

# Wybrane aspekty chemii supramolekularnej



Praca zbiorowa pod redakcją  
Grzegorza Schroedera



# **Wybrane aspekty chemii supramolekularnej**

Praca zbiorowa pod redakcją

Grzegorza Schroedera

BETAGRAF P.U.H.  
Poznań 2009

**Recenzenci:**

prof. dr hab. Piotr Grzesiak  
dr hab. Bogusława Łęska

**Opracowanie techniczne:**

Marta Schroeder

**Poznań 2009**

**ISBN 978-83-89936-22-6**

**Wydawnictwo:**

BETAGRAF P.U.H.  
św. Antoniego 24  
61-359 Poznań

## Spis treści:

<b>Książka adresowa</b>	<b>7</b>
<b>Rozdział I</b>	<b>11</b>
<b>Metody syntezy katenanów oraz rotaksanów</b>	
Michał Cegłowski, Grzegorz Schroeder	
<b>Rozdział II</b>	<b>41</b>
<b>Rotaksany – molekularne urządzenia</b>	
Leszek Zalewski, Tadeusz Ossowski, Paweł Niedziałkowski, Anita Stefańska	
<b>Rozdział III</b>	<b>63</b>
<b>Metody syntezy oraz funkcjonalizacji tetra-O-podstawionych rezorcynoarenów</b>	
Barbara Gawdzik, Waldemar Iwanek	
<b>Rozdział IV</b>	<b>95</b>
<b>Dendrymery</b>	
Paweł Niedziałkowski, Tadeusz Ossowski, Justyna Czupryniak	
<b>Rozdział V</b>	<b>121</b>
<b>Nowe zastosowanie materiałów mezoporowatych – adsorpcja leków na przykładzie ibuprofenu</b>	
Katarzyna Walczak, Izabela Nowak	
<b>Rozdział VI</b>	<b>139</b>
<b>Chromojonofory zbudowane na bazie eterów koronowe</b>	
Leszek Zalewski, Tadeusz Ossowski, Dorota Zarzeczkańska	
<b>Rozdział VII</b>	<b>157</b>
<b>Interakcje jonowe w kondensatorach elektrochemicznych</b>	
Katarzyna Lota, Grzegorz Lota	

**Rozdział VIII**                    **171**  
**Mikroskopia sił chemicznych w badaniach powierzchni**  
**funkcjonalizowanych**

Agata Masalska, Teodor Gotszalk, Grzegorz Schroeder

**Rozdział IX**                    **187**  
**Podstawy techniki MALDI MS**

Grażyna Bartkowiak, Grzegorz Schroeder

## **Książka adresowa**

### **Grzegorz Schroeder**

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

### **Grażyna Bartkowiak**

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

### **Michał Ceglowski**

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

### **Justyna Czupryniak**

Uniwersytet Gdański  
Wydział Chemii  
ul. Sobieskiego 18/19  
80-952 Gdańsk

### **Barbara Gawdzik**

Uniwersytet Humanistyczno-Przyrodniczy Jana Kochanowskiego  
Instytut Chemii  
Świętokrzyska 15G  
25-406 Kielce

**Teodor Gotszalk**

Politechnika Wrocławska  
Wydział Elektroniki Mikrosystemów i Fotoniki  
ul. Janiszewskiego 11/17  
50-372 Wrocław

**Waldemar Iwanek**

Uniwersytet Humanistyczno-Przyrodniczy Jana Kochanowskiego  
Instytut Chemii  
Świętokrzyska 15G  
25-406 Kielce

**Grzegorz Lota**

Politechnika Poznańska  
Instytut Chemii i Elektrochemii Technicznej  
Piotrowo 3  
60-965 Poznań

**Katarzyna Lota**

Instytut Metali Nieżelaznych Oddział w Poznaniu  
Centralne Laboratorium Akumulatorów i Ogniw  
Forteczna 12  
61-362 Poznań

**Agata Masalska**

Politechnika Wrocławska  
Wydział Elektroniki Mikrosystemów i Fotoniki  
ul. Janiszewskiego 11/17  
50-372 Wrocław

**Paweł Niedziałkowski**

Uniwersytet Gdański  
Wydział Chemii  
ul. Sobieskiego 18/19  
80-952 Gdańsk



**Izabela Nowak**

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

**Tadeusz Ossowski**

Uniwersytet Gdański  
Wydział Chemii  
ul. Sobieskiego 18/19  
80-952 Gdańsk

**Anita Stefańska**

Uniwersytet Gdański  
Wydział Chemii  
ul. Sobieskiego 18/19  
80-952 Gdańsk

**Katarzyna Walczak**

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

**Leszek Zalewski**

Uniwersytet Gdański  
Wydział Chemii  
ul. Sobieskiego 18/19  
80-952 Gdańsk

**Dorota Zarzeczkańska**

Uniwersytet Gdański  
Wydział Chemii  
ul. Sobieskiego 18/19  
80-952 Gdańsk



# Rozdział I

## Metody syntezy katenanów oraz rotaksanów

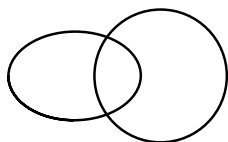
Michał Cegłowski, Grzegorz Schroeder

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

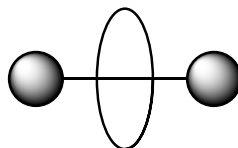
### 1. Wstęp

W przeciągu ostatnich 25 lat otrzymanie wzajemnie sprzężonych cząsteczek stało się niezwykle proste, dzięki stopniowemu opracowywaniu coraz to nowych i bardziej doskonałych metod templatowych. Tego typu układy cieszą się dużym zainteresowaniem chemii supramolekularnej w związku z możliwością ich zastosowanie jako molekularne przełączniki, czy maszyny<sup>[1]</sup>.

W rozumieniu chemii supramolekularnej cząsteczki wzajemnie sprzężone, są to cząsteczki, pomiędzy którymi nie występują wiązania walencyjne, natomiast połączone są tzw. wiązaniem mechanicznym<sup>[2]</sup>. Wiązanie to opiera się na powstaniu zawady przestrzennej, która powoduje, że powiązanych nią molekuł nie można rozdzielić bez zrywania ich własnych wiązań kowalencyjnych. Najprostszymi przykładami takich związków, przedstawionymi schematycznie na Rysunku 1, są [2]katenan i [2]rotaksan (numery w nawiasach przed nazwą związku informują z ilu pojedynczych cząsteczek składa się cały związek).



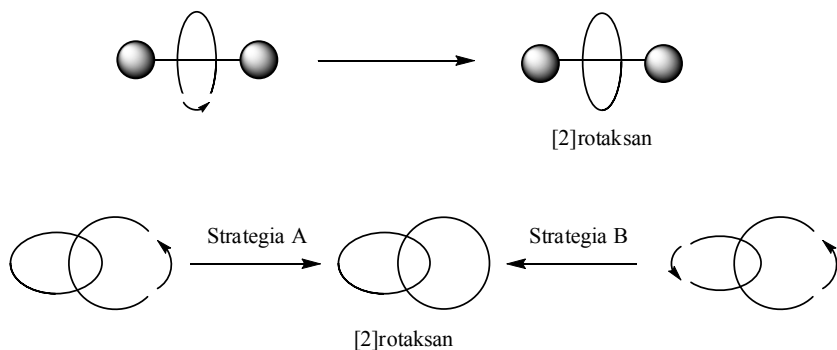
[2]katenan



[2]rotaksan

*Rysunek 1.*

Synteza rotaksanu może obejmować wiele różnych etapów, jednakże ostatni z nich, który obejmuje utworzenie ostatecznego, makrocyklicznego produktu określa się mianem „clipping”. Synteza katenanu wymaga utworzenia przynajmniej jednego z dwóch (lub więcej) makrocyklicznych pierścieni w ostatecznym etapie. Daje to dwie różne strategie syntezy w przypadku otrzymywania przykładowego [2]katenanu, w których skład wchodzi jeden etap makrocyklizacji (strategia A), bądź dwa takie etapy (strategia B)<sup>[3]</sup>. Schematyczne przedstawienie tych strategii znajduje się na Rysunku 2.



Rysunek 2. Strategie z wykorzystaniem etapu „clipping”.

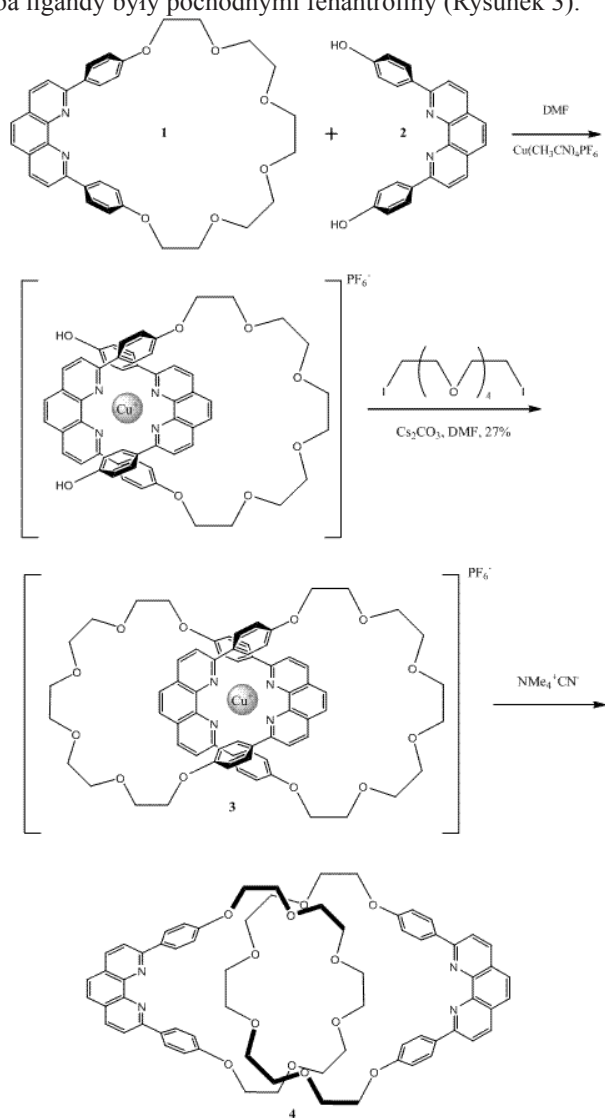
Syntezę molekuł wzajemnie sprzężonych najczęściej prowadzi się z wykorzystaniem efektu templatowego. Powoduje on, że reagenty układają się względem siebie w ściśle określony sposób umożliwiając w dość łatwy sposób etap makrocyklizacji. Dodatkowo w wielu przypadkach reaktywne końce pojedynczej cząsteczki zwrócone są w tym samym kierunku co ułatwia zajście reakcji i zapobiega ewentualnej polimeryzacji. Dzięki temu produkty otrzymuje się z dość dobrą wydajnością, stosując przy tym w miarę łagodne warunki reakcji. Niestety taka metoda syntezy nakłada pewne ograniczenia, gdyż etap zamykania pierścienia musi być kompatybilny z użytym templatem. Oznacza to, że przede wszystkim warunki reakcji nie mogą powodować rozrywania utworzonego kompleksu templatowego.

## 2. Metody syntezy katenanów oraz rotaksanów

### 2.1. Reakcja Williamsona

Reakcja anionów alkoholowych z halogenkami lub sulfonianami alkilowymi jest jedną z głównych metod otrzymywania eterów koronowych i w gruncie rzeczy jest jedną z podstawowych reakcji w całej chemii supramolekularnej<sup>[4]</sup>. Ta reakcja, została po raz pierwszy zastosowana w celu otrzymania katenanu

przy użyciu kationu metalu jako templaty<sup>[5]</sup>. Kation miedzi ( $\text{Cu}^+$ ) został użyty w celu umożliwienia przeniknięcia się w przestrzeni dwóch ligandów (jednego makrocyklicznego (**1**), jednego łańcuchowego (**2**), przykład strategii A), przy czym oba ligandy były pochodnymi fenantroliny (Rysunek 3).



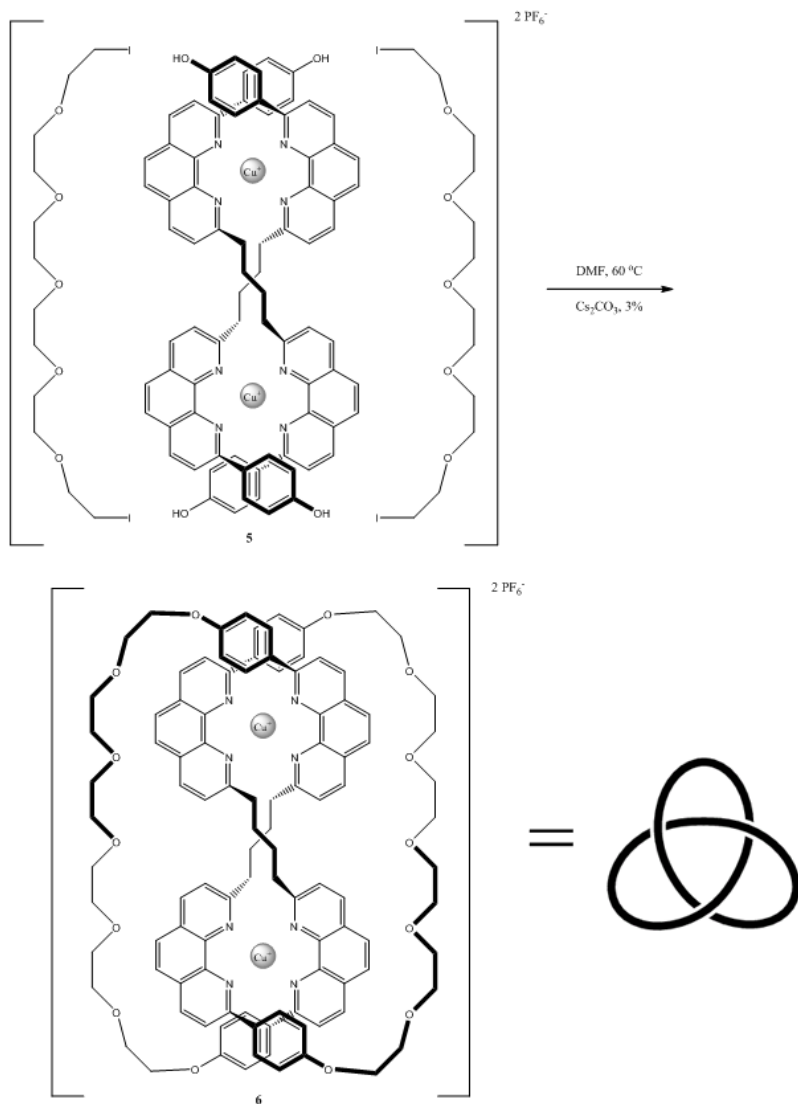
Rysunek 3. Katenan otrzymany przez reakcję Williamsona ( $\text{Cu}^+$  jako templat).

W trakcie badań, odkryto, iż polietylenowy fragment w cząsteczce makrocyklicznej musi zawierać co najmniej pięć grup etoksylowych w celu pełnego otoczenia liganda łańcuchowego<sup>[3]</sup>. Powstały kompleks jest niezwykle stabilny, co jest bardzo potrzebne w trakcie reakcji makrocyklizacji. Katenat **3** (końcówka „-at” ze względu na to, iż jest to kompleks z metalem) został otrzymany z 27% wydajnością, dzięki reakcji grup fenolanowych liganda acyklicznego z diiodkiem glikolu pentaetylenowego. Usunięcie kationu miedzi(I) za pomocą cyjanku tetrametyloaminy zaowocowało otrzymaniem katenandu **4**. Ten sam związek można otrzymać z identyczną wydajnością dzięki zastosowaniu strategii B. W tym wypadku korzysta się z kompleksu  $\text{Cu}^+$  z dwoma acyklicznymi ligandami i dwoma halogenkami polietylenowymi<sup>[6]</sup>.

Wykorzystanie analogicznej metody pozwoliło na otrzymanie związku **6**, czyli kompleksu makrocyklicznego o strukturze węzła (Rysunek 4)<sup>[7]</sup>. Do syntezy użyto związku **5**, składającego się kationów miedzi(I) oraz koordynujących je ligandów posiadających na swoich końcach grupy hydroksylowe. Etap cyklizacji zachodził w warunkach podobnych do warunków syntezy wcześniej omawianego katenatu **3**. Wydajność całego procesu wyniosła jednakże tylko 3%.

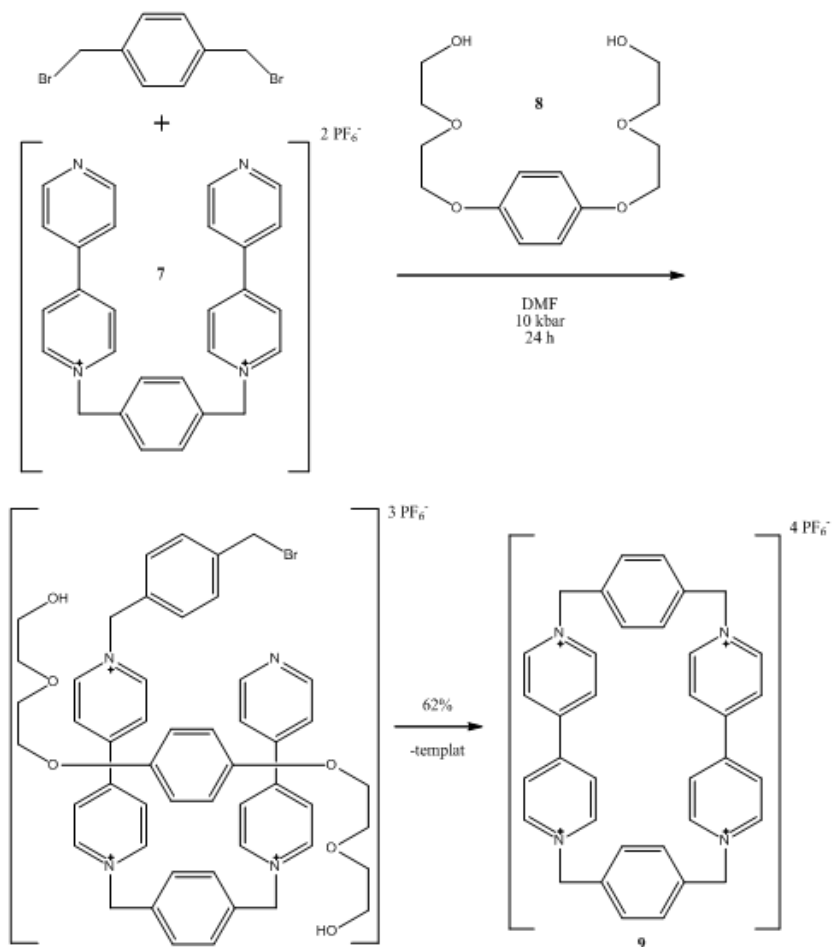
## 2.2. Czwartorzędowanie amin aromatycznych (reakcja Menschutkin’a)

Podczas badań nad kompleksowaniem kationów parakwatu (dichlorku 1,1'-dimetylo-4,4'-bipirydyniowego) przez etery koronowe<sup>[8]</sup>, stwierdzono, iż tworzenie kompleksu zachodzi przez złożenie oddziaływań  $\pi$ - $\pi$ , jon-dipol oraz tworzenie wiązań wodorowych. Otrzymanie makrocyklicznego produktu w wyniku tego rodzaju kompleksowania wymaga użycia elementu łączącego, który będzie reaktywny w stosunku do 4,4'-bipirydyli<sup>[9]</sup>. Jak zostało to przedstawione na Rysunku 5, bardzo dobrze nadaje się do tego  $\alpha, \alpha'$ -dibromo-p-ksylen, który powoduje wytworzenie soli czwartorzędowej. Związek makrocykliczny **9** może zostać otrzymany z substratu **7** oraz omawianego już  $\alpha, \alpha'$ -dibromo-p-ksylenu bez stosowania żadnego templaty z wydajnością 12% (reakcja trwająca 18 godzin w acetonitrylu). Jednakże zastosowanie templaty **8** (pochodnej bogatego w elektrony  $\pi$  hydrochinonu) owocuje zwiększeniem wydajności do 35% (przy czym czas reakcji wydłuża się do 9 dni. Natomiast zmiana rozpuszczalnika na DMF i zastosowanie bardzo wysokiego ciśnienia powoduje wzrost wydajności do 62%<sup>[10]</sup>.



Rysunek 4. Otrzymywanie kompleksu makrocyklicznego o strukturze węzła.

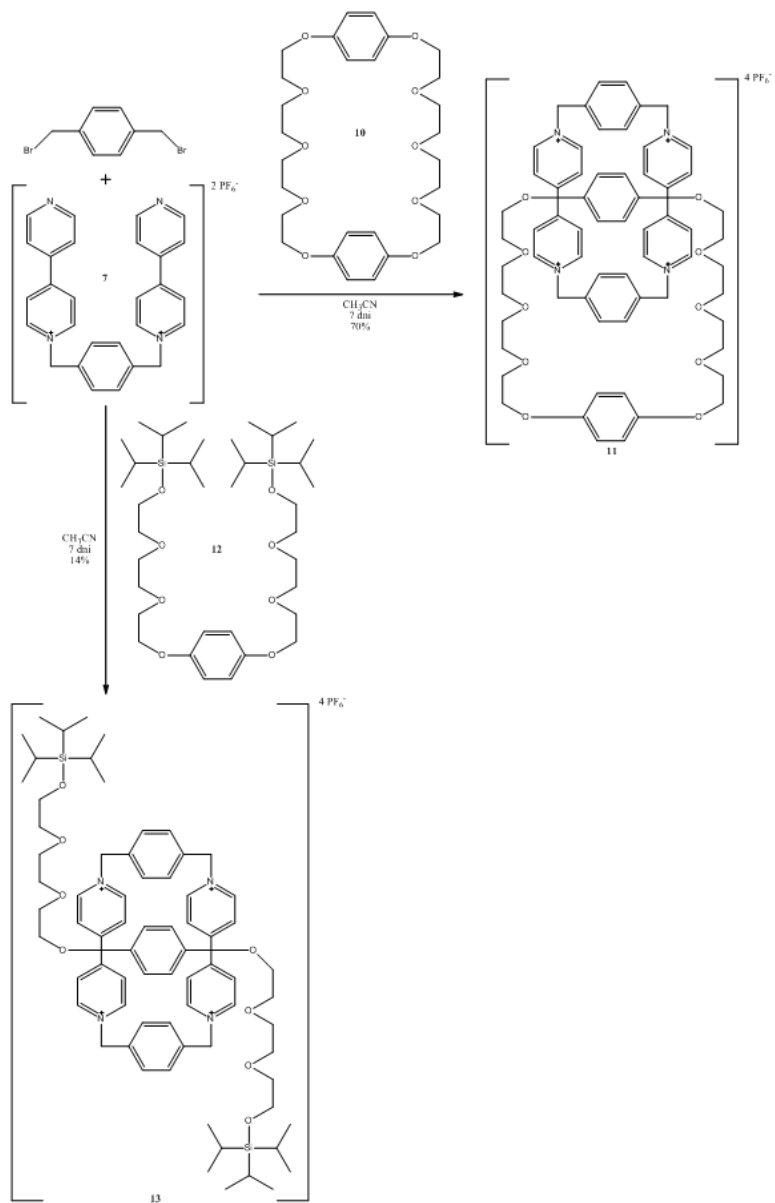
Metody syntezy katenanów oraz rotaksanów



Rysunek 5. Otrzymanie związku makrocyklicznego dzięki reakcji Mitsunobu.

Reakcja została użyta w celu otrzymania bardzo wielu rodzajów katenanów (**11**) oraz rotaksanów (**13**). Jak przedstawiono na Rysunku 6, w zależności od oczekiwanego produktu, stosuje się cykliczne pochodne hydrochinonu (**10**), lub ich łańcuchowe odpowiedniki (**12**)<sup>[10b,11]</sup>. Należy zwrócić uwagę, że w przypadku związków łańcuchowych niezbędna jest obecność na ich końcach rozbudowanych sterycznie grup, które po zakończeniu reakcji zapobiegną rozpadowi struktury rotaksan (w przypadku ich nieobecności, mielibyśmy do czynienia z tzw. pseudorotaksanem).





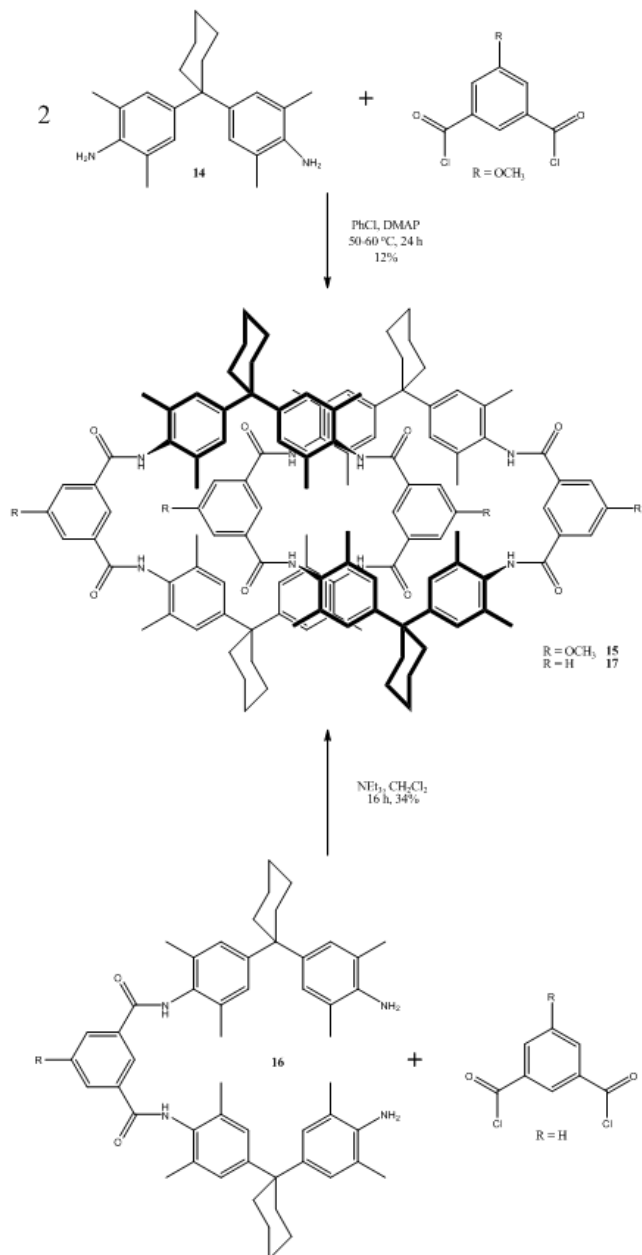
Rysunek 6. Otrzymywanie katenenów i rotaksanów w reakcji Mitsunobu.

### 2.3. Reakcja amin z chlorkami kwasowymi

Pierwsze przykłady syntez [2]katenanów, w przypadku których templatami były wiązania wodorowe zostały przedstawione w roku 1992. Pierwsza metoda syntezy<sup>[12]</sup> opierała się na reakcji dwóch cząsteczek diaminy **14** (z których jedna przejmowała rolę zasady) z jedną cząsteczką dichlorku 5-metoksyizoftaloilu w obecności katalitycznych ilości DMAP (4-(dimetyloamino)-pirydyny). W rezultacie otrzymano [2]katenan **15** z 12% wydajnością. Druga metoda syntezy<sup>[13]</sup> opierała się na wcześniejszym otrzymaniu związku **16**, co uprościło ostatni etap reakcji i zaowocowało zwiększeniem wydajności do 34%.

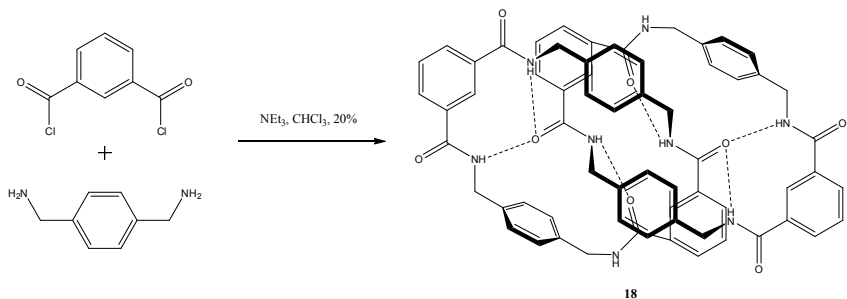
Późniejsze badania przy użyciu różnych chlorków kwasowych pozwoliły zaproponować mechanizm katenacji oparty na danych doświadczalnych<sup>[14]</sup>. Uznano, że na wstępnie utworzony związek makrocykliczny zostaje „nawleczony” związek utworzony z częściowo przereagowanego chlorku kwasowego i aminy. Ostatnim etapem jest cyklizacja wspomnianego „nawleczonego” substratu prowadząca do utworzenia grup amidowych.

Dłsze badania nad reakcjami chlorków kwasowych z aminami dowiodły, że [2]katenany można otrzymać ze zdumiewająco prostych odczynników. Przykładem takiej reakcji, jest kondensacja dichlorku izoftaloilu z p-ksylenodiaminą przeprowadzana w bezwodnym chloroformie z dodatkiem trietyloaminy jako zasady (Rysunek 8)<sup>[15]</sup>. [2]Katenan **18** otrzymano z 20% wydajnością bez konieczności zastosowania metod chromatograficznych w celu rozdzielenia reagentów. Ponadto stwierdzono, że idealne stężenie dla utworzenia [2]katenanu **18** wynosiło 0,02 M w bezwodnym chloroformie przy temperaturze 25°C. Użycie bardziej polarnych rozpuszczalników (np. DMF) powodowało powstawanie tylko produktów makrocyklicznych, bądź liniowych. Fakt ten można wytłumaczyć zrywaniem wiązań wodorowych między templatem, a związkiem makrocyklicznym przez cząsteczki rozpuszczalnika. Metodę zastosowano w celu otrzymania [2]rotaksanów z bardzo wysoką wydajnością. Przykładem takiej reakcji, jest zastosowanie dużego nadmiaru (4-5 krotnego) dichlorku izoftaloilu oraz p-ksylenodiaminy w stosunku do cząsteczki templatowej, jaką jest amid **19** (Rysunek 9). Wydajność 97% jest w tym przypadku zdumiewająca, zważywszy na fakt, iż reakcja wymaga kondensacji czterech cząsteczek dookoła piątej<sup>[16-19]</sup>.

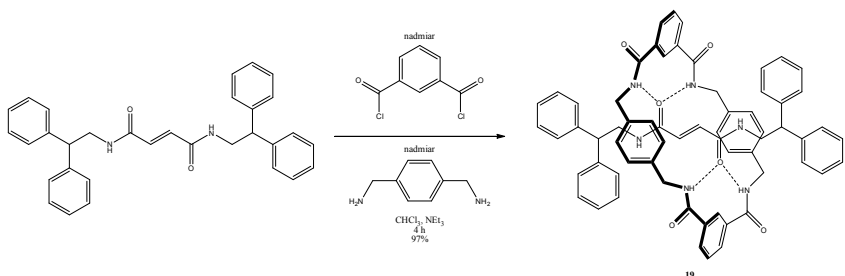


Rysunek 7. Synteza [2]katenanów z zastosowaniem wiązań wodorowych jako templaty.

## Metody syntezy katenanów oraz rotaksanów



Rysunek 8. Samoorganizujący się [2]katenan dzięki wiązaniom wodorowym.



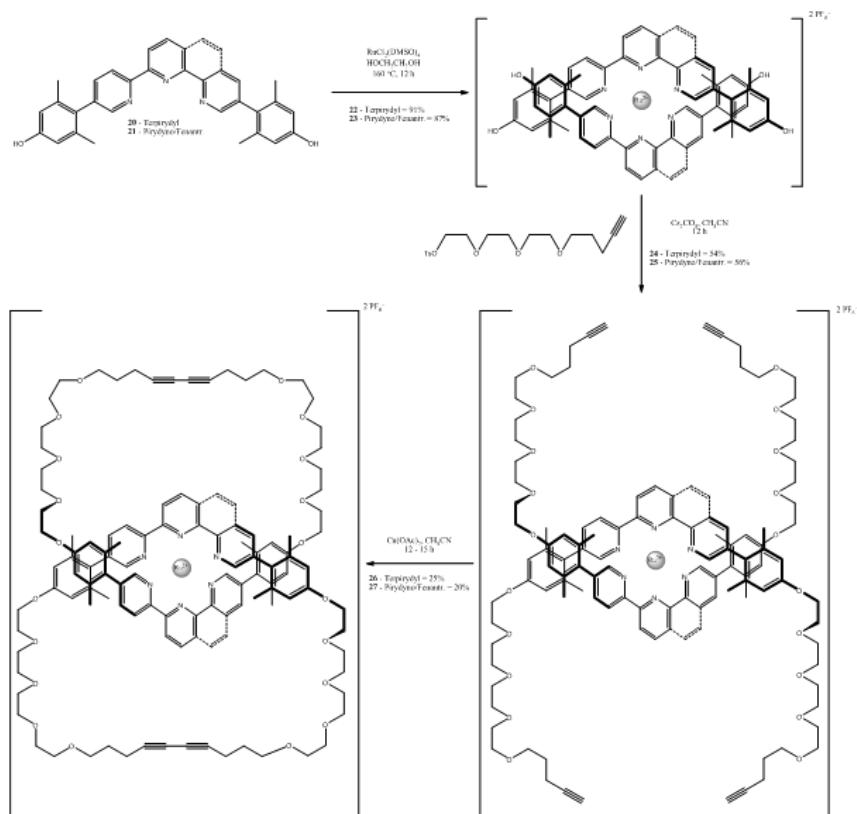
Rysunek 9. Synteza rotaksanu z wykorzystaniem wiązań wodorowych jako templat.

### 2.4. Utleniająca kondensacja alkinów

Utleniająca kondensacja dwóch terminalnych alkinów zachodząca pod wpływem kationów miedzi znana jest jako kondensacja Glaser-a, Eglinton-a, bądź Hay-a (w zależności od warunków prowadzenia reakcji)<sup>[20]</sup>. Sama reakcja jest łatwa do przeprowadzenia i jest zdecydowanie najczęściej wybraną metodą w przypadku otrzymywania związków makrocyklicznych, które miałyby zawierać ugrupowanie 1,3-butadiynowe w swojej strukturze<sup>[21]</sup>.

Przykładem wykorzystania tej reakcji jest otrzymanie [2]katenanów **26** i **27** z wydajnością między 20%, a 25% (Rysunek 10). Do syntezy użyto kationów rutenu(II), jako templat, natomiast ligandami w zależności od reakcji były pochodne terpiirydylu, bądź pochodne pirydino/fenantroliny<sup>[22]</sup>.

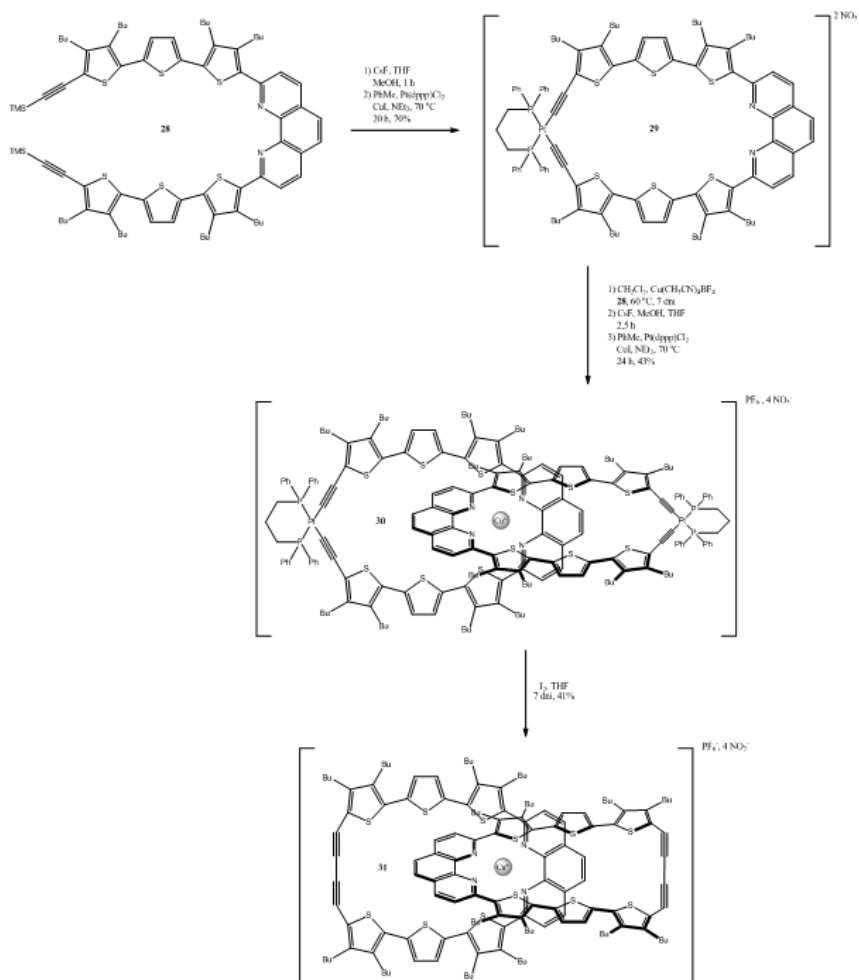
Kolejnym przykładem wykorzystania utleniającej kondensacji alkinów w celu otrzymania [2]katenanów jest otrzymanie związku **31** przy użyciu kationów miedzi(I) jako templat. W omawianej reakcji (Rysunek 11) jako odczynnik wywołujący kondensację wykorzystano kompleksy platyny, która w ostatnim etapie reakcji ulega utlenieniu pod wpływem jodu.



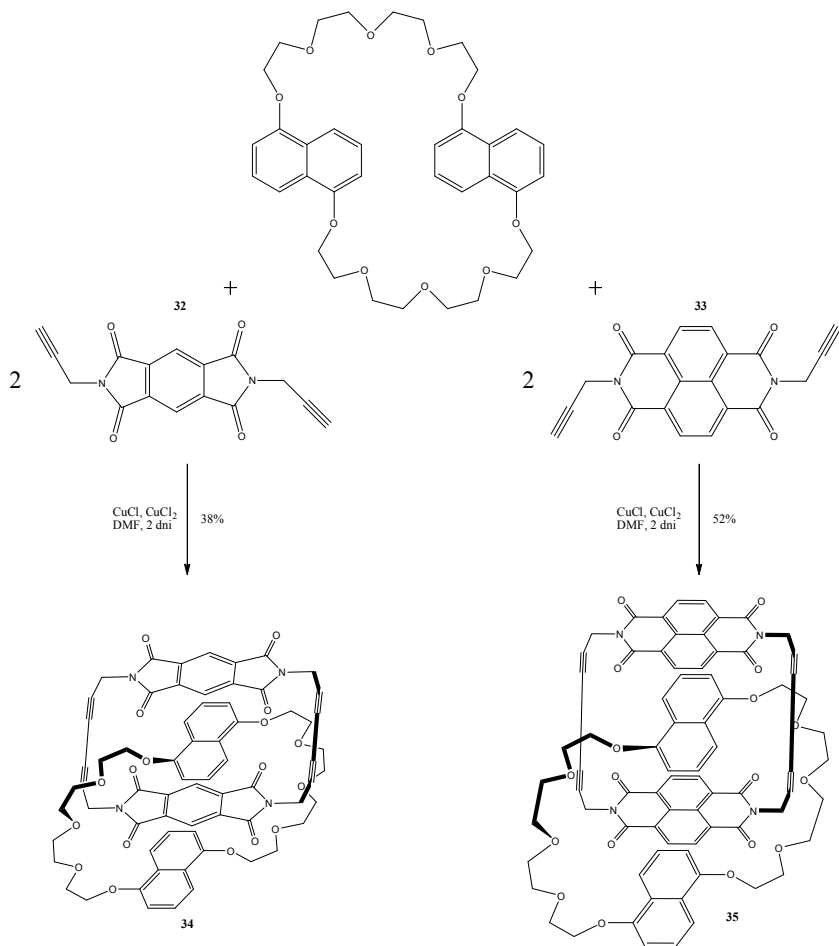
Rysunek 10. Synteza [2]katenanu templatowana kationami rutenu(II).

W 1997 roku zaprezentowano nowy rodzaj templat, który był oparty tylko na oddziaływaniach  $\pi$ - $\pi$  pomiędzy obojętnym elektrycznie donorem oraz akceptorem (Rysunek 12)<sup>[23]</sup>. W syntezie użyto dużego nadmiaru  $\text{CuCl}/\text{CuCl}_2$  w temperaturze  $50^\circ\text{C}$  w celu scyklinowania pochodnej diimidu kwasu 1,2,4,5-benzenotetrakarboksyłowego (**32**) oraz diimidowych pochodnych naftalenu (**33**) w obecności eteru koronowego posiadającego w swojej strukturze pierścienie naftalenowe. W rezultacie otrzymano [2]katenany **34** oraz **35** z wydajnością odpowiednio 25% i 33%. Późniejsze badania dowiodły, że zastosowanie temperatury pokojowej, zaowocowało zwiększeniem wydajności do odpowiednio 38% i 52% (mimo niecałkowitego rozpuszczenia się substratów w DMF)<sup>[24]</sup>.

Metody syntezy katenanów oraz rotaksanów



Rysunek 11. Synteza [2]katenanu z wykorzystaniem kompleksów platyny (dppp – 1,3-bis(difenylofosfino)propan).



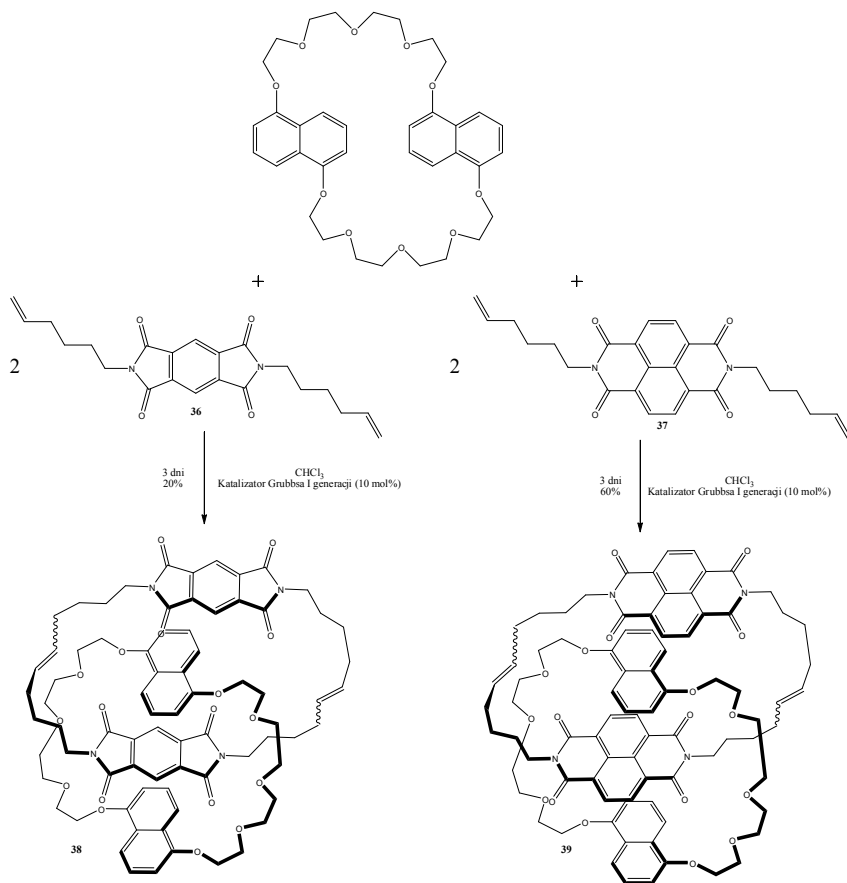
Rysunek 12. Synteza [2]katenanów z wykorzystaniem oddziaływań  $\pi$ - $\pi$  jako templat.

## 2.5. Metateza alkenów

Opracowanie reakcja metatezy alkenów, poza tym, że stało się dość istotne dla syntezy organicznej<sup>[25]</sup>, okazało się być jedną z bardziej użytecznych metod przy otrzymywaniu wzajemnie sprzężonych układów. Łatwy dostęp do katalizatorów, wysoka wydajność, łagodne warunki i duża tolerancja dla innych grup funkcyjnych stały się powodami, dla których metateza zamykania pierścienia (ang. Ring Closing Metathesis = RCM) stała się jedną z głównych reakcji pod-

czas otrzymywania katenanów oraz rotaksanów. Niestety jej wadą jest obecność izomerów E/Z w produktach jakimi są dwupodstawione alkeny, dlatego często po etapie cyklizacji stosuje się reakcje uwodornienia.

Podobnie jak w przypadku kondensacji alkinów, reakcję RCM zastosowano w celu scyklinowania obojętnych elektrycznie pochodnych diimidu kwasu 1,2,4,5benzenotetrakarboksyowego (**36**) oraz diimidowych pochodnych naftalenu (**37**; Rysunek 13)<sup>[26]</sup>. Dodanie LiI podczas syntezy [2]katenanu **38** spowodowało trzykrotny wzrost wydajności dzięki zwiększeniu oddziaływań templatowych<sup>[27]</sup>.

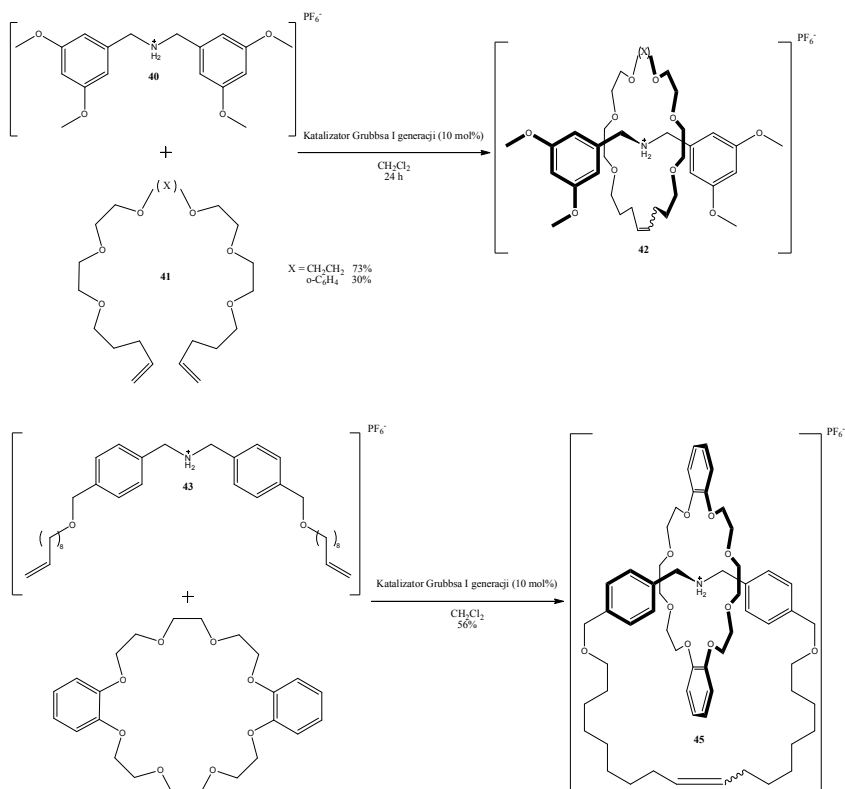


Rysunek 13. Zastosowanie reakcji RCM w syntezie [2]katenanów przy użyciu oddziaływań  $\pi$ - $\pi$  jako templat.

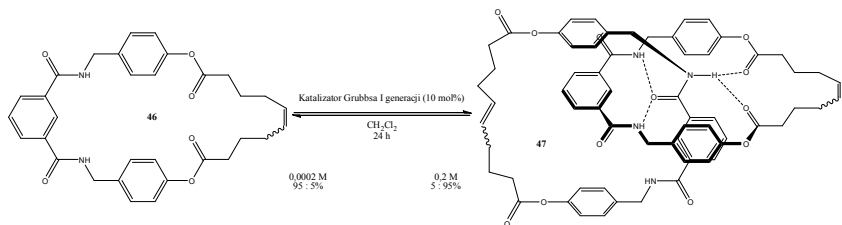


Kolejnym przykładem zastosowania reakcji RCM jest użycie jako templatoli soli dialkiloaminy w celu otrzymania katenanów albo rotaksanów (Rysunek 14). Produkty powiązane mechanicznie (**42**, **45**) otrzymano w wyniku cyklizacji eteru koronowego (**41**) lub dialkiloaminy (**43**) w zależności od oczekiwanego produktu<sup>[28,29]</sup>. Z reguły najwyższe wydajności obserwowano dla reakcji w których stężenia obu reagentów były sobie równe.

Przykładem wykorzystania reakcji RCM jest równowagowy proces tworzenia się katenanu **47** ze związku makrocyklicznego **46**, którego wydajność w danej temperaturze w olbrzymim stopniu zależy od stężenia (Rysunek 15)<sup>[30]</sup>.



Rysunek 14. Otrzymywanie katenanów i rotaksanów przy użyciu soli dialkiloamoniowych.



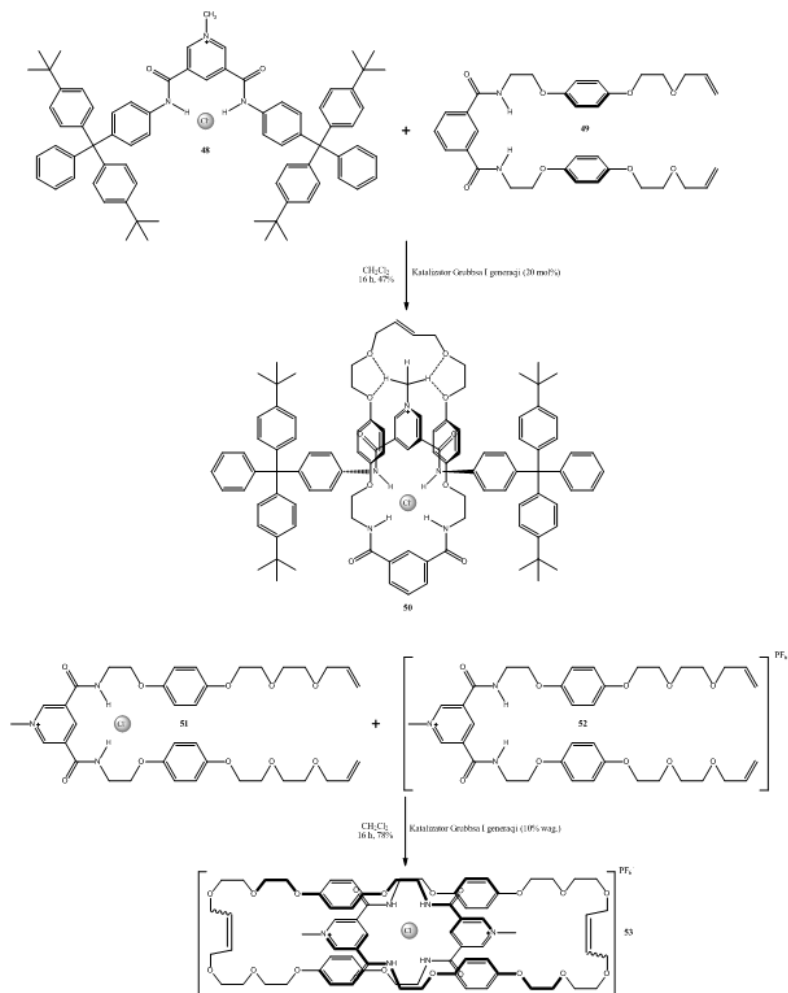
Rysunek 15. Odwracalna reakcja RCM z użyciem wiązań wodorowych jako templat.

W reakcji RCM udało się również z powodzeniem zastosować anion jako templat (Rysunek 15). Metoda ta, znalazła zastosowanie przy syntezie zarówno [2]rotaksanu (**50**) jak i [2]katenanu (**53**) z odpowiednich związków o strukturze liniowej (odpowiednio **48**, **49** oraz **51**, **52**)<sup>[31, 32]</sup>. W tym przypadku określone ułożenie związków organicznych wokół anionu jest efektem tworzenia się par jonowych oraz powstawania wiązań wodorowych. Dodatkowo ligand acykliczny został zaprojektowany tak, aby pod wpływem oddziaływań niekowalencyjnych z drugim ligandem jego reaktywne końce zbliżyły się do siebie na tyle, aby umożliwić reakcję cyklizacji. Brak anionów chlorkowych powodował, że w mieszaninie poreakcyjnej praktycznie nie stwierdzano obecności [2]rotaksanu albo [2]katenanu.

## 2.6. Tworzenie imin/aminowanie redukcyjne

Tworzenie zasad Schiffa przez kondensację amin pierwszorzędowych z aldehydami lub ketonami znalazło zastosowanie w syntezie wzajemnie sprzężonych układów<sup>[33]</sup>. Odwracalna natura takiego połączenia jest niezwykle użyteczna w trakcie syntezy z wykorzystaniem templaty, gdyż pozwala otrzymać określony, termodynamicznie najbardziej stabilny produkt dzięki dobraniu odpowiednich substratów. Równowagę reakcji można w takim przypadku przesunąć na korzyść tworzenia produktu poprzez zastosowanie kolejnego etapu syntezy, w którym otrzymana imina ulega redukcji.

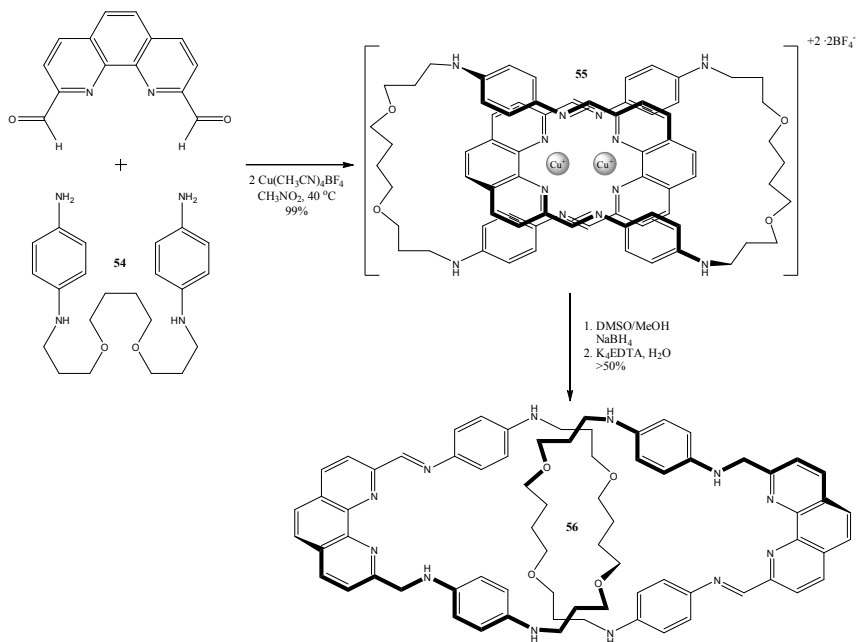
Jednym z przykładów wykorzystania tej reakcji jest samoorganizujący się [2]katenat **55** (Rysunek 17)<sup>[34]</sup>, którego podstawą jest kompleks miedzi z pochodną fenantrolinodiiminy<sup>[35]</sup>. Otrzymano go w niemal stechiometrycznej ilości, dzięki reakcji diaminy **54** z 2,9-diformylofenantroliną oraz  $\text{Cu}(\text{MeCN})_4\text{BF}_4$ . Po reakcji redukcji przy użyciu  $\text{NaBH}_4$  oraz usunięciu jonów centralnych za pomocą EDTA uzyskano odpowiadający mu [2]katenan **56**. Produkt ten nie został oczyszczony ze względu na niewielką skalę reakcji, jednakże wydajność oszacowano na >50%.



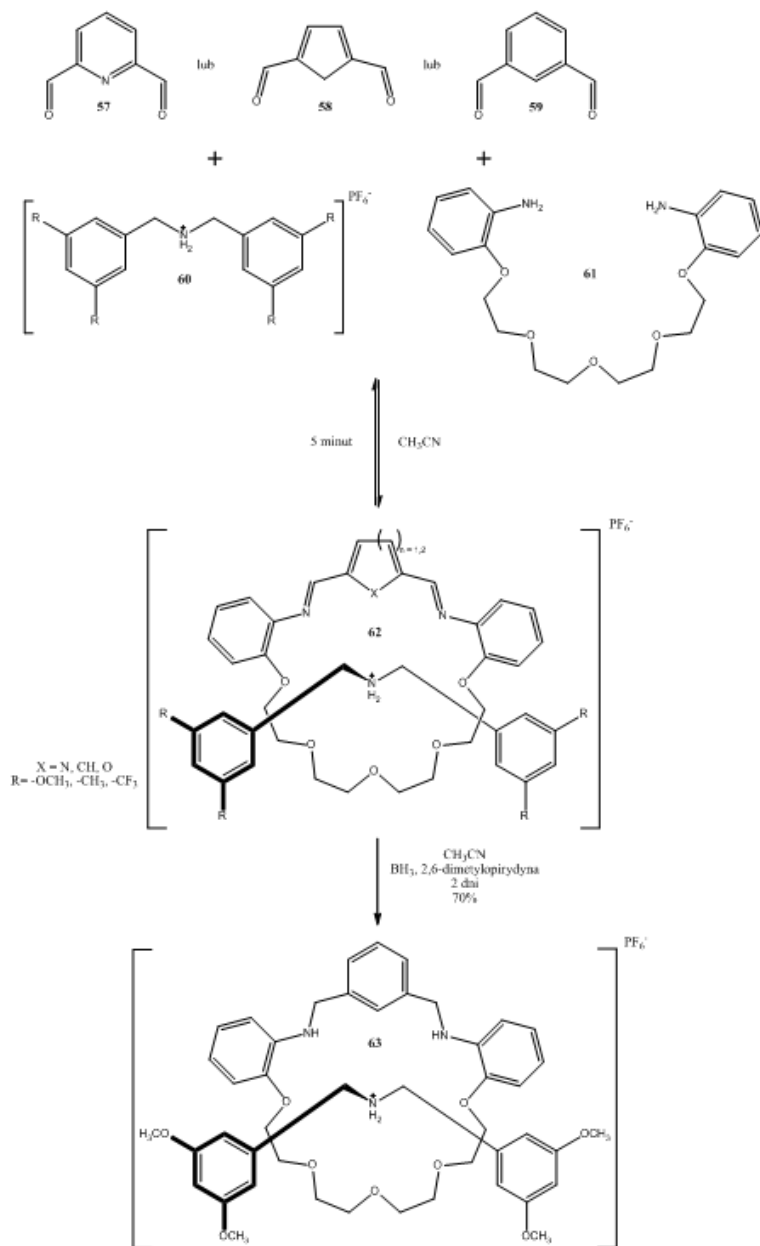
Rysunek 16. Templatowane anionem tworzenie [2]rotaksanów oraz [2]katenanów.

Kolejnym przykładem zastosowania reakcji tworzenia imin w otrzymywaniu rotaksanów jest kondensacja diaminy pierwszorzędowej (61) z dialdehydami (57-59; Rysunek 18). Jako templat wykorzystuje się pochodne omawianej już wcześniej soli dialkiloaminy (60)<sup>[36]</sup>. Niestety redukcja do grup aminowych za pomocą  $\text{BH}_3$  umożliwiła otrzymanie jedynie rotaksanu (63), który wcześniej uzyskano z kondensacji 2,6diformylopirydny (57)<sup>[36a]</sup>.

Jednym z najbardziej spektakularnych zastosowań reakcji tworzenia imin w chemii supramolekularnej jest otrzymanie molekularnych pierścieni Borromina (ang. Borromean Rings)<sup>[37]</sup>. Omawiane pierścienie składają się z trzech okręgów połączonych ze sobą w taki sposób, iż rozcięcie któregoś z nich umożliwia swobodne rozdzielenie pozostałych okręgów. Jednakże najbardziej zaskakującym elementem w przypadku molekularnych pierścieni Borromina jest sam etap syntezy (Rysunek 19). Oczekiwany produkt otrzymuje się w wyniku jednego etapu syntezy, podczas którego dochodzi do kondensacji sześciu cząsteczek diaminy (**64**), sześciu cząsteczek 2,6-diformylopirydyny oraz sześciu dwudodatnich kationów metali przejściowych. Wydajność reakcji waha się w tym przypadku od 36% przy wykorzystaniu jonów  $\text{Co}^{2+}$  do zdumiewających 95% przy zastosowaniu jonów  $\text{Zn}^{2+}$ . Otrzymany związek **65** poddano następnie redukcji ( $\text{NaBH}_4$ ) oraz usunięto metal przy pomocy EDTA uzyskując „czyste” pierścienie Borromina (**66**)<sup>[38]</sup>. Interesujący może być fakt, iż w przypadku zastosowania mieszaniny metali 1:1 ( $\text{Cu}^{2+}$  oraz  $\text{Zn}^{2+}$ ) wyizolowanym produktem jest podwójnie spleciony [2]katenan **67**<sup>[39]</sup>.

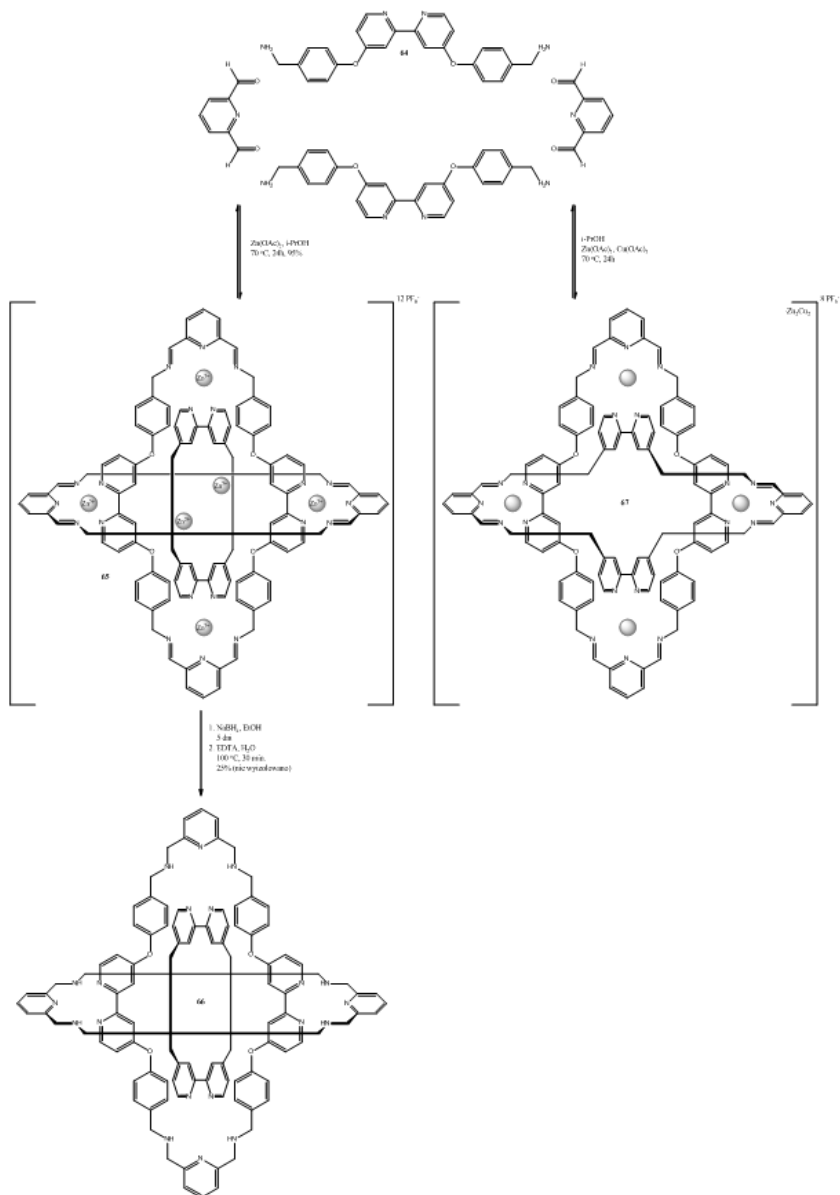


Rysunek 17. Templatowana kationami miedzi(I) synteza samoorganizującego się [2]katenanu.



Rysunek 18. Synteza [2]rotaksanów przy użyciu zasad Schiffa.

### Metody syntezy katenanów oraz rotaksanów

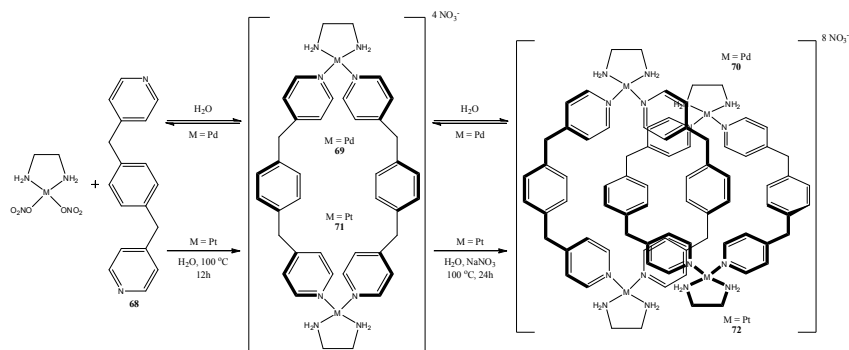


Rysunek 19. Otrzymywanie molekularnych pierścieni Borromina oraz podwójnie splecionego [2]katenanu.

## 2.7. Koordynacja metal-ligand

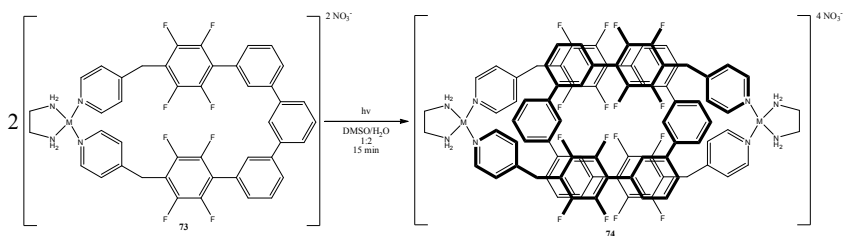
Stosunkowo łatwą metodą syntezy, która okazuje się być użyteczna podczas otrzymywania cząsteczek połączonych wiązaniem mechanicznym jest tworzenie związków koordynacyjnych opartych o oddziaływanie metal-ligand. Największą wadą zastosowania tej metody jest wysoka labilność wiązań występujących między metalem, a ligandem organicznym. Oznacza to, dopóki nie zastosuje się czynnika, który zmieni kinetyczną stabilność połączenia metal-ligand, ilość produktu, jaka wytworzy się podczas syntezy będzie uzależniona od wartości jaką przyjmuje stała równowagi dla określonych warunków reakcji. Często okazuje się, że zmiana składu mieszaniny reakcyjnej (np. zmiana stężenia) pozwala uzyskać mieszaninę pożądanego produktu oraz pozostałych reagentów lub produktów ubocznych.

Przykładem wykorzystania tej metody jest otrzymanie [2]katenanów dzięki samoasocjacji dwóch metalocyklicznych pierścieni pod wpływem oddziaływań hydrofobowych (Rysunek 20)<sup>[40]</sup>. Makrocycliczny związek **69** oraz [2]katenan **70**, oba zawierające w swojej strukturze pallad, w temperaturze pokojowej pozostają ze sobą w stanie równowagi termodynamicznej. Z kolei w przypadku analogicznych związków, opierających swoją budowę na platynie, w roztworze wodnym w temperaturze 100 °C udaje się jedynie otrzymać niezwiązane pierścienie makrocycliczne (**71**). Dodanie 5 M NaNO<sub>3</sub>, a następnie ogrzewanie całości w temperaturze 100 °C przez 24 godziny prowadzi do ilościowego otrzymania [2]katenanu **72**, który następnie można wytrącić w postaci soli chloranowej(VII). Metodę tą opisano jako „molecular lock”, gdyż otrzymany w ten sposób katenan nie ulega rozdzieleniu nawet podczas ogrzewania w temperaturze 100 °C.



Rysunek 20. Przykład odwracalnego i nieodwracalnego otrzymywania [2]katenanów z udziałem wiązań metalligand.

Omawiana procedura została rozszerzona do otrzymywania katenanów w temperaturze pokojowej<sup>[41]</sup>. Okazało się, że roztwór związku **73** jest kinetycznie stabilny w mieszaninie 1:2 DMSO- $d_6$ /D $_2$ O, jednakże nie obserwuje się powstawania produktu katenacji (Rysunek 21). Dopiero po naświetleniu lampą UV (lampa rtęciowa;  $330 \pm 70$  nm filtr środkowoprzepustowy) związek **73** uległ ilościowemu przekształceniu w odpowiadający mu [2]katenan **74**. Rozpuszczenie produktu w niewodnym rozpuszczalniku (MeCN/MeOH 1:1), powinno zaowocować rozkładem katenanu, jeżeli wymiana ligandów byłaby możliwa. Okazało się, że związek w tych warunkach jest stabilny, aż do momentu ponownego naświetlenia go promieniami UV, co skutkuje rozkładem do początkowego substratu **73**.

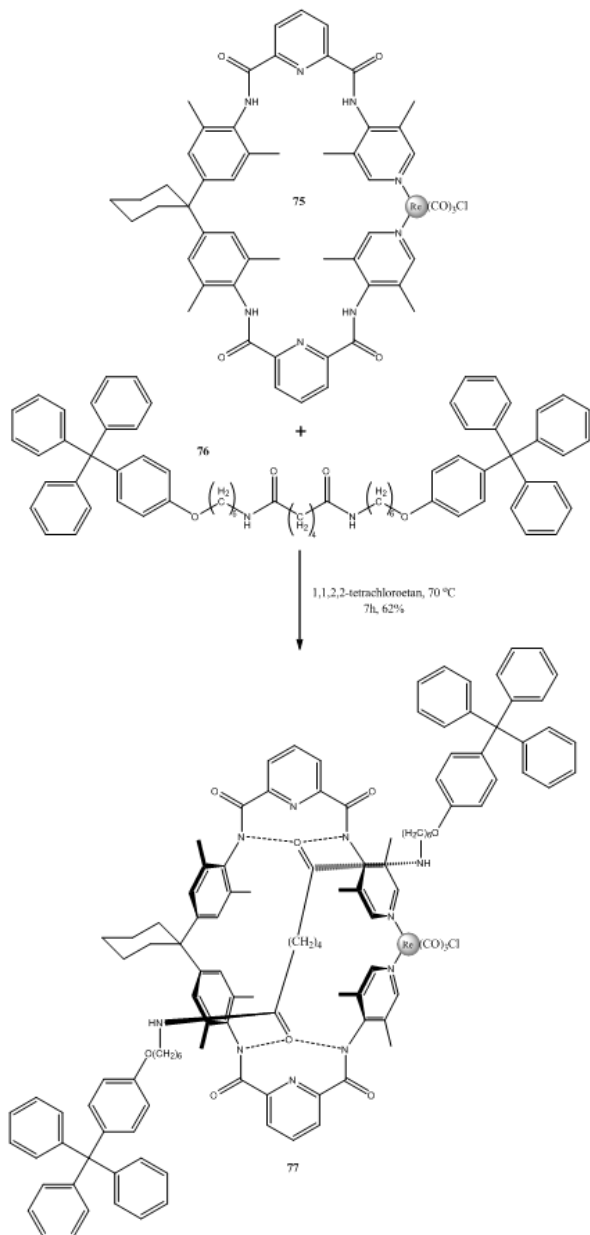


Rysunek 21. Zależne od promieniowania UV tworzenie [2]katenanu.

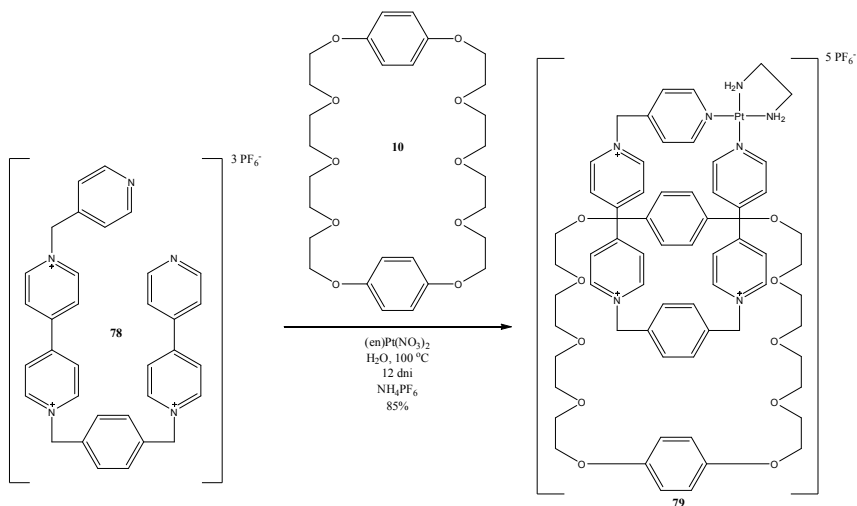
Kolejnym przykładem zastosowania oddziaływań metal-ligand jest otrzymanie kompleksu **75**, który swoją strukturą jest bardzo podobny do pojedynczego pierścienia w omawianym już związku **17** (prezentowanym na Rysunku 7)<sup>[42]</sup>. Po dodaniu templaty **76** omawiany pierścień metalocykliczny „zawija się” wokół niego, co owocuje powstaniem [2]rotaksanu **77** (Rysunek 22), który jest stabilny w temperaturze pokojowej i może zostać oczyszczony za pomocą chromatografii wykonanej na silikażelu.

Za pomocą trwałych połączeń metal-ligand udało się również otrzymać [2]katenan z pochodnych omawianego wcześniej parakwatu<sup>[43]</sup>. W tym przypadku jedną z jego pochodnych (**78**) ogrzewano ze związkiem **10** oraz (en)Pt(NO $_3$ ) $_2$  przez 12 dni w temperaturze 100 °C. W efekcie otrzymano [2]katenan **79** z 85% wydajnością (Rysunek 23).





Rysunek 22. Tworzenie [2]rotaksanu dzięki zastosowaniu trwałych oddziaływań metal-ligand.

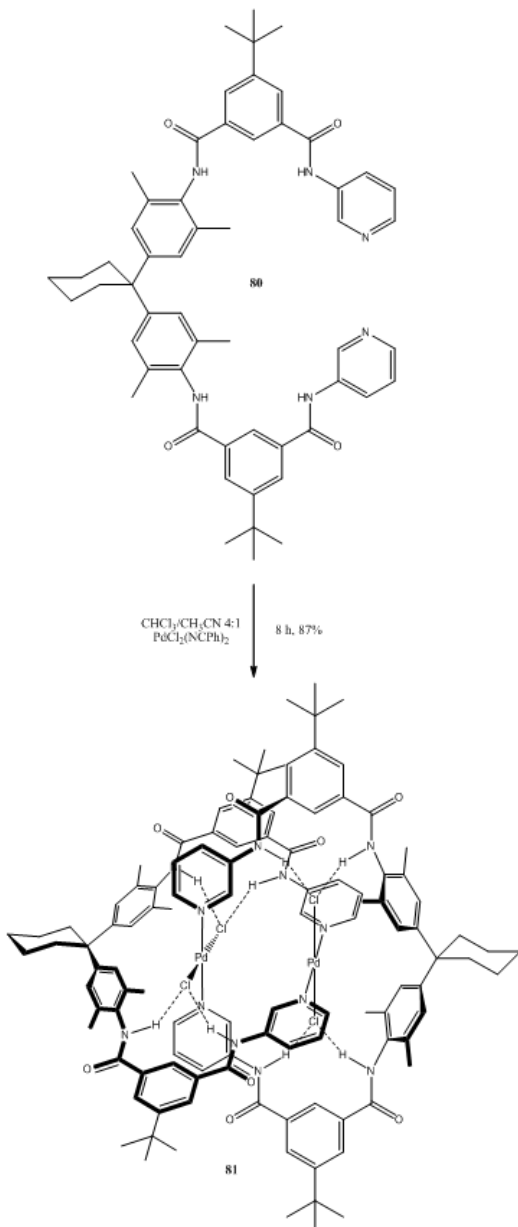


Rysunek 23. Tworzenie metalocyklicznego [2]katenanu z wykorzystaniem pochodnej parakwatu.

Niewielką modyfikacją przedstawionych powyżej metod jest zastosowanie metalu, który w trakcie reakcji będzie zachowywał się zarówno jako templat, jak i fragment pierścienia makrocyclicznego. Templat opiera się na związkach typu  $PdCl_2L_2$ , w których funkcję lignadu (L) spełniają grupy pirydynowe danej cząsteczki związku **80**, natomiast ligandy chlorkowe tworzą wiązania wodorowe z grupami izoftalimidowymi drugiej cząsteczki tego samego związku<sup>[44]</sup>. W efekcie tworzy się [2]katenan **81**, który jest niezwykle stabilny, mimo obecności labilnych wiązań koordynacyjnych Pd-N. W razie potrzeby katenan ten można poddać chromatografii, a ponadto jest on stabilny w wielu różnych rozpuszczalnikach. Jednakże dodanie  $>1$  M DMSO powoduje rozpad związku do początkowych substratów.

### 3. Podsumowanie

W przeciągu ostatnich kilkadziesiąt lat opracowano wiele różnorodnych metod pozwalających na otrzymanie cząsteczek wzajemnie sprzężonych z zadawalającą wydajnością. Metody te opierają się zarówno na nowych technikach syntezy (np. metateza alkenów), jak i wykorzystaniu coraz doskonalszych i bardziej wydajnych templatów. Najprawdopodobniej, dalsze zainteresowania chemików, będą dotyczyły zrozumienia i ilościowego opisu czynników, które prowadzą do uzyskania konkretnych fizycznie związanych molekuł (np. pierścieni Borromina) oraz opracowania sposobów na otrzymanie związków o



Rysunek 24. Otrzymywanie [2]katenanu, w którym metal jest równocześnie templatem oraz fragmentem pierścienia makrocyklicznego.

określonych właściwościach fizykochemicznych. Dla opisywanych związków znaleziono już wiele potencjalnych zastosowań, głównie do budowy tzw. maszyn molekularnych, w których dopatruje się przyszłości nowoczesnej nanotechnologii.

### **Podziękowania:**

Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2009-2012, jako projekt badawczy (N 204 – 028636).

### **Literatura:**

1. Kay, E.R., Leigh, D.A. and Zerbetto, F. (2007) *Angew. Chem.*, 119, 72-196; *Angew. Chem. Int. Ed.*, 46, 72-161.
2. J.-P. Sauvage and C. Dietrich-Buchecker (eds) (1999) *Molecular Catenanes, Rotaxanes and Knots; A Journey Through the World of Molecular Topology*, Wiley-VCH, Weinheim; (b) Schill, G. (1971) *Catenanes, Rotaxanes, and Knots*, Academic Press, New York.
3. Dietrich-Buchecker, C.O. and Sauvage, J.-P. (1987) *Chem. Rev.*, 87, 795-810.
4. (a) Pedersen, C.J. (1967) *J. Am. Chem. Soc.*, 89, 7017-7036; (b) G.W. Gokel (ed.) (1991) *Crown Ethers and Cryptands*, Royal Society of Chemistry, Cambridge.
5. Dietrich-Buchecker, C.O. and Sauvage, J.-P. (1983) *Tetrahedron Lett.*, 24, 5095-5098.
6. Dietrich-Buchecker, C.O. and Sauvage, J.-P. (1984) *J. Am. Chem. Soc.*, 106, 3043-3045.
7. (a) Dietrich-Buchecker, C.O., Sauvage, J.-P. and Kern, J.-M. (1989) *Angew. Chem.*, 101, 192-194; *Angew. Chem. Int. Ed.*, 28, 189-192; (b) Dietrich-Buchecker, C.O. and Sauvage, J.-P. (1992) *New. J. Chem.*, 16, 931-942.
8. (a) Allwood, B.L., Shahriari-Zavareh, H., Stoddart, J.F. and Williams, D.J. (1987) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1058-1061; (b) Allwood, B.L., Spencer, N. Shahriari-Zavareh, H., Stoddart, J.F. and Williams, D.J. (1987) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1061-1064; (c) Allwood, B.L., Spencer, N. Shahriari-Zavareh, H., Stoddart, J.F. and Williams, D.J. (1987) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1064-1066.
9. (a) Odell, B., Reddington, M.V., Slawin, A.M.Z., Spencer, N., Stoddart, J.F. and Williams, D.J. (1988) *Angew. Chem.*, 100, 1605-1608; (1988) *Angew. Chem. Int. Ed.*, 27, 1547-1550.
10. (a) Brown, C.L., Philp, D. and Stoddart, J.F. (1991) *Synlett*, 462-464;

- (b) Anelli, P. L., Ashton, P.R., Ballardini, R., Balzani, V., Delago, M., Gandolfi, M.T., Goodnow, T.T., Kaifer, A.E., Philip, D., Pietraszkiewicz, M., Prodi, L., Reddington, M.V., Slawin, A.M.Z., Spencer, N., Stoddart, J.F., Vincent, C. and Williams, D.J. (1992) *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 193-218.
11. (a) Brow, C.L., Philp, D. and Stoddart, J.F. (1991) *Synlett*, 459-461; (b) Philp, D. and Stoddart, J.F. (1991) *Synlett.*, 445-458; (c) Ashton, P.R., Grognez, M., Slawin, A.M.Z., Stoddart, J.F. and Williams, D.J. (1991) *Tetrahedron Lett.*, 32, 6235-6238; (d) Brown, C.L., Philp, D., Spencer, N. and Stoddart, J.F. (1992) *Israel J. Chem.*, 32, 61-67.
12. (a) Hunter, C.A., (1992) *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 5303-5311; (b) Carver, F.J., Hunter, C.A. and Shannon, R.J. (1994) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1277-1280; (c) Adams, H., Carver, F.J. and Hunter, C.A. (1995) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 809-810.
13. (a) Vögtle, F., Meier, S. and Hoss, R. (1992) *Angew. Chem.*, 104, 1628-1631; *Angew. Chem. Int. Ed.*, 31, 1619-1622; (b) Otten-Hildebrandt, S., Meier, S., Schmidt, W. and Vögtle, F. (1994) *Angew. Chem.*, 106, 1818-1821; *Angew. Chem. Int. Ed.*, 33, 1767-1770.
14. Otten-Hildebrandt, S., Nieger, M., Rissanen, K., Rouvinen, J., Meier, S., Harder, G. and Vögtle, F. (1995) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 777-778.
15. Johnston, A.G., Leight, D.A., Pritchard, R.J. and Deegan, M.D. (1995) *Angew. Chem.*, 107, 1324-1327; *Angew. Chem. Int. Ed.*, 34, 1209-1212.
16. Johnston, A.G., Leight, D.A., Murphy, A., Smart, J.P. and Deegan, M.D. (1996) *J. Am. Chem. Soc.*, 118, 10662-10663.
17. Leight, D.A., Murphy, A., Smart, J.P. and Slawin, A.M.Z. (1997) *Angew. Chem.*, 109, 752-756; *Angew. Chem. Int. Ed.*, 36, 728-732.
18. Bermudez, V., Capron, N., Gase, T., Gatti, F.G., Kajzar, F., Leigh, D.A., Zerbetto, F. and Zhang, S. (2000) *Nature*, 406, 608-611.
19. Gatti, F.G., Leigh, D.A., Nepogodiev, S.A., Slawin, A.M.Z., Teat, S.J. and Wong, J.K.Y. (2001) *J. Am. Chem. Soc.*, 123, 5983-5989.
20. Siemens, P., Livingston, R.C. and Diederich, F. (2000) *Angew. Chem.*, 112, 2740-2767; *Angew. Chem. Int. Ed.*, 39, 2632-2657.
21. Maraval, V. and Chauvin, R. (2006) *Chem. Rev.*, 106, 5317-5343.
22. Loren, J.C., Gantzel, P., Linden, A. and Siegel, J.S. (2005) *Org. Biomol. Chem.*, 3, 3105-3116.
23. Hamilton, D.G., Sanders, J.K.M., Davies, J.E., Clegg, W. and Teat, S.J. (1997) *Chem. Commun.*, 897-898.
24. Hamilton, D.G., Davies, J.E., Prodi, L. and Sanders, J.K.M. (1998)

- Chem. Eur. J.*, 4, 608-620.
25. (a) Chauvin, Y. (2006) *Angew. Chem.*, 118, 3824-3831; *Angew. Chem. Int. Ed.*, 45, 3740-3747; (b) Schrock, R.R. (2006) *Angew. Chem.*, 118, 3832-3844; *Angew. Chem. Int. Ed.*, 45, 3748-3759; (c) Grubbs, R.H., (2006) *Angew. Chem.*, 118, 3845-3850; *Angew. Chem. Int. Ed.*, 45, 3760-3765.
  26. Hamilton, D.G., Feeder, N., Teat, S.J. and Sanders, J.K.M. (1998) *New J. Chem.*, 1019-1021.
  27. Kaiser, G., Jarrosson, T., Otto, S., Ng, Y.-F., Bond, A.D. and Sanders, J.K.M. (2004) *Angew. Chem.*, 116, 1993-1996; *Angew. Chem. Int. Ed.*, 43, 1959-1962.
  28. (a) Kilbinger, A.F.M., Cantrill, S.J., Waltman, A.W., Day, M.W. and Grubbs, R.H. (2003) *Angew. Chem.*, 115, 3403-3407; *Angew. Chem. Int. Ed.*, 42, 3281-3285; (b) Guidry, E.N., Cantrill, S.J., Stoddart, J.F. and Grubbs, R.H. (2005) *Org. Lett.*, 7, 2129-2132.
  29. Iwamoto, H., Itoh, K., Nagamiya, H. and Fukazawa, Y. (2003) *Tetrahedron Lett.*, 44, 5773-5776.
  30. Kidd, T.J., Leigh, D.A. and Wilson, A.J. (1999) *J. Am. Chem. Soc.*, 121, 1599-1600.
  31. (a) Wisner, J.A., Beer, P.D., Drew, M.G.B. and Sambrook, M.R. (2002) *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 12469-12476; (b) Sambrook, M.R., Beer, P.D., Lankshear, M.D., Ludlow, R.F. and Wisner, J.A. (2006) *Org. Biomol. Chem.*, 4, 1529-1538.
  32. (a) Sambrook, M.R., Beer, P.D., Wisner, J.A., Paul, R.L. and Cowley, A.R. (2004) *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 15364-15365; (b) Ng, K.-Y., Cowley, A.R. and Beer, P.D. (2006) *Chem. Commun.*, 3676-3678.
  33. Borisova, N.E., Reshetova, M.D. and Ustyniyuk, Y.A. (2007) *Chem. Rev.*, 107, 46-79.
  34. Hutin, M., Schalley, C.A., Bernardinelli, G. and Nitschke, J.R. (2006) *Chem. Eur. J.*, 12, 4069-4076.
  35. Ziessel, R., Harriman, A., Suffert, J., Youinou, M.-T., De Cian, A. and Fischer, J. (1997) *Angew. Chem.*, 109, 2621-2624; *Angew. Chem Int. Ed.*, 36, 2509-2511.
  36. (a) Glink, P.T., Oliva, A.I., Stoddart, J.F., White, A.J.P. and Williams, D.J. (2001) *Angew. Chem.*, 113, 1922-1927; *Angew. Chem. Int. Ed.*, 40, 1870-1875; (b) Horn, M., Ihringer, J., Glink, P.T. and Stoddart, J.F. (2003) *Chem. Eur. J.*, 9, 4046-4054.
  37. (a) Chichak, K.S., Cantrill, S.J., Pease, A.R., Chiu, S.-H., Cave, H.W.V., Antwood, J.L. and Stoddart, J.F. (2004) *Science*, 304, 1308-1312; (b) Chichak, K.S., Cantrill, S.J. and Stoddart, J.F. (2005) *Chem. Commun.*,

- 3391-3393.
38. Peters, A.J., Chichak, K.S., Cantrill, S.J. and Stoddart, J.F. (2005) *Chem. Commun.*, 3394-3396.
  39. Pentecost, C.D., Chichak, K.S., Peters, A.J., Cave, G.W.V., Cantrill, S.J. and Stoddart, J.F. (2007) *Angew Chem.*, 119, 222-226; *Angew. Chem. Int. Ed.*, 46, 218-222.
  40. Fujita, M., Ibukuro, F., Hagihara, H. and Ogura, K. (1994) *Nature*, 367, 720-723.
  41. Yamashita, K.-i., Kawano, M. and Fujita, M. (2007) *J. Am. Chem. Soc.*, 129, 1850-1851.
  42. (a) Chang, S.-Y., Jang, H.-Y. and Jeong, K.-S. (2003) *Chem. Eur. J.*, 9, 1535-1541; (b) Chang, S.-Y. and Jeong, K.-S. (2003) *J. Org. Chem.*, 68, 4014-4019.
  43. Chas, M., Pia, E., Toba, R., Peinador, C. and Quintela, J.M. (2006) *Inorg. Chem.*, 45, 6117-6119.
  44. (a) Hunter, C. (1991) *J. chem. Soc., Chem. Commun.*, 749-751; (b) Hunter, C. and Puvic, D.H. (1992) *Angew. Chem.*, 104, 779-782; *Angew. Chem. Int. Ed.*, 31, 792-795.





## Rozdział II

### Rotaksany – molekularne urządzenia

Leszek Zalewski, Tadeusz Ossowski, Paweł Niedziałkowski,  
Anita Stefańska

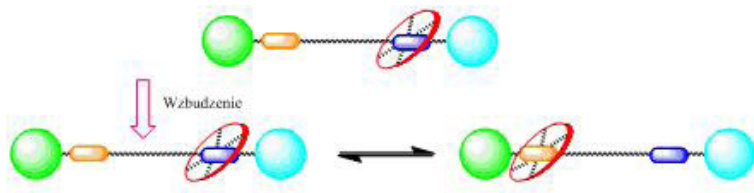
*Uniwersytet Gdański, Wydział Chemii, ul. Sobieskiego 18/19,  
80-952 Gdańsk*

Urządzenia świata makroskopowego używają energii świetlnej bądź elektrycznej do przechowywania, przekazywania bądź odbierania informacji. Oczywiście jest to, że elementy chemicznych komputerów (urządzeń) nie muszą działać w sposób analogiczny do tych zbudowanych na bazie procesorów krzemowych, lecz wydaje się, że działanie ich, na poziomie cząsteczkowym, będzie bazowało na bodźcach pochodzenia elektrycznego bądź świetlnego.<sup>1,2</sup> Znanych jest obecnie wiele grup związków, które mogą przekazywać elektrony bądź fotony, generować elektrony lub fotony po uprzednim pobudzeniu za pomocą metod chemicznych, elektrochemicznych lub fotochemicznych. Dlatego oczekuje się, że procesy zachodzące w cząsteczkach, będą znajdować coraz więcej zastosowań w projektowaniu i budowaniu nowoczesnych urządzeń elektronicznych.

W ciągu ostatnich lat przeprowadzono wiele badań, demonstrujących użyteczność procesów zachodzących na poziomie molekularnym w procesach przetwarzania informacji.<sup>3,4,5,6</sup> Mimo, iż badania te rozwijają się obecnie bardzo szybko, to skonstruowanie pracującego urządzenia chemicznego (z ang. *Molecular Devices*) pozostaje nadal w dalekiej przyszłości. Jednakże w chwili obecnej badania nad konstruowaniem elementów urządzeń elektronicznych, takich jak: przełączniki, przekaźniki, włączniki, baterie są wysoce zaawansowane i stanowią obiekt coraz szerszego zainteresowania ze strony chemików<sup>7,8</sup>

Większość badań nad systemami molekularnymi zdolnymi do pełnienia funkcji podobnych do tych, które wykonują urządzenia świata makroskopowego, dotyczy fotoindukowanego transferu ładunku bądź elektronów w układach supramolekularnych. System molekularny przedstawiony w tej części pracy to

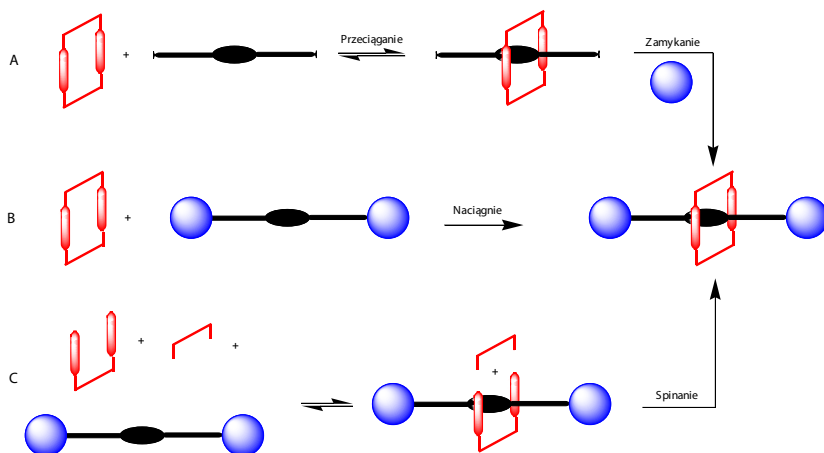
rotaksany. Nazwa rotaksany pochodzi od łacińskich słów *rota* (koło) i *axis* (oś, nić).



Rysunek 1. Schemat rotaksanu, oraz mechanizm ich działania.

Wzбудzenie

nici.<sup>12</sup> Ogólnie, strategia preparatywna prowadząca do zadawalających wydajności, związana jest z wykorzystaniem efektu templatowego, który opiera się na rozpoznaniu molekularnym elementów składowych cząsteczki docelowej. Rysunek 2 pokazuje drogi preparatywne, w których elementy składowe po ulokowaniu się w wygodnej termodynamicznie pozycji względem siebie, formują pożądane struktury supramolekularne.



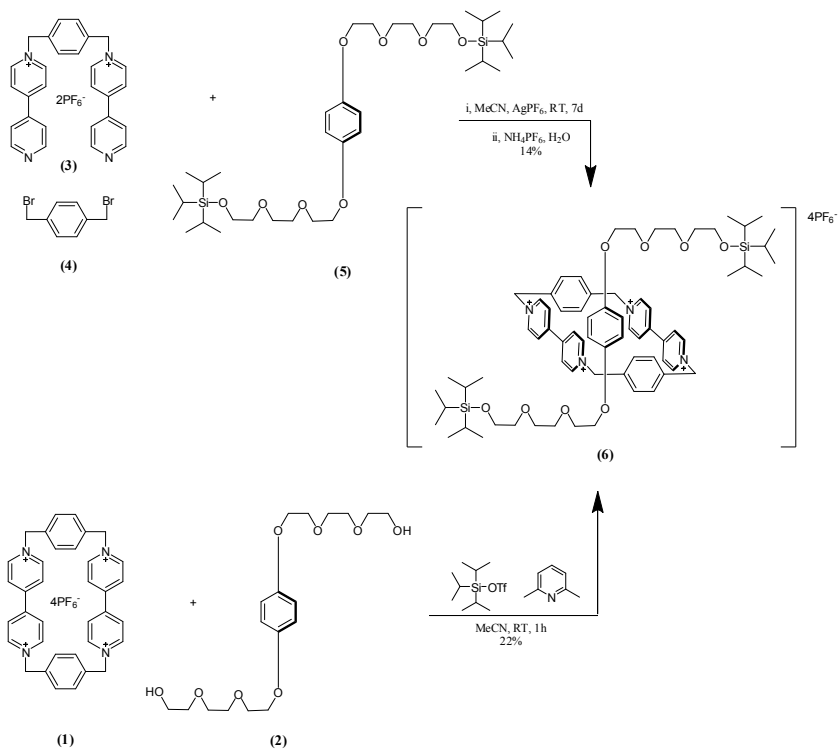
Rysunek 2. Strategie preparatywne prowadzące do otrzymania rotaksanów.

W metodzie pierwszej (A na rysunku 2), kluczowym etapem jest „przeciągnięcie” liniowej cząsteczki przez wnękę gotowego makrocyklu i następnie zablokowanie nici dwoma stoperami. W metodzie B, gotowy pierścień „naciąga” się na gotową cząsteczkę liniową. Ostatnia metoda, wykorzystuje zjawisko formowania się pierścienia makrocyclicznego wokół nici, która stabilizuje stany przejściowe w wyniku efektu templatowego.

Anelli i współpracownicy przedstawili syntezę rotaksanu, wykorzystując dwie metody: spinanie i przeciąganie.<sup>13</sup> Wychodząc z liniowej pochodnej (**2**), posiadającej bogaty w elektrony układ hydrochinonowy, i czterokationowego cyklofanu, autorzy otrzymali rotaxan (**6**) z 22% wydajnością. Terminowanie grup hydroksylowych części acyklicznej przeprowadzono za pomocą trifluorometanosulfonianu triizopropylsilanu w obecności lutydyny. Jednocześnie, w wyniku reakcji dibromku (**4**) z dikationem (**3**) w obecności przygotowanego elementu liniowego (**5**) z zablokowanymi grupami hydroksylowymi, otrzymano ten sam rotaxan (**6**) z wydajnością 14%. Ta sama metodę wykorzystano do zsyntezowania pochodnej, analogicznej do rotaksanu (**6**), której grupy hydrok-

syłowe zablokowano adamantylem. Oczekiwany produkt otrzymano z wydajnością 12%.<sup>14</sup>

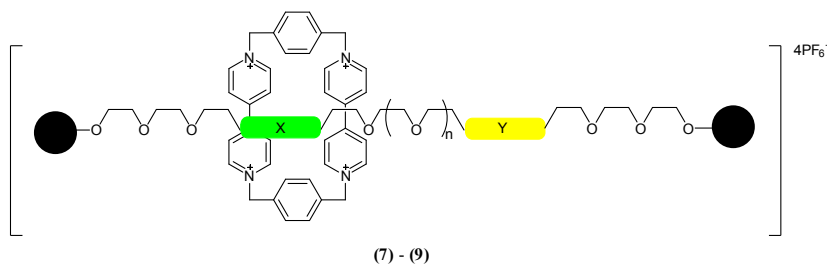
W celu badania odwracalnego procesu wędrówki pierścienia cyklofanowego, zsyntezowano szereg rotaksanów posiadających dwie lub więcej, bogate w elektrony  $\pi$  grupy, wbudowane w acykliczny element cząsteczki. Możliwość kontroli tego procesu, wywoływanego za pomocą bodźców zewnętrznych, w oczywisty sposób przyczyni się do znalezienia praktycznych aplikacji dla tej grupy związków.<sup>15</sup>



Rysunek 3. Dwie metody otrzymywania rotaksanów z pierścieniem cyklofanowym.

Przykładem rotaksanu posiadającego dwie elektronodonorowe grupy hydrochinonowe może być pochodna (7), którą w wyniku reakcji spinania otrzymano z wydajnością 32% (tabela 1).<sup>16</sup> Na przykładzie tej pochodnej po raz pierwszy zademonstrowano zjawisko cyklicznej wędrówki ubogiego w elektrony cyklofanu pomiędzy grupami hydrochinonowymi. Autorzy przeprowadzili serię eksperymentów wykorzystując technikę <sup>1</sup>H-NMR w różnych temperaturach. W 140°

C w  $\text{CD}_3\text{SOCD}_3$  proces wędrowki makrocyklicznego pierścienia następuje bardzo szybko, toteż osiem protonów położonych wokół grup hydrochinonowych uwidacznia się w postaci pojedynczego singletu  $\delta = 5,16$  ppm. Natomiast w temperaturze  $-50^\circ\text{C}$  w  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$  wyżej wymienione protony można obserwować w postaci dwóch pików, co pozwala nam odróżnić grupę hydrochinonową ze zlokalizowanym wokół cyklofanem  $\delta = 3,80$  ppm oraz wolną grupę, o wartości przesunięcia chemicznego  $\delta = 6,38$  ppm. Na podstawie tych badań,<sup>17,18</sup> udało się wyznaczyć barierę energetyczną dla procesu wędrowki cyklofanowego pierścienia pomiędzy grupami hydrochinonowymi, która wynosi  $54,4\text{ kJ mol}^{-1}$ .



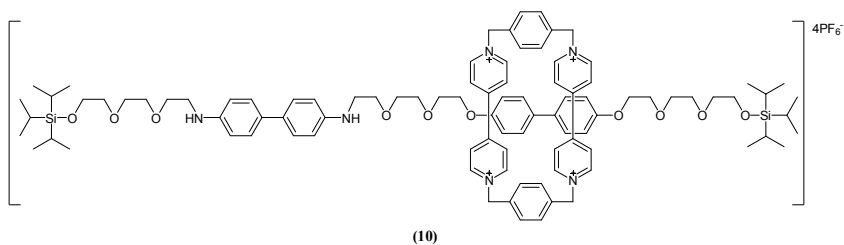
Rysunek 4. Rotaksany posiadające dwie grupy elektronodonorowe.

Tabela 1. Wydajność syntezy rotaksanów posiadających dwie grupy elektronodonorowe (7) – (9).

Rotaksan	n				Wydajność (%)
(7)	2				32
(8)	4				8
(9)	1				9

Rotaksan (8), otrzymano w wyniku reakcji dibromku (4) z dikationem (3) z wydajnością 8%. Eksperymentalnie potwierdzono, że w stanie niewzbudzonego preferencyjnym położeniem dla pierścienia jest element hydrochinonowy,<sup>19</sup> na-

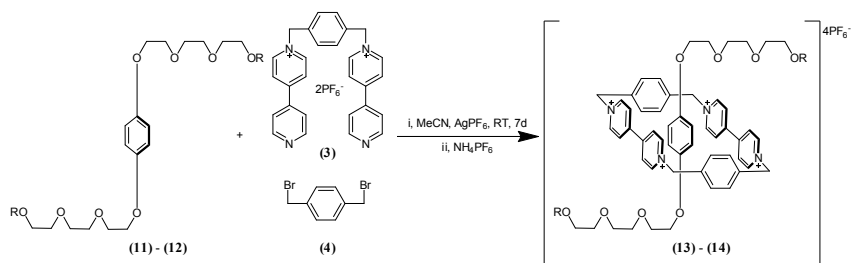
tomiast po jego utlenieniu makrocykl zmienia położenie na korzyść sąsiedniego *p*-ksylenu. Badania  $^1\text{H-NMR}$  potwierdziły szybką rotację pierścienia w temperaturze  $70^\circ\text{C}$  w  $\text{CD}_3\text{CN}$ , natomiast w temperaturze  $-40^\circ\text{C}$  reakcja nie ustaje, a stosunek dwóch konformerów wyznaczono na 7:3, na korzyść grupy hydrochinonowej. Wymieniając grupę *p*-ksylenową na indolową zsyntezowano, w podobnych warunkach jak poprzednio, rotaksan (**9**) z wydajnością 9%.<sup>20</sup> Zmierzeniem autorów było otrzymanie pochodnej, której równowaga procesu wędrówki pierścienia w pewnych warunkach będzie zdecydowanie przesunięta na korzyść jednego z istniejących konformerów. Zaskakująco, pomimo obecności w cząsteczce bogatszej w elektrony grypy indolowej, zaobserwowano wyłącznie jeden konformer z grupą hydrochinonową ulokowaną wewnątrz makrocyklu. Zjawisko wytłumaczono zbyt dużą zawadą steryczną, konieczną do pokonania, aby umieścić indolową pochodną wewnątrz cyklofanu.



Rysunek 5. Rotaksan posiadający grupę benzidynową i 4,4'-bifenylową.

Rotaksan (**10**), posiadający w części liniowej pochodną benzidynową i 4,4'-bifenylową, zsyntezowano zgodnie z metodą „przeciągania” z wydajnością 19% (rysunek 5).<sup>21</sup> Za pomocą spektroskopii  $^1\text{H-NMR}$  w  $\text{CD}_3\text{CN}$  w temperaturze  $-40^\circ\text{C}$  wyznaczono stosunek dwóch izomerów na 84:16 na korzyść konformeru posiadającego grupę benzidynową wewnątrz makrocyklu. Dodanie nadmiarowej ilości  $\text{CF}_3\text{COOD}$  powoduje sprotonowanie grup aminowych w grupie benzidynowej, co z kolei powoduje przesunięcie się czterokationowego cyklofanu w kierunku 4,4'-bifenylenu, który w takich warunkach staje się grupą najbardziej elektronodonorową. Zneutralizowanie układu przez dodanie deuterowanej pirydyny, powoduje deprotonację grup aminowych w cząsteczce liniowej i powrót makrocyklu do preferowanej pozycji. Proces ten może być również wywołany i kontrolowany za pomocą metod elektrochemicznych, gdyż utlenienie benzidyny sprawia przesunięcie się pierścienia w kierunku 4,4'-bifenylenu. Po redukcji układu, makrocykl powraca do wcześniejszej równowagi. Tak, więc w rotaksanie (**10**) proces wędrówki makrocyklu wzdłuż liniowej części można kontrolować w sposób chemiczny i elektrochemiczny.

## Rotaksany – molekularne urządzenia



Rysunek 6. Schemat syntezy rotaksanów (13) i (14).

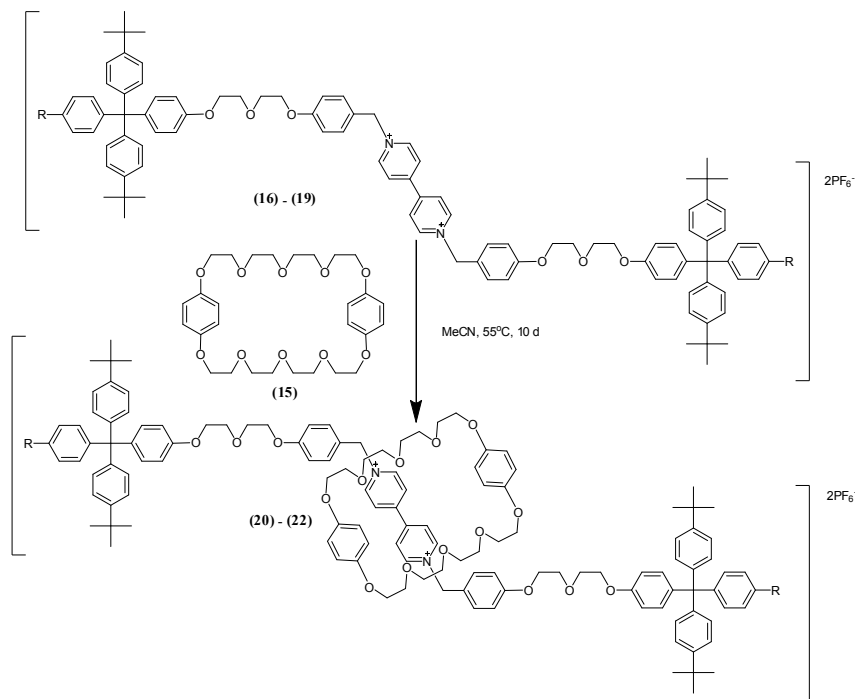
Tabela 2. Wydajności syntezy rotaksanów (13) i (14).

Substrat	R	Rotaksan	Wydajność (%)
(11)		(13)	6
(12)		(14)	25

Zjawisko tworzenia par jonowych przez cząsteczki substratów posłużyło do syntezy rotaksanów (13) i (14), których sposób otrzymania zaprezentowano na rysunku 6, a wydajności syntez zebrano w tabeli 2.<sup>22,23</sup> Wzbudzenie pochodnej (13) za pomocą pulsu laserowego o długości fali 437 nm powoduje powstanie par jonowych, które zanikają bardzo wolno. W pierwszym etapie, deaktywacja obejmuje przeniesienie ładunku od grupy hydrochinonowej do ferrocenowej oraz utlenienie ferrocenowych stoperów. W rezultacie, szybkość przegrupowania ładunku, czyli przeniesienie elektronu od cyklofanowego rodnikoanionu do grup ferrocynowych spada drastycznie. Podobne badania przeprowadzono dla rotaksanu posiadającego antracenowe stopery (14). W przeciwieństwie do poprzedniego przykładu, w tym wypadku przeniesienie ładunku i powstawania par jonowych zachodziły bardzo szybko.

Dokładne dopasowanie rozmiarów cyklicznego pierścienia i stoperów elementu liniowego pozwala na otrzymanie rotaksanów metodą „naciągania”. Kiedy rozmiary dwóch elementów, stoperów i makrocyklu, są zbliżone do siebie, to możliwe jest, poprzez odpowiednią stymulację termiczną, otrzymanie oczekiwanych produktów. Autorzy<sup>24</sup> otrzymali serię rotaksanów (20) – (22) ogrzewając mieszaninę złożoną z liniowych dikationów (16) – (18) i pierścienia makrocyklicznego (15) (rysunek 7, tabela 3). Wysoka temperatura pozwala przekroczyć

barierę energetyczną i w rezultacie przeprowadzić makrocykl przez stopery części acyklicznej. W otrzymanym rotaksanie, pierścień „wpada” w termodynamiczną pułapkę, przyjmując położenie wokół bipirydynowego dikationu, stąd też energia dysocjacji takiego układu znacznie wzrasta. W przypadku substratu **(19)**, posiadającego podstawnik izopropylowy nie zaobserwowano powstawania produktu (tabela 3).



Rysunek 7. Synteza rotaksanów metodą „naciągania”.

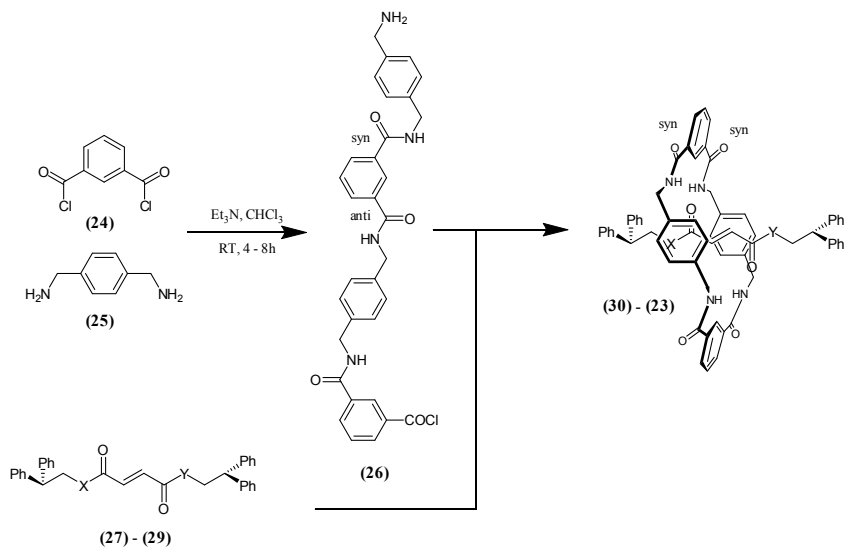
Tabela 3. Wydajności otrzymywania rotaksanów metodą „naciągania”.

Substrat	R	Rotaksan	Wydajność (%)
<b>(16)</b>	H	<b>(20)</b>	52
<b>(17)</b>	Me	<b>(21)</b>	45
<b>(18)</b>	Et	<b>(22)</b>	47
<b>(19)</b>	<i>i</i> -Pr	<b>(23)</b>	0

Bardzo wydajną metodę otrzymywania rotaksanów zaproponował Leigh i



współpracownicy,<sup>25</sup> w której dzięki efektowi templatowemu, czyli efektowi rozpoznania molekularnego acyklicznego fragmentu rotaksanu (**27**) – (**29**) przez liniowy produkt pośredni (**25**) i tworzeniu wiązań wodorowych, otrzymano rotaksany (**30**) – (**32**) z wysokimi wydajnościami (patrz tabela 4). Dodatkowo, produkt pośredni (**26**) przyjmuje liniową konformację syn-anti,<sup>26</sup> która utrzymuje dwa reaktywne końce cząsteczki w odległości ograniczającej spontaniczne formowanie pierścienia. Stąd też, nieobecność odpowiedniego templaty czyni pochodną (**26**) trwałą w roztworze, zdolną do tworzenia większych dimerów.<sup>27</sup> W warunkach reakcji otrzymywania rotaksanów, dochodzi do tworzenia wiązań wodorowych pomiędzy prekursorem pierścienia (**26**) i acyklicznym elementem rotaksanu, np. (**27**), które promują i stabilizują powstawanie rotameru syn-syn, co powoduje zbliżenie się aminy i chlorku kwasowego na odległość pozwalającą na szybką cyklizację.<sup>28</sup>



Rysunek 8. Schemat syntezy rotaksanów (**30**) – (**32**).

Tabela 4. Wydajności syntezy rotaksanów (**30**) – (**32**).

Substrat	X	Y	Rotaksan	Wydajność (%)
( <b>27</b> )	NH	NH	( <b>30</b> )	97
( <b>28</b> )	NH	O	( <b>31</b> )	35
( <b>29</b> )	O	O	( <b>32</b> )	3

Najwyższa wydajność (97%, patrz tabela 4), w warunkach reakcji (4-krotny

nadmiar diaminy (**25**) i dichloroku (**24**), Et<sub>3</sub>N, duże rozcieńczenie) uzyskano dla rotaksanu (**30**), którego element linowy zbudowany jest z amidu kwasu fumarowego. Zamiana jednego bądź dwu ugrupowań amidowych na estrowe, powoduje znaczny spadek wydajności, do 35% dla pochodnej (**31**) i aż do 3% dla (**32**). Obserwacja ta pozwala stwierdzić, że zdolności tworzenia wiązań wodorowych przez ugrupowanie estrowe są znacznie mniejsze, potwierdzeniem może być porównanie stałych wiązania di(*p*-bytylofenylo)izoftalamidu przez jony Cl<sup>-</sup> ( $K_a(\text{CD}_2\text{Cl}_2) = 6,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ) oraz estru metylowego kwasu benzoowego ( $K_a(\text{CD}_2\text{Cl}_2 < 10 \text{ M}^{-1}$ ).

## 1.2. Wykorzystanie magnetycznego rezonansu jądrowego w badaniach z użyciem rotaksanów.

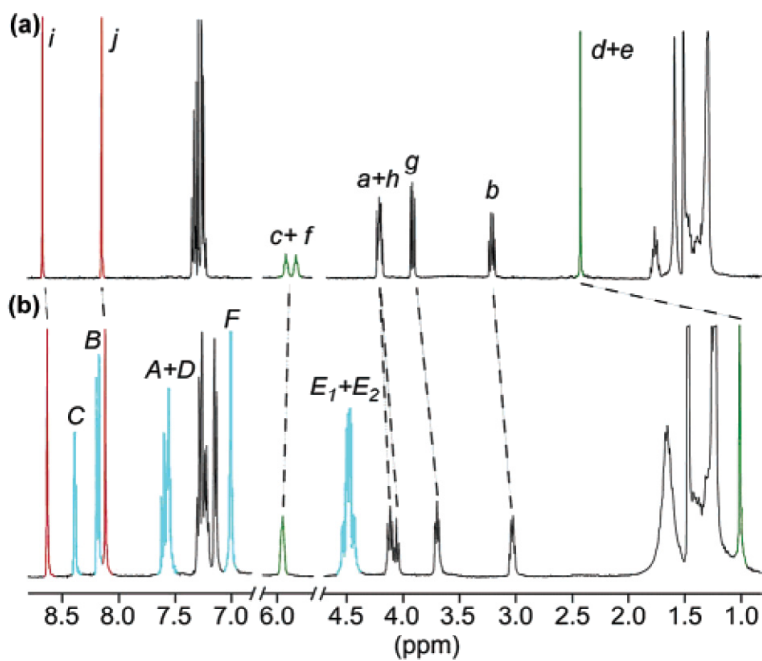
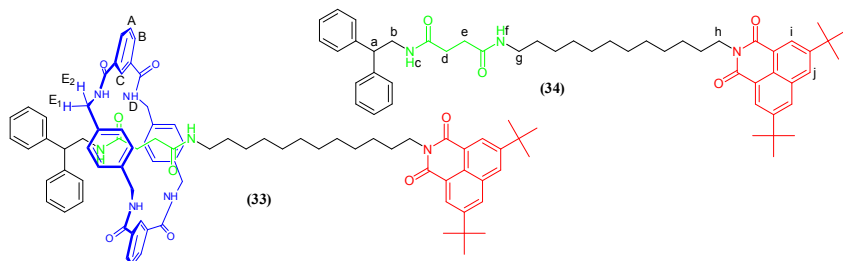
Magnetyczny rezonans jądrowy jest użytecznym narzędziem do potwierdzenia struktury oraz do ustalania stanów konfirmacyjnych otrzymanych pochodnych.

W przypadku rotaksanów z pierścieniem benzyloamidowym obserwujemy charakterystyczne przesunięcie protonów części acyklicznej, osłanianych przez grupy benzytowe makrocyklu.<sup>29</sup> Porównując widma <sup>1</sup>H-NMR rotaksanu (**33**) i odpowiadającej mu części acyklicznej (**34**) (rysunek 9)<sup>30</sup> możemy zaobserwować tego rodzaju przesunięcie dla protonów amidu kwasu bursztynowego H<sub>d</sub> i H<sub>e</sub> ( $\Delta\delta_{\text{H}} = 1,45 \text{ ppm}$ ). Protony usytuowane na zewnątrz amidu kwasu bursztynowego (H<sub>a</sub>, H<sub>b</sub>, i H<sub>g</sub>) są również przesunięte w kierunku niższych wartości przesunięć chemicznych ( $\delta$ ), lecz wartość tego przesunięcia jest znacznie niższa.

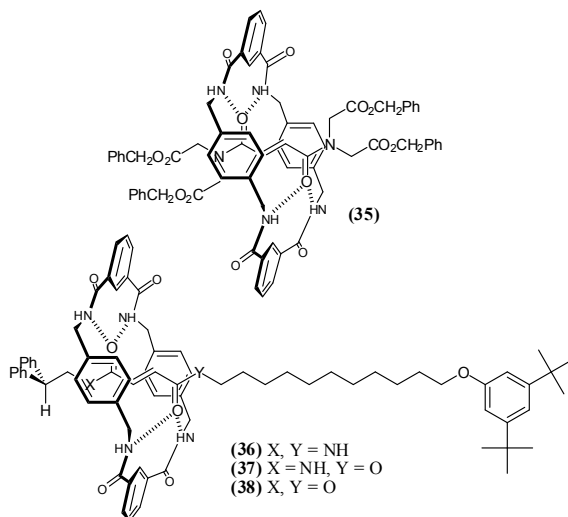
Cechą charakterystyczną, która niewątpliwie czyni rotaksany bardzo interesującą grupą pochodnych jest możliwość cyklicznej wędrówki makrocyklu wzdłuż acyklicznej osi. W przypadku pochodnych, które mogą tworzyć wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe istotne jest, aby poznać siłę tych oddziaływań oraz barierę energetyczną, jaka towarzyszy rotacji pierścienia wokół osi.

Dzięki przeprowadzonym w różnych temperaturach eksperymentom <sup>1</sup>H-NMR, wyznaczono siłę wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych, poprzez określenie bariery energetycznej rotacji części makrocyklicznej wokół elementu liniowego.<sup>31</sup> Wykorzystując kilka metod<sup>32,33</sup> wyznaczono wartości energii swobodnej ( $\Delta G$ ) w temperaturze 298 K w CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> dla rotaksanu (**35**) ( $\Delta G = 13,4 \pm 0,1 \text{ kcal mol}^{-1}$ ), (**36**) ( $\Delta G = 11,5 \pm 0,2 \text{ kcal mol}^{-1}$ ), (**37**) ( $\Delta G = 9,3 \pm 0,2 \text{ kcal mol}^{-1}$ ), (**38**) ( $\Delta G = 7,2 \pm 0,4 \text{ kcal mol}^{-1}$ ). Mechanizm rotacji we wszystkich przebadanych rotaksanach jest taki sam, różnica bariery energetycznej procesu rotacji maleje w szeregu (**36**)>(**37**)>(**38**) i jest związana z siłą powstających wiązań wodorowych, która jest większa w przypadku pochodnych posiadających wiązania amidowe w części acyklicznej.

Rotaksany – molekularne urządzenia



Rysunek 9. Widmo  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz) dla nici (33) – (a) i rotaksanu (34) – (b) w  $\text{CDCl}_3$  w 298 K.



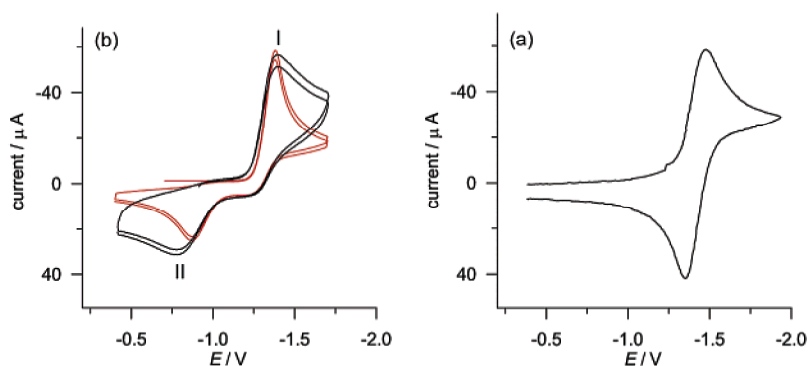
Rysunek 10. Struktury rotaksanów z pochodna kwasu fumarowego w części liniowej.

### 1.3. Rotaksany wzbudzone i monitorowane za pomocą metod elektrochemicznych

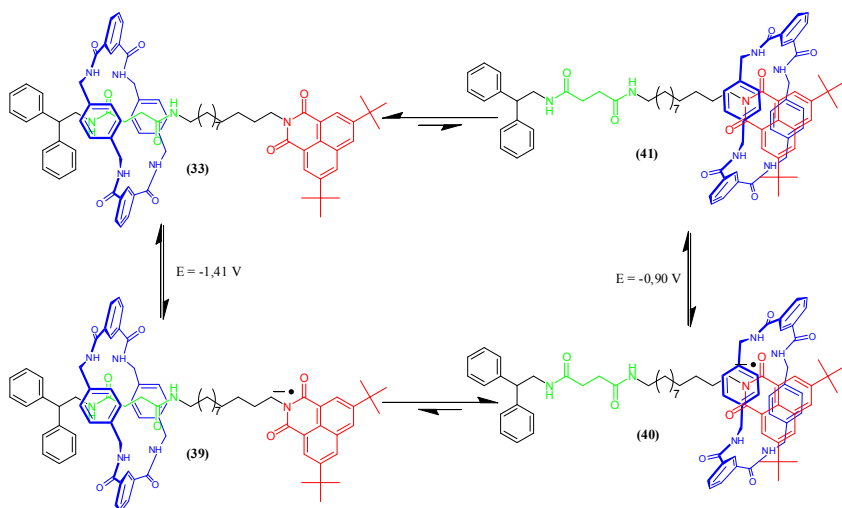
W rotaksanach posiadających grupę redoksaktywną proces translokacji części cyklicznej może być wywoływany i obserwowany za pomocą voltametrii cyklicznej (CV). Rysunek 11 przedstawia diagram CV w DMF nici (**34**) – krzywa (a), oraz rotaksanu (**33**) – krzywa (b).<sup>30</sup> W przypadku pochodnej (**34**) obserwujemy jednoelektronowy, odwracalny proces z pikiem katodowym ( $E_c = -1,40$  V) i odpowiadającym mu anodowym pikiem utlenienia ( $E_a = -1,30$  V). Rotaksan (**33**) charakteryzuje się podobnym pikiem redukcji ( $E_c = -1,40$  V), podczas gdy odpowiadający mu pik anodowy ulega znacznemu wygaszeniu oraz dodatkowo obserwujemy dodatkowy pik anodowy (II na rysunku 11 (b)) przesunięty w kierunku bardziej pozytywnych potencjałów ( $E_a = -0,89$  V).

Wyniki te można zinterpretować zgodnie z mechanizmem reakcji zaprezentowanym na rysunku 11. Dzięki badaniom <sup>1</sup>H-NMR udowodniono, że w stanie niewzbudzonym rotaksan przyjmuje konformację taką jak pokazano na rysunku 9, gdzie makrocykliczny pierścień zajmuje położenie wokół amidu kwasu bursztynowego. Dzięki temu, pierścień makrocykliczny nie wpływa na proces redukcji grupy naftalenoimidowej prowadzącej do otrzymania rodnikoanionu (**39**). Ponieważ naładowana ujemnie grupa naftalenoimidowa jest lepszym akceptorem wiązań wodorowych, makrocykl przesuwają się w jej kierunku tworząc

pochodną (**40**). W rezultacie, nowo utworzone wiązania wodorowe, stabilizują ładunek elektronowy naftalenoimidu, stąd też utlenianie rodnikonionu zaczyna się po osiągnięciu bardziej pozytywnego potencjału ( $\Delta E_p = 0,51$  V). Po utlenieniu, grupa naftalenoimidowa traci ładunek, pierścień makrocykliczny wraca do swego pierwotnego położenia.

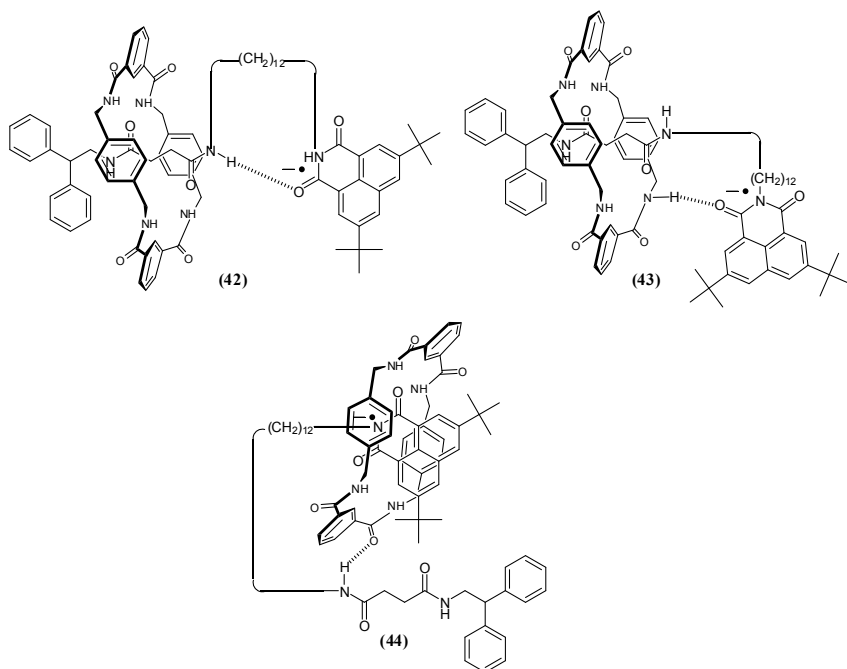


Rysunek 11. Krzywe voltametryczne nici (**34**) – (a) oraz rotaksanu (**33**) – (b), w roztworze DMF-u z heksafluorofosforanem tertbutyloaminy jako wzorec wewnętrzny, w 298 K. Czerwona linia oznaczono dane pochodzące z symulacji procesu.

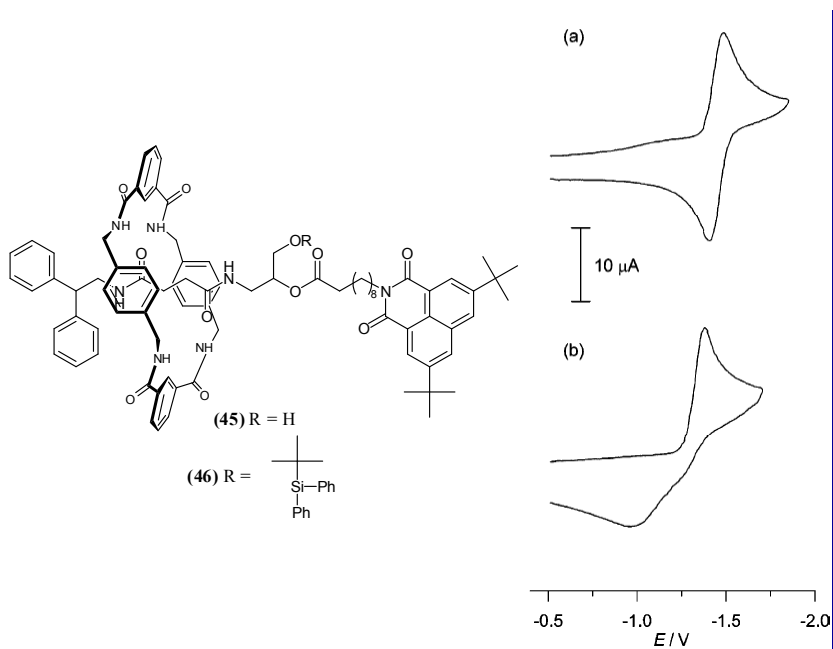


Rysunek 12. Mechanizm indukowanej elektrochemicznie reakcji translokacji makrocyklu w rotaksanie (**33**), zaproponowany przez D. A. Leigh i współpracowników.<sup>30</sup>

Zakładając, że podany wyżej mechanizm jest prawidłowy, i że to tworzone wiązania wodorowe pomiędzy redoksaktywnym naftalenoimidem a pierścieniem makrocyklicznym powodują przesunięcie piku anodowego, zachodzi przypuszczenie, że w wyniku pofałdowania się węglowego łańcucha, końce cząsteczki przysuną się do siebie i wytworzą się wiązania wodorowe bez translokacji pierścienia. Kilka możliwych struktur konformacyjnych, z zaznaczonymi wiązaniami wodorowymi, które potencjalnie mogą zostać utworzone, przedstawiono na rysunku 12. W celu wykluczenia możliwości tworzenia się konformerów wskutek fałdowania się łańcucha i potwierdzenia mechanizmu redukcji rotaksanów z translokacją makrocyklu, zsyntezowano i przebadano voltametrycznie rotaksany **(45)** i **(46)**.



Rysunek 13. Możliwe struktury konformacyjne powstałe w wyniku pofałdowania rotaksanu **(33)**.



Rysunek 14. Struktury oraz krzywe voltametryczne rotaksanów, (45) – krzywa (b) i (46) – krzywa (a), w roztworze DMF-u z heksafluorofosforanem tertbutyloaminy jako wzorzec wewnętrzny, w temperaturze 298 K.

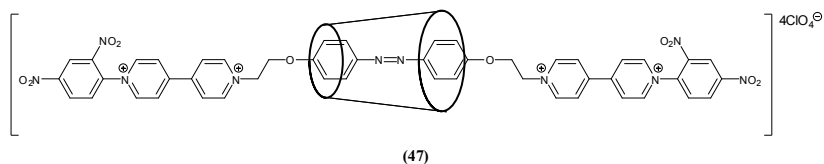
W strukturę rotaksanu (46) wbudowano eterową grupę silanową, dostatecznie dużą by uniemożliwić translację makrocyklu oraz umożliwić tworzenie się konformerów wskutek fałdowania się łańcucha węglowego. Hydroliza grupy eterowej, prowadzi do otrzymania pochodnej (45), bliskiego analogu rotaksanu (33), w której ruch makrocyklu jest dozwolony. Krzywa voltametryczna (46) (krzywa (a) na rysunku 14) jest identyczna do krzywej acyklicznej nici (34) a nie rotaksanu (33). Potwierdza to wcześniej zaproponowany mechanizm translacji pierścienia makrocyklicznego wzdłuż łańcucha węglowego i stabilizację naftalenoimidowego rodnikoanionu. Dodatkowym potwierdzeniem jest eksperymentalnie wyznaczona krzywa voltametryczna rotaksanu (35), wyraźnie podobna do otrzymanej wcześniej krzywej dla rotaksanu (33).

### 3.4. Rotaksany wzbudzone za pomocą metod fotochemicznych.

Rotaksany posiadające układy chromoforowe dają możliwość wzbudzenia i śledzenia zachodzących procesów za pomocą technik spektroskopowych. Uży-

cie fotonów do wzbudzenia cząsteczek pozwala na uzyskanie szybkiej odpowiedzi i może przebiegać na stosunkowo małej powierzchni bez powstawania produktów ubocznych.<sup>34,35</sup> Powodowana energią świetlną transllokacja makrocyklu wzdłuż liniowego elementu rotaksanów może być wynikiem: transferu fotowzbudzonych elektronów (ET),<sup>36</sup> zmian w tworzonych wiązaniach wodorowych w stanie wzbudzonym,<sup>37</sup> lub fotoimeryzacji ugrupowań azowych.<sup>38</sup> Metody najczęściej używane do obserwowania zachodzących wewnątrz cząsteczek zmian to: techniki magnetycznego rezonansu jądrowego, spektroskopia absorpcyjna i emisyjna oraz spektroskopia dichroizmu kołowego.<sup>39,40</sup>

Przykładem fotoczułego rotaksanu jest pochodna (**47**), posiadająca grupę azobenzenową w części acyklicznej otoczoną przez pierścieniową  $\alpha$ -cyklodekstrynę (rysunek 15).<sup>41</sup>



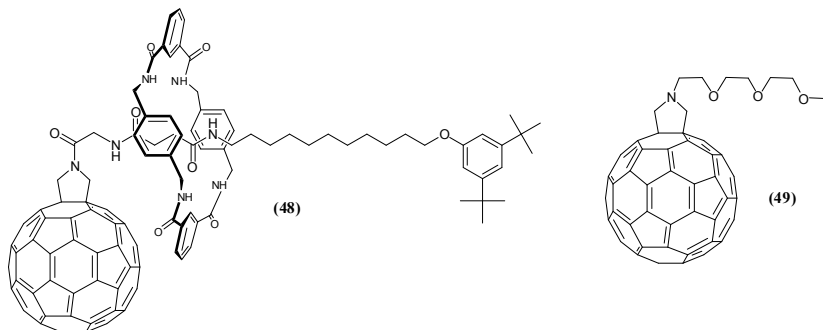
Rysunek 15. Struktura rotaksanu z azobenzenowym chromoforem i cyklodekstrynowym układem cyklicznym.

Zarówno rotaksan (**47**) jak i jego cykliczny element ulegają reakcji fotoimeryzacji. Po ich wzbudzeniu ( $\lambda = 360$  nm) grupa azobenzenowa zmienia konformację z *trans* do *cis* i powraca do swej pierwotnej konfiguracji po wzbudzeniu światłem widzialnym ( $\lambda = 430$  nm). Obydwie pochodne osiągają stan fotostabilny w ciągu 15 minut – rotaksan i 11 minut – nić. Dzięki połączeniu badań NMR (Nuclear Overhauser Effect)<sup>42</sup> z technikami spektroskopowymi udało się ustalić położenie pierścienia cyklodekstrynowego w stanie podstawowym i wzbudzonym. W zarejestrowanym widmie <sup>1</sup>H-NMR rotaksanu (**47**) piki protonów azobenzenowych były przesunięte w kierunku wyższych wartości ppm (średnio 0,2 – 0,3 ppm) w porównaniu do widma wyizolowanej części liniowej. Anizotropia ta jest powodowana obecnością cyklodekstrynowego makrocyklu, który w stanie podstawowym przyjmuje położenie wokół grupy azobenzenowej. Po wzbudzeniu rotaksanu (**47**) światłem UV, obserwujemy przesunięcie pików należących do mostka metylenowego, łączącego grupę azobenzenową z resztą acyklicznej cząsteczki, w kierunku niższych wartości ppm. Wskutek przesunięcia się pierścienia dekstrynowego w wzbudzonej cząsteczce, osłaniane metylenowe protony zmieniły swe położenie w widmie <sup>1</sup>H-NMR z 5,30 ppm do 3,65 ppm. Konkludując, rotaksan (**47**) można nazwać fotoczułym urządzeniem, w którym cyklodekstrynowy pierścień ulega transllokacji z położenia wokół gru-



py azobenzenowej do położenia wokół mostka metylenowego po wzbudzeniu światłem widzialnym lub UV.

Fulleren  $C_{60}$  jest pochodną wyjątkowo użyteczną w projektowaniu rotaksanów. Jego rozmiary czynią go dogodnym układem w projektowaniu rotaksanowych stoperów, natomiast jego właściwości fotochemiczne decydują o jego potencjalnym zastosowaniu w projektowaniu fotoczułych urządzeń molekularnych.<sup>43,44</sup>



Rysunek 16. Struktura rotaksanu z fullerenowym układem acyklicznym (48), oraz fullerenowy analog (49).

Na rysunku 16 przedstawiono strukturę rotaksanu (48) z fullerenem wbudowanym w liniową część cząsteczki i benzyloamidowym układem cyklicznym. Autorzy przebadali właściwości fluorescencyjne rotaksanu (48) oraz jego elementu liniowego,<sup>45</sup> i porównali otrzymane dane eksperymentalne z fullerenowym analogiem (49) posiadającym trietylenowy łańcuch glikolowy.<sup>46</sup> W roztworze  $CH_2Cl_2$  zaobserwowano zarówno dla rotaksanu (48) i jego liniowego elementu składowego 25% wygaszenie fluorescencji w porównaniu z analogiem (49). Sąsiedztwo makrocyklu nie wpływa na wygaszenie fluorescencji w rotaksanie, gdyż podobną sytuację obserwujemy dla wyizolowanego liniowego elementu cząsteczki. Wygaszenie fluorescencji jest wynikiem słabej interakcji fullereny z amidem kwasu bursztynowego (interakcji na tyle silnej by wygasić fluorescencje o 25%). Odwrotną sytuację obserwujemy w DMSO. Silne oddziaływanie polarnego rozpuszczalnika z amidem kwasu bursztynowego uniemożliwiają interakcję amidu z wzbudzonym fullerenem. W efekcie fluorescencja rotaksanu (48) i odpowiadającej mu nici jest porównywalna z fullerenopyrrolidynowym odpowiednikiem (49). Mechanizm procesu translokacji makrocyklu wzdłuż liniowej osi jest najprawdopodobniej zbliżony do zaproponowanego dla rotaksanu (33), lecz nie został jeszcze potwierdzony a badania z użyciem spektroskopii czasowo rozdzielczej są w toku.

Indukowana fotochemicznie translokacja makrocyklu wzdłuż osi rotaksanów **(50)** i **(51)** powoduje zmiany interakcji pomiędzy dwoma układami chromoforowymi. W części acyklicznej, związek ten posiada dwie wysoce fluorescencyjne grupy (pyrenową oraz perylenowy diamid) oraz dwa liniowe układy: amid kwasu fumarowego i ester amidu kwasu bursztynowego, które mogą tworzyć wiązania wodorowe z częścią cykliczną.<sup>47</sup> Autorzy przedstawili syntezę rotaksanów **(50)** i **(51)**, oraz przebadali właściwości spektroskopowe układów.

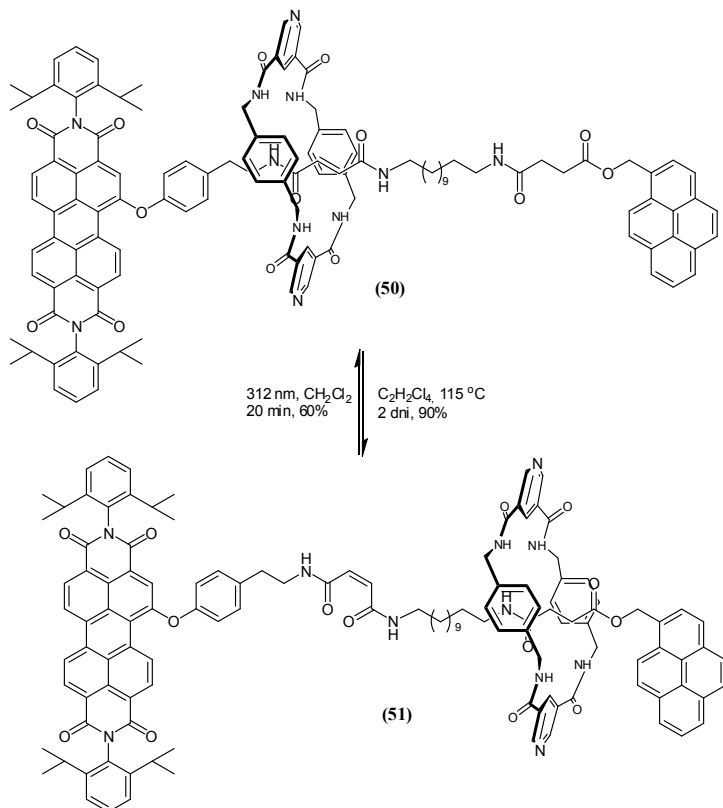
Po wzbudzeniu układu pyrenowego ( $\lambda_{\text{exc}} = 345$  nm) wyizolowanej części linowej rotaksanów **(50)** i **(51)** zaobserwowano wygaszenie emisji grupy pyrenowej ( $\lambda_{\text{max}} = 377$  nm) oraz nieznaczny wzrost emisji grupy perylenowej ( $\lambda_{\text{max}} = 556$  nm). Wskazuje to na obecność fotoindukowanego transferu energii między chromoforami. Wzbudzając układ perylenowy w wyżej wymienionych układach ( $\lambda_{\text{exc}} = 500$  nm), transfer energii nie występuje, mimo że emisja grupy perylenowej spada o około 30% w porównaniu z perylenowym odpowiednikiem. Pyren jest silnym układem donorowym, stąd też transfer energii, od wzbudzonego pyrenu do perylenowego układu akceptorowego nie jest zaskakujący.<sup>48</sup>

W przypadku rotaksanów **(50)** i **(51)** obecność makrocyklu zapobiega fałdowaniu się dwunastoczłonowego łańcucha, stąd też fotoindukowany transfer energii jest wolniejszy a emisja części perylenowej większa, w porównaniu do analizowanych wcześniej liniowych składowych rotaksanów. Emisja wzbudzonej grupy pyrenowej w rotaksanie **(51)** zostaje wygaszona po sprotonowaniu grup pirydynowych w cząsteczce makrocyklu za pomocą kwasu trifluoroctowego. Transfer energii od pyrenowego donora zostaje zatrzymany i w rezultacie fluorescencja perylenu zmniejszona. W przypadku pochodnej **(50)** fotoindukowany transfer energii z części perylenowej był mniej efektywny, a dodatek kwasu nie powodował wygaszenia fluorescencji grup chromoforowych. Sprotonowany makrocykl jest więc selektywnym przełącznikiem transferu energii z grupy pyrenowej do peryleneowej. Te specyficzne właściwości pozwalają wykorzystać tego typu układy do konstruowania molekularnych przełączników, w których pożądany efekt uzyskuje się za pomocą wzbudzania światłem o różnych długościach fali, a uzyskiwaną odpowiedź można śledzić dzięki zmianom w fluorescencji sygnału wyjściowego.

## Literatura:

1. R. Dagani, Chem. Eng. News, 2000, 78, 27
2. D. Rouvray, Chem. Br., 1998, 34, 26
3. Jortner, M. Ratler, „Molecular Electronics”, Blackwell Science, Oxford, 1977
4. C. Joachim, J. K. Gimzewski, A. Aviram, Nature 2000, 408, 541

Rotaksany – molekularne urządzenia



Rysunek 17. Rotaksany z układem perylenowym i pyrenowym.

- J. M. Tour, *Acc. Chem. Res.*, 2000, 33, 791
- A. R. Pease, J. O. Jeppensen, J. F. Stoddart, Y. Luo, C. P. Collier, J. R. Heath, *Acc. Chem. Res.*, 2001, 34, 433
- V. Balzani, A. Credi, M. Venturi, „Supramolecular Science: Where It is and Where It is Going”, Kluwer, Bordrecht, 1999
- V. Balzani, A. Credi, M. Venturi, “Stimulating Concepts in Chemistry”, Wiley-VCH, Weinheim, 2000
- M. C. T. Fyfe, P. T. Glink, S. Menzer, J. F. Stoddart, A. J. White, D. J. Williams, *Angew. Chem., Int. Edit.*, 1997, 36, 2068
- V. Balzani, M. Gomez - Lopez, J. F. Stoddart, *Acc. Chem. Res.* 1998, 31, 405
- J. P. Sauvage, *Acc. Chem. Res.* 1998, 31, 611

12. H. S. Nalwa, „Handbook of Photochemistry and Photobiology”, American Scientific Publisher, 2003
13. P. L. Anelli, P. R. Ashton, R. Ballardini, V. Balzani, M. Delgado, M. T. Gandolfi, T. T. Goodnow, A. E. Kaifer, D. Philp, M. Pietraszkiewicz, L. Prodi, M. V. Reddington, A. M. Z. Slawin, N. Sencer, J. F. Stoddart, C. Vincent, D. J. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114, 193
14. P. R. Ashton, M. Groguz, A. M. Z. Slawin, J. F. Stoddart, D. J. Williams, *Tetrahedron Lett.*, 1991, 32, 6235
15. G. Schill, K. Rissler, H. Fritz, W. Vetter, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1981, 20, 187
16. P. L. Anelli, N. Spencer, J. F. Stoddart, *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, 113, 5131
17. I. O. Sutherland, *Annu. Rep. NMR Spectrosc.*, 1971, 4, 71
18. J. Sandstrom, „Dynamic NMR Spectroscopy”, Academic Press, London, 1982
19. P. R. Ashton, R. A. Bissell, N. Spencer, J. F. Stodart, M. S. Tolley, *Synlett*, 1992, 914
20. P. R. Ashton, R. A. Bissell, R. Górski, D. Philp, N. Spencer, J. F. Stodart, M. S. Tolley, *Synlett*, 1992, 919
21. R. A. Bissel, E. Cordova, A. E. Kaifer, J. F. Stoddart, *Nature*, 1994, 369, 133
22. A. C. Benniston, A. Harriman, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1993, 32, 1459
23. A. C. Benniston, A. Harriman, V. M. Lynch, *Tetrahedron Lett.*, 1994, 35, 1473
24. P. P. Ashton, M. Belohradsky, D. Philp, J. F. Stoddart, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1993, 1269
25. F. G. Gatti, D. A. Leigh, S. A. Nepogodiev, A. M. Z. Slawin, S. J. Teat, J. K. Y. Wong, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123, 5983
26. S. G. Geib, C. Vincent, E. Fan, A. D. Hamilton, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1993, 32, 119
27. F. J. Carver, C. A. Hunter, R. J. Shannon, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1994, 1277
28. D. A. Leigh, A. Murphy, J. P. Smart, A. M. Z. Slawin, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1997, 36, 728
29. A. G. Johnston, D. A. Leigh, A. Murphy, J. P. Smart, M. D. Deegan, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118, 10662
30. A. Altieri, F. G. Gatti, E. R. Kay, D. A. Leigh, D. Martel, F. Paolucci, A. M. Z. Slawin, J. K. Y. Wong, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125, 8644
31. W. Clegg, C. Gimenez-Saiz, D. A. Leigh, A. Murphy, A. M. Z. Slawin,

- S. J. Teat, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, 121, 4124
32. F. W. Dahlquist, K. J. Longmur, R. B. Du Vernet, *J. Magn. Reson.*, 1975, 17, 406
  33. J. Sandstrom, „Dynamic NMR Spectroscopy”, Academic Press, London, 1982
  34. P.R. Ashton, R. Ballardini, V. Balzani, A. Credi, K. R. Dress, E. Ishow, C. J. Kleverlaan, O. Kocian, J. A. Preece, N. Spencer, J. F. Stoddart, M. Venturi, S. Wenger, *Chem. Eur. J.* 2000, 6, 3558
  35. R. Ballardini, V. Balzani, M. T. Gandolfi, L. Prodi, M., Venturi, D. Philp, H. G. Rickerrs, J. F. Stoddart, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1993, 32, 320
  36. C. P. Collier, J. O. Jeppesen, Y. Luo, J. Perkins, E. W. Wong, J. R. Health, J. F. Stoddart, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123, 12632
  37. M. Asakawa, P. R. Ashton, V. Balzani, C. L. Brown, A. Credi, O. A. Matthews, S. P. Newton, F. M. Raymo, A. N. Shipway, N. Spencer, A. Quick, J. F. Stoddart, A. J. P. White, D. J. Williams, *Chem. Eur. J.* 1999, 5, 860
  38. C. A. Stanier, S. J. Alderman, T. D. W. Claridge, H. L. Anderson, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2002, 41, 1769
  39. D. A. Leigh, M. A. F Morales, E. M. Perez, J. K. Y. Wong, C. G. Saiz, A. M. Z. Slawin, A. J. Carmichael, D. M. Haddleton, A. M. Brouwer, W. J. Buma, G. W. H. Wurpel, S. Leon, F. Zerbetto, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2005, 44, 3062
  40. Q. C. Wang, D. H. Qu, J. Ren, K. C. Chen, H. Tian, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2004, 43, 2661
  41. H. Murakami, A. Kawabuchi, K. Kotoo, M. Kunitake, N. Nakashima, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, 119, 7605
  42. R. J. Abraham, J. Fisher, P. Lotus, „Introduction to NMR Spectroscopy”, John Wiley and Sons, New York, 1988
  43. A. Hirsch, „Fullerenes and Related Structures”, Springer, Berlin, 1999
  44. L. Echegoyen, L. E. Echegoyen, *Acc. Chem. Res.*, 1998, 31, 695
  45. T. Da Ros, D. M. Guldi, A. F. Morale, D. A. Leigh, M. Prato, R. Turco, *Org. Lett.*, 5, 659
  46. P. Wang, B. Chen, R. M. Metzger, T. Da Ros, M. Prato, *J. Mater. Chem.*, 1997, 7, 2397
  47. Y. Li, H. Li, Y. Li, Shu Wang, X. He, N. Wang, D. Zhu, *Org. Lett.*, 2005, 7, 4835
  48. T. Froter, *Ann. Phys.* 1948, 55



## Rozdział III

### Metody syntezy oraz funkcjonalizacji tetra-O-podstawionych rezorcynoarenów

Barbara Gawdzik, Waldemar Iwanek

*Uniwersytet Humanistyczno-Przyrodniczy Jana Kochanowskiego,  
Instytut Chemii, Świątokrzyska 15G, 25-406 Kielce*

#### 1. Wstęp

Jedną z grup połączeń zaliczanych do chemii supramolekularnej stanowią związki określane mianem kaliksarenów, wśród których ważne miejsce zajmują rezorcynoareny.

Rezorcynoareny stanowią grupę związków makrocyklicznych otrzymywanych z wysokimi wydajnościami w jednoetapowej reakcji rezorcyny i jej pochodnych z aldehydami tak alifatycznymi jak i aromatycznymi (Schemat 1) [1-6].

Cząsteczki rezorcynoarenów mają charakter wnękowy co czyni je wyjątkowo atrakcyjnymi pod względem możliwości mimetowania układów receptorowych. Rezorcynoareny wykorzystując niekowalencyjne oddziaływania typu: wiązanie wodorowe, oddziaływania hydrofobowe, oddziaływania charge-transfer,  $\pi$ -aren-kation, jon-dipol mogą stanowić doskonałe modele chiralnych receptorów.

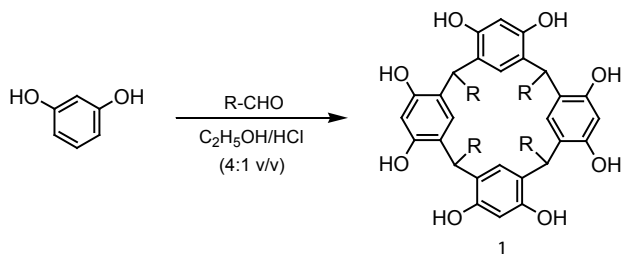
Metody syntezy rezorcynoarenów jak również możliwości wykorzystania ich jako syntetycznych receptorów molekularnych oraz wybrane przykłady zastosowań zostały opisane we wcześniejszych naszych pracach [7-9].

W odróżnieniu od niepodstawionych rezorcynoarenów, tetrapodstawione rezorcynoareny, w zależności od typu modyfikacji mogą posiadać również stabilną konformację łódkową, co zmienia ich preferencje w oddziaływaniu z potencjalnymi receptorami, preferując raczej układy płaskie i liniowe, przy zachowaniu całego bogactwa możliwych do realizacji oddziaływań międzycząsteczkowych.

Dodatkowe miejsca oddziaływania, specyficznie ułożone względem siebie w tetra-podstawionych rezorcynoarenach, wprowadzić można poprzez dobór odpowiednich pomocników, w tym również chiralnych.

W poniższej pracy przedstawiamy metody syntezy i funkcjonalizacji rezorcynoarenowych pochodnych, które w górnej obręczy mają zmodyfikowane cztery z ośmiu grup hydroksylowych. Jest to jeden z najczęściej spotykanych w literaturze typów pochodnych rezorcynoarenów. Ogólna strategia postępowania przedstawiona jest na rysunku poniżej – rysunek 1.

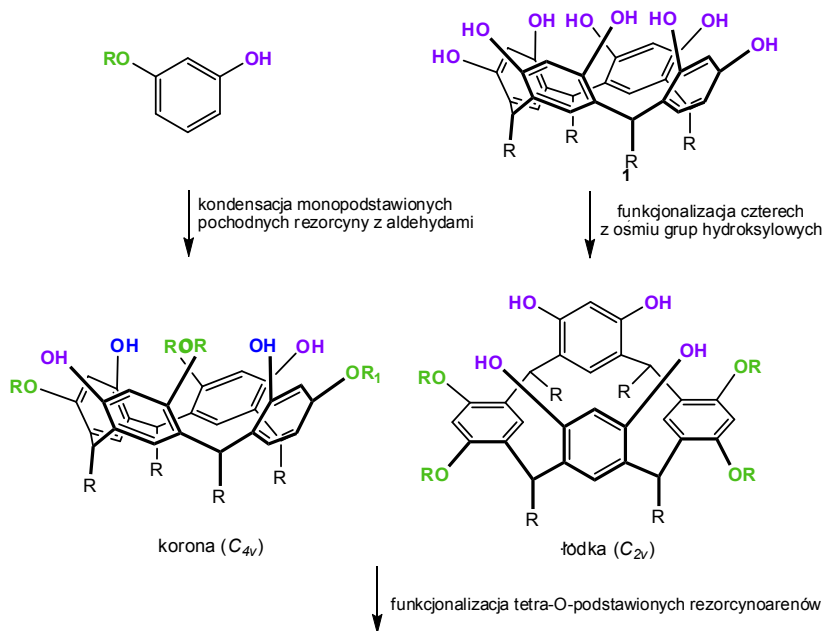
W dalszej części opisujemy szczegółowo możliwości zarówno syntezy tetra-O-podstawionych rezorcynoarenów jak również ich dalszej modyfikacji.



- |                                                                            |                                                                              |                                                                                                    |
|----------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>a</b> R = alkil                                                         | <b>h</b> R = 3-H <sub>3</sub> CSC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                | <b>o</b> R = 4-AcHNC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                                                   |
| <b>b</b> R = C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>                                 | <b>i</b> R = 4-BrC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                               | <b>p</b> R = 4-CH <sub>3</sub> OC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                                      |
| <b>c</b> R = C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> | <b>j</b> R = 4-(CH <sub>3</sub> ) <sub>n</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> | <b>r</b> R = 4-(C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O)C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                      |
| <b>d</b> R = NaO <sub>3</sub> S(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>             | <b>k</b> R = 4-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>   | <b>s</b> R = 4-HOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                                                     |
| <b>e</b> R = HO(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>                             | <b>l</b> R = 4-NCC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                               | <b>t</b> R = 3,4-[(OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> O]C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> |
| <b>f</b> R = Cl(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>                             | <b>m</b> R = 4-HO <sub>2</sub> CC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                | <b>u</b> R = [(CH) <sub>3</sub> S]C                                                                |
| <b>g</b> R = 3-O <sub>2</sub> NC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>               | <b>n</b> R = 4-H <sub>2</sub> NC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                 | <b>w</b> R = C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> [OGluc(OAc <sub>4</sub> )]                              |

*Schemat 1.*





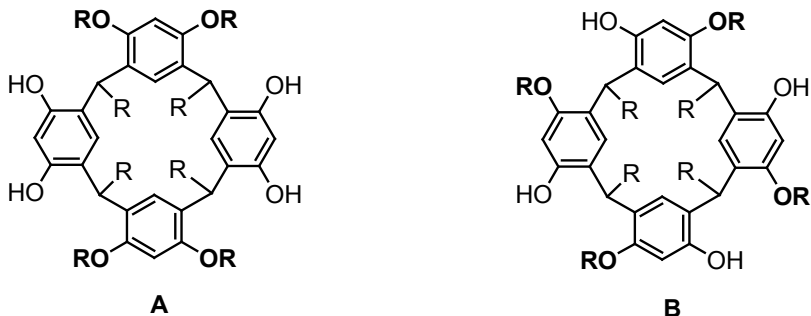
## ZMODYFIKOWANE TETRA-O-PODSTAWIONE REZORCINOARENENY

Rysunek 1.

### 2. Metody syntezy tetra-O-podstawionych rezorcynoarenów

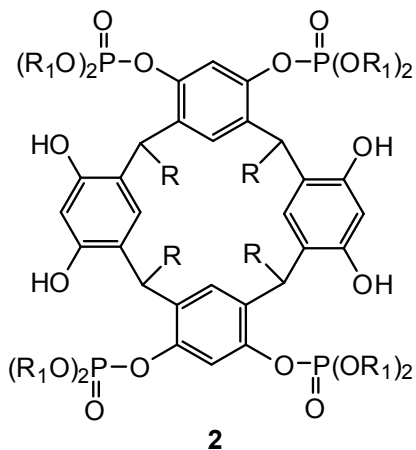
Rezorcynoareny należą do związków makrocyklicznych charakteryzujących się dużą reaktywnością między innymi z uwagi na obecność w ich strukturze grup hydroksylowych. Reakcje modyfikacji grup hydroksylowych dostarczają pochodnych rezorcynoarenowych o nowych określonych właściwościach fizykochemicznych. Ponadto grupy hydroksylowe mają znaczący wpływ na utrzymywanie koronowej konformacji rezorcynoarenu.

Aby w wyniku reakcji otrzymać jako produkty tetra-O-podstawione rezorcynoareny (Rysunek 2) funkcjonalizację czterech grup –OH należy przeprowadzić stosując jedną z dwóch metod. Pierwsza polega na modyfikacji grup hydroksylowych na platformie rezorcynoarenowej, co prowadzi do otrzymania rezorcynoarenu **A** z odpowiednio podstawionymi grupami –OH w naprzeciwległych jednostkach rezorcynoarenowych. Natomiast w drugiej metodzie w wyniku reakcji cyklizacji właściwie dobranej monopodstawionej pochodnej rezorcyny z odpowiednim aldehydem otrzymuje się rezorcynoaren **B** ze zmodyfikowanymi grupami –OH na każdej jednostce rezorcynoarenowej.



Rysunek 2.

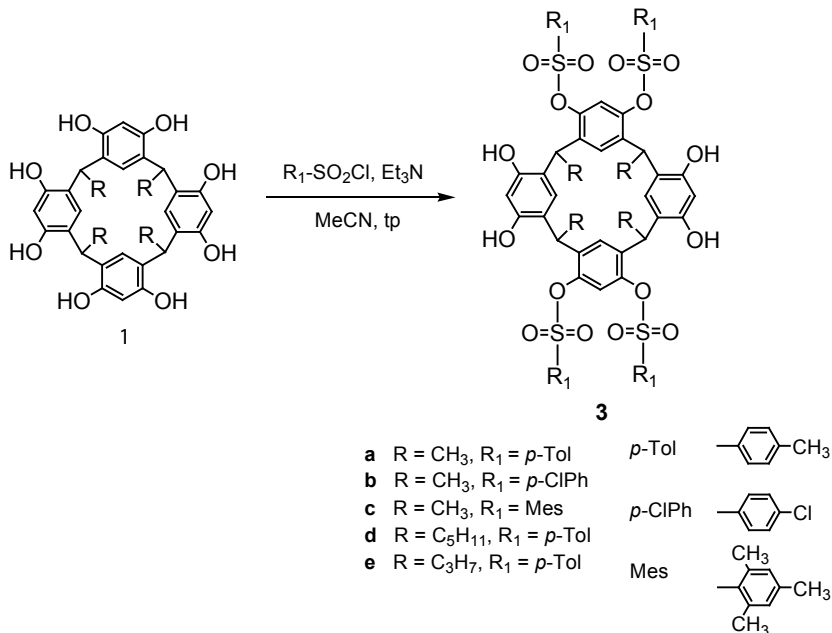
W pierwszej metodzie, funkcjonalizacji poddaje się grupy -OH w wyjściowym rezorcynoarenie **1**, co prowadzi do zsyntezowania regioselektywnych O-podstawionych pochodnych rezorcynoarenu o symetrii  $C_{2v}$ , w których modyfikacji uległy grupy hydroksylowe w dwóch naprzeciwległych jednostkach rezorcyny. Pierwszymi w taki sposób zmodyfikowanymi połączeniami rezorcynoarenowymi były tetra-O-fosfororezorcynoareny **2**, otrzymane w wyniku częściowej fosforylacji rezorcynoarenu **1** chlorkiem: dietylo- diizopropyl- lub di-*n*-butylofosfonianowym w obecności trietyloaminy w tetrahydrofuranie (Rysunek 3) [10].



- a** R = CH<sub>3</sub>, R<sub>1</sub> = *i*-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>
- b** R = CH<sub>3</sub>, R<sub>1</sub> = *n*-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>
- c** R = CH<sub>3</sub>, R<sub>1</sub> = *n*-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>
- d** R = C<sub>11</sub>H<sub>3</sub>, R<sub>1</sub> = C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>

Rysunek 3.

Inny przykład funkcjonalizacji grup hydroksylowych w naprzeciwległych jednostkach rezorcynoarenowych stanowi reakcja rezorcynoarenu **1** z chlorkami arylosulfonowymi prowadzona w acetonitrylu i w obecności trietyloaminy jako zasady. Produktami tej reakcji przedstawionej na schemacie 2 są tetrasulfonowe pochodne rezorcynoarenowe **3** [11].

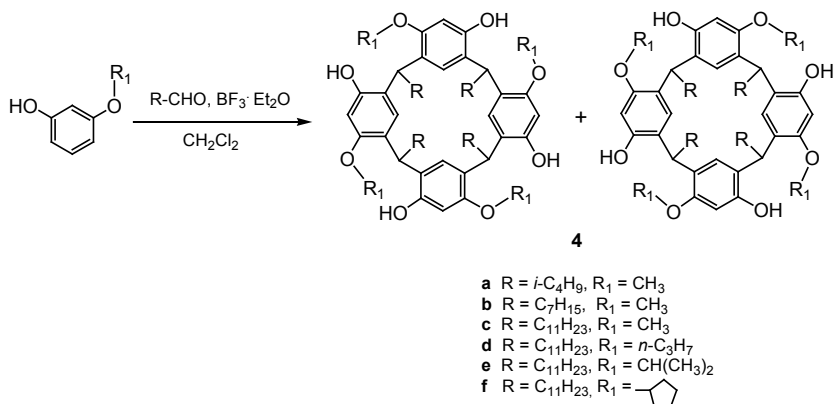


Schemat 2.

Tetra-O-fosfororezorcynoareny **2** jak również tetra-O-sulfonowe pochodne rezorcyno- arenowe **3** o symetrii  $C_{2v}$ , mogą tworzyć z kationami amoniowymi dimeryczne kompleksy. Wiązania wodorowe łączą dwie wykazujące konformację łódkową cząsteczki tetra-O-fosforo- lub tetra-O-sulfonorezorcynoarenów z czterema anionami chlorkowymi w dimer. Wielkość dimerycznej wnęki jest zdeterminowana konformacją łódkową a oddziaływania elektrostatyczne i wiązania wodorowe umożliwiają kompleksowanie dwóch kationów trietyloamoniowych [11].

W drugiej metodzie tetra-O-podstawione rezorcynoareny otrzymuje się na drodze reakcji kondensacji odpowiednich monopodstawionych pochodnych rezorcyny z aldehydami. Zgodnie z reakcją przedstawioną na schemacie 3 zsyntezowano tetraalkoksy-podstawione rezorcynoareny **4** o symetrii  $C_4$  w postaci mie-

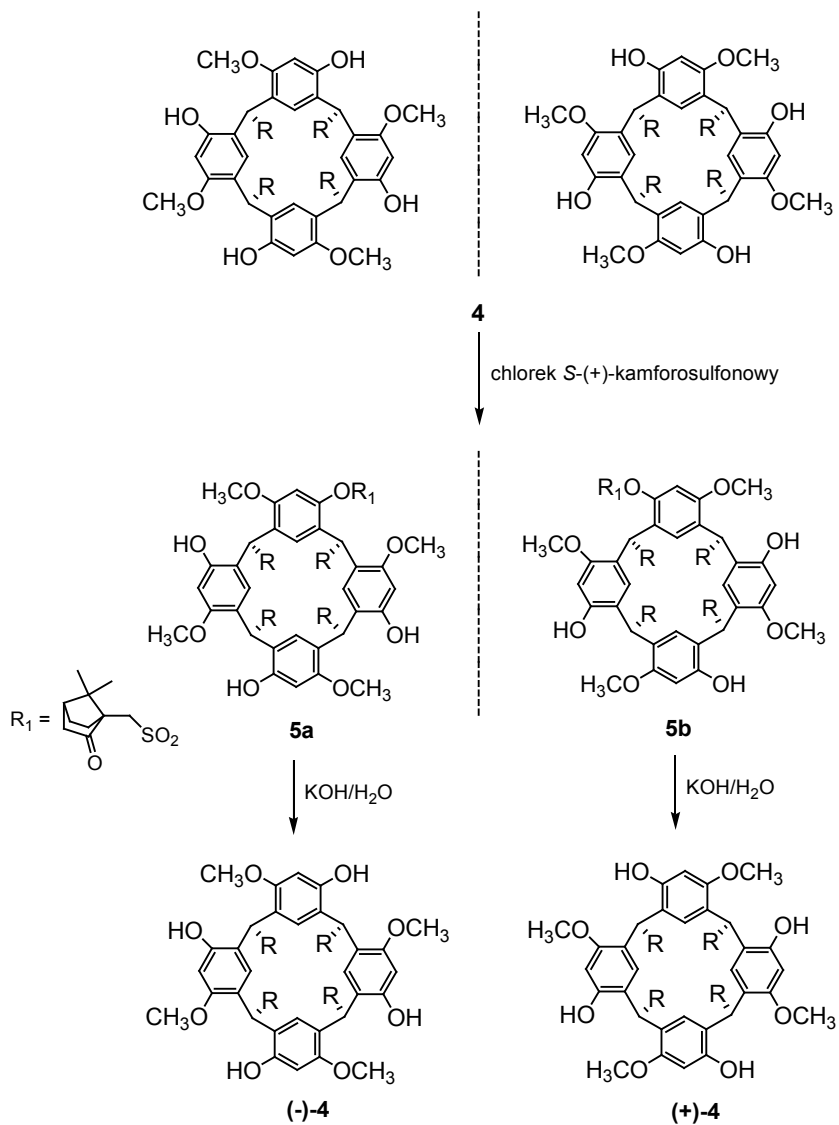
szanin racemicznych. W tego typu połączeniach w każdej jednostce rezorcyny w rezorcynoarenie zmodyfikowana jest jedna grupa hydroksylowa. Katalizatorami takiej kondensacji są kwasy Lewisa [12-14].



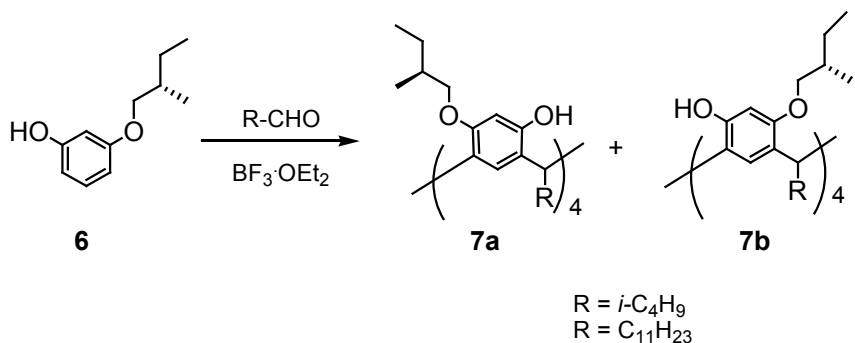
Schemat 3.

Mattay przedstawił metodę rozdzielania mieszanin racemicznych konformów koronowych tetra-O-metylorezorcynoarenów **4** otrzymanych z wysoką wydajnością w wyniku reakcji cyklizacji monometylowej rezorcyny z alifatycznymi aldehydami. Poddając tetra-O-metylorezorcynoareny **4** działaniu chlorku *S*-(+)-kamforosulfonowego w suchym tetrahydrofuranie z wykorzystaniem *n*-butylolitu jako zasady przeprowadził monofunkcjonalizację jednej grupy hydroksylowych w składnikach racematu **4**, uzyskując w ten sposób możliwą do rozdzielania na drodze HPLC mieszaninę dwóch mono-O-zestryfikowanych diastereoizomerów **5a** i **5b**. Zasadowa hydroliza diastereoizomerów **5a** i **5b** wodnym roztworem wodorotlenku potasu prowadzi do czystych enancjomerycznie tetra-O-podstawionych rezorcynoarenów (+)-**4**, (-)-**4** odpowiednio z wydajnościami 72% i 70%. (Schemat 4) [14].

W przypadku, gdy w reakcji kondensacji wykorzystuje się chiralny 3-[(2*S*)-2-metylobutoksy]fenol **6** otrzymany z rezorcyny i tosyłanu (2*S*)-(–)-2-metylobutylowego, w jednym etapie otrzymuje się łatwą do rozdzielania metodą HPLC mieszaninę dwóch diastereoizomerycznych tetra-O-(2-metylobutylo) rezorcynoarenów **7a** i **7b** (Schemat 5) [14].



Schemat 4.

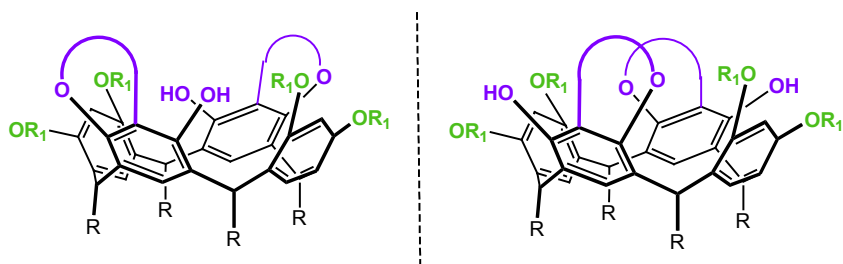


Schemat 5.

### 3. Funkcjonalizacja tetra-O-podstawionych rezorcynoarenów.

W literaturze opisano wiele pochodnych rezorcynoarenowych, których struktura jest konsekwencją funkcjonalizacji tetra-O-podstawionych rezorcynoarenów. Te połączenia, dokonując pewnych uogólnień, podzielić na następujące typy:

1. Pochodne tetra-O-podstawione rezorcynoarenu posiadające sfunkcjonalizowane cztery grupy hydroksylowe w dwóch naprzeciwległych jednostkach rezorcynoarenowych, natomiast na dwóch pozostałych jednostkach posiadają pierścień heterocykliczny utworzony w reakcjach z udziałem grup hydroksylowych oraz pozycji „*orto*” (Rysunek 4).

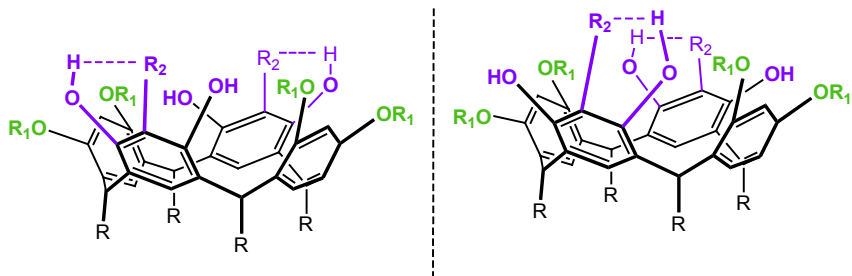


Rysunek 4.

2. Pochodne tetra-O-podstawione rezorcynoarenu, w których zmodyfikowano cztery grupy hydroksylowe w naprzeciwległych jednostkach rezorcynoarenowych ( $\text{OR}_1$ ), a funkcjonalizacji pozycji „*orto*” dokonano

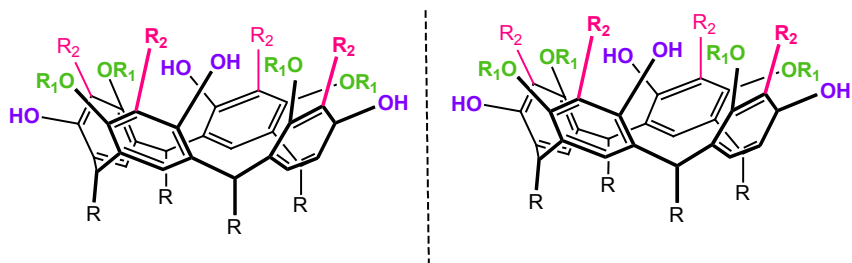
Metody syntezy oraz funkcjonalizacji tetra-O-podstawionych rezorcynoarenów

tylko w jednej lub w dwóch pozostałych jednostkach rezorcynoarenu (Rysunek 5).



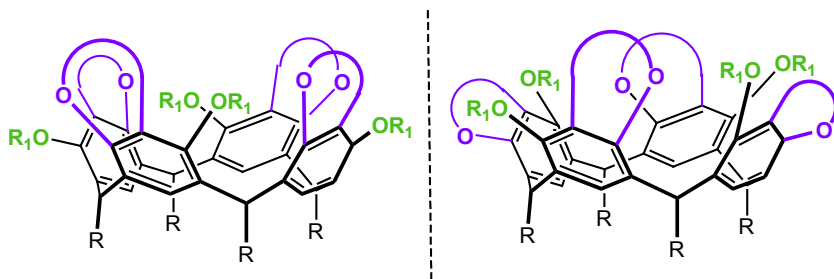
Rysunek 5.

3. Pochodne tetra-O-podstawionych rezorcynoarenów, które w każdej z czterech jednostek rezorcynowych mają po jednej wolnej grupie hydroksylowej i wprowadzony dodatkowo w pozycji „*orto*” nowy podstawnik (Rysunek 6).



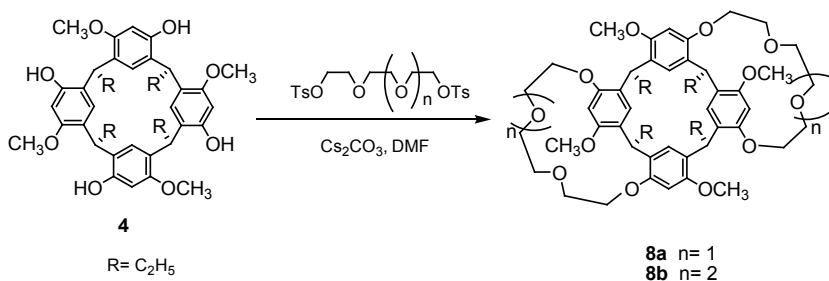
Rysunek 6.

4. Pochodne tetra-O-podstawionych rezorcynoarenów, które w każdej z czterech jednostek rezorcynowych mają po jednej sfunkcjonalizowanej grupie hydroksylowej (-OR<sub>1</sub>) a pozostałe cztery wolne grupy hydroksylowe wykorzystano do utworzenia czterech pierścieni heterocyklicznych (Rysunek 7).



Rysunek 7.

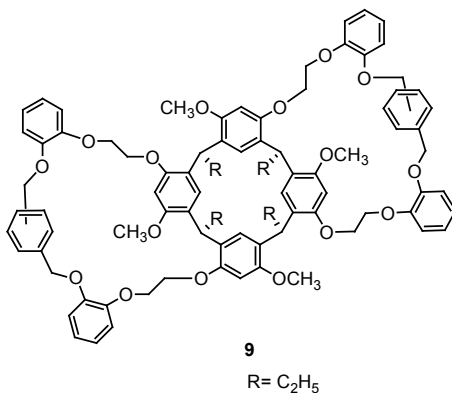
W reakcji tetrametoksyrezorcynoarenu **4** z ditosylanami eterów koronowych, zawierających 5 lub 6 atomów tlenu w łańcuchu otrzymano odpowiednie bis-koronowe etery tetrametoksyrezorcynoarenu **8a** i **8b**, które na z powodu mostków koronowych przyjmują symetrię  $C_{2v}$  (Schemat 6). Właściwości kompleksujące otrzymanych bis-koronowych pochodnych tetrametoksyrezorcynoarenowych **8a** i **8b** względem jonów metali alkalicznych zostały zbadane za pomocą metod:  $^1\text{H}$ NMR i rentgenograficznych. Stwierdzono, że rezorcynoaren **8b**, ma zdolność do jednoczesnego kompleksowania dwóch kationów w każdym fragmencie o budowie eteru koronowego [15].



Schemat 6.

Dwie sąsiednie jednostki tetrametoksyrezorcynoarenu **4** połączone aromatycznymi mostkami koronowymi w reakcji tetrametoksyrezorcynoarenu **4** z odpowiednim ditosylanem prowadzonej w acetonitrylu z udziałem  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  jako zasady, otrzymując bis-koronowe *m*- lub *p*-tribenzo-bis-korona-6 tetrametoksyrezorcynoareny **9** (Rysunek 8). Natomiast aromatyczne mostki koronowe zsyntezowano z wysokimi wydajnościami (powyżej 81%) w reakcji produktów kondensacji *m*- lub *p*-bis(bromometylo)benzenu z dwoma ekwiwalentami 2-(2-hydroksyetoksy)fenylu z chlorkiem *p*-toluenosulfonowym. [16].



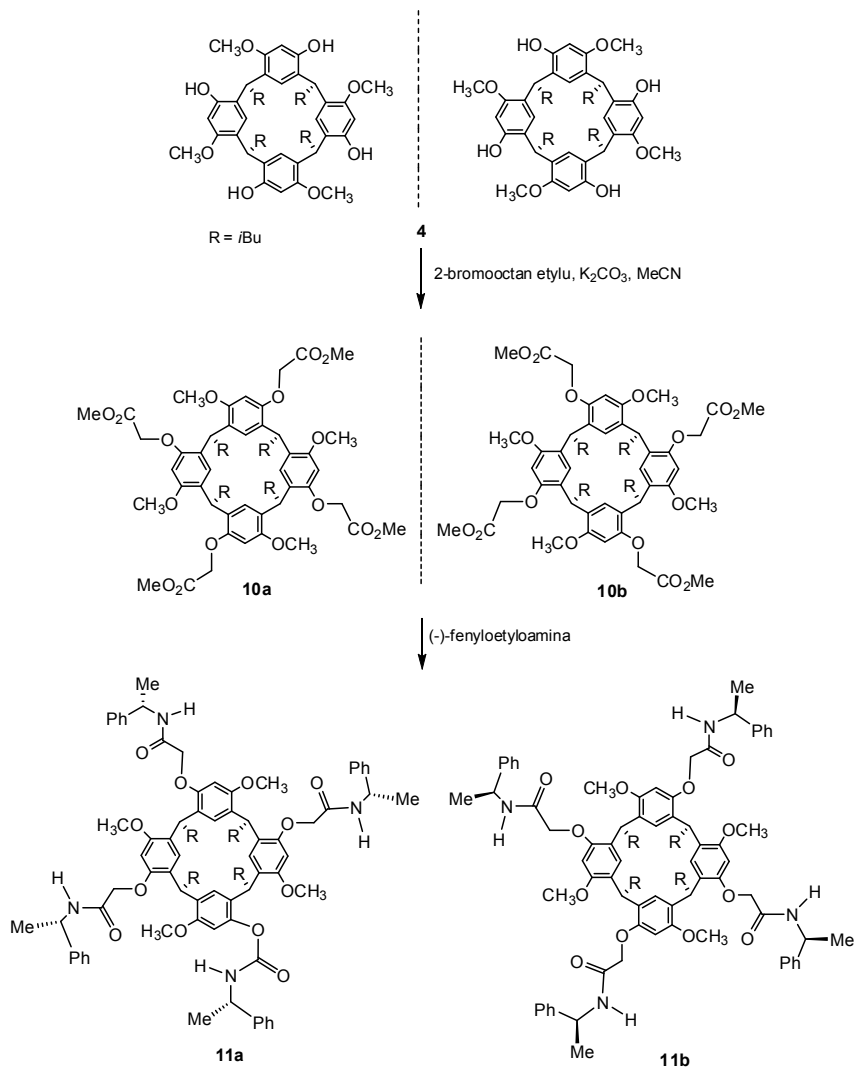


Rysunek 8.

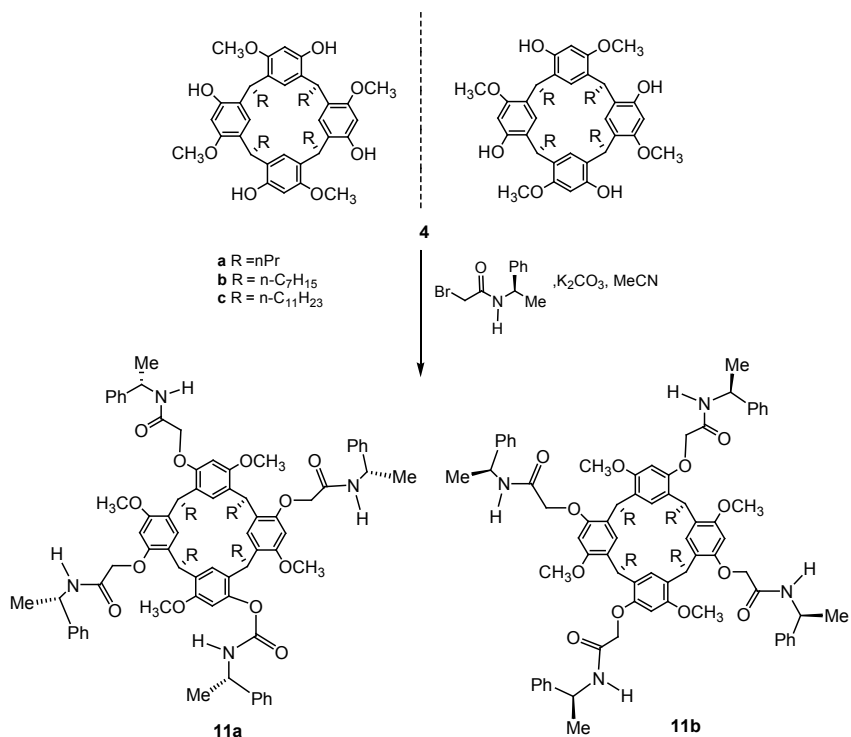
Bis-koronowe *m*- i *p*-tribeneno-bis-korona-6 tetrametoksyrezorcynoareny **9** wykazują właściwości kompleksujące w stosunku do jonów K<sup>+</sup>, Rb<sup>+</sup> oraz Cs<sup>+</sup>. Tetrametoksyrezorcaren modyfikowany aromatycznymi mostkami koronowymi **9** wykazuje większą aktywność w stosunku do jonów Cs<sup>+</sup> niż bis-koronowe etery tetrametoksyrezorcynoarenu **8a** i **8b**.

W wyniku reakcji alkilowania 2-bromoocetanem metylu mieszaniny racemicznej tetrametylorezorcynoarenu **4** zsyntezowano tetraacylo pochodne tetrametylorezorcynoarenu **10a** i **10b** również jako mieszaninę racemiczną, którą następnie poddano aminolizie chiralną (-)-fenyloetyloaminą, otrzymując mieszaninę dwóch „chiralnych osiowo” diastereoizomerów **11a** i **11b**, możliwą do rozdzielania metodą preparatywnej chromatografii kolumnowej (Schemat 7) [17].

Pochodne rezorcynoarenu **11a** i **11b** można również otrzymać w wyniku jednoetapowej reakcji racemicznych tetra-O-metylorezorcynoarenów **4** z chiralnym 2-bromo-N-[(R)-(+)-(α-metylobenzylo)]acetamidem, prowadząc reakcję w temperaturze wrzenia acetonitrylu w ciągu 15 godzin. Powstałe mieszaniny diastereoizomerów są łatwe do rozdzielania metodą preparatywnej chromatografii kolumnowej (Schemat 8) [18].



Schemat 7.



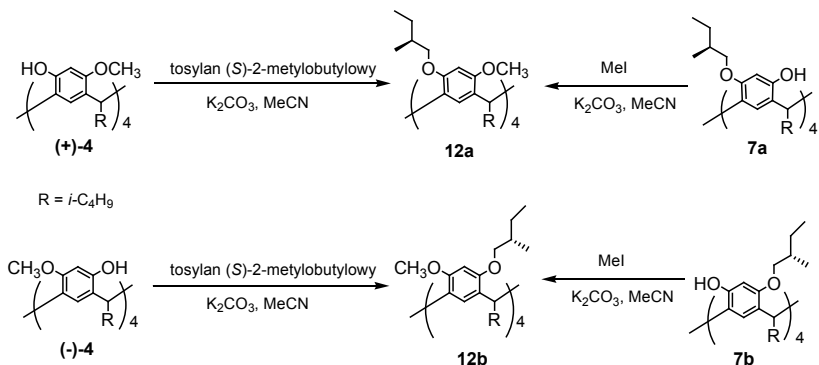
Schemat 8.

Reakcja z użyciem czystych enancjomerycznie tetrametoksy pochodnych rezorcynoarenu (+)-**4** i (-)-**4** z tosylationem (S)-2-metylobutylovym lub reakcja prowadzona z udziałem tetra-O-(2-metylobutylo)rezorcynoarenów **7a** i **7b** z jodkiem metylu dostarcza odpowiednich enancjomerycznych „chiralnych osiwo” tetra-O-(2-metylobutylo)-tetra-O-metylorezorcynoarenów **12a** i **12b** (Schemat 9) [17].

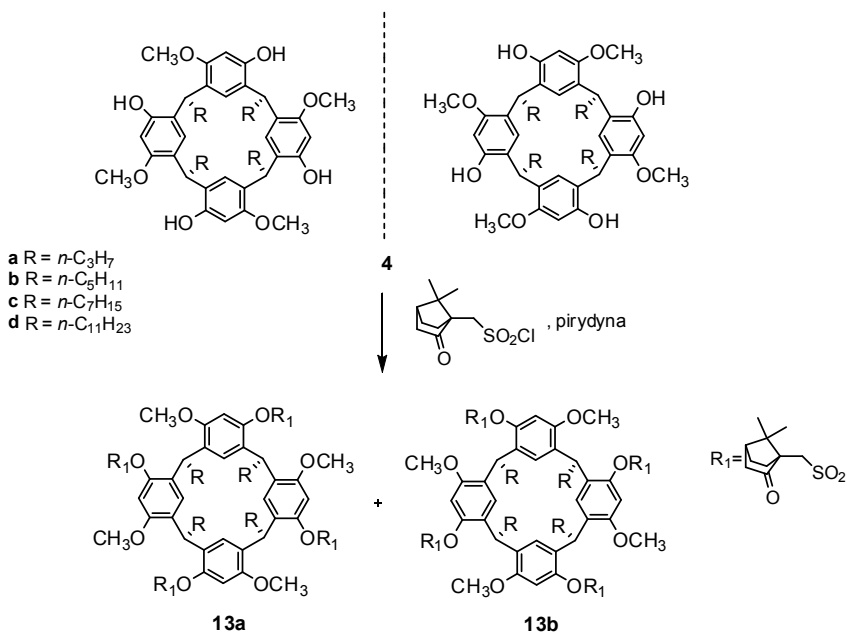
Reakcja racemicznych tetra-O-metylorezorcynoarenów **4** z chlorkiem (S)-(+)-10-kamforosulfonowym, w zależności od: warunków prowadzenia reakcji, wielkości podstawnika w górnej obręczy rezorcynoarenu, jak również od ilości użytego chlorku kwasowego, może prowadzić do: tetra-, tri-, di- lub mono-kamforosulfonowych pochodnych tetra-O-metylorezorcynoarenu [19].

Tetrakamforosulfonowe pochodne **13** zsyntezowano w wyniku ogrzewania racemicznej mieszaniny tetra-O-metylorezorcynoarenu **4** z nadmiarem chlorku (S)-(+)-10-kamforosulfonowego w temperaturze wrzenia pirydyny. Otrzymaną

mieszaninę diastereoizomerów: **13a** i **13b** rozdzielono metodą preparatywnej chromatografii kolumnowej (Schemat 10).



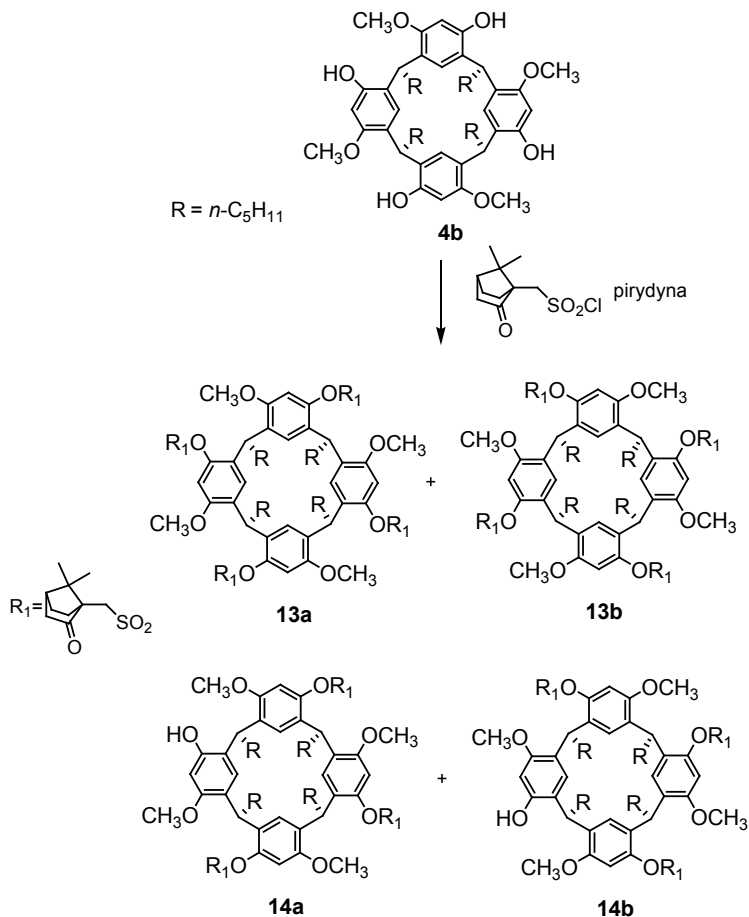
Schemat 9.



Schemat 10.

W przypadku reakcji prowadzonej z udziałem tetra-O-metylorezorcynoarenu **4b** z 12 ekwiwalentami chlorku (S)-(+)-10-kamforosulfonowego po 15 godzin-

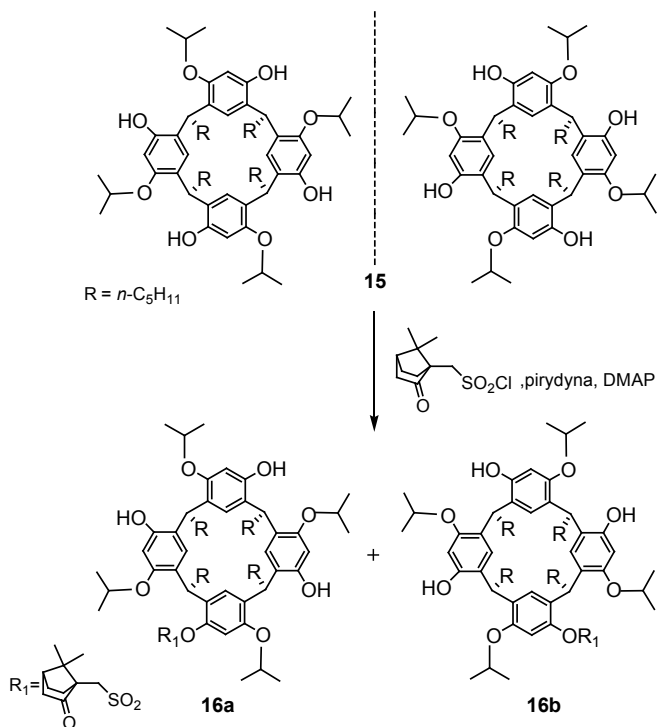
nym ogrzewaniu w temperaturze wrzenia pirydyny, otrzymano mieszaninę dwóch diastereomerycznych tetra-O-kamforosulfonowych pochodnych tetra-O-metylorezorcynoarenu: **13b** i **13a** w stosunku 4 do 1, jak również mieszaninę dwóch diastereomerycznych tri-O-kamforosulfonowych pochodnych: **14b** i **14a** w stosunku 1 do 4 (Schemat 11) [19].



Schemat 11.

Natomiast w reakcji z udziałem tetra-O-izopropylrezorcynoarenu **15**, posiadającego bardziej rozbudowany przestrzennie podstawnik izopropylowy z ośmioma ekwiwalentami chlorku (S)-(+)-10-kamforosulfonowego w obec-

ności DMAP i z udziałem pirydyny jako rozpuszczalnika otrzymano mieszaninę diastereomerycznych mono-O-kamforosulfonowych pochodnych **16a** i **16b** (Schemat 12) [19]. W analogicznej reakcji tetra-O-alkilorezorcynoarenów z podstawnikami: izopropylowym **15** lub cyklopentylowym z chlorkiem (S)-(+)-10-kamforosulfonowym prowadzonej w pirydynie, ale bez udziału DMAP, otrzymano mieszaninę diastereomerycznych di-O-kamforosulfonowych tetra-O-alkilorezorcynoarenów.

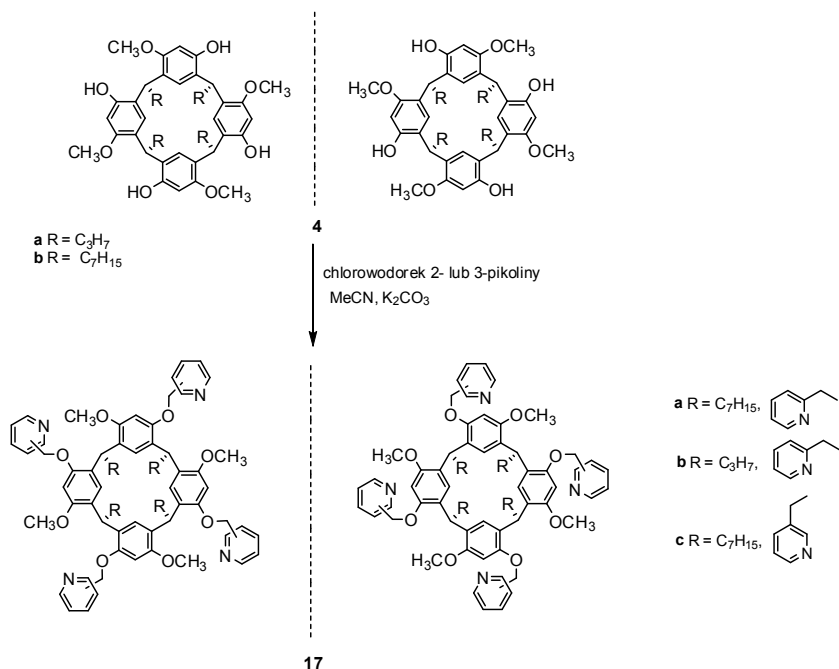


Schemat 12.

Kamforosulfonowe pochodne rezorcynoarenu można otrzymać również w wyniku dwuetapowego procesu. W pierwszym etapie pod wpływem *n*-butylolitu następuje deprotonacja wolnych grup hydroksylowych tetra-O-metylorezorcynoarenu **4**. W kolejnym etapie otrzymane tetraaniony reagując z chlorkiem (S)-(+)-10-kamforosulfonowym dostarczają, w zależności od temperatury procesu, połączeń tetra-O-kamforosulfonowych lub diastereomerycznych mieszanin mono- i di-O-kamforosulfonowych pochodnych tetra-O-metylorezorcynoarenu. W reakcji racemicznych tetra-

O-alkoksyrezorcynoarenów **4** z enancjomerycznym chlorkiem (*S*)-(+)-10-kamforosulfonowym otrzymuje się mieszaninę dwóch diastereoizomerów kamforosulfonowych pochodnych rezorcynoarenowych, którą łatwo można rozdzielić metodą preparatywnej chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym. Hydroliza w warunkach zasadowych poszczególnych diastereoizomerów kamforosulfonowych prowadzi do uzyskania czystych enancjomerycznie tetra-O-metylorezorcynoarenów. Jest to prosta metoda rozdziłu racemtów tetra-O-alkilowych pochodnych rezorcynoarenu [19].

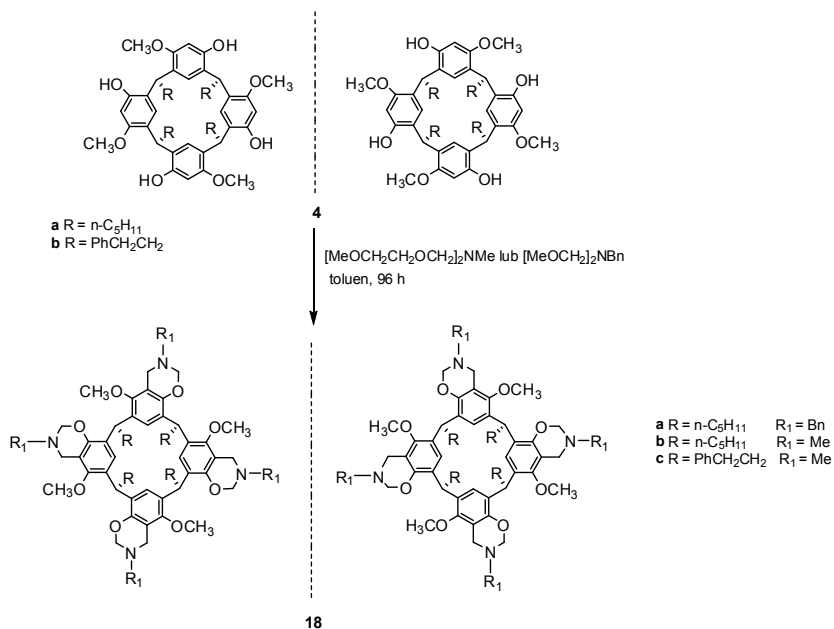
W wyniku reakcji alkilowania racemicznych tetra-O-metylorezorcynoarenów **4** chlorowodorkiem chlorku 2- lub 3-pikoliny prowadzonej w acetonitrylu i w obecności katalitycznych ilości węglańka potasu otrzymano z wysoką wydajnością (powyżej 80%) odpowiednie tetra-pikolinowe etery tetra-O-metylorezorcynoarenów **17**. (Schemat 13) [20].



Schemat 13.

Tetra-pikolino podstawione tetra-O-metylorezorcynoareny **17** mogą być stosowane jako wielokleszczowe ligandy koordynujące niektóre jony metali przejściowych takie jak: pallad, cynk, miedź lub nikiel. W wyniku kilkudziesięcio-

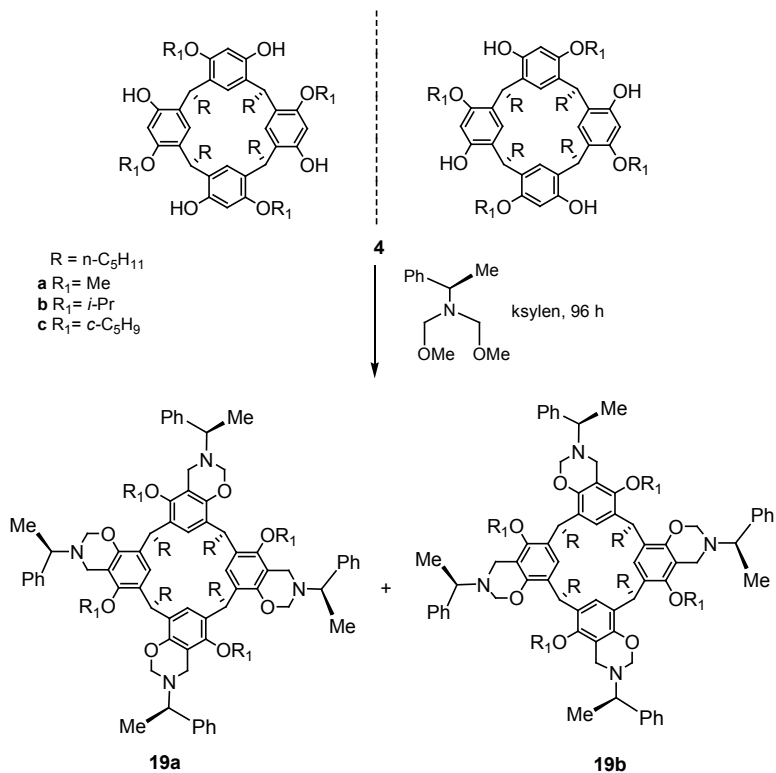
godzinnego ogrzewania mieszaniny racemicznej tetra-O-metylorezorcynoarenu **4** z *N,N*-bis(metoksymetylo)-*N*-benzyloaminą lub *N,N*-bis(2-metoksyetoksymetylo)-*N*-metyloaminą otrzymano z 73% wydajnością mieszaninę racemicznych oksazynowych pochodnych tetra-O-metylorezorcynoarenu **18** (Schemat 14) [18].



Schemat 14.

W reakcji racemicznego tetra-O-alkoksyrezorcynoarenu **4** z enancjomerycznymi eterami, otrzymanymi z *R*- lub *S*-( $\alpha$ -metylobenzylo)aminy, prowadzonej w temperaturze wrzenia ksyłenu w ciągu kilkadziesiąt godzin otrzymano mieszaniny diastereoizomerów **19a** i **19b** w stosunku: 1 do 1, które można rozdzielić na drodze preparatywnej chromatografii kolumnowej (Schemat 15) [18]. Syntezy tetraoksazynorezorcynoarenów: **18** i **19** przedstawione na schematach: 14 i 15 wyróżniały się dużą wydajnością, jednak wymagały długiego czasu ogrzewania w stosunkowo wysokich temperaturach. Z tych względów Haney i współpracownicy zbadali przebieg reakcji Mannicha w reaktorze mikrofalowym. Zastosowanie reaktora mikrofalowego w porównaniu z metodą prowadzenia reakcji w rozpuszczalniku ma wiele zalet: nie tylko skraca czas reakcji, ale również stwarza możliwość syntezy produktów o większej czystości z jeszcze większymi wydajnościami.



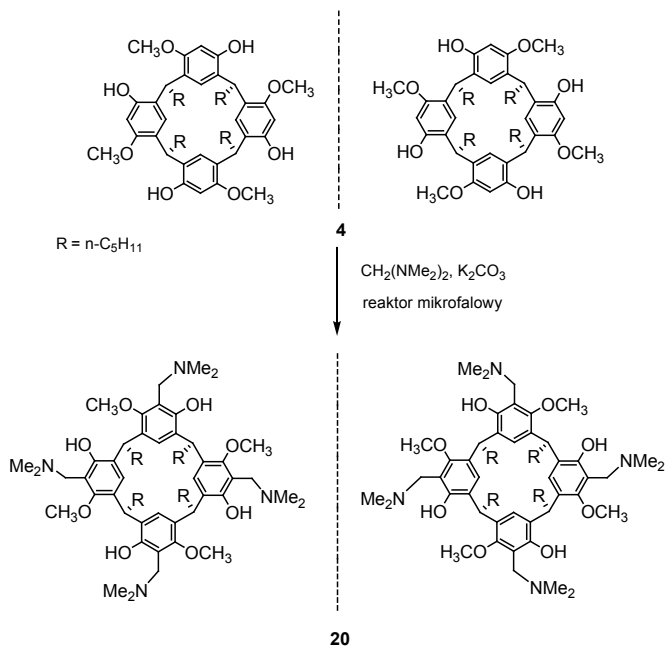


Schemat 15.

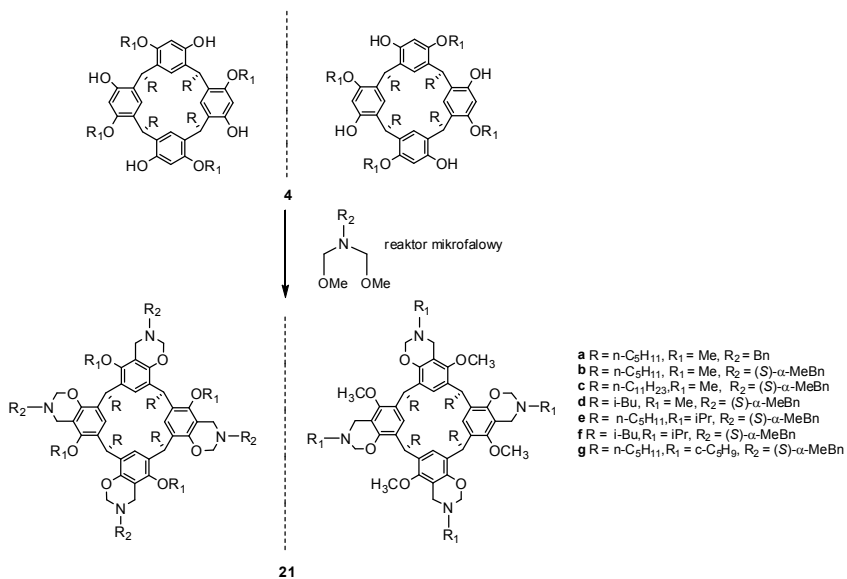
Na Schemacie 16 przedstawiono syntezę z wysoką 98% wydajnością tetra- $N,N$ -dimetylometyleno- podstawionego tetra-O-metylorezorcynoarenu **20** z racemicznego tetra-O-metylorezorcynoarenu **4** i bis(dimetyloamino)-metanu, którą przeprowadzono w reaktorze mikrofalowym w ciągu 10 minut [18].

Reakcja Mannicha między racemicznym tetra-O-metylorezorcynoarenem **4** i bis(amino)eterami prowadzona w reaktorze mikrofalowym dostarcza w ciągu zaledwie kilku minut w postaci racematów nowych tetra-O-metylorezorcynoarenów **21** zawierających  $N$ -podstawione pierścienie oksazynowe (Schemat 17) [18].

Zsyntezowane oksazynowych pochodnych tetra-O-metylorezorcynoarenu **18**, **19** jak również pochodne tetra-O-metylorezorcynoarenowe zawierające  $N$ -podstawione pierścienie oksazynowe **20** i **21** wykorzystano w celu zbadania wpływu  $N$ -chiralnie podstawionych ligandów na enancjoselektywność reakcji addycji dialkiloocynku do aromatycznych aldehydów [18].

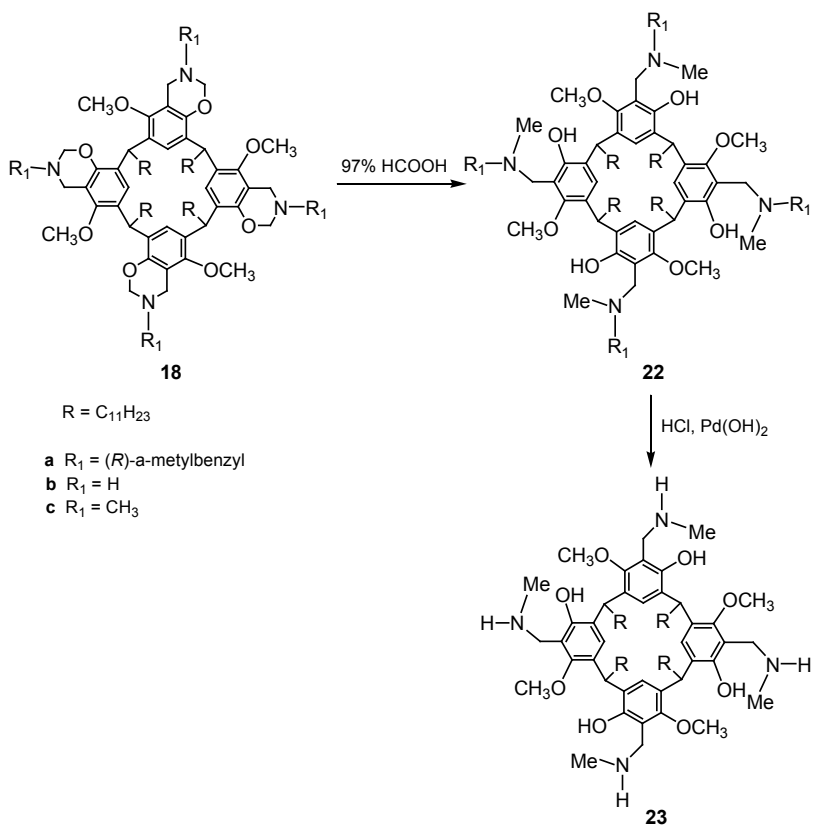


Schemat 16.



Schemat 17.

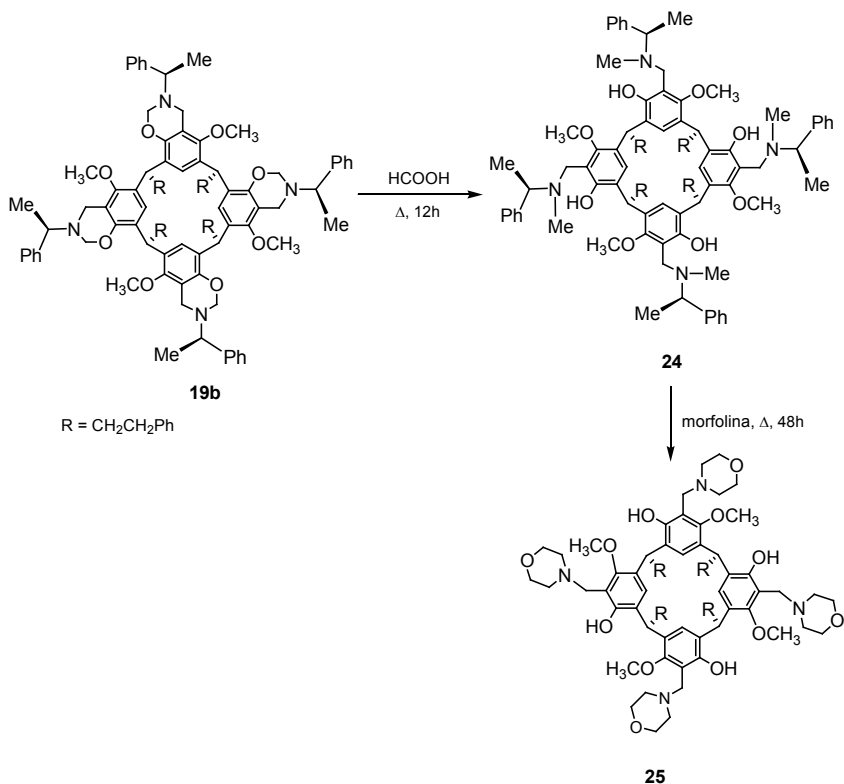
Ogrzewanie enancjomerycznie czystych pochodnych okazynowych tetra-O-metylorezorcynoarenów **18** w 97% procentowym kwasie mrówkowym prowadzi do otrzymania z 65% wydajnością enancjomerycznie czystych N-metylometylenowych pochodnych tetra-O-metylorezorcynoarenów **22**. Natomiast reakcja uwodorniania N-metylometylenowych pochodnych rezorcynoarenowych **22** prowadzona w obecności chlorowodoru z katalitycznym udziałem wodorotlenku palladu dostarczyła nowych enancjomerów N-metylo-tetra-O-metylo-rezorcynoarenów **23** (Schemat 18) [21].



Schemat 18.

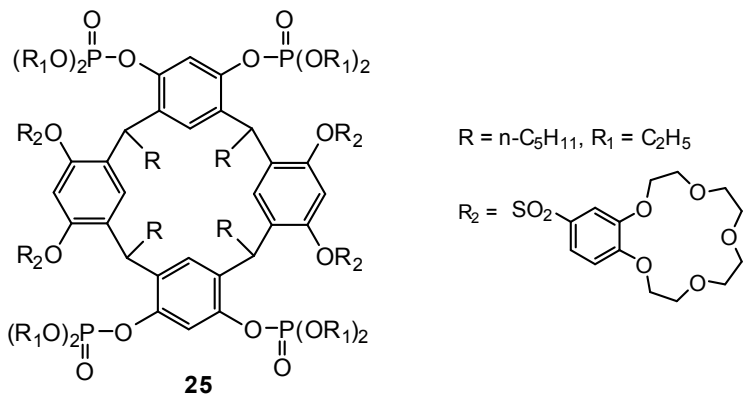
W wyniku ogrzewania z kwasem mrówkowym następuje otwarcie pierścieni oksazynowych. W ten sposób z tetraoksazynowej pochodnej tetra-O-metylorezorcynoarenu **19b** zsyntezowano z 83% wydajnością czy-

sty (R,S)-diastereoizomer tetra-O-metylorezorcynoarenu **24**, który pod wpływem ogrzewania z morfoliną prowadzono w odpowiednią tetra-O-metylorezorcynoarenową **25** zawierającą w swej strukturze cztery pierścienie (S)-morfolinowe (Schemat 19) [22].



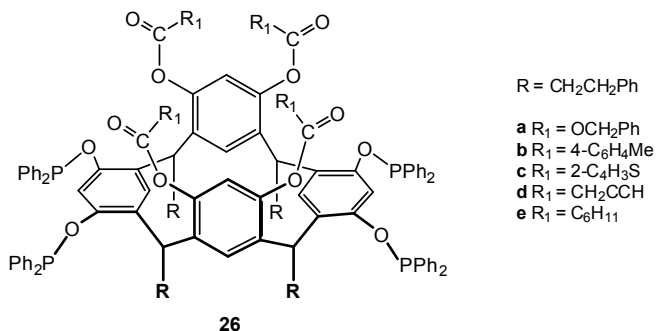
Schemat 19.

Wolne grupy hydroksylowe tetra-O-fosfororezorcynoarenów **2** otrzymanych w reakcji z chlorkami: dietylo- lub diizopropylfosforowmi w obecności trietyloaminy jako zasady, stosunkowo łatwo ulegają dalszym modyfikacjom. Na przykład w reakcji tetra-O-fosfororezorcynoarenu **2** z eterem koronowym: 4-chlorosulfonbenzo-15-korona-5 prowadzonej w obecności katalitycznych ilości trietyloaminy zsyntezowano odpowiedni tetra podstawiony tetra-O-fosfororezorcynoaren **25** (Rysunek 9) wykazujący własności jonoforowe w stosunku do jonów potasu [23].



Rysunek 9.

Bardzo dobre właściwości koordynujące zwłaszcza w stosunku do jonów srebra, złota i palladu wykazują odpowiednio zmodyfikowane tetra-O-fosfinorezorcynoareny **26**, których grupy hydroksylowe zastąpiono ugrupowaniem estrowym (Rysunek 10) [24].



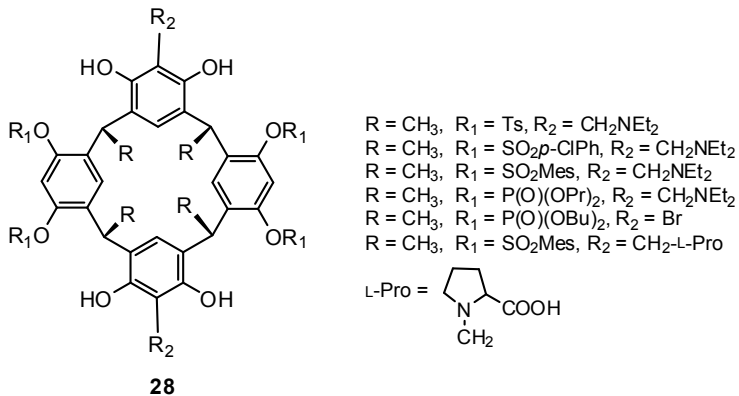
Rysunek 10.

Ligandy tetra-O-fosfinorezorcynoarenowe **26** w reakcji z czterema ekwiwalentami soli srebra  $\text{AgX}$  ( $\text{X}=\text{CF}_3\text{COO}$ ,  $\text{CF}_3\text{SO}_3$ ), z uwagi na dostępność wielu miejsc koordynacyjnych w makrocyclicznym szkielecie, tworzą kompleksy srebra (I) o interesującej strukturze supramolekularnej.

Cztery sulfonowe ugrupowania w tetratosylowych pochodnych rezorcynoarenów **3** jak również cztery fosforowe ugrupowania tetra-O-fosfororezorcynoarenów **2** uniemożliwiają podstawienie elektrofilowe w pozycjach „*orto*” jednostek rezorcynowych z sulfonowymi lub fosforowymi podstawnika-

mi, stwarzając tym samym warunki do dalszej funkcjonalizacji pozycji „*orto*” pozostałych jednostek rezorcarenowych z wolnymi grupami –OH.

Tak tetra-O-fosfonianowe **2** jak i tetra-O-sulfonowe **3** analogi rezorcynoarenu **1** w wyniku reakcji aminometylowania drugorzędowymi aminami lub bromowania N-bromo-sukcynoimidem katalizowanej kwasem octowym dostarczają odpowiednio diamino lub dibromo podstawionych połączeń rezorcynoarenowych produktów **28** (Rysunek 11) [11].



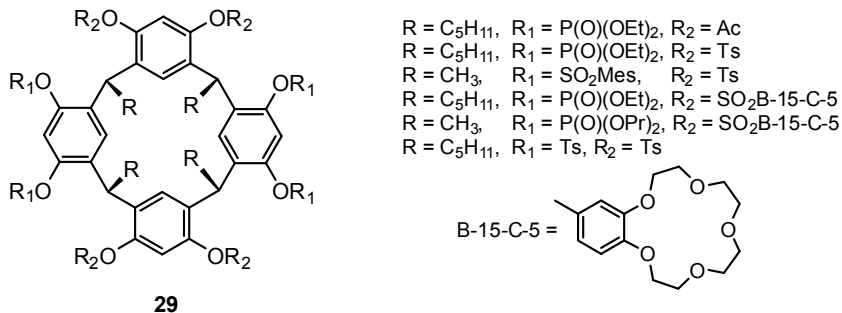
Rysunek 11.

Tetra-O-fosfonianowe i tetra-O-sulfonowe pochodne rezorcynoarenowe **2** i **3** łatwo ulegają acylowaniu pod wpływem chlorku tosyłu, chlorku acetylu lub chlorku benzeno-15-koronosulfonowego dostarczając odpowiednich oktaestrów rezorcynoarenowych tetra-O-fosfonianowych lub tetra-O-sulfonowych **29** (Rysunek 12) [11].

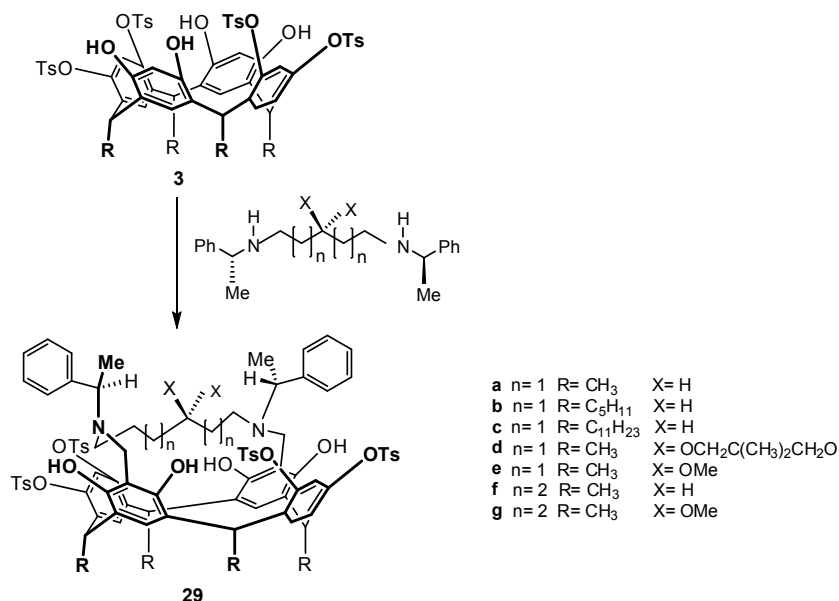
Aminometylowanie chiralnymi diaminami tetra-O-tosylrezorcynoarenów **3** o symetrii  $C_{2v}$  dostarcza na drodze standardowej reakcji Mannicha enancjomerycznie czystych produktów **29** z poprzecznym mostkiem diaminowym (Schemat 20) [25,26].

Zsyntezowane pochodne rezorcynoarenów **29** wykorzystano jako katalizatory w asymetrycznej reakcji addycji dietylocynku do benzaldehydu [27]. W wyniku przeprowadzonych reakcji addycji otrzymano 1-fenyl-1-propanol z nadmiarem enancjomerycznym w zakresie 5- 49%. Poprzez zastosowanie do badań szeregu pochodnych rezorcynoarenu **29** z różnymi modyfikacjami strukturalnymi, zbadano wpływ: czynników sterycznych, otoczenia elektronowego w pobliżu wnęki, poprzez zastosowanie różnych grup blokujących, wielkości dolnej obręczy, charakteru chemicznego podstawników w mostku łączącym jednostki rezorcyny, długości tego mostka na katalizie w powyższej reakcji. Na

podstawie zebranych wyników opracowano mechanizm katalizy asymetrycznej reakcji addycji za pomocą pochodnych rezorcynoarenu **29**.



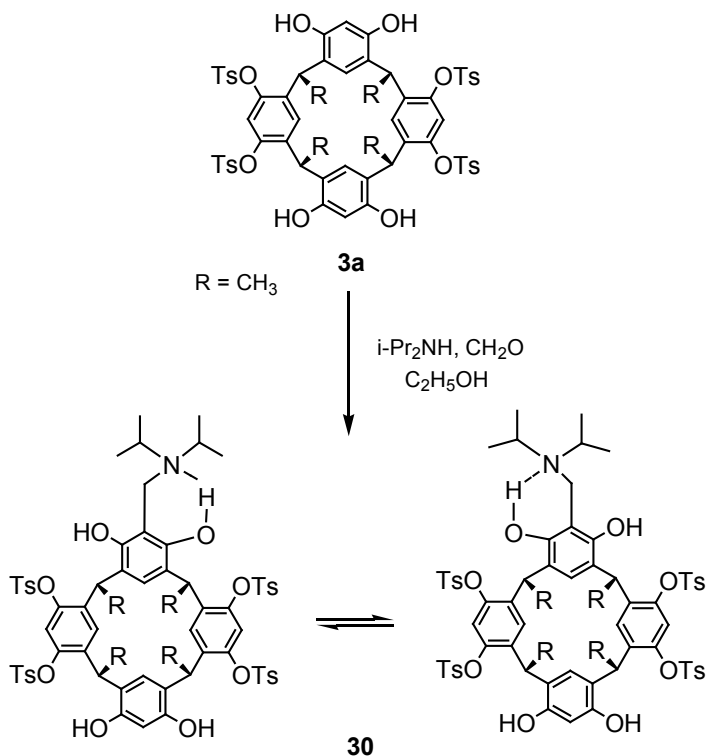
Rysunek 12.



Schemat 20.

Reakcja Mannicha teratotsylo-O-podstawionego rezorcynoarenu **3a** z formaldehydem i z wykorzystaniem diizopropylaminy w stosunku 1:4:4 w etanolu prowadzi do otrzymania monopodstawionego chiralnego tetratsylorezorcynoarenu **30**, który z uwagi na możliwość tworzenia dwukierunkowego wiązania

wodorowego między grupą aminową i sąsiednimi grupami hydroksylowymi występuje w postaci dwóch cykloenancjomerów (Schemat 21) [28].

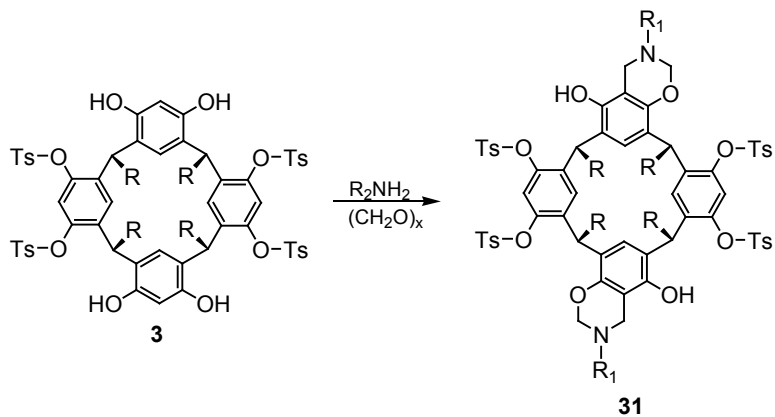


Schemat 21.

W wyniku regioselektywnej reakcji kondensacji tetra-O-tosylrezorcynoarenów **3** z formaldehydem i wybranymi pierwszorzędowymi aminami otrzymano z wysokimi wydajnościami (65%-74%) odpowiednie tetra-tosylrezorcynoareny **31** zawierające dwa oksazynowe pierścienie w naprzeciwległych jednostkach rezorcynowych (Schemat 22) [29].

W tym przypadku teoretycznie mogą tworzyć się dwa regioizomery bis-oksazynowych tetratosylrezorcynoarenów **31**: chiralna struktura z oksazynowymi pierścieniami w pozycji *trans* o dwukrotnej osi symetrii jak również forma *mezo* z pierścieniami oksazynowymi w położeniu *cis* i płaszczyzną symetrii (Rysunek 13). Analiza otrzymanych produktów wskazuje na tworzenie się wyłącznie chiralnej struktury **31-trans**.

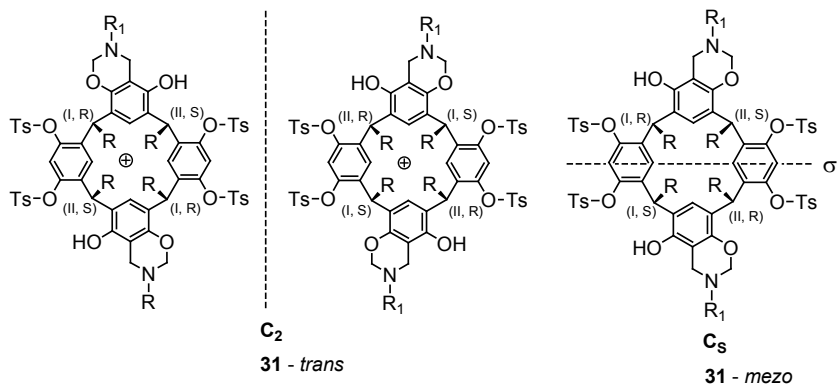




- a** R = CH<sub>3</sub>, R<sub>1</sub> = C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>  
**b** R = CH<sub>3</sub>, R<sub>1</sub> = CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>  
**c** R = CH<sub>3</sub>, R<sub>1</sub> = C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>  
**d** R = CH<sub>3</sub>, R<sub>1</sub> = C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>  
**e** R = CH<sub>3</sub>, R<sub>1</sub> = C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>  
**f** R = CH<sub>3</sub>, R<sub>1</sub> = C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>  
**g** R = CH<sub>3</sub>, R<sub>1</sub> = CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N

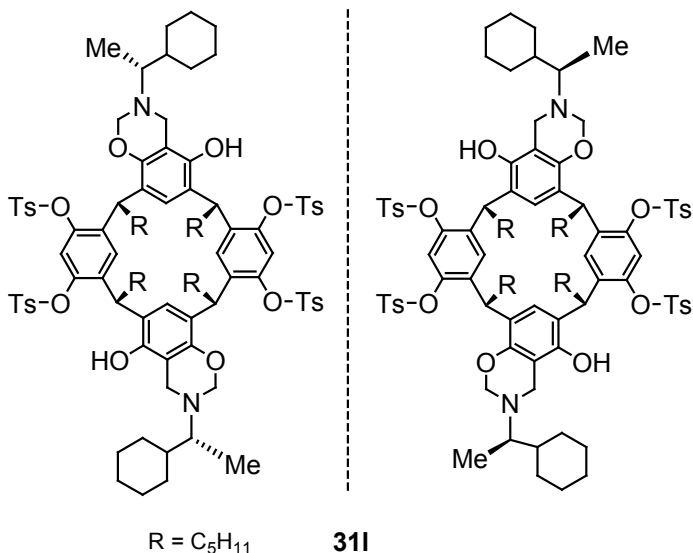
- h** R = CH<sub>3</sub>, R<sub>1</sub> =   
**i** R = CH<sub>3</sub>, R<sub>1</sub> =   
**j** R = C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>, R<sub>1</sub> = C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>  
**k** R = C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>, R<sub>1</sub> = CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>  
**l** R = C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>, R<sub>1</sub> =

Schemat 22.



Rysunek 15.

Zastosowanie chiralnej (*R*)- $\alpha$ -cykloheksyloetyloaminy w reakcji kondensacji z tetratosylowymi pochodnymi rezorcynoarenu **3a** prowadzi do dwóch diastereoizomerów o symetrii  $C_2$  w stosunku 60 : 40 (Rysunek 16).



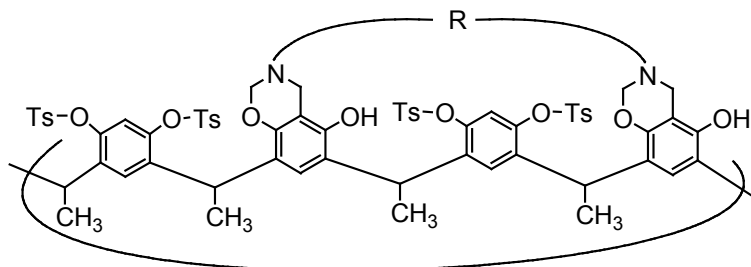
Rysunek 16.

Reakcja aminometylowania tetratosyloksazynowych pochodnych rezorcynoarenów **3a** diaminami o wystarczająco długich łańcuchach alkilowych, może prowadzić do otrzymania nowych pochodnych tetratosylorezorcynoarenów **32**, w których dwie naprzeciwległe jednostki oksazynowe są połączone łańcuchem alkilowym (Rysunek 17) [29].


Produktami reakcji aminometylowania tetratosylowych pochodnych rezorcynoarenów **3a** z diaminami o krótkich łańcuchach alkilowych takich jak: etylenodiamina są wyłącznie makrobicykliczne połączenia dioksazyno-O-tetratosylorezorcynoarenowe **33** (Rysunek 18).

W reakcji Mannicha tetratosylowej pochodnej rezorcynoarenu **3a** z udziałem formaldehydu, N-metyloamidowych pochodnych aminokwasów: (*R,S*)-fenyloalaniny, (*S*)-fenyloalaniny, (*R,S*)-fenyloglicyny i (*S*)-fenyloglicyny w obecności katalitycznych ilości kwasu octowego otrzymano pojedyncze diastereoizomery mono-benzoaksazynowych pochodnych **34** lub bis-benzoaksazynowych pochodnych **35**, w zależności od czasu ogrzewania substratów i rodzaju użytej amidowej pochodnej aminokwasu. Ogrzewane w metanolu racemicznej lub enancjomerycznej amidowej pochodnej fenyloalaniny w ciągu pięciu minut

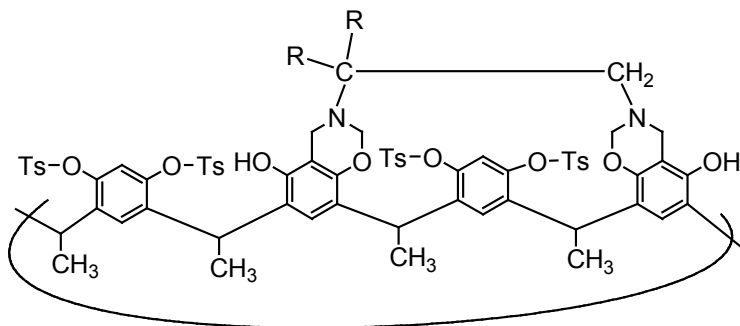
dostarcza z wysokimi wydajnościami odpowiednio: racemicznej lub enancjomerycznej mono-benzooksazynowej pochodnej, natomiast dłuższe ogrzewanie prowadzi do pochodnych bis-benzooksazynowych. Bez względu na czas ogrzewania w reakcjach z udziałem pochodnej fenyloglicyny produktem jest tylko monooksazynowa pochodna **34b** (Rysunek 19). Analiza krystaliczna otrzymanych mono-benzooksazynowych pochodnych tetratosylo-rezorcynoarenów **34**, jak również bis-benzooksazynowych pochodnych tetratosylorezorcynoarenu **35** wykazała, że są to konformery łódkowe [30].



**32**

- a** R =  $-(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2-$   
**b** R =  $-(\text{CH}_2)_3\text{O}(\text{CH}_2)_4\text{O}(\text{CH}_2)_3-$   
**c** R =  $\cdot\text{CH}_2$    $\text{CH}_2\cdot$

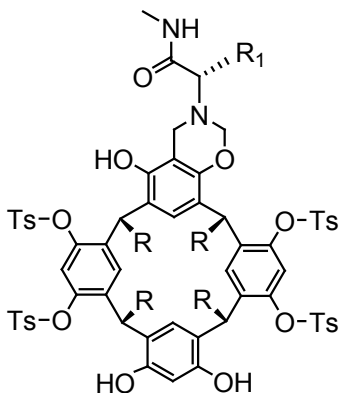
Rysunek 17.



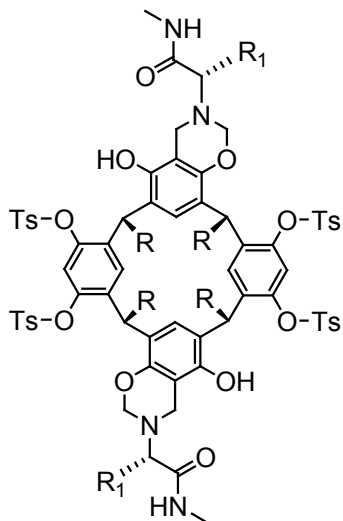
**33**

- a** R = H  
**b** R = CH<sub>3</sub>

Rysunek 18.

**34**

- a** R = *i*-Bu, R<sub>1</sub> = CH<sub>2</sub>Ph  
**b** R = *i*-Bu, R<sub>1</sub> = Ph

**35**

- R = *i*-Bu, R<sub>1</sub> = CH<sub>2</sub>Ph

Rysunek 19.

#### 4. Zakończenie

W zaprezentowanym przeglądzie przedstawiliśmy aktualne informacje na temat syntezy i funkcjonalizacji tetra-O-podstawionych rezorcynoarenów. Potencjalne możliwości zastosowania jak również dalszej modyfikacji tej klasy pochodnych rezorcynoarenów są ogromne. Ich względnie łatwe modyfikacje chemiczne mogą dostarczać dużej liczby nowych połączeń rezorcynoarenowych o predeterminowanych właściwościach fizykochemicznych.

#### Literatura:

1. Ed.J.L. Atwood, J.E D. Davis, *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, D.D. McNicol, F. Vögtle, Elsevier Science, Oxford 1996
2. a) C.D. Gutsche, *Calixarenes Revisited*, Monographs in Supramolecular Chemistry, The Royal Society of Chemistry 1988; b) J. Vicens, V. Böhmer, *Calixarenes: a Versatile Class of Macrocyclic Compounds*, Kluwer Academic Press, Dordrecht, 1991
3. D.J. Cram, J.M. Cram, *Container Molecules and Their Guests*, J. F. Stoddart Series Editor, The Royal Society of Cambridge, U.K. 1991

4. J.B. Niederl, H.J. Vogiel, *J. Am. Chem. Soc.*, 1940, **62**, 2512
5. a) H. Erdtman, S. Höglberg, S. Abrahamsson, B. Nilsson, *Tetrahedron Lett.*, 1968, 1679, b) B. Nilsson, *Acta Chem. Scand.*, 1968, **22**, 732
6. P. Timmerman, W. Verboom, D.N. Reinhoudt, *Tetrahedron*, 1996, **52**, No 8, 266
7. W. Iwanek, *Wiadomości Chemiczne*, Biblioteka, 1997
8. A. Wzorek, B. Gawdzik, M. Urbaniak, W. Iwanek, *Recent Res. Devel. Organic Chem.*, 2004, **8**, 85
9. M. Urbaniak, W. Iwanek, *Syntetyczne receptory molekularne*, Betagraf P.U.H., Poznań 2007, 71
10. a) J. Lipkowski, O.I. Kalchenko, J. Slowikowska, V.I. Kalchenko, O. Lukin, L.N. Markovsky, R. Nowakowsky, *J. Phys. Org. Chem.*, 1998, **11**, 426, b) V.I. Kalchenko, A.N. Shivanyuk, V.V. Pirozhenko, L.N. Markovsky, *Zhurn. Obshch. Khim.*, 1994, **64**, 1558; c) *Chem. Abstr.*, 1995, **122**, 314625u
11. O. Lukin, A. Shivanyuk, V.V. Pirozhenko, I.F. Tsymbal, V.I. Kalchenko, *J. Org. Chem.*, 1998, **63**, No 25, 9510
12. M.J. MacIldowie, M. Mocerino, B.W. Skelton, A.H. White, *Organic Letters*, 2000, **2**, No 24, 3869
13. J.Y. Boxhall, Ph.C.B. Page, M.R. J. Elsegood, Y. Chan, H. Heaney, K.E. Holmes, M.J. McGrath, *Synlett.*, 2003, **7**, 1002
14. M. Klaes, C. Agena, M. Köhler, M. Inoue, T. Wada, Y. Inoue, J. Mattay, *Eur. J. Org. Chem.*, 2003, 1404
15. K. Salorinne, M. Nissinen, *Organic Letters*, 2006, **8**, No 24, 5473
16. K. Salorinne, M. Nissinen, *Tetrahedron*, 2008, **64**, 1798
17. M. Klaes, B. Neumann, H-G. Stammer, J. Mattay, *Eur. J. Org. Chem.*, 2005, 864
18. B.R. Buckley, I.Y. Boxhall, P.C.B. Page, Y. Chan, M.R.J. Elsegood, H. Haney, K.E. Holmes, M.J. MacIldowie, M. McKee, M.J. McGrath, M. Mocerino, A.M. Poulton, E.P. Sampler, B.W. Skelton, A.H. White, *Eur. J. Org. Chem.*, 2006, 5117
19. B.R. Buckley, P.C.B. Page, Y. Chan, H. Haney, M. Klaes, M.J. MacIldowie, M. McKee, J. Mattay, M. Mocerino, E. Moreno, B.W. Skelton, A.H. White, *Eur. J. Org. Chem.*, 2006, 5135
20. M.J. MacIldowie, M. Mocerino, M.I. Ogden, B.W. Skelton, *Tetrahedron*, 2007, **63**, 10825
21. P.C.B. Page, H. Heaney, E.P. Sampler, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 6751
22. B.R. Buckley, P.C.B. Page, H. Haney, M.J. McGrath, E.P. Sampler, R.F. Wilkins, *Tetrahedron Letters*, 2003, **44**, 2965

23. I.S. Antipin, E.Kh. Kazakova, W.D. Habicher, A.I. Konovalov, *Russian Chemical Reviews*, 1998, **67**, 905
24. a) D.J. Eisler, R.J. Puddephatt, *Inorg. Chem.*, 2005, **44**, 4666, b) D.J.Eisler, R.J.Puddephatt, *Inorg. Chem.*, 2006, **45**, 7295, c) D.J. Eisler, R.J. Puddephatt, *Crysta Growth & Design*, 2005, **5**, No 1, 56
25. G. Arnott, P.C.B. Page, H. Haney, R. Hunter, E.P. Samoler, *Syntett*, 2001, **3**, 412
26. G. Arnott, H. Haney, R. Hunter, P.C.B. Page, *Eur. J. Org. Chem.*, 2004, 5126
27. G. Arnott, R. Hunter, *Tetrahedron*, 2006, **62**, 992
28. M. Luostarinen, A. Shivanyuk, K. Rissen, *Organic Letters*, 2001, **3**, No 26, 4141
29. A. Shivanyuk, Ch. Schmidt, V. Böhmer, E.F. Paulus, O. Lukin, W. Vogt, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 4319
30. A. Szumna, M. Górski, O. Lukin, *Tetrahedron Letters*, 2005, **46**, 7423

## Rozdział IV

### Dendrymery

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

#### Wprowadzenie

Trójwymiarowe makromolekuły posiadające regularną, gęsto upakowaną budowę, powstają najczęściej w wyniku ograniczeń konformacyjnych nie pokrywających się wzajemnie fragmentów, co różnicuje je od polimerów. Rozgałęzione makromolekuły posiadające zazwyczaj ściśle zdefiniowaną strukturę rozpatruje się jako pojedynczą cząsteczkę, która zachowuje elastyczność łańcuchów i swój osobliwy molekularny kształt, który nie jest ściśle określony i w głównej mierze zależy od wewnątrz cząsteczkowych interakcji elementów składowych makromolekuły i zaburzeń związanych z otaczającym środowiskiem. Swoistym przykładem takich makromolekuł są dendrymery, które w swojej specyficznej budowie łączą ze sobą właściwości zarówno pojedynczych cząsteczek jak i długich rozbudowanych polimerów. Trójwymiarowa postać dendrymerów, oraz szeroka możliwość użycia substratów do ich konstrukcji stwarza wielowartościowy potencjał i szerokie możliwości ich zastosowania, w celach diagnostycznych i środowiskowych. Dendrymery w zależności od składu i struktury są obszarem zainteresowań wielu dziedzin nauk, począwszy od chemii, biotechnologii do aplikacji biochemicznych. Związki te znalazły szerokie wykorzystanie począwszy od produkcji katalizatorów do użycia ich jako środki przeciwbakteryjne, antygrzybiczne i antywirusowe. Szczególnym zainteresowaniem cieszą się dendrymery peptydowe, które znalazły duże zastosowanie przemysłowe, głównie jako mimetyki do kompleksowania kationów i jako medium transportujące substancje lecznicze: syntetyczne szczepionki przeciw pasożytom, bakteriom i wirusom, kontrastów wykorzystywanych w MRI, przeciwciał, lub

materiał genetyczny. Przegląd ten koncentruje się na opisanu aktualnych klas dendrymerów, metodologii ich syntezy i krótkiej charakterystyce właściwości.

### **Rys historyczny, budowa dendrymerów**

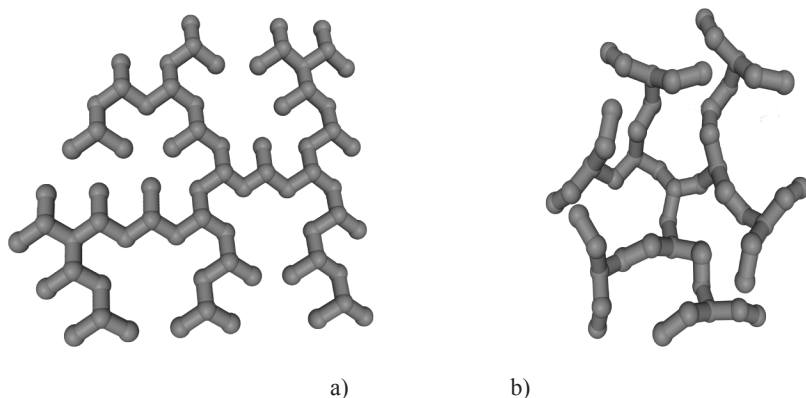
Dendrymery są makromolekułami posiadającymi precyzyjnie zdefiniowaną strukturę, stanowiącą kluczową rolę w ewolucji chemii makromolekularnej. Po raz pierwszy ich przypuszczalna budowa została teoretycznie opisana przez Paul'a J. Flory w 1941 roku [1], który wnioskował potencjalne istnienie rozgałęzionych molekuł. Dopiero po wielu latach od tamtego wydarzenia po raz pierwszy zostały one otrzymane niezależnie, przez niemieckiego uczonego Fritza Vöglera w 1978 [2], który opracował interakcyjną kaskadową metodę syntezy małowcząsteczkowych rozgałęzionych amin [3], Donalda Tomalię w 1984-1985 [4,5], który przeprowadził syntezę z wykorzystaniem istnienia „jadra” molekuly otrzymując pierwsze dendrymery typu PAMAM poli(amidoamidowy), i George'a R. Newcome'a [6], który otrzymał trójwymiarowe dendrymery pokryte zewnętrznymi grupami polarnymi. W latach osiemdziesiątych dwudziestego wieku Denkewalter [7] opatentował natomiast pierwszy dendrymer peptydowy, oparty na L-lizynie. Odkrycia Jean M. J. Fréchet'a [8] w 1990 roku dendrymerów typu polieterowego oraz późniejsze Moore'a [9], który otrzymał feniloacetylenowe dendrymery przyczyniły się do rozpropagowania prac i rozwojem nad tą klasą związków.

Termin dendrymer pierwotnie wywodzi się od greckiego słowa *dendron* oznaczającego drzewo, bądź gałąź i słowa *meros* oznaczającego część [10]. Inną nazwą rzadziej używaną dla określenia tych molekuł to „arborole” wprowadzona przez Newcome'a (łac: arboris = drzewo) dla określenia otrzymanych przez siebie związków, lub też kaskadowe polimery.

Dendrymery pomimo dużych rozmiarów posiadają dobrze zdefiniowaną strukturę. W odróżnieniu od tradycyjnych polimerów charakteryzują się małą dyspersją, a ich elementy składowe tworzą sferyczną, bądź pół-sferyczną strukturę, o dużym upakowaniu grup funkcyjnych znajdujących się na powierzchni makromolekuły. Istnieją dwa typy polimerów zawierające w swojej budowie całkowicie rozgałęzione, powtarzające się po sobie jednostki. Należą do nich regularne dendrymery i nieregularne, mniej doskonałe, rozgałęzione polimery (ang: hyperbranched polymers), które powstają w wyniku jednoetapowej nieinteraktywnej polimeryzacji, dlatego też w ich strukturze wewnętrznej znajdują się fragmenty zawierające nie przereagowane grupy funkcyjne [11,12] (Rysunek 1).



## Dendrymery



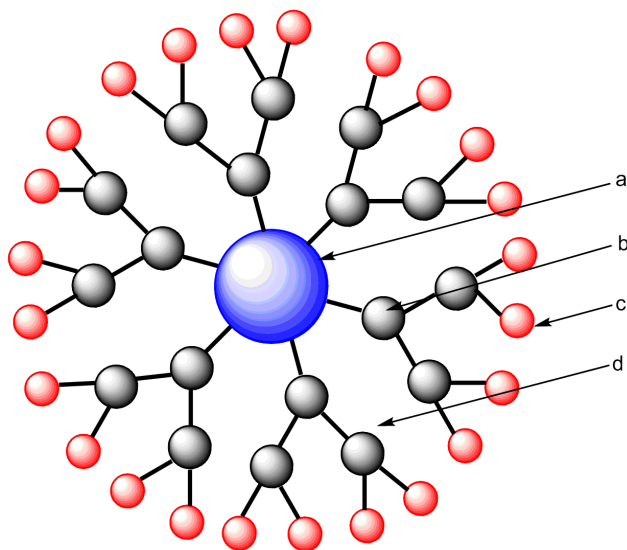
Rysunek 1. Schemat budowy przestrzennej a) rozgałęzionych polimerów, b) dendrymerów.

Istnieje kilka cech charakterystycznych tylko dla dendrymerów, co pozwala na wyodrębnienie i rozróżnienie ich od tradycyjnych polimerów liniowych.

Dendrymery, w odróżnieniu od polimerów mogą istnieć jako monodyspersyjne pojedyncze indywidua chemiczne, które najczęściej powstają w wyniku wieloetapowej syntezy, a ich produkty pośrednie na każdym etapie są oczyszczane, co w przypadku polimerów jest niemożliwe. Ze wzrostem masy cząsteczkowej dendrymerów wzrasta zawartość końcowych grup powierzchniowych, które w głównej mierze odpowiadają za właściwości fizyczne całej molekuly. Liniowe polimery natomiast zawierają tylko dwie grupy funkcyjne początkową i końcową. W przypadku liniowych polimerów, ich wzrost w trakcie syntezy, teoretycznie może być kontynuowany bez końca, o ile pozwolą na to warunki rozpuszczalności. Wzrost dendrymerów może być określony matematycznie. Ilość jednostek monomerycznych wzrasta wykładniczo do ich generacji, a objętość proporcjonalnie do sześcianu ich promieni. Jednakże na zahamowanie nieograniczonego wzrostu dendrymerów wpływają ograniczenia fizyczne. W pewnej generacji ze względu na ograniczenia steryczne molekuly przyjmują kulistą postać, a ich regularny wzrost i dalszy rozwój zostaje zahamowany. Bariere tę określa się jako gęstością upakowania, która została wprowadzona przez De Genna [13]. Dalszy wzrost dendrymeru po przekroczeniu tej gęstości prowadzi do otrzymania nieregularnych związków zawierających wady strukturalne.

Rozpatrując budowę wewnętrzną dendrymerów, można wyodrębnić w nich trzy charakterystyczne regiony: a) wewnętrzny nazywany jądrem cząsteczki, bądź też centralnym punktem molekuly, b) warstwę wewnętrzną, zawierającą powtarzające się po sobie rozgałęzione jednostki połączone z jądrem, i c) obszar zewnętrzny, zawierający cyklicznie powtarzające się grupy funkcyjne (hydrok-

syłowe, aminowe, karboksylowe etc), stanowiące ostatnią, zewnętrzną warstwę dendrymeru (Rysunek 2). Istotną cechą dendrymerów jest występowanie w ich strukturze wolnych przestrzeni międzycząsteczkowych (d).

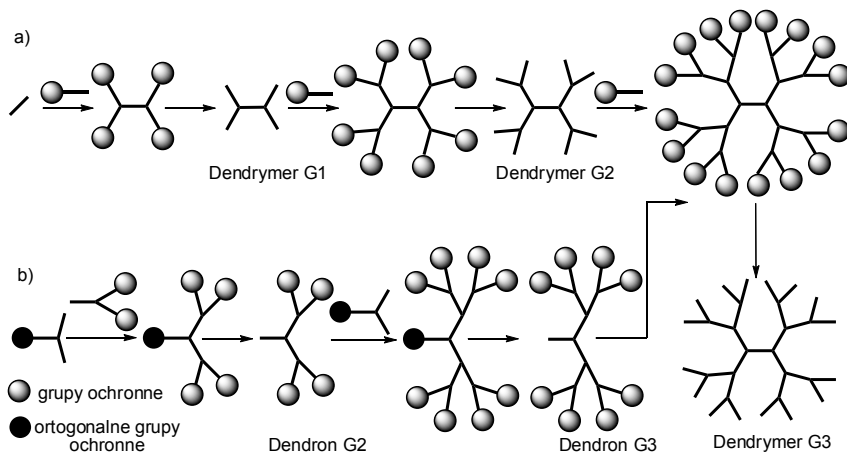


Rysunek 2. Schemat budowy wewnętrznej dendrymerów: a) jądro, b) ramiona boczne c) powierzchniowe grupy funkcyjne, d) przestrzenie wewnętrzne.

Dendrymery peptydowe są to zazwyczaj promieniście rozgałęzione makromolekuły, zawierające wiązania peptydowe [13], pomiędzy naturalnymi, bądź sztucznymi aminokwasami, które mogą znajdować się w wewnętrznej strukturze dendrymerów, jądrze dendrymeru, bądź w obszarze peryferyjnych łańcuchów zewnętrznych. Wśród dendrymerów peptydowych można wyróżnić trzy charakterystyczne rodzaje: „zaszczepione” dendrymery zawierające jedynie łańcuchy peptydowe w warstwie zewnętrznej (powierzchniowej). Drugą grupę dendrymerów stanowią dendrymery zbudowane tylko z peptydów i aminokwasów, natomiast do trzeciej grupy należą dendrymery zawierające peptydowe jądro i zewnętrzną warstwę powierzchniową, natomiast warstwa wewnętrzna (rozgałęzająca) jest pochodzenia nie peptydowego.

Dendrymery inaczej od liniowych polimerów które posiadają losową strukturę wewnętrzną, tworzą ugrupowania trójwymiarowe, w których powtarzające się fragmenty w warstwie wewnętrznej odróżniają się od siebie nazywając je generacjami. „Jądro” dendrymeru czasami nazywane jest „generacja zero” (G0). Istnieją również dendrymery nie zawierające rdzenia „jądra”, są to najczęściej

dendrymery peptydowe. Dendrymery zawierające rdzeń, podczas syntezy rozwijają się promieniście we wszystkich kierunkach, w zależności od wartościowości rdzenia i jednostek uczestniczących w tworzeniu ramion bocznych. Dendrymery nie zawierające rdzenia podczas syntezy rozwijają się tylko w jednym kierunku i nazywane są dendronami [15]. Dendrony są bardzo często wykorzystywane do syntezy właściwych dendrymerów (Rysunek 3). Peptydowe dendrony, dla ułatwienia terminologii nazywane są polipeptydami.



Rysunek 3. Dwie drogi preparatywne dendrymerów a) rozbieżna b) zbieżna, w których używa się: a) dendrymerów, b) dendronów [10].

Dendrymery niższych generacji zwykle mają tendencję do tworzenia form otwartych. Przyjmuje się, że dendrymery występują w postaci kulistej dopiero od piątej generacji. Strukturalne podobieństwo dendrymerów do globularnych białek, powoduje że mogą one pełnić podobne funkcje w organizmach żywych, jednakże przewagą dendrymerów jest ich mniejszy rozmiar oraz możliwość zmiany ich kształtu wraz ze wzrostem generacji i ze zmianą warunków środowiskowych. W dendrymerach podobnie jak i w białkach zjawisko rozpoznania molekularnego typu gość- gospodarz może zachodzić niezależnie od siebie na obrzeżach molekuly, bądź wewnątrz cząsteczki. Wiążące grupy wewnątrz dendrymerów nazywane są endo-receptorami. Egzo-receptory to grupy peryferyjne lub końcowe biorące aktywny udział w procesie kompleksowania [16].

### Synteza dendrymerów

Dendrymery są syntezowane chemicznie dwoma podstawowymi, różniącymi się od siebie metodami : zbieżną oraz rozbieżną (Rysunek 3). W metodzie

rozbieżnej punktem wyjściowym od którego syntezowane są dendryмеры, jest wielofunkcyjny rdzeń, do którego dobudowywane są kolejne generacje. Jądro molekuly reaguje zazwyczaj z monomerami zawierającymi jedną i dwie nieczynne grupy dając pierwszą generację dendrymeru. W dalszej kolejności przeprowadza się aktywację obszarów peryferyjnych powstałego polimeru, które reagują z kolejną porcją takiego samego monomeru, jak użytego we wcześniejszym etapie [17]. Duża liczba reakcji na pojedynczej molekule zawierającej dużą ilość miejsc reaktywnych wymaga efektywnych przejść pomiędzy poszczególnymi etapami syntezy sięgających 99%, dlatego też aby uniknąć defektów końcowego produktu, stosuje się duże nadmiary substratów co może być wadą tej metody, ponieważ stwarza to problemy w oczyszczaniu finalnego produktu [18].

Alternatywną metodą do metody rozbieżnej jest metoda zbieżna [8, 19], opracowana przez Hawker'a i Fréchet'a. Metoda ta opiera się na syntezie dendrymerów niejako od „końca” ramion bocznych i grup funkcyjnych do rdzenia molekuly, wykorzystując fragmenty dendronów, które wystarczająco duże sprzęgają się razem do rdzenia. W podejściu zbieżnym wykorzystuje się małą liczbę reakcji pomiędzy reaktywnymi grupami funkcyjnymi poszczególnych dendronów, co niewątpliwie jest atutem tej metody, ponieważ istnieje mniej reakcji ubocznych oraz każda generacja dendrymeru może być dodatkowo oczyszczana na poszczególnych etapach syntezy. Niewątpliwym dodatkowym atutem wykorzystania metody zbieżnej jest możliwość łączenia kilku różniących się od siebie dendronów, co niemożliwe jest w przypadku metody rozbieżnej. W ten sposób, można w bardzo prosty sposób otrzymać mieszane dendromery, niosące w sobie właściwości fizyczne i chemiczne kilku dendrymerów [20].

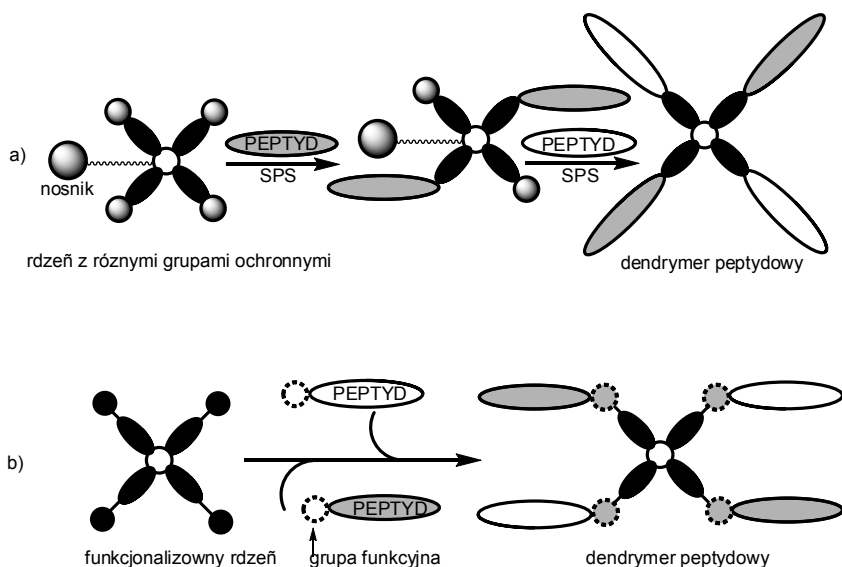
W syntezie dendrymerów peptydowych, metoda zbieżna i rozbieżna w połączeniu z konwencjonalną syntezą peptydów na nośniku stałym oraz tworzeniem regiospecyficznych wiązań amidowych lub nie amidowych podczas syntezy roztworze, również znalazła szerokie zastosowanie (Rysunek 4).

W przypadku dendrymerów peptydowych, szybkość i efektywność, to podstawowe zalety metody rozbieżnej, szczególnie w przypadku stopniowej syntezy na nośniku stałym, podczas której produkty pośrednie nie muszą być oczyszczane i charakteryzowane. Metoda ta zazwyczaj jest wykorzystywana do syntezy małych dendrymerów ze względu na problemy oczyszczania dendrymerów o dużych masach.

Metoda zbieżna jest metodą pośrednią, ponieważ każdy fragment z nowo tworzonego dendrymeru jest syntezowany oddzielnie, dopiero oczyszczone elementy peptydowe są ze sobą łączone w sekwencję żadanego dendrymeru, dlatego zalety chemiczne tej metody nie są jednoznaczne. Użycie metody zbieżnej wymaga niestety więcej czynności niż w przypadku stopniowej syntezy na no-

śniku stałym, ze względu na dodatkowe czynności związane z oczyszczaniem i charakterystyką używanych półproduktów. Strategia ta również może przynieść wiele kłopotów związanych z rozpuszczalnością w przypadku użycia peptydów zawierających ochronne grupy boczne.

Dendrymery peptydowe, oczyszcza się w bardzo podobny sposób jak peptydy i białka. Surowe syntetyczne dendrymery peptydowe otrzymane metodą rozbieżną wymagają często użycie takich metod jak dializa, filtracja żelowa, a następnie wysokosprawnej chromatografii ciśnieniowej, bądź jonowymiennej. W przypadku dendrymerów otrzymanych w drodze zbieżnej, otrzymane produkty oczyszcza się łatwiej, najczęściej z wykorzystaniem metod chromatograficznych [14].



Rysunek 4. Schematyczne porównanie metod syntezy dendrymerów peptydowych a) rozbieżnej, b) zbieżnej [14].

Pośród dendrymerów można wyróżnić dwa typy generacji: generację całkowitą posiadają dendrymery, które zawierają na końcach grupy hydroksylowe, lub aminowe, natomiast dendrymery o charakterze anionowym, posiadające na końcach grupy karboksylowe są generacji półówkowej [17].

Wraz ze wzrostem, dendrymery nabierają charakterystyczne dla siebie właściwości. Ich struktura jest podzielona na trzy zasadnicze części: obszar w któ-

rym występuje najwięcej miejsc reaktywnych, obszar tuż przy powierzchni ze ściśle określonym mikrośrodowiskiem oraz obszar rdzenia molekuly. Wnętrze tak utworzonego dendrymeru bardzo dobrze nadaje się do hermetyzacji zaproponowanych molekuł, a ich trójstopniowy podział powoduje że mogą pełnić rolę medium transportującego lek, leki, bądź duże makromolekuly.

Synteze dendrymerów można również przeprowadzać wykorzystując do tego celu syntezę z użyciem enzymów. Pierwsza taka synteza została opisana w 1998 roku [21]. Dendrymer pierwszej generacji na podstawie poli( $\epsilon$ -kaprolaktonu) otrzymano metodą selektywnego acylowania pierwszorzędowych grup końcowych łańcuchów z udziałem lipazy B *Candida antarctica* [22].

### **Fizykochemiczne właściwości dendrymerów**

Dendrymery znane są już od ponad dwudziestu lat, jednak pierwsze dziesięć lat ich historii to poszukiwanie względnie tanich i wydajnych metod syntez i oczyszczania. Obecnie polimery te są obiektem wielu badań biologicznych, chemicznych i biochemicznych. Dendrymery z racji swojej budowy mogą naśladować białka [23], jednakże należy pamiętać, że w przeciwieństwie do białek, które składają się z liniowych polipeptydów, wewnątrz dendrymerów w znacznym stopniu utworzone jest przez wiązania kowalencyjne, w wyniku czego ich struktura jest mniej elastyczna. Dodatkowo dendrymery różnią się od białek mniejszym upakowaniem wewnętrznym, oraz posiadają znacznie więcej powierzchniowych grup funkcyjnych. Badania molekularne przeprowadzone nad dendrymerami wykazują że właściwości ich zależą w dużej mierze od polarności, siły jonowej, i pH rozpuszczalnika. Dendrymery aminowe (np: PAMAM, PPI) zawierające na powierzchni pierwszorzędowe grupy aminowe, w zakresie obniżonego pH wykazują zmiany konformacyjne całej molekuly, które spowodowane są oddziaływaniami elektrostatycznymi pomiędzy sprotonowanymi trzeciorzędowymi grupami aminowymi wewnątrz molekuly oraz pierwszorzędowymi grupami aminowymi na powierzchni. W zakresie pH powyżej 9 pojawiają się wiązania wodorowe między tymi grupami, powodując zwiększenie gęstości makromolekuly, a co za tym idzie zmniejszenie jej rozmiarów (Rysunek 5).

Konsekwencją ograniczonego przenikania rozpuszczalnika do wnętrza dendrymerów, jest występowanie lokalnego mikrośrodowiska wewnątrz jądra. Dendrymery rozpuszczone w polarnych rozpuszczalnikach takich jak woda, posiadają apolarne wnętrze, co powoduje że mogą one transportować inne organiczne molekuly umiejscowione wewnątrz. Właściwość ta pozwala na wykorzystywanie dendrymerów, jako medium transportujące wiele substancji bioaktywnych do wnętrza organizmów.

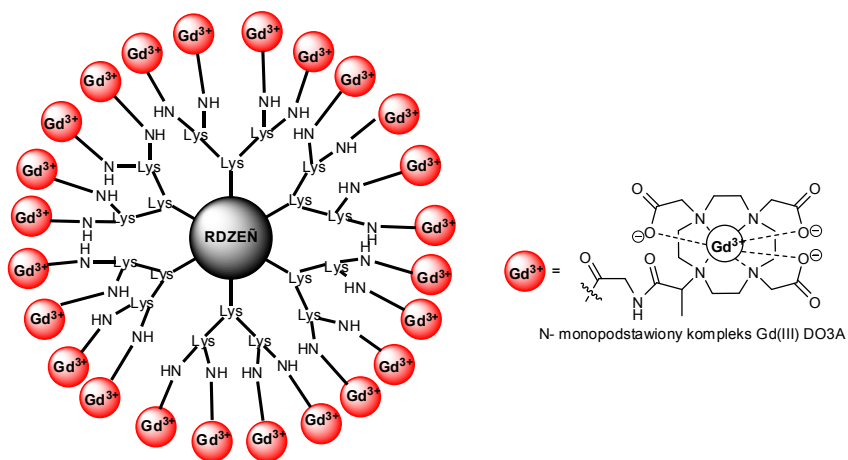
## Oddziaływania dendrymerów typu gość-gospodarz

W 1982 roku Maciejewski [24] zapostulował możliwość wykorzystania dendrymerów jako molekuly wychwytyjące związki o małej masie cząsteczkowej. Na przestrzeni wieloletnich badań zaobserwowano że dendrymery wykazują zdolność do wiązania metali. Powstają wówczas związki nazywane metalodendrymerami. Związki te mogą się tworzyć w wyniku przeróżnych interakcji pomiędzy dendrymerami a jonami metalami, w których dendrymery mogą być: wbudowane wokół kompleksu stanowiącego rdzeń, zawierać kompleks metalu będący rdzeniem dendronu, posiadać kompleks metalu stanowiący jednostki peryferyczne, tworzyć wiązania koordynacyjne z jonami metali przez ligandy obecne w strukturze gałęzi dendrymeru, posiadać rdzeń mogący wiązać się koordynacyjnie z jonami metalu, lub też być budowany wokół kompleksu metalu będącego rdzeniem cząsteczki zawierającej kompleksy metali będące rdzeniem i jednostkami peryferycznymi gałęzi dendrymeru [17]. Związki te charakteryzują się unikalnymi właściwościami chemicznymi i fizycznymi oraz znajdują zastosowania w takich dziedzinach jak chemia, biologia czy medycyna. Przykładem praktycznego wykorzystania kompleksów dendrymerów jest połączenie typu przeciwciało-dendrymer-porfiryna [25]. Modyfikowane przeciwciała radioizotopami są wykorzystywane w terapii lekowej. Dzięki zastosowaniu kompleksów dendrymerowych, modyfikowane przeciwciała nie tracą swoich właściwości biologicznych, tak jak jest to w przypadku bezpośredniej ich modyfikacji jonami metali. Dendromery znalazły szerokie zastosowanie w syntezie magnetycznych czynników kontrastujących, wykorzystywane są w radioterapii i obrazowaniu klinicznym. Firma Bayer Schering Pharma AG wprowadziła na rynek dendrymerowy kompleks  $Gd^{3+}$  oparty na dendrymerze lizynowym, wykorzystywany jako związek kontrastowy w obrazowaniu za pomocą rezonansu magnetycznego. Związek ten jest na 24 kaskadowym polimerem zawierającym N- podstawiony kwas 2,2',2''-(1,4,7,10-tetraazacyklododekano-1,4,7-tri)octowy DO3A (Rysunek 5), dostępny komercyjnie pod nazwą Gadomer-17 [26].

Interesującym przykładem wykorzystania dendrymerów do dektekcji jonów metali jest multi-chromoforowy dendrymer zawierający kwas benzo-trikarboksylowy jako „jądro” dendrymeru, 24 cząsteczki dansylu spełniające rolę sygnalizacyjną oraz 18 alifatycznych wiązań amidowych znajdujących się wewnątrz cząsteczki [27]. Charakterystyczną właściwością otrzymanego dendrymeru jest odwracalna zdolność protonowania i wiązania jonów metali przejściowych. Proces proponowania odbywa się w aktywnych częściach grup aminowych fragmentów cząsteczki dansylu, natomiast w proces koordynacji odbywa się przy współdziałaniu zdeprotonowanych alifatycznych wiązań amidowych. Zarówno proces protonowania, jaki i koordynacja tylko jonów  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  powoduje natychmiastowe wygaszenie emisji fluorescencji (jeden skoordynowany jon powoduje

wygaszenie 9 cząsteczek dansylu). Ciekawe zjawisko powodują jony cynku  $Zn^{2+}$  które osobno nie wygaszają intensywności fluorescencji, natomiast mogą zastępować jony  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  wewnątrz dendrymeru powodując tym samym wzmocnienie fluorescencji. Właściwości te powodują, że dendrymer (Rysunek 6) może być wykorzystany jako fluorescencyjny chemosensor.

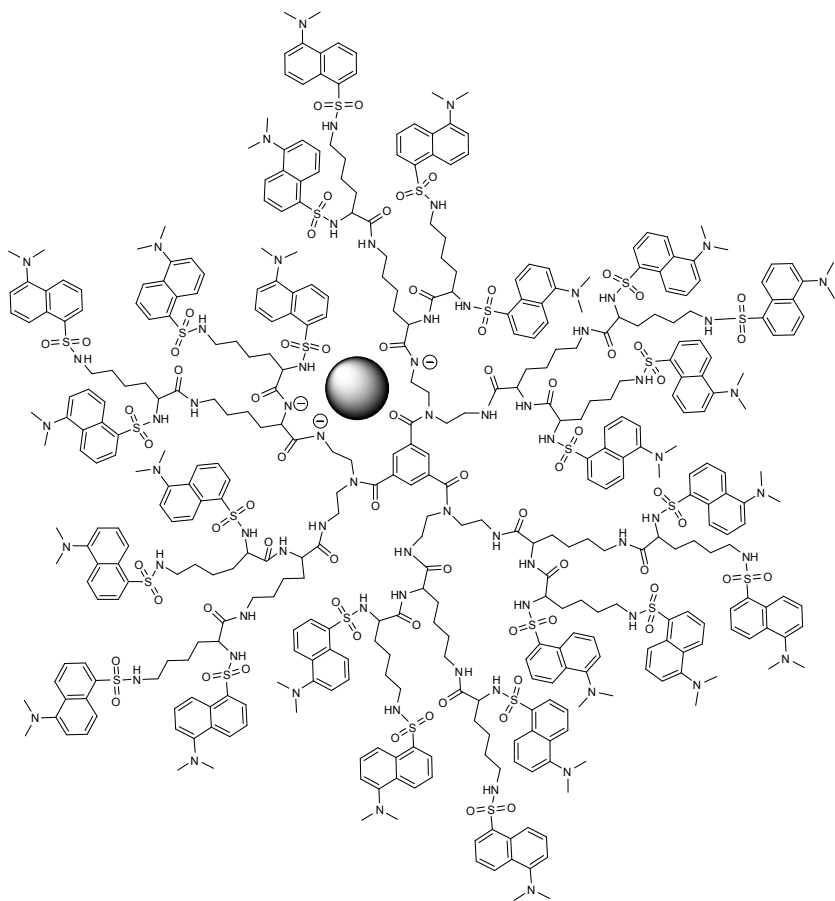
Dendrymery, w szczególności endoreceptory dendrymerowe, wykazują zdolność do umiejscawiania jonów metali wewnątrz ich struktury, co jest wykorzystywane do produkcji materiałów nanokompozytowych, w których dendrymery pełnią rolę „gospodarza”, natomiast jony metali, lub półprzewodnikowe większe cząstki pełnią rolę „gościa”. Klaster metali oraz półprzewodniki są bardzo interesującymi materiałami, ze względu na ich unikalne właściwości chemiczne, mechaniczne, elektroniczne i optyczne. Szczególnym zainteresowaniem cieszą się nanoklaster metali przejściowych, ze względu na ich praktyczne zastosowania w katalizie, i elektrokatalizie. Jony metali przejściowych takie jak  $Cu^{2+}$ ,  $Pt^{2+}$ ,  $Pd^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Ru^{3+}$  przenikają do wnętrza dendrymerów (np.: PAMAM), w wyniku silnego kompleksowania przez wewnętrzne grupy funkcyjne tworząc nanoklaster. Ilość kompleksowanych jonów metali przypadających na dendrymer może być ściśle określona [28]. Nanoklaster jonów metali otrzymuje się najczęściej, w wyniku reakcji dendrymerów z odpowiednimi jonami metali, a następnie ich redukcji przeprowadzanej *in situ* (Rysunek 7). W molekułach tych dendrymery pełnią rolę stabilizującą klaster zapobiegając ich aglomeracji. Otrzymane w ten sposób materiały znajdują głównie zastosowania w konstruowaniu modyfikowanych powierzchni elektrod, oraz w elektrokatalizie.



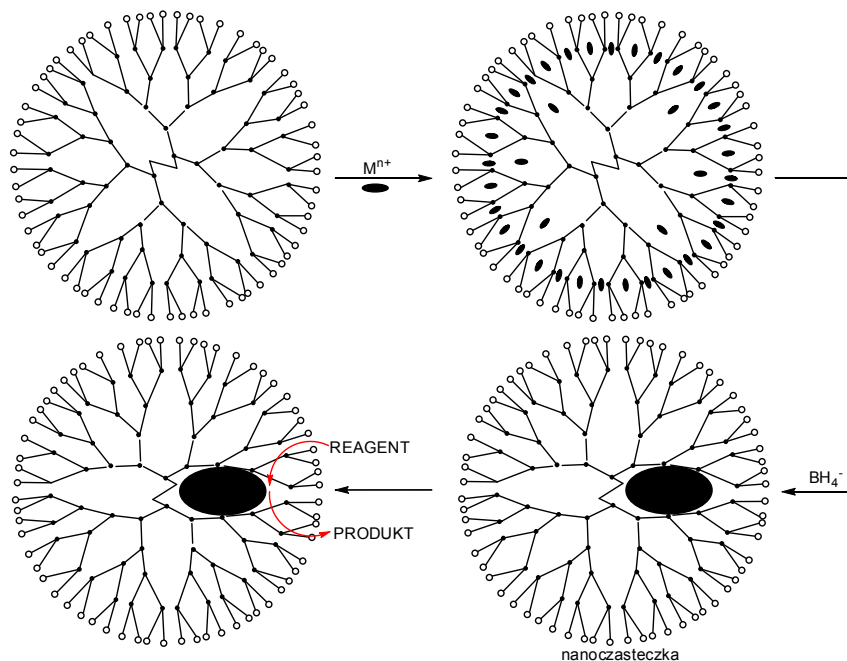
Rysunek 5. Uproszczona struktura lizynowego dendrymeru Gadomer-17.



## Dendrymery



Rysunek 6. Schemat amplifikacji sygnału spowodowany koordynacją jonu metalu do wnętrza dendrymeru [27].

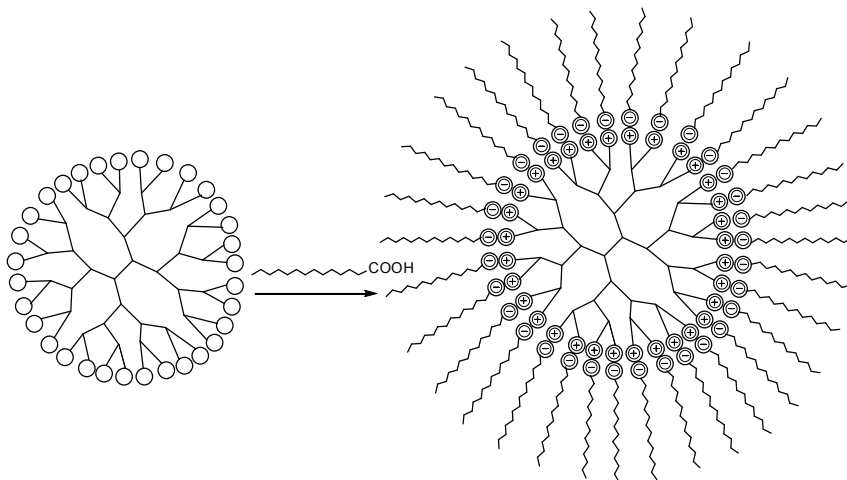


Rysunek 7. Schemat syntezy nanocząstek metali opartych na dendrymerach [29].

W zależności od właściwości grup funkcyjnych znajdujących się w warstwie powierzchniowej dendrymerów istnieje możliwość rozpuszczenia hydrofilowej molekuly „gościa” w niepolarnym środowisku oraz rozpuszczenie hydrofobowej molekuly w polarnym rozpuszczalniku. Jest to możliwe, niezależnie od właściwości cząsteczki „gościa” mieszczącego się wewnątrz dendrymeru. W przypadku, kiedy dendrymer zakończony jest hydrofobowymi grupami, umożliwia to rozpuszczenie w środowisku niepolarnym, natomiast, przypadku gdy, dendrymer zawiera terminalne grupy hydrofilowe, umożliwia to jego rozpuszczenie w polarnych rozpuszczalnikach takich jak woda czy małowcząsteczkowe alkohole [29].

Hydrofilowe molekuly mogą być również przenoszone do nisko polarnych rozpuszczalników poprzez ekstrakcję dendrymerów z hydrofilowymi terminalnymi grupami zawierającymi cząsteczkę gościa. Jest to osiągalne poprzez nie kowalencyjne oddziaływanie dendrymeru zawierającego terminalne grupy aminowe z wyższymi kwasami tłuszczowymi. Cząsteczki kwasów organizują się wokół dendrymerów tworząc złożoną strukturę, przypominającą odwrócone micelle, składające się z hydrofilowego wnętrza i hydrofobowych łańcu-

chów alkilowych na zewnętrznej powierzchni makromolekuły Rysunek 8 [29]. W przypadku dużego nadmiaru kwasu tłuszczowego, następuje przeniesienie protonu na trzeciorzędowe grupy aminowe wewnątrz dendrymeru. Właściwość ta umożliwi wykorzystanie kompleksów dendrymerów głównie w katalizie w organicznych i fluoroorganicznych rozpuszczalnikach.



Rysunek 8. Tworzenie się odwróconych miceli dendrymerowych [30].

### Właściwości dendrymerów w układach biologicznych

Dendrymery, aby mogły znaleźć zastosowanie jako elementy wykorzystywane w projektowaniu nowych leków, lub jako selektywne urządzenia dostarczające leki do wybranych obszarów organizmu muszą być nietoksyczne i nieimmunogenne. Muszą również charakteryzować się dużą przenikalnością przez błony komórkowe i kumulować się w miejscu chorobowym przez czas umożliwiający osiągnięcie efektu klinicznego [31].

Wiadomo, że dendrymery i makromolekuły obdarzone dodatnim ładunkiem powodują destabilizację błon komórkowych prowadząc do ich lizy [32]. Dokładny mechanizm cytotoxyczności spowodowany polikationowymi strukturami, niestety nie został jeszcze w pełni poznany.

Dendrymery zakończone grupami aminowymi przeważnie są cytotoxyczne [33]. Cytotoxyczność, można wytłumaczyć uprzywilejowaniem interakcji zachodzących pomiędzy ujemnie naładowanymi błonami komórkowymi, a dodatnio naładowaną powierzchnią dendrymerów, powodując uszkodzenie ścian komórkowych poprzez przyklejanie się dendrymerów.

Porównując właściwości kationowych dendrymerów poli(amidoamido-

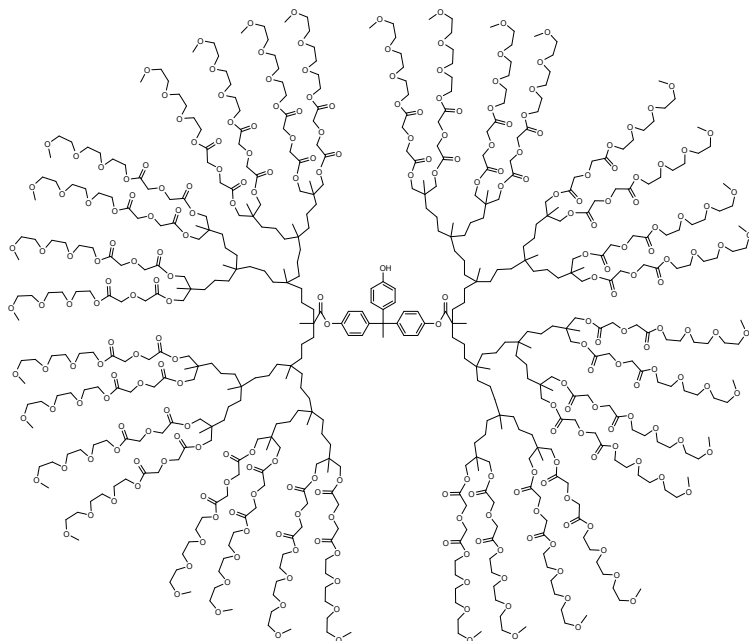
wych) PAMAM z anionowymi ich odpowiednikami, można stwierdzić że dendrymery zawierające powierzchniowe grupy aminowe ( kationowe), wykazują znacznie wyższą cytotoksyczność w porównaniu do anionowych dendrymerów, sfunkcjonalizowanych karboksylowymi grupami powierzchniowymi [34]. Okazuje się również, że dendrymery niższych generacji posiadające anionowe karboksylowe, bądź estrowe grupy powierzchniowe, nie wykazują cytotoksyczności oraz chemotoksyczności, nawet w wysokich stężeniach. Warto podkreślić, że charakter całej cząsteczki dendrymeru nie zależy jedynie od grup powierzchniowych. Badania oparte na aromatycznych dendrymerach polieterowych zawierających karboksylowe grupy powierzchniowe, wykazały że związki te powodują niedokrwistość w przypadku badanych szczurów nawet po upływie 24 godzin [33].

Częściowa modyfikacja aminowych grup powierzchniowych obojętnymi jednostkami takimi jak PEG bądź kwasami tłuszczowymi, powoduje obniżenie cytotoksyczności całej molekuly. Niestety wprowadzenie zbyt dużej ilości łańcuchów polieterowych nie wpływa na obniżenie cytotoksyczności. W przypadku dużej obecności kwasów tłuszczonych cytotoksyczność wzrasta, co tłumaczy się oddziaływaniami hydrofobowymi prowadzącymi do rozkładu komórek [34].

W przypadku cytotoksyczności poli(propyleno-iminowych) dendrymerów PPI zakończonych aminowymi grupami powierzchniowymi wiadomo że maleje ona podczas formowania się dendrymerów z DNA wykorzystywanego następnie w procesie wprowadzania obcego DNA do obcych komórek. Dodatkowo okazuje się że dendrymery te, szczególnie drugiej generacji są najlepszymi czynnikami wykorzystywanymi w transfekcji. Może to wskazywać na nie kowalencyjne wiązanie pomiędzy dendrymerem a DNA [ 35].

Dendrymery oparte na polieterowych łańcuchach, zakończone grupami hydroksylowymi, bądź metoksyłowymi, nie wykazują praktycznie żadnych właściwości toksycznych zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* [36], [37]. Nietoksyczne właściwości przedstawionego dendrymeru (Rysunek 9), stwarzają szeroką gamę obiecujących możliwości wykorzystania go, jako biodegradowalnego nośnika transportującego leki, ponieważ związek ten może być degradowalny przez enzymy hydrolityczne, po uwolnieniu transportowanego leku. Właściwa przenikalność dendrymerów na poziomie makroskopowym jest bardzo istotnym parametrem dającym możliwość wykorzystania ich jako nośniki leków. Badania *in vivo* na zdolność przenikania przez śródbłonek naczyniowy, kationowych amino zakończonych dendrymerów PAMAM generacji G1—G4 wskazują, że wyznaczenie śródbłonek wzrasta wraz ze wzrostem generacji, a co za tym idzie masy cząsteczkowej dendrymeru [38]. Badania nad transportem nabłonkowym aminowych dendrymerów PAMAM stwierdzają jednoznacznie, że dendrymery

wyższej generacji posiadają wyższą przepuszczalność aniżeli dendrymery niższych generacji.



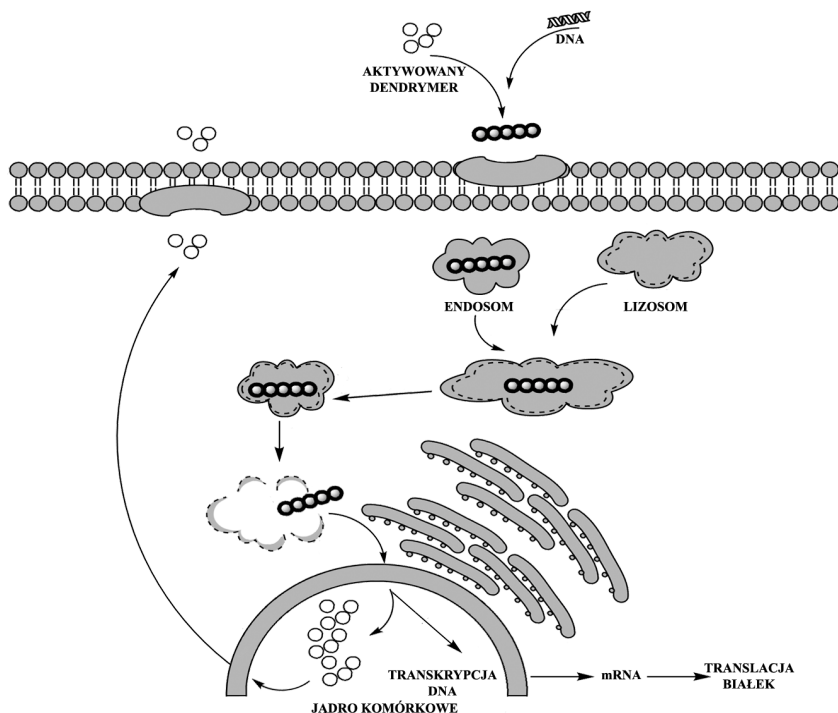
Rysunek 9. Struktura nietoksycznego poliestrowego dendrymeru opartego na polietarach [31], [37].

### Dendrymery wykorzystywane jako nośniki leków

Kierunki badań nad wykorzystaniem dendrymerów w transporcie leków głównie koncentrują się nad dostarczaniem genów lub ich inhibitorów do jądra komórkowego wykorzystywanych w terapii genowej. Wiele doniesień literaturowych wskazuje na możliwość wykorzystania do tego celu niemodyfikowanych aminowych dendrymerów PAMAM i PPI. Dokładna struktura oddziaływania „gość - gospodarz” nie została jeszcze szczegółowo rozpoznana, ale najprawdopodobniej oddziaływanie to opiera się na interakcjach kwasowo-zasadowych pomiędzy anionowymi grupami fosforanowymi w DNA, a pierwszo i trzeciorzędowymi grupami aminowymi w dendrymerze, które w warunkach fizjologicznych są dodatnio naładowane. Stwierdzono, że fragmenty powstające z wielkocząsteczkowych dendrymerów są bardzo dobrym medium transportującym geny [31]. W porównaniu do nienaruszonych dendrymerów, częściowo zdegradowane dendrymery z racji mniejszej ilości wiązań amidowych mają bar-

dziej elastyczną strukturę i tworzą bardziej zwarty kompleks z DNA, co jest preferowane w dostarczaniu genów drogą endocytozy. Ponadto stwierdzono, nadmiar grup aminowych w stosunku do grup fosforanowych DNA powoduje najefektywniejszą transfekcję. Bardziej elastyczne dendrymery PPI, które zawierają mniej wiązań amidowych niestety są zbyt cytotoksyczne, jednakże dendrymery niższych generacji są odpowiednimi nośnikami genów.

Nie modyfikowane dendrymery zawierające powierzchniowe grupy aminowe transportujące DNA do komórek, mogą przyczynić się do procesu transfekcji poprzez przerwanie błony komórkowej. Proces transfekcji wolnego DNA jest hamowany przez odpychanie elektrostatyczne, pomiędzy ujemnie naładowanymi grupami fosforanowymi, a ujemnie naładowaną błoną komórkową [39].



Rysunek 10. Transfekcja DNA do jądra komórkowego wspomaganie przez części dendrymerów [ 40, 31].

W warunkach fizjologicznych dodatkowo naładowane terminalne grupy dendrymerów oddziałują z ujemnie naładowanymi grupami fosforanowymi kwa-

sów nukleinowych, tworząc pierścieniową strukturę, umożliwiającą transport i wniknięcie do komórki obcego DNA. W wyniku pochłonięcia powstaje endosom, zawierający dendrymer i DNA. Na skutek działania pomp protonowych w błonie endosomu następuje stopniowe obniżanie pH, co prowadzi do połączenia się endosomu z lizosomem, czego rezultatem jest utworzenie fagolizosomu. Enzymy trawienne dostarczane przez lizosom, stabilizują dodatkowo kompleks dendrymeru i DNA, który następnie wnika do jądra komórkowego, gdzie uwalniane jest DNA oraz następuje usunięcie makrocząsteczek (Rysunek 10).

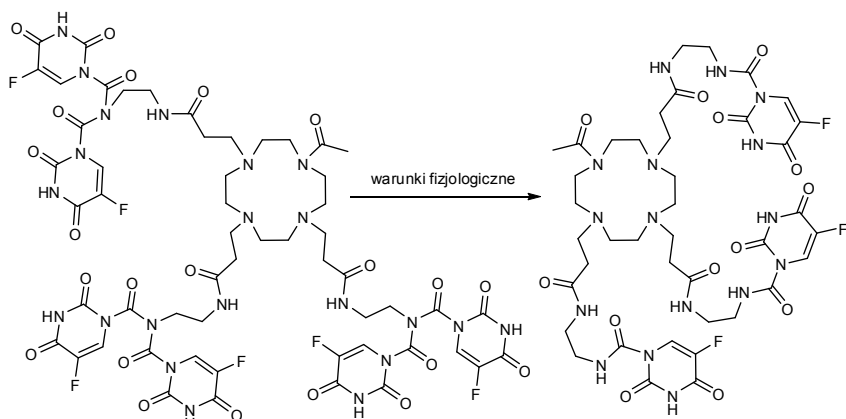
Kationowe dendrymery zakończone grupami aminowymi, w wyniku częściowej modyfikacji grup powierzchniowych poprzez wiązania kowalencyjne, mogą być wykorzystywane w transporcie leków (genów). Metoda ta stosowana jest w przypadku gdy dany lek, bądź gen, kierowany jest do szerokiego spektrum komórek. W przypadku gdy transportowany lek ma być przeznaczony dla wybranych komórek wymaga to specyficznego zaprojektowania molekuly. Przykładem specyficznego dendrymeru, jest polieterowy dendrymer zawierający terminalne grupy oparte na cząsteczce hydrazynie, transportujący kwas foliowy, który szczególnie wychwytywany jest przez receptory komórek nowotworowych. Stwarza to dodatkową możliwość wykorzystania dendrymerów w transportowaniu modyfikowanych pochodnych kwasu foliowego w walce z nowotworami [41]. W wyniku modyfikacji dendrymeru PAMAM 5 generacji cząsteczką metotreksatu (MTX - kwas 4 amino-N-10-metylofoliowy), będącego analogiem kwasu foliowego, która jest jego antywitaminą i wiąże się ponad 10 tysięcy razy silniej niż sam kwas foliowy z reduktazą dihydrofolianową, uniemożliwiając tym samym proces syntezy zasad purynowych i pirymidynowych, co w konsekwencji prowadzi do zablokowania syntezy DNA i RNA, powodując śmierć komórki [42], otrzymano pochodną dendrymeru, który można wykorzystać jako lek nowotworowy, charakteryzujący się mniejszą toksycznością oraz dziesięciokrotnie większą skutecznością niż sam metotreksat [43,44].

Pochodne dendrymerów PAMAM i kwasu foliowego znalazły wykorzystanie w terapii wychwytu neutronów boru (Boron Neutron Capture Therapy BNCT), ze względu na dość dużą akumulację atomów boru. W terapii tej znajduje się przeciwciała izotopami  $^{10}\text{B}$ , które akumulują się w chorej tkance, po czym organizm nasświetla się strumieniem neutronów, tak aby, były pochłaniane przez  $^{10}\text{B}$ . Po pochłonięciu neutronu emitowana jest cząstka  $\alpha$  i  $^7\text{Li}$  o dużej masie powodującej niszczenie chorych komórki. Zaletą wykorzystania dendrymerów powoduje precyzyjne ulokowanie terapeutyku w nowotworze [45].

Dendrymery PAMAM zakończone grupami karboksylowymi wykazują zdolności do kompleksowania *cis*-platyny – leku wykorzystywanego w terapii nowotworowej. Dendrymerowe kompleksy, ze względu na wyższą trwałość termodynamiczną w porównaniu do czystej *cis*-platyny uwalniają kompleksy Pt

(II) wolniej, co powoduje zmniejszenie toksyczności oraz większe lokalne nagromadzenie leku w miejscu chorobowym, co powoduje większą skuteczność leku [46].

Dendrymery oparte na jądrze 1,4,7,10-tetraazacyklododekanu zawierające pierwszorzędowe grupy aminowe, modyfikowane poprzez ugrupowanie amidowe cząsteczkami 5-fluoro-uracylu - lek wykorzystywany w onkologii, ulegają hydrolizie w warunkach fizjologicznych uwalniając 5-fluoro-uracyl *in vitro* (Rysunek 11).



Rysunek 11. Dendrymery oparte na 1,4,7,10-tetraazacyklododekanie [47].

### Dendrymery wykorzystywane jako leki

Dendrymery, oprócz zdolności przenoszenia leków, mogą samodzielnie wykazywać duże aktywności biologiczne, dlatego też stały się bardzo interesującymi materiałami wykorzystywanymi do syntezy biologicznie czynnych molekuł. Szczególnie w ostatnich latach zauważa się duży wzrost zainteresowań tą klasą związków, które znajdują coraz to powszechniejsze zastosowanie w diagnostyce medycznej oraz w produkcji nowych leków. Dodatkowym atutem przemawiającym na korzyść dendrymerów są względy ekonomiczne. Główną zaletą tej klasy związków jest ich mały koszt produkcji oraz dostęp do dużej liczby reagentów wykorzystywanych w ich syntezie, co przekłada się na ich szerokie spektrum właściwości biologicznych i farmakologicznych. Ich proces syntezy pozwala, na łączenie właściwości biologicznych kilku mniejszych aktywnych molekuł w jeden wielocząsteczkowy związek. Właściwość dendrymerów pozwalająca na transport i uwalnianie aktywnych molekuł sprawia że, leki te są bardzo efektywne, poprzez możliwość osiągnięcia wysokiego lokalnego stężenie dostarczanego leku, skoncentrowane w jednym miejscu. W procesie dostarczenia leków przez



dendrymer, staje się on mniej toksyczny dla organizmu, co sprawia że może być łatwo usuwany. Wirusy łączą się do powierzchni komórki gospodarza, a następnie wnikają do wnętrza, w której wykorzystują procesy syntezy białka oraz replikację DNA, do procesu samonamnażania się. Rozmiary dendrymerów, które na ogół są porównywalne, lub nieco mniejsze od rozmiarów większości wirusów, sprawiają że można je modyfikować, tak, aby zakłócały proces wnika-  
nia wirusów do komórki gospodarza powodując hamowanie infekcji. Dokonuje się tego poprzez specyficzne dendrymery, które wiążą receptory na powierzchni komórki gospodarza, lub na elementach powierzchni wirusów. W przypadku wirusów wykorzystuje się najczęściej anionowe dendrymery, które łączą się do ich powierzchni poprzez oddziaływania elektrostatyczne. W przypadku receptorów wiążących, ich blokowanie jest na ogół trudniejsze do osiągnięcia i zależy od takich procesów jak adhezja i stopień ich przyczepności. Antywirusowe dendrymery, przyłączające się do powierzchni komórki zazwyczaj zawierają na swojej powierzchni grupy pochodzące od kwasu sialowego, który naturalnie, obecny jest w organizmie człowieka w czasie infekcji wirusowej, lub grupy sulfonianowe, wykazujące zbliżone właściwości do kwaśnych węglowodanów, znajdujących się na powierzchni komórek ssaków. Głównie polianionowe leki dendrymerowe konkurują z powierzchnią komórek, narażonych na infekcję, jednakże występują też dendrymerowe leki przeciwwirusowe, zawierające kationowe, bądź neutralne grupy powierzchniowe.

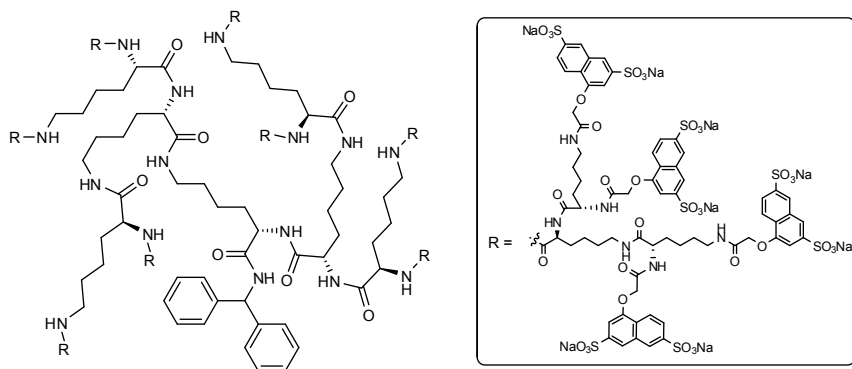
W przypadku wirusa opryszczki pospolitej, HSV (*herpes simplex virus*) zarówno polikationowe (poliargininowe, polilizynowe [48] ), jak i polianionowe [49] związki zapobiegają adsorbowaniu się wirusa na powierzchni komórki. Zjawisko to, może wynikać z antagonistycznego oddziaływania wirusa z powierzchnią komórki, będącego sprzężonym oddziaływaniem komórki z anionową strukturą receptora, bądź oddziaływaniem kationowego wirusa z komórką. Jednakże przewagą polianinowych dendrymerów nad polikationowymi dendrymerami jest ich niższa cytotoksyczność.

W przypadku odmian wirusa grypy, z powodzeniem wykorzystano dendrymery zakończone kwasem sialowym, które łączą się z powierzchnią komórki docelowej poprzez glikoproteiny, które są naturalnymi receptorami na wirus grypy [50]. Dendrymery PAMAM poprzez modyfikację siarczynem naftyłu tworzą polianionową powierzchnię, dzięki czemu są nietoksyczne i wykazują aktywność wobec wirusa HIV [51].

Dendrymery zawierające terminalne ugrupowania amidowe, wykazują aktywność wobec wirusa (*Respiratory Syncytial Virus*) (RVS), wirusa RNA o wielkości 150-300 nm, należącego do rodziny *Paramyxoviridae*, rodzaju *Pneumovirus* zwyczajowo nazywany ludzki syncytialnym wirusem oddechowym. Dokładny mechanizm działania tego typu dendrymerów nie został jeszcze w

pełni poznany, jednakże wszystko wskazuje na że mogą się tworzyć wiązania wodorowe, pomiędzy białkami wirusowymi, a grupami amidowymi dendrymerów, które blokują wiązanie i wnikanie wirusa do komórki. Nie wyklucza się również w tym przypadku istotnego oddziaływania wiązań  $\pi$ - $\pi$  pomiędzy atomem syn-H grupy amidowej a pierścieniem aromatycznym [52].

Aktualnie, nowy preparat o nazwie VivaGel i potencjalnym zastosowaniu, oparty na strukturze dendrymerów (Rysunek 12), produkowany przez australijską firmę Starpharma przeszedł z pozytywnym rezultatem fazę testów na zwierzętach. Eksperymentalne wyniki wskazują na wysoką skuteczność tego związku w blokowaniu transmisji wirusa HIV oraz wirusa *herpes simplex* (HSV) - wirusa opryszczki pospolitej, co daje możliwość walki z chorobą AIDS. Poniższy dendrymer posiada zdolność wchłaniania wirusa HIV do wnętrza dendrymeru, zapobiegając rozprzestrzenianiu się go na cały organizm [53].



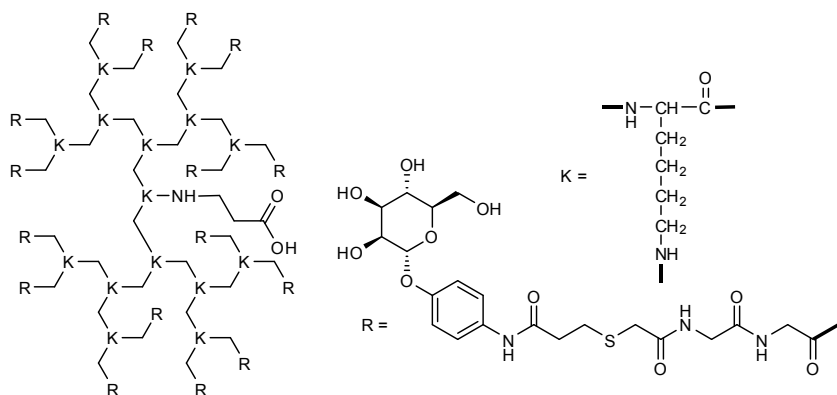
Rysunek 12. Struktura chemiczna przedstawiająca dendrymer o nazwie VivaGel [53].

Na całym świecie, tradycyjne antybiotyki znajdują szerokie zastosowanie w leczeniu zakażeń bakteryjnych. Ich wysoka częstość stosowania bardzo często doprowadza do uodpornienia się organizmów, dlatego też, istnieje potrzeba ciągłego poszukiwania nowych związków które mogą spełniać funkcje antybiotyków. Szczególnie obiecującą grupą związków są antybiotyki peptydowe, które posiadają zazwyczaj niewielkie rozmiary, ich budowa odpowiada budowie związków kationowych. Dodatkowo określane są jako cząsteczki amfipatyczne, czyli posiadające w swojej strukturze zarówno fragmenty hydrofobowe oraz hydrofilowe. Cechą charakterystyczną antybakteryjnych dendrymerów jest to że, łączą w sobie wszystkie powyższe funkcje. Związki o strukturze dendrymerów wykazują wyższe aktywności w porównaniu z rozgałęzionymi polimerami.

W przeciwieństwie do dendrymerowych leków wirusowych, antybakte-

ryjne dendrymery zawierają kationowe powierzchnie modyfikowane zazwyczaj grupami aminowymi, lub grupami tetraalkilo - amoniowymi. Najogólniej związki te przylegają do anionowej ściany komórkowej bakterii powodując jej uszkodzenie, a następnie rozkład całej bakterii. Przykładem dendrymeru antybakteryjnego jest dendrymer oparty na PPI, modyfikowany trzeciorzędowymi alkilowymi grupami amoniowymi [54, 55], który okazuje się być silnym czynnikiem przeciwbakteryjnym przeciwko bakteriom Gram dodatnim i przeciw Gram ujemnym.

Dendromery oparte na lizynie, zawierające na powierzchni cząsteczki mannozy wykazują aktywność wysoką aktywność antybakteryjną [56] szczepów *E. coli* (Rysunek 13).



Rysunek 13. Struktura antybakteryjnego dendrymeru [56].

Powszechnie wiadomo, że nanocząsteczki srebra oraz kompleksy srebra wykazują właściwości antymikrobowe trwające długi czas. Ze względu na nie toksyczność oraz dobrą rozpuszczalność w wodzie, wykorzystano kompleksy srebra poli(amidoamidowych) dendrymerów PAMAM, które wykazują aktywność przeciwko bakteriom (*Staphylococcus aureus*), (*Pseudomonas aeruginosa*) i (*Escherichia coli*).

Dendrymery w ostatnich latach zostały wykorzystane w terapii fotodynamicznej (PDT). Jest to niezwykle obiecującą metoda leczenia nowotworów, w której wykorzystuje się tlen singletowy, wytwarzany *in situ*, powstający w wyniku naświetlenia światłem lasera leku (fotouczulacza) znajdującego się w chorych komórkach, powodujący ich uszkodzenie. Terapia ta okazuje się skuteczna w leczeniu nowotworów oskrzela, przewodu pokarmowego, dróg żółciowych, nowotworów znajdujących się w jamie otrzewnej, nowotworów szyjki macicy, a nawet guzów ośrodkowego układu nerwowego. Ogromną jej zaletą jest niein-

ważność. Szczególnie obiecującym dendrymerem są dendrymery zawierające kwas 5-aminolewulinowy w sferze grup powierzchniowych [58] oraz klasa dendrymerów zawierająca protoporfiryny, jako fotouczulacze [59]. Dendrymerowe pochodne protoporfiryn wykazują większą cytotoksyczność niż same protoporfiryny oraz około 140-krotnie niższą „ciemną” toksyczność w porównaniu z wolną protoporfiryną.

Wiadomo, że związki o małej masie cząsteczkowej nie są immunogenne, lub wywołują przeciwko sobie słabą reakcją immunologiczną po wstrzyknięciu jej do organizmu. Dendrymery z racji swoich wysokich mas, są bardzo wielowartościowymi i użytecznymi związkami które mogą być wykorzystywane w produkcji szczepionek, ponieważ wykazują zdolność przenoszenia antygenów poprzez wiązanie ich do grup znajdujących się na powierzchni. Głównie dendrymery peptydowe oparte na cząsteczce lizyny wykorzystywane są jako do produkcji szczepionek. Arylowanie  $\alpha$  i  $\epsilon$  grupy aminowej lizyny prowadzi do otrzymania asymetrycznych dendrymerów.

Obecnie przeprowadza się wiele badań nad produkcją dendrymerowych szczepionek peptydowych. Obiecującą wydaje się być potencjalna szczepionka na malarię, znajdującą się w I fazie badań klinicznych na ludziach [60].

## Podsumowanie

Trójwymiarowa, kulista postać dendrymerów oraz duża dostępność substratów ich konstrukcji stwarza wielowartościowy potencjał i szerokie możliwości ich zastosowania. Niepowtarzalna zdolność dendrymerów do zmiany kształtu w zależności od charakteru rozpuszczalnika umożliwia zaprojektowanie wysoce specyficznych molekuł o określonych aktywnościach biologicznych. Dodatkowym atutem przemawiającym na korzyść dendrymerów jest możliwość ich analizy poprzez użycie standardowych metod spektroskopowych. Dendrymery znajdują zastosowania w wielu gałęziach nauki oraz w przemyśle. Obecnie na rynku znajduje się wiele leków komercyjnie dostępnych opartych na dendrymerach. Dendrymery znajdują szereg zastosowań w medycynie jako związki transportujące leki, bezpośrednio do chorobowych jednostek, jako leki wykazujące działanie przeciw wirusom i bakteriom. Badania nad nowymi szczepionkami oparte na dendrymerach są bardzo obiecujące. Związki te znajdują również aplikacje w diagnostyce medycznej, analityce i nanotechnologii. Dendrymery dzięki zdolności oddziaływania z jonami metali mogą posłużyć jako nowoczesne i czułe bioindykatory w badaniach analitycznych. Związki te mogą również stanowić potencjalne chelatory dla jonów metali ciężkich i być wykorzystane w celu ich usuwania ze środowiska. Ponadto, dendrymery okazały się bardzo przydatne w projektowaniu biosensorów i sztucznych receptorów. W przyszłości należy się spodziewać opracowania nowych struktur na bazie dendrymerów o szerokich

zastosowaniach oraz coraz to większej dostępność w handlu.

### **Podziękowania:**

Praca finansowana ze środków BW 8000-5-0257-9

### **Literatura**

1. Flory Paul J., *J. Am. Chem. Soc.*, 1941, 63 (11), 3091-3096
2. Buhleier E., Wehner W., Vögtle F., *Synthesis.*, 1978, 155-158
3. Scott M. Grayson., Fréchet Jean M. J., *Chem. Rev.*, 2001, 101 (12), 3819-3868
4. Tomalia D. A., Dewald J., Hall M., Martin S., Smith P., *Prepr. 1st SPSJ Int. Polym. Conf., Soc. Polym. Sci. Jpn. (Kyoto) 1984*, 65
5. Tomalia D. A., Baker H., Dewald J., Hall M., Kallos G., Martin S., Roeck J., Ryder J., Smith P., *Polym. J.*, 1985, 17, 117-132
6. Newkome G. R., Zhongqi Y., Baker G.R., Gupta V. K., *J. Org. Chem.*, 1985, 50 (11), 2003-2004
7. Bosman A. W., Janssen H. M., Meijer E. W., *Chem. Rev.*, 1999, 99 (7), 1665-1688
8. Hawker C. J., Fréchet J. M. J., *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, 112 (21), 7638-7647
9. Kawaguchi T., Walker K. L., Wilkins C. L., Moore J. S., *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, 117 (8), 2159-2165
10. Niederhafner P., Šebestík J., Ježek J., *J. Peptide Sci.*, 2005, 11, 757-788
11. Hawker C. J., *Adv. Polym. Sci.*, 1999, 147, 113-160
12. Ikladios N. E., Mansour S. H., Rozik N. N., Dirnberger K., Eisenbach C. D., *Journal of Polymer Science Part a: Polymer Chemistry.*, 2008, 46 (16), 5568 – 5579
13. De Gennes P. G., Herve H., *J. Phys. Lett.*, 1983, 44, 351-360
14. Sadler K., Tam J. P., *Reviews in Molecular Biotechnology.*, 2002, 90, 195-229
15. Sadler K., Tam J. P., *Mol. Biotechnol.*, 2002, 90, 195-229
16. Tomalia D. A., Naylor A. M., Goddard W. A., *Angew. Chem.*, 1990, 138-175
17. Sekowski S., Gabryela T., *Kosmos., Problemy Nauk Biologicznych.*, 2007, 56, 99-106
18. Bosman A. W., Janssen H. M., Meijer E. W., *Chem. Rev.*, 1999, 99, 1665-1688
19. Hawker C. J., Fréchet J. M. J., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1990,

1010–1011

20. Wooley K. L., Hawker C. J., Frechet J. M. J., *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, 115, 11496–11505
21. Rokicki G., *Biotechnologia*, 2005, 2 (69), 48–68
22. Cordova A., Hult A., Hult K., Ihre H., *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, 120, 13521-13522
23. Farin D., Avnir D., *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1991, 30, 1379–1380
24. Maciejewski M., *J. Macromol. Sci.-Chem.*, 1982, A17, 689-703
25. Roberts J. C., Adams Y. E., Tomalia D., Mercer-Smith J. A., Lavallee D. K., *Bioconjugate Chem.*, 1990, 1 (5), 305-308
26. Misselwitz B., Schmitt-Willich H., Ebert W., Frenzel T., Weinmann H-J., *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine.*, 2001, 12, 128-134
27. Balzani V., Ceroni P., Gestermann S., Gorka M., Kauffmann C., Vögtle F., *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2000, 3765–3771
28. Zhao M., Sun L., Crooks R. M., *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, 120 (19), 4877-4878
29. Crooks R. M., Lemon B. I., Sun L., Yeung L. K., Zhao M., *Topics in Current Chemistry*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg., 2001, 212, 82-131
30. Chechik V., Zhao M., Crooks R. M., *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, 121, 4910-4911
31. Boas U., Heegaard P. M. H., *Chem. Soc. Rev.*, 2004, 33, 43–63
32. Rittner K., Benavente A., Bompard-Sorlet A., Heitz F., Divita G., *Mol. Therapy.*, 2002, 5, 104–114
33. Ambade A. V., Savariar E. N., Thayumanavan V., *Mol Pharm.*, 2005, 2 (4), 264–272
34. Neerman M. F., Zhang W., Parrish A. R., Simanek E. E., *International Journal of Pharmaceutics.*, 2004, 281, 129–132
35. Zinselmeyer B. H., Mackay S. P., Schatzlein A. G., Uchegbu I. F., *Pharmacol. Res.*, 2002, 19, 960–967
36. Ihre H. R., Padilla De Jesús O L., Szoka F. C., Fréchet J. M. J., *Bioconjugate Chem.*, 2002, 13, 443–452
37. Padilla O. L., Ihre H. R., Gagne L., Frchet J. M. J., Szoka F. C., *Bioconjugate Chem.*, 2002, 13 (3), 453-461
38. El-Sayed M., Kiani M. F., Naimark M. D., Hikal A. H., Ghandehari H., *Pharm. Res.*, 2001, 18, 23–28
39. Tang M. X., Redemann C. T., Szoka F.C., *Bioconjugate Chem.*, 1996, 7 (6), 703-714
40. Stiriba S-E., Frey H., Haag R., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2002, 41, No. 8

1329-1334

41. Kono K., Liu M., Frchet J.M. J., *Bioconjugate Chem.*, 1999, 10 (6), 1115-1121
42. Zimecki M., Arytm J., *Postepy Hig Med. Dosw.*, 2004,58, 226-235
43. Kukowska-Latallo J. F., Candido K.A., Cao Z., Nigavekar S. S., Majoros I. J., Thomas T. P., Balogh L. P., Khan M. K., Baker J. R., Jr. *Cancer Res.*, 2005, 65, 5317- 5324
44. Quintana A., Raczka E., Piehler L., Lee I., Myc A., Majoros I., Patri A. K., Thomas T., Mulé J., Baker J.R., Jr. *Pharmaceutical Research*, 2002, 9, 1310-1316
45. Shukla S., Wu G., Chatterjee M., Yang W., Sekido M., Diop L. A., Mller R., Sudimack R. R., Lee R. J., Barth R. F., Tjarks W., *Bioconjugate Chem.*, 2003, 14 (1), 158-167
46. Haxton K J., Burt H. M., *Dalton Trans.*, 2008, 5872 – 5875
47. Boas U., Christensen J. B., Heegaard P. M. H., *Dendrimers in Medicine and Biotechnology New Molecular Tools.*, The Royal Society of Chemistry, 2006
48. Langeland N., Moore L. J., Holmsen H., Haarr L., *J Gen Virol.*, 1988, 69, 1137-1145
49. Aguilar J. S., Rice M., Wagner E. K., *Virology.*, 1999, 258, 141-151
50. Reuter Jon D., Myc A., Hayes M. M., Gan Z., Roy R., Qin D., Yin R., Piehler L. T., Esfand R., Tomalia D. A., Baker J. R., *Bioconjugate Chem.*, 1999, 10 (2), 271-278
51. Witvrouw M., Fikkert V., Pluymers W., Matthews B., Mardel K., Schols D., Raff L., Debyser Z., Clercq E., Holan G., Pannecouque C., *Mol Pharmacol.*, 2000, 58, 1100–1108
52. Razinkov V., Gazumyan A., Nikitenko A., Ellestad G., Krishnamurth G., *Chemistry & Biology.*, 2001, 8, 645-659
53. McCarthy T. D., Karellas P., Henderson S. A., Giannis M., O’Keefe D. F., Heery G., Paull J. R. A., Matthews B. R., Holan G., *Mol. Pharm.*, 2005, 2 (4), 312-318
54. Chen C. Z., Cooper S. L., *Biomaterials.*, 2002, 23, 3359–3368
55. Chen C. Z., Cooper S. L., *Adv. Mater.*, 2000, 12, 843–846
56. Nagahori N., Lee R. T., Nishimura S. I., Page D., Roy R., Lee Y. C., *Chembiochem.*, 2002, 3, 836–844
57. Balogh L., Swanson D. R., Tomalia D. A., Hagnauer G. L., McManus A. T., *Nano Letters.*, 2001, 1 (1), 18-21
58. Battah S. H., Chee C. E., Nakanishi H., Gerscher S., MacRobert A. J., Edwards C., *Bioconjugate Chem.*, 2001, 12 (6), 980-988
59. Nishiyama N., Stapert H. R., Zhang G-D., Takasu D., Jiang D-L., Na-

- gano T., Aida T., Kataoka K., *Bioconjugate Chem.*, 2003, 14 (1), 58-66
60. Nardin E. H., Calvo-Calle J-M., Oliveira G. A., Nussenzweig R. S., Schneider M., Tiercy J-M., Loutan L., Hochstrasser D., Rose K., *J. Immunol.*, 2001, 166, 481 - 489



## Rozdział V

### **Nowe zastosowanie materiałów mezoporowatych – adsorpcja leków na przykładzie ibuprofenu**

Katarzyna Walczak, Izabela Nowak

*Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Wydział Chemii,*

*ul. Grunwaldzka 6, 60-780 Poznań*

#### **1. Mezoporowate matryce krzemianowe**

Od roku 1992, kiedy to naukowcy z firmy Mobil Oil Company otrzymali rodzinę mezoporowatych materiałów nazwanych M41S [1], stały się one obiektem zainteresowań i badań, w szczególności pod kątem modyfikacji procesu ich syntezy w celu otrzymania matryc o pożądanych właściwościach. Aby możliwe było zastosowanie tych materiałów w takich procesach i działach przemysłowych jak: reakcje katalityczne, adsorpcja, rozdział i wymiana jonów, elektronika czy sensoryka [2-7], konieczna stała się możliwość kontrolowania takich parametrów zsyntetyzowanych materiałów jak: wielkość powierzchni właściwej i wewnętrznej oraz jej ukształtowanie i charakterystyka, rozmiary i rozkład wielkości porów oraz typ i morfologia struktury [1,8]. Jedną z dróg modyfikacji struktury materiałów mezoporowatych jest wprowadzenie do ścian krzemianowej macierzy lub wnętrza porów różnych grup funkcyjnych lub metali i ich związków [9,10]. W dniu dzisiejszym możliwość kontroli wpływu na takie właściwości matryc krzemianowych jak: otrzymanie porów w zakresie od 2 do 30 nm, wysoka wartość (sięgająca 1500 m<sup>2</sup>/g) powierzchni właściwej, duża (dochodząca do 1,5 cm<sup>3</sup>/g) objętość porów jednakowej wielkości tworzących uporządkowaną mezoporowatą strukturę oraz łatwa do funkcjonalizacji (ze względu na obecność wolnych grup silanolowych) powierzchnia wewnętrzna, umożliwia potencjalne zastosowanie tych materiałów jako systemów nośnikowych w skali nano dla cząsteczek organicznych wykazujących aktywność leczniczą oraz innych leków.

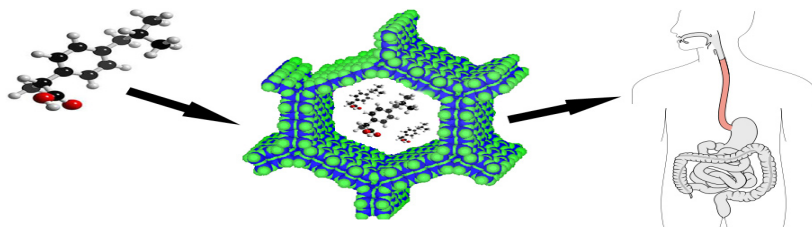
## **2. Biodostępność substancji aktywnych w materiałach mezoporowatych**

Ze względu na swoją nietoksyczność i liczne wolne grupy silanolowe na wewnętrznej powierzchni porów, mezoporowate macierze wykazują zdolność do adsorbowania dużych ilości różnorodnych związków aktywnych i ich kontrolowanego uwalniania [11,12]. Od roku 2001, kiedy to materiał MCM-41 został zaproponowany jako nośnik leków, wiele grup badawczych zajęła się tematyką zastosowania struktur M41S i SBA-15 jako nośników dla cząsteczek aktywnych przyjmowanych doustnie takich jak na przykład ibuprofen czy erytromycyna [11-13]. Modyfikacja struktury materiału mezoporowatego pozwala na zwiększenie siły oddziaływań pomiędzy krzemianowym gospodarzem a lekiem- gościem i zależy od natury wprowadzonych na powierzchnię materiału grup funkcyjnych [11,13]. Wpływa ona również na profil uwalniania, który zależy także od takich wartości jak: pH, rozpuszczalność wprowadzonej molekuly czy procesy dyfuzyjne [13,14]. Ze względu na występowanie zależności pomiędzy ilością uwalnianej substancji aktywnej a strukturą matrycy, jako modelowy lek wybrany został ibuprofen, który pozwala na porównanie otrzymanych wyników z danymi literaturowymi, w których jako nośniki badane były różne krzemiano- we mezoporowate struktury [11].

Słaba rozpuszczalność w wodzie dużej grupy związków biologicznie czynnych stanowi poważną wadę w przypadku leków doustnych. Liczba potencjalnych farmaceutyków o słabej rozpuszczalności w wodzie wzrosła drastycznie w przeciągu ostatnich kilku dekad ze względu na powiększającą się listę potencjalnych, które wymagają często od nowych nośników wysokiego stopnia lipofilowości [15]. Możliwość poprawy (zwiększenia) ustnej dostępności aktywnych cząsteczek stała się w dniu dzisiejszym poważnym wyzwaniem dla wielu naukowców. W celu uniknięcia tego problemu proces kontrolowanego transportu leków przy pomocy nośników zapewnia: niezmienny poziom (ciśnienia) krwi, minimalizowanie potencjalnie szkodliwych efektów ubocznych, wydłużenie czasu biologicznego półtrwania leku, zwiększenie biodostępności, poprawę biokompatybilności, ochronę cząsteczki aktywnej przed degradacją w układzie pokarmowym czy wydaleniem (rys. 1) [16]. Liczba farmaceutyków, które mogą zostać wprowadzone do wnętrza krzemionkowych matryc nadal jest ograniczona, jednak jako model dla różnych struktur zazwyczaj stosowany jest ibuprofen, mimo iż w przeciwieństwie do innych aktywnych cząsteczek znany jest z niezwykłego zachowania wewnątrz porów, mianowicie formowania dime- rów [17].

## **3. Wprowadzanie ibuprofenu do wnętrza uporządkowanego materiału mezoporowatego**

Ibuprofen jest lekiem o charakterze niesteroidowym wykazującym działanie

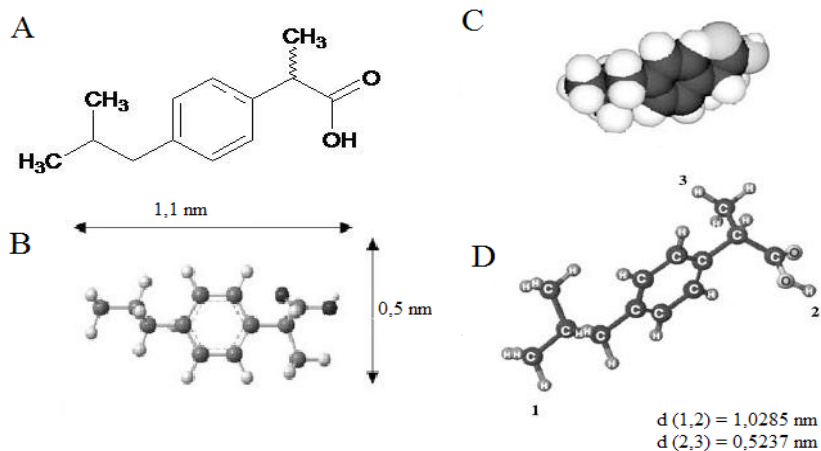


Rysunek 1. Schemat przygotowania biodostępnych leków na bazie mezoporowatych nośników

przeciwbólowe i przeciwzapalne, stosowanym w przypadku leczenia bólu i reumatyzmu. Zainteresowanie nim wynika z występowania w postaci dwóch enancjomerów, z których formą aktywną jest (S)-(+)-ibuprofen. Jednak ze względu na możliwość niektórych enzymów występujących w ludzkim organizmie do przekształcenia formy nieaktywnej w biologicznie czynną, może być również stosowany w postaci mieszaniny racemicznej. Ibuprofen jako lek o krótkim czasie biologicznego półtrwania (2 h), hydrofobowym charakterze i słabej rozpuszczalności w wodzie, jest dogodnym kandydatem dla procesu kontrolowanego dostarczania leków, a ze względu na mały rozmiar cząsteczki jest odpowiedni dla procesu adsorpcji wewnątrz porów krzemionkowych matrycy (rys. 2).

Powszechnie wiadomo, że uporządkowane materiały mezoporowate ze względu na odpowiednie właściwości powierzchni znajdują zastosowanie w procesach takich jak adsorpcja czy kataliza. Wykazują również dogodne warunki dla wprowadzenia do wnętrza swych kanałów innych cząsteczek i proces ten powinien przebiegać bez większych zakłóceń i problemów. Oczywistym wydaje się również fakt, iż rozmiar cząsteczki, która ma zostać zaadsorbowana, zależy będzie od morfologii porów, a maksymalna liczba wprowadzonych molekuł powiązana będzie z objętością porów, powierzchnią właściwą oraz oczywiście wielkością cząsteczki materiału. Jednak niezależnie od typu struktury i funkcjonalizacji macierzy krzemianowej, procedury adsorpcji ibuprofenu są niezmiennie. Dwie z nich są zasługująca na wyróżnienie i są powszechnie używane w procesach wprowadzania leków. Są to: adsorpcja leku z jego roztworu poddanego ciągłemu mieszaniu i impregnacja materiału roztworem leku zwana “incipient wetness”. Po raz pierwszy zostały one przedstawione przez Vallet-Regi i jej grupę badawczą i nadal są stosowane jako najbardziej efektywne i adekwatne metody [11]. Oprócz nich niedawno zaproponowane zostały nowe metody takie jak bezpośrednia spontaniczna synteza mezoporowatej matrycy zawierającej

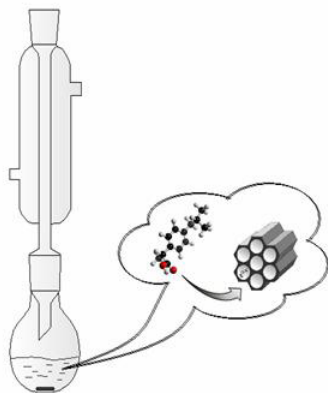
uwieczony wewnątrz porów lek oraz stapianie (ogrzewanie) mieszaniny leku i sproszkowanego materiału krzemianowego zwana “melt metod.



Rysunek 2. Cząsteczka ibuprofenu: wzór strukturalny (A), rozmiary cząsteczki (B), struktura trójwymiarowa 3D (C) oraz krystalograficzna z przedstawieniem odległości między skrajnymi grupami funkcyjnymi (D).

### 3.1. Adsorpcja z roztworu leku wskutek nieustannego mieszania

Adsorpcja z roztworów organicznych poddanych ciągłemu mieszaniu, po której następuje proces odsączania materiału mezoporowatego, jest najczęściej używaną procedurą wykorzystywaną w celu wprowadzenia do wewnątrz krzemianowej matrycy cząsteczek leku. W procesie tym lek i materiał mezoporowaty użyte są w stosunku równomolowym, w środowisku rozpuszczalnika organicznego. Macierz krzemianowa powinna być całkowicie zamoczona w roztworze farmaceutyku i poddana delikatnemu mieszaniu w czasie od 24 godzin [11] do 3 dni [18] w zależności od stosowanej procedury, zapobiegając odparowaniu rozpuszczalnika (rys. 3). Następnie otrzymany materiał powinien zostać odsączony, poddany szybkiemu przemyciu rozpuszczalnikiem i suszony w próżni. Warto w tym miejscu podkreślić, iż w każdym przypadku zawartość zaadsorbowanego ibuprofenu w materiale mezoporowatym osiągnęła szacunkową wartość około 30%, głównie ze względu na proces przemywania i sączenia. W niektórych przypadkach wykazano, iż powolny proces odparowania rozpuszczalnika znajd zawiesiny uporządkowanego materiału w roztworze leku może zwiększyć ilość zaadsorbowanej substancji aktywnej [19]. Wprowadzenie ibuprofenu powoduje



Rysunek 3. Schemat adsorpcji ibuprofenu z jego roztworu.

widoczne zmiany w porowatości materiału. W przypadku materiałów zawierających mikropory oprócz mezoporów, takich jak np. SBA-15, widoczny jest spadek objętości mikroporów (ibuprofen preferencyjnie lokalizuje się w mikroporach). Po wypełnieniu dostępnych mikroporów lub w przypadku materiałów o strukturze wyłącznie mezoporowatej ibuprofen adsorbują się wyłącznie na wewnętrznej powierzchni mezoporów, dopóki nie utworzony zostanie pojedynczy, jednorodny i cienki film cząsteczek [20].

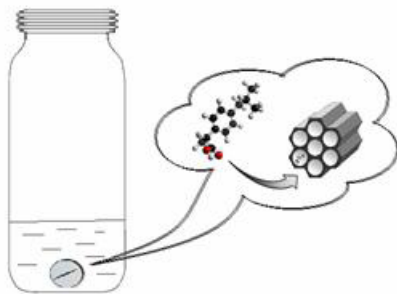
W przypadku procesu adsorpcji z roztworu leku w rozpuszczalniku organicznym, ważną rolę pełni również rodzaj użytego rozpuszczalnika. Przebadane zostały rozpuszczalniki aprotyczne, takie jak DMSO, DMA czy DMF, oraz powszechnie używane etanol, metanol i heksan (tabela 1) [21]. Zgodnie z wytycznymi grupy badawczej Vallet-Regi [11], heksan wykazał bardzo wysokie stężenie wprowadzanego do wnętrza porów leku, jednak z drugiej strony znany jest jako substancja o właściwościach wysoce toksycznych. Jako bardziej odpowiedni dla tego procesu rozpuszczalnik wydaje się być etanol, ze względu na swoją dostępność, brak toksyczności oraz jedynie niewiele niższą efektywność w tym procesie. Procedury adsorpcyjne nadal są rozwijane i badane pod kątem zwiększania ilości wprowadzonego ibuprofenu do wnętrza porów, ponieważ nadal użycie heksanu jako rozpuszczalnika zapewnia najwyższe wartości wypełnienia porów lekiem i gwarantuje jego uwięzienie we wnętrzu materiału po usunięciu rozpuszczalnika.

Tabela 1. Efekt użytego rozpuszczalnika na proces adsorpcji ibuprofenu w porach materiału MCM-41 [21]

Rozpuszczalnik	$\Gamma_{\text{MCM-41}}$ (mg/ml)
DMSO	25.5
DMF	47
DMA	0
Etanol	184
Heksan	590

### 3.2. Impregnacja uporządkowanego materiału mezoporowatego roztworem leku ("incipient wetness")

Metodą konkurencyjną do przedstawionej powyżej metody jest wprowadzanie leku wewnątrz matrycy krzemionkowej wskutek impregnacji (zwilżania)



Rysunek 4. Schematyczne przedstawienie metody "incipient wetness".

materiału roztworem leku, zwaną metodą "incipient wetness" (rys. 4). Jest to metoda bardziej wygodna i praktyczna, zakładająca obecność dużej objętości porów w uporządkowanym materiale mezoporowatym, zdolnych do wypełnienia ściśle określoną ilością roztworu leku w rozpuszczalniku organicznym. Pozwala ona na ominięcie kroku ustalania się stanu równowagi pomiędzy wypełnionymi roztworem porami a roztworem leku na zewnątrz materiału, który wymaga określonego czasu, oraz niepewnego etapu sączenia. Procedura ta okazała się być niezwykle efektywna w przypadku wprowadzania molekuł o dużych masach cząsteczkowych,

takich jak na przykład barwniki [20,22]. Zgodnie z metodą zaproponowaną przez Vallet-Regi i współpracowników, "incipient wetness" zakłada trzydniowe (czas potrzebny do osiągnięcia stanu równowagi) zanurzenie materiału mezoporowatego w roztworze leku. Roztwór farmaceutyczny oraz ilość użytej macierzy krzemionkowej stosuje się w ilościach równomolowych, a dodatkowo stały materiał prasowany jest w formę dysku dla poprawienia procesu wprowadzania leku [11]. Procedura była poddawana modyfikacjom pod kątem czasu kontaktu materiał-roztwór leku, użycia różnych stosunków molowych macierzy do leku oraz ilości stosowanych impregnacji. W przypadku użycia tego samego materiału mezoporowatego, nie zaobserwowano znaczącej różnicy w przypadku wydłużenia czasu trwania procesu adsorpcji [23], czy zwiększania stosunku macierz/lek (zwiększania stężenia użytego roztworu farmaceutycznego), natomiast widoczny był wpływ użytego rozpuszczalnika, podobnie jak to miało miejsce w przypadku poprzedniej procedury (adsorpcja z roztworu leku) [20,21,23]. Widoczny wzrost ilości zaadsorbowanej substancji czynnej można osiągnąć poprzez kilkukrotne stosowanie impregnacji materiału z użyciem roztworu ibuprofenu o wyższym stężeniu niż w przypadku stosunku równomolowego, z odparowaniem rozpuszczalnika pomiędzy kolejnymi etapami [21]. Oczywiście w tym przypadku ko-

Nowe zastosowanie materiałów mezoporowatych – adsorpcja leków na przykładzie ibuprofenu

nieczne jest odsączenie materiału po zakończeniu procesu oraz jego przemycie w celu usunięcia cząsteczek ibuprofenu osadzonych na zewnętrznej powierzchni matrycy. Teoretycznie sączenie oraz przemywanie materiału po impregnacji nie ma wpływu na ilość leku wprowadzonego i uwięzionego już w porach uporządkowanej matrycy krzemianowej.

### **3.3. "Melt method" – ogrzewanie sproszkowanej mieszaniny leku oraz materiału mezoporowatego**

"Melt method" została opublikowana niedawno jako procedura zainspirowana metodą wprowadzania cząsteczek sproszkowanych barwników do wnętrza zeolitów. Pozwala ona na uniknięcie użycia organicznych rozpuszczalników podczas procesu wprowadzania substancji aktywnych [24]. Zakłada przygotowanie mieszaniny fizycznej leku oraz materiału mezoporowatego oraz grzanie mieszaniny powyżej temperatury topnienia leku – w przypadku ibuprofenu powyżej 100°C. Stopiony ibuprofen, który ma niską wartość lepkości, powinien ulec procesowi dyspersji na wewnętrznej części ścian kanałów materiału mezoporowatego, co pozwoliłoby na skrócenie czasu adsorpcji do minut. Niestety metoda ta prowadzi do powstania skupisk ibuprofenu na zewnętrznej powierzchni matrycy krzemianowej i osiągnięcie niezadawalającej ilości cząsteczek leku wewnątrz porów materiału [20]. Nadzieją dla tej metody jest podobna technika zwana „melt emulsification” (używana zwykle w procesie syntezy stałych lipidowych nanocząsteczek), która została użyta w celu otrzymania nanozawiesiny umożliwiającej zwiększenie rozpuszczalności trudno rozpuszczalnych leków, takich jak ibuprofen [25].

### **3.4. Jednoetapowa synteza z użyciem leku jako templaty**

Nowe podejście do metody wprowadzania leków do wnętrza macierzy krzemianowych zaproponowali Stucky oraz jego grupa badawcza [26]. Otrzymali oni mezoporowaty materiał krzemianowy z wprowadzonym do jego wnętrza ibuprofenem na drodze bezpośredniej spontanicznej jednoetapowej syntezy. Bazuje ona na syntezie uporządkowanego materiału mezoporowatego, wskutek wystąpienia oddziaływań S<sup>N</sup>+I, w tym przypadku pomiędzy surfaktantem, źródłem krzemionki oraz ibuprofenem (aktywną cząsteczką) [26]. Otrzymany uporządkowany materiał zawiera uwięziony wewnątrz porów lek w ilości około 25% (ilości wyjściowej). Jak dotąd jest to jedyny taki odnotowany przypadek enkapsulacji, jednak prowadzi do obiecujących ilości zaadsorbowanej substancji czynnej oraz satysfakcjonującego profilu uwalniania.

## **4. Metody uwalniania leku i profil uwalniania**

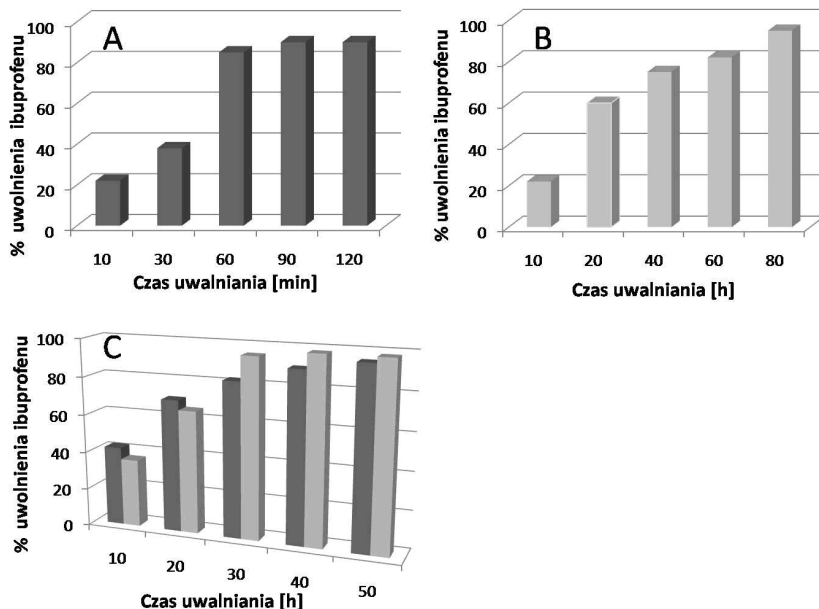
Po raz pierwszy profil uwalniania ibuprofenu został opublikowany przez

Vallet-Regi i jej grupę badawczą [11]. W tym celu próbki materiału mezoporowatego zawierającego w swej strukturze ibuprofen zostały sprasowane wskutek poddania ich działaniu izokratycznego i jednakowego we wszystkich kierunkach osi symetrii ciśnienia w celu otrzymania dysku. Następnie otrzymane próbki zanurzone zostały w roztworze imitującym płyn ustrojowy (simulated body fluid - SBF) w stosunku 1 ml SBF do 1 mg ibuprofenu (1:1) i poddane ciągłemu delikatnemu mieszaniu w temperaturze 37°C, przy zachowaniu stałej wartości pH w granicach 7,3-7,4 [18,23,27]. Zapobiega to ograniczeniu limitu dostarczenia leku wskutek procesów wymuszonej powierzchniowej dyfuzji. Skład roztworu SBF jest następujący: 7,996g NaCl, 0,350g NaHCO<sub>3</sub>, 0,224g KCl, 0,228g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O, 0,305g MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 40 mL 1N HCl, 0,278g CaCl<sub>2</sub>, 0,071g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 6,057g NH<sub>2</sub>C(CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub> na 1L redestylowanej wody i ma skład jonowy analogiczny do ludzkiej plazmy [28,29]. Stężenie ibuprofenu uwolnionego z porów materiału określane jest z użyciem spektrofotometrii w zakresie nadfioletu i światła widzialnego. Procedura uwalniania była modyfikowana przez inne grupy badawcze. Współpracownicy naukowci Qiu stosowali buforowany roztwór imitujący płyny ustrojowe o niższej wartości pH, mianowicie 6,8 [30]. Następnie niezależnie od siebie powyżej wspomniana chińska grupa badawcza [31] i naukowcy francuscy z Montpellier [21] jako pierwsi przeprowadzili eksperyment mający na celu uwolnienie leku z matrycy krzemianowej najpierw w środowisku kwaśnym roztworu imitującym płyn żołądkowy o pH 1,3, a następnie w roztworze imitującym płyny ustrojowe (pH 7,4) tak aby profil uwalniania przebiegał w warunkach jeszcze bardziej zbliżonych do panujących w ludzkim układzie pokarmowym po doustnym wprowadzeniu leku (rysunek 5). Grupa badawcza Devoisselle [21] również zaproponowała model celi przepływowej dla pomiarów uwalniania ibuprofenu i ilościowej analizy uwolnionego leku za pomocą chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz z detektorem UV-Vis. Jeszcze inny system uwalniania postulował Bein i jego grupa badawcza [32]: plastikową kufkę do pomiarów w ultrafiolecie i świetle widzialnym wytrząsaną ruchami kolistymi. System ten wymaga utrzymania temperatury pokojowej i dokonywania pomiarów bezpośrednio z kufki umieszczonej w spektrometrze UV-Vis, podczas gdy badany materiał zawierający ibuprofen znajduje się na dnie kufki. Zapobiega to interferencji materiału i promieniowania UV [32].

Jak już wspomniano, średni procent masowy zaadsorbowanego ibuprofenu w matrycy materiału MCM-41 osiąga wartość około 30%. Zachowując optymalne warunki, kontrolowany proces uwalniania ibuprofenu uwięzionego wewnątrz krzemianowej macierzy zachodzący w roztworze imitującym płyny ustrojowe, zachodzi w przeciągu trzech dni. Ponad to ilość uwolnionego leku zależy od formy zaimpregnowanego materiału: czy jest on w postaci proszku czy sprasowanej tabletki. Dowiedziono również, że wartość uwolnionej frakcji



leku osiąga wyższe wartości w przypadku proszków niż dyskowej pastylki [33]. Obserwacje te można również powiązać ze sposobem wprowadzenia leku. Metoda z użyciem mieszania roztworu substancji czynnej i materiału mezoporowatego daje zwiększenie szybkości procesu uwalniania, niż ma to miejsce w przypadku krzemionek impregnowanych na drodze „incipient wetness” (oraz „melt method”), które podlegają wolniejszemu uwalnianiu i z nieco niższymi wydajnościami [20,33].



Rysunek 5. Profile uwalniania ibuprofenu z różnych roztworów: - medium kwaśne a następnie SBF (wg procedury Beina i wsp. [21]) (A), tylko w roztworze imitującym płyny ustrojowe (wg procedury Vallet-Regi i wsp. [11]) (B) i osobno w roztworze imitującym soki żołądkowe (ciemniejsze słupki) i SBF (jaśniejsze słupki) (wg procedury Qiu i wsp. [31]) (C).

Bardzo ważną kwestią w przypadku procesu dostarczania leków jest określenie profilu dostarczania farmaceutyku przez dany nośnik. Pozwala to na optymalizację kinetyki uwalniania leku. Ogólnie proces uwalniania zaadsorbowanej w macierzy krzemianowej cząsteczki aktywnej można opisać za pomocą czterech kolejnych etapów: wniknięcie medium uwalniającego do wnętrza porów na skutek ciśnienia osmotycznego wytworzonego przez gradient stężenia

roztworu, rozpuszczenie leku, jego dyfuzję wzdłuż kanałów matrycy zgodnie z gradientem stężeń oraz regulowany przez dyfuzję i konwekcję transport farmaceutyku do medium uwalniającego. Cały przebieg procesu może być zależny od jednego lub większej ilości kroków [34,35]. Profil uwalniania w wielu przypadkach może zostać opisany klasycznym równaniem teorii dyfuzji Fick'a lub za pomocą uproszczonego modelu Higuchi'ego, który zwykle jest używany w przypadku systemów zawierających zaadsorbowany ibuprofen. Model ten jest odpowiedni dla takich nośników, w których stężenie leku jest dużo wyższe niż jego rozpuszczalność. Higuchi był pierwszym naukowcem, który opisał proces uwalniania leku z wnętrza nierozpuszczalnej matrycy przy pomocy pierwiastka kwadratowego procesu zależnego od czasu, opartego na prawie dyfuzji Fick'a. Uwolnione ilości impregnowanego leku na jednostkę zajmowanej powierzchni w czasie  $t$ , można opisać prostą zależnością:

$$Q_t = k_H \cdot t^{1/2}, \quad (\text{wzór 1})$$

gdzie  $Q_t$  jest ilością uwolnionego leku,  $k_H$  stałą uwalniania dla modelu Higuchiego.

Dla procesu kontrolowanego jedynie przez dyfuzję, ilość uwolnionego leku powiązana jest liniową zależnością z pierwiastkiem kwadratowym czasu, w którym zachodzi proces uwalniania [36-38]. W przypadku, gdy cząsteczki leku zdyspergowane są w matrycy i dyfuzja zachodzi wskutek wypełnienia porów medium uwalniającego, zależność przybiera postać:

$$k = f(D, \varepsilon, \tau, C, A), \quad (\text{wzór 2})$$

gdzie  $D$  jest współczynnikiem dyfuzji leku w medium,  $\tau$  współczynnikiem krętości ośrodka porowatego,  $\varepsilon$  porowatością matrycy,  $A$  całkowitą ilością leku wprowadzonego do matrycy, a  $C$  oznacza rozpuszczalność leku w użytym medium (rozpuszczalniku) [23].

Zastosowanie tego modelu opisuje właściwie badane systemy, gdy rozpatrywane jest uwalnianie cząsteczek o relatywnie małych rozmiarach, które są jednorodnie rozprzeżstrzenione we wnętrzu matrycy.

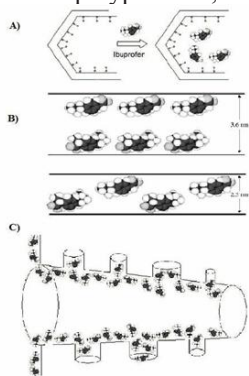
## 5. Wpływ właściwości powierzchni wewnętrznej macierzy na proces dostarczenia leku

Każda grupa uporządkowanych materiałów mezoporowatych posiada dużą ilość porów o odpowiednim rozmiarze, aby stać się gospodarzem dla cząsteczek farmaceutyków i potencjalnym kandydatem dla systemu kontrolowanego dostarczania leku. Macierz powinna pozwolić, aby lek wypełnił puste kanały, a

następnie opuścił je całkowicie w pełni kontrolowany sposób. Morfologia porów i właściwości wewnętrznej powierzchni kanałów decydują o typie cząsteczki, która spełniałaby warunki konieczne do procesu adsorpcyjnego. Natomiast średnia objętość porów i całkowita objętość porów w danym materiale wpływają na maksymalną możliwą ilość zaadsorbowanego leku. W przypadku rodzin materiałów zawierających mezopory, takich jak na przykład MCM-41, sumaryczna objętość porów jest w większości przypadków równa całkowitej objętości mezoporów. Jednak często materiały zawierają w swej strukturze również mikropory (na przykład SBA-15), a nawet makropory stanowiące dodatkowe połączenia, a ich wkład w sumaryczną objętość porów wzrasta ze spadkiem rozmiaru ziaren materiału. W tych przypadkach położenie leku wewnątrz kanałów zależy od średnicy jego cząsteczki lub predyspozycji powierzchni wewnętrznej. Rozmiar porów wpływa na ilość zaadsorbowanego leku i jest to szczególnie widoczne w przypadku materiałów typu MCM-41 o różnej średnicy porów, co pozwala na dobranie odpowiednich dawek leku i jego kontrolowane uwalnianie proporcjonalnie do rozmiaru porów [13,27]. W przeciwieństwie do materiału MCM-41, mezoporowata powierzchnia wewnętrzna SBA-15 posiada wiele silnych centrów adsorpcyjnych wynikających z defektów powierzchni [39], co wiąże się z obecnością w SBA-15 znacznych ilości grup silanolowych towarzyszących wejściom do mikroporów, co czyni powierzchnię niejednorodnie aktywną w stosunku do interakcji z cząsteczkami - gośćmi. Tym samym w materiale typu SBA-15 molekuly ibuprofenu są adsorbowane preferencyjnie wewnątrz mikroporów (rys. 6). Po ich wypełnieniu, lek lokalizuje się wewnątrz mezoporów tworząc cienki film cząsteczek na powierzchni mezoporowatych ścian wzdłuż kanałów.

W obu przypadkach, zarówno materiału MCM-41 o większej średnicy porów oraz SBA-15, ibuprofen jako kwas karboksylowy, ulega dimeryzacji wewnątrz mezoporów [17,20].

Porównując struktury materiałów z rodzin M41S (MCM-41 i MCM-48) i SBA (SBA-1, SBA-3 i SBA-15) adsorpcja ibuprofenu wykazuje zależność od morfologii macierzy, tj. nośnika. Według grupy badawczej Vallet-Regi, w przypadku MCM-41 efekt średnicy porów, który wpływa zarówno na adsorpcję, jak i uwalnianie ibuprofenu jest znaczny [27]. Pozwala przewidzieć zarówno szacunkową ilość zaadsorbowanego farmaceutyku, jak i szybkość uwalniania proporcjonalnie do wielkości porów. Również w przypadku mezoporowatych



Rysunek 6. Adsorpcja cząsteczek ibuprofenu wewnątrz matrycy krzemianowej (A), różnice pomiędzy wypełnieniem porów materiału MCM-41 o średnicach odpowiednio 2,5 nm i 3,6 nm [27] (B) oraz lokalizacja w kanałach SBA-15 [20] (C).

krzemianów MCM-48 o różnych rozmiarach porów widoczne jest wolniejsze uwalnianie substancji uwieżionej w macierzy wraz ze spadkiem rozmiaru porów [13]. Inne grupy badawcze wykazały istnienie zależności pomiędzy ilością zaimpregnowanego leku a rozmiarem cząstek materiału MCM-41. Cząstki o kształcie sferycznym i niewielkich rozmiarach podlegają szybszej adsorpcji i procesowi uwalniania uwieżionego leku, a szybkość ta maleje wraz ze wzrostem rozmiarów. Podobne zachowanie leków wewnątrz mezoporów może być zależne od długości kanałów w użytej macierzy – gospodarza, co można powiązać ze wzrostem rozmiaru cząsteczki sferycznej oraz ze zmianą kształtu od nieregularnej po sferyczną. Dłuższa droga, którą musi pokonać lek, utrudnia jego wprowadzenie i opuszczenie macierzy krzemianowej, co prowadzi również do wydłużenia czas uwalniania. Podobne rezultaty otrzymano również dla cząsteczek MCM-41 o strukturze kanałów linowego typu, określonych jako linowe „rope-like” [23,30,40].

Grupa badawcza Lindena wykazała silny wpływ rozmiaru porów na profil uwalniania leków również w przypadku materiałów z rodziny SBA. Wydajność uwalniania wzrastała w kierunku SBA-1 < SBA-3 < MCM-41, w tym samym kierunku zmieniał się również stopień adsorpcji leku wewnątrz materiału mezoporowatego. Występowanie dodatkowych jednowymiarowych połączeń pomiędzy kanałami w strukturze materiału oznaczonego jako c-MCM-41 czyniło go odpowiednim dla wolnego procesu uwalniania leku z wnętrza materiału ze względu na bardzo wysoki stopień adsorpcji ibuprofenu oraz hydrofobową naturę wewnętrznej powierzchni porów. Notomiast SBA-1 posiadający trójwymiarowe sferyczne, połączone ze sobą pory oraz SBA-3 o cylindrycznych heksagonalnych porach, połączonych między sobą mniejszymi porami, wykazują wolniejszy i mniej efektywny stopień uwalniania [38].

## **6. Funkcjonalizacja porowatej powierzchni krzemianów w celu ułatwienia adsorpcji leków oraz kontroli nad ich profilem uwalniania**

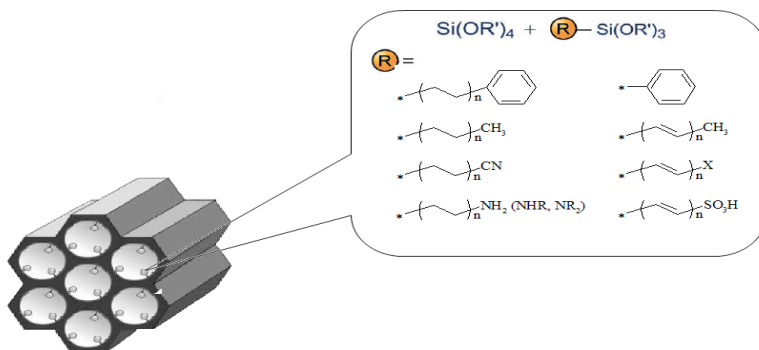
Materiały mezoporowate znane są z posiadania dużej liczby defektów spowodowanych obecnością grup silanolowych na ich powierzchni [41]. Modyfikacja wewnętrznej powierzchni poprzez wprowadzenie w miejsce atomu wodoru różnych centrów chemicznych R powiązanych z atomem tlenu wiązaniem kowalencyjnym, może prowadzić do otrzymania całej rodziny materiałów hybrydowych o właściwościach nawet zdecydowanie odmiennych niż nieorganiczna matryca. W większości przypadków centrum R stanowi organiczna grupa funkcyjna, zawierająca jedno lub więcej miejsc reaktywnych, które mogą następnie ulec chemicznej modyfikacji. Takie grupy funkcyjne mogą zostać wprowadzone do matrycy krzemianowej na drodze ko-kondensacji, zwanej inaczej syntezą “one-pot” lub post-syntetycznej funkcjonalizacji – graftingu [10,13]. Obie me-

tody różnią się położeniem wprowadzonej grupy organicznej R. W przypadku pierwszej metody organiczne grupy są połączone zarówno z grupami silanowymi obecnymi w ścianach, jak i we wnętrzu kanałów, natomiast modyfikacja post-syntetyczna zapewnia wprowadzenie grup R na wewnętrzną powierzchnię porów, prowadząc do większego stopnia funkcjonalizacji [10,42].

Zwykle modyfikacja powierzchni krzemionki przy pomocy różnych grup funkcyjnych (grupy organiczne, metale, tlenki metali itp., w przypadku materiału MCM-41 na przykład: Cl-Pr, NH<sub>2</sub>-Pr, Ph, Bz, SH-Pr, CN-Pr i Bu) prowadzi do polepszenia takich właściwości materiału jak aktywność katalityczna czy właściwości adsorpcyjne, w taki sposób aby stał się użyteczny dla celów kontrolowanego dostarczania leków, zależnego od rodzaju leku i jego zastosowania [13,35,42].

### 6.1. Wprowadzenie grup organicznych

Ibuprofen – lek o małej średnicy cząsteczki, zawierający grupę karboksylową o charakterze kwasowym – jako jeden z pierwszych był rozważany i badany jako związek modelowy. Zaobserwowano, iż różnice w adsorpcji leku i jego uwalnianiu zależą od wprowadzonych grup funkcyjnych (rys 7). Modyfikacja macierzy krzemianowej materiałów typu MCM-41 i SBA-15 grupami aminowymi prowadzi do zwiększenia ilości zaadsorbowanego ibuprofenu w porównaniu z czystą krzemionką. Funkcjonalizacja pełni w tym przypadku znaczną rolę w zwiększaniu ilości zaadsorbowanego farmaceutyku, znacznie większą niż rozmiar cząsteczki czy jej morfologia. Obecne wewnątrz porów protonowane grupy amino- i aminopropylowe oddziałują elektrostatycznie z grupami karboksylowymi ibuprofenu, co prowadzi do powstania mocniejszych interakcji niż wytworzenie wiązania wodorowego z grupami silanolowymi obecnymi w czystej, niemodyfikowanej macierzy krzemianowej. Z tego powodu zauważono istotne różnice w profilu uwalniania leków z sfunkcjonalizowanych i niesfunkcjonalizowanych materiałów. Czas uwalniania leku z modyfikowanych macierzy zostaje wydłużony, co można powiązać z silnymi oddziaływaniami pomiędzy cząsteczkami ibuprofenu a grupami organicznymi wprowadzonymi na mezoporowatą powierzchnię krzemionki [18,43]. W przypadku sfunkcjonalizowanych macierzy, kształt mezoporowatego nośnika również pełni rolę w profilu uwalniania leku. Sferyczne cząstki wykazują niższe wartości uwalniania leku niż nieregularne proszki. Również rozmiar cząstek jest ważny, mniejsze wykazują wolniejszy profil uwalniania. Wpływ ten nie jest jednak tak istotny jak przypadku krzemianowych materiałów [40,44].



Rysunek 7. Przykłady grup organicznych wprowadzonych do macierzy materiału mezoporowatego metodami "one-pot" lub grafting

Modyfikowane grupami polarnymi mezoporowate krzemiany wykazują wyższy stopień wprowadzenia ibuprofenu niż te, na powierzchnię których wprowadzono grupy niepolarne. Również ich profil uwalniania leku jest wolniejszy, nie tylko w obecności grup aminowych, podobne działanie wykazują grupy tiolowe [45]. Wprowadzenie ich jako zakończeń długołańcuchowych węglodorów lub modyfikowanych grup siliłowych (MS, DMS, HMDS) pozwala na kontrolę ilości adsorbowanego leku i profilu jego uwalniania przez zwiększanie hydrofobowości. Ich obecność w macierzy krzemianowej osłabia oddziaływanie ibuprofenu z modyfikowaną powierzchnią, prowadząc do wprowadzenia leku w mniejszej ilości i jego szybkiego opuszczenia matrycy, jednak wolniejszej niż w przypadku czystej macierzy krzemianowej. Obniżenie stopnia zaadsorbowania ibuprofenu można osiągnąć w obecności grup funkcyjnych na wewnętrznej i zewnętrznej powierzchni porów oraz na ich końcach, czyli generując hydrofobowe właściwości powierzchni wewnętrznej i tworząc silny efekt barierowy [46,47].

## 6.2. Tlenki metali i cząsteczki o właściwościach magnetycznych

W ostatnim czasie pojawił się nowy kierunek w projektowaniu nośników leków. Dowiedziono, iż do matrycy krzemianowej za pomocą metod: ko-kondensacji zol-żel [48,49], dotowania [50] i impregnacji zwilżeniowej [51], wprowadzone mogą zostać także związki metali, głównie wykazujące właściwości magnetyczne. Adsorpcję ibuprofenu w tego typu materiałach, tj. ze zmodyfikowaną w ten sposób powierzchnią można zwiększyć do 70% wagowych leku w przypadku zastosowania żelaza do funkcjonalizacji, co jest wartością dwukrotnie wyższą niż w przypadku dotychczasowych badań materiałów krzemianowych.

Oddziaływania pomiędzy wprowadzonym lekiem a zmodyfikowaną powierzchnią krzemionki mogą mieć bardzo różną naturę, zwykle mają one jednak charakter wiązania wodorowego pomiędzy grupą karbonylową ibuprofenu a modyfikowaną matrycą krzemianową. W obecności MCM-41 modyfikowanego MgO, ibuprofen również wykazuje wysoki stopień zaadsorbowania i wydłużenie w czasie procesu uwalniania, co związane jest pośrednio z grubością warstwy tlenku [48]. W szczególności związki wykazujące właściwości magnetyczne, są niezwykle interesujące z punktu widzenia kontrolowanego dostarczania leków. Wykazują one nie tylko wysoki stopień zaadsorbowania leku spowodowany wystąpieniem oddziaływań pomiędzy farmaceutykiem a macierzą-nośnikiem, ale umożliwiają temperaturową kontrolę nad procesem dostarczania i uwalniania leku wskutek sterowania wodorowymi oddziaływaniami w modyfikowanej matrycy [49,51]. Ze względu na te unikalne właściwości (w przypadku krzemianowych macierzy sfunkcjonalizowanych  $CeF_3:Tb^{3+}$ ) mogą one pełnić dodatkową rolę jako fluorescencyjne znaczniki w procesie kontrolowanego dostarczania leków, dodatkowo umożliwiając uwalnianie cząsteczek biologicznie aktywnych głównie wskutek naświetlania promieniowaniem w zakresie światła widzialnego o długości fali 254 nm [50].

## 7. Podsumowanie

Niezwykle właściwości materiałów mezoporowatych, takie jak ich uporządkowana struktura oraz zdefiniowana geometria porów w połączeniu z możliwością modyfikacji ich właściwości pozwala na zastosowanie ich jako nośników w procesie kontrolowanego dostarczania leków. Wykazano, że właściwości teksturalne i strukturalne tych materiałów pełnią znaczącą rolę w ich bioaktywnym zachowaniu. Dodatkowo właściwości te można ulepszyć poprzez wprowadzenie na powierzchnię wewnętrzną porów i do wnętrza ścian metali oraz ich związków, bądź organicznych grup funkcyjnych. Poprzez odpowiednie dobranie cząsteczki leku oraz mezoporowatej krzemianowej struktury z odpowiednio zmodyfikowaną powierzchnią, na skutek ich wzajemnych oddziaływań, możliwe jest dobranie adekwatnej metody wprowadzenia leku do wnętrza porów macierzy, przewidzenie i przejęcie kontroli nad wprowadzaną ilością oraz nadzór nad procesem uwalniania (wydłużeniem lub przyspieszeniem). To czyni różne krzemianowe materiały mezoporowate obiecującymi kandydatami jako nośniki leków.

## Podziękowania:

Praca naukow finansowane ze środków na naukę w latach 2009-2012, jako projekt badawczy (N 204 – 163636).

**Literatura:**

1. J. S. Beck, J. C. Vartulli, W. J. Roth, M. E. Leonowicz, C. T. Kresge, K. D. Schmitt, C.T. Chu, D. H. Olson, D. W. Scheppard, *J. Am. Chem. Soc.* 114 (1992) 10834-10843
2. A. Corma, *Chem. Rev.* 97 (1997) 2373- 2420
3. D. Brunel, *Micropor. Mesopor. Mater.* 27 (1999) 329-344
4. O. Olkhovyk, M. Jaroniec, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 60
5. A. Monnier, F. Schüth, Q. Huo, D. Kumar, D. Margolese, R.S. Maxwell, G.D. Stucky, M. Krishnamurty, P. Petroff, A. Firouzi, M. Janicke, B.F. Chmelka, *Science* 261 (1993) 1299-1300
6. M. Grun, K.K. Unger, A. Matsumoto, K. Tsutsumi, *Micropor. Mesopor. Mater.* 27 (1999) 207–216
7. B.D. Hatton, K. Landskron, W. Whitnall, D.D. Perovic, G. A. Ozin, *Adv. Funct. Mater.* 15 (2005) 823
8. M. Kruk, M. Jaroniec, A. Sayari, *Micropor. Mesopor. Mater.* 27 (1999) 219
9. K. Moller, T. Bein, *Chem. Mater.* 10 (1998) 2950
10. F. Hoffmann, M. Cornelius, J. Morell, M. Fröba, *Angew. Chem. Int. Ed.* 45 (2006) 3216 – 3251
11. M. Vallet-Regí, A. Rámila, R.P. del Real, J. Perez-Pariente, *Chem. Mater.* 13 (2001) 308-311.
12. C. Hari, R.A. Paruchuri, D.A. Sabatini, T.C.G. Kibbey, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 2592.
13. M. Vallet-Regí, *Chem. Eur. J.* 12 (2006) 5934
14. Y. Zhu, J. Shi, W. Shen, X. Dong, J. Feng, M. Ruan, Y. Li, *Angew. Chem. Int. Ed.* 44 (2005) 5083
15. J. Alsenz, M. Kansy, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 (2007) 546-567
16. K.E. Uhrich, S.M. Cannizzaro, R.S. Langer, K.M. Shakesheff, *Chem. Rev.* 99 (1999) 3181
17. F. Babboneau, L. Yeung, N. Steunou, C. Gervais, A. Ramila, M. Vallet-Regí, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 31 (2004) 219–223
18. S.-W. Song, K. Hidajat, S. Kawi, *Langmuir* 21 (2005) 9568-9575
19. Z. Wu, Y. Jiang, T. Kim, K. Lee, *J. Control. Release* 119 (2007) 251–221
20. R. Mellaerts, J. A. G. Jammaer, M. Van Speybroeck, H. Chen, J. Van Humbeeck, P. Augustijns, G. Van den Mooter, J.A. Martens, *Langmuir*, 24 (2008) 8651-8659
21. C. Charnay, S. Bégu, C. Tourné-Péteilh, L. Nicole, D.A. Lerner, J.M. Devoisselle, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 57 (2004) 533–540
22. A. Devaux, K. Lutkouskaya, G. Calzaferri, *Chimia* 61 ( 2007) 626–



630

23. I. Izquierdo-Barba, Á. Martínez, A.L. Doadrio, J. Pérez-Pariente, M. Vallet-Regi, *Eur. J. Pharm. Sci.* 26 (2005) 365-373
24. M. Pauchard, A. Devaux, G. Calzaferri, *Chem. Eur. J.* 6 (2000) 3456–3470
25. P. Kocbek, S. Baumgartner, J. Kristl, *Int. J. Pharm.* 312 (2006) 179–186
26. Q. Huo, D.I. Margolese, U. Ciesla, P. Feng, T. E. Gier, P. Sieger, R. Leon, P.M. Petroff, F. Schueth, G.D. Stucky, *Nature* 368 (1994) 317 – 321
27. P. Horcjada, A. Rámilla, J Pérez-Pariente, M. Vallet-Regi, *Micropor. Mesopor. Mater.* 68 (2004) 105-109
28. T. Kokobo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi, T. Yamamuro, *J. Bio-med. Mater. Res.* 24 (1990) 721
29. S.-B.Cho, K. Nakanishi, T. Kokubo, N. Soga, C. Ohtsuki, T. Nakamura, T. Kitsugi, T. Yamamuro, *J. Am. Ceram. Soc.* 78 (1995) 1769
30. F. Qu, G. Zhu, H. Lin, W. Zhang, J. Sun, S. Li, S. Qiu, *J. Solid State Chem.* 179 (2006) 2027-2035
31. F. Qu, G. Zhu, H. Lin, J. Sun, W. Zhang, S. Li, S. Qiu, *Eur. J. Inorg. Chem* (2006) 3943-3947
32. V. Cauda, L. Mühlstein, B. Onida, T. Bein, *Micropor. Mesopor. Mater.* 118 (2009) 435-442
33. A.L. Doadrio, E.M.B. Sousa, J.C. Doadrio, J. Perez-Pariente, I. Izquierdo-Barba, M. Vallet-Regi, *J. Control. Release* 97 (2004) 125
34. H. Li, G.P. Yan, S.N. Wu, Z.J. Wang, K.Y. Lam, *J. Appl. Polym. Sci.* 93 (2004) 1928–1937
35. S. Wang, *Micropor. Mesopor. Mater.* 117 (2009) 1–9
36. T. Higuchi, *J. Pharm. Sci.* 50 (1961) 874
37. T. Higuchi, *J. Pharm. Sci.* 52 (1963) 1145
38. J. Andersson, J. Rosenholm, S. Areva, M. Lindén, *Chem. Mater.* 16 (2004) 4167
39. I.G. Shenderovich, G. Buntkowsky, A. Schreiber, E. Gedat, S. Sharif, J. Albrecht, N.S. Golubev, G.H. Findenegg, H.-H. Limbach, *J. Phys. Chem. B* 107 (2003) 11924–11939
40. M. Manzano, V. Aina, C.O. Areán, F. Balas, V. Cauda, M. Colilla, M.R. Delgado, M. Vallet-Regi *Chem. Eng. J.* 137 (2008) 30–37
41. J. Liu, X. Fena, G.E. Fryxell, L.-Q. Wang, A.Y. Kim, M. Gong, *Adv. Mater.* 10 (1998) 161
42. B. Muñoz, A. Rámila, J. Pérez-Pariente, M. Vallet-Regi, *Chem. Mater.* 15 (2003) 500

43. F. Balas, M. Manzano, P. Horcajada, M. Vallet-Regi, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 8116
44. Y.-F. Zhu, J.-L. Shi, Y.-S. Li, H.-R. Chen, W.-H. Shen, X.-P. Dong, *Micropor. Mesopor. Mater.* 85 (2005) 75-81
45. D.R. Radu, C.-Y. Lai, J. Huang, X. Shu, V. S.-Y. Lin, *Chem. Commun.* (2005) 1264-1266
46. Q. Tang, Y. Xu, D. Wu, Y. Sun, J. Wang, J. Xu, F. Deng, *J. Control. Release* 114 (2006) 41-46
47. Q. Tang, Y. Xu, D. Wu, Y. Sun, *Chem. Lett.* 35 (2006) 474-475
48. S. Shen, P. S. Chow, F. Chen, R.B.H. Tan, *Chem. Pharm. Bull.* 55 (2007) 985-991
49. S. Zhu, Z. Zhou, D. Zhang, *Chem. Phys. Chem.* 8 (2007) 2478-2483
50. D. Kong, P. Yang, Z. Wang, P. Chai, S. Huang, H. Lian, J. Lin, *J. Nanomater.* (2008) Article ID 312792
51. M. Arruebo, M. Galán, N. Navascués, C. Téllez, C. Marquina, M.R. Ibarra, J. Santamaria, *Chem. Mater.* 18 (2006) 1911-1919

## Rozdział VI

### Chromojonofory zbudowane na bazie eterów koronowe

Leszek Zalewski, Tadeusz Ossowski, Dorota Zarzeczkańska  
*Uniwersytet Gdański, Wydział Chemii, ul. Sobieskiego 18/19,  
80-952 Gdańsk*

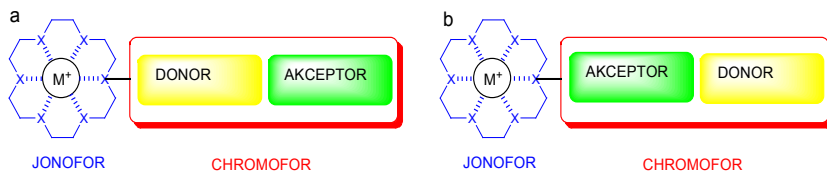
Zmiana pasm absorpcji w zakresie UV-Vis, indukowana kompleksowaniem jonów metali stanowi podstawę do projektowania i budowy wysoce czułych sensorów optycznych. Za pionierskie w tej dziedzinie uważa się prace Takagiego i współpracowników.<sup>1</sup> Zaprezentowano w nich ligandy zbudowane z części jonoforowej – eteru koronowego oraz anionowego elementu chromoforowego, który odbiera informację chemiczną od jonoforu wchodzącego w reakcję z jonem metalu i przekazuje ją w postaci sygnału optycznego. Niezależnie od badań prowadzonych przez Takagiego, rok później (1978) Vögtle i Dix zaprojektowali serię obojętnych chromojonoforów, które po skoordynowaniu jonu metalu, w rozpuszczalnikach organicznych zmieniały kolor.<sup>2,3</sup>

Prace nad poszukiwaniem specyficznych i selektywnych chromojonoforów, uległy znacznemu przyspieszeniu z chwilą, gdy do ich budowy użyto bardziej złożonych systemów molekularnych: kryptandy, sferandy, hemisferandy oraz kaliksareny.<sup>4</sup>

Związki chromojonoforowe można podzielić na dwa rodzaje, w zależności od ładunku pojawiającego się po skompleksowaniu jonu metalu: obojętne (bez ładunku) i anionowe.<sup>5</sup> Ligandy te można również sklasyfikować na wiele innych sposobów, w zależności od struktury części jonoforowej, rodzaju chromoforu, rodzaju użytej metody optycznej. W rozdziale tym zostaną przedstawione ligandy zbudowane z eterów koronowych (głównie eterów azakoronowych) i różnego rodzaju chromoforów. Zostaną zaprezentowane i krótko opisane funkcje oraz mechanizmy, które wynikają ze struktury molekularnej omawianych chromojonoforów.

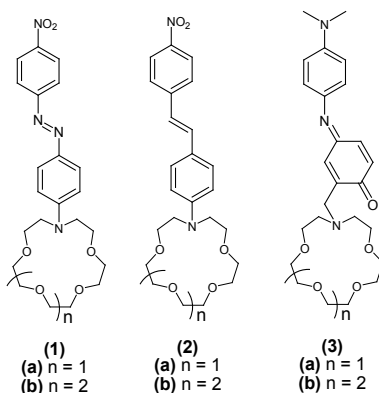
### 1.1. Chromofory obojętne z hipsochromowym i batochromowym przesunięciem pasma absorpcyjnego.

Obojętne chromojonofory można przedstawić tak jak to zaprezentowano na rysunku 1. Element chromoforowy można w wyraźny sposób podzielić na część donorową i akceptorową, których usytuowanie względem wnęki makrocyklicznej decyduje o hipsochromowym lub batochromowym przesunięciu w widmie absorpcyjnym jonów kompleksowych względem wolnych ligandów.



Rysunek 1. Schemat obojętnych chromojonoforów, które w wyniku indukcji jodem metalu powodują przesunięcie hipsochromowe (a) i batochromowe (b) w widmie absorpcyjnym w stosunku do wolnych ligandów.

Seria chromojonoforów zaprojektowanych przez Dixa i Vögtlego (rysunek 2, pochodne **(1)** i **(2)**), jest bardzo dobrym przykładem ligandów, gdzie donor jest w bezpośrednim kontakcie z jonoforem.<sup>6</sup>

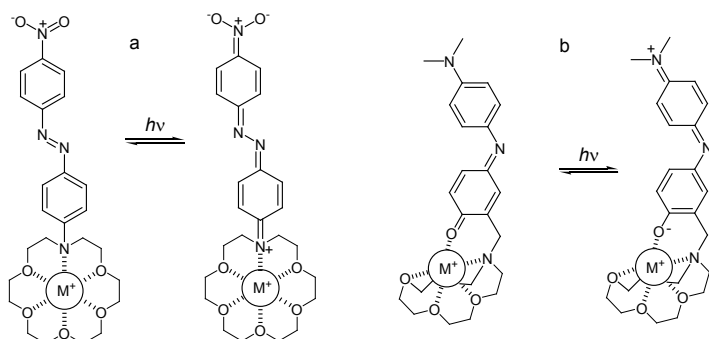


Rysunek 2. Struktury chromojonoforów z donorem usytuowanym w pobliżu wnęki makrocyklicznej **(1)** i **(2)** oraz na zewnątrz chromoforu **(3)**.

Wzbudzenie powoduje przeniesienie elektronu od donora do akceptora wzdłuż cząsteczki chromoforu (rysunek 3, przykład a). W efekcie związania jonu metalu obserwuje się stabilizację elektronowego stanu podstawowego i

destabilizację stanu wzbudzonego chromoforu. W rezultacie obserwujemy hipsochromowe przesunięcie maksimów absorpcyjnych ( $\lambda_{\max}$ ) po skoordynowaniu jonu metalu.

Przykłady chromojonoforów posiadających batochromowe przesunięcie w widmie absorpcyjnym zaprezentowano na rysunku 2, pochodne (**3**).<sup>7</sup> W tym przypadku akceptorowa grupa karbonylowa usytuowana jest w pobliżu jonoforu. Wynikiem tego jest oddziaływanie jonu metalu z wnęką makrocykliczną oraz z grupą karbonylową, która przyjmuje ładunek ujemny (rysunek 3, przykład b). W wyniku stabilizacji jonu kompleksowego obserwujemy silne przesunięcia batochromowe w widmie absorpcyjnym w stosunku do wolnego ligandu.



Rysunek 3. Zmiany w strukturze neutralnego chromojonoforu wywołane absorpcją światła po skompleksowaniu jonu metalu.

Charakterystykę widm absorpcyjnych wolnych ligandów (**1**) – (**3**) oraz kompleksów z wybranymi jonami metali w roztworze acetonitrylu podano w tabeli 1.<sup>5</sup>

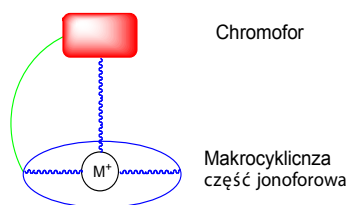
Tabela 1. Charakterystyka w roztworze acetonitrylu, stężenia ligandów  $10^{-4}$  –  $10^{-5}$  M. <sup>a</sup>Wartości podane w nawiasach to  $\Delta\lambda_{\max}$ , wartości w nm. <sup>b</sup>Ca(SCN)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O. <sup>c</sup>Ba(SCN)<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O <sup>d</sup>Wartości w przedziale 464 – 472 bardzo zależne od stężenia soli.

Sól metalu	Ligand					
	(1a)	(1b)	(2a)	(2b)	(3a)	(3b)
Wolny ligand	$\lambda_{\max}^a$ (nm)					
Wolny ligand	474	477	476	477	590	598
LiI	465 (- 9)	474 (- 3)	451 (- 25)	472 (- 5)	630 (+ 40)	634 (+ 36)
KSCN	473 (- 7)	b.d.	464 (- 12)	382 (- 95)	608 (+ 18)	599 (+ 10)
Ca(SCN) <sub>2</sub> <sup>b</sup>	467 (- 7)	451 (- 26)	377 (- 99)	381 (- 96)	668 (+ 78)	676 (+ 78)
Ba(SCN) <sub>2</sub> <sup>c</sup>	<sup>d</sup>	360 (- 117)	394 (- 82)	371 (- 106)	651 (+ 61)	645 (+ 47)

Szczególnie silne oddziaływania możemy zaobserwować dla jonów  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Ba}^{2+}$ . Jest to konsekwencją dobrego dopasowania się kationu do wnęki makrocyklicznej jonoforu oraz następujących zmian w strukturze elektronowej części chromoforowej. Spowodowane jest to również tym, że gęstość ładunku dla dwudodatnich jonów jest większa niż dla jonów o porównywalnej wielkości i mniejszym ładunku. W efekcie oddziaływanie jonów  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Ba}^{2+}$  z polarnymi grupami donorowymi jest silniejsze. Ciekawa i zaskakująca jest wysoka selektywności ligandów **(3a)** i **(3b)** w stosunku jonu litu.

## 1.2. Chromojonofory protonowe.

Chromojonofory anionowe zbudowane są z dysocjujących grup protonowych ulokowanych najczęściej w części chromoforowej (rysunek 4). Można je podzielić na dwie podgrupy: monoprotynowe – wydzielające w wyniku dysocjacji jeden proton, oraz diprotynowe – wydzielające w wyniku dysocjacji dwa protony.

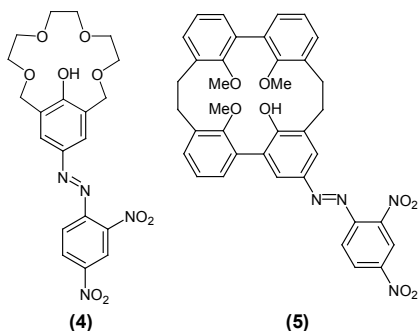


Rysunek 4. Schemat chromojonoforów z chromoforem zawierającym grupy protono – dysocjujące.

Interakcja z jonami metali powoduje zmiany we właściwościach optycznych całego jonu kompleksowego, co z powodzeniem wykorzystano w ekstrakcyjnych metodach fotochemicznych. Jeżeli chromojonon anionowy powstaje w wyniku oddysocjowania jednego protonu, to w wyniku skoordynowania jonu metalu z pierwszej grupy układu okresowego pierwiastków powstaje obojętny jon kompleksowy, który zazwyczaj można ekstrahować do warstwy organicznej. W przypadku chromoforów dwuprotonowych, istnieje możliwość wyekstrahowania kationów dwudodatnich. Zgodnie z tą koncepcją zaprojektowano i doświadczalnie udowodniono użyteczność wielu chromojonoforów w fotometrii ekstrakcyjnej w stosunku do jonów alkalicznych jak i ziem alkalicznych.<sup>8</sup>

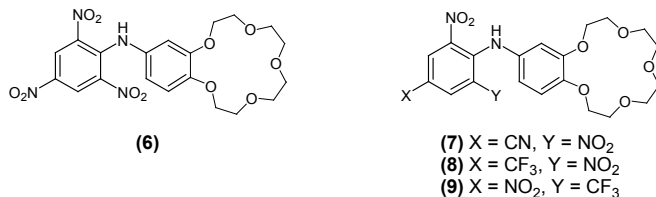
Bardzo dobrym przykładem zjawiska, w którym po skoordynowaniu jonu metalu i dysocjacji protonu możemy zaobserwować zmiany w widmach absorpcyjnych powstałych kompleksów są związki przedstawione w pracach Misumiego i współpracowników.<sup>9,10,11</sup> Zaprojektowali oni ligandy oparte o 2,4-

dinitroazafenol, w których grupy fenolowe stanowią integralną część szkieletu makrocyclicznego. Dla przykładu, ligand **(4)** w obecności  $\text{Li}^+$  charakteryzuje się silnym batochromowym przesunięciem od pasma żółtego ( $\lambda_{\text{max}} = 430 \text{ nm}$ ) charakterystycznego dla wolnego ligandu, do pasma fioletowego ( $\lambda_{\text{max}} = 580 \text{ nm}$ ) pod wpływem jonów litu w rozpuszczalniku organicznym w obecności piperydyny. Istotny jest tu fakt, że dodatek samej zasady jest niewystarczający do przesunięcia pasma absorpcyjnego. Jest to więc jednoznacznie związane z wywoływaną przez kation metalu dysocjacją grupy fenolowej. Ponadto ligand **(4)** wykazuje podobne batochromowe przesunięcie pasm absorpcyjnych w obecności jonów wapnia, w przeciwieństwie do pochodnej **(5)**, która w szeregu przebadanych oddziaływań z jonami metali, wykazuje wysoką selektywność wyłącznie w stosunku do jonów litu.



Rysunek 5. Chromojonofory z chromoforem 2,4-dinitroazofenolowym.

Ciekawą grupą ligandów są pochodne z chromoforem pikryloaminowym lub jego pochodnymi (rysunek 6).<sup>12,13,14,15</sup> Dla przykładu pochodna **(6)**, z jonami metali ( $\text{Li}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$ ) tworzy kompleksy w stosunku molowym 1:1, przy czym powstałe jony kompleksowe cechują się dość znacznym przesunięciem batochromowym widma absorpcyjnego w stosunku do wolnych ligandów.



Rysunek 6. Chromojonofory z chromoforem pikryloaminowym **(6)** i pochodnymi pikryloaminowymi **(7)**, **(8)**, **(9)**.

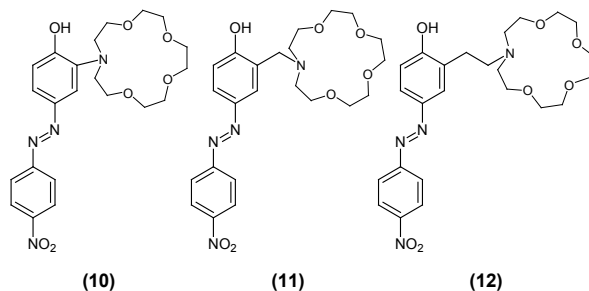
Chromojonofory, w których grupa nitrowa cząsteczki pikryloaminy jest podstawiona grupą cyjanową lub trifluorometylową wykazują silne oddziaływania z jonami litu. Chromojonofory te wykorzystano w fotometrii ekstrakcyjnej, w której roztwory zmieniają barwę od pomarańczowej (wolny ligand) do czerwonej (jon kompleksowy). Charakterystykę spektralną dla wolnych ligandów (**6**) – (**9**) i ich kompleksów z jonem litu zestawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Charakterystyka spektralna chromojonoforów pikryloaminowych. <sup>a</sup>W roztworze woda/dioksan (1/1, V/V). <sup>b</sup>W roztworze woda/acetonytryl (3/2, V/V).

Ligand	X	Y	HL		LiL		$\Delta\lambda_{\max}$ (nm)
			$\lambda_{\max}$ (nm)	$\epsilon$ (M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\epsilon$ (M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )	
<b>(6)</b> <sup>a</sup>	NO <sub>2</sub>		390	12,9x10 <sup>3</sup>	445	20x10 <sup>3</sup>	+ 55
<b>(7)</b> <sup>b</sup>	CN	NO <sub>2</sub>	420	11x10 <sup>3</sup>	550	8,5x10 <sup>3</sup>	+ 130
<b>(8)</b> <sup>b</sup>	CF <sub>3</sub>	NO <sub>2</sub>	425	6,4x10 <sup>3</sup>	585	4,4x10 <sup>3</sup>	+ 150
<b>(9)</b> <sup>b</sup>	NO <sub>2</sub>	CF <sub>3</sub>	380	13,25x10 <sup>3</sup>	460	20,8x10 <sup>3</sup>	+ 80

### 1.2.1. Chromojonofory monoprotanowe.

Ciekawą i dość dużą grupą chromojonoforów anionowych są pochodne posiadające w części chromoforowej grupę fenolową. Ligandy (**10**) – (**12**) to pochodne eteru monoazakornowego-15, zawierające w ramieniu bocznym ten sam chromofor – 4-(4-nitrofenyloazo)fenol (rysunek 7).<sup>16</sup>



Rysunek 7. Chromojonofory z 4-(4-nitrofenyloazo)fenolem.

Różnica pomiędzy chromojonoforami (**10**) – (**12**) polega na długości ramienia łączącego chromofor z jonoforem, który może tworzyć pięcioczłonowy (**10**), sześcioczłonowy (**11**) lub siedmioczłonowy (**12**) pierścień chelatujący jon metalu umiejscowiony we wnęce makrocyklicznej. W przypadku ramienia krótszego,



powstały chelat będzie bardziej sztywny, wzmacniający powstałe wiązanie koordynacyjne między małym jonem metalu a tlenem fenylowym. Dlatego ligand **(12)** wykazuje najwyższą selektywność w stosunku do jonu litu, pomimo że piętnastoczołnowa korona, zgodnie z zasadami dopasowania geometrycznego wnęki makrocyklicznej do rozmiaru jonu,<sup>17,18</sup> powinna kompleksować najbardziej efektywnie jon sodu. W przypadku ligandów **(11)** i **(12)** tworzone pierścienie chelatujące są zdecydowanie mniej sztywne, stąd wnęka makrocykliczna jest łatwiej dostępna dla większych jonów sodu i potasu. Fakt ten uwydatnia się mniejszą selektywnością ekstrakcyjną ligandów **(11)** i **(12)** w stosunku do Li<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> i Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> (patrz tabela 3).

Ligand	$pK_a^a$		$pK_{ex}^b$			Selektywność <sup>c</sup>		
	OH	NH <sub>2</sub>	Li <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Li <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup>	Li <sup>+</sup> /K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup>
<b>(10)</b>	9,0	11,4	9,0	9,3	11,0	2,0	100	50
<b>(11)</b>	6,5	10,0	9,8	10,3	11,5	3,7	56	15
<b>(12)</b>	7,5	9,5	9,9	9,9	10,8	0,8	6	8

Tabela 3. Stałe dysocjacji oraz stałe ekstrakcji jonów metali pochodnych eteru monoazakoronowego 15. <sup>a</sup>W roztworze woda/dioksan (9/1, V/V). <sup>b</sup>W roztworze woda/1,2-dichloroetan. <sup>c</sup>Stosunek wartości  $pK_{ex}$ .

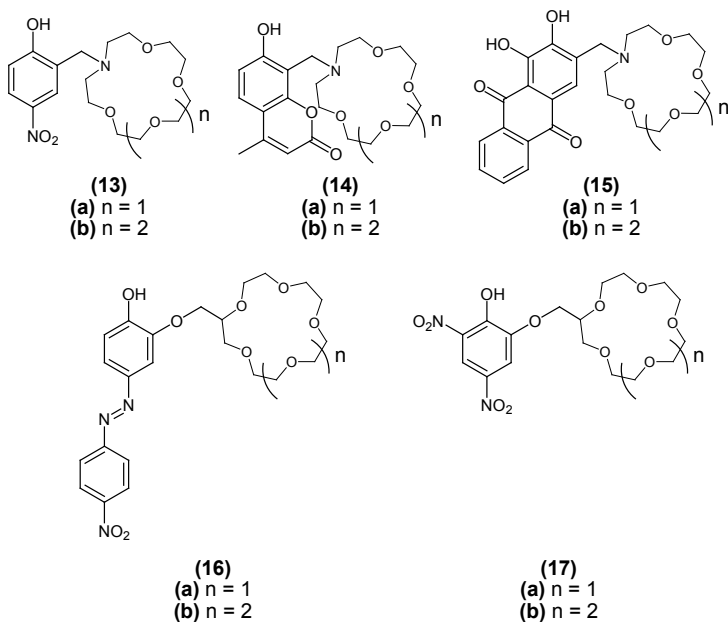
Zbrane dane fizykochemiczne w tabeli 3 (stałe dysocjacji protonu  $pK_a$  oraz stałe ekstrakcyjne  $pK_{ex}$  jonów metali pierwszej grupy układu okresowego pierwiastków), zdefiniowano za pomocą równań (1) i (2), gdzie indeksy „o” i „w” odnoszą się do fazy organicznej i wodnej.

$$K_{ex}(ML) = \frac{[(ML)_o][(H^+)_w]}{[(HL)_o][(M^+)_w]} \quad (1)$$

$$K_{ex}(ML \cdot HL) = \frac{[(ML \cdot HL)_o][(H^+)_w]}{[(HL)_o]^2[(M^+)_w]} \quad (2)$$

Chromojonofory zaprezentowane przez Katayamę i współpracowników są typowymi przykładami ligandów, w których fenolowy chromofor ma decydujący wpływ na zdolności kompleksotwórcze i selektywność w stosunku do ekstrahowanych metali (rysunek 8).<sup>19</sup> Autorzy zasugerowali, że mniej zasadowe

fenolaty, w których ładunek jest bardziej zdelokalizowany, koordynują silniej większe jony metali (w których gęstość ładunku jest mniejsza) tworząc wewnątrzcząsteczkowe kompleksy podobne do par jonowych. Natomiast bardziej zasadowe chromojonofory anionowe, o większej gęstości elektronowej, będą lepiej wiązały mniejsze jony, tworząc kompleksy chelatowe.



Rysunek 8. Ligandy z fenolowym ugrupowaniem chromoforowym.

Stałe dysocjacji oraz stałe trwałości ligandów (13) – (17) z jonami litu, sodu oraz potasu zestawiono w tabeli 4. Słabsza zasadowość chromojonoforów uwydatnia się w mniejszej selektywności w stosunku do układu kationów  $\text{Li}^+/\text{Na}^+$ , zwłaszcza dla ligandów (13a) i (15a). Natomiast w przypadku ligandu (14a), gdzie ładunek ujemny jest bardziej zlokalizowany, selektywność w układzie  $\text{Li}^+/\text{Na}^+$  jest zdecydowanie większa (patrz tabela 4).

Zgodnie z teorią geometrycznego dopasowania kationu do rozmiaru wnęki makrocyklicznej, ligandy (13b) – (17b) zbudowane na bazie korony osiemnastocłonowej powinny najefektywniej kompleksować jony potasu. W serii badanych ligandów zasada ta zostaje zachowana dla pochodnych, które najsilniej ekstrahują jony potasu, pomimo obecności fenolowego ramienia chelatującego (tabela 4). Najlepszą selektywność w stosunku do potasu wykazuje pochodna

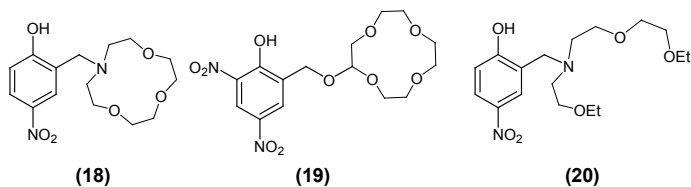
(17b), która posiada chromofor z najbardziej zdelokalizowanym ładunkiem.

Tabela 4. Stałe dysocjacji oraz stałe ekstrakcji jonów metali chromojonoforów (13) – (17). <sup>a</sup>W roztworze woda/dioksan (9/1, V/V). <sup>b</sup>W roztworze woda/1,2-dichloroetan. <sup>c</sup>Stosunek wartości  $pK_{ex}$ .

Ligand	$pK_a^a$		$pK_{ex}^b$			Selektywność <sup>c</sup>		
	OH	NH <sub>2</sub>	Li <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Li <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup>	Li <sup>+</sup> /K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup>
(13a)	5,8	9,7	9,2	9,8	10,4	4,0	13	3,3
(14a)	6,3	10,5	9,7	10,3	11,5	4,0	63	16
(15a)	4,8	9,9	8,3	8,7	9,6	2,5	20	7
(16a)	7,5		9,8	8,4	9,2	4x10 <sup>-2</sup>	0,25	6,3
(17a)	3,2		5,6	3,6	4,2	1x10 <sup>-2</sup>	3,3x10 <sup>-2</sup>	3,5
(13b)	5,8	9,6	10,3	9,5	8,9	0,15	4x10 <sup>-2</sup>	0,3
(14b)	6,5	10,5	11,0	10,4	9,9	0,25	8x10 <sup>-2</sup>	0,31
(15b)	4,9	10,3	11,0	8,7	8,3	5x10 <sup>-3</sup>	0,2x10 <sup>-2</sup>	0,4
(16b)	7,5		8,8	8,3	7,1	0,33	2x10 <sup>-2</sup>	6x10 <sup>-2</sup>
(17b)	3,3		4,8	4,0	2,2	0,16	0,3x10 <sup>-2</sup>	2x10 <sup>-2</sup>

Dla porównania wartości stałych dysocjacji ( $pK_a$ ) oraz stałych ekstrakcji ( $pK_{ex}$ ), zsyntezowano i przebadano grupę chromojonoforów zawierających dwunastoczłonowy makrocykl (18) i (19) oraz odpowiednik z otwartym łańcuchem eterowym (20).<sup>19</sup> Dane fizykochemiczne zestawiono w tabeli 5.

Redukując rozmiar jonoforu z piętnastoczłonowego (13a) do dwunastoczłonowego (18), zdolności ekstrakcyjne w stosunku do Na<sup>+</sup> znacząco maleją, podczas gdy dla Li<sup>+</sup> wartości te pozostają prawie niezmienione. Dlatego selektywność w układzie Li<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> wzrasta od 4,0 dla (13a) do 500 dla ligandu (18). Podobny ligand (19) nie ekstrahuje jonów metali grupy pierwszej, ponadto cechuje go niska zasadowość fenolowego anionu i duże, mało stabilne ramie chelatujące.



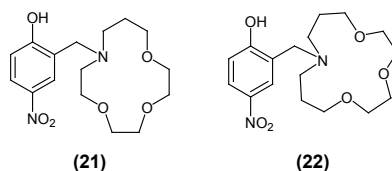
Rysunek 9. Chromojonofory z dwunastoczłonowym makrocyklem oraz otwartym eterowym.

Z kolei pochodna **(20)** charakteryzuje się wysoką zdolnością ekstrakcji jonów  $\text{Na}^+$  i  $\text{Li}^+$ , jednocześnie wykazuje dużą selektywność w układzie  $\text{Li}^+/\text{Na}^+$ , pomimo że nie posiada cyklicznego jonoforu. Wyniki te sugerują, że konieczna jest obecność przynajmniej czterech donorowych atomów, aby wydajnie stabilizować powstawanie kompleksu z  $\text{Li}^+$  w rozpuszczalnikach organicznych.

Tabela 5. Charakterystyka spektralna ligandów **(18)** – **(22)**. <sup>a</sup>Stale  $pK_a$  wyznaczone w mieszaninie woda/dioksan (9/1, V/V), stale  $pK_{ex}$  wyznaczone w mieszaninie woda/1,2-dichloroetan. <sup>b</sup>Stale  $pK_a$  wyznaczone w wodzie, stale  $pK_{ex}$  wyznaczone w mieszaninie woda/chloroform. <sup>c</sup>Stosunek wartości  $pK_{ex}$ . <sup>d</sup>Brak ekstrakcji. <sup>e</sup>Nie wyznaczono.<sup>20</sup>

Ligand	$pK_a$		$pK_{ex}$			Selektywność <sup>c</sup>
	OH	$\text{NH}_2$	$\text{Li}^+$	$\text{Na}^+$	$\text{K}^+$	$\text{Li}^+/\text{Na}^+$
<b>(18)</b> <sup>a</sup>	5,4	9,8	9,7	12,4	d	500
<b>(19)</b> <sup>a</sup>	3,0		d	d	d	e
<b>(20)</b> <sup>a</sup>	5,1	9,1	11,0	13,1	d	130
<b>(18)</b> <sup>b</sup>	5,8	10,3	10,2	12,5	d	210
<b>(21)</b> <sup>b</sup>	5,7	10,3	10,0	12,7	d	525
<b>(22)</b> <sup>b</sup>	5,6	10,8	9,5	12,9	d	$2,82 \times 10^3$

Natomiast Wilcox i Pacey przebadali pochodne z trzynasto- i czternastoczłonowym układem makrocyklicznym (rysunek 10).<sup>21,22</sup> Modyfikacja polegała na wprowadzeniu mostków propylenowych do cyklicznego jonoforu. Dane fizykochemiczne dla ligandów **(18)** oraz **(21)** i **(22)** zebrano w tabeli 5. Dzięki modyfikacji tych ligandów, uzyskano większą selektywność dla jonów litu oraz spadek tych własności dla jonów sodu. Selektywność ekstrakcyjna w układzie  $\text{Li}^+/\text{Na}^+$  wzrosła od 210 dla ligandu **(19)** do 525 dla **(21)** i aż do  $2,82 \times 10^3$  dla chromojonoforu **(22)** (w układzie woda/chloroform, patrz tabela 5).



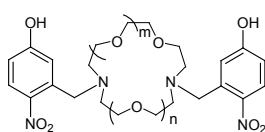
Rysunek 10. Chromojonofory z trzynasto- i czternastoczłonowym układem cyklicznym.

### 1.2.2. Chromojonofory dwuprotonowe.

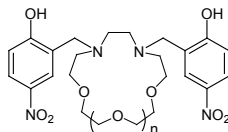
Seria chromojonoforów dwuprotonowych została zaprezentowana w pracach Takagiego.<sup>23</sup> Jako elementu kompleksotwórczego, użyto eterów diazokoronowych o różnych rozmiarach wnęki makrocyklicznej, od piętnastoczłonowej do dwudziestocząteroczłonowej (rysunek 11). Człon chromoforowy stanowiły;

2-hydroksy-5-nitrobenzyl (**23**) – (**24**) oraz pochodna pikryloaminy (**25**), które włączono w strukturę jonoforu przez atom azotu, w wyniku, czego otrzymano dipodstawione N-lariaty. W tabeli 6 zestawiono dane fizykochemiczne, selektywność w układzie kationów drugiej grupy układu okresowego pierwiastków  $\text{Ca}^{2+}/\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$  oraz  $\text{Sr}^{2+}/\text{Ba}^{2+}$  i stałe ekstrakcyjne  $K_{\text{ex}}$ , które zdefiniowano za pomocą równania (3).

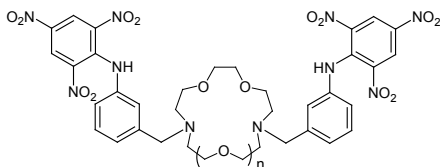
$$K_{\text{ex}}(ML) = \frac{[(ML)_o][H^+]_w^2}{[(HL)_o][M^{2+}]_w} \quad (3)$$

**(23)**

- (a)  $m = 1, n = 1$   
 (b)  $m = 1, n = 2$   
 (c)  $m = 2, n = 3$

**(24)**

- (a)  $n = 1$   
 (b)  $n = 2$   
 (c)  $n = 3$

**(25)**

- (a)  $n = 1$   
 (b)  $n = 2$   
 (c)  $n = 3$

Rysunek 11. Chromojonofory dwuprotonowe.

W wyniku prowadzonych badań zaobserwowano, że mechanizm ekstrakcji kationów dwuwartościowych jest zbliżony dla serii ligandów (**23**) - (**25**). W przypadku ekstrakcji jonów dwudodatnich, oddziaływanie kation – anion, sumarycznie odgrywa większe znaczenie niż oddziaływania kation – dipol (makrocycl) w rozpuszczalnikach niepolarnych. Stąd też, niewielkie zmiany w rozmiarach wnętrza makrocyclicznej, nie odgrywają większego znaczenia, podczas gdy rodzaj i umiejscowienie anionowego ramienia bocznego, odgrywa znaczącą rolę we właściwościach ekstrakcyjnych tych ligandów.

Tabela 6. Charakterystyka spektralna chromojonoforów dwuprotonowych. <sup>a</sup>W roztworze woda/1,2-dichloroetan. <sup>b</sup>Stosunek wartości  $K_{ex}$ . <sup>c</sup>Brak ekstrakcji. <sup>d</sup>Nie wyznaczono.

Ligand	$pK_{ex}^a$				Selektywność <sup>b</sup>		
	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Sr <sup>2+</sup>	Ba <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup> /Ba <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup> /Sr <sup>2+</sup>	Sr <sup>2+</sup> /Ba <sup>2+</sup>
<b>(23a)</b>	c	15,0	16,8	17,6	400	63	6,3
<b>(23b)</b>	c	12,5	13,5	15,1	400	10	40
<b>(23c)</b>	c	17,7	17,0	14,3	4x10 <sup>-4</sup>	0,2	2x10 <sup>-3</sup>
<b>(24a)</b>	18,5	16,1	17,3	17,0	7,9	16	0,5
<b>(24b)</b>	c	10,8	11,8	14,3	3,2x10 <sup>3</sup>	10	320
<b>(24c)</b>	c	15,2	14,8	13,9	5x10 <sup>-2</sup>	0,4	0,13
<b>(25a)</b>	c	>20	>19	>20	d	d	d
<b>(25b)</b>	c	>20	>20	15,1	10 <sup>-5</sup>	d	10 <sup>-5</sup>

Zgodnie z zasadą dopasowania rozmiaru wnęki makrocyklicznej do wielkości kationu, jon Ca<sup>2+</sup> powinien najmocniej oddziaływać z chromojonoforami zawierającymi koronę piętnastoczłonową. Dane eksperymentalne (wartości  $K_{ex}$  zebrane w tabeli 6) pokazują jednoznacznie że najlepsze efekty uzyskano dla chromojonoforów osiemnastoczłonowych **(23b)** i **(24b)**.

Położenie atomów azotu w eterach diazakoronowych jest decydującym elementem, jeśli chodzi o zdolności ekstrakcyjne prezentowanych chromojonoforów. Zauważono, że korona piętnastoczłonowa, w której atomy azotu umieszczone są obok siebie, wykazuje obniżone zdolności ekstrakcyjne jonów Ca<sup>2+</sup> w porównaniu z ligandem, którego atomy azotu umieszczone są naprzeciwległe. Odwrotną zależność odnotowano w przypadku chromojonoforów z osiemnastoczłonowym makrocyklem, ligand **(24b)** wykazuje znacznie lepsze zdolności ekstrakcyjne jonów Ca<sup>2+</sup> niż ligand **(23b)**.

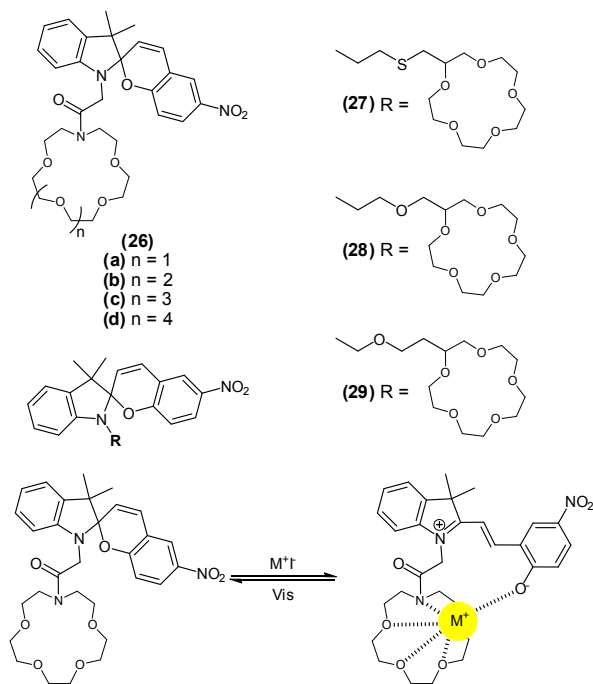
Podobne zależności nie są obserwowane w przypadku ekstrakcji jonów Ba<sup>2+</sup>. Oznacza to, że w wyniku koordynacji jonu metalu przez badane ligandy obserwuje się silne zmiany konformacyjne cząsteczki chromojonoforu.

Spośród chromojonoforów posiadających w ramionach bocznych grupę pikryloaminową tylko ligand **(25b)** wykazuje zdolności ekstrakcyjne wyłącznie w stosunku do jonów Ba<sup>2+</sup>. Sytuację tą tłumaczy się naturą chromoforowego podstawnika, dla którego preferowaną i stabilizowaną formą tworzonych jonów, są kompleksy typu par jonowych a nie typu chelatowego.<sup>24</sup>

### 1.3. Inne chromojonofory z eterowym układem cyklicznym.

Pochodne spirobenzopirany to dobrze znana grupa związków, których zdolność odwracalnej izomeryzacji pod wpływem promieniowania UV lub światła widzialnego, została wykorzystana do budowy fotoczułych sensorów jonów

metali.<sup>25,26,27</sup> Mechanizm indukowanej światłem widzialnym izomeryzacji spirobenzopiranu oraz przykłady ligandów zawierających tego typu chromofor zaprezentowano na rysunku 12.



Rysunek 12. Chromojonofory z chromoforem spirobenzopiranowym oraz mechanizm fotoizomeryzacji.

Wszystkie chromojonofory (26) – (29) nie absorbują w zakresie powyżej 450 nm w rozpuszczalnikach organicznych, takich jak acetonitryl. Dodanie do roztworu zawierającego wyżej wymienione ligandy jodków metali powoduje znaczące zmiany w ich widmach absorpcyjnych. Dla przykładu, dodanie pięciokrotnego nadmiaru Li<sup>+</sup> do acetonitrylowego roztworu (26a) lub (26b) powoduje pojawianie się nowego pasma absorpcyjnego z maksimum około 530 nm ( $\epsilon = 7,7 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) dla ligandu (26a) oraz dla ligandu (26b) z maksimum również około 530 nm ( $\epsilon = 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Podobnych zmian spektralnych nie obserwowano dla jodków innych metali grupy pierwszej układu okresowego pierwiastków. W przypadku pochodnej (26c) zaobserwowano niewielkie zmiany spektralne w stosunku do NaI, natomiast ligand (26d), posiadający dwudziestojednoczłon-

wy makrocykl, nie wykazywał żadnych zmian spektralnych z badanymi jonami metali. Na podstawie tych danych oraz analizy widm NMR wolnych ligandów i jonów kompleksowych zaproponowano mechanizm izomeryzacji spirobenzopiranu zaprezentowany na rysunku 12.

Długość łańcucha łączącego spirobenzopiran z eterem koronowym, również wpływa na zdolności kompleksotwórcze badanych ligandów. Pochodne **(27)** – **(29)** posiadają dłuższy łańcuch łączący chromofor z eterem koronowych niż ligandy **(26)**. Dla tych pochodnych zauważono zdecydowanie mniejsze zmiany w widmach absorpcyjnych w obecności jonów metalu w porównaniu z pochodnymi **(26a)**. Jest to spowodowane dużą odległością pomiędzy skompleksowanym we wnęce makrocyklicznej jonem metalu a grupą fenolową izomeru spirobenzopiranu (patrz rysunek 12).

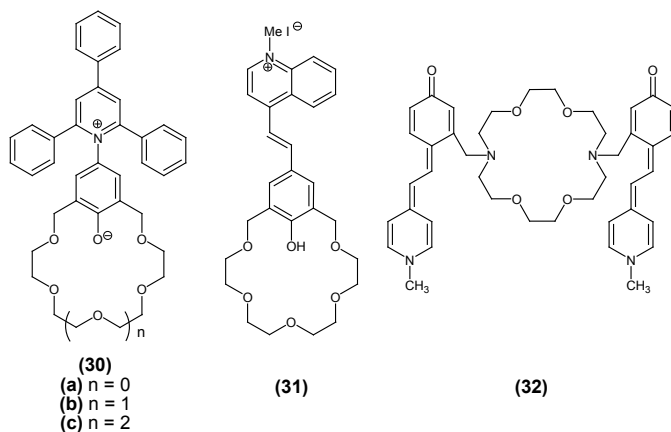
Chromojonofory zawierające betainowy barwnik (**(30)** – **(32)**, rysunek 13) to kolejny przykład pochodnych, których odpowiedzią na obecność jonu metalu jest zmiana barwy, pozwalająca śledzić zjawisko kompleksowania za pomocą spektroskopii absorpcyjnej. Dla przykładu pochodna **(30b)** w obecności KI w roztworze acetonitrylu zmienia barwę z fioletowej ( $\lambda_{\max} = 583$  nm) na ciemno czerwoną ( $\lambda_{\max} = 529$  nm).<sup>28</sup> Za pasmo długofalowe ligandów **(30a – c)** jest odpowiedzialny wewnątrzcząsteczkowy transfer ładunku, od grupy fenylowej do cząsteczki pirydyny. W proces kompleksotwórczy tych ligandów silnie zaangażowana jest część fenolowa chromoforu, gdzie w wyniku dopasowania jonu metalu do wnęki makrocyklicznej obserwujemy hipsochromowe przesunięcie w widmie absorpcyjnym jonu kompleksowego w porównaniu z widmem wolnego ligandu. Spowodowane jest to silnym oddziaływaniem O<sup>-</sup> (z grupy fenylowej) i jonu metalu, co powoduje wzrost energii jonizacyjnej donora elektronów, podczas gdy powinowactwo elektronowe cząsteczki akceptora pozostaje niezmiennic. Spośród jodków metali grupy pierwszej, największe hipsochromowe przesunięcia zaobserwowano dla Na<sup>+</sup> z **(30a)**, K<sup>+</sup> z **(30b)** i Cs<sup>+</sup> z **(30c)**.

Pochodna **(31)** posiadająca również betainowy chromofor, wykazuje podobne właściwości jak omówione wcześniej ligandy **(30)**.<sup>29</sup> Maksimum absorpcji tej pochodnej przesuwa się od  $\lambda_{\max} = 430$  nm dla formy sprotonowanej do  $\lambda_{\max} = 610$  nm dla formy niesprotonowanej w metanolu. Wartość  $\lambda_{\max}$  dla kompleksu z Ca<sup>2+</sup> jest pośrednią wartością formy sprotonowanej i niesprotonowanej i w roztworze metanolu wynosi 520 nm. Stałe trwałości z jonami Ca<sup>2+</sup> i Ba<sup>2+</sup> w metanolu wynoszą  $10,0 \cdot 10^4$  M<sup>-1</sup>, co jest wartością znacznie wyższą niż te otrzymane dla jonów Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> i Mg<sup>2+</sup>, które wynoszą mniej niż  $0,3 \cdot 10^4$  M<sup>-1</sup>.

Wewnątrzcząsteczkowy transfer ładunku w betainowym chromoforze pod wpływem koordynowanego jonu metalu, umożliwia obserwację zachodzącego procesu kompleksotwórczego w dwupodstawionym lariatcie **(32)**.<sup>30,31</sup> Autorzy przeprowadzili serię miareczkowań kwasowo – zasadowych oraz miareczko-

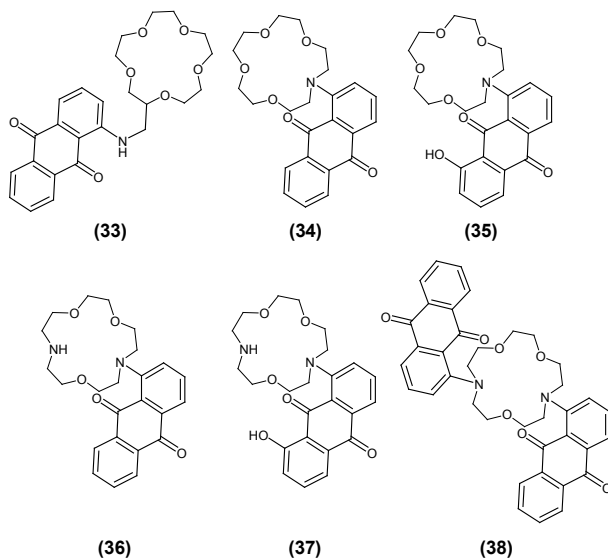


wań jonami metali w środowisku wodnym. W pierwszej kolejności ustalili, że ligand **(32)** cechuje się największą czułością w pH 8,5. Dla wartości pH poniżej 6,0, nie obserwowano żadnych zmian spektralnych po dodaniu chlorków metali. Spośród serii badanych kationów ( $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ), największe zmiany spektralne zaobserwowano dla  $\text{Ca}^{2+}$ . Eksperymentalnie wyznaczony molowy współczynnik absorpcji ( $\epsilon$ ) w wodzie dla wolnego ligandu wynosi  $2,9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  ( $\lambda_{\text{max}} = 410 \text{ nm}$ ), dla kompleksu z wapniem  $5,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  ( $\lambda_{\text{max}} = 450 \text{ nm}$ ). Zmian spektralnych nie obserwowano dla kationów jednododatnich, nawet w przypadku jonu potasu, pomimo iż piętnastoczłonowa korona jest dobrze znanym kompleksonem jonów  $\text{K}^+$ . Dodatkowo, przeprowadzono badania odpowiedzi ligandu **(32)** na obecność  $\text{Ca}^{2+}$  w roztworze wodnym zawierającym jony  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  oraz  $\text{Mg}^{2+}$  o stężeniach zbliżonych do tych, które występują w typowych układach fizjologicznych (140 mM  $\text{Na}^+$ , 4,5 mM  $\text{K}^+$ , 0,6 mM  $\text{Mg}^{2+}$ ). W wyniku tego eksperymentu zaobserwowano takie same zmiany spektralne jak w przypadku miareczkowań jonami  $\text{Ca}^{2+}$  czystego ligandu **(32)**, co pozwala stwierdzić, że zjawisko kompleksowania współzawodniczących jonów nie zachodzi.



Rysunek 13. Ligandy z betainowym układem chromoforowym.

Kolejną grupą ligandów, w których umieszczony w ramieniu bocznym chromofor jest spektroskopowym indykátorem zmian zachodzących podczas formowania kompleksu, są pochodne antrachinonu (rysunek 14).<sup>32</sup> Część cząsteczki chromoforu posiada charakterystyczne pasma w zakresie widzialnym widma absorpcyjnego, związane z przeniesieniem ładunku od grupy aminowej do cząsteczki antrachinonu.<sup>33,34</sup>



Rysunek 14. Ligandy z antrachinonowym układem chromoforowym.

Na podstawie analizy zebranych danych pomiarowych (tabela 7) możemy zauważyć, że położenie pasm absorpcyjnych nie zależy od tego czy cząsteczka antrachinonu połączona jest z makrocyklem za pomocą metylenowego mostka (ligand **(33)**,  $\lambda_{\max} = 510$  nm), czy też bezpośrednio do atomu azotu (ligand **(34)**,  $\lambda_{\max} = 510$  nm). Gdy w cząsteczce chromoforu obecna jest grupa hydroksylowa (pochodne **(35)** i **(37)**), pasmo absorpcyjne przesuwa się w kierunku długofalowym ( $\lambda_{\max} = 530$  nm, dla obydwu pochodnych) z jednoczesnym wzrostem molowego współczynnika absorpcji do około 3,88. Brak zmian w położeniu widm absorpcyjnych dla dipodstawionej pochodnej **(38)** ( $\lambda_{\max} = 510$  nm), oraz zbliżone wartości molowego współczynnika absorpcji oznaczają, że układy chromoforowe są w pełni od siebie niezależne.

Na podstawie zmian w widmach absorpcyjnych wolnych ligandów i w obecności jonów  $\text{Ag}^+$ , autorzy zaproponowali stechiometrię powstających kompleksów oraz wyznaczyli stałe trwałości tych jonów ( $\log K$ ) w roztworze węgla propylenu. Z podanych w tabeli 7 wartości  $\log K$  widać, że stechiometria 1:1 ( $\text{AgL}^+$ ) formowanych kompleksów jest dominująca. Wartości  $\log K_1$  wzrastają wraz ze wzrostem liczby atomów azotu w pierścieniu makrocyklicznym i osiągają wartość maksymalną dla pochodnej **(36)** ( $\log K_1 = 11,71 \pm 0,04$ ). Dość znaczny spadek tych wartości dla pochodnej **(37)**, w której chromofor posiada grupę hydroksylową, jest wynikiem tworzenia się wewnątrzcząsteczkowego wiązania wodorowego, pomiędzy grupą hydroksylową, a grupą aminową

pierścienia makrocyklicznego. Autorzy wyznaczyli również stałe trwałości dla jonów kompleksowych o stechiometrii 1:2 ( $AgL_2^+$ ). W przypadku pochodnych zawierających jeden, donorowy atom azotu (**33**) i (**34**) wartości  $\log K_2$  są wyraźnie mniejsze niż wartości obliczone dla pochodnych z makrocyklem diazowym. Tłumaczy się to mniejszą trwałością kompleksów sandwichowych (powstających w przypadku ligandów zawierających eter monoazakoronowy) niż tych, w których procesie powstawania biorą udział dwa donorowe atomy azotu.

Tabela 7. Charakterystyka spektralna wolnych ligandów (**33**) – (**38**) oraz w obecności jonów  $Ag^+$ , stałe trwałości kompleksów z  $Ag^+$  wyznaczone w węglanie propyleny. <sup>a</sup>Wyznaczone dla stechiometrii  $AgL^+$ . <sup>b</sup>Wyznaczone dla stechiometrii  $AgL_2^+$ .

Ligand	Wolny ligand		Ligand w obecności $Ag^{2+}$		$\log K_1^a$	$\log K_2^b$
	$\lambda_{max}$ (nm)	$\log(\epsilon/mol^{-1}dm^3cm^{-1})$	$\lambda_{max}$ (nm)	$\log(\epsilon/mol^{-1}dm^3cm^{-1})$		
<b>(33)</b>	510	3,7	508	3,7	$6,08 \pm 0,03$	$2,57 \pm 0,03$
<b>(34)</b>	510	3,6	463	3,31	$5,92 \pm 0,03$	$1,55 \pm 0,09$
<b>(35)</b>	530	3,89	462	3,69	$5,02 \pm 0,04$	
<b>(36)</b>	510	3,54	467	3,17	$11,71 \pm 0,04$	$4,71 \pm 0,04$
<b>(37)</b>	530	3,88	467	3,71	$4,98 \pm 0,03$	$4,08 \pm 0,03$
<b>(38)</b>	510	3,9	469	3,68	$5,59 \pm 0,05$	$1,85 \pm 0,24$

### Podziękowanie:

Praca finansowana ze środków BW 8000-5-0264-9

### Literatura:

1. M. Takagi, H. Nakamura, K. Ueno, Anal. Lett., 1977, 10, 1115
2. J. P. Dix, F. Vögtle, Angew. Chem., 1978, 90, 893
3. J. P. Dix, F. Vögtle, Angew. Chem., Int. Ed. Engl., 1978, 17, 857
4. M. Hiraoka (ed.), „Crown Ethers and Analogous Compounds”, Elsevier, New York, 1992
5. G. W. Gokel (ed.), „Comprehensive Supramolecular Chemistry”, vol. 1, Elsevier, 1996
6. J. P. Dix, F. Vögtle, Chem. Ber. 1980, 113, 457
7. J. P. Dix, F. Vögtle, Chem. Ber. 1981, 114, 638
8. Y. Inoue, G. W. Gokel, „Cation Binding by Macrocycles”, Dekker, New York, 1990
9. T. Kaneda, K. Sugihara, H. Kamiya, S. Misumi, Tetrahedron Lett., 1981, 22, 4407
10. K. Nakashima, S. Nakatsuji, S. Akiyama, T. Kaneda, S. Misumi, Chem. Lett., 1982, 1781

11. T. Kaneda, S. Umeda, H. Tanigawa, S. Misumi, Y. Kai, H. Morii, K. Miki, N. Kasai, *J. Am. Chem. Soc.*, 1985, 107, 4802
12. H. Nakamura, M. Takagi, K. Ueno, *Talanta*, 1979, 26, 921
13. H. Nakamura, M. Takagi, K. Ueno, *Anal. Chem.*, 1980, 52, 1668
14. G. E. Pacey, B. P. Bubnis, *Anal. Lett.* 1980, 13, 1085
15. G. E. Pacey, B. P. Bubnis, Y. P. Wu, *Analyst*, 1981, 106, 636
16. Y. Katayama, R. Fukusa, M. Takagi, *Anal. Chim. Acta*, 1986, 185, 295
17. N. K. Dalley, w: "Synthetic Multidentate Macrocyclic Compounds", R. M. Izatt, J.J. Christensen, Academic Press, New York, 1978
18. N. S. Poonia, *J. Am. Chem. Soc.*, 1970, 96, 2007
19. Y. Katayama, K. Nita, M. Ueda, H. Nakamura, M. Takagi, *Anal. Chim. Acta*, 1985, 173, 193
20. K. Sasaki, G. E. Pacey *Anal. Chim. Acta*, 1985, 174, 141
21. K. Wilcox, G. E. Pacey, *Anal. Chim. Acta*, 1991, 245, 235
22. K. Wilcox, D. E. Pacey, *Talanta*, 1991, 38, 1315
23. H. Nishida, M. Tazaki, M. Takagi, K. Ueno, *Mikrochim. Acta*, 1981, 1, 281
24. Y. Katayama, R. Fukuda, T. Iwasaki, K. Nita, M. Takagi, *Anal. Chim. Acta.*, 1988, 204, 113
25. M. Inouye, M. Ueno, T. Kitao, *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, 112, 8977
26. M. Inouye, M. Ueno, T. Kitao, *J. Org. Chem.*, 1992, 57, 1639
27. M. Inouye, M. Ueno, K. Tsuchiya, N. Nakayama, T. Konishi, T. Kitao, *J. Org. Chem.*, 1992, 57, 5377
28. C. Reichardt, S. Asharin-Fard, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1991, 30, 558
29. J. V. Gent, E. J. R. Sudholter, P. V. Lambeck, T. J. A. Popma, G. J. Gerrotsoma, D. N. Reinhoudt, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1988, 893
30. D. Citterio, M. Omagari, T. Kawada, S. Sasaki, Y. Suzuki, K. Suzuki, *Anal. Chim. Acta*, 2004, 504, 227
31. H. Hisamoto, H. Tohoma, T. Yamada, K. Yamauchi, D. Siswanta, N. Yoshioka, K. Suzuki, *Anal. Chim. Acta*, 1998, 373, 271
32. T. Ossowski, J. Kira, D. Rogowska, H. Warmke, J. Młodzianowski, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2000, 689
33. H. Inuone, T. Hoshi, Y. Tanizaki, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1972, 45, 1018
34. Z. Yoshida, F. Takabyashi, *Tetrahedron*, 1968, 24, 933

## Rozdział VII

### Interakcje jonowe w kondensatorach elektrochemicznych

Katarzyna Lota<sup>a</sup>, Grzegorz Lota<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> *Instytut Metali Nieżelaznych Oddział w Poznaniu, Centralne Laboratorium Akumulatorów i Ogniw, Forteczna 12, 61-362 Poznań*

<sup>b</sup> *Politechnika Poznańska, Instytut Chemii i Elektrochemii Technicznej, Piotrowo 3, 60-965 Poznań*

#### 1. Wprowadzenie

Kondensatory elektrochemiczne, zwane również superkondensatorami lub ultrakondensatorami [1-8] są atrakcyjnymi źródłami prądu z powodu ich bardzo wysokiej mocy, dobrej trwałości cyklicznej oraz pośredniej energii między klasycznymi dielektrycznymi kondensatorami, a ogniwami – rys. 1.

Kondensatory elektrochemiczne są urządzeniami magazynującymi energię mającymi zastosowanie w systemach hybrydowych dla zasilania samochodów elektrycznych, komputerów przenośnych, UPS i w pulsowej technice laserowej, itp.

Energia magazynowana w tych urządzeniach, pochodzi głównie z ładunku skumulowanego w podwójnej warstwie elektrycznej (warstwa Helmholtza) występującej na granicy faz elektroda/elektrolit (ultrakondensatory, kondensatory elektrochemiczne podwójnej warstwy elektrycznej), ale także, może pochodzić od reakcji faradajowskich (związanych z przejściem elektronów) zachodzących w materiale elektrodowym (superkondensatory). Dodatkowo i ujemne jony z elektrolitu gromadzą się na powierzchni stałej elektrody kompensując elektronowy ładunek dostarczony do elektrody – rys. 2.

Pojemność liczona na jedną elektrodę, jest proporcjonalna do powierzchni granicy faz elektroda – elektrolit (S), co przedstawia równanie:

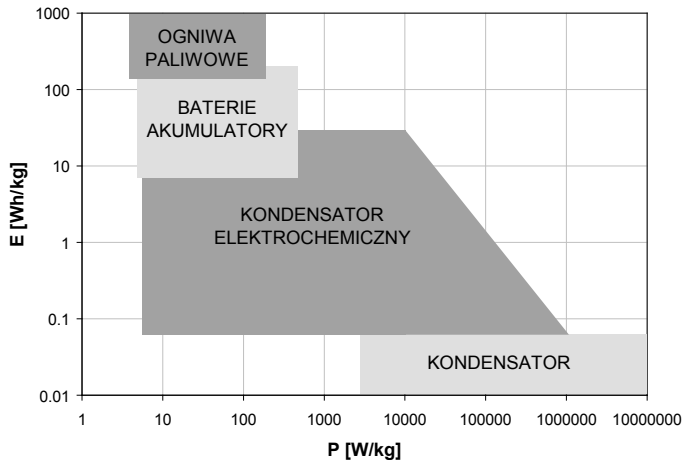
$$C = \frac{\epsilon S}{d} \quad (1)$$

gdzie  $\epsilon$  jest stałą dielektryczną, a  $d$  to grubość podwójnej warstwy elektrycznej.

Na pojemność całego kondensatora składają się pojemności szeregowo połączonych dwóch kondensatorów, zgodnie z równaniem:

$$\frac{1}{C} = \frac{1}{C_1} + \frac{1}{C_2} \quad (2)$$

Jednakże w przypadku kondensatora zbudowanego z dwóch elektrod różniących się pojemnościami elektroda o mniejszej pojemności decyduje o całkowitej pojemności, z powodu odwrotnie proporcjonalnej zależności. Pojemność wyrażana jest w (F), co odpowiada ładunkowi zakumulowanemu w zdefiniowanym przedziale potencjału ( $1F = 1C/1V$ ). Pojemność właściwa może być odniesiona do masy elektrody (F/g), do objętości elektrody ( $F/cm^3$ ), lub do jej powierzchni ( $F/cm^2$ ).



Rysunek 1. Zależność energii od mocy dla różnych źródeł prądu – tzw. Ragone plot [1].



warunki dla dłuższych czasów wyładowania, tak jak jest to wymagane w zastosowaniach dla hybrydowych samochodów elektrycznych, czy porów o większych rozmiarach dla urządzeń wykorzystywanych w technice pulsacyjnej, jest zależne od założonej aplikacji kondensatora [10]. Dodatkowo, wykorzystanie materiałów elektrodowych z porowatością dobraną do rozmiarów jonów elektrolitu może polepszyć elektrochemiczną charakterystykę kondensatora. E. Rajmundo-Pinero wraz z współpracownikami badając mikroporowate materiały węglowe o różnej nanoteskturalnej charakterystyce, wyznaczyła związek między rozmiarami porów i chemią powierzchni a właściwościami pojemnościowymi w różnych elektrolitach. Pojemności liczone na masę (F/g), uzyskane w wodnym roztworze KOH charakteryzują się prawie liniową zależnością względem powierzchni rzeczywistej materiału elektrodowego. Wzrost wartości pojemności wyrażonych na masę, we wszystkich elektrolitach, dla materiałów charakteryzujących się rozwiniętą powierzchnią rzeczywistą związany był ze wzrostem średniej wartości szerokości porów. Objętość porów dla serii badanych węgli była bardzo duża. Pory te były za szerokie by efektywnie brać udział w formowaniu podwójnej warstwy elektrycznej. Znacznie większy wpływ na uzyskiwane pojemności w różnych elektrolitach ma odpowiedni rozmiar porów niż bardzo rozwinięta powierzchnia rzeczywista. Wyznaczony optymalny rozmiar ultramikroporów dla elektrolitów wodnych (6 M KOH, 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) to 0,7 nm a dla organicznych (1 M TEABF<sub>4</sub>) to 0,8 nm [11]. Aby uzyskiwać maksymalne wartości przy dużych obciążeniach zarówno energii (na którą znaczący wpływ ma mikroporowatość) jak i mocy (zależną w dużej mierze od mezoporów) węglowy materiał elektrodowy musi posiadać odpowiednią kombinację porów [12]. Tak więc, pojemność kondensatora zależy przede wszystkim od pojemności materiału elektrodowego wyrażonej w F/g, natomiast napięcie pracy i oporność takiego urządzenia zależy w głównej mierze od stosowanego elektrolitu. Pojedyncze urządzenie posiada napięcie pracy w granicach 1 - 4 V, w zależności od stosowanego elektrolitu [1-8]. Elektrolity różnią się znacznie oporem właściwym i napięciem, pracy – tabela 1. Ze względu na fakt, iż maksymalna energia magazynowana w kondensatorach jest liczona zgodnie z równaniem:

$$W = \frac{1}{2} CU^2 \quad (3)$$

gdzie:  $C$  – pojemność kondensatora, a  $U$  – napięcie pracy urządzenia.

Zastosowanie odpowiedniego elektrolitu może kilkukrotnie zwiększyć energię, ponieważ energia rośnie wykładniczo wraz z napięciem pracy urządzenia.



Tabela 1. Właściwości różnych elektrolitów [8]

Elektrolit	Gęstość [g/cm <sup>3</sup> ]	Opór właściwy [ $\Omega$ cm]	Napięcie urządzenia [V]
KOH	1,29	1,9	1,0
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,2	1,35	1,0
PC	1,2	52	2,5-3,0
AN	0,78	18	2,5-3,0
Ciecz jonowa	1,3-1,5	125 (25°C)	4,0
		28 (100°C)	3,25

Komersyjne kondensatory są przygotowywane z wykorzystaniem maksymalnie stężonych elektrolitów lub takich roztworów, które charakteryzują się maksymalnym przewodnictwem, oczywiście w celu zminimalizowania oporności, a co jest z tym związane strat energii [13].

Podziału kondensatorów elektrochemicznych można dokonać na podstawie kilku kryteriów. Jednym z nich jest stosowany materiał elektrodowy, gdzie wyróżnia się trzy główne grupy materiałów elektrodowych: (I) opartych na materiałach węglowych, (II) na tlenkach metali i (III) na polimerach przewodzących. Innym kryterium klasyfikacji kondensatorów elektrochemicznych jest rodzaj stosowanego elektrolitu lub konstrukcja urządzenia.

Jak już zostało wspomniane, rodzaj stosowanego elektrolitu może stanowić kryterium podziału kondensatorów elektrochemicznych. W kondensatorach elektrochemicznych podwójnej warstwy elektrycznej, w których materiałem aktywnym są materiały węglowe jako elektrolity stosuje się roztwory wodne kwasów, zasad, soli, roztwory elektrolitów w rozpuszczalnikach aprotycznych, stałe elektrolity polimerowe, żelowe elektrolity polimerowe oraz ciecz jonowe i podandy.

## 2. Elektrolity organiczne stosowane w kondensatorach elektrochemicznych

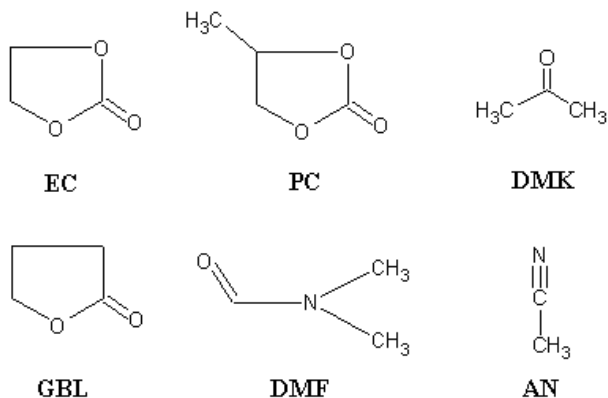
Większość komercyjnych kondensatorów wykorzystuje organiczne elektrolity. Dobór niewodnego elektrolitu jest skomplikowany. Wymagania stawiane elektrolitom dotyczą wysokiego przewodnictwa właściwego i elektrochemicznej stabilności w szerokim zakresie temperatur, oraz chemicznej trwałości wobec zastosowanych materiałów. Główną zaletą organicznych elektrolitów jest osiągalne wyższe napięcie pracy. Zgodnie z równaniem (3) kwadrat napięcia pracy kondensatora określa maksymalną zmagazynowaną energię. Organiczne elektrolity pozwalają na stosowanie napięć powyżej 2 V (rys. 4), przeważnie 2,3 V a w krótkim okresie czasu nawet do 2,7 V [1]. Napięcie urządzenia jest determinowane najprawdopodobniej śladową zawartością wody w elektrolicie. Podobne problemy dotyczące napięcia pracy zostały rozwiązane w technologii ogniw litowo-jonowych. Niestety elektrolity organiczne mają także wadę, która dotyczy ich znacząco wyższej rezystancji. Opór właściwy acetonitrylu, którego wadą jest toksyczność i łatwopalność, jest czterokrotnie niższy w porówna-

niu do węgla propylenu. Natomiast w porównaniu do stężonych elektrolitów wodnych jego opór jest kilkanaście razy wyższy. Wartość ta wpływa na wzrost oporu porowatej warstwy, co z kolei obniża maksymalną moc urządzenia (P), którą określa równanie:

$$P = \frac{U^2}{4R} \quad (4)$$

gdzie: *R* oznacza zastępczą rezystancję szeregową (*ESR* – *Equivalent Series Resistance*).

Oczywiście, wzrost *ESR* jest częściowo kompensowany stosowanym wyższym napięciem pracy kondensatora. Przewodnictwo i stabilne napięcie pracy kondensatora są ważnymi parametrami elektrochemicznymi. Przewodnictwo bezpośrednio wpływa na opór wewnętrzny kondensatora i prowadzi do strat energii podczas cyklicznego ładowania/wyładowania. Stabilny przedział potencjałowy pracy kondensatora określa natomiast maksymalne napięcie pracy kondensatora. Wymagania stawiane rozpuszczalnikowi, mogącemu zastąpić acetonitryl, dotyczą niskiej wartości oporu właściwego oraz nietoksyczności. Jak na razie nie ma innej alternatywy i acetonitryl jest wykorzystywany jako składnik elektrolitów organicznych. Jako sole przewodzące mogą zostać wykorzystane takie związki jak  $\text{LiPF}_6$ ,  $\text{LiClO}_4$ ,  $\text{LiAsF}_6$ ,  $\text{Et}_4\text{NCH}_3$ ,  $\text{Et}_4\text{NBF}_4$ ,  $\text{Et}_4\text{NPF}_6$ ,  $\text{Et}_4\text{NClO}_4$ ,  $\text{Et}_4\text{NCF}_3\text{SO}_3$  [7,14-23]. Charakteryzują się one stosunkowo wysokimi wartościami przewodnictwa w porównaniu do innych ciekłych organicznych soli. Jako rozpuszczalniki mogą być wykorzystane takie związki jak węgiel propylenu (PC), aceton (DMK),  $\gamma$ -butyrolakton (GBL),  $\text{N,N}$ -dimetyloformamid (DMF), węgiel etylenu (EC) czy acetonitryl (AN). Przewodnictwo maleje zgodnie z porządkiem:  $\text{Et}_4\text{N}^+ > \text{Pr}_4\text{N}^+ > \text{Bu}_4\text{N}^+ > \text{Me}_4\text{N}^+ > \text{BF}_4^- > \text{PF}_6^- \geq \text{ClO}_4^- > \text{CF}_3\text{SO}_3^-$  [2]. Elektrochemiczna stabilność anionów maleje w porządku:  $\text{PF}_6^- \geq \text{BF}_4^- > \text{CF}_3\text{SO}_3^- \geq \text{ClO}_4^-$ . Przewodnictwo zależy od ruchliwości jonów ale, także od odwrotności masy cząsteczkowej rozpuszczalnika [2,7]. Taka zależność, wskazuje na występowanie interakcji między substancją rozpuszczoną a rozpuszczalnikiem. Oczywiście, parametry charakteryzujące kondensator, takie jak energia i moc, czas wyładowania itp., zależą od rozmiarów porów i przewodnictwa materiału elektrodowego. Ruchliwość jonów bezpośrednio zależy od ich masy cząsteczkowej, która dodatkowo może być zmieniona przez solwatację. Energia uzyskiwana z kondensatora zależy również od właściwości fizykochemicznych rozpuszczalnika, takich jak lepkość czy molowe przewodnictwo. Z wybranych rozpuszczalników, najlepsze parametry uzyskano w odpowiedniej kolejności dla: AN>GBL>DMK>PC.



Rysunek 3. Przykładowe rozpuszczalniki stosowane do badań kondensatorów elektrochemicznych.

### 3. Elektrolity polimerowe stosowane w kondensatorach elektrochemicznych

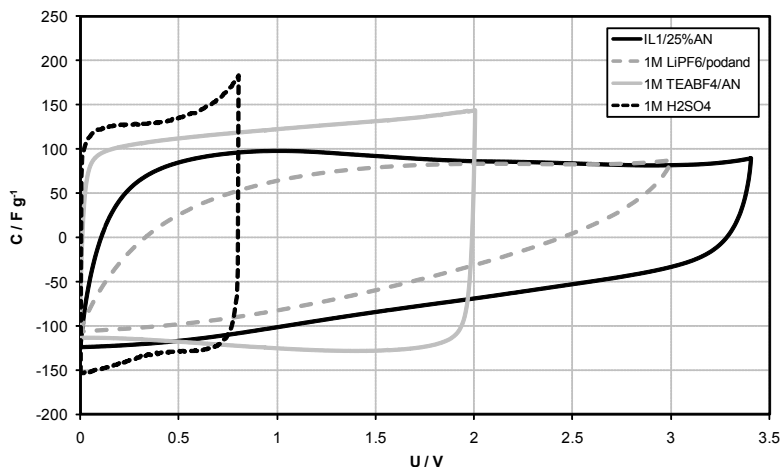
Ze względu na fakt, iż obniżenie masy całego układu wpływa na wzrost grawimetrycznej i wolumetrycznej energii i mocy kondensatora, podejmuje się próby stosowania elektrolitu w postaci cienkiego filmu, gdzie zastosowanie mają stałe i żelowe elektrolity polimerowe. Elektrolit żelowy najczęściej wykonany jest z soli przewodzącej np.  $\text{LiClO}_4$  rozpuszczonej w rozpuszczalniku niewodnym np. w PC i uplastyczniony polimerem takim jak polimetakrylan metylu (PMMA) [3]. Badane elektrolity polimerowe wykorzystywały takie sole przewodzące jak  $\text{TEAPF}_6$  (sześćfluorofosforan czteroetyloamonu),  $\text{TEABF}_4$  (czterofluoroboran czteroetyloamonu),  $\text{TEAClO}_4$  (chloran(VII) czteroetyloamonu),  $\text{TBAPF}_6$  (sześćfluorofosforan czterobutyloamonu),  $\text{TBABF}_4$  (czterofluoroboran czterobutyloamonu),  $\text{TBAClO}_4$  (chloran(VII) czterobutyloamonu) [4,24,25]. Uzyskanie elektrolitu w postaci cienkiej foli było możliwe dzięki odpowiedniej preparatyce. Poliakrylonitryl (PAN) był mieszany z odpowiednią solą amonową i rozpuszczany w PC. Odparowanie rozpuszczalnika – węglanu propyleny prowadziło do uzyskania elektrolitu w postaci stałej. Sól przewodząca  $\text{TEABF}_4$  wydaje się najodpowiedniejsza zarówno dla elektrolitów ciekłych jak i stałych. Taki wybór uwarunkowany jest przewodnictwem soli amonowych i pojemnościami uzyskiwanymi przez kondensatory, które to bezpośrednio związane są z rozmiarem jonów. Porównanie rozmiarów jonów wygląda w następujący sposób:  $\text{TEA}^+ < \text{TBA}^+$ , natomiast dla anionów:  $\text{BF}_4^- < \text{PF}_6^- \cong \text{ClO}_4^-$  [4]. Wykazano

korelacje pomiędzy zmniejszeniem rozmiarów jonów a wzrostem przewodnictwa dla kompozytowych elektrolitów polimerowych (PAN/sól amonowa/PC). Innym typem elektrolitu żelowego jest mieszanina PVP-PVAc (poliwinilopirrolidonu i polioctanu winylu), TEABF<sub>4</sub> – pełniące rolę soli przewodzącej i PC jako plastyfikatora. Przewodnictwo takiego elektrolitu żelowego jest w granicach 1 mS/cm, w temperaturze pokojowej [5].

#### 4. Elektrolity wodne stosowane w kondensatorach elektrochemicznych

Elektrolity wodne ograniczają potencjałowy przedział pracy kondensatora elektrochemicznego do 1 - 1.2 V (rys. 4), co z kolei wpływa na znaczące obniżenie energii urządzenia w porównaniu do elektrolitów organicznych. Natomiast, do zalet elektrolitów wodnych można zaliczyć wysokie przewodnictwo (0,8 S/cm dla H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> [1]) zazwyczaj dużo niższy koszt w porównaniu do elektrolitów organicznych, oraz mniej kosztowny i czasochłonny proces ich przygotowywania. Roztwory wodnych elektrolitów dobrze zwilżają powierzchnię materiału elektrodowego, szczególnie o charakterze hydrofilowym, co wpływa na pojemność układu. Najczęściej stosowanymi elektrolitami są roztwory kwasu siarkowego, kwasu solnego, wodorotlenku potasu, wodorotlenku sodu. Przewodnictwo właściwe wodnych elektrolitów zależy głównie od ich stężenia. Jest oczywiste, iż kondensator musi być opracowany dla konkretnego elektrolitu, nie tylko ze względu na materiał elektrodowy, ale na fakt, że jego struktura porowata musi być dostosowana do rozmiaru i właściwości odpowiedniego elektrolitu. Wydaje się że dla roztworów wodnych ze względu na rozmiar solwatowanych jonów elektrolitu odpowiednie są węglowe materiały z przewagą mezoporów w porównaniu do zawartości mikroporów. Ruchliwość jonów w mikroporach może być nawet 10 niższa niż w elektrolicie [12,26]. Roztwory elektrolitów mają duży wpływ na budowę podwójnej warstwy elektrycznej. Występują tu oddziaływania elektrostatyczne, oraz procesy nieelektrostatycznej adsorpcji jonów lub cząsteczek na powierzchni materiału. Zjawisko pseudopojemności wynika z reakcji faradajowskich związanych z powierzchnią lub z zaadsorbowanymi cząsteczkami na granicy faz elektroda/elektrolit. Dzięki temu zjawisku uzyskiwane pojemności na jednostkę powierzchni w porównaniu do kondensatorów z podwójną warstwą elektryczną są 10 a nawet 100-krotnie większe [6]. Dlatego naukowcy starają się znaleźć odpowiednie elektrolity do materiałów elektrodowych, w których te zjawiska będą widoczne. N. Wu wraz z współpracownikami przebadał kilka wodnych roztworów soli i KOH by wyznaczyć optymalny elektrolit dla kompozytowych elektrod z Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. Dla przebadanych jedno molowych roztworów Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, KOH i Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, najwyższe pojemności (5-7 krotnie wyższe) uzyskali dla wodnego roztworu siarczanu(IV) sodu w przedziale potencjałowym pracy kondensatora wynoszącym 1.2 V. Naj-

niższe wartości pojemności uzyskali dla obojętnych elektrolitów, tj. dla NaCl i Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Uzyskane w tych elektrolitach krzywe potencjodynamiczne są charakterystyczne dla powierzchni styku półprzewodnik/elektrolit, związane z ograniczeniem pojemności przez ładunek przestrzenny. Natomiast w KOH widoczne były reakcje redox przy bardziej ujemnych potencjałach, w których najprawdopodobniej brały udział jony wodorotlenowe. Najwyższe pojemności uzyskane w elektrolicie siarczanu(IV) sodu związane są z zaproponowanymi przez autorów reakcjami. Uważają oni, że siarka może zmieniać stopień utlenienia z IV na VI, bądź żelazo z II na III, które to zmiany mogą towarzyszyć interkalacji jonów siarczanowych(IV) w powierzchniowe warstwy tlenku, mające na celu zrównoważenie dodatkowego ładunku pojawiającego się między warstwami. Ciekawym rozwiązaniem jest zastosowanie wodnego żelowego elektrolitu (tzw. hydrożelu), składającego się z poliakrylanu potasu, chlorku potasu i wody [27-30]. Zastosowanie takiego elektrolitu umożliwiło obserwację pseudopojemnościowego charakteru materiału elektrodowego oraz uzyskanie wyższych pojemności w szerszym zakresie stężeń i temperatur, dla elektrod wykonanych np. z MnO<sub>2</sub> czy z węgla aktywnego, w porównaniu do wodnego roztworu KOH. Hydrożel oparty na H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, alkoholu poliwinylowym i na aldehydzie glutarowym dodatkowo charakteryzuje się znacząco niższym samowyladowaniem [31].



Rysunek 4. Krzywe potencjodynamiczne (5 mV/s) dla kondensatorów symetrycznych zbudowanych z węgla aktywnego i pracujących w różnych elektrolitach: IL2/25%AN – fosfoniowa ciecz jonowa z kationem triheksylo(teradecylo)fosfoniowym i anionem bis(trifluorometylosulfonylo)imidowym z dodatkiem 25% acetonitrylu, 1M LiPF<sub>6</sub>/podand – 1M roztwór LiPF<sub>6</sub> rozpuszczony w metylo tris(2-metoksyetoksy)silanie, 1M TEABF<sub>4</sub>/AN – 1M roztwór czterofluoroboranu czteroetyloamoni w acetonitrylu.

## 5. Ciecze jonowe jako elektrolity w kondensatorach elektrochemicznych

Inną grupą elektrolitów stosowanych w kondensatorach elektrochemicznych są ciecze jonowe [32-38]. Ciecze jonowe składają się z jonów i ich kombinacji i nie zawierają żadnego cząsteczkowego rozpuszczalnika. Przyjęło się, że do cieczy jonowych zalicza się sole posiadające temperaturę topnienia poniżej 100°C [33]. Elektrolity te mogą pracować w przedziale potencjałowym znacznie przekraczającym 3 V (rys. 4), co wpływa na znaczne podniesienie wartości energii kondensatorów elektrochemicznych nawet do 40 Wh/kg [33,36]. Ich zaletami są termiczna trwałość w tak wysokich temperaturach jak 300°C, mała łatwopalność, niskie ciśnienie pary, czy niewielka toksyczność [8]. Jednakże, zastosowanie cieczy jonowych jako elektrolitów dla kondensatorów jest wciąż ograniczone, ze względu na stosunkowo wysoki koszt produkcji, dużo niższe przewodnictwo rzędu 0.1-10 mS/cm a także dużą lepkość takich układów w stosunku do elektrolitów wodnych, co uwidacznia się szczególnie przy dużych obciążeniach prądowych [33]. Opór właściwy cieczy jonowych jest silnie zależny od temperatury. W podwyższonych temperaturach ok. 125°C ciecze jonowe mają oporność porównywalną do acetonitrylu. Niestety w wysokich temperaturach napięcie pracy znacząco spada – tabela 1. Rozwiązaniem wydaje się być elektrolit składający się z cieczy jonowej i acetonitrylu [33,36,39] przez co zmieniają się właściwości fizyko-chemiczne np. lepkość, a jednocześnie napięcie pracy kondensatora nie zmniejsza się znacząco. Innym rozwiązaniem zastosowanym przez Y. Nagao i współpracowników [40] jest dodatek materiału ferroelektrycznego – BaTiO<sub>3</sub> do materiału elektrodowego z węgla aktywnego w celu polepszenia dysocjacji cieczy jonowej w środku lub w sąsiedztwie elektrody, które prowadzi do zwiększenia pojemności podwójnej warstwy elektrycznej. Najczęściej stosowanymi do kondensatorów elektrochemicznych cieczami jonowymi są aprotyczne sole imidazoliowe. Natomiast zastosowanie protonowej cieczy jonowej pozwala na obserwowanie efektów pseudopojemnościowych np. RuO<sub>2</sub> podobnie jak to ma miejsce w elektrolitach wodnych [41].

## 6. Podandy krzemowe jako potencjalne rozpuszczalniki dla kondensatorów elektrochemicznych.

Nowym rozwiązaniem jest zastosowanie podandów jako składników elektrolitu dla kondensatorów elektrochemicznych. Nazwą podandy określa się łańcuchy zbudowane z elementów węgiel-węgiel-heteroatom np. łańcuchy polieteryrowe. Łańcuchy te mogą być spięte za pomocą atomu lub grupy atomów. W zależności od liczby łańcuchów przyłączonych do atomu centralnego wyróżniamy di-, tri-podandy, itp. Jeśli atomem spinającym jest krzem, to mówimy o podandach krzemowych. Podandy krzemowe posiadają bardzo dobre właściwości solwatuujące w stosunku do kationów metali alkalicznych. Zastosowanie jako

rozpuszczalnika dla soli  $\text{LiPF}_6$  różnych trójpodandów krzemowych pozwoliło na osiągnięcie znaczących pojemności kondensatora elektrochemicznego z elektrodami z węgla aktywnego. Niestety przewodnictwo właściwe tych związków jest niższe w porównaniu do stosowanych komercyjnie elektrolitów organicznych, co jest widoczne w gwałtowniejszym spadku pojemności wraz ze wzrostem stosowanych reżimów prądowych podczas cyklicznego ładowania/wyładowania kondensatora [42]. Do zalet takich rozpuszczalników zaliczyć należy wysokie napięcie pracy, ok. 3V (rys. 4), wyższe od komercyjnych elektrolitów organicznych (2,5 V), co z kolei wpływa na wzrost energii kondensatora – wzór nr (3).

## 7. Podsumowanie

Pojemność, energia i moc kondensatora zależą w dużej mierze od zastosowanego elektrolitu. Z kolei na parametry charakteryzujące dobry elektrolit ma wpływ zarówno sól przewodząca jak i rozpuszczalnik. Przewodnictwo elektrolitu zależy od ruchliwości jonów ale, także od odwrotności masy cząsteczkowej rozpuszczalnika, jego lepkości i przewodnictwa. Taka zależność, wskazuje na występowanie interakcji między substancją rozpuszczoną a rozpuszczalnikiem. Oczywiście, elektrochemiczne parametry charakteryzujące kondensator zależą od rozmiarów porów i przewodnictwa materiału elektrodowego. Na uzyskiwane pojemności oprócz rozwiniętej powierzchni rzeczywistej ma wpływ geometria i rozmiar porów z uwzględnieniem ich średniej wielkości, przewodnictwo, zwilżalność a także obecność elektroaktywnych cząsteczek. Optymalne rozwiązanie zakłada wykorzystanie materiałów elektrodowych z porowatością dobraną do rozmiarów jonów elektrolitu. Maksymalne wartości energii, przy dużych obciążeniach prądowych, zapewnia odpowiednio mikroporowata elektroda kondensatora, natomiast wielkość mocy kondensatora zależna jest w dużej mierze od mezoporów. Tak więc, pojemność kondensatora elektrochemicznego zależy przede wszystkim od pojemności materiału elektrodowego wyrażonej w F/g, natomiast napięcie pracy i oporność takiego urządzenia zależy w głównej mierze od stosowanego elektrolitu.

## Podziękowania:

Praca naukowa finansowana przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego jako granty N N205 012334 i DS 419/E-138/F/2008.

## Literatura:

1. R. Kotz, M. Carlen, *Electrochim. Acta* 45 (2000) 2483
2. M. Ue, K. Ida, S. Mori J. *Electrochem. Soc.* 141 (1994) 2989
3. M. D. Ingram, A. J. Pappin, F. Delalande, D. Poupard, G. Terzulli *Electrochim. Acta* 43 (1998) 1601

4. M. Ishikawa, M. Ihara, M. Morita, Y. Matsuda *Electrochim. Acta* 40 (1995) 2217
5. Y. Matsuda, K. Inoue, H. Takeuchi, Y. Okuhama *Solid State Ionics* 113-115 (1998) 103
6. N.L. Wu, S.Y. Wang, C.Y. Han, D.S. Wu L.R. Shiue *J. Power Sources* 113 (2003) 173
7. M. Arulepp, L. Permann, J. Leis, A. Perkson, K. Rumma, A. Janes, E. Lust *J. Power Sources* 133 (2004) 320
8. A. Burke *Electrochim. Acta* 53 (2007) 1083
9. E. Frackowiak, F. Beguin *Carbon* 39 (2001) 937
10. J. Chmiola, G. Yushin, Y. Gogotsi, C. Portet, P. Simon, P.L. Taberna *Science* 313 (2006) 1760
11. E. Raymundo-Pinero, K. Kierzek, J. Machnikowski, F. Beguin *Carbon* 44 (2006) 2498.
12. J. Huang, B.G. Sumpter, V. Meunier *Chem. Eur. J.* 14 (2008) 6614
13. B.E. Conway, W. G. Pell Wu *J. Power Sources* 105 (2002) 169
14. A. B. Fuertes, G. Lota, T. A. Centano, E. Frackowiak *Electrochim. Acta* 50 (2005).
15. B. E. Conway *Electrochemical supercapacitors – scientific fundamentals and technological applications* (Kluwer Academic/ Plenum, 1999)
16. E. Frackowiak, G. Lota, J. Machnikowski, C. Vix-Guterl, F. Béguin *Electrochim. Acta* 51 (2006) 2209
17. G. Lota, B. Grzyb, H. Machnikowska, J. Machnikowski, E. Frackowiak *Chem. Phys. Lett.* 404 (2005) 53
18. Hulicova, M. Kodama, H. Hatori *Chem. Mater.* 18 (2006) 2318
19. T. Morimoto, K. Hiratsuka, Y. Sanada, K. Kurihara *J. Power Sources* 60 (1996) 239
20. W. Li, D. Chen, Z. Li, Y. Shi, Y. Wan, G. Wang, Z. Jiang, D. Zhao *Carbon* 45 (2007) 1757
21. J.A. Fernandez, T. Morishita, M. Toyoda, M. Inagaki, F. Stoeckli, T.A. Centeno *J. Power Sources* 175 (2008) 675
22. B. Zhang, J. Liang, C.L. Xu, B.Q. Wei, D. B. Ruan, D. H. Wu *Mater. Lett.* 51 (2001) 539
23. M. Egashira, S. Okada, Y. Korai, J. Yamaki, I. Mochida *J. Power Sources* 148 (2005) 116
24. A. Lewandowski, M. Galiński, M. Krzyżanowski *Solid State Ionics* 158 (2003) 367
25. A. Lewandowski, M. Krzyżanowski *Electrochim. Acta* 48 (2003) 1325
26. V. V. N. Obreja *Physica E* 40 (2008) 2596
27. K.T. Lee, N.L. Wu *J. Power Sources* 179 (2008) 430



28. S. Nohara, H. Wada, N. Furukawa, H. Inoue, M. Morita, C. Iwakura *Electrochim. Acta* 48 (2003) 749
29. S. Nohara, T. Asahina, H. Wada, N. Furukawa, H. Inoue, N. Sugoh, H. Iwasaki, C. Iwakura *J. Power Sources* 157 (2006) 605
30. H. Wada, S. Nohara, N. Furukawa, H. Inoue, N. Sugoh, H. Iwasaki, M. Morita, C. Iwakura *Electrochim. Acta* 49 (2004) 4871
31. H. Wada, K. Yoshikawa, S. Nohara, N. Furukawa, H. Inoue, N. Sugoh, H. Iwasaki, C. Iwakura *J. Power Sources* 159 (2006) 1464
32. A. Lewandowski, M. Galiński *J. Phys. Chem. Solids* 65 (2003) 281
33. M. Galiński, A. Lewandowski, I. Stępnik *Electrochim. Acta* 51 (2006) 5567
34. J. N. Barisci, G. G. Wallace, D. R. MacFarlane, R. H. Baughman *Electrochem. Commun.* 6 (2004) 22
35. T. Sato, G. Masuda, K. Takagi *Electrochim. Acta* 49 (2004) 3603
36. E. Frackowiak, G. Lota, J. Pernak *Appl. Phys. Lett.* 86 (2005) 164104
37. W. Opydo, A. Lewandowski, M. Galiński, A. Świdorska-Mocek, M. Krzyżanowski, M. Zajder *Electr. Eng.* 88 (2006) 83
38. A. Lewandowski, A. Świdorska *Appl. Phys. A* 82 (2006) 579
39. A. Lewandowski, A. Olejniczak *J. Power Sources* 172 (2007) 48
40. Y. Nagao, Y. Nakayama, H. Oda, M. Ishikawa *J. Power Sources* 166 (2007) 595.
41. D. Rochefort, A.L. Pont *Electrochem. Commun.* 8 (2006) 1539
42. M. Walkowiak, D. Waszak, M. Osińska, G. Lota, B. Gierczyk, G. Schroeder, Zastosowanie podandów krzemoorganicznych w akumulatorach litowo-jonowych I kondensatorach elektrochemicznych, 241-271, w *Receptory supramolekularne*, Beta Graf P.U.H. Poznań 2007



## Rozdział VIII

### Mikroskopia sił chemicznych w badaniach powierzchni funkcjonalizowanych

Agata Masalska <sup>a)</sup>, Teodor Gotszalk <sup>a)</sup>, Grzegorz Schroeder <sup>b)</sup>

<sup>a)</sup> Politechnika Wroclawska, Wydział Elektroniki Mikrosystemów i Fotoniki, ul. Janiszewskiego 11/17, 50-372 Wrocław

<sup>b)</sup> Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Wydział Chemii, ul. Grunwaldzka 6, 60-780 Poznań

#### 1. Wstęp

Możliwość funkcjonalizacji powierzchni pod kątem uzyskania monowarstw o pożądanym właściwościach optycznych, elektrycznych czy chemicznych czyni je niezmiernie atrakcyjnymi w wielu zastosowaniach mikrosystemowych: jako molekularne kleje [1], warstwy smarujące [2, 3], fotorezysty [4], metalizację powierzchni biologicznych [5] czy jako powierzchnie selektywnych biosensorów [6]. Nadanie powierzchni mikrosystemowej określonych właściwości wymaga pokrycia podłoża dodatkową monowarstwą. Najczęściej wykorzystywane w tym celu są związki tworzące samoorganizujące się warstwy molekularne (ang. *Self-Assembled Monolayer* - SAM), których grupy funkcyjne w decydujący sposób stanowią o właściwościach fizyko – chemicznych powstałej powierzchni.

Metody charakteryzacji sfunkcjonalizowanych powierzchni obejmują techniki optyczne, próżniowe, mikroskopowe czy elektrochemiczne. Wśród popularnych metod badawczych wyróżnić można pomiar kąta zwilżalności informujący o hydrofobowych właściwościach powierzchni, spektroskopię w podczerwieni (ang. *Infra Red Spektroskopy* - IR) dostarczającą informacji o grupach funkcyjnych warstwy i orientacji molekuł związku na powierzchni, elipsometrię dostarczającą informacji o grubości warstwy, spektroskopię rentgenowską fotoelektronów (ang. *X-ray Photoelectron Spektroskopy* - XPS) określającą skład

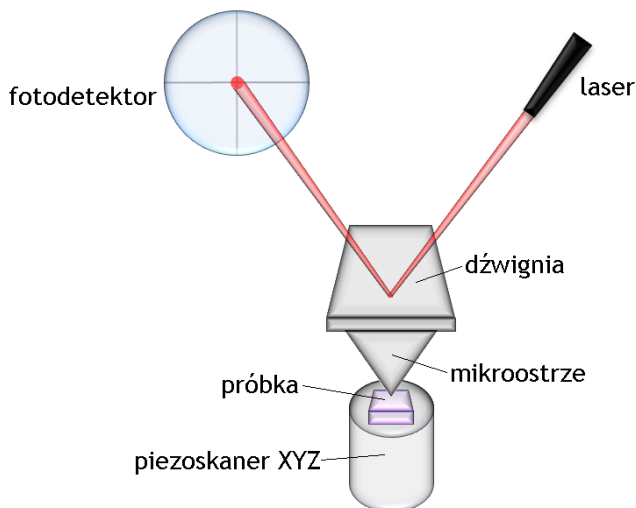
elementarny, mikroskopię sił atomowych (ang. *Atomic Force Microscopy* - AFM) badającą między innymi jakość i jednorodność pokrycia powierzchni czy skaningową mikroskopię tunelową (ang. *Scanning Tunneling Microscopy* - STM) mogącą dostarczać informacji o upakowaniu molekuł na powierzchni. Techniki mikroskopii sił atomowych i mikroskopii tunelowej wykorzystują w pomiarach mikroostrze o promieniu końcówki rzędu 10 nm. Pozwala to na badanie zjawisk występujących lokalnie, jedynie pod ostrzem, co jest zdecydowanym atutem w przypadku charakteryzacji warstw molekularnych. Ponadto chemiczna modyfikacja ostrza pomiarowego mikroskopu sił atomowych umożliwia badanie oddziaływań molekularnych oraz poznanie mechanizmów wiązania pomiędzy grupami funkcyjnymi podłoża a molekułami osadzonymi na sondzie pomiarowej. Badania takie szczególnie interesujące są w przypadku zastosowania chemicznie funkcjonalizowanych powierzchni jako warstw receptorowych, które to wiążą tylko wybrane substancje chemiczne i biologicznie czynne (np. antygeny, przeciwciała, pestycydy, środki bojowe, wirusy, bakterie). Z powodzeniem selektywne warstwy detekujące wykorzystane zostały w konstrukcjach nanobioelektronicznego nosa [7], urządzenia diagnozującego raka prostaty (detekcja antygeny swoistego dla prostaty (ang. *Prostate Specific Antigen* - PSA), którego podwyższone stężenie we krwi wskazuje na rozwój procesów nowotworowych) [8] czy czujnika detekującego komplementarne nici kwasów deoksyrybonukleinowych (ang. *Deoxyribonucleic Acid* – DNA ) [9].

## 2. Mikroskopia sił atomowych

Mikroskopia sił atomowych jest bezinwazyjną metodą diagnostyczną do badania powierzchni oraz jej właściwości z nanometrową zdolnością rozdzielczą. Zasada działania polega na wprowadzeniu sprężystej dźwigni zakończonej ostrzem pomiarowym w zakres bliskich oddziaływań z badaną powierzchnią – rys. 1. Mikroostrze przesuwane jest następnie nad powierzchnią badanej próbki, a wartość pojawiających się wtedy oddziaływań rejestrowana jest w każdym punkcie pomiarowym. W ten sposób uzyskuje się mapę oddziaływań, zarejestrowanych na danym polu skanowania, na podstawie której wyznaczyć można określone właściwości powierzchni. Detekcja wybranego rodzaju oddziaływań (oddziaływania elektrostatyczne, magnetyczne, międzycząsteczkowe, przepływ prądu tunelowego, przepływ ciepła) związana jest z zastosowaniem odpowiedniej metody pomiarowej.

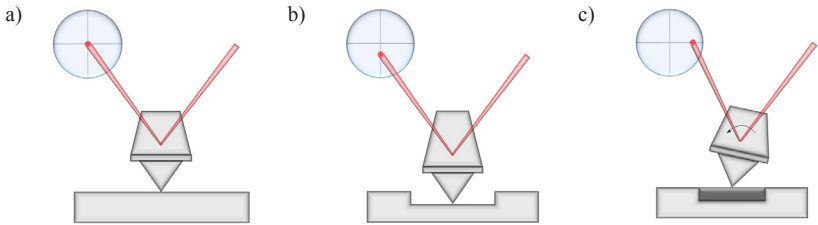
Skanowanie powierzchni (przesuwanie mikroostrza nad badanym podłożem) w większości rozwiązań mikroskopów sił atomowych realizowany jest przy wykorzystaniu elementów piezoelektrycznych. Umożliwiają one precyzyjny przesuw mikroostrza nad badaną powierzchnią. Znajomość czułości piezoceramiki przesuwającej próbkę w kierunkach XY i Z pozwala na ilościowe

określenie pola skanowania i wysokości badanej struktury w danym punkcie pomiarowym.



Rysunek 1. Zasada działania mikroskopu sił atomowych

Pomiar oddziaływań między atomami ostrza i podłoża w klasycznym mikroskopie sił atomowych odbywa się natomiast poprzez obserwację wychylenia sprężystej dźwigni, która to wygina się na skutek sił skupionych na końcówce pomiarowej. Pomiar ugięcia belki najczęściej realizowany jest optyczną metodą natężeniową. W metodzie tej skupiona wiązka laserowa odbija się od powierzchni dźwigni, a następnie pada na powierzchnię fotodetektora czterosekcyjnego – rys. 2a. Każde wychylenie belki pomiarowej powoduje zmianę położenia wiązki laserowej na powierzchni detektora, co skutkuje zmianą oświetlenia poszczególnych jego sekcji. Obserwacja sygnałów wyjściowych z danych sekcji dostarcza informacji o stopniu i sposobie wygięcia dźwigni, a zatem i o charakterze sił działających na ostrze skanujące. Ugięcie pionowe jest bowiem proporcjonalne do różnicy sygnału pomiędzy górnymi i dolnymi parami fotodiod – rys. 2b, a ugięcie boczne – do różnicy sygnału między lewymi i prawymi parami fotodiod – rys. 2c.



Rysunek 2. Zasada działania natężeniowego detektora ugięcia mikrobekki

Podstawowymi trybami pomiarowymi mikroskopii sił atomowych są tryby statyczny i rezonansowy.

## 2.1. Tryb statyczny mikroskopii sił atomowych

Styczna mikroskopia sił atomowych wykorzystuje, jako sygnał do odwzorowania topografii powierzchni, siłę  $F$  skupioną na ostrzu pomiarowym. Jej wartość jest proporcjonalna do ugięcia  $z$  dźwigni zgodnie z zależnością [10]:

$$F = kz$$

gdzie  $k$  – stała sprężystości dźwigni pomiarowej.

Podczas procesu skanowania powierzchni wartość siły jest utrzymywana na stałym poziomie. Oznacza to, że wartość napięcia doprowadzona do piezoaktuatora odpowiedzialnego za przesuw badanej powierzchni w kierunku  $Z$  jest tak dobierana, by ugięcie belki pomiarowej było również stałe. Ruch piezoaktuatora odwzorowuje zatem bezpośrednio ukształtowanie badanej powierzchni.

Tryb statyczny umożliwia także pomiar sił tarcia. Skanowanie powierzchni musi odbywać się wtedy w kierunku prostopadłym do najdłuższej osi symetrii dźwigni pomiarowej, tak by możliwe było rejestrowanie zmiany bocznego skrętu belki na skutek zmiany współczynnika tarcia badanej powierzchni, a zatem na skutek zmiany siły działającej na końcówkę pomiarową – rys. 2c.

W statycznej mikroskopii sił atomowych stosowane są dźwignie pomiarowe o małych wartościach stałej sprężystości (w zakresie 0,01 – 5 N/m), by zapewnić możliwie duże ugięcie belki przy niewielkich już siłach działających na ostrze pomiarowe. Niemniej jednak przez cały czas trwania procesu skanowania, ostrze wywiera nacisk na badaną powierzchnię. Tryb statyczny mikroskopii sił atomowych nie jest wskazany zatem do pomiarów miękkich preparatów biologicznych ze względu na możliwość uszkodzenia próbki. Jego zastosowanie ogranicza się głównie do badania twardych powierzchni.

## 2.2. Tryb rezonansowy mikroskopii sił atomowych

W rezonansowej mikroskopii sił atomowych dźwignia wprowadzana jest w drgania rezonansowe. Wraz ze zbliżaniem ostrza do powierzchni zmienia się częstotliwość drgań belki. Przesunięciu częstotliwości drgań odpowiada spadek wartości amplitudy drgań dźwigni. Pomiar zmiany amplitudy oscylacji jest z kolei podstawą oceny oddziaływań występujących między mikroostrzem a badaną powierzchnią.

Podczas procesu skanowania powierzchni wydłużenie piezoaktuatora w kierunku Z jest tak sterowane, by wartość amplitudy drgań dźwigni nie ulegała zmianie. W ten sposób ruch piezoaktuatora odwzorowuje ukształtowanie powierzchni.

Dodatkowym atutem dynamicznej mikroskopii sił atomowych jest możliwość jednoczesnego pomiaru zmian fazy drgań dźwigni w trakcie skanowania powierzchni. Obraz fazy sygnału może dostarczać informacji o jednorodności badanej powierzchni, co jest cenną informacją w przypadku badania monowarstw pod kątem jakości pokrycia podłoża.

W trybie rezonansowym nie dochodzi do zetknięcia ostrza pomiarowego z badanym podłożem. Tryb ten bardzo dobrze sprawdza się przy pomiarach delikatnych powierzchni, bowiem ryzyko uszkodzenia powierzchni bądź ostrza pomiarowego jest zminimalizowane.

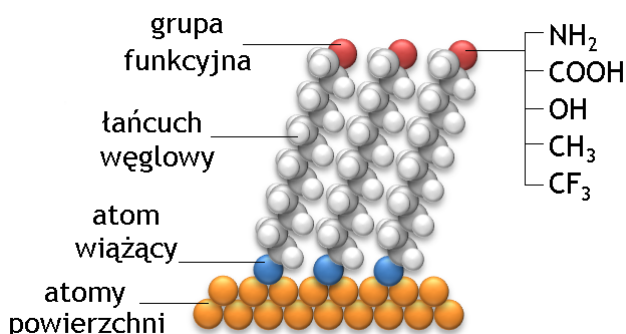
## 3. Mikroskopia sił chemicznych

Mikroskopia sił chemicznych (ang. *Chemical Force Microscopy* - CFM) jest techniką pokrewną do mikroskopii sił atomowych. Poszerza ona pole zastosowań mikroskopii sił atomowych, bowiem dostarcza informacji o chemicznej naturze badanych układów. Metoda ta zakłada modyfikację standardowego ostrza pomiarowego stosowanego w mikroskopii sił atomowych za pomocą warstw samoorganizujących się (SAMs). Są to związki organiczne, które samorzutnie organizują się na podłożu w powtarzalny sposób. Samorzutna organizacja możliwa jest dzięki procesowi chemisorpcji, a więc tworzenia się silnych wiązań chemicznych (wiązania kowalencyjne) pomiędzy atomami powierzchni a atomami molekuly (ang. *head group*) – rys. 3. Pomiędzy łańcuchami węglowymi, będącymi częścią centralną molekuly, występują znacznie słabsze oddziaływania van der Waalsa. Przeciwna strona łańcucha węglowego zakończona jest grupą funkcyjną (ang. *tail group*), która w znacznym stopniu decyduje o właściwościach danej warstwy molekularnej.

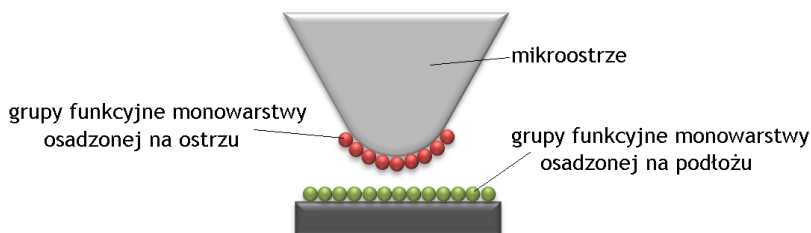
Organiczne monowarstwy można uzyskać poprzez samorzutną organizację kwasów tłuszczowych na podłożu z tlenku glinu czy srebra, organizację związków krzemooorganicznych na powierzchniach z grupami hydroksylowymi (np. dwutlenek krzemu, tlenek glinu, szkło), czy związków alkanotioili na podłożu

metalicznym, w szczególności na złocie, srebrze i miedzi.

Ostrza pomiarowe mikroskopu sił atomowych najczęściej są funkcjonalizowane związkami silanów (ostrza krzemowe bądź azotkowo-krzemowe) i alkanotioli (ostrza złote). Molekuły warstwy samoorganizującej się są związane kowalencyjnie z powierzchnią ostrza z jednej strony, z drugiej zaś strony zakończone są ściśle określonymi grupami funkcyjnymi. Taka chemiczna modyfikacja końcówki pomiarowej uczula ją na specyficzne oddziaływania molekularne. Zastosowanie sfunkcjonalizowanego ostrza w klasycznej statycznej mikroskopii sił atomowych umożliwia zatem pomiar sił pomiędzy różnymi grupami funkcyjnymi – rys. 4.



Rysunek 3. Schemat budowy samoorganizującej się warstwy molekularnej



Rysunek 4. Schemat zasady działania mikroskopu sił chemicznych

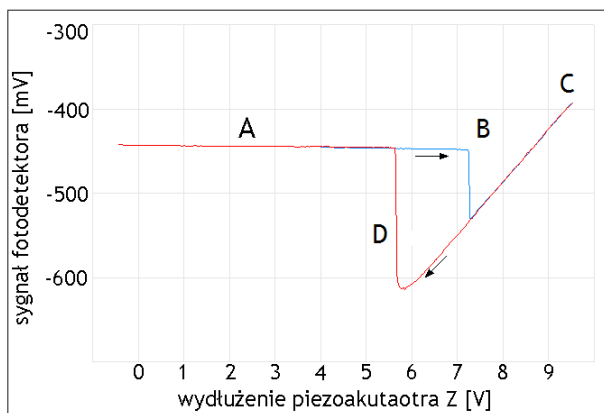
#### 4. Spektroskopia sił atomowych

Spektroskopia sił atomowych pozwala na pomiar interakcji pomiędzy ostrzem pomiarowym znajdującym się na końcu sprężystej dźwigni mikroskopu sił atomowych, a badanym podłożem. Belka pomiarowa jest zbliżana do podłoża aż do zetknięcia z nią, a następnie oddalana do momentu odseparowania jej od powierzchni – jeden cykl pomiarowy. Zmiana odległości między ostrzem

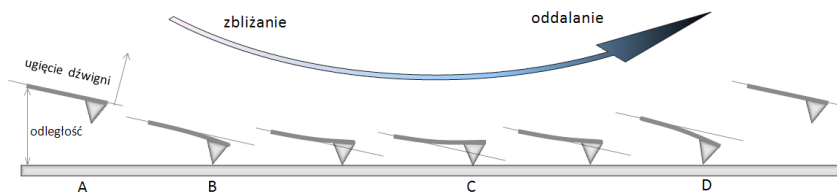


pomiarowym i podłożem realizowana jest poprzez zmianę długości piezoporurki odpowiedzialnej za przesuw w kierunku Z.

Podczas takiego cyklu pomiarowego na skutek sił działających na dźwignię ulega ona ugięciu (przeważnie w granicach do kilkudziesięciu nanometrów), którego miarą jest zmiana sygnału fotodetektorów – rys. 5, 6.



Rysunek 5. Przykładowy pomiar spektroskopii sił atomowych zarejestrowany w powietrzu



Rysunek 6. Schemat ruchu i ugięcia się dźwigni pomiarowej podczas jednego cyklu pomiarowego spektroskopii sił atomowych

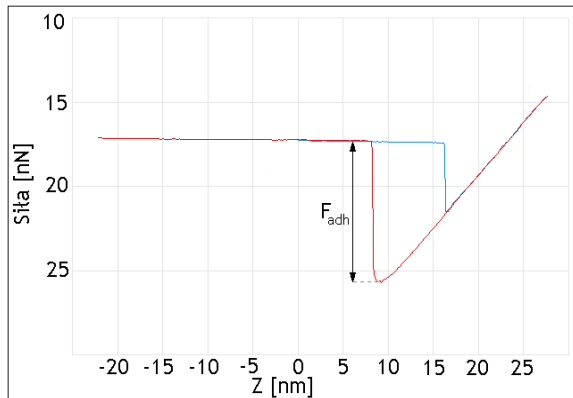
Dla ostrza będącego w odległości rzędu kilkudziesięciu nanometrów od powierzchni nie obserwuje się sił wzajemnych oddziaływań (obszar A). Wraz ze zbliżaniem ostrza do powierzchni oddziaływania zaczynają mieć charakter przyciągający (zazwyczaj z powodu sił van der Waalsa). Gdy gradient siły stanie się większy od stałej sprężystości dźwigni pomiarowej następuje przyciągnięcie dźwigni do powierzchni (ang. *snap-in*) (obszar B). Dalsze zbliżanie powoduje liniowe uginanie się belki wraz z rosnącą siłą nacisku (obszar C). Proces oddalania ostrza od podłoża skutkuje oderwaniem się dźwigni od powierzchni (ang. *snap-out*). Następuje to wtedy, gdy siła sprężystości belki stanie się większa od

siły adhezji  $F_{adh}$  (obszar D).

Sygnal fotodetektora czterosekcyjnego  $d_V$ , niosący informacje o stopniu ugięcia belki przeliczany jest na wartość siły  $F$  po uprzednim wyznaczeniu czułości fotodetektora odpowiedzialnego za detekcję ugięcia belki  $s$  oraz stałej sprężystości belki pomiarowej  $k$ , zgodnie z zależnością:

$$F[\text{nN}] = d_V[\text{V}] \cdot s \left[ \frac{\text{nm}}{\text{V}} \right] \cdot k \left[ \frac{\text{N}}{\text{m}} \right]$$

Dzięki temu możliwe jest przedstawienie wyników spektroskopii sił atomowych w postaci krzywych odległość – siła (ang. *force-distance curves*), a zatem jako zależność siły działającej na ostrze pomiarowe  $F$  w funkcji zmiany długości piezourki  $Z$  odpowiedzialnej za przesuw w kierunku pionowym. Taka prezentacja wyników pozwala na bezpośrednie wyznaczenie siły adhezji na podstawie pomiarów spektroskopii sił atomowych – rys. 7.



Rysunek 7. Przykładowa krzywa siła – odległość zarejestrowana w powietrzu.

Czułość fotodetektora (czułość ugięcia belki)  $s$  jest parametrem opisującym jakie ugięcie (wyrażone w nanometrach) belki pomiarowej pod wpływem pewnej siły spowoduje jednostkową zmianę sygnału fotodetektora.

Wyznaczenie czułości odpowiedzi fotodetektora wymaga wykorzystania podłoża o znacznie większej twardości niż materiał, z którego wykonana jest belka pomiarowa. Procedura ta bowiem zakłada, że ani podłoże ani ostrze, które zakańcza sprężystą belkę, nie ulega odkształceniu w momencie kontaktu, a jedynie dźwignia ugina się na skutek działających sił. Wartość czułości fotodetektora zmienia się dla różnych długości i kształtów belek pomiarowych, a także pod

wpływem zmiany jakości odbicia wiązki laserowej od powierzchni belki, czy też zmiany położenia plamki lasera na powierzchni danej dźwigni. Każda taka ingerencja w układzie pomiarowym wymaga ponownego przeprowadzenia procedury kalibracji czułości fotodetektora.

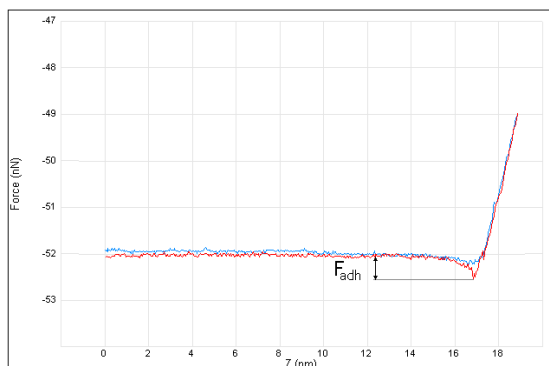
Stała sprężystości dźwigni pomiarowej może być wyznaczana czterema podstawowymi metodami:

- na podstawie pomiaru wymiarów geometrycznych dźwigni,
- na podstawie obciążania dźwigni dodatkową znaną masą i obserwacji zmian częstotliwości rezonansowej belki,
- na podstawie pomiaru ugięcia belki na skutek wywierania na nią nacisku inną dźwignią o zdecydowanie większych wymiarach i precyzyjnie określonej stałej sprężystości,
- na podstawie analizy szumów termicznych dźwigni.

Metoda pomiaru wymiarów geometrycznych mikrobekki jest obciążona dużym, sięgającym nawet kilkudziesięciu procent błędem. Wynika to z niedokładności wyznaczenia wymiarów belki, w szczególności jej grubości oraz z niedokładności określenia parametrów materiałowych dźwigni, które w wielu przypadkach posiadają powierzchnię pokrytą tlenkiem bądź dodatkową warstwą metaliczną (w celu zwiększenia współczynnika odbicia powierzchni) [11]. Metoda masy dodanej oraz kontrolowanego ugięcia belki są dokładniejsze, jednakże czasochłonne i trudne w realizacji. W praktyce laboratoryjnej standardową procedurą wyznaczania stałej sprężystości dźwigni jest metoda pomiaru szumów termicznych dźwigni.

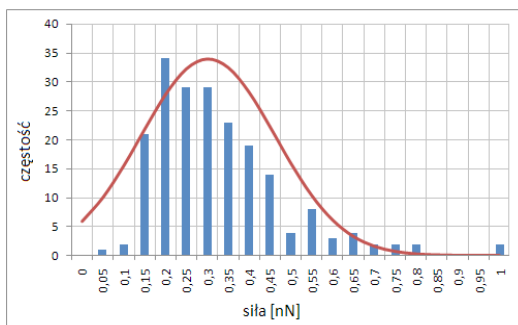
Zastosowanie spektroskopii sił atomowych w układzie z jednocześnie sfunkcjonalizowanym ostrzem pomiarowym i podłożem, tak jak to ma miejsce w mikroskopii sił chemicznych, daje możliwość badania oddziaływań molekularnych między grupami funkcyjnymi.

W warunkach atmosferycznych powierzchnie ostrza i podłoża pokryte są cienką warstwą wody. Powoduje to występowanie znacznych sił kapilarnych, które są do dwóch rzędów wielkości większe od specyficznych oddziaływań chemicznych [12]. Siły kapilarne przysłonią zatem niewielkie oddziaływania molekularne między grupami funkcyjnymi ostrza i podłoża. Skuteczną metodą wyeliminowania efektu sił kapilarnych jest przeniesienie pomiarów do środowiska ciekłego – rys. 8. Ponadto taki zabieg pozwala na badanie molekuł aktywnych biologicznie w ich naturalnym środowisku oraz ocenę wpływu różnych roztworów (rozpuszczalników polarnych i niepolarnych, roztworów o różnych pH i sile jonowej) na mechanizmy oddziaływań molekularnych, co z kolei może być szczególnie pomocne w ustaleniu środowiska roboczego rzeczywistych układów mikrosystemowych gwarantującego największą czułość pomiarową.



Rysunek 8. Przykładowa krzywa siła-odległość zarejestrowana w etanolu pomiędzy złotym ostrzem funkcjonalizowanym grupami karboksylowymi a krzemowym podłożem funkcjonalizowanym grupami aminowymi.

Wartość siły adhezji między sfunkcjonalizowanym ostrzem i podłożem wyznacza się na podstawie wielokrotnego pomiaru krzywych siła odległość (kilkaset pomiarów). Powierzchnia kontaktu (ilość pojedynczych wiązań między molekułami sfunkcjonalizowanego ostrza i sfunkcjonalizowanego podłoża) może się różnić w kolejnych cyklach pomiarowych. Dla wiarygodnej oceny siły adhezji konieczne jest zatem przeprowadzenie statystycznej analizy uzyskanych wyników – rys. 9.



Rysunek 9. Histogram siły adhezji

Wartość siły adhezji  $F_{ad}$  zależna jest od powierzchni kontaktu ostrza z podłożem, a więc od promienia krzywizny wierzchołka ostrza pomiarowego  $R$ . Jednolity opis oddziaływań różnych grup funkcyjnych wymaga eliminacji zależności uzyskanych wyników od kształtu i wymiaru sondy skanującej. Para-

metrem spełniającym to wymaganie jest energia adhezji  $W$  (praca przypadająca na jednostkę powierzchni wymagana do rozseparowania ostrza i podłoża), która wyrażona jest zależnością [13]:

$$W = \frac{2F_{ad}}{3\pi R}$$

Spektroskopia sił atomowych umożliwi również oszacowanie siły pojedynczego wiązania między molekułami sfunkcjonalizowanego ostrza i podłoża.

Pole powierzchni kontaktu  $a_c$  ostrza z podłożem, wyznaczone na podstawie tzw. modelu Johnson'a-Kendall'a-Roberts'a (JKR) [13], przyjmuje postać:

$$a_c = \left( \frac{3\pi R^2 W}{2K} \right)^{\frac{1}{3}},$$

gdzie  $K$  – moduł elastyczności podłoża pokrytego monowarstwą.

Określając średnie pole powierzchni zajmowane przez molekułę poprzez modelowanie komputerowe bądź w przypadku powierzchni przewodzących (np. molekuły tioli osadzone na powierzchni złota) poprzez pomiary mikroskopii tunelowej [14], wyznaczyć można ilość molekuł biorących udział w kontakcie. Informacja ta pozwala przeliczyć siłę przypadającą na pojedyncze wiązanie grupa funkcyjna – grupa funkcyjna.

## 5. Przykładowe pomiary wybranych powierzchni funkcjonalizowanych

Wiele publikacji poświęconych badaniom jakości osadzania warstw samoorganizujących się i ich właściwości dotyczy pomiarów powierzchni funkcjonalizowanych na podłożu krzemu i utlenionego krzemu za pomocą związków silanów czy na podłożu złotym za pomocą związków tioli. Grupy aminowe ( $-\text{NH}_2$ ), karboksylowe ( $-\text{COOH}$ ) czy metylowe ( $-\text{CH}_3$ ) są powszechnie spotykane jako grupy terminalne – tabela 1.

Monowarstwy wytworzone na bazie powyższych związków często zatem stosowane są w mikroskopii sił chemicznych do funkcjonalizowania powierzchni ostrza i podłoża. Oddziaływania różnych kombinacji grup funkcyjnych były przedmiotem licznych badań. W tabeli 2 przedstawiono skrócone zestawienie wybranych grup terminalnych.

Środowisko, w którym wykonywane są pomiary oddziaływań między grupami funkcyjnymi ostrza i podłoża, może decydująco wpływać na mierzone

siły. W celu badania oddziaływań związanych jedynie ze swobodną energią powierzchniową, pomiary siły adhezji muszą być przeprowadzane w ultrawysokiej próżni. W praktyce laboratoryjnej jednak zdecydowana większość badań wykonywana jest w środowisku wodnym, gdyż daje to gwarancję eliminacji wpływu sił kapilarnych na uzyskane wyniki. W przypadku pomiarów w atmosferze gazu obojętnej interpretacja wyników może być kłopotliwa, ponieważ nie można wykluczyć obecności zaadsorbowanej pary na powierzchniach o dużej energii powierzchniowej.

Tabela 1. Przykłady związków tworzących samoorganizujące się monowarstwy

Podłoże	Immobilizacja do podłoża	Grupy terminalne	Związki	Literatura
Si/SiO <sub>2</sub> szkło	Silany -Si(OR) <sub>3</sub>	-NH <sub>2</sub>	3-aminopropyltrimethoxysilane (APTMS) 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES)	[15] [16, 17]
		-CH <sub>3</sub>	octadecyltrichlorosilane (OTS)	[18]
Au	Tiole -HS	-NH <sub>2</sub>	SH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> -NH <sub>2</sub> , n=9, 10, 11	[19]
		-CH <sub>3</sub>	1-dodecanethiol SH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> -CH <sub>3</sub> SH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> -CH <sub>3</sub> , n=9, 10, 11 octadecanethiol SH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>17</sub> -CH <sub>3</sub>	[20] [19] [21]
		-COOH	11-mercaptopundecanoic acid SH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> -COOH SH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> -COOH, n=9, 10, 11 16-mercaptohexadecanoic acid SH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>15</sub> -COOH	[20, 21] [19] [22]

Tabela 2. Siły adhezji pomiędzy wybranymi grupami funkcyjnymi

Zaobserwowano, że oddziaływania grup funkcyjnych ostrze/podłoże w etanolu zmieniały się zgodnie z zależnością COOH/COOH > CH<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub> > CH<sub>3</sub>/COOH. Wyniki te potwierdziły oczekiwania, że oddziaływania pomiędzy grupami tworzącymi wiązania wodorowe (np. COOH) w danym rozpuszczalniku są większe niż pomiędzy grupami nie tworzącymi takich wiązań (np. CH<sub>3</sub>). Przykładowe krzywe siła – odległość zmierzone w etanolu dla różnych grup funkcyjnych wraz z histogramami wyznaczonymi na podstawie 250 krzywych przedstawione są odpowiednio na rysunkach 10 i 11. Pomiary wykonane zostały w Wydziałowym Zakładzie Metrologii Mikro- i Nanostruktur Politechniki Wrocławskiej.

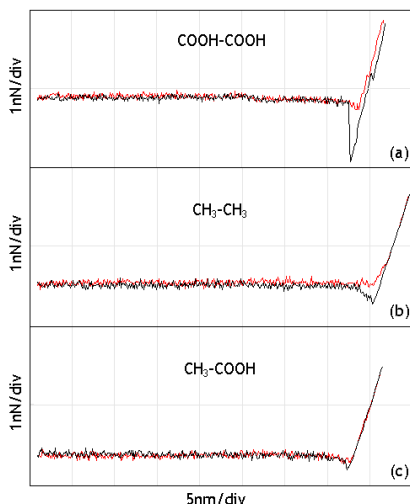
Ponadto stwierdzono, że w roztworach o właściwościach podobnych do właściwości grup terminalnych warstw samoorganizujących pokrywających powierzchnię ostrza i podłoża (np. grupy CH<sub>3</sub> w heksanie, czy grupy CH<sub>2</sub>OH w etanolu) siły adhezji pomiędzy ostrzem i funkcjonalizowanym podłożem są niewielkie. W przypadku natomiast, gdy rozpuszczalnik ma właściwości odmienne od właściwości grup funkcyjnych ostrza i podłoża (np. grupy CH<sub>3</sub> w wodzie

– tabela 2) siły potrzebne do rozseparowania sondy pomiarowej i powierzchni próbki są stosunkowo duże [12]. Odpowiedzialne za to zjawisko mogą być zarówno oddziaływania van der Waalsa jak i hydrofobowe właściwości molekuł funkcjonalizujących.

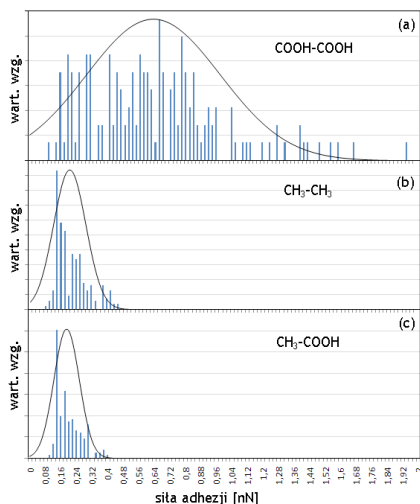
Grupy funkcyjne (ostrze – podłoże)	Roztwór	Siła adhezji [nN]	Promień krzywizny mikroostrza [nm]	Literatura
COOH-COOH	etanol	1,3 ± 0,3	35	[13]
		2,3 ± 0,8	60	[21]
1,6 ± 0,41		b.d.	[23]	
2,1 ± 0,85		b.d.	[23]	
	woda	~3	b.d.	[24]
CH <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub>	etanol	0,9 ± 0,2	35	[13]
		1,0 ± 0,4	60	[21]
		1,2 ± 0,54	b.d.	[23]
	woda	37,48 ± 0,15	5-40	[25]
24,76 ± 2,56		5-40	[25]	
~21		b.d.	[24]	
CH <sub>3</sub> -COOH	etanol	0,3 ± 0,1	35	[13]
		0,7 ± 0,1	35	[13]
		0,3 ± 0,2	60	[21]
		0,57 ± 0,17	b.d.	[23]
		0,78 ± 0,26	b.d.	[23]
	woda	5,51 ± 0,88	5-40	[25]
		~8	b.d.	[24]

## Podsumowanie

W pracy przedstawiliśmy skrócony opis możliwości zastosowań mikroskopii sił chemicznych, techniki wywodzącej się z mikroskopii sił atomowych, w badaniach wiązań chemicznych występujących między sfunkcjonalizowanym ostrzem a molekułami osadzonymi na badanej powierzchni. Przeprowadzone badania wykazały, że mikroskopia sił chemicznych może być nadzwyczaj przydatnym narzędziem do oceny oddziaływań między osadzonymi grupami terminalnymi związanymi z ostrzem i podłożem. Uważamy, że technika ta może znaleźć zastosowanie w wysokorozdzielczej diagnostyce powierzchni czujników chemicznych przeznaczonych do różnorodnych zastosowań.



Rysunek 10. Przykładowe krzywe siła – odległość zmierzone w etanolu dla grup funkcyjnych ostrze/podłoże odpowiednio: (a) COOH/COOH, (b) CH<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>, (c) CH<sub>3</sub>/COOH



Rysunek 11. Histogramy siły adhezji wyznaczonej w etanolu dla grup funkcyjnych ostrze/podłoże odpowiednio: (a) COOH/COOH, (b) CH<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>, (c) CH<sub>3</sub>/COOH

## Literatura:

1. V.V. Tsukruk, *Molecular Lubricants and Glues for Micro- and Nanodevices*, *Advanced Materials*, 13(2), 95-108 (2001)
2. S.W. Baek, S. I. Oh, S. H. Rhim, *Lubrication for Micro Forming of Ultra Thin Metal Foil*, *Annals of the CIRP*, 55 (2006)
3. S. T. Patton, K. C. Eapen, J. S. Zabinski, J. H. Sanders, A. A. Voevodin, *Lubrication of microelectromechanical systems radio frequency switch contacts using self-assembled monolayers*, *Journal of Applied Physics*, 102, 024903 (2007)
4. J. Huang, D. A. Dahlgren, J. C. Hemminger, *Photopatterning of Self-Assembled Alkanethiolate Monolayers on Gold: A Simple Monolayer Photoresist Utilizing Aqueous Chemistry*, *Langmuir*, 10, 626-628 (1994)
5. K. Rajalingam, T. Strunskus, A. Terfort, R. A. Fischer, Ch. Wöll, *Metalization of a Thiol-Terminated Organic Surface Using Chemical Vapor Deposition*, *Langmuir*, 24, 7986-7994 (2008)
6. N. K. Chaki, K. Vijayamohanan, *Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications*, *Biosensors & Bioelectronics*,



- 17, 1-12 (2007)
7. E. Pajot-Augy, *Nanobiosensors based on individual olfactory receptors*, Symposium on Design, Test, Integration and Packaging of MEMS and MOEMS, 25-27 April 2007, Stresa, Lago Maggiore, Italy
  8. G. Wu, R. H. Datar, K. M. Hansen, T. Thundat, R. J. Cote, A. Majumdar, *Bioassay of prostate-specific antigen (PSA) using microcantilevers*, Nature Biotechnology, 19, 856 - 860 (2001)
  9. M. Su, S. Li, V. P. Dravid, *Microcantilever resonance-based DNA detection with nanoparticle probes*, Applied Physics Letters, 82(20), 3562-3564 (2003)
  10. J. R. Withers, D. E. Aston, *Nanomechanical measurements with AFM in the elastic limit*, Advances in Colloid and Interface Science, 120, 57-67 (2006)
  11. J. E. Sader, J. W. M. Chon, P. Mulvaney, *Calibration of rectangular atomic force microscope cantilevers*, Review of Scientific Instruments, 70(10), 3967-3969 (1999)
  12. A. Noy, D. V. Vezenov, Ch. M. Lieber, *Chemical Force Microscopy*, Annu. Rev. Mater. Sci., 27, 381-421 (1997)
  13. E. W. van der Vegte, G. Hadziioannou, *Scanning Force Microscopy with Chemical Specificity: An Extensive Study of Chemically Specific Tip-Surface Interactions and the Chemical Imaging of Surface Functional Groups*, Langmuir, 13, 4357-4368 (1997)
  14. A. Ptak, M. Kappl, S. Moreno-Flores, H. Gojzewski, H.-J. Butt, *Quantitative Characterization of Nanoadhesion by Dynamic Force Spectroscopy*, Langmuir, 25(1), 256-261 (2009)
  15. G. C. Allen, F. Sorbello, C. Altavilla, A. Castorina, E. Ciliberto, *Macro-, micro- and nano-investigations on 3-aminopropyltrimethoxysilane self-assembly-monolayers*, Thin Solid Films 483, 306-311 (2005)
  16. J. Kim, P. Seidler, L. S. Wan, C. Fill, *Formation, structure, and reactivity of amino-terminated organic films on silicon substrates*, Journal of Colloid and Interface Science, 329, 114-119 (2009)
  17. M. Giesbers, J. M. Kleijn, M. A. C. Stuart, *Interactions between Acid- and Base-Functionalized Surfaces*, Journal of Colloid and Interface Science, 252, 138-148 (2002)
  18. M. Reiniger, B. Basnar, G. Friedbacher, M. Schleberger, *Atomic force microscopy of thin organic films on silicon in ultrahigh vacuum and under ambient conditions*, Surface and Interface Analysis, 33, 85-88 (2002)
  19. R. C. Thomas, J. E. Houston, R. M. Crooks, T. Kim, T. A. Michalske, *Probing Adhesion Forces at the Molecular Scale*, J. Am. Chem. Soc.,

- 117, 3830-3834 (1995)
20. G. Papastavrou, S. Akari and H. Möhwald, *Interactions between hydrophilic and hydrophobic surfaces on microscopic scale and the influence of air bubbles as observed by scanning force microscopy in aqueous and alcoholic mediums*, Europhysics Letters, 52(5), 551–556 (2000)
  21. A. Noy, C. D. Frisbie, L. F. Rozsnyai, M. S. Wrighton, C. M. Lieber, *Chemical Force Microscopy: Exploiting Chemically-Modified Tips To Quantify Adhesion, Friction, and Functional Group Distributions in Molecular Assemblies*, J. Am. Chem. Soc., 117, 7943-7951 (1995)
  22. J. Vidic, M. Pla-Roca, J. Grosclaude, M.-A. Persuy i inni, *Gold Surface Functionalization and Patterning for Specific Immobilization of Olfactory Receptors Carried by Nanosomes*, Anal. Chem., 79, 3280-3290 (2007)
  23. B. D. Beake, G. J. Leggett, *Friction and adhesion of mixed self-assembled monolayers studied by chemical force spectroscopy*, Phys. Chem. Chem. Phys., 1, 3345-3350 (1999)
  24. M. Fujihira, Y. Tani, M. Furugori, U. Akiba, Y. Okabe, *Chemical force microscopy of self-assembled monolayers on sputtered gold films patterned by phase separation*, Ultramicroscopy, 86, 63-73 (2001)
  25. J. E. Headrick, C. L. Berrie, *Alternative Method for Fabricating Chemically Functionalized AFM Tips: Silane Modification of HF-Treated SiN Probes*, Langmuir, 20(10), 4124-4131 (2004)

## Rozdział IX

### Podstawy techniki MALDI MS

(*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*)

Grażyna Bartkowiak, Grzegorz Schroeder

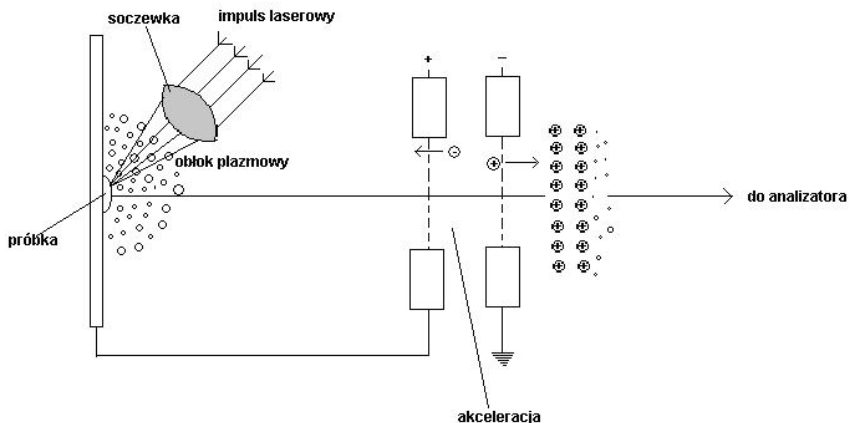
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Wydział Chemii, Grunwaldzka 6,  
60-780 Poznań

#### Wstęp:

Burzliwy rozwój spektrometrii mas jako techniki analitycznej pociągnął za sobą konieczność poszukiwania nowych, łagodnych metod jonizacji, które pozwalają na analizę dużych cząsteczek, np. biomolekuł, bez naruszenia ich struktury. Duże cząsteczki organiczne, np. polimery, dendrymery, biopolimery takie jak peptydy, cukry czy proteiny, analizowane za pomocą spektrometrii mas przy użyciu tradycyjnych metod jonizacji (np. jonizacji strumieniem elektronów) ulegają zwykle łatwo rozpadowi na fragmenty, co uniemożliwia wyznaczenie lub potwierdzenie ich masy cząsteczkowej. Potrzebna była metoda, pozwalająca zjonizować wielkie cząsteczki i przenieść je do fazy gazowej bez destrukcji. W latach 1980-tych znane były już różne techniki „miękkiej jonizacji” (*soft ionization*), np. jonizacja przez desorpcję polem (*field desorption*, FD), bombardowanie szybkimi atomami (*fast atom bombardment*, FAB) i  $^{252}\text{Cd}$ -PD (*californium plasma desorption*). Znana była też, wprowadzona w końcu lat 1960-tych, metoda desorpcji laserowej (*laser desorption ionization*, LDI)<sup>1</sup>, ale znajdowała ona zastosowanie głównie do niskocząsteczkowych soli organicznych<sup>2</sup> i cząsteczek, absorbujących silnie promieniowanie lasera, a zawodziła dla biomolekuł o masach cząsteczkowych, przekraczających  $10^3$  Da. Przełomem było wprowadzenie desorpcji laserowej, wspomaganą matrycą. Użycie odpowiednich matryc pozwoliło na analizowanie cząsteczek o masach kilkuset tysięcy, a nawet miliona, Da.

## Jonizacja przez desorpcję laserową (*laser desorption ionization, LDI*)

Technika LDI, polegająca na bombardowaniu powierzchni próbki stałej impulsami lasera o energii  $10^6 - 10^{10}$  W  $\text{cm}^{-2}$ , umożliwia otrzymanie jonów w fazie gazowej. Impuls laserowy jest ogniskowany na małej, rzędu  $10^{-3} - 10^{-4}$   $\text{cm}^2$ , powierzchni próbki (plamce, ang. *spot*), co powoduje wyrzucenie nad powierzchnię mieszaniny jonów i cząsteczek obojętnych, tworzących tzw. „obłok plazmowy” (*plasma plume*) (Rys.1). Jony i cząsteczki w obłoku znajdują się blisko siebie, co umożliwia wzajemne reakcje pomiędzy nimi, między innymi przeniesienie ładunku.



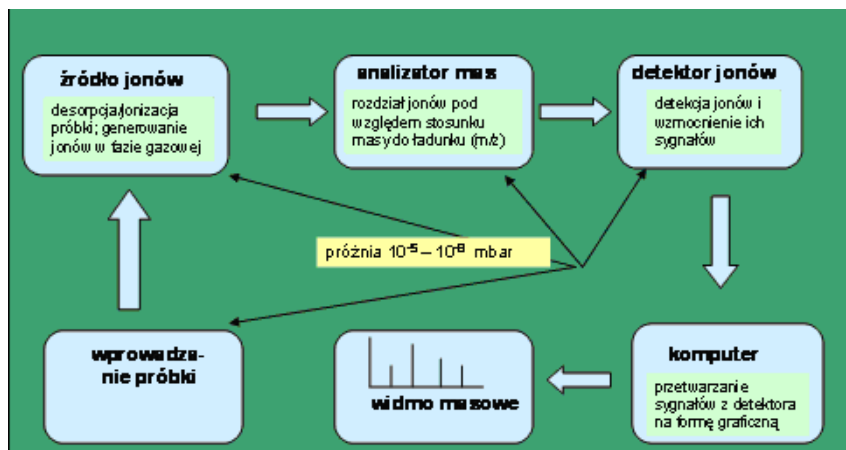
Rysunek 1. Tworzenie obłoku plazmowego nad powierzchnią próbki(LDI).

Metoda LDI – jonizacji laserowej bez użycia matrycy - znalazła zastosowanie do badań powierzchni, np. inkluzji w minerałach, do analizy soli organicznych i nieorganicznych<sup>3</sup>, do cząsteczek z układem kilku sprzężonych wiązań  $\pi^4$ , porfiryn<sup>5</sup>, polimerów syntetycznych, absorbujących promieniowanie UV<sup>6</sup>, niektórych barwników organicznych<sup>7</sup>. Technika ta, historycznie wcześniejsza od jonizacji przez desorpcję laserową wspomaganą matrycą, jest w zasadzie prekursorem MALDI i opiera się na tych samych podstawach, jednak zakres jej stosowalności jest znacznie mniejszy i ogranicza się do stosunkowo małych cząsteczek.

## Spektrometry MALDI-MS

Budowa spektrometru mas do pomiarów MALDI odpowiada schematowi ogólnemu spektrometru MS (jak na Rys.2.), gdzie źródłem jonów jest komora próżniowa, zawierająca płytkę (*MALDI target*) z naniesioną mieszaniną próbki

z matrycą, bombardowaną impulsami lasera, a jako analizator mas przeważnie stosuje się analizator czasu przelotu (*time-of-flight, TOF*).



Rysunek 2. Schemat blokowy spektrometru mas

Obecnie istnieje wiele komercyjnie dostępnych na rynku aparatów MALDI-MS, wyposażonych w przyjazne dla użytkownika oprogramowanie użytkowe, najnowocześniejsze typy lasera, łączące zalety laserów azotowych i YAG, przystawki udoskonalające urządzenie, jak automatyczne pobieranie próbek czy rozpoznawanie płytek poprzez kody paskowe, opcje panoramiczne skupiania zakresu mas (poprawy rozdzielczości), możliwość „czyszczenia” widma z jonów tła i wiele innych. Stanowią one cenne narzędzie dla genomiki, proteomiki, chemii polimerów i innych makrocząsteczek, badania biomarkerów, identyfikacji mikroorganizmów oraz dla chemii supramolekularnej.

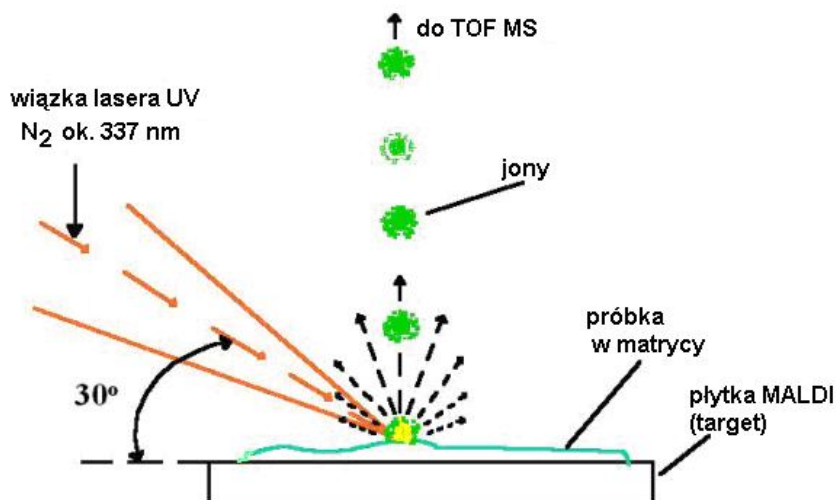
Rys.3. przedstawia zdjęcie aparatu MALDI-TOF firmy Bruker Daltonics<sup>8</sup>:

### Źródła jonów w LDI i MALDI

Źródło jonów jest to urządzenie, w którym następuje jonizacja próbki (przy użyciu różnych technik) analizowanej substancji wraz z przeniesieniem powstałych jonów do fazy gazowej. W technikach desorpcji/jonizacji laserowej źródło jonów stanowi komora próżniowa (Rys. 5.), do której wprowadza się próbkę, bombardowaną następnie promieniowaniem lasera. W typowym źródle jonów MALDI stosuje się próżnię poniżej  $10^{-6}$  mbar. Istnieje też technika pomiaru MALDI pod ciśnieniem atmosferycznym (AP MALDI, *atmospheric pressure MALDI*)<sup>9</sup>, z użyciem lasera podczerwonego i możliwością eliminacji matrycy (matrycę może stanowić np. roztwór wodny).

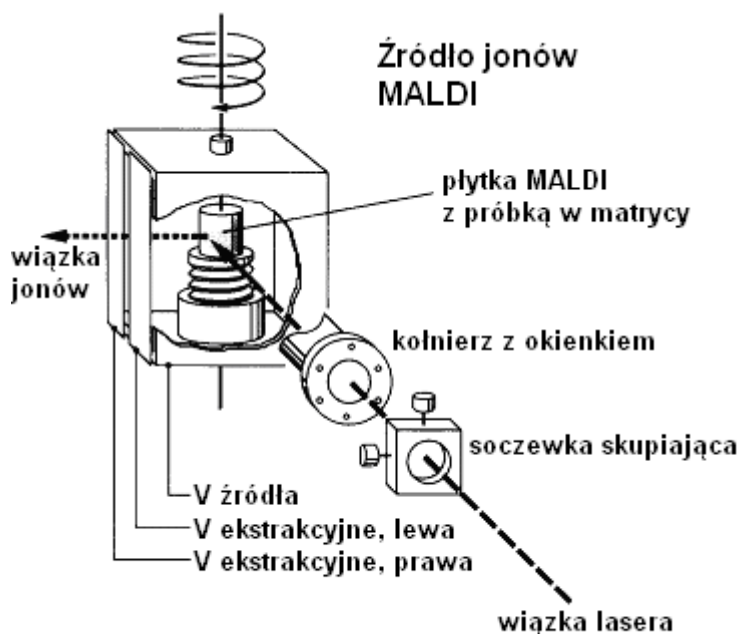


Rysunek 3. Aparat MALDI-TOF BrukerBiflex III (Bruker Daltonics)



Rysunek 4. Jonizacja przez desorpcję laserową w matrycy (MALDI) – zasada działania [według <sup>11c</sup>].

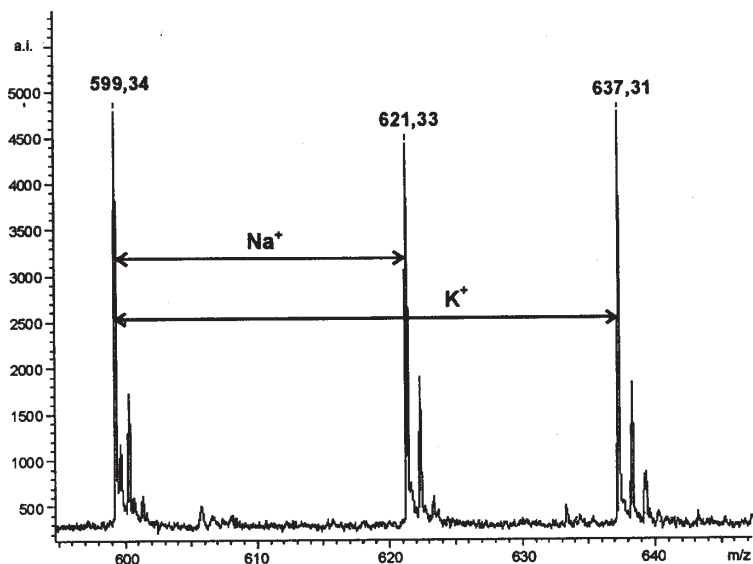
W technice MALDI MS próbkę poddaje się współkrystalizacji (*co-crystallization*) z nadmiarem niskocząsteczkowej substancji, dobrze absorbującej promieniowanie lasera (matrycą). Stosunek molowy matrycy do analitu, zależnie od rodzaju i wielkości cząsteczek substancji analizowanej, powinien wynosić od 500:1 do 10<sup>6</sup>:1. Podczas współkrystalizacji cząsteczki próbki zostają rozmieszczone równomiernie pomiędzy cząsteczkami matrycy, co chroni molekuly analitu przed rozpadem pod wpływem lasera i zapobiega tworzeniu agregatów. Pulsująca wiązka lasera dostarcza energii do matrycy, która częściowo odparowuje, porywając z sobą cząsteczki analitu do fazy gazowej i przekazując im ładunek. Powstałe jony poddawane są ekstrakcji przez przyłożone pole elektryczne (różnicę potencjałów). Stosuje się wielokrotne impulsy lasera dla poprawy kształtu pików i stosunku sygnału do szumu (*signal-to-noise ratio*), a tym samym dla zwiększenia dokładności oznaczeń.



Rysunek 5. Źródło jonów MALDI – schemat<sup>10</sup>. Wiązka laserowa uderza w próbkę na płytce pod kątem (30-45 stopni) do powierzchni. Płytkę jest obracana i przesuwana tak, by każdy impuls lasera trafiał na świeżą próbkę. Jony, opuszczające powierzchnię płytki przechodzą przez szczelinę ekstrakcyjną, są przyspieszane i trafiają do analizatora.

## Tworzenie jonów w MALDI

Podczas napromieniowania laserem badanej próbki matryca absorbuje energię i przekazuje ją, wraz z transferem części ładunku, do cząsteczek analitu. Obserwowane są jony quasi-molekularne, np. protonowane  $[M+H]^+$ , kationizowane jonami sodu  $[M+Na]^+$  lub potasu  $[M+K]^+$  lub deprotonowane  $[M-H]^-$ . Najczęściej w widmach MALDI obecne są jony pojedynczo naładowane, chociaż wielokrotnie naładowane  $[M+nH]^{n+}$  pojawiają się również, zależnie od rodzaju matrycy, energii lasera i użytego napięcia. Wszystkie uprzednio wymienione jony są parzystoelektronowe (mają sparowane elektrony); kationorodniki i anionorodniki (jony nieparzystoelektronowe) występują rzadko, chociaż w przypadku stabilnych cząsteczek też mogą się pojawiać. Przykładowe widmo MALDI peptydu o masie 598 przedstawia Rys.6. (widoczny jon M protonowany, sodowany i potasowany).

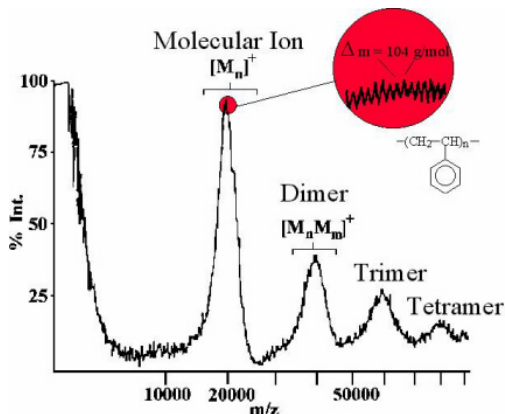


Rysunek 6. Widmo MALDI peptydu (zakres od 595 do 647 m/z), na którym widać jon quasi-molekularny  $[M+H]^+$  m/z 599,34, addukt sodowy  $[M+Na]^+$  m/z 621,33 i potasowy  $[M+K]^+$  m/z 637,31<sup>11</sup>.

Obecność klasterów typu  $[nM+H]^+$  (dimerów, trimerów i tetramerów) pokazano na widmie polistyrenu o masie cząsteczkowej MW = 20 000 (wyznaczonej metodą chromatografii żelowej) – Rys. 7. Jest to rzadki przypadek zastosowania do MALDI matrycy ciekłej, którą stanowił tu eter 2-nitrofenylo-oktylowy (bar-



dzo lepka ciecz), gdyż użycie typowych matryc krystalicznych (np. 2,5-DHB, patrz Tabela 2) prowadziło do separacji cząsteczek matrycy i polimeru. Próby aplikacji innych matryc stałych (o złej mieszalności z polimerem) prowadziły albo do destrukcji cząsteczek analitu (fragmentacji) albo do zbyt słabej jonizacji, poniżej progu detekcji. Zastosowano dodatek soli kationizującej –  $\text{CF}_3\text{COO}^- \text{Ag}^+$ . Obserwuje się spadek intensywności jonów w kolejności:  $M > 2M > 3M > 4M$ <sup>64</sup>.



Rysunek 7. Widmo MALDI polistyrenu o  $MW = 20000$ ; matryca: eter 2-nitrofenylo-oktylowy z dodatkiem trifluorooctanu srebra<sup>60</sup>.

Istnieją różne opinie co do miejsca i mechanizmu tworzenia jonów w technice MALDI, ponieważ na podstawie wyników eksperymentalnych wiadomo, że nie jest to proces jednorodny<sup>12</sup>. Jedno z często stawianych pytań to: „Czy jonizacja następuje już w matrycy, czy też po desorpcji cząsteczki?”. Niskie pH roztworu matryca-analit wpływa pozytywnie na uzysk jonów w przypadku peptydów, co świadczy, że decydującą rolę ma tu desorpcja jonów protonowanych  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ; podobna sytuacja ma miejsce w przypadku jonów kationizowanych  $[\text{M}+\text{Met}]^+$  (gdzie Met - kation metalu alkalicznego) dla związków, zawierających liczne atomy tlenu. Jednakże nie można wykluczyć procesu jonizacji w fazie gazowej, gdyż takie jony mogą się tworzyć również we wstępnie wytworzonym „obłoku plazmowym”, tuż nad powierzchnią próbki<sup>13</sup>. Uważa się<sup>14</sup>, że duże cząsteczki, typowe analizy MALDI, wymagają inkorporacji w kryształy matrycy, by mogły być wykryte tą metodą, natomiast analizy o małych, obojętnych cząsteczkach mogą ulegać kationizacji w fazie gazowej.

Istnieje też możliwość jonizacji cząsteczek analitu drogą przeniesienia protonu poprzez stany wzbudzone cząsteczek matrycy<sup>15</sup> (np. w przypadku matrycy,

które nie są kwasami karboksylowymi) oraz bezpośrednia fotojonizacja (w przypadku analitów, silnie absorbujących promieniowanie UV). Fotojonizacja analitu prowadzi do wytworzenia kationorodników  $M^+$  wskutek usunięcia z cząsteczki jednego elektronu. Niekiedy obserwuje się również obecność w widmie MALDI anionorodników,  $M^-$ , które wskazują na proces wychwytu elektronów przez cząsteczkę analitu w fazie gazowej. Który z procesów – fotojonizacji, przeniesienia ładunku czy wychwytu elektronów – jest dominujący, zależy od kombinacji składu matrycy, analitu, ewentualnie substancji dodatkowych (domieszek) i zanieczyszczeń.

Rodzaj tworzących się jonów w MALDI zależy w znacznym stopniu od polarności substancji badanej oraz od jej energii jonizacji, wpływ ma również matryca, obecność jonów metali i zanieczyszczenia. Zestawienie jonów, powstających podczas desorpcji/ionizacji laserowej (LDI i MALDI) zawiera tabela 1<sup>14</sup>.

Tabela 1. Jony tworzące się w MALDI i LDI (Ma oznacza matrycę, Met – metal)<sup>14</sup>

Anality	Jony dodatnie	Jony ujemne
niepolarne	$M^+$	$M^-$
średnio polarne	$M^+$ i/lub $[M+H]^+$ , $[M+Met]^+$ , {klastery $[2M]^+$ i/lub $[2M+H]^+$ , $[2M+Met]^+$ addukty $[M+Ma+H]^+$ , $[M+Ma+Met]^+$ } - <i>rzadko występujące</i>	$M^-$ i/lub $[M-H]^-$ , {klastery $[2M]^-$ i/lub $[2M-H]^-$ , addukty $[M+Ma]^-$ , $[M+Ma-H]^-$ } - <i>rzadko występujące</i>
polarne	$[M+H]^+$ , $[M+Met]^+$ , wymiana $[M-H_n+Met_{n+1}]^+$ $[M+2H]^{2+}$ , $[M+2Met]^{2+}$ , {klastery $[nM+H]^+$ , $[nM+Met]^+$ , addukty $[M+Ma+H]^+$ , $[M+Ma+Met]^+$ } - <i>rzadko występujące</i>	$[M-H]^-$ wymiana $[M-H_n+Met_{n+1}]^-$ {klastery $[nM-H]^-$ addukty $[M+Ma-H]^-$ } - <i>rzadko występujące</i>
jonowe (składające się z kationu $C^+$ i anionu $A^-$ )	$C^+$ , $[C_n+A_{n-1}]^+$ , $[CA]^+$	$A^-$ , $[C_{n-1}+A_n]^-$ , $[CA]^-$

### Analizatory czasu przelotu, TOF

Zwykle w technice MALDI stosowane są spektrometry masowe z analizatorem czasu przelotu (*time-of-flight mass spectrometer*, TOF), głównie wskutek dużego zakresu masy. Pomiar TOF są również korzystne ze względu na proces jonizacji w MALDI, ponieważ laser działa w trybie impulsowym („strzałów”) a nie w trybie ciągłym. W użyciu są dwa typy analizatorów TOF – linearne (liniowe) i reflektromowe (z reflektorem).

W linearnym aparacie TOF cząstki wyemitowane z próbki uzyskują taką

samą translacyjną energię kinetyczną, gdyż są poddawane takiej samej różnicy potencjałów. Jony dryfują w próżniowej rurze wolnej od pola w stronę detektora, pokonując taką samą drogę  $d$ . Jony mniejsze (lżejsze) docierają do detektora w czasie krótszym niż jony o większej masie (cięższe). Detektor rejestruje czas przelotu jonu przez rurę, wykrywając jon w postaci sygnału elektrycznego. Sygnały, uzyskane z kolejnych impulsów lasera są sumowane i przetwarzane na widmo masowe TOF, tj. zapis sygnałów detektora w funkcji czasu. Czas  $t$  przelotu jonu o masie  $m$  i ładunku  $z$ , potrzebny na pokonanie odległości do detektora, zależy od stosunku  $m/z$ .

$$t \sim (m/z)^{1/2}$$

Zależność ta służy do obliczenia masy jonów zgodnie z poniższymi wzorami:

Jony, wystrzeliwane ze źródła jonów impulsami lasera, są przyspieszane w polu elektrycznym za pomocą różnicy potencjałów  $V_s$  i przebywają drogę  $d$  do detektora. Energia kinetyczna jonu o masie  $m$  i ładunku całkowitym  $q = ze$  wynosi:

$$\frac{mv^2}{2} = qV_s, \quad [1]$$

$$\text{prędkość jonu } v = \frac{d}{t}, \quad \text{więc } t = \frac{d}{v}, \quad \text{czyli } t^2 = \frac{d^2}{v^2} \quad [2]$$

Z równania [1] wyznaczamy  $v^2$  i podstawiamy do wzoru [2]:

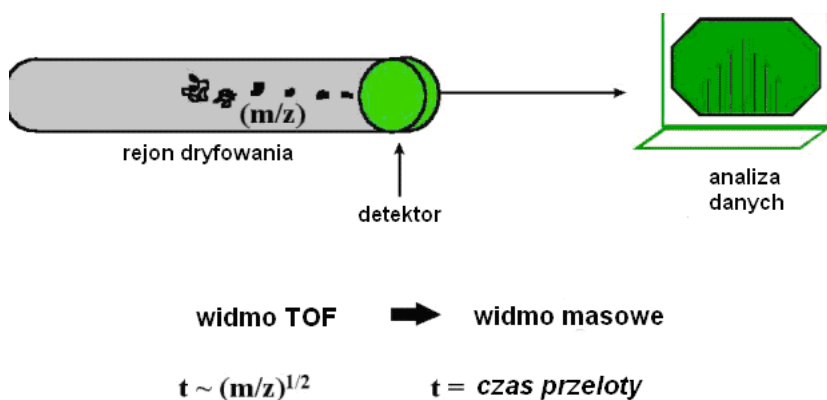
$$v^2 = \frac{2qV_s}{m} \quad [3]$$

$$t^2 = \frac{md^2}{2qV_s} = \frac{md^2}{2zeV_s} = \frac{m}{z} \left( \frac{d^2}{2eV_s} \right) \quad [4]$$

Uwzględniając, że wartość w nawiasie jest stałą, czas przelotu jest proporcjonalny do stosunku  $m/z$ .

$$t^2 \sim \frac{m}{z} \quad \text{czyli} \quad t \sim \sqrt{\frac{m}{z}}$$

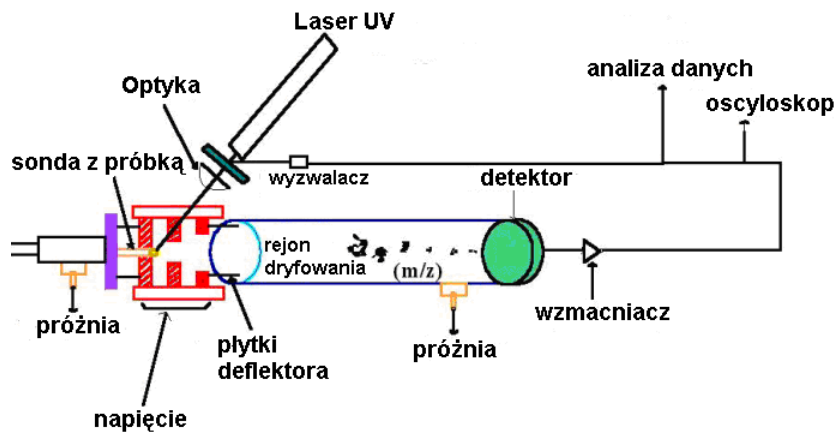
Uzyskane czasy przelotów można przeliczyć na wartości  $m/z$ , przekształcając w ten sposób widmo TOF w standardowe widmo masowe (Rys. 8.), gdzie na osi odciętych jest stosunek  $m/z$ .



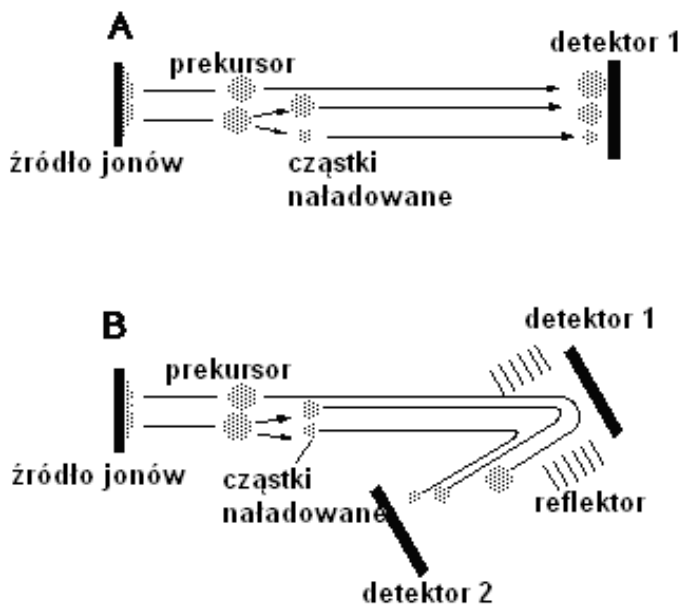
Rysunek 8. Przekształcanie widma TOF w standardowe widmo masowe<sup>16</sup>.

Aparaty z analizatorem liniowym TOF nie mają zwykle dużej rozdzielczości, tzn. przy dużych masach cząsteczkowych trudno jest rozróżnić jony o małej różnicy masy (rzędu kilku Da), nie da się także zaobserwować pików izotopowych. Spowodowane jest to pewnym rozrzutem początkowej energii kinetycznej jonów o danej masie przy napięciu przyspieszającym  $V_{acc}$ , co powoduje minimalne różnice w ich czasie przelotu i poszerzenie na widmie piku, odpowiadającego danemu jonowi.

Reflektrowe aparaty MALDI-TOF są zwykle wyposażone w „zwierciadło jonów” (reflektor, zwany też reflektorem, RF), odbijające wiązkę jonów w polu elektrycznym, w ten sposób podwajając drogę przelotu jonów i zwiększając rozdzielczość. Różnicę w działaniu analizatora liniowego i z reflektorem przedstawia Rys.10.



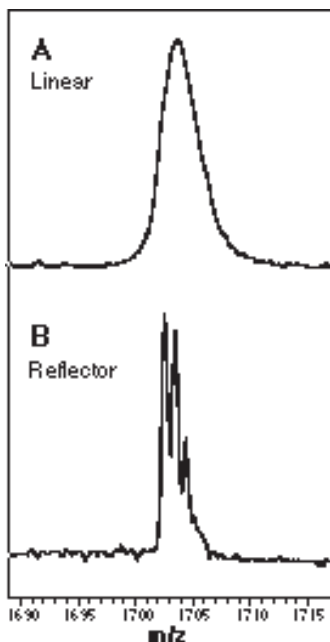
Rysunek 9. Ogólny schemat spektrometru MALDI-TOF<sup>16</sup>



Rysunek 10. Schemat działania analizatora TOF: (A) – liniowego, (B) – z reflektorem<sup>17</sup>.

W reflektornowym instrumencie TOF rozrzut energii, powstający przy akceleracji jonów, jest korygowany przez reflektor, który spowalnia jony aż do ich zatrzymania i zwraca w przeciwnym kierunku, w stronę drugiego detektora (Rys.10). Napięcie reflektora jest nieco wyższe od napięcia przyspieszającego źródła. Jony o nieco niższej energii kinetycznej od pozostałych nie docierają tak blisko zwierciadła jonów, są zwracane wcześniej i wskutek tego, że ich droga do pokonania jest krótsza, doganiają jony o pełnej energii kinetycznej na drodze do drugiego detektora. Jony o wyższej energii kinetycznej docierają bliżej detektora i ulegają odbiciu nieco później (droga nieco się wydłuża), przez co ich czas przelotu wyrównuje się z czasem przelotu pozostałych jonów. W rezultacie czas przelotu wszystkich jonów o jednakowej wartości stosunku  $m/z$  ulega wyrównaniu i otrzymujemy ostry sygnał na widmie masowym.

Rys. 11. przedstawia zakres molekularny widma MALDI syntetycznego peptydu o sekwencji TRDIYETDpYYRK (wg jednoliterowego kodu aminokwasów) o masie monoizotopowej  $M_r = 1701,8$ , zapisanego w trybie dodatnim z matrycą CHCA z analizatorem TOF linearnym (A) i reflektornowym (B)<sup>17</sup>.



Rysunek 11. Widma MALDI peptydu o masie monoizotopowej  $M_r = 1701,8$  (zakres jonu molekularnego) z analizatorem TOF linearnym (A) i reflektornowym (B)<sup>17</sup>.

Łatwo zauważyć znacznie większą rozdzielczość w przypadku widma B (na widmie B widać rozkład izotopowy piku, pochodzący od izotopów C, H, N, O i P, co pozwala na ustalenie składu elementarnego peptydu).

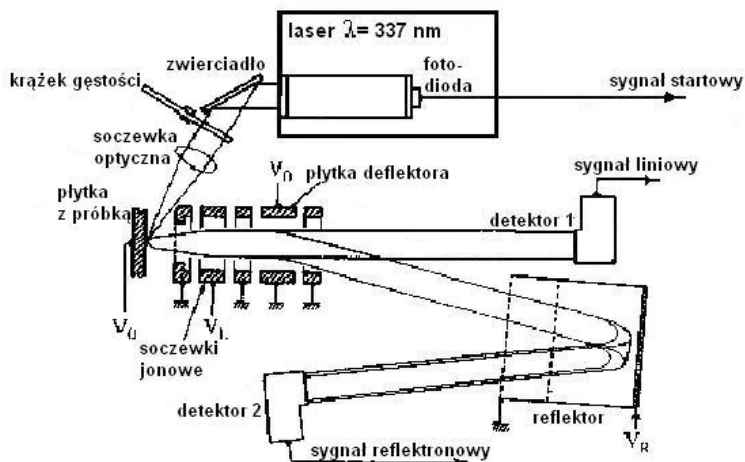
Obecnie komercyjne aparaty reflektromowe TOF osiągają rozdzielczość  $m/\Delta m$  ponad 20000 FWHM (*full-width half-minimum*), gdzie  $\Delta m$  jest zdefiniowane jako szerokość piku przy 50% jego wysokości.

Produkowane są również instrumenty hybrydowe, wyposażone w dwa analizatory – kwadrupol i analizator czasu przelotu (Q-TOF).

Przykład aparatu MALDI Kratos z reflektorem przedstawia Rys.12.

### Spektrometr masowy Kratos MALDI 4

laser: azotowy (N <sub>2</sub> )	czas trwania impulsu lasera: ok. 3 ns
długość fali: UV ( $\lambda = 337$ nm)	średnica wiązki: 100 $\mu$ m



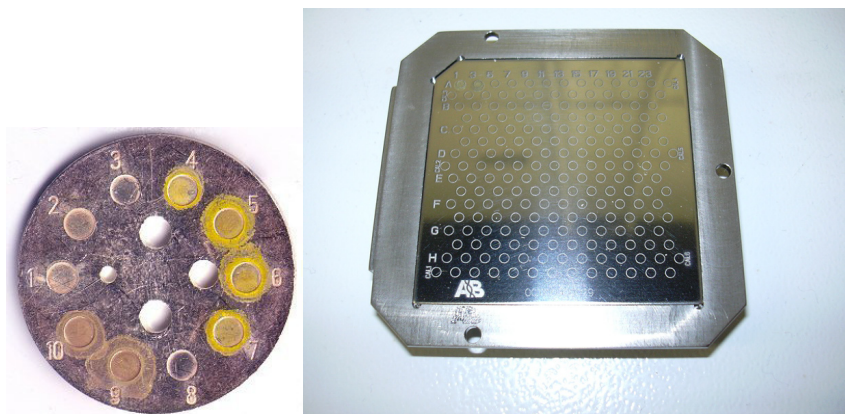
Rysunek 12. Schemat aparatu Kratos MALDI 4.

### Płytki MALDI

(MALDI target, Sample target for matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry)

Produkowane są różnego rodzaju płytki do nanoszenia próbek MALDI<sup>18</sup>, za pomocą których wprowadza się analizowane substancje do źródła jonów; poniżej – płytka pokryta warstwą srebra (okrągła), zawierająca 10 punktów pomiarowych (Bruker) i standardowa, stalowa płytka prostokątna na 96 punktów pomiarowych (Waters Micromass) (Rys.13.).

W użyciu są również płytki jednorazowe, np. typu AnchorChip. Firma Bruker Daltonics produkuje płytki MALDI PAC<sup>19</sup> (ang. *Prespotted AnchorChip*<sup>TM</sup>, Rys. 14.), z fabrycznie naniesioną matrycą CHCA, zawierające 384 punkty na próbki i 96 punktów kalibracyjnych. Płytki te mają punkt nałożenia próbki pokryty warstwą hydrofilową, a otoczenie tego punktu jest pokryte hydrofobowo, co powoduje, że naniesiona kropla kurczy się i próbka jest zagęszczana na bardzo małej powierzchni hydrofilowej o średnicy 0,1-0,5 mm. Zaletą płytek jednorazowych jest unikanie kontaminacji śladami poprzedniej próbki czy tzw. efektu pamięci, możliwość przechowywania próbek przez kilka miesięcy i zwiększenie czułości pomiaru w stosunku do płytek stalowych wielokrotnego użytku, nawet 100-krotnie.



Rysunek 13. Płytki MALDI (MALDI targets) do nanoszenia próbek. Widoczne w formie kółek (wells, studzienki) miejsca nanoszenia analitu i matrycy.



Rysunek 14. Płytki Prespotted AnchorChip<sup>TM</sup> z adapterem MTP i z obudową.



## Matryce

W technice MALDI związek badany analizuje się w matrycy (ang. *matrix*) organicznej, przeważnie stałej. W nielicznych wypadkach jako matrycę używa się lekkich cieczy, np. gliceryny. Użycie matrycy ma na celu ochronę makrocząsteczki przed zniszczeniem (rozpadem) pod wpływem bezpośredniej wiązki lasera oraz ułatwienie jej odparowania i jonizacji. Inna rola matrycy polega na separowaniu cząsteczek analitu od siebie, aby utrudnić ich agregację. Niektórzy autorzy sugerują, że konieczna jest inkorporacja analitu w kryształ matrycy<sup>20</sup> i utworzenie roztworu stałego<sup>21</sup> dla uzyskania dobrych wyników analizy MALDI, ale istnieją przypadki, w których inkorporacja nie zachodzi, a mimo to uzyskuje się dobrą desorpcję jonów, np. dla cytochromu C przy użyciu matrycy 2,6-DHB (kwasu 2,6-dihydroksybenzoesowego)<sup>22</sup>. Alternatywą dla inkorporacji jest asocjacja cząsteczek analitu do powierzchni krystalicznej matrycy, czyli oddziaływania powierzchniowe. Mechanizm oddziaływania analitu i matrycy jest dyskutowany<sup>12</sup>, zależnie od rodzaju badanych związków, użytej matrycy i zastosowanej metody przygotowania próbki.

Dobra matryca powinna mieć zdolność intensywnego pochłaniania promieniowania lasera (zwykle w zakresie UV), a następnie przekazywania pochłoniętej energii cząsteczkom substancji analizowanej.

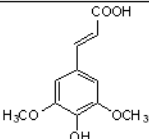
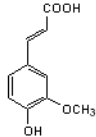
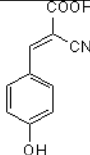
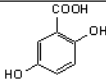
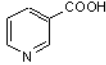
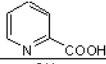
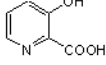
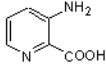
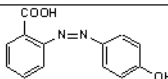

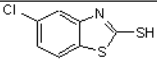
Pożądanymi cechami matrycy MALDI są:

- a) dość niska masa cząsteczkowa, co sprzyja łatwemu odparowaniu, ale wystarczająco duża, by odparowanie nie nastąpiło przed pomiarem, np. w czasie przygotowywania próbki;
- b) rozpuszczalność w rozpuszczalniku kompatybilnym z analitem;
- c) kwasowość, by ułatwić protonowanie cząsteczek analitu;
- d) obecność grup polarnych (hydrofilowych) w cząsteczce, co umożliwia rozpuszczanie matrycy w roztworach wodnych;
- e) stabilność w warunkach wysokiej próżni;
- f) wspomaganie jonizacji analitu;
- f) zdolność intensywnej absorpcji promieniowania UV lasera; zwykle wymóg ten spełnia związek, posiadający układ sprzężonych wiązań podwójnych C=C (dlatego często matrycami są pochodne aromatycznych kwasów karboksylowych, często nienasyconych, np. kwasu cynamonowego).

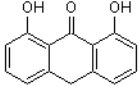
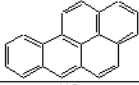
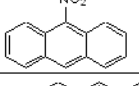
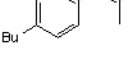
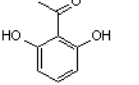
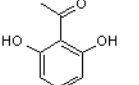
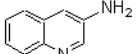
Listę często stosowanych matryc UV MALDI przedstawia tabela 2.

Wśród rzadziej stosowanych matryc można wymienić kwas *all-trans* retinowy<sup>23</sup> (*all-trans retinoic acid*, ATRA, tretinoina, kwas witaminy A) i matryce na bazie fulerenów<sup>24</sup>.

Tabela 2. Najczęściej stosowane matryce MALDI

Związek	Wzór strukturalny	Inne nazwy	Rozpuszczalnik	Długość fali [nm]	Zastosowanie	Lit.
Kwas 3,5-dimetoksy-4-hydroksycynamonowy		kwas synapinowy sinapic acid, sinapinic acid, SA, SINA	Acetonitryl, woda, chloroform, aceton	337, 355, 266	Proteiny, peptydy, lipidy	25, 26
Kwas 4-hydroksy-3-metoksy-cynamonowy		Ferulic acid	Acetonitryl, woda, propanol	337, 355, 266	proteiny	1, 2
Kwas α-cyano-4-hydroksycynamonowy		CHCA, αCHCA	Acetonitryl, woda, etanol, aceton	337, 355	peptydy, lipidy, nukleotydy	27
Kwas 2,5-dihydroksybenzoesowy		2,5-DHB, gentisic acid	Acetonitryl, woda, chloroform, aceton metanol	337, 355, 266	peptydy, nukleotydy, oligonukleotydy, oligosacharydy	28
Kwas nikotynowy		NA		266	oligonukleotydy,	29
Kwas pikolinowy		PA	etanol	266	oligonukleotydy	30
Kwas 3-hydroksypikolinowy		HPA	etanol	337, 355	oligonukleotydy, proteiny	31
Kwas 3-aminopikolinowy		3-APA		266	Proteiny, DNA, biopolimery	32
Kwas 2-(4-hydroksyfenylazo)benzoesowy		HABA			Glikolipidy, peptydy, proteiny	
2-merkaptobenzotiazol		MBT			proteiny	33
5-chloro-2-merkaptobenzotiazol		CMBT	H <sub>2</sub> O/EtOH/ TFA 1:1:1		Proteiny, peptydy	8

Podstawy techniki MALDI

Związek	Wzór strukturalny	Inne nazwy	Rozpuszczalnik	Długość fali [nm]	Zastosowanie	Lit.
ditranol		DIT			Polimery syntetyczne	
Benzo[a]pyren						
9-nitro-antracen		9-NA				
2-[(2-E)-3-(4-tert-butylfenylo)-2-metyloprop-2-enylideno]-malonitryl		DCTB				
2,6-dihydroksy-acetofenon		-				
2,4,6-trihydroksy-acetofenon		THAP			Oligonukleotydy	34
3-amino-chinolina		AQ			Cukry, peptydy, polimery	8

Dobór matrycy nie zawsze jest łatwy i najczęściej dokonuje się go metodą prób i błędów. Nie ma ścisłej relacji między budową i właściwościami fizykochemicznymi matrycy a budową i składem analitu, dlatego wybór wymaga eksperymentowania z różnymi związkami. Pożądana jest obecność specyficznych grup funkcyjnych, takich jak  $-\text{COOH}$  lub też  $-\text{OH}$  dla ułatwienia protonowania analitu<sup>31</sup>. Jednakże badania procesów protonowania białek i polimerów przy pomocy znakowania deuterem<sup>35</sup> wykazały, że obecność łatwo wymienialnego protonu z grup  $-\text{COOH}$  lub  $-\text{OH}$  matrycy jest istotna, ale nie zawsze konieczna dla uzyskania jonów quasi-molekularnych  $[\text{M}+\text{H}]^+$  analitu. Przy użyciu matryc, takich jak nitroantracen, pozbawionych kwasowych grup funkcyjnych, w protonowaniu biorą udział protony, pochodzące z rozpuszczalnika (np. acetonu). Dla zrozumienia, dlaczego niektóre z matryc faworyzują transfer protonu bardziej niż inne, konieczna jest dogłębniejsza znajomość powinowactwa do protonu (*proton affinities*) pospolitych matryc MALDI<sup>36</sup>.

## Lasery

Zarówno w LDI, jak i w MALDI, warstwa substancji stałej zostaje napromieniowana wiązką światła lasera, przy czym pochłonięte promieniowanie powoduje odparowanie i jonizację substancji. Najczęściej używane są lasery UV, ale stosowane są też metody IR-MALDI. W powszechnym użyciu są lasery azotowe, o długości fali  $\lambda = 337$  nm, ekscymerowe ( $\lambda = 193, 248, 308$  i  $351$  nm), szybkozmiennne (Q-switched), o częstotliwości trzy- i czterokrotnej, neodymowe i erbowe na kryształach YAG (YAG: *yttrium aluminium garnet*, granat itrowo-glinowy) oraz oparte na ditlenku węgla (TEA – CO<sub>2</sub>). Zestawienie najpopularniejszych laserów stosowanych w technice MALDI-MS zebrano w tabeli 3.

Tabela 3. Lasery, stosowane w technice MALDI-MS:

Typ lasera	Długość fali $\lambda$ [nm]	Literatura
azotowy	337	37
Nd: YAG	355, 266	38
Er: YAG	2940	39
CO <sub>2</sub>	10 600	40

Impuls laserowy skupiany jest na małej plamce (spot)<sup>37</sup>, a intensywność promieniowania jest dostrajana indywidualnie dla każdego pomiaru, za pomocą tłumika (attenuatora), np. obrotowego filtra UV, ustawionego na drodze optycznej lasera. Filtr ten ma zmienną transmitancję – od bliskiej 100% do około 1%. Czas trwania impulsu lasera wynosi 3-10 ns w przypadku laserów UV oraz 6-200 ns dla laserów podczerwonych. Zaletami działania krótkich impulsów laserowych są wywoływanie szybkiej ablacji warstwy próbki i jednocześnie unikanie degradacji termicznej analitu. Przeważająca większość aparatów UV-MALDI stosuje lasery azotowe (337 nm, 3 ns). W IR-MALDI zastosowanie znajdują lasery na bazie granatu itrowo-glinowego, domieszkowanego neodymem - Nd:YAG (3,27  $\mu\text{m}$ , 3050  $\text{cm}^{-1}$ ) lub lasery CO<sub>2</sub> (10,6  $\mu\text{m}$ ). Widma IR-MALDI wykazują mniejszą rozdzielczość niż UV-MALDI, jednak ta pierwsza technika nadaje się lepiej do analizy polimerów halogenowanych, które pod wpływem lasera UV wykazują intensywną fragmentację<sup>41</sup>. IR-MALDI stosuje się również tam, gdzie korzystna jest głębsza penetracja promieniowania, np. gdy analit jest desorbowany bezpośrednio z płytek chromatograficznych TLC.

Do opisu parametrów lasera stosowane są dwie wielkości:

- fluencja (ang. *fluence*), definiowana jako energia przypadająca na jednostkę powierzchni (w MALDI zazwyczaj w zakresie 10 – 100  $\text{mJ cm}^{-2}$ );
- irradiancja (ang. *irradiance*), definiowana jako iloraz fluencji przez czas trwania impulsu lasera (w MALDI rzędu 10<sup>6</sup> – 10<sup>7</sup>  $\text{W cm}^{-2}$ ).

Poniżej progu irradiancji około 10<sup>6</sup>  $\text{W cm}^{-2}$  nie następuje wytwarzanie jo-

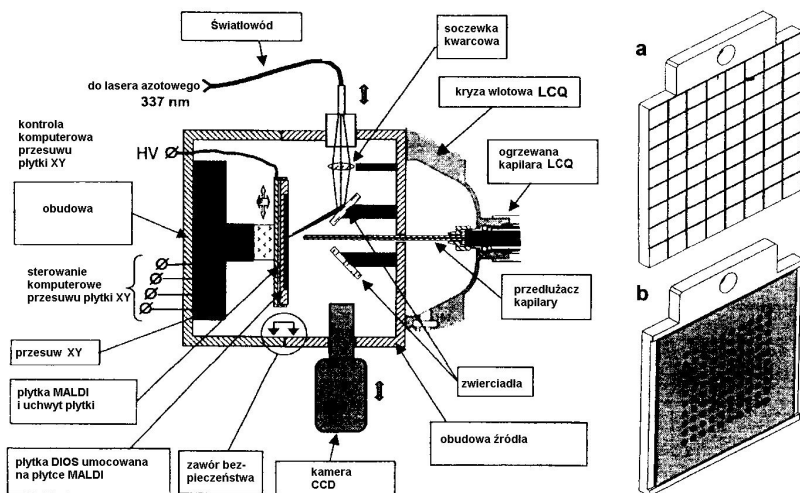
nów. Po przekroczeniu tego progu następuje raptowna jonizacja i pojawiają się – w sposób nieliniowy – jony o wysokiej abundancji.

Dla uzyskania detekcji jonów potrzebne jest również osiągnięcie pewnego progu fluencji lasera. Ta wartość progowa zależy zarówno od rodzaju matrycy jak i stężenia analitu tj. stosunku molowego matryca-analit. Przykładowo dla cytochromu C minimum fluencji progowej występuje przy stosunku matrycy do analitu 4000:1<sup>42</sup>.

## AP-MALDI

Zwykle aparaty MALDI działają w warunkach wysokiej próżni, a wytwarzanie jonów odbywa się przy ciśnieniu 10mTorr lub niższym. Istnieją jednak urządzenia AP-MALDI (*atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption/ionization*), działające pod normalnym ciśnieniem atmosferycznym. W aparatach AP-MALDI proces desorpcji/ionizacji odbywa się w atmosferze suchego, gazowego azotu, a stosowane lasery emitują promieniowanie podczerwone. W tej technice można stosować jako analizatory pułapki jonowe (*ion trap*) i wykonywać eksperymenty MS/MS. Wadą aparatów tego typu jest zmniejszona czułość i ograniczony zakres masy (do 6000 Da) jak również możliwość zachodzenia reakcji ubocznych podczas pomiaru, zaletą natomiast brak konieczności stosowania matrycy i większa tolerancja wahań fluencji lasera.

Schemat budowy źródła jonów AP-MALDI pokazano na Rys. 15.



Rysunek 15. Schemat budowy źródła jonów AP-MALDI z przedłużoną kapilarą; a – płytka MALDI, b – chip DIOS<sup>14</sup>.

## Krótką historia MALDI

W 1985 ukazała się przełomowa praca Karasa, Bachmanna i Hillenkampa<sup>24</sup>, dotycząca laserowej desorpcji związków organicznych, gdzie opisano wprowadzenie matrycy, czyli dodawanego w nadmiarze do próbki dodatkowego związku, który dobrze absorbuje promieniowanie lasera. Autorzy badali wpływ długości fali UV lasera na próg napromieniowania, przy którym wykrywane są specyficzne jony próbki. Poddali oni napromienianiu aminokwasy i dipeptydy nieabsorbujące i absorbujące w 266 nm, przy czym okazało się, że te absorbujące (np. tryptofan) ułatwiają jonizację nieabsorbujących (np. alaniny), przekazując im pochłoniętą energię. Wymienieni badacze wprowadzili wówczas termin „Matrix-assisted laser desorption” (desorpcja laserowa wspomagana matrycą). Wkrótce udało się przy użyciu takiego typu matrycy zjonizować peptydy o większych cząsteczkach, aż do mellityny (2843 Da)<sup>43</sup>, a w 1988 roku Koichi Tanaka z korporacji Shimadzu opublikował zastosowanie jonizacji laserowej do peptydów i polimerów o masach do 100 000 Da<sup>23</sup>. Stosując jako matrycę zawieszinę nanocząstek kobaltu (30 nm) w glicerynie oraz promieniowanie lasera azotowego 337 nm, Tanaka i współpracownicy zjonizowali m. in. karboksypeptydazę-A o masie 34 472 Da. Za wykazanie, że odpowiednia kombinacja matrycy i promieniowania lasera o określonej długości fali może pozwolić na „miękką” jonizację wielkich biomolekuł, takich jak białka, otrzymał Tanaka 1/4 Nagrody Nobla w 2002 roku.

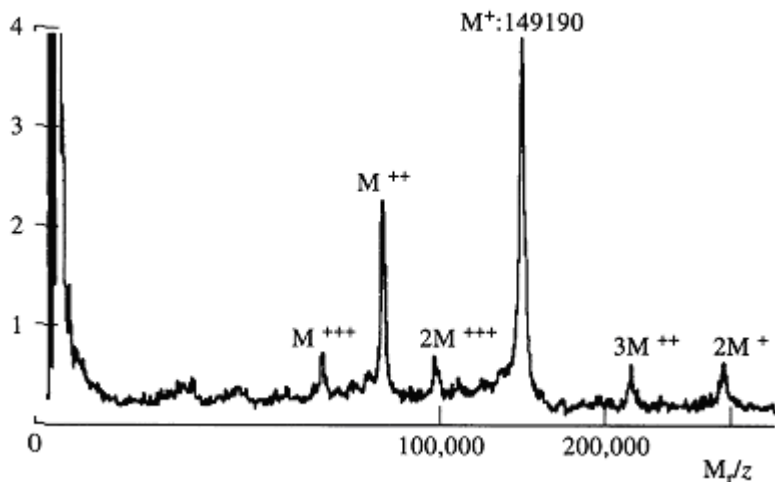
W ostatniej dekadzie XX wieku i ostatnich latach nastąpił burzliwy rozwój metody MALDI, wprowadzono wiele nowych matryc, przeważnie organicznych, m.in. liczne pochodne kwasu cynamonowego (kwas synapinowy, ferulowy i kawowy), pojawiły się łatwo dostępne lasery azotowe i komercyjnie produkowane spektrometry z jonizacją laserową. Dało to pole do wielu zastosowań MALDI w proteomice, chemii polimerów i chemii supramolekularnej.

## Widma MALDI

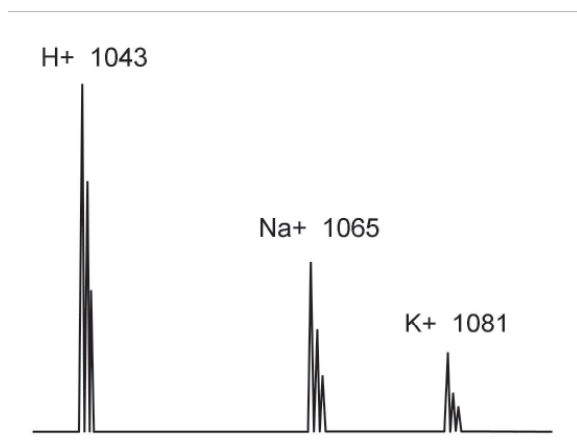
W widmach MALDI występują przede wszystkim pojedynczo naładowane jony quasi-molekularne, ale również jony dimerów i trimerów, jony wielokrotnie naładowane oraz nieliczne jony fragmentacyjne. Rys.16. przedstawia widmo przeciwciała monoklonalnego IgG<sup>44</sup> o masie 149190, na którym widoczne są jony pojedynczo, podwójnie i potrójnie naładowane, dimery (2M) i trimery (3M), w tym również obdarzone ładunkiem wielokrotnym (np. 2M<sup>+++</sup> - dimer trzykrotnie naładowany).

Pseudomolekularnym jonom protonowanym towarzyszą często na widmie MALDI jony kationizowane jonami metali, zwłaszcza sodowane i potasowane. Podobnie jak w przypadku innych widm masowych, podstawowym jonom monoizotopowym towarzyszy zespół pików izotopowych, tworzących charakterystyczny

styczny rozkład izotopowy (obwiednię izotopową) – Rys. 17.



Rysunek 16. Widmo MALDI-TOF przeciwciała monoklonalnego IgG myszy;  $M = 149\,190$ , matryca: kwas nikotynowy,  $\lambda$  lasera = 266 nm.<sup>41</sup>



Rysunek 17. Widmo MALDI peptydu<sup>45</sup> o masie  $M = 1042$ ; na widmie widoczny jon protonowany  $[M+H]^+$   $m/z$  1043, jon  $[M+Na]^+$   $m/z$  1065 i jon  $[M+K]^+$   $m/z$  1081. Każdemu z pików towarzyszy zespół pików izotopowych, różniących się masami kolejno o +1 Da od macierzystego.

## Zastosowania techniki MALDI

Wiele cząsteczek pochodzenia naturalnego, np. biopolimerów jak i syntetycznych makromolekuł organicznych ma masy cząsteczkowe rzędu tysięcy lub dziesiątków tysięcy; należą do nich dendrymery, polimery hiperrozgałęzione („hyperbranched polymers”), katenany i rotaksany oraz inne połączenia. Dla tych związków zawodzi większość technik jonizacji MS (nie udaje się uzyskać jonów molekularnych); natomiast można je analizować techniką MALDI.

### „Fingerprinting” czyli „odcisk palca”

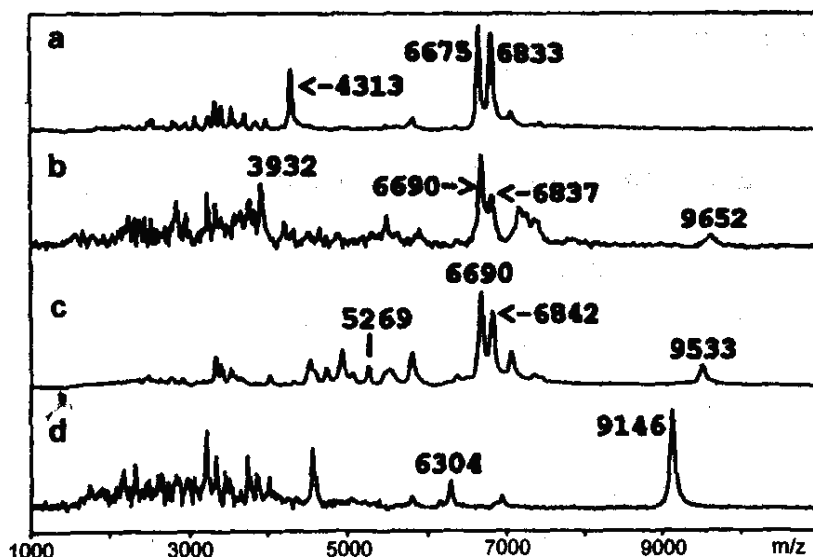
Wielkie, złożone biocząsteczki mają swoje, charakterystyczne dla nich i często niepowtarzalne widma MALDI, które umożliwiają identyfikację danej substancji i odróżnienie jej od innych z danej grupy. Mówimy, że takie widmo stanowi „odcisk palca” (ang. *fingerprint*) badanego związku, czyli posiadając kartotekę takich widm możemy zidentyfikować związek (względnie grupę związków) lub określić jego pochodzenie.

Metoda „fingerprint” ma liczne zastosowania praktyczne. Swoje „odciski palców” mają nie tylko białka, ale i węglowodany, pochodzące z różnych źródeł biologicznych. Oznaczenie składu białek lub pewnej ich frakcji, uzyskanej przy użyciu dobrze zdefiniowanej i powtarzalnej procedury, może służyć do identyfikacji szczepów bakterii<sup>46</sup> lub grzybów<sup>47</sup>, w tym patogennych lub nie, do oceny pochodzenia mleka, z którego sporządzono ser<sup>48</sup> mozzarella (by wykryć podrabiany) (Rys.19. i 20.) lub do sprawdzenia, czy ser owczy nie był fałszowany przez dodatek mleka krowiego<sup>49</sup>. Rys. 18. przedstawia „odciski palców” białek, otrzymanych z różnego rodzaju bakterii *Bacillus*, różniące się w widoczny sposób, co umożliwia ich identyfikację.

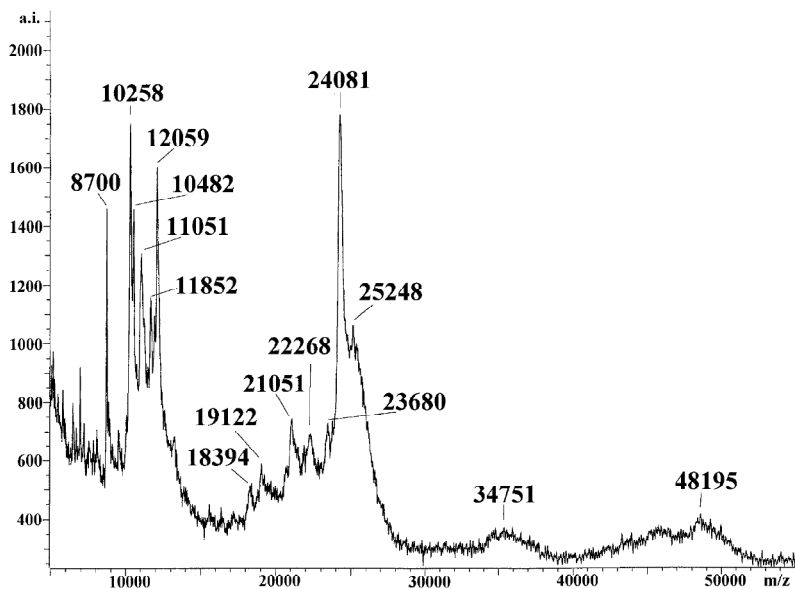
Widma przedstawione na Rys.19. i Rys.20. są przykładem metody „fingerprinting” w badaniach produktów spożywczych, prowadzonych przez Angelettiego<sup>46</sup> i współpracowników. Zastosowali oni technikę spektrometrii mas MALDI do analizy serów, wytwarzanych w włoskich wytwórniach. Ser mozzarella jest markowym włoskim produktem, wytwarzanym z mleka bawolego, odpowiadającego wysokim standardom (zawartość tłuszczu w takim serze jest nie mniejsza niż 52%, a wody nie większa niż 65%). Mozzarellę wytwarza się również z mleka krowiego, ale jej właściwości smakowe i odżywcze są gorsze. Mozzarella „Campana” z mleka bawołu indyjskiego posiada Europejski Certyfikat Jakości 1996 (European Quality Certification), a więc istotne jest kontrolowanie, czy produkt ten nie jest fałszowany przez dodawanie mleka krowiego. Ponieważ profil białkowy mleka krowiego i bawolego jest różny, można się spodziewać, że skład białkowy obu serów też będzie się różnił, co łatwo jest wykryć za pomocą widm MALDI (Rys. 19. i 20. przedstawiają widma jednego i drugiego; widoczna jest ewidentna różnica). Szczegółowa analiza widm pozwa-



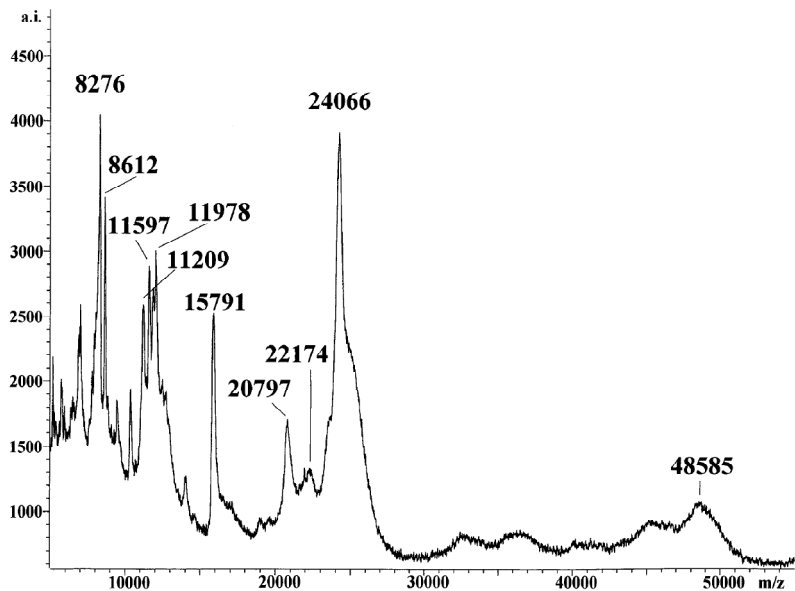
ła na przypisanie poszczególnych pików odpowiednim białkom, np. na widmie sera krowiego (Rys. 19.) pik przy 24 081  $m/z$  odpowiada  $\beta$ -kazeinie, 19 122  $m/z$  –  $\kappa$ -kazeinie, 21 051  $m/z$  –  $\gamma_1$ -kazeinie, 18394  $m/z$  –  $\beta$ -laktoglobulinie, a 23 680  $m/z$  –  $\alpha_{S1}$ -kazeinie; pik przy  $m/z$  22 268 zidentyfikowano jako proteozo-pepton p.p.3, natomiast pik 8 700  $m/z$  należy do nieznannej substancji, ale występuje tylko w produktach z mleka krowiego. Odpowiednio w mozzarelli z mleka bawolego (Rys. 20.) występują piki 20 797  $m/z$  ( $\gamma_1$ -kazeina) i 22 174  $m/z$  (proteozo-pepton p.p.3), brak jest piku  $\beta$ -laktoglobuliny, natomiast występuje pik typowy tylko dla mleka bawolego – przy  $m/z$  15 791, określanymi jako proteina X oraz pik przy  $m/z$  8 276, niezidentyfikowany, ale charakterystyczny dla mleka bawolego i produktów jego przetwarzania. Metoda MALDI/MS pozwala nie tylko na identyfikację, z jakiego mleka wytworzono ser, ale też na określenie ilościowe – jaka ilość mozzarelli krowiej dodano do bawolej (ze stosunku powierzchni pod krzywymi sygnałów  $\alpha_{S1}, \beta, \alpha_{S2}$ -kazein do powierzchni sygnału proteiny X).



Rysunek 18. Widma MALDI ekstraktu białkowego z różnych gatunków bakterii *Bacillus* (matryca –  $\alpha$ -CHCA); (a) – *B. anthracis* (Sterne), (b) – *B. thuringiensis* (4A1), (c) – *B. cereus* (6E1), (d) – *B. subtilis* (3A1).<sup>14</sup>



Rysunek 19. Widmo MALDI sera mozzarella z mleka krowiego<sup>46</sup>



Rysunek 20. Widmo MALDI sera mozzarella z mleka bawołu indyjskiego (water buffalo)

## Metoda PMF, czyli „peptide-mass fingerprinting” („masowy odcisk palca” peptydu) przy pomocy MALDI-MS

Technika MALDI jest szeroko stosowana w proteomice, do identyfikacji białek, izolowanych drogą elektroforezy żelowej SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) i dwuwymiarowej elektroforezy żelowej (*2D-gels*).

Technika analityczna, znana też jako „protein fingerprinting”, rozwinięta w 1993 roku przez kilka grup badawczych niezależnie<sup>50,51,52</sup>. Badane białko jest najpierw rozkładane na mniejsze peptydy, których masy są mierzone przy pomocy spektrometru MALDI-TOF (lub ESI-TOF)<sup>53</sup>. Wyznaczone masy są następnie porównywane komputerowo z bazą danych, zawierającą znane sekwencje białek lub genomów. Istnieją programy komputerowe, które przekładają genom organizmu na proteiny, dokonują (teoretycznie) podziału proteiny na peptydy i obliczają masy dla wszystkich peptydów. Kolejnym etapem jest porównanie mas peptydów, uzyskanych z MALDI nieznannej proteiny z teoretycznie wyliczonymi masami peptydów dla każdego białka, występującego w genomie, a następnie analiza statystyczna wyników i wybór najlepszego dopasowania.

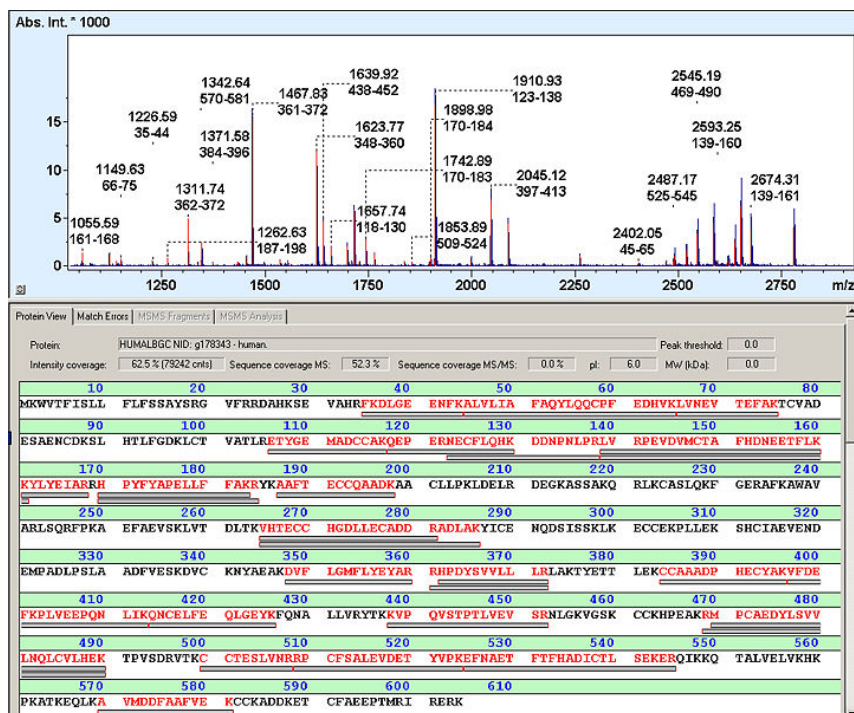
Niedogodnością metody jest fakt, że analizowane białko musi występować już w bazie danych i że program zakłada, iż wszystkie peptydy pochodzą z pojedynczej, wyizolowanej proteiny. Użycie mieszaniny kilku białek komplikuje analizę i może zaburzyć wyniki, dlatego też dla metody PMF próbki powinny być proteinami po izolacji drogą dwuwymiarowej elektroforezy żelowej (2D gels) lub SDS-PAGE.

W typowej metodzie postępowania wydzielone białko poddaje się modyfikacjom chemicznym, tj. redukuje się mostki disulfidowe, a aminokwasy cysteinowe poddaje się karboksymetylowaniu (chemicznie) lub akrylamidowaniu (podczas elektroforezy żelowej). Następnie proteinę poddaje się trawieniu proteazą, tj. enzymem, powodującym hydrolizę wiązań peptydowych (trypsyną, chymotrypsyną względnie endoproteinazą Glu-C), przeważnie w ciągu nocy. Typowy stosunek białko-proteaza wynosi 50:1. Otrzymane w ten sposób peptydy, po ekstrakcji i wysuszeniu pod próżnią, rozpuszcza się w małej ilości wody i nanosi na płytkę MALDI z matrycą. Po współkryształizacji cząsteczek peptydu i matrycy przeprowadza się pomiar MALDI, otrzymując widmo – szereg mas cząsteczkowych peptydów.

Do interpretacji wyników wykorzystuje się ogromne bazy danych, zawierające informacje o sekwencjach białek, np. Swissprot czy Genbank oraz programy komputerowe<sup>54</sup>, które teoretycznie „trawią” białka na peptydy z użyciem tego samego enzymu (np. trypsyny), jaki zastosowano w doświadczeniu, a następnie obliczają masy absolutne peptydów. W dalszym toku postępowania program porównuje masy peptydów zmierzone doświadczalnie (widmo MALDI) z

masami obliczonymi teoretycznie i wykonuje optymalne dopasowanie.

Rys.21. przedstawia widmo MALDI-TOF albuminy osocza ludzkiego po trawieniu trypsyną (góra) i dopasowanie sekwencji peptydów (dół)<sup>55</sup>.



Rysunek 21. Widmo MALDI-TOF albuminy osocza ludzkiego po trawieniu trypsyną (góra) i dopasowanie sekwencji peptydów (dół)

### Analiza PSD; rozpad poza źródłem (Post-Source-Decay)

Analiza PSD (*post-source-decay*; rozpad poza źródłem) jest rozszerzeniem techniki MALDI-MS, która pozwala na obserwację i identyfikację diagnostycznych jonów fragmentacyjnych, powstających podczas rozpadu, który ma miejsce po opuszczeniu przez jony źródła a przed dotarciem do detektora, w rejonie wolnym od pola (*field-free region*).

Mimo, że technikę MALDI uważa się za metodę bardzo „miękkiej” jonizacji (*soft ionization*), prowadzącą do uzyskania jonów quasi-molekularnych ogromnych cząsteczek bez zniszczenia ich struktury i z reguły w widmie tego typu nie obserwuje się jonów fragmentacyjnych, jednak jony o dużej energii wewnętrznej lub poddawane kolizji z gazem obojętnym mogą ulegać dysocjacji

w czasie długiej drogi przelotu w aparacie. Ponieważ rozpad ten zachodzi już po opuszczeniu źródła jonów, a przed osiągnięciem kolektora, zalicza się go do tzw. rozpadów metastabilnych.

Wszystkie jony macierzyste (prekursory), opuszczające źródło jonów, mają w przybliżeniu taką samą energię kinetyczną  $E_k$ . Jony te, podczas długiego czasu przelotu przez wolny od pola rejon dryfowania, mają dość czasu, by ulec rozpadowi na jony potomne. Jony potomne mają niemal taką samą prędkość jak jony macierzyste, ale mniejszą masę, a więc ich energia kinetyczna też jest mniejsza (ponieważ  $E_k \sim m$ ).

Fragmentacji ulega tylko nieznaczna ilość jonów, generowanych w źródle – te, które mają wystarczającą energię. Aby zintensyfikować fragmentację, można wpływać na zwiększenie energii wewnętrznej jonów macierzystych dwiema metodami: przez podwyższenie intensywności promieniowania lasera lub przez zastosowanie komory kolizyjnej. Fragmentacji jonu sprzyjają także:

- mała liczba stopni swobody ( $M < 1000$  Da),
- obecność grup chromoforowych, czułych na promieniowanie UV,
- zastosowanie „gorącej” matrycy, np.  $\alpha$ -CHCA,
- brak stabilizujących kationów o dużym promieniu jonowym, np.  $K^+$ ,  $Ag^+$ .

W trybie linearnym TOF jony macierzyste i potomne są nierozróżnialne, gdyż ich prędkość jest jednakowa. Reflektronowe aparaty MALDI-TOF pozwalają na rozróżnienie tych dwóch rodzajów jonów na podstawie różnic ich energii kinetycznej.

Ważną cechą PSD jest możliwość wyboru jonów-prekursorów, których rozpad chcemy śledzić, z mieszaniny wielu składników. Wyboru prekursora dokonuje się przez zastosowanie bramek jonowych (*ion gates*), sterowanych odpowiednio zmianami napięcia. Wszystkie jony, przechodzące przez bramkę są odchylane od detektora jonów - za wyjątkiem pewnego, wąskiego zakresu masy, który jest przepuszczany bez odchylenia.

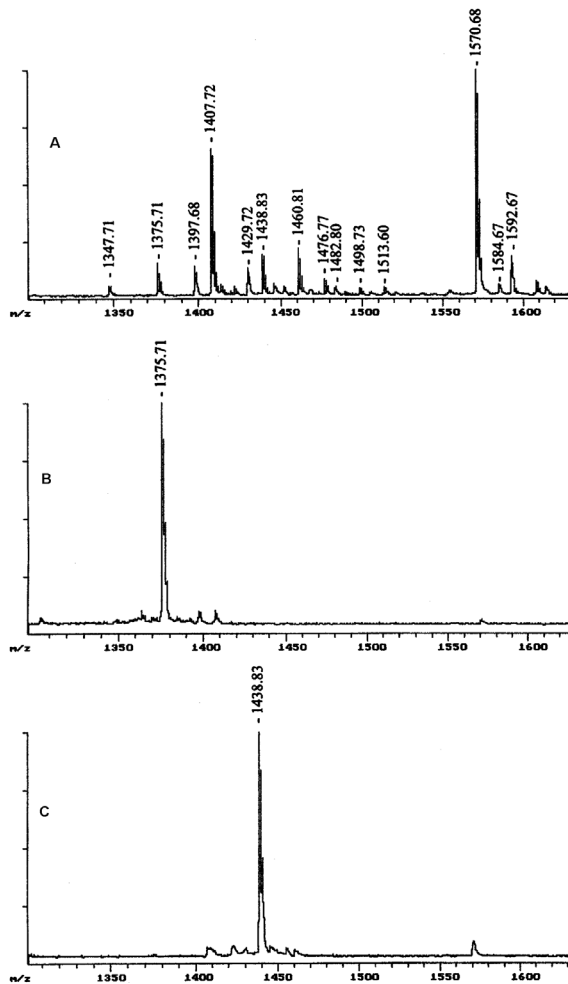
Metoda PSD jest bardzo pomocna w analizie struktury biomolekuł, np. białek i peptydów, konkurencyjną względem innych metod<sup>56</sup>. Dla przykładu – typowe sekwencjonowanie peptydów prowadzi się poprzez degradację Edmana, obecnie zautomatyzowaną. Ta tradycyjna metoda jest zastępowana przez metody spektrometrii masowej – elektrorozpylanie z potrójnym kwadrupolem (ESI + *triple-quadrupole*), eksperymenty MS/MS w aparatach wielosektorowych z pułapką jonową i MALDI, skojarzone z PSD. Wyższość metod MS polega na większej czułości i możliwości analizy próbek wieloskładnikowych lub niedokładnie oczyszczonych. Spośród technik spektrometrii mas, MALDI-PSD wyróżnia się największą prostotą aparaturową w porównaniu z potrójnym kwadrupolem lub czterosektorowymi instrumentami MS/MS.

Rys.22 przedstawia widma MALDI próbki, zawierającej mieszaninę 10

różnych peptydów i produktów ich derywatywacji, A – przy wyłączonej bramce jonowej, B – przy bramce włączonej, nastawionej na przepuszczanie jonów peptydu o masie 1375,8 u, C – przy bramce włączonej, nastawionej na peptyd o masie 1438,7 u.<sup>56</sup>

Fragmentację wyselekcjonowanego jonu  $m/z$  1375,8 można prześledzić na widmie MALDI-PSD (Rys. 23)

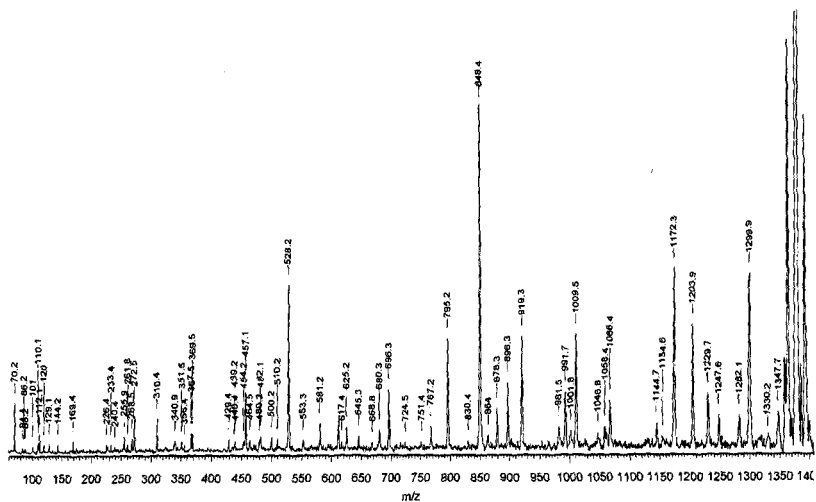
Rysunek 22. Widma MALDI próbki, zawierającej mieszaninę 10 różnych peptydów i pro-



duktów ich derywatywacji, A – przy wyłączonej bramce jonowej, B – przy bramce włączonej, nastawionej na przepuszczanie jonów peptydu o masie 1375,8 u, C – przy bramce

włączonej, nastawionej na peptyd o masie 1438,7 u.<sup>56</sup> Widma otrzymane na aparacie ALADIM I, Institute of Laser Medicine, Duesseldorf.

Rysunek 23. Widmo masowe MALDI-PSD peptydu dla jonu  $[M+H]^+ = 1375,8u^{56}$ .



tycznych, gdyż umożliwia uzyskanie pojedynczo naładowanych jonów quasi-molekularnych w bardzo dużym, prawie nieograniczonym, zakresie masy bez naruszenia struktury cząsteczek. Jednakże nie wszystkie polimery łatwo ulegają jonizacji. W przeciwieństwie do biopolimerów, które jonizują łatwo przez protonowanie, polimery syntetyczne łatwiej jest zjonizować przez kationizowanie jonami metali. Stosunkowo łatwo można otrzymać kationy polimerów polarnych, takich jak poli(metakrylan metylu) PMMA czy poli(glikol etylenowy) (PEG), poli(glutaran butylenowy) PBG<sup>57</sup> względnie poli(adypinian butylenowy) PBA, gdyż związki te przyłączają protony lub kationy metali alkalicznych, tworząc jony  $[M+H]^+$  lub  $[M+Met]^+$  (gdzie Met = metal alkaliczny). Polimery te przyłączają jony  $Na^+$  i/lub  $K^+$  nawet, gdy nie były one dodawane do analitu ani do matrycy. Obecność jonów sodu i potasu może pochodzić z zanieczyszczeń reagentów, rozpuszczalników, matrycy, szkła i innych źródeł. Polimery o wysokim powinowactwie do kationów metali alkalicznych mają zdolność wyłapywania ich nawet wtedy, gdy stężenie tych jonów jest bardzo małe. Badania Bowersa<sup>58</sup> i współpracowników, korelujące analizę konformacji i energii procesu kationizacji polimerów z danymi doświadczalnymi z MALDI wskazują, że łańcuchy polimerów, zawierających atomy tlenu, owijają się wokół kationów takich jak  $Li^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$  i  $Cs^+$ .

Rys. 24. przedstawia owijanie kationów sodowych  $Na^+$  przez łańcuchy PEG<sup>10</sup>. Widoczne są struktury o najniższej energii dla układów  $Na^+PEG9$ ,  $Na^+PEG13$  i  $Na^+PEG17$ ; w każdym przypadku kation  $Na^+$  jest otoczony przez pięć jednostek  $-CH_2-CH_2-O-$ , co tworzy strukturę podobną do eteru koronowego 15-c-5.

Kationy większe tworzą stabilne struktury z dużymi oligomerami, które posiadają więcej atomów tlenu dostępnych do koordynacji.

Polimery węglowodorowe, zawierające wiązania nienasycone, jak poliizopren PI, polibutadien (PB) czy polistyren (PS) można przeprowadzić w kationy przez dodanie soli odpowiedniego metalu przejściowego, np.  $Ag^+X^-$ , które oddziałują z wiązaniami podwójnymi polimeru<sup>59</sup>. (Rys. 25)

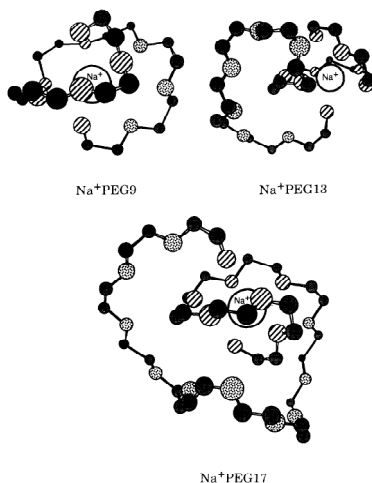
Najtrudniej jonizują polimery niepolarne nasycone, jak polietylen czy polipropylen, wskutek skrajnie niskiej energii wiązania kation-makrocząsteczka<sup>60</sup>.

Próby kationizacji polistyrenu<sup>61</sup> i polietylenu przy użyciu soli różnych metali, jak Ag(I), Cu(II), Pd(II), Zn(II), Cd(II), Pt(III), Cr(III) czy Al(III) wykazały, że tylko kationy metali przejściowych na +1 stopniu utlenienia kationizują skutecznie cząsteczki polimerów niepolarnych.

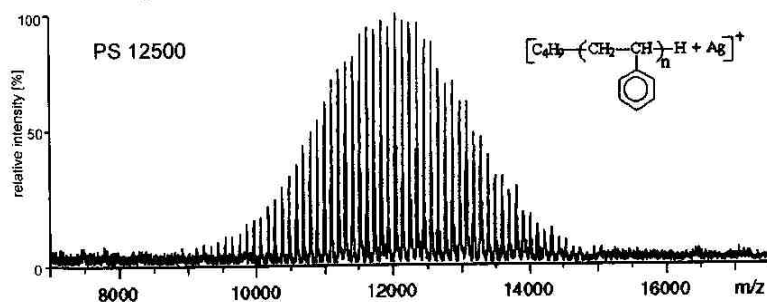
Otrzymane serie jonów oligomerów o jednakowych odległościach na widmie (tej samej różnicy wartości  $m/z$ ) umożliwiają kalibrację wewnętrzną widma<sup>62</sup>.



## Podstawy techniki MALDI



Rysunek 24. „Owijanie” kationów sodowych Na<sup>+</sup> przez łańcuchy PEG<sup>10</sup>



Rysunek 25. Widmo MALDI-TOF polistyrenu PS 12500, domieszkowanego jonami Ag<sup>+</sup><sup>14</sup>.

- Za pomocą MALDI można wyznaczyć następujące parametry polimerów:
- liczbowo średnią masę cząsteczkową  $M_n$  (number-average molecular weight);
  - wagowo średnią masę cząsteczkową  $M_w$  (weight-average molecular weight);
  - polidispersyjność (rozkład masy cząsteczkowej)  $PD$ .

Można uzyskać również określenie grup końcowych polimeru oraz informacje o budowie kopolimeru blokowego lub statystycznego<sup>63</sup>.

Oznaczając przez  $M_i$  masę cząsteczkową składnika oligomerycznego, a przez  $I_i$  – intensywność jego sygnału, przy założeniu liniowej zależności pomię-

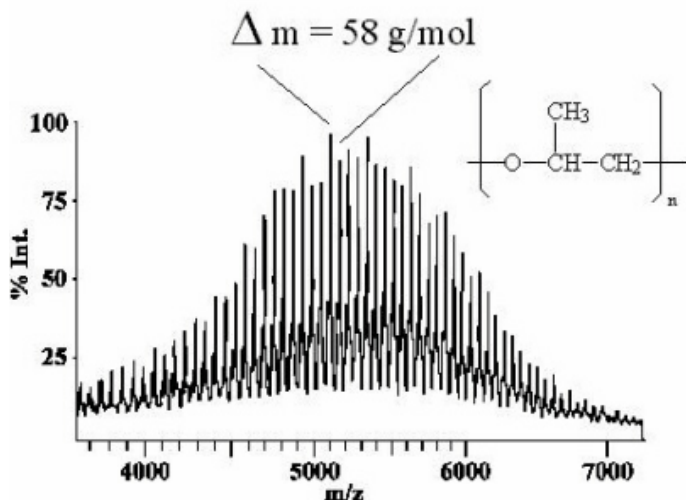
dzy liczbą jonów a intensywnością sygnału, możemy obliczyć  $M_n$ ,  $M_w$  i  $PD$  ze wzorów:

$$M_n = \frac{\sum M_i I_i}{\sum I_i}$$

$$M_w = \frac{\sum M_i^2 I_i}{\sum M_i I_i}$$

$$PD = \frac{M_w}{M_n}$$

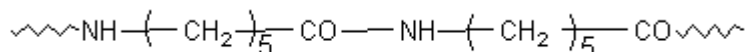
Typowe widmo MALDI-TOF związku polidispersyjnego (polimeru) - poli(glikolu polipropylenowego) o masie cząsteczkowej  $MW = 5300$ , wyznaczonej metodą chromatografii żelowej (*Gel Permeation Chromatography*, GPC) przedstawia rysunek 26<sup>64</sup>: Widmo to składa się z szeregu pików o stałej odległości, tj. stałej różnicy mas  $\Delta m = 58$ , co odpowiada masie jednostki powtarzalnej [-O-CH(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-]



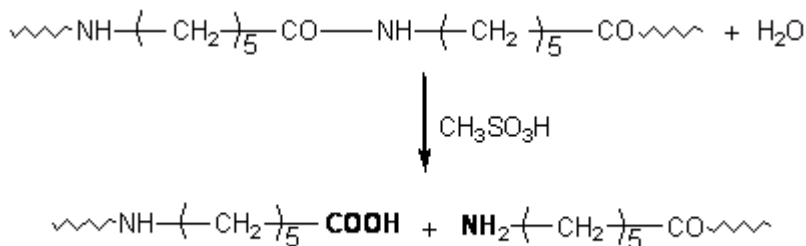
Rysunek 26. Widmo MALDI-TOF poli(glikolu propylenowego),  $MW = 5300$  (przez GPC) Parametry, wyznaczone na podstawie MALDI-TOF dla tego polimeru to liczbowo średnia masa cząsteczkowa  $M_n = 5157$ , wagowo średnia masa cząsteczkowa  $M_w = 5227$ , polidispersyjność  $PD = 1,01$  i masa maksymalna  $M_p = 5280$ <sup>64</sup>.

Zastosowanie MALDI-TOF do określania grup końcowych polimerów jest przedmiotem wielu doniesień<sup>65,66,67</sup>

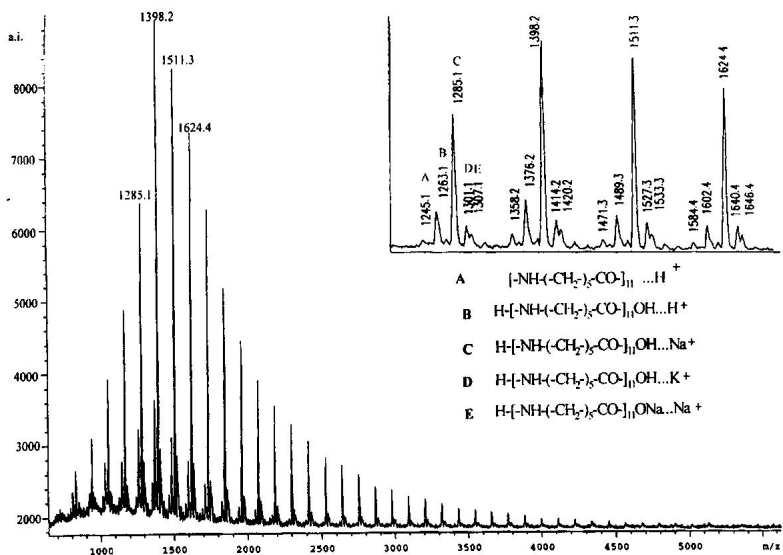
Dobrym przykładem jest tu określanie grup końcowych w Nylonie 6 przez Montaudo i współpracowników<sup>67</sup>. Nylon 6 (Ny 6) jest popularnym polimerem o budowie poliamidu, stanowiącym bazę wielkiej ilości włókien tekstylnych i technicznych. Jego ogólną strukturę można przedstawić wzorem:



Rys.27. przedstawia widmo MALDI-TOF nylonu 6 po hydrolizie. Próbkę nylonu hydrolizowano przy użyciu wodnego roztworu kwasu metanosulfonowego zgodnie z równaniem:



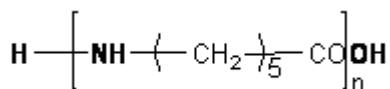
Spodziewane grupy końcowe otrzymanych oligomerów to  $-\text{COOH}$  i  $-\text{NH}_2$ .



Rysunek 27. Widmo MALDI-TOF zhydrolizowanego nylonu 6 (Ny6).

W widmie MALDI-TOF Ny6 (Rys. 27.) dominują intensywne piki serii o zakresie masy od 800 do 5000 Da. Wśród nich największą intensywnością wyróżniają się piki o masach: 1285,1; 1398,2; 1511,3; 1624,4. Łatwo stwierdzić, że odległości pomiędzy tymi pikami na widmie są jednakowe, różnica masy  $\Delta m$  odpowiadających im jonów wynosi  $(1624,4 - 1511,3) = (1511,3 - 1398,2) = (1398,2 - 1285,1) = 113,1$  u, co jest zgodne z masą jednostki powtarzalnej tego poliamidu:  $[\text{NH}(\text{CH}_2)_5\text{CO}]$ .

Jaka grupa końcowa jest obecna w oligomerze można wywnioskować przez kolejne odejmowanie masy jednostek powtarzalnych od masy wybranego jonu. Dla przykładu – od masy jonu 1285,1 można odjąć 11 pełnych jednostek powtarzalnych  $(11 \cdot 113,1)$ , otrzymując:  $1285,1 - (11 \cdot 113,1) = 41,0$ . Pozostała różnica 41 u musi obejmować grupy, dołączone na końcach ciągu jednostek powtarzalnych. Uwzględniając przewidywane grupy końcowe, otrzymujemy budowę oligomeru:

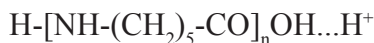


tj. od masy 41,0 musimy jeszcze odjąć 18 u (H+OH). Różnica – 23 u – wskazuje na obecność kationu Na<sup>+</sup>, a więc na budowę jonu przy m/z 1285,1:

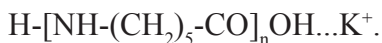


Na powiększonej części widma (Rys. 27, prawy górny narożnik) widać, że każdemu z tych intensywnych pików towarzyszy zespół mniej intensywnych sygnałów, np. pikowi C przy m/z 1285,1 towarzyszą piki A przy 1245,1 m/z, B przy 1263,1 m/z, D przy 1301,1 m/z i E przy 1307,1 m/z.

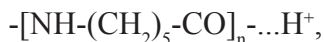
Wykonanie obliczeń, analogicznych jak powyższe, dla pików B (1263,1 Da) i D (1301,1 Da) prowadzi do wniosku, że piki typu B (tj 1263,1 Da, 1376,2 Da, 1489,3 Da i 1602,4 Da) odpowiadają jonom protonowanym:



a piki typu D (tj. 1301,1 Da, 1414,2 Da, 1527,3 Da i 1640,4 Da) reprezentują jony potasowane o strukturze:



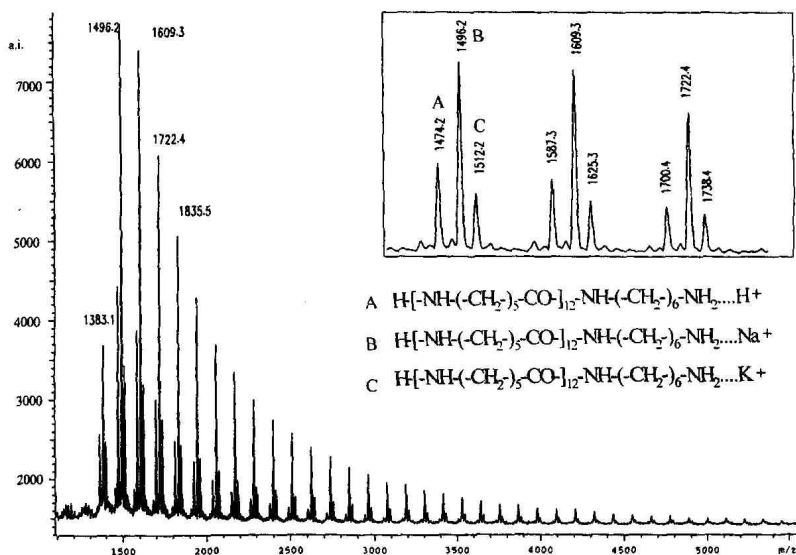
Piki A (1245,1 Da, 1358,2 Da, 1471,1 Da i 1584,4 Da) pochodzą od protonowanych oligomerów cyklicznych



a piki typu E można przypisać sodowanym oligomerom, w których terminalna grupa karboksylowa występuje w postaci soli sodowej:



Przeprowadzając analogiczne rozumowanie, można ustalić strukturę grup końcowych w Nylonie 6 po reakcji z heksametylenodiaminą, której widmo MALDI przedstawia Rys. 28.



Rysunek 28. Widmo MALDI-TOF Ny6 po reakcji z heksametylenodiaminą.<sup>52</sup>

### Przygotowanie próbeki

W MALDI istotny wpływ na wynik ma odpowiednie przygotowanie próbeki, dobór odpowiedniej matrycy, sposób jej przygotowania, zastosowanie właściwego rozpuszczalnika i ewentualnie czynnika protonującego (często tę rolę pełni sama matryca). Skład analitu również nie jest obojętny, chociaż metoda MALDI wykazuje pewną tolerancję zanieczyszczenia próbeki. Ekstrakty białek zawierają zwykle sole nieorganiczne, które zakłócają proces jonizacji; sole te usuwa się metodą ekstrakcji fazy stałej (*solid phase extraction, SPE*) albo przez przemywanie gotowych plamek na płytce MALDI wodą, jednak obie metody mogą spowodować wymycie innych substancji z próbeki (np. istotnych składników analitu).

Mieszanka matryca-analit (np. matryca-białko) nie jest jednorodna wskutek różnej polarności obu związków, co prowadzi do ich rozdzielania (separacji) podczas krystalizacji. Średnica plamki docelowej jest znacznie większa niż wiązki lasera, co powoduje konieczność wielokrotnych „strzałów” laserem w różne miejsca plamki, by uzyskać statystycznie przeciętny wynik dla stężenia substancji w obrębie plamki. Dla otrzymania powtarzalnych wyników ważne jest również stosowanie tej samej procedury przygotowywania matrycy dla danej serii pomiarów.

Najczęściej stosowane metody nanoszenia próbki (analitu i matrycy) to:

**1. Metoda wysychającej kropli<sup>68</sup> (*dried droplet method*)** – jednowarstwowa:

Przyrządza się osobno roztwór próbki i roztwór matrycy w tym samym rozpuszczalniku, lub – jeśli to niemożliwe – w dwóch kompatybilnych; niekiedy jeszcze używa się trzeciego roztworu - środka kationizującego, np. soli metalu (możliwe są różne rozpuszczalniki i stężenie). Wszystkie roztwory miesza się, a uzyskaną mieszaninę (0,5-1 µl) umieszcza na płytce MALDI (*MALDI target*) i pozostawia do wyschnięcia na powietrzu. Wadą tej metody jest powolne wysychanie próbki, co może prowadzić do rozdzielenia kryształów matrycy próbki i soli kationizującej.

Modyfikacjami tej metody są: zastosowanie odparowywania próżniowego<sup>69</sup> lub odparowywanie w strumieniu ultraczystego azotu<sup>70</sup>. W obu przypadkach otrzymuje się drobniejsze kryształy, lepszą rozdzielczość i powtarzalność oraz intensywność sygnałów.

**2. Metoda cienkiej warstwy (*thin-layer method*)** – dwuwarstwowa.

Roztwór matrycy w odpowiednim rozpuszczalniku (np. dla CHCA – roztwór nasycony w acetonie) nanosi się na płytkę MALDI i pozwala mu się wyschnąć, otrzymując cienką warstwę matrycy. Następnie 1 µl roztworu analitu nanosi się na wierzch uzyskanej powierzchni matrycy i suszy<sup>71</sup>.

**3. Nanoszenie przez rozpylanie**

Wariantami tej metody są: osadzanie strumieniem powietrza (*air spray deposition*)<sup>72</sup> i osadzanie przez elektrosprej (*electrospray sample depositon*)<sup>73</sup>.

**4. Metoda mieszania ciał stałych (*solid/solid sample preparation*)**

Metoda polega na bardzo dokładnym mieszaniu drobno sproszkowanych matrycy i próbki (bez rozpuszczalnika) i prasowaniu całości w pastylkę. Stosuje się ją dla niektórych poliamidów, nierozpuszczalnych w pospolitych rozpuszczalnikach organicznych<sup>74</sup>.

Przygotowanie próbki do analizy MALDI w trybie ujemnym, np. polimerycznych kwasów, jak sulfonowany polistyren czy poli(kwas akrylowy), wymaga często odsalania i przekształcenia w formę protonową<sup>75</sup>. Do tych celów stosuje się wymiennicze jonowe, odsalanie membranowe lub odsalanie „*on-probe*” (dosłownie: „na sondzie”) z użyciem monowarstw samoorganizujących (SAM)<sup>76</sup>.

Dla jakości i powtarzalności wyników w pomiarach MALDI istotne są;

- skład matrycy;
- dodatek czynnika protonującego, np. kwasu trifluorooctowego lub mrówkowego,
- odstęp pomiędzy impulsami lasera,
- opóźnienie czasu przyspieszenia,
- długość fali lasera,
- gęstość energii lasera,
- kąt padania wiązki lasera na cel.

### **Inne metody desorpcji laserowej – modyfikacje techniki MALDI:**

#### **Desorpcja/ionizacja na porowatym krzemie (DIOS, *desorption/ionization on porous silicon*)<sup>77</sup>**

Wprowadzona przez Siuzdaka i współpracowników metoda jonizacji/desorpcji na porowatym krzemie lub ditlenku krzemu (DIOSD, *desorption/ionization on porous silicon dioxide*) umożliwia analizę związków niskocząsteczkowych przy użyciu MALDI-TOF, eliminuje bowiem konieczność stosowania matrycy, która zwykle daje własne widmo w zakresie niskich mas, utrudniając interpretację uzyskanych wyników. Zastosowanie płytek z porowatego krzemu względnie porowatego ditlenku krzemu umożliwia bezpośrednią jonizację próbki bez użycia matrycy (rolę matrycy pełni porowaty krzem, dzięki zdolności absorbowania promieniowania UV). DIOS umożliwia analizę związków niskocząsteczkowych, często o istotnej roli fizjologicznej, takich jak steroidy, prostaglandyny, neuroprzekazniki. Metoda znajduje zastosowanie w kryminalistyce do wykrywania śladowych ilości substancji, do monitorowania reakcji enzymatycznych (np. tworzenia choline z acetylocholine), do analizy peptydów, tj. trawienia białka bezpośrednio na płytce DIOS, a następnie analizowania map peptydowych bez użycia matrycy.

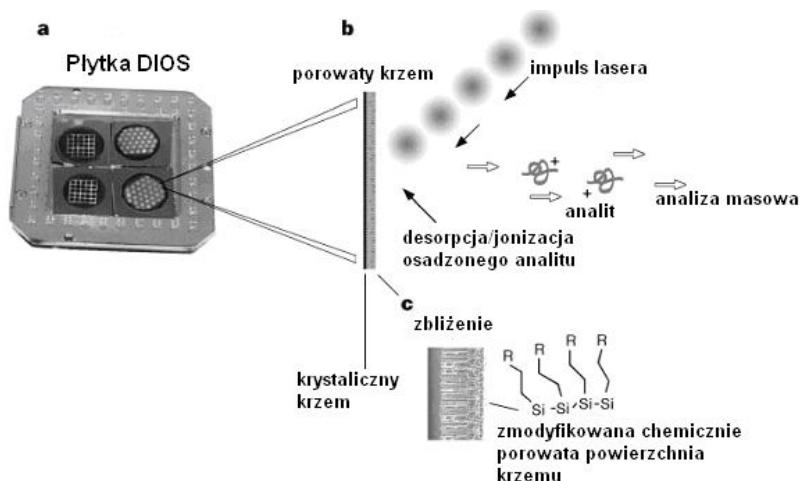
Procedura DIOS obejmuje uzyskanie porowatego krzemu z krystalicznych gładkich płytek krzemowych za pomocą odpowiedniego trawienia, przy czym tworzy się warstwa porowata mikrometrowej grubości, wykazująca silną fotoluminescencję po poddaniu promieniowaniu UV. Ogólną budowę, grubość, porowatość, oporność i inne parametry materiału można regulować przez odpowiedni dobór płytek krzemowych i warunków trawienia. Świeżo wytrawiona powierzchnia porowatego krzemu jest hydrofobowa (dzięki grupom terminalnym Si-H), ale po poddaniu reakcji hydrosililowania, kontrolowanej kwasami Lewisa<sup>78</sup> lub stymulowanej światłem<sup>79</sup>, może być dalej funkcjonalizowana zależnie od potrzeb (Rys.29). Dzięki wysokiej odporności powierzchni hydrosililowanych na warunki środowiska wodnego, powierzchnie te mogą być wielo-



krotnie używane, ulegając degradacji tylko w niewielkim stopniu.

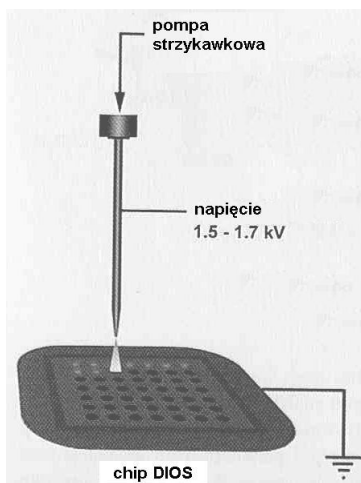
Z analizy uzyskanych widm DIOS, gdzie można obserwować nienaruszone jony różnego rodzaju, można wnioskować, że porowaty krzem wykazuje właściwości wysokorozwiniętej powierzchni<sup>80</sup> oraz silną absorpcję promieniowania ultrafioletowego<sup>81</sup>, co może poprawić efekt laserowej desorpcji/ jonizacji.

Próbki do analizy DIOS rozpuszcza się zazwyczaj w wodzie lub w mieszaninie metanol/woda. Ponieważ powierzchnia płytki jest hydrofobowa, próbka nie rozlewa się na dużej powierzchni, lecz skupia w punkcie. Użycie mieszaniny woda/alkohol poprawia penetrację próbki w głąb płytki.



Rysunek 29. Konfiguracja eksperymentu DIOS-MS: a) cztery płytki z porowatego krzemu, umieszczone na typowej płytce MALDI; każda płytka ma naniesioną siatkę punktów pomiarowych (fotowzorzec, uzyskany przez naświetlenie krzemu typu n za pomocą włókna wolframowego 300 W przez odpowiednią maskę i soczewki); b) proces desorpcji/jonizacji na porowatym krzemie; c) przekrój przez porowaty krzem i funkcjonalizacja powierzchni po hydroksylowaniu (R – fenyl lub alkil).<sup>72</sup>

Aby uniknąć nierównomiernego nanoszenia próbek, co zwykle ma miejsce przy użyciu mikropipety, stosuje się aplikację przez elektrozropylanie. (Rys. 30.)



Rysunek 30. Nanoszenie próbki metodą elektrorozpylania – ESD (electrospray deposition). Kapilara pod napięciem wytwarza strumień kropelek roztworu analitu, naładowanych dodatnio. Roztwór jest rozpylany równomierną, cienką warstwą na powierzchni krzemu. [Zaadaptowano z <sup>76</sup>]

Rys. 31. przedstawia przykładowe widma<sup>72</sup>, zarejestrowane metodą DIOS, gdzie:

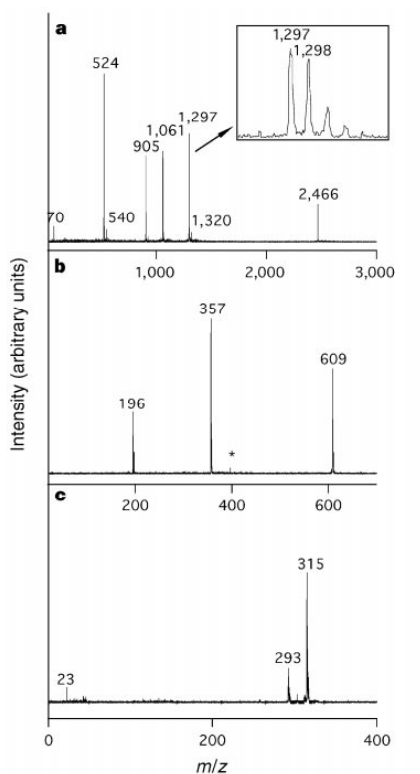
**a** - jest widmem mieszaniny pięciu peptydów (każdy w ilości 2 pmol), tj. peptydu o sekwencji aminokwasów MRFA (wg jednoliterowego kodu aminokwasów) przy  $m/z$  524, des-arg-bradykininy ( $m/z$  905), bradykininy ( $m/z$  1061), angiotensyny ( $m/z$  1297) i hormonu adrenokortykotropowego ( $m/z$  2466); na wstawce – rozkład izotopowy dla angiotensyny, rozdzielczość nie zaburzona przez powierzchnię krzemu;

**b** – widmo DIOS-MS mieszaniny trzech związków niskocząsteczkowych (każdy w ilości 1 pmol), tj. kofeiny ( $m/z$  196), środka przeciwwirusowego WIN ( $m/z$  357) i rezerpiny ( $m/z$  609);

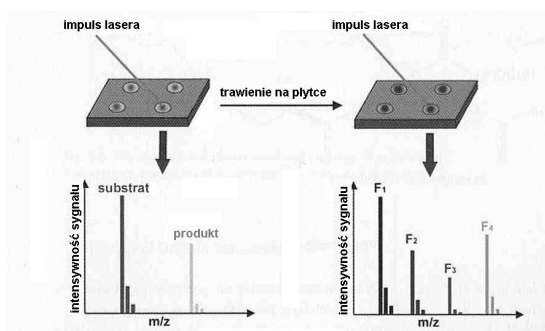
**c** – widmo DIOS N-oktylo  $\beta$ -D-glukopiranozydu ( $m/z$  293) i jego adduktu sodowego  $[M+Na]^+$  ( $m/z$  315); na widmie widoczny jest także sam kation sodowy  $Na^+$  ( $m/z$  23).

DIOS daje też możliwość identyfikacji białka drogą bezpośredniego trawienia proteazą na płytce krzemowej: Imobilizowany na krzemie enzym, który służył do przeprowadzenia substratu w produkt reakcji enzymatycznej (i określenia zużycia substratu i /lub tworzenia się produktu w próbie wstępnej) jest poddawany działaniu odpowiedniej proteazy, a następnie produkty trawienia są analizowane za pomocą DIOS-MS (Rys. 32.).

## Podstawy techniki MALDI



Rysunek 31. Przykładowe widma masowe, uzyskane metodą DIOS.



Rysunek 32. Sekwencyjna charakteryzacja funkcjonalna i identyfikacja strukturalna enzymu. W początkowym etapie uzyskuje się informacje o aktywności enzymu (z oceny zużycia substratu i tworzenia produktu); następnie enzym trawiony jest na płytce, a uzyskane peptydy  $F_1 - F_4$  są badane przez DIOS-MS.

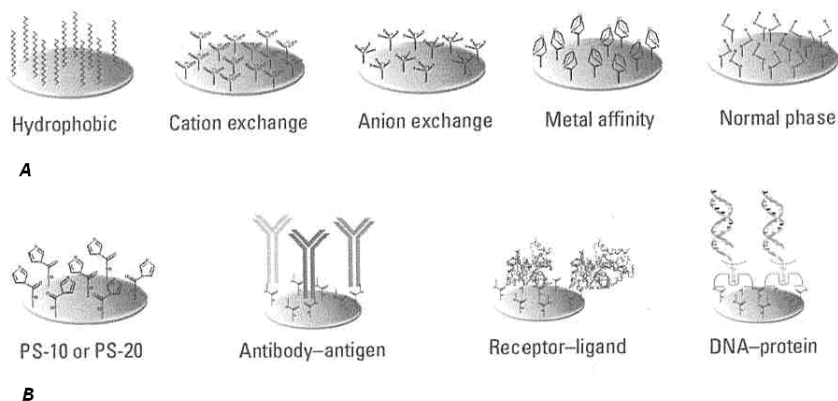
## **Desorpcja/ionizacja z wykorzystaniem modyfikowanych powierzchni (surface-enhanced laser desorption/ionization, SELDI)**

Jednym z wariantów techniki MALDI jest SELDI, tj. technika desorpcji/ionizacji z wykorzystaniem modyfikowanych powierzchni (ang. *surface-enhanced laser desorption/ionization, SELDI*), będąca skojarzeniem technik chromatograficznych ze spektrometrią mas czasu przelotu. Stosowana w poszukiwaniu biomarkerów różnych schorzeń w skomplikowanych próbkach biologicznych, zawierających często złożony zestaw białek, np. w płynach fizjologicznych organizmu, takich jak ślina, moczu, osocze, w ekstraktach tkankowych względnie plazmie.

Podstawową metodą proteomiki, służącą do wykrywania biomarkerów chorób jest dwuwymiarowa, poliakrylamidowa elektroforeza żelowa, 2D-PAGE (*two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis*), technika separacji mieszanin białek. Jest to jednak metoda pracochłonna, mało czuła i nieodpowiednia dla związków o wysokich masach cząsteczkowych. Inną metodą separacji o dużym znaczeniu jest wysokosprawna chromatografia cieczowa, HPLC. Metody te opierają się na elucji izolowanej substancji z fazy stacjonarnej. SELDI, w przeciwieństwie do metod uprzednio wymienionych, opiera się na zatrzymaniu (retencji) substancji na zmodyfikowanej powierzchni. Zasada działania SELDI polega na tym, że białka są wychwytywane na zasadzie adsorpcji, oddziaływań elektrostatycznych, podziału lub chromatografii powinowactwa na stałej powierzchni chipu proteinowego. Powierzchnia chipu jest tak zaprojektowana, by zatrzymać na niej białka o specyficznych właściwościach, pochodzące ze złożonych mieszanin. Pozostałe składniki, nie wiążące się z powierzchnią są wymywane, a następnie dodawany jest roztwór matrycy i powierzchnia jest badana metodą desorpcji/ionizacji laserowej.

Ważnym elementem instrumentarium SELDI są płytki czyli chipy proteinowe, zwane też mikrotablicami albo mikromacierzami (*microarrays*), o zmodyfikowanej powierzchni. Na płytce SELDI (pasku folii aluminiowej) naniesione są plamki, których powierzchnie są zróżnicowane pod względem aktywności chemicznej (Rys.33). Każda plamka ma inne właściwości chemiczne lub/i biochemiczne – hydrofobowe, hydrofilowe, kationo- lub anionowymienne, wiążące jony metali, zawierające unieruchomione przeciwciała, enzymy, receptory lub DNA. Podczas gdy zwykle powierzchnia chemicznie aktywna zatrzymuje wszystkie związki danej klasy, w tym wypadku (SELDI) powierzchnia każdej plamki jest przeznaczona do zatrzymywania pojedynczego, ściśle określonego, docelowego białka o określonych właściwościach fizykochemicznych. Takie powierzchnie aktywne biochemicznie wykorzystują specyficzne mechanizmy rozpoznania molekularnego, jak oddziaływanie enzym-substrat, przeciwciało-antygen, receptor-ligand lub białko-DNA w celu wychwytywania określonej

proteiny ze skomplikowanej próbki biologicznej.



Rysunek 33. Plamki na płytce SELDI o różnych właściwościach powierzchni. A- powierzchnie modyfikowane chemicznie, B- modyfikowane biochemicznie<sup>82</sup>

Dalszymi etapami analizy SELDI są: wymycie płytki (odmycie pozostałych, nie zatrzymanych substancji), naniesienie matrycy i analiza w aparacie MALDI-TOF oraz komputerowa obróbka danych. Zaletą SELDI jest możliwość szybkiego analizowania złożonych mieszanin, np. płynów biologicznych (jak mocz, osocze, plazma), nanoszonych bezpośrednio na płytkę (tablicę) i duża wydajność analiz w określonym czasie. Wśród wad można wymienić dość niską rozdzielczość, co wiąże się z niedokładnym pomiarem masy.

Metodę SELDI wykorzystano do znalezienia markerów białkowych wczesnych stadiów choroby nowotworowej, w tym raka prostaty i trzustki oraz do monitorowania zmian w peptydach, charakterystycznych dla choroby Alzheimera.

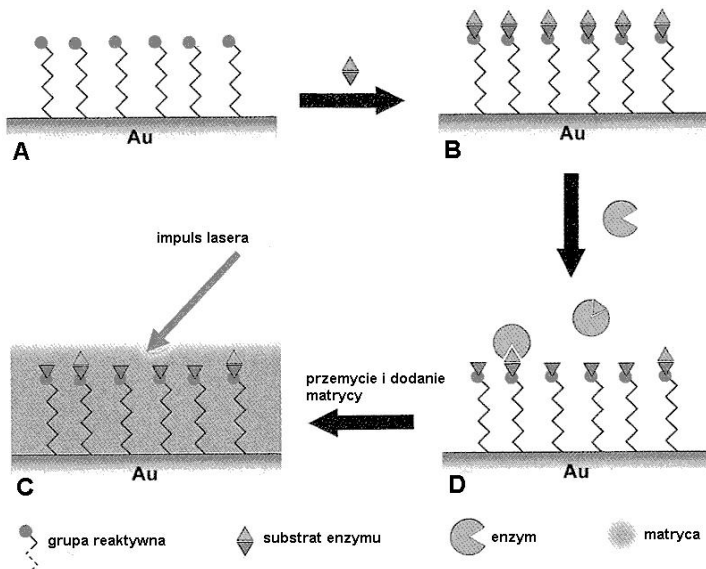
### Zastosowanie samoorganizujących się monowarstw w MALDI-MS:

#### SAMDI (*self-assembled monolayers desorption/ionization*)

Technika, wykorzystująca samoorganizujące się monowarstwy organiczne (*self-assembled monolayers*, SAMs) do modyfikacji powierzchni, poddawanych następnie analizie za pomocą MALDI oznaczana jest skrótem SAMDI (*self-assembled monolayers desorption/ionization*). W technice SAMDI wykorzystuje się monowarstwy samoorganizujące z aktywnymi grupami końcowymi do kowalencyjnego wiązania substratów enzymów z powierzchnią. Po funkcjonalizacji, powierzchnię poddaje się działaniu roztworu, zawierającego badany enzym. Po pewnym czasie reakcję przerywa się przez przemycie powierzchni,

dodaje się roztworu matrycy, suszy i bada zużycie substratu i tworzenie się produktu za pomocą MALDI. Schemat ideowy, przedstawiający zasadę działania SAMDI przedstawia Rys. 34.

Przez zmianę czasu inkubacji można otrzymać profil reakcji enzymatycznej w zależności od czasu. Wydajność przemiany enzymatycznej można obliczyć ze stosunku intensywności sygnału produktu do sumy intensywności sygnałów substratu i produktu<sup>77</sup>.

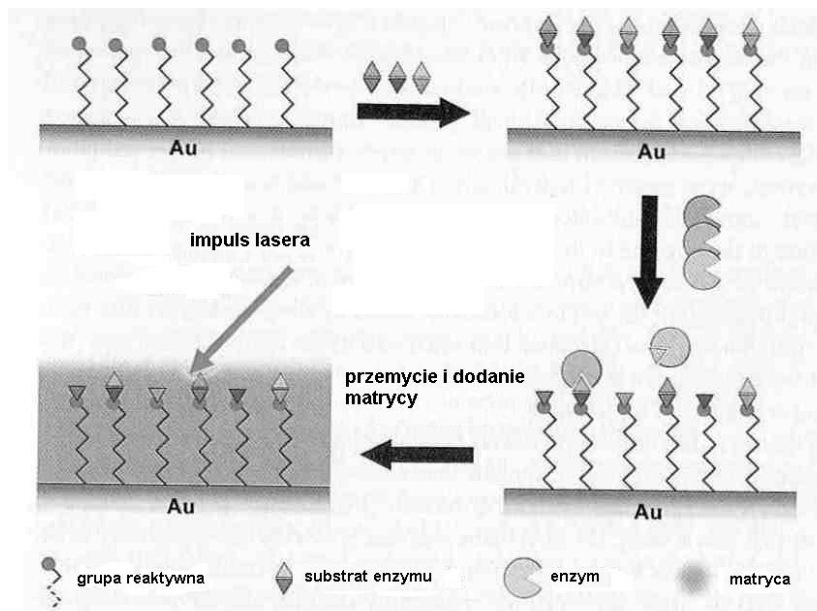


Rysunek 34. Zasada działania SAMDI. (A) Monowarstwa z reaktywnymi grupami końcowymi, osadzona na złocie. (B) Immobilizacja substratu enzymu. (C) Działanie roztworu, zawierającego enzym, na substrat – przekształcenie w produkt. (D) Po przerwaniu reakcji (przez przemycie) – dodanie matrycy, odparowanie rozpuszczalnika i analiza powierzchni przy pomocy MALDI. (Zaadaptowane z <sup>83</sup>)

W przypadku SAMDI – inaczej niż w DIOS, gdzie powłoka powierzchni krzemu zastępuje matrycę – uporządkowana monowarstwa organiczna służy jedynie do selektywnego unieruchamiania analitów, a jonizacja laserowa jest wspomagana przez późniejsze dodanie matrycy<sup>84</sup>.

Metoda SAMDI może służyć do analizy złożonej (Rys. 35.) układów biologicznych. Min<sup>85</sup> i współpracownicy zastosowali tę technikę do badania aktywności różnych kinaz, używając substratów peptydowych, specyficznych dla jednego typu kinazy. Na monowarstwie unieruchomiono mieszaninę czterech

substratów, następnie inkubowano w obecności odpowiedniej kinazy, a potem przemyto płytkę, zatrzymując reakcję. Po naniesieniu matrycy, płytkę poddano analizie MALDI, która pozwoliła na określenie aktywności enzymatycznej poprzez określenie intensywności sygnałów substratów i produktów.



Rysunek 35. Złożona analiza SAMDI-MS. Imobilizacja trójskładnikowej mieszanki substratów na SAM, inkubacja z enzymem, przerwanie reakcji i naniesienie matrycy. Po wysuszeniu – analiza MALDI-MS, umożliwiającą równoległe oznaczenie zużycia każdego z trzech substratów. [Zaadaptowano z <sup>76</sup>]

Technika SAMDI stwarza szerokie perspektywy dla chemii medycznej. Metoda jednoczesnego unieruchomienia różnych biomolekuł na tej samej monowarstwie SAM może posłużyć do szybkiego testowania enzymów, inhibitorów lub potencjalnych leków.

### Wady i zalety techniki MALDI

Technika MALDI, mimo jej burzliwego rozwoju w ostatnich latach, posiada pewne ograniczenia i niedogodności. Jakkolwiek dla proteomiki i genomiki MALDI jest potężnym i niezastąpionym narzędziem badawczym, jednak nie do wszystkich związków można tę technikę spektralną stosować. Zastosowania desorpcji/ionizacji laserowej, wspomaganej matrycą, ograniczają się do związków

polarnych, ciał stałych lub nietlotnych cieczy, o masach cząsteczkowych powyżej 500 (przy niższych masach widmo bywa nieczytelne z powodu obecności maskujących jonów matrycy), a zawodzą dla związków lotnych, niepolarnych (które trudno jest zjonizować zarówno dodatnio jak i ujemnie) i niskocząsteczkowych.

Aparaty MALDI działają głównie z analizatorami czasu przelotu (TOF), które też nie są pozbawione wad, ponieważ analizatory liniowe (*linear TOF*) umożliwiają pomiary dużych mas, ale mają niższą rozdzielczość, natomiast analizatory ze zwierciadłem (*reflectron TOF*) mają dużą rozdzielczość, ale nie nadają się do analizy bardzo dużych cząsteczek.

Wadą (ale i zaletą) MALDI jest też praktyczny brak fragmentacji i ograniczone możliwości śledzenia rozpadu cząsteczki, gdyż traci się część informacji o strukturze badanej substancji, które można by uzyskać z widma MS.

Z drugiej strony fakt, że mamy do czynienia z nienaruszoną cząsteczką ułatwia identyfikację i umożliwia analizę złożonych mieszanin związków wielkocząsteczkowych, jak białka czy polimery.

Wśród licznych zalet techniki MALDI należy wymienić możliwość analizowania dużego zakresu mas: od 500 do 1 000 000 Da, prostotę i szybkość wykonania analizy (można wykonać kilkadziesiąt pomiarów dziennie), małą wrażliwość metody na zanieczyszczenie próbki oraz często niewielkie rozmiary aparatu (*bench-top*, aparat mieszczący się na stole laboratoryjnym). Nowa generacja aparatów MALDI umożliwia automatyzację procesu pomiarowego, użycie płytek jednorazowych typu „prespotted” z naniesioną fabrycznie matrycą, dołączenie przystawki autoPSD (*automated post-source decay*), pozwalającej na doświadczenia typu MS/MS czyli śledzenie rozpadu wybranego jonu macierzystego, dostrajanie rozdzielczości do potrzeb pomiarowych oraz łatwą obróbkę komputerową uzyskanych danych z możliwością usuwania z widma sygnałów, pochodzących z tła.

Wprowadzenie nowych rozwiązań technologicznych, jak optyki jonowej, widm panoramicznych, udoskonalonych laserów i różnych technik ekstrakcji jonów (*delayed ion extraction, pulsed ion extraction*) spowodowało, że MALDI stała się jedną z najdynamiczniej rozwijających się technik spektrometrii mas.

### **Podziękowanie**

Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2009-2012, jako projekt badawczy (N 204 – 028636).

### **Literatura:**

1. Fenner NC, Daly NR, “Laser used for mass analysis”; *Rev. Sci. Instrum.*



- 37, 1068-1070, 1966
2. Vastola F, Mumma RO, Pirone AJ; "Analysis of organic salts by laser ionization", *Org. Mass Spectrom.* **3**, 1970, 101-104
  3. J, Claeys M, Geise H, Gijbels R, Vertes A; "Laser Microprobe-MS of Quaternary Phosphonium Salts: Direct Versus Matrix-Assisted Laser Desorption", *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **4**, 1994, 798-812
  4. Wolkenstein K, Gross JH, Oeser T, Schöller HF; "Spectroscopic characterization and crystal structure of the 1,2,3,4,5,6-hexahydrophenanthro-[1,10,9,8-*opqra*]perylene"; *Tetrahedron Lett.* **43**, 2002, 1653-1655
  5. Jones RM, Lamb JH, Lim CK, "Urinary porphyrin profiles by laser desorption/ionization-TOF-MS without the use of classical matrixes", *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **9**, 1995, 921-923
  6. Cotter RJ; "Laser-MS: an overview of techniques, instruments and applications", *Anal. Chim. Acta* **195**, 1991, 45-59
  7. DM, Siegel J, Allison J; "Does ink age inside of a pen cartridge?", *J. Forensic Sci.* **47**, 2002, 1294-1297
  8. <http://cbs.umn.edu/msp/instrumentation/maldi.shtml>
  9. Laiko L, Baldwin MA, Burlingame AL; „Atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry“, *Anal. Chem.* **72**, 2000, 652-657
  10. von Helden G, Wytenbach T, Bowers MT; "Inclusion of a MALDI Ion Source in the Ion Chromatography Technique: Conformational Information on Polymer and Biomolecular Ions"; *Int. J. Mass Spectrom Ion Proc.*, **146/147**, 1995, 349-364
  11. a) "Spektrometria mas" pod red. Piotra Sudera i Jerzego Silberringa, Wyd. UJ Kraków 2006; b). Bahr U, Deppe A, Karas M, Hillenkamp F, Giessmann U; "Mass spectrometry of synthetic polymers by UV-matrix-assisted laser desorption/ionization", *Anal. Chem.* **64** (22), 1992, 2866-2869. doi:10.1021/ac00046a036; c) <http://www.psrc.usm.edu/mauritz/maldi.html>
  12. Glückmann M, Pfenninger A, Krüger R, Thierolf M, Karas M, Horneffer V, Hillenkamp F, Strupat K; "Mechanisms in MALDI analysis: surface interaction or incorporation of analyte?", *Int. J. Mass Spectrom.* **210/211**, 2001, 121-132
  13. Liao P-C, Allison J; "Ionization processes in MALDI-MS: Matrix-dependent formation of of  $[M+H]^+$  vs.  $[M+Na]^+$  in small peptides and some mechanistic comments"; *J. Mass Spectrom.* **30**, 1995, 408-423
  14. Gross JH, "Mass Spectrometry – a textbook", Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York 2004, ISBN 3-540-40739-1
  15. Gimion ME, Preston LM, Solouki T, White MA, Russel DH; "Are pro-

- ton transfer reactions of excited states involved in UV laser desorption ionization?"; *Org. Mass Spectrom.* **27**, 1992, 827-830
16. <http://www.psrc.usm.edu/mauritz/maldi.html>
  17. <http://www.abrf.org/ABRFNews/1995/December1995/dec1995maldi.html>; Phosphopeptide analysis by MALDI-TOF mass spectrometry"
  18. [http://en.wikipedia.org/wiki/File:MALDI\\_Target.jpg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:MALDI_Target.jpg)
  19. <http://www.bruker.pl/content/section/36/195/>
  20. Beavis RC, Bridson JN; "Epitaxial protein inclusion in sinapic acid crystals"; *J. Phys. D.: Appl. Phys.* **26**, 1993, 442-427; doi: 10.1088/0022-3727/26/3/015
  21. Hillenkamp F, Karas M, Beavis RC, Chait BT; "Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers"; *Anal. Chem.* **63**, 1991, 1193 A-1203A
  22. Horneffer V, Dreisewerd K, Lüdemann HC, Hillenkamp F, Läge M, Strupat K; „Is the incorporation of analytes into matrix crystals a prerequisite for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry? A study of five positional isomers of dihydroxybenzoic acid"; *Int. J. Mass Spectrom.* **185-187**, 1999, 859-870
  23. Schriemer DC, Li L; „Mass discrimination in the analysis of poly-disperse polymers by MALDI Time-of-Flight mass spectrometry. 1. Sample preparation and desorption/ionization issues"; *Anal. Chem.* **69**, 1997, 4169-4175
  24. Ugarov MV, Egan T, Khabashesku DV, Schultz JA, Peng H, Khabashesku VN, Furutani H, Prather KS, Wang H-W J, Jackson SN, Woods AS; "MALDI matrices for biomolecular analysis based on functionalized carbon nanomaterials"; *Anal. Chem.* **76** (22), 2004, 6734-6742
  25. Beavis RC, Chait BT; „Matrix-assisted laser-desorption mass spectrometry using 355 nm radiation"; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **3** (12), 1989, 436-9, doi:10.1002/rcm.1290031208. PMID 252022
  26. Beavis RC, Chait BT; "Cinnamic acid derivatives as matrices for ultraviolet laser desorption mass spectrometry of proteins"; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **3** (12), 1989, 432-5, doi:10.1002/rcm.1290031207. PMID 2520223
  27. Beavis RC, "α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid as a matrix for matrix-assisted laser desorption mass spectrometry"; *Org. Mass Spectrom.* **27**, 1992, 156-8; doi:10.1002/oms.12102702217
  28. Strupat K, Karas M, Hillenkamp F; „2,5-Dihydroxybenzoic acid: a new matrix for laser desorption-ionization-MS"; *Int. J. Mass Spectrom.*, **111**, 1991, 89-102
  29. Vertes A, Balazs L, Gijbels R; "Matrix-assisted laser desorption of pep-

- tides in transmission geometry”, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **4**, 7, 1990, 293-296
30. Tang K, Taranenko NI, Allman SI, Chang LY, Chen CH; “Detection of 500-nucleotide DNA by laser desorption mass spectrometry”, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **8** (9), 1994, 727-30
  31. Wu KJ, Steding A, Becker CH; “Matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry of oligonucleotides using 3-hydroxypicolinic acid as an ultraviolet-sensitive matrix”, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **7** (2), 1993, 142-6
  32. Taranenko NI, Tang K, Allman SL, Ch’ang LY, Chen CH; „3-Aminopicolinic acid as a matrix for laser desorption mass spectrometry of biopolymers”, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **8** (12), 1994, 1001-1006; doi:10.1002/rcm.1290081219
  33. Xu N, Huang Z-H, Watson JT, Gage DA; „Mercaptobenzothiazoles: a new class of matrixes for laser desorption ionization-MS”; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **8**, 1997, 116-124
  34. Waters Micromass MALDI Q-ToF Premier Operator’s Guide
  35. Wong CKL, So MP, Dominic Chan T-W, “Origins of proton in the generation of protonated polymers and peptides in matrix-assisted laser desorption/ionization”, *Eur. Mass Spectrom.* **4**, 1998, 223
  36. Burton RD, Watson CH, Eyler JR, Lang GL, Powell DH, Avery MY; “Proton affinities of eight matrices used for matrix-assisted laser desorption/ionization”, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **11**, 1997, 443
  37. Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Yoshida T; „Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry”, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **4**, 1990, 151-153
  38. Karas M, Bachmann D, Hillenkamp F; „Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules”, *Anal. Chem.* **57**, 1985, 2935-2939
  39. Overberg A, Karas M, Bahr U, Kaufmann R, Hillenkamp F; „Matrix-assisted infrared-laser (2,94  $\mu\text{m}$ ) desorption/ionization mass spectrometry of large biomolecules“; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **4**, 1990,293-296
  40. Overberg A, Karas M, Hillenkamp F; „Matrix-assisted laser desorption of large biomolecules with a TEA-CO<sub>2</sub>-laser“; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **5**, 1991, 128-131
  41. McEwen CN, Peacock PM, Guan Z; “Complication in the analysis of synthetic polymers by MALDI”; *Proc. 46<sup>th</sup> ASMS Conf. Mass Spectrom.*, Allied Topics, Orlando, FL, 409, 1998

42. Medina N, Huth-Fehre T, Westman A, Sundqvist BUR; “Matrix-assisted laser desorption: Dependence of the threshold fluence on analyte concentration”; *Org. Mass Spectrom.* **29**, 1994, 207-209
43. Karas M, Bachman D, Bahr U, Hillenkamp F; “Matrix-Assisted Ultraviolet Laser Desorption of Non-Volatile Compounds”; *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* **78**, 1987, 53–68
44. <http://www.cem.msu.edu/~cem333/Week18.pdf>
45. [http://www.altabioscience.bham.ac.uk/pdfs/Intro\\_to\\_series\\_MALDI\\_MASS\\_SPEC.pdf](http://www.altabioscience.bham.ac.uk/pdfs/Intro_to_series_MALDI_MASS_SPEC.pdf)
46. Krishnamurthy T, Ross PL, Ramajani U; „Detection of pathogenic and non-pathogenic bacteria by MALDI-TOF-MS”; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **10**, 1996, 883-888
47. Welham KJ, Domin MA, Johnson K, Jones L, Ashton DS.; „Characterization of fungal spores by laser desorption/ionization-TOF-MS”; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **14**, 2000, 307-310
48. Angeletti R, Gioacchini AM, Seraglia R, Piro R, Traldi P; “The potential of MALDI-MS in the quality control of water buffalo mozzarella cheese”; *J. Mass Spectrom.* **33**, 1998, 525-531
49. Fanton C, Delogu G, Maccioni E, Podda G, Seraglia R, Traldi P; “MALDI-MS in the dairy industry 2. The protein fingerprint of ewe cheese and its application to detection of adulteration by bovine milk”; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **12**, 1998, 1569-1573
50. Pappin DJ, Hojrup P, Bleasby AJ; „Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting”, *Curr. Biol.* **3** (6), 1993, 327-332. doi:10.1016/0960-9822(93)90195-T. PMID 15335725
51. James P, Quadroni M, Carafoli E, Gonet G; „Protein identification by mass profile fingerprinting”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **195** (1), 1993, 58-64. Doi:10.1016/bbrc.1993.2009.PMID 8363627
52. Henzel WJ, Billeci TM, Stults JT, Wong SC, Grimley C, Watanabe C; “Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases”; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90** (11), 1993, 5011-5. doi:10.1073/pnas.90.11.5011
53. Clauser KR, Baker P, Burlingame AL.; „Role of accurate mass measurement (+/-10 ppm) in protein identification strategies employing MS or MS/MS and database searching”, *Anal. Chem.* **71** (14), 1999, 2871-82. doi:10.1021/ac9810516. PMID 10424174
54. Hufnagel P, Rabus R; “Mass spectrometric identification of proteins in complex post-genomic projects. Soluble proteins of the metabolically versatile, denitrifying ‘Aromatoleum’ sp. strain EbN1”. *J. Mol. Micro-*

- biol. Biotechnol.* **11** (1-2), 2006, 53–81. doi: 10.1159/000092819
55. [http://en.wikipedia.org/wiki/File:PMF\\_example\\_Peptide\\_Mass\\_Fingerprinting.jpg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:PMF_example_Peptide_Mass_Fingerprinting.jpg)
  56. Spengler B; “Post-source decay analysis in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biomolecules”; *J. Mass Spectrom.* **32**, 1997, 1019-1036
  57. Williams JB, Chapman TM, Hercules DM; „MALDI-MS of discrete mass poly(butylene glutarate) oligomers”, *Anal. Chem.* **75**, 2003, 3092-3100
  58. von Helden G, Wyttenbach T, Bowers MT; “Conformation of macromolecules in the gas phase: Use of matrix-assisted laser desorption methods in ion chromatography”; *Science* **267**, 1995, 1483-1485
  59. Mowat IA, Donovan RJ, “Metal-ion attachment to nonpolar polymers during laser desorption/ionization at 337 nm”, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **9**, 1995, 82
  60. Reinhold M, Meier RJ, de Koster CG; „How feasible is matrix-assisted laser/desorption/ ionization time-of-flight mass spectrometry analysis of polyolefins?“, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **12**, 1998, 1962
  61. Rashidezadeh H, Baochuan G; “Investigation of metal attachment to polystyrenes in matrix-assisted laser desorption ionization”, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **9**, 1998, 724-730
  62. Montaudo G, Montaudo MS, Puglisi C, Samperi F; “Self-calibrating property of MALDI-TOF spectra of polymeric materials”; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **8**, 1994, 981-984
  63. Montaudo MS, „ Mass spectra of Copolymers”; *Mass Spectrom. Rev.* **21**, 2002, 108-144
  64. Bahr U, Deppe A, Karas M, Hillenkamp F, Giessmann U; “Mass spectrometry of synthetic polymers by UV-matrix-assisted laser desorption/ionization”, *Anal. Chem.* **64** (22), 1992, 2866-2869. doi:10.1021/ac00046a036
  65. de Koster CG, Duursma MC, van Ronij GJ, Heeren RMA, Boon JJ; “Endgroup analysis of polyethylene glycol polymers by MALDI Fourier-Transform ion cyclotron resonance-MS”, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **9**, 1995, 957-962
  66. Weidner S, Kühn G, Just U; “Characterization of oligomers in poly(ethylene terephthalate) by MALDI-MS”, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **9**, 1995, 697-702
  67. Montaudo G, Montaudo MS, Puglisi C, Samperi F; “Characterization of end-groups in Nylon 6 by MALDI-TOF Mass Spectrometry”, *J. Polym. Sci. A: Polym. Chem.* **34**, 1996, 439-447

68. Karas M, Hillenkamp F; "Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 1000 Daltons", *Anal. Chem.* **60**, 1988, 2299
69. Nicola AJ, Gusev AI, Proctor A, Jackson EK, Hercules DM; "Application of the fast-evaporating sample preparation method for improving quantification of angiotensin II by matrix-assisted laser desorption/ionization", *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **9**, 1995, 1164
70. Gusev AI, Wilkinson WR, Proctor A, Hercules DM; "Improvement of signal reproducibility and matrix/comatrix effect in MALDI analysis"; *Anal. Chem.* **67**, 1995, 1164
71. Hanton SD, Cornelio Clark PA, Owens KG; "Investigations of matrix-assisted laser desorption/ionization sample preparation by time-of-flight ion mass spectrometry", *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **10**, 1999, 104
72. Haddleton DM, Waterson C, Derrick PJ; "Comment: A simple, low-cost, air-spray method for improved sample preparation for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of derivatised poly(ethylene glycol)"; *Eur. Mass Spectrom.* **4**, 1998, 203
73. Axelsson J, Scrivener E, Haddleton DM, Derrick PJ; "Mass discrimination effects in an ion detector and other causes for shifts in polymer mass distribution measured by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry", *Macromolecules* **29**, 1996, 8875
74. Skelton R, Dubois F, Zenobi R; "A MALDI sample preparation method suitable for insoluble polymers"; *Anal. Chem.* **72**, 2000, 1707
75. Danis PO, Karr DE; "Analysis of poly(styrene sulfonic acid) by matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry", *Macromolecules* **28**, 1995, 8548
76. Przybilla L, Brand J-D, Yoshimura K, Räder J, Müllen K; "MALDI-TOF mass spectrometry of insoluble giant polycyclic aromatic hydrocarbons by a new method of sample preparation"; *Anal. Chem.* **72**, 2000, 4591
77. Wei J, Buriak JM, Siuzdak G; „Desorption-ionization mass spectrometry on porous silicon", *Nature* **339**, 1999, 243-245
78. Buriak . M, Allen M J; "Lewis acid mediated functionalization of porous silicon with substituted alkenes and alkynes"; *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 1998, 1339–1340
79. Stewart MP, Buriak J M; "Photopatterned hydrosilylation on porous silicon"; *Angew. Chem. Int. Edn* **37**, 1998, 3257–3261
80. Canham LT, w: "*Properties of Porous Silicon*" (ed. Canham LT), 83–88, (Institution of Electrical Engineers, London, 1997

81. Amato G, Rosenbauer M, w: "*Optoelectronic Properties of Semiconductors and Superlattices*" (eds. Amato G, Delerue C, Bardeleben H.-J.V.), 3–52 (Gordon and Breach, Amsterdam, 1997)
82. Issaq HJ, Conrads TP, Prieto DRA, Tirumalai R, Veenstra TD; "SELDI-TOF MS for diagnostic proteomics", *Anal. Chem.* **75** (7), 2003, 148 A – 155 A
83. „Mass Spectrometry in Medicinal Chemistry”, Vol. 36, Ed. Klaus Wanner, Georg Höfner; Wiley 2007, ISBN 978-3-527-31456-0
84. Su J, Mrksich M; „Using mass spectrometry to characterize self-assembled monolayers presenting peptides, proteins and carbohydrates”; *Angew. Chem. Int. Ed.* **41**, 2002, 4715-4718
85. Min DH, Su J, Mrksich M; „Profiling kinase activities by using a peptide chip and mass spectrometry“; *Angew. Chem. Int. Ed.* **431**, 2004, 5973-5977





**Z zakresu chemii supramolekularnej  
ukazały się dotychczas następujące pozycje:**

**Zastosowanie magnetycznego rezonansu jądrowego w chemii  
supramolekularnej**

G. Schroeder, B. Gierczyk, 2002

**Kompleksy typu gość-gospodarz**

Pod redakcją G. Schroedera, 2003

**Zastosowanie spektrometrii mas w chemii supramolekularnej**

R. Frański, G. Schroeder, 2003

**Maszyny molekularne**

G. Schroeder, J. Wyrwał, 2004

**Syntetyczne receptory jonowe**

Pod redakcją G. Schroedera, 2005

**Syntetyczne receptory molekularne**

Pod redakcją G. Schroedera, 2007

**Receptory supramolekularne**

Pod redakcją G. Schroedera, 2007

**Materiały supramolekularne**

Pod redakcją G. Schroedera, 2008

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

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

