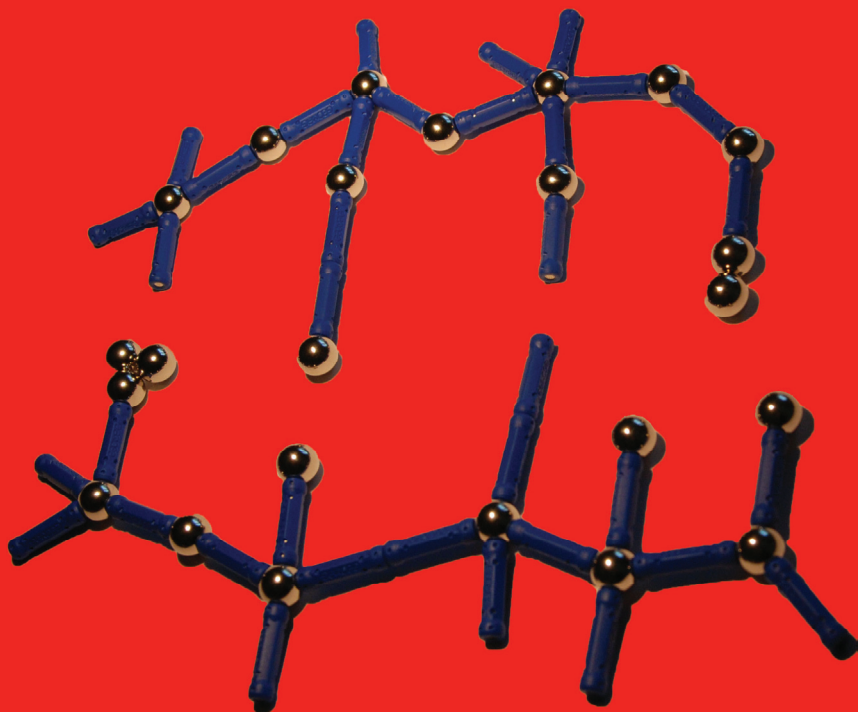


# Materiały supramolekularne

*Praca zbiorowa pod redakcją  
Grzegorza Schroedera*





## **Materiały supramolekularne**

pod redakcją  
Grzegorza Schroedera

## **BETAGRAF P.U.H.**

ul. Św. Antoniego 24, 61-359 Poznań

**Z serii chemia supramolekularna  
zostały wydane następujące pozycje:**

- 1. Zastosowanie magnetycznego rezonansu jądrowego w chemii supramolekularnej**  
G. Schroeder, B. Gierczyk, 2002
- 2. Kompleksy typu gość-gospodarz**  
Pod redakcją G. Schroedera, 2003
- 3. Zastosowanie spektrometrii mas w chemii supramolekularnej**  
R. Frański, G. Schroeder, 2003
- 4. Maszyny molekularne**  
G. Schroeder, J. Wyrwał, 2004
- 5. Syntetyczne receptory jonowe**  
Pod redakcją G. Schroedera, 2005
- 6. Syntetyczne receptory molekularne**  
Pod redakcją G. Schroedera, 2007
- 7. Receptory supramolekularne**  
Pod redakcją G. Schroedera, 2007

**Przedstawione monografie są dostępne w wersji elektronicznej  
na stronach Wielkopolskiej Biblioteki Cyfrowej**

**<http://www.wbc.poznan.pl>**



# **MATERIAŁY SUPRAMOLEKULARNE**

Praca zbiorowa pod redakcją  
Grzegorza Schroedera

BETAGRAF P.U.H.  
Poznań 2008

**Opiniodawca:**

Doc. dr hab. Piotr Grzesiak

Dr hab. Bogusława Łęska

**Opracowanie techniczne:**

Marta Schroeder

**Poznań 2008**

**ISBN 978-83-89936-21-9**

**Wydawnictwo:**

BETAGRAF P.U.H.

Św. Antoniego 24

61-359 Poznań

## SPIS TREŚCI

Wstęp . . . . .	7
Książka adresowa . . . . .	9
<i>1. Paweł Niedziałkowski, Tadeusz Ossowski</i>	
Zastosowanie nośników stałych w projektowaniu oraz syntezie układów na potrzeby chemii supramolekularnej . . . . .	15
<i>2. Joanna Kurczewska i Grzegorz Schroeder</i>	
Otrzymywanie i zastosowania modyfikowanej krzemionki . . . . .	51
<i>3. Tadeusz Ossowski, Paweł Niedziałkowski, Dorota Zarzeczkańska, Monika Przyborowska, Justyna Czupryniak</i>	
Chemosensory fluorescencyjne w rozpoznawaniu jonów metali . . . . .	69
<i>4. Piotr Przybylski, Adam Huczynski, Bogumil Brzezinski, Grzegorz Schroeder</i>	
Aktywność biologiczna zasad Schiffa i innych aza-pochodnych fenoli . . . . .	87
<i>5. Zdzisława Nowakowska, Grzegorz Schroeder</i>	
Pochodne chalkonu jako związki ciekłokrystaliczne . . . . .	133
<i>6. Michał Ceglowski, Grzegorz Schroeder</i>	
Polimery supramolekularne . . . . .	151
<i>7. Tadeusz Ossowski, Paweł Niedziałkowski, Dorota Zarzeczkańska, Monika Przyborowska, Hanna Sulowska</i>	
Fluorojonofory . . . . .	175
<i>8. Grażyna Bartkowiak, Grzegorz Schroeder</i>	
Kwas orotowy – synteza i reaktywność . . . . .	219
<i>9. Anna Żubrowska, Kamil Żukowski, Agnieszka Adamczyk-Woźniak, Alicja Filipowicz-Szymańska, Andrzej Sporzyński</i>	
Badanie oddziaływań między receptorami boronowymi a cukrami metodami absorpcyjnymi i fluorescencyjnymi . . . . .	263

10. <i>Małgorzata Barańska</i>	
Techniki spektroskopii ramanowskiej: mapowanie ramanowskie	
Wybrane przykłady niedestrukcyjnej analizy chemicznej związków bioaktywnych . . . . .	287
11. <i>Błażej Gierczyk, Michał Schulz, Grzegorz Schroeder, Tadeusz Ossowski</i>	
Wybrane metody badań oddziaływań w układach gość-gospodarz . . . . .	299
12. <i>Agnieszka Adamczyk-Woźniak, Andrzej Sporzyński, Anna Żubrowska</i>	
Benzoksaborole – struktury, właściwości chemiczne, zastosowania i metody syntezy . . . . .	361
13. <i>Grzegorz Gruca, Grzegorz Wielgoszewski, Michał Zielony, Paweł Zawierucha, Michał Świątkowski, Agata Masalska, Krzysztof Kolanek, Karol Waszczuk, Mirosław Woszczyzna, Jacek Radojewski, Teodor Gotszalk, Piotr Grabiec, Iwo Rangelow</i>	
Mikrodźwignia sprężysta jako bioczuJNIK . . . . .	379

## Wstęp

Nauka o materiałach jest na progu rewolucji. Tą śmiałą tezę można postawić na podstawie licznych doniesień literaturowych oraz przeglądu ofert handlowych w Internecie. Dziedzina ta bardzo szybko rozwija się w kierunku otrzymywania materiałów, których strukturę możemy projektować i kontrolować w skali nanometrycznej. Otrzymywanie wielofunkcyjnych organicznych materiałów o kontrolowanej nanostrukturze i wysokiej selektywności wymaga stosowania koncepcji chemii supramolekularnej. Do realizacji takiego przedsięwzięcia potrzebna jest współpraca naukowców z prawie wszystkich obszarów nauki, w tym chemików, fizyków, biochemików i biologów.

Badania naukowe w tym zakresie wymagają:

- badania właściwości skondensowanych faz w sztucznych strukturach supramolekularnych;
- badania nanomateriałów, takich jak polimery, ciekłe kryształy, porowate nośniki, modyfikowane krzemionki czy inteligentne błony biologiczne;
- opracowania metod badawczych do kontrolowania supramolekularnej architektury, w tym optycznych diagnostycznych technik badania powierzchni i rozmieszczenia w „inteligentnych” materiałach selektywnych receptorów;
- rozwoju metod projektowania molekuł z zastosowaniem technik komputerowych, projektowania molekularnych urządzeń, w tym molekularnych komputerów, komórkowych automatów i molekularnych urządzeń dla elektronicznej regulacji genów.

Otrzymywanie nowych supramolekularnych materiałów wiąże się najczęściej z supramolekułą. Supercząsteczka składa się z conajmniej dwóch molekuł dopasowanych przestrzennie, jest zaprojektowana tak, aby mogła wykonywać określone zadanie. Składniki tej inteligentnej cząsteczki powstałej w wyniku odwracalnego tworzenia kompleksów gość-gospodarz, utrzymywane są nie poprzez kowalencyjne wiązania lecz przez międzycząsteczkowe siły.

Syntetyczne receptory molekularne nazywane cząsteczkami gospodarza to cząsteczki o zdefiniowanej odpowiedniej budowie przestrzennej mające takie położenie grup wiążących, że umożliwiają selektywne kompleksowanie innych cząsteczek. Otrzymywanie nowych supramolekularnych materiałów wiąże się najczęściej z pojęciem supramolekuły tworzącej się na podstawie rozpoznania

molekularnego lub samoorganizacji. Supramolekuła to duża zaprojektowana cząsteczka tak, aby mogła wykonać określone zadanie. Składniki tej inteligentnej cząsteczki powstałej w wyniku odwracalnego tworzenia kompleksów gość-gospodarz, utrzymywane są przez międzycząsteczkowe siły, a nie poprzez kowalencyjne wiązania.

W monografii powstałej w ramach realizacji w latach 2006-2008 grantu badawczo rozwojowego nr R0501601 pt. „Syntetyczne receptory molekularne dla potrzeb diagnostyki i nanotechnologii” przedstawiono wybrane zagadnienia dotyczące funkcjonalnych materiałów, które każdorazowo mają swój chemiczny początek w syntezie molekularnych receptorach oraz metody badawcze umożliwiające badanie supramolekularnych materiałów.

Poznań, czerwiec, 2008 rok

Grzegorz Schroeder



**Prof. dr hab. Grzegorz Schroeder**

Uniwersytet im. A. Mickiewicza  
Wydział Chemii  
Grunwaldzka 6  
60-780 Poznań  
e-mail: [schroeder@amu.edu.pl](mailto:schroeder@amu.edu.pl)  
tel. +48-61-8291-486  
fax: +48-61-8658-008

**Agnieszka Adamczyk-Woźniak**

Politechnika Warszawska  
Wydział Chemiczny  
Noakowskiego 3  
00-664 Warszawa

**Małgorzata Barańska**

Wydział Chemii  
Uniwersytet Jagielloński  
ul. Ingardena 3  
30-060 Kraków

**Grażyna Bartkowiak**

Uniwersytet im. A. Mickiewicza  
Wydział Chemii  
Grunwaldzka 6  
60-780 Poznań

**Bogumił Brzezinski**

Uniwersytet im. A. Mickiewicza  
Wydział Chemii  
Grunwaldzka 6  
60-780 Poznań

**Michał Cegłowski**

Uniwersytet im. A. Mickiewicza  
Wydział Chemii  
Grunwaldzka 6  
60-780 Poznań

**Justyna Czupryniak**

Uniwersytet Gdański  
Wydział Chemii  
Sobieskiego 18/19  
80-852 Gdańsk

**Alicja Filipowicz-Szymańska**

Politechnika Warszawska  
Wydział Chemiczny  
Noakowskiego 3  
00-664 Warszawa

**Błażej Gierczyk**

Uniwersytet im. A. Mickiewicza  
Wydział Chemii  
Grunwaldzka 6  
60-780 Poznań

**Teodor Gotszalk**

Wydział Elektroniki Mikrosystemów i Fotoniki  
Politechnika Wrocławska  
ul. Janiszewskiego 11/1  
50-372 Wrocław

**Piotr Grabiec**

Instytut Technologii Elektronowej  
al. Lotników 32/46  
02-668 Warszawa



**Grzegorz Gruca**

Wydział Elektroniki Mikrosystemów i Fotoniki  
Politechnika Wroclawska  
ul. Janiszewskiego 11/1  
50-372 Wrocław

**Adam Huczynski**

Uniwersytet im. A. Mickiewicza  
Wydział Chemii  
Grunwaldzka 6  
60-780 Poznań

**Krzysztof Kolanek**

Wydział Elektroniki Mikrosystemów i Fotoniki  
Politechnika Wroclawska  
ul. Janiszewskiego 11/1  
50-372 Wrocław

**Joanna Kurczewska**

Uniwersytet im. A. Mickiewicza  
Wydział Chemii  
Grunwaldzka 6  
60-780 Poznań

**Agata Masalska**

Wydział Elektroniki Mikrosystemów i Fotoniki  
Politechnika Wroclawska  
ul. Janiszewskiego 11/1  
50-372 Wrocław

**Paweł Niedziałkowski**

Uniwersytet Gdański  
Wydział Chemii  
Sobieskiego 18/19  
80-852 Gdańsk

**Zdzisława Nowakowska**

Uniwersytet im. A. Mickiewicza  
Wydział Chemii  
Grunwaldzka 6  
60-780 Poznań

**Tadeusz Ossowski**

Uniwersytet Gdański  
Wydział Chemii  
Sobieskiego 18/19  
80-852 Gdańsk

**Monika Przyborowska**

Uniwersytet Gdański  
Wydział Chemii  
Sobieskiego 18/19  
80-852 Gdańsk

**Piotr Przybylski**

Uniwersytet im. A. Mickiewicza  
Wydział Chemii  
Grunwaldzka 6  
60-780 Poznań

**Iwo Rangelow**

Institute of Technological Physics, IMA  
University of Kassel,  
Heinrich-Plett-Strasse 40  
34132 Kassel

**Jacek Radojewski**

Wydział Elektroniki Mikrosystemów i Fotoniki  
Politechnika Wrocławska  
ul. Janiszewskiego 11/1  
50-372 Wrocław

**Michał Schulz**

Uniwersytet im. A. Mickiewicza  
Wydział Chemii  
Grunwaldzka 6  
60-780 Poznań

**Andrzej Sporzyński**

Politechnika Warszawska  
Wydział Chemiczny  
Noakowskiego 3  
00-664 Warszawa

**Hanna Sulowska**

Uniwersytet Gdański  
Wydział Chemii  
Sobieskiego 18/19  
80-852 Gdańsk

**Karol Waszczuk**

Wydział Elektroniki Mikrosystemów i Fotoniki  
Politechnika Wrocławska  
ul. Janiszewskiego 11/1  
50-372 Wrocław

**Grzegorz Wielgoszewski**

Wydział Elektroniki Mikrosystemów i Fotoniki  
Politechnika Wrocławska  
ul. Janiszewskiego 11/1  
50-372 Wrocław

**Mirosław Woszczyna**

Wydział Elektroniki Mikrosystemów i Fotoniki  
Politechnika Wrocławska  
ul. Janiszewskiego 11/1  
50-372 Wrocław

**Dorota Zarzeczkańska**

Uniwersytet Gdański  
Wydział Chemii  
Sobieskiego 18/19  
80-852 Gdańsk

**Paweł Zawierucha**

Wydział Elektroniki Mikrosystemów i Fotoniki  
Politechnika Wroclawska  
ul. Janiszewskiego 11/1  
50-372 Wrocław

**Michał Zielony**

Wydział Elektroniki Mikrosystemów i Fotoniki  
Politechnika Wroclawska  
ul. Janiszewskiego 11/1  
50-372 Wrocław

**Anna Żubrowska**

Politechnika Warszawska  
Wydział Chemiczny  
Noakowskiego 3  
00-664 Warszawa

**Kamil Żukowski**

Politechnika Warszawska  
Wydział Chemiczny  
Noakowskiego 3  
00-664 Warszawa

## Rozdział I

# Zastosowanie nośników stałych w projektowaniu oraz syntezie układów na potrzeby chemii supramolekularnej

Paweł Niedziałkowski, Tadeusz Ossowski  
*Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański, ul. Sobieskiego 18/19,  
80-952 Gdańsk*

### 1. Wprowadzenie

Koncepcja wykorzystania nośników stałych do celów syntetycznych zawdzięcza swój początek pionierskim pracom Letsingera [1] i Merrifielda [2] pochodzących z sześćdziesiątych lat ubiegłego stulecia. Wykorzystanie metody syntezy na nośniku stałym w głównej mierze przyczyniło się do gwałtownego rozwoju syntezy peptydów, ale i również znajduje ona szerokie zastosowanie w syntezie organicznej od małych molekuł do dużych układów molekularnych, takich jak oligonukleotydy oraz dendrymery. Metodę tę, w szczególności wykorzystano w chemii kombinatorycznej i w syntezie równoległej, która pozwala na otrzymanie w stosunkowo szybkim czasie oraz przy nie dużym nakładzie sił bardzo dużej liczby bibliotek związków, co znalazło zastosowanie w projektowaniu nowych związków biologicznie aktywnych.

W syntezie na nośniku stałym (solid phase organic synthesis – SPOS) substrat biorący udział w reakcji kowalencyjnie przyłączony jest do materiału wspomagającego (żywicy), podczas gdy reagent i/lub czynnik aktywujący znajduje się w roztworze otaczającym nośnik. W wyniku następujących po sobie transformacji, nośnik ulega cyklom przemian, po to, aby usunąć zanieczyszczenia powstałe w wyniku reakcji, tak aby otrzymać możliwie jak najczystszy produkt przed odłączeniem z nośnika stałego.

Dane literaturowe donoszą że jako pierwszy nośnik stały do syntezy estru butylowego kwasu okso-dekanowego wykorzystał Sussman [3] już w roku 1943 stosując żywicę opartą na kwasie sulfonowym. W późniejszym okresie, w latach pięćdziesiątych odkryto zależność form kwaśnych i zasadowych żywic stosowanych do dzisiaj w laboratoriach chemicznych jako jonowymieniacze, oraz bufor w roztworach wodnych.

W latach dziewięćdziesiątych, w wyniku poszukiwania nowych związków, znajdujących zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym oraz rozwojowi chemii kombinatorycznej, nastąpił dynamiczny rozkwit syntezy na nośniku stałym (solid phase organic synthesis-SPOS), co spowodowało z kolei że liczba dostępnych na rynkach nośników stałych uległa wzrostowi.

## 2. Podłoża polimerowe-założenia ogólne

Podstawowym założeniem podłoża stałego, jest dostarczenie możliwie jak najbardziej obojętnych warunków dla syntezowanego substratu. Idealne podłoże to takie, które w żaden sposób nie wpływa na przebieg reakcji chemicznej. Wiadomo jednak że grupy funkcyjne zakotwiczone na polimerze mają zbliżoną reaktywność do tych występujących w stanie wolnym. Natomiast wpływ „zawieszanej” makromolekuły na reakcję chemiczną w głównej mierze zależy od efektu sterycznego, elektrostatycznego oraz dyfuzji. W przypadku ziaren poprzecznie usieciowanego polimeru, powszechnie nazywanego żywicą na reakcję wpływa dostępność substratów do miejsc aktywnych i mikrośrodowisko sprzężone z fazą polimerową wewnątrz ziaren.

Najczęściej używanymi żywicami w syntezie na nośniku stałym (SPOS) są pochodne o małym usieciowaniu polistyrenu - polietyleno glikole, (PEG)-kopolimer polistyrenu oraz makroporowaty polistyren. Żywice polistyrenowe znalazły tak szerokie zastosowanie ze względu na ich dużą stabilność chemiczną. Jednakże grupa związków, która może być wykorzystana do modyfikacji żywic opartych na styrenie i akrylu jest ograniczona, ze względu na metodologie polimeryzacji.

Podczas gdy polistyren jest najczęściej wykorzystywanym podłożem stałym, nie oznacza to, że jest to jedyny materiał, który może być wykorzystywany w syntezie. Alternatywnymi nośnikami, mogą być szkło porowate, monolit [4], celuloza [5], zeolity i silikaty, a także „torebki herbaciane” [6] wykorzystywane w równoległej syntezie kombinatorycznej.

W syntezie na nośniku stałym bardzo ważne również jest dyfundowanie reagentów do miejsc reaktywnych wiążących molekułę. Dla polistyrenowych żywic o małym usieciowaniu oraz dla żywic PEG bardzo ważne jest, aby ziarna żywicy były odpowiednio nasączone rozpuszczalnikiem w którym zachodzi reakcja chemiczna. W przybliżeniu na 10-20% polimeru powinno przypadać 80-90% rozpuszczalnika, aby reakcja na żywicy zachodziła w optymalnych warunkach z najwyższą wydajnością [7]. W przypadku polistyrenowych żywic makroporowatych, o wysokim stopniu usieciowania reagenty dyfundują poprzez pory wewnątrz ziaren, niż poprzez przestrzeń pomiędzy ziarnami w nasączonej żywicy. Synteza SOPS w odniesieniu do syntezy w roztworze posiada znaczącą przewagę, ponieważ otrzymywane produkty można bardzo łatwo i szybko

oczyszczyć, a co najważniejsze czas syntezy na nośniku ulega znacznemu skróceniu. Dodatkowym atutem świadczącym na korzyść SOPS w przypadku syntezy peptydów jest możliwość selektywnego ściągania produktów z osłonami grup bocznych, co umożliwi dalsze ich wykorzystanie do kolejnych etapów syntetycznych. Synteza na nośniku stałym może być również zautomatyzowana, co znacznie skraca czas pracy, a otrzymane produkty niejednokrotnie są wysokiej czystości.

### 3. Budowa żywic

Metoda syntezy na nośniku stałym została z powodzeniem zaadaptowana do przeprowadzenia wielu reakcji organicznych, potwierdzając że wybór żywicy, oraz warunków reakcji jest bardzo istotna w celu otrzymania zaplanowanego substratu.

Reagenty używane do syntezy kotwiczone zostają na podłożu poprzez wiązanie kowalencyjne, bądź elektrostatyczne. Najczęściej używanym podłożem stałym w SPOC jest polistyren, usieciowany diwinylo benzenem (DVB). W zależności od stopnia usieciowania, żywice polistyrenowe mogą być zarówno mikro, jak i makroporowate. Podstawową zaletą nośników polistyrenowych jest nie tylko ich przystępna cena, ale możliwość dużego ich osadzenia, a także to że są chemicznie inertne.

Nie usieciowany, bądź liniowy polistyren rozpuszcza się w hydrofobowych rozpuszczalnikach i uczestniczy w protonowaniu rozpuszczalników. Zaletę tę wykorzystał Chen do syntezy prostaglandyny  $F_{2a}$  [8].

Właściwością żywicy polistyrenowych jest pęcznienie w większości powszechnie występujących rozpuszczalnikach organicznych, uwarunkowane jest to od stopnia ich usieciowania. Żywice o małym stopniu usieciowania zawierające (1–2% DVB), nazywane mikrowłóknistymi, znacznie lepiej pęcznią niż makrowłókniste zawierające (>30% DVB).

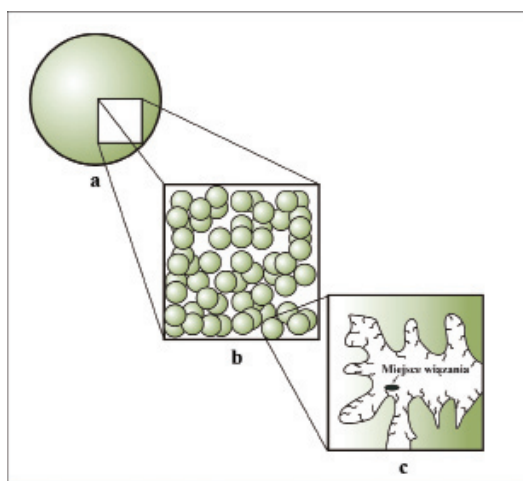
Jeden gram żywicy o 1% usieciowania (DVB), w wyniku pęcznienia w chlorku metylenu zmienia swoją objętość od 4 do 6 razy, w momencie kiedy a sama ilość żywicy o 2% stopniu usieciowania zmienia swoją objętość od 2 do 4 razy [9].

Makroporowate polistyrenowe żywice są ko-polimerami styrenu i diwinylo benzenu, posiadające wewnętrzne pory. Zazwyczaj otrzymywane są w wyniku polimeryzacji w obecności inertnego rozpuszczalnika, co powoduje rozdzielenie faz, tworząc pory wewnątrz struktury żywicy. Zaletą tego typu żywicy jest to że reagenty transportowane są raczej poprzez pory, niż poprzez przestrzeń między polimerem.

Polimeryczne mikroziarna (Rysunek 1.) są heterogeniczne, złożone z wysoko usieciowanych ziaren, z mniejszym sieciowaniem na powierzchni, co wynika

z większej reaktywności diwinylobenzenu względnie do styrenu podczas polimeryzacji [10].

Średnice ziaren żywic polistyrenowych wahają się w granicach od mikrona do 750 mikronów. Kinetyka reakcji zasadniczo jest tym wyższa, im mniejszych ziaren użyje się do syntezy, w wyniku zwiększenia stosunku powierzchni do objętości. Jednakże użycie zbyt małych rozmiarów żywicy może spowodować kłopoty związane z filtracją. Rozmiar ziaren zazwyczaj podaje się w jednostce mesh, która jest odwrotnie proporcjonalna do nominalnej średnicy. Najczęściej używanymi żywicami są żywice o rozmiarze 100-200 mesh oraz 200- 400 mesh co odpowiednio stanowi 75-150 mikronów i 35-75 mikronów.



Rysunek 1. Schemat budowy żywicy makroporowej, (a) pojedyncze ziarenko, (b) mikroziarno, (c) wewnętrzna budowa porów [10].

#### 4. Rodzaje żywic oraz ich wykorzystanie na potrzeby chemii supramolekularnej

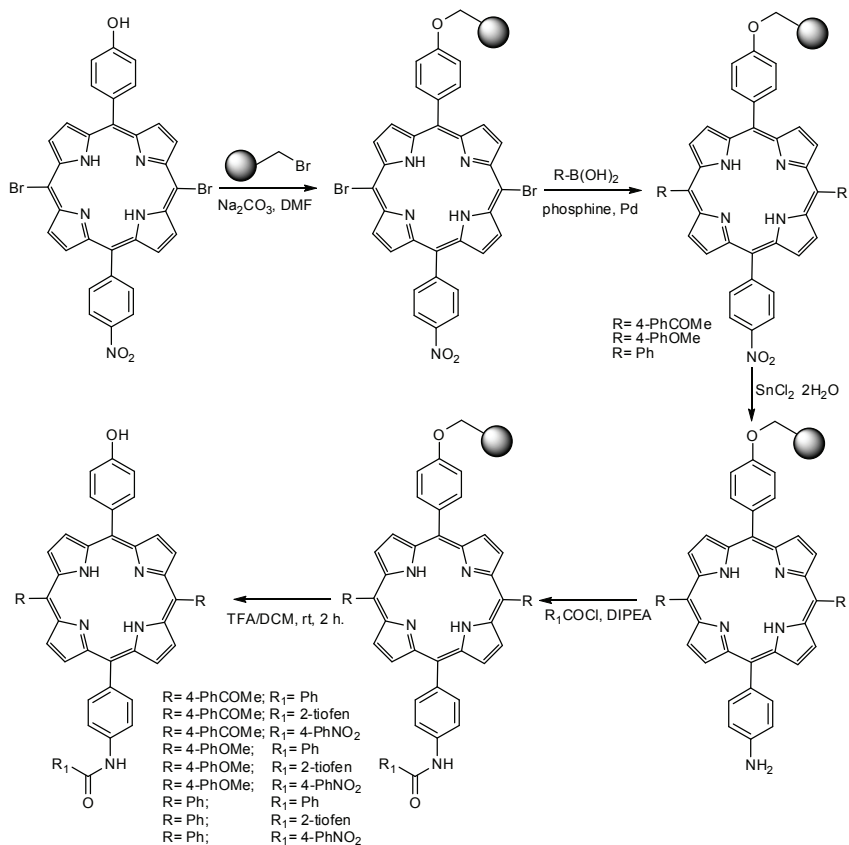
Obecnie na rynku znajduje się bardzo szeroki wybór żywic stosowanych do syntezy na nośniku stałym. W poniższej pracy, ze względu na ograniczenia objętościowe, zostaną przedstawione oraz scharakteryzowane najważniejsze żywice zazwyczaj wykorzystywane w syntezie związków na nośniku stałym.

Bromowana żywica polistyrenowa – jest podstawową żywicą używaną do przygotowania wielu jej pochodnych. Można ją z powodzeniem wykorzystać do reakcji Suzuki [11] (tworzenia wiązania C-C). Żywicę tę otrzymuje się z litowej



Zastosowanie nośników stałych w projektowaniu oraz syntezie układów na potrzeby chemii...

pochodnej polistyrenu, która służy również do otrzymywania fosfinowych, silanowych, boranowych, tiolowych, oraz karboksylowych żywic polistyrenowych. [12].

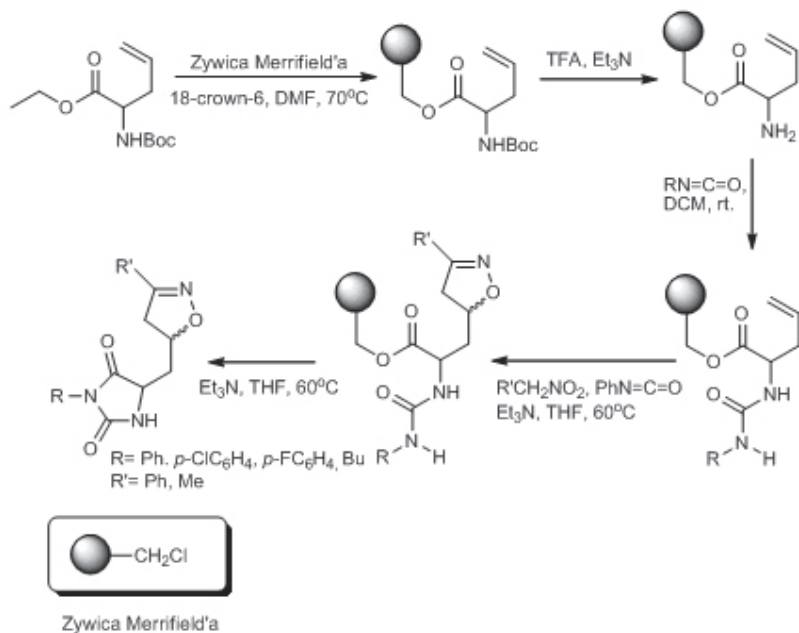


Rysunek 2. Synteza tetra-mezo-fenylo porfiryń z wykorzystaniem SPOS.

Shi [13] wykorzystał bromowaną żywicę do syntezy fotoaktywnych bibliotek porfiryńowych pochodnych tetra-mezo-fenylo porfiryń. Na podkreślenie zasługuje fakt, że w syntezach tych wykorzystano reakcje Suzuki na nośniku stałym (Rysunek 2.).

Na szczególnie uznanie zasługuje chlorometylowana żywica polistyrenowa nazywana potocznie żywicą Merrifield'a [2], która przez szereg lat była podstawową żywicą do syntezy peptydów. W 1984 roku Robert Bruce Merrifield za prace nad syntezą peptydów na nośniku stałym otrzymał Nagrodę Nobla.

Substraty do żywicy Merrifield'a przyłączane są w wyniku nukleofilowego podstawienia atomu chloru. Wiązanie pomiędzy nośnikiem, a substratem jest bardzo silne i trwałe nawet w środowisku kwasowym i wymaga użycia bardzo drastycznych warunków kwasowych (kwas fluorowodorowy), przy ściąganiu produktu z żywicy, co może być uznawane za wadę. Produkty zakotwiczone grupą karboksylową często sprawiają dużo trudności w ściąganiu ich z nośnika, toteż inne metody takie jak kwaśna hydroliza przy użyciu od jedno do trój molowego kwasu solnego [14], transestryfikacja [15] oraz wewnątrz cząsteczkowa cyklizacja [16] (Rysunek 3.) znalazły również efektywne zastosowanie.



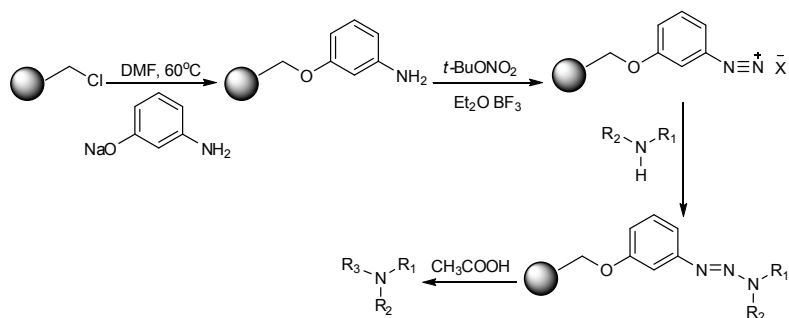
Rysunek 3. Schemat syntezy związków heterocyklicznych z wykorzystaniem żywicy Merrifield'a.

Kyung-Ho Park [16] wykorzystał żywicę Merrifield'a do syntezy szeregu pochodnych hydantoiny, związku krócej pochodne znajdują szerokie wykorzystanie w przemyśle farmaceutycznym, oraz rolnictwie.

Modyfikowane żywice Merrifield'a ze względu na bardzo silne i stabilne wiązanie pomiędzy substratem, a nośnikiem znalazły szerokie zastosowanie w chemii supramolekularnej, ze względu na możliwość kotwiczenia związków na podłożu stałym. Szczególne wykorzystanie żywicy Merrifield'a znalazło zasto-

Zastosowanie nośników stałych w projektowaniu oraz syntezie układów na potrzeby chemii...

sowanie do produkcji nowych modyfikowanych żywic [17-18]. Jednym z wielu przykładów modyfikacji żywicy Merrifield'a może być synteza triazyn przedstawiona przez Bräse [19], w której z żywicy Merrifield'a w reakcji z solą sodową *m*-hydroksyaniliny otrzymano aminową pochodną, a następnie w reakcji z azotynem *tert*-butylu *t*-BuONO<sub>2</sub> w obecności trifluoroboro-eteru w THF uzyskano sól diazoniową, którą poddano reakcji z aminami w niskiej temperaturze uzyskując pochodne triazyn. Otrzymane produkty w wyniku odcięcia 10% kwasem octowym od żywicy, uzyskano z bardzo wysoką wydajnością, a co najistotniejsze, o bardzo dużej czystości (Rysunek 4.).



Rysunek 4. Wykorzystanie żywicy Merrifield'a do syntezy pochodnych amin.

Żywice Merrifielda tak samo jak i wiele innych podstawionych żywic można wytwarzać dwoma sposobami: W wyniku bezpośredniego przyłączenia substratu na powierzchnię polimeru poprzez substytucję elektrofilową do pierścienia aromatycznego, bądź poprzez kopolimeryzację podstawionego monomeru ze styrenem.

Najczęściej podstawione żywice, produkowane są w wyniku reakcji bezpośredniego podstawienia substratu, w której to otrzymuje się mieszaninę izomerów. Żywica Merrifield'a jest typowym przykładem mieszaniny dwóch izomerów, która zawiera 70% izomeru podstawionego w pozycję *para* i 30% izomeru podstawionego w pozycję *meta*.

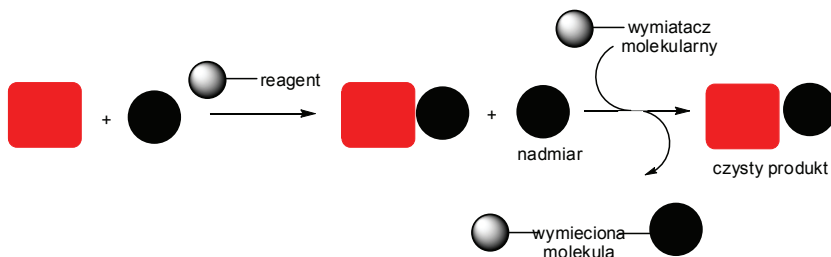
Kopolimeryzacja, natomiast pozwala na użycie do produkcji oczyszczonych izomerów, w wyniku czego można otrzymać izomery podstawione w pozycję *para* nawet w 98%. Żywice tego typu wykazują większą zdolność do pęcznienia, co ma z kolei ogólny wpływ na wydajność przeprowadzanych reakcji.

Dodatkowo kopolimeryzacja pozwala kontrolowanie podstawienia żywic, poprzez ścisły nadzór nad odpowiednio dodawanymi porcjami styrenu, oraz podstawionego monomeru, dzięki czemu firmy zajmujące się produkcją żywic w swojej ofercie posiadają tak duży asortyment żywic różniących się rozmiara-

mi, podstawieniem oraz sieciowaniem.

Żywice Merrifield'a wykorzystuje się również do syntezy powszechnie stosowanych wymiataczy molekularnych. Wymiatacze molekularne oparte na żywicach, są związkami pomocniczymi, które selektywnie wyłapują określone związki z mieszanin reakcyjnych, powodując ich nierozpuszczalność. Właściwość ta wykorzystywana jest do szybkiego ich usuwania poprzez filtrację (Rysunek 5.).

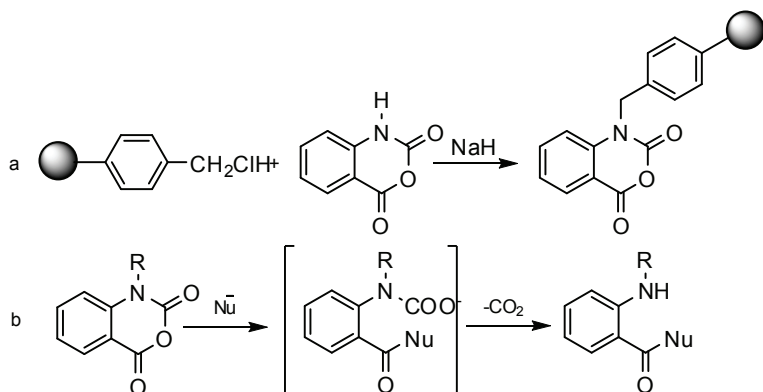
W wymiataczach molekularnych występują zarówno oddziaływania jonowe, jak i kowalencyjne, a wiązania zanieczyszczenia mogą być pochodzenia organicznego, jak i nieorganicznego. Dobór odpowiedniego wymiatacza molekularnego jest bardzo istotny w przypadku, gdy zanieczyszczeniem jest elektrofilem lub nukleofilem..



Rysunek 5. Usunięcie nadmiaru substratu z użyciem wymiatacza molekularnego na nośniku.

Użycie wymiataczy jest bardzo efektywne i ekonomiczne. Stosowanie ich bardzo wpływa na polepszenie czystości otrzymywanych produktów niejednokrotnie czas reakcji ulega znacznemu skróceniu. Pozwalają one na uniknięcie takich czynności jak ekstrakcja woda-woda, bądź chromatografia kolumnowa.

Coppola [20] przedstawił syntezę wymiataczy pierwszo i drugo rzędowych amin alifatycznych, z roztworów w których zostały użyte w nadmiarze, co ma niewątpliwie zastosowanie w wielu reakcjach chemicznych. Używając tego typu wymiataczy możemy w bardzo prosty sposób pozbyć się nadmiaru aminy, tym samym otrzymując czysty produkt reakcji. Wymiatacze te otrzymano poprzez przyłączenie do żywicy Merrifield'a bezwodnika kwasu 2-amino benzoowego (Rysunek 6.) poprzez atom azotu. Mechanizm działania tego typu wymiataczy polega prawdopodobnie na ataku węgla karbonylowego C4 w pierścieniu heterocyklicznym na nukleofile, w wyniku czego powstaje dwutlenek węgla, oraz N-podstawiona pochodna bezwodnika 2-aminobenzoowego.



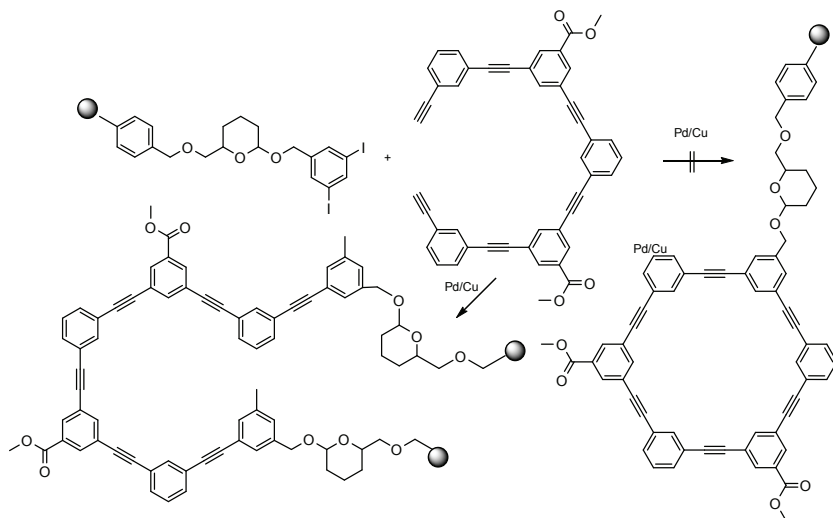
Rysunek 6. Wymiatacz molekularnych amin, (a) metoda syntezy, (b) mechanizm działania.

Shortell [21] wraz ze współpracownikami wykorzystał żywicę Merrifield'a o małym stopniu usieciowania oraz podobną żywicę Argopore o dużym stopniu usieciowania do syntezy w warunkach dużego rozcieńczenia cyklicznych oligo- (*m*-fenylo-etynylenów). W wyniku prób syntezy makrocykli udowodniono, że względu na reakcje uboczne zachodzące podczas zastosowania żywicy o małym stopniu usieciowania, przy zastosowaniu katalizatora Pd/Cu powstają produkty liniowe (Rysunek 7.), natomiast jeśli ta sama synteza przeprowadzona zostanie na żywicy o dużym stopniu usieciowania, w tych samych warunkach, otrzymuje się spodziewany produkt makrocykliczny z zadawalającą wydajnością (Rysunek 8.).

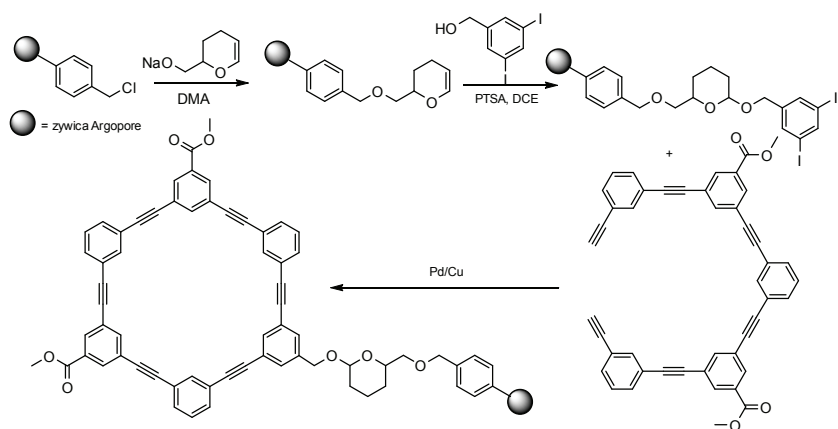
Okazało się jednak, że próby wyizolowania czystego cyklicznego oligo- (*m*-fenylo-etynylenu) nie powiodły się, zaskakujące okazało się że związek po odcięciu z żywicy tworzy strukturę katenanu „nawleczonego” wewnątrz sieci polimerowych (Rysunek 9.).

Żywica Merrifield'a znalazła szerokie wykorzystanie w produkcji polimerowych żywic jonowymiennych. Pochodne te najczęściej zawierają układy zdolne w sposób selektywny i specyficzny kompleksować określone jony, co znalazło zastosowanie w analizach środowiskowych.

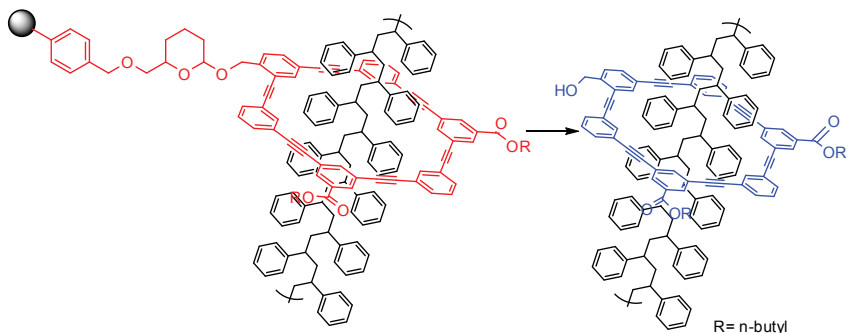
Jeden z przykładów wykorzystania żywicy Merrifield'a do syntezy polimeru chaletującego zaprezentował Vinod [22]. Przedstawił on syntezę modyfikowanych kaliksarenów, które wykorzystał do wydzielania oraz oznaczania w naturalnych ciekach takich jonów jak Cu(II), Cd(II) Pb(II). Właściwości kompleksotwórcze kaliksarenów, zależą w dużej mierze od modyfikacji górnej bądź dolnej części ich obręczy. Vinod zmodyfikował kaliksareny cząsteczką *o*-wanilintiosemikarbazonem (Rysunek 10.), pochodną, która w połączeniu z kaliksarenem wykazuje zdolności chaletujące toksycznych jonów metali [23].



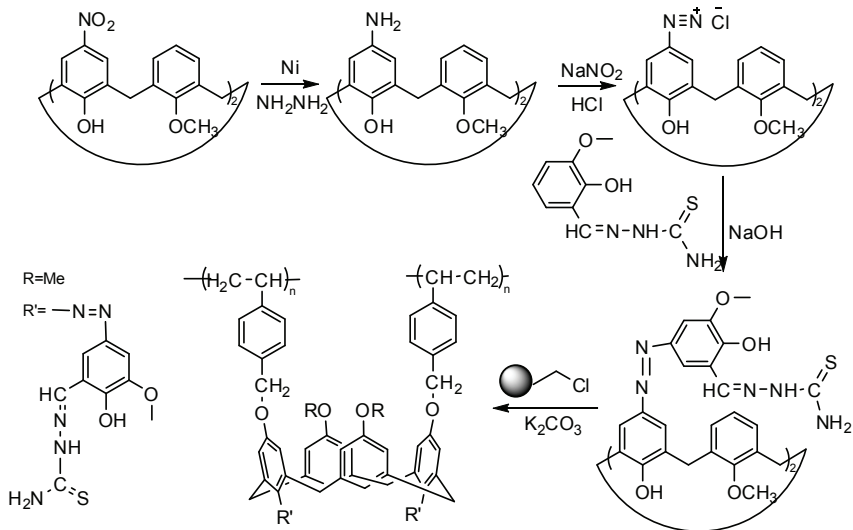
Rysunek 7. Synteza cyklicznych oligo(*m*-fenylo-etynylenów) z użyciem żywicy Merrifield'a.



Rysunek 8. Synteza cyklicznych oligo(*m*-fenylo-etynylenów) z użyciem mocno usieciowanej żywicy.



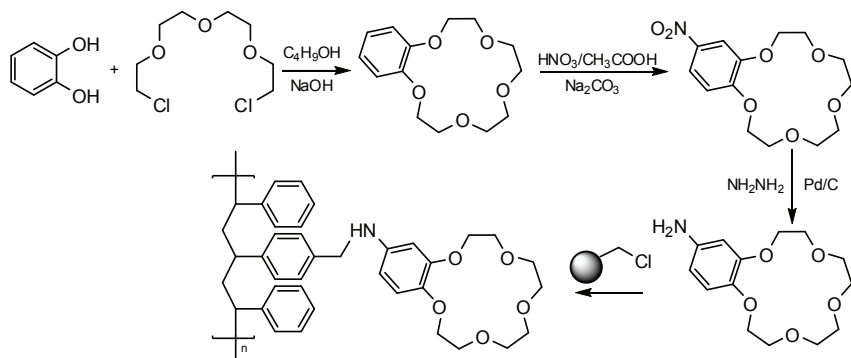
Rysunek 9. Efekt reakcji ściągania cyklicznej makromolekuły z żywicy Argopore.



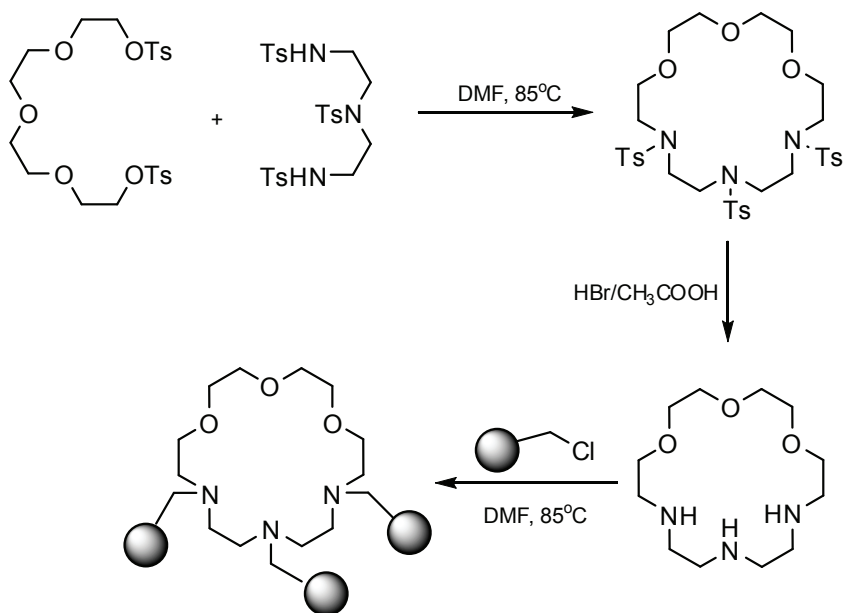
Rysunek 10. Synteza żywic modyfikowanych cząsteczką kaliksarenu.

Kim [24-25] zmodyfikował żywicę Merrifield'a eterami koronowymi, a następnie wykorzystał je do celów chromatograficznych. Używając koron 4'-aminobenz-15-crown-5 (AB15C5) (Rysunek 11.) i korony 4'-aminobenz-18-crown-6 (AB18C6), w obydwu przypadkach zauważył że cięższy izotop  $^7\text{Li}$  kotwiczy się na modyfikowanej żywicy, podczas gdy lżejszy izotop  $^6\text{Li}$  znajduje się w wycieku z kolumny. Podobna zależność zachodzi podczas gdy, żywica Merrifield'a zostanie zmodyfikowana 1,13,16-trioksa-4,7,10-triazacyklooktadekanem (Rysunek 12.) [26].

Materiały supramolekularne



Rysunek 11. Synteza żywicy modyfikowanych eterami koronowymi.



Rysunek 12. Synteza żywicy Merrifield'a z modyfikacją 1,13,16-trioksa-4,7,10-triazacyklooktadekanem.

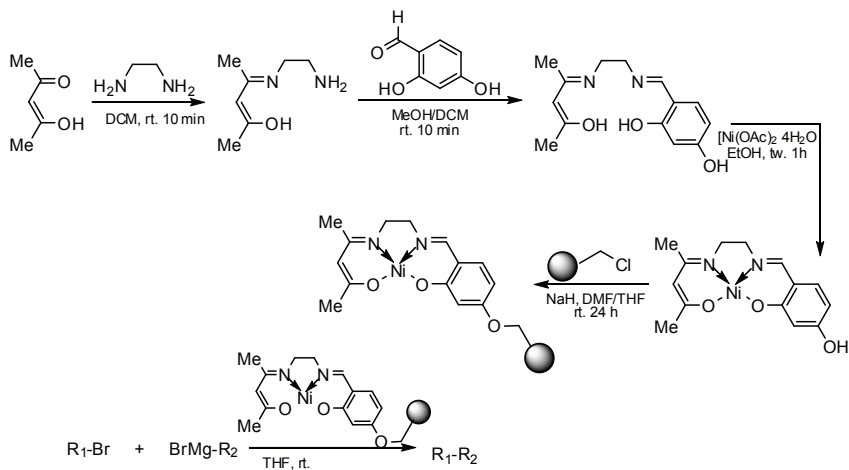
W przypadku modyfikacji żywicy eterami 2'-aminometylo-15-crown-5 oraz 2'-aminometylo-18-crown-6 zachodzi odwrotna zależność w przypadku magnezu. Cięższe wzbogacane izotopy magnezu znajdują się w wycieku z kolumny



Zastosowanie nośników stałych w projektowaniu oraz syntezie układów na potrzeby chemii...

upakowanej modyfikowaną żywicą, natomiast lżejsze wzbogacane izotopy kowalencyjnie się na powierzchni żywic [27-28].

Żywica Merrifield'a z pośród wielu praktycznych zastosowań znalazła również wykorzystanie jako nośnik w reakcji sprzężenia Tamao-Kumada-Corrid, w której zachodzi reakcja pomiędzy węglem o hybrydyzacji  $sp^2$  a węglem o hybrydyzacji  $sp^3$ . Zaletą tej reakcji jest czynnik temperaturowy, ponieważ może ona zachodzić w warunkach  $-20^{\circ}C$  do temperatury wrzenia stosowanych rozpuszczalników. Optymalna jest w temperatura pokojowa [29]. Reagentami są związek Grignard'a oraz organiczna pochodna bromkowa. Reakcja ta katalizowana jest przez jon nikiel (II), który skompleksowany jest na żywicy (Rysunek 11.). Cykl katalizatora jest odtwarzalny, a nikiel ze względu na zakotwiczenie nie przedostaje się do roztworu, co pozwala na otrzymanie produktu wolnego od zanieczyszczeń pochodzących od katalizatora reakcji, co ma z kolei znamienite znaczenie w produkcji związków biologicznie czynnych i leków.

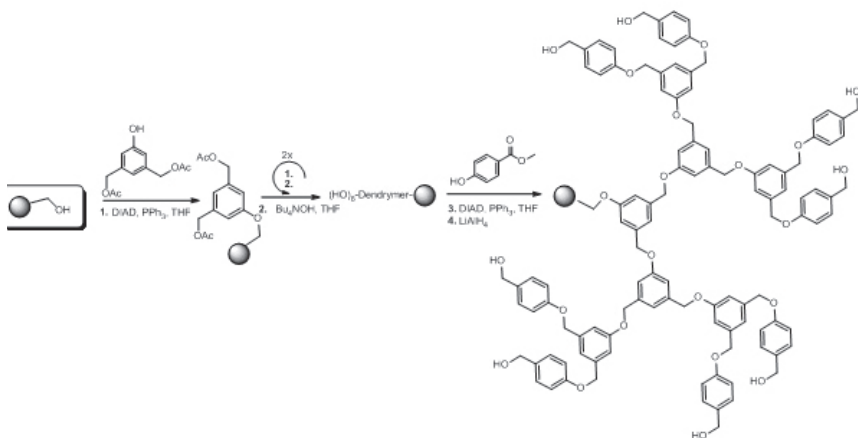


Rysunek 13. Synteza kompleksu nikiel na żywicy Merrifield'a w reakcji Tamao-Kumada-Corrid.

Pomimo że żywica Merrifield'a jest fundamentalną żywicą, z której otrzymuje się wiele innych popularnych żywic, posiada on jedną wadę, mianowicie, wyniku reakcji niecałkowitego sprzężenia, może dojść do przypadku w którym na powierzchni żywic zostaną wolne, nie przereagowane miejsca pozostawiając aktywne grypy chlormetylowe. Problem ten nie występuje w przypadku żywic hydroksymetylowych, do których substrat przyłączany jest w reakcji z elektrofilem, takim jakim jest aktywowana grupa karboksylowa, bądź poprzez

reakcje Mitsunobu [30]. Nie przereagowane miejsca na żywicy hydroksymetylowej najczęściej blokowane są w wyniku nadmiaru bezwodnika octowego obecności pirydyny.

Basso [31] wykorzystał polistyrenową hydroksymetylową żywicę do syntezy arylo-eterowych dendrymerów, wykorzystując syntezę na nośniku stałym (Rysunek 14.) Obecność grup fenolowych oraz dwóch grup acetylowych pozwoliła na syntezę dendrymerów w dwóch etapach reakcji, złożoną z kondensacji Mitsunobu, oraz hydrolizy estrów alkoholi pierwszorzędowych. Końcowym etapem syntezy była reakcja Mitsunobu z estrem metylowym kwasu 4-hydroksybenzoesowym, następnie jego redukcja  $\text{LiAlH}_4$ . W wyniku 7 reakcji Mitsunobu oraz 14 hydroliz uzyskano czysty produkt z wydajnością 86%. Jest to wygodna oraz bardzo prosta metoda syntezy dendrymerów, którą można również przeprowadzać na innych typach (żywica Wanga).

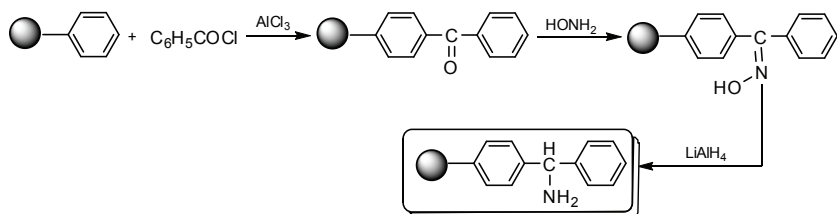


Rysunek 14. Metoda syntezy arylo-eterowych dendrymerów na żywicy hydroksymetylowej z wykorzystaniem reakcji Mitsunobu.

Oprócz żywic hydroksylowych na rynku dostępne są również żywice aminowe. Żywica aminometylowa (AM) w wyniku tworzenia stabilnego wiązania amidowego przez substrat i wolną grupą aminową zakotwiczoną na polimerze, przez długi czas była uznawana, za podstawową żywicę w syntezie peptydów. Inne żywice aminowe, wykorzystywane w syntezie peptydów w której wykorzystuje się strategię Boc to benzhydrolaminowa (BHA) [32] i 4- metylobenzhydrolaminowa (MBHA) .

Żywice te tworzą bardzo stabilne wiązanie aminowe lub amidowe, w wyniku podstawienia elektrofilowego, w reakcji z aktywowaną grupą karboksylową

lub substratem alkiilowym. Do ściągnięcia produktów z żywicy wymagane jest bardzo silne środowisko kwaśne, co zapewnione jest stosując kwas fluorowodorowy. Produkcja tego typu żywic odbywa się w wyniku elektrofilowego podstawienia pierścienia aromatycznego (Rysunek 15.). Stopień podstawienia tej reakcji może sprawić dużo problemów. Głównymi zanieczyszczeniami powstającymi w procesie produkcji są najczęściej nie przereagowane grupy karbonylowe, oraz produkty uboczne. Jednakże obecnie firmy zajmujące się wytwarzaniem żywic wyeliminowały wiele problemów na drodze produkcyjnej oferując bardzo dobre żywice w swoim asortymencie.



Rysunek 15. Metoda syntezy żywicy benzhydrylaminowej.

Bonnat [33] wraz ze współpracownikami wykorzystał aminometylowa żywicę do zakotwiczenia guanidyny, po to, aby przyłączyć do niej łańcuchy peptydowe, w celu osiągnięcia „kleszczowego” receptora na inne peptydy zawierające terminalną grupę karboksylową. Guanidynę przyłączono do żywicy aminometylowej poprzez arylosulfoamid, dzięki czemu w obecności silnego kwasu (TFA) istnieje możliwość bardzo łatwego odcięcia produktu, oraz osłon bocznych z żywicy (Rysunek 16.).

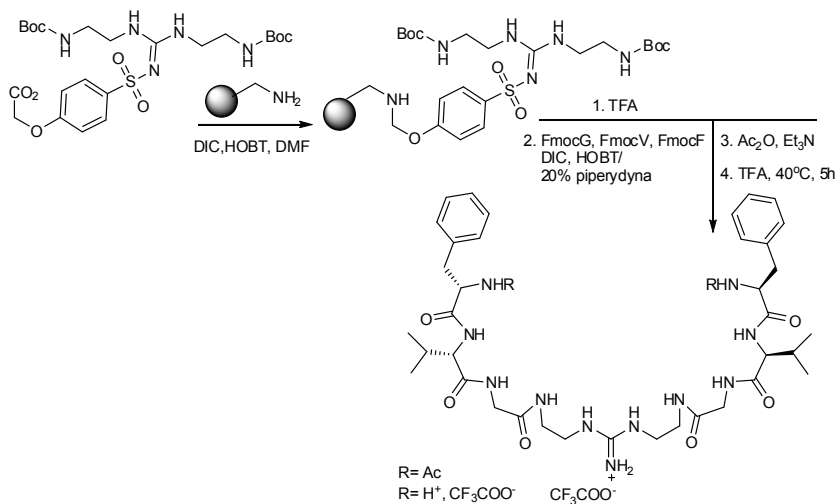
Fioki [34] użył metylowanej żywicy polistyrenowej do syntezy bibliotek fluorescencyjnie znakowanych kaliksarenów podstawionych peptydami w obrębie górnej obręczy. Głównym zamierzeniem stworzonej biblioteki pochodnych kaliksarenów było nie tylko sprawdzenie, która sekwencja peptydowa odpowiedzialna jest za wiązanie modelowego pentapeptydu (pochodnej  $Leu^5$ -enkefaliiny), ale również związki te miały spełniać funkcję chemosensorów.

Do syntezy biblioteki użyto diaminometylowy calix[4] aren, chroniony grupami *p*-metoksybenzyloksykarbonylowymi (Moz), który zakotwiczone na żywicy, a następnie po usunięciu grup ochronnych, stosując strategię syntezy Fmoc użyto 15 różnych aminokwasów, co dało kombinację  $15^3=3375$  różnych peptydokaliksarenów (Rysunek 17.). Po usunięciu grupy ochronnej Fmoc w fragmencie tripeptydowym, przyłączono kwas 2 – pirenocetowy.

Okazało się, że z całej biblioteki otrzymanych peptydokaliksarenów,  $Leu^5$ -enkefalinę znaczoną barwnikiem, kompleksją tylko 4 z 3375 całej rodziny po-

chodnych, zawierające w swojej strukturze L-Tyr w pozycji AA<sub>2</sub>, oraz D-Phe w pozycji AA<sub>3</sub>. Związki te

Związki te w następnej kolejności, poddano badaniom fluorescencyjnym. Dodanie alifatycznej pochodnej enkefaliny powodowało wzmocnienie fluorescencji i było zależne od stężenia kompleksowanego analitu. Wyniki te potwierdzają że kompleksowana Leu<sup>5</sup>-enkefalina zbliża do siebie dwa pierścienie pirenu.



Rysunek 16. Synteza z użyciem żywicy aminometylowej.

Wadą hydrofobowych żywic polistyrenowych jest ich brak pęcznienia w protycznych rozpuszczalnikach takich jak metanol, czy woda, często stosowanych w reakcjach organicznych. Ponadto hydrofobowe środowisko matrycy polimerowej odpycha związki typu jonowego, które bardzo często występują w stanach przejściowych wielu reakcji.

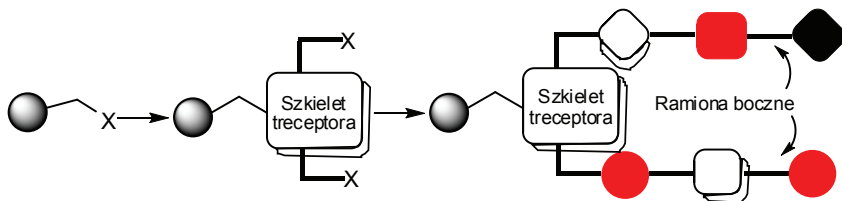
Producenci nośników stałych, aby zaradzić tym problemom wprowadzili na powierzchnię polistyrenu łańcuchy w postaci polietylenoglikoli (PEG) otrzymując nowy typ żywic nazywanej powszechnie żywicą TentaGel. W rezultacie otrzymano żywice mające właściwości zarówno hydrofobowe, jak i hydrofilowe, pęczniejące w rozpuszczalnikach protycznych jak i aprotycznych. Ze względu na tę własność żywice typu TentaGel znalazły szerokie wykorzystanie i zastosowanie w wielu syntezach na nośniku stałym. W wyniku zakotwiczenia substratów na końcach nici łańcuchów polietylenowych (PEG), są one strywnie mniej zablokowane, tym samym bardziej swobodne, co ma niewątpliwie wpływ



styrenu. Linker diolowy powoduje wzrost odporności żywicy na kwasy, oraz ma wpływ na wzrost jej osadzenia [35].

Żywice TentaGel w chemii supramolekularnej znalazły szczególne zastosowanie w syntezie dendrymerów, receptorów peptydowych, sensorów oraz kompleksów metali. Żywice te znalazły szczególne zastosowanie w syntezie kombinatorycznej. Z racji małego osadzenia, w wyniku syntezy często otrzymuje się związki o bardzo dużej czystości.

Chemia kombinatoryczna może być efektywnie wykorzystana do syntezy oraz oceny właściwości wiążących wielu receptorów. Podejście to szczególnie stosowane jest do syntezy receptorów typu „szcypce” oraz dwu i „multi-ramiennych” receptorów [36]. Receptory tego typu zazwyczaj zbudowane są ze związku pełniącego funkcję szkieletu podstawowego, który jest konformacyjnie ograniczony, do którego przyłączone są ramiona boczne, pełniące funkcję ramion wiążących. Przyłączając szkielet cząsteczki do nośnika stałego można otrzymać bibliotekę związków, w celach scharakteryzowania i wyizolowania tych o najciekawszych właściwościach (Rysunek 18.). Na drodze syntetycznej można otrzymać wiele bibliotek zawierające ramiona boczne symetrycznie podstawione, bądź podstawione nie symetrycznie.

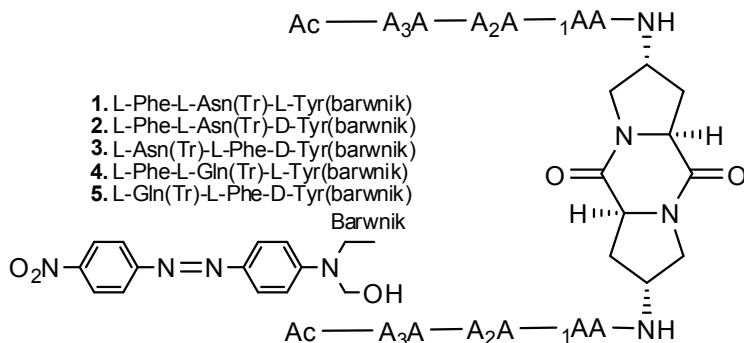


Rysunek 18. Zastosowanie chemii kombinatorycznej, do syntezy bibliotek receptorowych.

Receptory tego typu charakteryzują się dość dużą zdolnością rozpoznawania molekularnego. Dodatkową zaletą jest ich dość łatwa synteza i elastyczność konformacyjna, dzięki czemu wykorzystywane są zarówno w środowiskach wodnych jak i nie wodnych. Dobór odpowiedniego szkieletu jest bardzo istotny, ponieważ w głównej mierze od niego zależy ustawienie ramion bocznych, które odpowiadają za wiązanie i rozpoznanie molekularne. Conza [37] przedstawił syntezę „dwu-ramiennego” receptora opartego na szkielecie diketopiperazyny, zawierającego w łańcuchu bocznym kombinację trój peptydów z modyfikowaną tyrozyną zawierającą barwnik (Rysunek 19.). Zastosowanie *trans-trans* diketopiperazyny, która przybiera sztywną konformację tworząc kształt litery U, tworzy idealną odległość pomiędzy dwoma ramionami, co ma wpływ na właści-

wości wiążące całego receptora. W przypadku kiedy zastosowano diketopiperazynę w konformacji *cis-cis* receptor nie wykazywał żadnych, bądź umiarkowane właściwości wiążących substrat.

Działanie receptora piperazynowego sprawdzono na bibliotece peptydowej zawierającej trój peptydy składające się z 29 aminokwasów, co dało sumaryczną liczbę  $29^3=24\ 389$  trójpeptydów. Okazało się, że receptor diketopiperazynowy ma wszechstronne właściwości wiązania substratów peptydowych, ze specyficznością wiązania enancjomerów i diastereoizomerów. Właściwości wiążące receptora zależą nie tylko od ilości peptydów w łańcuchu bocznym, ale i również od grup ochronnych, co ma wpływ na tworzenie wiązań wodorowych.



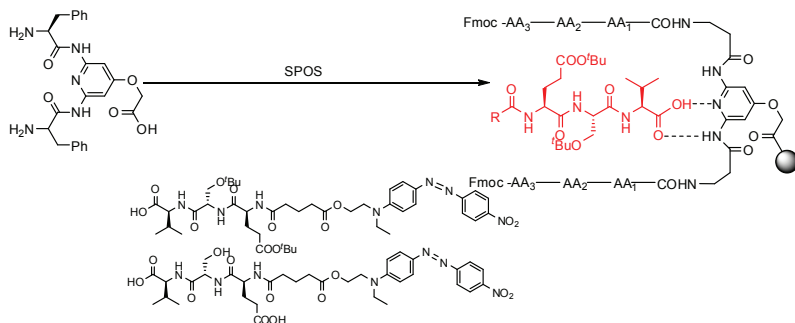
Rysunek 19. Receptor diketopiperazynowy znaczonej barwnikiem

Istnieje również możliwość syntezy receptorów, w których związek, pełniący funkcje szkieletu podstawowego bierze aktywny udział w selektywnym wiązaniu rozpoznawanej molekule. Warunki te spełnia kwas 2-(2,6-diaminopirydino-4-yloksy) octowy, który w receptorze typu „szczypce” wiąże się z grupą karboksylową. Został on wykorzystany przez Arienzo [38], który otrzymał serię bibliotek receptorów peptydowych (Rysunek 20.). Pochodną diaminopirydyny przyłączono do żywicy TentaGel, co pozwoliło na wykorzystanie chemii kombinatorycznej, w celu znalezienia najaktywniejszej sekwencji peptydowej w ramieniu bocznym.

Weryfikacji oddziaływań pomiędzy chronionym, jak i wolnym trójpeptydem, znaczonej barwnikiem dokonano na bibliotece receptorów zawierających w ramieniu bocznym trójpeptydy zbudowane z 12 aminokwasów co w sumie dało  $12^3=1728$  całkowitą liczbę bibliotek.

W wyniku oddziaływań otrzymanych bibliotek z chronionym trójpeptydem zaobserwowano zmianę zabarwienia żywicy na kolor czerwony dla pięciu bibliotek, zawierających w ramieniu bocznym receptora w pozycji jeden (AA<sub>1</sub>)

alaninę, bądź glutaminę, w pozycji dwa (AA<sub>2</sub>) leucynę lub walinę, a w pozycji trzeciej alaninę. W przypadku acylowanego barwnika, nie zawierającego peptydu, żadnych zmian tych nie obserwowano. Dla niechronionego peptydu otrzymano cztery aktywne biblioteki, zawierające w pozycji pierwszej jedynie walinę, w pozycji trzeciej prolinę, a w pozycji drugiej alaninę i metioninę.



Rysunek 20. Receptor zawierający szkielet pochodnej diaminopirydyny na peptydy znaczone barwnikiem.

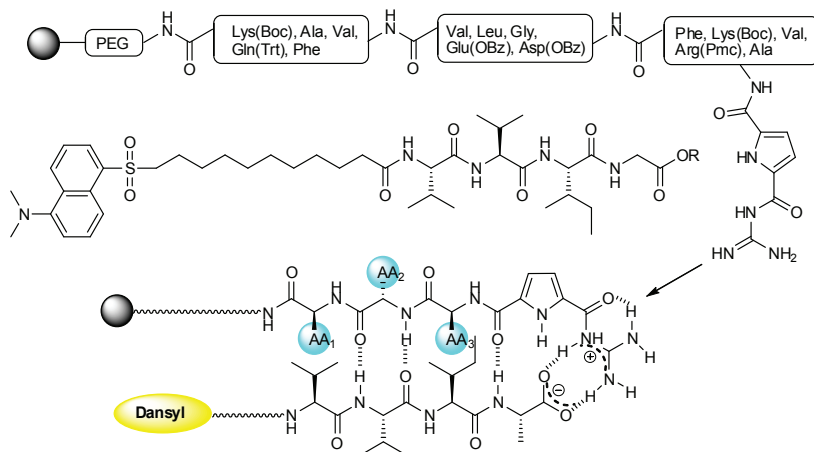
Schmuck [39] wykorzystał żywicę TentaGel do syntezy kationowych jednoramiennych receptorów peptydowych. Otrzymane trójpeptydowe receptory modyfikowane pochodną cząsteczki guanidyny i pirolu (Rysunek 21.), wykazują selektywne właściwości wiążące tetrapeptydu L-Val-L-Val-L-Ile-L-Ala, będący C-terminalną częścią peptydów  $\beta$ -amyloidowych, zarówno w środowisku polarnym, jak i niepolarnym.

Peptydy te mają wpływ na powstawanie choroby Alzheimera. Nazwa amyloid określa grupę peptydów i białek, zwykle glikozylowanych, charakteryzujących się wspólnym motywem strukturalnym, zawierającym struktury fałdowe wokół osi włókien nerwowych. Błazki amyloidowe mają szkodliwy wpływ na neurony, powodując ich uszkodzenie na drodze niewyjaśnionych do dziś mechanizmów [40]. Schmuck otrzymując bibliotekę 125 receptorów dowiódł że 12 z nich wykazuje selektywne właściwości wiążące tetrapeptydu L-Val-L-Val-L-Ile-L-Ala, znakowanego fluorescencyjnym dansylem. Właściwości wiążące otrzymanych receptorów w głównej mierze zależą od uwarunkowań sterycznych w łańcuchu peptydowym receptora, doboru hydrofilowości łańcuchów bocznych, oraz od zdolności do tworzenia wiązań wodorowych z rozpoznawaną molekułą. Największe zdolności kompleksotwórcze wykazuje receptor o sekwencji L-Phe-L-Val-L-Val.

Żywica TentaGel znalazła również szerokie zastosowanie w syntezie dendrymerów. Istnieją dwa główne sposoby syntezy dendrymerów, na drodze roz-



bieżnej, w której otrzymuje się dendrymery liniowe oraz na drodze zbieżnej, gdzie fragmenty dendrymerów są wzajemnie do siebie skondensowane. Metody te sprawiają dużo problemów preparatywnych ze względu na konieczność ciągłego powtarzania po sobie tych samych operacji, co niejednokrotnie wymaga poświęcenia bardzo dużo czasu, ze względu na konieczność oczyszczania produktów przejściowych. Z tego powodu zaadaptowano syntezę na nośniku stałym, na potrzeby preparatywne dendrymerów, co znacznie skróciło czas syntezy oraz umożliwiło syntezę nowych asymetrycznych dendrymerów, ze względu na użycie nowych związków startowych zawierających różniące się od siebie grupy ochronne.

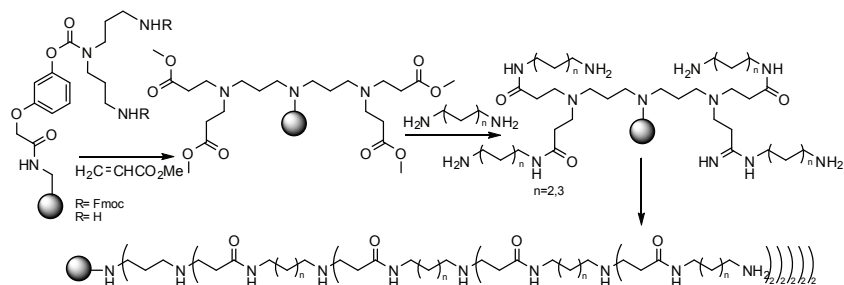


Rysunek 21. Wykorzystanie chemii kombinatorycznej do syntezy kationowych receptorów na znacznym cząsteczka danslu tetrapeptyd L-Val-L-Val-L-Ile-L-Ala.

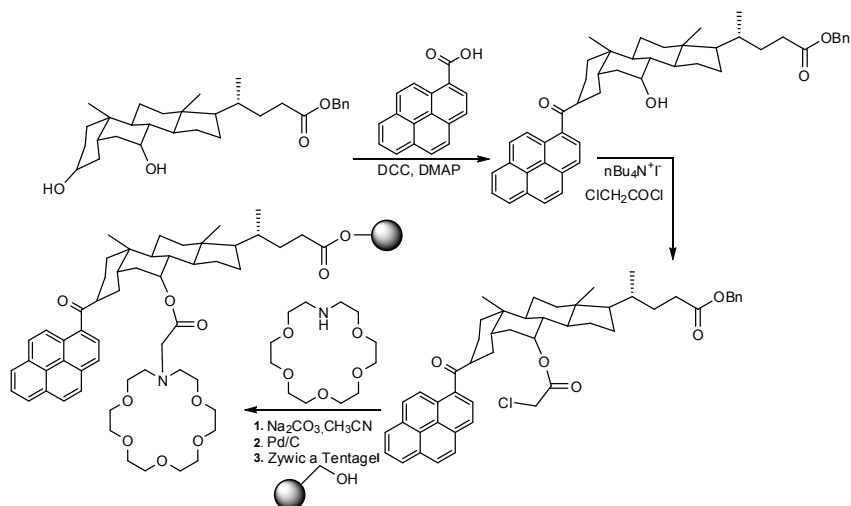
Swali [41] użył żywicy Tentagel do syntezy serii homogenicznych dendrymerów (Rysunek. 22), w wyniku której w końcowym efekcie otrzymano dendrymer cztero generacyjny, zawierający 32 wolne grup aminowe. Syntezy dendrymeru dokonano, wychodząc ze związku osadzonego na żywicy, na który podziałano kolejno nadmiarem akrylanu metylu, a następnie diaminoalkanami o różnych długościach.

Żywica TentaGel znalazła zastosowanie do budowy nowych, unieruchomionych na podłożu stałym sensorów. Nath [42] wykorzystał żywice TentaGel do syntezy fluorescencyjnego sensora, wrażliwego na jony metali, składającego się z eteru koronowego (aza-18-Crown-6), cząsteczki pirenu pełniącego funkcje sygnalizacyjne zakotwiczonego na żywicy (Rysunek. 23), co umożliwia detekcję jonów metali ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) w wodzie oraz innych rozpuszczalnikach polarnych.

Obecność tych jonów powoduje wzrost fluorescencji.



Rysunek 22. Synteza dendrymerów z użyciem żywicy TentaGel.

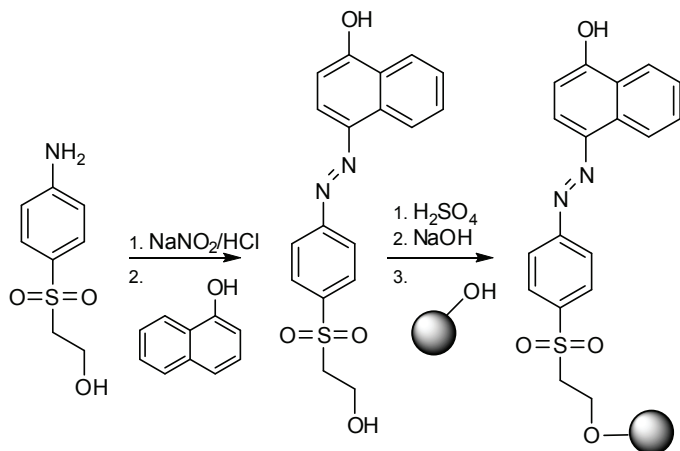


Rysunek 23. Synteza sensora na jony metali z użyciem żywicy TentaGel.

Brigo [43] wraz ze współpracownikami wykorzystała żywicę TentaGel do syntezy i budowy optycznych sensorów wrażliwych na zmiany pH, włączając na powierzchnię żywicy barwnik azowy (Rysunek 24.), będący pochodną 1-naftolu. Otrzymany sensor w zależności od wartości pH zmienia barwę z koloru żółtego przy pH 5 do koloru purpurowego przy pH 12.

Synteza na nośniku stałym znalazła również zastosowanie w syntezie kompleksów związków organicznych. Mulcahy [44] używając żywicy TentaGel przedstawił bardzo wygodną metodę syntezy kompleksu rutenu (II). Do ami-

dowej modyfikowanej żywicy TentaGel przyłączono karboksylową pochodną fenantroliny, po czym dodano kompleks rutenu i bipyridylu. Ogrzewając mieszaninę reakcyjną do 80°C otrzymano kompleks rutenu na nośniku stałym. W następnej kolejności dodano 4,4'-dimetoksy-2,2'-bipirydydyl otrzymując kompleks rutenu na drugim stopniu utlenienia (Rysunek. 25). Po zdjęciu z nośnika otrzymano czysty produkt z wysoką wydajnością, który znalazł zastosowanie jako inhibitor acetylocholinoesterazy enzymu pełniącego kluczową rolę w przewodzeniu impulsów nerwowych.



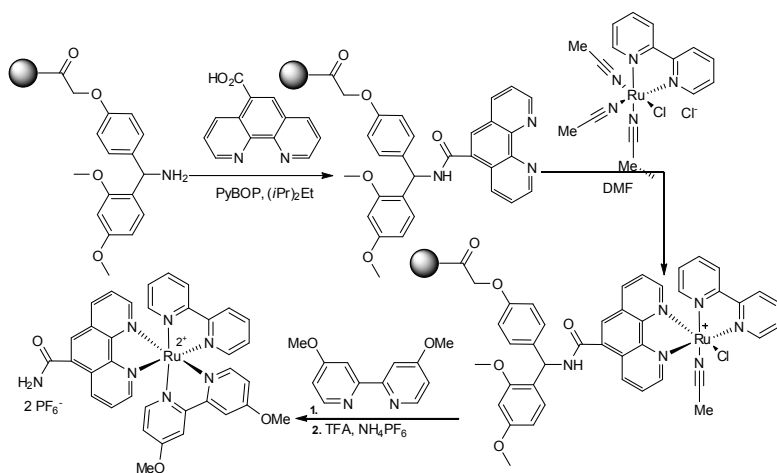
Rysunek 24. Użycie żywicy TentaGel w celu otrzymania sensora na pH.

Acetylowane żywice polistyrenowe to kolejna grupa żywic często wykorzystywana bądź to w syntezie na nośniku stałym, bądź jako zmiatacze w reakcjach chemicznych przeprowadzanych w roztworze. Są to żywice zawierające acylowe grupy funkcyjne bezpośrednio przyłączone do rdzenia polistyrenu. Najczęściej stosowanymi żywicami są żywice formylowe, które mogą być wykorzystywane do syntez innych nośników stałych, lub w syntezie związków organicznych takich jak podstawione furany [45], (Rysunek. 26). Innymi żywicami należącymi do tej grupy są żywice acetylopolistyrenowe, wykorzystywane jako zmiatacze hydrazyn, lub alkiolthioli. Żywice karboksypolistyrenowe znalazły powszechne zastosowanie w syntezie na nośniku stałym, oraz mogą być wykorzystywane jako zmiatacze zasadowych zanieczyszczeń w roztworze przeprowadzanej reakcji.

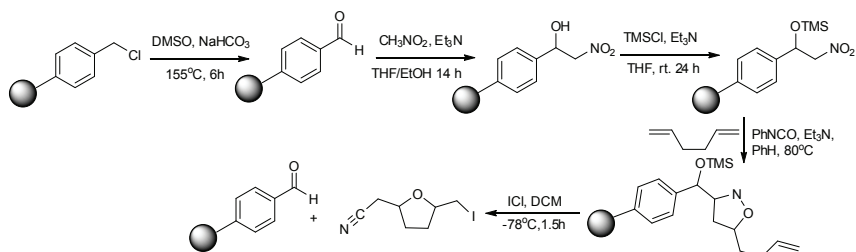
Żywica PAM (żywica 4-hydroksymetylo-fenylacetamidometylowa), ze względu na wysoką stabilność w środowisku kwaśnym, większą niż żywica Merrifield'a jest najczęściej używaną żywicą w syntezie peptydów, w strategii

Boc. Żywica PAM ma szerokie zastosowanie w syntezie peptydów, zarówno długich, jak i krótkich. Przykładem jednym z wielu może być synteza Abbenante [46], który wykorzystał żywicę PAM do syntezy cyklicznych oktapeptydów, zdolnych do kompleksowania jonów miedzi oraz potasu (Rysunek 27.).

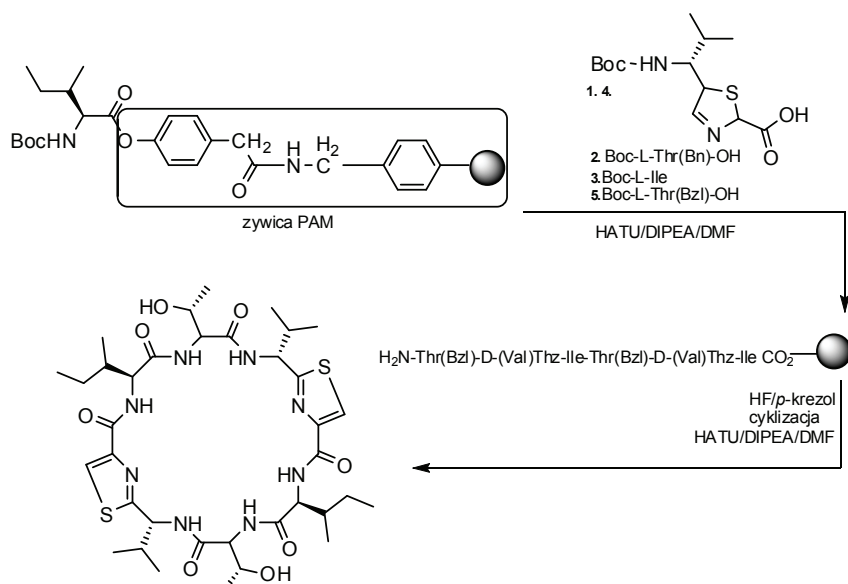
Jedną z najczęściej wykorzystywanych żywic do syntezy na nośniku stałym jest żywica Wang. Jest to żywica składająca się z linkeru w postaci alkoholu 4-hydroksybenzoesowego przyłączonego do rdzenia polistyrenowego [47]. Linker zakotwiczony jest do polistyrenu za pomocą wiązania fenylesterowego, substrat natomiast łączy się z żywicą za pośrednictwem wiązania benzyloвого, estrowego, bądź eterowego. Linker ten stabilny jest w środowiskach wielu reakcji. Produkty po syntezie zazwyczaj ściągane są w środowisku kwaśnym, zazwyczaj do tego celu wykorzystuje się kwas trifluoroctowy. Podczas syntezy na żywicy Wang mogą się tworzyć zanieczyszczenia, będące konsekwencją niedoskonałości żywicy, powstające w przypadku kiedy linker przyłączony jest do polistyrenu za pomocą grupy benzylowej, pozostawiając wolną reaktywną grupę fenolową. Przyłączenie substratu do nukleofilowej żywicy zazwyczaj zachodzi w pełni w wyniku podstawienia elektrofilowego, bądź reakcji Mitsunobu [30]. Jednakże problem powstaje w przypadku gdy substratem jest związek optycznie czynny, taki jak pochodne aminokwasów, ponieważ proces aktywacji może doprowadzić do powstania mieszaniny racemicznej. Jednakże przy zastosowaniu odpowiednich związków antyracemicznych problem ten można ograniczyć do minimum.



Rysunek 25. Synteza kompleksu Ru(II).



Rysunek 26. Synteza żywicy formylowej.

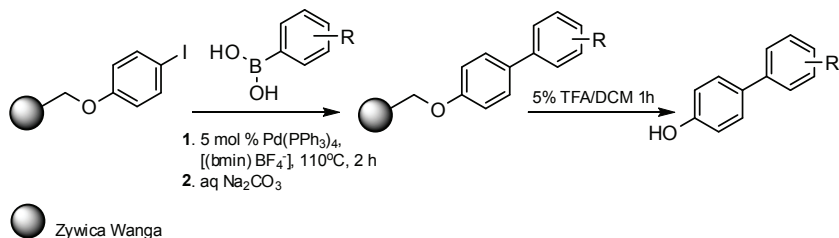


Rysunek 27. Synteza cyklicznych peptydów.

Żywice Wanga dostępne są również w formie elektrofilowej. Przykładem może być żywica bromkowa benzyloksybenzylu. Żywica ta jest bardzo użyteczną żywicą, w przypadku substratów optycznie czynnych, ponieważ zazwyczaj substraty przyłączane są w procesie w którym zjawisko racemizacji nie występuje.

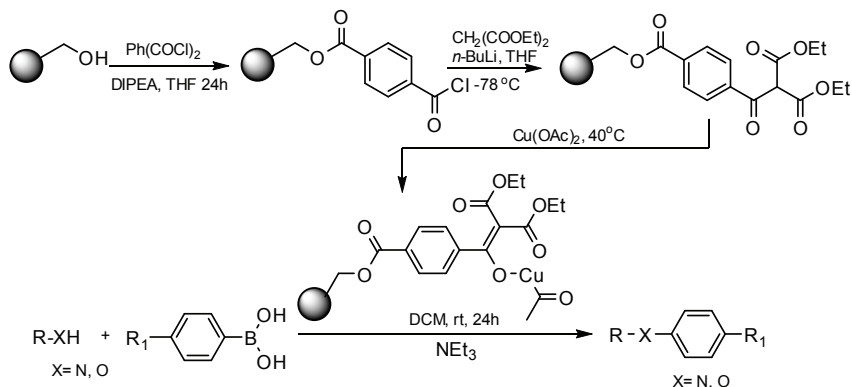
Żywica Wangi głównie wykorzystywana jest w chemii peptydów, jednakże z powodzeniem znalazła zastosowanie w chemii organicznej, jako nośnik wielu reakcji. Revell wykorzystał żywicę Wangi przeprowadzając na nośniku stałym

reakcję sprzęgania Suzuki-Miyaura [48]. W reakcji z pochodnymi kwasów aryloboronowych, wykorzystał 4-jodofenol zakotwiczony na nośniku stałym, oraz ciecz jonową etrafluoroboranu 1-butylo-3-metyloimidazolu, spełniającą rolę katalizatora reakcji (Rysunek. 28), otrzymując odpowiednie pochodne 4-hydroksy bifenylu.



Rysunek 28. Reakcja Suzuki-Miyaura z użyciem nośnika stałego.

Chiang [49] zmodyfikował żywicę Wang pochodną miedzi (II) w celu otrzymania na jej powierzchni efektywnego katalizatora, który wykorzystał w reakcji sprzęgania pomiędzy kwasami boronowymi, a fenolami, bądź N- postawionymi substratami (Rysunek. 29).



Rysunek 29. Reakcja kwasów boronowych z fenolami i aminami katalizowana katalizatorem miedziowym.

Mechanizm reakcji prawdopodobnie polega na tym że do miedzi (II) zakotwiczonej na żywicy Wang koordynuje cząsteczka fenolu, bądź aminy, po czym

następuje proces utlenienia poprzez tlen, co prowadzi do powstania miedzi na trzecim stopniu utlenienia. W wyniku transmetylacji kwasem boronowym powstaje produkt przejściowy, który ulega redukcyjnej eliminacji dając zamierzony produkt reakcji a na żywicy pozostaje miedź na pierwszym stopniu utlenienia. Zaletą katalizatora miedziowego osadzonego na żywicy jest jego zdolność do całkowitej regeneracji, bez straty na jego efektywności.

Rivero [50] wraz ze współpracownikami wykorzystał żywice Wanga do syntezy układów supramolekularnych opartych na budowie szkieletu „lumino-for-spacer-receptor”. Według tego założenia, podczas gdy receptor oddziaływanie selektywnie, bądź specyficznie z rozpoznawaną molekułą, zachodzi oddziaływanie pomiędzy cząsteczką ulegającą wzbudzeniu (luminescencyjną) w taki sposób, że cząsteczka ta jest wzbudzana i emituje promieniowanie, bądź może ulegać wygaszaniu czyli dezaktywacji bezpromienistej.

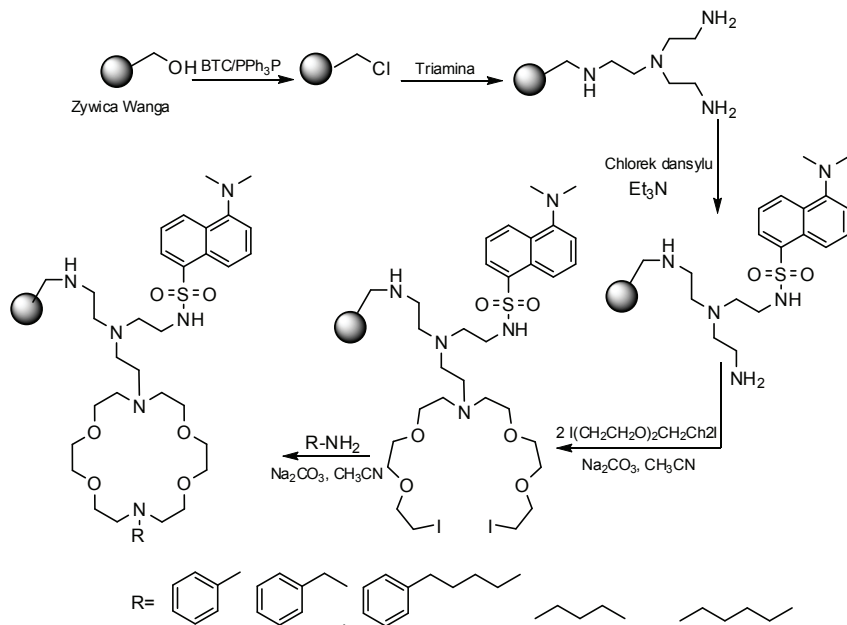
Do syntezy fluorescencyjnych chemosensorów jonów metali alkalicznych i ziem alkalicznych opartych na makrocyclicznym eterze koronowym wykorzystano 1,4,10,13-tetraoksa-7,15-diaza-cykloktadecanie pełniącym funkcję receptora oraz cząsteczkę dansylu pełniącego funkcję sygnalizacyjną (Rysunek. 30). Badania fluorescencyjne wykazały, że dla jonu magnezu, otrzymane sensory wykazują najwyższą czułość i wrażliwość.

Zakotwiczenie fluorescencyjnego chemosensora na nośniku stałym ma kilka zalet w analityce, przede wszystkim przyczynia się do nieprzerywalności odczytów oraz wzmacnia czułość. Metoda ta pozwala na niższe zużycie reagentów, oraz możliwość użycia sensorów w rozpuszczalnikach w których identyfikowane molekuly mogą wykazywać słabą rozpuszczalność.

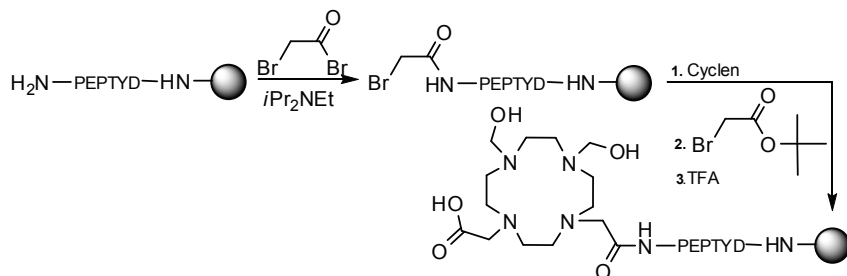
Rodríguez [51] wykorzystując żywicę Wanga, przedstawił bardzo wygodną metodę włączania kwasu 1,4,7,10-tetra-octowego 1,4,7,10-tetraazacyklododekanu w struktury peptydowe (Rysunek 31.). Pochodne peptydowe tego typu, w zależności od kompleksowanego jonu metalu, mają trzy główne zastosowania. Dla kompleksów  $Gd^{3+}$ ,  $Eu^{3+}$  znajdują wykorzystanie w Magnetycznym Rezonansie Obrazowym (MRI) jako związki kontrastowe, kompleksy peptydowe  $In^{111}$ ,  $Ga^{68}$   $Cu^{64/67}$  w Pozycyjnej Tomografii Emisyjnej (PET) oraz jako związki terapeutyczne stosowane w radioterapii  $Y^{90}$ ,  $Lu^{177}$ .

Żywice polistyrenowe bardzo często wykorzystywane są jako nośniki stałe w syntezie dendrymerów. Najczęściej używaną żywicą w syntezie dendrymerów jest żywica PAMAM – żywica poli(amidoaminowa) [52], jednakże żywica Wanga, również znalazła szerokie zastosowanie, szczególnie w syntezie dendrymerów opartych na pochodnych aminokwasów i peptydów. Sanclimens [53] przedstawiła metodologię syntezy kulistych dendrymerów, opartych na kombinacji proliny, glicyny oraz imidazolu, stanowiącego ramiona pojedynczej jednostki dendrymeru. Metodologia ta pozwala na uzyskanie dendrymerów do czwartej

generacji (Rysunek. 32).

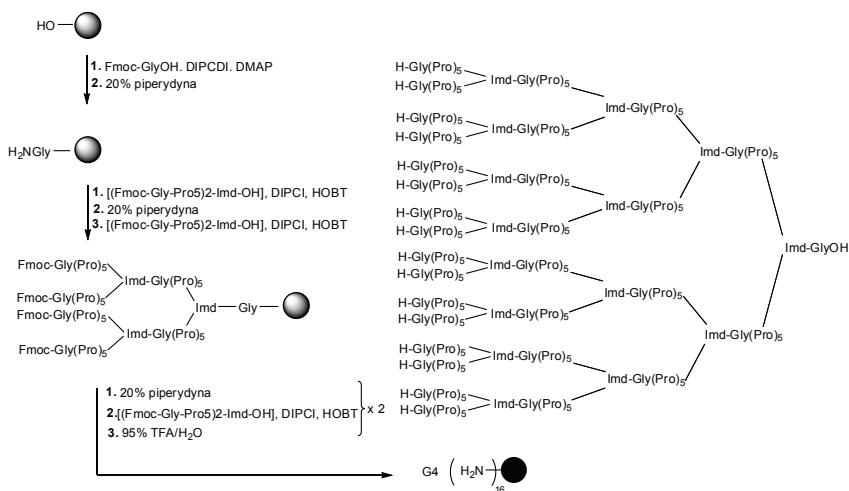


Rysunek 30. Synteza Chemosensorów opartych na żywicy Wang.



Rysunek 31. Metoda syntezy peptydów modyfikowanych kompleksonami.





Rysunek 32. Metoda syntezy dendrymerów peptydowych.

W syntezie na nośniku stałym (SPOS), w przypadku, gdy zamierzony produkt ma być amidem stosuje się żywice amidowe, są to żywice typu Rink, Knorr i PAL. Pierwotnym przeznaczeniem żywic tego typu była synteza amidowych peptydów w strategii Fmoc. Żywice te charakteryzują się bardzo słabą odpornością w środowisku kwaśnym, dzięki czemu syntezowane produkty ściągane mogą być w łagodnych warunkach kwasowych, najczęściej za pomocą 1% kwasu trifluorooctowego. Substraty kwasowe mogą być przyłączane do żywicy w wyniku zastosowania standardowej procedury tworzenia wiązania amidowego taką jaką metoda DIC/HOBT, HBTU lub BOP.

Tak jak w przypadku żywicy Wang, w żywicy typu Rink linker związany jest z rdzeniem polistyrenowym poprzez wiązanie eterowe, natomiast w przypadku żywicy Knorr linker przyłączony jest za pomocą wiązania amidowego. Żywice Rink, oraz Knorr są żywicami najczęściej stosowanymi w syntezie na nośniku stałym, posiadające porównywalne właściwości, natomiast żywica PAL jest żywicą bardzo labilną w środowisku kwaśnym. Żywica ta często wykorzystywana jest w przypadku syntezy długich peptydów, w której otrzymuje się bardzo czyste produkty. Żywice tego typu najczęściej w chemii supramolekularnej znajdują zastosowanie do syntezy peptydów, cyklicznych peptydów [54] glikopeptydów, receptorów na inne peptydy [55].

Żywica chlorotrytylowa to żywica szeroko wykorzystywana w chemii peptydów oraz w syntezie na nośniku stałym. Żywice te charakteryzują się niezwykłą labilnością w środowisku kwaśnym. Produkty po syntezie mogą być ściągane za pomocą kwasu octowego. Właściwość ta jest bardzo istotna i pomocna,

w przypadku syntezy cyklicznych peptydów, kiedy istnieje konieczność ściągnięcia produktów syntezy z osłonami bocznymi. Kenichi wykorzystał żywicę 2-chlorotrytylową do syntezy cyklicznego tetrapeptydu metodą głowa-ogon, na żywicy z wykorzystaniem reakcji Heck'a. Liniowy prekursor peptydowy zsyntezowano na żywicy, do której przyłączono najpierw grupą  $\beta$ -karboksylową pochodną kwasu asparaginowego, następnie w kolejności cząsteczkę glicyny, argininy, ponownie glicyny i kwas akrylowy, a następnie dokonano reakcji sprzęgania pomiędzy kwasem akrylowym a 3-jodobenzylaminą. Otrzymując z wysoką wydajnością cykliczny tetrapeptyd, z którego w następnym kroku zdjęto osłonę –Mtr (4-metoksy-2,3,6- trimetylobenzosulfonylową ) z grupy guanidynowej argininy (Rysunek 33.)

Dodatkowym atutem żywicy chlorotrytylowej jest możliwość kotwiczenia do niej kwasów, alkoholi, amin oraz tioli. Mourtas [57] wykorzystał całą rodzinę żywic opartych na linkerze tritylowym do syntezy merkaptocyloamino alkoholi, związków będących inhibitorami metallopeptydaz. Do żywicy 2-chlorotrytylowej (Clt)-, tritylowej (Trt)-, 4-metylotrytylowej (Mtt)-, 4-metoksytritylowej (Mmt)- oraz 4,4'-dimetoksytritylowej (Dmt)- przyłączono kwasy merkaptanowe grupą tiolową. Do tak przygotowanych żywic dołączono amino alkohole, a następnie ściągnięto z żywicy gotowy produkt (Rysunek 34.).

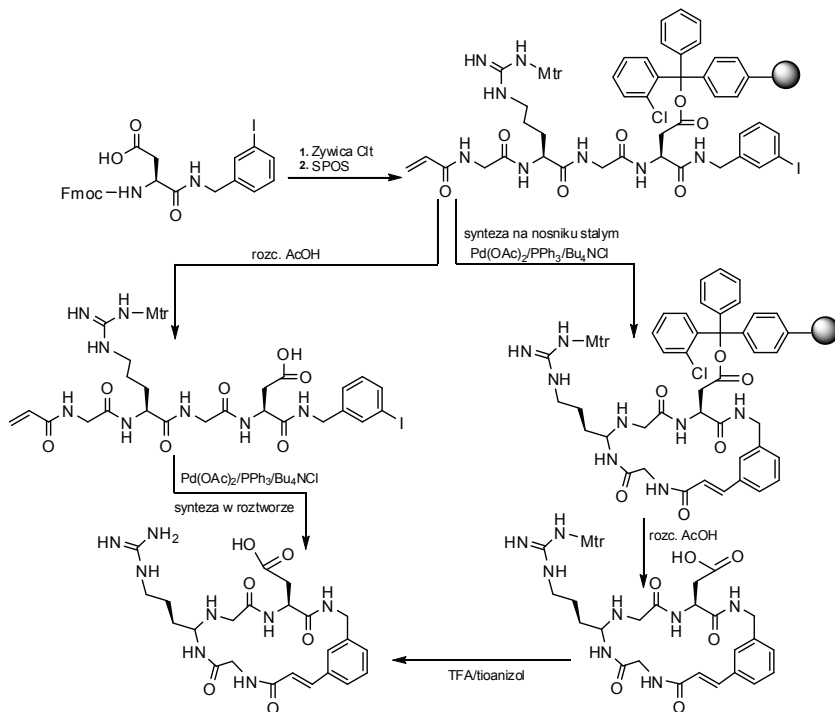
Podstawiona żywica chlorotrytylowa aminą może być wykorzystana do dalszej syntezy amidów [58]. Meller stosując żywicę 2-chlorotrytylową otrzymała w bardzo prosty sposób pochodną proliny, związek ze względu na grupę funkcyjną zaliczany do kwasów hydroksamowych (Rysunek. 35).

Żywice tego typu dostępne są w różnych formach, różniących się odpornością na środowisko. Żywice 4- metylotrytylowa i 4 metoksytritylowa są bardziej labilne niż żywica tritylowa. Natomiast żywca 2-chlorotrytylowa charakteryzuje się większą stabilnością, niż żywica tritylowa. Żywica tritylowa oraz 2-chlorotrytylowa dostępne są zarówno w formie alkoholowej, bądź w formie chlorkowej. Forma chlorkowa jest bardzo wrażliwa na wilgoć, dlatego należy żywicę tę przechowywać w inertnych warunkach, inaczej może dojść do jej dezaktywacji. Jednak istnieje sposób na przywrócenie aktywności żywicy poprzez podziałoanie na nią, bezpośrednio przed użyciem, chlorkiem tionylu.

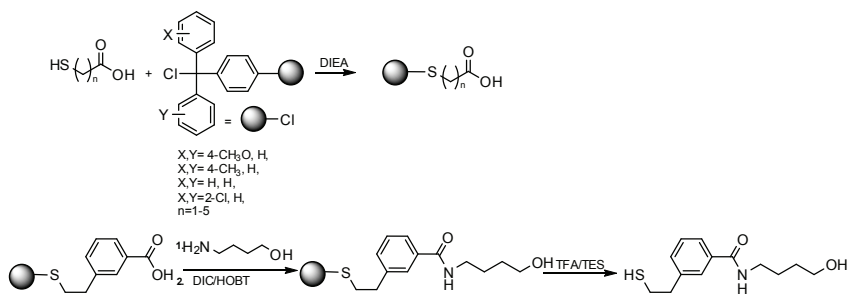
Bardzo często w syntezie na nośniku stałym (SPOS), a także chemii peptydów stosuje się żywice labilne w środowisku zasadowym. Do żywic tego typu należą żywica zawierająca linker oksymowy (MBHA) oraz żywica zawierająca linker składający się z kwasu hydroksymetylo benzoowego (HMBA-MBHA). Rodzaj ściąganych produktów uwarunkowany jest zastosowanym czynnikiem nukleofilowym w obecności którego zachodzi reakcja. W przypadku użycia amin pierwszorzędowych, otrzymuje się odpowiednie (amidy) [59] (Rysunek. 36), hydrazyny (hydrazydy) [60], metanolu/trietyloaminy (estry metylowe) [61].

Zastosowanie nośników stałych w projektowaniu oraz syntezie układów na potrzeby chemii...

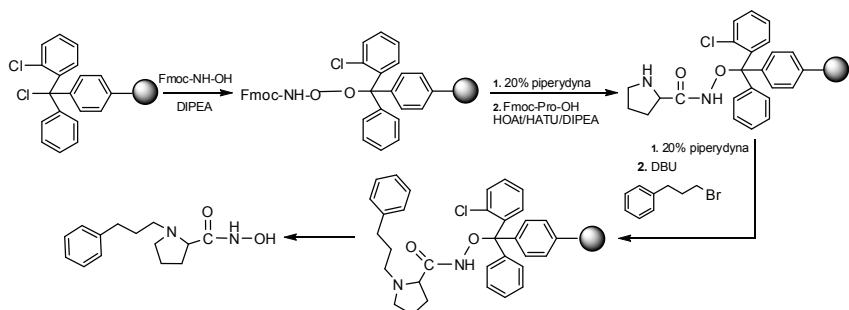
Żywice HMBA oraz HMBA-MBHA znalazły, szczególne wykorzystanie w chemii peptydów, do syntezy związków cyklicznych.



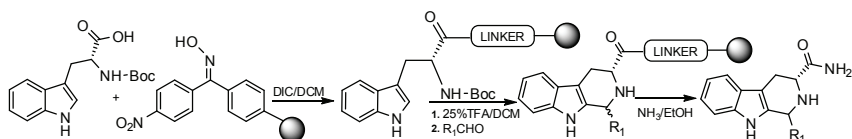
Rysunek 33. Synteza cyklicznych tetrapeptydów z użyciem żywicy chlorotrytylowej z wykorzystaniem reakcji Heck'a.



Rysunek 34. Synteza merkaptocyloamino alkoholi za pomocą żywicy troytylowych.



Rysunek 35. Synteza kwasów hydroksamowych w oparciu o żywicy 2-chlorotrytylową.



Rysunek 36. Synteza pochodnych  $\beta$ -karboliny z użyciem żywicy oksymowej-Reakcja Picket-Spengler'a [59].

## 5. Podsumowanie

Synteza na nośniku stałym (SPOS) jest bardzo użyteczną i wygodną metodą syntetyczną, którą obecnie wykorzystuje się nie tylko w chemii peptydów, dla której została pierwotnie stworzona, ale wyszła po za obręb laboratoriów peptydowych i stała się nieodzowną metodą zaadaptowaną na potrzeby wszystkich laboratoriów organicznych. Dla Chemii Supramolekularnej, dziedziny nauki przeżywającej w ostatnim dwudziestolecu wielki rozkwit naukowy, metoda syntezy na nośniku stałym stała się bardzo wdzięczną i często wykorzystywaną metodą w syntezie układów supramolekularnych.

W wyniku dużego zapotrzebowania na żywice do syntezy na nośniku stałym rozwinął się przemysł oraz rynek zajmujący się produkcją i dystrybucją żywic. Należy jednak pamiętać i liczyć się z tym, aby każdą syntezę dokładnie zaplanować, wybrać odpowiednią strategię i dopiero wtedy dokonać doboru właściwej żywicy.

## Podziękowania:

Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2006-2008 jako projekt badawczy rozwojowy nr R0501601.

## Literatura:

1. Letsinger R. L.; Kornet, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* 1963. 85. 3045–3046;
2. Merrifield R. B. *J. Am. Chem. Soc.* 1963. 85. 2149–2154;
3. *Comprehensive Medicinal Chemistry II*. Elsevier. 2006. Vol. 3, 791–836;
4. Tripp J. A.; Stein J. A.; Svec F.; Frechet J. M. *J. Org. Lett.* 2000. 2. 195–198;
5. Porcheddu A.; Giacomelli G.; Chighine, A.; Masala S. *Org. Lett.* 2004. 6. 4925–4927;
6. *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*. JohnWiley&Sons. Inc. 2003. Vol. 2. 2-32;
7. Regen S. L. *J. Am. Chem. Soc.* 1974. 96:1003-1006;
8. Chen S.; Janda, K. D. *Tetrahedron Lett.* 1998. 39. 3943-3946;
9. *Materials Today for Tomorrow's Discoveries*. Advanced Chemtech. Technical Notes, 2006;
10. Labadie J. W.; *Current Opinion in Chemical Biology* 1998. 2. 346-352;
11. Woolard F. X.; Paetsch J.; Ellman J. A. *J. Org. Chem.* 1997. 62. 6102-6103;
12. Farrall M. J.; Fréchet, J. M. J. *J. Org. Chem.* 1976. 41. 3877-388;
13. Shi B.; Scobie M.; Ross S.; Boyle W. *Tetrahedron Lett.* 2003. 44. 5083–5086;
14. S. Chamoin S.; Houldsworth C. G.; Kruse W.; Bakker I.; Snieckus V. *Tetrahedron Lett.* 1998. 39. 4179-4182;
15. Pulley S. R.; Hegedus L. S. *J. Am. Chem. Soc.* 1993. 115. 9037-9047;
16. Park K.-H.; Abbate E.; Najdi S.; Olmstead M. M.; Kurth M. J. *Chem. Commun.* 1998. 1679-1680;
17. Sylvain C.; Wagner A.; Mioskowski C. *Tetrahedron Lett.* 1998. 39. 9679-9680;
18. Dressman B.A.; Singh, U.; Kaldor S.W. *Tetrahedron Lett.* 1998. 39. 3631-3634;
19. Bräse S.; Köbberling J.; Enders D.; Lazny R.; Wang M.; Brandtner, S. *Tetrahedron Lett.* 1999. 40. 2105-2108;
20. Coppola G. M. *Tetrahedron Lett.* 1998. 39. 8233-8236;
21. Shortell D. B; Palmer L. C.; Tour J.M. *Tetrahedron.* 2001. 57. 9055-9065;
22. Jain K. V.; Pandya R. A.; Pillai S. G.; Agrawal Y. K.; Shrivastav P. S. *Microchim. Acta.* 2004.147, 253–264;
23. Garg B. S.; Jain V. K. *Microchemical Journal.* 1988. 38. 144–169;

24. Kim D. W.; Kim H. J.; Jeon J. S.; Choi K. Y.; Jeon Y. S. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. 2000. 3. 571-57;
25. Kim D. W.; Kang B. M.; Jeon B. K. ; Jeon Y. S.; *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*.2003. 256. 81–85;
26. Kim D. W.; Kim C. S.; LeeN-S.; Ryu H.; Kim J. S.; Jang Y. H. *Naturforsch.* 2002. 57b. 107-112;
27. Kim D. W.; Kang B. M. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. 2001. 2. 291–294;
28. Kim D. W.; Kang B. M. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. 2001. 3. 577–580;
29. Styring P.; Grindon C.; Fisher C. M. *Catalysis Letters*. 2001. 77.219-225;
30. Mitsunobu O. *Synthesis*. 1981. 1-28;
31. Basso A.; Evans B.; Pegg N.; Bradley M. *Chem. Commun.* 2001, 697–698;
32. Pietta P. G.; Cavallo P. F.; Takahashi K.; Marshall G. R. *J. Org. Chem.* 1974, 39, 44-48;
33. Bonnat M.; Bradley M.; Kilburn J. D.; *Tetrahedron Lett.* 1996. 37. 5409-5412;
34. Fioki H.; Ohnishi Y.; Kubo M.; Nashimoto E.; Kinoshita Y.; Samejima M.; Kodama M. *Tetrahedron Letters*. 2004. 45. 561–564;
35. Swayze E. E. *Tetrahedron Letters*. 1997. 38. 8465-8468;
36. Srinivasan N.; Kilburn J. D.; *Current Opinion in Chemical Biology*. 2004. 8. 305–310;
37. Conza M.; Wennemers H. *J. Org. Chem.* 2002, 67. 2696-2698;
38. Arienzo R.; Kilburn J. D.; *Tetrahedron*. 2002. 58. 711-719;
39. Schmuck C.; Heil.; *Org. Biomom. Chem.* 2003. 1. 633-636;
40. Eva Žerovnik. *Eur. J. Biochem.* 2002. 269, 3362–3371;
41. Swali V.; Wells N. J.; Langley G. J.; Bradley M. *J. Org. Chem.* 1997. 62. 4902-4903;
42. Nath S.; Maitra U. *Org. Lett.* 2006.8.3239-3242;
43. Brigo L.; Carofiglio T.; Fregonese C.; Meneguzzi F.;Mistura G.; Natali N.; Tonellato U. *Sensors and Actuators B*. 2008.130. 477–482;
44. Mulcahy S. P.; Li S.; Korn R.; Xie X.; Meggers E. *Inorg. Chem.* 2008;
45. Beebe X.; Schore N. E.; Kurth M. J. *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114, 10061-10062;
46. Abbenante G.; Fairlie D. P.; Gahan L. R.; Hanson G. R.; Pierens G. K.; Brenk A. L.; *J. Am. Chem. Soc.* 1996. 118. 10384-10388;
47. Wang S. S.; *J. Am. Chem. Soc.* 1973. 95. 1328-1333;
48. Revell J. D.; Ganesan A. *Organic Letters*. 2002. 4 3071-3073;

49. Chiang G. C. H.; Olsson T. *Organic Letters*. 2004. 4 3079-3082;
50. Rivero I. A.; Gonzalez T.; Pina-Luis G.; Diaz-Garcia M. E. *J. Comb. Chem.* 2005. 7.46-53;
51. Rodríguez L. M. De L.; Kovacs Z. *Bioconjugate Chem.* 2008. 19. 391–402;
52. Basso A.; Evans B.; Pegg N.; Bradley M. *Chem. Commun.* 2001. 697;
53. Sanclimens G.; Crespo L.; Giralt E.; Albericio T.; Royo M.; *J. Org. Chem.* 2005. 70. 6274-6281;
54. Rana S.; Dubuc J.; Bradley M.; White P. *Tetrahedron Letters*. 2000. 41. 5135-5139;
55. Rzepecki P.; Geib N.; Peifer M.; Biesemeier F.; Schrader T. *J. Org. Chem.* 2007. 72. 3614-3624;
56. Akaji K.; Teruya K.; Akaji M.; Aimoto S. *Tetrahedron*. 2001. 57. 2293-2303;
57. Mourtas S.; Gatos D.; Karavoltos M.; Katakalous C.; Barlos K. *Tetrahedron Letters*. 2002. 43. 3419–3421;
58. Mellor S. L.; McGuire C.; Chan W. C. *Tetrahedron Lett.* 1997. 38. 3311-3314;
59. Mohan R.; Choi Y-L.; Morrissey. *Tetrahedron Letters*. 1996. 37. 3963-3966;
60. DeGrado W. F.; Kaiser E. T. *J. Org. Chem.* 1980. 45. 1295-1300;
61. Pichette A.; Voyer N.; Parouche R.; Meillon J-C. *Tetrahedron Letters*. 1997. 38. 1279-1282.





## Rozdział II

### Otrzymywanie i zastosowania modyfikowanej krzemionki

Joanna Kurczewska, Grzegorz Schroeder

*Uniwersytet im. A. Mickiewicza, Wydział Chemii, Grunwaldzka 6,  
60-780 Poznań*

#### 1. Wprowadzenie

Naturalne i syntetyczne stałe matryce znajdują obecnie szereg zastosowań. Wykorzystuje się je między innymi, jako fazy w chromatografii, do ekstrakcji kationów z wodnych i niewodnych roztworów, w reakcjach katalitycznych lub wymiany jonowej, elektronice, ceramice czy bioinżynierii. Przykładowo żywice polimerowe stanowią matryce do zateżniania ekstrakcyjnego jonów metali z roztworów wodnych i ścieków. Niemniej jednak tego typu nośniki charakteryzuje wrażliwość na czynniki zewnętrzne, podatność na pęcznienie, a także spadek odporności mechanicznej przy złożonych procesach. Z kolei duże wykorzystanie podłoży nieorganicznych wynika z ich licznych zalet, wśród których warto wymienić dobrą selektywność, brak skłonności do pęcznienia, szybką sorpcję jonów metali czy odporność mechaniczną [1, 2], co skutkuje wypieraniem stałych matryc polimerowych.

Bezpośrednie przyłączanie chelatujących grup do nieorganicznego podłoża stanowi problem ze względu na znikomą aktywność powierzchni w stanie podstwowym. Można temu jednak zaradzić poprzez aktywację podłoża na drodze modyfikacji [3, 4]. Unieruchomienie grup funkcyjnych na powierzchni podłoża daje możliwość sterowania właściwościami międzyfazowymi stałych substratów z zachowaniem podstawowej geometrii i odporności mechanicznej. Dokonuje się tego w dwojaki sposób, tj. na drodze adsorpcji fizycznej lub chemicznego przyłączania grup funkcyjnych. Warto zaznaczyć, że właściwości chemiczne i analityczne czynnika chelatującego osadzonego na stałym podłożu różnią się od tego znajdującego się w roztworze, co więcej jego aktywność wzrasta po unieruchomieniu na matrycy w stosunku do fazy homogenicznej [5].

Lista czynników modyfikujących powierzchnie jest niezliczona, począwszy

od organicznych reagentów, polimerów, soli metali, poprzez związki naturalne, mikroorganizmy, a skończywszy na stałych matrycach typu żywic, celulozy, włókien, węgla aktywnego, piasku lub tlenków metali. Istotą procesu unieruchomienia grup funkcyjnych lub związków jest reakcja substytucji między czynnikiem modyfikującym a modyfikowaną powierzchnią. Zatem aktywny adsorbent powinien odznaczać się wysoką pojemnością sorpcyjną, stabilnością chemiczną i dużą selektywnością [6, 7].

Spośród licznych czynników adsorbujących, dużą uwagę poświęca się żelowi krzemionkowemu. Proces osadzania pożądanych grup funkcyjnych zachodzi poprzez bezpośrednie przyłączenie reagenta do podłoża lub na drodze szeregu reakcji, w wyniku których wspomniane grupy funkcyjne przyłącza się do łańcucha stanowiącego pomost między nimi a podłożem [8]. Pierwszym etapem wydłużania łańcucha jest często proces silanizacji, prowadzący do powstania prekursora reagującego z właściwym reagentem zapewniającym określone z góry zaplanowane zastosowanie końcowego produktu. Powierzchnia krzemionki reaguje z silanem tworzącym z nią wiązania kowalencyjne [9]. Wprowadzenie grup funkcyjnych na powierzchnię krzemionki prowadzi do częściowej przemiany silanoli, nadając powierzchni inne właściwości niż wyjściowej matrycy [10, 11].

Bezpośrednie przyłączenie grupy chelatującej do powierzchni krzemionki skutkuje napięciami sterycznymi i tym samym zmniejsza znacząco dostęp cząsteczek. Z kolei zastosowanie serii reakcji prowadzących ostatecznie do przyłączenia pożądanej grupy poprzez zastosowanie czynnika łączącego wpływa na wzrost właściwości adsorbujących.

Powszechne stosowanie żelu krzemionkowego wynika z szeregu zalet, którymi wyróżnia się w stosunku do innych organicznych i nieorganicznych podłoży:

- unieruchomienie na krzemionce skutkuje otrzymaniem różnorodnych czynników sililujących pomocnych przy wprowadzaniu grup funkcyjnych do struktury nieorganicznej [12];
- przyłączanie do powierzchni krzemionki zachodzi łatwiej w porównaniu do polimerowych nośników organicznych, zawierających większą ilość usieciowanych wiązań i wymagających kilku godzin dla osiągnięcia równowagi [13];
- popularność żelu krzemionkowego to częściowo efekt wprowadzenia go na rynek jako pierwszego dostępnego produktu o wysoce specyficznej powierzchni i stałym składzie, umożliwiającego łatwą analizę i interpretację wyników [14];
- żel krzemionkowy nie ulega pęcznieniu [15];
- żel krzemionkowy wykazuje dużą odporność na rozpuszczalniki orga-

niczne [16];

- krzemionkę cechuje bardzo wysoka odporność termiczna [17].

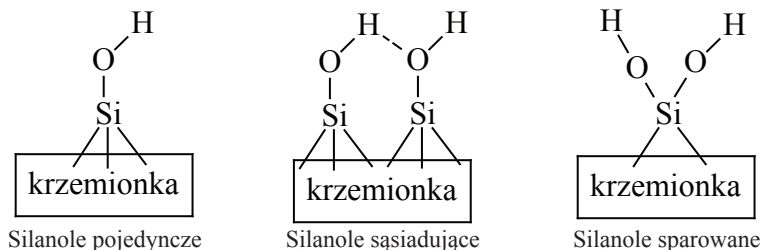
Z kolei zasadniczą wadą tego typu podłoża jest nieodwracalne wiązanie jonów metali i zanik selektywności przy zastosowaniu ciągłego cyklicznego użycia i procesu wymywania [18].

Modyfikowana krzemionka znajduje obecnie zastosowanie w szeregu reakcji katalitycznych i wymiany jonów [19], jak również jako faza w chromatografii [20], biosensor w biotechnologii [21].

## 2. Charakterystyka sfunkcjonalizowanego żelu krzemionkowego

Krzemionka stanowi polimer kwasu krzemowego. Żel krzemionkowy to porowaty granulat zbudowany z krzemionki, wytwarzany na drodze syntetycznej z krzemianu sodu, tetrachlorku krzemu lub roztworu podstawionego chlorosilanu/ortokrzeminu [22].

Powierzchnia krzemionki składa się z dwóch typów grup funkcyjnych, siloksanów ( $\equiv\text{Si-O-Si}\equiv$ ) i silanoli ( $\equiv\text{Si-OH}$ ). Grupy silanoli mogą występować pojedynczo, gdzie powierzchniowy atom krzemu tworzy trzy wiązania ze strukturą krzemionki i jedno z grupą hydroksylową; w postaci sąsiadujących silanoli, gdzie dwa pojedyncze silanole połączone z różnymi atomami krzemu spina mostek z wiązania wodorowego; a także w postaci sparowanych silanoli gdzie dwie grupy hydroksylowe znajdują się przy jednym atomie krzemu (Rys. 1). Silanole sparowane znajdują się w odległościach wystarczających do tworzenia wiązań wodorowych, podczas gdy pojedyncze są zbyt oddalone od siebie [23].



Rysunek 1. Rodzaje grup silanolowych na powierzchni krzemionki

Rozróżnienie rodzaju grup silanolowych możliwe jest dzięki technikom badania powierzchni. Stosując spektroskopię w podczerwieni, obserwuje się dwa pasma:  $3745\text{ cm}^{-1}$  pochodzące od pojedynczych i sparowanych silanoli, jak również  $3743\text{ cm}^{-1}$  od pary sąsiadujących silanoli [24]. Różnice między pojedyn-

czymi i sparowanymi silanolami widoczne są dopiero na widmach krzemowego magnetycznego rezonansu jądrowego,  $^{29}\text{Si-NMR}$ , w przypadku którego sparowane grupy hydroksylowe występują przy wartości przesunięcia chemicznego -92 ppm, a pojedyncze i sąsiadujące przy -100 ppm [25].

Z kolei ilościowy rozkład grup powierzchniowych, w szczególności pojedynczych silanoli, możliwy jest przy wykorzystaniu spektroskopii w podczerwieni poprzez zawieszenie krzemionki w tetrachlorku węgla [26]. Przy czym obszar  $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$  jest mało wiarygodny w tym względzie, gdyż trudno rozróżnić pasmo pochodzące od adsorbowanej wody i właściwych silanoli.

W celu określenia ilości grup silanolowych na powierzchni krzemionki stosuje się zarówno metody fizyczne, chemiczne, jak i teoretyczne. Zawartość grup waha się od 4,5 do 8,0 grup/nm<sup>2</sup> w zależności od typu krzemionki i temperatury [27,28]. Aktywacja powierzchni żelu krzemionkowego zachodzi w temperaturze 423 K. Przy 673 K liczba silanoli maleje prawie o połowę, a przy 1023 K pozostają wyłącznie pojedyncze silanole [29]. Przyjmuje się, że jeśli około 46% silanoli tworzy wiązania wodorowe bezpośrednio z sąsiadującymi [30], to około 35% z pośrednictwem mostków z cząsteczek wody [31].

Podstawowe parametry charakteryzujące powierzchnię krzemionki od strony fizycznej to zakres powierzchni, objętość porów oraz rozmiar cząstek. Obszar powierzchni żelu krzemionkowego stanowi o stężeniu aktywnych czynników, zatem daje pojęcie o pokryciu powierzchni a tym samym o napięciach sterycznych. Rozmiar porów umożliwia lepszą ocenę dostępności grup silanolowych dla reagujących z nimi cząsteczek. Natomiast pomiar rozmiaru cząstek skutkuje danymi o porowatości.

Wśród metod instrumentalnych stosowanych do badania struktury powierzchni modyfikowanej krzemionki najczęściej stosuje się spektroskopię w podczerwieni, spektroskopię UV-Vis, spektroskopię fotoakustyczną i NMR w ciele stałym [32].

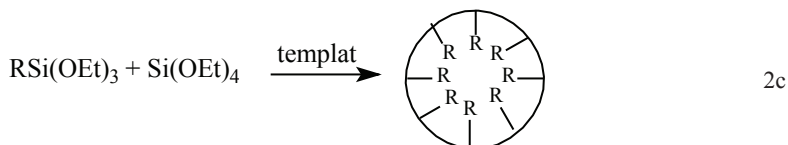
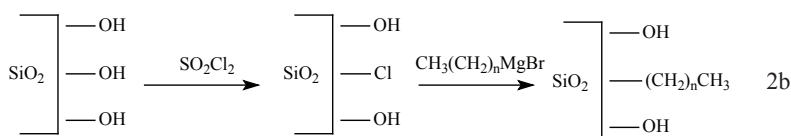
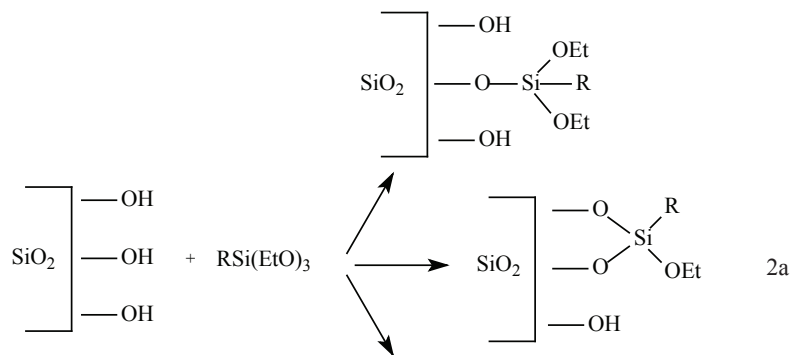
### 3. Modyfikacja powierzchni żelu krzemionkowego

Istnieją trzy podstawowe metody przyłączania grup funkcyjnych do powierzchni krzemionki [33]:

- na drodze reakcji między organosilanami lub cząsteczkami organicznymi a powierzchnią krzemionki (Rys. 2a);
- poprzez chlorowanie powierzchni krzemionki, a następnie reakcję między Si-Cl a właściwym reagentem (Rys. 2b);
- poprzez zastosowanie metody zol-żel do wprowadzenia grup funkcyjnych i ewentualną dalszą modyfikację (Rys. 2c).

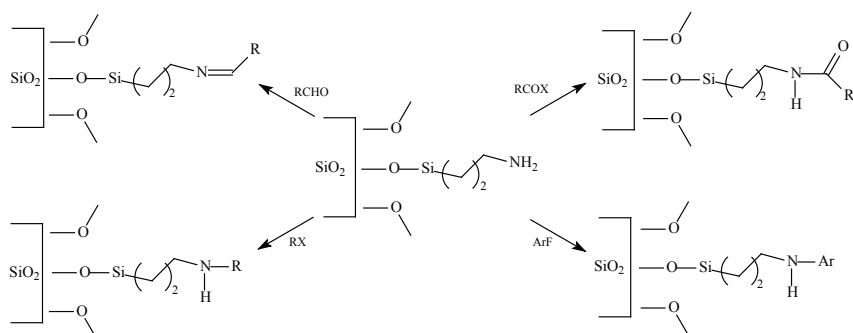
Alternatywą dla metody chlorowania, prowadzącej do powstawania szkodziwych produktów ubocznych, jest wprowadzanie grup funkcyjnych do stałej

matrycy podczas przygotowywania krzemionki. Proces polega na mieszaniu organoalkoksycjanów z prekursorem krzemionkowym, z reguły tetraetoksylianem. Niemniej jednak jego wadą jest brak możliwości kontroli obszaru powierzchni i porowatości ostatecznego materiału. Dla jej ulepszenia wprowadza się templaty typu surfaktantów jonowych lub obojętnych [34].



Rysunek 2. Podstawowe metody modyfikacji żelu krzemionkowego

Inną powszechnie stosowaną metodą jest powtórna modyfikacja. Jeśli krzemionka w pierwszym etapie modyfikacji zyskała grupy aminowe na powierzchni, to w kolejnym etapie może reagować z szeregiem związków organicznych (Rys. 3), [35].

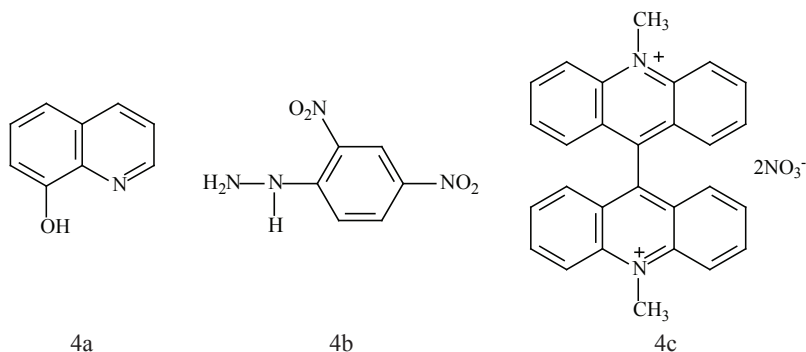


Rysunek 3. Modyfikacja krzemionki zawierającej wolne grupy aminowe

Niezależnie od dotychczas wymienionych metod modyfikacji żelu krzemionkowego, temat ten można rozpatrywać w znacznie szerszym zakresie. Przede wszystkim metody modyfikacji dzieli się na fizyczne (termiczne, hydrotermiczne), prowadzące do zmiany stosunku zawartości silanoli i siloksanów, i chemiczne, prowadzące do zmian właściwości chemicznych powierzchni krzemionki. Na skutek modyfikacji, właściwości adsorpcyjne ulegają zmianie. Chemisorpcja cząsteczek chelatujących zapewnia statyczność, mechaniczną stabilność i nierozpuszczalność w wodzie, czym zwiększa wydajność, czułość i selektywność techniki analitycznej, w której krzemionka jest stosowana. Inny generalny podział modyfikacji krzemionki zależy od typu czynnika modyfikującego, tj. grup organicznych lub czynników nieorganicznych-składników organo-metalicznych lub tlenków metali.

### 3.1 Modyfikacja poprzez nasycenie

Nasycenie krzemionki odbywa się poprzez oddziaływanie między czynnikiem modyfikującym a stałą matrycą na drodze inkluzji do porów, adhezji lub oddziaływań elektrostatycznych [36]. Na tej drodze unieruchamia się 8-hydroksychinolinę, poprzez mieszanie z aktywną krzemionką i wykorzystuje do zagęszczania ekstrakcyjnego jonów metali (Rys. 4a), [37]. Z kolei formaldehyd, zaadsorbowany na krzemionce nasyconej 2,4-dinitrofenylohydrazyną, wykrywa się w powietrzu i mierzy w postaci kompleksu hydrazonego (Rys. 4b), [38]. Lucigenin, odczynnik chemiluminescencyjny, osadzony na krzemionce stosuje się do określania zawartości żelaza(II) i V(IV) (Rys. 4c), [39].



Rysunek 4. Przykłady modyfikacji krzemionki przez nasycenie

## 3.2 Modyfikacja poprzez wiązanie kowalencyjne

### 3.2.1 Unieruchomianie silanów

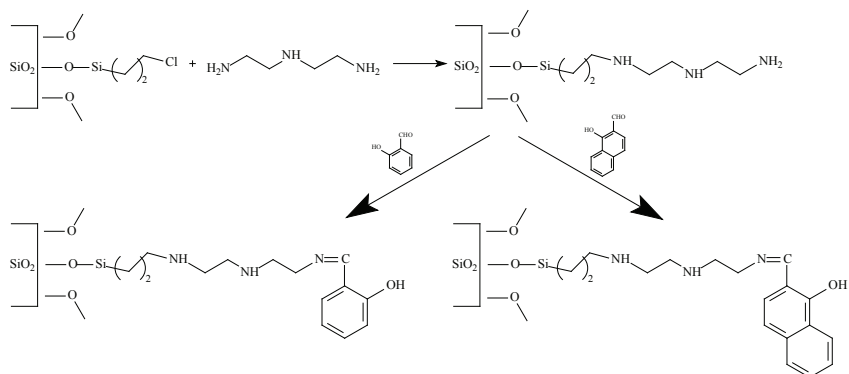
Cząsteczki organiczne zazwyczaj przyłączają się do powierzchni krzemionki w procesie silanizacji [40] przy udziale wiązań kowalencyjnych. Znaczna ilość grup chelatujących nie posiada grup funkcyjnych zdolnych do bezpośredniego związania się z powierzchnią. W takim wypadku dobrym rozwiązaniem jest adsorpcja na stałym podłożu, prowadzona w oparciu o oddziaływania hydrofobowe [41].

W przypadku wiązania kowalencyjnego aktywne atomy wodoru powierzchniowych grup silanolowych reagują z grupami organosililującymi celem nadania cech organicznych nieorganicznej matrycy [42]. Taka sfunkcjonalizowana powierzchnia służy do wprowadzania właściwych grup poprzez przyłączenie do bocznych łańcuchów [43].

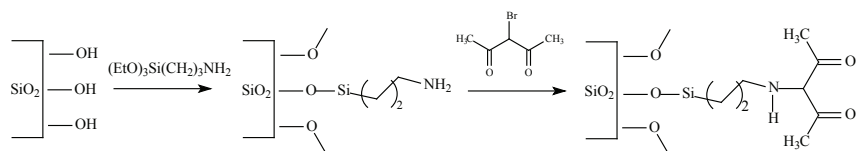
Typowe metody modyfikacji powierzchni krzemionki na drodze chemicznej opierają się na reakcji powierzchniowych grup hydroksylowych z silanowymi czynnikami spinającymi, pełniącymi rolę prekursorów w procesie unieruchomienia właściwych związków organicznych. Czynniki sililujące dostarczają pożądaných grup końcowych, za pomocą których przyłączany jest właściwy fragment modyfikujący powierzchnię. I tak modyfikacja do układów o charakterze zasad Schiffa odbywa się dwuetapowo (Rys. 5). W pierwszej kolejności żel krzemionkowy, sfunkcjonalizowany 3-chloropropyltrimetoksylsilanem, reaguje z dietylenotriaminą, a następnie z aldehydem 2-hydroksy-naftylowym lub salicylowym [44].

Z kolei modyfikacja grupami  $\beta$ -diketoaminowymi zachodzi w reakcji silanolu z powierzchni krzemionki z 3-aminopropylotrietoksylsilanami, po której następuje drugi etap z udziałem 3-bromopentadionu (Rys. 6), [45].

## Materiały supramolekularne



Rysunek 5. Synteza krzemionki modyfikowanej zasadami Schiffa



Rysunek 6. Synteza krzemionki modyfikowanej grupami  $\beta$ -diketoaminowymi

Modyfikacja krzemionki zakończona przyłączeniem kwasu formylosaliicylowego zachodzi na skutek wieloetapowego ciągu reakcji (Rys. 7), [46]. Na wstępie żel krzemionkowy traktuje się 3-aminopropylotrimetoksylanem lub 3-chloropropylotrimetoksylanem w zależności od drogi otrzymywania końcowego produktu. Krzemionka posiadająca chloropochodne reaguje z etylenodiaminą z uzyskaniem aminoalkilowej pochodnej. Z kolei powstanie fragmentu z kwasem formylosaliicylowym to efekt reakcji tegoż kwasu z krzemionką zakończoną fragmentem odpowiednio 3-aminopropylowym lub etylenodiaminowym.

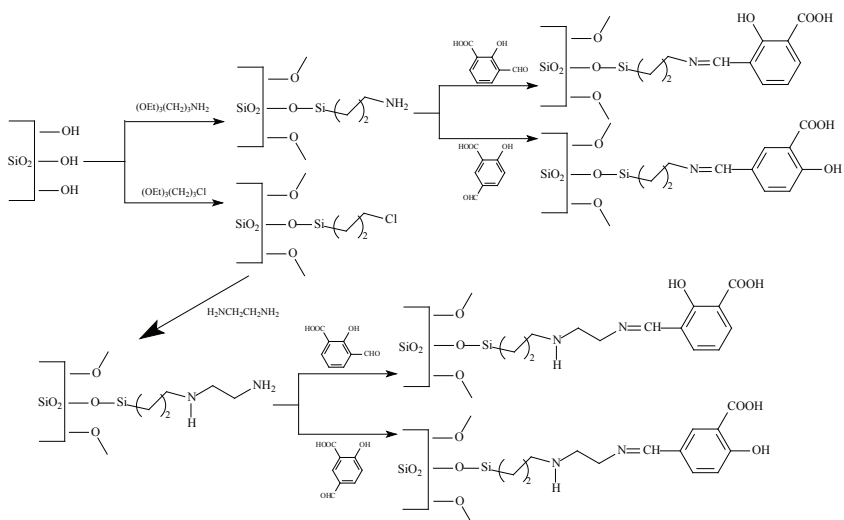
### 3.2.2 Modyfikacja powierzchni metodą żol-żel

Proces żol-żel znajduje zastosowanie przy powstawaniu organicznie modyfikowanej krzemionki. Sprowadza się on do otrzymywania hybryd typu żol-żel, w tym krzyżowania nieorganicznych tlenków z alkiloalkoksylanami [47].

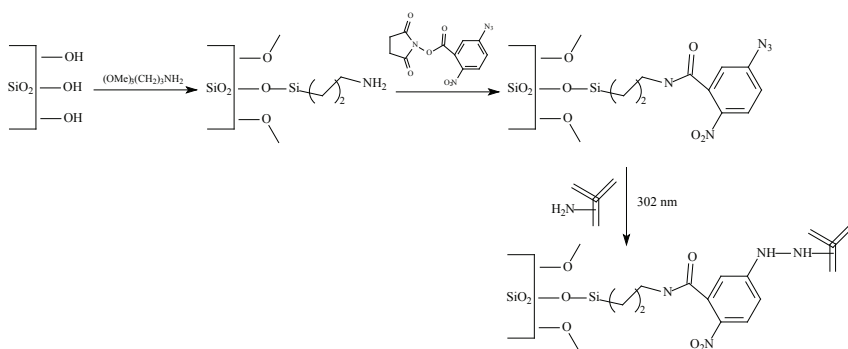
Wspomniana metoda modyfikacji sprawdza się przy projektowaniu leków uwalnianych w ściśle określonym miejscu wewnątrz organizmu. Na powierzchnię koloidu złota można nanieść warstwę krzemionki. Z tak powstałej nanopowłoki krzemowej wypłukuje się złoto wraz z odpowiednim reagentem pochodzącym z warstwy krzemowej. Przy modyfikacji żelu krzemionkowego



i nanowarstwy stosuje się czynnik sililujący 3-aminopropylotrimetoksylan w postaci roztworu wodnego. Tak wstępnie zmodyfikowana krzemionka ulega związaniu kowalencyjnemu z linkerem. Ostatni etap sprowadza się do nasycenia krzemionki przeciwciałem anty-cytochrom c na drodze inkubacji. Przyłączenie przeciwciała do krzemionki następuje na skutek działania promieniowania o długości fali 302 nm (Rys. 8), [48].



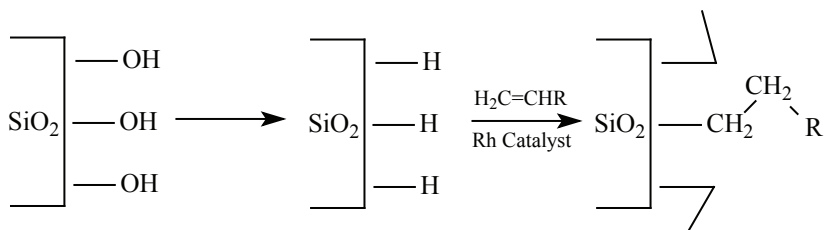
Rysunek 7. Synteza krzemionki modyfikowanej kwasem formylosalicylowym



Rysunek 8. Synteza krzemionki modyfikowanej przeciwciałem

### 3.2.3 Inne metody modyfikacji powierzchni krzemionki

Niezależnie od wiązania kowalencyjnego i metody zol-żel, istnieją także inne mniej powszechne metody modyfikacji powierzchni. Uzyskanie krzemionki z grupami alkilowymi zachodzi poprzez halogenowanie grup silanolowych w reakcji powierzchniowych grup hydroksylowych z czynnikiem halogenującym w bezwodnym aprotycznym rozpuszczalniku. Następnie w reakcji uczestniczy związek Grignard'a lub organolitu, a końcowy produkt posiada atomy węgla powiązane kowalencyjnie z krzemem [49]. Z kolei przekształcenie powierzchniowym silanoli na wodorki, a następnie katalityczne wiązanie olefin zachodzi zgodnie ze schematem na Rys. 9 [50]. Skuteczność tej syntezy zależy w głównej mierze od pierwszego etapu, tj. przekształcania alkoholi w wodorki. Można tego dokonać w dwojaki sposób: poprzez chlorowanie silanoli chlorkiem tionylu i redukcję glinowodorkiem litu lub kontrolowaną chemisorpcję silanotriolem  $\text{HSi}(\text{OH})_3$  z utworzeniem siloksanowego wiązania [51].



Rysunek 9. Synteza krzemionki modyfikowanej olefinami

## 4. Zastosowanie krzemionki modyfikowanej związkami organicznymi

Organicznie modyfikowana krzemionka (*ang.* Organically modified silica, ORMOSIL) to grupa związków o licznych zastosowaniach chemicznych i medycznych. To znakomite matryce stanowiące podstawę dla licznych związków organicznych i nieorganicznych, wykorzystywane jako sensory gazów, rozpuszczalników, odczynu pH, cząsteczek bioaktywnych; czy też jako warstwy ochronne dla istotnych materiałów; w celu zwiększania aktywności katalitycznej związków; dla uzyskania układów o określonych właściwościach fotochemicznych; lub celem otrzymywania wysoce czułych elektrod reagujących na obecność biocząsteczek.

### 4.1 Pułapka molekularna

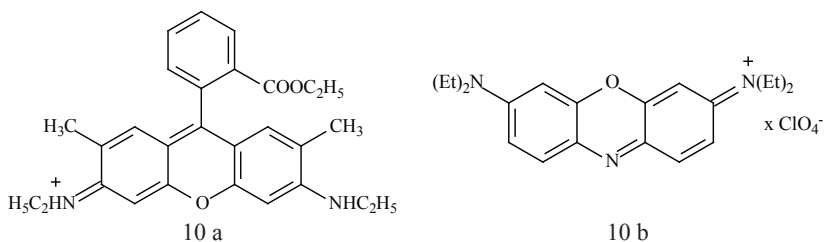
Organicznie modyfikowane krzemionki cechuje zdolność do „łapania” biocząsteczek i związków organicznych, zmieniając tym sposobem ich właściwości fizyczne i chemiczne, i tym samym nadając im nowe zastosowania w medycy-

nie i przemyśle. Unieruchomienie we fragmencie krzemionki zależy w głównej mierze od dostępności niehydrolizujących grup silanu.

Apomioglobina (apoMb) to modelowe białko stosowane przy badaniu stopnia pofałdowania łańcucha. Próbkę osadzone na szkle kwarcowym występują w konformacji niepofałdowanej [52]. Prawdopodobnie powierzchnia krzemionki wpływa niekorzystnie na strukturę i właściwości wody w porach szkła, co w efekcie prowadzi do wspomnianego stanu apoMb [53]. Po wprowadzeniu alkilowych grup hydrofobowych do krzemowej matrycy, wzrasta zawartość postaci heliakalnej białka. Podobnie modyfikacja szkła kwarcowego trifluoropropylową grupą prowadzi do wzrostu drugorzędowej struktury białka [54].

Unieruchomianie barwnika ketocyjaninowego w krzemionce to metoda na oszacowanie polarności wnęki [55]. Z kolei zastosowanie metody zol-żel do otrzymania matrycy krzemowej z rodaminą pozwala na zmniejszenie porowatości matrycy (Rys. 10a), [56].

Organicznie modyfikowane krzemionki sprawdzają się w roli gospodarzy dla wzorców fluorescencji. Rozmieszczenie oksazyny (Rys. 10b) na porowatej powierzchni wnęki krzemionki określa się metodami fluorescencyjnymi [57]. Wyniki badań wskazują, że wspomniany barwnik silnie reaguje z grupami silanowymi, a jego mobilność jest w znaczący sposób ograniczona.



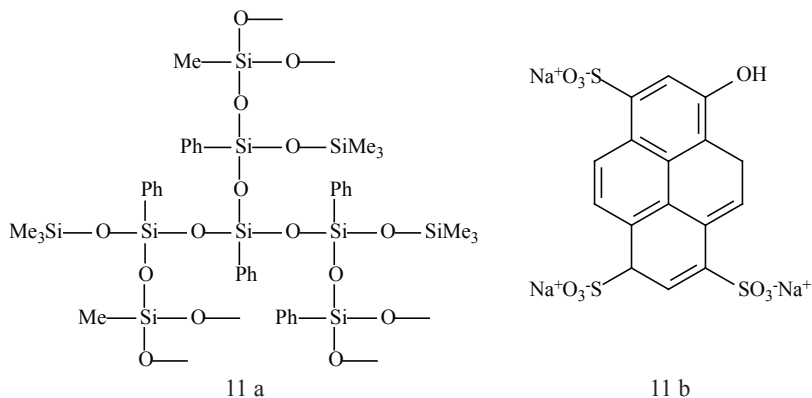
Rysunek 10. Przykłady barwników unieruchamianych w pułapce molekularnej

#### 4.2 Sensory gazowe

Sieci polisiloksanowe powstają na drodze hydrolizy i polikondensacji tetralakilosilanów typu Si(OR)<sub>4</sub> [58] i znajdują zastosowanie jako sensory gazowe. Przykładowo fynelotrimetoksylan i jego kopolimery z trialkoksylanami (Rys. 11a) odznaczają się dużą przepuszczalnością dla gazów.

Z kolei wykorzystanie barwnika (Rys. 11b) unieruchomionego na organicznie zmodyfikowanej krzemionce w procesie zol-żel, prowadzi do powstania sensora CO<sub>2</sub>, [59] wykazującego dużą czułość przy różnym stężeniu dwutlenku węgla. Sensor charakteryzuje się znakomitą przepuszczalnością gazów, a film z barwnikiem znaczną stabilnością w warunkach otoczenia. Ten sam barwnik,

pełniący rolę fluorescencyjnego wskaźnika pH, ale unieruchomiony na hydrofobowej matrycy, stanowi stabilny sensor CO<sub>2</sub> dający wyniki zgodne z metodami odniesienia w analizie dwutlenku węgla [60].



Rysunek 11. Aktywne fragmenty sensorów gazowych

### 4.3 Sensory rozpuszczalników i sensory pH

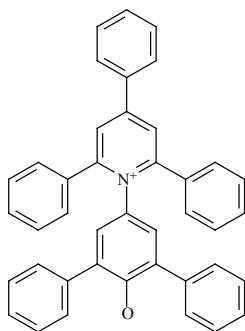
Rodzaj rozpuszczalnika i odczyn pH roztworu to istotne aspekty chemii roztworów, procesów ekstrakcji rozpuszczalników czy przemysłu chemicznego. Skutecznym sensorem alkoholi okazał się układ bazujący na matrycy złożonej z różnych R-trójmetoksylanów i tetrametoksylanu, z unieruchomionym na powierzchni barwnikiem – fenolanem 2,6-difenylo-4-(2,4,6-trifenylo-N-pirydynowym), Rys. 12 [61]. Polarność badanych układów zależy od typu zastosowanego monomeru, stosunku trójmetoksylanów do tetrametoksylanów, jak również od rozpuszczalnika na granicy faz. Z kolei funkcję sensorów pH pełnią krzemionki modyfikowane organicznym barwnikami będącymi wskaźnikami odczynu pH [62].

### 4.4 Sensory biomolekularne

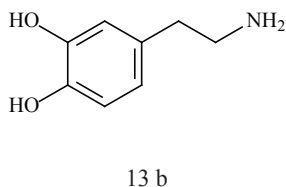
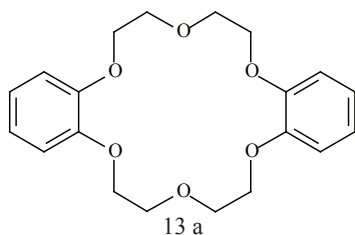
Matryce z modyfikowanej krzemionki znakomicie sprawdzają się w roli sensorów węglowodorów, tłuszczów, białek czy innych układów. Posiadają zdolność do ‘wylapywania’ przeciwciał i działania na zasadzie immunosensorów. Ze względu na wysokie przewodnictwo elektryczne i hydrofilowość zapewniają mikroklimat sprzyjający utrzymaniu aktywności biologicznej unieruchomionego białka.

Biocząsteczki typu enzymów czy przeciwciał charakteryzuje wysoka specy-

ficzność i czułość, z tego względu mogą pełnić rolę katalizatorów lub czynników rozpoznania [63]. Wspomniane właściwości wykorzystuje się poprzez unieruchamianie biocząsteczek na powierzchni modyfikowanej krzemionki w procesie zol-żel. Badanie takich organiczno-nieorganicznych hybryd bazujących na krzemionce odbywa się w oparciu o procesy elektrochemiczne. Do tego typu elektrod można wprowadzić cyjanożelazian potasu i perfluorowaną membranę lub dibenzo-18-koronę-6 (Rys. 13a) uzyskując sensor dopaminy (Rys. 13b), [64] i nadtlenków [65]. Obecność kwasu askorbinowego zwiększa elektrochemiczne właściwości sensoryczne układu w kierunku dopaminy. Natomiast zastosowanie dwuwarstwowej elektrody zbudowanej z organicznie modyfikowanej krzemionki zwiększa selektywność w kierunku nadtlenków, w szczególności, jeśli eter koronowy znajduje się w górnej warstwie.



Rysunek 12. Aktywny fragment sensora rozpuszczalników



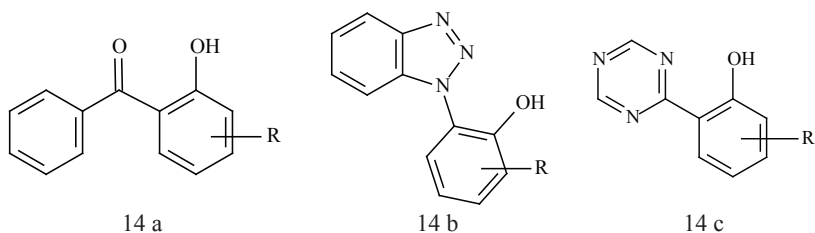
Rysunek 13. Aktywny fragment sensora biomolekularnego (a); wykrywany związek (b)

#### 4.5 Powłoki ochronne

Powłoki ochronne wykorzystuje się głównie w procesach przemysłowych. Zapewniają nie tylko ochronę materiałowi, który pokrywają, ale również zwiększają trwałość, chronią przed rozkładem, a także modyfikują właściwości foto-

chemiczne materiałów. Z reguły nietoksyczne, bezbarwne i fotoczułe powłoki powstają w procesie zol-żel. Wspomniana technika umożliwia otrzymywanie bezbarwnych, stałych i porowatych nieorganicznych matryc w niskiej temperaturze, a następnie wprowadzenie cząsteczek organicznych do wnętrza ich porów [66].

Jednym z czynników o dużej szkodliwości jest promieniowanie UV, odpowiedzialne za odbarwianie pigmentów, żółknięcie plastiku, spadek połysku i właściwości mechanicznych, poparzenia słoneczne i inne. Zastosowanie absorberów UV, posiadających wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe, (Rys. 14), wynika z ich fotostabilności i niskiej wydajności kwantowej fotorozkładu [67].



Rysunek 14. Aktywne fragmenty powłok chroniących przed fotodegradacją

#### 4.6 Katalizatory i wymiatacze

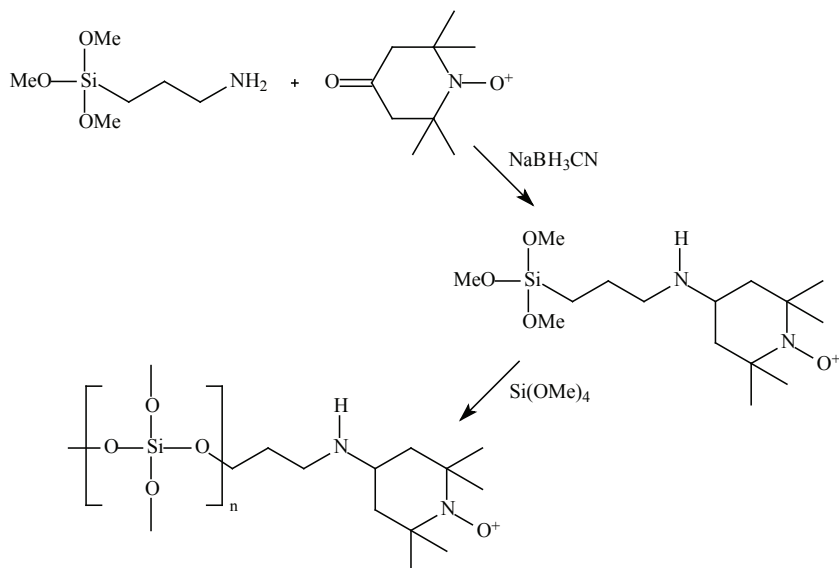
Jednym z istotniejszych zastosowań technologii zol-żel jest zdolność do zwiększania aktywności katalitycznej osadzanych cząsteczek. Wiąże się to z większą stabilnością termiczną podłoża nieorganicznego, brakiem reaktywności z wyłapywaną cząsteczką, dużą porowatością i obszarem powierzchni. Ponadto materiały w formie zol-żel wykazują właściwości chromatograficzne, tj. reagent znajduje się na powierzchni, co zwiększa czułość i selektywność reakcji z tymże czynnikiem.

W porównaniu do tradycyjnych metod otrzymywania heterogenicznych katalizatorów, technologia zol-żel cechuje się wieloma zaletami [68]. W zależności od wymagań, materiały zol-żel są mikro lub mezoporowate. W sytuacji, kiedy reagent z roztworu ma rozmiar mniejszy od średnicy porów, jego aktywność katalityczna jest większa w porównaniu do heterogenicznych katalizatorów otrzymywanych na drodze nasycania lub derywatywacji [69].

2,2,6,6-tetrametylotlenek pirydyny, złapany przez zastosowanie metody zol-żel to wydajny heterogeniczny katalizator stosowany w selektywnym utlenianiu D-metylgłukozy, (Rys. 15). Wnęka tlenu zostaje związana z aminopropylotri-metoksylanem. Następnie prekursor zawierający fragment  $\text{Si}(\text{OCH}_3)_4$  ulega

hydrolizie i kopolikondensacji [70].

Poza aktywnością katalityczną, wspomnianie materiału sprawdzają się także w roli „gąbek”, uwalniających otoczenie ze szkodliwych substancji [71].



Rysunek 15. Otrzymywanie modyfikowanej krzemionki o zastosowaniu katalitycznym

#### 4.7 Zastosowania fotochemiczne

Produkcja laserów bazuje na wymuszonej emisji, produkującej silne promieniowanie o zastosowaniu medycznym i przemysłowym. Natomiast falowody bazują na różnicy współczynnika załamania i wykorzystywane są przy produkcji włókien światłowodowych. Organicznie modyfikowane krzemionki stanowią znakomite matryce dla fotochemicznie aktywnych materiałów, i stąd mogą być wykorzystywane przy produkcji laserów i światłowodów.

Materiały oparte na tlenku krzemu i cyrkonu wzbogaca się w technice żol-żel barwnikami rodminy B i 6G, uzyskując lasery barwnikowe [72]. Z kolei hybrydy oparte na 3-metakryloksypropyltrimetoksyasilanie, przepuszczalne dla promieniowania ultrafioletowego, stosuje się przy budowie urządzeń światłowodowych [73].

Niniejsza praca zawiera jedynie wycinek szeregu zastosowań modyfikowanej krzemionki. Ten materiał o ogromnym potencjale znakomicie sprawdza się

w wielu obszarach, począwszy od chemii i medycyny, poprzez optykę i elektrochemię, a skończywszy na inżynierii i technologii.

### **Podziękowania:**

Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2006-2008 jako projekt badawczy rozwojowy nr R0501601.

### **Literatura:**

1. P. K. Jal, S. Patel, B. K. Mishra, *Talanta*, 62 (2004) 1005;
2. S. Dash, S. Mishra, S. Patel, B. K. Mishra, *Adv. Colloid Interface Sci.*, (2008) in press;
3. H. H. Weetall, in: J. N. Abelson, M. I. Simmon (Eds.), *Methods in Enzymology*, vol. 135, Academic Press, San Diego, CA (1987) 134;
4. K. K. Unger, *Packing and Stationary Phases in Chromatographic Techniques*, Marcel Dekker, New York (1990);
5. S. B. Savvin, A. V. Mikhoilova, *Zh. Anal. Khim.*, 51 (1996) 49;
6. E. A. Kazantsev, V. P. Remez, *Khim. Technol. Vody*, 17 (1995) 50;
7. O. A. Zaporohets, O. M. Gover, V. V. Sukhan, *russ. Chem. Rev.*, 66 (1997) 636;
8. A. Tong, Y. Akama, S. Tanaka, *Analyst*, 115 (1990) 947;
9. R. K. Iler, in: *The Chemistry of Silica*, Wiley, New York (1979);
10. P. Pasucci, Y. Sendon, in: *Pittsburgh Conference Presents*, New Orleans, *Abstracts of Reports*, (1992) 1177;
11. U. Pyell, G. Stork, J. Fresenius, *Anal. Chem.*, 343 (1992) 576;
12. B. Buszewski, M. Jezierska, M. Welniak, D. Berek, *J. High Rezolut. Chromatogr.*, 21 (1998) 267;
13. L. N. H. Arakaki, L. M. Nunes, J. A. Simoni, C. Airoidi, *J. Colloid. Interface Sci.*, 228 (2000) 46;
14. Lit. 13;
15. I. P. Alimarin, V. I. Fadeeva, G. V. Kudryavtsev, I. M. Loskutova, T. I. Tikhomirova, *Talanta* 34 (1987) 103;
16. A. R. Sarkar, P. K. Dutta, M. Sarkar, *Talanta* 43 (1996) 1857;
17. V. I. Lygin, *Kinet. Catal.*, 35 (1994) 480;
18. D. E. Leyden, G. H. Luttrell, *Anal. Chem.*, 47 (1975) 1612;
19. M. Dupraz, J. R. Wijin, S. A. T. Meer, K. de Groot, *J. Biomed. Matter. Res.*, 30 (1996) 231;
20. N. Simonzahed, A. A. Schilt, *Talanta*, 35 (1988) 187;
21. S. Kar, M. A. Arnold, *Anal. Chem.*, 64 (1992) 2438;
22. D. Barby, in: G. D. Parfitt, G. S. W. Sings (Eds.), *Silicas in Characterization of Powder Surfaces*, Academic Press, London, UK (1976) 353;



23. A. V. Ying, J. B. Benzinger, A. Navrotsky, *J. Am. Ceram. Soc.*, 76 (1993) 2571;
24. F. H. Van Cauwelaert, P. A. Jacobs, J. B. Uytterhoeven, *J. Phys. Chem.*, 76 (1970) 1434;
25. D. W. Sindorf, G. E. Maciel, *J. Am. Chem. Soc.*, 105 (1983) 1487;
26. J. Kratochvila, Z. Salajka, A. Zada, Z. Kadlc, J. Soucek, M. Gheorghiu, *J. Non-Cryst. Solids*, 116 (1990) 93;
27. D. F. Cadogan, D. T. Sawyer, *Anal. Chem.*, 42 (1970) 190;
28. C. G. Armistead, A. J. Tyler, F. A. Hambleto, *J. Phys. Chem.*, 73 (1969) 3947;
29. R. K. Iler, in: *The Chemistry of Silica Solubility, Polymerization, Colloid and Surface Properties and Biochemistry*, Wiley, New York (1979);
30. I. S. Chung, G. E. Maciel, *J. Phys. Chem. B*, 101 (1997) 3052;
31. Y. Dong, S. V. Pappu, Z. Xu, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 4730;
32. D. E. Lyden, D. S. Kendall, L. W. Burggraf, F. J. Pern, M. DeBello, *Anal. Chem.*, 54 (1982) 101;
33. P. M. Price, J. H. Clark, D. J. Macquarrie, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, (2000) 101;
34. J. S. Beck, J. C. Vartuli, W. J. Roth, M. E. Leonowicz, C. T. Kresge, K. D. Schmitt, *J. Am. Chem. Soc.*, 114 (1992) 10834;
35. J. H. Clark, D. J. Macquarrie, *Chem. Commun.*, (1998) 853;
36. N. L. Dias Filho, W. L. Polito, Y. Gishikem, *Talanta* 42 (1995) 1031;
37. U. Pyell, G. Stork, J. Fresenius, *Anal. Chem.*, 342 (1992) 281;
38. M. Colli, A. Girony, V. Molina, R. Marchetti, M. G. D'Eril, C. Lucarelli, *Chromatographia* 32 (1991) 113;
39. V. V. Sukhan, O. A. Zaporozhest, N. A. Lipkovskaya, L. B. Pogasii, A. A. Chuiko, *Zh. Anal. Khim.*, 40 (1994) 700;
40. Lit. 3;
41. J. S. Kim, S. Chah, J. Yi, *Kor. J. Chem. Eng.*, 17 (2000) 118;
42. B. B. Wheals, *J. Chromatogr.*, 177 (1979) 263;
43. M. G. Voronkov, N. N. Vlasona, Y. N. Pozhidaev, *Appl. Organomet. Chem.*, 14 (2000) 287;
44. E. M. Soliman, M. E. Mohmound, S. A. Ahmed, *Talanta* 54 (2001) 243;
45. A. Gambero, L. T. Kubota, Y. Gushikem, C. Airoidi, J. M. Granjeiro, E. M. Taga, E. F. C. Alcantara, *J. Colloid Interface Sci.*, 185 (1997) 313;
46. M. E. Mahmoud, E. M. Soliman, *Talanta* 44 (1997) 15;
47. D. A. Loy, K. J. Shea, *Chem. Rev.*, 95 (1995) 1431;
48. C. Wong, J. P. Burgess, A. E. Ostafin, *J. Young Invest.*, (2002) 6;
49. L. A. Belyakova, A. V. Simurov, *Russ. J. Gen. Chem.*, 66 (1996) 942;

50. J. E. Sandoval, J. J. Pesek, *Anal. Chem.*, 61 (1989) 2067;
51. C. Chu, E. Jonsson, M. Auvinen, J. J. Pesek, J. E. Sandoval, *Anal. Chem.*, 65 (1993) 808;
52. D. K. Eggers, J. S. Valentine, *Protein Sci.*, 10 (2001) 250;
53. D. K. Eggers, J. S. Valentine, *J. Mol. Biol.*, 314 (2001) 911;
54. T. M. Tillotson, K. G. Foster, J. G. Reynolds, *J. Non-Cryst. Solids*, 350 (2004) 202;
55. A. K. Dutta, K. Kamada, K. Ohta, *J. Photochem. Photobiol. A*, 93 (1996) 57;
56. M. T. Laranjo, V. Stefani, E. V. Benvenuti, T. M. H. Costa, G. O. Ramming, M. R. Gallas, *J. Non-Cryst. Solids*, 353 (2007) 24;
57. F. Monte, M. L. Ferrer, D. Levy, *J. Mater. Chem.*, 11 (2001) 1745;
58. O. S. Wolfbeis, *J. Mater. Chem.*, 15 (2005) 2657;
59. C. Malins, B. D. Macraith, *Analyst*, 123 (1998) 2373;
60. A. Mills, Q. Chang, N. McMurray, *Anal. Chem.*, 64 (1992) 1383;
61. C. Rottman, G. S. Grades, Y. D. Hazan, D. Avnir, *Langmuir*, 12 (1996) 5505;
62. C. Rottman, G. S. Grades, D. Avnir, *Chem. Mater.*, 13 (2001) 3631;
63. V. S. Tripathi, V. B. Kandimalla, H. Ju, *Sens. Actuators B Chemical*, 114 (2006) 1071;
64. P. C. Pandey, B. C. Upadhyay, *Talanta*, 67 (2005) 997;
65. P. C. Pandey, B. Singh, R. C. Boro, C. R. Suri, *Sens Actuators B Chemical*, 122 (2007) 30;
66. E. M. Moreno, D. Levy, *Chem. Mater.*, 12 (2000) 2334;
67. A. Maliakal, G. Lem, N. J. Turro, R. Ravichandran, J. C. Suhadolnik, A. D. DeBellis, *J. Phys. Chem. A*, 106 (2002) 7680;
68. D. Avnir, *Acc. Chem. Res.*, 28 (1995) 328;
69. J. Blum, D. Avnir, H. Schumann, *Chem. Tech.*, 29 (1999) 32;
70. R. Ciriminna, J. Blum, D. Avnir, M. Pagliaro, *Chem. Commun.*, (2000) 1441;
71. H. F. Mullerad, D. Avnir, *Chem. Mater.*, 12 (2000) 3754;
72. S. Schultheiss, E. Yariv, R. Reisfeld, H. D. Breuer, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 1 (2002) 320;
73. X. Zhang, A. M. Soutar, X. Zeng, *J. Mater. Chem.*, 14 (2004) 357.

## Rozdział III

### **Chemosensory fluorescencyjne w rozpoznawaniu jonów metali**

Tadeusz Ossowski, Paweł Niedziałkowski, Dorota Zarzeczkańska,  
Monika Przyborowska, Justyna Czupryniak  
*Uniwersytet Gdański, Wydział Chemii, ul. Sobieskiego 18/19,  
80-852 Gdańsk*

#### **1. Ogólna charakterystyka fluorescencyjnych chemosensorów**

Wśród wielu metod analitycznych, które umożliwiają wykrywanie kationów metali, są takie techniki jak np. fotometria płomieniowa, atomowa spektroskopia absorpcyjna, elektrody jonoselektywne itp. Metody te są kosztowne, wymagają często cząsteczek o dużych rozmiarach i nie umożliwiają ciągłego ich monitorowania. Za to metody opierające się na fluorescencyjnych chemosensorych [1-6] oferują wiele korzyści takich jak selektywność, czułość, szybki czas odpowiedzi oraz możliwość obserwacji lokalnych. Co więcej, w przypadku metody fluorescencji możliwe jest zdalne obserwowanie analitu przy użyciu optycznego światłowodów z cząsteczkowym sensorem zakotwiczonym na jego końcu [7]. Biorąc pod uwagę powyższe cechy metody fluorescencji, wiele badań poświęcono projektowaniu selektywnych fluorojonoforów kationów metali.

Kalorymetryczne oznaczanie kationów oparte na zmianach koloru w czasie kompleksowania przez czynniki barwne zdobyło popularność wiele lat temu. Szczególnie dla jonów berylowców, które są wydajnie chelatowane przez czynniki typu EDTA. Jednak technika fluorometryczna jest bardziej czuła niż fotometryczna. Fernandez-Gutierrez i Muñoz de la Peña w 1985 przebadali i znaleźli zastosowanie dla wielu fluorogennych czynników chelatujących [8]. Wśród nich ważne miejsce w analityce chemicznej zajmuje 8-hydroksychinolina i wiele jej pochodnych, ale brak im specyficzności. Natomiast fluorescencyjne sensory cząsteczkowe typu EDTA wykazują wysoką selektywność w kierunku jonów wapnia względem innych jonów obecnych w komórkach żywych.

Odkrycie eterów koronowych i kryptandów w późnych latach 1960, otwo-

rzyło nowe możliwości rozpoznawania kationów w sposób bardziej selektywny, zwłaszcza w przypadkach jonów potasowców, dla których brak jest selektywnych chelatów. Pomysł wiązania tych jonoforów z chromoforami lub fluoroforami, prowadzący odpowiednio do chromojonoforów i fluorojonoforów pojawił się kilka lat później. Pomysł ten wprowadzili w 1985 roku Löhr i Vögtle.

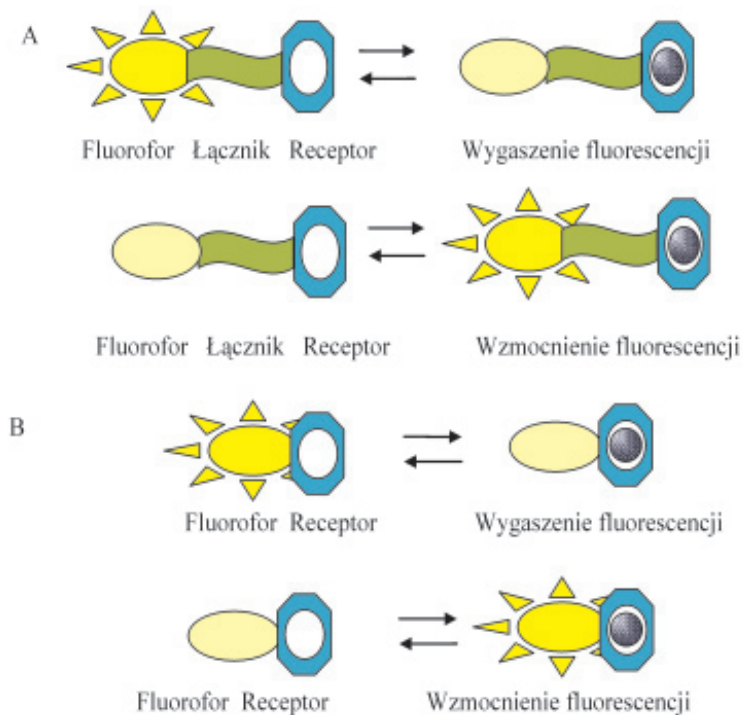
W projektowaniu fluorojonoforów [9] szczególną uwagę kładzie się na właściwości części jonoforowej i na oczekiwane zmiany we właściwościach fluorescencyjnych części fluoroforowej, następujące pod wpływem wiązania analitu. Wiadomo, że na trwałość kompleksu pomiędzy ligandem a kationem wpływa wiele czynników, takich jak rodzaj kationu, rodzaj rozpuszczalnika, temperatura, siła jonowa, a także w niektórych przypadkach pH środowiska. Dlatego w rozpoznaniu jonu, selektywność kompleksowania (tzn. preferowane kompleksowania wybranego kationu w obecności innych kationów) jest bardzo ważne. W związku z tym, właściwości jonofora tj. topologia liganda i liczba oraz rodzaj kompleksujących heteroatomów czy grup, powinna pasować do właściwości kationu, tj. średnicy jonu, gęstości ładunku, liczby koordynacyjnej, „twardości” kationu metalu, rodzaju i struktury organicznych kationów, zgodnie z generalnymi zasadami chemii supramolekularnej. Jonoforem może być chelator, struktura z otwartym pierścieniem (podand), makrocykl (koronand, eter koronowy), związek makrobicykliczny (kryptand), pochodne kaliksarenów itd. Bardzo duża trwałość kryptatów wynika z trójwymiarowej struktury tych związków i selektywność kompleksowania jest zwykle dla tych związków większa ze względu na utrudnienie w deformowaniu struktury tych układów. W przypadku kompleksów z udziałem koronandów i kryptandów, najbardziej stabilne kompleksy powstają z jonami o średnicy jonowej zbliżonej do średnicy wnęki liganda. Inną generalną zasadą mającą zastosowanie w chemii jest teoria „twardych i miękkich” kwasów i zasad Pearsona [10,11]. Określa ona, że „twardy” tlen będący zasadą wiąże się z „twardym” kwasem, który może stanowić jon z grupy potasowców lub berylowców, a „miękką” siarka czy „miękki” azot z „miękkimi” kwasami, takimi jak jony metali przejściowych.

Warunki środowiska mają ogromne znaczenie zarówno na trwałość powstających kompleksów, jak i selektywność procesu kompleksowania kationów. Głównymi czynnikami są: różnica między energią koordynacji liganda a energią solwatacji tj. siła solwatacji liganda w porównaniu do rozpuszczalnika; różnica w oddziaływaniu z powłoką liganda i dielektrycznym środowiskiem poza pierwszą otoczką solwatacyjną. W przypadku roztworów wodnych, główną rolę odgrywa pH i siła jonowa.

Połączenie pomiędzy jonoforem a fluoroforem jest bardzo ważnym aspektem w projektowaniu sensora, biorąc pod uwagę poszukiwanie silniejszych zaburzeń właściwości fotofizycznych fluorofora przez kation. Jonofor może być

połączony z fluoroforem bezpośrednio lub poprzez łącznik (Rys.1), ale w wielu przypadkach kilka atomów lub grup uczestniczących w kompleksowaniu należy do fluorofora. Zatem selektywność wiązania często wynika z całej struktury, włączając część sygnalizującą i część rozpoznającą.

W strukturę fluorojonofora może być włączony więcej niż jeden jonofor i/ lub więcej niż jeden fluorofor.



Rysunek 1. Budowa fluorojonoforów. A-fluorofor połączony z receptorem poprzez łącznik i B-fluorofor połączony bezpośrednio z receptorem.

Należy zwrócić uwagę na możliwość istnienia kilku kompleksów o różnej stechiometrii. Konieczność wstępnych badań składających się z zarejestrowania fluorescencyjnych i/lub wzbudzeniowych widm w warunkach pomiarowych (rodzaj rozpuszczalnika, składniki środowiska, siła jonowa, pH-jeśli wpływa na

trwałość kompleksu) jak najbliżej jak to możliwe do środowiska, w którym kation będzie wykrywany. Zmiany w intensywności fluorescencji dla odpowiednich par długości fali wzbudzenia i emisji ( lub dla kilku długości fali wzbudzenia i emisji) w funkcji stężenia kationu muszą zostać zanalizowane, jeśli chcemy wyznaczyć stechiometrię i stałą trwałości kompleksu. Rekomenduje się wykonanie pomiarów względnych, tzn. wyznaczenie stosunku intensywności fluorescencji zmierzonych przy dwóch długościach fal zgodnie z następującymi metodami:

**METODA 1** - jedna długość fali emisji i dwie długości fali wzbudzenia. Metoda ta wykorzystywana jest w przypadku większości wskaźników i stosowana w konwencjonalnej mikroskopii fluorescencyjnej.

**METODA 2** - jedna długość fali wzbudzenia i dwie długości fal emisji. Ten stosunek emisji ma zastosowanie tylko do wskaźników pH wykazujących podwójną emisję (emisja formy kwasowej i zasadowej występuje przy różnych długościach fal). Zmiany w widmie fluorescencji względem pH wynikają z widma absorpcji. Ta metoda preferowana jest dla cytometrii i mikroskopii wspólniskowej, a pozwala na zobrazowanie stosunku emisji.

**METODA 3** -dwie długości fal wzbudzenia i emisji. Ta metoda jest również możliwa dla wskaźników pH wykazujących podwójną emisję. Główną korzyścią tej metody jest to, że intensywności emisji są znacznie większe, ponieważ obie formy kwasowa i zasadowa są wzbudzone blisko ich maksimów absorpcji powodując w rezultacie silniejszą emisję dwóch związków.

Pomiary względne są preferowane, ponieważ stosunek intensywności fluorescencji przy dwóch długościach fal jest w istocie niezależny od całkowitego stężenia fluoroforu, zmian intensywności źródła, czułości instrumentu itp. Pomiary przy jednej długości fali wzbudzenia i emisji są również możliwe, ale nie oferują korzyści, które daje metoda względna. Są stosowane przy badaniu równowag w układach fluoroforów.

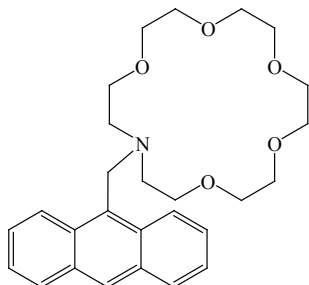
Projektuje się wiele fluorescencyjnych chemosensorów, z których większość jest słabo rozpuszczalna w wodzie, a ich zdolności kompleksujące prezentowane są zatem w rozpuszczalnikach organicznych. Zastosowanie tych chemosensorów w środowiskach wodnych i w wodnych środowiskach komórek nie jest możliwe. Za to są one użyteczne w monitorowaniu procesów ekstrakcyjnych, na przykład wyznaczenie wartości stężenia kationu w fazie organicznej. Ponadto hydrofobowy charakter tych chemosensorów nie jest wadą, ale korzyścią, kiedy używa się je do pokrywania czułych części ( polimer lub zol-żel) optycznych urządzeń sensorowych dla celów biomedycznych lub w celu monitorowania związków w środowisku.

## 2. Podział fluorojonoforów

Fluorescencyjne chemosensory klasyfikuje się zgodnie z rodzajem fotoindukowanego procesu (głównie fotoindukowanego przeniesienia elektronu lub energii, tworzenia się ekscymerów), który odpowiedzialny jest za fotofizyczne zmiany powstałe pod wpływem wiązania kationu.

### 2.1 Chemosensory z fotoindukowanym przeniesieniem elektronu

Chemosensory fluorescencyjne z fotoindukowanym przeniesieniem elektronu, w skrócie PET stanowią grupę chemosensorów najczęściej badanych [5,12]. W większości przypadków składają się z fluorofora przyłączonego do części aminowej poprzez mostek metylenowy (Rys. 2).

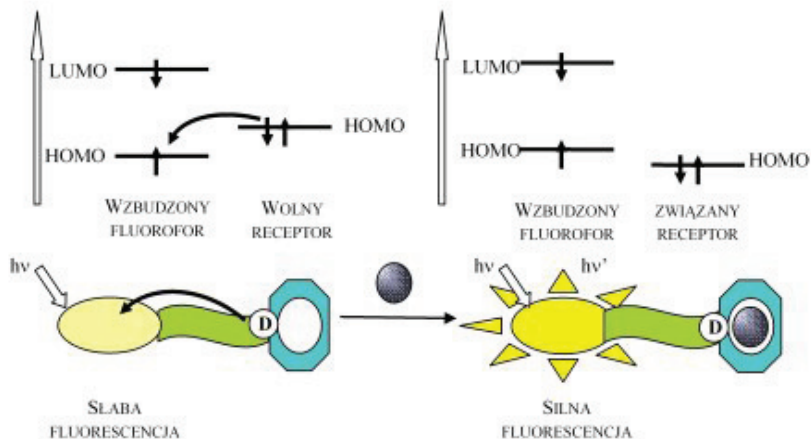


Rysunek 2. Przykład sensora PET.

Fotoindukowane przeniesienie elektronu, następuje z grupy aminowej do aromatycznego węglowodoru, powodując wygaszenie fluorescencji fluorofora. Jeśli grupa aminowa jest sprotonowana lub silnie oddziałuje z kationem, przeniesienie elektronu zostaje zahamowane i obserwuje się duże wzmocnienie intensywności procesu fluorescencji.

Schemat mechanizmu PET w ujęciu teorii orbitali molekularnych przedstawia rysunek 3.

Na skutek wzbudzenia fluorofora, elektron z najwyższego zajętego orbitala molekularnego HOMO ulega promocji do najniższej leżącego niezajętego orbitala molekularnego LUMO, który umożliwia PET z orbitala HOMO donora (wolna grupa aminowa) do orbitala HOMO fluorofora, powodując wygaszenie fluorescencji. Na skutek wiązania kationu potencjał redoks donora jest zwiększony na tyle, że dany orbital HOMO staje się niżej energetyczny niż orbital HOMO fluorofora, w konsekwencji, PET nie jest już możliwe i gaszenie fluorescencji jest zahamowane.



Rysunek 3. Wpływ kompleksowania kationu na mechanizm fotoindukowanego przeniesienia elektronu.

Większość chemosensorów PET działa na zasadzie powyższego schematu. Ale mogą również zachodzić inne mechanizmy, kiedy mamy do czynienia z oddziaływaniami z przejściowymi kationami metali[13,14]. Metale 3d wykazują właściwości redoks i przeniesienie elektronu może zachodzić z fluorofora na wiązany kation lub w odwrotnym kierunku. W niektórych przypadkach możliwa jest wymiana elektronu, co powoduje w rezultacie wygaszenie fluorofora przez bezpromienne przeniesienie energii zgodnie z mechanizmem Dexter[15]. Obserwuje się również chemosensory, w których mechanizmowi indukowanego przeniesienia elektronu towarzyszy tworzenie się ekscymerów.

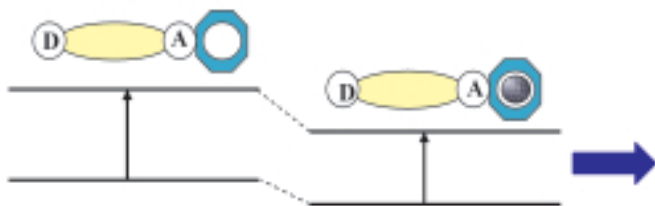
## 2.2 Chemosensory z fotoindukowanym przeniesieniem ładunku

Obok fotoindukowanego przeniesienia elektronu możliwe jest również fotoindukowane przeniesienie ładunku, w skrócie z ang. PCT (photoinduced charge transfer). Kiedy fluorofor zawiera grupę elektronodonorową (często grupę tę stanowi grupa aminowa) sprzężoną z grupą elektronoakceptorową, ulega wówczas wewnątrzcząsteczkowemu przeniesieniu ładunku od donora do akceptora na skutek wzbudzenia światłem. W konsekwencji zmiana momentu dipolowego wpływa na przesunięcie Stokesowkie, które zależy od mikrośrodowiska fluorofora. Można zatem przewidywać, że kationy w bliskim oddziaływaniu z częścią donorową lub akceptorową będą powodować zmiany właściwości fotofizycznych fluorofora, ponieważ kompleksowany kation wpływa na wydajność wewnątrzcząsteczkowego przeniesienia ładunku.

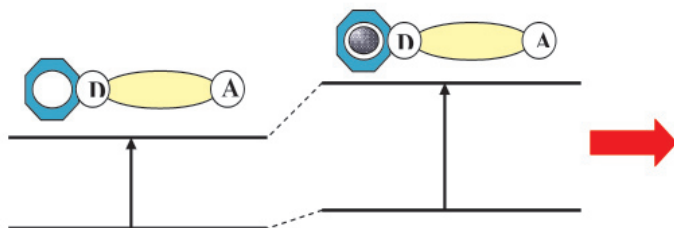


Kiedy grupa (np. gr. aminowa) pełniąca rolę donora elektronów oddziałuje z kationem, ten ostatni redukuje elektronodonorowy charakter tej grupy. Z powodu redukcji w sprzężeniu, oczekiwane jest niebieskie przesunięcie widma absorpcji, razem z obniżeniem molowego współczynnika absorpcji. I odwrotnie, kation oddziałujący z grupą akceptorową wzmacnia charakter wyciągający elektrony tej grupy. Widmo absorpcji przesuwają się długofalowo a molowy współczynnik absorpcji rośnie. Widma fluorescencji są generalnie przesunięte w tym samym kierunku, co widma absorpcyjne. Dodatkowo do przesunięć zachodzą zmiany w wydajności kwantowej i czasie życia cząsteczki w stanie wzbudzonym. Wszystkie te efekty fotofizyczne są zależne od ładunku i rozmiaru kationu, oczekuje się zatem selektywności tego efektu.

Zachodzące na skutek wiązania kationu zmiany można również wyjaśnić używając pojęcia oddziaływania ładunków dipolowych. W przypadku, kiedy moment dipolowy w stanie wzbudzonym jest większy niż w stanie podstawowym (wtedy, kiedy kation oddziałuje z grupą donorową), stan wzbudzony jest bardziej destabilizowany przez kation niż stan podstawowy i obserwuje się hipsokromowe przesunięcie widm absorpcji i emisji (Rys. 4) (choć widmo fluorescencji ulega tylko niewielkiemu hipsokromowemu przesunięciu). Odwrotnie, kiedy kation oddziałuje z grupą akceptorową, stan wzbudzony jest bardziej stabilizowany przez kation niż stan podstawowy, a to prowadzi do przesunięcia batokromowego widm absorpcji i emisji (Rys. 5).



Rysunek 4. Przesunięcie hipsokromowe widma fluorofora wywołane kompleksowaniem kationu.

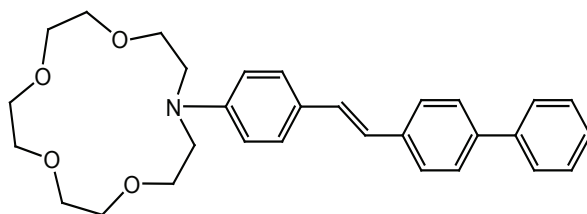


Rysunek 5. Przesunięcie bathochromowe widma fluorojonofora wywołane kompleksowaniem kationu.

### a) Chemosensory PCT, gdzie kation oddziałuje z grupą elektronodonorową

Duża liczba fluorojonoforów została zaprojektowana w oparciu o następującą zasadę [70-74]: receptorem kationów jest azakorona zawierająca atom azotu sprzężony z grupą wyciągającą elektrony. Grupa ta stanowi największy zbiór sensorów PCT.

Związek **PCT-1** (Rys. 6) charakteryzuje się tym, że krótkofalowe przesunięcie widma absorpcji jest dużo większe niż widma emisji pod wpływem wiązania kationu. Długości fal odpowiadające maksimum absorpcji i emisji w nieobecności i obecności kationu wapnia przedstawia dla tego związku tabela 1.



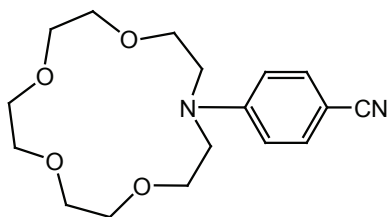
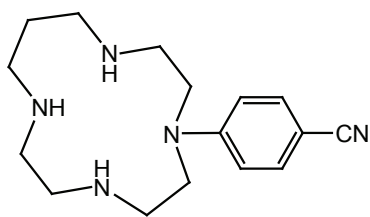
Rysunek 6. Chemosensor PCT-1.

Tabela. 1 Długości fal maksimum absorpcji i emisji w acetonitrylu dla PCT-1 [21].

	Maksimum absorpcji [nm]		$\Delta \lambda$ [nm]	Maksimum emisji [nm]		$\Delta \lambda$ [nm]
	wolny ligand	kompleks z $\text{Ca}^{2+}$		wolny ligand	kompleks z $\text{Ca}^{2+}$	
PCT-1	372	332	40	483	469	14

Relatywnie małe przesunięcie widma fluorescencji, zaskakujące w pierwszej chwili, można zinterpretować w następujący sposób: PCT redukuje gęstość elektronową na atomie azotu w koronie, wtedy atom ten traci właściwości koordynacyjne z powodu dodatniego spolaryzowania. Dlatego też wzbudzenie wywołuje zmniejszenie oddziaływań pomiędzy kationem a atomem azotu korony. Widmo fluorescencji jest dlatego tylko trochę efektywne, ponieważ większość fluorescencji emitowana jest ze związku, w którym oddziaływanie pomiędzy kationem i fluoroforem nie istnieje w ogóle lub jest bardzo słabe. Rezultatem takiego fotorozrywania jest niższa trwałość kompleksów w stanie wzbudzonym. Zatem wzbudzenie takiego kompleksu intensywnym pulsem światła spowoduje, że niektóre kationy opuszczą koronę i dyfundują, pod warunkiem, że stała czasowa dla całkowitego uwolnienia kationu z korony jest krótsza niż czas życia stanu wzbudzonego [17].

Wewnątrzcząsteczkowemu przeniesieniu ładunku w sprzężonych cząsteczkach donorowo-akceptorowych może towarzyszyć wewnętrzna rotacja prowadząca do skręconych wewnątrzcząsteczkowych stanów przeniesienia ładunku (z ang. TICT) [22]. Można wtedy zaobserwować podwójną fluorescencję jak np. w chemosensory **PCT-2** (Rys. 7) [23]: pasmo krótkofalowe odpowiada fluorescencji z lokalnie wzbudzonego stanu a długofalowe pasmo pojawia się ze stanu TICT. Intensywność fluorescencji pasma długofalowego pod wpływem wiązania kationu ulega obniżeniu. Przyczyną mniejszej intensywności długofalowego pasma jest oddziaływanie pomiędzy wiązaniem kationem a azotem korony uniemożliwiające formowanie się stanu TICT, a co w rezultacie prowadzi do konkurencyjnego wzrostu pasma krótkofalowego.

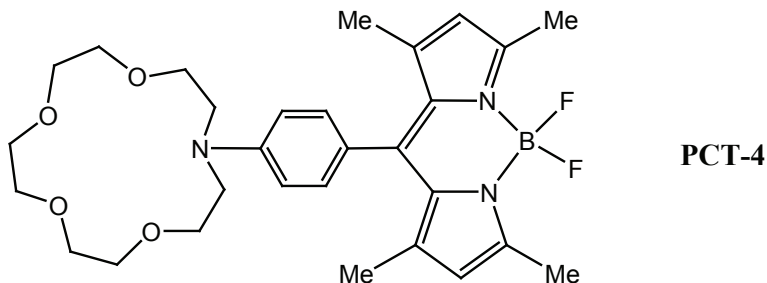
**PCT-2****PCT-3**Rysunek 7. Chemosensory **PCT-2** i **PCT-3**.

Analogiczny do liganda **PCT-2** związek **PCT-3** [24] zsyntezowano, aby otrzymać układ zdolny do kompleksowania jonów metali przejściowych. W tym celu monoazakoronę zastąpiono tetraazakoroną-cyklamem. W wyniku tej

zamiany obserwuje się potrójną fluorescencję: oprócz emisji z lokalnego stanu i stanu TICT, fluorescencja jest także emitowana z wewnątrzcząsteczkowego eks-cypleksu (kompleks sandwichowy tworzy się w stanie wzbudzonym ze względu na dużą giętkość cyklamu). Potrójna fluorescencja w dużym stopniu zależy od pH oraz rozpuszczalnika i jest zakłócana wiązaniem kationu przez ligand. Na względne zmiany pasm wpływa rodzaj kompleksowanego kationu.

Nawet jeśli nie obserwuje się podwójnej fluorescencji, nie oznacza to, że nie tworzy się stan TICT. Dla donorowo-akceptorowego stilbenu **PCT-1** zaproponowano schemat oparty o kinetyczne uwarunkowania[21] składający się z trzech stanów: planarnego stanu  $E^*$  osiągniętego pod wpływem wzbudzenia, który prowadzi następnie do stanu  $P^*$  (który nie wykazuje fluorescencji) poprzez skręcenie podwójnego wiązania i do stanu TICT  $A^*$  poprzez skręcenie pojedynczego wiązania, ostatni stan jest odpowiedzialny za główną część emisji.

W większości przypadków, zmiany w intensywności fluorescencji pod wpływem wiązania kationu nie są bardzo duże (współczynnik od 2 do 5) w chemosensorach PCT w porównaniu do chemosensorów PET. Znaczny wyjątek stanowi chemosensor **PCT-4** [25] przedstawiony na rysunku 8: współczynnik fluorescencji zmienia się od 90 dla jonów litu do 2250 dla jonów magnezu.

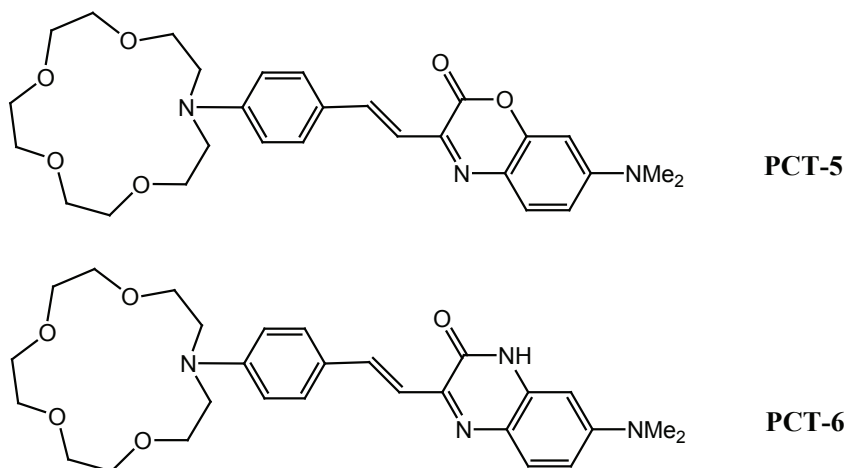


Rysunek 8. Chemosensor PCT-4

W porównaniu do wcześniejszych fluorojonoforów PCT, widma emisyjne chemosensorów **PCT-5** i **PCT-6** (Rys. 9) ulegają dużemu krótkofalowemu przesunięciu fluorescencji pod wpływem wiązania kationu.

**PCT-5**[26-28] jest jednym z pierwszych zaprojektowanych chemosensorów PCT, zawierających eter koronowy. Maksimum fluorescencji z 642 nm dla wolnego liganda przesuwają się do 574 nm dla kompleksu z jonami wapnia w acetonitrylu. Takie hipsokromowe przesunięcie pasma emisyjnego oznacza, że nie występuje tu fotorozrywanie oddziaływania pomiędzy kationem a atomem azotu korony, jak to miało miejsce w chemosensorze **PCT-1**, ponieważ atom azotu korony odgrywa rolę drugiego atomu donorowego w związku, natomiast część

benzoksazynowa sama w sobie jest układem donorowo-akceptorowym. Wydaje się, że występowanie fluorescencyjnego stanu TICT jest prawdopodobne w tym związku [29]. **PCT-5** nie tylko reaguje na kationy ziem alkalicznych, ale również na dwuwartościowe jony metali ciężkich  $Hg^{2+}$  i  $Pb^{2+}$  [30].



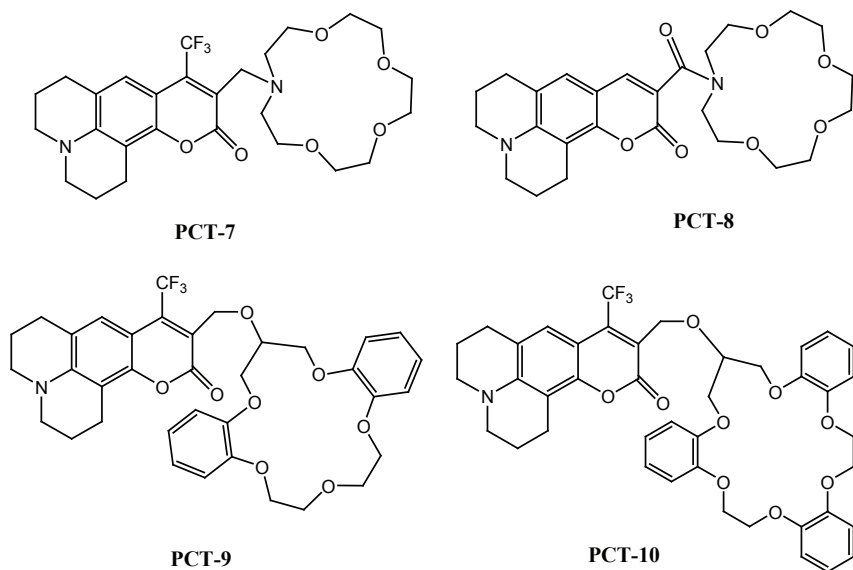
Rysunek 9. Chemosensory **PCT-5** i **PCT-6**

Struktura chemosensora **PCT-6** [31] jest bardzo podobna do **PCT-5**. Heterocykliczny atom tlenu w podstawniku benzoksazynonu zastąpiono atomem azotu uzyskując pochodną benzodiazynonu. Pomimo tych zmian, kation oddziałujący z ligandem **PCT-6** indukuje podobne zmiany we właściwościach fotofizycznych jak w **PCT-5**.

#### b) Chemosensory PCT, gdzie kation oddziałuje z grupą akceptorową

W przeciwieństwie do opisanych wcześniej chemosensorów PCT, w których kation oddziałuje z grupą donorową, istnieje tylko kilka chemosensorów, w których kation oddziałuje z grupą akceptorową. Szczególnie ciekawe są kumaryny przyłączone do eterów koronowych, ponieważ w związkach tych kation oddziałuje bezpośrednio z grupą wyciągającą elektrony, tzn. z grupą karbonylową [32-35] mimo występowania mostka metylenowego pomiędzy fluoroforem a eterem koronowym (Rys. 25).

Wynikiem włączenia w proces kompleksowania zewnętrznego atomu jest wzrost stałej trwałości kompleksu w porównaniu do samej korony bez zewnętrznego atomu kompleksującego.

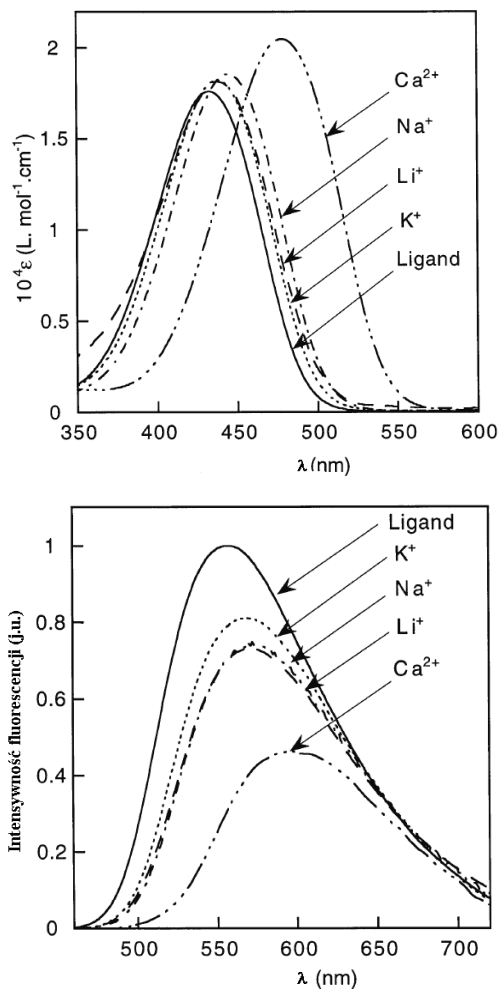


Rysunek 10. Sensory PCT, w których kation oddziałuje z grupą akceptorową.

Analizując indukowane poprzez kation zmiany fotofizyczne, należy pamiętać, że moment dipolowy aminokumarynu w stanie wzbudzonym jest większy niż w stanie podstawowym, ponieważ zachodzi proces PCT z atomu azotu korony do grupy karbonylowej. Zatem kiedy kation jest koordynowany przez grupę karbonylową, stan wzbudzony jest bardziej stabilizowany niż stan podstawowy, dlatego oba widma absorpcji i emisji ulegają batochromowemu przesunięciu. Obserwowane w obecności kationów przesunięcie widm związku PCT-9 przedstawia rysunek 11.

Selektywność **PCT-7** jest bardzo niska z powodu giętkości eteru koronowego dookoła łącznika pomiędzy barwnikiem a eterem koronowym. Ponadto atom azotu korony łatwo ulega protonowaniu. Wymiana mostka metylenowego obecnego w **PCT-7** na mostek amidowy w **PCT-8** wyklucza czułość na zmiany pH i prowadzi do polepszenia selektywności względem metali ziem alkalicznych w porównaniu do alkalicznych. Wiąże się to z dużą sztywnością wiązania amidowego. Innym sposobem polepszenia selektywności jest użycie bardziej sztywnej korony zawierającej grupy fenylowe jak np. dibenzokorona lub tribenzokorona[36]. Efekt ten można uzyskać poprzez zamianę eteru koronowego monoaza 15-crown-5 na sztywniejszą dibenzokoronę otrzymując związek **PCT-9**. W acetonitrylu układ ten okazał się być selektywny dla niektórych jonów metali, tj. selektywność przedstawiona jako stosunek stałych trwałości wynosi 12500

dla  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  i 16 dla  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . Przesunięcie widm UV-Vis w obecności kationów jest większe dla **PCT-9** niż te, które obserwowano dla **PCT-7** i **PCT-8** i może być związane z wydłużeniem mostka. Można oczekiwać, że **PCT-9** przyjmie konformację, w której wiązany kation jest bliżej grupy karbonylowej niż w innych układach.



Rysunek 11. Widmo absorpcji i fluorescencji chemosensora PCT-9 i jego kompleksów w AN [32].

Tribenzokorona kowalencyjnie przyłączona do kumaryny tworzy chemosensor **PCT-10**. Oczekuje się, że ta część kompleksująca będzie selektywna dla jonów  $K^+$ . Selektywność  $K^+/Na^+$  wynosi tylko 2 w acetonitrylu, ale już 20 w etanolu.

Przedstawione przykłady pokazują, że najważniejszymi parametrami odpowiedzialnymi za selektywność w koronowych pochodnych kumaryn są: sztywność łącznika pomiędzy fluoroforem a koroną, sztywność samej korony i rozmiar korony.

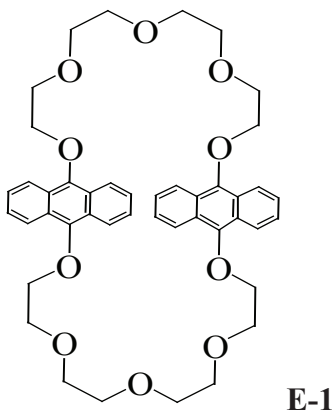
### 2.3 Chemosensory oparte na tworzeniu się ekscymerów

Niektóre fluorofory jak np. antracen czy piren mogą tworzyć ekscyмеры - dimery w stanie wzbudzonym. Dimery tworzą się wówczas, gdy wzbudzone cząsteczki zdążą zbliżyć się do siebie w czasie życia w stanie wzbudzonym. Obserwuje się wówczas podwójną fluorescencję. Jedno pasmo pochodzi od monomeru, natomiast drugie, poszerzone i przy dłuższej długości fali, pojawia się, gdy dochodzi do uformowania ekscymeru. Stosunek intensywności fluorescencji odpowiadający emisji monomeru i ekscymeru jest uzależniony od ruchliwości cząsteczkowej i mikrolepkości [37].

Kiedy fluorojonofor zawiera dwa fluorofory, których wzajemna odległość jest zależna od kompleksowanego kationu, wówczas rozpoznanie kationu może być monitorowane poprzez pomiar stosunku intensywności fluorescencji monomeru do ekscymeru. Kation może ułatwiać lub hamować tworzenie się ekscymeru.

Eter bisantracenokoronowy **E-1** [38-40] posiada widmo fluorescencji złożone z pasma charakterystycznego dla monomera i ekscymera. Stopniowe dodawanie nadchloranu sodu do metanolowego roztworu, powoduje zmniejszenie pasma monomera i wzrost intensywności pasma ekscymera. Kompleksowanie istotnie powoduje zbliżenie się dwóch cząsteczek antracenu, co ułatwia tworzenie się ekscymera. Marquis i Desvergne przedstawili, że badana cząsteczka eteru bisantracenokoronowego tworzy z jonami sodu kompleks 1:2 w metanolu i acetonitrylu. Interesujące było to, że całkowita stała trwałości otrzymana z danych absorpcyjnych była niższa niż ta otrzymana z danych fluorescencyjnych. Oznacza to, że zdolność kompleksotwórcza jest większa w stanie wzbudzonym. Określono również, że w przeciwieństwie do jonów sodu, związek **E-1** tworzy z jonami potasu kompleks 1:1.





Rysunek 12. Chemosensor eteru bisantracenokoronowego E-1.

### 3. Podsumowanie

W zaprezentowanym przeglądzie staraliśmy się przedstawić aktualne informacje o możliwościach zastosowania fluorojonoforów do wykrywania jonów metali. Szczególnie dużo miejsca poświęciliśmy próbie sklasyfikowania fluorojonoforów z punktu widzenia ich potencjalnych zastosowań do budowy fluorescencyjnych chemosensorów. Przegląd literaturowy w tym zakresie wyraźnie wskazuje na ogromne zainteresowanie układami molekularnymi zawierającymi ugrupowania chromoforowe w klasycznej analizie, chemii środowiska czy diagnostyce medycznej. Potencjalne możliwości zastosowania fluorofjonoforów są ogromne. Łatwość modyfikacji najbliższego otoczenia fluoroforu jak i samego fluoroforu pozwala nam zbudować dużą liczbę pochodnych o predeterminowanych właściwościach fizykochemicznych. Dane literaturowe pokazują, że w chwili obecnej obserwuje się znaczący postęp w metodach syntezy selektywnych i specyficznych receptorów, uwłącza w kontekście poszukiwania układów molekularnych rozpoznawania większych molekuł typu peptydów cukrów czy białek. Analiza oddziaływań jon metalu cząsteczką fluorojonoforu daje nam podstawy do wnioskowania o potencjalnym charakterze oddziaływać bardziej złożonych biologicznych supermolekuł co tworzy ważne narzędzie badawcze w chemii rozpoznawania molekularnego.

### Podziękowania:

Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2006-2008 jako projekt badawczy rozwojowy nr R0501601.

**Literatura:**

1. A.W. Czarnik (Ed.), *"Fluorescent Chemosensors for Ion and Molecule Recognition"*, ACS Symposium Series 358, American Chemical Society, Washington, DC, (1993);
2. J.R. Lakowicz ((ed.), *"Probe Design and Chemical Sensing, Topics in Fluorescence Spectroscopy"*, vol. 4, Plenum, New York, (1994);
3. B. Valeur, E. Bardez, *Chem. Br.* 31 (1995) 216;
4. L. Fabbrizzi, A. Poggi, *Chem. Soc. Rev.* 24 (1995) 197;
5. J.-P. Desvergne, A.W. Czarnik ((eds.), *"Chemosensors of Ion and Molecule Recognition"*, NATO ASI Series, Kluwer, Dordrecht, (1997);
6. A.P. de Silva, H.Q.N. Gunaratne, T. Gunnlaugsson, A.J.M. Huxley, C.P. McCoy, J.T. Rademacher, T.E. Rice, *Chem. Rev.* 97 (1997) 1515;
7. O.S. Wolfbeis, *"Fiber Optic Chemical Sensors and Biosensors"*, vols. I-II, CRC Press, Boca Raton, FL, (1991);
8. B. Valeur, *Probe design and chemical sensing*, in: J.R. Lakowicz (Ed.), *Topics in Fluorescence Spectroscopy*, vol. 4, Plenum, New York, (1994) 21;
9. Fernandez-Gutierrez A. and Mun˜oz de la Pen˜a A. *Determination of Inorganic Substances by Luminescence Methods*, in: Schulman S. G. (Ed.), *Molecular Luminescence Spectroscopy, Methods and Applications: Part 1*, Wiley & Sons, New York, (1985) 371;
10. Pearson, R.G., *J. Am. Chem.Soc.*, 85 (1963) 3533;
11. Pearson, R.G., *Coord. Chem. Rev.*, 100 (1990) 403;
12. R.A. Bissell, A.P. de Silva, H.Q.N. Gunaratne, P.L.M. Lynch, G.E.M. Maguire, C.P. McCoy, K.R.A.S. Sandanayake, *Top. Curr. Chem.* 168 (1993) 223;
13. L. Fabbrizzi, M. Lichelli, P. Pallavicini, D. Sacchi, A. Taglietti, *Analyst* 121 (1996) 1763;
14. R. Bergonzi, L. Fabbrizzi, M. Lichelli, C. Mangano, *Coord. Chem. Rev.* 170 (1998) 31;
15. Dexter D. L. *"A Theory of Sensitized Luminescence in Solids"*, *J. Chem. Phys.* 21 (1953) 836;
16. B. Valeur, J. Bourson, J. pouget, in: A. W. Czarnik (Ed.), *"Fluorescent Chemosensors for Ion and Molecule Recognition"*, ACS Symposium Series 538, American Chemical Society, Washington, DC, (1993) 25;
17. W. Rettig, R. Lapouyade, *Probe design and chemical sensing*, in: J.R. Lakowicz (Ed.), *Topics in Fluorescence Spectroscopy*, vol. 4, Plenum, New York, (1994) 109;
18. B. Valeur, F. Badaoui, E. Bardez, J. Bourson, P. Boutin, A. Chatelain, I. Devol, B. Larrey, J.P. Lefèvre, A. Soulet, in: J.-P. Desvergne, A. W.

- czarnik (Eds.), *Chemosensors of Ion and Molecule recognition*, NATO ASI Series, Kluwer, Dordrecht, (1997) 195;
19. H.-G. Löhr, F. Vögtle, *Acc. Chem. Res.* 18 (1985) 65;
  20. M.V. Alfimov, S.P. Gromov, *Applied fluorescence*, in: W. Rettig (Ed.), *Chemistry, Biology and Medicine*, Springer, Berlin, (1999);
  21. J.F. Létard, R. Lapouyade, W. Rettig, *Pure Appl. Chem.* 65 (1993) 1705;
  22. W. Rettig, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 25 (1986) 971;
  23. J.F. Létard, S. Delmond, R. Lapouyade, D. Braun, W. Rettig, *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas* 114 (1995) 517;
  24. G.E. Collins, L.-S. Choi, J.H. Callahan, *J. Am. Chem. Soc.* 120 (1998) 1474;
  25. M. Kollmannsberger, K. Rurack, U. Resch-Genger, J. Daub, *J. Phys. Chem.* 102 (1998) 10211;
  26. S. Fery-Forgues, M.-T. Le Bris, J.-P. Guetté, B. Valeur, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 5 (1988) 384;
  27. S. Fery-Forgues, M.-T. Le Bris, J.-P. Guetté, B. Valeur, *J. Phys. Chem.* 92 (1988) 6233;
  28. S. Fery-Forgues, J. Bourson, L. Dallery, B. Valeur, *New J. Chem.* 14 (1990) 617;
  29. S. Fery-Forgues, M.-T. Le Bris, J.-C. Mialocq, J. Pouget, W. Rettig, B. Valeur, *J. Phys. Chem.* 96 (1992) 701;
  30. R.S. Addleman, J. Bennett, S.H. Tweedy, S. Elshani, C.M. Wai, *Talanta* 46 (1998) 573;
  31. L. Cazaux, M. Faher, A. Lopez, C. Picard, P. Tisne's, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 77 (1994) 217;
  32. J. Bourson, M.-N. Borrel, B. Valeur, *Anal. Chim. Acta* 257 (1992) 189;
  33. J. Bourson, J. Pouget, B. Valeur, *J. Phys. Chem.* 97 (1993) 4552;
  34. J. Bourson, F. Badaoui, B. Valeur, *J. Fluoresc.* 4 (1994) 275;
  35. J.-L. Habib Jiwan, C. Brander, J.-L. Habib Jiwan, J.-Ph. Soumillion, B. Valeur, *Chem. Commun.* (1999) 795;
  36. A. Ohki, J.P. Lu, J.L. Hallman, X. Huang, R.A. Bartsch, *Anal. Chem.* 67 (1995) 2405;
  37. B. Valeur, in: S.G. Schulman (Ed.), *Molecular Luminescence Spectroscopy, Part 3*, Wiley, New York, (1993) 25;
  38. H. Bouas-Laurent, A. Castellan, M. Daney, J.-P. Desvergne, G. Guinand, P. Marsau, M.-H. Riffaud, *J. Am. Chem. Soc.* 108 (1986) 315;
  39. D. Marquis, J.-P. Desvergne, *Chem. Phys. Lett.* 230 (1994) 131;
  40. D. Marquis, J.-P. Desvergne, H. Bouas-Laurent, *J. Org. Chem.* 60 (1995) 7984.



## Rozdział IV

### Aktywność biologiczna zasad Schiffa i innych aza-pochodnych fenoli

Piotr Przybylski, Adam Huczynski, Bogumil Brzezinski,  
Grzegorz Schroeder

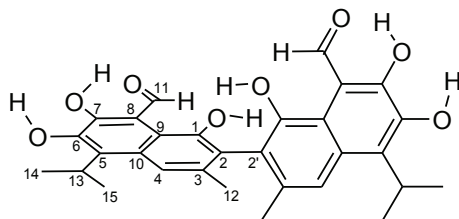
*Wydział Chemii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Grunwaldzka 6,  
60-780 Poznań*

Główną inspiracją do badań chemii zasad Schiffa, od początku ich odkrycia przez Hugo Schiffa w XIX wieku, było duże zapotrzebowanie przemysłu farmaceutycznego na nowe związki. Nagromadzona literatura na ten temat stanowi bardzo wyraźny dowód o znaczeniu zasad Schiffa i pochodnych związków w chemii, biochemii, farmacji i przemyśle chemicznym.

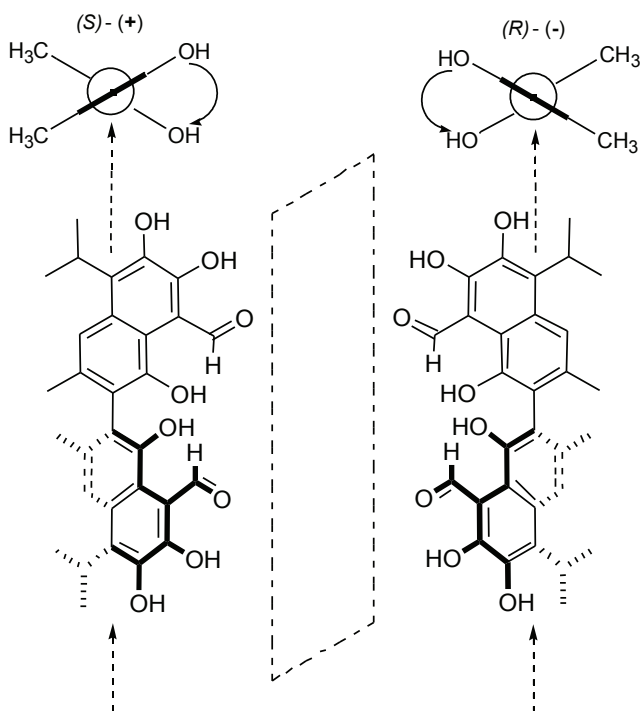
#### 1. Gossypol

Gossypol (Schemat 1) jest biseskwiterpenem posiadającym interesujące właściwości fizyko-chemiczne, a także znaczącą aktywność biologiczną. Ważna i poszukiwana aktywność biologiczna gossypolu jest ograniczona jego względnie wysoką toksycznością i szeregiem niepożądanych efektów ubocznych [1-5]. Toksyczność gossypolu jest bezpośrednio skierowana na organy rozrodcze, wątrobę, serce a także błony komórkowe [6, 7]. W ostatnich 30 latach opublikowano około 2000 prac naukowych poświęconych zastosowaniu pochodnych gossypolu, w tym także zasadom Schiffa w terapiach medycznych. Ta liczba publikacji świadczy już o znaczeniu tego związku w medycynie.

Gossypol został po raz pierwszy wyizolowany z nasion bawełny 1886 r. przez Longmore'a [8], a jego struktura oraz reaktywność chemiczna została opisana przez Adams'a i współpracowników [9]. Ze względu na ograniczoną rotację wokół  $C_2-C_2$  binaftyłowego wiązania (Schemat 2) gossypol istnieje jako para enancjomerów, które różnią się aktywnością biologiczną.



Schemat 1



Schemat 2

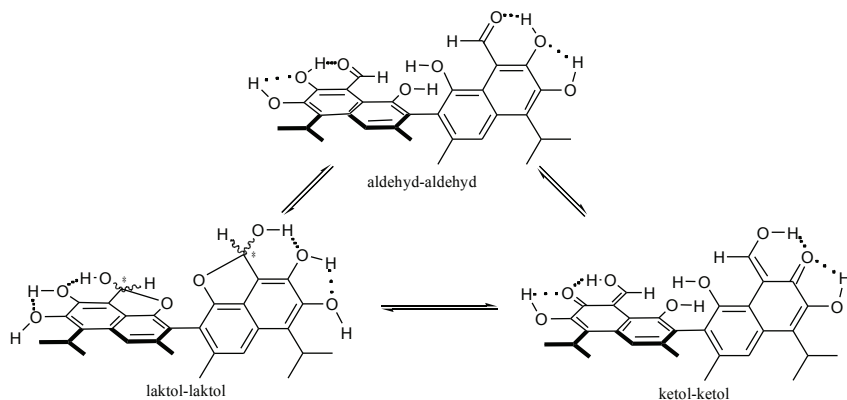
Energetyczna bariera rotacji wokół wiązania C<sub>2</sub>-C<sub>2</sub>, wynosząca 50 kcal/mol została wyznaczona przez Jaroszewskiego i współpracowników metodami obliczeniowymi [10].

Z reguły (R)-(-) enancjomer gossypolu posiada wyższą aktywność biologiczną w porównaniu z aktywnością biologiczną (S)-(+)-enancjomeru lub racematu [11-14].

Synteza racemicznego gossypolu została opracowana przez Edwards'a [15] a synteza enancjomeru (*S*) – gossypolu przez Meyers'a and Willemsen'a [16, 17]. Najczęściej jednak Gossypol jest otrzymywany przez izolacje z roślin bawełny jako równo-molowa mieszanina enancjomerów [(*R*) i (*S*)] w wyniku ekstrakcji i krystalizacji z roztworów zawierających kwas octowy [(*R, S*)-gossypol × HOAc]. Jest rzeczą interesującą, że poszczególne enancjomery gossypolu nie tworzą kompleksu z kwasem octowym [18].

W roślinach bawełny gossypol jest syntezowany z kwasu mewalonowego poprzez seskwiterpeny i pełni rolę ochronną skierowaną przeciw insektom i roślinożercom [19-22]. Stosunek enancjomerów gossypolu w roślinach bawełny (*Gossypium*) zależy od ich odmian. Ponieważ niezmiernie trudne jest otrzymanie czystych enancjomerów gossypolu opracowano metody rozdzielania racemicznej przez wytworzenie diastereoizomerycznych zasad Schiffa, ich rozdział z zastosowaniem preparatywnych metod HPLC oraz TLC [23-26] i następnie ich hydrolizę.

Struktura gossypolu jest stosunkowo złożona, ponieważ oprócz dwóch atropizomerów może on występować w różnych formach tautomerycznych. W celu wyjaśnienia właściwości chemicznych gossypolu Adams zaproponował trzy formy tautomeryczne pokazane na Schemacie 3 [27]. Badania form tautomerycznych gossypolu z zastosowaniem metod spektroskopowych (NMR, FT-IR, UV-Vis) wykazały, że ich występowanie jest silnie związane z przenikalnością dielektryczną rozpuszczalnika oraz wartością pH roztworów [28-34].

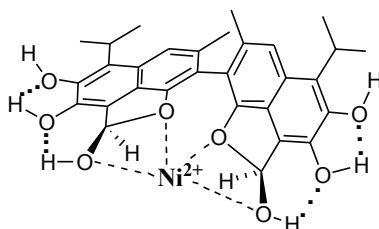


Schemat 3

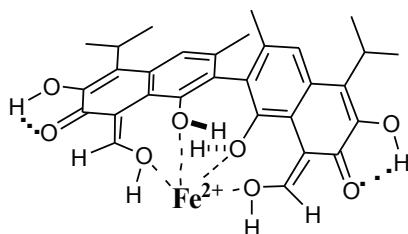
Badania rentgenowskie i spektroskopowe gossypolu wskazują, że w ciele stałym i w roztworze jedna z form tautomerycznych jest zawsze dominującą ze

względem na stabilizujący wpływ wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych [35-45] (Schemat 3). W ciele stałym gossypol istnieje wyłącznie w formie aldehydowo-aldehydowej podczas gdy w  $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  i  $\text{CH}_3\text{CN}$  aldehydowo-aldehydowa forma tautomeryczna jest dominującą obok laktolowo-laktolowej formy tautomerycznej. Ketolowo-ketolowa forma tautomeryczna gossypolu istnieje wyłącznie w zasadowym środowisku. Przeprowadzenie gossypolu w kompleksy z kationami metali jest jedną z metod stabilizacji form tautomerycznych a także zmniejszania jego toksyczności [46-50]. Gossypol jest także w stanie zrywać nici DNA w obecności jonów  $\text{Cu}^{2+}$  [51-53]. Badania spektroskopowe i obliczenia semiempiryczne różnych kompleksów gossypolu wykazały, że formy tautomeryczne są zależne od rodzaju kationu. W kompleksach gossypolu z kationami  $\text{Be}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Dy}^{3+}$ ,  $\text{Gd}^{3+}$ ,  $\text{Tb}^{3+}$  i  $\text{Eu}^{3+}$  tworzy się laktolowo-laktolowa forma tautomeryczna [32, 54-56], podczas gdy w kompleksach z kationami  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  i  $\text{Fe}^{3+}$  obserwowana jest wyłącznie ketolowo-ketolowa forma tautomeryczna [32, 56, 57].

Przykładowe struktury kompleksów gossypolu z kationami, które koordynowane są przez atomy tlenu występujących w dwóch formach tautomerycznych są pokazane na Schematach 4 i 5.



Schemat 4



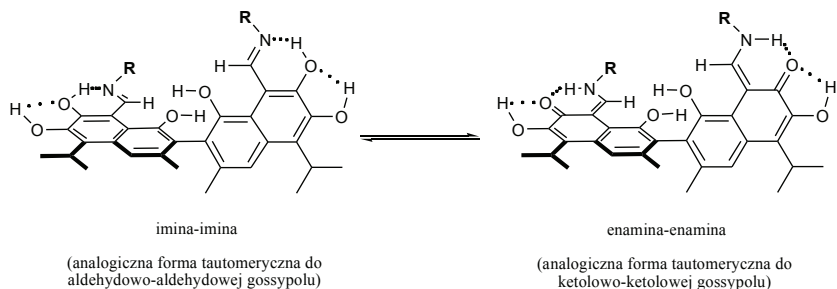
Schemat 5

Ze względu na obecność w cząsteczce gossypolu dwóch grup aldehydowych i sześciu grup hydroksylowych może on ulegać szeregu reakcjom: utleniania, redukcji, dehydratacji, halogenacji lub tworzenia eterów, estrów, pochodnych siarkowych, pochodnych azotowych, nitryli, hydrazonów i zasad Schiffa [58]. Bogata chemia gossypolu i jego wyjątkowo szeroka aktywność biologiczna zainspirowała wiele grup badawczych na świecie do syntezy i badań różnych pochodnych gossypolu w celu obniżenia jego toksyczności z równoczesnym zachowaniem jego ważnych aktywności biologicznych. Najważniejszymi i najczęściej badanymi pochodnymi gossypolu są jego zasady Schiffa.



## 2. Zasady Schiffa gossypolu

Toksyczność gossypolu jest związana z obecnością dwóch grup aldehydowych w jego cząsteczce [60, 112-117]. Transformacja gossypolu w zasady Schiffa jest dogodną metodą obniżania jego toksyczności. Otrzymane i badane do tej pory zasady Schiffa gossypolu są pokazane na Schematach 8 i 9. Zasady Schiffa gossypolu analogicznie do samego gossypolu mogą występować w różnych formach tautomerycznych (Schemat 6). Enamino-enaminowa forma tautomeryczna występuje w czystych zasadach Schiffa [60, 67, 69, 75, 76, 78-81, 89, 90, 104, 107, 105, 108, 120-122] oraz w ich kompleksach z jednowartościowymi jonami metali [123-132], podczas gdy imino-iminowe formy tautomeryczne są obecne w protonowanych formach zasad Schiffa [123, 125, 128, 129, 131, 132].



Schemat 6

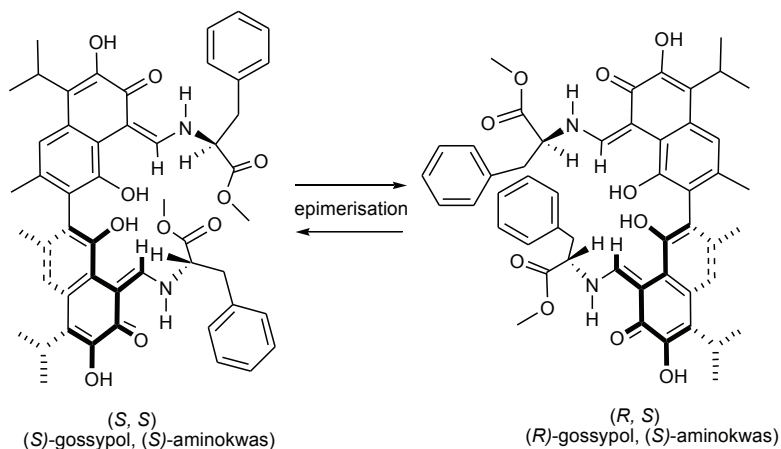
Szczególną właściwością charakteryzują się zasady Schiffa gossypolu otrzymane z L-aminokwasów. Ulegają one powolnej foto-epimeryzacji w obecności rozproszonego światła (Schemat 7) [78, 79]. Wykazano, że czysta diastereoizomeryczna zasada Schiffa gossypolu może ulegać transformacji w mieszaninę obu izomerów lub równo-molową mieszaninę dwóch diastereoizomerów lub w jeden z nich. Ta właściwość tych pochodnych gossypolu jest szczególnie ważna ze względu na aktywność biologiczną, ponieważ najczęściej aktywność biologiczna formy (*R*)-gossypolu jest wyższa niż formy (*S*)-gossypolu i racematu.

W warunkach fizjologicznych gossypol chętnie wiąże się kowalencyjnie z białkami mikrosomalnymi z utworzeniem labilnych zasad Schiffa, co wpływa na metabolizm steroidów i kwasów tłuszczowych [133]. Gossypol jest także inhibitorem kompetycyjnym niektórych enzymów np. pepsyny. Duża stabilność kompleksu gossypol - pepsynogen wynika z tworzenia stabilnych zasad Schiffa pomiędzy grupami aldehydowymi gossypolu i grupami aminowymi Lys(18) i Lys(358) pepsynogenu [134].

Wiele uwagi poświęcono właściwości gossypolu do inhibitowania ludzkiej

spermatogenezy, a także wpływu na reprodukcyjność zwierząt [135-144]. Analogicznie niektóre zasady Schiffa zawierające podstawniki (50-52) alifatyczne mają wpływ na zmniejszenie się ruchliwości męskich plemników [84]. Najsilniejszy wpływ inhibujący zaobserwowano dla pochodnej charakteryzującej się najdłuższym łańcuchem alkilowym (52).

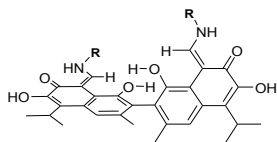
Pochodne gossypolu **50-52** wywierają niekorzystny wpływ na receptorowe białka w błonach komórkowych TM4, a także zaburzają funkcje mitochondriów [83].



Schemat 7

Generalnie gossypol posiada wysoką aktywność antynowotworową w przypadku człowieka i zwierząt [145-149]. Groundwater i współpracownicy przetestowali cytotoksyczność pojedynczej (asymetrycznej) i podwójnej (symetrycznej) zasady Schiffa gossypolu z estrem metylowym L-Phe (**40**) na komórkach zawierających raka skóry (SK-mel-19), szyjki macicy (Sihas), małych komórek płucnych (H69) a także leukemii (K562) [119]. Porównanie aktywności biologicznej zasad Schiffa (**40**) i gossypolu wykazało, że podwójna zasada Schiffa jest najmniej aktywna, a pojedyncza zasada Schiffa jest tak aktywna jak najbardziej aktywny enancjomer gossypolu. Cztery inne zasady Schiffa gossypolu (**3-5**, **14**) były testowane przeciwko rozprzestrzenianiu się komórek nowotworowych (MCF-7, MCF-7adr) raka piersi [62]. Tylko związek **14** charakteryzował się aktywnością przeciwnowotworową porównywalną z aktywnością (R)-(-) gossypolu.

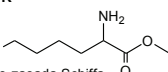
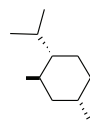

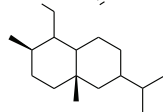
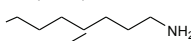

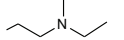
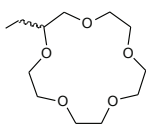
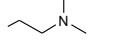
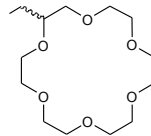
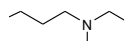
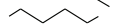
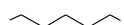
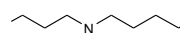
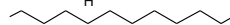




Aktywność biologiczna zasad Schiffa i innych aza-pochodnych fenoli



Pochodna	R =	Ref.	Pochodna	R =	Ref.
1	-H	[59]	27		[71]
2	-CH <sub>3</sub>	[60, 61]	28		[71]
3		[60, 61, 62, 63, 64]	29		[71]
4		[60, 61, 62, 65, 66]	30		[68]
5		[60, 61, 62, 65, 67]	31		[73, 74]
6		[60, 61, 63]	32		[24, 65]
7		[60, 61, 65]	33		[64]
8		[60, 61]	34		[75]
9		[63, 68]	35		[76]
10		[60, 61]	36		[75]
11		[63]	37		[75]
12		[63]	38		[77]
13		[63]	39		[62]
14		[60, 61, 62, 65]	40		[24, 78, 79, 80]
15		[60, 61, 65]	41		[24, 78]
16		[60]	41b		[154]
17		[61]	42		[78]
18		[64]	43		[81]
19		[65]	44		[24]
20		[64, 69]	45		[24]
21		[70]	46		[77]
22		[71]			
23		[71]			
24		[65]			
25		[65, 70, 72]			
26		[71]			

Schemat 8

## Materiały supramolekularne

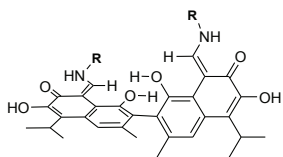
Pochodna	R =	Ref.	Pochodna	R =	Ref.
47		[62]	61		[24]
	(mono-zasada Schiffa)				
48		[82]	62		[71]
49		[77]	63		[89]
50		[64, 83, 84, 85]	64		[90]
51		[83, 84]	65		[90]
52		[83, 84, 86]			
53		[82]			
54		[82]			
55		[82]			
56		[68]			
57		[71]			
58		[87]			
59		[87, 88]			
60		[71]			

cd. Schemat 8

Benz i współpracownicy sugerowali, że izolacja enancjomerów związku **14** i dalsza modyfikacja gossypolonu izo-propyloaminą może prowadzić do nowej generacji analogów gossypolu o podwyższonej aktywności antynowotworowej. Zasady Schiffa **3-5** posiadają tylko niewielką aktywność inhibicyjną na wzrost komórek nowotworowych. Związek **5** posiada najwyższą aktywność przeciw komórkom HBL-100 i MCF-7.

Dao i współpracownicy badali aktywność różnych zasad Schiffa (**2-8, 10, 14-16, 40, 125**) przeciw komórkom nowotworowym KB [60]. Otrzymane przez nich wyniki były zgodne z tymi otrzymanymi przez Benz'a [62]. Dao zasugerował, że aktywność przeciwnowotworowa zasad Schiffa gossypolu zależy od dostępności atomów tlenu grup fenolowych a także od struktury podstawników w części aminowej. Zauważył, że z wydłużaniem łańcuchów alkilowych zasad Schiffa aktywność wobec komórek KB malała. Najbardziej efektywnymi zasadami okazały się te z podstawnikiem etylowym i propylowym.

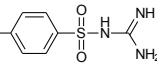
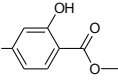
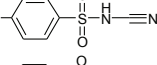
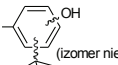
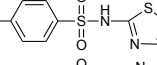
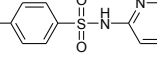
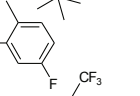
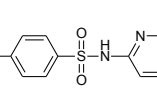
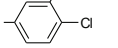
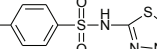

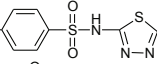

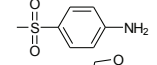

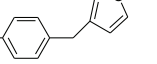

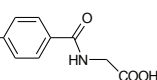

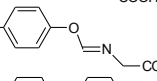

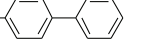

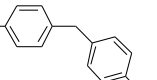

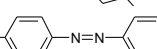

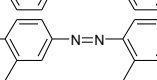

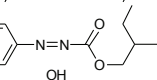

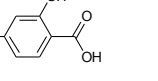




Aktywność biologiczna zasad Schiffa i innych aza-pochodnych fenoli



Pochodna	R =	Ref.	Pochodna	R =	Ref.
66		[66, 70]	83		[65]
67		[71]	84		[91]
68		[71]	85		[65, 66]
69		[91]	86		[65]
70		[92]	87		[94]
71		[92]	88		[94]
72		[92]	89		(mono zasada Schiffa) [91]
73		[91]	90		(di zasada Schiffa) [91]
74		[65]	91		[91]
75		[93]	92		[91]
76		[91, 92, 93]	93		(mono zasada Schiffa) [96]
77		[91, 92, 93]	94		(di zasada Schiffa) [97]
78		[91, 92, 93]	95		[98]
79		[65]	96		[98]
80		[85, 92]	97		[70]
81		[64]	98		[64]
82		[94, 95]	99		[85, 92]


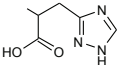


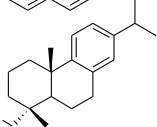

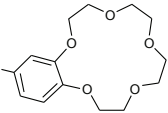

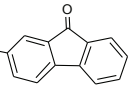

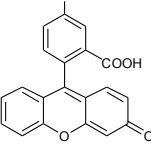

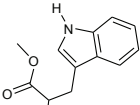

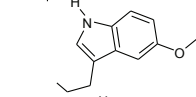
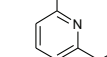


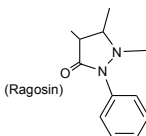




Schemat 9

## Materiały supramolekularne

Pochodna	R =	Ref.	Pochodna	R =	Ref.
100		[85, 92]	117		[65]
101		[85]	118		[71]
102		[85]	(izomer nieokreslony)		
103		[92]	119		[94]
104		[92]	120		[94]
105		[92]	121		[63, 68]
106		[92]	122		[64]
107		[85, 92]	123		[68, 92]
108		[71]	124		[99, 100, 101]
109		[64, 98]	125		[60, 61]
110		[71]	126		[26, 102]
111		[63]	127		[103]
112		[63]	128		[24]
113		[64, 92]	129		[24]
114		[64, 92]	130		[24]
115		[92]	131		[64]
116		[65]	132		[64]
			133		[64]
			134		[64]
			135		[93]

cd. Schemat 9

## Aktywność biologiczna zasad Schiffa i innych aza-pochodnych fenoli

Pochodna	R =	Ref.	Pochodna	R =	Ref.
136		[91]	146		[77]
137		[91]	147		[71]
138		[24]	148		[24]
139		[104]	149		[71]
140		[105]	150		[65, 71]
141		[105]	151		[65, 71]
142		[24, 106]	152		[65, 71]
143		[107, 108]	153		[65]
144		[71]	154		[110, 111]
145		[109]	155		[71]
			156		[71]
			157		[71]
			158		[105]

cd Schemat 9

Poza tym Dao wykrył, że (+)- enancjomer związku **3** jest mniej aktywny przeciw komórkom MCF-7/WT niż (-) enancjomer [150]. Dla porównania, dokładnie odwrotną zależność zaobserwowano dla enancjomerów związku **3** wo-

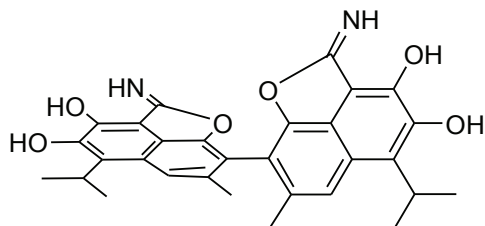
bec komórek MCF-7/ADR.

Gossypol oddziałuje z centrami aktywnymi oksyreduktaz a także wykazuje aktywność antymalaryczną [151]. Aktywność antymalaryczna gossypolu polega głównie na inhibitowaniu dehydrogenazy mleczanowej *Plasmodium falciparum* [152]. Ze względu na toksyczność gossypol nie został jednak wprowadzony jako lek antymalaryczny. Otrzymano w związku z tym serię zasad Schiffa (**2-8**, **10**, **14**, **15**, **17**, **40**, **125**), które testowano pod kątem ich aktywności antymalarycznej wobec szczepów PFB i FCB1 [61]. Wszystkie testowane związki za wyjątkiem związku **6** okazały się być aktywnymi wobec tych dwóch szczepów. Najwyższą aktywność wobec szczepów PFB i FCB1, odpornych na chlorochininę, wykazywały związki **4** i **14**, podczas gdy pochodne **40** i **125** były mniej aktywne. Zasady Schiffa gossypolu z podstawnikami butylowymi i dłuższymi niż butylowe posiadają niższą aktywność wobec tych dwóch szczepów. Obserwacje te wskazują, że nawet niewielkie modyfikacje strukturalne zasad Schiffa gossypolu mogą mieć znaczący wpływ na aktywność antymalaryczną.

Gossypol jest bardziej aktywny przeciwko komórkom czerniaka skóry niż *cis*-platyna, melfalan i dakarbazyna [153]. Dodou i współpracownicy badali aktywność przeciwwzrostową i antyutleniającą zasad Schiffa z estrami (*S*) i (*R*)-aminokwasów (**40**, **41**, **41b**, **143**) aby znaleźć aktywne związki przeciwko łuszczycy [154] i wykazali dla pochodnej z tyrozyną jego większą aktywność w porównaniu z (-) gossypolem. Jednakże inhibitowanie wzrostu komórek HPV-16 przez zasady Schiffa okazało się słabsze w porównaniu z (-)-gossypolem. Najbardziej aktywne okazały się diastereoizomery zasady Schiffa **41b**.

Studia biologiczne wykazały także aktywność gossypolu skierowaną przeciwko wirusom [117, 155-162]. Warto zaznaczyć, że (-)-gossypol wykazuje aktywność przeciwko wirusom HIV-1, chociaż mechanizm jego działania nie został jeszcze w pełni wyjaśniony. Między innymi sugeruje się, że gossypol może inhibitować odwrotną transkryptazę [155, 158, 159]. Bourinbair i Lee-Huang przeprowadzili porównawcze badania *in vitro* dla takich związków jak: gramicydyna, nonoxynol-9 i gossypol na aktywność przeciw wirusowi HIV [161]. Wyniki pokazały, że wszystkie związki charakteryzowały się silną aktywnością antywirusową przy czym aktywność gramicydyny była najsilniejsza. Royer i współpracownicy zasugerowali, że pochodna iminowa gossypolu, taka jak iminolaktonu gossypolu (GIL) (Schemat **10**) jest aktywna przeciw wirusom HIV-1 lecz nie inhibituje odwrotnej transkryptazy tak jak AZT i gossypol [156]. Antywirusowa aktywność GIL może być związana z budową wirusa i komórkami gospodarza, a jego niższa toksyczność w porównaniu z gossypolem stwarza możliwość rozwinięcia środków terapeutycznych przeciw wirusom HIV, po raz pierwszy bazujących na związkach polifenolowych.





**GIL** - iminolakton gossypolu

Schemat 10

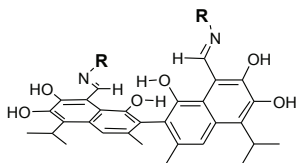
Rezhepov i współpracownicy badali wpływ interferonu na wzrost aktywności różnych zasad Schiffa gossypolu (: **66**, **70-72**, **76-78**, **98-100**, **102**, **103** + *ortho* i *para* isomery, **104**) [121, 163] i stwierdzili, że ważną rolę odgrywa amina powiązana z cząsteczką gossypolu. Generalnie proste pochodne aromatyczne jak **66**, **70-72**, **76-78** [121] nie wykazują praktycznie aktywności, podczas gdy zasady Schiffa zawierające grupy siarczanowe lub heterocykliczne podstawniki były aktywowane interferonem.

Mimo otrzymania wielu zasad Schiffa gossypolu aktywność biologiczna była testowana dla niewielkiej liczby związków. Stanowią one jednak poważną grupę nowoczesnych terapeutyków, ze względu na szerokie spektrum ich aktywności biologicznej i ich bardzo małą toksyczność.

### 3. Hydrazony gossypolu

Otrzymano szereg hydrazonów gossypolu (Schemat 11), które zostały przetestowane pod kątem ich aktywności biologicznej. Liczba tych pochodnych jest jednak niezmiernie mała w porównaniu z zasadami Schiffa. Jest to związane z kłopotliwym otrzymywaniem czystych związków a także ograniczonym dostępem do odpowiednich hydrazyn jako substratów. Poza tym hydrazony gossypolu są trudno rozpuszczalne w rozpuszczalnikach organicznych, co dodatkowo utrudnia badania ich aktywności biologicznej. Badania *in vivo* aktywności pochodnych gossypolu zawierających N-alkilo-N-amino-piperazynę na szczurach (**165**, **167**) wykazały, że nie mają one w przeciwieństwie do gossypolu wpływu na procesy spermatogenezy [118]. Do podobnego wniosku doszli Sonenberg i współpracownicy badając związki **166** i **168** [88].

Materiały supramolekularne



Pochodna	R =	Ref.	Pochodna	R =	Ref.
159		[96]	170		[164]
160		[169]	171		[164]
161		[170]	172		[110, 111]
162		[171]	173		[71]
163		[172]	174		[71]
164		[164]	175		[71, 77]
165		[118]	176		[107]
166		[88]	177		[175]
167		[118]	178		[173]
168		[88]	179		[85]
169		[71]	180		[174]

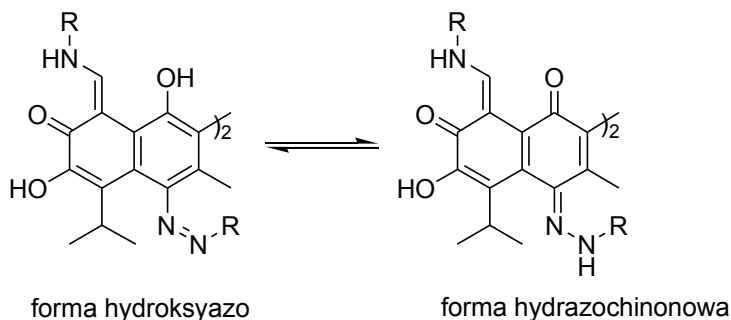
Schemat 11

Auelbekov i współpracownicy wykazali, że niektóre pochodne piperydynamy gossypolu (**164**, **170**, **171**) wykazują aktywność antywirusową [164].

Aromatyczna pochodna gossypolu otrzymana z pentafluorofenylohydrazy (175) okazała się być niespecyficznym inhibitorem acetylocholinoesterazy [165]. Ci sami autorzy wykazali także, że odpowiednie pochodne z podstawnikami alifatycznymi i aromatycznymi (zasady Schiffa i hydrazoney) posiadają podobne właściwości.

#### 4. Pochodne azowe gossypolu

Najlepiej przebadana grupa pochodnych azowych gossypolu zawiera ugrupowania azowe w położeniach 4, 4' i 11, 11'. Związki te zostały otrzymane przez kondensację gossypolu z solami diazoniowymi. Związki podstawione grupami azowymi w pozycjach 4, 4' i 11, 11' mogą być rozpatrywane jako pochodne gossypolonu - utlenionej formy gossypolu, ponieważ Baram i współpracownicy [166] stwierdzili, że mogą one występować w dwóch formach tautomerycznych, tj. w formach hydroksyazowej i hydrazoquinonowej (Schemat 12).

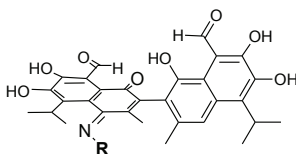


Schemat 12

Kilka związków z podstawnikami aromatycznymi (Schematy 13-16) zostały otrzymane przez Rezhepov'a, Baram'a i współpracowników [121, 163, 166-168]. Autorzy ci wykazali, że wpływ tych związków na modulację immunologiczną indukowaną interferonem (IA) zależy od liczby i rodzaju podstawników i ich pozycji (*o*-, *m*-, *p*-) w cząsteczce.

W przypadku izomerycznych kwasów aminobenzoesowych *o*-izomer okazał się immunostymulatorem, *m*-izomer immunosupresorem, a aktywność izomeru *para* pozostawała na poziomie kontrolnym. Wskazuje to, że odpowiedź immunologiczna na różne związki jest niezmiernie skomplikowana i zależy od liczby wolnych grup hydroksylowych w cząsteczce gossypolu i od położe-

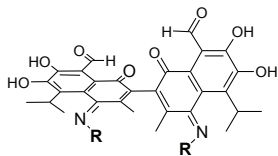
nia podstawnika. W innej pracy ci sami autorzy [168] wykazali, że aktywność związków, pokazanych na Schematach. **13**, **14**, **16**, do indukowana interferonu (IA) zależy nie tylko od natury komponentu aminowego ale także od miejsca jego podstawienia. Związki otrzymane przez kondensację z grupa aldehydową były zdecydowanie mniej aktywne niż te postawione w pozycji C4. Najbardziej aktywnymi związkami okazały się te, które zostały pokazane na Schemacie **16**, szczególnie związki 221, 222 i 226. Generalnie jednak można stwierdzić, że ze wzrostem liczby podstawników wzrasta także aktywność biologiczna pochodnych gossypolu. Warto zaznaczyć, że większość tych związków była syntezowana z przeznaczeniem jako organiczne barwniki.



Pochodna	R =	Ref.	Pochodna	R =	Ref.
181		[166]	184		[166]
182		[166]	185		[166]
183		[166]			

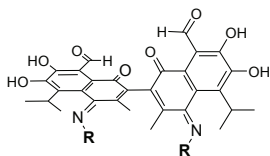
Schemat 13

Aktywność biologiczna zasad Schiffa i innych aza-pochodnych fenoli



Pochodna	R =	Ref.	Pochodna	R =	Ref.
186		[121, 166-168]	196		[163]
187		[121, 168]	197		[163, 166, 167]
188		[121, 168]	198		[163]
189		[121, 168]	199		[163]
190		[121, 168]	200		[163, 166, 167]
191		[121, 168]	201		[163, 166, 167]
192		[121, 168]	202		[166, 167]
193		[163, 166, 167]	203		[166, 167]
194		[163]	204		[166, 167]
195		[163, 166, 167]	205		[166, 167]

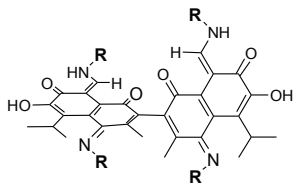
Schemat 14



Pochodna	R =	Ref.	Pochodna	R =	Ref.
206		[166, 167]	209		[163, 166, 167]
207		[166, 167]	210		[166, 167]
208		[166, 167]			

Schemat 15

## Aktywność biologiczna zasad Schiffa i innych aza-pochodnych fenoli



Pochodna	R =	Ref.	Pochodna	R =	Ref.
211		[121, 168]	220		[163]
212		[121, 168]	221		[163]
213		[121, 168]	222		[163]
214		[121, 168]	223		[163]
215		[121, 168]	224		[163]
216		[121, 168]	225		[163]
217		[121, 168]	226		[163]
218		[163]	227		[163]
219		[163]			

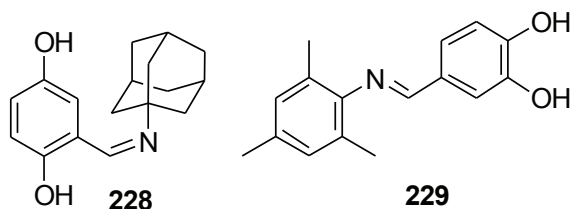
Schemat 16

### 5. Zasady Schiffa jako inhibitory lipooksygenazy

W ostatnich latach udało się wykazać efektywną rolę niektórych zasad Schiffa jako środków przeciwzapalnych a także inhibitorów lipooksygenazy.

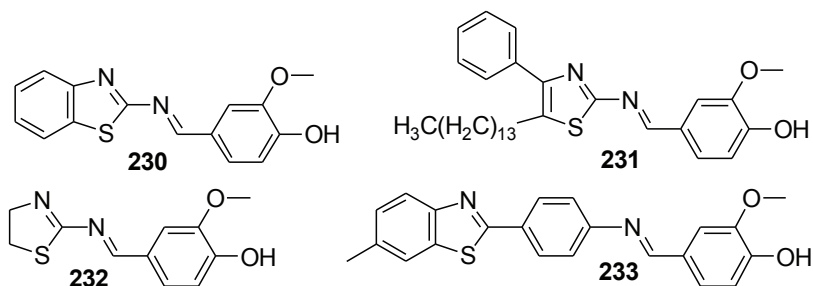
Lipooksygenazy są enzymami zawierającymi jony żelaza i zdolnymi do utleniania nienasyconych kwasów tłuszczowych z utworzeniem peroksydów. Lipooksygenaza działa pośrednio poprzez leukotrieny i lipoksyny, wywołując pośrednio takie procesy jak: skurcz oskrzeli, wzrost przepuszczalności naczyń krwionośnych, chemotaksja i aktywacja leukocytów, regulacja procesów immunologicznych, a także mają udział w reakcjach nadwrażliwości bezpośredniej (alergie). Lipooksygenaza jest pojedynczym łańcuchem polipeptydowym o masie 75–80 kDa w przypadku zwierząt i 94–104 kDa w przypadku roślin. Lipooksygenazy ssaków biorą udział w chorobotwórczych stanach takich jak artretyzm, łuszczyca czy astma oskrzelowa. Istnieje także podejrzenie, że lipooksygenazy odgrywają pewną rolę w miażdżycy, w procesach mózgowych, zakażeniach HIV i chorobach nerek [176-179].

Oxphaman [1-(2,5-dihydroksybenzylideno)aminoadamantan] (**228**) and Oxphalin [1-3,4-dihydroksybenzylideno)-2,4,6-trimetylonilina] (**229**) (Schemat 17) należą do silnych inhibitorów lipooksygenaz oraz cyklooksygenaz. Wykazują one także działania przeciwzapalne [180-182].



Schemat 17

W 2003 roku Gerionikaki i współpracownicy otrzymali nowe tiazolilo, tiazolinilo i benzotiazolilo zasady Schffa (związki: **230-233**, Schemat 18), które okazały się inhibitorami lipooksygenaz soi [183].



Schemat 18



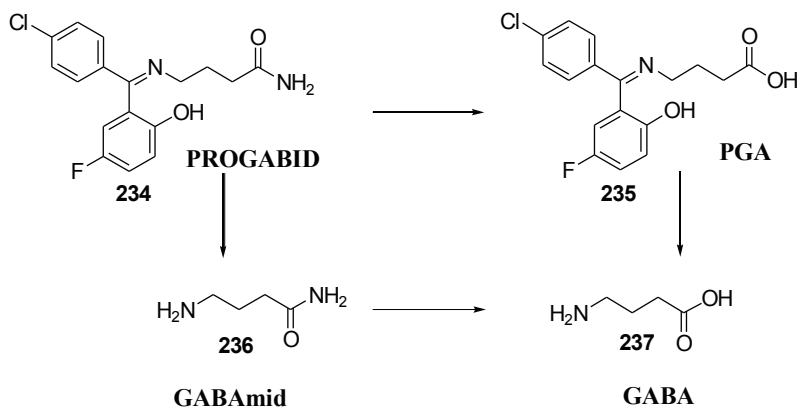
## 6. Zasady Schiffa jako gabamimetyki

4-[(4-chlorofenylo)-(5-fluoro-2-hydroksyfenylo)-metylideno]aminobutyloamid (Progabid) (**234**) i sól sodowa kwasu 4-[(4-chlorofenylo)-(5-fluoro-2-hydroksyfenylo)-metylideno]-butanowego (PGA) (**235**) należą do związków znanych jako substraty leków typu GABA (kwas  $\gamma$ -aminobutanowy) (Schemat **19**) [184]. Sam GABA jest głównym inhibitorem neurotransmiterów mózgu. Jest on zaangażowany w neurotransmisji w 20-50 % synaps mózgu w szczególności w między-neuronowych obwodach mózgowych struktur. Gdy stężenie GABA zmniejsza się poniżej pewnego granicznego poziomu, to mogą pojawiać się stany napadowe i różne choroby neurologiczne. GABA jest uznawany jako naturalny czynnik uspakajający i antyepileptyczny. Ponieważ GABA nie jest wydajnie transportowany z krwioobiegu do mózgu, to musi on być tam syntezowany [187].

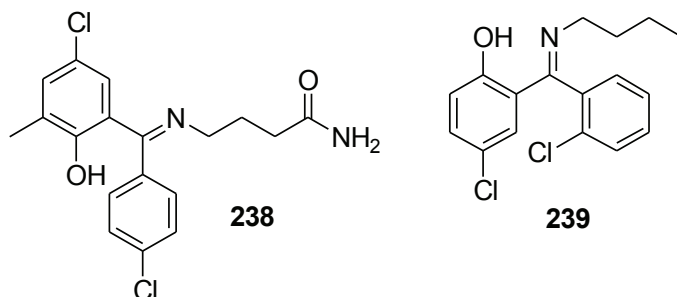
Progabid jest zasadą Schiffa utworzoną z amidowej pochodnej GABA i ketonu 4-chlorofenylo-5-fluoro-2-hydroksyfenylowego. Obecność tego podstawnika ułatwia transport GABA poprzez barierę krew - mózg. W mózgu progabid jest przemieniany w metabolit kwasowy (PGA), GABAmid (**236**) i GABA (**237**) (Schemat **19**). PGA posiada takie właściwości farmakologiczne jak pozostałe związki [184-186]. Progabid wykazuje aktywność antyepileptyczną, antykonwulsyjną i dyskinetyczną [184-186, 199-204].

Tolgabid (**238**) posiada strukturę i właściwości biologiczne analogiczne do progabidu i jest nowym związkiem anty-dyskinetycznym (gabamimetyk) (Schemat **20**) [205-206].

Fengabin (**239**) jest zasadą Schiffa o działaniu antydepresyjnym (Schemat **20**) [207-210].



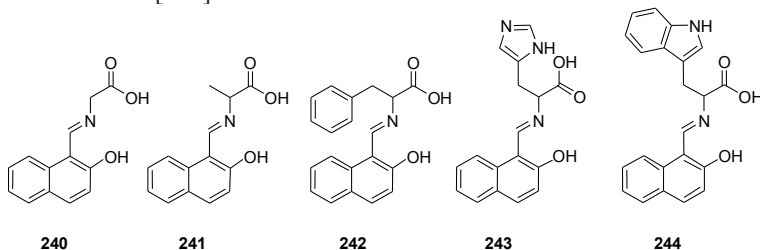
Schemat 19



Schemat 20

### 7. Nowe zasady Schiffa fenoli i ich właściwości antybakteryjne

Sakiyan i współpracownicy opisali syntezę i antybakteryjne właściwości kilku N-(2-hydroksy-1-naftalideno)-aminokwasów (związki: **240-244**) (Schemat **21**), które okazy się być inhibitorami bakterii Gram-dodatnich (*Staphylococcus aureus* i *Bacillus polymyxa*) i Gram-ujemne (*Escherichia coli*) i grzybów *Candida albicans* [211].

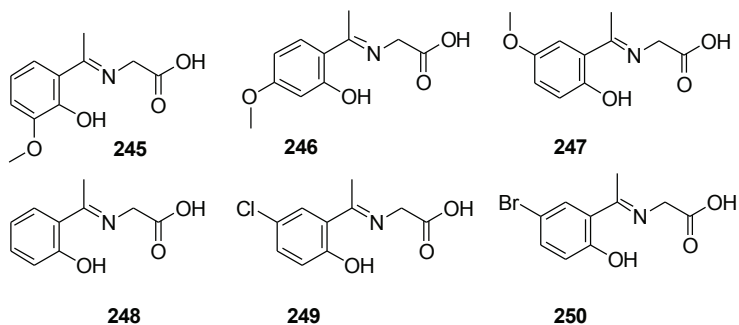


Schemat 21

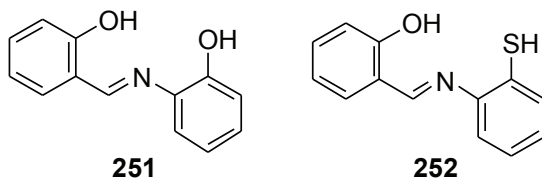
Ligandy zasad Schiffa otrzymanych z glicyny a także *o*-hydroksyaceto-fenonu (związki: **245-250**), a także ich kompleksy z palladem(II) i platyną(II) posiadają właściwości cytotoksyczne *in vitro* wobec komórek nowotworów *Ehrlich ascites*, chociaż jak zauważono aktywność tych związków zwiększa się gdy zastosować je *in vivo* (Schemat **22**) [212].

Zasady Schiffa otrzymane na bazie aldehydu salicylowego i *orto*-amino-fenolu a także *orto*-aminotiofenolu (**251-252**) i ich kompleksy testowano szeroko *in vitro* przeciw bakteriom *Escherichia coli*, *Bacillus sp.* i *Pseudomonas sp* (Schemat **23**) [213]. Testy te wykazały, że kompleksy z kationami metali np. z rutenem(II) posiadały lepsze właściwości antybakteryjne niż same ligandy. Poza tym stwierdzono, że wzrost stężenia roztworu silnie zwiększał działanie antybakteryjne.

Aktywność biologiczna zasad Schiffa i innych aza-pochodnych fenoli

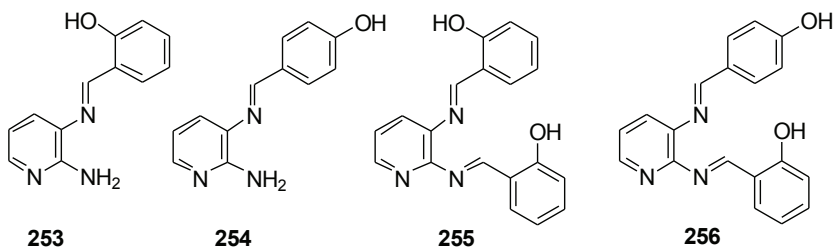


Schemat 22



Schemat 23

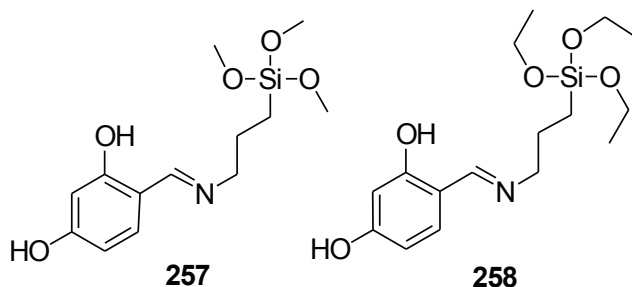
Jeewoth i współpracownicy otrzymali zasady Schiffa w wyniku połączenia 2,3-diaminopirydyny z aldehydem salicylowym i 4-hydroksybenzaldehydem a także mieszanej zasady (związki: **253-256**) i poddali je badaniom na ich aktywność antybakteryjną. (Schemat **24**) [214]. Wykazali, że wszystkie te zasady były aktywne wobec *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, a także *Staphylococcus aureus*.



Schemat 24

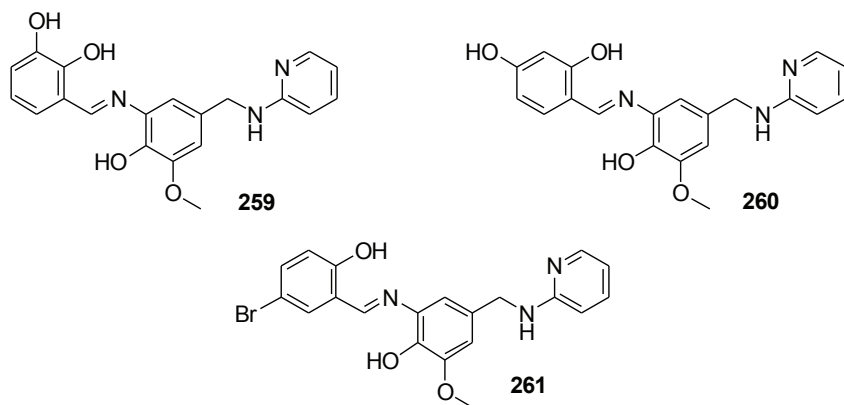
W 2005 roku doniesiono o syntezie nowych zasad Schiffa, których wzory pokazano na Schemacie **25** i oznaczono numerami (**257**) i (**258**). Te zasady Schiffa otrzymano w reakcji 4-dihydroksybenzaldehydu z 3-aminopropyl-

trimetoksysilanem i 3-aminopropylotrietoksy-silanem [215]. Wykazano, że zarówno te zasady jak i ich kompleksy z metalami ciężkimi posiadają właściwości antygrzybicze przeciw *Rhodotorula rubra* MC 12, *Kluyveromyces merxianus*, *Aspergillus fumigatus* i *Mucor pusillus*.



Schemat 25

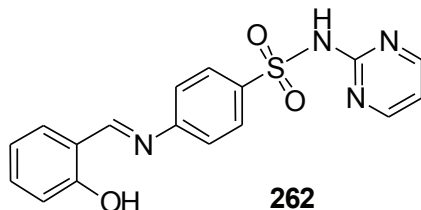
Trzy nowe zasady Schiffa otrzymane z aldehydu 3-hydroksyalicylowego, 4-hydroksyalicylowego i 5-bromosalicylowego z nową aminą N-(pirydylo)-2-hydroksy-3-metoksy-5-aminobenzylaminą zostały otrzymane przez Tümera i współpracowników w 1999 roku (związki: **259-261**, Schemat **26**). Okazało się że one wszystkie hamują wzrost dwóch kultur bakteryjnych, a mianowicie *Bacillus subtilis* IMG 22 i *Micrococcus luteus* LA 297 [216].



Schemat 26

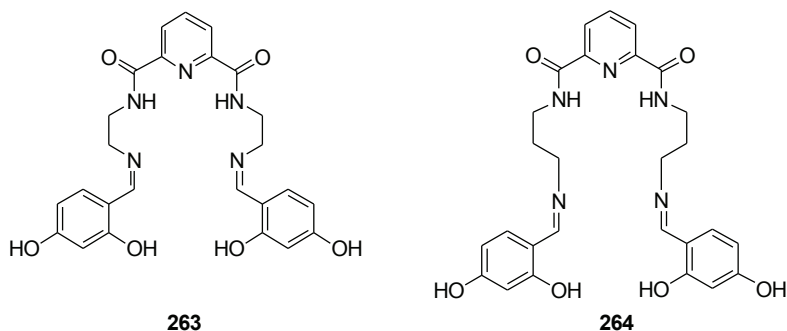
W El-Baradie w 2005 roku otrzymał zasadę Schiffa z wykorzystaniem al-

dehydu salicylowego i leku sulfamidowego – sulfadiazyny (**262**, Schemat 27). Związek ten wykazywał aktywność zarówno przeciw bakteriom Gram dodatnim (*Staphylococcus aureus* i *Bacillus subtilis*) jak i Gram ujemnym (*Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*) [217].



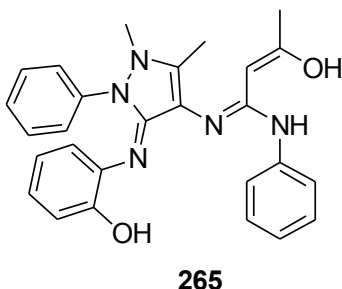
Schemat 27

Nowe zasady Schiffa opisane wzorami (**263**, **264**) wykazywały także aktywność przeciwko *Staphylococcus aureus* (Schemat 28) [218].



Schemat 28

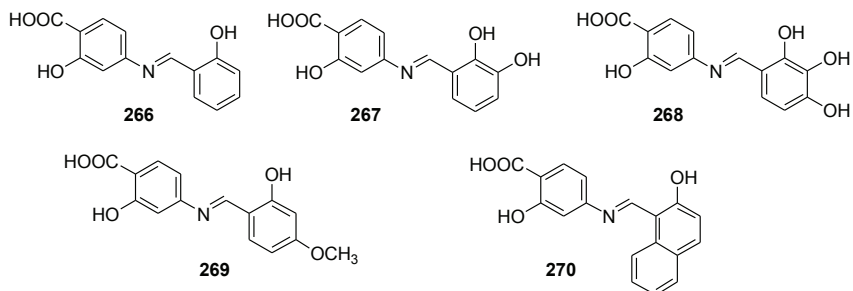
Natarajan Raman i współpracownicy opisali syntezę kompleksów nowej zasady Schiffa z metalami przejściowymi (II) a także ich właściwości redox i antybakteryjne (**265**, Schemat 29). Badania antybakteryjne *in vitro* tego związku prowadzono dla *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa*, a także grzybów *Aspergillus niger* i *Rhizoctonia bataicola*. Autorzy wykazali, że chelaty metali posiadały zdecydowanie wyższą aktywność w porównaniu z samymi ligandami [219].



Schemat 29

J. Patole i współpracownicy opisali syntezę nowych zasad Schiffa z wykorzystaniem kwasu *p*-aminosalicylowego (związki: **266-270**) zdolnych do chelataowania kationów metali. Wykazali, że chelaty te wykazują aktywności przeciw *Mycobacterium Smegmatis* i *Mycobacterium bovis* BCG (Schemat **30**) [220].

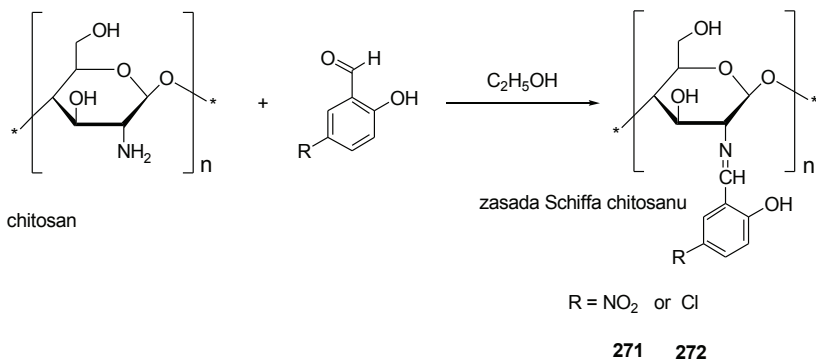
Gruźlica wywołana patogenem *Mycobacterium tuberculosis* jest ciągle jeszcze przyczyną około 3.mln zgonów na świecie rocznie. Taka liczba chorujących osób może w okresie roku powodować dalsze zainfekowania w liczbie do około 9 mln osób PAS (kwas *p*-aminosalicylowy) jest czynnikiem anty-prądkowym używanym w połączeniu z innymi lekami przeciwgruźliczymi [221, 222]. J. Patole i współpracownicy wykryli, że zasady Schiffa otrzymane na bazie kwasu *p*-aminosalicylowego i związki bogate w grupy hydroksylowe wykazują przeciwrądkową aktywność wobec *Mycobacterium smegmatis* i *Mycobacterium bovis* BCG i mogą być użyteczne w rozwoju nowych leków.



Schemat 30

Zasady Schiffa chitosanu i ich aktywność jako anty-oksydantów była badana przez Guo i współpracowników (związki: 271, 272, Schemat 31) [223]. Chitosan jest linowym polimerem  $\beta$ -(1,4)-glukozaaminy tworzonym w wyniku

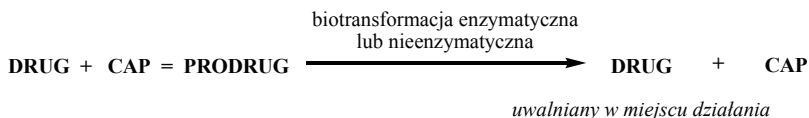
deacylacji chityny. Chitosan poprawia transport polarnych leków przez błony komórkowe, jest biologicznie kompatybilny i podlega biodegradacji. Oczyszczone preparaty chitosanu budzą zainteresowanie w zastosowaniach biomedycznych. Wykazano np. że chitosan i jego pochodne posiadają właściwości antyoksydacyjne [224-227]. Badania zasad Schiffa otrzymanych na bazie chitosanu wykazały, że związki te już takich właściwości nie posiadają. Zanik właściwości antyutleniających jest wynikiem pewnych reorganizacji wiązań wodorowych a także tworzenia wiązań iminowych zamiast grup  $\text{NH}_2$  [223].



Schemat 31

## 8. Pochodne kwasu 5-aminosalicylowego (5-ASA)

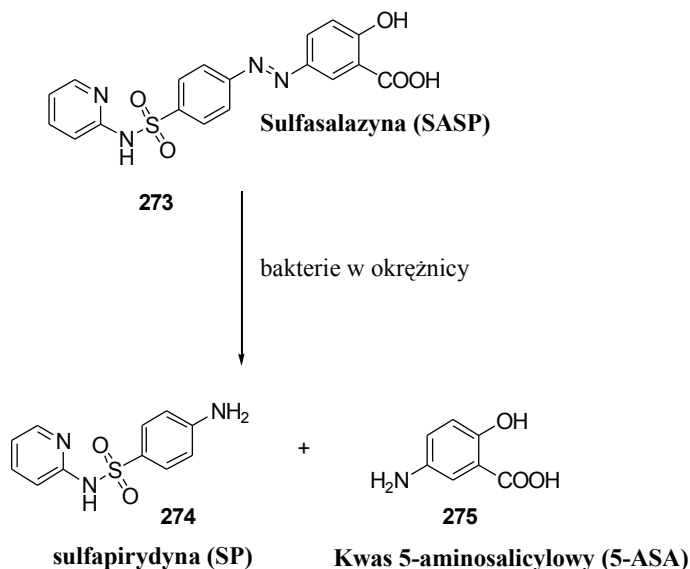
Wiele pochodnych fenoli należy do grupy związków nazywanych prolekami (ang. prodrugs). Albert wraz z współpracownikami jako pierwsi w 1950 roku zaszczyli nową ideę proleków w celu zwiększenia efektywności produkcji leków [228]. Same proleki są nieaktywnymi farmakologicznie pochodnymi leków. Są one projektowane w celu zwiększenia stężenia aktywnych leków w miejscu ich działania poprzez zmianę fizykochemicznych, biofarmaceutycznych i farmakologicznych właściwości leków. Proleki są zamieniane na aktywne leki w organizmach w wyniku enzymatycznych lub nieenzymatycznych reakcji. W idealnym przypadku konwersja proleku w aktywny lek powinna zachodzić zaraz po osiągnięciu miejsca docelowego działania poprzez szybką eliminację grup stosowanych do wytworzenia pochodnych (ang. CAP) bez jakichkolwiek efektów ubocznych w procesie (Schemat 32) [229-230].



Schemat 32

Sulfasalazyna (salazosulfapirydyna, SASP) (**273**, Schemat **33**) została pierwszy raz opisana przez Svartz'a w 1942 roku i zastosowana w leczeniu reumatoidalnego artretyzmu i zapaleń reumatoidalnych [4-8]. SASP kwas [2-hydroksy-5-((4-((2-pirydynyloamino)-sulfonylo)-fenylo)azo-benzoowy)] jest związkiem azowym, w którym sulfapirydyna (SP) (**274**) jest połączona z resztą 5-aminosalicylanową (**275**) poprzez wiązanie azowe. Jest to żółto - brązowy proszek, trudno rozpuszczalny w wodzie i rozcieńczonych w kwasach, a rozpuszczalny w alkaliach i stężonych kwasach [231]. Sulfasalazyna jest lekiem powszechnie używanym w leczeniu schorzeń reumatycznych oraz zapalenia jelit [232-253]. Statystyki pokazują, że w latach 1980–1990 wypisano 4.3 milionów recept na 652 milionów tabletek sulfasalazyny [254].

SASP nie jest wchłaniany w żołądku, ponieważ jest on nierozpuszczalny w słabych kwasach. Do okrężnicy przedostaje się on w niezmienionej formie i tam rozpada się do SP i kwasu 5-aminosalicylowego (5-ASA) na skutek redukcyjnych procesów pod wpływem bakterii [255-259].



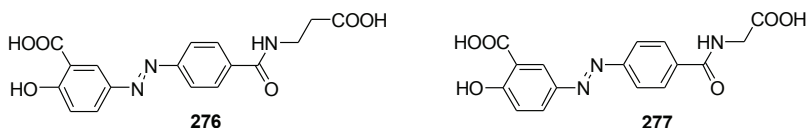
Schemat 33



Sulfasalazyna wykazuje szereg ciężkich efektów ubocznych u około 1/5 liczby pacjentów, takich jak: mdłości, wymioty, złuszczenie skóry, gorączka i dysfunkcje wątrobowe. Do bardziej poważnych efektów ubocznych należy toksyczność pulmonologiczna i zmiany morfologiczne w obrazie krwi.

Wiele badań pokazuje, że aktywnym składnikiem sulfasalazyny jest kwas 5-aminosalicylowy, a nie sulfapyrydyna. Ta ostatnia jest terapeutycznie nieczynna, a poza tym odpowiedzialna za większość niepożądanych efektów ubocznych sulfasalazyny [260-262]. Te badania wskazały na potrzebę opracowania innego składnika dla kwasu 5-ASA, który zastąpi toksyczną sulfapyrydynę. Takie zapotrzebowanie doprowadziło do licznych testów nowych proleków z wiązaniem azowym [263]. Farmakodynamika kwasu 5-aminosalicylowego została szeroko opisana w pracach przeglądowych 260, 261, 263 i 264.

Balsalazyd (Kolazid) (**276**) pokazany na Schemat 34 jest prolekiem metabolizowanym przez bakteryjne azoreduktazy w jelitach prowadząc do uwolnienia terapeutycznego kwasu 5-ASA z jego połączenia z 4-aminobenzoilo- $\beta$ -alaniną (4-ABA) [37, 42-45].



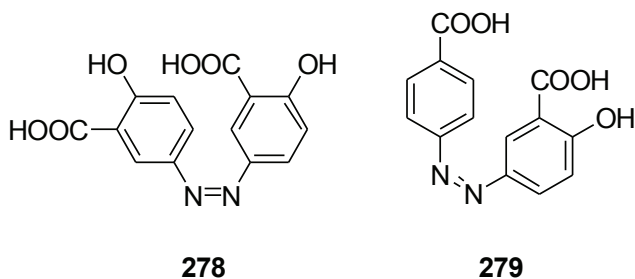
Schemat 34

Wrzodzące zapalenie jelita grubego jest chronicznym stanem zapalnym występującym w około 7 przypadkach na 100000 osób. Typowymi klinicznymi objawami tego schorzenia jest krwawa biegunka z ciągłym parciem na stolec oraz ból brzucha [265, 269-270].

Ipsalazyd (**277**, Schemat 34) posiada podobną strukturę i podobne właściwości antybakteryjne do balsalazydu [263].

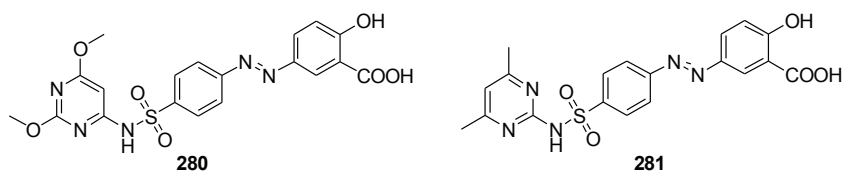
Intersującym prolekiem jest olsalazyna (dipentum<sup>TM</sup>, azodisal) (**278**, Schemat 35) która jest dimerem złożonym z dwóch cząsteczek kwasu 5-ASA połączonych wiązaniem azowym. W okrężnicy wiązanie azowe ulega redukcyjnemu rozerwaniu z wyzwoleniem 5-ASA [270-275].

Analog olsalazyny - kwas salicylo-benzoowy (**279**) wykazuje właściwości antybakteryjne na florę jelit [276-277].



Schemat 35

Salazodimetoksyna (**280**) i salazosulfadimidyna (**281**, Schemat 36) są również pochodnymi kwasu 5-ASA wykazującymi właściwości antybakteryjne [277-280].



Schemat 36

## 9. Barwniki sudanowe jako potencjalnie kancerogenne i mutagenne związki dla człowieka

Barwniki azowe stanowią dużą grupę odczynników chemicznych stosowanych w przemyśle. Nie występują one w przyrodzie lecz są one wyłącznie otrzymywane na drodze syntezy chemicznej. Równocześnie stanowią one ważną grupę związków wykorzystywanych w prostych syntezach. Aktualnie około 2000 różnych barwników azowych jest używanych do barwienia różnych materiałów takich jak tkaniny, skóra, tworzywa sztuczne, kosmetyki i żywność [281]. W organizmach barwniki te są redukowane przez azoreduktazy jelitowych bakterii oraz inne enzymy.

Sudan I (**282**) (Schemat 37) jest czerwonym barwnikiem często używanym do barwienia cieczy, olejów, wosków, benzyny, obuwia i żywności. Sugerowano jego zagrożenie, ponieważ wywołuje on nowotwory wątroby i pęcherza moczowego u szczurów, myszy i królików. Pomimo jego kancerogenności w przypadku gryzoni sudan I został oceniony przez Urząd do Spraw Nowotworów (IARC) jako środek kancerogenny także dla ludzi [82-283]. Sudan I jest metabolizowany *in vivo* na kilku drogach, głównie w wątrobie w wyniku procesów

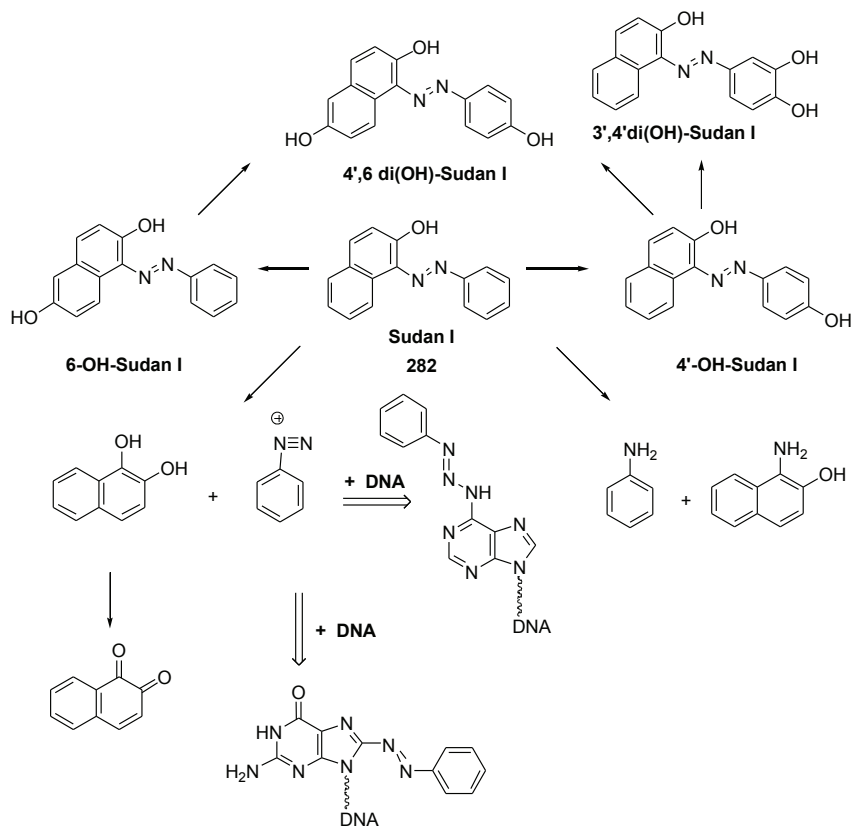
redox prowadząc do pochodnych hydroksylowych w pozycjach 4'-OH 6-OH jako głównych produktów. Poza tym C-hydroksylowane pochodne jako produkty detoksyfikacji w wyniku rozerwania wiązania azowego w Sudanie I reagują jak wykazano *in vitro* z DNA. Główny addukt z DNA został scharakteryzowany jako 8-(fenyloazo) guaninowa pochodna. Sudan I i jego hydroksylowe pochodne mogą być także utleniane pod wpływem peroksydaz prowadząc do adduktów z DNA, RNA i białkami [281, 285-297].

Inne barwniki Sudanowe (sudan II, sudan III i sudan IV, związki: **283-285**) są strukturalnie podobne do sudanu I. Ostatnio w szeregu krajach Uni Europejskiej wykryto obecność sudanów I-IV w sproszkowanej chili importowanej z Indii. Stężenie tych związków wynosiło 2.8 - 3,500 mg / kg sproszkowanej chili. Barwniki te znaleziono także w gotowych produktach spożywczych, w których stosowano chili do poprawy ich kolorystyki. W szczególności wszelkie przekłamanie o niestosowaniu barwników azowych w przemyśle spożywczym może mieć poważne konsekwencje zdrowotne. W Unii Europejskiej istnieje zakaz stosowania sudanów I-IV w przemyśle spożywczym.

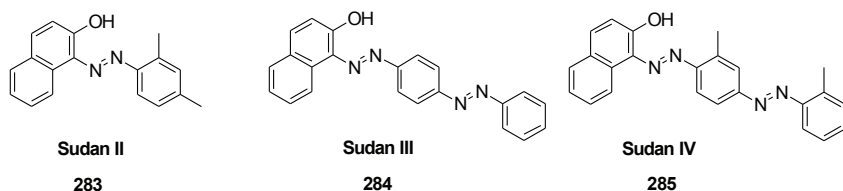
W przypadku chili istnieje podejrzenie, że barwniki Sudanowe zostały użyte do zafalszowania naturalnego produktu, ponieważ cena tej przyprawy zależy głównie od intensywności zabarwienia proszku i stabilności zabarwienia. Warzywa i przyprawy bowiem z czasem tracą swoje naturalne zabarwienie i stają się mniej atrakcyjne dla handlowców.

Barwniki azowe sudany I-IV ulegają w przewodzie pokarmowym rozszczepieniu do amin, z których niektóre zaliczane są do związków kancerogennych (kategoria 2). Podczas redukcji Sudanu I powstają anilina i 1-amino-2-naftol (Schemat 37). Anilina jest zakwalifikowana do związków rakotwórczych (kategoria 3) toksycznych i szkodliwych. Wywołuje ona genotoksyczne efekty *in vitro* i *in vivo*. 1-amino-2-naftol wywołuje mutacje genowe w przypadku *Salmonella typhi* [298]. Podczas redukcji sudanu II powstają 2,4-ksylidyna, zakwalifikowana do kategorii 3 związków kancerogennych, i 1-amino-2-naftol. W wyniku redukcji wiązania azowego Sudanu III tworzy się 4-aminoazobenzen (1-((4-aminofenyl)azo)-2-naftol, anilina i *p*-fenylenodiamina, która sklasyfikowana została do kategorii 3B. W wyniku redukcji sudanu IV powstają *o*-aminoazotoluen, 1-((4-amino-2-metylofenyl)azo)-2-naftol, 1-amino-2-naftol, 2,5-diaminotoluen i *o*-toluidyna. Pierwszy związek jest zakwalifikowany do związków kancerogennych.

Poza tym doniesiono, że sudan I jest związkiem silnie alergizującym i prowadzić może do dermatoz w przypadkach stosowania go do barwienia kosmetyków jak np. w "kumkum" (indyjskim kosmetyku), gdzie jego stężenie wynosi od 2.8 mg/g do 8.7 mg/g [299-300].



Schemat 37



Schemat 38

### Podziękowania:

Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2006-2008 jako projekt badawczy rozwojowy nr R0501601.

**Literatura:**

1. Gallup, W.D. *J. Biol. Chem.* 1928, 77, 437;
2. Clawson, A.J.; Maner, J.H.; Gomez, G.; Mejia, O.; Flores, Z.; Buitrago, J. *J. Anim. Sci.* 1975, 40, 640;
3. Joseph, A.E.A.; Matlin, S.A.; Knox, P. *British J. Cancer* 1986, 54, 511;
4. Gamboa, D.A.; Haq, A.U.; Calhoun, M.C.; Bailey, C.A. *Poult. Sci.* 1997, 76, 80;
5. Lopez, L.M.; Grimes, D.A.; Schulz, K.F. *Obstetrical and Gynecological Survey* 2005, 60, 746;
6. Kovaci, P. *Curr. Med. Chem.* 2003, 10, 2711;
7. Morgan, S.E. *The Veterinary Clinics of North America, Food animal practise* 1989, 5, 252;
8. Longmore, J. *Indian J. Chem.* 1886, 5, 200;
9. Adams, R.; Geissman, T.A.; Edwards, J.D. *Chem. Rev.* 1960, 60, 555;
10. Jaroszewski, J.W.; Strom-Hansen, T.; Hansen, L.L. *Chirality* 1992, 4, 216;
11. Wang, J.M.; Tao, L.; Wu, X.L.; Lin, L.X.; Wu, J.; Wang, M.; Zhang, G.Y. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1992, 95, 277;
12. Wu, D.-F.; Yu, Y.-W.; Tang, Z.-M.; Wang, M.-Z. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 1986, 39, 613;
13. Ford, J.M.; Hait, W.N.; Matlin, S.A.; Benz, C.C. *Cancer Letters* 1991, 56, 85;
14. Gonzales-Garza, M.T.; Matlin, S.A.; Mata-Cardenas, B.D.; Said-Fernandez, S. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 1993, 45, 144;
15. Edwards, J.D. *J. Am. Chem. Soc.* 1958, 80, 3798;
16. Meyers, A.I.; Willemsen, J.J. *Chem. Commun.* 1997, 16, 1573;
17. Meyers, A.I.; Willemsen, J.J. *Tetrahedron* 1998, 54, 10493;
18. Cass, Q.B.; Tiritan, E.; Matlin, S.A.; Freire, E.C. *Phytochemistry* 1991, 30, 2655;
19. Barton, D.H.R.; de Mayo, P. *Quart. Rev.* 1957, 11, 192;
20. Heinstejn, P.F.; Herman, D.L.; Tove, S.B.; Smith, F.H. *J. Biol. Chem.* 1970, 245, 4658;
21. Wang, Y.-H.; Davila-Huerta, G.; Essenberg, M. *Phytochemistry* 2003, 64, 219;
22. Xu, Y.-H.; Wang, J.-W.; Wang, S.; Wang, J.-Y.; Chen, X.-Y. *Plant Physiology* 2004, 135, 507;
23. Matlin, S.A.; Zhou, R.H.; Belenguer, A.; Tyson, R.G.; Brookes, A.N. *Contraception* 1988, 37, 229;
24. Tyson, R. *Chem. Ind.* 1988, 118;

25. Matlin, S.A.; Belenguer, A.; Tyson, R.G.; Brookes, A.N. *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.* 1987, 10, 86;
26. Sampath, D.S.; Balaram, P. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1986, 649;
27. Adams, R.; Morris, R.C.; Geissman, T.A.; Butterbaugh, D.J.; Kirkpatrick, E.C. *J. Am. Chem. Soc.* 1938, 60, 2193;
28. Kamaev, F.G.; Baram, N.I.; Ismailov, A.I.; Leontyev, V.B.; Sadykov, A.S. *Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Khim.* 1979, 1003;
29. Stipanovic, R.D.; Bell, A.A.; Howell, C.R. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1973, 50, 462;
30. Reyes, J.; Wyrick, S.D.; Borriero, L.; Benas, D.J. *Biochem. Biophys. Acta* 1986, 863, 101;
31. Brycki, B.; Brzezinski, B.; Marciniak, B.; Paszyc, S. *Spectroscopic Lett.* 1991, 24, 509;
32. Brzezinski, B.; Marciniak, B.; Paszyc, S.; Zundel, G. *J. Mol. Struct.* 1992, 268, 61;
33. Marciniak, B.; Schroeder, G.; Kozubek, H.; Brzezinski, B. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* 1991, 9, 1359;
34. Brzezinski, B.; Olejnik, J.; Paszyc, S.; Aripov, T.F. *J. Mol. Struct.* 1990, 220, 261;
35. Changfu, X.; Cunheng, H.; Guanghong, B.; Shantian, M. *Scienta Sinica* 1982, B25, 1194;
36. Talipov, S.A.; Ibragimov, B.T.; Dadabaev, B.N.; Aripov, T.F.; Sadykov, A.S. *Khim. Prir. Soed.* 1986, 111;
37. Ibragimov, B.T.; Talipov, S.A.; Dadabaev, B.N.; Nazarov, G.B.; Aripov T.F. *Khim. Prir. Soed.* 1988, 675;
38. Ibragimov, B.T.; Talipov, S.A.; Aripov, T.F.; Sadykov, A.S. *J. Incl. Phenom.* 1990, 8, 323;
39. Ibragimov, B.T.; Gdaniec, M.; Dabaev, B.N. *J. Incl. Phenom.* 1990, 8, 333;
40. Gdaniec, M.; Ibragimov, B.T.; Talipov, S.A. *J. Incl. Phenom.* 1990, 8, 431;
41. Gdaniec, M.; Ibragimov, B.T.; Talipov, S.A. *J. Incl. Phenom.* 1990, 9, 231;
42. Gdaniec, M.; Ibragimov, B.T.; Dabaev, B.N. *Acta Cryst. C* 1990, 46, 810;
43. Dowd, M.K.; Stevens, E.D. *Acta Cryst. C* 2003, 59, 397;
44. Brzezinski, B.; Olejnik, J.; Paszyc, S. *J. Mol. Struct.* 1990, 239, 23;
45. Brzezinski, B.; Paszyc, S.; Zundel, G. *Chem. Phys. Lett.* 1990, 167, 7;
46. Haas, R.H.; Shirley, D.A. *J. Org. Chem.* 1965, 30, 4111;

47. Ramaswamy, H.N.; O'Connor, R.T. *J. Agr. Food Chem.* 1969, 17, 1406;
48. Santos, J.E.P.; Mena, H.; Huber, J.T.; Tarazon, M. *J. Diary. Sci.* 2005, 88, 3563;
49. Achudume, A.C.; Eno, T.L. *Advances in Contraception* 1996, 12, 227;
50. Barraza, M.L.; Coppock, C.E.; Brooks, K.N.; Wilks, D.L.; Saunders, R.G.; Latimer, Jr.G.W. *J. Diary. Sci.* 1991, 74, 3457;
51. Zaidi, R.; Hadi, S.M. *Biochem. Int.* 1992, 28, 1135;
52. Zaidi, R.; Hadi, S.M. *J. Biochem. Toxicol.* 1992, 7, 213;
53. Li, A.S.; Bandy, B.; Tsang, S.S.; Davison, A.J.; *Free Radic. Res.* 2000, 33, 551;
54. Brzezinski, B.; Paszyc, S.; Zundel, G. *J. Mol. Struct.* 1991, 246, 45;
55. Brzezinski, B.; Rozwadowski, J.; Marciniak, B.; Paszyc, S. *J. Mol. Struct.* 1997, 435, 275;
56. Marciniak, B.; Kozubek, H.; Brzezinski, B. *Spectrosc. Lett.* 1991, 24, 1265;
57. Przybylski, P.; Wojciechowski, W.; Brzezinski, B.; Kozubek, H.; Marciniak, B.; Paszyc, S. *J. Mol. Struct.* 2001, 569, 147;
58. Kenar, J.A. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2006, 83, 269;
59. Miller, R.F.; Adams, R. *J. Am. Chem. Soc.* 1937, 59, 1736;
60. Dao, V.T.; Gaspard, C.; Mayer, M.; Werner, G.H.; Nguyen, S.N.; Michelot, R.J. *Eur. J. Med. Chem.* 2000, 35, 805;
61. Razakantoanina, V.; Phung, N.K.P.; Jaureguiberry, G.; *Parasitol. Res.* 2000, 86, 665;
62. Liang, X.S.; Rogers, A.J.; Webber, C.L.; Ormsby, T.J.; Tiritan, M.E.; Matlin, S.A.; Benz, C.C. *Invest. New Drugs* 1995, 13, 181;
63. Shirley, D.A.; Sheehan, W.C. *J. Org. Chem.* 1956, 21, 251;
64. Alley, P.W.; Shirley, D.A. *J. Org. Chem.* 1959, 24, 1534;
65. Correa, O.G.; Cappi, H.M.; Salem, M.; Staffa, C. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1966, 43, 678;
66. Matlin, S.A.; Zhou, R. *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.* 1984, 7, 629;
67. Przybylski, P.; Wojciechowski, G.; Schilf, W.; Brzezinski, B.; Bartl, F. *J. Mol. Struct.* 2003, 646, 161;
68. Kim, I.; Marcelle, G.B.; Waller, D.P.; Cordell, G.A.; Fong, H.H.S. *Contraception* 1987, 35, 289;
69. Przybylski, P.; Małuszyńska, M.; Brzezinski, B. *J. Mol. Struct.* 2005, 750, 152;
70. Baram, N.I.; Biktimirov, L.; Dzhurabekova, S.B.; Kamaev, F.G.; Ismailov, A.I. *Chem. Nat. Comp.* 1991, 27, 309;

71. Ziyaev, Kh. L.; Kamaev, F.G.; Baram, N.I.; Biktimirov, L.; Ismailov, A.I. *Chem. Nat. Comp.* 1997, 33, 545;
72. Baram, N.I.; Ziyaev, Kh. L.; Ismailov, G.A.; Biktimirov, L.; Ismailov, A.I.; Urazmetov, K.G. *Chem. Nat. Comp.* 1988, 24, 547;
73. Hron, R.J.; Kim, Sr.H.H.; Calhoun, M.C.; Fisher, G.S. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1999, 76, 1351;
74. Wu, D.F.; Reidenberg, M.M.; Drayer, D.E. *J. Chromatogr.* 1988, 433, 141;
75. Przybylski, P.; Bartl, F.; Brzezinski, B. *Biopolymers* 2002, 65, 111;
76. Przybylski, P.; Lewandowska, W.; Brzezinski, B.; Bartl, F. *J. Mol. Struct.* 2006, 797 92;
77. Khaitbaev, A.Kh.; Tulyabaev, Z.; Achilova, G. Sh.; Khaitbaev, Kh.Kh.; Auelbekov, S.A.; *Chem. Nat. Compd.* 1995, 31, 33;
78. Fish, R.G.; Groundwater, P.W.; Morgan, J.J.G. *Tetrahedron: Assymetry* 1995, 6, 873;
79. Przybylski, P.; Brzezinski, B. *Biopolymers (Biospectroscopy)* 2002, 67, 61;
80. Przybylski, P.; Schilf, W.; Brzezinski, B. *J. Mol. Struct.* 2005, 734, 123;
81. Przybylski, P.; Schilf, W.; Kamieński, B.; Brzezinski, B.; Bartl, F. *J. Mol. Struct.* 2005, 748, 111;
82. Kunesh, N.; Barbier, M.P.; Dalkafouki, A.; Poisson, J.E. *Ann. Pharm. Fr.* 1990, 48, 1;
83. Tanphaichitr, N.; Fitzgerald, L.M. *Contraception* 1989, 39, 677;
84. Tanphaichitr, N.; Agulnick, A.; Hill, J.A. *Contraception* 1989, 39, 687;
85. Markman, A.L.; Rzhekhin, V.P. *Gossypol and its derivatives*, Izdatel'stvo Pishchevaya Promyshlennost, Moskova [Eng. Translation: Israel Program for Scientific Translations, Jerusalem 1969], Jerusalem 1965;
86. Kong, A.; Zhu, C.; Xue, H.; Wu, G.; Mao, B.; Zhao, S.; Gu, Z. *Zhongguo Yaowu Huaxue Zazhi* 1996, 6, 198;
87. Dalimov, D.N.; Mukhamedzhanova, E.N.; Shneivais, V.B.; Biktimirov, L.; Ismailov, A.I.; Kamaev, F.G. *Chem. Nat. Compd.* 1989, 25, 603;
88. Sonenberg, M.; Huang, J.-T.; Ren, Y.-F.; Su, T.-L.; Watanabe, K.A.; Haspel, H.C.; Corin, R.E.; Hoffer, A.P. *Contraception* 1988, 37, 247;
89. Przybylski, P.; Włodarz, M.; Brzezinski, B.; Bartl, F. *J. Mol. Struct.* 2004, 691, 227;
90. Przybylski, P.; Jasiński, K.; Brzezinski, B.; Bartl, F. *J. Mol. Struct.* 2002, 611, 193;
91. Dechary, J.M.; Brown, L.E.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1956, 33, 76;



92. Baram, N.I.; Kamaev, F.G.; Ziyaev, Kh.L.; Biktimirov, L.; Ismailov, A.I.; Nazarov, G.B.; Ibragimov, B.T. *Chem. Nat. Compd.* 1988, 24, 550;
93. Khaitbaev, A.Kh.; Aslanov, Kh.A.; Auelbekov, S.A.; Khaitbaev, Kh.Kh.; Saiitkulov, S.M. *Chem. Nat. Compd.* 1994, 30, 40;
94. Zhou, X.; Wang, Q.; Ji, J. *Huaxue Xuebao* 1988, 46, 375;
95. Zhou, X.; Wang, Q.; Ji, J. *Huaxue Xuebao* 1986, 44, 357;
96. Karrer, P.; Tobler, E. *Helv. Chim. Acta* 1932, 15, 1204;
97. Adams, R.; Price, C.C.; Dial, W.R. *J. Am. Chem. Soc.* 1938, 60, 2158;
98. Mukhamedzhanova, E.N.; Dalimov, D.N.; Tilyabaev, Z.; Shneivais, V.B.; Kamaev, F.G.; Biktimirov, L.; Ismailov, A.I. *Chem. Nat. Compd.* 1991, 27, 157;
99. Kai, Z.D.; Kang, S.Y.; Ke, M.J.; Jin, Z.; Liang, H.; *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1985, 168;
100. Zheng, D.K.; Si, Y.K.; Meng, J.K.; Huang, L. *Yaoxue Xuebao* 1990, 25, 417;
101. Huang, L.; Zheng, D.K.; Si, Y.K. *J. Ethnopharmacol.* 1987, 20, 13;
102. Yang, W.; Xiang, S. *Sequ* 1995, 13, 264;
103. Zheng, D.K.; Meng, J.K.; Si, Y.K.; Ma, S.Y.; Huang, L. *Yaoxue Xuebao* 1990, 25, 430;
104. Przybylski, P.; Brzezinski, B.; Bartl, F. *J. Mol. Struct.* 2006, 794, 237;
105. Matlin, S.A.; Roshdy, S.; Cass, G.B.; Freitas, C.G.; Longo, R.L.; Malvestiti, I. *J. Brazil. Chem. Soc.* 1990, 1, 128;
106. Strom-Hansen, T.; Cornett, C.; Jaroszewski, J. *Int. J. Pept. Protein Res.* 1989, 34, 306;
107. Przybylski, P.; Bejcar, G.; Huczyński, A.; Schroeder, G.; Brzezinski, B.; Bartl, F. *Biopolymers* 2006, 82, 521;
108. Przybylski, P.; Bejcar, G.; Schilf, W.; Kamiński, B.; Brzezinski, B. *J. Mol. Struct.* 2006 in press MOLSTR 15035;
109. Baram, N.I.; Ziyaev, Kh.L.; Khodzhanizayov, B.; Ismailov, A.I. *Chem. Nat. Compd.* 1999, 35, 29;
110. Adams, R.; Geissman, T.A. *J. Am. Chem. Soc.* 1938, 60, 2163;
111. Adams, R.; Geissman, T.A. *J. Am. Chem. Soc.* 1938, 60, 2166;
112. Vander Jagt, D. L.; Deck, L. M.; Royer, R. E. *Curr. Med. Chem.* 2000, 7, 479;
113. Uzal, F. A.; Puschner, B.; Tahara, J. M.; Nordhausen, R. W. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2005, 17, 626;
114. Lordelo, M. M.; Davis, A. J.; Calhoun, M. C.; Dowd, M. K.; Dale, N. M. *Poultry Sci* 2005, 84, 1376;
115. Aneja, R.; Dass, S. K.; Prakash, S.; Chandra, R. *Artificial Cells, Blood*

- Substitutes and Biotechnology 2004, 32, 159;
116. Qian, S.Z.; Wang, Z.G. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1984, 24, 329;
117. Radloff, R.J.; Deck, L.M.; Royer, R.E.; Vander Jagt, D.L. *Pharmacol. Res. Commun.* 1986, 18, 1063;
118. Huang, J.X.; Zhao, S.X.; Gu, Z.P.; Zhu, Y.Q.; Ji, R.Y. *Shengzhi Yu Biyun* 1986, 6, 48;
119. Shelley, M.D.; Hartley, L.; Groundwater, P.; Fish, R. *Anticancer Drugs* 2000, 11, 209;
120. Quang, T.T.; Nguyen, K.P.P.; Hansen, P.E. *Magnetic Reson. Chem.* 2005, 43, 302;
121. Rezhopov, K.Zh.; Ziyaev, Kh.L.; Baram, N.I.; Kamaev, F.G.; Levkovich, M.G.; Saiitkulov, A.M.; Ismailov, A.I. *Chem. Nat. Compd.* 2003, 39, 358;
122. Przybylski, P.; Ratajczak-Sitarz, M.; Katrusiak, A.; Wojciechowski, G.; Schilf, W.; Brzezinski, B. *J. Mol. Struct.* 2003, 655, 293;
123. Przybylski, P.; Schroeder, G.; Brzezinski, B. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2002, 4, 6137;
124. Przybylski, P.; Schroeder, G.; Brzezinski, B.; Bartl, F. *J. Phys. Org. Chem.* 2003, 16, 289;
125. Przybylski, P.; Brzezinski, B. *J. Mol. Struct.* 2003, 654, 167;
126. Przybylski, P.; Schroeder, G.; Brzezinski, B. *J. Mol. Struct.* 2003, 658, 115;
127. Przybylski, P.; Bejcar, G.; Schroeder, G.; Brzezinski, B. *J. Mol. Struct.* 2003, 654, 245;
128. Przybylski, P.; Schroeder, G.; Pankiewicz, R.; Brzezinski, B.; Bartl, F. *J. Mol. Struct.* 2003, 658, 193;
129. Przybylski, P.; Ilkevych, N.; Schroeder, G.; Brzezinski, B.; Bartl, F. *Biopolymers* 2004, 73, 470;
130. Przybylski, P.; Włodarz, M.; Schroeder, G.; Pankiewicz, R.; Brzezinski, B.; Bartl, F. *J. Mol. Struct.* 2004, 694, 55;
131. Przybylski, P.; Schroeder, G.; Brzezinski, B. *J. Mol. Struct.* 2004, 699, 65;
132. Przybylski, P.; Brzezinski, B.; Bartl, F. *Biopolymers* 2004, 74, 273;
133. Moh, P.P.; Li, P.K.; Darby, M.V.; Brueggemeier, R.W.; Lin, Y.C. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology* 1992, 76, 305;
134. Finlay, T.H.; Dharmgongartama, E.D.; Perlmann, G.E. *J. Biol. Chem.* 1973, 248, 4827;
135. Coutinho, E.M.; Athayde, C.; Atta, G.; Gu, Z.P.; Chen, Z.W.; Sang, G.W.; Emuveyan, E.; Adekunle, A.O.; Mati, J.; Otubu, J.; Reidenberg,

- M.M.; Segal, S.J. *Contraception* 2000, 61, 61;
136. Leung, W.N.; Tso, W.W. *Abstr. Chin. Med.* 1988, 2, 233;
137. Lee, K.J.; Rinchar, J.; Dabrowski, K.; Babiak, I.; Ottobre, J.S.; Christensen, J.E. *Animal Feed Science and Technology* 2006, 126, 93;
138. Coutinho, E.M. *Contraception* 2002, 65, 259;
139. Rinchar, J.; Ciereszko, A.; Dabrowski, K.; Ottobre, J. *Toxicol. Lett.* 2000, 111, 189;
140. Bai, J.P.; Shi, Y.L.; Fang, X.; Shi, Q.X. *Eur. J. Pharmacol.* 2003, 464, 9;
141. Dabrowski, K.; Lee, K.J.; Rinchar, J.; Ciereszko, A.; Blom, J.H.; Ottobre: J.S. *Biochim. Biophys. Acta* 2001, 1525, 37;
142. Santos, J.E.; Villasenor, M.; Robinson, P.H.; DePeters, E.J.; Holmberg, C.A. *J. Dairy Sci.* 2003, 86, 892;
143. Elangovan, A.V.; Tyagi, P.K.; Shrivastav, A.K.; Tyagi, P.K.; Mandal, A.B. *Animal Feed Science and Technology* 2006, 129, 252;
144. Taha, T.A.; Shaaban, W.F.; El-Mahdy, A.R.; El-Nouty, F.D.; Salem, M.H. *Animal Science* 2006, 82, 259;
145. DeBonis, S.; Skoufias, D.A.; Lebeau, L.; Lopez, R.; Robin, G.; Margolis, R.L.; Wade, R.H.; Kozielski, F. *Molecular Cancer Therapeutics* 2004, 3, 1079;
146. Oliver, C.L.; Bauer, J.A.; Wolter, K.G.; Ubell, M.L.; Narayan, A.; O'Connell, K.M.; Fisher, S.G.; Wang, S.; Wu, X.; Ji, M.; Carey, T.E.; Bradford, C.R. *Clinical Cancer Research* 2004, 10, 7757;
147. Rao, P.N.; Yong-Chao, W.; Lotzova, E. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 1985, 15, 20;
148. Jiang, J.; Sugimoto, Y.; Liu, S.; Chang, H.L.; Park, K.Y.; Kulp, S.K.; Lin, Y.C. *Anticancer Res.* 2004, 24, 91;
149. Huang, Y.W.; Wang, L.S.; Chang, H.L.; Ye, W.; Dowd, M.K.; Wan, P.J.; Lin, Y.C. *Anticancer Res.* 2006, 26, 1925;
150. Dao, V.-T.; Dowd, M.K.; Martin, M.-T.; Gaspard, C.; Mayer, M.; Michelot, R.J. *Eur. J. Med. Chem.* 2004, 39, 619;
151. Tripathi, A.K.; Desai, P.V.; Pradhan, A.; Khan, S.I.; Avery, M.A.; Walker, L.A.; Tekwani, B.L. *Eur. J. Biochem.* 2004, 271, 3488;
152. Conners, R.; Schambach, F.; Read, J.; Cameron, A.; Sessions, R.B.; Vivas, L.; Easton, A.; Croft, S.L.; Brady, R.L. *Mol. Biochem. Parasit.* 2005, 142, 137;
153. Blackstaffe, L.; Shelley, M.D.; Fish, R.G. *Melanoma Res.* 1997, 7, 364;
154. Dodou, K.; Anderson, R.J.; Lough, W.J.; Small, D.A.P.; Shelley, M.D.; Groundwater, P.W. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 2005, 13,

- 4228;
155. Lin, T.-S.; Schinazi, R.; Griffith, B.P.; August, E.M.; Eriksson, B.F.H.; Zheng, D.-K.; Huang, L.; Prusoff, W.H. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1989, 33, 2149;
156. Royer, R.E.; Mills, R.G.; Young, S.A.; Vander Jagt, D.L. *Pharmacol. Research* 1995, 31, 49;
157. Prusoff, W.; Lin, T.S.; Pivazyan, A.; Sun, A.S.; Birks, E. *Pharmacology and Therapeutics* 1993, 60, 315;
158. Royer, R.E.; Mills, R.G.; Deck, L.M.; Mertz, G.J.; Vander Jagt, D.L. *Pharmacol. Research* 1991, 24, 407;
159. Wang, H.X.; Ng, T.B. *Planta Medica* 2001, 67, 669;
160. Royer, R.E.; Deck, L.M.; Vander Jagt, T.J.; Martinez, F.J.; Mills, R.G.; Young, S.A.; Vander Jagt, D.L. *J. Med. Chem.* 1995, 38, 2427;
161. Bourinbaiar, A.S.; Lee-Huang, S. *Contraception* 1994, 49, 131;
162. Lin, T.-S.; Schinazi, R.F.; Zhu, J.; Birks, E.; Carbone, R.; Si, Y.; Wu, K.; Huang, L.; Prusoff, W.H. *Biochem. Pharmacol.* 1993, 46, 251;
163. Rezhopov, K.Zh.; Ziyaev, Kh.L.; Baram, N.I.; Ismailov, A.I.; Kamaev, F.G.; Saïtkulov, A.M. *Chem. Nat. Compds.* 2002, 38, 319;
164. Auelbekov, S.A.; Mirzaabdullaev, A.B.; Aslanova, D.Kh.; Kurchakov, S.; Atchilova, G.Sh. *Khim. Farm. Zh.*, 1985, 19, 829;
165. Khaitbaev, A.H.; Tiliabaev, Z.; Atchilova, G.Sch.; Haitbaev, H.H.; Auelbekov, S.A. *Khim. Prir. Soedin.* 1995, 1, 44;
166. Baram, N.I.; Ziyaev, Kh.L.; Ismailov, A.I.; Ziyamov, D.; Mangutova, Yu.S. *Chem. Nat. Compd.*, 2000, 36, 185;
167. Baram, N.I.; Ziyaev, Kh.L.; Ismailov, A.I.; Ziyamov, D.; Mangutova, Yu.S. *Chem. Nat. Compd.*, 2000, 36, 541;
168. Baram, N.I.; Ismailov, A.I.; Ziyaev, Kh.L.; Rezhopov, K.Zh. *Chem. Nat. Compd.*, 2004, 40, 199;
169. Bejcar, G.; Przybylski, P.; Brzezinski, B. *J. Mol. Struct.*, 2005, 734, 45;
170. Bejcar, G.; Przybylski, P.; Fusiara, J.; Brzezinski, B.; Bartl, F. *J. Mol. Struct.*, 2005, 754, 31;
171. Bejcar, G.; Przybylski, P.; Walkowiak, M.; Brzezinski, B. *J. Mol. Struct.*, DOI 10.1016/j.molstruct.2006.06.034. (in press);
172. Bejcar, G.; Przybylski, P.; Fusiara, J.; Brzezinski, B.; Bartl, F. *J. Mol. Struct.*, 2005, 743, 145;
173. Przybylski, P.; Schilf, W.; Lewandowska, W.; Brzezinski, B. *Biopolymers*, 2006, 83, 213;
174. Zhu, G.-D.; Chen, D.-H.; Huang, J.-H.; Liu, F.-K.; Chi, C.-S. *J. Fluorine Chem.*, 1988, 42, 279;

175. Boatner, C.H. In Cottonseed and Cottonseed Products, Chap. 6, Interscience Publishers, New York 1948;
176. Jakobsson, P.J.; Steinhilber, D.; Odlander, B.; Rådmark, O.; Claesson, H.E.; Samuelsson, B. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1992, 89, 3521;
177. Brash, A.R. J. Biol. Chem., 1999, 274, 23679;
178. Maccarrone, M.; Melino, G.; Finazzi-Agro, A. Cell Death and Differentiation, 2001 8, 776;
179. Kühn, H.; Borngraber, S. Adv. Exp. Med. Biol., 1999, 447, 5;
180. Bekemeier, H.; Hirschelmann, R.; Langner, A.; Giessler, A.J.; Krause, E.; Funke, T.; Hansel, F.; Schmidt, K.; Zarnack, S.; Schumann, H. Pharmazie, 1989, 44, 550;
181. Kuhn, C.; Bekemeier, H.; Hirschelmann, R.; Giessler, A.J.; Biomed. Biochim. Acta, 1988, 47, 320;
182. Bakathir, H.A.; Giessler, J.; Hirschelmann, R. Gen Pharmacol. 1991, 22, 673;
183. Geronikaki, A.; Hadjipavlou-Litina, D.; Amourgianou, M. Il Farmaco, 2003, 58, 489;
184. Kaplan, J.P.; Raizon, B. M. J. Med. Chem. 1980, 23, 702;
185. Bianchetti, G.; Padovani, P.; Thenot, J.P.; Thiercelin, J.F.; Morselli, P.L. Epilepsia 1987, 28, 68;
186. Farraj, N.F.; Davis, S.S; Parr, G. D.; Srevens, H.N.E. Pharm. Res. 1998, 5, 226;
187. Bowery, N.G. Ann. Rev. Pharm. Toxicol., 1993, 33, 109;
188. Petroff, O.A.C. Neuroscientist, 2002, 8, 653;
189. Gonce, M.; Schoenen, J.; Charlier, M.; Delwaide, P.J.; J. Neurology, 1983, 229, 121;
190. Lloyd, K.G.; Arbilla, S.; Beaumont, K.; Briley, M.; De Montis, G.; Scatton, B.; Langer, S.Z.; Bartholini, G. J Pharmacol. Exp. Ther, 1982, 220, 672;
191. Worms P.; Depoortere, H.; Durand, A.; Morselli, P.L.; Lloyd, K.G, Bartholini, G.J. Pharmacol. Exp. Ther. 1982, 220, 660;
192. Scatton, B.; Bartholini, G.J. Pharmacol. Exp. Ther. 1982, 220, 689;
193. Benassi, E.; Besio, G.; Bo, G.P.; Cocito, L.; Maffini, M.; Mainardi, P.; Morselli, P.L.; Loeb, C. Int. J. Clin. Pharmacol. Res. 1988, 8, 353;
194. Fromm G.H.; Terrence, C.F; Chattha, A.S. Epilepsia. 1985, 26, 672;
195. Jacob, J.N.; Hesse, G.W.; Shashoua, V.E. J. Med. Chem. 1990, 33, 733;
196. Backus, L.I.; Stellar, J.R.; Jacob, J.; Hesse, G.W.; Shashoua, V.E. Pharmacol. Biochem. Behav. 1988, 30, 657;
197. Scatton, B.; Lloyd, K.G.; Zivkovic, B.; Dennis, T.; Claustre, Y.; Dedek,

- J.; Arbilla, S.; Langer, S.Z.; Bartholini, G. J. *Pharmacol. Exp. Ther.* 1987, 241, 251;
198. Hollister, L.E.; J. L. Claghorn, *Ann. Rev. Pharm. Toxicol.*, 1993, 33, 165;
199. Paykel, E.S.; van Woerkom, A.E.; Walters, D.E.; White, W.; Mercer, J. *Human Psychopharmac.* 1991 6, 147;
200. Magni, G.; Garreau, M.; Orofiamma, B.; Palminteri, R. *Neuropsychobiol.* 1989, 20, 126;
201. Sakiyan, I.; Loğoğlu, E.; Arslan, S.; Sari, N.; Sakiyan, N. *BioMetals*, 2004, 17, 115;
202. Offong, O.E.; Nfor E.; Ayi, A.A.; Martelli, S. *Trans. Met.Chem.*, 2000, 25, 369;
203. Jayabalakrishnan, C.; Natarajan, K. *Trans. Met. Chem.*, 2002, 27, 75;
204. Jeewoth, T.; Bhowon, M.G.; Wah, H.L K. *Trans. Met. Chem.*, 1999, 24, 445;
205. Ispir, E.; Kurtoğlu, M.; Purtaş, F.; Serin, S. *Trans. Met. Chem.*, 2005, 30, 1042;
206. Tümer, M.; Köksal H.; Sener, M.K, Serin, S. *Trans. Met. Chem.*, 1999, 24, 414;
207. El-Baradie, K.Y. *Monatshefte für Chemie*, 2005, 136, 1139;
208. Li-Xia, Z.; Yi, L.; Li-Hua, C.; Yan-Jun H.; Jun Y.; Pei-Zhi H. *Thermo-chimica Acta*, 2006, 440, 51;
209. Raman, N.; Kulandaisamy A.; Thangaraja C.; Jeyasubramanian, K. *Trans. Met. Chem.*, 2003, 28, 29
210. Patole, J.; Shingnapurkar, D.; Padhye, S.; Ratledge, C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2006, 16, 1514;
211. Brown, K.A.; Ratledge C. *Biochim. Biophys. Acta*, 1975, 385, 207;
212. Winder, F. G. The antibacterial action of streptomycin, isoniazid and PAS, In *Chemotherapy of tuberculosis* V. C. Barry, Ed., 1964; 111–149. Butterworth and Co. Ltd., London, United Kingdom;
213. Guo, Z.; Xing, R.; Liu, S.; Yu, H.; Wang, P.; Li, C.; Li, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2005, 15, 4600;
214. Paul, W.; Sharma, C.P. *STP Pharma Sci.* 2000, 10, 5;
215. Xing, R. E.; Yu, H. H.; Liu, S.; Zhang, W. W.; Zhang, Q. B.; Li, Z. E.; Li, P. C. *Bioorg. Med. Chem.*, 2005, 13, 1387;
216. Sun, T.; Xie, W. M.; Xu, P. X. *Carbohydr. Polym.*, 2004, 58, 379;
217. Xie, W. M.; Xu, P. X.; Liu, Q. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2001, 11, 1699;
218. Albert, A. *Nature*, 1958, 182, 421.;
219. Banerjee, P.K.; Amidon, G.L. *Design of Prodrugs*, Bundgaard, H., Ed.

- Elsevier: New York, 1985, pp. 93-133;
220. Patrick, G.M. *An Introduction to Medical Chemistry*, Oxford University Press, Oxford, 2001;
221. Svartz, N. *Acta Med. Scand.*, 1942, 60, 577;
222. Svartz, N. *Rheumatism* 1948, 56;
223. Sinclair, R.J.G.; Duthie, J.J.R. *Ann. Rheum. Dis.*, 1948, 8, 226;
224. Kuzell, W.K.; Gardner, G.M. *California Med.*, 1950, 73, 476;
225. McConkey, B.; Amos, R.S.; Durham, S.; *Br. Med. J.*, 1980, 442;
226. Griffiths, I.D.; Kane, S.P. *Br. Med. J.*, 1977, 6096, 1188;
227. Jaup, B.H.; *Dtsch. Med. Wochenschr.*, 1978, 103, 1211;
228. Crisp, A.J.; Hoffbrand B.I. *J. R. Soc. Med.*, 1980, 73, 60;
229. Carr-Locke, D.L. *Am. J. Gastroenterol.*, 1982, 77, 614;
230. Rafferty, P.; Young, A.C.; Haeney, M.R. *Postgrad. Med. J.*, 1982, 58, 98;
231. Vanheule, B.A.; Carswell, F. *Eur. J. Pediatr.*, 1983, 140, 66;
232. Clementz, G.L.; Dolin, B.J. *Am J. Med.* 1988, 84, 535;
233. Deboever, G.; Devogelaere, R.; Holvoet, G. *Am. J. Gastroenterol.* 1989, 84, 85;
234. Wildhagen, K.; Hartung, K.; Hammer, M.; Mau, W., Schmidt, R.E.; Deicher, H. *Clin. Rheumatol.*, 1993, 12, 265;
235. Siam, A.R.; Hammoudeh, M. *J. Rheumatol.*, 1993, 20, 207;
236. Borg, A.A.; Davis, M.J.; Dawes, P.T.; Shadforth, M.F. *Clin. Rheumatol.*, 1994, 13, 522;
237. Walker, E.M.; Carty, J.E. *Br. J. Rheumatol.*, 1994, 33, 175;
238. Hill, M.E.; Gordon, C.; Situnayake, R.D.; Heath, D.A. *J. Rheumatol.*, 1994, 21, 748;
239. Caulier, M.; Dromer, C.; Andrieu, V.; Le Guennec, P.; Fournie, B. *J. Rheumatol.*, 1994, 21, 750;
240. Bray, V.J.; West, S.G.; Schultz, K.T.; Boumpas, D.T.; Rubin, R.L. *J. Rheumatol.*, 1994, 21, 2157;
241. Laversuch, C.J., Collins, D.J.; Charles, P.J.; Bourke, B.E. *Br. J. Rheumatol.*, 1995, 34, 435;
242. Khattak, F.H.; Morris, I.M.; Mattingly, P.C. *Br. J. Rheumatol.*, 1996, 35, 104;
243. Pinals, R.S.; Kaplan, S.B.; Lawson, J.G.; Hepburn, B. *Arthritis Rheum.*, 1986, 29, 1427;
244. Parry, S.D.; Barbatzas, C.; Peel, E.T.; Barton, J.R. *Eur. Respir. J.* 2002; 19: 756–764;
245. Das, K.M.; Eastwood, M.A.; McManus, J.P.A.; Sircus, W. *Scand. J. Gastroenterol.*, 1974, 137;

246. Peppercorn, M.A.; Goldman, P. J. *Pharmacol. Exp. Ther.*, 1972, 181, 555;
247. Das, K.M.; Eastwood, M.A.; McManus, J.P.A.; Sircus, W. *Gut*, 1973, 14, 631;
248. Das, K.M.; Martin, A.E. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 1975, 18, 514;
249. Klotz, U. *Clin. Pharmacokinet.*, 1985, 10, 285;
250. Prakash, A.; Markham, A. *Drugs* 1999, 57, 383;
251. Clemett, D.; Markham, A. *Drugs* 2000 Apr; 59 (4): 929-56;
252. Nikolaus, S.; Fölsch, U.; Schreiber, S. *Hepatogastroenterology* 2000, 47, 82;
253. Chan, R.P.; Pope, D.J.; Gilbert A.P.; Sacra, P.J.; Baron, J.H.; Lennard-Jones, J.E. *Dig. Dis. Sci.* 1983; 28 (7): 609-15;
254. Travis, S.P.L.; Jewell, D.P. *Pharmacol. Ther.*, 1994, 63, 135;
255. Muijsers, R.B.R.; Goa, K. L. *Drugs* 2002, 62, 1689;
256. Lennard-Jones, J.E. *Research and Clinical Forums* 1998, 20, 75;
257. Green, J.R.B.; Lobo, A.J.; Holdsworth C.D., *Gastroenterology*, 1998, 114, 15;
258. Mansfield, J.C.; Giaffer, M. H.; Cann, P.A, *Aliment Pharmacol. Ther.*, 2002, 16, 69;
259. Farrokhyar, F.; Swarbrick, E. T.; Irvine, E.J. *Scand. J. Gastroenterol.* 2001, 36, 2;
260. Sandberg-Gertzen, H.; Jarnerot, G.; Kraaz, W. *Gastroenterology*. 1986, 90, 1024;
261. Wright, J.P.; O'Keefe, E.A.; Cuming, L.; Jaskiewicz, K. *Dig. Dis. Sci.*, 1993, 38, 1837;
262. Bebb J.R., Scott, B.B. *Aliment Pharmacol. Ther.*, 2004, 20, 143;
263. Brown, W. A.; Farmer, K.C.; Skinner, S.A.; Malcontenti-Wilson, C.; Misajon, A. *Dig. Dis. Sci.*, 2000, 45, 1578 ;
264. Ryde, M.; Huitfeldt, B.; Pettersson, R. *Biopharm. Drug Dispos.* 1991, 12, 233;
265. Klotz, U. *Digestive and Liver Disease*, 2005, 37, 381;
266. Bartalsky, A. *Lancet*, 1982, 24, 960;
267. Negwer, M.; Scharnow, H.-G. *Organic-Chemical Drugs and Their Synonyms*, 8th Edition, VCH-WILEY, 2002;
268. Chevrel, B. *Med. Chir. Dig.* 1985, 14, 77-79;
269. Nielsen, O.H. *Scand. J. Gastroenterol.*, 1982, 17, 389;
270. Beletskaya, G.T.; Bobrov, V.I.; Dorokhov V.V.; Yakovlev, V.P., *Pharm. Chem. J.*, 1988, 22, 508;
271. Stolz, A. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2001, 56, 69;
272. Westmoreland C., Gatehouse D. C.: *Carcinogenesis*, 1991, 12, 1403;



273. Moller P., Wallin H.: *Mutat. Res.* 2000, 462, 13;
274. Kozuka, T.; Tashiro, M.; Sano, S.; Fujimoto, K.; Nakamura, Y.; Hashimoto, S.; Nakaminami, G. . *Contact Dermatitis*, 1980, 6, 330;
275. Stiborová, M.; Asfaw, B.; Anzenbacher, P.; Lešetický, L.; Hodek, P. *Cancer Lett.*, 1988, 40, 319;
276. Stiborová M.; Asfaw B.; Anzenbacher, P.; Hodek, P. *Cancer Lett.*, 1988, 40, 327;
277. Stiborová, M.; Asfaw, B.; Frei, E.; Schmeiser, H.H.; Wiessler, M. *Chem. Res. Toxicol.*, 1995, 8, 489;
278. Stiborová, M.; Asfaw, B.; Anzenbacher, P.; *FEBS Lett.*, 1988, 232, 387;
279. Martínek, V.; Stiborová, M. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 2002, 67, 1986;
280. Stiborová, M.; Frei, E.; Schmeiser, H.H.; Wiessler, M.; Hradec, J. *Carcinogenesis*, 1990, 11, 1843;
281. Childs J. J., Clayson D. B.: *Biochem. Pharmacol.*, 1966, 15, 1247;
282. Stiborová, M.; Frei, E.; Schmeiser, H.H.; Wiessler, M. *Carcinogenesis*, 1992, 13, 1221;
283. Stiborová, M.; Frei, E.; Schmeiser, H.H.; Wiessler, M.; Hradec, J. *Cancer Lett.*, 1993, 68, 43;
284. Stiborová, M.; Schmeiser, H.H.; Frei, E. *Cancer Lett.*, 1999, 142, 53;
285. Moller, P.; Hakan, W. *Mutataion Research*, 2000, 462, 13;
286. Stiborová, M.; Martínek, V.; Rydlova, H.; Hodek, P.; Frei, E. *Cancer research*, 2002, 62, 5678;
287. Raffi, F.; Franklin, W.; Carniglia, C.E. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1990, 56, 2146;
288. Dillon, D.; Combes, R.; Zeiger, E. *Mutagenesis*, 1994, 9, 295;
289. Kato, S.; Itagaki, H.; Uchiyama, M.; Kobayashi, T. Fujiyama, Y. *Contact Dermatitis.*, 1986, 15, 205;
290. Kozuka, I.; Goh, C.L.; Doi, T. Yioshikawa, K. *Ann. Acad. Medicine Singapore.*, 1988



## Rozdział V

### Pochodne chalkonu jako związki ciekłokrystaliczne

Zdzisława Nowakowska, Grzegorz Schroeder  
*Uniwersytet im. A. Mickiewicza, Wydział Chemii, Grunwaldzka 6,  
60-780 Poznań*

**Ciekle kryształy** (również zwane cieczami anizotropowymi lub mezofazą) [1,2] są to fazy pośrednie między ciekłym i krystalicznym stanem skupienia materii, które charakteryzują się tak jak ciecze zdolnością do płynięcia, i jednocześnie wykazują daleko zasięgowe uporządkowanie tworzących ją cząsteczek, podobnie jak to ma miejsce w kryształach. Wykazują anizotropię własności fizycznych, co oznacza, że wielkości fizyczne mierzone w różnych kierunkach przyjmują różne wartości. Fragment podziału ciał fizycznych z usytuowaniem ciekłych kryształów przedstawiono na rysunku 1.

kryształ stały	smektyk	nematyk	cholesteryk	ciecz izotropowa
	ciekły kryształ			

*Rys.1. Fragment podziału ciał fizycznych.*

Struktura przestrzenna cząsteczek ciekłego kryształu związanych niewielkimi siłami jest bardzo podatna na wpływ oddziaływań zewnętrznych w postaci temperatury, oświetlenia, naprężeń oraz pól elektrycznych i magnetycznych. Działanie pola elektrycznego, wywołując zmianę konfiguracji przestrzennej cząsteczek ciekłego kryształu powoduje zmianę właściwości przepuszczania światła. Po ustaniu działania pola oddziaływania powierzchniowe przywracają pierwotny układ przestrzenny cząsteczkom ciekłego kryształu. Zmiany temperaturowe powodują rozszerzenie cieplne, które prowadzą do zmiany odstępów i ułożenia między cząsteczkami termochromowej substancji ciekłokrystalicznej, co wywołuje zmianę obserwowanego koloru w zależności od wysokości temperatury. Fazę ciekłokrystaliczną sensu stricto mogą generować długie, sztyw-

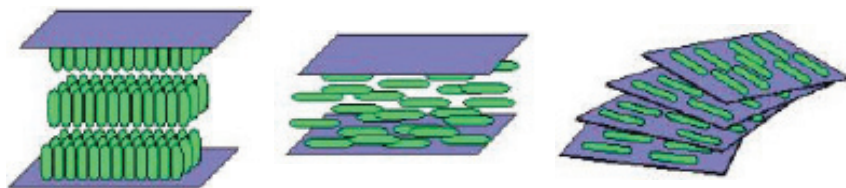
ne cząsteczki podobne do prętów lub sztywne i płaskie cząsteczki podobne do dysków, które oddziałują między sobą siłami typu van der Waalsa. Typowa cząsteczka mezogenu składa się z dwóch lub większej liczby pierścieni aromatycznych lub cykloalkanowych, połączonych mostkową grupą funkcyjną X [np.  $-\text{CH}=\text{CH}-$ ,  $-\text{CH}=\text{N}-$ ,  $-\text{N}=\text{N}-$ ,  $-\text{CH}=\text{N}-\text{N}=\text{CH}-$ ] ograniczającą ich swobodę rotacji. Cząsteczki te muszą mieć grupy polarne zapewniające im odpowiednie ułożenie w stanie ciekłym zmierzające do pewnego uporządkowania molekuł. Oddziaływania typu van der Waalsa sprawiają, że molekuły ustawiają się równolegle, ale pozwalają też na przesuwanie się molekuł względem siebie. Średni kierunek uporządkowania molekuł ciekłokrystalicznych w danym obszarze określa bezwymiarowy wektor jednostkowy  $\mathbf{n}$  zwany директором (wskaźnikiem kierunku).

### Faza ciekłokrystaliczna może być generowana na trzy sposoby:

- poprzez ogrzewanie stałych kryształów – jest nazywana wtedy **mezofazą termotropową**. Kryształy, zamiast od razu topić się w zwykłą ciecz, przechodzą w pewnej określonej temperaturze w stan mezofazy, a dopiero w wyższej temperaturze następuje izotropizacja mezofazy, czyli zamiana ciekłych kryształów w ciecz izotropową.
- poprzez rozpuszczanie cząsteczek mających tendencję do tworzenia mezofazy w odpowiednim rozpuszczalniku polarnym – faza jest nazywana wtedy **mezofazą liotropową**.
- poprzez zmiany ciśnienia – **mezofaza barotropowa**.

### W zależności od stopnia orientacji molekuł w próbkę mezofazy termotropowe dzieli się na

- fazę nematyczną - oznaczaną symbolem  $\mathbf{N}$
- fazę smektyczną, w której oprócz równoległego uporządkowania osi cząsteczek wzdłuż wersora, istnieje też dodatkowe uporządkowanie w warstwy - oznaczaną symbolem  $\mathbf{S}$
- fazę kolumnową, którą generują zwykle cząsteczki dyskopodobne – tutaj oprócz równoległego uporządkowania osi cząsteczek, cząsteczki układają się jeszcze w kolumny. Fazy kolumnowe są oznaczane literą  $\mathbf{D}$
- fazę cholesterolową, w której uporządkowanie jest związane ze skręceniem o określony kąt przy przechodzeniu między warstwami, czyli ich wersor nie jest linią prostą lecz układu się w kształt helisy. Faza cholesterolowa jest w istocie podtypem fazy nematycznej. Fazę cholesterolową nazywa się też często fazą nematyczną skręconą i oznacza symbolem  $\mathbf{N}^*$



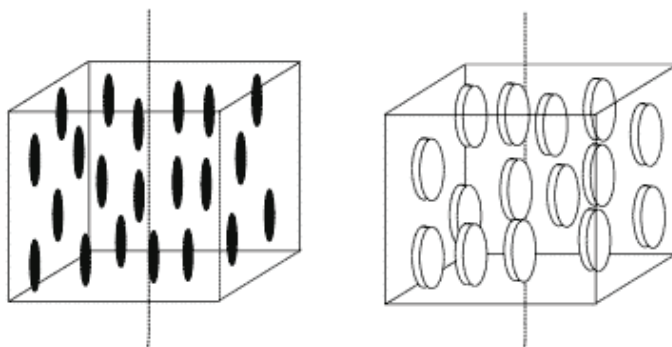
*smektyk*

*nematyk*

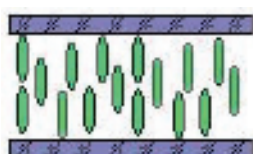
*cholesteryk*

### Faza nematyczna

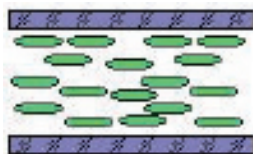
- (gr. *nema*-nić) to takie ułożenie cząsteczek ciekłego kryształu, że są one zorientowane w tym samym kierunku, lecz ich środki ciężkości nie są uporządkowane. Cząsteczki mogą przemieszczać się we wszystkich trzech kierunkach i swobodnie obracać się wzdłuż długich osi.
- w fazie tej pręto- lub dyskopodobne cząsteczki mają zablokowaną możliwość zmieniania kąta ułożenia jednej ze swoich osi względem innych cząsteczek, co powoduje, że cząsteczki układają się samorzutnie osiami równoległe do siebie:



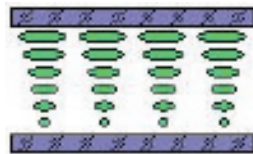
Dla nematycznych ciekłych kryształów rozróżnia się trzy podstawowe **typy** **tekstur**:



*homeotropowa*



*planarna skręconego*



*nematyka*

- Nematyczne ciekłe kryształy są jednoosiowe i posiadają dwa współczynniki załamania światła  $n_o$  i  $n_e$ . Współczynnik zwyczajny  $n_o$  jest obserwowany dla fali, której wektora pola elektrycznego drga w kierunku prostopadłym do osi optycznej ciekłego kryształu, czyli prostopadle do kierunku direktora, gdyż pokrywa się on z osią optyczną. Natomiast współczynnik nadzwyczajny  $n_e$  występuje dla fali świetlnej liniowo spolaryzowanej, której drgania wektora pola elektrycznego odbywają się wzdłuż osi optycznej.
- nematyczne ciekłe kryształy są bardziej przezroczyste i mniej lepkie niż kryształy smetyczne. Często kryształy smetyczne przechodzą w nematyczne w miarę wzrostu temperatury.

### Faza smektyczna

- smektyki charakteryzują się największym stopniem uporządkowania. Molekuły są ułożone równolegle w warstwach, które mogą poruszać się względem siebie. W całym obszarze jest taki sam kierunek direktora, a środki ciężkości molekuł tworzą płaszczyzny. Smektyki cechują się dużą lepkością i sztywnością struktury.

### Faza cholesteryczna

- w strukturze **cholesterycznej** molekuły w poszczególnych warstwach wykazują uporządkowanie w jednym kierunku, przy czym ich środki ciężkości rozmieszczone są chaotycznie. Direktory sąsiednich warstw są skrócone względem siebie o niewielki kąt, co nadaje strukturze charakter spiralny (tzw. struktura helikoidalna).
- Ciekłe kryształy o budowie cholesterycznej posiadają podobną budowę do kryształów nematycznych. W tym przypadku cząsteczki w kolejnych warstwach są jednak zorientowane jedna względem drugiej. W ten sposób cząsteczki w poszczególnych płaszczyznach są obrócone wokół osi prostopadłych do ich środków i tworzą spiralę.
- Całkowity obrót o  $360^\circ$  ma przeważnie miejsce, gdy osiągnięta zostanie odległość długości światła widzialnego. Z tego też powodu substancje o budowie cholesterycznej posiadają zdolność odbijania światła o różnej długości fali (kolorze) w zależności od temperatury, ponieważ zmiana temperatury powoduje zmianę struktury spirali. Zmiana zabarwienia ciekłych kryształów cholesterycznych w wyniku temperatury znalazła praktyczne zastosowanie (sporządzanie map temperaturowych w medycynie). Również pole elektryczne może mieć wpływ na strukturę ciekłego kryształu powodując zmiany zabarwienia odbitego światła lub zmiany przejrzystości kryształu. Zjawisko to zostało wykorzystane do

konstrukcji wyświetlaczy cyfrowych w kalkulatorach, zegarkach, aparaturze naukowej.

### Zastosowania ciekłych kryształów

Ciekłe kryształy termotropowe znajdują szereg zastosowań w różnych dziedzinach m.in:

- w wyświetlaczach ciekłokrystalicznych (LCD) jak również ekranach LCD, w których wykorzystuje się eutektyczne mieszaniny związków prętopodobnych, które są zdolne do generowania fazy nematycznej lub SmC\*. Mechanizm działania wyświetlaczy opiera się na zmianach kierunku uporządkowania mezofazy pod wpływem przyłożonego pola elektrycznego co powoduje zmianę kierunku dwójłomności światła przechodzącego przez te fazy. Wyświetlacze oparte na fazie nematycznej są monochromatyczne i nie mogą posiadać skali szarości. Wyświetlacze oparte na fazie SmC\* mogą być w pełni kolorowe i posiadać szeroką skalę szarości.
- w pamięciach masowych do komputerów, w których zapis informacji odbywa się przez generowanie zmian kierunku uporządkowania przez przyłożenie pola elektrycznego, a kasowanie poprzez proste ogrzanie nośnika powyżej temperatury izotropizacji – tego rodzaju pamięci masowe, ze względu na komplikacje sprzętowe, przegrały jednak z płytami CD w latach '80 XX w.
- w optoelektronice wykorzystuje się tzw. zjawiska nieliniowe – ciekłe kryształy są wykorzystywane jako bramki logiczne oraz generatory i analizatory wyższych harmonicznych światła (SHG), które wielokrotnie zwiększają przepustowość informacyjną światłowodów.
- zastosowania własności termooptycznych – które oparte są na zjawisku zmiany koloru odbijanego światła przez mezofazę N\* (cholesterolową) w zależności od temperatury:
  - termometry bezręczowe – proste w użyciu, ale wciąż bardzo niedokładne termometry w kształcie paska folii.
  - indykatory temperatury (zmieniające kolor przy ściśle określonej temperaturze)
  - dodatki do farb i emulsji, zmieniających kolor pod wpływem temperatury – są one stosowane jako przyciemniacze szyb samochodowych, farby którymi pokrywa się zabawki zmieniające barwę w trakcie kąpieli oraz do tworzenia termogramów ciał osób chorych. Chore organy zazwyczaj wykazują większe tempo metabolizmu, co objawia się wzrostem temperatury i uwidocznia poprzez zmianę barwy

„pomalowanej” skóry.

- ciekłe kryształy kojarzą się nam, przede wszystkim, z laptopami, telewizorami i telefonami komórkowymi, jednak okazuje się, że niektóre z nich mogą mieć również właściwości farmakologiczne. Oprócz powszechnie znanych ciekłych kryształów, które znajdują zastosowanie przy wytwarzaniu ekranów, istnieje jeszcze grupa związków organicznych (występujących w każdym organizmie żywym), które nazywane są liotropowymi ciekłymi kryształami. Należą do nich między innymi: DNA, białka, cholesterol. Unikalną grupę stanowią natomiast ciekłe kryształy o właściwościach farmakologicznych – LCPs (*ang. Liquid Crystal Pharmaceuticals*). Leki przeciwnowotworowe oparte na LCPs (Tolecine i Apatone) wykazują niską toksyczność, dużą specyficzność, i nie atakują zdrowych, dzielących się komórek.
- ciekłe kryształy w technologii kosmetyków zostały wprowadzone w latach 60-tych. Preparaty kosmetyczne zawierające ciekłe kryształy skutecznie zatrzymują utratę wody z naskórka. Gdybyśmy wyobrazili sobie jako poukładane cegielki tworzące jakby mur to ceramidy (40-50 %) wraz z kwasami tłuszczowymi i cholesterolem (25-35%) tworzą tzw. cement międzykomórkowy, czyli barierę wodno-lipidową naskórka. Dzięki tym składnikom ma ona strukturę ciekłych kryształów, a taka właśnie budowa decyduje o zatrzymaniu wody w skórze, a więc o prawidłowym jej nawilżaniu. W kosmetykach są stosowane kryształy liotropowe, których podstawowymi jednostkami są micelle (detergenty) i lamele.

### **Polimery ciekłokrystaliczne (PCK) z cząsteczką chalkonu jako ugrupowaniem mezogenicznym.**

Odrębną klasą ciekłych kryształów stanowią **polimery ciekłokrystaliczne** czyli układy w których występuje kombinacja właściwości polimerowych i ciekłokrystalicznych, wynikająca z połączenia łańcuchów typowych polimerów z cząsteczką mezogeniczną. W zależności od umiejscowienia mezogenu rozróżnia się

- głównolańcuchowe polimerowe ciekłe kryształy – gdy mezogeny są częścią łańcucha polimerowego
- bocznolańcuchowe polimerowe ciekłe kryształy – gdy mezogeny zostały połączone z głównym łańcuchem jako grupy boczne za pomocą giętkiego mostka.

### **I. Polimery ciekłokrystaliczne z cząsteczkami chalkonu w matrycy**



## polimerowej

Pierwsze doniesienia literaturowe dotyczące polimerów ciekłokrystalicznych z wbudowanymi cząsteczkami chalkonu (nazwa systematyczna: 1,3-difenylo-2-propen-1-on) pochodzą z roku 1959.[3] Związki tego typu posiadają mezo-geniczną cząsteczkę chalkonu w łańcuchu głównym, lub w łańcuchu bocznym albo wbudowaną w łańcuch żywicy epoksydowej. [4-51] Ze względu na niską rozpuszczalność głównolańcuchowych polimerów ciekłokrystalicznych, wynikającą z ich sztywnej natury, większość badań prowadzi się na bocznołańcuchowych polimerach.

### I.a. Metakrylanowe polimery ciekłokrystaliczne z cząsteczką chalkonu w łańcuchu bocznym:

Właściwości polimetakrylanów z grupami chalkonyłowymi w łańcuchu bocznym zostały szeroko przebadane [4-21], a struktury niektórych z nich przedstawiono w Tabelach 1 i 2. Polimery te są dobrze rozpuszczalne w acetonie, chloroformie, chlorku metylenu, tetrahydrofuranie, oraz innych rozpuszczalnikach organicznych. Naświetlanie liniowo spolaryzowanym światłem UV (LPUV) wywołuje strukturalne zmiany cząsteczki chalkonu przyłączonej do matrycy polimerowej, wynikające głównie z zachodzącej w tych warunkach fotodimeryzacji. Stopień fotodimeryzacji zależy od uporządkowania i ruchów termicznych grupy chalkonowej. Jednostki chalkonowe ulegają reakcji usieciania poprzez cykloaddycję  $[2\pi+2\pi]$  wzbudzonej i niewzbudzonej cząsteczki chalkonu. Analiza widm w podczerwieni, wskazuje jednoznacznie na zmniejszenie się absorpcji pasma wiązania podwójnego w mostkowej grupie funkcyjnej  $-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}-$  ( $\sim 980 \text{ cm}^{-1}$ , pozapłaszczynowe drgania zginające), jak również przesuwanie się do wyższych długości fal drgań rozciągających grupy karbonylowej. Stopień fotodimeryzacji może być również oszacowany zmniejszaniem się absorpcji piku  $\sim 320 \text{ nm}$  w widmach UV. Kluczowym czynnikiem wpływającym na tworzenie się mezofazy jest obecność w tych polimerach benzoesanowego fragmentu. Sama grupa chalkonowa nie może być rozważana jako grupa mezogenna.

Metakrylanowy polimer ciekłokrystaliczny **PCK-1** jest pochodną wykazującą stałe uporządkowanie ciekłokrystaliczne po naświetleniu liniowo spolaryzowanym światłem UV ( $\lambda=300-360 \text{ nm}$ ) z lampy rtęciowej (1 KW). Ujemna wartość stosunku dichroicznego (ang. *dichroic ratio*) wskazuje, że ciekły kryształ ustawia się prostopadle do wektora pola elektrycznego. Pochodne podstawione w pozycji 4 pierścienia A grupami  $-\text{CN}$  lub  $-\text{F}$  wykazują podobny kierunek uporządkowania co **PCK-1**. Zwiększanie czasu ekspozycji światła UV, powoduje powolny zanik właściwości anizotropowych filmu ze względu na tworzenie się cyklobutanowego układu pomiędzy bocznymi łańcuchami chalkonyłowymi.

**PCK-2/3:** Oba polimery przyjmują strukturę smektyczną typu  $A_1$ , przy czym polimer **2** tworzy warstwę smektyczną wolniej niż polimer **3**. Pomiar stosunku dichroicznego wskazują, że polimer **2** w stanie ciekłokrystalicznym ustawia się prostopadle do wektora elektrycznego, natomiast polimer **3** równolegle.

Tabela 1. Metakrylanowe polimery ciekłokrystaliczne

	<p style="text-align: right;"><b>PCK-1</b></p>
	<p style="text-align: center;"><math>X = H, CN, F, OCH_3</math></p> <p style="text-align: right;"><b>PCK-2</b></p>
	<p style="text-align: right;"><b>PCK-3</b></p>

Wśród metakrylanowych polimerów ciekłokrystalicznych z cząsteczką chalkonu znane są również bifunkcyjne kopolimery z przyłączoną w bocznym łańcuchu cząsteczką innego związku.

Tabela 2. Metakrylanowe polimery ciekłokrystaliczne otrzymywane na bazie kopolimeru

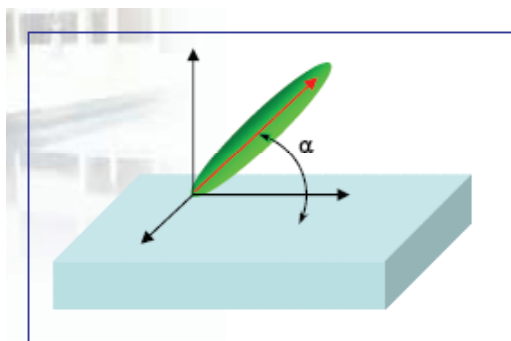
	<p style="text-align: right;"><b>PCK-4</b></p>
	<p style="text-align: center;"><math>R_1 = COOCH_3, C_6H_5</math></p> <p style="text-align: right;"><b>PCK-5</b></p>
	<p style="text-align: right;"><b>PCK-6</b></p>

Przykładem tego typu kopolimeru jest związek posiadający w łańcuchu bocznym oprócz cząsteczki chalkonu również cząsteczkę cholesterolu **PCK-6**. Charakteryzuje się on dużą stabilnością termiczną. Przebadano kopolimery zawierające 2%, 8% lub 20% części chalkonowej w stosunku do części cholesterolowej, a wyznaczone wartości kąta  $\alpha$  (*ang. pretilt angle*) uzyskane po na-

świeceniu liniowo spolaryzowanym światłem UV w czasie 3 minut, wynoszą odpowiednio 90, 87 i 81°.

**PCK-7:** Jest to przykład kopolimeru z fotochromową cząsteczką spiropiranu w której po naświetlaniu promieniowaniem UV następuje otwarcie pierścienia i E/Z-transformacja z formy spiropiranowej do odpowiadającej jej formy merocyjaninowej oraz reakcja odwrotna przy naświetlaniu światłem widzialnym lub ogrzewaniu.

Przebadano polimery z różnym stosunkiem monomeru spiropiranowego (m) do monomeru chalkonowego (n), mianowicie : **PCK-7A** 3:1, **PCK-7B** 1:1, **PCK-7C** 1:3. Kopolimery z większą zawartością części spiropiranowej wykazywały wyższą temperaturę zeszklenia  $T_g$ . (**PCK-7A**  $T_g=150$  °C, **PCK-7B**  $T_g=134$  °C, **PCK-7C**  $T_g=125$  °C). Poprzez cykloaddycję  $[2\pi+2\pi]$  cząsteczek chalkonu następuje zmniejszenie odległości pomiędzy łańcuchami polimeru powodujące zmniejszenie wolnej przestrzeni koniecznej do przekształcania się formy *trans*-merocyjaninowej w formę spiropiranową. Wraz ze zwiększaniem się stężenia chalkonu w kopolimerze następuje wzrost stabilności fotochromowej układu.



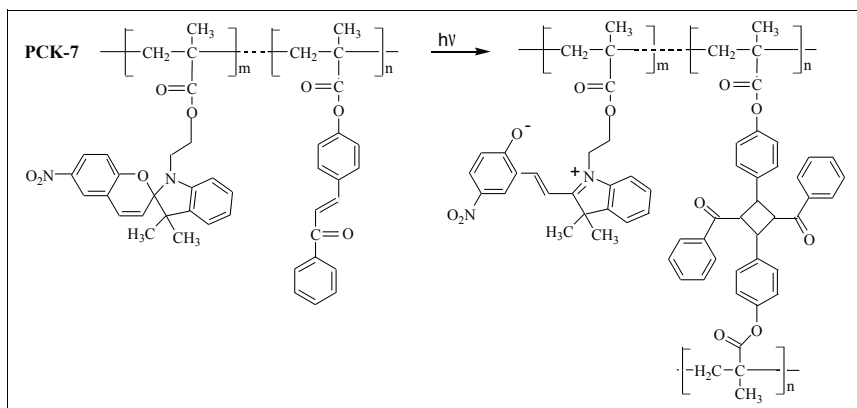
Definicja kąta  $\alpha$  (ang. pretilt angle)



Kąt  $\alpha$  (ang. pretilt angle)=0

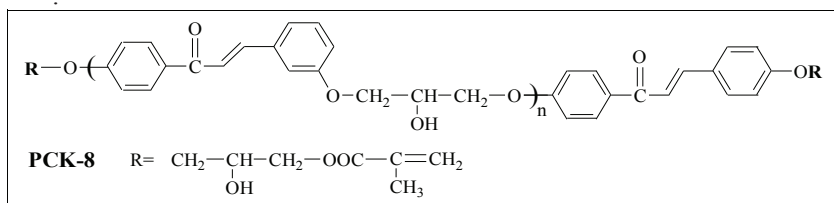


Kąt  $\alpha$  (ang. pretilt angle)>0



### I. b. Metakrylanowe polimery ciekłokrystaliczne zawierające chalkon w łańcuchu głównym.

**PCK-8:** Tego typu układy [22,23] ulegają szybciej reakcjom fotochemicznym w obecności fotoinicjatora (TSFA- jako kationowy, oraz DMPA (dimeksofenyloacetofenon)- jako rodnikowy fotoinicjator) niż bez niego. Są to zarówno reakcje fotokrzyżowe pomiędzy podwójnymi wiązaniami  $-C=C-$  części chalkonowej, jak i reakcje fotopolimeryzacji pomiędzy fragmentami metakrylanowymi. Sugeruje się również, że możliwa jest krzyżowa reakcja rodnikowa pomiędzy rodnikiem generowanym z atomu węgla  $\alpha$  grupy metakrylanowej, a rodnikiem podwójnego wiązania cząsteczki chalkonu

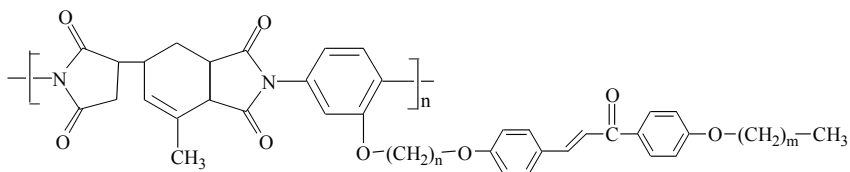


### I. c. Amidowe polimery ciekłokrystaliczne z cząsteczką chalkonu w łańcuchu bocznym:

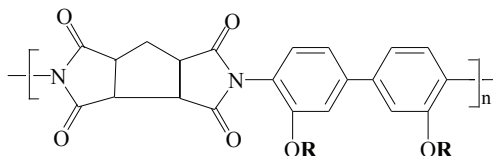
Grupa poliamidowych ciekłokrystalicznych związków **PCK-9-14** [24-32] w których cząsteczka chalkonu modyfikowana jest w pierścieniu A grupami alkoksylowymi o różnej długości łańcucha, a związana jest z łańcuchem poliamidowym poprzez giętki linker n-alkilowy. Cząsteczka chalkonu zostaje wprowadzona do matrycy poliamidowej poprzez reakcję Williamsona. Naświetlanie

linowo spolaryzowanym światłem UV wywołuje strukturalne zmiany cząsteczki chalkonu przyłączonej do matrycy poliamidowej. Reakcja fotochemiczna wywołuje anizotropię cząsteczki ciekłego kryształu ze względu na zachodzącą dimeryzację i izomeryzację cząsteczki chalkonu.

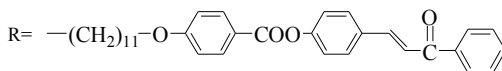
Długość łańcucha alkilowego (wartość  $m$ ) wyraźnie wpływa na kąt  $\alpha$  (*ang. pretilt angle*) i ustawienie cząsteczki ciekłego kryształu. Jednorodne, planarne ustawienie w zostaje osiągnięte gdy pochodna chalkonu ma krótki łańcuch alkilowy ( $n=1$   $m=2$  **PCK-9**). Cząsteczka ciekłego kryształu ustawia się prostopadle do kierunku polaryzacji światła UV gdy  $n=3$  a  $m=2$ . Natomiast pochodne chalkonu z łańcuchem heksadecylowym ( $m=15$ ) wywołują wysokie wartości kąta  $\alpha$  (*ang. pretilt angle*) oraz orientację pionową ciekłego kryształu w matrycy poliamidowej. W przypadku bocznołańcuchowych ciekłokrystalicznych polimerów poliamidowych fotodimeryzacja obserwowana powyżej temperatury zeszklenia jest większa niż ta w temperaturze pokojowej.



**PCK-9**  $n=1$   $m=2$     **PCK-10**  $n=1$   $m=15$     **PCK-11**  $n=3$   $m=2$   
**PCK-12**  $n=3$   $m=7$     **PCK-13**  $n=3$   $m=11$     **PCK-14**  $n=3$   $m=15$



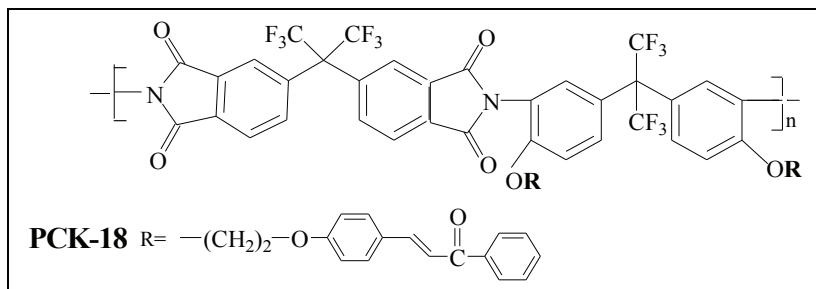
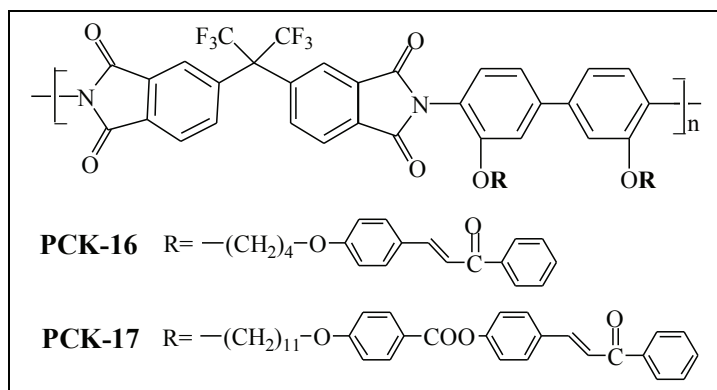
**PCK-15**



**PCK-16** występuje w formie nematyku i wykazuje wysoką stabilność termiczną do 450°C, która zostaje zwiększona dzięki wykorzystaniu nowej metody *in-situ* fotodimeryzacji. Wysokie wartości kąta  $\alpha$  (*ang. pretilt angle*) wywołane są obecnością w matrycy polimerowej układu bifenyloвого oraz reakcją fotodimeryzacji części chalkonowej. Zaobserwowano również, że wykorzystując tradycyjną metodę fotodimeryzacji otrzymuje się wyższą wartość kąta  $\alpha$  (*ang. pretilt angle*) niż przy użyciu modyfikowanej metody *in-situ* fotodimeryzacji.

**PCK-17:** Tego typu polimer ciekłokrystaliczny ukierunkowany jest równo-

legle, oraz wykazuje dodatnie wartości DR, przy czym obserwowano wyraźne zmiany wartości DR przy wydłużającym się czasie naświetlania, i w zależności od temperatury. Polimer o strukturze **PCK-18** również wykazuje równoległe ukierunkowanie na powierzchni do zewnętrznego wektora pola elektrycznego.



#### I. d. Amidowe polimery ciekłokrystaliczne zawierające chalkon w łańcuchu głównym.

PCK-19-20: Przykłady polimerów amidowych z cząsteczką chalkonu w głównym łańcuchu [33-35] występujące w formie smektycznej typu A. W wyniku naświetlania polimeru w przeciągu 360 sekund następuje widoczne w widmie UV zmniejszanie się z czasem absorpcji w zakresie  $\sim 320$  nm, a wzrost intensywności absorpcji przy  $\sim 270$  nm przypisany do zdimeryzowanego chalkonu. Absorpcja światła w kierunku prostopadłym do wektora elektrycznego LPUV światła jest większa niż w kierunku równoległym.

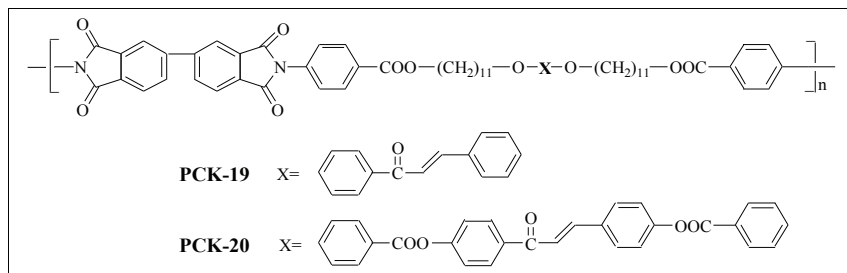


Tabela 3. Zależność temperatur przejść fazowych od budowy związku.

Związek	Temperatury przejść międzyfazowych [°C]	Związek	Temperatury przejść międzyfazowych [°C]
<b>PCK-1</b>	$T_g$ 103	<b>CK-3a</b>	$T_g$ 237.3 → Sm 250.19 → Sm 269.4
<b>PCK-2</b>	$T_g$ 87 → $S_m A_1$ 165 → $C_i$	<b>CK-3b</b>	$T_g$ 231.6 → Sm 262.9 → Sm 266.0
<b>PCK-3</b>	$T_g$ 34 → $S_m A_1$ 196 → $C_i$	<b>CK-3c</b>	$T_g$ 218.4 → Sm 260.4 → $C_i$
<b>PCK-6</b>	$T_g$ 110	<b>CK-3d</b>	$T_g$ 213.3 → Sm 259.9 → $C_i$
<b>PCK-15</b>	$T_g$ 81	<b>CK-3e</b>	$T_g$ 78.9 → $T_g$ 205.0 → Sm 249.5 → $C_i$
<b>PCK-17</b>	$T_g$ 87 → $C_i$	<b>CK-3f</b>	$T_g$ 86.2 → $T_g$ 200.5 → Sm 251.7
<b>PCK-18</b>	$T_g$ 158	<b>CK-3g</b>	$T_g$ 116.4 → $T_g$ 196.7 → Sm 255.2
<b>PCK-19</b>	$T_g$ 87 → $S_m$ 229 → $C_i$	<b>CK-3h</b>	$T_g$ 103.4 → $T_g$ 198.6 → Sm 253.5
<b>PCK-20</b>	$T_g$ 96 → $S_m$ 310 → D		

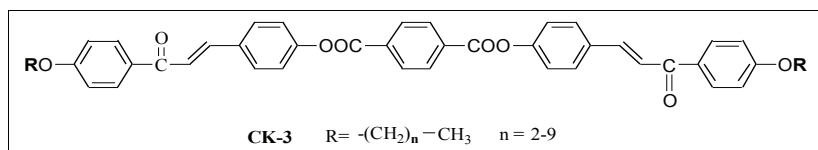
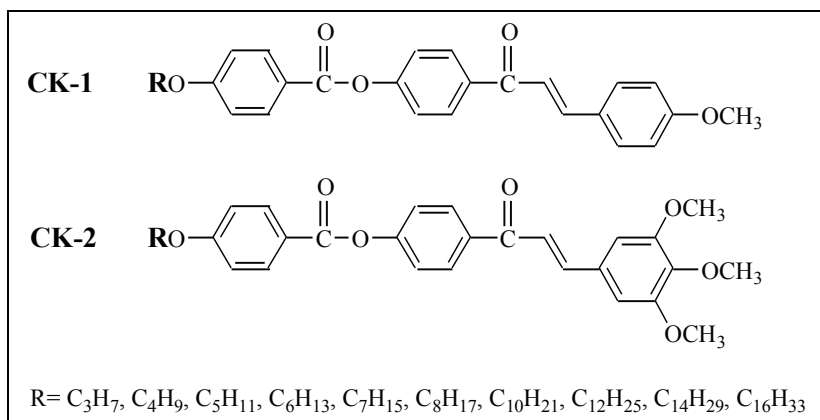
$T_g$  – temperatura zeszklenia,  $C_i$  – ciecz izotropowa, D – rozkład

## II. Ciekłe kryształy (CK) zawierające cząsteczkę chalkonu.

W celu określenia zależności właściwości ciekłokrystalicznych od struktury cząsteczki zsyntetyzowano serię połączeń z terminalnymi grupami alkoksylowymi o różnej długości łańcucha alkilowego **CK-1** i **CK-2**. [36] Związki z łańcuchem o długości  $C_3$ – $C_7$ , przyjmują strukturę nematyczną, dla  $R=C_8H_{17}$  i  $C_{10}H_{21}$  tworzą się ciekłe kryształy o strukturze smektycznej (w niższej temperaturze 81, 76°C) a następnie nematycznej (w wyższej temperaturze, odpowiednio 87, 96°C), natomiast gdy podstawnik alkoksylowy zawiera 12, 14 lub 16 atomów węgla obserwowana jest tylko struktura smektyczna typu C. Związki o strukturze typu **CK-2** charakteryzują się niższą stabilnością termiczną ze względu na obecność dwóch dodatkowych grup  $OCH_3$  w pozycjach *meta* pierścienia B cząsteczki chalkonu.

Cząsteczki typu **CK-3** [37,38] występujące jako smektyczne ciekłe kryształy typu A są przykładem związków w których dwie cząsteczki chalkonu stanowią część sztywnego łańcucha. Cząsteczki zorientowane są równolegle do wek-

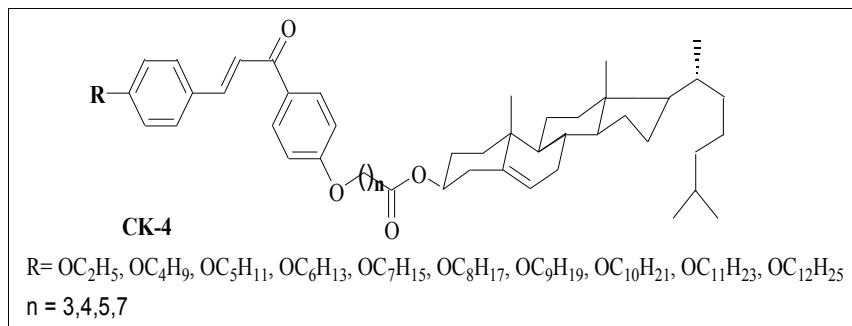
torą przyłożonego pola elektrycznego. Naświetlanie lampą rtęciową powoduje zarówno fotodimeryzację jak i fotopolimeryzację.



Odrębną grupą stanowią analogi ciekłych kryształów tzw. ang. *twist grain boundary (TGB) phases*. [39,40] Są to niesymetryczne fluoroscencyjne dimery ciekłokrystaliczne składające się z cholesterolowo-estrowego trzonu jako jednostki wykazującej chiralne właściwości oraz części mezogenicznej którą jest chalkon. Charakteryzują się one niespodziewanym i zadziwiającym zachowaniem termicznym. Są to cząsteczki które w wąskim przedziale temperaturowym (kilka stopni Celsjusza) istnieją w stanie pośrednim pomiędzy cieczą izotropową albo stanem ciekłokrystalicznym o właściwościach skręconego nematyku (N\*), a fazą smektyczną typu A lub typu C. Oznacza się je jako np. I-TGB-TGBC\*.

Przebadano szereg układów z linkerem składającym się z 4, 5, 6 lub 8 atomów węgla i różnej długości podstawnikiem alkoksylowym w pierścieniu benzenowym (pozycja *para*) cząsteczki.





Niższe homologi wykazują teksturę skróconego nematyku, związki pośrednie stabilizują fazę TGB i/lub smektyczną A, podczas gdy wyższe homologi przejawiają tylko cechy kryształów SmA. Dimery posiadające nieparzystą liczbę atomów węgla w linkerze łączącym część chalkonową z częścią cholesterolową przyjmują kształt powyginanej cząsteczki.

Chalkon jest związkiem pośrednim w syntezie flawonoidów, substancji występujących w szeregu roślinach, posiadających różnorodną aktywność biologiczną. Hydroksychalkony oraz inne pochodne z różnorodnymi podstawnikami w jednym lub obydwu pierścieniach cząsteczki chalkonu wykazują min. aktywność przeciwdrobnoustrojową, przeciwutleniającą, antymutagenną czy insektycydową.[53,54] Niektóre pochodne chalkonu ze względu na swój słodki smak stosowane są jako składniki słodzików, inne są dodatkami do kremów lub też stosowane są w terapii antyrakowej.[55] Do określania struktury podstawionych chalkonów i rozróżniania izomerycznych połączeń (podstawienie w pierścieniu A lub B cząsteczki chalkonu) powszechnie wykorzystywana jest spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego jak również różne metody spektrometrii masowej, a w szczególności techniki wykorzystujące EI, ESI czy też FAB jako metody jonizacji cząsteczki. [56-60]

#### Literatura:

1. K. Pigoń, Z. Ruziewicz, *Chemia fizyczna*, Wydawnictwo Naukowe PWN, 2005, Warszawa, ISBN:830114484X;
2. [http://en.wikipedia.org/wiki/Liquid\\_crystal](http://en.wikipedia.org/wiki/Liquid_crystal);
3. C.C. Unruh, *J. Appl. Polym. Sci.*, 6, 1959, 358;
4. Y. Makita, T. Natsui, S.-I. Kimura, S. Nakata, M. Kimura, Y. Matsuki, Y. Takeuchi, *J. Photopolym. Sci. Tech.*, 11(2), 1998, 187-192;
5. D.-H. Choi, Y.-K. Cha, *Polym. Bull.*, 48, 2002, 373-380;

6. K. Subramanian, V. Krishnasamy, S. Nanjundan, A.V. Rami Reddy, *Eur. Polym. J.*, 36, 2000, 2343-2350;
7. D.-H. Choi, Y.K. Cha, *Bull. Korean Chem. Soc.*, 23(3), 2002, 469-476;
8. S.Y. Ban, S. Kaihua, J.H. Kim, D.H. Choi, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, 406, 2003, 287-293;
9. T. Mihara, M. Tsutsumi, N. Koide, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, 382, 2002, 53-64;
10. T. Mihara, M. Tsutsumi, N. Koide *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, 412, 2004, 247-258;
11. T. Mihara *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, 441, 2005, 185-200;
12. P. Selvam, K. Victor Babu, A. Penlidis, S. Nanjundan, *Eur. Polym. J.*, 41 (2005) 831-841;
13. A. Rehab, *Eur. Polym. J.*, 34(12), 1998, 1845-1855;
14. D.-H. Choi, S.Y. Ban, J.H. Kim, *Bull. Korean Chem. Soc.*, 24(4), 2003, 441-445;
15. J.-Y. Hwang, D.-S. Seo, E.-J. Hahn, *Liq. Cryst.*, 29(4), 2002, 567-572;
16. J.-Y. Hwang, D.-S. Seo, *Liq. Cryst.*, 28(7), 2001, 1065-1069;
17. J.-Y. Hwang, Y.-B. Kim, D.-S. Seo, *Ferroelectrics*, 278, 2002, 115-125;
18. J.-Y. Hwang, D.-S. Seo, J.-H. Son, D.-H. Suh, *Jpn. J. Appl. Phys.*, 39(11 A), 2000, 1108-1110;
19. D.-S. Seo, J.-Y. Hwang, *Jpn. J. Appl. Phys.*, 39(12 A), 2000, 1239-1241;
20. D.-S. Seo, J.-Y. Hwang, *Jpn. J. Appl. Phys.*, 39(8A), 2000, 816-818;
21. J.-Y. Hwang, Y.-B. Kim, D.-S. Seo, *Ferroelectrics*, 278, 2002, 115-125;
22. D.H. Choi, S.J. Oh, S.Y. Ban, K.Y. Oh, *Bull. Korean Chem. Soc.*, 22(11), 2001, 1207-1212;
23. Dong Hoon Choi, Sang Joon Oh, *Eur. Polym. J.*, 38(8), 2002, 1559-1564;
24. K.-H. Jung, S.-Y. Hyun, D.-M. Song, D.-M. Shin, *Opt. Mater.*, 21, 2002, 663-666;
25. S.-Y. Hyun, J.-H. Moon, D.-M. Shin, Y.-B. Kim, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, 412, 2004, 369-376;
26. D.M. Song, D.M. Shin, K.Y. Choi, M.H. Yi, *Colloids Surf. A*: 198-200, 2002, 875-879;
27. D.-M. Song, K.-H. Jung, J.-H. Moon, D.-M. Shin, *Opt. Mater.*, 21, 2002, 667-671;
28. D.-M. Shin, J.-H. Moon, K.H. Jung, D.M. Song, *Ferroelectrics*, 278, 2002, 167-174;

29. D.-M. Shin, D.-M. Song, Y.-B. Kim, *Mater. Sci. Eng., C*, 24, 2004, 127-130;
30. J.-Y. Hwang, D.-S. Seo, D.-H. Suh, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, 412, 2004, 259-268;
31. J.-Y. Hwang, D.-S. Seo, J.-H. Son, D.H. Suh, *Jpn. J. Appl. Phys.*, 40(7B), 2001, 761-764;
32. J.-Y. Hwang, Y.-B. Kim, D.-S. Seo, *Ferroelectrics*, 278, 2002, 127-137;
33. T. Mihara, Y. Nakao, N. Koide, *Polym. J.*, 37(3), 2005, 162-168;
34. T. Mihara, Y. Nakao, N. Koide, *Polym. J.*, 36(11), 2004, 899-908;
35. H. Tunell, M. Selo, K. Skarp, J. Hilborn, *Polym. J.*, 38(7), 2006, 716-723;
36. B.T. Thaker, D.M. Patel, P.K. Tandel, M.S. Jesani, C.J. Vyas and A.D. Vansadia, *Phase Transitions*, 78(6), 2005, 521-527;
37. J.-Y. Chang, S.-W. Nam, Ch.-G. Hong, J.-H. Im, J.-H. Kim, M.-J. Han, *Adv. Mater.*, 13(17), 2001, 1298-1301;
38. S.W. Nam, S.H. Kang, J.Y. Chang, *Macromol. Res.*, 15(1), 2007, 74-81;
39. Ch.V. Yelamaggad, N.L. Bonde, A.S. Achalkumar, D.S. Shankar Rao, S.K. Prasad, A.K. Prajapati, *Chem. Mater.*, 19, 2007, 2463-2472;
40. Ch.V. Yelamaggad, A.S. Achalkumar, N.L. Bonde, A.K. Prajapati, *Chem. Mater.*, 18, 2006, 1076-1078;
41. D.-H. Choi, Y.-K. Cha, *Bull. Korean Chem. Soc.*, 23(4), 2002, 587-592;
42. N.K. Chudgar, S.N. Shah; *Liq. Cryst.*, 4(6), 1989, 661-668;
43. J.-H. Kim, S.-Y. Ban, Q. Zhang, G.-W. Kim, M.-J. Cho, D.-H. Choi, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, 445, 2006, 307-314;
44. X.-D Li, Z.-X. Zhong, S.H. Lee, G. Ghang, M.-H. Lee, *Appl. Phys. Lett.*, 86, 2005, 131912;
45. X.-D. Li, Z.-X. Zhong, J.J. Kim, M.-H. Lee, *Macromol. Rapid Commun.*, 25, 2004, 1090-1094;
46. A. Kumano, *J. Photopolym. Sci. Technol.*, 14(1), 2001, 23-28;
47. H.R. Allcock, Ch.G. Cameron, *Macromolecules*, 27, 1994, 3131-3135;
48. K. Subramanian, S. Nanjundan, A.V. Rami Reddy, *Eur. Polym. J.*, 37 (2001) 691-698;
49. P. Selvam, K. Victor Babu, S. Nanjundan, *Eur. Polym. J.*, 41 (2005) 35-45;
50. M. Veber, G. Berruyer, *Liq. Cryst.*, 27(5), 2000, 671-676;
51. R. Eelkema, R.A. van Delden, B.L. Feringa, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 43, 2004, 5013-5016;

52. K.-S. Choi, H.-W. Kim, Y.-B. Kim, J.-D. Kim, *Liq. Cryst.*, 31(5), 2004, 639-647;
53. Z. Nowakowska, G. Schroeder, *Chemistry for Agriculture*, 8, 2007, 168-172;
54. Z. Nowakowska, B. Kędzia, G. Schroeder, *Eur. J. Med. Chem.*, 43, 2008, 707-713;
55. Z. Nowakowska, *Eur. J. Med. Chem.*, 42(2), 2007, 125-137;
56. Z. Nowakowska, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 16, 2002, 634-637;
57. Z. Nowakowska, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 18, 2004, 2513-2516;
58. Z. Nowakowska, *Spectroscopy Letters*, 38 (4-5), 2005, 477-485;
59. Z. Nowakowska, *Eur. J. Mass Spectrom.*, 12(5), 2006, 339-343;
60. Z. Nowakowska, *Eur. J. Mass Spectrom.*, 14, 2008, 37-47.

## Rozdział VI

### Polimery supramolekularne

Michał Cegłowski, Grzegorz Schroeder

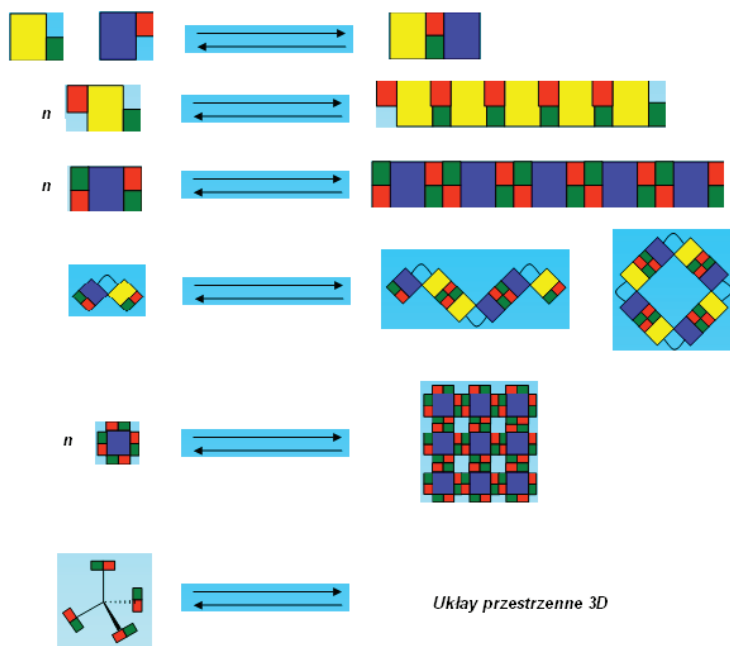
*Uniwersytet im. A. Mickiewicza, Wydział Chemii, Grunwaldzka 6,  
60-780 Poznań*

#### 1. Wstęp

Jednym z największych osiągnięć chemii XX wieku, które z całą pewnością wywarło olbrzymi wpływ na nasze codzienne życie, było otrzymanie sztucznych polimerów. Związki te znalazły zastosowanie w każdej dziedzinie życia codziennego oraz w różnych obszarach nauki. Ze względu na dobór ilości i jakości cząsteczek poddanych polimeryzacji lub kondensacji (merów) można w bardzo szerokim zakresie modyfikować zarówno ich właściwości chemiczne jak i fizyczne. Cechą wspólną omawianych polimerów jest występowanie wiązań kowalencyjnych między powtarzającymi się merami. Wraz z rozwojem chemii supramolekularnej zainteresowano się ideą syntezy „polimerów supramolekularnych” [1], w których monomery byłby połączone wiązaniami niekowalencyjnymi. W szerszym rozumowaniu owe polimery supramolekularne obejmowałyby niekowalencyjne oddziaływania między powtarzającymi się ugrupowaniami oraz bocznymi łańcuchami klasycznych polimerów, a także oddziaływania między tymi polimerami, a małymi cząsteczkami lub jonami metali.

Innowacyjną, a zarazem niezwykle użyteczną właściwością tego typu polimerów jest ich zdolność do samoorganizacji, gdyż oznacza to, iż badane układy mogą samoistnie rozbudowywać się w określonym kierunku w zależności od własnej struktury. Z tego właśnie powodu związki te są przedmiotem wielu badań, które mają na celu otrzymanie polimerów supramolekularnych dzięki procesowi samoorganizacji uzupełniających się monomerów posiadających dwa lub więcej ugrupowań wiążących. Proces powstawania omawianych polimerów można zilustrować następująco: selektywne łączenie uzupełniających się cząsteczek dzięki molekularnemu rozpoznaniu określonych ugrupowań; wzrost struktury przez kolejne łączenie tylko tych komponentów, które są odpowied-

nie względem siebie zorientowane; zakończenie procesu wymagająca elementu kończącego reakcję.



*Typy polimeryzacji supramolekularnej*

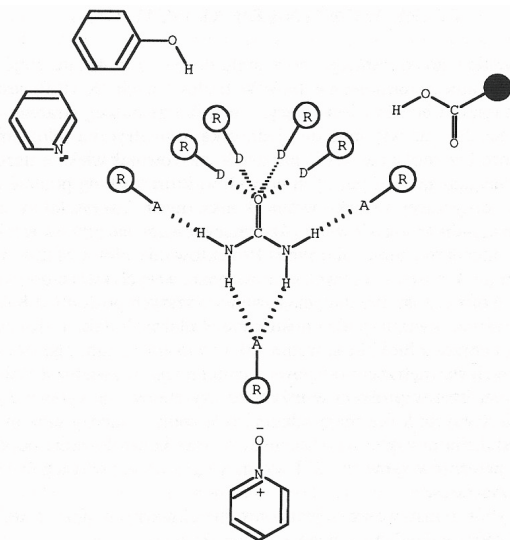
Chemia supramolekularna obejmuje ten rodzaj oddziaływań międzycząsteczkowych, których tworzenie jest odwracalne i ich siła zależy w dużej mierze od środowiska. Oznacza to, że omawiane polimery mogłyby wykazywać zdolność do samodzielnego naprawiania powstałych defektów w ich strukturze, w przeciwieństwie do tradycyjnych polimerów zawierających tylko wiązania kowalencyjne.

## 2. Wiązanie wodorowe

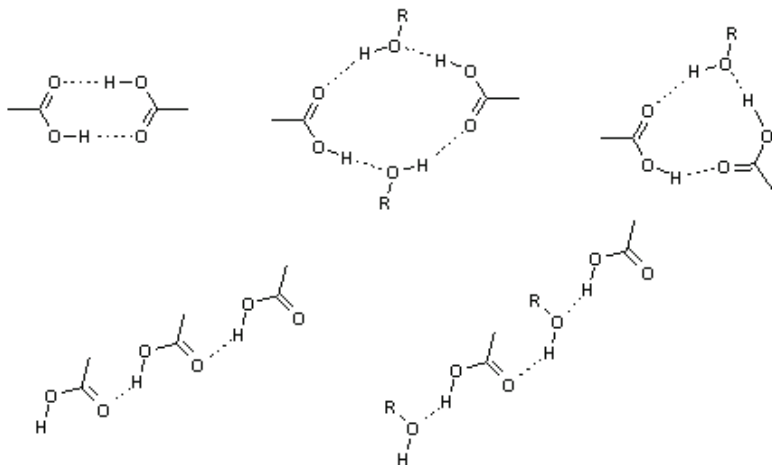
Niewątpliwie najlepszym z oddziaływań niekowalencyjnych, które z powodzeniem mogłyby wiązać pojedyncze molekuly tworzące polimery supramolekularne jest wiązanie wodorowe. Podpatrując organizmy żywe można znaleźć wiele przykładów skutecznego wykorzystania owego oddziaływania do tworzenia makromolekuł o bardzo skomplikowanej budowie [2]. Zarówno struktura podwójne helisy DNA, czy harmonijki beta opiera się w dużej mierze o wystę-

powanie szeregu wiązań wodorowych [3]. W tym momencie mogą narodzić się dwa pytania: dlaczego właśnie używać wiązań wodorowych oraz jakiego rodzaju monomerów należałoby użyć? Wiązania wodorowe są stosunkowo silnymi oddziaływaniami, skierowanymi w konkretnym kierunku, których efektywność można regulować w zależności od środowiska. Te wszystkie własności są w przypadku polimerów supramolekularnych bardzo ważne, ponieważ umożliwiają otrzymanie ściśle określonych struktur, których trwałość można regulować w oparciu o warunki w jakich się znajdują. Oznacza to, że właśnie dzięki wiązaniom wodorowym długość i właściwości polimerów będą ściśle zależne między innymi od stężenia, temperatury oraz pH.

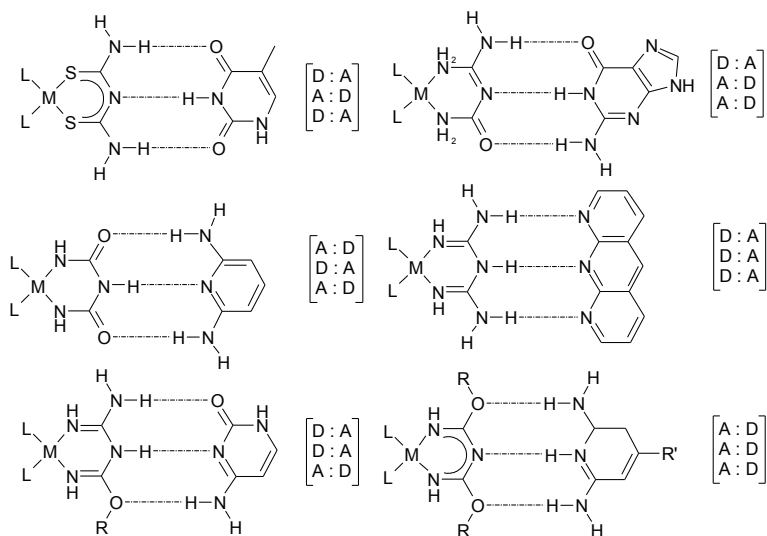
Odpowiedź na drugie z postawionych pytań jest uzależniona od właściwości jakich oczekuje się od danego polimeru. Kompleksy utworzone tylko dzięki pojedynczym wiązaniom wodorowym okazały się niezwykle pomocne w uzyskiwaniu polimerów ciekłokrystalicznych oraz bocznołańcuchowych. Pojedyncze mery w pierwszym przypadku są związkami dość łatwymi do otrzymania. Molekuły zdolne do wytworzenia kilku wiązań wodorowych cieszą się ogromnym zainteresowaniem, ze względu na większą siłę oddziaływań jaka występuje między poszczególnymi merami i to właśnie one są głównym tematem zainteresowań chemików zajmujących się polimerami supramolekularnymi. Częsteczki mające podstawniki donorowe lub akceptorowe mogą tworzyć kilka typów superamolekuł poprzez tworzenie wiązań wodorowych:



*Możliwe oddziaływania pomiędzy cząsteczką gospodarza i cząsteczkami gościa*



Możliwe sposoby polimerizacji kwasów karboksylowych



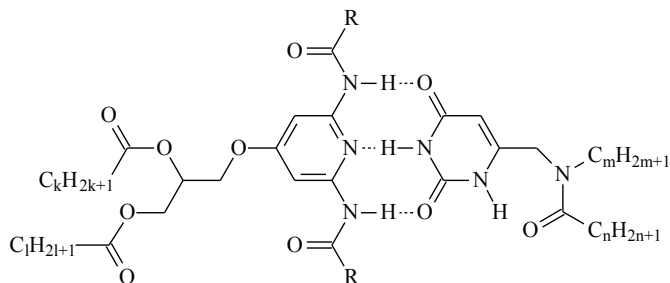
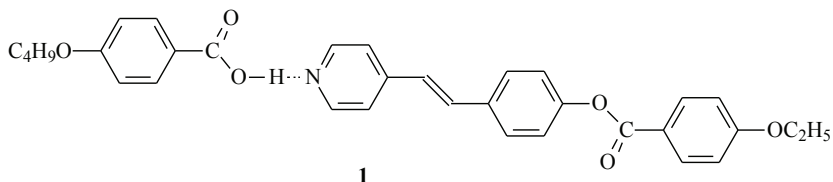
Możliwe kierunki polimerizacji kompleksów metali poprzez wiązania wodorowe

### 3. Kompleksy ciekłokrystaliczne

W związku **1** (rysunek 1) pojedyncze wiązanie wodorowe powstaje między grupą karboksylową i ugrupowaniem pirydynowym, co powoduje utworzenie

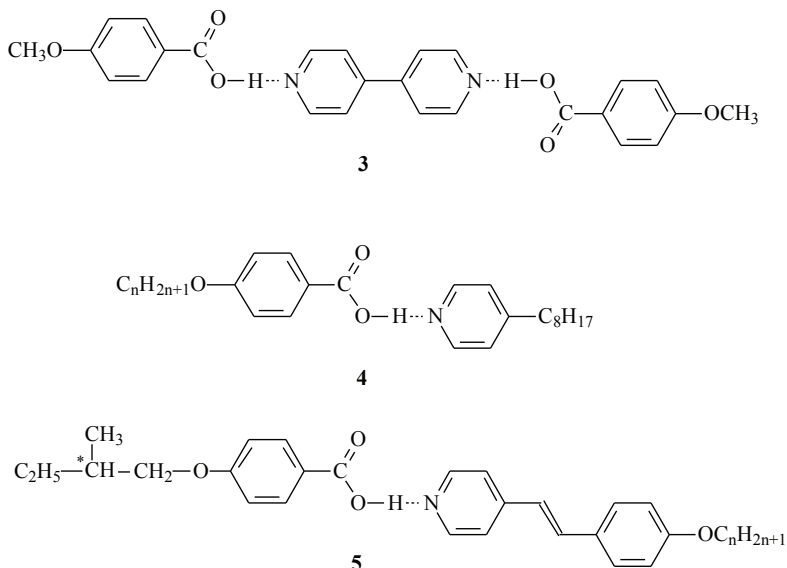


układu o ściśle określonej strukturze [4]. Należy również dodać, że kompleks ten jest stabilny w temperaturze ok. 200°C, czyli więcej niż dla każdego z merów z osobna. Z kolei mezogeniczny kompleks **2** powstaje dzięki utworzeniu trzech wiązań wodorowych między pochodnymi uracylu i 2,6-diaminopirydny [5] zawierającymi po dwa łańcuchy lipofilowe.



Rysunek 1. Przykłady kompleksów mezogenicznych.

Bardzo wiele mezogenicznych struktur o budowie łańcuchowej otrzymano dzięki wiązaniu wodorowemu, które tworzy się między grupą karboksylową oraz pochodnymi pirydyny (Rysunek 2). Kompleks **3** tworzy fazę ciekłokrystaliczną, natomiast w temperaturze powyżej 160°C tworzy fazę nematiczną. Powstaje dzięki utworzeniu kompleksu przez kwas 4-metoksybenzoowy oraz 4,4'-bipirydynę [6, 7]. Jest to przykład związku ciekłokrystalicznego, który powstaje ze związków niemezomorficznych. Kompleks **4** ( $n = 6-10$ ) tworzy fazę nematiczną w temperaturze pokojowej [8, 9]. Należy zaznaczyć, że chiralne fazy smektyczne mają właściwości ferroelektryczne i są otrzymywane z związków czynnych optycznie. Związek **5** ( $n = 8$ ) w tym przypadku tworzy chiralną fazę smektyczną C, jednak jak się okazało, pojedyncza chiralna cząsteczka nie tworzy fazy ciekłokrystalicznej o właściwościach ferroelektrycznych.



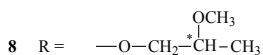
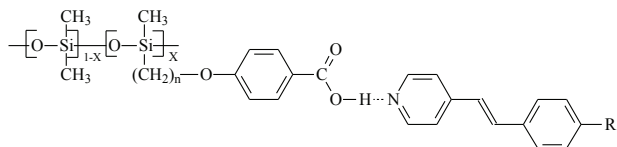
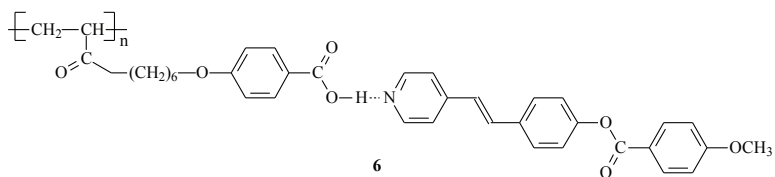
Rysunek 2. Mezogeniczne kompleksy o strukturze liniowej zawierające wiązanie między grupą karboksylową oraz ugrupowaniem pirydynowym.

#### 4. Supramolekularne, ciekłokrystaliczne polimery bocznołańcuchowe

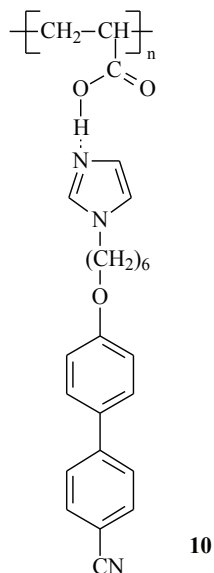
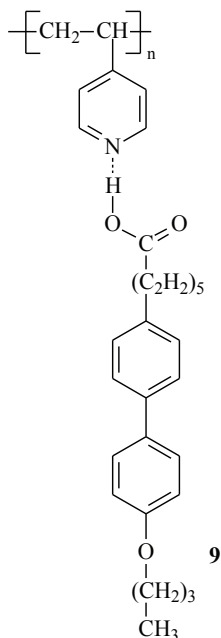
Jedynym z pierwszych otrzymanych związków zaliczanych do polimerów bocznołańcuchowych była pochodna poliakrylanu z przyłączonymi cząsteczkami kwasu 4-oksobenzoesowego, których celem było tworzenie wiązań wodorowych z pochodnymi stilbazolu [10]. Faza nematyczna polimeru **6** była obserwowalna przy temperaturze 250°C dla kompleksów o stosunku 1:1. Ponadto otrzymano różnorodne struktury, oparte o połączenia poliakrylanów i polisiloksanów (Rysunek 3) [11, 12]. Związek **7** tworzy fazę smektyczną, natomiast związek **8** ma właściwości ferrochemiczne i tworzy fazę smektyczną C.

Supramolekularne polimery bocznołańcuchowe charakteryzują się tym, iż wiązanie koordynacyjne tworzy się w pewnej odległości od głównego łańcucha standardowego polimeru o wiązaniach kowalencyjnych. Do samego polimeru jest dołączone ugrupowanie, które może przyjmować różne ułożenia, co oznacza, że powstałe wiązanie koordynacyjne nie znajduje się w ściśle określonej odległości od głównego łańcucha. Przejdziemy teraz do drugiego podtypu supramolekularnych polimerów bocznołańcuchowych, w których ugrupowanie tworzące wiązanie koordynacyjne znajduje się bezpośrednio przy łańcuchu głównym. Pierwszym z tego typu związków jest polimer **9**, który otrzymano z 4-winylopirydyny [13]. Związek **10**, który tworzy fazę smektyczną A, powstaje

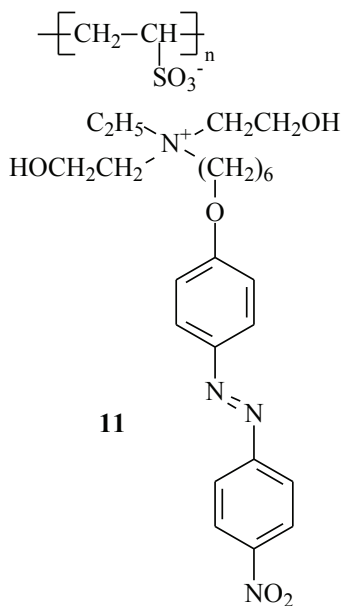
dzięki utworzeniu wiązania wodorowego między imidazolem, a grupą karboksylową [14].



Rysunek 3. Przykłady supramolekularnych polimerów boczołańcuchowych.



Rysunek 4. Supramolekularne kompleksy boczołańcuchowe.



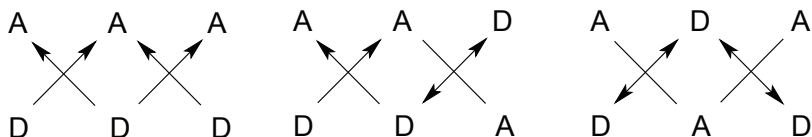
Rysunek 5. Supramolekularny kompleks bocznolącuchowy powstały dzięki oddziaływaniom jonowym.

### 5. Stabilność kompleksów zawierających wielokrotne wiązanie wodorowe

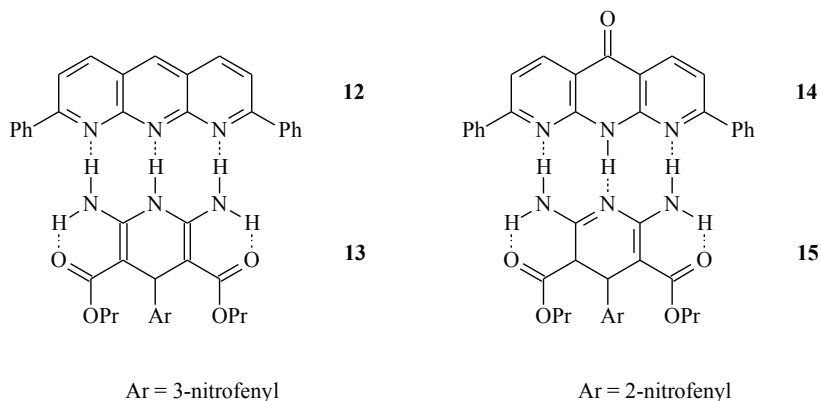
W wielu przypadkach konieczne jest sprecyzowanie parametrów wpływających na stabilność kompleksów. Nie można dokładnie przewidzieć siły wiążącej wielokrotnego wiązania wodorowego, gdyż zależy ona między innymi od środowiska (temperatura, pH), jak i od geometrii samych cząsteczek. Okazało się natomiast, że siła wiążąca kompleksów zawierających takie same ilości wiązań wodorowych, zależy w dużej mierze od ułożenia przestrzennego akceptorów (A) wiązania wodorowego oraz jego donorów (D). Dla układów zawierających po trzy wiązania wodorowe o podobnej sile kształtuje się ona następująco: AAA · DDD > AAD · DDA > ADA · DAD. Tendencję tą tłumaczy się drugorzędowymi oddziaływaniami pomiędzy sąsiadującymi ugrupowaniami [16, 17]. W celu lepszego zobrazowania zostało to zilustrowane na Rysunku 6.

Model ten tłumaczy ponad 100-krotną różnicę w stałej trwałości między kompleksami guanina · cytozyna (AAD · DDA) oraz uracyl · 2,6-diaminopirydina (ADA · DAD). Dalsze badania przeprowadzone nad tego typu układami dostarczyły empirycznych dowodów potwierdzających znaczny wpływ drugorzędowych oddziaływań między sąsiadującymi ugrupowaniami na trwałość komplek-

sów [18, 19]. Dla przykładu, kompleks AAA · DDD (Rysunek 2, kompleks **12** · **13**) ma Kasoc w chloroformie ponad 104 razy większą niż Kasoc dla kompleksu ADA · DAD (Rysunek 2, kompleks **14** · **15**). Wiązania wodorowe w kompleksach **12** · **13** oraz **14** · **15** mają podobną naturę, gdyż występują pomiędzy niemal identycznymi układami. Różnica w sile oddziaływania wynika właśnie na skutek drugorzędowych oddziaływań między ugrupowaniami tworzącymi wiązanie wodorowe.



Rysunek 6. Drugorzędowe oddziaływania między sąsiadującymi ugrupowaniami. W przypadku AAA · DDD występuje tylko przyciąganie, natomiast w pozostałych układach pojawia się odpychanie sąsiadujących grup.



Rysunek 7. Kompleks AAA · DDD (**12** · **13**) oraz ADA · DAD (**14** · **15**).

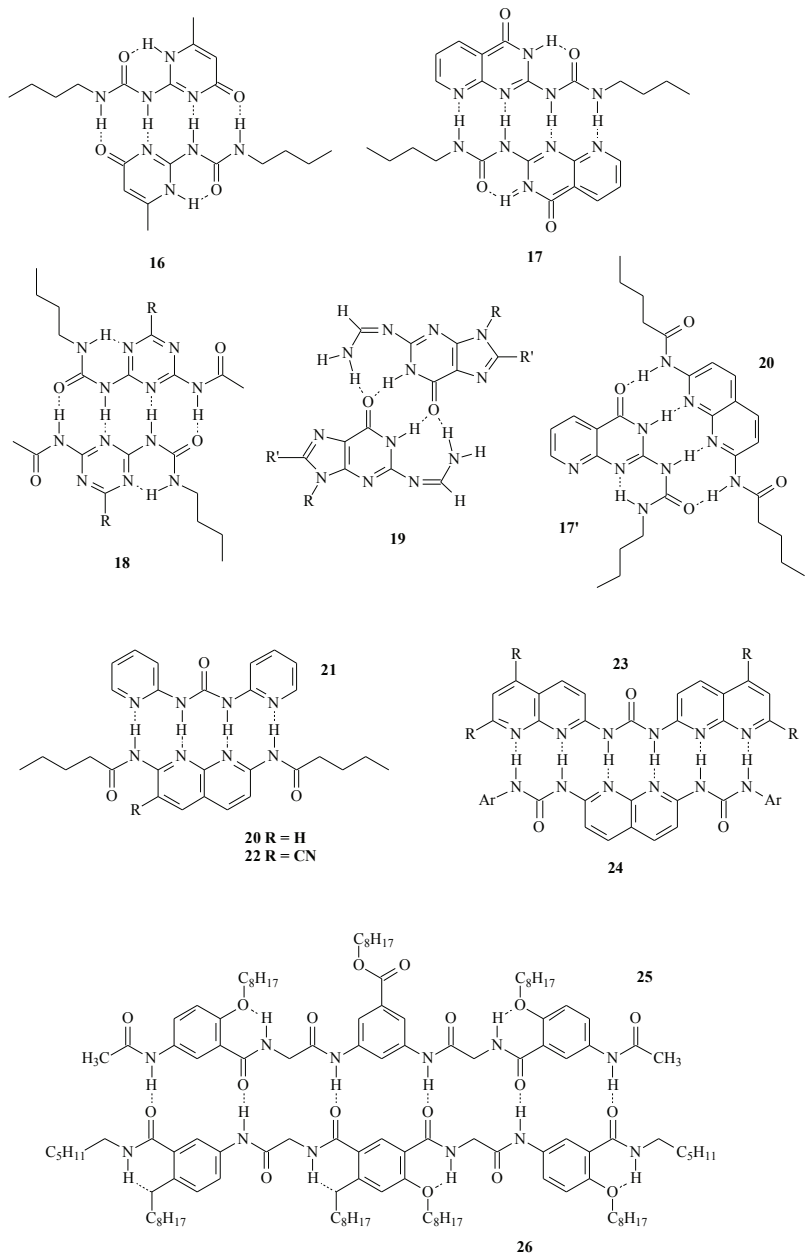
W późniejszych pracach zaproponowano, iż entalpia swobodna asocjacji ( $\Delta G_{\text{asoc}}$ ) dla kompleksów zawierających wiązania wodorowe rozpuszczonych w chloroformie może zostać opisana dwoma przyrostami, jedynym odpowiadającym z tworzenie wiązania, a drugim odpowiedzialnym za drugorzędowe oddziaływania [20]. Obliczono, że energia pojedynczego wiązania wodorowego wynosi 7,9 kJ/mol, a wpływ drugorzędowego oddziaływania wynosi odpowiednio 2,9 kJ/mol.

## 6. Stabilność ugrupowań zawierających wielokrotne wiązania wodorowe

Ukazało się wiele prac opisujących układy zdolne do tworzenia wyjątkowo silnych kompleksów [21, 22]. Przykładem takich kompleksów jest zaprezentowany już kompleks **12** · **13**, a ponadto związki przedstawione na Rysunku 3. Podstawą większości tego typu układów jest obecności pierścieni heterocyklicznych. Dimer **16** · **16** [23, 24] rozpuszczony w chloroformie ma stałą dimeryzacji większą niż 106 M<sup>-1</sup>. Jeszcze wyższe stałe dimeryzacji ( $2 \times 107$  M<sup>-1</sup>) w chloroformie oraz ( $\sim 108$  M<sup>-1</sup>) w toluenie zostały osiągnięte dla pochodnych związku **16** [24]. Z tego właśnie powodu znalazł on duże zastosowanie w otrzymywaniu polimerów supramolekularnych, o czym będzie mowa w dalszej części tekstu. Dimer **17** · **17** [25, 26] wykazuje również wysoką stałą dimeryzacji, która osiąga wartość powyżej 107 M<sup>-1</sup> wyznaczoną dzięki spektroskopii <sup>1</sup>H NMR z roztworów w chloroformie. Dimer **18** · **18** [2] jest przykładem kompleksu ADAD, dlatego można się dla niego spodziewać stałej dimeryzacji niższej niż w poprzednich przykładach. Teoria znajduje tutaj potwierdzenie, gdyż K<sub>dim</sub> wynosi w tym przypadku  $2 \times 104$  M<sup>-1</sup> [27]. Kolejnym przykładem związku ulegającego dimeryzacji dzięki tworzeniu wiązań wodorowych jest pochodna guanozyny (**19**) zaprezentowana przez Sessler-a i Wang-a [28, 29].

Poza opisanymi układami należy również zwrócić uwagę na heterodimeryczne kompleksy, gdyż mogą być one również efektywnymi łącznikami tworzącymi polimery supramolekularne. Przykłady tego typu związków to omawiany już kompleks **12** · **13** oraz pozostałe związki zaprezentowane na Rysunku 3. Stała asocjacji kompleksu **17'** · **20** wynosi 3500 M<sup>-1</sup>, a cząsteczka **17'** powstała dzięki innemu ułożeniu konformacyjnemu prezentowanego już związku **17**. Przykładami kompleksów zawierających sześć wiązań wodorowych są kompleksy **23** · **24** [30, 31] oraz **25** · **26** [32, 33]. Należy zaznaczyć, że drugi z tych kompleksów ma bardzo wysoką stałą asocjacji w chloroformie ( $1,3 \times 109$  M<sup>-1</sup>).

Polimery supramolekularne

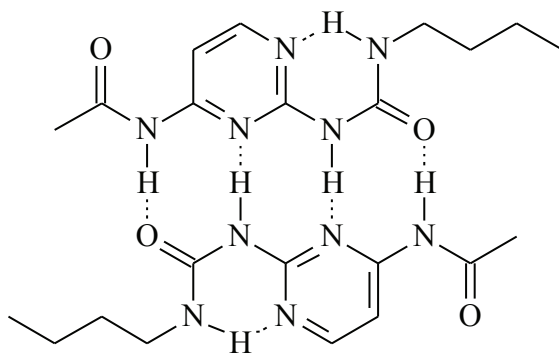


Rysunek 8. Przykłady związków zawierających wielokrotne wiązania wodorowe.

## 7. Czterokrotne wiązania wodorowe

Polimery można otrzymywać na bazie wielokrotnych wiązań wodorowych. Wielokrotne wiązania wodorowe cieszą się bardzo dużym zainteresowaniem ze względu na swoje unikatowe właściwości. Jednakże z praktycznego punktu widzenia w przypadku tego typu polimerów musi zostać zawarty kompromis między ilością wiązań wodorowych, czyli siłą otrzymanego kompleksu, a możliwościami oraz ekonomią jego syntezy. Poza zaprezentowanymi już przykładami polimerów zawierających po sześć wiązań wodorowych, udało się otrzymać związki zdolne do wytworzenia nawet dziesięciu tego typu oddziaływań. Jednakże w obu przypadkach, związki te wymagają bardzo wielu etapów syntezy i są praktycznie niedostępne na większą skalę. Z kolei zbyt mała liczba wiązań wodorowych, powoduje, że otrzymany polimer jest zbyt nietrwały już w temperaturze pokojowej i tworzy agregaty o niewielkim stopniu polimeryzacji.

Okazuje się, że bardzo dobrym kompromisem między dostępnością związku i siłą wzajemnych oddziaływań między jego merami jest zastosowanie związków zdolnych wytworzyć czterokrotne wiązania wodorowe. Głównym czynnikiem wpływającym w tym przypadku na siłę tworzonego kompleksu są omówione już drugorzędowe oddziaływania między sąsiadującymi ugrupowaniami. W przypadku kompleksów typu DADA wyraźnie widać, że drugorzędowe oddziaływania limitują maksymalną wartość stałej dimeryzacji do wartości 105 M<sup>-1</sup> [27]. Mimo, że jest ona nadal większa niż dla kompleksów DAD-ADA, okazuje się dalej niewystarczająca, aby utworzyć polimery supramolekularne o wystarczająco długich łańcuchach. Ponadto związek wykazujący najwyższą stałą dimeryzacji (27) jest dość trudny do otrzymania na większą skalę, ze względu na cenę jednego z substratów – diaminopirymidyny.



27

Rysunek 9. Kompleks typu DADA · ADAD

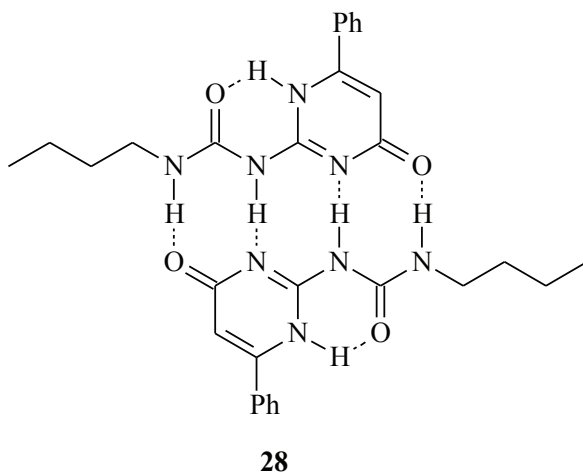


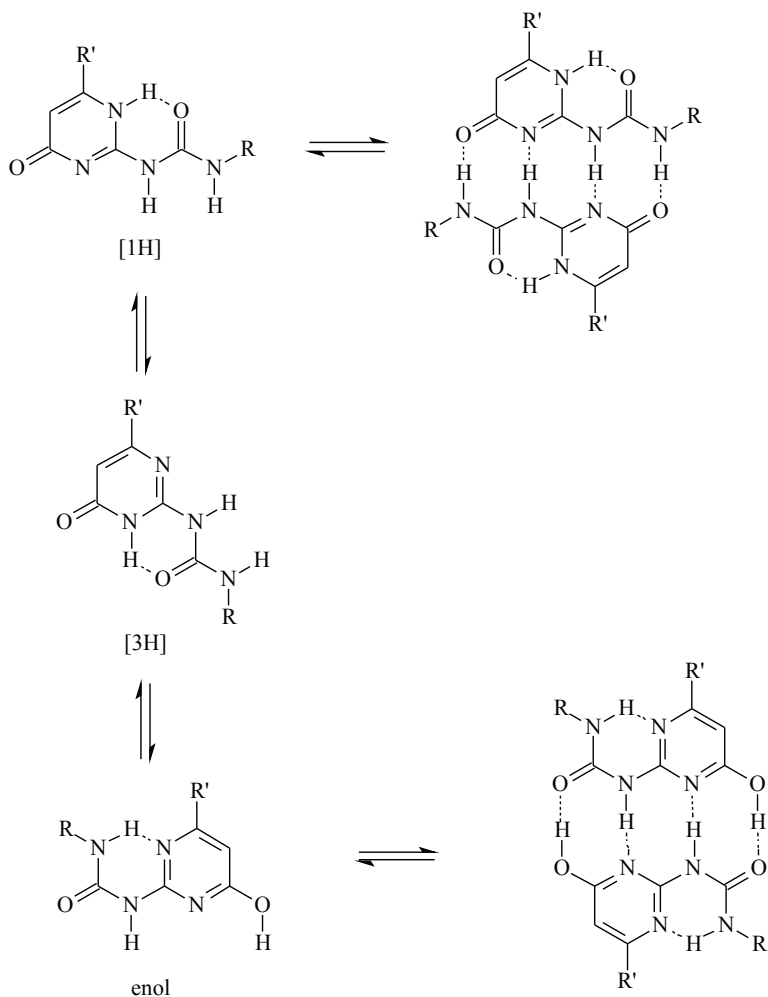
Znacznie wyższe stałe dimeryzacji otrzymuje się dla kompleksów DDAA, które uzyskuje się dzięki ureidynopirymidinonom UPy (Rysunek 8, związek **16**) [23]. Co ciekawe, ich otrzymywanie jest tańsze niż otrzymywanie kompleksów DADA, w których substratem jest diaminopirymidyna. W przypadku UPy związkami wyjściowymi są metyloizocytozyna oraz izocyjaniany. Z tych powodów to właśnie w pochodnych UPy dopatruje się idealnych kandydatów do otrzymania trwałych i możliwe tanich polimerów supramolekularnych, które znalazłyby wiele zastosowań w przemyśle.

## 8. Właściwości UPy

Tak jak w przypadku innych heterocyklicznych cząsteczek, tautomeria powoduje powstawanie różnych izomerów cząsteczki UPy (Rysunek 10). W macierzystym pierścieniu heterocyklicznym, izocytozynie, forma tautomeryczna 3H jest najbardziej stabilna [34]. W DMSO, czyli rozpuszczalniku polarnym, UPy **16** również występuje w tej formie tautomerycznej. Z kolei w chloroformie, ten sam związek w ponad 99 procentach występuje w formie tautomerycznej 1H.

Ilość każdego tautomeru w roztworze jest uzależniona od względnej energii występowania każdego z tautomerów w formie monomeru, a ponadto zależy od stałej dimeryzacji. Nie należy również zapomnieć o wpływie rozpuszczalnika oraz podstawników znajdujących się przy pierścieniu. Dla przykładu energia obu dimeryzujących tautomerów dla związku **28** jest podobna, co zaowocowało otrzymaniem krystalicznych form obu tautomerów.

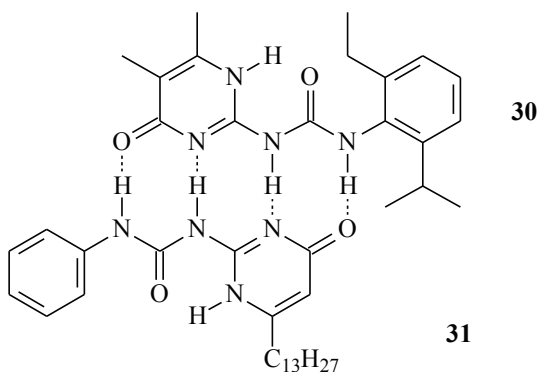
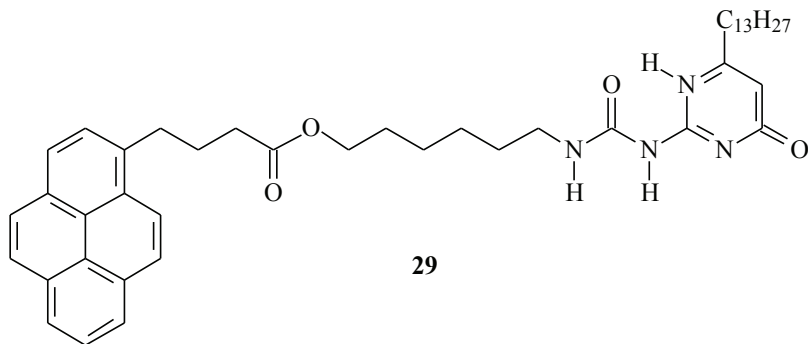




Rysunek 10. Różne tautomery związków UPy.

Zdolności asocjacyjne UPy zbadano przy użyciu pochodnych piren (29) [24]. Wykazano, że w deuterowanym chloroformie przy temperaturze 298 K wartość stałej dimeryzacji wynosi  $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ , natomiast w toluenie wartość ta wzrosła do  $6 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ . Wartość ta została tylko w niewielkim stopniu zmniejszona (do  $10^6 \text{ M}^{-1}$ ) kiedy do chloroform został wysycany wodą. Ponadto bardzo ważnym parametrem opisującym asocjację jest długość istnienia opisywanych

dimerów. W przypadku UPy współczynnik wymiany między homo- i heterodimerami w statystycznej mieszaninie związków **30** i **31** został wyznaczony za pomocą spektrometrii NMR.



Wyznaczono, że czas wymiany w deuterowanym chloroformie wynosi 170 msec, natomiast w toluenie wartość ta jest dziesięciokrotnie większa. Porównanie współczynników dysocjacji ze stałymi dimeryzacji może prowadzić do wniosku, że współczynnik asocjacji nie jest zależny od dyfuzji, jak w przypadku innych kompleksów zawierających wiązanie wodorowe. Najprawdopodobniej tautomerizacji monomeru musi nastąpić przed etapem dimeryzacji.

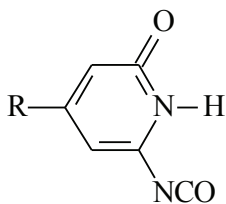
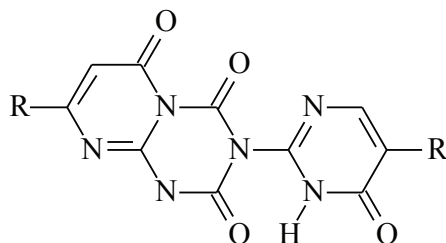
Kolejnym ważnym aspektem supramolekularnych polimerów jest ich odporność termiczna. Wykazano, że UPy ogrzewane przez dłuższy czas w temperaturze powyżej 180°C ulegają rozkładowi. Wiązanie kowalencyjne N-C jest najbardziej nietrwałe i ogrzewanie przez dłuższy czas prowadzi do jego zerwania.

## 9. Synteza UPy

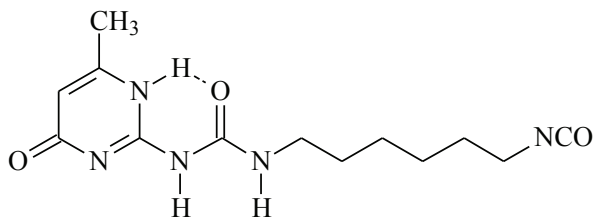
Ureidynopirymidinony można łatwo otrzymać dzięki reakcji pomiędzy pochodnymi izocytozyny oraz alifatycznymi lub aromatycznymi izocyjanianami. Izocytozyny mogą z kolei zostać otrzymane dzięki kondensacji  $\beta$ -ketoestrów z solami guanidyny. Synteza mono-UPy z izocytozyny i izocyjanianów nie stanowi większych problemów i gdyby zainteresowanie chemików ograniczało się tylko do monofunkcyjnych pochodnych, najprawdopodobniej nie byłoby konieczne usprawnianie procedur w syntezie. Niestety otrzymanie bis-UPy w celu otrzymania polimerów supramolekularnych nie należy do prostych syntez, ponieważ związki zawierające kilka ugrupowań izocyjanianowych są bardzo reaktywne i często prowadzą do niechcianych produktów.

W czasie syntezy z wykorzystaniem izocyjanianu oraz aminy, reaktywny izocyjanian może reagować z każdym z wymienionych ugrupowań. Dla syntezy monomerów zawierających dwa albo więcej grup UPy, związek **32** będący kombinacją izocyjaniano-izocytozyny wydaje się być bardzo dobrym rozwiązaniem. Może on reagować z wielofunkcyjną aminą, a część grup izocyjanianowych, które uległyby hydrolizie może zostać uzupełniona nadmiarem substratu.

Niestety okazało się, że izocyjaniany aminopirymidyn są niestabilne i ulegają reakcji tworząc dimer **33** [35].

**32****33**

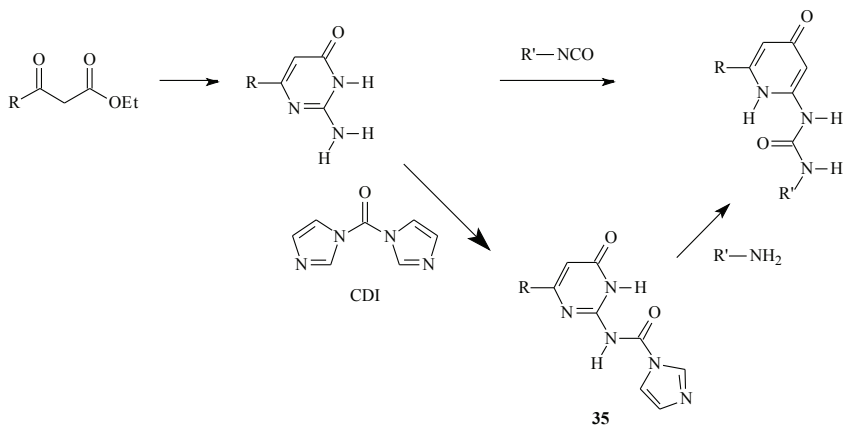
W celu ominięcia tego problemu, reaktywna pochodna UPy została przygotowana przez destylację metyloizocytozyny w obecności diizocyjanianoheksanu, który został użyty jako rozpuszczalnik [36]. Otrzymany produkt **34** został wyizolowany przez filtrację, a nadmiar diizocyjanianoheksanu mógł zostać odzyskany przez destylację.



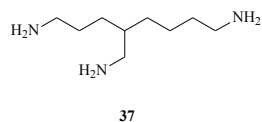
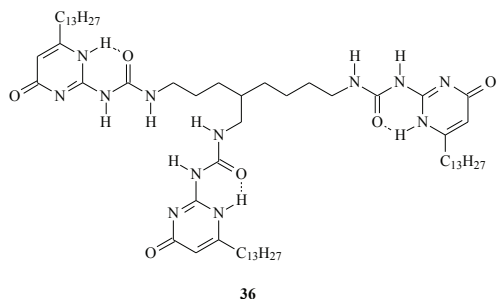
34

Dzięki użyciu tej procedury, reaktywny produkt został otrzymany w dużych ilościach, a następnie został użyty w reakcji z polimerami o reaktywnych grupach końcowych. Dodatkową zaletą użycia tego odczynnika jest jego zdolność do reakcji zarówno z grupami aminowymi, jak i grupami hydroksylowymi.

Kolejna metoda syntezy opiera się na wykorzystaniu związku **35**, otrzymanego w wyniku reakcji izocytozyny z CDI. Późniejsza reakcja z alifatycznymi lub aromatycznymi aminami zachodzą z wysoką wydajnością i trwają kilka godzin. Efektywność związku **35**, który można uznać za zastępczy dla grupy izocyjanianowej, została pokazana na przykładzie otrzymania związku **36** z triaminy **37**. Całkowita wydajność reakcji wyniosła 84%, a czysty produkt został wytrącony z metanolu.

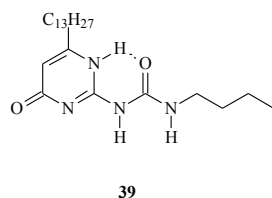
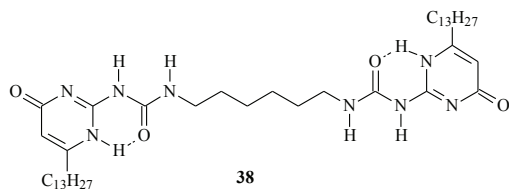


Rysunek 11. Alternatywne zastosowanie CDI w syntezie UPY.



### 10. UPy powiązane linkerami o niewielkich masach cząsteczkowych

Dwufunkcyjne pochodne UPy o małej masie cząsteczkowej zostały wykorzystane do zademonstrowania, iż możliwe jest otrzymanie liniowych, polimerów supramolekularnych o wysokim stopniu polimeryzacji. Pierwsze tego typu polimery zawierały po dwa ugrupowania UPy, które były połączone ze sobą łańcuchem heksanowym [37]. Roztwór tego związku w chloroformie cechował się wyraźną lepkością. Tak samo jak w przypadku polimerów kowalencyjnych, stopień polimeryzacji polimerów supramolekularnych w dużej mierze zależy od obecności monofunkcyjnych związków, które pełnią rolę zakończeń łańcucha polimeru. Zaobserwowano, że lepkość roztworu zawierającego związek **38** zwiększała się po każdorazowym oczyszczaniu. Niewielki dodatek związku **39** do 40 mM, dobrze oczyszczonego roztworu związku **38** spowodował znaczny spadek lepkości. Eksperyment ten dowodzi odwracalności polimeryzacji opartej na oddziaływaniach supramolekularnych, ponieważ redukcja gęstości następowała natychmiastowo.



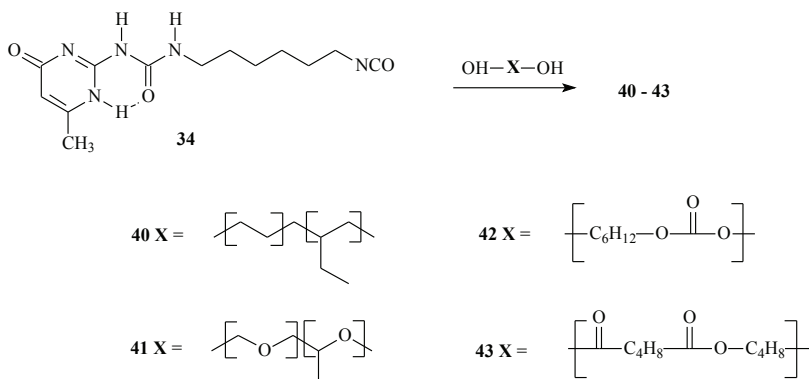
### 11. UPy powiązane linkery o dużych masach cząsteczkowych

Polimery supramolekularne posiadające niewielkie linkery posiadają wiele ciekawych właściwości, które jednakże można obserwować tylko w laboratorium. Chyba najważniejszym kryterium jakie musiałyby spełnić polimery supramolekularne oparte na UPy, aby znaleźć zastosowanie w przemyśle, jest niski koszt produkcji. Jednym ze sposobów osiągnięcia tego jest użycie dwufunkcyj-

nych pochodnych UPy przyłączonych do długich linkerów. W ten sposób redukuje się ilość ugrupowań UPy, ale zachowa się wszystkie właściwości, których oczekuje się od polimerów supramolekularnych. Zgodnie z tymi założeniami otrzymano szereg związków [36]. W tym celu użyto związku **34**, który został przyłączony do polimerów kowalencyjnych zawierających grupy hydroksylowe (Rysunek 12).

Reakcja hydroksyl poli(etylenu butylenu) ze związkiem **34** zaowocowała produktem o zupełnie innych właściwościach mechanicznych, niż polimeru wyjściowego [23, str. 565]. Polimer wyjściowy był lepkiem płynem, natomiast UPy pochodna stała się gumo-podobnym materiałem, którego moduł Younga wynosił 5 MPa.

Funkcjonalizacja innych, bardziej polarnych polimerów zaowocowała również dużymi zmianami w ich właściwościach fizycznych. Polieter jest gęstą cieczą, natomiast po przyłączeniu ugrupowań UPy staje się tworzywem przypominającym gumę. W przypadku poliestrów i poliwęglanów wyjściowe materiały są dość kruche, natomiast po funkcjonalizacji stają się polimerami semikrystalicznymi.



Rysunek 12. Funkcjonalizacja polimerów kowalencyjnych.

## 12. Zastosowanie polimerów supramolekularnych

Silne niekowalencyjne oddziaływania czterokrotnego wiązania wodorowego powiązane z prostotą syntezy spowodowały, że powstało już wiele patentów opisujących zastosowanie polimerów supramolekularnych. Znalaziono dla nich wiele zastosowań, na przykład przy produkcji klejów [38], drukowaniu [39-43], produkcji kosmetyków [44]. Głównymi powodami, dla których w polimerach supramolekularnych dopatruje się tak dużego zastosowania są: (I) zdolność do ich wytworzenia w roztworze, co nie zmienia ich właściwości po oczyszczeniu

do fazy stałej; (II) nie wymagają wysokich temperatur przy syntezie; (III) prostota syntezy; (IV) możliwość przyłączenia ich do istniejących polimerów; (V) odwracalność ich polimeryzacji, co czyni z nich materiały łatwe do usunięcia.

Jedną z pierwszych gałęzi przemysłu, w których polimery supramolekularne znalazły zastosowanie jest drukarstwo atramentowe. W metodzie tej tusz zostaje naniesiony na papier, bądź inną powierzchnię, za pomocą małych otworków. Tusz w tym przypadku musi mieć niewielką lepkość, aby mógł zostać naniesiony małymi kroplami. Z drugiej strony tusz po naniesieniu na papier musi wykazać się wysoką lepkością, gdyż w przeciwnym wypadku tworzyłby smugi i zacieki. Firma Xerox zgłosiła dwa patenty na zastosowanie polimerów supramolekularnych jako spoiw dla tuszu. Jeden z nich [43] opisuje zastosowanie tuszu, w którego skład wchodzi barwnik i łącznik. Tusz ten w temperaturze 50°C jest ciałem stałym, a w temperaturze 160°C cieczą o lepkość ok. 20 cps. Łącznik jest związkiem wielofunkcyjnym o niewielkiej masie cząsteczkowej, do którego zostały przyłączone od 2 do 5 ugrupowań UPy, co zaowocowało otrzymaniem związku zdolnego do tworzenia supramolekularnych sieci. Drugi z patentów [42] obejmuje tusze oparte na roztworach wodnych. Właściwości fizyczne tuszu, zależą od temperatury oraz polarności rozpuszczalnika, gdyż wpływają one bezpośrednio na ilość wiązań wodorowych, jakie tworzą ugrupowania UPy. Sam tusz w tym przypadku składa się z barwnika, wody i supramolekularnego łącznika. Z racji wysokiej polarności rozpuszczalnika, ilość tworzących się wiązań wodorowych pomiędzy cząsteczkami łącznika jest niewielka, co powoduje, że tusz charakteryzuje się niewielką lepkością. Z kolei podczas nanoszenia tuszu, rozpuszczalnik odparowuje pochłaniając przy tym pewną ilość ciepła, co owocuje powstaniem wielu wiązań wodorowych pomiędzy ugrupowaniami UPy. W konsekwencji lepkość tuszu rośnie, a na gotowym wydruku nie tworzą się smugi.

Kolejny patent opisujący wykorzystanie polimerów supramolekularnych został złożony przez Kodak Polychrome Graphics [40]. Wykorzystuje on fakt, iż rozpuszczalność polimerów supramolekularnych rośnie wraz z temperaturą. Znalazło to zastosowanie w kliszach drukarskich wykorzystywanych w litografii. Technika ta, opiera się na wykorzystaniu hydrofilowości i hydrofobowości różnych powierzchni. Kłisza składa się z materiałów hydrofilowych, które zwilżane są wodą oraz materiałów hydrofobowych, które zwilżane są tuszem. W takim przypadku część hydrofobowa może zostać wykorzystana do nadrukowania obrazku na papierze. Zazwyczaj wzorce pokrywa się tworzywem wrażliwym na promieniowanie, a dokładniej takim materiałem który staje się rozpuszczalny pod wpływem promieniowania. Po naświetleniu i usunięciu rozpuszczalnika część hydrofobowa zostaje odsłonięta i jest już zdolna do zaabsorbowania tuszu. W omawianym patencie polimery supramolekularne zostały wykorzystane jako



tworzywa wrażliwe na ciepło. Całość pokrywa się barwnikami, które zdolne są przekształcić promieniowanie IR na ciepło. W ten sposób w miejscach naświetlonych promieniowaniem podczerwonym następuje zerwanie części wiązań, co powoduje, że polimery stają się bardziej rozpuszczalne i odsłaniają powierzchnie zdolne do zaabsorbowania tuszu.

### 13. Perspektywy

Olbrzymi postęp, jaki dokonał się w chemii supramolekularnej w przeciągu ostatnich kilkunastu lat, pozwolił na otrzymanie polimerów o niespotykanych dotąd właściwościach. Dzięki obecności wiązania wodorowego, ich właściwości mogą być dopasowywane do określonych potrzeb, dzięki zmienianiu takich parametrów jak temperatura, czy pH środowiska. Dzięki opracowanym już metodom syntezy i znajomości ugrupowań UPy, możliwe będzie otrzymanie coraz to nowych rodzajów polimerów o właściwościach uzależnionych tylko od intencji chemika.

### Podziękowania:

Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2006-2008 jako projekt badawczy rozwojowy nr R0501601.

### Literatura:

1. C. Fouquey, J.-M. Lehn, A.-M. Levelut. *Adv. Mater.* 2:254-257, 1990;
2. G.A. Jeffrey. *An Introduction to Hydrogen Bonding*. New York: Oxford University Press, 1997, pp. 184-212;
3. A. Aggeli, M. Bell, N. Boden, J.N. Keen, P.F. Knowels, T.C.B. McLeish, M. Pitkeathly, S.E. Radford. *Nature* 386:259-262, 1997;
4. T. Kato, J.M.J. Fréchet. *J. Am. Chem. Soc.* 111:8533-8534, 1989;
5. M.-J. Brenne, J. Gabard, J.-M. Lehn, I. Stibor. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1868-1870, 1989;
6. T. Kato, P.G. Wilson, A. Fujishima, J.M.J. Fréchet. *Chem Lett.* 2003-2006, 1990;
7. T. Kato, P.G. Wilson, A. Fujishima, J.M.J. Fréchet., T. Saito, T. Uryu, C. Jin, F. Kaneuchi. *Chem. Mater.* 5:1094-1100, 1993;
8. M. Fukumasa, T. Kato, T. Uryu, J.M.J. Fréchet. *Chem. Lett.* 65-68, 1993;
9. M. Fukumasa, T. Kato, J.M.J. Fréchet. *Chem. Mater.* 7:368-372, 1995;
10. T. Kato, J.M.J. Fréchet. *Macromolecules* 23:360, 1990;
11. U. Kumar, T. Kato, J.M.J. Fréchet. *J. Am. Chem. Soc.* 114:6630-6639, 1992;

12. T. Kato, H. Kihara, T. Uryu, A. Fujishima, J.M.J. Fréchet. *Macromolecules* 25:6836-6841, 1992;
13. C.G. Bauzin, F.A. Brandys, T.M. Eve, M. Plante. *Macromol. Symp.* 84:183-196, 1994;
14. T. Kawakami, T. Kato. *Macromolecules* 31:4475-4479, 1998;
15. S. Ujmie, K. Iimura. *Macromolecules* 25:3174-3178, 1992;
16. W.L. Jorgensen, J. Prałata. *J. Am. Chem. Soc.* 112:2008-2010, 1990;
17. J. Pranata, S.G. Wierschke, W.L. Jorgensen. *J. Am. Chem. Soc.* 113:2810-2819, 1991;
18. S.C. Zimmerman, T.J. Murray. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. A* 345:49-56, 1993;
19. T.J. Murray, S.C. Zimmerman. *J. Am. Chem. Soc.* 114:4010-4011, 1992;
20. J. Sartorius, H.-J. Schneider. *Chem. Eur. J.* 2:1446-1452, 1996;
21. S.C. Zimmerman, P.S. Corbin. *Struci. Bonding* 96:63-94, 2000;
22. R.P. Sijbesma, E.W. Mejer. *Chem. Commun.* (1):5-16, 2003;
23. F.H. Beijer, R.P. Sijbesma, H. Kooijman, A.L. Spek, E.W. Meijer. *J. Am. Chem. Soc.* 120:6761-6769, 1998;
24. S.H.M. Söntjens, R.P. Sijbesma, W.H.P. van Genderen, E.W. Meijer. *J. Am. Chem. Soc.* 122:7487-7493, 2000;
25. P.S. Corbin, S.C. Zimmerman. *J. Am. Chem. Soc.* 120:9710-9711, 1998;
26. P.S. Corbin, L.J. Lawless, Z. Li, Y. Ma, M.J. Witmer, S.C. Zimmerman. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:5099-5104, 2002;
27. F.H. Beijer, H. Kooijman, A.L. Spek, R.P. Sijbesma, E.W. Meijer. *Angew. Chem. Int. Ed.* 37:75-78, 1998;
28. J.L. Sessler, R. Wang. *Angew. Chem. Int. Ed.* 37:1726-1729, 1998;
29. J.L. Sessler, R. Wang. *J. Org. Chem.* 63:4079-4091, 1998;
30. P.S. Corbin, S.C. Zimmerman. *J. Am. Chem. Soc.* 122:3779-3780, 2000;
31. P.S. Corbin, S.C. Zimmerman, P.A. Thiessen, N.A. Hawrluk, T. J. Murray. *J. Am. Chem. Soc.* 123:10475-10488, 2001;
32. B. Gong. *Synlett.* 5:582-589, 2001;
33. H. Zeng, R.S. Miller, R.A. Flowers II, B. Gong. *J. Am. Chem. Soc.* 122:2635-2644, 2000;
34. J. Elguero, C. Marzin, A.R. Katritzky, P. Linda. *The Tautomerism of Heterocycles*. New York: Academic Press, 1976;
35. U. von Gizycki, *Angew. Chem.* 83:406-408, 1971;
36. B.J.B. Folmer, R.P. Sijbesma, R.M. Verateegen, J.A.J. van der Rijt, E.W. Meijer, *Adv. Mater.* 12:874-878, 2000;

37. R.P. Sijbesma, F.H. Beijer, L. Brunsveld, B.J.B. Folmer, J.H.K.K. Hirschberg, R.F.M. Lange, J.K.L. Lowe, E.W. Meijer, *Science* 278:1601-1604, 1997;
38. B. Eling (Huntsman Int), WO 0246260, 2002;
39. Y. Ishizuka, E. Hawakawa, Y. Asawa, S.P. Pappas (Kodak Polychromer Graphics), WO 02053627, 2002;
40. A. Monk, S. Saraiya, J. Huang, S.P. Pappas (Kodak Polychromer Graphics), WO 02053626, 2002;
41. J. Locculier, L.L. Vanmaele, E.W. Meijer, P. Fransen, H. Janssen (Agfa Gevaert), EP1310533, 2003;
42. D.J. Luca, T.W. Smith, K.M. McGrane (Xerox Corp), U.S. 2003079644, 2003;
43. H.B.S. Goodbrand, D. Popovic, D.A. Foucher, T.W. Smith, K.M. McGrane (Xerox Corp), U.S. 20030105185, 2003;
44. A. Livoreil, J. Monet, N. Mouglin (L'Oreal), WO 02098377, 2002.;
45. A. Ciferri, *Supramolecular Polymers*, Taylor & Francis Group, 2005.



## Rozdział VII

### Fluorojonofory

Tadeusz Ossowski, Paweł Niedziałkowski, Dorota Zarzeczańska,  
Monika Przyborowska, Hanna Sulowska  
*Uniwersytet Gdański, Wydział Chemii, ul. Sobieskiego 18/19,  
80-852 Gdańsk*

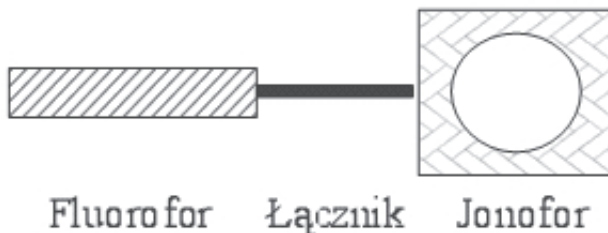
#### 1. Ogólna charakterystyka fluorojonoforów.

Jony metali pełnią różne ważne funkcje w naszym organizmie i środowisku. Obecność ich w niektórych procesach jest niezbędna, a w innych wręcz niekorzystna. Sód, potas, magnez, wapń są zaangażowane w biologiczne procesy, takie jak przesyłanie impulsów nerwowych, skurcze mięśni, regulacja działalności komórki, itp. W medycynie, bardzo ważna jest kontrola poziomu litu w surowicy u chorych na depresję maniacką i potasu w przypadku wysokiego ciśnienia krwi. Badania z zakresu oceanografii wykazały, że pewne składniki pokarmowe niezbędne dla przeżycia mikroorganizmów w wodzie morskiej zawierają cynk, żelazo i mangan jako kofaktory enzymów. W końcu, dobrze znana jest toksyczność związków rtęci, ołowiu i kadmu dla organizmów. Dlatego analiza jakościowa i ilościowa jonów metali odgrywa ważną rolę w badaniach z zakresu biologii, biotechnologii, medycyny, a także ekologii.

Rozwój diagnostyki medycznej, zastrzegające się wymogi ochrony środowiska oraz tzw. „czyste” technologie, stawiają nowe wymagania metodom analitycznym i systemom automatycznej kontroli. Klasyczne metody analizy chemicznej mimo wielu zalet, jak: dokładność, czułość i duża precyzja, stają się mało przydatne w tych zastosowaniach, gdzie pożądane jest szybkie oznaczanie, możliwość pracy w trybie monitorowania oraz automatyzacja pomiarów. Wymienione wymogi spełniają sensory chemiczne, łączące czułość i selektywność klasycznych metod analizy z szerokim wachlarzem rozwiązań konstrukcyjnych, dostosowanych do określonego zastosowania takiego urządzenia [2]. Dlatego znaczne wysiłki kładzie się na rozwój selektywnych sensorów chemicznych służących do wykrywania kationów. Wykorzystanie zjawiska luminescencji w chemosensorach dostarcza niewątpliwych korzyści pod względem czułości, se-

lektywności, czasu odpowiedzi oraz lokalnej obserwacji [3-8].

Fluorescencyjne chemosensory wykorzystywane w analityce jonów metali zostały nazwane fluorojonoforami. Związki te składają się z fluorofora połączonego z jonoforem (rysunek 1).



Rysunek 1. Ogólna budowa fluorojonoforów.

Rola obu ugrupowań, rozpoznającego i sygnalizującego jest niezmiernie ważna w projektowaniu chemosensorów [9]. Jonofor jest odpowiedzialny za wiązanie kationu, którego miarą jest stała tworzenia kompleksu ( $K_f$ ) lub jej odwrotność, czyli stała dysocjacji ( $K_d$ ). Warunkiem efektywnego wykrywania jest dopasowanie stałej tworzenia kompleksu do spodziewanego zakresu stężenia kationu, który jest zróżnicowany w zależności od środowiska w jakim występuje. Kolejnym bardzo ważnym parametrem poprawnego działania chemosensorów jest selektywność, czyli uprzywilejowane wiązanie jednego kationu w obecności innych. Duży wpływ zarówno na efektywność, jak i na selektywność wiązania kationu ma budowa jonofora, a właściwie jego elastyczność. Sztuczne ugrupowania jonoforowe wykazują wyższe powinowactwo do określonego jonu metalu. Natomiast giętkie, łatwo ulegające deformacjom struktury otwarte tworzą zazwyczaj bardzo trwałe jony kompleksowe z szeroką grupą jonów metali. Wśród receptorów różniących się budową można wyróżnić podandy (niecykliczne ligandy), koronandy (ligandy makrocycliczne) oraz kryptandy (struktury makrobicykliczne). Stabilność kompleksów z jonami litowców i berylowców rośnie w następującym porządku: podandy  $\ll$  koronandy  $\ll$  kryptandy. Wysoka trwałość kryptandowych kompleksów wynika z ich trójwymiarowej struktury, która ulega tylko niewielkim deformacjom. Ich specyficzna budowa przyczynia się również do podwyższenia selektywności oddziaływania z kationem. Cykliczne receptory tworzą najbardziej stabilne kompleksy z jonami, których promienie jonowe są zbliżone do rozmiarów wnęki receptorowej. Oprócz struktury jonoforu na proces kompleksowania wpływa także rodzaj heteroatomów występujących w ligandzie. Wynika to z faktu, iż „twarde” tlenowe centra silnie oddziałują z „twardymi” jonami metali alkalicznych, natomiast „miękkie” atomy siarki lub azotu wykazują silne powinowactwo do „miękkich” jonów metali

przejściowych. Szczegółową analizę czynników decydujących o efektywności i selektywności oddziaływań metal – ligand zawierają liczne prace z zakresu chemii supramolekularnej [10-17].

W chemosensorach część sygnalizująca powoduje przetworzenie sygnału poprzez przekształcenie informacji związania kationu na optyczny sygnał, dzięki zmianie fotofizycznych właściwości fluorofora. Istnieje wiele przyczyn, dla których fluorescencja może być uważana za optymalny mechanizm przetwarzania sygnału w możliwych zastosowaniach chemosensorów. Technika ta jest bardzo czuła, co w dużej mierze wynika z faktu, iż obserwowana długość fali jest zawsze większa od wzbudzonej. W skrajnych przypadkach można obserwować fluorescencję nawet pojedynczych cząsteczek. Poprzez wybór odpowiedniego fluorofora możliwa jest obserwacja sygnału przy zerowym lub bliskim zeru tła. W niektórych zastosowaniach fluorescencja tła nie jest szczególnym problemem (badania czystości wody), jednak autofluorescencja wielu biologicznych próbek obserwowana jest przy około 650 nm. Fluorofory posiadające pasma emisyjne w zakresie długofalowym są zwykle nieczułe na emisję analitu, chociaż czasami obserwuje się wyraźne poszerzenie sygnałów. Zmiany fotofizyczne chemosensora pod wpływem koordynacji jonu metalu mogą być wywołane zakłóceniami fotoindukowanych procesów, takich jak przeniesienie elektronu, przeniesienie ładunku, przeniesienie energii, tworzenie lub rozpad ekscimeru lub ekscipleksu, itp.

Pojęcie selektywności fluorescencyjnych chemosensorów odnosi się nie tylko do wiązania kationu, lecz dotyczy także zmian fotofizycznych. Dlatego niezmiernie ważną rolę odgrywa środowisko, w którym następuje proces rozpoznawania. Parametry takie jak: natura rozpuszczalnika (polarność, zdolność do tworzenia wiązań wodorowych, charakter protonowy lub aprotonowy), pH, siła jonowa, itp. odgrywają istotną rolę w tym procesie, ponieważ wykazują wpływ nie tylko na efektywne i selektywne wiązanie jonu, ale także na fotofizyczną charakterystykę fluoroforu (przykładowo, protonowanie może konkurować z wiązaniem kationu).

Sposób połączenia ugrupowania jonoforowego z fluoroforem jest również ważnym aspektem w projektowaniu fluorescencyjnych chemosensorów. Jakość zaburzeń właściwości fotofizycznych fluoroforu wywołanych obecnością kationu jest zależna od zastosowanego mostka łączącego. Odpowiedni jego wybór ma na celu uzyskanie możliwie najsilniejszych zmian, chociaż jego obecność nie zawsze jest korzystna. W niektórych przypadkach brak mostka łączącego umożliwia udział pewnych atomów fluoroforu w kompleksowaniu, dlatego selektywne wiązanie często wynika z połączenia obu ugrupowań w całą strukturę.

## 2. Klasyfikacja fluorojonoforów.

Fluorescencyjne chemosensory można różnorodnie sklasyfikować, zależnie od tego którą ich własność chcemy scharakteryzować. Najprostszy podział dotyczy typu ugrupowania jonoforowego lub fluoroforowego, które zostało wykorzystane w danej cząsteczce. Taka klasyfikacja, ze względu na dużą różnorodność opisywanych w literaturze receptorów i fluoroforów jest bardzo rozbudowana. Pozwala ona jednak na ilościowe określenie stanu badań nad zastosowaniem danego ugrupowania w budowie fluorescencyjnych chemosensorów. Znacznie bardziej praktyczny jest podział fluorojonoforów ze względu na ich powinowactwo do danego jonu metalu [18,19]. Wymienione rodzaje klasyfikacji są rzadko stosowane, znacznie częściej można znaleźć w literaturze podział chemosensorów dotyczący ich właściwości fotofizycznych. Jeden z nich odnosi się do emisyjnych technik pomiaru stężenia jonu metalu, w których wyszczególnia się trzy podstawowe typy:

- Pomiar intensywności fluorescencji przy jednej długości fali, gdy jon metalu powoduje jedynie jej spadek lub wzrost. Zmiany wywołane kompleksowaniem kationu są opisywane współczynnikiem wzmocnienia fluorescencji – FE (z ang. *fluorescence enhance*) lub współczynnikiem wzmocnienia wygaszania – QE (z ang. *enhance quenching*).
- Pomiar intensywności przy dwóch długościach fali, które ulegają odmiennym zmianom pod wpływem kationu. Dla przykładu, pasmo emisyjne przy 500 nm maleje, podczas gdy pasmo przy 400 nm rośnie. Możliwość takiej detekcji jest niezmiernie korzystna, ponieważ raz skalibrowany stosunek intensywności dla dwóch pasm przy zmiennym stężeniu jonu metalu nie zależy od całkowitego stężenia fluorojonoforu. Reasumując, jon metalu obecny w układzie może występować w dużym nadmiarze.
- Pomiar czasu życia fluorescencji, jeśli jon metalu powoduje jego zmiany. Ta technika wymaga zastosowania bardziej skomplikowanego sprzętu niż w pomiarze intensywności. Jednak pomiar czasu życia ma swoje zalety, ponieważ nie jest zależny od stężenia chemosensora. Ponadto zmianom intensywności emisji często towarzyszą zmiany czasu życia fluorescencji, dlatego gdy pierwsze z nich są niewidoczne, z powodu naturalnej fluorescencji analizowanej próbki, z powodzeniem stosuje się pomiar tych drugich.

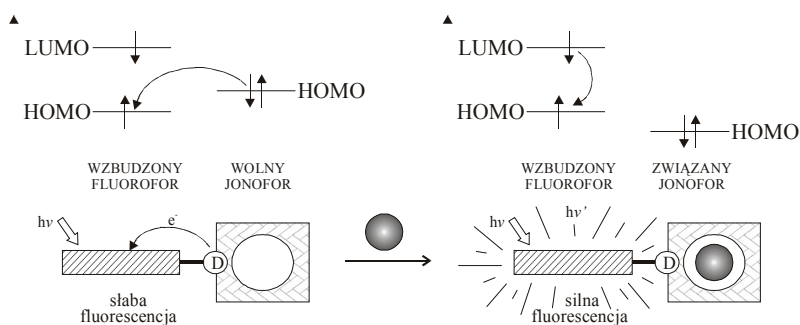
Opisany powyżej podział opiera się na wyniku zmian właściwości emisyjnych chemosensorów wywołanych przez jony metali, bez analizowania ich przyczyn. Dlatego powszechnie stosowana jest klasyfikacja fluorojonoforów według natury fotoindukowanych procesów w nich zachodzących. Taki podział jest niezmiernie przydatny w zrozumieniu przyczyny zmian zarówno intensywności



fluorescencji, jak i kształtu i położenia widma emisyjnego oraz czasu życia. Naturalnie obserwowany kierunek zmian jest niezmiernie pomocny w przypisaniu odpowiedniego procesu do danego fluorojonoforu.

## 2.1 Fluorescencyjne chemosensory z fotoindukowanym przeniesieniem elektronu (PET).

Mechanizm działania większości fluorescencyjnych chemosensorów opisywanych w literaturze wykorzystuje zachodzący w nich proces fotoindukowanego przeniesienia elektronu, który powoduje wygaszenie fluorescencji. Zasada działania chemicznych sensorów PET jest przedstawiona na rysunku 2 [20].



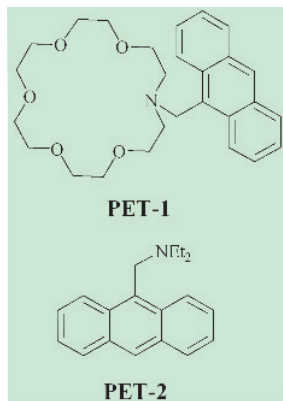
Rysunek 2. Schemat mechanizmu działania chemosensorów PET [20].

Budowa prezentowanego fluorojonoforu pozwala na przeniesienie elektronu z jonoforu do fluoroforu (lub na odwrót), pod warunkiem, że proces ten jest termodynamicznie i kinetycznie możliwy [21]. W większości przykładów kinetyczne ograniczenia takiego procesu są niewielkie, jednak istnieją wyjątki [22,23]. Co ważniejsze, gdy proces PET jest termodynamicznie dozwolony, szybkość przeniesienia elektronu w wielu przypadkach jest znacznie większa niż szybkość luminescencji. Luminescencja i przeniesienie elektronu są dwoma głównymi, konkurencyjnymi procesami, które dezaktywują stan fotowzбудzony. Kompleksowanie jonu metalu przez jonofor może drastycznie zmieniać termodynamikę PET, który staje się procesem endoenergetycznym. W takiej sytuacji luminescencja staje się zjawiskiem dominującym. Luminescencja może być przełączana pomiędzy stanem „włączonym” i „wyłączonym” przez wprowadzanie i usuwanie jonu metalu. Chemosensorom PET często towarzyszą inne procesy zachodzące w stanie wzbudzone, takie jak przeniesienie energii, czy tworzenie ekscimerów. Obecność ich wynika przeważnie z budowy cząsteczki, a szczególne zależy od natury samego fluoroforu. Odmienny mechanizm PET ma miejsce w przypadku przejściowych jonów metali [24,25]. Faktycznie, metale

bloku 3d są redoksaktywne, a przeniesienie elektronu może nastąpić z fluoroforu do związanego jonu metalu, lub na odwrót. W niektórych przypadkach, możliwa jest wymiana elektronu, czego rezultatem jest gaszenie fluorescencji fluoroforu poprzez bezpromieniste przeniesienie energii zgodnie z mechanizmem Dexter [26].

Odkrycie zjawiska gaszenia fluorescencji aromatycznych węglowodorów przez alifatyczne i aromatyczne aminy przyczyniło się do rozwoju chemosensorów wykorzystujących ten fakt. Doskonałym przykładem jest antracen związany poprzez mostek łączący z jonoforem zawierającym atom azotu. Badania nad tego typu układami (np. **PET-1**) prowadzone były przez zespół A. P. de Silvy. Ligand **PET-1** [27] służący do detekcji jonów litowców jest pochodną znanego w literaturze chemosensora protonów **PET-2** [28,29], w którym grupa dietyloaminowa została zastąpiona azaeterem koronowym. Aby jednoznacznie określić wpływ jonów metali na właściwości fotofizyczne ligandu, autorzy prowadzili badania w obecności wodorotlenku benzylotrójmetyloamoniowego. Doskonałą sygnalizację „włączonej – wyłączonej” fluorescencji wykazywały dla tego związku jony potasu, powodujące 47-krotny wzrost wydajności kwantowej fluorescencji. Wartości stałych tworzenia kompleksów **PET-1** z określonym alkalicznym kationem okazały się praktycznie identyczne z odpowiednimi wartościami stałych niepodstawionego azaeteru koronowego. Fotofizyczne parametry omawianego związku, takie jak długości fali absorpcji i emisji, molowy współczynnik absorpcji, zbliżone są do 9-metyloantracenu. Natomiast wydajności kwantowe fluorescencji kompleksów **PET-1** z jonami litowców odpowiadają wartościom wyjściowego fluoroforu. Połączenia eterów koronowych, wykazujących szczególne zdolności koordynacyjne, z aromatycznymi węglowodorami o własnościach emisyjnych były analizowane również przez Kubo i jego współpracowników, jednak tylko niektóre z otrzymanych przez nich chemosensorów okazały się sukcesem [30-32].

Zamiana monoazaeteru koronowego w pochodnej antracenu na poliazamakrocykl w **PET-3** przez grupę Czarnika umożliwiło detekcję jonów metali przejściowych [33-35]. Fluorescencja podstawnika antracenu jest zależna od pH, dlatego wszystkie związki wykazują słabą fluorescencję w zasadowych warunkach. Największy wzrost fluorescencji w wodzie o pH = 10, wynikający z zahamowania procesu PET, zaobserwowano w wyniku kompleksowania jonów  $Zn^{2+}$  i  $Cd^{2+}$  przez ligandy **PET-3c-e** (tabela 1). Wśród badanych kom-



pleksów kadmu, jedynie kompleks  $\text{Cd}[\text{PET-3d}]^{2+}$  posiada pasmo, którego kształt i maksimum znacznie odbiega od wolnego ligandu. Takie zachowanie zostało wytłumaczone przez autorów tworzeniem się w stanie podstawowym  $\pi$ -kompleksu jonów  $\text{Cd}^{2+}$ . Cecha ta pozwala odróżnić jony  $\text{Zn}^{2+}$  i  $\text{Cd}^{2+}$ .

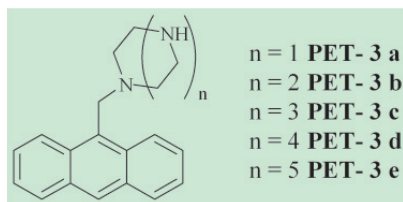


Tabela 1.

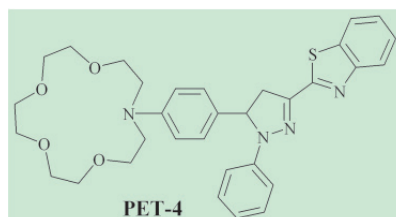
Względna intensywność fluorescencji ( $\lambda_{em} \approx 416$  nm) ligandów PET-3 w obecności różnych jonów metali w wodnym roztworze o  $\text{pH} = 10$  [33].

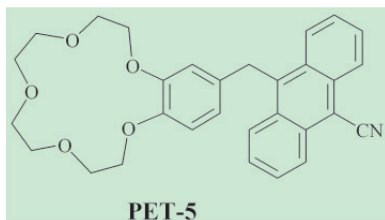
	PET-3a	PET-3b	PET-3c	PET-3d	PET-3e
ligand	2,5	1,3	9,0	2,3	3,5
ligand + $\text{Ca}^{2+}$	2,5	1,8	9,4	2,2	4,1
ligand + $\text{Al}^{3+}$	2,5	1,4	9,8	1,9	3,3
ligand + $\text{Pb}^{2+}$	4,0	1,8	4,1	2,6	2,7
ligand + $\text{Cu}^{2+}$	2,5	0,6	1,6	1,6	1,9
ligand + $\text{Cd}^{2+}$	2,7	13,8	81,0	20,3	107,1
ligand + $\text{Zn}^{2+}$	2,6	44,2	129,2	17,8	138,7

Wysokie powinowactwo poliazamakrocykli do jonów metali przejściowych zostało wykorzystane również przez Parkera, który połączył takie receptory z ugrupowaniem naftalenowym [36,37].

Badania wpływu jonów metali na właściwości fotofizyczne wyżej opisanych chemosensorów zawierających azaetery koronowe wymagają starannej kontroli pH. Rozwiązaniem może być zastosowanie *N*-fenyloazaeteru koronowego jako receptora. Związek **PET-4** charakteryzuje się doskonałym zwiększeniem intensywności fluorescencji pod wpływem jonów  $\text{Ca}^{2+}$  w acetonitrylu [38]. Oprócz współczynnika FE wynoszącego 28, autorzy zaobserwowali również wzrost czasu życia fluorescencji z 0,28 do 3,6 ns.

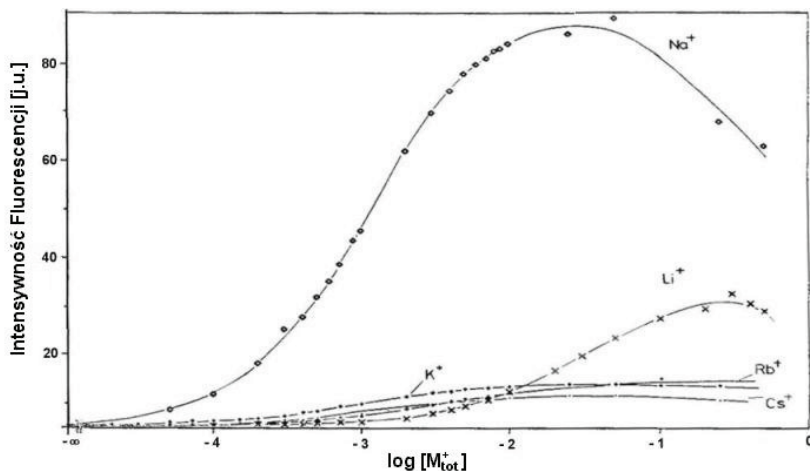
Benzoetery koronowe są również względnie nieczułe na obecność protonów, dlatego często stosuje się je w chemosensorach jako receptory alkalicznych kationów. Receptory, aby mogły być włączane w cząsteczki wykorzy-





stające mechanizm PET do fluorescencyjnej sygnalizacji, muszą być odpowiednio elektroaktywne. Obecność ugrupowania 1,2-dialkoksycyclohexanowego nadaje wymaganą elektroaktywność, mimo iż jego potencjał utleniania jest nieco wyższy niż w przypadku trzeciorzędowej alifatycznej aminy w azaeterze koronowym. Wnosząc taką poprawkę, uzyskano fluorescencyjne

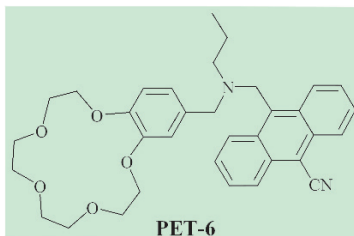
chemosensory sygnalizujące obecność jonów metali alkalicznych, której to sygnalizacji nie zakłóca obecność protonów. Ligand **PET-5** [39] selektywnie oddziałuje z jonami  $\text{Na}^+$  (rysunek 3). Wyznaczone stałe trwałości kompleksów z jonami alkalicznymi są słabo zróżnicowane, dlatego oddziaływanie gospodarz – gość w tym przypadku jest dalekie od ideału. Silniejsze wzmocnienia fluorescencji pod wpływem jonów  $\text{Na}^+$  uzyskano poprzez zmianę rozpuszczalnika [40]. Taki wzrost wynika z różnic w termodynamicznym fotoindukowanym przeniesieniu elektronu między wolną i skompleksowaną cząsteczką **PET-5**.



Rysunek 3. Intensywność fluorescencji ligandu **PET-5** ( $\lambda_{em} = 446 \text{ nm}$ ) w zależności od stężenia wybranych jonów metali alkalicznych w roztworze metanolu [39].

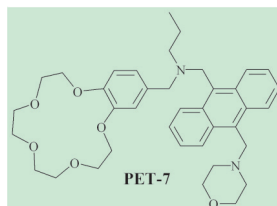
Kombinacja benzoeteru koronowego jako receptora  $\text{Na}^+$  i prostej aminy - receptora  $\text{H}^+$  w ramach fluorescencyjnego mechanizmu PET, pozwoliła na otrzymanie wielu kompleksów działających na zasadzie „włączonej – wyłączonej” sygnalizacji fluorescencyjnej. Specyficzność każdego receptora do odpowied-

niego jonu jest niezmiernie ważnym aspektem w projektowaniu złożonych fluorojonoforów. Związek **PET-6** łączy w sobie ugrupowania z przedstawionych wcześniej prostszych cząsteczek **PET-2** i **PET-5** [41]. Jon kontrolujący fotofizyczne właściwości multiskładnikowych systemów może prowadzić do zjawiska przełączania fluorescencji, które przypomina bardziej technologię informatyczną [42-44]. Omawiany ligand posiada dwa receptory i jeden fluorofor czuły na obecność zarówno jonów  $H^+$  jak i  $Na^+$ , jeśli będą one znajdowały się w otoczeniu odpowiedniego receptora. Oba

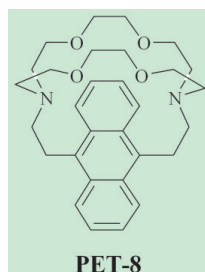


procesy PET powstające z benzoeteru koronowego i aminowego receptora muszą być eliminowane kompleksowaniem jonów  $Na^+$  i protonowaniem. W momencie, gdy oba receptory zwiążą odpowiednie dla siebie jony, zostanie osiągnięty względnie wysoki poziom fluorescencji. Chemosensor **PET-6** według autorów wymagał optymalizacji, ponieważ wydajność kwantowa fluorescencji „włączonego” stanu była niska, podobnie jak wartość współczynnik FE. Taka optymalizacja została dokonana poprzez rozdzielenie położenia receptorów w stosunku do fluorofora, przykładem może być tutaj związek **PET-7** [45].

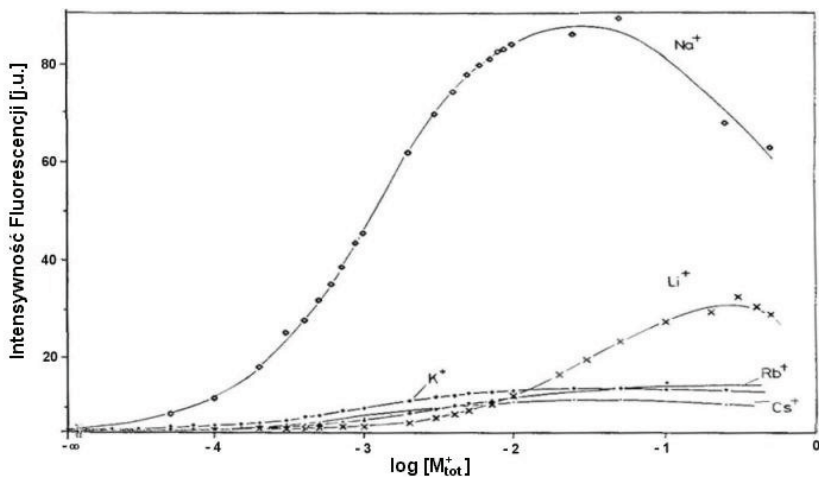
Oba procesy PET zachodzące w cząsteczce charakteryzują się bardzo małymi wartościami wydajności kwantowej. Świadczy o tym brak podwyższenia intensywności emisji ligandu w obecności tylko jednego z jonów -  $Na^+$  lub  $H^+$ . W przypadku, gdy oba jony są związane przez swoje receptory, 9,10-dipodstawiony antracenu wykazuje silną emisję, dlatego wartości współczynnika FE są wysokie.



Dołączenie dodatkowego ramienia do azaeteru koronowego spowodowało powstanie kryptandów o trójwymiarowej wnęce, charakteryzujących się podwyższonymi zdolnościami receptorowymi [46]. Kryptandy powodują zmniejszenie solwatacji jonu. Fluorojonofor **PET-8**, który był przedmiotem badań zespołu H. Bouas-Laurenta [47-49], składa się z antracenu przyłączonego do diazaeteru koronowego tworząc w ten sposób strukturę kryptandową. Ligand ten posiada charakterystyczne dla antracenu widmo emisyjne, co świadczy o zahamowaniu procesu PET. Efekt ten jest wynikiem utrudnionej solwatacji wolnej pary elektronowej atomu azotu w cząsteczce



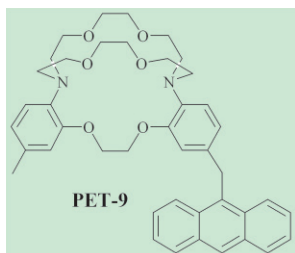
o tak złożonej strukturze. Zjawisko to powoduje, iż zmiany widma emisyjnego związku **PET-8** wywołane obecnością jonów litowców charakteryzują się niskimi wartościami współczynnika FE (rysunek 4).



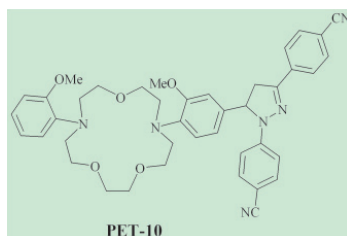
Rysunek 4. Zmiany w widmie emisyjnym ligandu **PET-8** wywołane obecnością jonów  $K^+$  w metanolu [49].

Interesującą cechą **PET-8** jest jego zdolność do tworzenia ekscimerów charakteryzujących się dodatkowym pasmem przy wyższej długości fali. Takie zjawisko umożliwia pomiar stosunku emisji przy dwóch różnych obserwowanych długościach fal. Obecność kationów litowców lub berylowców w metanolowym roztworze **PET-8** powoduje wzrost fluorescencji, z całkowitym zanikiem emisji ekscimeru. W literaturze można również znaleźć podobne struktury makrobicykliczne z pochodnymi kumaryny [50-52].

W przypadku pochodnych kryptandów pojawia się również problemem zasadowości atomów azotu. Odpowiednim rozwiązaniem jest sprzężenie aromatycznych ugrupowań z atomami azotu, o którym wspominałam wcześniej odnośnie chemosensora **PET-3**. Zaobserwowano, że takie sprzężenie może być niwelowane przez zmianę konformacji pod wpływem wiązania jonu metalu. Jednocześnie należy spodziewać się wzrostu potencjału utleniającego receptora, który można przewidzieć na podstawie jego elektrostatycznych właściwości. Przykładem takiego związku jest **PET-9**, który

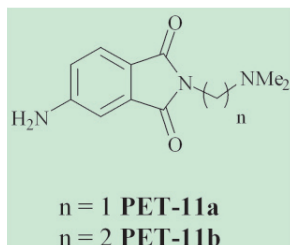


wykazuje dosyć wysokie wartości współczynnika FE w obecności jonów  $\text{Rb}^+$  i  $\text{K}^+$  [53]. Większe korzyści przynosi zastosowanie w chemosensorach PET pseudokryptandów. Oprócz nieco prostszej syntezy, większa elastyczność pozwala lepiej zachować ich potencjał utleniający podczas zmian konformacyjnych wywołanych obecnością jonu. Fluorescencja prezentowanego ligandu **PET-10** silnie wzrasta pod wpływem jonów sodu [54]. Podobne zmiany zaobserwowano w obecności jonu litu, jednak dopiero przy jego dużym stężeniu. Atomy azotu połączone bezpośrednio z pierścieniem



aromatycznym mogą ulegać protonowaniu, dlatego wpływ jonów na właściwości fotofizyczne chemosensora badano w obojętnym środowisku. Zmiany konformacyjne ligandu pod wpływem jonów zostały udowodnione badaniami krystalograficznymi wolnej i skompleksowanej formy. Badania te jednoznacznie potwierdziły, że sprzężenie aryl – azot jest eliminowane po związaniu jonu  $\text{Na}^+$ , ponieważ następuje rotacja wiązania węgiel aryłowy – azot o około  $39^\circ$ . W przypadku związków **PET-9** i **PET-10** zmiany konformacji, przyczyniły się do wzrostu intensywności emisji o podobnych wartościach współczynników FE w wyniku oddziaływania z jonami metali o różnej gęstości ładunku. Może się wydawać, że przedstawione działanie obu chemosensorów może być rozważane jako wada, ponieważ sugeruje całkowitą utratę selektywności. Ta sugestia jest raczej złudna, ponieważ ligandy z fluorescencyjną sygnalizacją posiadają dwa parametry selektywności - poprawa wydajności kwantowej oraz wartość stałej tworzenia jonu kompleksowego.

Makrocycliczne receptory są bez wątpienia użyteczne, jednak nie są one niezbędne dla właściwego działania sygnalizującego fluorojonoforu PET. Makrocykl może być zastąpiony niecyklicznym receptorem, którego elastyczność pozwala jonom dopasować się do centrum koordynacyjnego. Wśród różnych niecyklicznych ugrupowań receptorowych najprostsze są takie, które składają się tylko z jednego alifatycznego łańcucha posiadającego grupę aminową. Grupy badawcze Ramachandarama [55] i Mitchella [56] wykorzystały tendencję tworzenia kompleksów z jonami metali przejściowych przez alifatyczne aminy do rozwoju fluorescencyjnych chemosensorów. W przypadku związków **PET-11a** i **PET-11b** [55], zaobserwowano znaczne powiększenie fluorescencji w wyniku kompleksowania licznych

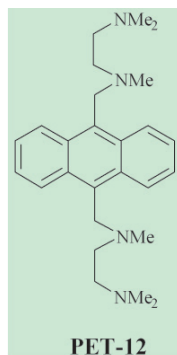


jonów metali przejściowych w roztworze acetonitrylu (tabela 2). Jednak jony, takie jak  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  i  $\text{Cu}^{2+}$  powodują słabszy wzrost emisji. Proponowany przez autorów mechanizm dla takiego niezwykłego powiększenia jest następujący: kompleksowanie zapobiega występowaniu mechanizmu PET, co prowadzi do zwiększenia fluorescencji, które z kolei jest częściowo zrównoważone przez gaszący efekt jonu metalu. Zaproponowany mechanizm jest poparty faktem, iż jony  $\text{Zn}^{2+}$  posiadające konfigurację elektronową  $d^{10}$ , zwykle nie wykorzystujące mechanizmu przeniesienia elektronu lub energii w celu dezaktywacji stanu wzbudzonego, wykazują najsilniejszy wzrost emisji.

Tabela 2.

Wartości współczynników FE przez podane jony dla chemosensorów PET-11a i PET-11b ( $5 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ ) w roztworze acetonitrylu [55].

	PET-11a		PET-11b	
	$C_{\text{Me}}$ [mol/dm <sup>3</sup> ]	FE	$C_{\text{Me}}$ [mol/dm <sup>3</sup> ]	FE
$\text{Cr}^{3+}$	$1,2 \times 10^{-4}$	39	$1,1 \times 10^{-4}$	25
$\text{Fe}^{3+}$	$1,0 \times 10^{-4}$	34	$1,0 \times 10^{-4}$	27
$\text{Co}^{2+}$	$1,9 \times 10^{-4}$	38	$9,2 \times 10^{-4}$	12
$\text{Ni}^{2+}$	$3,0 \times 10^{-4}$	37	$1,8 \times 10^{-2}$	22
$\text{Cu}^{2+}$	$2,7 \times 10^{-4}$	41	$4,0 \times 10^{-4}$	27
$\text{Zn}^{2+}$	$3,9 \times 10^{-4}$	55	$6,8 \times 10^{-4}$	30



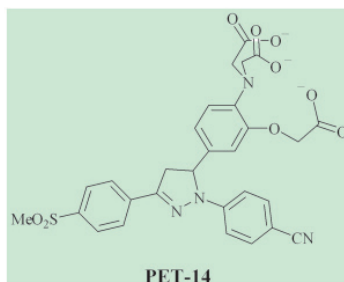
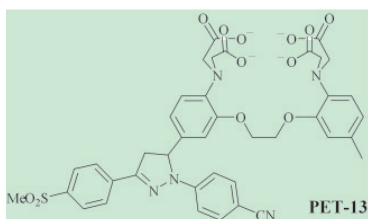
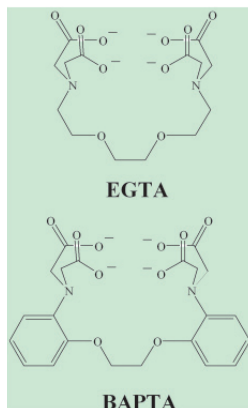
Większość opisywanych w literaturze chemosensorów jonów metali przejściowych zawiera receptory składające się z więcej niż jednego ugrupowania aminowego. Pozwala to na uzyskanie trwałych kompleksów w wyniku efektów. Pierwszym przykładem opisanym w literaturze przez Czarnika była pochodna antracenu **PET-12** [57,58]. Obecność jonów  $\text{Zn}^{2+}$  w acetonitrylowym roztworze tego ligandu drastycznie podnosi obserwowaną fluorescencję, więcej niż 1000-krotnie. Taka silna fluorescencja jest wynikiem tworzenia się kompleksu o stechiometrii 2:1 (metal:ligand), którego struktura została potwierdzona badaniami  $^1\text{H-NMR}$ . W literaturze można znaleźć wiele innych poliaminowych chemosensorów PET, które wykazują wysokie powinowactwo do jonów metali przejściowych [59-65].

Innym typem niecyklicznych receptorów stosowanych w fluorojonoforach są chelaty z grupą karboksylową, które znane są ze skutecznego wiązania dwu-

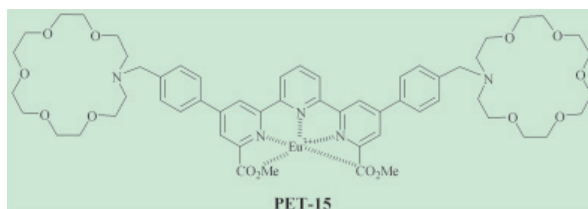


wartościowych twardych kationów, takich jak:  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$ . Tsien i współpracownicy zaprojektowali wiele selektywnych chemosensorów wapniowych, które znalazły zastosowanie w biologii komórkowej [66,67], np. do sondowania mikromolarnego stężenia jonów wapnia. Stosowany receptor, nazywany BAPTA przypomina EGTA, w którym atomy azotu połączone są z grupą fenylową w celu uniknięcia czułości na zmiany pH w fizjologicznych układach. Opisane przez Tsiena ligandy głównie wykorzystują mechanizm fotoindukowanego przeniesienia ładunku, jednak przyczyniły się one do rozwoju chemosensorów PET, w których wykorzystano receptor BAPTA. W literaturze można znaleźć prace wykorzystujące połączenia BAPTA z pochodnymi rodaminy i fluoresceiny, w których prostopadłe ułożenie obu ugrupowań umożliwia fotoindukowane przeniesienie elektronu [68-70]. Taki mechanizm działania wykorzystuje również związek **PET-13** [71], który jest czuły na jony  $\text{Ca}^{2+}$  w symulowanych fizjologicznych warunkach. Wapń nie tylko silnie podnosi fluorescencję cząsteczki (współczynnik FE wynosi 92), ale także jest mocno wiązany przez receptor ( $\log K = 6,5 \text{ M}^{-1}$ ), dlatego układ ten całkowicie spełnia optyczne i koordynacyjne parametry sygnalizacji. Zaproponowany przez Londona receptor jonów  $\text{Mg}^{2+}$  [72,73], który różni się od BAPTA wielkością wnęki, był inspiracją do otrzymania analogu ligandu **PET-13**. **PET-14** wykazuje mechanizm „wylłączonej – włączonej” fluorescencji pod wpływem jonów magnezu [74]. Podobne zmiany w intensywności emisji tego związku odnotowano w obecności wysokiego stężenia jonów  $\text{Ca}^{2+}$ , które znacznie przekracza stężenie tych jonów w komórkach. Fluorojonofor **PET-14** może być zatem z powodzeniem stosowany jako selektywny chemosensor jonów  $\text{Mg}^{2+}$  w fizjologicznych układach.

Niezwykle ciekawe jest zastosowanie w chemosensorach PET kompleksów jonów metali bloku f jako ugrupowania fluoroforowe. Przykładem może być tutaj sensor **PET-15** [75] zawierający diester terpirydynowy, który może



silnie wiązać  $\text{Eu}^{3+}$  oraz koronę potencjalnie wiążącą jony potasu. Przeniesienie wzbudzonej energii z tego typu ligandu do jonu  $\text{Eu}^{3+}$  jest możliwe poprzez stan tripletowy, a wynikiem tego jest luminescencja z  $\text{Eu}^{3+}$ . Wówczas gdy wnęka korony nie zawiera metalu, dostrzegana jest tylko słaba luminescencja, ponieważ jest ona wygaszana w wyniku procesu PET z atomu azotu korony. Związanie jonów  $\text{K}^+$  powoduje silne powiększenie wydajności kwantowej luminescencji, ponieważ kation skutecznie hamuje proces PET. Ligand **PET-15** jest pierwszym przykładem chemosensora o emisji pochodzącej od metalu. Dzięki długiemu czasowi życia luminescencji  $\text{Eu}^{3+}$  (setki mikrosekund), możliwa jest opóźniona w czasie obserwacja emisji, która pozwala na wykluczenie szybkiej naturalnej fluorescencji biologicznych próbek.



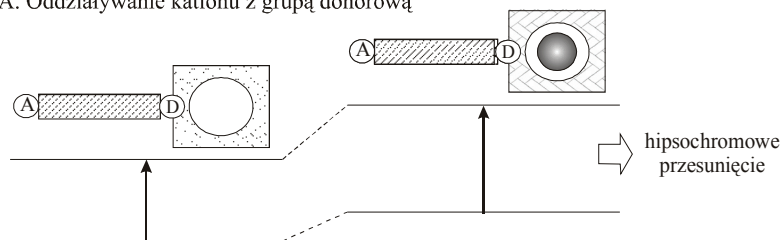
## 2.2 Fluorescencyjne chemosensory z fotoindukowanym przeniesieniem ładunku (PCT).

W fluoroforach po wzbudzeniu może zachodzić wewnątrzcząsteczkowe przeniesienie ładunku pomiędzy sprzężonymi ze sobą grupami elektronodonorowymi i elektronoakceptorowymi. W konsekwencji moment dipolowy cząsteczki ulega zmianie, czego efektem jest obserwowane przesunięcie Stokesowskie, które zależy od lokalnego otoczenia fluorofora. Takie zjawisko zostało wykorzystane w projektowaniu polarnych fluorojonoforów (rysunek 5) [76].

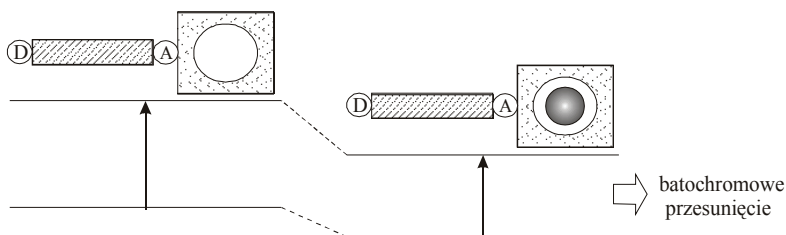
Kation oddziałując ze sprzężonym układem donorowo-akceptorowym może zmieniać fotofizyczne właściwości cząsteczki, ponieważ kompleksowanie kationu wpływa na skuteczność wewnątrzcząsteczkowego przeniesienia ładunku [77-79]. Cechą charakterystyczną takich układów jest zmiana położenia pasma absorpcji i emisji w wyniku oddziaływania z jonem metalu. Pozwala to na jednoznacznie odróżnienie chemosensory PCT od PET, ponieważ w przypadku tych drugich jony metali powodują głównie zmiany w intensywności fluorescencji. Kierunek przesunięcia pasm zależy od tego, z którą grupą (donorową czy akceptorową) kation bezpośrednio oddziałuje. Gdy donor elektronu (np. grupa aminowa) fluorofora oddziałuje z kationem, wówczas następuje zmniejszenie właściwości elektronodonorowych tej grupy. Wynikiem tego jest osłabienie

sprężenia donor - akceptor, co odzwierciedla „niebieskie przesunięcie” widma absorpcji połączone ze spadkiem wartości molowego współczynnika absorpcji (rysunek 5A). Natomiast kation oddziałując z grupą akceptorową (np. pierścien aromatyczny) uwydatnia jej charakter elektronoakceptorowy; widmo absorpcji ulega „czerwonemu przesunięciu”, a molowy współczynnik absorpcji rośnie (rysunek 5B). Widma fluorescencyjne ulegają analogicznym przesunięciom. Często obserwowane zmiany wydajności kwantowej fluorescencji i czasu życia powodowane są zwykle przez inne procesy towarzyszące fotoindukowanemu przeniesieniu ładunku. Wszystkie te fotofizyczne efekty są oczywiście zależne od ładunku i wielkości kationu, a ich selektywność jest niezmiernie ważna. Fotofizyczne zmiany wywołane wpływem kationu mogą też być analizowane jako oddziaływania ładunków dipolowych [80]. Zależnie od wielkości momentu dipolowego cząsteczki w stanie podstawowym i wzbudzonym, kation może powodować stabilizację lub destabilizację stanu wzbudzonego.

A. Oddziaływanie kationu z grupą donorową



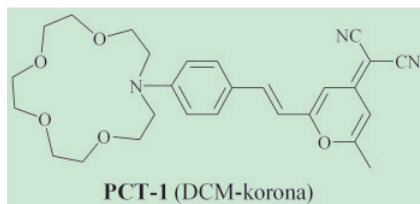
B. Oddziaływanie kationu z grupą akceptorową



Rysunek 5. Schemat obrazujący kierunek zmian spektralnych chemosensorów PCT.

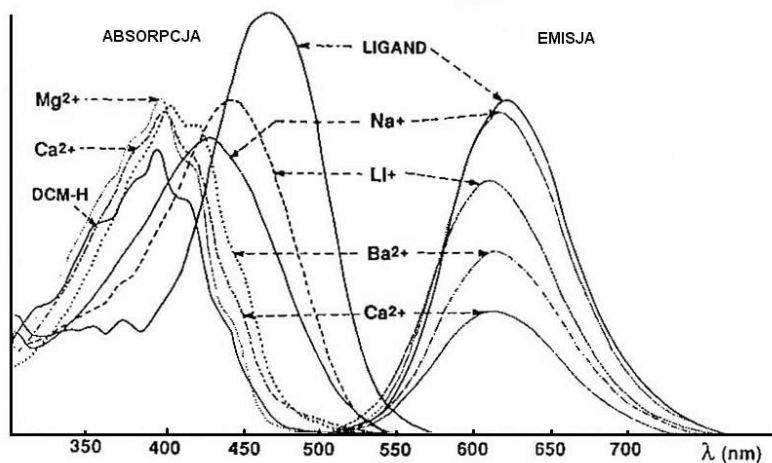
### 2.3 Chemosensory PCT, których grupa donorowa oddziałuje z kationem.

Do tej klasy chemosensorów należą związki, których jonofory zawierają w swojej strukturze ugrupowanie donorowe sprzężone z grupą akceptorową fluoroformu. Wspólną cechą tak zbudowanych ligandów jest hipsochromowe przesunięcie pasma absorpcji i emisji wywołane obecnością jonu metalu. Właściwości



fotofizyczne i koordynacyjne ligandu PCT-1 (DCM-korona) zostały szczegółowo zbadane przez Valeura i jego współpracowników [81,82]. Widmo absorpcyjne i emisyjne PCT-1 jest zbliżone do jego pochodnej pozbawionej korony (DCM-NH<sub>2</sub>). Jony metali alkalicznych i ziem alkalicznych wy-

wołują w roztworze acetonitrylu silny efekt antyauksochromowy, który jest najsilniejszy w przypadku jonów o dużej gęstości ładunku (rysunek 6). Kompleksy PCT-1 z jonami Ca<sup>2+</sup> i Mg<sup>2+</sup> posiadają pasmo absorpcyjne bardzo podobne do związku DCM-H, który nie posiada auksochromowej grupy aminowej. Omawiane jony nie powodują dużych zmian kształtu i położenia widma emisyjnego PCT oraz prawie nie wpływają na czas życia fluorescencji ligandu. Natomiast wydajność kwantowa fluorescencji ulega redukcji.



Rysunek 6. Widmo absorpcji i emisji ligandu PCT-1 i jego kompleksów w roztworze acetonitrylu [81].

Zadziwiająco małe przesunięcie widma fluorescencyjnego autorzy zinterpretowali następująco: PCT redukuje gęstość elektronową na atomie azotu korony, w ten sposób traci on swoje zdolności koordynacyjne, ponieważ staje się dodatnio naładowany. Dlatego, wzbudzenie powoduje fotorozzerwanie oddziaływania między kationem i atomem azotu korony. Widmo fluorescencji jest tylko nieznacznie zmienione, ponieważ nadal fluorescencja jest emitowana przez

cząsteczki, w których oddziaływanie między kationem i fluoroforem nie istnieje lub jest bardzo słabe. Jeśli oddziaływanie metal – ligand jest stosunkowo silne wówczas widoczna jest redukcja intensywności emisji. Ta interpretacja została potwierdzona szczegółowymi badaniami fotofizycznymi **PCT-1** i jego kompleksów z jonami  $\text{Li}^+$  i  $\text{Ca}^{2+}$  [83-85]. W szczególności, technika pikosekundowej fotolizy błyskowej dostarczyła wyraźne dowody rozrywania połączeń atom azotu korony – kation [83]. Fotorozrywanie powoduje spadek stałych trwałości kompleksów w stanie wzbudzonym. Wzbudzenie tych kompleksów przez intensywny puls światła powoduje, że niektóre kationy opuszczają koronę i dyfundują pod warunkiem, że stała czasowa dla całkowitego opuszczenia korony przez kation jest krótsza niż czas życia  $\tau$  stanu wzbudzonego.

Tabela 3.

Spektroskopowe właściwości **PCT-1** i jego kompleksów w acetonitrylu. Wartości stałych trwałości kompleksów.

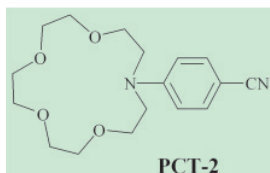
	$\lambda_{\text{abs}}$ (nm)	$\lambda_{\text{F}}$ (nm)	$\Phi_{\text{F}}$	$\tau_{\text{F}}$ (ns)	$\log K_d$ [ $\text{M}^{-1}$ ]	średnica jonu ( $\text{\AA}$ )	
<b>PCT-1</b> <sup>a</sup>	464	621	0,73	2,20			
<b>(PCT-1)</b> $\text{Li}^+$	440	606	0,57	1,88	2,49	1,39	$\text{Li}^+$
<b>(PCT-1)</b> $\text{Na}^+$	427	611	0,65	2,06	1,98	1,94	$\text{Na}^+$
<b>(PCT-1)</b> $\text{Mg}^{2+}$	394	610	-	2,10	-	1,32	$\text{Mg}^{2+}$
<b>(PCT-1)</b> $\text{Ca}^{2+}$	398	608	0,27	1,94	3,75	1,98	$\text{Ca}^{2+}$
<b>(PCT-1)</b> $\text{Ba}^{2+}$	401	611	0,40	1,99	2,98	2,68	$\text{Ba}^{2+}$
DCM	461	627	0,60	1,90			
DCM-H	391	490	$3 \times 10^{-4}$	-			

<sup>a</sup> rozmiar wnęki korony: 1,7 – 2,2  $\text{\AA}$

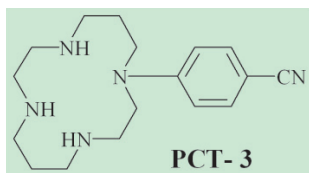
Wśród analizowanych jonów o takim samym ładunku najbardziej stabilne kompleksy tworzą jony o promieniach jonowych zbliżonych do rozmiarów wnęki korony (tabela 3). Stała trwałości kompleksu litu odbiega od tej reguły, ponieważ jest wyższa od stałej trwałości kompleksu sodu, co wynika z efektów solwatacyjnych. Słabe zmiany położenia pasma emisyjnego w porównaniu ze zmianami widma absorpcji wykazują także inne chemosensory należące do tej grupy, opisane w literaturze [86-91].

Wewnątrzcząsteczkowemu przeniesieniu ładunku w cząsteczkach ze sprzężonym układem donor - akceptor może towarzyszyć wewnętrzna rotacja prowadząca do powstania wewnątrzcząsteczkowych stanów przeniesienia ładunku ze skręceniem (stany TICT) [92]. Obecność takiego stanu może prowadzić do

powstania w widmie fluorescencyjnym dodatkowego pasma. Związek **PCT-2** [93] (który przypomina dobrze znany DMABN, zawierający grupę dimetyloaminową zamiast monoaza-15-korony-5) wykazuje



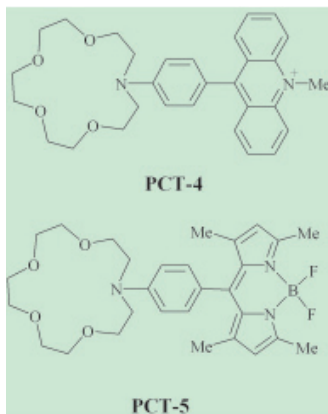
podwójną fluorescencję: krótkofalowe pasmo odpowiada normalnej fluorescencji ze stanu wzbudzonego  $S_1$ , a długofalowe pasmo pochodzi od stanu TICT. Intensywność fluorescencji drugiego pasma maleje w obecności kationu, ponieważ oddziaływanie między związanym kationem i azotem korony nie sprzyja tworzeniu stanu TICT, to z kolei prowadzi do niezwykłego wzrostu krótkofalowego pasma. Związek **PCT-3** [94] jest analogiem



**PCT-2**, w którym monoazaeter koronowy został zastąpiony tetraazaeterem - cyklem, w celu kompleksowania jonów metali przejściowych. W tym przypadku, obserwowana jest potrójna fluorescencja. Oprócz emisji lokalnego wzbudzenia i stanu TICT, fluorescencja jest też emitowana przez wewnątrzcząsteczkowe

eksypleksy (tworzenie „kanapkowego” kompleksu w stanie wzbudzonym dzięki elastyczności cyklu). Taka potrójna fluorescencja zależy od rozpuszczalnika i od pH, a wiązanie kationu może ją zaburzać. Względne zmiany pasm zależą również od natury kationu.

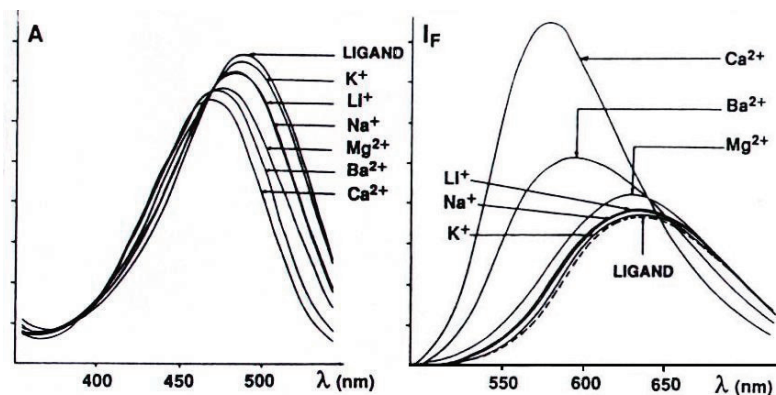
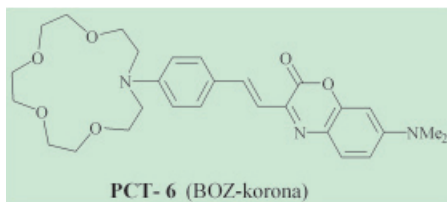
Tworzenie stanu TICT często ma miejsce, nawet jeśli nie obserwuje się podwójnej fluorescencji. Brak fluorescencji w przypadku **PCT-4** [95] może być spowodowane tworzeniem stanu TICT, który nie wykazuje emisji. Koordynacja jonów  $H^+$  lub  $Ag^+$  powoduje wzrost fluorescencji typowej dla akrydyny. W większości przypadków, zmiany w intensywności fluorescencji chemosensorów PCT w wyniku wiązania kationu są niewielkie w porównaniu do chemosensorów PET. Nadzwyczajny wyjątek stanowi



W większości przypadków, zmiany w intensywności fluorescencji chemosensorów PCT w wyniku wiązania kationu są niewielkie w porównaniu do chemosensorów PET. Nadzwyczajny wyjątek stanowi **PCT-5** [96] w przypadku, którego wartość współczynnika wzmocnienia fluorescencji (EF) rośnie z 90 dla jonów  $Li^+$  do 2250 dla  $Mg^{2+}$ .

W przeciwieństwie do omówionych powyżej fluorojonoforów PCT widmo emisyjne związku **PCT-6** ulega silnemu przesunięciu w kierunku krótszych fal pod wpływem kompleksowania jonu. **PCT-6** [97-99] jest jedną z pierwszych zaprojektowanych przez grupę badaczy Valeura

koron, która zawiera fluorescencyjny chemosensor PCT. Takie przesunięcie jest dowodem, iż nie następuje w tym przypadku fotorozrywanie oddziaływania między kationem a atomem azotu korony w przeciwieństwie do ligandu **PCT-1**, ponieważ atom azotu korony nie jest jedynym obecnym w tym układzie donorem elektronów dla benzoksalowego ugrupowania.



Rysunek 7. Widmo absorpcji i emisji ligandu **PCT-6** i jego kompleksów w roztworze acetonitrylu.

Dodatkowo jony metali alkalicznych i ziem alkalicznych powodują wzrost wydajności kwantowej fluorescencji ligandu, której wartość zbliżona jest do związku modelowego, który posiada atom wodoru zamiast azoeteru koronowego (tabela 4).

Analiza wartości stałych trwałości tworzonych kompleksów jest analogiczna do **PCT-1**, a wyższe wartości odpowiednich stałych potwierdzają fakt, iż fotorozrywanie powoduje spadek stabilności kompleksów. Zmiany widma emisyjnego **PCT-6** powodują nie tylko jony berylowców, ale też dwuwartościowe ciężkie jony metali  $\text{Hg}^{2+}$  i  $\text{Pb}^{2+}$  [100], dlatego istnieje możliwość zastosowania tego związku do środowiskowych analiz. Pochodna **PCT-6**, w której benzo-diazolowe ugrupowanie zostało zastąpione benzoksazolem wykazuje podobne fotofizyczne zmiany spowodowane obecnością kationu [101]. Wartości stałych trwałości kompleksów obu ligandów są porównywalne.



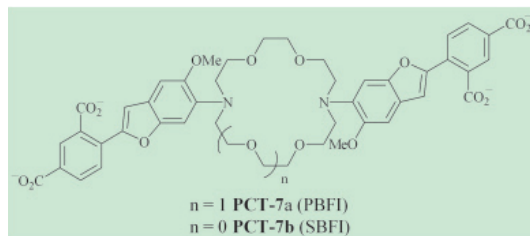
Tabela 4.

Spektroskopowe właściwości PCT-6 i jego kompleksów w acetonitrylu. Wartości stałych trwałości kompleksów.

	$\lambda_F$ (nm)	$\Phi_F$	$\tau_F$ (ns)	$\log K_d$ [M <sup>-1</sup> ]	średnica jonu (Å)	
<b>PCT-6<sup>a</sup></b>	642	0,33	2,10			
<b>(PCT-6)Li<sup>+</sup></b>	612	0,44	2,80	2,83	1,39	Li <sup>+</sup>
<b>(PCT-6)Na<sup>+</sup></b>	611	0,38	2,50	2,23	1,94	Na <sup>+</sup>
<b>(PCT-6)Mg<sup>2+</sup></b>	573	0,48	3,30	2,68	1,32	Mg <sup>2+</sup>
<b>(PCT-6)Ca<sup>2+</sup></b>	574	0,64	3,35	4,14	1,98	Ca <sup>2+</sup>
<b>(PCT-6)Ba<sup>2+</sup></b>	576	0,59	3,05	3,62	2,68	Ba <sup>2+</sup>
BOZ-H	567	0,54	4,00			
BOZ-NMe <sub>2</sub>	649	0,23	1,60			

<sup>a</sup> rozmiar wnętrza korony: 1,7 – 2,2 Å

Fluorojonofory zawierające korony są niezmiernie interesujące z punktu widzenia poznania oddziaływań kation – fluorofor. Prezentują one dużą różnorodność fotofizycznych zmian pod wpływem wiązania kationu, dzięki czemu są chętnie wykorzystywane w analizie kationów. Ich słaba rozpuszczalność w wodzie wyklucza zastosowanie w wodnych roztworach, ale mogą być one używane jako wrażliwa część optycznych czujników. Niestety, w sytuacji gdy wymagana jest silna dyskryminacja kationów o podobnej naturze, selektywność azakoron dla odpowiednich jonów metali jest często niezadowalająca. Poprawę selektywności pochodnych eterów koronowych osiągnięto poprzez udział w koordynacji grup nienależących do jonoforów. W **PCT-7a** (PBFI) [102] i **PCT-7b** (SBFI) [19], atom tlenu podstawnika metoksy fluorofora może oddziaływać z kationem;

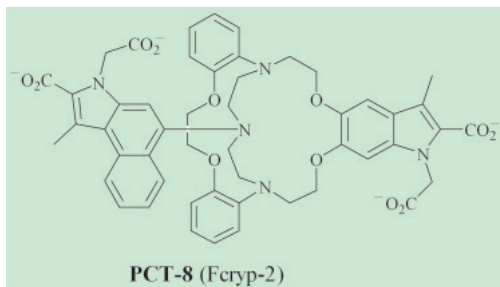


przez co skuteczność i selektywność wiązania jest wyższa niż samej korony. Ligand **PCT-7b** został zaprojektowany w celu sondowania śródkomórkowego poziomu jonów sodu, a **PCT-7a** jonów potasu. W obu związkach, fotofizyczne zmiany są wywołane redukcją elektronodonorowego charakteru atomów azotu korony w wyniku kompleksowania kationu. W zastosowaniach medycznych niezmiernie ważna jest



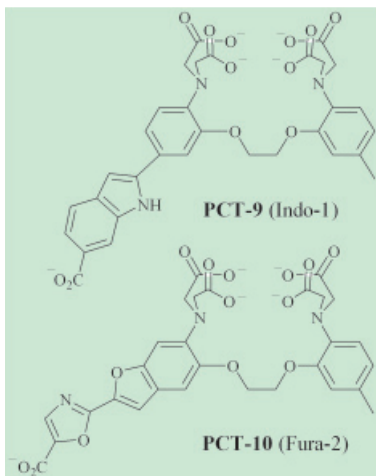
ciągła poprawa selektywności wobec jonów  $K^+$  względem  $Na^+$ , która w pewnym stopniu została już osiągnięta [103].

W chemosensorach PCT również wykorzystano struktury kryptandowe, które charakteryzują się wysoką selektywnością. **PCT-8** (FCryp-2) [104] jest przykładem takiego fluorojonoforu, w którym część jonoforowa wykazuje wysokie powinowactwo do jonów sodowych. Po związaniu jonów sodu, maksimum emisji pochodnej indolu przesuwają się z 460 do 395 nm a intensywność fluorescencji wzrasta 25-krotnie. Inny przykład kryptandowego chemosensora

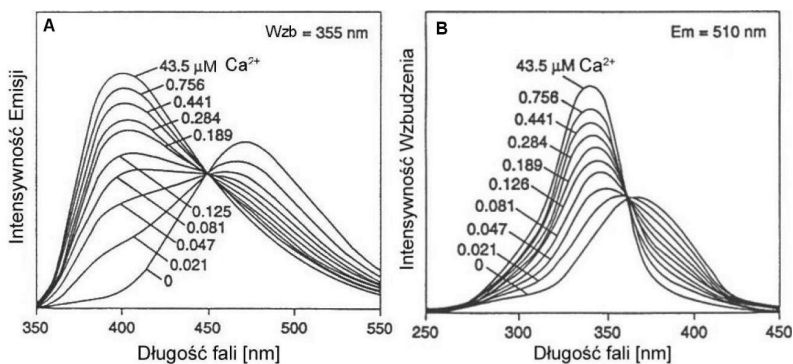


PCT, który wykazuje potencjalne zastosowanie jako sonda pozakomórkowego poziomu jonów potasu, został zaproponowany przez Grossleya [105].

W świetle poprzedzających rozważań o koronowych i kryptandowych związkach, w których zachodzi przeniesienie ładunku, warto również omówić fotofizyczne własności dobrze znanych chelatów - pochodnych BAPTA używanych do analizy cytologicznych kationów, w szczególności jonów wapnia [18]. Przykładami mogą być tutaj związki **PCT-9** (Indo-1) i **PCT-10** (Fura-2), które są szeroko stosowane jako wskaźniki wapnia. Kompleksowanie jonów  $Ca^{2+}$  w wodzie przez tego typu chemosensory, powoduje hipsochromowe przesunięcie ich widm absorpcyjnych i emisyjnych. Wartość przesunięć pasma emisyjnego jest zazwyczaj niewielka ( $\Delta\lambda < 13$  nm), chociaż istnieją wyjątki, do których należy właśnie chelat **PCT-9** ( $\Delta\lambda \approx 75$  nm) (rysunek 8). Została tutaj zaproponowana taka sama interpretacja jak w przypadku powyżej opisanych związków zawierających etery koronowe. Gęstość elektronowa atomu azotu sprzężonego z grupą akceptorową fluorofora maleje po wzbudzeniu, mogąc powodować nawet jego dodatnie naładowanie; w wyniku czego następuje zakłócenie oddziaływania pomiędzy atomem azotu a związanym kationem. W



konsekwencji, widmo fluorescencyjne kompleksu jest podobne do widma wolnego ligandu.



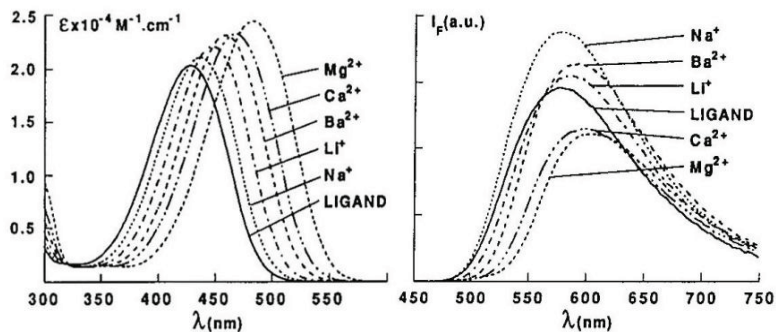
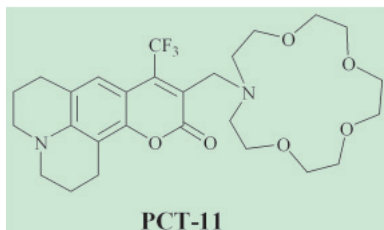
Rysunek 8. Zmiany w widmie fluorescencyjnym ligandu PCT-9 (A) i PCT-10 (B) wywołane obecnością jonu  $\text{Ca}^{2+}$  [18].

W przypadku chelatowych chemosensorów proces fotorozrywania nie został jeszcze udowodniony. Rozważając przypadek **PCT-9**, mechanizm PCT nie jest dostatecznie silny, aby spowodować rozrywanie wiązania azot –  $\text{Ca}^{2+}$ . Ta interpretacja jest konsekwencją faktu, że maksimum fluorescencji wolnego **PCT-9** jest położone przy krótszych długościach fali, niż wszystkie pozostałe ligandy (około 30–60 nm), co wskazuje na mniejszą polarność stanu CT. Badanie rozkładu fluorescencji **PCT-10** za pomocą globalnej analizy [106] wykazało, że stała trwałości kompleksu wapnia w stanie wzbudzonym jest więcej niż trzy rzędy wielkości mniejsza niż w stanie podstawowym. Połączenie opisanych powyżej fluoroforów z jonoforem o mniejszej wnęce umożliwiło otrzymanie chemosensorów selektywnie oddziałujących z jonami magnezu [107]. Większość chelatowych fluorojonoforów PCT jest dostępna komercyjnie w formie pochodnych nie wykazujących fluorescencji (estry acetylometoksyłowe), dzięki temu mogą one przenikać do komórki, gdzie odzyskują fluorescencję w wyniku hydrolizy wywołanej przez enzymy [107].

#### 2.4 Chemosensory PCT, których grupa akceptorowa oddziałuje z kationem.

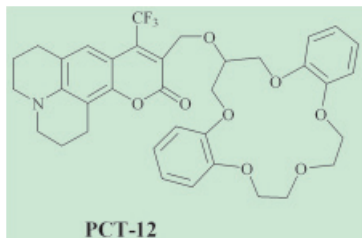
W przeciwieństwie do opisanych powyżej systemów PCT, istnieje tylko kilka układów opisanych w literaturze, w który związany kation oddziałuje z ugrupowaniem akceptorowym fluorofora. Szczególnie interesujący jest przypadek kumaryny połączonej z koroną, ponieważ kation oddziałuje bezpośrednio z akceptorem, tj. z grupą karbonylową, niezależnie od występującego tam

mostka dystansującego pomiędzy fluoroforem i koroną. Zaletą takich układów są wysokie stałe trwałości tworzenia kompleksów. Badania nad własnościami kompleksującymi takich układów z jonami litowców i berylowców były prowadzone w laboratorium Valeura [108-111]. W analizie fotofizycznych zmian aminokumaryny wywołanych obecnością kationu, należy zwrócić uwagę na jej moment dipolowy, który w stanie wzbudzonym jest większy niż w stanie podstawowym. Koordynacja kationu przez grupę karbonylową tego typu ligandów powoduje wyższą stabilizację stanu wzbudzonego niż stanu podstawowego, dlatego zarówno widmo absorpcyjne jak i emisyjne ulega bathochromowemu przesunięciu. Innymi słowy kation powoduje wzmocnienie charakteru akceptorowego grupy karbonylowej. Tak jak w przypadku chemosensorów PCT, których grupa donorowa oddziałuje z kationem, wartość przesunięcia pasm zależy od gęstości ładunku danego kationu. Pochodna azaeteru koronowego **PCT-11** jest przykładem, w którym koronowy atom azotu nie bierze udziału w sprzężeniu donorowo – akceptorowym. Istnieje jednak oddziaływanie pomiędzy barwnikiem a azaeterem koronowym, które powoduje obniżenie jego wydajności kwantowej. W przypadku **PCT-11** jony takie jak  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$  i  $\text{Ba}^{2+}$  powodują wzrost intensywności fluorescencji ligandu, który autorzy tłumaczą redukcją oddziaływania korona – fluorofor. Natomiast spadek wydajności kwantowej pod wpływem kompleksowania jonów  $\text{Mg}^{2+}$  i  $\text{Ca}^{2+}$  świadczy o obecności dodatkowej, konkurencyjnej drogi dezaktywacji fluorescencji, która prawdopodobnie zależy od gęstości ładunku kationu (rysunek 9).



Rysunek 9. Widmo absorpcji i emisji ligandu PCT-11 i jego kompleksów w roztworze acetonitrylu.

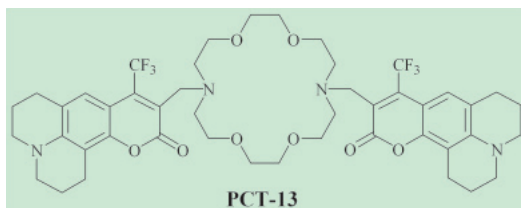
Niska selektywność **PCT-11** wynika z elastyczności zarówno korony, jak i łącznika pomiędzy barwnikiem a koroną. Ponadto, atom azotu korony ulega łatwo protonowaniu. Zamiana mostka metylenowego w **PCT-11** na sztywniejszy



- amidowy eliminuje wrażliwość na zmianę pH i prowadzi do poprawy selektywności ku jonom berylowców względem jonów litowców. Podwyższoną selektywność uzyskano również wykorzystując mniej elastyczną koronę zawierającą grupę fenylową, czyli dibenzo- lub tribenzoeter koronowy [112]. W acetonitrylu, związek **PCT-12** jest selektywny dla pewnych kationów, tj. selektywność wyrażona jako stosunek stałych trwa-

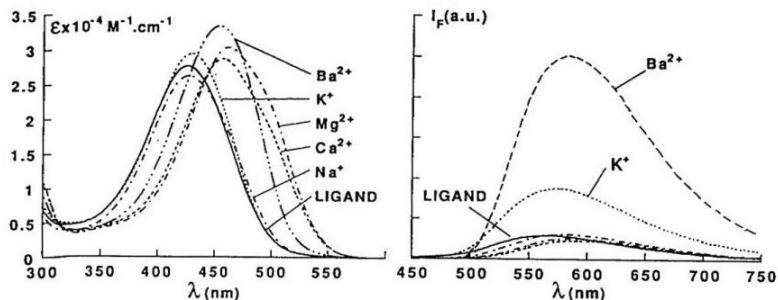
łości kompleksów wynosi 12500 dla pary  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  i 16 dla  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . Zmiany właściwości fotofizycznych **PCT-12** wywołane koordynacją jonu są silniejsze niż w przypadku ligandu **PCT-11**, fakt ten autorzy wyjaśniają długością mostka dystansującego. Kompleksy **PCT-12** przyjmują konformację, w której kation jest położony bliżej grupy karbonylowej w porównaniu z innymi ligandami.

Dodatkowych efektów fotofizycznych dostarcza związek **PCT-13** [109], który posiada dwa podstawniki kumarynowe. Wydajność kwantowa fluorescencji wolnego ligandu jest



10-krotnie niższa od jego pochodnej **PCT-11**. Przyczyną samowygaszania jest wzajemne oddziaływanie dwóch ugrupowań kumarynowych, które jest możliwe dzięki elastyczności eteru koronowego. Obie grupy

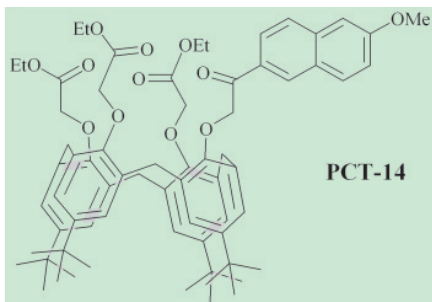
karbonylowe uczestniczą w kompleksowaniu, a ich bezpośrednie oddziaływanie z kationem tłumaczy wysokie stałe trwałości i fotofizyczne zmiany. Oprócz przesunięć widma absorpcyjnego i emisyjnego, zaobserwowano interesujący, specyficzny wzrost wydajności kwantowej fluorescencji w obecności jonów  $\text{K}^+$  i  $\text{Ba}^{2+}$ , których promienie jonowe są najbardziej dopasowane do rozmiarów wnętrza korony (rysunek 10). Preferowana jest wówczas konformacja, w której grupy karbonylowe kumaryn położone są po przeciwnych stronach kationu, dlatego samowygaszanie jest częściowo lub całkowicie zniesione.



Rysunek 10. Widmo absorpcji i emisji ligandu PCT-13 i jego kompleksów w roztworze acetonitrylu [109].

W przypadku kompleksów omawianego ligandu z jonami o mniejszych promieniach jonowych możliwe jest położenie dwóch grup karbonylowych po tej samej stronie kationu, w wyniku czego ugrupowania kumarynowe znajdują się blisko siebie, co wyjaśnia słabą emisję.

Przykładem ligandu należącego do tej klasy chemosensorów posiadającego receptor kaliksarenowy jest **PCT-14** [113], który zawiera trzy grupy estrowe i naftalenowy fluorofor. Wykazuje on bardzo interesujące fotofizyczne i kompleksujące własności. Oddziaływanie kationu z grupą karbonylową fluorofora prowadzi do batochromowego przesunięcia widm absorpcji i emisji. Duży wzrost wydajności kwantowej fluorescencji wywołany koordynacją jonu został wyjaśniany względным położeniem stanów singletowych  $\pi\pi^*$  i  $n\pi^*$ . W wolnym ligandzie najniższy stan wzbudzony  $n\pi^*$  ulega wewnątrzsystemowemu przejściu do stanu tripletowego, w konsekwencji wydajność kwantowa fluorescencji jest niska. Obecność kationu silnie oddziałującego z wolną parą elektronów grupy karbonylowej prawdopodobnie powoduje przesunięcie stanu  $n\pi^*$  w kierunku wyższej energii, tak więc najniższym wzbudzonym stanem staje się  $\pi\pi^*$ . Dla tego chemosensora zaobserwowano wysoką selektywność oddziaływania z jonami  $\text{Na}^+$  względem jonów  $\text{K}^+$ , którą wyraża stosunek stałych trwałości wynoszący 1300 w mieszaninie alkoholu etylowego i wody (60:40, v:v). Taka selektywność jest bardzo obiecująca ze względu na praktyczne zastosowanie tego związku w wodnych próbkach.



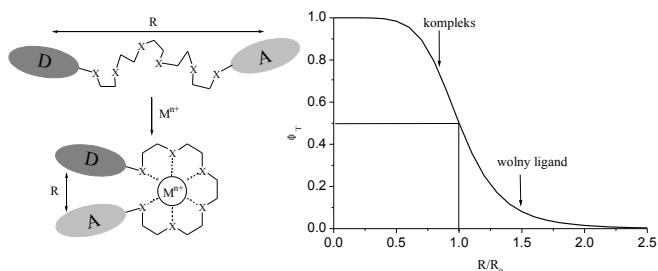
## 2.5 Fluorescencyjne chemosensory z przeniesieniem wzbudzonej energii (EET).

Często wykorzystywany w badaniach konformacji biomolekuł, proces przeniesienia energii wzbudzonej (EET, z ang. *excitation energy transfer*) znalazł również zastosowanie w projektowaniu fluorescencyjnych chemosensorów. Taki mechanizm wymaga obecności donora energii i jej akceptora. Przejściu wzbudzonego elektronu ugrupowania donorowego na niższy orbital towarzyszy zmiana momentu dipolowego, w wyniku której powstaje pole elektryczne. Elektron akceptora doznaje działania tego pola i przechodząc na wyższy orbital, wytwarza swoje własne pole elektryczne, które z kolei działa na elektron donora.

Bifluorofory składające się z dwóch różnych fluorescencyjnych barwników połączonych giętkim łańcuchem zawierającym heteroatomy wykazują zdolność wiązania kationu. Kompleksowanie powoduje zmniejszenie odległości między dwoma fluoroforami, co w konsekwencji powoduje wzrost wydajności przeniesienia energii. Warunkiem procesu EET jest wzajemne nachodzenie na siebie widma emisyjnego donora i widma absorpcyjnego akceptora [114]. Wydajność transferu energii zależy od odległości, zgodnie z teorią Förstera:

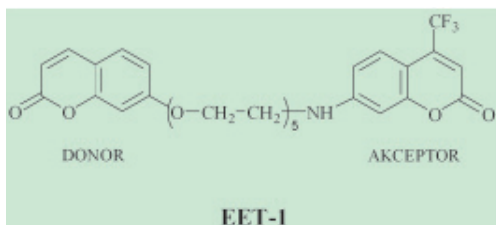
$$\Phi_T = \frac{1}{1 + \left(\frac{R}{R_0}\right)^6}$$

gdzie  $R$  jest odległością pomiędzy dwoma fluoroforami, a  $R_0$  jest krytyczną odległością Förstera. Ponieważ  $\Phi_T$  silnie zależy od wartości czynnika  $R/R_0$ , relatywnie małe zmiany odległości mogą powodować duży wzrost wydajności przeniesienia pod warunkiem, że odległość międzychromoforowa jest większa niż wartość  $R_0$  dla wolnego ligandu i niższa w kompleksie (rysunek 11).

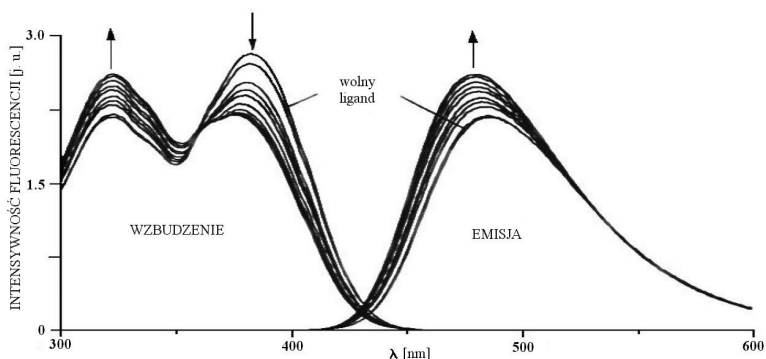


Rysunek 11. Zasada działania fluorjonoforów wykorzystujących proces przeniesienia energii.

Przy projektowaniu kompleksujących bifluorojonoforów należy zwrócić szczególną uwagę na wartość krytycznej odległości Förstera w porównaniu z odległością pary donor – akceptor. Wartość tej pierwszej zależy od wydajności kwantowej donora oraz od wielkości spektralnego nakładania się widma emisyjnego donora i absorpcyjnego akceptora.



Pierwszym bifluorojonoforem zaprojektowanym w myśl tej zasady jest ligand **EET-1** [115,116], który składa się z dwóch pochodnych kumaryny połączonych łańcuchem polieterowym. Kompleksowanie jonów  $Pb^{2+}$  w roztworze acetonitrylu potwierdziły zaobserwowane przez autorów zmiany widma absorpcji, wzbudzenia oraz emisji. Na widmie emisyjnym ligandu widoczne jest tylko pasmo charakterystyczne dla fragmentu akceptorowego, ponieważ wydajność kwantowa fluorescencji ugrupowania donorowego jest bardzo mała. Po wzbudzeniu  $\lambda = 321$  nm, czyli długości odpowiadającej pasmu absorpcyjnego donora, dodanie jonów  $Pb^{2+}$  powoduje wzrost intensywności fluorescencji akceptora (rysunek 12).



Rysunek 12. Zmiany w widmie wzbudzenia i emisji ligandu EET-1 wywołane obecnością jonów  $Pb^{2+}$  w acetonitrylu [115].

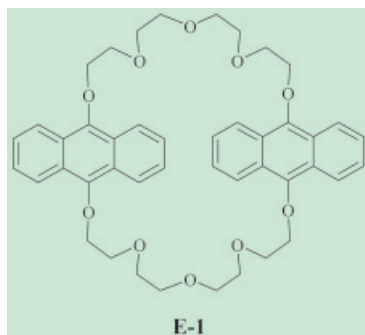
Na podstawie badań spektroskopowych wyznaczona została stała tworzenia kompleksu o stechiometrii 1:1, która wynosi  $3,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ . Autorzy zbadali również wpływ jonów litowców i berylowców na właściwości fotofizyczne omawianego ligandu, jednak jony te nie wywołały zmian. W wyniku koordynacji



jonów  $Pb^{2+}$  wydajność przeniesienia energii wzrosła od 0,77 do 0,89. Ta niewielka zmiana wynika z faktu, że dla wolnego ligandu odległość między parą donor – akceptor jest krótsza od krytycznej odległości Förstera. Ponadto autorzy przytoczyli nie osiągnięcia wartości wydajności transferu bliskiej jedności, tłumacząc spiralnym owinięciem się niecyklicznego ligandu wokół jonu metalu.

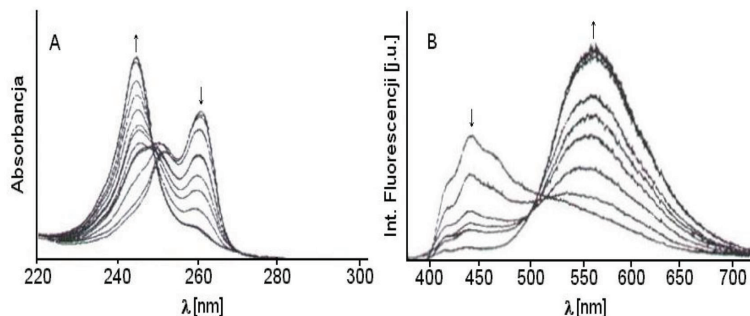
## 2.6 Fluorescencyjne chemosensory zdolne do tworzenia ekscimerów.

Fluorofory takie jak antraceni i piren wykazują zdolność tworzenia ekscimerów (wzbudzonych dimerów), jeśli wzbudzona cząsteczka ma możliwość zbliżenia się do drugiej w czasie życia stanu wzbudzonego. Widmo emisji posiada wówczas dwa pasma, pierwsze odpowiada fluorescencji monomeru, a drugie, szerokie pasmo przy dłuższych falach jest wynikiem tworzenia ekscimeru (ekscimerowa fluorescencja). Stosunek intensywności fluorescencji monomeru i ekscimeru zależy od ruchliwości i „mikrolepkkości” cząsteczki [76]. Kiedy fluorojonofor zawiera dwa identyczne fluorofory, których wzajemna odległość jest zależna od kompleksowanego jonu, rozpoznawanie tego kationu może



być monitorowane przez stosunek intensywności fluorescencji monomeru do ekscimeru. Wiązanie kationu może ułatwiać lub utrudniać tworzenie wzbudzonego dimeru. Metody wykorzystujące pomiar stosunku intensywności pozwalają na samokalibrację, dzięki czemu cieszą się dużym zainteresowaniem w praktycznych zastosowaniach. Przykładem chemosensora, którego kompleks wykazuje silną ekscimerową fluorescencję jest bisantracenoeter koronowy **E-1** [117-119]. Wolny ligand posiada widmo fluorescencyjne złożone z pasm charakterystycznych dla monomeru i ekscimeru. W wyniku stopniowego dodawania nadchloranu sodu do roztworu metanolowego **E-1** pasmo monomeru zanika, a pasmo ekscimeru rośnie (rysunek 13). Kompleksowanie powoduje zbliżenie się do siebie dwóch ugrupowań antracenowych, przez co ułatwia tworzenie formy ekscimerowej. Ligand w alkoholu metylowym i acetonitrylu tworzy z jonami  $Na^+$  kompleksy o stechiometrii 1:1 i 1:2 (L:Na<sup>+</sup>). Wartość całkowitej stałej trwałości kompleksu otrzymana z danych spektrofotometrycznych jest niższa niż z fluorometrycznych, co pozwala twierdzić, iż zdolność tworzenia kompleksów jest większa w stanie wzbudzonym.

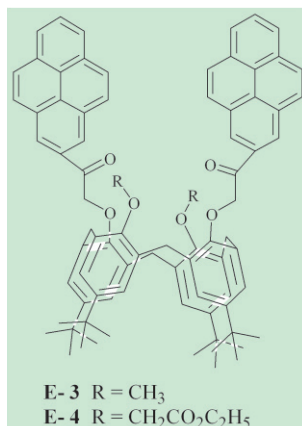
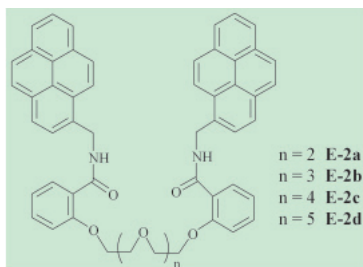




Rysunek 13. Miareczkowanie roztworu ligandu *E-1* w acetonitrylu. (A) Spektroskopia absorpcyjna; (B) spektroskopia emisyjna ( $\lambda_{wzb} = 370$  nm) [118].

Wzrost pasma ekscimerowego w widmie emisyjnym antracenu pod wpływem jonów metali ziem alkalicznych zaobserwowano również w przypadku niecyklicznego eteru [120]. Silną tendencją do tworzenia wewnątrzcząsteczkowych ekscimerów wykazują także ugrupowania pirenowe w cząsteczce **E-2** [121]. Obecność jonów berylowców powoduje zanik pasma ekscimeru. Powodem rozpadu formy dimerowej są spiralne struktury kompleksów o stechiometrii 1:1, które zostały potwierdzone badaniami  $H^1$  NMR. Dzięki strukturze pseudocyklicznej, stałe trwałości kompleksów z jonami  $Ca^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$  i  $Ba^{2+}$  w acetonitrylu są dosyć wysokie (ok.  $10^6 - 10^7$   $M^{-1}$  dla **E-2d**), lecz selektywność takich oddziaływań jest mała, co jest konsekwencją elastyczności oksyetylenowego łańcucha.

Struktura dipodstawionych kaliksarenów również umożliwia tworzenie ekscimerów przez fluorofory. **E-3** [122] jest przykładem jonoforowego kaliksarenu z dodanymi do niego pirenami, który zapoczątkował zainteresowanie kaliksarenowymi chemosensarami. Obecność jonów litowców uniemożliwia tworzenie ekscimerów, dlatego silna fluorescencja ekscimerowa zanika. Selektywność oddziaływań metal - ligand niestety nie jest wysoka. Rozwiązanie tego problemu



dostarczył ligand **E-4** [123], którego powinowactwo do jonów  $\text{Li}^+$  i  $\text{K}^+$  drastycznie spadło (tabela 5).

Tabela 5.

Stale trwałości kompleksów kaliksarenowych pochodnych **E-3** i **E-4** z jonami metali alkalicznych [122,123].

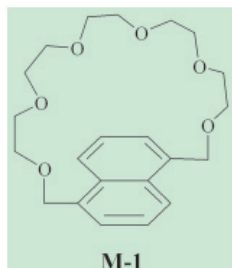
	$\text{Li}^+$	$\text{Na}^+$	$\text{K}^+$
<b>E-3</b> <sup>a</sup>			
$\log K_s [\text{M}^{-1}]$	4,73	5,34	4,06
<b>E-4</b> <sup>b</sup>			
$\log K_s [\text{M}^{-1}]$	-	4,43	2,24

<sup>a</sup> w eterze dietylowym

<sup>b</sup> w układzie MeOH-THF (v/v 15/1)

## 2.7 Fluorescencyjne chemosensory wykorzystujące odmienne fotofizyczne procesy.

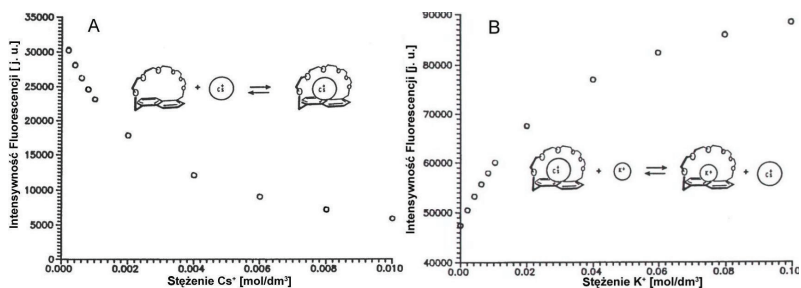
Mechanizm działania wielu sond fluorescencyjnych wykazujących zmiany fotofizyczne pod wpływem koordynacji jonu nie może być wyjaśniony procesami, które zostały opisane w poprzednich rozdziałach. Oddziaływanie kationu z fluoroforem często prowadzi do zmian stałych szybkości przejść promienistych, bezpromienistych i/lub międzysystemowych, powodując w konsekwencji zmiany wydajności kwantowej fluorescencji i czasu życia (podczas gdy przesunięcie widm nie jest ogólną regułą).



Pionierskie prace Sousa i jego współpracowników dotyczyły oddziaływań pomiędzy kationem a  $\pi$ -elektronowym układem naftalenu włączonego w strukturę eteru koronowego. Jon ciężkiego atomu  $\text{Cs}^+$  pełni rolę wygaszacza w układzie **M-1**, ponieważ powoduje on wzrost przejść międzysystemowych z fluorescencyjnego stanu  $S_1$  do stanu  $T_1$  (rysunek 14A) [124,125]. Dlatego intensywność fluorescencji ligandu drastycznie spada w wyniku kompleksowania tego jonu. Inaczej zachowuje się ligand w obecności jonów potas, które wywołują niewielki spadek emisji chemosensora.

W wyniku miareczkowania kompleksu  $\text{Cs}[\text{M-1}]^+$  jonami potasu nastąpił wzrost emisji, ale dopiero przy dużym nadmiarze tych jonów. Taki pomiar potwierdził tworzenie kompleksu ligandu z jonami  $\text{K}^+$ , które wypierają jony cezu z jego kompleksu (rysunek 14B).

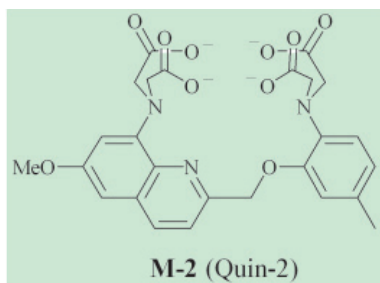
## Fluorojonofory



Rysunek 14. Zmiany względnej intensywności fluorescencji (przy 335 nm) w metanolu: A – ligandu M-1 w zależności od stężenia jonów Cs<sup>+</sup>; B – kompleksu Cs[M-1]<sup>+</sup> w zależności od stężenia jonów K<sup>+</sup> [124].

Wyznaczona wartość stałej trwałości kompleksu z jonami potasu jest niższa od stałej trwałości z jonami cezu, dlatego przy równomolowym stężeniu obu jonów intensywność fluorescencji jest wyższa od emisji kompleksu (M-1)Cs<sup>+</sup> tylko o 10%.

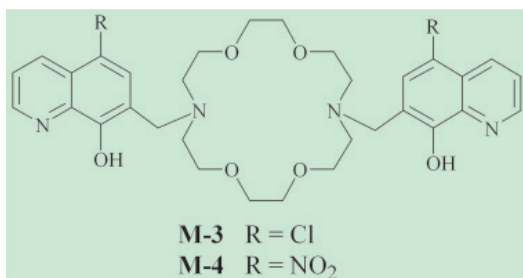
Kolejnym przykładem fluoroforu, którego mechanizm oddziaływania z kationem w stanie wzbudzonym nie wykorzystuje procesów omówionych w poprzednich rozdziałach, jest oksychinolina i jej pochodne. 8-hydroksychinolina (8-HQ), często nazywany oksyną, jest uważana za bardzo ważny (drugi po EDTA) odczynnik chelatujący [126]. Najbardziej interesującą cechą 8-HQ jest jego fluorogeny charakter, tj. wydajność kwantowa jej fluorescencji w wodnych lub organicznych roztworach jest bardzo niska, a związanie kationu powoduje powiększenie fluorescencji. Brak fluorescencji 8-HQ w obojętnej wodzie został niedawno wyjaśniony poprzez występowanie w stanie wzbudzonym reakcji przeniesienia protonu połączonej z wewnątrzcząsteczkowym przeniesieniem elektronu [127,128]. Faktycznie, fotoindukowana deprotonacja grupy –OH i protonacja heterocyklicznego atomu azotu może występować albo z otaczającymi cząsteczkami wody albo wewnątrzcząsteczkowo, zależnie od możliwości istnienia wiązania wodorowego pomiędzy dwoma grupami. Dezaktywacja wzbudzenia poprzez tautomer (formę ketonową) zachodzi głównie bezpromiennie. Połączenia chelatowe 8-HQ z jonami metali (np.: Cd, Zn, Mg, Al, Ga, In) wykazują intensywną żółtozieloną fluorescencję, ponieważ powyżej opisane procesy są osłabiane przez wiązanie kationu. Jednak, zmiany w rozkładzie elektronowym pod wpływem wzbudzenia prawdopodobnie osłabiają wiązanie między atomem tlenu i jonem metalu, pozwalając na pewne przeniesienie ładunku z fenolanu –O do atomu azotu przyległego pierścienia. Selektywność 8-HQ jest uboga, ale może być ulepszona przez odpowiednią substytucję na atomie tlenu, czyli poprzez otrzymanie niecyklicznych polieterów zawierających dwa oksy-



chinolinowe fluorofory [129-131]. **M-2** (Quin-2) jest pierwszym praktycznym fluorescencyjnym wskaźnikiem cytolegicznego wapnia, w którym zastosowano 6-metoksychinolinę jako fluorofor [132]. Związanie  $\text{Ca}^{2+}$  powoduje sześciokrotny wzrost intensywności fluorescencji bez widmowych przesunięć w przeciwieństwie do **PCT-10** (rozdział 2.2.2.1). Czas życia fluorescencji **M-2** jest niezmiernie

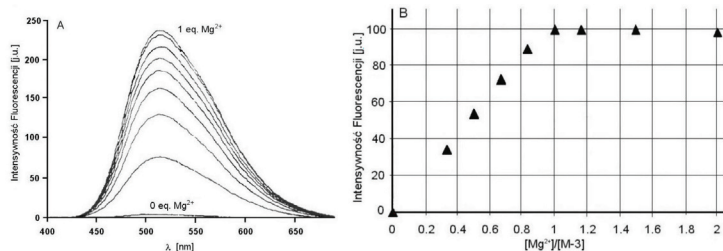
wrażliwy na stężenie wapnia; dlatego związek ten może być używany jako sonda mierząca czas życia fluorescencji [133].

Wspólne badania L. Prodi i P. B. Savage oraz ich współpracowników poświęcone były również



pochodnym hydroksychinolinoln połączonych z diaza-18-koroną-6. Ligandy tego typu wykazują bardzo interesujące własności kompleksujące. Wydajność kwantowa fluorescencji **M-3** [134] wzrasta około 1000-krotnie pod wpływem jonów  $\text{Mg}^{2+}$  w mieszaninie metanol-woda

(1:1, v:v) o pH=7,2 (rysunek 15A). Pozostałe jony berylowców nie powodują takiego wzrostu.

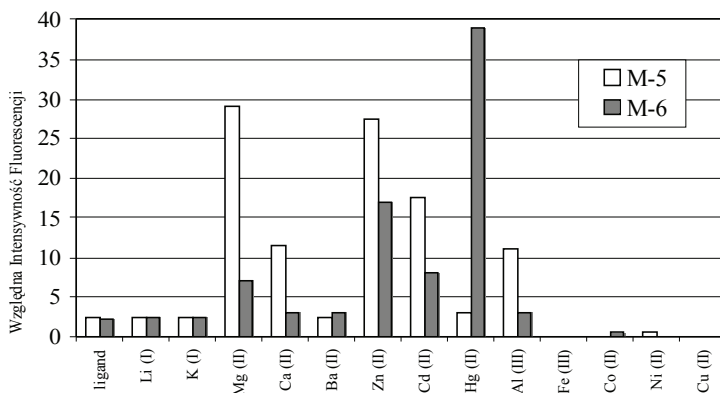
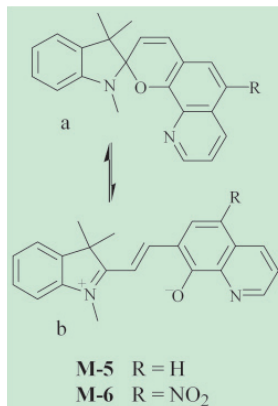


Rysunek 15. A - Przebieg miareczkowania spektrofluorometrycznego ligandu **M-3** jonami  $\text{Mg}^{2+}$ ; B – Zmiany intensywności fluorescencji przy 530 nm związku **M-3** w zależności od stosunku  $\text{Mg}^{2+}/\text{M-3}$  w obecności jonów:  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  i  $\text{Ba}^{2+}$  [134].

Dodatkowo ligand **M-3** wykazuje wysoką selektywność względem jonów magnezu, ponieważ obecność w roztworze ligandu jonów  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  i

$Ba^{2+}$  nie hamuje wzrostu emisji (rysunek 15B). Wymiana atomu chloru na grupę nitrową pozwoliła na otrzymanie chemosensora **M-4**, który charakteryzuje się selektywnym oddziaływaniem z jonami  $Hg^{2+}$  [135]. Jony te powodują wzrost intensywności fluorescencji ligandu, a współczynnik podwyższenia wynosi 12. Obecność w roztworze jonów takich jak  $Zn^{2+}$  i  $Cd^{2+}$ , które znacznie słabiej podwyższają fluorescencje (EF wynosi 3,4 dla  $Zn^{2+}$  i 3,0 dla  $Cd^{2+}$ ), nie hamuje tworzenia kompleksu z jonami  $Hg^{2+}$ .

Zjawisko fotoizomeryzacji wykorzystują natomiast związki **M-5** i **M-6** [136]. Dodatek jonów  $Zn^{2+}$  do etanolowego roztworu **M-5a** prowadzi do 14-krotnego wzrostu fluorescencji w 610 nm. Powiększenie to wywołane jest powstaniem izomeru **M-5b** w wyniku tworzenia się kompleksu. Wrażliwość **M-5a** na jony  $Zn^{2+}$  w roztworze etanol-woda sięga zakresu około 3 ppb. Niewielki wzrost emisji został również zaobserwowany w obecności jonów  $Cd^{2+}$  i  $Mg^{2+}$ . Wzrost absorbancji w długofalowym zakresie odpowiadającym formie **M-5b** potwierdza tworzenie się chelatów nie wykazujących luminescencji z jonami  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  i  $Fe^{3+}$  (rysunek 16).

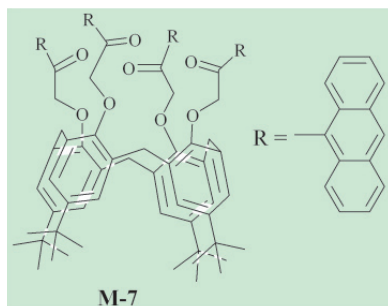


Rysunek 16. Względna intensywność fluorescencji **M-5** (w metanolu) i **M-6** (w benzenie) oraz ich kompleksów [136].

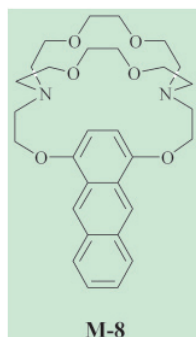
Wprowadzenie grupy nitrowej w ugrupowanie chinolinowe dające **M-6a**, powoduje dwie ważne zmiany w prezentowanym układzie, mianowicie (i) przesunięcie się równowagi ku otwartej formie nawet w nieobecności dodawanych

jonów metali i (ii) spadku zdolności kompleksotwórczych chinoliny. Dziewięciokrotny wzrost intensywności fluorescencji ligandu **M-6a** zaobserwowano pod wpływem jonów cynku, tylko od 3- do 4-krotny wzrost w obecności jonów magnezu lub kadmu oraz bardzo obiecujący, 20-krotny wzrost wywołany dodaniem jednego ekwiwalentu jonów rtęci.

Niezwykle szybki w ostatnich latach rozwój kaliksarenowych chemosensórow spowodował, iż większość z nich oddziałuje z kationami w szczególny sposób. Praktycznie każdy przypadek opisany w literaturze należałoby rozpatrywać osobno [137,138]. Często autorzy sami nie są w stanie przypisać odpowiedniego mechanizmu. Przykładem może być tutaj ligand **M-7** [139], który posiada cztery ugrupowania antracenowe umieszczone na dolnej obręczy. Widmo emisyjne tego ligandu w roztworze chloroformu posiada tylko monomerną pasmę, którego intensywność fluorescencji ulega zmianie w wyniku działania jonów litowców. Wygaszanie fluorescencji przez jony  $\text{Na}^+$  może wynikać z konformacyjnych zmian kompleksu, którego zamknięta struktura umożliwia wzajemne oddziaływanie czterech podstawników antracenowych. Natomiast obserwowany wzrost intensywności fluorescencji wywołany przez jony  $\text{K}^+$  jest trudny do wyjaśnienia.



Warto również wspomnieć o pochodnej antracenu **M-8** [140], której mechanizm oddziaływania z kationami znacznie odbiega od antracenowych kryptandów (np. PET-8). Gdy atomy azotu połączone są z antracenem w pozycjach 1 i 4, wówczas ich wolne pary elektronów niechętnie uczestniczą w procesie PET, dlatego wydajność fluorescencji ligandu jest wysoka we wszystkich rozpuszczalnikach. Moment dipolowy cząsteczki w stanie wzbudzonym jest dużo wyższy niż w stanie podstawowym ( $\Delta\mu \approx 10$  Debye). Zmiany w widmie UV-VIS i fluorescencji wywołane obecnością jonu mogą być wyjaśniane przez osłabienie oddziaływania między wolną parą elektronów atomu azotu i antracenem. Taką interpretację popiera największe hipsokromowe przesunięcie wynikające z protonacji atomów azotu. Dlatego, najsilniejszych zmian można oczekiwać w przypadku kationów, które wykazują wysokie powinowactwo do atomu azotu. W szczególności, „miękkie” kationy, takie jak  $\text{Ag}^+$  i  $\text{Tl}^+$  tworzą bardzo stabilne kom-



pleksów. Często autorzy sami nie są w stanie przypisać odpowiedniego mechanizmu. Przykładem może być tutaj ligand **M-7** [139], który posiada cztery ugrupowania antracenowe umieszczone na dolnej obręczy. Widmo emisyjne tego ligandu w roztworze chloroformu posiada tylko monomerną pasmę, którego intensywność fluorescencji ulega zmianie w wyniku działania jonów litowców. Wygaszanie fluorescencji przez jony  $\text{Na}^+$  może wynikać z konformacyjnych zmian kompleksu, którego zamknięta struktura umożliwia wzajemne oddziaływanie czterech podstawników antracenowych. Natomiast obserwowany wzrost intensywności fluorescencji wywołany przez jony  $\text{K}^+$  jest trudny do wyjaśnienia.

pleksy w alkoholu metylowym zgodnie z ich powinowactwem atomów azotu i chmur  $\pi$ -elektronowych.

## 2.8 Właściwości fotofizyczne dansylu

Ugrupowanie dansylowe (1-dimetyloamino-5-naftalenosulfonowe) jest dobrze znane z intensywnej, zielonej fluorescencji wynikającej z obecności stanów z przeniesieniem ładunku (stany CT) z grupy aminowej do pierścienia naftalenowego. Przejścia elektronowe w 1-aminonaftalenach są przesunięte w kierunku dłuższych fal w stosunku do niepodstawionego naftalenu [141]. Stany CT wykazują zależność od polarności układu, dlatego pasmo emisji dansylu jest czułe na zmiany natury otoczenia fluorofora. Cecha ta przyczyniła się do częstego stosowania tego ugrupowania do badań, w których oczekiwano zmiany polarności układów. Dane dotyczące parametrów spektroskopowych pochodnej dansylu zostały przedstawione w tabeli 6.

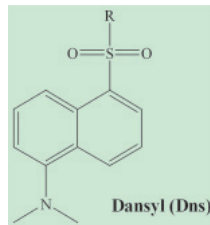
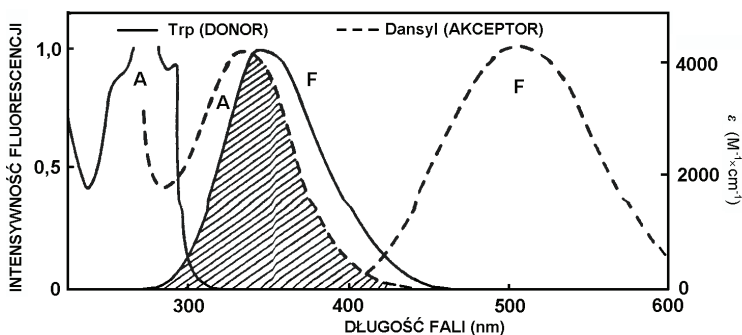


Tabela 6.

Charakterystyka właściwości spektroskopowych chlorku dansylu [142].

fluorofor	pasmo absorpcji (nm)	$\epsilon$ ( $M^{-1} \times cm^{-1}$ )	pasmo emisji (nm)	wydajność kwantowa fluorescencji	czas życia fluorescencji (ns)
Dns-Cl	340-350	4300	510-560	0,1-0,3	10-15

Zainteresowanie biochemików ugrupowaniem dansylowym wywodzi się z opisanego po raz pierwszy przez Webera zastosowania tego syntetycznego fluorofora do znakowania protein, które nie wykazują fluorescencji [143]. Badanie tak modyfikowanych makrocząsteczek dostarcza wielu informacji o nich samych oraz umożliwia analizę ich oddziaływań z innymi cząsteczkami. Badania biochemiczne stawiają przed syntetycznymi fluoroforami pewne wymagania. Długość fali ich wzbudzenia i emisji powinna być większa niż aromatycznych aminokwasów. Ugrupowanie dansylowe jest często wykorzystywany w tego typu badaniach, ponieważ długość fali jego wzbudzenia leży poza pasmem absorpcji protein. Dodatkową korzyścią wynikającą z położenia pasma absorpcyjnego dansylu, jest możliwość jego wykorzystania jako akceptora fluorescencji aromatycznych aminokwasów, np. tryptofanu (rysunek 17).



Rysunek 17. Całka nakrywania (zaznaczone pole) przeniesienia energii z donora – tryptofanu do akceptora – dansylu [144].

Na podstawie wyznaczonej wydajności przeniesienia energii możliwe jest określenie odległości pomiędzy donorem a akceptorem, a co za tym idzie określenie struktury białeczki [144,145].

Wysoka czułość emisji pochodnych dansylu na zmianę polarności otoczenia, w którym to ugrupowanie się znajduje, jest z powodzeniem wykorzystywana w procesach rozpoznawania cząsteczek organicznych oraz jonów metali. Przykładem mogą być tutaj cyklodekstryny modyfikowane omawianym fluoroforem, które wykazują silną fluorescencję w wodnym środowisku [146-148]. Dansyl lokuje się w hydrofobowej wnęce receptora, dzięki czemu zostaje odizolowany od polarnego rozpuszczalnika. Obecność „gościa” powoduje, że wypiera on z wnęki cyklodekstrynowej fragment dansylowy. Konsekwencją takiego wypierania jest spadek intensywności emisji. Fotofizyczne własności dansylu zostały również wykorzystane do obserwacji koordynacji jonów metali przez peptydy [149,150]. Imperiali i jego współpracownicy zaproponowali znakowany dansylem palec cynkowy, jako selektywny i czuły receptor jonów  $Zn^{2+}$  [151,152]. Koordynacja jonu powoduje pofałdowanie peptydu, który w takiej formie osłania fluorofor przed rozpuszczalnikiem, a to z kolei wzrost intensywności fluorescencji.

Oprócz prac dotyczących zastosowania dansylu w peptydowych chemosensoraх jonów metali, w literaturze można znaleźć doniesienia o połączeniach tego fluorofora z cyklicznymi i liniowymi poliaminami [153-155]. Ugrupowanie dansylowe połączone jest z tego typu ligandami poprzez utworzenie wiązania sulfonamidowego z pierwszorzędową aminą. Według autorów koordynacji jonów metali towarzyszy deprotonacja grupy sulfonamidowej, co ma swoje odzwierciedlenie w zmianie intensywności emisji dansylu.



**Podziękowania:**

Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2006-2008 jako projekt badawczy rozwojowy nr R0501601.

**Literatura:**

1. R.Y. Tsien, *Biochemistry*, **19** (1980) 2398;
2. J. Janata, "Principles of Chemical Sensors", Plenum Press, Inc., New York, 1989;
3. A.W. Czarnik (ed.), "Fluorescent Chemosensors for Ion and Molecule Recognition", ACS Symposium Series 358, ACS, Washington, DC, 1993;
4. J.R. Lakowicz (ed.), "Probe Design and Chemical Sensing", Topics in Fluorescence Spectroscopy, vol. 4, Plenum, New York, 1994;
5. B. Valeur, E. Bardez, *Chem. Br.* **31** (1995) 216;
6. L. Fabbrizzi, A. Poggi, *Chem. Soc. Rev.* **24** (1995) 197;
7. J.-P. Desvergne, A.W. Czarnik (ed.), "Chemosensors of Ion and Molecule Recognition", NATO ASI Series, Kluwer, Dordrecht, 1997;
8. A.P. de Silva, H.Q.N. Gunaratne, T. Gunnlaugsson, A.J.M. Huxley, C.P. McCoy, J.T. Rademacher, T.E. Rice, *Chem. Rev.* **97** (1997) 1515;
9. B. Valeur, "Probe design and chemical sensing", w: J.R. Lakowicz (ed.), Topics in Fluorescence Spectroscopy, vol. 4, Plenum, New York, 1994, str. 21;
10. F. Vögtle, Host Guest Complex Chemistry II, Topic in Current Chemistry 101, Springer Verlag, Berlin (1982);
11. F. Vögtle, E. Weber, Host Guest Complex Chemistry III, Topic in Current Chemistry 121, Springer Verlag, Berlin (1984);
12. J. M. Lehn, *Science* **227** (1985) 849;
13. J. M. Lehn, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **27**(1988) 89;
14. Y. Inoue i G.W. Gokel, "Cation Binding by Macrocycles. Complexation of Cationic Species by Crown Ethers", Marcel Dekker, New York i Basel (1990);
15. F. Vögtle, "Supramolecular Chemistry. An Introduction", John Wiley & Sons, Chichester, England (1991);
16. B. Ditrich, P. Viout i J.M. Lehn, "Aspects de la chimie des composés macrocycliques", Savoirs Actuels, InterEditions, Paris (1991);
17. G. W. Gokel, „Crown-eters and Cryptands", Royal Society of Chemistry, Cambridge, England (1991);
18. G. Gryniewicz, M. Poenie, R.Y. Tsien, *J. Biol. Chem.* **260** (1985) 3440;
19. A. Minta, R.Y. Tsien, *J. Biol. Chem.* **264** (1989) 19449;

20. A.J. Bryan, A.P. de Silva, S.A. de Silva, R.A.D.D. Rupasinghe, K.R.A.-S. Sandanayake, *Biosensors* **4** (1989) 169;
21. R.A. Bissell, A.P. de Silva, H.Q.N. Gunaratne, P.L.M. Lynch, G.E.M. Maguire, C. P. McCoy, K. R. A. S. Sandanayake, *Top. Curr. Chem.* **168** (1993) 223;
22. A.P. de Silva, H.Q.N. Gunaratne, J.-L. Habib-Jiwan, C.P. McCoy, T.E. Rice, J.-P. Soumillion, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **34** (1995) 1728;
23. A.P. de Silva, T.E. Rice, *Chem. Commun.* (1999) 163;
24. L. Fabbrizzi, M. Lichelli, P. Pallavicini, D. Sacchi, A. Taglietti, *Analyst* **121** (1996) 1763;
25. R. Bergonzi, L. Fabbrizzi, M. Lichelli, C. Mangano, *Coord. Chem. Rev.* **170** (1998) 31;
26. A. P. de Silva, S. A. de Silva, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1986) 1709;
27. R. A. Bissell, A. P. de Silva, H.Q.N. Gunaratne, P. L. M. Lynch, G. E. M. Maguire, K. R. A. S. Sandanayake, *Chem. Soc. Rev.* **21** (1992) 187;
28. A. P. de Silva, R. A. D. D. Rupasinghe, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1985) 1669;
29. K. Kubo, S. Sakaguchi, T. Sakurai, *Talanta* **49** (1999) 735;
30. K. Kubo, R. Ishige, J. Kubo, T. Sakurai, *Talanta* **48** (1999) 181;
31. K. Kubo, R. Ishige, T. Sakurai, *Heterocycles* **48** (1998) 347;
32. E.U. Akkaya, M.E. Huston, A.W. Czarnik, *J. Am. Chem. Soc.* **112** (1990) 3590;
33. M.E. Huston, C. Engleman, A.W. Czarnik, *J. Am. Chem. Soc.* **112** (1990) 7054;
34. A.W. Czarnik, *Acc. Chem. Res.* **27** (1994) 302;
35. D. Parker, J.A.G. Williams, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* (1995) 1305;
36. A. Beeby, D. Parker, J.A.G. Williams, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* (1996) 1565;
37. K. Rurack, J.L. Bricks, A. Kachkovski, U. Resch, *J. Fluoresc.* **7** (1997) 63S;
38. A.P. de Silva, K.R.A.S. Sandanayake, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1989) 1183;
39. A.P. de Silva, K.R.A.S. Sandanayake, *Tetrahedron Lett.* **32** (1991) 421;
40. A.P. de Silva, H.Q.N. Gunaratne, C.P. McCoy, *Nature* (London) **364** (1993) 42;
41. A.P. de Silva, C.P. McCoy, *Chem. Ind.* (1994) 992;
42. A.P. de Silva, T. Gunnlaugsson, T.E. Rice, *Analyst* **121** (1996) 1759;

43. A.P. de Silva, T. Gunnlaugsson, C.P. McCoy, *J. Chem. Educ.* **74** (1997) 53;
44. A.P. de Silva, H.Q.N. Gunaratne, C.P. McCoy, *J. Am. Chem. Soc.* **119** (1997) 7891;
45. J.-M. Lehn, *Supramolecular Chemistry*, VCH, Weinheim (1995);
46. J.P. Konopelski, F. Kotzyba-Hibert, J.-M. Lehn, J.-P. Desvergne, F. Fages, A. Castellan, H. Bouas-Laurent, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1985) 433;
47. F. Fages, J.-P. Desvergne, H. Bouas-Laurent, *J. Am. Chem. Soc.* **111** (1989) 96;
48. F. Fages, J.-P. Desvergne, H. Bouas-Laurent, P. Marsau, J.-M. Lehn, F. Kotzyba-Hibert, A.-M. Albrecht-Gary, M. Al-Joubbeh, *J. Am. Chem. Soc.* **111** (1989) 8672;
49. K. Golchini, M. Mackovic-Basic, S.A. Gharib, D. Masilamani, M.E. Lucas, I. Kurtz, *Am. J. Physiol.* **258** (1990) F438;
50. F. Kastenholtz, E. Grell, J.W. Bats, G. Quinkert, K. Brand, H. Lanig, F.W. Schneider, *J. Fluoresc.* **4** (1994) 243;
51. M. Doldda, F. Kastenholtz, E. Lewitzki, E. Grell, *J. Fluoresc.* **6** (1996) 159;
52. A.P. de Silva, H.Q.N. Gunaratne, K.R.A.S. Sandanayake, *Tetrahedron Lett.* **31** (1990) 5193;
53. A.P. de Silva, H.Q.N. Gunaratne, T. Gunnlaugsson, *Chem. Commun.* (1996) 1967;
54. B. Ramachandaram, A. Samanta, *Chem. Commun.* (1997) 1037;
55. K.A. Mitchell, R.G. Brown, D. Yuan, S.-C. Chang, R.E. Utecht, D.E. Lewis, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **115** (1998) 157;
56. P. Nanjappan, A.W. Czarnik, *J. Am. Chem. Soc.* **109** (1987) 1826;
57. M.E. Huston, K.W. Haider, A.W. Czarnik, *J. Am. Chem. Soc.* **110** (1988) 4460;
58. B. Ramachandaram, A. Samanta, *Chem. Phys. Lett.* **290** (1998) 9;
59. B. Ramachandaram, A. Samanta, *J. Phys. Chem.* **102** (1998) 10579;
60. J.A. Sclafani, M.T. Maranto, T.M. Sisk, S.A. Van Arman, *Tetrahedron Lett.* **13** (1996) 2193;
61. L. Fabbrizzi, M. Licchelli, P. Pallavicini, A. Perotti, A. Taglietti, D. Sacchi, *Chem. Eur. J.* **2** (1996) 75;
62. M.A. Bernardo, F. Pina, E. Garcia-España, J. Latorre, S.V. Luis, J.M. Llinares, J.A. Ramý rez, C. Sorioano, *Inorg. Chem.* **37** (1998) 3935;
63. L. Fabbrizzi, M. Licchelli, P. Pallavicini, A. Perotti, D. Sacchi, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **33** (1994) 1975;
64. G. De Santis, M. Di Casa, L. Fabbrizzi, M. Licchelli, C. Mangano, P.

- Pallavicini, A. Perotti, A. Poggi, D. Sacchi, A. Taglietti, w: L. Fabbrizzi, A. Poggi (ed.), *Transition Metals in Supramolecular Chemistry*, NATO-ASI Series, Kluwer, Dordrecht (1996);
65. R.Y. Tsien, *Annu. Rev. Neurosci.* **12** (1989) 227;
66. R.Y. Tsien, w: "Methods in Cell Biology", vol. 30, Academic Press (1989), str. 127;
67. M.A. Kuhn, Rozdział 10, w: A.W. Czarnik (ed.), *Fluorescent Chemosensors for Ion and Molecule Recognition*, ACS Symposium Series 358, American Chemical Society, Washington, DC (1993), str. 47;
68. A. Minta, J.P.Y. Kao, R.Y. Tsien, *J. Biol. Chem.* **264** (1989) 8171;
69. A.P. de Silva, H.Q.N. Gunaratne, A.T.M. Kane, G.E.M. Maguire, *Chem. Lett.* (1995) 125;
70. A.P. de Silva, H.Q.N. Gunaratne, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1990) 186;
71. L.A. Levy, E. Murphy, B. Raju, R.E. London, *Biochemistry* **27** (1988) 4041;
72. B. Raju, E. Murphy, L.A. Levy, R.D. Hall, R.E. London, *Am. J. Physiol.* **256** (1989) C540;
73. A.P. de Silva, H.Q.N. Gunaratne, G.E.M. Maguire, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1994) 1213;
74. A.P. de Silva, H.Q.N. Gunaratne, T.E. Rice, S. Stewart, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1997) 1891;
75. B. Valeur, w: S.G. Schulman (ed.), "Molecular Luminescence Spectroscopy", Część 3, Wiley, New York (1993), str. 25;
76. B. Valeur, J. Bourson, J. Pouget, w: A.W. Czarnik (ed.), "Fluorescent Chemosensors for Ion and Molecule Recognition", ACS Symposium Series 538, American Chemical Society, Washington, DC (1993), str. 25;
77. Rettig, R. Lapouyade, w: J.R. Lakowicz (ed.), "Topics in Fluorescence Spectroscopy", vol. 4, Plenum, New York (1994), str. 109;
78. B. Valeur, F. Badaoui, E. Bardez, J. Bourson, P. Boutin, A. Chatelain, I. Devol, B. Larrey, J.P. Lefèvre, A. Soulet, w: J.-P. Desvergne, A.W. Czarnik (ed.), "Chemosensors of Ion and Molecule Recognition", NATO ASI Series, Kluwer, Dordrecht (1997), str. 195;
79. H.-G. Löhr, F. Vögtle, *Acc. Chem. Res.* **18** (1985) 65;
80. J. Bourson, B. Valeur, *J. Phys. Chem.* **93** (1989) 3871;
81. S. Fery-Forques, J. Bourson, L. Dallery, B. Valeur, *New J. Chem.* **14** (1990) 617;
82. M.M. Martin, P. Plaza, N. Dai Hung, Y.H. Meyer, J. Bourson, B. Valeur, *Chem. Phys. Lett.* **202** (1993) 425;

83. M.M. Martin, L. Bégin, J. Bourson, B. Valeur, *J. Fluoresc.* **4** (1994) 271;
84. M.M. Martin, P. Plaza, Y.H. Meyer, F. Badaoui, J. Bourson, J.P. Lefèvre, B. Valeur, *J. Phys. Chem.* **100** (1994) 6879;
85. J.F. Létard, R. Lapouyade, W. Rettig, *Pure Appl. Chem.* **65** (1993) 1705;
86. E.N. Ushakov, S.P. Gromov, O.A. Fedorova, M.V. Alfimov, *Russ. Chem. Bull.* **46** (1997) 463;
87. N. Mateeva, V. Enchev, L. Antonov, T. Deligeorgiev, M. Mitewa, *J. Incl. Phenom.* **93** (1995) 323;
88. P.H. Dumon, G. Jonusauskas, F. Dupuy, P. Pée, C. Rullière, J.F. Létard, R. Lapouyade, *J. Phys. Chem.* **98** (1994) 10391;
89. R. Mathevet, G. Jonusauskas, J.F. Létard, R. Lapouyade, *J. Phys. Chem.* **99** (1995) 15709;
90. S.I. Druzhinin, M.V. Rusalov, B.M. Uzhinov, M.V. Alfimov, S.P. Gromov, O.A. Fedorova, *Proc. Indian Acad. Sci.* **107** (1995) 721;
91. W. Rettig, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **25** (1986) 971;
92. J.F. Létard, S. Delmond, R. Lapouyade, D. Braun, W. Rettig, *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas* **114** (1995) 517;
93. G.E. Collins, L.-S. Choi, J.H. Callahan, *J. Am. Chem. Soc.* **120** (1998) 1474;
94. S.A. Jonker, S.I. Van Dijk, K. Goubitz, C.A. Reiss, W. Schuddeboom, J.W. Verhoeven, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **183** (1990) 273;
95. M. Kollmannsberger, K. Rurack, U. Resch-Genger, J. Daub, *J. Phys. Chem.* **102** (1998) 10211;
96. S. Fery-Forgues, M.-T. Le Bris, J.-P. Guetté, B. Valeur, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **5** (1988) 384;
97. S. Fery-Forgues, M.-T. Le Bris, J.-P. Guetté, B. Valeur, *J. Phys. Chem.* **92** (1988) 6233;
98. S. Fery-Forgues, J. Bourson, L. Dallery, B. Valeur, *New J. Chem.* **14** (1990) 617;
99. R.S. Addleman, J. Bennett, S.H. Tweedy, S. Elshani, C.M. Wai, *Talanta* **46** (1998) 573;
100. L. Cazaux, M. Faher, A. Lopez, C. Picard, P. Tisnès, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **77** (1994) 217;
101. S.E. Kasner, M.B. Ganz, *Am. J. Physiol.* **262** (1992) F462;
102. R. Crossley, Z. Goolamanli, J. Gosper, P.G. Sammes, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **2** (1994) 513;
103. G.A. Smith, T.R. Hesketh, J.C. Metcalfe, *Biochem. J.* **250** (1988) 227;
104. R. Crossley, Z. Goolamali, P.G. Sammes, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*

- 2 (1994) 1615;
105. V. Van den Bergh, N. Boens, F.C. De Schryver, M. Ameloot, P. Steels, J. Gallay, M. Vincent, A. Kowalczyk, *Biophys. J.* **68** (1995) 1110;
106. R.P. Haugland, "Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes", Inc, Eugene, OR, USA;
107. J. Bourson, M.-N. Borrel, B. Valeur, *Anal. Chim. Acta* **257** (1992) 189;
108. J. Bourson, J. Pouget, B. Valeur, *J. Phys. Chem.* **97** (1993) 4552;
109. J. Bourson, F. Badaoui, B. Valeur, *J. Fluoresc.* **4** (1994) 275;
110. J.-L. Habib Jiwan, C. Branger, J.-P.h. Soumillion, B. Valeur, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **116** (1998) 127;
111. A. Ohki, J.P. Lu, J.L. Hallman, X. Huang, R.A. Bartsch, *Anal. Chem.* **67** (1995) 2405;
112. I. Leray, F. O'Reilly, J.-L. Habib Jiwan, J.-Ph. Soumillion, B. Valeur, *Chem. Commun.* (1999) 795;
113. J.R. Lakowicz, "Principle of Fluorescence Spectroscopy" Kulwer Academic/Plenum, New York, 1999;
114. B. Valeur, J. Pouget, J. Bourson, M. Kaschke, N.P. Ernstring, *J. Phys. Chem.* **96** (1992) 6545;
115. B. Valeur, J. Pouget, J. Bourson, *J. Lumin.* **52** (1992) 345;
116. H. Bouas-Laurent, A. Castellan, M. Daney, J.-P. Desvergne, G. Guinand, P. Marsau, M.-H. Riffaud, *J. Am. Chem. Soc.* **108** (1986) 315;
117. D. Marquis, J.-P. Desvergne, *Chem. Phys. Lett.* **230** (1994) 131;
118. D. Marquis, J.-P. Desvergne, H. Bouas-Laurent, *J. Org. Chem.* **60** (1995) 7984;
119. R. Tahara, T. Morozumi, Y. Suzuki, Y. Kakizawa, T. Akita, H. Nakamura, *J. Incl. Phenom.* **32** (1998) 283;
120. Y. Suzuki, T. Morozumi, H. Nakamura, M. Shimomura, T. Hayashita, R.A. Bartsch, *J. Phys. Chem.* **102** (1998) 7910;
121. I. Aoki, H. Kawabata, K. Nakashima, S. Shinkai, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1991) 1771;
122. T. Jin, K. Ichikawa, T. Koyama, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1992) 499;
123. L.R. Sousa, J.M. Larson, *J. Am. Chem. Soc.* **99** (1977) 307;
124. J.M. Larson, L.R. Sousa, *J. Am. Chem. Soc.* **100** (1978) 1943;
125. K. Soroka, R.S. Vithanage, D.A. Phillips, B. Walker, P.K. Dasgupta, *Anal. Chem.* **59** (1987) 629;
126. B. Valeur, F. Badaoui, E. Bardez, J. Bourson, P. Boutin, A. Chatelain, I. Devol, B. Larrey, J.P. Lefèvre, A. Soulet, w: J.-P. Desvergne, A.W. Czarnik (ed.), „Chemosensors of Ion and Molecule Recognition", NATO ASI Series, Kluwer, Dordrecht (1997), str. 195;

127. E. Bardez, I. Devol, B. Larrey, B. Valeur, *J. Phys. Chem. B* **101** (1997) 7786;
128. K. Hiratani, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1987) 960;
129. E. Weber, F.M. Vogtle, *Tetrahedron Lett.* **29** (1992) 2415;
130. O.S. Wolfbeis, H. Offenbacher, *Monat. Chem.* **115** (1984) 647;
131. R.Y. Tsien, T. Pozzan, *Methods Enzymol.* **172** (1989) 230;
132. J.R. Lakowicz, H. Szmaciński, K. Nowaczyk, M.L. Johnson, *Cell Calcium* **13** (1992) 131;
133. L. Prodi, F. Bolletta, M. Montalti, N. Zaccheroni, P.B. Savage, J.S. Bradshaw, R.M. Izatt, *Tetrahedron Lett.* **39** (1998) 5451;
134. L. Prodi, F. Bolletta, M. Montalti, N. Zaccheroni, N. Su, J.S. Bradshaw, R.M. Izatt, P.B. Savage, *J. Am. Chem. Soc.* **122** (2000) 6769;
135. J.D. Winkler, C.M. Bowen, V. Michelet, *J. Am. Chem. Soc.* **120** (1998) 3237;
136. H. Murakami, S. Shinkai, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1993) 1533;
137. K. Crawford, M. Goldfinger, T. Swager, *J. Am. Chem. Soc.* **120** (1998) 5187;
138. C. Pérez-Jiménez, S. Harris, D. Diamond, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1993) 480;
139. J.-P. Desvergne, J. Rau, O. Cherkaoui, R. Zniber, H. Bouas-Laurent, N. Lahrahar, U. Meyer, P. Marsau, *New J. Chem.* **20** (1996) 881;
140. Y.-H. Li, L.-M. Chan, L. Tyer, R.T. Moody, C.M. Himel, D.M. Hercules, *J. Am. Chem. Soc.* **97** (1975) 3118;
141. I.A. Hemmila, „Applications of Fluorescence in Immunoassays”, John Wiley & Sons, New York, str. 107-167;
142. G. Weber, *Biochem. J.* **51** (1952) 155;
143. J.R. Lakowicz, I. Gryczyński, W. Wiczak, G. Laczko, F.C. Prendergast i M.L. Johnson, *Biophys. Chem.* **36** (1990) 99;
144. J.R. Lakowicz, W. Wiczak, I. Gryczyński, i M.L. Johnson, *Proc. SPIE.* **1204** (1990) 192;
145. Y. Wang, T. Ikeda, K. Ikeda, A. Ueno, F. Toda, *Bull. Chem. Soc. Jap.* **67** (1994) 1598;
146. H. Ikeda, M. Nakamura, N. Ise, N. Oguma, A. Nakamura, T. Ikeda, F. Toda, A. Ueno, *J. Am. Chem. Soc.* **118** (1996) 10980;
147. C.M. Cardona, J. Alvarez, A.E. Kaifer, T.D. McCarley, S. Pandey, G.A. Baker, N.J. Bonzagni, F.V. Bright, *J. Am. Chem. Soc.* **122** (2000) 6139;
148. S. Deo, H.A. Godwin, *J. Am. Chem. Soc.* **122** (2000) 174;
149. A. Torrado, G.K. Walkup, B. Imperiali, *J. Am. Chem. Soc.* **120** (1998) 609;
150. G.K. Walkup, B. Imperiali, *J. Am. Chem. Soc.* **118** (1996) 3053;

151. G.K. Walkup, B. Imperiali, *J. Am. Chem. Soc.* **119** (1997) 3443;  
152. L. Prodi, F. Bolletta, M. Montalti, N. Zaccheroni, *Eur. J. Inorg. Chem.*  
(1999) 455;  
153. E. Kimura, T. Koike, *Chem. Soc. Rev.* **27** (1998) 179;  
154. T. Koike, T. Watanabe, S. Aoki, E. Kimura, M. Shiro, *J. Am. Chem. Soc.*  
**118** (1996) 12696.



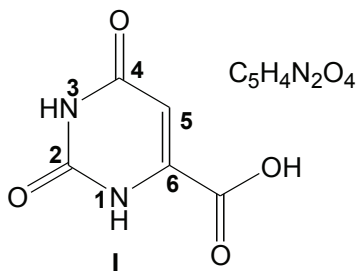
## Rozdział VIII

### Kwas orotowy – synteza i reaktywność

Grażyna Bartkowiak, Grzegorz Schroeder  
*Wydział Chemii, Uniwersytet im. A. Mickiewicza, Grunwaldzka 6,  
60-780 Poznań*

#### 1. Wstęp

Wiele związków organicznych posiada zdolność tworzenia kompleksów z jonami metali, w których cząsteczka organiczna jest ligandem i może wykazywać różne typy koordynacji. Kompleksy te, łącząc się za pomocą wiązań wodorowych, tworzą usieciowanie o różnej, jedno-, dwu- lub trójwymiarowej architekturze przestrzennej. Jednym z takich związków organicznych, zdolnych do koordynowania jonów metali i budowania rozmaitych struktur supramolekularnych jest kwas orotowy **I** (OA, orotic acid, kwas 2,6-diokso-1,2,3,6-tetrahydropirymidyno-4-karboksylowy; 6-karboksyracyl;  $H_3L$ ), zaliczany do witamin z grupy B (witamina  $B_{13}$ ).



*Rysunek 1. Kwas orotowy (6-karboksyracyl; podana numeracja atomów, stosowana dla pierścienia uracylowego)*

Od czasu, gdy Biscaro i Belloni<sup>1</sup> w 1905 roku wyizolowali tę nieznaną wówczas substancję z serwatki mleka krowiego, kwas orotowy wzbudza coraz

większe zainteresowanie chemików, biologów i przedstawicieli nauk medycznych z uwagi na jego unikalną pozycję w układach biologicznych jak i znaczenie terapeutyczne jego pochodnych. Związek ten odgrywa bowiem kluczową rolę w biosyntezie zasad pirymidynowych<sup>2</sup>, tworzących nukleozydy i nukleotydy, wchodzące w skład kwasów nukleinowych, a jego kompleksy z metalami wykazują aktywność przeciwnowotworową<sup>2,4</sup>.

Za jeden z najciekawszych aspektów chemii orotanów i kwasu orotowego uważa się zdolność koordynowanych anionów orotanowych do tworzenia dwóch lub trzech wiązań wodorowych, zależnie od typu koordynacji<sup>5</sup>. Pospolita koordynacja dwukleszczowa O2-N1 skutkuje wiązaniem wodorowym o motywie akceptor-donor-akceptor (ADA), które jest potencjalnie zdolne do tworzenia wiązań wodorowych ze związkami, zawierającymi komplementarne motywy DAD lub DA, jak np. 2,6-diaminopirydyna lub adenina<sup>6</sup>. To rozpoznanie na poziomie molekularnym cząsteczek organicznych może mieć interesujące zastosowania w chemii farmaceutycznej i materiałowej, gdzie aniony orotanowe mogą służyć jako syntony dla uporządkowanych struktur supramolekularnych.

## 2. Budowa cząsteczki i właściwości fizykochemiczne kwasu orotowego

**Kwas orotowy** C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>,

**Nazwa systematyczna:** kwas 2,6-dioksy-1,2,3,6-tetrahydropirymidyno-4-karboksylowy.

**Inne nazwy:** kwas uracylo-6-karboksylowy, 6-karboksyracyl, witamina B<sub>13</sub>, czynnik galaktozy u zwierząt (Animal Galactose Factor, Whey Factor), orotonina, 2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahydro-pyrimidine-4-carboxylic acid, 6-uracilcarboxylic acid, orotic acid, OA, 2,6-Dioxo-1,2,3,6-tetrahydro-pyrimidin-4-carbonsaeure, Orotsaeure, acidum oroticum.

Beilstein Registry Number BRN: 383901,

CAS Registry Number 65-86-1

Masa cząsteczkowa: 156,10

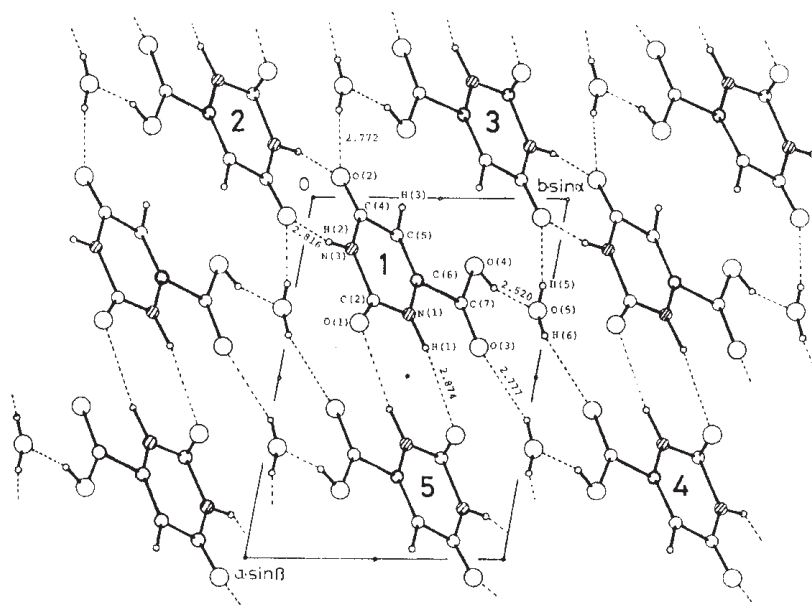
pK<sub>a1</sub> = 2,09 (dla protonu karboksylowego)

pK<sub>a2</sub> = 9,45 (dla N3-H)<sup>7</sup>

1% roztwór ma odczyn kwaśny - pH 2,5.

Występuje przeważnie jako monohydrat C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O o masie cząsteczkowej 174,06. Struktura krystaliczna monohydratu, określona drogą dyfrakcji

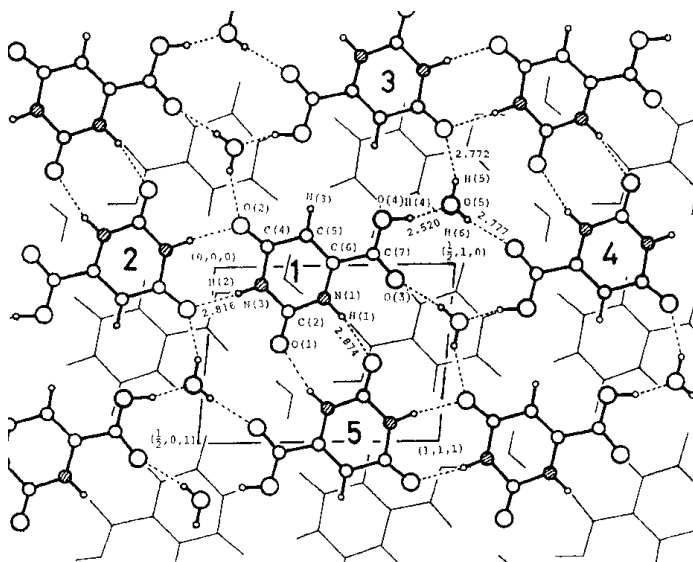
promieni rentgenowskich, wykazała, że krystalizuje on w układzie trójskośnym<sup>8</sup> i należy do grupy przestrzennej  $P\bar{1}$ . W kryształach cząsteczki kwasu orotowego występują w formie tautomerycznej w pełni ketonowej. Są one planarne i wiążą się wiązaniami wodorowymi  $O-H\cdots O$ ,  $N-H\cdots O$  i  $C-H\cdots O$ , obejmującymi grupy NH, dwa karbonylowe atomy tlenu i cząsteczkę wody (rozpuszczalnika)<sup>9</sup>. Wymiary pierścienia uracylowego w kwasie orotowym są podobne, jak w samym uracylu<sup>11</sup>. Cząsteczki monohydratu kwasu orotowego ułożone są w równoległe warstwy, w których cząsteczki kwasu orotowego łączą się dwoma rodzajami wiązań wodorowych  $N-H\cdots O$  w zygzakowate łańcuchy, a każdy łańcuch wiąże się trzema rodzajami wiązań wodorowych  $O-H\cdots O$  za pośrednictwem cząsteczek wody z dwoma sąsiadującymi łańcuchami, tworząc arkusze równoległe do płaszczyzny  $(2\ 1\ 1)$ . Wiązanie wodorowe cząsteczki wody jako akceptora jest typu F (według klasyfikacji Chidambarama, Sequeiry i Sikki<sup>10</sup>, gdzie dwusieczna kąta między wolnymi parami elektronowymi tlenu skierowana jest bezpośrednio w kierunku grupy donorowej).



Rysunek 2. Struktura krystaliczna monohydratu kwasu orotowego wzdłuż osi  $c$ . Wiązania wodorowe zaznaczone liniami przerywanymi<sup>8</sup>.

Tabela 1. Dane krystalograficzne dla monohydratu kwasu orotowego<sup>11</sup>

Wzór sumaryczny	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O
Masa cząsteczkowa	174,06
Układ krystal.	trójskośny
Grupa przestrzenna	P1
Wymiary komórki	
a	9,561±- 0,006 Å
b	7,261±-0,006 Å
c	5,895±-0,006 Å
α	117,6±-0,09°
β	107,6±-0,08
γ	90,4±- 0,09
V	340,7±-0,4 Å



Rysunek 3. Monohydrat kwasu orotowego – widok struktury krystalicznej prostopadle do płaszczyzny  $(2\ 1\ 1)$ ; pokazana orientacja względna cząsteczek na dwu równoległych warstwach.

### Geometria cząsteczki kwasu orotowego

Geometrię cząsteczki kwasu orotowego zoptymalizowano<sup>11</sup> komputerowo na poziomie B3LYP/6-311G\*\* używając pakietu GAUSSIAN 98 do wszystkich obliczeń, a uzyskane dane odpowiadały dobrze parametrom wyznaczonym eksperymentalnie z pomiarów dyfrakcji promieni rentgenowskich. Uzyskane wyniki porównano z danymi dla geometrii uracylu, zoptymalizowanej przy użyciu tej

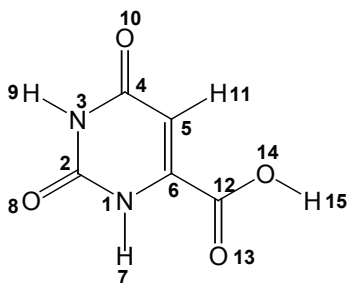
samej rozszerzonej bazy 6-311G\*\* (Tabela 2).

Porównanie otrzymanych parametrów prowadzi do wniosku, że wprowadzenie elektronoakceptorowej grupy karboksylowej w pozycję 6 pierścienia uracylu powoduje istotne zmiany w geometrii cząsteczki, a mianowicie:

- skrócenie wiązania C<sub>6</sub>-N<sub>1</sub> i ściślejsze wiązania w tym rejonie (delokalizacja gęstości ładunku w obrębie układu  $\pi$  wzrasta po wprowadzeniu grupy COOH w pozycję 6);
- nieznaczne wydłużenie wiązań N<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> i C<sub>4</sub>-C<sub>5</sub>, sugerujące osłabienie wiązania w tym rejonie.

Długość obu wiązań karbonylowych C=O w pierścieniu heterocyklicznym kwasu orotowego jest prawie jednakowa, podobnie jak w przypadku uracylu, co jest wynikiem sprzężenia krzyżowego („cross-conjugation”) w obszarze grup karbonylowych.

Tabela 2. Wybrane parametry geometryczne dla kwasu orotowego i uracylu, obliczone na poziomie B3LYP/6-311G\*\* (OA = kwas orotowy, U = uracyl)<sup>11</sup>.



Atom	Ładunek		Kąt między wiązaniami			Długość wiązania		
	OA	U	Kąt	OA	U	wiązanie	OA	U
N1	-0,466	-0,374	<(2,1,6)	123,651	123,880	R(1,2)	1,392	1,412
C2	0,485	0,428	<(1,2,3)	112,839	112,270	R(2,3)	1,388	1,397
N3	-0,447	-0,405	<(2,3,4)	128,317	128,590	R(3,4)	1,408	1,432
C4	0,432	0,360	<(3,4,5)	113,381	113,030	R(4,5)	1,462	1,466
C5	-0,220	-0,269	<(4,5,6)	119,961	120,320	R(5,6)	1,349	1,359
C6	0,166	0,160	<(6,5,11)	120,988	121,760	R(1,6)	1,377	1,383
O8	-0,339	-0,312	<(1,6,5)	121,851	121,910	R(2,8)	1,208	1,222
O10	-0,327	-0,304	<(1,6,12)	117,683	115,310	R(4,10)	1,212	1,226

Porównanie otrzymanych parametrów prowadzi do wniosku, że wprowadzenie elektronoakceptorowej grupy karboksylowej w pozycję 6 pierścienia uracylu powoduje istotne zmiany w geometrii cząsteczki, a mianowicie:

- skrócenie wiązania C<sub>6</sub>-N<sub>1</sub> i ściślejsze wiązania w tym rejonie (delokalizacja gęstości ładunku w obrębie układu  $\pi$  wzrasta po wprowadzeniu grupy COOH w pozycję 6);
- nieznaczne wydłużenie wiązań N<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> i C<sub>4</sub>-C<sub>5</sub>, sugerujące osłabienie wiązania w tym rejonie.

Długość obu wiązań karbonylowych C=O w pierścieniu heterocyklicznym kwasu orotowego jest prawie jednakowa, podobnie jak w przypadku uracylu, co jest wynikiem sprzężenia krzyżowego („cross-conjugation”) w obszarze grup karbonylowych.

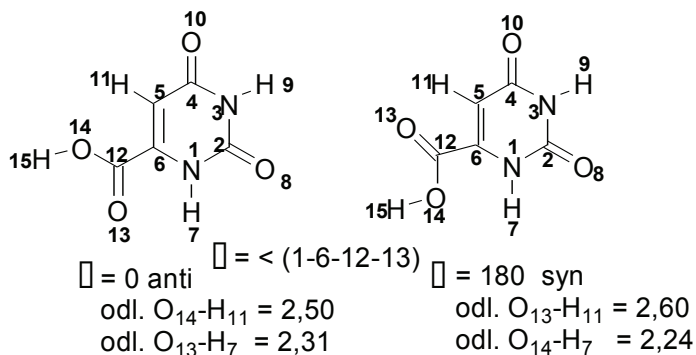
Zgodność otrzymanych teoretycznie wyników z danymi rentgenograficznymi dla kwasu orotowego pokazuje Tabela 3. Dane te są zgodne również co do koplanarności cząsteczki.

Tabela 3. Doświadczalne (rentgenografia) i obliczone (B3LYP\6-311G\*\*) parametry geometryczne kwasu orotowego<sup>11</sup>.

Parametr	X-ray	teoretycznie	różnica
N1-C2	1,363	1,392	-0,029
C2-N3	1,373	1,388	-0,015
N3-C4	1,364	1,408	-0,044
C4-C5	1,433	1,462	-0,029
C5-C6	1,546	1,349	0,197
C6-N1	1,369	1,377	-0,008
C2-O8	1,227	1,208	0,019
C4-O10	1,237	1,212	0,025
C5-H11	1,030	1,079	-0,049
C6-H12	1,498	1,498	0,001
C12-O13	1,197	1,200	-0,003
C12-O14	1,306	1,353	-0,047
O14-H15	1,020	0,969	0,051
N1-H7	0,940	1,010	-0,070
N3-H9	0,890	1,012	-0,122

Możliwe są dwie orientacje grupy karboksylowej względem pierścienia heterocyklicznego – syn i anti (Rys.4.) Cząsteczka kwasu orotowego zachowuje swobodną rotację względem wiązania C<sub>6</sub> – C<sub>12</sub>, a więc obie konformacje – syn i anti – są jednakowo prawdopodobne.

Kwas orotowy – synteza i reaktywność



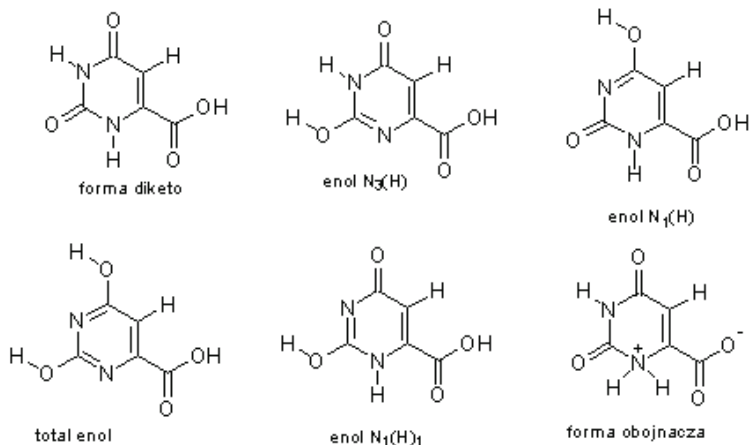
Rysunek 4. Konformacje syn i anti grupy karboksylowej kwasu orotowego

Obliczenia na poziomie B3LYP/6-311\*\* wykazały jednak, że nieco bardziej stabilna jest forma syn (o 1,58 kcal/mol) (Tabela 4). Obliczono również wewnętrzną barierę rotacji względem wiązania C6-C12; jest ona dosyć niska (7,655 kcal/mol) i wiąże się z konformacją o kącie  $\theta = 90^\circ$ , tj. taką, w której płaszczyzny grupy COOH i pierścienia są względem siebie prostopadłe. Analiza fourierowska funkcji rotacji wewnętrznej wskazuje, że większa stabilność formy syn niż anti nie polega na wzroście oddziaływań sprzężenia, ale raczej na zmniejszeniu odpychania dipol-dipol i oddziaływania momentów wiązań, tj. oddziaływań natury elektrostatycznej.

Tabela 4. Wartości energii dla kwasu orotowego2 (syn) i kwasu orotowego1 (anti), obliczone na poziomie B3LYP/6-311G\*\*.

Związek	Energia	$\Delta E$ kcal/mol	dipol	$E_{HOMO}$	$E_{LUMO}$
Anti	-603,5599	+1,5746	4,0628	-0,0055	0,0047
Syn	-603,5621	0	3,7850	-0,0049	0,0095

Kwas orotowy może występować w roztworze w kilku formach tautomerycznych i w formie jonu obojnaczego (zwitterjonu) (Rys.5). W literaturze sugerowano, że forma obojnacza ma duże znaczenie dla aktywności biologicznej kwasu orotowego oraz dla zdolności tego związku do kompleksowania jonów metali. Na podstawie obliczeń teoretycznych okazało się jednak, że najstabilniejszą formą kwasu orotowego, zarówno w fazie gazowej jak i w roztworze, jest forma diketonowa. Należy jednak zaznaczyć, że wzrost polarności rozpuszczalnika stabilizuje formę obojnacza bardziej niż ketonową.



Rysunek 5. Możliwe formy tautomeryczne kwasu orotowego

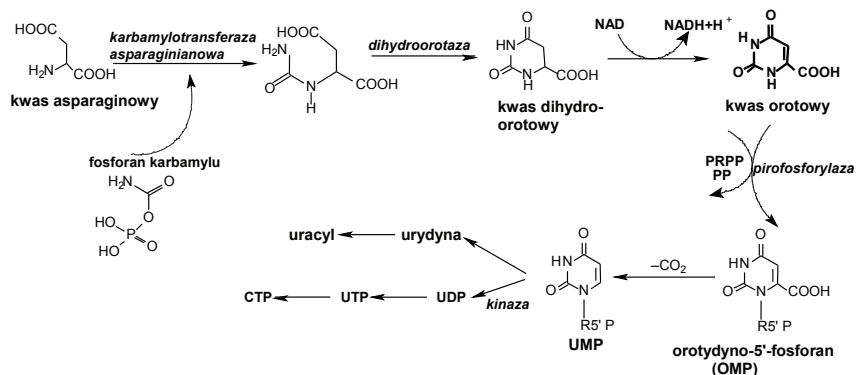
### 3. Znaczenie biologiczne kwasu orotowego

Kluczowa rola kwasu orotowego w biosyntezie nukleotydów została wykryta już w latach czterdziestych dwudziestego wieku<sup>12</sup>. Uważa się, że jest on prekursorem wszystkich związków pirymidynowych, występujących w organizmach żywych<sup>13,14</sup> oraz ważnym ogniwem w cyklu przemian metabolicznych<sup>15</sup>. Witamina B<sub>13</sub> jest czynnikiem wzrostu wielu mikroorganizmów<sup>16</sup>, np. *Lactobacillus bulgaricus*<sup>17</sup>, a sama wytwarzana jest przez florę przewodu pokarmowego. W naturze występuje w mleku<sup>18</sup> i jego przetworach<sup>19</sup> oraz w marchwi, rzepie, burakach i innych warzywach korzeniowych<sup>20,21</sup>.

Od lat prowadzone są szeroko zakrojone badania nad przemianami kwasu orotowego w organizmie ludzkim, gdyż jest on ważnym ogniwem w cyklu mocznikowym<sup>22,23</sup>. Zakłócenia tej przemiany, spowodowane niedoborem niektórych enzymów prowadzą do rozmaitych, niekiedy bardzo ciężkich schorzeń metabolicznych. Odbiegający od normy poziom kwasu orotowego w moczu znaleziono w przypadku kilkunastu chorób i schorzeń<sup>24</sup>, m. in. u osób z zaburzoną funkcją wątroby<sup>23</sup>, np. po infekcjach wirusowych, nadużyciu alkoholu lub środków odurzających, zatruciu polekowym lub krwawieniu z przewodu pokarmowego. Jest on również objawem chorób takich jak citrulinemia, niedobór OTC czyli ornitynotranskarbamylazy albo acydurii arginino-bursztynianowej<sup>25</sup>. Jedną z rzadkich, a dramatycznych w skutkach chorób genetycznych jest dziedziczna acyduria orotowa, wywołana deficytem dwufunkcyjnej proteiny, oznaczanej skrótem UMPS (UMP synthase, syntaza urydynomonofosforanowa), zawierającej dwa enzymy – fosforybozylotransferazę kwasu orotowego oraz dekarboksylazę oro-



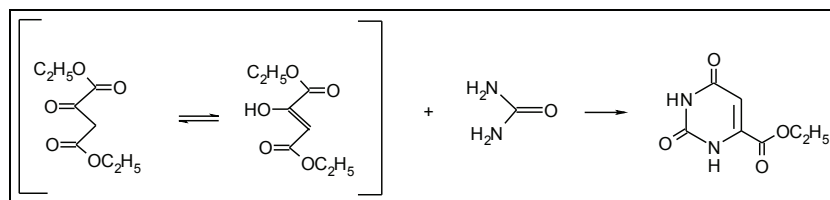
tydno-5'-monofosforanu. Niedobór UMPS w organizmie ludzkim zakłóca cykl przemian prowadzących do nukleotydów pirymidynowych i skutkuje kumulowaniem się kwasu orotowego, który nie ulega dalszym przemianom, pojawiając się w moczu chorego, gdzie może być wykryty zwykłymi metodami chemicznymi. Potrzeba monitorowania poziomu kwasu orotowego w moczu wywołała rozwój technik jego wykrywania, opartych głównie na chromatografii, sprzężonej ze spektrometrią masową (GC-MS lub HPLC-MS)<sup>26</sup>.



Rysunek 6. Udział kwasu orotowego w biosyntezie zasad pirymidynowych

#### 4. Otrzymywanie kwasu orotowego

Początkowo kwas orotowy otrzymywano ze źródeł naturalnych, tj. wyodrębniano go z serwatki. Biscaro i Belloni<sup>1</sup> opublikowali wyizolowanie tego związku w 1905 roku, a już w 1907 Wheeler<sup>27</sup> otrzymał go przez saponifikację estru etylowego, uzyskanego uprzednio przez Müllera<sup>28</sup> w reakcji kondensacji mocznika z szczawiooctanem dietylu w kwasie octowym (Rys.8).



Rysunek 8.

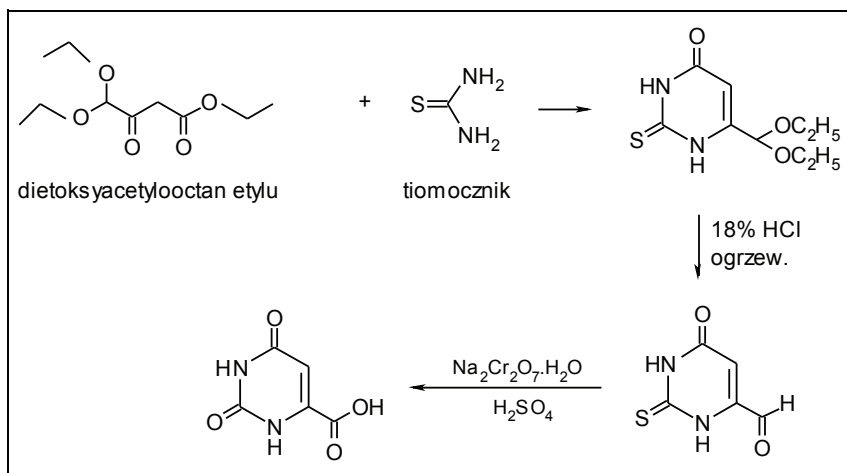
W następnych latach opublikowano szereg metod, prowadzących do kwasu orotowego drogą utleniania pochodnych uracylu.

## Otrzymywanie kwasu orotowego drogą utleniania pochodnych uracylowych

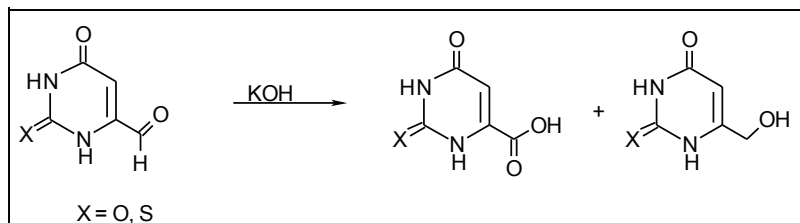
Behrend i Struve<sup>29</sup> zsyntetyzowali kwas orotowy, utleniając 6-metylouracyl w roztworze wodorotlenku potasu przy użyciu żelazicyjanku potasu  $K_3[Fe(CN)_6]$ , a Johnson i Schroeder<sup>30</sup> otrzymali go z aldehydu 6-uracylowego, który utleniali kwasem chromowym. Stwierdzili oni również, że ten sam produkt powstaje podczas utleniania 2-tio-6-uracyloaldehydu, otrzymanego poprzez kondensację  $\gamma,\gamma$ -dietoksyacetylooctanu etylu z tiomocznikiem, a następnie ogrzewanie powstałego diacetalu z rozcieńczonym kwasem solnym<sup>31</sup> (Rys.9).

Poddając 6-uracyloaldehyd i 2-tio-6-uracyloaldehyd reakcji Cannizzaro (tj. działaniu stężonego roztworu KOH), Johnson i Schroeder<sup>31</sup> otrzymali odpowiednio kwas orotowy i alkohol 6-metylenouracylowy (6-hydroksymetylo-1*H*-pirymidyno-2,4-dion) oraz kwas 2-tioorotowy i 6-hydroksymetyleno-2-tiouracyl (Rys.10).

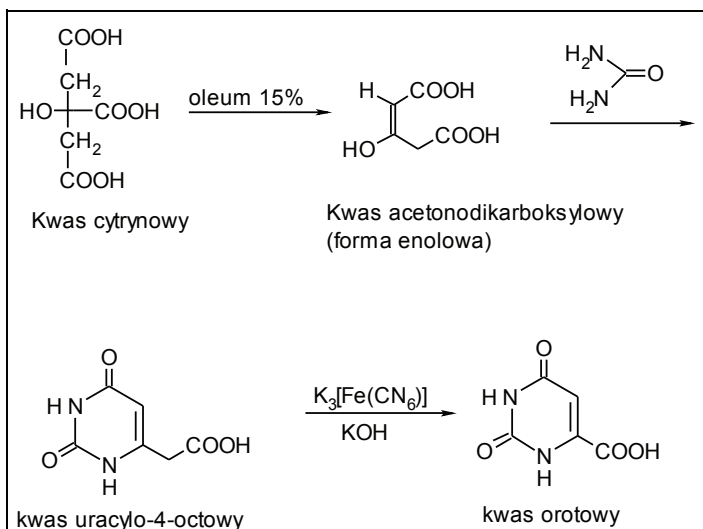
Mniej wydajną niż utlenianie 6-metylouracylu metodę otrzymywania kwasu orotowego opisał Hilbert<sup>32</sup>. Działając dymiącym kwasem siarkowym (oleum 15%) na kwas cytrynowy w obecności mocznika otrzymał on kwas uracylo-4-octowy, który następnie poddał utlenianiu za pomocą  $K_3[Fe(CN)_6]$  w wodnym roztworze KOH w temperaturze pokojowej. Czas reakcji wynosił 22 dni, a uzyskana wydajność kwasu orotowego była niska, prawdopodobnie wskutek konkurencyjnych reakcji, połączonych z destrukcją pierścienia pirymidynowego (Rys.11).



Rysunek 9.



Rysunek 10.

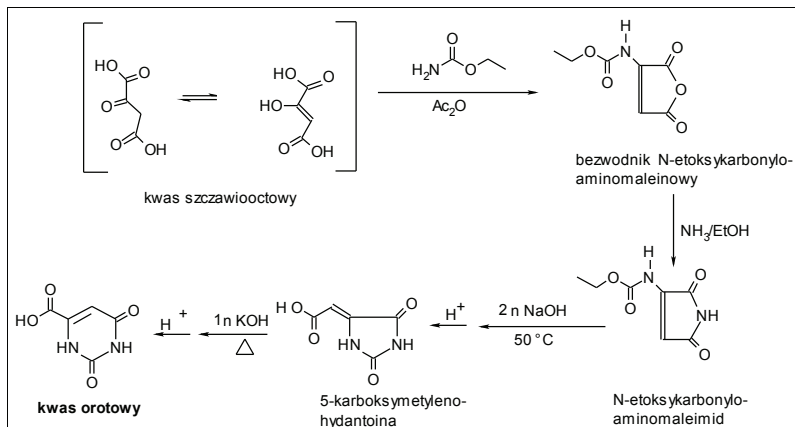


Rysunek 11.

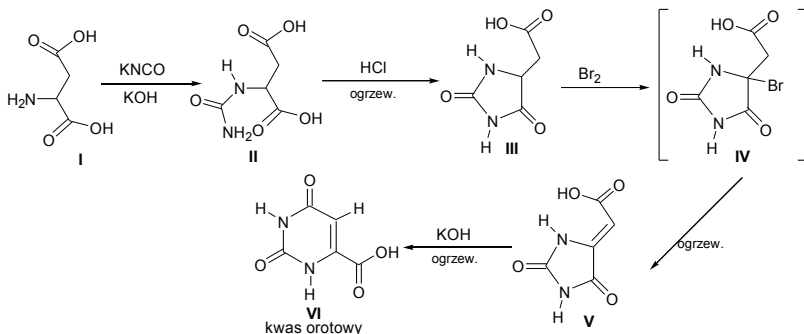
### Otrzymywanie kwasu orotowego z substratów niecyklicznych (totalna synteza)

Atkinson, Maguire i współpracownicy<sup>33</sup> opracowali syntezę kwasu orotowego z kwasu szczawiooctowego (systematycznie: oksaloocetowego) i uretanu etylowego (Rys.12). Kwas hydroksymaleinowy – postać tautomeryczna kwasu szczawiooctowego - reaguje z uretanem etylowym w obecności bezwodnika octowego lub chlorku fosforu ( $\text{POCl}_3$ ), dając bezwodnik N-ε-toksykarbonylmaleinowy. Bezwodnik ten reaguje z amoniakiem, dając imid, który pod wpływem wodorotlenku sodu tworzy pochodną hydantoiny. Uzyskana po zakwaszeniu 5-karboksymetylenohydantoina przegrupowuje się po ogrzaniu do kwasu orotowego.

Inna totalna synteza kwasu orotowego - z kwasu asparaginowego – została opisana przez Nyca i Mitchella<sup>34</sup>. Obejmuje ona syntezę kwasu ureidobursztynowego (**II**) (Rys.13) przez traktowanie kwasu asparaginowego **I** cyjanianem potasu w środowisku alkalicznym, a następnie cyklizację związku **II** do kwasu 5-hydantoinooctowego **III**, bromowanie związku **III** i otrzymanie 5-(karboksymetylideno)-hydantoiny **V** i jej przegrupowanie do kwasu orotowego **VI**.



Rysunek 12.

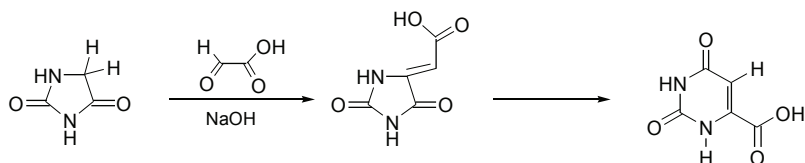


Rysunek 13.

Badanie stereochemii i mechanizmu powyższych reakcji było przedmiotem dalszych prac<sup>35</sup>.

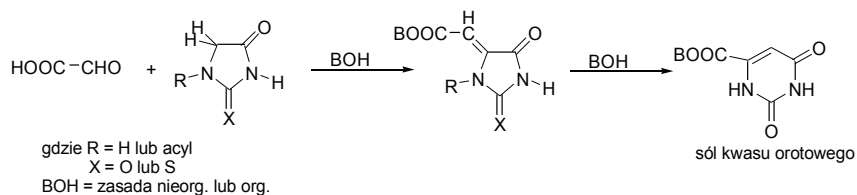
**Kwas orotowy z hydantoiny**

Kwas orotowy można też otrzymać, wychodząc bezpośrednio z hydantoiny<sup>36</sup>, czyli imidazolidyno-2,4-dionu. Kondensacja hydantoiny z kwasem glioksalowym w wodnym roztworze zasady sodowej lub potasowej prowadzi do 5-karboksymetylidenohydantoiny, która przegrupowuje się do kwasu orotowego (Rys.14).



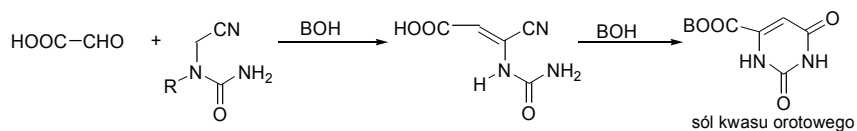
Rysunek 14.

Metody otrzymywania kwasu orotowego z podstawionych hydantoin i ich modyfikacje były przedmiotem kilku patentów. M. in. Rambacher i Mäke<sup>37</sup> opatentowali metodę preparatyki kwasu orotowego, obejmującą tworzenie karboksymetyleno-hydantoiny lub -tiohydantoiny, a następnie przegrupowaniem pierścienia pięcioczłonowego do sześcioczłonowego (rys.15)



Rysunek 15.

oraz wariant tej metody z nitylem kwasu hydantoinowego (Rys.16, BOH = zasada):

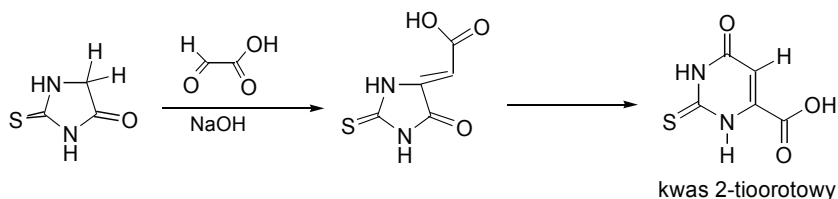


Rysunek 16.

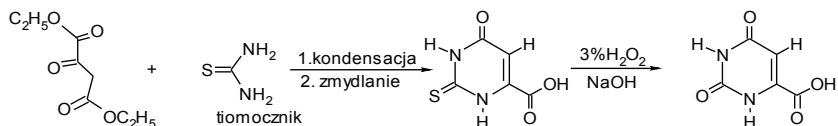
## Otrzymywanie kwasu orotowego poprzez 2-tioorotowy

Działanie kwasem glioksalowym na 2-tiohydantoinę w wodnym roztworze zasady sodowej lub potasowej, a następnie przegrupowanie powstałej 5-karboksymetylideno-2-tiohydantoiny do 6-karboksy-2-tiouracylu (tj. kwasu 2-tioorotowego)<sup>36</sup> prowadzi do otrzymania kwasu 2-tioorotowego (Rys. 17).

Inną metodą otrzymania kwasu 2-tioorotowego jest kondensacja tiomocznika z szczawiooctanem etylu i następujące zmydlanie powstałego estru<sup>38</sup>. Kwas ten po krótkim ogrzewaniu z 3%-owym roztworem nadtlenku wodoru w środowisku alkalicznym ulega odtiolowaniu do kwasu orotowego (Rys.18).



Rysunek 17.



Rysunek18.

## 5. Reaktywność kwasu orotowego – modyfikacje chemiczne

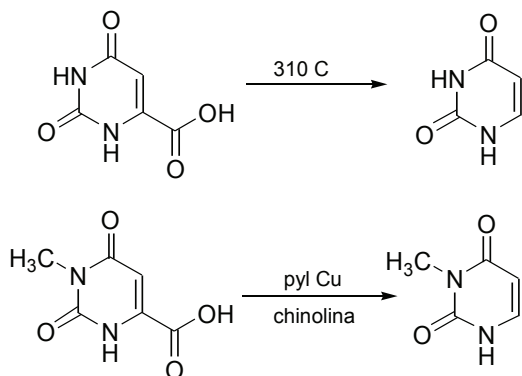
### 5.1. Reakcje z udziałem grupy karboksylowej:

#### 5.1a. Dekarboksylacja

Zarówno wolny kwas orotowy, jak i alkilowany na atomach azotu N<sub>1</sub> i N<sub>3</sub>, można zdekarboksylować do odpowiednich uracyli (Rys.19) działając pyłem cynkowym w chinolinie<sup>33</sup> albo wysoką temperaturą<sup>39</sup>.

Reakcja dekarboksylacji kwasu orotowego jest ważnym etapem przemian biochemicznych, zachodzących w organizmach żywych. W biosyntezie nukleotydów pirymidynowych zachodzi dekarboksylacja kwasu orotydylowego do kwasu urydylowego (Rys.6.), katalizowana przez enzym dekarboksylazę orotydylo-5'-monofosforanu (ODase). Zakłócenia

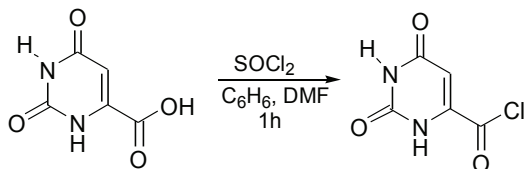
w działaniu tego enzymu są powodem występowania acydurii orotowej, dlatego też mechanizm dekarboksylacji kwasu orotowego budzi spore zainteresowanie i jest intensywnie badany<sup>40,41</sup>.



Rysunek 19.

### 5.1b. Reakcja otrzymywania chlorków kwasowych:

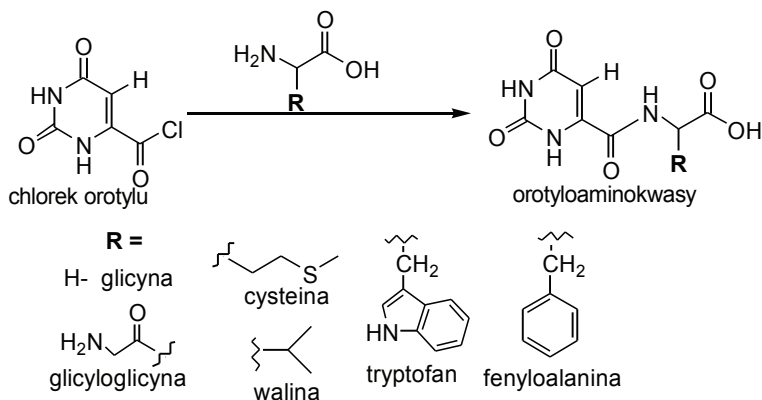
Chlorki kwasowe kwasów karboksylowych są zwykle bardzo reaktywne i stanowią dogodny substrat do wielu dalszych reakcji chemicznych, np. do estryfikacji, tworzenia amidów albo jako czynnik acylujący. Z uwagi na słabą rozpuszczalność kwasu orotowego w większości rozpuszczalników organicznych, m.in. w alkoholach, trudno jest go modyfikować chemicznie, np. estryfikować metodą Fischera alkoholem w obecności stężonego kwasu siarkowego, dlatego też podejmowano liczne próby przeprowadzenia takich reakcji *via* chlorek orotylu. Pierwsze próby otrzymania chlorku orotylu nie powiodły się<sup>42</sup>, w następnych otrzymano halogenek acylowy użyto do estryfikacji bez izolowania i oczyszczania<sup>43</sup> jednak kolejne zostały uwieńczone wyizolowaniem<sup>44</sup> oczekiwanego produktu. Chlorek orotylu otrzymano prawie ilościowo z bezwodnego kwasu orotowego, który ogrzewano z chlorem tionylu w benzenie z dodatkiem N, N-dimetyloformamidu (Rys. 20).



Rysunek 20.

Otrzymanie chlorku orotylu dało możliwość uzyskania wielu estrów kwasu orotowego, które wcześniej sprawiały trudności syntetykom (m.in. estru metylowego i etylowego). Chlorek ten znalazł też zastosowanie do acylowania grupy

aminowej w  $\alpha$ -aminokwasach i otrzymania wielu orotyloaminokwasów<sup>44</sup>, jak orotyloglicyna, orotyloglicyloglicyna, orotylo-DL-metionina, orotylo-DL-metioninamid, orotylo-DL-feniloalanina, orotylo-DL-tryptofan, orotylo-DL-walina (Rys. 21). Otrzymane związki testowano jako dodatki do paszy dla kurcząt. Niektóre z nich – np. orotyloglicyna i orotylo-DL-metioninamid – wykazały dodatni wpływ na przyrost masy kurcząt w porównaniu z populacją kontrolną.



Rysunek 21.

### 5.1c.-d. Estryfikacja i modyfikacje estrów:

Serię modyfikacji kwasu orotowego poprzez ester *n*-butylowy przeprowadzili Ross, Goodman i Baker<sup>49</sup> (Rys. 22). Grupę karboksylową kwasu orotowego można zestryfikować *n*-butanolem w obecności stężonego kwasu siarkowego; inne estry trudno jest otrzymać tą drogą z powodu słabej rozpuszczalności kwasu orotowego w innych alkoholach, np. w metanolu lub etanolu.

Orotan *n*-butyłu reaguje z wodzianem hydrazyny w metanolu, tworząc hydrazyd a z *n*-butyloaminą i 2-aminoetanolem w roztworze etanolowym dając odpowiednio amidy: *n*-butylamid i 2-hydroksyetylamid. Hydrazyd kwasu orotowego ulega reakcji z azotanem(III) sodu w środowisku kwaśnym do karboksyazydku, a w reakcji z 2,4-pentanodionem tworzy odpowiedni hydrazon (Rys.21). Niepodstawiony amid kwasu orotowego uzyskuje się z orotanu metylu pod działaniem wodnego roztworu amoniaku<sup>45</sup>.

Podobną metodą, jak orotan *n*-butyłu, otrzymano też estry alkoholi długołańcuchowych, np. orotan heptyłu, oktylu, nonyłu (Rys. 23) i decyłu<sup>46</sup>.

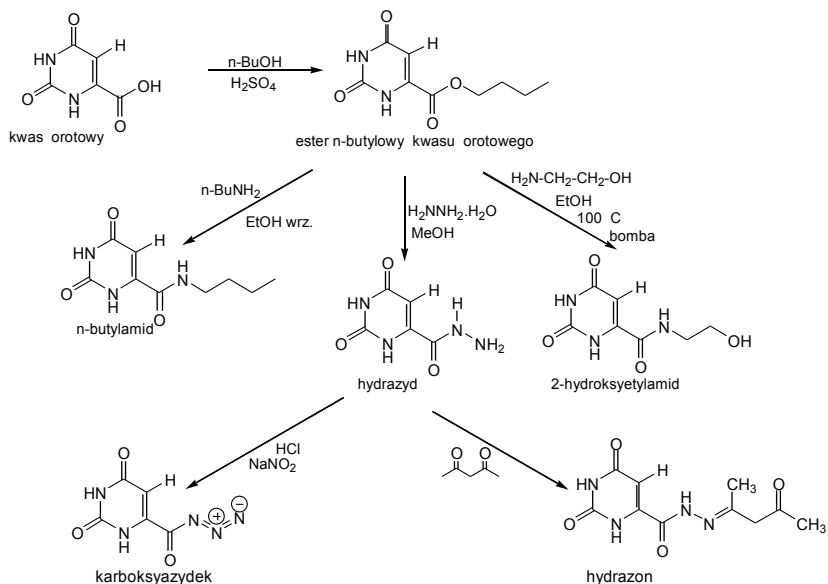
Orotany metylu, etylu, oktadecyłu i 2-etyloheksyłu uzyskano działając chlorkiem kwasu orotowego na odpowiednie alkohole<sup>44</sup>.

Działanie na kwas orotowy diazometanem (Rys. 24) powoduje estryfikację

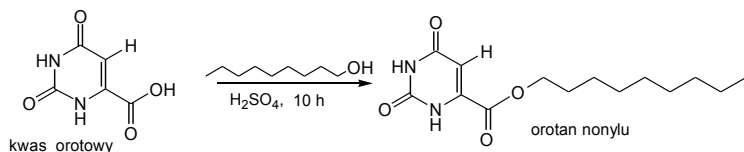


Kwas orotowy – synteza i reaktywność

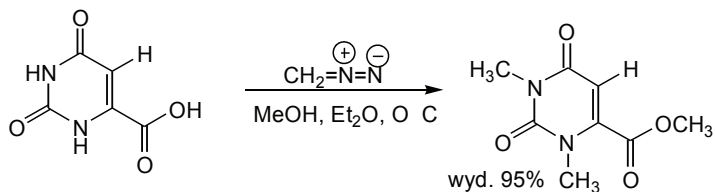
grupy karboksylowej i jednocześnie metylowanie obu atomów azotu w pierścieniu pirymidynowym<sup>47</sup>.



Rysunek 22.



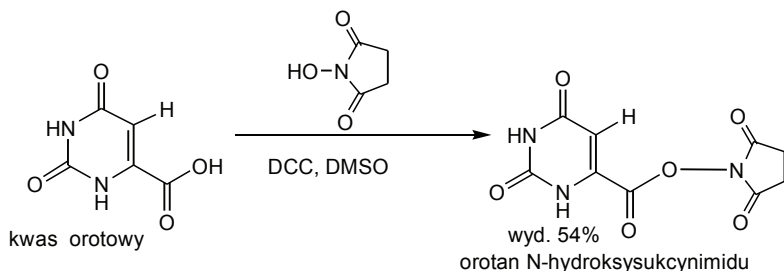
Rysunek 23.



Rysunek 24.

Estryfikacja kwasu orotowego N-hydroksyimidem kwasu bursztynowego w obecności DCC w dimetylosulfotlenku<sup>48</sup> daje ester orotowy N-

hydroksysukcynimidu z wydajnością 54% a w dimetyloformamidzie – 28%<sup>49</sup> (Rys.25). Orotan N-hydroksysukcynimidu otrzymano w celu zaktywowania cząsteczki kwasu orotowego i ułatwienia jej sprzęgania z amino-funkcjonalizowanymi analogami dinukleotydów. Doświadczenie miało na celu otrzymanie nowych katalitycznych oligonukleotydów metodą selekcji *in vitro*, a szczególnie przebadanie możliwości katalizowania reakcji pomiędzy dwiema małymi cząsteczkami organicznymi w warunkach amplifikacji enzymatycznej.



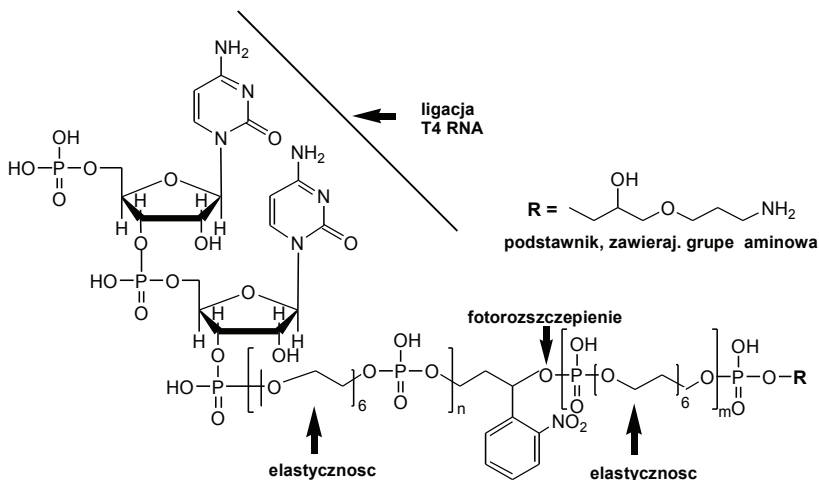
Rysunek 25.

Zakłada się, że enzymatycznie generowane rybozomy mogą oddziaływać wewnątrzcząsteczkowo na sprzężone z nimi reagenty, wywierając efekt katalityczny. Otrzymanie nowych połączeń RNA powinno doprowadzić do izolacji nowych rybozymów, katalizujących fundamentalne reakcje organiczne, jak np. reakcję tworzenia amidów, reakcję cykloaddycji Dielsa – Aldera względnie tworzenia wiązań N-glikozydowych.

Generalna strategia, mająca na celu uzyskanie nowych katalizatorów, obejmuje syntezę złożonych związków, wywodzących się z dinukleotydów, a zawierających w jednej cząsteczce następujące elementy strukturalne:

- dwie reszty cytydynowe i 5'-terminalną grupę fosforanową (do ligacji do transkryptów RNA lub oligonukleotydów przy pomocy ligazy T4 RNA),
- dwie do pięciu jednostek glikolu heksaetylenowego (HEG), by zapewnić odpowiednie pozycjonowanie RNA i sprzęganego reagenta; jako jednostki pozycjonującej („spejsera”) użyto glikolu polietylenowego (PEG) z uwagi na dużą giętkość (elastyczność), obojętność chemiczną i neutralność strukturalną, by zminimalizować udział linkera w katalizie<sup>50</sup>,
- grupę o-nitrobenzylową, umożliwiającą fotolityczny rozpad linkera w różnorodnych warunkach (niezależnie od pH, polarności rozpuszczalnika, siły jonowej czy potencjału redox);
- 3'- terminalną grupę funkcyjną, pozwalającą na dołączenie potencjal-

nego reagenta lub innej małej cząsteczki; na rysunku (Rys. 26.) jako **R** wprowadzono pierwszorzędową grupę aminową, która umożliwia „przyczepienie” cząsteczki kwasu karboksylowego (jako konkretny przykład kwasu karboksylowego o znaczeniu biologicznym wybrano kwas orotowy).



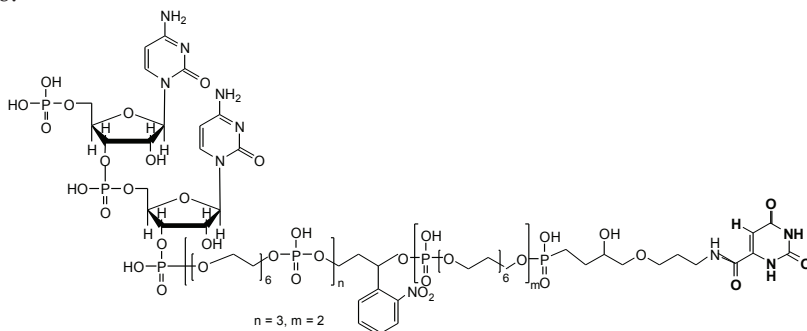
Rysunek 26.

Do tak otrzymanego reagenta, zawierającego na końcu łańcucha R grupę aminową, podstawiano resztę orotanową, działając uzyskanym uprzednio estrem orotowym N-hydroksysukcynimidu (Rys.27). Reakcję derywatywacji dinukleotydu za pomocą NHS-aktywowanego estru prowadzono w roztworze 0,4M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (pH 8,0) z dodatkiem 20% DMF w temperaturze pokojowej w ciągu 2-3 godzin. Potem reakcję przerywano, dodając 1M roztwór octanu amonu, a produkty oczyszczano przy użyciu HPLC. Identyfikacji produktów dokonywano przy zastosowaniu pomiarów MALDI-TOF.

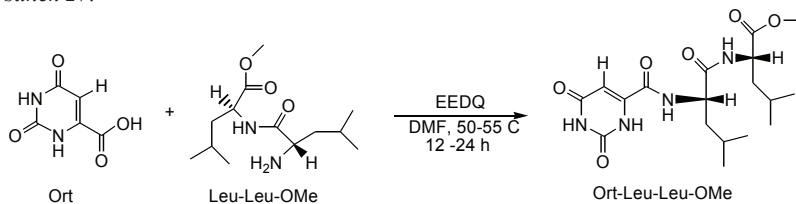
Otrzymany amid kwasu orotowego jest jednym z elementów większej biblioteki derywatyzowanych pochodnych dinukleotydu, które mogą posłużyć jako narzędzie w doświadczeniach metodami selekcji *in vitro* oraz w badaniach oddziaływań RNA.

Do amidów kwasu orotowego zaliczyć należy też połączenia tego związku z dipeptydami względnie estrami dipeptydów<sup>49</sup>, których serię otrzymano w celu zbadania ich aktywności przeciwgrzybiczej względem drożdżaka *Candida albicans*<sup>49</sup>. Próby sprzęgania z peptydami kwasu orotowego lub jego chlorku przez ogrzewanie z odpowiednim peptydem w alkoholu lub rozpuszczalniku

niepolarnym (np.  $\text{CHCl}_3$ ) okazały się mało dogodne. Znacznie skuteczniejsza była reakcja sprzęgania dipeptydów (lub ich estrów) z resztą orotanową, gdy kwas orotowy przeprowadzono uprzednio w ester N-hydroksysukcynimidu. Jako nukleofilowych substratów peptydowych użyto estrów metylowych, *t*-butylowych lub benzylowych glicyloglicyny, leucyloleucyny i metionilometioniny. Niestety metoda ta zawiodła, gdy zamiast kwasu orotowego użyto kwasu 5-fluoroorotowego, który nie ulegał estryfikacji N-hydroksysukcynimidem. Doprowadziło to do opracowania bardziej uniwersalnej metody sprzęgania kwasu orotowego i podstawionych kwasów orotowych z aminokwasami i peptydami przy użyciu EEDQ czyli 1-(etoksykarbonylo)-2-etoksy-1,2-dihydrochinoliny jako czynnika sprzęgającego. Reakcję prowadzi się w DMF w 50-55 °C przez 12-24 godzin, a uzyskiwane wydajności są rzędu 80-90%. Przykładową reakcję kwasu orotowego z estrem metylowym L-leucylo-L-leucyny przedstawia Rys. 28.



Rysunek 27.



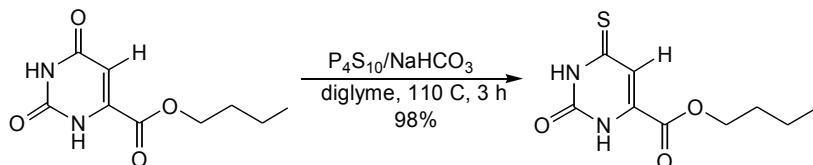
Rysunek 28.

Przy użyciu jednej lub drugiej metody, tj. poprzez ester N-hydroksysukcynimidu lub przy użyciu EEDQ, uzyskano szereg amidów kwasu orotowego i 5-fluoroorotowego, podstawionych aminokwasami i dipeptydami:

Ort-Gly-OMe, Ort-Gly-O-*t*-Bu, Ort-Gly-Gly-OBzl, Ort-Gly-Gly-O-*t*-Bu, Ort-Leu-Leu-OMe, Ort-Gly-Gly-OH, Ort-Leu-Leu-OH, Ort-Met-Met-OMe, 5-FOrt-Leu-OH, 5-FOrt-Leu-Leu-OH, 5-FOrt-Leu-O-*t*-Bu, 5-FOrt-Leu-Leu-O-*t*-Bu i in.

Stwierdzono, że orotylo-L-leucylo-L-leucyna i 5-fluororotylo-L-leucylo-L-leucyna inhibują wychwytywanie trimetioniny (Met)<sub>3</sub> przez *C. albicans* WD 18-4.

Wśród reakcji modyfikacji estrów kwasu orotowego należałoby wymienić reakcję tiolowania orotanu n-butylu za pomocą P<sub>4</sub>S<sub>10</sub>, przeprowadzoną przez Łapuchę<sup>51</sup>. W zastosowanych warunkach reakcji (Rys.29.) następuje wymiana atomu tlenu grupy karbonylowej w pozycji 4 pierścienia uracylowego na atom siarki, tj. wprowadzenie grupy tionowej.

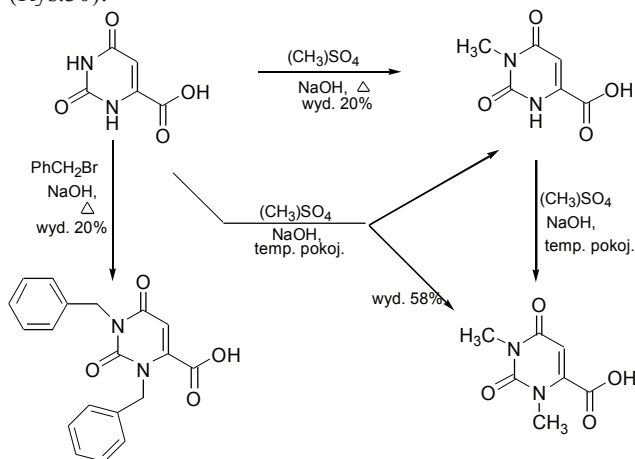


Rysunek 29.

Nie udaje się tą metodą tiolować grupy karbonylowej w pozycji 2 pierścienia pirymidynowego; wprowadzenie atomu siarki w pozycję 2 jest możliwe drogą syntezy pierścienia pirymidynowego z substratów niecyklicznych.

## 5.2. Reakcje podstawienia na atomach azotu N<sub>1</sub> i /lub N<sub>3</sub>

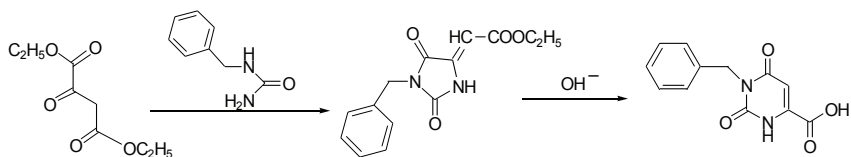
Metylowanie kwasu orotowego w roztworze NaOH siarczanem dimetylu, prowadzi zależnie od warunków reakcji do mono- lub dimetylowych pochodnych<sup>52,53,54</sup> (Rys.30):



Rysunek 30.

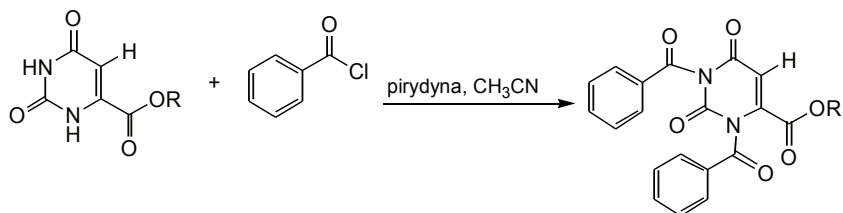
natomiast stosując jako czynnik alkilujący bromek benzylu w tych samych warunkach (roztwór NaOH, ogrzewanie) otrzymuje się kwas 1,3-dibenzyloorotowy z wydajnością 20%. Nie udaje się otrzymać tą drogą selektywnie pochodnej monobenzylowej, tj. kwasu 3-benzyloorotowego względnie 1-benzyloorotowego.

Kwas 3-benzyloorotowy otrzymuje się przez kondensację N-benzylmoczniaka zszczawiooctanem dietylu do 1-benzylo-4-karboetoksymetylidenuhydantoiny, która w środowisku alkalicznym przegrupowuje się do kwasu 3-benzyloorotowego (Rys.31.)



Rysunek 31.

Pochodne dibenzyłowe<sup>55</sup> i dibenzoilowe<sup>56</sup> otrzymano też wychodząc z estrów kwasu orotowego (Rys. 32)



Rysunek 32.

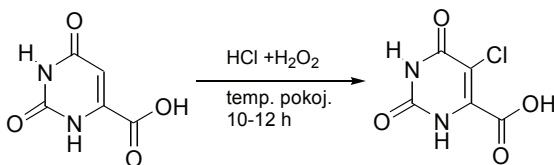
### 5.3. Wprowadzenie podstawnika w pozycję 5

Kwas orotowy ulega reakcjom substytucji, w których atom wodoru w pozycji 5 zostaje podstawiony inną grupą, np. nitrowaniu lub chlorowcowaniu, ale nie wszystkie z tych reakcji zachodzą łatwo, a warunki reakcji często są inne, niż dla typowej aromatycznej substytucji elektrofilowej.

W celu uzyskania kwasu 5-fluoroorotowego prowadzi się syntezę z substratów niecyklicznych: siarczanu metyloizotiouroniowego i dietylofluoroszczawiooctanu sodu w obecności etanolanu sodu we wrzącym etanolu. Podczas kondensacji zachodzi cyklizacja do 2-(metylotio)-4-hydrokso-5-fluoro-6-pirymidynokarboksyłanu etylu, który hydrolizuje pod wpływem stężonego kwasu solnego do kwasu 5-fluoroorotowego<sup>49</sup> [Ti J-S., Steinfeld A. S., Naider F.,

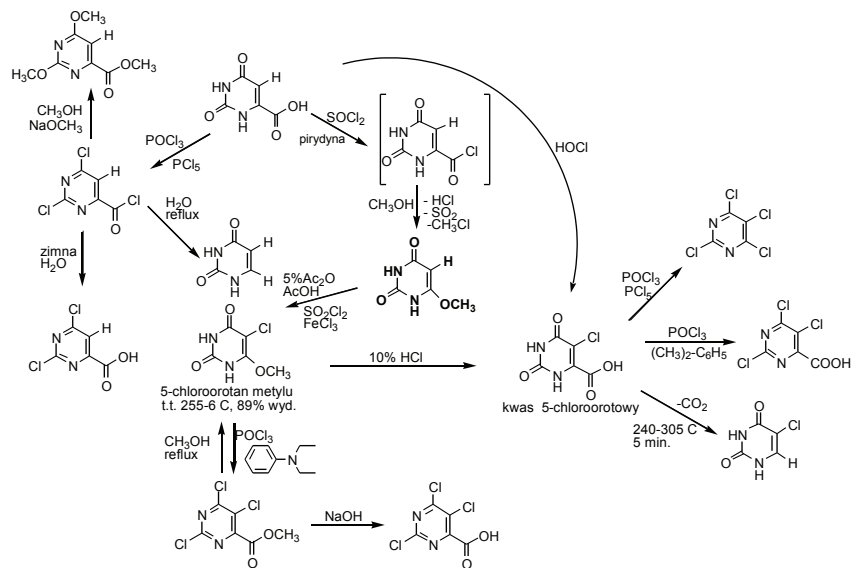
Gulumoglu A., Lewis S. V., Becker J. M.; Anticandidal Activity of pyrimidine-peptide conjugates; *J. Med. Chem.* 23, 913-918 (1980)].

Chlorowanie kwasu orotowego do 5-chloroorotowego można uzyskać, działając stężonym kwasem solnym i 30%-owym nadtlenkiem wodoru („Superoxol”, Merck) w temperaturze pokojowej; w czasie 10-12 godzin reakcja zachodzi praktycznie ilościowo (Rys.33)<sup>57</sup>.



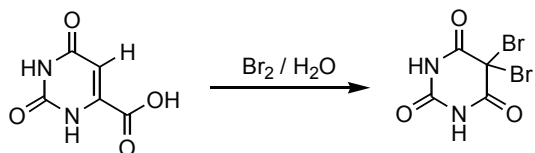
Rysunek 33.

Kwas 5-chloroorotowy otrzymano też działając na kwas orotowy HOCl. Reakcja ta była jedną z wielu przemian, prowadzących do chlorowanych pirymidyn<sup>43</sup>, przedstawionych na rysunku 34. Chloropirymidyny są dogodnymi substratami do wielu reakcji substytucji, w których atom chloru zostaje podstawiony grupą hydroksylową, aminową względnie tiolową.



Rysunek 34.

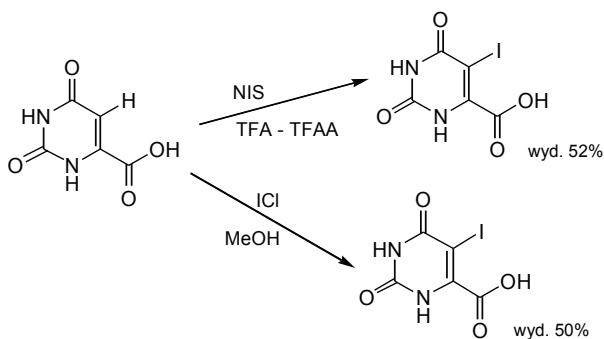
Bezpośrednie działanie na kwas orotowy wodą bromową prowadzi do otrzymania kwasu 5,5-dibromobarbiturowego (Rys.35)<sup>27</sup>, natomiast bromowanie roztworem bromu w tetrachlorometanie w temperaturze 70°C nie daje efektów<sup>58</sup> – odzyskuje się wyłącznie nieprzereagowany kwas orotowy.



Rysunek 35.

Kwas 5-bromoorotowy można otrzymać, działając mieszaniną 48% kwasu bromowodorowego i wodnego roztworu nadtlenu wodoru (30%) na kwas orotowy w temperaturze < 35°C (burzliwa reakcja, konieczne chłodzenie lodem); produktem jest dihydrat kwasu bromoorotowego (bladżółte igły, t.t. 288°C), a wydajność tej reakcji wynosi 73%. Bezwodny kwas 5-bromoorotowy uzyskuje się po wysuszeniu dihydratu z ogrzewaniem do 80°C nad P<sub>2</sub>O<sub>5</sub><sup>58</sup>. Ogrzewanie czystego kwasu 5-bromoorotowego do temperatury ok. 300°C powoduje wydzielanie CO<sub>2</sub> i uzyskanie niemal ilościowo 5-bromouracylu (t.t. 296°C).

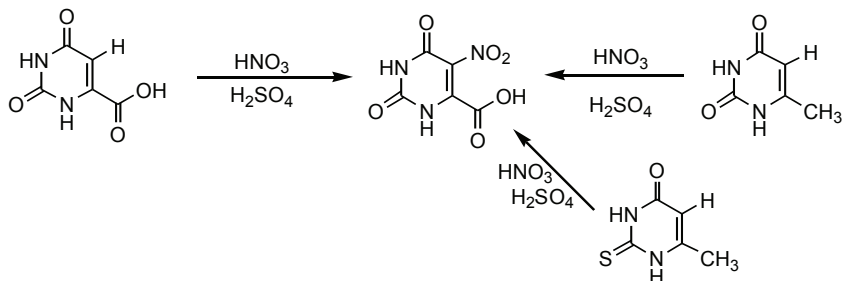
Jodowanie kwasu orotowego prowadzi się za pomocą N-jodosukcynimidu (NIS) we wrzącej mieszaninie kwasu trifluorooctowego i bezwodnika trifluoroctowego (TFA-TFAA) w ciągu 10 godzin<sup>59</sup>. Alternatywną metodą jest jodowanie za pomocą roztworu chlorku jodu we wrzącym metanolu (czas reakcji 24 h). W obu przypadkach powstaje kwas 5-jodoorotowy (Rys. 36), ale ta druga metoda jest powolniejsza, nieco mniej wydajna i sprzyja reakcjom ubocznym.



Rysunek 36.



Kwas 5-nitroorotowy można uzyskać przez bezpośrednie nitrowanie kwasu orotowego lub jego estru mieszaniną nitrującą, tj. kwasem azotowym(V) w mieszaninie ze stężonym kwasem siarkowym(VI)<sup>60</sup>. Ten sam produkt powstaje także podczas działania mieszaniną nitrującą na 6-metylouracyl<sup>61</sup> lub 6-metylo-2-tiouracyl<sup>62</sup>, gdyż silnie utleniające działanie kwasu azotowego powoduje utlenienie grupy metylowej do karboksylowej, a w silnie kwaśnym środowisku pochodne 2-tiouracylu ulegają odtiolowaniu (Rys. 37)

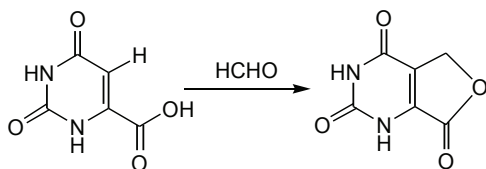


Rysunek 37.

#### 5.4. Dobudowa drugiego pierścienia z udziałem grupy –COOH i atomu węgla C<sub>5</sub>:

Stosując odpowiednie reagenty, możliwa jest rozbudowa cząsteczki kwasu orotowego o drugi, skumulowany pierścień, zawierający atomy węgla C<sub>3</sub>, C<sub>6</sub> i atom karboksylowy.

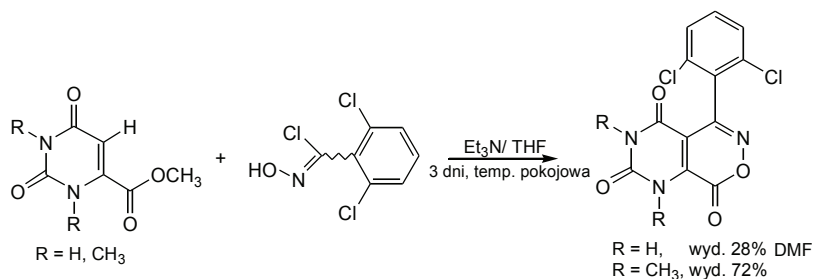
Ogrzewając kwas orotowy z paraformaldehydem we wrzącej wodzie w ciągu 40 godzin uzyskano lakton kwasu 5-hydroksymetyloorotowego<sup>63</sup> (Rys.38.) z wydajnością (po oczyszczaniu na kolumnie i krystalizacji) 8%. Reakcja przebiega przez etap podstawienia grupy CH<sub>2</sub>OH, wywodzącej się z cząsteczki formaldehydu, w pozycję 5 pierścienia pirymidynowego.



Rysunek 38.

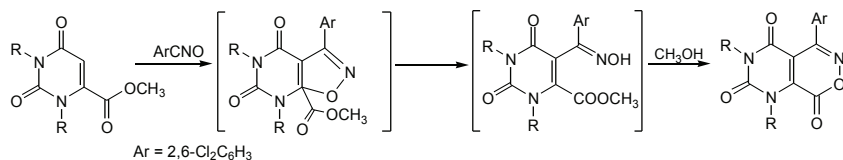
Działając na orotan metylu chlorkiem 2,6-dichlorobenzohydroksymolu w obecności trietyloaminy w DMF uzyskano pochodną oksazyjonu, 5-(2,6-

dichlorofenylo-)-1*H*-7-oksa-1,3,6-triazanaftaleno-2,4,8-trion<sup>64</sup> (Rys.39.):



Rysunek 39.

Analogiczna reakcja zachodzi dla 1,3-dimetylorotanu metylu i dla pochodnych uracylu, jak 1,3,6-trimetylouracyl lub 6-chloro-1,3-dimetylouracyl, nie zachodzi natomiast, gdy zasada pirymidynowa posiada podstawnik w pozycji 5, np. dla 1,3-dimetylotyminy. Postuluje się, że reakcja ta przebiega przez etap cykloaddycji [3+2], a następnie otwarcie pierścienia przez zasadę ( $\text{Et}_3\text{N}$ ) lub polarny rozpuszczalnik (DMF) do oksymu i ponowne zamknięcie z eliminacją cząsteczki metanolu (Rys.40.).

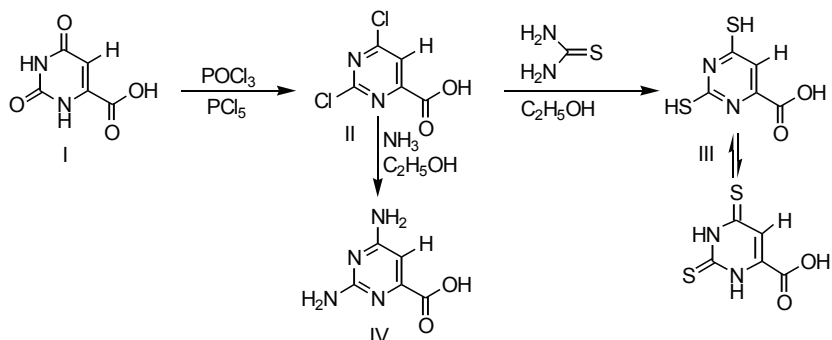


Rysunek 40.

### 5.5. Modyfikacje chemiczne w pozycjach 2 i 4 pierścienia uracylowego.

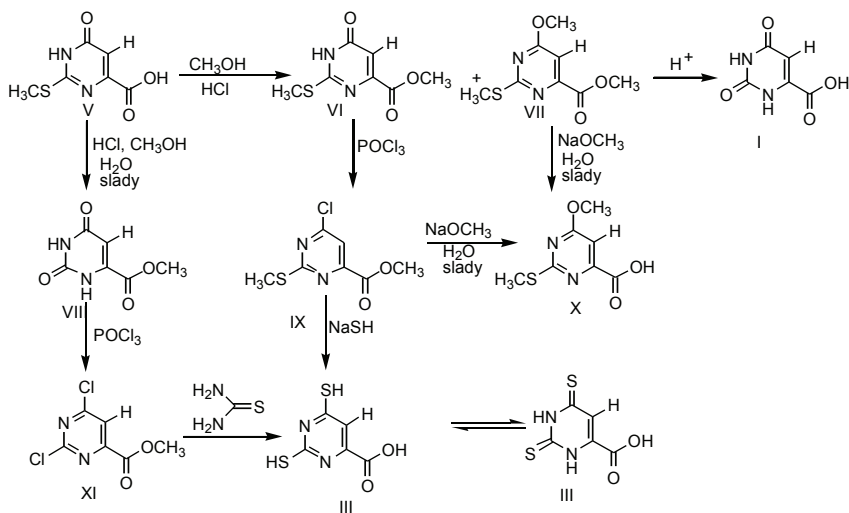
Otrzymano szereg analogów strukturalnych kwasu orotowego, posiadających w pozycji 2 i/lub 4 pierścienia uracylowego grupę tiolową<sup>65</sup>, aminową lub atom chlorowca.

Kwas orotowy I pod wpływem mieszaniny  $\text{POCl}_3$  i  $\text{PCl}_5$  ulega przemianom w kwas 2,6-dichloro-4-pirymidynokarboksylowy<sup>43</sup> (II), a ten reaguje łatwo z mocznikiem w etanolu do kwasu 2,4-ditioorotowego (III) i z etanolem z roztworem amoniaku, dając kwas 2,6-diamino-4-pirymidynokarboksylowy (IV) (Rys. 41.).



Rysunek 41.

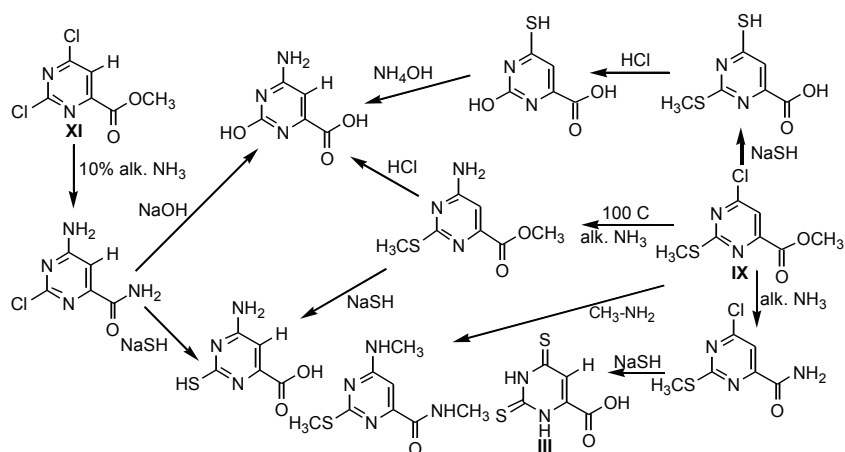
Wychodząc z otrzymanego uprzednio kwasu 2-metylotioorotowego (V), można pod działaniem HCl i metanolu w obecności śladów wody otrzymać orotan metylu (VIII); reakcji estryfikacji towarzyszy tu odmetyliolowanie (Rys. 42). Estryfikując V metanolem nasyconym gazowym chlorowodorem otrzymuje się mieszaninę dwóch estrów: 2-metylotioorotanu metylu (VI) i 2-metylotio-6-metoksy-4-pyrimidynokarboksylanu metylu (VII). Związek VII w środowisku kwaśnym hydroлізуje do kwasu orotowego (I).



Rysunek 42.

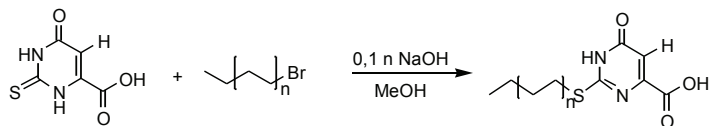
Działając na orotan metylu (VIII) tlenochlorkiem fosforu  $\text{POCl}_3$ , uzyskano 2,6-dichloro-4-pyrimidynokarboksylan metylu (XI), a z 2-metylotioorotanu metylu (VI) pod działaniem tego samego odczynnika powstaje 2-metylotio-6-chloro-4-pyrimidynokarboksylan metylu (IX). Pod działaniem tlenochlorku fosforu następuje wymiana grupy hydroksylowej (w enolowej formie tautomerycznej) na atom chloru, podczas gdy grupa metylotiolowa pozostaje nienaruszona. Reakcje związku IX z wodorosiarczkiem sodowym i związku XI z tiomocznikiem prowadzą do tego samego produktu – kwasu 2,4-ditioorotowego III.

Cykl reakcji substytucji chloru przez grupę aminową lub tiolową oraz hydrolizy grupy estrowej w pochodnych kwasu orotowego przedstawia poniższy schemat (Rys.43.):



Rysunek 43.

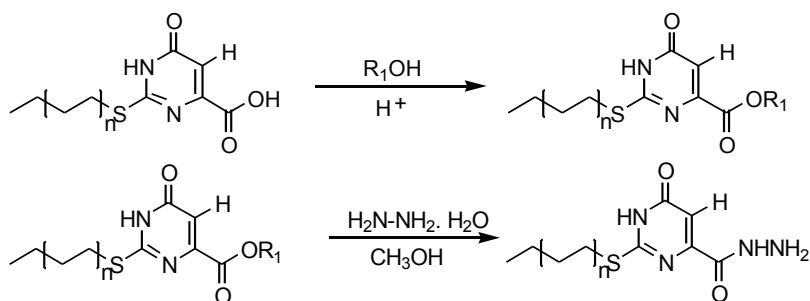
W cyklu reakcji substytucji, opisanych powyżej, otrzymuje się między innymi kwas 4-tioorotowy i kwas 2,4-ditioorotowy (III, Rys. 43). Kolejny siarkowy analog kwasu orotowego, kwas 2-tioorotowy, można otrzymać metodami opisanymi uprzednio<sup>36, 38</sup>. Kwasy tioorotowe budzą spore zainteresowanie nie tylko z powodu ich zdolności do kompleksowania jonów metali<sup>66</sup>, ale i jako potencjalne antymetabolity kwasu orotowego. Zastąpienie atomu tlenu grupy karbonylowej kwasu przez atom siarki stwarza nowe możliwości modyfikacji chemicznej cząsteczki. Kwas 2-tioorotowy w reakcji z halogenkami alkiłowymi w środowisku alkalicznym ulega alkiłowaniu na atomie siarki (Rys. 44), a niektóre z otrzymanych tą drogą kwasów 2-alkilotioorotowych wykazują aktywność przeciwdrobnoustojową<sup>67</sup>.



Rysunek 44.

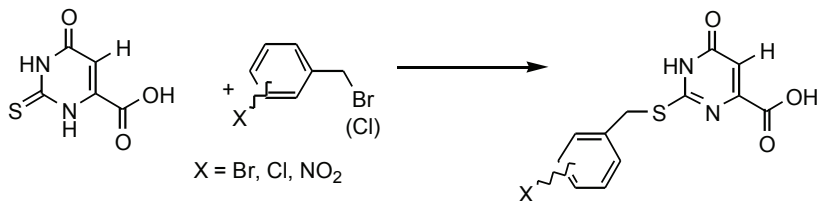
Interesujące są również właściwości spektralne tych połączeń, zwłaszcza ich zachowanie w komorze jonizacyjnej spektrometru mas EI/MS<sup>68</sup>.

Kwasy 2-alkyltioorotowe ulegają reakcjom z udziałem grupy karboksylowej; można je estryfikować, a uzyskane estry przeprowadzać w hydrazydy kwasowe (Rys. 45). Uzyskane tą drogą izomeryczne związki analizowano metodami spektrometrii mas<sup>69</sup>.



Rysunek 45

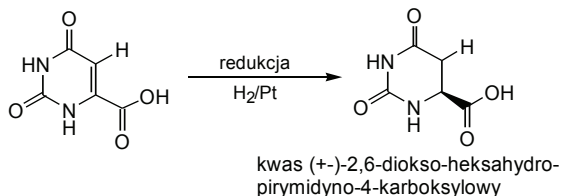
Zsyntetyzowano także szereg kwasów *orto*-, *meta*- i *para*- chloro-, bromo- i nitro-benzyltioorotowych (Rys. 46) oraz przebadano wpływ miejsca podstawienia w pierścieniu aromatycznym na widma masowe i widma węglowego rezonansu jądrowego tych połączeń<sup>70</sup>.



Rysunek 46.

### 5.6. Redukcja pierścienia pirymidynowego

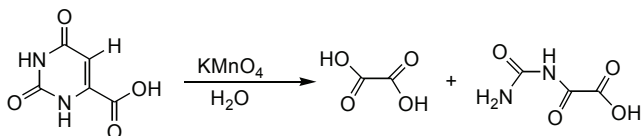
Podwójne wiązanie  $C_5=C_6$  można zredukować enzymatycznie<sup>71</sup> albo działając wodorem na katalizatorze platynowy<sup>72</sup> w etanolu, otrzymując kwas dihydroorotowy (kwas 2,6-diokso-heksahydro-pyrimidino-4-karboxyowy) (Rys. 47). Jako katalizator uwodornienia stosuje się też  $Rh-Al_2O_3$ <sup>73</sup> w obecności morfoliny



Rysunek 47.

### 5.7. Destrukcja pierścienia

Pod wpływem silnych czynników utleniających, np. nadmanganianu potasu  $KMnO_4$ , pierścień pirymidynowy ulega rozpadowi. Reakcja przebiega łatwo, bez ogrzewania, a jej produktami są kwas szczawiowy i monoureid kwasu szczawioowego<sup>29</sup> (Rys. 48).

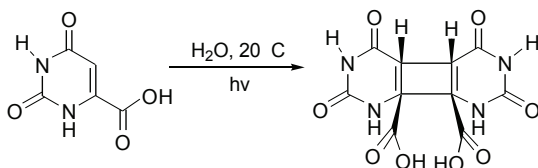


Rysunek 48.

Istnieją też doniesienia o rozkładzie kwasu orotowego pod wpływem  $KMnO_4$  z wydzieleniem mocznika<sup>1</sup>.

### 5.8. Inne reakcje

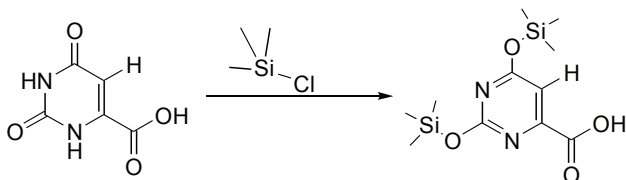
Wśród reakcji, nie objętych powyższym podziałem można wymienić fotochemiczną dimeryzację kwasu orotowego (Rys.49)<sup>74</sup>



Rysunek 49.

**Reakcja sililowania:**

Działanie na kwas orotowy chloro-trimetylo-silanem powoduje sililowanie grup karbonylowych (Rys. 50), związanych z pierścieniem pirymidynowym i daje kwas 2,6-bis- trimetylosilanoksy-pirymidyno-4-karboksylowy<sup>75</sup>:

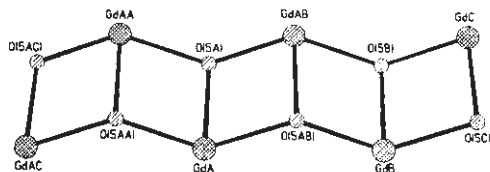


Rysunek 50.

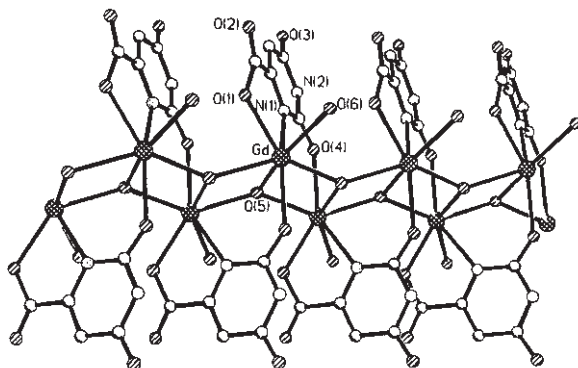
**6. Przykłady związków kompleksowych, zawierających ligandy orotowe**

W literaturze opisano wiele związków kompleksowych, zawierających jako ligand kwas orotowy. Jest on ligandem polifukcyjnym, zdolnym do koordynowania jonów metali za pośrednictwem dwóch atomów azotu z pierścienia pirymidynowego, dwóch karbonylowych atomów tlenu oraz grupy karboksylowej. Od względów sterycznych i od budowy pozostałych ligandów zależy, które z tych atomów są zaangażowane w tworzenie kompleksu. Kwas orotowy może wykazywać różne tryby koordynacji, działając jako ligand jednokleszczowy, dwukleszczowy, mostkujący, chelatujący lub mostkująco-chelatujący. Wśród jonów metali, które tworzą kompleksy z udziałem kwasu orotowego wymienia się metale alkaliczne<sup>76</sup> i przejściowe<sup>6, 77,78,79</sup> np. Cu(II)<sup>80,81</sup>, Ni(II)<sup>82,83</sup>, Cd(II)<sup>84</sup>, Pt(II)<sup>85</sup>, a także, chociaż rzadziej, lantanowce<sup>86,87,88</sup>. Kompleksy te mają różną budowę przestrzenną, od jednowymiarowych łańcuchów, przez struktury w kształcie drabinek, powiązanych „spejserami” orotanowymi<sup>16</sup> aż do skomplikowanych sieci trójwymiarowych. Taką sieć tworzy np. koordynacyjny polimer gadolinu(III) o składzie [Gd(HL)(OH)(H<sub>2</sub>O)]<sub>n</sub> (II) gdzie HL = ligand orotanowy<sup>16</sup>, w którym centra stanowią jonu Gd o liczbie koordynacyjnej 8. Gd(III) jest koordynowany przez jeden atom azotu (N1 z cząsteczki kwasu orotowego) i siedem atomów tlenu, z których trzy pochodzą od grup OH<sup>-</sup>; trzy od trzech różnych ligandów orotanowych i jeden od cząsteczki wody. Strukturę kolejnych wymiarów tego kompleksu (II) pokazują przykładowo rysunki 51-53.

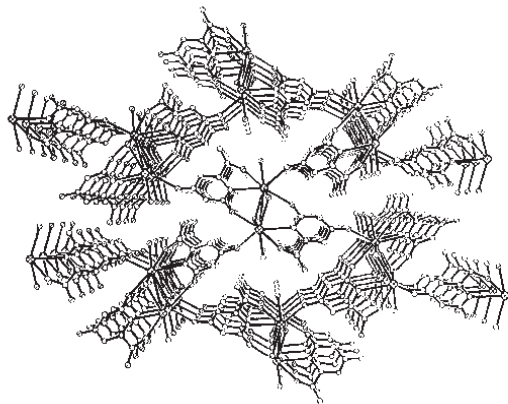
Inne związki koordynacyjne, zawierające jako ligandy cząsteczki kwasu orotowego lub jony orotanowe, wykazują inne typy architektury przestrzennej. Przykładem może być struktura lamelarna kompleksu **III** anionów kwasu orotowego z jonami srebra Ag(I), przedstawiona na rys. 54.



Rysunek 51. Łańcuch w kształcie drabiny, tworzony przez Gd(III) i  $\mu_3$ -OH w związku II.

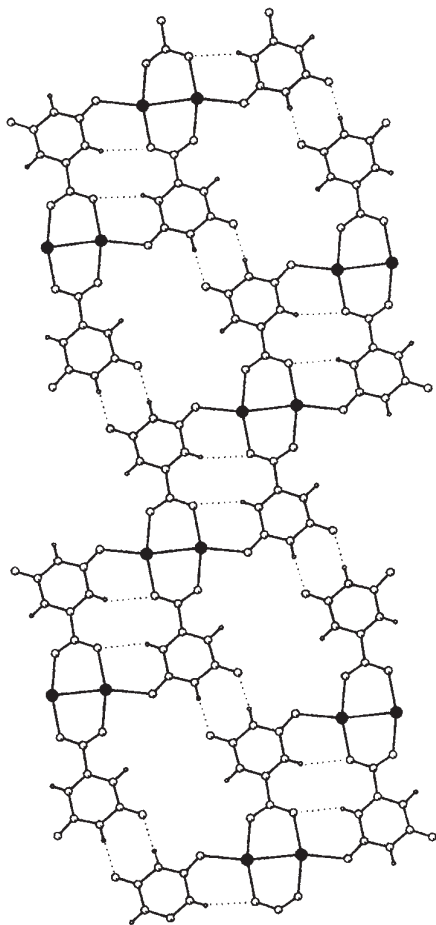


Rysunek 52. Struktura związku II – zygzakowate łańcuchy Gd(III) z ligandami orotanowymi i mostkami  $\mu_3$ -OH.



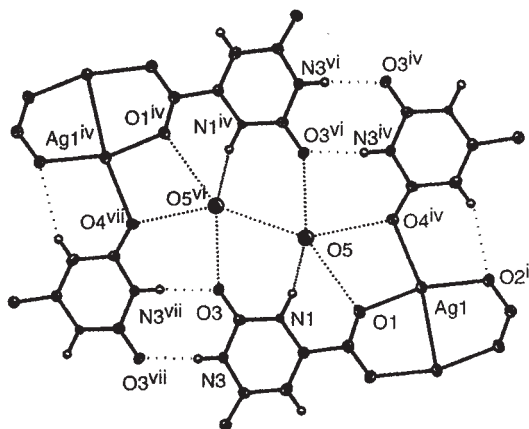
Rysunek 53. Gwiazdista, trójwymiarowa struktura kompleksu II. Łańcuchy połączone pozostałymi karbonyłowymi atomami tlenu ligandów orotanowych w różnych kierunkach tworzą otoczenie Gd(III) o liczbie koordynacyjnej 8.





Rysunek 54. Struktura dihydratu bis(O,O',O'')-hydroorotano)disrebra(I) – związek **III**. Jony srebra zaznaczono czarnym wypełnieniem, cząsteczki wody dla przejrzystości pominięto.

Sieć wiązań wodorowych w powyższym kompleksie przedstawia Rys.55.



Rysunek 55. Układ sieci wiązań wodorowych w kompleksie III.

Różnorodność związków kompleksowych z udziałem kwasu orotowego oraz wielość struktur, które tworzą te związki jest ogromna i przekracza ramy niniejszego opracowania.

Sam kwas orotowy, krystalizowany z wody, tworzy monohydrat, krystalizujący w układzie trójskośnym (patrz: **2. Budowa cząsteczki i właściwości fizykochemiczne kwasu orotowego**).

## 7. Zastosowania kwasu orotowego

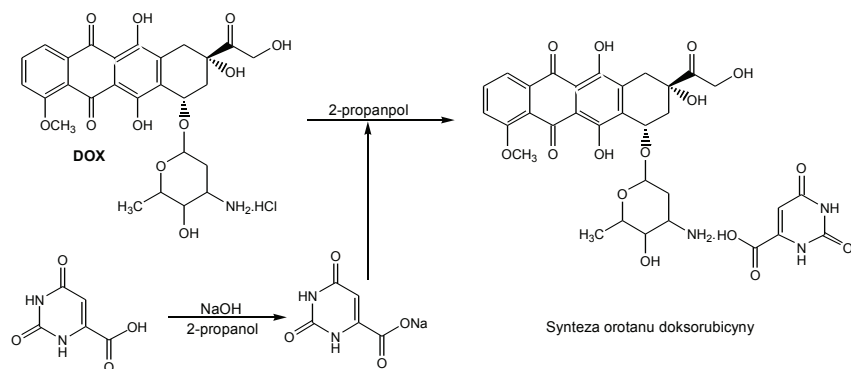
Kwas orotowy odgrywa kluczową rolę w metabolizmie kwasu foliowego<sup>89</sup> i witaminy B<sub>12</sub>; uważa się, że może częściowo rekompensować niedobór tej witaminy<sup>90</sup> oraz poprawiać transport składników mineralnych przez błony komórkowe organizmu. Stosowany jest jako lek w schorzeniach wątroby, w leczeniu stwardnienia rozsianego oraz zawałe serca i u pacjentów z chorobą wieńcową (poprawia stan energetyczny mięśnia sercowego). Najczęściej wprowadza się go do organizmu w postaci soli – orotanów wapnia, magnezu lub potasu. Sole te są łatwo wchłaniane z układu pokarmowego i transportowane w organizmie z krwią, gdzie następuje uwolnienie kationu metalu, co umożliwia jego terapeutyczne działanie.

Orotan magnezu zwiększa tolerancję wysiłku u pacjentów z chorobą wieńcową i u trenujących sportowców, natomiast orotan wapnia poprawia wchłanianie wapnia i w ten sposób zapobiega osteoporozie. Orotan litu jest lekiem w schorzeniach, przebiegających z nadmiernym pobudzeniem układu nerwowego.

go, np. silnej zmienności nastrojów czy chorobie dwubiegunowej. Handlowo dostępny jest również orotan cynku i addukty kwasu orotowego z niektórymi aminokwasami, stosowane jako suplementy diety, dodatki do odżywek dla sportowców oraz jako nutraceutyki, tj. środki, które nie tylko wzogacają dietę, ale i wywierają efekt farmakologiczny.

Sole kwasu orotowego są elektrycznie obojętne i dość odporne na dysocjację, co wydaje się mieć kluczowe znaczenie dla transportu minerałów i ich przyswajania. Dysocjacja tych soli przebiega znacznie wolniej niż np. soli kuchennej, dzięki czemu odpowiednie składniki mineralne zdążą dotrzeć do właściwego miejsca w organizmie, zanim zostaną uwolnione. Nawet gdy zależy nam na wprowadzeniu do organizmu samego kwasu orotowego (niezależnie od kationu metalu), korzystniejsze jest stosowanie kwasu w postaci soli niż w postaci niezwiązanej, gdyż wolny kwas orotowy przenika biernie do wnętrza komórki drogą dyfuzji przez błonę komórkową; nie jest on transportowany aktywnie i wskutek tego ilość tego związku, która dostaje się do komórki, jest ograniczona. W przypadku uracylu, który różni się od kwasu orotowego tylko brakiem grupy karboksylowej, transport przebiega inaczej: cząsteczki uracylu, mniej polarne, bardziej lipofilowe niż OA, łączą się z białkiem transportowym, które przynosi je efektywnie do wnętrza komórki<sup>91</sup>. Przeprowadzenie cząsteczki kwasu orotowego w sól sprawia, że otrzymany kompleks jest bardziej lipofilowy i łatwiej transportowany przez membrany lipidowe niż wolny kwas<sup>92</sup>.

Inne zastosowania kwasu orotowego są ostatnio przedmiotem patentów<sup>93</sup>, mających na celu zmniejszenie toksyczności środków przeciwnowotworowych w stosunku do tkanek nienowotworowych przez przeprowadzenie ich w pochodne kwasu orotowego. Dotyczą one antybiotyków z grupy antracyklin kationowych, takich jak doksorubicyna (DOX) względnie daunorubicyna.



Rysunek 56.

Doksorubicyna tj. chlorowoderek (8S, 10S)- 10[(3-amino- 2,3,6- trideoksy- $\alpha$ -L-likso-heksopiranosylo)-oksylo-8-glikolilo-7,8,9,10-tetrahydro-6,8,11-trihydroksy-1-metoksy-5,12-naftacenodionu ,  $C_{27}H_{29}NO_{11} \cdot HCl$  , masa cząsteczkowa 579,99, (Rys. 56. – Synteza orotanu doksorubicyny) jest antybiotykiem, stosowanym szeroko w terapii białaczek i guzów nowotworowych, podobnie jak jej pochodne i inne kationowe antracykliny. Niestety w większych dawkach i w miarę kumulowania się w organizmie jest ona toksyczna dla zdrowych tkanek, m.in. dla mięśnia sercowego i powoduje wiele efektów ubocznych, jak obrzęki, bóle głowy, dreszcze, bóle pleców, ściskanie w klatce piersiowej lub gardle, niedociśnienie. U większości pacjentów objawy te mijają z czasem, ale zdarzają się przypadki ciężkie, nawet śmiertelne (grupą szczególnie narażoną są dzieci), stąd wielkie zapotrzebowanie na modyfikacje, które poprawią działanie tych leków a jednocześnie zmniejszą efekty uboczne. Wprowadzanie doksorubicyny w postaci orotanu sprawia, że jest ona wolniej wchłaniana w układzie pokarmowo-trawiennym, ulega powolnemu rozpuszczaniu z rozpadem na antybiotyk w postaci jonu i wolny kwas orotowy, który z kolei redukuje toksyczność leku w stosunku do wątroby i serca. Pomiarzy metodami biochemicznymi stężenia doksorubicyny w zdrowych tkankach po podaniu leku w postaci orotanu wykazały, że ta postać antybiotyku słabiej przenika do zdrowych organów i mniej się w nich kumuluje, co niweluje wiele wymienionych poprzednio efektów ubocznych.

Kwas orotowy znalazł także zastosowanie w kosmetyce jako dodatek do kremów nawilżających skórę i opóźniających efekty starzenia, gdyż jest łatwo absorbowany przez komórki nabłonka i przenika w głąb tkanek skórnych, odżywiając je<sup>94</sup>.

### Literatura:

1. (a) Biscaro G., Belloni E.; *Ann. Soc. Chim. Milano* XI, fasch I, II (1905);  
(b) Biscaro G., Belloni E.; *Chem. Zentr.* [II] 63 (1905);
2. Lehninger A., *Principles of Biochemistry*, Worth Publisher, New York, 661 (1970);
3. Schmidbaur H., Classen H. G., Helbig J.; Aspartic and glutamic acid as ligands to alkali and alkaline-earth metals: Structural chemistry as related to magnesium therapy; *Angew. Chem.Int. Ed. Engl.* 29 (10) 1090 – 1103 (1990) [Asparagin- und Glutaminsäure als Liganden für Alkali- und Erdalkalimetalle];
4. Kumberger O., Riede J., Schmidbaur H.; Preparation and crystal structure of zinc bis-[orotate(1-)] octahydrate; *Z. Naturforsch.* B 48(7), 961 (1993);
5. Bekiroglu S., Kristiansson O.; Hydrogen-bonded neutral and anionic lamellar networks: Crystal structures of bis(O,O',O'')-hydroorotato)di-

- silver(I) dihydrate, potassium hydroorotate and rubidium hydroorotate. *Ab initio* calculations on orotic acid and the hydroorotate anion; *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1330 (2002), doi: 10.1039/b110386p;
- James S. L., Mingos D. M. P., Xu X., White A. J. P., Williams D. J.; Orotate complexes of rhodium(I) and iridium(I): effect of coligand, counter ion, and solvent of crystallisation on association *via* complementary hydrogen bonding; *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1335 (1998);
  - Shugar D., Fox J. J., Spectrophotometric studies of nucleic acid derivatives and related compounds as a function of pH. I. Pyrimidines. *Biochim. Biophys. Acta*, 9 (2), 199 (1952);
  - Takusagawa F., Shimada A.; The crystal structure of orotic acid monohydrate (vitamin B<sub>13</sub>); *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 46, 2011-2019 (1973);
  - Portalone G., Redetermination of orotic acid monohydrate, *Acta Crystallographica Section E (Structure Reports Online)*, E64, o656, (2008), doi: 10.1107/S160053680800562X.;
  - Chidambaram R., Sequeira A., Sikka S. K.; Neutron – diffraction study of the structure of potassium oxalate monohydrate: Lone-pair coordination of the hydrogen-bonded water molecule in crystals; *J. Chem. Phys.*, 41, 3616 (1964);
  - Hilal R., Zaky Z. M., Elroby S. A. K.; Electronic structure of orotic acid. I. Geometry, conformational preference and tautomerism, *J. Mol. Struct. (Theochem)* 685, 35-42 (2004), doi: 10.1016/j.theochem.2004.04.027;
  - Chattaway F. W.; Growth stimulation of *L. casei* E. by pyrimidines; *Nature* 153, 250 (1944), doi: 10.10038/153250b0;
  - Brown D. J., w: „Comprehensive Heterocyclic Chemistry”, Vol. 3, Part 2B, 1984, 146; Wiley Interscience Publ;
  - Anastasi G., Antonelli M. L., Biondi A., Vinci G.; Orotic acid , a milk constituent. Enzymatic determination by a new microcalorimetric method; *Talanta* 52, 947 (2000);
  - Pita A. M., Wakabayashi Y., Fernandez-Bustos M. A., Virgili N., Riudor E., Soler J. and Farriol M.; Plasma urea-cycle-related amino acids, ammonium level, and urinary orotic acid excretion in short-bowel patients managed with an oral diet”, *Clinical Nutrition* 22, 1, 93-98 (2003);
  - Nelson E. V., Shapiro S. K.; „Pyrimidine biosynthesis in *Aerobacter aerogenes*”, *J. Bacteriol.* 67, 6, 692-695 (1954);
  - Wieland O. P., Averner J., Boggiano E. M., Bohonos N., Hutchings B. L., Williams J. H.; Orotic acid in the nutrition of a strain of *Lactobacillus bulgaricus*; *J. Biol. Chem.* 186, 2, 737 (1950);
  - Hallanger L. E., Laakson J. W., Schultze M. D.; Orotic acid in milk; *J. Biol. Chem.* 200, 83-89 (1953);

19. Okonkwo P. O.; Kinsella J. E.; Orotic acid in food milk powders; *Am. J. Clin. Nutr.* 22, 532-534 (1969);
20. Brosnan M. E., Brosnan J. T.; Orotic acid excretion and arginine metabolism, *J. Nutr.* 137, 16565-16615 (2007);
21. Cataldi T. R. I., Nardiello D., Ciriello R., Guerrieri A.; Pulsed electrochemical detection of orotic acid by an activated potential waveform at a gold working electrode following anion-exchange chromatography; *J. Chromatogr. A* 1107(1/2), 130 (2006), doi: 10.1016/j.chroma.2005.12.049;
22. Salerno C., Crifò C., Diagnostic value of urinary orotic acid levels: applicable separation method, *J. Chromatogr. B* 781[1/2], 57-71 (2002).: doi.org10.1016/S1570-0232[02]00533-0;
23. Burton B., Urea cycle disorders, *Clinics in Liver Disease* 4[4], 815 (2000);
24. Hušková R., Bartak P., Čap L., Friedecky D., Adam T.; Analytical derivatization – a tool for determination of orotic acid, *J. Chromatogr. B*, 799, 303 (2004);
25. Ueta A., Sumi S., Kidouchi K., Ito T., Ban K., Hamajima N., Fujimoto S., Togari H., Wada Y.; Intra-day variations in urinary pyrimidines in ornithine carbamoyltransferase deficiency and healthy individuals, *Clinica Chimica Acta* 308[1/2], 187 (2001). doi: 10.1016/S0009-8981(01)00472-7;
26. la Marca G., Casetta B., Zammarchi E., “Rapid determination of orotic acid in urine by a fast liquid chromatography/tandem mass spectrometric method”, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17(8), 788-793 (2003). doi: 10.1002/rcm.980;
27. Wheeler H.L., Researches on pyrimidines: Uracil-4-carboxylic acid; *Am. Chem. J.*, 38, 358 (1907);
28. Müller R., *J. Prakt. Chem.*, 56, 488 (1897);
29. Behrend R., Struve K.; Ueber die Oxydation des Methyluracils, *Justus Liebigs Ann. Chem.*; 378, 153 (1911);
30. Johnson T. B., Schroeder E.F., Researches on pyrimidines.CXXII. Improved method for the synthesis of orotic acid. *J. Am. Chem. Soc.*, 53, 1989 (1931);
31. Johnson T. B., Schroeder E.F., Researches on pyrimidines.CXXIX. The synthesis of 2-thioorotic acid. *J. Am. Chem. Soc.*, 54, 2941 (1932);
32. Hilbert G.E., Preparations of uracil-4-acetic and orotic acids. Orotic acid as the possible intermediate in the synthesis of purines from histidine. *J. Am. Chem. Soc.* 54, 2076 (1932);
33. Atkinson M. R., Maguire M. H., Ralph R. K., Shaw G., Warrenner R.

- N.; „Purines, Pyrimidines and Glyoxalines. Part V. New Syntheses of Uracils and Orotic Acids”, *J. Chem. Soc.* 2363-2368 (1957);
34. Nyc J. F., Mitchell H. K.; Synthesis of orotic acid from aspartic acid; *J. Am. Chem. Soc.* 69, 1382 (1947);
  35. Bruce J. M., Butler A. R., Russell K. V.; Formation of N-Carbamoylaspartic Acid and its cyclisation to orotic acid; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 319 (1994);
  36. Ivin B. A., Djaczkov A. I., Rutkovski G. B., Soczilin E. G.; Nowy sposób połączenia orotowej i 2-tioorotowej kislót; *Žurnal Org. Chīmii* 12(8), 1836 (1976); *J. Org. Chem. USSR* (Engl. Transl.) 12, 1802 (1976);
  37. Rambacher P., Mäke S.; Process for preparing orotic acid; US Patent 4,062,847 (1977);
  38. Bachstsz M., Thioorotic acid (2-thiouracil-4(6)-carboxylic acid); *Berichte* 64, 322 (1930);
  39. Fox J. J., Yung N., Wempen I.; Spectrophotometric studies of nucleic acid derivatives and related compounds as a function of pH. IV. On the structure of orotidine. A study of N-methylated orotic acids; *Biochim. Biophys. Acta* 23, 293 (1957);
  40. Silverman R. B., Groziak M. P.; Model chemistry for covalent mechanism of action of orotidine 5'-phosphate decarboxylase; *J. Am. Chem. Soc.* 104, 6434-6439 (1982);
  41. Phillips L. M., Lee J. K.; Theoretical studies of mechanisms and kinetic isotope effects on the decarboxylation of orotic acid and derivatives; *J. Am. Chem. Soc.* 123, 12067 (2001);
  42. Ross L. O., Goodman L., Baker B. R.; Potential Anticancer Agents. XLIV. Some derivatives of Uracil-5- and -6-carboxylic acid; *J. Org. Chem.* 25 (11), 1950-5 (1960);
  43. Gershon H.; Pyrimidines. II. Chlorinated pyrimidines derived from orotic acid; *J. Org. Chem.* 27, 3507 (1962);
  44. Crosby D. G., Berthold R. V.; Orotylamino acids; *J. Med. Chem.* 6, 334 (1963);
  45. Vanderhaeghe H.; The preparation of orotic acid and several derivatives; *Bull. Soc. Chim. Belg.*; 62, 611 (1953);
  46. Falk M., Luecke L.; Transport of substances through lipid membranes. Part 11. Effect of esterification on the dissociation and permeation of orotic acid; *Pharmazie* 44, 9, 647 (1989);
  47. Botta M., Saladino R., Lamba D., Nicoletti R.; Researches on anti-viral agents .31. Synthesis and transformations of racemic and chiral 6-oxiranyl pyrimidinones; *Tetrahedron* 49, 27, 6053 (1993);

48. Ti J-S., Steinfeld A. S., Naider F., Gulumoglu A., Lewis S. V., Becker J. M.; Anticandidal Activity of pyrimidine-peptide conjugates; *J. Med. Chem.* 23, 913-918 (1980);
49. Hausch F., Jaeschke A.; Multifunctional dinucleotide analogs for the generation of complex RNA conjugates; *Tetrahedron* 57, 7, 1261-68 (2001);
50. Jaeschke A., Fuerste J. P., Cech D., Erdmann V. A.; Automated incorporation of polyethylene glycol into synthetic oligonucleotides; *Tetrahedron Lett.* 34, 301 (1993);
51. Łapucha A.; A rapid and efficient synthesis of sulfur analogues of pyrimidine bases; *Synthesis* 3, 256 (1987);
52. Dodin G., Dubois J.-E.; Tautomerism of orotic acid dianion, *J. Am. Chem. Soc.* 102, 9, 3049(1980);
53. Deady L.W.; Substituent effects in non-aromatic nitrogen heterocycles: alkaline hydrolysis of methyl N-methyl(oxo)dihydropyrimidine carboxylates and diaza analogs; *Aust. J. Chem.* 38, 4, 637-41 (1985);
54. Curran W. V., Angier R. B.; The synthesis of orotidine and its isomer, 3-β-D-ribofuranosylorotic acid and the methylation of orotic acid, *J. Org. Chem.* 31, 201 (1966);
55. Kundu N. G., Hertzberg R. P., Schmitz S. A., Khatri S. G., Kunda N. G., Sikdar S.; Studies on uracil derivatives and analogs. Part 8. A noncatalytic method for the conversion of uracil derivatives into dihydrouracil derivatives; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1;* (7) 1295 (1985);
56. Botta M., Saladino R., Gentile G., Summa V., Nicoletti R., Verri A., Focher F., Spadari S.; Researches on antiviral agents. 4<sup>1</sup>. Studies on the chemistry of 6-methyl-2-methoxy-4-O-acyloxy and 6-methyl-2,4-di-O-acyloxy pyrimidine derivatives as new acylation reagents and inhibitors of uracil DNA glycosylases; *Tetrahedron*; 50; 11, 3603-3618 (1994);
57. Johnson T. B., Chlorination of 2,4-diketotetrahydropyrimidines by action of a mixture of superoxol and hydrochloric acid; *J. Am. Chem. Soc.* 65, 1218 (1943);
58. Crosby D. G., Berthold R. V., 5-Bromoorotic acid, *J. Org. Chem.*; 23, 1377 (1958);
59. Das B., Kundu N. G.; An efficient method for the iodination of C<sub>5</sub>-position of dialkoxy pyrimidines and uracil derivatives; *Synth. Commun.* 18(8), 855-867 (1988);
60. Behrend R.; Roosen O.; Synthese der Harnsaeure, *Justus Liebigs Ann. Chem.* 251; 238. (1889);
61. Fischer F. G.; Roch J.; Pyrimidinopyrimidines. I. Tetrahydroxy-homopurine and trihydroxy-homopurine, two "ring homologs of uric acid and



- xanthine; *Justus Liebigs Ann. Chem.*; 572; 217 (1951);
62. Clark J.; Ramage G. R.; Glyoxalinopyrimidines. Part II.; *J. Chem. Soc.*; 2821 (1958);
  63. Cline R. E., Fink R. M., Fink K.; Synthesis of 5-substituted pyrimidines via formaldehyde addition; *J. Am. Chem. Soc.* 81, 2521 (1959);
  64. Kim J. N., Ryu E. K.; The reaction of 2,6-dichlorobenzonitrile oxide with pyrimidine derivatives; *Heterocycles* 34, 7, 1423 (1992);
  65. Daves G. D., Baiocchi F., Robins R. K., Cheng C. C.; Pyrimidines. II. Orotic acid analogs; *J. Org. Chem.* 26, 2755 (1961);
  66. Pandey G. S., Nigam P. C., Agarwala U.; Complexing behaviour of 2-thioorotic acid. Complexes of nickel(II), palladium(II), platinum(II) and rhodium(I); *J. Inorg. Nucl. Chem.* 39(10), 1877 (1977); doi: 10.1016/0022-1902(77)80226-1;
  67. Wyrzykiewicz E., Bartkowiak G., Nowakowska Z., Kędzia B.; Synthesis and antimicrobial properties of S-substituted derivatives of 2-thiou-racil; *Farmaco* 48, 979 (1993);
  68. Wyrzykiewicz E., Bartkowiak G.; Alkylation in electron-impact mass spectrometry of hydrobromides of 2-alkylthioorotic acids; *Org. Mass Spectrom.* 29(1), 50 (1994); doi: 10.1002/oms.1210290109;
  69. Bartkowiak G.; Differentiation of 2-alkylthioorotic acids, methyl and ethyl 2-alkylthioorotates and hydrazides of 2-alkylthioorotic acids by using electron ionization mass spectra; *Eur. J. Mass Spectrom.* 14, 27 (2008); doi: 10.1255/ejms.906;
  70. Wyrzykiewicz E., Bartkowiak G.; EIMS and <sup>13</sup>C NMR study of new ortho (meta nad para) substituted derivatives of 2-benzylthioorotic acids; *Pol. J. Chem.* 69, 566 (1995);
  71. Lieberman I.; Kornberg A.; Enzymic synthesis and breakdown of a pyrimidine, orotic acid. I. Dihydroorotic dehydrogenase; *Biochem. Biophys. Acta*; 12; 223 (1953);
  72. Batt R. D., Martin J. K., Ploeser J. McT., Murray J.; Chemistry of the dihydropyrimidines. Ultraviolet spectra and alkaline decomposition; *J. Am. Chem. Soc.*; 76; 3663 (1954);
  73. Snikeris D., Stankevics E., Duburs G.; Derivatives of 2,6-dihydroxy-4,5-dihydropyrimidines. I. DL-4,5-Dihydroorotic acid, its methyl derivatives and salts; *Chem. Heterocycl. Compd. (Engl. Transl.)*; 4; 496 (1970); *Khim. Geterotsykl. Soedin*; 4; 536 (1970);
  74. M'Boungou R., Petit-Ramel M., Thomas-David G., Perichet G., Pouyet B.; Interactions du Cu(II), du Hg(II) et du Pt(II) avec les formes monomères et dimères de la thymine, de la thymidine et de l'acide orotique; *Can. J. Chem.* 65, 1479-1484 (1987);

75. Ozerov A. A., Novikov M. S., Brel' A. K., Andreeva, O. T.; Vladykov G. V.; Boreko E. I., Korobchenko L. V., Vervetchenko S. G.; Synthesis and antiviral activity of new unsaturated pyrimidine acyclonucleosides; *Pharm.Chem.J.(Engl.Transl.)*; 25; 8; 560 (1991); *Khim. Farm. Zh.*; 25; 8; 44 (1991);
76. Yesilel O. Z., Kastas G., Büyükgüngör O.; The novel polymeric potassium complex with a new coordination mode of orotic acid  $[K_9\mu_5\text{-H}_2\text{Or})(\mu\text{-H}_2\text{O})_n]$ ; Synthesis and structural characterization; *Inorg. Chem. Commun.* 10, 936 (2007);
77. Köse D. A., Zümreoglu-Karan B., Sahin O., Büyükgüngör O.; Transition metal(II) complexes of vitamin B<sub>13</sub> with monodentate orotate(1-) ligands; *J. Mol. Struct.* 789, 147 (2006);
78. Darensbourg D. J., Draper J. D., Larkins D. L., Frost B. J., Reibenspies J. H.; Organometallic derivatives of orotic acid; *Inorg. Chem.* 37(10), 2538 (1998);
79. Yesilel O. Z., Olmez H., Icbudak H.; Orotic acid complexes of Co(II), Ni(II), Zn(II) and Cd(II) with imidazole: Syntheses, spectroscopic and thermal studies; *J. Therm. Anal. Calorim.* 89, 2, 555 (2007);
80. Michalska D., Hernik K., Wysokiński R., Morzyk-Ociepa B., Pietraszko A.; Copper(II)- $\pi$  interaction in *cis*-[Cu(orotato)(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] and the crystal structure of [Cu(orotato)(H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>] $\cdot$ H<sub>2</sub>O: X-ray, vibrational spectroscopy and density functional study; *Polyhedron* 26, 4303 (2007);
81. Hacht B., Tayaa H., Benayad A., Mimouni M.; A potentiometric and spectroscopic investigation of copper(II)- and zinc(II)-orotate complex equilibria under physiological conditions; *J. Solution Chem.* 31, 9, 757–769 (2002);
82. Sabat M., Zglinska D., Jeżowska-Trzebiatowska B.; Tetraaquarotatonickel(II) monohydrate; *Acta Cryst.* (1980), B36, 1187-1188;
83. Köse D. A., Zümreoglu-Karan B., Kosar B., Büyükgüngör O.; Diaquabis(phen)Ni(II) complex with vitamin B<sub>13</sub> counter-ions; *J. Chem. Crystallography* 38 (4) (2008) 305-309;
84. Yesilel O. Z., Olmez H., Arici C.; The first bis(orotato-N,O) cadmium complex with monodentate protonated ethylenediamine ligands. Synthesis, spectrothermal properties of a cadmium(II)-orotato with ethylenediamine – Crystal structure of *trans*-[Cd(HOr)<sub>2</sub>(enH)<sub>2</sub>] $\cdot$ 2H<sub>2</sub>O and *cis*-[Cd(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>(phen)<sub>2</sub>](H<sub>2</sub>Or)<sub>2</sub> $\cdot$ H<sub>2</sub>O; *Polyhedron* 26, 14 (2007) 3667-3674;
85. Solin T., Matsumoto K., Fuwa K.; The crystal structure of *cis*-diammine(orotinato)platinum(II); *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 54 (1981) 3731-3734;
86. Li X., Cao R., Sun D. F., Shi Q., Hong M. C., Liang Y. C.; Hydrother-

- mal synthesis and structural characterization of a novel gadolinium(III) coordination polymer  $[Gd(Hdtpc)(OH)(H_2O)]_n$ ; *Inorg. Chem. Commun.* 5, 589-591(2002);
87. Li X., Cao R., Sun D. F., Shi Q., Bi W.H., Hong M. C.; A novel Sm-Co polymeric complex formed via metal-mediated oxidation-hydrolysis of orotic acid in a hydrothermal reaction; *Inorg. Chem. Commun.* 6, 815 (2003);
  88. Wu A-Q., Zheng F-K., Liu X., Guo G-C., Cai L-Z., Dong Z-C., Takano Y., Huang J-S.; A novel bi-layered samarium complex with an unprecedented coordination mode of orotic acid  $[Sm_2(HL)_2(ox)(H_2O)_2] \cdot 2.5nH_2O$  ( $H_3L$  = orotic acid,  $ox^{2-}$  = oxalate<sup>2-</sup>): Synthesis, crystal structure and physical properties; *Inorg. Chem. Commun.* 9, 347-350(2006);
  89. Pasquali P., Landi L., Caldarera C. M., Marchetti M.; Effects of orotic acid on dihydrofolate dehydrogenase and on tetrahydrofolate-dependent enzymes in the chick liver; *Biochim. Biophys. Acta* 158(3), 482-4 (1968);
  90. Rundles R. W., Brewer S. S. Jr; Haematologic responses in pernicious anaemia to orotic acid; *Blood* 13(2), 99-115 (1958);
  91. Rundles R. W., Brewer S. S. Jr; Haematologic responses in pernicious anaemia to orotic acid; *Blood* 13(2), 99-115 (1958);
  92. Wohlhueter R. M., McIvor R. S., Plagemann P. G.; Facilitated transport of uracil and 5-fluorouracil, and permeation of orotic acid into cultured mammalian cells; *J. Cell Physiol.* 104(3), 309-319 (1980);
  93. Nieper H. A.; The anti-inflammatory and immune-inhibiting effects of calcium orotate on bradytrophic tissues. *Aggressologie* 10 (4), 349-357, 1969;
  94. Patent WO/2008/016711: Compositions et procédés de réduction des taux tissulaires de médicaments de l'administration sous forme de dérivés d'orotate (Compositions and methods of reducing tissue levels of drugs when given as orotate derivatives) Karmali R. A., Savvipharm Inc. ;
  95. <http://www.mic-d.com/gallery/polarized/oroticacid1.html>.



## Rozdział IX

### **Badanie oddziaływań między receptorami boronowymi a cukrami metodami absorpcyjnymi i fluorescencyjnymi**

Anna Żubrowska, Kamil Żukowski, Agnieszka Adamczyk-Woźniak,  
Alicja Filipowicz-Szymańska, Andrzej Sporzyński  
*Wydział Chemiczny Politechniki Warszawskiej, Noakowskiego 3,  
00-664 Warszawa*

#### **1. Wprowadzenie**

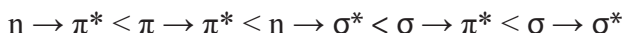
Prowadzone w ostatnich dekadach badania nad syntezą nowych receptorów molekularnych cukrów wymagają szybkich i wiarygodnych metod oceny oddziaływania między tymi związkami. Jeszcze ważniejsze jest zagadnienie opracowania tanich i prostych sensorów cukrów. Pośród metod detekcji wyróżniają się metody absorpcji UV-VIS oraz metody fluorescencyjne ze względu na ich dużą czułość, dostępność spektrometrów oraz możliwość łatwego ciągłego monitorowania z użyciem włókien optycznych. Obecne opracowanie jest omówieniem podstaw absorpcji i fluorescencji oraz zastosowania tych metod do badania oddziaływań między przykładowymi związkami boru a cukrami. Systematycznemu omówieniu receptorów boronowych, wpływowi ich budowy na selektywność wiązania cukrów oraz przeglądowi innych metod badawczych były poświęcone wcześniejsze opracowania [1,2].

#### **2. Spektrofotometria UV-Vis**

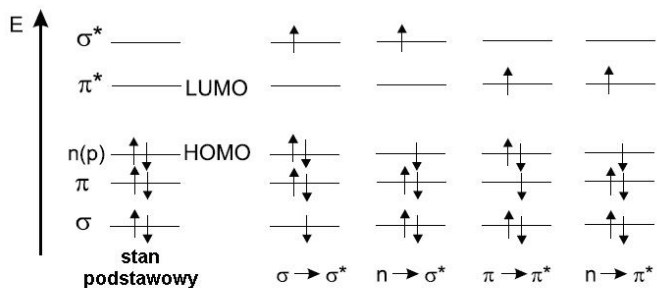
Promieniowanie elektromagnetyczne przechodząc przez dany ośrodek może ulec różnym zjawiskom: absorpcji, odbiciu i rozproszeniu. W metodach spektrofotometrycznych wykorzystuje się absorpcję promieniowania. Aby zaszło to zjawisko, energia padającego promieniowania musi odpowiadać różnicy energii poziomów elektronowych danej cząsteczki (elektrony pochłaniającej cząsteczki zostają przeniesione ze stanu podstawowego do stanu wzbudzonego). W wyniku tej przemiany ulega zmianie energia elektronowa cząsteczki, co powoduje rów-

niez zmianę energii oscylacyjnej i rotacyjnej. Budowa elektronowa cząsteczki (ilość i rodzaj wiązań) ma decydujący wpływ na energię pochłoniętych kwantów.

Wiązanie  $\sigma$  może zostać utworzone w wyniku czołowego nałożenia się dwóch orbitali s, lub jednego orbitala s i jednego p, lub z dwóch równoległych względem siebie orbitali p. Natomiast wiązanie  $\pi$  powstaje w wyniku bocznego nakładania się orbitali. W wyniku absorpcji promieniowania o odpowiedniej energii jeden z elektronów tworzących wiązanie  $\sigma$  lub  $\pi$  może ulec wzbudzeniu, przy czym wzbudzenie elektronów tworzących wiązanie  $\sigma$  wymaga o wiele większej energii (absorpcja w zakresie dalekiego UV). W cząsteczkach mogą się również znajdować niewiążące elektrony zlokalizowane na heteroatomach, takich jak tlen czy azot (orbitale, na których znajdują się te elektrony oznaczane są jako n). Poniżej zestawiono przemiany według wzrastającej energii:



Na rysunku 1 przedstawiono możliwe przejścia, na przykładzie acetonu.



Rysunek 1. Obsadzenie poziomów energetycznych w cząsteczce acetonu.

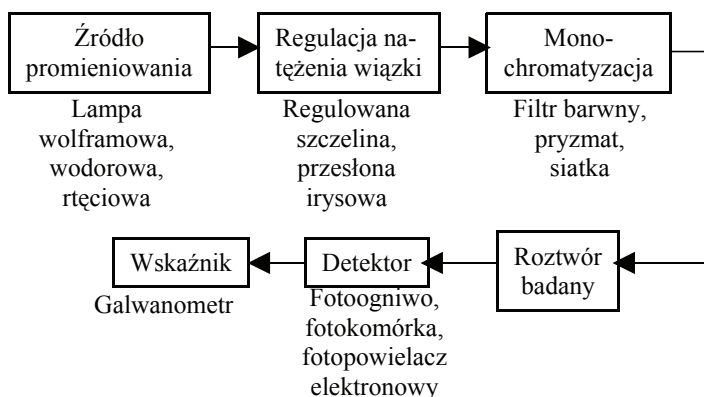
W przypadku spektroskopii absorpcyjnej i fluorescencyjnej duże znaczenie mają dwa poziomy energetyczne oznaczane jako HOMO (ang. the Highest Occupied Molecular Orbital), czyli najwyższy zajęty orbital molekularny, oraz LUMO (ang. the Lowest Unoccupied Molecular Orbital), czyli najniższy niezajęty orbital molekularny. Oba te poziomy charakteryzują stan podstawowy cząsteczki.

Do najczęściej stosowanych metod instrumentalnych należą metody spektroskopowe. Wśród nich czołowe miejsce zajmuje spektrofotometria absorpcyjna, zwłaszcza w zakresie promieniowania widzialnego (VIS, kolorymetria). Popularność tej metody wynika z:

- prostej techniki pomiarowej,
- stosowania nieskomplikowanej i dość taniej aparatury,
- dużego zakresu stężeń oznaczanych składników – od makroilości (spektrofotometria różnicowa) do zawartości śladowych rzędu ppm,
- wysokiej uniwersalności i precyzji.

Spektrofotometria w nadfiolecie ma mniejsze zastosowanie niż kolorymetria. Stosuje się ją głównie do oznaczania związków organicznych, zwłaszcza aromatycznych, a także alifatycznych o podwójnym wiązaniu.

Między spektrofotometrią w świetle widzialnym i nadfiolecie nie ma istotnych różnic teoretycznych ani aparaturowych. Poniżej przedstawiono schemat blokowy spektrofotometru (Rys. 2).



Rysunek 2. Schemat blokowy spektrofotometru

Źródłem promieniowania w zakresie widzialnym jest lampa z elektrycznie żarzoną włóknem wolframowym, która dostarcza wiązkę światła „białego” o widmie ciągłym i odpowiednim natężeniu. Natężenie wiązki reguluje się za pomocą przesłony irysowej lub regulowanej szczeliny. Wiązka promieniowania ulega monochromatyzacji promieniowania, czyli wydzieleniu ze światła złożonego promieniowania o określonej długości fali. Spektrofotometry są wyposażone w monochromator złożony z dwóch szczelin, wejściowej i wyjściowej oraz z elementu rozpraszającego światło (najczęściej siatki dyfrakcyjnej lub pryzmatu), który umożliwi otrzymanie światła praktycznie monochromatycznego (0,1 – 2 nm). Następnie wiązka przechodzi przez kuetę z badanym roztworem

i dalej pada na detektor, w wyniku czego powstaje prąd elektryczny. Natężenie powstałego prądu jest rejestrowane przez galwanometr.

Ze względu na dostępność aparatury oraz łatwość wykonania pomiarów spektroskopia absorpcyjna jest często stosowana do badania receptorów molekularnych, zwłaszcza w układach barwnych. Układy barwne stosowane do oznaczeń spektrofotometrycznych powinny mieć następujące właściwości:

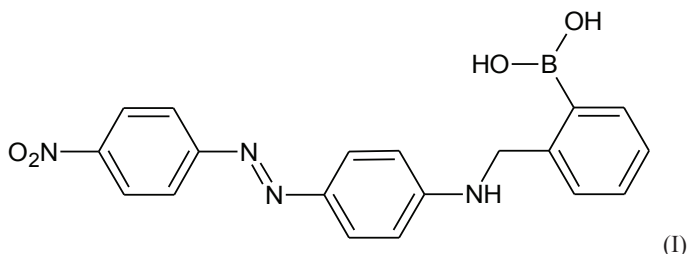
- duże natężenie zabarwienia, które jest warunkiem odpowiedniej czułości oznaczenia,
- trwałość zabarwienia,
- dobrą odtwarzalność zabarwienia,
- specyficzność lub selektywność.

Barwa związków chemicznych związana jest z teorią chromoforową, stworzoną przez Witta. Zgodnie z nią związki organiczne są barwne, a więc wykazują selektywną absorpcję światła (w zakresie promieniowania nadfioletowego oraz widzialnego), jeżeli zawierają grupy chromoforowe. Grupami chromoforowymi są nienasycone ugrupowania atomów lub układy sprzężonych wiązań podwójnych w cząsteczce związku organicznego. Przejścia elektronowe w grupach chromoforowych są ułatwione. Według teorii elektronowej przyczyną powstawania barwy jest wzbudzenie obecnego w tych grupach sprzężonego układu elektronów  $\pi$  (występujących w atomach z wielokrotnymi wiązaniami), które szczególnie łatwo ulegają wzbudzeniu. Aby związek był barwny, wystarcza obecność w cząsteczce jednego silnego chromoforu. Słabsze chromofory muszą występować w większej liczbie.

W ostatnich latach prowadzone są intensywne badania nad syntezą receptorów molekularnych cukrow - związków zawierających odpowiednie grupy chromoforowe, dzięki którym układy te pochłaniają promieniowanie elektromagnetyczne z zakresu widzialnego. Kwasy boronowe zmieniające barwę w wyniku związania diolu mają szerokie znaczenie praktyczne (zwłaszcza, jeżeli obserwowana zmiana barwy jest znacząca). Dąży się do otrzymania związku, którego zmiana barwy w wyniku związania cukru byłaby na tyle znaczna, aby możliwe stało się stworzenie papierka wskaźnikowego do wykrywania ważnych biologicznie cukrów np. glukozy (analogicznego do papierków wskaźnikowych pH).

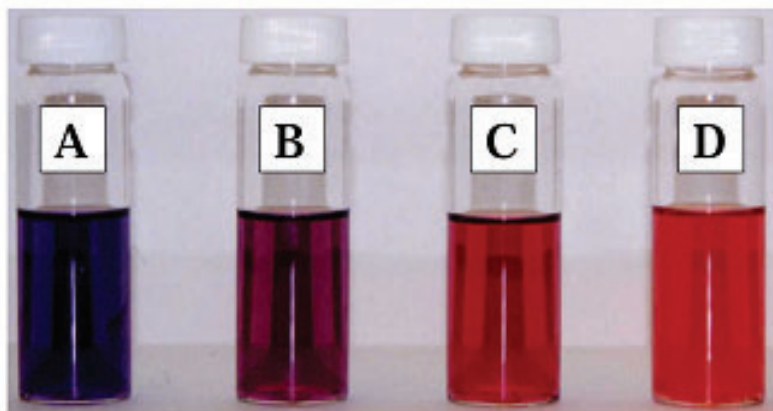
Pierwsze receptory barwne zmieniały barwę w obecności diolu tylko w roztworach o bardzo wysokim pH (powyżej 11). Przykład takiego receptora został przedstawiony na rysunku 3.





Rysunek 3. Barwnik azowy (I), zmieniający kolor w wyniku związania cukru [3].

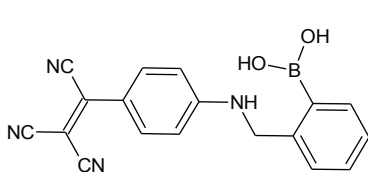
Dodanie cukru do roztworu związku (I) powoduje zmianę barwy z purpurowej na czerwoną (Rys. 4). Jednak zmiana zabarwienia jest obserwowana tylko w roztworze o pH=11,32, co czyni ten receptor całkowicie niepraktycznym.



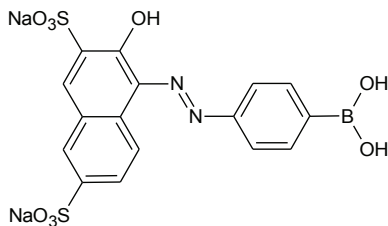
Rysunek 4. Zmiana zabarwienia roztworu związku (I) po dodaniu D-glukozy (A) roztwór związku (I) bez glukozy, (B) roztwór zawierający D-glukozę ( $0,339 \times 10^{-2} \text{ mol/dm}^3$ ), (C) roztwór zawierający D-glukozę ( $1,66 \times 10^{-2} \text{ mol/dm}^3$ ), roztwór zawierający D-glukozę ( $22,7 \times 10^{-2} \text{ mol/dm}^3$ ) [3].

Wprowadzenie do struktury receptorów grup elektroakceptorowych umożliwiło ich zastosowanie w roztworach o odczynie bliskim obojętnemu. Przykłady tego typu związków przedstawiono poniżej:

Materiały supramolekularne



(II)

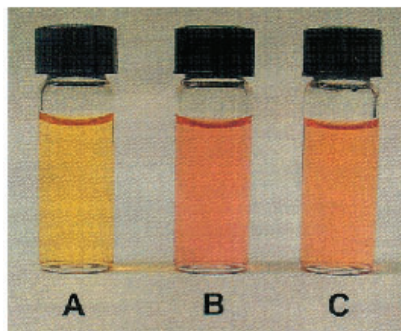


(III)

Rysunek 5. Receptory barwne (II i III), zmieniające barwę w wyniku dodania cukru w roztworze o pH bliskim obojętnemu.



Rysunek 6. Zmiana barwy po dodaniu D-fruktozy do roztworu receptora (II). Po lewej roztwór bez cukru, po prawej roztwór z cukrem.



Rysunek 7. Zmiana zabarwienia roztworu związku (III) : (A) bez cukru; (B) po dodaniu D-fruktozy; (C) po dodaniu D-glukozy.

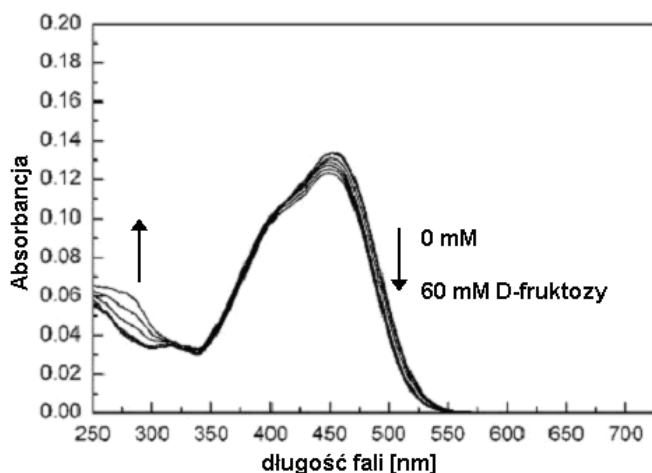
Badanie oddziaływań między receptorami boronowymi a cukrami metodami...

Jak widać na powyższych rysunkach, dodanie cukrów powoduje widoczną zmianę barwy:

- w przypadku związku (II) z purpurowej na różową [4]
- w przypadku związku (III) z żółtej na pomarańczową [5].

Kwasy boronowe, wykazujące zmianę barwy w wyniku związania diolu, są atrakcyjnymi receptorami cukrów z dwóch przyczyn. Po pierwsze obecność cukru może być określona przez wizualne rozpoznanie barwy, natomiast jego dokładne stężenie może zostać określone poprzez spektrofotometryczny pomiar absorpcji promieniowania widzialnego.

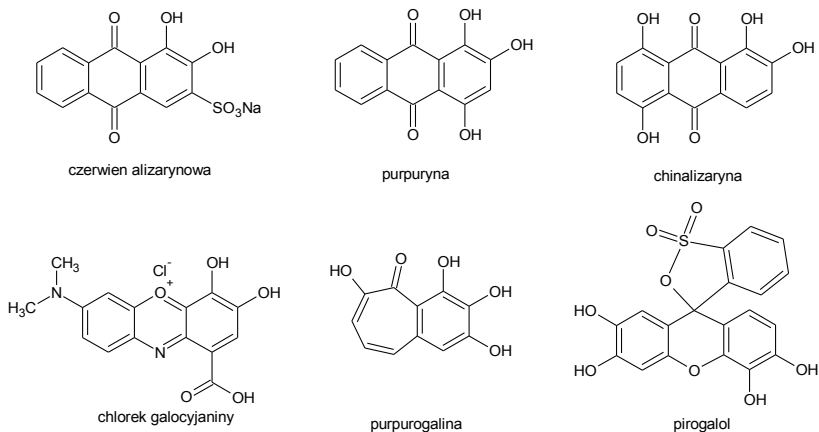
Badanie oddziaływań przedstawionych receptorów z cukrami wykonuje się przy pomocy miareczkowania spektrofotometrycznego. Do roztworu kwasu boronowego wprowadza się kolejne porcje diolu. Następnie rejestruje się widmo absorpcyjne. Przykład widm absorpcji promieniowania z zakresu widzialnego dla związku (III) przedstawiono na Rys. 8.



Rysunek 8. Miareczkowanie spektrofotometryczne kwasu boronowego (III) roztworem D-fruktozy.

Możliwe jest również badanie oddziaływania kwasów boronowych, które nie absorbują światła widzialnego. Realizuje się to w tzw. układach trójskładnikowych. Układ taki oprócz kwasu boronowego oraz diolu zawiera barwnik, odpowiedzialny za pochłanianie promieniowania elektromagnetycznego z zakresu widzialnego. Najczęściej stosowane barwniki w tego typu badaniach zostały przedstawione na Rys. 9.

## Materiały supramolekularne



Rysunek 9. Stosowane barwniki w układach trójskładnikowych, przy badaniu oddziaływań kwasów boronowych z diolami [6].

Jedną z wielkości służących do opisu reakcji chemicznej jest stała równowagi reakcji  $K_{eq}$ . Przez wiele lat stałe równowagi reakcji estryfikacji kwasów boronowych z cukrami wyznaczone były przy użyciu metody potencjometrycznej, na podstawie zmian pH roztworu. Jak się później okazało, przy pomocy tej metody wyznaczano tylko jedną ze składowych sumarycznej stałej równowagi reakcji (między tetragonalną formą kwasu boronowego a cukrem) [7, 8]. Wyznaczenie sumarycznej stałej równowagi reakcji jest możliwe poprzez przedstawione powyżej pomiary spektrofotometryczne.

Stałe równowagi reakcji barwnych kwasów boronowych z cukrami wyznacza się przy pomocy metody Benesiego-Hildebranda [9]. Podstawę tej metody stanowi równanie ogólne (1):

$$K_{eq} = \frac{[c]}{([S] - [c])([L] - [c])} \quad (1)$$

gdzie:  $[c]$  – stężenie kompleksu kwas boronowy – cukier

$([S] - [c])$  – stężenie niezwiązanego cukru

$([L] - [c])$  – stężenie niezwiązanego kwasu boronowego.

Ze względu na fakt, iż określenie stężenia kompleksu kwas boronowy – cukier nastęrczał wiele problemów wprowadzono molowy współczynnik ekstynkcji (2), który umożliwia eliminację niewygodnego stężenia kompleksu.

$$\varepsilon_0 = (\log A_0 / A) / [c] \cdot l \quad (2)$$

gdzie:  $\log A_0/A$  jest wartością absorbancji warstwy roztworu kompleksu kwas boronowy – cukier, o stężeniu  $[c]$  i grubości  $l$ .

Po przekształceniu tego równania (2) względem  $[c]$  i podstawieniu do równania (1), otrzymujemy następującą zależność (3):

$$\frac{[S] \cdot l}{\log A_0 / A} = \frac{1}{K_{eq} \varepsilon_0 [L]} + \frac{1}{\varepsilon_0} \quad (3)$$

Jest to równanie prostej o ogólnym wzorze  $y = ax + b$ , z którego można wyznaczyć  $K_{eq}$ .

### 3. Spektrofotometria fluorymetryczna [10]

Najczęściej stosowaną metodą badania oddziaływań receptor-analit jest spektrofotometria fluorescencyjna. Jedną z czołowych zalet tej techniki analitycznej jest wysoka czułość. Drugą zaletą tej metody jest bezpośrednia detekcja fluorescencji za pomocą odpowiedniego spektrofluorymetru umożliwiającego odpowiednie wzbudzenie i obserwację długości fali, oczywiście gdy mamy do czynienia z analitem fluorescencyjnym. Związków posiadających taką właściwość jest wiele: węglowodory aromatyczne, białka, chlorofile itp. W praktyce metoda ta jest stosowana w licznych badaniach takich jak np.: analiza zanieczyszczonej wody i powietrza, analiza leków, olejów, żywności, monitorowanie procesów przemysłowych czy analizy kryminologiczne. W przypadkach związków nie wykazujących fluorescencji stosuje się metody pośrednie:

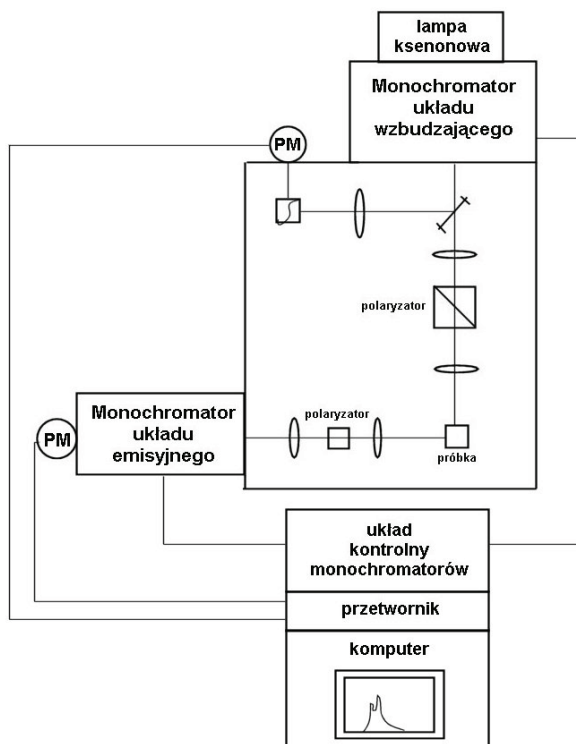
- derywatywacja, oparta jest na reakcji pomiędzy analitem i reagentem prowadzącej do otrzymania układu fluorescencyjnego; metoda ta jest powszechnie stosowana w biochemii i chemii klinicznej;
- metoda tworzenia kompleksu fluorescencyjnego; jest wykorzystywana do rozpoznawania jonów i cząstek;
- metoda gaszenia fluorescencji; jest wynikiem oddziaływania analitu z układem fluorescencyjnym. Metoda ta jest często używana do detekcji takich gazów jak  $O_2$  (rozpuszczonego w wodzie lub krwi),  $SO_2$ ,  $H_2S$ ,  $NH_4$ ,  $HCl$ ,  $Cl_2$ .

W badaniach fluorescencyjnych należy zwrócić uwagę na następujące zagadnienia, mogące być przyczyną błędów:

- występują zależności długości fali od: intensywności źródła światła, sprawności transmisji monochromatora, czułości detektora, co sprawia, iż korekcja widma emisyjnego i wzbudzenia emisji nie są łatwe;
- efekt polaryzacji światła padającego i emisji fluorescencji;
- możliwość zanieczyszczenia sygnału przez światło rozproszone (źródłem może być np. mętna próbka).

### 3.1 Zasada działania spektrofluorymetru

Rys. 10 przedstawia schemat tradycyjnego aparatu do pomiarów fluorescencji.



Rysunek 10. Schemat tradycyjnego spektrofluorymetru.

Źródło promieniowania wzbudzającego, monochromator, układ optyczny i detektor stanowią fundamentalne elementy tego urządzenia. Źródło promie-

niowania stanowią najczęściej: lampy ksenonowa, rtęciowa, wodorowa, deuterowa, halogenowa, wolframowa (ich widma promieniowania leżą w różnych obszarach spektralnych) lub laser. Monochromator umożliwia selekcję wiązki światła o odpowiedniej długości fali, a automatyczne przemieszczanie długości fali jest możliwe dzięki napędowi monochromatora, który jest kontrolowany przez urządzenia elektryczne i komputer. Fluorescencja jest gromadzona pod kątem prostym w odniesieniu do wiązki padającej i wykrywana bezpośrednio przez fotopowielacz (detektor). Moduł optyczny obejmuje takie elementy jak: uchwyt próbki, polaryzator, przegrody oraz zwierciadło półprzezroczyste, składające się z kwarcowej płytki odbijającej kilka procent wzbudzonej wiązki w kierunku kanału odniesienia, na który składa się fotodioda lub „licznik kwantowy”. Kanał odniesienia ma dwie podstawowe zalety:

- wyrównuje w czasie wahania lampy
- umożliwia korektę widma wzbudzenia.

„Licznik kwantowy”, składający się z kuwety zawierającej stężony roztwór barwnika, którego wydajność kwantowa fluorescencji nie zależy od wzbudzonej długości fali, jest ograniczony do zakresu długości fali absorbowanej przez barwnik, co czyni go bardziej pożądanym komponentem modułu optycznego od fotodiody.

## 3.2. Rodzaje pomiarów fluorescencyjnych

### 3.2.1. Badania widm emisji i wzbudzenia fluorescencji

Jednym z najczęściej stosowanych narzędzi do pomiarów fluorescencji jest rejestracja widm emisji i wzbudzenia fluorescencji. Uzyskujemy je przy zastosowaniu tradycyjnego spektrofluorymetru (Rys. 10), w którym źródło promieniowania stanowi lampa emitująca stały przepływ fotonów.

Podstawą, na której oparte są te pomiary, stanowi fakt iż intensywność fluorescencji  $I_F(\lambda_E, \lambda_F)$  jest proporcjonalna do natężenia wiązki padającej na próbkę i do wydajności fluorescencji  $\Phi_F$  zgodnie z równaniem:

$$I_F(\lambda_E, \lambda_F) = k F(\lambda_F) I_0(\lambda_E) \{1 - \exp[-2,3 \varepsilon(\lambda_E) l c]\} \quad (4)$$

gdzie:

$\lambda_E$  - długość fali wzbudzającej

$\lambda_F$  - długość fali obserwacji fluorescencji

$I_0$  - natężenie wiązki padającej na próbkę

$\varepsilon(\lambda_E)$  - molowy współczynnik absorpcji przy wzbudzającej długości fali

$l$  - długość drogi optycznej

$c$  - stężenie molowe

$F(\lambda_F)$  - wariacja intensywności fluorescencji w warunkach stacjonarnych do długości

$$f_{\text{fali}} \int F(\lambda_{\text{F}}) d\lambda_{\text{F}} = \Phi_{\text{F}}$$

$k$  - współczynnik, zależący od wielu parametrów (geometrii obserwacji, efektywności transmisji monochromatora, szerokości szczeliny monochromatora itp.).

Biorąc pod uwagę fakt, że intensywność fluorescencji jest proporcjonalna do stężenia tylko dla niskich absorbancji ( $A(\lambda_{\text{F}}) < 0,05$ ), otrzymujemy następującą formę zależności (4):

$$I_{\text{F}}(\lambda_{\text{E}}, \lambda_{\text{F}}) = 2,3 k F(\lambda_{\text{F}}) I_0(\lambda_{\text{E}}) \varepsilon(\lambda_{\text{E}}) l c \quad (5)$$

W celu uzyskania widm wzbudzenia monochromator emisyjny ustawiamy na określoną długość fali w zakresie fluorescencji ( $\lambda_{\text{F}} = \text{const.}$ ), natomiast monochromator wzbudzający przemiata długość fali promieniowania wzbudzającego ( $\lambda_{\text{E}} = \text{zmienna}$ ). Widmo emisyjne stanowi odwrotną sytuację: na określoną długość fali absorbowanej przez próbkę ustawiony jest monochromator wzbudzający ( $\lambda_{\text{E}} = \text{const.}$ ), natomiast monochromator emisyjny przemiata i analizuje emitowaną wiązkę ( $\lambda_{\text{F}} = \text{zmienna}$ ).

Zależność długości fali od wielu czynników zewnętrznych (np. natężenia światła) powoduje zniekształcenie widm. W celu uzyskania pomiarów o wysokiej dokładności konieczna jest ich odpowiednia korekta. W przypadku widma emisji elementami zaburzającymi pomiary są natężenie światła oraz efektywność transmisji monochromatora wzbudzającego. Rozwiązaniem jest rejestracja fluorescencyjnego sygnału z próbki jako funkcji wzbudzającej długości fali. W odniesieniu do widm emisji czynnikami zaburzającymi widma emisyjne są zależność długości fali od efektywności monochromatora emisyjnego i odpowiedzi fotopowielacza. Zastosowanie korygującej lampy wolframowej umożliwi korekcję widma.

Należy zaznaczyć, iż obecne spektrofluorymetry są zaopatrzone w niezbędne czynniki korygujące.

### 3.2.2. Pomiary wydajności kwantowej fluorescencji

Wydajność kwantowa fluorescencji to stosunek liczby wyemitowanych fotonów na drodze fluorescencji do ilości fotonów zaabsorbowanych. Wielkość ta nie zależy od długości fali światła wzbudzającego, ale zależy od temperatury (dlatego tak bardzo istotna jest kontrola temperatury próbki). Metoda pomiaru wydajności kwantowej fluorescencji jest metodą porównania ze standardem fluorescencyjnym spełniającym następujące warunki:

- wysoka czystość;



Badanie oddziaływań między receptorami boronowymi a cukrami metodami...

- fotochemiczna stabilność w roztworze i stanie stałym;
- znana wysoka kwantowa wydajność fluorescencji;
- szerokie widmo absorpcji i fluorescencji;
- niezależność widma fluorescencji i wydajności kwantowej od wzbudzającej długości fali;
- małe nakładanie pomiędzy widmami absorpcji i emisji;
- niespolaryzowana emisja.

Wielkość tę można przedstawić za pomocą poniższego wyrażenia (6):

$$\frac{\Phi_F}{\Phi_{FR}} = \frac{n^2}{n_R^2} \times \frac{\int_0^{\infty} I_F(\lambda_E, \lambda_F) d\lambda_F}{\int_0^{\infty} I_{FR}(\lambda_E, \lambda_F) d\lambda_F} \times \frac{1 - 10^{-A_R(\lambda_E)}}{1 - 10^{-A(\lambda_E)}} \quad (6)$$

( $n$  - współczynnik załamania światła konieczny w sytuacji gdy rozpuszczalnik stosowany do wzorca nie jest taki sam jak do badanego związku).

Kwantową wydajność fluorescencji możemy wyznaczyć przez porównanie scałkowanej postaci widma emisyjnego z analogiczną całką dla substancji wzorcowej, przy jednoczesnym pomiarze absorpcji substancji badanej i wzorca dla wzbudzającej długości fali.

### 3.2.3. Techniki detekcji umożliwiające określanie czasu życia fluorescencji

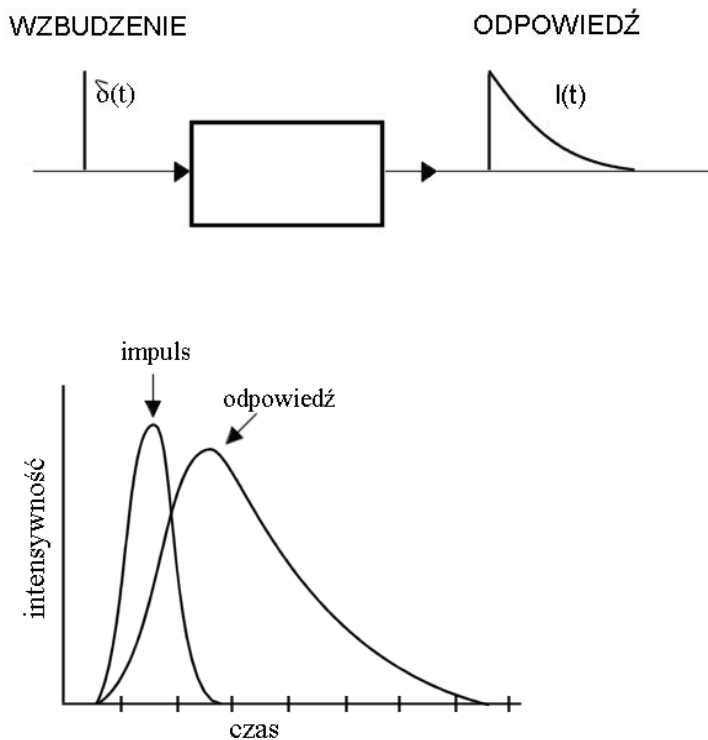
Dynamika stanu wzbudzonego jest podstawą do zrozumienia procesów fotochemicznych, fotobiologicznych czy fotofizycznych. Czynnikiem umożliwiającym śledzenie dynamiki interesujących nas procesów, w odróżnieniu od badania widm emisji i wzbudzenia fluorescencji, czy wyznaczania wydajności kwantowej, jest pomiar czasu życia fluorescencji, który można zdefiniować jako średnią wartość czasu, w którym cząstka pozostaje w stanie wzbudzonym przed jej powrotem do stanu podstawowego w wyniku fluorescencji.

Pomiar tego czynniki umożliwiają następujące metody:

1. fluorymetria pulsowa:
  - a) metoda pojedynczego zliczania impulsu (single-photon timing technique, SPT);
  - b) technika stroboskopowa;
  - c) inne;
2. fluorymetria modulowania fazowego:
  - a) metoda wykorzystująca ciągłe źródło światła i modulator elektrooptyczny;

b) metoda wykorzystująca laser pulsowy.

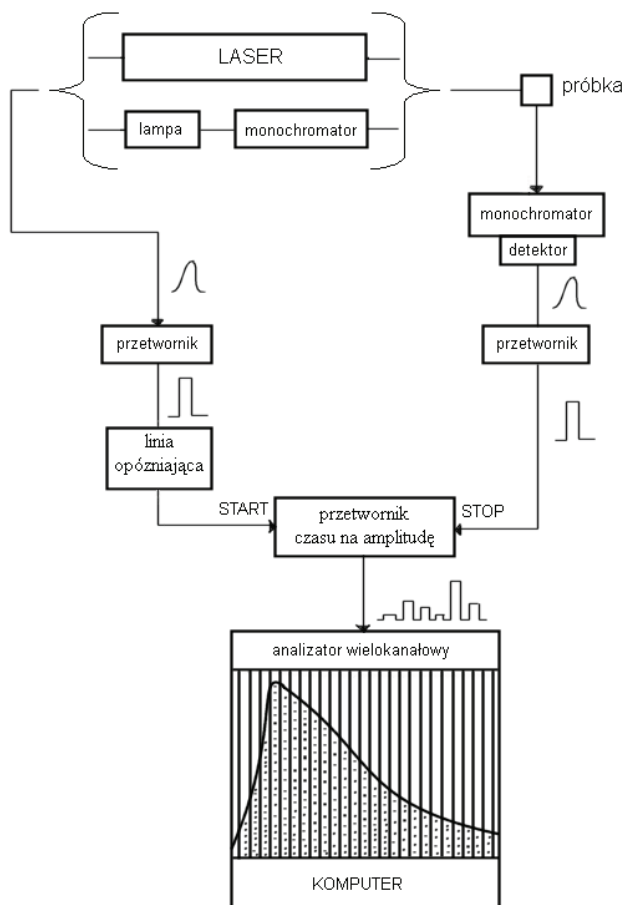
Podstawą fluorymetrii pulsowej jest wzbudzenie próbki przez krótkie impulsy światła i rejestracja odpowiedzi fluorescencji (zaniku intensywności fluorescencji) w czasie. Gdy czas trwania impulsu jest długi, w odniesieniu do stałego czasu rozkładu fluorescencji, odpowiedź fluorescencji stanowi splotowy produkt (impulsu i odpowiedzi) i analiza danych wymaga dekonwolucji (rozplotu) tych parametrów (Rys.11).



Rysunek 11. Schemat działania fluorymetrii pulsowej.

Większość urządzeń opartych na metodzie SPT wykorzystuje fakt, iż detekcja pojedynczego impulsu w czasie jest proporcjonalna do intensywności fluorescencji. Źródło promieniowania (lampa błyskowa lub laser) emituje impuls elektryczny 1, który jest generowany (np. przez fotodiode) i przeniesiony przez

rozróżniacz (dyskryminator) do przetwornika. Jednocześnie następuje wzbudzenie próbki i emisja fluorescencji, po czym odpowiedni impuls elektryczny 2 jest dostarczany do przetwornika. Wynikiem jest impuls wyjściowy, którego amplituda jest proporcjonalna do czasu rozkładu pomiędzy pulsem początkowym 1 i końcowym 2. Produktem końcowym analizy jest histogram przedstawiający krzywą rozkładu fluorescencji. Rys. 12 obrazuje schemat wyżej opisanego aparatu.

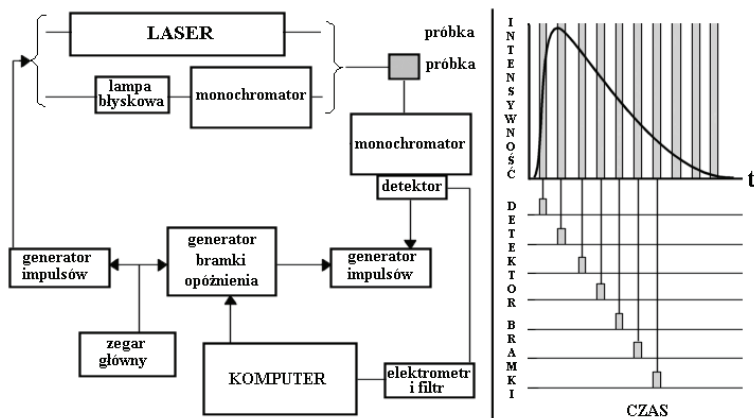


Rysunek 12. Schemat fluorymetru wykorzystującego technikę SPT.

Technikę SPT charakteryzują następujące walory:

- wysoka czułość;
- doskonały zakres dynamiki i liniowość;
- dobrze zdefiniowane dane statystyczne.

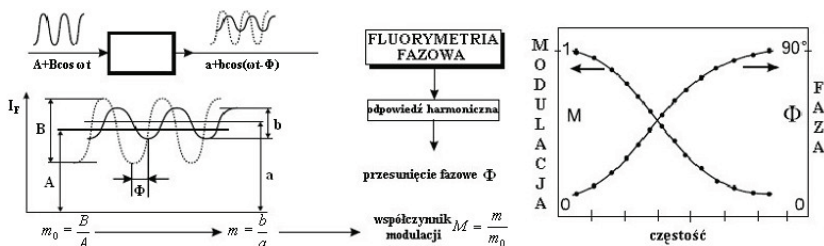
Ciekawą alternatywą do wyżej opisanej techniki jest metoda stroboskopowa. Opiera się ona na założeniu, iż wykrywane są tylko te fotony emitowane przez próbkę, które docierają do fotokatody fotopowielacza przez bramkę czasu. Bramkowanie fotopowielacza przez impuls napięcia w czasie odpowiedniego opóźnienia stosunku do impulsu światła jest możliwe przy zastosowaniu jednostki komputerowo kontrolowanego opóźnienia, natomiast synchronizację z lampą flesztową uzyskuje się przy zastosowaniu zegara głównego. Intensywność fluorescencji w funkcji czasu otrzymuje się poprzez przesunięcie okna czasu po każdym impulsie (od światła przed impulsem) do odpowiedniego czasu końcowego. Zaletą tej techniki jest brak konieczności stosowania drogiej elektroniki jak i źródła promieniowania o wysokiej częstotliwości ze względu na to, iż intensywność sygnału jest bezpośrednio proporcjonalna do intensywności impulsu światła. Na rysunku 13 przedstawiono schemat fluorymetru stosującego technikę stroboskopową.



Rysunek 13. Schemat fluorymetru wykorzystującego technikę stroboskopową.

Inną drogą pomiaru czasu życia fluorescencji jest wykorzystanie fluorimetrii modulowania fazowego. Ciekawostką jest, iż pierwszy fluorymetr do pomiaru czasu życia fluorescencji, zaprojektowany w 1962 roku przez Gaviała, oparty był właśnie na tej metodzie. Podstawą jej działania jest wzbudzenie próbki przez sinusoidalnie modulowane światło przy wysokiej częstotliwości. Po wzbudzeniu

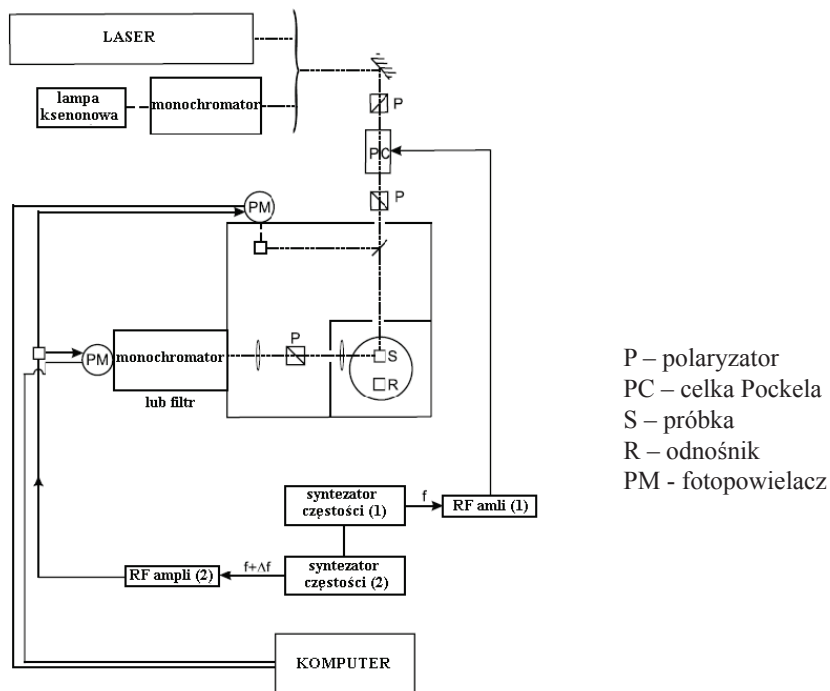
dzeniu światłem modulowanym odpowiedź fluorescencji ma tę samą częstotliwość modulacji i jest przesunięta w fazie. Harmoniczną odpowiedź systemu charakteryzują dwa parametry: przesunięcie fazowe  $\Phi$  i współczynnik modulacji  $M$  ( $m/m_0$ , stosunek współczynnika modulacji głębokości fluorescencji  $m$  do współczynnika modulacji głębokości wzbudzenia  $m_0$ ), są one mierzone jako funkcja częstotliwości modulacji. Innymi słowy, mierzy się różnicę faz światła wzbudzającego i fluorescencyjnego. Bezpośrednia analiza danych w obszarze częstości sprawia, iż dekonwolucja nie jest konieczna (Rys.14).



Rysunek 14. Schemat działania fluorymetrii modulowania fazowego.

Źródło promieniowania może stanowić lampa ksenonowa sprzężona z monochromatorem. Próbkę badaną i roztwór porównawczy umieszczone są w rotacyjnej wieżyczce. Nowym elementem jest celka Pockela (moduł optyczny), kierowana przez syntezytor częstości. Efektem jest modulowana przez zmienne napięcie katody wtórnej odpowiedź wychodząca z fotopowielacza, za pomocą innego syntezytora częstości sprzężonego w fazie z pierwszym. Oba syntezytory dostarczają różniących się częstością modulowanych sygnałów w celu osiągnięcia korelacji krzyżowej. Rysunek 15 prezentuje schemat fluorymetru modulowania fazowego.

Z wyżej przedstawionych informacji można wywnioskować, iż obie metody teoretycznie można uznać za równoważne. Z punktu widzenia oprzyrządowania są technikami wykorzystującymi aparaty podobnej generacji. Każda z nich ma swoje wady i zalety.



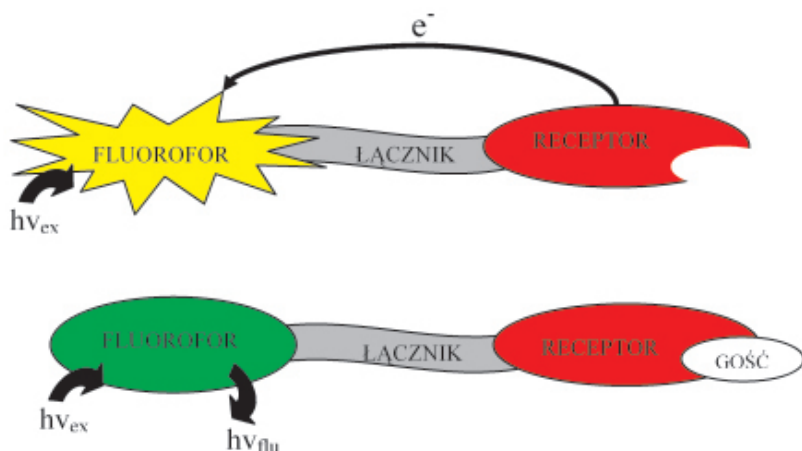
Rysunek 15. Fluorymetr modulowania fazowego z ciągłym źródłem promieniowania i modulatorem elektro-optycznym.

### 3.3. Przykład zastosowania pomiarów fluorymetrycznych do badania receptorów cukrów

Fluorescencyjne receptory boronowe w ostatnich latach cieszą się największym zainteresowaniem spośród wszystkich typów receptorów boronowych. Jest to spowodowane między innymi zaletami pomiarów fluorymetrycznych. Fluorescencja jest techniką bardzo czułą i wymaga małej ilości receptora ( $10^{-6}$  M). Jest wiele przykładów na to, że nawet pojedyncze cząsteczki mogą zostać wykryte tą techniką. Dodatkowo pomiar fluorymetryczny wywiera bardzo słaby wpływ na ludzki organizm, a w niektórych przypadkach wcale nie wywiera wpływu, zwłaszcza gdy jako źródła wzbudzenia zastosuje się promieniowanie z zakresu bliskiej podczerwieni. Dzięki tym właściwościom fluorymetria w połączeniu z receptorami boronowymi jest potencjalną metodą, w oparciu o którą można stworzyć całkowicie nieinwazyjny układ do oznaczania cukrów.

Większość grup badawczych zajmujących się tematyką kwasów boronowych jako receptorów cukrów skupia się na syntezie układów zawierających flu-

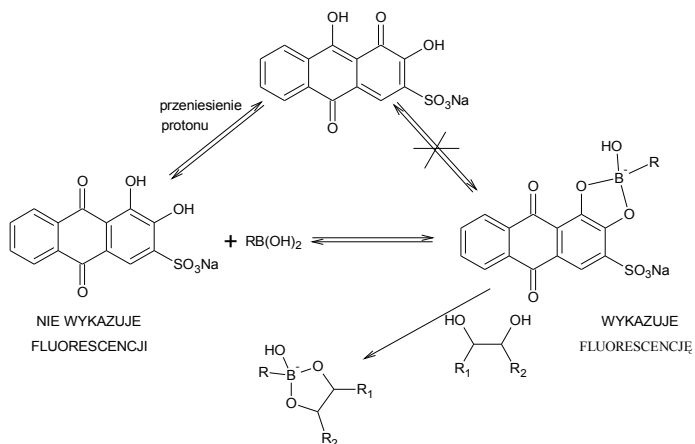
orofor jako integralny element cząsteczki receptora (receptory PET, ICT, FRET itp. [1]). Na rysunku 16 przedstawiono schemat budowy i działania receptorów PET.



Rysunek 16. Schemat budowy i działania receptora PET.

Badanie tego typu układów przeprowadza się w układzie dwuskładnikowym: receptor (kwas boronowy) oraz diol (cukier). Główną wadą takich układów jest dość skomplikowany proces projektowania oraz syntezy kwasów boronowych, które oprócz selektywności na dany cukier muszą także zmieniać swoje właściwości spektroskopowe w wyniku utworzenia estru. Istnieje duża grupa pochodnych kwasu fenyloboronowego, które w wyniku związania diolu nie zmieniają właściwości spektroskopowych lub ta zmiana jest bardzo mała. Jedynym sposobem zbadania oddziaływania tych związków z diolami jest przeprowadzenie reakcji estryfikacji w układzie trójskładnikowym. W skład tego układu wchodzi: kwas boronowy, barwnik (odpowiedzialny za konkretne właściwości spektroskopowe – pochłanianie lub emisja promieniowania) oraz diol. Powszechnie wykorzystywanym barwnikiem w tego typu pomiarach jest czerwień alizarynowa (ARS) [1, 11-13].

## Materiały supramolekularne

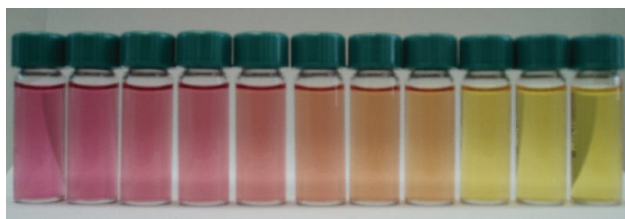


Rysunek 17. Reakcje zachodzące w układzie trójskładnikowym ARS – kwas boronowy – diol [1, 11].

Największą zaletą takiego układu jest możliwość zastosowania go do zbadania oddziaływania praktycznie wszystkich kwasów boronowych z diolami, a także wyznaczenie stałych równowagi tych reakcji w roztworach o różnym składzie i pH.

Układ trójskładnikowy umożliwia wyznaczenie stałej równowagi reakcji estryfikacji dwiema metodami. Jest to ważne zwłaszcza w przypadku pochodnych kwasu fenylboronowego, które nie wykazują fluorescencji, oraz których właściwości spektroskopowe nie zmieniają się w znaczący sposób w wyniku wprowadzenia diolu.

Wodny roztwór czerwieni alizarynowej posiada barwę purpurową i wykazuje jedynie słabą fluorescencję. Po wprowadzeniu kwasu boronowego do tego roztworu tworzy się kompleks kwasu boronowego z ARS, który jest barwy żółtej (rysunek 18).

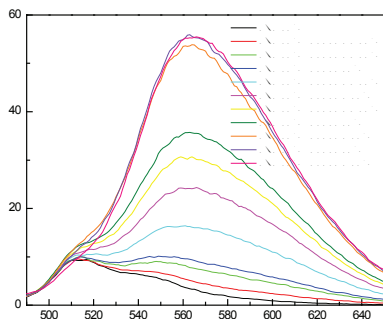


Rysunek 18. Zmiana barwy roztworu ARS w wyniku zwiększania stężenia kwasu 2-formylofenylboronowego [14].



W roztworze tym ustala się równowaga reakcji oznaczona jako  $K_{eq1}$ . Wprowadzenie diolu do tego roztworu powoduje ustalenie się drugiej równowagi reakcji między kwasem boronowym a diolem ( $K_{eq2}$ ), która jest konkurencyjna w stosunku do pierwszej równowagi reakcji. Roztwór staje się znowu purpurowy, w wyniku uwolnienia ARS z kompleksu.

W celu wyznaczenia stałej równowagi reakcji między kwasem boronowym a czerwienią alizarynową ( $K_{eq1}$ ) rejestruje się serię widm fluorescencyjnych dla roztworów o stałym stężeniu czerwieni alizarynowej oraz wzrastającym stężeniu kwasu boronowego. Rysunek 19 prezentuje serię widm fluorescencyjnych dla roztworów kwasu 2-formylofenyloboronowego z ARS.



Rysunek 19. Widma fluorescencyjne roztworów zawierających  $1 \times 10^{-4} M$  ARS o zmiennym stężeniu kwasu 2-formylofenyloboronowego. Widma zarejestrowano przy długości fali wzbudzenia  $\lambda_{ex} = 469 \text{ nm}$  [14].

Na podstawie uzyskanych w ten sposób danych wyznacza się stałą równowagi reakcji między kwasem boronowym i ARS. W tym celu wykorzystuje się modyfikację równania Benesiego-Hilderbranda, które ma postać:

$$\Delta I_f = \frac{(\Delta kp_0 K_{eq1})[L][I_0]}{1 + K_{eq1}[L]}$$

$$\Delta I_f = I - I_0$$

gdzie:  $I$  – intensywność fluorescencji dla konkretnego pomiaru

$I_0$  – intensywność fluorescencji dla wolnego ARS

$K_{eq1}$  – stała równowagi reakcji między kwasem boronowym a ARS

$[I_0]$  – całkowite stężenie barwnika (ARS)

$[L]$  – całkowite stężenie kwasu boronowego

Po przekształceniu otrzymuje się powyższe równanie w postaci:

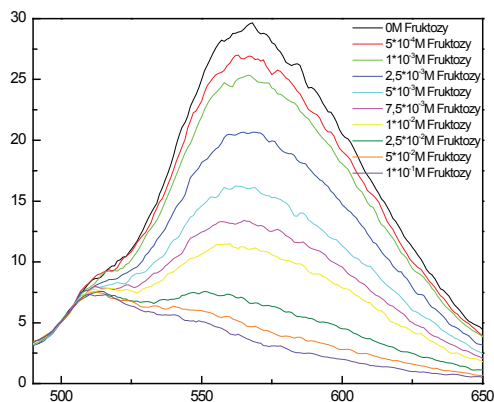
$$\frac{1}{\Delta I_f} = (\Delta kp_0 K_{eq1})^{-1} \frac{1}{[L]} + (\Delta kp_0 I_0)^{-1}$$

Otrzymane równanie jest równaniem liniowym typu:

$$y = ax + b$$

w którym zmiennymi są  $1/\Delta I_f$  oraz  $1/[L]$ . W celu wyznaczenia stałej równowagi  $K_{eq1}$  sporządza się wykres zależności  $1/\Delta I_f$  vs.  $1/[L]$ . Stała równowagi reakcji  $K_{eq1}$  między kwasem boronowym i ARS jest równa ilorazowi współczynników wyznaczonej prostej.

Kolejnym krokiem jest wyznaczenie stałej równowagi reakcji kwas boronowy – cukier. W tym celu przeprowadza się miareczkowanie spektrofluorymetryczne odpowiednim cukrem roztworu zawierającego kompleks kwasu boronowego z ARS. Po wprowadzeniu do roztworu kolejnych porcji cukru rejestruje się widmo fluorescencyjne (Rys. 20).



Rysunek 20. Miareczkowanie fluorescencyjne roztworu zawierającego  $1 \times 10^{-4}$  M ARS;  $1 \times 10^{-3}$  M kwasu 4-formylofenyloboronowego przy pomocy roztworu fruktozy [14].

W wyniku wprowadzania kolejnych porcji cukru do roztworu kwasu boronowego z ARS następuje stopniowe wygaszanie fluorescencji. Jest to spowodowane

wane rozpadaniem się kompleksu kwas boronowy – ARS (wykazującego fluorescencję) i powstawaniem na jego miejsce kompleksu kwas boronowy – cukier oraz wolnego barwnika, które nie wykazują fluorescencji.

W celu wyznaczenia stałej równowagi reakcji  $K_{eq}$  między kwasem boronowym a cukrem odczytuje się z widm zarejestrowanych podczas miareczkowania fluorescencyjnego maksymalnych intensywności fluorescencji. Do wyznaczenia tej stałej wykorzystuje się równanie:

$$\frac{[S_0]}{P} = \frac{K_{eq1}}{K_{eq}} Q + 1$$

gdzie:

$$P = [L_0] - \frac{1}{QK_{eq1}} - \frac{[I_0]}{Q + 1}$$
$$Q = \frac{[I]}{[IL]}$$

$[S_0]$  – stężenie cukru

$[I_0]$  – całkowite stężenie barwnika

$[I]$  – stężenie nie związanego barwnika (ARS)

$[IL]$  – stężenie kompleksu kw.boronowy – ARS

$K_{eq1}$  – stała równowagi reakcji między kwasem boronowym a ARS

$K_{eq}$  – stała równowagi reakcji między kwasem boronowym a cukrem

Następnie wyznacza się równanie prostej z zależności  $[S_0]/P$  w funkcji  $Q$ . Stałe równowagi reakcji  $K_{eq}$  pomiędzy kwasem boronowym a cukrem są równe ilorazowi stałej równowagi reakcji między kwasem boronowym a ARS ( $K_{eq1}$ ) i współczynnika kierunkowego wyznaczonych powyżej prostych.

### Podziękowania:

Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2006-2008 jako projekt badawczy rozwojowy nr R0501601.

### Literatura:

1. A. Sporzyński, A. Żubrowska, Kwasy aryloboronowe jako receptory cukrów, w: „*Syntetyczne receptory molekularne*”, Praca zbiorowa pod red. G. Schroedera, Betagraf, Poznań, **2007**;

2. A. Sporzyński, A. Żubrowska, A. Adamczyk-Woźniak, Synthesis of boronic acids – molecular receptors for sugars, w: „*Synthetic receptors in molecular recognition*”, Praca zbiorowa pod red. V.I. Rybachenki, Schidnyj Wydawnyczyj Dim, Donieck, Ukraina, **2007**;
3. C. Ward, P. Patel, P. Ashton, T. James, *Chem. Commun.*, **2000**, 229;
4. C. Ward, P. Patel, P. Ashton, T. James, *Chem. Commun.*, **2002**, 462;
5. N. DiCesare, J. Lakowicz, *Org. Lett.*, **2001**, 3, 3891;
6. T. Hoeg-Jensen, *QSAR Comb. Sci.*, **2004**, 23, 344;
7. H. Fang, G. Kaur, B. Wang, *J. Fluoresc.*, **2004**, 14, 481;
8. G. Springsteen, B. Wang, *Tetrahedron*, **2002**, 58, 5291;
9. H. A. Benesi, J. H. Hildebrand, *J. Am. Chem. Soc.*, **1949**, 71, 2703;
10. B. Valeur, „*Molecular Fluorescence Principles and Applications*”, Wiley-VCH, **2001**;
11. G. Springsteen, B. Wang, *Chem. Comm.*, **2001**, 1608;
12. G. Springsteen, B. Wang, *Tetrahedron*, **2002**, 58, 5291;
13. J. Yan, G. Springsteen, S. Deeter, B. Wang, *Tetrahedron*, **2004**, 60, 11205;
14. K. Żukowski, „Badania reakcji estryfikacji cukrów kwasami boronowymi w miniaturowych układach”, Praca magisterska, Politechnika Warszawska, 2007.

## Rozdział X

### **Techniki spektroskopii ramanowskiej: mapowanie ramanowskie Wybrane przykłady niedestrukcyjnej analizy chemicznej związków bioaktywnych**

Małgorzata Barańska

*Wydział Chemii, Uniwersytet Jagielloński, ul. Ingardena 3,  
30-060 Kraków*

#### **1. Wstęp**

Szereg składników roślinnych odgrywa ważną rolę zarówno z dietetycznego punktu widzenia jak i wchodzi w skład różnego rodzaju leków i preparatów farmaceutycznych. Przeciwutleniające, cenne związki występujące w owocach i warzywach, są istotnym czynnikiem obniżającym ryzyko wystąpienia różnych rodzajów raka i chorób niedokrwienia serca. W grupie tej można wyróżnić karotenoidy i flawonoidy, które jako naturalne koloranty określają również estetyczną wartość produktów roślinnych. Z kolei alkaloidy mogą wywoływać różne efekty na organizm ludzki, np. kofeina jest łagodnym stymulantem centralnego układu nerwowego i w efekcie może wpływać na nasze zachowanie.

Środki farmaceutyczne pochodzenia roślinnego są powszechnie dostępne i od tysięcy lat odgrywają znaczącą rolę zarówno w profilaktyce jak i terapii wielu chorób. Ogromne zapotrzebowanie na preparaty roślinopochodne sprawia, że są one niejednokrotnie produkowane z materiału o niskiej jakości, co ma negatywny wpływ na produkt końcowy, którego działanie nie przynosi pożądaných efektów. Dlatego poszukuje się szybkich i dokładnych metod, które łatwo mogą być stosowane do kontroli jakości zarówno nieprzetworzonego materiału roślinnego jak i końcowego produktu przeznaczonego do konsumpcji. Metody analityczne takie jak chromatografia gazowa (GC) czy wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC), obecnie stosowane do badania jakości oraz selekcji wysokiej jakości roślin do produkcji leków, preparatów leczniczych i żywności, wymagają

długiego czasu analizy i dlatego też poszukiwane są inne, alternatywne metody. Ponadto izolacja związków bioaktywnych z materiału roślinnego może powodować ich modyfikacje strukturalne lub tworzenie się różnych odmian polimorficznych, a tym samym wpływać na ich reaktywność oraz zdolność do wiązania się z innymi substancjami.

## 2. Metodyka

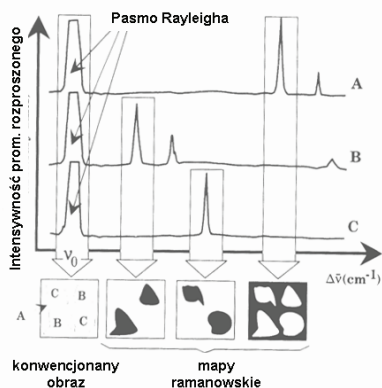
Analiza roślin i ich produktów farmaceutycznych bądź spożywczych prowadzona była w oparciu o spektroskopię ramanowską. Spektroskopia ta jest metodą badania przejść pomiędzy poziomami energetycznymi cząsteczek zachodzącymi na skutek nieelastycznego rozproszenia światła. W przypadku gazów możliwe jest badanie zarówno rotacji jak i oscylacji molekuł, natomiast dla ciał skondensowanych pomiary obejmują tylko przejścia pomiędzy poziomami oscylacyjnymi. Teoretycznie, efekt ten został opisany przez A. Smekala w 1923 roku, a w roku 1928 hinduski fizyk C.V. Raman potwierdził doświadczalnie jego istnienie w oparciu o wyniki badań benzenu. Za to odkrycie przyznano mu w 1930 roku Nagrodę Nobla w dziedzinie fizyki.

Wynikiem pomiaru próbek przy pomocy spektrometru ramanowskiego są widma, czyli zależności intensywności promieniowania rozproszonego przedstawione w skali względnych wartości częstości (wyrażonych w  $\Delta \text{ cm}^{-1}$ , tzw. przesunięcie ramanowskie) w zakresie od 4000 do 0  $\text{ cm}^{-1}$ . Tak wyrażone widmo ramanowskie odpowiada skali częstości widma absorpcyjnego w podczerwieni, co pozwala na porównanie tych komplementarnych względem siebie metod spektroskopowych. Widma oscylacyjne mogą być wykorzystane do identyfikowania nieznanymi substancji i ich ilości, ich przemian w reakcjach chemicznych oraz obecności określonych ugrupowań atomów, czy też wiązań cząsteczkowych. Identyfikację tę przeprowadza się w oparciu o szczegółową analizę pasm zarejestrowanego widma.

Metodą rozproszenia Ramana można badać związki we wszystkich stanach skupienia, a więc gazy, ciała stałe, ciecz, roztwory (w tym wodne), a również tkanki roślinne i zwierzęce, produkty spożywcze i farmaceutyczne, kamienie, dzieła sztuki itp., w szerokim przedziale temperatur i ciśnień. Pomiar widm ramanowskich nie wymaga zastosowania skomplikowanych procedur przygotowania próbek, badane substancje w ilości nawet kilku mikrogramów umieszczane są bezpośrednio na stole pomiarowym lub w naczynkach (najczęściej szklanych) przezroczystych dla promieniowania wzbudzającego. Niewątpliwą zaletą spektroskopii ramanowskiej jest możliwość jej zastosowania dla próbek w roztworach wodnych (szczególnie przydatne dla tkanek roślinnych i zwierzęcych), gdyż widmo ramanowskie wody jest ubogie, pasma wykazują stosunkowo słabą intensywność wynikającą z małej polaryzowalności molekuł wody.

Podstawowym problemem utrudniającym otrzymanie widm ramanowskich jest występowanie tła fluorescencyjnego. Jednak stosowanie spektrometrów ramanowskich z transformatą Fouriera (FT-Raman) i wzbudzeniem laserowym w zakresie bliskiej podczerwieni tj. przy 1064 nm, powoduje usunięcie lub zmniejszenie tego efektu. Ponadto, ze względu na ograniczenie absorpcji promieniowania laserowego przez próbkę, istnieje mniejsza możliwość jej fotochemicznego lub termicznego rozkładu.

Dokładniejsze poznanie własności różnych składników roślinnych umożliwia rozwijana ostatnio technika tzw. mapowania ramanowskiego, która pozwala zbierać informacje o ich rozkładzie przestrzennym bezpośrednio w żywym materiale roślinnym oraz produktach pochodnych. Dystrybucja wybranych związków w przekrojach próbki wyznaczona jest poprzez obrazowanie rozkładu intensywności ich sygnałów ramanowskich w badanym przekroju. Pozwala to na otrzymanie 2-wymiarowych obrazów przedstawiających rozkład pojedynczych składników w złożonych układach biologicznych (Rys. 1) [1-5].



Rysunek 1. Tworzenie map ramanowskich obrazujących rozkład pojedynczych składników A, B i C na podstawie charakterystycznych pasm dla tych substancji (zaadoptowane z [6]).

Powszechnie znane i stosowane są trzy techniki mapowania ramanowskiego tj.: punktowa, liniowa i powierzchniowa. Jednak w przypadku spektrometrów FT-Raman stosowane może być tylko mapowanie punktowe, zwane też seryjnym. W wyniku pomiaru z określonej powierzchni próbki otrzymywany jest zbiór widm, z którego konstruowana jest mapa ramanowska. Jeżeli analizowana jest duża powierzchnia lub stosowana duża rozdzielczość przestrzenna to pomiar jest dłuższy (rzędu kilku-kilkunastu godzin), ale dzięki automatyzacji nie

wymaga dużego zaangażowania prowadzącego pomiary. Najczęściej, wstępnie wykonuje się pomiary z niską rozdzielczością, a następnie z wybranego obszaru powtarzany jest pomiar z wyższą rozdzielczością (w przypadku FT-Ramana jest to około 30-50  $\mu\text{m}$ ).

Mapa ramanowska może być skorelowana z obrazem wizualnym próbki [7] lub wynikami otrzymanymi innymi technikami np. poprzez barwienie tkanek [8]. Przewagą mapowania jest jednak niedestrukcyjność oraz możliwość tworzenia wielu map z pojedynczego eksperymentu, które niosą informacje o zawartości i dystrybucji szeregu badanych związków, a także ich zmian zachodzących pod wpływem pewnych czynników (np. temperatury, pH lub stresu biotycznego i/lub abiotycznego [9]).

Prezentowane tu wyniki badań związków bioaktywnych *in situ* otrzymane zostały na spektrometrze ramanowskim NIR-FT-Raman Bruker model RFS 100 wyposażonym w przystawkę do mapowania umożliwiającą przesuwanie badanej próbki w płaszczyźnie xy z rozdzielczością przestrzenną 5  $\mu\text{m}$ . Taka konfiguracja umożliwia precyzyjne pomiary próbek o wymiarach max. 75 mm x 50 mm, co oznacza, że może być badany np. cały liść, korzeń lub inna część rośliny jak i np. cała tabletkę leku.

### 3. Analiza wybranych związków bioaktywnych

#### 3.1 Karotenoidy

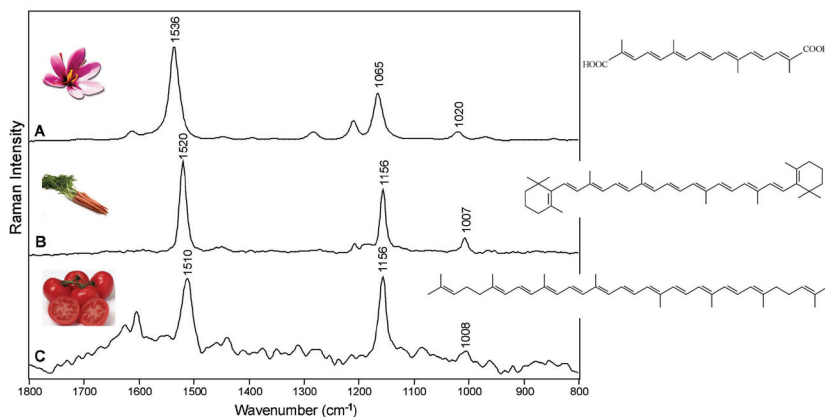
Karotenoidy występują w roślinach zaledwie w stężeniach ppm, ale ich detekcja możliwa jest przy pomocy rezonansowej spektroskopii ramanowskiej w widzialnym obszarze wzbudzenia, gdy wzbudzenie laserowe odpowiada przejściu elektronowemu danego karotenu [10,11]. W spektroskopii NIR-FT-Raman również obserwuje się silne wzmocnienie pasm pochodzących od drgań karotenoidowych, co związane jest z tzw. efektem prerezonansowym [12]. Niewątpliwą zaletą tej techniki jest ponadto brak fluorescencji na widmach ramanowskich badanych materiałów biologicznych [13,14].

Charakterystyczne pasma karotenoidów obserwowane są na widmach ramanowskich w zakresach 1500-1550 i 1150-1170  $\text{cm}^{-1}$  i pochodzą odpowiednio od drgań rozciągających zgodnych w fazie grup  $\text{-C=C-}$  ( $\nu_1$ ) i  $\text{-C-C-}$  ( $\nu_2$ ) łańcucha polienowego. Dodatkowo, drgania wahadłowe w płaszczyźnie grup  $\text{CH}_3$  przyłączonych do łańcucha centralnego widoczne są jako pasma średniej intensywności występujące w zakresie 1000-1020  $\text{cm}^{-1}$  (Rys. 2) [9,10, 15-18].

Na podstawie badań szerokiej gamy warzyw, owoców i kwiatów zawierających naturalne karotenoidy, jak również związków tych w wolnej, wyizolowanej postaci, można stwierdzić silną zależność pomiędzy długością łańcucha polienowego karotenoidu a położeniem jego pasm ramanowskich, w szczególności  $\nu_1$  i  $\nu_2$ . Karotenoidy z 11-, 9-, 8-, 7-sprzężonymi wiązaniami  $\text{-C=C-}$  mają



swoje charakterystyczne pasmo  $\nu_1$  na widmie ramanowskim odpowiednio przy 1510, 1524, 1530 i 1536  $\text{cm}^{-1}$ . Częstość położenia tego pasma może być użyta do celów identyfikacyjnych karotenoidów, jednak jego położenie zależy też od bocznych podstawników łańcucha, jak również nieznacznie zmienia się pod wpływem wiązania do roślinnych składników [17].



Rysunek 2. Widma ramanowskie wybranych naturalnych karotenoidów: krocetyny (A),  $\beta$ -karotenu (B) i likopenu (C).

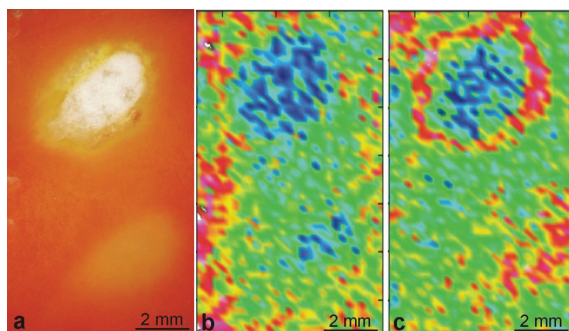
Spektroskopia ramanowska jest doskonałym narzędziem do badań izomerii *cis-trans* karotenoidów. Naturalne karotenoidy występują głównie jako bardziej stabilne izomery *trans*. Obecność *cis*-izomerów opisywana w literaturze jest często przesadzona i powinna w wielu przypadkach być traktowana jako artefakt analiz chromatograficznych. W wyniku ekstrakcji, działania wysokiej temperatury i rozpuszczalników w czasie takiej analizy może dojść do zmian konformacyjnych karotenoidów [19]. Tak więc analiza *in situ*, która nie naruszałaby środowiska naturalnego badanego karotenu, a tym samym nie zmieniałaby jego struktury byłaby wiarygodną metodą badania strukturalnego tych związków.

Tylko kilka roślinnych karotenoidów występuje w środowisku naturalnym w formie *cis*. Należy do nich m.in. biksyna. Po ekstrakcji chloroformem przekształca się ona do bardziej stabilnego izomeru *trans* [20]. Te eksperymentalne obserwacje zostały również potwierdzone przez obliczenia teoretyczne [21]. Na widmach ramanowskich obserwowane jest to jako podwyższenie częstości drgania  $\nu_1$  z 1518 do 1523  $\text{cm}^{-1}$  [17]. Dla izomerów krocetyny różnica w położeniu pasma  $\nu_1$  jest jeszcze większa i wynosi 12  $\text{cm}^{-1}$  [22]. Pokazuje to możliwości stosowania spektroskopii ramanowskiej do badań izomeryzacji karotenoidów np.

w czasie przechowywania roślin lub ich przetwarzania. Wiadomo bowiem, że światło, ciepło, kwasy i kontakt z powierzchniami metalicznymi są promotorami izomeryzacji, która może negatywnie wpływać na produkt końcowy poprzez utratę koloru czy redukcję bioaktywności karotenów [23,24].

Przy pomocy mapowania ramanowskiego przeprowadzono badania wpływu stresu biotycznego i abiotycznego na zawartość karotenoidów w liściach buraka i pietruszki oraz owocach pomidora [9]. Stres biotyczny wywołany np. infekcją grzybiczą zazwyczaj prowadzi do degradacji karotenu w centrum zakażenia oraz w pobliżu miejsca chorobowego [25,26]. Rzadkie, ale możliwe jest jednak również inne zjawisko, a mianowicie stymulowana akumulacja karotenu [27,28]. Taki mechanizm obrony przed infekcją odkryto w przypadku zakażenia *Septoria petroselini*, gdzie na mapach ramanowskich widać wyraźnie, że obok dekompozycji karotenu w tkance nekrotycznej obserwuje się wzrost jego stężenia dookoła zmiany chorobowej [9].

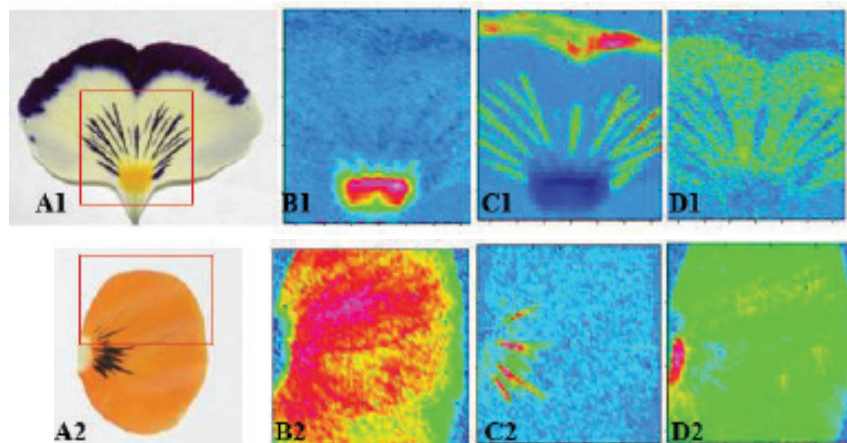
Zmiany stężenia karotenów obserwowano również w owocach pomidora pod wpływem wysokiej temperatury i światła, czyli stresu abiotycznego. W zdrowych tkankach występuje likopen obok  $\beta$ -karotenu, które mogą być zidentyfikowane na podstawie odpowiednich pasm markerowych tj.  $1510$  i  $1524$   $\text{cm}^{-1}$ . Ponieważ udowodniono, że spektroskopia ramanowska umożliwia rozróżnienie tych karotenów bezpośrednio w owocu, nawet gdy współwystępują w tych samych tkankach, zastosowano technikę mapowania do zbadania ich wzajemnej dystrybucji. Otrzymane mapy ramanowskie jednoznacznie pokazały, że w tkance objętej nekrozą nastąpiła degradacja zarówno likopenu jak i  $\beta$ -karotenu, natomiast w miejscach zmienionych chorobowo obserwuje się zahamowanie syntezy tylko likopenu, zaś  $\beta$ -karoten jest nie tylko obecny, ale wręcz akumulowany (patrz Rys. 3).



Rysunek 3. Zmiany stężenia karotenów w tkankach pomidora objętych nekrozą (stres abiotyczny). A: zdjęcie pomidora, B: mapa ramanowska przedstawiająca dystrybucję likopenu (intensywność pasma  $\sim 1510$   $\text{cm}^{-1}$ ), C: mapa ramanowska przedstawiająca dystrybucję  $\beta$ -karotenu (intensywność pasma  $\sim 1524$   $\text{cm}^{-1}$ ).

### 3.2 Flawonoidy

Choć literatura na temat spektroskopowych badań flawonoidów jest dość obszerna [29,30] to trudno znaleźć w niej przykłady takiej analizy *in vivo*. Na przykładzie kwiatu bratka pokazano, że możliwa jest nie tylko identyfikacja jego głównych barwników bezpośrednio w tkance żywej płatka, ale też zbadanie ich ewentualnej kopigmentacji (Rys. 4).



Rysunek 4. A: Zdjęcia dwóch bratków (1,2). B: Mapa dystrybucji karotenów (integracja  $\sim 1156\text{ cm}^{-1}$ ). C: Mapa dystrybucji antocyjanów (intensywność pasma  $\sim 1260\text{ cm}^{-1}$ ). D: Mapa dystrybucji glikozydów flawonolowych (intensywność pasma  $\sim 1570\text{ cm}^{-1}$ ). [31]

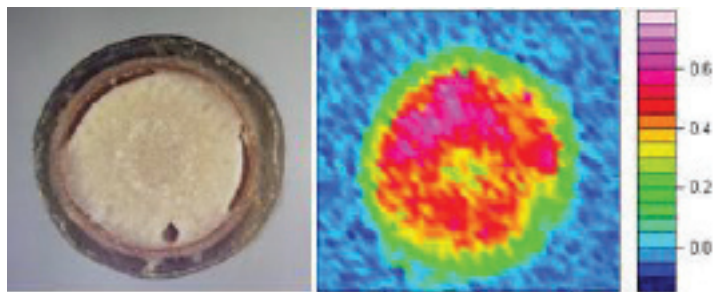
Kompleksową analizę *in situ* obejmującą identyfikację, badanie dystrybucji i analizę ilościową flawonoidu przeprowadzono dla aspalatyny występującej w liściach czerwonokrzewu (*Aspalathus linearis*) [32]. Na widmach otrzymanych bezpośrednio z rośliny część pasm markerowych aspalatyny była maskowana przez inne składniki roślinne, dlatego zastosowano spektroskopię korelacyjną 2D w celu zanalizowania nakładających się pasm. Metoda ta pozwala na uproszczenie złożonych widm i podwyższenie rozdzielczości spektralnej poprzez rozciągnięcie sygnałów w dwóch wymiarach. Poprzez korelację pasm na mapach synchronicznych i asynchronicznych można przeprowadzić ich jednoznaczne przypisanie [33-35]. W ten sposób uzyskano potwierdzenie, że obserwowane zmiany w intensywnościach tych pasm obserwowane na zmierzonych widmach związane są z rosnącym stężeniem flawonoidów w badanych próbkach. Przeprowadzona analiza ilościowa pozwoliła na otrzymanie satysfakcjonującego modelu kalibracyjnego o współczynniku determinacji  $R^2=0.83$  i  $SECV=0.94$ . Należy

podkreślić, że przeprowadzone badania aspalatyny *in situ* są nowatorskim, a jednocześnie kompleksowym, podejściem do analizy flawonoidów [32].

### 3.3 Alkaloidy

Pomimo tego, że alkaloidy charakteryzują się szerokim zakresem różnych struktur chemicznych, tylko dla nielicznych opublikowane zostały widma oscylacyjne [36-38]. W pracy zainteresowania zostały skupione na grupie alkaloidów występujących w makówkach (morfina, noskapina, kodeina, tebaina, papaweryna) [39] oraz piperynie w pieprzu [40]. Oprócz szczegółowej charakterystyki spektroskopowej tych związków w postaci wyizolowanej, prowadzono również badania *in vivo*. Stężenie alkaloidów w makówkach jest dość niskie (rzędu 0,01-2,00g/100g suchej masy) [41] a ich widma ramanowskie ujawniają obecność głównie składników roślinnych budujących ściany komórkowe tj. ligniny, celulozy oraz karotenów. Stąd też bezpośrednia detekcja alkaloidów w makówkach jest bardzo trudna. Pomocna w takim przypadku okazała się analiza skupień, która pozwoliła na pogrupowanie badanych próbek ze względu na wysokie lub niskie stężenie alkaloidów, co często wystarcza przy wstępnej kontroli jakości materiału roślinnego. Makówki o wysokiej zawartości m.in. morfiny wykorzystywane są do produkcji preparatów farmaceutycznych, zaś o niskiej zawartości – do celów spożywczych. Brak intensywnych pasm alkaloidów w widmach badanych roślin nie przeszkodził zbudować wiarygodne modele kalibracyjne do analizy ilościowej tych związków. Dla morfiny otrzymano model o współczynniku determinacji  $R^2=0.80$ , a SECV wynosił 0.92.

Znacznie wyższą zawartość alkaloidów wykazują ziarna pieprzu. Jeden z nich, piperyna, występuje w ilościach ok. 3-8g/100g - może więc być identyfikowana *in vivo*. Na widmach badanych ziaren widoczne są wyraźnie pasma pochodzące od drgań piperyny przy 1625, 1584, 1448, 1295, 1256 i 1153  $\text{cm}^{-1}$ . Na podstawie tych pasm sporządzono mapy ramanowskie dystrybucji piperyny w czarnych i zielonych ziarnach pieprzu, i tak np. w zielonych owocach piperyna jest rozlokowana równomiernie w części peryspermowej, zaś tkanki endospermy zawierają mniejsze ilości tego alkaloidu (Rys. 5) [40].



Rysunek 5. A: Ziarno zielonego pieprzu. B: Mapa dystrybucji piperyny (intensywność pasma  $\sim 1584\text{ cm}^{-1}$ ).

### Literatura:

1. Delhave, M.; Dhamelincourt, *Raman microprobe and microscope with laser excitation*. J. Raman Spectrosc. 1975, 3, 33-38;
2. Petry, R.; Schmitt, M.; Popp, J. *Raman spectroscopy – a prospective tool in the life science*. ChemPhysChem 2003, 4, 14-30;
3. Thygesen, L.G.; Løkke, M.M.; Micklander, E.; Engelsen, S.B. *Vibrational microspectroscopy of food. Raman vs. FT-IR*. Trends Food Sci. Tech. 2003, 14, 50-57;
4. Puppels, G.P.; de Mul, F.F.M.; Otto, C.; Greve, J.; Robert-Nicaud, M.; Arndt-Jovin, D.J.; Jovon, T.M. *Studying single living cells and chromosomes by confocal Raman microspectroscopy*. Nature, 1990, 347, 301-303;
5. Schrader, B.; Baranovic, G.; Keller, S.; Sawatzki, J. *Micro and two-dimensional NIR FT Raman spectroscopy*. Fresenius J. Anal. Chem. 1994, 349, 4-10;
6. Chalmers, J.M.; Griffiths, P.R. (Eds.). *Handbook of vibrational spectroscopy*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester. 2002;
7. Baranska, M.; Schulz, H.; Rösch, P.; Strehle, M.A.; Popp, J. *Identification of Secondary Metabolites in Medicinal and Spice Plants by NIR FT Raman Microspectroscopic Mapping*, Analyst, 2004, 129, 926-930;
8. Baranska, M., Schulz, H.; Baranski, R.; Nothnagel, T.; Christensen, L. *In situ Simultaneous Analysis of Polyacetylenes, Carotenoids and Polysaccharides in Carrot Roots*, J. Agric. Food Chem., 2005, 53, 6565-6571;
9. Baranski, R.; Baranska, M.; Schulz, H. *Changes in Carotenoid Content and their Distribution in Fresh Plant Tissue can be Observed and Mapped in situ using NIR-FT-Raman Spectroscopy*, Planta, 2005, 222, 448-457;

10. Withnall, R.; Chowdhry, B.Z.; Silver, J.; Edwards, H.G.M.; de Oliveira, L.F.C. *Raman spectra of carotenoids in natural products*. Spectrochim. Acta A, 2003, 59, 2207-2212;
11. Veronelli, M.; Zerbi, G.; Stradi, R. *In situ resonance Raman spectra of carotenoids in bird's feathers*. J. Raman Spectrosc. 1995, 26, 683-692-692;
12. Ozaki, Y.; Cho, R.; Ikegawa, K.; Muraishi, S.; Kawauchi, K. *Potential of near-infrared Fourier transform Raman spectroscopy in food analysis*. Appl. Spectrosc. 1992, 46, 1503-1507;
13. Schrader, B. *Infrared and Raman spectroscopy, methods and applications*. VCH, Weinheim 1995;
14. Schrader, B. *Raman spectroscopy in the near infrared – a most capable method of vibrational spectroscopy*. Fresenius J. Anal. Chem. 1996, 355, 233-239;
15. Schulz, H.; Barańska, M. *Identification and Quantification of Valuable Plant Substances by IR and Raman Spectroscopy. A Review*, Vib. Spectrosc., 2007, 43, 13-25;
16. Baranska, M.; Schulz, H.; Reitzenstein, S.; Uhlemann, U.; Strehle, M.A.; Krüger, H.; Quilitzsch, R.; Foley, W.; Popp, J. *Vibrational Spectroscopic Studies to Acquire a Quality Control Method of Eucalyptus Essential Oils*, Biopolymers, 2005, 78, 237-248;
17. Schulz, H.; Baranska, M.; Baranski, R. *Potential of NIR-FT-Raman Spectroscopy in Natural Carotenoid Analysis*, Biopolymers, 2005, 77, 212-221;
18. Baranska, M.; Baranski, R.; Schulz, H.; Nothnagel, T. *Tissue Specific Accumulation of Carotenoids in Carrot Roots*, Planta, 2006, 224, 1028-1037;
19. Rodriguez-Amaya, D.B. *A Guide to Carotenoid Analysis in Food*, Washington, USA, ILSI Press, 2001;
20. Kuhn, R.; Ehmman, L. *Über konjugierte Doppelbindungen XI. Über das Bixin und seinen Abbau zum Bixan*. Helv. Chim. Acta. 1929, 12, 904-915;
21. de Oliveira, L.F.C.; Dantas, S.O.; Velozo, E.S.; Santos, P.S.; Ribeiro, M.C.C. *Resonance Raman investigation and semi-empirical calculation of the natural carotenoid bixin*. J. Mol. Struct. 1997, 435, 101-107;
22. Assimiadis, M.K.; Tarantilis, P.A.; Polissiou, M.G. *UV-Vis, FT-Raman, and <sup>1</sup>H NMR Spectroscopies of cis-trans carotenoids from saffron (Crocus sativus L.)*. Appl. Spectrosc. 1998, 52, 519-522;
23. Lessin, W.J.; Catigani, G.L.; Schwartz, S.J. *Quantification of cis-trans isomers of provitamin A carotenoids in fresh and processed fruits and*



- vegetables*. J. Agric. Food Chem. 1997, 45, 3728-3732;
24. Marx, M.; Stuparic, M.; Schieber, A.; Carle, R. *Effects of thermal processing on trans-cis-isomerization of beta-carotene in carrot juices and carotene-containing preparations*. Food Chem. 2003, 83, 609-617;
  25. Merzlyak, M.N.; Gitelson, A.A.; Pogosyan, S.I.; Lekhimena, L.; Chivkunova, O.B. *Light-induced pigment degradation in leaves and ripening fruits studied in situ with reflectance spectroscopy*. Physil. Plantarum 1998, 104, 661-667;
  26. Steinkamp, M.P.; Martin, S.S.; Hoefert, L.L.; Ruppel, E.G. *Ultrastructure of lesions produced in leaves of Beta vulgaris by cercosporin, a toxin from Cercospora beticola*. Phytopathol. 1981, 71, 1272-1281;
  27. Batchvarova, R.B.; Reddy, V.S.; Bennett, J. *Cellular resistance in rice to cercosporin, a toxin of Cercospora*. Phytopathol. 1992, 82, 642-646;
  28. Daub, M.E. *Cercosporin, a photosensitizing toxin from Cercospora species*. Phytopathol. 1982, 72, 370-374;
  29. Merlin, J.C.; Cornard, J.P. *Vibrational analysis of hydroxyflavylum derivatives by IR, Fourier transform Raman and resonance Raman spectroscopies*. Spectrochim. Acta A, 1994, 50, 703-712;
  30. Merlin, J.C.; Statoua, A.; Cornard, J.P.; Saidi-Idrissi, M.; Brouillard, R. *Resonance Raman spectroscopic studies of anthocyanins and anthocyanidins in aqueous solutions*. Phytochem. 1994, 35, 227-232;
  31. Gamsjäger, S.; Baranska, M.; Schulz, H.; Heiselmayer, P.; Musso, M. *NIR-FT-Raman mapping spectroscopy of Viola x wittrockiana as method to study carotenoid and flavonoid content in living plant tissue*. Planta, praca wysłana;
  32. Baranska, M.; Schulz, H.; Joubert, E.; Manley, M. *In situ Flavonoids Analysis by FT-Raman Spectroscopy: Identification, Distribution and Quantification of Aspalathin in Green Rooibos (Aspalathus linearis)*, Anal. Chem., 2006, 78, 7716-7721;
  33. Noda, I.; Ozaki, Y., *Two dimensional correlation spectroscopy – applications in vibrational and optical spectroscopy*, J. Wiley&Sons, Chichester, 2004;
  34. Noda, I. *Advances in two-dimensional correlation spectroscopy*. Vib. Spectrosc. 2004, 36, 143-165;
  35. Czarnik-Matusiewicz, B.; Murayama, K.; Tsenkova, R.; Ozaki, Y. *Analysis of near-infrared spectra of complicated biological fluids by two-dimensional correlation spectroscopy: Protein and fat concentration-dependent spectral changes of milk*. Appl. Spectrosc. 1999, 53, 1582-1594;

36. Gunasekaran, S.; Sankari, G.; Ponnusamy, S. *Vibrational spectral investigation on xanthine and its derivatives - theophylline, caffeine and theobromine*. Spectrochim. Acta A 2005, 61, 117-127;
37. Urlaub, E.; Popp, J.; Kiefer, W.; Bringmann, G.; Koppler, D.; Schneider, H.; Zimmermann, U.; Schrader, B. *FT-Raman investigation of alkaloids in the liana Ancistrocladus heyneanus*. Biospectroscopy 1998, 4, 113-120;
38. Edwards, H.G.M.; Farwell, D.W.; de Oliveira L.F.C.; Alia, J.-M.; Hyaric, M.L.; de Ameida, M.V. *FT-Raman spectroscopic studies of guarana and some extracts*. Anal. Chim. Acta 2005, 532, 177;
39. Schulz, H.; Baranska, M.; Quilitzsch, R.; Schütze, W. *Determination of Alkaloids in Poppy Capsules by ATR-IR and Raman Spectroscopy*, Analyst, 2004, 129, 917-920;
40. Schulz, H.; Baranska, M.; Quilitzsch, R.; Schütze, W.; Lösing, G. *Characterization of Pepper and Pepper Oleoresins by Fourier-Transform Raman Spectroscopy*, J. Agric. Food Chem., 2005, 53, 3358-3363;
41. Frick, S.; Kramell, R.; Schmidt, K.; Fist, A.J.; Kutchan, T.M. *Comparative qualitative and quantitative determination of alkaloids in narcotic and condiment Papaver somniferum cultivars*. J. Nat. Prod. 2005, 68, 666-673;



## Rozdział XI

### Wybrane metody badań oddziaływań w układach gość-gospodarz

Błażej Gierczyk, Michał Schulz, Grzegorz Schroeder  
i Tadeusz Ossowski\*

*Uniwersytet im. A. Mickiewicza, Wydział Chemii, Grunwaldzka 6,  
60-780 Poznań*

*\* Uniwersytet Gdański, Wydział Chemii, ul. Sobieskiego 18/19,  
80-852 Gdańsk*

Chemia supramolekularna, czyli chemia wykraczająca poza obszar cząsteczki, to chemia asocjatów dwóch lub więcej molekuł, bez udziału wiązań kowalencyjnych. Rozwój wiedzy w tej dziedzinie uzależniony jest ściśle od rozwoju technik badawczych, umożliwiających identyfikację słabych oddziaływań w asocjatach.

Współczesna analiza instrumentalna dostarcza nam całego spektrum różnorodnych technik analitycznych, opierających się na zjawiskach elektrochemicznych (potencjometria, konduktometria, voltamperometria), absorpcji promieniowania elektromagnetycznego (spektroskopia NMR, EPR, NQR, IR, UV-Vis), procesie jonizacji cząsteczek i szeregu innych. Artykuł ma na celu przybliżenie kilku z nich, niektórych często goszczących, innych stosunkowo rzadko stosowanych w laboratoriach chemików supramolekularnych.

#### **1. Izotermiczne miareczkowanie kalorymetryczne (ITC) [1]**

Reakcjom tworzenia kompleksów gość- gospodarz towarzyszy najczęściej efekt egzotermiczny. Pomiar wartości ciepła wydzielonego podczas tego procesu pozwala wyznaczyć szereg wartości termodynamicznych, charakteryzujących układ gość-gospodarz.

Opis zastosowania metody miareczkowania kalorymetrycznego do wyznaczenia wartości stałej tworzenia kompleksu (K) i entalpii reakcji ( $\Delta H$ ) przed-

stawiony został około 40 lat temu. Początkowo procedura ta stosowana była do badania kompleksowania jonów metali i równowag kwasowo-zasadowych. Aktualnie jest ona ważnym narzędziem w biochemii, pozwalającym wyznaczać parametry termodynamiczne oddziaływań biomolekuł. Nowoczesne systemy pomiarowe pozwalają wyznaczać efekty cieplne mniejsze niż 0,4  $\mu\text{J}$ , co umożliwia badanie układów charakteryzujących się dużymi wartościami  $K$  (do  $10^9 \text{ M}^{-1}$ ).

Izotermiczny titrator kalorymetryczny jest stosunkowo prostym urządzeniem. Pomiar efektów cieplnych dokonywany jest w termostatowanej komorze pomiarowej (obok której znajduje się komora porównawcza). Standardowa objętość kuwety wynosi 1,5  $\text{cm}^3$ . Temperatura próbki utrzymywana jest w zakresie 5-80°C. Titrant dodawany jest przy pomocy pompy strzykawkowej, pracującej z krokiem 1-20  $\mu\text{l}$ . Intensywność sygnału ITC zależy od szeregu czynników: stężeń reagentów, objętości roztworu użytego do miareczkowania, wartości  $K$  i  $\Delta H$  oraz stechiometrii badanego układu. Wartości termodynamiczne uzyskuje się dzięki dopasowaniu założonego modelu do uzyskanych, eksperymentalnych krzywych miareczkowań. Otrzymanie wiarygodnych wyników wymaga starannego zaplanowania eksperymentu. Pierwszym etapem jest dobranie odpowiednich stężeń reagentów. Najczęściej stosowanym kryterium doboru stężeń jest założenie, iż iloczyn oczekiwanej wartości  $K$  i stężenia molowego liganda powinien zawierać się w przedziale 1-1000. Uzyskana w takim eksperymencie krzywa pozwala na obliczenie  $K$  i  $\Delta H$  z dużą dokładnością. Również wartość ciepła wydzielanego podczas miareczkowania (po dodaniu każdej porcji titranta) musi zawierać się w pewnym zakresie, ograniczonym głównie czułością aparatu. Stężenie czynnika miareczkującego ustala się zazwyczaj na 20-50 razy większe niż stężenie liganda. Jeśli celem eksperymentu jest jedynie wyznaczenie entalpii wiązania, stężenia muszą być dobrane tak, aby efekt cieplny zawierał się w zakresie umożliwiającym pomiar obarczony małym błędem (zwykle ok. 40  $\mu\text{J}$ ). Oba roztwory, użyte do miareczkowania, powinny być zgodne co do pH, siły jonowej, składu buforu itd., gdyż ewentualne efekty ciepłe związane z rozcieńczeniem lub mieszaniem mogą zafałszować wyniki. Ponadto, aby wyeliminować efekt rozcieńczenia titranta, należy wykonać „ślepy” eksperyment, polegający na miareczkowaniu roztworu niezawierającego liganda. Uzyskane wartości ciepła rozcieńczenia należy odjąć od właściwych wyników ITC. Z kolei efekt związany z rozcieńczeniem roztworu liganda jest zazwyczaj zaniedbywany – wynika to z tego, iż sumaryczna objętość titranta dodana do celi pomiarowej jest mała, w porównaniu do objętości roztworu liganda, znajdującego się w naczynku pomiarowym. Często konieczne jest uwzględnienie, podczas obróbki danych eksperymentalnych, ciepła protonowania/deprotonowania buforu. Wymiana protonów pomiędzy ligandem a środowiskiem podczas wiązania jonów lub cząsteczek go-

ścia jest szczególnie częsta w przypadku układów biologicznych. Najprostszym rozwiązaniem jest zastosowanie buforu o małej wartości  $\Delta H$  jonizacji. Wszystkie roztwory stosowane podczas miareczkowań kalorymetrycznych muszą być starannie odgazowane, celem uniknięcia powstawania pęcherzyków gazu w układzie pomiarowym.

Uzyskanie wartości  $K$  i  $\Delta H$  procesu kompleksowania oraz jego stechiometrii z otrzymanej zależności  $\Delta Q$  (wydzielonego ciepła) od objętości wprowadzonego roztworu) a dokładniej – stosunku molowego ligand/gość) jest możliwe, jak wcześniej wspomniano, na drodze dopasowania krzywej teoretycznej do punktów eksperymentalnych (fitowanie). Obliczone wartości entalpii są obarczone mniejszym błędem niż wartości  $K$ .

## 2. Pomiar prędkości sedymentacji [2]

Pomiar prędkości sedymentacji w ultrawirówkach jest dogodną metodą badań oddziaływań wielkocząsteczkowych supramolekuł. Łączenie się wielu małych cząsteczek w procesie samoorganizacji lub oddziaływanie (i tworzenie kompleksu) dwóch (lub więcej) makromolekuł powoduje znaczący wzrost masy i, w konsekwencji, zmianę właściwości sedymentacyjnych. Metoda powyższa znajduje zastosowanie głównie w badaniach biocząsteczek – oligo- i polinukleotydów i białek, jak również w chemii polimerów i metalopolimerów supramolekularnych. U podstaw technik sedymentacyjnych leży zależność pomiędzy masą obiektu (np.: makrocząsteczki), a działającą na nią siłą w polu grawitacyjnym (zależną od jego natężenia). Siła ta wywołuje ruch cząstki. W przypadku obiektów makroskopowych proces ten zachodzi już w ziemskim polu grawitacyjnym. Dla obiektów mikroskopowych, a w szczególności dla tych o rozmiarach molekularnych, ze względu na ruchy termiczne nie jest on obserwowany (lub też mierzalny) w tych warunkach. Z tego też względu pomiary prędkości sedymentacji makrocząsteczek dokonuje się w sztucznie wytworzonym polu siłowym, pochodzącym od siły odśrodkowej związanej z szybką rotacją układu. Początki zastosowania metody ultrawirowania w celach analitycznych datuje się na lata 20 XX wieku (pierwsze doniesienia dotyczyły wyznaczenia masy hemoprotein: mioglobiny i hemoglobiny). Istnieją dwie, zasadniczo różne, metody eksperymentalne dostępne w ramach tej techniki analitycznej: wyznaczanie prędkości sedymentacji i badanie równowagi sedymentacyjno-dyfuzyjnej. Obie nadają się do badań oddziaływań molekuł, pierwsza z nich jest głównym narzędziem do badań tworzenia heterogenicznych asocjacji protein, druga – do śledzenia asocjacji takich samych cząsteczek. W przypadku pomiaru szybkości sedymentacji analiza wyników pozwala uzyskać dane o rozkładzie stałych szybkości sedymentacji w badanym układzie, rozkładzie masy molowej, rozmiarze sedymentujących cząstek (jeśli mają one kształt sferyczny) oraz średnich współ-

czynnikach tarcia i dyfuzji dla badanych indywidualów. Metoda druga dostarcza danych o średnich masach molowych, stopniu asocjacji, stałej asocjacji i rozkładzie mas molowych w populacji badanych cząsteczek.

Aczkolwiek informacje dostarczane przez technikę ultrawirowania analitycznego (AUC) pokrywają się często z tymi, dostarczonymi przez inne metody, istnieje szereg przypadków, w których AUC jest niezastąpiona. Współczynniki dyfuzji i promienie hydrodynamiczne najłatwiej zmierzyć stosując dynamiczne rozproszenie światła (DLS), jednakże w przypadku wielu polimerów metasupramolekularnych silna absorpcja światła przez ich roztwory utrudnia lub uniemożliwia ten typ pomiarów. Ustalenie średniej masy molowej i rozkładu mas (w przypadku polidispersyjnych polimerów), aczkolwiek możliwe metodą chromatografii żelowej (GPC), jest skomplikowane w sytuacji badań nowych typów związków, dla których brak danych kalibracyjnych dla tej metody lub w przypadku polimerów naładowanych, silnie oddziałujących ze złożem w kolumnie. Dla polielektrolitów niemożliwe jest także ustalenie powyższych parametrów fizykochemicznych w oparciu o niskokątowe rozproszenie promieni rentgenowskich (SAXS) lub niskokątowe rozproszenie neutronów (SANS). Wyznaczanie mas molowych za pomocą NMR ograniczone jest dla niskocząsteczkowych polimerów liniowych z dobrze zdefiniowanymi grupami końcowymi lub polimerów o symetrii sferycznej, słabo oddziałujących z rozpuszczalnikiem (w oparciu o dyfuzjometryczne pomiary NMR). Metoda MALDI-TOF pozwala na dokładne ustalenie mas molowych, jednakże jej przydatność ogranicza się do polimerów o niskich masach i niewielkiej (<1,2) polidispersyjności. Ponadto w procesie jonizacji zrywane są często słabe asocjaty, istniejące w roztworze. Wobec powyższego, zalety AUC przedstawiają się następująco: pozwala wyznaczyć bezwzględne wartości mas molowych w szerokim ich zakresie, od kilkuset do kilkunastu milionów daltonów; słabo związane asocjaty są łatwo wykrywalne w oparciu o pomiary sedymentologiczne; nie jest wymagane oddziaływanie badanych związków z podłożem lub matrycą (jak w GPC lub MALDI-TOF). Główne wady metod sedymentacyjnych to z kolei: kłopotliwe wyznaczanie wartości objętości właściwej sedymentatu i kłopotliwa analiza danych eksperymentalnych.

Aparatura stosowana do pomiarów – ultrawirówka analityczna, jest połączeniem wirówki ze spektrofotometrem (bądź interferometrem), służącym do śledzenia procesu sedymentacji, zachodzącego w wirującej wokół osi wirówki kuwecie pomiarowej. Obok kuwety pomiarowej znajduje się kuweta referencyjna, wypełniana roztworem odniesienia. Aby uniknąć osadzania się sedymentatu na ściankach, boki komory pomiarowej nie są równoległe. Standardowa pojemność kuwety wynosi 400  $\mu$ l, długość – 2,5 cm. Stężenie substancji dobiera się tak, aby absorpcja wynosiła 0,1 – 1 jednostki. Szybkość rotacji nowoczesnych

ultrawirówek zawiera się (w zależności od budowy rotora) w zakresie 50000-60000 obrotów na minutę.

U podstaw teoretycznych pomiarów sedymentacyjnych leży równanie Lam-  
ma, opisujące ten proces:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \left[ \left( \frac{\partial^2 c}{\partial r^2} \right) + \frac{1}{r} \left( \frac{\partial c}{\partial r} \right) \right] - S \omega^2 \left[ r \left( \frac{\partial c}{\partial r} \right) + 2c \right]$$

gdzie:  $c$  – stężenie substancji sedymentującej;  $r$  – odległość od osi obrotu;  $t$  – czas;  $D$  –  
współczynnik dyfuzji;  $S$  – współczynnik sedymentacji;  $\omega$  – prędkość kątowna rotacji.

Współczynnik sedymentacji definiowany jest jako:

$$S = \frac{v_s}{\omega^2 r}$$

gdzie  $v_s$  – szybkość sedymentacji;  $\omega^2 r$  – siła odśrodkowa, działająca na obiekt.

W roztworach nieskończenie rozcieńczonych zachodzi zależność:

$$S = \frac{M(1 - v\bar{\rho})}{N_A f}$$

gdzie  $M$  – masa molowa;  $N_A$  – liczba Avogadro;  $\rho$  – gęstość rozpuszczalnika;  $v$  – objętość  
właściwa sedymentujących cząstek;  $f$  – współczynnik tarcia.

Związek pomiędzy współczynnikiem dyfuzji i współczynnikiem sedymenta-  
cji opisuje równanie Svedberga:

$$S = \frac{M(1 - v\bar{\rho})}{RT} D$$

Ustalenie wszystkich parametrów charakteryzujących układ supramoleku-  
larny wymaga zazwyczaj wykonania serii pomiarów dla roztworów różniących  
się ułamkiem molowym substratów lub stężeniem. W zależności od poszukiwa-  
nej wielkości fizykochemicznej, stosuje się różne podejścia obliczeniowe, któ-

rych omówienie czytelnik znajdzie w literaturze.

### 3. Magnetyczny rezonans jądrowy [3]

Zjawisko magnetycznego rezonansu jądrowego, odkryte blisko 70 lat temu, początkowo pozostawało w kręgu zainteresowań fizyków, lecz szybko zostało zaadaptowane przez chemików, biochemików, biologów, geologów, lekarzy i inżynierów do swoich celów. Badanie zachowania się spinu jądrowego w polu magnetycznym, ze względu na jego wrażliwość na subtelne zmiany w otoczeniu, zarówno bezpośrednim jak i dalszym spowodowało, iż technika ta jest jedną z najważniejszych metod badań struktury i oddziaływań cząsteczek, zarówno tych niewielkich, jaki i makromolekuł. Dodatkowo, możliwość „znakowania” cząsteczek poprzez nadanie spinom jądrowym określonych częstości precesji Larmora umożliwiła zastosowanie spektroskopii NMR w badaniach współczynników dyfuzji. Szereg parametrów, możliwych do zmierzenia za pomocą NMR dostarcza różnych informacji strukturalnych:

**a. Przesunięcie chemiczne** – jest miarą indukowanych w obrębie cząsteczki lokalnych pól magnetycznych, wpływających na efektywną wartość natężenia pola działającego na dane jądro. Te z kolei są wypadkową czynników stereoelektronowych w cząsteczce. W chemii supramolekularnej szczególne znaczenie ma tzw. indukowana kompleksowaniem zmiana przesunięcia chemicznego (CIS) pozwalająca, po pierwsze, wykazać oddziaływanie pomiędzy dwiema molekułami, po drugie zaś, w oparciu o pomiar CIS dla serii roztworów różniących się proporcjami składników kompleksu gość-gospodarz lub stężeniem, umożliwiającą wyznaczenie wartości stechiometrii i stałej (stałych trwałości) badanego układu. Osobnym zagadnieniem są tzw. przesunięcia paramagnetyczne, będące efektem oddziaływań cząsteczki z atomami lub jonami paramagnetycznymi. Ze względu na dużą wartość tych zmian, znalazły one zastosowanie w badaniach miejsc wiązania w molekułach gościa, które ze względu na swoją strukturę charakteryzują się nieczytelnym obrazem widma NMR (np.: dendrymery, biomoлекуły).

**b. Czasy relaksacji** – są pochodną szeregu parametrów cząsteczki, a w szczególności jej dynamiki, wymiany chemicznej czy obecności jąder kwadru-polowych lub centrów paramagnetycznych. Pod tym pojęciem rozumiemy parametry opisujące szybkość powrotu spinu do stanu równowagi termodynamicznej po ustaniu zaburzenia. W zależności od drogi, na której zachodzi oddanie „nadmiaru” energii pochłoniętej przez układ po zadziałaniu impulsu radiowego, mamy do czynienia z relaksacją podłużną (energia zostaje przekazana do otoczenia, tzw.: sieci; parametrem charakteryzującym ten proces jest tzw. czas  $T_1$ ) lub poprzeczną (przekazanie energii innym spinom; czas  $T_2$ ). Z punktu widzenia

chemii supramolekularnej najwięcej danych dostarczają informacje o szybkości procesu relaksacji wywołanego mechanizmem kwadrupolowym lub skalarnym (wywołanym wymianą chemiczną).

Szybkość relaksacji jądra kwadrupolowego zależy od wartości momentu kwadrupolowego tego jądra oraz od gradientu pola elektrostatycznego wokół niego. O ile pierwszy z tych parametrów jest stały, o tyle drugi może się zmieniać, w zależności od otoczenia chemicznego jądra. Efekty kwadrupolowe, wywołujące poszerzenie linii, są utrapieniem spektroskopistów, gdyż utrudniają a często wręcz uniemożliwiają pomiar widma NMR. Ze względu na poszerzenia sygnałów jąder kwadrupolowych często trudne jest dokładne wyznaczenie przesunięcia chemicznego takiej linii rezonansowej lub rozróżnienie sygnałów leżących blisko siebie. Jednakże relaksacja kwadrupolowa może być również cennym narzędziem badawczym. Oddziaływanie gradientu pola elektrostatycznego z momentem kwadrupolowym jądra, wywołujące poszerzenie linii jest opisane wzorem:

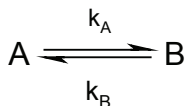
$$T_{1,2}^{-1} = \frac{3}{40} \frac{2I + 3}{I^2 (2I + 1)^2} (e^2 q Q)^2 \tau_{rot}$$

gdzie  $I$  oznacza spin jądra kwadrupolowego,  $eQ$  – moment kwadrupolowy,  $eq$  – gradient pola a  $\tau_{rot}$  – czas korelacji rotacyjnej.

Wartość czasu korelacji dla cząsteczki możemy wyznaczyć mierząc szybkość procesu relaksacji dla jąder innych, niekwadrupolowych, atomów w cząsteczce. Dzięki temu uzyskujemy informację o wartości iloczynu  $e^2 q Q$ , a co za tym idzie, o wielkości gradientu pola wokół badanego jądra. Parametr ten jest w oczywisty sposób zależny od symetrii wokół tego atomu. Jeżeli badamy proces kompleksowania jonów metali których jądra atomowe mają  $I > 1/2$  (np.:  $^{23}\text{Na}$ ) to obserwowany efekt jest miarą asymetrii miejsca wiązania tego kationu. Pozwala to na badanie geometrii miejsca wiązania dla ligandów których konformacja może ulegać zmianie (podandy, naturalne jonofory) lub które mogą tworzyć agregaty złożone z kilku cząsteczek receptora i kilku jonów. Również solwatacja takiego kompleksu wpływa na kształt linii rezonansowej, jest to zatem dogodne narzędzie przy pomocy którego analizować można oddziaływania supermolekuły z cząsteczkami rozpuszczalnika. Jest to również doskonała metoda śledzenia zjawisk transportu i dynamiki jonów kwadrupolowych lub ich połączeń inkluzyjnych, w środowiskach silnie anizotropowych, np.: biomembranach, micelach, liposomach, polimerach czy ciekłych kryształach.

Wartości czasów relaksacji wywołanej oddziaływaniem skalarnym mogą służyć do wyznaczania szybkości procesu wymiany pomiędzy indywiduami w

roztworze. Składowa czasu relaksacji poprzecznej pochodząca od procesów wymiany w najprostszym przypadku:



wyraża się wzorem:

$$T_2^{-1} = \frac{4\pi^2 p_A p_B (\nu_A - \nu_B)^2}{(k_A - k_B)}$$

gdzie  $\nu_A$  oznacza przesunięcie chemiczne (w Hz) danego jądra w formie A,  $\nu_B$  – przesunięcie tego samego jądra w formie B, natomiast  $p_i$  – populacje obu stanów.

W zależności od przyjętego mechanizmu reakcji równanie to przyjmuje różne formy, natomiast wyznaczenie parametrów kinetycznych i termodynamicznych procesu wymiany sprowadza się w większości wypadków (poza najprostszymi układami), do wykonania serii pomiarów czasów relaksacji w funkcji temperatury i stężenia reagentów, a następnie dopasowanie do tych wartości funkcji zależnych od poszukiwanych parametrów oraz przyjętego modelu, w oparciu o kolejne iteracje. Wyczerpującego przeglądu kinetycznych metod NMR-owskich dokonał Detelieer.

Wykazano, iż pomiary czasów relaksacji są dobrą metodą służącą do ustalania wartości stałych trwałości kompleksów. W warunkach szybkiej wymiany chemicznej obserwowana stała szybkości relaksacji podłużnej ( $R_1 = 1/T_1$ ), oznaczana jako  $R_{1obs}$  jest średnią ważoną dla stałej relaksacji substratu wolnego i skompleksowanego (odpowiednio  $R_{1f}$  i  $R_{1b}$ ), zatem wyraża się równaniem:

$$R_{1obs} = N_f R_{1f} + N_b R_{1b}$$

gdzie  $N_f$  i  $N_b$  oznaczają odpowiednio udział formy wolnej i skompleksowanej.

Ponieważ powyższe równanie jest analogiczne do przedstawionego uprzednio, opisującego zależność przesunięcia chemicznego od udziału poszczególnych indywiduów, możemy zastosować identyczne równania, zamieniając jedynie przesunięcie chemiczne ( $\delta$ ) na stałe szybkości relaksacji ( $R_1$ ). Pomiary czasów  $T_1$  są wygodnym narzędziem, jeśli wywołane kompleksowaniem prze-



sunięcie chemiczne jest zbyt małe i pomiary obarczone są zbyt dużym błędem. W przypadku badania kompleksowania jonów paramagnetycznych, stosuje się wyznaczenie stałej  $K$  drogą pośrednią. Stałe szybkości relaksacji protonów cząsteczek wody rosną w miarę kowalencyjnego lub niekowalencyjnego wiązania się jonów paramagnetycznych z makromolekułą. Możemy zatem, z pomiarów relaksacji cząsteczek wody, wyznaczyć stopień związania jonów a następnie obliczyć wartość stałej trwałości kompleksu.

**c. Oddziaływania dipolowe.** W fazie ciekłej oddziaływania dipolowe ulegają uśrednieniu, w efekcie czego sprzężeń dipolowych nie obserwuje się. Jednakże, w przypadku zaburzenia przejść energetycznych jednego z oddziałujących na siebie spinów (np.: poprzez napromieniowanie próbki falą elektromagnetyczną o częstości odpowiadającej przejściom rezonansowym tego jądra), oddziaływania dipolowe ujawniają się na widmie jako zmiana intensywności sygnałów atomów oddziałujących z jądrem napromieniowywanym. Efekt ten, zwany efektem Overhausera ( $nOe$ ) ma niezwykle znaczenie w poznawaniu struktur cząsteczek. Wynika to z faktu, iż wartość oddziaływania dipolowego pomiędzy atomami jest odwrotnie proporcjonalna do szóstej potęgi odległości pomiędzy nimi. Wartość  $nOe$  może zatem służyć do wyznaczania odległości międzyatomowych, wewnątrz oraz międzycząsteczkowych (za względu na szybki zanik wartości tego efektu wraz ze wzrostem odległości, nadaje się on jedynie do badania fragmentów molekuly leżących blisko siebie. Wielkość  $nOe$  jest ponadto zależna od wartości współczynników żyromagnetycznych oddziałujących jąder:

$$nOe = 1 + \frac{\gamma_A}{2\gamma_B}$$

Dla pary izotopów, w przypadku których  $sgn(\gamma_A) \neq sgn(\gamma_B)$  efekt Overhausera może doprowadzić do zaniku sygnału. Aby szacować odległości międzyatomowe z intensywności sygnałów korelacyjnych, konieczne jest ich skalowanie, względem układu spinów, których odległość znamy (najczęściej są to wicynalne protony aromatyczne lub olefinowe). Odległości między oddziałującymi na siebie dipolowo jądrami wynoszące powyżej  $4\text{\AA}$  są już praktycznie niemożliwe do zmierzenia tą techniką.

W chemii supramolekularnej efekt Overhausera stosowany jest przede wszystkim do analizowania zmian konformacyjnych liganda lub substratu wywołanych kompleksowaniem. Jest to podstawowa technika do badania struktury

związków makrocząsteczkowych, takich jak białka czy kwasy nukleinowe, jak również wielu pochodnych o mniejszych molekułach, np.: naturalnych antybiotyków jonoforowych, kaliksarenów, cyklodekstryn. Istotniejszym zagadnieniem jest jednak analiza oddziaływań pomiędzy receptorem a ligandem. W wielu przypadkach, szczególnie dla cyklodekstryn i kaliksarenów, możliwe jest ustalenie, które fragmenty cząsteczki gościa oddziałują z molekułą polisacharydu, poprzez obserwację specyficznych międzycząsteczkowych oddziaływań dipolowych. W przypadku kompleksów ligandów makrocyklicznych z jonami metali wielokrotnie udało się z powodzeniem zastosować techniki heterojądrowego efektu Overhausera w celu wykazania oddziaływania kationu z receptorem oraz ustalenia, które miejsca aktywne w receptorze są odpowiedzialne za interakcje z metalem. Pomiary te zawsze dotyczyły pary  $^1\text{H-X}$  gdzie  $X = ^6\text{Li}$  lub  $^{13}\text{C}$ .

**d. Sprzężenia skalarne.** Oddziaływanie skalarne pomiędzy dwoma magnetycznie aktywnymi jądrami skutkuje rozszczepieniem linii rezonansowych. Zjawisko to nazywamy sprzężeniem skalarnym (sprzężeniem spinowo-spinowym) a jego wartość, wyrażoną w Hz – stałą sprzężenia spinowo-spinowego. Wielkość ta jest zależna od kilku czynników: odległości między oddziałującymi atomami (w sensie ilości wiązań), charakteru tych atomów, gęstości elektronowej w obrębie wiązań łączących te atomy oraz wzajemnych geometrycznych relacji pomiędzy nimi. Związek stałych sprzężeń spin-spin z wartościami kątów dwusiecznych w cząsteczce pozwala stosować tą wielkość jako doskonałe narzędzie do badań konformacji cząsteczek. Zależność tą opisuje równanie Carplusa.

W chemii supramolekularnej najważniejszym zastosowaniem tego parametru są oczywiście badania zmian konformacyjnych wywołanych oddziaływaniami receptor – substrat. Związane jest to na ogół ze zmianami wielkości kątów w cząsteczce a co za tym idzie, stałych sprzężenia skalarnego. Możliwość powiązania wielkości stałej  $J$  z wartością kąta pozwala w prosty sposób wyznaczyć strukturę liganda lub cząsteczki gościa w formie wolnej i związanej. Potrzebne informacje o odległościach międzyatomowych uzyskujemy z eksperymentów  $n\text{Oe}$ .

Rzadko udaje się zaobserwować sprzężenia spin-spin pomiędzy cząsteczką gospodarza a skompleksowanym indywiduum. Wiązania pomiędzy atomami liganda a substratem są na tyle słabe, że przeniesienie informacji o stanach spinowych jąder atomowych jednego z nich na jądra atomowe drugiego jest możliwe jedynie w przypadku izotopów bardzo silnie wpływających na inne atomy. Przykładem mogą być jony talu(I) związane we wnękach makrocyklicznych, które powodują rozszczepienie sygnałów receptora. Drugim izotopem, dla którego obserwowano sprzężenia pomiędzy skompleksowanym jonom a ligandem jest kadm. Jest to efekt często wykorzystywany w badaniach protein. Dla wielu

metaloprotein zawierających normalnie jony cynku, wapnia lub magnezu badania NMR miejsca wiązania jonu są utrudnione, gdyż wszystkie wspomniane jony cechują się dużymi wartościami momentów kwadrupolowych, przez co nie nadają się zbyt do obserwacji technikami NMR. Zastąpienie wyżej wymienionych jonów kationami kadmu dostarcza potężnego narzędzia badawczego. Możliwe jest łatwe rejestrowanie widm  $^{113}\text{Cd}$  (położenie linii rezonansowej tego jonu jest wrażliwe na zmiany w sferze koordynacyjnej, co ułatwia badania) oraz szeregu eksperymentów heterokorelacyjnych, np.:  $^1\text{H}$ - $^{113}\text{Cd}$  HMBC,  $^{13}\text{C}$ - $^{113}\text{Cd}$  HMBC oraz  $^{15}\text{N}$ - $^{113}\text{Cd}$  HMBC. Pozwala to w łatwy sposób ustalić które z reszt łańcucha polipeptydowego uczestniczą w wiązaniu metalu. Tą techniką badać można również wiązanie w miejscu aktywnym enzymu czy receptora, szeregu związków małowczątkowych, np.: substratów czy inhibitorów. W badaniach białek zawierających kilka atomów metalu związanych w formie klastrów, zastosować można techniki homokorelacyjne, np.:  $^{113}\text{Cd}$ - $^{113}\text{Cd}$  COSY.

**e. Pomiary dyfuzyjne.** Wyznaczanie parametrów dyfuzji za pomocą eksperymentów NMR jest szeroko stosowane w różnych dziedzinach nauki, od nauk medycznych do inżynierii materiałowej. Znalazło ono również szerokie zastosowanie w chemii supramolekularnej, choć popularność tych metod jest nadal mała, w porównaniu z innymi technikami NMR, stosowanymi w tej dziedzinie. Dyfuzjometria NMR, zastosowana do badań układów supramolekularnych, pozwala znaleźć odpowiedź na pytania dotyczące stałej trwałości, kształtu cząsteczki (np.: polimeru supramolekularnego czy dendrymeru) i ustalenia stechiometrii indywiduów tworzących się podczas procesu samoorganizacji. Zastosowanie tej metody możliwe jest wyłącznie dla układów o szybkiej, w skali czasu NMR, wymianie chemicznej pomiędzy wolnymi a związanymi indywiduami. W tym wypadku obserwowany współczynnik dyfuzji ( $D_{\text{obs}}$ ) jest średnią ważoną wartości charakterystycznych dla indywiduum (cząsteczki gościa lub gospodarza) w formie związanej i wolnej (odpowiednio  $D_{\text{bound}}$  i  $D_{\text{free}}$ ):

$$D_{\text{obs}} = xD_{\text{bound}} + (1 - x)D_{\text{free}}$$

gdzie  $x$  oznacza ułamek molowy formy związanej.

W efekcie, w sposób analogiczny jak dla przesunięć chemicznych, możliwe jest wyznaczenie wartości  $K$ , stosując proste postępowanie iteracyjne dla serii danych uzyskanych dla różnego stosunku stężenia molekuł gościa i gospodarza.. Główna różnica polega na tym, iż w przypadku wyznaczania stałej  $K$  w oparciu o współczynniki dyfuzji, często nie jest potrzebne wykonanie pełnego miareczkowania. Sprawdza się to szczególnie w przypadku, gdy  $D_{\text{free}}$  dla cząsteczki

gościa jest znacząco różne od wartości  $D_{\text{bound}}$ . Ponieważ cząsteczka gościa jest z reguły znacznie mniejsza od cząsteczki gospodarza, przyjąć można iż wartość  $D_{\text{bound}}$  nie jest znacząco różna od wartości  $D_{\text{free}}$  dla liganda. Wyznaczanie stałych trwałości w oparciu o pomiary współczynników dyfuzji za pomocą technik NMR ma szereg zalet jak i wad, wynikających ze specyfiki metody rezonansu magnetycznego. Z jednej strony, w porównaniu z metodami opierającymi się na spektroskopii UV-Vis czy pomiarach elektrochemicznych, niewielkie ilości zanieczyszczeń nie powodują mierzalnych przekłamań uzyskanych wartości ani tym bardziej, jak to często bywa przy innych technikach, nie umożliwiają wykonania pomiaru. Z drugiej strony zastosowanie dyfuzjometrii ograniczone jest wyznaczania  $K$  zawierających się w przedziale  $10\text{-}10^5 \text{ M}^{-1}$ . Główną zaletą obliczania stałej trwałości ze współczynników dyfuzji jest ich niewrażliwość na równowagi kwasowo-zasadowe zachodzące w roztworze, mające duży wpływ na przesunięcia chemiczne. Ponadto, w wielu przypadkach, efekty związane ze zmianą przesunięć chemicznych są małe i, w efekcie, wyznaczone w oparciu o nie wartości  $K$  są obarczone dużymi błędami. Utrudnione i obarczone dużym błędem jest natomiast uzyskanie wartości  $K$  w przypadku, gdy wartości  $D_{\text{free}}$  i  $D_{\text{bound}}$  są podobne.

#### 4. Spektroskopia UV-Vis [4]

Spektroskopia absorpcyjna UV-Vis to technika spektroskopowa wykorzystująca zjawisko pochłaniania promieniowania elektromagnetycznego z zakresu 100-1000 nm (standardowo 190-800 nm) przez związki chemiczne, na skutek przejść elektronowych w nich następujących. Przejścia te dotyczą najniższej energetycznych orbitali, a zatem tych na orbitalach wiążących  $\pi$  (w zakresie dalekiego ultrafioletu również  $\sigma$ ), niewiązących z wolnych par elektronowych oraz elektronów zewnętrznych orbitali  $d$  i  $f$  w przypadku metali przejściowych. Pasma absorpcyjne są z reguły poszerzone na skutek przejść oscylacyjnych towarzyszących elektronowym.

Zastosowanie spektroskopii absorpcyjnej w zakresie światła widzialnego sprowadza się do dwóch, krańcowo różnych, podejść:

- a. spektroskopia układów w stanie równowagi
- b. spektroskopia układów wytrąconych ze stanu równowagi

**Ad. a.** W przypadku spektroskopii UV-Vis ilość informacji strukturalnych, możliwych do odczytania z widma jest ograniczona. Widmo to jest niespecyficzne i ponieważ pasma w nim występujące są najczęściej wypadkowymi kilku przejść – trudne do interpretacji. Jednakże, ze względu na wrażliwość kształtu krzywej absorpcji na zmiany elektronowe w cząsteczce, pomiar widm UV-Vis jest doskonałą metodą wykrywania nawet słabych oddziaływań między- i

wewnątrzcząsteczkowych. Zmiany położenia pasm lub ich intensywności są najlepszym i najszybszym sposobem wykrywania tworzenia się kompleksów gość-gospodarz w przypadku ligandów zawierających grupy chromoforowe lub auksochromy, które bezpośrednio uczestniczą w wiązaniu jonu (lub obojętnej cząsteczki). W wielu przypadkach również zmiana geometrii fragmentu chromoforowego, wywołana kompleksowaniem, jest przyczyną zmian charakteru widma. W przypadku jeśli grupa absorbująca światło jest oddalona od centrum kompleksowania, zmiany mogą być niezauważalne. Również w chemii supramolekularnej metali bloków d i f, ze względu na olbrzymi wpływ sfery koordynacyjnej na przejścia elektronowe d-d i f-f, metoda spektroskopii UV-Vis jest doskonałym narzędziem do śledzenia zachodzących w układzie oddziaływań. Miareczkowanie spektrofotometryczne, polegające na rejestracji widm w funkcji składu roztworu jest jedną z pierwszych technik, zastosowanych do wyznaczenia stałych trwałości kompleksów supramolekularnych. Dwie główne metody miareczkowania to metoda Joba (zwana metodą zmian ciągłych; polega na wykonaniu serii pomiarów dla roztworów, w których suma stężeń liganda i gościa pozostaje stała, zmienia się natomiast ich stosunek) oraz metoda stosunków molowych (przy której stężenie jednego z reagentów pozostaje stałe, drugiego zmienia się). Na podstawie wykresów zmian absorbancji przy wybranych, analitycznych długościach fali, określić można stechiometrię tworzących się kompleksów oraz ich stałe trwałości.

**Ad. b.** Pomiar widm UV-Vis wykonane dla układów wytrąconych ze stanu równowagi są jedną z głównych metod badań kinetyki reakcji tworzenia kompleksów. Stałe szybkości opisujące reakcję mogą być wyznaczone dzięki temu, że stała równowagi a zatem i entalpia swobodna ( $\Delta G$ ) mogą zostać zmienione po zadziałaniu na układ pozostający w równowadze gwałtownego zaburzenia (tj.: trwającego krócej niż czas odpowiedzi układu). Czynnikiem takim może być skok temperatury (*temperature jump*), ciśnienia (*pressure jump*) czy stężenia reagentów (wywołany ich raptownym zmieszaniem, np.: w technice zatrzymanego przepływu – *stopped flow* bądź fotodysocjacją kompleksu po zadziałaniu krótkiego impulsu laserowego). Inną metodą jest szybka zmiana stężenia jednego z substratów po wprowadzeniu go do układu w postaci tzw.: „*caged compounds*”. W tej technice reagenty są zmieszane, lecz nie reagują ze sobą gdyż jeden z nich (najczęściej cząsteczka gościa) pozostaje zdezaktywowana (związana z odpowiednią grupą ochronną). Krótki impuls światła powoduje rozpad takiego połączenia, co umożliwia reakcję tworzenia kompleksu. Ze względu na bardzo krótki czas pomiaru widma UV-Vis (lub absorbancji przy jednej/kilku długościach fali), metoda spektrofotometrii w zakresie światła widzialnego i ultrafioletu jest najbardziej odpowiednią metodą śledzenia zmian, zachodzących w czasie, w ta-

kim „wybitym” z równowagi, jedną z powyższych metod, układzie reakcyjnym. Zastosowanie każdej z metod jest ograniczone przez cechy badanego układu.

W przypadkach w których wartość  $\Delta G$  jest niewielka (rzędu wartości iloczynu RT), populacje wolnych ( $N_f$ ) i związanych w kompleks ( $N_b$ ) cząsteczek są porównywalne. Wówczas zastosowanie niewielkiego zaburzenia (skoku temperatury lub ciśnienia) szybko zmienia wartość  $\Delta G$  i populacje  $N_f$  i  $N_b$ . Ponieważ układ dąży do osiągnięcia stanu równowagi, zmianie ulega wielkość obu populacji. Dla prostego układu o stechiometrii 1:1 szybkość zmiany jednej z nich (np.:  $N_f$ ) opisać można jako:

$$\frac{\partial N_f}{\partial t} = k_{-1}N_b - k_1N_f$$

gdzie  $k_1$  i  $k_{-1}$  to odpowiednio, stałe szybkości procesów kompleksowania i rozpadu kompleksu.

Po przekształceniach otrzymujemy:

$$N_f(t) = N_f(\infty) + \Delta N_f e^{-\lambda t}$$

gdzie  $N_f(\infty)$  to równowagowa populacja formy wolnej (w warunkach po ustaniu zaburzenia);  $\Delta N_f$  – różnica populacji  $N_f$  w stanie początkowym i końcowym, natomiast wartość  $\lambda$  opisuje równanie:

$$\lambda = k_1 + k_{-1}$$

Na podstawie pomiaru wartości stałej trwałości K, możliwe jest wyznaczenie obu stałych szybkości.

Jeśli wartość  $\Delta G$  jest wielokrotnie większa od iloczynu RT, wielkości  $N_f$  i  $k_{-1}$  są bliskie zeru. Konieczne jest zatem wywołanie dużego zaburzenia w populacji wolnego liganda (lub gościa). Można to osiągnąć stosując metodę zatrzymanego przepływu, radiolizy impulsowej lub fotolityczną.

## 5. Absorpcyjna i ramanowska czasoworozdzielcza spektroskopia w podczerwieni [5]

Czasoworozdzielcza spektroskopia w zakresie podczerwieni łączy w sobie wrażliwość na zmiany strukturalne, zachodzące w molekułach ze znaczną rozdzielczością czasową, pozwalającą precyzyjnie śledzić procesy mające miejsce

w układzie ligand-gość. Oddziaływania pomiędzy komponentami kompleksu mogą zostać zaburzone za pomocą jednej z metod, wspomnianych przy okazji spektroskopii UV-Vis (najczęściej używa się metody skoku temperaturowego i zatrzymanego przepływu) lub technikę impulsów pompujących (promieniowania elektromagnetycznego z zakresu IR-UV). Maksymalna rozdzielczość czasowa pomiarów jest rzędu femtosekund. W zależności od szybkości badanego procesu stosuje się trzy metody akwizycji danych: metodę szybkiego skanowania (*rapid scan*), wymagającą akumulacji interferogramów w czasie wielokrotnie krótszym niż  $T_{1/2}$  badanych procesów oraz metodę krokowego skanowania (*step-scan*), wymagająca wykonania szeregu eksperymentów dla różnych położeń lustra interferometru. W drugim przypadku rozdzielczość czasowa determinowana jest przez dynamikę detektora, rozdzielczość widmowa, przez ilość położeń zwierciadła, dla których zarejestrowano widmo. Ponieważ każda rejestracja wymaga osobnego wzbudzenia, w przypadku badania reakcji nieodwracalnych konieczna jest każdorazowa wymiana próbki, na przykład dla 1000 punktów pomiarowych. Trzecią możliwością jest zastosowanie monochromatora i akwizycja szeregu przebiegów zmian absorbancji w czasie (przy jednostkowych długościach fali) a następnie rekonstrukcja widma. Niestety, popularność czasoworozdzielczej spektroskopii IR ograniczona jest znacznie przez fakt, iż na rynku brak komercyjnie dostępnego spektrometru, umożliwiającego takie pomiary.

## 6. Techniki elektrochemiczne

Techniki elektrochemiczne, mające zastosowanie w badaniu związków makrocyclicznych, można ogólnie podzielić na metody oparte o zmiany powierzchniowe i metody wewnątrzelektrodowe. Pierwsze z wymienionych wykorzystują zjawiska zachodzące na granicy elektroda-roztwór i można do nich zaliczyć na przykład pomiary woltametryczne. Drugie odnoszą się do procesów zachodzących we wnętrzu samej elektrody (konduktometria).

Procesy powierzchniowe można podzielić na dwie grupy:

1. procesy równowagowe
2. procesy dynamiczne

Grupa pierwsza dotyczy eksperymentów, w trakcie których przez cały czas utrzymywana jest równowaga w ogniwie (prąd płynący przez nie jest cały czas równy zero). Mierzony jest przede wszystkim potencjał ogniwa i jego zmiany w trakcie eksperymentu.

Grupa druga to eksperymenty, w trakcie których celowo wytrąca się układ ze stanu równowagi, utrzymując znany prąd lub potencjał. Istotna jest rejestracja potencjału i prądu, czasami istotnym wyznacznikiem staje się czas powrotu do stanu równowagowego. Grupa ta jest znacznie obszerniejsza i zaliczyć do niej można na przykład miareczkowanie cyklowoltametryczne, elektrogravimetrię,



kulometrię, woltometrię lub też miareczkowanie amperometryczne.

Umieszczając w elektrolicie dwie różne elektrody, można mierzyć potencjał między nimi – siłę elektromotoryczną ogniwa (SEM). Jeśli jedna z elektrod będzie miała określony i wyznaczony wcześniej potencjał, który w dodatku jest wystarczająco stabilny, to można operować potencjałem względnym, używając jej jako elektrody odniesienia. Elektroda druga jest wtedy nazywana elektrodą pracującą, a SEM jest określany wzorem:

$$\Delta E = E_w - E_{ref}$$

gdzie  $E_w$  jest potencjałem elektrody pracującej, a  $E_{ref}$  potencjałem elektrody odniesienia.

Potencjał taki jest stały i jednoznacznie określony, a przez ogniwo nie płynie żaden prąd. Taki układ można stosować przy pomiarach statycznych, w których i tak nie zakłóca się w żaden sposób równowagi.

Sytuacja komplikuje się, kiedy przeprowadza się pomiary dynamiczne. W takim wypadku przez ogniwo płynie prąd, a na powierzchni obu elektrod zachodzą procesy elektrochemiczne. Jest to zjawisko niedopuszczalne w przypadku większości elektrod odniesienia, gdyż zmieniłaby się ich charakterystyka, jak i potencjał standardowy, przez co stałyby się równie bezużyteczne, jak wyniki otrzymane za ich pomocą.

W takim wypadku pomocne jest wprowadzenie do ogniwa trzeciej elektrody, zwanej też elektrodą zliczającą. Jej zadaniem jest zbieranie całego prądu przepływającego przez elektrodę pracującą. W takim wypadku prąd przepływający między dwiema pierwszymi elektrodami jest niemalże równy zero (elektroda odniesienia jest podłączona przez bardzo dużą rezystencję).

Urządzenie kontrolujące ogniwo – potencjostat, automatycznie reguluje potencjał elektrody tak, aby zebrała ona całkowity prąd. Jej potencjał jest najczęściej w ogóle nie rejestrowany, gdyż nie odgrywa on żadnej roli. Istotne jest, aby jej powierzchnia użytkowa znacznie przekraczała powierzchnię elektrody pracującej. Jeśli taki warunek nie zostałby spełniony, to właśnie charakterystyka tej elektrody miałaby decydujący wpływ na całe ogniwo. Układ taki ma dodatkowo taką zaletę, że można się skupić tylko i wyłącznie na zjawiskach zachodzących na jednej elektrodzie.

Elektrody znajdujące się w układzie mogą albo same podlegać badaniu, bądź też mogą być tylko dostarczycielem lub odbiorcą elektronów. W drugim przypadku należy wziąć pod uwagę takie czynniki, jak bierność chemiczna materiału elektrody, jego czystość czy też przewodnictwo prądu elektrycznego w elektrolicie.

- Elektrody pracujące – jeśli bada się sam roztwór, elektrody wykonuje



się z takich materiałów, jak złoto, platyna, rtęć lub mocno sprasowany grafit (błyszczący). Najczęściej mają kształt dysku o powierzchni od 0,01 do 0,5 cm<sup>2</sup>. Bardzo ważne jest, aby powierzchnia była płaska i dokładnie wypolerowana. Jakikolwiek nierówności wpływają na charakterystykę elektrody. Elektrode poleruje się na specjalnych urządzeniach szlifierskich materiałami o grubości ziarna 0,05 do 5 μm lub też pastą diamentową. Polerowanie wykonuje się na chwilę przed eksperymentem lub czasem w jako trakcie.

- Elektrody dodatkowe – najczęściej platyna lub złoto, muszą mieć dostatecznie dużą powierzchnię czynną. Elektroda powinna być równoległą do elektrody pracującej.
- Elektrody odniesienia zostały opisane w kolejnej sekcji.

## 7. Potencjometria

Metoda ta polega, w uproszczeniu, na miareczkowaniu badanego roztworu w ogniwie galwanicznym. Jeśli jeden z reagentów występować będzie na kilku różnych stopniach utlenienia lub będzie obdarzony ładunkiem, w trakcie miareczkowania potencjał ogniwa będzie się zmieniał. Ogniwo zbudowane jest następująco:

elektroda odniesienia || elektrolit || elektroda pomiarowa

Potencjał półogniwa dany jest wzorem:

$$E = E_{\text{ref}} + E_j - E_i$$

gdzie  $E_{\text{ref}}$  jest potencjałem półogniwa odniesienia,  $E_j$  jest potencjałem dyfuzyjnym, a  $E_i$  potencjałem badanego półogniwa.

Elektroda wskaźnikowa (lub pracująca) powinna odpowiadać odwracalnie na zmiany ilości (stężenia) jonu (X), który jest oznaczany. Jeśli warunek ten jest spełniony, co można osiągnąć dobierając odpowiednie elektrody do danego eksperymentu, mierzony potencjał będzie funkcją stężenia składnika X. Dla układów idealnych  $E_i$  wyznacza się bezpośrednio z równania Nernsta, co przydatne jest w przypadku elektrod jonoselektywnych, gdzie potencjał zależy od gradientu stężenia jonów.

$$E_i = E_i^0 + \left(\frac{RT}{nF}\right) \ln a_x$$

gdzie  $E_i^0$  jest potencjałem standardowym, a  $a_x$  jest aktywnością jonów X.

W rzeczywistych układach elektrody zachowują się jedynie w sposób zbliżony do idealnego modelu, wskazując taką liniową zależność potencjału od logarytmu stężenia  $X$  w określonych warunkach ciśnienia i temperatury.

$$E_i = E_i^{0'} + S \log[X]$$

przy czym parametry  $E_i^{0'}$  i  $S$  są stałymi empirycznymi wyznaczanymi w trakcie kalibracji.

Potencjał ogniwa z elektrodą szklaną dany jest wzorem:

$$E = E^0 - E_{\text{ref}} = E_j - \left(\frac{2,3RT}{F}\right) \log([H^+] \gamma_H)$$

gdzie  $E^0$  jest potencjałem standardowym elektrody szklanej, a  $\gamma_H$  jest współczynnikiem aktywności jonów wodorowych.

Przy dużych stężeniach jony te, a wraz z nimi jony wodorotlenowe, zaczynają odgrywać główną rolę w przewodzeniu prądu z powodu swojej ogromnej mobilności w porównaniu do dużych jonów nieorganicznych występujących w elektrolitach. Z tego powodu wahania potencjału dyfuzyjnego są dużo większe od błędów pomiarowych i eksperyment traci sens. Z tego powodu elektrody szklane stosuje się dla pH z przedziału od 2 do 12. W układach rzeczywistych, zakładając niezmienność  $E_j$  i  $\gamma_H$ , równanie przybiera postać:

$$E = E^{0'} + SpH$$

gdzie:

$$E^{0'} = E^0 + E_{\text{ref}} + E_j - \left(\frac{2,3RT}{F}\right) \log \gamma_H, S = \left(\frac{2,3RT}{F}\right),$$

a pH jest zdefiniowane jako

$$\text{pH} = -\log[H^+]$$

Zastosowanie stężeń ma jednak w przypadku elektrody szklanej sens, gdyż to właśnie stężenia pojawiają się zarówno w bilansie materiałowym, jak i w

bilansie ładunków. Kalibrację elektrody szklanej przed pomiarami potencjometrycznymi należy przeprowadzić za pomocą serii roztworów o znanych stężeniach jonów wodorowych i sile jonowej identycznej z posiadaną przez roztwory użyte w samych pomiarach. Można na przykład kalibrować aparaturę w trakcie miareczkowania mocnego kwasu o znanym stężeniu (na przykład 0,005M) zasadą o tym samym stężeniu i sile jonowej jak elektrolit miareczkowania kwasu (na przykład elektrolitem jest 0,1M KCl, powinno się użyć do miareczkowania 0,1M roztworu KOH). Wyniki tego miareczkowania analizowane są następnie za pomocą wykresów Grana [6]. Kalibracja za pomocą roztworów buforowych jest możliwa, o ile zastosuje się takie sprzężone pary kwas-zasada, jak na przykład kwas octowy z octanem sodu czy jedno- i dwuzasadowe fosforany, gdyż ich stałe dysocjacji są bardzo dobrze znane dla różnych sił jonowych, dzięki czemu można obliczyć stężenie jonów wodorowych dla wszystkich zamierzonych punktów pomiarowych. Ważnym zastosowaniem miareczkowania potencjometrycznego jest wyznaczanie stałych dysocjacji protonowej cząsteczek i jonów w roztworach. Termodynamiczna stała dysocjacji kwasu LH dana jest wzorem:

$$K_a^T = \frac{a_H a_L}{a_{LH}} = \frac{[H][L]\gamma_H\gamma_L}{[LH]\gamma_{LH}}$$

gdzie  $a_H$ ,  $a_L$  i  $a_{LH}$  to aktywności,  $\gamma_H$ ,  $\gamma_L$ ,  $\gamma_{LH}$  współczynniki aktywności odpowiednich składników.

Stechiometryczna stała dysocjacji jest z drugiej strony dana równaniem:

$$K_a^C = \frac{[H][L]}{[LH]}$$

stąd wynika, że obie stałe są ze sobą powiązane zależnością

$$K_a^C = K_a^T \frac{\gamma_{LH}}{\gamma_H\gamma_L}$$

Jeśli założyć, że wszystkie współczynniki aktywności są stałe, można wnioskować, że wartość stałej dysocjacji nie zmienia się, co oznacza, że można tę wartość traktować jak stałą w danych warunkach. Jeśli kalibrację ph-metru prze-

proceedzi się zgodnie z podanymi zaleceniami, wartości stechiometrycznej stałej dysocjacji można będzie wyliczyć z danych miareczkowania. Stałą termodynamiczną można wtedy obliczyć za pomocą równania, korzystając bądź z wyliczonych współczynników aktywności lub też dokonując serii pomiarów stałej stechiometrycznej w różnych warunkach, i jeśli nośnik jest jednym elektrolitem, ekstrapolując do sił jonowej równej zero. Kolejny termin znany z literatury, to stała Brönsteda

$$K_a^B = \frac{a_H[L]}{[LH]}$$

Definicja ta może być przydatna w przypadkach, kiedy współczynnik może zostać zmierzony niezależnie, na przykład z użyciem metod spektrofotometrycznych, a aktywność jonów wodorowych jest mierzona elektrodą szklaną. Czasami wygodniej jest zamiast stałych dysocjacji zastosować ich odwrotność – stałe protonowania ( $pK_a = \log K_H$ ). Dla kwasu wieloprotonowego stałe te dane są wzorami (w równaniach pominięto dla uproszczenia zapisu znaczenie ładunków poszczególnych składników)

$$K_{H_1} = \frac{[LH]}{[L][H]} \qquad K_{H_2} = \frac{[LH_2]}{[LH][H]}$$

$$K_{H_n} = \frac{[LH_n]}{[LH_{n-1}][H]}$$

lub ogólnie

$$K_{H_i} = \frac{[LH_i]}{[LH_{i-1}][H]}, i \text{ od } 1 \text{ do } n$$

gdzie  $L$  jest formą kwasu całkowicie zdysocjonowaną.

Używając zestawu powyższych równań zapisać można dwa równania bilansu masowego, poprawne dla wszystkich punktów na krzywej miareczkowania

$$\begin{aligned}
 [L]_t &= [L] + [LH] + [LH_2] + \dots + [LH_n] \\
 &= [L](1 + K_{H_1}[H] + K_{H_1}K_{H_2}[H]^2 \\
 &\quad + \dots + K_{H_1}K_{H_2} \dots K_{H_n}[H]^n)
 \end{aligned}$$

oraz

$$\begin{aligned}
 [H]_t &= [H] - [OH^-] + [B] + [LH] + 2[LH_2] \\
 &\quad + \dots + n[LH_n] = [H] - \frac{K_w}{[H]} + [B] \\
 &\quad + [L](K_{H_1}[H] + 2K_{H_1}K_{H_2}[H]^2 \\
 &\quad + \dots + nK_{H_1}K_{H_2} \dots K_{H_n}[H]^n)
 \end{aligned}$$

gdzie  $[L]_t$  jest całkowitym stężeniem liganda w układzie,  $[H]_t = n[L]_t$  jest całkowitym stężeniem jonizowalnego wodoru,  $[B]$  jest stężeniem dodawanego tyrantu, a  $K_w$  jest iloczynem jonowym wody ( $pK_w = 13,891$  przy  $25^\circ\text{C}$  i sile jonowej  $0,1M$ ).

Korzystając z dwóch powyższych równań, obliczyć można funkcję Bjerruma w postaci:

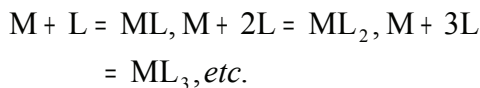
$$\begin{aligned}
 \bar{n} &= \frac{[H]_t - [H] + \frac{K_w}{[H]} - [B]}{[L]_t} \\
 &= \frac{K_{H_1}[H] + 2K_{H_1}K_{H_2}[H]^2 + \dots + nK_{H_1}K_{H_2} \dots K_{H_n}[H]^n}{1 + K_{H_1}[H] + K_{H_1}K_{H_2}[H]^2 + \dots + K_{H_1}K_{H_2} \dots K_{H_n}[H]^n}
 \end{aligned}$$

gdzie  $[H]$  jest obliczane na podstawie wskazań pH-metru, a  $[H]_t$ ,  $[L]_t$  i  $[B]$  są wyliczone na podstawie znanych stężeń początkowych i ilości dodawanego tyrantu. Funkcja Bjerruna  $\bar{n}$  wyraża średnią liczbę cząsteczek ligandu związanych z substratem i przyjmuje wartości od 0 do ogólnej liczby miejsc wiążących  $N$ . Do dopasowania tej funkcji do danych eksperymentalnych można użyć dowolnego programu używającego nieliniowej metody najmniejszych kwadratów.

Wyznaczanie stałych protonowania ligandu jest istotnym zadaniem, gdyż od wyników tych pomiarów zależy dobór rozpuszczalnika ze względu na możliwe tworzenie wiązań wodorowych i inne oddziaływania przy zadanej wartości pH. Ponadto, jeśli chce się wyznaczyć stałe tworzenia kompleksów kation-ligand, należy najpierw oznaczyć właśnie stałe protonowania, które później używa się jako stałe przy obliczeniach dających ostatecznie wartość stałej kompleksowa-

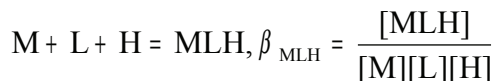
nia.

W najprostszym przypadku obserwowane są tylko kolejne etapy formowania kompleksów o różnej stechiometrii z ligandem:

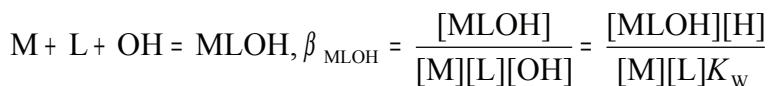


$$\begin{aligned} \beta_1 &= K_1 = \frac{[ML]}{[M][L]}; \beta_2 = K_1 K_2 \\ &= \frac{[ML_2]}{[M][L]^2}, \beta_3 = K_1 K_2 K_3 \\ &= \frac{[ML_3]}{[M][L]^3}, \text{etc.} \end{aligned}$$

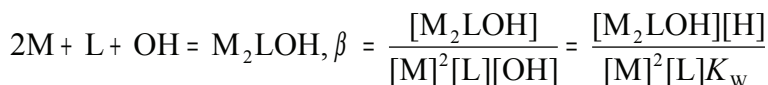
gdzie  $\beta_i$  i  $K_i$  są ogólnymi i cząstkowymi stechiometrycznymi stałymi tworzenia. W przypadku niektórych ligandów mogą istnieć formy częściowo protonowane –  $LH_j$  (j od 1 do  $n - 1$ ), na przykład:



W roztworach powstawać mogą również kompleksy hydroksometaliczne, na przykład:

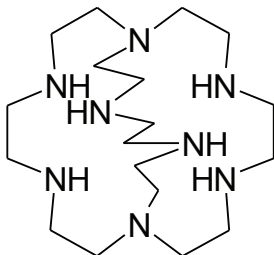
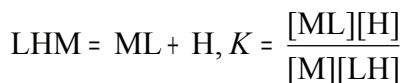


W układzie ponadto mogą równocześnie występować obok siebie ligandy protonowane lub aniony z grupami OH, co dodatkowo komplikuje układ, na przykład:



Niektóre ligandy mają tak wielką ostatnią stałą protonowania (na przykład ligandy z alkoholową lub amidową grupą donorową), że przy braku obecno-

ści jonu metalu nie obserwuje się formy całkowicie zdysocjonowanej. W takim przypadku tworzenie kompleksu związane jest z przemieszczeniem jednego lub więcej protonów w obrębie cząsteczki, w następujący sposób:



Azokryptand

We wszystkich przykładach równowag, kationy konkurują z protonami o grupy donorowe ligandów, zwiększając kwasowość środowiska. Dlatego też krzywe miareczkowania po dodaniu jonów metali zmieniają się w ten sposób, że przy takiej samej ilości dodanej zasady, pH będzie niższe niż przy miareczkowaniu samego ligandu. Im silniej wiązany jest metal z ligandem, tym bardziej krzywa miareczkowania będzie zbliżona do odpowiedniego miareczkowania mocnego kwasu mocną zasadą, co jest spowodowane praktycznie całkowitym zastąpieniem protonów przy donorach liganda jonami metalu.

Jeśli ligand posiada ładunek dodatni w formie sprotonowanej tak, jak to jest w przypadku poliamin, może dzięki oddziaływaniom elektrostatycznym i/lub wiązaniom wodorowym tworzyć kompleksy również z anionami. Stała równowagi takiego kompleksowania również może być obliczana za pomocą odpowiedniego miareczkowania. Kompleksowanie anionów stabilizuje sprotonowaną formę ligandu, tak więc zakłóca ono ich dysocjację i przesuwając krzywą miareczkowania w kierunku wyższych wartości pH, tak jak dzieje się to w przypadku kompleksowania fluorków z azokryptandem.

Analiza matematyczna krzywych miareczkowania uzyskanych przy obecności jonów metali opiera się na rozwiązaniu równań:

$$\begin{aligned}
 [L]_t &= [L] + [LH] + [LH_2] + \dots [LH_n] \\
 &= [L](1 + K_{H_1}[H] + K_{H_1}K_{H_2}[H]^2 \\
 &\quad + \dots K_{H_1}K_{H_2} \dots K_{H_n}[H]^n)
 \end{aligned}$$

oraz

$$\begin{aligned}
 [H]_t &= [H] - [OH^-] + [B] + [LH] + 2[LH_2] \\
 &\quad + \dots n[LH_n] = [H] - \frac{K_w}{[H]} + [B] \\
 &\quad + [L](K_{H_1}[H] + 2K_{H_1}K_{H_2}[H]^2 \\
 &\quad + \dots nK_{H_1}K_{H_2} \dots K_{H_n}[H]^n)
 \end{aligned}$$

które wiążą stężenia skompleksowanego ligandu, jak i skompleksowanych, ale częściowo sprotonowanych form ligandu z bilansem masowym dając w sumie wyrażenie na całkowite stężenie kompleksowanego związku –  $[M]_t$ . Na przykład  $Ca^{2+}$  tworzy z EDTA (kwas tetrakarboksylowy,  $LH_4$ ) dwa kompleksy: w jednym ligand jest kompletnie deprotonowany, w drugim zaś jest on jednozasadowy. W tym przypadku mamy do czynienia z trzema równaniami bilansu masowego:

$$[L]_t = [L] = [LH] + [LH_2] + [LH_3] + [LH_4] + [CaL] + [CaLH]$$

$$[H]_t = [H] - [OH^-] + [B] + [HL] + 2[LH_2] + 3[LH_3] + 4[LH_4] + 3[CaLH]$$

$$[M]_t = [Ca] + [CaL] + [CaLH]$$

Stężenie wszystkich sprotonowanych i skompleksowanych cząsteczek jest wyrażone w funkcji stężenia wolnego metalu, zdeprotonowanego ligandu i protonów zgodnie z zapisem równania. Otrzymuje się w efekcie końcowym trzy równania z trzema niewiadomymi, które muszą być rozwiązane dla każdego punktu krzywej miareczkowania. Jest to złożony problem matematyczny rozwiązywany z pomocą odpowiednich programów komputerowych.

Warto zwrócić uwagę na istotny wpływ błędów w wyznaczaniu stężenia reagentów, objętości roztworu, kalibracji elektrody, błędów przypadkowych, jak i traktowania stałych protonowych jako stałych, na jakość wyniku końcowego. Aby zminimalizować zakłócenia wart zamiast określonych wartości pH noto-



wać jedynie zmiany pH.

W niektórych przypadkach należy unikać zbyt dużych stężeń elektrolitu. Na przykład wyznaczając stałe tworzenia kompleksów rzędu  $1-10 \text{ M}^{-1}$ , potrzeba używać bardzo dużych stężeń składników, co może doprowadzić do zbyt dużej niestabilności siły jonowej w trakcie miareczkowania, co może doprowadzić do zmian współczynników aktywności w trakcie pomiarów. Należy wtedy wprowadzić czynniki korygujące na współczynniki aktywności, potencjał dyfuzyjny czy selektywność elektrody szklanej [7].

Z powodu ograniczeń narzucanych przez stosowanie elektrody szklanej, przy tego typu pomiarach można stosować wartość pH tylko z ograniczonego przedziału: od 2 do 12. W związku z tym nie jest możliwe badanie bardzo wielu związków, których stała protonowania jest mniejsza niż  $100 \text{ M}^{-1}$ , gdyż zbyt kwasowe ligandy pozostaną w tym przypadku całkowicie zdysocjonowane, zaś zbyt zasadowe ligandy nie będą w stanie oddać protonów w podanym zakresie pH. Niemniej jednak istnieją inne techniki, które pozwalają badać takie związki.

W elektrodach jonoselektywnych stosuje się półprzepuszczalne membrany ciekła lub stała, przepuszczające określone kationy czy aniony. Mogą one być na przykład nierozpuszczalnymi jonowymi fazami stałymi (na przykład szkło dla kationów), polimerowymi wymiennicami jonowymi (na przykład poliamina) albo neutralnymi nośnikami jonów, tak jak na przykład etery koronowe [8]. Potencjał elektrodowy powstaje, podobnie jak w przypadku elektrody szklanej, poprzez dyfuzję danych jonów przez membranę, która zachowuje się jak wymienniczk jonowy.

Wszystkie uwagi odnośnie potencjału dyfuzyjnego i współczynników aktywności dla elektrody szklanej, są aktualne również w przypadku elektrod jonoselektywnych. Rozwiązanie problemów jest również analogiczne i tak na przykład kalibrowanie aparatury przeprowadza się analogicznie. Warto zwrócić uwagę, iż wrażliwość elektrody jonoselektywnej na charakterystyczne dla niej jony jest zawsze mniejsze niż wrażliwość elektrody szklanej na jony wodorowe. Współczynnik selektywności,  $K_{XY}$  elektrody specyficznej dla X, w obecności innego jonu Y, dany jest następującym semiempirycznym równaniem:

$$E = \left( \frac{RT}{nF} \right) \ln([X] + K_{XY}[Y]) + \text{const.}$$

Elektrody jonoselektywne zastosowano z powodzeniem do wyznaczania stałych tworzenia kompleksów kationów metali alkalicznych i  $\text{NH}_4^+$  ze związkami makrocyklicznymi [9-11]. W metodzie tej roztwór soli (np. NaCl) o danym stężeniu  $[M]_i$  jest miareczkowany roztworem zawierającym sól o tym samym

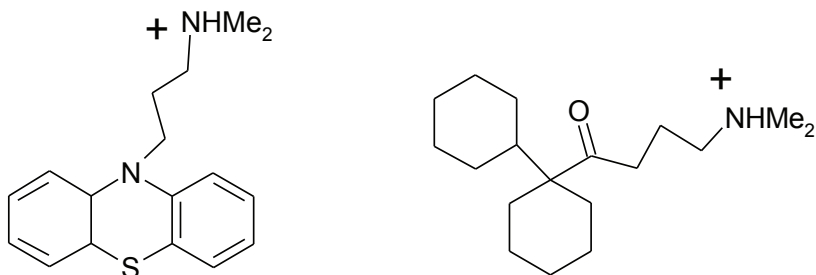
stężeniu i zawierającą nadmiar neutralnego ligandu makrocyklicznego. Ogniwu zbudowane jest z elektrody jonoselektywnej wrażliwej na dany jon i elektrody Ag/AgCl (chlorosrebrowej) jako elektrody odniesienia. Krzywa kalibracji ma wtedy punkt przecięcia, w którym  $\frac{RT}{F} = 59.16\text{mV}$ , tak więc stężenie wolnego kationu w każdym punkcie może być obliczone za pomocą następującego równania:

$$[M^+] = [M]_t 10^{-\Delta E / 59.16}$$

gdzie  $\Delta E$  jest różnicą pomiędzy wskazaniem miernika dla roztworu czystej soli i roztworu z ligandem. Stałe tworzenie kompleksów mogą być wtedy wyznaczone.

Poczyniono próby pomiarów z elektrodami tego typu w przypadku słabych kompleksów, kiedy to nie można utrzymać stałej siły jonowej [12].

Czasami można przystosować elektrodę wrażliwą na żądany jon, mając do dyspozycji elektrodę przeznaczoną dla zupełnie innego jonu poprzez chemiczną modyfikację membrany. Dzięki temu można było na przykład badać przyłączenie kationów do  $\alpha$  i  $\beta$  cyklodekstryn.



W badaniach tych użyto elektrod jonoselektywnych, w których wstawiono membrany z polichlorku winylu, w którym umieszczono odpowiednie grupy selektywne względem badanych związków [13]. Każda membrana została przygotowana przez wymianę protonów z grup końcowych  $-\text{SO}_3\text{H}$  sulfonowanego polichlorku winylu przez odpowiednie kationy.

Jeśli elektroda wskaźnikowa jest metalem zanurzonym w roztworze soli tego samego metalu, jak na przykład elektroda srebrna w roztworze soli  $\text{Ag}^+$  czy elektroda miedziana w roztworze  $\text{Cu}^{2+}$ , potencjał takiego półogniwa dany jest wzorem:

$$E_i = E_i^0 + \left(\frac{RT}{nf}\right) \ln a_x$$

przy czym  $a_x$  jest aktywnością kationu metalu stanowiącego daną elektrodę. Takie elektrody wydawałyby się idealnym narzędziem do pomiarów stężeń wolnych jonów metali. Niestety, większość z nich nie jest odwracalna (w równowadze termodynamicznej znajdują się tylko elektrody kilku metali: Ag, Cu, Pb, Cd i Hg).

Mimo tak ograniczonego zakresu zastosowań dokonano wielu pomiarów stałych tworzenia kompleksów ligandów makrocyclicznych z Ag<sup>+</sup> [14,15]. W technice tej roztwór AgNO<sub>3</sub> w danym rozpuszczalniku w obecności elektrolitu (nadchloran tetraetyloamoniowy) jest miareczkowany roztworem z ligandem w analogicznym rozpuszczalniku zawierającym ten sam elektrolit o analogicznym stężeniu. Roztwór jest połączony z półogniwem odniesienia, wypełnionym takim samym roztworem azotanu srebra, jak roztwór miareczkowania (połączenie jest wykonane za pomocą klucza elektrolitycznego, zawierającego ten sam elektrolit, w tym samym rozpuszczalniku). Elektroda wskaźnikowa, jak i elektroda odniesienia są elektrodami srebrowymi – pierwsza jest zanurzona w roztworze miareczkowanym, druga zaś w roztworze odniesienia.

Stałe tworzenia kompleksów mogą być obliczane analogicznie, jak w poprzednich przypadkach.

## 8. Polarografia i cyklowoltametria

W części tej przedstawione zostaną tylko dwie z wielu technik wykorzystujących zależność prądu od przyłożonego napięcia. Są one najbardziej rozpowszechnione w badaniach stanów równowagowych przy tworzeniu związków kompleksowych, jak i przy określaniu właściwości oksydacyjno-redukcyjnych w chemii supramolekularnej.

Klasyczna polarografia zajmuje się pomiarami zależności prądu od przyłożonego potencjału. Stosuje się tutaj najczęściej kroplową elektrodę rtęciową. Jeśli zachodzi odwracalny proces redox na elektrodzie, równanie wyznaczonej eksperymentalnie krzywej prąd-potencjał ma formę:

$$E = E_{1/2} - \left(\frac{2.3RT}{nf}\right) \log\left(\frac{i}{i_d - i}\right)$$

gdzie  $E_{1/2}$  jest obserwowanym potencjałem półfali ( $E = E_{1/2}$ , gdy  $i = i_d/2$ ), kiedy prąd  $i$  płynący przez ogniwo jest równy połowie prądu granicznego  $i_d$

$$E_{1/2} = E^{0'} - \left(\frac{2.3RT}{nf}\right) \log(I_{\text{ox}}/I_{\text{red}})$$

Prąd graniczny  $i_d$  jest prądem zaporowym – największą możliwą wartością prądu dla danego ogniwa – w takich warunkach stężenie formy utlenionej przy powierzchni elektrody wynosi zero (nieskończenie duży potencjał ujemny). We wzorze tym  $E^{0'}$  oznacza formalny potencjał danej pary redox, a  $I$  jest stałą prądu dyfuzyjnego. W celu wyznaczenia kolejnych stałych tworzenia kompleksów, używa się równania DeForda i Humme'a [16]:

$$\begin{aligned} & \text{Antilog}\left(\frac{0.4343nF}{RT}[(E_{1/2})_f - (E_{1/2})_c]\right) + \log\left(\frac{I_f}{I_c}\right) \\ & = 1 + \beta_1[L] + \beta_2[L]^2 + \beta_3[L]^3 + \dots \end{aligned}$$

gdzie indeksy 'f' i 'c' oznaczają odpowiednio formę wolną (ang. free) i skompleksowaną (ang. complexed) jonu. Funkcja Antilog jest zdefiniowana jako  $\text{Antilog}(x) = \log^{-1}(x) = 10^x$ . Współczynnik  $I_f/I_c$  to iloraz prądów dyfuzyjnych odpowiednio bez i w obecności ligandu:

$$\frac{I_f}{I_c} = \frac{(i_d)_f}{(i_d)_c}$$

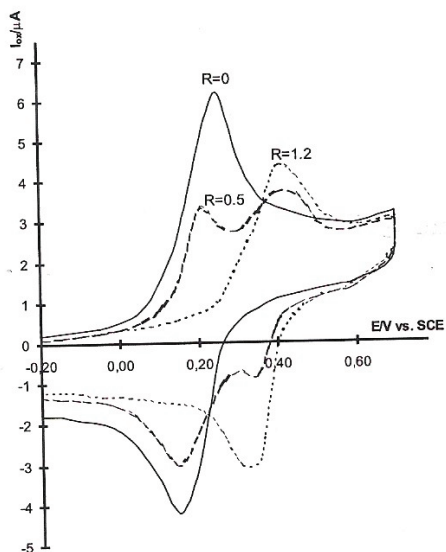
Badania polarograficzne opierają się na analizie przesunięć potencjału półfali  $E_{1/2}$  dla układu z i bez ligandu. Polarografia jest bardzo czułą techniką – można ją stosować już przy stężeniach metalu oscylujących wokół  $10^{-6}\text{M}$  i przy dużym nadmiarze stężenia ligandu. W takich warunkach stężenie wolnego ligandu może być z dobrą dokładnością uznane za całkowite stężenie ligandu, a dopasowywanie funkcji na podstawie wyników pomiarów może być przeprowadzane za pomocą dowolnego programu korzystającego z nieliniowej metody najmniejszych kwadratów. Stałe tworzenia kompleksów wyznaczone tą metodą są jednak mniej dokładne od uzyskiwanych za pomocą potencjometrii, co jest spowodowane dużymi niedokładnościami w wyznaczaniu potencjału półfalo-  
wego  $E_{1/2}$ .

Polarografię zastosowaną z dużym powodzeniem w wyznaczaniu stałych asocjacji par jonów różnych makrocyclicznych poliamin anionów di- i trikarboksylowych kwasów [17]. W ich przypadku obserwowano fale andowe:

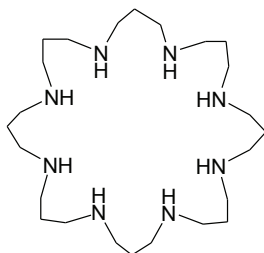


Cyklowoltametrya różni się od polarografii tym, iż potencjał zmienia się w obu kierunkach. Pomiar zaczyna się przy zadanym potencjale, który następnie maleje do określonej wartości, kierunek zmian zostaje wtedy odwrócony i potencjał powoli powraca do wartości początkowej. Elektroda rtęciowa z wiszącą kroplą i elektrody stałe takie jak szklana, platynowa czy złota używane są tutaj jako elektrody pracujące. Klasyczna cela do cyklowoltametrii składa się z trzech elektrod – pracującej, odniesienia i odbiorczej. Pierwsza i ostatnia są umieszczone bardzo blisko siebie, dzięki czemu przez elektrodę odniesienia nie płynie praktycznie żaden prąd i jej potencjał pozostaje stały.

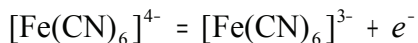
Weźmy dla przykładu  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ . Wykres:



przedstawia przykładowe wyniki pomiaru cyklowoltametrycznego dla tego związku, w których ligandem jest cząsteczka



Na początku potencjał zmienia się w kierunku dodatnich wartości zgodnie z kierunkiem wskazywanym przez strzałkę. Kiedy jest on dostatecznie wysoki, aby utlenić Fe(II), pojawia się silny prąd anodowy, spowodowany reakcją:



i rośnie dopóki stężenie  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  w pobliżu elektrody nie zmaleje dość

mocno z powodu przekształcania żelaza do formy utlenionej. Potencjał, przy którym następuje zmiana kierunku, wynosi dla tego przykładu 0,7V. Podczas powracania do potencjału początkowego można zaobserwować prąd katodowy spowodowany redukcją  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  skupionego wokół elektrody w trakcie

poprzedniego przebiegu. Należy zaznaczyć, że zarówno cząsteczki formy utlenionej, jak i zredukowanej, powinny przemieszczać się tylko i wyłącznie na zasadzie dyfuzji. Należy wykluczyć konwekcję, która mogłaby zaowocować gwałtownym usuwaniem produktu z bezpośredniego otoczenia elektrody. Dlatego należy odpowiednio zabezpieczyć celę pomiarową przed wpływami otoczenia (drżania). Ważnymi parametrami cyklowoltogramu są maksymalny prąd anodowy ( $i_{pa}$ ) i związany z nim potencjał ( $E_{pa}$ ) oraz maksymalny prąd katodowy ( $i_{pc}$ ) i potencjał z nim związany ( $E_{pc}$ ). Jeśli bowiem para red-ox jest odwracalna, potencjał półfali znajduje się dokładnie pośrodku między wartościami  $E_{pa}$  i  $E_{pc}$ .

$$E_{1/2} = \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2}$$

Często  $E_{1/2}$  wyznaczone tym sposobem jest utożsamiane z potencjałem standardowym, ponieważ współczynniki dyfuzji mają mały wpływ na tą wartość. Różnica pomiędzy potencjałami obu „wierzchołków” cyklowoltogramu jest związana z liczbą elektronów przeniesionych w trakcie reakcji elektrodowej:

$$\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} = 0.059/n$$

Elektrochemiczna „odwracalność” oznacza, że reakcja elektrodowa musi być wystarczająco szybka, aby osiągnąć stan równowagowy dla każdego przyło-

zone napięcia, zanim nie zmieni się ono ponownie. Istotnym procesem staje się samo przygotowanie elektrody przed pomiarem – powinna ona zostać dokładnie wyszlifowana i wypłukana dostatecznie dokładnie, by mieć gwarancję, iż nie pozostał na niej materiał ścierny i zanieczyszczenia. Ponadto, część badaczy zaleca „aktywowanie” elektrody, polegające na chwilowym przyłożeniu na przemian potencjału ujemnego i dodatniego o bardzo dużej wartości bezwzględnej. Należy bezwzględnie pamiętać o dostosowaniu szybkości zmian potencjału tak, aby wyżej wymieniony warunek odwracalności został spełniony. Mimo iż można stosować szybkość rzędu  $1000\text{Vs}^{-1}$ , przy takich prędkościach często obserwuje się zachowanie nieodwracalne, gdyż elektroda „nie nadąży” z osiągnięciem stanu równowagowego przed kolejną zmianą potencjału. W takim wypadku wartość  $\Delta E_p$  ulega zawyżeniu. Należy wtedy obniżyć szybkość skanowania do wartości takiej, aby  $\Delta E_p$  powróciło do normalnego poziomu. Jednocześnie nie powinno się przekraczać około 30s dla pomiaru, gdyż przy dłuższych analizach nie da się uniknąć wpływu konwekcji. W praktyce stosuje się tempo skanowania rzędu  $0,05\text{-}0,1\text{Vs}^{-1}$ , a przedział skanowania wynosi zwykle od 0,5 do 1V. Układy, w których wierzchołki na krzywej rozsuwają się przy zwiększaniu szybkości skanowania są quasi-odwracalnymi. Wyznaczenie potencjału półfalowego dla takich par staje się niewiarygodne. Jakkolwiek, nawet dla odwracalnych układów red-ox, potencjał półfalowy jest wyznaczany mniej dokładnie niż przy polarografii. W szczególności, wartość  $E_{1/2}$  zależy będzie od wyboru potencjału, w którym następuje przełączenie – powinien on być jak najdalej od środka między obydwoma wierzchołkami.

Prąd na wierzchołku, w przypadku reakcji odwracalnej, dany jest równaniem:

$$i_p = (2.69 \times 10^5) n^{3/2} A D^{1/2} C v^{1/2}$$

gdzie  $i_p$  dane jest w amperach,  $n$  jest liczbą przeniesionych elektronów,  $A$  jest powierzchnią elektrody ( $\text{cm}^2$ ),  $D$  jest współczynnikiem dyfuzji ( $\text{cm}^2\text{s}^{-1}$ ),  $C$  stężenie ( $\text{mol cm}^{-3}$ ), zaś  $v$  to szybkość skanowania ( $\text{Vs}^{-1}$ ). Istnieje liniowa zależność wartości prądu na wierzchołku do stężenia, jak i do pierwiastka kwadratowego szybkości skanowania. Proporcjonalność podobna istnieje w przypadku układów całkowicie nieodwracalnych, choć w przypadku quasi-odwracalnych prąd nie jest liniowo proporcjonalny do pierwiastka szybkości skanowania. Obserwując tę proporcjonalność razem z odległością między wierzchołkami, otrzymuje się wygodne kryterium pozwalające kwalifikować lub nie daną reakcję do grupy odwracalnych.

Ważnym zastosowaniem cyklowoltometrii jest wyznaczanie formalnych potencjałów za pomocą równania:

$$E_{1/2} = \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2}$$

Zostało to zrobione dla bardzo wielu związków makrocyklicznych [18]. Mimo że wartości obliczane w ten sposób są mało dokładne, są wystarczające przy porównywaniu jednych związków z innymi.

Przesunięcie wierzchołków spowodowane kompleksowaniem można użyć do wyznaczenia stałych tworzenia kompleksu, chociaż należy mieć na uwadze, że ta metoda jest mniej dokładna od wymienionych wcześniej.

Jeśli znane są potencjały wolnej ( $E_r^{0'}$ ) i skompleksowanej ( $E_c^{0'}$ ) formy

badanego składnika, można będzie obliczyć wielkość stałych tworzenia kompleksu dla formy zredukowanej ( $K_{red}$ ), jak i utlenionej ( $K_{ox}$ ) na podstawie

różnicy potencjałów formalnych. Dla wygody można stworzyć schemat, na którym zaznacza się formy zredukowaną i utlenioną w postaci wolnej, jak i skompleksowanej.

Słabsze kompleksy można badać wykorzystując zarówno przesunięcia zarówno potencjału półfali  $E_{1/2}$ , jak i prądu  $i_p$ . W przypadku mierzenia przesunięć potencjału półfali, postępuje się podobnie jak w przypadku polarografii. W drugim przypadku prąd  $i_p$  uważa się za sumę dwóch prądów: jeden to prądu redukcji wolnego składnika, drugi zaś to prąd redukcji składnika skompleksowanego. Obydwie metody zastosowane zostały z powodzeniem w przypadku tworzenia kompleksów pomiędzy  $\beta$ -cyklodekstryną z kwasem ferrocenokarboksylovym [19].

Innym podejściem do problemu może być zastosowanie elektrody obrotowej [20]. Próby takie zostały już poczynione dla cyklodekstryn.

## 9. Konduktometria

Przewodnictwo elektryczne elektrolitu zależy od natury i stężenia jonów występujących w roztworze. Można więc użyć pomiarów konduktometrycznych do wyznaczenia stałych tworzenia. Z definicji, przewodnictwo  $\kappa$  jest odwrotnością oporności roztworu, a przewodnictwo molowe  $\Lambda$  danego elektrolitu jest dane wzorem:

$$\Lambda = \frac{\kappa}{[MX]_t}$$



gdzie  $[MX]_t$  jest całkowitym stężeniem soli Załóżmy, że kation  $M$  i anion  $X$  mogą asocjować, przy czym stała równowagi tego procesu wynosi  $K_{MX}$

$$K_{MX} = \frac{[MX]}{[M][X]}$$

Oczywiście neutralna sól  $MX$  nie przewodzi prądu, więc mierzone przewodnictwo będzie proporcjonalne do stężenia niezasocjowanej soli

$$\kappa = \Lambda \alpha [MX]_t$$

gdzie  $\alpha$  jest stopniem dysocjacji. Ponieważ  $\alpha$  zależy od  $[MX]_t$ , obserwowane przewodnictwo jonowe  $\Lambda_{obs}$  zależy od stężenia elektrolitu

$$\Lambda_{obs} = \kappa / [MX]_t = \alpha \Lambda$$

Jeśli  $\Lambda$  może być mierzone przy dostatecznie dużym rozcieńczeniu, kiedy  $\alpha = 1$ , można obliczyć  $\alpha$  dla dowolnych stężeń elektrolitu, a stała równowagowa może być obliczona za pomocą wzoru

$$K_{MX} = \frac{1 - \alpha}{\alpha^2 [MX]_t}$$

Problemem jest fakt, iż przewodnictwo molowe zmienia się nawet przy braku jonów asocjujących z powodu oddziaływań międzyjonowych. Dla elektrolitów o stężeniach nie przekraczających 0,001 M zależność przewodnictwa jonowego określona jest za pomocą równania Osangera:

$$\Lambda = \Lambda^0 - SI^{1/2}$$

gdzie  $\Lambda^0$  jest granicznym przewodnictwem jonowym nieskończenie rozcieńczonego roztworu,  $S$  jest stałą wyznaczoną dla danego elektrolitu, a  $I$  jest siłą jonową.

Dla elektrolitu binarnego (na przykład  $NaCl$ )  $I = \alpha[MX]_t$ , a równanie Osangera przybiera postać:

$$\Lambda_{\text{obs}} = \alpha (\Lambda^0 - S(\alpha [\text{MX}]_t)^{1/2}$$

Wartość  $\alpha$  obliczone na podstawie wymienionego równania są bardzo dokładne i przy stosowaniu dostatecznie dużych rozcieńczeń mogą posłużyć do bezpośredniego obliczania wartości  $K_{\text{MX}}$ . Jedynym problemem jest fakt, że w pomiarach zmienia się siła jonowa, na co należy wprowadzić odpowiednie poprawki. Równania są poprawne dla układów rozcieńczonych i nie dają się jednak zastosować w przypadku większych stężeń. Pociąga to za sobą ograniczenia. Stałe asocjacji, nie mogą być mniejsze niż 100-1000 M<sup>-1</sup>. W przypadku bardzo stężonych elektrolitów należy wprowadzić kolejne poprawki przy obliczeniu przewodnictwa molowego i posłużyć się trzeba równaniem:

$$\Lambda = \Lambda^0 - SI^{1/2} + EI \ln I + J_1 I - J_2 I^{3/2}$$

gdzie  $S$  i  $E$  zależą od typu elektrolitu, mobilności jonów, stałej dielektrycznej, lepkości i temperatury, a  $J_1$  i  $J_2$  zależą od promienia jonowego i odległości między jonami. Należy zauważyć, że w literaturze dane są już gotowe zestawy tych parametrów dla różnych elektrolitów [21].

Odmiernym podejściem, stosowanym przy kompleksach makrocyklicznych z kationami [22], opiera się na zmianach przewodnictwa spowodowanymi łączeniem się kationów z elektrycznie naturalnymi ligandami, takimi jak etery koronowe, przy stałym stężeniu całkowitym elektrolitu. Elektrolitem takim jest na przykład nadchloran metalu w środowisku niewodnym, przygotowany jest w odpowiednim rozcieńczeniu tak, aby móc zaniedbywać efekty związane z asocjacją i jest miareczkowany roztworem ligandu. Obserwowane przewodnictwo molowe wzrasta lub maleje w zależności od tego, czy jon skompleksowany jest bardziej czy też mniej ruchliwy od jonu wolnego. Miareczkowanie trwa aż do wysycenia elektrolitu. Końcowe przewodnictwo molowe jest traktowane jak przewodnictwo czystego kompleksu ( $\Lambda_{\text{MLX}}$ ), a przewodnictwo początkowe jest przewodnictwem czystej soli ( $\Lambda_{\text{MX}}$ ). W trakcie całego miareczkowania mamy wtedy do czynienia z przewodnictwem będących sumą dla dwóch soli: soli wolnej MX, składającej się tylko i wyłącznie z kationu M<sup>+</sup> i anionu X<sup>-</sup> oraz soli skompleksowanej, składającej się z jonów ML<sup>+</sup> i X<sup>-</sup>

$$\kappa = \Lambda_{\text{obs}} [\text{M}]_t = \Lambda_{\text{MX}} [\text{MX}] + \Lambda_{\text{MLX}} [\text{MLX}]$$

przy czym  $[\text{M}]_t$  oznacza całkowite stężenie kationu i jest równe początkowemu stężeniu MX z poprawką na rozcieńczenie zachodzące podczas miareczkowania.

Metoda ta posiada istotne ograniczenia. Po pierwsze kompleksowanie nie zawsze prowadzi do znaczących zmian w przewodnictwie, po drugie można badać tylko ligandy neutralne, po trzecie zarówno forma MX jak i MLX muszą być kompletnie zdeasocjowane.

## 10. Pomiary elektrodą obrotową

Większość technik pomiarowych z nieruchomymi elektrodami i niezaburzonym mechanicznie elektrolitem daje w wyniku zależności prądowo napięciowe spowodowane przeniesieniem masy na drodze dyfuzji. Czasami jest jednak wygodnie zmienić warunki, aby móc zaobserwować zjawiska innego typu. Jeżeli roztwór będzie mieszany, bądź to za pomocą mieszadła, bądź też poprzez ruchy elektrody, masa przenoszona jest znacznie szybciej niż w przypadku dyfuzji i zmienia się charakterystyka odpowiedzi elektrody na zmiany potencjału lub prądu do niej przyłożonego. Prąd taki nazywany jest prądem równowagowym (prądem przy stanie równowagi).

Elektroda obrotowa jest jedną z najczęściej stosowanych przy takich właśnie pomiarach. Składa się z materiału przewodzącego w kształcie dysku (najczęściej sprasowany grafit, złoto albo platyna) umieszczonego w cylindrze z izolatora (szkło, polimer). Dysk jest umieszczony dokładnie pośrodku osi obrotu i prostopadłe do niej. Kontakt elektryczny zapewniony jest przez szczotkę grafitową przyciskającą miejsce kontaktu. Jakość połączenia jest bardzo istotna, gdyż wszelkie nierównomierności w połączeniu są doskonałymi źródłami szumu. Dodatkową wartością charakterystyczną takiej elektrody jest częstotliwość obrotów  $f$ , oznaczająca ilość obrotów w ciągu sekund, lub zamiennie wartości prędkości kątowna  $\omega$  (jej jednostką jest  $s^{-1}$ ) związana z poprzednią prostą zależnością  $\omega = 2\pi f$ . Czasami używana jest też ilość obrotów na minutę (rpm). W przypadku większości elektrod obrotowych parametr ten mieści się w zakresie od 100rpm do około 10000rpm. Większe prędkości nie mają sensu, gdyż pojawiają się turbulencje skutkujące wynikami niemożliwymi do interpretacji.

Warto odnotować jak działa taka elektroda. Jej ruch obrotowy powoduje, że ciecz w najbliższym jej otoczeniu zostaje odrzucona w kierunku prostopadłym do osi obrotu, co jest spowodowane po pierwsze lekkością cieczy, a po drugie siłą odśrodkową. Jednocześnie pojawia się prąd leżący na osi obrotu powodujący, że do elektrody stale docierają coraz to nowe porcje roztworu z wnętrza ogniwa. Elektrode taką można więc porównać do pompy wymuszającej stały obieg elektrolitu. Warto też zauważyć, że w tym przypadku podwójna warstwa przy powierzchni elektrody zostaje praktycznie zlikwidowana. Hydrodynamika cieczy przy założeniu wyłącznie laminarnego przepływu została zanalizowana i opisana [23]. Wyniki tych badań mogą posłużyć do sformułowania równań opisujących charakterystykę takiej elektrody. Na przykład dla redukcji formy Oxo

do Red przy założeniu ograniczeń na przeniesienie masy, kiedy potencjał jest na tyle ujemny, żeby zapoczątkować reakcję, maksymalny prąd katodowy jest dany przez równanie Levicha:

$$i_{1,c} = 0.620nFAD_{\text{Ox}}^{2/3} \omega^{1/2} \nu^{-1/6} C_{\text{Ox}}^*$$

gdzie  $\omega$  jest prędkością kątową elektrody,  $\nu$  oznacza lepkość kinetyczną cieczy (na przykład dla roztworów wodnych o temperaturze około 20°C wynosi ona mniej więcej 0,01cm<sup>2</sup>s<sup>-1</sup>), a pozostałe symbole mają swoje standardowe znaczenie.

Przy pominięciu ograniczeń na prąd, to znaczy przy założeniu, że  $C_{\text{Ox}}(x=0) > 0$ , prąd dany jest równaniem:

$$i = 0.620nFAD_{\text{Ox}}^{2/3} \omega^{1/2} \nu^{-1/6} [C_{\text{Ox}}^* - C_{\text{Ox}}(x=0)]$$

które po połączeniu z poprzednim równaniem daje:

$$i = i_{1,c} \frac{C_{\text{Ox}}^* - C_{\text{Ox}}(x=0)}{C_{\text{Ox}}^*}$$

Po napisaniu analogicznych równań dla maksymalnego prądu anodowego, można oba te równania podstawić do równania Nernsta, otrzymując:

$$E = E_{1/2} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{i_{1,c} - i}{i - i_{1,a}}$$

gdzie potencjał półfali  $E_{1/2}$  dany jest równaniem:

$$E_{1/2} = E^{0'} + \frac{RT}{nF} \ln \left( \frac{D_{\text{Eed}}}{D_{\text{Ox}}} \right)$$

Warto zauważyć, że zależność prądu od potencjału nie zależy w żaden sposób od prędkości kątowej elektrody. Wynika to stąd, że prąd przy każdym potencjale zależy liniowo od  $\omega^{1/2}$ . W rzeczywistości każde odchylenie od liniowej zależności  $i$  od  $\omega^{1/2}$  wynika z kinetycznych ograniczeń dla procesów zachodzących

na elektrodzie. Oznacza to, że transport masy może być szybszy niż przeniesienie elektronu, co utrudnia lub wręcz zatrzymuje procesy elektrochemiczne. Jeśli proces redukcji jest kontrolowany kinetyką, prąd płynący przez elektrodę obrotową dany będzie równaniem:

$$i = nFAk_f(E)C_{\text{Ox}}(x = 0)$$

gdzie  $k_f(E)$  jest zależnym od potencjału współczynnikiem szybkości przeniesienia elektronu.

Korzystając z równania:

$$i = nFAk_f(E)C_{\text{Ox}}^* \left[ 1 - \left( \frac{i}{i_{1,c}} \right) \right]$$

zdefiniujemy  $i_k$  jako prąd płynący przy braku przeniesienia mamy:

$$i_k = nFAk_f(E)C_{\text{Ox}}^*$$

to poprzednie równanie można przekształcić do bardzo ważnego równania:

$$\frac{1}{i} = \frac{1}{i_k} + \frac{1}{i_{1,c}} = \frac{1}{i_k} + \frac{1}{0.620nFAC_{\text{Ox}}^* D_{\text{Ox}}^{2/3} \nu^{-1/6} \omega^{1/2}}$$

udowadniającego podejrzenie, że wraz ze wzrostem prędkości obrotowej elektrody rośnie wpływ kinetyki przeniesienia elektronu na całkowity prąd przepływający przez roztwór. Jeśli  $\omega \rightarrow \infty$ , to także  $i \rightarrow i_k$ , tak więc wykres zależności  $1/i$  od  $\omega^{-1/2}$  powinien być liniowy, co pozwala na jego ekstrapolację do  $\omega^{-1/2} = 0$  i wyznaczenie wartości  $1/i_k$  przy określonym potencjale. Następnie, wykorzystując równania wyznaczyć można wartość  $k(E)$ . Można więc wyznaczyć zależność współczynnika szybkości przeniesienia protonu od przyłożonego potencjału [24].

## 11. Pomiary impedancji

Impedancja  $Z$  jest to opór pozorny układu, czyli opór odczytany w danej chwili z miernika. Jest to stosunek napięcia  $U$  przyłożonego do układu, do natężenia prądu prądów płynącego. W przypadku prądów stałych jest ona liczbą

rzeczywistą nazywaną również oporem elektrycznym  $R$ . Jednostką impedancji jest om ( $1\Omega$ ).

W przypadku prądu zmiennego o częstotliwości  $\omega$ , prąd i napięcie w chwili  $t$  dane są wzorami:

$$U(\omega) = U_0 \sin(\omega t)$$

$$I(\omega) = I_0 \sin(\omega t + \varphi)$$

gdzie  $U_0, I_0$  to odpowiednio napięcie maksymalne i prąd maksymalny.

Wielkość  $\varphi$  nazywana jest przesunięciem fazowym, i określa różnicę początków fazy prądu i napięcia. Jeśli ponownie wyrazimy impedancję jako stosunek napięcia do prądu, otrzymamy wyrażenie:

$$Z = \frac{U(\omega)}{I(\omega)} = Z_0 e^{i\varphi}$$

gdzie  $i$  jest liczbą urojoną jako  $i = \sqrt{-1}$ , a  $Z_0$  to maksymalna impedancja ( $Z_0 = \frac{U_0}{I_0}$ ).

Wzór otrzymano korzystając z równania  $\exp(i\varphi) = \cos\varphi + i \sin\varphi$ . Na wielkość impedancji mają wpływ opór elektryczny, pojemność i indukcyjność układu. Ich wkłady są następujące:

$$Z(R) = R; \quad Z(C) = \frac{1}{i\omega C}, \varphi = -\frac{\pi}{2}; \quad Z(L) = i\omega L, \varphi = \frac{\pi}{2}$$

Impedancja może być przedstawiona również jako:

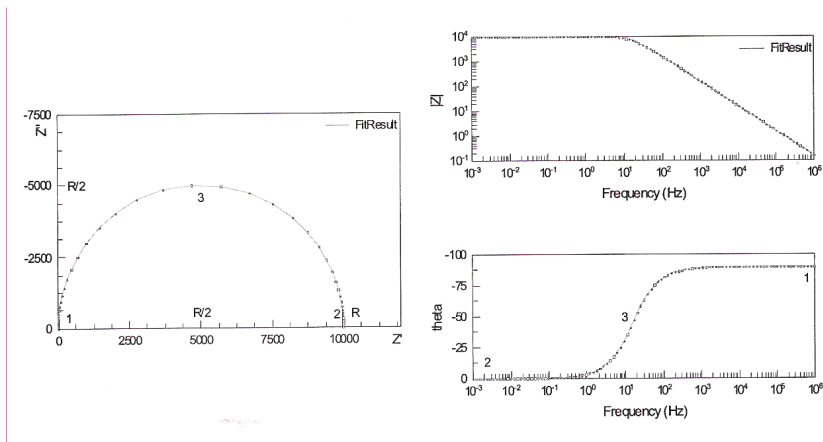
$$Z = R + iX$$

gdzie  $R = \Re(Z)$  to rezystencja, a  $X = \Im(Z)$  to reaktancja.

## 12. Wykresy impedancji

Najpopularniejszym wykresem przedstawiającym wyniki pomiarów impe-

dancji jest wykres Nyquisa. Przedstawia on wartość części urojonej impedancji w funkcji części rzeczywistej o zmienionym znaku  $\Im(Z) = f(\Re(Z))$ . Wykres odwrotny co do znaku jest nazywany wykresem Cole-Cole.



Wykresy impedancji dla układu RC

Co można zobaczyć na wykresie impedancji? Rozważmy najprostszemu przypadek – układ RC. Obliczanie impedancji układu złożonego z połączonych równolegle impedancji wykonuje się analogicznie jak w przypadku oporów:

$$\frac{1}{Z} = \frac{1}{R} + i\omega C$$

przy czym  $R$  i  $C$  to odpowiednio opór opornika i pojemność kondensatora. Przekształcając odpowiednio wyrażenie, otrzymamy:

$$Z = \frac{R}{1 + \omega^2 R^2 C^2} - \frac{i\omega R^2 C}{1 + \omega^2 R^2 C^2}; \quad \Re(Z) = \frac{R}{1 + \omega^2 R^2 C^2}, \quad \Im(Z) = \frac{i\omega R^2 C}{1 + \omega^2 R^2 C^2}$$

Wykresy dla takiego układu przedstawione na rysunku. Rysunek po lewej stronie to właściwy diagram Nyquista. Wykonany został dla wartości  $R = 10\text{k}\Omega$ ,  $C = 10\mu\text{F}$ . Częstotliwość zmieniała się w zakresie od 0,01Hz do 1 MHz. Można na nim wyróżnić trzy charakterystyczne punkty:

1.  $\omega \rightarrow \infty$

Ponieważ częstotliwość występuje w mianowniku dla części rzeczywistej, jak i urojonej, mamy  $\Re(Z) = \Im(Z) = 0$ ,

2.  $\omega \rightarrow 0$

Mianownik w obu wypadkach dąży do zera, lecz w przypadku części urojonej częstotliwość pojawia się również w liczniku, tak więc  $\Im(Z)$

$= 0$ , lecz  $\Re(Z) = R$ ,

3.  $\omega = \frac{1}{RC}$

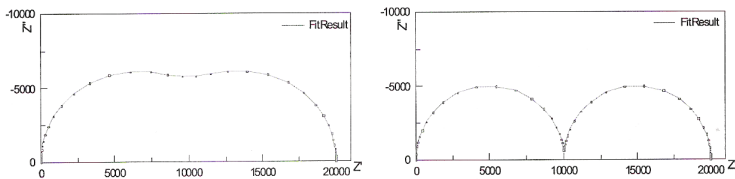
Jest to częstotliwość rezonansowa układu, przy której  $\Re(Z) = \Im(Z) =$

$\frac{1}{2} R$ .

Dwa wykresy po prawej stronie przedstawiają zależność modułu impedancji i przesunięcia fazowego od częstotliwości.

### 12.1 Separacja układów

Rozpatrzmy nieco bardziej złożony układ – dwa układy RC połączone ze sobą szeregowo. Można się spodziewać, że na wygląd wykresu będą miały oba podukłady. Jeżeli ich częstotliwości rezonansowe będą się znacznie różniły, zostaną one uwidocznione na wykresie jako osobne półkola. W przeciwnym wypadku będą się ze sobą zlewać. Zostało to przedstawione na rysunku.



Dobra i zła separacja podjednostek RC w układzie

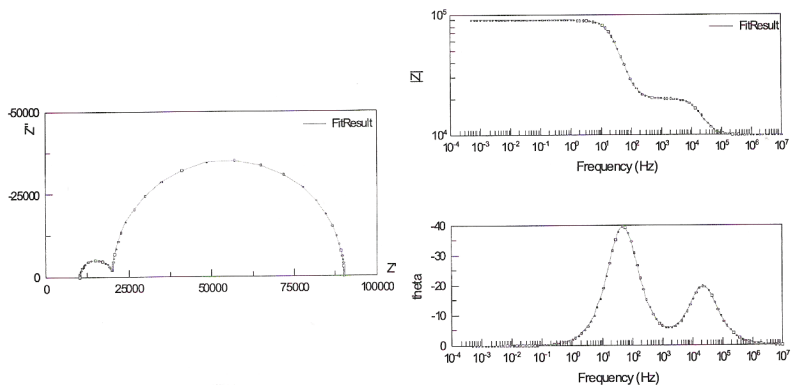
Pierwszy wykres wykonano dla podjednostek różniących się częstotliwością rezonansową 10-krotnie, drugi dla różnicy 1000-krotnej.



Separacja jest bardzo ważną właściwością. Dzięki niej można za pomocą jednego eksperymentu badać efekty związane z wnętrzem elektrody i podwójną warstwą elektryczną, gdyż iloraz ich częstotliwości rezonansowych jest bliski tysiąca. Typowa pojemność podwójnej warstwy elektrycznej to około  $10\mu\text{F}$ , ponad 1000-krotnie więcej niż pojemność elektrody. Przy podobnych oporach elektrycznych daje to różnicę wystarczającą do właściwego odseparowania efektów związanych z obydwoma tymi środowiskami.

Wyobraźmy sobie elektrodę zanurzoną w roztworze. Materiał z jakiego jest zbudowana, posiada pewien opór elektryczny  $R_e$  i pojemność  $C_e$  (układ RC). W miejscu, w którym kończy się elektroda, pojawia się roztwór (połączenie szeregowo). W najbliższym otoczeniu elektrody mamy do czynienia z podwójną warstwą elektryczną, posiadającą opór  $R_i$  i pojemności  $C_i$  (ponownie RC). W pewnym momencie można mówić już o czystym roztworze, o oporze  $R_s$  (połączenie szeregowo). Na podstawie powyższego opisu można stworzyć model elektryczny takiego półogniwa.

Jak będą wyglądać diagramy impedancji dla takiego układu? Spójrzmy na rys. przedstawiający taką sytuację.



Na wykresie Nyquista widać dwa półkola związane z dwoma układami RC. Mniejsze nie zaczyna się w punkcie  $(0, 0)$ , co jest spowodowane rezystencją roztworu  $R_s$ . Widać, że elektroda ma opór mniejszy niż podwójna warstwa elektryczna, co jest prawdziwe dla większości układów z elektrodami metalowymi. Dzięki znacznym różnicom pojemności oba półkola są od siebie odsunięte na tyle, że możliwe jest ich rozróżnienie i badanie. Uzyskując dane modelowe wybrano dość duży opór dla wszystkich elementów. Miało to wpływ na częstotliwości rezonansowe.

Zebrawszy dane z rzeczywistego układu można stworzyć model mu odpowiadający i następnie dokonać dopasowania wartości elementów teoretycznych. Można to wykonać korzystając z takich programów, jak na przykład ZView. Ponieważ do dopasowania używana jest metoda najmniejszych kwadratów, należy wybrać realne wartości parametrów początkowych. Nie jest to tak trudne, jak mogłoby się wydawać. Mając diagram dla rzeczywistego układu wystarczy odczytać  $-2 \Im(Z)$  z wierzchołka każdego półkola (otrzymamy w ten sposób

przybliżoną rezystancję  $R$ ), a następnie, znając częstotliwość na tym wierzchołku, obliczyć spodziewaną pojemność  $C$ .

Na wszystkich wykresach półkola miały środek położony na osi X wykresu. W trakcie analizy danych rzeczywistych wielokrotnie okazywało się, że takie założenie nie jest prawdziwe. Częstokroć środek półokręgu położony był poniżej tej osi. Jednym z wyjątków jest elektroda rtęciowa. Wyjaśnienie jej fenomenu zostanie przedstawione poniżej.

W celu wyjaśnienia takiego zachowania u umożliwienie jego symulacji, wprowadzono dodatkowy element podobny nieco do kondensatora. Jest to tak zwany element o stałej fazie (ang. *constans phase element* – CPE). Impedancja CPE jest opisana wzorem:

$$\frac{1}{Z} = Q^0 (i\omega)^n$$

gdzie  $Q^0$  to admitancja (odwrotność impedancji  $\frac{1}{|Z|}$  przy  $\omega \frac{\text{rad}}{\text{s}}$ ).

Konsekwencją tego równania jest to, że kąt fazowy dla CPE nie zależy od częstotliwości napięcia i wynosi  $-90n$  stopni. Stąd właśnie nazwa tego elementu.

Zauważmy, że dla  $n = 1$ , przedstawione równanie jest takie samo, jak dla kondensatora, czy czym w takim wypadku  $Q^0 = C$ . Wykres impedancji dla samego CPE jest podobny do wykresu dla kondensatora – jest to linia prosta. W przypadku czystej pojemności leży on na osi Y i na diagramie Nyquista jest skierowany w górę. Prosta reprezentująca CPE jest przechylona w stronę pierwszej ćwiartki układu współrzędnych. Kąt nachylenia wynosi  $90n$  stopni. Dla układu RCPE (analog RC) diagram przedstawia półkole obrócone o pewien kąt tak, że jego środek leży poniżej osi X na prostej o nachyleniu  $90(1-n)$  stopni.

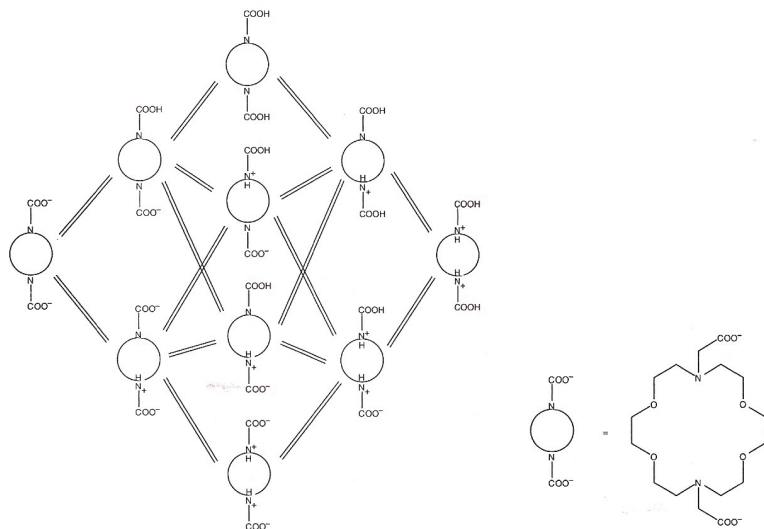
Jestem z wielu wyjaśnień dla zachowania się CPE, będącego modelem rzeczywistego kondensatora, jest porowatość elektrody. Materiał, z którego jest ona

zbudowana praktycznie nigdy nie może być idealnie płaska. Nawet najlepiej wypolerowany dalej jest porowaty. Powierzchnia elektrody jest więc fraktalem o wymiarze pomiędzy 2 a 3. Wykazano, że dla takich elementów impedancja międzyfazowa (związana z przeniesieniem elektronu albo pojemności podwójnej warstwy elektrycznej) jest modyfikowane przez wykładnik  $n = \frac{1}{D-1}$ , gdzie  $D$

jest wymiarem fraktalnym powierzchni [25]. Dla idealnie płaskich elektrod  $D = 2$ ,  $n = 1$ , zaś dla elektrod o największej porowatości  $D = 3$ ,  $n = 0.5$ .

Dla większości elektrod wartość współczynnika  $n$  mieści się między 0,9 a 1,0. Wartość  $n$  dla idealnie płaskich elektrod wynosi  $n = 1,0$ . Dlatego w przypadku rtęci nie obserwuje się tego zjawiska, gdyż w standardowych układach elektroda rtęciowa jest ciekła, a więc jej powierzchnia jest niemalże idealnie płaska.

Rysunek pokazuje wszystkie równowagi istniejące w przypadku makrocykla zawierającego cztery grupy protogeniczne – dwie grupy aminowe oraz dwie karboksylowe. W tym przypadku istnieje aż szesnaście mikrostałych, ale tylko cztery wyznaczalno eksperymentalnie. Ostatecznie jest czternaście równań do obliczenia szesnastu stałych [26]



### 13. Wybrane związki makrocykliczne

Stałe protonowania wyznaczone eksperymentalnie są parametrami makroskopowymi w tym sensie, iż stwierdzenie polikwasu lub też polizasady odnosi

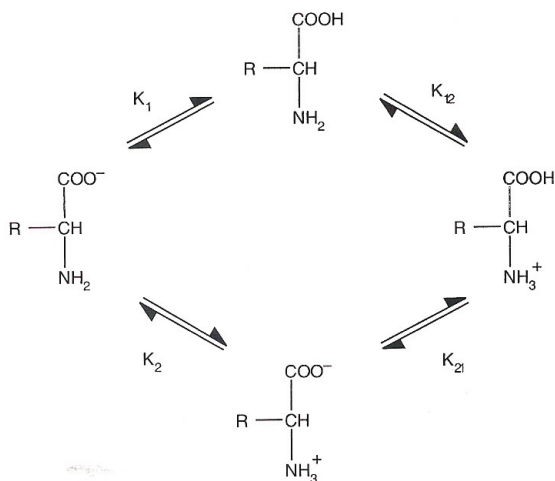
się w rzeczywistości w ich przypadku do całego zespołu związków będących ze sobą w równowadze: wszystkie izomery form  $LH_{i-1}$  i wszystkie izomery  $LH_i$ . Na przykład dla  $\alpha$ -aminokwasu z obojętną grupą R, istnieją cztery „mikrorównowagi” protonowe, istnieją jednak tylko dwie stałe protonowane wyznaczone eksperymentalnie:

$$K_{H1} = \frac{([AH] + [AH^{\ddagger}])}{[A^-][H^+]} = K_1 + K_2$$

$$K_{H2} = \frac{[AH_2^+]}{([AH] + [AH^{\ddagger}])[H^+]} = \frac{K_{12}K_{21}}{(K_{12} + K_{21})}$$

Mikrorównowaga przedstawiona na tym rysunku tworzy zamknięty cykl, można więc napisać kolejne równanie, wiążące ze sobą mikrostałe  $K_1$  i  $K_2$ :

$$K_1 K_{12} = K_2 K_{21}$$



Oczywiście nie istnieje możliwość wyznaczenia wartości stałych równowagi czterech mikrostanów korzystając jedynie z trzech równań i jeśli problem sprowadza się do wyznaczenia ich wartości, trzeba na wstępie znać przynajmniej jedną z nich. W tym akurat przypadku można posłużyć się stałą protonowania estru metylowego aminokwasu do wyznaczenia wartości  $K_{12}$  dlatego, że efekty indukcyjne grup COOH i COOMe są podobne. Na przykład rozpatrując glicerynę (R = H) logarytmy makrostałych protonowania wynoszą odpowiednio  $\log K_{H1} = 9,8$  i  $\log K_{H2} = 2,35$ , podczas gdy logarytm stałej protonowania  $H_2NCH_2COOMe$  wynosi  $\log K_H = 7,6 = \log K_{12}$ . Znając tą wartość oblicza się  $K_{21}$ , następnie oblicza się  $K_1 = 3.5 \cdot 10^4 M^{-1}$  i  $K_2$ . Otrzymuje się  $K_2 \gg K_1$  i  $K_{12} \gg K_{21}$ ,

co jest zgodne z przewidywaniami opierającymi się na fakcie, że alifatyczne aniony karboksylowe są o wiele bardziej zasadowe niż aminy alifatyczne. Współczynnik równowagowego stężenia formy jonu obojnaczego i formy obojętnej wynosi  $\frac{[AH^+]}{[AH]} = \frac{K_2}{K_1} = 1.8 \cdot 10^5$ . Oczywiście formą dominującą jest jon

obojnaczy, więc jeśli by usunąć stężenie formy neutralnej otrzymano by  $K_{H1} = K_2$  i  $K_{H21} = K_1$  z dość dużą dokładnością. Wyłącznie z obliczeń formy mikroskopowej sprawia, że niemożliwe jest wyznaczenie wszystkich mikroskopowych stałych, ale z drugiej strony upraszcza to znacznie całość obliczeń i pozwala nam zamiast otrzymać makroskopowe stałe protonowania.

Trudnym przypadkiem jest ligand, którego wszystkie grupy jonogenne są równocenne pod względem chemicznym, tak jak to się dzieje w przypadku poliamin lub kwasów polikarboksylowych. Zestaw równań także w ich przypadku musi zostać sformułowany, lecz równoważność niektórych form pozwala na wprowadzenie bardzo istotnych uproszczeń. Rozpatrzmy dla przykładu dowolną diaminę o wzorze  $H_2(CH_2)_nNH_2$ . Ponieważ grupy aminowe są w tym przypadku równocenne, możemy do każdej z nich przypisać tą samą stałą protonowania –  $K_0$  i pamiętać, że stężenie formy neutralnej oraz dwuprotonowej należy podwoić, aby otrzymać stężenie neutralnej i protonowanej grupy aminowej. Pierwsza stała makroskopowa protonowania może być teraz wyrażona jako:

$$K_{H1} = \frac{[H_3N(CH_2)_nNH_3^{2+}]}{[H_2N(CH_2)_nNH_3^+][H^+]} = 2K_0$$

a druga stała przedstawia się następująco:

$$K_{\text{H}_2} = \frac{[\text{H}_3\text{N}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_3^{2+}]}{[\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_3^+][\text{H}^+]} = \frac{K_0}{2}$$

Równania są poprawne, o ile protonowanie grup aminowych nie wpływa na  $\text{p}K_a$  drugiej grupy. W takim przypadku  $\frac{K_{\text{H}_1}}{K_{\text{H}_2}} = 4$  lub też  $\Delta \log K_{\text{H}} = 0.6$ .

Tabela przedstawia wybrane dane dotyczące protonowania diaminy i kwasów dikarboksylowych.

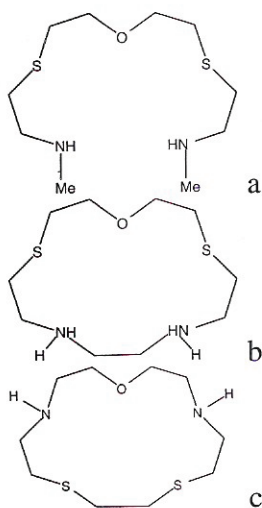
<i>Diamina lub kwas dikarboksylowy</i>	$\log K_{\text{H}_1}$	$\log K_{\text{H}_2}$	$\Delta \log K_{\text{H}}$
$\text{H}_2\text{NNH}_2$	7.9	-1.05	8.95
$\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$	9.93	6.85	3.08
$\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$	10.8	9.35	1.45
$\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_8\text{NH}_2$	11.0	10.1	0.9
$^-\text{OOC}\text{COO}^-$	4.3	1.3	3.0
$^-\text{OOC}(\text{CH}_2)_2\text{COO}^-$	5.6	4.2	1.4
$^-\text{OOC}(\text{CH}_2)_5\text{COO}^-$	5.4	4.5	0.9
$^-\text{OOC}(\text{CH}_2)_7\text{COO}^-$	5.4	4.55	0.85

Widać, iż  $\Delta \log K_{\text{H}}$  zbliża się do teoretycznej wartości 0.6 tylko dla dostatecznie długich cząsteczek, gdzie oddziaływania między grupami są dostatecznie małe. Dowodzi to, że protonowanie pierwszej grupy jest pod względem termodynamicznych preferowane nad protonowaniem drugiej grupy. Można to łatwo wytłumaczyć zważywszy na fakt elektrostatycznej destabilizacji dwudodatniego jonu spowodowaną odpychaniem ładunków. W szczególności w przypadku 1,2-diamin i kwasów 1,2-dikarboksylowych należy uwzględnić również stabilizację jednododatniego jonu spowodowaną tworzeniem wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych.

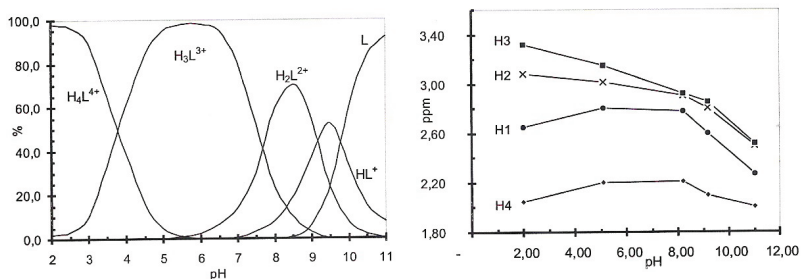
Grupy jonogeniczne mogą być częścią związku makrocyklicznego (tak jak atomy azotu w azanach) lub też mogą być do niego przytwierdzone (etery lariatowe itp.). Grupy funkcyjne umiejscowione poza częścią makrocykliczną zachowują się mniej więcej analogicznie do takich samych grup występujących w cząsteczkach acyklicznych, lecz grupy wewnątrz pierścieni są pod znacznie większym wpływem mikrośrodowiska.

Pod względem konformacyjnym cząsteczki makrocykliczne mają o wiele bardziej ograniczoną możliwość odkształcenia niż podobne pod względem chemicznym cząsteczki acykliczne. Z tego powodu grupy jonogeniczne zmuszone

są pozostawać pod znacznie większym wzajemnym wpływem, tak więc oddziaływania elektrostatyczne są w ich przypadku o wiele bardziej widoczne. Na przykład logarytmy dwóch kolejnych stałych protonowania w przypadku niecyklicznej diaminy różnią się o  $\Delta \log K_H = 0,8$ , ale dla diaminy makrocyclicznej  $\Delta \log K_H$  wzrasta do wartości 3,65, zaś w przypadku diaminy, gdzie atomy azotu są bardziej od siebie odsunięte, więc i wpływy elektrostatyczne mniejsze, różnica powyższa wynosi 1,05. Zmiany w stałych kolejnych etapów protonowania wskazują na z pozoru tak mało istotną rzecz, jaką są odległości między grupami jonogennymi wewnątrz pierścieni



Miejsce protonowane w niecałkowicie sprotonowanych makrocyklach mogą być identyfikowane za pomocą spektroskopii NMR [27].



Pierwsza jego część przedstawia rozkład różnych form sprotonowanych w funkcji pH wyznaczony z wykorzystaniem stałych protonowania zmierzonych metodą potencjometryczną. Druga część rysunku przedstawia przesunięcie chemiczne poszczególnych atomów wodoru w grupach metylowych i metylenowych tego związku w funkcji pH (jako rozpuszczalnika użyto  $D_2O$ ). Widać wyraźnie, iż dla pH w przedziale od 8 do 11, gdy tworzą się formy mono- i diprotonowane, przesunięcia chemiczne wszystkich protonów są dużo niższe niż dla formy obojętnej. Wskazuje to, że protony są rozproszone na wszystkich atomach azotu i ponieważ przeniesienie  $H^+$  w obrębie jednej cząsteczki jest na tyle szybkie (relatywnie względem NMR), iż obserwuje się ich uśredniony wpływ na wszystkie atomy wodoru. Dodanie trzeciego i czwartego protonu powoduje nieco odmienne zachowania. Podczas gdy sygnały wodorów przy węglach C2 i C3 (czyli będących w pozycji  $\alpha$  względem trzeciorzędnych azotów) wracają praktycznie do wartości początkowych. Na podstawie tych wyników można stwierdzić, że w przypadku jonu czterododatniego protony nie są już rozpraszane po wszystkich atomach azotu, lecz pozostają skoordynowane wyłącznie przez te drugorzędne. Taką hipotezę potwierdzają badania  $^{13}C$  NMR.

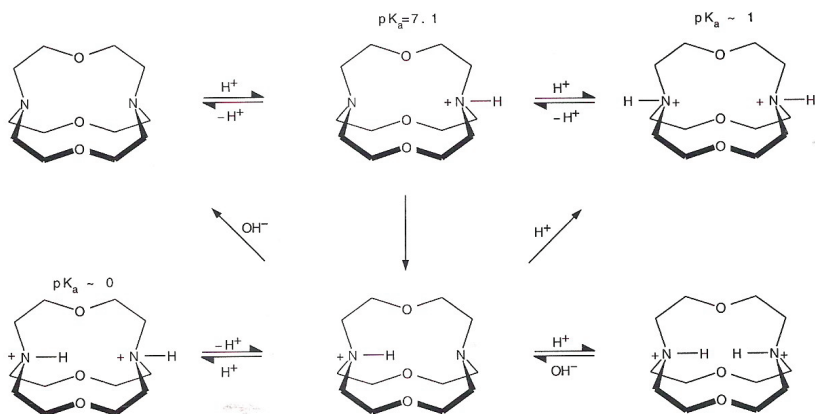
Wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe mogą pojawiać się nawet w wodnych środowiskach, powodując jednocześnie, że stałe protonowania są odmienne od spotykanych w przypadku prostszych analogów. Podobne zjawisko można zaobserwować także dla makrocyclicznych pirymidyn rozpuszczalnych w wodzie, metanolu, bądź ich mieszaninie. Dzięki stabilizacji formy sprotonowanej zaobserwowano wzrost zasadowości tych związków.

Najciekawsze zachowanie zaobserwowano jednak w przypadku cząsteczek makobicyklicznych. Dotychczas obserwowane zmiany zasadowości są nadal obserwowane, jednak nie one skupiają na sobie uwagę badaczy. Zaobserwowano bowiem, iż protonowanie takich cząsteczek powoduje, że stała szybkość przeniesienia protonu z kryptandu na zewnątrz maleje o trzy do siedmiu rzędów wielkości w porównaniu ze stałą szybkością przeniesienia protonu w przypadku alifatycznych jonów amoniowych [28]. W strukturach bicyklicznych atomy azotu mogą przyłączać proton na zewnątrz (konformacja *o* czy też *egzo*), bądź też wewnątrz (konformacja *i* czy też *endo*) klatki. Jeśli klatka jest duża (występuje w niej dużo podjednostek  $-CH_2CH_2O-$ ), energia przejścia pomiędzy poszczególnymi konformerami jest na tyle niska, że w cząsteczka ciągle zmienia swoją konformację, a samo przejście jest bardzo szybkie. Jeśli jednak cząsteczka jest mała, szybkość przejścia maleje do tego stopnia, że można badać kinetykę protonowania dającego oba konformery. Najbardziej uderzającym przykładem takiej małej cząsteczki może być kryptand 111.

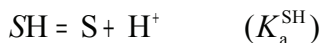
Podwójnie protonowana forma *endo* nie traci jonów wodorowych nawet przez tygodnie pozostając w 5M roztworze KOH. Rysunek przedstawia równo-



wagę między poszczególnymi formami.



Kompleksowanie substancja-rozpuszczalnik może wpłynąć dość znacznie na stałe dysocjacji obu tych substancji. Rozpatrzmy najprostszy przypadek: oddziaływania między jonizowalnym substratem i niejonizowalnym ligandem. Oto równowagi, które należy rozpatrzyć:



Pozorna stała tworzenia ( $K_{app}$ ) zależy od pH i wyrażona jest wzorem:

$$K_{app} = \frac{[SL] + [SHL]}{[S] + [SH]} [L] = \frac{K_1 K_2 [H^+] / K_a^{SH}}{1 + [H^+] / K_a^{SH}}$$

Z równania wynika, że dla bardzo dużych wartości pH stała pozorna jest równa  $K_1$ , a przy bardzo małym pH –  $K_2$ . Tak, jak stała pozorna zależy od pH, tak stała pozorna dysocjacji substratu  $K_{a,app}^{SH}$  jest funkcją stężenia ligandu:

$$K_{a,app}^{SH} = \frac{([S] + [SL])[H^+]}{[SH][SHL]} = K_a^{SH} \frac{1 + K_1[L]}{1 + K_2[L]}$$

Z równań tych wynika, że do opisanego całego układu wystarczy znajomość stałych dysocjacji wolnego substratu. Stałe dysocjacji związanego substratu dana jest następującym wzorem:

$$K_a^{SH} = \frac{[SL][H^+]}{[SHL]} = \frac{K_a^{SH} K_1}{K_2}$$

lub też

$$pK_a^{SHL} = pK_a^{SH} - \log(K_1 / K_2)$$

Ponieważ stałe dysocjacji kwasowej ulegają przesunięciu pod wpływem kompleksowania, co oczywiście pociąga za sobą zmiany pH. Dzięki temu można stosować pomiary potencjometryczne. W przypadku kompleksów z metalami, protony konkurują z jonami metalu o centra kompleksujące. W tym wypadku kompleksowanie powoduje silne zmiany kwasowości. Jeśli zaś badane są kompleksy organiczne, przesunięcie kwasowości są małe i nie przekraczają nawet 2 jednostek. Nawet jednak w takim przypadku przesunięcie pH są na tyle duże, że pomiary potencjometryczne mogą być wystarczającą metodą do obliczenia stałych tworzenia kompleksów.

Reakcja cząsteczki ze związkami makrocyklicznymi może być określona równaniem:



gdzie *A* oznacza jon metalu lub inną cząsteczkę wprowadzoną do roztworu, *L* oznacza ligand makrocykliczny, a *C* to kompleks obydwu.

Siła oddziaływania między kationem a ligandem jest wyrażona przez stałą wiązania *K*, określoną równaniem:

$$K = \frac{[C]_{\text{eq}}}{[A]_{\text{eq}} [L]_{\text{eq}}}$$

gdzie  $[C]_{\text{eq}}$ ,  $[A]_{\text{eq}}$  i  $[L]_{\text{eq}}$  oznaczają stężenia równowagowe odpowiednich składników.

Ponieważ wartość stałej wiązania chcemy określić za pomocą technik elektrochemicznych, co najmniej jeden ze składników musi być aktywny w elektrochemicznym sensie. Najczęściej takim składnikiem jest substancja dodawania – kation metalu. Do określania stałej wiązania można wykorzystać wartość prądu i potencjału otrzymane w wyniku pomiarów woltametrycznych.

Zmiana prądu mierzonego w pomiarach tego typu wynika ze zmian współczynników dyfuzji. Są więc one cennym źródłem informacji o układzie i pozwalają na jego dokładne scharakteryzowanie – jest to dość czuła technika dająca bardzo dobre wyniki. Innym podejściem może być wykorzystanie potencjałów półfali.

#### 14. Określanie stałej za pomocą współczynników dyfuzji

Załóżmy, że zarówno jon A, jak i kompleks C są elektroaktywne, zaś ligand jest nieaktywny w sensie elektrochemicznym. Można bezpiecznie założyć, że w takim wypadku zarówno A, jak i C będą podlegać takim samym procesom na powierzchni elektrod przy podobnym bądź tym samym potencjale. Jeśli zmieszane zostaną A i L (roztwór soli metali w ligandzie), po krótkiej chwili ustali się równowaga dynamiczna i część jonów przereaguje z ligandem, tworząc cząsteczki kompleksu C. W roztworze pojawiają się więc dwa media aktywne elektrochemicznie. W takim wypadku po przyłożeniu potencjału dostatecznego do zapoczątkowania procesów elektrodowych dla A i C, obserwować będziemy wypadkowy współczynnik dyfuzji  $D_w$ , który jest funkcją współczynnika  $D_A$  i  $D_C$ . Jak pokazano ostatnio, związek pomiędzy  $D_w$ ,  $D_A$  i  $D_C$  zależy od względnego współczynnika równowagi pomiędzy obydwoma elektroaktywnymi formami [29]. Jeśli eksperyment przeprowadzony jest szybko, to znaczy, kiedy A i C nie mają dostatecznie dużo czasu na ponowne ustalenie równowagi między sobą, sytuacja przypomina układ, w którym nie ma żadnego związku między stężeniami obydwu form elektroaktywnych. Prąd płynący pochodzi od całkowitego stężenia składnika  $C^* = C_A + C_C$ , a obserwowany współczynnik dyfuzji dany jest wzorem:

$$D_w = \sqrt{X_A \sqrt{D_A} + X_C \sqrt{D_C}}$$

gdzie  $X_A$  i  $X_C$  oznaczają ułamki molowe odpowiednich składników.

Z drugiej strony, jeśli eksperyment jest na tyle powolny, że po każdej zmianie przyłożonego potencjału składniki mają czas na ustalenie równowagi między sobą, wypadkowy współczynnik dyfuzji będzie wyrażony wzorem:

$$D_w = X_A D_A + X_C D_C$$

Niezależnie od tego, w jaki sposób będzie przeprowadzony pomiar (co poiąga za sobą konieczność stosowania jednego z dwóch wspomnianych równań), wyznaczenie stałej wiązania sprowadza się do:

1. wyznaczenia wartości  $D_A$  (przy braku ligandu)
2. wyznaczeniu wartości  $D_w$  przy różnych stężeniach A i L
3. dopasowaniu za pomocą dowolnej techniki (np. metody najmniejszych kwadratów) wartości  $D_w$  i ułamków molowych, używając jako zmiennych parametrów wartości  $K$  i  $D_C$ .

Najlepszy wynik dopasowania daje w rezultacie wartości stałej wiązania  $K$  i współczynnika dyfuzji kompleksu  $D_C$ . Bardzo istotne jest dokładne wyznaczenie współczynnika dyfuzji. Jedną z zalecanych metod jest voltametria z użyciem elektrody obrotowej, drugą jest chronokulometria. Używanie cyklowoltametria nie jest zalecane w przypadku wykorzystywania jej wyników w późniejszych obliczeniach.

## 15. Określanie stałej za pomocą potencjałów półfali

Jest to dość powszechny sposób na wyznaczanie stałych równowagi kompleksowania jonów metali przez ligandy makrocycliczne w roztworach. Do określenia stechiometrii i stałych wiązania stosuje się w tym wypadku równanie Lingana:

$$E_{1/2(L)} = E_{1/2} + \frac{RT}{2nF} \ln \frac{D_{M^{n+}}}{D_{ML_p^{m+}}} - \frac{RT}{nF} \ln K - p \frac{RT}{nF} \ln [L]$$

gdzie  $E_{1/2}$  to potencjał półfali redukowany do jonu  $M^{n+}$  do  $M$ ,  $E_{1/2(L)}$  jest potencjałem półfali zmierzonym w obecności ligandu  $L$  o ściśle określonym stężeniu,  $p$  jest liczbą ligandów wchodzących w skład jednej cząsteczki,  $K$  jest stałą trwałości kompleksu, zaś  $D_{M^{n+}}$  i

$D_{ML_p^{m+}}$  to współczynniki dyfuzji odpowiednio solwatowanego jonu i jonu związanego z ligandem.

Podane równanie nie ma sensownego zastosowania w chemii supramolekularnej z powodu silnego wpływu na potencjał półfali produktów reakcji na

elektrodach. Polega on na tym, że w przypadku niektórych kationów metalu ich formy zredukowane odkładają się na ich powierzchni lub nawet reagują z materiałem zmieniającym jego właściwości. Efekt ten może odgrywać aż tak wielką rolę, że wyznaczenie jakichkolwiek parametrów kinetycznych układu na podstawie pomiarów woltametrycznych staje się niemożliwe. Sposobem na ominięcie tego problemu jest konstrukcja takiego układu, w którym zarówno forma utleniona, jak i zredukowana są rozpuszczalne w elektrolicie.

Prosty przykład takiego rozwiązania to kompleksy miedzi (II), mającej liczbę koordynacyjną 4. W wielu środowiskach niewodnych jony  $\text{Cu}^{2+}$  ulegają redukcji do  $\text{Cu}^+$ . Proces jest oczywiście odwracalny i dodatkowo żaden z wyżej wymienionych jonów nie odkłada się na powierzchni elektrody. Dodatkowo obydwie formy mogą oddziaływać z ligandem, dając kompleksy. Można w przypadku tego układu stosować techniki woltametryczne w celu wyznaczenia stałych wiązania obu form. Zaobserwowano [30], że potencjał półfali dla pary  $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$  przesuwa się wraz z dodawaniem ligandu do roztworu zgodnie z równaniem:

$$E_{1/2(L)} = E_{1/2} + \frac{RT}{2nF} \ln \left[ \frac{1 + K^I[L]}{1 + K^{II}[L]} \right]$$

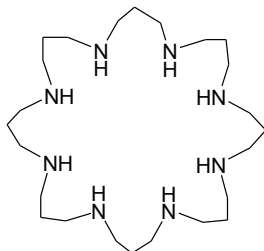
gdzie  $K^I$  i  $K^{II}$  oznaczają stałe wiązania dla obu form miedzi z ligandem  $L$ .

Analiza przesunięć potencjału półfali przy różnych stężeniach ligandu prowadzi w tym wypadku do wyznaczenia wartości obu tych stałych.

Zupełnie inne zachowanie zostało zaobserwowane w przypadku kompleksów żelaza z jonami  $\text{CN}^-$  przez Lehna w 1983 roku [31]. Badał on zachowanie jonów  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  w środowisku zawierającym różne ligandy makrocycliczne.

Żelazo dwuwartościowe jest utleniane w trakcie procesu do żelaza trójwartościowego w środowisku wodnym.

Dodatek niestechiometrycznej ilości sprotonowanego ( $8\text{H}^+$ ) ligandu



powoduje ustalenie się równowag związanych z utworzeniem się nowego związku kompleksowego o potencjale półfali bardziej dodatnim niż początkowy. Para: ligand makrocycliczny-żelazo II i żelazo III jest w pełni odwracalna i prąd wierzchołkowy  $i_p$  rośnie wraz ze wzrostem stężenia ligandu, aż do momentu, w którym na jedną cząsteczkę żelaza przypada jedna cząsteczka związku. Dalsze zwiększanie stężenia nie wnosi praktycznie żadnych zmian, gdyż w roztworze istnieje tylko para skompleksowana przez makrocycła.

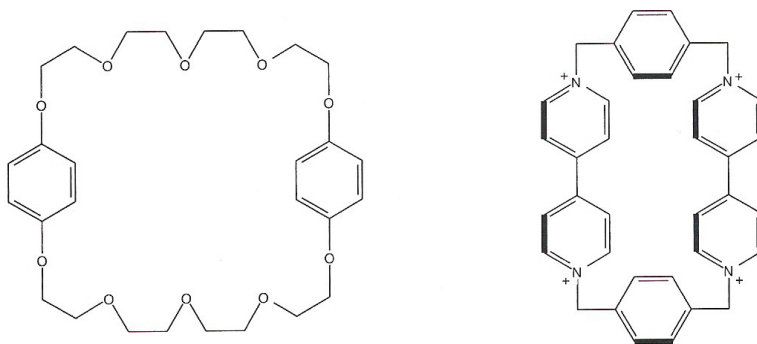
Znając potencjał półfali zarówno dla jonu skompleksowanego, jak i wolnego można użyć następującej zależności:

$$E_{1/2,zw} - E_{1/2,wol} = \frac{RT}{nF} \ln \frac{K_{Red}}{K_{Ox}}$$

gdzie  $E_{1/2,zw}$  i  $E_{1/2,wol}$  oznaczają odpowiednio potencjały dla związku z ligandem i związku wolnego a  $K_{Red}$  i  $K_{Ox}$  odpowiadają stałym wiązania formy zredukowanej i utlenionej.

Przedstawiono dwie techniki woltametryczne dające kinetyczny obraz zjawisk zachodzących w roztworze. Pokazano, że potencjał półfali potrafi być bardzo czułym narzędziem pozwalającym na dokładne określenie stałych wiązania. Należy jednak pamiętać, że nie jest to metoda w pełni uniwersalna. Jeśli na przykład kompleksowanie ma miejsce w jednym miejscu cząsteczki, a jej elektroaktywna część jest dość odległa, to nie zauważy się praktycznie żadnych przesunięć potencjałów półfaliowych. Ponadto, jeśli ligand stabilizuje zarówno formę utlenioną, jak i zredukowaną, to przesunięcia dla obu będą bardzo małe.

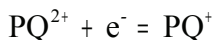
Innym przykładem badania środowiska z zastosowaniem kompleksów supramolekularnych i potencjałów półfali jest wykorzystanie związków



Istnieje możliwość takiego zsyntetyzowania tych cząsteczek, że zazębiają się one wzajemnie tworząc jedną strukturę. Były one badane przez Stoddarta i

współpracowników [32, 33]. Cyklofan posiada dobrze określone właściwości elektrochemiczne i bazując na ich znajomości i pomiarach woltametrycznych dla całej jednostki można uzyskać dane na temat jej struktury.

Każda cząsteczka posiada dwie grupy 4,4'-bipirydynowe. Każda z nich podlega odwracalnemu procesowi redukcji zgodnie z równaniem:



Proces ten przebiega jednocześnie w obydwu grupach tej samej cząsteczki cyklofanu przy takich samych potencjałach półfali. Zaobserwować go można jako jeden sygnał na cyklowoltogramie wykonanym dla substancji rozpuszczonej w acetonitrylu z dodatkiem małych ilości elektrolitu. W przypadku jednak cząsteczki zbudowanej z obu zazębionych wzajemnie jednostek, na cyklowoltogramie pojawiają się dwa sygnały osobno dla obu grup 4,4'-bipirydynowych. Jest to spowodowane tym, że znajdują się one w dwóch różnych od siebie otoczeniach. Jedna z nich, znajdująca się wewnątrz drugiego pierścienia, jest stabilizowana przez niego poprzez przenoszenie ładunku. Grupa zewnętrzna jest stabilizowana tylko w niewielkim stopniu. Pierścień preferuje grupę  $\text{PQ}^{2+}$  jako silniej oddziałującą z bogatą w elektrony strukturą polieteru. Im większy jest wpływ elektronów na grupę, tym bardziej ujemny potencjał półfali zostanie zarejestrowany. I tak grupa wewnętrzna daje sygnał przy znacznie niższej wartości  $E_{1/2}$  niż zewnętrzna. W ten oto sposób analizując zmiany potencjału można przewidzieć strukturę związku. Warto zwrócić uwagę, że występuje w nim wewnętrzny gradient elektrochemiczny redukcji grupy 4,4'-bipirydonowej wynikający z geometrii cząsteczki. Można wyobrazić sobie znacznie bardziej złożone struktury posiadające analogiczne właściwości. W przyszłości mogą one znaleźć zastosowanie w sztucznej fotosyntezie jako skuteczne cząsteczki rozdzielające ładunki.

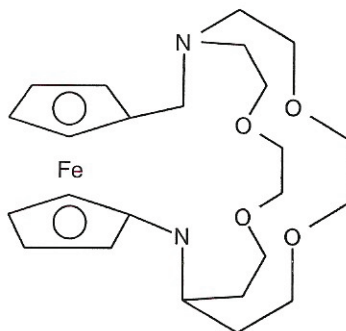
## 16. Receptory utlenienia-redukcji

W chemii supramolekularnej pożądanym jest z reguły tworzenie kompleksów o bardzo silnych oddziaływaniach między ligandem a jonem kompleksowanym. Nie zawsze jest to jednak zjawisko pożądanym. Czasami jest istotne, aby właściwości zmieniały się wraz ze środowiskiem. Ligandy przenoszące substancje przez błony lipidowe są tutaj dobrym przykładem takich potrzeb. Po jednej stronie muszą jak najmocniej wiązać jon, aby wydajność była zadowalająca, zaś z drugiej strony błony jon nie może być zbyt silnie trzymany przez cząsteczkę.

Te wymagania są bardzo ostre i nie jest łatwo je spełnić. Dlatego też taka grupa związków cieszy się wielką popularnością i zainteresowaniem. Wśród re-

ceptorów o zadawalających właściwościach największą rodzinę stanowią receptory red-ox. Ligandem jest w tym przypadku cząsteczka makrocykliczna, która zawiera w pobliżu podjednostkę red-ox aktywną. Istotne jest w ich przypadku zapewnienie jak najdoskonalszego połączenia w celu przekazywania informacji z jednej grupy do drugiej. Działanie takich receptorów opiera się na zmianie właściwości ligandu indukowane zmianami stopnia utlenienia grupy red-ox. Jej redukcja powoduje, że wzrasta gęstość elektronów, co skutkuje większym przyciąganiem kationów. Z drugiej strony utlenienie spowoduje obniżenie gęstości ładunku i jednocześnie zmniejszenie siły wiązania kationów. Siły sterujące zmianami zachowania są więc czysto elektrostatyczne. Z tego powodu wśród receptorów dominują te wiążące kationy.

Receptory red-ox to naturalne połączenie chemii supramolekularnej z elektrochemią. Z jednej strony związki makrocykliczne i ich właściwości kompleksujące, a z drugiej strony procesy utlenienia i redukcji wpływające na działanie całości. Rozpatrzmy dla przykładu kryptand ferrocenu



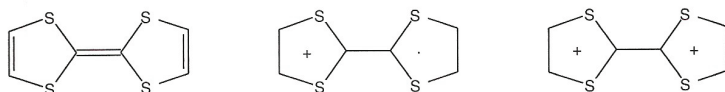
Jego właściwości są dobrze znane. Tworzy on trwałe kompleksy z jonami  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ag}^+$  i  $\text{Ca}^{2+}$ . Przeprowadzono badania voltametryczne dla tego związku i wykazały one, że grupa ferrocenowa ma bardzo silny wpływ na właściwości wiążące. Stała wiązania dla  $\text{Ag}^+$  zmieniła się z  $2,2 \cdot 10^8 \text{M}^{-1}$  na  $1,1 \cdot 10^4 \text{M}^{-1}$  po utlenieniu ferrocenu. Co więcej związek ten działa podobnie również w środowisku wodnym.

Większe trudności można napotkać przy poszukiwaniu receptorów wiążących cząsteczki obojętne, bowiem w ich wypadku oddziaływania determinujące selektywność są bardziej subtelne niż siły elektrostatyczne. Istnieją jednak związki, które dość dobrze spisują się na tym polu. Cyklofan jest dobrym ligandem ze względu na dwie grupy 4,4'-bipirydynowe. Ligand ten potrafi tworzyć związki kompleksowe z tyrozyną i tryptofanem. Wykazano, że forma  $4^+$  tworzy również



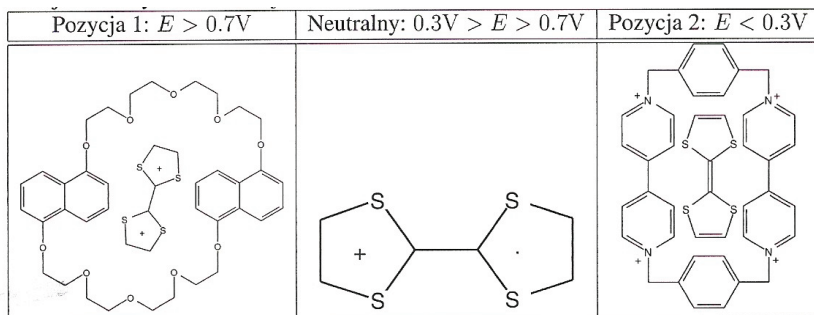
trwałe cząsteczki z serotoniną i wieloma neurotransmiterami. Ponieważ w jego wypadku stabilność układu kompleksowego jest determinowana przez efekty przeniesienia ładunku, redukcja grup parakwatowych powinna prowadzić do osłabienia trwałości kompleksu. Zostało dowiedzione eksperymentalnie [28], że redukcja  $4^+$  do  $2^+$  powodowała przesunięcie się potencjału półfalowego tworząc osłabienia stałej wiązania. Dlatego właśnie cyklofan jest bardzo dobrym receptorem cząsteczek o znaczeniu biologicznym. Pomiary voltametryczne przy jego obecności są czułe na wyżej wymienione cząsteczki, można go więc zastosować jako ich sensor w warunkach fizjologicznych.

Układ supramolekularny, który może w sposób odwracalny przechodzić przez kilka stanów równowagowych, może być zastosowany jako przełącznik supramolekularny. Wpływając na stopień utlenienia cząsteczki można sprawić, że będzie ona kompleksowana przez dwa różne rodzaje ligandów. Ciekawą cząsteczką wykazującą powinowactwo zależnie od stopnia utlenienia jest TTF



W stanie neutralnym jest on donorem elektronów  $\pi$  i tworzy kompleksy z cyklofanem ( $\text{CBPQT}^{4+}$ ). Po oderwaniu jednego elektronu tworzy się indywiduum posiadające ładunek  $1+$  i jeden niesparowany elektron. W tym stanie TTF nie tworzy żadnych kompleksów. Zwiększając stopień utlenienia jeszcze o jednostkę otrzymuje się doskonały akceptor elektronów  $\pi$  dający kompleksy z 1,5-dinafto-[38]koroną-10 ( $1/5\text{DN}38\text{C}10$ ). Przeprowadzono badania nad układem, który składał się z mieszaniny obu ligandów i TTF [34]. Wykazano, że jest on odwracalny i istnieje możliwość sterowania nim za pomocą potencjału elektrycznego. Istnieją setki aplikacji, w których przełącznik supramolekularny może znaleźć zastosowanie, od wyświetlaczy graficznych po urządzenia sterujące procesami przeniesienia elektronu bądź energii.

Korzystając z badań rentgenograficznych otrzymano odpowiedź na pytanie – jaka jest struktura obydwu kompleksów. Okazało się, że w obydwu wypadkach cząsteczka TTF umieszczona jest we wnętrzu dużych pierścieni. Otoczona w ten sposób donorami (bądź akceptorami – zależnie od jej stopnia utlenienia) elektronów  $\pi$  jest doskonale stabilizowana. Tabela przedstawia trzy możliwe formy pojawiające się w badanej mieszaninie.



Przeprowadzono pomiary elektrochemiczne dla wszystkich możliwych kombinacji tego trójskładnikowego układu, począwszy od pojedynczych składników, poprzez mieszaniny dwuskładnikowe, na trójskładnikowej skończywszy. Okazało się, że wolny TTF wykazuje dwa przejścia, co jest związane z tym, że dwukrotnie oddaje po jednym elektronie, przechodząc w sposób odwracalny następujący szereg reakcji:



Dodając 20-krotny nadmiar CBPQT<sup>4+</sup> ponad 90% całego TTF został skompleksowany. Pierwszy proces utlenienia uległ przesunięciu o 70mV, podczas gdy drugi nie uległ zmianie. Jednocześnie zmalała gęstość prądu, co jest spowodowane tym, że forma skompleksowana jest znacznie mniej mobilna. Podobnie dodając 50-krotny nadmiar 1/5DN38C10, pierwszy proces redukcji uległ przesunięciu o około 14mV bez zmiany drugiego. Przesunięcia te sugerują, że forma TTF jest kompleksowana tylko i wyłącznie przez CBPQT<sup>4+</sup>, TTF<sup>2+</sup> oddziałuje wyłącznie z 1/5DN38C10, a TTF<sup>+\bullet</sup> nie oddziałuje z żadnym z tych ligandów.

Do potwierdzenia tej teorii użyto roztwór trójskładnikowy, składający się z TTF i obu ligandów w nadmiarach takich samych, jak przy poprzednich badaniach. Wyniki całkowicie potwierdziły przypuszczenia. Potencjał pary TTF<sup>+\bullet</sup>/TTF przesunął się w stronę bardziej dodatnich wartości o 70mV, a potencjał pary TTF/TTF<sup>+\bullet</sup> przesunął się w stronę wartości bardziej ujemnych o 14mV. Widać więc, że efekty wynikające z wpływu obydwu ligandów są od siebie całkowicie niezależne. Potwierdziła się również teoria, że TTF<sup>+\bullet</sup> nie oddziałuje z żadnym z tych kompleksów. Warto również zwrócić uwagę, że trzy formy TTF różnią się od siebie kolorami, przy czym można uzyskać dodatkowe kolory zmieniając dodatkowo stopień utlenienia cząsteczki cyklofanu.

Układ trójskładnikowy składający się z dwóch ligandów i związku łączące-

go się z jednym z nich zależnie od warunków kontrolowanych z zewnątrz może mieć szereg różnych zastosowań. Jedno z nich zostało już wymienione – układ ten zmienia kolor pod wpływem zmieniającego się potencjału elektrycznego. Wyobrazić można sobie jednak bardziej wyszukane aplikacje. Ligandy mogą być fragmentami większych cząsteczek, których działanie można by aktywować poprzez utworzenie kompleksu, mogą one być też odpowiednio odległymi fragmentami jednej cząstki, która mogłaby zmieniać swoje właściwości tak, jak trójpozycyjny przełącznik. Zastosowań jest mnóstwo – wiele teraz i wiele możliwych do realizacji w przyszłości. Jedynym ograniczeniem jest wyobraźnia eksperymentatora.

### Podziękowania:

Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2006-2008 jako projekt badawczy rozwojowy nr R0501601.

### Literatura:

1. a. E. A. Lewis, K. P. Murphy *Isothermal Titration Calorimetry*, w: G. U. Nienhaus (red.) *Protein-Ligand Interactions*; Humana Press, 2005; b. F. P. Schmidten; *Isothermal Titration Calorimetry in Supramolecular Chemistry* w: C. A. Schalley (red.) *Analytical Methods in Supramolecular Chemistry*; Willey VCH, 2005; c. A. Arnaud, L. Bouteiller *Isothermal Titration Calorimetry of Supramolecular Polymers* Langmuir, 20, 6858, 2004;
2. C. Urbanke, G. Witte, U. Curth *Sedimentation Velocity Method in the Analytical Ultracentrifuge for the Study of Protein-Protein Interactions*, w: G. U. Nienhaus (red.) *Protein-Ligand Interactions*; Humana Press, 2005; b. M. Rasa, U. S. Schubert *Progress in the Characterization of Synthetic (Supramolecular) Polymers by Analytical Ultracentrifugation* Soft Matter, 2, 561, 2006;
3. a. R. Kimmich *NMR Tomography, Diffusiometry, Relaxometry*; Springer-Verlag, 1997; b. L. Fielding *Determination of Association Constants ( $K_a$ ) from Solution NMR Data*; Tetrahedron, 56, 6151, 2000; c. Y. Cohen, L. Avram, L. Frish *Diffusion NMR Spectroscopy in Supramolecular and Combinatorial Chemistry: An Old Parameter – New Insights* Angew. Chem. Int. Ed. 44, 520, 2005; d. S.J. Cantrill, M.C.T. Fyfe, F.M. Raymo., J.F. Stoddart *Probing Self-assembly by NMR*, w: M. Pons (red.) *NMR in Supramolecular Chemistry. NATO ASI Series C*, vol. 526, Kluwer Academic Publishers, 1999; e. M. Pons, O. Millet *Dynamic NMR studies of supramolecular complexes*, Progr. Nuc. Magn. Reson. Spect., 38, 267, 2001; f. A. Moser, C. Detellier *Nuclear Magnetic Resonance*

- Spectroscopy*, w: J. L. Atwood, J. W. Steed (red.) *Encyclopedia of Supramolecular Chemistry*, vol. 2, Marcel Dekker, 2004;
4. a. K. Nienhaus, G. U. Nienhaus *Probing Heme Protein-Ligand Interactions by UV/Visible Absorption Spectroscopy*, w: G. U. Nienhaus (red.) *Protein-Ligand Interactions*; Humana Press, 2005; b. M. S. Hargrove *Ligand Binding With Stopped-Flow Rapid Mixing*, w: G. U. Nienhaus (red.) *Protein-Ligand Interactions*; Humana Press, 2005; c. B. Valeur, B. N. Berberan-Santos, M. M. Martin *Photophysics and Photochemistry of Supramolecular Systems* w: C. A. Schalley (red.) *Analytical Methods in Supramolecular Chemistry*; Willey VCH, 2005;
  5. a. M. Lim, P. A. Anfinrud *Ultrafast Time-Resolved IR Studies of Protein-Ligand Interactions*, w: G. U. Nienhaus (red.) *Protein-Ligand Interactions*; Humana Press, 2005; b. C. Kötting, K. Gerwert *Monitoring Protein-Ligand Interactions by Time-Resolved FTIR Difference Spectroscopy*, w: G. U. Nienhaus (red.) *Protein-Ligand Interactions*; Humana Press, 2005; c. U. Samumi, J. M. Friedman *Proteins in Motion: Resonance Raman Spectroscopy as a Probe of Functional Intermediates*, w: G. U. Nienhaus (red.) *Protein-Ligand Interactions*; Humana Press, 2005;
  6. G. Gran (1950) *Acta chem. Scand.*, **4**, 559; G. Gran (1952) *Analyst*, **77**, 661; F.J.C. Rossotti, H. Rossotti (1965) *J. Chem. Ed.*, **42**, 375;
  7. P.M. May, K. Murray, D.R. Williams (1985) *Talanta*, **32**, 483;
  8. K. Kimura, T. Shono (1990) *Cation Binding by Macrocycles*, Ed. Y. Inoue, G.W. Gokel, Marcel Dekker, New York, p. 429;
  9. H.K. Frensdorff (1971) *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 600;
  10. J.M. Lehn, J.P. Sauvage (1975) *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 6700;
  11. K.A. Arnold, G.W. Gokel (1986) *J. Org. Chem.*, **51**, 5025; K./A. Arnold, L. Echegoyen, G.W. Goken (1987) *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 3713;
  12. A. De Robertis, P. Di Giacomo, C. Foti (1995) *Anal. Chim. Acta.*, **300**, 45;
  13. N. Takasiva, D.G. Hall, E. Wyn-Jones, P. Brown (1988) *J. Chem. Soc., Faraday Trans. I*, **84**, 3059;
  14. J. Gutknecht, H. Schneider, J. Stroka (1978) *Inorg. Chem.*, **17**3326;
  15. B.G. Cox, H. Schneider (1992) *Coordination and Transport Properties of Macrocyclic Compounds in Solution*, Elsevier, Amsterdam;
  16. D.D. DeFord, D.N. Humme (1951) *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 5321;
  17. E. Kimura, S. Sakonaka, T. Yatsunami, M. Kodama (1981) *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 3041;
  18. P.D. Beer (1989) *Chem. Soc. Rev.*, **18**, 409;
  19. T. Matsue, D.H. Evans, T. Osa, N. Kobayashi (1985) *J. Am. Chem. Soc.*,

- 107**, 3411;
20. R. Isnin, C. Salam, A.E. Kaifer (1991) *J. Org. Chem.*, **56**, 35;
  21. R. Ferenandez-Prini, J.-C. Justice (1984) *Pure Appl. Chem.*, **56**, 541;
  22. Y. Takada u Y. Inoue, G.W. Gokel (1990) (Eds.) *Cation Binding by Macrocycles*, Marcel Dekker, New York, 133;
  23. V.G. Levich (1962) *Physicochemical Hydrodynamics*, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ;
  24. J.O'M. Bockris, A.K.N. Reddy (1970) *Modern Electrochemistry*, **862**, vol. 2, Plenum Press, New York;
  25. Mulder, et. al. (1990) *J. Electronal. Chem.*, **285**, 103;
  26. J. Altman, J.J. Lipska, I. Kuntz, L. Waskell (1989) *Biochemistry*, **28**, 7516; C.D. Moore, Q.N. Al-Misky, J.T.J. Leconte (1991) *Biochemistry*, **30**, 8357;
  27. A. Andreas, C. Bazzicalupi, A. Bencini, V. Fusi, E. Garcia-Espana, C. Giorgi, N. Nardi, P. Paoletti, J.A. Ramires, B. Valtancoli (1994) *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **2**, 2367;
  28. B.G. Cox, D. Knop, H. Schneider (1981) *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 6044;
  29. D.H. Evans (1989) *J. Electroanal. Chem.*, **258**, 451;
  30. R.R. Gagné, J.L. Allison, D.M. Ingle (1979) *Inorg. Chem.*, **18**, 2767;
  31. F. Peter, M. Gross, M.W. Hossemi, J.-M. Lehn (1983) *J. Electronal. Chem.*, **144**, 279;
  32. P.R. Asthon, T.T. Goodnow, A.E. Kaifer, M.V. Reddington, A.M.Z. Slawin, N. Spancer, J.F. Dtodart, C. Vincent, D.J. Williams (1989) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **28**, 1396;
  33. P.L. Anelli, P.R. Asthon, R. Ballardini, V. Balzani, M. Delgado, M.T. Gandolfi, T.T. Godonow, A.E. Kaifer, D. Philip, M. Pietraszkiewicz; L. Prodi, M.V. Reddington, A.M.Z. Slawin, N. Spancer, J.F. Stoddart, C. Vincent, D.J. Williams (1992) *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 193;
  34. P.R. Asthon, V. Balzani, J. Becher, A. Credi, M.C.T. Fyfe, G. Matteredsteig, S. Menzer, M.B. Nielsen, F.M. Raymo, J.F. Stoddart, M. Venturi, D.J. Williams (1999) *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 3951.



## Rozdział XII

### **Benzoksaborole – struktury, właściwości chemiczne, zastosowania i metody syntezy**

Agnieszka Adamczyk–Woźniak, Andrzej Sporzyński, Anna Żubrowska  
*Wydział Chemiczny Politechniki Warszawskiej, Noakowskiego 3,  
00-664 Warszawa*

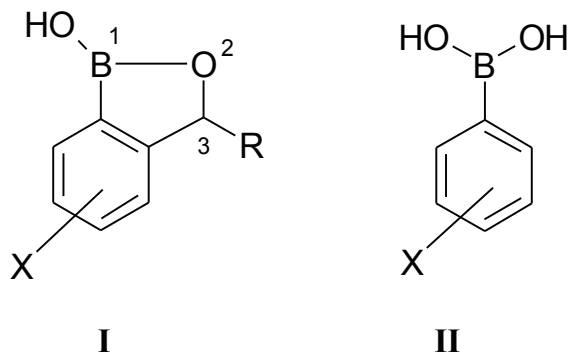
#### **1. Wprowadzenie**

Kwasy boronowe  $\text{RB(OH)}_2$  znajdują obecnie zastosowanie we wszystkich dziedzinach chemii [1]. W ostatnich dwóch dekadach nastąpił lawinowy wzrost publikacji poświęconych tym związkom. Najważniejsze kierunki prowadzonych obecnie badań dotyczą:

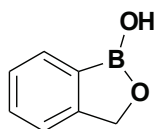
- Wykorzystania kwasów boronowych jako syntonów organicznych. Najszerzej badaną reakcją jest reakcja Suzuki’ego otrzymywania układów biarylowych [2].
- Zastosowania tych związków w biologii i medycynie związane z ich właściwościami antybakteryjnymi, antywirusowymi oraz działaniem przeciwwgrzybiczym i antynowotworowym [3].
- Wykorzystania kwasów boronowych jako receptorów molekularnych, szczególnie w wiązaniu cukrów [4].

Prowadzone badania obejmują kwasy aryloboronowe z różnymi podstawnikami w pierścieniach aromatycznych, których obecność pozwala na modyfikowanie właściwości tych związków. Bardzo ważna jest tu możliwość różnego rodzaju oddziaływań wewnątrz- i międzycząsteczkowych ze szczególną rolą wiązania wodorowego [5].

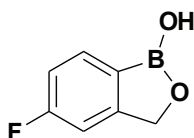
Stosunkowo niedawno uwagę badaczy przyciągnęły pochodne kwasu fenylboronowego – 1-hydroksy-1,3-dihydrobenzoksaborole **I**.



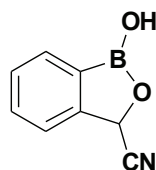
Istotną różnicą w stosunku do kwasów fenylboronowych II jest tu obecność tylko jednej grupy hydroksylowej związanej z atomem boru. Pierwsze benzoksaborole zostały otrzymane i scharakteryzowane już ponad 50 lat temu [6]. Dalsze badania wykazały, że benzoksaborole charakteryzują się zarówno szczególną trwałością pierścienia boroksolu, jak i wzrostem odporności na hydrolizę wiązania bor-węgiel w porównaniu z odpowiednim kwasem boronowym [7]. Związki te łatwiej otrzymać w postaci czystej – kwasy boronowe ulegają łatwo odwodnieniu z utworzeniem cyklicznych boroksynów i zwykle występują z nimi w mieszaninie. Benzoksaborole wykazują również lepszą od kwasów boronowych rozpuszczalność w wodzie. Ze względu na unikalną zdolność wiązania niektórych glikokoniugatów wydają się być interesujące z punktu widzenia ich potencjalnego zastosowania jako receptorów molekularnych. Benzoksaborole znalazły również zastosowanie w medycynie. Niektóre z nich wykazują działanie przeciwgrzybicze, a związek z podstawnikiem fluorowym w pierścieniu benzenowym (AN2690) jest obecnie w fazie badań klinicznych jako środek przeciwko onychomycyzie [8]. Z kolei benzoksaborol z grupą nitrylową w pierścieniu boroksolu okazał się aktywnym biocydem.



rozpoznawanie  
glikokoniugatów



środek przeciwko  
onychomycyzie  
(testy kliniczne)



biocyd



Po stwierdzeniu, że benzoksaborole znajdują zastosowanie we wszystkich dziedzinach wymienionych powyżej, rozwinęły się intensywne badania nad syntezą i zastosowaniem tych związków. Przedmiotem niniejszej pracy jest przegląd opublikowanych struktur cząsteczkowych, omówienie właściwości chemicznych i związanych z nimi zastosowań benzoksaboroli **I** oraz zestawienie metod ich syntezy.

## 2. Nomenklatura

Niepodstawiony związek **I** ma następujące systematyczne angielskie nazwy:

- 3*H*-benzo[*c*][1,2]oxaborol-1-ol lub 2-oxa-1-bora-indan-1-ol (Beilstein),
- 3*H*-2,1-benzoxaborol-1-ol (CAS),
- 1-hydroxy-1,3-dihydro-benzo[*c*]-1,2-oxaborol (Houben-Weyl) [9].

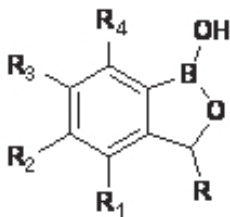
Ogólna nazwa używana w literaturze to **benzoksaborole** [8], rzadziej **benzoboroksole** [10]. We wcześniejszych pracach spotyka się również nazwy: **boronoftalidy** [7] lub **aryloboronolaktony** [11].

W niniejszym opracowaniu zebrano informacje literaturowe dotyczące 1-hydroksydihydrobenzoksaboroli **I**. Cieszą się one największym zainteresowaniem ze względu na szeroką gamę zastosowań. Związki zawierające inne podstawniki w pozycji 1 (np. grupy alkilowe lub aryłowe) oraz związki z grupą hydroksylową w pozycji 3 (formy tautomeryczne kwasów 2-formylofenyloboronowych [12]) nie zostały uwzględnione w niniejszym opracowaniu.

W Tabeli 1 zestawiono wartości temperatur topnienia, informacje o zbadanych strukturach w fazie krystalicznej, główne zastosowania opisane w poszczególnych pracach oraz metody syntezy z podaniem wydajności.

Tabela 1.

*Struktury, właściwości, zastosowania i metody syntezy 1-hydroksydihydrobenzoksaboroli*



Materiały supramolekularne

Nr zw	R	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	t.t./(°C)	Str.	Metoda syntezy (wyd.)	Zast.	Odn.
1	H	H	H	H	H	96-98	+(D)	B2 (84%)	Rec.	13
						87-89		B1 (86%)		10
						97-98		A1 (40%)		6
						90-97		A5 (77%)		14
						87-89		B1 (30%)		15
2	H	H	H	H	Me	115-125		A1 (7%)		17
3	R <sub>3</sub>	H	H	H	H	130-133		A4 (67%)		18
4	R <sub>6</sub>	H	H	H	H	111-113		A4 (75%)		18
5	R <sub>7</sub>	H	H	H	H	132-136	+(D)	A4 (71%)		18
6	R <sub>3</sub>	H	H	H	H	127-130		A4 (69%)		18
7	H	H	OMe	H	OMe	121-123	+(D)	B2a (72%)	C-C	19
								B4 (27%)		C-C
8	Winył	H	H	H	H	74-76	+(D)	B2 (84%)	C-C	13
Nr zw	R	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	t.t./(°C)	Str.	Metoda syntezy (wyd.)	Zast.	Odn.
9	Allil	H	H	H	H			B2 (79%)	C-C	13
10	Fenyl	H	H	H	H	142-144		B2 (73%)	C-C	13
11	C <sub>10</sub> H <sub>21</sub>	H	H	H	H			B2 (41%)	C-C	13
12	H	H	F	H	H	120-122		B2 (69%)		13
13	Etył	H	F	H	H	70-72		B2 (71%)		13
14	Winył	H	F	H	H			B2 (70%)		13
15	Fenyl	H	F	H	H	145-147		B2 (68%)		13
16	R <sub>9</sub>	H	H	H	H	127-130		A3a (32%)		21
17	R <sub>10</sub>	H	H	H	H	117-119		A3b (96%)		21
18	CN	H	H	H	H	107-109		A3c (88%)		21
19	CO <sub>2</sub> H	H	H	H	H	141-142		z 18: aq.HCl (98%)		21
20	CH <sub>2</sub> Br	H	H	H	H	100-101		A2		22
21	R <sub>11</sub>	H	H	H	H	132(dec)	+(D)	A3		23
22	H	H	F	H	H	118-120		B2b (60%)	Med	8
23	H	H	Cl	H	H	142-144		B2b (75%)	Med	8
24	H	H	Me	H	H	124-128		B2b (55%)	Med	8
25	H	H	CF <sub>3</sub>	H	H	113-118		B2b (55%)	Med	8
26	H	H	CN	H	H	98-101		B2b	Med	8
27	H	H	OMe	H	H	102-104		B2b (46%)	Med	8
28	H	H	CH <sub>2</sub> OH	H	H	124-128		B2b (7%)	Med	8
29	H	H	F	F	H	134-140		B2b (60%)	Med	8
30	H	F	H	H	H	83-87		B2b (55%)	Med	8
31	H	H	H	F	H	110-117		B2b (8%)	Med	8
32	H	H	H	H	F	120-124		B3	Med	8
33	Me	H	F	H	H	72-76		B2b (58%)	Med	8
34	H	H	H	R <sub>11</sub>		139-140		B2b (30%)	Med	8
35	Me	H	H	H	H			B1		10
36	CF <sub>3</sub>	H	H	H	H			B1		10
37	H	H	R <sub>12</sub>	H	nBu	85-86	+(D)	C (76%)		24

## Benzoksaborole – struktury, właściwości chemiczne, zastosowania i metody syntezy

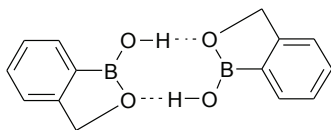
Nr zw	R	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	t.t./(°C)	Str.	Metoda syntezy (wyd.)	Zast.	Odn.
38	R <sub>13</sub>	H	H	H	H	100-102		A2 (85%)		11
39	R <sub>14</sub>	H	H	H	H			A2 (85%)		11
40	R <sub>15</sub>	H	H	H	H			A2 (92%)		11
41	R <sub>13</sub>	H	OMe	H	H	104-105		A2 (92%)		11
42	R <sub>16</sub>	H	H	H	H	121-123		A1a (22%)		25
43	R <sub>9</sub>	H	H	H	H	128-130		A3d (53%)		26
44	R <sub>17</sub>	H	H	H	H	88-90		43 + MeOH (84%)		26
45	R <sub>9</sub>	H	NO <sub>2</sub>	H	H	217-218		43 + HNO <sub>3</sub> (62%)		26
46	R <sub>17</sub>	H	NO <sub>2</sub>	H	H	118-120		45 + MeOH		26
47	R <sub>18</sub>	H	H	H	H	236-238		43+ LiAlH <sub>4</sub> , PhNCO (67%)		26
48	R <sub>19</sub>	H	NO <sub>2</sub>	H	H	100-102		47 + HNO <sub>3</sub>		26
49	H	H	Br	H	H	143-148		A5 (37%)		14
50	H	H	H	NMe <sub>2</sub>	H	145-153		A5 (39%)		14
51	H	H	H	H	NMe <sub>2</sub>	115-116		A5 (39%)		14
52	H	H	H	NO <sub>2</sub>	H	203-206		1, HNO <sub>3</sub>		27
53	H	H	H	NH <sub>2</sub>	H	157(dec) 153(dec)		52, H <sub>2</sub> , Ra-Ni 52, Pd/C, HCOONH <sub>4</sub>		27 28
54	H	H	H	R <sub>21</sub>	H	170		53, bezw. kw. (70%)		28

Podstawniki: R<sub>5</sub>: 2-MeOC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, R<sub>6</sub>: 3-MeOC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, R<sub>7</sub>: 2,6-(MeO)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>, R<sub>8</sub>: 2,4,6-Me<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>2</sub>,  
R<sub>9</sub>: CH<sub>2</sub>COOH, R<sub>10</sub>: CH<sub>2</sub>NO<sub>2</sub>, R<sub>11</sub>: 4-morfolino, R<sub>12</sub>: CH<sub>2</sub>OMe, R<sub>13</sub>: CH<sub>2</sub>Br,  
R<sub>14</sub>: CH(Br)CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, R<sub>15</sub>: CH<sub>3</sub> i CH<sub>2</sub>Br, R<sub>16</sub>: Et i C(O)C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>OH, R<sub>17</sub>: CH<sub>2</sub>COOME,  
R<sub>18</sub>: CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCONhPh, R<sub>19</sub>: CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>ONO<sub>2</sub>, R<sub>20</sub>: benzo, R<sub>21</sub>: NHCOC(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>

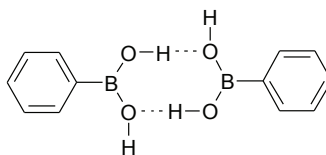
D – struktura dimeryczna, Rec – receptor, Med- medycyna, dec. – rozkład, C-C – reakcja Suzuki'ego.

## 3. Struktury

W bazie CSD są dostępne dane tylko kilku benzoksaboroli. Podstawą strukturą jest płaski centrosymetryczny dimer z dwoma wewnątrzcząsteczkowymi wiązaniami wodorowymi.

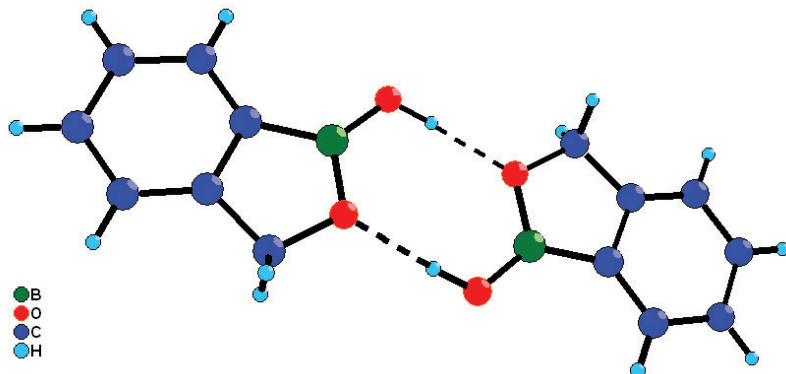


I-dimer



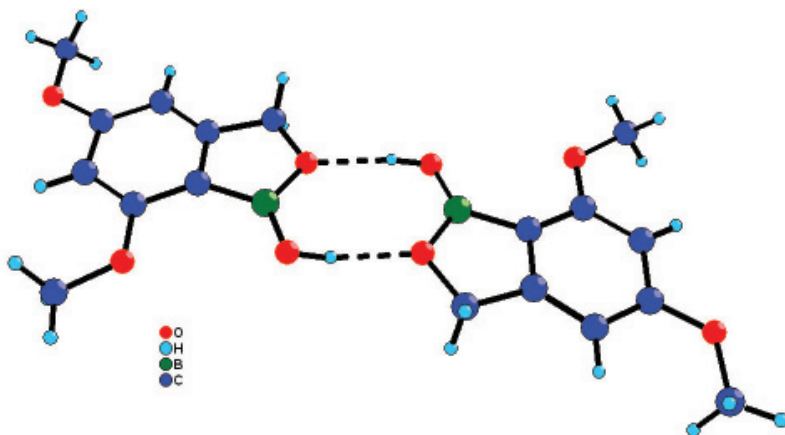
II-dimer

Obecność tylko jednej grupy hydroksylowej przy atomie boru powoduje brak możliwości tworzenia dodatkowych wiązań wodorowych i przestrzennego usieciowania tych związków, jak w przypadku kwasów boronowych **II**. Przykłady struktur przedstawiono na Rys. 1 - 4.



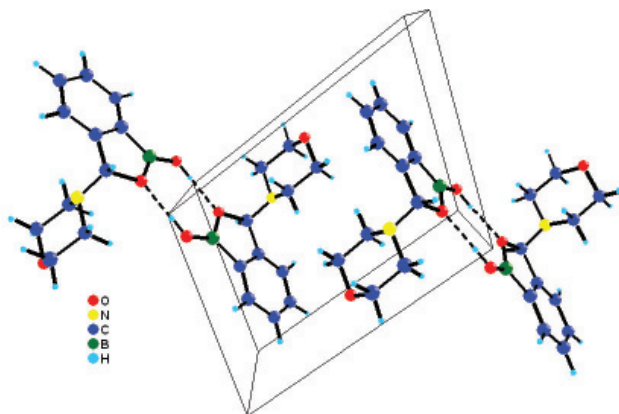
Rysunek 1. Struktura molekularna dimeru niepodstawionego 1-hydroksydihydrobenzoborolu [10].

Cząsteczka jest płaskim centrosymetrycznym dimerem z dwoma międzycząsteczkowymi wiązaniami wodorowymi. Podobny układ tworzy benzoksaborol z dwoma grupami metoksyłowymi w pierścieniu benzenowym (Rys. 2).



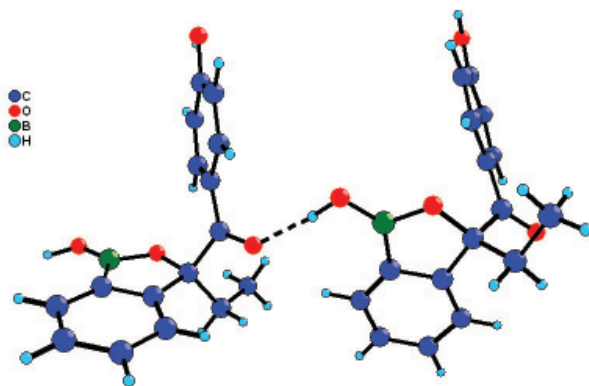
Rysunek 2. Struktura molekularna dimeru benzoksaboroluz podstawnikami metoksyłowymi w pierścieniu benzenowym [19].

Wprowadzenie bardziej objętościowych podstawników wpływa na geometrię układu. Obecność grupy morfolinyowej zwiększa odległości O...O, a także powoduje uporządkowanie cząsteczek w kryształe wskutek oddziaływań międzycząsteczkowych pierścieni morfolinylowych (Rys. 3.)



Rysunek 3. Ułożenie w sieci krystalicznej cząsteczek dimeru benzoksaborolu z podstawnikiem morfolinyowym [23].

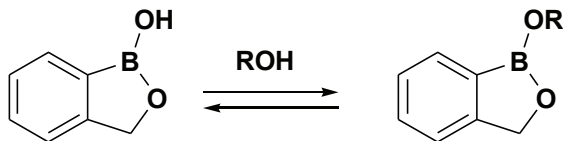
Obecność dwóch większych podstawników przy węglu metylenowym unieumożliwia powstanie dimeru, a grupa hydroksylowa tworzy wiązanie międzycząsteczkowe z tlenem karbonylowym podstawnika (Rys. 4).



Rysunek 4. Struktura benzoksaborolu z dwoma podstawnikami przy węglu metylenowym [25].

#### 4. Właściwości chemiczne i zastosowania benzoksaboroli

Właściwości chemiczne benzoksaboroli, określone na podstawie badań związku **1a**, zostały przedstawione w pracy [10]. Związki te, podobnie jak proste kwasy boronowe, reagują z alkoholami z utworzeniem estrów, które są związkami higroskopijnymi i w obecności wilgoci z powietrza rozkładają się z odtworzeniem substratów [7] (Schemat 1).



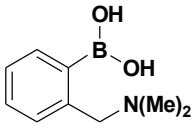
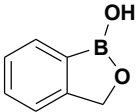
Schemat 1

Znacznie wyższą trwałością odznacza się ester etanoloaminy ( $R = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), co przypisuje się oddziaływaniu koordynacyjnemu atomów azotu i boru [26]. Szybka i odwracalna reakcja tworzenia estrów z alkoholami jest podstawą potencjalnego zastosowania benzoboroksoli jako receptorów cukrów, glikokoniugatów oraz kwasów  $\alpha$ -hydroksykarboksylowych, a także materiałów polimerycznych selektywnie wiążących monoalkohole. Materiały te mają potencjał zastosowania w chromatograficznym rozdzielaniu mieszanin [28]. W porównaniu z pozostałymi kwasami boronowymi wykazują one zwiększoną rozpuszczalność w wodzie oraz unikalną zdolność oddziaływania z niektórymi glikozydami. W związku z wymienionymi cechami stanowią one bardzo obiecującą grupę związków z punktu widzenia możliwości ich zastosowania jako selektywnych receptorów cukrów oraz powierzchniowych glikokoniugatów [16]. Zastosowano je również jako biocujniki kwasów  $\alpha$ -hydroksykarboksylowych.

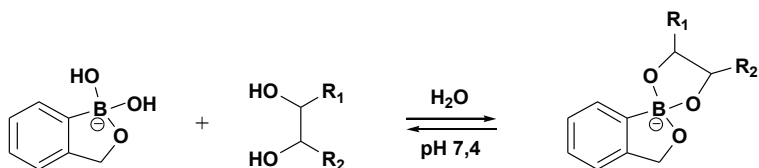
Tworzenie trwałych cyklicznych estrów z wicynalnymi diolami przez kwasy boronowe **II** wynika z obecności w tych związkach dwóch grup hydroksylowych. Zaskakująca wydaje się więc zdolność benzoksaboroli, związków zawierających jedną grupę hydroksylową, do silnego wiązania cukrów (Tabela 2).

Tabela 2. Wartości stałej równowagi tworzenia estru przez związki boru z fruktozą [16]

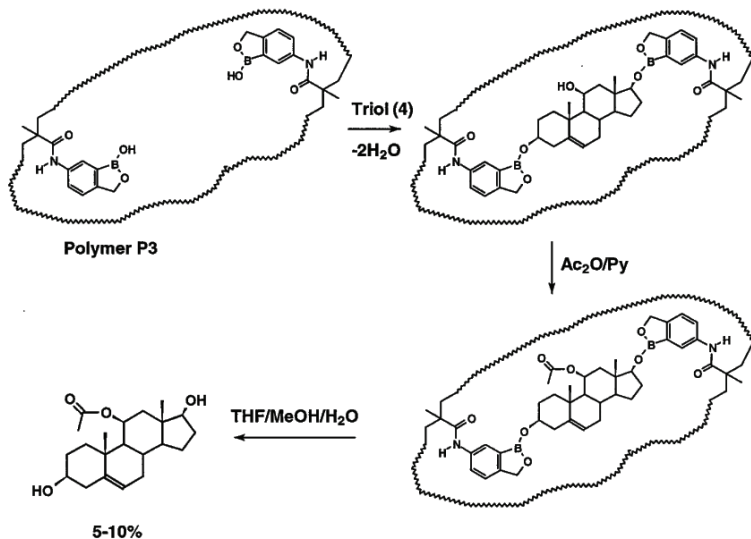
Receptor	Stała równowagi tworzenia estru
	79

	115
	606

Dowlut i Hall [16] zaproponowali mechanizm tworzenia estrów przez benzoksaborole w środowisku obojętnym lub słabo alkalicznym:

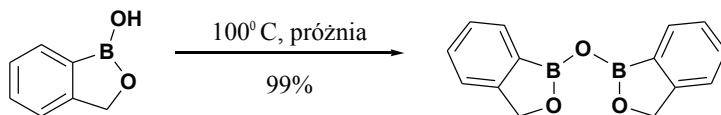


Tworzenie estrów ze związkami hydroksylowymi wykorzystano również w procesie tzw. wdrukowywania molekularnego (*molecular imprinting*), które zastosowano w celu selektywnej modyfikacji trioli (Schemat 2) [29].



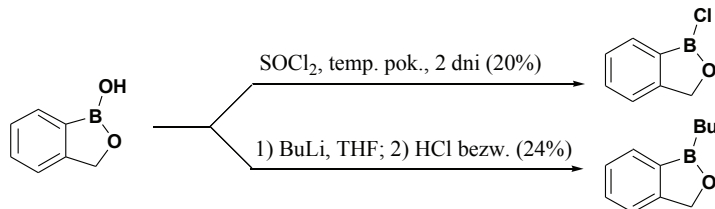
Schemat 2.

Heterocykliczny pierścień benzoksaboroli odznacza się wyjątkową trwałością [26]. Na szczególną uwagę zasługuje zwiększona w porównaniu z prostymi kwasami boronowymi odporność wiązań B-O i B-C na hydrolizę [7] zarówno kwasową (10% HCl) jak i zasadową (15% NaOH). Na przykład związek **1** został odzyskany prawie ilościowo po trzygodzinnym ogrzewaniu w 10% HCl (temperatura wrzenia), podczas gdy w przypadku kwasu fenylboronowego odzyska no jedynie 10% wyjściowego związku po 1,5 godzinach ogrzewania [28]. Pod wpływem ogrzewania pod obniżonym ciśnieniem benzoksaborole tworzą odpowiednie bezwodniki, które pod wpływem wilgoci rozpadają się z odtworzeniem wyjściowych boronoftalidów [7,10] (Schemat 3).



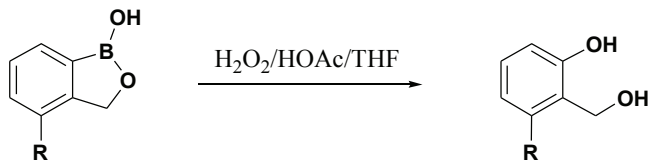
Schemat 3.

Badano również reaktywność wolnej grupy OH in situ. Przy zastosowaniu techniki NMR stwierdzono wymianę grupy hydroksylowej na atom chloru lub grupę butylową z zauważalnymi wydajnościami [10] (Schemat 4).



Schemat 4.

Podobnie jak inne kwasy aryloboronowe, benzoksaborole ulegają utlenianiu pod wpływem nadtlenku wodoru z utworzeniem odpowiedniego fenolu [14] (Schemat 5).

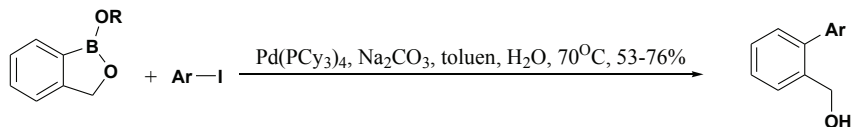


R = H (100%) lub Br (64%)

Schemat 5.



Benzoksaborole lub ich estry z alkoholami znajdują zastosowanie w syntezie organicznej, szczególnie w modyfikacji reakcji Suzuki’ego, w wyniku której otrzymuje się odpowiednie alkohole benzytowe [24,30] (*Schemat 6*).



R = H lub <sup>t</sup>Pr

*Schemat 6.*

Najczęściej opisywanym przykładem wykorzystania benzoboroksoli w reakcji Suzuki’ego jest zastosowanie związku **7** jako kluczowego syntonu w wieloetapowej syntezie Vankomycyny [15,20,31]. Podjęto także próby zastosowania benzoboroksoli w celu aktywacji jednej z grup w cząsteczce cukru [32].

Jak już wspomniano, benzoksaborol z podstawnikiem fluorowym (związek **12**) okazał się skutecznym lekiem grzybobójczym [13,33,34]. Prowadzone są badania nad aktywnością biologiczną innych benzoksaboroli [13].

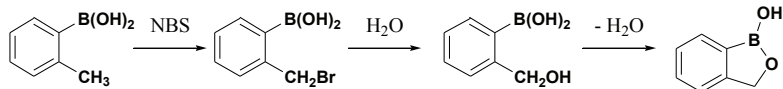
## 5. Metody syntezy

Benzoksaborole są estrami wewnętrznymi odpowiednich alkoholi *ortho*-boronobenzytowych, a ostatnim etapem ich otrzymywania jest odwodnienie takiego alkoholu, prowadzące do struktury cyklicznej. Dehydratacja zachodzi bardzo łatwo i benzoksaborole otrzymuje się z odpowiednich alkoholi nawet w wyniku krystalizacji z wody. Początkowe etapy syntez polegają na otrzymaniu związków, w których grupy boronowa oraz metylenohydroksylowa znajdują się w odpowiednim ułożeniu w cząsteczce.

### Metoda A. Funkcjonalizacja kwasu boronowego

Związek **1a** otrzymywany był w wyniku wieloetapowej syntezy, z kwasu 2-metylofenyloboronowego, który został poddany bromowaniu przy zastosowaniu *N*-bromosukcynimidu. Kolejnym etapem była hydroliza otrzymanego bromku do alkoholu, który uległ wewnątrzcząsteczkowej reakcji estryfikacji (metoda **A1**) [6,17,27].

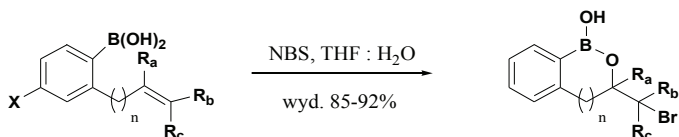
A1:



Modyfikacją tej metody jest użycie odpowiedniego jodku benzyłu zamiast bromku (**A1a**).

Podobny przebieg miała reakcja bromo-boronolaktonizacji olefin, prowadząca do benzoksaboroli lub ich sześcioczłonowych analogów [11] (metoda **A2**).

A2:



$n=0$  lub 1; dla  $n=0$ ,  $X=R_a=R_b=R_c=H$ ,  $X=R_a=R_b=H$ ,  $R_c=C_5H_{11}$ ,  $R_a=Me$ ,  $X=R_b=R_c=H$ ,  
 $X=OMe$ ,  $R_a=R_b=R_c=H$

( $n=0$  lub 1)

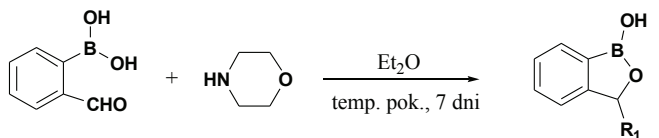
Jako substraty w reakcji hydrolizy stosowano również odpowiednie ( $\alpha$ -halogeno-*o*-metylo)-boroksyny, które są bezwodnikami kwasów fenylboronowych [7,22,26].

Benzoboroksole otrzymywano w reakcjach kwasu *ortho*-formyloboronowego z aminą drugorzędową [23] lub innymi czynnikami nukleofilowymi [21] (metoda **A3**).

Opisano użycie następujących substratów: malonian izopropylidenu (**A3a**), nitrometanu (**A3b**), cyjanku sodu (**A3c**), kwas malonowy (**A3d**).

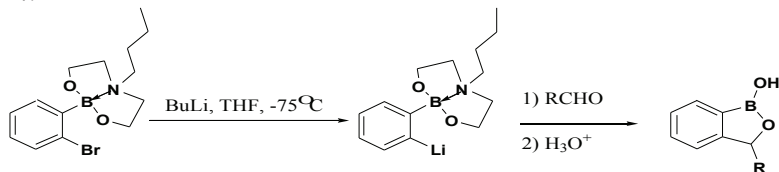
Wprowadzenie atomu litu bezpośrednio do pierścienia fenylowego wymagało zabezpieczenia grupy  $B(OH)_2$  w postaci estru z dietanoloaminą. Usunięcie zabezpieczenia oraz dehydratacja, prowadzące do benzoboroksolu zachodziło w kwaśnym środowisku wodnym (metoda **A4**).

A3:



$R_1 = N(C_2H_4)_2O$

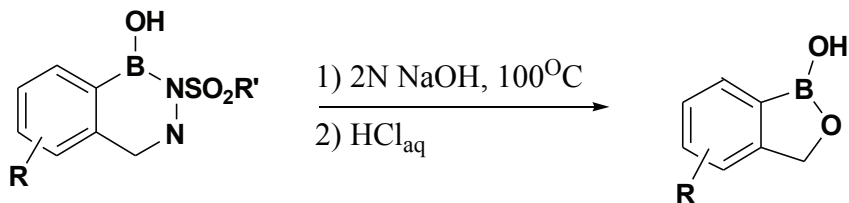
A4:



R (wyd.) = 2-MeOC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (67%), 3-MeOC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (75%), 2,6-(MeO)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>3</sub> (71%), 2,4,6-Me<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>3</sub> (69%)

Środowiska wodnego wymagała również reakcja hydroliza zasadowej sulfonylobenzodiazaborynu [14] (metoda A5).

A5:

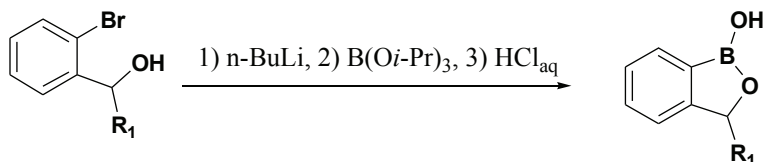


R = H, 5-Br, 6-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 7-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>

### Metoda B. Wprowadzenie grupy boronowej do cząsteczek alkoholi benzylowych

Najczęściej stosowanymi substratami były alkohole *ortho*-bromobenzylowe, poddawane reakcji z butylolitem, prowadzącej do wymiany bromu na lit [10,13,19]. Otrzymane związki fenylolitowe poddawano najczęściej reakcji z trialkoksyboranem, którego hydroliza kwasowa i następująca dehydratacja prowadziła do otrzymania oczekiwanego związku cyklicznego. Produkt w postaci stałej był wytrączany heksanem.

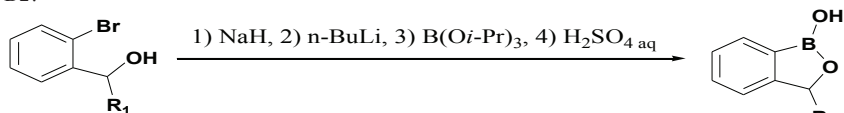
B1:



R<sub>1</sub>(wyd.) = H (86%)

Benzoksaborole otrzymywano również w reakcji odpowiednich *ortho*-bromoalkoholi benzytowych w czterech etapach. Pod wpływem NaH następowała deprotonacja grupy hydroksylowej. Metalacja przy użyciu butylolitu, a następnie transmetalacja z zastosowaniem triizopropoksyboranu pozwoliła na wprowadzenie grupy boronowej do cząsteczki. Kończącym etapem była hydroliza otrzymanego estru kwasu boronowego, prowadząca do cyklizacji [13].

B2:

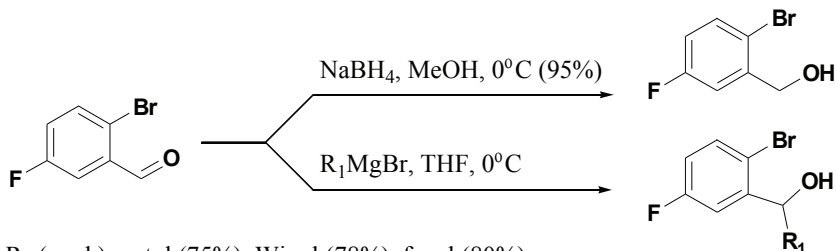


R<sub>1</sub> (wyd.) = H (84%), Vinyl (79%), Allyl (74%), Phenyl (73%), n-Decyl (41%)

Benzoboroksole wydzielane były z mieszaniny poreakcyjnej poprzez ekstrakcję do alkalicznej fazy wodnej (6M NaOH). Faza wodna była przemywana pentanem, a następnie zakwaszana do pH ~1. Z tak otrzymanej fazy wodnej produkty ekstrahowano octanem etylu.

Modyfikacją tej metody jest zabezpieczenie grupy hydroksylowej przed reakcją z butylolitem. Jako grupę zabezpieczającą stosowano grupę tetrahydropiranylową (THP) (metoda **B2a**) lub metoksymetylową (**B2b**).

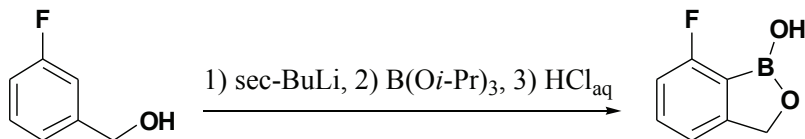
*ortho*-Bromoalkohole benzytowe będące substratami powyższej reakcji można otrzymać w wyniku redukcji aldehydów aromatycznych lub ich reakcji z odczynnikami Grignarda.



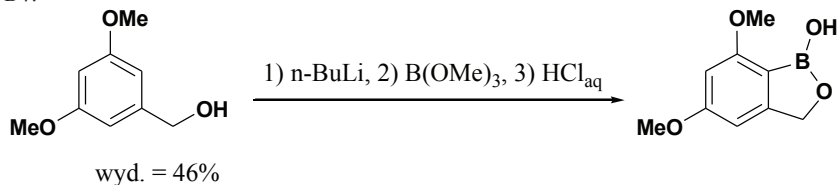
R<sub>1</sub> (wyd.) = etyl (75%), Winył (78%), fenyl (80%)

Niektóre benzoboroksole otrzymano w reakcji bezpośredniej *ortho*-metalacji (*directed ortho-metalation*) odpowiedniego alkoholu benzykowego związkiem litoorganicznym, a następnie transmetalacji, hydrolizy i cyklizacji [8,20,30] (metody **B3** i **B4**).

B3:

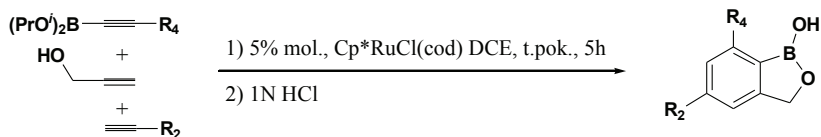


B4:



### Metoda C. Katalityczna cyklotrimeryzacja odpowiednich alkinów

Benzoboroksole otrzymywano również na drodze reakcji katalitycznej [24].



$R_2 = \text{CH}_2\text{OMe}$ ,  $R_4 = n\text{-Bu}$  (wyd. 76%)

Otrzymane benzoboroksole były *in situ* katalitycznie przekształcane w odpowiednie ftalidy z wydajnościami rzędu 47-73%.

### Podziękowania:

Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2006-2008 jako projekt badawczy rozwojowy nr R0501601.

### Literatura:

1. Boronic acids: Preparation and applications in organic synthesis and medicine, D.G. Hall (red.), Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2005;
2. N. Miyaura, A. Suzuki, J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1979, 866;
3. W. Yang, X. Gao, B. Wang, Med. Res. Rev., 23, 2003, 346;
4. T.D. James, M.D. Phillips, S. Shinkai, Boronic acids in saccharide recognition, RSC Publishing, Cambridge, UK, 2006;

5. A. Sporzyński, *Pol. J. Chem.*, 81, 2007, 757;
6. K. Torsell, *Ark. Kemi*, 10, 1957, 507;
7. R.R. Haynes, H.R. Snyder, *J. Org. Chem.*, 29, 1964, 3229;
8. S.J. Baker, Y-K. Zhang, T. Akama, A. Lau, H. Zhou, V. Hernandez, W. Mao, M.R.K. Alley, V. Sanders, J.J. Plattner, *J. Med. Chem.*, 49, 2006, 4447;
9. Houben-Weyl, *Methoden der Organischen Chemie*, Vol. XII/3c, Organobor-Verbindungen III, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Germany, 1984;
10. V.V. Zhdankin, P.J. Persichini III, L. Zhang, S. Fix, P. Kiprof, *Tetrahedron Letters*, 40, 1999, 6705;
11. J.R. Falck, M. Bondela, S.K. Venkataramanan, D. Srinivas, *J. Org. Chem.*, 66, 2001, 7148;
12. S. Luliński, I. Madura, J. Serwatowski, H. Szatyłowicz, J. Zachara, *New. J. Chem.*, 31, 2007, 144;
13. D.S. Gunasekera, D.J. Gerold, N.S. Aalderks, J.S. Chandra, C.A. Mannu, P. Kiprof, V.V. Zhdanikin, M.V.R. Reddy, *Tetrahedron*, 63, 2007, 9401;
14. M.A. Grassberger, *Liebigs Ann. Chem.*, 1985, 683;
15. A.G. Brown, M.J. Crimmin, P.D. Edwards, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 1992, 123;
16. M. Dowlut, D.G. Hall, *J. Am. Chem. Soc.*, 128, 2006, 4226;
17. R.T. Hawkins, W.J. Lennarz, H.R. Snyder, *J. Am. Chem. Soc.*, 82, 1960, 3053;
18. M. Dąbrowski, P. Kurach, S. Luliński, J. Serwatowski, *Applied Organometal. Chem.*, 21, 2007, 234;
19. Y.-L. Tan, A.J.P. White, D.A. Widdowson, R. Wilhelm, D.J. Williams, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 2001, 3269;
20. K.C. Nicolau, J.M. Ramanjulu, S. Natarajan, S. Bräse, H. Li, C.N.C. Boddy, F. Rübsam, *Chem. Commun.*, 1997, 1899;
21. P. Tschampel, H.R. Snyder, *J. Org. Chem.*, 29, 1964, 2168;
22. W.J. Dale, J.R. Rush, *J. Org. Chem.*, 27, 1962, 2598;
23. A. Sporzyński, M. Lewandowski, P. Rogowska, M.K. Cyrański, *Appl. Organometal. Chem.*, 19, 2005, 1202;
24. Y. Yamamoto, J. Ishii, H. Nishiyama, K. Itoh, *J. Am. Chem. Soc.*, 127, 2005, 9625;
25. V.L. Arcus, L. Main, B.K. Nicholson, *J. Organomet. Chem.*, 460, 1993, 139;
26. W.M.C. Cummings, C.H. Cox, H.R. Snyder, *J. Org. Chem.*, 34, 1969, 1669;

27. J. Lennarz, R. Snyder, *J. Am. Chem. Soc.*, 82, 1960, 2172;
28. H.R. Snyder, A.J. Reedy, W.J. Lennarz, *J. Am. Chem. Soc.*, 20, 1958, 835;
29. C. Alexander, C.R. Smith, M.J. Whitcombe, E.N. Vulfson, *J. Am. Chem. Soc.*, 121, 1999, 6640;
30. J.T. Link, B.K. Sorensen, J. Patel, M. Emery, M. Grynfarb, A. Goos-Nilsson, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14, 2004, 2209;
31. K.C. Nicolaou, H. Li, C.N.C. Boddy, J. M. Ramanjulu, T-Y. Yue, S. N-ararajna, X-J. Chu, S. Bräse, F. Rübsam, *Chem. Eur.J.*, 5, 1999, 2584;
32. K. Oshima, Y. Aoyama, *J. Am. Chem. Soc.*, 121, 1999, 2315;
33. S.J. Baker, Y.-K. Zhang, T. Akama, C. Wheeler, J.J. Plattner, R.M. Rosser, R.P. Reid, N.S. Nixon, *J. Labelled Compd. Rad.*, 50, 2007, 245;
34. F.L. Rock, M. Weimin, A. Yaremchuk, M. Tukalo, T. Crepin, Z. Huchen, Z. Yong-Kang, V. Hernandez, T. Akama, S.J. Baker, J.J. Plattner, L. Shapiro, S.A. Martinis, S.J. Benkovic, S. Cusack, M.R.K. Alley, *Science*, 316, 2007, 1759.





## Rozdział XIII

### Mikrodźwignia sprężysta jako bioczuJNIK

Grzegorz Gruca<sup>a)</sup>, Grzegorz Wielgoszewski<sup>a)</sup>, Michał Zielony<sup>a)</sup>, Paweł Zawierucha<sup>a)</sup>, Michał Świątkowski<sup>a)</sup>, Agata Masalska<sup>a)</sup>, Krzysztof Kolanek<sup>a)</sup>, Karol Waszczuk<sup>a)</sup>, Mirosław Woszczyna<sup>a)</sup>, Jacek Radojewski<sup>a)</sup>, Teodor Gotszalk<sup>a)</sup>, Piotr Grabiec<sup>b)</sup>, Iwo Rangelow<sup>c)</sup>

<sup>a)</sup> *Wydział Elektroniki Mikrosystemów i Fotoniki, Politechnika Wroclawska, ul. Janiszewskiego 11/17, 50-372 Wrocław*

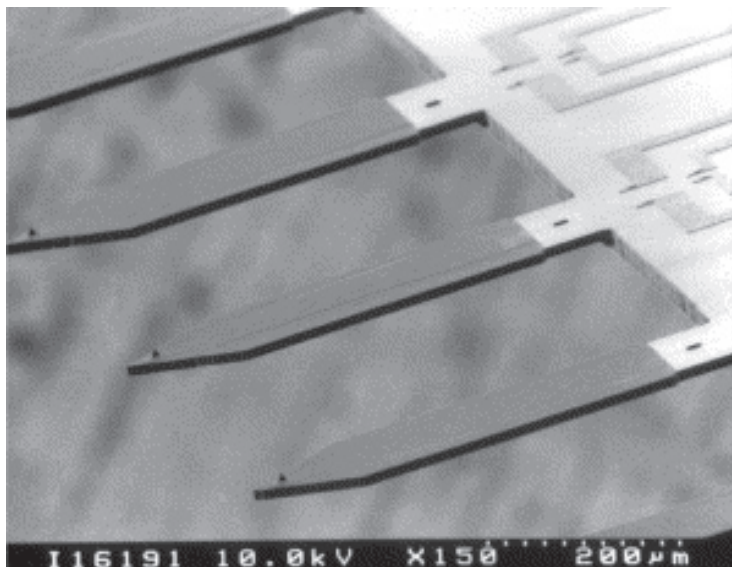
<sup>b)</sup> *Institut Technologii Elektronowej, al. Lotników 32/46; 02-668 Warszawa*

<sup>c)</sup> *Institute of Technological Physics, IMA, University of Kassel, Heinrich-Plett-Strasse 40, 34132 Kassel*

#### 1. Wstęp

We współczesnej technologii i praktyce badawczej coraz szersze zastosowanie znajduje zminiaturyzowane układy detekcyjne i pomiarowe. W wielu wypadkach częścią centralną tego typu systemów są tzw. układy mikrosystemowe, które w wersji najbardziej zaawansowanej integrują w sobie przetwornik (czujnik) pomiarowy z elektronicznym układem przetwarzania, zespołem wykonawczym i blokami sterowania. Zasada działania mikrosystemowych przetworników pomiarowych (ang. Micro Electro Mechanical Systems - MEMS) przypomina klasyczne układy elektromechaniczne, w których sygnał wejściowy związany z obserwowanym zjawiskiem ulega przetwarzaniu na korespondujący z nim sygnał elektryczny lub mechaniczny (np. przesunięcie, skrócenie lub naprężenie).

Przykładem tego typu rozwiązań jest układ przeznaczony do pomiarów topografii powierzchni zbudowany za pomocą matrycy dźwigni sprężystych [1]. W opisywanym rozwiązaniu badana powierzchnia jest jednocześnie skanowana za pomocą ostrzy zintegrowanych z pojedynczymi sprężystymi belkami krzemowymi w układzie przypominającym klasyczny mikroskop sił atomowych (ang. Atomic Force Microscope - AFM). Wychylenie każdej belki sięgające ułomkom nanometra jest detekowane elektrycznie w drodze obserwacji zmian rezystancji opornika znajdującego się u nasady dźwigni skanującej.



*Rysunek 1. Matryca dźwigni sprężystych do pomiaru powierzchni (wymiary pojedynczej belki: długość 400  $\mu\text{m}$ , szerokość 100  $\mu\text{m}$ , grubość: 10  $\mu\text{m}$ ) [1]*

Warto zaznaczyć, że dzięki takiej miniaturyzacji układu, dla którego największe wymiary komór ewentualnie pól pomiarowych są z reguły rzędu dziesiątków mikrometrów osiągnięta jest zdecydowanie większa czułość i zdolność rozdzielcza pomiaru aniżeli w klasycznych układach makroskopowych. Dodatkowo, jeśli układy mikrosystemowe zostaną użyte do analiz chemicznych to przetwarzaniu poddawane będą próbki o bardzo małej objętości co zredukuje koszty badań i w wielu wypadkach skróci czas pomiaru. Należy również zwrócić uwagę, że układy mikrosystemowe są wytwarzane w technologii mikroelektronicznej, w której wytwarza się m. in. współczesne monolityczne elektroniczne układy scalone. Do dyspozycji projektantów i wytwórców mikrosystemów stoją zatem technologie zaawansowane i w wielu wypadkach bardzo dobrze opanowane. Przedstawiono powyżej charakterystyka sprawia, że technika mikrosystemów, która obejmuje projektowanie, wytwarzanie, pomiary i użycie mikroukładów należy do najszybciej rozwijających się współczesnych technologii. Znaczną część obecnie wytwarzanych mikrosystemów stanowią różnego typu czujniki, począwszy od czujników: przyspieszenia, siły nacisku, naprężeń, ciśnienia, skończywszy na biosensorach. Część z nich jest obecnie masowo stosowana w wielu komercyjnych urządzeniach: żyrokompasy, czujniki samochodowych poduszek powietrz-

nych, samochodowe osiowe czujniki przyspieszenia, czujniki ciśnienia krwi, wysokościomierze, tensometry itd. Dobrze opanowana technologia wytwarzania i znana metodyka pomiaru pozwala na masową ich produkcję. Układy te znajdują również coraz szersze zastosowania w diagnostyce chemicznej i biochemicznej, w których do najbardziej obiecujących rozwiązań należą układy na bazie dźwigni sprężystych. Czujniki tego typu mogą znaleźć zastosowanie m.in.: w przemyśle biofarmaceutycznym (monitoring bakteryjny), w monitoringu środowiska (zawartość pestycydów, azotanów, zanieczyszczeń), w końcu w medycynie (detekcja bakterii, endotoksyn, diagnostyka posocznicy (sepsa), oznaczanie stężenia glukozy, cholesterolu, DNA, obecność narkotyków w krwiobieg) [2-9].

## 2. Charakterystyka mikrodźwigni sprężystych

Wspomniane we wstępie mikrodźwignie (mikrobelki) sprężyste wykorzystywane są poszechnie w mikroskopii sił bliskiego pola. Pełnią one rolę sond skanujących powierzchnię z niespotykaną do momentu skonstruowania pierwszego skaningowego mikroskopu tunelowego STM (Scanning Tunneling Microscopy), a później mikroskopu sił atomowych AFM (Atomic Force Microscope) rozdzielczością. Obecnie mikrobelki wytwarzane są w wielu odmianach różniąc się od siebie w zależności od zastosowań. Wyróżniamy m.in. : optymalizowane pod względem kształtu belki wykorzystywane w mikroskopii sił tarcia FFM (Friction Force Microscopy), mikrobelki z naniesioną warstwą metaliczną zapewniającą możliwość badania próbek organicznych w środowiskach cieczowych (magnetyczna aktywacja drgań), mikrobelki z przewodzącym ostrzem pozwalające na badanie rozptyłu prądu w warstwach izolacyjnych, mikrobelki pełniące rolę sond temperaturowych oraz wiele innych. Większość obecnie wytwarzanych mikrodźwigni wykonana jest z krzemu. Wiąże się to ściśle z jego bardzo dobrymi własnościami mechanicznymi, termicznymi i elektrycznymi. Krzem (Si, łac. Silicium) jako półprzewodnik jest materiałem powszechnie stosowanym w elektronice (krzem monokrystaliczny) i drugim, zaraz po tlenie, najbardziej rozpowszechnionym pierwiastkiem na ziemi (w postaci związków), stanowi on również jeden z podstawowych materiałów wykorzystywanych w technice mikrosystemów. Krzem tworzy regularne ściennie centrowane kryształy o tzw. strukturze diamentu. Należy podkreślić, iż krzem jest materiałem anizotropowym – jego właściwości silnie zależą od kierunku krystalograficznego, a jego parametry mechaniczne nie wykazują efektów histerezy. Dźwignie wykonane z krzemu charakteryzują się wysoką odpornością na przeciążenia, elastycznością i wytrzymałością. Ugięcie belek w niektórych zastosowaniach mikrosystemowych często przekracza wielokrotnie jej grubość i mimo tego nie ulegają one zniszczeniu. Istotnym elementem prze-

mawiającym za powszechnym stosowaniem krzemu jako materiału, z którego wykonuje się mikrobjelki jest łatwość jego formowania i obróbki. Trawienie anizotropowe, trawienie izotropowe, domieszkowanie, utlenianie, wszystkie te procesy są dobrze opisane, znane i przede wszystkim powtarzalne. Oprócz dźwigni wytworzonych z krzemu spotykać można mikrobjelki wykonane z azotku krzemu  $\text{Si}_3\text{N}_4$  lub polimerowe np. mikrobjelki wykonane z fotorezystu SU8. Te ostatnie charakteryzują się znacznie mniejszą wartością modułu Younga (na poziomie 4,4 GPa w przypadku SU8) w porównaniu z modułem Younga krzemu i azotku krzemu. Pociąga to za sobą wzrost ugięcia biosensora (pomiar statyczny) dla identycznej masy osadzonej na belce i tej samej grubości belki, a tym samym zwiększenie czułości biosensora. Problem w tym wypadku jest jednak niewystarczająca powtarzalność i rozrzut parametrów mechanicznych tego typu czujników.

Istotnym parametrem charakteryzującym mikrobjelki jest ich częstotliwość rezonansowa. Zakładając że mikrobjelka jest układem o stałych skupionych, drgania jej możemy opisać analogicznie do drgań oscylatora harmonicznego z wymuszającą siłą (1) (belka pobudzona do drgań przykładowo piezoelementem). Przyjętym założeniem jest proporcjonalności siły oporu do prędkości z jaką porusza się belka  $R = -B \frac{\partial x}{\partial t}$ . W tym wypadku można napisać:

$$\frac{k}{\omega_0^2} \frac{\partial^2 x(t)}{\partial t^2} + \frac{k}{\omega_0} Q \frac{\partial x(t)}{\partial t} + kx(t) = kA \cos(\omega t) \quad (1)$$

gdzie:

$$\omega_0 = \sqrt{\frac{k}{m^*}} \quad \text{- pulsacja nietłumionych drgań swobodnych,}$$

$$Q = \frac{B}{\sqrt{km^*}} \quad \text{- dobroć rezonatora,}$$

$$kA \cos(\omega t) \quad \text{- pobudzenie - siła okresowo zmienna,}$$

$$m^* = n \cdot m \quad \text{- masa efektywna belki, dla prostokątnej belki } n = 0,24.$$

Wprowadzenie pojęcia masy efektywnej belki jest niezbędne, gdyż uwzględnia się w ten sposób rzeczywisty, a nie punktowy charakter rozłożenia masy. W przypadku gdy dobroć układu nie przekracza wartości  $\frac{1}{2}$ , mogą pojawić się drgania rezonansowe o charakterystycznej pulsacji (2), fazie (3) i maksymalnej amplitudzie (4).

$$\omega_R = \omega_0 \sqrt{1 - \frac{1}{2Q^2}} \quad (2)$$

$$\varphi_R = \arctg\left(2Q \sqrt{1 - \frac{1}{2Q^2}}\right) \quad (3)$$

$$A_{\max} = A_p Q \frac{1}{\sqrt{1 - \frac{1}{4Q^2}}} \quad (4)$$

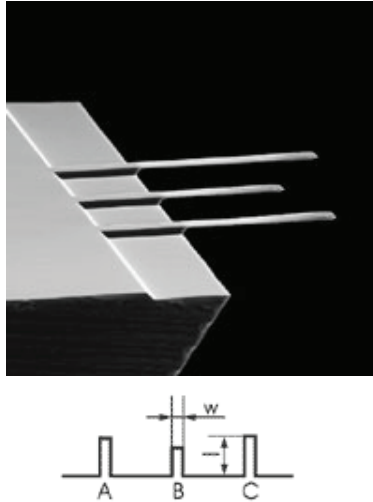
Przy większych wartościach dobroci ( $Q > 200$ ) powyższe równania upraszczają się do postaci:

$$\omega_R \approx \omega_0, \quad (5)$$

$$\varphi_R \approx \arctg(2Q), \quad (6)$$

$$A_{\max} = A_p Q. \quad (7)$$

Tego typu modelowy opis drgań mikrobilki użyteczny jest przykładowo w przypadku klasycznej mikroskopii rezonansowej. W tabeli 1 przedstawiono dane katalogowe przykładowych, komercyjnie mikrobelki krzemowych.

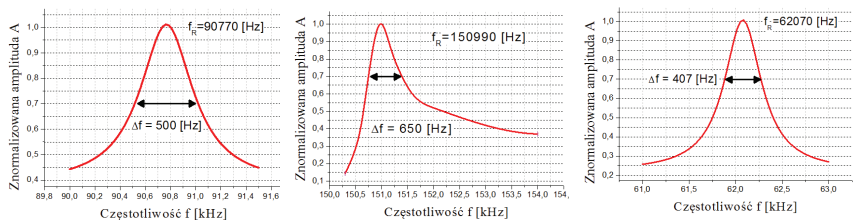


Rysunek 2. Mikrobełki krzemowe SCS12/Pt produkcji MikroMasch [10]

Tabela 1. Zestawienie podstawowych parametrów mikrobełek krzemowych

Oznaczenie Belki	Długość $l \pm 5 \mu\text{m}$	Szerokość $w \pm 3 \mu\text{m}$	Grubość $\mu\text{m}$			Częstotliwość rezonansowa kHz			Stała sprężystości $k \text{ N/m}$		
			min.	typ.	maks.	min.	typ.	maks.	min.	typ.	maks.
A	110	35	0,7	1,0	1,3	65	105	150	0,25	0,95	2,5
B	90	35	0,7	1,0	1,3	95	155	230	0,45	1,75	5
C	130	35	0,7	1,0	1,3	50	75	105	0,15	0,60	1,5

Na rys.3 przedstawiono krzywe rezonansowe typowych belek sprężystych zarejestrowane w powietrzu.



Rysunek 3. Krzywe rezonansowe mikrodźwigni sprężystych o długości: 110  $\mu\text{m}$  a), 90  $\mu\text{m}$  b), 130  $\mu\text{m}$  c)

Analiza tabeli pozwala zauważyć jak znaczne są rozbieżności, istotnych z punktu widzenia biosensorów, parametrów takich jak częstotliwość rezonanso-

wa, czy stała sprężystości. Różnice te powstają w trakcie przeprowadzania procesów technologicznych prowadzących do wytworzenia mikrobelki. Z punktu widzenia techniki pomiarowej niezwykle ważna jest precyzyjna znajomość stałej sprężystości  $k$ . Rzeczywistą jej wartość można wyliczyć opierając się na zarejestrowanej częstotliwości rezonansowej mikrobelki [11]:

$$k = 11,27 E b l^3 f_R^3 \sqrt{\left(\frac{3\rho}{E}\right)^3}, \quad (8)$$

gdzie:

$l$  - długość belki,

$b$  - szerokość belki,

$E$  - moduł Younga materiału belki,

$f_R$  - częstotliwość rezonansowa belki,

$\rho$  - gęstość materiału belki.

Błąd względny popełniany podczas takiego pomiaru równy jest co do wartości:

$$\frac{dk}{k} = \frac{db}{b} + 3 \frac{dl}{l} + 3 \frac{df_R}{f_R}, \quad (9)$$

gdzie:

$dk$ ,  $db$ ,  $dl$ ,  $df_R$  - bezwzględne niepewności pomiarowe.

Dla analizowanych mikrodźwigni wartość stałej sprężystości, wyznaczona na podstawie przeprowadzonych pomiarów, równa jest odpowiednio (przy założeniu bezwzględnych niepewności pomiaru  $dl$ ,  $db = 1 \mu\text{m}$  oraz  $df_R = 20 \text{ Hz}$ ):

- $k = (0,56 \pm 0,03) \text{ N/m}$  dla belki  $110 \mu\text{m}$ ,
- $k = (1,42 \pm 0,09) \text{ N/m}$  dla belki  $90 \mu\text{m}$ ,
- $k = (0,30 \pm 0,02) \text{ N/m}$  dla belki  $130 \mu\text{m}$ .

Wszystkie z powyższych wartości znajdują się poniżej typowej wartości podanej przez producenta. Fakt ten potwierdza ko-

nieczność kalibracji mikrobekki przed wykorzystaniem jej w jakichkolwiek pomiarach.

### 3. Sposoby detekcji i aktuacji wychylenia mikrobekki sprężystej

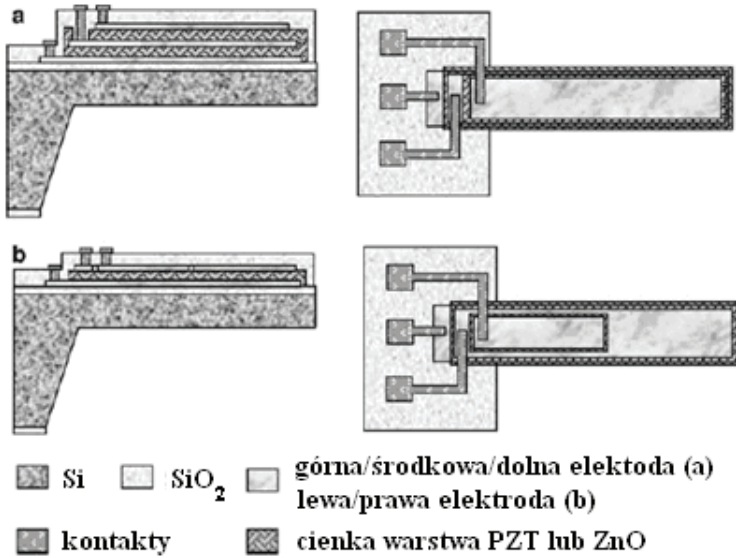
W celu pomiaru charakterystyk częstotliwościowych mikrobekki i wyznaczenia jej parametrów, m.in. podstawowej częstotliwości rezonansowej, dobroci należy mikrodźwignię pobudzić do drgań. Wyjątkiem jest sposób wyznaczania częstotliwości rezonansowej z pomiaru drgań wywołanych szumem termicznym dźwigni. W tym przypadku dźwignia drga pobudzana szumem termicznym  $1/2k_B T$  przypadającym na każdy ze stopni swobody. Pomiaru takie, są jednak w praktyce laboratoryjnej kłopotliwe ze względu na niewielką wartość energii drgań termicznych wzbudzanych w temperaturze pokojowej i w konsekwencji, nadzwyczaj małe wartości drgań belki sprężystej. Niezbędnym elementem w wyznaczaniu charakterystyk częstotliwościowych jest detektor wychylenia pozwalający na pomiar ugięcia belki. Istnieje kilka rodzajów detektorów i kilka sposobów pobudzania belki do drgań. Poniżej przedstawiono wybrane z nich.

#### 3.1 Aktuacja piezoelektryczna

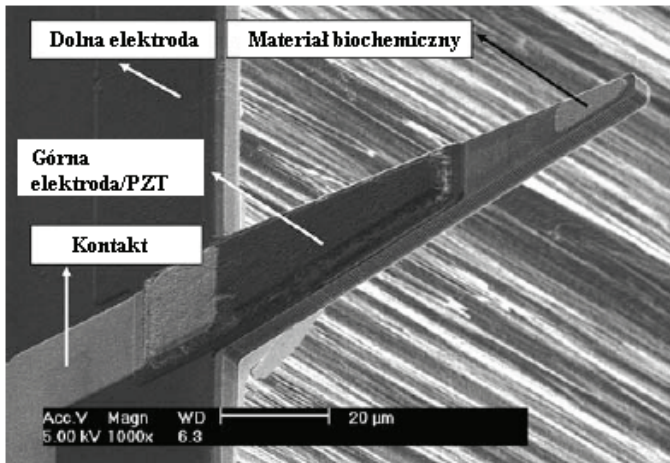
Piezoelektryki są to mono- lub polikryształy wykazujące się zjawiskiem indukowania ładunku na ścianach materiału pod wpływem jego odkształceń (zjawisko piezoelektryczne proste) oraz zmianą wymiarów geometrycznych na skutek przyłożonego pola elektrycznego (zjawisko piezoelektryczne odwrotne). Drugie z wymienionych zjawisk wykorzystywane jest do pobudzania mikrodźwigni do drgań. Jest to jedna z najczęściej obecnie stosowanych metod. Element piezoelektryczny, najczęściej wykonany z ceramiki PZT lub ZnO, umieszcza się najczęściej w pobliżu dźwigni, tak aby generowane drgania i ich energia pobudzały belkę. Potrząsana belka w okolicy częstotliwości rezonansowej zwiększa amplitudę drgań co rejestrowane jest przez układ detekcyjny. Należy liczyć się z pewnym błędem pomiaru wynikającym z charakterystyki piezoelementu, który jako zwykły element mechaniczny cechuje się swoją własną częstotliwością rezonansową. Pobudzenie więc, przy stałej amplitudzie napięcia podawanego na piezoelement nie jest jednakowe w całym zakresie częstotliwości. Dodatkowo układy z piezoelektryczną aktuacją wychylenia wymagają zasilania warstwy piezoelektryka napięciem elektrycznym co utrudnia ich stosowanie w badaniach prowadzonych w cieczach. Na rys. 4 i 5 przedstawiono konstrukcję biosensora na bazie mikrobekki ze integrowanym elementem piezoelektrycznym. Złożona wielowarstwowa budowa podnosi koszty wytwarzania tego typu układów co ogranicza ich zastosowania.



Mikrodźwignia sprężysta jako bioczuJNIK



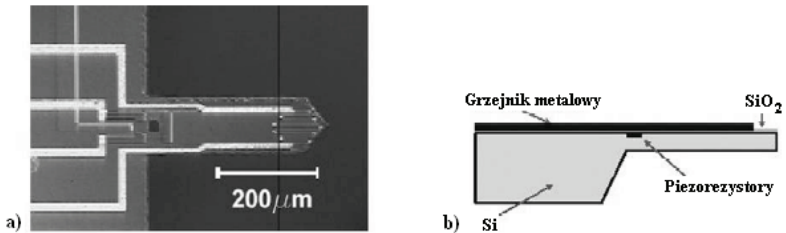
Rysunek 4. Model mikrobilki ze zintegrowanym akuatorem wychylenia przedstawiony w pracy [12]



Rysunek 5. Mikrobilka jako biosensor ze zintegrowanym akuatorem wychylenia [13]

### 3.2 Aktuacja termiczna

W związku z niewielką masą belki oraz dużą wartością przewodnictwa cieplnego pomiędzy belką a jej otoczeniem (np. powietrzem), istnieje możliwość szybkiego (ze stałymi czasowymi rzędu milisekund) ogrzewania i wychładzania mikrobełki. Wraz ze zmianami temperatury zmianie ulegają naprężenia w mikrobełce. Fakt ten sprawia, że gwałtowne wahania temperatury wprawiają ją w drgania. Aby umożliwić ogrzanie dźwigni w krótkim czasie, na jej powierzchni umieszcza się mikrogrzejnik (rys.6). Naprężenia mechaniczne można wprowadzać również przez oświetlenie (ogrzanie) sensora wiązką światła [14-15]. Rozwiązanie takie jednak ma pewne istotne wady - przede wszystkim brak możliwości zintegrowania lasera z mikrochipem, na którym mikrobełka została wytrawiona, co pociąga za sobą wzrost kosztów produkcji i wymiarów układu.



Rysunek 6. Mikrobełka ze zintegrowanym elementem grzejnym widok pod mikroskopem elektronowym a), schemat b) [16]

Grzejnik umieszczony jest na szczycie mikrobełki. Takie usytuowanie sprawia, iż ciepło generowane w obszarze pod grzejnikiem nie dociera do nasady dźwigni. Jest to istotne ze względu na możliwość wytwarzania całych matryc mikrozdźwigni sąsiadujących ze sobą [17]. Koniecznym jest wtedy odizolowanie od siebie poszczególnych dźwigni w celu minimalizacji wpływu danej belki na wychylenie innej, jak i na zapewnienia stabilności całości – wzrost temperatury i zakłócenia spowodowane przepływem ciepła z kilkudziesięciu dźwigni. Zależność opisującą wychylenie końca dźwigni na skutek absorpcji mocy z grzejnika ma postać [18]:

$$\Delta z = \frac{5}{4} (\alpha_1 - \alpha_2) \frac{t_1 + t_2}{t_2^2 K} \cdot \frac{l^3}{\lambda_1 t_1 + \lambda_2 t_2} P, \quad (10)$$

$$K = 4 + 6 \left( \frac{t_1}{t_2} \right) + 4 \left( \frac{t_1}{t_2} \right)^2 + \frac{E_1}{E_2} \left( \frac{t_1}{t_2} \right)^3 + \frac{E_1}{E_2} \left( \frac{t_1}{t_2} \right),$$

gdzie:

$t_1, t_2$  - grubość warstw mikrobjelki,

$E_1, E_2$  - moduły Younga,

$\alpha_1, \alpha_2$  - współczynniki rozszerzalności termicznej,

$\lambda_1, \lambda_2$  - wartości przewodności termicznej,

$l$  - długość belki,

$P$  - moc wydzielana w grzejniku.

Istotną cechą termicznego pobudzania dźwigni jest możliwość kontroli statycznego wychylenia belki w zakresie pojedynczych mikrometrów z rozdzielczością rzędu pojedynczych  $\text{\AA}$ . Wychylenie to jest sterowane poprzez składową stałą (offset) napięcia przyłożonego do grzejnika. Zależność napięcia pobudzającego dźwignię od czasu można przedstawić następująco [16]:

$$P_{osc} = \frac{(U_{DC} + U_{AC} \sin(\omega t))^2}{R_{grzejnika}} = \frac{1}{R_{grzejnika}} (U_{DC}^2 + 2U_{DC}U_{AC} \sin(\omega t) + U_{AC}^2 \sin^2(\omega t)) \quad (11)$$

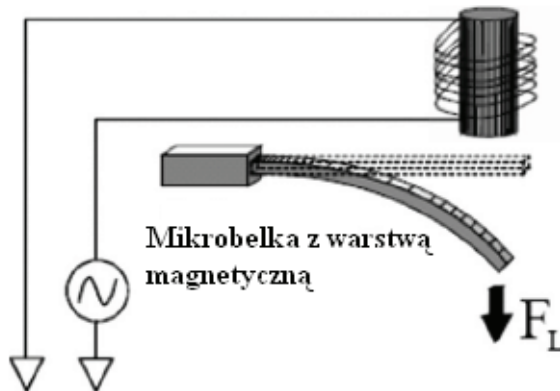
Charakterystyczną cechą jest fakt, że powyższe równanie można przekształcić do równania, w którym pojawia się składowa mocy o podwójnej pulsacji  $2\omega$ . W rzeczywistości, aby uzyskać rezonans dźwigni na jej podstawowej częstotliwości  $f_R$  (częstotliwości pierwszego modu), pulsacja napięcia zasilającego grzejnik może stanowić połowę wartości odpowiadającej  $f_R$ . Składowa stała mocy

$\frac{U_{DC}^2}{R_{grzejnika}}$  odpowiada za ugięcie statyczne belki. Przedstawiony powyżej model

aktuacji termicznej belek, pełniących w biosensorach rolę przetwornika, nie znalazł zastosowania. Zasadniczy problem polega na wpływie temperatury na biologiczne warstwy osadzone na powierzchni dźwigni.

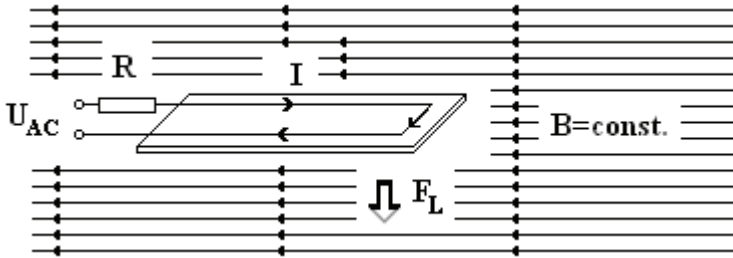
### 3.3 Aktuacja polem magnetycznym

W układach cieczowych drgania mikrobelki są wzbudzane zewnętrznym polem magnetycznym. W tym przypadku w powierzchni dźwigni osadzony jest ferromagnetyk, który w zewnętrznym zmiennym polu magnetycznym porusza się zgodnie z oscylacjami tego pola. Ideę tą przedstawiono na rys 7. Mikrobelka znajduje się w obszarze pola magnetycznego generowanego przez cewkę magnetyczną zasilaną ze źródła napięciowego o przestrajanej częstotliwości. Częstotliwość obwodu rezonansowego, w którego skład wchodzi cewka musi odbiegać od zakresu częstotliwości pobudzanych mikrobelki. Pewną odmianą magnetycznego wzbudzenia drgań jest aktuacja w stałym zewnętrznym polu magnetycznym. Specjalna belka z przewodzącą pętlą prądową wykonaną na powierzchni, znajduje się w obszarze stałego pola magnetycznego. Płaszczyzna dźwigni równoległa jest do linii pola magnetycznego. Przy takiej geometrii układu, przyłożenie napięcia do pętli prądowej wytworzonej na dźwigni, powoduje powstanie siły Lorentza wprawiającej dźwignię w drgania (rys. 8).



Rysunek 7. Schemat układu magnetycznego pobudzania dźwigni [19]

Zwrot tej siły zależy od kierunku przepływu prądu. Niewątpliwą zaletą pobudzania magnetycznego jest jego duża uniwersalność. Dźwignia może być pobudzana w każdym rodzaju ośrodku. Do wad takiego rozwiązania należy dość skomplikowany układ sterowania zewnętrznej cewki, oraz konieczność stosowania specjalnego typu mikrobelki.



Rysunek 8. Geometria układu pobudzania dźwigni z zewnętrznym stałym polem magnetycznym

### 3.4 Aktuacja elektrostatyczna

Najmniej popularną metodą aktuacji drgań jest metoda elektrostatyczna. Wykorzystuje się w niej występowanie siły, równej co do wartości sile Coulomba, pomiędzy okładkami kondensatora. Kondensator tworzą: uziemiona płaszczyna, pod lub nad mikrobelką, stanowiąca jedną z okładek oraz mikrobelka jako druga okładka (rys. 9). Siła z jaką przyciągają lub odpychają się okładki wyrażona jest zależnością:

$$F = \frac{1}{2} EQ = \frac{1}{2} A \varepsilon_m \frac{U^2}{d_0^2}, \quad (12)$$

gdzie:

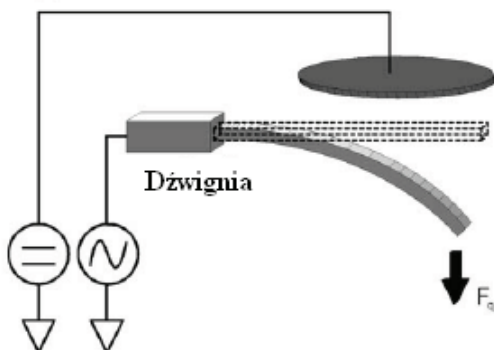
$A$  - wspólna powierzchnia okładek kondensatora,

$U$  - napięcie na kondensatorze,

$\varepsilon_m$  - przenikalność dielektryczna ośrodka,

$d_0$  - odległość pomiędzy okładkami.

Siła opisana powyższym wzorem w rzeczywistości zmienia się w trakcie drgań na skutek zmian geometrii układu - ugięcie dźwigni zmienia odległość pomiędzy okładkami oraz efektywną wspólną powierzchnię. Zakres stosowanych napięć sterujących dochodzi do wartości kilkudziesięciu woltów.



Rysunek 9. Schemat układu elektrostatycznego pobudzania dźwigni [20]

Jeśli chodzi o obszar zastosowań to ograniczony jest on ze względu na występujące w układzie potencjały elektryczne. Aktuację elektrostatyczną spotyka się przykładowo w mikromechanicznych czujnikach gazu.

### 3.5 Optyczna natężeniowa detekcja wychylenia belki

Najbardziej rozpowszechnioną metodą obserwacji ugięcia mikrobelek jest tzw. detekcja natężeniowa [21]. Jest ona powszechnie stosowana w mikroskopach sił atomowych, co wynika z jej bardzo dużej czułości i zdolności rozdzielczej. Podstawowymi elementami układu detekcji jest laser i natężeniowy detektor czterosekcyjny-fotodioda czterosekcyjna (ang. PSD – Position Sensitive Detector). W natężeniowym układzie detekcji skupiona wiązka lasera pada na powierzchnię mikrobełki, następnie po odbiciu od niej pada na detektor czterosekcyjny. Ugięcie mikrodźwigni powoduje przesunięcie odbitej plamki lasera na powierzchni fotodetektora – rys. 10.

Wyjściem detektora są cztery sygnały bezpośrednio powiązane z mocą lasera, która pada na dany fragment detektora. Na podstawie ich wartości można określić pozycję plamki lasera. Przy założeniu stałego rozkładu mocy, jej prostokątnego rozkładu na powierzchni, następujące równania:

$$Y = (TL + TR) - (BL + BR), \quad (13)$$

$$X = (TL + BL) - (TR + BR), \quad (14)$$

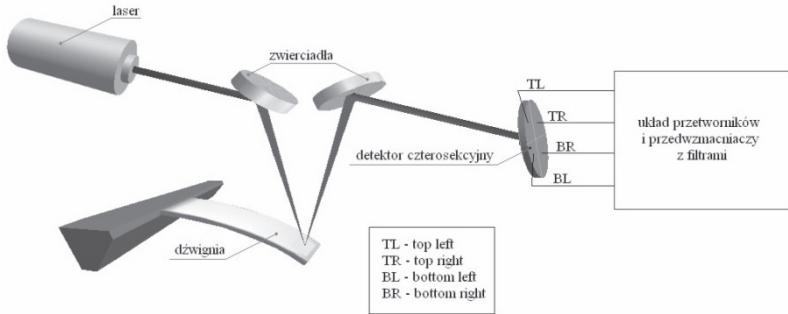
odwzorowują położenie plamki na detektorze i w konsekwencji ugięcie mikrobelki. Sygnały te odnoszą się odpowiednio do ugięcia i skręcenia mikrobelki. Należy podkreślić, iż równania powyższe okupione są pewnymi założeniami – stały rozkład mocy w obszarze plamki lasera, plamka o przekroju kwadratowym. Rzeczywista wiązka lasera charakteryzuje się w najlepszym przypadku gaussowskim rozkładem mocy. Błędy wynikające z tego fakt są jednak niewielkie przy małych wychyleniach od punktu równowagi, a z takimi mamy do czynienia w wypadku mikrobelki. Charakterystyka sygnału wyjściowego w funkcji położenia plamki pozostaje więc liniowa w obszarze pracy (rys. 11). Należy zdawać sobie również sprawę z faktu, że ugięcie belki jest złożeniem przesunięcia w osi  $z$  i zmiany kąta padania promienia lasera na belkę, przesunięcie wiązki lasera na detektorze odpowiada więc złożeniu tych ruchów (rys. 12). Zakładając sytuację z rys 12b łatwo pokazać zależność opisującą wzrost rozdzielczości pomiaru wychylenia belki przy zwiększaniu odległości  $L$  – detektor belka. Zakładając, że  $tg(\delta_\phi) = \frac{\delta_d}{L}$  oraz przyjmując, że

wchylenie belki powoduje zmianę o kąt, którego sinus równy jest  $\sin\left(\frac{\delta_\phi}{2}\right) = \frac{h}{l_c}$  ( $h$  – wychylenie belki,  $l_c$  – długość mikrobelki) można pokazać,

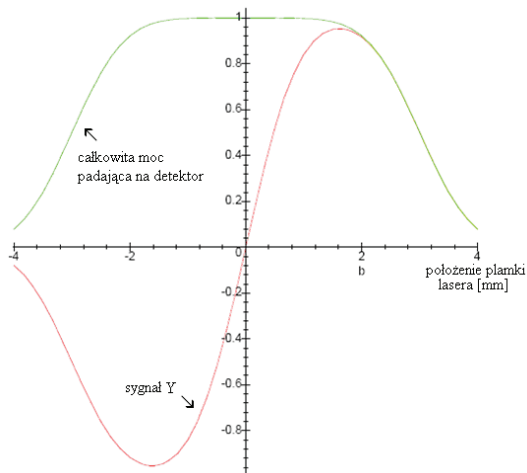
że  $\delta_d = 2L \frac{h}{l_c}$  (założono, że wiązka lasera pada na czubek belki). To proste

przybliżone równanie pokazuje, iż zwiększając odległość  $L$  pomiędzy detektorem, a belką zwiększamy bezwzględne przesunięcie plamki lasera na jego powierzchni. Ograniczeniem pozostaje tutaj rozmiar detektora – średnica plamki padającej na detektor nie może być tak duża, aby podczas ugięcia belki wychodziła ona poza jego obszar aktywny. Ograniczenie jawi się również ze strony szumów samego detektora i układów mu towarzyszących – promień lasera docierający do detektora powinien mieć wystarczającą moc do zapewnienia odpowiedniego stosunku sygnał-szum. Często definiuje się dodatkowy sygnał będący sumą wszystkich czterech. Służy on do normalizacji sygnałów  $X$  i  $Y$  przy założeniu, iż

rozkład gęstości powierzchniowej mocy wiązki laserowej pozostaje stały. Metoda natężeniowa pozwala na określenie wychylenia belki z rozdzielczością dochodzącą do  $10^{-14}$  m. Należy podkreślić, iż wymaga ona kalibracji. Sygnał napięciowy pochodzący z detektora należy przetransformować w dziedzinę nm. Najczęściej robi się to doświadczalnie ze względu na niewystarczającą dokładność obliczeń analitycznych.



Rysunek 10. Schemat przedstawiający ideę detekcji wychylenia belki przy użyciu detektora czterosekcyjnego [22]

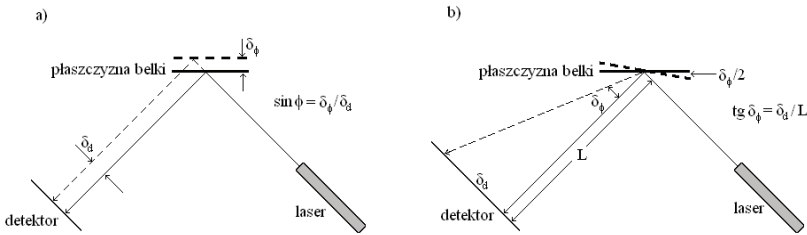


Rysunek 11. Znormalizowane charakterystyki mocy całkowitej padającej na detektor oraz sygnału wychylenia w funkcji położenia plamki lasera [23]



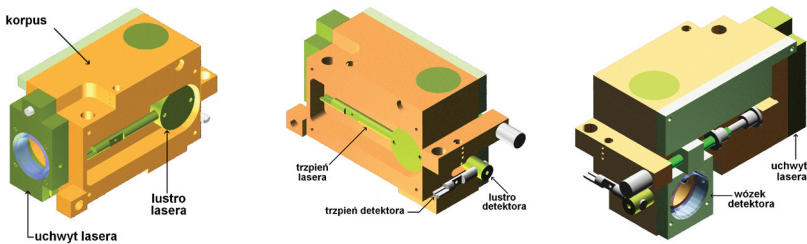
Do zalet tej metody należy zaliczyć również: prostotę idei pomiaru, dużą rozdzielczość, możliwość stosowania w środowiskach ciecZowych, niezawodność. Jeśli chodzi o wady należy wymienić:

1. skomplikowany układ ogniskujący justujący wiązkę lasera na powierzchni belki (minimalna średnica wiązki dochodząca do kilku  $\mu\text{m}$ ),
2. problematyczne skalowanie – należy uzyskany sygnał napięciowy przeskalować w dziedzinę  $\text{nm}$ ,
3. ograniczenie związane z pasmem pomiarowym - detektory czterosekcyjne pracują w zakresie kilkuset  $\text{kHz}$ , co, biorąc pod uwagę tendencję w miniaturyzacji i przesunięcie częstotliwości rezonansowych belek w kierunku wyższych częstotliwości, stanowi pewien problem.



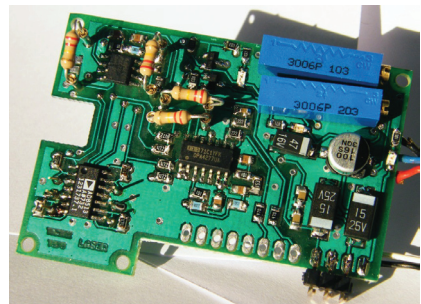
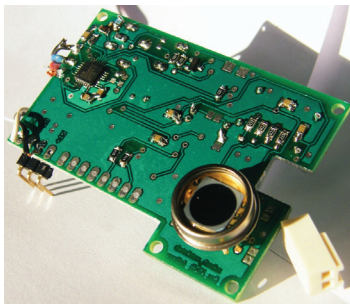
Rysunek 12 Różne podejście do analizy ugięcia mikrobelki – przesunięcie płaszczyzny a), zmiana kąta padania b)

Na rys. 13 przedstawiono mode głowicy detektora czterosekcyjnego zaprojektowanego na Politechnice Wrocławskiej, za pomocą którego można obserwować ugięcia belki w mikroskopach sił atomowych. Widoczne są zespoły, za pomocą których dokonuje się justowania pozycji lasera na tylnej ścianie belki mikromechanicznej i zespoły do ustawienia (centrowania) fotodetektora tak aby wszystkie jego sekcje były w pozycji wyjściowej równomiernie oświetlone. Zespół fotodetektora wraz z zespołami przetwarzania przedstawia rys. 14.

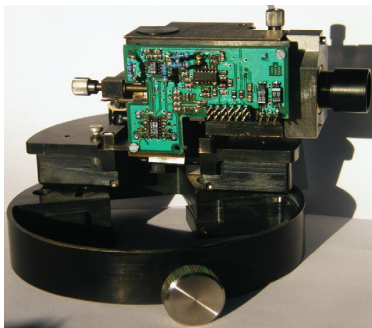


Rysunek 13. Model głowicy pomiarowej pozwalającej na detekcję ugięcia mikrobelki metodą natężeniową [24]

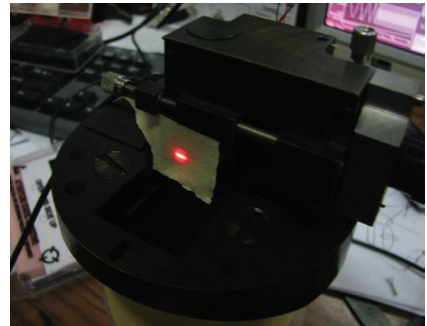
Rys. 14 przedstawia natomiast widok skonstruowanej i stosowanej na Politechnice Wrocławskiej głowicy pomiarowej wraz z podstawą do zamocowania na bloku tłumiącym drgania. Konstrukcja charakteryzuje się modułową architekturą, która ułatwia wymianę podzespołów. Dodatkowa naszym zamierzeniem było zapewnienie odpowiedniej sztywności układu, który zapewnić powinien możliwe dobre tłumienie drgań i zakłóceń z otoczenia oraz niskie dryfy całego zespołu. Widok głowicy ze zdemontowanym przetwornikiem fotodiody gdzie widoczna jest plamka laserowa odbita od mikrodźwigni sprężystej przedstawia rys. 15b. Plamka lasera oświetla fotodetektor czterosekcyjny i jej przesunięcia powodują zmiany wartości sygnałów elektrycznych układu przetwornika, dzięki czemu możliwa jest detekcja ugięcia belki w zakresie ułamków Angströma.



Rysunek 14. Widok układu (z przodu i z tyłu) fotodetektor ze zintegrowanym źródłem prądowym zasilającym laser i układami przetwarzania sygnałów ugięcia i skręcenia belki mikroskopu [25]



a)



b)

Rysunek 15. Widok głowicy pomiarowej wraz z podstawą mocującą a) i widok plamki laserowej odbitej od mikrodźwigni sprężystej b)

### 3.6 Detekcja piezorezystywna

Piezorezystywność jest zjawiskiem polegającym na zmianie rezystancji materiału pod wpływem występujących w nim naprężeń. Idea detekcji wychylenia mikrobjelki wykorzystująca efekt piezorezystywny polega na umieszczeniu na powierzchni mikrodźwigni pojedynczego piezorezystora lub piezorezystywnego mostka Wheatstone'a. Istotną rzeczą jest umiejscowienie piezorezystora(ów) – najczęściej u nasady belki, gdzie występujące podczas uginania naprężenia są największe. Piezorezystory wykonywane są najczęściej metodą dyfuzji np. boru. Sygnałem niosącym informację o ugięciu dźwigni jest sygnał rozrównoważenia mostka Wheatstone'a, który dla czterech jednakowych piezorezystorów tworzących go równy jest:

$$U_{roz} = \frac{\Delta R}{4R} U_{ster}, \quad (15)$$

gdzie:

$U_{roz}$  - napięcie niezrównoważenia,

$\Delta R$  - zmiana rezystancji wywołana efektem piezorezystywnym,

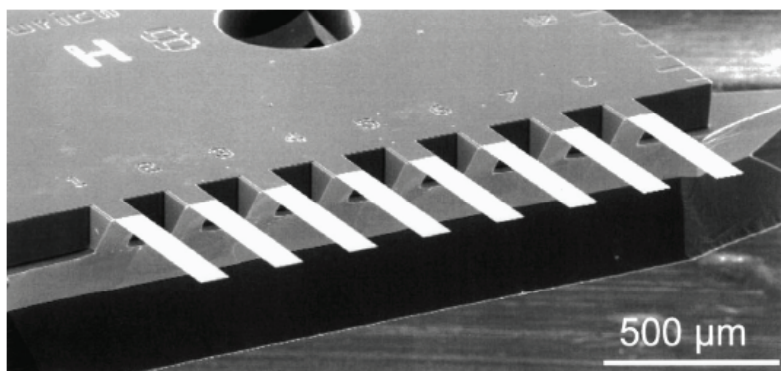
$U_{ster}$  - napięcie zasilania mostka.

Wartość napięcia wyjściowego zależy od napięcia sterującego, przyjmując napięcie zasilania mostka na poziomie kilku woltów, sygnał odpowiadający ugięciu mikrobjelki ma amplitudę rzędu kilkuset mikrowoltów. Zaletą tego typu rozwiązania jest brak kłopotliwej, jak w przypadku detekcji natężeniowej, optyki ogniskującej i justującej – detektor wychylenia zintegrowany jest z mikrobjelką. Co więcej, istnieje możliwość zintegrowania na wspólnym podłożu krzemowym mikrodźwigni oraz elektroniki w technologii CMOS. Do wad należy zaliczyć: fakt ciągłego przepływu prądu przez piezorezystory, co powoduje wzrost temperatury i dryft napięcia niezrównoważenia mostka (gwałtowna zmiana temperatury zewnętrznej może być interpretowana jako ugięcie mikrobjelki), rozrzut technologiczny właściwości piezorezystorów, brak możliwości stosowania w środowiskach cieczowych ze względu na prądy upływu. Ostatnia z wad może być wyeliminowana przez zastosowanie powłok izolujących [16, 26].

#### 4. Mikrodźwignia sprężysta jako czujnik masy – zasada działania

#### 4.1 Zakres zastosowań

W ostatnich latach prowadzone są intensywne prace nad konstrukcją i zastosowaniem bioczuJNIKÓW budowanych na bazie belek mikromechanicznych. O atrakcyjności tego typu rozwiązań decydują głównie małe rozmiary sensorów, czego konsekwencją jest z jednej strony niewielka objętość substancji poddawanej badaniom, z drugiej zaś możliwość detekcji nadzwyczaj małej masy osadzającej się na powierzchni sensora sięgających często pojedynczych pikogramów [27]. W wielu przypadkach układy takie budowane są w postaci matryc co otwiera możliwości detekcji (wykrywania obecności) większej liczby związków chemicznych i substancji biologicznych.



Rysunek 16. Matryca czujników mikromechanicznych przeznaczonych do detekcji gazów (tzw. elektroniczny nos) [28]

We wszystkich tego typu eksperymentach konieczne jest funkcjonalizacja części aktywnej powierzchni belki sprężystej substancjami, które w sposób selektywny potrafią chemicznie związać substancje poszukiwane w gazowym lub cieczowym otoczeniu czujnika. Czujniki pracujące na tej zasadzie znajdowały zastosowanie w wykrywaniu zagrożeń biologicznych i diagnostyce chorób. Dotyczyło to np. detekcji obecności bakterii, wirusów i antyciał [2][6], detekcji obecności antygeny raka prostaty [4][5] i hybrydyzacji DNA [29]. Osobną grupę czujników mikrobelkowych działających jednak na tej samej zasadzie stanowią czujniki chemiczne detekcji pestycydów DDT [7], gazów bojowych [9], oznaczania pH [8].

Mimo obserwowanego ostatnio dużego zainteresowania mikrobelkowymi czujnikami chemicznymi utrudnione są powszechniejsze aplikacje tego typu sensorów. Do najważniejszych problemów, których rozwiązanie otworzy nowe

zastosowania i umożliwi powszechniejsze aplikacje zaliczyć należy:

- opracowanie i zastosowanie selektywnych warstw funkcjonalizujących powierzchnię mikrobelk dobranych pod kątem detekcji ściśle zdefiniowanych substancji; warstwy te powinny zapewniać możliwie jak największą czułość i selektywność detekcji oraz powinny się charakteryzować stabilnością w czasie; dodatkowe utrudnienia wiążą się z nadzwyczaj małymi wymiarami mikrobelk, których powierzchnia w idealnym układzie powinna być pokryta warstwą receptora tylko w ściśle określonym rejonie sensora;
- budowę i zastosowanie czułych detektorów ugięcia mikrobelk; zadanie to ulega komplikacjom w związku z integracją w jednej macierzy kilku lub nawet kilkunastu czujników, których wychylenie musi być selektywnie obserwowane w zakresie ułamków nanometra w paśmie do około 1MHz; od detektora ugięcia mikrobelk oczekuje się również możliwie małych rozmiarów, co powinno umożliwiać powszechniejsze aplikacje przenośne tego typu układów;
- kłopotliwą i w wielu przypadkach niejednoznaczną analizą odpowiedzi czujników mikromechanicznych; odpowiedź czujników belkowych jest z reguły funkcją obecności i stężenia kilku substancji chemicznych oraz dodatkowo zależy od wielu czynników zewnętrznych takich jak np. temperatura, wilgotność i oświetlenie; według naszej oceny analiza uzyskanych wyników i wnioskowanie o pobudzeniu czujnika powinna być wspomagana metodami sztucznej inteligencji (do których należą np. sieci neuronowe lub systemy ekspertowe); metody te bazują na znajomości reakcji pojedynczego czujnika przy zdefiniowanych (tzw. uczących) pobudzeniach; odpowiednie przetwarzanie takich charakterystyk dostarcza dodatkowej wiedzy o stanie całego układu wielu dźwigni mikromechanicznych;

Z pomiarowego punktu widzenia można wskazać dwie zasadnicze konsekwencje osadzania się (adsorbcji) molekuł na powierzchni funkcjonalizowanych dźwigni mikromechanicznych:

- efekt zwiększania masy mikromechanicznej dźwigni sprężystej, co wynika z obecności na powierzchni receptora wiążących się z nim molekuł; w tym wypadku detekcję obecności molekuł (innymi słowy osadzającej się masy) na powierzchni czujnika przeprowadza się zwykle na podstawie obserwacji częstotliwości rezonansowej mikrobelki, stąd badania masy osadzonej na powierzchni mikrobelki prowadzone są w tzw. rezonansowym trybie pomiarowym,
- efekt wprowadzanie dodatkowych maprężen na powierzchni mikroczujnika, co wynika z oddziaływania między molekułami analitu zwią-

zanymi z aktywnymi (wiążącymi) grupami receptora; rezultatem wprowadzenie naprężeń mechanicznych po jednej stronie mikrobełki jest jej statyczne ugięcie stąd tryb pomiarowy, w którym badania takie są prowadzone nazywa się statycznym trybem pomiarowym.

W praktyce laboratoryjnej opisane powyżej zjawiska występują często jednocześnie, co może utrudniać analizę rejestrowanych wyników. Nasze doświadczenie wskazuje jednak, że umiejętne kształtowanie geometrii i struktury czujnika mikromechanicznego efektywnie ogranicza to splątanie. Układ pomiarowy przeznaczony do badań statycznych i rezonansowych zachowań mikrobełek sprężystych przedstawia rys. 17. Układ ten składa się z głowicy pomiarowej przedstawionej w rozdziale poprzednim, układu precyzyjnego zasilania lasera półprzewodnikowego, zespołu przetwornika wartości skutecznej i karty przetworników analogowo-cyfrowych jako układu rejestrującego wychylenia mikrobełki. Dodatkowo dla precyzyjnego justowania belki sprężystej zastosowano mikroskop optyczny z kamerą CCD rejestrującą położenie plamki laserowej na powierzchni dźwigni.

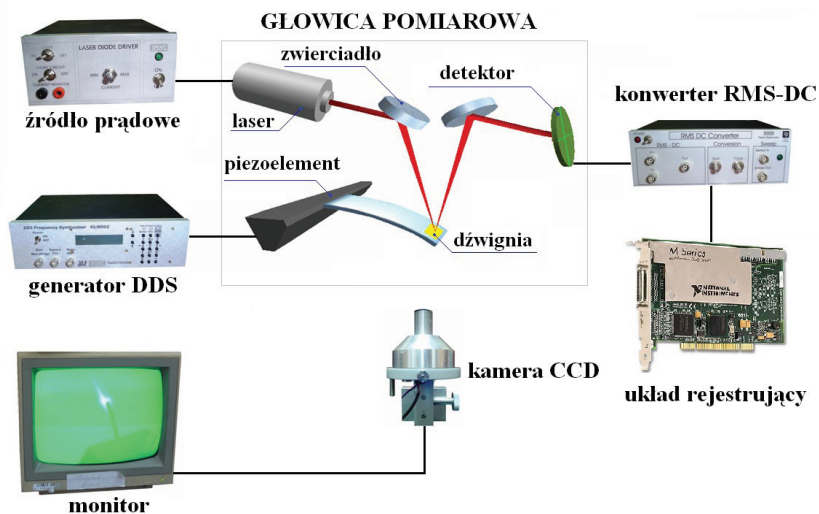


Rysunek 17. Statyczny i rezonansowy tryb pomiarowy z wykorzystaniem mikrobełki sprężystej[2]

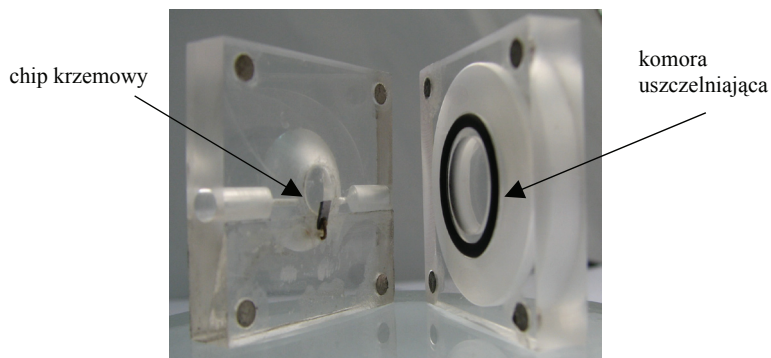
Na Politechnice Wrocławskiej w pomiarach prowadzonych w cieczach wykorzystuje się komorę pomiarową, przez którą przepływa badany analit omywając belkę sprężystą. Celka ta jest zintegrowana z zespołem głowicy pomiarowej układu detektora natężeniowego. W rozwiązaniu tym mikroczytnik jest oświetlany przez okienko celki, przez które przechodzi również promień odbity od mikroczytnika. Uszczelnienie całości zapewnia uszczelka z Vitonu®.



## Mikrodźwignia sprężysta jako biocujnik



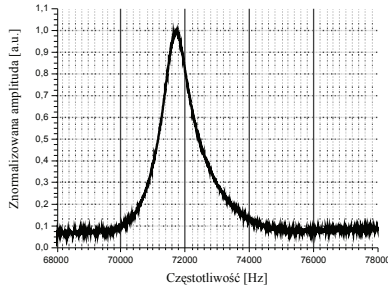
Rysunek 18. Układ pomiarowy do statycznych i rezonansowych badań zachowań mikrobelki sprężystych z wykorzystaniem natężeniowego czujnika ugięcia czujnika[24]



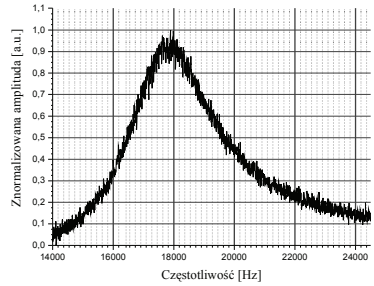
Rysunek 19. Celka pomiarowa przeznaczona do badań wychylenia mikrodźwigni w cieczach[24]

Na rys. 20 przedstawiamy krzywą rezonansową belki sprężystej zarejestrowaną po jej zamocowaniu w opisywanej komórce ciekowej i przed wprowadzeniem analitu do wnętrza komory. W tym wypadku zarejestrowano częstotliwość rezonansową równą 71800 Hz i dobroć 250. Po wprowadzeniu wody do komory częstotliwość rezonansowa i dobroć uległy odpowiednio zmniejszeniu do 17700 Hz i 5,5. Przyczyną takiego zjawiska jest znaczny współczynnik lepkości cieczy,

który bezpośrednio wpływa na rozpraszanie energii w czasie drgań mikrobelki. Niewielkie wartości dobroci belki w cieczech (w konsekwencji stosunkowo szerokie krzywe rezonansowe) są w tym wypadku źródłem dużej niedokładności wyznaczania częstotliwości rezonansowej belki.



Rysunek 20. Krzywa rezonansowa mikrobelki zarejestrowana w powietrzu ( $Q=250$ , częstotliwość rezonansowa 71800 Hz)



Rysunek 21. Krzywa rezonansowa mikrobelki zarejestrowana w wodzie ( $Q=5,5$ , częstotliwość rezonansowa 17700 Hz)

#### 4.2 Pomiar rezonansowe

Podstawą pomiarów dynamicznych jest rejestracja przesunięcia częstotliwości rezonansowej drgającego czujnika. Przesunięcie to jak już wspomniano wiąże się bezpośrednio z masą zaadsorbowanych na powierzchni belki molekuł. W wypadku pomiarów rezonansowych substancją odpowiedzialną za wychylenie (związanie) z otaczającego dźwignię środowiska odpowiednich cząstek pokrywa się najczęściej obie powierzchnie dźwigni – górną i dolną. W praktyce laboratoryjnej zależność opisującą częstotliwość rezonansową belki można przekształcić do postaci [30]:

$$f_n = \frac{\lambda_n^2}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{3m^*}}, \quad (16)$$

gdzie:

$k$  - stała sprężystości belki,

$m^*$  - efektywna masa belki,



$\lambda_n$  - bezwymiarowy współczynnik związany z odpowiednim modem drgań mikrobjelki.

Biorąc pod uwagę fakt, iż w środowisku ciekowym częstotliwość rezonansowa ulega zmniejszeniu, należy określić jej wartość w cieczy. Zależność pomiędzy częstotliwością rezonansową w powietrzu i odpowiadającą jej częstotliwością, na której występuje rezonans w cieczy wyraża się wzorem [30]:

$$f_{n, \text{ciecz}} = \frac{f_{n, \text{powietrze}}}{\sqrt{1 + \frac{\pi \rho_c b}{4 \rho_b h}}}, \quad (17)$$

gdzie:

$\rho_c$  - gęstość cieczy,

$\rho_b$  - gęstość materiału belki,

$b$  - szerokość belki,

$h$  - grubość belki.

Biorąc pod uwagę dodatkową masę, która ulega adsorpcji na powierzchni belki można zapisać, że [31]:

$$f_{n, \text{ciecz}} = \frac{\frac{\lambda_n^2}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{3m^* + \Delta m}}}{\sqrt{1 + \frac{\pi \rho_c b}{4 \rho_b h}}}, \quad (18)$$

gdzie:

$\Delta m$  - dodatkowa zaadsorbowana masa.

W powyższym wzorze należy wziąć pod uwagę rozłożenie masy na powierzchni belki – nie jest to masa punktowa na końcu dźwigni standardowa

przyjmuje się masę efektywną równo 0,24 masy całkowitej substancji. Ostatecznie masę osadzoną na powierzchni belki możemy wyrazić w funkcji częstotliwości mikrobełki rejestrowanej w wodzie i w powietrzu jako:

$$\Delta m = \frac{k}{4\pi^2 N_n} \left( \frac{1}{(f'_{n,ciecz})^2} - \frac{1}{(f_{n,ciecz})^2} \right), \quad (19)$$

gdzie:

$N_n$  - współczynnik odpowiadający za masę efektywną substancji zaadsorbowanej dla danego modu drgań,

$f'_{n,ciecz}$  - częstotliwość rezonansowa po adsorpcji masy,

$f_{n,ciecz}$  - częstotliwość rezonansowa przed adsorpcją masy.

Biorąc pod uwagę pierwszy człon rozwinięcia w szereg Taylora oraz fakt, że  $\Delta m \ll m^*$  można wyznaczyć przybliżoną zależność wiążącą przesunięcie częstotliwości rezonansowej i masę zaadsorbowanych na powierzchni belki molekuł:

$$\Delta m \approx \frac{2m_c \Delta f}{f_{n,ciecz}}, \quad (20)$$

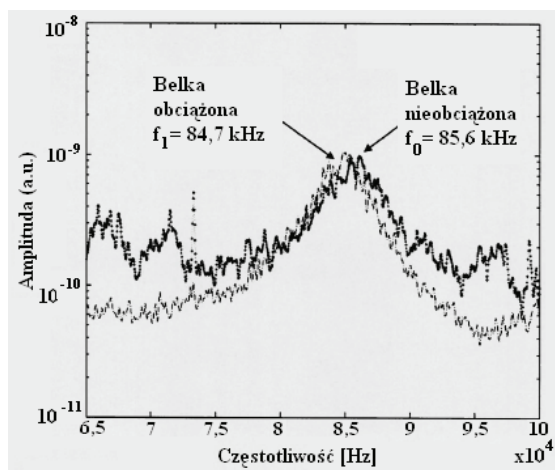
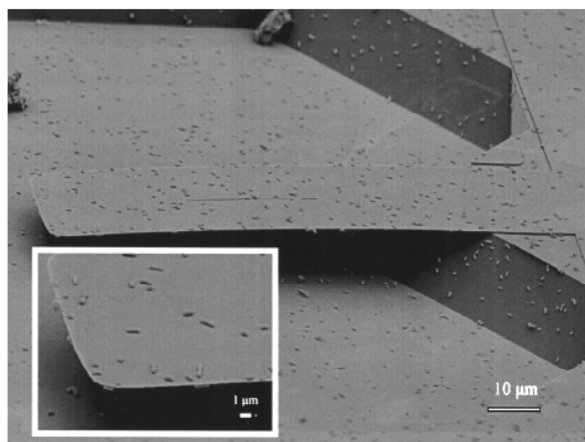
gdzie:

$\Delta m$  - masa zaadsorbowanych molekuł,

$\Delta f$  - przesunięcie częstotliwości rezonansowej w cieczy wywołane adsorpcją masy.

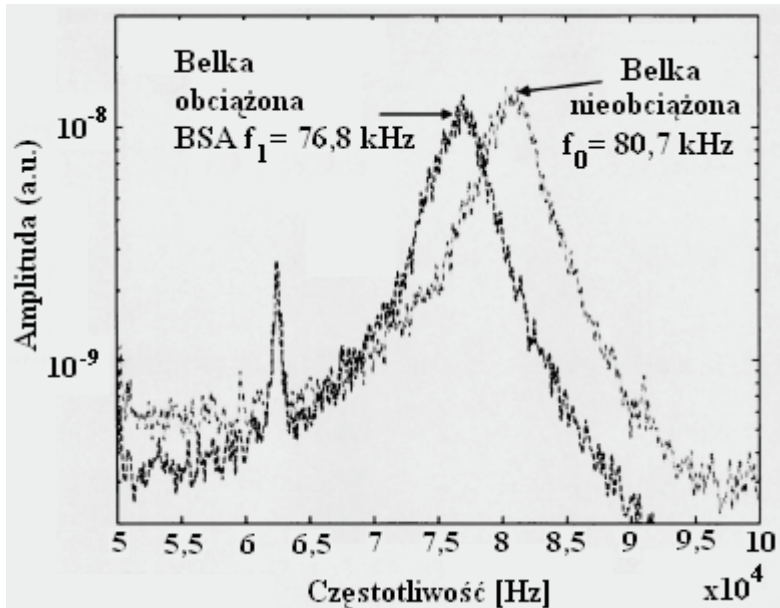
W praktyce laboratoryjnej przesunięcie częstotliwości rezonansowej mikrobełki waha się w granicach od kilkadziesiątu herców do kilku kiloherców. Wartość ta jest wystarczająca jeśli chodzi o większość zastosowań. W pracy [6] obserwowano przykładowo przesunięcia częstotliwości rezonansowej mikrobeł-

ki przy obciążaniu ją bakteriami *Listeria innocua*. W tych badaniach zaobserwowano przesunięcia rzędu 100 Hz dla dźwigni, której częstotliwość rezonansowa belki swobodnej wynosiła 85,6 kHz (rys. 22).



Rysunek 22. Mikrobelka krzemowa pokryta bakteriami *Listeria innocua* oraz krzywe rezonansowe przed i po pokryciu dodatkową masą [6]

Na rys. 23 przedstawiono natomiast rezultaty pomiarów adsorpcji białka BSA (surowiczna albumina wołowa) na sfunkcjonalizowanej powierzchni dźwigni. Widoczne jest znaczne przesunięcie częstotliwości rezonansowej, które odpowiadają ok. 166 pg białka BSA osadzonym na dźwigni.

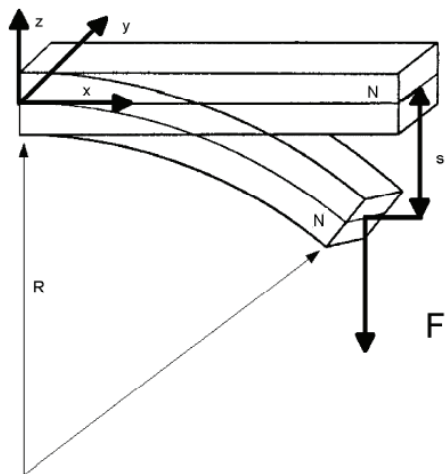


Rysunek 23. Przesunięcie częstotliwości rezonansowej mikrobelki pod wpływem obciążenia dodatkową masą - białkiem BSA [6]

#### 4.3 Pomiary statyczne

Pomiary statyczne bazują na rejestracji ugięcia belki wynikającego ze zmiany naprężeń powierzchniowych. Jeśli na jednej z powierzchni belki np. górnej, występują naprężenia ściskające bądź rozciągające i nie są one kompensowane przez identyczne naprężenia występujące na drugiej z powierzchni (dolnej) to belka ulega wygięciu. Zmiany naprężeń następują na skutek adsorpcji molekuł na jednej z powierzchni mikrobelki i mogą być wywołane m.in. procesem adsorpcji (fizykosorpcja lub chemisorpcja), elektrostatycznymi oddziaływaniami na powierzchni belki (oddziaływania pomiędzy zaadsorbowanymi cząsteczkami), zmianą hydrofobowości powierzchni lub konformacyjnymi zmianami zaadsorbowanych molekuł. Druga z powierzchni jest zabezpieczona i odizolowana, więc nie zachodzą na niej żadne reakcje.

Na rysunku 24 schematycznie przedstawiono model wyginającej się pod wpływem naprężeń belki.



Rysunek 24. Statyczne ugięcie belki pod wpływem siły skupionej na włóknie neutralnych; przypadek statycznej belki przeznaczonej do obserwacji adsorpcji molekuł na powierzchni bioczuJNIka [32]

W naprężonej dźwigni, pomiędzy jej górną a dolną powierzchnią istnieje tzw. powierzchnia neutralna, w której nie obserwuje się naprężeń mechanicznych. Po przyłożeniu do tej warstwy siły  $F$  jej moment wyrażony zależnością  $M = F \cdot x$ , powoduje odkształcenie czujnika o promieniu wyrażonym funkcją [32]:

$$\frac{1}{R} = \frac{\partial^2 z}{\partial x^2} = \frac{M}{E'I}, \quad (21)$$

gdzie:

$M$  - moment siły,

$E' = \frac{E}{1 - \nu}$  - efektywny moduł Younga,  $\nu$  - współczynnik Poissona,

$I = \frac{1}{12}bh^3$  - moment bezwładności dźwigni o przekroju prostokątnym.

Gdy na powierzchniach następują zmiany w naprężeniach moment siły powodujący wygięcie belki wyraża się zależnością:

$$M = \frac{\Delta \sigma \cdot b \cdot h}{2}, \quad (22)$$

gdzie:

$\Delta \sigma = \sigma_1 - \sigma_2$  - różnica w naprężeniach powierzchniowych pomiędzy górną, a dolną powierzchnią.

Podstawiając równanie (22) do równania (21) otrzymujemy tzw. równanie Stoney'a [33] wiążące promień krzywizny ugiętej belki ze zmianami naprężeń powierzchniowych:

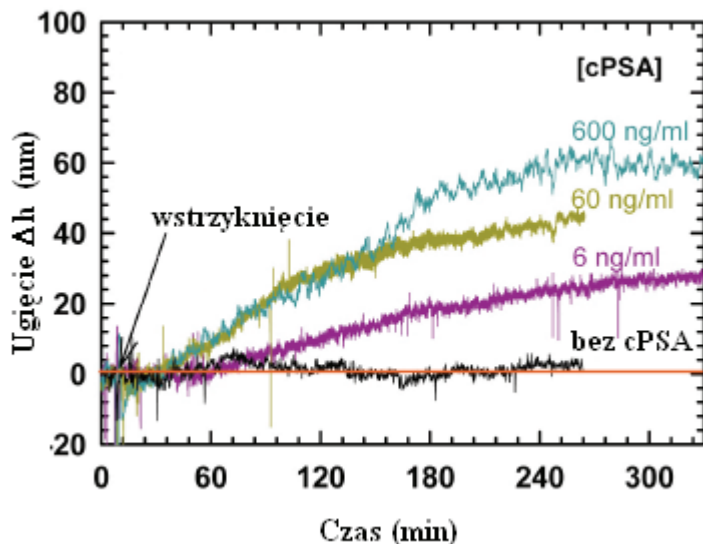
$$\frac{1}{R} = \frac{6(1-\nu)}{Eh^2} \Delta \sigma \quad (23)$$

Zakładając, że  $R \gg l$  co ma miejsce w przypadku mikrobelki ugięcie dźwigni  $s$  można zapisać jako:

$$s = \frac{3l^2(1-\nu)}{Eh^2} \Delta \sigma, \quad (24)$$

Z powyższej zależności bezpośrednio wynika fakt skalowania wymiarów belki w celu osiągnięcia wyższych czułości. Belki długie o niewielkiej grubości najlepiej sprawdzają się w roli czujników masy działających na zasadzie zmian naprężeń powierzchniowych.

Jako przykład powyższej metody mogą zostać przytoczone wyniki zamieszczone w *Nature Biotechnology* [5]. Na rysunku 28 przedstawiono krzywe reprezentujące statyczne ugięcie mikrobelki pod wpływem adsorpcji antygenu cPSA (complex Prostate-Specific Antigen) dla różnych jego koncentracji (od 6 do 600 ng/ml).



Rysunek 25 Ugięcie belki z  $\text{Si}_3\text{N}_4$  (długość  $200\ \mu\text{m}$ , grubość  $0,5\ \mu\text{m}$ ) pod wpływem adsorpcji antygeny PSA [5]

## 5. Podsumowanie

Wykorzystanie czujników mikromechanicznych w roli biosensorów we współczesnej diagnostyce biochemicznej wydaje się naturalne ze względu na ich bardzo dobre właściwości metrologiczne takie jak duża czułość (możliwa jest detekcja zmiany masy w zakresie ułamków pikogramów), krótki czas odpowiedzi oraz mała objętość analitu potrzebnego do wykonania analizy (rzędu pojedynczych mikrolitrów). Jednym z problemów, które należy jednak rozwiązać jest opracowanie technik pomiarowych oraz optymalizacja konstrukcji samych czujników, tak aby zapewnić powtarzalne i wiarygodne pomiary obecności substancji chemicznych i biochemicznych, do których zaliczyć można endotoksyny, przeciwciała i antygeny. Opanowanie tych zagadnień pozwoli na masowe wytwarzanie szerokiej gamy bioczuJNIków, których obszar zastosowań limitowany będzie jedynie rodzajem substancji funkcjonalizującej powierzchnię sensora.

**Literatura:**

1. „Evaluation and fabrication of AFM array for ESA-Midas/ Rosetta space mission”, W. Barth, T. Debski, N. Abedinov, Tz. Ivanov, H. Heerlein, B. Volland, T. Gotszalk, I.W. Rangelow, K. Torkar, K. Fritzenwallner, P. Grabiec, K. Studzińska, I. Kostic, P. Hudek, *Microelectronic Engineering* 57–58 (2001) 825–831;
2. “Cantilever-Based Biosensors in CMOS Technology” K.-U. Kirstein, Y. Li, M. Zimmermann, C. Vancura, T. Volden, W. H. Song, J. Lichtenberg, A. Hierlemann, *Proceedings of the Design, Automation and Test in Europe Conference and Exhibition (DATE’05) IEEE*;
3. “Characterization of vaccinia virus particles using microscale silicon cantilever resonators and atomic force microscopy”, L. Johnson, A. K. Gupta, A. Ghafoor, D. Akin, R. Bashir, *Sensors and Actuators B* 115 (2006) 189–197;
4. “Immunoassay of prostate-specific antigen (PSA) using resonant frequency shift of piezoelectric nanomechanical microcantilever”, Jeong Hoon Lee<sup>a,b</sup>, Kyo Seon Hwang<sup>a</sup>, Jaebum Park<sup>a</sup>, Ki Hyun Yoon<sup>b</sup>, Dae Sung Yoon<sup>a</sup>, Tae Song Kim<sup>a</sup>, *Biosensors and Bioelectronics* 20 (2005) 2157–2162;
5. “Bioassay of prostate-specific antigen (PSA) using microcantilevers”, Guanghua Wu, Ram H. Datar, Karolyn, M. Hansen, Thomas Thundat, Richard J. Cote, and Arun Majumdar, *Nature Biotechnology*, volume 19, september 2001, 856 – 860;
6. “Detection of bacterial cells and antibodies using surface micromachined thin silicon cantilever resonators”, Amit Gupta and Demir Akin Rashid Bashir *J. Vac. Sci. Technol. B* 22(6), Nov/Dec 2004 2785 - 2791;
7. “Development of nanomechanical biosensors for detection of the pesticide DDT”, M. Alvarez, Ana Calle, J. Tamayo, L. M. Lechuga, A. Abad, A. Montoya, *Biosensors and Bioelectronics* 18 (2003) 649/653;
8. “New technology for the detection of pH” M. Yuqing, C. Jianrong, F. Keming, *J. Biochem. Biophys., Methods* 63 (2005) 1 – 9;
9. [Electrostatically Actuated Resonant Microcantilever Beam in CMOS Technology for the Detection of Chemical Weapons”, I. Voiculescu, M. E. Zaghoul, R. Andrew McGill, E. J. Houser, G. K. Fedder, *IEEE Sensors Journal*, volume 5, number 4, august 2005;
10. <http://www.spmtips.com/csc12/pt>, 10.06.2008;
11. “Systemy mikroskopii bliskich oddziaływań w badaniach mikro- i nanostruktur” T.P. Gotszalk, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocław-



- skiej 2004;
12. "Effective mass and flow patterns of fluids surrounding microcantilevers", Don W. Dareing, Fang Tian, Thomas Thundat, *Ultramicroscopy* 106 (2006) 789–794;
  13. „A piezoelectric micro-cantilever bio-sensor using the mass-microbalancing technique with self-excitation”, Y. Lee, G. Lim, W. Moon, *Microsyst Technol* (2007) 13: 563–567;
  14. "Photothermal excitation of microcantilevers in liquids", D. Ramos, J. Tamayo, J. Mertens, and M. Calleja, *Journal of Applied Physics* 99, 124904 2006;
  15. "Optical excitation of nanoelectromechanical oscillators", B. Ilic, S. Krylox, K. Aubin, R. Reichenbach and H.G. Craighead, *Applied Physics Letters* 86, 193114 2005;
  16. "Thermally driven micromechanical beam with piezoresistive deflection readout", Tzv. Ivanov, T. Gotszalk, P. Grabiecc, E. Tomerov, I.W. Rangelow, *Microelectronic Engineering* 67–68 (2003) 550–556;
  17. "Piezoresistive and self-actuated 128-cantilever arrays for nanotechnology applications", I.W. Rangelow, Tzv. Ivanov, K. Ivanova, B.E. Voland, P. Grabiecc, Y. Sarov, A. Persaud, T. Gotszalk, P. Zawierucha, M. Zielony, D. Dontzov, B. Schmidt, M. Zier, N. Nikolov, I. Kostic, W. Engl, T. Sulzbach, J. Mielczarski, S. Kolb, Du P. Latimier, R. Pedreau, V. Djakov, S.E. Huq, K. Edinger, O. Fortagne, A. Almansa, H.O. Blom *Microelectronic Engineering* 84 (2007) 1260–1264;
  18. J. R. Barnes, R. J. Stephenson, M. E. Welland, C. Gerber, and J. K. Gimzewski, *Nature (London)* 372, 79, 1994;
  19. "A new cantilever system for gas and liquid sensing" A. Vidic, D. Then, C. Ziegler, *Ultramicroscopy* 97 (2003) 407–416;
  20. "A highly sensitive self-oscillating cantilever array for the quantitative and qualitative analysis of organic vapor mixtures" D. Then, A. Vidic, Ch. Ziegler, *Sensors and Actuators B* 117 (2006) 1–9;
  21. "A complete analysis of the laser beam deflection systems used in cantilever-based systems", L.Y. Beaulieu, M. Godin, O. Laroche, V. Tabard-Cossa, P. Grutter, *Ultramicroscopy* 107 (2007) 422–430;
  22. "Badanie bioczuJNIKów mikromechanicznych" G. Gruca, T. Gotszalk, M. Klich, K. Woźniak, P. Zawierucha, M. Zielony, IV Seminarium STM/AFM 2006 Zakopane, 6 - 10 grudnia 2006;
  23. "Calibration of Optical Levers" M. E. Zucker LIGO-T990026-00-D 3/5/99;
  24. "Testing of the cantilever based biosensors", G. Gruca, M. Klich, K. Woźniak, P. Zawierucha, M. Zielony, T. Gotszalk, J. Rybka, P. Grabiecc,

- X Konferencja Naukowa Technologia Elektronowa ELTE 2007, Kraków 4.-7.09.2007;
25. Analiza szumów i projekt układu przetworników I/U fotodetektora czterosekcyjnego”. J. Siekierzycka, G. Gruca, M. Klich, T. Gotszalk, VI Krajowa Konferencja Elektroniki Darłówko Wschodnie 11-13.06.2007;
  26. „Scanning proximity probes for nanoscience and nanofabrication”, Ivo W. Rangelow, *Microelectronic Engineering* 83 (2006) 1449–1455;
  27. “Nanomechanical biosensors: a new sensing tool”, L.G. Carrascosa, M. Moreno, M. A Alvarez, L.M. Lechuga, *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 25, No. 3, 2006;
  28. “A cantilever array-based artificial nose” M.K. Baller, H.P. Lang, J. Fritz, Ch. Gerber, J.K. Gimzewski, U. Drechsler, H. Rothuizen, M. Despont, P. Vettiger, F.M. Battiston, J.P. Ramseyer, P. Fornaro, E. Meyer, H.-J. Guntherodt, *Ultramicroscopy* 82 (2000) 19;
  29. “Highly sensitive polymer-based cantilever-sensors for DNA detection”, Calleja, M., Nordström, M.; Álvarez, M.; Tamayo, J.; Lechuga, L.M.; Boisen, A., *Ultramicroscopy Volume: 105, Issue: 1-4, November, 2005*, pp. 215-222;
  30. “Frequency response of cantilever beams immersed in viscous fluids with applications to the atomic force microscope”, J.E. Sader, *J. Appl. Phys.* 84, 64(1998);
  31. “Real-Time Mass Sensing by Nanomechanical Resonators in Fluid” Murali K. Ghatkesar, V. Barwich, T. Braun, A.H. Bredekamp, U. Drechsler, M. Despont, H. P. Lang, M. Hegner, Ch. Gerber, *IEEE*;
  32. “Cantilever-based biosensors” C. Ziegler, *Anal Bioanal Chem* (2004) 379: 946–959;
  33. Stoney GG (1909) *Proc R Soc Lond A*82:172.







