RECEPTORY SUPRAMOLEKULARNE

Praca zbiorowa
pod redakcją Grzegorza Schroedera

Poznań 2007

Opiniodawca:

Doc. dr hab. Piotr Grzesiak

Opracowanie techniczne:
Marta Schroeder
Jan Polak

Poznań 2007

ISBN 978-83-89936-19-4

Wydawnictwo:
BETAGRAF P.U.H.
Św. Antoniego 24
61-359 Poznań

SPIS TREŚCI

Książka adresowa 4

Wstęp 9

1. Michał Cegłowski, Grzegorz Schroeder
Efekty stabilizujące układy gość – gospodarz 11

2. Joanna Kurczewska, Grzegorz Schroeder
Efekt templatowy – supramolekularna strategia syntezy 27

3. Paweł Niedziałkowski, Dorota Zarzeczńska, Tadeusz Ossowski
Synteza oraz charakterystyka kompleksów opartych na cząsteczce 1,4,7,10-tetraazacyklododecanu 61

4. Grzegorz Schroeder
Wymiatacze molekularne 89

5. Piotr Młynarz, Anna Czernicka, Agata Rydzewska, Paweł Kafarski
Nowoczesna diagnostyka medyczna. Chipy i matryce molekularne 101

6. Izabela Nowak
Uporządkowane nanoporowate materiały hybrydowe – organiczne krzemionki165

7. Arleta Skotowska, Radosław Pankiewicz, Grzegorz Schroeder
Jonofory naturalne – salilomycyna 203

8. Mariusz Walkowiak, Daniel Waszak, Monika Osińska, Grzegorz Lota, Błażej Gierczyk, Grzegorz Schroeder
Zastosowania podandów krzemowych w akumulatorach litowo-jonowych i kondensatorach elektrochemicznych 241

9. Krzysztof Wołowiec, Waldemar Iwanek
Rezorcynoareny jako fazy stacjonarne w GC i HPLC 271

10. Błażej Gierczyk, Grzegorz Schroeder
Zastosowanie dyfuzyjnych pomiarów NMR w chemii supramolekularnej . . 289

Prof. dr hab. Grzegorz Schroeder
Uniwersytet im. A. Mickiewicza
Wydział Chemii
Grunwaldzka 6
60-780 Poznań
e-mail: schroeder@amu.edu.pl
tel. +48-61-8291-486
fax: +48-61-8658-008

Michał Cegłowski
Uniwersytet im. A. Mickiewicza
Wydział Chemii
Grunwaldzka 6
60-780 Poznań
e-mail: michal_c@icpnet.pl

Błażej Gierczyk
Uniwersytet im. A. Mickiewicza
Wydział Chemii
Grunwaldzka 6
60-780 Poznań
e-mail: hanuman@amu.edu.pl

Waldemar Iwanek
Akademia Świętokrzyska
Instytut Chemii
Chęcińska 5
25-020 Kielce
e-mail: waldemar.iwanek@neostrada.pl

Joanna Kurczewska
Uniwersytet im. A. Mickiewicza
Wydział Chemii
Grunwaldzka 6
60-780 Poznań
e-mail: asiaw@amu.edu.pl

Izabela Nowak
Uniwersytet im. A. Mickiewicza
Wydział Chemii
Grunwaldzka 6
60-780 Poznań
e-mail: nowakiza@amu.edu.pl

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

Piotr Młynarz
Zakład Chemii Bioorganicznej
Wydział Chemiczny
Politechnika Wrocławska
Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370 Wrocław
e-mail: piotr.mlynarz@pwr.wroc.pl

Agata Czernicka
Zakład Chemii Bioorganicznej
Wydział Chemiczny
Politechnika Wrocławska
Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370 Wrocław

Agata Rydzewska
Zakład Chemii Bioorganicznej
Wydział Chemiczny
Politechnika Wrocławska
Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370 Wrocław

Paweł Kafarski
Zakład Chemii Bioorganicznej
Wydział Chemiczny
Politechnika Wrocławska
Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370 Wrocław
e-mail: pawel.kafarski@pwr.wroc.pl

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

Tadeusz Ossowski
Uniwersytet Gdański
Wydział Chemii
Zakład Chemii Supramolekularnej
Sobieskiego 18/19
80-852 Gdańsk
e-mail: tedos@univ.gda.pl

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

Radosław Pankiewicz
Uniwersytet im. A. Mickiewicza
Wydział Chemii
Grunwaldzka 6
60-780 Poznań
e-mail: radek@px.pl

Mariusz Walkowiak
Centralne Laboratorium Akumulatorów i Ogniw
Oddział Instytutu Metali Nieżelaznych
Forteczna 12
61-362 Poznań
e-mail: walkowiak@claio.poznan.pl

Daniel Waszak
Centralne Laboratorium Akumulatorów i Ogniw
Oddział Instytutu Metali Nieżelaznych
Forteczna 12
61-362 Poznań

Monika Osińska
Centralne Laboratorium Akumulatorów i Ogniw
Oddział Instytutu Metali Nieżelaznych
Forteczna 12
61-362 Poznań

Grzegorz Lota
Centralne Laboratorium Akumulatorów i Ogniw
Oddział Instytutu Metali Nieżelaznych
Forteczna 12
61-362 Poznań

Krzysztof Wołowiec
Akademia Świętokrzyska
Instytut Chemii
Chęcińska 5
25-020 Kielce

Początek wieku XXI można bez wątpienia nazwać okresem dominacji chemii supramolekularnej w nauce. Ten dział nauki swoje zainteresowania kieruje ku supercząsteczkom, które nie tylko posiadają unikalne właściwości chemiczne, ale również stanowią interesujący substrat do otrzymywania nowych materiałów o wyjątkowych parametrach. Supercząsteczki to agregaty powstałe na skutek łączenia się komponentów o innych właściwościach niż produkt końcowy. Supramolekularne agregaty to najczęściej układy typu gość-gospodarz lub kompleksy inkluzyjne tworzące się w procesie rozpoznania molekularnego lub samoorganizacji. Rozpoznawanie molekularne (ang. *molecular recognition*) w odniesieniu do kompleksów supramolekularnych oznacza, że gość i gospodarz muszą być podwójnie komplementarne: zarówno elektronowo-energetycznie, jak i geometryczno-sterycznie poprzez dopasowanie grup funkcyjnych, aby były zdolne do utworzenia termodynamicznego stabilnego produktu. Rozpoznawanie molekularne jest procesem dynamicznym. Efektywne rozpoznawanie molekularne wymaga powierzchni o wzajemnie uzupełniających się rozmiarach, kształtach i funkcjach. Samoorganizacja (ang. *self-assembly*) w rozumieniu supramolekularnym opiera się na spontanicznym powstawaniu, w warunkach kontrolowanych termodynamicznie, wieloskładnikowych agregatów w na bazie informacji zawartych w każdym pojedynczym elemencie. Końcowy agregat, w określonych warunkach i środowisku, charakteryzuje się stabilną termodynamicznie strukturą.

Supramolekularne receptory zdolne do rozpoznania molekularnego lub samoorganizacji znalazły zastosowanie w wielu dziedzinach nauki i techniki. Monografia „Receptory supramolekularne" przedstawia wybrane zagadnienia z chemii supramolekularnej istotne dla zrozumienia procesów chemorecepcji i jej praktycznego zastosowania. Praca została przygotowana przez grupę chemików z różnych ośrodków naukowych realizujących wspólne badania nad praktycznym zastosowaniem receptorów molekularnych w syntezie i analizie chemicznej.

Prof. dr hab. Grzegorz Schroeder

Poznań, 20 listopada 2007 roku

Z serii monografii dotyczących chemii supramolekularnej dotychczas ukazały się następujące książki:

1. G. Schroeder, B. Gierczyk *Zastosowanie magnetycznego rezonansu jądrowego w chemii supramolekularnej*, Betagraf, Poznań, 2002

2. R. Frański, G. Schroedera *Zastosowanie spektrometrii mas w chemii supramolekularnej*, Betagraf, Poznań, 2003

3. G. Schroeder (praca zbiorowa) *Kompleksy typu gość-gospodarz*, Betagraf, Poznań, 2003

4. G. Schroeder, J. Wyrwał *Maszyny molekularne*, Betagraf, Poznań, 2004

5. G. Schroeder (praca zbiorowa) *Syntetyczne receptory jonowe*, Betagraf, Poznań, 2005

6. G. Schroeder (praca zbiorowa) *Syntetyczne receptory molekularne*, Betagraf, Poznań, 2007

Monografie te dostępne są w wersji elektronicznej w Wielkopolskiej Bibliotece Cyfrowej (wbc.poznan .pl)

Rozdział 1

Efekty stabilizujące układy gość - gospodarz

Michał Cegłowski, Grzegorz Schroeder

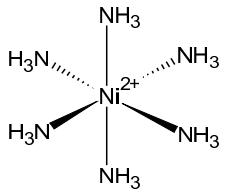
Uniwersytet im. A. Mickiewicza, Wydział Chemii, Grunwaldzka 6, 60-780 Poznań

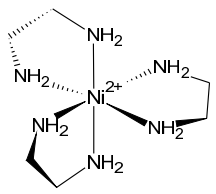
Receptory molekularne to układy zdolne do wiązania innych cząsteczek lub jonów w aktywnych fragmentach swojej struktury na zasadzie kompleksów gość-gospodarz. Trwałość połączeń gość-receptor zależy od dopasowania przestrzennego oraz rodzaju oddziaływań pomiędzy składnikami. Otrzymanie trwałych kompleksów gość–gospodarz jest możliwe dzięki utworzeniu dostatecznie silnego oddziaływania między cząsteczką donora a akceptorem. W wielu przypadkach energia sumaryczna uzyskana dla całego kompleksu jest większa niż suma wszystkich energii cząstkowych. Taką dodatkową energię stabilizacji tłumaczy się efektem chelatowym, makrocyklicznym lub kryptatowym[1-27].

Efekt chelatowy

Efekt chelatowy[1,2] jest bardzo dobrze znany w chemii koordynacyjnej i najczęściej jest obserwowany przy tworzeniu kompleksów przez ligandy zawierające w swojej strukturze dwa atomy donora. Stwierdzono, że takie kompleksy są o wiele stabilniejsze niż analogiczne kompleksy otrzymane z ligandów zawierających pojedyncze atomy donora. Kompleks chelatowy Ni^{2+} z 1,2-diaminoetanem jest około 10^8 razy bardziej stabilny niż kompleks z amoniakiem.

$$[Ni(NH_3)_6]^{2+} + 3NH_2CH_2CH_2NH_2 \xrightarrow{\log K = 8{,}76} [Ni(NH_2CH_2CH_2NH_2)_3]^{2+} + 6NH_3$$





Zwiększoną stabilność kompleksów chelatowych w roztworze można wytłumaczyć zarówno efektami termodynamicznymi, jak i kinetycznymi. W przypadku reakcji jonu metalu z ligandem chelatowym można zauważyć, że sumaryczna liczba moli jest większa dla produktów niż dla substratów reakcji. Dla przedstawionej reakcji kompleksowania jonów niklu mamy siedem moli produktów i cztery mole substratów. Sprzyja to wzrostowi entropii, co, zgodnie ze wzorem na entalpię swobodną Gibbsa: $\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0$, jest korzystne energetycznie (wzrost stałej trwałości tworzenia kompleksu) dla rozpatrywanej reakcji. Ponadto w wielu przypadkach tworzenia kompleksów chelatowych, obserwuje się również korzystne obniżenie entalpii w stosunku do analogów jednodonorowych, co tłumaczy się korzystniejszą konformacją otrzymanych układów.

Stabilizacja uzyskana dzięki efektowi chelatowemu jest wyraźnie zależna od rozmiaru pierścienia utworzonego przez ligand i atom centralny. Układ 1,2-diaminoetanu z jonami niklu jest przykładem stabilnych kompleksów tworzących pierścienie pięcioczłonowe. Okazuje się, że kompleksy tworzące taki układ są stabilniejsze ze względu na niewielkie naprężenia występujące wewnątrz pierścienia. W czteroczłonowych pierścieniach występują bardzo duże naprężenia, a z kolei wraz ze wzrostem rozmiaru pierścienia jego istnienie staje się coraz mniej prawdopodobne, ze względu na zbyt dużą odległość między donorami. Siła naprężeń w pierścieniu chelatowym zależy w największej mierze od rozmiaru kationu. Dla małych kationów, takich jak kationu boru, czy berylu tworzenie kompleksów chelatowych, w których pierścienie składają się z sześciu atomów jest dość powszechne. Dzieje się tak, gdyż dzięki niewielkim rozmiarom kationu w kompleksach długość wiązania zbliżoną do długości wiązań między atomami węgla w cykloheksanie, w którym naprężenia wewnątrz pierścieniowe nie występują.

Wiele kompleksów supramolekularnych gość-gospodarz jest o wiele bardziej stabilnych niż wynikałoby to z udziału efektu chelatowego. Cząsteczki gospodarza to z reguły układy makroczne, czyli cząsteczki o budowie pierścieniowej zawierające atomy donorowe w swojej strukturze. Dodatkowa energia stabilizacji tego typu układów wynika z udziału efektu makrocyklicznego.

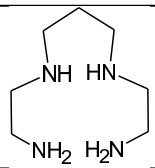
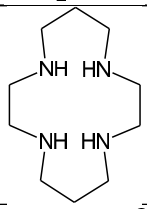
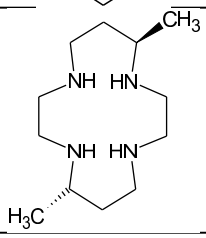
Efekt makrocykliczny

Energia stabilizacji cyklicznych ligandów posiadających w swojej strukturze cztery atomu azotu jest większa niż ich otwarto-łańcuchowych odpowiedników[1-29]. Okazało się, że wyznaczona doświadczalnie energia jest około dziesięć razy większa niż wynikałoby to z efektu chelatowego obserwowanego dla kompleksów miedzi(II) z aminami o różnej ilości atomów azotu w cząsteczkach. Stąd pojawiła się nowa jakość, nie dająca się wyjaśnić na gruncie efektów chelatowych. Pojęcie efektu makrocyklicznego zostało wprowadzone przez Cabbiness'a i Margerum'a[14] w celu ukazania, iż kompleksy, w których ligand jest cykliczny, są o wiele stabilniejsze niż kompleksy utworzone przez otwarto-łańcuchowe ligandy o podobnej strukturze. Wyjaśnienie tego efektu na drodze za pomocą termodynamiki procesów, tak jak uczyniono to w przypadku efektu chelatowego nie było już takie łatwe. Narodziło się wiele kontrowersji odnośnie tego, czy efekt ten powstaje na skutek większego wpływu entalpii, czy entropii[15].

Cabbiness i Margerum[14] w swojej pracy o efekcie makrocyklicznym zaobserwowanym w reakcji cyklicznych tetraaminach z kationami metali odrzucili możliwość wyjaśnienia tego zjawiska na drodze zmian entropii. Uznali, że warto zwrócić uwagę na konfigurację liganda. W późniejszej publikacji Hinz i Margerum[16] nad kompleksami tetraamin i niklu(II) w wodzie potwierdzili tą hipotezę. Wyniki badań uzyskane przez tych autorów prezentowane są w tabeli 1.

Można stwierdzić wyraźny wpływ efektu makrocyklicznego na trwałość otrzymywanych kompleksów poprzez porównanie wartości logarytmu stałej K między cyklicznym i otwarto-łańcuchowym ligandem. Efekt entalpowy wyznaczony dla tych procesów również przemawia na korzyść tworzenia stabilnych kompleksów z cyklicznymi ligandami. Co ciekawe, w tym przypadku zmiany w entropii nie są podporządkowane, jak sądzono wcześniej, efektowi makrocyklicznemu.

Tabela 1. Termodynamiczne parametry tworzenia kompleksów Ni^{2+} z tetraaminami w wodzie[16]

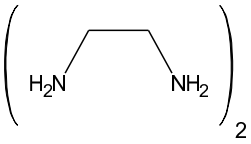
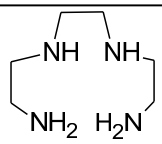
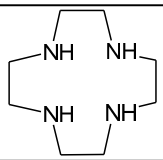
Ligand	log K	$\Delta H\left(\frac{kcal}{mol}\right)$	$T\Delta S\left(\frac{kcal}{mol}\right)$
	15,3	-16,8	4,1
	22,2	-31	0,6
	21,9	-28	2,4

Hinz i Margerum[16] wytłumaczyli wyniki swoich badań różnicą w solwatacji cząsteczek ligandów. Uwolnienie cząsteczek rozpuszczalnika z jonu metalu i ligandów owocuje dodatnimi zmianami entalpii i entropii. Zakładając, że odłączenie cząsteczek rozpuszczalnika od kationów niklu w obu przypadkach jest identyczne, należy zwrócić uwagę na desolwatację ligandów. Cykliczny ligand, który jest mniejszych rozmiarów niż będący jego analogiem ligand otwarto-łańcuchowy, jest otaczany przez mniejszą liczbę cząsteczek rozpuszczalnika. W efekcie oznacza to, iż na jego desolwatację należy zużyć mniejszą ilość energii. Ligand otwarto-łańcuchowy jest solwatowany przez dwie cząsteczki wody więcej niż ligand cykliczny. Dodatkowo patrząc na efekty entropowe, dochodzi się do wniosku, że łatwiej jest umieścić atom akceptora wewnątrz cyklicznego liganda, niż „zawinąć" całą otwarto-łańcuchową cząsteczkę wokół niego. Uznano, że mimo iż efekty entropowe są dość ważnym czynnikiem pozwalającym otrzymać stabilne makrocykliczne kompleksy, to właśnie efekty entalpowe związane z wiązaniami wodorowymi między ligandami i cząsteczkami

rozpuszczalnika są w tym przypadku determinującym czynnikiem. W przypadkach, w których wiązania wodorowe między ligandem a rozpuszczalnikiem są słabe, efekty entropowe jest czynnikiem decydującym o stabilności kompleksu.

W roku 1973 Paoletti, Fabbrizzi i Barbucci[18] opublikowali swoje wstępne badania nad kompleksami tworzonymi przez kationy miedzi(II) i tetraaminy. Zaproponowali, iż efekt makrocykliczny jest wynikiem wpływu zarówno entalpii jak i entropii. Po dokładniejszym przestudiowaniu wyników swoich badań doszli jednak do wniosku, że tylko wpływ entropii jest znaczący[6]. Wyniki ich badań, a także badań Kodamy i Kimury[19,20], zostały zestawione w tabeli 2.

Tabela 2. Termodynamiczne parametry tworzenia kompleksów Cu^{2+} z tetraaminami w wodzie[6]

Ligand	log K	$\Delta H\left(\frac{kcal}{mol}\right)$	$T\Delta S\left(\frac{kcal}{mol}\right)$
	19,7	-25,2	1,7
	20,1	-21,6	5,8
	24,8	-18,3	15,3

W tym przypadku entalpia w przeciwieństwie do entropii ma negatywny wpływ na tworzenie się kompleksu z cyklicznym ligandem. Ligandy dyskutowane w tym przypadku, różnią się tym od ligandów użytych przez Hinz'a i Margerum'a, iż mostki węglowe łączące atomy donorów mają identyczną długość w każdym przypadku. Rozważano również reakcje kationów miedzi(II) z większymi tetraaminowymi ligandami i ich otwarto-łańcuchowymi odpowiednikami. Stwierdzono na podstawie badań spektroskopowych, że entropia decyduje o ich trwałości. W tej samej pracy

porównano energię hydratacji cyklicznych tetraamin i 1,2-diaminoetanu, co wykazało, iż nie występuje między nimi żadna znacząca różnica. Zasugerowano natomiast, iż do liganda cyklicznego może być przyłączona mniejsza liczba cząsteczek wody, natomiast mogą one tworzyć po dwa wiązania wodorowe zamiast jednego. Wyniki tych badań poddają w wątpliwość możliwość wyjaśnienia efektów chelatowych i makrocyklicznych poprzez teorię solwatacji ligandów przedstawioną przez Hinz'a i Margerum'a.

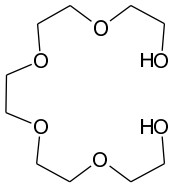
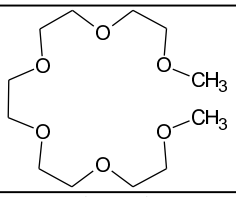
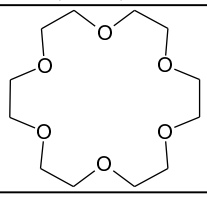
Kodama i Kimura[19,20] na podstawie badań polarograficznych kompleksów miedzi(II) z tetraaminami ustalili, iż wzrost stabilności kompleksów jonów metali z cyklicznymi ligandami zależał wyłącznie od korzystnych zmian w entropii. Stanowi to pewien kontrast do wniosków przedstawionych przez Hinz'a i Margerum'a, gdyż w ich przypadku stabilności kompleksów niklu nie można było wyjaśnić wyłącznie w oparciu o różnice w rozmiarach jonów i pierścieni ligandów. Modele molekularne i badania krystalograficzne przy użyciu promieniowania Röntgena[10,21,22] wykazały, że kationy niklu(II) i miedzi(II) mogą być kompleksowane przez większe tetraamino ligandy. Dzięki modelom molekularnym okazało się również, iż przestrzeń wewnątrz cyklenu (1,4,7,10-tetraazacyklododekanu) jest zbyt mała, aby pomieścić wspomniane kationy.

Podobnie jak w przypadku kompleksów cyklicznych poliamin, tak i kompleksy cyklicznych polieterów są o wiele bardziej stabilne niż ich otwarto-łańcuchowe odpowiedniki. W przypadków kompleksów jonów sodu i potasu z 18-koroną-6 i eterem dimetylowym glikolu pentaetylenowego obserwuje się wzrost stabilności tworzonych kompleksów rzędu 10^3-10^4 razy na korzyść eteru koronowego. Ligandy otwarto-łańcuchowe ze względu na swoją budowę nie są w stanie w pełni „zawinąć się" wokół kationu, gdyż atomy tlenu na końcach cząsteczki będą się wzajemnie odpychać. Ponadto otoczenie kationu przez całą cząsteczkę liganda cechowałoby się niekorzystną entropią. Dla omawianych reakcji zostały zbadane zmiany w entalpii[13,23], co pozwoliło na zrozumienie natury efektu makrocyklicznego. Przedstawione dane zostały zestawione w tabeli 3.

W przypadku eterów koronowych występuje kilka korzystnych zjawisk wpływając na stabilność kompleksów z jonami metali, z którymi nie mamy do czynienia w przypadku poliamin:

- ligandy w pH obojętnym nie posiadają ładunku, a ich zdolność do tworzenia kompleksów nie zależy od wartości pH,
- metalami, które najczęściej tworzą kompleksy z tymi ligandami są metale I i II grupy układu okresowego, które można traktować jako obdarzone ładunkiem kule w przeciwieństwie do metali przejściowych, które mają inną budowę przestrzenną,
- reakcje zachodzą szybko.

Tabela 3. Termodynamika tworzenia kompleksów metali z eterem 18-korona-6 i jego otwarto-łańcuchowymi odpowiednikami w metanolu[13]

Ligand	Kation	log K	$\Delta H\left(\frac{kcal}{mol}\right)$	$T\Delta S\left(\frac{kcal}{mol}\right)$
	K^+ Ba^{2+}	2,05 3,96	-6,37 -6,71	-3,57 -1,31
	Na^+ K^+ Ba^{2+}	1,0 2,27 2,51	-9,14 -8,16 -5,64	-7,7 -5,06 -2,22
	Na^+ K^+ Ba^{2+}	4,33 6,05 7,0	-8,11 -13,21 -10,38	-2,20 -4,96 -0,83

Analiza danych przedstawionych w tabeli 3 nie ujawnia żadnych tendencji dla entalpii ani entropii, które mogłyby wyjaśnić efekt makrocykliczny dla przedstawionych kompleksów. Oczywiście w każdym przypadku stabilność kompleksów tworzonych przez etery koronowe znacznie przewyższa stabilność kompleksów tworzonych przez ich otwarto-łańcuchowe odpowiedniki, jednakże

w żadnych dwóch przypadkach obserwowane wyniki nie pokrywają się w pełni z charakterem tego efektu. Kompleksy z jonami sodu są stabilniejsze głównie dzięki entropii, efekty entalpowe mają w tym procesie bardzo niewielki udział. Do analogicznego wniosku doszli Kodama i Kimura[24] podczas badania kompleksów ołowiu(II) z tetraaminami. Z kolei dodatkowa stabilizacja kompleksów potasu jest uzyskana wyłącznie dzięki korzystnemu wpływowi entalpii. Kompleksy baru są stabilizowane dzięki entalpii oraz entropii, przy czym należy zaznaczyć, iż wpływ entalpii jest większy. Znajomość struktur przestrzennych tych kompleksów jest cenną informacją, która może pomóc w zrozumieniu efektu makrocyklicznego. Okazuje się, że kation potasu o rozmiarze 1,33 Å bardzo dobrze mieści się wewnątrz pierścienia eteru koronowego 18-korona-6, co oznacza, że leży on praktycznie w płaszczyźnie pierścienia. Podobnego efektu należy spodziewać się w przypadku kationu baru[8], który jest o 0,02 Å większy niż kation potasu. Z kolei kation sodu (rozmiar 0,97 Å) jest zdecydowanie za mały, aby idealnie wpasować się w przestrzeń wewnątrz pierścienia. Może to oznaczać, iż albo kation sodu nie tworzy wiązań ze wszystkimi atomami donorów, albo pierścień musi zmienić swoją strukturę przestrzenną, aby dopasować się do wielkości kationu.

W celu lepszego zrozumienia roli rozpuszczalnika i wiązań wodorowych w powstawaniu efektu makrocyklicznego wyznaczono stałe trwałości dla kompleksów eteru 18-korona-6 i jego otwarto-łańcuchowych odpowiedników z kationami baru i potasu w roztworze metanolu o stężeniu 90% i 99%.[13] Otrzymane wyniki zostały przedstawione w tabeli 4.

Bazując na teorii Hinz'a i Margerum'a, iż różnice występujące w solwatacji ligandów cyklicznych i ich otwarto-łańcuchowych odpowiedników są w większej mierze odpowiedzialne za obserwowany efekt makrocykliczny, należałoby się spodziewać odmiennych wartości stałej równowagi przy zastosowaniu różnych rozpuszczalników. Zredukowanego wpływu efektu makrocyklicznego można się spodziewać w rozpuszczalnikach, których siła solwatowania cząsteczek liganda jest mniejsza. Wiązania wodorowe między cząsteczkami rozpuszczalnika a ligandem powinny mieć niższą energię w 99% metanolu, gdyż stała dielektryczna 90% metanolu jest większa. Oznacza to, że mniejszej różnicy między stałymi trwałości eteru koronowego i jego otwarto-łańcuchowego odpowiednika należy oczekiwać w 99%

metanolu. Okazuje się, że wniosek ten jest sprzeczny z przedstawionymi wynikami doświadczalnymi. Różnica wartości log K między kompleksami jonów potasu z 18-korona-6 i eterem dimetylowego glikolu pentaetylenowego w 90% metanolu wynosi 3,39, natomiast dla 99% metanolu wynosi 3,78. Podobne wyniki otrzymuje się podczas badania innych układów. Oznacza to, że efekt makrocykliczny jest większy dla rozpuszczalników o niższych stałych dielektrycznych.

Frensdorff[12] jako pierwszy zauważył, że w łańcuchach polieterowych, jeżeli za atomy tlenu podstawimy atomy azotu lub siarki, efekt makrocykliczny w przypadku cyklizacji takiego liganda przestaje być zauważalny. Efekty jego badań zostały przedstawione w tabeli 5.

Tabela 4. Wartości log K dla kompleksów K^+ i Ba^{2+} z eterem 18-korona-6 i jego otwartołańcuchowymi odpowiednikami w 90% i 99% metanolu[13]

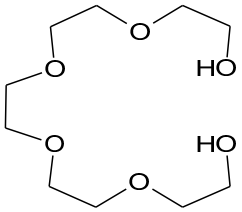
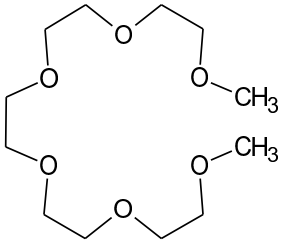
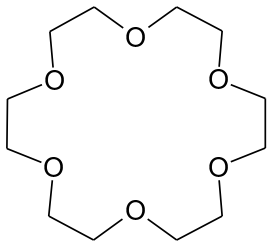
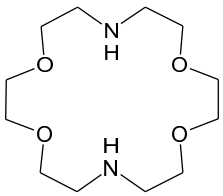
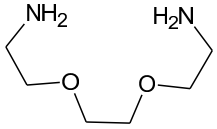
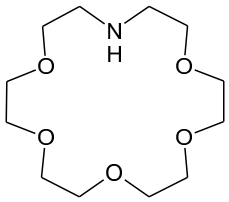
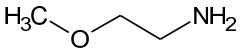
Ligand	Kation	log K	
		90% metanol	99% metanol
	K^+ Ba^{2+}	1,91 3,42	2,05 3,96
	K^+ Ba^{2+}	1,96 2,34	2,27 2,51
	K^+ Ba^{2+}	5,35 6,56	6,05 7,0

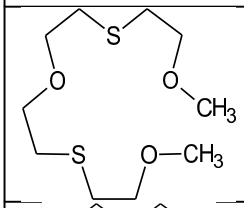
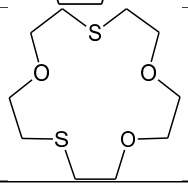
Tabela 5. Wartości log K dla kompleksów Ag^+ z cyklicznymi ligandami i ich otwarto-łańcuchowymi odpowiednikami[12]

Ligand	log K
	7,8
	7,9
	3,3
	3,2

Takie same cechy wykazują ligandy zawierające w swojej strukturze atomy siarki. W tabeli 6 przedstawiono dane termodynamiczne dla kompleksów jonów metali z cyklicznymi ligandami zawierającymi atomy siarki wraz z ich otwarto-łańcuchowymi odpowiednikami o stechiometrii 1:1 oraz 2:1 (liganda do metalu).

Kompleksy Ag^+ i Hg^{2+} są trwalsze dla otwarto-łańcuchowych tio-podstawionych ligandów, co oznacza, iż w tych przypadkach nie obserwuje się efektu makrocyklicznego. Badania krystalicznych kompleksów chlorku palladu(II) z 1,10-ditio-18-koroną-6[26] wykazały, że tylko atomy siarki są zaangażowane w koordynowanie jonów palladu. Atom palladu znajduje się poza pierścieniem, a utworzone wiązania powodują „wygięcie" deformację pierścienia liganda. Brak efektu makrocyklicznego u ligandów zawierających atomy siarki wynika zapewne z tego, iż tylko część pierścienia zaangażowana jest w utworzenie wiązania.

Tabela 6. Termodynamika tworzenia kompleksów Ag^{+} i Hg^{2+} z tio-podstawionymi ligandami w wodzie[11]

Ligand	Kation	Stechiometria 1:1	Stechiometria 2:1		
		$\Delta H\left(\frac{kcal}{mol}\right)$	log K	$\Delta H\left(\frac{kcal}{mol}\right)$	$T\Delta S\left(\frac{kcal}{mol}\right)$
	Ag^{+} Hg^{2+}	-14,13 -14,02	3,06 3,22	-3,68 -7,09	0,68 -3,64
	Ag^{+} Hg^{2+}	-16,57 -16,10	2,70 2,91	-1,00 -5,00	2,80 -1,10

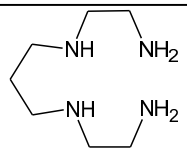
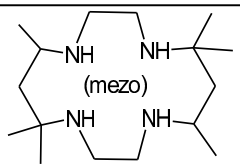
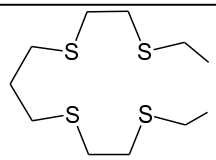
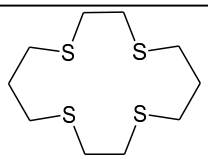
Należy zwrócić uwagę na kinetykę tworzenia kompleksów cyklicznych, gdyż okazuje się ma ona również ważny wpływ na obserwowany efekt makrocykliczny. Informacje przedstawione w tabeli 7 dowodzą, iż kompleksy cyklicznych tetraamin znacznie wolniej ulegają rozpadowi niż ich otwarto-łańcuchowe odpowiedniki.

Fakt ten tłumaczy się hipotezą, iż w ligandzie otwarto-łańcuchowym zastępowanie w sferze koordynacyjnej jonu metalu atomów liganda cząsteczkami rozpuszczalnika rozpoczyna się od jednego z jego końców. W przypadku ligandów cyklicznych proces rozpadu kompleksu jest bardziej złożony. Proponuje się mechanizm, w którym ligand ulega zniekształceniu w celu osłabieniu wiązań koordynacyjnych, aż do momentu, w którym jedno wiązań zostanie zerwane. Taki mechanizm wyjaśnia większą stabilność ligandów cyklicznych, także w takich przypadkach, w których kation metalu nie jest idealnie dopasowany do rozmiaru liganda.

Fakt ten tłumaczy się hipotezą, iż w ligandzie otwarto-łańcuchowym zastępowanie w sferze koordynacyjnej jonu metalu atomów liganda cząsteczkami rozpuszczalnika rozpoczyna się od jednego z jego końców. W przypadku ligandów cyklicznych proces rozpadu kompleksu jest bardziej złożony. Proponuje się

mechanizm, w którym ligand ulega zniekształceniu w celu osłabieniu wiązań koordynacyjnych, aż do momentu, w którym jedno wiązań zostanie zerwane. Taki mechanizm wyjaśnia większą stabilność ligandów cyklicznych, także w takich przypadkach, w których kation metalu nie jest idealnie dopasowany do rozmiaru liganda.

Tabela 7. Kinetykatworzenia i rozpadu kompleksów Cu^{2+} [7,27]

Ligand	Rozpuszczalnik	Stała szybkości tworzenia $(1/M\,s)$	Stała szybkości rozpadu $(1/s)$
	woda	$8{,}9\ 10^{4}$	4,1
	woda	$5{,}8\ 10^{-2}$	$3{,}7\ 10^{-7}$
	80% metanol	$4{,}1\ 10^{5}$	$3{,}0\ 10^{4}$
	80% metanol	$2{,}8\ 10^{4}$	9

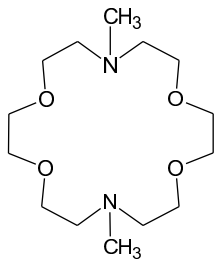
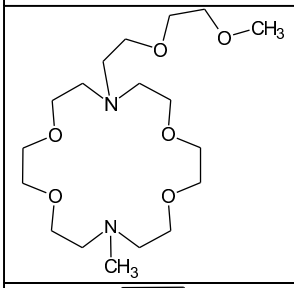
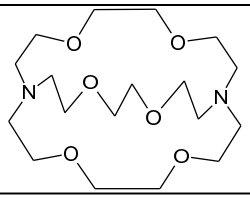
Efekt kryptatowy

Efekt makrocykliczny obserwuje się również w makrobicyklicznych ligandach i kryptandach. Okazuje się, że dodatkowa energia stabilizacji jest o wiele większa niż spodziewana energia uzyskana dzięki efektowi makrocyklicznemu. Właśnie dlatego

omawiany efekty został nazwany efektem kryptatowym. Przykłady takiego efektu zostały przedstawione w tabeli 8 dla pochodnych diaza-18-korony-6.

W wyniku cyklizacji eteru lariatowego otrzymuje się cząsteczkę makrobicykliczną, której kompleksy z kationami potasu są około 10^5 razy trwalsze niż kompleksy ze wspomnianym eterem lariatowym. Wzrost stabilności jest większy niż ten obserwowany podczas efektu makrocyklicznego dla eteru 18-korona-6.

Tabela 8. Wartości stałych równowagi dla kompleksów metali z ligandami makrocyklicznymi w 95% metanolu[9]

Ligand	log K				
	Na^+	K^+	Ca^{2+}	Sr^{2+}	Ba^{2+}
	3,26	4,38	4,4	6,1	6,7
	3,35	4,80			
	7,21	9,75	7,60	11,5	12

Podsumowanie

Informacje uzyskane z badań nad procesami tworzenia kompleksów z ligandami cyklicznymi i ich analogami otwarto-łańcuchowymi pozwalają na

sformułowanie następujących wniosków dotyczących efektu makrocyklicznego i kryptatowego.

1. Stabilność kompleksów jonów metali z układami makrocyklicznymi wzrasta w stosunku do ich analogów otwarto-łańcuchowymi tylko wtedy, gdy zawierają one tylko jeden rodzaj atomów donorowych (atom tlenu, azotu, czy siarki);
2. Stabilność kompleksów jonów metali z układami makrocyklicznymi nie ulega zmianie w stosunku do ich analogów otwarto-łańcuchowymi wtedy, gdy zawierają one kilka rodzaj atomów donorowych (atomy tlenu i siarki, azotu i siarki czy azotu i tlenu);

W przypadku omawianych efektów nie można jednoznacznie stwierdzić, czy powstają one głównie dzięki zmianą entalpii czy też entropii procesu. Wielkość efektu zależy od budowy ligandów oraz typu jonu tworzącego kompleksy

Literatura:

1. J. D. Lamb, R. M. Izatt, J. J. Christensen, D. J. Eatough, *Thermodynamics and Kinetics Of Cation-Macrocycl Interaction* w G. A. Melson, *Coordination Chemistry of Macrocyclic Compunds*, Plenum Press, New York, 1979;
2. E. C. Constable, *Coordination Chemistry of Macrocyclic Compunds*, Oxford Science Publications, 1999;
3. J. W. Steed, Jerry L. Atwood, *Supramolecular Chemistry*, J. Wiley & Sons, 2000;
4. D. H. Busch, K. Farmery, V. Goedken, V. Katovic, A. C. Melnyk, C. R. Sperati, N. Tokel, *Advan. Chem. Soc.*, 89, 7017 (1967);
5. E. Kauffmann, J. M. Lehn, J. P. Sauvage, *Hevl. Chim. Acta*59, 1099 (1976)
6. L. Fabrizzi, P. Paoletti, A. B. P. Lever, *Inorg. Chem.* 15, 1502 (1976);
7. T. E. Jones, L. L. Zimmer, L. L. Diaddario, D. B. Rorabacher, L. A. Ochrymowycz, *J. Am. Chem. Soc.* 97, 7163 (1975);
8. R. D. Shannon, C. T. Prewitt, *Acta Cryst.* B25, 925 (1696);
9. J. M. Lehn, J. P. Sauvage, *J. Am. Chem. Soc.* 97, 6700 (1975);
10. C. Nave, M. R. Truter, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 1974, 2351 (1974);

11. R. M. Izatt, R. E. Terry, L. D. Hansen, A. G. Avondet, J. S. Brandshaw, N. K. Dalley, T. E. Jensen, B. L. Haymore, J. J. Christensen, *Inorg. Chim. Acta* 30, 1 (1978);
12. H. K. Frensdorff, *J. Am. Chem. Soc.* 93, 600 (1971);
13. J. D Lamb, *Synthetic Macrocyclic Ligands: Stability, Selectivity and Transport of Their Cation Complexes*, Ph. D, Disseratation, Brigham Young University, Provo, Utah (1978);
14. D. K. Cabbiness, D. W. Margerum, *J. Am. Chem. Soc.* 91, 6540 (1969);
15. D. Munro, *Chem. Br.* 13, 100 (1977);
16. F. P. Hinz, D. W. Margerum, *Inorg. Chem.* 13, 2941 (1974);
17. A. Dei, R. Gori, *Inorg. Chim. Acta* 14, 157 (1975);
18. P. Paoletti, L. Fabbrizzi, R. Barbucci, *Inorg. Chem.* 12, 1961 (1973);
19. M. Kodama, E. Kimura, *J. Chem Soc. Chem. Commun.* 1975, 326 (1975);
20. M. Kodama, E. Kimura, *J. Chem Soc. Dalton Trans.* 1976, 116 (1976);
21. B. Bosnich, M. L. Tobe, G. A. Webb, *Inorg. Chem.* 4, 1109 (1965);
22. N. F. Curtis, D. A. Swann, T. N. Waters, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 1973, 1408 (1973);
23. P. U. Früh, W Simon, *Protides of the Biological Fluids – 20th Colloquium*, Pergamon Press, New York (1973);
24. M. Kodama, E. Kimura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 49, 2465 (1976);
25. G. Anderegg, *Helv. Chim. Acta* 58, 1218 (1975);
26. B. Metz, D. Moras, R. Weiss, *J. Inorg. Nucl. Chem.* 36, 785 (1974);
27. D. K. Cabbiness, D. W. Margerum, *J. Am. Chem. Soc.* 92, 2151 (1970);
28. T. E. Jones, D. B. Rorabacher, L. A. Ochrymowycz, *J. Am. Chem. Soc.* 97, 7485 (1975);
29. M. Micheloni, P. Paoletti, and A. Sabatini, J. Chem. SOC., Dalton. Trans., (1983), 1189;

Rozdział 2

Efekt templatowy - supramolekularna strategia syntezy

Joanna Kurczewska, Grzegorz Schroeder

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

1. Wprowadzenie

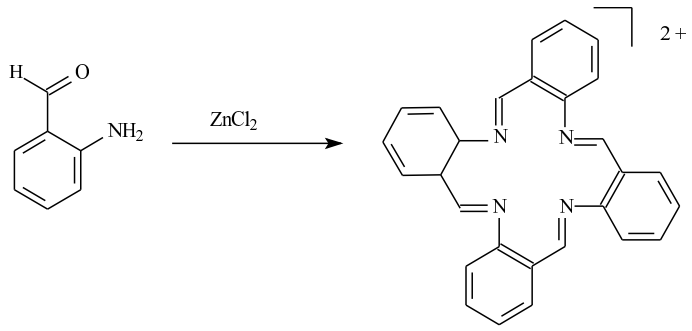
Pochodzenie słowa templat (*ang. template*) sięga odległych czasów średniowiecza, kiedy to zostało spopularyzowane w środowisku architektów, budowniczych, kamieniarzy i rzemieślników. W ówczesnych realiach jego znaczenie ściśle wiązało się z wymienionymi zawodami, tj. odnosiło się do szablonu lub formy wykonanej z drewna lub metalu, a także wzornika przy obróbce kamieni lub budowie przejść ze sklepieniem łukowym. Zadanie templatu ograniczało się wyłącznie do przenoszenia informacji, gdyż nie stanowił on części konstrukcji i mógł być ponownie wykorzystany. Przykładowo przy budowie kamiennego sklepienia łukowego, zadaniem „szablonu" było przytrzymywanie kamieni w wyznaczonym miejscu do momentu utrwalenia zaprawy, po czym go usuwano uzyskując wolno stojącą konstrukcję.

Chemicy postanowili wykorzystać właściwości templatów na poziomie cząsteczkowym. Takie molekularne templaty (*ang. molecular templates*) to czynniki sterujące powstawaniem sprecyzowanego pojedynczego produktu z substratu lub substratów o potencjalnej zdolności do organizowania się i reagowania na szereg sposobów. Punktem wyjścia było naśladowanie naturalnie występujących templatów o wysokiej selektywności. Przykładem wartym przytoczenia jest DNA stanowiący templat dla RNA.

Początkowo koncentrowano się wyłącznie na reakcjach makrocyklizacji z udziałem kationów metali w roli templatów (Rys. 1)[1]. Koncepcję efektu

templatowego (*ang. template effect*) przedstawił w latach 60-tych Busch[2], który do zobrazowania swojej teorii wykorzystał reakcję między kompleksem niklu (II) a 1,2-bis(bromometylo)benzenem (Rys. 2).

W przypadku wolnego substratu powstają inne produkty – cykliczny i acykliczny, zatem nie ma możliwości otrzymania nieskompleksowanego liganda.



Rysunek 1. Kondensacja 2-aminobenzaldehydu w obecności chlorku cynku (II) prowadząca do układu makrocyklicznego

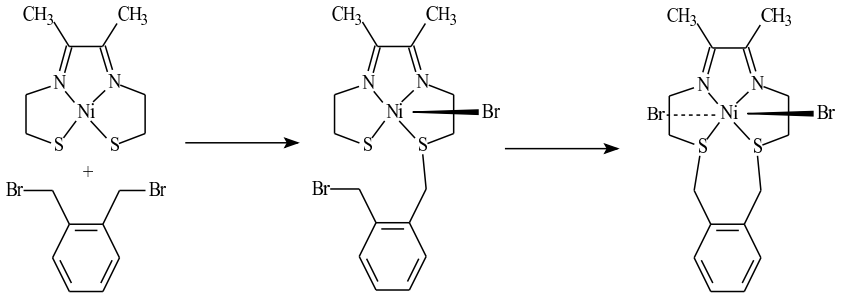
Zgodnie z założeniem Busch'a templat chemiczny definiuje się jako czynnik organizujący zbiór atomów zgodnie z jednym konkretnym położeniu geometrycznym celem połączenia atomów na z góry zaplanowany sposób[3]. Zatem zasadnicze właściwości templatu to:

- zdolność do przestrzennego organizowania zbioru atomów,
- ograniczenie otrzymywanych produktów do jednego mimo możliwości uzyskania większych ilości,
- stanowienie nie tylko podstawy, na której opiera się budowana struktura, ale także czynnika sprzyjającego przyciąganiu elementów porządkowanych wokół niego.

2. Znaczenie templatów

Wyróżnia się dwa typy templatów, tj. templat termodynamiczny i kinetyczny. Pierwszy odpowiada za przesunięcie równowagi odwracalnej reakcji w kierunku

pożądanego produktu. Z kolei drugi dotyczy reakcji nieodwracalnych i stabilizuje główny stan przejściowy prowadzący do oczekiwanego produktu. Dodatkową zaletą templatów kinetycznych jest prawie nieodwracalne i silniejsze wiązanie produktu niż substratów, co za tym idzie sprzyjają powstawaniu produktu także termodynamicznie. Klasyfikacja obserwowanego efektu zachodzi głównie na podstawie warunków reakcji i skali czasu. Templaty kinetyczne wydają się dużo bardziej złożonym zagadnieniem, choć jednocześnie są bardziej uniwersalne w porównaniu do termodynamicznych. Templaty termodynamiczne muszą jedynie wiązać pożądany produkt silniej od innych składników mieszaniny reakcyjnej. Z kolei od templatów kinetycznych oczekuje się wiązania wszystkich stanów przejściowych reakcji, obniżania ich energii a tym samym poruszania się w takich obszarze energetycznym, który faworyzuje preferowaną ścieżkę przebiegu reakcji i chroni przed niepożądanymi drogami.



Rysunek 2. Nikiel(II) jako makrocyklizujący templat

Układy przypominające templaty to enzymy. Wykazują one zdolność do przyspieszania reakcji i wzrostu jej specyficzności na kilka sposobów:

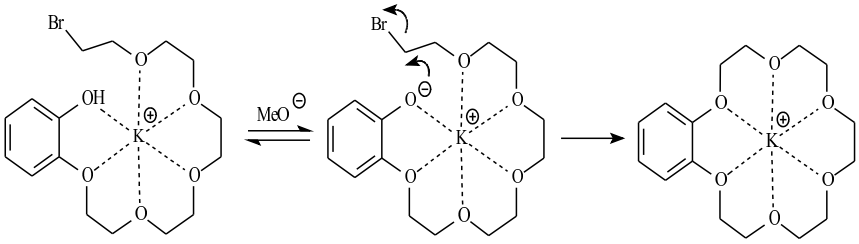
- obniżają wielkość ΔH^{+} reakcji poprzez stabilizację ładunków i modyfikację substratów dla zwiększenia ich reaktywności,
- obniżają wielkość ΔS^{+} reakcji przez zwiększanie sąsiedztwa grup i kontrolę specyficzności reakcji przez wiązanie substratów za pomocą szczególnej orientacji,
  - powodują zmianę katalityczną poprzez silniejsze wiązanie stanów przejściowych niż substratów czy produktów.

2.1 Topologia reakcji

W zależności od topologii działania templaty określa się jako: cyklizujące, liniowe lub wplecione.

2.1.1 Templaty cyklizujące

Typowym przykładem cyklizacji sterowanej templatem jest proces makrocyklizacji wywołany obecnością kationu metalu (Rys. 3)[4].



Rysunek 3. Templat w formie kationu metalu prowadzący do powstania benzo[18]korony-6

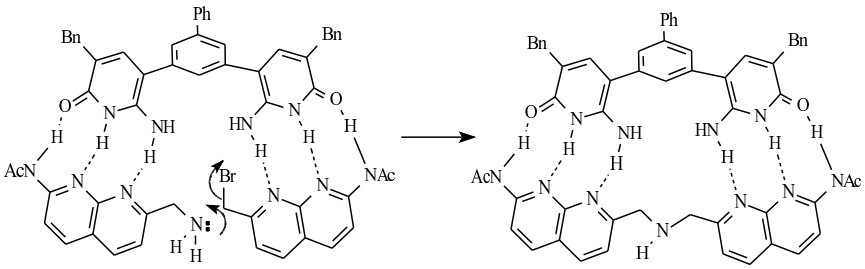
Związki makrocykliczne powstają także z udziałem szeregu innych templatów. Przykładowo bogaty w elektrony hydrochinon pełnie rolę templatu w syntezie czterokationowego makrocykla i oddziaływuje (π-π) z ubogim w elektrony fragmentem bipirydylowym substratu. Organiczne ligandy mogą pełnić rolę templatów także dzięki koordynacji metali. Na tej drodze powstają m. in. oligomery cyklicznych porfiryn.

Templaty cyklizujące mogą ponadto pełnić rolę czynników „zamiatających" substraty podatne na cyklizację i tym samym umożliwiać powstawanie liniowych oligomerów. Przy czym takie „zamiatające" templaty nie wywołują bezpośredniego powstawania dłuższych oligomerów, a prowadzą do cyklizacji cząsteczek z dwoma reaktywnymi końcami, które w dalszym etapie ulegają sprzęganiu.

2.1.2 Templaty liniowe

Z reguły templaty liniowe działają na zasadzie wzmagania reakcji między dwoma związanymi substratami, a nie między dwoma końcami tego samego substratu.

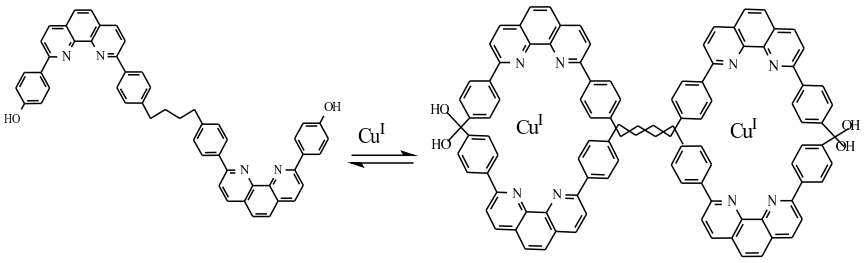
Typowym przykładem obecności takich templatów jest replikacja DNA i synteza RNA. W obu przypadkach pojedyncza nić DNA pełni rolę templatu, a sekwencja zasad w tej nici jest komplementarna do powstającej sekwencji w nowej nici (Rys. 4).



Rysunek 4. Templat wiąże jednocześnie dwa substraty w postaci potrójnego kompleksu i przyspiesza reakcję między nimi

2.1.3 Templaty wplecione

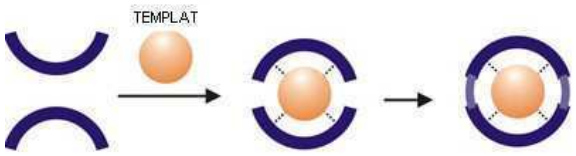
Zadaniem tej grupy templatów jest wymuszanie na substratach przyjmowania topologii przeplatającej się nici. Przykładowo rolę tego typu templatu pełni miedź(I), dzięki której obecności ligandy fenantrolinowe układają się prostopadle wokół metalu i powstaje katenand (Rys. 5).



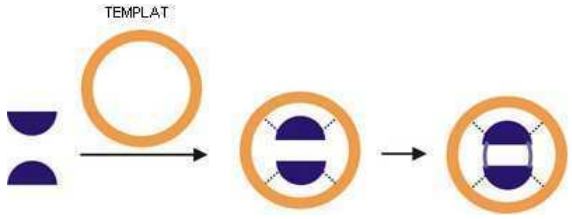
Rysunek 5. Miedź(I) jako templat wpleciony w syntezie katenandu

Inny podział, uwzględniający topografię zakłada następujące typy templatów[5]:

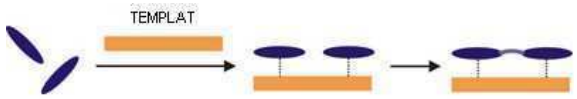
a) wypukłe, których rolę pełnią kationy, wokół których budują się prostsze (etery koronowe) lub bardziej złożone struktury (rotaksany, katenany),



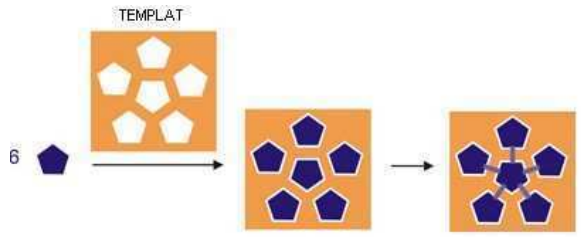
b) wklęsłe, organizujące reagenty we wnęce, w której związane są z reguły oddziaływaniami niekowalencyjnymi. Powstawanie pożądanego wiązania to efekt orientacji przestrzennej i znacznego stężenia reagentów we wnęce,



c) liniowe,



d) płaskie, na które składa się powierzchnia wiążąca cząsteczki w specyficzny sposób i umożliwiająca ich samoorganizację celem otrzymania uporządkowanej struktury.



Poza wymienionymi typami templatów istnieją też takie, które charakteryzuje przeciwne działanie do wcześniej omawianych, tj. nie sprzyjają powstawaniu określonego produktu. Przy czym działanie takich negatywnych templatów opiera się nie na przyspieszaniu reakcji konkurencyjnych, a niesprzyjaniu określonemu rozkładowi przestrzennemu atomów, które dawałoby wspomniany produkt.

Osobną grupę stanowią templaty enzymatyczne. Przykładowo nierybosomowy peptyd syntetaza stanowi duży templat enzymatyczny do syntezy strukturalnie odmiennej i istotnej pod kątem farmakologicznym klasy peptydów. Biosyntetyczne kompleksy wspomnianych nierybosomalnych peptydów działają na zasadzie wielomodułowej organizacji, gdzie każdy moduł odpowiada za specyficzne rozpoznanie, aktywację i wprowadzanie określonego aminokwasu do powstającego łańcucha peptydowego. Stosownie do tego pojedynczy moduł dzieli się na poszczególne strefy katalityczne, tj. przyłączanie adeniny czy wiązanie kowalencyjne tioestru. W konsekwencji modułowa struktura wymusza ścisłą współliniowość biosyntetycznego templatu i pierwszorzędowej struktury peptydowego produktu[6].

3. Przegląd zespolonych struktur powstałych na drodze syntezy templatowej

W dzisiejszych czasach możliwe jest kontrolowanie skomplikowanej sekwencji etapów („przewlekanie", „krzyżowanie", zamykanie pierścieni, inne sposoby wiązania) w celu otrzymania wysoce złożonych układów. Liczne wzory strukturalne układów otrzymanych z udziałem templatów chemicznych przedstawia rysunek 6[7].

Celem nadrzędnym jest umiejętność otrzymywania polimerów poprzez kontrolowanie serii kolejnych etapów, gdyż dąży się do otrzymania wysoce skomplikowanych struktur, jak molekularne warkocze czy tkaniny.

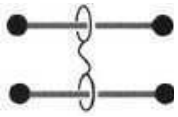
3.1 Jony metali w roli templatów

Jony metali do historyczne pierwowzory templatów, które odegrały kluczową rolę w rozwoju chemii ligandów makrocyklicznych i ich pochodnych. Pojedynczy jon metalu działa na zasadzie szczególnego punktu, wokół którego powstaje określona struktura, niemożliwa do otrzymania na inny znany sposób. Dodatkową zaletą tego typu templatów jest możliwość ich odzysku bez naruszenia uzyskanej struktury.

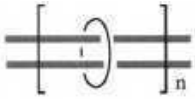
Potencjał templatów jonowych do uzyskiwania zespolonych struktur wykorzystano do otrzymywania katenandów, tj. układów złożonych z dwóch lub więcej pierścieni połączonych za pomocą wiązań mechanicznych. Mimo innych możliwości syntezy tego typu związków, metody templatowe okazały się najbardziej wydajne. Proste katenandy stanowią punkt wyjścia do uzyskiwania węzłów. Pierwszy najprostszy węzeł powstał przez wykorzystanie układu stabilizowanego przez dwa kationy miedzi(I), (Rys. 5). W obecności jonów miedzi para podwójnie skręconych zwojów, stanowiąca pojedynczy ligand, jest skręcona prostopadle. Wprowadzenie dodatkowego ogniwa łączącego skutkuje otrzymaniem węzła (Rys. 7)[8]. Węzły złożone powstają z kolei na skutek przecięcia nici w pojedynczym węźle. Wolne końce łączą się z drugim rozerwanym węzłem, dając w konsekwencji większy układ węzłowy oparty na mniejszych i prostszych.[9]

Rotaksany

[1]-rotaksan

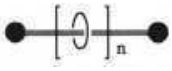


Bis-[2]-rotaksan



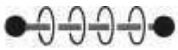
Niezablokowany z podwójną nicią

[2]-rotaksan

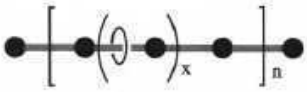


Zablokowany na końcach

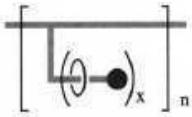
Polimer rurowy



[5]-rotaksan



Wielokrotnie zablokowany

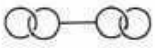


Boczne ramię

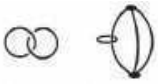
Katenandy

[1]-katenand

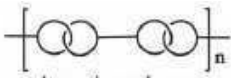
„precel"

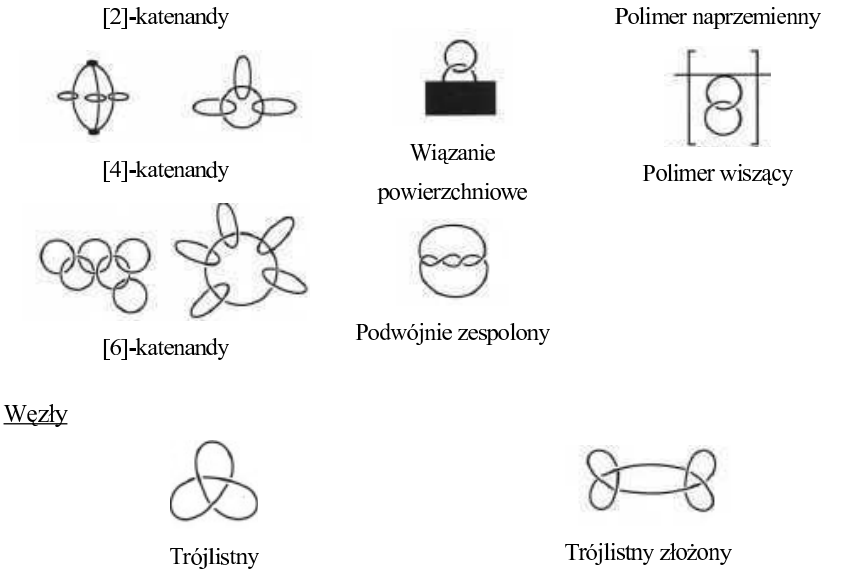


Bis-[2]-katenand



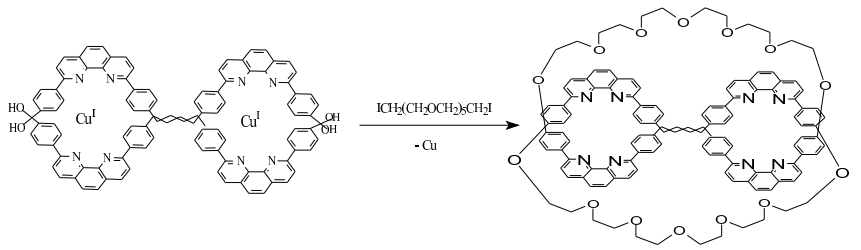
„hak i drabina"





Rysunek 6. Przykłady struktur zespolonych powstałych na drodze syntezy templatowej: rotaksany, katenandy i węzły

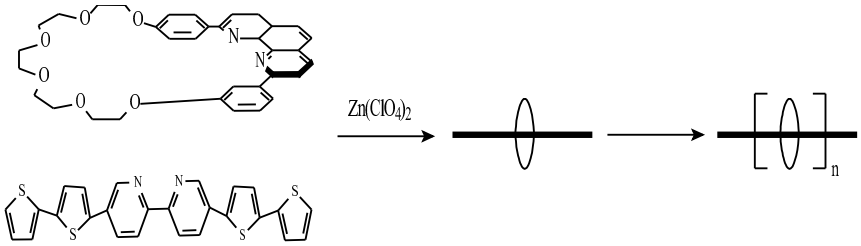
Pierwsze złożone węzły powstały w obecności templatów miedziowych i dwóch sprzężonych składników. Ostateczne sprzężenie czterech zwojów następuje przez połączenie dwóch *m*-fenylenowych ligandów z łańcuchem poliglikolowym.



Rysunek 7. Synteza pierwszego trójlistnego węzła

Ze względu na duże prawdopodobieństwo uzyskania układów cechujących się znaczną wytrzymałością i labilnością, poszukiwano także takich powiązanych struktur, które miałyby charakter polimerów. Przykładowo polirotaksany powstają z udziałem

jonu metalu w roli templatu. Część pierścieniową stanowi związek makrocykliczny zawierający fragment fenantrolinowy, a przeplata ją struktura z fragmentem bipirydylowym. Uzyskany monomer pseudorotaksanu ulega polimeryzacji elektrochemicznej, a otrzymany polimer charakteryzuje się zdolnością do wiązania zarówno cynku (II) jak i miedzi (I), (Rys. 8)[10].

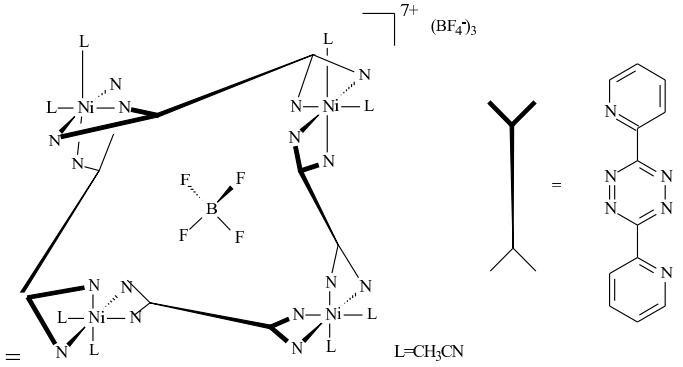


Rysunek 8. Polirotaksan oparty na kationie cynku (II) - nić z fragmentem bipirydylowym i makrocykl z fragmentem fenantrolinowym

3.2 Templaty anionowe

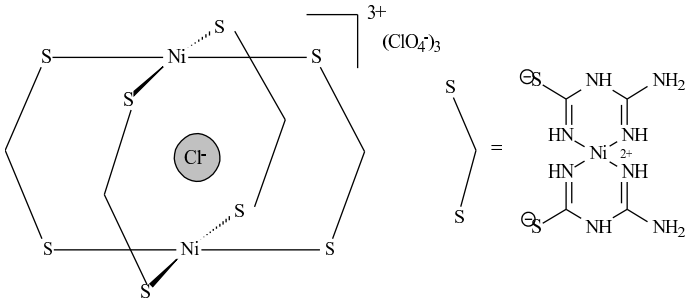
Pomimo, że zagadnienie reakcji templatowych jest obecnie doskonale znane i powszechnie stosowane, to wykorzystanie anionów w roli templatów wciąż stanowi względnie młody obszar badań. W przeciwieństwie do szeroko rozpowszechnionych i wykorzystywanych templatów kationowych, negatywnie naładowane cząstki znalazły zastosowanie w tworzeniu specyficznych cząsteczek zaledwie w ciągu ostatnich kilku lat. Wolniejszy rozwój tej grupy templatów wynika z rozproszonej natury anionów, które wrażliwe są na wartość odczynu pH i posiadają stosunkowo wysokie wartości energii solwatacji[11].

Konstrukcja licznych zespołów koordynowanych przez metale zależy od wpływu templatów anionowych. Tym sposobem otrzymuje się szereg nieorganicznych motywów, w tym makrocykli, klatek, nonatub, polimerów i sieci[12]. Oszacowanie roli anionowych templatów pozwala wykorzystanie ich w roli czynników kierujących powstawaniem metalomakrocykli. I tak mały anion tetrafluoroboranowy sprzyja powstawaniu cząsteczkowych kwadratów (Rys. 9), podczas gdy większy SbF_6^- - cząsteczkowego pięciokąta[13].



Rysunek 9. Metalomakrocykl powstały w wyniku syntezy z udziałem templatu anionowego

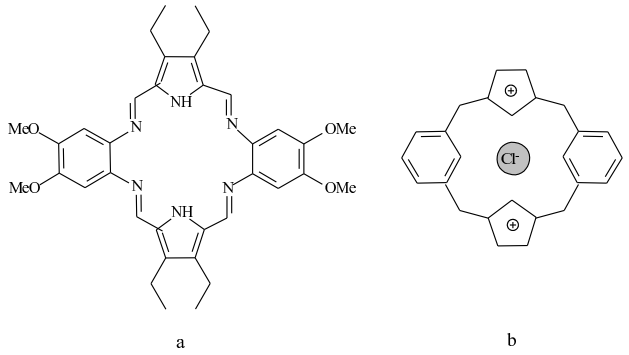
Podobnie sprawa wygląda w przypadku powstawania kompleksów metaloklatek. Geometrię i rozmiar anionów wykorzystano do kierowania powstawaniem zbioru klatek typu M_4L_6[14], poprzez połączenie oddziaływań wiązań wodorowych i elektrostatycznych z templatami czworościennymi typu BF_4^- i ClO_4^-.[15] Co więcej, przy udziale anionów jako czynników templatujących udało się także uzyskać sensory kolorymetryczne[16]. Układy klatkowe z Ni(II) lub Pd(II) powstają wyłącznie w obecności templatu chlorkowego lub bromkowego (Rys. 10), przy czym najbardziej skuteczne są tu chlorki, a za ich pośrednictwem dochodzi do oddziaływań elektrostatycznych i wiązań wodorowych z ligandem. Ze względu na intensywne zmiany barwy towarzyszące powstawaniu wspomnianych metaloklatek, takie układy stanowią doskonałe sensory dla jonów templatujących.



Rysunek 10. Metaloklatka powstała w wyniku syntezy z udziałem templatu anionowego

W ostatnim czasie wykazano zdolność ograniczonego powierzchniowo anionu chlorkowego do narzucania osadzonej monowarstwie metalomakrocykli porządkowania o charakterze dalekiego zasięgu[17]. Aniony chlorkowe adsorbowały się na dodatnio naładowanej elektrodzie miedziowej, a następnie poddawane były działaniu związku makrocyklicznego. W idealnych warunków do osadzania, uzyskiwano wzór uporządkowany dwuwymiarowo. Z kolei przy adsorpcji na powierzchni grafitowej bez udziału templatu chlorkowego, powstały wzór nie był jednolity.

Synteza licznych układów organicznych zależy również od obecności templatów anionowych[18]. Synteza układu makrocyklicznego (Rys. 11 a) zależy od obecności jonów azotanowych w postaci kwasu azotowego[19]. W przypadku syntezy dwukationowego układu (Rys. 11 b) obecności templatu chlorkowego prowadzi do wzrostu szybkości i wydajności reakcji[20]. Taki efekt to wynik anionowej stabilizacji stanów pośrednich reakcji poprzez łączenie oddziaływań wiązań elektrostatycznych i wodorowych.



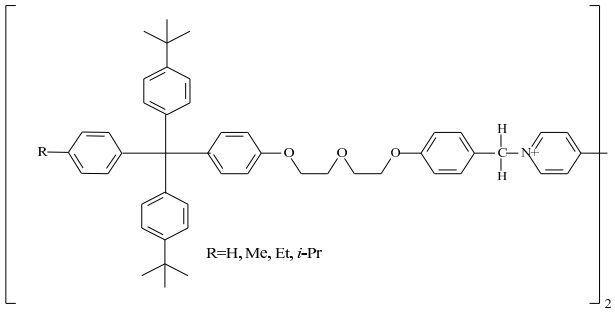
Rysunek 11. Związki makrocykliczne powstałe w wyniku udziału templatów anionowych

Ponadto aniony istotnie wpływają na strukturę zespołów supramolekularnych w ciele stałym[21]. Co więcej wykorzystuje się je do otrzymywania wysoce złożonych struktur. I tak przykładowo powstawanie określonego [5]-pseudorotaksanu ściśle zależy od obecności anionu PF_6^-.[22]

3.3 Templaty z wiązaniem wodorowym

Zasadniczo wiązania wodorowe są znacznie słabsze od kowalencyjnych, nawet te obecne w licznych kompleksach metali. Ponadto cechuje je zdolność do tworzenia dwucentrycznych wiązań. Skuteczność tego typu templatów, przejawiająca się silnym kompleksowaniem, zależy od ilości miejsc wiążących.

Pseudorotaksany powstają przy udziale liniowych cząsteczek, które przeplatają się ze swoimi makrocyklicznymi partnerami bez udziału grup blokujących. Są one prekursorami rotaksanów, zawierających duże grupy blokujące na końcach liniowych cząsteczek, zapobiegające rozplataniu powstałego układu. Pseudorotaksany występują w formie mieszaniny równowagowej form splecionej i rozwiniętej, podczas gdy rotaksany stanowią topologicznie połączone fragmenty, których rozpad możliwy jest jedynie poprzez rozerwanie wiązania kowalencyjnego.



Rysunek 12. Składnik osiowy do tworzenia rotaksanu z bis-p-fenyleno-34-koroną-10

Istnieje szereg metod otrzymywania rotaksanów, z których kilka zachodzi w obecności czynników templatujących[23]. Jeden z mechanizmów opiera się na reakcji „osuwania", jak w przypadku reakcji bis-*p*-fenyleno-34-korony-10 (Rys. 12) z liniowymi fragmentami bipirydylowymi, blokowanymi przez 4-R-fenylo-bis(4-*tert*-butylo-fenylo)metanowe gdzie R=H, Me, Et i *i*-Pr[24]. Przy czym syntezy z udziałem tego właśnie mechanizmu zawsze zachodzą bez udziału czynnika templatującego. Wynika to z faktu, iż po powstanie kompleksu nie dochodzi do dalszych reakcji z powstaniem wiązania. Jednak różnica między techniką osuwania zarezerwowaną dla

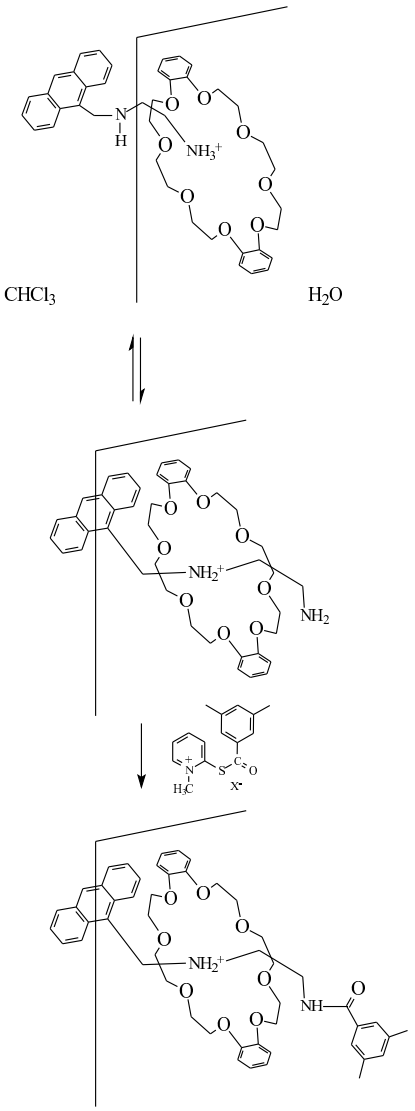
rotaksanów a przeplatania - dla pseudorotaksanów jest nie do końca jednoznaczna, ale przyjmuje się ją za obowiązującą ze względów historycznych.

Badania opisane w pracy Pedersen'a[25] stanowiły istotne źródło informacji o zdolnościach eterów koronowych do tworzenia kompleksów z solami amoniowymi. Struktury krystalograficzne kompleksów pierwszorzędowych soli amoniowych z większymi eterami koronowymi wskazują na głębokie przenikanie pierwszorzędowych grup aminowych do wnętrza makrocykla, co sugeruje na możliwość przeplatanie drugorzędowymi aminami.

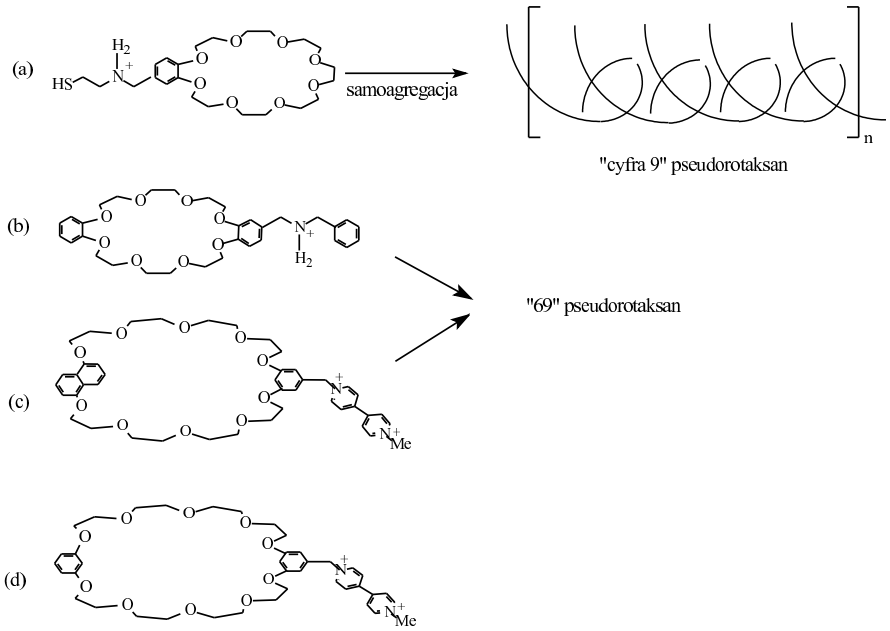
Obserwacje z otrzymywania polirotaksanów sugerowały, iż obecność wielokrotnych miejsc wiążących w cząsteczkach o poliaminowych osiach sprzyja mechanizmowi przeplatania. Najmniejszym zastosowanym w tym celu modelem była diamina prowadząca do otrzymania rotaksanu opartego na templacie jon amonowy/eter koronowy (Rys. 13)[26]. Pierwszorzędowa grupa aminowa miała za zadanie wstępne koordynowanie grupy końcowej do cyklicznego receptora, co ułatwiałoby penetrowanie pierścienia. Natomiast konkurencja o wiązania wodorowe między tlenami eteru koronowego a drugorzędową aminą miała kończyć proces przeplatania. Zatem przejście eteru koronowego od aminy pierwszorzędowej do drugorzędowej kończy proces przeplatania dając pseudorotaksan. W dalszej kolejności zachodzi acylowanie pierwszorzędowej grupy aminowej i utworzenie [2]-rotaksanu. Zarówno cząsteczka diaminowa, jak i eter koronowy charakteryzują się słabą rozpuszczalnością w wodzie, w przeciwieństwie do czynnika acylującego. Z tego względu reakcję prowadzono na granicy faz, co doprowadziło do dwukrotnego zwiększenia wydajności powstającego produktu.

W wyniku rywalizacji między kilkoma czołowymi zespołami badawczymi poszukującymi nowych układów z wiązaniami mechanicznymi, powstały między innymi oligomery nowego typu rotaksanów, w których oś i element pierścieniowy stanowią składowe pojedynczego monomeru (Rys. 14 a)[27]. Odpowiadające im pseudorotaksany, zwane „cyfra 9", tworzą także oligomeryczne formy. W przypadku układu zawierającego cząsteczkę eteru koronowego z grupą benzyloaminową w bocznym ramieniu (Rys. 14 b) również podejrzewano powstawania analogicznego motywu polimerycznego. Okazało się jednak, że tego typu związek tworzy cykliczny

dimer w kształcie liczby 69[28]. Podobnie poszukując nowych pseudooligorotaksanów uzyskano analogiczne cykliczne dimery (Rys. 14 c)[29].

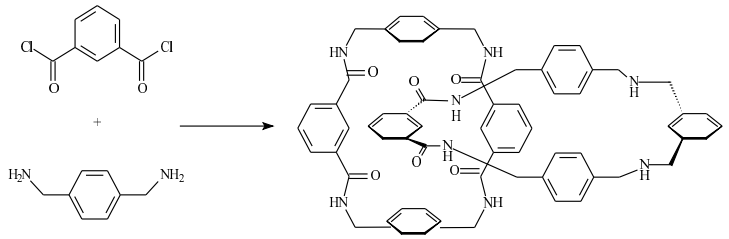


Rysunek 13. Wykorzystanie właściwego ułożenia przekaźnika i granicy faz do zwiększenia wydajności powstawania rotaksanu



Rysunek 14. Rozwój koncepcji polirotaksanu „figura 9" (a) pierwowzór pseudorotaksanu „figura 9" wg Kolchinskiego i Buscha; (b) i (c) dimery 69 wg Stoddarta; (d) prekursor „figury 9" wg Gibsona

Przykładem prostszej syntezy [2]-katenandu jest układ z wiązaniem amidowym (Rys. 15). Przy zastosowaniu tej prostej i niedrogiej techniki można uzyskać szereg różnych [2]-katenandów bazujących na aromatycznych związkach dikarbonylowych i diaminach benzylowych[30].

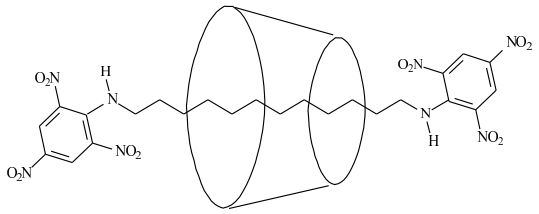


Rysunek 15. Synteza [2]-katenandu

3.4 Templaty cyklodekstrynowe

Cyklodekstryny (CDs) składają się z sześciu (α), siedmiu (β) lub ośmiu (γ) fragmentów D-glukozowych tworzących torus, dając stożkowy sztywny układ z hydrofobową wnęką. Cyklodekstryny stanowią kotwicę dla templatów poprzez wiązanie liniowych organicznych cząsteczek wewnątrz hydrofobowej wnęki, co pozwala na poddanie dalszym reakcjom fragmentu wychodzącego poza wnękę. Na skutek akumulacji szeregu słabych oddziaływań międzycząsteczkowych jak efekt hydrofobowy, siły van der Waals'a, wiązania wodorowe, cyklodekstryny wiążą cząsteczki gościa stosunkowo silnie, czasami nawet z siła zbliżoną do wiązań kowalencyjnych[31]. Wśród dotychczas wymienionych czynników templatujących, cyklodekstryny wydają się najmniej specyficzne, gdyż na dobrą sprawę każda cząsteczka posiadająca łańcuch polimetylenowy lub pierścień aromatyczny może przeplatać cząsteczkę cyklodekstryny o odpowiednim rozmiarze dając prototyp templatu.

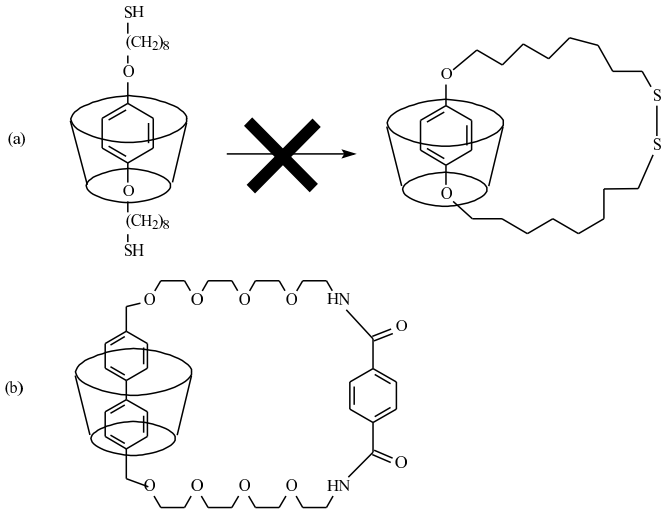
Na skutek przeplatania α,ω-diaminoalkanu, diaminoheksaetylenu (DAHE) przez (2,6-di-*o*-metylo)-α-cyklodekstrynę, a następnie prowadzenia reakcji hamującej z solą sodową kwasu 2,4,6-trinitrobenzenosulfonowego otrzymano pierwszy całkowicie niejonowy cyklodekstrynowy [2]-rotaksan (Rys. 16)[32].



Rysunek 16. Pierwszy kowalencyjny [2]-rotaksan z cyklodekstryną jako czynnikiem pierścieniowym

W przeciwieństwie do syntez rotaksanów z udziałem cyklodekstryn, otrzymywanie katenandów okazało się znacznie trudniejsze. Pionierskie prace zakładały włączenie cyklodekstryny do katenandu[33]. Nie udało się jednak wyizolować katenandu przy zastosowaniu w roli templatu bis(8-merkaptooktylo) pochodnej

hydrochinonu w kompleksie z α-cyklodekstryną (Rys. 17 a). Natomiast pierwszy katenand cyklodekstrynowy powstał z udziałem fragmentu bitolilowego (bimetylofenylowego) między glikolowymi grupami tetraetylenowymi z aminowymi zakończeniami, który przeplatano przez (2,6-di-*o*-metylo)-β-CD. Przy czym uzyskany katenand powstał z niską wydajnością (Rys. 17 b)[34]. Różnice w wydajności powstających rotaksanów i katenandów wynikają z natury cząsteczek przeplatających cyklodekstrynę, gdyż na ogół są one stosunkowo labilne stąd grupy terminalne nie są specyficznie zorientowane, co nie ma istotnego znaczenia przy otrzymywaniu rotaksanów, natomiast znacząco utrudnia zamknięcie pierścienia przy powstawaniu katenandów.

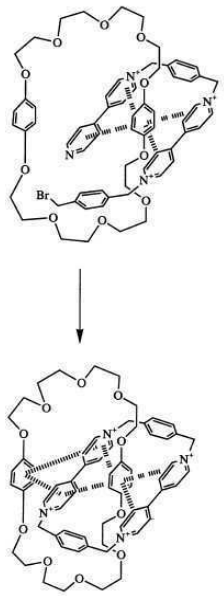


Rysunek 17. (a) Nieudana próba uzyskania katenandu z cyklodekstryną; (b) [2]-katenand z cyklodekstryną

3.5 Templaty z wiązaniem π-π (donorowo-akceptorowym)

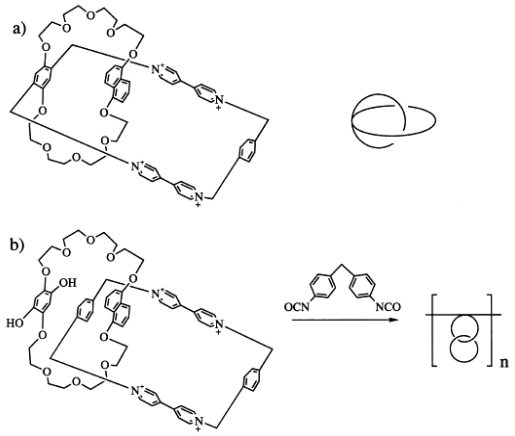
Templaty typu π-π opierają się na kompleksach typu gość-gospodarz z herbicydem paraquat jako czynnikiem z niedoborem elektronów π i makrocyklem w roli donora, jak np. bis-p-fenyleno-34-korona-10 (BPP34C10). We względnie polarnych rozpuszczalnikach powstają silne kompleksy z herbicydem związanym

między bogatym w elektrony fragmentem hydrochinonowym makrocykla[35]. Połączony grupą fenylenową bis-paraquat, po skompleksowaniu przez BPP34C10 wchodzi w reakcję z dibromkiem *p*-ksylenu dając [2]-katenand z wysoką wydajnością (Rys. 18)[36]. Synteza tego prostego katenandu okazała się przełomowa i umożliwiła otrzymywania znacznie bardziej złożonych struktur z wykorzystaniem tej samej strategii templatowej: tworzenia kompleksu typu π-π, po którym następuje reakcja z zamknięciem pierścienia lub powstaniem rotaksanu.



Rysunek 18. Synteza prototypowego [2]-katenandu

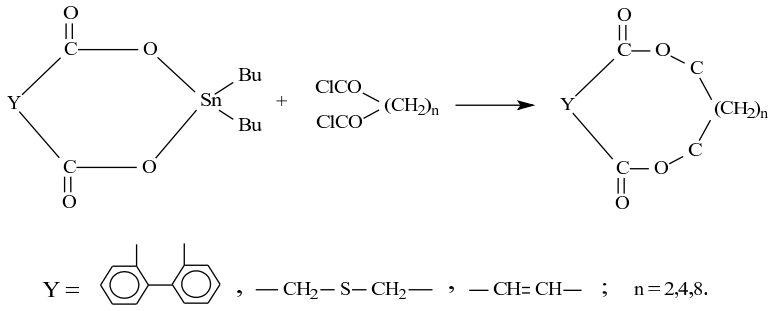
Interesujący układ, który można określić jako [1]-katenand powstał z udziałem benzokorony, której benzo-grupa znajduje się między ramionami paraquatu. Następnie ramiona ulegają samokompleksowaniu z grupą naftylową z drugiej strony eteru koronowego i ostatecznie dochodzi do zamknięcia pierścienia przy udziale *p*-dibromoksylenu (Rys. 19 a)[37]. Podobny układ, będący spolimeryzowanym [2]-katenandem, posiada dwufunkcyjny pierścień prowadzący do wiszącego poli [2]-katenandu (Rys. 19 b)[38].



Rysunek 19. Dwufunkcyjność pierścienia prowadząca do powstania a) nowego [1]-katenandu, b) pierwszego łańcuchowego polikatenandu

3.6 Templaty z wiązaniem kowalencyjnym

Rola templatów niekowalencyjnych w syntezie organicznej jest doskonale znana, przy czym duże znaczenie mają także templaty kowalencyjne. I tak skuteczną metodą syntezy związków makrocyklicznych jest wykorzystanie dikarboksylanów cyny (IV) w roli templatów kowalencyjnych[39].

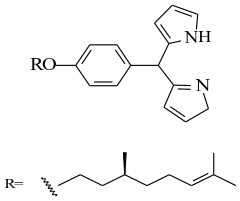


Rysunek 20. Struktury makrocyklicznych produktów powstałych z udziałem templatu kowalencyjnego – związku cynoorganicznego

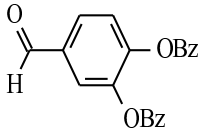
Makrocykliczne tetralaktony, tiolaktony, ditiokarbaminiany powstają na skutek kondensacji dichlorków kwasowych, cyklicznych bezwodników i diizocyjanianów

z dioksa- i ditio- pochodnymi cynowymi dioli i tioli[40]. Makrocykliczne polieterowe tetraestry, zawierające glikolowy fragment, powstają poprzez rozszczepienie wiązania O-M-O (M=Sn, Sb)[41]. Związki cynoorganiczne zawierające reaktywne wiązania Sn-O wykorzystano do licznych transformacji organicznych[42]. Makrocykliczne połączenia z fragmentami ketono-bezwodnikowymi (Rys. 20) powstały poprzez działanie na dikarboksylany di-n-butylocyny (IV) kwasów bifenylo-2,2'-dikarboksylowego, tiodioctowego lub bezwodnika maleinowego dichlorkami kwasów bursztynowego, adypinowego i sebacynowego.

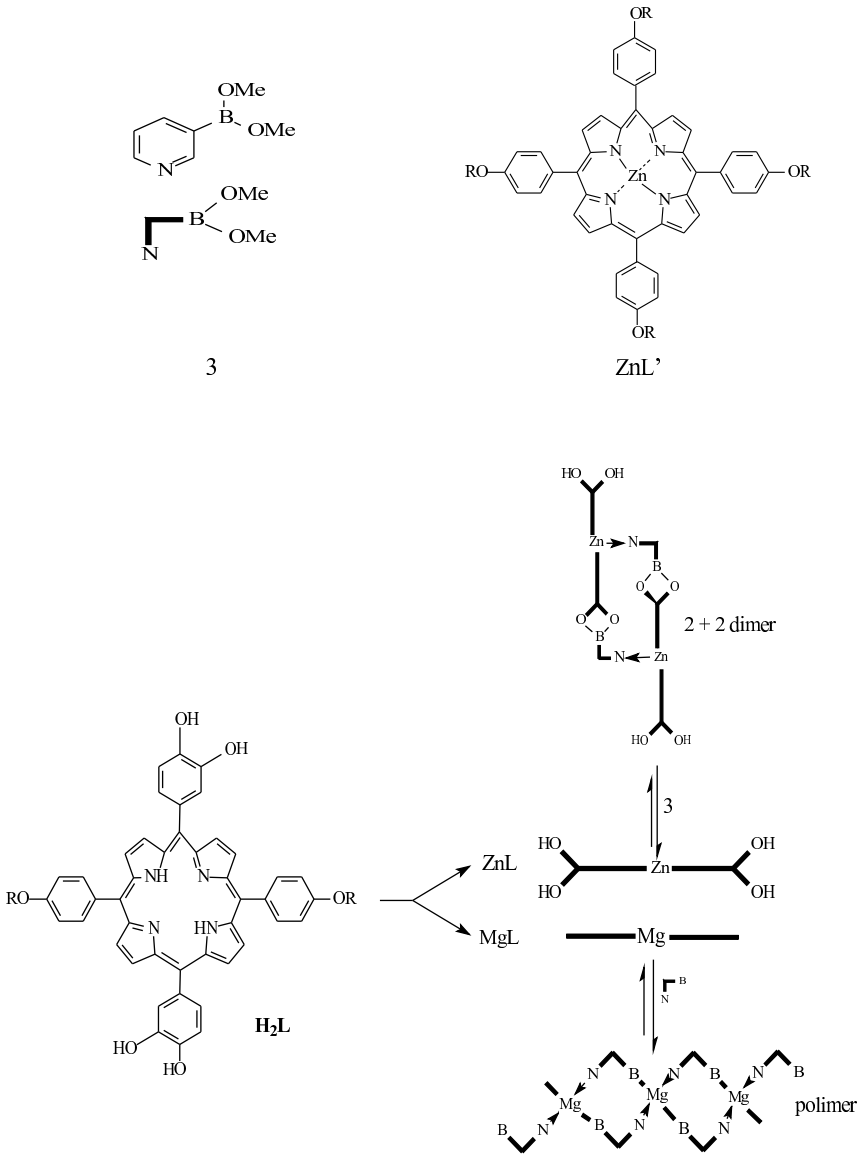
Metodą, która coraz bardziej znajduje zastosowanie w szybkiej i efektywnej konstrukcji dużych molekuł, jest samoorganizacja[43]. Ze względu na swoje właściwości fotofizyczne, spektroskopowe, geometryczne, katalityczne i syntetyczne, szczególnie podatnymi składnikami budulcowymi w syntezie niekowalencyjnej są porfiryny. Istnieje szereg przykładów samoorganizacji struktur porfirynowych poprzez koordynację pirydyna-metal[44]. Opierają się one na pojedynczej cząsteczce łączącej zarówno ligand pirydynowy jak również atom akceptora. Ułatwianie syntezy makrocykli przez niekowalencyjne templaty jest doskonale znane, czego dowodzą licznie wcześniej przytoczone przykłady, zatem wydaje się, iż wprowadzenie niekowalencyjnego łącznika między porfiryną a ligandem pirydynowym byłoby również korzystne[45]. Rolę takiego templatu może pełnić kwas borowy. Pomimo, że oddziaływanie kwas borowy – diol ma charakter kowalencyjny, jest ono odwracalne i może być traktowane analogicznie jak klasyczne niekowalencyjne układy z np. wiązaniem wodorowym. Poprzez połączenie kompleksu cynkowego dikatecholu porfiryny z pirydyną podstawioną kwasem borowym powstaje samoorganizujący dimer lub w przypadku kompleksu magnezowego – polimer (Rys. 21), czyli samoorganizujące superstruktury zawierające elementy porfirynowe.



1



2



Rysunek 21. Reagenty i synteza układów porfirynowych ZnL i MgL oraz samoorganizacja dimeru i polimeru

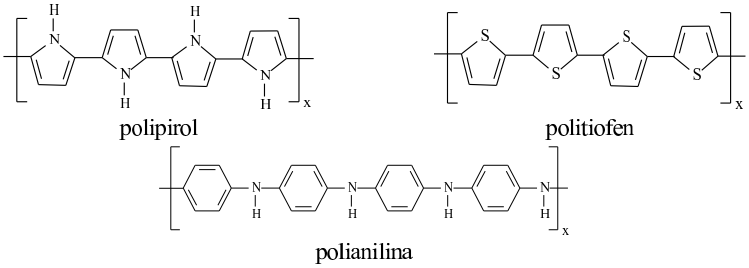
5. Templatowa synteza nanomateriałów[46] i polimerów

Szerokie zainteresowanie nanostrukturami to efekt ich licznych potencjalnych zastosowań w różnych obszarach jak nauki biomedyczne, elektronika, optyka, przechowywanie energii czy elektrochemia. Ultra małe elementy budujące wykazują zwiększone właściwości mechaniczne, optyczne, magnetyczne i elektroniczne w porównaniu do grubouziarnionej materii o analogicznym składzie chemicznym.

Istnieje szereg metod otrzymywania nanomateriałów, począwszy od technik mielenia poprzez metody chemiczne, do litograficznych[47]. Niemniej jednak charakteryzuje je słaby wpływ na kontrolowanie końcowej morfologii otrzymywanej nanostruktury. Z kolei metoda określana jako „synteza templatowa" prowadzi do uzyskania szeregu różnorodnych mikro- i nanostruktur o pożądanej morfologii, a tym samym stanowi sposób na zwiększenie stopnia uporządkowania nanostruktur. W szerokim rozumieniu templat stanowi centralny element, wewnątrz którego tworzy się sieć w taki sposób, iż usunięcie templatu daje wnękę o cechach morfologicznych i/lub stereochemicznych odpowiadających temu templatowi. Wykorzystuje się różne porowate templaty, a nanostruktury powstają wewnątrz porów. W przypadku cylindrycznych porów templatu o jednolitej średnicy, wewnątrz pustej przestrzeni materiałów templatowych powstają monodyspersyjne nanocylindry. Zależnie od parametrów, otrzymane nanocylindry mogą być jednolite (nanopręty) lub puste w środku (nanorurki). Otrzymane nanostruktury pozostają wewnątrz porów templatu lub stanowią zespół wolnych nanocząsteczek. Ponadto mogą również wystawać ponad powierzchnię przypominając warstwę włosia. Wśród uzyskiwanych struktur wymienia się układy polimeryczne, nanometale, nanorurki węglowe i inne nanomateriały.

Przewodzące polimery (Rys. 22): polipirol[48], poli(3-metylotiofen)[49] i polianilina[50] powstają na drodze syntezy templatowej poprzez polimeryzację elektrochemiczną lub utleniającą. Przykładowo celem otrzymania polipirolu[51], membranę templatową zanurza się w wodnym roztworze pirolu, a następni dodaje kolejno wodnych roztworów $FeCl_3$ i kwasu *p*-toluenosulfonowego. Tym sposobem dochodzi do utleniającej polimeryzacji monomeru zarówno wewnątrz porów jak i na powierzchni templatu membranowego. Poprzez kontrolowanie czasu polimeryzacji

powstają przewodzące polimerowe rurki o cienkich lub grubych ścianach. Ostatecznie rurki polipirolowe tworzą lite włókna.



Rysunek 22. Polimery przewodzące otrzymane na drodze syntezy templatowej

W przypadku przeniesienia metali do nanoskali, zachodzi szereg zmian ich właściwości. Nanocząstki złota powstają na drodze elektroosadzania[52]. W pierwszej kolejności rozpyla się cienką warstwę srebra, a następnie zachodzi elektroosadzanie Ag w porach templatu. W dalszej kolejności powstają nanocząstki Au, a podstawa srebrowa zostaje usunięta chemicznie pozostawiając nanodruty złota. W zależności od średnicy porów templatu powstają nanocząstki złota o różnej średnicy.

Z kolei zaletą otrzymywania nanorurek węglowych metodami syntezy templatowej jest powstawanie mieszaniny uszeregowanych i jednakowo rozproszonych rurek o średnicy rzędu kilku nanometrów[53].

Poza przewodzącymi włóknami, nanorurkami metalicznymi i węglowymi oraz nanoprętami, syntezę templatową wykorzystuje się do uzyskiwania także innych nanostruktur. Jedna ze strategii zakłada otrzymywanie złożonych nanostruktur cylindrycznych o licznych zastosowaniach[54]. Tym sposobem powstają cylindryczne nanozbiory półprzewodnik-przewodnik (TiO_2-polipirol lub TiS_2-polipirol), czy złożone układy przewodnik-izolator-przewodnik (C-PAN-Au). Z kolei prawie monorozproszone nanorurki MoS_2 powstają na drodze termicznego rozkładu prekursorów $(NH_4)_2MoS_4$ i $(NH_4)_2Mo_3S_{13}$ wewnątrz porów membrany templatowej Al_2O_3[55].

Wyróżnia się pięć zasadniczych metod prowadzenia syntezy templatowej nanocząsteczek. *Elektrowypieranie z roztworu* materiałów wewnątrz porów matrycy

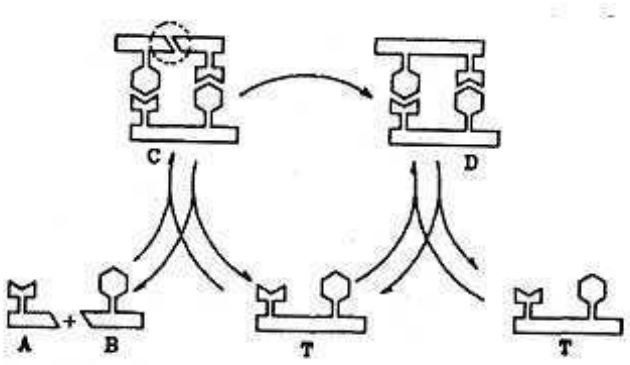
poprzedza pokrywanie jednej warstwy templatu filmem metalu, który stanowi katodę dla elktropowlekania[56]. Pory templatu są systematycznie wypełniane począwszy od dna, zatem poprzez zmianę ilości osadzanego materiału kontroluje się długość nanostruktury. Tą drogą syntezy powstają zarówno metaliczne, jak i przewodzące polimeryczne nanopręty. *Wypieranie z roztworu* wymaga z kolei wykorzystania czynnika chemicznego do powlekania powierzchni templatu materiałem z otoczenia[57]. Różnica w stosunku do pierwszej metody polega na tym, iż powierzchnia, która ulega pokryciu nie musi charakteryzować się przewodnością elektrochemiczną. Proces rozpoczyna się od ścian porów. Zatem już po krótkim czasie wewnątrz porów tworzą się puste rurki, natomiast po długim okresie - lite nanodruty. Wielkość wewnętrznej średnicy rurek zależy od czasu osadzania. Kolejna technika - *chemiczna polimeryzacja* - to źródło szeregu przewodzących polimerów[58]. W uproszczeniu proces polega na zanurzaniu membrany w roztworze zawierającym właściwy monomer i odczynniki do polimeryzacji. Początkowo polimer wzrasta na ścianach porów dając rurki w krótkim okresie osadzania lub włókna po długim czasie prowadzenia procesu. Następna stosowana technika syntezy templatowej - *osadzanie zol-żel* - pozwala na otrzymywanie zarówno rurek jak i włókiem z różnych materiałów[59]. Na proces składa się przygotowanie roztworu prekursora dla otrzymania zawiesiny cząstek koloidalnych (zol), a następnie poddanie obróbce termicznej żelu złożonego z agregatu cząstek zolu celem uzyskania oczekiwanej nanostruktury wewnątrz porów templatu. Ostatnia metoda – *chemiczne naparowywanie próżniowe* – wymaga zestalenia na powierzchni koniecznych odczynników poprzez przemianę chemiczną w fazie gazowej i pozwala na uzyskanie nanorurek węglowych[60].

W większości syntez templatowych wykorzystuje się dwa rodzaje materiałów nanoporowatych - polimerowe membrany[61] i porowate membrany glinowe[62] lub krzemowe[63]. Niemniej jednak istnieje szereg innych naturalnych (np. DNA)[64] lub syntetycznych materiałów[65], które mogą pełnić rolę templatów. Ponadto zsyntezowane nanostruktury mogą także być wykorzystywane jako templaty[66].

Metoda templatowa umożliwia projektowanie i syntezę szerokiej gamy nanostruktur o określonej geometrii, parametrach powierzchni i szerokim wachlarzu potencjalnych zastosowań.

6. Efekt templatowy jako metoda replikacji

Samoreplikujące cząsteczki są z definicji zdolne do autokatalizy swojej syntezy. Takie autokatalityczne cząsteczki działają jak templaty dla związania prekursorów, wykorzystując oddziaływania niekowalencyjne i zapewniając zbliżenie reagujących grup (Rys. 23)[67]. Potrójny odwracalny kompleks C powstaje z templatu T i prekursorów A i B. Bliskość reaktywnych końców ułatwia tworzenie wiązania kowalencyjnego między dwoma prekursorami. Odwracalna dysocjacja podwójnego układu D daje dwie cząsteczki templatów, z których każdy może uczestniczyć w kolejnej cyklu replikacji.

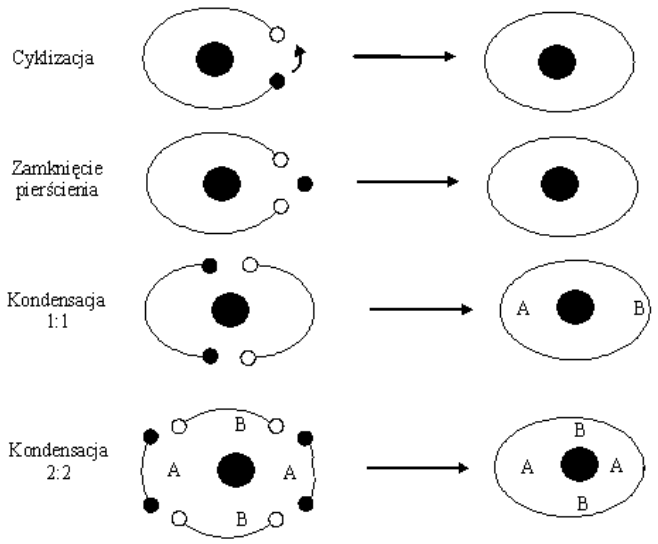


Rysunek 23. Schematyczna ilustracja samoreplikacji

Początki prac na skalę laboratoryjną nad samoreplikacją odnosiły się do syntezy templatowej oligonukleotydów z aktywowanych mononukleotydów[68]. Te wstępne badania ujawniły wpływ szeregu czynników (np. rodzaju templatu, typu grupy opuszczającej, obecności jonów metali) na regioselektywność procesu kondensacji. Ponadto wykazały, iż funkcję templatów w procesie polikondensacji spełniają oligo- lub polinukleotydu z przewagą zasad pirymidynowymch, a nie purynowych. Ostatni z wymienionych czynników okazał się największą przeszkodą w wydajnej syntezie templatowej i nieenzymatycznej samoreplikacji wychodzącej z prekursorów mononukleotydowych. Mimo to udało się otrzymać w pełni komplementarne produkty syntezy[69].

Samoreplikacja następuje również w układach syntetycznych. Przykładowo taka sztuczna samoreplikacja ma miejsce w układzie opartym na pochodnych kwasu Kempa[70] czy pochodnych kwasu (2-formylofenoksy)-octowego i 3-aminobenzoamidyny[71].

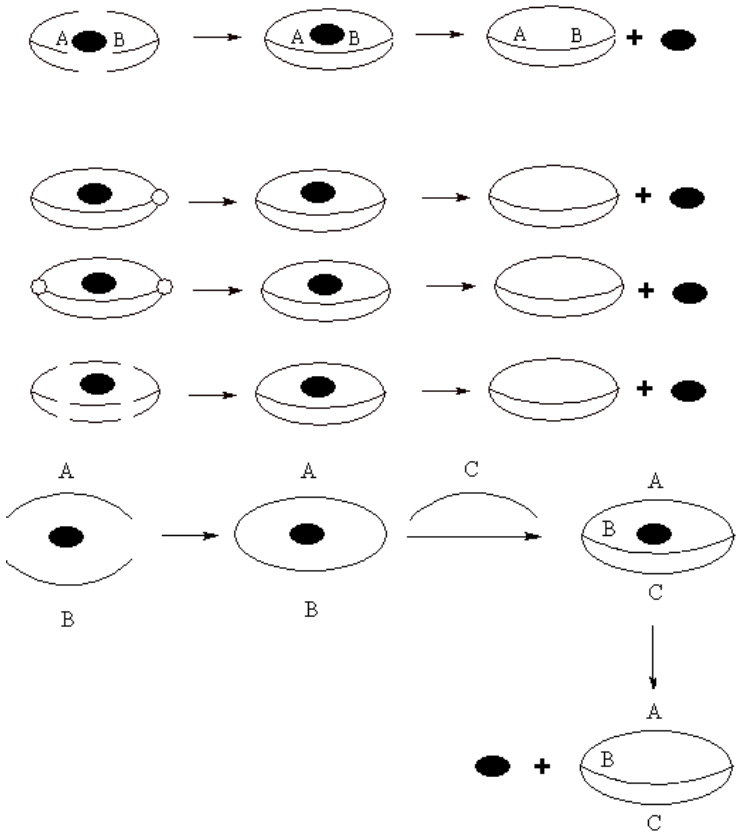
Efekt templatowy jest powszechnie wykorzystywany podczas syntezy układów cyklicznych we wszystkich typach stosowanych reakcji takich jak: cyklizacja, zamykania pierścienia z udziałem małych cząsteczek, kondensacja (1:1) i (2:2).



Zjawisko efektu templatowego znalazło również szerokie zastosowanie w syntezie układów bicyklicznych.

Chemia templatów odgrywa znaczącą rolę w rozwoju coraz bardziej zróżnicowanych układów supramolekularnych. Wybór oddziaływań odpowiedzialnych za działanie o charakterze templatowym znacznie powiększył się w stosunku do pionierskich czynników stosowanych w tej roli i dziś można śmiało twierdzić, że czynnikiem stymulującym jest dowolna ograniczająca siła działająca na poziomie molekularnym. Znaczące sukcesy syntetyczne na tym polu stanowią magnes do

poszukiwania metod otrzymywania coraz bardziej skomplikowanych układów poprzez zastosowanie molekularnego „szycia", „robienia na drutach" czy „tkania".



Podziękowania:

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

Literatura:

1. D. H. Bush, A. L. Vance, A. G. Kolchinski, Molecular Template Effect: Historial View, Principles and Perspectives, Coprehensive Supramolecular Chemistry; V. 9, 1-42, J.-M. Lehn (Ed.), Elsevier Science: New York (1996);
2. (a) M. C. Thompson, D. H. Busch, *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 3651 (1964); (b) M. C. Thompson, D. H. Busch, *Chem. Eng. News*, **17**, 57 (1962); (c) J. D. Curry, D. H. Busch, *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 592 (1964); (d) G. A. Melson, D. H. Busch, *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 4834 (1964); (e) G. A. Melson, D. H. Busch, *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 1706 (1965); (f) D. H. Bush, *J. Inclus. Phen. Molec. Recog. Chem.* **12**, 389 (1992);
3. D. H. Busch, *Top. Curr. Chem.,* Springer-Verlag Berlin/Heidelberg, **249**, 1 (2005);
4. G. Ercolani, L. Mandolini, B. Masci, *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 2780 (1981);
5. http://userpage.chemie.fu-berlin.de/~schalley/research/research_templates.html
6. M. Hahn, T. Stachelhaus, *PNAS*, **103**, 2, 275 (2006);
7. T. J. Hubin, D. H. Bush, *Coord. Chem. Rev.*, **200-202**, 5 (2000);
8. (a) C. O. Dietrich-Buchecker, J.-P. Sauvage, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **28**, 189 (1989); (b) C. O. Dietrich-Buchecker, J.-P. Sauvage, A. De Cian, J. Fischer, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 2231 (1994);
9. (a) R. F. Carina, C. Dietrich-Buchecker, J.-P. Sauvage, *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 9110 (1996); (b) C. C. Adams, The Knot Book, W. H. Freeman, New York (1994);
10. S. S. Zhu, P. J. Carroll, T. M. Swager, *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 8713 (1996);
11. (a) N. Gimeno, R. Vilar, *Coord. Chem. Rev.*, **250**, 3161 (2006); (b) P. D. Beer, P. A. Gale, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **40**, 486 (2001); (c) A. Bianchi, K. Bowman-Janes, E. Garcia-Espana (Eds.), Supramolecular Chemistry of Anions, Wiley-VCH, New York (1997); (d) P. A. Gale, *Coord. Chem. Rev.*, **240**, 191 (2003); (e) M. D. Lankshear, P. D. Beer, *Coord. Chem. Rev.*, **250**, 3142 (2006);
12. (a) B. Hasenknopf, J.-M. Lehn, N. Boumedience, E. Leize, A. van Dorsselaer, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **37**, 3265 (1998); (b) R. Vilar, D. M. P. Mingos, A. J. P. White, D. J. Williams, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **37**, 1258 (1998);

(c) R. Wang, H. D. Selby, H. Liu, M. D. Carducci, T. Jin, Z. Zheng, J. W. Anthis, R. J. Staples, *Inorg. Chem.*, **41**, 278 (2002); (d) Y. Kubota, S. Sakamoto, K. Yamaguchi, M. Fujita, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 4854 (2002); (e) C. J. Kuehl, Y. K. Kryschenko, U. Radhakrishnan, S. R. Seidel, S. D. Huang, P. J. Stang, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 4932 (2002); (f) H. Amouri, L. Mimassi, M. N. Rager, B. E. Mann, C. Guyard-Duhayon, L. Raehm, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **44**, 4543 (2005); (g) M. Aoyagi, K. Biradha, M. Fuijta, *J. Am .Chem. Soc.*, **121**, 7457 (1999); (h) M. J. Hannon, C. L. Painting, E. A. Plummer, L. J. Childs, N. W. Alcock, *Chem. Eur. J.*, **8**, 2225 (2002); (i) K. S. Min, M. P. Suh, *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 6834 (2000);

13. C. S. Campos-Fernandez, B. L. Schottel, H. T. Chifotides, J. K. Bera, J. Bacsa, J. M. Koomenn, D. H. Russell, K. R. Dunbar, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 12909 (2005);
14. (a) J. S. Fleming, K. L. V. Mann, C.-A. Carrez, E. Psillakis, J. C. Jeffrey, J. A. McCleverty, M. d. Ward, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **37**, 1279 (1998); (b) S. P. Argent, T. Riis-Johannessen, J. C. Jeffrey, L. P. Harding, M. D. Ward, *Chem. Commun.*, 4647 (2005);
15. R. L. Paul, Z. R. Bell, J. C. Jeffery, J. A. McCleverty, M. D. Ward, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 4883 (2002);
16. P. Diaz, D. M. P. Mingos, R. Vilar, A. J. P. White, D. J. Williams, *Inorg. Chem.*, **43**, 7597 (2004);
17. C. Safarowsky, L. Merz, A. Rang, P. Broekmann, B. A. Hermann, C. A. Schalley, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **43**, 1291 (2004);
18. (a) Y. H. Kim, J. Calabrese, C. McEwan, *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 1545 (1996); (b) J. Sanchez-Quesada, C. Seel, P. Prados, J. de Mendoza, *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 277 (1996);
19. J. L. Sessler, T. Do. Mody, V. Lynch, *Inorg. Chem.*, **31**, 529 (1992);
20. S. Ramos, E. Alcalde, G. Doddi, P. Mencarelli, L. Perez-Garcia, *J. Org. Chem.*, **67**, 8463 (2002);

21. (a) M. W. Hosseini, R. Ruppert, P. Schaeffer, A. D. Cian, N. Kyritsakas, J. Fischer, J. Chem. Soc.: Chem. Commun., 2135 (1994); (b) P. A. Gale, K. Navakhun, S. Camiolo, M. E. Light, M. B. Hursthouse, M. E. Light, *J. Am. Chem. Soc*., **124**, 11228 (2002);
22. (a) M. C. T. Fyfe, P. T. Glink, S. Menzer, J. F. Stoddart, A. J. P. White, D. J. Wiliams, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*., **36**, 2068 (1997); (b) M. C. T. Fyfe, S. K. Hickingbottom, S. Menzer, J. F. Stoddart, A. J. P. White, D. J. Williams, *Chem. Eur. J*., **4**, 577 (1998);
23. T. J. Hubin, A. G. Kolchinski, A. L. Vance, D. H. Bush, in: G. W. Gokel (Ed.), Advances in Supramolecular Chemistry, V. 5, JAI Press, Stanford, CT, USA (1999);
24. R. M. Raymo, K. N. Houk, J. F. Stoddart, *J. Am. Chem. Soc*., **120**, 9318 (1998);
25. C. J. Pedersen, *J. Am. Chem. Soc*., **89**, 7017 (1967);
26. A. G. Kolchinski, D. H. Bush, N. W. Alcock, *J. Chem. Soc. Chem. Commun*., 1289 (1995);
27. Book of abstracts from XXII Macrocycle Conference in Korea (1997);
28. P. R. Ashton, I. Baxter, S. J. Cantrill, M. C. T. Fyfe, P. T. Glink, J. F. Stoddart, A. J. P. White, D. J. Williams, R. Wolf, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*. , **37**, 1294 (1998);
29. P. R. Ashton, I. W. J. Parsons, F. M. Raymo, J. F. Stoddart, A. J. P. White, D. J. Williams, R. Wolf, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*., **37**, 1913 (1998);
30. (a) A. G. Johnston, D. A. Leigh, R. J. Pritchard, M. D. Deegan, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*. ,**34**, 1209 (1995); (b) A. G. Johnston, D. A. Leigh, L. Nazhet, J. P. Smart, M. D. Deegan, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*., **34**, 1212 (1995); (c) D. A. Leigh, A. Murphy, J. P. Smart, A. M. Z. Slawin, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*., **36**, 728 (1997); (d) D. A. Leigh, A. Murphy, J. P. Smart, M. S. Deleuze, F. Zerbetto, *J. Am. Chem. Soc*., **120**, 6458 (1998);
31. J. Szejtli, in J.-M. Lehn (Ed.), Comprehensive Supramolecular Chemistry, V. 3, p. 189, Elsevier Science, New York (1996);
32. A. Harada, J. Li, M. Kamachi, *J. Chem. Soc. Chem. Commun*., 1413 (1997);

33. A. Luttringhaus, F. Cramer, H. Prinzbach, F. M. Henglein, *Liebigs Ann.*, **613**, 185 (1958);
34. D. Armspach, P. R. Ashton, C. P. Moore, N. Spencer, J. F. Stoddart, T. J. Wear, D. J. Williams, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **32**, 854 (1993);
35. (a) B. L. Alwood, N. Spencer, H. Shariari-Zavareh, J. F. Stoddart, D. J. Williams, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1064 (1987); (b) P. R. Ashton, A. M. Z. Slawin, N. Spencer, J. F. Stoddart, D. J. Williams, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1066 (1987);
36. P. R. Ashton, T. T. Goodnow, A. E. Kaifer, M. V. Reddington, A. M. Z. Slawin, N. Spencer, J. F. Stoddart, C. Vincent, D. J. Williams, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.,* **28**, 1396 (1989);
37. R. Wolf at al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.,* **37**, 975 (1998);
38. C. Hamers, F. M. Raymo, J. F. Stoddart, *Eur. J. Org. Chem.*, 2109 (1998);
39. G. K. Sandhu, N. Sharma, *Appl. Organomet. Chem.*, **10**, 363 (1996);
40. (a) A. Shazner, E. Berman, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 259 (1980); (b) A. Shazner, N. Mayer-Schochet, F. Frolow, D. Rabinovich, *J. Org. Chem.*, **46**, 4662 (1981); (c) A. Schazner, N. Schochet, D. Rabinovich, F. Frolow, *Angew. Chem.*, **19**, 326 (1980);
41. C. Anchisi, L Corda, A. Maccioni, A. Podda, *J. Heterocycl. Chem.*, **19**, 141 (1982);
42. P. G. Harisson, *Main Group Met. Chem.*, **14**, 177 (1991);
43. (a) C. A. Hunter, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **34**, 1079 (1995); (b) P. Baxter, J.-M. Lehn, A. DeCian,
J. Fischer, *Angew. Che. Int. Ed. Engl.*, **32**, 69 (1993);
44. (a) C. A. Hunter, L. D. Sarson, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **33**, 2313 (1994); (b) C. M. Drain, J.-M. Lehn, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 2313 (1994);
45. L. D. Sarson, K. Ueda, M. Takeuchi, S. Shinkai, *Chem. Commun.*, 619 (1996);
46. A. Huczko, *Apply. Phys.*, **70**, 365 (2000);
47. G. C. Hadjipanayis, R. W. Siegle, Nanophase Materials: Synthesis, Properites, Applications. Series E: Applied Science, Kluwer, Dordrecht (1994);

48. (a) S. M. Marinakos, L. C. Brousseau, A. Jones, D. L. Feldheim, *Chem. Mater.*, **10**, 1214 (1998); (b) M. Nishizawa, K. Mukai, S. Kuwabata, C. R. Martin, H. Yoneyama, *J. Electrochem. Soc.*, **144**, 1923 (1997);
49. B. B. Lakshami, C. J. Patrissi, C. R. Martin, *Chem. Mater.*, **9**, 2544 (1997);
50. C.-G. Wu, T. Bein, *Science*, **264**, 1757 (1994);
51. S. De Vito, C. R. Martin, *Chem. Mater.*, **10**, 1738 (1998);
52. (a) C. J. Brumlik, V. P. Menon, C. R. Martin, *J. Mater. Res.*, 1174 (1994); (b) B. Z . Tang, H. Xu, *Macromolecules*, **32**, 2569 (1999); (c) T. M. Whitney, J. S. Jiang, P. C. Searson, C. L. Chien, *Science*, **261**, 1316 (1993); (d) E. Braun, Y. Eichen, U. Sivan, G. Ben-Yoseph, *Nature*, **391**, 775 (1998);
53. (a) T. Kyotani, L.-F. Tsai, A. Tomita, *Chem. Mater.*, **8**, 2109 (1996); (b) S. Fan, M. G. Chapline, N. R. Franklin, T. W. Tombler, A. M. Cassel, H. Dai, *Science*, **283**, 512 (1999); (c) X.-Y. Song, W. Cao, M. R. Ayers, A. J. Hunt, *J. Mater. Res.*, **10**, 251 (1995); (d) J. Kong, H. T. Soh, A. M. Cassel, C. F. Quate, H. Dai, *Nature*, **395**, 878 (1998);
54. J. C. Hulteen, C. R. Martin, *Mater. Chem.*, **7**, 1075 (1997);
55. C. M. Zelenski, P. K. Dorhaut, *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 734 (1998);
56. C. J. Brumlik, C. R. Martin, *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 3174 (1991);
57. (a) P. M. Ajayno, O. Stephan, Ph. Redlich, *Nature*, **375**, 564 (1995); (b) W. Han, S. Fan, Q. Li, Y. Hu, *Science*, **277**, 1287 (1997); (c) E. W. Wong, B. W. Maynor, L. D. Burns, C. M. Lieber, *Chem. Mater.*, **8**, 2041 (1996);
58. (a) N. Sonobe, T. Kyotani, Y. Hishiyama, M. Shiraishi, A. Tomita, *J. Phys. Chem.*, **92**, 7079 (1998); (b) T. Kyotani, N. Sonobe, A. Tomita, *Nature*, **331**, 331 (1988); (c) T. J. Bandosz, J. Jagiello, K. Putyera, J. A. Schwarz, *Chem. Mater.*, **8**, 2023 (1996);
59. B. C. Satishkumar, A. Govindraj, E. M. Vogel, L. Basumallick, C. N. R. Rao, *J. Mater. Res.*, **12**, 604 (1997);
60. M. Terrones et al., *Nature*, **388**, 52 (1997);
61. (a) L. Piraux, S. Dubois, S. Demoustier-Champagne, *Nucl. Instr. Meth. Phys. Res.*, **131**, 357 (1997); (b) C. Schoenenberger et al., *J. Phys. Chem. B*, **101**, 5497 (1997);

62. D. Routkevitchi, J. Chan, J. M. Xu, M. Moskovits, *J. Appl. Phys*., **70**, 4421 (1991);
63. R. L. Smith, S. D. Collins, *J. Appl. Phys*., **71**, R1 (1992);
64. A. M. Cassel, W. A. Scrivens, J. M. Tour, *Angew. Chem. Int. Ed*., **37**, 1528 (1998);
65. S. Jones, J. Gruszczynski, A. Kielski, E. Walasek, A. Czyzewska, G. Krupa, *Szklo i Ceramika*, **46**, 25 (1995);
66. M. Freemantle, *C&EN*, **75** (33), 11 (1997);
67. B. G. Bag, G. Von Kiedrowski, *Pure&Appl. Chem*., **68**, 11, 2145 (1996);
68. (a) L. E. Orgel, R. Lohrmann, A. *Chem. R*es., **7**, 368 (1974); (b) T. Inoue, L. E. Orgel, *Science*, **219**, 859 (1983); (c) L. E. Orgel., *Acc. Chem. Res*., **28**, 109 (1995);
69. (a) T. Inoue, G. F. Joyce, K. Grzeskowiak, L. E. Orgel, J. M. Brown, C. B. Reese, *J. Mol. Evol*., **178**, 669 (1984); (b) L. E. Orgel, *Nature*, **358**, 203 (1992);
70. (a) T. Tjivikua, P. Ballester, J. Rebek, Jr., *J. Am. Chem. Soc*., **112**, 1249 (1990); (b) J. S. Nowick, Q. Feng, T. Tjivikua, P. Ballester, J. Rebek, Jr., *J. Am. Chem. Soc*., **113**, 8831 (1991);
71. A. Terfort, G. von Kiedrowski, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*., **31**, 654 (1992).

Rozdział 3

Synteza oraz charakterystyka kompleksów opartych na cząsteczce 1,4,7,10-tetraazacyklododecanu

Paweł Niedziałkowski, Dorota Zarzeczńska, Tadeusz Ossowski

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

Wprowadzenie

Makrocykliczne polietery i poloaminy cieszą się w ostatnim dziesięcioleciu dużym zainteresowaniem jako potencjalne związki do budowy struktur rozpoznawania molekularnego. W tej grupie związków na szczególną uwagę zasługuje cząsteczka cyklenu, która w swojej budowie zawiera cztery atomy donorowe azotu, które tak jak w przypadku eterów koronowych pooddzielane są od siebie mostkami etylenowymi.

1,4,7,10-tetraazacyklododecan (cyklen) oraz jego modyfikowane na atomach azotu pochodne znalazły duże zastosowanie w szeroko pojętym rozpoznaniu molekularnym, w analityce, diagnostyce medycznej, katalizie molekularnej i biokatalizie. Cząsteczka cyklenu dzięki bardzo wysokim powinowactwem do tworzenia związków kompleksowych z jonami metali przejściowych oraz lantanowcami stała się bardzo atrakcyjnym elementem strukturalnym w projektowaniu wielu syntez organicznych.

Niezwykłe zainteresowanie budzą N-funkcjonalizowane pochodne cyclenu, ponieważ znajdują wiele zastosowań praktycznych. W głównej mierze pochodne te wykorzystywane są jako związki kontrastowe w Magnetycznym Rezonansie Obrazowym (MRI) i Pozytonowej Tomografii Emisyjnej (PET) oraz szeregu technik pokrewnych zwianych z radiodiagnostyką i radioterapia. Bardzo ważnym faktem zasługującym na podkreślenie jest to, że wiele sensorów pH-metrycznych oraz

fluorescencyjnych wykorzystywanych do monitoringu środowiska, bądź w analityce zbudowanych jest na bazie cząsteczki cyklenu.

Niewątpliwie, tak duże zastosowanie pochodnych cyklenu w farmakologii wynika głównie z możliwości tworzenia trwałych kompleksów cyklenu z Gd^{3+}, a także z Y^{3+}, oraz innymi radioizotopami, które wykorzystywane są jako biokoniugaty do radioaktywnego znaczenia monokloalnych przeciwciał. Obecny kierunek badań wielu ośrodków naukowych skoncentrowany jest na syntezie pochodnych peptydów, kwasów nukleinowych oraz związków biologicznych aktywnych zawierających w swojej strukturze fragment cyklenu, który używany jest głównie ze względu na swoje właściwości kompleksujące. Kompleks metalu przeważnie odziaływuje z białkiem, bądź peptydem w sposób nie kowalencyjny, po to, aby zaburzyć właściwości grup kowalencyjnie połączonych do peptydów. Zjawisko to znalazło szerokie zastosowanie głownie w spektroskopii. Szczególne zainteresowanie budzą związki kompleksowe lantanowców, które charakteryzują się właściwościami luminescencyjnymi, na których głownie opierają się procedury bioanalityczne oznaczenia próbek.

Ogólne zasady syntezy pochodnych 1,4,7,10-tetraazacyklododecanu

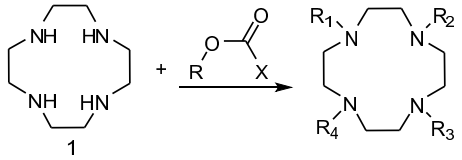
Synteza pochodnych 1,4,7,10-tetraazacyklododecanu, w początkowym etapie, może nie wydawać się skomplikowana, jednakże na drodze preparatywnej można spotkać się z wieloma, trudnymi do rozwiania problemami praktycznymi. Główna przyczyna tych trudności związaną z niską selektywnością podstawienia, bądź z trudnością stopniowego blokowania atomów azotu w cząsteczce cyklenu. Ogólnie N- pochodne cyklenu można otrzymać w dwojaki sposób: poprzez bezpośrednie podstawienie atomów azotu docelowymi podstawnikami, bez uprzedniego blokowania pozostałych atomów azotu, bądź drugą metodą, selektywnym zablokowaniu jednego, dwóch, lub trzech atomów azotu, a następnie syntezy odpowiedniej pochodnej w reakcji z wolną grupą aminowa. W tym wypadku, końcowym etapem syntezy jest deprotekcja. Stosunkowo obszerna literatura podaje szereg metod otrzymywania

odpowiednich pochodnych mono-, di- jak i tri- podstawionych pochodnych cząsteczki cyklenu [1].

W przypadku syntez dipodstawionych pochodnych bardzo często można spotkać się z wieloma opisami syntez, które jednoznacznie nie określają, jaką pochodną otrzymujemy w wyniku przedstawionych procedur. Nie opisano czy w ich wyniku otrzymujemy związki makrocykliczne symetrycznie lub niesymetrycznie N-trans, N- cis podstawione.

Dialkilowe pochodne N1, N7 (N-trans) otrzymuje się stosując fosforylowe oraz silikonowe produkty przejściowe [2]. N-trans symetryczne pochodne alkilowane cyklenu można otrzymać w wyniku reakcji kompleksów cyklenu kobaltu i chromu z wybranymi jodoalkanami [3]. Reakcja powolnego wkraplania wybranych mrówczanów w kontrolowanym środowisku pH 2-3 pozwala na selektywne otrzymanie pochodnych cyklenu w pozycji N1, N7 [4]. W przypadku N10, N4 (N-cis) pochodnych cyklenu otrzymuje się je zazwyczaj w dwuetapowej reakcji poprzedzonej reakcją osłaniania. Synteza, w której następują po sobie etapy osłaniania, funkcjonalizowania oraz usuwania grup ochronnych, ma dwie zasadnicze wady. Przede wszystkim charakteryzuje się umiarkowaną całkowitą wydajnościa (od 48 do 78%) oraz warunki deprotekcji bardzo często przeprowadzane są w bardzo drastycznych środowiskach. Dlatego metoda bezpośredniego podstawienia cząsteczki cyklenu często przeważa nad metodą protekcji.

Luis M. De Leon- Rodriguez [4] przedstawił efektywną metodę otrzymywania selektywnie dipodstawionych pochodnych cyklenu, stosując osłony stosowane głównie w chemii peptydów *tert*-butoxycarbonylową oraz benzyloxykarbonylową (**Schemat 1**). Metoda ta jest bardzo wygodna, ponieważ pozwala na otrzymanie N1, N7 pochodnych cyklenu z ilościową wydajnością.



Schemat1. Synteza selektywnego otrzymywania pochodnych cyklenu.

$R_1 = R_2 = R_3 = H$ $R_4 = -CO_2R'$ N – mono

$R_1 = R_3 = - H$ $R_2 = R_4 = -CO_2R'$ N1,N7 – di

$R_1 = H$ $R_2 = R_3 = R_4 = -CO_2R'$ N – tri

$R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = -CO_2R'$ N – tetra

Mechanizm reakcji selektywnego N- podstawienia cyklenu w główniej mierze związany jest z charakterem całej cząsteczki, której stałe proponowania pK_a poszczególnych azotów wynoszą odpowiednio 10.5, 9.5, 1.6, 0.8 [5]. Wartości te są miarą zasadowości poszczególnych grup aminowych, które wskazują kolejno po sobie następujące procesy proponowania. Reakcje proponowania maja niewątpliwy wpływ na zmiany konformacyjnej szkielety aminy i reakcji podstawiania. Efekt ten niejednokrotnie wykorzystywany jest podczas otrzymywania N1, N7 pochodnych cyklenu.

Badania rentgenowskie wykazały, że cząsteczka cyklenu w stanie stałym jak i w roztworze przyjmuje confomrację czworokąta, w której atomy węgla usytuowane są w pozycji „narożnej", a atomy wodoru w pozycji N1 i N7 skierowane są do środka wnętrza cząsteczki. Konsekwentnie, atomy wodoru w pozycji N4, N10 usytuowane są na zewnątrz pierścienia makrocyklicznego. Biorąc ten fakt pod uwagę można stwierdzić, że cząsteczka cyklenu ma dwie grupy aminowe z wolnymi parami elektronowymi. To tłumaczy efekt di podstawienia w pozycji N1, N7 w wyniku reakcji z chloromrowczanem [4]. W reakcji tej jedna lub dwie z niechronionych grup aminowych N4, N10 są na tyle zasadowe, że tworzą chlorowodorek di-chronionej pochodnej cząsteczki cyklenu. Reakcja ta, zachodzi szybciej w niepolarnym środowisku. Dobrą ilustracją takiego mechanizmu jest reakcja 1 eq cyklenu z 2 eq chloromrowczanu benzylu przeprowadzana w środowisku chloroformu, która praktycznie biegnie z ilościową wydajnością [1].

Reakcja cyklenu z węglanem di*tert*-butylowym nie jest reakcją selektywną, tak jak w przypadku chloromrówczanami, ponieważ głównymi produktami reakcji są di-N1, N7, tri- i oraz w mniejszym stopniu tetra podstawione pochodne. Związane jest to przede wszystkim efektem sterycznym wnoszonym przez dość duże podstawniki Boc.

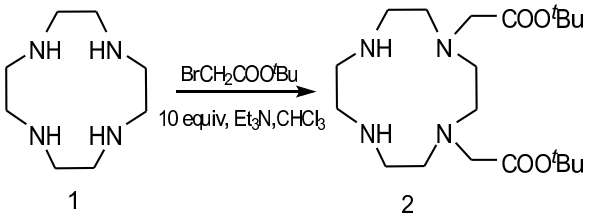
Pomimo to reakcje tę bardzo często wykorzystuje się do syntezy pochodnych cyklenu jako produktów przejściowych, w której otrzymuje się di i tri podstawione pochodne.

Bardzo wygodną, oraz wysoce selektywną metodę bezpośredniego włączania innej zatłoczonej przestrzennie grupy, jaką jest grupa *tert*-butoksykarbonylometylowa do sąsiednich atomów cząsteczki cyklenu w pozycji N1, N4 opracował Cong Li oraz Wing-Tak Wong [6]. Zastosował on jako substrat w reakcji, bromooctan *tert*-butylu (**Schemat 2**) w stosunku molowym 2:1 do cząsteczki cyklenu, w rożnych środowiskach (**Tabela 1**). Warte podkreślenia jest to, że w metodzie tej stosuje się dziesięciokrotny nadmiar zasady, jaką jest trietyloamina, pirydyna oraz pięciokrotny nadmiar K_2CO_3, a reakcję przeprowadza się w temperaturze pokojowej w czasie od 6 do 8 godzin z bardzo dużą wydajnością. W wyniku reakcji cyklonu z bromooctan *tert*-butylu w obecności nadmiaru aminy w środowisku chloroformu, reakcja podstawienia cyklenu w pozycji N1, N7 nie zachodzi.

Tabela 1. Efekt rozpuszczalnika i użytej zasady w reakcji podstawienia cząsteczki cyklenu.

Lp.	Warunki reakcji	zasada	Wydajność %			1,4/1,7 di podstawiony cyklen *
			tri	di	mono	
1	$CHCl_3$	-	14	55	~8	>99*
2	$CHCl_3$	pirydyna	11	63	~5	>99*
3	$CHCl_3$	K_2CO_3	15	57	~6	>99*
4	$CHCl_3$	trietyloamina	6	84	~2	>99*
5	DMF	trietyloamina	13	61	~8	4.3
6	MeOH	trietyloamina	23	46	~7	4.2

* Brak pochodnej cyklenu w pozycji 1,7.

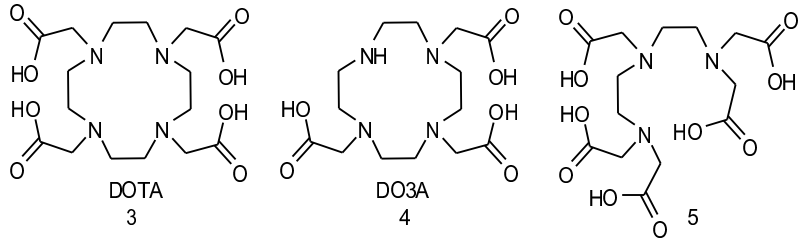


Schemat 2. *Synteza 1,4-di(tert-butoksykarbonylomethylo)-1,4,7,10-tetraazacyclododecanu.*

Synteza i właściwości pochodnych 1,4,7,10-tetraazacyklododekanu.

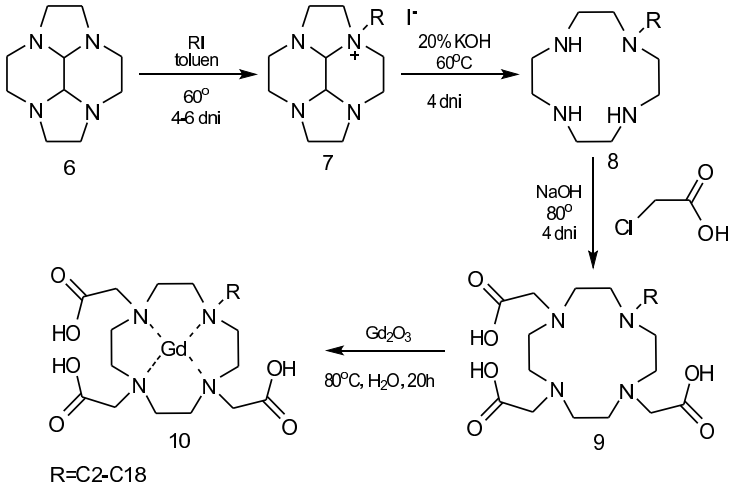
Jednym z najbardziej interesujących i najważniejszych ligandów w medycznej chemii nieorganicznej jest 1,4,7,10-tetraazacyklododecane (cyclen), oraz jego dwie najważniejsze pochodne DOTA kwas 2,2',2",2'''-(1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetrayl) tetra octowy (**3**) i DO3A kwas 2,2',2"(1,4,7,10-tetraazacyklododekane-1,4,7-triyl) tri octowy (**4**). Obydwa te związki są funkcjonalizowane resztami kwasu octowego. Głównymi ich zaletami jest to, że tworzą trwałe kompleksy z takimi jonami metali jak gal, miedź, ind, gadolin, itr i wieloma innymi [7].Kompleksy te znalazły szerokie zastosowanie w takich dziedzinach jak obrazowanie molekularne i radioterapia. Ostatnio pochodne teteazacyklododekanu znajdują coraz to szersze wykorzystywane jako leki anty nowotworowe oraz jako związki wykorzystywane w walce z HIV [8].

Pochodne cyklenu skupiają na sobie wielkie zainteresowanie, ponieważ tworzą stabilne kompleksy z lanatanowcami, dzięki czemu znajdują szerokie zastosowanie w Magnetycznym Rezonansie Obrazowym (MRI) [9]. Obecna generacja związków kontrastowych oparta jest przede wszystkim na chaletorach kwasu amino poli octowego Gd (III) (**3**, **4**, **5**) które wzmagają czas relaksacji protonów solwatując wodę.



Dowiedziono, że bardzo ważne jest, aby ligand wykorzystywany w (MRI) posiadł dość znaczny charakter liofilowy, ponieważ musi on pełnić rolę transportową jonów metali, paramagnetyków, poprzez błony komórkowe. Wzrost hydrofobowości ligandu powoduje ze dociera on do osocza krwi i dalej przenoszony jest w miejca docelowe organizmu.

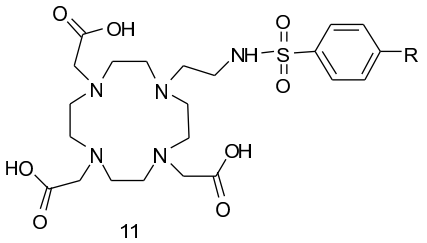
William C. Baker [10] oraz jego współpracownicy przedstawili strategię syntezy pochodnych cyklenu, która pozwala na selektywne monoalkilowanie tetraazacklododekanu używając niewielkiego nadmiaru soli alkilowej z bardzo dużą wydajnością. Metoda ta pozwala na otrzymanie lipofilowych kompleksów Gd (III) (**Schemat 3**) o różnej długości łańcucha alkilowego (C2-C18). Otrzymane pochodne cyklenu mogą być wykorzystane jako paramagnetyczne związki kontrastowe (PCAs).



Schemat 3. Synteza alkilowanych analogów DO3A.

Wyniki badań Magnetycznym Rezonansem Obrazowym (MRI), pozwoliły na zdefiniowanie zmian zachodzących w tkankach organizmu człowieka, które mogą powstać w wyniku choroby, bądź urazu ciała. Stwierdzono, że pH guza występującego w chorobie nowotworowej waha się w granicy (6,8-6,9). Oznacza to, że środowisko tkanki nowotworowej jest bardziej kwaśne niż w tkankach zdrowego organizmu (~7.4). Równowaga pH może być nieznacznie zachwiana poziomem jonów sodowych i wodorowych. Odkrycie to ma kolosalne znaczenie, gdyż pozwala na stymulację przerzutów oraz umożliwia dopasowanie leków stosowanych w chemoterapii, dzięki czemu mogą być one lepiej wchłaniane i tolerowane przez organizm.

Lowe [11] wraz ze współpracownikami zsyntezował serię makrocyklicznych tolueno sulfamidowych kompleksów Eu (III) i Gd(III) opartych na cyklenie, których właściwości koordynacyjne silnie zmieniały się z pH środowiska(**Rysunek 4**). W serii badanych ligandów zauważono że w momencie gdy pH roztworu zmniejsza się, sulfoamid ulega protonowaniu uwalniając jon Eu (III) w zakresie pH 8-5 oraz jon Gd(III) dla pH 7,4-6,8.



R= OMe

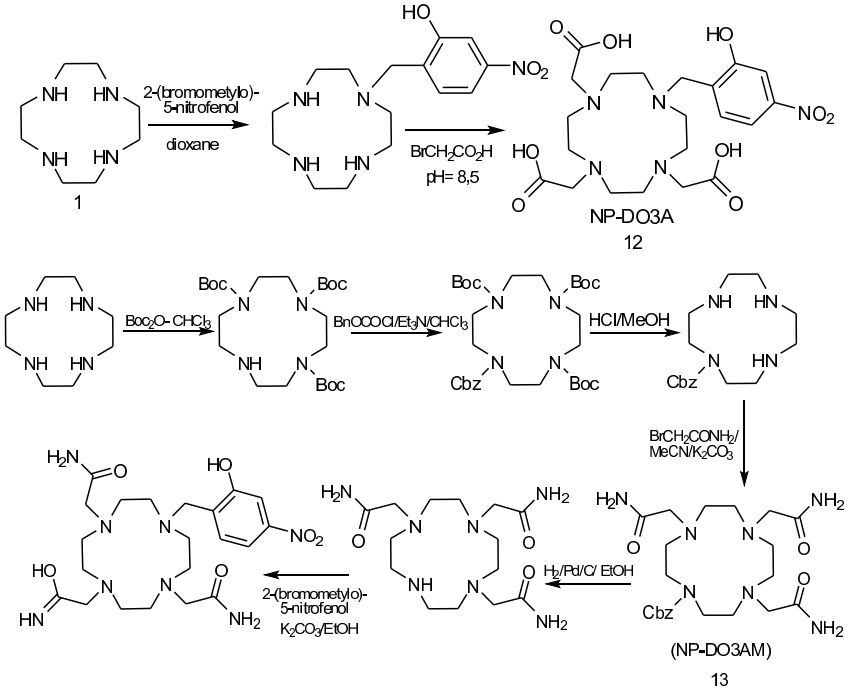
R= Me

R= CF_3

Rysunek4. Pochodne sulfamidowe cyklenu.

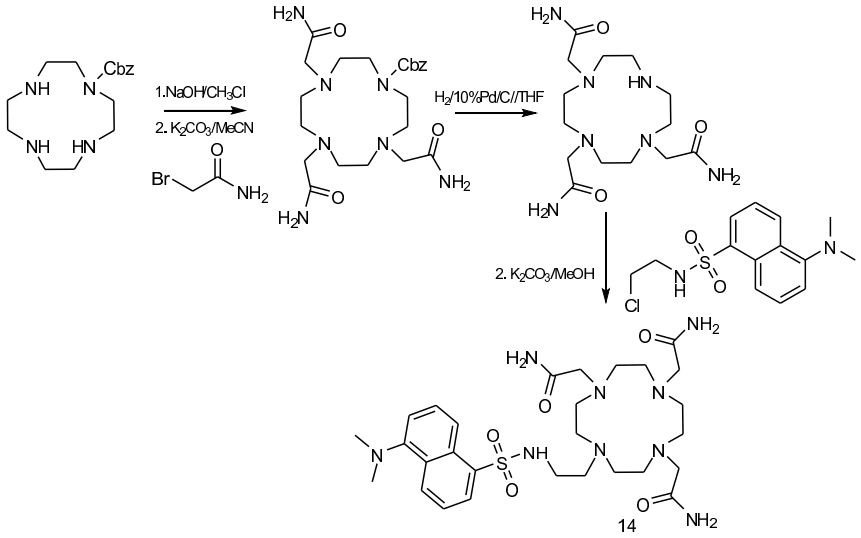
Woods zaobserwował że kompleksy lananowców (III) (Gd, Ln,Dy,Tb), oparte na cyklenie podstawionym jedną cząsteczką *p*-nitro fenolu, oraz trzema resztami kwasu octowego (NP-DO3A) **(12)** wrażliwe są na zmianę pH [12]. Bardzo podobne zmiany wykazują pochodne zawierające w swojej strukturze oprócz cząsteczki *p*-nitro fenolu trzy reszty amidowe (NP-DO3AM) (**13**). Podstawienie trzema grupami amidowymi (**Rysunek 5**), zamiast resztą kwasu octowego cząsteczki cyklenu ma istotny wpływ na zachowanie się kompleksów lantanowców w zależności od środowiska. W wyniku obecności grup amidowych kompleks Gd (NP-DO3AM) jest protonowany w mniejszym zakresie pH.

Shin Aoki [13] wraz ze swoimi współpracownikami przedstawił syntezę nowej pochodnej opartej na cząsteczce cyklenu spełniającej rolę sensora fluorescencyjnego, łączącego w sobie dwie funkcje. Pochodna ta wrażliwa jest na zmianę pH, oraz czuła na obecność jonów lantanowców. Do cząsteczki cyklenu dołączono trzy grupy amidowe (**Schemat 6**), spełniające rolę mikrośrodowiska w otoczeniu z fluorescencyjną cząsteczką dansylu (**14**).

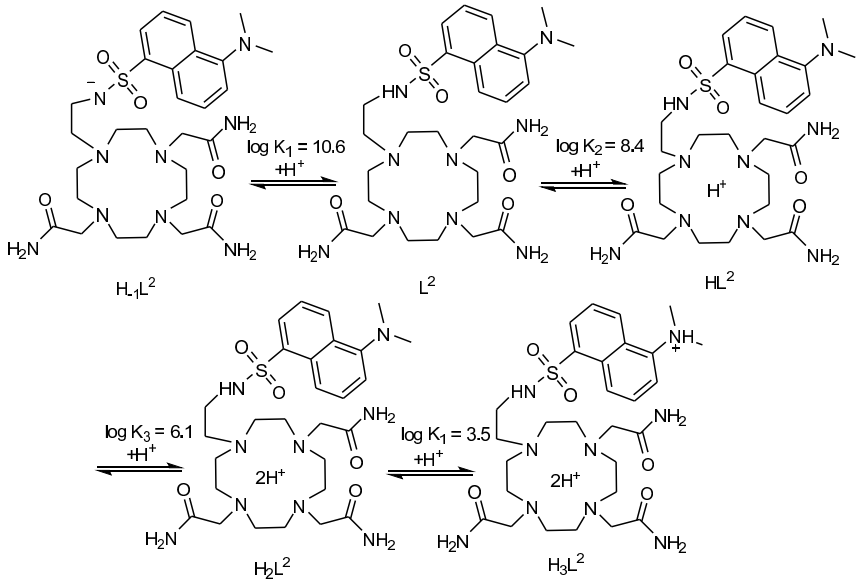


Schemat 5. Schemat syntezy ligandów (NP-DO3A) i (NP-DO3AM).

Pochodna cyklenu (14) zawiera cząsteczkę dansylu i oraz trzy grupy amidowe. Ugrupowania amidowe pełnią rolę lokalnego mikrośrodowiska w stosunku do fluorofora dansylowego. Funkcja trzech grup amidowych polega na dostarczeniu wiązań wodorowych, tak, aby ułatwić deprotonację znajdującego się w pobliżu ugrupowania dansylu, co powoduje emisję fluorescencyjną w stanie wzbudzonym (**Schemat 7.**) Intensywność fluorescencyjna zależna jest od pH środowiska oraz od występowania jonów lantanowych. Obecność trzech grup amidowych powoduje stabilizację kompleksów itru oraz lantanu. Przedstawiona koncepcja ligandu opartego o cząsteczkę cyklamu zawierającego ugrupowania zdolne do selektywnych i specyficznych kompleksowania jonów Y^{3+} i La^{3+} w środowisku wodnym ma zastosowanie w technikach radioimmunologicznych [14].

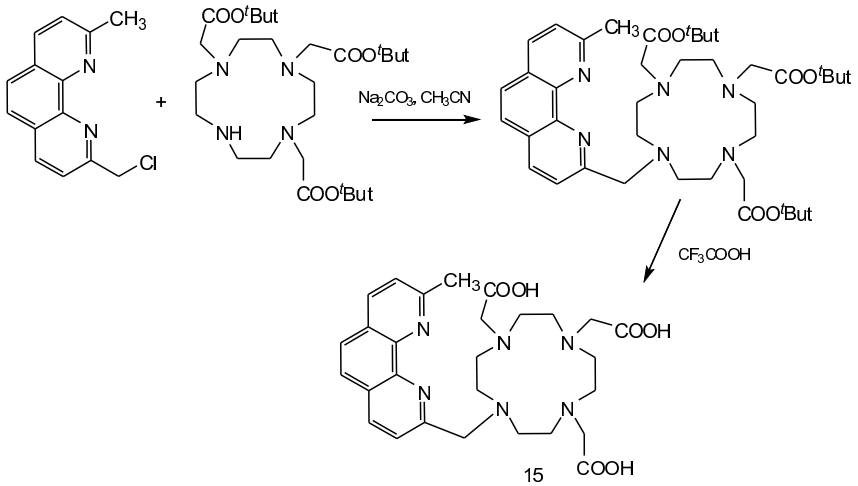


Schemat 6. Schemat syntezy pochodnej cyklonu z grupą dansylową .



Schemat 7. Właściwości fluorescencyjnego sensora opartego na cząsteczce dansylu, w zależności od pH środowiska.

Opierając się na metodzie difunkcjonalizowania pochodnych cząsteczki cyklenu, Silvio Quici wraz ze współpracownikami [15] przedstawił syntezę (**Schemat 8**) oraz właściwości związku pochodnej kwasu 1,4,7,10 tetraazacyklododecane-1,4,7-trioctowego (DO3A) zawierającej w swojej strukturze asymetrycznie podstawioną cząsteczkę 1,10-phenanthroliny spełniającą rolę chromoforu (**15**). Tak otrzymany związek jest termodynamicznie i kinetycznie stabilny, który w środowisku wodnym koordynuje jony lantanowców, ze stałą kompleksowania $K_{ML} > 20$ [16]. Cząsteczka fenantroliny odgrywa ważną role, ponieważ włączona bezpośrednio do atomu azotu w cyklenie, uczestniczy w koordynacji jonów metali. Ponadto, jej sztywna budowa oraz organizacja przestrzenna, powoduje że zapobiega ona wnikaniu wody do sfery koordynacyjnej jonu metalu. Cecha ta została wykorzystana do osiągnięcia stabilnych kompleksów Eu^{3+} and Tb^{3+}, które charakteryzują się dużą wydajnością luminescencyjną w środowisku wodnym.

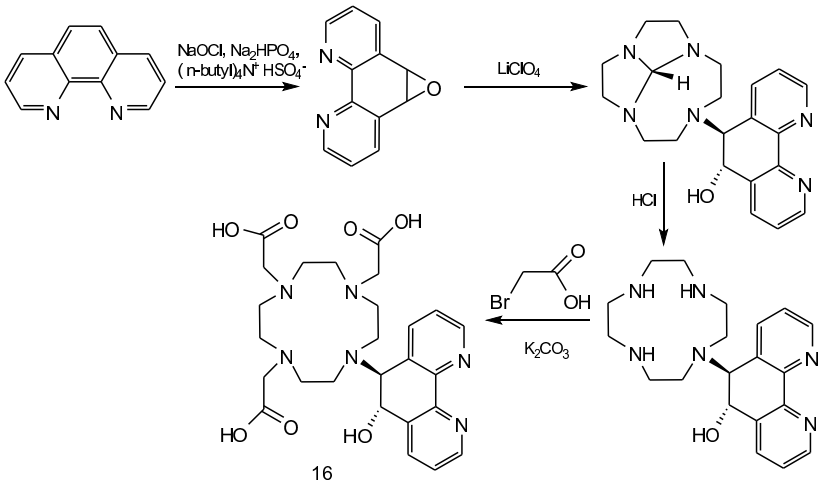


Schemat 8 . Synteza pochodnych (DO3A) z 1,10-fenanthroliną.

Nową klasę związków opartych na jednostce tetraazacyklododecanu podstawioną trzema resztami kwasu octowego i 6-hydroxy-5,6-dihydro-1,10-

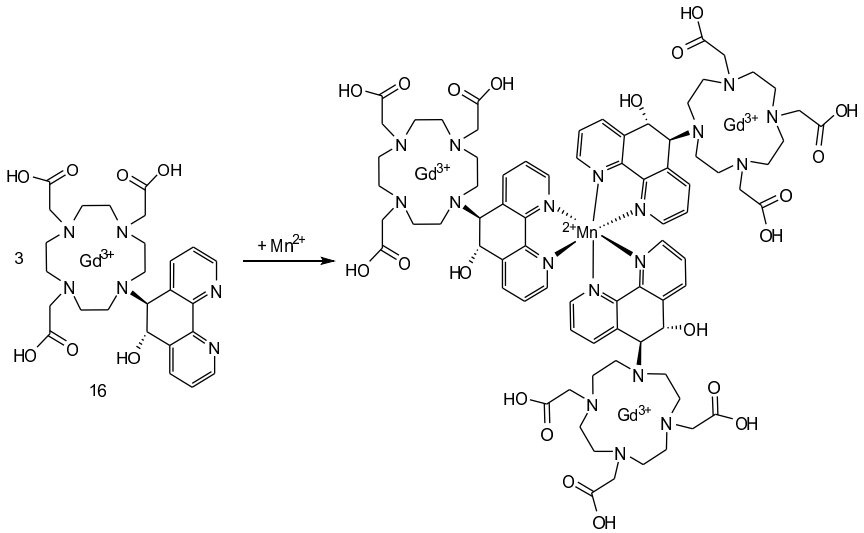
phenantroliną (PhenHDO3A) (**16**) predstawił Paris [17]. Ligand ten został specjalnie zsyntezowany, aby osiągnąć bardzo stabilną strukturę w której wnikanie wody do sfery koordynacyjnej jonu metalu jest utrudnione, co z kolei powoduje wysoką luminescencje koordynowanych jonów lantanowych.

Do syntezy ligandu (**16**) jako związku wyjściowego użyto pochodną epoksydową fenantroliny i nie chronioną cząsteczkę cyklenu, lub trój chronioną *tert*-butylową pochodną cyklenu (**Schemat 9**)



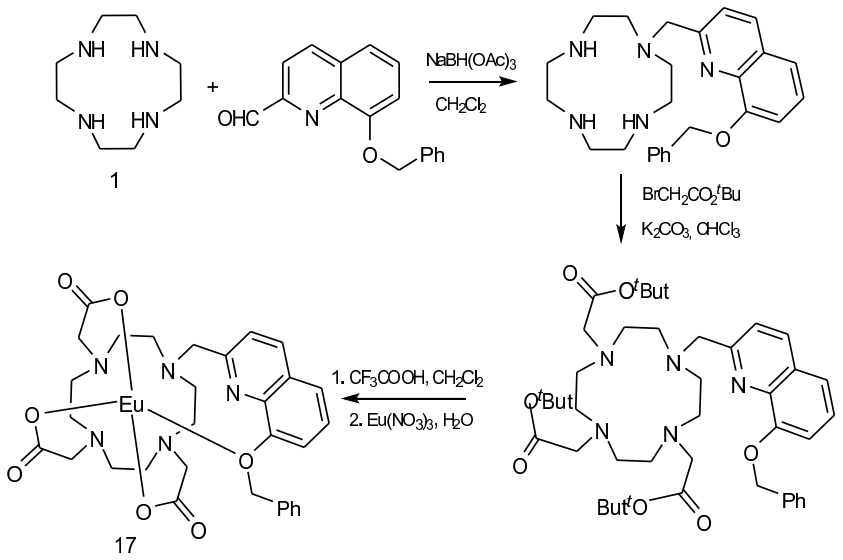
Schemat 9. Synteza (PhenHDO3A).

Ligand (PhenHDO3A) (**16**) tworzy kinetycznie stabilne kompleksy z jonami lantanowców. Grupy alkoholowe występujące w jednostce dihydro-fenantroliny uczestniczą w procesie koordynacji zamykając jon metalu wewnątrz cząsteczki. Badania luminescencyjne kompleksów (PhenHDO3A) z lantanowcami dowodzą, że w środowisku wodnym tworzy się kompleks z uwikłaną jedną cząsteczką wody w sferze koordynacyjnej. Ponadto kompleks z Gd(III) GdPhenHDO3A tworzy wysoce stabilne tri-kompleksy z jonami Fe^{2+} i Ni^{2+}. Taka multi metaliczna struktura tworzy się spontanicznie poprzez samorzutną asocjację **(Schemat 10)**.

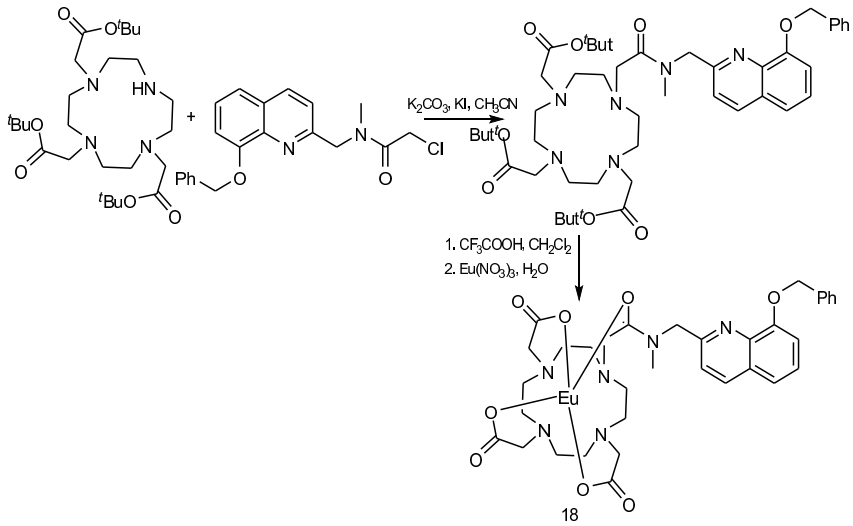


Schemat 10. Tworzenie trój kompleksu GdPhenHDO3A z Fe- (II) lub Ni(II).

Davide Maffeo i Gareth Williams [18] przedstawili syntezę pochodnej cyklamu zawierającą w swojej strukturze cząsteczkę chromoforu, którym jest 8-benzyloksychinolina. W cząsteczce 1,4,7,10-tetraazacyklododecanu jeden z czterech atomów azotu podstawiono grupą 8-benzyloksychinolinową bezpośrednio do pierścienia przez grupę metylenową (-CH_2-) (**17**), lub poprzez linker amidowy (-$CH_2C(O)N(Me)CH_2$-) (**18**). Pozostałe trzy atomy azotu podstawiono resztą kwasu octowego, otrzymując w ten sposób pochodną (DO3A). Podstawienie grupy 8-benzyloksychinolinowej (**Schemat 11, 12**) poprzez linker metylenowy skutecznie wyeliminowało pozostałość pojedynczej cząsteczki wody z zewnętrznej sfery koordynacyjnej w kompleksach z jonami lantanowców. Tym sposobem azot chinolinowy został umiejscowiony tak, że uczestniczy w wiązaniu jonów lantanowców oraz równocześnie grupa ta zmuszona jest do przyłączenia cząsteczki wody uniemożliwiając występowanie jej w sferze koordynacji jonu metalu, równocześnie utrzymanie neutralnego ładunku kompleksu zostało zachowane, co jest kluczową rolą kompleksach lantanowców.

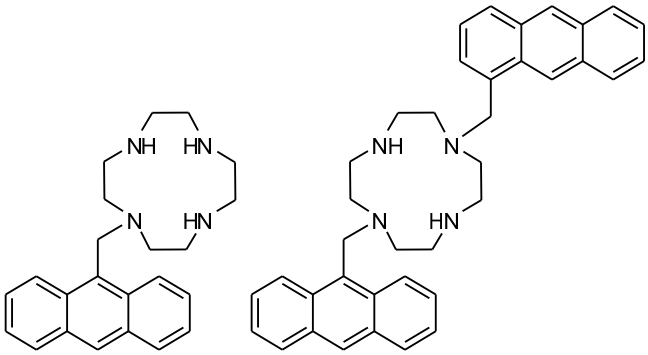


Schemat 11. Synteza pochodnej cyklamu grupą 8-benzyloksychinolinową.



Schemat 12. Synteza pochodnej cyklamu z grupą 8-benzyloksychinolinową poprze linker amidowy.

Syntezę nowych fluorescencyjnych chemosensensorów opartych na cząsteczce cyklenu i jednej (**19**), bądź dwóch grupach (**20**) antracenometylowych, wrażliwych na zmiany pH, oraz selektywnych na jonny lantanowców opracował Yasuhiro Shiraishi [19] wraz ze swoimi współpracownikami (**Schemat 13**). Właściwości fluorescencyjne oraz właściwości kompleksotwórcze (**20**) w porównaniu z pochodną cyclenu zawierającą pojedynczą cząsteczkę antracenometylową są niemal identyczne. Niewielkie różnice wyrażają się tym że, związek (**20**) w stosunku do (**19**) wykazuje większą fluorescencję w zakresie mniejszych wartości pH oraz w obecności Zn^{2+} i Cd^{2+}, natomiast w zakresie większych wartości pH i obecności jonów Cu^{2+} jego fluorescencja maleje. Warte podkreślenia jest to że związek (**20**) jest bardzo stabilny w atmosferze o dużym zawilgoceniu, podczas gdy związek (**19**) ulega rozkładowi w bardzo szybkim czasie. Właściwość ta powoduje, że związek (**20**) może mieć bardzo duże zastosowanie jako fluorescencyjny chemosensor wrażliwy na zmianę pH.

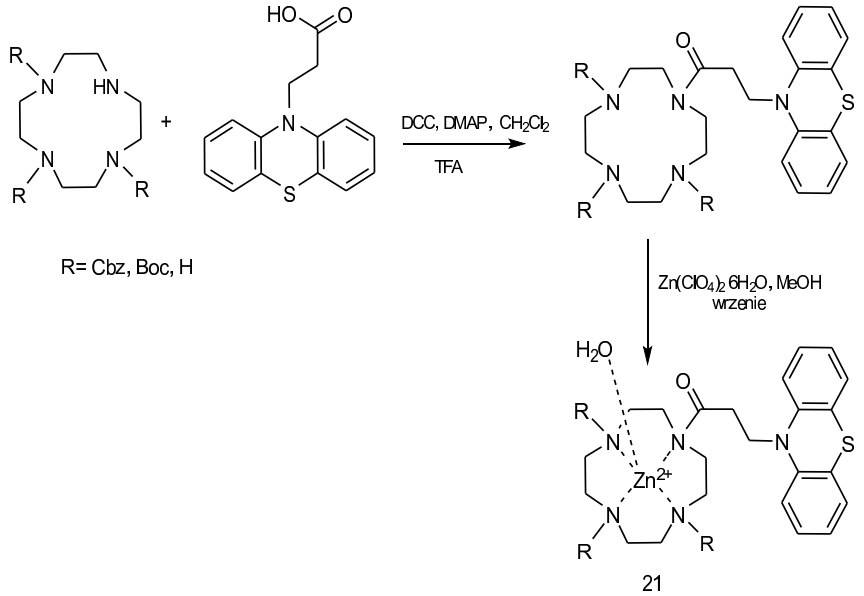


19 20

Schemat 13. Stuktura fluorescencyjnych chemosensorów opartych na czasteczce cyklenu.

Pochodne cyklenu, bądź sam cyklen bardzo często przyłączony jest również do układów biologicznych. Burkhard König [20] przedstawił syntezę włączania pochodnych cyklenu do ryboflawiny, używając do syntezy chroniony cyklen trzema grupami ochronnymi, stosowanymi w chemii peptydów Cbz (benzyloksykarbonylową)

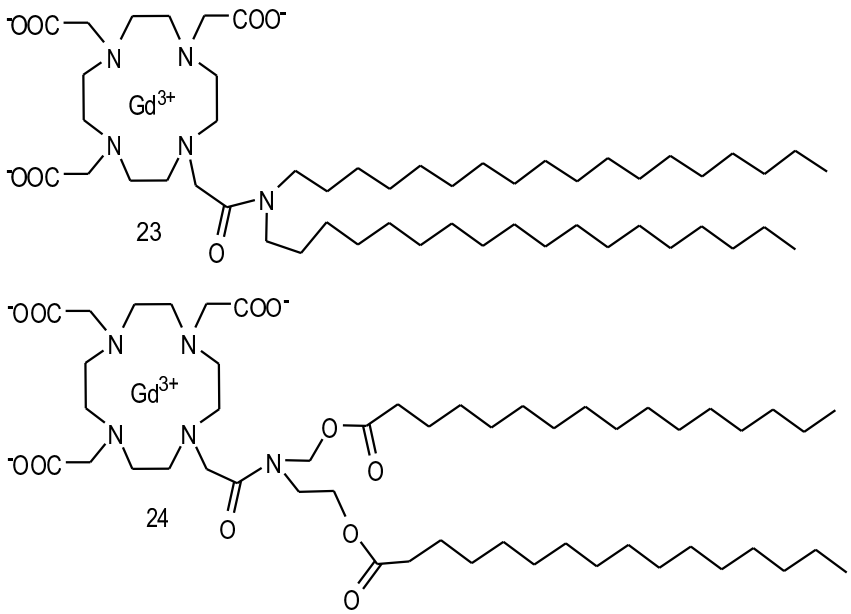
lub Boc (*tert*-butoksykarbonylową). Do pozostałego wolnego atomu azotu dołączono karboksylową pochodną ryboflawiny stosując standardowe metody sprzęgania. Powstały (**21**) azamakrocykl przekształcono w kompleks cynku stosując nadchloran cynku (**Schemat 14**). Okazało się, że kwasowość kompleksu (**21**) jest porównywalna do 1,4,7,10-tetraazacyklododecanu.



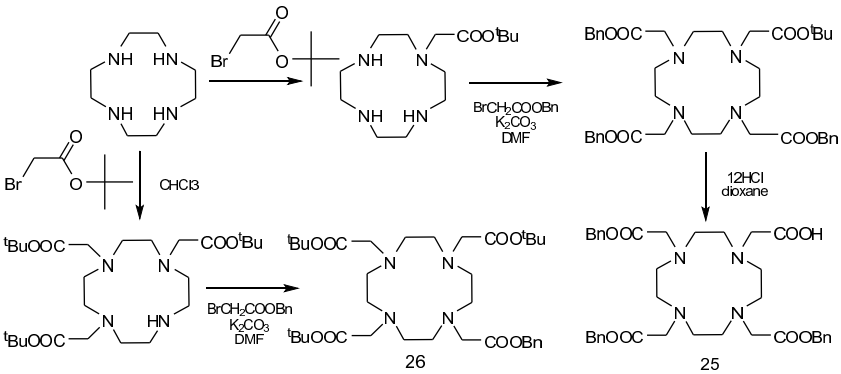
Schemat 14. Synteza pochodnej 1,4,7,10-tetraazacyklododecanu z ryboflawiną.

Pier Lucio Anelli [21] i jego współpracownicy zaproponowali bardzo ciekawą syntezę lipofilowych kompleksów gadolinu i pochodnych cyklenu. Związki (**23**) i (**24**) (**Schemat 15**) mają szerokie zastosowanie w Magnetycznym Rezonansie Obrazowym (MRI) i koronografii jako związki kontrastowe, ponieważ posiadają zdolność do tworzenia mieszanych miceli. W szczególności związek (**23**) ma długi czas relaksacji oraz wykazuje dużą trwałość w krwi, jednakże minusem jego jest to, że bardzo ulega usunięciu przez organizm. Po siedmiu dniach od iniekcji jedynie 50% podanej dawki zostaje usunięta. Dlatego też zdecydowano się na syntezę związku (**24**), zawierającego

dwie grupy estrowe kwasu palmitynowego, które hydrolizują *in vivo* powodując wzrost hydrofilowości kompleksu gadolinu, który z kolei jest bardzo łatwo usuwalny z organizmu. Z punktu widzenia preparatywnego synteza związków (**23**) i (**24**) wydaje się być bardzo ciekawa. Zostały one zsyntezowane wychodząc ze związku, (**25**) którego chemat podano poniżej(**Schemat 16**). Otrzymany w syntezie (**25**) może być bardzo łatwo włączany w różne układy i grupy zawierające wolną grupę aminową. Po etapie sprzęgania następuje etap usuwania grup ochronnych i w konsekwencji otrzymujemy w bardzo łatwy i przystępny sposób pochodne DOTA. Usuwanie grup ochronnych zachodzi w łagodnych warunkach, w wyniku katalitycznej wodorolizy. Metoda, w której wykorzystuje się pochodną (**25**) cyklenu ma przewagę nad metodą, w której używa się pochodnej (**26**), ponieważ dla tej pochodnej deprotekcja zachodzi w warunkach kwaśnych.

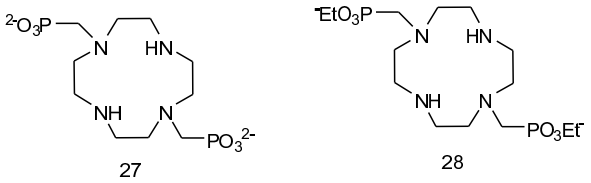


Schemat 15. Struktura lipofilowych kompleksów gadolinu opartych na cyklenie.



Schemat 16. Synteza związków wyjściowych do syntezy pochodnych DOTA 25, 26

Istnieje wiele ligandów makrocyklicznych opartych na cząsteczce cyklenu, podstawionych wieloma ramionami bocznymi nazywanych „pendant arms". Laszlo Burai [22] przedstawił syntezę ligandów opartych na cząsteczce tetraazacyklododecanu. Związki te są bardzo ciekawe, ponieważ podstawione są nie symetrycznie w pozycji N1, N7 grupami fosforanowymi (**27, 28**), co powoduje że tworzą one kompleksy z takimi kationami jak Mg^{2+}, Ca^{2+}, Sr^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+} oraz Ln^{3+} (**Schemat 17**) w stosunku 1:1 M:L.

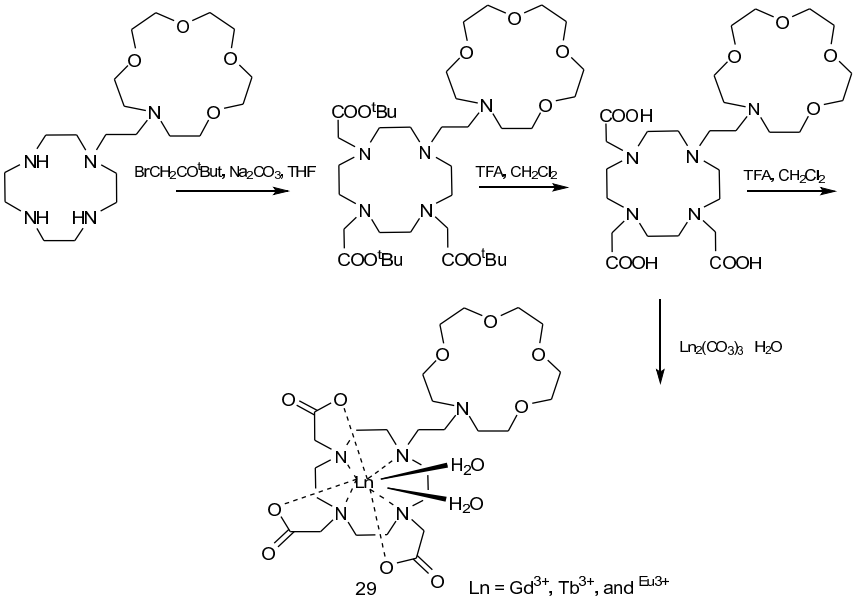


Schemat 17. Fosforowe pochodne cząsteczki cyclenu.

Małe molekularne kompleksy gadolinu, takie jak Gd-DOTA (Dotarem), oraz inne kompleksy pochodnych DOTA są szeroko używane jako związki kontrastowe (CAs) w Magnetycznym Rezonansie Obrazowym (MRI), aby wspomóc diagnozę w patologiach. Kompleksy te wykazują relatywnie mały czas relaksacji, dlatego też

niezbędna dawka, aby osiągnąć satysfakcjonujący obraz magnetyczny musi być bardzo wysoka. Rozwiązaniem tego problemu jest przyłączenie makrocyklicznych kompleksów do protein, przeciwciał, dendrymerów i miceli [23, 24]. Duży ich rozmiar nie tylko prowadzi do uwiezienia kompleksowanego jonu metalu, zwiększaja przepływ przez układ naczyniowy, ale również zwiększa czas relaksacji, poprzez zwiększenie ich rotacyjnego czasu korelacji [25]. Niestety, toksyczność wielu nowych związków może być dość znaczna. Wynika ona głównie z powolnego usuwania ich z organizmu oraz niedostatecznego ich dostarczenia do miejsca przeznaczenia, co znacznie utrudnia ich aplikacje.

Cong Li [26] zaproponował syntezę pochodnych 1,4,7,10-tetraazacyklododecanu z eterami koronowymi. W wyniku reakcji cyklenu z bromooctanem *tert*-butylu tworzy on *tert*-butylową pochodną, a po deprotekcji pochodną DOTA (**29**) (**Schemat 15**). Kompleksy z kationami lantanowców **Ln29** dają zadawalające sygnały i są mało toksyczne dla organizmu, co powoduje, że są bardzo użyteczne jako związki kontrastowe w MRI.



Schemat 18. Synteza pochodnych cylenu i eteru koronowego.

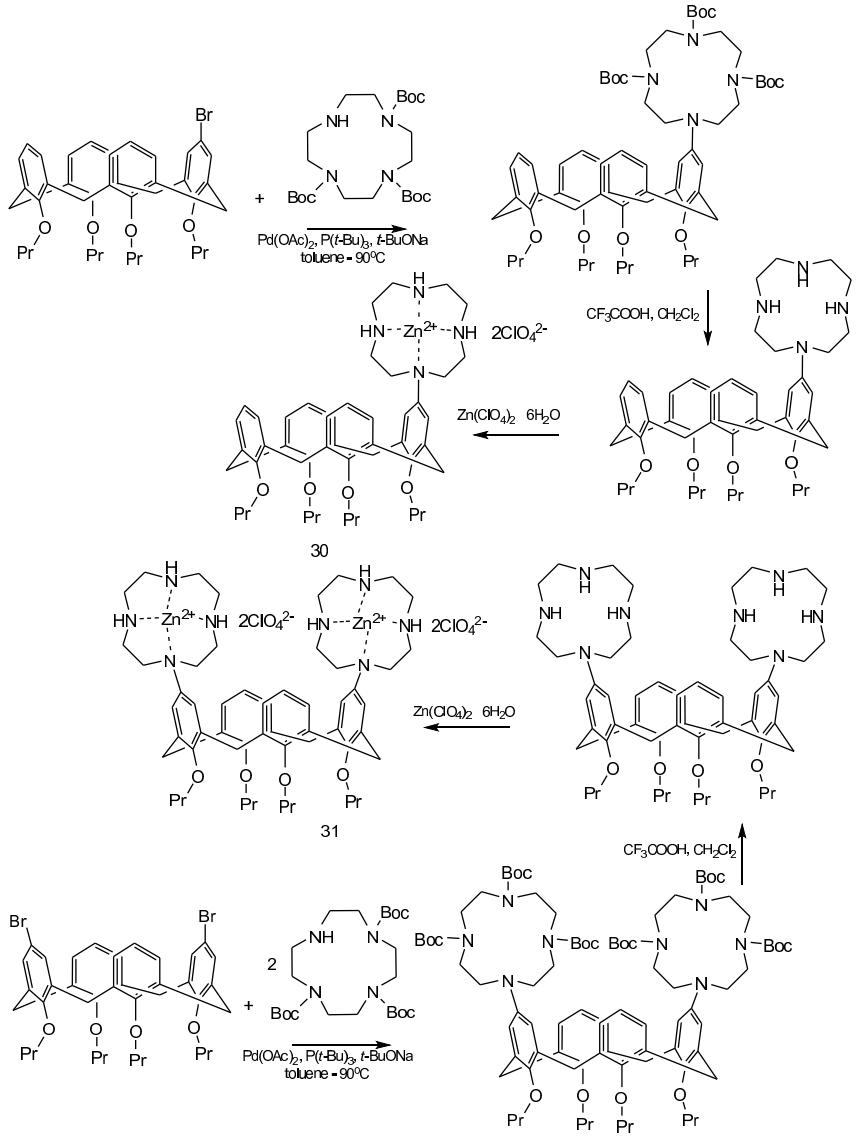
Wykorzystując metodę syntezy Buchwalda–Hartwiga [27] sprzęgania N-arylowych pochodnych Václav Stastny [28] przedstawił syntezę pochodnych calix[4]arenów o wymuszonej konformacji stożkowej1,3 z jedna lub dwoma cząsteczkami cyclenu, bezpośrednio podłącznej do górnej obręczy calix[4]arenu (**Schemat 19**). Otrzymane molekuły oparte na cyklenie w wyniku deprotekcji tworzą kompleksy cynku (**30**), (**31**). Niestety zamiar autora użycia tych kompleksów do utworzenia fosfodiestrowych wiązań w wyniku hydrolizy się nie powiódł.

Robert Trokowski [29] wykorzystał pochodne cyklenu do budowy sensorów, które selektywne wiążą cząsteczki cukrów w zależności od wzajemnego dopasowania strukturalnego cukru i pochodnych cykenu. Pokazał on syntezę (**Schemat 20**) nowych połączeń cyklenu z kwasami fenyloboronowymi użytymi jako ramię boczne oraz właściwości kompleksów Eu^{3+}. Kompleks di-fenyloboronowy Eu^{3+} Eu(**32**) oraz kompleks Eu^{3+} mono- fenyloboronowy Eu(**33**), wykazuje zdolności wiązania glukozy, jednakże ich selektywność oraz powinowactwo zależy od struktury wiązanego cukru. Wolne ligandy **32** i **33**, wykazują większą selektywność na fruktozę niż na glukozę, jednakże selektywność ta zależna jest od właściwości utworzonego kompleksu Eu^{3+}. Kompleks Eu(**32**) wykazuje bardzo dużą selektywność i powinowactwo w stosunku do cząsteczki glukozy.

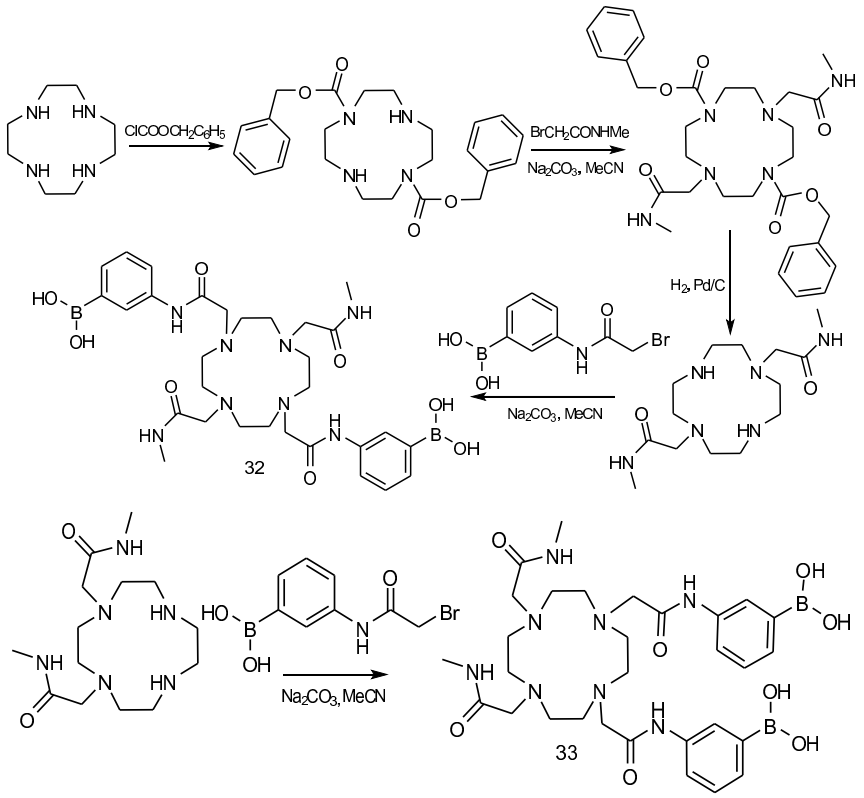
Znaczniki molekularne emitujące promieniowanie γ są bardzo ważnymi narzędziem w rozpoznawaniu guzów nowotworowych. Przykładami radioemiterów najczęściej stosowanymi w medycynie są ^{99m}Tc, ^{111}In oraz ^{67}Ga. Duże znaczenie medyczne maja również β- emitery ^{90}Y, ^{186}Re . Wprowadzenie radioemirtera do organizmu poprzedza otrzymanie kompleksów z odpowiednimi biomolekułami. Wśród potencjalnych biomolekół, peptydy budzą szczególne zainteresowanie, ponieważ charakteryzuje je wysoka ekspresja receptorów na poszczególne nowotwory.

Heppeler [30] przedstawił syntezę włączania pochodnych tetraazacyklododecanu do peptydów stosując syntezę peptydów na nośniku stałym. Heppeler włączył pochodną cyklenu jaką jest DOTA do analogu somatostatyny (**34**) (**Schemat 21**). Tak zmodyfikowany peptyd wykazuje zdolności kompleksotwórcze w stosunku do takich kationów jak: $^{67}Ga^{3+}$, $^{111}In^{3+}$ and $^{90}Y^{3+}$. Kompleksy te są bardzo

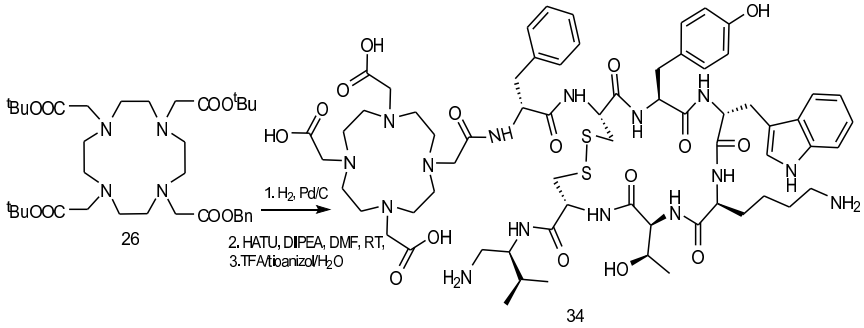
stabilne w surowicy krwi człowieka, oraz wykazują cztery, pięć razy większe powinowactwo w stosunku do somatostatyny.



Schemat 19. Synteza pochodnych cyklenu i calix[4]arenu.

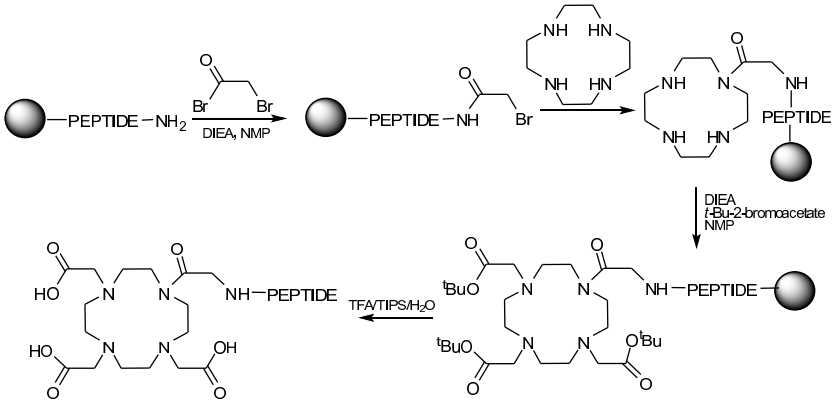


Schemat 20. Synteza sensorów na cukry opartych o cząsteczkę cyklenu.



Schemat 21. Synteza włączenia cyklenu do somatostatyny.

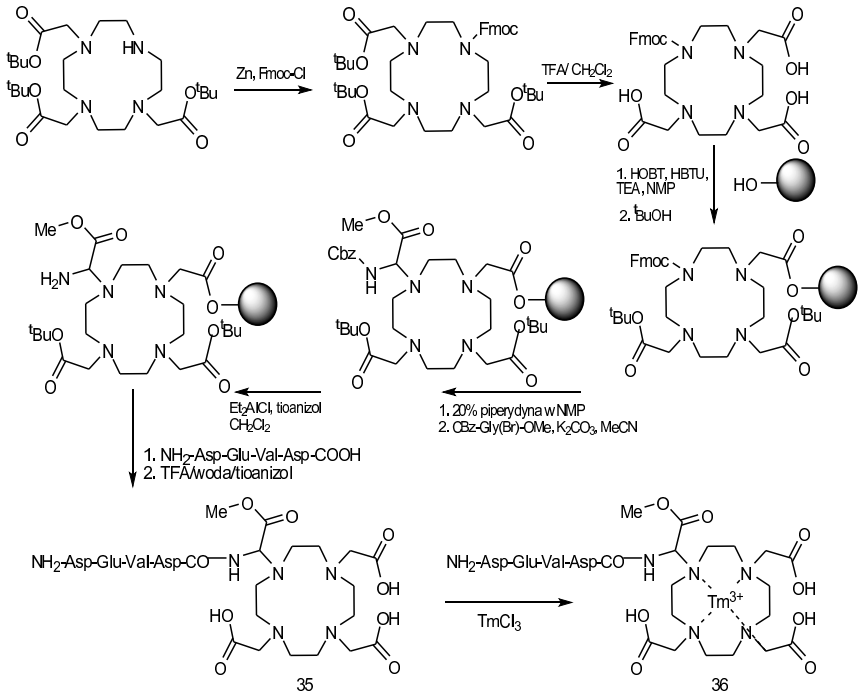
Inną, bardzo wygodną metodę funkcjonalizowania peptydów fragmentem makrocyklicznym - kwasem 1,4,7,10-tetraazacyklododecan- *N,N'N'',N'''*-tetra octowym (DOTA) przedstawił J. Petersom [31]. Chroniona cząsteczka tetraazacyklododecanu grupą *tert*-butylową, lub *tert* butyloxykarbonylową może być przełączona do peptydu zakotwiczonego na nośniku stałym (żywica). W wyniku deprotekcji oraz odcięcia peptydu od nośnika stałego uzyskuje się peptyd wolny od grup osłonowych, wraz dołączoną cząsteczką pochodnej DOTA. Metoda ta pozwala na sfunkcjonalizowanie peptydu w jednym kroku preparatywnym. Aby przyłączyć cząsteczkę DOTA do peptydu należy sfunkcjonalizować terminalną grupę aminową, bromkiem kwasu bromooctowego, lub chlorkiem kwasu chlorooctowego, a następnie dodać chronioną pochodną DOTA. W metodzie tej wykorzystuje się zależność tego że chlorek acylowy jest o wiele bardziej reaktywny niż chlorek alkilowy reakcja acylowania ma pierwszeństwo ponad reakcje alkilowania (**Schemat 22**).



Schemat 22. Synteza na nośniku stałym DOTA-Peptyd.

Wykorzystując metodę syntezy peptydów na nośniku stałym (SPPS) Byunghee Yoo [32] przedstawili inna, nową metodę włączenia cząsteczki DOTA do C - terminalnego końca peptydu, uzyskując w ten sposób peptydowe związki kontrastowe (**Schemat 23**). Byunghee Yoo zaproponował syntezę pochodnej DO3A w której jeden atom azotu w pierścieniu makrocyklicznym osłonił grupą Fmoc (9-

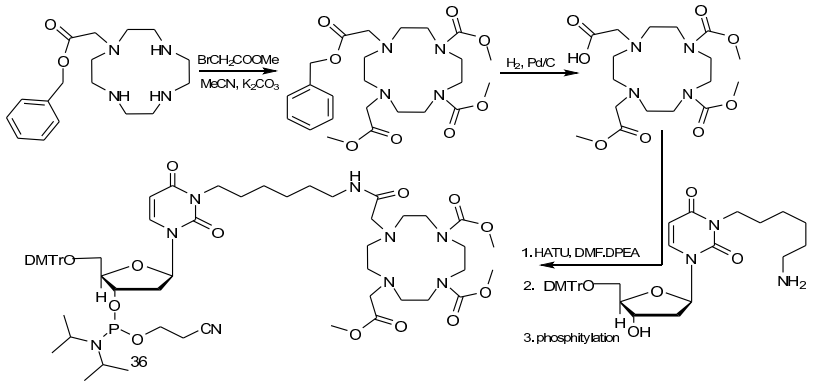
Fluorenylmetoksykarbonylową), a następnie jedną z grup karboksylowych wykorzystał do osadzenia na nośniku stałym. Ochraniając pozostałe grupy karboksylowe grupą *tert*-butylową, w wyniku usunięcia grupy Fmoc bardzo łatwo można rozbudowywać peptyd włączając go do jednej grupy aminowej makrocykla. Po usunięciu grup osłonowych i ściągnięciu peptydu z żywicy. Używając tej metodologii można otrzymać dowolne peptydy połączone do pochodnej cyklenu.



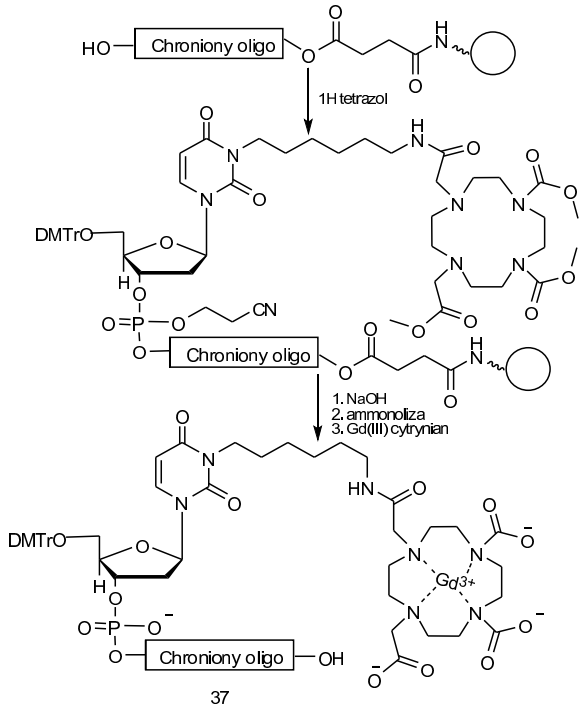
Schemat 23. Syntezy pochodnych związków kontrastowych opartych na peptydach.

Używając standardowego syntezatora oligonkleotydów Lassi Jaakkola [33] wykorzystał kwas 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetra octowy (DOTA) do syntezy oligonukleotydów, połączonych bezpośrednio do cyklenu **(36)** (**Schemat 24**). Po ukończeniu syntezy z otrzymany związek skompleksowano, uzyskując kompleks Ga^{3+}oligonukleotydu i pochodnej DOTA **(37)** (**Schemat 25**). Strategia syntetyczna

pozwala na otrzymanie wolnego koniugatu, który można użyć do reakcji kompleksowania wielorakimi jonami, co jest bardzo wygodne.



Schemat 24. Synteza pochodnej DOTA z nukleotydem.



Schemat 25. Synteza kompleksu gadolinu (III) ze związkiem 36.

Podziękowania:

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

Literatura.

1. L. M. De León-Rodríguez, Z. Kovacs, A. C. Esqueda-Olivaa, A. D. Miranda-Olvera,. *Tetrahedron Letters*. 2006, 47, 6937–6940;
2. A. Roignat, I. G. Gardinier, H. Bernard, J-J. Yaouanc, H. Handel,. *J. Chem. Soc., Chem. Commun*. 1995, 1233–1234;
3. V. Patinec, J-J. Yaouanc, H. Handel, J. C. Clement, H. Abbayes,. *Inorg. Chim. Acta*, 1994, 220, 347–348;
4. Z. Kovacs , A. D. Sherry,. *Chem. Soc., Chem. Commun.* 1995, 185–186;
5. R. M. Izait, K. Pawlak, J. Bradshaw., *Chem. Rev.* 1991, 91, 1721–2085;
6. C. Li, W.-T. Wong., *J. Org. Chem.* 2003, 68, 2956-2959;
7. K.-P. Eisenwiener, P.Powell, H. R. Maéck,. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 10, 2133-2135, 2000;
8. X. Liang, J. A. Parkinson, M. Weishaeupl, R. O. Gould, S.J. Paisey,. *J. Am. Chem. Soc*. 2000, 124, 9105-9112;
9. Jonathan P. Hill, Christopher E. Ansin Annie K Powell,.*Tetrahedron Letters*, 43, 7301-7302, 2002;
10. C. Wiliam, M. J. Baker, D. C. Choi, J. L. Hill, , P. A. Thomson,. *J. Org. Chem.* 1999, 64, 2683-2689;
11. M. P. Lowe, D. Parker, O. Reany, S. Aime, M. Botta, G. Castellano, E. Gianolio, R. Pagliarin,. *J. Am. Chem. Soc.* 2001, 123, 7601-7609;
12. M. Woods, G. E. Kieler, S. Bott, A. Castillo-Muzquiz, C. Eshelbrenner, L. Michaudet, K. Mcmillan, S. D. K. Mudiguanda, D. Ogrin, G. Tirsco, S. Zang, P. Zhao, D. Sherry,. *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 9248-9256;
13. S. Aoki, H. Kawatani, T. Goto, E. Kimura, M. Shiro,. *J. Am. Chem. Soc.* 2001, *123,* 1123-1132;

14. J. L.Sessler, T. D. Mody, G. W. Hemmi, V. Lynch,. *Inorg. Chem*. 1993, *32*, 3175-3187;
15. S. Quici, G. Marzanni, M. Cavazzini, P. L. Anelli, M. Botta, E. Gianolio, G. Accorsi, N. Armaroli, F.Barigelletti,. *Inorg. Chem*. 2002, *41*, 2777-2784;
16. D. E. Reichert, J. S. Lewis, C. J. Anderson,. *Coord. Chem. Re*v. 1999, 184, 3;
17. J. Paris, C. Gameiro, V. Humblet, P. K. Mohapatra, V. Jacques, J. F. Desreux,. *Inorg. Chem*. 2006, 45, 5092-5102;
18. D. Maffeo, J.A.Gareth Williams,. *Inorganica Chimica Acta*. 2003, 355, 127- 136;
19. Y. Shiraishi, Y. Kohno, T.Hirai,. *Ind. Eng. Chem.* Res. 2005, 44*,* 847-851;
20. B. König, M. Pelka, H. Zieg, T. Ritter, H. Bouas-Laurent, R. Bonneau, J.-P. Desvergne,. *J. Am. Chem. Soc*. 1999, *121,* 1681-1687;
21. P. L. Anelli, L. Lattuada, M. Gabellini, P. Recanati,. *Bioconjugate Chem.* 2001, 12, 1081-1084, 2001;
22. L. Burai, J. Ren, Z. Kovacs, E. Bruücher, A. D. Sherry,. *Inorg. Chem.* 1998, 37, 69-75;
23. H. Kobayashi, S. Kawamoto, S. K. Jo, H. L. Bryant, M. W. Brechbiel, R. A. Star,. *Bioconjugate Chem.*, 2003, 14, 388-394;
24. A. Accardo, D. Tesauro, P. Roscigno, L. Gianolio, Paduano, G. D'Errico, C. Pedone, G. Morelli., *J. Am. Chem. Soc*. 2004, 126, 3097-3107;
25. S. Aime, M. Botta, M. Fasano, E. Terreno,. *Chem. Soc. Rev*. 1998, 27, 19-29;
26. C. Li, Y.-X. Li, G.-L. Law, K. Man, W.-T. Wong, H. Lei,. *Bioconjugate Chem.* 2006, 17, 571-574;
27. J. F. Hartwig, Acc. Chem. Res,.1998, 31, 852–860;
28. V. Stastny, P. Lhoták, I. Stibor, B. König,.*Tetrahedron*. 1998, 62, 5748–5755;
29. R. Trokowski, S. Zhang, A. D.Sherry,. *Bioconjugate Chem*. 2004, 15, 1431-1440;
30. A. Heppeler, S. Froidevaux, H. R. Mäcke, E. Jermann, M. Béhé, P. Powell, M. Hennig,. *Chem. Eur. J*. 1999.5, 7, 1974 -1981;

31. J. J. Peterson, R.H. Pak, C. F. Meares,. *Bioconjugate Chem.* , 1999, 10, 316-320;
32. B. Yoo M. D. Pagel,. *Bioconjugate Chem.* 2007, 18, 903-911;
33. Lassi Jaakkola, Alice Ylikoski, Jari Hovinen,. *Bioconjugate Chem.* 2006, 17, 1105-110.7.

Rozdział 4

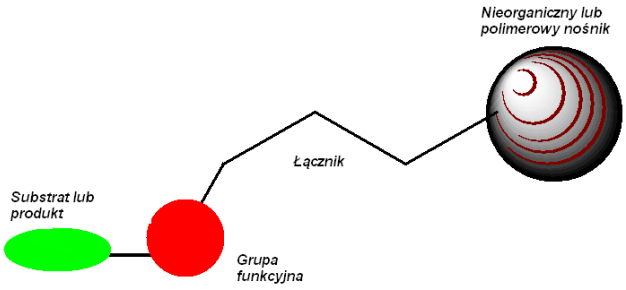
Wymiatacze molekularne

Grzegorz Schroeder

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

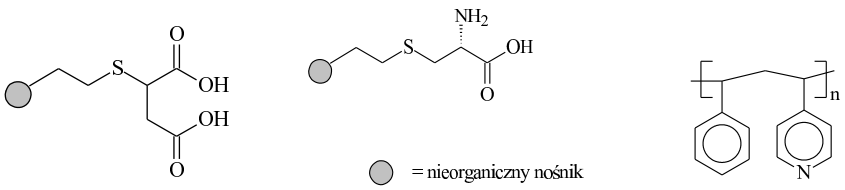
Pojęcie „zmiatacza" czy „wymiatacza" molekularnego związane jest z stosowanym powszechnie wyrażeniem wymiataczy wolnych rodników. Sformułowanie to jest próbą zaadoptowania do polskiego piśmiennictwa angielskiego zwrotu „free radical scavenger". Słowo „scavenger" oznacza w dosłownym rozumieniu „zamiatacza ulic". To pojęcie, wprowadzone do literatury chemicznej w 1946 roku[1], opisujące zastosowanie nowej generacji reagentów, nabrało szczególnego znaczenia wtedy, kiedy opracowano podstawy wieloetapowej syntezy organicznej z użyciem stałych nośników substratów (ang. solid-supported reagents). Synteza organiczna z zastosowaniem nośników reagentów w fazie stałej lub nierozpuszczalnych w środowisku reakcji wymiataczy produktów (ang. solid-phase organic synthesis, SPOS) to nowa, wysoce wydajna droga pozyskiwania wielu ważnych związków organicznych. Obszerne opracowanie tego zagadnienia przedstawili w pracy przeglądowej S. V. Ley i współpracownicy[2], a praktyczne zastosowanie techniki SPOS w syntezie wybranych układów przedstawiają prace [3-5].

Nośniki substratów lub wymiatacze produktów stosowane w tej specyficznej metodzie syntezy organicznej zbudowane są z nierozpuszczalnego, nieorganicznego lub polimerowego nośnika (ang. support), na którym osadzono za pomocą łącznika (ang. spacer) reaktywne grupy funkcyjne zdolne do wiązania substratu lub produktu (rysunek 1).



Rysunek 1.

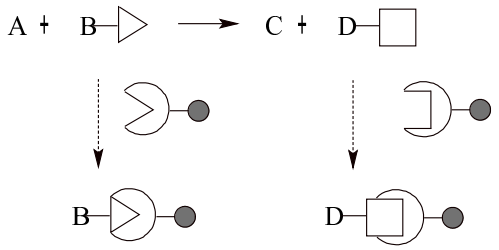
Jako nieorganiczne nośniki najczęściej stosuje się: SiO_2, Al_2O_3, tlenki metali o uziarnieniu od 5-500 mikronów i wielkości por 30-300 Å. Funkcjonalizacja nieorganicznych nośników lub polimeru za pomocą dwufunkcyjnych związków organicznych zdolnych do wiązania się z nośnikiem i równocześnie do tworzenia wiązania z cząsteczką substratu lub produktu pozwala na otrzymanie nowego typu materiału o ogromnym praktycznym zastosowaniu. Przykładową strukturę takiego materiału przedstawia rysunek 2.



Rysunek 2.

Zastosowanie wymiataczy molekularnych w syntezie organicznej przedstawiają równania 1 i 2.[6]

Równanie 1.



Równanie 2.

gdzie:

podstawnik zdolny do tworzenia wiązania się z wymiataczem molekularnym

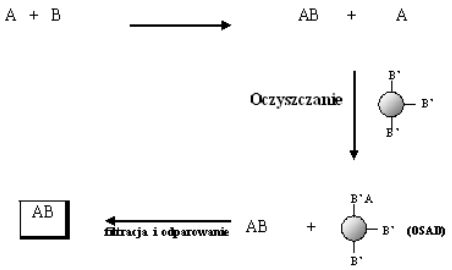
receptor osadzony na wymiataczu molekularnym zdolny do wiązania substratu B

podstawnik zdolny do tworzenia wiązania się z wymiataczem molekularnym

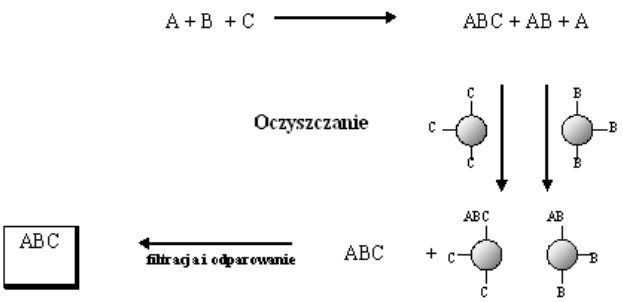
receptor osadzony na wymiataczu molekularnym zdolny do wiązania produktu B

Równanie 1 przedstawia reakcje, w której zastosowano substrat osadzony na podłożu stałym, który w obecności związku C tworzy trwalszy kompleks nierozpuszczalny z wymiataczem molekularnym. Uwolniony reaktywny substrat, daje w wyniku reakcji produkt AB. Równanie 2 przedstawia reakcję, w której zastosowano nierozpuszczalne wymiatacze molekularne do usuwania nie przereagowanego substratu lub ubocznego produktu.

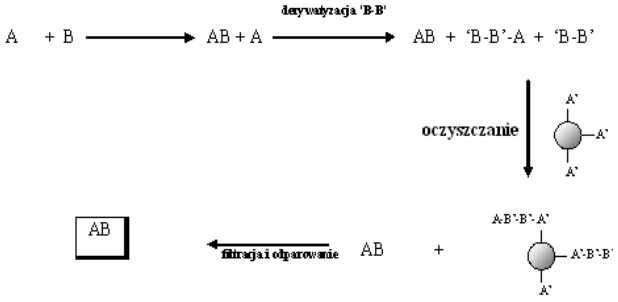
Różne strategie zastosowania wymiataczy molekularnych w syntezie organicznej przedstawiają równania 3-5.



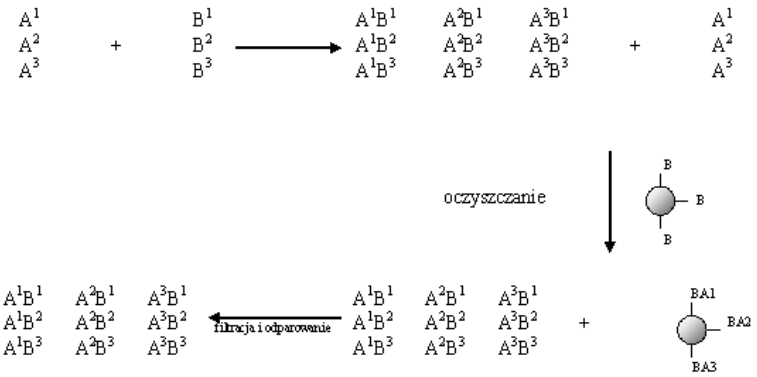
Równanie 3.



Równanie 4.



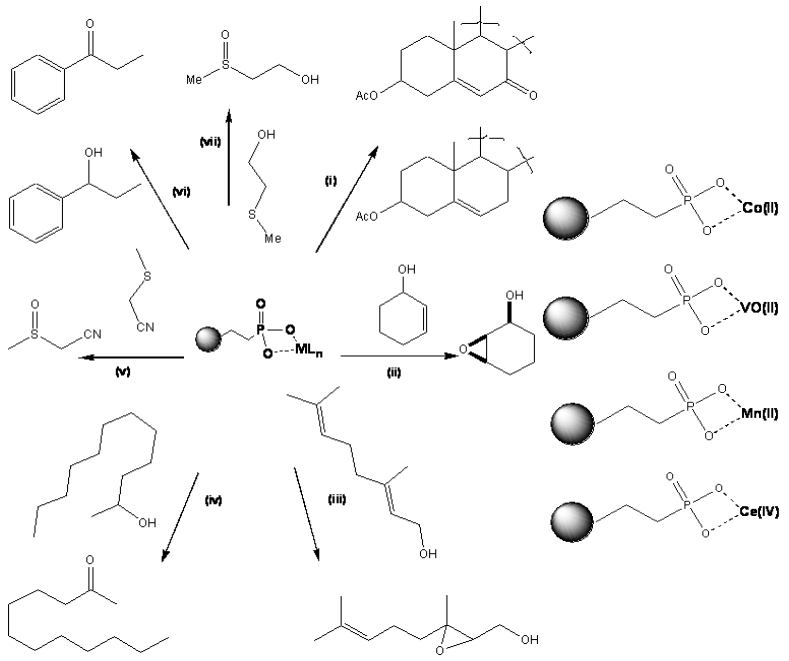
Równanie 5.



Równanie 6.

P. Wipf i C. M. Coleman[7] oraz R. J. Booth i J. C. Hodges[8] przedstawili w pracach przeglądowych strategię syntezy z zastosowaniem idei chemii kombinatorycznej i wymiataczy molekularnych do otrzymywania bibliotek biologicznie aktywnych cząsteczek (równanie 6).

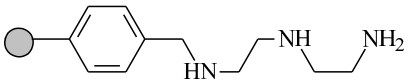
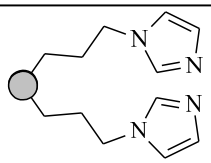
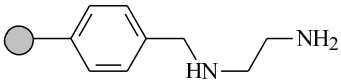
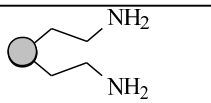
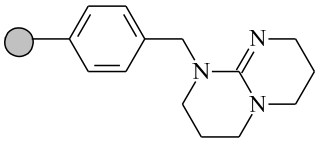
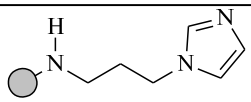
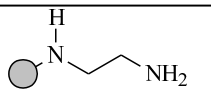
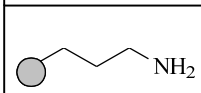
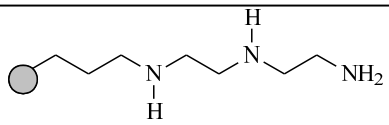
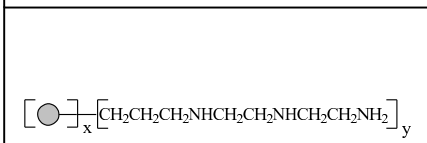
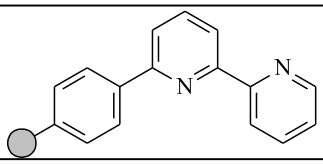
Zastosowanie wymiataczy molekularnych w procesie utleniania w warunkach heterogenicznej katalizy przedstawia równanie 7. Reakcje tego typu charakteryzują się dużą wydajnością procesu, możliwością odzyskiwania katalizatora, znikomym zanieczyszczeniem produktu metalem zastosowanym w procesie katalitycznym oraz łatwością prowadzenia procesu.[6]



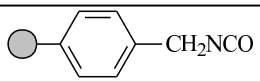
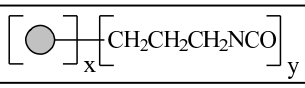
Równanie 7.

Wymiatacze molekularne można podzielić w zależności od rodzaju cząsteczek, które są przez nie wiązane na:

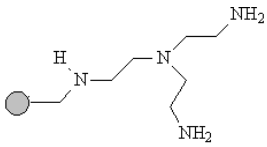
1. wymiatacze wiążące kwasy i ich pochodne: bezwodniki kwasowe, chlorki kwasowe...

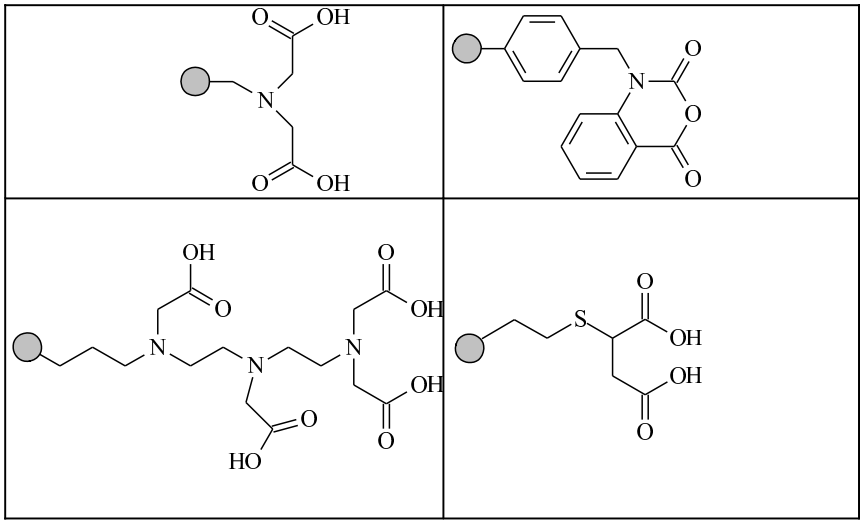
2. wymiatacze wiążące alkohole

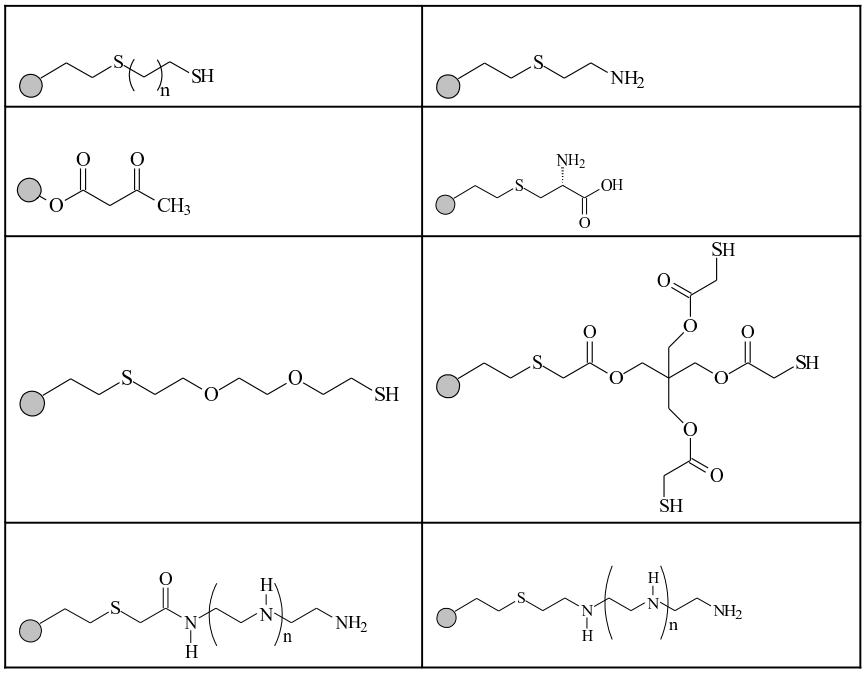
3. wymiatacze wiążące aldehydy

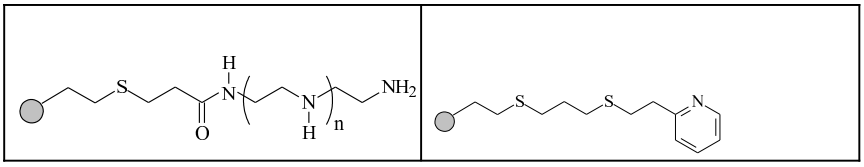


4. wymiatacze wiążące zasady



5. wymiatacze wiążące kationy metali





W literaturze chemicznej[9-12], jak i w katalogach firm[13-18] sprzedających komercyjne wymiatacze molekularne dla celów laboratoryjnych można znaleźć wiele innych podziałów tego typu układów.

W przypadku zastosowania wymiataczy jonów metali szczególnie ważne jest, aby reagowały one z jonami metali bez względu na formę ich występowania w roztworze. Wiele wymiataczy jonów metali ciężkich posiada taką zdolność. Tabela 1 przedstawia skuteczność usuwania jonów palladu z roztworu zawierającego różnego typu kompleksy tego pierwiastka[13].

Tabela 1 .

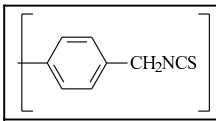
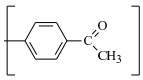
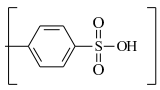
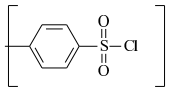
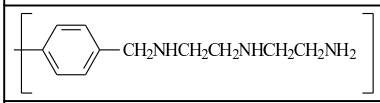
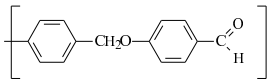
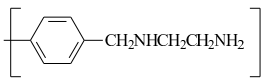
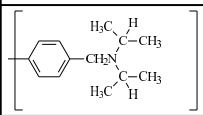
Skuteczność usuwania jonów palladu z roztworu zawierającego różnego typu kompleksy tego pierwiastka z zastosowaniem selektywnego zmiatacza molekularnego[6].

stężenie palladu [ppm]	$Pd(OAc)_2$	$Pd(PPh_3)_2X_2$	$Pd_2(dba)_2$	$Pd(PPh_3)_4$
w roztworze przed zastosowaniem zmiatacza molekularnego	1000	1000	250	330
w roztworze po zastosowaniu zmiatacza molekularnego po	<1	<1	<1	<1

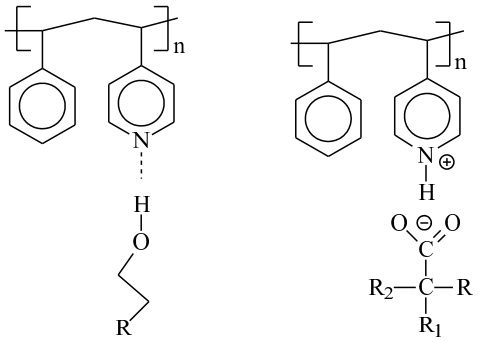
Ważnym parametrem charakteryzującym wymiatacze molekularne jest czas potrzebny do zajścia reakcji chemicznej pomiędzy grupami terminalnymi zawartymi w wymiataczu jonowym a usuwanym (wiązanym) jonem lub obojętną cząsteczką w roztworze. Z punktu widzenia praktycznego szacuje się, że czas ten nie powinien wynosić więcej niż 1 minuta.

Obok modyfikowanych związków nieorganicznych szczególne znaczenie posiadają wymiatacze molekularne zbudowane na bazie polimeru[14]. Wybrane

przykłady grup funkcyjnych osadzonych na nierozpuszczalnym polimerze przedstawia zestawienie:

Mechanizm działania wymiatacza jonowego w różnych warunkach pH na bazie vinylobenzenu z pirydyną jako reaktywną grupą terminalna przedstawia równanie 5:



Równanie 5.

Możliwość syntezy wymiataczy molekularnych otworzyło nowe możliwości nie tylko w syntezie nowych materiałów ale również w analizie chemicznej wielu mieszanin. To nowy typ reagenta chemicznego o dużej selektywności jest niezmiernie prosty w zastosowaniu i stanowi nowym narzędzie w rękach chemików.

Podziękowania:

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

Literatura:

1. S. Sussman, Ind. Eng. Chem., 38, 1228 (1946);
2. S.V. Ley, I. R. Baxendale, R. N. Bream, P. S. Jackson, A. G. Leach, D.A. Longbottom, M. Nesi, J. S.Scott, R. I. Storer, S. J.Taylor, Multi-Step Organic Synthesis Using Solid-Supported Reagents and Scavengers: A New Paradigm in Chemical Library Generation, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 3815 (2000);
3. J. Christopher, C. McCusker, S. Booth, J. Tierney, Solid Phase Organic Synthesis, J. Chem. Soc., XI, (2000);
4. D. Orain, J. Ellard, M. Bradley, Protecting Group in Solid-Phase Organic Synthesis, J. Combina., 4, 1 (2002) ;
5. M. Izumi, Solid-Phase Organic Synthesis of Heterocyclic Compounds, J. Pestic. Sci. 31, 1 (2006);
6. D. L. Flynn, J. Z. Crich, R. V. Devraj, S. L. Hockerman, J. J. Parlow, M. S. South, S. Woodard, Chemical library Purification Strategies Based on Principles of Complementary Molecular Reactivity and Molecular Recognition, J. Am. Chem. Soc., 119, 4874 (1997);
7. P. Wipf i C. M. Coleman UPCMLD, 10, 1 (2004);
8. R. J. Booth, J. C. Hodges, Acc. Chem. Res., 32, 18 (1999);
9. J. C. Hodges, Covalent Scavengers for Primary and Secondary Amines, Synlett, 1, 152 (1999);
10. K. A. Newlander, B. Chenera, D. F. Veber, N. C. F. Yim, M. L. Moore, Simle Silyl Linker for the Solid Phase Organic Synthesis of Aryl-Containing Molecules, J.Org. Chem., 62, 6726 (1997);
11. Polymer-Supported Scavengers and Reagents for Solution-Phase Synthesis, ChemFiles, 4, 1 (2002);

12. M. Castillo, G. Pina-Luis, M. E. Diaz-Garcia, I. A. Rivero, Solid-Phase Organic Synthesis of Sensing Sorbent Materials for Copper and Lead Recovery, J. Braz. Chem. Soc., 16, 412 (2005);
13. Novel Functionalised Materials, Metal Scavengers and Solid Phase Catalysts, Phosphonics, www.phosphonics.com;
14. Scavengers, www.sigmaaldrich.com.;
15. Scavengers, www.silicycle.com.;
16. Fluorous scavenging, www.fluorous.com.;
17. Materials Today for Tomorrow's Discoveries, www.advancedchemtech.com.;
18. Technical notes, www.novabiochem.com.;

Rozdział 5

Nowoczesna diagnostyka medyczna.

Chipy i matryce molekularne

Piotr Młynarz, Anna Czernicka, Agata Rydzewska, Paweł Kafarski
Zakład Chemii Bioorganicznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Wrocławska
Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław

1. Kierunki rozwoju badań nad konstrukcją chipów i mikrourządzeń diagnostycznych – wprowadzenie i perspektywy.

Badania z zakresu nauk medycznych stanowią priorytet na całym świecie i dlatego ich rozwój można uznać za gwałtowny, a poszukiwanie nowych i efektywnych metod diagnostycznych stanowi ich ważny element. Co więcej, badania te nie wymagają zaangażowania tak kolosalnych środków finansowych jak poszukiwanie leków innowacyjnych, czy też projektowanie nowych technik terapeutycznych, a ich głównym celem jest poszukiwanie takich technik diagnostycznych, które byłyby w jak najmniejszym stopniu inwazyjne, a więc nie wymagają one kosztochłonnych badań klinicznych. To z kolei powoduje, że badania takie mogą prowadzić z sukcesem laboratoria akademickie.

Znacznie mniej uwagi poświęca się poszukiwaniu technik diagnozowania stanu środowiska naturalnego i środowiska pracy. Jest tak, dlatego że badania takie są kosztowne, a sposoby monitorowania zagrożeń uregulowane od lat odpowiednimi normami, zaś samo monitorowanie prowadzone systematycznie. Co również ważne,

w procesach monitorowania zagrożeń czas analizy nie odgrywa najczęściej aż tak znaczącej roli.

Nowe techniki diagnostyczne mają w zasadzie dwa podstawowe zadania do spełnienia:

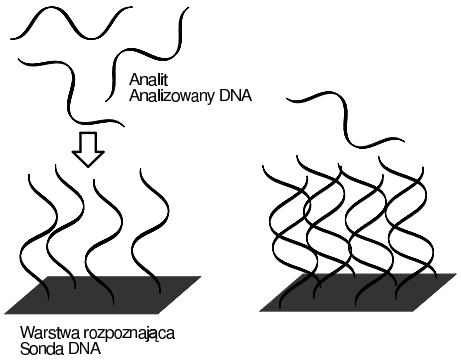
- ułatwić lekarzowi podjęcie decyzji co do przebiegu dalszej terapii (na przykład, ma to znaczenie gdy trzeba szybko ustalić czy nowotwór jest czy nie jest złośliwy);
- pozwolić pacjentowi monitorować przebieg leczenia i rozwój choroby w domu, w sposób tak prosty jak dziś wykonuje się testy ciążowe lub testy na zawartość narkotyków we moczu.

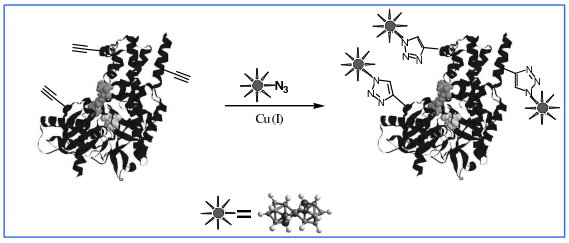
Jest oczywistym, że wymagania stawiane projektowaniu i konstruowaniu chipów i mikrourządzeń diagnostycznych są różne i zależne od celu, jakie mają one spełniać. Jest również oczywistym, że przy tak szybkim rozwoju badań w tej dziedzinie niezwykle trudno jest prognozować, w jakich kierunkach badania takie się rozwiną. Obecnie główny impet badań nad konstrukcją takich urządzeń diagnostycznych skierowany jest w trzech kierunkach:

- zastosowania monoklonalnych przeciwciał do rozpoznawania charakterystycznych elementów budowy komórek patogennych;
- zastosowania technik rozpoznawania patogennego DNA i RNA (antysensowne oligonukleotydy, mikromacierze DNA);
- identyfikacji i analizy poziomu indywidualnych markerów procesów chorobowych.

Jednym z ważnych kierunków badawczych jest poszukiwanie specyficznych markerów określonych chorób, lub czynników zagrożenia środowiska. W najszerzej badanych przypadkach - chorób nowotworowych, czy też identyfikacji nosicielstwa AIDS - mogą to być oligonukleotydy charakterystyczne dla określonego stanu chorobowego, których obecność można badać stosując komplementarne, tzw. antysensowne, oligonukleotydy (aptamery) immobilizowane na prostym nośniku

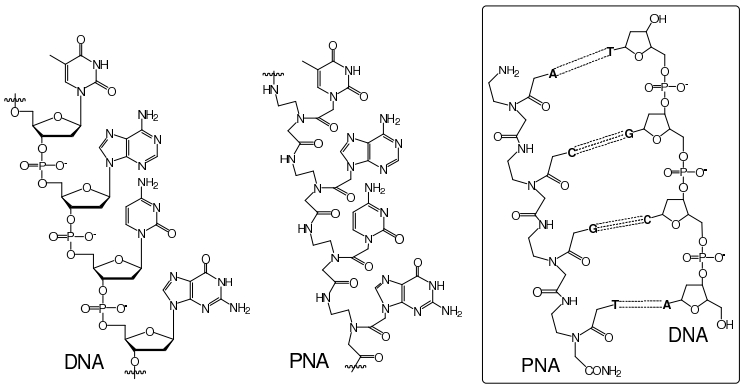
(papier, polimer). Są one modyfikowane tak, aby obecność markerowego związku dawała sygnał barwny lub elektryczny [1]. Badania takie, w których wykorzystuje się kompleksy boru pozwalające na elektrochemiczną i elektroforetyczną detekcję sygnału prowadzone są w Polsce (Rys 1) [2]. Co więcej, takie oligonukleotydy można zastosować również jako sondy rozpoznające charakterystyczne cechy strukturalne białek lub, charakterystycznych dla rozwoju choroby, metabolitów bazując na zdolnościach do selektywnego kompleksowania tych ostatnich. W celach tych można użyć techniki SELEX (***S**ystematic **E**volution of **L**igands by **EX**ponential Enrichment*), która pozwala na równoczesny skryning nawet do 10^{15} indywidualnych cząsteczek kwasów nukleinowych pod względem ich zdolności do wiązania zarówno strukturalnie zróżnicowanych niskocząsteczkowych związków chemicznych, jak i wiązania białek [3].





Rysunek 1. Sondy diagnostyczne oparte na antysensownych nukleotydach i białkach znakowanych klasterami boru

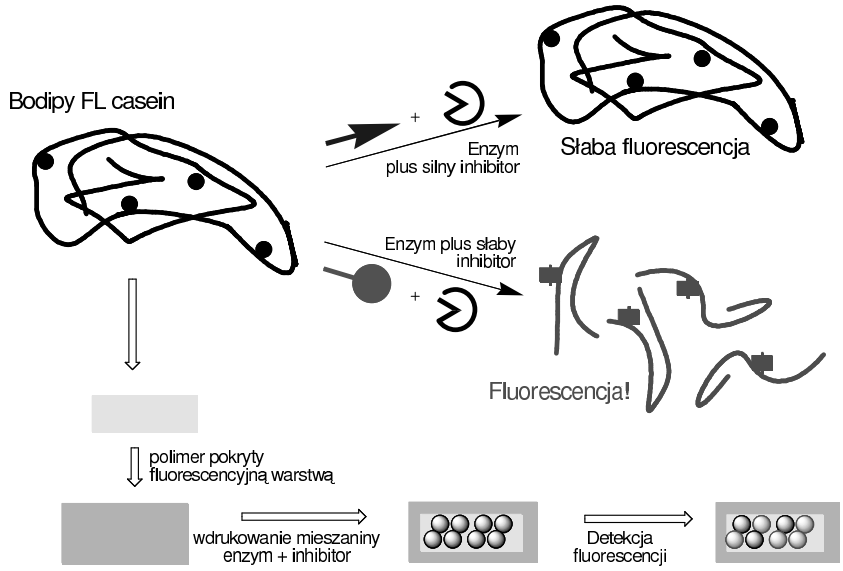
Alternatywnym sposobem jest zastosowanie peptydowych analogów kwasów nukleinowych (PNA, **P**eptide **N**ucleic **A**cid, rysunek 2). Opisano taki system, w którym badano kompleksowanie proteaz i kinaz przez składniki biblioteki PNA modyfikowanej fluoroforem i liczącej 10 000 związków. Nieskompleksowane składniki biblioteki były wykrywane przez mikromacierz DNA złożoną z 22 575 dostępnych handlowo fragmentów DNA [4].



Rysunek 2. Peptide Nucleic Acids (PNA) jako analogi DNA i ich aktywność antysensowna

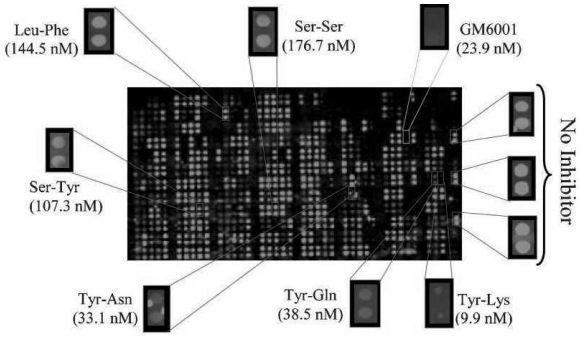
Przykładem podobnego podejścia jest konstrukcja urządzeń rozpoznających selektywnie białka charakterystyczne (markerowe) dla analizowanego stanu patogennego. W przypadku chorób nowotworowych mogą to być, na przykład, metaloproteazy matriksowe, zróżnicowane pod względem budowy, wielodomenowe enzymy odgrywające podstawową rolę w remodelowaniu tkanek podczas procesu tworzenia przerzutów złośliwych nowotworów. Konstruuje się biblioteki substratów lub inhibitorów takich enzymów, czyli biblioteki substancji różnorodnie reagujących z markerowymi enzymami. Biblioteki takie mogą być immobilizowane na nośnikach takich jak papier, szkło, złoto, czy polimer, stanowić integralną część kolumn monolitycznych, czy też być umieszczone w nanoreaktorach tak, aby rozpoznanie stanu chorobowego polegało na zdefiniowaniu różnic w zachowaniu (barwie,

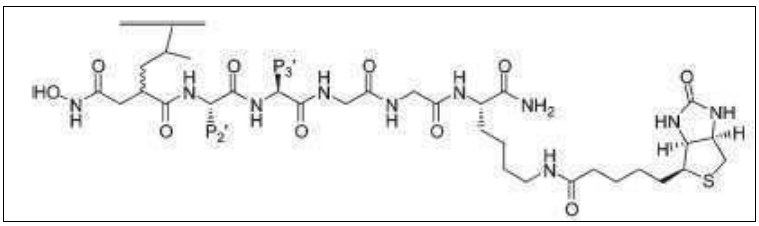
fluorescencji, przewodnictwie elektrycznym itp.) płynu fizjologicznego (moczu, krwi, wyciągu tkankowego) wobec poszczególnych składników biblioteki. Przykładem może być zastosowanie inhibitorów oddziałujących z wybranymi protezami w ten sposób, że towarzyszy temu reakcja barwna lub fluorescencja. System pokazany na rysunku 3 polega na umieszczeniu biblioteki inhibitorów na powierzchni pokrytej fluorogenicznym substratem, a następnie przeprowadzeniu reakcji z homogenatem tkankowym. W miejscach gdzie następuje inhibicja nie obserwuje się fluorescencji lub jest ona częściowo zahamowana [5].



Rysunek 3. Sonda złożona z biblioteki 400 inhibitorów identyfikująca protezy matriksowe

Przykładem może tu być, pokazany na rysunku 4, obraz otrzymany w przypadku biblioteki utworzonej z 400 krótkich peptydów i zastosowanej do identyfikacji mieszaniny dwóch modelowych enzymów termolizyny i kolagenazy (zastosowano tu detekcję fluorescencyjną).



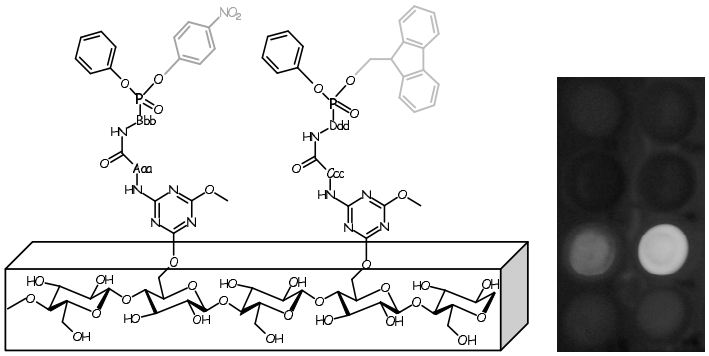


Rysunek 4. Detekcja obecności termolizyny i elastazy przez bibliotekę oligopeptydową skonstruowaną z inhibitorowych peptydów zawierających kwasy hydroksamowe

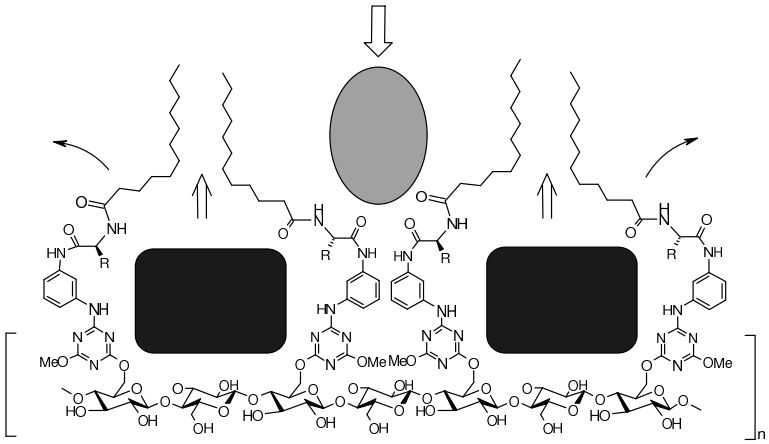
Przykładem podobnego podejścia jest biblioteka fosfonowych inhibitorów proteaz serynowych, której ideę reprezentuje rysunek 5, pokazujący dwa inhibitory o podstawnikach różniących się barwą fluorescencji (po inhibicji enzymu proteolitycznego podstawnik ten jest uwalniany), immobilizowanych na podłożu stałym (tu krystalicznej celulozie). Obok pokazany jest wstępny eksperyment różnicowania wyciągów tkankowych otrzymanych z tkanek zaatakowanych przez nowotwór tarczycy (z lewej) i tkanek zdrowych pobranych od tego samego chorego przez cztery różne strukturalnie inhibitory [6].

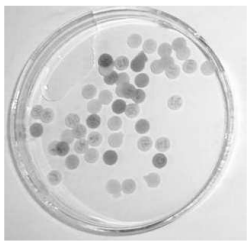
Ciekawym rozwiązaniem jest konstrukcja papierowych pasków diagnostycznych. Polega ona na zastosowaniu innego, pomysłu, a mianowicie badaniu, w jakim stopniu składniki mieszaniny związków stanowiących wyciąg tkankowy wypierają z monomolekularnych warstw związków hydrofobowych

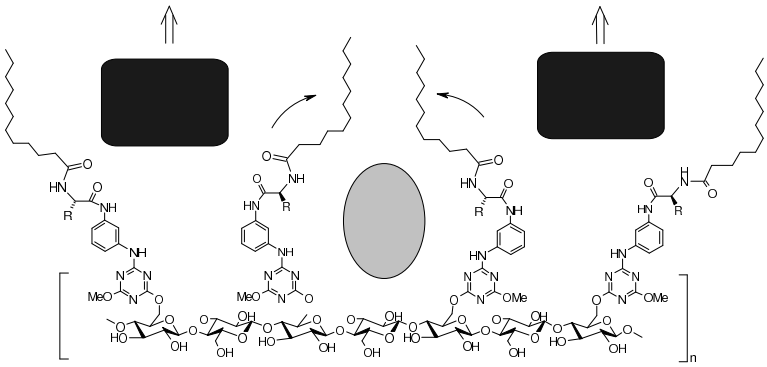
immobilizowaną w nich substancję barwną (Rys 5). Wstępny wynik takiego eksperymentu pokazany jest obok – są to różnie wybarwione krążki bibuły [7].



Rysunek 5. Biblioteka inhibitorów proteaz serynowych

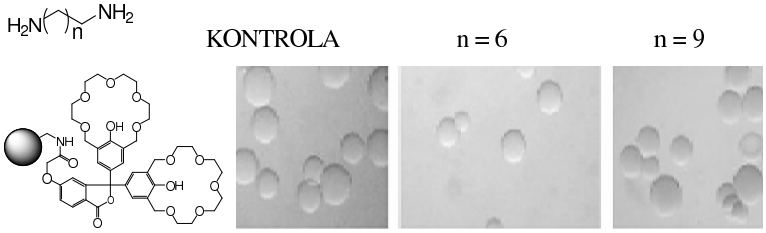






Rysunek 6. Bibułki do diagnozowania nowotworów tarczycy

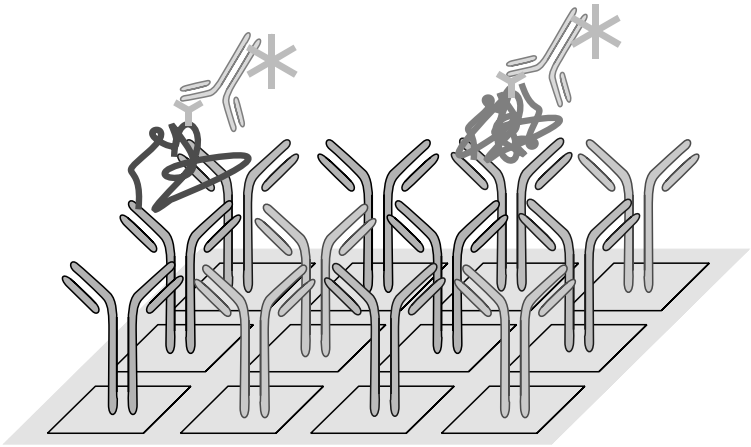
Układy takie jak pokazano powyżej są pomyślane jako prototypy tych, które mają ułatwić lekarzowi podjęcie decyzji, co do sposobu leczenia pacjenta i dać mu więcej informacji na temat stanu chorego. Wynika to głównie z faktu, że są one bardziej złożone niż te zaprojektowane do monitorowania przebiegu choroby w domu. Można też podjąć próbę identyfikacji niskocząsteczkowych markerów stanów patogennych. Dobrym przykładem jest tu próba detekcji poziomu amin biogennych wykorzystując w tym celu chemię supramolekularną [8]. Otrzymano odpowiedni eter koronowy immobilizowany na powierzchni polistyrenu, który kompleksuje równocześnie dwie grupy aminowe 1,n-diaminoalkanów, czemu towarzyszy zmiana zabarwienia perełek żywicy (Rys. 7).



Rysunek 7. Modyfikowany polimer wykrywający obecność tiamin biogennych

Identyfikację obecności tych amin można również dokonać badając ich transport przez membrany ciekłe, stosując niezwiązany z polimerem eter koronowy jako przenośnik i detekcję elektrochemiczną, czyli konstruując odpowiednią selektywną elektrodę.

Oczywiście nie można sobie wyobrazić rozwoju konstrukcji systemów diagnostycznych bez modyfikacji i rozwoju standardowo dziś badanych technik, jakimi są techniki immunologiczne. Takie badania prowadzi wielka liczba ośrodków badawczych, a modyfikacje polegają na stosowaniu coraz to bardziej złożonych układów diagnostycznych [9,10], jak na przykład układ pokazany poniżej wykorzystujący dwa przeciwciała, a jedno z nich jest modyfikowane czynnikiem dającym fluorescencję (Rys. 8).

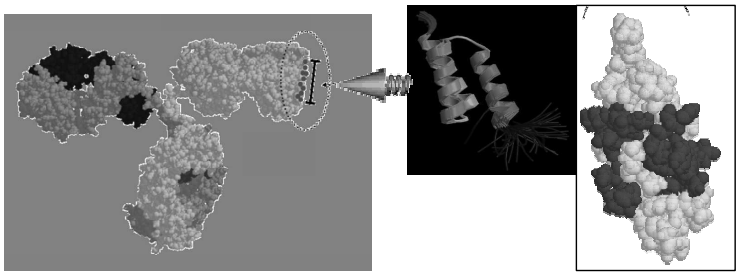


Rysunek 8. Chip diagnostyczny oparty o zastosowanie przeciwciał

Ważnym kierunkiem badań nad technikami immunologicznymi jest miniaturyzacja układów pomiarowych.

Ciekawą modyfikacją i znacznym uproszczeniem jest próba zastosowania bibliotek specyficznych białek wirusów *Measles, Mumps i Sendai* (tzw. *affibodies*), które są homologiczne ze zmiennym fragmentem przeciwciał (Rys.9). Są to małe, stabilne białka o masie 6 kDa, złożone z 58 aminokwasów [11,12]. Co ważne są one

łatwe do produkcji w bakteriach lub nawet na drodze syntezy chemicznej. Miejsce wiązania wykrywanych białek z *Affibody* znajduje się na płaskiej powierzchni dwóch z trzech helis domeny. Tylko 6-8 reszt aminokwasowych jest kluczowych w oddziaływaniach z innymi białkami, zaś mutacje w obrębie tych reszt nie zmieniają struktury ani stabilności *Affibody*.

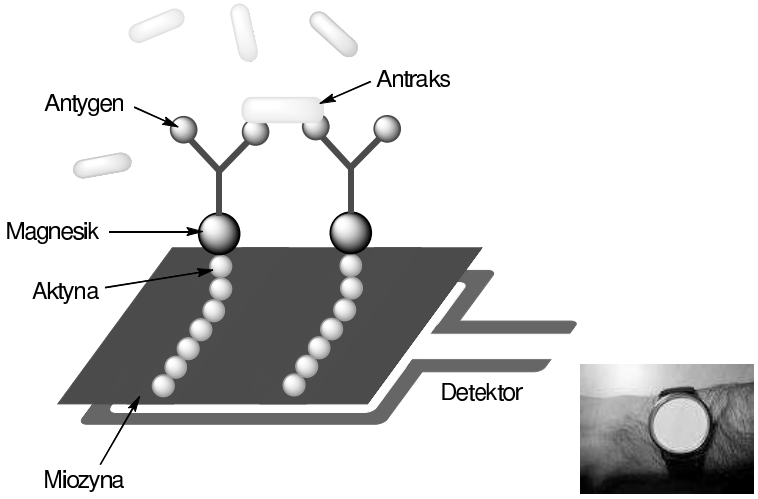


Rysunek 9. Affibodies

Konstrukcja bibliotek takich białek prezentowanych na powierzchni makrofagów w obecności określonych markerów stanu patogennego (białek, policukrów itp.) powinna pozwolić znaleźć te białka, które selektywnie rozpoznają antygeny charakterystyczne dla badanej choroby, a tym samym pełnią rolę identyczną do przeciwciał.

Poszukiwanie nowych, nietypowych technik diagnostycznych bardziej zależy od inwencji i pomysłowości badaczy, a mniej od dostępności środków technicznych. Dobrym przykładem jest tu próba mapowania powierzchni tkanek roślin uprawnych za pomocą spektroskopii ramanowskiej (SARS) w celu zidentyfikowania różnic między roślinami hodowanymi w warunkach standardowych a tymi hodowanymi w rejonach zagrożeń ekologicznych, a tym samym opracowania stosunkowo prostego (choć wymagającego dostępu do drogiej aparatury i odpowiedniego przygotowania próbek) testu identyfikującego jakość tych roślin [13,14]. Technikę SARS można zaadaptować do różnicowania próbek tkanek nowotworowych i zdrowych. Wadą tej techniki jest konieczność inwazyjnego pozyskiwania materiału do badań i koszt aparatury.

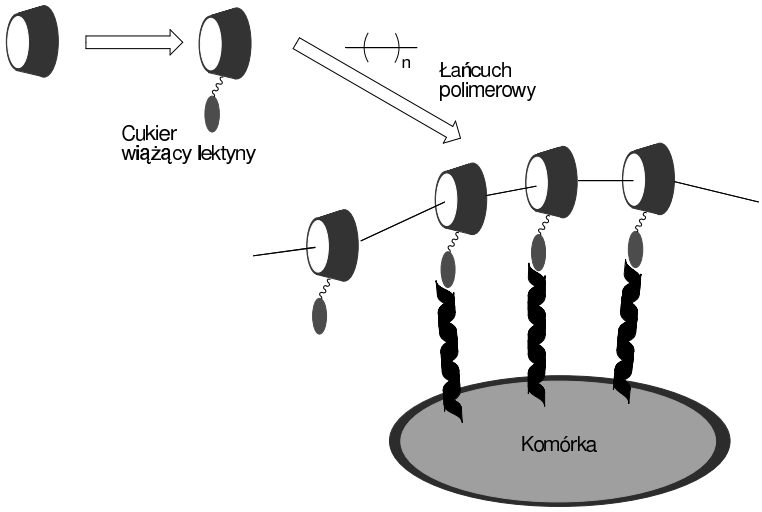
Konstrukcja układów diagnostycznych, zarówno medycznych jak i innego typu zależy bardzo silnie od fantazji i pomysłowości zespołów prowadzących badania. Przykładem może tu być układ wprowadzany w armii Stanów Zjednoczonych Ameryki Północnej do stwierdzania obecności bakterii *Bacillus anthracis*, producenta silnej białkowej toksyny – antraksu (Rys. 10). Wykorzystano w tym celu molekularną zasadę funkcjonowania mięśni. Na podłożu wyścielonym jednym z białek tego systemu – miozyną – wytworzono ścieżki z drugiego białka – aktyny. Do aktyny przyłączono przeciwciało selektywnie rozpoznające *Bacillus anthracis*. Gdy w środowisku znajduje się ta bakteria jej kontakt z przeciwciałem powoduje wędrówkę aktyny wzdłuż wytworzonych ścieżek, a osiągnięcie przez nią krańca ścieżki powoduje fluorescencję tarczy zegarka i wskazuje na niebezpieczeństwo. Oczywiście nieznane są szczegóły konstrukcji tego układu.



Rysunek 10. Układ do wykrywania obecności antraksu

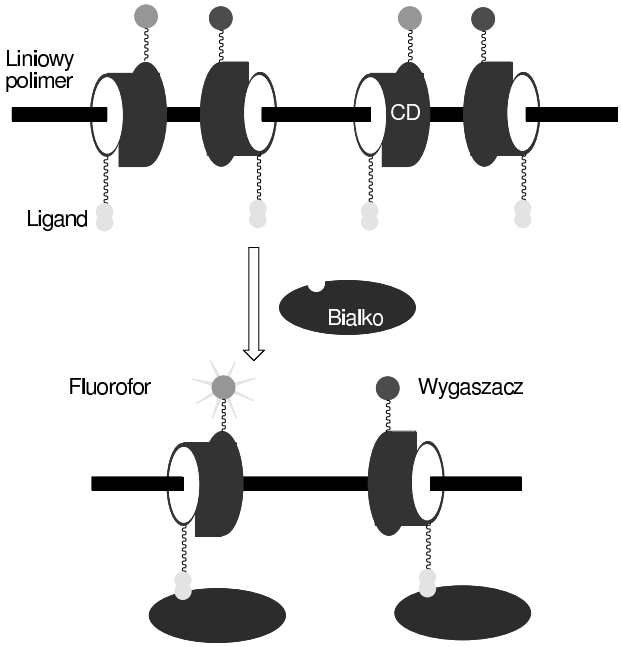
Innym przykładem niezwykle oryginalnego pomysłu jest zastosowanie w diagnostyce cyklodekstryn modyfikowanych oligocukrem rozpoznającym

charakterystyczne dla badanej komórki lektyny. „Nawleczenie” tych cyklodekstryn na łańcuch polimerowy powoduje, że łatwo jest za ich pomocą monitorować poziom patogenu w płynach ustrojowych lub w środowisku naturalnym gdyż polimer taki tworzy koniugaty z komórkami i powoduje zmianę fizyczną (na przykład mętnienie roztworu) łatwą do detekcji (Rys. 11) [15].



Rysunek 11. Układ do diagnozowania komórek patogennych

Innym pomysłem na zastosowanie zdolności wiążących cyklodekstryn jest użycie podobnych układów, w których cyklodekstryna modyfikowana jest substratem lub inhibitorem określonego enzymu (moduł rozpoznający) i równocześnie przyłączone są do niej fluofor lub wygaszacz fluorescencj (Rys.12). W stanie podstawowym znacznik fluorescencyjny jest nieaktywny na skutek bliskiego sąsiedztwa wygaszacza. W obecności badanego białka fluorofor i wygaszacz odsuwają się od siebie, co związane jest z emisją sygnału optycznego [16].

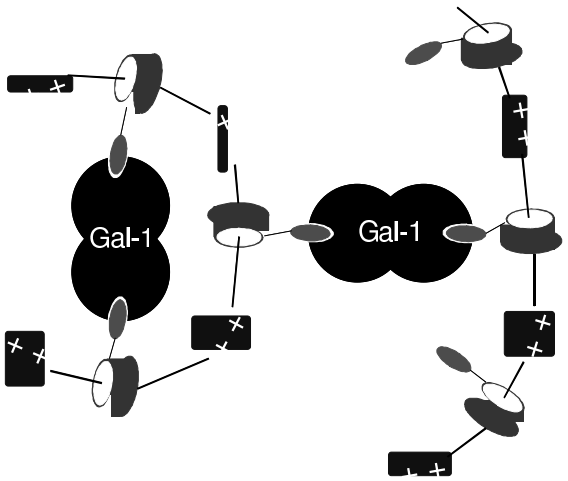


Rysunek 12. Układ cyklodekstryn stosowany do monitorowania poziomu białek markerowych

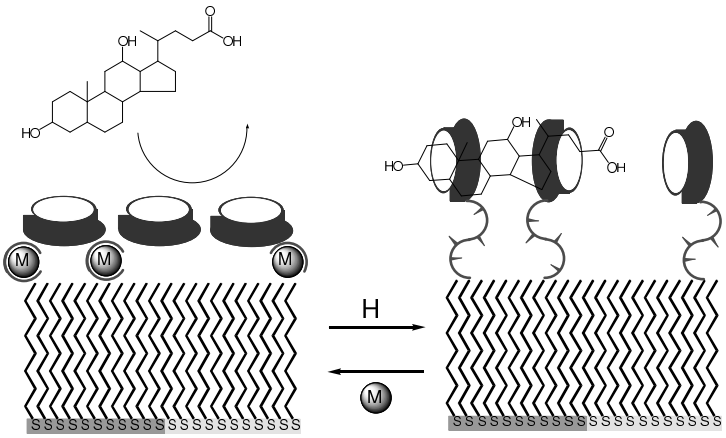
Podobny system diagnostyczny zastosowano dla monitorowania poziomu galektyny-1, białka markerowego białaczki. Cyklodekstryna „nawleczona" została na rozpuszczalny w wodzie poli(dekametylenowiologen) i modyfikowana laktozą, która selektywnie wiąże się z galektyną. Jak pokazano na rysunku 13 wiązanie takiego polimeru z białkami tworzy agregat i, na przykład, mętnienie roztworu [17].

Innym pomysłowym rozwiązaniem jest zastosowanie cyklodekstryn do monitorowania poziomu cholesterolu w płynach ustrojowych (Rys.14). Cyklodekstryna wiązana jest do powierzchni monowarstwy lipidowej osadzonej na złocie lub szkle i utrzymywana w pozycji poziomej do tej powierzchni przez kompleksowanie jonu metalu przez łącznik (linker), którym jest fragment glikolu polietylenowego [16]. Gdy zmienia się pH roztworu dwie cząsteczki cyklodekstryny

wiążą jedną cząsteczkę cholesterolu i zakłóceniu ulega spójność monowarstwy, co można obserwować pod mikroskopem.



Rysunek 13. Oddziaływanie ligandu laktozowego umieszczonego na fragmencie policyklodekstrynowym z galektyną-1



Rysunek 14. Sensor do i dentyfickacji cholesterolu

Trzeba jednak zdawać sobie sprawę, że doprowadzenie każdego pomysłu do takiego stanu, aby można go było wykorzystać w diagnostyce wymaga zaprojektowania i wykonanie odpowiedniego urządzenia diagnostycznego (chipu, mikromacierzy, systemu *lab-on-chip* itp.). Rysunek 15 w pełnej humoru formie wskazuje konieczność wytworzenia odpowiedniego urządzenia dla konkretnego celu diagnostycznego (tu do wykrywania malarii). Konstrukcje takich urządzeń omówiono wcześniej i poświęconych jest jej kilka interesujących prac przeglądowych [18-22]

Rysunek 15. Lab-on-chip (www.rsc.org)

2. Opis metod diagnostycznych w medycynie – pojęcia ogólne i definicje.

2.1 Obecnie stosowane metody diagnostyczne

Obecna strategia przeprowadzania badań diagnostycznych opiera się głównie na rozpoznaniu widocznych i już rozwiniętych objawach chorobowych. Niestety do dziś rozpoznaje się i leczy schorzenia dopiero w zaawansowanym stadium, podczas gdy właściwym kierunkiem rozwoju diagnostyki powinno być przewidywanie i zapobieganie chorobom. Działania takie jak przesiewowe badania i nieskomplikowane testy pozwalające na szybkie wykrycie choroby powinny stanowić integralną część standardowego badania lekarskiego. Powinny one, zatem

stanowić element szeroko pojętej profilaktyki. Mając to na uwadze, rozwój nowych i skutecznych metod diagnostyki jest nie tylko działaniem wspomagającym stosowaną dotychczas profilaktykę, lecz także koniecznością. Szybka i trafna diagnoza umożliwia skrócenie czasu leczenia i rehabilitacji chorego, a co za tym idzie – zmniejsza również koszty leczenia [23]. Od poprawnej diagnozy często zależy życie pacjenta. Szacuje się, że w przypadku schorzeń sercowo-naczyniowych, nowotworowych i autoimmunologicznych dokładna i precyzyjna diagnoza stanowi ponad 50% sukcesu przyszłego leczenia [24]. Pod pojęciem badań diagnostycznych należy rozumieć wszystkie techniki prowadzące do określenia stanu zdrowia pacjenta. Obecnie powszechnie są stosowane badania laboratoryjne, histopatologiczne, cytologiczne oraz diagnostyka obrazowa. Do badań laboratoryjnych możemy zaliczyć między innymi standardowo wykonywane badania morfologiczne krwi, badania z zakresu homeostazy (np.: czas krwawienia, czas krzepnięcia krwi oraz tzw. czas trombinowy), badania biochemiczne (np.: oznaczanie poziomu cholesterolu, obecność pierwiastków śladowych i witamin) oraz badania wydzielin i wydalin. W przypadku diagnostycznych badań specjalistycznych można przyjąć podział na:

- diagnostykę obrazową na którą składają się: rentgenodiagnostyka, ultrasonografie i medycyna nuklearna, a przykładowymi badaniami tego typu mogą być tomografia, angiografia czy koronografia;
- diagnostykę elektrograficzną - wykorzystującą zjawiska bioelektryczne powstające w mięśniach i mózgu. Do tej grupy badań możemy zaliczyć EKG (elektrokardiografię), EEG (elektroencefalografię,); EMG (elektromiografię) oraz badanie Holtera;
- diagnostykę endoskopową, polegającą na wziernikowaniu (oglądaniu) wnętrza ciała za pomocą endoskopu wprowadzanego przez naturalne otwory ciała takie jak nos czy jama ustna lub poprzez otwory powstałe w skutek nacięcia skóry. Wyróżnia się tu: aminoskopię, artroskopię, bronchoskopię, cystoskopię, ezofagoskopię, gastroduodenoskopię, gastroskopię, histeroskopię, kolonoskopię, koloskopię, laparoskopię,

laryngoskopię, mediastinoskopię, retromamoskopię, retroskopię, oraz torakoskopię;

- biopsje – wykonywane w celu pobrania tkanek lub płynu niezbędnych do wykonania badania cytologicznego i badania histopatologicznego. Jako osobną metodę wyróżnia się nakłucie, którego celem jest pobranie treści nagromadzonej w jamach ciała i narządach do badania cytologicznego lub bakteriologicznego
- badania łączące wymienione wyżej metody [23].

Obecnie stosowane metody są jednak dość czasochłonne, a wykonywanie kilku testów diagnostycznych jednocześnie jest kosztowne. Co więcej, wyniki badań w wielu przypadkach nie są jednoznaczne, co stwarza duże problemy prognostyczne.

Celem wykonywania diagnostycznych badań laboratoryjnych jest, zatem dostarczenie informacji ułatwiających lub umożliwiających odróżnienie zdrowia od choroby, a więc użytecznych w rozpoznawaniu i różnicowaniu chorób, oraz prognozowaniu i kontrolowaniu leczenia. W tym zakresie są one komplementarne z badaniami z zakresu diagnostyki obrazowej. Dobór właściwej profilaktyki jest niełatwy i oczywiście inny dla każdej choroby. Dobrym i przyszłościowym rozwiązaniem mogą okazać się wielozadaniowe chipy molekularne, inaczej sensory w postaci mikromacierzy z bibliotekami substancji aktywnych, zdolne zarejestrować najmniejsze niepokojące zmiany w metabolizmie naszego organizmu. Dzięki takiego rodzaju urządzeniom możliwa będzie kompleksowa analiza aktualnego stanu zdrowia.

2.2 Podstawowe pojęcia i definicje

Duże zapotrzebowanie sprzyja powstawaniu prototypów nowych urządzeń diagnostycznych, co doskonale obrazuje fakt wprowadzenia na rynek około kilkuset nowatorskich testów w formie chipów molekularnych. Dla przeciętnego pacjenta testy pozwalające na samokontrolę zdrowia mają dzisiaj jeszcze niewielkie znaczenie, ponieważ ich dostępność jest dzisiaj niewielka. Masowa produkcja chipów molekularnych ma szansę przyspieszyć procesy monitorowania stanu zdrowia populacji a każdą procedurę diagnostyczną może przenieść na poziom

samoświadomości na temat profilu genetycznego i biochemicznego własnego organizmu. Oczywiście wprowadzenie na rynek nowego produktu tego typu nie jest sprawą prostą, jednak z roku na rok pojawiają się nowe ogólnodostępne testy diagnostyczne, czego przykładem mogą być modyfikowane testy ELISA. Niestety droga do komercjalizacji testów nowej generacji, rozumianych docelowo jako wielozadaniowy „multiskaner zdrowia", jest jeszcze dość daleka. Można jedynie przypuszczać, że znajdujemy się tuż przed prawdziwym szturmem nowatorskich technologii [25].

Termin **chip** do niedawna był kojarzony wyłącznie z urządzeniem elektronicznym lub częścią komputera. Obecnie jest to termin określający wiele różnych urządzeń stosowych powszechnie w wielu dziedzinach nauki, między innymi w: analityce, biologii, chemii, medycynie, mechanice i elektronice. W naukach przyrodniczych i medycznych termin chip i biochip często stosowane są zamiennie. Zestawienie przedstawia definicje najczęściej używanych pojęć.

2.2.1 BIOCHIP – kolekcja miniaturowych testów punktowych (miejscowych), zazwyczaj osadzonych w określonym miejscu podłoża, lub przypisanych konkretnym pozycjom, często nazywana też mikromacierzą bądź mikromatrycą. Ułożenie (immobilizacja) specyficznych substratów na stałym podłożu pozwala na wykonanie wielu testów w tym samym czasie w celu osiągnięcia wyższej wydajność i szybkość skryningu badanego analitu. Miniaturowe testy mogą być dwuwymiarowe (2D) osadzone przykładowo na powierzchni szkła lub stanowić trójwymiarowe układy (3D) np.: w postaci ziaren. W przypadku matryc dwuwymiarowych najpopularniejsze są: multipletowe dołki, czarki lub studzienki zawierające immobilizowane substraty (np.: proteiny w przypadku mikromacierzy białkowych) lub inne składniki i związki w zależności od specyfiki próby. W przypadku matryc trójwymiarowych często immobilizowane substraty są dodatkowo „sumowane", zbierane w grupy tworząc wielowymiarowe, przestrzenne struktury w większym stopniu kompatybilne z analizowaną substancją [23-25].

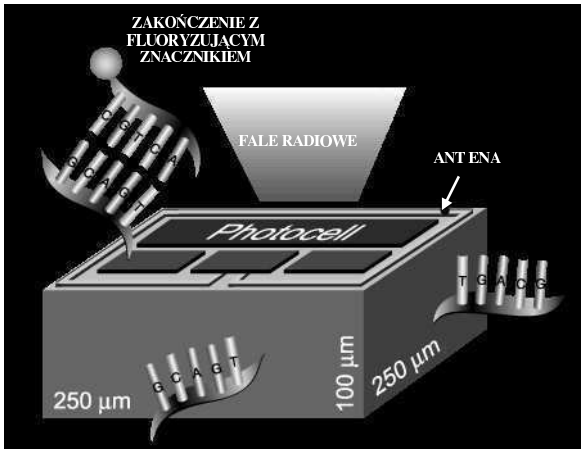
2.2.2 MIKROCHIP – ten typ chipu zawiera rząd, pasmo mikroelementów takich jak mikrotunele czy mikrokomory, specjalnie projektowane do specyficznych zadań. Komory wypełnione są aktywnymi substratami. Przykładem może tu być PCR (***P****olimerase* ***C****hain* ***R****eaction*) czyli zstosowanie polimerazy służące do powielania łańcuchów DNA, wykonywane w kilkudziesięciu rzędach mikroelementów jednocześnie. Mikrochipy to najczęściej chipy DNA, lub chipy stosowane do badania reakcji immunologicznych i badań oddziaływań białko-białko. W przypadku takich chipów możemy stosować różne metody aplikacji próbki i detekcji. „Ładowanie" i rozdział próbki w mikrotunelach, jest kontrolowany przy użyciu elektrod do generowania pola elektrycznego. Inną metodą detekcji może być detekcja odpowiedzi biologicznej na powierzchni układu testującego (*on-chip*) np.: metodami fluorescencji czy chemiluminescencji, które są równie efektywne. Wiele innych technik analitycznych zostało także zastosowanych do badania niskich stężeń substancji markerowych. Należą do nich, między innymi, chromatografia gazowa, chromatografia micelarna i izotachoforeza [26,27].

2.2.3 NANOCHIP – to kolejna generacja urządzeń diagnostycznych, których konstrukcja jest prowadzona w skali „*nano*". Chipy tego typu są budowane dosłownie atom po atomie tak, że każda molekuła ma ściśle określone i zaprojektowane miejsce w przestrzeni. Od odpowiedniego ułożenia poszczególnych molekuł zależy funkcja urządzenia, a dzięki jego miniaturowym rozmiarom możliwe jest bezinwazyjne prowadzanie testu diagnostycznego w złożonych układach biologicznych oraz w pojedyńczych komórkach. Nanochipy a właściwie nanobiochipy to na razie urządzenia przyszłości. Obecnie, nie ma jeszcze stosowanego na dużą skalę, w pełni sprawnego i selektywnego nanochipu [27,28].

2.2.4 CHIP BIOELEKTRONICZNY – spośród różnego rodzaju matryc i chipów można wyróżnić podkategorię chipów bioelektronicznych, a więc tych, w których następuje sprzęganie matryc i układów analitycznych z elektroniką, najczęściej za pomocą odpowiednich elektrod lub światłowodów. Ma to za zadanie ułatwienie transferu wyników przeprowadzonych badań biologicznych do komputera

lub odpowiedniego zautomatyzowanego detektora. Napięcie przyłożone do matrycy może także pełnić inne funkcje, przykładowo ułatwiać separację lub lizę komórek, czy pomagać w porządkowaniu reagentów na powierzchni matrycy. Przykładem dobrze obrazującym to zagadnienie może być produkt firmy *Pharmaseq* (http://www. Pharmaseq.com). Chip ten, postaci sześcianu o wymiarach 250 µm na 250µm, umieszczony na powierzchni z silikonu o grubości 100 µm jest z zewnątrz pokryty odpowiednim reagentem i wyposażony w światłoczuły przekaźnik. Jest on zdolny „rozpoznawać" różnorakie cząsteczki. Odpowiednio programowany może służyć do przeprowadzania wielu unikatowych analiz. Jedną z nich jest rozpoznawanie specyficznych regionów w sekwencji DNA przez kowalencyjne związanie z powierzchnią mikrochipu sondy DNA. Powierzchnia mikrochipu jest odpowiednio wytrawiona tak, aby powstało miejsce wiążące, np. pętlę antenową, fotokomórkę, ROM (*ang. **R**ead-**O**nly **M**emory – pamięć operacyjna tylko do odczytu, zawierająca dane potrzebne do pracy urządzenia*) oraz zegar. Padające na układ światło lasera aktywuje przekaźnik, który transmituje sygnał w postaci fal radiowych. W tym samym czasie światło indukuje fluorescencję barwnych molekuł, a przekaźnik przechwytuje sygnał. W momencie, w którym sonda połączy się z odpowiednią sekwencją otrzymujemy sygnał pozytywny i odwrotnie, jeśli brak jest odpowiedniej sekwencji ze wskaźnikiem na powierzchni chipu mamy sygnał negatywny. (Rys.16) [29,30].

Podobne bioelektroniczne chipy zostały zaadoptowane do standardowych multipleksowych testów DNA, gdzie używano materiału immobilizowanego na powierzchni elektrod.[31]



Rysunek 16. Chip elektroniczny bazujący na DNA, firmy Pharmaseq

2.2.5 TECHNIKA MIKROMACIERZY (MICROARRAY) – to technika szeregowania, układania i osadzania molekuł w odpowiednio zaprojektowanej mikroprzestrzeni - przykładowo protein, antygenów, przeciwciał, enzymów, oligonukleotydów, DNA, cDNA - na powierzchni stałej. Techniki „*microarrays*" mają szerokie zastosowanie w analityce biologicznej, chemicznej i klinicznej włączając w to wiele analiz z zakresu immunologii, badania mutacji czy ekspresji genów oraz badania komórek rakowych. Można także powiedzieć, że jest to technika adaptowania testów analitycznych do formatu mikro. Tak więc, używając relatywnie małych urządzeń analitycznych możemy wykonywać od kilkudziesięciu do kilku tysięcy testów jednocześnie [32].

2.2.6 MIKROMACIERZ– często też nazywana mikromatrycą (pojęcia stosowane zamiennie) to płytka (np.: szklana, polimerowa, metalowa, ceramiczna) z immobilizowanymi na powierzchni molekułami lub wybranymi związkami chemicznymi. Są one związane z powierzchnią za pomocą różnego typu oddziaływań – od kowalencyjnych po słabe oddziaływania niekowalencyjne. Służą one zazwyczaj do celów diagnostycznych i analitycznych. Skonstruowano wiele rodzajów

mikromacierzy i różnicuję się je w zależności od osadzonych na niej substratów - macierze peptydowe, DNA, z osadzonymi komórkami a nawet tkankami (Rys. 17) [33,34].

Rysunek 17. Przykłady mikromacierzy: (A) płytka polimerowa ze studzienkami, (B) macierz kontrolowana elektronicznie (www.mrc.ethz.ch/image_collection), (C) mikromacierz z osadzonymi tkankami (www.pathology.wustl.edu/html/facilitiestp.html).

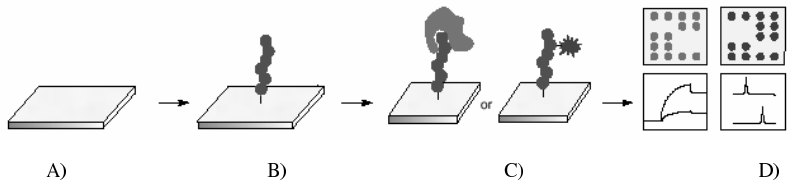
3. Budowa i zasady działania chipów diagnostycznych na przykładzie mikromacierzy peptydowych.

Dzisiaj posługujemy się pojęciami określającymi urządzenia i zjawiska, które nie tak dawno nie istniały. Rozwój nowych technologii i postęp w projektowaniu nowatorskich terapii i innowacyjnych leków w ostatniej dekadzie był wręcz imponujący. O {Przykładem może być fakt, że 10 lat temu w bazie GenBank® (http://www.ncbi.nml.nih.gov/) były zgromadzone informacje dotyczące 217 milionów par zasad z sekwencji różnych genomów, a dzisiaj zidentyfikowano ich już ponad 80 bilionów. Dziesięć lat temu chipy DNA nie były komercyjnie dostępne, a identyfikacja białek za pomocą spektrometrii mas dopiero zaczynała stanowić technikę zdolną konkurować z innymi metodami analitycznymi Podobnie szybki rozwój dotyczy takich technik badania aktywności biologicznej jak zautomatyzowany i szybki skryning. Obecnie cały ludzki genom został zsekwencjonowany i może być badany na jednej mikromacierzy DNA, a tysiące białek można zidentyfikować po wykonaniu pojedynczej analizy techniką spektrometrii mas. Dalsze powodzenie w konstruowaniu nowych testów diagnostycznych zwłaszcza przy pomocy techniki „*microarray*" jest

determinowane przez niezależny rozwój technik budowania poszczególnych elementów mikromacierzy. Ważny jest tu rozwój metod syntezy nowych selektywnych substratów i inhibitorów enzymów, tworzenie zróżnicowanych bibliotek strukturalnie zbliżonych związków jak i znajdowanie nowych metod detekcji ich aktywności biologicznej. Dopiero łącząc te wszystkie informacje otrzymamy „przepis" na dobre urządzenie diagnostyczne [35].

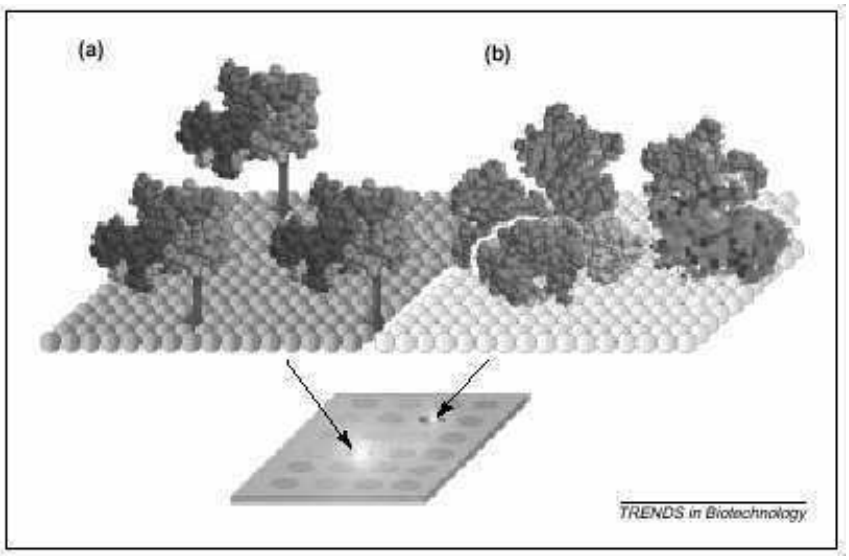
Konstrukcja chipu diagnostycznego lub dowolnej mikromacierzy, z immobilizowanymi substratami lub inhibitorami, opiera się na kilku kluczowych etapach (Rys. 18) [36,37]:

- pierwszy etap to wybór nośnika, czyli powierzchni niezbędnej do unieruchomienia substratów lub konstrukcja odpowiednich mikroreaktorów;
- drugi etap stanowi przygotowanie wybranej powierzchni do reakcji – np.: funkcjonalizowanie powierzchni, synteza równoległa przygotowanych wcześniej substratów lub ich immobilizacja;
- etap trzeci to przeprowadzenie próby użyteczności skonstruowanego wcześniej układu (mikromacierzy);
- ostatni etap, to etap czwarty polegający na ocenie rezultatów przeprowadzonego testu (test pozytywny lub negatywny) i dokonaniu modyfikacji metody detekcji odpowiedzi biolopgicznej.



Rysunek 18. Etapy konstrukcji chipu diagnostycznego: (A) wybór podłoża: szkło, papier (celuloza), polimer; (B) immobilizacja lub synteza na podłożu odpowiedniego detektora; (C) analiza oddziaływania detektora z analitem (np. analiza oddziaływania białko-białko, badanie aktywności enzymów, adhezja komórek itp.); (D) detekcja efektu za pomocą technik spektroskopowych, np. fluorescencji, spektrometrii mas, czy spektroskopii.

Podczas realizacji projektów zazwyczaj etap drugi jest wykonywany jako pierwszy ze względu na specyficzność substratów i medium, w jakim chcemy daną próbę wykonać. Ponadto ten sam substrat np.: peptyd można immobilizować na kilka różnych sposobów (Rys.19) [38].

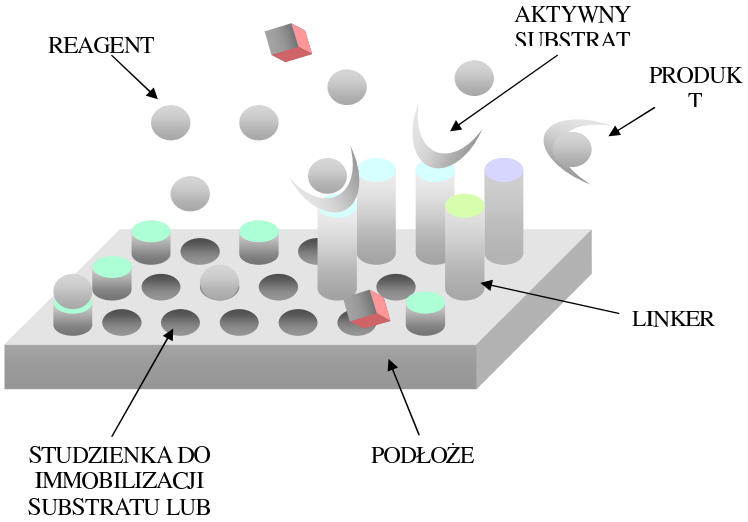


Rysunek 19. Przykłady immobilizacji białek na powierzchni płytki: (a) poprzez tzw. linker; (b) bezpośrednio zaadsorbowane na podłożu.

Opisując budowę chipu molekularnego możemy wyróżnić (Rys.20):

- podłoże, czyli fazę stałą – za którą mogą służyć różnorakie materiały takie jak :szkło, celuloza czy polimery
- linker wiążący podłoże z susbtartami, bądź studzienki w których będą immobilizowane substraty

- substraty lub inhibitory – w zależności jakiego typu reakcję mamy zamiar wykonać
- znaczniki i markery – ułatwiające detekcję

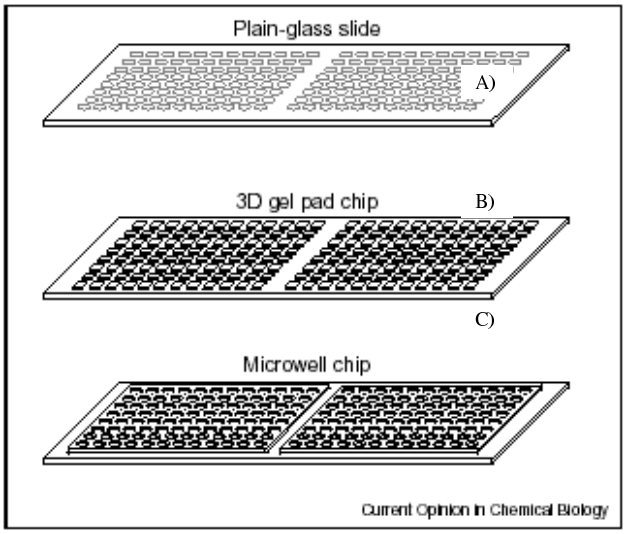


Rysunek 20. Schemat budowy chipu diagnostycznego tworzonego technologią „microarray”.

3.1.1 PODŁOŻE – FAZA STAŁA

Najczęściej wybieranymi i stosowanymi nośnikami są (Rys. 21):

- szklana płytka, ogólnie szkło lub szkło kwarcowe;
- celuloza i inne polimery cukrów;
- żel, silkażele (związki, substraty zawieszone w żelu);
- płytka z polimeru z mikrostudzienkami z zastosowaniem różnorodnych polimerów;
- nośniki ceramiczne, w tym spieki ceramiczne o różnej porowatości;
- stopy metali lub powierzchnie pokryte metalami szlachetnymi (np.: złotem, miedzią).



Rysunek 21. Podłoża z różnych materiałów: A) płytka szklana, B) płytka pokryta strukturyzowanym żelem, C) płytka z mikrostudzienkami.

Wszystkie wymienione rodzaje powierzchni można odpowiednio modyfikować tak, aby lepiej wiązały i immobilizowały wybrany substrat. Materiałem najczęściej wykorzystywanym jako nośniki są szkło i celuloza. Modyfikacja podłoża może następować po dodaniu odpowiednich grup funkcyjnych (np.: nitroceluloza), ale lepsze efekty modyfikacja podłoża poprzez zastosowanie tzw. „linkera". Linker w takim przypadku pełni podwójną funkcję a mianowicie modyfikuje odpowiednio podłoże tak, że można już bezpośrednio nałożyć (zsyntetyzować) substrat na jego powierzchnię oraz pozwala na regularne rozmieszczenie cząsteczek substratu, które są w ten sposób oddalone od powierzchni w sposób zrandomizowany, a tym samym bardziej dostępne dla reagentów [39].

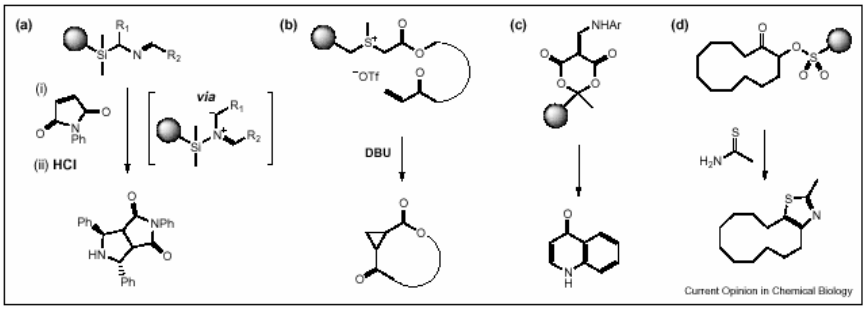
3.1.2 LINKER

Linker (*spacer*) to cząsteczka znajdująca się pomiędzy właściwym substratem a powierzchnią nośnika inaczej mówiąc strukturalny most pomiędzy podparciem

a substratem. Jest to rodzaj „przedłużacza" ułatwiający i zwiększający dostępność substratu dla reagentów. Związek ten zazwyczaj nie bierze udziału w reakcji i dlatego jako linkery mogą zostać wykorzystane związki należące do różnych grup. Od linkera są zależne wszystkie kolejne chemiczne kroki dotyczące załadunku substancji na powierzchnię, inicjacji umiejscawiania wiązanych substancji oraz właściwego rozmieszczenia molekuł w przestrzeni. Projektowanie nowych systemów linkierów bazuje na udoskonalaniu ich stabilności a następnie stabilności substratów immobilizowanych na ich powierzchni oraz przewidywania rodzajów oddziaływań zachodzących w tym strukturalnym moście. Możliwości modyfikowania powierzchni poprzez przyłączanie linkerów jest bardzo wiele i ciągle opisywane są nowe rozwiązania.

W projektowaniu nowych linkerów i systemów do immobilizacji molekuł można wyróżnić kilka tendencji a mianowicie (Rys 22-25):

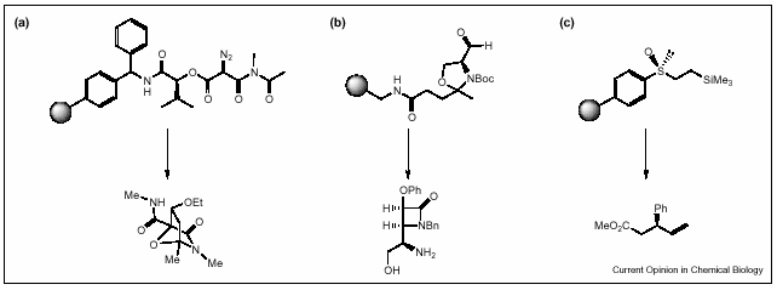
- projektowanie struktur nowych, dotychczas nie stosowanych linkerów;



Rysunek 22. Przykłady nowych linkerów zastosowanych ostatnio: (a) ylidowy linker reaktywny; (b) linker pozwalający na łatwe usunięcie układu reaktywnego; (c) linker bazujący na kwasie Meldruma; (d) reaktywny linker sulfonowy.

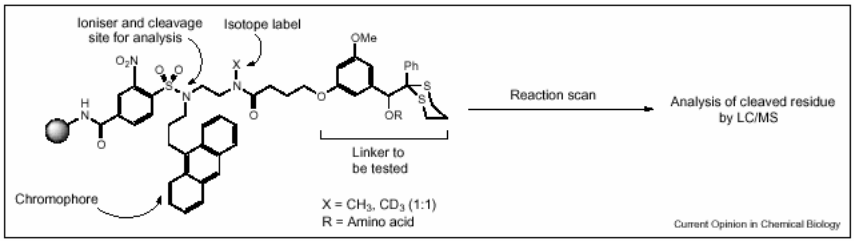
- konstruowanie linkerów zdolnych rozpoznawać stereochemiczne preferencje cząsteczek i wykorzystanie tej właściwości podczas formowania nowych asymetrycznych centrów podczas immobilizacji reagentów na powierzchniach

stałych. Inaczej można powiedzieć, że jest to wykorzystanie zdolności linkerów do dodawania właściwości stereochemicznych;



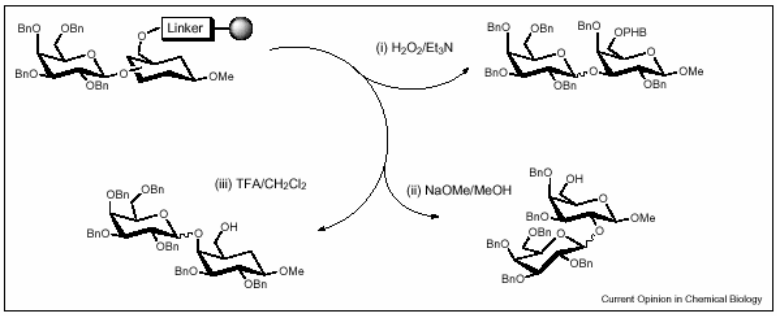
Rysunek 23. Nowe linkery zdolne do stereochemicznej indukcji wiązania: (a) linker zawierający walinę zaprojektowany do syntezy związków [2.2.1] bicyklicznych; (b) α – chiralny aldehyd oksazolidynowy użyty do syntezy chiralnych β-laktamów; (c) chiralny linker sulfoksydowy użyty do syntezy chiralnych estrów.

- badanie linkerów pozwalających na monitorowanie zachodzących na powierzchni reakcji, lub na uproszczenie analizy (tzw. linkery analityczne). Są to linkery dodatkowo znakowane np.: izotopami węgla ^{13}C lub odpowiednimi chromoforami;



Rysunek 24. Konstrukcja analitycznego linkera zawierającego cząsteczkę chromofora zaprojektowana przez Cano [40]

- wykorzystanie nowych strategii w aplikowaniu linkerów na powierzchnię, oraz nowych wykorzystań linkerów.



Rysunek 25. Biblioteki sacharydowe otrzymane przy użyciu strategii ortogonalnych linkerów. Każdy składnik biblioteki jest uwalniany przez zastosowanie odpowiedniej reakcji chemicznej

Poprzez linker do podłoża można przytwierdzić różnego rodzaju substraty, a wśród nich najczęściej immobilizowane są:

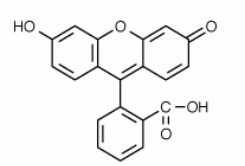
- białka: enzymy, peptydy i fosfonopeptydy;
- przeciwciała i antygeny;
- fragmenty łańcuchów DNA i różnorodne kwasy nukleinowe;
- związki kompleksujące oraz związki z aktywnymi wnękami otrzymane metodami chemii supramolekularnej.

Oprócz substratów możliwa jest także immobilizacja inhibitorów reakcji. Mechanizm działania takiego układu jest wtedy odwrócony. Przykładem takiej reakcji może być reakcja enzymatyczna, w której enzym (reagent) wiąże się z inhibitorem w taki sposób, że pokrywa lub zasłania przyłączony bezpośrednio do inhibitora albo do linkera chromofor, co powoduje wygaszanie sygnału [41].

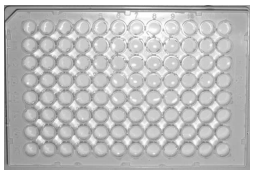
3.1.3 ZNACZNIKI I MARKERY

W większości przypadków do identyfikacji produktów przeprowadzonej na mikromacierzy reakcji niezbędny jest znacznik bądź odpowiedni marker pozwalający na właściwą detekcję. Najczęściej wybieranymi znacznikami są związki barwne lub fluoryzujące (chromofory), takie jak: fluoresceina czy rodamina. Obecnie poszukuje

się nowych uniwersalnych znaczników, które poszerzyłyby stosowalność mikromacierzy (Rys. 26).



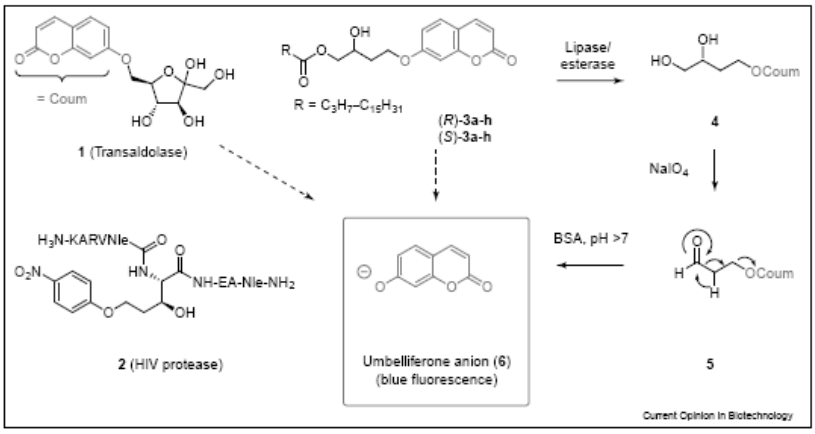
A)



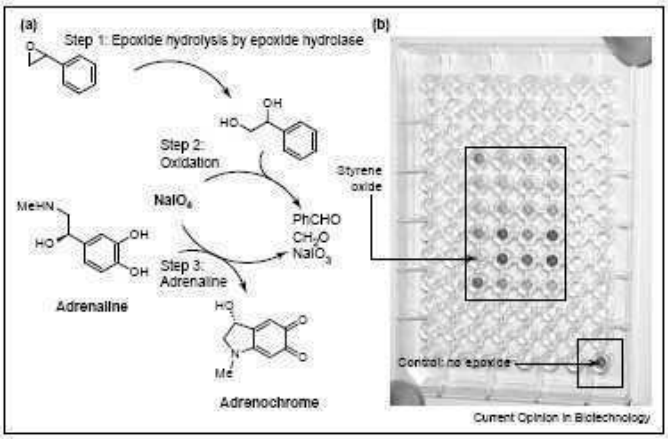
B)

Rysunek 26. (A) wzór fluoresceiny najpowszechniej stosowanego znacznika; (B) macierz przeznaczona do krystalizacji białek wypełniona roztworem fluoresceiny (www.innovadyne.com).

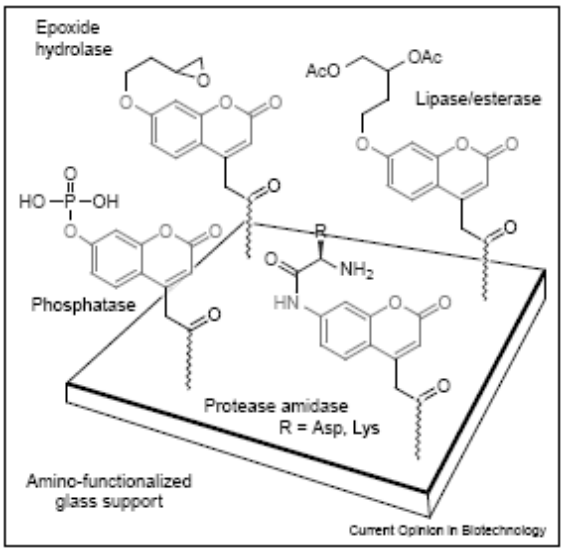
Chromofory lub odpowiednie markery mogą być immobilizowane bezpośrednio na podłożu, wstawione pomiędzy substrat a linker, bądź umiejscowione na końcu cząsteczki a obecność danego znacznika lub markera determinuje rodzaj detekcji używanej w analizie (Rys.27-29) [41].



Rysunek 27. Przykłady chromogenicznych i fluorogenicznych substratów takich jak umbeliferon i nitrofenol, które zostały użyte do monitorowania aktywności enzymatycznej



Rysunek 28. Adrenalinowy test enzymatyczny. Adrenalina po reakcji z nadjodanem sodu tworzy barwny (czerwony) związek adrenochrom.



Rysunek 29. Mikromacierz z fluorogenicznym substratem hydrolizy, którym jest pochodna kumaryny umieszczona pomiędzy linkerem a właściwym substratem.

3.2 Mikromacierze peptydowe

Mikromacierze peptydowe to obecnie najczęściej używane testy w postaci chipów, opartych na szeregu oddziaływań pomiędzy cząsteczkami biologicznymi, takimi jak: białka i liposom, białka i lek, enzym i substrat oraz oddziaływań typu białko–białko [26,27].

Ze względów technicznych wyróżnia się trzy typy mikromacierzy białkowych:

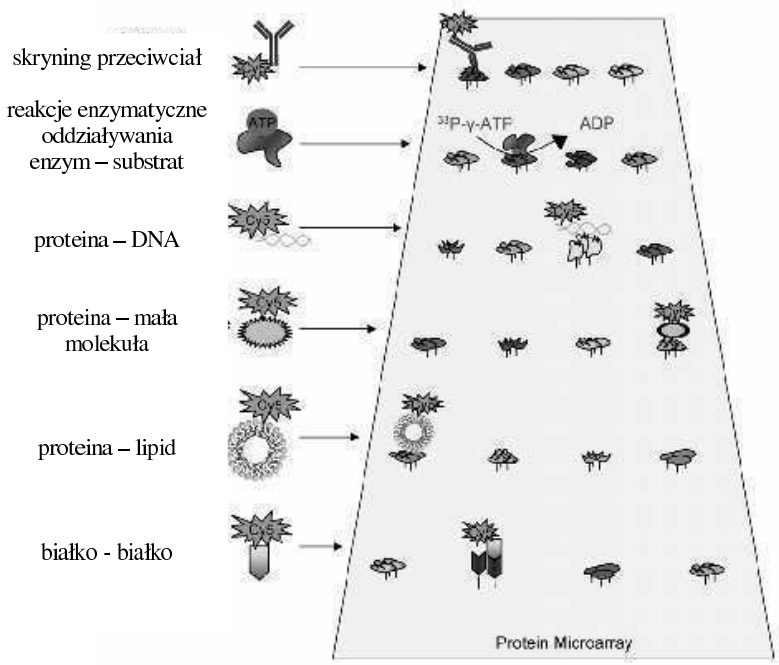
- analityczną – gęsto upakowaną macierz związków pokrewnych (tzw. biblioteka), których używa się do wykrywania białek w mieszaninach
- funkcjonalną, która jest konstruowana poprzez immobilizację dużej ilości białek na podłożu stałym, wykorzystywaną do analizy aktywności biochemicznej oraz badania przebiegu reakcji
- odwróconą wykorzystującą fazy RPA (*reverse phase protein microarray*) - ten typ mikromacierzy jest relatywnie związany z mikromacierzą analityczną.

Za pomocą mikromacierzy peptydowych możemy badać szereg różnego typu oddziaływań pomiędzy proteinami, co najlepiej ilustruje rysunek 30.

4. Chipy i mikromatryce DNA – budowa i zasady działania

Jedną z najszybciej rozwijających się metod diagnostycznych są mikromacierze i chipy DNA. Od czasu wykrycia przez Mieschera w 1869 roku kwasów nukleinowych oraz rozwiązania struktury DNA przez Watsona i Cricka ten biopolimer stał się najbardziej eksplorowanym przez naukę związkiem chemicznymi w dziejach ludzkości. Informacje, które niesie ze sobą w postaci zakodowanej przez dwie zasady purynowe (**A**denina, **G**uanina) i dwie pirymidynowe (**C**ytozyna, **T**ymina) stanowią bardzo ważny element poznania każdego żywego organizmu. Z tego powodu istotnym wydaje się poznanie fragmentów struktur DNA odpowiedzialnych za choroby, wady genetyczne, czy cechy zewnętrzne [42]. Ponadto zbudowanie komercyjnego urządzenia, które w szybki i precyzyjny sposób potrafiłoby odczytać strukturę DNA dałoby możliwości zastosowania go w testach klinicznych, technologii żywienia czy kryminalistyce i medycynie sądowej [43]. Niewątpliwym wyzwaniem jest tak zwane

„szycie na miarę" leku w oparciu o poznaną strukturę DNA [44]. Jednak, aby sprostać wszystkim wyzwaniom, potrzebne są metody szybkiej i taniej diagnostyki genetycznego biomateriału DNA lub RNA.



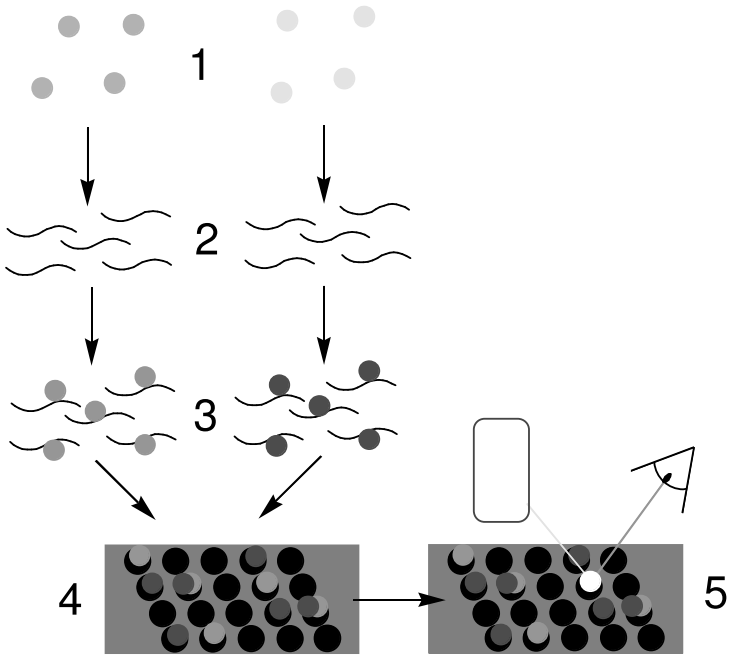
Rysunek 30. Typy oddziaływań pomiędzy proteinami.

Od lat 90-tych ubiegłego stulecia zaczął się gwałtowny rozwój metod mających na celu określenie sekwencji DNA. W wielu laboratoriach skonstruowano mikromacierze (*microarray*) DNA, które na zasadzie wiązania komplementarnego łańcucha potrafią w szybki sposób diagnozować sekwencje oligonukleotydów. W miarę rozwoju nauki skonstruowano chipy diagnostyczne, które w oparciu o biblioteki oligonukleotydowe potrafią sprawnie zdiagnozować określoną cząsteczkę DNA. Chociaż corocznie ukazują się setki opracowań dotyczących układów

diagnostycznych, rozdział ten opisuje, w oparciu o istniejące prace zbiorowe jak również prace źródłowe, główne trendy w budowie matryc i chipów diagnostycznych oraz wykorzystywanych metodach detekcji.

4.1. Metody nanoszenia materiału genetycznego na podłoże

Ogólnie metodę wykrywania materiału genetycznego można przedstawić zgodnie z rysunkiem 28.



Rysunek 28. 1: komórki chore i zdrowe; 2; wydzielony materiał genetyczny mRNA oraz proces odwrotnej transkrypcji, 3; powstanie pojedynczych znakowanych łańcuchów cDNA (target DNA, analit), 4; hybrydyzacja pojedynczych łańcuchów do sond ssDNA, 5; detekcja [45].

Ze względu na używane materiały jak i stosowane metody immobilizacji oraz detekcji istnieje wiele różnych technik budowy matryc i ich diagnostyki.

Podstawą budowy matrycy jest podłoże, do którego musi być związana sonda, czyli odpowiedni materiał genetyczny lub jego mimetyk np.: molekuła RNA, ssDNA (*single strand DNA*) lub PNA (*peptide nucleic acid*). W tym celu stosuje się podłoża polimerowe, nieorganiczne i organiczno-biologiczne.

Tabela 1. Podłoża stałe używane do sprzęgania biochemicznych układów [46].

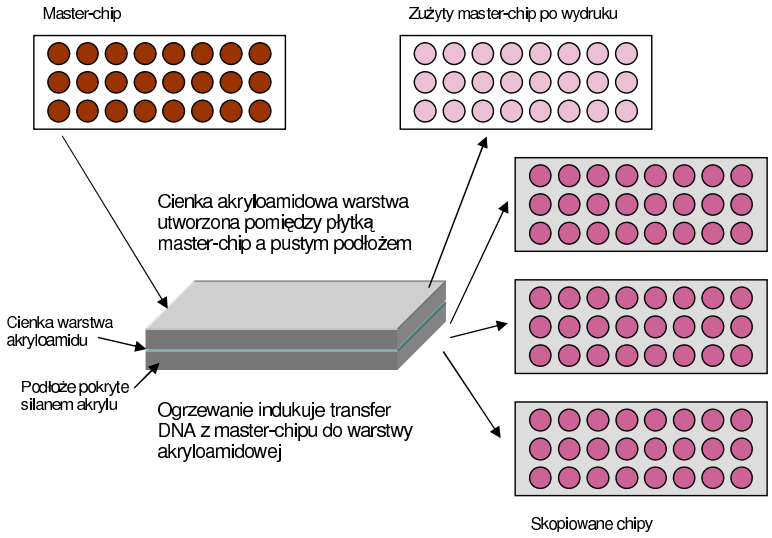
Polimery	**Nieorganiczne**	**Organiczno- biologiczne**
Polistyren	Złoto	Bawełna
Poliakryloamid	Szkło	Celuloza
Tereftalan polipropylenowy	Tytan	Lateks
Poliuretan	Aluminium	Nitroceluloza
Nylon	Metal-chelat	Karboksymetylodekstran
Polipirolowe		Chitozan
Sephadex		
Perflouoropolimer		
Polipropylen		

Jednak najbardziej użytecznym materiałem jest szkło ze względu na niski poziom tła w spektroskopii fluorescencyjnej, odporności na wysokie temperatury, stałej struktury fizycznej i niskiej ceny [46].

Umieszczenie materiału genetycznego na fazie stałej może odbywać się na dwa sposoby: poprzez sprzęganie łańcuchów ssDNA (cDNA lub dowolnych fragmentów oligonukleotydów) oraz nabudowywanie pojedynczych nukleotydów do mikromacierzy oraz poprzez osadzanie oligonukleotydów na powierzchni materiału (na drodze dotykowej lub bezdotykowej). Pierwsza z nich wykorzystuje różnego rodzaju igły, szpilki i pensety, które nanoszą na macierz (matryce) kropelki o objętościach od 50pl do 100nl. Natomiast metoda bezdotykowa opiera się na tych

samych zasadach nanoszenia roztworu na powierzchnię, jakie wykorzystują drukarki atramentowe [46].

Do metod kontaktowych należy również zaliczyć sposób pośredniego nanoszenia oligonukleotydów za pomocą nanodruku (*nonoprinting*). System ten (*chip to chip nanoprinting, lub spot to spot nanoprinting*) został opracowany na początku tego dziesięciolecia. Wykorzystuje się w nim pierwotnie zbudowany chip (*master chip*), który posiada gęsto zimmobilizowane do podłoża nukleotydy za pomocą wiązań disiarczkowych. Na drodze chemicznej w termo-kontrolowanym procesie „przechodzą" one do warstwy akryloamidowej przymocowanej do drukowanego chipu (Rys. 29).



Rysunek 29. Proces nanodrukowania [47].

Inną metodą nanodrukowania jest przekazanie do chipu drukowanego nie sond, jak w powyższym przypadku, a analitów (DNA-target) po uprzedniej ich hybrydyzacji [48].

Popularną metodą jest również nadrukowywanie materiału genetycznego metodą *soft-litography*. Polega ona na pierwotnej immobilizacji na powierzchni „pieczątki" z polidimetylosiloksanu (PDMS) odpowiednich łańcuchów polinukleotydowych, a następnie odciśnięciu jej na podłożu substratu [49]. W tym procesie kwasy nukleinowe przechodzą z jednej powierzchni na drugą (tę o większym powinowactwie) aż do momentu ustalenia się równowagi. Pieczątkę taką można wykorzystywać wielokrotnie, jednakże ilość zastosowanego materiału genetycznego zużywa się ekspotencjalnie.[50,51].

Nabudowywanie *in situ* oligonukleotydów na powierzchni matrycy poprzez sprzęganie do siebie pojedynczych jednostek, które mogą zawierać w swej sekwencji do 25 nukleotydów najczęściej odbywa się metodą fotolitograficzną. Nadaje się ona doskonale do budowy bibliotek łańcuchów DNA o wymaganej sekwencji. Jednak metoda ta posiada również ujemne strony. Przede wszystkim największym minusem jest ograniczona długość łańcucha, brak możliwości poprawienia sekwencji oligonukleotydów oraz wysokie koszty wykonania tego rodzaju matryc. Niemniej wiąże się nadzieje, że te niedogodności będą mogły być przezwyciężone przy użyciu sytntetyzera typu „*benchtop*" [50].

Następną metodą osadzania materiału genetycznego na podłożu mikromacierzy jest metoda elektrochemiczna. Elektrochemiczna akumulacja odbywa się poprzez oddziaływanie materiału genetycznego z dodatnio naładowaną matrycą. Poprzez odpowiednie sterowanie układem można w pożądany sposób nanosić materiał biologiczny na stosownie skonstruowane podłoże (Rys. 31).

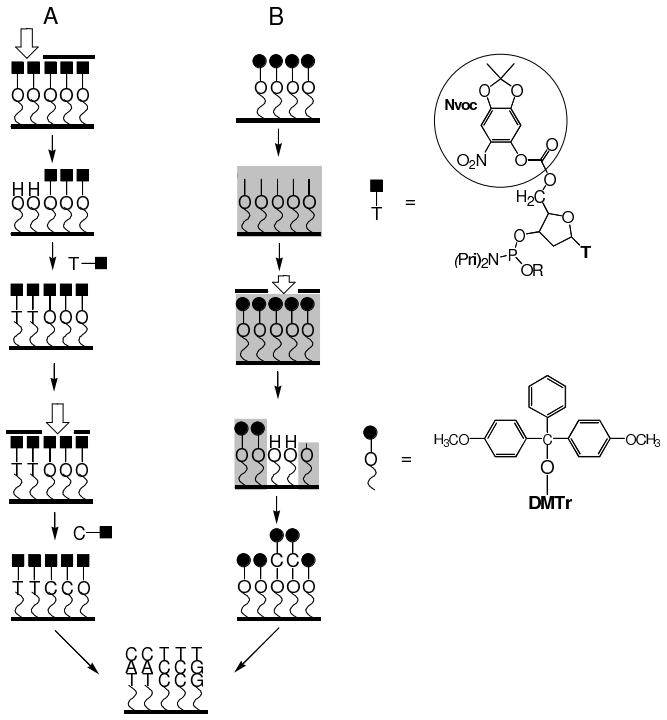
4.2. Chemiczne metody wiązania łańcuchów polinukleotydowych do podłoża

Sprzęganie oraz immobilizowanie biomateriału na powierzchni podłoża odbywa się na kilka ogólnie stosowanych sposobów [46]:

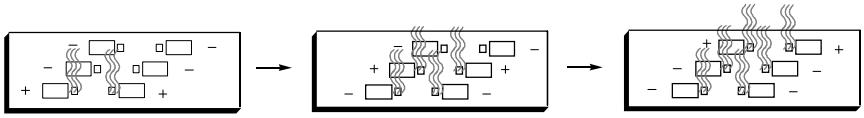
1. asorpcję (*adsorptive interaction*);
2. sprzęgania za pomocą powinowactwa (*affinite coupling*);
3. wiązania kowalencyjnego (*covalent attachment*):
    a) aktywowania próbki;

b) aktywacji powierzchni z zastosowaniem czynników sieciujących (np. linkerów równej długości);

c) sieciowania fotochemicznego (*photochemical cross linking*).



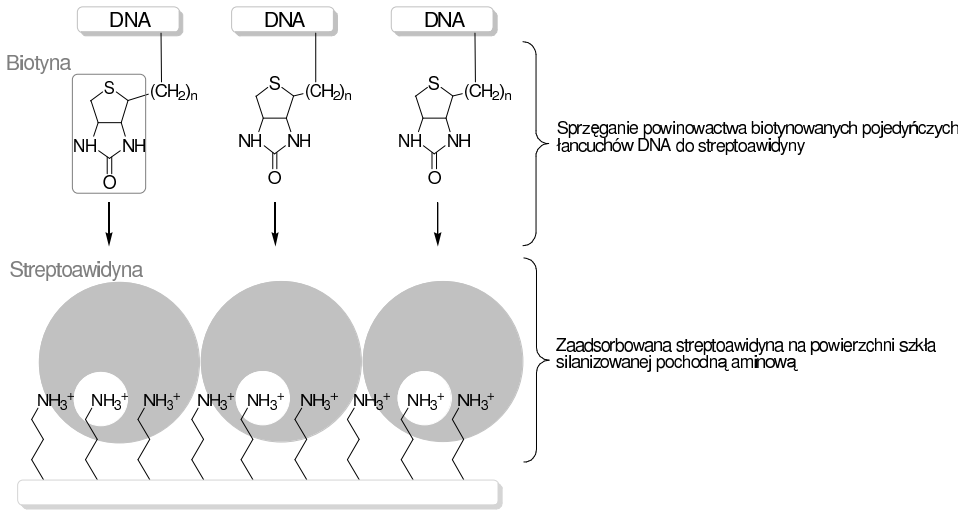
Rysunek 30. Fotolitograficzne nabudowywanie nukleotydów.



Rysunek 31. Elektrochemiczna akumulacja ujemnie naładowanych biotynylowanych sond na dodatnio naładowanej powierzchni elektrody pokrytej streptoawidyną.

Immobilizowanie biomateriału na drodze adsorpcyjnej odbywa się poprzez oddziaływania elektrostatyczne, van der Waalsa, hydrofobowe oraz wiązania wodorowe. Technika ta jest używana do niekowalencyjnego wiązania łańcuchów DNA poprzez depozycję mokrą lub suchą na materiałach bazujących na różnych odmianach węgla, takich jak: szkło węglowe, pirolityczny grafit, diament domieszkowany borem, kompozyty węglowe, „atrament" węglowy (*carbon inks*), nanorurki, czy grafit (*graphite pencil leads*). Ponadto materiałami wykorzystywanymi dla tego typu immobilizacji mogą być nitroceluloza, nylonowe membrany, polistyren, powierzchnie pokryte tlenkami metali (palladu i glinu) itp. [52].

Sprzęganie powinowactwa odbywa się na zasadzie oddziaływania biotynowanego (biotyna, czyli witamina B7)materiału biologicznego z glikoproteiną - awidyną (lub streptoawidyną), która tworzy jedno z najtrwalszych w przyrodzie kompleksów typu ligand–białko ($K_D=10^{-15}$ mol/l) [46].



Rysunek 32. Adsorpcja streptoawidyny na podłożu uzyskiwana na skutek oddziaływań elektrostatycznych i hydrofobowych, oraz przyłączanie biotynowanych łańcuchów DNA do podłoża za pomocą powinowactwa.

Jednak z tego względu, że endogenna biotyna może czasami fałszować wyniki pomiarów alternatywnym linkerem może być digoksygenina lub specjalnie dobrane pochodne biotyny [53,54].

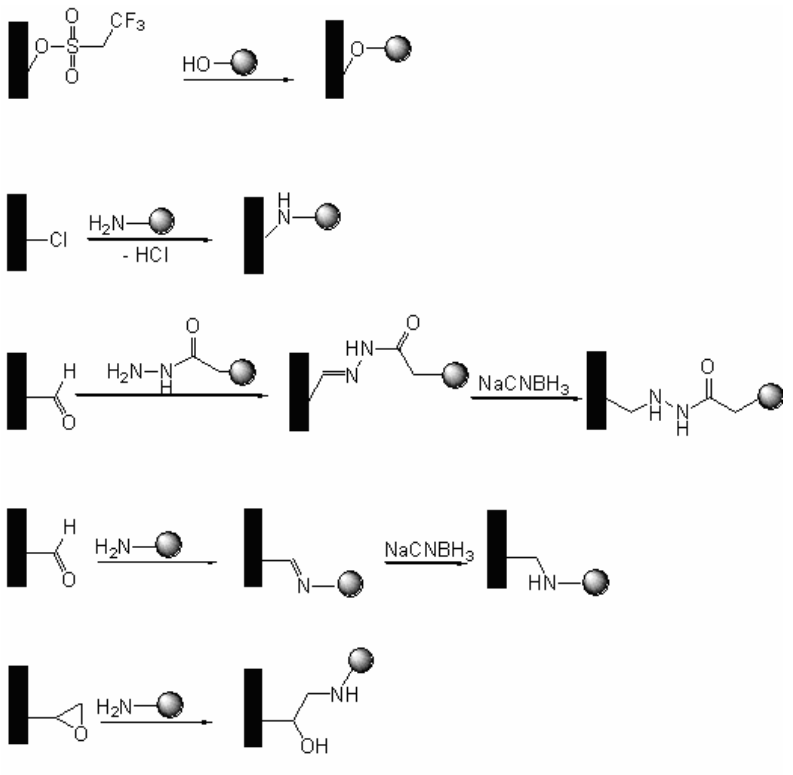
Kowalencyjne przyłączanie aktywowanych sond ssDNA (*activated probes*) do modyfikowanego podłoża odbywa się z zastosowaniem klasycznych metod sprzęgania przy użyciu karbodiimidu, reaktywnych bezwodników i aktywnych estrów [46]. Ponadto do kowalencyjnego oraz niekowalencyjnego immobilizowania oligonukletydów na specjalnie przygotowanych podłożach stosuje się ich modyfikowane pochodne. Obecność grup aminowych, tiolowych, akrydyno-akryloamidowych pozwala na łatwiejsze immobilizowanie tych związków [47].Ciekawym przykładem zastosowania wiązania kowalencyjnego są silanizowane oligonulekleotydy oraz cDNA, które tworzą wiązania kowalencyjne bezpośrednio z powierzchnią szkła. Zaletą tej metody jest niskie tło dla spektroskopii fluorescencyjnej, jak też uniknięcie wielu żmudnych procesów chemicznych.

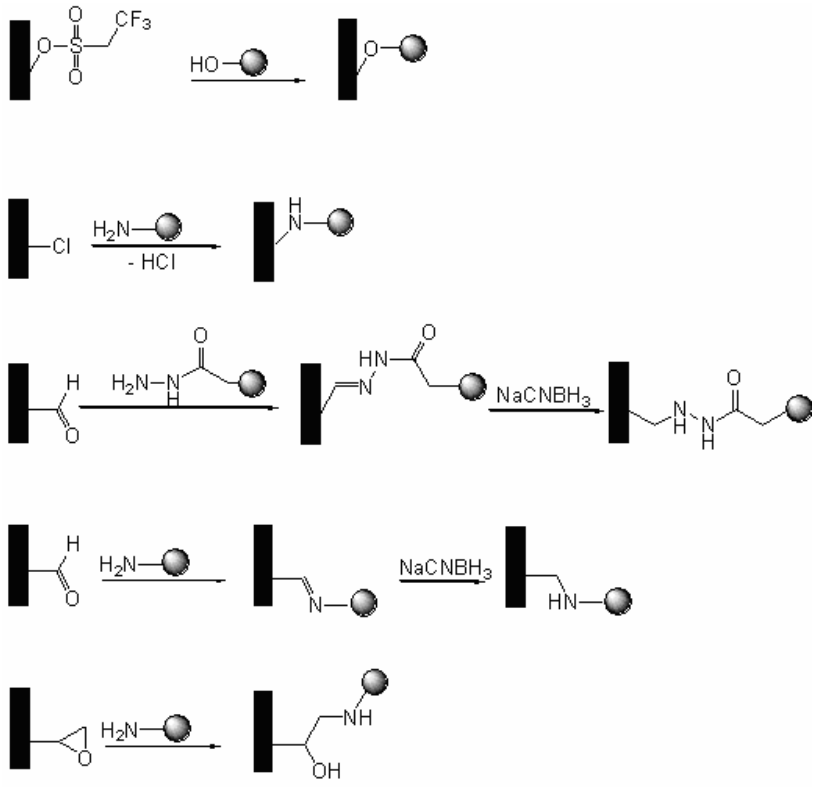
Sprzęganie modyfikowanych chemicznie sond ssDNA do aktywowanego podłoża odbywa się głównie za pomocą czterech różnych typów linkerów: zerowej długości (*zero-length cross linkers*) (Rys. 33), homobifunkcyjnych (*homobifunctional cross linkers*) (Rys. 34), heterobifunkcyjnych (*heterobifunctional cross linkers*) (Rys. 35), oraz trójfunkcyjnych (*trifunctional cross linkers*) (Rys. 36) [46].

W metodzie fotochemicznego sprzęgania ssDNA wykorzystuje się molekuły, które na skutek naświetlania promieniowaniem UV (ok. 360nm), w wyniku reakcji rodnikowych generują aktywne ugrupowania sieciujące materiał genetyczny z podłożem. Do tego celu stosuje się substancje takie jak azydki, benzofenon, antrachinon, czy diaziryna [46].

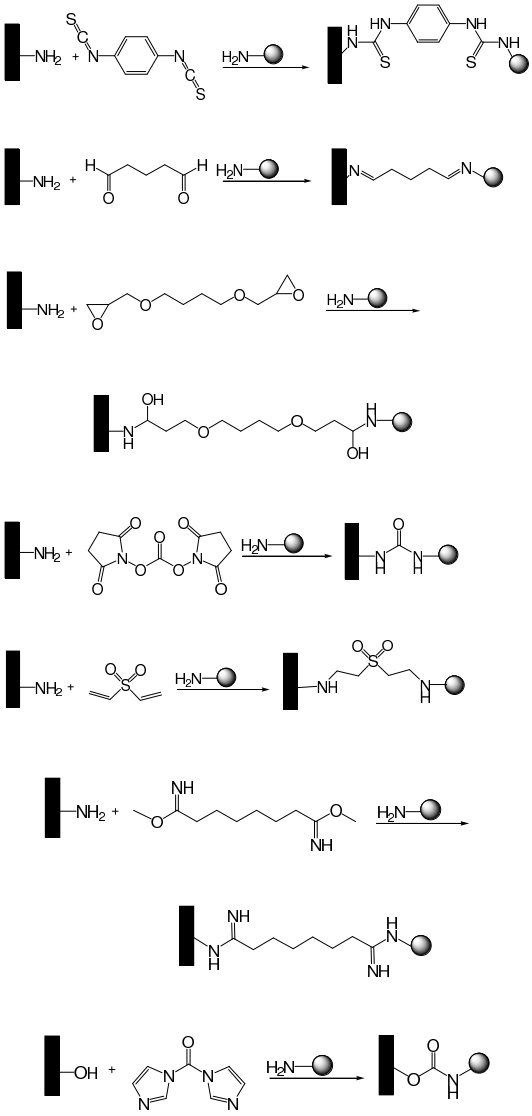
Oprócz opisanych powyżej sposobów przyłączania biopoilmerów do podłoża immobilizacja sond DNA odbywa się również poprzez wiązania koordynacjne siarczkowych pochodnych nukleotydów (oligonukletydów) do złota. Poza wiązaniem klasycznie modyfikowanego materiału biologicznego za pomocą grup zawierających jednostki tiolowe na szczególną uwagę zasługuje zastosowanie samoorganizujących

się polimerów. Są to łańcuchy poliallilloaminowe zawierające jako grupy kotwiczące kwas lipoinowy lub łańcuchy kwasów poliakrylowych (PAA) z dołączonymi grupami 3-(pirydylotio)propionylohydrazyny (PDHP) posiadającymi przyłączone do polimerów łańcuchy ssDNA (Rys. 37). Te molekuły posiadają zdolnośc do samoorganizacji na powierzchni złota (Rys. 37).

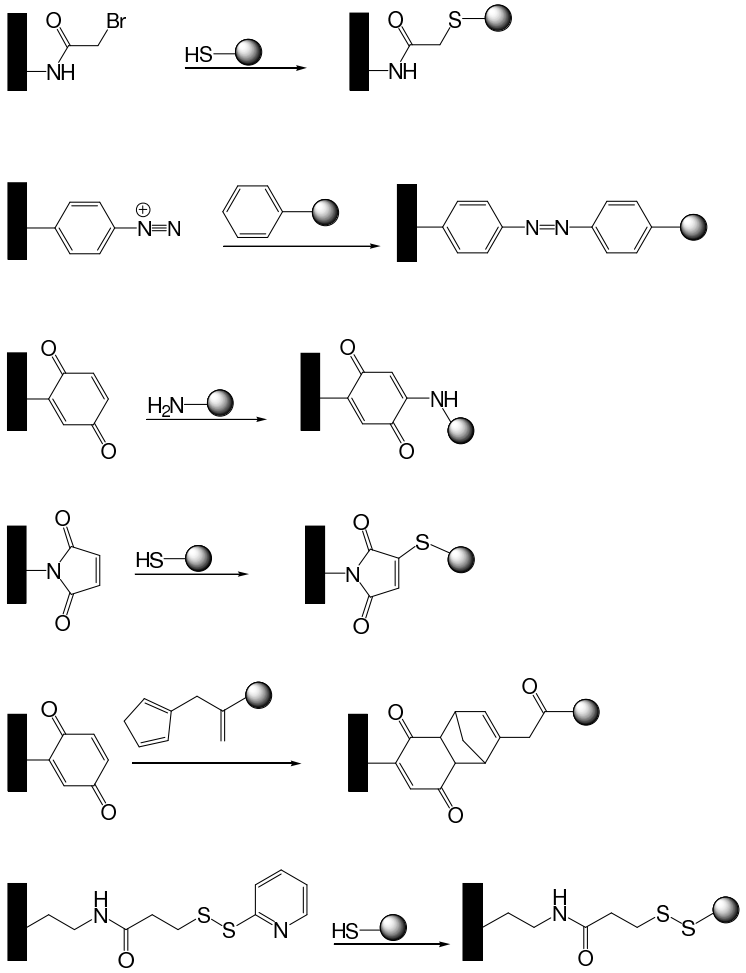




Rysunek 33. Przykład sieciowania materiału genetycznego ● do podłoża ▭ za pomocą związków sieciujących zerowej długości.

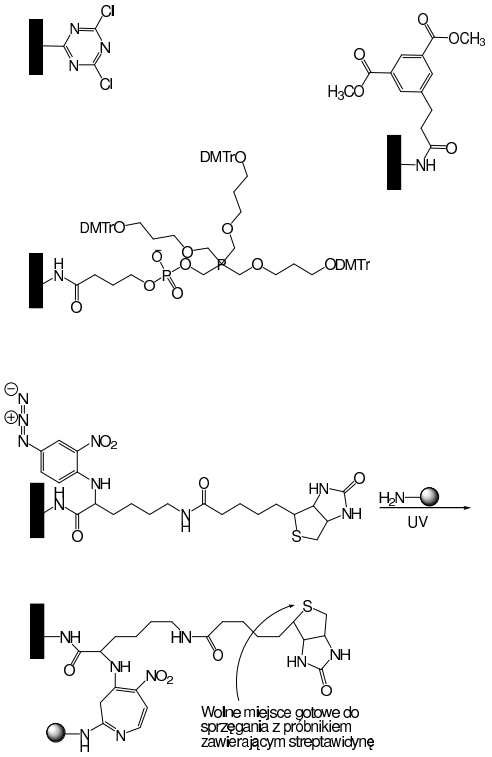


Rysunek 34. Przykład sieciowania materiału genetycznego ● do podłoża ▭ za pomocą homobifunkcyjnych związków sieciujących.

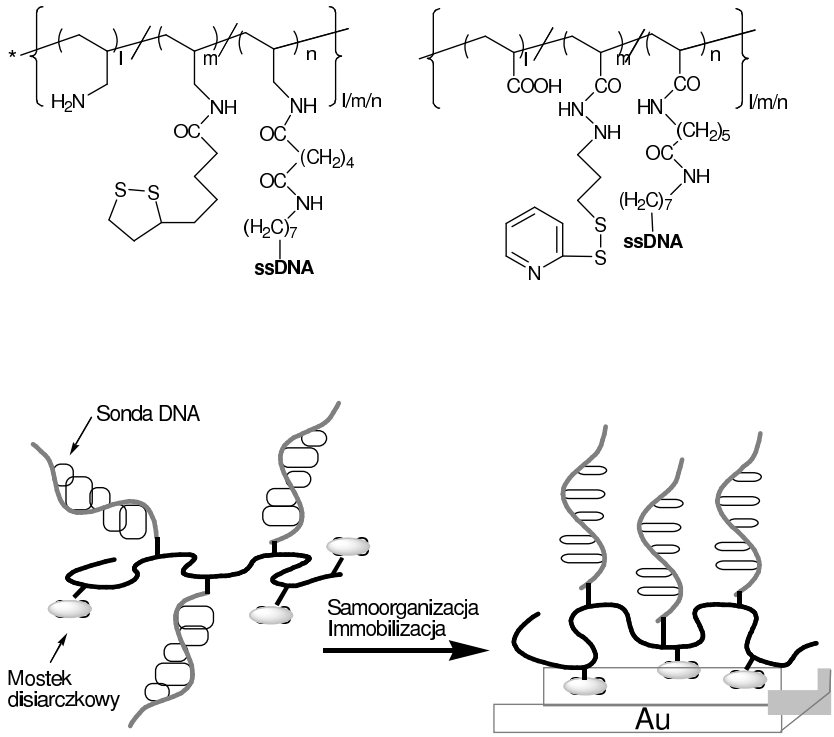


Rysunek 35. Przykład sieciowania materiału genetycznego ● do podłoża ▭ za pomocą heterobifunkcyjnych związków sieciujących.

.



Rysunek 36. Przykład sieciowania materiału genetycznego ● do podłoża ▭ za pomocą trójfunkcyjnych związków sieciujących.



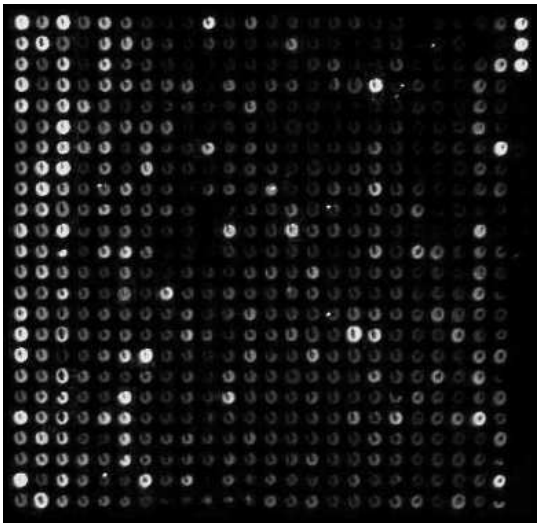
Rysunek 37. ssDNA połączone z łańcuchami polialliloaminowymi i kwasów poliakrylowych. Schemat samoorganizacji sond na powierzchni złota [55].

3.3. Metody detekcji procesów hybrydyzacji DNA w systemach diagnostycznych.

Detekcja procesów hybrydyzacji DNA typu sonda-analit może odbywać się z wykorzystaniem markerów (np.: optyczna, elektrochemiczna, magnetyczna) oraz bez ich użycia (np.: elektrochemiczna, radioaktywna, masy, ładunku, odbicia promieniowania, mikroskopii sił atomowych).

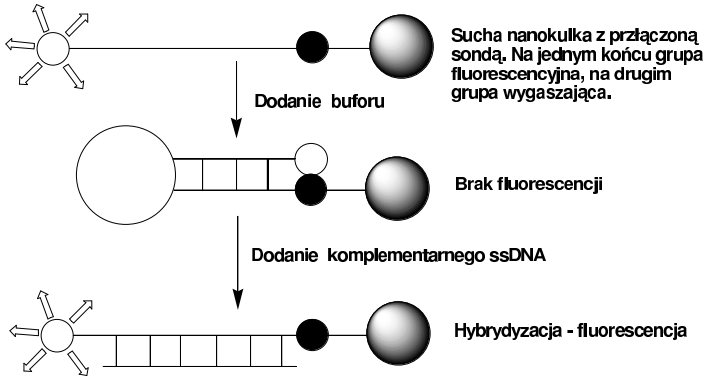
Główną techniką detekcji optycznej jest laserowo indukowana fluorescencja lub LED (zastosowanie diod elektroluminescencyjnych). Indukowanie fluorescencji

również może być wywoływane białym światłem. Z założenia detekcja optyczna wymaga, aby sonda lub badana cząsteczka (*target*) były znakowane fluorescencyjnymi grupami (np. cyjaniny: zielona-Cy3, czerwona-Cy5), które selektywne świecą (punkty) po połączeniu się dwóch komplementarnych łańcuchów. Uzyskany obraz jest skanowany przez kamery CCD i analizowany przez komputer (Rys. 38).



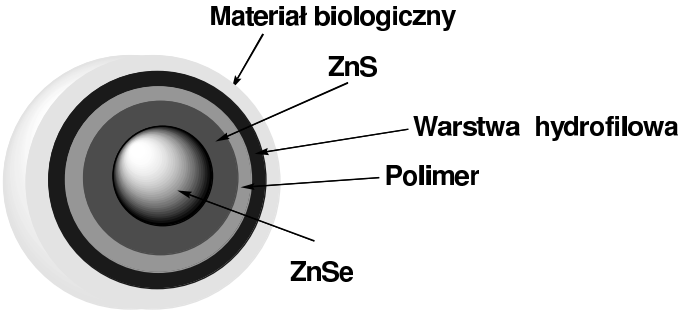
Rysunek 38. Przykład matrycy fluorescencyjnej [56].

Istnieją również komercyjnie dostępne mikromatrycowe skanery DNA oferowane przez takie firmy jak: *Agilent*, *Affymetrix, Nanogen*, [57]. Do technik optycznych należy również zaliczyć układy zawierające PDA (*photodiode array*) [53]. Wykorzystując zjawisko fluorescencji można zastosować również inne podejście, które wymaga, aby sonda posiadała zarówno grupę fluoryzującą jak i jej wygaszasz (*quencher*). Takie układy nazywane są z języka angielskiego *molecular beacons* (Rys.39). Wykazują one fluorescencję po hybrydyzacji z komplementarnym łańcuchem [58].



Rysunek 39. Schemat budowy i działania molekularnego markera typu molecular beacon

Inna metoda diagnostyki procesów hybrydyzacji bazuje na zjawisku fluorescencji i oparta jest na nanostrukturach kropek kwantowych (*quantum dots*) z CdSe, które w zależności od wielkości nanostruktur emitują światło o różnej energii [59]. Takie mikrocząstki pokryte są warstwą siarczku cynku, polimerem, grupami zmniejszającymi hydrofobowość całej cząstki, a następnie materiałem biologicznym (Rys. 40).



Rysunek 40. Schemat budowy kropki kwantowej [59]

Ciekawym przykładem wykorzystania metod optycznych są włókna światłowodowe z immobilizowanymi sondami DNA (*microstructured optical fiber*, MOF). Oligonukleotydy posiadają przyłączone jednostki fluorescencyjne Cy3

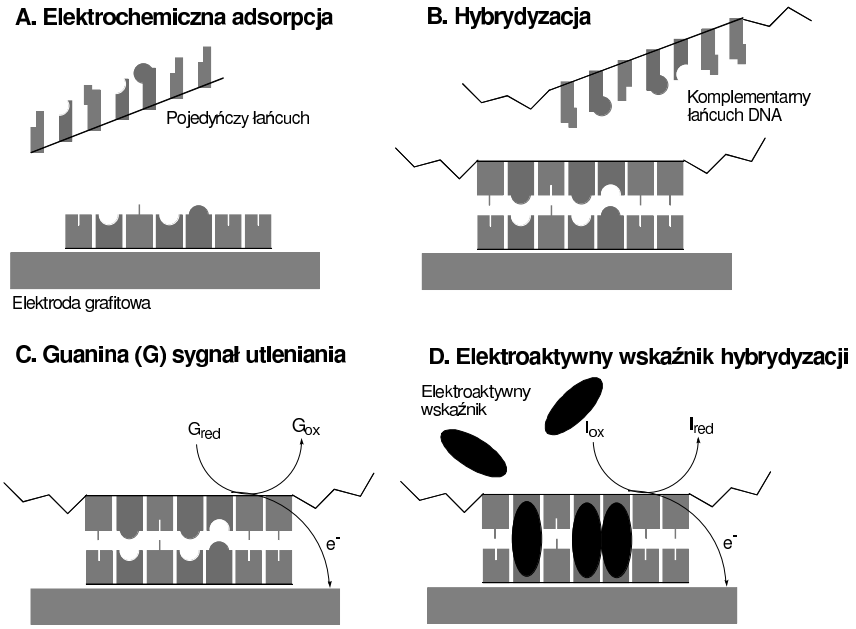
i pomiar procesu hybrydyzacji odbywa się na zasadzie zaniku fali elektromagnetycznej [60]. Opracowywane są również chipy diagnostyczne służące do rozdziału nukleotydów wykorzystując ich różnice w masie cząsteczkowej. Bazują one na rozdziale elektroforetycznym połączonym z optyczną detekcją [61].

Opisując elektrochemiczne metody detekcji ogólnie można powiedzieć, że istnieją ich dwa rodzaje: jedna poprzez zastosowanie elektroaktywnych wskaźników i druga – bez użycia markerów, ale przez detekcję obecności reszty guaninowej. Jako elektroaktywnych indykatorów używa się kompleksów jonów metali, takich jak: $Co(phen)_3^{+3}$, $Co(bpy)_3^{+3}$, $Ru(bpy)_3^{+2}$, $Fe(phen)_3^{+2}$, $Fe(bpy)_3^{+2}$, $Cu(phen)_2^{+2}$ oraz $Cu(TAAB)^{+2}$; (TAAB= tetraaza makrocykliczny ligand) lub wskaźniki organiczne, takie jak: pomarańcz akrydynowy, antracyklina, fenotiazyna, czy bromek etydyny. Związki te oddziaływują w różny sposób z ssDNA oraz dsDNA preferując interkalacje pomiędzy zasadami w podwójnym łańcuchu poprzez oddziaływania stakingowe (nakładkowe). Wzrost odpowiedzi elektrochemicznej indykatora z badanego układu wskazuje na zachodzące procesy hybrydyzacji (Rys. 41).

Również pomiary chronopotencjometryczne (*current chronopotentiometric stripping analysis* - CPSA) pozwalają na wskazanie ilości molekuł interkalujących z dsDNA (np. daunomycyny) [62]. Do badań elektrochemicznych wykorzystuje się także nukleotydy znakowane ferrocenem oraz oksydazami, takimi jak peroksydaza [63,64]. Ciekawym rozwiązaniem jest hybryda optoelektronicznego chipu wykorzystującego katalizowaną enzymatycznie chemiluminescencję ze standardowym fotodetektorem typu CMOS [65,66].

Ostatnią metodą, w której bada się zjawiska hybrydyzacji w sposób pośredni, czyli za pomocą dodatkowych cząsteczek lub cząstek, w tym przypadku małych nanomagnesów, jest metoda oparta na pomiarach magnetycznych. Pomimo istnienia wielu sensorów stosowanych do detekcji nanokulek (sensory Halla, sensorów typu *GMI* (***G****iant* ***M****agneto****I****mpedance*) na szczególną uwagę zasługują sensory GMR (***G****iant* ***M****agneto****R****esistive*) i MR (***M****agneto****R****esistive*) [64,67,68]. Najbardziej znanym sensorem jest BARC (***B****ead* ***A****rray* ***C****ounter*), który w dużym uproszczeniu działa na

zasadzie zliczania ilości mikrokulek przyłączonych po hybrydyzacji łańcuchów DNA do sensora z wykorzystaniem detekcji pola magnetycznego [69]. Na bazie tego urządzenia zostały zbudowane sensory BARC II i BARC III [70].



Rysunek 41. Schemat działania detekcji elektrochemicznej z udziałem wskaźników red-oks [62].

Skonstruowano również regulowane chipy za pomocą zaworów spinowych bazujące na efekcie MR [71]. Wykorzystując anizotropowy efekt magnetooporności AMR (***A**nisotropic **M**agneto**R**esistance*) zostały skonstruowane urządzenia typu *on/off* do zliczania cząstek w matrycach o dużej gęstości [72]. Taki sam mechanizm wykorzystano również w chipach z efektem MR [73].

Przykładem detekcji procesów hybrydyzacji bez użycia markerów jest elektrochemiczne utlenianie guaniny w wyniku, którego powstaje

chronopotencjometryczny sygnał malejący wraz z postępującym łączeniem się komplementarnych łańcuchów DNA. Aby nie dopuścić do nakładania się sygnałów utlenianej guaniny z immobilizowanego łańcucha DNA oraz łańcucha celowego zastępuje się guaninę inozyną [74]. Do metod elektrochemicznych, w których nie używa się markerów można zaliczyć również matryce mikroelektrodowe z immobilizowanym DNA [75].

Metoda radioaktywna należy również do metod „bezwskaźnikowych", chociaż ze względu na zagrożenia płynące z używania radioaktywnych izotopów nie ma raczej szans na wprowadzenie jej do powszechnie dostępnych układów diagnostycznych. Polega ona na znakowaniu nukleotydów izotopami ^{3}H, ^{14}C, ^{33}P lub ^{35}S, a następnie wywołaniu obrazu procesów hybrydyzacji z zastosowaniem np. filmu rentgenowskiego.

Dodatkowo wyróżniamy takie metody jak: detekcję czułą na zmianę masy (*mass sensitive detection*), czułą detekcję ładunku (*charge sensitive detection*), wskaźnik załamania (*refractive index sensitive detection)*. Pierwsza z wymienionych metod, czyli detekcja czuła na zmianę masy, polega na umieszczeniu na kwarcowej mikrowadze (*quartz crystal microbalance*) sondy i pomiarze zmiany masy będącej wynikiem hybrydyzacji [76,77]. Metoda ta funcjonuje dobrze do granicy 61nM i do trzydziestu jeden jednostek oligonukleotydów w sekwencji [64]. Metoda bazująca na pomiarze elektrochemicznym ładunku przed i po hybrydyzacji jest rzadziej stosowana [78]. Najbardziej rozpowszechnioną metodą detekcji procesów hybrydyzacji jest pomiar współczynnika załamania promieniowania (*refractive index*) na cienkiej warstwie metalu (np. złota), za pomocą metody powierzchniowego rezonansu plazmowego (*surface plasmon resonance*, *SPR imaging*) [79, 80]. Doskonale nadaje się ona się do diagnostyki wiązania wszelkiego rodzaju analitów z immobilizowanymi na powierzchni receptorami, w tym DNA [81].

Alternatywną metodą detekcji materiału genetycznego, który jest związany do podłoża, jest mikroskopia sił atomowych atomowych AFM (***A**tomic **F**orce **M**icroscopy*). Za pomocą tej metody można badać powierzchnie mikromacierzy

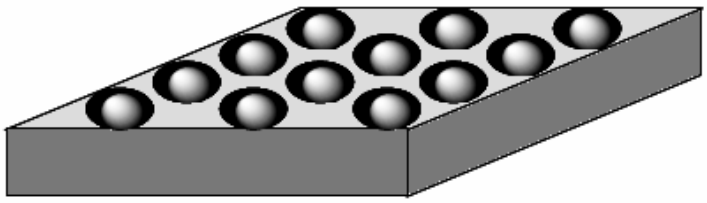
uzyskując informację o ułożeniu, procesach samoorganizacji, hybrydyzacji oraz oddziaływaniach biopolimerów na powierzchni [82].

5. Mikrosfery jako nośniki sond genetycznych

Oprócz podłoża składającego się z różnego rodzaju płytek ogromnym zainteresowaniem cieszą się mikrosfery (nanokulki). Immobilizowanie na ich powierzchni pojedynczych łańcuchów DNA odbywa się poprzez sprzęganie powinowactwa lub kowalencyjne wiązania. Same nanokulki mogą być wytworzone z różnego typu modyfikowanych materiałów, takich jak: agaroza, szkło, lateks, silikon, czy polistyren. Macierze uzyskuje się poprzez wytrawianie płytek silikonowych kwasem fluorowodorowym, lub techniką *imaging fiber optic bundles*. Niestety wadą tej metody jest brak fizycznej możliwości ułożenia kulek w „studzienkach" (*wells*) (Rys. 42). W celu sprawdzenia pozycji mikrosfer w „pułapkach" stosuje się kilka znanych metod detekcji. Pierwsza z nich wykorzystuje fluorescencję znakowanych mikrosfer, natomiast druga polega na wiązaniu komplementarnych znakowanych łańcuchów biopolimerów związanych na powierzchni mikrosfery. Inna metoda detekcji bazuje na iluminacji płytki silikonowej w polu elektrycznnym (*Light-controlled Electrokinetic Assembly of Particles near Surface*) po ułożeniu na niej nanokulek.

Wszystkie rodzaje „macierzy kulkowych" charakteryzują się bardzo wysoką czułością i dlatego biochipy oparte na tej technologii budzą wielkie nadzieje na ich wykorzystanie w diagnostyce genetycznej [83]. Generalnie można wyróżnić dwa główne trendy technologiczne budowy kulkowych biochiopów. Pierwszy z nich bazuje na kulkach immobilizowanych natomiast drugi na kulkach stosowanych w fazie homogenicznej. Immobilizowanie kulek do podłoża może odbywać na drodze chemicznej, powinowactwa, pułapkowania *(entrapment)* oraz immobilizowania na powierzchni elastomeru (*elastomer/air interface*). Natomiast faza homogeniczna to zawieszone w roztworze mikrosfery z immobolizowanymi (chemicznie, powinowactwa, jak również poprzez połączenia homo-oligonukleotydów z sondami

typu: AAAAAAAAA z komplememntarnymi zasadami - TTTTTTTTT - przyłączonymi do nanokulki) na powierzchni sondami gotowymi do komplementarnego łączenia z łańcuchami ssDNA (*target*). Roztwór zawierający kulki zawieszone w cieczy można aproksymować do roztworu homogenicznego. Takie podejście daje możliwość pracy z immobilizowanymi sondami w roztworach i poszerza spektrum stosowania wielu innych technik pomiarowych. Jedną z nich jest technika cytometrii przepływowej, która może służyć jako analizator mikrosfer, gdzie zawieszone w roztworze kulki są dzielone na te, które uległy hybrydyzacji i na te, na których ten proces nie zaszedł. Szacuje się, że wykorzystanie tej metody umożliwi wykonywanie analiz z szybkością ok. 300 000 próbek dziennie [83]! Wykorzystanie nanokulek w fazie homogenicznej daje możliwość budowy urządzeń diagnostycznych bazujących na mikroprzepływowych układach z zastosowaniem elektrochromatografii. Ciekawym rozwiązaniem są nanoczasteczki, które na skutek hydrofobowych oddziaływań ulegają samoorganizacji (*Random Fluidic Self-assembly*) na powierzchni chipu [84].



Rysunek 42. Mikrokulki umieszczone w studzienkach pomiarowych [83].

5. Spis firm produkujących mikromacierze i chipy diagnostyczne.

Szacuje się, że obecnie ponad 500 światowych firm zajmuje się wytwarzaniem substratów i elementów do różnego typu modułów diagnostycznych, a 70 bezpośrednio produkcją biochipów.

Liderami na rynku są firmy:
Biacore International AB (http://www.biacore.com),
Ciphergen Biosystems, Inc. (http://www.ciphergen.com) oraz
Luminex Corporation (http://www.luminexcorp.com).

W bazie internetowej *BioChipNe*t (www.biochipnet.de), w której zgromadzone są informacje na temat mikromacierzy i chipów diagnostycznych podano wiadomości o 504 instytucjach i firmach realizujących różnego typu projekty związane z produkcją testów diagnostycznych, o 1710 patentach oraz 172 produktach znajdujących się aktualnie sprzedaży.

Tabela 2. Przykłady urządzeń wprowadzonych na rynek wymienionych w bazie BioChipNet

Nazwa produktu Firma produkująca urządzenie	Działanie
ProtoArray™ Human Protein Microarray **INVITROGEN** http://catalog.invitrogen.com	**The ProtoArray™ Human Protein Microarray** – wysokofunkcjonalizowana proteinowa matryca dająca możliwość szybkiego skryningu (przesiania) tysięcy interakcji białko-białko w jeden dzień. Wersja 3.0 testu ProtoArray™ zawiera więcej niż 5 000 unikatowych, specjalnie wyselekcjonowanych z wielu rodzin genetycznych, białek. Wybrana ich kolekcja zostaje naniesiona podwójnie (jako próba kontrolna) na powierzchnię nitrocelulozy o wymiarach 1 na 3 cale. Powierzchnia nitrocelulozy zapewnia wysoką stabilność układu. Matryca jest tak zaprojektowana, aby białka nie straciły na swoich właściwości. Producent gwarantuje pełną aktywność testu przez 6 miesięcy pod warunkiem, że będzie on przechowywany w temperaturze - 20ºC. ProtoArray™ Human Protein Microarray daje

	możliwość przeprowadzenia wielu testów, między innymi: • identyfikacji nowych biomarkerów, specyficznych dla chorób zakaźnych, chorób nowotworowych oraz autoimmunologicznych • mapowania (śledzenia) wielu ważnych biochemicznych ścieżek opartych na interakcjach proteina – proteina • określanie profilu specyficznych przeciwciał do różnego typu terapii.
ChIP-on-chip DNA microarrays **AGILENT TECHNOLOGIES** http://www.chem.agilent.com	Test chromatynowy firmy Agilent (**CHIP-on-chip DNA microarrays**) jest zaprojektowany do badań biologicznych i biochemicznych. Pozwala on na monitorowanie wiązania białek z DNA w bliskości ludzkich, mysich bądź pochodzących z drożdży promotorów. Do przeprowadzenia pełnego testu za pomocą „CHIP-on-chip DNA microarrays" wymagany jest odpowiedni sprzęt analityczny (czytnik), oprogramowanie oraz podana przez producenta lista odpowiednich odczynników.
CytoChips™ **BLUE GENOME** http://www.cambridgebluegnome.com	CytoChips™ - mikromatryca BAC (*Bacterial Artifical Chromosome*), gdzie umieszczono sklonowane i sekwencjonowane wektory wywodzące się z bakteryjnego chromosomu. Na matrycy może zostać zaaplikowane conajmniej 100 000 fragmentów. Test CytoChips™ został specjalnie przygotowany tak, aby spełniać standardy badań klinicznych „*arrayCGH*". Najnowsza technika

	cytogenetyki i biologii molekularnej tzw. porównawcza hybrydyzacja genomowa do mikromacierzy (*array CGH*) umożliwia analizę całego genomu z rozdzielczością zależną tylko od liczby zastosowanych klonów. Pierwsze badania genomu człowieka za pomocą techniki CGH do mikromacierzy wykazały, że genomy ludzi różnią się między sobą fragmentami DNA o wielkości sięgającej nawet do 2 milionów par zasad. Zjawisko to określono mianem zmienności liczby kopii fragmentów DNA (*copy-number variation*, CNV).
ProteinChip® System Series **CIPHERGEN** http://www.ciphergen.com	**ProteinChip® System Series** to zestaw testów Pattern Track™ do analizy biomarkerów. System ten jest sprzężony z innymi produktami firmy, co daje możliwość poszukiwania biomarkerów różnego typu i możliwość wykorzystania różnych metod detekcji.

Analizując powyższe dane i uwzględniając fakt, że corocznie tylko w samych Stanach Zjednoczonych Ameryki Północnej pula środków pieniężnych na dotacje dla projektów badawczych i instytucji związanych z szeroko pojęta diagnostyką chorób cywilizacyjnych jest zwiększana o ponad 900 milionów dolarów można pokusić się o stwierdzenie, że stoimy przed prawdziwą rewolucją w tej dziedzinie [23,24].

Pomimo tego, że rynek mikrourządzeń diagnostycznych jest rynkiem dopiero rozwijającym się już w tej chwili przynosi ogromne zyski firmom zajmującymi się nowoczesnymi technologiami (Tabela 3). Wśród firm innowacyjnych przodują te z USA, natomiast w Europie niewątpliwie czołowe miejsca zajmują Niemcy, Anglia, Holandia, Francja i Rosja. Sprzedawane urządzenia diagnostyczne są stosowane do

diagnostyki eróznorodnych schorzeń, poprzez rozróżnianie ras zwierząt do bardziej ogólnego wykorzystania. Ujmując rozwój najnowszych technologii a w tym także chipów i mikromacierzy DNA globalnie, można pokusić się o stwierdzenie, że są to technologie przyszłości, które niewątpliwie będą wywierały znaczący wpływ na nasze życie.

Tabela 3. Wybrane firmy zajmujące się sprzedażą i badaniami mikromacierzy i chipów DNA

Nr	**Nazwa firmy**	**Adres internetowy**
1	Affymetrix INC	www.affymetrix.com
2	Agilent Technologies	www.chem.agilent.com
3	BioMicro Systems	www.biomicro.com
4	BioRad Laboratories	www.bio-rad.com
5	Caliper Life Sciences	www.caliperls.com
6	Capital Biochip Corp	www.capitalbio.com
7	Cepheid	www.cepheid.com
8	Combimatrix Corp	www.combimatrix.com
9	DNAPrint Genomics	www.dnaprint.com
10	Fluidigm Corp	www.fluidigm.com
11	Genetix	www.genetix.co.uk
12	Greiner Bio-One	www.greinerbioone.com
13	Illumina Inc	www.illumina.com
14	Lonza - Genolife	www.genolife.com
15	Micronit Microfluidics BV	www.micronit.nl
16	Molecular Devices Corp (MDC)	www.moleculardevices.com

17	Nanogen Inc	www.nanogen.com
18	Oxford Gene Technology (OGT)	www.ogt.co.uk
19	Perkin Elmer	www.instruments.perkinelmer.com
20	Plexigen Inc	www.plexigen.com
21	Protron Mikrotechnik GmbH	/www.protron-mikrotechnik.de
22	Qiagen	www1.qiagen.com
23	Roche (Hoffmann LaRoche)	www.roche-diagnostics.com
24	Sequenom	www.sequenom.com
25	SIRS Lab GmbH	www.sirs-lab.de
26	SuperArray Bioscience Corp	www.superarray.com
27	Takara - Bio	www.takara-bio.co.jp
28	US Genomics	www.usgenomics.com
29	Biochip-IMB Ltd.	www.biochip.ru

Podziękowania:

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

Literatura:

1. W. W. Lockwood, R. Chari1, B. Chi, W. L. Lam, Eur. J. Human. Gen., 14 (2006) 139-148;
2. A. B. Olejniczak, J. Plesek, Z. J. Leśniowski, Chem. Eur. J., 13 (2007), 311-318;

3. D. H. J. Bunka, P. G. Stockley, Nature Reviews Microbiology 4 (2006) 588-596;
4. J. J. Diaz-Mochón, L. Bialy, M. Bradley, Chem. Commun. (2006) 3984–3986;
5. J. Wang, M. Uttamchandani, L. P. Suna, S. Q. Yao, Chem. Commun. (2006) 717-719;
6. A. Czernicka, W. Balcerzak, Z. Brzózka, P. Kafarski, Austrian-German-Hungarian-Italian-Polish-Slovenian 5th Joint Meeting on Medicinal Chemistry, Portoroz, Slovenia 2007;
7. W. Balcerzak, W. Bednarz, P. Domosławski, R. Olewiński1, J. Kolesińska, Z. Kamiński, K. Dziarkowska, P. Wieczorek, Pol. J. Endocrinol., 57 (2006) 307-313;
8. K. Tsubaki, D. Tanima, T. Sasamori, N. Tokitoh, T. Kawabata, Tetrahedron Lett. 48 (2007) 2135-2138;
9. K. Usui-Aoki, K. Shimada, H. Koga, Mol. BioSyst., 3 (2007) 36–42;
10. S. Song, B. Li, L. Wang, H. Wu, J. Hu, M. Lia, C. Fan, Mol. BioSyst. 3 (2007) 151–158;
11. M. Högbom, M. Eklund, P.-Å. Nygren, P. Nordlund, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100 (2003) 3191-3196;
12. N. Blow, Nature 447 (2007) 741-744;
13. H. Schulz, M. Barańska, R. Barański, Biopolymers, 77 (2005) 212-221;
14. B. Schrader, H. Schulz, M. Barańska, G.N. Andreev, C. Lehner, J. Sawatzki, Spectrochim. Acta Part A, 61 (2005) 1396-1401;
15. http://stoddart.chem.ucla.edu/research/
16. G. Wenz, B.-H. Han, A. Müller, Chem. Rev. 106 (2006) 782-817;
17. A. Nelson, J. M. Belitsky, S. Vidal, C. S. Joiner, L. G. Baum, J. F. Stoddart, J. Am. Chem. Soc., 126 (2004) 11914-11916;
18. C. D. Chin, V. Linder, S. K. Sia, Lab Chip, 7 (2007) 41-57;
19. H. Andersson, A. van den Berg, Curr. Opin. Biotechnol., 15 (2004) 1-6;

20. P. S. Waggoner, H. G. Craighead, Lab Chip, **7** (2007) 1238 – 1255;
21. A. J. Tüdõs, G. A. J. Besselink, R. B. M. Schasfoort, Lab Chip, 1 (2001) 83-95;
22. P. Abgrall, A.-M. Gué, J. Micromech. Microeng. 17 (2007) R15-R49;
23. J. Zbrojewska, J. Przytuła; Badania Diagnostyczne, Wydawnictwo Akademii Rolniczej im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu, Poznań 2005;
24. http://www.allbusiness.com/services/business-services/3937504-1.html
25. S. Bodovitz, T. Joos, J. Bachmann, Drug Discovery Today Targets, 10 (2005) 283-287;
26. D. A. Hall, J.Ptacek, M. Snyder, Mechanism of Ageing and Development 128 (2007) 161-167;
27. U.R. Müller, D.V. Nicolau (Eds.), Microarray Technology and its Applications, Springer 2005;
28. Y. S. Lee, M. Mrksich, Trends in Biotechnology, 20 (2002) 14-18;
29. L.J. Kricka, Clinica Chemica Acta, 307 (2001) 219-223 (XXI wiek);
30. T. Vo-Dinh, Sensor and Acumulators B, 51 (1998) 52-59;
31. D. P. Dumas, Targets, 1 (2002) 74 – 80;
32. T. Kukar, S. Eckenrode, Y. Gu, W. Lian, Analitical Biochemistry, 306 (2002) 50-54;
33. T. Livache, H. Bazin, P. Caillat, A. Roget, Biosensor and Bioelectronics, 13 (1998) 629-634. Hultsching C., J. Kreutzberger, H. Seitz, Z. Konthur, K. Büssow, H. Lehrach; Current Opinion in Chemical Biology, 10 (2006), 4-10;
34. K. Usui –Aoki, M. Kyo, M. Kawai, M. Murakami, K. Imai, K. Shimada, H. Koga, Frontiers in Drug Design and Discovery, 2 (2006) 23-33;
35. A.J. Wills, S. Balasubramanian, Current Opinion in Chemical Biology,7 (2003) 346-352;

36. F. Guillier, D. Orain, M. Bradley, Chemical Reviews, 100 (2000) 2091 – 2157;
37. B. J. Backes, J. A. Ellman, Current Opinion in Chemical Biology, 1 (1997) 86-93;
38. J.P. Goddard, J.L. Reymont, Current Opinion in Biotechnology, 15 (2004) 314-322;
39. J. R. Epstein, I. Biran, D.R. Walt, Analitica Chimica Acta, 469 (2002) 3-36;
40. M. Cano, M. Ladlow, S. Balasubramanian, J. Comb. Chem. , 4 (2002) 44-48;
41. S. R. Horner, Ch. R. Mace, L. j. Rothberg, B. L. Miller, Biosensors and Bioelectronics, 21 (2006) 1659-1663;
42. T. Urata, N. Takahashi, Y. Hakamata, Y. Iijima, N. Kuwahara, N. Ozaki, Y. Onoe, M. Amanoa, T. Nada, Neuroscience Letters 414 (2007) 209–212;
43. A.-M. Divne, M. Allen, Forensic Science International 154 (2005) 111–121;
44. B. Strommengera, Ch. Schmidta, G. Wernera, B. Roessle-Lorchb;
45. T. T. Bachmannb, W. Wittea, Molecular and Cellular Probes 21 (2007) 161–170; M. H. Antwerpena, M. Schellhaseb, E. Ehrentreich-Forsterb, F. Bierb, W. Wittea, U. Nubela, Molecular and Cellular Probes 21 (2007) 152–160;
46. www.cs.wustl.edu/~jbuhler/research/array/array.png
47. Ch. Heise, F. F. Bier, Topics in Current Chemistry (2006) 261, 1-25;
48. Q. Du, O. Larsson, H. Swerdlow, Z. Liang, Topics in Current Chemistry 261, (2006), 45-61;
49. S. Kim, G.-S. Lim, S. E. Lee, J.-G. Lee, K. Yun, J.-K. Park, Biosensors and Bioelectronics 22 (2007) 1926–1932;
50. D. B. Weibel, W. R. DiLuzio, G. M. Whitesides, Nature Reviews in Microbiology, 5 (2007), 209-218;
51. A. del Campo, I. J. Bruce, Topics in Current Chemistry 260 (2006), 77-111;
52. S. A. Ruiz, Ch. S. Chen, Soft Matter, (2007), 3, 168–177;

53. M. I. Pivadori, S. Alegret, DNA Adsorption on Carbonaceous Materials, Topics in Current Chemistry 260 (2005), 1-36;
54. J. M. Songa,M.-S. Yang, H. T. Kwan, Biosensors and Bioelectronics 22 (2007) 1447–1453;
55. C. L. Smith, J. S. Miela, G. H. Nguyen, Topics in Current Chemistry 261, (2006), 63-90;
56. K. Yokoyama, Sh. Taira, Topics in Current Chemistry 261, (2006), 91-112;
57. www.icg.tu-graz.ac.at/research/CGIS/GENVIEW/
58. www.agilent.com, www.affymetrix.com , www.nanogen.com, www.moleculardevices.com/pages/instruments/gn_genepix4000.html
59. L. J. Brown, J. Cummins, A. Hamilton, T. Brown Chemical Communication (2000) 621–622;
60. www.olympusconfocal.com/theory/fluorophoresintro.html
61. L. Rindorf . P.E. Høiby, J. B. Jensen, L. H. Pedersen, O. Bang, O. Geschke, Analytical and Bioanalytical Chemistry 385 (2006), 1370–1375;
62. R. Ogawa, H. Ogawa, A. Oki, S. Hashioka, Y. Horiike, Thin Solid Films 515 (2007) 5167–5171;
63. I. Palchetti, M. Mascini, Electrochemical, Topics in Current Chemistry 261 (2006) 27-43;
64. D. J. Caruana, A. Heller, Journal of the American Chemical Society 121 (1999) 769-774;
65. Z.J. Leśnikowski, Boioczujniki i elektrochemiczne, Na pograniczu chemii i biologii, Tom X, UAM (2004)144-168;
66. Jörg Schotter, Praca doktorska (PhD thesis in physics): "Development of a magneto-resistive biosensor for the detection of biomolecules" University of Bielefeld Department of Physics Nano Device Group October 28th, 2004, ogólnie dostępna online: http://bieson.ub.uni-bielefeld.de/volltexte/2004/616/index.html
67. http://en.wikipedia.org/wiki/Active_pixel_sensor

68. F. Mallard, G. Marchand, F. Ginot, R. Campagnolo, Biosensors and Bioelectronics 20 (2005) 1813–1820;
69. http://pl.wikipedia.org/wiki/Magnetoop%C3%B3r
70. http://pl.wikipedia.org/wiki/Gigantyczny_magnetoop%C3%B3r
71. http://stm2.nrl.navy.mil/barc/barc.html; D. R. Baselt, G. U. Lee, M. Natesan, S. W. Metzger, P. E. Sheehan, R. J. Colton Biosensors & Bioelectronics 13 (1998) 731-739;
72. M. M. Miller, J.C. Rife, C.R. Tamanaha, P.E. Sheehan, M. A. Piani, S.P. Mulvaney;
73. D. L. Grahama, H. Ferreira, J. Bernardo, P. P. Freitas, J. M. S. Cabral Journal of Applied Physics 91 (2002) 7786; L. Lagae, R. Wirix-Speetjens, J. Das, D. Graham, H. Ferreira, P. P. F. Freitas, G. Borghs and J. De Boeck, Cabral Journal of Applied Physics 91 (2002) 7445; H. A. Ferreira, D. L. Graham, P. P. Freitas, J. M. S. Cabral Journal of Applied Physics 93 (2003) 7281;G. Li, V. Joshi, R. L. White, Sh. X. Wang, J. T. Kemp, Ch. Webb, R. W. Davis Journal of Applied Physics 93, (2003) 7557;
74. http://pl.wikipedia.org/wiki/Anizotropowy_magnetoop%C3%B3r; M. M. Miller, G. A. Prinz, S.-F. Cheng, S. Bounnak Applied Physics Letters 81 (2002) 2211;
75. E. Mirowski, J. Morelanda, S. Russeka, M. Donahueb, K. Hsieha Journal of Magnetism and Magnetic Materials 311 (2007) 401–404;
76. M.I. Pividori, A. Merkoc¸i, S. Alegret, Biosensors & Bioelectronics 15 (2000) 291–303;
77. Y.-S. Choi, K.-S. Lee, D.-H. Park Current Applied Physics 6 (2006) 772–776;
78. J. Wang,, P. E. Nielsen, M. Jiang, X. H. Cai, J. R. Fernandes, D. H. Grant, M. Ozsoz, A. Beglieter, M. Mowat, Analytical Chemistry 69, (1997) 5200-5202;

79. A. Bardea, A. Dagan, I. Ben-Dov, B. Amit, I. Willner, I., Chemical Communications 7 (1998) 839-840;
80. E. Souteyrand, J. P. Cloarec, J. R. Martin, C. Wilson, I. Lawrence, S. Mikkelsen, M. F. Lawrence Journal of Physical Chemsitry B 101 (1997) 2980-2885; H. Berney, J. West, E. Haefele, J. Alderman, W. Lane, J.K. Collins, Sensors and Actuators B 68 (2000) 100-108;
81. http://en.wikipedia.org/wiki/Surface_plasmon_resonance
82. I. Mannelli, L. Lecerf, M. Guerrouache, M. Goossens, M.-C. Millot, M. Canva Biosensors and Bioelectronics 22 (2007) 803–809;
83. D.-K. Kim, K. Kerman, M. Saito, R. R. Sathuluri, T. Endo, Sh. Yamamura, Y.-S. Kwon, E. Tamiya Analytical Chemistry, 79 (2007) 1855 -1864; L. He, M.D. Musick, S.R. Nicewarner, F.G. Salinas, S.J. Benkovic, M.J. Natan, C.D. Keating,. Journal of the American Chemical Society 122 (2000) 9071-9077;
84. D. V. Nicolau, P. D. Sawant, Topics in Current Chemistry 260 (2006), 113-160;
85. C. A. Marquette, L. J. Blum, Topics in Current Chemistry 261, (2006), 113-129;
86. Y.-S. Choi, J.-Y. Lim, K.-S. Lee, Current Applied Physics 7 (2007) 370–374.

Rozdział 6

Uporządkowane nanoporowate materiały hybrydowe – organiczne krzemionki

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

Porowate ciała stałe, w których występują pory przenikające przez cząstki ciała stałego we wszystkich kierunkach, zwykle mają powierzchnie właściwe rzędu setek m^2/g. Przy tym powierzchnia wewnętrzna jest dziesięciokrotnie, a nawet niekiedy stukrotnie większa od powierzchni zewnętrznej. Oprócz tego, wskutek występujących specyficznych krzywizn powierzchni wewnątrz porów, następuje istotne zwiększenie potencjału adsorpcyjnego. Dlatego jest oczywiste, że porowate ciała stałe są godne uwagi, gdyż odznaczają się możliwością efektywnego i opłacalnego ekonomicznie wykorzystania, np. w procesach adsorpcyjnych czy katalitycznych. Z tego względu synteza materiałów porowatych zawierających pory o ściśle zdefiniowanych rozmiarach, zdolne do przesiewania cząsteczek związków chemicznych o różnych rozmiarach i/lub kształtach, stanowi przedmiot zainteresowania chemików ze względu na możliwość ich zastosowania w procesach katalitycznych, adsorpcyjnych czy rozdziału.

Zgodnie z klasyfikacją podaną przez IUPAC materiały porowate, ze względu na wielkość porów, podzielono na trzy grupy: mikroporowate (wielkość porów w granicach 0,2–2 nm), mezoporowate (2-50 nm) i makroporowate (>50 nm). Wiele rodzajów materiałów porowatych zostało szeroko opisanych w literaturze, np.

najbardziej znanymi przedstawicielami rodziny materiałów mikroporowatych są zeolity, charakteryzujące się wąskim, jednakowej wielkości systemem porów zdefiniowanym przez ich strukturę krystalograficzną. Materiały mezoporowate w porównaniu do zeolitów mają wysoko rozwiniętą powierzchnię (600-1300 m^2/g) i większy rozmiar porów (2-30 nm), jednak bardzo często ich struktury i centra aktywne są mniej dostępne niż ma to miejsce w przypadku zeolitów, zaś ich ściany są amorficzne, co przeszkadza w praktycznym zastosowaniu w katalizie. Mezoporowate sita molekularne z powodzeniem znalazły jednak zastosowanie w takich dziedzinach nauki jak medycyna, ekologia i nanotechnologia. Porównanie obu typów materiałów porowatych zostało przedstawione w Tabeli 1.

Tabela 1. Porównanie mikroporowatych, tj. zeolitów i mezoporowatych sit molekularnych

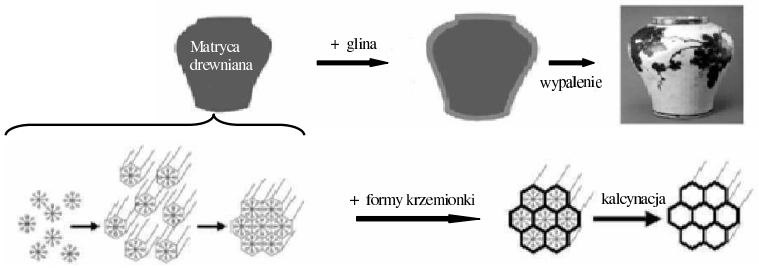
Zeolity	***Materiały mezoporowate***
• Rozmiar porów < 2 nm	• Rozmiar porów ~2-15 nm
• Małe cząsteczki używane są jako środki ukierunkowujące;	• Szeroko są stosowane surfaktanty oraz inne środki ukierunkowujące, np. organiczne cząsteczki i cząsteczki supramolekularne, np. biomolekuły;
• Krystaliczne krzemiany i glinokrzemiany z trójwymiarową strukturą są perfekcyjnymi nieorganicznymi kryształami w skali molekularnej;	• „Kryształy" (psedokryształy) posiadają okresowo uporządkowane cząstki o specyficznych własnościach chemicznych i dają dobrze zdefiniowane linie dyfraktometryczne w zakresie nano, tj, przy 2Θ=0.4-10°;
• Klasyczne odmiany zbudowane są z glinokrzemianowych tetraedrycznych jednostek (TO_4) ;	• Ściany są amorficzne – występuje wiele poliedrycznych jednostek, takich jak sześciokrotnie- i pięciokrotnie skoordynowane jednostki TO_6 i TO_5;

• Jednostki TO_4 połączone są z czterema innymi za pomocą wiązań kowalencyjnych. Niewiele podstawowych jednostek posiada trójkrotne połączenia, co implikuje niską zawartość grup silanolowych;	• Nie wszystkie jednostki TO_4 są połączone z czterema innymi. Obecne są połączenia 3- i 2-krotne, co generuje hydrofilowość powierzchni;
• Wysoka hydrotermalna stabilność;	• Niska stabilność na działanie pary wodnej – mezoporowatą strukturę można zniszczyć na drodze gotowania w wodzie przez 6h lub poprzez traktowanie parą wodną (100% wody) w temperaturze 1073 K przez 4 h;
• Temperatura syntezy jest raczej wysoka – 353-573 K;	• Niska temperatura syntezy – zwykle 373-403 K, ale niektóre syntezy przebiegają nawet w temperaturze 263 K;
• Krystalizacja zajmuje zwykle od kilku dni do kilku miesięcy;	• Bardzo krótka szybkość tworzenia – zwykle potrzeba od kilku sekund do kilku minut na wytworzenie ciała stałego;
• Syntetyzowane są tylko w środowisku wodnym (bez wody nie następuje pełna krystalizacja);	• Mogą się tworzyć w środowisku niewodnym. Różne polarne organiczne rozpuszczalniki, takie jak alkohole i tetrahydrofuran (THF) mogą służyć do generowania mezostruktury na drodze samoorganizacji indukowanej odparowaniem rozpuszczalnika lub metodą solvotermalnej syntezy;

• Synteza zachodzi wyłącznie w środowisku zasadowym; jedynie dodatek jonów fluorkowych pozwala na obniżenie pH do ~7 lub środowiska lekko kwaśnego;	• Szeroki zakres stosowanego pH, tj. od ~0 do 12 (zob. Tabela 5);
• Morfologia jest silnie związana z ich strukturą i jest trudna do kontrolowania ze względu na tworzenie idealnie uporządkowanych kryształów.	• Możliwe jest kontrolowanie morfologii; tworzą się takie formy jak: filmy, sfery, monolity, włókna, łańcuchy, liny, itp.

Pierwsza synteza materiału mezoporowatego została opisana w literaturze w 1971 r., jednak mimo badań nad jego strukturą, nie została ona w pełni scharakteryzowana [1]. Przełomem okazało się odkrycie w 1992 r. przez firmę Mobil Oil Company nowej klasy uporządkowanych materiałów porowatych nazwanych MCM-41 (Mobil Composition of Matter No. 41). Pierwsze publikacje [1,2] opisujące syntezę ww. materiałów zapoczątkowały nową erę w chemii materiałów porowatych. W pracach tych zademonstrowano po raz pierwszy proces samorzutnego uporządkowania surfaktantów w obecności ortokrzemianu tetraetylu lub krzemianu sodu, które umożliwiło otrzymanie nowych materiałów o heksagonalnie (MCM-41), regularnie (MCM-48) i warstwowo (lamelarnie) (MCM-50) uporządkowanej strukturze porów od 2 do 8 nm. Formowanie struktury opierało się w tych przypadkach na oddziaływaniach elektrostatycznych pomiędzy dodanie naładowanym środkiem ukierunkowującym a roztworem związku krzemionki o ładunku ujemnym. Mezoporowate materiały otrzymywane były następnie przez usunięcie surfaktantu na drodze ekstrakcji lub kalcynacji. Materiały te posiadają uporządkowaną strukturę dużych jednakowych porów, wysokorozwiniętą wyspecjalizowaną powierzchnię i zdefiniowaną średnicę porów. Schemat syntezy takiego sita można przyrównać do

otrzymywania starożytnych waz, albowiem już wtedy na bazie matrycy drewnianej, na drodze jej oblepienia gliną połączonego z wypaleniem, otrzymuje się dokładną replikę (rys. 1).



Rysunek 1. Schemat syntezy mezoporowatego sita molekularnego oraz wykonywania wazy.

O intensywności rozwoju określonej dziedziny nauki niewątpliwie świadczy liczba publikacji jej poświęconych. Biorąc to pod uwagę należy stwierdzić, że nauka o mezoporowatych sitach molekularnych rozwija się w zawrotnym tempie. Dzieli nas ok. 15 lat od opublikowania pierwszej pracy nt. syntezy mezoporowatych sit, a liczba publikacji poświęconych tym materiałom jest imponująca (bliska 5500), a ich potencjalne zastosowania w procesach separacji, katalizie, ochronie środowiska, medycynie, nano- i biotechnologii są bardzo obiecujące.

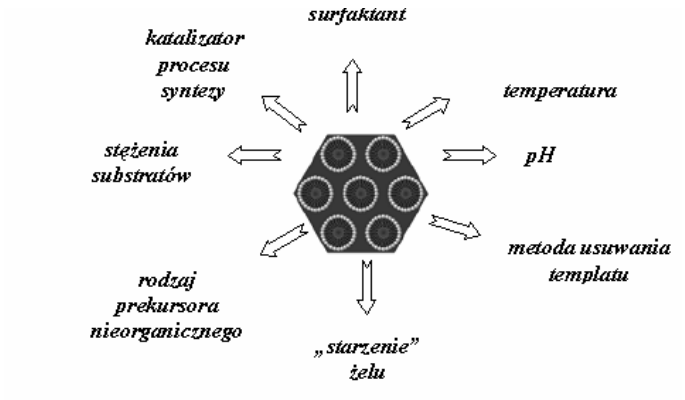
Od roku 1992 nastąpiła olbrzymia ewolucja w dziedzinie nauki syntezy materiałów mezoporowatych. Składa się na nią rozwój metod syntezy przez zastosowanie różnych surfaktantów i polimerów w szerokim zakresie pH oraz odkrycie kilkunastu nowych krzemianowych struktur takich jak na przykład: SBA-n, MSU-n, KIT-1, itp. Tym samym otrzymano szeroką gamę nowych materiałów z różnymi strukturami: dwuwymiarowa (2D) heksagonalna z grupą przestrzenną p6mm, trójwymiarowa (3D) heksagonalna - $P6_3/mmc$, 3D regularna - $Pm\bar{3}m$, $Pm\bar{3}n$, $Fd\bar{3}m$, $Fm\bar{3}m$, $Im\bar{3}m$, ciągła regularna $Ia\bar{3}d$, itp. Bardzo szybko okazało się, że proces samorzutnego uporządkowania można wykorzystać do otrzymywania różnych innych materiałów, nie tylko krzemionkowych, o ściśle zdefiniowanej strukturze porowatej i

pożądanych właściwościach powierzchniowych. Tym samym nastąpił okres rozpowszechnienia tych samych metod syntezy dla mezoporowatych niekrzemianowych materiałów, których synteza była uprzednio utrudniona. Możliwości tak szybkiego rozwoju metod syntezy uporządkowanych mezoporowatych materiałów (*Ordered Mesoporous Materials* – OMMs) wynikają przede wszystkim z użycia oligomerycznych i polimerycznych związków, które mogą służyć jako supramolekularne templaty.

Właściwości strukturalne, takie jak kształt i rozmiar porów, udaje się kontrolować przez dobór odpowiednich surfaktantów lub polimerów blokowych, które są zdolne do samorzutnego uporządkowania w obecności różnych związków nieorganicznych lub przez dobór warunków syntezy (pH, stężenie reagentów, temperatura i czas). Istnieją również nieograniczone możliwości modyfikacji właściwości powierzchniowych uporządkowanych materiałów nanoporowatych, szczególnie krzemionkowych, przez chemiczne wiązanie ligandów o odpowiednich właściwościach fizykochemicznych po ich syntezie lub już na etapie syntezy. Ten ostatni sposób okazał się bardzo atrakcyjny, gdyż pozwolił na otrzymanie materiałów z grupami organicznymi przyłączonymi do powierzchni lub wkomponowanymi w strukturę materiału. W wyniku takiego procesu, tj. integracji do ścian mezoporowatej krzemionki za pomocą wiązań kowalencyjnych Si-C mostkowo związanych form $(RO)_3Si–R'–Si(OR)_3$, otrzymano po raz pierwszy w 1999 roku materiały mezoporowate – organiczne krzemionki – PMO (*periodic mesoporous organosilicas* - PMOs) [4-6]. Fuzja chemii organicznej oraz chemii nieorganicznej ciała stałego (tj. materiałów krzemionkowych) pozwoliła na wytworzenie materiałów z jednorodną dystrybucją organicznych grup rozdzielających i rozkładem rozmiaru porów. PMOs charakteryzują się unikalnymi cechami związanymi z ich strukturą: wysoką zawartością składnika organicznego (tylko nieznaczną blokadą porów), obecnością chemicznie reaktywnych centrów; homogeniczną dystrybucją grup funkcyjnych; chemiczną i fizyczną właściwości materiałów zmienianą na drodze manipulowania budową i składem prekursora silseskwioksanowego. Takie kowalencyjnie powiązane

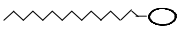
struktury organiczno-nieorganiczne reprezentują nową klasę materiałów z możliwością zastosowania jako gospodarze dla syntezy nanoklasterów, w ceramice, kształtoselektywnej katalizie, optoelektronicznych materiałach, mikroelektronicznych materiałach z niskim współczynnikiem k, sensorach chemicznych i nanoreaktorach. Badania nad nowymi materiałami hybrydowymi są także motywowane potencjalnym ich zastosowaniem w chemii materiałowej (wypełnienia kolumn HPLC, oleje silikonowe). Aktualnie weszliśmy w etap rozwoju badań nad zastosowaniem mezoporowatych organicznych krzemionek, których rozwój datuje się zaledwie od 1999 roku a i zapewne najbliższe lata przyniosą szereg rozwiązań technologicznych w tym zakresie.

W celu otrzymania jednorodnych i uporządkowanych, mezoporowatych adsorbentów konieczne jest zastosowanie metod pozwalających kontrolować, podczas procesu syntezy, wymiary powstających porów, a także ich geometryczny kształt i wzajemne przestrzenne ułożenie. Wśród różnych metod mezoporowatego „projektowania" regularnej i uporządkowanej nanoporowatej struktury materiału najbardziej skuteczne okazały się metody syntezy bezpośredniej, na którą wpływ mają czynniki zamieszczone na rys.2.



Rysunek 2. Czynniki mające wpływ na syntezę materiałów mezoporowatych.

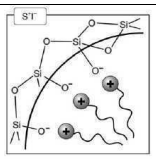
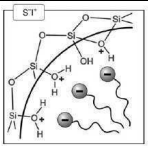
Opracowanie nowej metody syntezy sit molekularnych przez firmę Mobil Oil Co. na początku lat dziewięćdziesiątych pozwoliło na otrzymanie mezoporowatych materiałów. W metodzie tej zastosowano supramolekularne agregaty cząsteczek surfaktantów (środków powierzchniowo czynnych) zamiast pojedynczych cząsteczek. Użycie tych liotropowych faz prowadzi do otrzymania mezostrukturalnych materiałów (krzemianów, glinokrzemianów, glinofosforanów, etc.), które po kalcynacji prowadzącej do usunięcia matrycy, mają średnicę porów w granicach wyznaczanych przez długość hydrofobowej części surfaktantu, tj. od 2 do 30 nm. Materiały te, określane jako M41S, nie są krystaliczne (mają ściany amorficzne) [7]. Mechanizm syntezy materiałów mezoporowatych nie jest przedstawiony w literaturze jednoznacznie. Następujące publikacje przeglądowe prezentują przegląd różnych teorii nt. mechanizmu powstawania struktury materiału mezoporowatego [np. 8-26]. Surfaktant stosowany jako templat jest cząsteczką z grupą hydrofilową i hydrofobowym łańcuchem węglowodorowym:

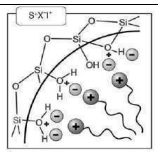
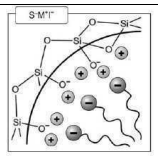
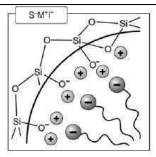
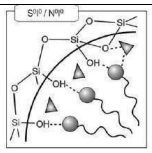


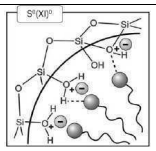
Dla powstania materiału porowatego ważne jest znalezienie odpowiedniej grupy hydrofilowej środka powierzchniowo czynnego, tak aby umożliwić powiązanie jej z nieorganicznym prekursorem. Oddziaływania pomiędzy komponentem nieorganicznym (I) a surfaktantem (S) mogą przybierać różne formy: wiązania elektrostatycznego, kowalencyjnego lub wodorowego (Tabela 2). W przypadku jonowych środków powierzchniowo czynnych, może dojść do oddziaływania elektrostatycznego typu S^+I^-, gdy reakcja przebiega w warunkach zasadowych I w obecności kationowego surfaktantu i anionowej formy nieorganicznej lub S^-I^+ - warunki kwasowe, surfaktant anionowy i nieorganiczny kation. W przypadku, gdy środek powierzchniowo czynny i część nieorganiczna mają ten sam ładunek, konieczne jest dodanie dodatkowych jonów, takich jak halogenki X^- ($S^+X^-I^+$, warunki

kwasowe syntezy) czy kationy metali alkalicznych M^+ ($S^-X^+I^-$, warunki zasadowe syntezy). Powyższe oddziaływania mają charakter elektrostatyczny, co ma także miejsce w przypadku ścieżki $S^0H^+X^-I^+$, ale możliwe są także występowanie wiązań wodorowych w przypadku użycia niejonowego surfaktantu lub kopolimeru i obojętnego źródła krzemionki (S^0I^0/S^0N^0). Stosunkowo rzadko zdarzają się wiązania kowalencyjne surfaktant-komponent nieorganiczny (S-I), jednak istnieją głównie podczas tworzenia sieci zawierających metale (Nb, Ta).

Tabela 2. Ścieżki syntezy mezoporowatych materiałów ze szczególnym uwzględnieniem formy nieorganicznej (I) oraz rodzaju surfaktantu (S).

Typ/rodzaj oddziaływań	Proponowany model	Symbole	Warunki	Przykłady
S^+I^- kulombowskie elektrostatyczne		S^+, kationowe surfaktanty (zob. Tabela 2) I^-, anionowe formy krzemianowe	zasadowe	MCM-41,MCM-48, SBA-2, SBA-6, SBA-8, FDU-2, FDU -11, FDU -13
S^-I^+ kulombowskie elektrostatyczne		S^- anionowe surfaktanty, np. $C_nH_{2n+1}COOH$, $C_nH_{2n+1}SO_3H$, $C_nH_{2n+1}OSO_2H$, $C_nH_{2n+1}OPO_2H$; I^+, jony metali przejściowych takie jak np. Al^{3+}	wodne	tlenki glinu

$S^+X^-I^+$ kulombowskie elektrostatyczne; podwójna warstwa wiązań wodorowych		S^+, kationowe surfaktanty (zob. Tabela 2) I^-, anionowe formy krzemianowe; X^-, Cl^-, Br^-, I^-, SO_4^{2-}, NO_3^-	kwaśne	SBA-1, SBA-2, SBA-3
$S^-N^+I^-$ kulombowskie elektrostatyczne		S^-, anionowe surfaktanty (rys 4); N^+, kationowe grupy aminowe z TMAPS lub APS; I^-, anionowe formy krzemianowe	zasadowe	AMS-*n*
$S^-M^+I^-$ kulombowskie elektrostatyczne; podwójna warstwa wiązań wodorowych		S^-, anionowe surfaktanty $C_nH_{2n+1}COOH$, $C_nH_{2n+1}SO_3H$, $C_nH_{2n+1}OSO_2H$, $C_nH_{2n+1}OPO_2H$; I^-, jony metali przejściowych, np. WO_4^{2-}, $Mo_2O_7^-$; M^+, Na^+, K^+, Cr^{3+}, Ni^{2+}	zasadowe	tlenki W, Mo
S^0I^0 (N^0I^0) wiązanie wodorowe		S^0, niejonowe surfaktanty, oligomeryczne alkilowe PEO surfaktanty i trójblokowe kopolimery; N^0, organiczne aminy, $C_nH_{2n+1}NH_2$,	obojętne	HMS, MSU, materiały z kanałami o kształcie robakowatym

		$H_2NC_nH_{2n+1}NH_2$; I^0, obojętne formy krzemianów, glinianów		
$S^0H^+X^-I^+$ kulombowskie elektrostatyczne; podwójna warstwa wiązań wodorowych		S^0, niejonowe surfaktanty I^+, kationowe formy krzemianów; X^-, Cl^-, Br^-, I^-, SO_4^{2-}, NO_3^-	kwaśne, pH < 2	SBA-*n* (*n* =11, 12, 15 i 16), FDU-*n* (*n* = 1, 5 i 12), KIT-*n* (*n* = 5 i 6)
N^0----I^+ koordynacyjne		N^0, organiczne aminy; I^+, metale przejściowe (Nb, Ta)	kwaśne	tlenki Nb, Ta
S^+-I^- wiązanie kowalencyjne		S^+, kationowe surfaktanty zawierające krzemiany, np. $C_{16}H_{33}N(CH_3)_2OSi(OC_2H_5)_3Br$; I^-, anionowe formy krzemianów	zasadowe	mezoporowata krzemionka

Typowa strategia syntezy materiałów mezoporowatych składa się z kilku podstawowych etapów (rys. 3). Po pierwsze należy otrzymać homogeniczną mieszaninę surfaktantu w rozpuszczalniku, którym przeważnie jest woda. Następnie dodaje się źródło krzemu, które podlega procesowi hydrolizy katalizowanej przez kwas lub zasadę, co w efekcie prowadzi do otrzymania zolu składającego się oligomerów krzemowych. W wyniku oddziaływania pomiędzy oligomerami i micelami surfaktantu, kooperacyjne składanie (*assembly*) i agregacja prowadzą do procesu wytrącania ciała stałego z zolu. Podczas tego procesu zachodzi ciągła separacja mikrofazowa i kondensacja krzemowych oligomerów. Tworzenie

mezoporowatych krzemianów jest bardzo szybkie w przypadku stosowania kationowych surfaktantów – zwykle potrzeba 3-5 minut, zaś dla niejonowych surfaktantów jest on trochę dłuższy, tj. wymagane jest minimum 30 min. Badania przeprowadzone za pomocą multidyscyplinarnych technik pozwoliły na wykazanie, że materiał mezoporowaty na tym etapie syntezy, zanim wytworzy się żel, jest nieuporządkowany [27]. W momencie rozpoczęcia procesu strącania zaczyna się także proces uporządkowania struktury. Dotychczas do syntezy materiałów mezoporowatych używane były proste tetraalkoksysilany takie jak TEOS (tetraetoksysilan) lub TMOS (tetrametoksysilan). Jednak w przypadku reakcji otrzymywania hybryd organiczno-nieorganicznych jako podstawowe źródło krzemionki mogą być używane bardziej skomplikowane połączenia krzemu, w tym podstawione grupami etylotrietoksykrzemianowymi etoksysilany i cykliczne trimetylotrietoksysilany. Warto w tym miejscu zwrócić uwagę na szybsze tworzenie mezoporowatych krzemionek w przypadku stosowania tetrametoksysilanów niż TEOS oraz wolniejsze w przypadku stosowania tetrabutoksysilanu, co jest silnie związane z szybkością hydrolizy prekursorów krzemowych.

Po wytworzeniu produktu stałego następuje proces kondensacji w celu uzyskania uporządkowanej mezostruktury. Następnie prowadzi się proces hydrotermalny w celu doprowadzenia do kompletnej kondensacji i solidyfikacji oraz dalszej poprawy organizacji struktury. Materiał mezoporowaty jest ostatecznie otrzymywany przez usunięcie surfaktantu.

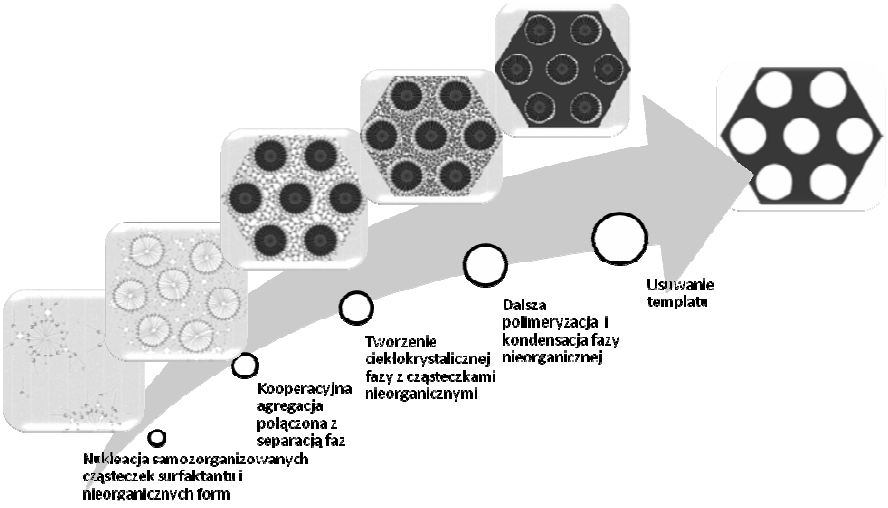
Uporządkowane mezoporowaty struktury otrzymuje się w warunkach kwaśnych lub zasadowych. Zwykle obojętny roztwór nie pozwala na otrzymanie uporządkowanych struktur, ze względu na to iż, zbyt szybki proces polimeryzacji oraz szybkość usieciowania krzemianów przy pH w zakresie od 6 do 8.5 nie pozwalają na kontrolowany proces templatowania przy użyciu surfaktantów [28]. Dodanie jonów fluorkowych pozwala na generowanie mezoporowatych struktur nawet w warunkach obojętnych. W przypadku syntez prowadzonych w środowisku zasadowym, jako zasady stosuje się wodorotlenek sodu lub potasu, wodę amoniakalną (NH_3 H_2O),

wodorotlenek tetrametyloamoniowy (TMAOH, $(CH_3)_4NOH$) i tetraetyloamoniowy (TEAOH, $(C_2H_5)_4NOH$), przy czym te dwa ostatnie ze względu na ich wysoką cenę jedynie w przypadku syntezy materiałów glinokrzemianowych. Warto w tym miejscu zwrócić uwagę na fakt, że pH środowiska reakcyjnego zmienia się z czasem i jest początkowo obniżane ze względu na proces hydrolizy krzemianów, by później wzrosnąć w związku z sieciowanie form krzemionkowych. W związku z tym materiały mezoporowate o wysokim uporządkowaniu, np. MCM-41, otrzymuje się zwykle jedynie przy pH od 11 do 11,5, co jest uzyskiwane przez nastawianie pH w trakcie syntezy za pomocą kwasu siarkowego bądź też octowego.

W przypadku syntezy kwasowej proces otrzymywania materiałów mezoporowatych jest znacząco przyspieszany przez obniżenie pH roztworu. Z drugiej jednak strony niskie pH powoduje spowolnienie szybkości strącania. Jeśli jako katalizator procesu stosuje się HCl, wtedy optymalne pH to <1. Im wyższe jest stężenie jonów H^+ tym bardziej hydrofilowy staje się blokowy kopolimer poprzez protonowanie cząstek PEO blokowych kopolimerów. Wysokie stężenie HCl (>4 M) nie jest zalecane ze względu na generowanie nieuporządkowanych struktur. Z kolei niskie stężenie kwasu (0.5 M HCl) oraz dodatek n-butanolu obniżają szybkość kondensacji form nieorganicznych, co pozwala na otrzymanie wysoko uporządkowanej struktury 3D typu SBA-16. Ogólnie przyjmuje się, że niskie stężenie katalizatorów sprzyja powolnej kinetyce kondensacji grup nieorganicznych. Oprócz HCl jako katalizatory stosuje się HNO_3, HBr, HI i H_2SO_4, zaś znacznie rzadziej H_3PO_4 oraz kwas octowy. Ponieważ strącanie krzemianów jest ekstremalnie powolne przy pH=1-2, stąd też możliwe było dokładne prześledzenie mechanizmu tworzenia mezoporowatych struktur przy użyciu kopolimerów blokowych [29]. W przypadku hydrolizy kwasowej przeważnie jako źródło krzemu stosuje się TEOS, rzadziej zaś metakrzemian sodu (Na_2SiO_3), tj. tylko w przypadku szybkiego procesu zakwaszenia. Dodatek soli nieorganicznych takich jak KCl, NaCl, Na_2SO_4 and K_2SO_4 może poprawiać syntezę poprzez jej przyspieszenie oraz polepszenie uporządkowania,

podczas gdy dodatek organicznych rozpuszczalników przeważnie obniża szybkość tworzenia w przypadku niejonowych systemów surfaktantów [30].

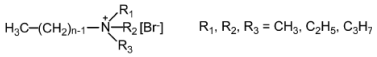
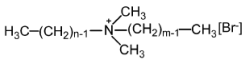
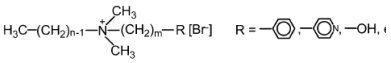
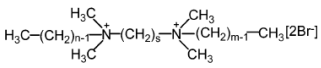
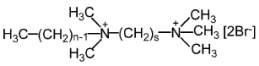
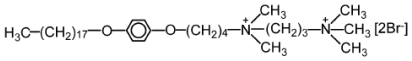
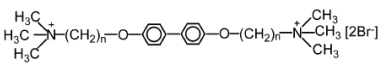
Bardzo ciekawym zjawiskiem w przypadku syntezy materiałów mezoporowatych w środowisku kwaśnym jest całkowity brak przemian fazowych. Zwykle dany surfaktant przyczynia się do otrzymana określonej struktury, np. CTAB daje 2D heksagonalne mezostrukturę SBA-3, natomiast CTEAB 3D regularną SBA-1. W porównaniu do zasadowej syntezy jest więc znacznie trudniej zmieniać mezostrukturę poprzez dopasowanie stężenia, czy też zmianę temperatury. Jedynie w przypadku syntezy 3D struktury SBA-12 z mieszaniną fazy heksagonalnej upakowanej (hcp) i regularnej upakowanej (ccp) proces hydrotermalnej obróbki w 373 K przez 3 dni powoduje przemianę w 2D heksagonalną mezostrukturę.



Rysunek 3. Syntetyczna strategia otrzymywania materiałów mezoporowatych

Natura surfaktantu, określana przez długość łańcucha i ładunek grupy polarnej oraz jej strukturę, ma wpływ na strukturę otrzymanego produktu. W tabelach 3 i 4 oraz na rys. 4 zestawiono podstawowe typy surfaktantów stosowanych w syntezie materiałów mezoporowatych. Przeważnie używa się czwartorzędowych amoniowych surfaktantów z długimi łańcuchami alkilowymi.

Tabela 3. Przykłady wzorów strukturalnych stosowanych surfaktantów kationowych

Czwartorzędowe amoniowe sole trialkilowe		 $R_1, R_2, R_3 = CH_3, C_2H_5, C_3H_7$ $n = 8 – 22$  $n = 8 – 22$; $m = 2 – 22$  R = $n = 8 – 22$; $m = 0 – 3$
Gemini	C_{n-s-m}	 $n = 8 – 22$; $s = 2 – 6$; $m = 1 – 22$  $n = 8 – 22$; $s = 2 – 6$
	C_{n-s-1}	
	$18B_{14-3-1}$	
Bolafoam R_n		 $n = 4, 6, 8, 10, 12$

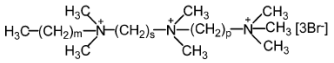
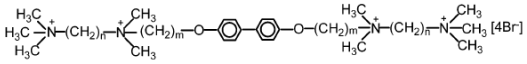
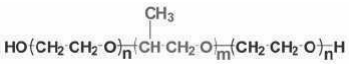
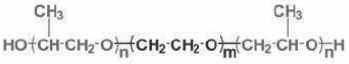
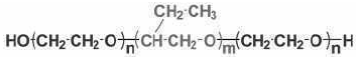
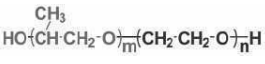
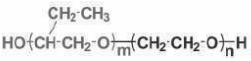
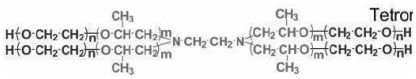
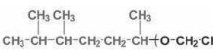
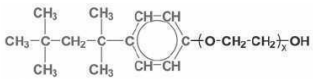
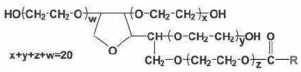
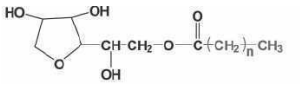
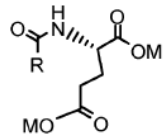
Z trzema grupami polarnymi $C_{m\text{-}s\text{-}p\text{-}1}$	 *m* = 14, 16, 18; *s* = 2; *p* = 3
Z czterema grupami polarnymi $C_{m\text{-}n\text{-}n\text{-}m}$	 *n* = 2, 3, 4; *m* = 8, 10, 12

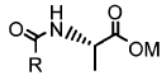
Tabela 4.Wykaz najczęściej stosowanych komercyjnych niejonowych surfaktantów

Polialkilooksylowe kopolimery blokowe	Trójblokowe		Pluoronic PEO-PPO-PEO
			Pluoronic R PPO-PEO-PPO
			PEO-PBO-PEO
	Dwublokowe		PPO-PEO
			PBO-PEO
	Gwiaździste dwublokowe		Tetronic
Oligomeryczne alkilowe poli(etylenowe tlenki)			Brij
			Tergitol

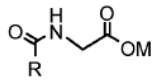
Alkilofenylowe poli(etylenowe tlenki)		Triton
Estry sorbitanu		Tween
		Span



C_nGluA (M = H R = C_nH_{2n+1})
C_nGluS (M = Na R = C_nH_{2n+1})



C_nAlaA (M = H R = C_nH_{2n+1})
C_nAlaS (M = Na R = C_nH_{2n+1})



C_nGlyA (M = H R = C_nH_{2n+1})
C_nGlyS (M = Na R = C_nH_{2n+1})

$C_nH_{2n+1}AM$

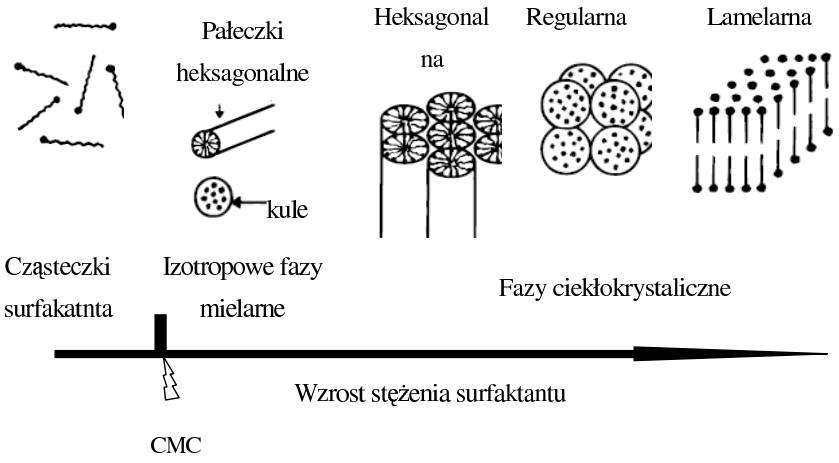
A = COO, OSO_3, SO_3, OPO_3
M = H, Na, K

$n = 8 - 18$

Rysunek 4. Surfaktanty typu anionowego, syntetyzowane w sposób laboratoryjny.

W zależności od temperatury i stężenia, cząsteczki surfaktantu samorzutnie dążą do organizowania się w agregaty o różnych kształtach. Przy bardzo niskim stężeniu, cząsteczki środka powierzchniowo czynnego są w roztworze w dyspersji monomolekularnej (rys. 5). W przypadku syntezy materiału MCM-41 przy stężeniu określanym jako krytyczne stężenie micelowania - CMC1 (ok. 20% CTAB w wodzie) - tworzą się kuliste micele. W takim układzie zewnętrzna powierzchnia miceli składa się z grup hydrofilowych, podczas gdy łańcuchy węglowodorowe są skierowane do środka miceli [31]. Dalszy wzrost stężenia do CMC2 (ok. 35%) powoduje agregację

miceli kulistych do cylindrycznych lub pałeczkowatych, by w końcu utworzyć odpowiednie ciekłokrystaliczne mezofazy: heksagonalną H_1, regularną V_1 i warstwową (lamelarną) L (rys. 5). Ogólnie przyjęto, iż mezoporowate struktury tworzą się przy wartości CMC od 0 do 20 mg/l. W przypadku wyższego stężenia, tj. od 20 do 300 mg/l, stosowane są strategie służące obniżeniu wartości CMC. Surfaktanty z wysoką wartością CMC zwykle mają tendencję do tworzenia struktur o uporządkowaniu regularnym. W przypadku dalszego wzrostu CMC trudno jest wygenerować mezostrukturę [32].



Rysunek 5. Diagram struktur, w tym mezofaz, w zależności od wartości krytycznego stężenia micelowania

Bardzo długie surfaktanty (> C_{22}) nie są raczej stosowane ze względów ekonomicznych. Namba i wsp. [33] donoszą o możliwości zastosowania mieszaniny surfaktantów o różnym stosunku obu komponentów, np. użycie mieszaniny C_{12}TMABr/CTAB pozwoliło na otrzymanie materiału o rozmiarze porów od 1,8 do

4,2 nm, zaś mieszaniny CTAB/C_{22}TMABr – od 2,8 do 5,2 nm.

Stucky i wsp. [34] wprowadzili pojęcie czynnika **g**, tzw. czynnika upakowania, określanego wzorem empirycznym: $g=V/a_0l$, gdzie V jest całkowitą objętością łańcucha surfaktantu, a_0 – efektywną powierzchnią grupy polarnej surfaktantu, a l – efektywną kinetyczną długością łańcucha. Kiedy parametr **g** wzrasta, zachodzą zmiany fazowe kontrolowane za pomocą pH – Tabela 5. Przewidywana teoretycznie sekwencja mezofazy w funkcji wartości g przedstawia się następująco: regularna ($Pm\bar{3}n$, itp.) i 3D heksagonalna ($P63/mmc$) dla $g < 1/3$, 2D heksagonalna ($p6mm$) dla $1/3 < g < 1/2$, regularna ($Ia\bar{3}d$) dla $1/2 < g < 2/3$, i lamelarna dla $g \approx 1$. Użycie środka powierzchniowo czynnego posiadającego bliźniaczo rozmieszczone ładunki (amoniowy gemini – tab. 3 – w skrócie GEM *n-s-m*, gdzie n = 16, s = 2-12, m = 1-16) powoduje powstanie nowej mezofazy typu SBA-1 o strukturze heksagonalnej. Dla serii $(C_{16}H_{33})(C_nH_{2n+1})(CH_3)_2N^+Br^-$ (n = 1-12) Sayari [7] obserwował przy n < 9 bardzo ciekawy przypadek, kiedy faza heksagonalna tworzyła się gdy liczba n była nieparzysta, a lamelarna przy parzystych wartościach n. Przy n > 9 powstawała jedynie faza lamelarna. Van Der Voort i wsp. [35] stosując GEM *n-s-m* jako surfaktanty, stwierdzili, iż długość łańcucha (*n* oraz *m*) określa rozmiar porów, a długość „rozdzielacza" *s* wpływa na rodzaj powstałej fazy krystalicznej. I tak, przy s = 10-12 powstaje regularna struktura MCM-48, zaś użycie GEM z s < 10 powoduje powstanie heksagonalnej fazy MCM-41.

Pojęcie czynnika upakowania pozwala uwzględniać i rozważać wpływ dodatku pomocniczych substancji stosowanych do zmiany polarności oraz właściwości hydrofobowych/hydrofilowych surfaktantów na strukturę otrzymanego materiału. Apolarne dodatki, takie jak TMB, łączą się hydrofobową częścią miceli (tworzy się MCM-50 zamiast MCM-41), a polarne wchodzą do hydrofobowych/hydrofilowych regionów palisady łańcucha (dodanie *t*-AmOH powoduje powstanie SBA-3 (struktura heksagonalna) zamiast SBA-1 (regularna)).

Wprawdzie w większości przypadków tworzenie się struktur można przewidzieć na podstawie wartości g, to jednak wiele czynników może mieć wpływ na finalną mezostrukturę:

1. Obserwuje się zmniejszenie rozmiaru (*repulsion)* główki jonowego surfaktantu po dodaniu nieorganicznych soli. W wyniku tego procesu spada efektywna powierzchnia główki, a tym samym rośnie wartość g. Powoduje to takie przejścia, że np. zamiast 3D regularnej mezostruktury otrzymujemy 2D heksagonalną. Różne sole nieorganiczne mają odmienny wpływ na surfaktanty jonowe w zależności od wielkości promieni hydratowanych anionów i kationów. Obserwuje się tutaj zależność zgodną z serią Hofmeistera dla anionów.
2. Na przykład dla surfaktantu CTEAB obserwuje się następujący szereg: NO_3^- > Cl^- > SO_4^{2-} towarzyszący zmianie krzywizny od wyższej do niższej. W przypadku niejonowych surfaktantów jest to bardziej złożone. Tang i współpracownicy [36] znaleźli w tym przypadku zupełnie inny szereg: SO_4^{2-} (HSO_4^-) > NO_3^- > Cl^-, albowiem w kwaśnym środowisku w obecności P123 zachodzi przemiana struktury z grupą przestrzenną p6mm do Ia$\bar{3}$d.
3. Wzrost wielkości hydrofilowej główki prowadzi do zmniejszenia wartości g co prowadzi do tworzenia sferycznych mezostruktur z dużą krzywizną. I tak kationowe surfaktanty $C_nH_{2n+1}N(CH_3)_3Br$ (n = 10-18) zwykle powodują generowanie 2D struktury heksagonalnej, natomiast 3D klatkowa mezostruktura (np. SBA-1) jest syntetyzowana z użyciem $C_nH_{2n+1}N(CH_2CH_3)_3Br$ jako środka ukierunkowującego.
4. Jeśli dwa surfaktanty mają taką samą główkę, natomiast ogonek składa się pojedynczego, bądź podwójnego łańcucha to pomimo tej samej wartości a_0 mamy zupełnie inne wartości g, co prowadzi do tworzenia sferycznych zamiast kulistych miceli. I tak na przykład surfaktant typu bliźniaczego $C_{16\text{-}2\text{-}16}$ prowadzi do wytworzenia lamelarnej mezostruktury.

Tabela 5. Wpływ parametru g na rodzaj mezostruktury w różnych warunkach syntezy.

g=V/a$_0$l			
<1/3	**1/3 < 1/2**	**1/2 < 2/3**	**1**
Sferyczne micele	**Cylindryczne micele**	**3D cylindryczne micele**	**Lamelarne micele**
Surfaktanty z pojedynczym łańcuchem i dużą główką, $C_nH_{2n+1}N(C_2H_5)_3X$ (n=12-18), $18B_{4-3-1}$, C_{m-s-1} (n=12-18)	Surfaktanty z pojedynczym łańcuchem i małą główką $C_nH_{2n+1}N(CH_3)_3X$ (n=8-18)	Surfaktanty z pojedynczym łańcuchem i małą główką; surfaktanty z hydrofobową polarną główką, surfaktanty z podwójnym łańcuchem i dużą główką $C_{16}H_{33}(CH_3)_3N(CH_2)$-$(C_6H_5)$, Gemini C_{m-s-1}	Surfaktanty z podwójnym łańcuchem i małą główką $C_nH_{2n+1}(CH_3)_3N(CH_3)_3X$ (n=20,22), $C_{16-2-16}$
		Synteza w środowisku zasadowym	
SBA-6 **SBA-7**	**MCM-41**	**MCM-48**	**MCM-50**
		Synteza w środowisku kwaśnym	
SBA-1 **SBA-2**	**SBA-3**		**SBA-4**

5. Dla typu bliźniaczego C_{m-s-m} hydrofilowy charakter może być modyfikowany przez długość łańcucha węglowodorowego. I tak dla s w zakresie od 2 do 12 w przypadku surfaktantu typu $C_{16-s-16}$, templatowana struktura zmienia się w środowisku zasadowym od lamelarnej przez 2D heksagonalną aż po regularną.

Podsumowując, do syntezy materiałów mezoporowatych używa się zarówno czwartorzędowych surfaktantów alkilowych, o różnych długościach łańcucha, jak

również mieszaniny surfaktantów w różnych proporcjach, czy również surfaktanty o bliźniaczo rozłożonych ładunkach, których właściwości hydrofobowo-hydrofilowe i kontrola długości łańcucha prowadzą do otrzymania struktur o określonej morfologii i wielkości porów, czy w końcu blokowe kopolimery typu Pluronic F127 ($EO_{106}PO_{70}EO_{106}$) czy P123 ($EO_{20}PO_{70}EO_{20}$). Wszystkie one mają za zadanie pomóc w otrzymaniu materiałów hybrydowych o ogromnych porach, jednak o zbliżonym ich rozmiarze, poprawienie uporządkowania strukturalnego i otrzymanie cieńszych ścian. Mają one zastosowanie głównie podczas syntez z udziałem mostkowych organosilanów. Dla uzyskania jeszcze lepszej stabilności mezoporów do roztworu suraktantu typu triblokowego polimeru możliwe jest dodanie surfaktantu fluorowęglowego (FC-4).

Mezoporowate materiały hybrydowe posiadają mikroskopowo heterogeniczną strukturę składającą się z nieorganicznej matrycy i organicznej części wprowadzonej (uwięzionej) do matrycy. Można to osiągnąć na trzy sposoby:

- kokondensacji (syntezy tzw. "one – pot")
- zaszczepiania, tj. „graftingu"
- bezpośredniej syntezy materiałów PMO.

Kokondensacja, inaczej zwana syntezą „one-pot", jest metodą syntezy bezpośredniej wykorzystującej mieszaninę tetraalkoksysilanów $(RO)_4Si$ (TEOS lub TMOS) i terminalnych trialkoksyorganosilanów typu $(R'O)_3SiR$, które w obecności środków ukierunkowujących prowadzą do materiałów posiadających organiczne cząsteczki wbudowane kowalencyjnie w porowate ściany lub skierowane do środka porów (rys. 6). Zaletą tego typu syntezy są: niezablokowane pory, homogeniczny rozkład jednostek organicznych w materiale porowatym i możliwość późniejszej funkcjonalizacji wprowadzonych grup. Jednak synteza „one-pot" ma też szereg wad: nieuporządkowanie struktury wzrasta wraz ze stężeniem $(R'O)_3SiR$, których obecność w otrzymanej strukturze jest raczej niska (nie przekracza 40% molowych, grupy organosilanowe faworyzują homokondensację w porównaniu z reakcją z sililowym prekursorem). Ponadto zbyt duże naładowanie struktury organosilanami powoduje

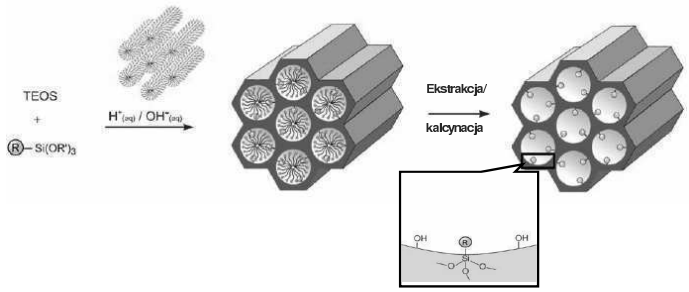
redukcję wielkości porów, rozkładu ich rozmiarów, wielkości powierzchni aktywnej, a zbyt gwałtowne usunięcie surfaktantu (np. przez kalcynację zamiast ekstrakcji) może doprowadzić do załamania się struktury.

Zaszczepianie, w przeciwieństwie do syntezy „one-pot", jest metodą modyfikacji wewnętrznej powierzchni mezoporowatej krzemionki przez wprowadzenie różnorodnych grup organicznych. Przebiega zazwyczaj przez reakcję organosilanów typu $(R'O)_3SiR$, rzadziej chlorosilanów Cl_3SiR lub silazanów $HN(SiR_3)_3$, z wolnymi grupami silanolowymi na powierzchni porów (rys. 7). Zaletą tej metody jest zachowanie wyjściowej powierzchni krzemionki, podczas gdy usieciowanie ścian zmniejsza tylko pory materiału hybrydowego (co może okazać się największą wadą tej metody prowadzącą nawet do całkowitego zatkania porów). Rozmieszczenie i ilość wprowadzonych grup funkcyjnych zależy od reaktywności organosilanu i dostępności do powierzchni krzemionki, determinowanych przez dyfuzję i czynniki steryczne.

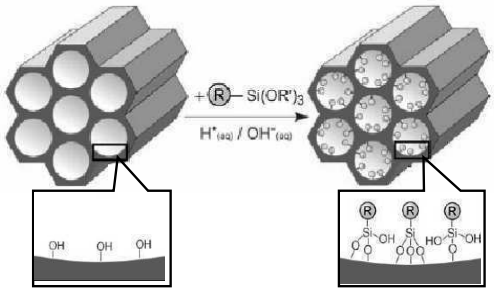
Użycie mostkowych prekursorów organosililowych typu $(R'O)_3Si\text{-}R\text{-}Si(R'O)_3$ (bis-sililowych) umożliwia otrzymanie trójwymiarowej macierzy krzemionkowej z dwoma wiązaniami kowalencyjnymi między grupami nieorganicznymi I organicznymi (Si-C) rozmieszczonymi homogenicznie w strukturze ścian, bez blokowania porów (rys. 8). Polega ona na jednoczesnej hydrolizie i kondensacji prekursora w obecności surfaktantów, prowadząc do powstania termicznie stabilnych struktur o dużej powierzchni wewnętrznej, uporządkowanym systemie porów I wąskim przedziale ich średnicy, którego morfologię i skład matrycy można kontrolować. Wiele zmodyfikowanych grup organicznych, posiadających różne właściwości w różnych warunkach może zostać wprowadzonych do takiej struktury.

Najbardziej ciekawą grupą materiałów hybrydowych są połączenia benzenowo-krzemianowe. Charakteryzują cechą ich budowy jest występowanie amorficznych, pseudokrystalicznych ścian składających się z okresowo powtarzających się jednostek benzenowych i krzemianowych O-Si-C-Si-O, powiązanych wiązaniami kowalencyjnymi. W hybrydzie widoczne jest heksagonalne ułożenie mezoporów (rys.

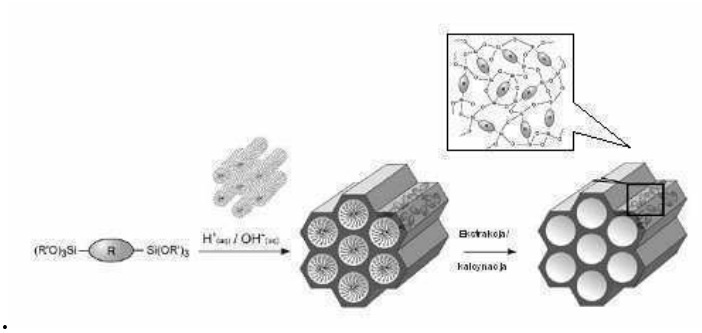
9). Hydrofobowe powierzchnie pierścieni benzenowych i hydrofilowe grupy silanolowe (Si-OH) tworzą powtarzalną matrycę ścian (elementy następują po sobie co



Rysunek 6. Schemat procesu kokondensacji tetraalkoksysilanów $(RO)_4Si$ (TEOS lub TMOS) i terminalnych trialkoksyorganosilanów typu $(R'O)_3SiR$



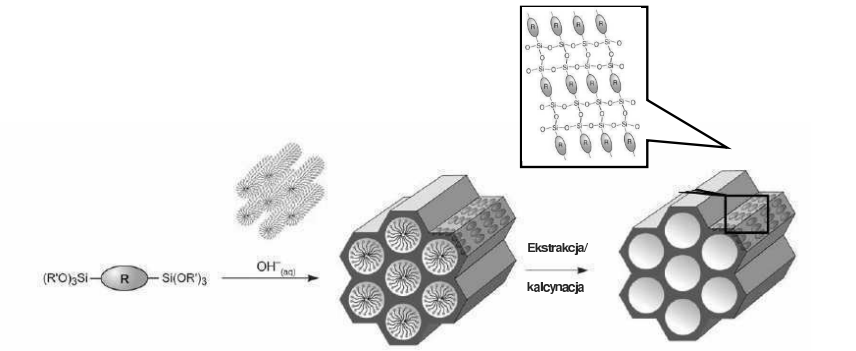
Rysunek 7. Schemat przebiegu procesu zaszczepiania, tj. „graftingu" różnorodnych grup organicznych



.

Rysunek 8. Schemat przebiegu procesu wprowadzania do ścian mezoporowatych materiałów grup organicznych z wykorzystaniem mostkowych prekursorów organosililowych typu $(R'O)_3Si\text{-}R\text{-}Si(R'O)_3$ (bis-sililowych)

0,76 nm), zaś kanały mają średnicę 3,8 nm. Struktura stabilizowana jest dzięki obecności wiązań wodorowych między grupami (Si-OH···HO-Si), stąd zapewne wysoka odporność hydrotermalna i termalna. Jest ona zachowana nawet po 8 h bytności we wrzącej wodzie, czy też w obecności powietrza bądź w atmosferze azotu w temperaturze 773 K. Powierzchnia takiej hybrydy jest dogodna do funkcjonalizacji.



Rysunek 9. Schemat przebiegu procesu wprowadzania do ścian mezoporowatych materiałów grup aromatycznych.

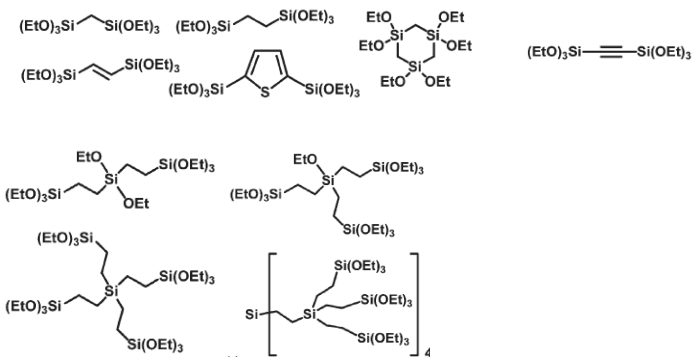
Funkcjonalizacja hybryd zawierających benzen zachodzi dość łatwo, ze względu na aktywność części organicznej. Wprowadzenie części organicznej może nastąpić w drodze modyfikacji po syntezie, tj. zaszczepiania (grafting) lub w drodze bezpośredniej syntezy („one-pot"), gdy jeden z prekursorów zawiera specyficzną grupę, np. tiolową, łatwo ulegającą konwersji do grupy sulfonowej. Funkcjonalizacji może ulec 10-41% grup Si-OH (mniej w przypadku graftingu, więcej, gdy użyje się metody „one-pot"). Otrzymane w ten sposób modyfikowane-sulfonowane hybrydy zawierają zarówno hydrofobowe (benzen), jak i kwasowe (np. grupy sulfonowe) właściwości, co może ułatwić dyfuzję substratów i produktów podczas reakcji, np. katalizy kwasowej. W przypadku tych materiałów istnieje także prawdopodobieństwo modyfikacji grup w trakcie trwania reakcji katalitycznej, co w wielu przypadkach może być przydatne, np. dla regeneracji katalizatora.

Drugim ciekawym przykładem hybryd organiczno-krzemianowych są tzw. BPMOs (bifunkcyjne hybrydy), które powstają w wyniku syntezy z użyciem bis-sililowego (mostkowego) prekursora i trietoksysililowej pochodnej tej samej części organicznej. W tym przypadku rdzeń grupy organicznej znajduje się w szkielecie materiału mezoporowatego, a jej terminalne łańcuchy wystawiony jest do wnętrza porów (stąd nazwa – dwufunkcyjne). Obie grupy różnią się reaktywnością, czego przykładem jest np. reakcja hydroborowania, w wyniku której grupy szkieletowe pozostały nietknięte, a terminalne łańcuchy uległy utlenieniu do alkoholu. Tego typu materiały mogą uzyskać interesujące zastosowania w katalizie.

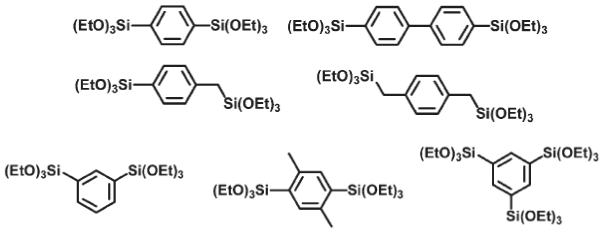
Dotychczas do szkieletu krzemianowego zastało wprowadzonych wiele różnych związków organicznych. Można jednak wyróżnić kilka głównych grup związków używanych do tego rodzaju syntez. Są nimi przede wszystkim łańcuchy alkilowe o różnej długości i wysyceniu, pochodne benzenu, związki heterocykliczne, związki sandwichowe czy pochodne amin.

Wprowadzane nasycone łańcuchy alkilowe nie przekraczają zwykledługości 10 węgli i zwykle są to alkany o parzystej ilości atomów węgla. Wśród nienasyconych węglowodorów, większym zainteresowaniem cieszą się alkeny, sililowane zarówno

z obu końców, jak i z terminalnymi wolnymi grupami winylowymi. Do szkieletu związku hybrydowego wprowadzić można również alkiny, jednak są to sporadyczne przypadki.

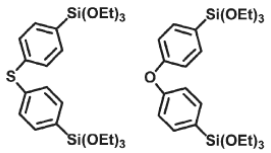


Do syntez wykorzystywane były różnorodne pochodne benzenu, zarówno te z grupami siloksanowymi przyłączonymi bezpośrednio do pierścienia (1,3, 1,4 lub 1,3,5), jak i sililowe pochodne toluenu, ksylenu. Niekoniecznie pochodne te muszą być symetryczne. Wprowadzić można również dwa pierścienie benzenowe połączone bezpośrednio lub przez łącznik, a nawet benzeny zawierające zarówno grupy trietoksysililowe, jak i inne podstawniki.

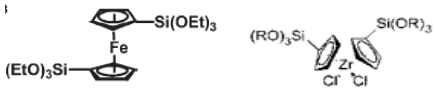


Wśród związków heterocyklicznych prym wiodą związki zawierające azot jako heteroatom, jednak zdarzają się również związki z atomem siarki – głównie pochodne tiofenu. Bardzo ciekawym przykładem tej grupy jest cykliczny triizocyjanian, wprowadzony do hybrydy organiczno-nieorganicznej, która posiada duże

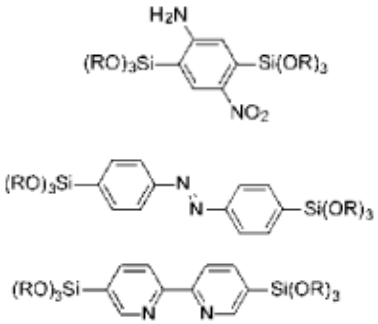
powinowactwo do jonów rtęci(II) i może być stosowany jako absorbent wyłapujący jony tego metalu.



Jedynymi wprowadzonymi dotychczas związkami sandwichowymi są: ferrocen z dwoma podstawnikami trietoksysililowymi oraz pochodna tytanowa czy też żelazowa.

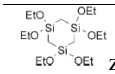


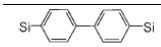
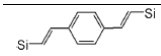
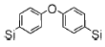
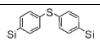
Występujące w szkielecie materiału hybrydowego aminy, mogą być różnorodne – od pierwszo- i drugorzędowych z prostymi łańcuchami, po podstawione związkami aromatycznymi. Spotkać się możemy również z podstawionymi amidami.



Na podstawie literatury [37-42] w tabelach 6-8 przedstawiono metody otrzymywania i charakterystyki właściwości strukturalnych nowych, uporządkowanych materiałów hybrydowych zawierających jednorodne pory.

Tabela 6. Przegląd warunków syntezy materiałów PMO otrzymanych w obecności kationowych, bądź też niejonowych surfaktantów.

Prekursor/środowisko	Surfaktant	Struktura	Rozmiar porów
zasadowe	CTAB	2D hex	3.1
	OTAC	2D hex, 3D hex	2.7-3.3
	CTAC	regularne	2.9–4.0
	C10–C18 TMACl	2D hex C16: regularna	3.0–4.4
kwaśne	Brij 76	2D hex	5.0
kwaśne	CPB	wormlike	2.8–3.1
	CTAB	2D hex/wormlike	2.2
	P123	2D hex/wormlike	6.0–20.0
	F127	cubic	5.6; 9.8
	LGE53	2D hex	7.9
	B50-6600	FDU-1-like	10.0
	Brij 76	2D hex	4.3–5.5
	Brij 56	2D hex	3.6–4.5
zasadowe	Brij 30/OTAC	cubic	2.8
obojętne	NiCl2/NH4F	2D hex	3.9–4.7
zasadowe	CTAB	2D hex	3.9
	OTAC	2D hex	3.3
kwaśne	P123	2D hex	8.0–8.6
	Brij 76	2D hex	3.9–5.1
	Brij 56	2D hex	4.0
 zasadowe	CTAC	-	2.2
kwaśne	CPC	2D hex	2.0
	P123	2D hex	7.4

	Brij 76	2D hex	3.5–3.9
	Brij 56	2D hex	3.5
zasadowe	OTAC	2D hex cryst.	3.8
	C14–C18 TMABr/TMACl	2D hex cryst	3.2–3.9
zasadowe	OTAC	2D hex cryst.	3.0
 zasadowe	OTAC	2D hex cryst.	3.5
 zasadowe	OTAC	2D hex cryst.	2.7–3.1
kwaśne	CPC	2D hex	<2.2
kwaśne→obojętne	CPC	2D hex	2.3
kwaśne→obojętne	CPC	2D hex	2.3
kwaśne→obojętne	CPC	Niskie uporządkowanie	2.3
kwaśne	Brij 56	Niskie uporządkowanie	2.9
 kwaśne	Brij 56	Niskie uporządkowanie	2.4
 kwaśne	Brij 76	wormlike	2.0–3.0
kwaśne	CPC	2D hex	-
	P123	2D hex	5.0–6.0
kwaśne	P123	2D hex	6.2
kwaśne	P123	2D hex	5.8

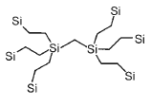
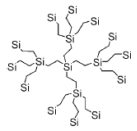
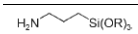
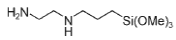
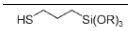
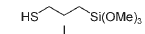
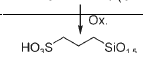
zasadowe	OTAC	-	2.5
	P123	-	8.2
	P123	-	9.1

Tabela 7. Przegląd syntez polegających na kokondensacji bis-sililowanych oraz monosililowanych prekursorów z użyciem jonowych lub niejonowych surfaktantów jako środków strukturotwórczych..

Bis-sililowany prekursor/ środowisko	Mono- lub bis-sililowany prekursor	Surfaktant	Zawartość w	
			mieszaninie reakcyjnej, %	finalnym produkcie, %
zasadowe		CTAB/Brij 30	25	n.d.
		CTAB/Brij 30	25	n.d.
		CTAC	25	17-18
		CTAC	25	13
		CTAC	25	21
	 	CTAC	50	33 (-SH) 15 (-SO_3H)

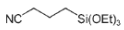
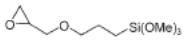
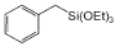
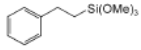
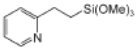
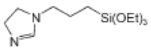
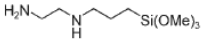
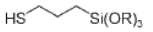
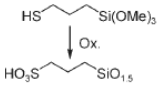
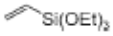
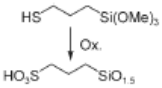
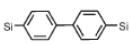
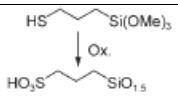
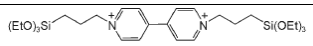
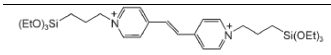
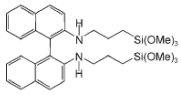
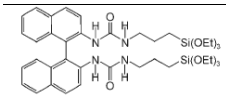
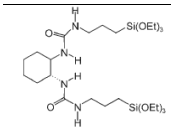
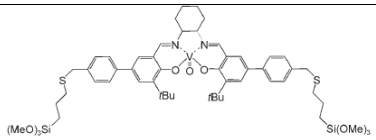
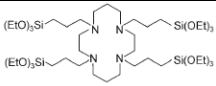
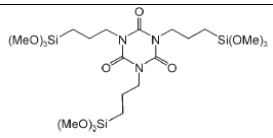
		OTAC	25	-
		CTAB	50	-
		CTAB/Brij 30	25	-
		CTAB/Brij 30	25	-
		CTAC	25	23
		CTAC	25	22
		CTAC	25	16
		CTAC	25	10
	$(H_3CO)_3$-Si-CH_2-CH_2-CH_2-NH-CH_2-CH_2-CH_2-Si-$(OCH_3)_3$	CTAB	25	13
kwaśne		CTAC	30	16
		Brij 76	40	-
		P123	30	-
		Brij 76	30	1.72 H+ mmol/g
zasadowe		CTAB	33	-
zasadowe		OTAC	67	24
 zasadowe		OTAC	70	-

Tabela 8. Przegląd metod syntezy materiałów otrzymanych na drodze kokondensacji TEOS z bis- lub multisililowanym prekursorem w obecności jonowych lub niejonowych surfaktantów.

Surfaktant /środowisko	Bis- lub multisilylowany prekursor	Zawartość w	
		mieszaninie reakcyjnej, %	finalnym produkcie, %
CTAB Zasadowe		1–15	-
		1.5–18	31
		5-50	7
		5-50	5
		5-50	6
		5-15	3
P123 obojętne		10	11
P123 kwaśne		10-90	90

W związku z niedawnym odkryciem uporządkowanych materiałów mezoporowatych, a także prężnie rozwijanymi metodami ich otrzymywania, perspektywa wykorzystania tych materiałów znacznie się rozszerza. Uporządkowane, nanoporowate materiały hybrydowe stwarzają nowe możliwości w adsorpcji i katalizie. Materiały te będą z pewnością stosowane jako nośniki katalizatorów, adsorbenty, sensory czy też jako doskonałe materiały elektrodowe.

Podziękowania:

Podziękowania dla Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego za finansowe wsparcie w ramach projektu badawczego „Nowe kompozyty zawierające niob – hybrydy nanoporowatych niobokrzemianów ze związkami organicznymi – przeznaczone do procesów utleniania przyjaznych dla środowiska" (N204 084 31/1965) oraz dla Fundacji na rzecz Nauki Polskiej za dofinansowanie doposażenia chromatografu gazowego (zakupionego w ramach ww. grantu) w detektor masowy typu pułapka jonowa (program Novum 9/2007).

Wykaz i objaśnienia ważniejszych akronimów, skrótów i symboli stosowanych w tekście

2D hex	– struktura 2D heksagonalna
Cab-O-Sil	– nieporowata krzemionka o dużej powierzchni właściwej, otrzymywana przez hydrolizę płomieniową $SiCl_4$ (*fumed silica*)
CMC	*critical micellar concentration* – krytyczne stężenie micelowania
CPB	– bromek cetylopyridiniowy
CPC	– chlorek cetylopyridiniowy
CTA^+	– kation heksadecylotrimetyloamoniowy
CTAB	– bromek heksadecylotrimetyloamoniowy
CTEAB	– bromek heksadecylotrietyloamoniowy
CTAC	– chlorek heksadecylotrimetyloamoniowy
EO	*poliethylene oxide* – polioksyetylen

FDU-1	– mezoporowate sita molekularne – struktura regularna, budowa klatkowa
M41S	– rodzina mezoporowatych sit molekularnych
MCM-41	– mezoporowate sita molekularne – 2D struktura heksagonalna, P6mm
MCM-48	– mezoporowate sita molekularne – 3D struktura regularna, Ia3d
OTAB	– bromek oktadecylotrimetyloamoniowy
OTAC	– chlorek oktadecylotrimetyloamoniowy
PEO	*polyetylene oxide* – polioksyetylen
PPO	*polypropylene oxide* – polioksypropylen
PXXX	– kopolimer trójblokowy o ogólnym wzorze $HO(EO)_x(PO)_y(EO)_xH$, np. P123 – $HO(EO)_{20}(PO)_{70}(EO)_{20}H$
SBA-1	– mezoporowate sito molekularne – struktura regularna, $Pm\bar{3}n$
SBA-2	– mezoporowate sito molekularne – struktura heksagonalna, $P6_3/mmc$
SBA-3	– mezoporowate sito molekularne –struktura 2D heksagonalna, P6mm
SBA-6	– mezoporowate sito molekularne – struktura regularna, $Pm\bar{3}n$
SBA-7	– mezoporowate sito molekularne – struktura heksagonalna, $P6_3/mmc$
SBA-15	– mezoporowate sito molekularne – struktura heksagonalna, P6mm; mikroporowatość zlokalizowana w ścianach materiału
TEA	– trietanoloamina
TEOS	– tetraetoksysilan
TMOS	– tetraetoksysilan
worm-like	– struktura nieuporządkowana typu robakowatego.

Literatura:

1. V. Chila, J.E. Ritsko, C.D. Vanderpool, US Patent 3 556 725, 1971;
2. C.T. Kresge, M.E. Leonowicz, W.J. Roth, J.C. Vartuli, J.S. Beck, *Nature*, 1992, 359, 710; US Patent 5 098 684, 1992; US Patent 5 102 643, 1992;

3. J.S. Beck, J.C. Vartuli, W.J. Roth, M.E. Leonowicz, C.T. Kresge, K.D. Schmitt, C.T.-W. Chu, D.H. Olson, E.W. Sheppard, S.B. McCullen, J.B. Higgins, J.L. Schlenker *J. Am Chem. Soc.*, 1992, 114, 10834;
4. T. Asefa, M. J. MacLachlan, N. Coombs and G. A. Ozin, Nature, 1999, 402, 867;
5. B. J. Melde, B. T. Holland, C. F. Blanford and A. Stein, Chem. Mater., 1999, 11, 3302;
6. S. Inagaki, S. Guan, Y. Fukushima, T. Ohsuna and O. Terasaki, J. Am. Chem. Soc., 1999, 121, 9611;
7. A. Sayari, [w:] *Recent Advances and New Horizons in Zeolite Science and Technology*, H. Chon et al. (Eds.), Elsevier Science B.V., Amsterdam, 1996, *Stud. Surf. Sci. Catal.*, 1996, 102, 1;
8. D. M. Antonelli, J. Y. Ying, Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 1996, 1, 523;
9. J. S. Beck, J. C. Vartuli, Curr. Opin. Solid State Mater. Sci. 1996, 1, 76;
10. A. Corma, Top. Catal. 1997, 4, 249;
11. D. Y. Zhao, P. D. Yang, Q. S. Huo, B. F. Chmelka, G. D. Stucky, Curr. Opin. Solid State Mater. Sci. 1998, 3, 111;
12. U. Ciesla, F. Schuth, Microporous Mesoporous Mater. 1999, 27, 131;
13. G. Oye, J. Sjoblom, M. Stocker, Adv. Colloid Interface Sci. 2001, 89, 439;
14. P. Selvam, S. K. Bhatia, C. G. Sonwane, Ind. Eng. Chem. Res. 2001, 40, 3237;
15. A. Davidson, Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 2002, 7, 92;
16. F. Schuth, Angew. Chem., Int. Ed. 2003, 42, 3604;
17. A. E. C. Palmqvist, Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 2003, 8, 145;
18. G. Soler-Illia, E. L. Crepaldi, D. Grosso, C. Sanchez, Curr. Opin.Colloid Interface Sci. 2003, 8, 109;
19. A.Stein, Adv. Mater. 2003, 15, 763;
20. D. Grosso, F. Cagnol, G. Soler-Illia, E. L. Crepaldi, H. Amenitsch, A. Brunet-Bruneau, A. Bourgeois, C. Sanchez, Adv. Funct. Mater. 2004, 14, 309;

21. Q. Y. Sun, E. G. Vrieling, R. A. van Santen, N. Sommerdijk, Curr. Opin. Solid State Mater. Sci. 2004, 8, 111;
22. D. Y. Zhao, B. Z. Tian, X. Y. Liu, [w:] Mesoporous Crystals and Related Nano-Structured Materials; O. Terasaki, Ed.; Studies in Surface Science and Catalysis, Vol. 148; Elsevier Science Bv: Amsterdam, 2004;
23. A. Berggren, A. E. C. Palmqvist, K. Holmberg, Soft Matter 2005, 1, 219;
24. B. Smarsly, M. Antonietti, Eur. J. Inorg. Chem. 2006, 1111;
25. Y. Wan, Y. F. Shi, D. Y. Zhao, Chem. Commun. 2007, 897;
26. Y. Wan, D. Y. Zhao, Chem. Rev 2007, 107, xxx;
27. C. C. Landry, S. H. Tolbert, K. W. Gallis, A. Monnier, G. D. Stucky, F. Norby, J. C. Hanson, Chem. Mater. 2001, 13, 1600;
28. C. J. Brinker, G. W. Scherer, Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing; Academic Press: New York, 1990;
29. C. Boissiere, A. Larbot, C. Bourgaux, E. Prouzet, C. A. Bunton, Chem. Mater. 2001, 13, 3580;
30. C. Z. Yu, J. Fan, B. Z. Tian, D. Y. Zhao, Chem. Mater. 2004, 16, 889;
31. U. Henriksson, E.S. Blackmore, G.J.T. Tiddy, O. Söderman, J. Phys. Chem., 1992, 96, 3894;
32. C. Z. Yu, J. Fan, B. Z. Tian, G. D. Stucky, D. Y. Zhao, J. Phys.Chem. B 2003, 107, 13368;
33. S. Namba, A. Mochizuki, M. Kito, [w:] *Mesoporous Molecular sieves 1998,* L. Bonneviot (Eds), Elsevier, Amsterdam, 1998, *Stud. Surf. Sci. Catal.*, 1998, 117, 257; *Chem. Lett.*, 1998, 569;
34. G.D. Stucky, D. Zhao, P. Yang, W. Lukens, N. Melosh, B.F. Chmelka, [w:] *Mesoporous Molecular sieves 1998,* L. Bonneviot (Eds), Elsevier, Amsterdam, 1998, *Stud. Surf. Sci. Catal.*, 1998, 117, 1;
35. P. Van Der Voort, M. Mathieu, F. Mess, E.F. Vansant, J. Phys. Chem. B, 1998, 102, 8847;

36. J. W. Tang, C. Z. Yu, X. F. Zhou, X. X. Yan, D. Y. Zhao, Chem. Commun. 2004, 2240;
37. A. Sayari, S. Hamoudi,Y. Yang, I. L. Moudrakovski, J.R. Ripmeester, Chem. Mater. 2000, 12, 3857;
38. B. Hatton, K. Landskron, W. Whitnall, D. Perovic, G.A. Ozin, Acc. Chem. Res. 2005, 38, 305;
39. W.J. Hunks, G.A. Ozin, J. Mater. Chem., 2005, 15, 3716;
40. J.A. Melero, R. van Grieken, G. Morales, Chem. Rev. 2006;
41. M. P. Kapoor, S. Inagaki, Bull. Chem. Soc. Jpn., 2006, 79, 1463;
42. F. Hoffmann, M. Cornelius, J. Morell, M. Froeba, Angew. Chem. Int. Ed. 2006, 45, 3216.

Rozdział 7

Jonofory naturalne - salilomycyna

Arleta Skotowska, Radosław Pankiewicz i Grzegorz Schroeder
Uniwersytet im. A. Mickiewicza, Wydział Chemii,
Grunwaldzka 6, 60-780 Poznań

Ogólna charakterystyka

Kilkadziesiąt lat intensywnych badań w chemii supramolekularnej doprowadziło do otrzymania różnych syntetycznych klas związków makropolicyklicznych, spełniających funkcje supracząsteczek, znanych z układów biologicznych. Związki te posiadają zdolność rozpoznawania indywiduów chemicznych i ich selektywnego transportu. Dzięki rozpoznaniu molekularnemu mogą być zastosowane jako specyficzne przestrzenne katalizatory.

Antybiotyki (z gr. *Anti* – przeciw; *bios* – życie) definiujemy jako związki chemiczne: naturalne, wytwarzane przez organizmy żywe oraz syntetyczne – produkowane przez człowieka, które stosowane są w lecznictwie jako leki przeciwdziałające infekcjom wywoływanym przez drobnoustroje.

Jonofory (z gr. *Ion* – jon; *phore* – nośnik) definiujemy jako nośniki (akceptory) cząstek naładowanych np.: kationów Na^+, K^+, czy Ca^{2+}, które tworząc kompleksy z tymi kationami mogą je transportowa poprzez membrany (błony) biologiczne[1, 8].

Antybiotyki jonoforowe możemy zatem zdefiniować jako związki chemiczne, naturalne, bądź produkowane przez człowieka, których działanie lecznicze związane jest ze zdolnością do przenoszenia cząstek naładowanych poprzez błony biologiczne.

Aktywność biologiczna antybiotyków jonoforowych po raz pierwszy została rozpoznana na podstawie ich działania na metabolizm w mitochondriach. Badania przeprowadzone na walinomycynie, nigerycynie oraz dianemycynie pokazały, że walinomycyna ma duży wpływ na fosforylację oksydacyjną, natomiast dwa pozostałe antybiotyki mają wpływ na produkcję związków selektywnie inhibitujących oddychanie mitochondrialne[19,20]. Uznano wówczas, iż antybiotyki te są prototypami związków jonoforowych. Związki te możemy podzielić je na dwie grupy:

a) jonofory obojętne (np. walinomycyna), które tworzą z kationami naładowane elektrycznie kompleksy, podczas transportu których obniżony zostaje gradient elektrochemiczny;
b) jonofory karbocykliczne (np. nigerycyna), które tworzą z kationami elektrycznie obojętne kompleksy obojnacze, których transport jest przyspieszony i polega on na elektrycznie obojętnej wymianie kationów poprzez błony biologiczne na drodze dyfuzji np. wymiana Na^+ na K^+ [8, 2, 19].

W drugiej połowie lat czterdziestych XX wieku zaczęto dodawać do pasz antybiotyki. W handlu pojawia się nowa grupa antybiotyków tzw. antybiotyki paszowe. W Polsce antybiotyki paszowe zaczęto stosować na większą skalę dopiero w latach 1968-1970. Znaczną grupę antybiotyków paszowych stanowią antybiotyki jonoforowe, których działanie, w odróżnieniu od antybiotyków stosowanych leczniczo, polega głównie na zapobieganiu rozwojowi chorób w stadzie zwierząt otrzymujących dodatki z ich udziałem, poprzez stabilizację flory przewodu pokarmowego. Dzięki stosowaniu dodatku antybiotyków do paszy ginie znaczna część flory chorobotwórczej.

Spośród 130 rodzajów antybiotyków zastosowanie w żywieniu zwierząt – jako antybiotyki paszowe – znalazło zastosowanie około 20. W Polsce zarejestrowanych i stosowanych jest tylko kilka. Z żywieniowego punktu widzenia obecność antybiotyków w paszy powoduje pocienienie ścianek przewodu pokarmowego (jelit) oraz lepsze ich ukrwienie. Dzięki tym zmianom w budowie anatomicznej obserwuje się zwiększone wchłanianie składników

pokarmowych ze światła jelit. Dotyczy to zarówno związków azotowych, cukrów prostych, a także witamin i składników mineralnych. Poprawa strawności powoduje, że z tej samej porcji paszy zwierzę może wykorzystać więcej składników pokarmowych na przemiany podstawowe lub do produkcji. W ten sposób poprawia się wykorzystanie paszy.

Jednocześnie stabilizacja flory bakteryjnej, czyli hamowanie namnażania się bakterii niekorzystnych, a sprzyjanie rozwojowi bakterii pożądanych w przewodzie pokarmowym sprzyja lepszemu wykorzystaniu składników zawartych w paszy. Następuje zmniejszenie rozkładu białek i węglowodanów pod wpływem enzymów bakteryjnych w dalszych odcinkach przewodu pokarmowego. Mniejsza aktywność bakterii objawia się także zmniejszoną produkcją metabolitów, które niekorzystnie lub wręcz toksycznie działają na organizm zwierzęcia (amoniak, kadaweryna, putrescyna).

W żywieniu zwierząt mogą być stosowane tylko te antybiotyki które: nie są stosowane w lecznictwie, a zwłaszcza w leczeniu człowieka, nie powodują powstawania odpornych szczepów bakterii, antybiotyki dodawane do pasz nie powinny ponadto wchłaniać się z przewodu pokarmowego, a tym bardziej przechodzić do produktów zwierzęcych, a więc powinny być wydalane w całości z kałem. Obecnie ważną cechą antybiotyków dopuszczonych do stosowania w żywieniu zwierząt jest ich nieszkodliwość i szybki rozkład w środowisku po wydaleniu z organizmu zwierzęcia.

W żywieniu zwierząt gospodarskich stosowane są następujące antybiotyki paszowe:

- polipeptydowe – bacytracyna i jej pochodne (np. cynk bacytracyna), virgniamycyna,
- makrolidowe – tylozyna i jej pochodne,
- flavofosfolidowe – flavomycyna,
- glukopeptydowe – avoparcyna,
- oligosacharydowe – avilamycyna,

- polieterowe – salinomycyna, narazyna, sól sodowa monenzyny i pochodne, sól sodowa kwasu lasalowego.

Najczęściej antybiotyki znajdują się w premiksach, gotowych mieszankach przemysłowych lub koncentratach białkowych. Przeznaczone są one przede wszystkim dla zwierząt monogastrycznych – świń i drobiu, a także bydła. Antybiotyki paszowe odgrywają ogromne znaczenie w produkcji zwierzęcej z trzech powodów:

1. zmniejszenia zużycie paszy w produkcji zwierzęcej;
2. większego wzrostu masy ciała przy zmniejszeniu dawek pokarmowych;
3. zmniejszenia ilości zachorowań zwierząt, wpływających na efektywność i opłacalność hodowli.

Najważniejsze antybiotyki stosowane jako dodatki do pasz to:

1. Awilamycyna
2. Bacytracyna
3. Chlorotetracyklina
4. Erytromycyna
5. Flawomycyna
6. Griseofulwina
7. Hygromycyna
8. Kormogrizyna
9. Linkomycyna
10. Monenzyna
11. Neomycyna
12. Nowobiocyna
13. Nystatyna
14. Oksytetracyklina
15. Oleandomycyna
16. Penicylina
17. Salinomycyna
18. Spiramycyna

19. Tiamulina
20. Tylozyna
21. Wirginiamycyna

W UE stworzono system prawny, który ściśle reguluje wielkość i rodzaj stosowanych antybiotyków w paszach. W prawodawstwie polskim nie ma uregulowań prawnych określających pozostałości leków, w tym antybiotyków w paszach w produkcji zwierzęcej.

Struktura chemiczna antybiotyków jonoforowych

Antybiotyki jonoforowe określić możemy jako karbocykliczne kwasy jonoforowe, które pod względem chemicznym występują zazwyczaj w formie otwartych łańcuchów molekuł, składających się z szeregu heterocyklicznych pierścieni zawierających liczne połączenia eterowe. Jonofory polieterowe zawierają w swej strukturze przeważnie karbocykliczne grupy kwasowe lub grupy estrowe, przyłączone do pierścieni tetrahydrofuranowych lub tetrahydropiranowych. Jonofory te chętnie tworzą rozpuszczalne w tłuszczach, cykliczne kompleksy z kationami takimi jak Li^{+}, Na^{+}, K^{+}, Cs^{+}, NH_4^{+}, Ca^{2+}, Mg^{2+} i Cu^{2+} [3-6]. Tworzenie kompleksów możliwe jest dzięki obecności eterowych i karbonylowych atomów tlenu, które koordynują jony metali.

Właściwości fizyczne i chemiczne

Jonofory rozpatrywane mogą być jako cząsteczki posiadające różnorodną strukturę łańcucha głównego, zawierającym strategicznie umiejscowione atomy tlenu. Łańcuch główny jest zdolny do przyjmowania krytycznych konformacji co prowadzi do koncentracji atomów tlenu wokół miejsca, w którym umiejscowiony został skompleksowany kation. Ligandy tlenowe zawierają różne grupy funkcyjne. Obojętny ligand tlenowy łączy się z kationem poprzez jonowo-dipolowe wiązanie, analogicznie jak to się dzieje podczas rozpuszczania jonów w wysoce dielektrycznym rozpuszczalniku.

Pod względem fizycznym antybiotyki jonoforowe wystepują zazwyczaj jako ciała stałe w postaci krystalicznego proszku, które dostępne są jako sole sodowe [$(M-H)^-Na^+$]. Większość antybiotyków jonoforowych rozpuszczalna jest m.in. w acetonie, chloroformie, eterze, benzenie, metanolu i praktycznie nierozpuszczalna w wodzie.

Znaczna część antybiotyków jonoforowych nie wykazują zdolności do absorbowania promieniowania UV, dlatego też w celu zanalizowania danego związku otrzymywane są pochodne z absorbującymi UV składnikami. W celu określenia struktury antybiotyków jonoforowych stosuje się często wysoce skuteczną, podwójną analizę MS (MS/MS).

Antybiotyki jonoforowe wykazują dużą aktywność biologiczną wobec m.in. gram-pozytywnych bakterii, prątków i grzybów.

Właściwości antybiotyków jonoforowych są ściśle powiązane z ich budową chemiczną. Jonofory polieterowe wykazują wysoką aktywność biologiczną, która jest wynikiem zdolności tychże związków do kompleksowania i transportu metali poprzez membrany biologiczne, jak również zdolności do oddysocjowania kwasów lub obojętnych kompleksów[6].

Transport cząstek naładowanych poprzez błony biologiczne

Transport związków poprzez błony biologiczne jest procesem składającym się z czterech etapów:

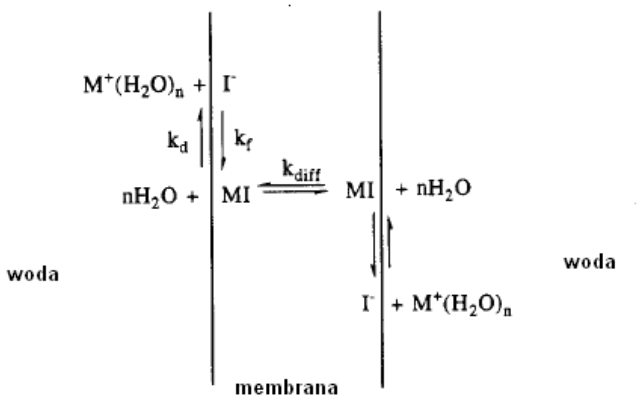
1. rozpoznanie substratu przez cząsteczkę nośnika i utworzenie kompleksu
2. dyfuzja utworzonego kompleksu przez membranę
3. odtworzenie nośnika po drugiej stronie membrany (dekompleksowanie)
4. powtórna dyfuzja wolnego nośnika przez membranę[1].

Aby penetracja błon biologicznych przez antybiotyki jonoforowe była możliwa jon metalu musi najpierw utracić otoczkę solwatacyjną i przez to stać się dostępny dla jonoforu, to znaczy musi utworzyć wiązanie z jonoforem.

Następnie w formie kompleksu może dyfundować poprzez błonę biologiczną i przejść odwrotny proces po drugiej stronie membrany.

Podczas tego procesu konieczne jest aby molekuły mogły zmienić swoją konformację oraz utworzyły za pomocą wiązania wodorowe trwały kompleksy jonem metalu. W celu zainicjowania transportu czynnego, który jest niezbędny do uzyskania wysokiej aktywności biologicznej, konieczny jest szybki proces kompleksacji i dekompleksacji. Zmienia to znacznie wymagania mobilności konformacyjnej pomiędzy składnikami heterocyklicznymi, jak również powoduje łatwą zmianę wiązań wodorowych pomiędzy cząsteczkami.

Wysoce prawdopodobny mechanizm transportu metali poprzez błony biologiczne został przedstawiony na Rys. 1.



Rysunek 1. Mechanizm transportu jonów metali przez błony biologiczne za pośrednictwem antybiotyków jonoforowych[9]

W fizjologicznym pH główna grupa kwasowa jonoforów jest prawdopodobnie zjonizowana i uwięziona w wodnym środowisku, blisko powierzchni błony biologicznej. Reszta cząsteczki, która jest bardziej lipofilowa będzie znajdowała się w środku, pomiędzy dwoma warstwami błony. W początkowym etapie transportu jon metalu (M^+) zbliża się do jonoforu i inicjuje utworzenie wiązania z ujemnie naładowaną grupą

karboksylową. Cząsteczki posiadające zsolwatowaną wodę zostają następnie przesunięte na odległość wystarczającą na to, aby eterowe atomy tlenu w cząsteczce jonoforu (I^-) wytworzyły wiązanie konieczne do utworzenia obojętnego kompleksu (MI). Nawet jeśli reakcja ta jest wielostopniowa możemy określić ją za pomocą jednej stałej szybkości k_f. Otrzymany kompleks dyfunduje poprzez błonę z szybkością określoną przez współczynnik k_{dff}. Na przeciwnej powierzchni błony biologicznej zachodzi odwrotny proces, którego stała szybkości może być oznaczona jako k_d. Jonofor został teraz uwięziony po przeciwnej stronie błony i potrzebuje przereagować z następnym kationem i dyfundować z powrotem, zanim zrekonstruowana zostanie oryginalna powierzchnia membrany.

Antybiotyki jonoforowe wykazują znaczą selektywność w wyborze jonów metali alkalicznych. Selektywność ta może być opisana:

a) kinetycznie – tzn. który jon jest transportowany z największą szybkością
b) termodynamicznie – tzn. który jon jest najsilniej związany z antybiotykiem jonoforowym [17].

Selektywność jonoforu w stosunku do kationów litowców i berylowców wynika zarówno z jego trójwymiarowej struktury, jak i różnicy energii desolwatacji i kompleksowania. Selektywność walinomycyny charakteryzuje np. 10 000 razy większe powinowactwo do jonów potasu w porównaniu z powinowactwem do jonów sodu. Monenzyna wykazuje uprzywilejowaną selektywność w stosunku do Na^+ w stosunku do K^+, wynoszącą jak 10 do 1, a stosunek współczynników selektywności K^+ do Na^+ dla innego jonoforu - nigerycyny wynosi 100.

Jedną z najlepszych metod badania transportu metali poprzez błony biologiczne jest wykorzystanie analizy NMR, ponieważ każdy metal alkaliczny posiada aktywne dla NMR jądro atomowe. Szczegółowa analiza związków makrocyklicznych, potencjalnych jonoforów, skupia się generalnie na kilku czynnikach związanych z procesem kompleksowania jonów. Są to: polarność

wnęki, lipofilowość powierzchni, wiązania wodorowe utrzymujące strukturę oraz zdolność transportowania[9, 18].

Klasyfikacja jonoforów ze względu na rodzaj transportu, w którym biorą udział

A. Jonofory obojętne

Przykładem jonoforu obojętnego jest walinomycyna, której cząsteczka pokazuje, iż jest ona pozbawiona jonizujących lub innych aktywnych grup funkcjonalnych. (Rys.3.). Jej specjalne właściwości związane są z jej zdolnością do przechodzenia jej łańcucha głównego w precyzyjną konformację koncentrującą 6 karbonyli estrowych na powierzchni kulistej. Kompleks walinomycyny otrzymuje ładunek od skompleksowanego jonu. Na rysunku 2A przedstawiony został uproszczony obraz transportu jednowartościowych jonów przez jonofory obojętne. Jonofor występujący wewnątrz błony (a) dyfunduje do granicy międzyfazowej (b) gdzie natrafia na zdolny do skompleksowania jon. Kiedy jon znajduje się w odpowiedniej pozycji, pozwalającej na zajście reakcji z jonoforem (c) zostaje on pozbawiony zsolwatowanej wody i wymieniony z ligandem tlenowym jonoforu (d). Stabilny kompleks (M^+ + I) dyfunduje następnie z granicy międzyfazowej do wnętrza membrany, gdzie zachodzi proces *f-h* (proces odwrotny do *b-d).* W końcowym etapie pozbawiony jonu jonofor dyfunduje z powrotem do membrany (i), gdzie przywrócona zostaje mu wyjściowa forma. W przypadku tego rodzaju transportu stężenie (M^+), w określonym miejscu membrany, ma wpływ na reakcje sprzęgające *b-d* i *f-h.*

B. Jonofory karbocykliczne

Jonofory karbocykliczne zaliczane są do klasy naturalnie występujących jonoforów. W ich budowie chemicznej zauważyć możemy obecność otwartego łańcucha głównego zawierającego utlenione, heterocykliczne pierścienie oraz terminalną grupę karboksylową. Wszystkie jonofory karboksylowe, mimo obecności otwartego łańcucha, mogą tworzyć formy pierścieniowe. Obecna tu

grupa karboksylowa może (np. nigerycyna) ale nie musi (np. monensyna) być zaangażowana w tworzenie ligandu tlenowego.

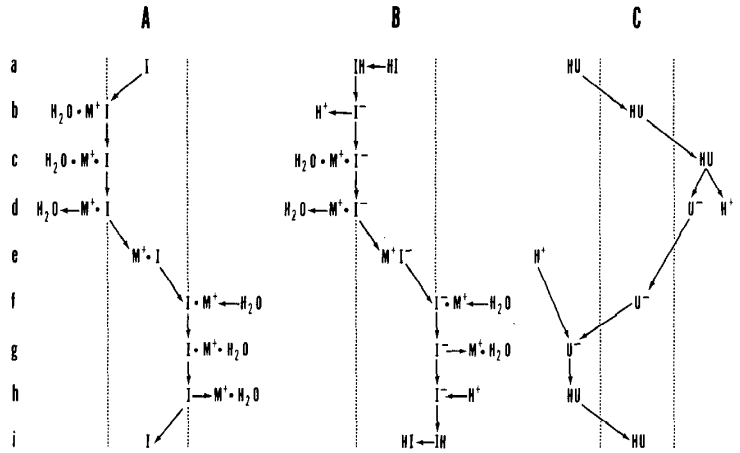
Jonofory karboksylowe tworzą kompleksy kationowe tylko wówczas, gdy występują w ich deprotonowanej formie anionowej i transportują jony jako obojętne elektrycznie jony obojnacze. Jakkolwiek wiadomo, iż mogą one brać udział również w ujemnym typie transportu, gdzie występują jako kompleksy wielocząsteczkowe. Gdy wystepują w ich protonowanej formie karboksylowej zdolne są również do transportu protonów.

Transport z udziałem jonoforów karbocyklicznych zilustrowany jest na rysunku 2B. Protonowane jonofory wewnątrz membrany dyfundują do granicy międzyfazowej, gdzie uwolnione zostają ich protony. Następnie jonofor wychwytywany jest przez polarną granicę międzyfazową, co jest wynikiem wzrostu polarności naładowanej formy anionowej. Anionowa forma jonoforu napotyka na zdolny do skompleksowania jon (M^+) i zachodzi proces kompleksowania, podczas którego następuje wymiana zsolwatowanej wody. Wewnętrzny ładunek kompleksu obojnaczego zostaje wyrównany, dzięki czemu jonofor jest zdolny do oderwania się od granicy międzyfazowej, dyfuzji do przeciwnej powierzchni błony i uwolnienia kationu przy równoczesnej jego resolwatacji. Jeśli jonofor anionowy zdolny jest do połączenia z protonem, w konsekwencji czego następuje obniżenie jego polarności, będzie to pozwalało na opuszczenie granicy międzyfazowej przez protonowany jonofor i powrotu do wnętrza membrany, gdzie będzie on dostępny dla następnego cyklu wymiany (M^+) na (H^+).

W klasycznych warunkach jonofory karboksylowe zachowują się jak przenośnik w wymianie zachodzącej na drodze dyfuzji, podczas gdy jonofory obojętne mogą być jednocześnie nośnikami elektrogenicznymi (jeśli zmieniają istniejący uprzednio potencjał błonowy) lub nośnikami elektroforetycznymi (jeśli przenoszą jony pod stałym silnym kierunkiem, narzuconym przez potencjał).

C. Jonofory zdolne do formowania kanałów błonowych.

Przykładem tego rodzaju antybiotyków jonoforowych jest gramicydyna, która charakteryzuje się znacznie większą szybkością transportu w porównaniu m.in. z walinomycyną. Duża szybkość transportu wskazuje, że przejście poprzez błony biologiczne, na drodze różnych mechanizmów, związane jest ze zdolnością gramicydyny do formowania kanałów przewodnictwa jonowego (Rys.2C).



Rysunek 2. Rodzaje transportu z udziałem różnych jonoforów: A jonofory obojętne; B jonofory karboksylowe; C czynniki nie sprzężone (transport czysto protonowy)[6]

Selektywność jonowa jonoforów

Antybiotyki jonoforowe wykazują różnice w selektywności kompleksowanych związków, co związane jest m.in. z rodzajem jonoforu, jego budową chemiczną i masą cząsteczkową, jak i charakterem chemicznym kompleksowanej cząsteczki. Poniżej przedstawiona została selektywność jonowa wybranych jonoforów.

<u>Jonofory obojętne:</u>

Walinomycyna (MS 1110) Rb>K>Cs>Ag>TI>>NH_4>Na>Li >Ba>Ca>Sr>Mg

Nonaktyna (MS 336) NH_4>K=Rb>Cs>Na

Monaktyna (MS 750) NH_4>K>Rb>Cs>Na>Ba

Jonofory karbocykliczne:

Nigerycyna (MS 724) K >Rb>Na>Cs>>Li

Lasalocid (MS 590) Cs>Rb~K>Na>Li, Ba>Sr>Ca>Mg

Salinomycyna (MS 706) Na> K> Co> Cu> Mn>Mg> Ca> Li

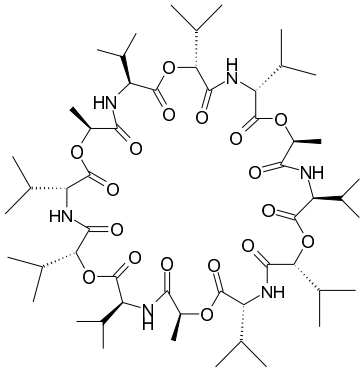
Jonofory tworzące kanały błonowe:

Gramicydyna A (przewodnictwo jest niezależne od napięcia) (MS 1700) H>Cs~Rb>NH_4>K>Na>Li

Monazomycyna (przewodnictwo jest zależne od napięcia) (MS 1422) Cs>Rb>K>Na>Li [6, 21, 31, 36, 37, 38, 39].

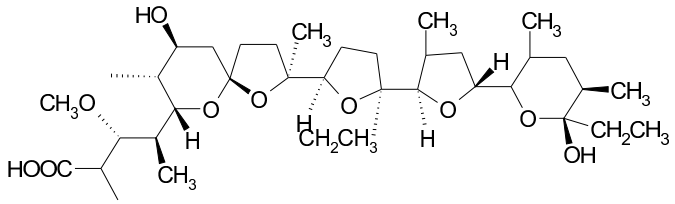
Przykłady związków należących do grupy antybiotyków jonoforowych

Walinomycyna – antybiotyk jonoforowy, zaliczany do cyklicznych depsipeptydów (związki zbudowane na przemian z α-aminokwasów i β-hydroksykwasów), zawierający w cząsteczce wiązania kowalencyjne oraz 36 atomów w łańcuchu głównym. Łańcuch główny ma postać pofałdowanego naszyjnika, 4Å wysokiego i 10Å szerokiego. Kation znajdujący się w centrum cząsteczki koordynowany jest przez 6 karbonylowych atomów tlenu, które określić możemy jako ligandy[8, 15, 21, 22].



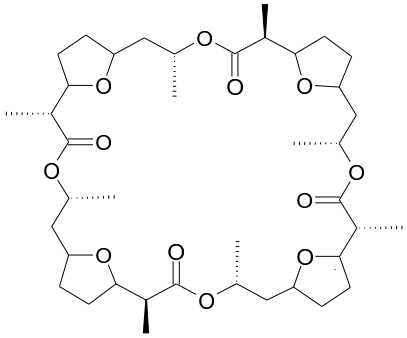
Rysunek 3. Struktura chemiczna walinomycyny[15]

Monensyna – typowy karbocykliczny jonofor z quasiliniowym ułożeniem haterocyklicznych pierścieni, które stabilizowane są przez wiązania wodorowe. Pofałdowany łańcuch główny zawiera 24 atomy. Monensyna tworzy chętnie kompleksy z jonami metali gdy występuje w formie zjonizowanej – formę zjonizowaną przyjmuje w fizjologicznym lub wyższym od fizjologicznego pH [8, 15, 21, 25].



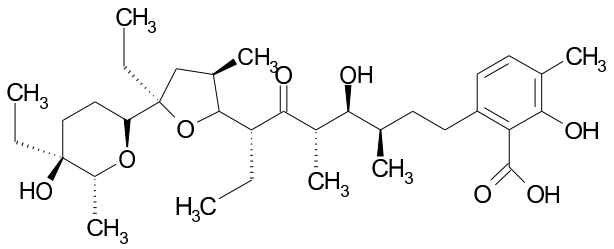
Rysunek 4. Struktura chemiczna monensyny[15]

Nonaktyna – antybiotyk jonoforowy zaliczany do cyklodepsydów, które składają się tylko z α-hydroksykwasów. W łańcuchu głównym zawiera 32 atomy połączone wiązaniami kowalencyjnymi. Łańcuch główny przyjmuje formę pofałdowanej konfiguracji, w której 4 karbonylowe i 4 heterocykliczne, eterowe atomy tlenu rozmieszczone są na wierzchołkach sześciennego ligandu kationowego [8, 15, 23, 24].



Rysunek 5. Struktura chemiczna nonaktyny[15]

Kwas lasalowy – Lasalocid – antybiotyk jonoforowy, którego łańcuch główny zawiera 20 atomów. Grupa karbocykliczna przyłączona jest do pierścienia aromatycznego. Lasalocid ma tendencję do tworzenia dimerów i z tego względu może tworzyć elektrycznie obojętne kompleksy z ważnymi biologicznie II wartościowymi jonami, takimi jak Ca^{2+} i Mg^{2+}. Jonofor ten wykazuje szeroki zakres zdolności kompleksotwórczych oraz transportowych obejmujących nie tylko nieorganiczne, wielowartościowe i alkaliczne jony metali ale także pierwszorzędowe aminy takie jak katecholaminy [8, 15, 29, 30, 31].



Rysunek 6. Struktura chemiczna lasalocidu[15]

Zastosowanie antybiotyków jonoforowych

Antybiotyki jonoforowe ze względu na ich właściwości biologiczne i farmakologiczne znalazły szerokie zastosowanie.

1. Zastosowanie techniczne:
    - w chromatograficznym rozdziale kationów racemicznych posiadających aktywność optyczną;
    - w syntezach organicznych wykorzystywana jest zdolność antybiotyków jonoforowych do zwiększania stopnia rozpuszczalności reagentów w rozpuszczalnikach, co wpływa na przyspieszanie reakcji saponifikacji (zmydlanie), oksydacji i redukcji odpowiednich związków organicznych;
    - do produkcji selektywnych elektrod jonowych (podczas gdy najlepsza K^+ selektywna szklana elektroda wykazuje 20:1 selektywność K^+ nad Na^+, elektroda, której podstawą w budowie

jest walinomycyna wykazuje selektywność 4000:1 K^+ nad Na^+, oraz selektywność K^+ nad NH_4^+ jak 100:1);

2. Biologiczne wykorzystanie jonoforów:
   - katalizują uwalnianie i wymianę K^+ na H^+ w mitochondriach w erytrocytach i mikrosomach w mózgu;
   - hamują proces fotofosforylacji;
   - regulują transport jonów w wielu systemach biologicznych np. w mięśniach;
   - hamują egzocytozę (pojawianie się wędrujących komórek zapalnych w naskórku) poprzez wpływ na uwalnianie histaminy z komórek tucznych;
   - wpływają na biologiczną aktywność sekrecji komórkowej;
   - wpływają na stymulację sercowo-naczyniową;
   - w medycynie nuklearnej stosowane m.in. do zobrazowania niewydolności zawałowej serca, w diagnozie guzów i innych stanów patologicznych.
   - eliminują toksyczne działanie metali ciężkich;
   - walinomycyna posiada zdolności do regulowania długotrwale obniżonego ciśnienia śródocznego, co sugeruje, iż antybiotyk ten posiada potencjalne zastosowanie w leczeniu jaskry;
3. Inne zastosowanie:
   - środki stosowane jako stymulatory wzrostu;
   - środki stosowane jako kokcydiostatyki paszowe - środki silnie hamujące rozwój pasożytniczych pierwotniaków m.in. z rodzaju *Coccidia* i *Eimeria* wywołujących kokcydiozę m.in. u bydła, królików, gołębi, drobiu;
   - środki stosowane w celu poprawy wskaźników wykorzystania paszy;
   - środki stosowane w celu poprawy stanu zdrowia i produkcyjności zwierząt hodowlanych (dodawanie antybiotyków jonforowych do

pożywienia dla przeżuwaczy powoduje zmniejszenie problemu wzdęć, poprzez inhibitowanie wzrostu bakterii odpowiedzialnych za produkcję nadmiaru śliny oraz wywoływanie kwasicy);

- środki przeciw bakteryjne - zwłaszcza przeciwko bakteriom Gram-dodatnim;
- środki przeciwmalaryczne;
- środki wspomagające apoptozę (śmierć) niektórych komórek nowotworowych[6, 14, 16];

Kokcydioza i kokcydiostatyki handlowe

Kokcydioza jest infekcją układu żołądkowo-jelitowego u ptaków i ssaków wywoływaną przez pasożytnicze pierwotniaki z podklasy *Coccidia*. Ważne wydarzenie w historii medycyny weterynaryjnej miało miejsce w 1968 roku, kiedy to grupa pracująca dla firmy Eli Lilly, wykazała, że monensyna podawana doustnie wykazuje silną aktywność leczniczą w leczeniu kokcydiozy. Z tego względu wiele laboratoriów rozpoczęło poszukiwania nowych jonoforów polieterowych i do 1995 roku ustalono ponad 120 struktur, włączając w to również leki handlowe, jak salinomycyna lasalocid i narazyna. Ze względu na wysoką toksyczność pozajelitową wykazywaną przez polietery, nie są one stosowane jako antybakteryjne leki kliniczne, jednak niskie dawki jonoforów stosowane są jako dodatki paszowe w celu zwiększenia stopnia wykorzystania pokarmów przez bydło, owce i kozy, poprzez kontrolowanie bakterii powodujących rozkład węglowodanów do kwasu pirogronowego u żwaczy[5, 40].

Niebezpieczeństwa mogące wynikać ze stosowania antybiotyków jonoforowych

Jonofory karbocykliczne wykazują zarówno pozytywne jak i negatywne właściwości. Z jednej strony posiadają one ważne ekonomicznie wartości dla hodowli bydła i drobiu, z drugiej strony brak dokładnych informacji na temat wpływu antybiotyków jonoforowych na różne procesy metaboliczne

w organizmach żywych, przyczynia się do ograniczenia ich farmakologicznego zastosowania. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, iż np. monensyna jest wysoko toksyczna dla koni, przez co zabronione jest jej wykorzystanie jako suplementu paszowego dla tych zwierząt. Raport sporządzony przez Matsouka pokazał, iż stosowanie monensyny w określonych dawkach, przy normalnym poziomie odżywienia bydła, ma różny wpływ na zwierzęta, i tak np. monensyna przy wielkości dawki 31 ppm dawała mały efekt, przy 125 ppm powodowała anoreksję i śmierć 1/3 zwierząt, a 279 ppm miało fatalne skutki dla wszystkich zwierząt którym podano tę dawkę. Dawka śmiertelna monensyny w przypadku koni wynosi około 2-3 mg/kg, natomiast dla bydła jest 10-krotnie większa.

Kilka raportów potwierdziło, iż monensyna ma również toksyczny wpływ na osoby pracujące przy jej produkcji lub przy dodawaniu ich do koncentratów paszowych. Pojawiające się symptomy to głównie: bóle głowy, nudności, krwawienie z nosa oraz wysypka na skórze.

Podobne właściwości toksyczne wykazują również pozostałe antybiotyki jonoforowe co przyczynia się do znacznego ograniczenia w ich stosowaniu[8, 32, 33, 34, 35].

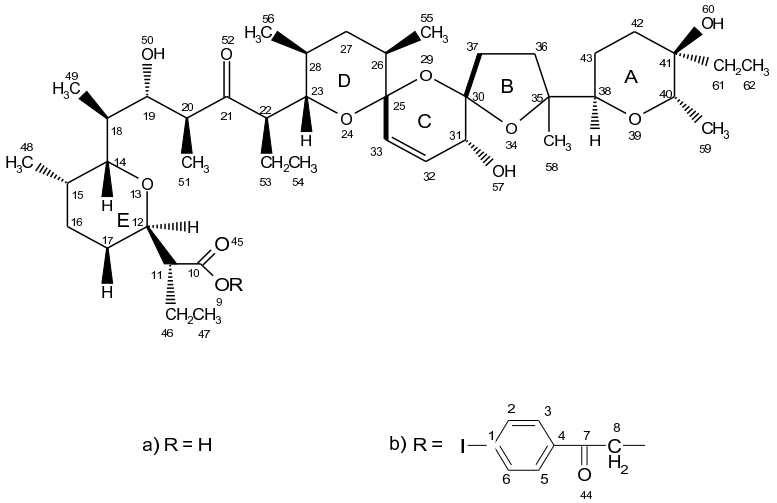
Salinomycyna -antybiotyk jonoforowy

Budowa cząsteczki

Salinomycyna jest jednym z przedstawicieli antybiotyków jonoforowych odkrytym i przedstawionym przez Kakena. Jako antybiotyk zarejestrowana została po raz pierwszy w Japonii w 1978 roku. Dzięki sukcesowi marketingowemu salinomycyna jest obecnie jednym z najlepiej sprzedających się antykoksystatycznych dodatków paszowych na świecie.

Salinomycyna jest monokarbocyklicznym, polieterowym antybiotykiem jonoforowym wyizolowanym z kultury bakterii (promieniowców) *Streptomyces albus*.

Struktura chemiczna salinomycyny ($C_{42}H_{70}0_{11}$) (a) ustalona została na drodze analizy X-ray estru p-jodofenancylu ($C_{50}H_{75}O_{12}$ I.) (b).



Rysunek 7. Struktura chemiczna a) salinomycyny, b) estru p-jodofenancylu salinomycyny

Salinomycyna posiada bardzo interesującą strukturę chemiczną wykazującą kilka znaczących różnic w porównaniu z pozostałymi antybiotykami jonoforowymi. Pierścienie B, C i D w cząsteczce salinomycyny tworzą unikatowy tricykliczny, spiroketalowy system pierścieni. Długość wiązania pomiędzy atomami C(32) i C(33) wynosi 1,33 Å, co wskazuje na występowanie tam wiązania podwójnego, zatem salinomycyna jest pierwszym przykładem antybiotyku jonoforowego zawierającym nienasycony pierścień (C) w swej strukturze. Na podstawie badań przeprowadzonych przez Haruyasu Kinashi'ego ustalono, iż ułożenie atomów w obrębie C(25) i C(30) tworzy czworościan, co dowodzi, że połączenia pomiędzy pierścieniami C i D oraz pierścieniami B i C są typu spiro.

W odróżnieniu od pozostałych antybiotyków jonoforowych, terminalna grupa hydroksylowa [O(60)H] oraz karbonylowa grupa estrowa mogą występować w dwóch różnych odległościach podczas tworzenia wiązania wodorowego. Jest to spowodowane tym, iż pierścień (A) może zmieniać swoją orientację przestrzenną. Zazwyczaj pierścień (A) zorientowany jest „w dół"

estrową grupą karbonylową, co powoduje, że cała cząsteczka przyjmuje konformację spiralną, a nie jak w przypadku pozostałych antybiotyków jonoforowych kolistą, co miałoby miejsce, gdyby pierścień (A) zorientowany był estrową grupą karbonylową „w górę".

Również pozostałe grupy hydroksylowe O(50)H oraz O(57)H w cząsteczce salinomycyny zaangażowane są w tworzenie wewnątrz cząsteczkowych wiązań wodorowych. Wiązania pomiędzy O(50)...O(34) i O(57)...O(39) wynoszą odpowiednio 2,81 i 2,93 Å. Tworzenie powyżej opisanych wiązań wodorowych jest możliwe gdyż kąty pomiędzy C(19)O(50)O(34) oraz C(31)O(57)O(39) wynoszą odpowiednio 144,1° i 114,3°. Atomy tlenu O(50) i O(52) w β-ketolu nie tworzą pomiędzy sobą wiązania wodorowego ponieważ kąt C(19)O(50)O(52) wynosi zaledwie 66,0°. Występujące w cząsteczce wiązania wodorowe wzmacniają spiralną konformację cząsteczki.

Większość atomów tlenu salinomycyny ukryta jest we wnętrzu cząsteczki co sprawia, iż wnętrze przyjmuje właściwości hydrofilowe, natomiast zewnętrzna powierzchnia posiada właściwości hydrofobowe. Z tego względu salinomycyna, tak jak pozostałe antybiotyki jonoforowe, chętnie tworzy kompleksy z jonami metali, w których jon metalu zostaje „uwięziony" w hydrofobowym centrum molekuły.

Pięcioczłonowy pierścień (B) w cząsteczce salinomycyny przyjmuje konformację kopertową, w której atom C(37) znajduje się powyżej płaszczyzny pierścienia tworzonej przez pozostałe cztery atomy występujące w tymże pierścieniu. Trzy sześcioczłonowe pierścienie (A, D, F) przyjmują konformację krzesełkową, natomiast sześcioczłonowy pierścień (C) przyjmuje konformację półkrzesełkową, ze względu na obecność wiązania podwójnego w pierścieniu.

W przypadku pierścienia (A) podstawniki C(35) i C(61) leżą ekwatorialnie, a C(59) oraz O(60) leżą aksjalnie w stosunku do płaszczyzny pierścienia. W pierścieniu (D) wszystkie podstawniki z wyjątkiem C(33), który leży aksjalnie, znajdują się w położeniu ekwatorialnym. Pierścień (E) zawiera

podstawnik ekwatorialny C(18) oraz dwa podstawniki aksjalne C(11) oraz C(48). Natomiast w pierścieniu (F) podstawniki C(26), C(37) i O(57) znajdują się w położeniu pseudoekwatorialnym, a podstawniki O(24) i O(34) pseudoaksjalnym[10, 11].

Grupy charakterystyczne występujące w cząsteczce salinomycyny

Salinomycyna w swej strukturze chemicznej zawiera:

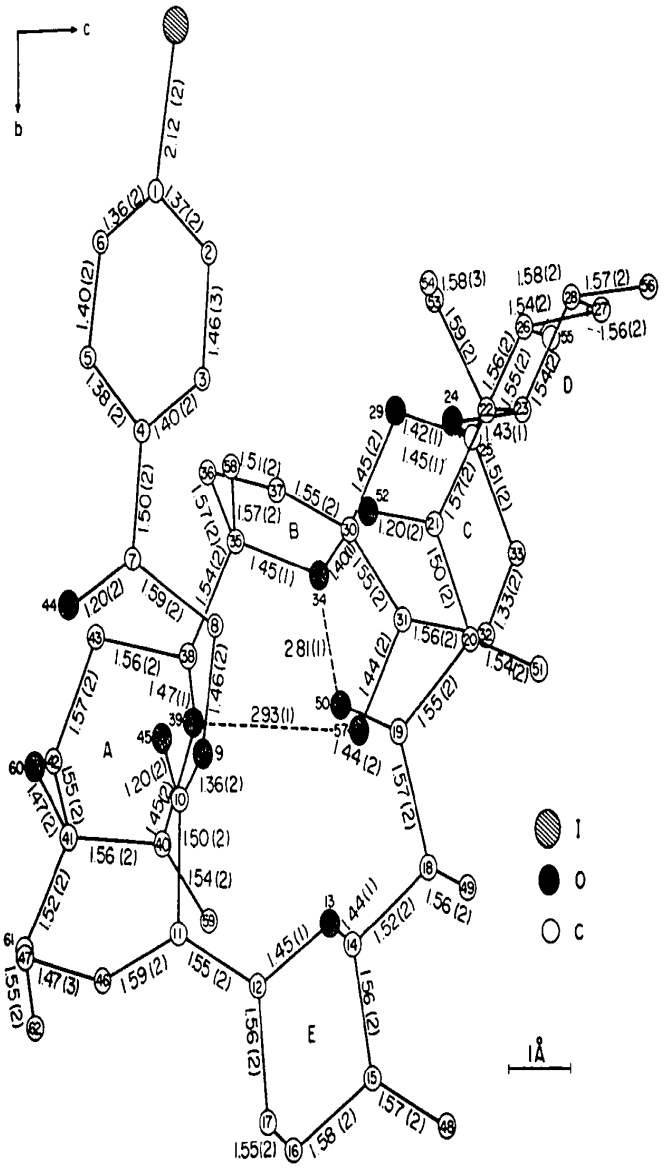
- cztery sześcioczłonowe pierścienie piranowe (A, C, D, E), w tym pierścień nienasycony (C);
- pięcioczłonowy pierścień furanowy (B);
- grupy hydroksylowe przy atomach węgla 19, 31, 41;
- karbonylowy atom tlenu przy atomie węgla 21;
- grupę karboksylową przy atomie węgla 11, która nadaje salinomycynie właściwości kwasowe [10, 11].

Długości wiązań w cząsteczce salinomycyny

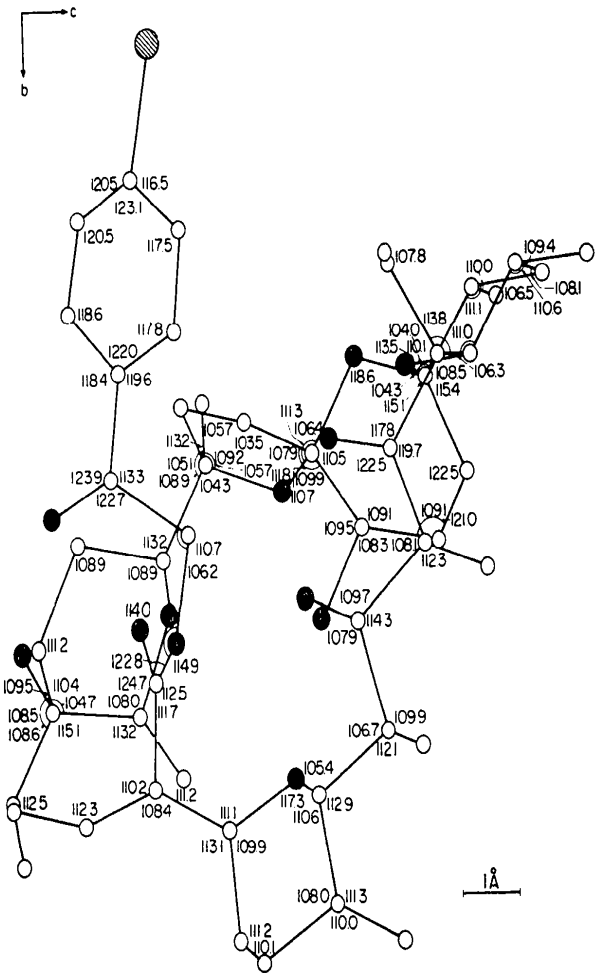
Rysunek 8 przedstawia schemat cząsteczki estru p-jodofenancylu salinomycyny, na którym określone zostały długości wszystkich wiązań występujących w cząsteczce. Obliczenia wykonane przez zespół Haruyasu Kinashi'ego nie wykazują znaczących różnic w porównaniu z rzeczywistymi wartościami. Wiązanie wodorowe przedstawione zostało za pomocą linii przerywanej. Prawdopodobne standardowe odchylenia we wszystkich długościach wiązań wynoszą 0-0,2 Å [10].

Wielkości kątów w cząsteczce salinomycyny

Rysunek 9 przedstawia schemat cząsteczki estru p-jodofenancylu salinomycyny, na którym określone zostały wielkości wszystkich kątów występujących w cząsteczce. Obliczenia wykonane przez zespół Haruyasu Kinashi'ego nie wykazują znaczących różnic w porównaniu z rzeczywistymi wartościami. Prawdopodobne standardowe odchylenia we wszystkich wielkościach kątów wynoszą 1-1° [10].



Rysunek 8. Schemat cząsteczki salinomycyny przedstawiający długości wiązań (Å) [10]

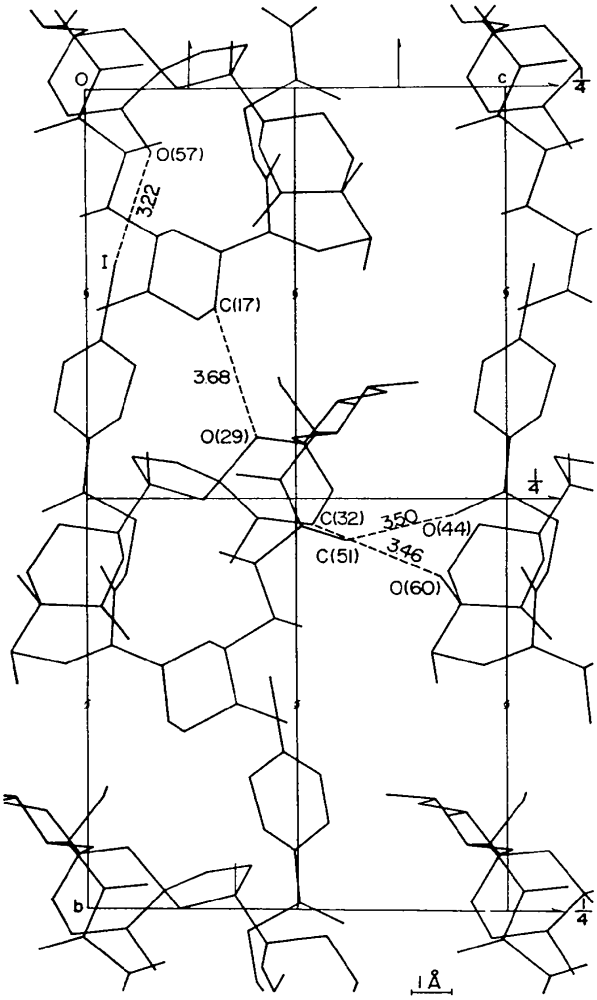


Rysunek 9. Schemat cząsteczki salinomycyny przedstawiający wielkości kątów (°) [10]

Struktura krystaliczna salinomycyny

Ponieważ sole metali salinomycyny nie tworzą odpowiednich kryształów niezbędnych do zastosowania analizy rentgenograficznej w celu ustalenia kompletnej struktury molekularnej oraz konfiguracji cząsteczki wykorzystano do tego celu kryształy estru salinomycyny. Kryształy estru są

bezbarwne, kształtu długich graniastosłupów wzdłuż osi „c”. Grupa przestrzenna kryształu to $P2_12_12_1$. W każdej komórce elementarnej o wymiarach: a = 20*981(2) Å, b = 22*761(2) Å, c = 10*493(1) Å, znajdują się cztery molekuły. Wymiary komórki elementarnej oraz grupa przestrzenna zostały ustalone na podstawie fotografii Weissenberga [10].



Rysunek 10. Struktura krystaliczna cząsteczki estru p-jodofenancylu salinomycyny[10]

Właściwości salinomycyny

Właściwości fizyczne

Pod względem fizycznym salinomycyna jest ciałem stałym o białej lub jasnożółtej barwie, w postaci krystalicznego wonnego proszku. Temperatura topnienia formy nasyconej ($C_{42}H_{72}O_{11}$) wynosi: 140–142ºC, natomiast formy nienasyconej ($C_{42}H_{70}O_{11}$) wynosi: 112–114ºC. Salinomycna jest związkiem wrażliwym na temperaturę, rozpuszczalnym m.in. w acetonie, chloroformie, eterze, benzenie, metanolu i praktycznie nierozpuszczalnym w wodzie. Współczynnik RF dla salinomycyny wynosi 0.675 [11, 10].

Właściwości chemiczne salinomycyny i jej zastosowanie

Salinomycyna jest monokarbocyklicznym kwasem o pKa = 6,4 (DMF), który tak jak wiele antybiotyków jonoforowych nie wykazuje zdolności do absorbowania promieniowania UV.

Salinomycyna posiada antymikrobiologiczną aktywność przeciwko gram-dodatnim bakteriom, prątkom i grzybom.

Salinomycyna - antybiotyk paszowy - stosowana jest jako stymulator wzrostu oraz kokcydiostatyk paszowy. Mechanizm działania salinomycyny oparty jest na zdolności związku do transportowania jonów metali (zwłaszcza sodu i potasu) do wnętrza komórki. Zaburzenia koncentracji jonów wewnątrz komórki wywołują efekt bakterio-kokcydiobójczy. Salinomycyna jest w minimalnym stopniu wchłaniana z przewodu pokarmowego, ok. 90% dawki ulega wydaleniu z kałem w ciągu 3 dni. Stosowanie salinomycyny w dodatkach do pasz wzrasta, ponieważ wykazuje ona aktywność odżywczą oraz powoduje znaczne korzyści przyczyniając się do wzrostu wagi zwierząt hodowlanych. Dodawanie antybiotyków jonforwych do pożywienia dla przeżuwaczy powoduje zmniejszenie problemu wzdęć poprzez inhibitowanie wzrostu bakterii odpowiedzialnych m.in. za produkcję nadmiaru śliny. Jednak nieodpowiednie podawanie salinomycyny jak i innych antybiotyków jonoforowych (np. nierównomierne rozprowadzenie w paszy, stosowanie zbyt dużych dawek) może być przyczyną zatruć zwierząt hodowlanych.

Cytotoksyczne działanie tych związków ujawnia się głównie w komórkach wątrobowych oraz mięśniowych[10, 11].

Pochodne salinomycyny

Zdolności kompleksotwórcze antybiotyków jonoforowych ze szczególnym uwzględnieniem kompleksów salinomycyny

W ostatnich czasach przeprowadzono wiele badań mających na celu określenie zdolności kompleksotwórczych antybiotyków jonoforowych. Na podstawie otrzymanych wyników ustalono, iż antybiotyki jonoforowe zdolne są do tworzenia rozpuszczalnych w tłuszczach cyklicznych kompleksów z kationami jak np. Li^+ , Na^+ ,K^+ ,Cs^+ ,NH_4^+ ,Ca^{2+} ,Mg^{2+} i Cu^{2+}[3-6] . Poza tym ustalono, iż jonofory wykazują preferencyjne kompleksowanie metali nad protonowaniem jonoforów, z tego względu tworzenie protonowanych jonoforów jest nieskuteczne. Salinomycyna, monensyna i lasalocid posiadają zdolności do wiązania więcej niż jednego jonu metalu. Np. widmo mieszaniny soli monensyny i sodu przedstawia zarówno kompleks (monensyna + Na^+) *m/z* 693 jak i (monensyna $2H^+$ + $2Na^+$) *m/z* 715^+. Te same zachowania kompleksotwórcze zostały zaobserwowane dla monensyny i potasu, zaobserwowano mianowicie występowanie kompleksów (monensyna + K^+), (monensyna 2 H^+ + K^+ + Na^+) i (monensyna 2 H^+ + $2K^+$). Obecność małego dodatku sodu, nawet w obecności nadmiaru potasu, potwierdza preferencje monensyny w stosunku do sodu nad potasem.

Lit jest najmniejszym, najbardziej gęsto naładowanym jonem metalu alkalicznego. Chociaż proces kompleksowania litu jest bardzo podobny do procesów kompleksowania przedstawionych dla pozostałych jonów metali alkalicznych, zaobserwowano tu dwie różnice. Po pierwsze kompleksy typu (jonofor $2H^+$ + $2Li^+$) obserwowane były tylko dla salinomycyny, lasalocidu i monensyny, rzadziej obserwowano kompleksy typu (jonofor + Li^+). Te wyniki mogą wynikać z większego i gęstszego upakowania ładunku w przypadku jonu Li^+, w porównaniu z większymi jonami metali alkalicznych. Po drugie kompleksy z jonem litu zostały zaobserwowane ze znacznie mniejszą

intensywnością niż kompleksy z innymi kationami metali alkalicznych, co może wynikać ze zwiększonej trudności desolwatacji kompleksu (jonofor $2H^+$ + $2Li^+$), w stosunku do innych kompleksów typu (jonofor + metal alkaliczny$^+$). Niższa efektywność kompleksowania Li^+ może zależeć również od jego małych rozmiarów.

W przypadku jonów metali przejściowych zdolności kompleksotwórcze jonoforów przedstawiają się następująco: z wyjątkiem cyklicznej nonaktyny, acykliczne jonofory (salinomycyna, monensyna i lasalocid) tworzą pojedynczo naładowane kompleksy metali z metalami przejściowymi typu (jonofor $2H^+$ + M^{2+}). Nonaktyna natomiast tworzy podwójnie naładowany kompleks typu (jonofor + M^{2+}). Różnice zaobserwowane pomiędzy nonaktyną a acyklicznymi jonoforami wynikają prawdopodobnie z jonizacyjnych zdolności jonoforów. Nonaktyna nie posiada żadnych jonizujących grup, takich jak grupy hydroksylowe czy karbocykliczne grupy kwasowe, które występują w strukturach pozostałych jonoforów i dlatego nonaktyna nie ulega równie łatwo deprotonowaniu.

W przypadku zdolności kompleksotwórczych jonoforów z metalami ziem alkalicznych zauważono, iż tworzenie kompleksów przez salinomycynę, lasalocid i monensyne obejmuje deprotonowanie jonoforu, natomiast nonaktyna tworzy stabilne podwójnie naładowane kompleksy. Na podstawie widm obserwowanych dla metali przejściowych, nie samorzutna dehydratacja została zaobserwowana dla kompleksów lasalocidu i nonaktyny, podczas gdy tylko część procesu dehydratacji zaobserwowana została w przypadku kompleksów salinomycyny oraz monensyny.

Ogólnie odpowiednie intensywności kompleksów jonofor – jon metalu możemy przedstawić w następującym kierunku: kompleksy sodu i potasu > kompleksy metali przejściowych > kompleksy metali ziem alkalicznych > kompleksy litu. Ten kierunek pokazuje, że zarówno rozmiar jak i struktura geometryczna jonu metalu odgrywają ważną rolę w procesie tworzenia oraz stabilności kompleksów jonofor–jon metalu. Na podstawie wyników przeprowadzonych badań zauważono, że odpowiednie intensywności nie

ulegają znacznym zmianom w przypadku salinomycyny, monensyny, lasalocidu i nonaktyny, co sugeruje podobne efektywności kompleksotwórcze dla tych czterech jonoforów[3, 14].

Proponowane drogi fragmentacji kompleksów antybiotyków jonoforowych z jonami metali

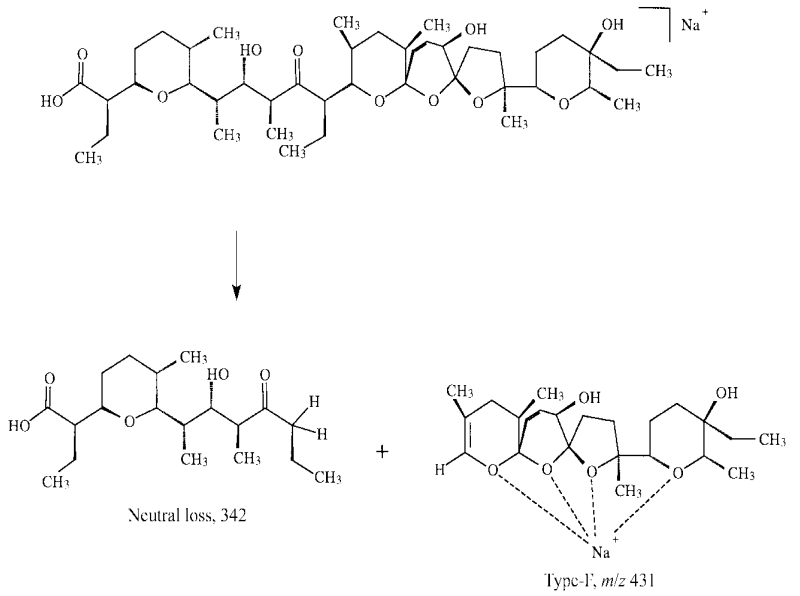
Kompleksy salinomycycny, jak i pozostałych antybiotyków jonoforowych wykazują zdolność do ulegania samoistnemu procesowi fragmentacji. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, iż wyróżnić możemy dwa główne typy procesu fragmentacji dla kompleksów jonofor – jon metalu.

Pierwsza główna proponowana droga fragmentacji związana jest z konsekwencją utraty obojętnej cząsteczki wody.

Drugi proces fragmentacji jest odmienny i zależy od typu jonoforu. W przypadku salinomycyny i lasalocidu dotyczy on rozerwania wiązania węgiel-węgiel w jednym z miejsc, gdzie występuje centralna karbonylowa grupa funkcyjna. W tej sytuacji utworzone zostają dwa fragmenty jonowe, określane jako „typ-A" (fragment zawiera jon metalu oraz karbonylowy koniec) lub „typ-F" (fragment zawiera jon metalu oraz hydroksylowy koniec).

Ogólnie, typy procesów fragmentacji dla kompleksów metali alkalicznych, metali przejściowych i metali ziem alkalicznych są podobne, jest to zaskakujące biorąc pod uwagę wyniki przeprowadzonych badań, że kompleksowanie jonów metali ziem alkalicznych i przejściowych zachodzi w połączeniu z deprotonowaniem jonoforów, takich jak salinomycyna, lasalocid czy monensyna. Te wyniki sugerują, że jony metali zlokalizowane są w kompleksach analogicznie. Dlatego też typy proponowanych dróg fragmentacji są generalnie takie same dla każdego kompleksu metalu. Zakres różnic w dehydratacji zależy natomiast od rodzaju jonu metalu. Np. trzystopniowa dehydratacja na drodze dysocjacji obserwowana jest dla kompleksu (lasalocid + Na^{+}), dla kompleksu (lasalocid + $2H^{+}$ + Ca^{2+}) obserwowana jest jednostopniowa droga dysocjacji, a dla kompleksu (lasalocid

+ $2H^+$ + Co^{2+}) nie zaobserwowano procesu dysocjacji w ogóle. Różnice w dehydratacji dowodzą, że są one zależne od charakteru jonu metalu oraz prawdopodobnie od czynników takich jak: rozmiar jonu metalu, gęstość ładunku, preferowana koordynacja geometryczna. Czynniki te mają wpływ na liczbę atomów tlenu, które koordynują jon metalu oraz na siłę wiążących interakcji pomiędzy atomami tlenu, a jonem metalu. W przypadku kompleksów jonoforów cyklicznych (nonaktyna), gdzie dysocjacja wymaga rozerwania co najmniej dwóch wiązań kowalencyjnych w łańcuchu głównym jonoforu, proces dysocjacji jest nieefektywny bez względu na rodzaj jonu metalu. Dysocjacja zachodzi tu na drodze utraty cząsteczek obojętnych (eliminacja cząsteczek $C_{10}O_3H_{16}$), co zaobserwowane zostało dla wszystkich kompleksów metali. Otrzymane kompleksy zawierały podwójnie naładowane jony metali ulegające procesowi przemieszczenia ładunku, prowadzącego do otrzymania pojedynczo naładowanego fragmentu jonu zawierającego metal [3].



Schemat 1. Jedna z proponowanych dróg dysocjacji kompleksu (salinomycyna + Na $^+$)[3]

Kompleksy metal-antybiotyk jonoforowy

Salinomycyna jest antybiotykiem jonoforowym, zdolnym do kompleksowania jonów metali alkalicznych Na^+, K^+, Li^+, jonów metali przejściowych Co^{2+}, Cu^{2+}, Mn^{2+} i jonów metali ziem alkalicznych Mg^{2+}, Ca^{2+}, podobnie jak to jest w przypadku pozostałych antyiotyków jonoforowych.

Salinomycynę możemy scharakteryzować jako cząsteczkę posiadającą hydrofilowe miejsce wiążące, służące jako koordynacyjny partner dla centralnego jonu metalu oraz bardzo hydrofobową powierzchnię, która jest wystawiona na działanie środowiska zewnętrznego (np. rozpuszczalnik, membrana). Badania CAD (Fragmentacja przez zderzenia) i IRMPD (Fragmentacja wielofotonowa promieniowaniem podczerwonym) kompleksów salinomycyny, monensyny, lasalocidu i nonaktyny z jonami metali dały następujące rezultaty:

a) Kompleksy metali alkalicznych.

Analizy kompleksów antybiotyków jonoforowych (salinomycyna, monensyna oraz lasalocid) z metalami alkalicznymi pokazują, iż najbardziej prawdopodobnym zachowaniem w przypadku tego rodzaju kompleksów jest utracenie jednej lub dwóch cząsteczek wody. Tylko w przypadku cząsteczki nonaktyny nie zaobserwowano procesu dehydratacji, co prawdopodobnie jest wynikiem braku grup hydroksylowych. Najbardziej prawdopodobną drogą fragmentacji, zachodzącą dla kompleksów jonów metali alkalicznych z salinomycyną, monensyną oraz lasalocidem, jest przedstawiona wcześniej fragmentacja prowadząca do otrzymania fragmentów jonowych typu-F lub typu-A, która przebiega w połączeniu z jedno lub dwustopniową dehydratacją. W przypadku nonaktyny kompleksy nie ulegają fragmentacji, co wskazuje, iż dehydratacja w tym przypadku jest całkowicie nieefektywna. Typowy czas do zajścia procesu fragmentacji wynosi w przypadku salinomycyny, monensyny i lasalocidu ok. 20-50 ms, natomiast w przypadku nonaktyny ponad 200 ms. Nawet po tym czasie efektywność procesu dysocjacji kompleksów nonaktyna-metal alkaliczny jest mniejsza niż 25% (gdzie efektywność dysocjacji jest definiowana jako suma intensywności jonowych fragmentów podzielona przez

intensywność wyjściowego kompleksu). Nieefektywność procesu w przypadku nonaktyny jest po pierwsze braku wynikiem grup hydroksylowych, a po drugie w wyniku cyklicznej struktury cząsteczki nonaktyny zajście procesu fragmentacji wiązać się musi z rozerwaniem wielokrotnego wiązania kowalencyjnego. Z tego względu kompleksy nonaktyna-metal alkaliczny dysocjują poprzez wielokrotną utratę cząsteczki $C_{10}O_3H_{16}$.

b) Kompleksy jonów metali przejściowych

Na podstawie przeprowadzonych analiz CAD i IRMPD stwierdzono, iż kompleksy metali przejściowych z monensyną i Co^{2+}, Cu^{2+} i Mn^{2+} w wyniku ogrzewania tracą kolejne cząsteczki wody, podczas gdy kompleksy salinomycyny charakteryzują się utratą tylko jednej cząsteczki. Proces dysocjacji kompleksów metali przejściowych zachodzi podobnie jak to było w przypadku metali alkalicznych tzn. na drodze utraty obojętnej cząsteczki. Np. kompleksy monensyny dysocjują poprzez formowanie fragmentów jonowych typu-A, a kompleksy salinomycyny dysocjują poprzez formowanie fragmentów typu- F. Dlatego też, chociaż formowanie kompleksów metali przejściowych wymaga deprotonowania jonoforu, w rezultacie kompleksy te zachowują się podobnie do kompleksów metali alkalicznych. To wskazuje, że deprotonowanie jonoforu, podczas formowania kompleksów metali przejściowych, dotyczy karbocyklicznego końca kwasowego w przypadku monensyny i hydroksylowego końca w przypadku salinomycyny. W przypadku dysocjacji kompleksów metali przejściowych lasalocidu zaobserwowano występowanie wyłącznie fragmentacji typu-F. Widzimy tu znaczącą różnicę w zachowaniu tych kompleksów w porównaniu z metalami alkalicznymi, ponieważ w przypadku kompleksów lasalocid-metal alkaliczny dochodziło do utraty 3 cząsteczek wody, natomiast w przypadku kompleksów lasalocid-metal przejściowy nie dochodzi nawet w najmniejszym stopniu do dehydratacji. Kompleksy nonaktyna-metal przejściowy dysocjują poprzez tą samą utratę cząsteczki $C_{10}O_3H_{16}$, jak to było przedstawione w przypadku kompleksów z metalami alkalicznymi.

c) Kompleksy metali ziem alkalicznych

Zachowanie kompleksów metali ziem alkalicznych z salinomycyną, monensyną i lasalocidem jest podobne do zachowania kompleksów tychże jonoforów z metalami przejściowymi. Rodzaj zachodzącego procesu dehydratacji zależny jest tu od charakteru jonu metalu czyli np. od rozmiaru jonu metalu. Np. kompleks jonofor- wapń ulega mniej intensywnie dehydratacji niż kompleks jonofor- magnez. Kompleks magnezu ulega jedno, dwu lub trzystopniowej dehydratacji i dominującym typem pojawiającego się fragmentu jest zdehydratowny fragment typu-A. W przeciwieństwie do tego, kompleks wapnia faworyzuje tylko jednostopniową dehydratację i oba typy fragmentów: typ-A i zdehydratowany typ-A są jednakowo faworyzowane. Takie zachowanie jest prawdopodobnie wynikiem tego, iż większy rozmiar kationu wapnia hamuje proces dehydratacji, ponieważ więcej atomów tlenu w jonoforu może tym sposobem swobodnie koordynować jon metalu, z tego względu, atomy tlenu są mniej podatne na eliminację na drodze dehydratacji. Podobnie jak w przypadku kompleksów metali przejściowych kompleksy nonaktyna-metal ziem alkalicznych, dysocjują poprzez utratę cząsteczki $C_{10}O_3H_{16}$ [3].

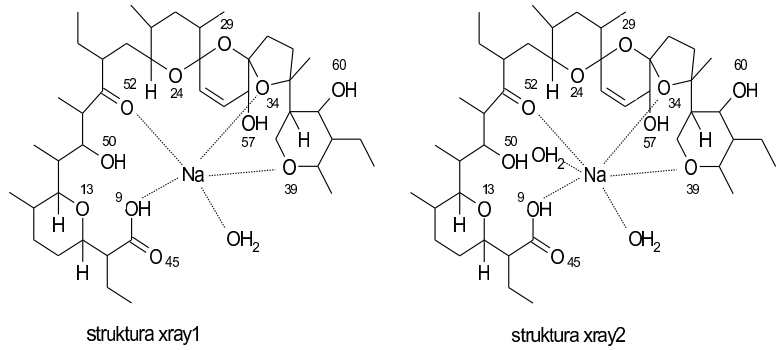
Struktury X-ray kompleksów salinomycyny z jonami metali

Struktury X-ray kompleksów salinomycyny z jonami sodu otrzymane zostały na drodze rekrystalizacji kompleksów z mieszaniny woda-acetonitryl. Otrzymane kryształy pokazują, iż salinomycyna może tworzyć kompleksy o różnych konformacjach ale z podobną drogą koordynacji centralnego jonu sodu[13].

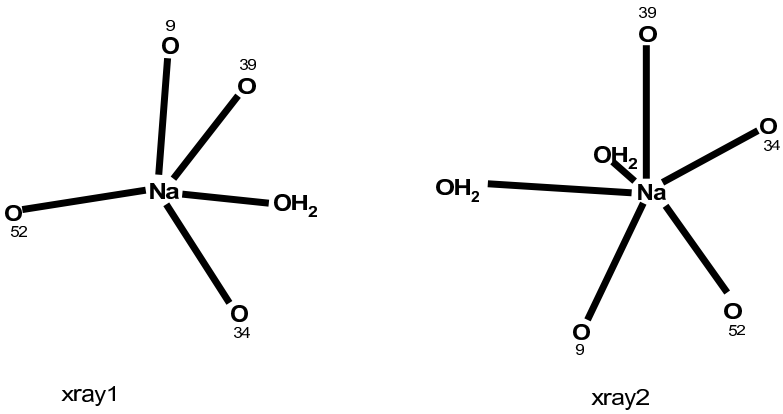
Otrzymane konformacje (określone jako x-ray1 i x-ray2) wykazują nieznaczne różnice w strukturze, a mianowicie podczas gdy centrum cząsteczki (tricykliczny układ) jest sztywne, kąty rotacji tego systemu wykazują różnice wynoszące prawie 20º. Konformacja 1 (x-ray1) jest bardziej spłaszczona, z jednym hydrofilowym i jednym hydrofobowym miejscem, podczas gdy konformacja 2 (x-ray2) jest bardziej sferyczna (rys.11). Odległości pomiędzy jonem sodu, a atomami tlenu w pierwszej, kulistej konformacji, wynoszą od

2,356 do 2,631 Å. W x-ray1 jon sodu jest koordynowany przez jedną czasteczkę wody, podczas gdy w x-ray2 koordynowany jest on przez 2 cząsteczki wody. W pierwszym przypadku, pod względem geometrycznym, mamy do czynienia ze zniekształconym trójkątem, w drugim przypadku ze zniekształconą, tetragonalną bipiramidą. Bez cząsteczek wody konfiguracja sodu, w obu konformacjach, mogłaby być rozważana jako zniekształcony czworościan. Żaden z atomów tlenu, z trzech hydroksylowych grup, nie jest zaangażowany w koordynowanie jonu sodu. W x-ray2 ekstremalnie krótka odległość zaobserwowana została pomiędzy tlenem, a cząsteczką wody i tlenami w cząsteczce salinomycyny: 57-O (2,100 Å), 45-O (2,421 Å) i 9-O (2,538 Å). Wewnątrz molekularne wiązania wodorowe są podobne w obu konformacjach. Jakkolwiek na całej długości łańcucha głównego (odległość pomiędzy 45-O/9-O i 60-OH) jest znacznie mocniejsza w x-ray1 (2,833 Å) niż w x-ray2 (3,251 Å). W xray1 wiązanie wodorowe utworzone zostało z udziałem tlenu karboksylowej grupy, który koordynuje sód, podczas gdy w x-ray2 bliżej karboksylowego tlenu znajduje się tlen 60-OH, który nie bierze udziału w koordynowaniu atomu sodu. Wszystkie trzy hydroksylowe grupy są zaangażowane w tworzenie wewnątrz cząsteczkowych wiązań wodorowych. W x-ray1 50-OH tworzy wiązanie wodorowe z 45-O (2,707 Å) i 52-O (3,047 Å); 60-OH tworzy wiązanie wodorowe z 39-O (2,874 Å) i 9-O (2,833 Å). W x-ray2 50-OH jest powiązany z 9-O (2,654 Å) i 52-O (3,221 Å), podczas gdy 60-OH tworzy wiązania wodorowe z 45-O (3,255 Å) i 39-O (2,910 Å). W konformacjach 57-OH tworzy wewnątrz cząsteczkowe wiązanie wodorowe z 34-O (długości wiązań wynoszą odpowiednio 2,850 Å (x-ray1) i 2,768 Å (x-ray2)). Odległości te pokazują, że wiązania są zazwyczaj słabsze w strukturze x-ray2 aniżeli w x-ray1. Pierścień piranowy posiada w obu strukturach krzesełkową konformację. Sześcioczłonowy pierścień z jednym wiązaniem podwójnym posiada konformację kopertową, w której 30-C znajduje się odpowiednio w odległości 0,633 Å (x-ray1) i 0,557 Å (x-ray2) poza płaszczyzną tworzoną przez pozostałe atomy w pierścieniu. Pięcioczłonowy pierścień jest skręcony, w wyniku czego atom 30-C znajduje się w odległości

0.316 Å (xray1) i 0.212 Å (x-ray2) poza płaszczyzną tego pierścienia i odpowiednio atom 37-C znajduje się 0,225 Å (x-ray1) i 0,387 Å (x-ray2) poza płaszczyzną pierścienia [13].



Rysunek 11. Struktury x-ray1 i x-ray2 kompleksu salinomycyny z jonem sodu[13]



Rysunek 12. Model koordynacji centralnego jonu sodu w obu konformacjach salinomycyny (x-ray1, x-ray2)[13]

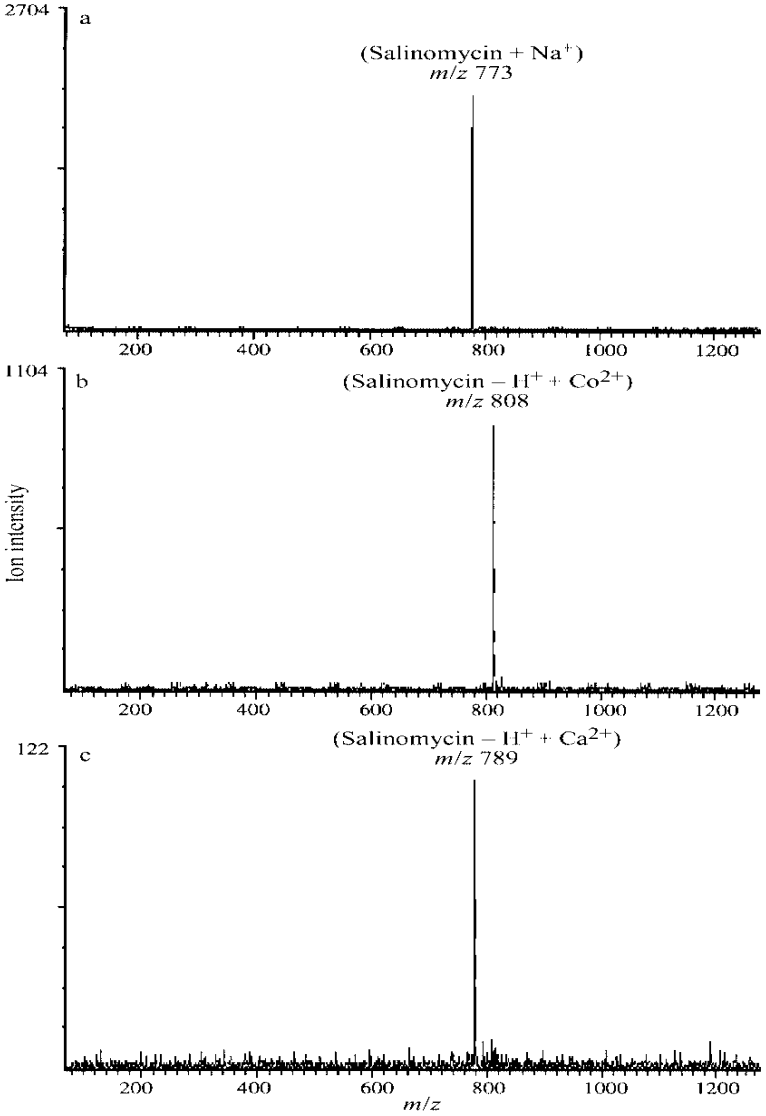
Efektywność jonizacji w przypadku tworzenia kompleksów z jonami metali przez salinomycynę

Efektywność jonizacji warunkowana przez intensywność tworzenia kompleksów, obrazowana jest w następującym kierunku: metal alkaliczny > metal przejściowy > metal ziem alkalicznych. Efektywność jonizacji w przypadku salinomycyny przedstawiona została na rys.13, gdzie możemy zauważyć zgodność z powyższym stwierdzeniem. Salinomycyna wykazuje najwyższą intensywność w przypadku kompleksowania jonów sodu (jon metalu alkalicznego), następnie jonów kobaltu (jon metalu przejściowego) i jonów wapnia (jon metalu ziem alkalicznych).

W celu porównania struktury salinomycyna-Na z innymi jonoforami wykorzystane zostały dane krystalograficzne, dotyczące liczby atomów tlenu występujących w przestrzeni koordynacyjnej. Liczba wszystkich atomów tlenu tworzących wiązanie z jonem metalu wynosi od 3 dla lasalocidu do 9 dla monensyny. Mimo występowania wielu strukturalnych podobieństw pomiędzy kompleksami różnych antybiotyków polieterowych z jonami metali, zaobserwować można istotne różnice pod względem budowy i liczby grup funkcjonalnych zaangażowanych w tworzenie tych kompleksów[7, 13].

Podziękowania:

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



Rysunek 13. Efektywność jonizacji w przypadku kompleksów salinomycyny z jonami sodu, kobaltu i wapnia[3]

Literatura:

1. http://www.mlyniec.gda.pl/~chemia/organiczna/supra/jonofory.htm
2. Pressman, B. C.; Harris, E. J.; Jagger, W. S.; Johnson, J. H.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **1967,** *58,* 1949-56
3. Shen, J.; Brodbelt, J. S.; *Analys*t, **2000**, *125*, 641–650
4. Mitani, M.; Yamanishi, T.; Miyazaki, Y.; Ōtake, N.; *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **1976**, 655-660
5. Kocieński, P. J.; Brown, R. C. D.; Pommier, A.; Procter, M.; Schmidt, B.; *J. Chem. Soc.,* **1998,** *Perkin Trans. 1*
6. Pressman, B. C.; *Annu. Rev. Biochem.,* **1976**, *45*, 501-530.
7. Miao, X-S; March, R. E.; Metcalfe, C. D.; *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2003**, *17*, 149–154
8. Pressman, C.; Fahim, M.; *Pharmacol. Toxicol*, **1982**, *22*, 465-90
9. Riddell, F. G.; *Chirality*, **2002**, *14,*121-125
10. Kinashi, H.; Ōtake, N.; Yonehara, H.; *Acta Cryst.*, **1975**, *B31*, 2411
11. Kinashi, H.; Ōtake, N.; Yonehara, H.; *Tetrahedron Letters*, **1973**, *49,* 4955 - 4958
12. Mronga, S.; Müller, G.; Fischer, J.; Riddell, F.; *J. Am. Chem. SOC.*, **1993***, 115,* 8414-8420
13. Paulus, E. F.; Kurz, M.; Matter, H.; Ve´rtesy, L.; *J. Am. Chem. Soc.* **1998,** *120,* 8209-8221
14. Miao, X-S; March, R. E.; Metcalfe,C. D.; *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2003**, *17*, 149–154
15. http://en.wikipedia.org/wiki/Ionophore
16. Matabudul, D. K.; Conway, B.; Lumley, I.; Sumar, S.; *Food Chem.,* **2001**, *75*, 345.
17. Riddell, F. G.; *Chem. Bri.,* **1992**, 533-537
18. Riddell, F. G.; Arumugam, S.; Brophy, P. J.; Cox, B. G.; Payne, M. C.; Southon, T. E.; *J. Am. Chem. Soc,* **1988**, *110*, 734-738
19. McMurray, W. C.; Begg, R. W.; *Arch. Biochem. Biophys.,* **1959,** *84,*546-48

20. Graven, S. N.; Estrado-O, S.; Lardy, H. A.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1966,** *56,*654-62
21. Pressman, B. C.; *Fed. Proc.*, **1968,** *27,* 1283-90
22. Moore, C.; Pressman, B. C.; *Biochem. Biophyx Rex Commun.*, **1964**, *15*, 562-67
23. Kilbourn, D. T.; Dunitz, J. K.,;Pioda, L. A. R.; Simon, W.; *Z Mol. Biol.,* **1967,** *30,* 559-63
24. Graven, S. N.; Lardy, H. A.; Estrado-O, S.; *Biochemistry,* **1967,** 6, 365-73
25. Agtarap, A.; Chamberlin, J. W.; Pinkerton, M.,; Steinrauf, L.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1967,** *89*, 5737-40
26. Steinrauf, L. K.; Pinkerton, M.; Chainberlin, J. W.; *Biochem, Biophys. Rex Commun.*, **1968**, *33,*29-31
27. Kubota, T.; Matsutani, S.; Shiro, M.; Koyama, H.; *Chem. Commun.*, **1968**, *23*, 1541-43
28. Greenwald, R.; Pressman, B. C.; *Biophys. J.*, **1977**, *17,*A151 (Abstr.)
29. Johnson, S. M.; Herrin, J.; Liu, S. J.; Paul, I. C.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1970**, *92,* 4428-30
30. Westley, J. W.; Evans, R. H.; Williams, T.; Stempd, A.; *J. Chem. Soc. Chem. Commun. D.*, **1970**, 71-75
31. Pressman, B. C.; *Fed. Proc.*, **1973,** 32,1696-1703
32. Matsuoka, T.; *Am. Fet. Med. Assoc.,* **1976,** *169*,1098-1100
33. Amend, J. F.; Mallon, F. M.; Wren, W. B.; Rarnos, A. S.; *Compendium Continuing l~duc.*, **1980,** *2(I0)*,173-83
34. Rumensin Technical Manual; Elaneo Products Manual.; **1978**, Indianapolis: Eli Lilly
35. Haynes, D. H.; Wiens, T.; Pressman, B. C.; *J. Membr. Biol.*, **1974,** *18*-23
36. Hladky, S. B.; Haydon, D. A.; *Biochim. Biophys. Acta.,* **1972**, 274-294
37. Haynes, D. H.; Pressman, B. C.; *J. Membr. Biol.,* **1974**, *18,*1
38. Kinashi, H.; Otake, N.; Yonehara, H.; Sato, S.; Saito, Y.; *Tetrahedron Lett.,* **1973,** 495
39. Estrada, S.; Gomez-Lojero, C.; *Biochemistry.* **1971**, *10*,1598

40. Miyazaki, Y. M.; Shibuya, H.; Sugawara, O.; Kawaguchi, C.; Hirose and J. Nagatsu, *J. Antibiot.* **1974**; *27*, 814.

Rozdział 8

Zastosowania podandów krzemowych w akumulatorach litowo-jonowych i kondensatorach elektrochemicznych

Mariusz Walkowiak[a], Daniel Waszak[a], Monika Osińska[a], Grzegorz Lota[a,c], Błażej Gierczyk[b], Grzegorz Schroeder[b]

[a] *Centralne Laboratorium Akumulatorów i Ogniw, Oddział Instytutu Metali Nieżelaznych, Forteczna 12, 61-362 Poznań*

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

[c] *Politechnika Poznańska, Instytut Chemii i Elektrochemii Technicznej, Piotrowo 3, 60-965 Poznań*

1. Chemia supramolekularna a elektrochemia stosowana

Elektrochemiczne urządzenia do magazynowania i konwersji energii stosowane są w wielu aspektach życia codziennego. Ich znaczenie systematycznie rośnie i trudni sobie dzisiaj wyobrazić współczesne gospodarstwo domowe czy zakład produkcyjny bez takich urządzeń jak:

- wysokoenergetyczne baterie pierwotne i wtórne (akumulatory),
- ogniwa paliwowe,
- kondensatory elektrochemiczne (zwane również superkondensatorami, ultrakondensatorami, lub kondensatorami podwójnej warstwy elektrycznej),
- sensory elektrochemiczne,
- elektrochemiczne ogniwa słoneczne (znane w literaturze angielskojęzycznej jako *dye sensitized solar cells*),
- urządzenia elektrochromowe.

Przedstawione urządzenia bazują na wiedzy z zakresu zaawansowanej chemii organicznej a niektóre z nich zbudowane zostały w oparciu o dorobek szeroko rozumianej chemii supramolekularnej. W przypadku baterii i kondensatorów rozważać można kompleksy supramolekularne jako różnego rodzaju rozpuszczalniki dla soli litu, funkcjonalne dodatki do elektrolitów, receptory anionów zwiększające liczbę przenoszenia kationu litu w elektrolitach polimerowych, nanocząstki ceramiczne modyfikowane receptorami kationowymi jako aktywne wypełniacze w kompozytowych elektrolitach polimerowych, elektrolity polimerowe powstałe przez zaszczepienie centrów kationoakceptorowych na łańcuchu głównym, i inne. W dziedzinie sensorów elektrochemicznych chemia supramolekularna może zaoferować różnego rodzaju jonofory, selektywne w stosunku do określonych indywiduów chemicznych. W obszarze elektrochemicznych ogniw słonecznych badane są na przykład organiczne półprzewodniki typu p powstałe przez dotowanie molekuł o charakterze akceptorowym kationami litu.

Chemia supramolekularna i elektrochemia stwarza możliwości prowadzenia nowatorskich i znaczących z praktycznego punktu widzenia prac badawczych, zarówno podstawowych jak i aplikacyjnych. Artykuł analizuje pewien wycinek tego wspólnego pola, a mianowicie możliwości zastosowania związków podandowych jako składników elektrolitów dla wysokoenergetycznych akumulatorów litowych i superkondensatorów. Przedstawiono też budowę i zasadę działania akumulatora litowo-jonowego i kondensatora eklektrochemicznego.

2. Wysokoenergetyczne akumulatory i kondensatory elektrochemiczne

2.1 Akumulator Li-ion

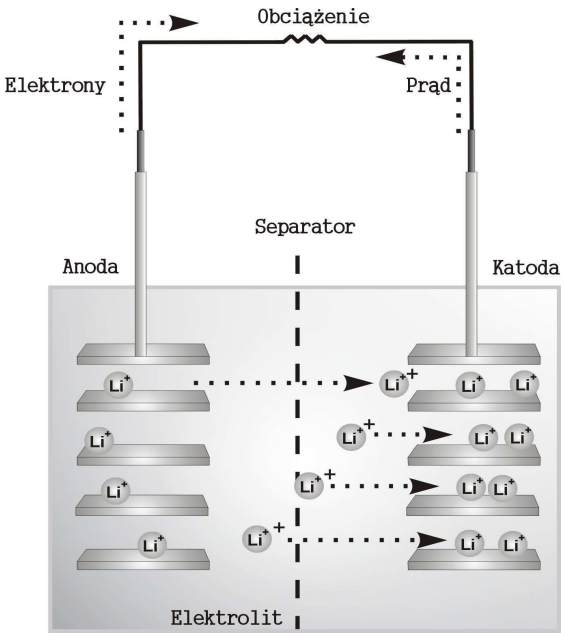
Obserwowany w ostatnich dekadach dynamiczny wzrost rynku przenośnych urządzeń elektronicznych spowodował konieczność opracowania dla nich nowych wydajnych źródeł zasilania w energię elektryczną. Użytkownik oczekuje, aby urządzenie działało długi czas bez konieczności ponownego ładowania, było lekkie i niewielkie gabarytowo, a przy tym bezpieczne w użytkowaniu i niedrogie. Przekładając to na język chemicznych źródeł prądu, należało opracować akumulator o dużej żywotności cyklicznej, wysokiej wagowej i objętościowej gęstości energii,

a tym w miarę możliwości wykorzystujące nietoksyczne i łatwo dostępne materiały. Pierwsze telefony komórkowe zasilane były akumulatorami Ni-Cd. Toksyczność kadmu spowodowała, że zastąpiono je bliźniaczą technologią Ni-MH. Ta ostatnia jednak okazała się być tylko rozwiązaniem przejściowym, które obecnie ustępuje w obliczu bezprecedensowego sukcesu technologii Li-ion, jakiego jesteśmy świadkami od kilkunastu lat. Ogniwo Li-ion posiada trzykrotnie wyższe napięcie pracy od układów Ni-Cd i Ni-MH, co oznacza że ilość energii zmagazynowana w jednostce objętości lub masy akumulatora jest znacznie wyższa [1-2]. Początkowe wady akumulatorów Li-ion, takie jak niezdolność do pracy pod wysokimi obciążeniami prądowymi i w niskich temperaturach, a także wysoka cena i ryzyko eksplozji, są sukcesywnie usuwane. Należy pamiętać, że idea ogniwa litowo-ionowego jest bardzo młoda, ponieważ akumulatory takie zostały wprowadzone po raz pierwszy do komercyjnej produkcji dopiero w roku 1991 przez firmę Sony. Od tego czasu obserwuje się stały, dynamiczny wzrost produkcji i sprzedaży tego typu chemicznych źródeł prądu. Obecnie akumulatory Li-ion uznawane są obecnie za najbardziej perspektywiczne źródło zasilania dla przenośnych urządzeń elektronicznych, takich jak laptopy, telefony komórkowe, kamery, itp. Panuje również powszechne przekonanie, że w niedalekiej przyszłości ten typ akumulatora znajdzie również zastosowanie w zasilaniu pojazdów elektrycznych, aparatury medycznej, urządzeń do eksploracji przestrzeni kosmicznej, itp. Aby tak się stało, konieczne jest opracowanie nowych rozwiązań konstrukcyjnych, cechujących się wyższą niż do tej pory gęstością energii, zdolnością do pracy pod ekstremalnie wysokimi obciążeniami prądowymi i w niskich temperaturach, a także wyższym poziomem bezpieczeństwa. Przy tym wszystkim konieczna jest stała redukcja kosztów i spełnienie restrykcyjnych wymogów ochrony środowiska. Aby sprostać tym wymaganiom, niezbędne są nowatorskie strategie w projektowaniu aktywnych materiałów elektrodowych i elektrolitów.

Akumulator Li-ion jest bardzo złożonym układem chemiczno-elektycznym, składającym się przynajmniej z trzech zasadniczych elementów: katody, anody i (ponadto praktyczne rozwiązanie technologiczne akumulatora musi uwzględniać ogromną ilość elementów „pomocniczych", takich jak separatory, kolektory prądowe,

itp). Każdy z trzech wymienionych elementów podstawowych stanowi odrębny obszar intensywnych prac badawczo-rozwojowych na świecie. Jednocześnie w ogniwie elektrochemicznym te trzy elementy są bardzo ściśle ze sobą powiązane, ponieważ właściwe procesy chemiczne, będące źródłem potencjałów elektrycznych, zachodzą właśnie na granicach faz pomiędzy elektrodami a elektrolitem.

Istnieje wiele praktycznych rozwiązań ogniwa litowo-jonowego. Wspólną ich cechą jest zastosowanie insercyjnych (w szczególnym przypadku interkalacyjnych) elektrod oraz organicznych elektrolitów. W najbardziej typowym przypadku anodą w ogniwie jest grafit, katodą tlenek litowo-kobaltowy o strukturze spinelu, natomiast elektrolitem roztwór $LiPF_6$ w mieszaninie węglanu etylenu i węglanu dietylenu. Zasadę działania akumulatora Li-ion przedstawia Rysunek 1.



Rysunek 1. Schemat działania ogniwa litowo-jonowego

W stanie rozładowanym anoda węglowa nie zawiera jonów litu, natomiast katoda jest maksymalnie wypełniona tymi jonami. Podczas ładowania elektrony są dostarczane z obwodu zewnętrznego do anody obniżając jej potencjał do momentu

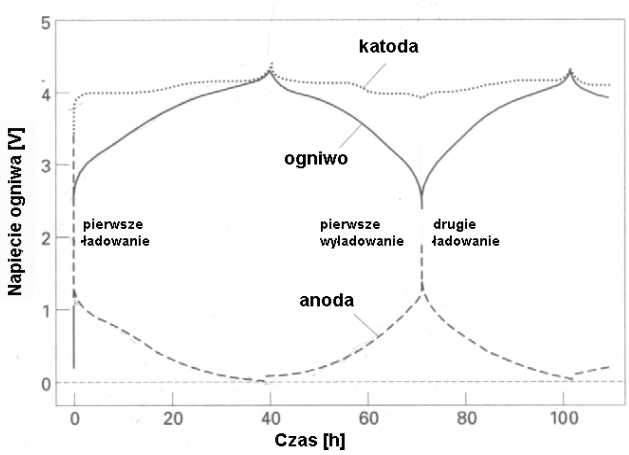
w którym może zachodzić lokowanie się jonów litu z przestrzeni przyelektrodowej w sieci krystalicznej grafitu. Od tego momentu zaczyna się plateau potencjałowe, które trwa tak długo, jak długo w sieci grafitu są wolne miejsca, w których może ulokować się jon. Sumaryczną reakcję elektrodową przedstawia równanie:

$$C_6 + xLi^+ + xe^- \rightleftharpoons C_6Li_x$$

Jednocześnie elektrony są odbierane z katody i jej potencjał wzrasta do poziomu przy którym może zachodzić wychodzenie jonów litu z sieci krystalicznej materiału katodowego. Sumaryczna reakcja katodowa ma zatem postać:

$$Li_xMn_2O_4 \rightleftharpoons Mn_2O_4 + xLi^+ + xe^-$$

Rysunek 2 pokazuje jak zmieniają się potencjały elektrod oraz napięcie ogniwa w trakcie stałoprądowego ładowania/rozładowania.



Rysunek 2. Zmiany potencjałów poszczególnych elektrod oraz napięcia całego ogniwa w trakcie pracy [1].

Procesom zachodzącym na elektrodach towarzyszą procesy transportu kationów litu w elektrolicie w kierunku od katody do anody. W czasie wyładowania ogniwa wszystkie procesy mają kierunek przeciwny do opisanego wyżej. Ogniwo Li-ion cechuje się swoistą elegancją. Reakcje elektrodowe są topotaktyczne, polegają na cyklicznej insercji i deinsercji kationu litu w sieci krystaliczne anody i katody, których zasadnicza sieć krystaliczna nie ulega przy tym zmianom. W uproszczeniu można powiedzieć że praca ogniwa polega na przemieszczaniu się kationu litu od anody do katody i z powrotem (stąd stosowane często w literaurze angielskojęzycznej nazwy: *swing, rocking chair*, lub *shuttle cock battery*).

Ładunek elektryczny doprowadzony do elektrody podczas rozładowania w pierwszym cyklu $Q_{1rozł}$ można utożsamić z pojemnością odwracalną elektrody Q_{odwr}. Pojemność odwracalną można inaczej określić jako dostępną pojemność elektrody po początkowym cyklu formacji. Różnica ładunku doprowadzonego do elektrody podczas ładowania w pierwszym cyklu $Q_{1ład}$ i ładunku dostarczonego podczas wyładowania Q_{1roz} nosi nazwę pojemności nieodwracalnej elektrody $Q_{nieodwr}$:

$$Q_{nieodrw} = Q_{1ład} - Q_{1rozł}$$

$$Q_{nieodwr} + Q_{odwr} = Q_{1ład}$$

2.2 Warstwa pasywna na anodzie grafitowej

Zjawisko pojemności nieodwracalnej jest szczególne ważne dla prawidłowego funkcjonowania ogniwa litowo-jonowego, dlatego też przyczyny jej występowania są przedmiotem intensywnych badań [3-10]. W takcie pierwszego ładowania anody grafitowej część doprowadzonego ładunku elektrycznego jest zużywana na nieodwracalne procesy elektrochemiczne, z których największe znaczenie ma elektroredukcja rozpuszczalników i soli litu. Bardzo duży ujemny potencjał anody działa redukująco na większość znanych rozpuszczalników, układ jest więc skrajnie niestabilny termodynamicznie. Procesy te są widoczne na krzywej ładowania anody grafitowej jako plataeu potencjałowe w okolicy 800 mV (względem Li/Li^+), a więc na długo przed rozpoczęciem właściwych procesów prądotwórczych anody grafitowej, które zaczynają się przy około 200 mV. Produkty rozkładu rozpuszczalnika i soli

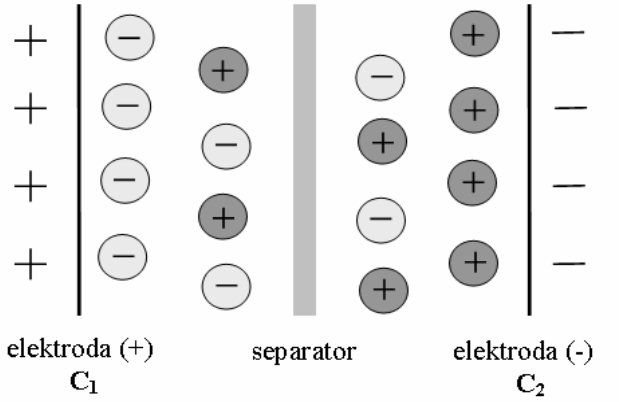
odkładają się na powierzchni grafitu jako warstwa pasywna (określana w literaturze angielskojęzycznej jako *solid electrolyte interphase - SEI)*, która jest izolatorem elektronowym i przewodnikiem jonowym. W pewnym momencie grubość warstwy pasywnej osiąga taką wartość, że powierzchnia elektrody staje się odizolowana od elektrolitu i jego rozkład ustaje, układ osiąga więc stan względnej stabilności kinetycznej, umożliwiający stabilną pracę całego ogniwa nawet przez ponad tysiąc cykli ładowania.

Z jednej więc strony tworzenie warstwy pasywnej konsumuje nieodwracalnie pewną ilość ładunku elektrycznego doprowadzanego do anody w trakcie ładowania, pogarszając wydajność ładowania, z drugiej jednak strony warstwa pasywna jest niezbędna do tego żeby ogniwo z anodą grafitową mogło pracować w sposób odwracalny. W toku wieloletnich prac badawczych wiele uwagi poświęcono dobraniu właściwych rozpuszczalników, które redukując się na anodzie podczas pierwszego cyklu pracy ogniwa tworzyłyby warstewkę pasywną o odpowiednich właściwościach. Wiadomo, że w przypadku niektórych rozpuszczalników warstwa ta jest zbyt gruba, uniemożliwiając migrację kationów litu, oraz będąc przyczyną zbyt dużej pojemności nieodwracalnej. W innych przypadkach warstwa ta jest nazbyt porowata, przez co nie izoluje wystarczająco powierzchni anody i w trakcie kolejnych cykli dochodzi do dalszej elektroredukcji składników elektrolitu. Znamiennym przypadkiem jest węglan propylenu (PC). Związek ten jest skądinąd bardzo dobrym rozpuszczalnikiem dla soli litu i z powodzeniem stosowany był w pierwotnych ogniwach litowych (w ogniwach takich stosuje się metaliczny lit jako anodę, i ogniwa nie ładuje się ponownie po rozładowaniu). W takcie pracy w odwracalnym akumulatorze litowo-jonowym z anodą grafitową dochodzi jednak do kointerkalacji cząsteczek PC solwatujących kationy litu wraz z tymi kationami pomiędzy warstwy grafenowe materiału anodowego, po czym następuje rozkład rozpuszczalnika z wydzieleniem gazowego propylenu. Ciśnienie jakie się wtedy wytwarza powoduje rozszczepienie łusek grafitowych i jego nieodwracalną degradację. Zjawisko to nazywamy eksfoliacją grafitu. O możliwych metodach przeciwdziałania temu zjawisku traktował będzie jeden z kolejnych rozdziałów. Tymczasem jednak standardem w komercyjnych akumulatorach Li-ion są elektrolity, w których rozpuszczalnikami dla soli litu jest

mieszanina węglanu etylu (EC) i składnika obniżającego lepkość, takiego jak węglan dietylu (DEC) lub węglan dimetylu (DMC). Węglan etylu stosuje się ze względu na jego doskonałe właściwości pasywujące (filmotwórcze). Do wad takiego rozwiązania należy brak możliwości pracy w bardzo niskich temperaturach (węglan etylu jest ciałem stałym w temperaturze pokojowej).

2.3 Kondensatory elektrochemiczne

Kondensatory elektrochemiczne są innego rodzaju urządzeniami do magazynowania i konwersji energii. Podczas gdy w akumulatorze energia gromadzona jest w wiązaniach chemicznych substancji podlegających reakcjom redoks, w kondensatorze energia gromadzona jest zasadniczo w postaci czysto elektrostatycznej (z pewnymi zastrzeżeniami). Kondensatory elektrochemiczne, zwane również superkondensatorami lub ultrakondensatorami [11-29], są atrakcyjnymi źródłami prądu z powodu ich bardzo wysokiej mocy, dobrej trwałości cyklicznej oraz pośredniej energii między klasycznymi dielektrycznymi kondensatorami, a ogniwami. Właściwości typowego kondensatora elektrochemicznego związane są z akumulowaniem ładunku w podwójnej warstwie elektrycznej bez faradajowskich reakcji (czyli bez przejścia elektronów). Elektrochemiczny kondensator składa się z elektrod: dodatniej i ujemnej (rysunek 3).



Rysunek 3. Schemat kondensatora elektrochemicznego

Pojemność C liczona na jedną elektrodę, ze względu na czyste elektrostatyczne oddziaływania jonów jest proporcjonalna do powierzchni pogranicza faz elektroda – elektrolit, co przedstawia wzór:

$$C = \frac{\varepsilon S}{d}$$

gdzie ε jest stałą dielektryczną, d to grubość podwójnej warstwy elektrycznej, która jest zwykle mniejsza od 1 nm.

Technologiczna przewaga kondensatorów elektrochemicznych nad konwencjonalnymi kondensatorami polega na bardzo małej wartości odległości między okładkami kondensatora (podwójna warstwa elektryczna), co prowadzi do uzyskiwania bardzo dużych pojemności w porównaniu do wartości około 0.1 F/m^2 typowych dla konwencjonalnych kondensatorów. Biorąc pod uwagę fakt, iż elektrody superkondensatorów są głównie wykonywane z węgli aktywnych, które mają powierzchnie rzędu 1000 m^2/g, pojemności około 100 F na gram węgla są łatwo osiągalne [11-18]. Na pojemność całego kondensatora składają się pojemności szeregowo połączonych dwóch kondensatorów, zgodnie ze wzorem:

$$\frac{1}{C} = \frac{1}{C_1} + \frac{1}{C_2}$$

W przypadku kondensatora zbudowanego z dwóch elektrod różniących się pojemnościami elektroda o mniejszej pojemności wnosi więcej do 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). Wartość energii zakumulowanej w kondensatorze elektrochemicznym jest proporcjonalna do pojemności C i kwadratu napięcia U zgodnie ze wzorem:

$$W = \frac{1}{2}CU^2$$

Zastosowanie elektrolitów organicznych, cechujących się stabilnością w szerszym przedziale potencjałowym, w porównaniu do elektrolitów wodnych jest obecnie przedmiotem intensywnych badań. Kondensator z elektrolitem organicznym, może pracować w przedziale potencjałowym nawet 2,5 V (a przy zastosowaniu cieczy jonowych nawet większym), w przeciwieństwie do elektrolitów wodnych pracujących w zakresie poniżej 1 V. Do zalet kondensatorów zalicza się zdolność do bardzo szybkiej propagacji ładunku, z czym wiąże się zdolność do bardzo szybkiego oddawania zgromadzonej energii, ponieważ nie ma reakcji chemicznych jak ma to miejsce w akumulatorach. Takie źródło energii może być wykorzystane w systemach hybrydowych dla zasilania samochodów elektrycznych, komputerów przenośnych, UPS i w pulsowej technice laserowej itp.

Wyróżnia się dwa typy kondensatorów elektrochemicznych:

1. Kondensator z podwójną warstwą elektryczną, gdzie występują tylko elektrostatyczne oddziaływania między jonami, a powierzchnią elektrody [11-18],
2. Superkondensatory opierające się dodatkowo na pseudopojemnościowych reakcjach faradajowskich [11,12, 18-29].

Elektrony biorące udział w reakcjach faradajowskich są przenoszone do lub z poziomu walencyjnego materiałów, takich jak tlenki metali przejściowych (RuO_2, MnO_2, CrO_3) [1, 18-20], lub polimerów przewodzących [11, 12, 21]. Efekty pseudopojemnościowe mogą być realizowane przez dotowanie heteroatomami takimi jak: tlen, azot [22-26]. Wartość pojemności jest ściśle związana z właściwościami i powierzchnią granicy faz elektroda – elektrolit, a także z ilością pseudopojemnościowych domieszek.

Zdolność gromadzenia ładunku elektrycznego, a także dobra przewodność elektryczna i termiczna oraz odporność na działanie agresywnych elektrolitów, to cechy, którymi powinny się charakteryzować materiały elektrodowe w kondensatorach elektrochemicznych [11]. Właściwościami takimi cechują się tlenki metali szlachetnych i półszlachetnych (np. RuO_2), polimery przewodzące oraz materiały

węglowe [11-29]. W skład tych ostatnich wchodzą: węgle aktywne, aerożele, kserożele, sadza, nanorurki węglowe. Materiały węglowe mogą posiadać niezwykle rozwiniętą powierzchnię rzeczywistą, co prowadzi do wzrostu pojemności elektrod [17]. Duża powierzchnia porów ułatwiających dyfuzję elektrolitu w strukturę materiału węglowego oraz odpowiedni rozmiar porów odpowiadający wielkości jonów są korzystne dla pełnego wykorzystania tych materiałów w kondensatorach elektrochemicznych.

W kondensatorach elektrochemicznych podwójnej warstwy elektrycznej, w których materiałem aktywnym są materiały węglowe jako elektrolity stosuje się roztwory wodne kwasów, zasad, soli, roztwory elektrolitu w rozpuszczalnikach aprotycznych, stałe elektrolity polimerowe, żelowe elektrolity polimerowe oraz ciecze jonowe. Najczęściej stosowanymi elektrolitami są roztwory kwasu siarkowego, kwasu solnego, wodorotlenku potasu, wodorotlenku sodu. Przewodnictwo właściwe wodnych elektrolitów zależy głównie od ich stężenia. Roztwory elektrolitów mają duży wpływ na budowę podwójnej warstwy elektrycznej. Występują tu oddziaływania elektrostatyczne, oraz procesy nieelektrostatycznej adsorpcji jonów lub cząstek na powierzchni materiału. Zaletą stosowanych elektrolitów w kondensatorach elektrochemicznych podwójnej warstwy elektrycznej jest ich niski koszt, ogólna dostępność, oraz ich dobre przewodnictwo. Roztwory wodnych elektrolitów dobrze zwilżają powierzchnię materiału elektrodowego, co wpływa na pojemność układu. Wadą wodnych roztworów elektrolitów jest mały zakres przedziału potencjałowego do 1 V.

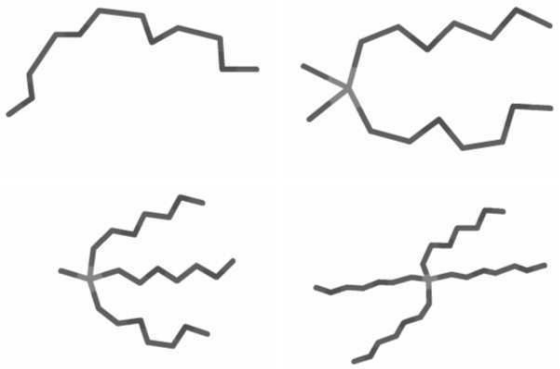
Dobór niewodnego elektrolitu jest bardziej skomplikowany. Elektrolit organiczny powinien wykazywać elektrochemiczną stabilność, oraz powinien być chemicznie trwały wobec zastosowanych materiałów. Powinien również mieć możliwie najlepsze właściwości przenoszenia, a więc charakteryzować się dużą wartością przewodnictwa właściwego. Najczęściej stosowanymi niewodnymi elektrolitami są: acetonitryl, węglan propylenu wraz z rozpuszczoną w nim solą przewodzącą, np. $LiPF_6$, $LiAsF_6$, $TEABF_4$. Elektrolity takie mogą pracować w zakresie przedziału potencjałowego do 2,5 V [11, 24-25].

Inną grupą elektrolitów w zastosowaniach dla kondensatorów elektrochemicznych są ciecze jonowe [27-29]. Elektrolity te mogą pracować w przedziale potencjałowym znacznie przekraczającym 3 V, co ma ogromne znaczenie, dla znacznego podniesienia energii kondensatorów elektrochemicznych nawet do 40 Wh/kg [28]. Aczkolwiek zastosowanie cieczy jonowych jako elektrolitów dla kondensatorów jest wciąż ograniczone, ze względu na dużo niższe przewodnictwo a także dużą lepkość takich układów w stosunku do elektrolitów wodnych, co uwidacznia się szczególnie przy dużych obciążeniach prądowych.

3. Zastosowanie podandów w akumulatorach Li-ion i kondensatorach

3.1 Związki podandowe

Podandami nazywa się w chemii supramolekularnej związki, których podstawowym elementem strukturalnym są łańcuchy zbudowane z powtarzających się elementów węgiel-węgiel-heteroatom. W przypadku gdy heteroatomem tym jest tlen, mamy do czynienia z łańcuchami polioksaetylenowymi (lub polieterowymi) np: -$(CH_2\text{-}CH_2\text{-}O)_n$-. Łańcuchy te mogą być spięte za pomocą atomu lub grupy atomów, tworząc w ten sposób skomplikowane struktury przestrzenne. Jeśli atomem spinającym jest krzem, wtedy mówimy o podandach krzemowych. W zależności od liczby łańcuchów przyłączonych do atomu centralnego wyróżniamy di-, tri- i tetrapodandy (rysunek 4).



Rysunek 4. Możliwe struktury podandów

Podandy, a w szczególności podandy krzemowe, posiadają unikalne własności solwatujące w stosunku do kationów metali alkalicznych, i z tego względu mogą być rozważane jako rozpuszczalniki dla soli metali alkalicznych. Właściwości solwatujące podandów krzemowych wynikają z obecności wolnych par elektronowych na atomach tlenu w łańcuchach polioksaetylenowych. Bardziej szczegółowe omówienie właściwości chemicznych i zastosowań podandów krzemowych przekracza zakres niniejszego artykułu. Szersze omówienie tego zagadnienia znaleźć można w pracach [30-31]. Z punktu widzenia urządzeń elektrochemicznych opartych na licie istotne jest, że względu na swoje właściwości kompleksujące względem kationu litu, oraz możliwość funkcjonalizacji za pomocą pożądanych ugrupowań, podandy mogą być rozważane jako rozpuszczalniki lub też dodatki do elektrolitów spełniające określone zadania w ogniwie litowo-jonowym.

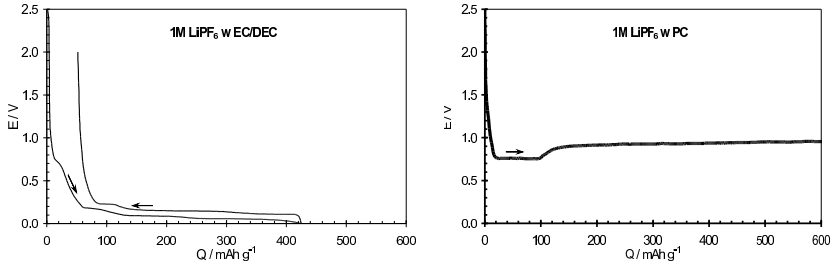
3.2 Podandy jako funkcjonalne dodatki do elektrolitów w ogniwie Li-ion

We wcześniejszym rozdziale opisano ogólną budowę typowego ogniwa Li-ion, na którą składa się grafitowa anoda, katoda wykonana z tlenku litowo-kobaltowego, oraz elektrolit będący roztworem soli litu w mieszanie dwóch rozpuszczalników organicznych. Ten obraz należy uzupełnić o całą gamę substancji pomocniczych nie będących materiałami aktywnymi, wśród których szczególnie ważną rolę odgrywają różnego rodzaju dodatki do elektrolitów. Wyróżnić można następujące główne typy dodatków do elektrolitów [32]:

1. substancje usprawniające tworzenie się warstw pasywnych na graficie (filmotwórcze),
2. środki ochraniające katodę,
3. stabilizatory soli litu,
4. środki przeciwdziałające przeładowaniu ogniwa,
5. środki obniżające palność elektrolitu,
6. środki usprawniające osadzanie metalicznego litu (w przypadku akumulatorów z anodą z metalicznego litu),
7. środki ułatwiające dysocjację jonową,
8. Inhibitory korozji aluminiowych kolektorów prądowych,

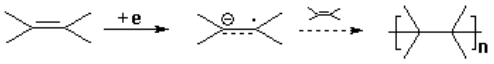
9. Substancje zwilżające i zmniejszające lepkość.

Dodatki filmotwórcze są to substancje, która dodane do głównego rozpuszczalnika, lub też mieszaniny rozpuszczalników, powodują że warstwa pasywna na anodzie grafitowej posiada bardziej pożądane właściwości. Przekłada się to na dłuższą pracą cykliczną ogniwa. W skrajnym przypadku odpowiedni dodatek filmotwórczy umożliwia w ogóle funkcjonowanie ogniwa Li-ion. Jest tak we wcześniej opisywanym przypadku ogniw z węglanem propylenu jako głównym rozpuszczalnikiem. Na rysunku 5. pokazano krzywe stałoprądowego ładowania/wyładowania zarejestrowane w półogniwach anodowych z litową elektrodą przeciwną dla typowego materiału grafitowego w dwóch rodzajach elektrolitów: „typowym" elektrolicie zawierającym węglan etylenu jako składnik filmotwórczy i elektrolicie w którym rolę rozpuszczalnika soli litu pełni wyłącznie węglan propylenu. W pierwszym przypadku obserwuje się prawidłowe tworzenie warstwy pasywnej (plateau przy ok. 800 mV), po którym następuje długie plateau związane z wchodzeniem kationów Li^+ w strukturę krystaliczną grafitu i tworzeniem związku interkalacyjnego. W drugim przypadku plateau przy 800mV nie kończy się, i nigdy nie dochodzi do fazy interkalacji litu, ogniwo więc nie funkcjonuje. Powodem tego jest wspomniane zjawisko eksfoliacji łusek grafitowych, w wyniku którego powierzchnia wystawiona na kontakt z elektrolitem stale wzrasta, powodując rozkład wciąż nowych partii elektrolitu.

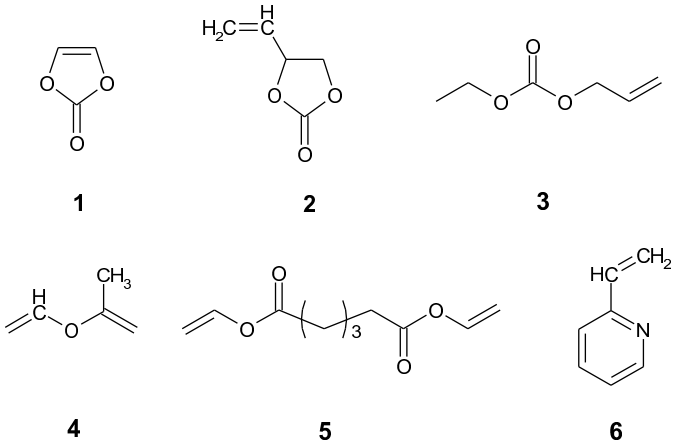


Rysunek 5. Porównanie krzywych stałoprądowego ładowania/wyładowania elektrody grafitowej w klasycznym elektrolicie zawierającym węglan etylenu (rysunek lewy) i elektrolicie zawierającym wyłącznie węglan propylenu jako rozpuszczalnik (rysunek prawy)

Wcześniejsze badania pokazały, że dodatek niewielkich ilości pewnych związków chemicznych likwiduje zjawisko eksfoliacji w elektrolitach z PC. Jest tak zwłaszcza w przypadku dużej liczby związków zawierających wiązanie podwójne. Dodatki filmotwórcze zawierające wiązania podwójne należą podkategorii dodatków typu redukcyjnego. Przyjmuje sie, że dodatki typu redukcyjnego ulegają elektroredukcji tworząc wstępną warstewkę pasywną, która ułatwia powstawanie „właściwej" warstwy pasywnej. Proces ten zachodzi wcześniej (tj. przy wyższych potencjałach) niż proces redukcji zasadniczego rozpuszczalnika. Podtypem dodatków typu redukcyjnego są dodatki polimeryzowalne. Są one monomerami zdolnymi do ulegania polimeryzacji indukowanej elektrochemicznie, zgodnie z następującym równaniem ogólnym:

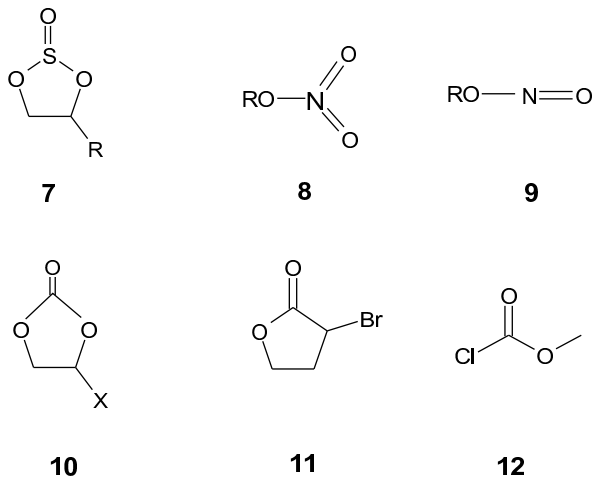


Do dodatków filmotwórczych typu polimeryzowalnego należą między innymi: węglan winylu **1** [32-33], węglan winylowo-etylowy **2** [32-34], węglan allilowo-etylowy **3** [35], octan winylu **4** [36], adypinian winylu **5** [36], 2-winylopirydyna **6** [37], itp. (schemat 1).



Schemat 1.

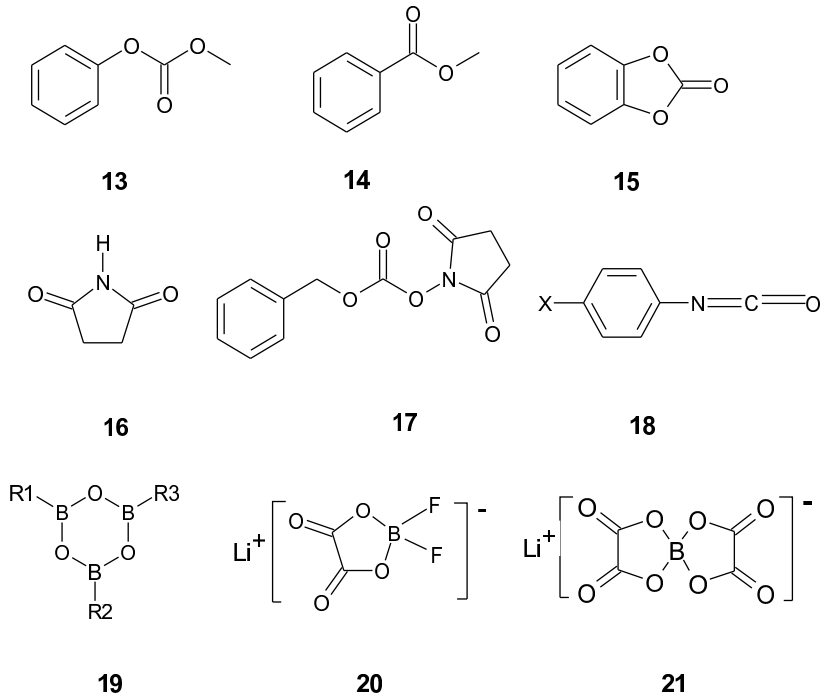
Z kolei niepolimeryzowalne dodatki filmotwórcze typu redukcyjnego to między innymi: cykliczne siarczkany (IV) alkilowe i arylowe **7** [38], azotany(V) **8** [39], azotki **9** [40], halogenowane węglany etylenu **10** [41-42], halogenowane laktony **11** i chloromrówczan metylenu **12** [43]. Do tej samej klasy dodatków ułatwiających tworzenie warstwy pasywnej należą SO_2, CS_2 i polisiarczki. Działanie związków zawierających sierkę polega na wspomaganiu budowania warstwy pasywnej poprzez adsorpcję produktów ich redukcji na krawędziach łusek grafitowych, a więc miejscach szczególnie reaktywnych. Ich efektywność zależy od powinowactwa wspomnianych produków redukcji do miejsc reaktywnych na graficie i wzrasta wraz z zawartością siarki w cząsteczce. Rola związków zawierających wiązanie (>C=O) polega natomiast na redukcji grupy karbonylowej w sposób podobny jak to ma miejsce w przypadku węglanu etylenu.



Schemat 2.

Z kolei dodatki filmotwórcze typu reakcyjnego nie ulegają elektrochemicznej redukcji, natomiast posiadają zdolność wyłapywania rodników anionowych, które są produktem przejściowym w procesie redukcji rozpuszczalników. Mogą one również wchodzić w reakcje z produktami końcowymi tej redukcji. W obu przypadkach

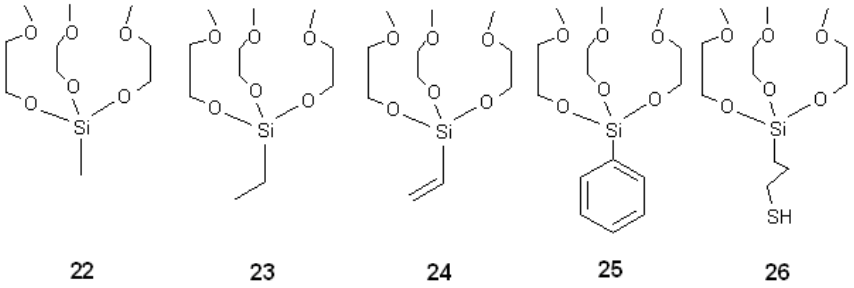
rezultatem końcowym jest bardziej stabilna warstwa pasywna. Przykłady tego typu związków przedstawia schemat 3.



Schemat 3.

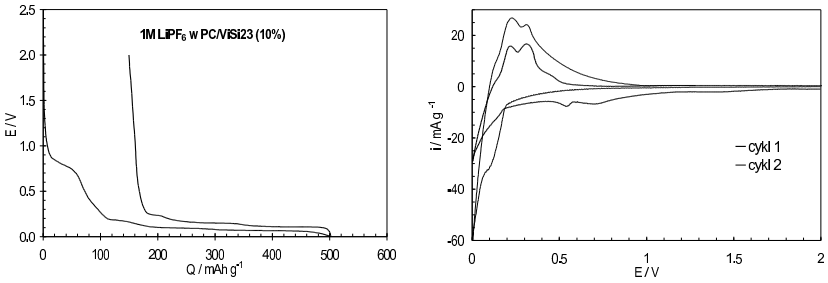
3.3 Podandy krzemowe jako współrozpuszczalniki/dodatki filmotwórcze w ogniwie Li-ion

Okazuje sie, że niektóre związki podandowe mogą z powodzeniem rozważane być jako dodatki do elektrolitów zawierających PC przeciwdziałające eksfoliacji grafitu. Weźmy pod uwagę rodzinę trójpodandów krzemowych różniących się rodzajem grupy funkcyjnej przy atomie krzemu:



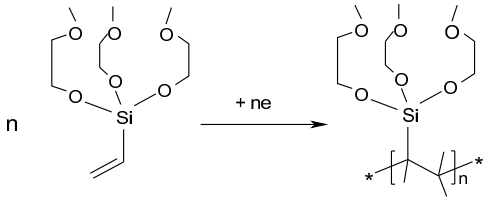
Schemat 4.

Ze względu na właściwości solwatujące względem kationu litu związki te można rozważać jako rozpuszczalniki soli litu w elektrolitach dla ogniw Li-ion. Jednocześnie związki te zachowują się w określony sposób w trakcie elektroredukcji na anodzie grafitowej podczas pierwszego ładowania ogniwa, tak więc produkty ich rozkładu utworzą warstwę pasywną, bądź też wywrą wpływ na formowanie się warstwy pasywnej w obecności innego rozpuszczalnika. Dla przykładu rozważmy zachowanie półogniwa anodowego z anodą grafitową, w której głównym rozpuszczalnikiem jest węglan propylenu, a rozpuszczalnikiem mniejszościowym (dodatkiem do elektrolitu) winylo tris(2-metoksyetoksy)silan **24** (akronim ViSi23). Na rysunku 6 pokazano krzywą galwanostatyczną i potencjodynamiczną zarejestrowaną w takim układzie [44].

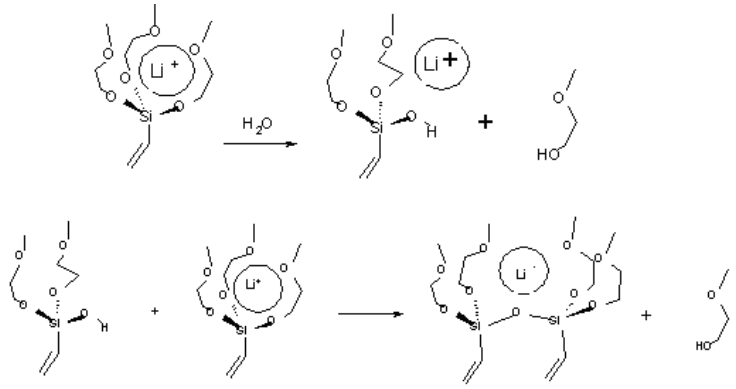


Rysunek 6. Krzywe stałoprądowego ładowania/wyładowania (rysunek po lewej) i krzywe chronowoltoamperometrii cyklicznej (rysunek po prawej) zarejestrowane dla ogniwa Li | 1M $LiPF_6$ w PC/ViSi23 (10%)|grafit.

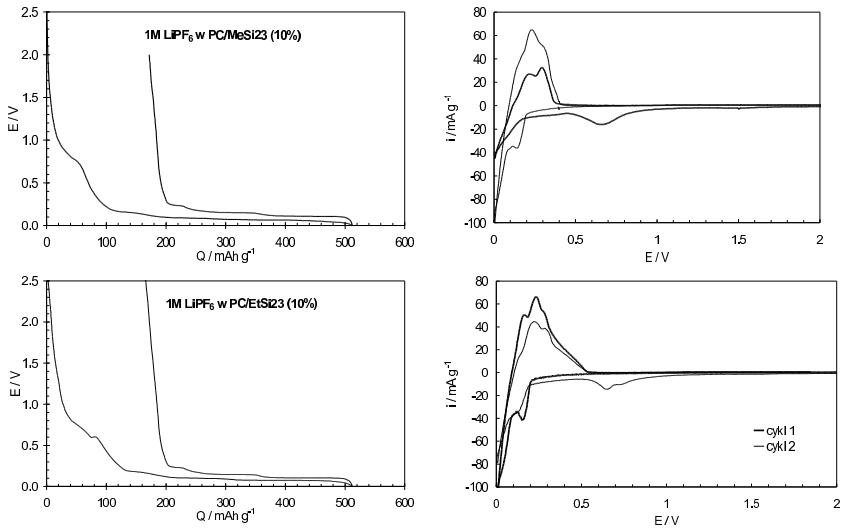
Dodatek trójpodandu krzemowego z grupą winylową do węglanu propylenu powoduję, że ogniwo pracuje w prawidłowy sposób. Charakterystyczne plateau potencjałowe na krzywej galwanostatycznej przy około 800 mV, po którym ma miejsce interkalacja litu, wskazuje na to że utworzyła się warstwa pasywna o dobrych właściwościach i nie doszło do szkodliwej kointerkalacji cząsteczek PC. Warstwa pasywna tworzy się tylko w pierwszym cyklu (brak jest widocznych pików w drugim cyklu na krzywej potencjodynamicznej). Świadczy to posiadaniu przez ViSi23 właściwości wspomagania tworzenia warstwy pasywnej. Pojemność odwracalna anody grafitowej wynosi 352 mAh/g, co jest wartością bardzo bliską maksymalnej teoretycznie dostępnej pojemności materiałów grafitowych. Ze względu na obecność grupy winylowej omawiany związek można zaliczyć do dodatków filmotwórczych typu polimeryzowalnego. Może mieć więc miejsce inicjowana elektrochemicznie polimeryzacja zgodnie ze schematem:



Możliwy jest inny mechanizm, specyficzny dla tego typu podandów. Mechanizm ten wiąże się z możliwością hydrolizy, zgodnie ze schematem:



Procesy hydrolizy zachodzą w obecności wody i są one katalizowana obecnością soli litu. Rola kationu litu polega na wymuszaniu samoorganizacji centrów podandowych, przez co polepszają się warunki przestrzenne do zajścia reakcji. Samoorganizacja związków podandowych jest ich cechą charakterystyczną i została dobrze udokumentowana w literaturze. Hydroliza prowadzi do kondensacji centrów podandowych i w utworzenia sieci, przy czym uwalniane są odpowiednie glikole. Możliwe, że taki czysto chemiczny proces prowadzi to utworzenia bariery przeciwdziałającej kointerkalacji cząsteczek PC w strukturę grafitu, byłby to więc szczególny przypadek dodatku filmotwórczego typu reakcyjnego. Nasuwa się pytanie, czy procesy tego typu mogą stanowić zasadniczy mechanizm ułatwiający prawidłową pasywację anody grafitowej. Weźmy pod uwagę dwa inne związki z omawianej rodziny, mianowicie metylo tris(2-metoksyetok)sysilan **22** (akronim MeSi23) i etylo tris(2-metoksyetoksy)silan **23** (akronim EtSi23). Przedstawione na rysunku 7 charakterystyki elektrochemiczne dowodzą, ze również w tym przypadku mamy do czynienia z pozytywnym wpływem dodatku podandu. Jest tak pomimo braku wiązań podwójnych, a więc mechanizm polimeryzacji jest w tym przypadku wykluczony.

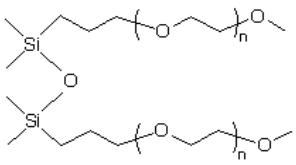


Rysunek 7. Krzywe stałoprądowego ładowania/wyładowania i krzywe chronowoltoamperometrii cyklicznej zarejestrowane dla ogniw Li | 1M $LiPF_6$ w PC/MeSi23 (10%)|grafit i Li | 1M $LiPF_6$ w PC/EtSi23 (10%)|grafit

Mechanizm działania omawianych dwóch związków opiera się albo na hydrolizie i sieciowaniu (dodatki typu reakcyjnego) [45], albo też na redukcji elektrochemicznej z utworzeniem odpowiednich produktów nierozpuszczalnych (dodatki typu redukcyjnego). Warto też zauważyć różnice w przebiegu krzywych galwanostatycznych i potencjodynamicznych zarejestrowanych dla wszystkich trzech omówionych trójpodandów krzemowych, co świadczy o pewnych różnicach w przebiegu procesów tworzenia warstw pasywnych. O różnicach tych świadczą również nieco inne wartości parametrów elektrochemicznych anod grafitowych (wartości pojemności odwracalnych i nieodwracalnych).

Niektóre inne trójpodandy krzemowe również posiadają zdolność przeciwdziałania kointerkalacji PC, aczkolwiek charakterystyki elektrochemiczne niekiedy bardzo odbiegają od standardu. Na przykład w przypadku struktury **25** rejestrowane pojemności anod grafitowych są zbyt małe, co może wynikać z dużej lepkości elektrolitu, natomiast w przypadku struktury **26** wogóle nie obserwuje się korzystnego działania pasywującego. Dalsze badania wykażą, jaki jest rzeczywisty skład chemiczny warstw pasywnych na graficie w przypadku zastosowania różnych trójpodandów krzemowych, co pozwoli na definitywne rozstrzygnięcie zachodzących tam mechanizmów.

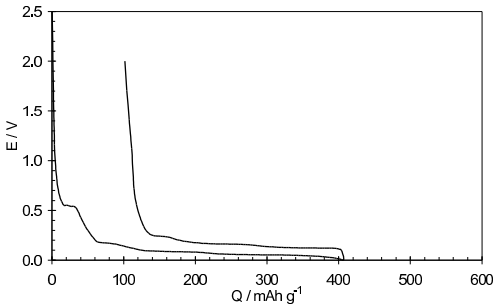
Struktura **27** pokazana na Schemacie 5 jest kolejnym typem związków podandowych, który okazał się być skutecznym w zapobieganiu kointerkalacji PC w ogniwach litowych z anodą grafitową. Na Rysunku 8 pokazano krzywą galwanostatyczną dla układu zawierającego silan o n=3-7. Ta struktura podandowa charakteryzuje się brakiem możliwości hydrolizy, mechanizm pasywacji musi się więc opierać wyłącznie na elektrochemicznej redukcji cząsteczek silanu. Dodatki tego typu należy więc zaliczyć do dodatków typu redukcyjnego.



27

Schemat 5.

Związki tego typu wydają się być szczególnie obiecujące jako składniki elektrolitów ze względu na bardzo dobre charakterystyki elektrochemiczne i łatwość syntezy. Zwraca uwagę zwłaszcza najmniejsza jak dotąd wartość pojemności nieodwracalnej.



Rysunek 8. Krzywe stałoprądowego ładowania/wyładowania i krzywe chronowoltoamperometrii cyklicznej zarejestrowane dla ogniw Li | 1M $LiPF_6$ w PC/silan (10%)|grafit dla silanu o strukturze pokazanej na Schemacie 5

3.4. Trójpodandy krzemowe jako rozpuszczalniki elektrolitów dla superkondensatorów

W przypadku kondensatorów elektrochemicznych, inaczej niż w przypadku ogniw Li-ion, pomimo stosowania elektrod węglowych nie mamy do czynienia z się warstw pasywnych o zasadniczym znaczeniu dla funkcjonowania urządzenia. Dlatego też stosowany rozpuszczalnik ma jedynie za zadanie pełnić rolę medium dla kationów i anionów. W tabeli 1 zestawiono pojemności (mierzone w faradach) wyznaczone dla kondensatorów elektrochemicznych wykorzystujących węgiel aktywny jako elektrody. Elektrolitami we wszystkich przypadkach był roztwór $LiPF_6$ w trójpodandzie krzemowym (struktury **22**, **23** i **24**). Badanie demonstruje możliwość uzyskiwania znaczących pojemności kondensatorów przy zastosowaniu związków podandowych pełniących rolę jedynych rozpuszczalników. Pomimo dość znacznych pojemności widać wyraźnie, że wraz ze wzrostem gęstości prądu spada pojemność kondensatora elektrochemicznego wykorzystującego jako elektrolit trójpodand krzemowy. Powodem obserwowanego spadku pojemności jest znaczna różnica w przewodnictwie

właściwym roztworów na bazie silanów w stosunku do komercyjnie używanych w kondensatorach elektrolitów aprotycznych (takich jak 1 M $TEABF_4$ w acetonitrylu). Przewodnictwo najlepszego spośród prezentowanych układów, zawierającego podand z grupą etylową, jest trzykrotnie mniejsze niż dla elektrolitu komercyjnego, zaś dla pozostałych elektrolitów jest to różnica około dwudziestokrotna. Pomimo tak znacznych różnic w przewodnictwie, są to elektrolity o potencjalnym znaczeniu, ponieważ dają możliwość rozszerzenia przedziału potencjałowego pracy kondensatora elektrochemicznego do około 3 V (dla komercyjnych elektrolitów aprotycznych przyjmuje się wartość 2.5V jako bezpieczną). Tak znaczne rozszerzenie przedziału potencjałowego pracy kondensatora ma znaczny wpływ na energię kondensatora, która jak wiadomo zależy od kwadratu potencjału.

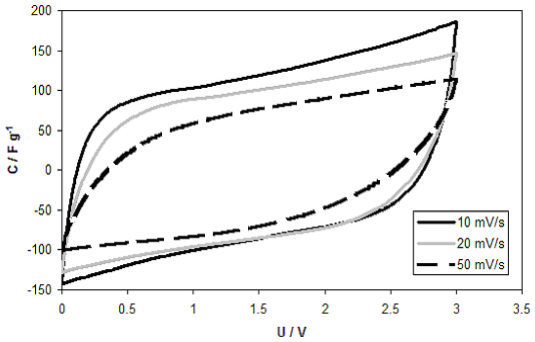
Krzywe voltametryczne dla układu z podandem EtSi23 jako rozpuszczalnikiem pokazano na Rysunku 9. Dalsze prace z pewnością pozwolą na zoptymalizowanie układów.

Tabela 1. Zestawienie pojemności kondensatorów wyznaczonych metodą stałoprądową dla różnych gęstości prądowych, w zależności od rodzaju rozpuszczalnika podandowago

Elektrolit	i [mA/g]	C [F]
1M $LiPF_6$ w ViSi23	100	71
	200	55
	500	25
1M $LiPF_6$ w MeSi23	100	79
	200	64
	500	38
1M $LiPF_6$ w EtSi23	100	120
	200	105
	500	96

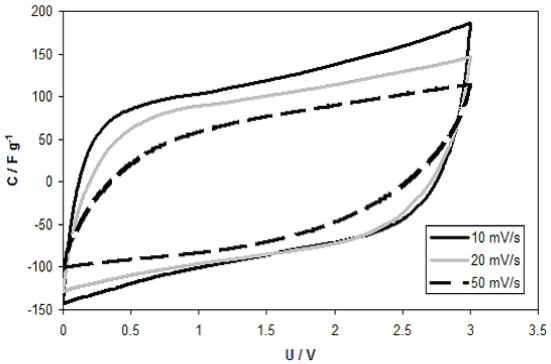
3.5. Inne elektrolitowe zastosowania związków podandowych

Dotychczas omawiane przykłady zastosowania związków podandowych jako składników elektrolitów charakteryzowały się tym że związki te występowały w postaci wolnej w elektrolitach ciekłych. W tej postaci pełniły rolę rozpuszczalników lub współrozpuszczalników i ewentualnie dodatków o określonej funkcji. Istnieje możli-



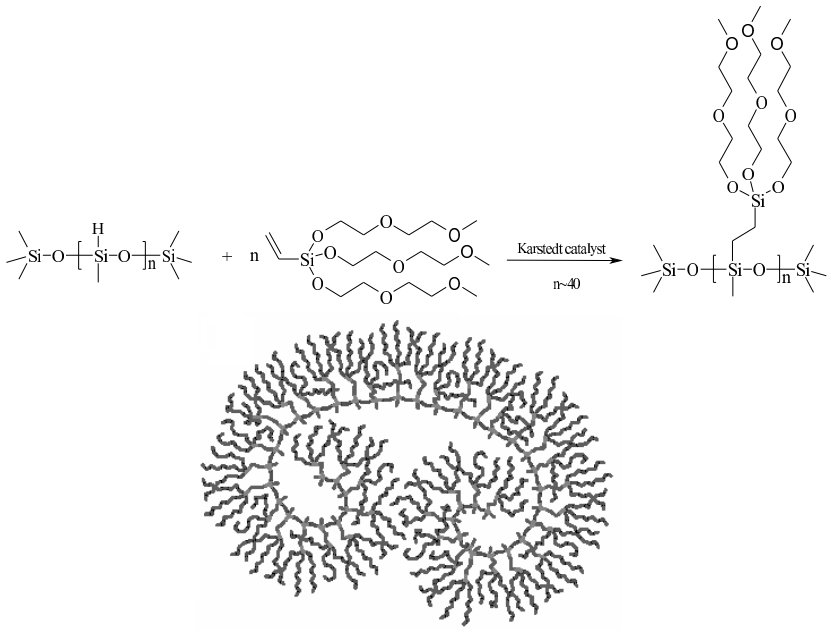
Rysunek 9. Krzywe chronowoltoamperomatryczne (przy różnych szybkościach skanowania potencjału) zarejestrowane dla kondensatora elektrochemicznego z silanem EtSi23 jako rozpuszczalnikiem

wość przyłączenia centrów podandowych do pewnych struktur polimerowych lub ceramicznych. Idea ta stwarza dla związków typu podandowego całkowicie nowe obszary zastosowań w dziedzinie elektrolitów dla akumulatorów litowych i superkondensatorów, a być może także w innych urządzeniach elektrochemicznych wykorzystujących, takich jak sensory elektrochemiczne i elektrochemiczne ogniwa słoneczne.



Rysunek 9. Krzywe chronowoltoamperomatryczne (przy różnych szybkościach skanowania potencjału) zarejestrowane dla kondensatora elektrochemicznego z silanem EtSi23 jako rozpuszczalnikiem

Jednym z takich obszarów zastosowań dla podandów krzemowych są elektrolity polimerowe. Przez przyłączenie cząsteczki silanu ViSi33 (struktura **24**) do łańcucha polisiloksanowego możliwe jest uzyskanie nowego polimeru, w którym centra trójpodandowe zaszczepione są w sposób zorganizowany wzdłuż łańcucha głównego (rysunek 10). Obecność grup polieterowych sprawia, że polimer taki być stałym rozpuszczalnikiem dla soli litu, i z tego względu mogą być rozważane jako potencjalne elektrolity polimerowe dla akumulatorów Li-ion, a także być może jako jonofory w elektrochemicznych sensorach litu.



Rysunek 10. Równanie reakcji syntezy i wizualizacja cząsteczki polimeru powstałego przez przyłączenie centrów trójpodandowych do łańcucha polisiloksanowego

Udało się wykazać, że elektrolity takie charakteryzują się nie tylko bardzo wysokim przewodnictwem jonowym, jednym z najwyższych notowanych w literaturze naukowej dla nieplastyfikowanych elektrolitów polimerowych, ale również korzystne właściwości mechaniczne i wysoką stabilność elektrochemiczną [45].

Inną możliwością jest przyłączenie centrów podandowych do powierzchni krzemionki. Uzyskane w ten sposób funkcjonalizowane nanocząstki można traktować jak stałe rozpuszczalniki/receptory dla kationów litu, posiadające znaczące przewodnictwo powierzchniowe. Mogą znaleźć zastosowanie między innymi jako wypełniacze ceramiczne do elektrolitów polimerowych, zarówno suchych (głównie opartych na politlenku etylenu) jak i żelowych.

4. Podsumowanie

W pracy omówiono budowę i zasadę działania akumulatora litowo-jonowego i kondensatora elektrochemicznego i pokazano, że procesy w nich zachodzące stanowią pole do zastosowania niektórych osiągnięć chemii supramolekularnej. Przedstawiono wybrane zagadnienia związane z zastosowaniem podandów krzemowych jako składników elektrolitów w wyżej wymienionych elektrochemicznych urządzeniach do magazynowania i konwersji energii. Niektóre trójpodandy krzemowe mogą znaleźć zastosowanie jako funkcjonalne dodatki do elektrolitów w ogniwach Li-ion, wspomagające tworzenie warstw pasywnych i zapobiegające szkodliwej eksfoliacji materiału elektrodowego. Dalsze prace zmierzają do identyfikacji innych struktur podandowych mogących pełnić podobne role. Idea ta może posłużyć do opracowania nowatorskich elektrolitów charakteryzujących się niskim kosztem, mniejszą szkodliwością dla środowiska i zdolnością do pracy w bardzo niskich temperaturach. Te same trójpodandy krzemowe z powodzeniem pełnią rolę podstawowych rozpuszczalników w wysokoenergetycznych kondensatorach elektrochemicznych, pozwalając na uzyskiwanie pojemności zbliżonych do obecnie stosowanych rozwiązań. Poprzez przyłączenie centrów trójpodandowych do długich łańcuchów polimerowych lub nanocząstek ceramicznych możliwe jest uzyskanie materiałów przewodzących jonowo, które mogą znaleźć zastosowanie jako elektrolity polimerowe i ceramiczne składniki kompozytowych elektrolitów polimerowych. Omówiony wycinek prac badawczych stanowi dowód na potencjał jaki tkwi w zastosowaniu dokonań chemii supramolekularnej w szeroko rozumianej dziedzinie elektrochemii stosowanej.

Literatura

1. "Modern Batteries", C. A. Vincent, B. Scrosati, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1997;
2. Handbook;
3. E. Peled, J. Electrochem. Soc., 126 (1979) 2047;
4. Y. Ein-Eli, B. Markovsky, D. Aurbach, Y. Carmeli, H. Yamin, S. Luski, Electrochim. Acta, 39 (1994) 2559;
5. J.-S. Kim, Y.-T. Park, J. Power Sources, 91 (2000) 172;
6. F. Coowar, A. M. Christie, P. G. Bruce, C. A. Vincent, J. Power Sources, 75 (1998) 144;
7. R. Imhof, P. Novák, J. Electrochem. Soc., 145 (1998) 1081;
8. Y. Ein-Eli, S. F. McDevitt, D. Aurbach, B. Markovsky, A. Schechter, J. Electrochem. Soc., 144 (1997) L180;
9. F. Béguin, F. Chevallier, C. Vix, S. Saadallah, J. N. Rouzaud, E. Frąckowiak, J. Phys. Chem. Solids, 65 (2004) 211;
10. S.-K. Jeong, M. Inaba, Y. Iriyama, T. Abe, Z. Ogumi, J. Power Sources, 119-121 (2003) 555;
11. B. E. Conway *Electrochemical supercapacitors – scientific fundamentals and technological applications* (Kluwer Academic/ Plenum, 1999);
12. E. Frackowiak *Carbon Nanotubes for Storage of Energy: Super Capacitors*. Edited by J. A. Schwarz, C. Contescu, and K. Putyera *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology* (Marcel Dekker, New York, 2004) 537;
13. E. Frackowiak, F. Béguin, Carbon, 39 (2001) 937;
14. E. Frackowiak, F. Béguin, Carbon, 40 (2002) 1775;
15. R. Kotz, M. Carlen, Electrochim. Acta, 45 (2000) 2483;
16. G. Gryglewicz, J. Machnikowski, E. Lorenc-Grabowska, G. Lota, E. Frackowiak, Electrochim. Acta, 50 (2005) 1197;
17. K. Kierzek, E. Frackowiak, G. Lota, G. Gryglewicz, J. Machnikowski, Electrochim. Acta, 49 (2004) 515;
18. J. S. Ye, H. F. Cui, X. Liu, T. M. Lim, W.D. Zhang, F. S. Sheu, Small 1 (2005) 1;

19. J. Jiang. A. Kucernak, Electrochim. Acta, 47 (2002) 2381;
20. G. Lota, E. Frackowiak, J. Mitkal, M. Monthioux, 434 (2007) 73;
21. E. Frackowiak, V. Khomenko, K. Jurewicz, K. Lota, F. Béguin, J. Power Sources, 153 (2006) 413;
22. T. A. Centeno , F. Stoeckli, J. Power Sources, 154 (2006) 314;
23. F. Béguin, K. Szostak, G. Lota, E. Frackowiak, Adv. Mater., 17 (2005) 2380;
24. G. Lota, B. Grzyb, H. Machnikowska, J. Machnikowski, E. Frackowiak, Chem. Phys. Lett., 404 (2005) 53;
25. E. Frackowiak, G. Lota, J. Machnikowski, C. Vix-Guterl, F. Béguin, Electrochim. Acta, 51 (2006) 2209;
26. G. Lota, K. Lota, E. Frackowiak, Electrochem. Commun., 9 (2007) 1828;
27. A. Lewandowski, M. Galiński, J. Phys. Chem. Solids, 65 (2003) 281;
28. E. Frackowiak. G. Lota, J. Pernak, Appl. Phys. Lett., 86 (2005) 164104;
29. J. Pernak, A. Skrzypczak, G. Lota, E. Frąckowiak, Chem. Eur. J., 13 (2007) 3106;
30. J.-M. Lehn, *Chemia supramolekularna*, IChF PAN, Warszawa, 1985;
31. B. Łęska, G. Schroeder, *Rozpuszczalniki podandowe*, w *Kompleksy typu gość-gospodarz*, Betagraf P.U.H, Poznań 2003;
32. G. Chen, G.V. Zhuang, T.J. Richardson, G. Liu, P.N.J. Ross, Electrochem. Solid-State Lett. 8 (2005) A344;
33. T. Sasaki, T. Abe, Y. Iriyama, M. Inaba, Z. Ogumi, J. Electrochem. Soc. 152 (2005) A2046;
34. Y.S. Hu, W.H. Kong, Z.X. Wang, H. Li, X. Huang, L.Q. Chen, Electrochem. Solid-State Lett. 7 (2004) A442;
35. J.T. Lee, Y.W. Lin, Y.S. Jan, J. Power Sources 132 (2004) 244;
36. K. Abe, H. Yoshitake, T. Kitakura, T. Hattori, H.Wang, M. Yoshio, Electrochim. Acta 49 (2004) 4613;
37. S. Komaba, T. Itabashi, T. Ohtsuka, H. Groult, N. Kumagai, B. Kaplan, H. Yashiroa, J. Electrochem. Soc. 152 (2005) A937;
38. G.H. Wrodnigg, J.O. Besenhard, M. Winter, J. Electrochem. Soc. 146 (1999) 470;

39. H. Gan, E.S. Takeuchi, U.S. Patent 6,136,477 (2000);
40. H. Gan, E.S. Takeuchi, U.S. Patent 6,027,827 (2000);
41. Z.X. Shu, R.S. McMillan, J.J. Murray, I.J. Davidson, J. Electrochem. Soc. 142 (1995) L161;
42. Z.X. Shu, R.S. McMillan, J.J. Murray, I.J. Davidson, J. Electrochem. Soc. 43 (1996) 2230;
43. A. Naji, J. Ghanbaja, P. Willmann, D. Billaud, Electrochim. Acta 45 (2000) 1893;
44. G. Schroeder, B. Gierczyk, D. Waszak. M. Kopczyk, M. Walkowiak, Electrochem. Commun. 8 (2006) 523;
45. G. Schroeder, B. Gierczyk, D. Waszak, M. Walkowiak, , Electrochem. Commun. 8 (2006) 1583;
46. M. Walkowiak, G. Schroeder, B. Gierczyk, D. Waszak, M. Osińska, Electrochem. Commun., in press.

Rozdział 9

Rezorcynoareny jako fazy stacjonarne w GC i HPLC

Krzysztof Wołowiec, Waldemar Iwanek

Akademia Świętokrzyska, Instytut Chemii, Chęcińska 5, 25-020 Kielce

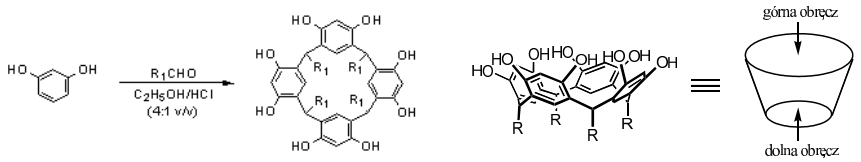
1. Wprowadzenie

Rozwój chromatografii to w dużej mierze rozwój faz stacjonarnych. Pomimo wielkiej różnorodności, nie istnieje faza stacjonarna o charakterze uniwersalnym. Stąd ciągłe poszukiwania faz doskonalszych, dzięki którym można by poszerzyć i tak ogromną już gamę analizowanych związków lub udoskonalić fazy już obecnie stosowane.

W ostatnich latach dużą popularność w technikach chromatograficznych zdobyły fazy stacjonarne oparte na cyklodekstrynach. Znalazły one zastosowanie zarówno w chromatografii gazowej jak i wysokosprawnej chromatografii cieczowej [1-5]. Cyklodekstryny szczególnie dobrze sprawdziły się w chromatografii enancjomerów i, zyskując miano chiralnych faz stacjonarnych, zdominowały analizę izomerów optycznych w technikach GC. Skuteczność tej grupy związków wynika z ich specyficznej budowy. Posiadają one kształt toroidalny, czego efektem jest obecność chiralnej wnęki [6]. Dzięki temu cyklodekstryny posiadają zdolność stereoselektywnego inkludowania cząsteczek lub jonów tworząc kompleksy typu „gospodarz – gość" [7]. Podobne właściwości wykazują etery koronowe, które także znalazły zastosowanie w chromatografii [8].

Powodzenie cyklodekstryn oraz eterów koronowych jako faz stacjonarnych wzbudziło zainteresowanie kaliksarenami i podobnymi im rezorcynoarenami – związkami, które także posiadają wnękową budowę. Rezorcynoareny to cykliczne oligomery. Otrzymywane są najczęściej w katalizowanej, jednoetapowej reakcji pomiędzy rezorcyną lub pirogalolem oarz alifatycznym lub aromatycznym aldehydem (rys. 7) [9].

Katalizatorami tej reakcji mogą być zarówno kwasy i zasady nieorganiczne jak również kwasy i zasady Lewisa [10].



Rysunek 1. Struktura rezorcynoarenów

Charakterystyczna struktura w kształcie wazy sprawia, że rezorcynoareny, podobnie jak cyklodekstryny i etery koronowe, wykazują zdolność do tworzenia kompleksów inkluzyjnych z szeroką gamą agalitów [11]. Istotną cechą jest także możliwość ich łatwej modyfikacji. Dobór odpowiedniego aldehydu umożliwia funkcjonalizację obręczy dolnej. Natomiast obręcz górną modyfikuje się przez reakcje grup hydroksylowych lub/i pozycji „orto-", co sprawia, że tetrametry te stanowią dobrą platformę do otrzymywania bardziej skomplikowanych układów. Dodatkowo, reakcja syntezy rezorcynoarenu przeprowadzona z chiralnym aldehydem, czy wprowadzanie optycznie czynnych grup przez funkcjonalizację górnej obręczy cząsteczki powodują, podobnie jak przynależność produktu do grupy symetrii C_n, że związki te są chiralne [12].

Do chwili obecnej jest stosunkowo niewiele prac na temat wykorzystania rezorcynoarenów w technikach chromatograficznych. Pomimo tego podjęliśmy próbę podsumowania dotychczasowych osiągnięć w rozwoju chromatograficznych technik analitycznych przy wykorzystaniu tej grupy związków.

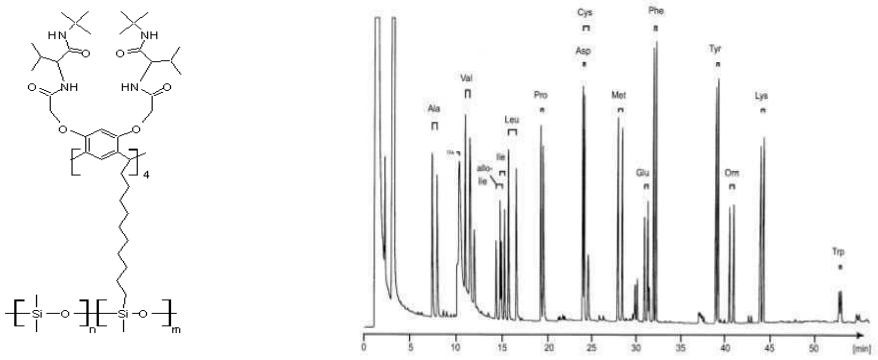
2. Rezorcynoareny jako fazy stacjonarne w chromatografii gazowej

Chromatografia gazowa była pierwszą techniką chromatograficzną, w której użyte zostały fazy stacjonarne oparte na pochodnych rezorcynoarenów. Okazały się one przydatne do wielu szczególnych problemów analitycznych.

Jako fazy stacjonarne znalazły zastosowanie O-alkilowe i O-fenylowe pochodne rezorcynoarenów. Na wypełnieniach tych skutecznie rozdzielano regioizomery dwupodstawionego benzenu, węglowodory o długich łańcuchach, alifatyczne ketony,

aldehydy i alkohole [13].

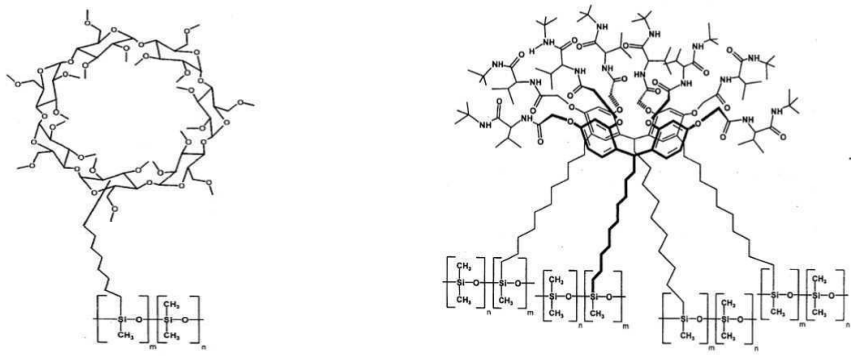
Schurig i współpracownicy [14] opisali syntezę i właściwości fazy opartej na undecenylrezorcynoarenie z grupami L-walino-t-butyloamidowymi przy górnej obręczy. Nienasycone łańcuchy alkilowe dolnej obręczy wykorzystane zostały do związania z powierzchnią żelu krzemionkowego. Uzyskane w ten sposób wypełnienie nazwano fazą „Chirasil-Calix". Autorzy wykorzystali ją do analizy enancjomerów pochodnych aminokwasów w postaci estrów metylowych. Struktura fazy oraz chromatogram mieszaniny aminokwasów przedstawione zostały na rysunku 2. Nieoczekiwanie stwierdzono, że dla analitów posiadających w swojej cząsteczce pierścień aromatyczny współczynniki rozdziału okazały się mniejsze w porównaniu z pozostałymi aminokwasami.



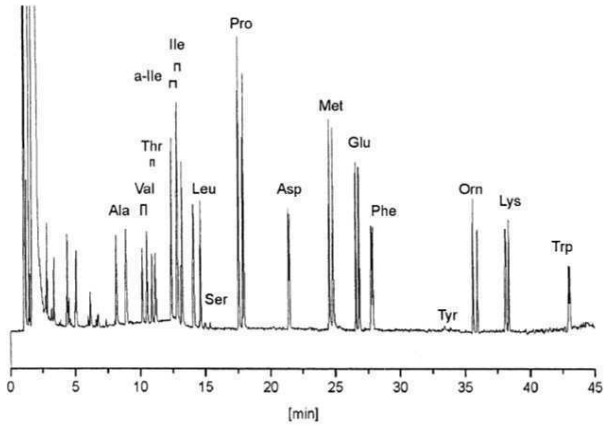
Rysunek 2. Struktura fazy „Chirasil-Calix" i chromatogram mieszaniny DL-aminokwasów w postaci estrów metylowych.

Bardziej skuteczną analizę enancjomerów aminokwasów Schurig i współpracownicy [15, 16] wykonali na kolumnie „Chirasil-Calixval-Dex", której wypełnienie stanowiła faza otrzymana przez związanie z żelem okta-O-[(L-walino-t-butylamid)-N-acetylo]-C-decenylrezorcynoarenu z pochodną β-cyklodekstryny, w stosunku molowym 1:1 (rys. 3, 4). Czysta faza cyklodekstrynowa, nazwana jako „Chirasil-Dex" nie daje w tym przypadku zadowalających wyników. W szczególności niewystarczające są współczynniki rozdziału dla treoniny, metioniny, izoleucyny i leucyny, natomiast w przypadku waliny oraz kwasów asparaginowego i glutaminowego rozdział enancjomeryczny nie został osiągnięty. Z kolei

kolumna rezorcynoarenowa, „Chirasil-Calixval" nie jest zdolna do rozdzielenia analitów pozbawionych możliwości oddziaływań przez wiązania wodorowe. Opracowana faza mieszana ma tę zaletę, że oddziałuje z analitami według zróżnicowanych mechanizmów takich jak wiązania wodorowe czy tworzenie kompleksów inkluzyjnych z ugrupowaniami o różnej polarności.



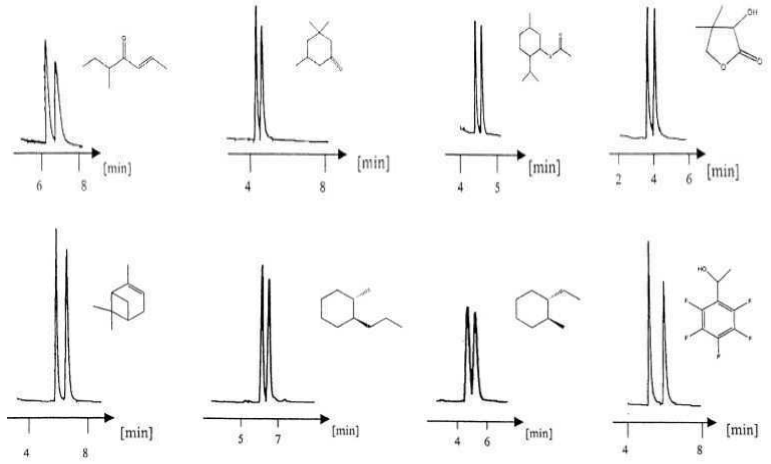
Rysunek 3. Struktura fazy „Chirasil-Calixval-Dex"



Rysunek 4. Chromatogram mieszaniny enancjomerów niektórych estrów etylowych N(O)-trifluoroacetylo-DL-aminokwasów przy użyciu kolumny „Chirasil-Calixval-Dex"

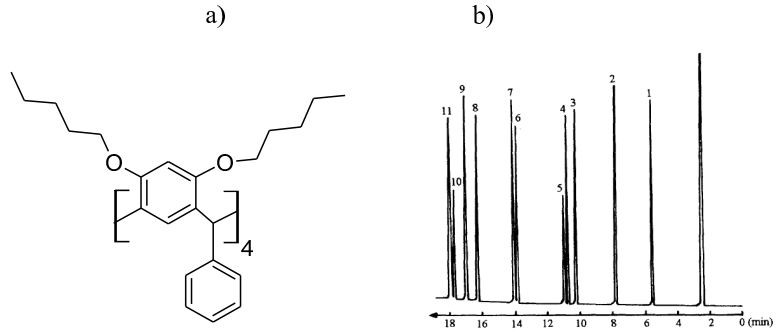
Wykorzystując opisywana fazę dokonano również analizy enancjomerów związków,

których nie udało się rozdzielić na kolumnie rezorcynoarenowej (rys. 5). Współczynniki rozdziału były z reguły mniejsze w porównaniu z fazą „Chirasil-Dex", która zawiera większe stężenie cyklodekstrynowego ligandu.



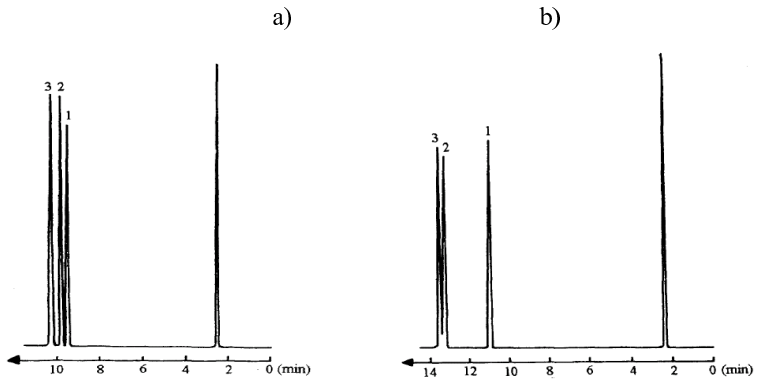
Rysunek 5. Analiza enancjomerów różnej klasy związków przy wykorzystaniu fazy „Chirasil Calixval-Dex"

Zhang i współpracownicy [17] badali właściwości kolumn kapilarnych modyfikowanych przez adsorpcję okta-O-pentylobenzylrezorc[4]arenu (rys. 6a).



Rysunek 6. a) okta-O-pentylobenzylrezorcynoaren, b) analiza mieszaniny Groba (1 = n-dekan, 2 = n-undekan, 3 = 1-oktanol, 4 = n-dodekan, 5 = nonaldehyd, 6 = 2,6-dimetylofenol, 7 = n-tridekan, 8 = 2,4-dimetyloanilina, 9 = naftalen, 10 = dekanonan metylu, 11 = tetradekan)

Parametry wypełnienia określono przy użyciu trzech związków: dodekanu (niepolarny), naftalenu (średniopolarny) i nonanolu (polarny). Omawiana faza wykazywała względem tych związków wysoką sprawność. Obserwowana w tym przypadku większa retencja naftalenu w stosunku do nonanolu (pomimo zbliżonych temperatur wrzenia tych związków) wskazuje na zdolność pierwszego do oddziaływań poprzez tworzenie związków inkluzyjnych z fazą stacjonarną. Dalsze badania przydatności tej fazy polegało na analizie testowej mieszaniny Groba (mieszanina jedenastu związków o różnym charakterze). Wszystkie składniki mieszaniny testowej udało się rozdzielić otrzymując na chromatogramie symetryczne piki (rys. 6b). W szczególności można stwierdzić, iż naftalen eluowany jest po tridekanie i 2,4-dimetyloanilinie, co wg autorów uznawane jest za dowód szczególnej selektywności fazy względem tej substancji. Wykazano również szczególną selektywność fazy względem niektórych izomerów. Na kolumnach tych udało się rozdzielić między innymi izomery chlorotoluenu i krezolu nawet pomimo zbliżonych temperatur wrzenia (rys. 7). Analiza wielkości retencyjnych pozwoliła stwierdzić, że tworzenie kompleksów typu „gospodarz – gość" jest w dużej mierze odpowiedzialne za właściwości fazy rezorcynoarenowej.



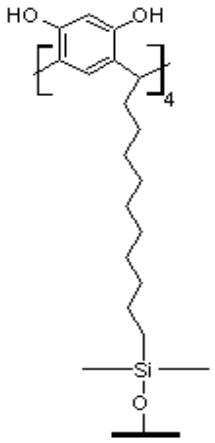
Rysunek 7. Chromatogramy izomerów a) chlorotoluenu: 1 = o-chlorotoluen, 2 = m-chlorotoluen, 3 = p-chlorotoluen; b) krezolu: 1 = o-krezol, 2 = p-krezol, 3 = m-krezol

Współczynnik rozdziału p- i m-chlorotoluenu był większy od analogicznego dla izomerów meta- i orto- za co odpowiedzialność ponoszą różnice momentów dipolowych. Wynika

z tego fakt, że w przypadku analizy chromatograficznej chlorotoluenu znaczenie mają oddziaływania typu dipol-dipol. Wykorzystując opisywaną fazę nie udało się rozdzielić meta- i para- izomerów ksylenu, dwubromobenzenu i dwuchlorobenzenu. Zauważono również, że kolejność elucji m- i p- nitrochlorobenzenu i dwumetoksybenzenu były przeciwne do kolejności ich temperatur wrzenia, co przypisano tworzeniu przez anality kompleksów „gospodarz – gość" z wypełnieniem kolumny.

3. Rezorcynoareny jako fazy stacjonarne w wysokosprawnej chromatografii cieczowej

W chromatografii cieczowej zastosowanie znalazły odwrócone fazy C18 zmodyfikowane undecylrezorcynoarenem (rys. 8) lub jego eterem metylowym. Kolumny takie wykazywały dobrą stabilność i powtarzalność [18].

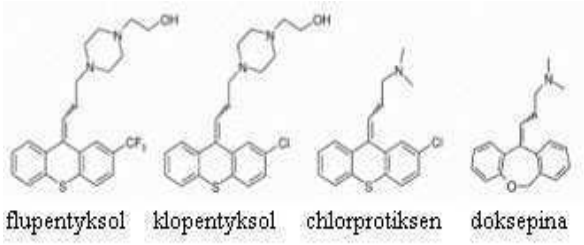


Rysunek 8. Undecylrezorcynoaren związany z powierzchnią żelu krzemionkowego

Udało się rozdzielić na nich regioizomery podstawionych fenoli a także zasady pirydynowe. Te ostatnie, wskutek oddziaływania z grupami –OH rezorcynoarenu, wykazywały większą retencję w porównaniu z fazą RP-C18. Undecylrezorcynoaren umożliwia również rozdział liniowych i cyklicznych alkoholi, dioli i cukrów w roztworach wodnych. W przypadku alkoholi obserwuje się przeważnie krótsze czasy retencji, za co odpowiedzialny jest wzrost polarności fazy stacjonarnej modyfikowanej rezorcynoarenami w porównaniu

z oktadecylową fazą odwróconą. Odmiennie zachowuja się natomiast 1,2-, 1,3- i cis-1,4-cykloheksanodiole – ich większa retencja spowodowana jest oddziaływaniami typu „gospodarz – gość".

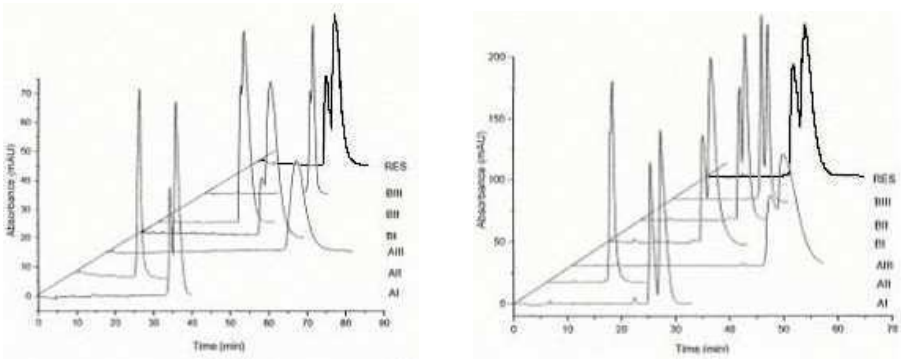
Wykorzystując fazę undecylrezorcynoarenową Sokolieβ i współpracownicy wykazali jej przydatność do analizy izomerów związków zawierających grupy hydroksylowe (rys. 9). Dokonali oni rozdziału na wspomnianej fazie izomerów cis- i trans- flupentyksolu.



Rysunek 9. Substancje analizowane przy użyciu fazy undecenylrezorcynoarenowej

Ze względu na obecność grup hydroksylowych zdolnych do oddziaływań z chromatografowanymi izomerami, faza rezorcynoarenowa okazała się najskuteczniejsza wśród testowanych (rys. 10a). Prawdopodobnie o skuteczności zadecydował fakt, iż cząsteczki flupentyksolu także posiadały w grupy –OH w swojej budowie co umożliwiało tworzenie wiązań wodorowych z fazą stacjonarną. Podobne wyniki uzyskano przy próbie rozdzielenia izomerów klopentyksolu (rys. 10b). We wszystkich przypadkach jako pierwsze eluowane były izomery cis. Według autorów wysokie współczynniki rozdziału są efektem niewielkiej wnęki, jaką posiadają rezorcynoareny oraz obecności grup hydroksylowych. Porównując wyniki analizy stwierdzono mniejsze współczynniki rozdziału dla klopentyksolu. Jest to efektem różnych podstawników w pozycji „2" (trifluorometyl, chlor). Można, więc wysunąć wniosek, że trans-flupentyksol tworzy najsilniejszy kompleks z fazą stacjonarną. Nie uzyskano natomiast zadowalających efektów dla chlorprotiksenu i doksepiny. W przeciwieństwie do powyższych, związki te nie posiadają grup hydroksylowych.

a) b)



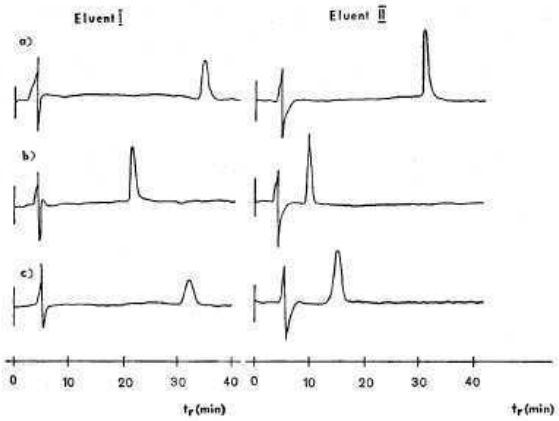
Rysunek 10. Rozdział izomerów geometrycznych a) flupentyksolu i b) klopentyksolu na fazie rezorcynoarenowej (RES) w porównaniu z fazami kaliksarenowymi (AI = kaliks(4)aren, AII = kaliks(6)aren, AIII = kaliks(8)aren, BI = t-butylokaliks(4)aren, BII = t-butylokaliks(6)aren, BIII = t-butylokaliks(8)aren).

Oprócz chemicznego związywania rezorcynoarenów stosowano również adsorpcję. Metodę tą wykorzystał Pietraszkiewicz i współpracownicy [19] osadzając na fazie RP-18 undecylrezorcynoaren oraz eter metylowy tego rezorcynoarenu. Adsorpcję uzyskano przepuszczając przez fazę roztworór danego adsorbatu w acetonitrylu. Wypełnienia testowano za pomocą podstawionych fenoli porównując wyniki z niemodyfikowaną fazą RP-18. Wśród substancji testujących znalazły się izomery orto-, meta- i para- krezolu, chlorofenolu, nitrofenolu oraz 3,4-, 2,6-, 3,5-, 2,5- dimetylofenole. Proces chromatografowania przeprowadzano wykorzystując jako eluenty: 40% MeOH/H_2O (v/v) (eluent I) oraz 40% MeCN/H_2O (v/v) (eluent II). Dla roztworu z metanolem uzyskano dłuższe czasy retencji co wskazuje na silniejsze oddziaływania acetonitrylu z rezorcynoarenami. Obie fazy wykazały dużą skuteczność i stabilność zarówno z eluentem I jak i II. Przy zawartościach do 80% MeOH lub MeCN w eluencie, badania spektrofotometryczne nie wykazały obecności rezorcynoarenowego modyfikatora w opuszczającym kolumnę eluacie. Dla sprawdzenia powtarzalności i stabilności kolumn wybrana została mieszanina o- i p-chlorofenolu. Tabela 1 przedstawia skuteczność (N) kolumn dla p-chlorofenolu.

Tabela 1. Skuteczność (N) kolumn dla p-chlorofenolu

Eluent	RP-18	RP-18 + **1**	RP-18 + **2**
I	9772	6154	1999
II	7380	2443	965

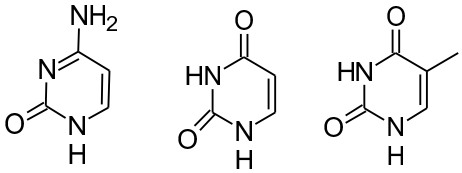
Z kolei na rysunku 11 przedstawiono chromatogramy p-chlorofenolu. Porównując kolumny 1 i 2 stwierdzono znacznie większą skuteczność pierwszej z nich. Lepsze wyniki dało również zastosowanie eluentu z udziałem metanolu (eluent I) niż acetonitrylu (eluent II). Różnice w oddziaływaniu tych faz wynikają z faktu znacznej zmiany polarności wypełnienia przy zastosowaniu odpowiedniej pochodnej rezorcynoarenu.



Rysunek 11. Chromatogramy p-chlorofenolu: a) kolumna RP-18, b) kolumna RP-18 modyfikowana rezorcynoarenem 1, c) kolumna RP-18 modyfikowana rezorcynoarenem 2

Fazę modyfikowaną undecylrezorcynoarenem zastosował Pietraszkiewicz i współpr. [20] do analizy wybranych zasad pirydynowych. Wśród testowanych związków znalazły się: cytozyna, uracyl i tymina (rys. 12).

Badanie przeprowadzono wykorzystując następujące eluenty: 20% MeOH w wodzie (v/v, eluent A), woda o pH = 2 oraz pH = 4 (eluenty B i C), woda (eluent D) i 18% MeOH w wodzie (eluent D). Uzyskane wyniki przedstawia tabela 2, natomiast na rysunku 13 przedstawione są chromatogramy trzech zasad pirydynowych na niemodyfikowanej i modyfikowanej kolumnie.



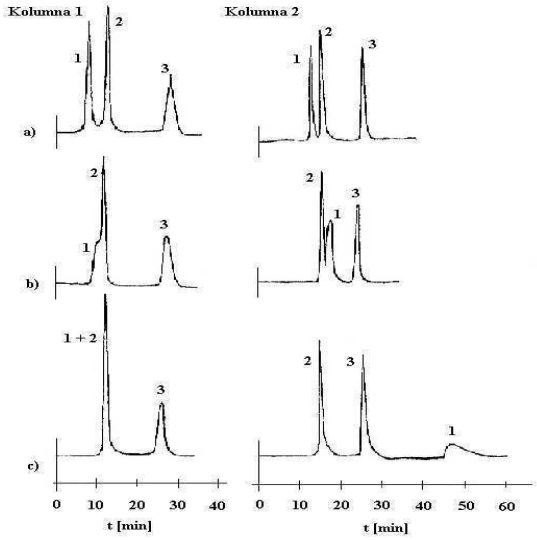
1 2 3

Rysunek 12. Struktura analizowanych zasad pirydynowych; (1 = cytozyna, 2 = uracyl, 3 = tymina)

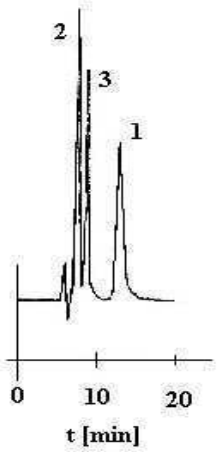
Tabela 3. Współczynniki retencji i selektywności dla analizowanych związków.

Kolumna	Analit	Eluent A		Eluent B		Eluent C		Eluent D	
		k	α	k	α	k	α	k	A
1	Cytozyna	3.25		3.50		5.25		6.00	
	Uracyl	3.25	1.00	6.25	1.79	6.00	1.14	6.00	1.00
	Tymina	4.42	1.36	16.25	2.60	16.00	2.67	14.75	2.46
2	Cytozyna	4.75	1.06	7.00		10.25	1.14	27.75	1.82
	Uracyl	3.50		8.50	1.21	9.00		8.50	
	Tymina	4.50	1.29	15.00	1.76	14.75	1.44	15.25	1.79

Z danych eksperymentalnych widać, że nie udało się uzyskać rozdzielenia analitów przy zastosowaniu eluentu A. Z kolei obie kolumny umożliwiły skuteczną analizę z eluentem B. Dla eluentów C i D faza modyfikowana rezorcynoarenem okazała się zdecydowanie skuteczniejsza. Najlepsze wyniki uzyskano stosując roztwór 18 % metanolu w wodzie (eluent D). Efekt rozdzielenia zasad pirydynowych przy użyciu modyfikowanej fazy stacjonarnej z owym eluentem widoczny jest w postaci chromatogramu na rysunku 14.

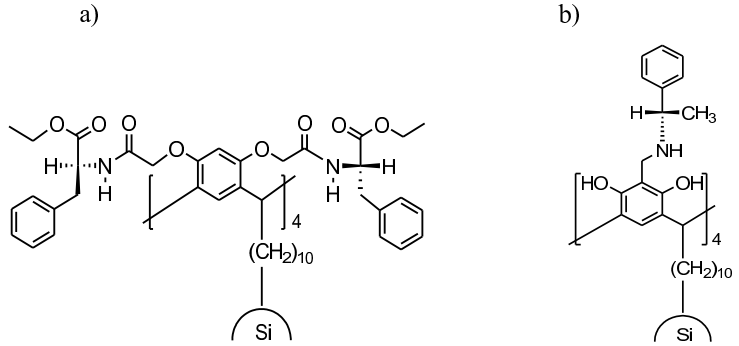


Rysunek 13. Analiza trzech zasad pirydynowych (1 = cytozyna, 2 = uracyl, 3 = tymina) na kolumnach niemodyfikowanej (Kolumna 1) i modyfikowanej (Kolumna 2), eluent: a) woda o pH = 2, b) woda o pH = 4, c) woda



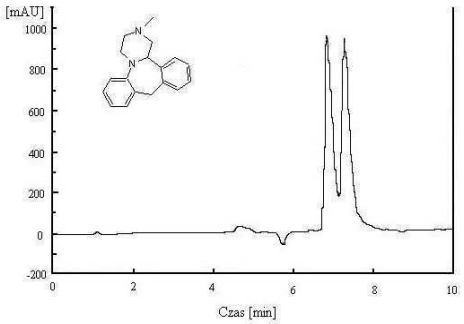
Rysunek 14. Chromatogram zasad pirydynowych w optymalnych warunkach: faza RP-18 modyfikowana undecylrezorcynoarenem, eluent: 18 % MeOH w wodzie; (1 = cytozyna, 2 = uracyl, 3 = tymina)

Jira i współpracownicy [21] do analizy farmaceutyków zastosowali także pochodne rezorcynoarenów zawierające ester etylowy L-fenyloalaniny (RES-Phe, rys. 15a) oraz aminometylenową pochodną S-fenyloetyloaminy (RAM-Ph rys.15b).



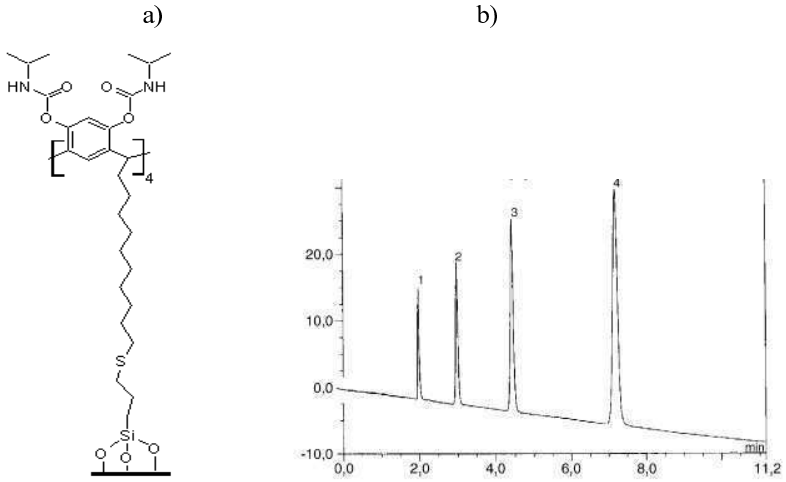
Rysunek 15. Struktury faz rezorcynoarenowych: RES-Phe (a) i RAM–Ph (b)

Separacje na RES-Ph uzyskano w normalnym układzie faz, co oznacza, że główny mechanizm polega na oddziaływaniach pomiędzy fazą stacjonarną a polarnymi strukturami analitów. Stosując, jako eluent, układ Hex/IPA 8:2 (v/v) z dodatkiem 0.1 % TEA możliwy był rozdział między innymi izomerów mianseryny (rys. 16). Wyników takich nie zaobserwowano w odwróconym układzie faz (wodne eluenty o odczynie kwaśnym). Z kolei dla RES-Phe analiza możliwa była w obu przypadkach a o możliwości użycia wodnych faz ruchomych decyduje prawdopodobnie wyższa hydrofobowość wypełnienia kolumny.



Rysunek 16. Chromatogram enancjomerów mianseryny na fazie RES-Naph.

Schurig i Iwanek [22] opisali syntezę i właściwości fazy stacjonarnej opartej na okta-O-(izopropylokarbamato-undecenylrezorcynoarenie (rys. 17a).

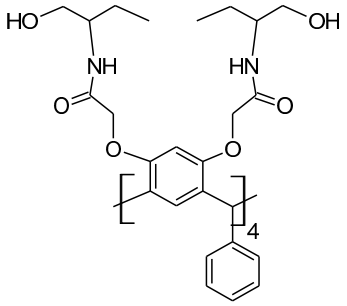


Rysunek 17. a) Związana faza stacjonarna oparta na rezorcynoarenie z grupami polarnymi, b) chromatograf mieszaniny testowej (1 – uracyl, 2 – fenol, 3 – naftalen, 4 – antracen)

Zaletą takiego wypełnienia jest wprowadzenie grupy polarnej do odwróconego układu faz w znacznej odległości od powierzchni żelu krzemionkowego. Właściwości fazy porównywano z właściwościami czterech innych wypełnień (C18, C18 z wbudowanymi grupami polarnymi, C8, C_6H_5). Do określenia właściwości kolumny wybrano mieszaninę testową złożoną ze związków o zróżnicowanej polarności (uracyl, fenol, naftalen, antracen, rys. 17b). Kolumna rezorcynoarenowa wykazywała odmienne właściwości od pozostałych. W szczególności, w porównaniu z fazą oktadecylsilanową stwierdzono zwiększoną retencję dla fenolu co zgadza się z faktem wzrostu polarności fazy. Uzyskano także różne współczynniki retencji dla naftalenu i antracenu. Czasy retencji tych dwóch związków były dłuższe w porównaniu z fazą C8, krótsze jednak niż dla fazy C18 zawierającej grupy polarne. Autorzy wysunęli stąd wniosek, że łańcuchy alkilowe są odpowiedzialne za retencje układów hydrofobowych. Tak, więc uzyskana faza oferuje bardzo zróżnicowane mechanizmy oddziaływania z analitami (oddziaływania wan der Waalsa, π-π, wiązania

wodorowe).

Wykorzystując fazy rezorcynoarenowe dokonano także prób analizy enancjomerów pochodnych aminokwasów. Seyhan i współpracownicy [23] zastosowali w tym celu adsorpcję fenylorezorcynoarenu modyfikowanego grupami amidowymi (rys. 18) na fazie Amberlite XAD-16.



Rysune 18. Struktura oktaamidowej pochodnej rezorcynoarenowej jako fazy stacjonarnej

Łatwo udało się rozdzielić izomery optyczne fenyloglicyny i tryptofanu użytych w postaci soli sodowych. Izomery L wykazywały krótsze czasy retencji. Nie powiódł się natomiast rozdział soli sodowej fanyloalaniny. Okazało się, że kluczowe znaczenie ma tu rodzaj kationu tworzącego daną sól: zastąpienie sodu potasem w ostatnim przypadku pozwoliło na skuteczne rozdzielenie, przy czym izomer D charakteryzował się mniejszą retencją. Wpływ kationu nie zaobserwowano w przypadku analizy mieszanin innych aminokwasów.

4. Podsumowanie

Zastosowanie rezorcynoarenów i ich pochodnych jako modyfikatorów faz stacjonarnych jest dopiero rozwijającym się kierunkiem badań. Do tej pory tylko nieliczne kolumny znalazły zastosowanie stając się komercyjnie dostępnymi („Chirasil-Calix", „Chirasil-Calixval-Dex"). Rezorcynoarenowe fazy stacjonarne okazały się przydatne do niektórych szczególnych problemów analitycznych. Jak opisano powyżej, rezorcynoareny i ich pochodne wykorzystywane były do rozdzielania różnorodnych mieszanin przy zastosowaniu chromatografii gazowej oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Badane fazy posiadały szczególną skuteczność w analizie enancjomerów związków

optycznie czynnych oraz izomerów geometrycznych. Nie jest to zaskoczeniem, jako że rezorcynoareny z jednej strony są związkami chiralnymi, z drugiej obecność wnęki umożliwia selektywne tworzenie kompleksów z substancjami analizowanymi. Cechy te wyznaczają kierunek dalszym badaniom klasyfikując fazy rezorcynoarenowe jako chiralne fazy stacjonarne.

Literatura:

1. W.A. König, *Enantioselective Gas Chromatography With Modified Cyclodextrins*, Hüthig, Heidelberg, 1992;
2. *Chiral Separation Techniques: A Practical Approach, Second, completely revised and updated edition*, Edited by G. Subramanian, Wiley-VCH Verlag, 2001;
3. T. J. Ward, D. W. Armstrong, "Cyclodextrin-stationary phases" in *Chromatographic chiral separations*, M. Zief, L. J. Crane (Eds.), Chromatographic Science Series, Vol. 40, Marcel Dekker, NewYork (1988);
4. V. Schurig, H. Nowotny, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 29, 939 (1990);
5. D. Sybilska, A. Bielejewska, R. Nowakowski, K. Duszczyk, J. Jurczak, *J. Chromatogr.* 625, 349 (1992);
6. E. Schneiderman, A.M. Stalcup, *J. Chromatogr. B* 745, 83 (2000);
7. J. Szejtli, *Chem. Rev.* 98, 1743 (1998);
8. A. Kenneth Connors, *Chem. Rev.*, 97, 13255 (1997);
9. P. Timmerman, W. Verboom, D. N. Reinhoudt, *Tetrahedron,* 52, 2663 (1996);
10. M. Urbaniak, W. Iwanek, *Wiadomości Chemiczne*, *2003;*
11. R. Ludwig, Fresenius J. Anal. Chem. 367 103 (2000);\
12. Wzorek A., Gawdzik B., Urbaniak M. and Iwanek W, in *Recent Res. Devel. Org. Chem.,* 8, 85, Transworld Research Network, Kerala, India, (2004);
13. R. Milbradt, V. Boehmer, w: *Calixarenes,*, Kluwer Academic Publisher (2001);
14. J. Pfeiffer, V. Schurig, *J. Chromatogr. A,* 840, 145 (1999);
15. A. Ruderisch, J. Pfeiffer, V. Schurig, *Tetrahedron: Asymmetry,* 12, 2025 (2001);
16. A. Ruderisch, J. Pfeiffer, V. Schurig, *J. Chromatogr. A, 994,* 127 (2003);
17. H. Zhang, R. Dai, Y. Ling, Y. Wen, S. Zhang, R. Fu, J. Gu, *J. Chromatogr. A* 787,

161 (1997);
18. T. Sokolieβ, U. Menyes, U. Roth, T. Jira, *J. Chromatogr.A,* 948, 309 (2002);
19. M. Pietraszkiewicz, O. Pietraszkiewicz, M. Koźbiał, *Polish J. Chem,* 72, 1963 (1998);
20. M. Pietraszkiewicz, O. Pietraszkiewicz, *Polish J. Chem,* 72, 2418 (1998);
21. T. Sokolieβ, A. Opolka, U. Menyes, U. Roth, T. Jira, *Pharmazie,* 57, 8 (2002);
22. A. Ruderisch, W. Iwanek, J. Pfeiffer, G. Fischer, K. Albert, V. Schurig, *J. Chromatogr. A,* 1095, 40 (2005);
23. S. Seyhan, O. Ozbayrak, N. Demirel, M. Merdivan, N. Pirinccioglu, *Tetrahedron: Asymmetry,* 16, 3735-3738 (2005).

Rozdział 10

Zastosowanie dyfuzyjnych pomiarów NMR w chemii supramolekularnej

Błażej Gierczyk, Grzegorz Schroeder

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

Na podstawie danych uzyskanych z widm NMR określić można wiele parametrów dotyczących budowy, dynamiki czy zdolności kompleksotwórczych badanych układów. Już w latach 70-tych wykazano możliwość wykorzystania tej techniki w badaniach procesu dyfuzji jednakże, ze względu na niedostępność odpowiedniego software i hardwareu w komercyjnych spektrometrach, zainteresowanie dyfuzjometrią NMR było przez szereg lat ograniczone. Dopiero rozpowszechnienie i wzrost znaczenia technik gradientowych, mający miejsce w początku lat 90-tych XX wieku, który zaowocował wprowadzeniem generatorów impulsów gradientowych i stosownych sond pomiarowych, wyposażonych w specjalne cewki, jako standardowego wyposażenia wysokorozdzielczych aparatów NMR, zaowocował wyraźnym rozpowszechnieniem technik diffusion NMR.

1. Dyfuzja

Dyfuzja to zjawisko migracji cząstek pod wpływem gradientu stężenia, wywołanej ruchami termicznymi w układzie. Proces ten opisany jest przez I i II prawo Ficka. Pierwsze z nich wiąże prędkość przepływu z wielkością gradientu stężenia:

$$J = -D\frac{dN}{dx}$$

J – liczba cząsteczek przechodzących w jednostce czasu przez jednostkę powierzchni przekroju prostopadłego do kierunku gradientu stężenia, dN/dx – gradient stężenia składnika, D – stała, tzw. współczynnik dyfuzji

Drugie prawo Ficka opisuje zmianę stężenia (lub gęstości liczbowej) w nieskończenie małym elemencie objętości w wyniku dyfuzji:

$$\frac{N}{t} = -D\frac{{}^{2}N}{x^{2}}$$

wartość współczynnika D powiązać można z szeregiem właściwości substancji podlegającej dyfuzji oraz ośrodka, w którym ten proces zachodzi. Dla ośrodków nielepkich, współczynnik dyfuzji opisuje równanie Stokesa-Einsteina:

$$D = \frac{kT}{f}$$

gdzie k – stała Boltzmana, f – tzw. hydrodynamiczny współczynnik tarcia. Dla cząstek sferycznych poruszających się w jednorodnym ośrodku o lepkości η, wartość f opisana jest równaniem Stokesa:

$$f = 6\pi a\eta$$

gdzie a to tzw. promień hydrodynamiczny.

Dla indywiduów o kształcie odbiegającym od sferycznego, przyjąć należy oczywiście inne przybliżenia w celu opisania wartości hydrodynamicznego współczynnika tarcia.

Ponieważ wartości f (a w szczególności wartości współczynnika a) zależy od rozmiaru cząsteczki i jej kształtu, oczywistym jest, iż pomiar współczynnika dyfuzji może dostarczyć wielu informacji o strukturze i agregacji badanych indywiduów.

2. Metody pomiarowe

2.1 Podstawowe sekwencje impulsów

Podstawową przy pomiarach dyfuzyjnych jest fakt, iż gradient pola magnetycznego może być wykorzystany do „oznakowania" spinu jądrowego jego częstością precesji Larmora (ω_0). Dokonuje się tego poprzez użycie zewnętrznego pola magnetycznego o liniowym gradiencie wartości (G).

$$G = \frac{B}{x}\hat{i} + \frac{B}{y}\hat{j} + \frac{B}{z}\hat{k}$$

gdzie i, j, k – wektory jednostkowe, odpowiednio w kierunkach x, y i z.

Wynika z tego, ze całkowite pole magnetyczne w punkcie o współrzędnych r, opisuje wzór:

$$B(r) = B_0 + Gr$$

wobec czego wartość częstości precesji Larmora, w zależności od położenia jądra w próbce ma postać:

$$\omega(r) = \gamma B(r)$$

Jeśli liniowy gradient G użyty zostanie przez ściśle określony czas, τ, zarejestrowane przesunięcie fazowe liniowo zależy od wartości B(r). Zakładając, że stosujemy tylko pole

gradientowe w kierunku z (zgodnym z liniami sił pola B_0) – G_z, zarejestrujemy przesunięcie fazowe, w zależności od punktu próbki, opisane równaniem:

$$\Phi(z) = -B(z)\gamma\delta$$

gdzie:

$$B(z) = B_0 + zG(z)$$

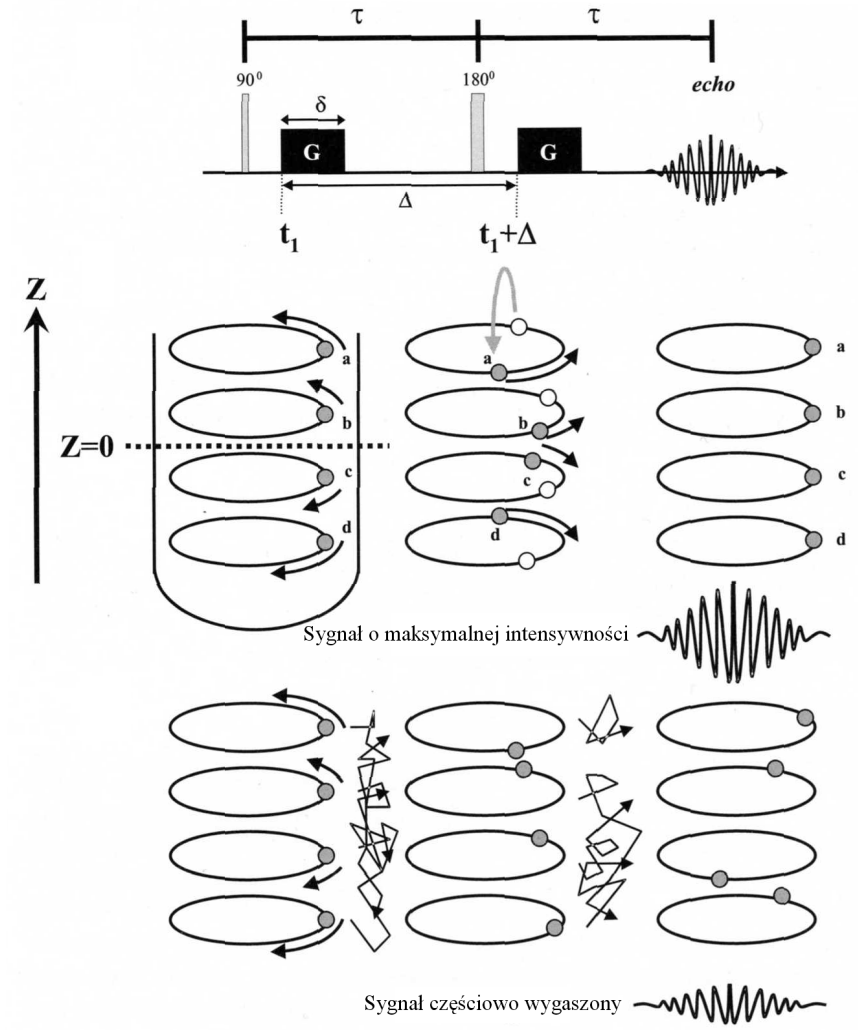
Najczęściej używaną techniką w pomiarach dyfuzjometrycznych jest sekwencja PGSE (pulsed gradient spin echo), będąca modyfikacją metody pomiaru ech spinowych wg Hahna. Schematyczny zapis sekwencji PGSE i jej wpływu na magnetyzację przedstawia rysunek 1.

Na początku eksperymentu, wypadkowa magnetyzacja skierowana jest wzdłuż osi z, co świadczy o pozostawaniu spinów w równowadze termodynamicznej z otoczeniem. Następnie, po zadziałaniu impulsu pola radiowego 90°, następuje skierowanie wektora magnetyzacji na płaszczyznę x-y. Po czasie t_1 na próbkę działa impuls gradientowego pola magnetycznego wzdłuż osi z, o natężeniu G i czasie trwania τ. W efekcie, po czasie τ, każdy ze spinów wykazuje przesunięcie fazowe, zależne od położenia w próbce, zgodne z równaniem:

$$\Phi_i(\tau) = \gamma B_0 + \gamma G \int_{t_1}^{t_1+\delta} z_i(t)dt$$

Pierwszy człon równania, γB_0, opisuje przesunięcie fazowe wynikające z wpływu stałego pola B_0, człon drugi – efekt liniowego gradientu pola, działającego w kierunku z.

Następnie stosuje się drugi impuls pola radiowego, długości 180°, powodujący zmianę kierunku i fazy precesji spinów. W czasie $t_1 + \tau$ stosuje się drugi, identyczny z wcześniejszym, impuls pola gradientowego, powodujący „skasowanie" wyindukowanych



Rysunek 1. Schemat sekwencji PGSE i jej wpływu na magnetyzację

wcześniej różnic w przesunięciu fazowym po czasie τ. Sytuacja taka ma miejsce tylko w przypadku spinów niepodlegających translacji wzdłuż osi z ($z_i(t)$ = const.; w czasie τ nie następuje dyfuzja) – uzyskujemy wówczas maksymalną możliwą wartość echa spinowego. Podczas dyfuzji, wartości przesunięć fazowych poszczególnych spinów po pierwszym i drugim okresie τ mają różną wielkość. Jest to skutek różnic w położeniu (z kierunku z) każdego ze spinów czasie t_1 i $t_1+\tau$ - w efekcie działa na nie pole magnetyczne o różnym natężeniu. Następstwem dyfuzji jest niemożliwość wygaszenia różnic w przesunięciach fazowych po zadziałaniu drugiego impulsu gradientowego. Zarejestrowane echo spinowe ma zatem mniejszą wartość. Równanie Stejskal'a-Taner'a dla pojedynczego, dyfundującego składnika, opisujące intensywność sygnału, ma postać:

$$I_{(2\tau,G)} = I_{(0,0)} e^{-\frac{2\tau}{T_2}} e^{-\gamma^2 G^2 \delta^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right) D} = I_{(2\tau,0)} e^{-\gamma^2 G^2 \delta^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right) D}$$

$$\ln \frac{I_{(2\tau,G)}}{I_{(2\tau,0)} e} = -\gamma^2 G^2 \delta^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right) D = -bD$$

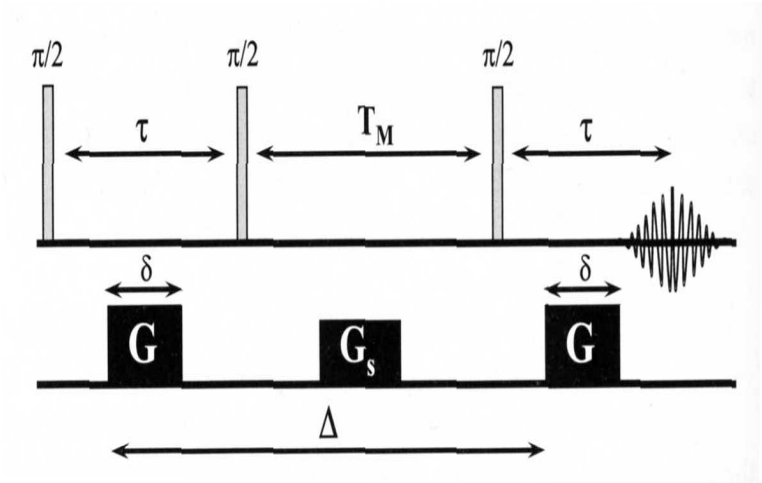
gdzie $I_{(0,0)}$, $I_{(2\tau,0)}$, $I_{(2\tau,G)}$, to odpowiednio intensywności sygnału bezpośrednio po impulsie 90° oraz po czasie 2τ, bez i z użyciem impulsu pola gradientowego, G – natężenie pola gradientowego, τ - odstęp pomiędzy impulsami gradientowymi, τ - czas ich trwania, D – współczynnik dyfuzji.

Dla roztworów izotropowych, wykres zależności $\ln(I_{(2\tau,G)}/ I_{(2\tau,0)})$ od iloczynu $\gamma 2G^2\delta^2(\Delta-\delta/3)$ pozwala wyznaczyć współczynnik dyfuzji (jest to linia prosta o współczynniku kątowym równym –D). Podczas eksperymentu zmieniać można dowolny z parametrów: G, δ lub Δ. Jak widać, eksperyment PGSE pozwala oddzielić efekty związane z relaksacją poprzeczną od efektów dyfuzyjnych.

Sekwencja STE (Stimulated Echo), której schemat przedstawiono na rysunku 2, pozwala uzyskać serię ech spinowych, o intensywności opisanej równaniem:

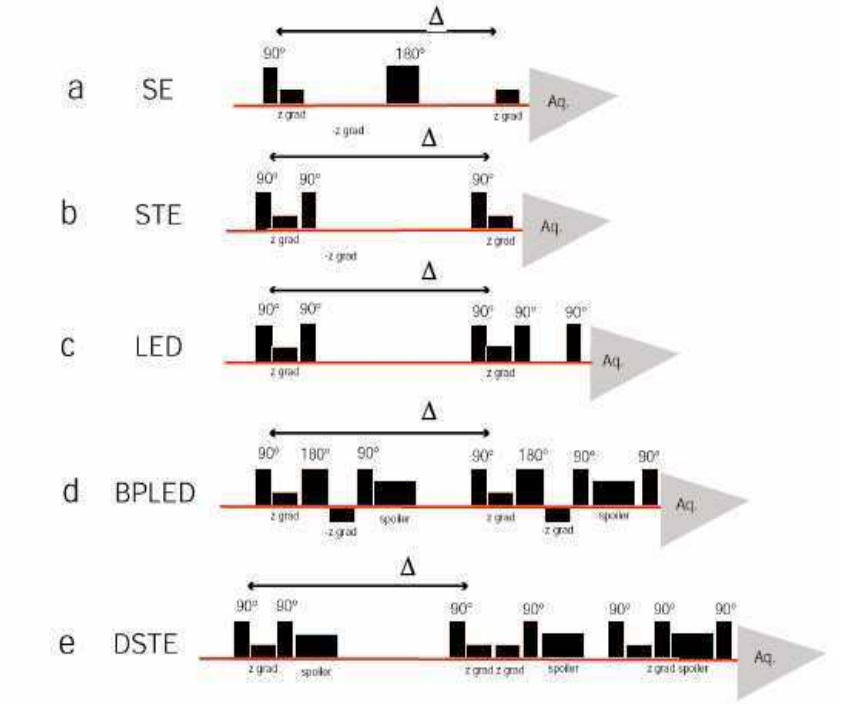
$$I_{(T_M+2\tau,G)} = \frac{I_{(0,0)}}{2} e^{-\frac{2\tau}{T_2}-\frac{T_M}{T_1}} e^{-\gamma^2 G^2 \delta^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right) D} = I_{(T_M+2\tau,0)} e^{-\gamma^2 G^2 \delta^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right) D}$$

Sekwencja pozwala odseparować efekty relaksacji podłużnej i poprzecznej od tych, związanych z dyfuzją. Umożliwia to w porównaniu z eksperymentem PGSE, otrzymać bardziej wiarygodne wyniki dla układów o krótkim czasie relaksacji poprzecznej, T_2, i większymi wartościami T_1.



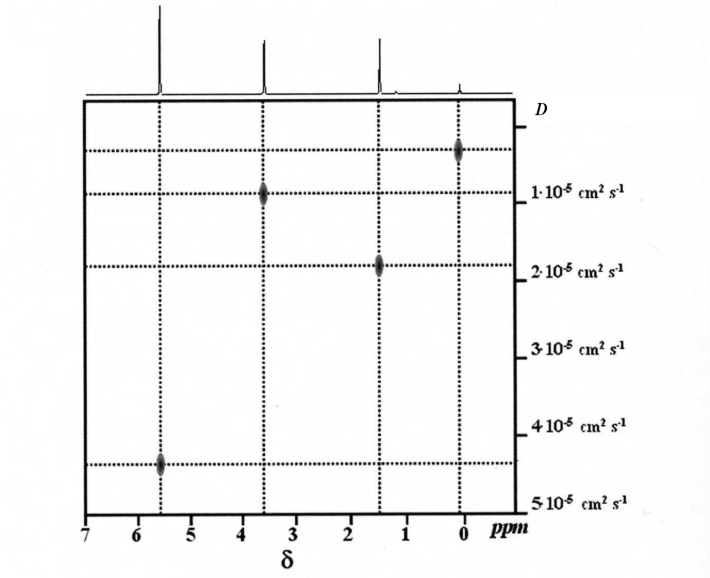
Rysunek 2. Schemat sekwencji STE

Inne typy sekwencji stosowane w badaniach układów wieloskładnikowych oraz ich stosowane skróty przedstawia zestawienie:



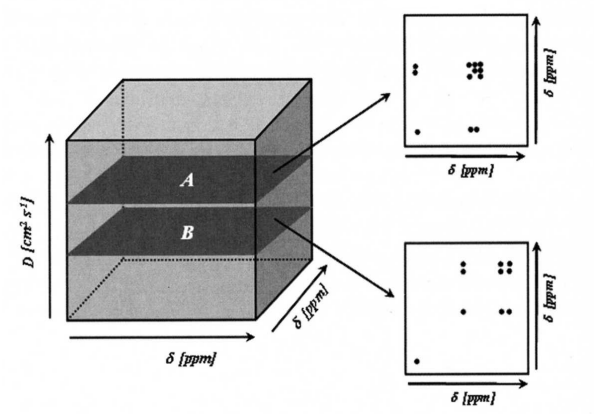
2.2 Techniki dwuwymiarowe

Przełomem w rozwoju technik dyfuzjometrycznych było opracowanie różnicujących, ze względu na współczynnik dyfuzji, eksperymentów dwu- i trójwymiarowych. Metoda DOSY (diffusion ordered spectroscopy), wykorzystując odwrotna transformacje Laplace'a (ILT) pozwala uzyskać dwuwymiarowe mapy, w których na jednej osi prezentowane jest przesunięcie chemiczne, na drugiej zaś, współczynnik dyfuzji. Schematyczna prezentacja wyniku uzyskanego w tym eksperymencie ukazana jest na rysunku 3.



Rysunek 3. Wynik eksperymentu DOSY

Problemem jest, iż o ile transformacja Fouriera (FT) daje wynik jednoznaczny, o tyle ILT może prowadzić do kilku wyników. Jedyną z głównych zalet tej techniki jest możliwość sprzężenia jej z dowolną inną sekwencją dwuwymiarową, co prowadzi do uzyskania, w trójwymiarowym eksperymencie, wirtualnego rozseparowania składników mieszaniny. Efektem jest np.: szereg widm COSY (przy użyciu sekwencji 3D-DOSY-COSY), z których każde dotyczy innego związku, obecnego w próbce, o ile różnią się one współczynnikami dyfuzji (zakłada się, że dla pełnego rozdzielenia muszą się one różnić 2-3 krotnie). Schemat wyniku uzyskanego w powyższym eksperymencie zaprezentowano na rysunku 4.



Rysunek 4. Wynik eksperymentu 3D-DOSY-COSY

3. Zastosowanie metod dyfuzjometrycznych w chemii supramolekularnej

3.1 Wyznaczanie stałych trwałości

Jednym z głównych parametrów opisujących kompleksy gość-gospodarz, jest stała trwałości. Jej wyznaczenia dokonać można jedną z szeregu metod analitycznych, w tym na podstawie pomiarów NMR. Najczęściej wykorzystywanym, przy obliczaniu wartości K, parametrem spektralnym, jest przesunięcie chemiczne. Znanych jest także szereg przykładów zastosowania w tym celu pomiarów czasów relaksacji T_1. Również w oparciu o współczynniki dyfuzji ustalić można wartość stałej trwałości. Tak jak w przypadku zastosowania innych parametrów, i tym razem znaleźć możemy szereg czynników przemawiających na korzyść dyfuzjometrii, jak również całą listę jej ograniczeń. Zastosowanie tej metody możliwe jest wyłącznie dla układów o szybkiej, w skali czasu NMR, wymianie chemicznej pomiędzy wolnymi a związanymi indywiduami. W tym wypadku obserwowany współczynnik dyfuzji (D_{obs}) jest średnią ważoną wartości charakterystycznych dla indywiduum (cząsteczki gościa lub gospodarza) w formie związanej i wolnej (odpowiednio D_b i D_f):

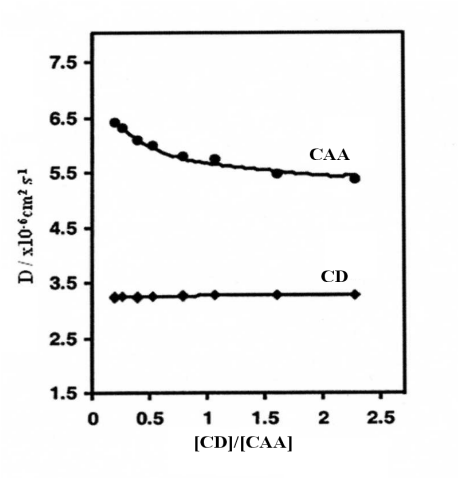
$$D_{obs} = xD_b + (1-x)\,D_f$$

gdzie x oznacza ułamek molowy formy związanej.

W efekcie, w sposób analogiczny jak dla przesunięć chemicznych, możliwe jest wyznaczenie wartości K, stosując proste postępowanie iteracyjne dla serii danych uzyskanych dla różnego stosunku stężenia molekuł gościa i gospodarza. Główna różnica polega na tym, iż w przypadku wyznaczania stałej K w oparciu o współczynniki dyfuzji, często nie jest potrzebne wykonanie pełnego miareczkowania. Sprawdza się to szczególnie w przypadku, gdy D_f dla cząsteczki gościa jest znacząco różne od wartości D_b. Ponieważ cząsteczka gościa jest z reguły znacznie mniejsza od cząsteczki gospodarza, przyjąć można, iż wartość D_b nie jest znacząco różna od wartości D_f dla liganda. Wyznaczanie stałych trwałości w oparciu o pomiary współczynników dyfuzji za pomocą technik NMR ma, jak wspomniano, szereg zalet jak i wad, wynikających ze specyfiki metody rezonansu magnetycznego jak i samych technik dyfuzjometrycznych. Z jednej strony, w porównaniu z metodami opierającymi się na spektroskopii UV-Vis, pomiarach elektrochemicznych czy też innych parametrach NMR-owskich, niewielkie ilości zanieczyszczeń nie powodują mierzalnych przekłamań uzyskanych wartości ani tym bardziej, jak to często bywa przy innych technikach, nie umożliwiają wykonania pomiaru. Z drugiej strony zastosowanie dyfuzjometrii ograniczone jest wyznaczania K zawierających się w przedziale $10\text{-}10^5$ M^{-1}. Główną zaletą obliczania stałej trwałości ze współczynników dyfuzji jest ich niewrażliwość na równowagi kwasowo-zasadowe zachodzące w roztworze, mające duży wpływ na przesunięcia chemiczne. Ponadto, w wielu przypadkach, efekty związane ze zmianą przesunięć chemicznych są małe i, w efekcie, wyznaczone w oparciu o nie wartości K są obarczone dużymi błędami. Utrudnione i obarczone dużym błędem jest natomiast uzyskanie wartości K w przypadku, gdy wartości D_f i D_b są podobne.

Przykładem zastosowania pomiarów współczynników dyfuzji do wyznaczania stałej trwałości mogą być prace nad kompleksami eterów koronowych i kryptandów

z jonem $CH_3NH_3^+$. Wyznaczenie wartości K w oparciu o pomiary CIS jest trudne, gdyż zmiany przesunięć chemicznych są niewielkie, natomiast wartości D zmieniają się w szerokim zakresie, co pozwala uzyskać wartość K z dużą dokładnością. Również dla układów trójskładnikowych, dla których cząsteczka gościa jest jednocześnie cząsteczką gospodarza dla kolejnego indywiduum (np.: układ cyklodekstryna - eter koronowy - kation), wyznaczenie stałych trwałości metodami NMR możliwe jest w zasadzie wyłącznie na drodze pomiarów współczynników dyfuzji. Przykładowy wynik miareczkowania NMR (układ β-cyklodekstryna (CD)/kwas cykloheksanooctowy (CAA)), wykorzystującego pomiar współczynników D, przedstawia rysunek 5.

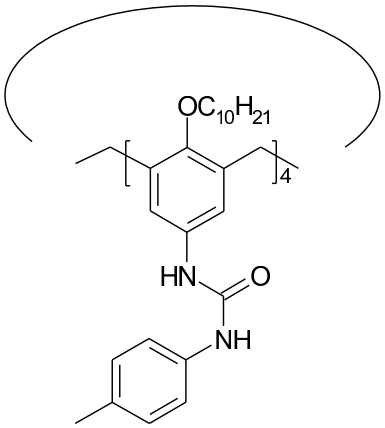


Rysunek 5. Przykładowa krzywa miareczkowania dyfuzjometrycznego

3.2 Badania strukturalne

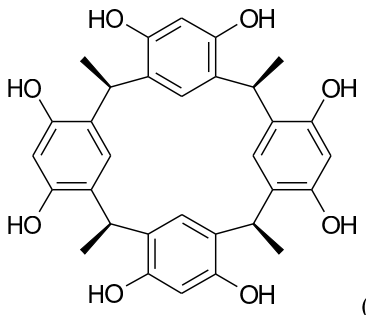
O ile pomiar stałych trwałości w oparciu o dyfuzjometrię NMR jest głównym jej zastosowaniem dla układów, w których zachodzi szybka wymiana chemiczna, o tyle dla systemów, w których proces wymiany jest powolny, pomiary wartości współczynników

dyfuzji służą do śledzenia procesów enkapsulacji. Wielkości te są parametrami, możliwymi do zmierzenia za pomocą technik NMR, najbardziej czułymi na proces zamykania cząsteczek gościa w klatkach, utworzonych przez cząsteczkę/cząsteczki gospodarza. Współczynniki dyfuzji dla wolnej cząsteczki gościa, ze względu na jej małe rozmiary, są znacznie większe w porównaniu z wartościami dla cząsteczek gospodarza. Ponadto, enkapsulowana cząsteczka gościa posiada z reguły takie same wartości D jak cząsteczki liganda (w przypadku powolnej wymiany chemicznej). Dzięki pomiarom dyfuzjometrycznym wykazano na przykład, że niektóre z kaliksarenów ulegają preorganizacji w oligomery przed dodaniem molekuł gościa do układu. Dla przykładu, w przypadku mocznikowej pochodnej kaliksarenu (**1**) wyznaczony współczynnik dyfuzji, dla roztworów w benzenie, $0{,}34 \cdot 10^{-5}$ cm^2 s^{-1} (dimer związku). Wolna cząsteczka benzenu, w tych samych warunkach, charakteryzuje się wartością D równą $2{,}21 \cdot 10^{-5}$ cm^2 s^{-1}. Po enkapsulacji współczynnik ten, dla benzenu, jest równy wartości dla dimeru **1**, co świadczy o stworzeniu kompleksu, w którym cząsteczka C_6H_6 zamknięta jest we wnęce utworzonej przez dwie molekuły kaliksarenu.



(**1**)

Kolejny przykład, to zastosowanie technik dyfuzjometrycznych w badaniach preorganizacji ligandów. Stwierdzono, iż rezorcyno[4]aren **2** tworzy, w roztworach i fazie stałej, kompleks z cząsteczkami typu $(n\text{-}C_6H_{13})_4X^+\ Br^-$ (X = N, Sb) - G, o stechiometrii $(\mathbf{2})_6G$. Jednakże pomiary współczynników dyfuzji dla powyższego kompleksu i wolnego liganda, w obecności śladów wody, wykazały całkowitą zbieżność – na podstawie powyższych danych wywnioskowano, iż mamy do czynienia z preorganizacją liganda i wytworzeniem struktur typu $(\mathbf{2})_6(H_2O)_8$. Ponadto, w roztworach chloroformowych liganda, obserwuje się sygnał pochodzący od chloroformu uwięzionego we wnęce kapsuły, dla którego wartość D jest taka sama jak dla heksameru.



(**4**)

Ze względu na duży wpływ rozmiaru i kształtu cząsteczki na wartości współczynników dyfuzji, opisywana metoda znajduje duże zastosowanie w badaniach oligo- i polimerów supramolekularnych. Również w przypadku dendrymerów analiza danych dyfuzjometrycznych pozwala uzyskać wiele cennych informacji. Dzięki wysokiej symetrii wspomnianych indywiduów, na podstawie obliczeń teoretycznych przewidzieć można wartości współczynnika dyfuzji dla tego typu połączeń. Porównanie wartości eksperymentalnych z obliczonymi pozwala w efekcie ustalić takie parametry, jak średnia ilość merów tworzących polimer, kształt supermolekuły (liniowa, pofałdowana, cykliczna) i ułożenie poszczególnych podjednostek w przestrzeni.

3.3 Współczynnik dyfuzji jako filtr

Widmo DOSY pozwala uzyskać dla mieszaniny szereg widm poszczególnych składników, o ile związki obecne w badanym układzie różnią się miedzy sobą wartościami współczynnika D. Ponadto dyfuzjometrię NMR można użyć do „screeningu" zdolności kompleksotwórczych. Współczynnik dyfuzji małych cząsteczek, po dodaniu liganda (z reguły związku o dużej masie cząsteczkowej) raptownie spada. Z praktycznego punktu widzenia, celem rejestracji widma kompleksów gość-gospodarz należy:

- przygotować roztwory mieszanin złożone z bibliotek gości,
- zarejestrować widma NMR, a po ich rejestracji tak dobrać parametry aparatu (moc impulsu, interwały), aby sygnały pochodzące od nich uległy wygaszeniu,
- dodać do mieszaniny gości roztwór liganda i ponowne zarejestrowanie widma NMR.

W przypadku tworzenia się kompleksów gość-gospodarz obok sygnałów pochodzących od cząsteczek gospodarza, pojawią się sygnały dla kompleksu. Tą drogą otrzymamy informacje, które cząsteczki gościa utworzyły kompleksy.

3.4 Wskazówki metodyczne

W celu prawidłowego pomiaru współczynników dyfuzji należy:

- sprawdzić czy softwere aparatu NMR udostępnia szereg sekwencji pozwalających wyznaczyć współczynniki dyfuzji. W tej technice najbardziej przydatne są te, które nie są wrażliwe na „niedoskonałość" impulsów gradientowych (np.: bpled)
- pomiary prowadzić dla próbek dokładnie termostatowanych; na wartość współczynnika dyfuzji duży wpływ ma stężenie i lepkość roztworu (substancje obce),
- dokładnie wykalibrować impulsy, zarówno transmitera jak i generatora gradientów. Do „wykalibrowania" algorytmu służącego do obliczania

wartości D stosuje się najczęściej wartość współczynnika dyfuzji dla wody lub HDO w D_2O,

- w przypadku sondy z cewkami umożliwiającymi uzyskanie impulsów gradientowych w trzech kierunkach (XYZ) stosować probówki typu Shigemi ze względu na zaburzenia liniowości pola gradientowego w kierunku Z. W przypadku innych głowic NMR, zastosowanie tego typu probówek poprawia jakość wyników (m. in. ze względu na zmniejszenie efektów konwekcyjnych),
- pomiary wykonywać w temperaturach odbiegających od temperatury wrzenia rozpuszczalnika. W temperaturach zbliżonych do $T_{wrz.}$ rozpuszczalnika wyznaczone wartości współczynników D są obarczone dużym błędem.

Podziękowania:

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

Literatura:

1. R. Kimmich; NMR Tomography, diffusiometry, relaxometry; Springer-Verlag Berlin; 1997.
2. Lee Fielding; Determination of Association Constants (K_a) from Solution NMR Data; *Tetrahedron* **56,** 6151-6170; 2000.
3. Y. Cohen, L. Avram, L. Frish; Diffusion NMR Spectroscopy in Supramolecular and Combinatorial Chemistry: An Old Parameter – New Insights; *Angew. Chem. Int. Ed.* **44**, 520-554, 2005.
4. N. Horike, Y. Hashimoto, S. Yamazaki, DOSY NMR as characterization tool for cyclodextrin host-guest association, *Polymer Preprints, Japan*, **55**, 4222-4223, 2006.

5. W.S. Price, F. Hallberg, P. Stilbs, A PGSE diffusion and electrophoretic NMR study of Cs^+ and Na^+ dynamics in aqueous crown ether systems, *Magn. Res. Chem.,* **45**, 152-156, 2007.
6. P.S. Pregosin, E. Martinez-Vivente, P.G. Anil Kumar, Diffusion and NOE NMR spectroscopy. Applications to problems related to coordination chemistry and homogenous catalysis, *Dalton Trans.,* 4007-4014, 2003,.
7. R.W. Mair, M.S. Rosen, R. Wang, D.G. Cory, L. Walsworth, Diffusion NMR methods applied to xenon gas for materials study, *Magn. Res. Chem.*, **40**, S29-S39, 2002.
8. J. Hrabe, G. Kaur, D. N. Guilfoyle. Principles and limitations of NMR diffusion measurements, J. Med. Phys., **32**, 34-42J, 2007.
9. J. W. Emsley, J. Feeney, Forty years of Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, **50**, 179-198, 2007.
10. M. S. Kaucher, Y-F. Lam, S. Pieraccini, G. Gottarelli, J. Davis, Using diffusion NMR to Characterize Guanosine self-association: Insights into structure and mechanism, *Chem. Eur. J.,* **11**, 164-173, 2005.
11. R. Wimmer, F. L. Aachmann, K. L. Larsen, S. B.Petersen, NMR diffusion as a novel tool for measuring the association constant between cyclodextrin and guest molecules, *Carbohydrate Research*, **337**, 842-849, 2002.
12. C.S. Johnson Jr., Diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy: princyples and applications, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy,* **34**, 203-256, 1999.
13. R .Soong, P.M. Macdonald, PEG molecular weight and lateral diffusion of PEG-ylated lipids in magnetically aligned bicelles, *Biochimica et Biophysica Acta,* ***1768***, 1805-1814, 2007.

CANDELA®

Candela sp. z o.o.

oferuje:

Mikrofalowe systemy do:

- syntezy organicznej
- syntezy peptydów
- oznaczania suchej masy
- spopielania mikrofalowego
- mineralizacji
- ekstrakcji
- zatężania

Candela Sp. z o.o.
ul. Czarnieckiego 72
PL 01-541 Warszawa
Tel. (48-22) 8394315
Fax (48-22) 8393577

www.candela.com.pl
e-mail: candela@candela.com.pl

CANDELA®

Wyłączne przedstawicielstwo, dystrybucja i serwis produktów firmy VARIAN Inc.

Aparaturę do analiz chromatograficznych:

Chromatografy gazowe

GC 3800

GC 3900

Micro GC

Systemy GC/MS

GC/MS/MS 4000

GC/MS 1200

GC/MS/MS 2100 I 2200

Chromatografy cieczowe

Serii Polaris

Serii ProStar

systemy dHPLC HELIX

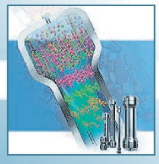
Systemy LC/MS/MS

LC/MS/MS 1200L

LC/MS/MS/NMR

Kolumny i osprzęt chromatograficzny

Kolumny do GC



Kolumny do HPLC

Candela s-ka z o.o.
ul. Czarnieckiego 72
PL 01-541 Warszawa
Tel. (48-22) 8394315..6
Fax (48-22) 8393577

www.candela.com.pl
E-mail: candela@candela.com.pl