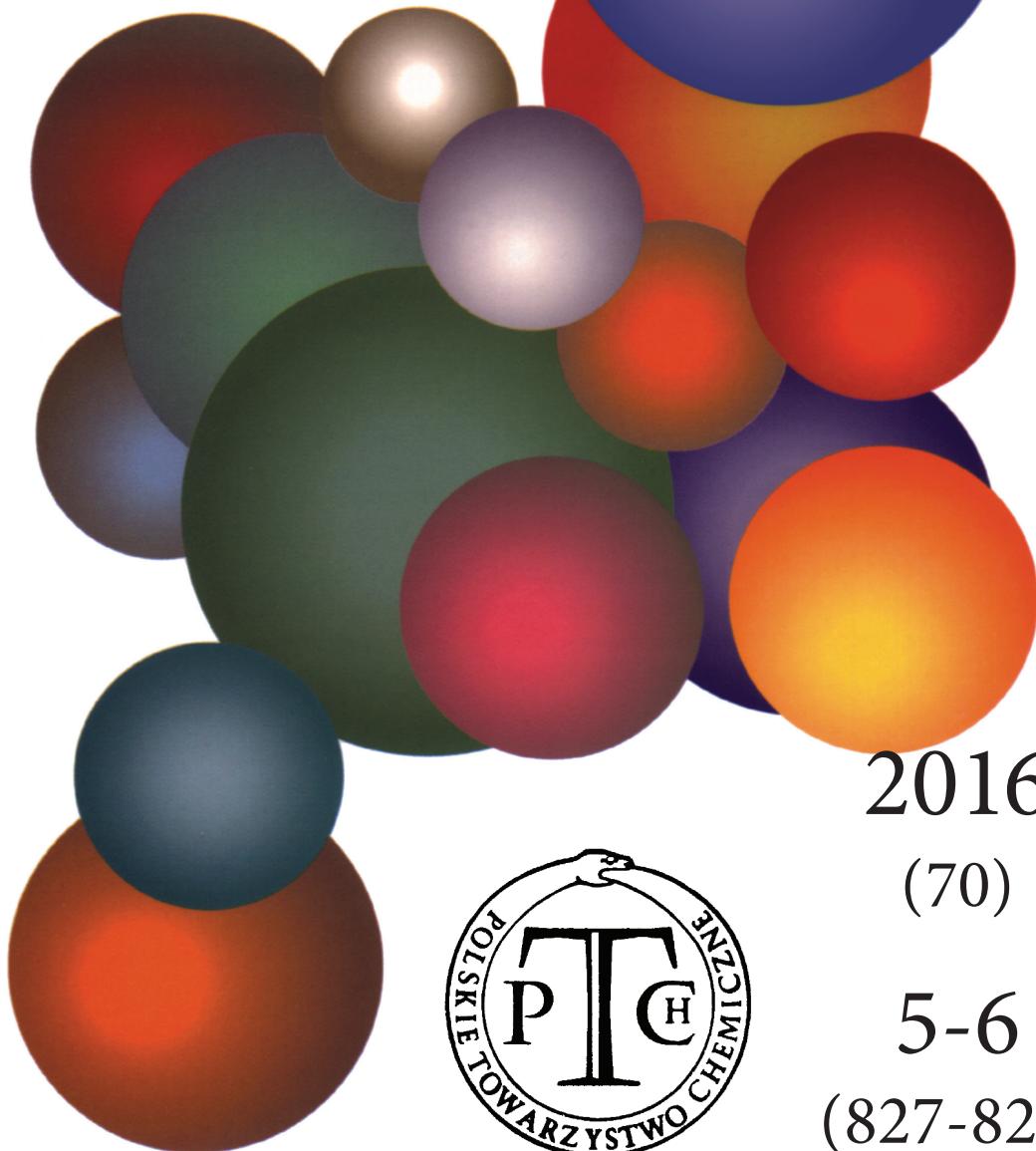


WIADOMOŚCI *chemiczne*

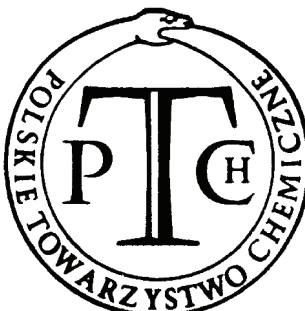


2016

(70)

5-6

(827-828)



CZASOPISMO POLSKIEGO TOWARZYSTWA CHEMICZNEGO

Publikacja dotowana przez MNiSW

RADA REDAKCYJNA

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

KOMITET REDAKCYJNY

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

REDAKTOR NACZELNY

ZDZISŁAW LATAJKA

SEKRETARZ REDAKCJI

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

Korespondencję należy kierować pod adresem:

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

INTERNET

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

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

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

Maszynopis niniejszego numeru przekazano Wydawcy w lipcu 2016

Przygotowanie do druku i druk:

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

WSPOMNIENIE O JANIE MAŁYSZKO (1936–2015)



W dniu 7 lipca 2015 roku odszedł Profesor Jan Małyszko, pracownik naukowy, nauczyciel akademicki, wychowawca wielu pokoleń chemików, jeden z nas. Dołączył do grona swoich znakomitych kolegów i przyjaciół z Uniwersytetu Warszawskiego, którzy wyprzedzili Go w drodze do *Wiecznego Laboratorium*: Piotra Wrony (1948–2004), Stanisława Rubla (1922–2008), Stanisława Głuba (1945–2008), Marka Kalinowskiego (1937–2014). W tym roku obchodziły osiemdziesiąte urodziny. Mimo wieku i przebywania na zaślubionej emeryturze, miał jeszcze wiele planów naukowych. Niestety, nagłe i niespodziewane dla wszystkich odejście nie pozwoliło na ich realizację. Pozostał smutek i nadzieję na obecność Jego dobrego ducha wśród nas.

Był absolwentem Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. Tam też stawał pierwsze kroki na drodze naukowej. Swoją pracę kontynuował w Wyższej Szkole Pedagogicznej w Siedlcach (obecnie Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny), a następnie w Wyższej Szkole Pedagogicznej im. Jana Kochanowskiego w Kielcach (obecnie Uniwersytet Jana Kochanowskiego).

Skromny, lecz fachowy i pełen poświęcenia, wymagający, ale sprawiedliwy. Te cechy, które charakteryzowały osobę Profesora Małyszki zostały w Nim ukształtowane nie tylko przez rodzinę i szkołę, lecz także przez całe otoczenie geograficzne i społeczne, w którym przyszło Mu żyć.

Urodził się 2 stycznia 1936 r. w Sokołowie Podlaskim. W tym mieście spędził dzieciństwo i młodość. Edukację szkolną rozpoczął w 1942 r. w I klasie *Polnische Volksschule*, kontynuował na tajnych kompletach, a od 1949 r. w Liceum Ogólnokształcącym w Sokołowie. Z szacunkiem wspominał swoich nauczycieli, którym

zawdzięczał swoje późniejsze osiągnięcia. Zamiłowanie do chemii i fizyki rozbudzili w Nim miejscowy aptekarz oraz nauczyciel fizyki. Ten ostatni zlecał Mu przygotowywanie demonstracji chemicznych, wypożyczał podręczniki akademickie i zachęcał do ich lektury. Okres szkoły średniej miał w życiu Profesora duży wpływ na wybór specjalizacji pod koniec studiów.

W 1953 r. zdał egzaminy maturalne i rozpoczął studia chemiczne na Uniwersytecie Warszawskim. Pracę magisterską wykonywał w Katedrze Chemii Nieorganicznej. Miał szczęście trafić pod opiekę Profesora Wiktora Kemuli, już wówczas uczonego o światowej sławie. Ten wybór zaważył na całej dalszej drodze naukowej Profesora Małyszki, która skupiła się głównie na elektrochemii. Był niewątpliwie dobrym studentem skoro zyskał uznanie swojego Mistrza, wspominając po latach: „*W końcowym etapie wykonywania pracy magisterskiej Profesor Kemula zaproponował mi zatrudnienie na stanowisku zastępcy asystenta, co potraktowałem jako wyróżnienie i przyjąłem z wielką wdzięcznością*” [1].

Po uzyskaniu magisterium w 1958 r. został zatrudniony na Uniwersytecie Warszawskim i w dalszym ciągu pracował pod kierunkiem Profesora Kemuli przechodząc typową drogę naukową od asystenta do starszego asystenta. W 1966 roku obronił pracę doktorską zatytułowaną „*Badanie mechanizmu procesów elektrodowych cynku na elektrodzie rtęciowej*” i awansował na stanowisko adiunkta w Katedrze Chemii Nieorganicznej, a następnie w Pracowni Elektroanalizy Chemicznej.

W 1974 r. otrzymał propozycję objęcia stanowiska docenta kontraktowego w Wyższej Szkole Pedagogicznej w Siedlcach, przemianowanej następnie na Wyższą Szkołę Rolniczo-Pedagogiczną. W nowym miejscu pracy kierował Zakładem Chemii Analitycznej i stworzył pierwszy własny zespół naukowy. Badania naukowe z tego okresu zaowocowały uzyskaniem w 1978 roku stopnia naukowego doktora habilitowanego na Wydziale Matematyki, Fizyki i Chemii UMCS w Lublinie na podstawie rozprawy zatytułowanej „*Mechanizm elektroredukacji jonów Cu(II) z uwzględnieniem stadiów przejściowych*”. Działalność dydaktyczna Profesora skupiała się na prowadzeniu wykładów z chemii analitycznej i analizy instrumentalnej.

Doświadczenia zawodowe zdobywał na stażach naukowych w Laboratoire Suisse de Reserches Horlogeres w Neuchatel (Szwajcaria), w Uniwersytecie Humbolta w Berlinie oraz w Uniwersytecie Eötvösa w Budapeszcie.

W 1980 roku Profesor Małyszko opuścił Siedlce i przeniósł się do Kielc, obejmując stanowisko etatowego docenta w Instytucie Chemii Wyższej Szkoły Pedagogicznej. Później uczelnia dwukrotnie zmieniała nazwę: na Akademię Świętokrzyską, a następnie na Uniwersytet Humanistyczno-Przyrodniczy Jana Kochanowskiego. W uczelni tej pracował na stanowisku profesora aż do przejścia na emeryturę w 2006 r. Był twórcą i kierownikiem Zakładu Chemii Analitycznej w Instytucie Chemii (1980–2006), w latach 1981–1987 wicedyrektorem Instytutu do spraw naukowych, a w okresie 1994–1998 także jego dyrektorem. Olbrzymią wagę przywiązywał do kształcenia studentów i rozwoju naukowego swoich współpracowników. Prowadził wykłady z chemii analitycznej i analizy instrumentalnej oraz zajęcia specjalizacyjne

z elektrochemii. Dał się zapamiętać jako bardzo wymagający lecz sprawiedliwy nauczyciel. Dzięki temu cieszył się szacunkiem i uznaniem społeczności akademickiej. Był promotorem około 70 prac magisterskich i 16 dyplomowych. Wypromował także pięciu doktorów, z których dwaj uzyskali stopień naukowy doktora habilitowanego.

W kręgu zainteresowań naukowych Profesora Małyszki znalazła się chemia analityczna, elektrochemia i elektroanaliza chemiczna. Badania naukowe obejmowały głównie kinetykę i mechanizm procesów elektrodowych, inhibitory korozji oraz właściwości elektrochemiczne antyutleniaczy i ich woltamperometryczne oznaczanie. Były one realizowane z zastosowaniem kropowej elektrody rtęciowej, wirującej elektrody dyskowej i dyskowej z pierścieniem, elektrochemicznej mikrowagi kwarcowej oraz mikroelektrod woltamperometrycznych.

W dorobku naukowym Profesora jest około 100 publikacji oryginalnych, przeglądowych, popularnonaukowych i dydaktycznych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym i krajowym. Był także współautorem podręcznika *Elektroanalityczne metody wyznaczania stałych fizykochemicznych* pod redakcją Zbigniewa Galusa (PWN, Warszawa 1979). Recenzował rozprawę habilitacyjną i 9 rozpraw doktorskich oraz wiele artykułów w czasopismach naukowych.

Pomimo przejścia na emeryturę Jego działalność naukowa nie osłabła. Ze względu na ograniczony dostęp do aparatury, swoje zainteresowania realizował pisząc prace przeglądowe i popularnonaukowe drukowane m.in. w *Wiadomościach Chemicznych* i w *Chemii w Szkole*. Dotyczyły one substancji biologicznie aktywnych w olejach jadalnych [2] i winie [3], jubileuszu metody miareczkowania kulometrycznego [4], stulecia witamin [5] i problemu zwiększania rozpuszczalności związków organicznych w wodzie [6] (ostatnia praca Profesora).

Za działalność dydaktyczną i organizacyjną Profesor Małyszko był odznaczony Srebrnym i Złotym Krzyżem Zasługi oraz Krzyżem Kawalerskim Orderu Odrodzenia Polski oraz nagradzany przez Rektorów Uczelni.

Był rzecznikem do merytorycznej oceny podręczników szkolnych w zakresie chemii powołanym przez Ministra Edukacji Narodowej oraz wieloletnim członkiem Zespołu Elektroanalizy Komitetu Chemii Analitycznej Polskiej Akademii Nauk.

Wspomnienie o Panu Profesorze byłoby niepełne, gdyby nie zaznaczyć Jego szerokich, pozanaukowych zainteresowań. Nie miała dla niego tajemnic historia i literatura, interesował się sztuką, zwłaszcza sakralną, teatrem, muzyką poważną, a także turystyką i fotografią. Czyniło to z Pana Profesora prawdziwego człowieka renesansu. Dążył do tego, aby i w nas zaszczępić te zainteresowania snując ciekawe opowieści o wydarzeniach historycznych, o miejscowościach, które warto zwiedzić, o ciekawych szlakach górskich, które warto przemierzyć, o filmach czy sztukach teatralnych, które są godne obejrzenia.

Dla studentów i współpracowników Profesor Małyszko był wzorem sumienności, pracowitości i pedantycznej wręcz dokładności. Dzięki temu potrafił zyskać ogromny szacunek, podziw i wdzięczność. Był znakomitym nauczycielem, człowie-

kiem o ogromnej wiedzy, a także życzliwości dla ludzi. Jesteśmy dumni, że mogliśmy być Jego uczniami i że możemy Go nazywać swoim Mistrzem i Mentorem. Pozostanie dla nas niedościgłym wzorem Naukowca i Nauczyciela oraz niekwestionowanym autorytetem.

„Nie umiera ten, kto trwa w sercach i pamięci naszej”

*Wdzięczni uczniowie,
Sławomir Michałkiewicz
Agata Skorupa
Instytut Chemiczny
Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach*

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] J. Małyszko, [w:] *Na życiowych szlakach. Informacje, wspomnienia, refleksje Ludzi związanych z Sokołem Podlaskim*, Biblioteka Regionalna Sokołowskiego Towarzystwa Społeczno-Kulturalnego, Sokołów Podlaski 2009.
- [2] J. Małyszko, S. Michałkiewicz, Wiad. Chem., 2010, **64**, 467.
- [3] J. Małyszko, M. Karbarz, Wiad. Chem., 2012, **66**, 563.
- [4] J. Małyszko, Wiad. Chem., 2011, **65**, 345.
- [5] B. Gawdzik, J. Małyszko, Chemia w szkole, 2012, **299**, 9.
- [6] J. Małyszko, B. Gawdzik, Chemia w szkole, 2014, **311**, 47.

Praca wpłynęła do Redakcji 16 lipca 2016

PROFESOR KAZIMIERZ ŁUKASZEWICZ IN MEMORIAM



23 maja 2016 r. we Wrocławiu w wieku 89 lat zmarł prof. dr hab. Kazimierz Łukaszewicz, członek korespondent PAN, wieloletni Przewodniczący i Honorowy Przewodniczący Komitetu Krystalografii PAN, Profesor i Profesor Honorowy Instytutu Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych PAN – współtwórca polskiej krystalografii.

Profesor Kazimierz Łukaszewicz urodził się w 1927 r. w Duboi na Polesiu, a lata szkolne i okupację spędził w Wilnie. Był żołnierzem 7 Brygady Wileńskiej Armii Krajowej. Zmuszony do opuszczenia swoich rodzinnych stron i rzucony losem II Wojny

Światowej trafił po jej zakończeniu do Torunia, gdzie w 1946 r. rozpoczął studia biologiczne i chemiczne na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika. Studia kontynuował na Wydziale Matematyki, Fizyki i Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Chemię ukończył w 1952 r., a jeszcze jako student został asystentem w Katedrze Krystalografii, kierowanej wówczas przez prof. Ludwika Chrobaka, a następnie w Katedrze Chemii Nieorganicznej Politechniki Wrocławskiej, u prof. Włodzimierza Trzebiatowskiego. Rozpoczął też pracę w Zakładzie Badań Strukturalnych Instytutu Chemii Fizycznej PAN. W 1959 r. uzyskał doktorat nauk technicznych na Politechnice Wrocławskiej za pracę o strukturze krystalicznej tytanianów strontu i baru.

W latach 1963–64 Profesor przebywał na stażu naukowym w Laboratorium Cavendisha Uniwersytetu w Cambridge. Po powrocie do kraju, w 1968 r. habilitował się w dziedzinie nauk fizycznych w zakresie krystalografii w Instytucie Chemii Fizycznej PAN w Warszawie. W 1974 r. został profesorem nadzwyczajnym, a w 1981 r. profesorem zwyczajnym nauk fizycznych. W 1979 r. został wybrany członkiem korespondentem PAN. Całe swoje twórcze życie Profesor związał

z Instytutem Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych PAN we Wrocławiu, który w roku 2000 w uznaniu zasług i osiągnięć naukowych przyznał Mu tytuł Profesora Honorowego.

Głównym naukowym zainteresowaniem Profesora były badania struktury materiałów, przede wszystkim ferroelektryków, w tym badania przemian fazowych i powiązanych z nimi procesów związanych z porządkiem i nieporządkiem atomowym. Rozwinął, jako jeden nielicznych w świecie, metodę bardzo precyzyjnych pomiarów parametrów sieci krystalicznej umożliwiającej monitorowanie niezmiernie subtelnych strukturalnych przemian fazowych. Jako jeden z pierwszych podjął badania struktur zmodulowanych, a ostatnie lata czynnej działalności naukowej poświęcił pracom nad kryształami ze skorelowanym nieporządkiem strukturalnym przejawiającym się rozpraszaniem dyfuzyjnym. Jest autorem około 130 prac naukowych i pierwszego polskiego podręcznika rentgenografii strukturalnej (wspólnie z prof. Włodzimierzem Trzebiatowskim). Ostatnia z prac Profesora ukazała się w 2008 r.

Profesor Kazimierz Łukaszewicz należy do pionierów polskiej krystalografii, którzy rozpoczęli pracę zdobywając samodzielnie zarówno doświadczenie, jak i podstawowe środki do prowadzenia badań. Przez wiele lat dążył wytrwale do uwocześnienia zaplecza metodycznego i aparaturowego oraz poszerzenia krystalograficznej tematyki badawczej. Dziełem Profesora były pierwsze polskie programy komputerowe do obliczeń krystalograficznych. Pierwszy w Polsce dyfraktometr do badania struktury monokryształów, choć jeszcze półautomatyczny, uruchomiony został w kierowanym przez Niego zakładzie w 1968 r. W kolejnych latach Profesor zaprojektował i wdrożył najpierw we własnej pracowni, a następnie rozpropagował w innych placówkach naukowych kraju, dyfraktometry Bonda służące do precyzyjnych pomiarów parametrów sieci monokryształów. Wspierał czynnie podjęte przez Jego uczniów nowatorskie prace nad polskim automatycznym dyfraktometrem monokrystalicznym. Niemała w tym zasługa Profesora, że Polska stała się wiodącym w świecie producentem tych złożonych urządzeń badawczych.

W 1972 r. prof. Kazimierz Łukaszewicz został przewodniczącym Komitetu Krystalografii PAN i kierował jego pracami do 2003 r., a w latach późniejszych pozostawał jego Honorowym Przewodniczącym. W latach 1972–76 był członkiem Komitetu Wykonawczego Międzynarodowej Unii Krystalografii, w latach 1981–83 wiceprzewodniczącym, a następnie, w kadencji 1983–86, przewodniczącym Europejskiego Zrzeszenia Krystalograficznego. Działalność organizacyjna zarówno w kraju, jak i za granicą, przyczyniła się znacznie do rozwoju badań krystalograficznych w Polsce i zyskała uznanie na arenie międzynarodowej, czego wyrazem było powierzenie Polsce organizacji w 1978 r. w Warszawie XI Międzynarodowego Kongresu Krystalograficznego, a następnie w 1986 r. i 2001 r. 10. i 20. Europejskiej Konferencji Krystalograficznej we Wrocławiu i w Krakowie.

W 1956 r. prof. Kazimierz Łukaszewicz (jeszcze jako magister) był jednym z organizatorów I Konwersatorium Krystalograficznego. Kolejne Konwersatoria

organizowane tradycyjnie co roku (z niewielkimi przerwami do dziś) we Wrocławiu stały się miejscem spotkań, prezentacji wyników badań i wymiany poglądów wszystkich polskich krystalografów.

Profesor wypromował 15 doktorów, z których 5 uzyskało tytuł profesora.

Prof. Kazimierz Łukaszewicz był niestrudzonym propagatorem krystalografii. Uważał, że krystalografia jest niezależną dziedziną nauk usytuowaną pomiędzy fizyką, chemią, matematyką, mineralogią, inżynierią materiałową i biologią. Podkreślał zawsze, że teoria symetrii leży u podstaw wszelkich nauk.

Kończąc to krótkie wspomnienie, jeszcze jedno wydaje się ważne i charakterystyczne dla Niego: Profesor będąc już na zasłużonej emeryturze zwykł w marcowe święto swego patrona, Kazimierza, wygłaszać dla nas, swoich wychowanków i współpracowników, jakiś przekrojowy referat z nauk przyrodniczych. W zamian tylko oczekiwał, że otrzyma kopie naszych najnowszych prac, powstałych w zespole, który niegdyś zbudował. Takim Go zapamiętamy: pełnym ciekawości, nowych idei, chęci do działania, optymizmu i entuzjazmu.

*Ryszard Kubiak – Adam Pietraszko – Marek Wołczyrz
Instytut Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych PAN we Wrocławiu*

REAKCJE UTLENIANIA WYBRANYCH GRUP FUNKCYJNYCH Z WYKORZYSTANIEM OXONE® JAKO ŹRÓDŁA TLENU CZĄSTECZKOWEGO

THE OXIDATION REACTIONS OF SELECTED FUNCTIONAL GROUPS USING OXONE® AS A SOURCE OF MOLECULAR OXYGEN

Przemysław Zawadzki¹, Wojciech Czardybon¹,
Anna Chrobok²

¹ Selvita S.A.

ul. Bobrzyńskiego 14, 30-348 Kraków

email: przemyslaw.zawadzki@selvita.com

email: wojciech.czardybon@selvita.com

² Silesian University of Technology, Faculty of Chemistry,
Department of Chemical Organic Technology and Petrochemistry
ul. Krzywoustego 4, Gliwice 44-100
e-mail: anna.chrobok@polsl.pl

Abstract

Wprowadzenie

1. Ketony i dioksirany

2. Funkcjonalizowanie olefin

2.1. Epoksydy

2.2. Metody klasyczne z udziałem katalizatorów metalicznych

3. Reakcje utleniania alkoholi

4. Ciecze jonowe w reakcjach utleniania

4.1. Ciecze jonowe w procesie utleniania alkoholi

4.2. Ciecze jonowe w syntezie epoksydów

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane



Mgr Przemysław Zawadzki jest kierownikiem Laboratorium Chemicznego w Selvicie. Urodził się w 1982 r. W 2002 roku rozpoczął studia na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego, gdzie w 2006 roku uzyskał tytuł magistra. Zainteresowania naukowe autora obejmują nowoczesną syntezę organiczną z wykorzystaniem cieczy jonowych oraz nowoczesne technologie syntetyczne.



Dr inż. Wojciech Czardybon kieruje projektami badawczymi, których celem jest opracowanie nowych leków. Jego zainteresowania badawcze obejmują łączenie chemii obliczeniowej, chemii medycznej oraz biologii w procesie projektowania nowych leków.



Dr hab. inż. Anna Chrobok – profesor nadzwyczajny Politechniki Śląskiej. W roku 1996 ukończyła Wydział Chemiczny Politechniki Śląskiej w Gliwicach. W 2001 roku uzyskała tytuł doktora nauk technicznych, a w 2011 roku stopień doktora habilitowanego na tym samym wydziale. Obecnie jest zatrudniona na stanowisku kierownika Katedry Technologii Chemicznej Organicznej i Petrochemii. Specjalność – technologia chemiczna organiczna.

ABSTRACT

Oxidation reactions belong to the group of the most commonly used processes in both organic and inorganic chemistry. The main issues in such transformation are usually safe handling of the oxidants as well as waste generation.

Peroxymonosulfuric acid is one of the strongest oxidants. It was described for the first time in 1898 by Heinrich Caro. Nowadays, the commercial sources of KHSO_5 are low-cost industrial bulk chemicals, e.g., the triple salt Oxone® ($2\text{KHSO}_5 \cdot \text{KHSO}_4 \cdot \text{K}_2\text{SO}_4$). These products are stable oxidizing agents commonly used in fine chemicals synthesis, and are easy to handle, non-toxic as well as generate non-polluting by-products.

Over the past several years the scope of its use has extended. One of the most important transformation that have been made possible with the use of Oxone® are epoxidation and ketone formation. Epoxides and ketones are important synthetic building blocks widely used in the chemical industry for the production of pharmaceutical products, flavours, fragrances, resins, adhesives and paints.

The use of Oxone® was demonstrated in several combinations both in classical methods that involved metal catalysis as well as in novel approaches with the use of microwaves and ionic liquids. Over the past 20 years, ionic liquids, together with supercritical fluids and water, have become powerful alternatives to conventional organic solvents. Ionic liquids are salts having in the structure an organic cation and an inorganic or organic anion, with a melting point below 100°C. The advantage of using ionic liquids is a big variety of available structures. Combinations of both ionic liquids and Oxone® offer an interesting alternative to classical oxidation methods used in industry.

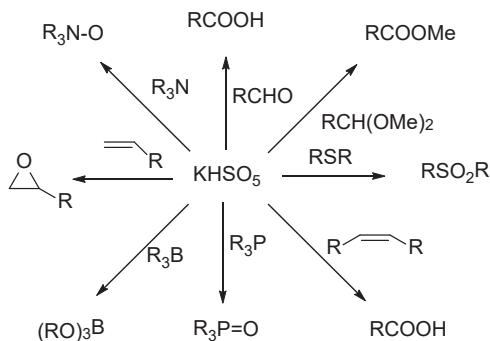
Keywords: oxone(R), ionic liquids, oxidation reactions, epoxide

Słowa kluczowe: oxone(R), ciecze jonowe, reakcje utlenienia, epoksyd

WPROWADZENIE

Reakcje utleniania są to reakcje, w których substancja przechodzi z niższego stopnia utlenienia na wyższy, przy zastosowaniu odczynników chemicznych zwanych „utleniaczami”. Jednym z utleniaczy mających coraz większe zastosowanie jest mieszanina soli o handlowej nazwie Oxone®. Głównym składnikiem mieszaniny jest sól potasowa kwasu nadtlenosiarkowego(VI), czyli kwasu Caro, który zawdzięcza swoją nazwę odkrywcy Heinrichowi Caro. Pozostałymi składnikami są wodorosiarczan(IV) potasu $KHSO_4$, oraz siarczan(IV) potasu K_2SO_4 . Największymi atutami Oxone® jest jego wysoka stabilność w warunkach atmosferycznych, brak toksyczności, niska cena produkcji oraz fakt że jako substancja stała nie wymaga żadnych zaawansowanych metod dozowania do reakcji chemicznych [1].

Z uwagi na swoje unikalne właściwości, Oxone® znalazł zastosowanie w wielu reakcjach chemicznych. Przykładem może być utlenianie związków zawierających ugrupowania boranowe, azotowe, fosforowe czy też siarkę. Jest również szeroko stosowany do modyfikacji innych grup funkcyjnych, tj. alkoholi, aldehydów, ketonów, alkenów, czy też nitryli [2].



Schemat 1. Przegląd reakcji z zastosowaniem Oxone® [2]

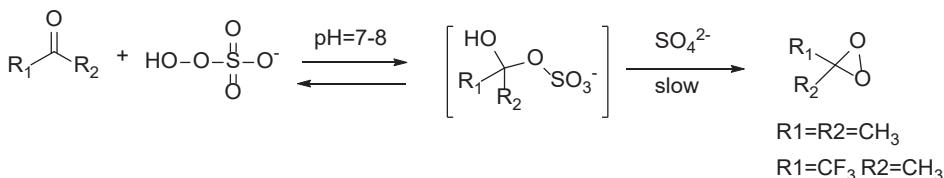
Scheme 1. Reaction review with the use of Oxone® [2]

Jako dość łagodny utleniacz jest również stosowany do otrzymywania innych związków o charakterze silnie utleniającym np. dioksiranów lub nadkwasów. Szczególną rolę odgrywa w otrzymywaniu dimetylodioksiranu DMDO, który powstaje w wyniku utlenienia acetenu i jest często używany w reakcjach epoksydacji.

1. KETONY I DIOKSIRANY

Pierwsze reakcje utleniania prostych ketonów za pomocą Oxone® zostały przeprowadzone w 1979 r. przez Edwardsa, który dowiodł, że w środowisku lekko zasadowym ($pH = 7,5\text{--}8,0$) można otrzymać dioksirany [3]. Dioksirany są to trójczłonowe ziązki cykliczne posiadające w swej strukturze dwa atomy tlenu. Z uwagi na

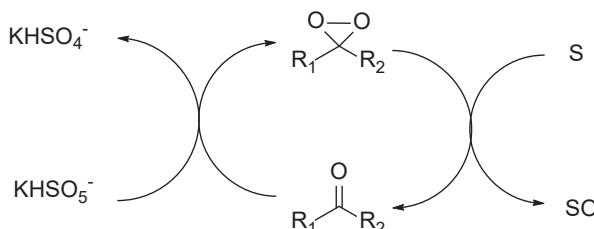
naprężenia steryczne wynikające z ich cyklicznego charakteru są to ugrupowania niestabilne, ale również bardzo reaktywne. W celu zbadania natury powstawania dioksiranów zostały przeprowadzone badania z zastosowaniem znaczonego izotopowo tlenu ^{18}O , które pozwoliły zaproponować mechanizm reakcji (Schemat 2) [3, 4].



Schemat 2. Reakcja tworzenia dioksiranu z zastosowaniem jonu HSO_5^- [3, 4]

Scheme 2. Formation of dioxirane with the use of HSO_5^- [3, 4]

Dioksiran wygenerowany w roztworze może zostać zaatakowany przez kolejny anion kwasu Caro, z wytworzeniem jonu siarczanowego oraz tlenu molekularnego. Jednakże w konkurencyjnym procesie może dojść do ataku innego bogatego w elektrony substratu, który zostanie utleniony (Schemat 3). W obu procesach wyjściowy keton jest odzyskiwany i wchodzi w kolejny cykl procesu [3, 5].



Schemat 3. Mechanizm generowania dioksiranu w reakcji ketonu z Oxone® [3, 5]

Scheme 3. Mechanism of dioxirane generation in the reaction between ketone and Oxone® [3, 5]

2. FUNKCJONALIZOWANIE OLEFIN

2.1. EPOKSYDY

Epoksydy inaczej zwane epitlenkami lub oksiranami są heterocyklicznymi związkami organicznymi zawierającymi w swej strukturze trójczłonowy pierścień złożony z dwóch atomów węgla i tlenu. Związki te wykazują wysoką reaktywność głównie ze względu na swoją unikalną budowę, mogą ulegać reakcjom otwierania pierścienia przyłączając nukleofil [6].

Związki epoksydowe charakteryzuje wysoka reaktywność czego przyczyną są naprężenia steryczne wynikające z ich cyklicznego charakteru. Pierścień epoksy-

dowy może ulegać w sprzyjających warunkach otwarciu, i w zależności od obecności wybranego nukleofila prowadzić do bogatej gamy pochodnych. Dzięki swoim unikalnym właściwościom epoksydy znalazły szerokie zastosowanie w przemyśle chemicznym do produkcji żywic, klejów czy farb. Są one również wykorzystywane w medycynie jako produkty pośrednie w syntezie wielu leków, takich jak Monur-al® gdzie substancją czynną jest fosfomycyna, która w swojej strukturze zawiera sfuncjonalizowany pierścień epoksydowy. Ponadto reakcja tworzenia oraz otwierania pierścieni epoksydowych jest stosowana w syntezie wielu innych produktów farmakologicznych tj. prostaglandyn, steroidów (scholarisine A) [7], antybiotyków (Brefeldin A) [8], leków na nadciśnienie (Diltiazem) [9] czy też leków przeciwnowotworowych (Taxol).

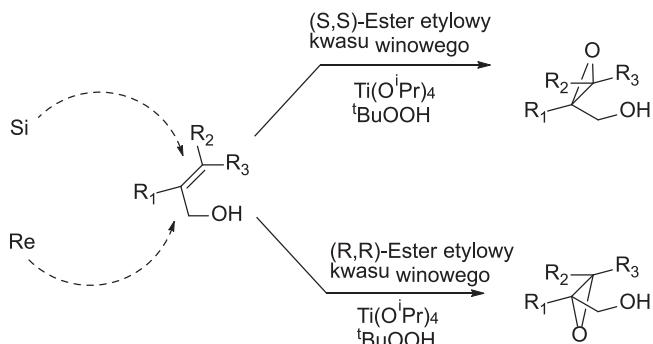
Typowymi czynnikami utleniającymi wykorzystywanyimi w reakcji epoksydacji są nadtlenek wodoru, organiczne lub nieorganiczne nadkwasły (Oxone®) bądź też wysoce reaktywne dioxirany [10].

Metod syntezы epoksydów jest wiele można je jednak podzielić na dwie podstawowe grupy: z udziałem olefin i utleniaczy, oraz poprzez konwersję innych ugrupowań np. ketonów i aldehydów (w reakcjach Darzensa czy Coreya-Chaykowskiego). W prezentowanej pracy skupiono się na metodach z udziałem olefin.

2.2. METODY KLASYCZNE Z UDZIAŁEM KATALIZATORÓW METALICZNYCH

Reakcja epoksydacji Sharplessa

Jednym z pionierów reakcji epoksydacji z użyciem katalizatorów metaloorganicznych był Sharpless, który zastosował układ trójskładnikowy, w którego skład wchodzi: isopropanolan tytanu(IV), pochodne kwasu winowego generujące stereo-selektywność, oraz utleniacz w postaci wodoronadtlenku *tert*-butylowego (Schemat 4) [11].



Schemat 4. Reakcja epoksydacji Sharplessa [11, 12]

Scheme 4. Sharpless epoxidation reaction [11, 12]

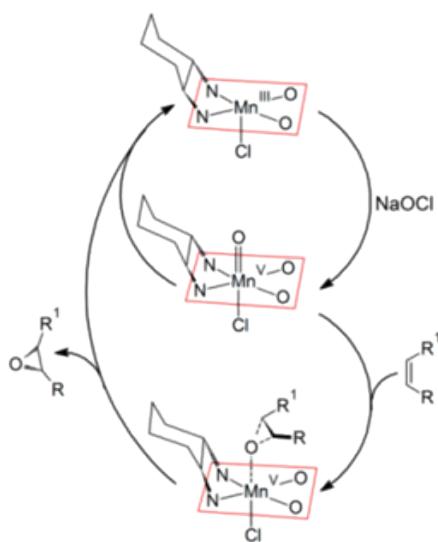
Stereochemia powyższej reakcji jest determinowana poprzez chiralność pochodnych kwasu winowego, które to w pierwszym etapie reakcji tworzą kompleks z tytanem. Następnie dochodzi do właściwego utlenienia, po jednej lub po drugiej stronie wiązania podwójnego.

Metoda epoksydacji Sharplessa znalazła szerokie zastosowanie z uwagi na kilka istotnych powodów. Jest to metoda uniwersalna do pierwszo- oraz drugorzędowych alkoholi allilowych. Zwykle otrzymane produkty reakcji charakteryzują się wysokimi nadmiarami enancjomerycznymi Można łatwo przewidzieć produkty reakcji, a używane substraty są relatywnie tanie. Wyżej wymienione atuty reakcji znalazły zastosowanie w syntezie związków farmaceutycznych, m.in. metymecyny, erytromycyny czy leukotrienów. Pomimo swojej niewątpliwej użyteczności, metoda ta ma również swoje ograniczenia; głównym z nich jest konieczność występowania w cząsteczce grupy hydroksylowej przy węglu alfa w stosunku do wiązania podwójnego.

Reakcja epoksydacji Jakobsena-Katsuki

Kolejną metodą z użyciem katalizatorów metaloorganicznych,wartą przytoczenia jest metoda Jacobsena-Katsuki, gdzie zastosowano kompleks manganu z salenem [13, 14]. Stosowana jest nie tylko dla alkoholi winylowych, ale również dla wszelkiego rodzaju olefin, z szeroką gamą podstawników.

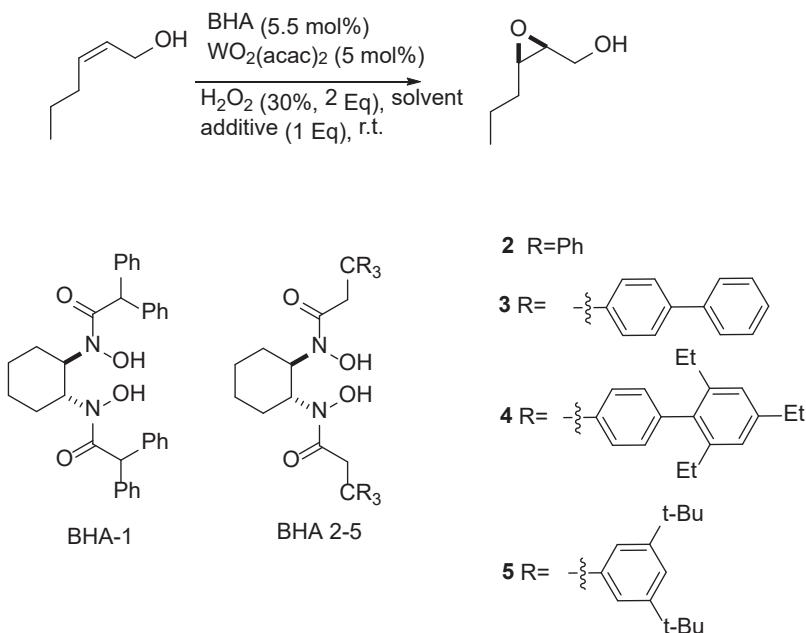
Historia tej metody sięga roku 1990, w którym to niezależnie Jacobsen oraz Katsuki opublikowali wyniki swoich badań prowadzących do otrzymania chiralnych epoksydów [13]. Pomimo wielu badań, mechanizm samej reakcji nie jest do końca poznany. Postuluje się, że najpierw kompleks Mn(III) jest utleniony do Mn(V) za pomocą podchlorynu sodu, a następnie tak aktywowany układ reaguje dalej z olefiną tworząc nowe wiązanie epoksydowe. Stereochemia tej reakcji jest określona poprzez strukturę samego kompleksu, a olefina użyta do reakcji może atakować tylko od jednej strony. W ostatnim etapie reakcji wiązanie tlen-mangan zostaje zerwane, a katalizator odtwarza się, mogąc wziąć udział w kolejnym cyklu (Schemat 5) [15].



Schemat 5. Schemat reakcji epoksydacji Jakobsena-Katsuki [15]

Scheme 5. Jacobsen-Katsuki epoxidation reaction scheme [15]

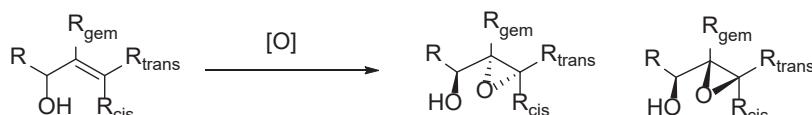
W obecnym rozdziale nie może zabraknąć wzmianki o innych metodach epoksydacji wykorzystujących metale jako nośniki oraz źródło tlenu cząsteczkowego. Dość szerokie zastosowanie w asymetrycznej syntezie epoksydów mają również wolfram, wanad oraz kompleksy żelaza [16, 17]. Prekursorami reakcji katalizowanej $\text{WO}_2(\text{acac})_2$ (gdzie acac = acetyloacetonian) byli Mizuno oraz Wang, którzy udowodnili, że przy odpowiednim doborze pomocników chiralnych można przeprowadzić reakcje stereoselektywnie [18].



Schemat 6. Przykładowe ligandy reakcji Wang [18]

Scheme 6. Examples of the ligands used in Wang reaction [18]

Również katalizatory na bazie wanadu zostały wykorzystane do stereoselektywnej reakcji. Sharpless w swoich pracach wykazał, że stosując do reakcji V(O)/(acac)₂ jest możliwość sterowania jeszcze precyzyjniej powstawaniem pożdanego izomeronu. Porównując jego wyniki z innymi metodami jednoznacznie można stwierdzić, że zastosowanie katalizatora na bazie wanadu daje kilkukrotny wzrost stereoselektywności reakcji [19].

Tabela 1. Zestawienie porównawcze pomiędzy katalizatorami wanadowymi, molibdenowymi oraz *m*-CPBA (kwas *meta*-chloroperoxybenzoëowy) [19]Table 1. Comparison between vanadium, molybdenum catalysts vs *m*-CPBA(*meta*-chloroperoxybenzoic acid) [19]

L.p.	Substrat	VO(acac) ₂	Mo(CO) ₆	<i>m</i> -CPBA
1		4:1	1:1	1:1,5
2		19:1	5:1	1:1

Zarówno w metodzie Sharpless'a jak i Jacobsena niezbędnym elementem jest obecność katalizatora metaloorganicznego, co ze względów ekonomicznych jest głównym minusem prowadzonych reakcji. Konieczność zatrudniania tego typu katalizatorów lub ich utylizacja stanowi główne źródło generowania kosztów w skali przemysłowej.

Reakcje epoksydacji z wykorzystaniem Oxone®

Wyżej wymienione problemy mogą być wyeliminowane stosując metody otrzymywania epoksydów nie angażujące żadnych metali. W tym wypadku źródłem tlenu są głównie nadkwasy, bądź ich sole, na przykład takie jak Oxone®.

Dotychczas zostało opublikowane wiele metod wykorzystujących Oxone® zarówno bezpośrednio, jak i pośrednio w celu wygenerowania bardziej reaktywnych, bądź selektywnych utleniaczy. Najczęściej stosuje się Oxone® w obecności ketonów, generując tym samym wyżej wspomniane dioxirany (np. DMDO-dimethylodioxiran). Kolejno dioxirany wchodzą w reakcję z wiązaniem podwójnym, czego wynikiem jest powstawanie epoksydu. Bardzo istotną rolę odgrywa w całym procesie rozpuszczalnik. Reakcja może być przeprowadzona również dwufazowo, jeśli w fazie organicznej będą rozpuszczone olefina oraz produkt natomiast w fazie wodnej Oxone®. Tego typu układy wymagają jednak dodatków jakimi są katalizatory przeniesienia między fazowego, co z kolei może powodować inne niepożądane reakcje oraz generować produkty uboczne. Poszukując najlepszego systemu autorzy Hashimoto i Kanda doszli do wniosku, że zastosowanie toluenu oraz wody daje najlepszy efekt. W Tabeli 2 przedstawione są wyniki optymalizacji procesu oraz przykładowe wydajności [20].

Tabela 2. Epoksydacja z zastosowaniem DMDO w układach dwufazowych [20]
Table 2. Epoxidation reaction with the use DMDO in biphasic media [20]

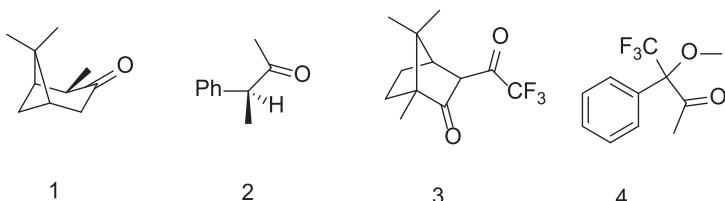
L.p.	Rozpuszczalnik	Aceton (eq)	Oxone® (eq)	PTC (eq)	Konwersja (%)
1	DCM	0	2	0,1	6,5
2	DCM	10	2	0,1	99,8
3	DCM	10	2	0	90,8
4	EtOAc	10	2	0	96,4
5	EtOAc	10	1,2	0	76,5
6	EtOAc	10	1,2	0	80,2
7	toluen	10	2	0	78,1

Tabela 3. Przykładowe reakcje z zastosowaniem Oxone® w układzie dwufazowym EtOAc:woda [20]
 Table 3. Examples of the reactions with Oxone® in biphasic media EtOAc:H₂O [20]

L.p.	Olefina	NaHCO ₃ (eq)	Konwersja (%)	Wydajność (%)
1a		2,0	47	–
1b		5,0	51	–
1c		5,0	66	65
2		5,0	96	74
3		5,0	96	91
4		5,0	–	80
5		5,0	–	94
6		5,0	–	83
7		5,0	–	5

Zastosowanie ketonów niesie ze sobą szereg możliwości – poprzez wprowadzenie w cząsteczkę centrum chiralności można by wpływać na stereoselektywność reakcji epoksydacji. Równocześnie keton jest odtwarzany w czasie reakcji dlatego też może być stosowany w katalitycznych ilościach, co dodatkowo uatrakcyjnia opisywany proces.

Jako pierwszy, chiralne ketony w reakcjach selektywnej epoksydacji zastosował Crucis publikując swoje wyniki w 1984 r. Jako prekursory chiralności wybrał on (+)-isopinokamfon (**1**), bądź (*S*)-(+)3-fenylobutan-2-on (**2**) w modelowej reakcji 1-methylcycloheksenu oraz (*E*)- β -metylostyrenu [21, 24].



Schemat 7. Przykładowe chiralne ketony jako prekursory reakcji asymetrycznej [21, 24]
Scheme 7. Examples of the chiral ketons as precursor for asymmetric reaction [21, 24]

Pierwsze próby wymagały dość dużych ilości katalizatorów oraz wydłużonego czasu reakcji. Również początkowe wyniki nie były spektakularne i prowadziły do nadmiarów enanjomerycznych rzędu 11–12% ee. Jednak poprzez drobne modyfikacje, np. wprowadzenie elektronoakceptorowej grupy $-CF_3$, polepszono konwersję reakcji usprawniając również selektywność [22, 24].

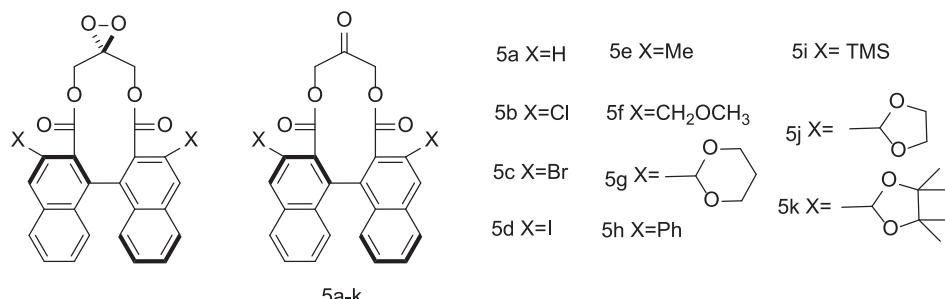
Tabela 4. Asymetryczna epoxidacja olefin z zastosowaniem chiralnego ketonu 1 oraz 2 [22, 24]
Table 4. Asymmetric epoxidation of the olefins with chiral keton 1 and 2 [22, 24]

L.p.	Substrat	Keton (eq)	Wydajność (%)	ee (%)	Konfiguracja
1		1 (2,0)	60	11	(+)-(1R, 2R)
2		1 (1,0)	60	12,5	(+)-(1R, 2R)
3		1 (0,2)	68	11,2	(+)-(1R, 2R)
4		2 (1,0)	85	9,5	(+)-(1R, 2R)
5		1 (1,0)	90	10,4	(+)-(1S, 2R)
6		1 (0,2)	85	10,2	(+)-(1S, 2R)
7		2 (0,5)	92	12	(+)-(1S, 2R)

Tabela 5. Asymetryczna epoksydacja olefin z zastosowaniem chiralnego ketonu 3 oraz 4 [22, 24]
Table 5. Asymmetric epoxidation of the olefins with chiral keton 3 and 4 [22, 24]

Lp.	Substrat	Keton (eq)	Wydajność (%)	ee (%)	Konfiguracja
1		3	82	13	(+)-(1R,2R)
2		(S)-4	77	18	(+)-(1R,2R)
3		(S)-4	80	20	(+)-(2S,3S)
4		(S)-4	80	16	(+)-(7R,8S)

Istotny przełom przyniosły badania Yang'a, opublikowane w 1996 r., w których to 11-członowy cykliczny keton ulegał reakcji utlenienia do odpowiedniego dioksiiranu, **5a** następnie sam stanowił bardzo reaktywny układ wchodzący w dalsze reakcje w wydzieleniu epoksydu [23, 24].



Schemat 8. Struktura ketonu zastosowanego przez Yang'a [23]

Scheme 8. Structure of the keton used by Yang [23]

Kombinacja odsłoniętego ugrupowania karbonylowego, w połączeniu z obecnością grup elektronoakceptorowych okazała się być bardzo skuteczna. Keton **5** jest bardzo reaktywnym ale zarazem stabilnym układem, który w katalitycznych ilościach daje znaczące nadmiary enancjomeryczne w wybranych reakcjach (Tab. 6).

Tabela 6. Asymetryczna epoksydacja olefin z zastosowaniem chiralnego ketonu **5** [24]

Table 6. Asymmetric epoxidation of the olefins with chiral keton **5** [24]

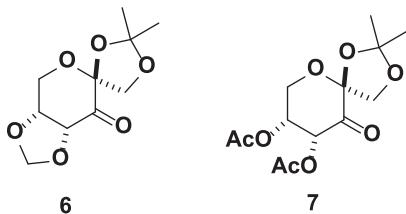
L.p.	Substrat	Wydajność (%)	ee (%)	Konfiguracja
1	R=H	99	47	(v)-(S,S)
2	R=Me	99	50	(-)-(S,S)
3	R=Et	96	60	(-)-(S,S)
4	R=i-Pr	98	71	(-)-(S,S)
5	R=t-Bu	95	76	(-)-(S,S)
6	R=Ph	82	87	(-)-(S,S)
7		98	50	(-)-(S)
8		83	33	(-)-(S,S)

L.p.	Substrat	Wydajność (%)	ee (%)	Konfiguracja
9		70	18	
10		85	5	
11		83	18	(-)-(S)

Prace Yang'a zapoczątkowały większe zainteresowanie prezentowaną tematyką oraz pojawienie się nowych generacji katalizatorów opartych na tej samej koncepcji. W 1997 r. Adams zaprezentował chiralne katalizatory oparte na mannitolu oraz pochodnych kwasu winowego, które również wykazywały bardzo dobre właściwości katalityczne zachowując przy tym bardzo wysokie nadmiary enancjomeryczne prowadzonych reakcji [24, 25].

Reakcja epoksydacji Shi

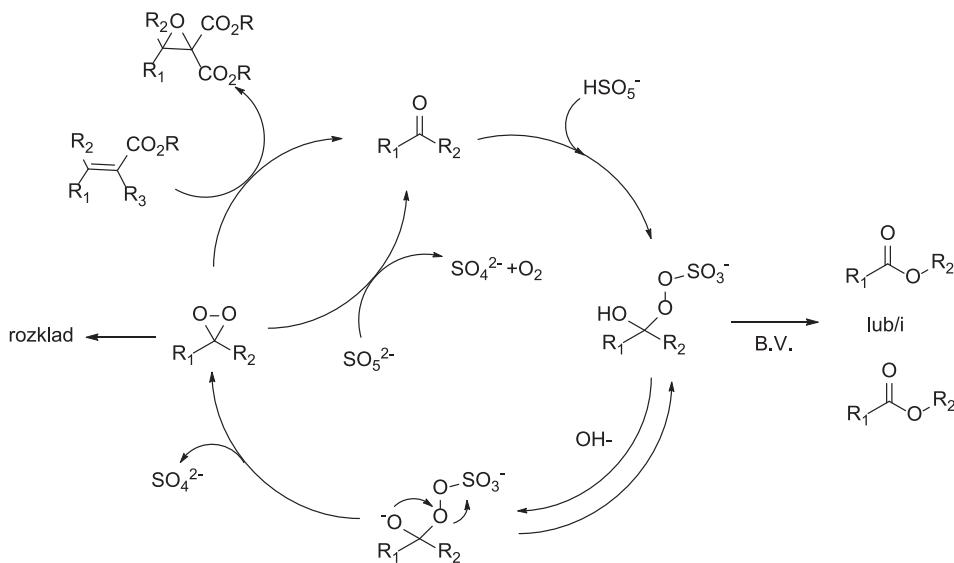
O krok dalej posunęli się Shi oraz jego współpracownicy stosując keton nie tylko jako niezbędny czynnik w cyklu utleniającym ale jako pomocnik chiralny w celu wygenerowania czystego optycznie produktu. Wieloletnie badania grupy Shi pozwoliły zbudować bazę pochodnych, które ulegają tej reakcji z bardzo korzystnymi nadmiarami enancjomerycznymi. Dodatkowym atutem zastosowanych ketonów jest fakt, że pochodzą one z tanich i łatwo dostępnych chiralnych cukrów takich jak np. fruktoza [26].



Schemat 9. Podstawowe struktury ketonów Shi [26]
Scheme 9. Principal structures of the keton Shi [26]

Zaprezentowane wyżej ketony zostały użyte w modelowych reakcjach epoksydacji α,β -nienasyconych estrów, które to powszechnie uznaje się za problematyczne oraz wymagające reakcje. Warto zaznaczyć, że czynnikiem utleniającym we wszystkich reakcjach był Oxone®, który dzięki swojej dobrej rozpuszczalności

w układach wodnych stanowił bardzo dobry czynnik utleniający. Mechanizm reakcji epoksydacji przedstawia Schemat 10.



Schemat 10. Mechanizm reakcji epoksydacji za pomocą Oxone® [25, 26]

Scheme 10. Epoxidation reaction mechanism with Oxone® [25, 26]

Warto zaznaczyć, że Oxone® jest tutaj pośrednim czynnikiem utleniającym keton do dioksiranu, który następnie reaguje z wiązaniem podwójnym z wytworzeniem pożądanego epoksydu oraz odtworzeniem pierwotnego ketonu. Cały proces zamknięty w cykl katalityczny, co powoduje, że metoda jest atrakcyjniejsza pod względem zastosowania komercyjnego.

W Tabeli 7 zebrane przykładowe wyniki prowadzonych reakcji z podaniem wydajności oraz nadmiarów enancjomerycznych [27].

Tabela 7. Asymetryczna epoksydacja olefin z zastosowaniem chiralnego ketonu 7 [27]

Table 7. Asymmetric epoxidation of the olefins with chiral keton 7 [27]

L.p.	Substrat	Wydajność (%)	ee (%)	Konfiguracja
1	Ph-CH=CH-CO ₂ Et	73	96	(+)-(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)
2	Ph-CH=CH-CO ₂ Et	67	93	(+)
3	Ph-CH(CH ₃)-CH=CH-CO ₂ Et	91	97	(+)

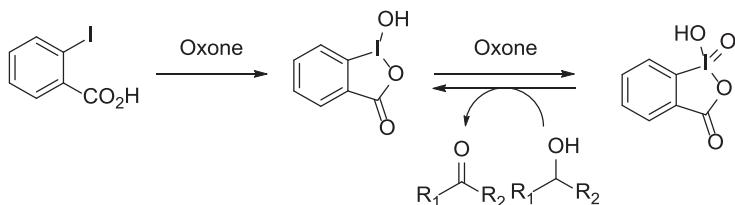
4		57	90	(+)-(2S,3R)
5		64	97	(+)
6		77	96	(+)
7		41	97	(+)
8		40	95	(+)
9		93	96	(+)-(2S,3R)
10		91	93	(+)
11		64	82	(+)
12		77	89	(+)
13		77	93	(+)

3. REAKCJE UTLENIANIA ALKOHOLOW

Kolejną grupą funkcyjną, która ulega reakcjom utleniania jest ugrupowanie hydroksylowe. Alkohole ulegają reakcji utlenienia do związków karbonylowych, w zależności od swojej rzędowości mogą być to ketony, aldehydy lub kwasy karboksylowe. Dotychczas opisano wiele metod utleniania alkoholi z użyciem różnych czynników utleniających, zarówno wspomaganych katalizatorami metalicznymi jak i bardzo silnymi utleniaczami. Niemniej jednak bardzo ciekawą alternatywą jest zastosowanie Oxone®, który po zakończonej reakcji może być łatwo oddzielany od powstającego produktu.

Reakcje z zastosowaniem Oxone®/IBX (kwas jodoksybenzoesowy)

Jednym z prekursorów tego typu strategii był Vinod, który to za pomocą Oxone® oraz IBA (kwasu jodobenzoesowego) w środowisku woda-acetonitryl utlenił wybrane alkohole do odpowiednich ketonów oraz kwasów karboksylowych [28]. Dużym atutem tej metody jest jej chemiczna selektywność oraz fakt, że w zasadzie dla prezentowanych prostych układów nie stwierdzono reakcji ubocznej Baeyer-Villigera, która to często ma miejsce w procesach utleniania. Mechanizm samego utleniania przedstawia Schemat 11.

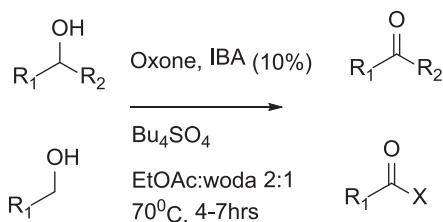


Schemat 11. Reakcja utleniania za pomocą IBX powstającego in situ z IBA oraz Oxone® [29]
Scheme 11. reaction with IBX formed in-situ from IBA and Oxone® [29]

W pierwszej kolejności kwas jodobenzoesowy jest utleniany za pomocą Oxone® do reaktywnej pochodnej (IBX), której katalityczna ilość jest wystarczająca do zainicjowania właściwej reakcji utlenienia pochodnych hydroksylowych. Pomimo sukcesu, metoda ta ma również pewne ograniczenia, a mianowicie nie udało się zatrzymać procesu utlenienia alkoholi pierwszorzędowych na etapie aldehydu.

Shulze i Giannis, zainspirowani wynikami Vinoda, zaproponowali zastosowanie wodorosiarczanu tetrabutyloamonowego jako katalizatora przeniesienia fazowego w środowisku dwufazowym octan etylu: woda. Poprzez zastosowanie roztworu dwufazowego udało się bardziej precyzyjnie sterować reakcją i otrzymać pełne spektrum produktów utlenienia w zależności od warunków prowadzonych reakcji. Warto nadmienić, że prezentowana metoda również tolerowała obecność wiązań podwójnych w cząsteczce [30]. Przykłady reakcji utleniania przedstawiono w Tabeli 8.

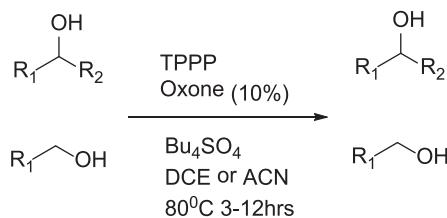
Tabela 8. Reakcje utleniania alkoholi katalizowane układem IBX/Oxone® [30]
 Table 8. Oxidation reaction of the alcohols catalyzed by IBX/Oxone® system [30]



Substrat	Produkt	Wydajność [%]
$\text{R}-\text{CH}_2-\text{OH}$	$\text{R}-\text{CHO}$	
$\text{R} = \text{Ph}$	$\text{R} = \text{Ph}$	72
$\text{R} = 3\text{-F-C}_6\text{H}_4$	$\text{R} = 3\text{-F-C}_6\text{H}_4$	91
$\text{R} = 4\text{-NO}_2\text{-C}_6\text{H}_4$	$\text{R} = 4\text{-NO}_2\text{-C}_6\text{H}_4$	93
		75
		82
$\text{R}(-\text{CH}_2)_n\text{OH}$	$\text{R}-\text{CH}_2-\text{CHO}$	
$\text{R} = \text{Me } n = 6$	$\text{R} = \text{Me } n = 6$	77
$\text{R} = \text{CH}_2\text{Cl } n = 4$	$\text{R} = \text{CH}_2\text{Cl } n = 4$	82

Możliwość zatrzymania reakcji utlenienia na etapie aldehydu była niewątpliwie osiągnięciem, jednak tym razem dla niektórych sterycznie zatłoczonych pochodnych np. (-)-mentolu można było zaobserwować znaczący udział reakcji Baeyera-Viligera w całkowitym procesie. Zmiana rozpuszczalnika na bezwodny nitrometan pozwoliła częściowo rozwiązać ten problem.

Bardzo ciekawy przykład stanowi metoda Page, który jako utleniacz zastosował sól tetrafenylofosfinową kwasu nadtlenosiarkowego (TPPP). Związek został otrzymany poprzez wymianę anionu pomiędzy Oxone®, a chlorkiem tetrafenylofosfiowym. Zastosowanie takiego układu w reakcji z alkoholami pierwszorzędowymi pozwalało otrzymać wyłącznie aldehydy, bez dalszego, nawet częściowego, utlenienia do kwasów karboksylowych (Schemat 12) [31, 32].

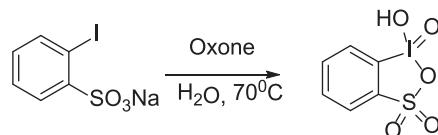


Schemat 12. Utleniania za pomocą systemu TPPP/Oxone® [31, 32]

Scheme 12. Oxidation by TPPP/Oxone® system [31, 32]

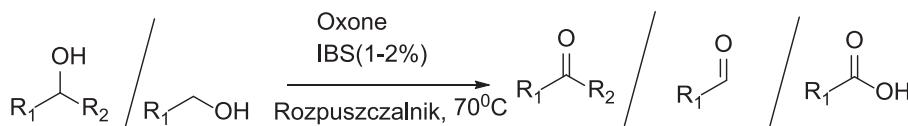
Reakcje z zastosowaniem Oxone®/IBS (kwas jodoksybenzenosulfonowy)

Prekurem utleniającym alkohole może być również „siarkowy” analog IBX czyli kwas jodoksybenzenosulfonowy (IBS). Zarówno otrzymywanie jak i reaktywność IBS jest bardzo zbliżona do IBX, jednak posiada on większe zastosowanie szczególnie w reakcjach kaskadowych. Ponadto pozwala na sterowanie reakcji w kierunku selektywnego powstawania aldehydów, ketonów bądź kwasów karboksylowych z prostych alkoholi, oraz dodatkowo utlenia α,β -nienasycone alkohole oraz bardziej skomplikowane układy przedstawione na Schemacie 13 [33–35].

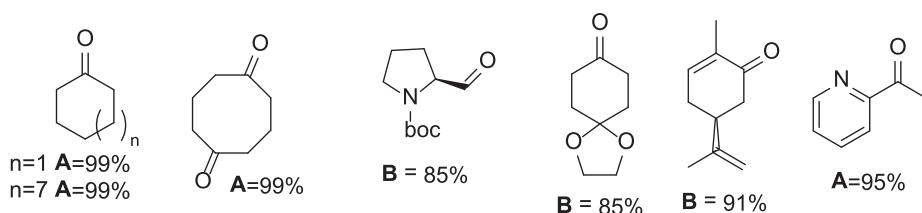


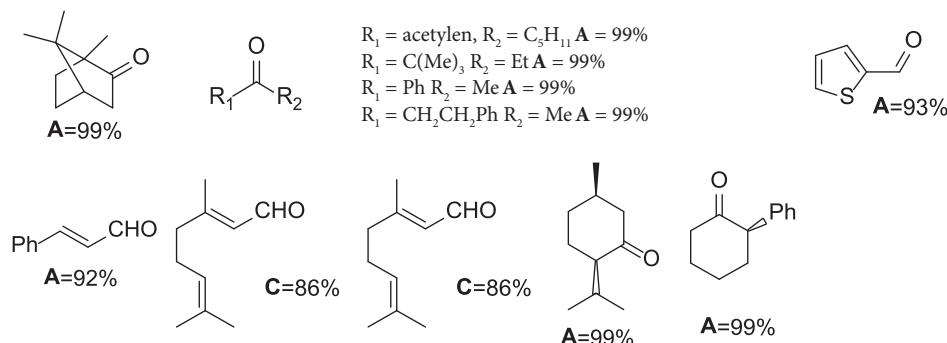
Schemat 13. Reakcja otrzymywania IBS [33]

Scheme 13. Reaction of IBS formation [33]



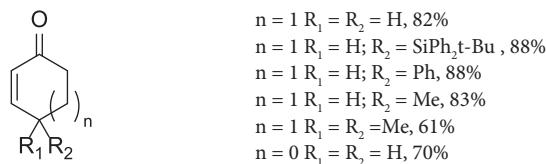
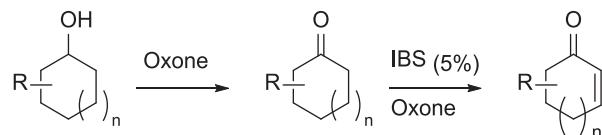
Metoda A: acetonitryl bez dodatków; Metoda B: EtOAc, Na2SO4; Metoda C:CH3NO2,Na2SO4





Schemat 14. Przykładowe produkty powstałe w wyniku selektywnego utleniania w układzie Oxone®/IBS [35]
Scheme 14. Products examples that were formed during selective oxidation with Oxone®/IBS system [35]

Stosując IBS mamy możliwość otrzymywania układów sprzężonych poprzez oksydacyjną dehydrogenację, co zaprezentował Ishihara i współpracownicy dla układów cyklicznych (Schemat 15) [35].



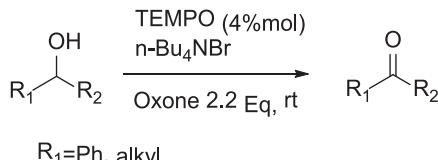
Schemat 15. Kaskadowa reakcja utleniania w układzie Oxone®/IBS [35]

Scheme 15. Cascade oxidation reaction with Oxone®/IBS system [35]

W pierwszej kolejności utlenieniu ulega cykliczny alkohol do ketonu, a następnie tworzy się sprzężone wiązanie podwójne. Zarówno dla układów 5 i 6-członowych reakcje zachodzą z bardzo dobrymi wydajnościami oraz selektywnościami, jednakże próba aplikacji tych warunków dla układów liniowych nie przyniosła pożądanych rezultatów.

**Reakcje z zastosowaniem Oxone®/TEMPO
(rodnik 2,2,6,6-tetrametylopirerydyno-1-oksylowy)**

Kolejnym wartym wspomnienia układem utleniającym jest zastosowanie mieszaniny TEMPO/Oxone®. Bolm i współpracownicy zaprezentowali, że zastosowanie tej metodologii do utleniania alkoholi jest bardzo wydajne i efektywne [36].



Schemat 16. Utlenianie za pomocą TEMPO/Oxone® [36]

Scheme 16. Oxidation with TEMPO/Oxone® [36]

Reaktywność układu katalitycznego w tym wypadku jest silnie związana z obecnością odpowiedniej amoniowej soli czwartorzędowej, z których TBAB (bromek tetrabutyloamoniowy) wyróżnia się największą uniwersalnością. Dodatkowo układ katalityczny Oxone®/TEMPO stanowi dużo łagodniejsze środowisko reakcji w porównaniu z innymi publikowanymi metodami, przez co wykazuje większą tolerancję dla wrażliwych grup funkcyjnych oraz zapobiega następczym reakcjom wielokrotnego utlenienia. Ciekawostką może być fakt, że stosując tę metodologię w układach ztoluenem alkohole drugorzędowe wykazywały większą reaktywność niż pierwszorzędowe, co stanowi precedens. Powszechnie wiadomo bowiem, że reakcje z zastosowaniem TEMPO preferują pochodne pierwszorzędowe. Zaobserwowano również interesujący trend zależności zastosowanego rozpuszczalnika i wydajności. Alkohole pierwszorzędowe dawały dużo lepsze rezultaty w dichlorometanie, natomiast drugorzędowe w toluenie [37, 38].

4. CIECZE JONOWE W REAKCJACH UTLENIANIA

W ostatniej dekadzie ciecze jonowe stały się obiektem dużego zainteresowania, głównie ze względu na swoje unikalne właściwości i możliwość zastąpienia klasycznych lotnych rozpuszczalników „zielonym” odpowiednikiem. Szczególne zastosowanie znalazły wszędzie tam, gdzie układ reakcyjny wymaga zastosowania dwufazowego medium lub obecności katalizatorów przeniesienia fazowego. Istnieje szereg reakcji jakie udało się przeprowadzić w obecności cieczy jonowych, które pełniły różną rolę – medium reakcyjnego, katalizatora, prekatalizatora bądź też ligandu w cyklu katalitycznym [39]. Jednak na szczególnie wyróżnienie zasługują reakcje utleniania, gdyż zwykle wymagają one homogenicznego środowiska reakcji. Reakcje prowadzone w cieczach jonowych w obecności H_2O_2 odznaczały się wyższymi wydajnościami oraz selektywnościami. W wielu przypadkach ciecz jonowa bierze udział w procesie

nie tylko jako rozpuszczalnik ale również stanowi doskonałe środowisko dla reakcji rodnikowych, stabilizacji kationów lub anionów jak również immobilizacji katalizatora, głównie poprzez swój jonowy charakter [40–42].

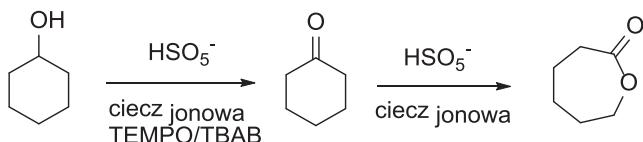
4.1. CIECZE JONOWE W PROCESIE UTLENIANIA ALKOHOLOW

Uhlenianie alkoholi zawsze stanowiło pewnego rodzaju wyzwanie; nie ze względu na brak reaktywności, a raczej na problem z zatrzymaniem reakcji następujących. Jedną z lepszych metod jest zastosowanie TEMPO, który daje dobre rezultaty już w katalitycznych ilościach, jednak jego przemysłowe odzyskiwanie pozostaje cały czas przedmiotem badań oraz istotnym czynnikiem generującym koszty. Wychodząc naprzeciw tym potrzebom Wang i współpracownicy immobilizowali katalizator wanadowy oraz kokatalizator TEMPO w tetrafluoroboranie *N*-butylopirodyniowym [BPy][BF₄] uzyskując bardzo dobre wydajności, a tym samym umożliwiając proste odzyskanie każdego z komponentów poprzez ekstrakcję [43].

Kolejnym przykładem jest proces Jiangi, który zastosował heksafluorofosforan 1-butyl-3-metyloimidazoliowy [bmim][PF₆] w reakcji utlenienia alkoholi benzylowych do odpowiadających im aldehydów. Jako źródło tlenu został zastosowany zmodyfikowany acetamido-TEMPO. Reakcja w porównaniu do klasycznych rozpuszczalników była 3-krotnie bardziej wydajna i wykazywała 99% selektywności w kierunku aldehydów [44].

Strategia „zakotwiczenia” TEMPO w cieczy jonowej została również zastosowana w procesach utleniania prezentowanych przez Falla. Poprzez reakcję typu „klik” TEMPO zostało przyłączone do łańcucha bocznego cieczy jonowej, polepszając rozpuszczalność w samej cieczy. Aktywność tak przekształconego TEMPO wzrosła. Polepszyło to również znacząco odzysk katalizatora oraz wielokrotne użycie bez zauważalnych zmian w aktywności [45].

O krok dalej poszli Zawadzki i Chrobok stosując jako utleniacz ciecz jonową, która została dodatkowo sfunkcjonalizowana poprzez utlenianie jej anionu [46]. Zastosowana metodologia pozwoliła na opracowanie nowej metody otrzymywania laktonów z alkoholi w reakcji „one-pot”. Dodatek cieczy jonowej pozwolił na osiągnięcie homogenicznego środowiska, które jest kluczowe dla reakcji tandemowych, a tym samym pozwolił osiągnąć wysoką selektywność procesu (Schemat 17).



Schemat 17. Utlenianie cycloheksanolu w cieczy jonowej z zastosowaniem ultradźwięków bądź mikrofal [46]

Scheme 17. Oxidation of cyclohexanol in ionic liquid with ultrasounds

Uniwersalność procesu została potwierdzona na kilku przykładach, z pośród których każdy wyróżnia się wysoką wydajnością. Z technologicznego punktu widzenia reakcja również zasługuje na wyróżnienie. Produkty reakcji oddzielono w bardzo prosty sposób z mieszaniny poreakcyjnej poprzez ekstrakcję, a samą ciecz jonową poddano procesowi zawracania w kolejnych cyklach.

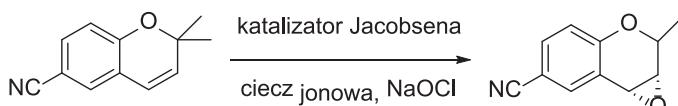
Tabela 9. Zestawienie cyklicznych alkoholi oraz produktów reakcji Bayera-Villigera w cieczy jonowej [bmim][N(CN)₂] (dicyanoimidek 1-butylo-3-metyloimidazoliowy) [46]

Tabela 9. Comparison cyclic alcohols and products from Bayer-Villiger reaction in the presence of ionic liquid [bmim][N(CN)₂] [46]

Alkohol	Lakton	Czas reakcji [h]	Wydajność [%]
		5	75
		6	86
		6	88
		6	89

4.2. CIECZE JONOWE W SYNTEZIE EPOKSYDÓW

Epoksydacja w cieczach jonowych jest zagadnieniem cały czas szeroko badanym oraz unikalnym; pierwsze publikacje ukazały się na początku XXI wieku i dotyczyły głównie reakcji epoksydacji katalizowanej za pomocą kompleksów z metalami [42]. Autorzy zastosowali dodatek cieczy jonowej [bmim][PF₆] aby usprawnić system odzyskiwania chirального katalizatora Jacobsena w asymetrycznej wersji reakcji [47]. Obecność cieczy jonowej nie tylko zwiększyła wydajność reakcji, ale również polepszyła rozpuszczalność substratu, oraz późniejszy odzysk katalizatora (Schemat 18).



Schemat 18. Reakcja utleniania w cieczy jonowej z zastosowaniem katalizatora Jacobsena [47]
Scheme 18. Oxidation reaction in the ionic liquid with Jacobsen catalyst [47]

Prace innych autorów poszerzają zastosowanie cieczy jonowych eliminując konieczność użycia klasycznych rozpuszczalników w układzie reakcyjnym z zastosowaniem szerokiej gamy czynników utleniających, wspieranych przez drogie katalizatory metaloorganiczne [48]. Wyniki otrzymywane w takich układach katalitycznych przewyższają klasyczne reakcje zarówno pod względem wydajności jak i selektywności [49, 50].

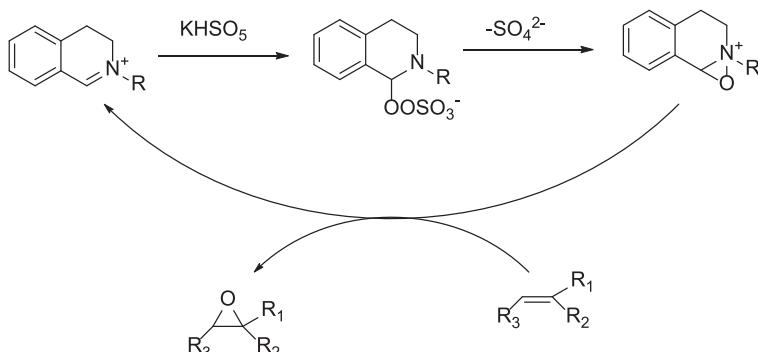
W 2008 roku Welton podjął również próby eliminacji katalizatorów metalicznych poprzez zastosowanie *N*-tlenków heterocyklicznych amin [51] w reakcji epoksydacji z zastosowaniem trifluorometanosulfonianu 1-butylo-3-metyloimidazoliowego [bmim][OTf] oraz Oxone® jako źródła tlenu. Wyniki zastosowania takiego układu reakcyjnego były porównywalne lub lepsze od klasycznej mieszaniny acetonitryl : woda. Przykładowe wyniki przedstawiono w Tabeli 10.

Tabela 10. Porównanie wyników reakcji w klasycznym układzie ACN : woda z układem ciecz jonowa : woda [51]

Table 10. Comparison of the results in classical ACN:water and Ionic liquid:water system

Lp.	Substrat	Konwersja [%]	
		ACN/H ₂ O 1:1	[bmim][OTf]/H ₂ O 1:1
1		92	100
2		75	63
3		66	6
4		18	14
5		0	0

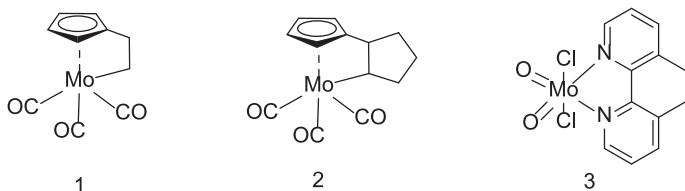
Obecność kationu 2-metylo-3,4-dihydroisochinolinowego jest wystarczająca aby katalizować reakcję epoksydacji bez użycia dodatkowego katalizatora metaloorganicznego. Mechanizm reakcji został przedstawiony na Schemacie 19.



Schemat 19. Mechanizm reakcji epoxidacji w obecności kationu 2-metylo-3,4-dihydroisochinolinowego [51]
 Scheme 19. Epoxidation reaction mechanism with the presence of 2-methyl-3,4-dihydroisoquinoline cation [51]

Autorzy przetestowali szereg cieczy jonowych i ciekawym jest fakt, że w przypadku zastosowania cieczy nie mieszających się z wodą obserwowano brak konwersji do pożądanego produktu. Analogiczna reakcja prowadzona w mieszaninie homogenicznej wykazywała około 60% skuteczność. Autorzy postulują, że prawdopodobnie przyczyną są utrudnienia w przeniesieniu anionu HSO₅⁻ pomiędzy fazami.

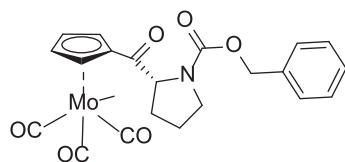
Dodatkowo wykazano, że możliwe jest wydzielanie katalizatorów wraz z cieczą jonową i powtórne wykorzystywanie takiej fazy katalitycznej w kolejnym procesie. Zastosowanie katalizatorów molibdenowych w bardzo wymagającej reakcji epoksydacji *trans*-β-styrenu prowadzi do bardzo dobrych wyników zarówno w pierwszym cyklu katalitycznym jak i w kolejnych bez znaczącego ubytku w wydajności (Schemat 20) [52].



Schemat 20. Przykładowe katalizatory molibdenowe zastosowane w reakcji w cieczach jonowych [52]
 Scheme 20. Examples of the molybdenum catalyst used in the reaction with the presence of ionic liquids [52]

Przeprowadzenie reakcji w imidku bis(trifluorometylo)sulfonylowym [bmim][NTf₂] pozwoliło na zwiększenie żywotności katalizatora oraz na jego kilkukrotne zastosowanie w kolejnych cyklach reakcji [52].

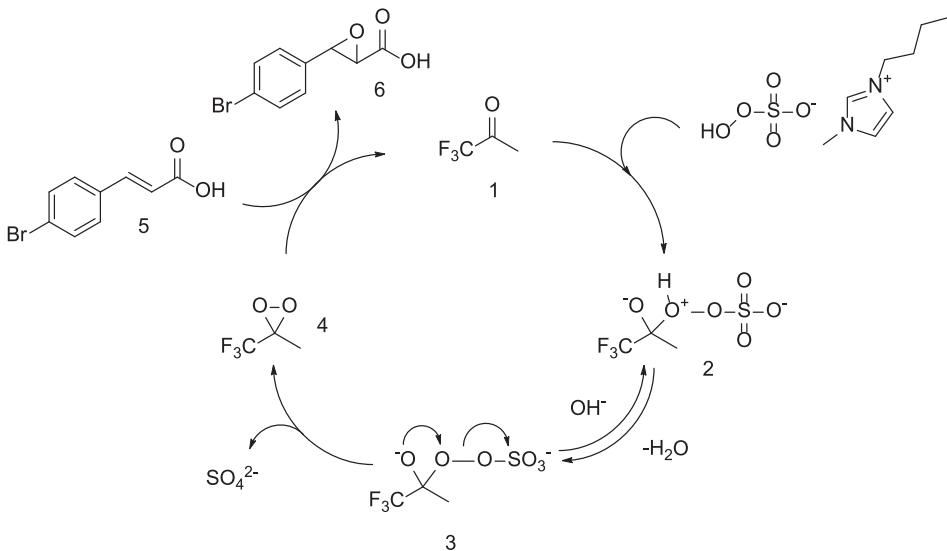
Innowacyjne podejście zaprezentowali również Abrantes i współpracownicy, którzy sfunkcjonalizowali katalizator metaloorganiczny za pomocą aminokwasu, pochodnej proliny (Schemat 21) [53].



Schemat 21. Cząsteczka chiralnego katalizatora na bazie proliny [53]
Scheme 21. Chiral catalyst based on proline scaffold [53]

Założeniem tak przygotowanego kompleksu było uzyskanie dodatkowo stereo-kontroli nad reakcją epoksydacji styrenu, co jednak nie zostało do końca osiągnięte. Prowadzone reakcje osiągały bardzo znikomy, 5% procentowy nadmiar enancjome-ryczny [53].

Inną, ciekawą koncepcję zastosowali Zawadzki i Chrobok, którzy zaaplikowali ciecz jonową sfunkcjonalizowaną anionem kwasu Caro, co zaowocowało brakiem potrzeby użycia dodatkowego utleniacza [54]. Istotnym atutem tak przygotowanej cieczy jonowej jest minimalizacja nieorganicznego balastu, który po skończonej reakcji musi zostać oddzielony, od mieszaniny reakcyjnej. Głównym czynnikiem utleniającym jest pochodna dioksiranowa 1,1,1-trifluoroacetonu tworząca się *in situ* w prowadzonym procesie, która następnie wchodzi w reakcję z olefiną z wytworzeniem produktu (Schemat 22) [54].



Schemat 22. Mechanizm reakcji utleniania kwasu 4-bromo cynamonowego z zastosowaniem cieczy jonowej $[\text{bmim}]\text{HSO}_4^-$ [54]
Scheme 22. Oxidation reaction mechanism of 4-bromo-cinnamic acid in the presence of ionic liquid $[\text{bmim}]\text{HSO}_4^-$ [54]

Prezentowana koncepcja bardzo dobrze sprawdziła się na mało reaktywnym substracie jakim jest kwas cynamonowy oraz na kilku wybranych przykładach prezentowanych w Tabeli 11. Zastosowane cieczne jonowe zostały otrzymane w reakcji wymiany anionu Br⁻ – na anion HSO₄⁻, a następnie jego utlenieniu przy pomocy Oxone® [54].

Tabela 11. Zestawienie wyników epoksydacji wybranych związków organicznych z zastosowaniem sfuncjonalizowanej cieczy jonowej

Table 11. Comparison of the epoxidation results of selected molecules formed with functionalized ionic liquid

Lp.	Olefina	Produkt	Utleniacz	Czas reakcji	Wydajność [%]
1			Oxone®	24 h	25
			[bmim]HSO ₄ ⁻	1 h	100
2			<i>m</i> -CPBA	30 min	60
			[bmim]HSO ₄ ⁻	30 min	100
3			<i>m</i> -CPBA	1 h	50
			[bmim]HSO ₄ ⁻	1 h	80
4			<i>m</i> -CPBA	1h	90
			[bmim]HSO ₄ ⁻	10 min	100
5			<i>m</i> -CPBA	5 min	20
			[bmim]HSO ₄ ⁻	5 min	100

PODSUMOWANIE

Reakcje utlenienia są jedną z najczęstszych przemian chemicznych spotykanych w procesach technologicznych. Dlatego też tak istotne jest pogłębianie wiedzy w tej dziedzinie oraz poszukiwanie nowych, bezpiecznych, bardziej wydajnych oraz ekologicznych układów utleniających. Z przeglądu literatury wynika, że pomimo obecności wielu różnorodnych metod utleniania, cały czas w przemyśle istnieje olbrzymie zapotrzebowanie na nowe, wydajne układy utleniające, które będą spełniać coraz bardziej restrykcyjne wymogi środowiskowe. W przedstawionej pracy skupiono się głównie nad uniwersalnym zastosowaniem OXONE® w procesach

utlenienia wiązań podwójnych oraz alkoholi, zarówno w procesach klasycznych jak i nowoczesnych z wykorzystaniem cieczy jonowych. Przedstawiono zarówno korzyści oraz czynniki limitujące dla klasycznych metod metaloorganicznych oraz bardziej przyjaznych środowisku metod przebiegających w środowisku wodnym. Tego typu media reakcyjne mogą stanowić ciekawą alternatywę szczególnie dla układów katalizowanych metalami przejściowymi.

PIŚMIENIĘTWO CYTOWANE

- [1] H. Hidayat, I.R. Green, A. Ishtiaq, *Chem. Rev.*, 2013, **113**, 3329.
- [2] B.R. Travis, M. Sivakumar, G.O. Hollist, B. Borhan, *Org. Lett.*, 2003, **5**, 1031.
- [3] J.O. Edwards, R.H. Pater, R. Curci, F. DiFuria, *Photochem. Photobiol.*, 1979, **30**, 63.
- [4] R. Curci, L. Daccolti, C. Fusco, *Acc. Chem. Res.*, 2006, **39**, 1.
- [5] R. Curci, A. Dinoi, M.F. Rubino, *Pure Appl. Chem.*, 1995, **67**, 811.
- [6] A.K. Yudin, *Aziridines and Epoxides In Organic Synthesis*, WILEY-WCH, Weinheim 2006.
- [7] G.L. Adams, P.J. Carroll, A.B. Smith, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 4037.
- [8] T. Hübscher, G. Helmchen, *Synlett*, 2006, **9**, 1323.
- [9] M. Seki, T. Furutani, R. Imashiro, T. Kuroda, T. Yamanaka, N. Harada, H. Arakawa, M. Kusamab, T. Hashiyama, *Tetrahedron Lett.*, 2001, **42**, 8201.
- [10] W. Adam, R. Curci, J.O. Edwards, *Acc. Chem. Res.*, 1989, **22**, 205.
- [11] T. Katsuki, K.B. Sharpless, *J. Am. Chem. Soc.*, 1980, **102**, 5974.
- [12] S. Woodard, M.G. Finn, K.B. Sharpless, *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, **113**, 106.
- [13] W. Zhang, J.L. Loebach, S.R. Wilson, E.N. Jacobsen, *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, **112**, 2801.
- [14] N.H. Lee, A.R. Muci, E.N. Jacobsen, *Tetrahedron Lett.*, 1991, **32**, 5055.
- [15] R. Irie, K. Noda, Y. Ito, N. Matsumoto, T. Katsuki, *Tetrahedron: Asymm.*, 1991, **2**, 481.
- [16] K. Kamata, K. Yamaguchi, N. Mizuno, *Chem. Eur. J.*, 2004, **10**, 4728.
- [17] K. Kamata, T. Hirano, S. Kuzuya, N. Mizuno, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 6997.
- [18] C. Wang, H. Yamamoto, *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, **136**, 1222.
- [19] K.B. Sharpless, R.C. Michaelson, *J. Am. Chem. Soc.*, 1973, **95**, 6136.
- [20] N. Hashimoto, A. Kanda, *Org. Res. Proc. Dev.*, 2002, **6**, 405.
- [21] R. Curci, M. Fiorentino, M.R. Serio, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1984, 155.
- [22] R. Curci, L. D'Accolti, M. Fiorentino, A. Rosa, *Tetrahedron Lett.*, 1995, **36**, 5831.
- [23] D. Yang, M.-H. Wong, Y.-C. Yip, X.-C. Wang, M.-W. Tang, J.-H. Zheng, H.-K. Cheung, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 5943.
- [24] M. Frohn, Y. Shi, *Synthesis*, 2000, **14**, 1979.
- [25] W. Adam, C.-G. Zhao, *Tetrahedron: Asymm.*, 1997, **8**, 3995.
- [26] Y. Tu, Z.-X. Wang, Y. Shi, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 9806.
- [27] X.-Y. Wu, X. She, Y. Shi, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 8792.
- [28] A.P. Thottumkara, M.S. Bowsher, T.K. Vinod, *Org. Lett.*, 2005, **7**, 293.
- [29] M. Uyanik, K. Ishihara, *Chem. Commun.*, 2009, 2086.
- [30] A. Schulze, A. Giannis, *Synthesis*, 2006, 257.
- [31] P.C.B. Page, D. Barros, B.R. Buckley, A. Ardakani, B.A. Marples, *J. Org. Chem.*, 2004, **69**, 3595.
- [32] P.C.B. Page, L.F. Appleby, B.R. Buckley, S.M. Allin, M.J. McKenzie, *Synlett*, 2007, 1565.
- [33] A.Y. Koposov, D.N. Litvinov, V.V. Zhdkin, M.J. Ferguson, R. McDonald, R.R. Tykwinski, *Eur. J. Org. Chem.*, 2006, 4791.

- [34] S.V. Ley, *Comprehensive Organic Synthesis*, Wyd. 3, Vol. 7, Chapter 2 Pergamon: Oxford, 1999, str. 251.
- [35] M. Uyanik, M. Akakura, K. Ishihara, J. Am. Chem. Soc., 2009, **131**, 251.
- [36] C. Bolm, A.S. Magnus, J.P. Hildebrand, Org. Lett., 2000, **2**, 1173.
- [37] A.E.J. de Nooy, A.C. Besemer, H.V. Bekkum, Synthesis, 1996, 1153.
- [38] M. Zhao, J. Li, E. Mano, Z. Song, D.M. Tschaen, E.J.J. Grabowski, P.J. Reider, J. Org. Chem., 1999, **64**, 2564.
- [39] R. Sheldon, Chem. Commun., 2001, 2399.
- [40] L. Gharnati, M. Doering, U. Arnold, Curr. Org. Synth., 2009, **6**, 342.
- [41] D. Betz, P. Altmann, M. Cokoja, W.A. Herrmann, F.E. Kuehn, Coord. Chem. Rev., 2011, **255**, 1518.
- [42] J. Muzart, Adv. Synth. Catal., 2006, **348**, 275.
- [43] S.S. Wang, Z. Popovic, H.H. Wu, Y. Liu, ChemCatChem, 2011, **3**, 1208.
- [44] N. Jiang, A.J. Ragauskas, Tetrahedron Lett., 2005, **46**, 3323.
- [45] A. Fall, M. Sene, M. Gaye, G. Gomez, Y. Fall, Tetrahedron Lett., 2010, **51**, 4501.
- [46] K. Matuszek, P. Zawadzki, W. Czardybon, A. Chrobok, New J. Chem., 2014, **38**, 237.
- [47] C.E. Song, E.J. Roh, Chem. Commun., 2000, 837.
- [48] K. Smith, S. Liu, G.A. El-Hiti, Catal. Lett., 2004, **98**, 95.
- [49] D. Betz, P. Altmann, M. Cokoja, W.A. Herrmann, F.E. Kuhn, Coordination Chem. Rev., 2011, **255**, 1518.
- [50] D. Betz, W.A. Herrmann, F.E. Kuehn, J. Organomet. Chem., 2009, **694**, 3320.
- [51] J.M. Crosthwaite, V.A. Farmer, J.P. Hallett, T. Welton, J. Mol. Catal. A: Chem., 2008, **279**, 148.
- [52] A. Günyar, D. Betz, M. Drees, E. Herdtweck, F.E. Kühn, J. Mol. Catal. A: Chem., 2010, **331**, 117.
- [53] M. Abrantes, F.A. Almeida Paz, A.A. Valente, C.L. Pereira, S. Gago, A.E. Rodrigues, J. Klinowski, M. Pillinger, I.S. Gonçalves, J. Organomet. Chem., 2009, **694**, 1826.
- [54] P. Zawadzki, K. Matuszek, W. Czardybon, A. Chrobok, New J. Chem., 2015, **39**, 5282.

Praca wpłynęła do Redakcji 19 kwietnia 2016

METODY OKREŚLANIA STRUKTURY POLISACHARYDÓW

METHODS FOR DETERMINING POLYSACCHARIDES STRUCTURE

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

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

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Izolowanie i oczyszczanie egzopolisacharydów
2. Określanie struktury pierwszorzędowej polisacharydów
 - 2.1. Identyfikacja składu cukrowego
 - 2.2. Określenie sposobu powiązania reszt cukrowych
 - 2.3. Oznaczenie sekwencji reszt cukrowych
 - 2.4. Ustalenie wielkości pierścieni składników cukrowych
 - 2.5. Przypisanie monosacharydów do szeregu konfiguracyjnego D lub L
 - 2.6. Oznaczenie konfiguracji anomerycznych atomów węgla
 - 2.7. Identyfikacja i miejsce podstawienia składników niewęglanowych

Uwagi końcowe

Podziękowanie

Piśmiennictwo cytowane

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

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

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

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

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

ABSTRACT

Sequencing of polysaccharides is difficult to achieve because of the heterogeneous nature of the polysaccharide structure, high molecular weight (the size of a polysaccharide varies between approximately 16,000 and 16,000,000 daltons (Da)), and polydispersity of the polymer chains.

The following information is essential to determine the primary structure of a polysaccharide:

- monosaccharide composition: nature and molar ratios of the monosaccharide building blocks;
- relative configuration of monosaccharides: D or L;
- anomeric configuration: α - or β -configuration of the glycosidic linkage;
- ring size: presence and distinction of furanosidic and pyranosidic rings;
- linkage patterns: linkage positions between the monosugars and branches;
- sequences of monosaccharide residues in the repeating units;
- substitutions: position and nature of OH-modifications, such as O-phosphorylation, acetylation, O-sulfation, etc.;
- molecular weight and molecular weight distribution.

A polysaccharide extracted from plant materials or food products is usually purified before being subjected to structural analysis. The first step of characterizing a polysaccharide is the determination of its purity, which is reflected by its chemical composition, including total sugar content, level of uronic acids, proteins, ash, and moisture of the preparation. The second step is the determination of monosaccharide composition, which will unveil structural information such as the number of monosaccharides present in the polysaccharide and how many of each sugar unit. NMR spectroscopy has become the most powerful and noninvasive physicochemical technique for determining polysaccharide structures. It can provide detailed structural information of carbohydrates, including identification of monosaccharide composition, elucidation of α - or β -anomeric configurations, establishment of linkage patterns, and sequences of the sugar units in oligosaccharides and/or polysaccharides. Monosaccharide composition can be determined also by analysis of totally acid hydrolyzed polysaccharide using high performance liquid chromatography (HPLC) or gas chromatography (GC). The ring size and glycosidic linkage positions of sugar units in a polysaccharide could be established by methylation analysis and/or cleavage reduction. The anomeric configuration is conventionally determined by oxidation, and this method can be combined with mass spectrometry to obtain more structural information.

Keywords: polysaccharides, monosaccharides, oxidative degradation, methylation analysis, acetolysis, NMR, MS

Słowa kluczowe: polisacharydy, monosacharydy, degradacja oksydacyjna, analiza metylacyjna, acetoliza, NMR, MS

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

Ac	– acetyl
COSY	– spektroskopia korelacyjna (ang. <i>correlation spectroscopy</i>)
DMSO	– dimetylosulfotlenek
ELSD	– detektor rozpraszania światła przez odparowanie (ang. <i>evaporative light scattering detector</i>)
ESI-MS	– spektrometria mas z jonizacją elektosprejem (ang. <i>electrospray ionisation mass spectrometry</i>)
FAB-MS	– spektrometria mas z jonizacją szybkimi atomami (ang. <i>fast atom bombardment mass spectrometry</i>)
GC	– chromatografia gazowa (ang. <i>gas chromatography</i>)
GC-MS	– chromatografia gazowa z detektorem masowym (ang. <i>gas chromatography mass spectrometry</i>)
Glc	– glukoza
GTA	– aldehyd glutarowy
HMBC	– heterokorelacyjne widmo dwuwymiarowe dalekiego zasięgu (ang. <i>heteronuclear multiple bond coherence</i>)
HPLC	– wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. <i>high-performance liquid chromatography</i>)
HSQC	– heterokorelacyjne widmo dwuwymiarowe poprzez jedno wiązanie (ang. <i>heteronuclear single quantum correlation</i>)
MALDI	– wspomagana matrycą jonizacja laserem (ang. <i>matrix assisted laser desorption and ionisation</i>)
Me	– methyl
NMR	– magnetyczny rezonans jądrowy (ang. <i>nuclear magnetic resonance</i>)
NOE	– jądrowy efekt Overhausera (ang. <i>nuclear overhauser effect</i>)
NOESY	– spektroskopia efektu Overhausera (ang. <i>nuclear overhauser effect spectroscopy</i>)
PS	– polisachryd (ang. <i>polysaccharide</i>)
Rha	– ramnoza
SEC	– chromatografia wykluczania (ang. <i>size-exclusion chromatography</i>)
SPE	– ekstrakcja do fazy stałej (ang. <i>solid-phase extraction</i>)
TCA	– kwas trichlorooctowy
TFA	– kwas trifluorooctowy
TOCSY	– korelacyjna spektroskopia zupełna (ang. <i>total correlation spectroscopy</i>)
TRIS	– tris(hydroxymethyl)aminomethane (2-amino-2-hydroksymetylo-propano-1,3-diol)

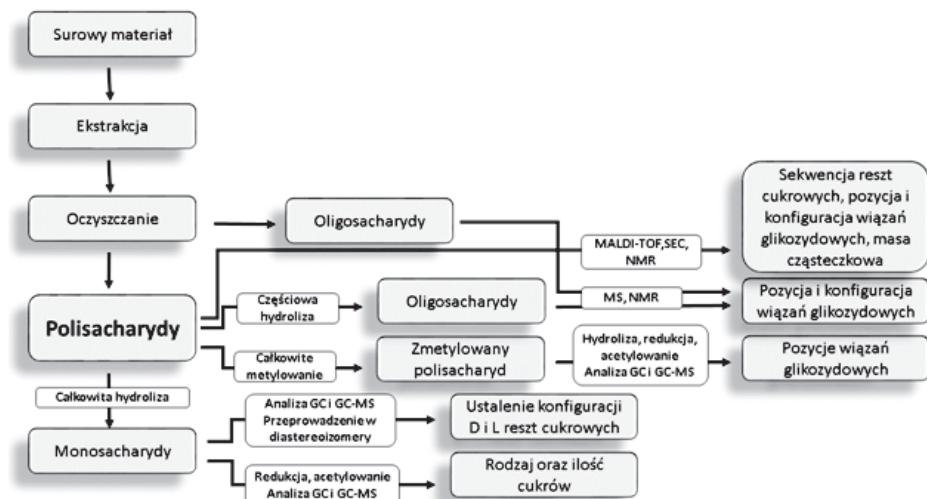
WPROWADZENIE

Szacuje się, że każdego roku na Ziemi powstaje w procesie biosyntezy prowadzonej przez rośliny i bakterie fotosyntetyzujące około 4×10^{11} ton węglowodanów. Większość z tych związków jest produkowana jako polisacharydy (PS). Jak dla każdego polimeru, nie jest możliwe przypisanie im odrębnej masy cząsteczkowej, ponieważ są one polidispersyjnymi cząsteczkami, które charakteryzuje się podając średnią masą cząsteczkową. Polisacharydy występują w ogromnej różnorodności strukturalnej. Są one produkowane przez wszystkie grupy organizmów, w tym mikroorganizmy, glony, grzyby, rośliny i zwierzęta.

Analiza połączeń cukrów w polisacharydach jest niezwykle ważną dziedziną badań strukturalnych. Proces ustalenia struktury PS należy do jednych z najtrudniejszych badań. Jak skomplikowane i pracochłonne jest to zadanie niech świadczy poniższy opis. Dwie cząsteczki tego samego aminokwasu można połączyć ze sobą na jeden sposób. W wyniku połączenia glikozydowo dwóch takich samych cząsteczek monosacharydu można uzyskać aż 11 disacharydów. Dwa różne aminokwasy pozwalają uzyskać 4 różne peptydy, dwa cukry 20 sacharydów i to nie uwzględniając możliwości różnej wielkości pierścienia.

1. IZOLOWANIE I OCZYSZCZANIE EGZOPOLISACHARYDÓW

W analizie materiału pochodzenia naturalnego kluczowym etapem jest proces izolowania i oczyszczania próbki. Istotne jest aby badana substancja nie uległa żadnym przemianom podczas tych procesów oraz aby nie została zanieczyszczona.



Rysunek 1. Schemat przykładowego sposobu postępowania podczas analizy polisacharydów

Figure 1. Diagram of an analytical procedure of polysaccharides

Do najczęściej wykorzystywanych metod izolowania polimerów węglowodanowych należą:

- ekstrakcja przy użyciu aldehydu glutarowego (GTA);
- ekstrakcja przy użyciu aldehydu mrówkowego;
- ekstrakcja buforami np. octanowym [1] lub TRIS [2];
- ekstrakcja w obecności żywicy kationowymiennej;
- ekstrakcja trudno rozpuszczalnych w wodzie polisacharydów roztworem NaOH;
- ekstrakcja ultradźwiękami;
- odwirowywanie;
- ekstrakcja wodą na gorąco;
- wytrącanie etanolem.

Podstawowym parametrem danej metody ekstrakcji jest jak największy odzysk egzopolimerów przy jak najmniejszym stopniu lizy komórek bakteryjnych. Ekstrakcja na gorąco, czy przy użyciu ultradźwięków prowadzi do znacznego odzysku substancji pozakomórkowych, niestety towarzyszy temu znaczne zanieczyszczenie materiałem komórkowym. Liczne badania procesu izolowania materiału pozakomórkowego wskazują, iż w większości przypadków najodpowiedniejszą metodą jest ekstrakcja 3% roztworem aldehydu glutarowego [3, 4]. Metoda ta charakteryzuje się wysoką wydajnością ekstrakcji substancji pozakomórkowych oraz minimalnym stopniem przenikania materiału komórkowego. Jak wykazano, aldehyd glutarowy zapobiega lizie komórek bakteryjnych poprzez stabilizowanie ściany komórkowej, dzięki czemu praktycznie unikamy zanieczyszczeń pochodzenia wewnętrzkomórkowego. Często, w celu zwiększenia odzysku, stosuje się techniki łączone, przykładowo ekstrakcja GTA, a dopiero po niej sonikacja czy ekstrakcja przy użyciu żywicy jonowymiennej [5, 6].

Kolejnym etapem jest izolowanie egzopolisacharydów z ekstraktów pozakomórkowych i ich oczyszczenie. W celu usunięcia niewęglowodanowych substancji wysokocząsteczkowych: białek i kwasów nukleinowych, wykorzystuje się najczęściej procesy strącania lub/i metody enzymatyczne. Kwasy nukleinowe usuwa się poprzez strącanie 40% roztworem etanolu przy pH 4,5 lub używając enzymów deoksyrybonukleazy (DNA-zy) i rybonukleazy (RNA-zy). Białka najczęściej strąca się etanolem, alkoholem izopropylowym czy roztworem kwasu trichlorooctowego (TCA) lub przy użyciu proteaz. Typowo stosowanym enzymem proteolitycznym jest Proteinaza K [7, 8].

Po usunięciu interferujących makrocząsteczek należy polisacharydy oddzielić od niskocząsteczkowych zanieczyszczeń. Dogodną metodą oczyszczenia polimerów jest dializa. W zależności od masy cząsteczkowej badanego polisacharydu dobiera się odpowiedni rodzaj worka dialitycznego, o określonej wielkości porów (ang. *cut-off*). Następnie dializat najczęściej frakcjonuje się metodą sączenia molekularnego, używając między innymi wypełnień typu Bio-Gel P-100, Sephadryl S-400, Sephadex G-50 czy Sepharose 6B, lub poprzez chromatografię jonowymienną, stosując mię-

dy innymi kolumny z wypełnieniem Sephadex A-25, Hitrap Q czy DEAE Sepharose [9, 10].

2. OKREŚLANIE STRUKTURY PIERWSZORZĘDOWEJ POLISACHARYDÓW

Badając strukturę pierwszorzędową polisacharydów należy określić: skład cukrowy, sposób połączenia reszt monosacharydowych, sekwencję poszczególnych reszt, wielkość pierścieni cukrowych jednostek budujących polimer, konfigurację D lub L, konfigurację anomerycznych atomów węgla oraz rodzaj i miejsce podstawienia składników niecukrowych. Najpowszechniej wykorzystywanymi technikami w analizie struktury pierwszorzędowej polisacharydów są: chromatografia gazowa, chromatografia cieczowa, spektrometria mas oraz magnetyczny rezonans jądrowy [11–13].

2.1. IDENTYFIKACJA SKŁADU CUKROWEGO

W analizie strukturalnej polisacharydów pierwszym, nieodzownym etapem jest ustalenie składu cukrowego, czyli typu reszt monosacharydowych budujących polimer. W tym celu należy polisacharyd poddać całkowitej depolimeryzacji, następnie zależnie od metod detekcji ewentualnie odpowiedniej derywatyzacji. Najczęściej, w celu kompletnej depolimeryzacji polisacharydu wykorzystuje się reakcję kwaśnej hydrolizy wodnymi roztworami kwasu siarkowego(VI), chlorowodorowego, czy trifluorooctowego. Stosowana jest także solwoliza chlorowodorem w bezwodnym metanolu (np. 2 M HCl/MeOH). Stałe szybkości reakcji hydrolizy wiązań glikozydowych w polisacharydzie różnią się znacząco i są zależne od typu wiązania glikozydowego, rodzaju reszt cukrowych, wielkości pierścienia reszt oraz konfiguracji anomerycznej wiązań. I tak labilność poszczególnych wiązań glikozydowych w warunkach kwaśnej hydrolizy przedstawia się następująco (od najwrażliwszego wiązania): 1,2 > 1,3 > 1,4 > 1,6.

Wiązania glikozydowe tworzone przez reszty aminocukrów czy kwasów uronowych wymagają zastosowania do hydrolizy wyższych stężeń kwasów (np. 4 M TFA) w porównaniu z wiązaniemami tworzonymi przez cukry obojętne. Natomiast kwasy sjalowe i deoksycukry są bardzo wrażliwe na warunki kwaśnej hydrolizy i mogą wręcz ulegać degradacji. W tym wypadku należy zastosować łagodniejsze warunki (0,02 M TFA) lub przeprowadzić depolimeryzację w warunkach niewodnych, jak na przykład metanolizę czy solwolizę fluorowodorem. Reakcję metanolizy wykonuje się przy użyciu 0,1–0,5 M roztworu chlorowodoru w metanolu, natomiast w reakcji solwolizy wykorzystuje się bezwodny fluorowodór, który jest silnie toksyczny, a zważywszy na fakt rozwoju alternatywnych metod, jest obecnie coraz rzadziej zastosowany.

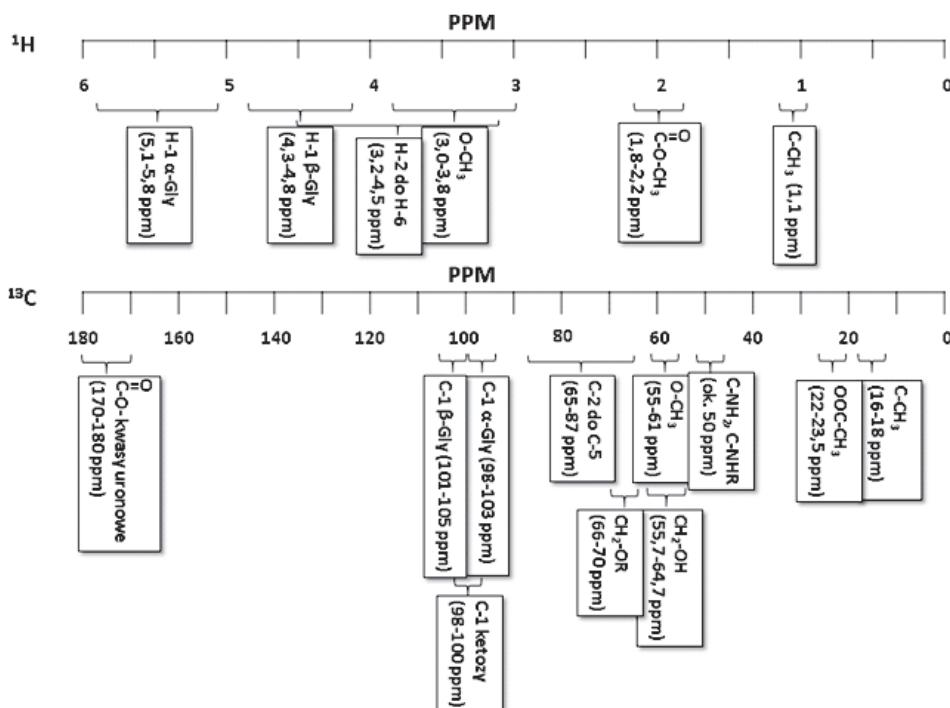
Wielkość pierścienia monosacharydów budujących PS ma wpływ na trwałość wiązań glikozydowych i tak reszty furanozowe są o wiele bardziej labilne niż piranozowe (10–1000 razy szybciej ulegają odszczepieniu). Wykazano również, że anomery α łatwiej hydrolizują w porównaniu z anomerami β [14–16].

Po całkowitej depolimeryzacji polisacharydu najczęściej detekcji poszczególnych monosacharydów dokonuje się poprzez chromatografię gazową (GC) oraz chromatografię gazową sprzężoną ze spektrometrią mas (GC-MS).

W tym celu należy mieszaninę po hydrolizie przekształcić w lotne pochodne, najczęściej acetyloalditole lub pochodne trimetylosililowe. Identyfikacji cukrów dokonuje się porównując czasy retencji z substancjami wzorcowymi oraz poprzez analizę widm mas.

Mniej powszechnie stosowaną techniką w analizie cukrów jest wysokosprawna chromatografia cieczowa, głównie za sprawą utrudnionej detekcji. Dotychczas do identyfikacji natywnych cukrów najczęściej wykorzystywano detekcję refraktometryczną lub elektrochemiczną, które wiążą się z pewnymi ograniczeniami. I tak głównym czynnikiem ograniczającym zastosowanie detektora refraktometrycznego jest brak możliwości pracy w gradiencie fazy ruchomej, natomiast w warunkach detekcji elektrochemicznej nie wszystkie składniki cukrowe są stabilne. Stosowane są również detektory UV czy fluorescencyjne, aczkolwiek te wymagają przeprowadzania cukrów w odpowiednie pochodne. Jednak za sprawą detektora ELSD nastąpił przełom w badaniach cukrów za pomocą HPLC. ELSD jest uniwersalnym detektorem umożliwiającym elucję gradientową, przez co idealnie nadaje się do analizy sacharydów. Dodatkowo wyróżnia się on wysoką czułością w porównaniu z detektorem refraktometrycznym oraz stabilnością linii podstawowej [17–19].

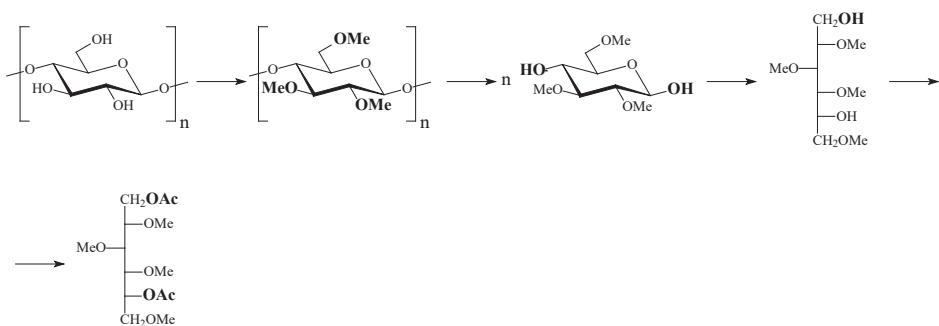
Kolejnym sposobem identyfikacji składu cukrowego polisacharydu jest analiza widm magnetycznego rezonansu jądrowego, zarówno protonowego jak i węglowego. Do tego celu użyteczny jest zakres anomeryczny widma. Przesunięcie chemiczne protonów anomerycznych mieści się w zakresie 4,3–5,7 ppm, natomiast anomerycznych atomów węgla 90–110 ppm. Informacje o liczbie różnych reszt cukrowych uzyskuje się z liczby sygnałów anomerycznych protonów i atomów węgla. Analizując dogłębnie homo- i heterokorelacyjne widma dwuwymiarowe (COSY, TOCSY, HSQC i HMBC) można określić wartości przesunięć chemicznych wszystkich protonów i atomów węgla. Ich przesunięcia chemiczne mieszczą się odpowiednio w zakresie δ_{H} 3–4,3 ppm oraz δ_{C} ~50–87 ppm i porównać je z danymi literaturowymi [13].



Rysunek 2. Wartości przesunięć chemicznych cukrów na widmach ¹H i ¹³C NMR
Figure 2. Chemical shifts in the ¹H i ¹³C NMR spectra of sugars.

2.2. OKREŚLENIE SPOSOBU POWIĄZANIA RESZT CUKROWYCH

Poza wielowymiarowymi technikami NMR, najczęściej stosowaną metodą określania sposobu powiązania reszt cukrowych w polisacharydach jest analiza metylacyjna, polegająca na całkowitym zmetylowaniu polisacharydu, następnie jego hydrolizie, redukcji i acetylowaniu (Rys. 3). Uzyskane częściowo metylowane i acetylowane pochodne alditoli analizuje się techniką GC porównując czasy reten-cji składników badanej próbki z wzorcami. Analizując preparaty techniką GC-MS, uzyskuje się dodatkowo widma mas poszczególnych pochodnych.



Rysunek 3. Schemat analizy methylacyjnej
Figure 3. Scheme of methylation analysis

Poniżej zestawiono kilka powszechnie stosowanych metod metylowania polisacharydów:

- *metoda Hakomori*, w której preparat PS rozpuszczony w dimetylo-sulfitenku (DMSO), poddaje się działaniu dimetylosulfinylu sodu (dimsyłu sodu), a następnie jodku metylu [20];
- *metoda Kerek'a-Ciucanu*, w której preparat PS rozpuszcza się w DMSO, dodaje się suchego, sproszkowanego wodorotlenku sodu i jodku metylu. Procedura jest prostsza niż w przypadku metody Hakomori, jednak amino-cukry mogą ulegać niepełnej metylacji [21];
- *metoda Prehma*, w której próbce PS rozpuszcza się w fosforanie trimetylu, następnie wprowadza się 2,6-di-*tert*-butylopirydynę i trifluorometanosulfonian metylu. Jest to łagodna metoda, wykorzystywana w przypadku polisacharydów zawierających składniki labilne w środowisku zasadowym [22];
- *metoda Kuhn'a*, w której preparat PS rozpuszcza się w *N,N*-dimetyloformamidzie lub DMSO i poddaje działaniu jodku metylu, bądź siarczanu dimetylu w obecności tlenku baru [23].

Istotnym etapem analizy methylacyjnej jest oczyszczanie próbki po reakcji metylowania. Stosuje się kilka sposobów oddzielenia zmetylowanego polisacharydu od zanieczyszczeń. Są to:

- dializa [24];
- ekstrakcja chloroformem [25–27];
- ekstrakcja do fazy stałej (SPE), z użyciem kolumnki wypełnionej krzemionką z chemicznie związaną fazą oktadecylową (Sep-Pak, C18) [28, 29];
- sączenie molekularne na złożu Sephadex LH-20 [30, 31].

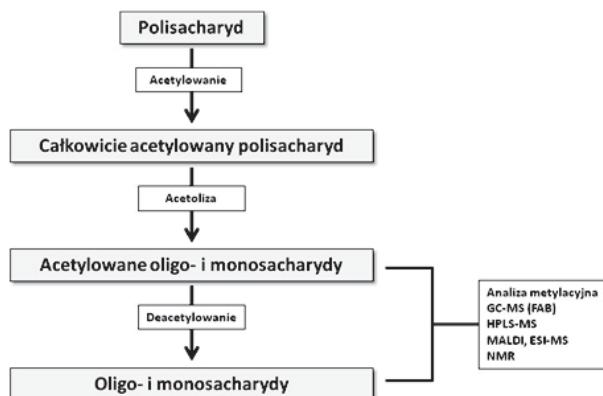
Potwierdzeniem wyników analizy methylacyjnej jest analiza jedno- i dwuwymiarowych widm NMR oraz porównanie uzyskanych wyników z danymi literaturowymi. Wartości przesunięć chemicznych zarówno atomów węgla jak i protonów ulegają zmianie po przeprowadzeniu węglowodanów w ich metylowe pochodne.

2.3. OZNACZENIE SEKWENCJI RESZT CUKROWYCH

Poza analizą widm 1D i 2D NMR, informacje o sekwencji reszt cukrowych uzyskuje się dzięki różnorodnym metodom selektywnej degradacji oligosacharydów, w tym takich jak: częściowa kwaśna hydroliza, acetoliza, utlenianie połączone z łagodną hydrolizą (hydroliza oksydacyjna), czy trawienie enzymatyczne. Również wyniki analizy metylacyjnej dostarczają informacji o sekwencji reszt cukrowych. Doboru metody degradacji dokonuje się w oparciu o skład cukrowy i rodzaj wiązań występujących w badanym polisacharydzie.

Częściowa kwaśna hydroliza jest wykorzystywana gdy w polisacharydzie znajdują się składniki labilne w roztworze o niskim pH, takie jak kwasy sjalowe, czy deoksycukry oraz reszty cukrowe posiadające pierścień pięcioczłonowy (furanozy) czy nietrwałe wiązania jak na przykład fosfodiestrowe. Częściową hydrolizę w warunkach kwaśnych wykorzystano między innymi w badaniach nad strukturą gellanu – egzopolisacharydu syntezowanego przez *Sphingomonas elodea*. Polisacharyd poddano hydrolizie w 0,05 M TFA, 100°C przez 45 minut, w wyniku czego otrzymano mieszaninę oligosacharydów, którą następnie frakcjonowano metodą sączenia molekularnego. Poszczególne oligocukry identyfikowano techniką ESI-MS. Głównym produktem częściowej hydrolizy okazał się charakterystyczny tetrasacharydowy fragment powtarzającej się jednostki gellanu oraz ten sam tetrasacharyd zawierający przyłączoną resztą glicerolu. Mimo, że natywny gellan zawierał reszty acetylowe to w trakcie analizy nie zaobserwowano O-acetylowanych oligocukrów, co potwierdza większą labilność tej grupy w środowisku kwaśnym w porównaniu z resztą glicerolu. Obecność tetrasacharydowej jednostki powtarzalnej gellanu wynika z rozpadu wiązania glikozydowego pomiędzy resztą ramnozy a glukozą [α -L-Rha-(1 \rightarrow 3)- β -D-Glc], co jest zgodnie z tym, że 6-deoksycukry tworzą wiązania glikozydowe mniej trwałe w warunkach kwaśnej hydrolizy [32]. Częściową hydrolizę wykorzystano również podczas analizy struktury antygenu O *Salmonella Abortus equi* O4 i *Salmonella Agona*. Oba antygeny zawierają resztę abekozy (3,6-dideoxyhekszozy) labilną już w 0,2 M TFA w 4°C [33, 34].

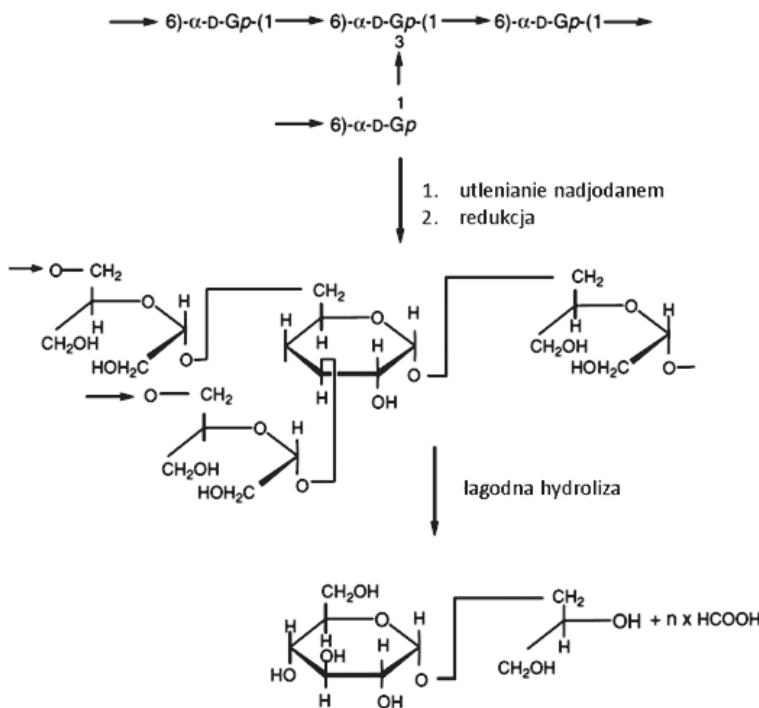
Inną szeroko stosowaną metodą częściowej degradacji polisacharydów jest acetoliza pomocna w ustalaniu struktury polisacharydów, w których występuje wiązanie glikozydowe (1 \rightarrow 6). W reakcji acetolizy wykorzystuje się znaczne różnice w trwałości wiązań glikozydowych. Wiązanie (1 \rightarrow 6) jest bardzo czułe, podczas gdy pozostałe wiązania są stosunkowo trwałe w warunkach reakcji. Wrażliwość poszczególnych wiązań glikozydowych w warunkach acetolizy przedstawia następujący szereg: 1,6 >> 1,4 > 1,3 > 1,2 [35]. Schemat procedury acetolizy przedstawia Rysunek 4. W wyniku acetolizy otrzymuje się mieszaninę mono- i oligosacharydów będących odzwierciedleniem rozgałęzień polimeru, co jest bardzo cenne w analizie wysoce rozgałęzionych polimerów [36, 37]. Produkty acetolizy identyfikuje się głównie za pomocą spektrometrii mas i magnetycznego rezonansu jądrowego.



Rysunek 4. Schemat acetolizy
Figure 4. Scheme of acetolysis

Acetolizę wykorzystuje się między innymi do ustalenia sekwencji reszt cukrowych w mannanach izolowanych z różnych gatunków drożdży, badając mono- i oligosacharydy powstałe w wyniku reakcji. Mannany grzybowe zazwyczaj zbudowane są z szkieletu mannonowego o wiązaniach $\alpha(1 \rightarrow 6)$, które są nieregularnie podstawione w pozycji 2 przez mono- lub oligosacharydowe fragmenty.

Kolejną metodą degradacji polisacharydu używaną w celu określenia jego struktury jest hydroliza oksydacyjna. Najszerzej wykorzystywany wariantem tej metody jest degradacja Smitha (Rys. 5). Polega ona na utlenianiu polisacharydu jodanem(VII) sodu, w wyniku czego następuje rozerwanie wiązania pomiędzy sąsiadującymi ze sobą hydroksylowanymi atomami węgla. Reakcji ulegają wszystkie końcowe cukry nieredukujące, poza 3,6-dideoxsypiranozami. Dodatkowo wewnętrz łańcucha polisacharydowego utleniają się wszystkie reszty oprócz 3-podstawionych. Produkty utleniania poddaje się redukcji, łagodnej lub całkowitej hydrolizie z utworzeniem aldoz, 1,2-dioli, gliceryny, czy tetritolii, które identyfikować można na sze- reg różnych sposobów, głównie poprzez spektrometrię mas z jonizacją technikami MALDI i ESI.



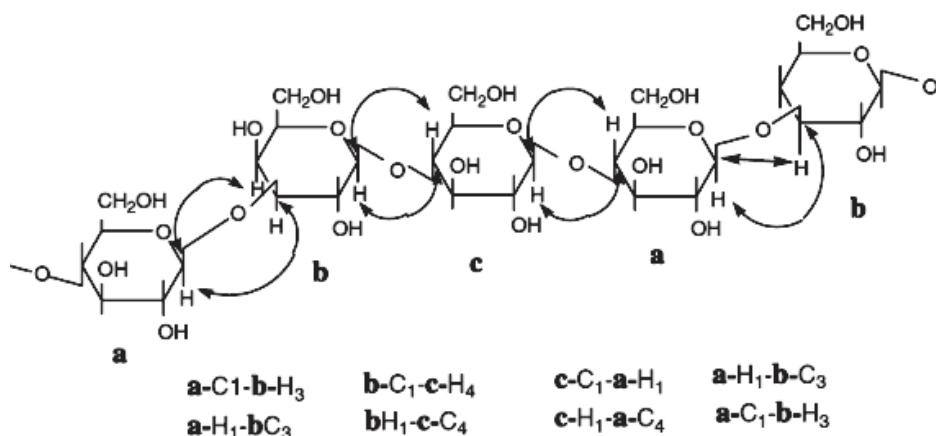
Rysunek 5. Degradacja Smitha dekstranu [38]

Figure 5. Smith degradation of dextran [38]

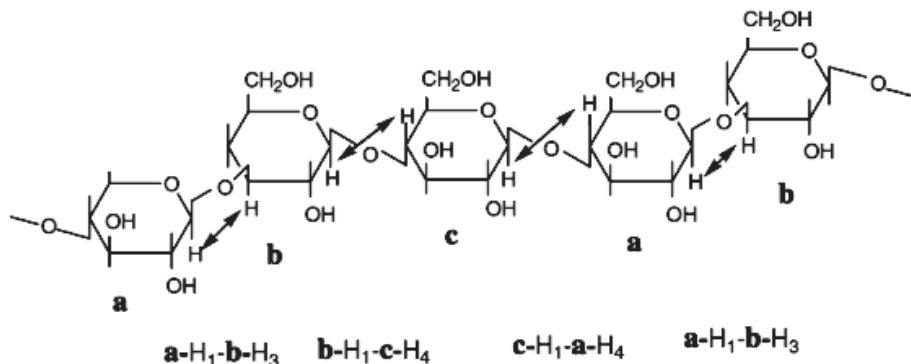
Degradację Smitha zastosowano między innymi w celu ustalenia struktury fukoidanu izolowanego z brunatnicy Chorda filum oraz antygenu somatycznego Salmonella Dakar [39, 40].

Wysoce specyficzne enzymy, trawiące polisacharydy określonych miejscach, są często wykorzystywane w celu określenia sekwencji cukrów w polimerze. Hydrolizę enzymatyczną wykorzystano między innymi podczas badania struktury ksantana, który poddawano kolejno działaniu liazy ksantanowej, β -D-glukanazy, β -D-glukozydazy, hydrolazy nienasyconej pochodnej kwasu glukuronowego oraz α -D-mannozydazy. Produkty identyfikowano techniką spektrometrii mas z jonizacją elektrosprejem [41].

Analiza dwuwymiarowych widm NMR jest nieocenionym źródłem informacji o sekwencji monocukrów w polisacharydzie. Na widmie heterokorelacyjnym HMBC można zaobserwować sprzężenia pomiędzy protonem anomerycznym jednej reszty cukrowej, a atomem węgla kolejnej (schemat oddziaływań, Rys. 6). Natomiast na widmie NOESY pojawiają się sygnały sprzężenia przez przestrzeń pomiędzy protonem anomerycznym jednej reszty cukrowej z najbliższym przestrzennie protonem kolejnej reszty (Rys. 7).



Rysunek 6. Odziaływanie, które można zaobserwować w postaci sygnałów na widmie HMBC β -D-glukanu
Figure 6. Illustration of HMBC effects of β -D-glucan



Rysunek 7. Odziaływanie typu NOE w β -D-glukanie
Figure 7. Illustration of NOE effects of β -D-glucan

2.4. USTALENIE WIELKOŚCI PIERŚCIENI SKŁADNIKÓW CUKROWYCH

Monosacharydy w roztworze występują w formie łańcuchowej oraz pierścieniowej, zarówno pięcio- jak i sześcioczlonowej. Natomiast w polisacharydzie, gdzie cukry są z sobą połączone poprzez wiązanie glikozydowe, mamy do czynienia wyłącznie z formami pierścieniowymi, za wyjątkiem reszt końcowych (redukujących). W celu określenia wielkości pierścieni cukrowych w badanym polisacharydzie możemy się posłużyć wynikami analizy metylacyjnej. Pochodne 1,5-di-O-acetylowe oraz 1,4-di-O-acetylowe wskazują odpowiednio na strukturę pierścienia piranozowego (sześcioczlonowego) i furanozowego (pięcioczlonowego). Problem pojawi się, gdy grupami acetylowymi są podstawione pozycje 1, 4 i 5. Wówczas należy interpretację oprzeć o wyniki analiz NMR albo korzystając z metod chemicznych

zmetylowaną próbkę tak hydrolizować, aby powstało jak najwięcej disacharydów, które należy zredukować, poddać etylowaniu i przeprowadzić całkowitą hydrolizę produktu. Uzyskane, w końcowym etapie octany metyloetyloalditoli można analizować metodą GC-MS.

Obecność reszt furanozyloowych można również potwierdzić analizując jednowymiarowe widmo ^{13}C NMR, gdyż odpowiadające atomom węgla tworzącym pierścień pięcioczłonowy sygnały występują w zakresie δ 83-88 ppm. Brak sygnałów w tym zakresie wyklucza występowanie pierścieni furanozowych w badanym polisacharydzie.

2.5. PRZYPISANIE MONOSACHARYDÓW DO SZEREGU KONFIGURACYJNEGO D LUB L

Określenie konfiguracji D i/lub L jest koniecznym etapem badań struktury polisacharydu, ponieważ wiele cukrów takich jak galaktoza, arabinosa, ramnoza czy fukoza występuje w związkach wielkocząsteczkowych w postaci obu enancjomerów, często w tym samym polisacharydzie.

Najczęściej stosowanymi metodami ustalania konfiguracji D, L cukrów są:

- pomiar skręcalności optycznej – szybka i tania metoda, która jednak wymaga stosunkowo dużej ilości próbki;
- dichroizm kołowy octanów alditoli lub benzoesanów cukrów [42];
- metody enzymatyczne – wykorzystanie specyficznych dla danej konfiguracji cukru enzymów. Przykładowo, metodą tą posłużyono się w celu określania konfiguracji absolutnej reszt cukrowych egzopolisacharydu *Lactococcus rhamnosus* KL37C [43, 44];
- chromatografia gazowa na fazach nieczynnych optycznie, po przeprowadzeniu analizowanych monocukrów w diasteroizomeryczne pochodne [45, 46];
- chromatografia gazowa na chiralnych fazach stacjonarnych – metoda nie wymagająca przeprowadzania w diasteroizomeryczne pochodne, przez co wygodniejsza, jednakże do oznaczeń konieczna jest kolumna chromatograficzna z chiralną fazą. Wykorzystano ją między innymi do określenia konfiguracji absolutnej składników galaktanu z *Helix pomatia* [47, 48];
- analiza widm NMR pochodnych cukrów – wykorzystywane są pochodne (S)-2-metylomaślanu [49, 50].

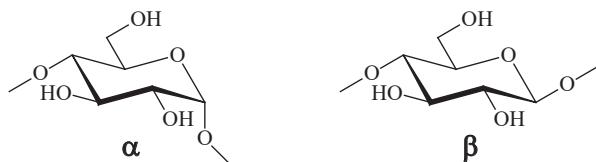
Najczęściej wykorzystywana metodą ustalania konfiguracji względnej reszt cukrowych w bakteryjnych polisacharydach jest chromatografia gazowa na niechiralnych fazach stacjonarnych. Badane enancjomery cukrowe poddaje się na ogólną reakcję z optycznie czynnym alkoholem, [np. (S)-butan-2-olem, czy (S)-oktan-2-olem] w wyniku czego powstają diastereoizomeryczne produkty, które po przeprowadzeniu w lotne pochodne można rozdzielić na niechiralnej fazie stacjonarnej, przy czym właściwości chromatograficzne glikozydów D-cukru i (R) alkoholu są

identyczne jak glikozydów L-cukru i (S) alkoholu, co eliminuje konieczność posiadania dodatkowych wzorców. Poza optyczne czynnymi alkoholami stosuje się również inne odczynniki jak na przykład 1-fenyloetanotiol [51].

2.6. OZNACZENIE KONFIGURACJI ANOMERYCZNYCH ATOMÓW WĘGLA

W polisacharydach reszty cukrowe występują w formie pierścieni.

W wyniku zamknięcia w pierścień węgle C-1 (w przypadku aldoz) oraz C-2 (w przypadku ketoz) stają się centrum chiralnym. Konsekwencją tego procesu wiązanie glikozydowe może posiadać konfigurację α lub β (Rys. 8).



Rysunek 8. Konfiguracja α i β anomerycznego atomu węgla reszty D-glukopiranazy
Figure 8. α and β configuration of anomeric carbon atom of D-glucopyranose

Istnieje kilka sposobów ustalania konfiguracji α i β anomerycznych atomów węglia. Należą do nich między innymi:

- analiza widm NMR;
- metody enzymatyczne;
- selektywne utlenianie.

W celu określenia konfiguracji anomerycznych atomów węglia za pomocą widm magnetycznego rezonansu jądrowego korzysta się z wartości przesunięć chemicznych zarówno protonów jak i węgli anomerycznych. Wartości te znajdują się (Rys. 2):

- dla protonu H-1 anomeru α w zakresie 5,1–5,8 ppm;
- dla protonu H-1 anomeru β w zakresie 4,3–4,8 ppm;
- dla węgla anomerycznego anomeru α w zakresie 98–103 ppm;
- dla węgla anomerycznego anomeru β w zakresie 101–105 ppm. (Rys. 2)

Również stałe sprzężenia $^3J_{H_1-H_2}$ dostarczają informacji o konfiguracji anomerycznej. Stała sprzężenia $^3J_{H_1-H_2}$ o wartości 2–3 Hz świadczy o konfiguracji α , a $^3J_{H_1-H_2}$ o wartości 7–8 Hz jest dowodem na występowanie konfiguracji β . Jednak dotyczy to tylko cukrów o konfiguracji gluko- i galakto-, gdyż dla konfiguracji manno- stałe dla anomerów α i β wykazują porównywalnie małe wartości. Dodatkowo z nierożprzeczonego widma heterokorelacyjnego $^1H-^{13}C$ (HSQC) można określić stałe sprzężenia $^1J_{H_1-C_1}$. Wynoszą one ~160 i 170 Hz odpowiednio dla anomeru β (położenie aksjalne protonu anomerycznego) i anomeru α (położenie ekwatorialnego) [13, 16, 52].

Kolejnym sposobem określenia konfiguracji anomerycznej są metody enzymatyczne, wykorzystujące stereospecyficzne dla danej konfiguracji enzymy. Metodę tą

wykorzystano do ustalenia konfiguracji anomerycznej reszty mannozy występującej w antygenie O *Salmonella* grupy B, D i E, stosując α - i β -mannozydazę [53]. W ustalaniu konfiguracji anomerycznej pomocna może być metoda utleniania, w której w pełni zacetylowany polisacharyd utlenia się tlenkiem chromu(VI) w lodowatym kwasie octowym. Produkty utleniania poddaje się analizie metylacyjnej. Są one różne dla anomerów α i β , gdyż glikozydy, w których aglikon występuje w pozycji ekwatorialnej, ulegają znacznie szybciej reakcji utleniania niż te, w których aglikon występuje w pozycji aksjalnej. Polisacharyd, w którym występują wiązania α -glikozydowe jest bardzo powoli utleniany, w wyniku czego produkty analizy metylacyjnej są podobne do tych z natywnego polisacharydu. Natomiast dla polisacharydów o wiążaniach β -glikozydowych utlenianie zachodzi bardzo szybko, w rezultacie produkty metylowania są znaczowo różne [54]. Powyższą metodę zastosowano między innymi do ustalenia konfiguracji anomerycznej wiązań glikozydowych w egzopolisacharydzie wyizolowanym z *Rhodococcus* szczep 33 oraz polisacharydzie otoczkowym *Klebsiella* typ 61 [55, 56].

2.7. IDENTYFIKACJA I MIEJSCE PODSTAWIENIA SKŁADNIKÓW NIECUKROWYCH

Polisacharydy często oprócz jednostek monosacharydowych zawierają podstawniki niecukrowe, takie jak reszty acetylowe, metylowe, siarczanowe, fosforanowe i wiele innych. Identyfikacja i określenie miejsca przyłączenia tych grup jest niezbywalnym etapem badań struktury PS-u, gdyż decydują one w dużej mierze o właściwościach chemicznych i fizycznych polimeru. Najszerzej stosowana metodą identyfikacji składników niecukrowych jest analiza widm NMR. W zależności od rodzaju podstawnika obserwuje się zmiany przesunięć chemicznych zarówno protonów jak i atomów węgla w stosunku do niepodstawionej grupy. Generalizując przesunięcie chemiczne wzrasta o 0,2–0,5 ppm na widmie protonowym i 6–7 ppm na widmie węglowym po podstawieniu grup hydroksylowych polisacharydu resztą metylową, acetylową, siarczanową czy fosforanową. Dodatkowo grupy zawierające atomy wodoru i/lub węgla będą dawały charakterystyczne sygnały na widmach. Przykładowo, sygnał protonów podstawnika metylowego występuje przy ~1,1 ppm, natomiast atom węgla tej grupy daje sygnał przy 17,8 ppm na widmie węglowym. Podobnie możemy zidentyfikować resztę acetylową, której protony dają sygnał przy $\delta H \sim 2,0$ ppm, natomiast węgle odpowiednio metylowy przy $\delta C \sim 25$ ppm i karbonylowy przy $\delta C \sim 170$ ppm. Podstawienie grupą siarczanową skutkuje zwiększeniem wartości przesunięcia chemicznego o 2–5 ppm. W przypadku podstawienia grupami funkcyjnymi zawierającymi atomy azotu czy fosforu, oprócz charakterystycznych zmian w wartościach przesunięć chemicznych odpowiednich protonów i atomów węgla rejestruje się również widma azotowe (^{14}N , ^{15}N) i fosforowe (^{31}P). Przykładowo w wiązaniu fosfodiestrowym na widmie ^{31}P obserwujemy przesunięcie chemiczne w zakresie od -0,78 do +1,68 ppm, natomiast reszta fosforanowa połączona z cukrem wiązaniem monoestrowym daje sygnał przy ~4 ppm [11, 52, 57].

UWAGI KOŃCOWE

Rosnąca liczba zastosowań polisacharydów w przemyśle spożywczym, kosmetycznym czy medycynie sprawia, że konieczne staje się poznawanie struktury naturalnie występujących polisacharydów. Różnorodność występujących biopolimerów węglowodanowych sprawia, że określanie budowy tych naturalnych substancji wielokocząsteczkowych należy do wyjątkowo trudnych i pracochłonnych zadań. Duże masy cząsteczkowe, przy niewielkiej ilości pozyskiwanych do badań próbek stanowi dodatkowe wyzwanie. W artykule tym staraliśmy się przybliżyć typowe metody wykorzystywane do analizy strukturalnej polisacharydów i mamy nadzieję, że dla zainteresowanych stanowić on będzie wprowadzenie w tę problematykę i zachętą do pogłębienia wiedzy w oparciu o literaturę anglojęzyczną [58, 59].

PODZIĘKOWANIE

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

PIŚMIENIICTWO CYTOWANE

- [1] J.A. de Vries, F.M. Rombouts, A.G.J. Voragen, W. Pilnik, Carbohydr. Polym., 1984, **4**, 89.
- [2] B. Lindberg, B. Lindqvist, J. Lönngren, D.A. Powell, Carbohydr. Res., 1980, **78**, 111.
- [3] J. Azeredo, R. Oliveira, V. Lazarova, Wat. Sci. Tech., 1998, **37**, 367.
- [4] M. Kuzma, B. Clack, J. Edwards, R. Tylingo, J. Samaszko, J. Madaj, Carbohydr. Res., 2012, **348**, 84.
- [5] Y. Wang, Z. Cheng, J. Mao, M. Fan, X. Wu, Carbohydr. Polym., 2009, **77**, 713.
- [6] X. Wang, H.L. Ma, Chin. Food Sci. Technol., 2007, **9**, 99.
- [7] L.A. de Weger, B. Jann, K. Jann, B. Lugtenberg, J. Bacteriol., 1987, **169**, 1441.
- [8] L.A. de Weger, G.V. Bloemberg, T. van Wezel, M. van Raamsdonk, D.C. Glandorf, J. van Vuurde, K. Jann, B.J. Lugtenberg J. Bacteriol., 1996, **178**, 1955.
- [9] S.R. Sudhamani, R.N. Tharanthan, M.S. Prasad, Carbohydr. Polym., 2004, **56**, 423.
- [10] S. Omarsdottir, B.O. Petersen, B.S. Paulsen, A. Togola, J.Ø. Duus, E.S. Olafsdottir, Carbohydr. Res., 2006, **341**, 2449.
- [11] D.I. Grice, J.C. Wilson, *Analytical approaches towards the structural characterization of microbial wall glycopolymers*, [w:] *Microbial Glycobiology*, A. Moran, P.J. Brennan, M. von Itzstein (Red.) , San Diego, CA, Academic Press 2010.
- [12] F.N. Lamari, R. Kuhn, N.K. Karamanos, J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci., 2003, **793**, 15.
- [13] J.Ø. Duus, C.H. Gotfredsen, C. Bock, Chem. Rev., 2000, **100**, 4589.
- [14] J.C. Michalski, *Methods on Glycocomplexes*, A. Verbert (Red.), Harwood Academic Publishers, 1995.
- [15] J.H. Pazur, *Carbohydrate Analysis*, M.F. Chaplin, J.F. Kennedy (Red.), Oxford University Press, 1994.
- [16] J. Szafranek, Zagadnienia Biofizyki Współczesnej, 1988, **13**, 129.
- [17] D. Asa, American Laboratory, 2006, **38**, 16.
- [18] M.M. Bernárdez, J.M. Miguélez, J.G. Queijo, J. Food Comp. Anal., 2004, **17**, 63.

- [19] R. Slimestad, I.M. Vågen, *J. Chromatogr. A*, 2006, **1118**, 281.
- [20] S.I. Hakomori, *J. Biochem. (Tokyo)*, 1964, **55**, 205.
- [21] J. Ciucanu, F. Kerek, *Carbohydr. Res.*, 1984, **131**, 209.
- [22] P. Prehm, *Carbohydr. Res.*, 1980, **78**, 372.
- [23] R. Kuhn, H. Trischmann, I. Löw, *Angew. Chem.*, 1955, **67**, 184.
- [24] M.A. Olsthoorn, B.O. Petersen, S. Schlecht, J. Haverkamp, K. Bock, J.E.T. Oates, O. Holst, *J. Biol. Chem.*, 1998, **273**, 3817.
- [25] Y.A. Knirel, E. Vinogradov, N. Jimenez, S. Merino, J.M. Tomas, *Carbohydr. Res.*, 2004, **339**, 787.
- [26] H. Masoud, E. Altman, J.C. Richards, J.S. Lam, *Biochemistry*, 1994, **33**, 10568.
- [27] E. Vinogradov, K. Drift, J.E. Thomas-Oates, S. Meshkov, H. Brade, O. Holst, *Eur. J. Biochem.*, 1999, **261**, 629.
- [28] T.J. Waeghe, A.G. Darvill, M. McNeil, P. Albersheim, *Carbohydr. Res.*, 1983, **123**, 281.
- [29] A. Tacken, H. Brade, *Carbohydr. Res.*, 1986, **149**, 263.
- [30] D.H. Shaw, M.J. Hart, O. Lüderitz, *Carbohydr. Res.*, 1992, **231**, 83.
- [31] E. Jansson, A.A. Lindberg, B. Lindberg, R. Wollin, *Eur. J. Biochem.*, 1981, **115**, 571.
- [32] V.M.F. Gonçalves, A. Reis, M.R.M. Domingues, J.A. Lopes-da-Silva, A.M. Fialho, L.M. Moreira, I. Sá-Correia, M.A. Coimbra, *Carbohydr. Polym.*, 2009, **77**, 10.
- [33] Z. Kaczyński, J. Gajdus, H. Dziadziuszko, P. Stepnowski, *J. Pharm. Biochem. Anal.*, 2009, **50**, 679.
- [34] J. Szafranek, J. Kumirska, M. Czerwicka, D. Kunikowska, H. Dziadziuszko, R. Głosnicka, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2006, **48**, 223.
- [35] J.C. Michalski, *Methods on Glycocomjugates*, A. Verbert (Ed.), Harwood Academic Publishers, 1995.
- [36] T.S. Stewart, P.B. Mendershausen, C.E. Ballou, *Biochemistry*, 1968, **7**, 1843.
- [37] B.L. Lindberg, J. Lönngren, S. Svensson, *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 1975, **31**, 185.
- [38] A.O. Chizhov, A. Dell, H.R. Morris, S.M. Haslam, R.A. McDowell, A.S. Shashkov, N.E. Nifant'ev, E.A. Khatuntseva, A.I. Usov, *Carbohydr. Res.*, 1999, **320**, 108.
- [39] J. Kocurek, C.E. Ballou, *J. Bacteriol.*, 1969, **100**, 1175.
- [40] J. Kumirska, J. Szafranek, M. Czerwicka, M. Gołębiowski, M. Paszkiewicz, H. Dziadziuszko, D. Kunikowska, P. Stepnowski, *Carbohydr. Res.*, 2008, **343**, 1120.
- [41] H. Nanakai, W. Hashimoto, H. Miki, S. Kawai, K. Murata, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, **65**, 2520.
- [42] K. Kaluarachchi, C.A. Bush, *Anal. Biochem.*, 1989, **179**, 209.
- [43] H. Roth, S. Segal, D. Bertoli, *Anal. Biochem.*, 1965, **10**, 35.
- [44] T. Lipiński, Ch. Jones, X. Lemercinier, A. Korzeniowska-Kowal, M. Strus, J. Rybka, A. Gamian, P. B. Heczkó, *Carbohydr. Res.*, 2003, **338**, 605.
- [45] G.J. Gerwig, J.P. Kamerling, J.F.G. Vliegenthart, *Carbohydr. Res.*, 1979, **77**, 1.
- [46] K. Leontine, B. Lindberg, J. Lönngren, *Carbohydr. Res.*, 1978, **62**, 359.
- [47] H. Bretting, G. Jacobs, I. Benecke, W. Konig, J. Thiem, *Carbohydr. Res.*, 1985, **77**, 225.
- [48] J. Heinrich, W.A. König, H. Bretting, P. Mischnick, *Carbohydr. Res.*, 1997, **299**, 1.
- [49] W.S. York, S. Hantus, P. Albersheim, A.G. Darvill, *Carbohydr. Res.*, 1997, **300**, 199.
- [50] A.S. Shashkov, G.M. Lipkind, Y.A. Knirel, N.K. Kochetkov, *Magnet. Reson. Chem.* 1988, **26**, 735.
- [51] L. Lindqvist, P.E. Jansson, *J. Chromatogr. A*, 1997, **769**, 253.
- [52] L. Yang, L.M. Zhang, *Carbohydr. Polym.*, 2009, **76**, 349.
- [53] M. Fukuda, F. Egami, G. Hämerling, O. Lüderitz, G. Bagdian, A.M. Staub, *Eur. J. Biochem.*, 2005, **20**, 438.
- [54] J.H. Pazur, *Carbohydrate Analysis*, M.F. Chaplin, J.F. Kennedy (Ed.), Oxford University Press, 1994.

- [55] T.R. Neu, T. Dengler, B. Jann, K. Poralla, *J. Gen. Microbiol.*, 1992, **138**, 2531.
- [56] A.S. Rao, N. Roy, *Carbohydr. Res.*, 1979, **76**, 215.
- [57] J. Ganeshapillai, E. Vinogradov, J. Rousseau, J.S. Weese, A. Monteiro, *Carbohydr. Res.*, 2008, **343**, 703.
- [58] J. Wingender, T.R. Neu, H-C. Flemming, *Microbial Extracellular Polymeric Substances Characterization, Structure and Function* Springer (Red.), 1999.
- [59] S.W. Cui, *Food Carbohydrates Chemistry, Physical Properties, and Applications*, Chapter 3. Structural Analysis of Polysaccharides, S.W. Cui (Red.), CRC, 2005.

Praca wpłynęła do Redakcji 13 czerwca 2016

1'-HOMONUKLEOZ(T)YDY – SYNTEZA I AKTYWNOSĆ BIOLOGICZNA

1'-HOMONUCLEOS(T)IDES – SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY

Joanna Gotkowska*, Dorota G. Piotrowska

*Zakład Chemii Bioorganicznej, Wydział Farmaceutyczny,
Uniwersytet Medyczny w Łodzi
ul. Muśnickiego 1, 90-151 Łódź
e-mail: joanna.gotkowska@umed.lodz.pl

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wstęp

1. 1'-Homonukleozydy

2. 1'-Homo-2'-deoksynukleozydy

3. 1'-Homo-4'-dehydroksymetyltonukleozydy

4. 1'-Homo-2',3'-dideoksy-2',3'-dehydronukleozydy

5. Pochodne fosfonianowe

Podsumowanie

Podziękowanie

Piśmiennictwo cytowane

Mgr Joanna Gotkowska ukończyła studia magisterskie na Wydziale Chemiczny Uniwersytetu Łódzkiego w 2009 r. Po studiach rozpoczęła pracę na stanowisku asystenta w Zakładzie Chemii Bioorganicznej na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. W swojej pracy naukowej zajmuje się syntezą nitronów pochodnych nukleozasad oraz zastosowaniem ich w reakcjach 1,3-dipolarnej cykloaddycji.

Dr hab. Dorota G. Piotrowska studiowała chemię (1991–1996) na Wydziale Chemicznym Politechniki Łódzkiej, w 2002 roku uzyskała stopień doktora nauk farmaceutycznych na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, a w roku 2011 – stopień doktora habilitowanego nauk chemicznych na Wydziale Chemiczny Uniwersytetu Łódzkiego. Jej zainteresowania naukowe dotyczą, m.in. syntezy nitronów i ich zastosowania w reakcjach dipolarnej cykloaddycji, syntezy i stereochemii nowych pochodnych heterocyklicznych jako fosfonianowych mimetyków nukleozydów i nukleotydów o potencjalnych właściwościach przeciwnowotworowych i przeciwwirusowych oraz zastosowania spektroskopii NMR w analizie konfiguracyjnej i konformacyjnej.

ABSTRACT

Long-lasting interest in the synthesis of nucleos(t)ide analogues is dictated by hope to obtain compounds possessing antibacterial, antiviral and antitumor activities [1, 2]. Introduction of a methylene linker between an anomeric carbon and the nucleobase nitrogen atom produces a new class of compounds called 1'-homonucleos(t)ides as potentially active analogues. Although a sugar ring in nucleosides can be replaced by several cyclic or even acyclic moieties we focus attention on compounds containing the tetrahydrofuran ring. Since methods of attachment of nucleobases are limited to their alkylation with appropriate compounds and the *de novo* synthesis we discussed various synthetic approaches to substituted tetrahydrofuranes in racemic or optically pure forms. Various pentose and hexose derivatives were employed as starting materials and their transformations into the final sugar frameworks were detailed, thus revealing the importance of these class of compounds. To prepare deoxysugars Barton-McCombie reaction sequence was applied.

A significant number of final 1'-homonucleos(t)ides were screened for antiviral and cytotoxic activity to identify a few very potent compounds. Thus, phosphonates *trans*- and *cis*-**138a** were as active against HCMV as ganciclovir. In addition *trans*-**138a** inhibited the proliferation of several murine and human cancer cell lines with IC₅₀s in the μM range. 1'-Homonucleosides **64b** and **66b** exhibited selective antiviral activity against HSV-1 TK⁻ and HSV-2 TK⁻ (MIC = 8–12 μg/mL). Compound **129** was found active against HCV (EC = 6.31 μM) and reduced growth of CCRF-CEM cells with IC₅₀ = 5.73 μM.

Despite limited activity observed so far for the known 1'-homonucleos(t)ides and their analogues, they deserve further interest both from the synthetic point of view and biological potential inherent in molecules having nucleobase scaffolds.

Keywords: nucleoside analogues, 1'-homonucleos(t)ides, substituted tetrahydrofurans, modified monosaccharides, biological activity

Słowa kluczowe: analogi nukleozydów, 1'-homonukleoz(t)ydy, podstawione tetrahydrofurany, modyfikowane monosacharydy, aktywność biologiczna

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

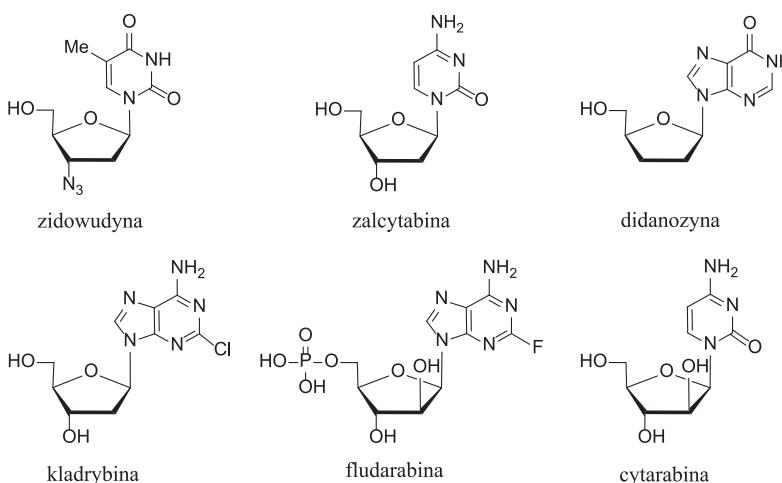
AIBN	– azobis(izobutyronitryl)
BSTFA	– <i>N,O</i> -bis(trimetylosililo)trifluoroacetamid
DCC	– <i>N,N'</i> -dicykloheksylokarbodiimid
DEAD	– azodikarboksylan dietylu
DIBAL	– wodorek diizobutyloglinowy
DIPEA	– diizopropyloloetyloamina
DMAP	– 4-(dimetyloamino)pirydyna
EDC	– 1-etyl-3-(3-dimetyloaminopropylo)karbodiimid
HCMV	– wirus cytomegalii
HCV	– wirus zapalenia wątroby typu C
HIV-1,2	– ludzki wirus niedoboru odporności typu 1, 2
HSV-1,2	– wirus opryszczki pospolitej
MCPBA	– kwas <i>m</i> -chloronadbenzoëowy
MTO	– metylotrioksoren(VII)
NB	– nukleozasada
NMO, NMMO	– <i>N</i> -tlenek <i>N</i> -metylomorfolinę
PDC	– dichromian pirydyny
TBAF	– fluorek tetrabutyloamoniowy
TBDPSCl	– <i>tert</i> -butyldifenylochlorosilan
TBDMSCl	– chlorek <i>tert</i> -butyldimetylosililu
TFA	– kwas trifluorooctowy
THP	– tetrahydropiranył
TIPDSCl ₂	– 1,3-dichloro-1,1,3,3-tetraizopropylodisilosan
TMSCl	– chlorek trimetylosililu
TMSBr	– bromek trimetylosililu
TMSOTf	– trifluorometanosulfonian trimetylosililu
t. pok.	– temperatura pokojowa
VZV	– wirus ospy wietrznej i półpaśca
VV	– wirus krowianki

WSTĘP

Analogi nukleozydów wykazują właściwości m.in. przeciwwirusowe i przeciwnowotworowe, a wiele z nich jest stosowanych jako leki. Jest to inspiracją do dalszych poszukiwań aktywnych związków. Modyfikacje budowy nukleozydów mogą być dokonane w trzech fragmentach cząsteczki:

- w obrębie pierścienia cukrowego;
- w obrębie nukleozasady;
- w sposobie połączenia pierścienia cukrowego z nukleozasadą.

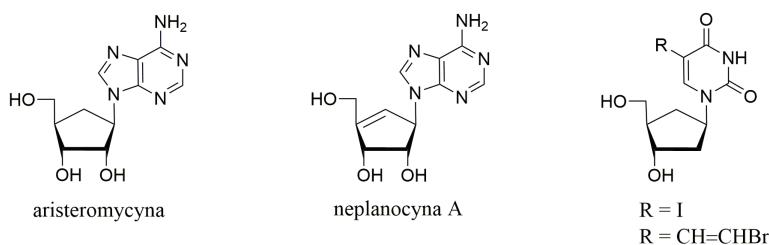
Doprowadziło to do otrzymania wielu związków o aktywności przeciwwirusowej [1], np.: zidowudyna (AZT), zalcytabina, didanozyna, jak również przeciwnowotworowej: kladrybina, fludarabina, cytarabina (Rys. 1).



Rysunek 1. Przykłady modyfikowanych nukleozydów stosowanych w lecznictwie

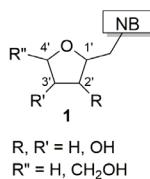
Figure 1. Examples of modified nucleosides used in therapy

Ważny sposób modyfikacji fragmentu cukrowego polega na zastąpieniu go przez pierścień cyklopentanowy. Aktywne związki o takiej budowie, np.: aristeromycyna [3, 4], neplanocyna A [5] wyodrębniono najpierw jako produkty naturalne (Rys. 2). Ich aktywność biologiczna jest związana z odpornością na działanie enzymów hydrolizujących naturalne wiązanie N-glikozydowe (O–C–N), które zostało w nich zastąpione przez układ C–C–N, co prowadzi do zwiększenia trwałości metabolicznej analogów.



Rysunek 2. Naturalnie występujące karbocykliczne analogi nukleozydów (CAN)
Figure 2. Naturally occurring carbocyclic analogues of nucleosides (CAN)

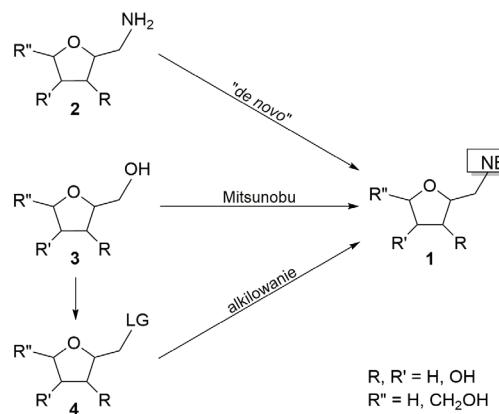
Jednakże ten sam efekt można uzyskać wprowadzając łącznik metylenowy pomiędzy nukleozasadą a fragmentem cukrowym otrzymując nową klasę związków – 1'-homonukleozydy (Rys. 3).



Rysunek 3. 1'-Homonukleozydy **1** (NB – nukleozasada)
Figure 3. 1'-Homonucleosides **1** (NB – nucleobase)

Pomimo obecności mostka metylenowego umożliwiającego swobodną rotację wokół wiązań łączących fragment cukrowy z heterocyklicznym i zwiększenia odległości nukleozasad od ugrupowania HO-C(5'), 1'-homonukleozydy są substratami dla enzymów komórkowych oraz ulegają parowaniu zgodnie z regułami Watsona-Cricka. Ponadto w 1'-homonukleozydach nie występuje anomeryczny atom węgla, co powoduje, że dowolny pierścień pięcioczłonowy zastępujący układ furanozydowy może przyjąć charakterystyczną dla siebie konformację bez udziału efektów stereo-elektronowych, które również nie będą wpływać na jego zmiany konformacyjne.

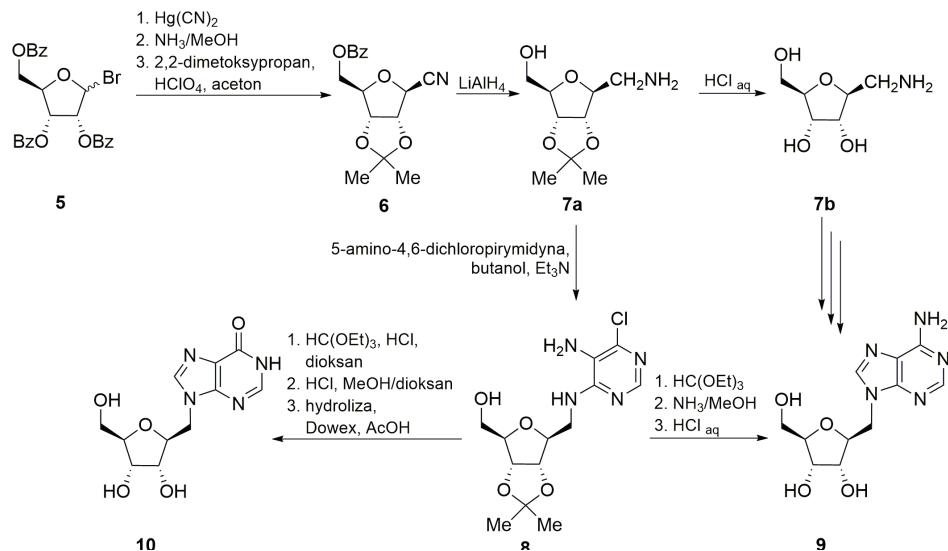
1'-Homonukleozydy **1** otrzymuje się wykorzystując trzy ogólne strategie, a materiałami wyjściowymi są związki zawierające pierścień tetrahydrofuranowy sfunkcjonalizowany przy C1' (Schemat 1). W przypadku pochodnych z grupą aminometylową (CH₂NH₂) **2** atom azotu zostaje włączony do pierścienia pirymidynowego (N1) albo purynowego (N9) – syntezy *de novo*. Pochodne zawierające grupę hydroksymetylową **3** można poddać reakcji Mitsunobu [6–8], zaś po przekształceniu grupy hydroksymetylowej **3** w dobrą grupę opuszczającą związki **4** można użyć do alkilowania soli nukleozasad. Niniejsze opracowanie obejmuje prace, które ukazały się do końca 2015 roku.



Schemat 1. Strategie syntezy 1'-homonukleozydów 1
 Scheme 1. Synthetic strategies for 1'-homonucleosides 1

1. 1'-HOMONUKLEOZYDY

Pierwsze metody otrzymywania 1'-homonukleozydów 1 polegały na skonstruowaniu *de novo* pierścienia nukleozasady [9, 10]. 1'-Homoadenozynę 9 otrzymano wychodząc z bromku 2,3,5-tri-O-benzoilo-d-rybofuranozy 5, który w trzech etapach przekształcono w związek 6, a następnie poddano redukcji otrzymując pierwszorzędowąaminę 7a (Schemat 2) [10].



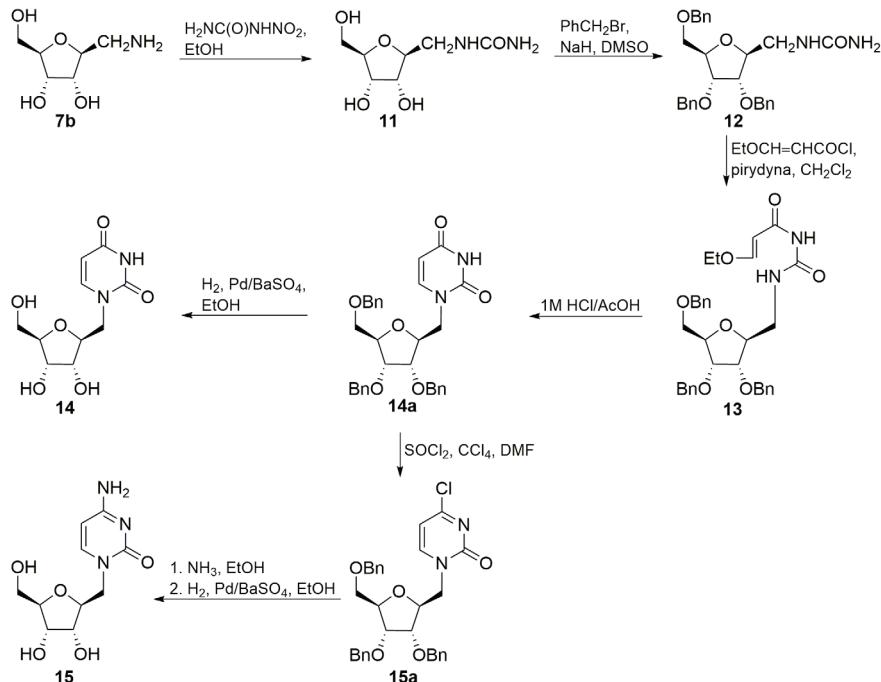
Schemat 2. Synteza pochodnych purynowych 9 i 10
 Scheme 2. Synthesis of purine derivatives 9 and 10

W wyniku reakcji ochronionej aminy **7a** z 5-amino-4,6-dichloropirymidyną powstała pochodna **8**, która w obecności ortomrówczanu etylu uległa cyklizacji. Fragment 6-chloropurynowy był prekursorem 1'-homoadenozyny **9**, którą otrzymano w wyniku hydrolizy grupy izopropylidenowej.

Równocześnie wykazano, że w analogicznej syntezie 1'-homoadenozyny **9** nie jest wymagana ochrona grup hydroksylowych i w reakcji z 5-amino-4,6-dichloropirymidyną może być użyty triol **7b** [11]. Ponadto, związek **8** wykorzystano w syntezie 1'-homoinozyny **10** [11].

Niestety okazało się, że 1'-homoadenozyyna **9** jak i purynowa pochodna **10** nie wykazują właściwości inhibujących wzrost *Escherichia coli* przy stężeniu powyżej 1 mg/mL [11].

Syntezy 1'-homourydyny **14** i 1'-homocytydyny **15** zrealizowano wychodząc z 1-deoksy-1-amino-2,5-anhydro-D-allitolu **7b** (Schemat 3), z którego w reakcji z nitromocznikiem powstała pochodna **11**. Ochroniono trzy grupy hydroksylowe za pomocą bromku benzylu, a następnie poddanie związku **12** reakcji z chlorkiem β -etoksyakryloilu pozwoliło otrzymać amid **13**. Cyklizacja **13** doprowadziła do powstania pochodnej 1'-homourydyny **14a**, z której po wodorolizie otrzymano końcowy produkt **14**. 1'-Homocytydynę **15** otrzymano w dwuetapowej reakcji wychodząc z ochronionej 1'-homourydyny **14a** (Schemat 3).

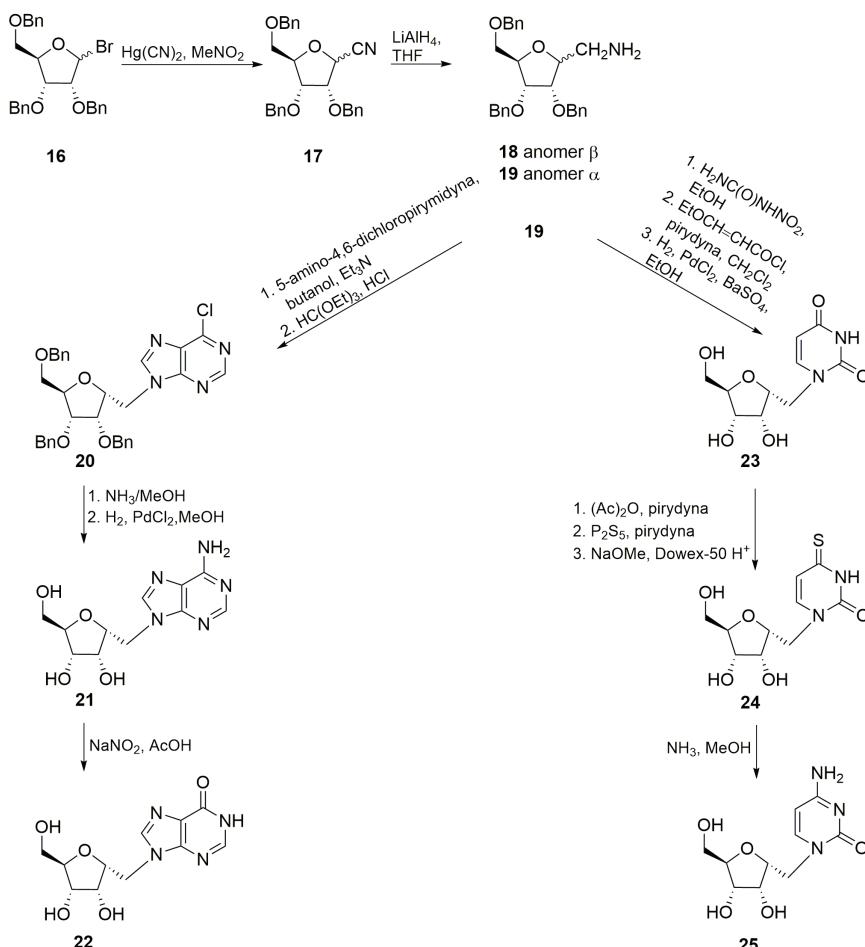


Schemat 3. Synteza 1'-homourydyny **14** i 1'-homocytydyny **15**

Scheme 3. Synthesis of 1'-homouridine **14** and 1'-homocytidine **15**

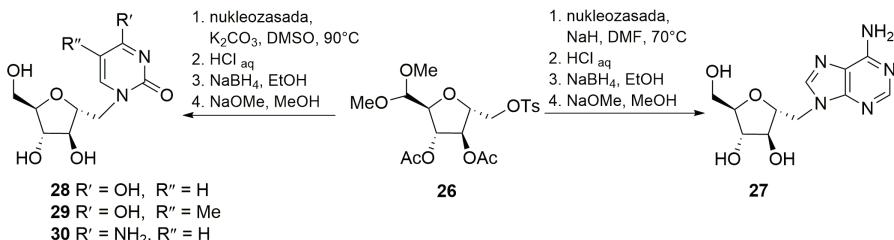
Zarówno 1'-homourydynę **14** jak i 1'-homocytydynę **15** uzyskano z dobrymi wydajnościami, odpowiednio 91 i 71%. Związki **14** i **15** nie wykazywały właściwości inhibujących bakterie pałeczki okrężnicy (*Escherichia coli*) przy stężeniu 100 µg/ml [9].

Zsyntetyzowano również 1'-homonukleozydy zawierające fragment nukleozaady w nienaturalnej pozycji α . Aby to osiągnąć zastosowano bromek 2,3,5-tri-O-benzylo-D-rybofuranozy **16**, który poddano sekwencji reakcji opisanej na Schemacie 4 otrzymując mieszaninę 1 : 2 diastereoizomerycznych amin **18** i **19**, które zostały rozdzielone [12]. Substratem w syntezech *de novo* pseudoanomerów α 1'-homoadenozyny **21**, 1'-homoinozyny **22**, 1'-homourydyny **23**, 1'-homocytydyny **25** była powstająca w mniejszej ilości ochroniona amina **19**.



Schemat 4. Synteza α 1'-homoadenozyny **21**, 1'-homoinozyny **22**, 1'-homourydyny **23**, 1'-homocytydyny **25**
Scheme 4. Synthesis of α 1'-homoadenine **21**, 1'-homoinosine **22**, 1'-homouridine **23**, 1'-homocytidine **25**

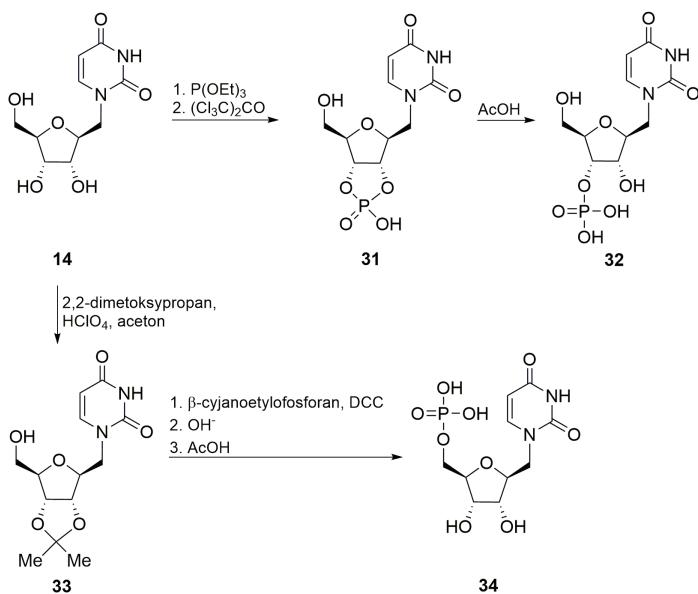
Znane są również pseudoanomery α 1'-homonukleozydów zawierające pierścienie furanozowe o konfiguracji *arabino* [13]. Analigi zawierające reszty adeniny 27, uracylu 28, tyminy 29 i cytozyny 30 otrzymano z acetalu 26 (Schemat 5). Określono także aktywność cytotoksyczną na linii nowotworowej białaczki mysiej L1210 LD₅₀, która wynosiła dla 29 600 mg/kg a dla 27 i 30 50–1500 mg/kg [13].



Schemat 5. Synteza α 1'-homonukleozydów 27–30

Scheme 5. Synthesis of α 1'-homonucleosides 27–30

W celu zbadania mechanizmu działania enzymów nukleolitycznych zsyntetyzowano fosforanowe pochodne 1'-homourydyny 32 i 34 (Schemat 6).



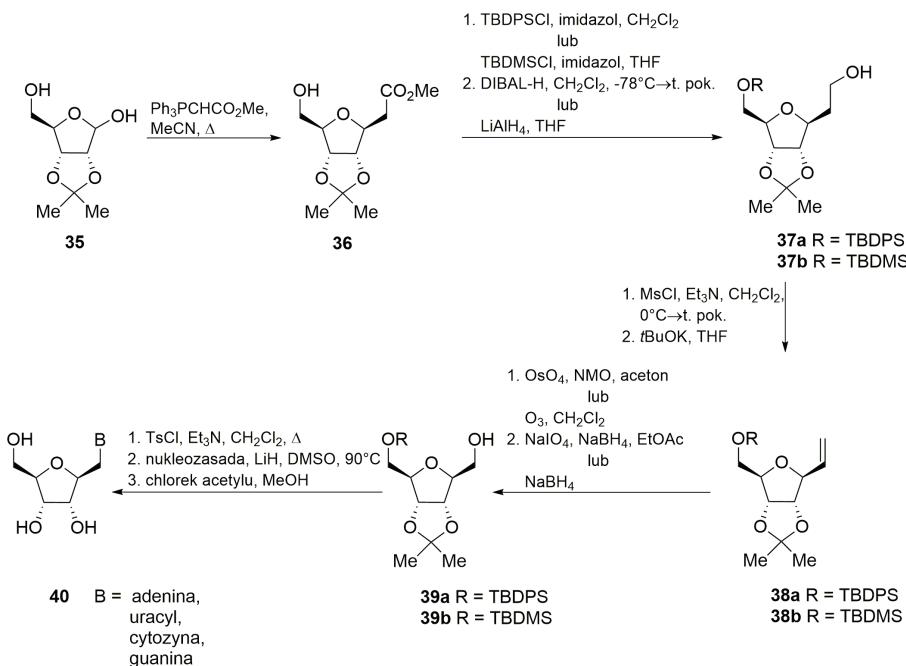
Schemat 6. Synteza fosforanowych pochodnych 1'-homourydyn 32 i 34

Scheme 6. Synthesis of phosphate derivatives of 1'-homouridine 32 and 34

Okazało się, że nawet duży nadmiar rybonukleazy trzustkowej A nie powodował hydrolizy cyklicznego fosforanu 31 [14]. Natomiast taka hydroliza związku 31 miała miejsce w obecności rybonukleazy T2, aczkolwiek reakcja była dużo wolniejsza w porównaniu z szybkością hydrolizy 2',3'-cyklicznego fosforanu urydyny.

5'-O-Fosforan 1'-homourydyny **34** okazał się całkowicie odporny wobec 5'-nukleotydydy jadu grzechotnika diamentowego (*Crotalus adamanteus*) i daboji łańcuszowej (*Vipera russelli*) [14].

W ogólnej metodzie syntezy zarówno purynowych jak i pirymidynowych 1'-homonukleozydów wykorzystano reakcję Wittiga z pochodną D-rybozy **35** (Schemat 7) [7, 15]. W pierwszym etapie utworzył się α,β -nienasycony ester, z którego w zasadowych warunkach reakcji w wyniku wewnętrzczasteczkowej addycji Michaela powstał diastereoizomerycznie czysty ester **36**. Przekształcenie związku **36** w alkohol **39a** zrealizowano w sekwencji reakcji obejmujących najpierw ochronę grupy hydroksylowej i redukcję funkcji estrowej, co doprowadziło do powstania **37a**. W celu usunięcia jednego atomu węgla z alkoholu **37a** otrzymano najpierw alken **38a**, a następnie w wyniku dihydroksylowania, utleniania diolu i redukcji aldehydu powstał kluczowy alkohol **39a**. Aktywacja grupy hydroksylowej w **39a** w wyniku przekształcenia w tosylan umożliwia efektywne alkilowanie wybranych nukleozasad, w wyniku czego otrzymano 1'-homonukleozydy **40** (Schemat 7) [15].

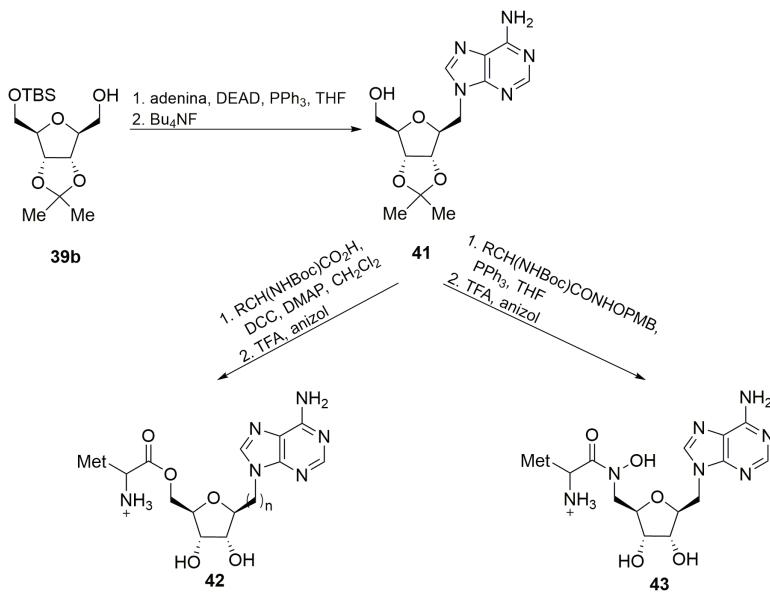


Schemat 7. Synteza 1'-homonukleozydów **40**

Scheme 7. Synthesis of 1'-homonucleosides **40**

Identyczną drogę syntezy 1'-homonukleozydów opisano wcześniej [7] dokumentując ją otrzymaniem 2',3'-O-izopropylidenowej pochodnej 1'-homoadenozyny **41**. We wcześniejszej pracy wykorzystano *tert*-butyldimetylosilową grupę ochronną, alken **38b** (Schemat 7) potraktowano ozonem, a odpowiednie ozonki

zredukowano do pochodnej **39b** i w końcu do alkilowania adeniny zastosowano reakcję Mitsunobu otrzymując związek **41** (Schemat 8).

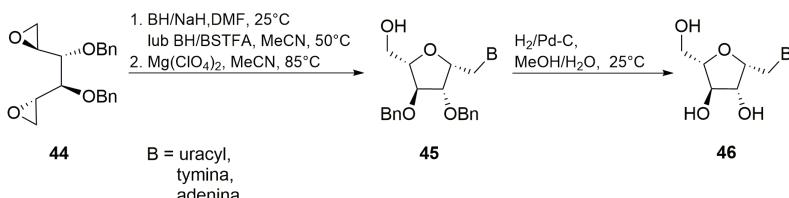


Schemat 8. Synteza analogów 1'-homonukleozydów jako potencjalnych inhibitorów syntetazy metionylo-tRNA **42** i **43**

Scheme 8. Synthesis of 1'-homonucleosides analogues as potential inhibitors of methionyl-tRNA **42** and **43**

Analogi 1'-homonukleozydów badano również jako potencjalne inhibitory syntetaz metionylo-tRNA i izoleucylo-tRNA (Schemat 8) [7]. Z produktu pośredniego **41** w odpowiednich warunkach uzyskano ester metioniny **42** ($n = 1$) i analog hydroksamowy **43** (Schemat 8). Wykazano, że związek **42** ($n = 1$) jest inhibitorem syntetazy metionyloowej-tRNA *Escherichia coli* o $IC_{50} = 3,6 \mu\text{M}$. Jednakowoż, wpływ łącznika metylenowego jest nieznaczny, ponieważ równocześnie ustalono, że aktywności nukleozydu **42** ($n = 0$) i homologu **42** ($n = 2$) wobec syntetazy metionylo-tRNA były zbliżone i wynosiły odpowiednio – 5,0 i 8,3 μM [7].

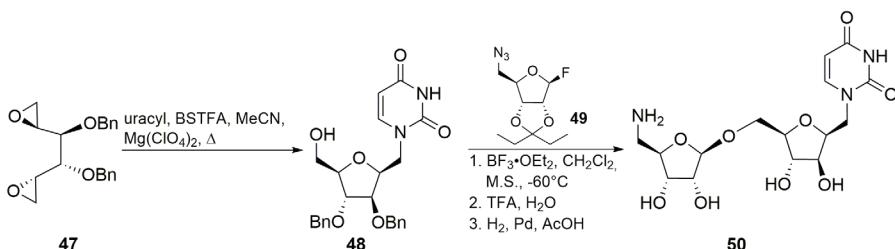
Efektywną metodą syntezy wiązania C–N pomiędzy atomem węgla reszty cukrowej a atomem azotu nukleozasady jest otwarcie pierścienia oksiranowego. W przypadku zastosowania 1,2:5,6-dianhydro-3,4-di-O-benzylo-D-mannitolu **44** otwarcie pierścienia oksiranowego za pomocą nukleozasady wywołuje nastęczącą reakcję cyklizacji z utworzeniem pierścienia tetrahydrofuranowego (Schemat 9) [16, 17].



Schemat 9. Synteza analogów 1'-homonukleozydów **46**
Scheme 9. Synthesis of 1'-homonucleosides analogues **46**

Istotny wpływ na wydajność końcowych 1'-homonukleozydów **46** mają warunki pierwszego etapu reakcji. Użycie soli sodowych adeniny, tyminy i uracylu doprowadziło do uzyskania produktów **45** z niskimi (11–19%) wydajnościami. Zastosowanie trimetylosilolowych pochodnych nukleozasad i kwasu Lewisa jako katalizatora znacznie podwyższyło (51–54%) wydajności związków **45**, które następnie prawie ilościowo przekształcono w 1'-homonukleozydy **46** [16, 17].

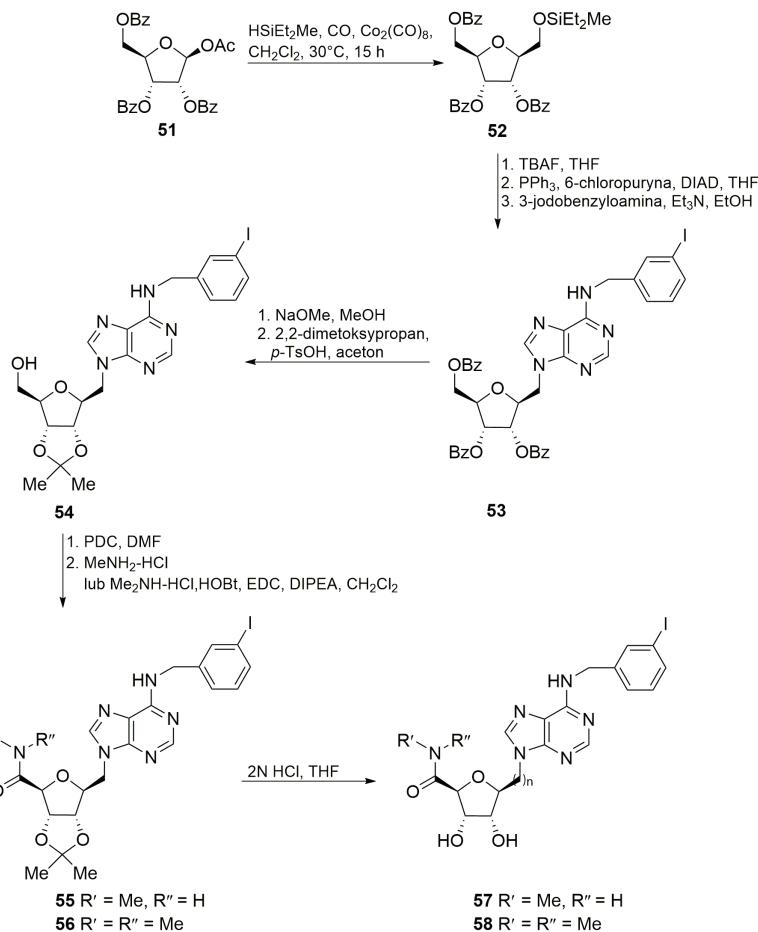
Postępując analogicznie jak w syntezie zaprezentowanej na Schemacie 9 z 1,2:5,6-dianhydro-3,4-di-O-benzylo-L-idiitolu **47** otrzymano ochroniony 1'-homonukleozyd **48**, który w reakcji z fluorkiem furanozylowym **49** przekształcono w związek **50** (Schemat 10). Okazało się, że cząsteczka **50** hamuje (81%) przy stężeniu 2 mM aktywność transferazy MraY bakterii laseczki siennej (*Bacillus subtilis*) $IC_{50} = 580 \mu\text{M}$ [18, 19].



Schemat 10. Synteza farmakoforu **50**
Scheme 10. Synthesis of the pharmacophore **50**

Poszukując ligandów receptora adenozynowego A3 opracowano nową metodę syntezy modyfikowanych 1'-homonukleozydów **57** i **58** (Schemat 11). 1-O-Acetyl-2,3,5-tri-O-benzoilo- β -D-rybofuranozę **51** potraktowano tlenkiem węgla i dietylo-metylosilanem (HSiEt_2Me) w obecności katalitycznych ilości karbonylku kobaltu uzyskując silową pochodną **52**, którą w trzech etapach przekształcono w związek **53**. Usunięcie benzoilowych grup ochronnych, a następnie izopropylidenowanie doprowadziło do utworzenia **54**, w którym grupę hydroksymetylową utleniono do karboksylowej. Z powstałego kwasu uzyskano amidy **55** i **56**, a po usunięciu izopropylidynowej grupy ochronnej otrzymano odpowiednie 1'-homonukleozydy **57** ($n = 1$) i **58** ($n = 1$) (Schemat 11) [20]. Nie wykazywały one istotnego powinowactwa z trzema pod-

typami receptorów adenozynowych w przeciwnieństwie do nukleozydu **57** ($n = 0$) ($K_i = 1,0 \text{ nM}$) [20]. Brak powinowactwa autorzy zinterpretowali jako skutek obecności **57** ($n = 1$) i **58** ($n = 1$) mostka metylenowego, który przyczynia się do przyjmowania przez cząsteczki wielu konformacji prowadząc przez to do niekorzystnych interakcji z miejscem wiążącym receptora [21, 22].

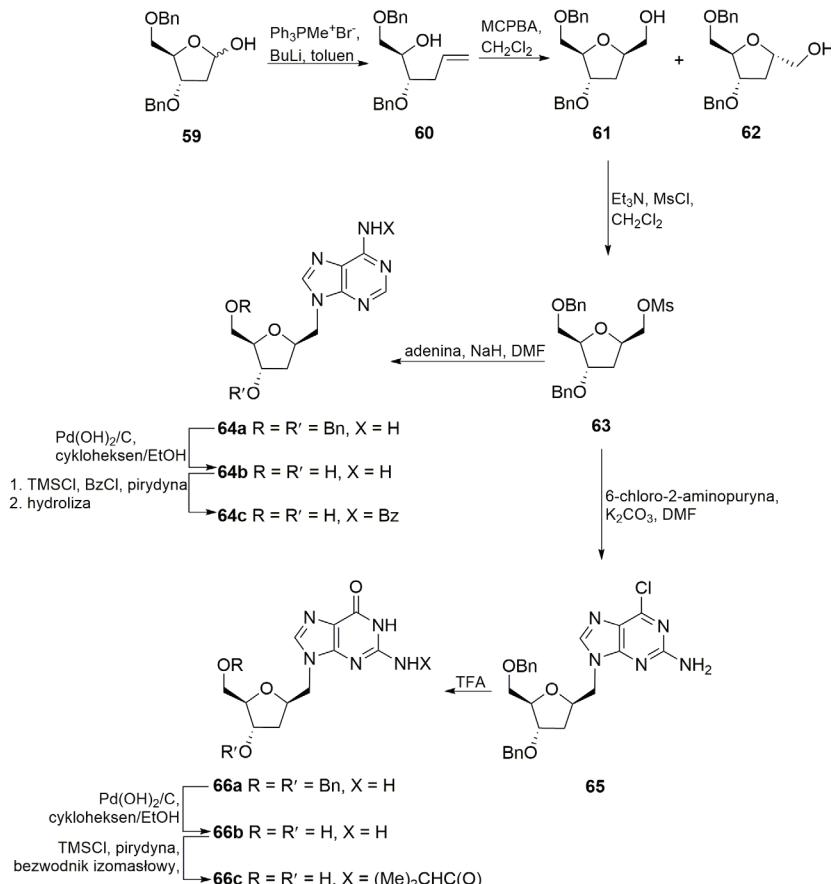


Schemat 11. Synteza potencjalnych ligandów receptora adenozynowego A3 **57** i **58**
Scheme 11. Synthesis of potential A3 adenosine receptor ligands **57** and **58**

2. 1'-HOMO-2'-DEOKSYNUKLEOZYDY

W syntezie 1'-homo-2'-deoksynukleozydów **64b** i **66b** (Schemat 12) ochronioną 2-deoksy-D-rybozę **59** przekształcono w równomolową mieszaninę C-glikozydów **61** i **62** wykorzystując reakcję Wittiga, a następnie spontaniczne otwarcie terminalnego epitlenku prowadzące do utworzenia pierścieni-

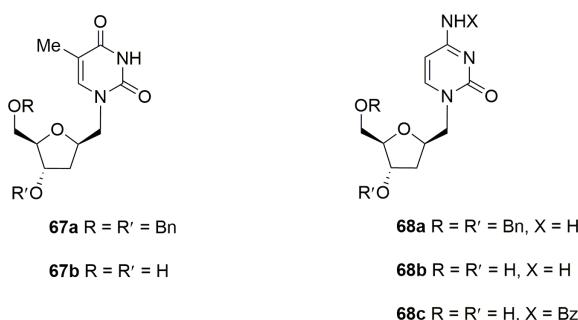
nia pięcioczłonowego. W reakcji soli sodowej adeniny z mesylanem **63** powstał 1'-homonukleozyd **64a**, zaś produktem reakcji z 2-amino-6-chloropuryną był związek **65** przekształcony w standardowych warunkach w 1'-homonukleozyd **66a**. Po wodorolitycznym usunięciu benzylowych grup ochronnych otrzymano 1'-homo-2'-deoxynukleozydy **64b** i **66b** [23].



Schemat 12. Synteza purynowych 1'-homo-2'-deoxynukleozydów **64b** i **66b**

Scheme 12. Synthesis of purine-containing 1'-homo-2'-deoxynucleosides **64b** and **66b**

Wykorzystując tę samą strategię otrzymano pirymidynowe analogi 1'-homonukleozydów: pochodne tyminy **67** oraz cytozyny **68** (Rys. 4) [23].



Rysunek 4. Pirymidynowe analogi 1'-homonukleozydów 67 i 68

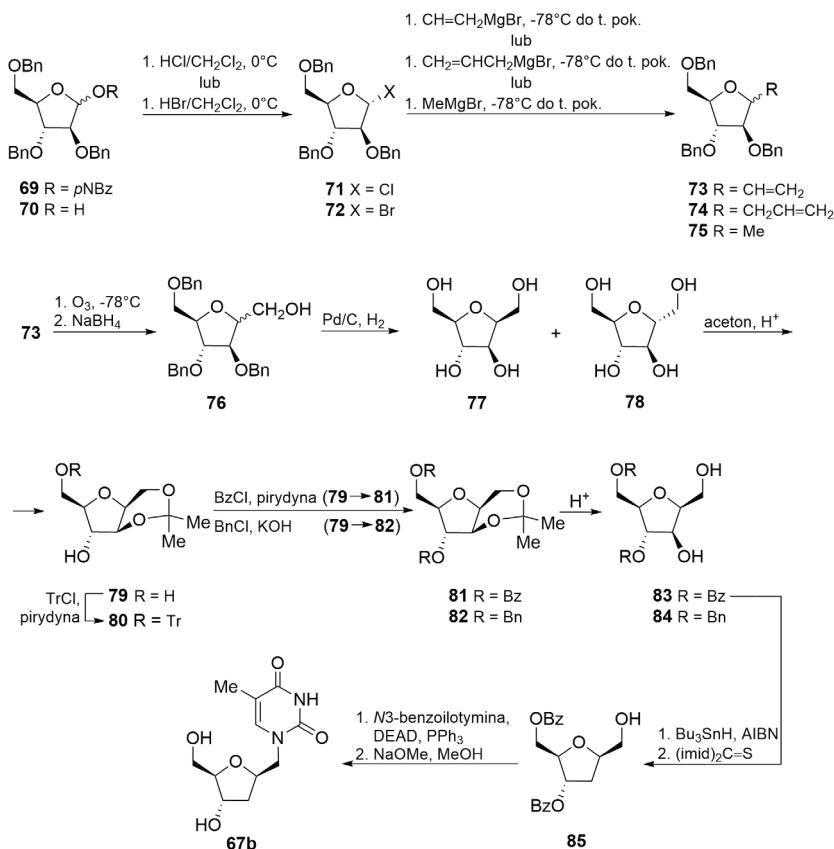
Figure 4. Pyrimidine analogues of 1'-homonucleosides 67 and 68

1'-Homonukleozydy zawierające pierścień purynowy (adenina **64b** MIC = 8 µg/mL albo guanina **66b** MIC = 12 µg/mL) wykazują znaczące działanie przeciw wirusom HSV-1 TK⁻ i HSV-2 TK⁻ w porównaniu do związków referencyjnych, którymi były briwudyna i acyklowir. Dodatkowo 1'-homonukleozyd **64b** był aktywny w stosunku do wirusa krowianki (MIC = 20 µg/mL). Natomiast 1'-homonukleozydy zawierające tyminę **67a–b** bądź cytozynę **68a–c** okazały się nieaktywne wobec wirusa opryszczki pospolitej (HSV-1 i HSV-2), wirusa krowianki, wirusa paragrypy typu 3, reowirusa typu 1, wirusa Sindbis, wirusa Coxsackie B4, wirusa Punta Toro oraz syncytialnego wirusa oddechowego [24].

Wprowadzenie związków **64b** oraz **66b** w sekwencję oligonukleotydów w celu zbadania stabilności podwójnej helisy DNA wymaga odpowiedniej ochrony grup aminowych nukleozasad (Schemat 12). Adeninę w **64b** przekształcono w pochodną benzoilową uzyskując produkt **64c**, natomiast fragment aminowy w guaninie został ochroniony jako izomaślan, co doprowadziło do powstania związku **66c**. Natomiast grupy hydroksylowe przy C5' w **64c** i **66c** przekształcono w etery monometoksytrytylowe i wykorzystując metodę amidofosforyno włączono oba 1'-homo-2'-deoksy-nukleozydy w wybrane pozycje łańcucha DNA. Okazało się, że już wprowadzenie jednego 1'-homonukleozydu zmniejsza trwałość termodynamiczną dupleksu utworzonego z udziałem tak zmodyfikowanego oligonukleotydu [24].

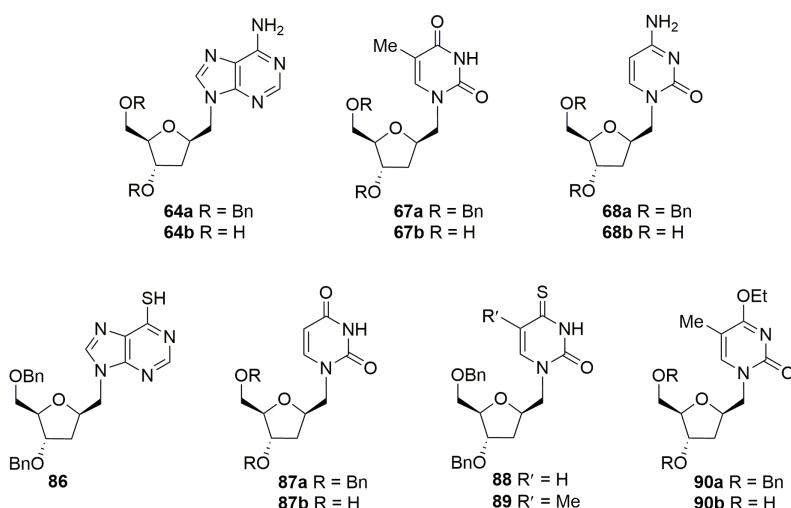
W syntezie 1'-homo-2'-deoksytymidyny **67b** wykorzystano halogenki (chlorek, bromek) 2,3,5-tri-O-benzylo-D-arabinofuranozy **71** i **72**, z których w reakcjach z odpowiednimi związkami Grignarda (R = winyl, allil, metyl) powstały mieszaniny α i β C-glikozydów **73–75** (Schemat 13). Pochodne winylowe **73** w wyniku ozonolizy połączonej z redukcją, a następnie wodorolizy zostały przekształcone w mieszaninę α i β 1-deoksy-1-C-hydroksymetylo-D-arabinofuranoz **77** i **78**, z której wydzielono związek **79** wykorzystując regioselektywne izopropylidenowanie pseudoanomeru α **77**. Ochrona grup hydroksylowych, a następnie kwasowa hydroliza acetalu prowadziła do diolu **83**. Regiospecyficzne usunięcie drugorzędowej grupy hydroksylowej z **83** zostało zrealizowane w warunkach reakcji Bartona-McCombie,

a fragment tyminy dołączono do **86** wykorzystując reakcję Mitsunobu. W ostatnim etapie usunięto benzoilowe grupy ochronne uzyskując związek **67b** [8, 25].



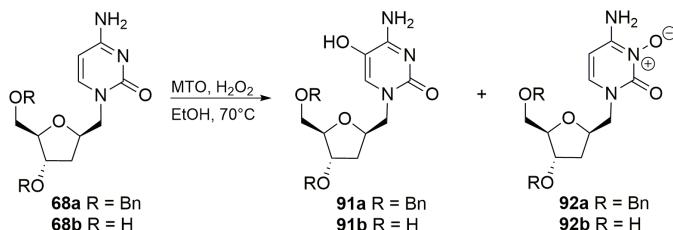
Schemat 13. Syntezę 1'-homo-2'-deoksytymidyny **67b**
Scheme 13. Synthesis of 1'-homo-2'-deoxythymidine **67b**

Strukturalne modyfikacje 1'-homonukleozydów są ważną drogą syntezy nowych potencjalnie aktywnych połączeń. Interesującym przykładem takiego podejścia jest wykorzystanie metylotrioksorenu(VII) (MTO) [26]. Utlenianiu poddano 1'-homonukleozydy **64a**, **67a–68a**, **86**, **87a**, **88–89** zawierające pierścień ochronionej 2'-deoksyrybofuranozy (Rys. 5), które wcześniej otrzymano w wyniku alkilowania nukleozasad za pomocą mesylanu **63** (Schemat 12).



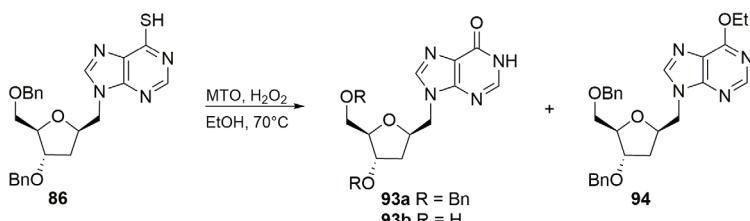
Rysunek 5. Analogi 1'-homonukleozydów 64, 67–68, 86–90
Figure 5. Analogues of 1'-homonucleosides 64, 67–68, 86–90

Okazało się, że 1'-homonukleozydy zawierające pierścień pirymidynowy 67a i 68a oraz 87a–89 ulegały utlenieniu przy atomie N3 albo przy C5 (Schemat 14).



Schemat 14. Utlenienie 3',5'-di-O-benzyl-1'-homo-2'-deoxycytidyny 68a
Scheme 14. Oxidation of 3',5'-di-O-benzyl-1'-homo-2'-deoxycytidine 68a

Natomiast w pierścieniach purynowych funkcjonalizowane były pozycje N1 i C8. W przypadku 1'-homotionukleozydów w trakcie utlenienia zachodził proces desulfuracji (Schemat 15).



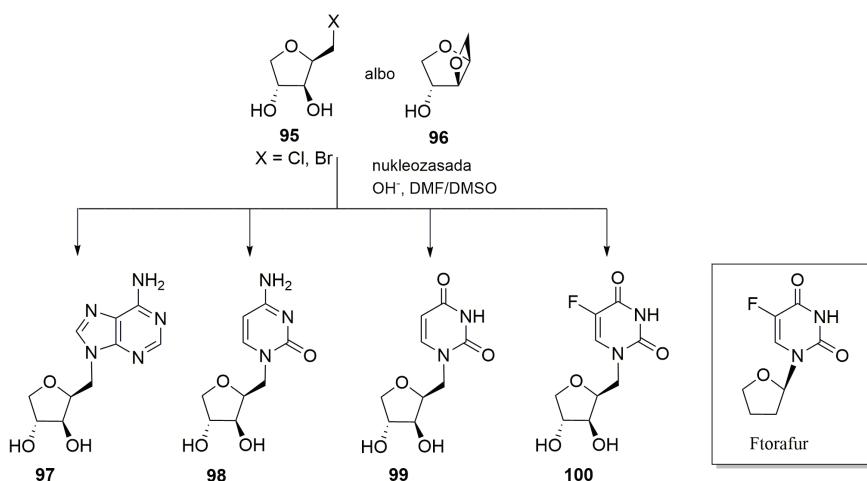
Schemat 15. Utlenienie 3',5'-di-O-benzyl-1'-homo-2'-deoxysytoinozyny 86
Scheme 15. Oxidation of 3',5'-di-O-benzyl-1'-homo-2'-deoxythioinosine 86

Oceniono aktywność przeciwwirusową zsyntetyzowanych 1'-homonukleozydów (szereg **a** – etery di-O-benzylowe i szereg **b** – związki dihydroksylowe) względem wirusa grypy typu A/PR8/H1N1 na linii komórkowej MDCK. Wiele z nich wykazało istotną aktywność w hamowaniu namażana wirusa nie wykazując jednocześnie efektu cytotoksycznego. Ponadto okazało się, że np. etery dibenzylowe **64a** ($IC_{50} = 39,9 \mu\text{g/mL}$), **90a** ($IC_{50} = 33,3 \mu\text{g/mL}$) oraz **93a** ($IC_{50} = 24,3 \mu\text{g/mL}$) są nieco bardziej aktywne od ich dihydroksylowych prekursorów **64b** ($IC_{50} = 49,3 \mu\text{g/mL}$), **90b** ($IC_{50} = 39,9 \mu\text{g/mL}$) oraz **93b** ($IC_{50} = 25,2 \mu\text{g/mL}$). Wśród 1'-homotionukleozydów tylko związek **86** wykazywał znaczącą aktywność ($IC_{50} = 41,5 \mu\text{g/mL}$). W celu określenia prawdopodobnego mechanizmu działania wybrano dwie pary związków o najwyższej aktywności **93a–93b** oraz **64a–64b**. Dla tych cząsteczek zbadano zdolność hamowania polimerazy RNA zależnej od RNA (RdRp), enzymu katalizującego replikację RNA z RNA matrycowego. Opierając się na tych danych wyciągnięto wniosek, że badane 1'-homonukleozydy i ich etery dibenzylowe działają według różnych mechanizmów. Pierwszy z nich polega na bezpośrednim hamowaniu RdRp, natomiast drugi przebiega na poziomie potranskrypcyjnym [26].

Oligonukleotyd (25-mer) zawierający 1'-homo-2'-deoksyurydynę **87b** wiązał się specyficznie ($K_d = 160 \text{ nM}$) z wirusowym UDG (glikozylaza uracylowa DNA), a jednocześnie stwierdzono brak powinowactwa do odpowiedniego enzymu ludzkiego [27].

3. 1'-HOMO-4'-DEHYDROKSYMETYLONUKLEOZYDY

Interesującą grupą analogów nukleozydów są połączenia niezawierające ugrupowania $\text{HOCH}_2\text{C}_4'$, które jest miejscem fosforylacji w naturalnych nukleozydach. Opisano syntezy odpowiednich 1'-homonukleozydów z fragmentami adeniny **97** [28, 29], cytozyny **98** [28, 29], uracylu **99** [28, 29] i 5-fluorouracylu **100** [30] (Schemat 16). Substratami w syntezach tych związków były 5-chloro(bromo)-5-deoksy-1,4-anhydro-DL-ksylitol **95** albo 1,4;3,5-dianhydro-DL-ksylitol **96**, a reakcje z solami nukleozasad polegały na odpowiednio: nukleofilowym podstawieniu chlorkowca albo otwarciu pierścienia oksetanowego [28, 29].

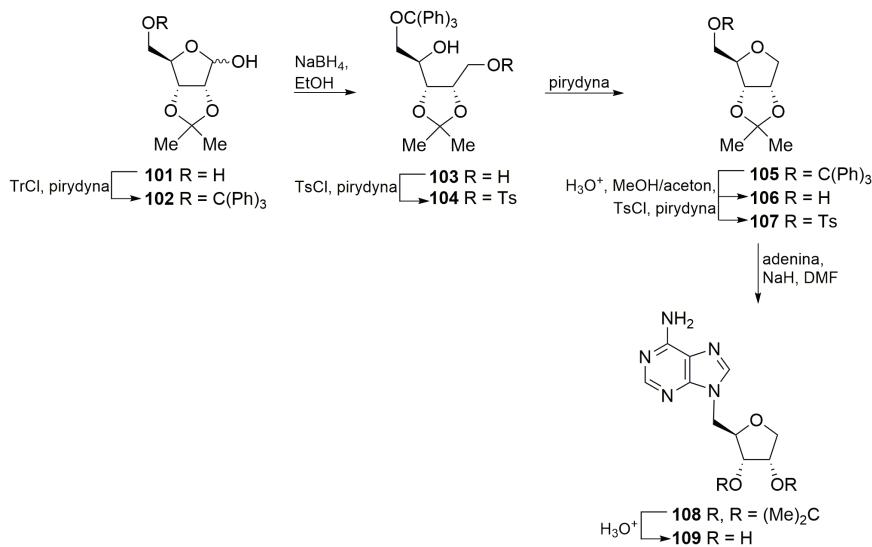


Schemat 16. Synteza 1'-homonukleozydów pochodnych 2',3'-dihydroksyfuranozydowych **97–100**

Scheme 16. Synthesis of 1'-homonucleosides derivatives of 2',3'-dihydroxyfuranosides **97–100**

Aktywność cytostyczna pochodnej 5-fluorouracylu **100** była niższa w porównaniu z ftorafurem. W badaniach na liniach nowotworowych białaczki mysiej, gruczolakoraka 755 i białaczki P388 związek **100** w dawce 100–400 mg/kg hamował rozwój nowotworów w 15 i 20%, podczas gdy ftorafur – 33 i 35% [30].

Syntezę 5-(adenin-9-ylo)-5-deoksy-1,4-anhydro-D-rybitolu **109** zrealizowano wychodząc z 2,3-O-izopropylideno-D-rybofuranozy **101** (Schemat 17). W sekwencji reakcji obejmującej trytylowanie, redukcję i tosylowanie powstał tosylan **104**, który uległ cyklizacji do 5-O-tritylo-2,3-O-izopropylideno-1,4-anhydro-D-rybitolu **105**. Po hydrolizie powstał związek **106**, który przekształcono w tosylan **107**, a następnie w pochodną adeniny **108**, którą poddano hydrolizie do produktu **109** (Schemat 17) [31].

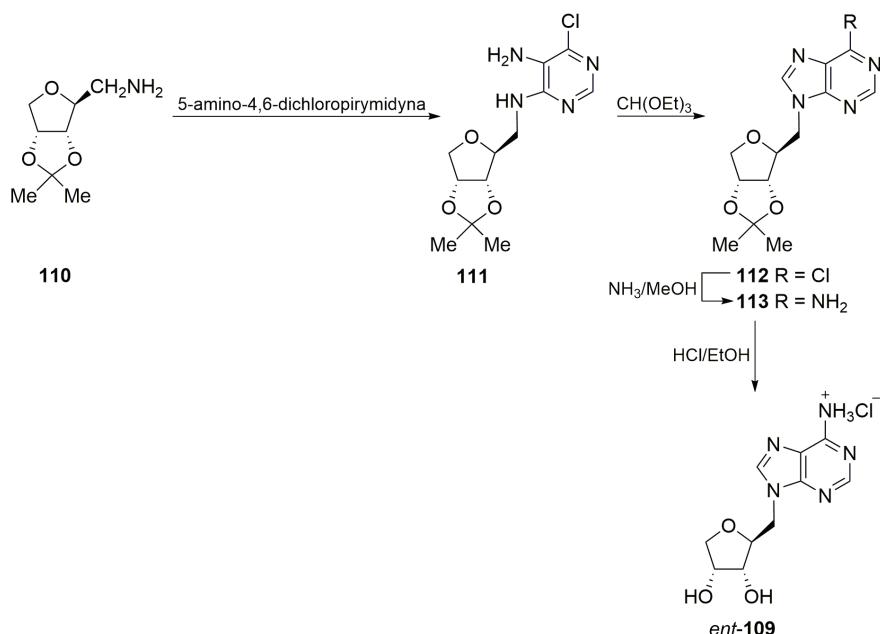


Schemat 17. Synteza 5-(adenin-9-ylo)-5-deoksy-1,4-anhydro-D-rybitolu 109

Scheme 17. Synthesis of 5-(adenin-9-yl)-5-deoxy-1,4-anhydro-D-ribitol 109

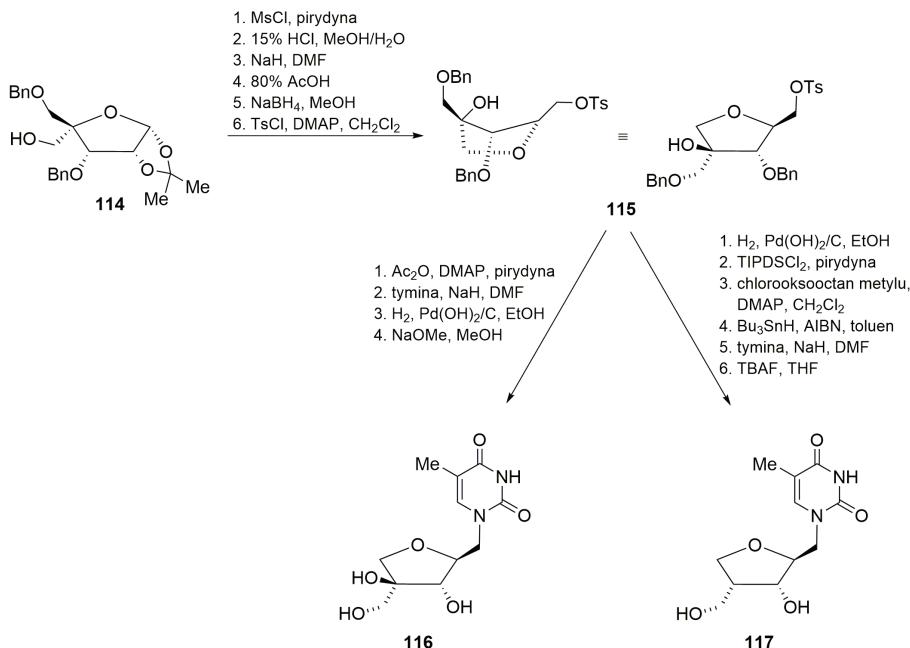
Związek **109** nie wykazywał właściwości inhibujących *Escherichia coli B* przy stężeniach do 1 mg/mL (3,7 μ M) [31]. Nie odnotowano także znaczącej aktywności ($\text{IC}_{50} > 400 \mu\text{g}/\text{mL}$) w stosunku do wirusów VSV (wirus pęcherzykowatego zapalenia jamy ustnej) i VV (wirusa krowianki) [32].

Kondensacja aminy **110** z 5-amino-4,6-dichloropiryimidyną, a następnie zamknięcie pierścienia imidazolowego w **111** doprowadziło do powstania pochodnej 6-chloropuryn-9-ylowej **112**, prekursora 1'-homonukleozydu *ent*-**109** (Schemat 18) [33].



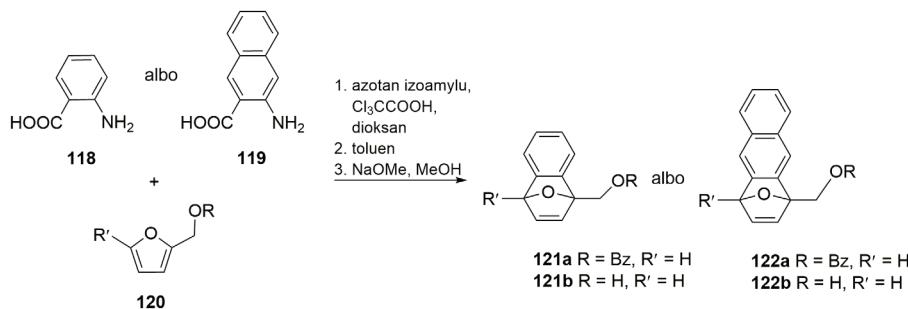
Schemat 18. Synteza chlorowodorku 1-deoksy-1-(adenin-9-ylo)-2,5-anhydro-D-rybitolu *ent*-109
Scheme 18. Synthesis of 1-deoxy-1-(adenin-9-yl)-2,5-anhydro-D-ribitol hydrochloride *ent*-109

Usztywnione konformacyjnie kwasy nukleinowe (ang. *locked nucleic acids*, LNA) wykorzystuje się w badaniach właściwości biologicznych zmodyfikowanych oligomerów RNA i DNA, ponieważ pierścień tetrahydrofuranowy występuje wtedy w jednej i dokładnie zdefiniowanej konformacji. Syntezy dwóch monomerów **116** i **117** zawierających resztę tyminy zostały przedstawione na Schemacie 19, a wspólnym materiałem wyjściowym była 3,5-di-O-benzylo-1,2-O-izopropylideno-4-C-hydroksymetylo- α -D-rybofuranosa **114**. W wyniku sekwencji kilku reakcji z glikozydu **114** otrzymano pochodną tetrahydrofuranu **115**. W celu otrzymania 1'-homonukleozydu **116** związek **115** poddano acetylowaniu, otrzymany octan wykorzystano do alkilowania soli sodowej tyminy, a następnie usunięto grupy ochronne. Związek **117**, analog 3'-deoksy 1'-homonukleozydu **116**, otrzymano z **115** w wyniku reakcji wodorolizy, ochrony ugrupowania diolu blokadą Markiewicza za pomocą 1,3-dichloro-1,1,3,3-tetra-izopropylodisiloksanu, usunięcia grupy hydroksylowej wykorzystując procedurę Bartona-McCombie i w końcu alkilowania oraz usunięcia grup ochronnych [34]. Wykorzystując metodę amidofosforyno włączono oba monomery **116** oraz **117** do łańcuchów oligonukleotydowych w celu zbadania trwałości tworzonych z ich udziałem dupleksów. Okazało się, że powoduje to znaczne zmniejszenie trwałości dupleksów, co powiązano z nieodpowiednimi konformacjami pierścieni tetrahydrofuranowych [34].



Schemat 19. Synteza LNA 1'-homonukleozydów **116** i **117**
 Scheme 19. Synthesis of LNA 1'-homonucleosides **116** and **117**

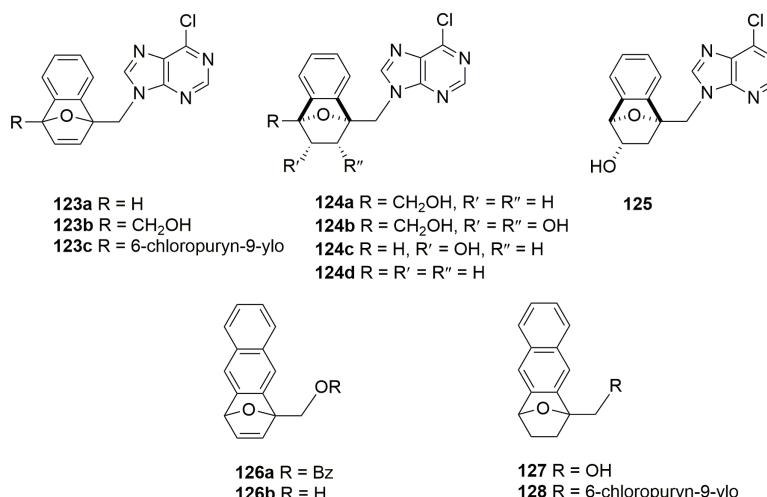
Ciekawą grupę usztywnionych konformacyjnie analogów nukleozydów stanowią pochodne zawierające układ 7-oksabicyklo[2.2.1]heptanu skondensowany z pierścieniem benzenowym albo naftalenowym. Takie analogi zsyntetyzowano z pochodnych alkoholu furfurylowego i odpowiednio benzynu albo naftytu (Schemat 20) [35].



Schemat 20. Synteza analogów 1'-homonukleozydów **121a–b** i **122a–b**
 Scheme 20. Synthesis of 1'-homonucleosides analogues **121a–b** and **122a–b**

Zbadano aktywność przeciwwirusową wszystkich zsyntetyzowanych analogów 1'-homonukleozydów **121** i **122** wobec wirusów RNA (Rys. 6). Żaden z otrzymanych związków w stężeniach powyżej 50 μM nie okazał się aktywny przeciw wiru-

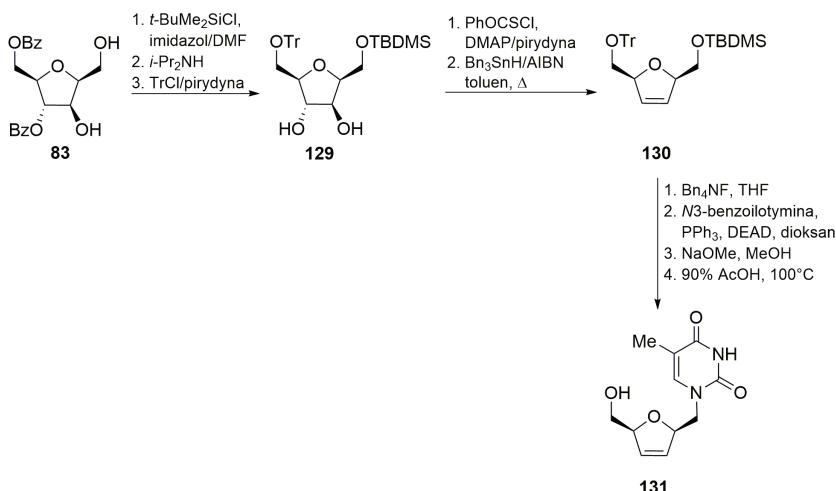
sowi Coxsackie. Jednakże dla kilku związków (Rys. 6) zaobserwowano aktywność w stosunku do wirusa HCV ($EC_{50} = 6,31\text{--}85,3 \mu\text{M}$), chociaż związki te były również cytotoksyczne ($CC_{50} = 11,1\text{--}95,2 \mu\text{M}$). Najwyższy indeks selektywności charakteryzuje aktywność analogu **123a** ($EC_{50} = 16,1 \mu\text{M}$ i $CC_{50} = 72,4 \mu\text{M}$). Związek **128** dodatkowo hamował wzrost komórek CCRE-CEM ($IC_{50} = 5,73 \mu\text{M}$) [35].



Rysunek 6. Związki wykazujące aktywność przeciwirusową względem wirusa HCV
 Figure 6. Anti-HCV active compounds

4. 1'-HOMO-2',3'-DIDEOOKSY-2',3'-DEHYDRONUKLEOZYDY

Zainteresowanie syntezą 1'-homonukleozydów zawierających pierścień 2,5-dihydrofuranowy wynika z wysokiej aktywności stawudyny, leku stosowanego w terapiach przeciw wirusowi HIV. Związek **83** przekształcono w diol **129**, który w warunkach reakcji Barton-McCombie ulegał regiospecyficznemu usunięciu drugorzędowych grup hydroksylowych prowadząc do powstania alkenu **130**. Po usunięciu silylowej grupy ochronnej w **130** wprowadzono resztę tyminy wykorzystując reakcję Mitsunobu. 1'-Homostawudynę **131** otrzymano w wyniku debenzylowania i hydrolizy eteru trytylowego (Schemat 21) [8, 25].

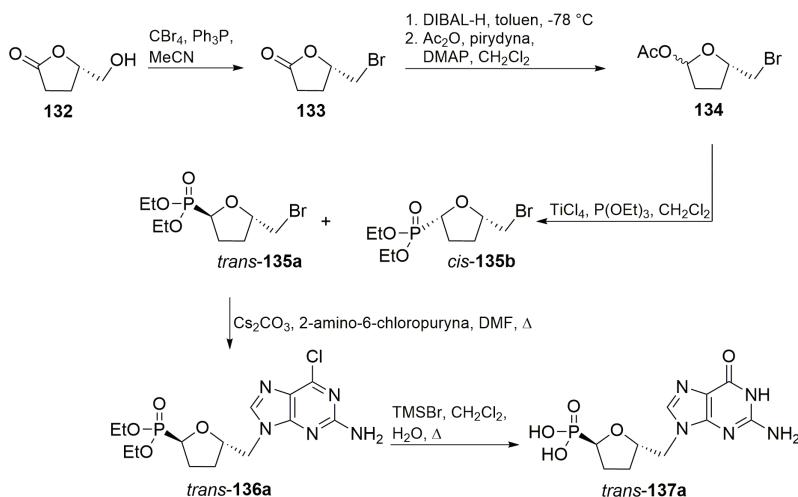


Schemat 21. Synteza 1'-homostawudyny 131

Scheme 21. Synthesis of 1'-homostavudine 131

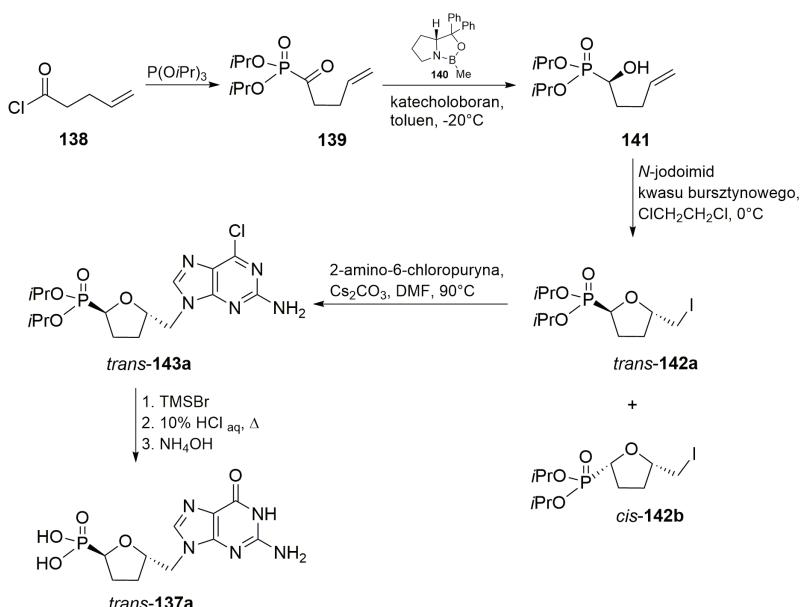
5. POCHODNE FOSFONIANOWE

Fosfonianowe analogi 1'-homonukleozydów zawierające ugrupowanie guaniny *trans*-137a otrzymano z (*S*)-(+)-5-(hydroksymetylo)tetrahydrofuran-2-onu 132, który przekształcono w bromek 133 (Schemat 22) [36]. W wyniku redukcji funkcji estrowej w 133 powstał cykliczny hemiacetal, z którego uzyskano pochodną acetylową 134. W katalizowanej kwasem Lewisa reakcji Arbuzowa związek 134 został przekształcony w mieszaninę (1:1) izomerycznych *trans* i *cis* fosfonianów 135a i 135b, którą rozdzielono chromatograficznie. Reakcja bromku *trans*-135a z 2-amino-6-chloropuryną najlepiej przebiegała w obecności węglanu cezu prowadząc do utworzenia fosfonianu *trans*-136a, z którego otrzymano kwas *trans*-137a z resztą guaniny (Schemat 22) [36]. Izomer *cis*-137a został uzyskany tą samą drogą z fosfonianu *cis*-135b [37].

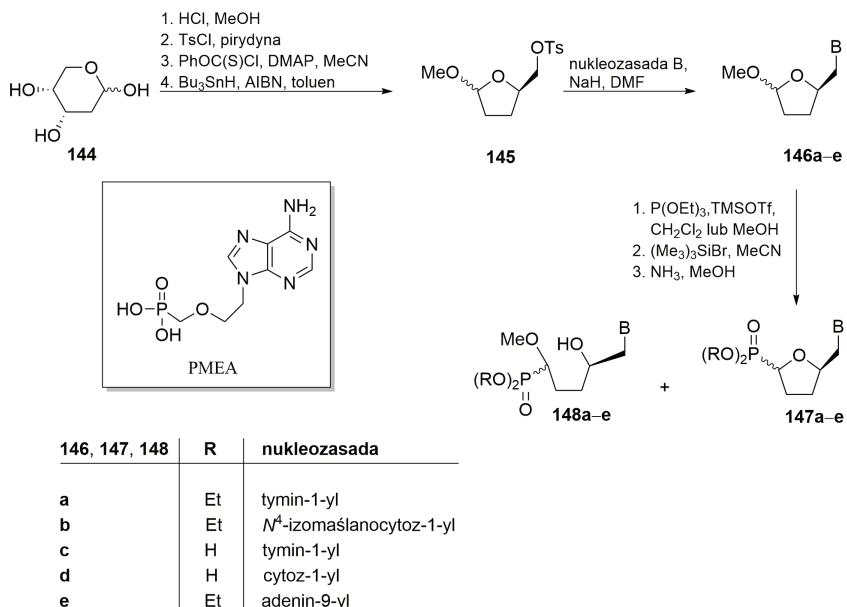
Schemat 22. Fosfonianowe analogi 1'-homonukleozydów *trans*-136a i *trans*-137aScheme 22. Phosphonate analogues of 1'-homonucleosides *trans*-136a and *trans*-137a

Fosfonian *trans*-137a jak również izomer *cis*-137b wykazują znaczącą aktywność *in vitro* względem HCMV. Izomer *cis* posiada IC₅₀ w zakresie 0,5–1 µg/mL, a CC₅₀ w zakresie 10–50 µg/mL porównywalną z gancyklowirem (IC₅₀ do 0,3 µg/mL; CC₅₀ do 12,5 µg/mL). Natomiast dla izomera *trans*-137a oznaczono IC₅₀ w zakresie 0,1–1 µg/mL, a CC₅₀ w zakresie 10–100 µg/mL, na takim samym poziomie jak dla HPMPC (IC₅₀ od 0,1–1 µg/mL; CC₅₀ od 10–50 µg/mL) [36, 38]. Jednocześnie stwierdzono, że oprócz właściwości przeciwwirusowych fosfonian *trans*-137a (BCH-1868) silnie hamuje *in vitro* proliferację wielu ludzkich jak i mysich nowotworowych linii komórkowych (IC₅₀ = 2,7–6,8 µM). Ponadto, BCH-1868 jest aktywny *in vivo* wobec ksenografów ludzkich komórek nowotworowych (Caki-1, HT-29, DU 145, COLO 205, CCRF-CEM) [39, 40].

Ze względu na wysoką aktywność przeciwwirusową jak i przeciwnowotworową opracowano stereoselektywną drogę syntezy izomera *trans*-137a wykorzystując α-hydroksyfuranosyli-1'-fosfonian 141, który powstawał w nadmiarze (14:1) w wyniku stereoselektywnej redukcji ketofosfonianu 139. Odpowiednie jony jodoniowe, które tworzą się w reakcji fosfonianu 141 z N-jodoimidem kwasu bursztynowego (NIS) jako produkty pośrednie, ulegają cyklizacji dając mieszaninę fosfonianów *cis*-142b i *trans*-142a w proporcji 1:11,4 (Schemat 23). Dalsze przekształcenia do *trans*-137a obejmują reakcję z 2-amino-6-chloropuryną i hydrolizę fosfonianu diizopropylogенного [41].

Schemat 23. Fosfonianowe analogi 1'-homonukleozydów **trans-137a** i **trans-143a**Scheme 23. Phosphonate analogues of 1'-homonucleosides **trans-137a** and **trans-143a**

Cykliczne analogi PMEA **147a–e** otrzymano wychodząc z 2-deoksy-D-rybozy **144** (Schemat 24). Tosylan 2-deoksy-D-rybofuranozydu metylowego poddano standardowej procedurze deoksygenacji przy C3 otrzymując glikozyd **145**, który w wyniku kondensacji z solami sodowymi wybranych nukleozasad przekształcono w **146a–e**. Następnie wykorzystując reakcję Arbuzowa uzyskano fosfonianowe analogi 1'-homonukleozydów **147a–e**. W trakcie reakcji powstają acykliczne analogi **148a–e** jako produkty uboczne [42].

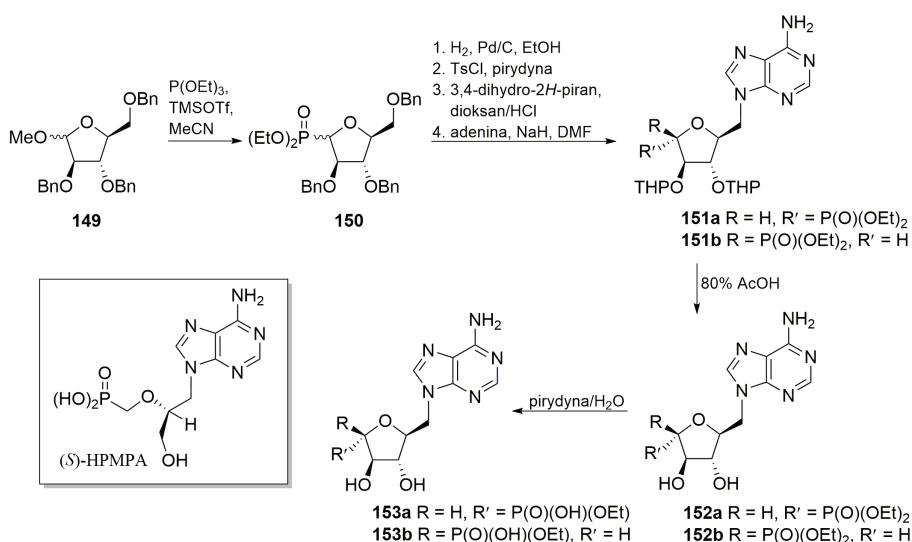


Schemat 24. Synteza fosfonianowych analogów 1'-homonukleozydów 147a–e

Scheme 24. Synthesis of phosphonate analogues of 1'-homonucleosides 147a–e

1'-Homonukleotydy **147a–e** nie wykazują znaczącej aktywności wobec HIV-1 w komórkach MT-4 w stężeniu do 100 µM. Natomiast związek **147e** był toksyczny w stosunku do komórek MT-4 w stężeniu do 100 µM, lecz nieaktywny względem wirusa HIV-1 [42].

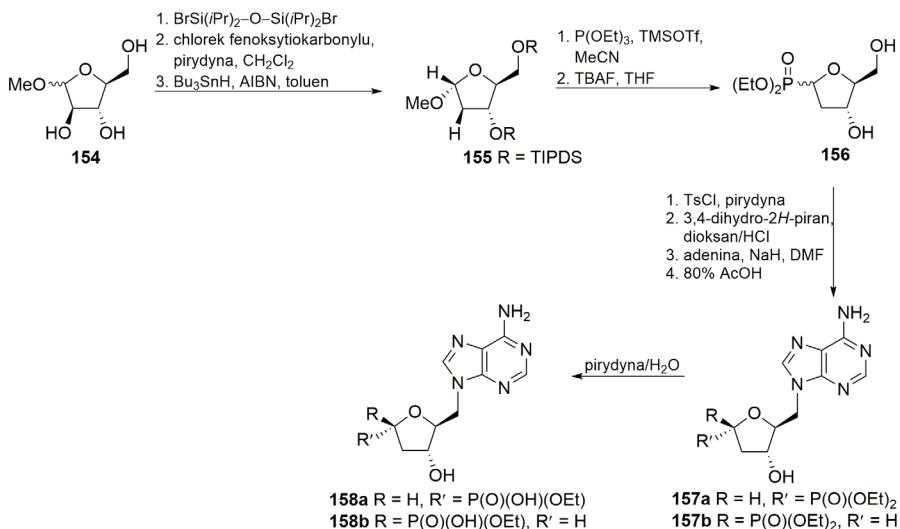
Ciekawą grupę stanowią cykliczne analogi nukleotydów, w których strukturę przeciwwirusowego (S)-HPMPA wbudowano pięcioczłonowy pierścień. Substratem w syntezie takich połączeń (Schemat 25) był 2,3,5-tri-O-benzyl- α/β -L-arabinofuranozyd metylowy **149**, z którego w warunkach reakcji Arbuzowa powstawała mieszanina anomerycznych fosfonianów **150** α i β w stosunku 1:3,5. Po wodorolitycznym usunięciu grup benzylowych pierwszorzędową grupę hydroksylową przekształcono w tosylan, drugorzędowe grupy hydroksylowe ochroniono za pomocą blokady tetrahydropiranylowej (THP) i przeprowadzono reakcję kondensacji z adeniną otrzymując fosfoniany **151a** i **151b**. Następnie usunięto blokady tetrahydropiranylowe (THP) otrzymując estry **152a** i **152b**, z których powstały estry monoetylowe **153a** oraz **153b** [43].



Schemat 25. Synteza analogów 1'-homonukleotydów 152–153

Scheme 25. Synthesis of 1'-homonucleotides analogues 152–153

Zsyntetyzowano również analogi 1'-homonukleotydów 157–158, które w pierścieniu furanozowym nie zawierały grupy hydroksylowej przy C3'. Wychodząc z mieszaniny α i β (1:1) L-arabinofuranozydów metylowych 154, najpierw w reakcji z 1,3-dibromo-1,1,3,3-tetraizopropylodisilosanem ochroniono dwie grupy hydroksylowe (Schemat 26), a następnie wykorzystując reakcję Barton-McCombie usunięto grupę hydroksylową. Anomer α 155 poddano reakcji Arbuzowa, a po desililowaniu uzyskano mieszaninę fosfonianów 156, z której otrzymano estry dieetylowe 157a i 157b oraz monoetylowe 158a, 158b wykorzystując przekształcenia opisane na Schemacie 25 [43].

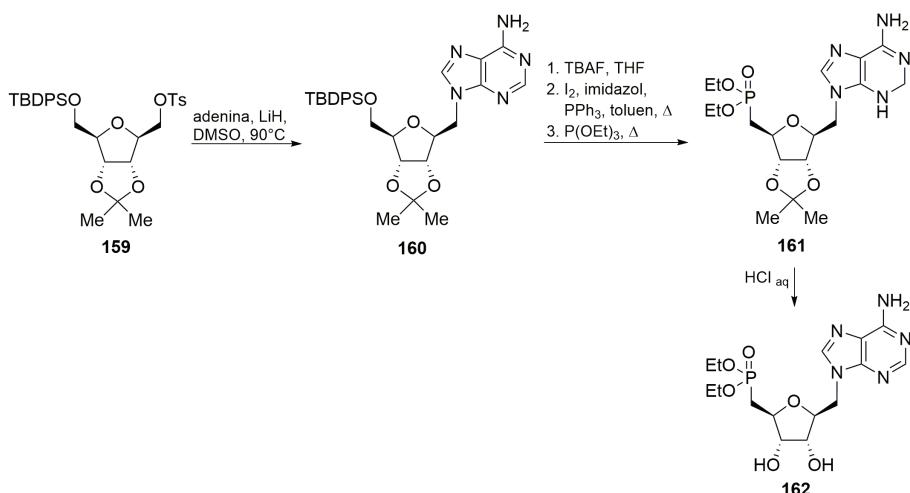


Schemat 26. Synteza analogów 1'-homonukleotydów 157–158

Scheme 26. Synthesis of 1'-homonucleotides analogues 157–158

Niestety, żaden z otrzymanych analogów nukleotydów oraz mono- jak i dietylowe estry nie wykazywał aktywności przeciwvirusowej w stosunku do wirusów RNA i retrowirusów podobnej do (S)-HPMPA. Jednakże, związki 152a, 152b, 157b, 158a i 158b wykazywały niską aktywność wobec wirusów DNA (HSV-1, HSV-2, wirusa krowianki, wirusa ospы wietrznej i półpaśca) oraz niską cytotoksyczność [43, 44].

Poszukując aktywnych biologicznie związków zsyntetyzowano pochodną adeniny 162, zawierającą przy C4' ugrupowanie fosfonylometylowe (Schemat 27). Ochroniony 1'-homonukleozyd 160 otrzymano w wyniku alkilowania adeniny za pomocą tosylanu 159. Następnie odbezpieczono pierwszorzędową grupę hydroksylową, przekształcono ją w jodek, aby w kolejnym etapie wykorzystując reakcję Arbuzowa wprowadzić grupę fosfonianową otrzymując związek 161. Po usunięciu izopropylidenowej grupy ochronnej uzyskano fosfonian 162. W podobny sposób zsyntetyzowano fosfonianowy analog 1'-homourydyny 34. Niestety żaden ze związków nie wykazywał aktywności przeciwvirusowej ani względem HCV, HIV ani wirusa dengi [45].

Schemat 27. Synteza fosfonianu **162**Scheme 27. Synthesis of a phosphonate **162**

PODSUMOWANIE

Zainteresowanie chemią analogów nukleoz(t)ydyów obok aspektu poznawczego niesie w sobie bardzo ważny czynnik potencjalnych zastosowań terapeutycznych. 1'-Homonukleoz(t)ydy są jedną z ciekawszych klas takich analogów [46], ponieważ mostek metylenowy wprowadza istotne zmiany strukturalne w porównaniu z nukleozydami zatem można oczekwać, że nowe związki będą miały także inne właściwości biologiczne. Potwierdzają to dotychczasowe wyniki badań, których fragment ograniczony do związków zawierających pierścień tetrahydrofuranowy został przedstawiony w tym opracowaniu.

Fosfoniany *trans*- i *cis*-**137a** skutecznie hamowały rozwój wirusa HCMV wykazując aktywność porównywalną z gancyklowirem (IC_{50} do 0,3 µg/mL; CC_{50} do 12,5 µg/mL). Warto odnotować wysoką aktywność 1'-homo-2'-deoksyadenozyny **64b** i 1'-homo-2'-deoksyguanozyny **66b** przeciw wirusom HSV-1 TK⁻ i HSV-2 TK⁻ ($MIC = 8-12 \mu\text{g}/\text{mL}$), a związkowi **64b** dodatkowo w stosunku do wirusa krowianki ($MIC = 20 \mu\text{g}/\text{mL}$). Istotną aktywnością przeciwvirusowym HCV ($EC_{50} = 6,31 \mu\text{M}$) odkryto dla związku **128**, jednakże jest on również wysoce cytotoksyczny ($CC_{50} = 11,6 \mu\text{M}$). Ponadto związek ten hamował wzrost komórek CCRE-CEM ($IC_{50} = 5,73 \mu\text{M}$). 1'-Homo-2'-deoksynukleozyd zawierający resztę hipoksantyny **93b** i jego pochodna di-O-benzylowa **93a** były aktywne względem wirusa grypy AH1N1 ($IC_{50} = 25,2$ i $24,3 \mu\text{g}/\text{mL}$).

Oprócz właściwości przeciwwirusowych zauważono wpływ na proliferację ludzkich jak i mysich nowotworowych linii komórkowych, np. dla *trans*-**138a** (BCH-1868) oznaczono IC_{50} w zakresie kilku µM. Należy jednak podkreślić, że dla

wielu zsyntetyzowanych analogów 1'-homonukleoz(t)ydów nie wykonano żadnych badań biologicznych, co uniemożliwiło pełną ocenę wpływu wprowadzonego mostka metylenowego na aktywność biologiczną.

Z punktu widzenia syntezy organicznej podsumowane zostały najważniejsze metody otrzymywania podstawionych tetrahydrofuranów, w tym także syntezy stereoselektywne. Dominują tutaj strategie oparte na substratach wywodzących się z furanoz. Chętnie wykorzystywane są pochodne heksoz, ponieważ wtedy dalsze konstruowanie 1'-homonukleoz(t)ydów nie wymaga etapów polegających na wydłużaniu i skracaniu łańcuchów węglowych. W syntezach układów niezawierających grup hydroksylowych w wybranych pozycjach stosowano 2'-deoksyfuranozy, a w przypadku użycia podstawionych furanoz do deoksygenacji wykorzystywano procedurę Bartona-McCombie.

PODZIĘKOWANIE

Autorzy pragną serdecznie podziękować Panu prof. dr. hab. Andrzejowi E. Wróblewskiemu za bezczenną pomoc i udzielone wskazówki. Praca powstała dzięki wsparciu finansowemu z projektu badawczego Narodowego Centrum Nauki nr UMO-2013/11/N/NZ7/00723 oraz badań statutowych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (503/3-014-1/503-01).

PIŚMIENIICTWO CYTOWANE

- [1] E. De Clercq, *Med. Res. Rev.* 2013, **33**, 1215.
- [2] C. Simons, *Nucleoside Mimetics. Their Chemistry and Biological Properties*, Gordon and Science Publisher, Amsterdam 2001.
- [3] T. Kishi, M. Muroi, T. Kusaka, M. Nishikawa, K. Kamiya, K. Mizuno, *Chem. Pharm. Bull.*, 1972, **20**, 940.
- [4] T. Kusaka, H. Yamamoto, M. Shibara, M. Muroi, T. Kishi, K. Mizuno, *J. Antibiotic*, 1968, **21**, 255.
- [5] R.T. Borchardt, B.T. Keller, U. Patel-Thombre, *J. Biol. Chem.*, 1984, **259**, 4353.
- [6] S. Fletcher, *Org. Chem. Front.*, 2015, **2**, 739.
- [7] J. Lee, S.U. Kang, S.Y. Kim, S.E. Kim, M.K. Kang, Y.J. Jo, S. Kim, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2001, **11**, 961.
- [8] B. Doboszewski, *Nucleosides & Nucleotides*, 1997, **16**, 1049.
- [9] M. Bobek, J. Farkas, *Coll. Czech. Chem. Commun.*, 1969, **34**, 1684.
- [10] J.A. Montgomery, K. Hewson, *J. Heterocycl. Chem.*, 1970, **7**, 443.
- [11] J. Farkas, *Coll. Czech. Chem. Commun.*, 1971, **36**, 3043.
- [12] M.W. Winkley, *Carbohydr. Res.*, 1973, **31**, 245.
- [13] P. Angibeaud, J. Defaye, H. Franconie, *Carbohydr. Res.*, 1980, **78**, 195.
- [14] A. Holy, *Coll. Czech. Chem. Commun.*, 1970, **35**, 81.
- [15] D.C. Pryde, D.S. Middleton, P.T. Stephenson, P. Wainwright, A. Maddaford, X. Zhang, D. Leese, R. Glen, J. Hart, N. Forrest, T. Guyot, *Tetrahedron Lett.*, 2011, **52**, 6415.
- [16] R. Saladino, U. Ciambecchini, S. Hanessian, *Eur. J. Org. Chem.*, 2003, **22**, 4401.

- [17] P. Busca, I. McCort, T. Prange, Y. Le Merrer, Eur. J. Org. Chem., 2006, **10**, 2403.
- [18] A. Clouet, C. Gravier-Pelletier, B. Al.-Dabbag, A. Bouhss, Y. Le Merrer, Tetrahedron: Asymmetry, 2008, **19**, 397.
- [19] D. Lecercle, A. Clouet, B. Al.-Dabbag, M. Crouvoisier, A. Bouhss, C. Gravier-Pelletier, Y. Le Merrer, Bioorg. Med. Chem., 2010, **18**, 4560.
- [20] H.W. Lee, W.J. Choi, K.A. Jacobson, L.S. Jeong, Bull. Korean Chem. Soc. 2011, **32**, 1620.
- [21] H.W. Lee, H.O. Kim, W.J. Choi, S. Choi, J.H. Lee, S.-G. Park, L. Yoo, K.A. Jacobson, L.S. Jeong, Bioorg. Med. Chem., 2010, **18**, 7015.
- [22] V. Ramkumar, M.E. Olah, K.A. Jacobson, G.L. Stiles, Mol. Pharmacol., 1991, **40**, 639.
- [23] N. Hossain, N. Blaton, O. Peeters, J. Rozenski, P.A. Herdewijn, Tetrahedron, 1996, **52**, 5563.
- [24] N. Hossain, C. Hendrix, E. Leschinier, A. Van Aerschot, R. Busson, E. De Clercq, P. Hedrewijn, Bioorg. Med. Chem. Lett., 1996, **6**, 1465.
- [25] B. Doboszewski, Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, 2009, **28**, 875.
- [26] R. Saladino, V. Neri, P. Checconi, I. Celestino, L. Nencioni, A.T. Palamara, M. Crucianelli, Chem. Eur. J., 2013, **19**, 2392.
- [27] Y. Sekino, S.D. Bruner, G.L. Verdine, J. Biol. Chem., 2000, **275**, 36506.
- [28] E.M. Ioannisan, V.V. Kolomeitseva, G.E. Ustyuzhanin, N.S. Tikhomirova-Sidorova, Zhurn. Obshch. Khim., 1980, **50**, 2146.
- [29] E.M. Ioannisan, V.V. Kolomeitseva, G.E. Ustyuzhanin, N.S. Tikhomirova-Sidorova, Zhurn. Obshch. Khim., 1981, **51**, 2128.
- [30] V.V. Kolomeitseva, G.V. Denisov, D.S. Terekhov, L.A. Uvarova, E.A. Pyaivinen, N.S. Sidorova, Zhurn. Obshch. Khim., 1988, **58**, 2387.
- [31] A. Holy, Collect. Czech. Chem. Commun., 1982, **47**, 2786.
- [32] A. Holy, I. Votruba, E. De Clerq, Collect. Czech. Chem. Commun., 1985, **50**, 245.
- [33] J. Defaye, T. Reyners, Bull. Soc. Chim. Biol., 1968, **50**, 1625.
- [34] L. Kvaerno, R. Kumar, B.M. Dahl, C.E. Olsen, J. Wengel, J. Org. Chem., 2000, **65**, 5157.
- [35] M. Dejmek, H. Hrebabecky, M. Dracinsky, J. Neyts, P. Leyssen, H. Mertlikova-Kaiserova, R. Nencka, Collect. Czech. Chem. Commun., 2011, **76**, 1549.
- [36] N. Nguyen-Ba, L. Chan, N. Quimpere, N. Turcotte, N. Lee, H. Mitchell, J. Bedard, Nucleosides & Nucleotides, 1999, **18**, 821.
- [37] P. Nguyen-Ba, N. Turcotte, L. Yuen, J. Bedard, M. Quimpere, L. Chan, Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, **8**, 3561.
- [38] J. Bedard, S. May, M. Lis, L. Tryphonas, J. Drach, J. Huffman, R. Sidwell, L. Chan, T. Bowlin, R. Rando, Antimicrob. Agents Chemother., 1999, **43**, 557.
- [39] L. Leblond, G. Attardo, B. Hamelin, D.-Y. Bouffard, N. Nguyen-Ba, H. Gourdeau, Mol. Cancer Ther., 2002, **1**, 737.
- [40] M. Bubenik, R. Rej, N. Nguyen-Ba, G. Attardo, F. Ouellet, L. Chan, Bioorg. Med. Chem. Lett., 2002, **12**, 3063.
- [41] M. Bubenik, P. Preville, J. Dugas, G. Attardo, L. Chan, Tetrahedron Letters, 2003, **44**, 8261.
- [42] T. Kofoed, A.E.-H.A. Ismail, E.B. Pedersen, C. Nielsen, Bull Soc Chim Fr, 1997, **134**, 59.
- [43] M. Otmar, I. Rosenberg, M. Masojidkova, A. Holy, Collect. Czech. Chem. Commun., 1993, **58**, 2159.
- [44] M. Otmar, I. Rosenberg, M. Masojidkova, A. Holy, Collect. Czech. Chem. Commun., 1993, **58**, 2180.
- [45] P. Wainwright, A. Maddaford, X. Zhang, H. Billington, D. Leese, R. Glen, D.C. Pryde, D.S. Middleton, P.T. Stephenson, S. Sutton, Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, 2013, **32**, 477.
- [46] C. Lamberth, Organic Preparations and Procedures Int., 2002, **34**, 149.

HORYZONTY NAUKI 2016
- FORUM PRAC DYPLOMOWYCH,
WYDZIAŁ CHEMII UJ, 17-18 MAJA 2016

SYNTEZA I REDUKCJA PROCHIRALNYCH IMIN

**SYNTHESIS AND REDUCTION OF PROCHIRAL
IMINES**

Tomasz Artur Berniak

*Wydział Chemii, Uniwersytet Jagielloński
ul. Ingardena 3, 30-06 Kraków
e-mail: tberniak@gmail.com*

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Gossypol

2. Iminy

 2.1. Wstęp

 2.2. Reakcje otrzymywania imin

 2.3. Tautomeria iminowo-enaminowa

 2.4. Aspekty stereochemiczne

 2.5. Redukcja imin

Uwagi końcowe

Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane



Tomasz Berniak urodził się w 1992 roku w Krakowie. Po ukończeniu w 2011 roku I Liceum Ogólnokształcącego im. Bartłomieja Nowodworskiego w Krakowie rozpoczął studia I stopnia na kierunku Chemia na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Pracę dyplomową licencjacką pt. „Synteza i redukcja prochiralnych imin” wykonał w Zespole Stereokontrolowanej Syntezy Organicznej pod opieką prof. dr hab. Jacka Mlynarskiego (19 września 2014 r.). Studia II stopnia odbył na kierunku Chemia UJ, gdzie w Zespole Chemii Polimerów pod kierunkiem dr hab. Ewy Witek wykonał pracę dyplomową pt. „Synteza nowej klasy chelatujących żywic jonowymiennych do usuwania śladowych zanieczyszczeń z wody” uzyskując tytuł magistra (15 czerwca 2016 r.).

ABSTRACT

Natural chemical compounds and their derivatives could be used for designing new classes of anticancer, antifungal or antiviral drugs. One of those compounds is gossypol, isolated from grains of wool. Gossypol's derivatives can freely penetrate the blood-brain barrier (BBB).

This basic review considers synthesis and reduction of prochiral imines. Gossypol derivatives belong to imines. Imines as unstable compounds, hydrolyze in contact with a small amount of water. There are substrates for preparation of oximes and its derivatives. In this article three methods of imines production are presented. There are: (a) reaction of aldehyde or ketones with primary amine, (b) addition of Grignard reagents to nitriles and (c) pyrolysis of alkyl azide. The first one is discussed in details with specific description of the mechanism of both steps: first stage - addition to form a hemiaminal, second one – dehydration with formation of imine. Many conditions such as acid power, value of pH reaction and environment (preferably anhydrous) have influence on the formation rate of imines and determine each of two stages, i.e. addition and dehydration.

Furthermore, the imines-enamines tautomeric and stereochemical aspects with possible attack of nucleophile molecules to the carbon atom of the C=N bond from the *Si* or *Re* side of prochiral imines as well as potential ways of imines reductions to amines by using commonly used reducers (NaCNBH_3) are discussed. Moreover, two new methods of reduction are presented: the first – with using trichlor acids catalyzed chiral Lewis's bases and the second one – asymmetric hydrogenation of imines.

Keywords: ketimines, gossypol, aldimines, Schiff bases, oximes

Słowa kluczowe: ketiminy, gossypol, aldiminy, zasady Schiffa, oksymy

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

- | | |
|-------|---|
| AChE | – acetylcholinesteraza |
| BBB | – bariera krew-mózg (ang. <i>blood-brain-barrier</i>) |
| IUPAC | – Międzynarodowa Unia Chemii Czystej i Stosowanej
(ang. <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>) |
| M | – muskaryna |
| OP | – związki organofosforanowe |

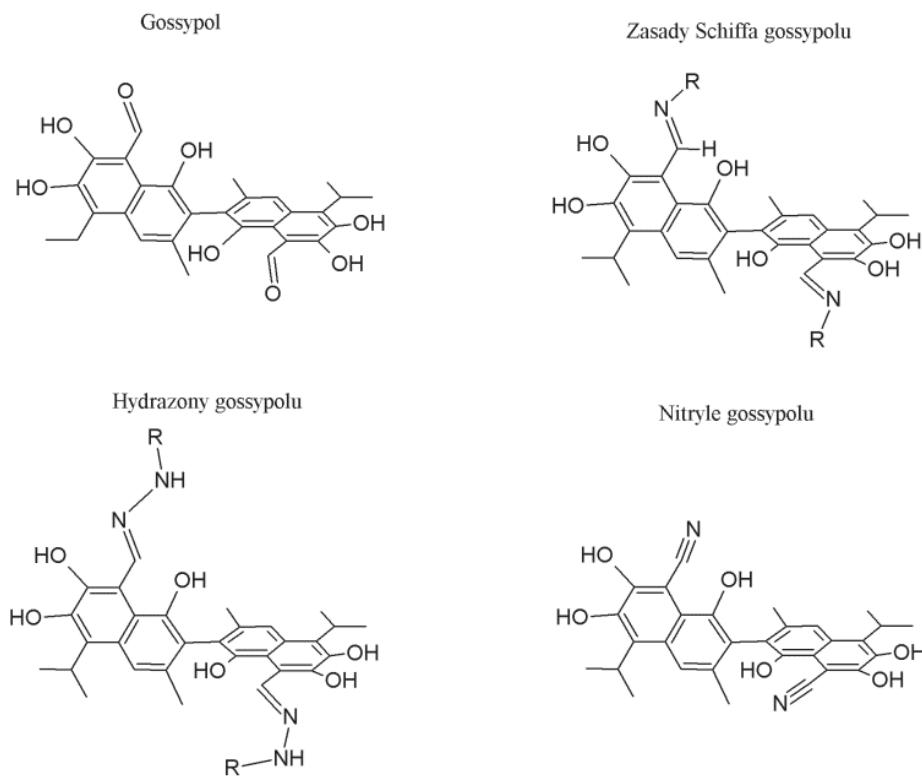
WPROWADZENIE

Niniejsza praca powstała na bazie pracy licencjackiej pt. „Synteza i redukcja prochiralnych imin” obronionej 19 września 2014 r.

Iminy są grupą związków organicznych biorących udział w wielu procesach biochemicznych, w których jest wykorzystywana ich wysoka aktywność. Przykładowo, iminy występują jako łącznik retinalu z lizyną w opsynie – białku, które wraz z grupą prostetyczną tworzy cząsteczkę fotoreceptora odpowiedzialnego za mechanizm widzenia – rodopsynę [1]. Stanowią one kluczowy substrat w tworzeniu aminokwasu alaniny, która jest otrzymywana poprzez redukcyjne aminowanie kwasu pirogronowego. W tej reakcji początkowe iminy powstają z kwasu pirogronowego oraz pochodnej witaminy B₆ – pirydoksaminy [2].

1. GOSSYPOL

Gossypol, zaliczany do terpenoidów, jest silnie toksycznym, żółtym pigmenitem obecnym w nasionach bawełny *Gossypium Herbaceum*. Toksyczność związku wynika z posiadania dwóch grup aldehydowych, co wyklucza jego bezpośrednie zastosowanie w medycynie [13]. Dlatego też poprzez modyfikacje gossypolu, a zarazem blokowanie grup aldehydowych otrzymano mniej toksyczne pochodne umożliwiając jego zastosowanie jako powszechnego składnika wielu medykamentów. Przykładami stosowanych pochodnych są zasady Schiffa, hydrazony i nitryle (Rys. 1) [3, 4]. Właściwości toksyczne pochodnych gossypolu zależą od dostępności fenolowych atomów tlenu [5]. Natomiast w przypadku zasad Schiffa, właściwości przeciwbakteryjne zależą od struktury związku oraz wielkości i polarności podstawników przy karbonylowym atomie węgla.



Rysunek 1. Wzór strukturalny gossypolu i jego pochodnych
Figure 1. The structural formula of gossypol and its derivatives

Związki te są wykorzystywane głównie do produkcji leków przeciwnowotworowych, przeciwgrzybiczych, przeciwwirusowych (np. przeciw wirusowi HIV), antymalarycznych, lecz najbardziej znane są jako składnik środków antykoncepcyjnych dla mężczyzn. Znajdują również szerokie zastosowanie jako herbicyd.

2. IMINY

2.1. WSTĘP

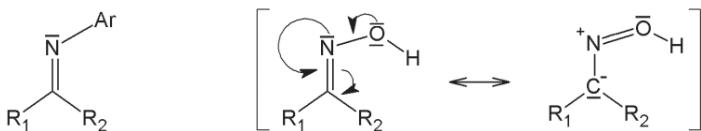
Iminy są to związki o ogólnym wzorze przedstawionym na Rysunku 2.

Charakterystycznym elementem struktury cząsteczek imin jest obecność podwójnego wiązania pomiędzy atomami azotu i węgla. Iminy jako grupę związków cechuje duża różnorodność właściwości fizykochemicznych. Wynika to z możliwości wprowadzenia różnych podstawników przy atomie azotu. Ponadto rodzaj podstawnika wpływa na trwałość imin.



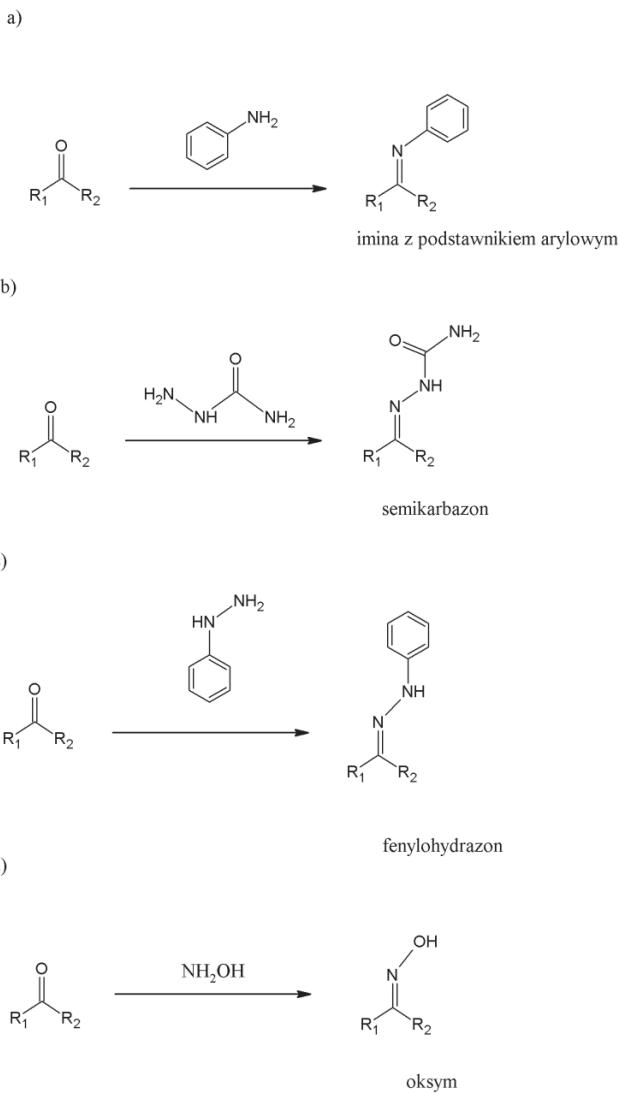
Rysunek 2. Wzór ogólny: ketimin (a) i aldimin (b)
Figure 2. General formula: ketimines (a) and aldimines (b)

Iminy są związkami bardzo nietrwałymi, które w kontakcie już z niewielką ilością wody ulegają hydrolizie. Dlatego też ich syntezę wykonuje się w warunkach bezwodnych stosując odpowiednio dobrane substraty zawierające śladowe ilości wody. Zgodnie z definicją IUPAC, iminy zawierające grupę węglowodorową na atomie azotu nazywa się zasadami Schiffa, co uważane jest często jako synonim azometinów [6]. Podstawnikami stabilizującymi strukturę imin są grupy arylowe oraz elektrodonorowe (np. -OH), których obecność powoduje wystąpienie sprzężenia pomiędzy wiązaniem C=N a elektroujemną grupą (Rys. 3).



Rysunek 3. Struktura imin stabilizowana podstawnikiem arylowym oraz elektrodonorowym
Figure 3. The structure of imines stabilized aryl and electro donor chemical entity

Delokalizacja wiązania powoduje zmniejszenie cząstkowego ładunku dodatniego ($\delta+$) na karbonylowym atomie węgla, a tym samym większą energię LUMO, co powoduje, że powstały związek jest mniej podatny na możliwy atak innego nukleofila. W taki sposób można otrzymać zmodyfikowane iminy tworzące odrębną grupę związków, m.in. oskymy, fenylohydrazony i semikarbazony. W przypadku oksymów, podobnie jak dla imin, w zależności od rodzaju podstawników R_1 , R_2 wyróżnia się ketoksymy (dla dwóch podstawników węglowodorowych) lub aldoksymy (kiedy jeden z nich jest protonem). Reakcje otrzymywania trwałych imin przedstawiono na Rysunku 4. Oksymy, podobnie jak zasady Schiffa i hydrazony, znalazły zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym. Są to związki, które ze względu na swoją budowę strukturalną oraz hydrofobowy charakter potrafią przeniknąć przez barierę krew-mózg (BBB), tym samym będąc przez ostatnie sześć dekad w kręgu badań wielu naukowców i toksykologów [7]. Jest to tym bardziej ciekawe, ponieważ spośród wszystkich leków, tylko około 5% wykazuje zdolność do pokonania BBB oraz efektywnego działania w całym mózgu.



Rysunek 4. Reakcje otrzymywania imin, semikarazonów, fenylohydrazonów i oksymów
Figure 4. Obtaining reaction of imines, semicarbazones, oximes and phenylhydrazones

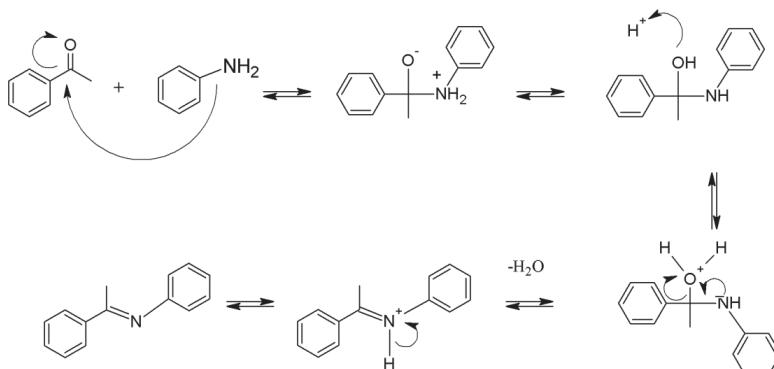
Budowę tych związków charakteryzuje następujące parametry: ciężar cząsteczkowy (< 450 Da); powierzchnia polarna ($60\text{--}70 \text{ \AA}^2$), liczba wiązań zdolnych do rotacji (< 8), liczba H-donorów (≤ 3), liczba H-akceptorów (< 7) [3]. Podane reguły są zgodne z Zasadami Lipińskiego określającymi możliwość wykorzystania danego związku chemicznego jako leku farmaceutycznego. Zdolność do pokonania BBB została zaobserwowana w trakcie badań kilku parametrów chemicznych charakteryzujących ilościowe zmiany składników odżywcznych pobieranych poprzez barierę krew-mózg wchodzących w interakcje z biologicznymi strukturami. Pomiar wspo-

mnianych wyżej parametrów pozwolił na precyzyjne określenie grupy związków zdolnych do pokonania BBB, wśród których znalazły się niektóre związki z grupy oksymów. Dalsze ich badanie pod względem farmakokinetycznym i farmakodynamicznym wykazały działanie zapobiegające uszkodzeniom mózgu (głównie ośrodkowi oddechowemu) oraz odtruwające przeciw związkom organofosforanowym (OP). Ziązki te hamują aktywność acetylcholinesterazy (AChE), a w przypadku gazów bojowych (sarin, soman, tabun, VX) ich działanie jest nieodwracalne. Oksymy są to polarne ziązki, dobrze rozpuszczalne w wodzie, które podobnie jak iminy występują w odmianach tautomerycznych. Słabo pokonują BBB, a delokalizacja wiązania C=N powoduje obniżenie ich reaktywności, przykładowo – zdolność reaktywowania AChE wynosi < 5% [7]. Dość niska reaktywność w konsekwencji prowadzi do utrudnionego badania działania oksymów jako środków o właściwościach odtruwających organizm. Dokładny mechanizm przedstawionej wyżej reakcji w dalszym ciągu pozostaje nie do końca poznany.

Optymalny zakres stężenia oksymów w mózgu nie został określony, jednak przyjmuje się, że stężenie to nie powinno przekroczyć 10%. Ponadto ziązki te przeciwdziałają głównym i ubocznym efektom muskaryny (M), związkowi z rodziną alkaloidów, który jest silnie trujący, blokując działanie AChE, występujący w wielu grzybach, np. w muchomorze czerwonym [7].

2.2. REAKCJE OTRZYMYWANIA IMIN

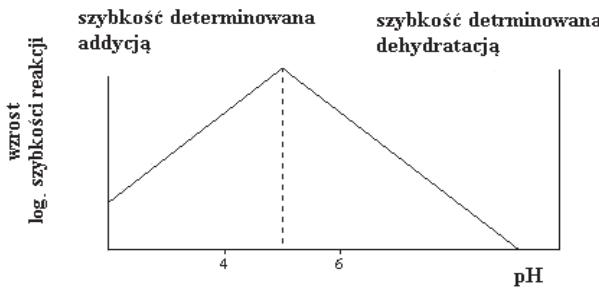
Iminy otrzymuje się głównie w reakcjach aldehydów lub ketonów z pierwszorzędowymi aminami. W szczególnym przypadku, gdy atom azotu lub węgla w wiązaniu C=N sąsiaduje z aromatycznym podstawnikiem, iminy są na tyle trwałe, że możliwe jest ich wydzielenie z mieszaniny poreakcyjnej. Na Rysunku 5 pokazano mechanizm przykładowej reakcji otrzymywania trwałej iminy.



Rysunek 5. Mechanizm syntezy iminy na przykładzie reakcji acetofenonu z aniliną
Figure 5. Mechanism of imine synthesis – example reaction of acetophenone with an aniline

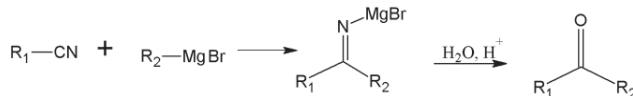
Omawiana reakcja wymaga zastosowania katalizatora kwasowego oraz dodatku związku, zdolnego do usuwania powstającej wody. Najczęściej stosowane są świeżo zaktywowane sita molekularne, siarczan(VI) magnezu – $MgSO_4$ lub aparat Deana-Starka. Jest to niezbędne, ponieważ iminy są związkami nietrwałymi, które pod wpływem wody hydrolizują do związków karbonylowych i amin. Najłatwiej hydrolizie ulegają iminy z podstawnikami alkilowymi, w przypadku których nie występują stabilizujące strukturę sprzężenia, występujące natomiast w iminach z podstawnikami arylowymi (Rys. 3a). Hydroliza oskymów, fenylohydrazonów, semikarbazonów i zasad Schiffa możliwa jest natomiast wyłącznie w kwaśnych roztworach wodnych [8]. Reakcja ketonu z pierwszorzędową aminą zachodzi bardzo powoli. Mechanizm syntezy składa się z dwóch etapów. W pierwszym zachodzi addycja, która prowadzi do powstania produktu pośredniego – hemiaminalu. Etap ten zachodzi najszybciej przy $pH = 4$, jednak nie zależy od obecności kwasu. W drugim etapie następuje dehydratacja z wytworzeniem iminy oraz wody jako produktu ubocznego. Etap ten determinowany jest obecnością kwasu, który jest konieczny do protonowania grupy hydroksylowej, co prowadzi do odłączenia cząsteczki wody i utworzenia produktu końcowego – iminy. Duży wpływ na przedstawioną reakcję ma wartość pH środowiska, w którym jest prowadzona. Użycie zbyt mocnego kwasu (zbyt niskie pH) spowalnia pierwszy etap reakcji, co spowoduje otrzymanie mniejszej ilości hemiaminalu, w konsekwencji finalnego produktu. Natomiast użycie zbyt słabego kwasu (wysokie pH) spowoduje brak wystarczającej ilości protonów w mieszaninie reakcyjnej, a w konsekwencji utrudnioną protonację grupy hydroksylowej i zajście dehydrogenacji. Uwzględniając wszystkie czynniki wpływające na przebieg reakcji, optymalna wartość pH przy jakim powinna być prowadzona synteza wynosi 4–6 (przy ograniczeniu dostępu wody) [2]. Obecność wody można ograniczyć stosując „suchy”, pozbawiony wody rozpuszczalnik, substancje do pochłaniania wody, np. wspomniane wcześniej sita molekularne oraz wykonując syntezę w atmosferze osuszonego gazu.

Podsumowując, czynnikiem który wpływa na szybkość tworzenia imin jest wartość pH, która determinuje zarówno etap addycji jak i dehydratacji. Obecność kwasu w mieszaninie reakcyjnej w pierwszym etapie nie jest potrzebna do jej zajścia, natomiast w drugim etapie, obecność kwasu jest już konieczna. Na Rysunku 6 przedstawiono poglądowy wykres zależności logarytmu szybkości reakcji od wartości pH [2].



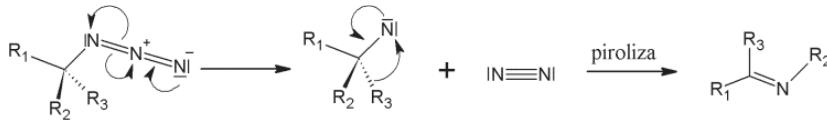
Rysunek 6. Wykres zależności logarytmu szybkości reakcji od pH [2]
Figure 6. Chart of dependence logarithm of the reaction rate on pH [2]

Kolejną reakcją otrzymywania imin jest reakcja addycji odczynników Grignarda do nitryli. W reakcji tej powstaje sól – ketimina, która następnie pod wpływem kwaśnego środowiska ulega hydrolizie do ketonu oraz lotnego amoniaku (Rys. 7) [2].



Rysunek 7. Schemat addycji odczynników Grignarda
Figure 7. Scheme of addition of Grignard reagents

Inną znaną reakcją otrzymywania imin jest wysokotemperaturowy proces pirolizy azydku alkilowego. Pirolizowana substancja pod wpływem wysokiej temperatury początkowo ulega rozkładowi z utworzeniem nietrwałej pierwszorzędowej aminy i wydzieleniem azotu i następnie przegrupowaniu do iminy. Syntezę tę prowadzi się w atmosferze beztlenowej z możliwością zastosowania katalizatora obniżającego temperaturę reakcji. Na Rysunku 8 przedstawiono mechanizm reakcji pirolizy azydku alkilowego [9].

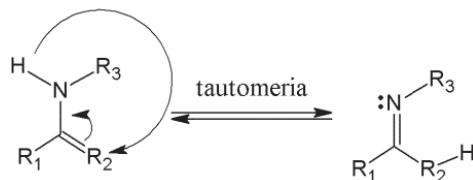


Rysunek 8. Mechanizm reakcji pirolizy azydku alkilowego
Figure 8. Mechanism of pyrolysis of the alkyl azide reaction

2.3. TAUTOMERIA IMINOWO-ENAMINOWA

Jak wcześniej wspomniano, iminy można otrzymać w reakcjach aldehydów lub ketonów z pierwszorzędowymi aminami. Zarówno iminy jak i enaminy są związkami pomiędzy którymi może zachodzić przemiana izomeryczna. Przemiana ta nosi nazwę tautomerii iminowo-enaminowej [10], która polega na przenoszeniu

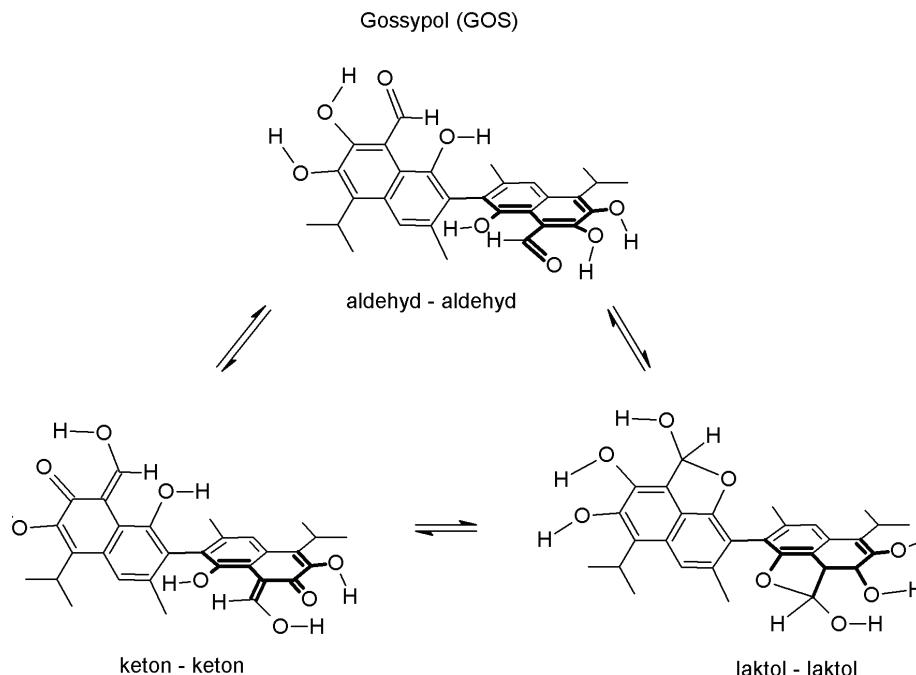
atomu wodoru pomiędzy atomami węgla i azotu występujących w charakterystycznym wiązaniu grupy iminowej i enaminowej (Rys. 9).



Rysunek 9. Schemat tautomerii iminowo-enaminowej

Figure 9. Scheme of imine-enamine tautomerism

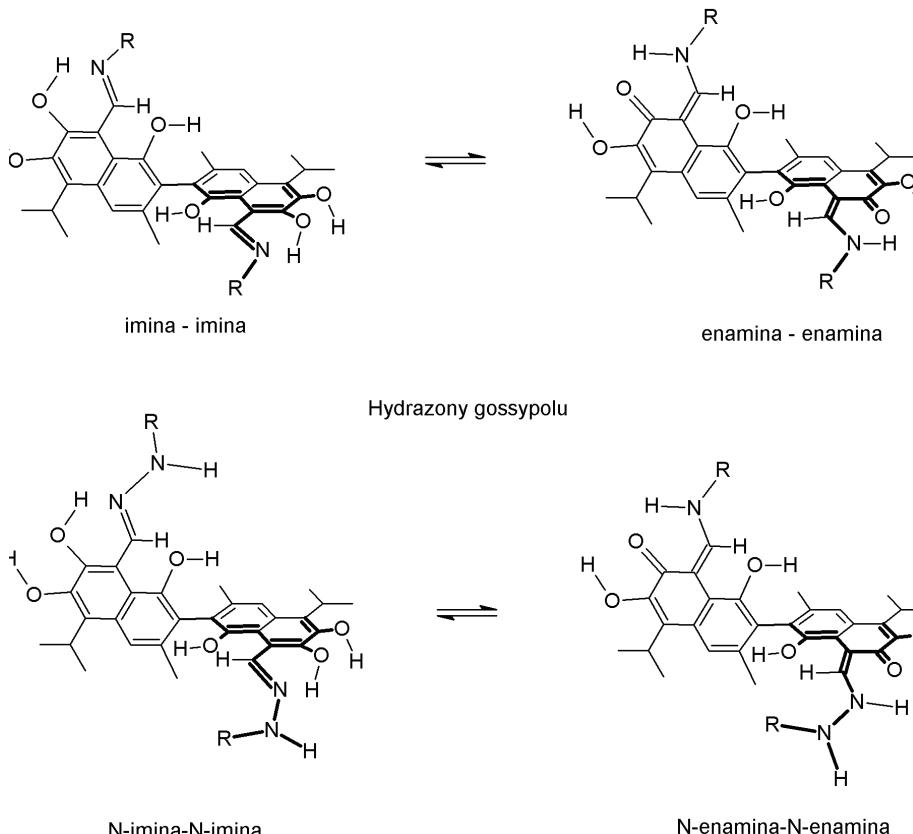
Gossypol i jego pochodne (zasady Schiffa, hydrazony) występują w tautomerycznych formach przedstawionych na Rys. 10 [4]. Gossypol występuje w formach aldehyd-aldehyd, keton-keton oraz laktol-laktol. Zasady Schiffa gossypolu natomiast występują w formach imina-imina oraz enamina-enamina, a hydrazony gossypolu w formach *N*-imina-*N*-imina oraz *N*-enamina-*N*-enamina (Rys. 1) [4]. W rezultacie, zarówno gossypol jak i zasady Schiffa, bez względu na rodzaj podstawnika i rozpuszczalnika mogą występować w różnych formach tautomerycznych, stabilizowanych przez wewnętrzcząsteczkowe wiązanie wodorowe [3].



Rysunek 10. Tautomeryczne formy gossypolu oraz jego pochodnych [4]

Figure 10. Tautomeric forms of gossypol and its derivatives [4]

Zasady Schiffa gossypolu

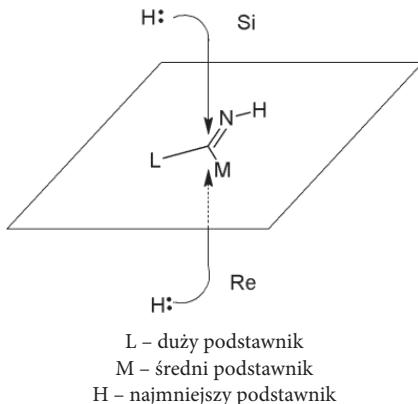


Rysunek 10. Ciąg dalszy
Figure 10. Continuation

2.4. ASPEKTY STEREOCHEMICZNE

Iminy stanowią grupę związków wykazujących stereoizomerię geometryczną *E* i *Z*. Obecność dwóch podstawników przy iminowym atomie węgla i jednego podstawnika przy atomie azotu daje możliwość syntezy nowych, jeszcze nie zbadanych, imin. Taka specyficzna budowa stwarza możliwość, otrzymania nowych związków o różnej konfiguracji. Zasady Schiffa posiadające polarne podstawniki przeważnie wykazują działanie przeciwbakteryjne. Wybierając do syntezy keton zawierający dwie różne grupy boczne przy karbonylowym atomie węgla można uzyskać prochiralne iminy. Atom węgla wiążania C=N zmieniający się w centrum chiralnym pod wpływem ataku nukleofila nazywamy prochirальным atomem węgla. Atak nukleofila może nastąpić zarówno od strony *Re* jak i *Si*, które wyznacza się zgodnie z regułami Cahna-Ingolda-Pre-

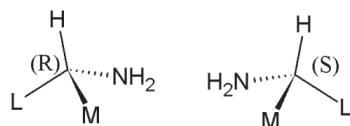
loga, dla strony *Re* zgodnie z ruchem wskazówek zegara, natomiast dla strony *Si* przeciwnie do ruchu wskazówek zegara [11]. Stosowanie prochiralnych ketonów jest kluczowe w przeprowadzanej syntezie. Otrzymane prochiralne iminy mogą być następnie zastosowane do syntezy optycznie czystych amin poprzez asymetryczną redukcję.



Rysunek 11. Schematyczny rysunek ataku anionu wodorkowego od strony *Re* i *Si* prochiralnej iminy
Figure 11. Scheme of attack hydride anion from the sides *Re* and *Si* prochiral imine

2.5. REDUKCJA IMIN

Iminy są grupą związków, które mogą ulegać redukcji do amin. Ogólny proces otrzymywania amin ze związków karbonylowych, pośrednio przez redukcję imin nosi nazwę redukcyjnego aminowania [2]. W przypadku wcześniej wspomnianych prochiralnych imin, po redukcji otrzymuje się parę enancjomerów amin. Iminy można redukować przy pomocy bardzo popularnych reduktorów takich jak np. tetrahydroboran sodu (NaBH_4), tetrahydroglinian litu (LiAlH_4) lub najczęściej stosowanego do redukcji imin – cyjanotrihydroboranu sodu (NaCNBH_3), w związku z posiadaniem elektronoakceptorowej grupy cyjankowej umożliwiającej łatwiejszy transport anionu wodorkowego [11]. W tych przypadkach, redukcja imin prowadzi do uzyskania par enancjomerów chiralnej aminy (Rys. 12).



Rysunek 12. Para enancjomerów chiralnej aminy
Figure 12. A pair of the enantiomers of a chiral amine

Enancjomery niektórych amin wykazują odmienne właściwości chemiczne. Znanym związkiem tego typu był talidomid, składnik leku w formie racematu, którego jeden z enancjomerów, w przeciwnieństwie do drugiego, działał szkodliwie na organizm człowieka (uszkadzał DNA płodu). Dalsze badania nad określeniem ich właściwości prowadzone były przy zastosowaniu stereo kontrolowanych metod otrzymywania imin. Jedną z nich jest asymetryczna redukcja wiązania C=N z użyciem trichlorosilanów katalizowana chiralnymi zasadami Lewisa [12]. Aby związki te wykazywały efektywne właściwości redukujące, wymagana jest aktywacja zasadą Lewisa, co w rezultacie tworzy sześciokoordynacyjny kompleks wodorokrzemianu. Kobayashi i in. [13], zasugerowali zastosowanie DMF, związku, który może aktywować trichlorosilan powodując redukcję różnych grup związków, takich jak: ketony, aldehydy i aldiminy.

Inną metodą otrzymania chiralnych amin jest asymetryczne uwodornienie imin, które obok redukcyjnego hydrosilowania stanowi jedną z bardziej znanych technik otrzymywania takich związków. Jako katalizatory zastosowano chiralne kwasy Lewisa, związki rutenu, irydu, palladu i tytanu. Pozwoliło to na stereokontrolowane uwodornienie iminy i otrzymanie z dość dużym nadmiarem enancjomerycznym produktu. Katalizatory irydowe szczególnie stosowane są wobec alifatycznych oraz cyklicznych imin powodując ich bezpośrednie uwodornienie. Mechanizm tej reakcji jest dość charakterystyczny, w związku z brakiem wiązania podłożą (substratu) z centrum metalicznym podczas uwodornienia. Hopmann i Bayer w jednej ze swoich prac [14], stawiają problem wielkości osiągniętej enancjoselektywności w takich układach. Stereokontrolowana reakcja uwodornienia iminy katalizowanej irydem stanowi mało poznane obszary nauki i to właśnie wymaga dalszych badań. Stereokontrola reakcji może być regulowana za pomocą słabych oddziaływań katalizatora z podłożem, a to może być modyfikowane poprzez dodatek rozpuszczalników lub innych związków.

UWAGI KOŃCOWE

Od wielu lat iminy stanowią grupę związków będących w kręgu zainteresowania wielu naukowców i toksykologów. W przedstawionej pracy opisano metody syntezy i redukcji prochiralnych imin ze szczególnym omówieniem reakcji ketonu lub aldehydu z pierwszorzędową aminą. Iminy jako związki nietrwałe oraz ulegające hydrolizie w kontakcie z wodą, w przyszłości mogą stać się prekursorem nowej klasy leków.

PODZIĘKOWANIA

Serdeczne podziękowania kieruję do dr Daniela Łowickiego za pomoc merytoryczną podczas pisania niniejszej pracy oraz do dr hab. Ewy Witek i mgr. Marcina Szewczyka za cenne rady i pomoc w redagowaniu tekstu.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemia*, PWN, Warszawa 2005.
- [2] J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, P. Wothers, *Chemia Organiczna*, Część 1, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa 2001.
- [3] P. Przybylski, K. Pyta, D. Remlein-Starosta, G. Schroeder, B. Brzezinski, F. Bartl, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2009, **19**, 1996.
- [4] P. Przybylski, K. Pyta, J. Stefańska, M. Ratajczak-Sitarz, A. Katrusiak, A. Huczyński, B. Brzezinski, *Eur. J. Med. Chem.*, 2009, **44**, 4393.
- [5] V.-T. Dao, C. Gaspard, M. Mayer, G.H. Werner, S.N. Nguyen, R.J. Michelot, *Eur. J. Med. Chem.*, 2000, **35**, 805.
- [6] International Union of Pure and Applied Chemistry, Compendium of Chemical Terminology, Gold Book, Version 2.3.3, 24.04.2014.
- [7] V.A. Voicu, J. Bajgar, A. Medvedovici, F.S. Radulescu, D.S. Miron, *J. App. Toxicol.*, 2010, **30**, 719.
- [8] G. Schroeder, *Materiały supramolekularne*, Betagraf P.U.H, Poznań 2008.
- [9] J. March, *Chemia Organiczna, Reakcje, mechanizmy, budowa*, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, McGraw-Hill, Warszawa 1975.
- [10] J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, P. Wothers, *Chemia Organiczna*, Część 2, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Wydanie I, Warszawa 2001.
- [11] J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, P. Wothers, *Chemia Organiczna*, Część 3, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa 2001.
- [12] S. Jones, C.J.A. Warner, *Org. Biomol. Chem.*, 2012, **10**, 2189.
- [13] S. Kobayashi, M. Yasuda, I. Hachiya, *Chem. Lett.*, 1996, 407.
- [14] K.H. Hopmann, A. Bayer, *Coord. Chem. Rev.* 2014, **268**, 59.

Praca wpłynęła do Redakcji 20 lipca 2016

HORYZONTY NAUKI 2016
- FORUM PRAC DYPLOMOWYCH,
WYDZIAŁ CHEMII UJ, 17-18 MAJA 2016

IMMOBILIZOWANE ALFA-AMYLAZY I CELULAZY
W ZASTOSOWANIACH PRAKTYCZNYCH

IMMOBILIZED ALPHA-AMYLASES AND CELLULASES
IN PRACTICAL APPLICATIONS

Zbigniew Chałupka

*Uniwersytet Jagielloński
ul. R. Ingardena 3, 30-060 Kraków
e-mail: zbigniewchalupka92@gmail.com*

Abstract

1. Enzymy
 - 1.1. Mechanizm działania
 - 1.2. Kinetyka reakcji enzymatycznych
 - 1.3. Klasyfikacja enzymów
 - 1.3.1. Podział hydrolaz
 2. Enzymy amylolityczne
 3. Celulazy
 4. Przemysłowe zastosowanie α -amylazy i celulaz
 5. Immobilizacja enzymów
 - 5.1. Immobilizacja enzymów przez adsorpcję
 - 5.2. Immobilizacja enzymów przez wiązanie kowalencyjne
 6. Mezoporowate materiały SBA-15 jako nośniki enzymów
- Uwagi końcowe
Piśmiennictwo cytowane
-



Zbigniew Chałupka urodził się w 1992 roku w Wieluniu. W roku 2011 ukończył I Liceum Ogólnokształcące im. Tadeusza Kościuszki w Wieluniu. Uczęszczał do klasy o profilu biologiczno-chemicznno-matematycznym. Po ukończeniu liceum rozpoczął studia chemiczne na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego. W roku 2014 skończył studia I stopnia obroną pracy licencjackiej pt. „Synteza nowej generacji TADDOLi z naturalnych terpenoidów”. Praca była wykonywana w Zespole Chemii Związków Heterocyklicznych i Metaloorganicznych pod opieką dr. Bartosza Trzewika. W tym samym roku rozpoczął studia II stopnia na tym samym wydziale. Jako specjalizację wybrał: Polimery i kompozyty w Zakładzie Technologii Chemicznej. Badania do pracy magisterskiej „Enzymatyczna hydroliza skrobi na immobilizowanej α -amylazie” rozpoczął w Zespole Chemii Polimerów pod opieką dr hab. Ewy Witek.

ABSTRACT

Today, more and more products made in biotechnological processes involving enzymes. The stability of the enzyme under process conditions are subjected to the immobilization on solid supports, which leads to a heterogeneous biocatalyst that can be used in several cycles or continuous processes. The article discusses the techniques presented in the literature immobilization of enzymes hydrolyzing starch and cellulose. Includes the method of immobilization in/on polymer and inorganic carriers and different ways of binding of the enzyme to a solid support. Particular attention is focused on mesoporous silica (mesoporous silica) (SBA-15) as a very attractive media for biocatalysts. Starch and cellulose are the main components of biomass, which is seen as an alternative raw material for ethanol production, i.e. second generation biofuels. Developing an effective biocatalyst for the conversion of biomass is the challenge of the XXI century.

Keywords: amylolytic enzymes, cellulases, enzyme immobilization, mesoporous silica, SBA-15

Słowa kluczowe: enzymy amylolityczne, celulazy, immobilizacja enzymów, mezoporowate krzemionki, SBA-15

WPROWADZENIE

Obecnie coraz więcej produktów otrzymywanych jest w procesach biotechnologicznych z udziałem enzymów. Celem zwiększenia stabilności enzymów w warunkach procesowych poddaje się je immobilizacji na stałych nośnikach, co prowadzi do otrzymania heterogenicznych biokatalizatorów, które mogą być używane w kilku cyklach lub w procesach ciągłych. W artykule omówiono prezentowane w literaturze techniki immobilizacji enzymów hydrolizujących skrobię i celulozę. Uwzględniono metody immobilizacji na/w nośnikach polimerowych i nieorganicznych oraz różne sposoby wiązania enzymu ze stałym podłożem. Szczerą uwagę skoncentrowano na mezoporowej krzemionce (mesoporous silica) (SBA-15) jako bardzo atrakcyjnym nośniku biokatalizatorów. Skrobia i celuloza są głównymi składnikami biomasy, która postrzegana jest jako alternatywny surowiec do produkcji etanolu, tj. biopaliwa drugiej generacji. Opracowanie efektywnego biokatalizatora do konwersji biomasy jest wyzwaniem XXI w.

1. ENZYMY

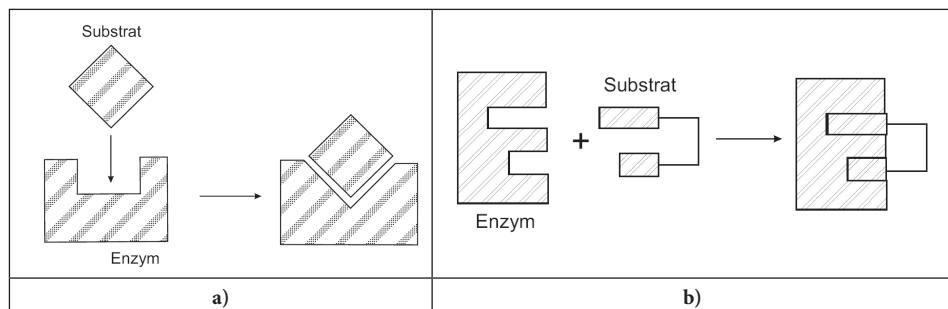
1.1. MECHANIZM DZIAŁANIA

Enzymy występujące w komórkach wszystkich żywych organizmów katalizują reakcje biochemiczne w warunkach fizjologicznych, w których energia wewnętrzna układu jest tak niska, że pokonanie bariery energetycznej stanu przejściowego nie jest możliwe bez udziału biokatalizatora. Enzymy zwiększają szybkość reakcji przy najmniej milion razy, co oznacza, że charakteryzują się ogromną siłą katalityczną nieosiągalną dla chemicznych układów katalitycznych. Działają tak jak wszystkie katalizatory, czyli nie zmieniają stanu równowagi katalizowanej reakcji, ale obniżając energię aktywacji poprzez utorowanie alternatywnej ścieżki zwiększają jej szybkość w danej temperaturze [1, 2].

Inną niezwykłą cechą enzymów jest selektywność procesowa i substratowa. Każdy enzym katalizuje jedną reakcję chemiczną lub kilka reakcji, ale ściśle spokrewnionych i na ogół działa tylko na jeden rodzaj substratu. Enzymy są zdolne do katalizowania nie tylko skomplikowanych reakcji chemicznych, ale i tak prostych jak przeniesienie dwutlenku węgla w organizmie [1]. Anhydroza węglanowa, czyli enzym, który jest za to odpowiedzialny, uwadnia 105 cząsteczek dwutlenku węgla na sekundę. W reakcjach katalizowanych przez enzymy nie są praktycznie generowane produkty uboczne, które nie mogą być wykorzystane w innych reakcjach. Te niezwykłe właściwości enzymów są ściśle związane z ich strukturą.

Zdecydowaną większość enzymów to białka, jednakże nane są wyjątki (cząsteczki RNA). Struktura enzymów białkowych jest złożona. Obok części białkowej zbudowanej z jednej lub częściej z kilku makrocząsteczek polipeptydowych zwanej apoenzymem

w wielu enzymach występuje także część niebiałkowa, która zawiera małocząsteczkowe związki organiczne i jony metali uczestniczące w procesie katalizy nazwane odpowiednio grupą prostetyczną, kofaktorem i koenzymem [3]. Najważniejszą częścią enzymu jest miejsce aktywne, które we wszystkich enzymach zlokalizowane jest w szczelinach lub zagłębieniach. Stanowi ono niewielki procent całej objętości enzymu jednakże jest ono kluczowe przy jego funkcjonowaniu. Znaczna część enzymu nie ma w ogóle kontaktu z substratem. Centrum aktywne jest specjalnie „zaaranżowane” przestrzennie tak aby przyjąć cząsteczkę substratu, co ilustruje model klucza i zamka z roku 1890 zaproponowany przez Emila Fischera (Rys. 1a). Niektóre enzymy nie posiadają ustalonego kształtu miejsca aktywnego, dopasowanie następuje dopiero w momencie związania substratu z centrum aktywnym, taki proces to wymuszone dopasowanie zaproponowany w 1958 przez D.E. Koshland'a Jr. (Rys. 1b).

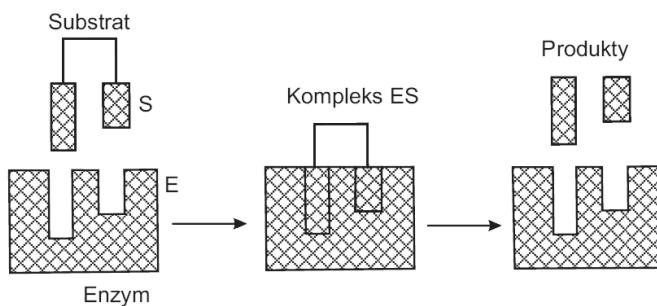


Rysunek 1. Schemat ilustrujący wiązanie enzymu z substratem a) model zamka i klucza b) model wymuszonego dopasowania

Figure 1. A diagram illustrating the binding of the enzyme to the substrate a) the lock and key model b) forced fit model

Wiązania wytwarzane pomiędzy cząsteczką substratu a enzymem są stosunkowo słabe (wiązania wodorowe, oddziaływanie jonowe, siły van der Waalsa) [1, 2]. Efektywność procesów katalizowanych przez enzymy związana jest ze zdolnością do specyficznego ułożenia przestrzennego substratów w miejscach aktywnych, co sprzyja tworzeniu i rozrywaniu wiązań chemicznych.

Podczas reakcji enzymatycznej substrat (S) łączy się z enzymem (E) tworząc kompleks przejściowy (ES), po czym produkt, lub produkty reakcji są uwalniane, co ilustruje Rysunek 2.



Rysunek 2. Powstawanie kompleksu enzym-substrat i uwalnianie produktu reakcji
Figure 2. The formation of the enzyme-substrate and releasing the reaction product

1.2. KINETYKA REAKCJI ENZYMATYCZNYCH

Na Rysunku 3 pokazano typową dla reakcji enzymatycznych zależność szybkości (r) od stężenia substratu (S). Model opracowany przez Michaelisa-Menten poprawnie opisuje kinetykę reakcji o takiej charakterystyce.

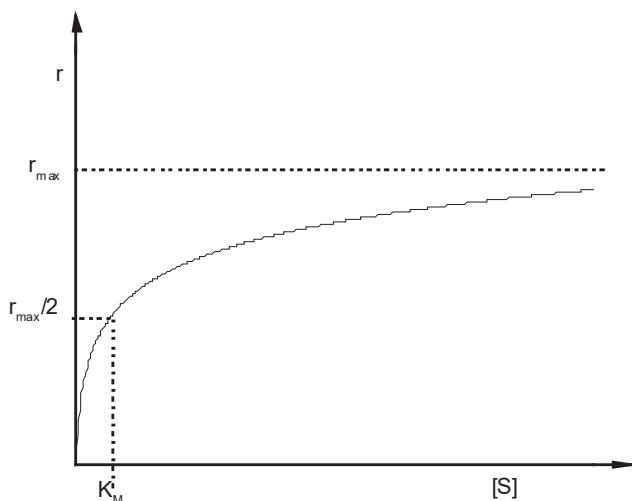
Substrat (S) łączy się z enzymem (E) tworząc kompleks przejściowy (SE) (I), który w dalszej kolejności reaguje z kolejnym substratem, lub daje produkt jeśli reakcja jest jednocząsteczkowa (II).



Po zastosowaniu przybliżenia stanu stacjonarnego dla SE i przekształceniach, a także przy założeniu, że reakcja jest zerowego rzędu otrzymujemy równanie znane pod nazwą równania Michelisa-Menten (III):

$$r = r_{\max} / (1 + K_M / [S]) \quad (III)$$

gdzie r_{\max} to maksymalna szybkość reakcji, a K_M to stała Michelisa. Stała Michelisa jest równa stężeniu substratu S w momencie gdy $r = r_{\max}/2$ (Rys. 3).



Rysunek 3. Zależność szybkości reakcji enzymatycznej od stężenia substratu
Figure 3. Relationship between the substrate concentration and reaction rate

K_M oraz r_{max} wyznacza się empirycznie podczas pomiarów szybkości dla różnego stężenia substratu (S). Równanie III często spotykane jest w postaci przekształconej do formy (IV):

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{r_{max}} + \frac{K_M}{r_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} \quad (IV)$$

Wydajność reakcji enzymatycznych zależy od wielu czynników, a jednym z nich jest pH środowiska. Jego wartość na wpływ na to w jakiej formie będzie występować enzym. Kolejnym istotnym parametrem mającym wpływ na działanie enzymów jest temperatura. Każdy enzym efektywnie pracuje w temperaturze determinowanej przez charakterystyczne dla niego środowisko fizjologiczne. Wzrost temperatury powoduje przyspieszenie reakcji enzymatycznej, jednak ogrzanie układu do temp. 40–60°C na ogół wywołuje całkowitą dezaktywację większości enzymów na skutek denaturacji, tj. zniszczenia struktury nadcząsteczkowej [2].

1.3. KLASYFIKACJA ENZYMÓW

Zgodnie z ustaleniami Międzynarodowej Unii Biochemicznej (IUB) enzymy podzielono na sześć głównych klas przyjmując jako kryterium typ katalizowanej reakcji i jej substraty. Każdy enzym został opisany specjalnym kodem: *EC.a.b.c.d.*, gdzie małym literom (*a*, *b*, *c*, *d*) przypisane są odpowiednie numery. Pierwszy z nich (*a*) odpowiada za przyporządkowanie enzymu do jednej z wcześniej wspomnianych sześciu głównych klas, kolejny numer oznacza (*b*) oznacza podklasę, (*c*): podklasę podklasy *b*, natomiast liczba (*d*) określa numer seryjny w podpodklasie *c*.

Główne klasy enzymów to: EC.1: oksydoreduktazy, EC.2: transferazy, EC.3: hydrolazy, EC.4: liazy, EC.5: izomerazy i EC.6: ligazy. Pierwsze z nich katalizują reakcje redox w obecności tlenu, kolejne (transferazy) są odpowiedzialne za reakcje przenoszenia grup funkcyjnych takich jak np. aminowa czy też acylowa. Hydrolazy katalizują rozkład wiązań, m.in. C-O, C-N, C-C. Enzymy z klasy EC.4 podobnie jak hydrolazy katalizują reakcje rozkładu wiązań, jednakże na drodze eliminacji. Zadaniem izomeraz jest katalizowanie wewnętrzczasteczkowych reakcji izomeryzacji. Ostatnia klasa enzymów to ligazy, które przyspieszają reakcje pomiędzy dwiema cząsteczkami połączone z hydrolizą ATP lub innego trójfosforanowego nukleozydu [4].

1.3.1. Podział hydrolaz

Hydrolazy (EC.3.b.c.d.) dzielą się na trzynaście podgrup: EC.3.1 – działają na wiązania estrowe, EC.3.2 – hydrolizują wiązania glikozydowe, EC.3.3 – wiązania estrowe, EC.3.4 – wiązania peptydowe, EC.3.5 – hydrolizują wiązania C-N, jednakże inne niż wiązanie peptydowe, EC.3.6 – hydrolizują wiązania w bezwodnikach kwasowych, EC.3.7 – hydrolizują wiązania C-C, EC.3.8 – wiązania w halogenkach, EC.3.9 – odpowiedzialne są za rozpad wiązania P-N, EC.3.10 – hydroliza wiązania S-N, EC.3.11 – rozpad wiązania C-P, EC.3.12 – hydroliza wiązania S-S, ostatnia podgrupa – EC.13 katalizuje reakcję rozpadu wiązania C-S [5].

2. ENZYMY AMYLOLITYCZNE

Enzymy amylolityczne (amylazy, diastazy; EC 3.2.1) jest to klasa enzymów, których zadaniem jest hydroliza skrobi (u roślin) i glikogenu (u zwierząt). W skład amylaz wchodzą α -amylazy (EC 3.2.1.1), β -amylazy (EC 3.2.1.2) oraz glikozydazy (EC 3.2.1.3) [11]. Pierwszy raz diastaza została wyizolowana przez dwóch naukowców Payen'a i Persoz'a w roku 1833 [7]. W kolejnym stuleciu, a dokładniej w roku 1924 Kuhn [8] zaobserwował, że w zależności od typu użytej amylazy otrzymuje się produkty o różnych właściwościach optycznych. Po tym odkryciu postanowiono podzielić amylazy na dwie grupy: α -amylazy i β -amylazy [8, 9]. Blisko 30 lat później opisano po raz pierwszy glikozydazę (wyizolowana z pleśni *Rizopodus delamar*) [10].

Amylasy znajdują zastosowanie na dużą skalę m.in. w procesach fermentacyjnych, przy przetwarzaniu skrobi. Występują również enzymy, które są zdolne do rozkładu skrobi jednakże nie są klasyfikowane jako amylazy, ponieważ oprócz hydrolizy wykazują aktywność w transferze czy też w reakcjach kondensacji. Ostatecznie powstała koncepcja klasyfikacji, zgodnie z którą do amylaz zaliczane są enzymy, które biorą udział w reakcjach hydrolizy skrobi lub glikogenu albo transferu tych związków jednakże bez udziału fosforanów. Z dużą dozą prawdopodobieństwa

stwa można założyć, iż enzymy amylolityczne i te charakteryzujące się podobnym działaniem są najbardziej rozpowszechnione wśród organizmów żywych, ponieważ występują nie tylko u wyższych roślin i zwierząt, ale i u mikroorganizmów. Godnym odnotowania jest fakt, iż invertujące typy amylaz występują u roślin wyższych i u niektórych mikroorganizmów, przede wszystkim bakterii, a także grzybów *Phycomyces* i *Ascomyces*. Rodzina α -amylaz to enzymy katalizujące hydrolizę (skrobi, glikogenu lub produktów z nich pochodzących), zdolne są także do transferu tych związków. Charakteryzują się tym, iż produktami reakcji są tylko formy α -anomeryczne, także w przypadku transferu [6].

Głównym źródłem energii z jakiego korzysta nasz organizm jest glukoza. W diecie przeciętnego człowieka występuje ona rzadko w czystej formie. Glukoza, którą spożywamy występuje w postaci dimerów, tj. laktozy i sacharozy lub w postaci makrocząsteczek – skrobi i glikogenu. Alfa-amylaza jest enzymem, którego zadaniem jest rozłożenie skrobi do jednostek dwu lub trzy cukrowych. Pierwsza amylaza znajduje się w ludzkiej ślinie i pomaga ona już wstępnie rozłożyć skrobię podczas przeżuwania. Druga produkowana jest przez trzustkę. Ten enzym katalizuje ostatni etap procesu trawienia skrobi. Jednostki dwu i trzy cukrowe są finalnie rozkładane do glukozy przy pomocy enzymów zlokalizowanych w ścianach jelita. Amylaza trzustkowa jest względnie małym enzymem, odpornym na działanie środowiska, w którym się znajduje [11].

Ramassubbu [12] w oparciu o badania dyfrakcji promieni rentgenowskich wyznaczył wymiary komórki kryształu α -amylazy znajdującej się w ślinie uzyskując następujące wartości: $a = 53,200 \text{ \AA}$, $b = 75,400 \text{ \AA}$, $c = 136,600 \text{ \AA}$.

W skład miejsca aktywnego α -amylazy wchodzą trzy aminokwasy: glutaminian 233, asparaginian 197 oraz asparaginian 300 (numery opisują, którym z kolejności jest dany aminokwas w łańcuchu białkowym). To one są odpowiedzialne za rozpad wiążania glikozydowego w cząsteczkach skrobi.

3. CELULAZY

Celulazy są klasą enzymów, które hydrolizują wiązania β -1,4 glikozydowe w łańcuchu celulozowym. Występują one w wielu organizmach żywych począwszy od grzybów, bakterii, poprzez rośliny, a kończąc na zwierzętach. Typowa celulaza składa się z dwóch modułów, katalitycznego i niekatalitycznego. Podjednostka katalityczna posiada ściśle określona sekwencję aminokwasów, która sprawia, iż enzym jest zdolny do wyżej wymienionej hydrolizy. Druga podjednostka to łańcuch węglowodorowy służący do zakotwiczenia enzymu.

Trzy enzymy działające synergistycznie degradują celulozę do monosacharytu: (i) *endo*-(1,4)- β -D-glukanglukanohydrolaza (EC 3.2.1.4), która rozpoczyna hydrolizę celulozy poprzez dysocjację obecnych w krystalicznej strukturze celulozy wiązań o charakterze niekowalencyjnym, (ii) *exo*-(1,4)- β -D-glukancelobiohydrolaza (EC 3.2.1.91) hydrolizująca celulozę do celobiozy, (iii) celobiaza (β -glukozydaza)

(EC 3.2.1.21), która bierze udział w ostatnim etapie rozkładu celulozy, tzn. hydroluje wiązania 1,4- β glikozydowe celobiozy do glukozy, finalnego produktu tej reakcji [12, 5].

Celobiohydrolazę (EC 3.2.1.91) występującą w grzybie *Trichoderma reesei* badali Abuja i wsp. [14]. Wyniki wskazują, że ciężar cząsteczkowy tego enzymu jest na poziomie 65 kDa. Zbudowany jest z dwóch domen, tj. aktywnego rdzenia (55 kDa) oraz elastycznego, długiego łańcucha glikopeptydowego (10 kDa) służącego do przytwierdzania enzymu do nierozpuszczalnej celulozy. Badania wykazały także, iż rdzeń ma wymiary $R_g = 2,09$ nm oraz maksymalną średnicę $D_{max} = 6,5$ nm, natomiast cały enzym $R_g = 4,27$ nm i $D_{max} = 18$ nm. Kształt cząsteczek enzymu przypomina kijankę („tadpole-like” structure). Cellobiohydrolaza jest zdolna do hydrolyzy celulozy mikrokrytalicznej i amorficznej.

4. PRZEMYSŁOWE ZASTOSOWANIE ALFA-AMYLAZY I CELULAZ

Zastosowanie enzymów jako katalizatorów w procesach realizowanych poza ich naturalnym środowiskiem sięga daleko w przeszłość. Zanim uczyonym udało się poznać, wyizolować i opisać te niezwykłe białka, katalizę enzymatyczną stosowano do produkcji alkoholu etylowego używając drożdży, w których obecna jest dehydrogenaza alkoholowa. Innym przykładem jest produkcja serów podpuszczkowych, do której stosowano podpuszczkę z żołądków bydlęcych. W wyniku badań realizowanych na szeroką skalę, uczyonym udało się opracować metody izolacji i oczyszczania białek enzymatycznych. Poznano mechanizmy ich działania, opracowano metody modyfikacji zmierzające do ich ustabilizowania poza środowiskiem fizjologicznym.

Enzymów nie można otrzymać na drodze syntezy chemicznej. Opracowano szereg metod wytwarzania preparatów enzymatycznych w laboratoriach genetycznych, gdzie prowadzi się hodowlę odpowiednich bakterii lub grzybów, do których wprowadza się gen kodujący i promotor wywołując w ten sposób nadprodukcję danego enzymu. Następnie izoluje się żywe białko enzymatyczne, zatęża, utrwała i otrzymuje gotowy preparat enzymatyczny [15].

Proteazy i α -amylazy to dwa najważniejsze enzymy przemysłowe reprezentujące ponad 70% światowego rynku biokatalizatorów. Zarówno grzyby jak i bakterie stosowane są do wytwarzania α -amylazy, jednakże preparaty otrzymywane z hodowli grzybów są bardziej stabilne niż pozyskiwane z bakterii [16].

Istnieje cały szereg organizmów wytwarzających celulazy, jednakże większość firm (Novozymes, Genencor) wytwarza handlowe celulazy z grzybów strzępkowych *Trichoderma* i *Aspergillus* lub pochodnych szczepów [17].

W krajach wysokorozwiniętych coraz więcej produktów otrzymuje się w procesach biotechnologicznych z udziałem enzymów. Enzymy znalazły szerokie zastosowanie w takich dziedzinach praktyki jak przemysł farmaceutyczny, spożywczy, tekstylny, chemiczny (głównie produkcja detergentów), papierniczy i garbarski [18].

Alfa-amylazy wykorzystywane są w przemyśle na szeroką skalę, począwszy od przemysłu spożywczego, poprzez zastosowanie w produkcji tekstyliów, detergentów, biopaliw kończąc na przemyśle papierniczym.

Enzymatyczna hydroliza skrobi, która jest podstawą wykorzystywania α -amylazy w przemyśle zachodzi w trzech etapach. Pierwszym z nich jest żelowanie, które ma na celu rozpuszczenie ziaren skrobi, drugi etap polega na częściowej hydrolyzie tak otrzymanej zawesiny w celu zmniejszenia jej lepkości; ostatnim etapem jest scukrzanie w którym to otrzymuje się finalne produkty-glukozę i maltozę [19].

Alfa-amylazy najszerzej zastosowanie znajdują w przemyśle spożywczym. Wykorzystywane są w procesach pieczenia, browarnictwie, a także produkcji soków owocowych, syropów i innych słodyczy [20]. Syrop fruktozowy z kukurydzy jest to mieszanina cukrów kukurydzianych w smaku przypominająca sacharozę, którą to z kolei otrzymuje się z trzciny cukrowej i buraków cukrowych. Tylko pierwszy etap w procesie otrzymywania syropu kukurydzianego jest przeprowadzany z wykorzystaniem α -amylazy, pozostałe są przeprowadzane przez glukoamylazę występującą w grzybach oraz izomerazę glukozową [11]. W piekarstwie α -amylazy są używane z wielu względów. Pierwszym z nich jest fakt dodawania ich w celu rozłożenia skrobi z mąki do dekstryn, które to z kolei są wykorzystywane przez drożdże w procesie fermentacji. Zaletą dodatku amylaz jest zmniejszenie lepkości ciasta, przez co poprawieniu ulega tekstura i produkt dodatkowo zysku jena objętości. Cukry produkowane przez enzymy przyczyniają się do poprawy smaku i koloru wypieków. Kolejnym faktem skłaniającym producentów do wykorzystania tych enzymów w procesach produkcji wypieków jest to, iż produkty te wolniej się starzeją i mają przez to dłuższą datę przydatności do spożycia [20, 21]. Dodatkowo α -amylazy wykorzystywane są w procesach oczyszczania piwa czy też soków owocowych [21].

Detergenty to kolejna z wcześniej wspomnianych gałęzi przemysłu, gdzie zastosowanie znajduje α -amylaza. Wykorzystywana jest ona w pralniach czy też zmywarkach automatycznych do usuwania zanieczyszczeń reszkami jedzenia, które zawierało w sobie skrobię, np. ziemniaki, sosy, czekoladę czy też kremy. Usuwanie zabrudzeń polega na enzymatycznym rozkładzie skrobi do prostszych cukrów [22]. Zastosowanie enzymów w środkach do prania pozwala na pracę detergentów w niskiej temperaturze, natomiast w czyszczeniu przemysłowym pozwala na pracę dodatkowo przy niższych wartościach pH [23].

W dzisiejszych czasach duży nacisk kładziony jest na wykorzystanie biomasy do produkcji biopaliw. Etanol, bo to właśnie on jest najczęściej produkowanym płynnym biopaliwem otrzymywany jest ze skrobi. Ten biopolimer jest wybierany ze względu na jego szeroką dostępność i niską cenę [24].

Przemysł tekstylny: tutaj α -amylazy wykorzystywane są do usuwania kleju na bazie skrobi. Środki klejące w tym między innymi skrobia dodawane są do przedzys w celu ochrony jej w procesie przedzalniczym. Skrobia jest chętnie wykorzystywana jako środek klejący ze względu na jej niską cenę i dostępność [25, 26].

W przemyśle papierniczym α -amylaza wykorzystywana jest do produkcji substancji do pokrywania papieru w celu poprawy jego gładkości i wytrzymałości i odporności na ścieralność. W normalnych warunkach kleik skrobiowy jest zbyt gęsty do pokrywania papieru, dlatego też skrobię poddaje się częściowej hydrolizie z wykorzystaniem α -amylazy otrzymując postać bardziej płynną [19, 27].

Celulazy znajdują coraz więcej zastosowań, wykorzystywane są m.in. w przemyśle papierniczym i tekstylnym. Celulazy dodawane są również do karm dla zwierząt w celu poprawy pracy ich układu pokarmowego. Szczególne zainteresowanie enzymami cellulitycznymi jest jednak związane z możliwością wykorzystania ich w biorafineriach do produkcji etanolu z lignocelulozy. Zużywanie kopalnych surowców oraz zwiększona produkcja gazów cieplarnianych sprawiają, iż aplikacja celulaz w tym kontekście staje się niezmiernie istotna. Bardzo ważnym aspektem jest modyfikacja celulaz pod kątem zwiększenia wytrzymałości termicznej jak i redukcja kosztów jej pozyskiwania. Przewidywania zakładają, iż produkcja 45 miliardów galonów alkoholu etylowego z celulozy osiągnie w roku 2030 poziom 0.20\$ za galon; a celulaza stanie się biokatalizatorem wykorzystywanym na największą skalę w porównaniu z pozostałymi enzymami [17].

5. IMMOBILIZACJA ENZYMÓW

Stosowanie w praktyce enzymów natywnych generuje znaczne koszty z uwagi na fakt, iż enzymy są drogie, czułe na zmiany pH, temperatury oraz czynników denaturujących, a operacje polegające na oczyszczaniu produktów od białka dodatkowo podnoszą cenę finalnego produktu. Osadzenie enzymu na stałym nośniku i uzyskanie katalizatora heterogenicznego zachowującego aktywność w kolejnych cyklach lub w procesie ciągłym oznacza ogromny zysk ekonomiczny [28]. Immobilizowane mogą być nie tylko same enzymy, ale i całe komórki [29].

Termin „immobilizacja enzymów”, zdefiniował Katchalski-Katzir w 1971 r. [30]. Zgodnie z tą definicją enzym uznaje się za immobilizowany, jeżeli zlokalizowany w ściśle określonej przestrzeni obszaru reakcyjnego, jest zdolny przejawiać swoją aktywność oraz może być wykorzystany ponownie lub stosowany w procesach ciągłych.

Należy podkreślić, iż nie istnieje materiał do immobilizacji, który spełniałby wszystkie oczekiwania, dlatego priorytetowymi wymaganiami przy doborze nośnika są wymagania procesowe. Podobnie nie istnieje jeden najkorzystniejszy sposób immobilizacji, z tego powodu dla każdego enzymu nośnik należy dobierać indywidualnie na drodze eksperymentalnej. W wyniku unieruchomienia enzymu na stałym nośniku zostaje znaczco ograniczona jego ruchliwość konformacyjna, co zwiększa stabilność. Jednak wielopunktowe związanie enzymu z nośnikiem może powodować jego dezaktywację w wyniku zmiany geometrii centrum aktywnego [31].

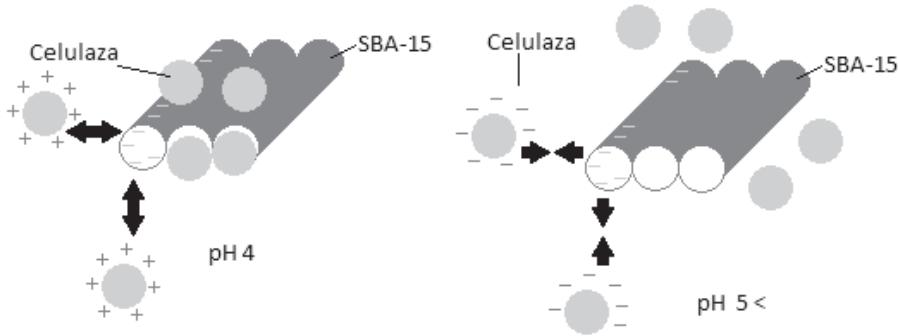
Jako nośniki często wykorzystywane są nierozpuszczalne polimery, albo stałe nośniki nieorganiczne. Enzymy działające w układzie enzym/nośnik działają w sposób odmienny niż te, które działają tylko w otoczeniu substratu i produktu [32]. Zdaniem Singh'a [32], idealny nośnik do immobilizacji enzymów musi charakteryzować się biernością, stabilnością, zdolnością do regeneracji, musi zwiększać specyficzność oraz aktywność enzymu, dodatkowo nie wskazane jest aby na nośniku następowała niespecyficzna adsorpcja i zanieczyszczenie mikroorganizmami. Pożądane jest również, aby w przypadku, gdy produkty reakcji powodują inhibicję enzymu, nośnik ograniczał to zjawisko. Proces immobilizacji wymaga przeprowadzenia dodatkowych operacji na etapie wytwarzania preparatów enzymatycznych, co w sposób oczywisty generuje dodatkowe koszty [33]. Jednakże korzyści z otrzymania aktywnego i stabilnego heterogenicznego biokatalizatora są niewspółmiernie większe niż koszty generowane przez immobilizację. Ogólne, kryteria dotyczące zasad doboru nośnika dla procesów enzymatycznych można sformułować w formie następujących zasad [34]: (i) nośniki hydrofobowe zwiększą szybkość reakcji z hydrofobowym substratem i stabilizują enzym, (ii) nośniki z wieloma centrami zdolnymi do wiązania enzymu zwiększą wytrzymałość termiczną enzymu, (iii) użycie łącznika chroni enzym przed dezaktywacją, (iv) porowatość nośnika może powodować zarówno wzrost aktywności (rozwiniecie powierzchni heterogenicznego katalizatora) jak i zahamowanie aktywności na skutek znacznych oporów dyfuzyjnych lub niedostępności substratu do centrum aktywnego.

5.1. IMMOBILIZACJA ENZYMÓW PRZEZ ADSORPCJĘ

Immobilizacja enzymów poprzez adsorcję polega na wytworzeniu wiązań wodorowych, oddziaływań van der Waalsa, bądź też wykorzystaniu oddziaływań hydrofobowych w celu związania enzymu z nośnikiem. Fakt, iż oddziaływanie te nie są trwałe, proces jest odwracalny poprzez zmianę pH, temperatury, siły jonowej czy też polarności rozpuszczalnika. Taki sposób wiązania enzymu z powierzchnią nośnika jest bezpieczniejszy dla katalizatora, ponieważ istnieje mniejsze ryzyko dezaktywacji enzymu, niż w przypadku gdy wytwarzane jest wiązanie kowalencyjne enzym-nośnik [35].

W pracy Anri Takimoto i współpracowników [36] immobilizowano celulazę na SBA-15. Naukowcy zbadali wpływ wielkości porów na proces immobilizacji celulazy. Zsyntezowali SBA-15 o porach wielkości 5,4 nm, 8,9 nm oraz 11 nm. Immobilizacja celulazy była prowadzona poprzez bezpośrednie dodanie do roztworu enzymu kilku miligramów SBA-15. Krzemionka nie była modyfikowana na powierzchni. Immobilizacja enzymu tłumaczona była poprzez powstawanie oddziaływań elektrostatycznych nośnik-enzym. Wraz ze wzrostem porów w krzemionce SBA-15 rośnie ilość zaadsorbowanego enzymu, jednakże nie idzie to w parze ze wzrostem aktywności katalitycznej. Okazało się, iż najlepsza dla procesu immobilizacji była krzemionka o wielkości porów 8,9 nm, gdyż jak twierdzą

naukowcy, taki rozmiar porów sprzyja lokowaniu się enzymu bliżej wejść porów niż w przypadku SBA-15 o porach 11 nm. Taki katalizator wykazuje również wysoką aktywność po przechowywaniu go przez 4 tygodnie w temperaturze pokojowej. Badano również wpływ pH na immobilizację i najkorzystniej zachodziła ona dla pH = 4, podczas gdy punkt izoelektryczny celulazy wynosi pI = 4,9. Wpływ pH na immobilizację zobrazowano schematycznie na rysunku poniżej (Rys. 4).



Rysunek 4. Oddziaływań pomiędzy SBA-15 a celulazą w zależności od pH
Figure 4. Interactions between SBA-15 and cellulose, at different pH

W publikacji Quing-Zhou Zhai i Si-Jia Sun [37] wykorzystano mezoporowatą krzemionkę SBA-15 do immobilizacji pepsyny-enzymu hydrolizującego rozkład białek. W drugiej serii krzemionkę SBA-15 dodatkowo zmodyfikowano za pomocą metylo-trimetoksy silanu deponując w ten sposób na jej powierzchni grupy metylowe. Prze prowadzono proces immobilizacji poprzez fizyczną adsorcję enzymu na otrzymanych nośnikach. Okazało się, iż immobilizacja pepsyny zachodzi lepiej w przypadku krzemionki modyfikowanej grupami $-\text{CH}_3$. Dodatkowo badano wpływ siły jonowej na proces immobilizacji. Badania wykazały, iż wraz ze wzrostem siły jonowej spada ilość zaadsorbowanej na nośniku pepsyny.

W innej publikacji, Gómez i inni [38] opisują immobilizację β -glukozydazy otrzymywanej z migdałów. Enzym ten ma masę 130 kDa (dimer). Zaobserwowano, że zazwyczaj immobilizowane enzymy (do roku 2010) mają masę poniżej 50 kDa i średnicę około 4,0 nm. Jest niewiele publikacji mówiących o immobilizacji większych enzymów (średnicy większej niż 5,0 nm). Immobilizowana β -glukozydaza ma średnicę 6,6 nm dla dimeru. Stwierdzono, iż sposób wiązania enzymu z powierzchnią SBA-15 następuje w skutek tworzenia oddziaływań elektrostatycznych, natomiast największa ilość enzymu immobilizuje się przy pH = 3,5.

Na mezoporowej krzemionce SBA-15 immobilizowano również enzym, którego poświęcona jest niniejsza praca: α -amylaza. Jak pisze w swojej pracy Quin-Zhou Zhai [39] immobilizację wykonano w oparciu o zjawisko fizycznej adsorpcji, proces prowadzono przez 27h w temp. 30°C. Maksymalna ilość immobilizowanego enzymu w przeliczeniu na 1g SBA-15 wyniosła 87,5 mg. Układ wykazywał odporność na wysokie pH oraz temperaturę.

W publikacji Kanako Hisamatsu i współpracowników [40] opisano immobilizację α -amylazy na mezoporowatych krzemionkach o różnych kształtach. Deponowanie enzymu na nośniku odbywało się poprzez proces bezpośredniego połączenia krzemionki z roztworem enzymu (układ był umieszczony w rotatorze w temperaturze 4°C, przez 3 h). Pierwszą z nich była krzemionka FSM, (folded sheet mesoporous silica) – przypominająca kształtem pofałdowaną kartkę, drugą KIT-6, krzemionka w kształcie sześciennych brył natomiast ostatnią SBA-15, dwuwymiarowa, heksagonalna krzemionka. Badania wykazały, że ilość zaimmobilizowanego enzymu wzrasta wraz ze wzrostem wielkości porów: SBA-15 < KIT-6 < FSM. Jak twierdzą naukowcy FSM w porównaniu do SBA-15 oraz KIT-6 wykazuje największą zdolność adsorpcji enzymu, ponieważ ziarna tej krzemionki posiadają mniejsze wymiary, z drugiej strony natomiast większe pory, które są rozmiieszczone w sposób nieregularny i sprzyjają dyfuzji enzymu.

5.2. IMMOBILIZACJA ENZYMÓW PRZEZ WIĄZANIE KOWALENCYJNE

Immobilizacja enzymu polegająca na wytworzeniu wiązania kowalencyjnego pomiędzy nośnikiem a enzymem jest trudnym zabiegiem. Wymaga ona znajomości grup funkcyjnych białka, które mają być wykorzystane do związania enzymu z nośnikiem, należy również uwzględnić fakt, iż podczas tego procesu może nastąpić dezaktywacja enzymu. Ważnym jest aby podczas wyboru grup funkcyjnych enzymu wybrać te, które nie są odpowiedzialne za działanie enzymu, ani za stabilizowanie struktury białka. Najczęściej wykorzystywany aminokwasami białkowymi są cysteina (ugrupowanie tiolowe), tyrozyna (ugrupowanie fenolowe), histydyna (ugrupowanie imidazolowe) oraz lisyna (ugrupowanie aminowe). W Tabeli 1 zestawiono najczęściej wykorzystywane grupy funkcyjne w przypadku nośnika i białka, przedstawiono również możliwe do zastosowania czynniki wiążące oraz wartość pH, przy którym następuje wiązanie białka [41].

Tabela 1. Przykłady najczęściej wykorzystywane grupy funkcyjne w przypadku nośnika i białka, czynniki wiążące oraz optymalne pH prowadzenia reakcji

Table 1. Examples of commonly used functional group of the support and protein binding agent, and the optimal pH of reaction

Grupa funkcyjna nośnika	Grupa funkcyjna białka	Czynnik wiążący/aktywujący	Wartość pH wiązania białka
-COOH	-NH ₂	Karbodiimid	3,5–4,5
	-COOH	Izocjanki	4,0–8,0

Grupa funkcyjna nośnika	Grupa funkcyjna białka	Czynnik wiążący/aktywujący	Wartość pH wiązania białka
-NH ₂	-NH ₂	Aldehyd glutarowy	6,0–8,0
	-NH ₂	Kwas askorbinowy	6,0–7,0
	-COOH	Karbodiimid	3,5–4,5
-OH	-NH ₂	Diwinylosulfon	8,0–10,0
	-SH		9,0–11,0
	-OH		11,0–13,0
	-NH ₂	Karbodiimid	8,0–9,5
	-OH	Sole diazoniowe	6,0–8,0

Enzym kowalencyjnie związaany z nośnikiem jest odporniejszy na czynniki denaturujące i może pracować w wyższych temperaturach, jednak oprócz zalet tego procesu występują także jego wady; najistotniejszą z nich jest wcześniej wspomniana dezaktywacja enzymu. Brak autolizy, a także wyeliminowanie agregacji oraz zwiększenie odporności na proteazy to zalety obserwowalne każdorazowo. Dużo bardziej pożądany jest otrzymanie preparatów stabilnych podczas przechowywania, co jest trudniejsze, ale bardziej pożądane z punktu widzenia handlu [41].

Przykładem przeprowadzonej immobilizacji w sposób kowalencyjny może być praca Sandy Budi Hartono i współpracowników [42], która dodatkowo pokazała wpływ modyfikacji powierzchni mezoporowej krzemionki na immobilizację enzymu i jego aktywność. Krzemionkę FDU-12 (wielkość porów do 25,4 nm) modyfikowano za pomocą organosilanów: 3-aminopropyltrietoksysilanu (APTES), 3-merkaptopropyltrimetoksysilanu (MPTMS), winylotrimetoksysilanu (VTMS) oraz fenylotrimetoksysilanu (PTMS); a następnie immobilizowano cellulazę sprawdzając później aktywność katalityczną tak powstałych układów. Najsłabszą aktywność wykazywała cellulaza immobilizowana na podłożu FDU-12-APTES, ponieważ ugrupowanie aminowe wpływa na strukturę trzeciorzędową enzymu obniżając jego aktywność. Materiał FDU-12-VTMS charakteryzował się natomiast wysokim powinowactwem do enzymu nie zmieniając jego struktury oraz nie blokując centrów aktywnych. Renee Han-Yi wraz ze współpracownikami [43] zbadał dodatkowo wpływ rodzaju oddziaływania enzymu (celulazy) z nośnikiem na jego aktywność. Powierzchnię krzemionki zawierającej duże pory (20–40 nm) zmodyfikowano za pomocą bezwodnika kwasu (3-trietoksysilino bursztynowego (TESP-SA). TESP-SA użyty jako łącznik do chemicznego związania mezoporowej krzemionki z cellulazą sprawił, iż układ taki charakteryzował się ponad 80% wydajnością konwersji celulozy do glukozy i zadowalającą stabilnością. W przypadku α -amylazy również zostały poczynione badania związane z kowalencyjnym związaniem na powierzchni krzemionek mezoporowych. W pracy

Pandya i współpracowników [44] opisane jest badanie wpływu wielkości porów w mezoporowatych krzemionkach na aktywność i stabilność α -amylazy. Immobilizowali oni enzym na krzemionkach o średnicy porów od 26–335 Å i wykorzystywali do hydrolizy skrobi. Powierzchnię krzemionek początkowo zmodyfikowano APTES (50 ml 10% roztworu APTES na 1 g krzemionki), a następnie przeprowadzono immobilizację enzymu używając jako łącznika aldehydu glutarowego (25 ml 2,5% roztworu GA na 1 g krzemionki zmodyfikowanej APTES, pH reakcji wynosiło 6,62). Badania wykazały, iż w materiałach posiadających małe pory aktywność enzymu była niska, ponieważ zdaniem naukowców enzym lokalizował się na zewnętrznej powierzchni materiałów. Enzym immobilizowany na krzemionkach o większych porach wykazywał się podwyższoną aktywnością. Finalnie okazało się iż najbardziej wydajny układ charakteryzował się 80% wydajnością w stosunku do wolnego enzymu. Układy katalityczne charakteryzowały się wyższą stabilnością na zmianę pH i temperatury w stosunku do enzymu niezwiązanego.

Kolejna publikacja również porusza problem immobilizacji α -amylazy na mezoporowatych krzemionkach (m.in. SBA-15), wiązanie enzymu następuje również w sposób kowalencyjny za pośrednictwem aldehydu glutarowego. Krzemionkę wcześniej również zmodyfikowano APTES. W pracy porównywano wpływ wielkości porów nośnika (76–300 Å) na aktywność enzymu. Badania wykazały iż w przypadku SBA-15 (średnica porów około 60 Å) oraz silica-15-N (nazwa umownie przyjęta przez autorów, średnica porów około 100 Å) enzym był immobilizowany wyłącznie na powierzchni, natomiast w przypadku silica-AC (nazwa umownie przyjęta przez autorów, średnica porów około 300 Å) enzym deponował się w wewnętrznych porach. Aktywność enzymu na nośniku rosła w następującym porządku: silica-AC > silica-N > SBA-15, natomiast jego stabilność: SBA-15 > silica-AC > silica-N. Wykazano również, iż enzym immobilizowany charakteryzuje się mniejszą aktywnością niż enzym niezwiążany [45].

6. MEZOPOROWATE MATERIAŁY SBA-15 JAKO NOŚNIKI ENZYMÓW

Chemiczna modyfikacja powierzchni mezoporowatych krzemionek stwarza możliwości kowalencyjnego związania nośnika z enzymem. 3-aminopropyltriektosilan (APTES) może służyć jako przykład związku chemicznego do przeprowadzenia takiej modyfikacji. Po zdeponowaniu go na powierzchni krzemionki, grupa $-\text{NH}_2$ stwarza możliwość kowalencyjnego związania nośnika z enzymem. W tym celu należy wykorzystać czynnik aktywujący jak np. aldehyd glutarowy, który utworzy z grupami aminowymi zmodyfikowanego nośnika i enzymu zasady Schiffa, łącząc je w sposób trwały ze sobą.

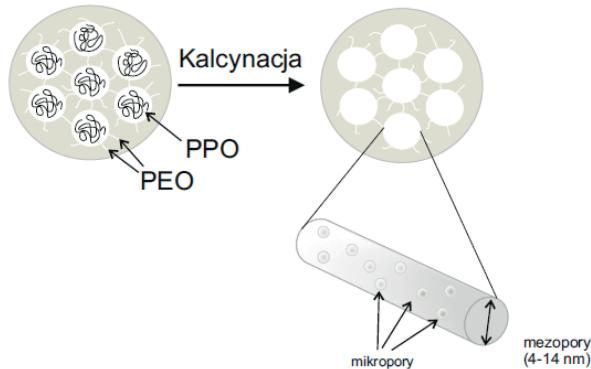
Zeolity posiadające mikropory są najbardziej znymi materiałami mającymi szereg zastosowań. Jednakowej wielkości pory (zbliżone do rozmiarów cząsteczek) znajdujące się w mikroporowatych krzemionkach oraz dodatkowo dobra stabilność

i selektywność, a także możliwość modyfikacji sprawiają, iż związki te mają szereg zastosowań- służą jako katalizatory, sorbenty czy też membrany filtrujące [46].

Na początku lat 90-tych udało się zsyntezować pierwszą klasę mezoporowatych krzemionek: M41S [47]. Synteza była przeprowadzona przez pracowników firmy Mobil i opierała się ona na wykorzystaniu surfaktantów mających zdolności do samoporządkowania.

Moment ten był punktem zwrotnym w syntezie nowych, zaawansowanych materiałów mezoporowatych. Zastosowania tych układów zostały poszerzone dodatkowo o wykorzystanie ich jako nośników leków, sensorów i wielu innych [46].

Kolejną klasą zsyntezowanych mezoporowatych krzemionek były m.in. materiały SBA (angielski akronim Santa Barbara Acids). Ta nowa rodzina wysoko uporządkowanych krzemionek została otrzymana po raz pierwszy w 1998 roku [48]. Preparatyka polegała na wykorzystaniu jako templatu niejonowego, trójblokowego kopolimeru EOnPOmEOn w kwaśnym środowisku [46]. Wyróżnia się wiele materiałów należących do tej klasy. SBA-1 [49] i SBA-11 [50] o strukturze kubicznej, SBA-12: trójwymiarowa heksagonalna sieć [48], SBA-14 o strukturze lamelarnej [48], SBA-15: dwuwymiarowa struktura heksagonalna [51] oraz SBA-16 [52] struktura sześciennej klatki (cubic cage). Największym zainteresowaniem cieszy się jednak SBA-15, ponieważ posiada wiele korzystnych cech.

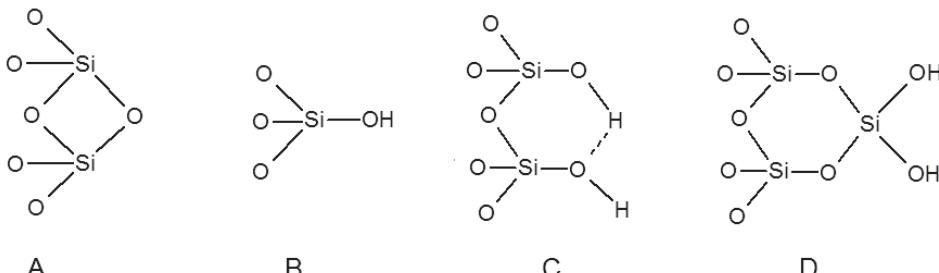


Rysunek 5. Proces syntezy materiału SBA-15 i jego struktura
Figure 5. Synthesis of the material SBA-15 and its structure

SBA-15 jest jak już wcześniej wspomniano materiałem o dwuwymiarowej strukturze heksagonalnej posiadającym zarówno mikro jak i makropory. Wielkość mezoporów zawiera się w przedziale od 4–14 nm [46] natomiast mikroporów od 1,5 do 5 nm [53] i zależy od warunków syntezy. Ściany SBA 15 mają charakter mikroporowy, a ich grubość wynosi od 3–6 nm. Takie ściany sprawiają, iż SBA-15 wykazuje wysoką hydrotermalną stabilność w przeciwieństwie do innych materiałów jak chociażby MCM-41 (klasa M41S) [54]. Dwuwymiarowe heksagonalne

pory SBA-15 należące do grupy przestrzennej p6mm obserwowane są na dyfraktogramie przy niskich wartościach kąta 2θ [46].

Powierzchnia SBA-15 jest pokryta dwoma różnymi rodzajami grup funkcyjnych. Pierwsze z nich są hydrofobowe: grupy siloksanowe ($\equiv\text{Si}-\text{O}-\text{Si}\equiv$), drugie natomiast hydrofilowe: grupy silanolowe ($\equiv\text{Si}-\text{OH}$). Grupy $\equiv\text{Si}-\text{OH}$ podzielone są ze względu na swoje otoczenie na: izolowane (atom krzemu z powierzchni posiada trzy wiązania O-Si oraz jedno wiązanie Si-OH), wicynalne (dwie grupy silanolowe są połączone przez mostek z atomem wodoru) oraz geminalne (do jednego atomu Si przyłączone są dwie grupy -OH (Rys. 6) [55].



Rysunek 6. Powierzchnia krzemionki SBA-15: A – grupa siloksanowa, B – izolowana grupa silanolowa, C – wicynalna grupa silanolowa, D – geminalna grupa silanolowa

Figure 6. SBA-15 surface: A – siloxane group, B – isolated silanol group, C – the vicinal silanol group, D – geminal silanol group

UWAGI KOŃCOWE

W niniejszej pracy poruszone zostały tylko niektóre aspekty praktycznego zastosowania α -amylaz i celulaz bowiem spektrum zastosowania tych enzymów jest bardzo duże. Mezoporowate krzemionki są jedną z wielu matryc stosowanych w procesach immobilizacji enzymów, ze względu na wiele korzystnych cech (m.in. stabilność temperaturową, możliwość funkcjonalizacji) zostały poruszone w tym artykule.

PODZIĘKOWANIA

Pragnę podziękować Pani Promotor dr hab. Ewie Witek za wsparcie podczas redagowania artykułu oraz ciągłą motywację do wybranej pracy.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] L. Stryer, *Biochemia*, PWN, Warszawa 2003.
- [2] D.W. Atkins, *Chemia fizyczna*, PWN, Warszawa 2007.

-
- [3] R.K. Murray, D.K. Granner, P.A. Mayes, V.W. Rodwell, *Biochemia Harpera*, PZWL, Warszawa 2006.
 - [4] W. Aehle, *Enzymes in industry*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim 2004.
 - [5] G.P. Moss, Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes by the Reactions they Catalyse [online] Dostępny w Internecie <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb> [dostęp: 8.05.2016].
 - [6] I. Yamamoto, Enzyme chemistry and molecular biology of amylases and related enzymes, The Amylase Research Society of Japan, Tokio 1994.
 - [7] A. Payen, J. Persoz, Ann. Chim. et Phys., 1833, **53**, 73.
 - [8] R. Kuhn, Ber., 1924, **67**, 1965; Ann. 1925, **443**, 1.
 - [9] E. Ohlsson, Z. Physiol. Chem., 1930, **189**, 57.
 - [10] L.L. Phillips, M.L. Caldwell, J. Am. Chem. Soc., 1951, **73**, 3559.
 - [11] D. Goodsell, Alpha-amylase [online] Dostępny w Internecie <http://pdb101.rcsb.org/motm/74>, [dostęp: 02.03.2016].
 - [12] N. Ramasubbu, V. Paloth, Y. Luo, G.D. Brayer, M.J. Levine, Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr., 1996, **52**, 435.
 - [13] B. Yang, Z. Dai , S.-Y. Ding, C.E. Wyman, Biofuels, 2011, **2**, 421.
 - [14] P.M. Abuja, M. Schmuck, I. Pilz, P. Tomme, M. ClaeysSENS, H. Esterbauer Eur. Biophys. J., 1988, **15**, 339.
 - [15] T. Ideker, T. Galitski, L. Hood, Annu. Rev. Genomics Hum. Genet., 2001, **2**, 343.
 - [16] H. Mukhtar, Ikram-ul-Haq, Braz. J. Microbiol., 2012, **43**, 1072.
 - [17] X.-Z. Zhang, Y.-H. Percival Zhang, *Cellulases: Characteristics, Sources, Production, and Applications from: Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers*, First Edition, John Wiley & Sons, Inc., 2013.
 - [18] A.K. Chandel, R. Rudravaram, L.V. Rao, R. Pogaku, M.L. Narasu, Integrative and Comparative, Biotechnology, 2007, **13**, 283.
 - [19] R. Gupta, P. Gigras, H. Mohapatra, V.K. Goswami, B. Chauhan, Process Biochem., 2003, **38**, 1599.
 - [20] S.R. Couto, M.A. Sanromán, J. Food Eng., 2006, **76**, 291.
 - [21] M.J. van der Maarel, B. van der Veen, J.C. Uitdehaag, H. Leemhuis, L. Dijkhuizen, J. Biotechnol., 2002, **94**, 137.
 - [22] A.K. Mukherjee, M. Borah, S.K. Raí, Biochem. Eng. J., 2009, **43**, 149.
 - [23] H.S.O. Olsen, P. Falholt, J. Surfactants Deterg., 1998, **1**, 555.
 - [24] Z. Chi, Z. Chi, G. Liu, F. Wang, L. Ju, T. Zhang, Biotechnol., 2009, **Adv 27**, 423.
 - [23] H. Feitkenhauer, Enzyme Microb. Technol., 2003, **33**, 250.
 - [24] S. Ahlawat, S.S. Dhiman, B. Battan, R.P. Mandhan, J. Sharma, Process Biochem., 2009, **44**, 521.
 - [25] P.M. Bruinenberg, A.C. Hulst, A. Faber, R.H. Voogd, *A process for surface sizing or coating of paper*, [w:] European Patent Application, 1996.
 - [26] S. Datta, L.R. Christena, Y.R. Sriramulu Rajaram, Biotech, 2013, **3**, 1.
 - [27] H.Y. Kawaguti, E. Manrich, H.H. Sato, Biochem. Eng. J., 2006, **29**, 270.
 - [28] E. Katchalski-Katzir, Trends in Biotechnology, 1993, **11**, 471.
 - [29] J. Bryjak, Wiadomości Chemiczne, 2004, **58**, 691.
 - [30] B.D. Singh, *Biotechnology expanding horizons*, Kalyani, India, 2009.
 - [31] S.F. D'Souza, Curr. Sci., 1998, **77**, 69.
 - [32] L. Cao, *Immobilized enzymes: past, present and prospects. In: Carrier-bound immobilized enzymes: principles, application and design*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim 2006.

- [33] B.M. Brena, F. Batista-Viera, *Immobilization of Enzymes*, from: *Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells*, Second Edition, Totowa, Madrid 2006.
- [34] A. Takimoto, T. Shiomi, K. Ino, T. Tsunoda, A. Kawai, F. Mizukami, K. Sakaguchi, Micropor. Mesopor. Mat., 2008, **11**, 601.
- [35] Q.-Z. Zhai, S.-J. Sun, Russ. J. Phys. Chem. A, 2014, **88**, 2243.
- [36] J.M. Gómez, M.D. Romero, T.M. Fernández, S. Garcíá, J. Porous. Mater., 2010, **17**, 657.
- [37] Q.-Z. Zhai, Asian J. Chem., 2014, **26**, 2736.
- [38] K. Hisamatsu, T. Shiomi, S. Matsuura, T.Y. Nara, T. Tsunoda, F. Mizukami, K. Sakaguchi, J. Porous. Mater., 2012, **19**, 95.
- [39] J. Bryjak, *Zarys technologii otrzymywania im mobilizowanej lakazy i tyrozynazy o podwyższonej stabilności operacyjnej*, Tytuł Projektu: „Biotransformacje użyteczne w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym” Nr POIG.01.03.01-00-158/09-06.
- [40] S.B. Hartono, S.Z. Qiao, J. Liu, K. Jack, B.P. Ladewig, Z. Hao, G.Q.M. Lu, J. Phys. Chem., C 2010, **114**, 8353.
- [41] R.H.-Y. Chang, J. Jang, K.C.-W. Wu, Green Chem., 2011, **13**, 2844.
- [42] P.H. Pandya, R.V. Jasra, B.L. Newalkar, P.N. Bhatt, Micropor. Mesopor. Mat., 2005, **77**, 67.
- [43] H.M. Mody, K.H. Mody, R.V. Jasra, H.J. Shin, R. Ryong, IJC-A, 2002, **41A**, 1795.
- [44] V. Meynen, P. Cool, E.F. Vansan, Micropor. Mesopor. Mat., 2009, **125**, 170.
- [45] C.T. Kresge, M.E. Leonowics, W.J. Roth, J.C. Vartuli, US Patent 5 098 684, 1992.
- [46] D. Zhao, Q. Huo, J. Feng, B.F. Chmelka, G.D. Stucky, J. Am. Chem. Soc., 1998, **120**, 6024.
- [47] H.-M. Kao, J.-D. Wu, C.-C. Cheng, A.S.T. Chiang, Micropor. Mesopor. Mater., 2006, **88**, 319.
- [48] J.M. Kim, G.D. Stucky, Chem. Commun., 2000, **13**, 1159.
- [49] D. Zhao, J. Feng, Q. Huo, N. Melosh, G.H. Frederickson, B.F. Chmelka, G.D. Stucky, Science, 1998, **279**, 548.
- [50] P. Van Der Voort, M. Benjelloun, E.F. Vansant, J. Phys. Chem. B, 2002, **106**, 9027.
- [51] A. Galarneau, H. Cambon, F. Di Renzo, R. Ryoo, M. Choi, F. Fajula, New. J. Chem., 2003, **27**, 73.
- [52] K. Cassiers, T. Linssen, M. Mathieu, M. Benjelloun, K. Schrijnemakers, P. Van Der Voort, P. Cool, E.F. Vansant, Chem. Mater., 2002, **14**, 2317.
- [53] R. Ojeda-López, I.J. Pérez-Hermosillo, J.M. Esparza-Schulz, A. Cervantes- Uribe, A. Dominiguez-Ortiz, Adsorption, 2015, **21**, 659.

Praca wpłynęła do Redakcji 20 lipca 2016

HORYZONTY NAUKI 2016
– FORUM PRAC DYPLOMOWYCH,
WYDZIAŁ CHEMII UJ, 17–18 MAJA 2016

**SZCZOTKI POLIMEROWE – OTRZYMYWANIE,
CHARAKTERYZACJA, ZASTOSOWANIE**

**POLYMER BRUSHES – SYNTHESIS,
CHARACTERIZATION AND APPLICATIONS**

Artur Jarema Wójcik

*Wydział Chemii, Uniwersytet Jagielloński
ul. R. Ingardena 3, 30-060 Kraków
e-mail: artur2.wojcik@student.uj.edu.pl*

Abstract

Wprowadzenie

1. Metody otrzymywania szczotek polimerowych
 - 1.1. Rodzaje polimeryzacji
 - 1.2. Kontrola struktury przestrzennej
 - 1.3. Funkcjonalizacja zsyntezowanych układów
2. Metody charakteryzowania szczotek polimerowych
3. Właściwości i zastosowanie szczotek polimerowych
 - 3.1. Szczotki polimerowe wrażliwe na bodźce zewnętrzne
 - 3.2. Kontrolowana adhezja komórek
 - 3.3. Modyfikacje powierzchni nowoczesnych materiałów opartych na grafenie
 - 3.4. Chromatografia

Podsumowanie

Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane



Artur Jarema Wójcik – ur. w 1993 r. w Szczecinie. Student I roku Chemii oraz Międzywydziałowych Indywidualnych Studiów Matematyczno-Przyrodniczych (II stopnia) na Uniwersytecie Jagiellońskim; członek Zespołu Nanotechnologii Polimerów i Biomateriałów Wydziału Chemii UJ, w którym prowadzi pod opieką dra hab. Szczepana Zapotocznego, prof. UJ, badania dotyczące przewodzących szczotek polimerowych. Pracę licencjacką, zatytułowaną: „Optymalizacja struktury i synteza monomerów wykorzystywanych do otrzymywania przewodzących szczotek polimerowych” obronił na Wydziale Chemii UJ w 2015 r. Od lipca 2014 r. związany z krakowską firmą biotechnologiczną Selvita S.A.

ABSTRACT

In 1959 Feynman said the future of engineering and science belongs to the nanotechnology [1, 2]. After fifty-seven years it has been proved that he was completely right. A perfect example of systems obtained in a nanometers scale, with huge development potential is a polymer brush.

Polymer brushes consist of polymer chains tethered by one end to a commonly solid substrate. For a sufficiently high grafting density the macromolecules are arranged sticking out perpendicularly to the surface. Such systems could be prepared following two main strategies: “grafting to” and “grafting from” processes by means of various polymerization methods. The most popular ones are controlled radical polymerizations, especially surface-initiated atom transfer radical polymerization (SI-ATRP) [3], but brushes may also be fabricated using surface-initiated anionic or cationic polymerization processes.

The architecture of the polymer systems could be very precisely controlled by selection of monomers used for the polymerization, substrates, types of solvents, temperature and duration of the whole synthesis. A postmodification of the produced brushes is also possible [4, 5].

Both structure and composition of polymer brushes may be characterized by means of numerous methods applied for a surface characterization including grazing-angle infrared spectroscopy, X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), atomic force microscopy (AFM) or even gel permeation chromatography (GPC) [6].

Thanks to the above mentioned distinguishing properties polymer brushes have found a lot of applications. They have been used e.g. in the construction of modified graphene surfaces (they improved solubility, mechanical properties, thermal stability and electrical conductivity of the material), by manipulation of cell adhesion processes, in the column chromatography (to change quality of the stationary phase what enabled more efficient proteins separation) etc. [4].

In this review the synthesis, characterization and applications of varied polymer brushes are discussed.

Keywords: nanotechnology, polymer brushes, SI-ATRP, “grafting from” process

Słowa kluczowe: nanotechnologia, szczotki polimerowe, SI-ATRP (inicjowana powierzchniowo polimeryzacja rodnikowa z przeniesieniem atomu, ang. *Surface-Initiated Atom Transfer Radical Polymerization*), proces „szczepienia z”

WPROWADZENIE

Mianem nanotechnologii określa się naukę, inżynierię i technologię, których przedmiot zainteresowań stanowią materiały, w przypadku których przynajmniej jeden z wymiarów mieści się w rozmiarze 1–100 nm ($1\text{--}100 \times 10^{-9}$ m) [1]. Niezwykle dynamiczny rozwój tej dyscypliny badań zapoczątkował w 1959 r. Feynman, prezentując na spotkaniu Amerykańskiego Towarzystwa Fizycznego na Kalifornijskim Instytucie Technologicznym wykład zatytułowany „There's Plenty of Room at the Bottom” (ang. Dużo zmieści się u podstawa lub Tam na dole jest jeszcze dużo miejsca). Rozwijając koncepcję miniaturyzacji podstawowych urządzeń elektronicznych oraz możliwości wykorzystania technologii operującej w skali nanometrowej ukazał on ogromny potencjał drzemiący w tego typu układach, a ponadto precyzyjnie nakreślił obecne w światowych badaniach tendencje do zdobywania bezpośredniej i pełnej kontroli nad coraz to mniejszymi porcjami materii [2]. Opanowanie tych umiejętności pozwoliłoby w przyszłości na tworzenie systemów o ściśle zdefiniowanym składzie czy strukturze przestrzennej, a także na ich daleko idącą funkcjonalizację odpowiadającą *stricte* stawianym wymaganiom. Już w dzisiejszych czasach nanomateriały wykazują charakterystyczne właściwości, których nie da się osiągnąć w przypadku żadnego innego typu substancji (vide: grafen, nanorurki węglowe). Jeden z podstawowych przykładów takich układów o rozmiarach rzędu 10^{-9} m stanowią posiadające ogromny potencjał rozwojowy szczotki polimerowe.

Szczotki polimerowe (ang. *polymer brushes*) to zbiór ułożonych równolegle względem siebie łańcuchów polimerowych przytwierdzonych jednym z końców do wybranego podłoża [3]. Identyczną strukturą charakteryzują się np. główka od szczoteczek do zębów – są one tylko ok. miliona razy większe. Aby wspomniane łańcuchy przyjęły odpowiednią konformację gęstość szczepienia musi być stosunkowo duża, tzn. odległość, d , pomiędzy punktami ich zaczepienia do zadanej powierzchni powinny przyjmować niewielkie wartości. Szczegółowa definicja podaje, że wysokość szczotek, H , osiąga w takich układach wartość większą aniżeli średnia kwadratowa odległości, $\langle r^2 \rangle^{1/2}$, między końcami tych samych łańcuchów polimerowych w tym samym rozpuszczalniku (lecz już odseparowanych od podłoża) (Wzór 1), a ponadto spełniona jest nierówność zadana Wzorem 2 [4].

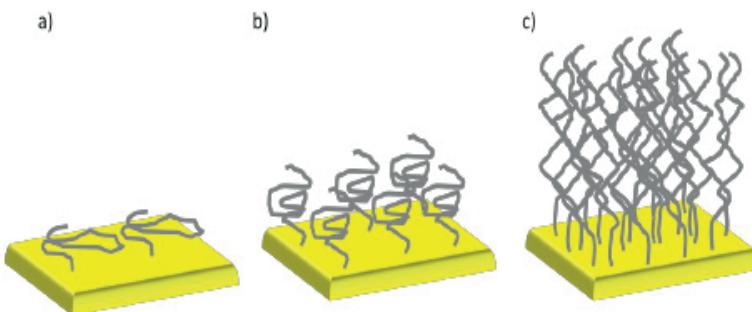
$$H > [r^2]^{(1/2)} \quad (1)$$

$$d < [r^2]^{(1/2)} \quad (2)$$

Taka architektura gwarantuje, iż w wyniku oddziaływań sterycznych siedzących segmentów pojedynczych „włókienek” polimerowych ulegną one wyprostowaniu i ułożą się prostopadle do podłoża. W innym przypadku nie zaobserwuje się struktury typu szczotka, ale raczej typu grzybowego (ang. *mushroom conformation*) lub nawet naleśnikowego (ang. *pancake conformation*) (Rys. 1) [4]. Do pozostałych czynników wpływających na przyjmowaną przez części składowe układu konfor-

mację należą struktura łańcuchów polimerowych, rodzaj użytego rozpuszczalnika, siła jonowa oraz wartość pH otaczającego medium, a także intra- i intermolekularne oddziaływanie elektrostatyczne [5].

W przypadku opisywanych systemów rolę podłożu mogą z powodzeniem pełnić różnorodne materiały, takie jak metale i ich tlenki, półprzewodniki, polimery organiczne. Doskonałymi przykładami są: złoto, ITO (mieszany tlenek indu i cyny, ang. *indium tin oxide*), porowaty tlenek glinu, mika, krzem, grafen, a nawet kapsuły polimerowe. Również kształt pokrywanej powierzchni nie stanowi praktycznie żadnego czynnika limitującego, albowiem może ona być zarówno płaska, jak i cylindryczna, kulista czy pofałdowana [6].



Rysunek 1. Możliwe struktury polimerów szczepionych na powierzchni: (a) struktura naleśnikowa (bardzo mała gęstość szczepienia łańcuchów polimerowych), (b) struktura grzybowa (średnia gęstość szczepienia łańcuchów polimerowych), (c) struktura gęstej szczotki polimerowej (wysoka gęstość szczepienia). Umieszczone za zgodą z [6]

Figure 1. The possible conformations of the surface-tethered polymer chains: “pancake-like” conformation (very low grafting density), (b) “mushroom” conformation (intermediate grafting density), (c) brush-type conformation (high grafting density). Reprinted with permission from ref. 6

Opis teoretyczny szczotek polimerowych jako pierwszy zaproponował Alexander [7]. Pomimo przyjęcia uproszczonych założeń (rozpatrywano tylko układ monodispersyjnych łańcuchów złożonych z N segmentów szczepionych na płaskiej, nieadsorbiującej powierzchni) bardzo dobrze powiązał on wysokość uzyskiwanych układów, H , z liczbą segmentów, N , oraz gęstością szczepienia, σ . Wartość wielkości H zależy ponadto od rodzaju rozpuszczalnika – czy dobrze solwatuje on makromolekuły (Wzór 3), czy też nie (Wzór 4).

$$H \sim N \cdot \sigma^{(1/3)} \quad (3)$$

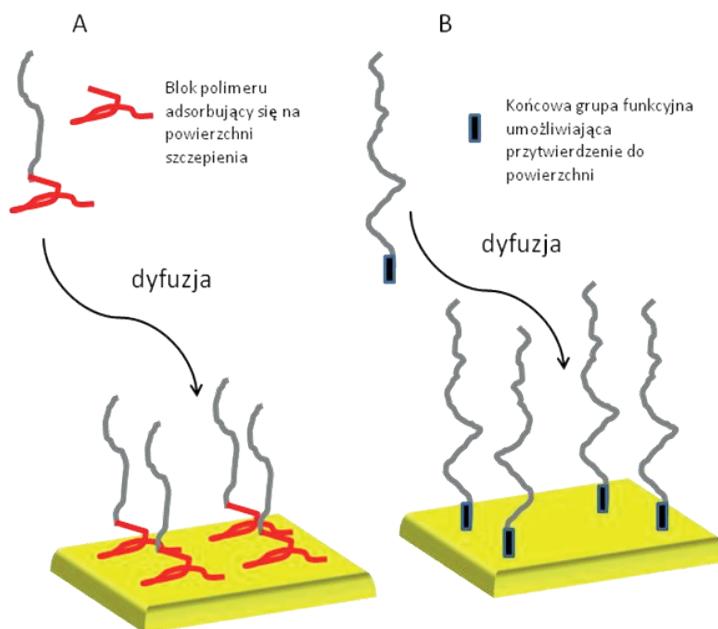
$$H \sim N \cdot \sigma^{(1/2)} \quad (4)$$

Obecnie stosuje się również opis teoretyczny powstały w oparciu o metodę pola uśrednionego. Na podstawie uzyskanych wyników tworzy się profil gęstości szczotek polimerowych. Jednak rezultaty zgodne w zadowalającym stopniu z doświadczeniem otrzymuje się jedynie dla umiarkowanych wartości σ oraz dla dużej masy

cząsteczkowej szczepionych polimerów. Założenia przytoczonej metody nie sprawdzają się w przypadku układów z bardzo małymi odległościami pomiędzy punktami zaczepienia łańcuchów makromolekuł (z uwagi na ich silne wzajemne oddziaływanie) [6].

2. METODY OTRZYMYWANIA SZCZOTEK POLIMEROWYCH

Łańcuchy polimerowe mogą zostać przytwierdzone do podłoża na kilka sposobów. Dwa podstawowe dotyczą adsorpcji fizycznej [8] oraz chemisorpcji [9]. Pierwszy z nich obejmuje oddziaływanie elektrostatyczne, van der Waalsa czy wiązania wodorowe, natomiast drugi – tworzenie wiązań kowalencyjnych (Rys. 2).



Rysunek 2. Szczepienie łańcuchów polimerowych na drodze: (A) adsorpcji fizycznej lub (B) chemisorpcji – metoda „szczepienia do”. Umieszczone za zgodą z [6]

Figure 2. The attachment of prefabricated polymers via either (A) physisorption or (B) chemisorption – the “grafting to” strategy. Reprinted with permission from ref. 6

Adsorpcja fizyczna stanowi odwracalny proces polegający na samoorganizacji (ang. *self-assembly*) polimerowych surfaktantów lub łańcuchów węglowodorowych posiadających na swoich końcach aktywne grupy funkcyjne. Z tego też względu opisywana metoda najlepiej sprawdza się w przypadku kopolimerów blokowych, do których dobiera się odpowiednie rozpuszczalniki i pokrycia szczepionych powierzchni, tak aby jeden fragment makromolekuły wykazywał selektywnie większe powinowactwo względem cząsteczek otaczającego medium (był lepiej solubi-

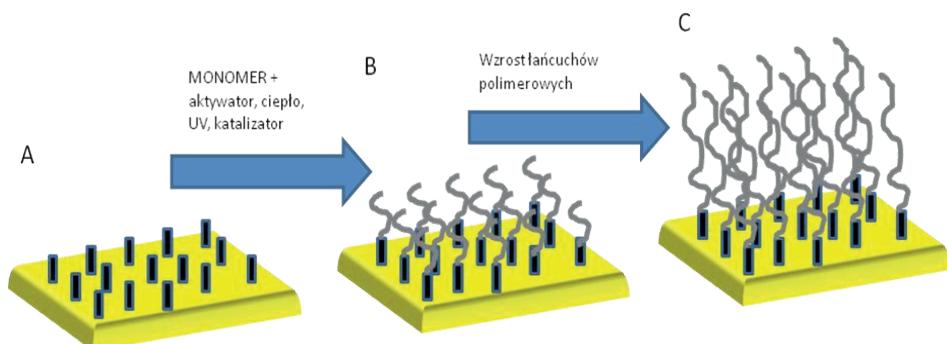
lizowany), natomiast druga część tej samej makromolekuły charakteryzowała się już silniejszymi oddziaływaniami z podłożem, stanowiąc niejako „kotwicę” (ang. *anchor*) całego łańcucha unieruchamiającą go na zadanej warstwie. Kwestia ostatecznego uzyskanie struktury szczotki zależy jednak od wielu czynników, do których należą: skład, architektura i masa cząsteczkowa kopolimeru, rodzaje rozpuszczalnika i szczepionej powierzchni, oddziaływanie pomiędzy nimi a poszczególnymi blokami makromolekuły. Gęstość otrzymanej szczotki, a także jej rozmiary stanowią rezultat procesów równowagowych kontrolowanych termodynamicznie, choć w niewielu wypadkach kluczowe okazują się aspekty kinetyczne [5].

Drugi sposób przytwierdzania łańcuchów polimerowych do wybranego podłoża polega natomiast na nieodwracalnym tworzeniu trwałych wiązań atomowych pomiędzy ugrupowaniami końcowymi makromolekułu a szczepioną powierzchnią. W przeciwnieństwie do układów otrzymanych w wyniku adsorpcji fizycznej (które często są niestabilne w warunkach zmieniającej się temperatury, typu rozpuszczalnika, pH roztworu, a nawet w obecności małocząsteczkowych związków wykazujących duże powinowactwo do podłoża) szczotki uzyskane na drodze chemisorpcji wykazują bardzo dużą trwałość przy nawet skrajnie różnych parametrach otoczenia. Na skutek tego naukowcy zdecydowanie częściej posługują się drugą z wymienionych metod przytwierdzania łańcuchów polimerowych do wybranej powierzchni [5].

Istnieją dwie strategie zrealizowania wspomnianych połączeń. Pierwsza, zwana „grafting to” (z ang. szczepienie do, używana również w przypadku występowania adsorpcji fizycznej) (Rys. 2), polega na przyłączeniu do wybranego podłoża wcześniej utworzonych łańcuchów polimerowych. Pomimo faktu, iż praktyczne zrealizowanie tego podejścia jest stosunkowo proste i nie wymaga przeprowadzania żadnych skomplikowanych syntezy, to jednak posiada ono kilka cech sprawiających, iż nie jest powszechnie stosowane przez badaczy. Mianowicie bardzo trudno otrzymać tą metodą grube i gęste szczotki polimerowe – uniemożliwiają to coraz silniejsze (w miarę naszczepiania kolejnych makromolekułów) międzycząsteczkowe odpychania steryczne i przebiegająca coraz wolniej dyfuzja nowych łańcuchów z roztworu ku modyfikowanej powierzchni. Ponadto wykorzystanie w syntezie polimerów o dużej masie cząsteczkowej obniża wydajność reakcji pomiędzy aktywnymi grupami końcowymi łańcuchów a podłożem [5, 10].

Większości wymienionych wyżej problemów pozwala uniknąć druga z opisywanych strategii postępowania – tzw. „grafting from” (z ang. szczepienie z) (Rys. 3). Procedura postępowania obejmuje w tym przypadku dwa etapy. Początkowo na szczepionej powierzchni są generowane chemicznie (albo na drodze samoorganizacji) cząsteczki inicjatora, po czym następuje proces stopniowego wydłużania łańcuchów przyszzej szczotki na skutek przebiegającej *in situ* polimeryzacji obecnych w otaczającym medium monomerów. Zapoczątkowanie wzrostu długości makromolekułów odbywa się na drodze termicznej, chemicznej lub fotochemicznej. Również sam mechanizm opisywanych zjawisk można dostosować zarówno do rodzaju szczepionej powierzchni, jak i typu stosowanego polimeru, co dodatkowo pozwala

eksperymentatorowi stosunkowo precyzyjnie sterować grubością, składem oraz architekturą generowanych szczotek. Obecnie stosowane metody obejmują polimeryzację wolnorodnikową (ang. *free radical polymerization*), kontrolowaną polimeryzację rodnikową (ang. *controlled radical polymerization*), polimeryzację anionową i kationową (ang. *anionic and cationic polymerization*), a także metatetyczną polimeryzację cykloolefin z otwarciem pierścienia – ROP (ang. *ring opening metathesis polymerization*). Poniżej zostaną dokładniej scharakteryzowane wybrane rodzaje polimeryzacji z uwzględnieniem polimeryzacji rodnikowych, a to z uwagi na ich popularność i obecne trendy w nauce zmierzające do ich jeszcze powszechniejszego wykorzystania w tworzeniu przedstawianych układów [11–13].



Rysunek 3. Schemat metody „szczepienia z”: (A) generowanie molekuł inicjatora na powierzchni szczepienia, (B) inicjowanie wzrostu łańcuchów polimerowych, (C) dalszy przebieg polimeryzacji. Umieszczone za zgodą z [6]

Figure 3. The scheme of the “grafting from” strategy: (A) the generation of initiator species at the surface of the substrate, (B) the initiation of chain-growth, (C) the further steps of polymerization. Reprinted with permission from ref. 6

Na drodze wymienionych wyżej metod uzyskuje się szczotki o wysokościach dochodzących do nawet 2000 nm (podczas gdy średnie wartości wysokości wyprowadzonych łańcuchów w przypadku stosowania procedury „szczepienia do” oscylują w granicach 5–10 nm), przy zachowaniu gęstości szczepienia na poziomie 3 nm [5].

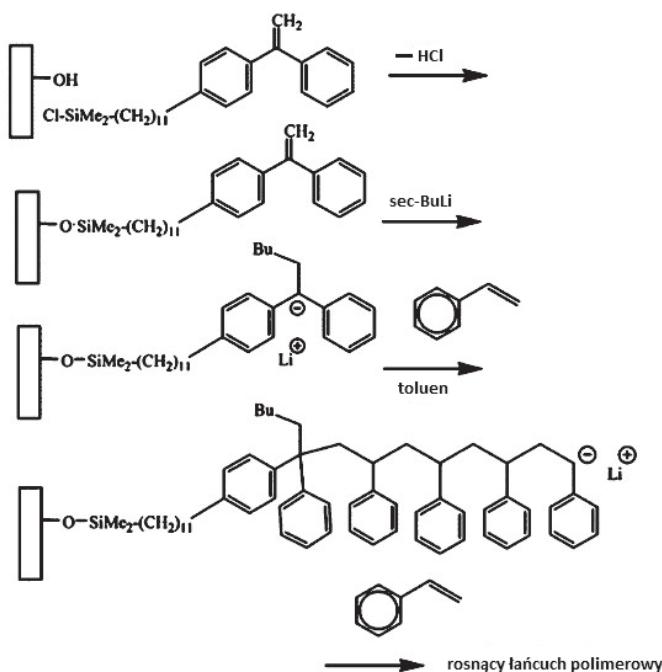
1.1. RODZAJE POLIMERYZACJI

Powierzchniowo inicjowana polimeryzacja anionowa

Pierwszy z wymienionych typów tworzenia łańcuchów makromolekuł stanowi przykład polimeryzacji addycyjnej, w przypadku której immobilizowane na szczepionej powierzchni anionowe centrum aktywne jest generowane już na etapie inicjacji. Następnie stopniowo przyłączają się do niego obecne w roztworze monomery (etap propagacji), tak że zawsze na wolnym końcu tworzonej cząsteczki znajduje się

fragment zdolny do reakcji z kolejną molekułą. Aby uniknąć przedwczesnej terminacji lub nawet częściowej degradacji budowanych łańcuchów, cały proces rozpoczynają cząsteczki inicjatora w tym samym czasie na wszystkich centrach anionowych przytwierdzonych trwale do podłoża, wzrost długości łańcuchów przebiega z przybliżoną stałą szybkością, a etap końcowy ma miejsce dopiero w przypadku wprowadzenia do mieszaniny substancji gwarantującej ostateczną dezaktywację tworzonych łańcuchów (ang. *quenching*). Takie działania pozwalają na uzyskanie układów jednorodnych o niskich wartościach wskaźnika dyspersji, $D_M < 1,1$ (ang. *dispersity*) [5, 6].

Czynnikami limitującymi praktyczne zastosowanie polimeryzacji anionowej (identyczne występują w przypadku odmiany kationowej) są kwestie dobrania właściwego zestawu inicjatora, monomeru i rozpuszczalnika, konieczność stosowania odczynników o wysokim stopniu czystości (pozbawionych dodatkowo śladów wody), a także konieczność prowadzenia procesu w atmosferze gazu obojętnego (najlepiej argonu). Dobór właściwego inicjatora odgrywa kluczową rolę w kontroli masy otrzymanych polimerów.



Rysunek 4. Schemat metody „szczepienia z” (polimeryzacja anionowa): (A) generowanie molekuły inicjatora na powierzchni szczepienia, (B) inicjowanie wzrostu łańcuchów polimerowych, (C) dalszy przebieg polimeryzacji. Umieszczone za zgodą z [14]. Prawa autorskie 2016, American Chemical Society

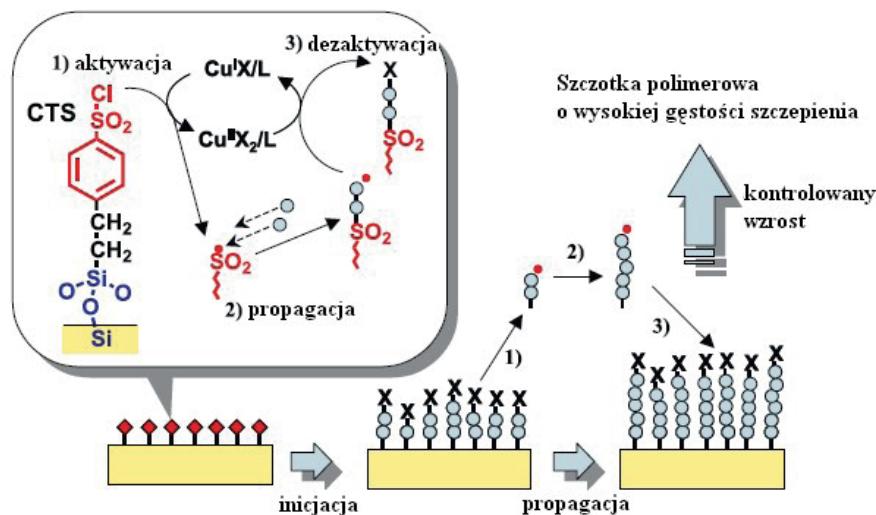
Figure 4. The scheme of the “grafting from” strategy (anionic polymerization): (A) the generation of initiator species at the surface of the substrate, (B) the initiation of chain-growth, (C) the further steps of polymerization. Reprinted with permission from ref. 14. Copyright 2016, American Chemical Society

W charakterze podłoża najlepiej sprawdzają się płytki krzemowe bądź złote, pokryte samoorganizującymi się warstwami allilosilanów lub organicznych tioli (odpowiednio) zawierających na swoich końcach odpowiednie grupy funkcyjne. Opisywana metoda gwarantuje uzyskanie pokrycia o łatwo kontrolowanej gęstości szczepienia i czystości. Proces inicjacji wzrostu łańcuchów polimerowych odbywa się w wyniku wprowadzenia do układu np. związków organolitowych. Wytworzone aktywne karboaniony reagują z dobranym uprzednio monomerem, tworząc pożądane makromolekuły [6]. Schemat takiej polimeryzacji został zamieszczony na Rysunku 4.

Powierzchniowo inicjowana polimeryzacja rodnikowa z przeniesieniem atomu – SI-ATRP (ang. *Surface-Initiated Atom Transfer Radical Polymerization*)

Zalicza się ją do grona najczęściej wykorzystywanych w praktyce kontrolowanych polimeryzacji rodnikowych, których główne zalety stanowią dobrze poznany mechanizm, łatwość wykonania syntezy czy też ogromna różnorodność możliwych do otrzymania makromolekułów. Choć stopień polidispersji wytwarzanych łańcuchów jest nieco większy niż w przypadku opisanego wyżej wariantu polimeryzacji anionowej (tzw. polimeryzacji żyjącej, gdzie $D_M < 1,1$), to i tak uzyskane wyniki w pełni satysfakcjonują eksperymentatorów [6]. W obliczu możliwości wykorzystania metody zarówno w wodnych, jak i w organicznych środowiskach reakcji, a także jej dużej tolerancji względem szerokiego zakresu grup funkcyjnych obecnych w przekształcanych cząsteczkach fakt ten nie odgrywa praktycznie żadnej roli [4].

Aby przeprowadzić proces SI-ATRP w roztworze, w wyniku którego otrzyma się szczotki polimerowe, należy skomponować mieszaninę reakcyjną składającą się z: jonów metalu przejściowego (Me^n) zdolnego do jednostkowej zmiany swojego stopnia utlenienia i rozbudowy swojej strefy koordynacyjnej w rezultacie przyłączenia liganda (L), co z kolei doprowadzi do wytwarzania kompleksu (Me^n/L), przeciwionu (X) mogącego z powodzeniem wchodzić w oddziaływanie z centrum metalicznym, immobilizowanego na zadanym podłożu inicjatora, a także monomerów (M). Rolę aktywatora w omawianym typie polimeryzacji pełni kompleks Me^n/L , który odszczepia od inicjatora bądź od nieaktywnego łańcucha polimerowego (RX) atom X (najczęściej jest to halogenek). Proces ten przebiegający według mechanizmu rodnikowego skutkuje utlenieniem atomu metalu w kompleksie i wykształceniem molekuł $Me^{n+1}X/L$. Natomiast powstały w tym samym czasie aktywny rodnik organiczny R^* ulega propagacji w wyniku przyłączania kolejnych cząsteczek M, aż do momentu terminacji będącej rezultatem wejścia w reakcję z dezaktywowaną formą katalizatora $Me^{n+1}X/L$. Obserwuje się wówczas zakończenie wzrostu łańcucha i odtworzenie aktywnego katalitycznie kompleksu metalu Me^n/L (Rys. 5) [6].



Rysunek 5. Schemat inicjonowanej powierzchniowo polimeryzacji rodnikowej z przeniesieniem atomu – SI-ATRP. Umieszczono za zgodą z [6]

Figure 5. The scheme of the surface-initiated atom transfer radical polymerization – SI-ATRP. Reprinted with permission from ref. 6

Za kontrolowany przebieg polimeryzacji typu SI-ATRP jest w głównym stopniu odpowiedzialny aktywator, tzn. kompleks metalu przejściowego. Największą popularnością w gronie pierwiastków do tego celu używanych cieszy się miedź (z uwagi na efektywność i uniwersalność powstałyaktywatorów), choć w literaturze spotyka się także doniesienia o wykorzystaniu kompleksów, których atomy centralne stanowią atomy tytanu, molibdenu, żelaza, rutenu, niklu oraz palladu [16]. Rolę ligandów pełnią z powodzeniem związki polidentne (wielokleszczowe, np. 1,4,8,11-tetraazocyklotetradekan – CYCLAM). W charakterze przeciwigonów, tak jak już wspomniano, stosuje się przeważnie halogenki [16].

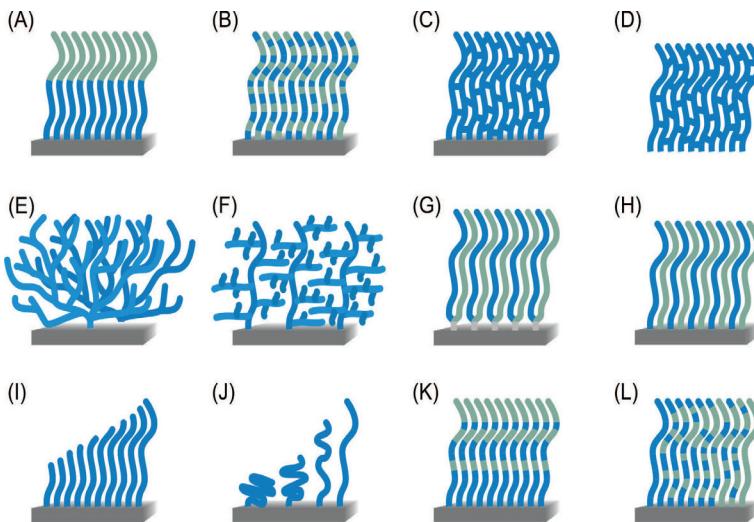
Czynnikami wpływającymi na szybkość przebiegu procesu tworzenia szczotek polimerowych są: stężenie inicjatora i gęstość jego naszczepienia, a także stosunek stężeń aktywatora do dezaktywatora (czyli form Me^n/L do $\text{Me}^{n+1}\text{X}/\text{L}$) [6].

Reasumując – udowodniono, iż SI-ATRP stanowi doskonałą metodę otrzymywania szczotek polimerowych. Jest ona uniwersalna, kompatybilna z dużą ilością różnorodnych monomerów czy obecnych w nich grup funkcyjnych, a ponadto stosunkowo odporna na obecność zanieczyszczeń w układzie reakcyjnym. Nawet obecność niewielkich ilości gazowego tlenu nie przeszkadza w wydajnym prowadzeniu całego procesu, albowiem jest on bardzo szybko usuwany w wyniku reakcji z nadmiarem katalizatora. Ponadto łatwo dostępne w handlu odczynniki (niezbędne katalizatory, inicjatory powierzchniowe) o odpowiedniej dla ATRP czystości, czy też możliwość ich stosunkowo łatwej syntezy we własnym laboratorium sprawiają, że opisywana metoda stanowi (z punktu widzenia realizacji samego eksperymentu) bardzo atrakcyjną technikę. Posiada ona jednak również kilka wad.

Użycie pochodnych pirydyny lub kwasów karboksylowych w charakterze monomerów stanowi nie lada wyzwanie dla eksperymentatora, albowiem skutecznie kompleksują one metaliczne katalizatory (lub wchodzą z nimi w inne oddziaływanie). Ponadto kwestią dokładnego usunięcia katalizatora z otrzymanych szczotek może być decydująca dla wykorzystania zsyntetyzowanych układów do celów biomedycznych oraz konstrukcji systemów elektronicznych [4].

1.2. KONTROLA STRUKTURY PRZESTRZENNEJ

W zależności od stosowanych substratów (ich rodzaju, względnych ilości wybranych monomerów w mieszaninie), rodzaju podłoża i osadzonych na nim inicjatorów, a także warunków prowadzenia reakcji (czas, rozpuszczalniki) metoda inicjowanej powierzchniowo kontrolowanej polimeryzacji rodnikowej pozwala na uzyskanie zdecydowanej większości znanych rodzajów szczotek polimerowych, począwszy od układów zbudowanych z kopolimerów blokowych, przez kopolimery statystyczne, po tzw. układy wolnostojące (ang. *free-standing*) nie posiadające trwałego podłoża (Rys. 6). Warto również podkreślić, iż właściwe powiązanie ze sobą poszczególnych czynników pozwala ściśle kontrolować architekturę otrzymywanych systemów, zarówno ich skład jakościowo-ilościowy, jak i przestrzenne rozmieszczenie łańcuchów na szczepionej powierzchni. Przykładowo można operować gęstością szczotek polimerowych poprzez: wprowadzanie do mieszaniny reakcyjnej odczynników chemicznych reagujących częściowo z unieruchomionym na podłożu inicjatorem, ale już niezdolnych do samej polimeryzacji, zmianę typu inicjatora, jednoczesne wprowadzania kilku jego rodzajów, a nawet poprzez stosowanie techniki kontaktowej litografii dla generowania odpowiednich matryc poddawanych dalszemu szczepieniu [4].



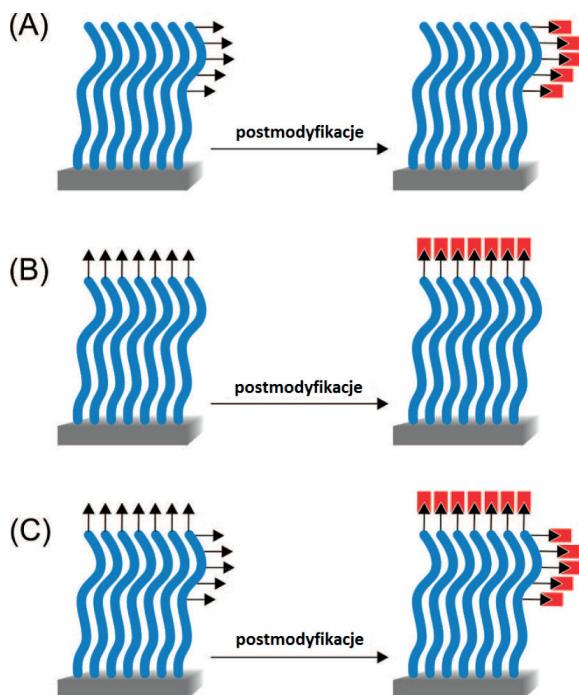
Rysunek 6. Typy szczotek polimerowych możliwe do uzyskania na drodze inicjowanej powierzchniowo kontrolowanej polimeryzacji rodnikowej: (A) zbudowane z kopolimerów blokowych, (B) złożone z kopolimerów statystycznych, (C) o łańcuchach usieciowanych, (D) wolnostojące o łańcuchach usieciowanych, (E) hiperrogażone, (F) rozgażcone, (G) o „włóknach” w kształcie litery Y złożonych z dwu różnych typów łańcuchów, (H) standardowe-miesiane zbudowane z dwu różnych typów łańcuchów, (I) z gradientem mas cząsteczkowych poszczególnych makromolekuł, (J) z gradientem gęstości naszczeplenia łańcuchów, (K, L) z gradientem składu jakościowo-ilościowego merów składających się na poszczególne łańcuchy. Umieszczone za zgodą z [4]. Prawa autorskie 2016, American Chemical Society

Figure 6. The overview of different polymer brush architectures that can be prepared via surface-initiated controlled radical polymerization: (A) block copolymer brushes, (B) random copolymer brushes, (C) cross-linked polymer brushes, (D) free-standing polymer brushes, (E) hyperbranched polymer brushes, (F) highly branched polymer brushes, (G) Y-shaped binary mixed polymer brushes, (H) standard binary mixed brushes, (I) molecular weight gradient polymer brushes, (J) grafting density gradient polymer brushes, (K, L) chemical composition gradient polymer brushes. Reprinted with permission from ref. 4. Copyright 2016, American Chemical Society

1.3. FUNKCJONALIZACJA ZSYNTEZOWANYCH UKŁADÓW

Pomimo że metody kontrolowanej polimeryzacji rodnikowej charakteryzują się stosunkowo dużą tolerancją względem obecnych w cząsteczkach monomerów grup funkcyjnych, to jednak z uwagi na potencjalne i dalece niepożądane oddziaływanie pomiędzy wspomnianymi fragmentami reaktywnymi a stosowanymi katalizatorami (bądź też powstającymi w trakcie procesu propagacji łańcucha na jego końcach ugrupowaniami silnie aktywowanymi) istnieje konieczność wprowadzenia ich do układów dopiero po syntezie całej szczotki polimerowej. Te tzw. postmodifikacje (ang. *post-modification*) umożliwiają lepsze dopasowanie prefabrykowanych szczotek do pełnionych przez nie funkcji, a także pozwalają na umieszczenie w otrzymywanych systemach grup atomów, które pierwotnie nie mogłyby się tam znaleźć. Rysunek 7 przedstawia możliwe rodzaje funkcjonalizacji obejmujące

zarówno zmianę składu bocznych fragmentów makromolekuł (A), ich wolnych końców (B), jak i jednoczesną jednych oraz drugich (C).



Rysunek 7. Funkcjonalizacja utworzonych szczotek polimerowych: (A) modyfikacja bocznej części łańcuchów, (B) modyfikacja wolnych końców makromolekuł, (C) połączenie obu wymienionych rodzajów modyfikacji naszczeplionych łańcuchów polimerowych. Umieszczone za zgodą z [4]. Prawa autorskie 2016, American Chemical Society

Figure 7. The postmodification of polymer brushes: (A) side chain modification, (B) chain end modification, (C) side chain and chain end modification. Reprinted with permission from ref. 4. Copyright 2016, American Chemical Society

Wprowadzone w wymienione pozycje grupy funkcyjne mogą ponadto służyć poprawieniu właściwości powierzchniowych otrzymanych szczotek lub jako swoiste „kotwice” dla nowego procesu polimeryzacji obejmującego syntezę łańcuchów zbudowanych z odmiennego typu monomerów niż te pierwotnie na podłożu osadzone. Postmodyfikacjom poddaje się ugrupowania estrowe, hydroksylowe, epoksydowe i in. [4].

2. METODY CHARAKTERYZOWANIA SZCZOTEK POLIMEROWYCH

Określanie składu chemicznego i struktury szczotki polimerowej

Najpopularniejszymi technikami dostarczającymi eksperymentatorowi dokładnej informacji na temat budowy jakościowej oraz ilościowej otrzymywanej układowi są metody spektroskopowe: IR (spektroskopia w podczerwieni, ang. *infrared spectroscopy*), AES (spektroskopia elektronów Augera, ang. *Auger Electron Spectroscopy*), XPS (spektroskopia fotoelektronów w zakresie promieniowania X, ang. *X-ray Photoelectron Spectroscopy*). Spektroskopia IR pozwala na ustalenie obecności określonych grup funkcyjnych w łańcuchach polimerów, podczas gdy XPS – na określenie ilościowe składu pierwiastkowego szczotek. Co znamienne, w przypadku XPS badaniu podlegają nie tylko wolne końce makromolekułów przytwierdzonych z drugiej strony do podłoża, ale cała warstwa zewnętrzna szczotki o grubości 2–10 nm. Pozwala to zatem na tworzenie stosunkowo dokładnych profili głębokościowych. Ponadto metoda XPS służy mapowaniu samej powierzchni szczotek. Przy określaniu składu chemicznego próbki wykorzystuje się także AES [17].

Badanie wysokości szczotek polimerowych

Charakterystyka tej cechy opisywanych układów odbywa się za pomocą elipsometrii, której niewątpliwą zaletę stanowi jej nieinwazyjność, natomiast wady – cząsochłonność oraz konieczność skonstruowania skomplikowanego modelu matematycznego umożliwiającego interpretację uzyskanych wyników pomiarowych. Inną popularną metodą wyznaczania grubości szczotek jest mikroskopia sił atomowych AFM (ang. *Atomic Force Microscopy*), jednakowoż wymaga ona mechanicznego usunięcia części łańcuchów polimerowych, a to w celu porównania wysokości fragmentu powierzchni z naszczepionymi makromolekułami i tego ich pozbawionego. W przypadku szczotek immobilizowanych na nanosferach dobre rezultaty uzyskuje się przy zastosowaniu metody dynamicznego rozpraszania światła DLS (ang. *Dynamic Light Scattering*) [17].

Wyznaczanie średniej masy cząsteczkowej naszczepionych polimerów

W tym celu wykorzystuje się najczęściej chromatografię żelową GPC (ang. *Gel Permeation Chromatography*). Wymaga ona jednak zniszczenia struktury szczotki poprzez odczepienie łańcuchów polimerowych od podłoża (z reguły za pomocą mocnego kwasu, np. solnego), a następnie przeprowadzenie wolnych makromolekułów do roztworu i nastrzyknięcie go na kolumnę chromatograficzną. Użycie zbyt inwa-

zyjnych odczynników może doprowadzić do daleko idącej degradacji łańcuchów, a w konsekwencji zafałszowania wyników pomiarów [17].

Określanie gęstości szczepienia

W przypadku syntezy szczotek metodą „szczepienia z” najprościej jest wyznaczyć uśrednioną gęstość szczepienia łańcuchów polimerowych na wybranym podłożu poprzez: (a) zdefiniowanie wydajności osadzania inicjatora na zadanej powierzchni, a następnie (b) określenie jego efektywnego tam stężenia dostępnego dla dalszych etapów syntezy opisywanych układów polimerowych. Służą temu następujące metody: XPS, analiza pierwiastkowa oraz analiza termograwimetryczna [17].

Można również skorzystać z tzw. teorii szczotek podającej zależność pomiędzy wysokością wyprostowanych łańcuchów, gęstością szczepienia i masą cząsteczkową polimerów. Po określeniu wysokości szczotek oraz wspomnianej masy (makromolekuły muszą uprzednio zostać odszczepione) wylicza się szukaną gęstość szczepienia [17].

Badanie topografii oraz struktury powierzchni szczotki polimerowej

Podstawowe narzędzie pracy dla eksperymentatora stanowi w tym wypadku wspomniana już mikroskopia sił atomowych AFM. Z uwagi na fakt, iż mikroskop AFM posiada swego rodzaju sondę wyposażoną w ostrze o średnicy kilku nanometrów, umożliwia on otrzymywanie obrazów o bardzo dobrej rozdzielcości. Co warte podkreślenia, dla badań tą metodą dostępne są układy znajdujące się w praktycznie dowolnym środowisku: gazie, cieczy, próżni. Inna technika wykorzystywana w recenzowanym wypadku to skaningowa mikroskopia elektronowa (pozwala jednocześnie badać topografię powierzchni i jej skład pierwiastkowy).

3. WŁAŚCIWOŚCI I ZASTOSOWANIE SZCZOTEK POLIMEROWYCH

Prace wielu zespołów naukowych z renomowanych uczelni krajowych i zagranicznych są często poświęcone badaniom dotyczącym *stricto* szczotek polimerowych. Ich dotychczasowe wysiłki nie poszły na marne – opisywane układy znalazły wiele praktycznych zastosowań. Naukowcy z całego świata systematycznie donoszą o kolejnych udoskonaleniach systemów już skonstruowanych albo o wynalezieniu nowych. Szczotki polimerowe są już obecne zarówno w biotechnologii, szeroko pojętej medycynie, jak i w elektronice. Poniżej przedstawiono najciekawsze ze stwierdzonych dotąd właściwości tych układów i ich praktyczne zastosowania.

3.1. SZCZOTKI POLIMEROWE WRAŻLIWE NA BODŹCE ZEWNĘTRZNE

Wykorzystując różnice w powinowactwie fragmentów łańcuchów kopolimerów do określonych rozpuszczalników można sterować konformacjami przyjmowanymi przez poszczególne makromolekuły. Umieszczenie rozpatrywanych układów w medium dobrze solwatuującym polimery liniowe naszpęcone na zadaną powierzchnię skutkuje uzyskaniem struktury szczotki, natomiast zastosowanie rozpuszczalnika o skrajnie innym charakterze przyczyni się do zniszczenia dotychczasowej architektury i do zwinięcia łańcuchów w kłębek w celu zminimalizowania powierzchni ich kontaktu z otaczającym środowiskiem. Takie zachowanie wykazują np. układy zbudowane ze szczotek PMMA (poli(metakrylan metylu, ang. *poly(methyl methacrylate)*), tzw. pleksiglas) w obecności odpowiednio tetrahydrofuranu („dobrego” rozpuszczalnika) i wody („złego” rozpuszczalnika) [18].

Inny czynnik sterujący właściwościami opisywanych systemów stanowi temperatura. Hydrofilowość powierzchni szczotek polimerowych składających się ze szczepionego na polistyrenie PNIPAM-u (poli(*N*-izopropyloakryloamid), ang. *poly(N-isopropylacrylamide)*) w temp. 37°C była odpowiednia do osadzania na nich komórek śródbłonkowych wołowej tętnicy szyjnej. Natomiast obniżenie temp. do ok. 20°C skutkowało praktycznie całkowitym odczepieniem komórek, co wynikało ze zbyt dużego dla nich wzrostu stopnia hydrofilowości PNIPAM-u [19].

Podobne efekty uzyskuje się operując w odpowiedni sposób wartościami pH czy siły jonowej roztworu, w którym zanurzone są szczotki polimerowe. W niedalekiej przyszłości może to umożliwić skonstruowanie czułych na bodźce pochodzące z organizmu pacjenta kapsuł dostarczających leki do wybranych narządów.

3.2. KONTROLOWANIE ADHEZJI KOMÓREK

Stosowanie tzw. deseniowych szczotek polimerowych, otrzymywanych za pomocą technik nanolitograficznych, mikrokontaktowego drukowania lub nano-przycinania, pozwala na sterowanie geometrią zaadsorbowanych na powierzchni układu żywych komórek, zapewnia ich kontrolowany wzrost, a ponadto umożliwia precyzyjne rozlokowywanie wspomnianych biomolekułów na zmodyfikowanym podłożu. H. Ma wraz ze współpracownikami [19] wykorzystali deseniowe szczotki z poli(glikolu etylenowego), które posłużyły do wyhodowania komórek fibroblastów. Autorzy tego eksperymentu dokonali funkcjonalizacji powierzchni złota za pomocą techniki mikrokontaktowego drukowania. Ich szczotki wykazywały biokompatybilność oraz kontrolowaną odporność na niepożądaną adsorcję komórek i białek. W sąsiedztwo tak zmodyfikowanej matrycy wprowadzono fibronektyny, które spowodowały z kolei selektywną adsorcję biomakromolekułów w miejscach niepokrytych przez szczotki polimerowe. Fakt ten potwierdził wspomnianą na początku akapitu możliwość sterowania przestrzennym wzrostem oraz adsorcją powierzchniową wybranych typów komórek [6].

Same szczotki deseniove mogą w przyszłości służyć także w charakterze biosensorów, wypełnień chromatograficznych czy rusztowań w inżynierii tkankowej [6].

3.3. MODYFIKACJE POWIERZCHNI NOWOCZESNYCH MATERIAŁÓW OPARTYCH NA GRAFENIE

Naniesienie na wybrane podłożo szczotek polimerowych może skutkować całkowitą zmianą niektórych właściwości powierzchni lub też ich polepszeniem. Jednym z najwnikliwiej badanych ostatnimi czasy materiałów, z którym różne gałęzie nauki i przemysłu wiążą olbrzymie nadzieje, jest grafen.

Grafen składa się z pojedynczych warstw atomów węgla zorganizowanych w połączone ze sobą sześcioczłonowe pierścienie. Jest nie tylko bardzo dobrym przewodnikiem ciepła, ale dzięki posiadaniu zdekomplikowanych elektronów π okazał się on również doskonałym nośnikiem ładunku. Ponadto cechuje go wysoka elastyczność oraz wytrzymałość mechaniczna. Materiał dla niego pokrewny stanowi tlenek grafenu. Szczepienie na powierzchni tego ostatniego szczotek z polistyrenem, poli(akrylanu butylu) czy poli(metakrylanu metylu) zwiększyło rozpuszczalność zmodyfikowanych w ten sposób warstw w cieczach, takich jak: woda, dimetyloformamid,toluen, chloroform oraz dichlorometan, poprawiło ich stabilność termiczną, trwałość mechaniczną oraz przewodnictwo elektryczne [6].

Kombinowanie szczotek polimerowych oraz materiałów podobnych do wyżej wspomnianych ma bez wątpienia niebywałe znaczenie w kontekście tworzenia nie tylko grafenopodobnych struktur, ale także szeroko rozumianych biokompatybilnych materiałów.

3.4. CHROMATOGRAFIA

Szczotki polimerowe znalazły również zastosowanie do modyfikacji faz stacjonarnych wykorzystywanych w chromatografii czy kapilarnej elektroforezie. Dzięki dodatkowej funkcjonalizacji polimerowych nanocząsteczek osiągniętej w wyniku naszczepienia na ich powierzchni szczotek zbudowanych z PSPMA(K)-u (sól potasowa poli(metakrylanu 3-sulfopropylowego), ang. *poly(potassium 3-sulfopropyl methacrylate)*) poprawiono separację wybranych białek, rozdzielanych metodą HPLC (wysokosprawna chromatografia cieczowa, ang. *high-performance liquid chromatography*) [20].

PODSUMOWANIE

Nanotechnologia stanowi niewątpliwie przyszłość nauki, techniki, inżynierii. Już teraz staje się ona powoli podstawą konstrukcji nowoczesnych urządzeń o szerokim zastosowaniu w medycynie czy też przy konstrukcji urządzeń elektronicz-

nnych. Postępująca w świecie miniaturyzacja oraz nabywanie przez eksperymentatorów zdolności do precyzyjnego operowania coraz to mniejszymi porcjami materii pozwala na konstruowanie układów o niespotykanych dotychczas właściwościach. Do tego grona należą również szczotki polimerowe.

Szczotki polimerowe dzięki swojej specyficznej architekturze, trwałości termicznej, stosunkowo dużej niezależności względem zmiennych warunków zewnętrznych (bądź też wręcz przeciwnie – zastosowanie innego rozpuszczalnika, modyfikacja jego pH, siły jonowej itp., zmiana temperatury otoczenia umożliwia w wielu wypadkach kontrolowanie struktury szczotki i dostosowywanie jej właściwości do pełnienia w danym momencie zadanych funkcji), a także możliwości użycia w charakterze bloków budulcowych praktycznie dowolnych monomerów doskonale nadają się do budowy inteligentnych urządzeń elektronicznych oraz biotechnologicznych. Nawet obecnie znalazły one zastosowanie przy konstrukcji powłok adhezyjnych dla układów komórkowych, tworzeniu powierzchni antybakterialnych, modyfikacji faz stałych w chromatografii, kierunkowym przesyłaniu ładunków elektrycznych (w skali nano) i w wielu, wielu innych dziedzinach, a przecież stanowią one stosunkowo młode i nadal dynamicznie udoskonalane systemy. Posiadają jednak niebywały wprost potencjał rozwojowy, co może sprawić, iż przyszłość będzie należeć właśnie do nich.

PODZIĘKOWANIA

Chciałbym serdecznie podziękować Panu dr. hab. Szczepanowi Zapotocznemu, prof. UJ, za wsparcie i okazaną pomoc, a także krakowskemu Oddziałowi PTChem., Pani dr hab. Ewie Witek oraz Pani dr Agnieszce Węgrzyn za umożliwienie mi stworzenia tejże pracy.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] Dostępne w internecie: <http://www.nano.gov/nanotech-101/what/definition> [6 V A.D. 2016].
- [2] R.P. Feynman, „There's Plenty of Room at the Bottom”, sesja Amerykańskiego Towarzystwa Fizycznego, California Institute of Technology, Pasadena, 29 XII A.D. 1959.
- [3] K. Wolski, M. Szuwarzyński, S. Zapotoczny, Chem. Sci., 2015, **6**, 1754.
- [4] R. Barbey, L. Lavanant, D. Paripovic, N. Schüwer, C. Sugnaux, S. Tugulu, H.A. Klok, Chem. Rev., 2009, **109**, 5437.
- [5] N. Khanduyeva, „Conjugated Polymer Brushes (Poly(3-hexylthiophene) brushes): new eletro- and photo-active molecular architectures”, Praca doktorska, Wydział Matematyki i Nauk Przyrodniczych Uniw. Techn. w Dreźnie, Drezno, 2008.
- [6] K. Wolski, „Nowe monomery do szczeponieju z powierzchni polimeryzacji matrycowej polimerów przewodzących”, Praca magisterska, Wydział Chemiczny UJ, Kraków, 2012.
- [7] Y. Rabin, S. Alexander, Europhys. Lett., 1990, **13**, 49.
- [8] P. Brandani, P. Stroeve, Macromolecules, 2003, **36**, 9492.
- [9] Y. Tran, P. Auroy, J. Am. Chem. Soc., 2001, **123**, 3644.

-
- [10] N. Ayres, *Polym. Chem.*, 2010, **1**, 769.
 - [11] R. Advincula, *Adv. Polym. Sci.*, 2006, **197**, 107.
 - [12] R. Barbey, L. Lavanant, D. Paripovic, N. Schüwer, C. Sugnaux, S. Tugulu, H.A. Klok, *Macromol. Rapid Commun.*, 2004, **25**, 1510.
 - [13] B. Kong, J.K. Lee, I.S. Choi, *Langmuir*, 2007, **23**, 6761.
 - [14] R. Advincula, Q. Zhou, M. Park, S. Wang, J. Mays, G. Sakellariou, S. Pispas, N. Hadjichristidis, *Langmuir*, 2002, **18**, 8672.
 - [15] Y. Tsujii, K. Ohno, S. Yamamoto, A. Goto, T. Fukuda, *Adv. Polym. Sci.*, 2006, **197**, 1.
 - [16] W.A. Braunecker, K. Matyjaszewski, *Prog. Polym. Sci.*, 2007, **32**, 93.
 - [17] H.M. Klok, *Chem. Rev.*, 2009, **109**, 5437.
 - [18] M. Wolkenhauer, G.G. Bumbu, Y. Cheng, S.V. Roth, J.S. Gutmann, *Appl. Phys. Lett.*, 2006, **89**, 054101.
 - [19] H. Ma, *Adv. Mater.*, 2004, **16**, 338.
 - [20] A. Tuncel, *Anal. Chem.*, 2006, **78**, 5868.

Praca wpłynęła do Redakcji 20 lipca 2016

INFORMACJE

SPRAWOZDANIE KOMITETU GŁÓWNEGO OLIMPIADY CHEMICZNEJ Z 62. OLIMPIADY CHEMICZNEJ W ROKU SZKOLNYM 2015/2016

W roku szkolnym 2015/2016 odbyła się 62. Olimpiada Chemiczna. Przygotowania do niej, tak jak w latach poprzednich, rozpoczęły się po uroczystości zakończenia 61. Olimpiady w dniu 20 czerwca 2015 r. – rozdaniem folderów z zadaniami wstępnyimi 62. Olimpiady. Jednocześnie teksty zadań zostały zamieszczone na stronie internetowej Olimpiady Chemicznej, a następnie rozesłane do nauczycieli i szkół. Zainteresowani uczniowie mogli zatem rozpocząć indywidualne rozwiązywanie zadań etapu wstępnego jeszcze przed wakacjami i uzupełniać przy tym swoje wiadomości na podstawie zalecanej literatury, a także korzystając z konsultacji nauczycieli i starszych kolegów.

Zgodnie z terminarzem 62. Olimpiady, do 24 października 2015 r. wszyscy chętni do udziału w zawodach musieli zarejestrować się na stronie internetowej Olimpiady w Internecie i zarazem przekazać swojemu nauczycielowi rozwiązania zadań z części A (zadania obowiązkowe). Wstępnie zarejestrowało się 1114 uczniów z 304 szkół. Nauczyciele po zweryfikowaniu rozwiązań wysłali je do Komitetów Okręgowych. Na podstawie otrzymanych udokumentowanych rozwiązań zadań etapu wstępnego ostatecznie zostało zakwalifikowanych do etapu pierwszego 937 uczniów z 260 szkół (Tabela 1).

Etap I odbył się 28 listopada 2015 r. w kilkunastu większych miastach Polski, pod nadzorem komisji powołanych przez Komitety Okręgowe. Zawodnicy rozwiązywali 5 zadań teoretycznych. Na podstawie uzyskanych wyników Komitet Główny zakwalifikował do II etapu 380 zawodników (Tabela 1).

62. Olimpiada Chemiczna – uczestnictwo w poszczególnych okręgach

Okręg	Rejestracja		I etap		II etap		Final		Laureaci	Wyróżnieni	szkoły L + W
	uczniów	szkół	uczniów	szkół	uczniów	szkół	uczniów	szkół			
Białostocki	36	10	32	9	15	5	5	1	1	1	1
Gdański	88	30	68	23	25	16	4	3	1	0	1
Katowicki	72	31	56	27	23	16	6	6	2	1	3
Kielecki	29	12	29	12	13	9	4	4	0	0	0
Krakowski	91	20	76	19	36	11	11	5	4	0	1
Lubelski	74	24	64	21	21	14	7	5	3	0	3
Łódzki	90	18	77	14	36	7	15	4	6	0	2
Poznański	98	40	66	29	33	17	3	3	1	0	1
Rzeszowski	60	24	55	22	18	14	4	4	1	0	1
Szczeciniński	89	11	78	10	29	5	9	4	5	0	2
Toruński	99	18	90	17	36	9	9	3	5	0	1
Warszawski	180	34	156	31	61	15	18	7	5	1	3
Wrocławski	108	32	90	26	34	13	6	3	0	1	1
Łącznie	1114	304	937	260	380	151	101	52	34	4	20

Tabela 2. Lista laureatów i wyróżnionych 62. Olimpiady Chemicznej 2015/2016

Lp	Nazwisko	Imię	Nauczyciele – opiekunowie laureata	Okręg
Laureaci				
1	Świerczyński	Mikołaj	dr Justyna Staluszka; dr hab. Robert Zakrzewski; mgr Maciej Sienkiewicz	Łódzki
2	Klukowski	Adam	mgr Krzysztof Kuśmierczyk; mgr inż. Agnieszka Kuś	Warszawski
3	Zajkowska	Dominika	dr Izabela Dobrzyńska	Białostocki
4	Gala	Michał Łukasz	mgr Katarzyna Czapla; prof.dr hab. inż. Stanisław Krompiec	Katowicki
5	Jankowski	Wojciech Jan	mgr Justyna Raulin	Gdański
6	Chrzanowski	Jędrzej	dr Justyna Staluszka; mgr Maciej Sienkiewicz	Łódzki
7	Makaro	Adam Ireneusz	dr Justyna Staluszka; mgr Maciej Sienkiewicz; dr hab. Robert Zakrzewski	Łódzki
8	Hahubiec	Przemysław	mgr Anna Kędzia	Łódzki
9	Puchta	Michał	dr inż. Małgorzata Kępińska-Żerko; dr n. techn. Robert Świejkowski	Szczeciniński
10	Walewski	Maks Zachary	Hubert Bednarski; dr Piotr Krajewski	Warszawski
11	Flis	Paweł	Honorowy profesor oświaty mgr Włodzimierz Kuśmierczuk	Lubelski
12	Wójcik	Radosław	mgr Małgorzata Augustynowicz - Kłyszewska; dr Andrzej Wolan	Toruński
13	Juszczyk	Albert Krzysztof	mgr Małgorzata Augustynowicz-Kłyszewska	Toruński
14	Siwak	Mirosz Dominik	mgr Alicja Nowak	Poznański
15	Wojciechowski	Robert	mgr Małgorzata Augustynowicz-Kłyszewska; dr Andrzej Wolan	Toruński
16	Paltuba	Bartosz	mgr Maciej Sienkiewicz; dr Justyna Staluszka	Łódzki
17	Lubnauer	Anna Agnieszka	mgr Maciej Sienkiewicz ; dr Justyna Staluszka	Łódzki
18	Chrupiak	Aleksandra Dominika	dr Wojciech Przybylski	Krakowski
19	Narodowiec	Jakub	mgr Anna Gęć; mgr. Katarzyna Cieplowska	Lubelski

Tabela 2. Lista laureatów i wyróżnionych 62. Olimpiady Chemicznej 2015/2016

Lp	Nazwisko	Imię	Nauczyciele – opiekunowie laureata	Okręg
20	Staniszewski	Krzysztof	mgr Teresa Kologrecka-Bajek; mgr Izabela Kiełska	Szczecinski
21	Wantoch-Rekowska	Filip	mgr Teresa Kologrecka-Bajek	Szczecinski
22	Prus	Antoni Artur	dr Wojciech Przybylski	Krakowski
23	Lewkowicz	Krystian Karol	mgr Małgorzata Augustynowicz-Klyszecka; dr Andrzej Wolan	Toruński
24	Każmierczak	Magdalena Maria	mgr Teresa Kologrecka-Bajek	Szczecinski
25	Kiszka	Bartosz	mgr Piotr Jakubiec	Lubelski
26	Janić	Szymon	dr Wojciech Przybylski; dr Zbigniew Fryt	Krakowski
27	Głowacki	Maksymilian Henryk	mgr inż. Agnieszka Kuś; dr hab. inż. Michał Fedoryński prof. PW	Warszawski
28	Golec	Daniel	dr Wojciech Przybylski; mgr Patrycja Paciorek	Krakowski
29	Szostak	Szymon Mikołaj	mgr Krystyna Barszcz	Rzeszowski
30	Kędziora	Mateusz	dr Małgorzata Karwowska-Stefaniak	Warszawski
31	Hatalak	Anna Magdalena	mgr Dariusz Grusza-Probst	Katowicki
32	Wieczorek	Ewa	mgr inż. Agnieszka Kuś	Warszawski
33	Cieślinski	Dominik Sebastian	mgr Małgorzata Augustynowicz; mgr Anna Rygielska	Toruński
34	Rutkowska	Wiktoria Katarzyna	mgr Teresa Kologrecka-Bajek	Szczecinski
			Wyróżnieni	
35	Gębala	Jacek Tomasz	mgr Rafał Kaźmierczyk; mgr Urszula Ostrowska-Prus	Katowicki
36	Łuszczyski	Krysztof	dr Izabela Dobrzańska	Białostocki
37	Ślubowska	Antonina Maria	mgr inż. Agnieszka Kuś	Warszawski
38	Ludwig	Bartłomiej Andrzej	dr Ludmila Szterenberg	Wrocławski

Etap II, w którym ostatecznie wzięło udział 378 zawodników, odbył się w dniach 30 i 31 stycznia 2016 r. w 13 miejscowościach, będących siedzibami Komitetów Okręgowych. Uczniowie mieli do rozwiązyania 5 zadań teoretycznych oraz jedno zadanie laboratoryjne. Na podstawie wyników tego etapu do III etapu (finału) Komitet Główny zakwalifikował 101 uczniów z 52 szkół.

Etap III odbył się w dniach 1 i 2 kwietnia 2016 r. w Warszawie. Zawody laboratoryjne, na które składało się rozwiązywanie 2 zadań (z jakościowej i ilościowej analizy chemicznej), przeprowadzone zostały w pracowniach Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej, a zawody teoretyczne, wymagające rozwiązywania 5 zadań – w Auli Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego.

Po sprawdzeniu prac Komitet Główny wyłonił 34 laureatów i 4 wyróżnionych (Tab. 2) oraz 4 reprezentantów Polski na Olimpiadę Miedzynarodową (IChO), która w tym roku odbędzie się w Tbilisi (Gruzja), w dniach od 23 lipca do 1 sierpnia. Do udziału w niej zostali zakwalifikowani: Mikołaj Świerczyński – zwycięzca tegorocznnej Krajowej Olimpiady, Michał Gala (zdobywca srebrnego medalu na ubiegłorocznnej IChO), Adam Klukowski i Dominika Zająkowska. Zawodnikiem rezerwowym jest Wojciech Jankowski.

Wszystkie zadania (wraz z przykładowymi rozwiązaniami) z poszczególnych etapów są zamieszczone na stronie internetowej Olimpiady: www.chem.uw.edu.pl.

Tradycyjnie laureaci i wyróżnieni oraz ich nauczyciele i dyrektorzy szkół zostali zaproszeni na uroczyste zakończenie Olimpiady, które tym razem miało miejsce 18 czerwca 2016 r. w Auli Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. Uroczystość tę zaszczycili swoją obecnością znakomici goście, którzy wspierali szkoły i Komitet Główny zarówno w pracy, jak i finansowo w nagradzaniu laureatów. Byli nimi przedstawiciele:

- Sejmu Rzeczypospolitej Polskiej – w osobie posła, p. mgr. Jerzego Bieleckiego
- Polskiej Akademii Nauk, reprezentowanej przez: prof. dr. hab. Janusza Jurczaka, Przewodniczącego Komitetu Chemii PAN, członka rzeczywistego PAN, prof. dr. hab. Marka Chmielewskiego, członka korespondenta PAN, a w przeszłości wiceprezesa PAN, Dyrektora Instytutu Chemii Organicznej PAN i wiceprzewodniczącego Komitetu Głównego Olimpiady Chemicznej, prof. dr. hab. Sławomira Jarosza, Dyrektora Instytutu Chemii Organicznej PAN, prof. dr. hab. Jacka Gregorowicza, Wicedyrektora Instytutu Chemii Fizycznej PAN oraz dr Andrzeja Żywocińskiego z IChF PAN.
- Polskiego Towarzystwa Chemicznego – w osobie Wiceprzewodniczącej PTChem, dr hab. inż. Izabeli Madury z Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej oraz prof. dr hab. inż. Adam Pronia, przewodniczącego Oddziału Warszawskiego Towarzystwa.
- Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego, reprezentowanego przez Dziekana, prof. dr hab. Pawła Kuleszę, członka korespondenta PAN i Wiceprzewodniczącego Komitetu Chemii PAN, Prodziekana, dr. hab. Andrzeja

Kudelskiego, prof. UW oraz prof. dr. hab. Marka T. Krygowskiego, laureata pierwszych dwóch krajowych olimpiad chemicznych.

- Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej, w osobach Prodziekanów: prof. dr hab. inż. Elżbiety Malinowskiej oraz prof. dr hab. inż. Marka Glińskiego.
- Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego, w osobie reprezentującego Dziekana prof. dr. hab. Kazimierza Orzechowskiego, przewodniczącego Komitetu Okręgowego Olimpiady Chemicznej we Wrocławiu
- Wydziału Chemii Politechniki Rzeszowskiej – reprezentowanego przez dr. Janusza Pusza, sekretarza Komitetu Okręgowego Olimpiady Chemicznej w Rzeszowie
- Wydziału Chemii Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu – w osobie dr hab. Romualdy Bregier-Jarzębowskiej, przewodniczącej Komitetu Okręgowego Olimpiady Chemicznej w Poznaniu.
- Kolegium Międzywydziałowych Indywidualnych Studiów Matematyczno-Przyrodniczych (MISMaP), w osobie Dyrektora, prof. dr. hab. Andrzeja Twardowskiego z Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego.

Zaproszenie przyjęli także: dr Małgorzata Jelińska-Kazimierczuk, wieloletnia Sekretarz Naukowa Komitetu Głównego Olimpiady Chemicznej, mgr Aleksandra Grabowska, ekspert egzaminu maturalnego z chemii, reprezentująca Centralną Komisję Egzaminacyjną, mgr Joanna Toczko, Kierownik Pracowni Matur z Okręgowej Komisji Egzaminacyjnej w Warszawie, a także przedstawiciele sponsorów: p. Tomasz Zieliński, rzecznik prasowy Zakładów Chemicznych NITRO-CHEM S.A. i p. Aleksandra Adrian z Agencji WALK PR, reprezentująca Biuro Prasowe Grupy ADAMED.

Członkowie Prezydium Komitetu Głównego Olimpiady Chemicznej – Przewodniczący, prof. dr hab. Marek Orlik, Wiceprzewodnicząca – prof. dr hab. Aleksandra Misicka-Kęsik, Sekretarz Naukowy – dr hab. Ewa Poboży oraz Kierownik Organizacyjny – mgr Wanda Szelągowska wręczyli laureatom oraz ich nauczycielom (Tab. 2) dyplomy i nagrody od Komitetu Głównego. Zwycięzca otrzymał laptop MacBook, a pozostały zawodnicy, odpowiednio – smartfony iPhone GS, tablety iPad Air, tablety iPad Mini, czytniki Kindle Paperwhite, odtwarzacze iPod touch oraz zewnętrzne dyski twarde. Wszyscy laureaci otrzymali także książki podarowane przez Polskie Towarzystwo Chemiczne i Wydawnictwo Naukowe PWN.

Tradycyjnie przyznane zostały też nagrody specjalne (kamery Sony), które otrzymali: zwycięzca Mikołaj Świerczyński – od Prezesa spółki Novichem, Adam Klukowski – od Dziekana Wydziału Chemicznego PW oraz Dominika Zajkowska – od Dziekana Wydziału Chemii UW.

Nagrody za najlepiej rozwiążane zadania z chemii organicznej, od Dyrektora Instytutu Chemii Organicznej PAN, prof. dr hab. Sławomira Jarosza otrzymali: Wojciech Jankowski, Maksymilian Głowiak i Adam Klukowski.



Adam Klukowski, Maksymilian Głowiak i Wojtek Jankowski dostali nagrody specjalne od Dyrektora IChO PAN za najlepiej rozwiążane zadania z chemii organicznej.

(Na zdjęciu także dr hab. Ewa Poboży – sekretarz naukowy Komitetu Głównego)

Nagrody za najlepiej rozwiążane zadania z chemii fizycznej, ufundowane przez Dyrektora Instytutu Chemii Fizycznej PAN, prof. dr. hab. Marcina Opałę, a wręczone przez prof. dr hab. Jacka Gregorowicza otrzymali Maks Walewski i Paweł Flis.



Maks Walewski i Paweł Flis dostali nagrody specjalne od Dyrektora IChF PAN za najlepiej rozwiążane zadania z chemii fizycznej

Najmłodsi laureaci – uczniowie klas pierwszych liceum: Wojciech Jankowski, Maksymilian Głowiak i Daniel Golec, otrzymali zewnętrzne dyski twarde lub słuchawki Bose, ufundowane przez Dziekana Wydziału Chemii UAM.



Laureaci z pierwszych klas (Daniel Golec, Antoni Prus i Wojciech Jankowski) dostali nagrody specjalne od Dziekana Wydziału Chemiczno-Metallurgicznego UAM

Po raz pierwszy Prezes firmy NITRO - CHEM S.A. p. Tomasz Ptaszyński ufundował nagrody dla wszystkich laureatów z Okręgu Toruńskiego, w postaci laptopa (dla Radosława Wójcika) i aparatów fotograficznych Sony dla czterech pozostałych laureatów.



Po raz pierwszy nagrody specjalne dla Laureatów z Okręgu Toruńskiego ufundował Prezes NITRO-CHEM S.A. Na zdjęciu uczniowie : Radosław Wójcik, Albert Juszczak, Robert Wojciechowski, Krystian Lewkowicz, Dominik Cieśliński z p. mgr. Tomaszem Zielińskim – rzecznikiem prasowym spółki

Dzięki hojności sponsorów także opiekunowie laureatów otrzymali pamiątkowe prezenty: portfele firmy Wttchen, zakładki magnetyczne i zestawy próbnych arkuszy maturalnych, wydanych przez Oficynę Edukacyjną Krzysztof Pazdro.

Zgodnie z miłą tradycją, członkom polskiej reprezentacji na Olimpiadę Miedzynarodową w Tbilisi, polską flagę wraz z życzeniami powodzenia na zawodach przekazali Karol Rząd i Michał Kopyt (srebrny i złoty medalista z ubiegłoroczej 47. IChO w Baku).



Na 48. Międzynarodową Olimpiadę Chemiczną do Tbilisi (Gruzja) pojadą : Michał Gala, Mikołaj Świerczyński, Dominika Zajkowska i Adam Klukowski. Na kurs przygotowawczy został także zaproszony zawodnik rezerwowy Wojciech Jankowski

Wszyscy finaliści (uczestnicy III etapu) i laureaci otrzymali wystawione przez Komitet Główny zaświadczenie, zwalniające ich z notą najwyższą z egzaminu maturalnego z chemii oraz będące podstawą do skorzystania z odpowiednich uprawnień przy przyjmowaniu na I rok studiów wyższych.

Po zakończeniu części oficjalnej wszyscy obecni zostali zaproszeni do Starej Biblioteki Wydziału Chemii UW na poczęstunek.

Kalendarium następnej, 63. Olimpiady Chemicznej przedstawia się następująco:

21 października 2016 r.

- zakończenie etapu wstępного i rejestracji internetowej zawodników

29 października 2016 r.

- ostateczny termin przesyłania prac etapu wstępnego do Komitetów Okręgowych godz. 11⁰⁰–16⁰⁰: zawody I etapu w miejscowościach wyznaczonych przez Komitety Okręgowe

26 listopada 2016 r. (sobota):

godz. 12⁰⁰–17⁰⁰: zawody części teoretycznej II etapu

27 stycznia 2017 r. (piątek)

godz. 9⁰⁰–14⁰⁰: zawody części laboratoryjnej II etapu

28 stycznia 2017 r. (sobota)

godz. 14⁰⁰–19⁰⁰: zawody części laboratoryjnej III etapu

31 marca 2017 r. (piątek)

godz. 8³⁰–13³⁰: zawody części teoretycznej III etapu

1 kwietnia 2017 r. (sobota)

Lista sponsorów, którzy przyczynili się do wzbogacenia nagród 62. Olimpiady Chemicznej:

1. Dyrektor Instytutu Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk
2. Dyrektor Instytutu Chemii Organicznej Polskiej Akademii Nauk
3. Dziekan Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego
4. Dziekan Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej
5. Dziekan Wydziału Chemii Uniwersytetu Adama Mickiewicza



INFORMACJE REDAKCJI „WIADOMOŚCI CHEMICZNYCH”

CENY PRENUMERATY NA ROK 2016

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

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

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

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

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

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

WYRÓŻNIONE PRACE DOKTORSKIE LUB HABILITACYJNE

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

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

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

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

Polskie Towarzystwo Chemiczne
Sekcja Chemii Organicznej

Zakład Chemii Organicznej
Wydział Chemiczny
Politechniki Wrocławskiej

Zapraszają do udziału w VIII seminarium p.t.:

„Postępy w syntezie związków nieracemicznych”

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

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

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

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

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

- Nomenklatura chemii nieorganicznej. Zalecenia 1990*, red. Z. Stasicka, cena 25 zł
Podstawowa terminologia stereochemii oraz Słownik podstawowych terminów w nauce o polimerach. Zalecenia 1996, red. O. Achmatowicz, B. Szechner i P. Kubisa, cena 12 zł
- Nomenklatura węglowodanów. Zalecenia 1996*, tłum. i red. T. Sokołowska i A. Wiśniewski, cena 18 zł
- I.Z. Siemion, *Bronisław Radziszewski i lwowska szkoła chemii organicznej*, cena 18 zł
- K. Maruszewski, *Fizykochemia molekuł zamkniętych w zeolitach i zol-żelach*, cena 18 zł
- Praca zbiorowa, *Uporządkowane materiały mezoporowe*, red. B. Burczyk, cena 18 zł
- Skorygowana nomenklatura rodników, jonów, jonorodników i podobnych indywidualów chemicznych. Zalecenia 1993*, red. T. Sokołowska i A. Wiśniewski, cena 15 zł
- I.Z. Siemion, *Lutum sapientiae, czyli Notatek chaotycznych część pierwsza*, cena 18 zł
- M. Zabłocka-Malicka, *Ruchliwość jonów w podwójnych układach stopionych soli*, cena 8 zł.
- Praca zbiorowa, *Nanomateriały*, red. D. Hreniak, W. Łojkowski, W. Stręk, M. Suszyńska, cena 25 zł.
- Praca zbiorowa, *Ogniwa paliwowe – nowe kierunki rozwoju*, red. H. Drulis, J. Hanuza, D. Hreniak, M. Miller, G. Paściak, W. Stręk, cena 20 zł
- Glosariusz nazw klas związków organicznych i reaktywnych produktów pośrednich oparty na strukturze (Zalecenia IUPAC 1994)*, red. i tłum. F. Kaźmierczak i J. Gawroński, cena 16 zł.
- Od substacji prostych do życia. Świat RNA – początki życia na Ziemi*, Zdzisław 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 umieszczenymi w nawiasach kwadratowych, w kolejności cytowania wg wzorów [1, 5, 7] (dla prac 1, 5 i 7) lub [1-5, 7] (dla prac od 1 do 5 oraz pracy 7).
- Jeśli w artykułach znajdują się przedruki rysunków, czy innych elementów prac cudzych, w opisach (polskich i angielskich) należy zamieścić stosowną informację.
- Zaleca się umieszczać w tekście pracy rysunki, tabele oraz podpisy (jeśli są przygotowane w edytorze Word), jednak w przypadku plików o bardzo dużych rozmiarach należy zaznaczyć miejsca na ich umieszczenie (zob. Pliki jakie należy przekazać do Redakcji).
- **Pierwsza strona pracy powinna zawierać kolejno:**
 - tytuł pracy w języku polskim (Times New Roman, 14 p, pogrubiony, WERSALIKI), i angielskim (Times New Roman, 14 p, WERSALIKI),
 - pełne imię i nazwisko autora (autorów) pracy (Times New Roman, 15p, pogrubione),
 - pełne nazwy ośrodków przypisane do autorów pracy (wraz z adresem ośrodka i adresem e-mail autora korespondującego (Times New Roman, 10,5, kursywa),
 - spis treści pracy z zastosowaniem następującego podziału:
Abstract
Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń
Wprowadzenie
1. Tytuł rozdziału
1.1. Tytuł podrozdziału itp.
Uwagi końcowe
Podziękowanie
Piśmiennictwo cytowane
- **Kolejne strony pracy powinny zawierać:**
 - **notki o autorach** pracy wraz z tytułem naukowym (można dołączyć osobno pliki z fotografiami autorów (zob. Pliki jakie należy przekazać do Redakcji)),

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

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

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

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

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

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

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

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

Redakcja „Wiadomości Chemicznych”

SPIS TREŚCI

Sławomir MICHAŁKIEWICZ, Agata SKORUPA: Wspomnienie o Janie Małyszko (1936–2015)	261
Ryszard KUBIAK, Adam PIETRASZKO, Marek WoŁCYZRZ: Profesor Kazimierz Łukaszewicz in memoriam	265
Przemysław ZAWADZKI, Wojciech CZARDYBON, Anna CHROBOK: Reakcje utleniania wybranych grup funkcyjnych z wykorzystaniem Oxone® jako źródła tlenu cząsteczkowego	269
Justyna SAMASZKO-FIERTEK, Monika KuźMA, Barbara DMOCHOWSKA, Rafał ŚLUSARZ, Janusz MADAJ: Metody określania struktury polisacharydów	299
Joanna GOTKOWSKA, Dorota G. PIOTROWSKA: 1'-Homonukleoz(t)ydy – synteza i aktywność biologiczna	319
Horyzonty Nauki 2016 – Forum Prac Dyplomowych, Wydział Chemii UJ, 17–18 maja 2016	
Tomasz Artur Berniak: Synteza i redukcja prochiralnych imin	353
Zbigniew CHAŁUPKA: Immobilizowane alfa-amylazy i celulazy w zastosowaniach praktycznych ...	369
Artur Jarema WÓJCIK: Szcotki polimerowe – otrzymywanie, charakteryzacja, zastosowanie	391
Informacje	411

W NASTĘPNYCH ZESZYTACH UKAŻĄ SIĘ:

- Katarzyna KULIK, Janina BARANIAK: Adenozyno-5'-O-(N-acylosulfamoilowe) pochodne jako potencjalne leki przeciwgruźlicze
- Justyna SEKUŁA, Joanna NIZIOŁ, Tomasz RUMAN: Zastosowanie nanocząstek srebra w laserowej spektrometrii mas oraz w obrazowaniu MS
- Justyna SAMASZKO-FIERTEK, Piotr ROGUSZCZAK, Barbara DMOCHOWSKA, Rafał ŚLUSARZ, Janusz MADAJ: Rutyna – budowa, właściwości
- Jagoda KOWALSKA, Zbigniew CZECH: Fotoreaktwne poliakrylanowe kleje samoprzylepne
- Barbara DMOCHOWSKA, Karol SIKORA, Justyna SAMASZKO-FIERTEK, Rafał ŚLUSARZ, Janusz MADAJ: Cukrowe czwartorzędowe sole amoniowe
- Justyna SAMASZKO-FIERTEK, Monika KuźMA, Barbara DMOCHOWSKA, Rafał ŚLUSARZ, Janusz MADAJ: Egzopolisacharydy bakteryjne – budowa i funkcje