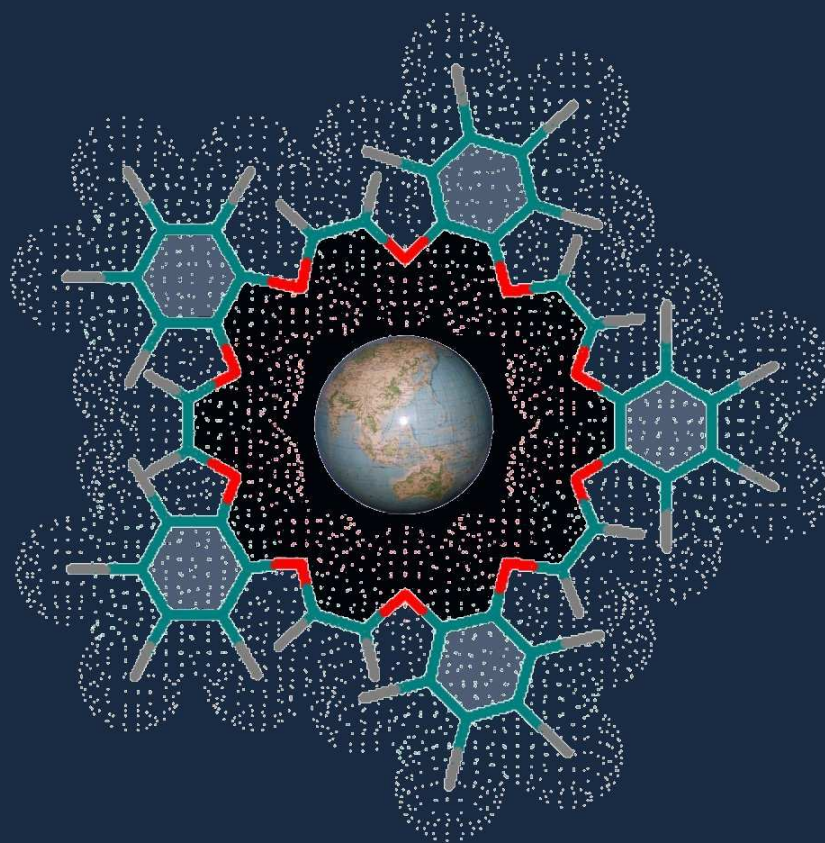


Syntetyczne receptory molekularne

Strategie syntezy
Metody badawcze

Praca zbiorowa pod redakcją Grzegorza Schroedera



Syntetyczne receptory molekularne

**Strategia syntezy
Metody badawcze**

**Praca zbiorowa
pod redakcją Grzegorza Schroedera**

BETAGRAF P.U.H.

Poznań 2007

Opiniodawcy:

Prof. dr hab. Florian Domka
Doc. dr hab. Piotr Grzesiak

Wydanie monografii było możliwe dzięki dofinansowaniu z funduszy pochodzących z grantu rozwojowego R0501601.

Opracowanie techniczne oraz projekt okładki:

Jan Polak
Marta Schroeder

ISBN 83-89936-18-6

Wydawnictwo:

BTAGRAF P.U.H.
Św. Antoniego 24
61-359 Poznań

*Dzień po dniu
natura maluje dla nas
nieskończenie piękne obrazy,
o ile tylko potrafimy
je zauważyć...*

John Ruskin

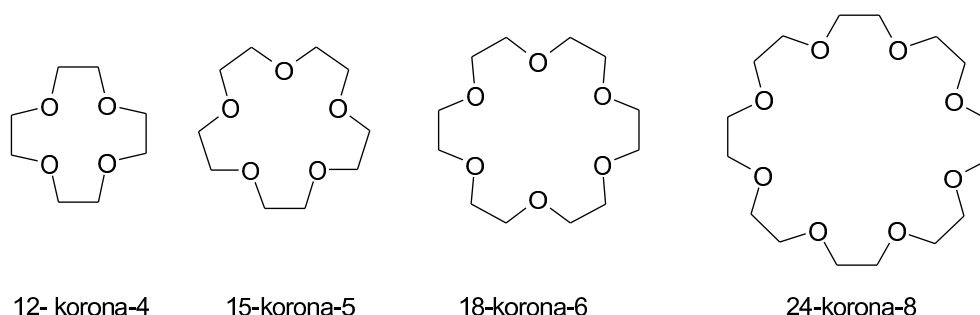
SPIS TREŚCI

Wstęp	7
Książka adresowa	13
1. <i>Michał Ceglowski, Grzegorz Schroeder</i> Strategia syntezy niektórych związków makrocyclicznych	17
2. <i>Dawid Lewandowski, Grzegorz Schroeder</i> Synteza układów makrocyclicznych z zastosowaniem metod klasycznej i dynamicznej chemii kombinatorycznej	49
3. <i>Grzegorz Schroeder, Błażej Gierczyk</i> Receptory molekularne oparte na allosterycznym efekcie	61
4. <i>Mariusz Urbaniak, Waldemar Iwanek</i> Rezorcynoareny jako receptory molekularne	71
5. <i>Andrzej Sporzyński, Anna Żubrowska</i> Kwasy aryloboronowe jako receptory cukrów	119
6. <i>Zbigniew J. Leśnikowski, Błażej Wojtczak</i> Aptamery i sensory DNA jako receptory kwasów nukleinowych, białek i związków niskocząsteczkowych.	139
7. <i>Beata Kolesińska, Justyna Frączyk, Zbigniew J. Kamiński</i> Receptory wdrukowane w polimer	161
8. <i>Alicja Filipowicz-Szymańska, Zbigniew Brzózka</i> Mikroreaktory enzymatyczne	199
9. <i>Jaromił Kira, Tadeusz Ossowski</i> Równowagi chemiczne w kompleksach gość – gospodarz. Metodyka badań	221
10. <i>Piotr Młynarz</i> Zastosowanie parametrów spektroskopii NMR w diagnostyce układów supramolekularnych	245
11. <i>Jaromił Kira, Tadeusz Ossowski</i> Metody chemii teoretycznej w badaniu oddziaływań gość – gospodarz (kompleksów supramolekularnych)	263
12. <i>Adam Huczyński, Bogumił Brzezinski</i> Zastosowanie spektroskopii w podczerwieni w badaniach oddziaływań międzycząsteczkowych	281
13. <i>Joanna Łojewska, Kamilla Małek, Leonard Proniewicz</i> Techniki spektroskopii oscylacyjnej w analizie ugrupowań chemicznych typu gość – gospodarz. Teoria i eksperyment	323
14. <i>Jan Milecki</i> Skaningowa mikroskopia tunelowa związków organicznych	363

15. <i>Bogusława Łęska, Grzegorz Schroeder</i>	
Zastosowanie metod kinetycznych w badaniach reakcji kompleksowania w układach gość-gospodarz	373
16. <i>Joanna Wyrwał, Grzegorz Schroeder</i>	
Kinetyka i mechanizm tworzenia kompleksów przez układy makrocycliczne typu cyklam	385
17. <i>Marta Rucińska</i>	
Aparatura stosowana w spektroskopii w podczerwieni	413

Wstęp

Receptory molekularne to układy zdolne do wiązania innych cząsteczek lub jonów w aktywnych fragmentach swojej struktury na zasadzie kompleksów gość-gospodarz. Zdolność związków do wiązania z receptorem zależy od stopnia dopasowania struktury cząsteczki gościa do miejsc wiążących gospodarza - receptora. Im jest on większy, tym bardziej selektywne i trwałe jest związanie gościa z receptorem.

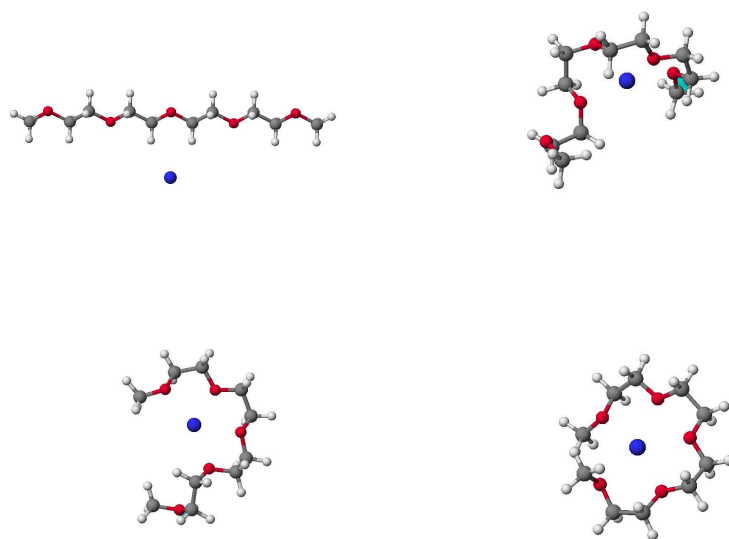


Rysunek 1. Rodzina eterów koronowych o wzrastającej wielkości wnęki.

Trwałość połączeń gość-receptor zależy od rodzaju oddziaływań pomiędzy nimi. Te fundamentalne stwierdzenia legły u podstaw chemii supramolekularnej, której twórcy Donald J. Cram, Jean-Marie Lehn i Charles J. Pedersen otrzymali w roku 1987 nagrodę Nobla jako uznanie środowisk naukowych za nowe spojrzenie na rolę oddziaływań niekowalencyjnych w przyrodzie takich jak: wiązanie wodorowe, oddziaływanie van der Waalsa, oddziaływanie jon-dipol oraz jon-jon, oddziaływania $\pi - \pi$ i oddziaływań kation - π .

Syntetyczne chemoreceptory to molekuly otrzymane przez chemików, nie występujące w środowisku naturalnym, zdolne do specyficznego rozpoznania innych substancji chemicznych (gości) lub/i zdolne do samoorganizacji.

Utworzone kompleksy gość-gospodarz, czy w innej nomenklaturze gość-receptor charakteryzują się pełną odwracalnością reakcji kompleksowania, w odróżnieniu od procesów prowadzących do powstania związków chemicznych. Wielkość stałej kompleksowania tworzenia układów gość-gospodarz oraz jej stosunek do innych stałych kompleksowania molekuł przez cząsteczkę receptora określa selektywność receptora oraz jego przydatność jako sensora w chemii analitycznej.



Rysunek 2. Proces samoorganizacji glikolu polioksaetylenowego pod wpływem jonu sodu.

W tym miejscu warto postawić bardzo ważne pytania: Czy potrafimy jako chemicy otrzymywać syntetyczne i selektywne receptory molekularne dla dowolnych cząsteczek gościa? Jeżeli pozytywnie odpowiemy na tak sformułowane pytanie, to możemy stworzyć nowy obszar chemii stosowanej, opartej na słabych niekowalencyjnych oddziaływaniach o ogromnym praktycznym zastosowaniu. Synteza tego typu układów nie stanowi w dzisiejszych czasach ograniczenia. Jedynym ograniczeniem mogą być jedynie koszty otrzymywania syntetycznych receptorów. Fakty te powodują, że możemy obecnie realizować bardzo śmiało projekty naukowe oparte na chemii kompleksów gość-gospodarz.

Praktyczne zastosowanie układów gość-receptor ma każdorazowo swój początek w syntezie funkcjonalnych receptorów, które następnie służą do otrzymywania nowych, funkcjonalnych materiałów.

Funkcjonalizacja syntetycznych receptorów molekularnych ma prowadzić do:

zmiana rozpuszczalności kompleksów w stosunku do jej składowych;

trwałego osadzanie receptora na powierzchni materiału;

nadanie charakteru wielofunkcyjnego lub w

zrost selektywności w procesie rozpoznania molekularnego z biblioteki podobnych cząsteczek gości.

Modyfikacja powierzchni materiałów za pomocą receptorów molekularnych najczęściej dotyczy:

- odmian alotropowych węgla (grafit, fuleren, rurki węglowe)
- powierzchni metalu (złota, srebra)
- krzemionki (SiO_2)
- celulozy
- materiałów ceramicznych
- szkła oraz
- polimerów.

W grupie receptorów molekularnych szczególne miejsce zajmują jonofory. Jonofory to hydrofobowe cząsteczki zdolne do transportu jonów z fazy wodnej do warstwy hydrofobowej, lub zdolne do transportu jonów poprzez warstwę lipidową do komórki. Jonofory definiuje się często jako nośniki, akceptory lub jako cząsteczki gospodarza dla jonów Na^+ , K^+ , czy Ca^{2+} , czyli takich, które są transportowane przez membrany biologiczne. Czynniki decydującymi o selektywności jonoforu są przede wszystkim: polarność wnętrza, lipofilowość powierzchni, wiązania wodorowe utrzymujące strukturę oraz oddziaływania jon-dipol. Znaczącą rolę w procesie selektywnego rozpoznawania molekularnego odgrywa także pH, siła jonowa środowiska oraz typ rozpuszczalnika.

Obecnie znanych jest wiele syntetycznych receptorów o dużej selektywności dla jonów lub małych obojętnych cząsteczek otrzymywanych w celu wykorzystania ich w budowie sensorów molekularnych.

Pojęcie sensora odnosi się do szeregu urządzeń fizycznych i narządów biologicznych zdolnych do wykrywania określonych sygnałów, parametrów fizycznych czy obecności związków chemicznych na sygnał użyteczny analitycznie, gdzie sygnał analityczny jest proporcjonalny do wielkości bodźca. Większość sensorów, choć nie wszystkie, opiera się na procesach elektrycznych lub elektronicznych. Stanowią one rodzaj przetwornika, pracującego samodzielnie lub połączonego ze wskaźnikiem. Są miniaturowymi urządzeniami pracującymi dla potrzeb diagnostyki lekarskiej, nanotechnologii, jak i bioinformatyki.

Poznanie drogi od syntetycznego receptora do sensora chemicznego lub urządzenia molekularnego otwiera nowe możliwości miniaturyzacji urządzeń diagnostycznych i przekazywania informacji.

Kilka lat temu grupa naukowców z różnych polskich ośrodków akademickich zajmujących się w pracy badawczej chemią supramolekularną rozpoczęła systematyczne spotkania naukowe, tematycznie związanych z syntetycznymi receptorami molekularnymi, efektem współpracy były liczne publikacje oraz uzyskanie grantu rozwojowego na lata

2006-2008 pt. „Syntetyczne receptory molekularne dla potrzeb diagnostyki i nanotechnologii” Nr R 05 016 01. Dotychczasowe spotkania odbywały się w: Obrzycku 13-14.10.2005, Warce-Sielance, 21-22.04.2006, Korbielowicach 6-8 10.2006, Ciężeniu 19-21.01. 2007.



Uczestnicy Seminarium Naukowego „Syntetyczne receptory molekularne dla potrzeb diagnostyki i nanotechnologii” Warka –Sielanka 2006



Uczestnicy Seminarium Naukowego „Syntetyczne receptory molekularne dla potrzeb diagnostyki i nanotechnologii” Korbielowice 2006



Uczestnicy Seminarium Naukowego „Syntetyczne receptory molekularne dla potrzeb diagnostyki i nanotechnologii” Ciężen 2007

Mają Państwo przed sobą monografię opracowaną przez dużą grupą polskich naukowców pokazującą zarówno strategię otrzymywania syntetycznych receptorów molekularnych oraz wybrane metody badawcze stosowane dla tej grupy związków.

Grzegorz Schroeder

Poznań, luty 2007 roku



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

Bogumił Brzezinski

Uniwersytet im. A. Mickiewicza
Wydział Chemii
Grunwaldzka 6
60-780 Poznań
e-mail: bbrzez@main.amu.edu.pl
tel. +48-61-8291-330
fax: +48-61-8658-008

Zbigniew Brzózka

Politechnika Warszawska
Wydział Chemiczny
Pracownia Miniaturowych Systemów Analitycznych
Noakowskiego 3
00-664 Warszawa
e-mail: brzozka@ch.pw.edu.pl

Michał Cegłowski

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

Alicja Filipowicz-Szymańska,

Politechnika Warszawska
Wydział Chemiczny
Pracownia Miniaturowych Systemów Analitycznych
Noakowskiego 3
00-664 Warszawa

Justyna Frączyk

Politechnika Łódzka
Instytut Chemii Organicznej
Żeromskiego 116
90-924 Łódź

Błażej Gierczyk
Uniwersytet im. A. Mickiewicza
Wydział Chemii
Grunwaldzka 6
60-780 Poznań
e-mail: hanuman@amu.edu.pl
tel: +48-61-8291489
fax: +48-61-8658008

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

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

Zbigniew J. Kamiński
Politechnia Łódzka
Instytut Chemii Organicznej
Żeromskiego 116
90-924 Łódź
e-mail: zbigniew.kaminski@p.lodz.pl

Jaromił Kira
Uniwersytet Gdański
Wydział Chemii
Zakład Chemii Supramolekularnej
Sobieskiego 18/19
80-852 Gdańsk
e-mail: jaromir@chemik.chem.univ.gda.pl
tel: +48-58-3450420
fax: +48-58-410357

Beata Kolesińska
Politechnia Łódzka
Instytut Chemii Organicznej
Żeromskiego 116
90-924 Łódź

Zbigniew J. Leśnikowski
Polska Akademia Nauk
Centrum Biologii Medycznej,
ul. Lodowa 106
93-232 Łódź
e-mail: zlesnikowski@cbm.pan.pl

Dawid Lewandowski

Uniwersytet im. A. Mickiewicza
Wydział Chemii
Grunwaldzka 6
60-780 Poznań
e-mail: dawid_le@interia.pl

Bogusława Łęska

Uniwersytet im. A. Mickiewicza
Wydział Chemii
Grunwaldzka 6
60-780 Poznań
e-mail: bogunial@amu.edu.pl
tel: +48-618291489
fax: +48-618658008

Joanna Łojewska,

Uniwersytet Jagielloński
Wydział Chemii
Ingardena 3
30-060 Kraków
e-mail: lojewska@chemia.uj.edu.pl
tel: +48-126632245,
fax: +48-126340515

Kamilla Malek

Uniwersytet Jagielloński
Wydział Chemii
Ingardena 3
30-060 Kraków
e-mail: malek@chemia.uj.edu.pl
tel: +48-126632245
fax +48-126340515

Jan Milecki

Uniwersytet im. A. Mickiewicza
Wydział Chemii
Grunwaldzka 6
60-780 Poznań
e-mail: janmil@amu.edu.pl
tel: +48-618291312
fax: +48-618658008

Tadeusz Ossowski

Uniwersytet Gdański
Wydział Chemii
Zakład Chemii Supramolekularnej
Sobieskiego 18/19
80-852 Gdańsk
e-mail: tedos@univ.gda.pl
tel: +48-583450420
fax: +48-583410357

Leonard Proniewicz

Uniwersytet Jagielloński
Wydział Chemii
Ingardena 3
30-060 Kraków
e-mail: proniewi@chemia.uj.edu.pl
tel: +48-610126336377
fax: +48-61126340515

mgr Marta Rucińska

Bruker Polska Sp. z o.o.
Budziszewska 69
60-179 Poznań
e-mail: marta@bruker.poznan.pl
tel: +48-618689008
fax: +48-618689096

Andrzej Sporzyński

Politechnika Warszawska
Wydział Chemiczny
Zakład Chemii Fizycznej
Noakowskiego 3
00-664 Warszawa
e-mail: spor@ch.pw.edu.pl
tel: +48-22660-7273
fax: +48-226282741

Mariusz Urbaniak

Akademia Świętokrzyska
Instytut Chemii
Chęcińska 5
25-020 Kielce

Błażej Wojtczak

Polska Akademia Nauk
Centrum Biologii Medycznej,
ul. Lodowa 106
93-232 Łódź

mgr Joanna Wyrwał

Uniwersytet im. A. Mickiewicza
Wydział Chemii
Grunwaldzka 6
60-780 Poznań
e-mail: asiaw@amu.edu.pl
tel: +48-618291486
fax: +48-618658008

Anna Żubrowska

Politechnika Warszawska
Wydział Chemiczny
Zakład Chemii Fizycznej
Noakowskiego 3
00-664 Warszawa

Rozdział 1

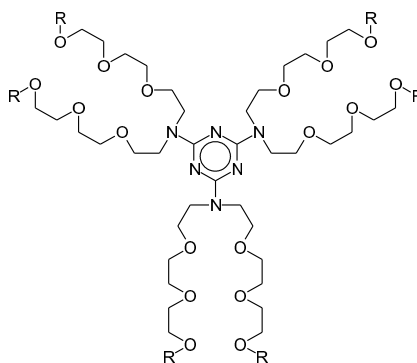
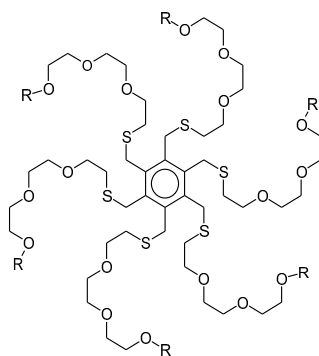
Strategia syntezy niektórych związków makrocyclicznych

Michał Cegłowski, Grzegorz Schroeder

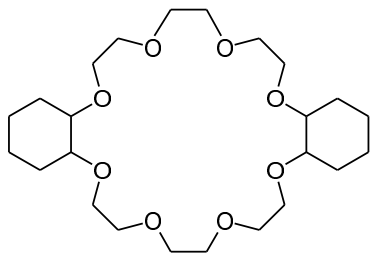
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Wydział Chemii, Grunwaldzka 6, 60-780 Poznań

Dynamiczny rozwój chemii supramolekularnej w ostatnich latach był możliwy dzięki opracowaniu wielu wydajnych metod syntezy receptorów molekularnych. Opracowane metody syntezy umożliwiają otrzymywanie cząsteczek receptorów molekularnych (tzw. cząsteczek gospodarza) o ściśle zaprojektowanych właściwościach i zdolnościach do selektywnego rozpoznawania cząsteczek gościa.

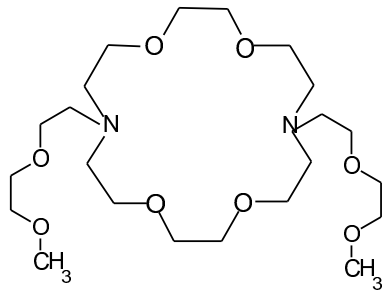
Syntetyczne receptory molekularne ze względu na budowę można podzielić na kilka grup: podandy, etery koronowe- koronandy, kryptandy, sferandy, kawitandy, karcerandy, katenaty, cyklodekstryny.



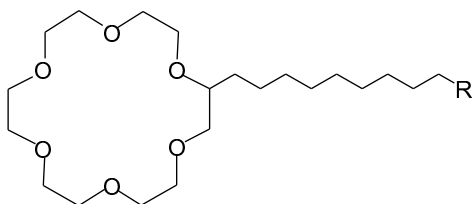
Podand



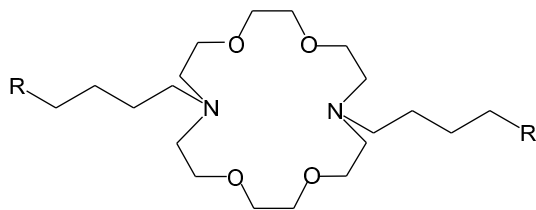
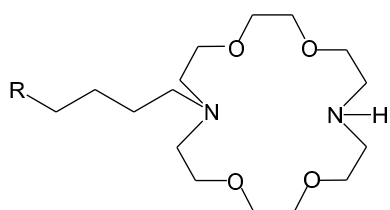
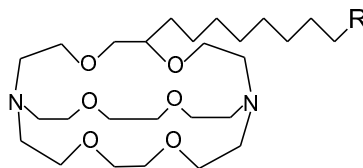
Koronand - Eter koronowy



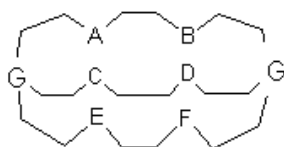
Podando-koronand



Eter lariatowy z połączeniem węglowym



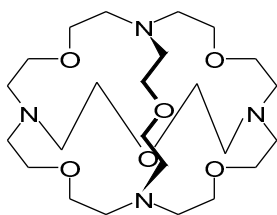
Eter lariatowy z połączeniem azotowym



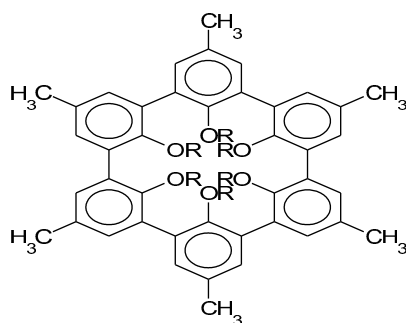
A-F = O, S, N-H, N-R, CH₂

G = N, C

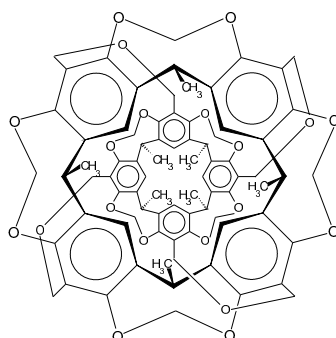
Kryptand



Sferand



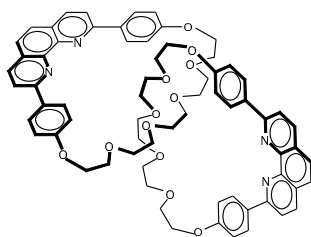
Kawitand



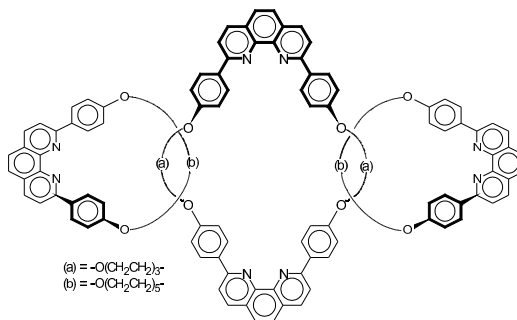
Karcerand

Z punktu widzenia biologicznego łańcuchowe - katenaty (catenanes) i pętlowe - knoty (knots) związki należą do jednych z najciekawszych grup związków makrocyklicznych.

Łańcuchowe związki makrocykliczne zbudowane są z pierścieni fizycznie splecionych z sobą. Na przykład: [2]-katenan składa się z dwóch połączonych z sobą pierścieni, a [3]-katenan z trzech pierścieni (chain-like arrangement):

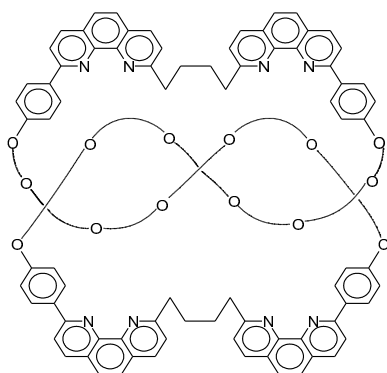


[2]-katenand

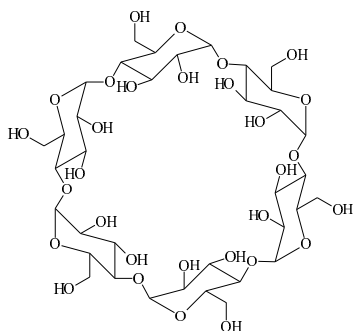


[3]-katenan

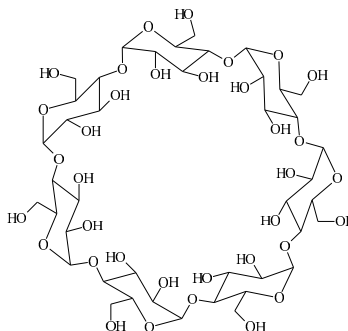
Pętlowe związki makrocykliczne charakteryzują się możliwością posiadania kilku miejsc pozwalających na koordynowanie kationów metali powstałych na skutek wzajemnego przeplatania się fragmentów makrocyklicznych. Powstałe w ten sposób helisowe struktury nazywane są w zależności od ilości miejsc koordynacji: trifoil z dwoma, pentafoil z czterema, heptafoil z sześcioma centrami koordynującymi, itd..



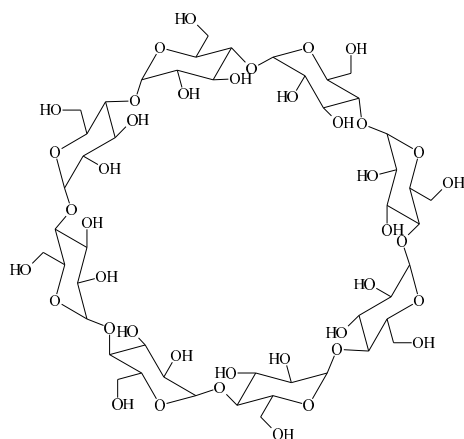
Osobną grupę związków makrocyklicznych stanowią cykliczne układy cukrowe - cyklodekstryny, wśród powszechnie stosowanych cyklodekstryn (CDs) można wyróżnić w zależności od ilości grup cukrowych w pierścieniu: α , β i γ -cyklodekstryny.



α -cyklodekstryna

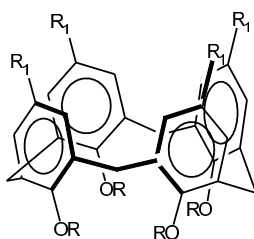


β -cyklodekstryna



γ -cyklodekstryna

Osobną klasą związków makropolicyklicznych tworzą produkty kondensacji fenoli z formaldehydem zwane kaliksarenami. Pojęcie „kaliksaren” pojawiło się w chemii stosunkowo niedawno, kiedy to w 1978 Gutsche po raz pierwszy zaproponował, aby tym, pochodzącym z greckiego słowa „chalice”, terminem określić fenyłowe pochodne cyklicznego tetrameru, w takiej szczególnej konformacji, gdzie wszystkie cztery grupy aryłowe były położone w tym samym kierunku. Następnie nazwano tak całą grupę oligomerów zawierających więcej niż cztery grupy aryłowe, w taki sposób, że ich liczbę (n) umieszcza się w nawiasie kwadratowym pomiędzy określeniami „kaliks” i „aren”, kaliks[n]aren.

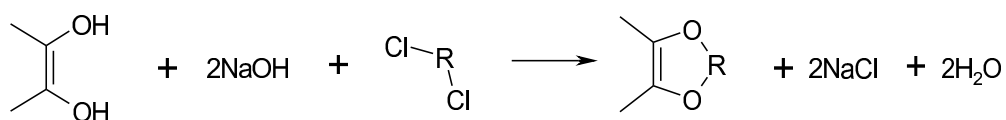


Wszystkie przedstawione grupy związków makrocyclicznych zdolne są do tworzenia dwóch typów kompleksów: kompleksów inkluzyjnych oraz kompleksów gość-gospodarz (klucz – zamek).

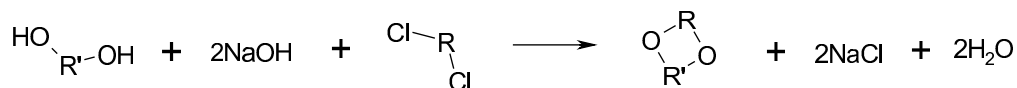
Etery koronowe

W syntezie makrocyklicznych polieterów można wyróżnić cztery główne metody otrzymywania tych związków, które określa się jako metodę: „V”, „W”, „X” oraz „Y”.

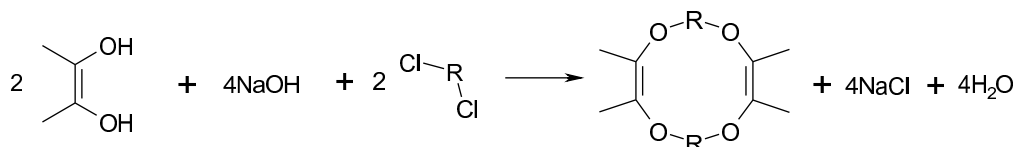
Metoda „V” opiera się na tym, iż pojedynczy diol reaguje z pojedynczym glikolem posiadającym grupę opuszczającą na każdym końcu łańcucha. W tej syntezie jako grupy opuszczające najczęściej stosuje się oprócz chlorków grupy tosylowe i metanosulfonowe.



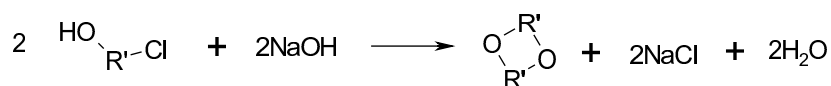
W metodzie „W” używany glikol zawiera już w swojej cząsteczce fragment łańcucha występującego w eterze koronowym.



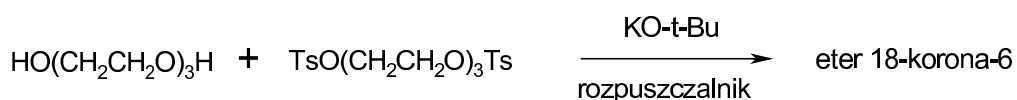
Metoda „X” jest bardzo podobna do metody „V”, ponieważ stechiometria substratów w obu przypadkach jest taka sama. Jedyną rzeczą, która determinuje przebieg tej reakcji jest jej dynamika, która prowadzi do otrzymywania większych eterów koronowych



W metodzie „Y” pojedynczy związek może być zarówno nukleofilem, jak i elektrofilem, reakcje tego typu mogą przebiegać w dwojaki sposób: jako reakcje cyklizacji na pojedynczej cząsteczce lub jako reakcje międzycząsteczkowe tworząc różnego typu etery koronowe.

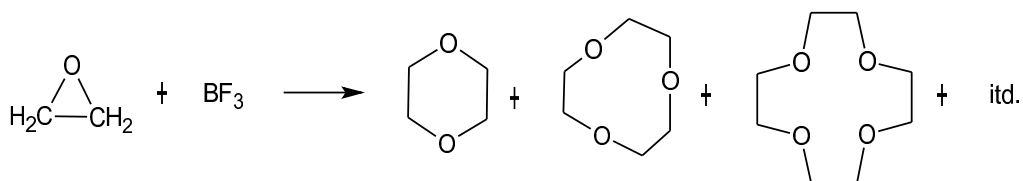


W 1972 roku opracowano bardzo wydajną metodę otrzymywania eterów koronowych w roztworach.



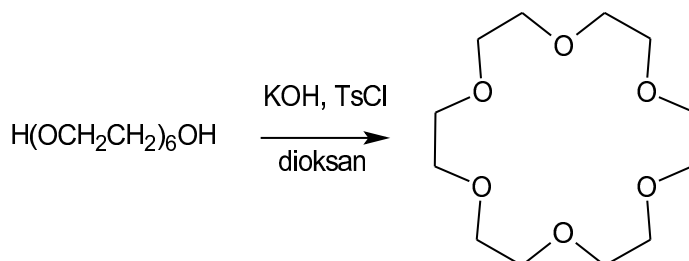
Wydajność tej reakcji w znacznym stopniu zależy od użytego rozpuszczalnika: dla DMSO wynosi ona 84%, dla THF 30-60 %, a dla DME aż 93%.

Kolejna metoda otrzymywania eterów koronowych polega na reakcji BF_3 z tlenkiem etylenu. Otrzymuje się mieszaninę związków o różnej wielkości pierścienia.



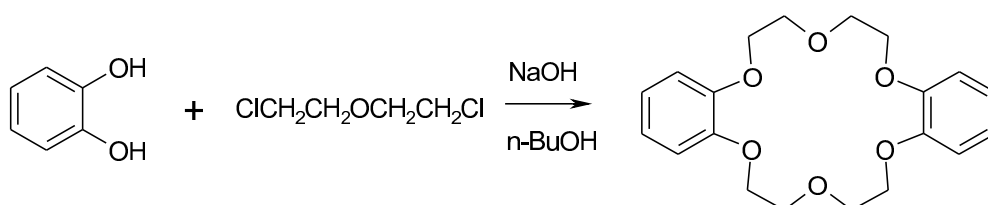
Dodatek tetrafluoroboranu cynku lub miedzi przesuną reakcję w kierunku tworzenia się eteru 15-korona-5 (ponad 90% zawartość w mieszaninie produktów).

Etery koronowe można również otrzymać przez reakcję glikoli o długich łańcuchach z chlorkiem tosyłu i dioksanem w środowisku KOH. Dla przykładu eter 15-korona-5 można wyizolować z mieszaniny poreakcyjnej z 50% wydajnością.

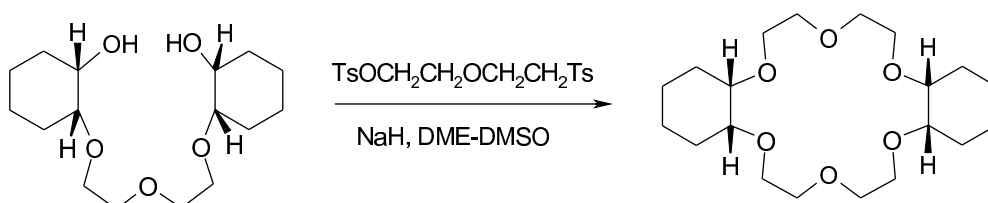
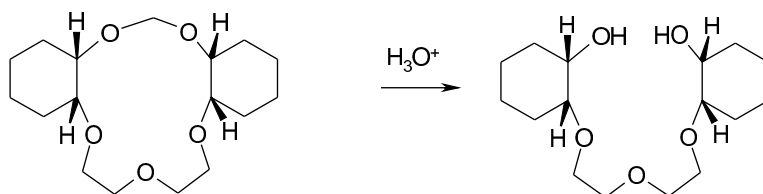
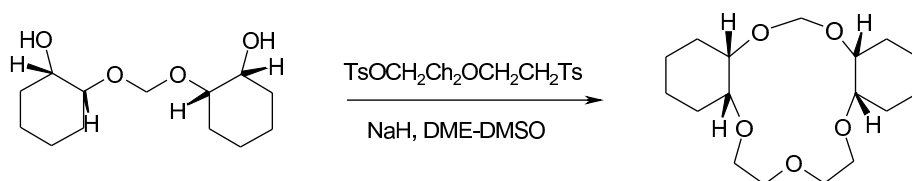
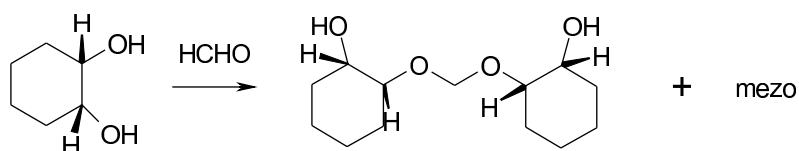


Synteza dibenzo i dicykloheksano eterów koronowych

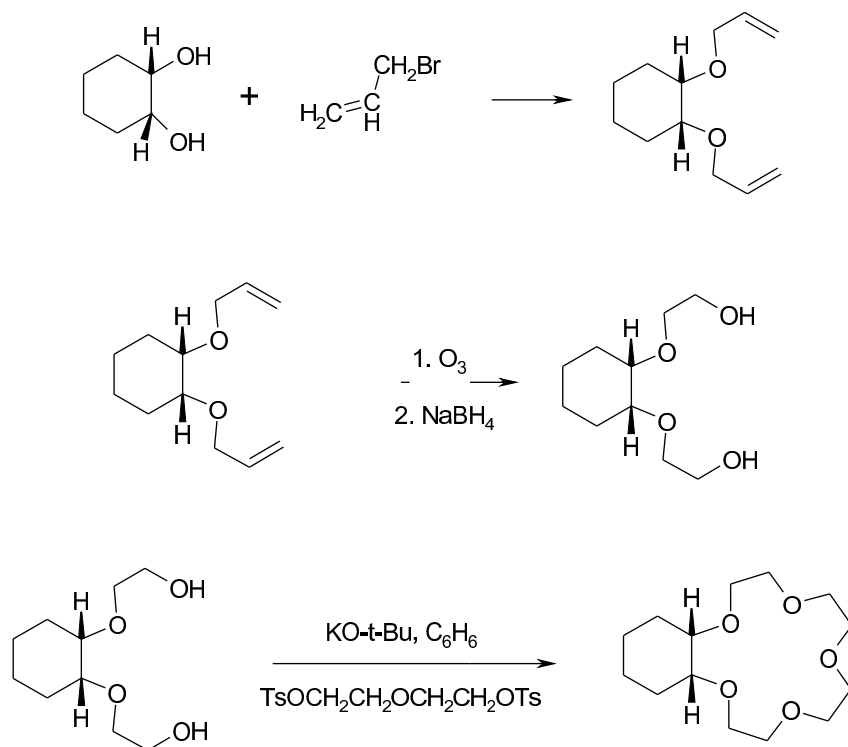
Dibenzo eter koronowy otrzymuje się w myśl metody „X” przedstawionej przez Pedersena.



Syntezę dicykloheksano eterów koronowych można przeprowadzić według następujących reakcji:

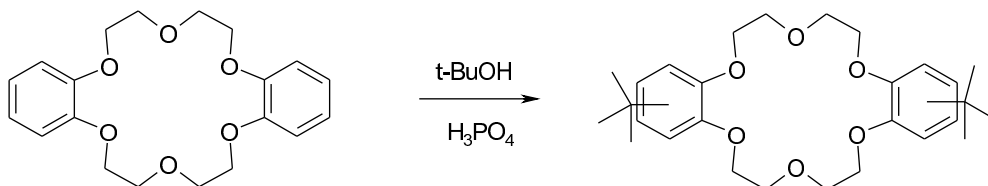


Znana jest również metoda opracowana przez Haywarda, Overtona i Whithama, w której dicykloheksano-15-koronę-5 otrzymuje się z 42% wydajnością.

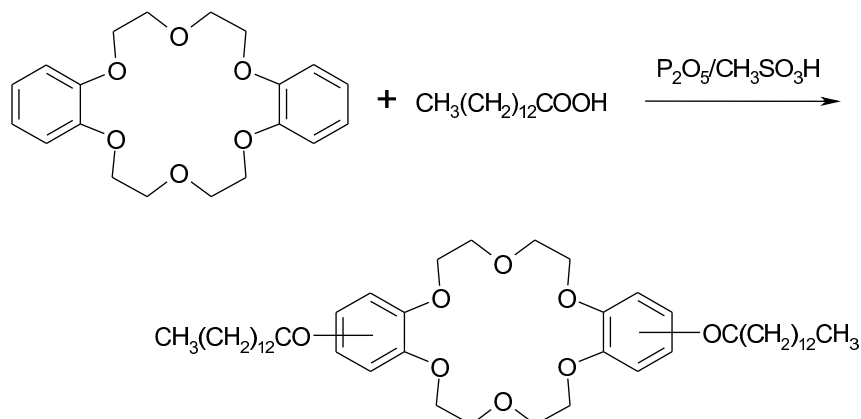


Synteza podstawionych benzenoeterów koronowych

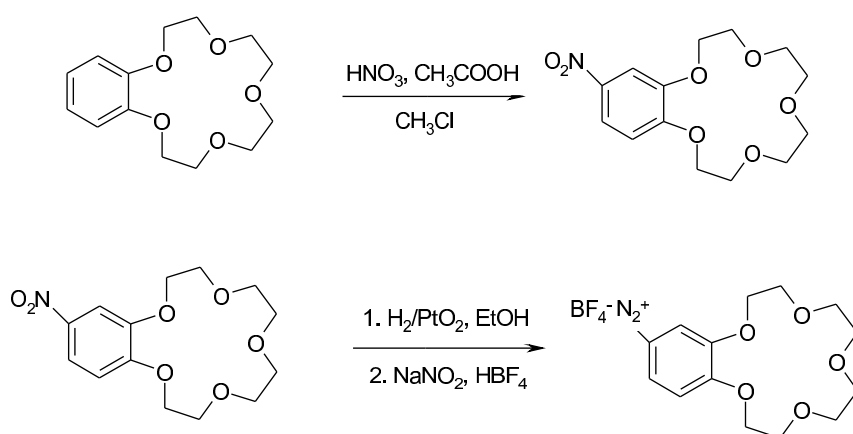
Najprostszą metodą syntezy tej klasy związków jest zastosowanie alkilowania lub acylowania Fiedela-Craftsa. Otrzymane związki są mieszaniną izomerów zawierających daną grupę w różnych położeniach w pierścieniu benzenowym.

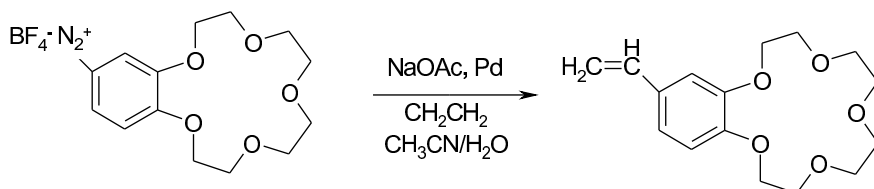


Prace nad acylowaniem pierścieni benzenowych przyłączonych do eterów koronowych wykazały, iż w przeciwieństwie do acylowania samego benzeno, chlorek glinu jest niewystarczającym katalizatorem dla przeprowadzania reakcji z satysfakcjonującą wydajnością. Syntezę dibenzeno-18-korony-6 przeprowadzono następująco:

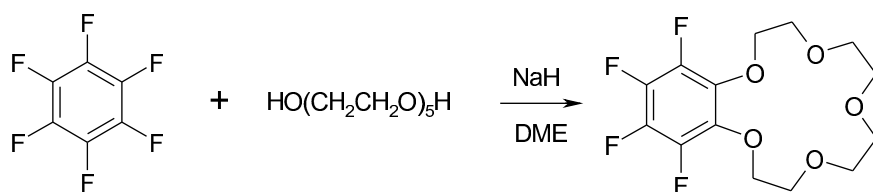


W celu otrzymania pochodnych benzenoeterów koronowych stosuje się następującą procedurę. Benzenoetery koronowe poddaje się reakcji nitrowania. Powstałą grupę nitrową można zredukować do grupy diazowej, która następnie ulega reakcji substytucji.



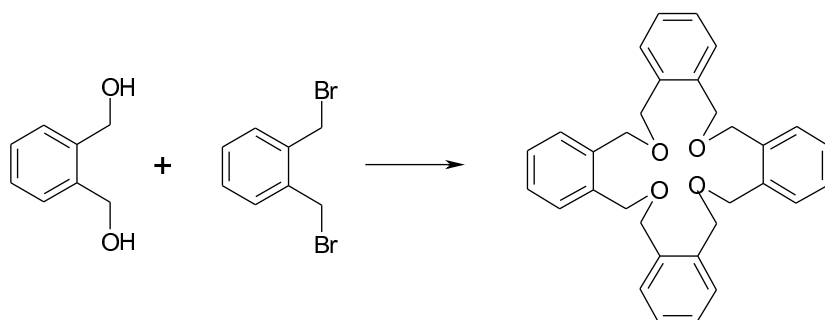


Ponadto podstawione benzenoetery koronowe można otrzymać przez reakcję heksafluorobenzenu z odpowiednim glikolem. Dla przykładu w reakcji z glikolem pentaetylenowym otrzymuje się odpowiednio podstawioną eter koronowy z wydajnością 38%.

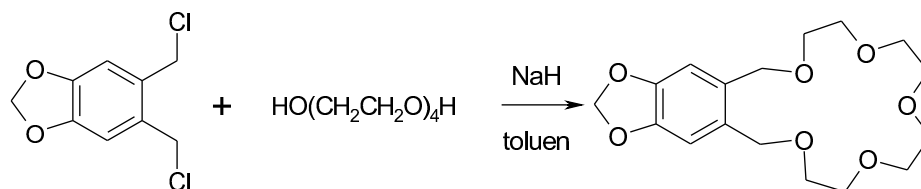


Synteza eterów koronowych zawierających ksylen

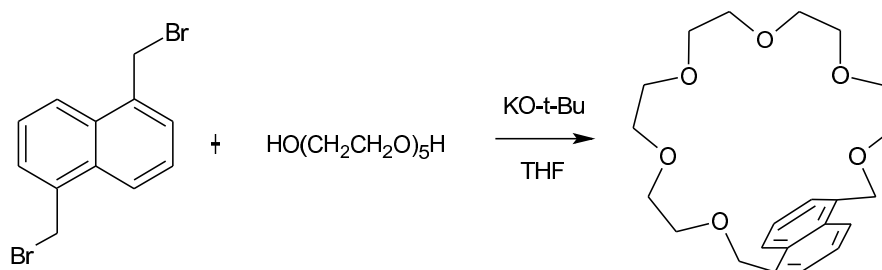
W 1972 roku Vögtle i Zuber skondensowali 1,2-dibromometylobenzen z 1,2-dihydroksymetylobenzenem otrzymując makrocykliczny tetraeter.



Analogiczną reakcję można przeprowadzić z wydajnością aż 29% stosując dichloroksylen i odpowiedni glikol.

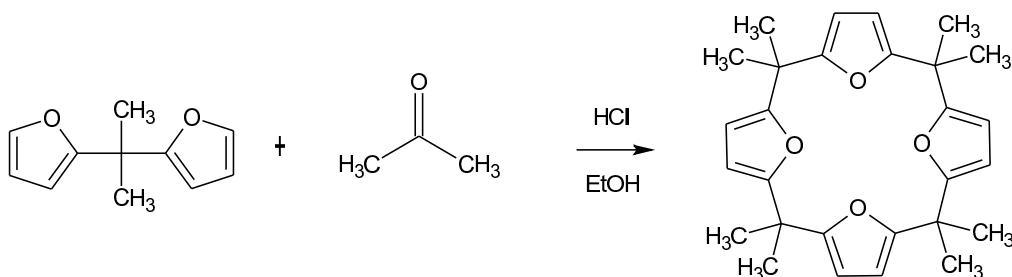


Ciekawe etery otrzymuje się w reakcji pochodnych naftalenu z odpowiednio długimi glikolami. Otrzymuje się wtedy związki, w których zachodzi tak zwany efekt „rope-skipping”.

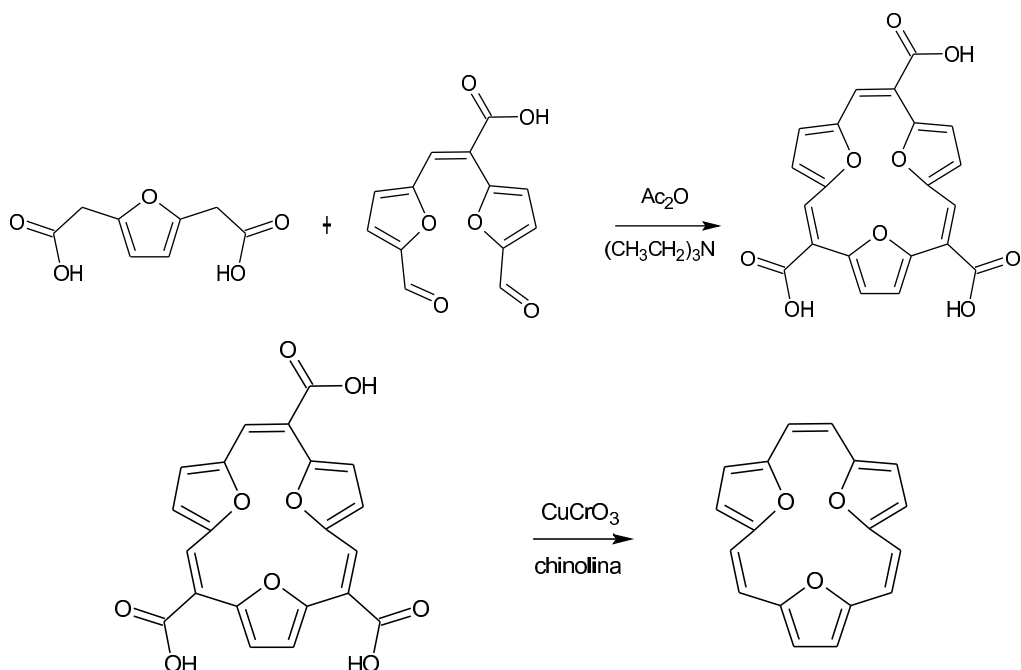


Synteza związków makrocyklicznych zawierających furan

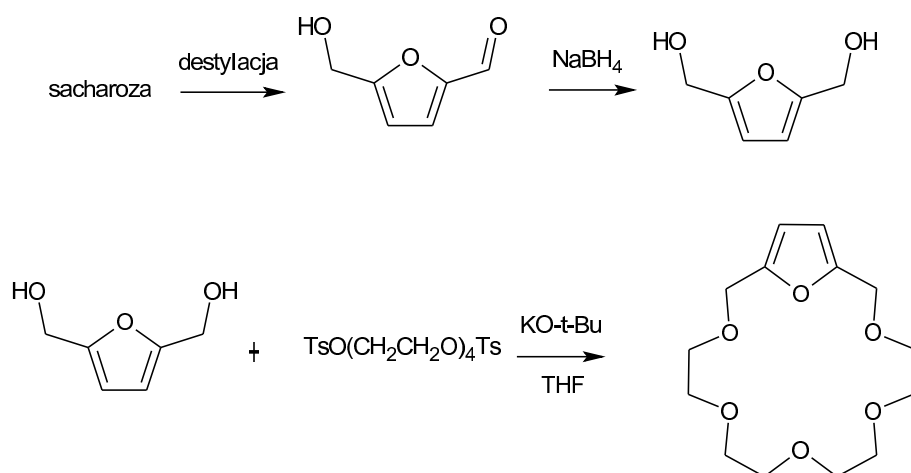
Cykliczne związki zawierające furan można otrzymać dzięki kondensacji pochodnych furanu i acetonu:



Ponadto reakcji kondensacji można poddać związki zawierające furan otrzymując tritlenek [18]annulenu.

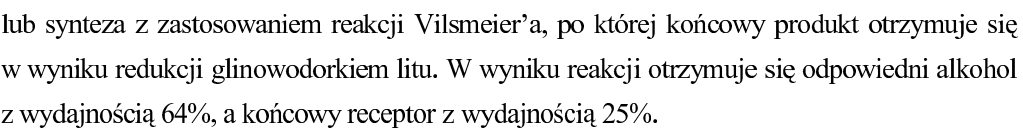


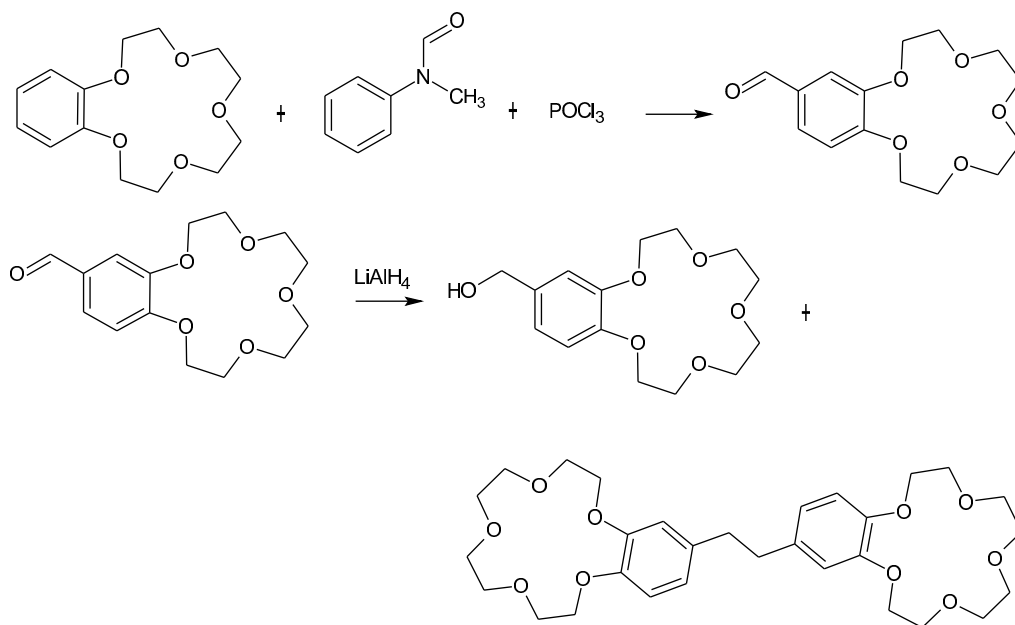
Etery koronowe zawierające furan można również otrzymać za pomocą reakcji, w których substancją wyjściową jest sacharoza:



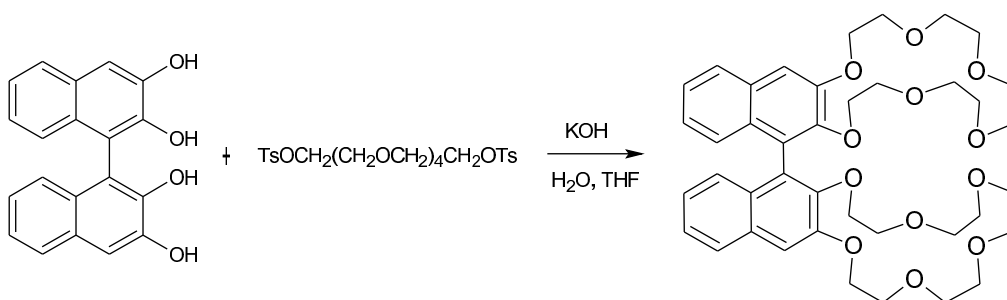
Synteza związków zawierających dwa fragmenty będącymi eterami koronowymi.

Przykładem takiej syntezy jest metoda otrzymania receptorów z dwoma eterami koronowymi, w których mostkiem łączącym jest glikol dietylenowy

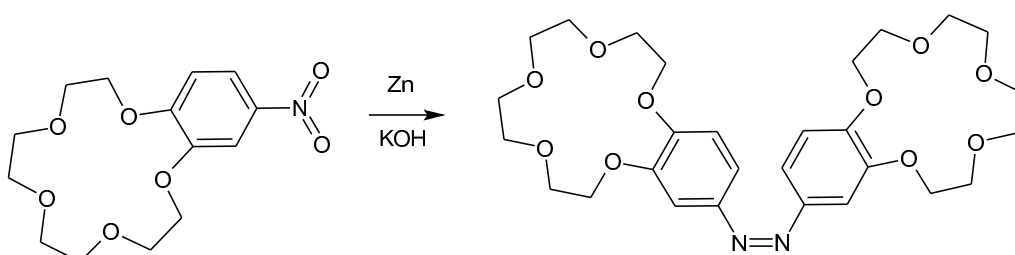




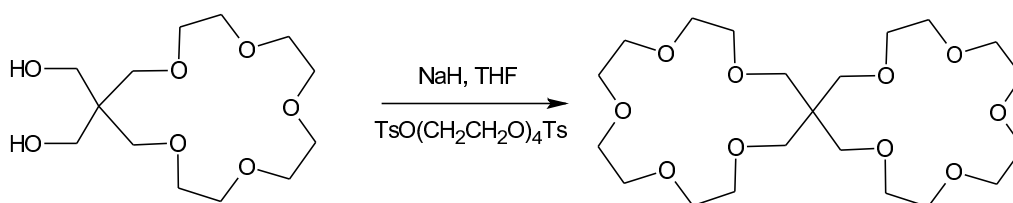
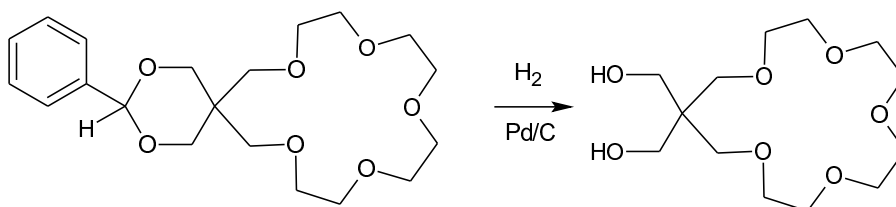
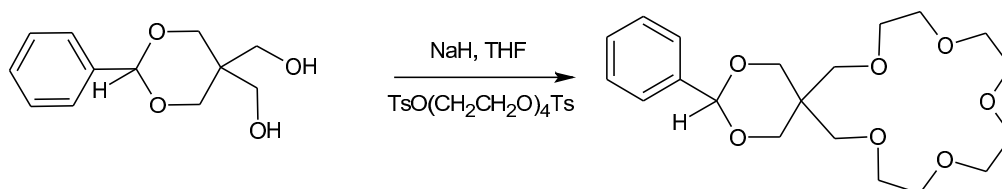
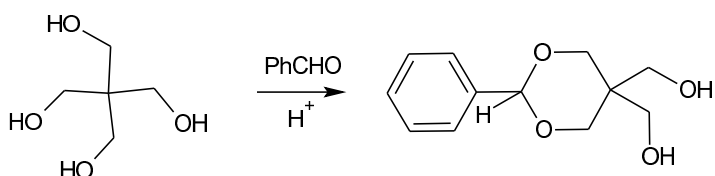
Bardzo ciekawe etery koronowe otrzymuje się w reakcji 2,2',3,3'-tetrahydroksy-1,1'-dinaftalenu z ditosyianem glikolu pentaetylowego.



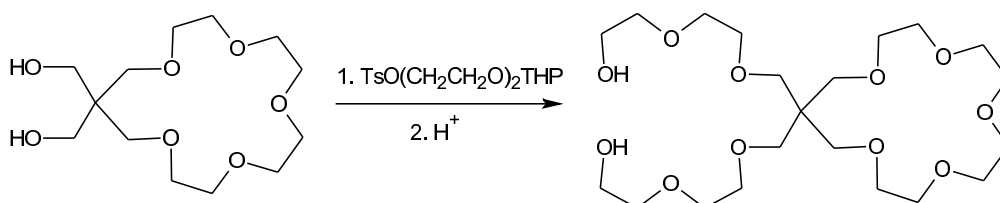
Związki z dwoma eterami koronowymi w strukturze receptora połączone wiązaniem diazowym, otrzymuje się zgodnie z następującą reakcją:

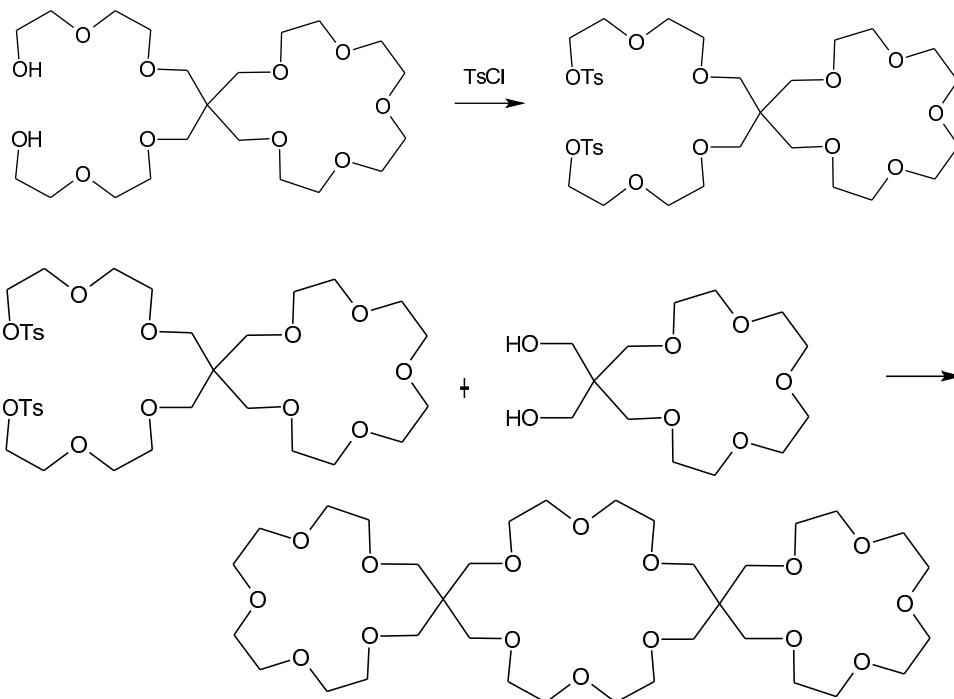


Grupami łączącymi etery koronowe w tej klasie związków mogą być również łańcuchy alifatyczne. W syntezie substancją wyjściową jest alkohol wielohydroksylowy, do którego przyłącza się kolejne glikole otrzymując dwa centra kompleksujące



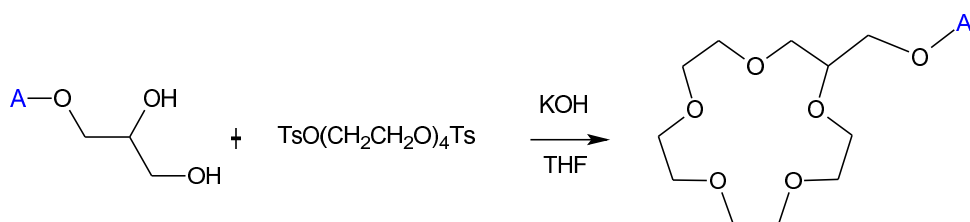
lub trzy centa receptorowe dla jonów metali.





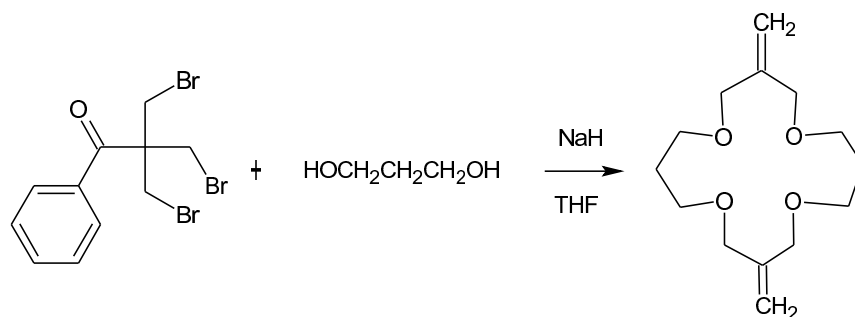
Synteza eterów lariatowych.

Etery lariatowe można otrzymać z pochodnych gliceryny, w których jedna z grup hydroksylowych została zablokowana grupą zabezpieczającą (np. tert-butyłową).

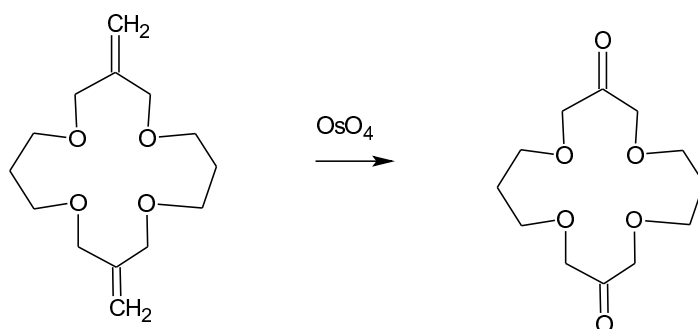


Synteza różnych typów eterów koronowych

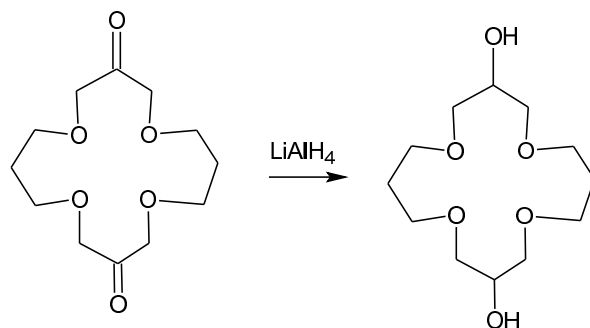
Etery koronowe zawierające w swojej strukturze wiązanie podwójne można otrzymać zgodnie z następującą reakcją:

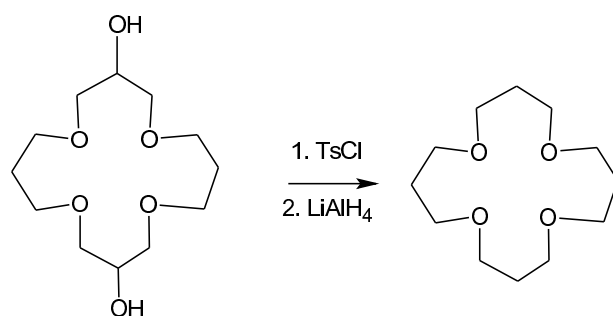


Etery koronowe zawierające w swojej strukturze wiązanie podwójne jest stosowany do otrzymywania w wyniku reakcji z silnymi utleniaczami jak: OsO_4 lub NaIO_4 etery zawierające grupy karbonyłowe.

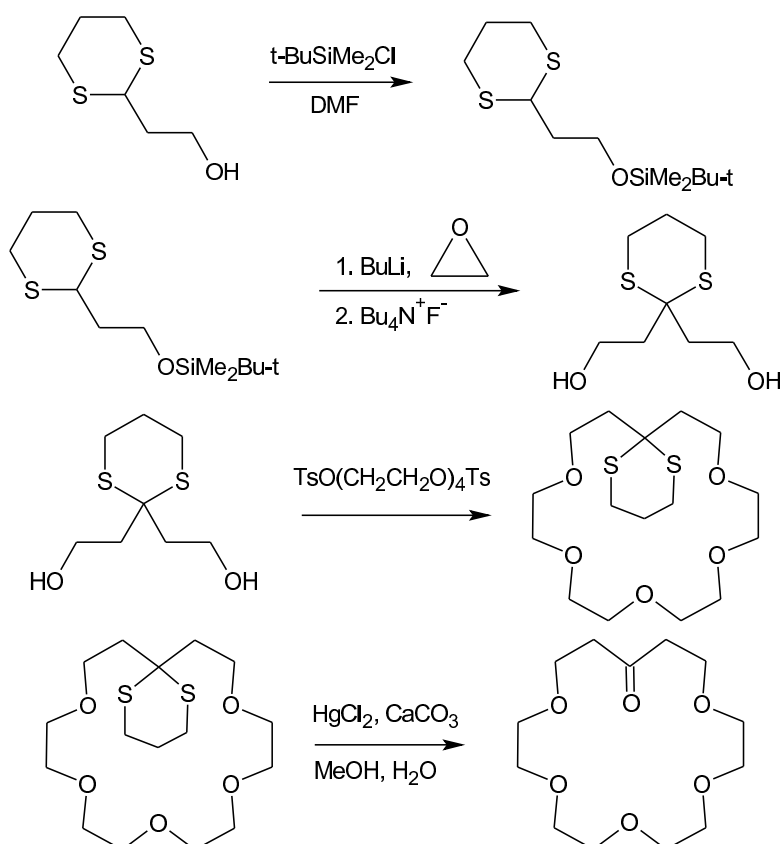


Otrzymany związek może być wykorzystany do syntezy 16-korona-4.

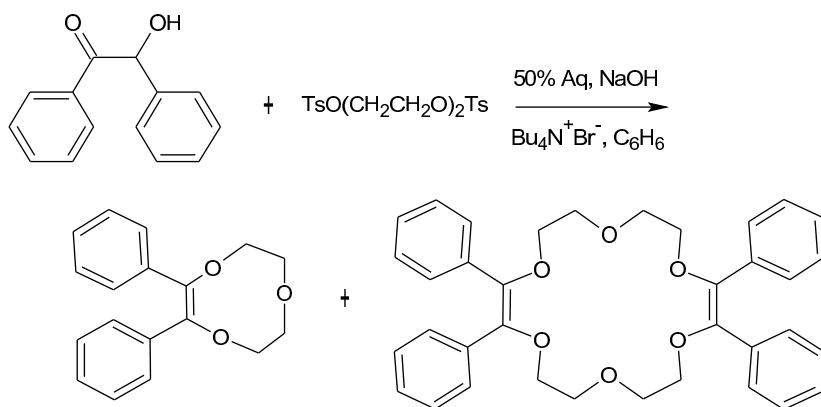




Etery koronowe zawierające grupę karbonylową we wnętrzu eteru można otrzymać również zgodnie z następującymi reakcjami:



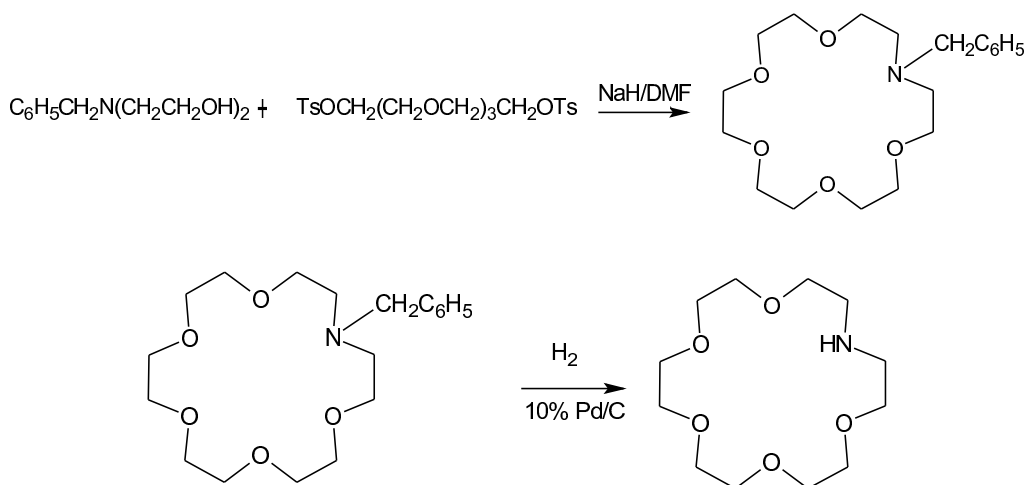
Bardzo ciekawe produkty otrzymuje się działając na benzoinę ditosyланem glikolu dietylowego w 50% roztworze NaOH z dodatkiem bromku tetra-n-butyloaminy i benzenu.



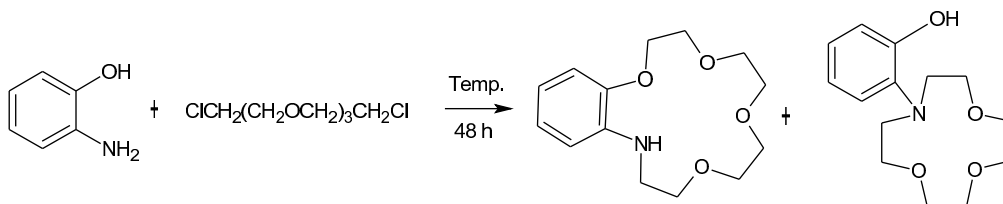
Azaetery koronowe

Synteza monoazaeterów koronowych.

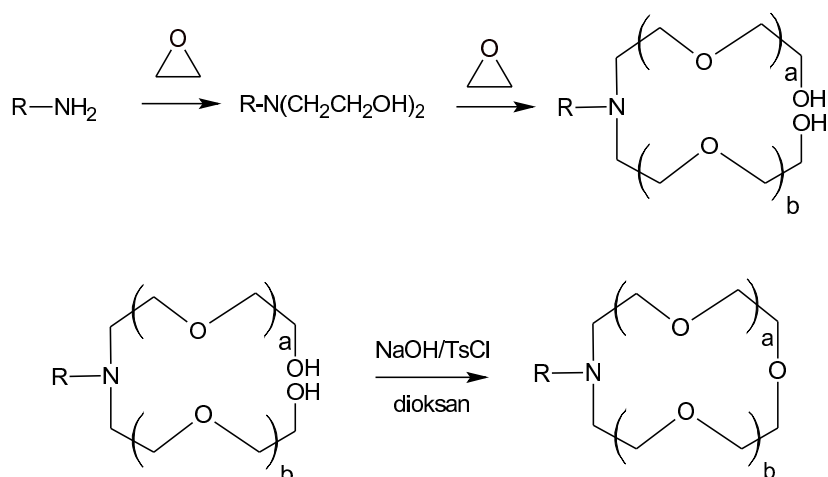
Azaetery koronowe otrzymuje się w wyniku reakcji N-benzylodietylaminy z odpowiednim tosyłanem glikolu. Następnie otrzymany związek należy poddać redukcji wodorem w obecności palladu jako katalizatora.



Mieszaninę monoazaeterów koronowych otrzymuje się w reakcji 2-aminofenolu z chlorowcopochodną odpowiedniego glikolu.

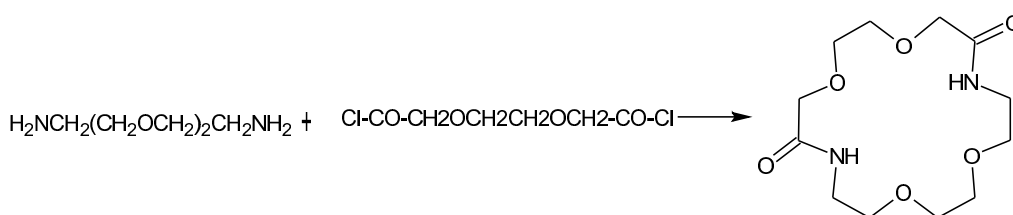


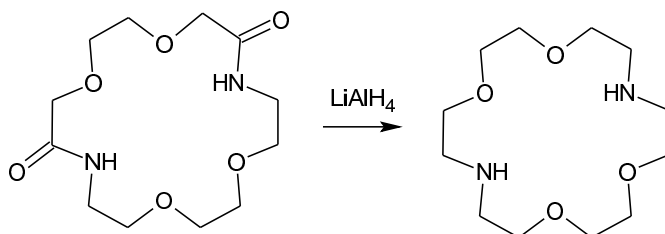
Kolejną metodą otrzymywania mieszanin azaetrów koronowych jest reakcja amin pierwszorzędowej z dioksanem.



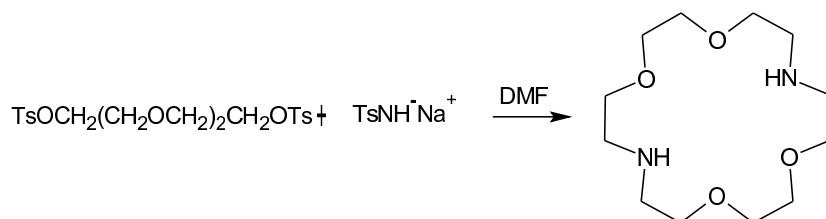
Synteza diazaeterów koronowych

Syntezę tej klasy związków można przeprowadzić dzięki kondensacji odpowiednich diamin, dla przykładu 1,8-diamino-3,7-dioksooktanu z chlorkiem kwasowym pochodzącym od odpowiedniego glikolu. Powstały związek należy następnie poddać redukcji glinowodorkiem litu.



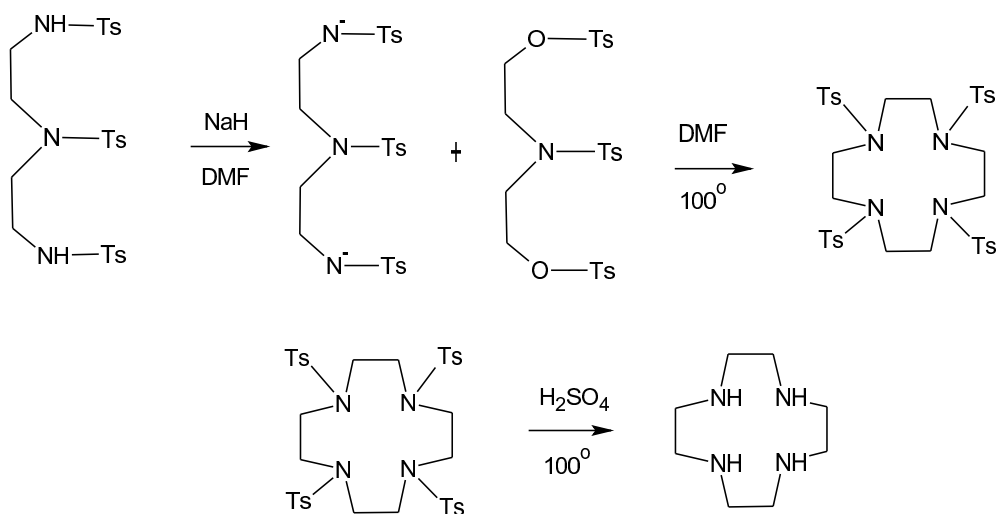


Diazaetery koronowe można również otrzymać w reakcji jednostopniowej pomiędzy tosyłanem odpowiedniego glikolu, a toluenosulfoamidem sodu. Dla przykładu w tej reakcji 1,10-diaza-18-koronę-6 otrzymuje się z 10% wydajnością.

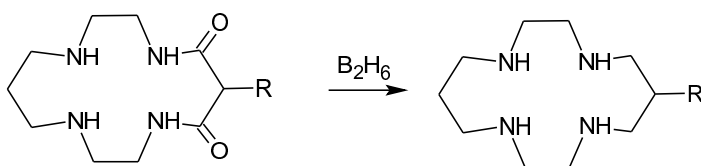
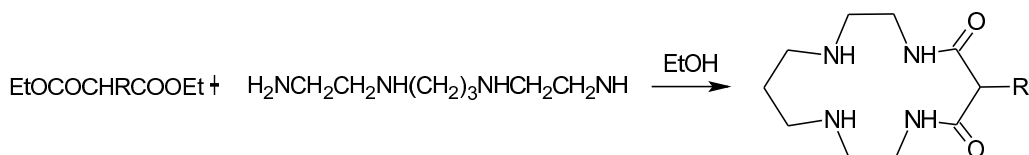
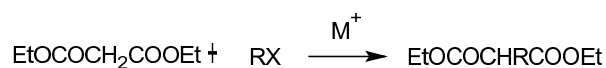


Synteza cyklamów.

Cyklamy otrzymuje się w reakcji odpowiednich pochodnych amin, najczęściej zawierających grupę tosyłową jako grupę opuszczającą. Dla przykładu tetraaza-12-koronę-4 otrzymuje się z soli sodowej tritosylanu dietylenotriaminy i tritosylanu dietanoloaminy. Detosylację przeprowadza się następnie przy użyciu stężonego kwasu siarkowego.



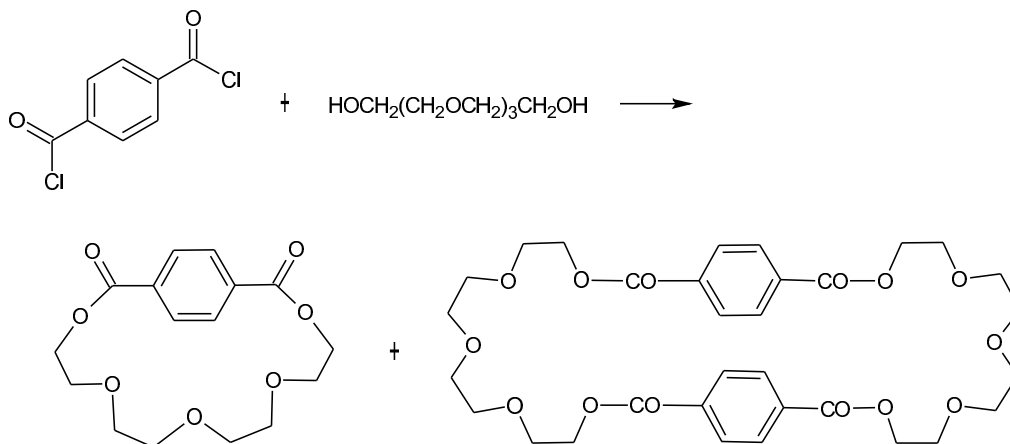
Alkilopochodne cyklamów można otrzymać w reakcji podstawionych estrów z odpowiednimi poliaminami. Następnie przeprowadza się redukcję używając wodoru boru.



Makrocykliczne laktony

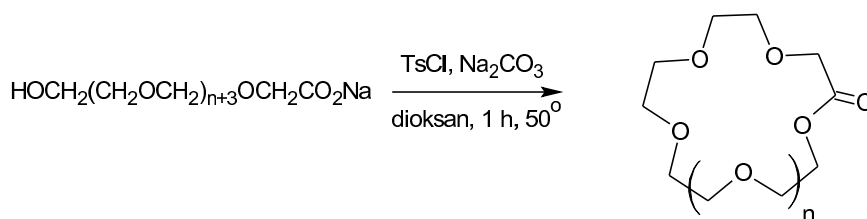
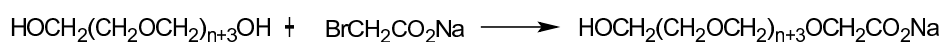
Ogólna metoda syntezy makrocyklicznych laktonów.

Laktony otrzymuje się w reakcji chlorków kwasowych z odpowiednimi glikolami. Można stosując tą metodę otrzymać dwie klasy związków, jedną będącą produktem o stechiometrii 1:1 oraz drugą o stechiometrii 2:2. Przykładem takiego procesu jest reakcja między chlorkiem kwasu tereftalowego, a glikolem tetraetylenowym.

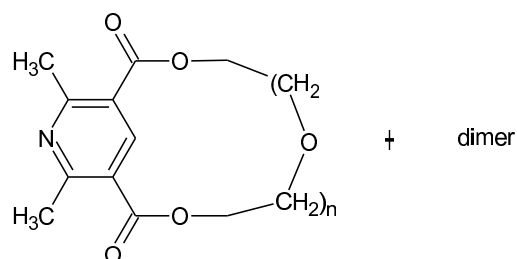
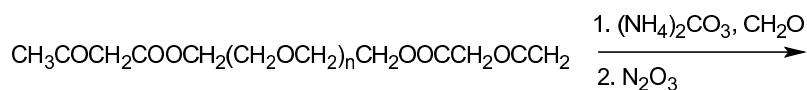


Jednostopniowa synteza makrocyclicznych laktonów.

W tej metodzie polietylenowy glikol poddaje się reakcji z bromooctanem sodu w metanolu. Powstały produkt reaguje następnie z chlorkiem 4-toluenosulfonylu, węglanem sodu i dioksanem prowadząc do otrzymania laktonu.

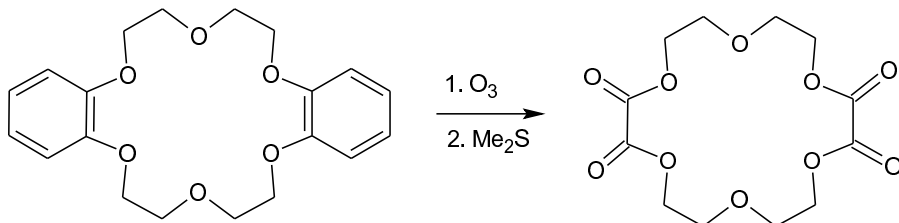


Synteza opiera się na reakcji diacetylooctanu glikolu polietylenowego z węglanem amonu i formaldehydem, a otrzymany produkt następnie poddaje się działaniu tlenku azotu(III).



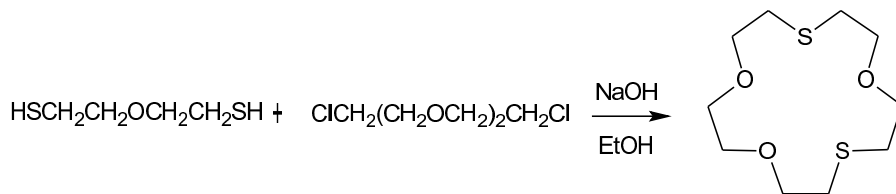
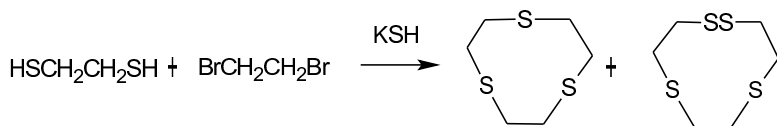
Otrzymywanie makrocyclicznych laktonów przez ozonolizę.

Działaniu ozonu poddaje się etery koronowe zawierające aryłowe podstawniki, a następnie powstały ozonok redukuje się siarczkiem dimetylu.

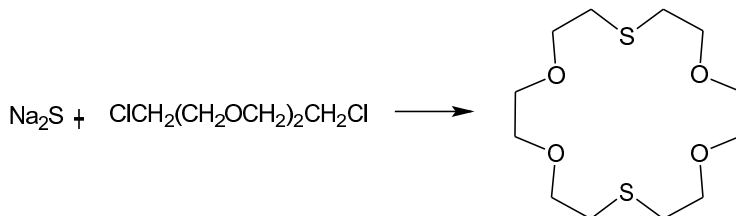


Synteza związków makrocyklicznych zawierających atom siarki.

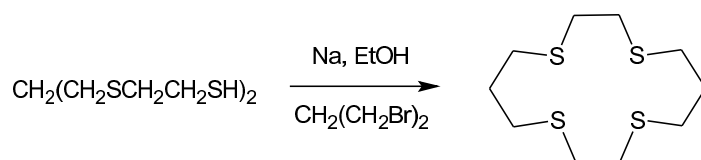
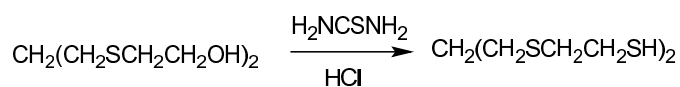
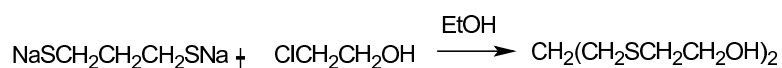
Związki te można otrzymać przez reakcję ditioli z dichlorowcopochodnymi.



Kolejną metodą otrzymania makrocyklów zawierających w swojej strukturze atomy siarki jest reakcja chlorowcopochodnych glikolu polietylenowego z siarczkiem sodu.

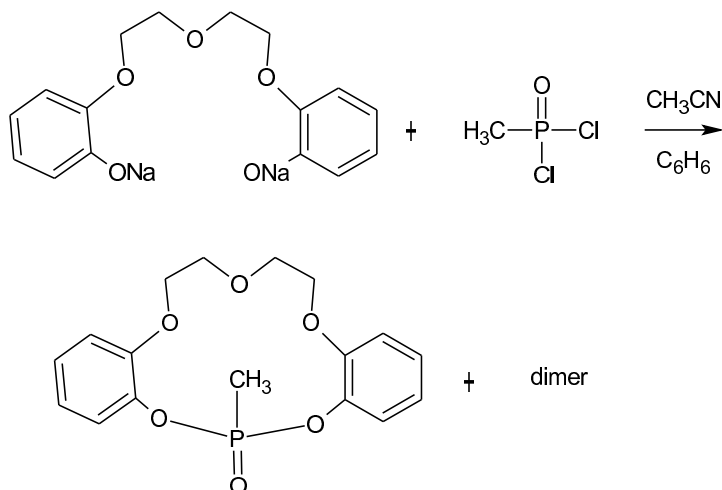


Makrocycliczne polisulfidy otrzymuje się w reakcji 1,3-propanoditiolu sodu z 2-chloroetanolem. Powstały produkt poddaje się działaniu tiomocznika w środowisku kwasu solnego. Następnie z otrzymanego dimerkaptanoditioeteru otrzymuje się jego sól sodowa i poddaje działaniu 1,3-dibromopropanu otrzymując końcowy oczekiwany produkt.

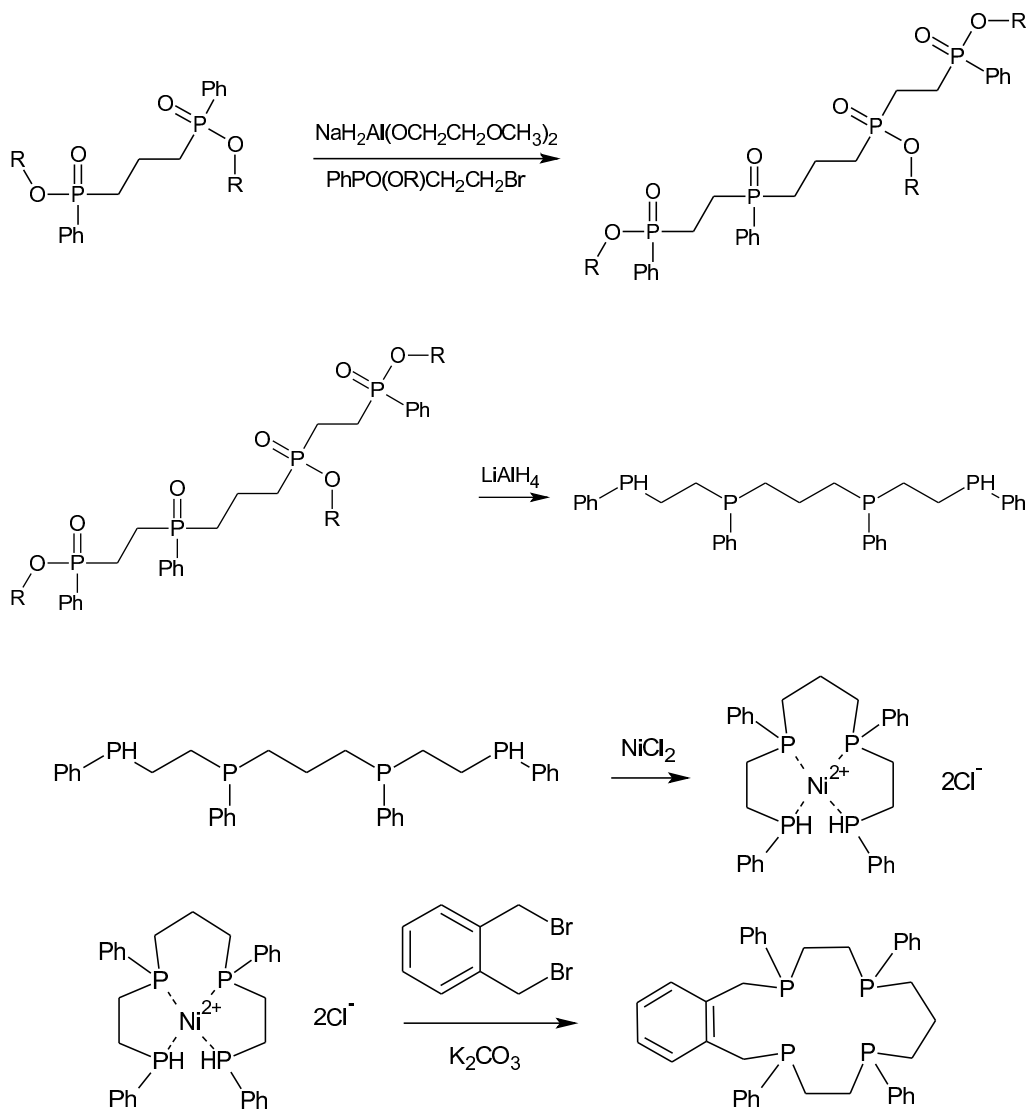


Synteza związków makrocyklicznych zawierających atom fosforu.

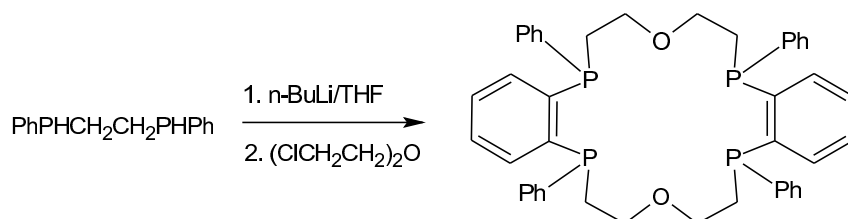
Związki te można otrzymać w reakcji 2,2'-[oksydi(etoksy)]difenolanu sodu z P,P-dichlorometylofosfiną.



Inną metodą otrzymywania tych związków jest przekształcenie difosfinianu do trifosfinianu, a następnie ich cyklizacja zgodnie z następującymi reakcjami.

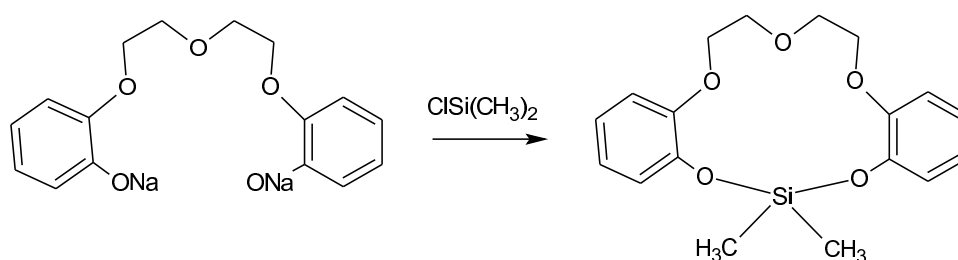


Związki makrocycliczne zawierające fosfor otrzymuje się również w reakcji 1,2-di(fenylfosfino)etanu z eterem 2,2'-dichlorodietylowym.



Synteza związków makrocyklicznych zawierających atom krzemu.

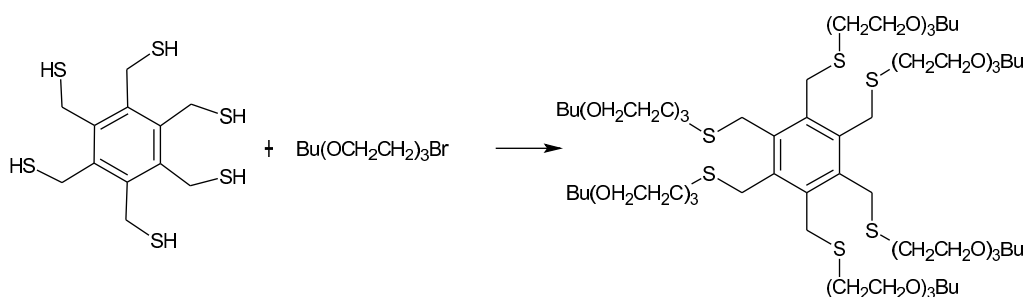
Reakcja syntezy tej klasy związków jest analogiczna to opisywanej metody otrzymywania związków makrocyklicznych zawierających fosfor. W tym wypadku 2,2'[(oksydi(etoksy))difenolan sodu poddaje się reakcji z dichlorodimetylosilanem.



Otwarto – łańcuchowe analogii eterów koronowych – podandy.

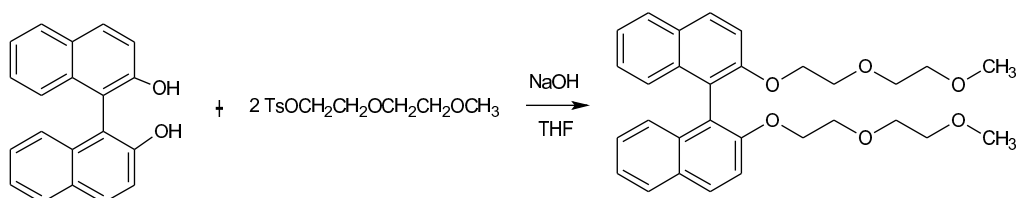
Synteza podandów na bazie benzenu.

Związki te mają bardzo silnie kompleksują kationy metali pierwszej i drugiej grupy. Otrzymuje się je w reakcji heksa-podstawionego benzenu z pochodnymi glikoli. Przykładową reakcją, jest reakcja heksametanotiolobenzenu z 1-bromo-3,6,9-trioksodekanem.



Synteza podstawionych podandów.

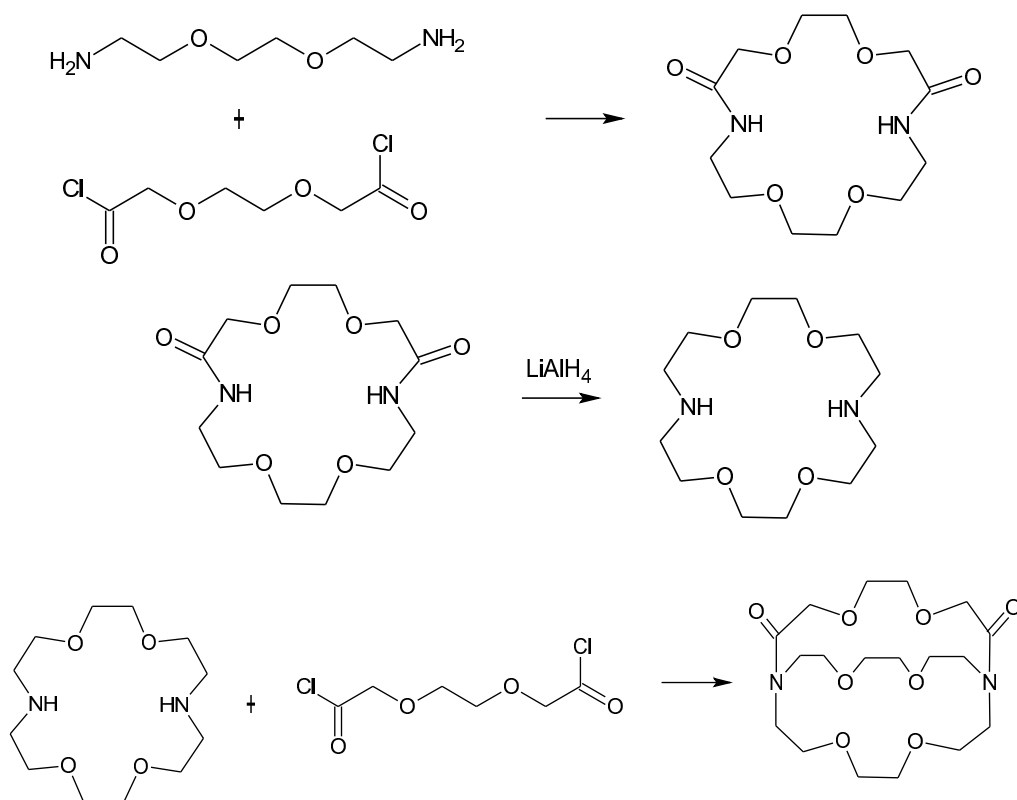
Reakcja otrzymywania tej grupy związków jest analogiczna do reakcji otrzymywania eterów koronowych, a jedyną różnicą jest użycie tosyłanu glikolu etylenowego zamiast ditosylanu.

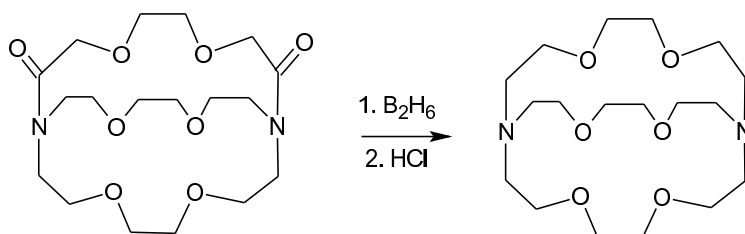


Kryptandy

Ogólna metoda syntezy.

Synteza kryptandów opiera się na reakcji odpowiedniego diaminopolieteru z chlorem kwasowym polieteru. Następnie otrzymany związek redukuje się do cyklicznej diaminy, do której ponownie przyłącza się chlorek kwasowy polieteru. Ostatnim etapem reakcji jest redukcja otrzymanego związku, która prowadzi do otrzymania kryptandu.

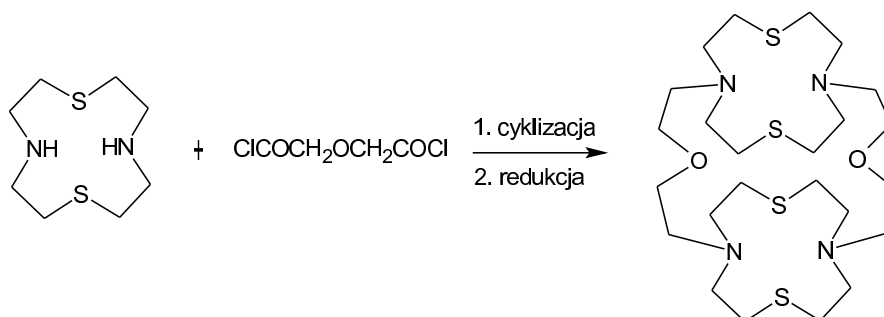




Synteza kryptandów zawierających atomy siarki i azotu.

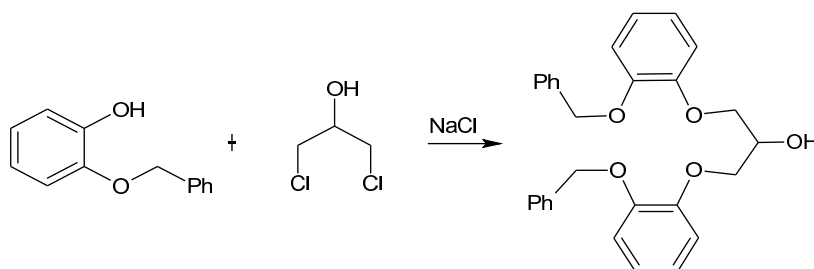
Synteza tych związków jest analogiczna do metody ogólnej, z tą różnicą, że cząsteczka diaminy zawiera w swoim łańcuchu atomy siarki zamiast atomów tlenu.

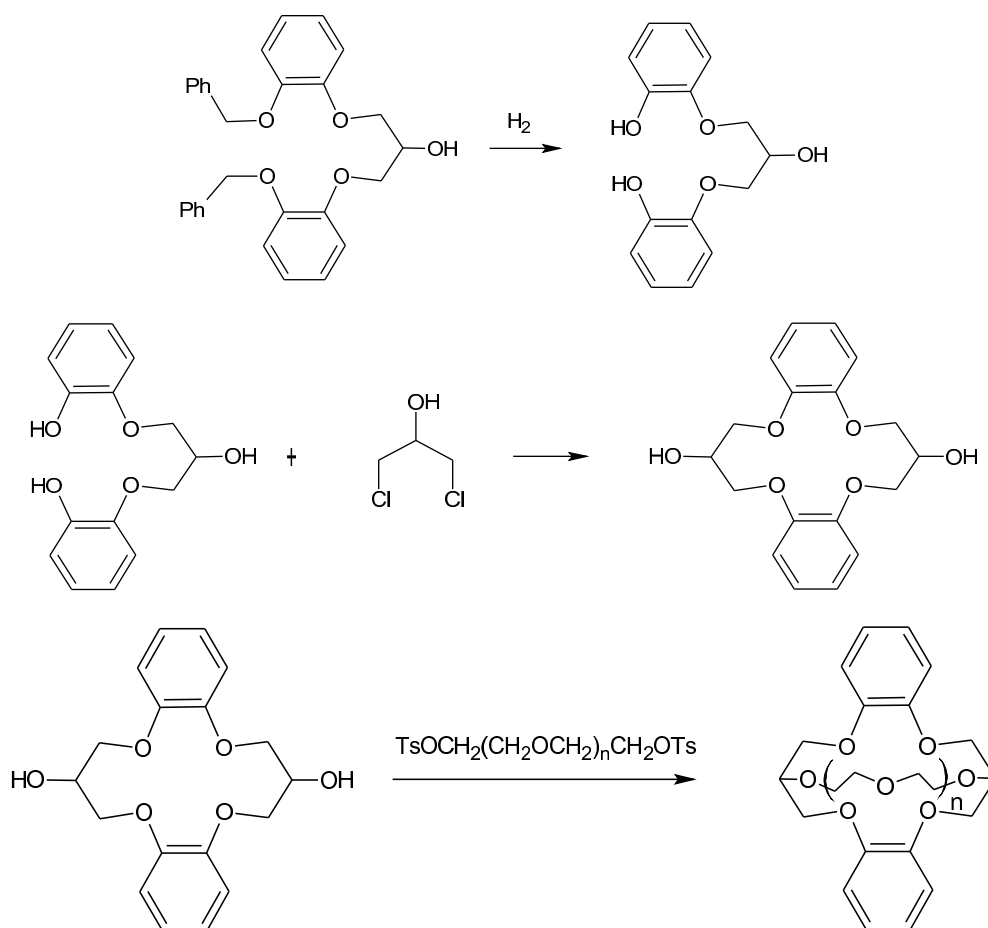
Możliwe jest również otrzymanie kryptandów zawierających dwa ugrupowania makrocykliczne w swojej strukturze. Reakcję między makrocyklem zawierającym siarkę i azot, a odpowiednim chlorkiem kwasowym glikolu przeprowadza się przy bardzo dużym rozcieńczeniu składników.



Synteza kryptandów zawierających atom węgla jako układ spinający.

W przypadku syntezy tych związków odczynnikami wyjściowymi są dichlorek gliceryny i 2-benzylloksyfenol.





Podziękowania:

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

Literatura

1. N.V. Gerbeleu, V.B. Arion, J. Burgess, *Template Synthesis of Macrocyclic Compounds*, John Wiley and Sons, Chichester, 1994.
2. G. Gokel, *Crown Ethers and Cryptands*, RSC Books, Cambridge, 1991.
3. M. Hiraoka, *Crown Compounds: Their Characteristics and Applications. Studies in Organic Chemistry*, vol. 12, Elsevier Science, Amsterdam, 1982.
4. *Host – Guest Chemistry: Mimetic Approaches to Study Carbohydrate Recognition. Topics in Current Chemistry*, vol. 218, Ed. S. Penades, Springer Verlag, Berlin, 2001.
5. P. Monk, *The Viologens: Physicochemical Properties, Synthesis and Applications of the Salts of 4,4'-Bipyridine*, John Wiley and Sons, Chichester, 1998.
6. S.E. Patai, *Chemistry of Ethers, Crown Ethers, Hydroxyl Groups and Their Sulfur Analogues*, John Wiley and Sons, Chichester, 1981.
7. J.A. Steed, J.L. Atwood, *Supramolecular Chemistry*, John Wiley and Sons, Chichester, 2000.
8. *Strength from Weakness: Structural Consequences of Weak Interactions in Molecules, Supramolecules and Crystals*, Ed. A. Domenicano, I. Hargittai, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2002.
9. *Supramolecular Architecture: Synthetic Control in Thin Films and Solids*, Ed. T. Bein, American Chemical Society, 1992.
10. *Supramolecular Chemistry I – Directed Synthesis and Molecular Recognition. Topics in Current Chemistry*, vol. 165, Ed. E. Weber, Springer Verlag, Berlin, 1993.
11. G.W. Gokel, S.H. Korzeniowski, *Macrocyclic poltether Syntheses*, Springer-Verlag, Berlin 1982.
12. P.J. Cragg, *A Practical Guide to Supramolecular Chemistry*, J. Wiley&Sons, Ltd, 2005
13. D. Parker, *Macrocyclic Synthesis, A Practical Approach*, Oxford University Press Oxford, 1996

Rozdział 2

Synteza układów makrocyklicznych z zastosowaniem metod klasycznej i dynamicznej chemii kombinatorycznej

Dawid Lewandowski, Grzegorz Schroeder

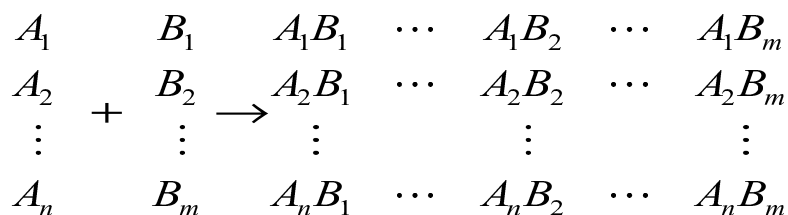
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Wydział Chemii, 60-780 Poznań, Grunwaldzka 6

Głównym powodem, dla którego chemicy, pomimo znaczących wysiłków, nie są w pełni zdolni do syntezy wielu związków makrocyklicznych, jest klasyczne podejście badaczy do problemu, znacząco odbiegające od kombinatorycznego systemu wypracowanego przez naturę (metoda „prób i błędów”). Ten drugi system syntezy pożądaných układów jest znacznie wydajniejszy, ponieważ wykorzystuje dużo większą przestrzeń badawczą, korzystając z losowych kombinacji na poziomie molekularnym.

Firma *Eli Lilly and Company* na swoich stronach internetowych tak propaguje zastosowanie chemii kombinatorycznej: „Chemia kombinatoryczna bardzo przyspiesza proces tworzenia potencjalnie przydatnych cząsteczek. Ramiona robotów podają przez dziesiątki strzykawkę precyzyjnie odmierzone objętości substancji chemicznych do ogromnej matrycy niewielkich płytek laboratoryjnych. Taka procedura pozwala na zsyntetyzowanie tysięcy unikatowych związków chemicznych o określonej z góry strukturze atomowej. Chemik-farmaceuta korzystający z tych metod tworzy nowe potencjalne leki 100 razy wydajniej w porównaniu z tradycyjnymi technikami chemii medycznej.” Ta technika znalazła również szerokie zastosowanie w syntezie związków makrocyklicznych.

Metoda chemii kombinatorycznej, zastosowana po raz pierwszy na początku lat 80-tych, obejmuje tworzenie dużych zbiorów („bibliotek”) związków przez zsyntetyzowanie wszystkich możliwych kombinacji z „bloków budulcowych”. Tak otrzymane biblioteki cząsteczek łatwo mogą być stosowane do dalszych badań, na przykład aktywności biologicznej. Zamiast reakcji związku A ze związkiem B celem utworzenia produktu AB, a następnie A ze związkiem B₁

celem otrzymania AB_1 itd, poddaje się równoczesnej reakcji różne bloki budulcowe typu A (A_1 - A_n) z różnymi blokami budulcowymi typu B (B_1 - B_m), co można przedstawić schematycznie:

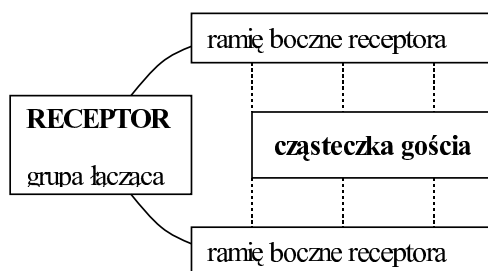


Metodami chemii kombinatorycznej, w odróżnieniu od metod klasycznych, wiele podobnych strukturalnie substancji otrzymywanych jest równocześnie oraz równoległe zamiast syntezy pojedynczej, czyli jednej substancji po drugiej.

Klasyczna chemia kombinatoryczna

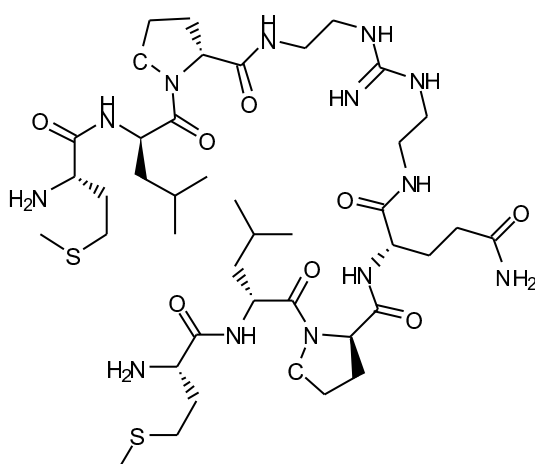
W klasycznej chemii kombinatorycznej wyróżnia się dwa podstawowe kroki: syntezę biblioteki i identyfikację aktywnych składników. Tworzenie bibliotek kombinatorycznych może zostać wykonane zarówno w roztworze, jak i na podłożu stałym. Obie techniki posiadają zalety i wady. Główną zaletą syntezy na nośniku stałym jest fakt, iż izolacja produktów reakcji z nośnika może zostać dokonana poprzez wymycie reagentów z jego powierzchni. Dodatkową zaletą tej metody jest to, że reakcje mogą zostać doprowadzone w tych warunkach do końca dzięki użyciu nadmiaru substratów. Rozwinięto różne strategie tworzenia bibliotek – zarówno w roztworze, jak i na podłożu stałym. Jedną z nich jest metoda syntezy dzielonej. Jest ona oparta na trzech procesach: dzieleniu – sprzęganiu – rekombinacji. Inną metodą jest synteza równoległa, gdzie różne związki są syntetyzowane oddzielnie – jeden z drugiego.

Zastosowania klasycznej chemii kombinatorycznej do otrzymywania związków makrocyklicznych najlepiej obrazuje synteza receptorów peptydowych. Ostatnie badania dotyczące tej klasy receptorów skupiają się głównie na receptorach „kleszczowych”, które są wysoce selektywne, pomimo ich strukturalnej elastyczności, dla określonych sekwencji innych peptydów.

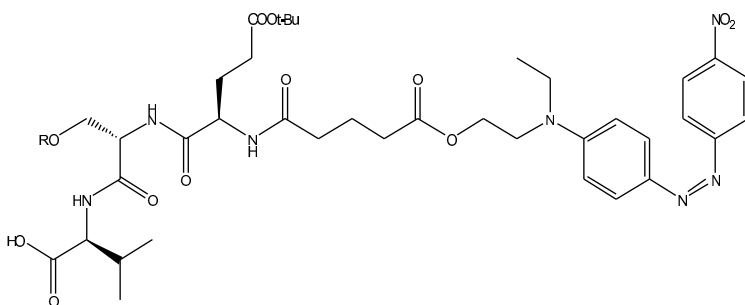


Schematyczne przedstawienie receptora „kleszczowego”.

Screening biblioteki z różnymi pochodnymi tripeptydów w roztworze wodnym doprowadził do identyfikacji receptora na tą grupę związków.



o $K_a = 8,2 \pm 2,5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ dla tripeptydu

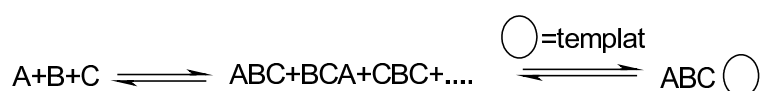


Konwencjonalna, statyczna chemia kombinatoryczna jest ograniczana przez analityczne problemy identyfikacji aktywnych cząsteczek w związku z dużą liczbą wytworzonych produktów. Problem ten może zostać zniwelowany dzięki użyciu układów molekularnych, które są zdolne do wzmacniania samych siebie, tak zwanych dynamicznych układów kombinatorycznych.

Dynamiczna chemia kombinatoryczna

Dynamiczna chemia kombinatoryczna, w odróżnieniu od statycznej (klasycznej) jest określana jako chemia kombinatoryczna z termodynamiczną kontrolą. Oznacza to, że w dynamicznej

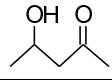
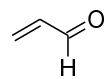
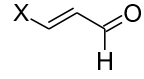
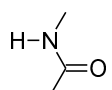
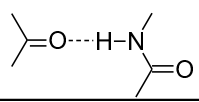
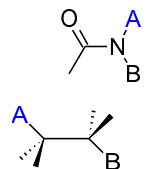
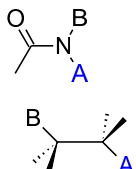
bibliotece kombinatorycznej wszystkie składniki znajdują się w równowadze. Jest to spowodowane interkonwersją elementów biblioteki dzięki odwracalnym procesom chemicznym, takim jak tworzenie i zrywanie wiązań kowalencyjnych oraz niekowalencyjne oddziaływania, włączając w to koordynację metal-ligand.

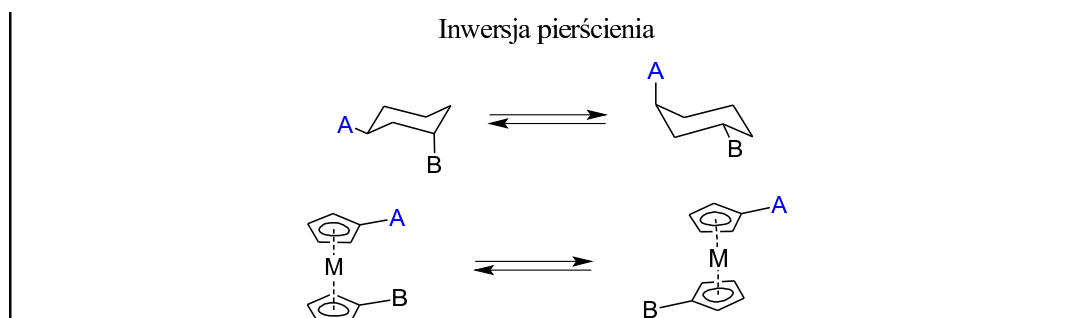


Dynamiczna chemia kombinatoryczna korzysta z odwracalnych połączeń między blokami budulcowymi. Tabela 1 przedstawia zestawienie stosowanych w tej technice oddziaływań kowalencyjnych i niekowalencyjnych.

Tabela 1. Zestawienie stosowanych w dynamicznej chemii kombinatorycznej oddziaływań kowalencyjnych i niekowalencyjnych.

Reakcje odwracalne oparte na wiązaniach kowalencyjnych			
Transestryfikacja			
$R-OH$	$R'O-C(=O)-CH_3$	$\rightleftharpoons$	$RO-C(=O)-CH_3 \quad R'-OH$
Tworzenie hemiacetali			
$R-OH$	$CH_3-C(=O)-CH_3$	$\rightleftharpoons$	$CH_3-C(OH)(OR)-CH_3$
Tworzenie estrów kwasu borowego			
$R-B(OH)_2$	$HO-CH(R')-CH(R'')-OH$	$\rightleftharpoons$	$R-B(O-CH(R')-CH(R'')-O)-R'$
Tworzenie oksymów ($X = OR$), imin ($X = C$) i hydrazonów ($X = NHR$)			
$X-NH_2$	$CH_3-C(=O)-CH_3$	$\rightleftharpoons$	$CH_3-C(=N^X)-CH_3$
Transacylacja			
$CH_3-C(=O)-XR^1$	$Y-R^2$	$\rightleftharpoons$	$CH_3-C(=O)-YR^2 \quad X-R^1$
Metateza olefin			
$R^1-CH=CH-R^1$	$R^2-CH=CH-R^2$	$\rightleftharpoons$	$R^1-CH=CH-R^2 \quad R^2-CH=CH-R^1$

Tworzenie disulfidów		
		
Kondensacja aldolowa		
		
Reakcja Michaela		
	$H-X$	
Reakcja Dielsa-Aldera		
	$\parallel$	
Reakcje odwracalne oparte o oddziaływania niekowalencyjne		
Koordinacja metalu		
M^{m+}	$+ nL$	$[ML_n]^{m+}$
Oddziaływanie elektrostatyczne		
$R-COO^-$	H_3N^+-R'	$R-COO^- \cdots HN_3^+ - R'$
Wiązanie wodorowe		
		
Oddziaływanie donor – akceptor		
D	$+ A$	$[D,A]$
Izomeryzacja cis-trans		
	$\rightleftharpoons$	
Wewnętrzna rotacja		
	$\rightleftharpoons$	



Główne różnice między „klasycznymi” statycznymi i dynamicznymi bibliotekami kombinatorycznymi przedstawia tabela 2.

Tabela 2. Podobieństwa i różnice dynamicznych i klasycznych bibliotek kombinatorycznych

Dynamiczna biblioteka kombinatoryczna	Statyczna biblioteka kombinatoryczna
Elementy molekularne lub supramolekularne	Elementy molekularne
Zestaw wirtualny	Zestaw rzeczywisty
Kolekcja komponentów	Kolekcja cząsteczek
Kowalencyjne lub niekowalencyjne oddziaływania w produktach reakcji	Kowalencyjne oddziaływania w produktach reakcji
Reakcje odwracalne	Reakcje nieodwracalne
Powstawanie produktów oparte na rozpoznaniu molekularnym	Powstawanie produktów oparte na nieokreślonych zasadach

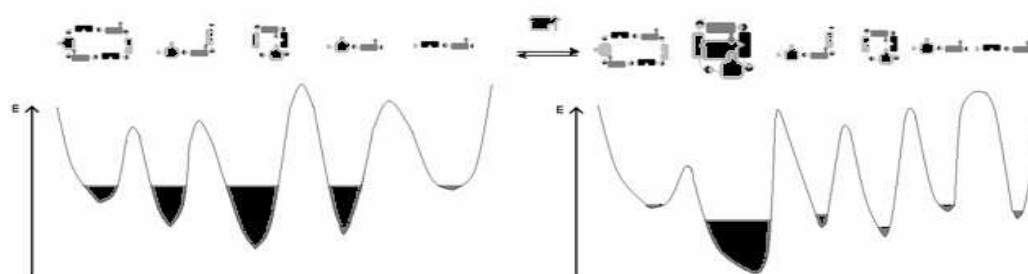
W dynamicznej chemii kombinatorycznej można wyróżnić trzy kroki:

1. Selekcja i dobór właściwych początkowych bloków budulcowych zdolnych do odwracalnych interakcji.
2. Ustalenie warunków tworzenia biblioteki (warunków, na podstawie których bloki budulcowe są zdolne do interakcji)
3. Utworzenie biblioteki cząsteczek w obecności czynnika templatowego na podstawie samoistnych, kontrolowanych termodynamicznie, reakcji odwracalnych.

Bloki budulcowe dla dynamicznych bibliotek kombinatorycznych powinny posiadać określone grupy funkcyjne, które muszą umożliwiać odwracalność reakcji z receptorem. Główną różnicą między klasyczną chemią kombinatoryczną i dynamicznymi bibliotekami kombinatorycznymi jest możliwość wzmacniania. Podczas dodania cząsteczki „gościa” do biblioteki potencjalnych cząsteczek „gospodarzy”, „gość” wybiera i wiąże się z najlepiej

dopasowanym przestrzennie i funkcjonalnie „gospodarzem”. To wiązanie wprowadza w układzie nową równowagę, która przesuwa reakcję w kierunku najlepszego „gospodarza” kosztem pozostałych, nie pasujących cząsteczek dzięki dodatkowej energii procesu wiązania.

Rozkład stężenia produktów reakcji w dynamicznej chemii kombinatorycznej kontrolowanej efektami termodynamicznymi (trwałością produktu) wzmocnionymi efektem templatowym przedstawia rysunek:

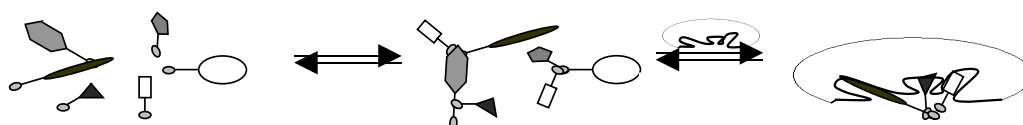


Dodatek do układu przedstawionego na rysunku czynnika templatowego tworzącego odwracalne, czyli czasowo trwałe połączenie gość-gospodarz skutkuje wzrostem wydajności reakcji tworzenia tego termodynamicznie kontrolowanego produktu

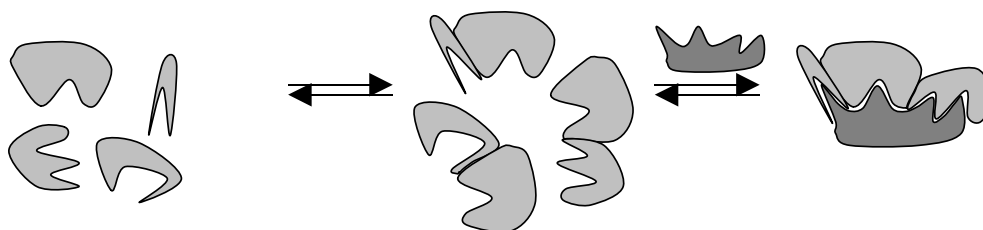
Wyróżniamy dwa rodzaje wzmacniania w dynamicznych bibliotekach: „obsadzanie” i „dobieranie”. W pierwszej z nich luka dostarczana jest przez makromolekulę, która wiąże cząsteczki lepiej dopasowane, a gorsze pozostawia w roztworze. W „dobieraniu” to składniki biblioteki wybierają optymalną makrocząsteczkę, otaczając ją i stabilizując połączenie.

Bloki budulcowe

Dynamiczna biblioteka



a)

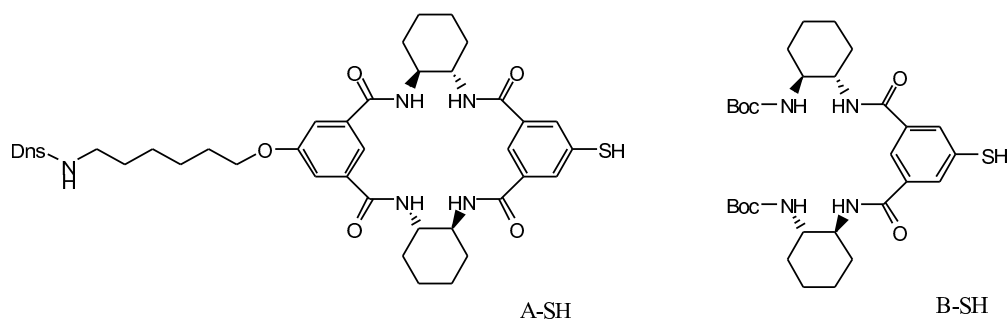


b)

Schemat prezentuje mechanizm “obsadzania” (a) i “dobierania” (b) w dynamicznej bibliotece kombinatorycznej

W 1996 roku Sanders zrealizował i wprowadził do literatury przedmiotu pomysł dynamicznych bibliotek kombinatorycznych przy okazji kontrolowanej termodynamicznie cyklizacji. Lehn i współpracownicy zsyntetyzowali bibliotekę imin dzięki odwracalnej reakcji między 3 aldehydami i 4 aminami. Przygotowanie biblioteki zostało wykonane zarówno w obecności, jak i nieobecności anhidrazy węglanowej II w wodzie. Analiza HPLC końcowej mieszaniny wykazała wzmocnienie jednego z piętnastu możliwych produktów, kiedy reakcja została przeprowadzona w obecności anhidrazy. Częsteczka zaznaczona w tabeli 3 związała się z anhidrazą. Wielkość powinowactwa imin z anhidrazą węglanową określiło zawartość finalnych produktów w mieszaninie.

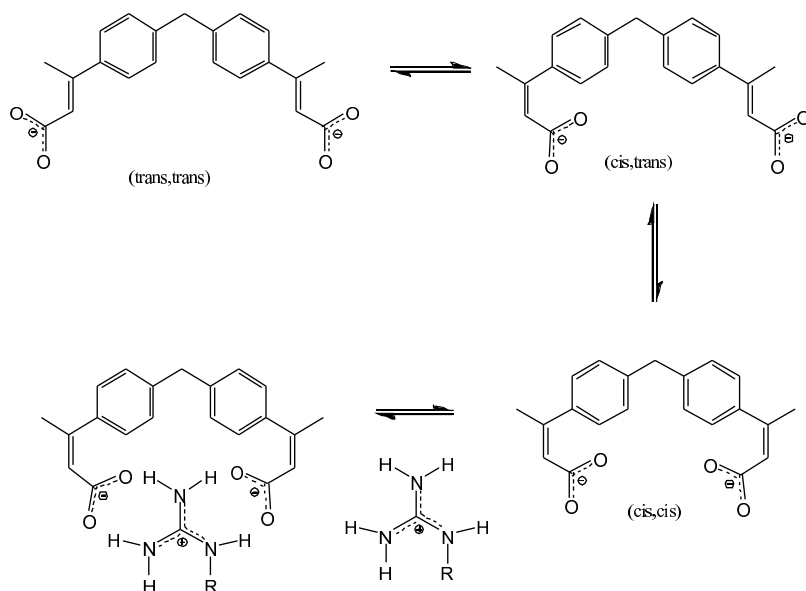
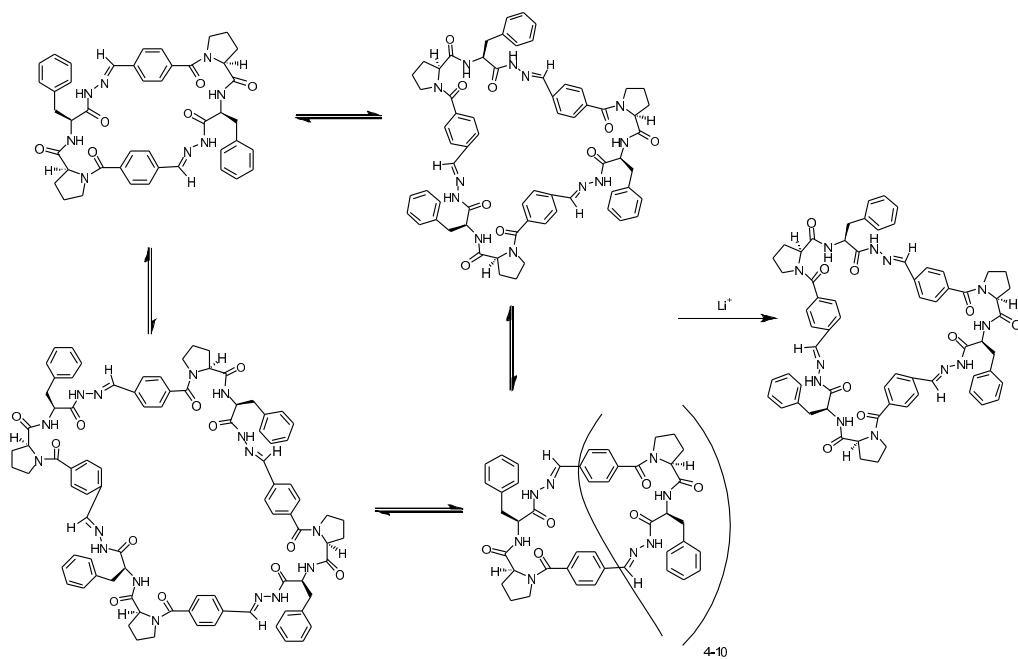
Still i inni wykazali efekt templatowy w trzelementowej bibliotece zsyntetyzowanej dzięki odwracalnemu tworzeniu disulfidów. Dodatek tripeptydu L-Pro-L-Val-L-Val przesunął równowagę reakcji, a tym samym wydajność produktów z 57% A-SS-A i B-SS-B do 85% A-SS-A i B-SS-B.



Sanders przygotował bibliotekę 10 związków makrocyklicznych z pojedynczego dipeptydowego bloku budulcowego, który zawiera zarówno hydrazyd, jak i zablokowaną grupę aldehydową. Hydrazydy zostały zmieszane w kwasowych warunkach z blokowanymi aldehydami celem wytworzenia różnych hydrazonów. Końcowa mieszanina została zamrożona podczas neutralizacji roztworu. Dodatek jonów Li^+ wywołał gwałtowną zmianę składu biblioteki, wzmacniając cykliczny trimer, który stanowił teraz 98% materiału peptydowego w bibliotece. Stała wiązania trimeru z Li^+ w $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (98:2) wynosi $4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$.

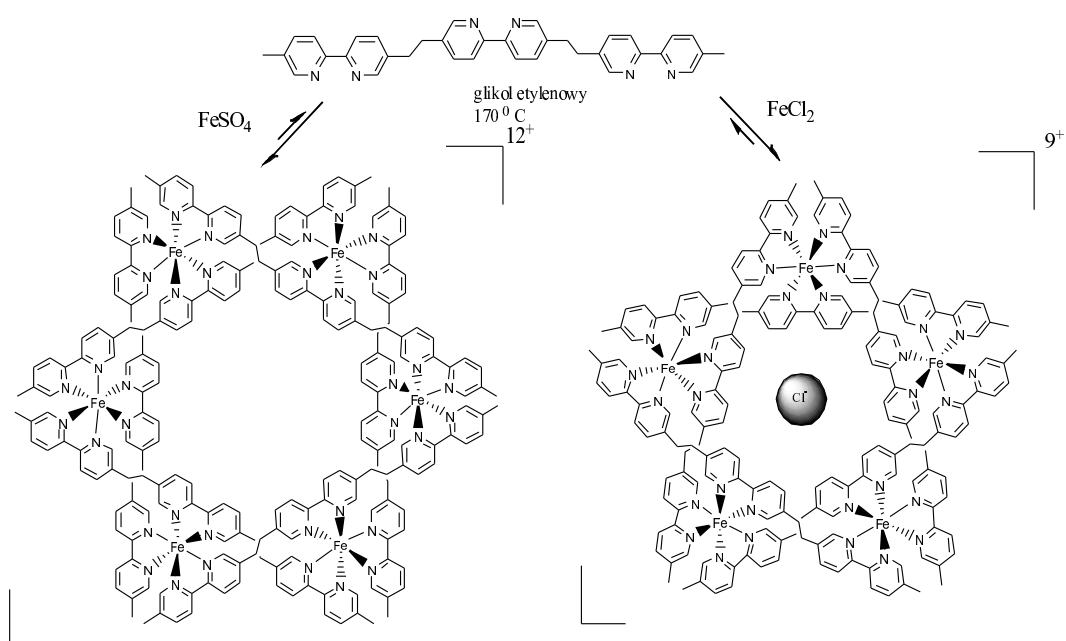
Tabela 3. Produkty reakcji aldehydów i amin w dynamicznej syntezie kombinatorycznej.

Odwracalne reakcje oparte na tworzeniu wiązań kowalencyjnych są używane przy tworzeniu termodynamicznie kierowanych konformacyjnych i/lub konfiguracyjnych dynamicznych bibliotek. W 1997 Eliseev i Nelen pokazali, że końcowe produkty mogą zostać wzbogacone w produkt termodynamicznie stabilny, wtedy gdy posiada najwyższe powinowactwo do dodawanego ligandu. Niezwiązany kwas dikarboksylowy może istnieć w trzech izomerycznych formach i ulegać przemianom przy naświetlaniu promieniami UV. Izomer cis-cis posiada idealną geometrię dla kompleksowania guanidynowej części argininy. Stosując powtarzalne cykle izomeryzacja-selekcja, receptor cis-cis może zostać uzyskany z mieszaniny reakcyjnej z wysoką wydajnością (85%).



Helikaty to wielocentrowe kompleksy metali w kształcie helisy, w których dwa albo trzy pasma ligandów opasują zestaw liniowo rozłożonych jonów metali. Te, zawierające metale,

koliste kompleksy są zdolne do wiązania anionów wewnątrz ich wnęk. Lehn i inni donieśli, że zależnie od wielkości kompleksowanego anionu tworzone są penta- lub heksamery. Ponadto wykazali, że dodatek jonów Cl^- prowadzi do formacji wyłącznie pentameru po podgrzaniu mieszaniny do temperatury 170°C .



Możliwości syntetyczne, jakie stwarza dzisiaj chemia kombinatoryczna, w połączeniu z nowoczesnymi metodami szybkiej analizy otrzymanych produktów, są trudne do oszacowania. Ten kierunek rozwoju metod syntezy jest szczególnie interesujący, zwłaszcza w połączeniu z tworzeniem kompleksów gość-gospodarz na bazie efektu templatowego.

Literatura:

1. http://www.lilly.pl/innowacja/synteza_miejsc_docelowych_metodami_chemii_kombinatorycznej.html
2. J-M. Lehn, A.V. Eliseev, *Science*, 291, (2001), 2331.
3. J-M. Lehn, *Chem.Eur. J.*, 5, (1999), 2455.
4. J.K.M. Sanders, *Chem.Soc.Rev.*, 26, (1997), 327.
5. J-M. Lehn, *Chem. Soc. Rev.*, 36, (2007), 151.
6. P.T. Corbett, J. Leclaire, L. Vial, K.R. West, J-L. Wietor, J.K.M. Sanders, S.Otto, *Chem. Rev.*, 106, (2006), 3652.
7. K. Ziach, J. Jurczak, p. 249-273, in *Organic and Polymer Synthesis and Catalysis*, Vol.10, ed. B.Marciniak, Wydawnictwo. Poznańskie, Poznań, 2006.

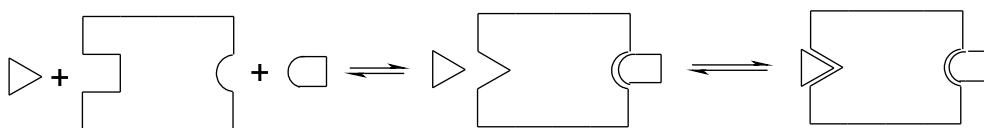
Rozdział 3

Receptory molekularne oparte na allosterycznym efekcie

Grzegorz Schroeder, Błażej Gierczyk

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

Allosteryczny efekt, termin biochemiczny, jest zdefiniowany w słownikach języka polskiego oraz w encyklopediach jako „odwracalna zmiana konformacji białka i aktywności biologicznej w określonym miejscu jego cząsteczki na skutek przyłączenia tzw. efektora allosterycznego w innym miejscu. Na zasadzie allosterycznego efektu działają niektóre inhibitory i aktywatory enzymatyczne.” Koncepcje allosterycznego białka została zaproponowana w roku 1963 przez Monoda [1]. Allosteryczna kontrola funkcji i aktywności biologicznych receptorów i enzymów odgrywa istotną rolę w wielu procesach metabolicznych. Efektor allosteryczny może odgrywać rolę pozytywnego czynnika i wówczas mówimy o pozytywnym, dodatnim efekcie allosterycznym (*positive allosterysm*) lub rolę negatywnego, ujemnego czynnika określanego efektem ujemnym (*negative allosterysm*). Mechanizm działania efektora allosterycznego w przemianach konformacyjnych receptorów przedstawia rysunek 1. Powstający kompleks efektora z receptorem wymusza zmianę konformacyjną w drugiej części cząsteczki, co umożliwia wiązanie kolejnej molekuly tworząc aktywny układ.

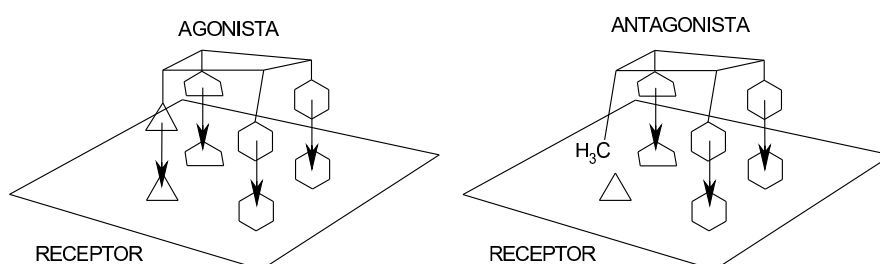


Rysunek 1. Mechanizm działania efektora allosterycznego w przemianach konformacyjnych receptorów.

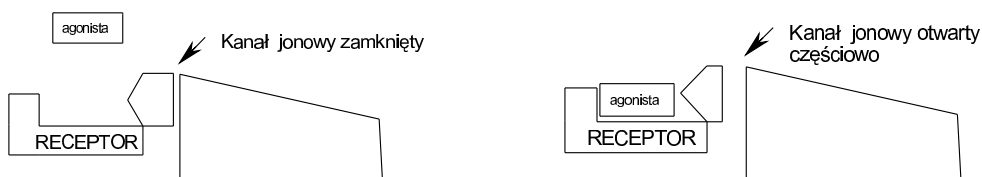
Czynnikiem allosterycznym (modulatorem) może być w przypadku enzymów substrat i wówczas określamy zjawisko zmian konformacyjnych enzymu efektem homotropowym lub inna cząsteczka, różna od substratu i wtedy mówimy o efekcie heterotropowym.

Agonista to substancja łącząca się z receptorem, wywołując reakcję w komórce. Jest przeciwieństwem antagonisty, który łącząc się z receptorem, blokuje go nie wywołując reakcji. Znane jest także pojęcie częściowego agonisty, który wywołuje reakcję receptora, jednakże nie tak silną jak pełny agonista. Mechanizm działania agonisty i antagonisty przedstawia rysunek 2.

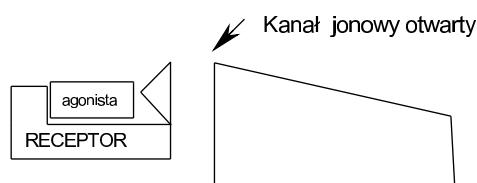
Działanie cząsteczki agonisty może powodować częściową lub całkowitą zmianę w budowie receptora (rysunek 3 i 4).



Rysunek 2. Mechanizm działania w procesie funkcjonowania receptorów cząsteczki agonisty (odpowiedź receptora na skutek oddziaływania z cząsteczką agonistyk) i antagonisty (brak reakcji receptora, receptor zablokowany przez cząsteczkę agonistyk).

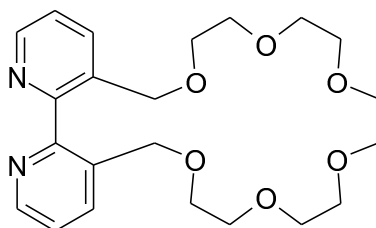


Rysunek 3. Mechanizm działania częściowego agonisty w procesie otwierania kanałów jonowych.



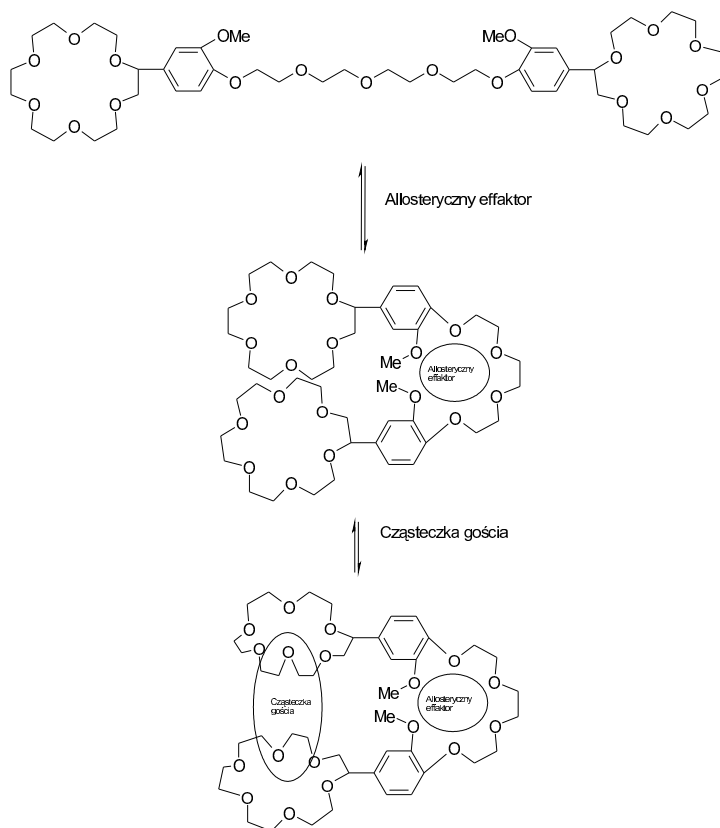
Rysunek 4. Mechanizm działania agonisty w procesie otwierania kanałów jonowych.

Poczynając od roku 1980 pojęcia stosowane w biochemii zostały zaadoptowane do obszaru chemii supramolekularnej. Pionierem tych zmian był Rebek [2, 3], który pierwszy otrzymał difunkcyjny allosteryczny receptor syntetyczny na bazie eteru koronowego i 2,2'-bipirydyny zawierający dwa centra zdolne do kompleksowania różnego typu jonów.



Działanie syntetycznego allosterycznego receptora molekularnego można opisać następującymi reakcjami:

1. Utworzenie kompleksu z allosterycznym effaktorem.
2. Utworzenie kompleksu z gościem (substratem) w drugim centrum receptora.



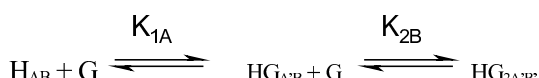
Praca przeglądowa „Allosteric Supramolecular Receptors and Catalysts” z roku 2004 [4] jest pierwszą próbą podsumowania wyników naukowych uzyskanych w tym obszarze w ciągu dwudziestopięcioletniego dynamicznego rozwoju syntetycznych allosterycznych receptorów.

Proces działania difunkcyjnego receptora można opisać następującymi równaniami



gdzie H – cząsteczka gospodarza, G – cząsteczka gościa, K_n – stężeniowa stała równowagi procesu asocjacji.

Proces przebiegający dwoma różnymi drogami można opisać równaniami:



gdzie K_n są stężeniowymi stałymi równowagi procesu asocjacji.

$$K_{1A} = \frac{[HG_{A'B}]}{[H][G]} \quad K_{1B} = \frac{[HG_{AB'}]}{[H][G]} \quad K_1 = \frac{[HG]}{[H][G]} = K_{1A} + K_{1B}$$

$$K_2 = \frac{[HG_2]}{[H][G]} = \frac{K_{2A}K_{2B}}{K_{2A} + K_{2B}}$$

$$\text{Jeżeli } A=B \text{ to } K_{1A} = K_{1B} \text{ i } K_1 = \frac{[HG]}{[H][G]} = K_{1A} + K_{1A} = 2K_{1A} \text{ oraz } K_2 = \frac{[HG_2]}{[H][G]} = K_{2B}/2$$

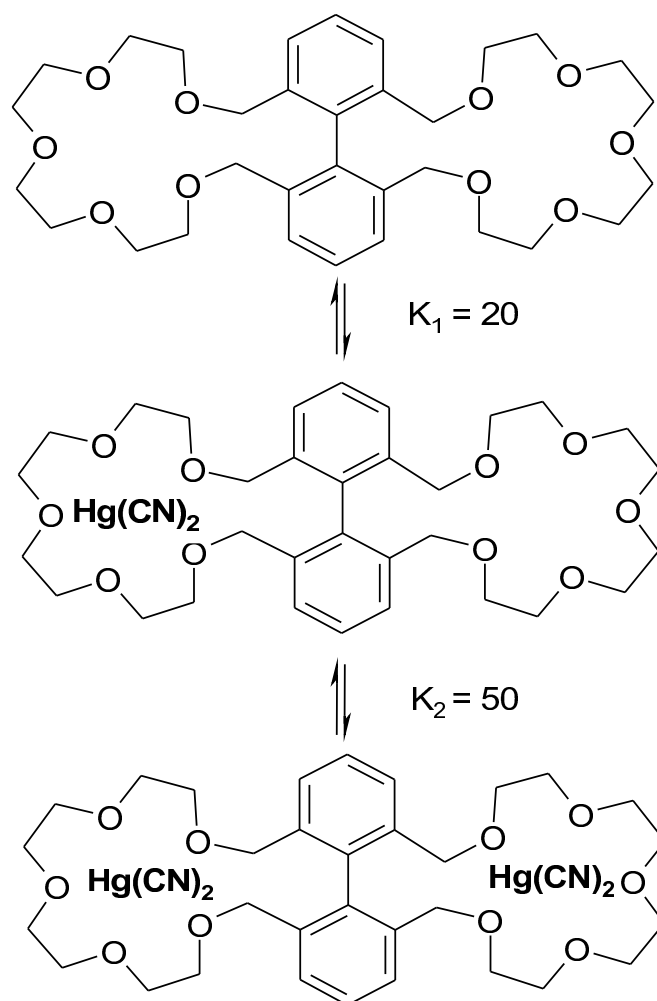
$$\text{to } K_1 = K_{1A} + K_{1B} = \frac{1}{2} K_1 + 2K_2 \text{ to}$$

$$K_1 = 4 K_2$$

Dla procesu opisanego równaniem:



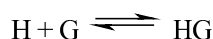
Istnieje zależność pomiędzy K_1 i K_2 . Jeżeli $K_1 = 4 K_2$ mamy do czynienia z procesem nie kooperatywnym, natomiast gdy $K_1 \neq 4 K_2$ proces jest kooperatywny. Wprowadzono pojęcie współczynnika będącego miarą kooperatywności procesu i tak gdy $\alpha = 1$ proces jest nie kooperatywny, gdy $\alpha < 1$ mamy do czynienia z ujemną (negatywną) kooperatywnością natomiast dla $\alpha > 1$ mamy dodatnią formę kooperatywności (rysunek 5).



Rysunek 5. Dodatni efekt kooperatywny dla allosterycznego receptora
 $\alpha = 4K_2/K_1 = 4 \cdot 50/20 = 10$ [5].

Allosteryczność bardzo silnie związana jest z kooperatywnością procesu. Campbell [6] uważa, że allosteryczność jest sumą kooperatywności i zmian strukturalnych receptora. Ocenę ilościową działania allosterycznego gospodarza przedstawił Rabek Jr. [5]

Proces tworzenia kompleksu można opisać równaniem:



gdzie $Ka = \frac{[HG]}{[H][G]}$ jest stałą asocjacji a $Kd = \frac{[H][G]}{[HG]}$ stałą dysocjacji kompleksu

a wartość swobodnej entalpii reakcji ΔG^0 wynosi $\Delta G^0 = -RT \ln[Ka \frac{[H][G]}{[HG]}]$.

Dla procesu kooperatywnego tworzenia allosterycznego kompleksu wartość ΔG_{AB}^0 jest sumą oddziaływań A z receptorem, B z receptorem oraz oddziaływań A-B;

$$\Delta G_{AB}^0 = \Delta G_A^i + \Delta G_B^i + \Delta G^s$$

gdzie $\Delta G^s = \Delta G_A^0 + \Delta G_B^0 + \Delta G_{AB}^0$

Wartość ΔG^s określa dodatni ($\Delta G^s > 1$) i ujemny ($\Delta G^s < 1$) efekt kooperatywny i zależy od stałych trwałości kompleksów:

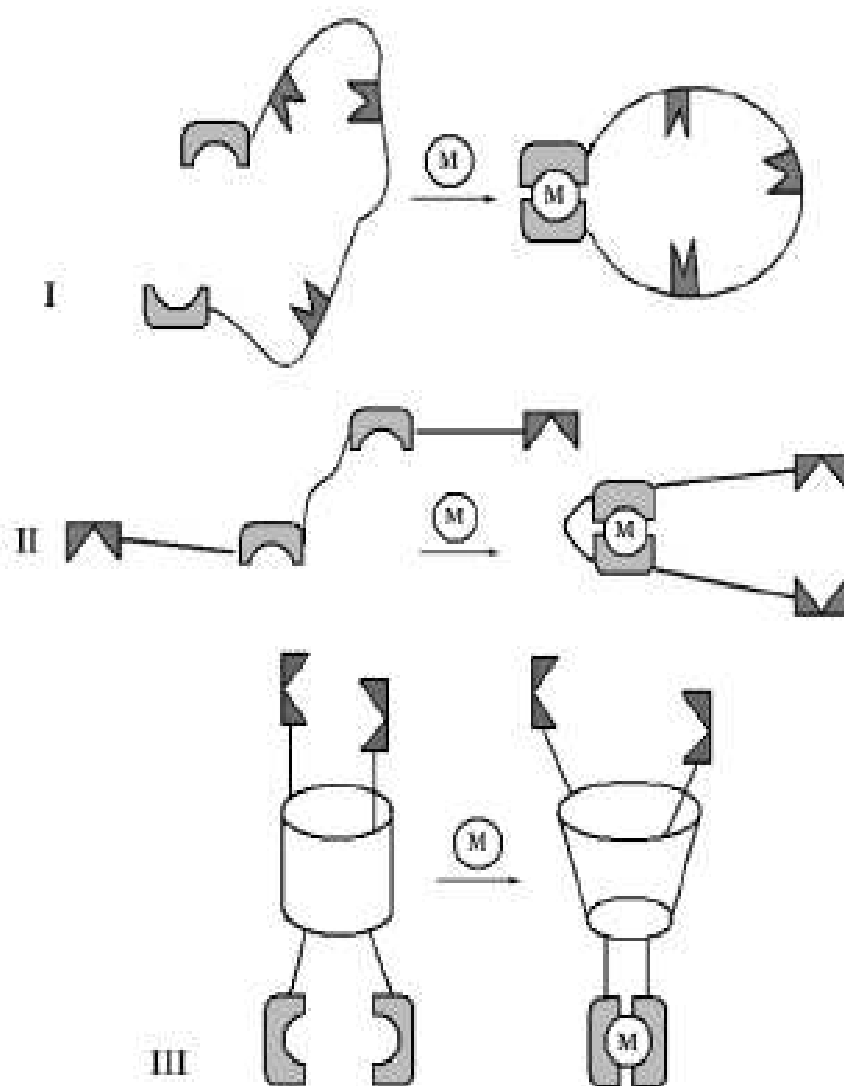
$$\Delta G^s = RT \ln \left(\frac{K_{AB}}{K_A K_B} \right).$$

Syntetyczne allosteryczne receptory molekularne muszą posiadać w swojej cząsteczce co najmniej dwa miejsca zdolne do kompleksowania jonów lub obojętnych cząsteczek. Utworzenie pierwszego kompleksu determinuje poprzez zmianę konfiguracji molekuly receptora możliwość tworzenia drugiego kompleksu. Syntetyczne allosteryczne receptory molekularne można podzielić ze względu na budowę lub ze względu na allosteryczne efekty: jony lub cząsteczki zmieniające na skutek oddziaływania z receptorem wielkość oraz kształt drugiego centrum zdolnego do kompleksowania. Przykładowe receptory przedstawia Tabela 1.

Kovbasyuk [4] zaproponował podział wszystkich syntetycznych allosterycznych receptorów molekularnych na trzy grupy (rysunek 6).

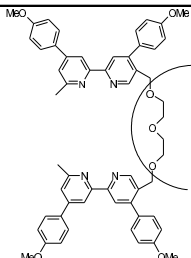
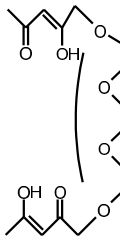
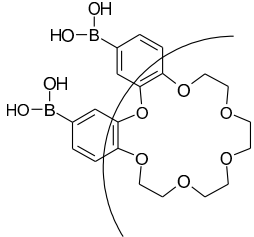
Pierwszą grupę stanowią otwartołańcuchowe podandy, tworzące pod wpływem czynnika allosterycznego wnęki analogiczne do eterów koronowych, drugą grupę stanowią systemy tworzące na skutek preorganizacji ligandy o budowie zdolnej do kompleksowania molekuł gościa (substratu), trzecią grupę stanowią kaliksareny oraz pseudokaliksareny posiadające w górnym i dolnym fragmencie podstawniki swojej cząsteczki podstawniki zdolne do kompleksowania czynnika allosterycznego oraz molekuly gościa.

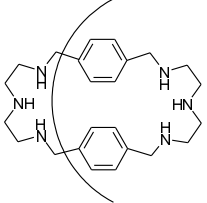
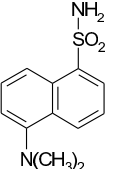
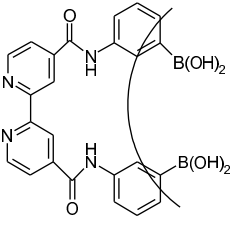
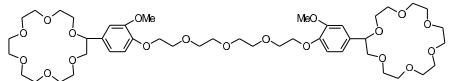
Syntetyczne receptory molekularne znalazły szerokie zastosowanie w procesach katalitycznych, analityce chemicznej i medycznej oraz w badaniach biochemicznych [4].



Rysunek 6.

Tabela 1. Syntetyczny allosteryczny receptor molekularny

L.p.	Syntetyczny allosteryczny receptor molekularny (fragment receptora zdolnego do kompleksowania cząsteczki gościa po utworzeniu kompleksu z allosterycznym efektem)	Allosteryczny effektor	Cząsteczka gościa	Literatura
1		Cu^+	Li^+ , Na^+ , K^+	7-9
2		B^{3+}	Na^+ , K^+	10
3		Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+}	Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+	11, 12
4		Rb^+	D-aldosy	13

5		Zn^{2+}		14
6		NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4	Fruktoza	15
7		Li^+ , Na^+ , K^+	diaminy, bipyrydył	16

Podziękowania:

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

Literatura:

1. J. Monod, J.P. Changeux F. Jacob, J. Mol. Biol., 1963, 6, 306.
2. J. Rabek Jr., J.E. Trend, R.V.Watlery, S.J.Chakrovorti, J. Am. Chem. Soc., 1979, 101, 4333.
3. J. Rabek Jr., R.V.Watlery, J. Am. Chem. Soc., 1980, 102, 4853.
4. L.Kovbasyuk, R.Kramer, Chem. Rev., 2004, 104, 3161.
5. J. Rabek Jr., R.V.Watlery, T. Costello, R. Gadwood, L. Marshall, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1981, 20, 605.
6. M. Campbell, Biochemistry 2nd ed. Saunders College Publishing 1995, <http://www.stark.kent.edu/~cerley/pchem/Review1/globpic.htm>.
7. T. Nabeshima, T.Inaba, N. Furukawa, Tetrahedron Lett. 1987, 28, 6211.
8. T. Nabeshima, T. Inaba, N. Furukawa, T. Hosoya, Yu Yano, Inorg. Chem. 1993, 32, 1407.
9. T. Nabeshima, T. Inaba, N. Furukawa, T. Hosoya, Yu Yano, Tetrahedron Lett. 1990, 31, 3919.
10. Y. Kobuke, Y. Sumida, M. Hayashi, H. Ogoshi, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1991, 30, 1496.
11. Y. Kobuke, Yo Satoh, J. Am. Chem. Soc. 1992, 114, 789.
12. Y. Kobuke, K. Kobubo, M. Munakata, J. Am. Chem. Soc. 1995, 117, 12751.
13. G. Deng, T.D. James, S. Shinkai, J. Am. Chem. Soc. 1994, 116, 4567.
14. R. Baldes, H.J. Schneider, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1995, 34, 321.
15. M. J. Deetz, B.D. Smith, Tetrahedron Lett. 1998, 39, 6841.
16. D. Monti, L.La Monica, A. Scipioni, G. Mancini, New J. Chem. 2001, 25 780.
17. Nathan C. Gianneschi, Paul A. Bertin, SonBinh T. Nguyen, Chad A. Mirkin, Lev N. Zakharov, and Arnold L. Rheingold J. Am. Chem. Soc., 125 (35), 10508 -10509, 2003.
18. Nathan C. Gianneschi, SonBinh T. Nguyen, and Chad A. Mirkin, J. Am. Chem. Soc., 127 (6), 1644 -1645, 2005.

Rozdział 4

Rezorcynoareny jako receptory molekularne

Mariusz Urbaniak, Waldemar Iwanek

Akademia Świętokrzyska, Instytut Chemii, Chęcińska 5, 25020 Kielce

1. Wstęp

Zapotrzebowanie na specyficzne receptory molekularne staje się wyzwaniem naszych czasów. Ich działanie opiera się na tworzeniu kompleksów supramolekularnych, z wykorzystaniem całej gamy różnorodnych oddziaływań międzycząsteczkowych. Trwają więc intensywne poszukiwania nowych, efektywnych receptorów o selektywnym różnicowaniu, które będą odgrywać coraz większą rolę w najbliższej przyszłości poprzez narastające zapotrzebowanie na enancjomerycznie czyste środki farmakologiczne, pestycydy, środki spożywcze czy też wreszcie markery nowotworowe. W wielu przypadkach konstruuje się selektywne receptory wykorzystujące obecność wnęki w strukturze jakiejś cząsteczki. Najczęściej wykorzystywaną obecnie klasą związków do tego celu są cyklodekstryny i jej pochodne.

W ostatnich latach obserwujemy niezmiennie szybki rozwój badań nad cząsteczkami, które posiadają wnęki w swojej strukturze, mogące mimetować układy biologiczne. Jedną z klas cząsteczek o odpowiednich właściwościach jest klasa cząsteczek policyklicznych o względnie dużym rozmiarze – kaliks[n]areny. Wśród nich na szczególną uwagę zasługują kaliks[4]rezorcynoareny, zwane dalej rezorcynoarenami, o budowie wnękowej, których geometria zależy od struktury molekularnej, a ściany i obrzeża tych wnęk zawierają miejsca oddziałujące, służące do wiązania substratu. Dostępność tak wielu miejsc reaktywnych czyni z tej cząsteczki dogodną platformę do syntezy wielu nowych typów rezorcynoarenów, które można wykorzystać do syntezy specyficznych receptorów.

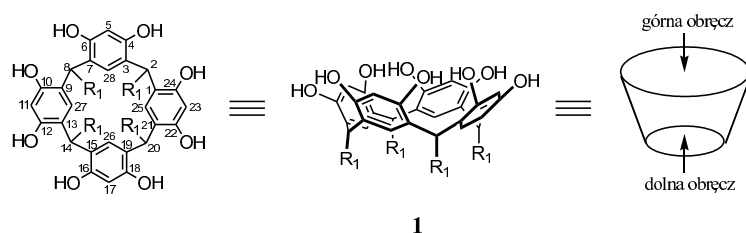
Przedstawiony poniżej przegląd możliwości kompleksotwórczych rezorcynoarenu i jego pochodnych nie zawiera takich jego pochodnych jak kawitandy, karkapleksy czy też receptory hybrydowy z doczepionymi do platformy rezorcynoarenowej takimi

makrocyclicznymi cząsteczkami, jak np. cyklodekstryny, kaliks[4]areny. Zgromadzony obecnie materiał literaturowy na ten temat jest już tak obszerny, że może być przedmiotem osobnej pracy przeglądowej.

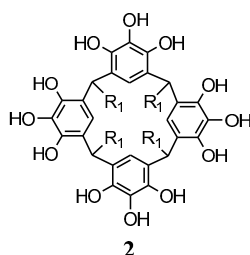
2. Budowa molekularna rezorcynoarenów

Pierwsze prace nad związkami syntezowanymi z aldehydów i fenoli, później nazwanych kaliksarenami, są bardzo wczesne. W 1872 roku Adolf von Bayer użył rezorcyny do reakcji z benzaldehydem i otrzymał bezbarwny krystaliczny produkt. Nie zainteresował się nim jednak, ponieważ prowadził badania nad barwnikami. Dopiero w 1940 roku Niederl i Vogel [1] syntezując związki z rezorcyny i aldehydów: octowego, propionowego oraz izowalerianowego, na podstawie ich mas molowych stwierdzili, że otrzymali tetrameryczne produkty o cyklicznej budowie **1** (Rysunek 1). Strukturę tę ostatecznie potwierdził Erdtman poprzez rentgenowską analizę krystalograficzną w 1968 roku.

Rysunek 1



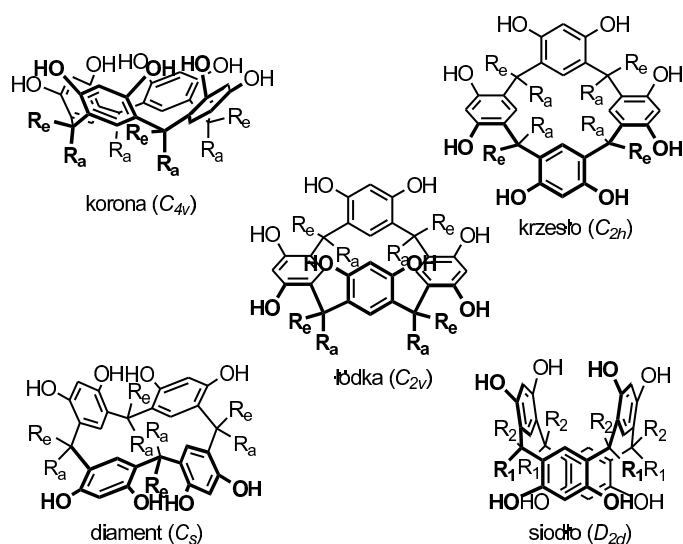
Zalecana przez IUPAC nazwa związku **1** (R_1 -łańcuch alifatyczny) jest skomplikowana; 2,8,14,20-*tetraalkilopentacyklo*[19.3.1.1^{3,7}.1^{9,13}.1^{15,19}]*oktakoza-1(25),3,5,7(28),9,11,13(27), 15,17,19(26),21,23-dodekano-4,6,10,12,16,18,22,24-oktole*. Przez analogię do związków, które Gutsche i Böhmer sklasyfikowali jako kaliksareny, nazwano je kaliksrezorc[4]arenami lub prościej rezorcynoarenami. Inne nazwy, jak związki Högburga lub proste oktole, są także spotykane w literaturze [2]. Ze względu na duże podobieństwo strukturalne, w pracy tej omawiane będą także właściwości pirogaloarenów **2** i ich pochodnych.



Nieplanarna budowa rezorcynoarenów powoduje, że mogą one występować w kilku różnych izomerycznych formach. Ich stereochemia jest ogólnie definiowana jako kombinacja następujących stereochemicznych elementów[3]:

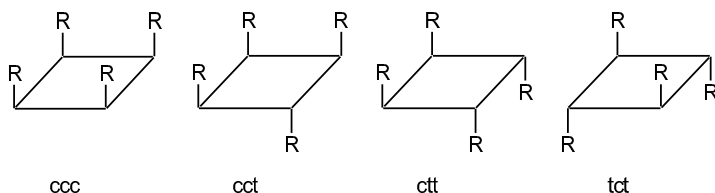
- 1) Konformacja makrocyklicznych obręczy może przyjmować pięć ekstremalnych, symetrycznych położeń: konformacji koronowej (C_{4v}), łódkowej (C_{2v}), krzesłowej (C_{2h}), diamentowej (C_s) i siodłowej (D_{2d}) (Rysunek 2) [4].

Rysunek 2



- 2) Relatywna konfiguracja podstawników R przy mostku metylenowym daje następujące ułożenia: cis-cis-cis (ccc), cis-cis-trans (cct), cis-trans-trans (ctt) i trans-cis-trans (tct) (Rysunek 3).

Rysunek 3



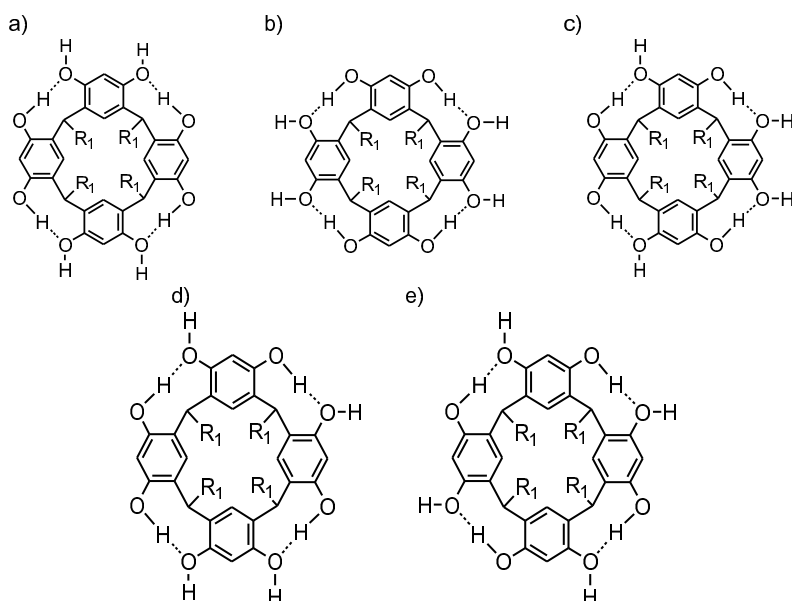
- 3) Indywidualna konfiguracja podstawników przy mostku metylenowym, które w konformacjach makrocykli z symetrią C mogą być aksjalne lub ekwatorialne.

Kombinacja tych stereochemicznych elementów daje ogromną liczbę możliwych stereoizomerów. Jednak w warunkach homogenicznej kondensacji kwasowej, stosunek

produktów w stanie równowagi świadczy o termodynamicznej stabilności różnych izomerów, ponieważ reakcja kondensacji jest odwracalna w tym środowisku. Ostateczny udział poszczególnych izomerów w uzyskanym produkcie zależy od wielkości podstawnika R, rodzaju rozpuszczalnika i temperatury.

Niezwykle istotny jest wpływ wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych na stabilność różnych konformerów w rezorcynoarenie 1. Wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe mogą tworzyć się pomiędzy sąsiednimi grupami OH pierścieni rezorcynoarenowych. Całkowita sieć wiązań wodorowych składa się z czterech niezależnych od siebie podsystemów mogących ułożyć się na 81 (3^4) różnych sposobów ułożenia wiązania wodorowego lub jego braku. Gdy wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe brane są pod uwagę w obliczeniach, stabilność konformerów rezorcynoarenu 1 znacznie wzrasta. Najtrwalsze są konformery złożone z czterech wiązań wodorowych. Obliczenia wykonane metodami kwantowo-mechanicznymi dla konformerów koronowych rezorcynoarenu 1 różniących się ułożeniem wiązań wodorowych wskazują, że konformacja koronowa jest najstabilniejszym konformerem rezorcynoarenu 1, jeśli ma kołowy, jednokierunkowy system wiązań wodorowych i symetrię C_4 . W tej konformacji każda z rezorcynoarenowych podjednostek jest jednocześnie donorem jak i akceptorem wodoru. Te kooperatywne wiązania wodorowe stabilizują konformer, ale wprowadzają także pewne naprężenie w szkieletie cząsteczki.. Obliczenia metodą *ab initio* wskazują, że podczas nieobecności wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych konformacja łódkowa rezorcynoarenu 1 jest najstabilniejsza [5] – rysunek 4..

Rysunek 4



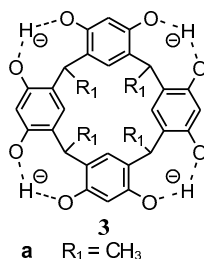
3. Właściwości kompleksujące rezorcynoarenów oraz ich pochodnych

Możliwość przyjmowania różnych konformacji, mostkowania grup hydroksylowych lub grup dolnej obręczy oraz łatwość wprowadzania grup funkcyjnych do górnej obręczy sprawia, że trudno wskazać wspólne właściwości kompleksujące dla wszystkich pochodnych rezorcynoarenów. Każdy z tych związków wykazuje indywidualne powinowactwo do różnych cząsteczek, a reaktywność jest najczęściej wypadkową kilku różnych cech strukturalnych. Przy pomocy modeli CPK, obliczeń metodami mechaniki kwantowej oraz obserwacji doświadczalnych można jednak wyszczególnić najczęstsze miejsca oddziaływań różnych pochodnych rezorcynoarenów. Są to:

- centrum wnęki utworzonej z aromatycznych pierścieni i grup funkcyjnych izomerów koronowego i łódkowego;
- wnęka hydrofobowa utworzona z grup funkcyjnych R_1 przy dolnej obręczy;
- zewnętrzna powierzchnia grup funkcyjnych górnej lub dolnej obręczy
- zewnętrzna powierzchnia aromatycznego szkieletu rezorcynoarenów;
- duża wnęka tworzona np. przez heksamery rezorcynoarenowe i pirogaloarenowe.

3.1. Kompleksowanie kationów

W środowisku zasadowym następuje deprotonowanie fenolowych grup hydroksylowych rezorcynoarenów [6]. Pierwsze cztery protony są bardziej kwasowe niż pozostałe. W roztworze NaOD, izomer koronowy 1 ($R_1 = \text{CH}_3$) jest obecny wyłącznie jako tetrafenolan 3. Miareczkowanie potencjometryczne wykazało, że wartość pK_a dla pierwszych czterech protonów jest niższa o dwie jednostki od pK_a rezorcyny, podczas gdy pozostałe cztery protony nie mogą być usunięte nawet w obecności zasady, jaką jest NaOCH_3 . Stabilność tetrafenolanu 3 jest rezultatem idealnego geometrycznego dopasowania układu wiązania wodorowego $\text{O} \cdots \text{H} \cdots \text{O}$ oraz delokalizacji ładunku ujemnego.



Tetrafenolan 3 wiąże kationy trialkiloamoniowe z bardzo wysoką stałą tworzenia ($K \cong 3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ w 0.5 N NaOD), przewyższającą odpowiednie stałe w układach biologicznych. Siła wiązania jest tylko umiarkowanie zależna od siły jonowej oraz od polarności rozpuszczalnika

lecz silnie maleje wraz z wydłużaniem się grup alkilowych (Tabela 1). Kompleksowanie kationów trialkiloamoniowych zależy głównie od oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy dodatnim ładunkiem na atomie azotu a ujemnym ładunkiem tetrafenolanu 3, zdelokalizowanym na obrzeżach górnej obręczy oraz od możliwości dopasowania kationu do wnęki tetrafenolanu 3. Mann [7] jako pierwszy otrzymał takie kompleksy tetrafenolanu 3 w stanie krystalicznym. Struktura rentgenograficzna kompleksów z kationami alkiloamoniowymi (Et_3HN^+ , $n\text{-Pr}_2\text{H}_2\text{N}^+$, $n\text{-Bu}_2\text{H}_2\text{N}^+$) potwierdziła, że tetrafenolan 3 przyjmuje prawie idealną konformację koronową (C_{4v}) i tworzy kompleksy o stechiometrii 1:1. Niewielkie odchylenia od tej symetrii spowodowane są przez cząsteczki rozpuszczalnika obecne w sieci krystalicznej.

Rysunek 5

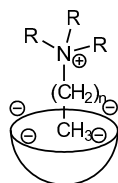
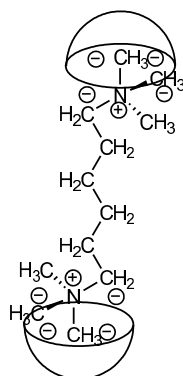


Tabela 1 Stałe kompleksowania K dla różnych trialkiloamoniowych pochodnych z 3.

R	K (M^{-1})
CH_3 ($n = 0$)	29000 ± 6000
C_2H_5 ($n = 1$)	3500 ± 400
C_3H_7 ($n = 2$)	32 ± 5
C_4H_9 ($n = 3$)	<2

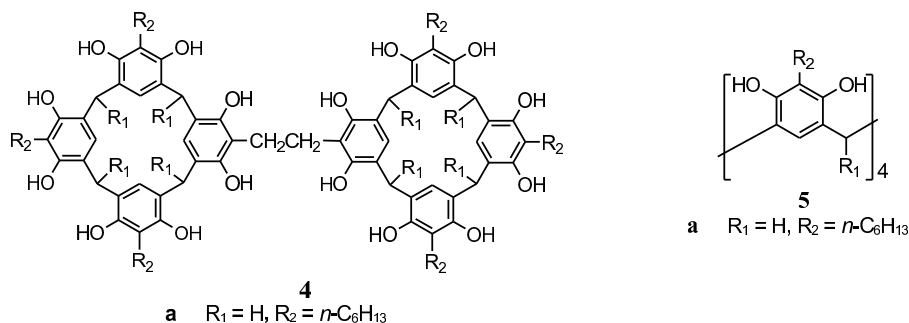
Bifunkcyjne związki amoniowe typu $\text{Me}_3^+\text{N}(\text{CH}_2)_n\text{N}^+\text{Me}_3$ mogą tworzyć, przy odpowiednim nadmiarze tetrafenolanu, kompleksy o stechiometrii 2:1 tetrafenolan 3 : diamina (Rysunek 6). Dla takich kompleksów stała tworzenia nie zależy od liczby grup CH_2 dzielących dwie części amoniowe [48].

Rysunek 6



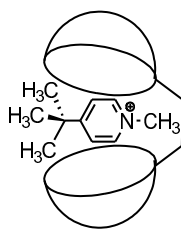
Badano także właściwości kompleksujące utworzonej poprzez wiązania kowalencyjne birezorcynoarenowej wnęki 4 ($\text{R}_1 = \text{H}$, $\text{R}_2 = n\text{-C}_6\text{H}_{13}$). Analiza widm ^1H NMR wskazuje, że dimer ten jest cząsteczką „elastyczną” i nie zachodzą w nim wzajemne oddziaływania

między dwoma wnękami rezorcynoarenowymi w roztworze. Dla porównania przeprowadzono także badania właściwości kompleksujących rezorcynoarenu 5 ($R_1 = H$, $R_2 = n\text{-C}_6\text{H}_{13}$), który jest monomerem birezorcynoarenu 4.



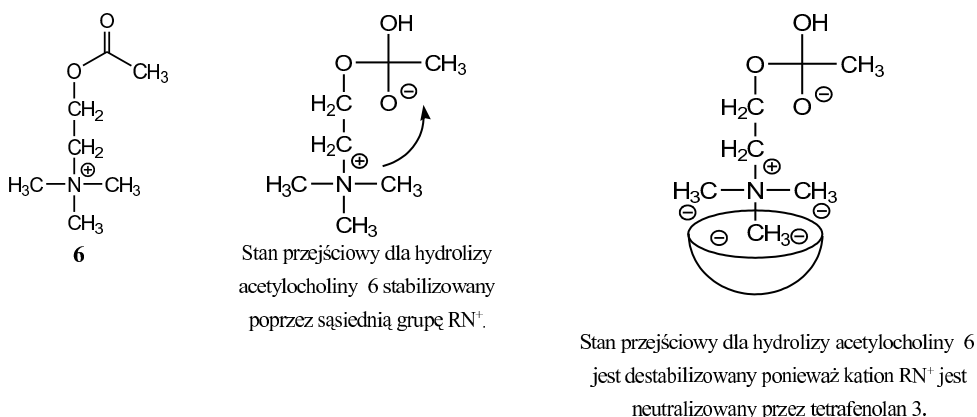
Analiza przesunięć sygnałów na widmach $^1\text{H-NMR}$ dla jonu 4-*tert*-butylo-N-metylopirydynowego z rezorcynoarenum 5 wskazuje na jego silne kompleksowanie we wnęce rezorcynoarenu ($K = 580 \text{ M}^{-1}$), spowodowane oddziaływaniem typu kation N-metylowy - układ π -elektronowy. Sugerowałoby to możliwość oddzielnego kompleksowania przez wnęki rezorcynoarenowe w dimerze 4. Jednak pomiary metodą Joba wskazują, że tworzy się kompleks o stechiometrii 1:1. Co więcej, dla takiego kompleksu obserwuje się znaczne przesunięcia sygnałów wszystkich protonów pochodnej 4 na widmach $^1\text{H-NMR}$. Wskazuje to na horyzontalne ułożenie cząsteczki gościa we wnęce (Rysunek 7).

Rysunek 7



Powinowactwo tetrafenolanu 3 do kationów metyloamoniowych jest interesujące w przypadku acetylocholiny 6. Wiązanie i hydroliza tego neuroprzekaźnika w synapsach jest ważnym etapem w przekazywaniu sygnałów nerwowych. Nieenzymatyczna hydroliza acetylocholiny jest silnie przyspieszana przez dodatnio naładowany podstawnik amoniowy - Rysunek 8.

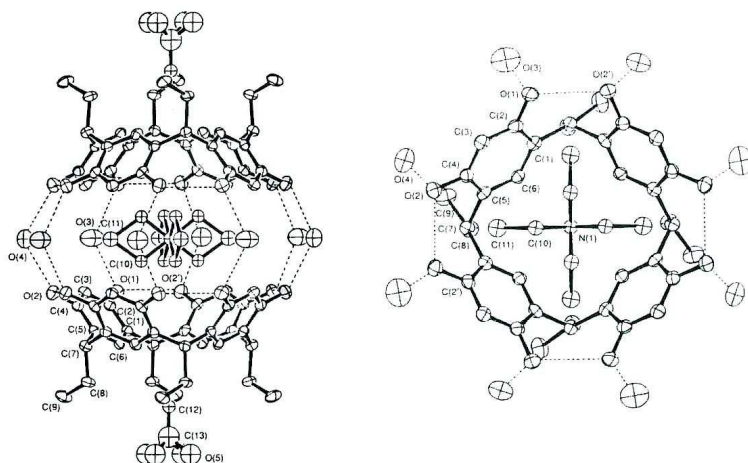
Rysunek 8



W obecności tetrafenolanu 3 wydajność hydrolizy acetylochliny zmniejsza się dziesięciokrotnie. Efekt ten jest przypisywany silnemu powinowactwu tetrafenolanu 3 do dodatnio naładowanego podstawnika amoniowego (K_a dla acetylochliny w 0.5 N NaOD wynosi 50000 M^{-1}), co w rezultacie powoduje efekt jej dezaktywacji (Rysunek 8). Również kation N-alkilopirydyniowy jest kompleksowany przez tetrafenolan 3 z podobną stałą asocjacji. Rezultatem takiego oddziaływania jest silne wygaszanie pomarańczowej fluorescencji tego pirydynowego barwnika. Po dodaniu acetylochliny do roztworu kompleksu 3·(N-alkilopirydyna) jego fluorescencja jest regenerowana. Nie obserwuje się takiego zachowania dla żadnego innego neuroprzekaźnika i cecha ta może być stosowana jako optyczna metoda wykrywania acetylochliny.

Rezorcynoaren 1 może oddziaływać także w inny sposób z kationami alkiloamoniowymi [8]. Struktura krystalograficzna kompleksu formowanego pomiędzy dwiema cząsteczkami rezorcynoarenu 1, jonem tetraetyloamoniowym oraz cząsteczkami rozpuszczalnika przedstawia Rysunek 9. Cząsteczki rezorcynoarenu 1 w konformacji koronowej z wewnątrzcząsteczkowymi wiązaniami wodorowymi pomiędzy sąsiednimi grupami hydroksylowymi są względem siebie w pozycji "głowa do głowy". Kation Et_4N^+ ułożony jest w centrum symetrii, a osiem cząsteczek wody, leżących w płaszczyźnie lustrzanej łączy wiązaniami wodorowymi dwie hydroksylowe grupy dwóch naprzeciwległych rezorcynoarenów. Ułożenie kationu we wnęce maksymalnie sprzyja oddziaływaniom π -elektronowym pomiędzy czterema grupami etylowymi kationu a pierścieniami aromatycznymi 1. Wyniki te potwierdzają także widma NMR.

Rysunek 9

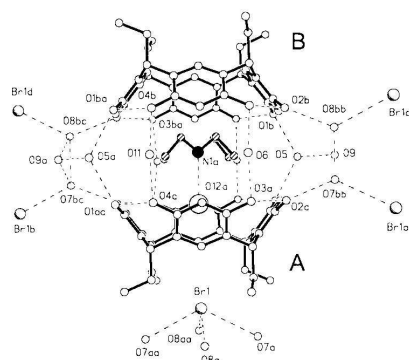


Struktura krystalograficzna $1 \cdot \text{Et}_4\text{N}^+ \cdot 1 \cdot 8\text{H}_2\text{O} \cdot 2\text{EtOH}$,
linie przerywane oznaczają wiązania wodorowe.

Widok z góry na kompleks, pokazujący ułożenie Et_4N^+
w supramolekularnej wnęce.

Można otrzymać także analogiczne dimery rezorcynoarenów zawierające kationy i będące heterokompleksami. Krystalizacja 1 ($\text{R}_1 = \text{C}_2\text{H}_5$) z 10-krotnym nadmiarem Et_3NHBr w wodnym roztworze EtOH powoduje powstanie sześciennych kryształów, nietrwałych poza roztworem, dla których można jednak wykonać badania rentgenograficzne [9]. W stanie krystalicznym dimer rezorcynoarenu 1, połączony wiązaniami wodorowymi z 10 cząsteczkami wody tworzy kompleks z $\text{Et}_3\text{N}^+ \cdot \text{H} \cdots \text{OH}_2$, podczas gdy anion bromkowy jest na zewnątrz wnęki (rysunek 10).

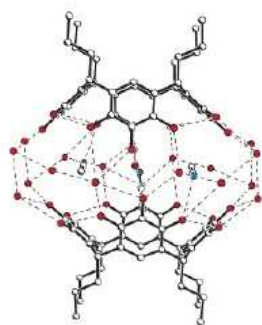
Rysunek 10



Podobne dimeryczne kapsuły, w których woda jest integralną częścią tych kapsuł zarówno w stanie stałym jak i rozpuszczalnikach nasyconych wodą, tworzy także pirogaloaren 2 ($\text{R}_1 = \text{C}_3\text{H}_7$). Dwie cząsteczki pirogaloarenu 2 ($\text{R}_1 = \text{C}_3\text{H}_7$) o symetrii C_{4v}

formują centrosymetryczny dimer połączony siecią wiązań wodorowych z 16 cząsteczkami wody (Rysunek 11). We wnętrzu tak utworzonego dimeru kompleksowane są cztery cząsteczki acetonitrylu. Dwie z cząsteczek acetonitrylu oddziałują z pierścieniami aromatycznymi poprzez oddziaływania typu CH- π . Ułożenie dwóch pozostałych wskazuje na oddziaływanie typu dipol-dipol, a odległości pomiędzy atomami azotu w acetonitrylu a atomami tlenami wskazują na powstawanie wiązań wodorowych pomiędzy cząsteczkami gości a wnętrzą gospodarza.

Rysunek 11

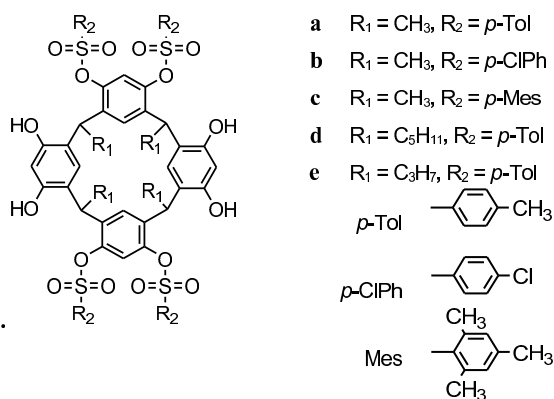


Dodanie kationu tetrametyloamoniowego ($R_1 = C_3H_7$) do roztworu pirogaloarenu 2 powoduje powstawanie kinetycznie stabilniejszego dimerycznego kompleksu o stechiometrii 1:2. Sygnały grup metylowych gościa przesunięte są o 3.8 ppm, co wskazuje na silne ekranowanie protonów soli amoniowej przez wnętrza rezorcynoarenowe formującej się dimerycznej kapsuły [48, 10].

Dimeryczne kapsuły pirogaloarenowe mogą tworzyć także inne kompleksy. Dodatek kationu tropyliowego $C_7H_7^+$ do roztworu pirogaloarenu 2 ($R_1 = C_3H_7$) w metanolu lub acetonitrylu powoduje intensywne czerwone zabarwienie wskazujące na oddziaływanie CT jonu tropyliowego z bogatym w elektrony pierścieniami pirogalowymi. Przy stosunku stężeń gospodarz/gość większym niż 2 na widmie NMR widać sygnały odpowiadające zarówno cząsteczkom pirogaloarenu tworzącego dimer jak i wolnych cząsteczek pirogaloarenu, natomiast przy stosunku stężeń gospodarz/gość równym 2 widać tylko sygnały pochodzące od kompleksu. Z integracji sygnałów protonowych wynika, że dwie cząsteczki pirogaloarenu kompleksują jedną cząsteczkę jonu tropyliowego. Powolna wymiana cząsteczki gościa i duże przesunięcie sygnałów (4.3 ppm) są typowe dla takich dimerycznych kapsuł. Dalsze dodawanie soli powoduje, że przy jej czterokrotnym nadmiarze w stosunku do pirogaloarenu sygnały odpowiadające dimerowi zanikają. Interesujące jest to, że nie obserwuje się sygnałów nie kompleksowanych jonów tropyliowych gdy stosunek stężeń gospodarz/gość jest mniejszy niż 2. Wskazuje to na powstawanie także kompleksu o składzie 1:1 pomiędzy jonem

tropyliowym a pirogaloarenem z szybszą wymianą składników, co potwierdzają także widma ESI MS. Dla bardziej lipofilowego pirogaloarenu 2 ($R_1 = C_{11}H_{23}$) w $CDCl_3$ nie zaobserwowano zmiany barwy ani zmian na widmie NMR pod wpływem dodawanego jonu tropyliowego. Dodatek metanolu (20%) powoduje zabarwienie się roztworu oraz odpowiednie zmiany na widmach NMR, co świadczy, że w tego typu kompleksach pomiędzy pirogaloarenami 2 ($R_1 = C_3H_7$ lub $C_{11}H_{23}$) a jonami tropyliowymi, cząsteczki metanolu lub wody pełnią rolę łącznika pomiędzy dwoma czaszami pirogaloarenowymi. Taką budowę dimerycznego kompleksu obserwuje się zarówno w roztworze jak i w stanie stałym. Interesujące, że rezorcynoaren 1 ($R_1 = CH_3$ lub C_2H_5) w tych warunkach nie tworzy kinetycznie stabilnych kompleksów z kationem tropyliowym. Widocznie *większa* π -zasadowość i rozszerzona sieć wiązań wodorowych znacznie ułatwia pirogaloarenom formowanie dimerycznych kapsuł w polarnych rozpuszczalnikach [48].

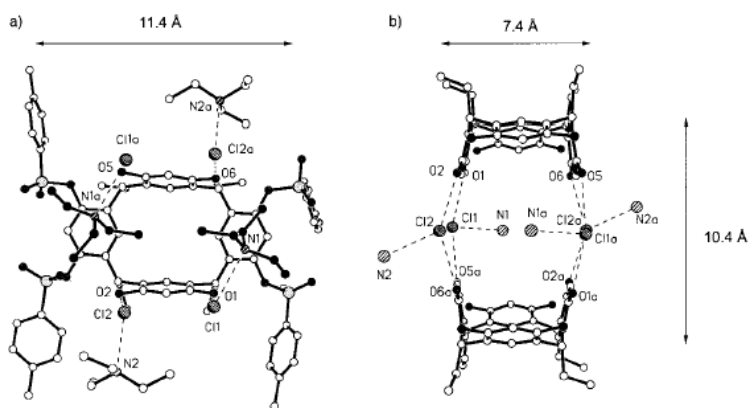
Rezorcynoareny w konformacji łódkowej o symetrii C_{2v} także mogą tworzyć dimeryczne kompleksy z kationami amoniowymi. Dwie cząsteczki tetraestrów 7 lub 8 w konformacji łódkowej połączone za pomocą wiązań wodorowych z czterema anionami chlorkowymi tworzą dimer [11].



7

Utworzona w ten sposób wnęka kompleksuje dwa kationy trietyloamoniowe dzięki oddziaływaniom elektrostatycznym i wiązaniami wodorowym typu $N-H \cdots Cl$ () [12]. Konformacja łódkowa determinuje rozmiar dimerycznej wnęki, podczas gdy elektrostatyczne oddziaływania i wiązania wodorowe są odpowiednie do kompleksowania dwóch kationów trietyloamoniowych. Różni to te wnęki od większości znanych kapsuł molekularnych, w wypełnianie pustych przestrzeni wewnętrznych jest najczęstszą przyczyną kapsułowania gości a same oddziaływania gość - gospodarz są stosunkowo słabe.

Rys.12.

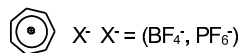
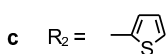
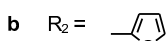
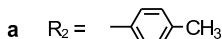
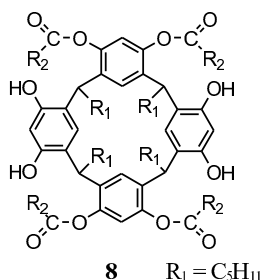


Dimer $(C_2H_5)_3NH^+[2 (C_2H_5)_3NH^+ \cdot (7 \cdot 4Cl^-)]$ tworzący się poprzez wiązania wodorowe.

a) widok z góry, jedna cząsteczka 7 została pominięta dla jasności rysunku.

b) widok z boku: fragmenty tosylowe i atomy węgla kapsułowanego kationu pominięto.

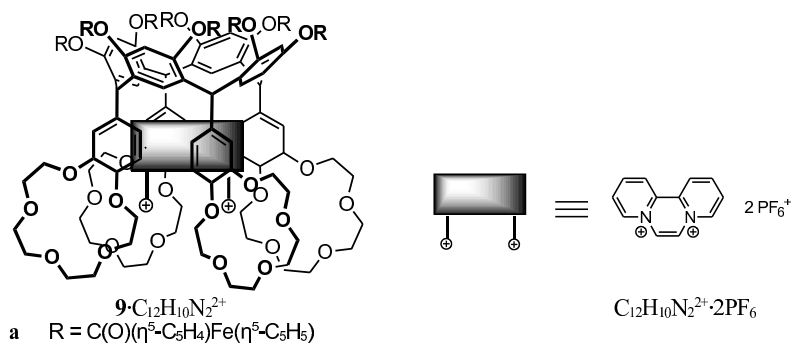
Sterowane cząsteczką gościa formowanie dimerów obserwuje się także w przypadku oddziaływań selektywnie zfunkcjonalizowanego rezorcynoarenu 8 z kationem tropyliowym $C_7H_7^+$. Przy nadmiarze rezorcynoarenu 8 tworzą się kompleksy typu $[8 \cdot C_7H_7^+ \cdot 8]X^-$. Dla porównywalnych stężeń substratów powstaje kompleks o stechiometrii 1:1. Podobnie jak w przypadku kompleksów rezorcynoarenu 1 z kationem tetraetyloamoniowym nie obserwuje się powstawania dimerów 8 po dodaniu benzenu lub toluenu pomimo, że kształt tych cząsteczek odpowiada wewnętrznej "przestrzeni" dimeru. Wskazuje to na wagę oddziaływań typu π -elektronowych w formowaniu kapsuł molekularnych. Kapsulacja cząsteczki gościa jest zazwyczaj niezbędna do dimeryzacji, ponieważ pusta lub niekompletnie zapełniona wnęka jest termodynamicznie mniej stabilna. W tych przypadkach, zarówno samo oddziaływanie typu gość - gospodarz, jak również oddziaływania pomiędzy dwiema komplementarnymi cząsteczkami gospodarzy nie są wystarczające do tworzenia dimerów. Kooperatywne oddziaływanie obu czynników prowadzi do formowania kompleksu typu 1:2 gość - gospodarz.



Chloroformowe roztwory rezorcynoaren 8, podobnie jak pirogaloaren 2 ($R_1 = C_3H_7$), nabierają intensywnej barwy pomarańczowej pod wpływem soli tropyliowej, co sugeruje tworzenie się kompleksu typu CT. Badania NMR wskazują natomiast, że kompleksy 8 z $C_7H_7^+$ powstają poprzez silne wiązania wodorowe [13].

Wyjaśnia to struktura krystaliczna kompleksu $[8c \cdot C_7H_7^+ \cdot 8c]PF_6^-$. Dwie cząsteczki rezorcynoarenu 8c, poprzez osiem międzycząsteczkowych wiązań wodorowych $C=O \cdots H-O$ tworzą dimer, we wnęce którego znajduje się cząsteczka gościa. Pierścień kationu tropyliowego ułożony jest we wnęce równoległe do jednego z nie podstawionych pierścieni rezorcynowych w odległości 3.57 Å, która odpowiada typowym odległościom w kompleksach CT. Natomiast odległości pomiędzy płaszczyznami pozostałych pierścieni rezorcynoarenowych a wszystkimi atomami kationu $C_7H_7^+$ są odpowiednie do formowania wiązań typu $CH-\pi$. Możliwe jest także tworzenie stabilnych heteroasocjatów, np. $[8a \cdot C_7H_7^+ \cdot 8b]PF_6^-$. W literaturze opisano także pochodne rezorcynoarenów mające miejsca aktywne o właściwościach utleniająco redukujących. Prostą metodę funkcjonalizowania grup hydroksylowych pierścieni rezorcynowych w rezorcynoarenach grupami $-C(O)(C_5H_4)M(C_5H_5)$ gdzie ($M = Fe, Ru$) została opracowana przez Beer'a [14, 15, 16]. Warto zauważyć obecność w cząsteczce 9 wiążących miejsc, jakimi są etery koronowe, które są zarazem zasadami Lewisa. Widma NMR wskazują, że rezorcynoaren 9 może tworzyć w roztworze kompleksy np. z dikationami pochodnych dipirydylopirazyny. Kompleksy takie tworzą się poprzez wiązania wodorowe pomiędzy protonami $-NCH_2-$ a atomami tlenu odpowiedniej jednostki eteru koronowego (Rysunek 13) [17].

Rysunek 12

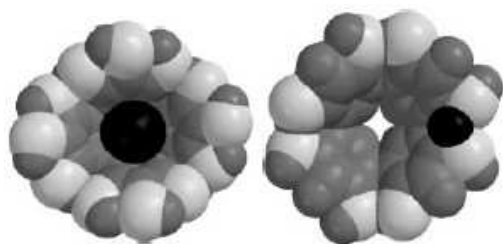


Kompleksowanie przez pochodne rezorcynoarenu kationów metali obserwowane było w szeregu różnych pracach. Rezorcynoaren 1 ($R_1 = C_{11}H_{23}$) selektywnie ekstrahuje cez z mieszaniny jonów metali alkalicznych. Gdy jonizacji ESI poddawany był pirogaloaren 2 wykazywał on także dużą preferencję do cezu. Selektywność tą obserwuje się także dla

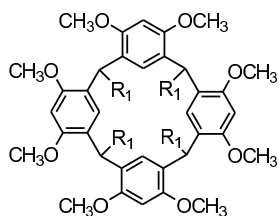
dimerycznego kompleksu składającego się z dwóch cząsteczek rezorcynoarenów 1 ($R_1 = C_{11}H_{23}$) i kationu Cs^+ , którego rozmiary bardzo dobrze pasują do wnęk tworzonych przez dimery rezorcynoarenu. Monomer pirogaloaren 2 ($R_1 = C_{11}H_{23}$) przejawia podobne właściwości podobne właściwości kompleksujące jak opisane powyżej, jednak jego dimer chętniej kompleksuje mniejsze alkaliczne jony metali [17].

Właściwości kompleksowania jonów metali badano metodą kinetyczną, obserwując dysocjację kompleksów heterodimerów rezorcynoarenów 1 i 2 z kationami pierwszej grupy układu okresowego w chloroformie [18]. Heterodimery te dysocjują, współzawodnicząc o jon metalu, co na widmach ESI-MS przejawia się różną abundancją obu fragmentów. Pozwala to ocenić relatywną stabilność monomerycznych fragmentów. Z pomiarów wynika, że kationy Li^+ i Na^+ są czułe na większą liczbę grup OH w rezorcynoarenie, podczas gdy pozostałe jony metali alkalicznych nie. Nasuwa to wniosek, że możliwe są dwa różne mechanizmy kompleksowania. Obliczenia przy użyciu modelu pola siłowego Mercka wskazują, że lit i sód zajmują pozycję blisko grup hydroksylowych i zachowują się jak donory elektronów (kompensują dużą gęstość ładunku na powierzchni: Li^+ - $15.2 \times 10^{-19} \text{ C nm}^{-2}$, Na^+ - $9.3 \times 10^{-19} \text{ C nm}^{-2}$). Nie można jednak jednoznacznie stwierdzić czy jony te położone są wewnątrz czy na zewnątrz symetrycznej, stabilizowanej przez wiązania wodorowe wnęki. W przeciwieństwie do nich potas, rubid i cez dobrze pasują do wnęki rezorcynoarenu. Mają one większą polarozywalność niż lit i sód i dlatego nie preferują tlenu jako donora. Dodatkowo gęstość ładunku na powierzchni tych metali alkalicznych jest niższa i jest kompensowana poprzez oddziaływania typu π z pierścieniami aromatycznymi.

Rysunek 13

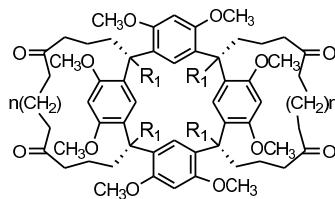


Podobne badania przeprowadzono dla kompleksów rezorcynoarenu 10 ($R_1 = H$) z jonami metali pierwszej grupy układu okresowego w roztworach wodno-acetonitrylowych. Widma ESI-MS wskazują, że siła tych oddziaływań rośnie wraz ze wzrostem wielkości kompleksowanego kationu. Najtrwalsze kompleksy powstają, podobnie jak poprzednio, z kationem cezu, który jest około 70 razy lepiej kompleksowany przez rezorcynoaren 10 niż najslabiej kompleksowany jon litu.



10

- a** $R_1 = H$
b $R_1 = C_2H_5$
c $R_1 = CH_2C(O)OCH(CH_3)_2$

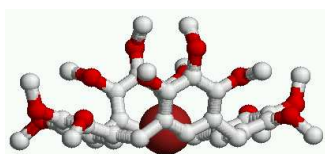


11

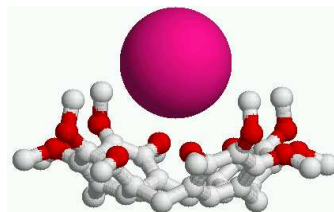
- a** $R_1 = H, n = 1, 2 \text{ i } 3$

Obliczenia kwantowomechaniczne wykonane za pomocą metody MNDO wykazały, że kompleks 10 z kationem potasu i sodu stabilizuje konformer koronowy 10, którego wnęka dobrze odpowiada rozmiarom kationów. Kompleks z litem stabilizuje natomiast konformację łódkową 10 (Rysunek 14). W polarnym, wodno - acetonitrylowym roztworze, przy braku wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych konformacja łódkowa jest najtrwalsza dla rezorcynoarenu 10, której wnęka jest odpowiednia dla mniejszych kationów. Większe kationy wymuszają zmianę konformacji stabilizując bardziej trwałą konformację koronową. Różne konformery rezorcynoarenu 10 są tu przykładem cząsteczek chętnie kompleksujących kationy metali [19].

Rysunek 14



konformacja łódkowa dla Li^+

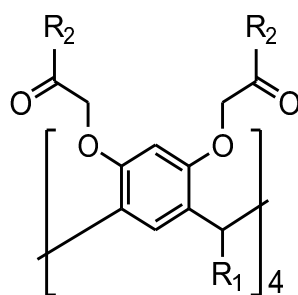


konformacje koronowe dla K^+

Z badań NMR wynika, że rezorcynoaren 10 ($R_1 = C_2H_5$) z kationami Ga^{3+} tworzy kompleks o stechiometrii 1:1 poprzez oddziaływanie kationu z górną obręczą rezorcynoarenu. Sygnały przypisywane grupom dolnej obręczy nie wykazują żadnego przesunięcia, co wskazuje, że alkilowe podstawniki nie oddziałują z tym kationem. Nadmiar chlorku galu (III)- $GaCl_3$ powoduje na widmach 1H -NMR powstawanie nowych sygnałów przypisywanych kompleksowi konformeru diamentowego 10 z Ga^{3+} . Potwierdza to również fakt, że dodanie do takiej mieszaniny metanolu powoduje wytrącenie się z roztworu rezorcynoarenu 10. Analiza metodą chromatografii cienkowarstwowej TLC utworzonego w ten sposób osadu pokazuje obecność zarówno konformeru koronowego jak i diamentowego

rezorcynoarenu 10 (w stosunku 3:1). Analogicznie, miareczkowanie GaCl_3 konformeru diamentowego 10 powoduje interkonwersję do konformeru koronowego rezorcynoarenu 10. Podobne przemiany konformacyjne rezorcynoarenu 10 ($\text{R}_1 = \text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{OCH}(\text{CH}_3)_2$) zaobserwowano pod wpływem chlorku żelaza (III)- $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Interesujące, że skład kompleksu rezorcynoaren 10: $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ wyznaczony metodą Joba określono na 1:2. Wskazuje to, że rezorcynoaren 10 oprócz miejsca oddziaływania z kationem umiejscowionym w górnej obręczy ma jeszcze drugie miejsce wiążące, utworzone z grup karboksylowych dolnej obręczy. Badano także właściwości kompleksotwórcze bardziej sztywnych rezorcynoarenów 11, w których dwa mostki dolnej obręczy wymuszają konformację zamrożonej łódki o symetrii C_{2v} . Widma NMR dla miareczkowania pochodnej 11 ($n = 2$) za pomocą GaCl_3 w deuterowanym chloroformie wskazują, że miejsce oddziaływań jest ulokowane pomiędzy grupami metoksyłowymi dwóch cząsteczek rezorcynoarenów, co potwierdzają także widma FAB-MS.

Ekstrakcja i transport kationów za pośrednictwem wielofunkcyjnych rezorcynoarenów były badane pod kątem przydatności tych receptorów w separacji kationów. Metodą ekstrakcji pikrynianów opisaną przez Crama i Chandlera [20] badano kompleksowanie rezorcynoarenów 12a-f z różnymi kationami metali w chloroformie. Tabela 2 przedstawia logarytmy stałych kompleksowania K dla tych rezorcynoarenów. Porównanie stałych dla kompleksów rezorcynoarenów 12a-c i 12d-f wskazuje, jak się spodziewano, że alkilowe łańcuchy mają mały wpływ na stałą tworzenia kompleksów.



12

- a** $\text{R}_1 = \text{C}_{11}\text{H}_{23}$, $\text{R}_2 = \text{OCH}_3$
- b** $\text{R}_1 = \text{C}_{11}\text{H}_{23}$, $\text{R}_2 = \text{OC}(\text{CH}_3)_3$
- c** $\text{R}_1 = \text{C}_{11}\text{H}_{23}$, $\text{R}_2 = \text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$
- d** $\text{R}_1 = \text{C}_7\text{H}_{15}$, $\text{R}_2 = \text{OCH}_3$
- e** $\text{R}_1 = \text{C}_7\text{H}_{15}$, $\text{R}_2 = \text{OC}(\text{CH}_3)_3$
- f** $\text{R}_1 = \text{C}_7\text{H}_{15}$, $\text{R}_2 = \text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$
- g** $\text{R}_1 = \text{CH}_3$, $\text{R}_2 = \text{OH}$

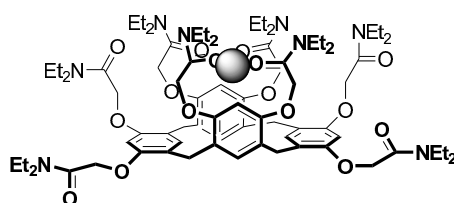
Tabela 2. Logarytmy stałych kompleksowania $[M^{-1}]$ rezorcynoarenów 12a-f z kationami metali.

	Na ⁺	K ⁺	Rb ⁺	Cs ⁺	Ag ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Ba ²⁺	La ³⁺
12a	3.22	4.01	4.10	4.09	3.91	4.24	5.48	5.13	6.98
12b	4.24	4.65	4.65	4.53	4.60	4.28	5.57	5.34	6.98
12c	5.25	5.73	5.56	5.50	7.63	5.73	7.74	8.75	11.11
12d	3.50	4.12	4.07	4.04					
12e	3.74	4.60	4.57	4.63					
12f	5.26	5.76	5.64	5.43					

Wartości %E (procent ekstrakcji) dla estrów 12a i 12b są mniejsze niż 2% co dowodzi, że związki te mają małe powinowactwo do badanych kationów. W odróżnieniu od nich, rezorcynoaren z grupami amidowymi w górnej obręczy - 12c wykazuje o wiele większe właściwości ekstrakcyjne. Wartość %E dla 12c do badanych kationów metali jest następująca: Na⁺- 7%; K⁺- 22%; Rb⁺- 13%; Cs⁺- 11%; Ag⁺- 75%; Mg²⁺- 2%; Ca²⁺- 25%; Ba²⁺- 47% i La³⁺- 65%. Siła kompleksowania jonów metali wzrasta, gdy grupy funkcyjne przy karbonylowych atomach węgla zmieniają się od estru metylowego, poprzez ester *t*-butylowy do amidu. Oktaamid jest najsilniej kompleksującym czynnikiem dzięki największej gęstości elektronowej na karboksylowych atomach tlenu. Oktaester *t*-butylowy ma pośrednie właściwości kompleksujące, co jest rezultatem większego przesunięcia gęstości elektronowej od grup *t*-butylowych niż od metylowych. Żaden kompleks rezorcynoarenu 12 z kationem metalu nie wykazał współczynnika %E większego niż 1, co wskazuje, że tworzą się kompleksy typu 1:1. Także badania NMR potwierdzają taką stechiometrię dla kompleksu 12c·Ag⁺. Stałe kompleksowania sugerują, że rozmiar kationów nie ma pierwszoplanowego znaczenia w selektywności ich wiązania. Źródłem selektywności jest tu prawdopodobnie kombinacja elektrostatycznych oddziaływań połączona z "twardo-miękkim" charakterem kationów metali (zmiana ładunku kationu wraz ze zmianą jego objętości). Badania NMR w różnych temperaturach, prowadzone dla 12a i 12c pokazały, że dla wolnych ligandów w temperaturze pokojowej następuje szybkie ustalenie się równowagi pomiędzy dwoma konformacjami łódkowymi z barierą pseudorotacji równą 42 kJ mol⁻¹. Konformację łódkową mają także ligandy kompleksujące jony srebra. Widma NMR dla kompleksu 12c·Ag⁺ pokazują, że jon srebra jest symetrycznie kompleksowany (Rys. 15) przez cztery grupy karbonylowe umieszczone na naprzeciwległych pierścieniach rezorcynoarenu. Dla kompleksów z kationem srebrowym bariera pseudorotacji wzrasta, co spowodowane jest dekompleksacją kationu niezbędną przed pseudorotacją.

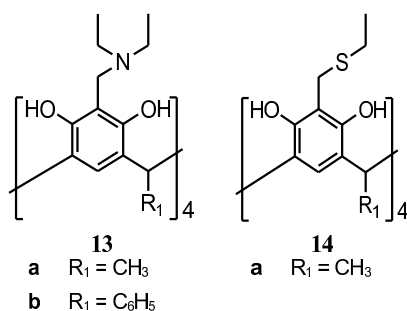
Tego typu pochodne znalazły praktyczne zastosowanie do selektywnego oznaczania i rozdzielu różnych kationów. Impregnowana rezorcynoarenem 12g żywica pozwala oznaczyć i rozdzielić kationów toru (IV) i uranu (VI) z roztworach wodnych. Chromatograficznego

rozdział kationów dokonuje się dobierając odpowiednią wartość pH. Tor wykazuje sorpcję na żywicy przy pH=3 a uran przy pH=6. Pojemność takiej żywicy względem kationów Th(IV) i U(VI) wynosi odpowiednio 0.29 i $0.27 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{g}^{-1}$. Tak wykonana żywica jest dość trwała i może być używana bez pogarszania właściwości ponad 10 razy [21].



Rys. 15. Konformacja kompleksu rezorcynoarenu 12c z jonem Ag^+ .

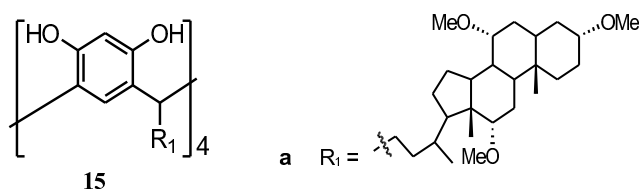
W literaturze opisano także kompleksy aminometylowych rezorcynoarenów 13 z kationami lantanowców [22]. Podobnie jak w większości przypadków, rezorcynoaren tworzy z kationami tych metali kompleksy o stechiometrii 1:1 ale zwrócono uwagę na interesujące właściwości fotochemiczne tych kompleksów. W etanolu luminescencja rezorcynoarenu 13 w kompleksie z kationem Yt^{3+} jest silnie wygaszana, co spowodowane jest efektywnym przeniesieniem energii z cząsteczki organicznej na jon lantanowca. Pasmo luminescencyjne kompleksu pojawia się przy 978 nm, co odpowiada przejściu $^2\text{F}_{5/2} \rightarrow ^2\text{F}_{7/2}$.



Silniejszą luminescencję przejawia rezorcynoaren 13b ($\text{R}_1 = \text{C}_6\text{H}_5$), zawierający fenyłowe podstawniki, co spowodowane jest prawdopodobnie bardziej sztywną strukturą kompleksu oraz zawadą steryczną grup fenyłowych, uniemożliwiając cząsteczkom wody dotarcie do wewnętrznej sfery koordynacyjnej kompleksu, co spowodowałoby efektywne wygaszanie fluorescencji lantanowców. Ze względu na silną luminescencję kompleksy takie mogą być potencjalnie zastosowane jako markery luminescencyjne w niezmiernie czułych diagnostycznych metodach spektroskopii fluorescencyjnej.

Tiometylenowa pochodna rezorcynoaren 14 także tworzy kompleksy z różnymi kationami metali [23]. Konduktometryczne pomiary w acetonitrylu wskazują, że pomiędzy rezorcynoarenem 14 a kationami Ag^+ , Pb^{2+} oraz Cu^{+2} powstają słabe kompleksy o składzie 1:1. Kompleksy o takiej samej stechiometrii powstają także w metanolu z tym, że początkowo dla kationów srebra tworzy się kompleks, w którym rezorcynoarenu 14 wiąże dwa kationy Ag^+ . Kompleks o takiej stechiometrii jest jednak nietrwały i pod wpływem dodawanego rezorcynoarenu przechodzi w kompleks o składzie 1:1. Różnice w stechiometrii kompleksu tłumaczy różna solwatacja kation Ag^+ w tych rozpuszczalnikach. Kation srebra, ze względu na swoją konfiguracji elektronową jest bardzo dobrze solwatowany w acetonitrylu i oddziaływania z cząsteczkami rozpuszczalnika mogą być konkurencyjne do oddziaływań z ligandem. Dla kationów Pb^{2+} w metanolu nie obserwuje się żadnych zmian konduktometrycznych jaki i przesunięć na widmach NMR.

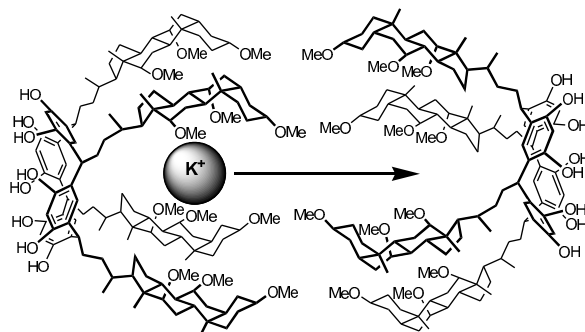
Rezorcynoareny przebadano także pod kątem możliwości wykorzystania ich do tworzenia kanałów jonowych [24]. Są to podstawowe urządzenia molekularne w przyrodzie, gdzie przepływ jonów przez bramki kontrolne typu "włącz-wyłącz" są podstawą działania np. układu nerwowego zwierząt. Naturalne kanały jonowe wykazują dużą przepustowości zachowując przy tym znaczną selektywność względem jonów i takie cechy próbuje się nadać także sztucznym kanałom jonowym [25, 26].



Górna obręcz wnętrza rezorcynoarenu 15, ma właściwości hydrofilowe natomiast steroidowe grupy funkcyjne dolnej obręczy nadają tej części cząsteczki właściwości amfifilowych. Cząsteczki rezorcynoarenu 15 przyjmując względem siebie pozycję typu *ogon do ogona* (tail-to-tail) układają się w dwuwarstwową błonę posiadającą transmembranowe kanały. Hydrofilowe części grup steroidowych są ustawiona tak, że formują hydrofilowe pory na centralnej osi pary rezorcynoarenowej, podczas gdy hydrofobowe części są skierowane na zewnątrz do otaczających grup alkilowych sąsiednich lipidów.

Kanały jonowe formowane przez rezorcynoaren 15 charakteryzują się długotrwałym (2.5-4.5 s) i stabilnym stanem otwartym, który pozwala na swobodny przepływ jonów. Stosunek czasu trwania tego stanu do czasu trwania stanu zamkniętego uniemożliwiającego przepływ jonów wynosi 95:5. Kanały jonowe tworzy także rezorcynoaren 1 ($\text{R}_1 = \text{C}_{17}\text{H}_{35}$) z długim alkilowym podstawnikiem przy dolnej obręczy, jednak obserwowana jest dla niego

bardzo szybka zmiana stanu otwartego z zamkniętym a średni czas otwarcia i drożności kanału jonowego to 35 ± 10 ms. Szybkie ruchy giętkich alkilowych łańcuchów rezorcynoarenu 1 ($R_1 = C_{17}H_{35}$) powodują prawdopodobnie naprzemian kanał jonowy drożnym i zablokowanym, natomiast w przypadku rezorcynoarenu 15 sztywne steroidowe części są "zakotwiczone" w membranie prawie całkowicie zapobiegając blokowaniu kanału jonowego. Wysoka stabilność kanału jonowego opartego na rezorcynoarenie 15, także w porównaniu do innych modelowych kanałów jonowych [27] jest także spowodowana obecnością polarnych grup metoksyowych, które utrzymują grupy steroidowe zwrócone ku sobie nawzajem poprzez polarne oddziaływania lub przez kompleksowanie kationów. Obecność steroidowych grup przy dolnej obręczy ma niewielki wpływ na selektywność typu K^+/Na^+ . Wcześniejsze badania wskazują bowiem, że przez rezorcynoarenową wnękę zarówno kationy sodowe ($r=0.95\text{\AA}$) jak i potasowe ($r=1.33\text{\AA}$) mogą przechodzić dość swobodnie. Obręcze makrocykliczne rezorcynoarenu 15 nie mogą więc pełnić w tym przypadku roli filtra kanału jonowego. Kation Rb^+ o nieco większym promieniu jonowym ($r=1.48\text{\AA}$) blokuje natomiast taki kanał jonowy uniemożliwiając przepływ innych kationów.



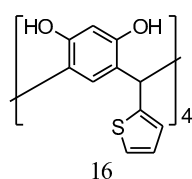
Rys. 16. Ułożenie typu "ogon do ogona" dwóch cząsteczek rezorcynoarenu 15 dające dwucząsteczkową warstwę membrany z kanałem międzymembranowym.

3.2. Kompleksowanie anionów

W literaturze można znaleźć zaledwie kilka przykładów rozpuszczalnych w wodzie receptorów anionów na bazie rezorcynoarenów. Anion jest mocniej solwatowany w wodzie niż kation o porównywalnym kształcie oraz posiada zróżnicowaną budowę przestrzenną, dlatego też badania nad rozpoznawaniem anionów są o wiele trudniejsze i nie są tak dalece zaawansowane jak badania nad rozpoznawaniem kationów.

Właściwości kompleksujące względem anionów przebadano dla rezorcynoarenu 16. Okazało się on użytecznym ligandem, tworzącym kompleksy z wieloma anionami, co

potwierdzają wartości współczynnik selektywności określona metodą potencjometryczną. Powinowactwo rezorcynoarenu 16 względem anionów maleje w szeregu: $\text{HSO}_3^- > \text{C}_2\text{O}_4^{2-} > \text{Cl}^- > \text{I}^- > \text{HCO}_3^- > \text{F}^- > \text{SO}_4^{2-} > \text{HPO}_4^{2-} = \text{SO}_3^{2-} > \text{SCN}^- > \text{NO}_3^- > \text{NO}_2^- > \text{CO}_3^{2-} > \text{S}_2\text{O}_3^{2-} > \text{N}_3^- > \text{Br}^- > \text{ClO}_4^- > \text{VO}_3^- > \text{MnO}_4^-$. Taki szereg selektywności różni się od konwencjonalnego szeregu Hofmeistra, co jest raczej rezultatem unikalnego oddziaływania pomiędzy jonoforem a anionem niż energii hydratacji anionów [28].



Wyniki te wskazują na możliwość zastosowania rezorcynoarenu 16 jako selektywnego jonoforu do ilościowego oznaczania np. jonów chromianowych CrO_4^{2-} . Sensor otrzymany na bazie tego rezorcynoarenu dobrze „pracuje” w szerokim zakresie stężeń (5.6×10^{-6} - 1.0×10^{-1} M), wykrywalność progowa wynosi 0.30 ppm a czas odpowiedzi to około 13 s. Na selektywność rezorcynoarenu 16 względem anionów nie wpływają jony interferujące. Sensor ten może być więc używany do potencjometrycznego miareczkowania chromianu w obecności Pb(II) i mieć zastosowanie do oznaczania chromianów np. w odpadach galwanicznych.

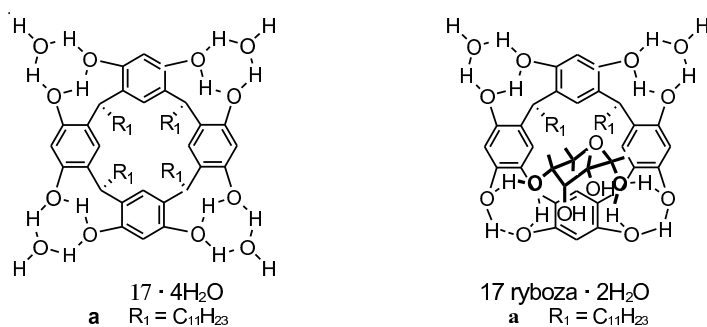
3.3. Kompleksowanie polarnych cząsteczek organicznych

Obecność ośmiu grup hydroksylowych przy górnej obręczy rezorcynoarenów sprawia, że kompleksują one chętnie organiczne cząsteczki zawierające polarne podstawniki. Aoyama pierwszy zbadał oddziaływania rezorcynoarenu 17 z cząsteczkami dioli w apolarnych, organicznych rozpuszczalnikach. Z przesunięć sygnałów protonów grup hydroksylowych na widmach $^1\text{H-NMR}$ i IR wynika, że grupy OH połączone są wiązaniami wodorowymi. Stechiometria 1:4 kompleksów rezorcynoarenu 17 z glicerolem i z H_2O sugeruje, że każda taka para grup hydroksylowych formuje osobne miejsce wiążące, zdolne do niezależnego oddziaływania z małymi cząsteczkami gości (rysunek 18) [29].

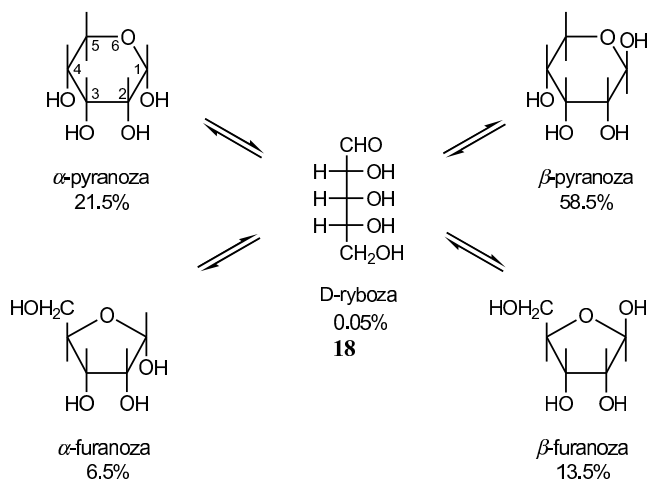
Wszystkie izomery 1,4-cykloheksanodiolu są mocno kompleksowane przez rezorcynoaren 17 ($K \approx 10^3 \text{ M}^{-1}$ w CDCl_3 w 25°C). Entalpia swobodna kompleksowania tych cykloheksanodiolu została określona na $-4.11 \text{ kcal mol}^{-1}$ i jest dwa razy większa niż entalpia swobodna ΔG kompleksowania odpowiednich cykloheksanoli. Selektywność kompleksowania izomeru *cis* 1,4-cykloheksanodiolu jest osiem razy większa niż izomeru *trans* [30]. Wynika to z lepszego geometrycznego ułożenia dwóch grup hydroksylowych

wizomerze *cis* (jedna ekwatorialna druga aksjalna), co pozwala na dwupunktowe oddziaływanie z cząsteczką gospodarza. W kompleksie z izomerem *trans*, aksjalne atomy wodoru cząsteczki gościa oddziałują z arylowym pierścieniem cząsteczki gospodarza, burząc tym optymalną geometrię wiązań. Selektywność 1,4-*cis* odgrywa ważną rolę w kompleksowaniu cukrów [49]. Aldopentoza, *D*-ryboza **18**, występująca w postaci sześciocząłowych pyranoz lub pięciocząłowych furanoz (Schemat 1) nie jest rozpuszczalna w czterochlorku węgla (CCl₄).

Rysunek 16



Schemat 1



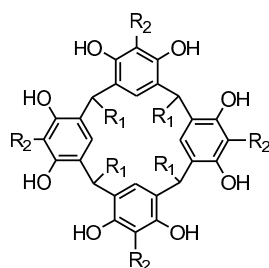
Łatwo jest ją jednak ekstrahować ze stężonych roztworów wodnych (5.5 M) roztworem rezorcynoarenu **17** w CCl₄. Wskazuje to, że oddziaływanie rezorcynoaren-ryboza z powodzeniem współzawodniczy z oddziaływaniami ryboza-H₂O i rezorcynoaren-H₂O. Badania NMR wskazują jednoznacznie, że ryboza jest kompleksowana wyłącznie w formie α -pyranozowej, ponieważ tylko ten izomer ma orientację *cis* grup hydroksylowych przy

węglach C-1 i C-4 [31]. Ekstrakcja z kilkoma podobnymi cukrami wykazała, że fukoza i 2-dioksyryboza są jeszcze łatwiej ekstrahowane niż ryboza. Ksyloza natomiast nie jest ekstrahowana w ogóle, chociaż różnice strukturalne między tymi cząsteczkami dotyczą tylko konfiguracji przy węglu C-3. Ogólnie, w oddziaływaniu rezorcynoarenów z cukrami dostrzeżono kilka ważnych strukturalnych czynników.

- 1) Relacja *cis* pomiędzy grupami OH przy atomach C-3 i C-4 cukrów jest decydująca dla ekstrakcji, ponieważ w pozycji *trans* grupa 3-OH koliduje z pierścieniem arylowym znajdującym się pomiędzy dwoma miejscami wiążącymi rezorcynoarenu.
- 2) Grupa OH przy atomie C-2 cukru nie jest odpowiedzialna za wiązanie i powinna być w położeniu *cis* do grup OH przy atomach C-3 i C-4 podobnie jak w rybozie, lub nieobecna, ponieważ prowadzi to do niekorzystnego oddziaływania grup OH cukru z niepolarnym rozpuszczalnikiem.
- 3) Podstawnik przy atomie C-5 cukru, oddziałujący tylko z apolarnymi rozpuszczalnikami powinien być silnie hydrofobowy, ponieważ wzmacnia to siłę kompleksowania.

Badania oddziaływań pomiędzy rezorcynoarenem 17 a różnymi monoalkoholami wskazują, że poza wiązaniami wodorowymi, które są siłą sterującą kompleksowaniem, także oddziaływania typu CH- π pomiędzy alifatycznymi częściami gości a bogatymi w π -elektrony pierścienie gospodarza, wnoszą wkład w to oddziaływanie [32]. Przesunięcie w stronę wyższych pól magnetycznych sygnałów protonów końcowych grup metylowych na widmie $^1\text{H-NMR}$ (np. $\Delta\delta \approx 3$ dla borneolu) wskazuje na głęboką penetrację aromatycznej wnęki przez cząsteczki gości. Znaczenie oddziaływań CH- π stopniowo wzrasta wraz ze wzrostem długości łańcucha lub rozgałęzienia części alifatycznej. Grupa acetylowa znacznie powiększa kwasowość końcowej grupy metylowej, co w rezultacie bardziej faworyzuje oddziaływanie CH- π . Cząsteczki gości zawierające wyłącznie grupy acetylowe (np. octan bornylowy) także tworzą kompleksy z gospodarzem 17, chociaż w tym przypadku grupy karbonylowe nie tworzą wiązań wodorowych z żadną grupą hydroksylową gospodarza.

Kompleksowanie rezorcynoarenów badane było także w roztworach wodnych [33]. Nieobecność wiązań wodorowych powoduje, że powinowactwo tetrasulfonianu 19 do polarnych gości wydaje się być spowodowane głównie przez oddziaływania hydrofobowe.



19 $R_1 = (CH_2)_2SO_3Na$, $R_2 = H$

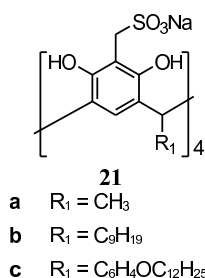
20 $R_1 = (CH_2)_2SO_3Na$, $R_2 = OH$

Powoduje to całkowite odwrócenie selektywności kompleksowania cukrów. W szczególności oddziaływanie CH- π odgrywają ważną rolę w wiązaniu cząsteczek hydrofobowych. Wzmoczone powinowactwo bardziej hydrofilowego rezorcynoarenu 20 do prawie wszystkich badanych substratów jest rezultatem zwiększonej π -elektronowej gęstości elektronowej (zasadowości) gospodarza.

Rezorcynoaren 17 może powodować znaczną selektywność w chemicznym modyfikowaniu cukrów. Glikozydacja rybozy, zwykle prowadzona przez dodanie kwasu solnego lub kwasu siarkowego do mieszaniny cukru i metanolu łatwo przebiega w CCl_4 bez kwasów, gdy obecny jest rezorcynoaren 17. W tej reakcji rezorcynoaren 17 działa jako kwasowy katalizator oraz stabilizator polarnych stanów przejściowych, powodując selektywne powstawanie β -anomeru. Wskazuje to, że część cząsteczki cukru jest silnie wiązana przez gospodarza 17, co zapobiega atakowi metanolu od strony α . Kompleksy gospodarza 17 z chiralnymi gośćmi wykazują indukowany dichroizm kołowy (DK) z efektem rozszczepienia Cottona, w którym sygnał bezpośrednio związany jest z chiralnością gospodarza. Ponieważ cząsteczka gospodarza 17 nie jest chiralna ale posiada układy chromoforowe, natomiast cząsteczka gościa jest chiralna a nie posiada układów chromoforowych, tworzony przez nie kompleks wykazuje dichroizm kołowy łącząc wzbudzenie arylowych pierścieni z asymetrycznym oddziaływaniem chiralnych gości. Oznacza to, że cząsteczka gospodarza 17 może być użyta jako supramolekularna sonda do stereochemicznych oddziaływań z chiralnymi gośćmi, np. cukrami i steroidami [34]. Gospodarz 17 kompleksuje N-metylo- i N-oktylglukopiranozyd poprzez wiązanie wodorowe w niepolarnych rozpuszczalnikach. W przypadku pochodnej metylowej, w $CHCl_3$ tworzy się kompleks o stechiometrii 2:1 gospodarz : gość ze znaczną selektywnością β/α . N-oktylglukozyd jest kompleksowany przez rezorcynoaren 17 dając kompleks gość - gospodarz o stechiometrii 1:4 z niską anomeryczną selektywnością. Cztery cząsteczki gościa wiązane są przez cząsteczkę gospodarza z wysoką kooperatywnością, która wynika z dodatkowego wewnątrzcząsteczkowego wiązania pomiędzy grupami 5- CH_2OH i 2-OH sąsiednich cząsteczek glukozydowych. Systemy detekcyjne, składające się z monowarstwy gospodarza 17 na podłożu stałym, np. SnO_2 lub Au, można użyć do stereoselektywnego kompleksowania cukrów. W przypadku elektrochemicznej detekcji osiągnięto wysoką czułość; rybozę można

wykryć nawet w stężeniach 4.2×10^{-5} M w wodzie. Selektyność wykrywania rybozy takimi detektorami względem innych cukrów różni się jednak od obserwowanej w CCl_4 . Fukoza, która jest chętnie ekstrahowana w CCl_4 jest tylko słabo wykrywalna, podczas gdy cukry, które nie są ekstrahowane w CCl_4 , jak galaktoza i arabinoza mają znaczne powinowactwo do takiego sensora.

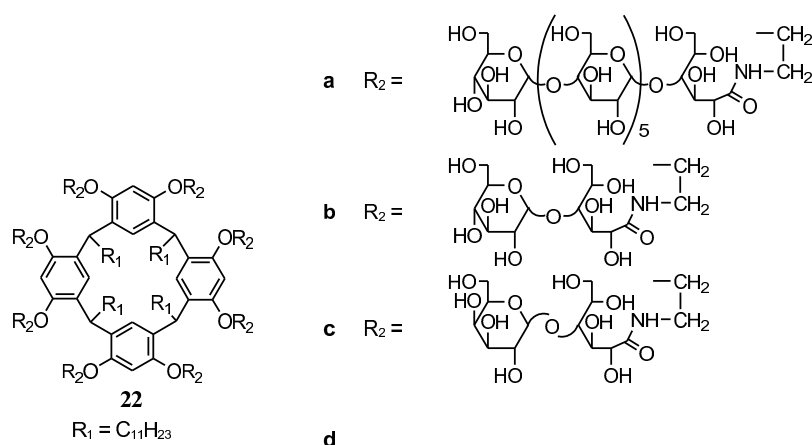
Wzajemne oddziaływanie aminokwasów i rezorcynoarenów badano w środowisku wodnym. Aminokwasy mające polarne łańcuchy nie wykazują powinowactwa do rezorcynoarenów 19 i 20. Tylko bardziej hydrofobowe aminokwasy, mające alifatyczne lub aromatyczne podstawniki, są kompleksowane ze stałą równowagi rzędu 70 M^{-1} . Jak w poprzednim przypadku, kompleksowanie jest rezultatem hydrofobowych efektów oraz oddziaływań typu $\text{CH} \cdots \pi$. Kwasy dikarboksylowe mogą formować kompleksy z rezorcynoarenem 17 w CDCl_3 poprzez dwa wiązania wodorowe. Energia wiązania silnie zależy od odległości pomiędzy dwoma karboksylowymi końcami cząsteczki, podkreślając tym pierścieniową strukturę gospodarza [35]. Kwas glutarowy mający trzy grupy $-\text{CH}_2-$ pomiędzy grupami karboksylowymi jest najsilniej wiązany ($K = 1.2 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$). Selektyność względem kwasu pimelinowego mającego pięć grup $-\text{CH}_2-$ jest wysoka - $K_{\text{glutarowy}}/K_{\text{pimelinowy}} = 105$. Opisano także kompleksy rezorcynoarenów 17 z trietyloaminą i [2.2.2]kryptandem. Przy pomocy metod konduktometrycznych określono stechiometrię powstających kompleksów na 1:3.



Interesujące kompleksy typu gość - gospodarz z aminokwasami tworzy rezorcynoarenem 21 [36]. Pochodne te dobrze rozpuszczają się w rozpuszczalnikach polarnych takich jak woda, DMSO i gliceryna, co spowodowane jest to obecnością wysoce hydrofilowych grup w górnej obręczy rezorcynoarenu. Analiza widm $^1\text{H-NMR}$ wskazuje, że kompleksy te mają stechiometrię 1:1. Hydrofobowy pierścień np. L-prolina jest inkludowany wewnątrz wnęki, natomiast hydrofilowa grupa aminowa i karboksylowa zwrócone są ku hydrofilowym grupom górnej obręczy rezorcynoarenu 21a. Podobnie kompleksują D,L-feniloalanina i L-tryptofan, które także mają duże aromatyczne podstawniki. Aromatyczne wnęki rezorcynoarenów są zdolne do kompleksowania tetraedrycznych jonów amoniowych

i ten typ oddziaływań jest charakterystyczny dla kompleksów gość - gospodarz w przypadku L-argininy i L-lizyny. Innaczej jest w przypadku mniej hydrofilowych aminokwasów np. L-kwasu asparaginowego, L-asparaginy, L-kwasu glutaminowego i L-treoniny. Ponieważ aminokwasy te nie posiadają ani dużych hydrofobowych grup ani tetraedrycznych grup amonowych mogą one tylko słabo oddziaływać z polarnymi grupy górnej obręczy. Oddziaływania ten nie są jednak wystarczające do formowania dobrze zdefiniowanych kompleksów.

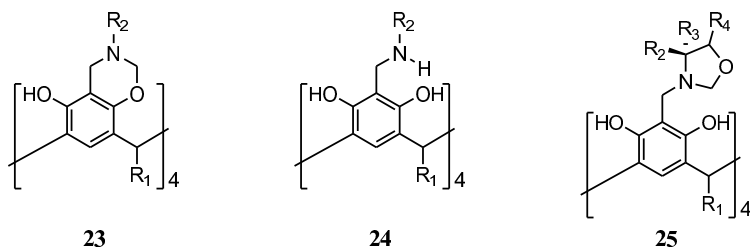
Pochodne rezorcynoarenów były także wykorzystywane do kompleksowania DNA i RNA. Rezorcynoaren 22 otrzymano w reakcji oktaaminowej pochodnej rezorcynoarenu z laktonami maltooligocukrów zawierającymi jednostki glukozowe. [37].



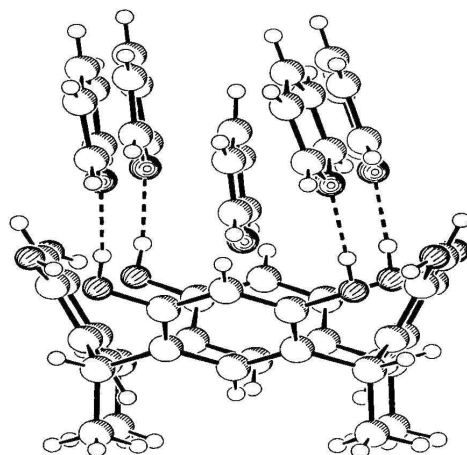
Kompleksowanie DNA przez rezorcynoareny 22a-c badane było przy pomocy elektroforezy i chromatografii żelowej. Zwinięte, zamknięto-koliste oraz otwarto-koliste formy plasmidu (odpowiednio I, II i III) DNA pBR322 (4361 par zasad) wykazują bardzo słabą mobilność na żelu w obecności rezorcynoarenu 22a z długimi grupami funkcyjnymi już przy stężeniu 20 μ M. Odpowiednik z krótszymi grupami funkcyjnymi, rezorcynoaren 22b przy większym stężeniu (>10 mM) jest równie skuteczny w unieruchomianiu pBR322. Efektywne maskowanie ładunku DNA przez klastry sacharydów jest więc znaczne. Oddziaływania liniowych fragmentów (CT) DNA (500-2000 par zasad) z grasic cięłat oszacowany został przy pomocy widmo CD dla CT. Pomiary te jasno wskazują na stechiometryczne oddziaływania grup funkcyjnych rezorcynoarenu 22 z parami zasad DNA nawet w zakresie mikromolowych stężeń. Ogólnie, rezorcynoareny funkcjonalizowane podstawnikami o dłuższym łańcuchu oddziałują bardziej efektywnie z DNA. Ponieważ większość układów biologicznych z terminalnymi resztami cukrowymi odgrywają decydującą

rolę w rozpoznawaniu komórkowych, być może takie układy na bazie rezorcynoarenu będą zastosowane jako nośniki specyficznych genów.

Rezorcynoareny mogą tworzyć także kompleksy o innej stechiometrii. Rezorcynoaren 1 może tworzyć kompleksy z pierwszo- i drugorzędowymi aminami np. dietyloaminą, piperydynam, cykloheksyloaminą o stechiometrii zależnej od stężenia użytej aminy. Analiza widm $^1\text{H-NMR}$ wskazuje, że rezorcynoaren oddziałuje z aminami poprzez wiązania wodorowe. Na podstawie wyników badań krystalograficznych oraz wcześniejszych prac ustalono strukturę tych kompleksów. Posługując się zaproponowanym modelem kompleksowania, wyznaczono w kilku temperaturach stałe tworzenia oraz parametry termodynamiczne dla poszczególnych kompleksów. Z pomiarów i z obliczeń ilościowych wynika, że w przypadku amin pierwszorzędowych dominują kompleksy o stechiometrii 1:2 ale tworzą się również kompleksy o stechiometrii 1:4. W przypadku amin drugorzędowych dominuje kompleks o stechiometrii 1:2. Optycznie czynne pochodne rezorcynoarenów np. 23, 24 i 25 przejawiają chiralną dyskryminację w oddziaływaniach z enancjomerami amin: fenyloetyloaminą i cykloheksyloetyloaminą.

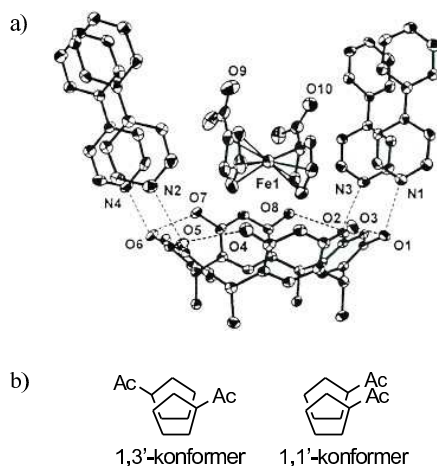


Charakter tych oddziaływań i struktura kompleksów jest podobna jak w kompleksach rezorcynoarenu 1 z aminami alifatycznymi. Chiralne różnicowanie optycznie czynnych amin przez rezorcynoareny 23-25 tych okazały się niewielkie. Maksymalne wartości chiralnej dyskryminacji są rzędu 20-30%. Spowodowane jest to prawdopodobnie oddziaływaniem amin z zewnętrzną powierzchnią rezorcynoarenów, gdzie przeszkody steryczne są niewielkie. Rezorcynoareny mogą tworzyć interesujące kompleksy także w drugiej sferze koordynacyjnej [38]. Rezorcynoaren 1 chętnie tworzy kompleks z pirydyną (Rysunek 17) [39].



Rysunek 17. Struktura krystalograficzna kompleksu rezorcynoarenu 1 z pirydyną. Linie przerywane symbolizują wiązania wodorowe.

W kompleksie tym ponad górną obręczą rezorcynoarenu znajdują się cztery cząsteczki pirydyny, tworząc wiązania wodorowe $\text{OH}\cdots\text{N}$ z dwoma naprzeciwległymi pierścieniami rezorcynowymi. Taka wieloskładnikowa supramolekuła gospodarza inkluduje w swej wnęce bez udziału wiązań wodorowych piątą cząsteczkę pirydyny. Wnęka rezorcynoarenu 1 może być jeszcze bardziej pogłębiona, oddziałując poprzez wiązania wodorowe $\text{OH}\cdots\text{N}$ z czterema stożkowo ustawionymi cząsteczkami 4,4'-bipirydny (Rysunek 18) [1]. Utworzona w ten sposób przez pięć cząsteczek 4,4'-bipirydny wnęka jest giętka i może przyjmować formę indukowaną przez matrycującą cząsteczkę gościa, może także przyjmować inne cząsteczki gości przez konformacyjną reorganizację szkieletu. Taka pogłębiona wnęka rezorcynoarenu może tworzyć kompleksy drugiej sfery koordynacyjnej, np. z ferrocenem i jego acetylowymi pochodnymi. Inkludowana cząsteczką ferrocenu ułożona jest wewnątrz symetrycznej wnęki tak, że pierścienie 28yklopentadienowi (Cp) leżą w poprzek lustrzanej płaszczyzny rezorcynoarenu. W tym ułożeniu oś „sandwiczowego” kompleksu żelaza $\text{Cp}\cdot\text{Fe}\cdot\text{Cp}$ skierowana jest, w przybliżeniu, równoległe do kierunku wiązań wodorowych w rezorcynoarenie 1. Pierścienie Cp, które przyjmują w przybliżeniu konformację ekliptyczną D_{5h} , oddziałują z wnąką rezorcynoarenu i bipirydynami poprzez oddziaływania typu $\text{CH}\cdots\pi$. Polarna, bogata w π -elektrony wnęka, może kontrolować poprzez drugą sferę koordynacyjną stereochemiczne własności cząsteczki gościa (efekt konformacyjny).

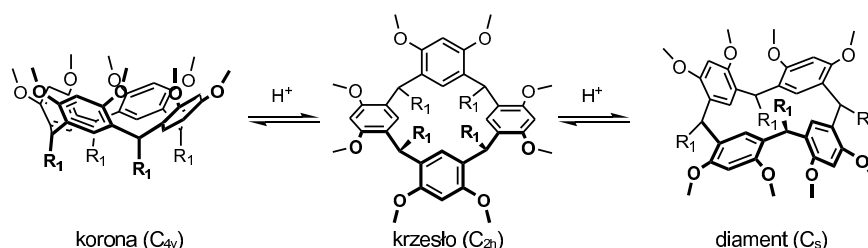


Rysunek 18. a) Krystalograficzna struktura kompleksu 1·4[4,4'-bipirydyna] z biacetylo podstawionym ferroceniem w 1,1'-konformacji b) Schematyczna reprezentacja konformacji biacetylo podstawionych ferrocenów.

Diacetylowa pochodna ferrocenu kompleksowana we wnęce przybiera 1,1'-konformację pierścieni cyklopentadienylowych (Rysunek 18a), podczas gdy 1,3'-konformacja jest charakterystyczna dla struktury wolnej cząsteczki (Rysunek 18b). Bogate elektronowo podstawniki karbonylowe skierowane są na zewnątrz wnęki rezorcynoarenu tak, że znajdują się ponad górną obręczą 1. Podobne kompleksy otrzymał także Atwood, w tym także kompleksy z 1,10-fenantroliną [40], [41].

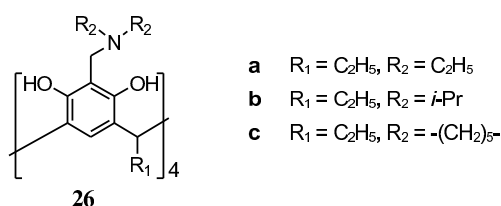
Rezorcynoareny oddziałują także chętnie z kwasami organicznymi. Badania NMR oraz obliczenia kwantowomechaniczne wskazują, że charakter tych oddziaływań jest kooperatywny i allosteryczny. Pod wpływem kwasu organicznego konformer koronowy oktametoksyrezorcynoarenu 10 (OMRA) izomeryzuje w temperaturze pokojowej poprzez konformer krzesłowy do konformeru diamentowego. Obliczenia teoretyczne metodą MM3 [42] wskazują, że proces przemiany konformacyjnej konformeru koronowego 10 przebiega poprzez konformer krzesłowy do konformeru diamentowego (Schemat 2). Z integracji sygnałów protonowych widma $^1\text{H-NMR}$ roztworu OMRA z deuterowanym kwasem trifluorooctowym (CF_3COOD) w CDCl_3 wykonanego po 48 h oszacowano udział poszczególnych konformerów w roztworze na: ok. 40% konformeru koronowego, 50% konformeru diamentowego i ok. 10% konformeru krzesłowego.

Schemat 2



OMRA mogą także oddziaływać z substancjami będącymi silnymi akceptorami elektronów np. tetracyanoetylenem lub tetrachlorobenzochinonem. Różnice w formie i położeniu maksimów pasm kompleksów CT konformerów koronowego i diamentowego rezorcynoarenu 10 z badanymi akceptorami wskazują, że budowa przestrzenna konformerów 10 wpływa na te oddziaływania. Siła tych oddziaływań maleje wraz ze zmniejszaniem się zdolności akceptorowych poszczególnych związków. Wykorzystując metodę Joba stwierdzono, że tworzące się kompleksy badanych konformerów OMRA z akceptorami elektronu w chloroformie wykazują stechiometrię typu 1:1. Obliczenia kwantowomechaniczne wskazują, że kompleksy te powstają dzięki oddziaływaniu $\pi \cdots \pi$ pomiędzy jednym z pierścieni aromatycznych konformeru koronowego lub diamentowego OMRA 10 a cząsteczką akceptora [43].

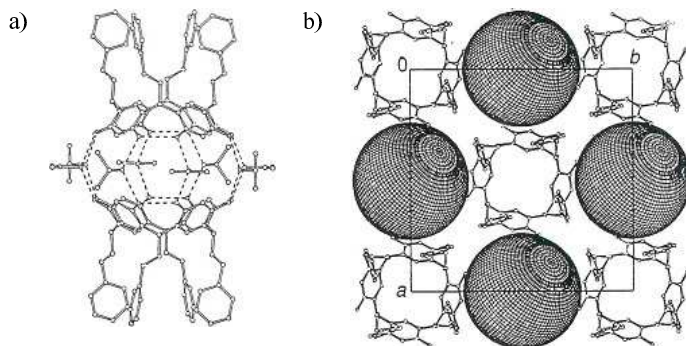
Molekularne rozpoznanie w roztworach przejawia także rezorcynoaren 26. Rezorcynoaren 26c przyjmuje w stanie stałym konformację koronową stabilizowaną przez cztery wiązania wodorowe pomiędzy sąsiednimi grupami hydroksylowymi. Cztery pozostałe grupy hydroksylowe formują cztery wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe z atomami azotów reszty aminometylowych. Taki układ czyni konformację naturalnie chiralną i znacznie powiększa wnękę rezorcynoarenu. Cząsteczka acetonitrylu lub acetaldehydu może być inkludowana wewnątrz z grupą metylową umieszczoną w kierunku π -zasadowej wnęki rezorcynoarenu jako rezultat oddziaływania typu CH- π z pierścieniami rezorcynowymi [44].



Stałą kompleksowania dla rezorcynoarenu 26b oszacowano na mniejsza od 10 M^{-1} zarówno dla acetonitrylu jak i dla acetaldehydu. Jednak widma $^1\text{H-NMR}$ rezorcynoarenu 26b

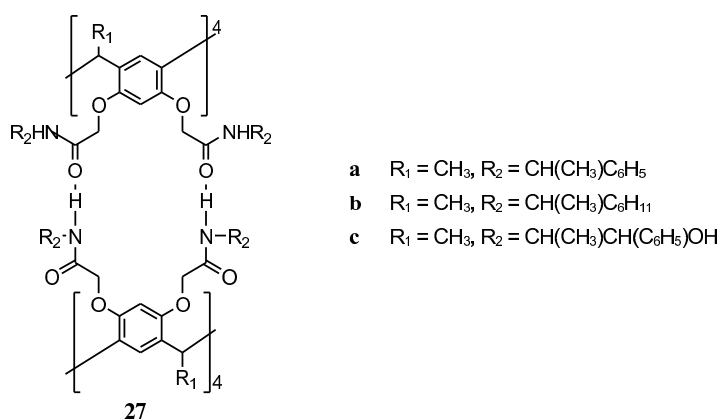
w CDCl_3 w obecności mieszaniny acetonitrylu i acetaldehydu (1:1) wskazują, że kompleks z acetonitrylem jest około dwukrotnie silniejszy niż z acetaldehydem. Nie zaobserwowano natomiast stabilnych kinetycznie kompleksów dla takich cząsteczek gości jak: propionitryl, nitrometan, etanol, *n*-butanol oraz alkohol *t*-butyloowy, co wskazuje, że inkluzja do wewnątrz wnęki jest selektywna ze względu na rozmiar, kształt i właściwości elektrostatyczne cząsteczki gościa. Co ciekawe rezorcynoaren 26a nie tworzy kinetycznie stabilnych kompleksów z acetonitrylem i acetaldehydem pomiędzy 303 a 233K. Wskazuje to na silne steryczne efekty grupy izopropylowej w 26b natomiast większa sztywność konformacyjna pierścieni piperydynowych w rezorcynoarenie 26c powoduje mechaniczną barierę uniemożliwiającą kompleksowania cząsteczek gości. Rezorcynoaren 23 także nie tworzy stabilnych kompleksów z acetonitrylem i acetaldehydem w tych warunkach chociaż w stanie stałym obserwuje się kompleks inkluzyjny o składzie 1:1. Prawdopodobnie dzieje się tak ze względu na giętkość pierścienia benzoksazynowego co niszczy intermolekularną strukturę wnęki.

W 1992 roku Aoyama [45] stwierdził, że rezorcynoareny 1 w obecności β -metyloglukopiranozydów chętnie formują dimery poprzez wiązania wodorowe w apolarnych, organicznych rozpuszczalnikach. Dowody na kapsułowanie cukru i stechiometrię kompleksu gospodarz - gość otrzymano z badań $^1\text{H-NMR}$ oraz pomiarów dichroizmu kołowego. Atwood [46] ustalił strukturę krystalograficzną dimeru, w którym międzycząsteczkowe wiązania wodorowe tworzą się pomiędzy fenolowymi grupami dwóch rezorcynoarenów 1 ($\text{R}_1 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$) a ośmioma cząsteczkami rozpuszczalnika, którym jest 2-propanol (Rysunek 19). W sieci krystalicznej dimery rezorcynoarenowe formują kolumny, pomiędzy którymi rozmieszczone są cząsteczki C_{60} dodane pierwotnie, jako potencjalne cząsteczki matrycowe reakcji dimeryzacji.



Rysunek 19. a) Struktura krystalograficzna kompleksu rezorcynoarenu 1 z ośmioma cząsteczkami 2-propanolu b) Diagram upakowania przestrzennego (pokazano tylko rezorcynoaren i C_{60}) widziany wzdłuż $[001]$, równoległe do dimerów rezorcynoarenowych.

Dimery mogą się formować poprzez wiązania wodorowe pomiędzy grupami innymi niż hydroksylowe. Iwanek [47] opisał dimery powstające w roztworze dzięki wiązaniom wodorowym pomiędzy grupami amidowymi rezorcynoarenów 27, co zostało potwierdzone widniami LSI-MS.



Oprócz dimerów, rezorcynoareny mogą formować także bardziej skomplikowane struktury, jakimi są heksamery [48, 49, 50]. Te dużo większe kapsuły molekularne opisane są nieco dokładniej w poniższym rozdziale..

4. Rezorcynoarenowe kapsuły molekularne

Chemia rezorcynoarenów i ich pochodnych rozwija się obecnie w kilku różnych kierunkach. Jednym z nich jest powiększanie wnęki cząsteczek gospodarzy, bazujących na rezorcynoarenach. Otrzymywane dziś pochodne rezorcynoarenów, mogą kompleksować w swoich wnękach cząsteczki o masie do około 200 g mol⁻¹. Jednak pełne wykorzystanie np. w medycynie lub rolnictwie rezorcynoarenów i ich pochodnych jako układów potencjalnie wolno dozujących substancję czynną wymaga jednak, aby we wnęce mieściły się antybiotyki bądź pestycydy mające masę od 300 do 400 g mol⁻¹ [51]. Zwrócono więc uwagę na duże supramolekularne kompleksy typu gospodarz - gość konstruowane z rezorcynoarenów i ich pochodnych które spełniają ten warunek. Obecnie najlepiej zbadane jest tworzenie dużych heksametrycznych kapsuł molekularnych poprzez spontaniczną asocjację sześciu cząsteczek rezorcynoarenów lub pirogaloarenów [49, 50]. Opisano także kapsuły heteromulti-komponentowych, zawierające rezorcynoareny lub ich pochodne i oddziałujące z innymi organicznymi supramolekularnymi synthonami.

Molekularne kapsuły znalazły już zastosowanie w czystej syntezie chemicznej, medycynie, nowoczesnych materiałach, technikach separacji oraz w biologii [52, 53, 54].

Wewnętrzna przestrzeń molekularnych kapsuł może być także traktowana jako nowa faza materii [55]. Jednak wzajemne oddziaływania cząsteczek gości i gospodarzy oraz wpływ na supramolekularne wnęki środowiska wciąż nie są do końca zbadane [56].

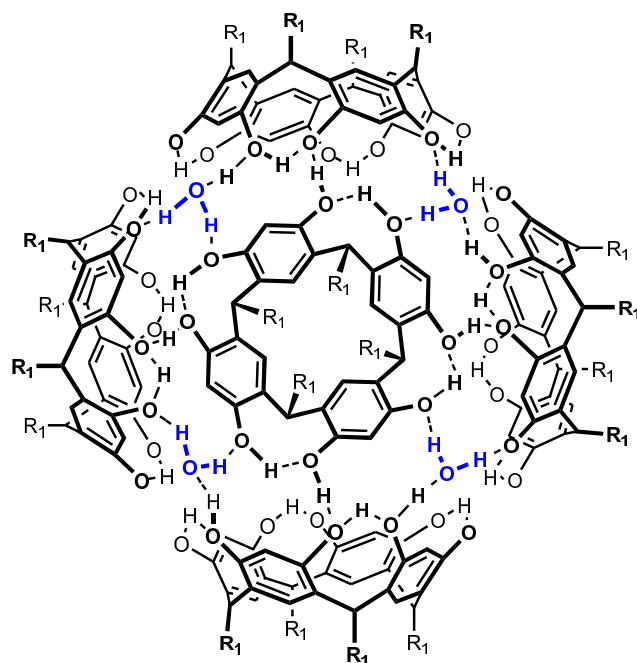
4.1. Heksamery rezorcynoarenowe

Cząsteczki rezorcynoarenu poprzez wielokrotne wiązania wodorowe mogą tworzyć zarówno dimery jak również kapsuły tetrameryczne [57]. Jednak większość opisanych kapsuł supramolekularnych pełniących rolę gospodarza w kompleksach typu gospodarz - gość to układy heksameryczne, powstałe przez samoasocjację rezorcynoarenów i pirogaloarenów. Struktura krystaliczna przedstawiona przez Atwooda [49] pokazuje, że rezorcynoaren 1 ($R_1 = C_{11}H_{23}$) tworzy w ciele stałym heksamer typu $[1_6] \cdot [8H_2O]$. Jest on zbudowany z sześciu cząsteczek rezorcynoarenów rozmieszczonych względem siebie jak ściany sześcianu oraz z ośmiu cząsteczek wody, które zajmują każdy z rogów tego sześcianu (rysunek 22). Utworzona w ten sposób wnęka ma objętości około 1.4 mm^3 i chętnie kompleksuje różne chemiczne indywidua.

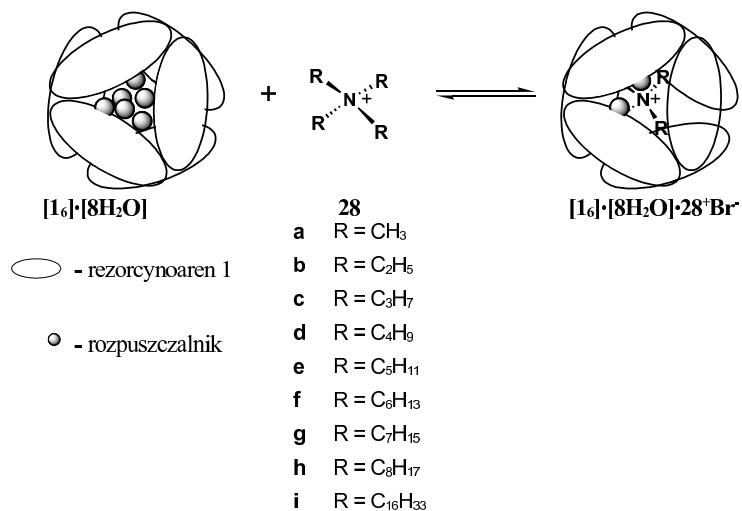
Rebek i Cohen wykazali, że w chloroformie nasycanym wodą rezorcynoaren 1 ($R_1 = C_{11}H_{23}$) spontanicznie tworzy heksamer $[1_6] \cdot [8H_2O]$, w którego wnęcie znajduje się sześć cząsteczek chloroformu [59, 59]. Cząsteczki rozpuszczalnika są więc w stanie indukować powstawanie heksamerycznej wnęki rezorcynoarenowej w roztworze i ją stabilizować poprzez wiązanie wodorowe. Powinowactwo takich sferycznych kapsuł jest jednak znacznie większe do cząsteczki gościa obdarzonego ładunkiem [60]. Dodatek soli tetraalkiloamoniowej, powoduje powstanie nowego heksamerycznego kompleksu $[1_6] \cdot [8H_2O] \cdot 28^+Br^-$, w którym zarówno anion jak i kation dzielą przestrzeń wnęki razem z cząsteczkami rozpuszczalnika (schemat 3) [61]. Pomiedzy gęstością elektronową wnęk rezorcynoarenowych a komplementarnym ładunkiem dodatnim soli amoniowych powstają oddziaływania typu π -kation, które lepiej stabilizują złożoną strukturę heksamerycznego kapsuły niż wiązania wodorowe pomiędzy chloroformem a grupami hydroksylowymi rezorcynoarenu. Powolna w skali czasu NMR wymiana zarówno kationu jaki cząsteczek chloroformu pozwoliła ustalić, że w zależności od rozmiaru kationu zmienia się ilość współkompleksowanych we wnęcie cząsteczek chloroformu. Bromki tetrapropyloamoniowy i tetrabutylamoniowy dzielą wnękę z trzema cząsteczkami $CHCl_3$, bromki tetrapentyloamoniowy i tetraheksyloamoniowy dzielą wnękę z dwoma cząsteczkami $CHCl_3$ a bomki tetraheptyloamoniowy i tetraoctyloamoniowy zostawiają przestrzeni we wnęcie zaledwie na jedną cząsteczkę $CHCl_3$. Indukowane przesunięcie sygnałów cząsteczek chloroformu kompleksowanych we wnęcie nie zależy jednak od rozmiaru współkapsulowanego kationu tetraalkiloamoniowego i wynosi około -3.0 ppm . Wskazuje to

na dłuższą średnią odległość pomiędzy cząsteczkami chloroformu a ekranującymi pierścieniami rezorcynowymi w porównaniu do ściślej spakowanych diemerycznych kapsuł ($\Delta\delta = -4.3$ ppm) [62].

Rysunek 20



Schemat 3



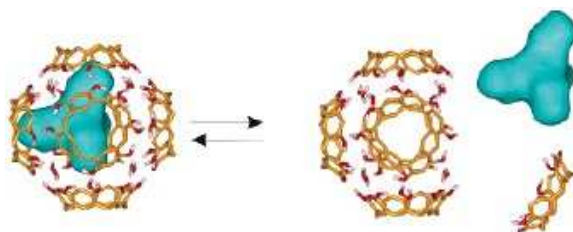
Dla większości kapsularnych systemów w roztworze, cząsteczki gościa zajmują około 55% dostępnej przestrzeni wnęki. Miarą wypełnienia wnęki jest tak zwany *współczynnik upakowania* (packing coefficient - PC) [63]. Dla rezorcynoarenowego heksameru wypełnionego tylko cząsteczkami chloroformu współczynnik PC wynosi 0.33. Po zainkludowaniu cząsteczki kationu amoniowego $28c^+Br^-$, połączonej z jednoczesnym uwolnieniem trzech cząsteczek chloroformu współczynnik PC wzrasta do 0.48, ale stabilność heksamerycznej wnęki zmniejsza się. Porównywalne wartości współczynnika upakowania PC wyznaczono dla kompleksów heksamerycznej wnęki np. z benzenem (0.45) lub 1,2-cyclohexanediolem (0.44) [50]. Jeszcze większy stopień upakowania uzyskano dla kompleksów z polarnymi kationami tropyliowymi, które podobnie jak kationy tetraalkiloamoniowe są zdolne do oddziaływań typu CH- π oraz CT.

Trwałość heksamerycznych kompleksów rezorcynoarenu 1b w roztworze zależy od stężenia czwartorzędowych soli amoniowych. Kompleks o stechiometrii $[1_6] \cdot [8H_2O] \cdot 28c^+Br^-$ współlistnieje z heksameryczną kapsułą rezorcynoarenową wypełnioną tylko cząsteczkami chloroformu oraz z solą tetraalkiloamoniową. Zwiększając stężenie soli (rezorcynoaren $[1]/[28c^+Br^-]=0.5$) obserwuje się zanikanie sygnałów pochodzących od heksamerycznych kapsuł wypełnionych samym chloroformem oraz narastanie sygnałów pochodzących od heksamerycznych kompleksów z kationami czwartorzędowych soli amoniowych wewnątrz. Dla rezorcynoarenowego heksameru stałe kompleksowania (przy 323K) z kationami amoniowymi $28f^+Br^-$, $28g^+Br^-$ oraz $28h^+Br^-$ wynoszą odpowiednio ~ 1200 , 450 i 150 M^{-1} . Wykres van't Hoffa wskazuje, że proces enkapsulacji dużych tetaalkilamoniowych soli przez heksameryczne kapsuły jest endotermiczny. Dodatnia entropia jest prawdopodobnie rezultatem uwalniania kompleksowanych początkowo we wnęce cząsteczek rozpuszczalnika. Przyrost entropii zmniejsza się wraz z wydłużaniem się łańcuchów alkilowych kationów amoniowych, co ma prawdopodobnie związek z ich mniejszą ruchliwością a także ewentualnym wyginaniem się łańcucha. Endotermiczny efekt odzwierciedla także słabsze oddziaływanie typu gospodarz - gość z mniejszymi cząsteczkami gościa. Dla czterokrotnie większego stężenia rezorcynoarenu 1b w stosunku do soli amoniowej $28c$ ($1b/[28c^+Br^-] = 0.25$) obserwuje się już inne sygnały wskazujące, że monomeryczny rezorcynoaren 1 tworzy poprzez wiązania wodorowe kompleks z jonem bromkowym. Wskazuje to, że przyczyną rozpadu heksamerycznej kapsuły kompleksu jest konkurencyjne oddziaływanie grup hydroksylowych rezorcynoarenu a anionami. Potwierdza to także fakt, że heksameryczne kapsuła kompleksu rezorcynoarenu 1 z $28d^+I^-$ i $28d^+BF_4^-$ są bardziej stabilne w obecności nadmiaru soli niż kompleks z odpowiednim bromkiem. Kationy tetraalkiloamoniowe podobnie jak cząsteczki chloroformu mogą być wyparte z wnęki rezorcynoarenowego heksameru przez lepiej pasującą do wnęki cząsteczkę gościa. Pomiar

elektrochemiczne wykazały, że bis(cyclopentadienyl)kobalt(III) (Cob^+) dobrze współzawodniczy z kationami tetraalkiloamoniowymi o wewnętrzną przestrzeń heksamery ale preferencje wnętrza do określonego kationu silnie zależą od natury elektrolitów używanych w pomiarach [64].

Struktury krystaliczne oraz obliczenia mechaniką molekularną pokazują, że uwalnianie cząsteczki gościa (w tym i dużych objętościowo rozpuszczalników) bez naruszenia któregośkolwiek z sieci wiązań wodorowych jest mało prawdopodobne. Etapem limitującym szybkość wymiany musi więc być powstawanie odpowiedniego portalu przez który ta wymiana będzie możliwa. Prawdopodobnie więc następuje rozerwanie kapsuły i dysocjacja co najmniej jednej cząsteczki rezorcynoarenu tworzącego heksameryczną kapsułę (rysunek 23). Inny mechanizm zakłada, że następuje tylko częściowa dysocjacja jednej cząsteczki rezorcynoarenu a nie zerwane wiązania wodorowe działają jak zawiasy. Pierwszy z tych mechanizmów jest faworyzowany statystycznie (jest sześć możliwości utworzenia pentameru) natomiast drugi mechanizm jest korzystniejszy ze względów energetycznych (mniejsza ilość zerwanych wiązań wodorowych) ale ostateczny mechanizm tworzenia portalu w rezorcynoarenowym heksamerze nie jest jeszcze dokładnie zbadany.

Rysunek 21



Heksameryczna wnęka rezorcynoarenowa jest na tyle trwała, że może wymuszać na kapsułowanych cząsteczkach określone zmiany w ułożeniu. Grupy alkilowe soli amoniowych adoptują się do wnętrza heksamery odpowiednio się wyginając. Przesunięcie chemiczne protonu metylowego na widmie $^1\text{H-NMR}$ w stronę wyższych pól magnetycznych dla wszystkich tetraalkiloamoniowych kationów rośnie wraz ze wzrostem długości łańcucha alkilowego od podstawnika propylowego do heksylowego. Kompleksowane w kapsule kationy 28c-f^+ przyjmują konformację rozłożoną (wydłużoną). Dla kationów tetraheptyloamoniowego 28g^+ oraz tetroctyloamoniowego 28h^+ największe, w stronę wyższego pola magnetycznego przesunięcie sygnału protonowego obserwuje się dla czwartej grupy metylowej (licząc od atomu azotu) a grupa metylowa jest ekranowana w znacznie mniejszym stopniu. Protony trzeciej i piątej grupy metylenowej nabierają cech diasterotopowych wskazując na zagięcie łańcuchów heptylowych i octylowych.

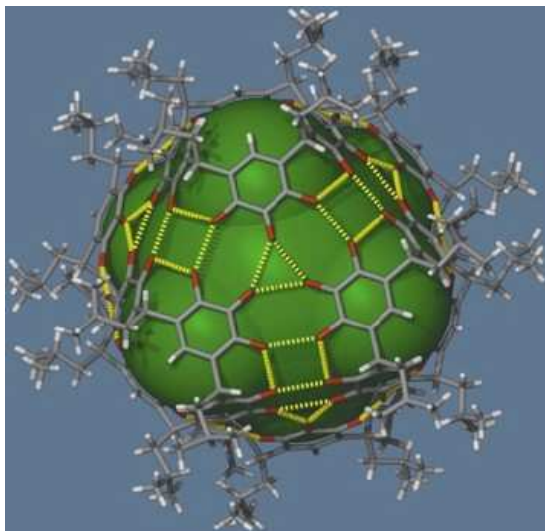
Przeprowadzone obliczenia metodą mechaniki molekularnej potwierdzają, że zakrzywienie dłuższych alkilowych łańcuchów kationu dopasowującego się do wnęki heksamery następuje przy czwartej grupie metylenowej. Prawdopodobnie dwie konformacje typu *gauche* pomiędzy 3-4 oraz 4-5 atomem węgla w łańcuchu alkilowym odpowiadają za różnice w przesunięciu chemicznym diasterotopowych wodorów grup metylenowych [65].

Możliwości kompleksotwórcze heksamerycznych wnęk rezorcynoarenowych nie ograniczają się do kompleksowania cząsteczek rozpuszczalnika i soli tetraalkiloamoniowych, aczkolwiek obecnie są one najlepiej zbadane. W heksamerycznej wnęce utworzonej przez cząsteczki rezorcynoarenu 1b mogą być kompleksowane np. cząsteczki bromu tetrafenyloantymonowego (Ph_4SbBr) lub bromku tetrabutylantymonowego (Bu_4SbBr). Heksameryczna kapsuła $[\text{I}_6] \cdot [8\text{H}_2\text{O}]$ ($V = 1375 \text{ \AA}^3$) zawierająca już wewnątrz cząsteczkę Bu_4SbBr ($V = 314 \text{ \AA}^3$), jest dalej zdolna do odwracalnego kompleksowania nie tylko rozpuszczalnika ale i innych cząsteczek gości. Współkompleksowane mogą być cząsteczki związków taki jak: etylbenzen, *p*-ksylen, propylobenzen, amylobenzen, nitrobenzen, 4-nitrotoluen, 2,6-dinitrotoluen, naftelen, bifenył, antracen czy azulen. Nie obserwuje się jednak kompleksowania tych związków w przypadku nieobecności Bu_4SbBr . Wskazuje to, że w tym przypadku cząsteczka głównego gościa indukuje współkompleksowanie oraz określa właściwości wnęki. Mniej polarne cząsteczki gości np. Bu_4Si i Bu_4Ge także nie powodują powstawania heksamerycznych kompleksów [66]. Najdłuższą cząsteczką gościa współkompleksowaną z Bu_4SbBr okazał się 4-fenyltoluen, podczas gdy nieco dłuższy 4,4'-dimetylbifenył nie jest już kapsułowany w tych warunkach. Kaifer pokazał, że rezorcynoaren 1 formuje heksameryczną kapsułę z kationem kobaltocenowym (Cob^+) ale już nie z ferrocenem [67]. Wyniki te wskazują, że rozmiar i kształt cząsteczki gościa mają wpływ na kompleksowanie wewnątrz kapsuły heksamery ale istotna jest także ich polarność.

4.3. Heksamery pirogaloarenowe

Pirogaloaren 2, podobnie jak rezorcynoaren 1, może tworzyć heksameryczne kapsuły molekularne. Mattay i Iwanek jako pierwsi zauważyli, że podczas katalizowanej kwasem kondensacji pirogalolu i aldehydu izowalerianowego, prowadzącej do tetramerycznego makrocyklu, powstawać mogą także sferyczne układy heksameryczne [49]. Struktura krystaliczna takiego heksamery składa się z sześciu cząsteczek pirogaloarenu związanych ze sobą przez 48 międzycząsteczkowych wiązań wodorowych, po osiem wiązań na cząsteczkę (Rysunek 22) [49, 68]. Dzięki sieci wiązań wodorowych można więc otrzymać heksameryczne wnęki o objętości $1200\text{--}1510 \text{ \AA}^3$ które okazały się stabilne w rozpuszczalnikach o bardzo różnej polarności.

Rysunek 22



Podczas standartowej syntezy z pirogaloarenu powstają wyłącznie monomery makrocylu. Konwersja do heksamerycznej kapsuły następuje przez rozpuszczenie pirogaloarenu w metanolu (Et_2O , acetonie) z kilkoma kroplami nitrobenzenu lub *o*-dichlorobenzenu i krystalizacji połączonej z powolnym odparowaniem rozpuszczalnika. Heksamer powstaje z wydajnością 1-5%, a strukturę heksameru potwierdzają widma NMR. Wyniki tych badań wskazują ponadto, że we wnętrzu kapsuły znajduje się około 18 cząsteczek metanolu. Wewnętrzna objętość takiej struktury, otrzymana z badań krystalograficznych pokazuje, że przestrzeń ta jest wystarczająca dla około 23 cząsteczek metanolu co wskazuje na wysoką wartość współczynnika PC. Metanol kapsułowany wewnątrz heksameru może być usunięty przez próżnię ale nie obserwuje się wymiany cząsteczek metanolu pomiędzy heksameryczną wnęką a masą rozpuszczalnika. Heksamer utworzony z cząsteczek pirogaloarenów jest więc znacznie bardziej stabilny niż heksamer utworzony z rezorcynoarenów, który łatwo wymieniał kapsułowane cząsteczki rozpuszczalnika [69].

Wpływ grupy R_1 znajdującej się przy dolnej obręczy na otrzymywanie heksamerów pirogaloarenowych wydaje się niewielki. Przy pomocy opisanych procedur otrzymano stabilne pirogaloarenowe heksamery dla R_1 = od *n*-propylem do *n*-tridecylem, podczas gdy dla R_1 = CH_3 i C_2H_5 nie ma dowodów na istnienie heksamerów. Rozpuszczalność pirogaloarenowych heksamerów jest niska w apolarnych rozpuszczalnikach a także wtedy, gdy grupa alkilowa jest krótka (t.j. C_3 , C_4) lub zbyt długa (t.j. C_{10} , C_{13}). Dlatego dobór grupy R_1 jest istotny ze względów praktycznych. Zarówno struktura krystaliczna jak i badania w roztworach pokazują, że heksamery pirogaloarenowe nie wymagają wody do utworzenia samoasocjujących heksamerycznych kapsuły. Jest to istotna różnica pomiędzy

pirogaloarenowym heksamerem a rezorcynoarenowym heksamerem w którego strukturze znajdują się cząsteczki wody. Pirogaloaren może, jak się okazało, formować kapsuły w wysoce niepolarnych rozpuszczalnikach takich jak alifatyczne węglowodory [70]. Po ogrzaniu amfifilowy pirogaloaren 2 ($R_1 = C_{11}H_{23}$) jest rozpuszczalny w *n*-octanie. W temperaturze pokojowej na widmie 1H -NMR widać przesunięte w stronę pola o mniejszym natężeniu trzy sygnały protonów fenolowych pirogaloarenu 2 wskazując na trzy odmienne otoczenia chemiczne dla tych hydroksyli. Z integracji sygnałów, wykazujących przesunięcia chemiczne w stronę silniejszych pól magnetycznych, co jest cechą charakterystyczną dla kapsułowanych cząsteczek wynika, że około pięciu cząsteczek *n*-octanu znajduje się we wnętrzu heksameru. Widma NMR wskazują także, że w cząsteczkach enkapsulowanych gości, pomiędzy węglami C2 a C3 zachodzi powolna rotacja. Heksameryczna wnęka pirogaloarenowa kapsuluje dość dużą gamę ciekłych *n*-alkanaów (C_5H_{12} - $C_{20}H_{42}$).

Heksameryczne kapsuły otrzymane z pirogaloarenów, podobnie jak heksamery rezorcynoarenowe, chętnie kompleksują w swoim wnętrzu cząsteczki chloroformu [71]. Z integracji sygnałów 1H -NMR wynika, że wewnątrz kapsuły znajduje się 6-7 cząsteczek chloroformu. Cohen [72] zaobserwował, że sygnał ten wyglądał jak multiplet ale dokładne badania technikami NMR wykazały obecność serii blisko siebie położonych singletów co wskazuje, że cząsteczki chloroformu znajdujące się we wnętrzu mają nieco inne otoczenie chemiczne. Potwierdza to także analiza widm ^{13}C -NMR, które okazały się „czułe” na proces agregacji. Zamiast spodziewanych czterech sygnałów regionu aromatycznego na widmie heksamerycznej kapsuły utworzonej z pirogaloarenu 2 ($R_1 = C_{11}H_{23}$) widać sześć sygnałów co pokazuje, że w utworzonym heksamerze nie wszystkie aromatyczne atomy węgla są chemicznie równoważne. W roztworze $CDCl_3/CD_3OD$ (70/30 v/v), w którym przeważa monomeryczna forma pirogaloarenu 2, widoczne są tylko cztery sygnały. Gdy do chloroformowego roztworu 2 o stężeniu 27 mM doda się około 200 ekwiwalentów CD_3OD piki pochodzące od enkapsulowanych cząsteczek chloroformu zanikają. Prawdopodobnie wiązania wodorowe są niszczone i heksamer rozpada się na monomery i kompleksowany chloroform jest uwalniany. W przypadku heksamerów z rezorcynoarenu 1 potrzeba znacznie mniej CD_3OD aby rozerwać wiązania wodorowe. Zbadano i porównano także współczynniki wymiany dla różnych cząsteczek rozpuszczalników w heksamerycznych pirogaloarenowych oraz rezorcynoarenowych. Pomiary przeprowadzono dla par rozpuszczalników: $CDCl_3/CHCl_3$, C_6D_6/C_6H_6 i C_6D_{12}/C_6H_{12} . Stałe wymiany były rzędu minut dla chloroformu, godzin dla benzeny i dni dla cykloheksanu. Okazało się, że cykloheksan ma większe powinowactwo do wnętrza pirogaloarenowej niż benzen, przeciwny trend zaobserwowano dla heksameru rezorcynoarenowego. Nie zaobserwowano jednak znacznych różnic we współczynnikach wymiany dla tych rozpuszczalników pomiędzy heksamerami pirogaloarenowymi

a rezorcynoarenowymi. Interesujące, że nie obserwuje się w układzie benzen/chloroform zjawiska wypierania z wnęki „gorszego” gościa i tworzenia kompleksy tylko z jednym, lepiej dopasowanym pod względem kształtu i wielkości ładunku elektronowego gościem, jak to ma miejsce w przypadku soli tetraalkiloamoniowych.

Pirogaloarenowe heksamery wykazują także stabilność w bardzo polarnych roztworach. Obecność czterech dodatkowych grupy hydroksylowych w pirogalowym makrocyklu zwiększa prawdopodobnie zdolności do samoasocjacji poprzez sieć wiązań wodorowe na tyle, że oddziaływania te stają się konkurencyjne do oddziaływań grup hydroksylowych pirogaloarenów z polarnymi protycznymi rozpuszczalnikami. do limitu rozpuszczalności. Miareczkowanie chloroformowego roztwór pirogaloarenu przy pomocy DMSO-d₆ pokazuje się heksameryczna kapsuła jest stabilna nawet przy stukrotnym nadmiarze DMSO-d₆. W tym przypadku pirogaloarenowe są znacznie trwalsze niż kapsuły formowane z rezorcynoarenów. Pirogaloarenowy heksamer jest stabilny w mieszaninie acetonu z wodą.

Podobnie jak w przypadku heksamerów rezorcynoarenowych heksamery powstałe z pirogaloarenów mogą kompleksować we wnęcie różne cząsteczki gości. Badano między innymi właściwości elektrochemiczne kompleksowanych w heksamerach centrów redoks w ferrocenie oraz kompleksie bis(cyclopentadienyl)cobaltu(III) [50,73].

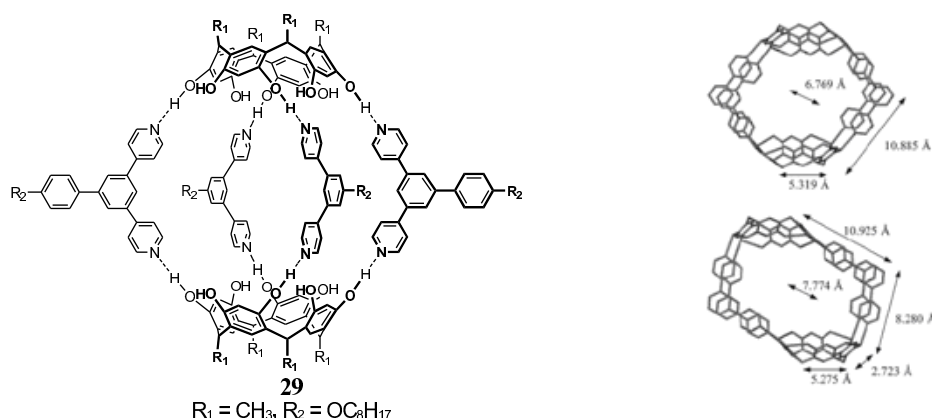
Proces samoasocjacji pomiędzy cząsteczkami pirogaloarenów a także rezorcynoarenów prowadzący do utworzenia heksamerycznych kapsuł poprzedza proces samorozpoznania. Gdy w chloroformie zmiesza się dwa makrocykle różnych typów (pirogaloarenowe i rezorcynoarenowe) heteroheksameryczne wnęki nie utworzą się. Tworzą się tylko kapsuły zbudowane z tych samych pirogaloarenowych lub rezorcynoarenowych makrocykli. Jednakże, gdy zmiesza się dwa różne pirogaloareny np. 2 ($R_1 = C_{11}H_{23}$) i 2 ($R_1 = \text{izobutył}$) to po pewnym czasie tworzą się heteroheksamery. Podobne zjawisko obserwuje się także dla rezorcynoarenów.

Kapsuły pirogaloarenowe i rezorcynoarenowe znacznie różnią się powinowactwem do różnych cząsteczek gości pomimo podobnej struktury. Kapsuły pirogaloarenowe kompleksują tylko obojętne czwartorzędowe alkiloaminy podczas gdy kapsuły rezorcynoarenowe kompleksują zarówno czwartorzędowe alkiloaminy jak i sole amoniowe. Dla heksamerów pirogaloarenowych protonowanie trzeciorzędowych amin powoduje wypchnięcie cząsteczki gości z kapsuły [74]. Wszystkie te obserwacje wskazują, że jedna dodatkowa grupa OH w pirogalolu w stosunku do rezorcynoarenu ma znaczny wpływ na strukturę oraz właściwości formowanych przez heksameryczne kapsuły kompleksów.

4.4. Inne układy supramolekularne

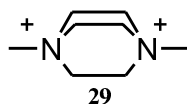
Rezorcynoareny poprzez wiązania wodorowe mogą także tworzyć struktury hetromultikomponentowe [75] – rysunek 25. Tworzą się one przez ogrzewanie np. rezorcynoarenu i pochodnej 1,3-dipirydynobenzenu w roztworze toluen-etanol lub toluen-eter dietylowy. Widma $^1\text{H-NMR}$ pokazują w CDCl_3 i acetonie skład kompleksu 3:2:1 (toluen/pochodna pirydyny/rezorcynoaren) dla tworzącej się oraz skład 2:2:2:1 (eter dietylowy/toluen/pochodna pirydyny/rezorcynoaren).

Rysunek 25



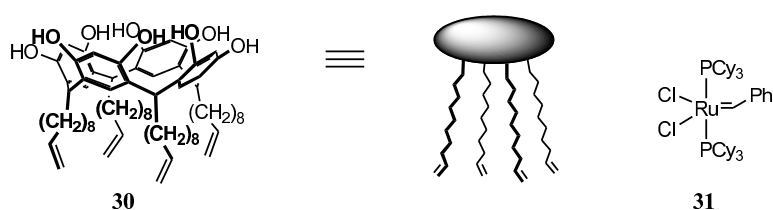
Oddziaływania z rozpuszczalnikiem determinują rozmiar i kształt wnęki. Supramolekuły te mają dużą wewnętrzną przestrzeń zajmowaną przez cztery nieuporządkowane cząsteczki toluenu lub uporządkowane w sieci krystalicznej dwie cząsteczki toluenu i dwie cząsteczki eteru dietylowego.

Inną dziedziną, w której supramolekuły rezorcynoarenowe i pirogaloarenowe znajdują zastosowanie to inżynieria krystaliczna, która bazuje na oddziaływaniach hydrofilowych i hydrofobowych rezorcynoarenowych obryścy ale także na właściwościach cząsteczek gości. Rezorcynoaren **1** ($\text{R}_1 = \text{CH}_3$) z dibromkiem 1,4-dimetylo-1,4-diazabicyclo[2,2,2]octanu **29** jako cząsteczką gościa może, w zależności od warunków krystalizacji tworzyć różne supramolekularne struktury. Rezorcynoaren **1** chętnie tworzy kompleksy o stechiometrii 1:1 które w strukturze krystalicznej zawierają dodatkowo trzy cząsteczki wody.

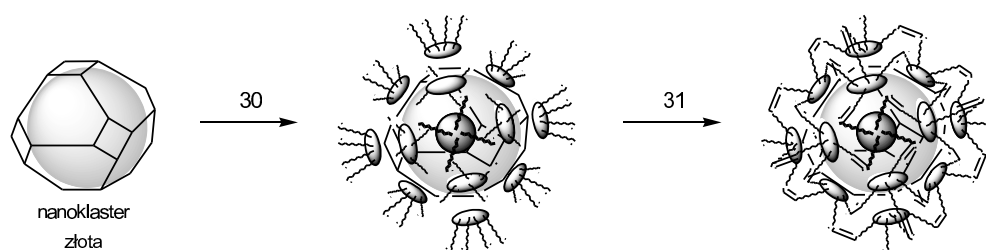


W rozpuszczalnikach takich jak *n*-propanol, 2-propanol i *n*-butanol rezorcynoaren 1 może także tworzyć supramolekularne cylindry w stanie stałym o składzie ($1_3 \cdot 29_4 \cdot 6H_2O$). W sieci krystalicznej powstają półnanoemtrowe niepolarne rurki a ich tworzenie jest templatowane przez cząsteczki odpowiednich pod względem rozmiaru alkoholi. Ta samoasocjacja oparta jest na oddziaływaniach typu $\pi \cdots \pi$ pomiędzy dwoma sąsiednimi cząsteczkami rezorcynoarenu 1 oraz oddziaływaniach typu $CH \cdots \pi$ i kation $\cdots\pi$ pomiędzy rezorcynoarenem 1 a cząsteczką gościa [76]. Niewielka zmiana w składzie rozpuszczalników do krystalizacji (dodatek toluenu) prowadzi całkowicie innej sieci krystalicznej. Powstające kryształy o składzie ($1_3 \cdot 29_4 \cdot 8H_2O$) różnią się od poprzedniej supramolekularnej rurki w kryształcie ilością współkrystalizowanych cząsteczek wody oraz supramolekularnymi oddziaływaniami. W przypadku pirogaloarenów obserwuje się także inne supramolekuły. Pirogaloaren ($R_1 = CH_3$) z 29 tworzy wprawdzie kompleks o stechiometrii 1:1 ale o strukturze krystalicznej innej niż kompleks rezorcynoarenu z 29. Nie obserwuje się także powstawania supramolekularnych rurek w kryształcie. Wszystko to pokazuje niezwykłą czułość supramolekularnych struktur np. na niewielkie zmiany w „klocków budulcowych” czy nawet różnic w warunkach ich powstawania [78].

Inny przykład zastosowania struktur supramolekularnych na bazie rezorcynoarenu to stabilizacja nanocząsteczek złota o wymiarach większych niż 20 nm. Chemisorpcja rezorcynoarenu 1 na powierzchni nanocząstek złota odbywa się najprawdopodobniej za pośrednictwem wielokrotnych oddziaływań typu Au-O, które to oddziaływania są dostatecznie silne do krótkotrwałego zapobiegania zbijania się w większe aglomeraty nanocząsteczek złota. Okazało się jednak, że cząsteczki rezorcynoarenu 30 tworzące na nanoklastkach złota monowarstwę mogą być dodatkowo związane poprzez reakcję metatezy olefin z wykorzystaniem katalizatora rutynowego 31, t trwałą supramolekularna sieć kompleksującą nanocząstkę złota. (Rysunek 23) [79].



Rysunek 23



Znacznie podnosi to odporność zamkniętej nanocząsteczki na desorpcję i indukowaną degradację do aglomeratu. Mechanicznie wzmocniona krzyżowymi wiązaniami powierzchniowa warstwa rezorcynoarenu 30 ma porowatą strukturę, co pozwala na kontakt powierzchni nanocząsteczki z innymi cząsteczkami w roztworze. Nanoklastry chronione monowarstwami mają ogromne możliwości jako materiały funkcjonalne. Ich optyczne lub magnetyczne właściwości mogą znaleźć zastosowanie przy znakowaniu biologicznym, jako sensory chemiczne, katalizatory czy też wreszcie w szeroko rozumianej elektronice.

5. Zakończenie

W zaprezentowanym krótkim przeglądzie staraliśmy się przedstawić aktualne informacje na temat możliwości kompleksotwórczych rezorcynoarenów oraz ich niezmiennie interesującą możliwość samoorganizacji. Potencjalne możliwości zastosowania rezorcynoarenów są ogromne. Ich względnie łatwe modyfikacje chemiczne mogą dostarczać dużej liczby pochodnych o predeterminowanych właściwościach fizykochemicznych. Rezorcynoareny, wykorzystując swoje bogactwo oddziaływań niekowalencyjnych typu: wiązanie wodorowe, wiązanie hydrofobowe, oddziaływania charge-transfer, π -aren-kation, jon-dipol mogą stanowić doskonałe modele enzymów. Dane literaturowe pokazują, że w chwili obecnej obserwujemy przede wszystkim rozwój metod syntezy tej klasy związków. W mniejszym stopniu przekłada się to na wykorzystanie tych związków. Jednak i takie prace można znaleźć w literaturze, np. poprzez zastosowanie rezorcynoarenów do rozdzielania chromatograficznego metodami GC i HPLC [80]; ich różnicowania chiralnego w monowarstwach Langmuira [81] czy też chiralnej dyskryminacji związków optycznie czynnych. O kilku innych potencjalnych zastosowaniach wspomniano również w tej pracy.

Literatura:

1. J. B. Niederl, H. J. Vogiel, *J. Am. Chem. Soc.*, 1940, 62, 2512.
2. P. Timmerman, W. Verboom, D. N. Reinhoudt, *Tetrahedron*, 1996, 52, No 8, 2663.
3. W. Iwanek, *Wiadomości Chemiczne, Biblioteka -Supramolecular Chemistry*, 1997, 143.
4. a) G. Mann, L. Hennig, F. Weinelt, K. Müller, R. Meusinger, G. Zahn, T. Lippmann, *Supramolecular Chemistry*, 1994, 3, 101; b) I. Thondirf, J. Brenn, V. Böhmer, *Tetrahedron*, 1998, 54, 12828.
5. M. Mäkinen, J.-P. Jalkanen, P. Vainiotalo, *Tetrahedron*, 2002, 58, 8591.
6. H.-J. Schneider, D. Güttles, U. Schneider, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1986, 25, 7, 647; *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, 110, 6449.
7. T. Lippmann, H. Wilde, M. Pink, A. Schäfer, M. Hesse, G. Mann, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1993, 32, 8, 1195.
8. K. Murayama, K. Aoki, *Chem. Commun.*, 1998, 607.
9. A. Shivanyuk, K. Rissanen, E. Kolehmainen; *Chem. Commun.*, 2000, 1107.
10. A. Shivanyuk, J. Rebek Jr.; *Chem. Commun.*, 2001, 2374.
11. O. Lukin, V. Pirozhenko, A. N. Shivanyuk, *Tetrahedron Letters*, 1995, 36, No 42, 7725.
12. A. Shivanyuk, E. F. Paulus, K. Rissanen, E. Kolehmainen, V. Böhmer; *Chem. Eur. J.*, 2001, 7, 9, 1944.
13. A. Shivanyuk, E. F. Paulus, V. Böhmer, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1999, 38, 2906.
14. P. D. Beer, M. G. B. Drew, A. Ibbotson, E. L. Title, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1988, 1498.
15. P. D. Beer, A. D. Keefe, M. G. B. Drew, *J. Organomet. Chem.*, 1988, C10, 353.
16. P. D. Beer, A. D. Keefe, A. M. Z. Slawin, D. J. Williams, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1990, 3675.
17. M. C. Letzel, C. Agena, J. Mattay; *Journal of Mass Spectrometry*, 2002, 37, 63.
18. R. G. Cooks, P. S. H. Wong, *Acc. Chem. Res.*, 1998, 379.
19. B. Botta, G. D. Monache, P. Ricciardi, G. Zappia, C. Seri, E. Gacs-Baitz, P. Csokasi, D. Misiti, *Eur. J. Org. Chem.*, 2000, 841.
20. a) S. S. Moore, T. L. Tarnowski, M. Newcomb, D. J. Cram, *J. Am. Chem. Soc.*, 1977, 99, 6398. b) C. J. Chandler, L. W. Dedy, J. A. Reiss, *Aust. J. Chem.*, 1988, 41, 1051.
21. N. Demirel, M. Merdivan, N. Pirinccioglu, C. Hamamci, *Anal. Chim. Acta*, 2003, 485, 213.

22. S. V. Shevchuk, N. V. Rusakova, A. M. Turianskaya, Y.V. Korovin, N. A. Nazarenko, A. I. Gren, Y. E. Shapiro, *Analytical Communications*, 1997, 34, 201.
23. A. F. D. de Namor, J. K. Chaaban, O. E. Piro, E. E. Castellano, *J. Phys. Chem. B*, 2006, 110, 2442.
24. N. Yoshino, A. Satake, Y. Kobuke, *Angew. Chem.*, 2001, 113, 2, 471.
25. Bertil Hille, *Ionic Channels of Excitable Membranes*, 2nd ed., Sinauer, Sunderland, 1992.
26. B. A. Cornell, V. L. B. Braach-Maksvytis, L. G. King, P. D. J. Osman, B. Raguse, L. Wieczorek, R. J. Pace, *Nature*, 1997, 387, 580.
27. E. W. B. Russel, L. B. Weiss, F. I. Navetta, R. E. Koeppe, O. S. Andersen, *Biophys. J.*, 1986, 49, 673.
28. A.K. Jain, V.K. Gupta, L.P. Singh, P. Srivastava, J. R. Raison, *Talanta*, 2005, 65, 716.
29. Y. Aoyama, Y. Tanaka, H. Toi, H. Ogoshi, *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, 110, 634.
30. Y. Kikuchi, Y. Kato, Y. Tanaka, H. Toi, Y. Aoyama, *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, 113, 1349.
31. Y. Aoyama, Y. Tanaka, S. Sugahara, *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, 111, 5397.
32. K. Kobayashi, Y. Asakawa, Y. Kikuchi, H. Toi, Y. Aoyama, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, 115, 2648.
33. K. Kobayashi, Y. Asakawa, Y. Kato, Y. Aoyama, *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, 114, 10307.
34. Y. Kikuchi, K. Kobayashi, Y. Aoyama, *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, 114, 1351.
35. Y. Tanaka, Y. Kato, Y. Aoyama, *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, 112, 2807.
36. E. K. Kazakova, N. A. Makarov, A. U. Ziganshina, L. A. Muslinkina, A. A. Muslinkin, W. D. Habicher, *Tetrahedron Letters*, 2000, 41, 10111.
37. O. Hayashida, A. Matsuo, Y. Aoyama, *Chemistry Letters*, 2001, 272.
38. D. R. Alston, P. R. Ashton, T. H. Lilley, J. F. Stoddart, R. Zarzycki, A. M. Z. Slawin, D. J. Williams, *Carbohydr. Res.*, 1988, 192, 259.
39. W. Iwanek, R. Fröhlich, *Polish J. Chem.*, 1998, 72, 2342.
40. L. R. MacGillivray, H. A. Spinney, J. L. Reid, J. A. Ripmeester, *Chem. Commun.*, 2000, 517.
41. L. R. MacGillivray, J. L. Atwood, *Chem. Commun.*, 1999, 181.
42. L. R. MacGillivray, J. L. Atwood, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, 119, 6931.
43. a) N. L. Allinger, Y. H. Yuh, J. H. Lii, *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, 111, 8551; b) J. H. Lii, N. L. Allinger, *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, 111, 8566.
44. M. Urbaniak, W. Iwanek, *Tetrahedron*, 1999, 55, 14459.

45. D. Falábu, A. Shivanyuk, M. Nissinen, K. Rissanen; *Org. Lett.*, 2002, 4, 18, 3019.
46. Y. Kikuchi, Y. Tanaka, S. Sutarto, K. Kobayashi, H. Toi, Y. Aoyama, *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, 114, 10302.
47. K. N. Rose, L. J. Barbour, G. W. Orr, J. L. Atwood, *Chem. Commun.*, 1998, 407.
48. W. Iwanek, *Tetrahedron: Asymetry*, 1998, 3171.
49. K. Kobayashi, T. Shirasaka, E. Horn, N. Furukawa, *Tetrahedron Letters*, 1999, 40, 8883.
50. L. R. MacGillivray, J. L. Atwood, *Nature*, 1997, 389, 469-472.
51. T. Gerkensmeier, W. Iwanek, C. Agena, R. Fröhlich, S. Kotila, Ch. Näther, J. Mattay, *Eur. J. Org. Chem.*, 1999, 2257.
52. D. M. Rudkevich, J. Rebek, Jr., *Eur. J. Org. Chem.*, 1999, 1991.
53. a) H. Ito, T. Kusukawa, M. Fujita, *Chem. Lett.*, 2000, 598; b) M. Yoshizawa, T. Kusukawa, M. Fujita, K. Yamaguchi, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122, 6311.
54. L. R. MacGillivray, J. L. Atwood, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1999, 38, 1018.
55. T. Douglas, M. Young, *Nature*, 1998, 393, 152.
56. J. C. Sherman, D. J. Cram, *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, 111, 4527.
57. L. R. MacGillivray, P. R. Diamente, J. L. Reid, J. A. Ripmeester, *Chem. Commun.*, 2000, 359.
58. a) T. Martin, U. Obst, J. Rebek, Jr., *Science*, 1998, 281, 1842; b) F. Hof, C. Nuckolls, J. Rebek, Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122, 4251.
59. L. Avram, Y. Cohen; *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 12678–12679; L. Avram, Y. Cohen; *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 15148–15149
60. M. Yamanaka, A. Shivanyuk, J. Rebek Jr.; *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 2939-2943.
61. a) L. Frish, M. O. Vysotsky, S. E. Matthews, V. Böhmer, J. Cohen; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 2002, 88; b) C. A. Schalley; T. Martin, U. Obst, J. Rebek, Jr, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, 121, 2133.
62. A. Shivanyuk, J. Rebek, Jr; *PNAS*, 2001, 98, 14, 7662.
63. A. Shivanyuk, J. Rebek, Jr., *Chem. Commun.*, 2002, 2326.
64. S. Mecozzi, J. Rebek, Jr., *Chem. Eur. J.*, 1998, 4, 1016.
65. I. Philip, A. E. Kaifer, *J. Org. Chem.*, 2005, 70, 1558.
66. L. Trambleu, J. Rebek, Jr., *Science*, 2003, 301, 1219.
67. A. Shivanyuk, J. Rebek Jr.; *Chem. Commun.*, 2001, 2424.
68. I. E. Philip, A. E. Kaifer, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, 124, 12678.
69. G. W. V. Cave, J. Antesberger, L. J. Barbour, R. M. McKinlay, J. L. Atwood, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004, 43, 5263.
70. J. L. Atwood, L. J. Barbour, A. Jerga; *Chem. Commun.*, 2001, 2376.

71. L. C. Palmer, J. Rebek Jr., *Org. Lett.*, 2005, 7, 787.
72. L. Avram, Y. Cohen; *Org. Lett.*, 2003, 5, 1099.
73. L. Avram, Y. Cohen; *Org. Lett.*, 2006, 8, 219.
74. I. Philip, A. E. Kaifer, *J. Org. Chem.*, 2005, 70, 1558.
75. L. Avram, Y. Cohen, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126, 11556.
76. G. W. V. Cave, M. J. Hardie, B. A. Roberts, C. L. Raston, *Eur. J. Org. Chem.*, 2001, 3227.
77. H. Mansikkamäki, M. Nissinen, K. Rissanen, *Chem. Commun.*, 2002, 1902.
78. H. Mansikkamäki, S. Busi, M. Nissinen, A. Åhman, K. Rissanen, *Chem. Eur. J.*, 2006, 12, 4289.
79. S. V. Pusztay, A. Wei, K. B. Stavens, R. P. Andres, *Supramolecular Chemistry*, 2002, 14, (2-3), 291.
80. A. Ruderisch, W. Iwanek, J. Pfeiffer, G. Fischer, K. Albert, V. Schurig, *J Chromat. A.*, 2005, 1095, 40; b) J. Pfeiffer, V. Schurig, *J.Chromat. A.*, 1999, 840, 145.
81. P. Prus, M. Pietraszkiewicz, R. Bilewicz, *Materials Science and Engineering C*, 2001, 18Z, 157.

Rozdział 5

Kwasy aryloboronowe jako receptory cukrów

Andrzej Sporzyński, Anna Żubrowska

Politechnika Warszawska, Wydział Chemiczny, Zakład Chemii Fizycznej,

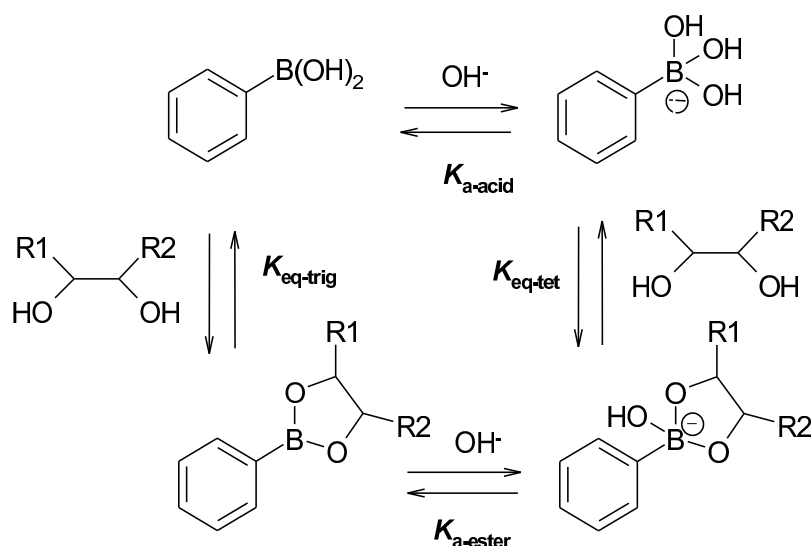
Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa

1. Wstęp

Detekcja biologicznie ważnych cukrów (D-glukozy, D-fruktozy, D-galaktozy i innych) ma duże znaczenie w medycynie i przemyśle. Szczególnie ważne jest oznaczanie glukozy ze względu na powiązanie zaburzeń jej poziomu w organizmie z różnymi chorobami (cukrzyca, choroby nowotworowe, cukromocz nerkowy, mukowiscydoza). Możliwości szybkiego nieinwazyjnego oznaczania stężenia glukozy oprócz znaczenia diagnostycznego pozwala uniknąć ryzyka powikłań wywołanych jej niewłaściwym poziomem. Zastosowanie przemysłowe dotyczy przede wszystkim monitorowania procesów fermentacyjnych i określania czystości enancjomerycznej syntetycznych leków.

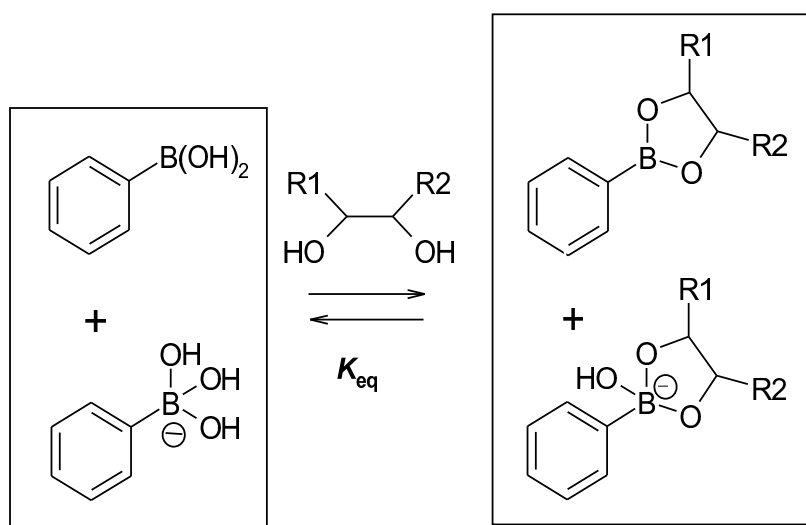
Obecnie stosowane metody enzymatyczne pozwalają na selektywne oznaczanie tylko niektórych cukrów, mają również szereg ograniczeń. W przeciwieństwie do nich chemiczne receptory cukrów dają potencjalną możliwość zaprojektowania sensora dla każdego rodzaju cukru, w tym także rozróżnienie enancjomerów. Kwasy boronowe $RB(OH)_2$ stanowią bardzo ważną grupę receptorów cukrów o praktycznym zastosowaniu ze względu na ich silne oddziaływanie z cukrami, trwałość i brak toksyczności.

Podstawą działania kwasów boronowych jako receptorów cukrów jest ich zdolność do szybkiego i odwracalnego tworzenia estrów z 1,2- i 1,3-diolami. Reakcja ta została opisana już w 1954 r. [1]. W 1959 r. Lorand i Edwards podali wartości stałych równowagi tworzenia estrów przez kwas fenyloboronowy z różnymi cukrami [2]. Stwierdzili oni, że cykliczne cis-diole, a więc związki zawierające układy grup OH występujące w cukrach, tworzą trwalsze cykliczne estry niż diole łańcuchowe i cykliczne trans-diole. Dalsze badania wykazały, że ze względu na możliwość tworzenia przez kwasy boronowe i ich estry formy czterokoordynacyjnej równowaga jest bardziej złożona (schemat 1) [3].



Schemat 1. Równowagi w układzie kwas boronowy – diol.

Dla ujednolicenia ilościowego określania oddziaływania kwasów boronowych z cukrami Springsteen i Wang [4] wprowadzili pojęcie ogólnej stałej wiązania cukru (overall binding constant) przez receptor – kwas boronowy (K_{eq} - schemat 2):



Schemat 2. Równowaga ogólna w układzie kwas boronowy – diol.

Wartości tej stałej można otrzymać w wyniku pomiarów spektroskopowych, podczas gdy metody potencjometryczne dają wartości stałej równowagi dla formy tetraedycznej (K_{eq-tet}). Rozbieżności między wartościami literaturowymi dla tych samych układów mogą wynikać

z podawania wartości różnych stałych [3]. Wartości stałych równowagi zależą od budowy cukru i kwasu boronowego, a ich różnice są podstawą selektywnego oznaczania cukrów.

Cząsteczka receptora cukrów musi zawierać grupę funkcyjną zdolną do silnego wiązania cukru (tę rolę spełnia grupa $B(OH)_2$ kwasu boronowego) oraz fragment wykazujący zmianę właściwości fizycznej w wyniku wiązania cukru (fluorofor, chromofor, układ redoks – ogólny termin angielski: „reporter”). Odpowiednia budowa cząsteczki receptora: obecność jednej lub kilku grup $B(OH)_2$, ich przestrzenne ułożenie w powiązaniu z obecnością innych grup funkcyjnych pozwala na selektywne wiązanie jednego cukru i skonstruowanie sensorów chemicznych czułych i selektywnych w stosunku do wybranego cukru.

Duże zainteresowanie wykorzystaniem kwasów boronowych jako receptorów cukrów powoduje, że obecnie rocznie ukazuje się kilkadziesiąt publikacji bezpośrednio związanych z tym zagadnieniem. Celem niniejszej pracy nie jest pełny przegląd literatury, a jedynie pokazanie najważniejszych wyników oraz kierunków badań prowadzonych w tej dziedzinie. Ostatnio ukazało się kilka obszernych prac przeglądowych omawiających całość zagadnienia lub niektóre jego aspekty [3, 5-8].

2. Rodzaje receptorów z punktu widzenia mechanizmu detekcji

2.1 Receptory fluorescencyjne

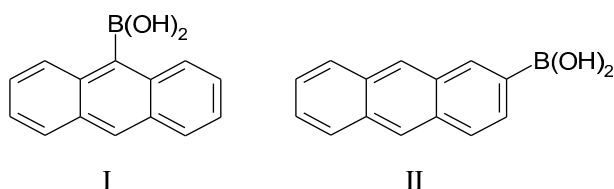
Fluorescencyjne receptory cukrów stanowią ważną grupę z praktycznego punktu widzenia. Wynika to z dużej czułości metod fluorescencyjnych (typowe wartości stężenia receptora rzędu 10^{-6} mol/dm³), dostępności spektrometrów oraz możliwości łatwego ciągłego monitorowania z użyciem włókien optycznych. W przypadku odpowiedniej charakterystyki spektralnej receptora pobudzenie fluorescencji może nastąpić przy użyciu tanich laserów, a nawet diod LED.

Kwasy boronowe używane jako fluorescencyjne receptory cukrów można podzielić na trzy główne grupy. Pierwsza grupa to **receptory PET** (photoinduced electron transfer – fotoindukowanego przeniesienia elektronów). Obejmuje ona niepodstawione kwasy aryloboronowe (skondensowane węglowodory wielopierścieniowe z podstawnikiem $B(OH)_2$) oraz pochodne kwasu fenyloboronowego z podstawnikiem aminometylowym w pozycji orto. Druga grupa – **receptory FRET** (fluorescence resonance energy transfer – fluorescencyjnego rezonansowego przeniesienia energii) to kwasy diboronowe zawierające dwie różne grupy fluoroforowe. Trzecia grupa to **receptory ICT** (internal charge transfer – wewnętrzne przeniesienie ładunku), do których należą liniowe związki zawierające grupę $B(OH)_2$, pełniącą rolę akceptora elektronów, i grupę elektrodonorową [3]. Zaliczenie receptora do

konkretnej grupy nie zawsze jest jednoznaczne, co wynika z różnych możliwych mechanizmów działania danego receptora [5].

2.1.1 Niepodstawione kwasy aryloboronowe

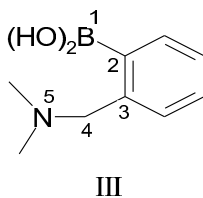
Pierwszymi fluorescencyjnymi receptorami cukrów były kwasy antryloboronowe (I, II), badane przez Yoona i Czarnika [9].



Związki te wykazują widoczne zmiany fluorescencji po związaniu z cukrami. Wynika to z różnic wartości pK_a dla kwasu i estru. W wolnym kwasie (pK_a ok. 8,8) atom boru występuje przy fizjologicznym pH w stanie trygonalnym, co powoduje efekt fotoindukowanego przeniesienia elektronów do niezapełnionego orbitalu boru i wygaszanie fluorescencji. Estry (pK_a 4,6 dla estru z glukozą i 6,8 z fruktozą) występują w tetraedrycznej formie anionowej, co powoduje zniesienie efektu PET i wzrost fluorescencji. Badane związki wykazywały małe zmiany fluorescencji (ok. dwukrotny wzrost w wyniku związania cukru). Inne kwasy aryloboronowe (pochodne naftalenu i układy wielopierścieniowe zawierające azot) dały nieco lepsze efekty, jednak w dalszym ciągu wzrost fluorescencji nie był duży [10]. Wadą tych związków jako receptorów cukrów jest również to, że wiążą one cukry tylko przy wysokich wartościach pH.

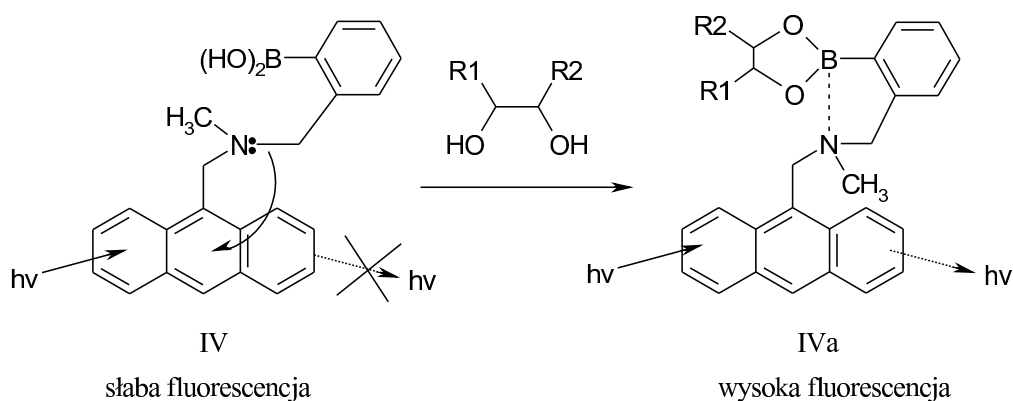
2.1.2 Kwasy fenyloboronowe z podstawnikiem aminometylowym w pozycji orto (układ „1-5”)

Opisane wyżej niedoskonałości pokonano przez wprowadzenie molekularnych receptorów cukrów – pochodnych kwasu fenyloboronowego, zawierającego grupę $B(OH)_2$ i grupę aminową w pozycji w układzie atomów boru i azotu oddalonych o 4 wiązania (układ „1,5”) (III).



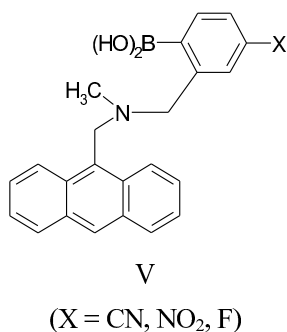
Pierwszy receptor tego typu, wykazujący działanie „off-on”, został opisany w 1994 r. [11]. Mechanizm jego działania przedstawiono na Schemacie 3.

W cząsteczce kwasu boronowego IV następuje wygaszanie fluorescencji przez oddziaływanie wolnej pary elektronów atomu azotu z fluoroforem (stan „off”). Związanie cząsteczki cukru przez grupę $\text{B}(\text{OH})_2$ powoduje utworzenie wiązania $\text{N} \rightarrow \text{B}$ umożliwiające wystąpienie fluorescencji (IVa, stan „on”). Utworzenie tego wiązania ułatwia wiązanie cząsteczki cukru, receptory tego typu działają więc przy niższych wartościach pH, niż niepodstawione kwasy boronowe.

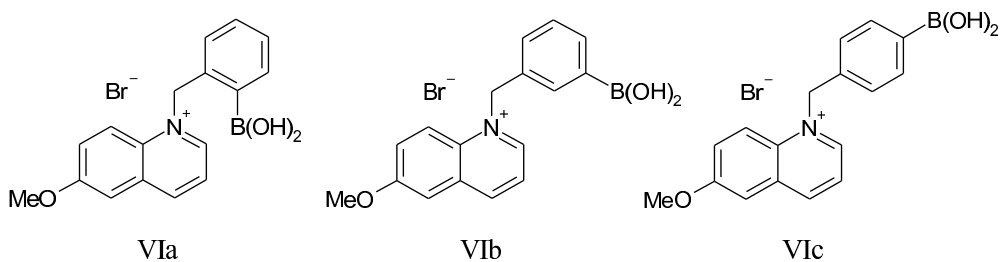


Schemat 3. Mechanizm fotoindukowanego przeniesienia elektronów.

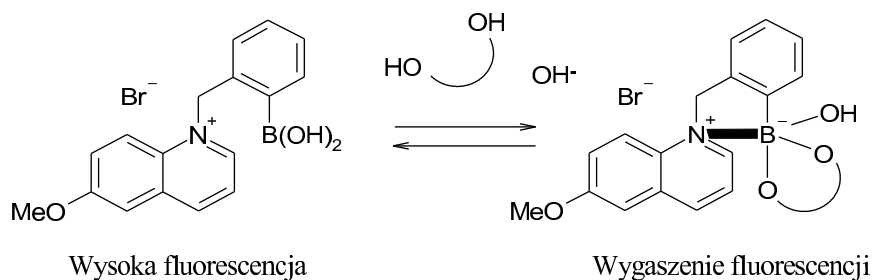
Mechanizm działania receptorów „1-5” jest przedmiotem licznych dyskusji. Jedną z interpretacji zakłada, że utworzenie cyklicznego estru zmniejsza kąt B-O-B ze 120° w wolnym kwasie do 108° w estrze ułatwiając zmianę hybrydyzacji atomu boru z sp^2 do sp^3 i tym samym umożliwiając utworzenie wiązania $\text{N} \rightarrow \text{B}$ w estrze [9]. Zaproponowano również mechanizm związany z efektem hydrolizy dla działania receptora w środowisku wodnym [12]. Na właściwości kwasów boronowych istotny wpływ ma tworzenie wiązań wodorowych [13]. W kwasie IV, w przeciwieństwie do estru IVa, może powstać wewnątrzcząsteczkowe wiązanie wodorowe $\text{B-O-H} \cdots \text{N}$. Struktura taka występuje w fazie krystalicznej [14], a obliczenia wykazały niższą energię dla tej formy w porównaniu ze strukturą z wiązaniem $\text{N} \rightarrow \text{B}$ o ok. 7 kcal/mol [15]. Rozbieżność interpretacji nie zmienia jednak faktu, że opisany układ jest podstawą tworzenia wielu nowych skutecznych receptorów cukrów. Kwas IV zmodyfikowano poprzez wprowadzenie do pierścienia benzenowego w pozycji para grup elektronoakceptorowych takich jak: CN , NO_2 , F (związek V), co pozwoliło nie tylko zwiększyć wartości stałych wiązania cukrów, lecz również poprawić selektywność działania receptorów. Zagadnienie to jest szerzej omówione w punkcie 3.



Kolejną grupę receptorów „1-5” stanowią sole czwartorzędowe: bromki N-(boronobenzylo)-6-metoksychinoliny VI, w których fragment 6-metoksychinoliny pełni rolę wskaźnika fluorescencji [16].



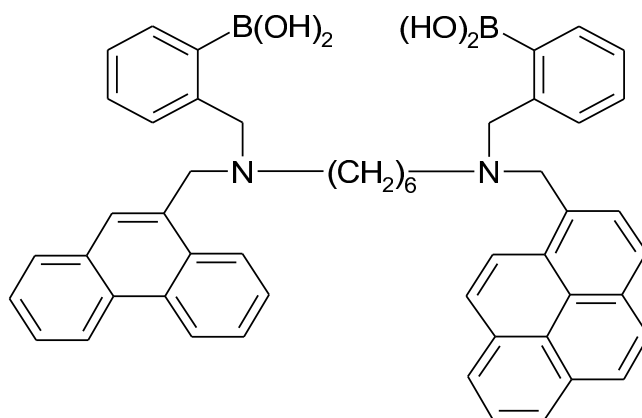
W przeciwieństwie do opisanych wyżej układów zwiększenie wartości stałych równowagi reakcji estryfikacji następuje w wyniku częściowej neutralizacji dodatniego ładunku na atomie azotu przez ujemny ładunek na atomie boru. Zjawisko to nosi nazwę stabilizacji przez neutralizację ładunku (charge neutralization-stabilization mechanizm) i zostało przedstawione na schemacie 4. Oddziaływanie to następuje przez układ wiązań oraz przez przestrzeń (through-bond i through-space interactions). W przypadku izomeru orto (VIa) możliwe są oba rodzaje oddziaływań, w przypadku dwóch pozostałych izomerów tylko oddziaływanie przez wiązania, co tłumaczy najsilniejszy efekt dla związku VIa [16].



Schemat 4. Stabilizacja przez neutralizację ładunku.

2.1.3 Kwasy boronowe zawierające dwie różne grupy fluoroforowe jako receptory FRET

Ważną grupę selektywnych receptorów cukrów stanowią kwasy diboronowe, omówione szerzej w sekcji 3.1. Wśród nich można wyróżnić grupę związków zawierających dwa centra fluoroforowe w jednej cząsteczce. Obecność dwóch jednakowych grup fluoroforowych powoduje zaburzenia w emisyjnych widmach fluorescencyjnych. Wprowadzenie do cząsteczki dwóch różnych grup fluoroforowych pozwala nie tylko na wyeliminowanie tych zaburzeń, ale także na wykorzystanie zjawiska fluorescencyjnego rezonansowego przeniesienia energii (FRET). Zjawisko to, opisane po raz pierwszy w 1946 r. przez Forstera [17], polega na przeniesieniu energii stanu wzbudzonego od jednej grupy fluoroforowej (donora) do drugiej (akceptora) i jest obserwowane, gdy długość fali emisji donora nakłada się na długość fali absorpcji akceptora. Grupy te muszą być oddzielone łącznikiem - fragmentem cząsteczki uniemożliwiającym oddziaływanie elektronów obu grup za pośrednictwem wiązań, natomiast powinny być usytuowane blisko siebie przestrzennie. Przykładem takiego receptora jest związek VII, a przeniesienie energii z fenantrenu do pirenu następuje po utworzeniu sztywnego kompleksu z cząsteczką dwucukru [18].

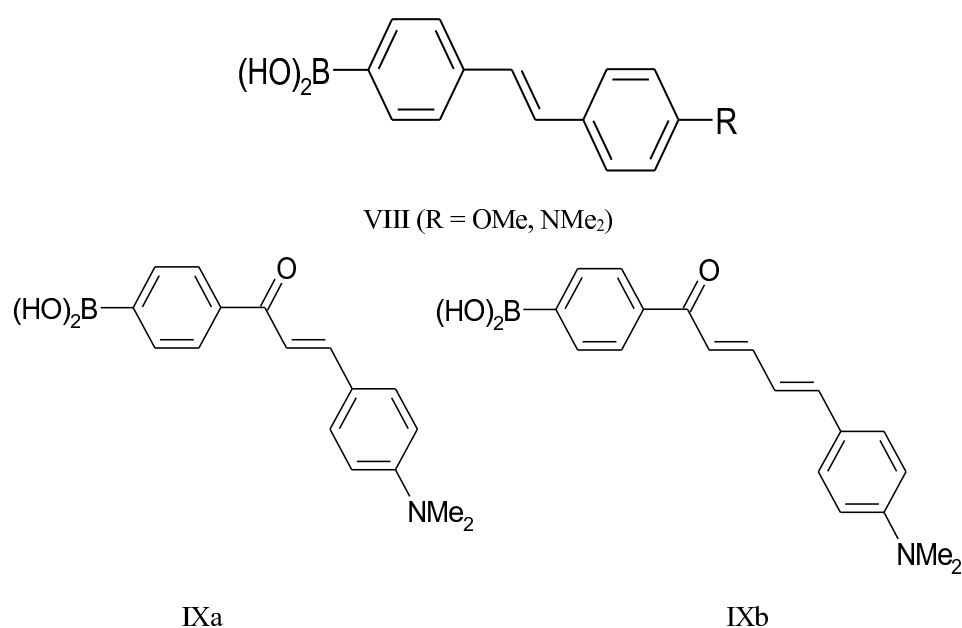


VII

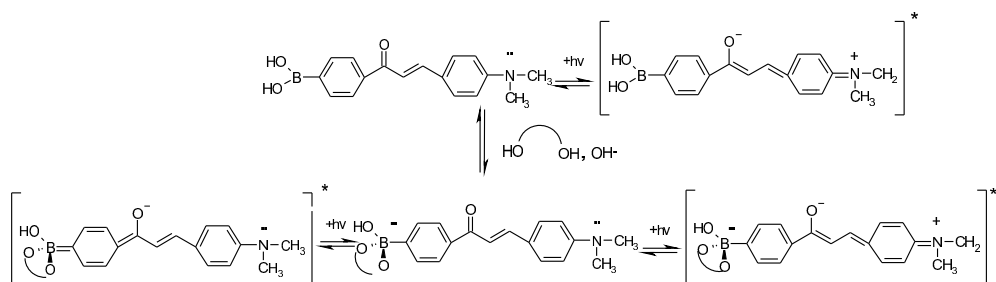
2.1.4 Kwasy boronowe jako receptory ICT

Receptory wykazujące efekt wewnętrznego przeniesienia ładunku (ICT) zawierają grupę elektronoakceptorową i elektronodonorową w tym samym fluoroforze, oddziałujące ze sobą przez układ sprzężonych elektronów π . Grupa boronowa w formie obojętnej działa jako akceptor elektronów dzięki obecności niezapełnionego orbitalu p atomu boru. Gdy atom boru ulega przemianie z formy obojętnej w anionową, zmieniając przy tym hybrydyzację z sp^2 na sp^3 , grupa boronowa przestaje być akceptorem elektronów, co powoduje zmiany w widmie w wyniku zakłócenia przeniesienia ładunku w stanie wzbudzonym [19].

Jako pierwsze boronowe receptory ICT były badane pochodne stilbenu, kwasy 1,2-difenyloetenoboronowe VIII, zawierające różne podstawniki w pozycji 4' [20]. Dalsze badania dotyczyły związków z dłuższymi łańcuchami polienowymi [19] i pochodnych oksazolu [21].

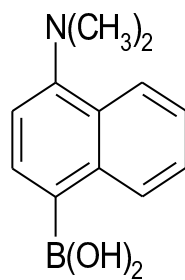


Wprowadzenie do łańcucha łączącego dwa pierścienie grupy karbonylowej sprawia, że mechanizm ICT zachodzi pomiędzy grupą dimetyloaminową (elektronodonorową) a karbonylową (grupą elektronoakceptorową). Układ taki reprezentują związki IX. W układach tych atom boru nie uczestniczy bezpośrednio w ICT, ale pozostaje w rezonansie z grupą elektronoakceptorową (schemat 5). Przykład ten pokazuje, że grupa boronowa nie musi być bezpośrednio zaangażowana w przeniesienie ładunku, aby wywoływać zmiany spektralne po związaniu cukrów [19].

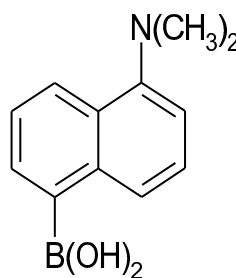


Schemat 5. Podstawowe i wzbudzone stany elektronowe związku IX i jego estru.

Innym przykładem związków wykorzystujących mechanizm ICT jest kwas 4-(dimetyloamino)naftaleno-1-boronowy X, wykazujący wysoki wzrost intensywności fluorescencji po związaniu z cukrami przy fizjologicznym pH. Jego dodatkowym atrybutem jest jego dobra rozpuszczalność w wodzie. Grupa aminowa (pełniąc funkcję donora) i grupa boronowa (pełniąc funkcję akceptora) są umieszczone w tym samym chromoforze. Układ naftalenowy daje możliwości konstruowania kwasów diboronowych o wysokiej selektywności.



X

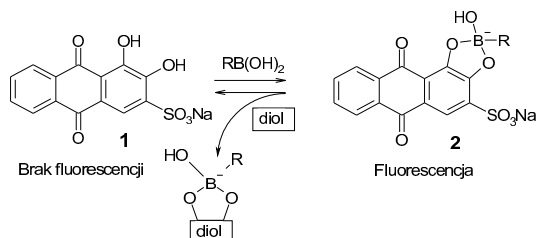


XI

Izomer tego związku, kwas 5-(dimetyloamino)naftaleno-1-boronowy XI wykazuje duże zmiany intensywności fluorescencji przy dwóch długościach fali (513 nm i 433 nm), po związaniu z cukrami przy fizjologicznym pH. Związek X wykazuje duże zmiany fluorescencji, ale przy pojedynczej długości fali, 445 nm. Przykład ten pokazuje, że różne położenie tych samych podstawników znacząco wpływa na właściwości fluorescencyjne danego związku [22, 23].

2.2 Fluorescencja z wykorzystaniem ars

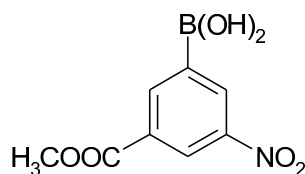
Wiele kwasów boronowych wykazuje silne powinowactwo do cukrów, nie zawiera jednak odpowiedniego fluorofora, umożliwiającego detekcję metodami fluorescencyjnymi. W celu rozwiązania tego problemu Springsteen i Wang stworzyli dwuskładnikowy układ zawierający fluorescencyjny związek: czerwień alizarynowa S (ARS) i kwas fenylboronowy (PBA) (schemat 6).



Schemat 6. Konkurencyjne wiązanie kwasu boronowego z ARS i diolem.

Wiązanie cukru przez kwas boronowy jest monitorowane przez dodanie oddzielnego fluorofora (ARS), którego fluorescencja jest czuła na wiązanie cząsteczek dioli przez grupę boronową. ARS jest więc wykorzystywany jako czynnik fluorescencyjny. W układzie tym ustala się równowaga dwóch konkurencyjnych reakcji. Pierwsza równowaga, pomiędzy kwasem boronowym i ARS, może być mierzona bezpośrednio. Obecność aktywnych protonów z grup hydroksylowych w wolnej cząsteczce ARS (1) powoduje wygaszanie fluorescencji, natomiast tworzenie estru boronowego eliminuje to zjawisko, w wyniku czego występuje zwiększona fluorescencja (2). Wprowadzenie diolu do układu powoduje ustalenie się równowagi drugiej reakcji pomiędzy kwasem boronowym a cząsteczką diolu z utworzeniem estru. Zaburzenia równowagi ARS/PBA powodują zmiany intensywności fluorescencji [24].

Badania szeregu podstawionych kwasów fenyloboronowych z wykorzystaniem ARS przeprowadzili Mulla i wsp. [25]. Z serii badanych związków kwas 3-metoksykarbonylo-5-nitrofenyloboronowy (XII) wykazywał zdolności wiązania fruktozy porównywalne do receptorów typu „1-5”. Obecność grupy karboksylowej daje możliwość łatwej rozbudowy układu oraz umieszczenia go w matrycy polimerowej.



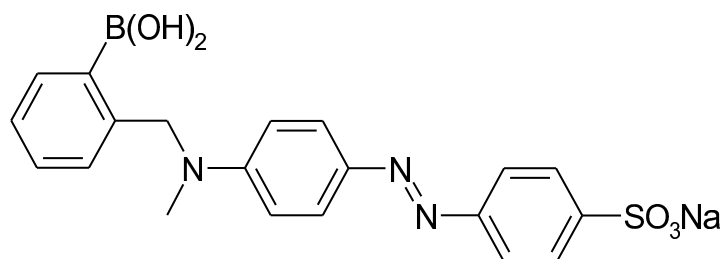
XII

2.3 Receptory barwne

Barwne receptory cukrów są szczególnie interesujące z praktycznego punktu widzenia. System wykazujący wyraźne zmiany barwy może być wykorzystany w papierowych testach diagnostycznych do wykrywania glukozy, podobnie jak uniwersalne papierki wskaźnikowe pH, co daje możliwość określenia stężenia glukozy bez konieczności

używania specjalistycznej aparatury. Zagadnienie ma duże znaczenie ze względu na potrzebę wykonywania takich badań u diabetyków.

Podobnie jak w przypadku innych receptorów ważne z praktycznego punktu widzenia są takie związki, które zmieniają barwę przy fizjologicznym pH. Pierwszym barwnym receptorem cukrów w którym wykorzystano oddziaływanie między grupą boronową a atomem azotu jest związek XIII. Wystąpienie oddziaływania bor-azot po związaniu cukru wywołuje zmiany w dołączonym chromoforze ICT [26].

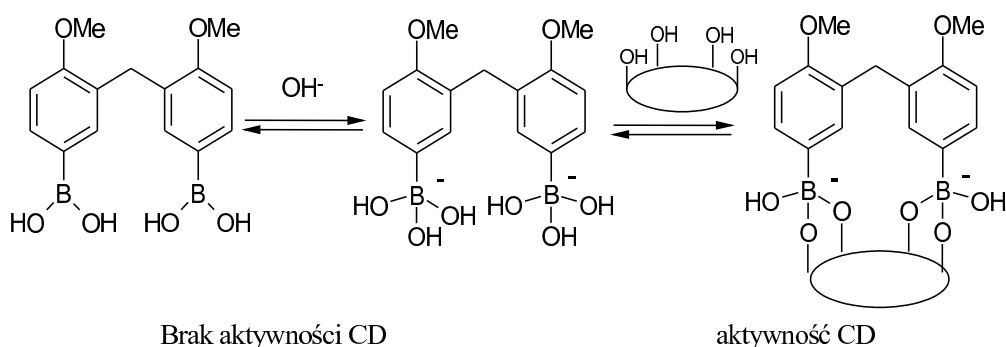


XIII

Obszerny przegląd różnych układów wykazujących zmiany barwy w wyniku wiązania cukrów zamieszczono w pracy [5].

2.4 Receptory dichroizmu kołowego

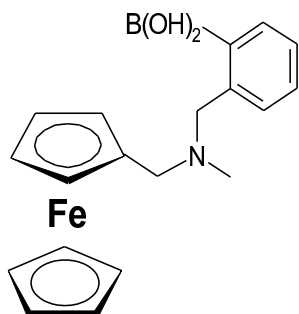
Kwas diboronowy może wiązać dwucukier z utworzeniem sztywnego cyklicznego kompleksu. Takie asymetryczne unieruchomienie dwóch chromoforowych pierścieni benzenowych przez zamknięty pierścień cukrowy (schemat 7) może wywoływać zmiany w widmach CD (dichroizmu kołowego). Metoda pozwala określić absolutną konfigurację związanego cukru ze znaku widma CD [6].



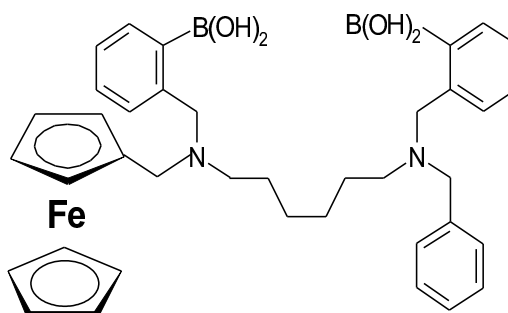
Schemat 7. Tworzenie aktywnego kompleksu kwasu diboronowego z cukrem.

2.5. Receptory elektrochemiczne

W porównaniu z używanymi elektrochemicznymi receptorami cukrów opartymi o rozkład enzymatyczny cukrów receptory wykorzystujące kwasy boronowe są potencjalnie układami o dużej selektywności. W literaturze opisano kilka układów, z których najprostszym jest kwas ferrocenoboronowy XIV, wykazujący znaczne różnice w zdolności wiązania cukrów w zależności od stopnia utlenienia [27].



XIV



XV

Elektrochemiczny receptor diboronowy XV jest przykładem układu o zwiększonej selektywności wobec D-glukozy w porównaniu z D-galaktozą [28].

3. Selektywność receptorów

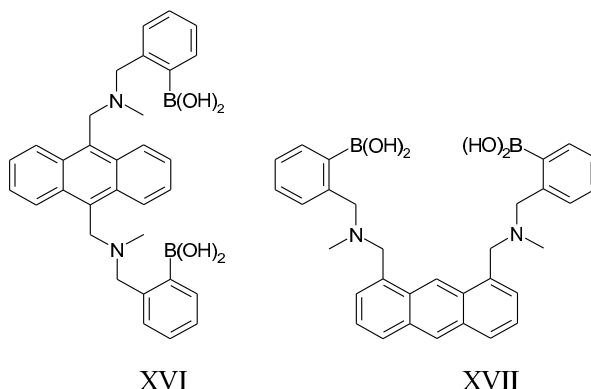
Bardzo ważnym zagadnieniem związanym z użyciem receptorów cukrów jest ich selektywność umożliwiającą oznaczanie wybranego cukru w obecności innych. Pierwsze receptory, niepodstawione kwasy aryloboronowe, wykazywały niewielkie różnice w zdolności wiązania różnych cukrów wynikające jedynie z budowy cząsteczki cukru, głównie ułożenia grup hydroksylowych. Wprowadzenie grupy aminowej w układzie „1-5” zwiększyło zdolność grupy boronowej do wiązania cukrów, nie poprawiło jednak radykalnie selektywności.

Poprawa selektywności może nastąpić przez wprowadzenie do cząsteczki receptora dodatkowego centrum wiążącego: kolejnej grupy boronowej lub innego centrum oddziałującego specyficznie z fragmentem wybranego cukru.

3.1 Zwiększenie selektywności receptorów przez zastosowanie kwasów diboronowych

Przykładem układu wykazującym zwiększoną selektywność w stosunku do glukozy w porównaniu z fruktozą jest pochodna diboronowa kwasu 4,10-diaminometyloantracenowego XVI. Zawiera ona dwie odpowiednio rozmieszczone grupy boronowe. Związek ten wykazuje bardzo duże zmiany fluorescencji przy wiązaniu glukozy i wiąże ją z większym

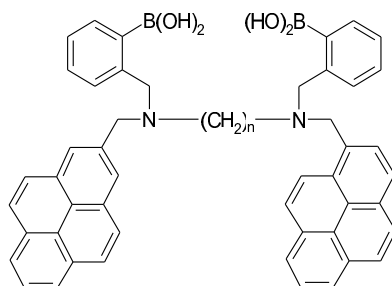
powinowactwem w porównaniu do kwasów monoboronowych. Fakt ten wskazuje na to, iż odpowiednie rozmieszczenie i odległości pomiędzy dwoma grupami boronowymi są kolejnym udoskonaleniem kwasów boronowych jako molekularnych receptorów cukrów.



O ile związek XVI jest selektywny w kierunku glukozy, to jego izomer XVII, zawierający dwie grupy fenyloboronowe w pozycjach 1,8 w pierścieniu antracenowym wykazuje selektywność w kierunku D-sorbitolu przy fizjologicznym pH.

Powyższe przykłady pokazują, że selektywność receptorów zawierających dwie grupy boronowe może być modyfikowana przez przestrzenną orientację grup boronowych oraz sztywność miejsc wiążących [29].

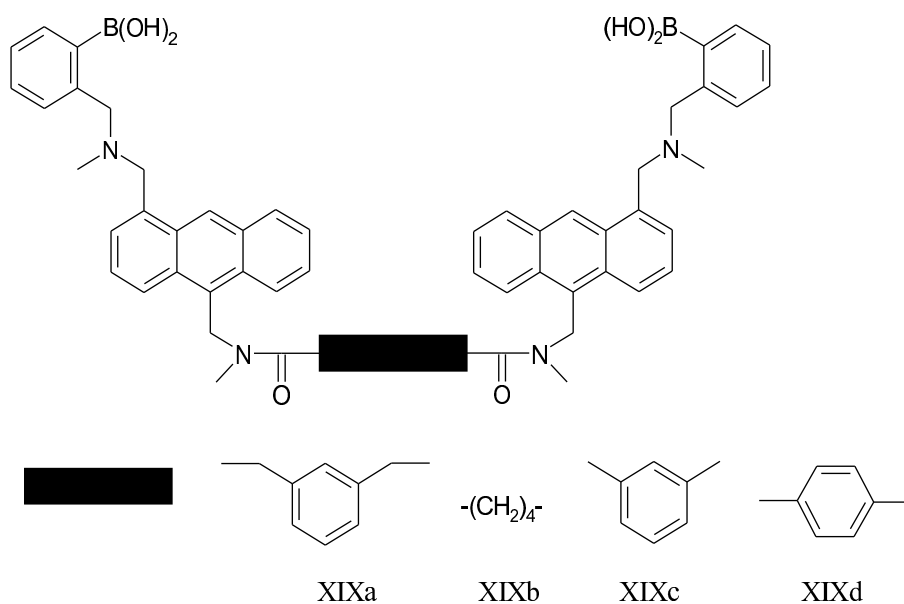
Kolejna modyfikacja boronowych receptorów cukrów polegała na wprowadzeniu dodatkowej cząsteczki fluorofora i użyciu odpowiednich łączników, dających różne odległości pomiędzy dwoma cząsteczkami kwasów boronowych. Związek XVIII zawierający heksametylenowy łącznik ($n=6$) pomiędzy dwoma fragmentami kwasów boronowych, wykazuje wysoką selektywność w stosunku do D-glukozy. Specyficzność działania tego związku determinuje właśnie łańcuchowy łącznik. Stwierdzono, iż receptory zawierające sześć- i siedmiowęglowe łączniki wykazują wysoką selektywność w kierunku glukozy, natomiast związki z dłuższymi łącznikami ($n=8,12$) zachowują się jak kwasy monoboronowe preferujące fruktozę. Jak widać, wybór odpowiedniego łącznika jest bardzo istotnym elementem przy projektowaniu receptora, ponieważ znacząco wpływa na selektywność wobec poszczególnych cukrów.



XVIII ($n = 6, 7, 8, 12$)

Na selektywność receptora wpływa nie tylko położenie przestrzenne grup boronowych, lecz również wielkość hydrofobowej powierzchni π układu fluoroforowego [7].

Jak już wcześniej wspomniano, czynnikiem determinującym selektywność wobec cukrów jest dobór odpowiedniego łącznika. Zjawisko to ilustruje przykład serii związków XIXa-d, różniących się łącznikami amidowymi.

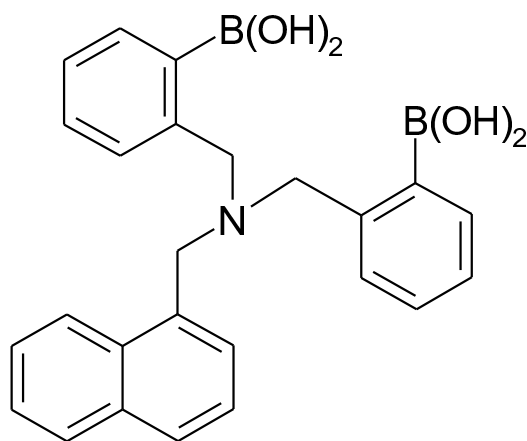


Stwierdzono, że związek XIXa, zawierający dwie grupy acetamidowe połączone z fenylowym w pozycjach orto wykazuje dzięki odpowiedniemu rozmieszczeniu i odległości pomiędzy grupami boronowymi zdolność do selektywnego wiązania glukozy. Jego powinowactwo i selektywność wobec glukozy są zdecydowanie większe niż wobec fruktozy, a w porównaniu ze związkami XIXb i XIXc jest zdecydowanie lepszym receptorem glukozy [3].

Na szczególną uwagę zasługuje związek XIXd, który może być wykorzystany w diagnostyce i wczesnym wykrywaniu niektórych nowotworów. Jego zastosowanie w medycynie wynika z tego, iż wykazuje on wysoką fluorescencję po związaniu

z tetracukrem „Sialyl Lewis X” (sLex). Sacharyd ten jest wiązany przez komórki nowotworowe przy tworzeniu się raka piersi, przewodu pokarmowego i trzustki [30].

Selektywność kwasów aryloboronowych wobec cukrów można również kształtować przez korekcję przestrzeni pomiędzy dwoma grupami boronowymi. Przykładem takiego układu jest związek XX. Zmniejszona przestrzeń powoduje selektywność wobec cukrów o małych cząsteczkach takich jak sorbitol [31, 32].

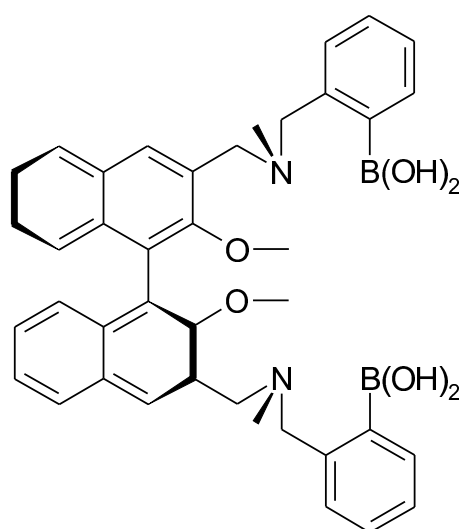


XX

Powyższy opis obrazuje kolejną optymalizację molekularnych receptorów cukrów. Odpowiednio dobrany łącznik, odpowiednia odległość i rozmieszczenie grup boronowych, zwiększona liczba i różnorodność fluoroforów w tej samej cząsteczce mają znaczący wpływ na kreowanie powinowactwa i selektywności w stosunku do poszczególnych cukrów.

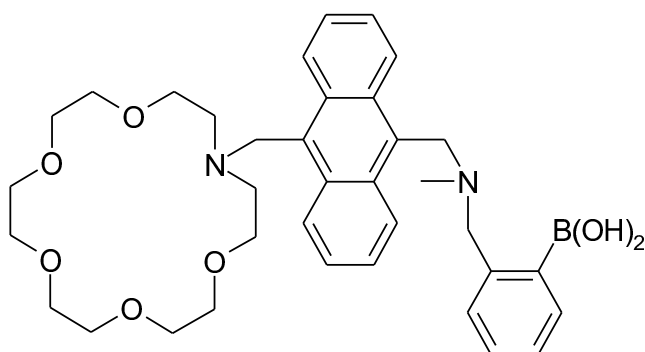
3.2 Zwiększenie selektywności receptorów przez wprowadzenie dodatkowych elementów strukturalnych

Omawiane dotychczas receptory nie pozwalały rozróżniać izomerów D i L cukrów. Wprowadzenie chiralnych receptorów daje takie możliwości. Przykładem może być związek XXI, który w zależności od konfiguracji (R lub S) wykazuje różne zmiany w wygaszaniu fluorescencji po skompleksowaniu izomerem D lub L cukru [33].



XXI (R lub S)

Wprowadzenie do receptora typu „1-5” fragmentu eteru azakoronowego (XXII) pozwoliło na selektywną detekcję glukozaminy. Grupa boronowa wiąże fragment cukrowy tego związku, a eter koronowy jego część amoniową [35].

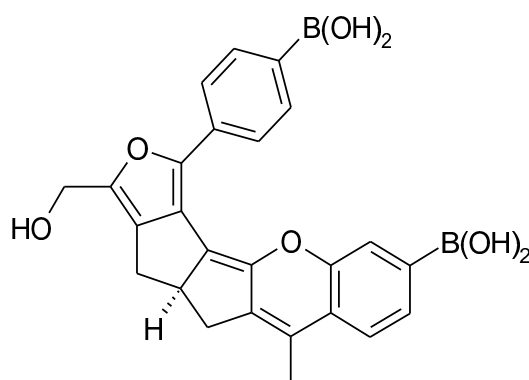


XXII

3.3 Podejście „de novo” przy konstruowaniu receptorów

Wykorzystanie metod obliczeniowych w projektowaniu receptorów pozwala otrzymać układ o bardzo wysokiej selektywności w stosunku do wybranego cukru. Przykładem jest związek XXIII, który synteza została przeprowadzona po obliczeniach uwzględniających budowę kompleksu – jego sztywność, właściwości fluoroforowe, a także takie czynniki jak rozpuszczalność w wodzie. Związek wykazuje bardzo silne wiązanie D-glukozy ($K_{eq} =$

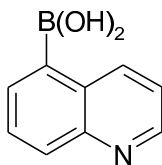
40000) i bardzo dużą selektywność w porównaniu z innymi cukrami (galaktoza: $K_{eq} = 100$, mannoza: $K_{eq} = 83$) [36].



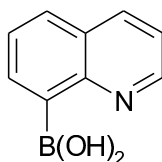
XXIII

4. Czynniki umożliwiające wykorzystanie receptorów w układach biologicznych

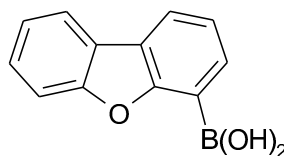
Receptory które mogą być zastosowane w układach biologicznych powinny charakteryzować się niską toksycznością oraz wysoką stabilnością chemiczną i fotochemiczną. Bardzo ważnym czynnikiem jest fizjologiczny zakres pH, w którym receptor wykazuje aktywność, oraz dobra rozpuszczalność w wodzie. Receptory fluorescencyjne z względu na obecność hydrofobowych układów fluoroforowych zwykle wykazują bardzo słabą rozpuszczalność w wodzie. Otrzymane ostatnio nowe związki oprócz dobrej rozpuszczalności w wodzie mają szereg zalet umożliwiających stosowanie ich jako receptorów.



XXIV



XXV



XXVI

Związek XXIV, kwas 5-chinolinoboronowy, doskonale rozpuszcza się w wodzie. Ponadto wykazuje on wysoką fluorescencję przy wiązaniu cukrów przy fizjologicznym pH. Związek ten w porównaniu z jego izomerem, kwasem 8-chinolinowym XXV, zdecydowanie silniej wiąże cukry: na przykład stała wiązania związku XXIV z fruktozą jest ośmiokrotnie wyższa niż dla związku XXV. Mechanizm zmian fluorescencji tego układu nie jest jeszcze do końca poznany [37].

Rozpuszczalny w wodzie okazał się również związek XXVI: kwas dibenzenofurano-4-boronowy. Układ ten charakteryzuje się niezwykle zmianami fluorescencji przy trzech długościach fal. Długość fali wolnego kwasu wynosi 327 nm. Po związaniu fruktozy wielkość ta zmienia się w dwie różne wartości 301 i 318 nm, a towarzyszy temu znaczący wzrost intensywności fluorescencji. Powinowactwo tego związku do poszczególnych cukrów zmienia się w następującym szeregu: sorbitol>fruktoza>mannitol>arabinoza>glukoza [38].

5. Podsumowanie

Kwasy aryloboronowe są grupą związków, które ze względu na szybkie i odwracalne tworzenie estrów z cukrami mogą być praktycznie stosowane jako receptory cukrów. Ich zaletą jest trwałość chemiczna i fotochemiczna i niska toksyczność.

Niepodstawione kwasy aryloboronowe wiążą cukry tylko w środowisku alkalicznym. Wprowadzenie grupy aminowej w układzie „1-5” obniża zakres pH, przy którym związki mogą być stosowane.

Kwasy monoboronowe wykazują niską selektywność. W przeciwieństwie do nich kwasy diboronowe mogą selektywnie wiązać wybrany cukier. Dobór geometrii układu zależy od budowy wiązanego cukru i może być zaprojektowany w wyniku obliczeń teoretycznych.

Wprowadzenie grup hydrofilowych zwiększa rozpuszczalność kwasów boronowych w wodzie i pozwala na stosowanie ich w układach biologicznych.

Wśród różnych metod detekcji najszersze zastosowanie ma metoda fluorescencyjna.

Podziękowania:

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

Literatura:

1. H. G. Kuivila, A. H. Keough, E. J. Soboczenski, *J. Org. Chem.*, 19 (1954) 780.
2. J. P. Lorand, J. O. Edwards, *J. Org. Chem.*, 24(1959) 769.
3. H. Fang, G. Kaur, B. Wang, *J. Fluoresc.*, 14 (2004) 481.
4. G. Springsteen, B. Wang, *Tetrahedron*, 58 (2002) 5291.
5. T. D. James, *Boronic-Acid-based Receptors and Sensors for Saccharides*, w: *Boronic Acids. Preparation, Applications in Organic Synthesis and Medicine*, D. G. Hall (ed.), Wiley-VCH, Weinheim (2005) (rozdział 12).
6. T. D. James, S. Shinkai, *Top. Curr. Chem.*, 218 (2002) 159.
7. J. F. Callan, A. P. de Silva, D. C. Magri, *Tetrahedron*, 61 (2005) 8551.
8. J. C. Pickup, F. Hussain, N. D. Evans, O. J. Rolinski, D. J. Birch, *Biosens. Bioelectron.*, 20 (2005) 2555.
9. J. Yoon, A. W. Czarnik, *J. Am. Chem. Soc.*, 114 (1992) 5874.
10. H. Suenaga, H. Yamamoto, S. Shinkai, *Pure Appl. Chem.*, 68 (1996) 2179.
11. T. D. James, K. Sandanayake, S. Shinkai, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, (1994) 477.
12. W. Ni, G. Kaur, G. Springsteen, B. Wang, S. Franzen, *Bioorg. Chem.*, 32 (2004) 571.
13. A. Sporzyński, *Polish J. Chem.*, (2007) (w druku).
14. A. Sporzyński, A. Lewandowska, B. T. Stępień, M. K. Cyrański, XVIII International Conference on Physical Organic Chemistry, Warsaw, 20-25.08.2006, p. 46.
15. A. Sporzyński, A. Lewandowska, B. T. Stępień, M. K. Cyrański, w przygotowaniu do druku.
16. R. Badugu, J. R. Lakowicz, C. D. Geddes, *Bioorg. Med. Chem.* 13 (2005) 113.
17. T. Forster, *Naturwissenschaften*, 33 (1946) 166.
18. S. Arimori, M. L. Bell, C. S. Oh, T. D. James, *Org. Lett.*, 4 (2002) 4249.
19. N. DiCesare, J. R. Lakowicz *J. Phys. Chem. A*, 105 (2001) 6834.
20. H. Shinmori, M. Takeuchi, S. Shinkai, *Tetrahedron*, 51 (1995) 1893.
21. N. DiCesare, J. R. Lakowicz, *J. Photochem. Photobiol. A*, 143 (2001) 39.
22. X. Gao, Y. Zhang, B. Wang, *Org. Lett.*, 5 (2003) 4615.
23. X. Gao, Y. Zhang, B. Wang, *New J. Chem.*, 29 (2005) 579.
24. G. Springsteen, B. Wang, *Chem. Commun.*, (2001) 1608.
25. H. R. Mulla, N. J. Agard, A. Basu, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14 (2004) 25.
26. K. R. A. S. Sandanayake, S. Shinkai, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, (1994) 1081.
27. A. N. J. Moore, D. D. M. Wayner, *Can. J. Chem.*, 77 (1999) 681.

28. S. Arimori, S. Ushiroda, L. M. Peter, A. T. A. Jenkins, T. D. James, *Chem. Commun.*, (2002) 2368.
29. K. M. Swamy, Y. J. Jang, M. S. Park, *Tetrahedron Lett.*, 46 (2005) 3453.
30. W. Yang, S. Gao, X. Gao, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 12 (2002) 2175.
31. K.M. Swamy, Y. J. Jang, M. S. Park, *Tetrahedron Lett.*, 46 (2005) 3453.
32. T. D. James, H. Shinmori, S. Shinkai, *Chem. Commun.*, (1997) 71.
33. T. D. James, K. R. A. S. Sandanayake, *Nature*, 374 (1995) 345.
34. C. R. Cooper, T. D. James, *Chem. Commun.*, (1997) 1419.
35. W. Yang, H. He, D.G. Drueckhammer, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 40 (2001) 1714.
36. W. Yang, L. Lin, B. Wang, *Tetrahedron Lett.*, 46 (2005) 798.
37. J. Wang, S. Jin, B. Wang, *Tetrahedron Lett.*, 46 (2005) 7003.

Rozdział 6

Aptamery i sensory DNA jako receptory kwasów nukleinowych, białek i związków niskocząsteczkowych

Zbigniew J. Leśnikowski, Błażej Wojtczak
Centrum Biologii Medycznej, Polska Akademia Nauk
ul. Lodowa 106, 93-232 Łódź,

1. Wstęp

Ogólna definicja receptorów określa, że są to struktury zdolne do rozpoznania stymulacji o naturze fizykochemicznej i wywołania bezpośrednio lub pośrednio, za pośrednictwem innych struktur, reakcji na tę stymulację. Klasyczna wykładnia definicji receptora zakłada, iż na poziomie molekularnym strukturami tymi są białka (białka receptorowe). W tym znaczeniu receptor określany jest jako białko umiejscowione wewnątrz komórki lub na jej powierzchni, zdolne do specyficznego rozpoznawania i wiązania innych cząsteczek – ligandów, w wyniku czego inicjowana jest specyficzna odpowiedź biologiczna (szersza definicja receptora) lub też generowany jest jedynie sygnał będący skutkiem związania się receptora i liganda (węższa definicja receptora).¹

Obecnie znanych jest wiele struktur syntetycznych nie będących białkami zdolnych do specyficznego rozpoznania bodźca (jest nim najczęściej cząstka chemiczna) i wywołania reakcji różnego typu na ten bodziec. Struktury takie, określane jako „syntetyczne receptory molekularne” będące przedmiotem zainteresowania min. chemii supramolekularnej, obejmują szeroki wachlarz związków takich jak cyklodekstryny i ich pochodne, kaliksareny, etery koronowe i inne cząstki makrocykliczne o podobnych właściwościach, pochodne porfiryn, kwasy nukleinowe i wiele innych.^{2,3}

Zgodnie z pierwotną, biologiczną definicją receptora przyjmujemy, że ligandem jest cząsteczka przez receptor rozpoznawana i wiązana. Należy jednak zdawać sobie sprawę,

że pojęcie ligandu nie jest jednoznaczne i w wielu przypadkach jest kwestią umowną, np. w związkach kompleksowych jest to atom, cząsteczka lub anion, który jest bezpośrednio przyłączony do atomu centralnego, lub kationu centralnego, zwanego centrum koordynacji, a więc pełni funkcję przeciwną niż w przytoczonej wyżej definicji. W immunologii ligandem w stosunku do przeciwciała jest antygen, w enzymologii mamy do czynienia z substratem i miejscem wiążącym (substrat). Przydatnym w takich przypadkach może być pojęcie cząsteczki gościa (ang. guest molecule) i cząsteczki gospodarza (ang. host molecule) stosowane w chemii supramolekularnej.

W niniejszym opracowaniu skupiamy się na syntetycznych receptorach o strukturze kwasów nukleinowych (aptamery i sondy molekularne). Omówimy niektóre zagadnienia związane z rozpoznawaniem przez te receptory białek, kwasów nukleinowych i związków niskocząsteczkowych.

2. Kwasy nukleinowe jako materiał do konstrukcji syntetycznych receptorów.

Główną i podstawową cechą kwasów nukleinowych jest ich zdolność do specyficznych oddziaływań z sekwencjami komplementarnymi na drodze parowania zasad zgodnie z regułami Watsona-Cricka. Zgodnie z tymi zasadami tymina (T) tworzy parę z adeniną (A) a cytozyna (C) z guaniną (G).⁴ W wyniku tych oddziaływań powstają struktury dwuniciowe typu podwójnej helisy różnego typu. Poza tym na skutek oddziaływań nieklasycznych między zasadami (min. Hoogstena i odwrócony Hoogsten) możliwe jest tworzenie struktur trójniciowych, a w przypadku niektórych sekwencji także czteroniciowych. Na skutek tego struktury tworzone przez kwasy nukleinowe charakteryzują się dużym zróżnicowaniem obejmując klasyczne helisy typu B, rzadziej spotykane struktury typu A, C, Z i szereg innych, jak również struktury wyższego rzędu takie jak struktury poślizgowe (ang. slipped), krzyżowe (ang. cruciform), zakrzywione (ang. bent) i szereg innych; RNA mogą tworzyć struktury szpilkowe, wybrzuszenia jednostronne i dwustronne, pseudowęzły i inne.^{5,6} Zróżnicowana topologia kwasów nukleinowych odgrywa istotną rolę w ich metabolizmie i regulacji ekspresji genów.

Poza oddziaływaniem kwasów nukleinowych z innymi kwasami nukleinowymi niezwykle istotną rolę odgrywa ich oddziaływanie z białkami.⁷⁻⁹ W przeciwieństwie do oddziaływań kwasów nukleinowych między sobą, w których główną rolę odgrywają wysoce specyficzne interakcje między zasadami nukleinowymi (parowanie zasad na drodze tworzenia ściśle zdefiniowanych wiązań wodorowych) za ich oddziaływania z białkami odpowiedzialne są interakcje między odpowiednio dopasowanymi motywami strukturalnymi białka i określoną sekwencją nukleotydów kwasu nukleinowego na zasadzie klucza i zamka.

W oddziaływaniach tego typu biorą udział różnego rodzaju interakcje chemiczne: wiązania wodorowe, oddziaływania elektrostatyczne i hydrofobowe. Oddziaływania między białkami i kwasami nukleinowymi związane są z fundamentalnymi procesami w komórkach żywych takimi jak: replikacja, transkrypcja i translacja, oddziaływania z enzymami restrykcyjnymi itp. Swoistość rozpoznawania w kompleksach białko-kwas nukleinowy realizowana jest za pomocą charakterystycznych elementów struktury białek, do których należą: helisy, zamki leucynowe, struktury beta czy też palce cynkowe. Utworzenie specyficznych wiązań następuje wskutek oddziaływania łańcuchów bocznych aminokwasów z dostępnymi grupami funkcyjnymi zasad nukleinowych.

Nieco ponad 15 lat temu zauważono, że również kwasy nukleinowe mogą rozpoznawać inne cząsteczki w podobny sposób jak białka.^{10,11} Kwasy nukleinowe o takich właściwościach nazwano „aptamerami”. W tworzeniu i stabilizacji struktur przestrzennych aptamerów biorą udział różne rodzaje oddziaływań chemicznych. Aptamery okazały się wygodnym uzupełnieniem narzędzi badawczych w takich dziedzinach jak proteomika i genomika, znalazły zastosowania w diagnostyce medycznej, duże nadzieje wiąże się również z ich wykorzystaniem w celach terapeutycznych.¹²⁻¹⁵ Swoistość rozpoznawania różnych klas molekuł pozwala porównywać aptamery z przeciwciałami monoklonalnymi i wykorzystywać je również do konstrukcji syntetycznych receptorów.

3. Aptamery

Aptamery definiuje się jako jednoniciowe oligonukleotydy RNA lub DNA, selekcionowane *in vitro* z bibliotek kombinatorycznych, w procesie zwanym SELEX (ang. Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) charakteryzujące się wysokim powinowactwem i selektywnością wiązania ze ściśle określoną cząsteczką docelową (ligandem).¹⁶ Nazwa „aptamer” wywodzi się od łacińskiego słowa „aptus” – dopasowany.

Proces SELEX określany jest jako “selekcja *in vitro*”.¹⁷ SELEX polega na identyfikacji i wybiórczej amplifikacji cząsteczek kwasów nukleinowych o pożądanych właściwościach spośród puli (zazwyczaj 10^{14} - 10^{15}) krótkich losowych sekwencji RNA lub DNA naśladując w ten sposób mechanizmy naturalnej ewolucji, tzn. zmienność, selekcję i replikację. Proces SELEX jest szczegółowo omówiony w szeregu publikacji i nie będzie szerzej dyskutowany w niniejszym opracowaniu.^{18,19} Należy dodać, iż oprócz naturalnych kwasów nukleinowych w konstrukcji aptamerów stosuje się także ich modyfikowane pochodne jak również peptydowe analogi kwasów nukleinowych (PNA) co w znacznym stopniu poszerza zakres zastosowań aptamerów.^{20,21}

Ważnym, aczkolwiek rzadko dyskutowanym zagadnieniem jest pleomorfizm aptamerów. Zazwyczaj przyjmuje się, że jednej, wyselekcjonowanej sekwencji odpowiada ściśle określona struktura przestrzenna (konformacja) zapewniająca specyficzność oddziaływania z cząsteczką docelową (ligandem). Jednakże często na skutek niewielkich różnic energii swobodnej między konformerami dana sekwencja może przyjmować więcej niż jedną konformację. W takich przypadkach tylko część cząsteczek aptameru może znajdować się w optymalnym stanie zapewniającym efektywne i specyficzne oddziaływanie z ligandem. Ze względu na zjawisko pleomorfizmu dużą uwagę przywiązuje się do selekcjonowania sekwencji o jak najmniejszej zdolności do tworzenia różnych konformerów i jak największej jednorodności konformacyjnej.¹⁶

4. Aptamery jako syntetyczne receptory molekularne.

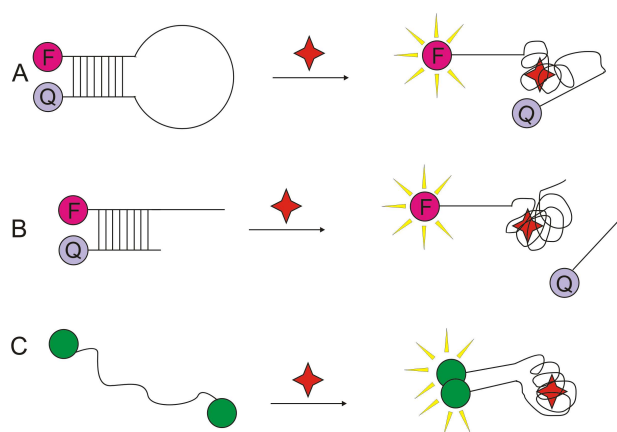
Zgodnie z definicją receptora struktura o takich właściwościach musi posiadać nie tylko zdolność selektywnego wiązania rozpoznawanych cząsteczek lecz także generowania sygnału na skutek takiego wiązania. Z tego też powodu klasyczne cząstki aptamerów nie są receptorami molekularnymi w sensie tej definicji, a pełnią jedynie funkcję selektywnych cząsteczek-gospodarzy (ang. host molecule) w stosunku do rozpoznawanej cząsteczki. Takie właściwości są wystarczające do stosowania aptamerów do celów analitycznych czy też badań nad aptamerami jako potencjalnymi lekami,^{12-15,22} w innych przypadkach, konieczne jest powiązanie aptameru z odpowiednim przetwornikiem (ang. transducer) generującym sygnał. W rezultacie prowadzi to do powstania funkcjonalnego kwasu nukleinowego (ang. functional nucleic acids), w tym przypadku o właściwościach syntetycznego receptora.

4a. Rodzaje syntetycznych receptorów o strukturze aptamerów.

Na Rysunku 1 i 2 przedstawione zostały przykłady formatów receptorów zbudowanych na bazie aptamerów połączonych z odpowiednimi przekaźnikami generującymi sygnał po przyłączeniu ligandu. Modułowa struktura receptorów o strukturze kwasów nukleinowych: zawierających moduł rozpoznający (aptamer) i moduł generujący sygnał (przekaźnik) jest charakterystyczna dla tego typu rozwiązań.²³

W przykładzie A) receptor o strukturze szpilki do włosów łączy w sobie moduł rozpoznający (aptamer) w postaci pętli i moduł generujący sygnał (przekaźnik), w tym przypadku typu latarni molekularnej (ang. molecular beacon), w postaci dupleksu. W stanie podstawowym znacznik fluoroscencyjny (F) jest nieaktywny na skutek bliskiego sąsiedztwa wygaszacza (Q); związanie ligandu (analitu) przez moduł rozpoznający powoduje dysocjację

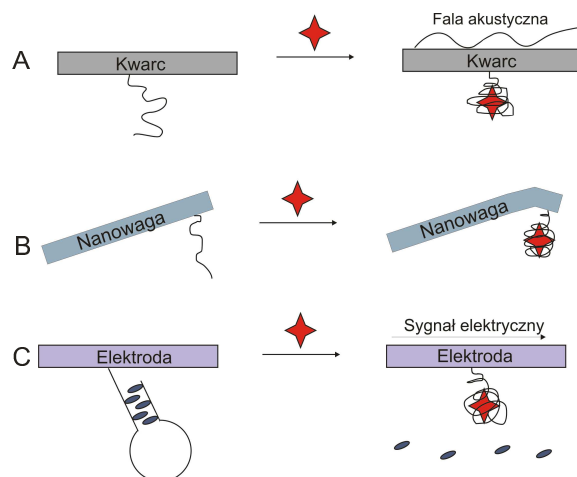
dupleksu i aktywację znacznika fluoroscencyjnego co związane jest z emisją sygnału optycznego.²⁴



Rysunek 1. Przykłady receptorów molekularnych o strukturze aptamerów, wykorzystywanych do konstrukcji biosensorów generujących sygnał optyczny, F (fluorofor), Q (wygaszacz), gwiazdka symbolizuje analit (ligand).

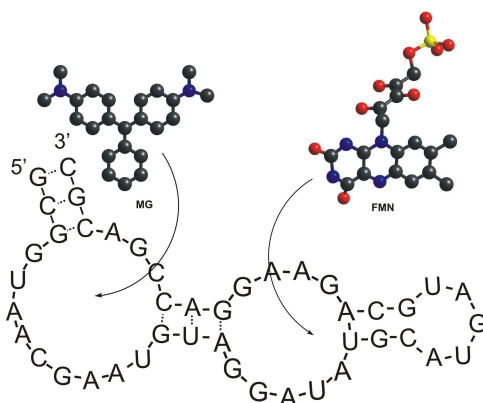
Przykład B) jest wariantem formatu A), z tą różnicą, że moduł rozpoznający ma w tym przypadku strukturę liniową, związanie ligandu z aptamerem powoduje zmianę struktury, całkowite oddysocjowanie antysensowego DNA zawierającego wygaszacz (Q) i aktywację znacznika fluoroscencyjnego.²⁵ W wariantcie C) mamy do czynienia z sytuacją odwrotną, związanie ligandu przez moduł rozpoznający (sekwencję aptamerową znajdującą się między dwoma fluoroforami) powoduje zbliżenie fluoroforów do siebie, ich aktywację i w konsekwencji emisję sygnału. Fluoroforami często stosowanymi w tym przypadku są cząsteczki pirenu. Zbliżenie dwóch cząsteczek pirenu powoduje powstanie dimeru połączonego oddziaływaniami typu oddziaływań warstwowych (ang. stacking) emitującego fluorescencję przy większej długości fali niż odseparowane cząstki pirenu.²⁶

Omawiane wcześniej formaty receptorów molekularnych wymagają stosowania znaczników emitujących sygnał optyczny. Niżej omówione są przykłady rozwiązań nie wymagających znakowania modułu generującego sygnał (przeźnika) dzięki wykorzystaniu w tym celu jego zmian fizycznych będących wynikiem oddziaływania ligandu z modułem rozpoznającym. W przykładzie A) aptamer przyłączony jest do powierzchni materiału piezoelektrycznego, najczęściej mikrokryształu kwarcu. Przyłączenie się ligandu do aptameru powoduje zmianę masy na powierzchni elementu piezoelektrycznego i emisję sygnału akustycznego.²⁷



Rysunek 2. Przykłady receptorów molekularnych o strukturze aptamerów, wykorzystywanych do konstrukcji biosensorów generujących sygnał akustyczny, mechaniczny lub elektryczny.

Innym przykładem jest wykorzystanie mikrowag jako modułu generującego sygnał. W przykładzie B) związanie ligandu z aptamerem przyłączonym do mikrowagi powoduje generowanie sygnału mechanicznego.²⁸ Innym rozwiązaniem, pokazanym w przykładzie C), jest wykorzystanie mikroelektrody jako modułu generującego bezpośrednio łatwy do zarejestrowania sygnał elektryczny. W tym przypadku zmiana konformacji modułu rozpoznającego (aptameru) na skutek związania z ligandem umożliwia kontakt znacznika elektrochemicznego z powierzchnią elektrody co powoduje przepływ ładunku i generowanie sygnału elektrycznego.²⁹



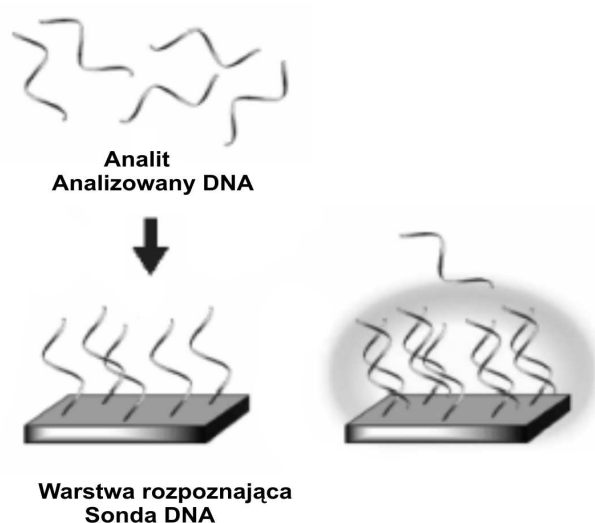
Rysunek 3. Receptor mononukleotydu flawinowego (FMN), w module generującym sygnał wykorzystano właściwości fluoroscencyjne zieleni malachitowej (MG), we wzorach FMN i MG pominięto atomy wodoru.

Szczególnym przypadkiem modularnej budowy receptorów o strukturze aptameru są receptory, w których zarówno moduł rozpoznający jak i moduł generujący sygnał są aptamerami (Rysunek 3).³⁰ W konstrukcji tego typu receptorów wykorzystano zjawisko różnicy fluorescencji niektórych barwników np. zieleni malachitowej (MG, ang. malachite green) w stanie związanym i niezwiązanym ze specyficznym w stosunku do niego aptamerem. Przykładem może być receptor do detekcji mononukleotydu flawinowego (FMN, ang. flavine mononucleotide). W tym celu wykorzystano aptamer specyficzny w stosunku do FMN (moduł rozpoznający), aptamer specyficzny w stosunku do MG (moduł generujący sygnał) i połączono je modulem komunikacyjnym w postaci krótkiego łącznika dwuniciowego RNA. Dodatkowo, strukturę aptameru wiążącego MG oraz strukturę łącznika dobrano w taki sposób aby zmiana konformacji aptameru wiążącego FMN po związaniu z ligandem powodowała allosteryczną stabilizację kompleksu aptameru związanego z MG.

4b. Przykłady receptorów kwasów nukleinowych, białek i związków niskocząsteczkowych.

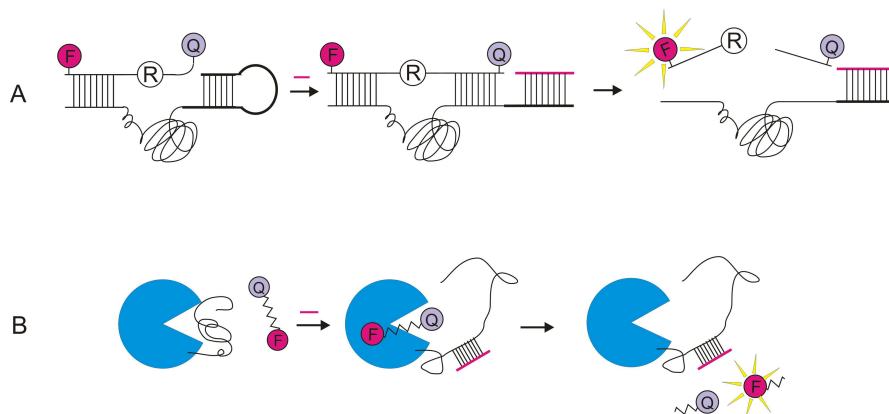
Kwasy nukleinowe są często stosowane w konstrukcji biocujników do detekcji DNA lub RNA. Można je rozpatrywać jako specjalny przypadek receptorów o strukturze kwasów nukleinowych gdyż są specyficzne w stosunku do cząsteczek o tej samej budowie chemicznej i wykorzystują w zasadzie tylko jeden rodzaj rozpoznawania molekularnego oparty na klasycznym parowaniu zasad nukleinowych zgodnie z regułami Watsona-Cricka. Biocujniki DNA/RNA w których wykorzystuje się tzw. technologie hybrydyzacji kwasów nukleinowych, ze względu na ich duże znaczenie w molekularnej diagnostyce medycznej, stanowią przekonujący przykład korzyści płynących z praktycznych zastosowań nanobiotechnologii. Na obecnym etapie rozwoju technologii hybrydyzacji kwasów nukleinowych na szczególną uwagę zasługuje technologia chipów DNA (mikromacierzy DNA) i zastosowanie ich w szeroko rozumianej genomice,³¹⁻³³ wspomniana wyżej, związana z nią technologia biocujników DNA^{34,35} oraz metody reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) w tym PCR w czasie rzeczywistym.^{36,37} Urządzenia wykorzystujące technologie hybrydyzacji kwasów nukleinowych (receptory molekularne i konstruowane na ich bazie biocujniki) oparte są na zdolności do wykrywania powstawania struktury dwuniciowej kwasu nukleinowego z jednoniciowych komplementarnych fragmentów. Niezwykle wysoka selektywność i specyficzność receptorów tego typu wynika nie ze zróżnicowania charakteru chemicznego wiązanych ligandów i struktury receptora lecz ze zdolności receptora do odczytania informacji zakodowanej w związanym ligandzie (analizie) w postaci sekwencji zasad nukleinowych. Zagadnienia te stanowią odrębne,

obszerne dziedziny badań i praktyki i nie będą tutaj szerzej omawiane. Niżej, na Rysunku 4 przedstawiona jest zasada działania klasycznego chipu DNA (mikromacierzy DNA) a na Rysunku 5 dwa z wielu formatów receptorów do detekcji RNA/DNA.



Rysunek. 4, Zasada działania chipu DNA: zakotwiczona na stałym podłożu wiązka sond DNA o znanych sekwencjach poddawana jest działaniu mieszaniny nieznanych fragmentów DNA. Analizowany DNA jest wcześniej amplifikowany i odpowiednio znakowany. Sygnał odzwierciedla wykrycie DNA o określonej sekwencji, a więc utworzenie dupletu między sondą i badanym DNA.

W przykładzie A) (Rysunek 5) receptor typu molekularnej latarni składa się z oligorybonukleotydu znakowanego na jednym końcu fluoroforem (F) na drugim wygaszaczem (Q), przyłączonego do niego rybozemu oraz sekwencji tworzącej pętlę blokującą aktywność rybozemu. Wykrywany DNA jest komplementarny do sekwencji blokującej, jego związanie z tą sekwencją niszczy pętlę co aktywuje rybozym, rybozym niszczy RNA co z kolei powoduje uaktywnienie fluoroforu i emisję sygnału optycznego.³⁸ B) Receptor składa się z trombiny i aptameru blokującego jej aktywność proteazową. Wykrywany DNA jest komplementarny do fragmentu blokującego trombinę aptameru, jego związanie z aptamerem uwalnia trombinę która degradowe peptyd zawierający na jednym końcu fluorofor (F) a na drugim wygaszacz (Q), odseparowanie wygaszacza od fluoroforu aktywuje go co powoduje emisję sygnału optycznego.³⁹ Stosowane w omawianych wyżej typach receptorów rybozomy są krótkimi kwasami rybonukleinowymi zdolnymi do katalizowania pewnych reakcji chemicznych, pełnią więc funkcje analogiczne do enzymów białkowych.



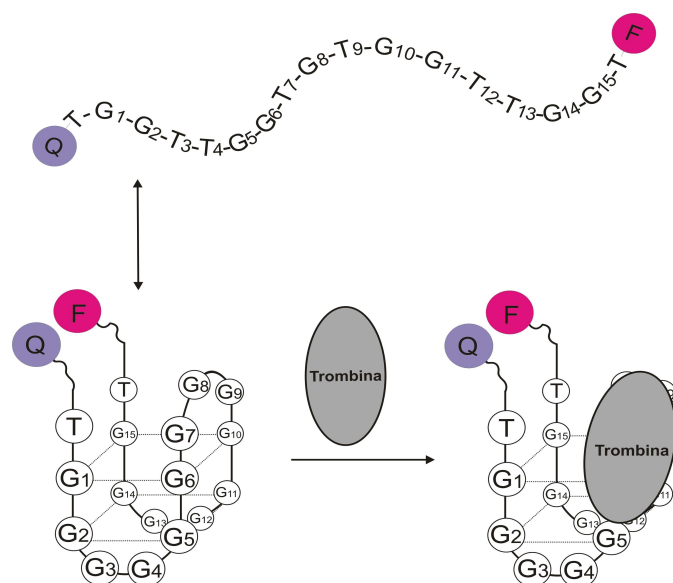
Rysunek 5. Przykłady receptorów o strukturze kwasu nukleinowego do detekcji DNA/RNA.

Kwasy nukleinowe wykorzystuje się z powodzeniem również w konstrukcji receptorów molekularnych do detekcji białek. Jednym z częściej przytaczanych przykładów receptorów tego typu są aptamery specyficzne w stosunku do trombiny, jednego z ważnych enzymów biorących udział w procesie krzepnięcia krwi.⁴⁰⁻⁴² W jednym z przypadków sekwencja antytrombinowa zbudowana z 15 nukleotydów (Rysunek 6) tworzy z trombiną trwały kompleks, w którym DNA-oligomer przyjmuje strukturę czteroniciową w skład której wchodzi dwa kwartety guaninowe. Aptamery specyficzne w stosunku do trombiny tworzą znakomitą podstawę do konstrukcji receptorów i czujników tego enzymu odgrywającego kluczową rolę m.in. w chorobach zakrzepowo-zatorowych żył. Na Rysunku 6 przedstawiony jest jeden z wielu formatów receptorów trombiny opartych na strukturze tetrapleksu guaninowego i molekularnej latarni.⁴²

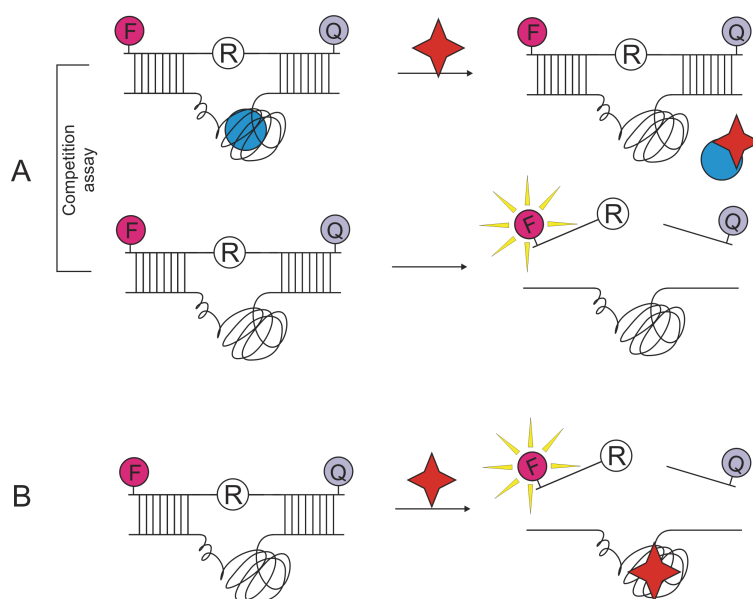
Aptamer znakowany przy końcu 3' wygaszczem (Q), w tym przypadku jest to kwas 4-(4'-dimetyloaminofenylazo)benzylowy (DABCYL), a przy końcu 5' fluoroforem (F), 6-karboksyfluoresceiną (6-FAM) istnieje w równowadze między strukturą nieuporządkowaną (kłębek) a wewnątrz cząsteczkowym kwadrupeleksem. Obecność trombiny powoduje powstanie kompleksu aptamer-białko stabilizując strukturę kwadrupleksu i zmniejszając fluorescencję na skutek zbliżenia fluoroforu i wygaszacza. W ostatnim czasie pojawiają się rozwiązania oparte na wykorzystaniu do detekcji białek nie tylko pojedynczych aptamerów lecz także mikromacierzy aptamerów specyficznych w stosunku do różnych białek.⁴³

Uniwersalność aptamerów porównywalną z właściwościami przeciwciał⁴⁴ uwydatnia fakt, iż można otrzymać wysoce specyficzne aptamery nie tylko w stosunku do cząstek o wysokiej masie cząsteczkowej takich jak kwasy nukleinowe i peptydy lecz również

w stosunku do związków niskocząsteczkowych. Na Rysunku 7 przedstawiono dwa przykłady receptorów związków niskocząsteczkowych o strukturze aptamerów, a niżej omówiono nieco szerzej kolejne przykłady.

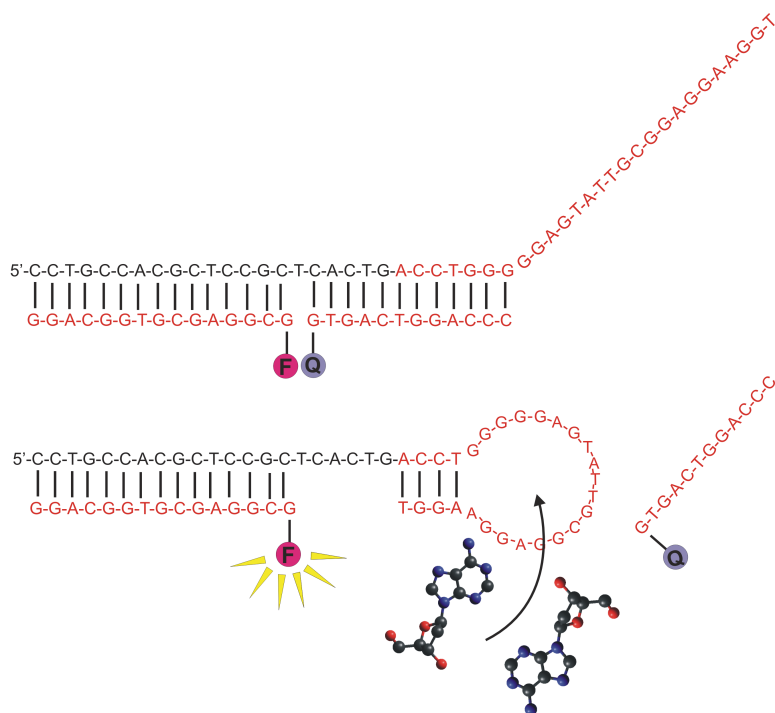


Rysunek 6. Receptor trombiny o strukturze aptameru zawierającego tetrapleks guaninowy i przekaźnik sygnału typu molekularnej latarni.



Rysunek 7. Przykłady receptorów związków niskocząsteczkowych o strukturze aptamerów.

W przykładzie A (Rysunek 7) receptor typu molekularnej latarni składa się z oligorybonukleotydu znakowanego na jednym końcu fluoroforem (F), na drugim wygaszaczem (Q), przyłączonego do niego rybozemu oraz połączonego z nim aptameru specyficznego w stosunku do białka wykazującego powinowactwo do interesującego nas związku niskocząsteczkowego. Związanie białka z aptamerem blokuje aktywność rybozemu, natomiast wprowadzenie do układu związku niskocząsteczkowego wiążącego się z białkiem silniej niż aptamer powoduje oddysocjowanie białka, aktywację rybozemu, który następnie oligorybonukleotyd co powoduje z kolei aktywację fluoroforu i emisję sygnału optycznego.⁴⁵ W przykładzie B) sytuacja jest odwrotna, przyłączenie związku niskocząsteczkowego do specyficznego w stosunku do niego aptameru uaktywnia rybozym powodując efekt jak opisano wyżej.⁴⁶



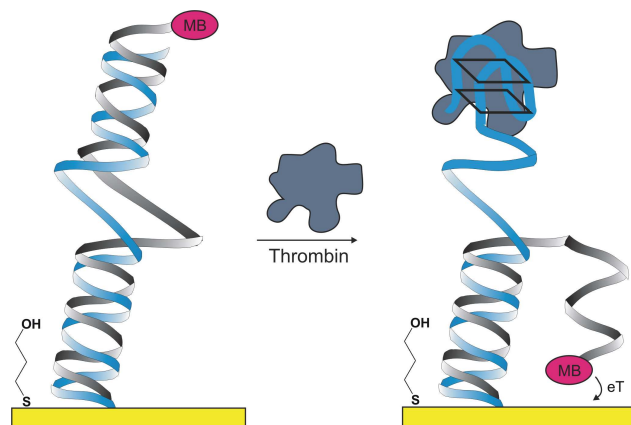
Rysunek 8. Przykłady receptora adenozyzny: powinowactwo aptameru wchodzącego w skład receptora do adenozyzny jest znacznie wyższe niż do jej fosforanów: AMP, ADP i ATP. W miejscu wiążącym receptora przyłączają się dwie cząsteczki adenozyzny.

Na Rysunku 8 przedstawiony jest receptor adenozyzny o strukturze molekularnej latarni zbudowany z dwóch oligomerów, jeden z nich mający właściwości aptameru specyficznego w stosunku do adenozyzny znakowany jest fluoroforem (F) a drugi, blokujący aktywność aptameru, zawierający wygaszacz (Q), jest komplementarny do pierwszego

oligomeru. Obecność adenozyiny w środowisku prowadzi do utworzenia trwałego kompleksu adenozyiny i aptameru co wiąże się z wyparciem oligonukleotydu zawierającego wygaszacz i emisję sygnału optycznego przez fluoroфор obecny w aptamerze.⁴⁷ Układy tego typu wykorzystywane są nie tylko do monitorowania stężenia adenozyiny, ale także do określania aktywności fosfatazy alkalicznej przekształcającej fosforany adenozyiny: AMP, ADP i ATP w adenozyinę. Wyższa aktywność fosfatazy powoduje degradację fosforanów adenozyiny i podwyższenie stężenia wolnego nukleozydu.

5. Receptory i biocujniki kwasów nukleinowych wykorzystujące detekcję elektrochemiczną.

W części 4a (Rysunek 2, C) podano detekcję elektrochemiczną analitu jako jeden z przykładów wielu możliwych rozwiązań stosowanych w budowie receptorów molekularnych,⁴⁸ niżej ten format omówiony będzie nieco szerzej. Bezpośrednie generowanie sygnału elektrycznego pozwala na znaczne uproszczenie konstrukcji urządzeń opartych na tego typu receptorach w porównaniu z czujnikami wykorzystującymi inne metody wytwarzania sygnału np. fluorescencję. Wynika to m.in. z faktu, że w metodach fluorescencyjnych wykorzystuje się wytwarzany wtórnie sygnał optyczny, który musi być w kolejnych etapach detekcji przekształcony w sygnał elektryczny. Do zalet receptorów elektrochemicznych zaliczyć można: 1) niższe koszty wytwarzania, 2) wysoką czułość, szczególnie w przypadku powiązania z amplifikacją sygnału na drodze elektrokatalizy, 3) szybkość reakcji na bodziec, 4) niezależność detekcji od zanieczyszczeń mechanicznych próbki powodujących jej zmętnienie oraz innych zanieczyszczeń absorbujących światło, 5) podatność na miniaturyzację, prostota konstrukcji. Na Rysunku 10 przedstawiony jest przykład receptora elektrochemicznego trombiny. Podobnie jak w opisanych wyżej receptorach tego białka również i w tym przypadku wykorzystuje się aptamer, w którym DNA-oligomer przyjmuje strukturę czteroniciową. W stanie podstawowym sonda detekcyjna (moduł detekcyjny) przyłączony do powierzchni elektrody zablokowana jest komplementarnym oligomerem (moduł sygnalizujący) zawierającym przy końcu przeciwnym w stosunku do elektrody znacznik elektrochemiczny (np. błękit metylenowy, MB). Ze względu na utworzenie struktury dwuniciowej między komplementarnymi fragmentami modułu detekcyjnego i sygnalizującego, znacznik elektrochemiczny nie może zbliżyć się do powierzchni elektrody. Pojawienie się w środowisku trombiny powoduje związanie cząstki białka ze specyficznym w stosunku do niego aptamerem i uwolnienie znacznika elektrochemicznego, który może teraz zbliżyć się do powierzchni elektrody i w konsekwencji, ulegając procesowi utleniania-redukcji generuje sygnał elektryczny.¹⁸



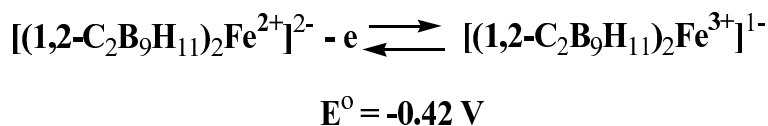
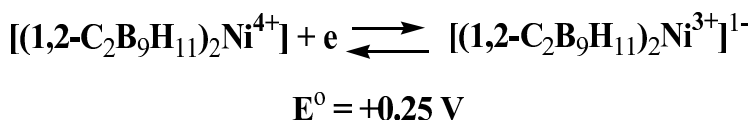
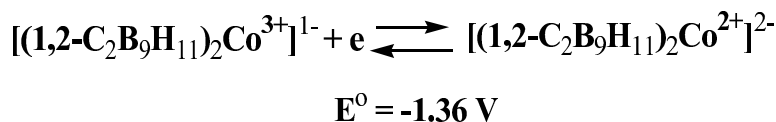
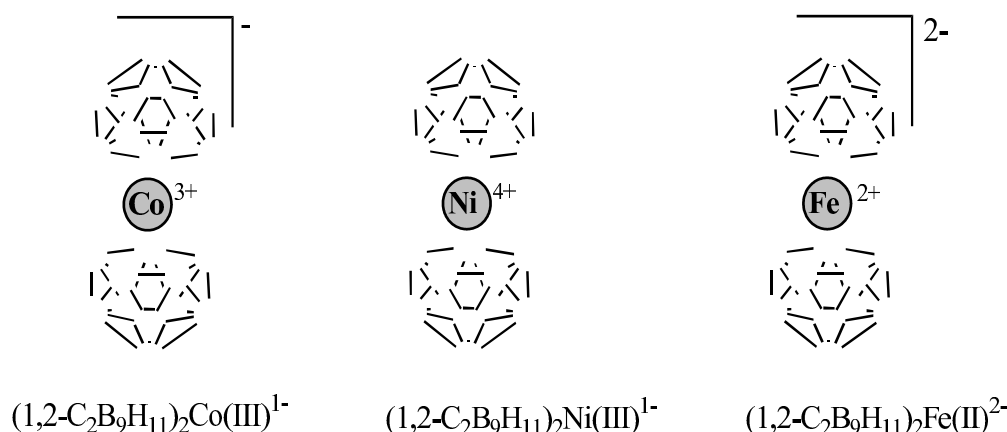
Rysunek 9. Przykład receptora elektrochemicznego trombiny.

Do najczęściej stosowanych rozwiązań wykorzystywanych w budowie biocujników elektrochemicznych zawierających jako element konstrukcyjny receptory o strukturze kwasów nukleinowych należą: 1) bezpośrednia detekcja elektrochemiczna kwasów nukleinowych, 2) wykorzystanie zdolności dwuniciowego DNA do przewodzenia ładunku elektrycznego, 3) zastosowanie aktywnych elektrochemicznie pośredników i interkalatorów, 4) wykorzystanie enzymów katalizujących reakcje utleniania-redukcji oraz 5) wykorzystanie znaczników elektrochemicznych.⁴⁸ Znacznikami elektrochemicznymi mogą być zarówno związki organiczne jak wspomniany wyżej błękit metylenowy jak i kompleksy metali.^{49,50} Do częściej stosowanych znaczników elektrochemicznych należą kompleksy żelaza i rutenu.

W ostatnim czasie opracowaliśmy nowy typ pochodnych kwasów nukleinowych zawierających jako element modyfikujący karborany (klastery boru)⁵¹ oraz ich kompleksy z metalami⁵² i wykazaliśmy przydatność tego rodzaju związków jako znaczników do detekcji elektrochemicznej. W badaniach modelowych wykorzystano 2'-CBM oligonukleotydy zawierające pojedynczą modyfikację w postaci klastera boru przyłączoną do reszty cukrowej. Oligonukleotydy analizowano w odpowiednim zakresie potencjałów, z wykorzystaniem detektora elektrochemicznego wyposażonego w dwukanałową celę kulometryczną z porowatą elektrodą grafitową i elektrodą odniesienia Pd/H₂.⁵³

Zastosowanie jako elektrochemiczne znaczniki DNA mogą znaleźć także kompleksy karboranów z metalami – metalokarborany.⁵² Metalokarborany stanowią rozległą rodzinę związków typu kompleksów kanapkowych mogących zawierać gamę różnych metali. Właściwości elektrochemiczne wielu metalokarboranów są znane. Proponowany przez nas nowy rodzaj znacznika elektrochemicznego oparty na strukturze karboranów i metalokarboranów umożliwia wbudowanie do cząsteczki znacznika jonów metali takich jak

Mn, Tc, Re, Fe, Ru, Co, Rh, Ir, Ni, Pd, Pt, Cu, Au, i innych, o różnych potencjałach utleniania/redukcji,⁵⁴ co w sposób istotny zwiększa zakres zastosowań tego typu znaczników.^{55,56}

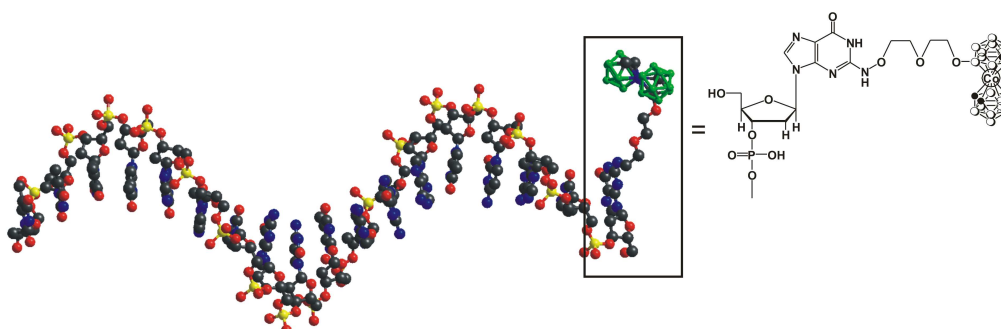


Rysunek 10. Metalokarborany jako potencjalne znaczniki elektrochemiczne.

Opracowaliśmy ogólną metodę syntezy koniugatów czterech podstawowych nukleozydów: tymidyny (T), 2'-deoksycytydyny (dC), 2'-deoksyadenozyny (dA) i 2'-deoksyguanozyny (dG) oraz metalokarboranów zawierających kobalt,⁵⁷ prowadzimy prace nad pochodnymi zawierającymi żelazo,⁵⁸ ruten oraz nikiel. Otrzymaliśmy także szereg DNA-oligomerów znakowanych klasterami boru (Rysunek 11).

Koniugaty nukleozydów i metalokarboranu zawierającego kobalt lub żelazo zostały scharakteryzowane elektrochemicznie.⁵⁹ Uzyskane wyniki pozwalają przypuszczać,

że metalokarborany mogą znaleźć zastosowanie jako nowy typ znaczników elektrochemicznych kwasów nukleinowych i innych biocząsteczek.



Rysunek 11. Oktadekamer 5'-d[(^{BEMC}G)CACTAGATCGCCGTTTT]-3' znakowany przy końcu 5' grupą metalokarboranową zawierającą kobalt.

6. Perspektywy

Poznanie biologii, właściwości chemicznych i fizycznych kwasów nukleinowych osiągnęło na przełomie XX i XXI wieku punkt krytyczny umożliwiając wykorzystanie kwasów nukleinowych nie tylko jako narzędzia biologii molekularnej czy też potencjalne leki lecz także zastosowanie ich do celów technicznych. Potrzeba miniaturyzacji oraz możliwość połączenia na poziomie molekularnym niektórych cech materii żywej i nieżywej stworzyło impuls do konstrukcji kompozytów bionieorganicznych oraz badań nad zastosowaniami kwasów nukleinowych w dziedzinie bioelektroniki i konstrukcji biocząsteczek. Dotychczas do tego celu stosuje się zazwyczaj naturalne kwasy nukleinowe, wydaje się jednak że w przyszłości można oczekiwać zwiększonego zainteresowania modyfikowanymi DNA/RNA i wykorzystaniem cech których naturalne kwasy nukleinowe nie posiadają. Prowadzone równoległe intensywne badania w dziedzinie chemii supramolekularnej sprawiają, że wiedza nagromadzona w tych obszarach może zaowocować wkrótce pojawieniem się na rynku szeregu nowych urządzeń o nieosiągalnych dotychczas właściwościach.

Wykaz skrótów:

AMP – 5'-monofosforan adenozyiny (*ang.: adenosine 5'-monophosphate*)

ADP – 5'-difosforan adenozyiny (*ang.: adenosine 5'-diphosphate*)

ATP – 5'-trójfosforan adenozyiny (*ang.: adenosine 5'-triphosphate*)

2'-CBM - grupa 2'-O-(o-karboran-1-yl-metylowa) [*ang.: 2'-O-(o-carboran-1-yl-methyl)*]

DABCYL - kwas 4-(4'-dimetyloaminofenylazo)benzylowy [*ang.: 4-((-4-(dimethylamino)-phenyl)-azo)-benzoic acid*]

DNA -kwas deoksyrybonukleinowy (*ang.: deoxyribonucleic acid*)

6-FAM - 6-karboksyfluoresceina (*ang.: 6-carboxyfluorescein*)

FMN - mononukleotyd flawinowy (*ang.: flavin mononucleotide*)

MB - błękit metylenowy (*ang.: methylene blue*)

MG – zieleń malachitowa (*ang.: malachite green*)

PCR - reakcja łańcuchowa polimerazy (*ang.: polymerase chain reaction*)

PNA - peptydowy analog kwasu nukleinowego (*ang.: peptide nucleic acid*)

RNA - kwas rybonukleinowy (*ang.: ribonucleic acid*)

SELEX – selekcja *in vitro* (*ang.: Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*)

Literatura:

1. The Encyclopedia of Molecular Biology, J. Kendrow and E. Lawrence, Eds., Blackwell Science, Ltd., Oxford, 1994.
2. Hartley, J.H., James, T.D., Ward, C.J. (2000) Synthetic receptors, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 3155-3184.
3. Kirkovits, G.J., Shriver, J.A., Gale, P.A., Sessler, J.L. (2001) Synthetic ditopic receptors. J. Incl. Phenom. & Macrocycl. Chem., 41, 69-75.
4. Watson, J.D., Hopkins, N.H., Roberts, J.W., Steitz, J.A., Weiner, A.M., Molecular Biology of the Gene, 5th Ed., Benjamin/Cummings, 2003.
5. Saenger, W., Principles of Nucleic Acid Structure, Springer-Verlag, New York, 1983.
6. Oxford Handbook of Nucleic Acid Structure, S. Neidle, Ed., Oxford University Press, Oxford, 1999.
7. DNA-Protein Interactions: Principles and Protocols, T. Moss, Ed., Humana Press; 2 ed., 2001.
8. Giel-Pietraszuk M., Barciszewska MZ., Barciszewski J. (1997) Oddziaływania kwasów nukleinowych z białkami, Postępy Biologii Komórki, 24, Sup. 8, 1-19.
9. Wrześniński, J. Struktura kompleksów RNA-białko, w „Na pograniczu chemii i biologii”, H. Koroniak, J. Barciszewski, W.T. Markiewicz, K. Ziemnicki, edytorzy, Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań, 1998, str. 245-265.
10. Turek, C., Gold, I. (1990) Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. Science, 249, 505-510.
11. Ellington, A.D., Szostak, J.W. (1990) In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. Nature, 346, 818-822.
12. Proske, D., Blank, M., Buhmann, R., Resch, (2005) A. Aptamers – basic research, drug development, and clinical applications. Appl. Microbiol. Biotechnol., 69, 367-374.
13. Brody, E.N., Gold, L. (2000) Aptamers as therapeutics and diagnostic agents. Mol. Biotech., 74, 5-13.
14. Lee, J.F., Stovall, G.M., Ellington, A.D. (2006) Aptamer therapeutic advance. Curr. Opin. Chem. Biol., 10, 282-289.
15. Szpechciński, A., Grzanka, A. (2006) Aptamery w diagnostyce klinicznej. Postępy Biochemii, 52, 260-270.

16. James, W. Aptamers, w "Encyclopedia of Analytical Chemistry", R.A. Meyers, Ed., John Wiley and Sons Ltd, Chichester, 2000, str. 4848-4871.
17. Sampson, T. (2003) Aptamers and SELEX: the technology, World Patent Information, 25, 123-129.
18. Hamula, C.L.A., Guthrie, J.W., Zhang, H., Li, X-F., Le, X.C. (2006) Selection and analytical application of aptamers. Trends Anal. Chem., 7, 681-691.
19. Subash Chandra Bose Gopinath (2007) Methods developed for SELEX, Anal. Bioanal. Chem., 387, 171-182.
20. Kusser, W. (2000) Chemically modified nucleic acid aptamers for in vitro selection: evolving evolution. Mol. Biotech., 74, 27-38.
21. Iato, S.M., Ozerova, N.D.S., He, K., Sergueeva, Z., Shw, B.R., Burke, D.H. (2002) Boron containing aptamers to ATP. Nucl. Acids Res., 30, 1-7.
22. Tombelli, S., Minunni, M., Mascini, M. (2005) Analytical applications of aptamers, Biosens. Bioelectr., 20, 2424-2434.
23. Nvani, N.K., Li, Y. (2006) Nucleic acid aptamers and enzymes as sensors. Curr. Opinion Chem.Biol., 10, 272-281.
24. Yamamoto, R., Baba, T., Kumar, P.K. (2000) Molecular beacon aptamer fluorescences in the presence of tat protein of HIV. Gene Cells, 5, 389-396.
25. Nutiu, r., Li, Y. (2003) Structure switching signaling aptamers. J. Am. Chem.Soc., 125, 4771-4778.
26. Yang, C.J., Jockusch, S., Vicens, M., Turro, N.J., Tan, W. (2005) Light switching excimer probes for rapid protein monitoring in complex biological fluids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 102, 17278-17283.
27. Gronewold, T.M., Glass, S., Quandt, E., Famulok, M. (2005) Monitoring complex formation in the eblood-coagulation cascade using aptamer-coated SAW sensors. Biosens. Bioelectron., 20, 2044-2052.
28. Savran, C.A., Knudsen, S.M., Ellington, A.D., Manalis, S.R. (2004) Micromechanical detection of proteins using aptamer-based receptor molecule. Annal. Chem., 76, 3194-3198.
29. Bang, G.S., Cho, S., Kim, B.G. (2005) A novel electrochemical detection method for aptamer biosensors. Biosens. Bioelectron., 21, 863-870.
30. Stojanovic, M.N., Kolpashchikov, D.M. (2004) Modular aptameric sensors. J. Am. Chem. Soc., 126, 9266-9270.
31. Anthony, R.M., Brown, T.J., French, G.L. (2001) DNA array technology and diagnostic microbiology, Expert. Rev. Mol. Diagn. 1, 30-38.

32. Gao, X., Gulari, E., Zhou, X. (2004) In situ synthesis of oligonucleotide microarrays, *Biopolymers*, 73, 579-96.
33. Goldsmith, Z.G., Dhanasekaran, N. (2004) The microrevolution: applications and impacts of microarray technology on molecular biology and medicine, *Int J Mol Med*. 13, 483-95.
34. Nakamura, H., Karube, I. (2003) Current research activity in biosensors, *Anal Bioanal Chem*. 377, 446-68.
35. D'Orazio, P. (2003) Biosensors in clinical chemistry, *Clin. Chim. Acta*, 334, 41-69.
36. Wilhelm, J., Pingoud, A. (2003) Real-time polymerase chain reaction, *ChemBiochem*. 4, 1120-1128.
37. Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., Williams P.M. (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Res*. 6, 986-994.
38. Stojanovic, M.N., de Prada, P., Landry, D.W. (2001) Catalytic molecular beacons. *ChemBioChem*., 2, 411-415.
39. Pavlov, V., Shlyahovsky, B., Willner, I. (2005) Fluorescence detection of DNA by the catalytic activation of an aptamer/thrombin complex. *J. Am. Chem. Soc.*, 127, 6522-6523.
40. Pavlov, V., Shlyahovsky, B., Willner, I. (2005) Fluorescence detection of DNA by the catalytic activation of an aptamer/thrombin complex. *J. Am. Chem. Soc.*, 127, 6522-6523.
41. Basnar, B., Elnathan, R., Willner, I. (2006) Following aptamer-thrombin binding by force measurements. *Anal. Chem.*, 78, 3638-3642.
42. Jianwei, J.Li, Xiaohong Fang, Weihong Tan, (2002) Molecular aptamer beacons for real-time protein recognition. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 292, 31-40.
43. Collett, J.R., Cho, E.J., Ellington, A.D. (2005) Production and processing of aptamer microarrays. *Methods*, 37, 4-15.
44. Szpechciński, A., Grzanka, A. (2006) Aptamery w diagnostyce klinicznej. *Post. Biochem.*, 52, 260-270.
45. Hartig, J.S., Najafi-Shoushtari, S.H., Grune, I., Yan, A., Ellington, A.D., Famulok, M. (2002) Protein-dependent ribozymes report molecular interactions in Real time. *Nat. Biotechnol.*, 20, 717-722.
46. Srinivasan, J., Cloud, S.T., Hamaguchi, N., Kurz, J., Keene, S., Kurz, M., Boomem, R.M., Blanchard, J., Epstein, D., Wilson, C., et al. (2004) ADP-specific sensors enable universal assay of protein kinase activity. *Chem. Biol.*, 11, 499-508.

47. Razvan Nutiu, Jasmine, M.Y. Yu, Yingfu, Li. (2004) Signaling aptamers for monitoring enzymatic activity and for inhibitors screening. *ChemBioChem*, 5, 1139-1144.
48. Leśnikowski, Z.J. Biocujniki i elektrochemiczne znaczniki DNA w „Na pograniczu chemii i biologii”, Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Poznańskiego, Poznań, 2004, 143-168.
49. Lesnikowski, Z.J. (2007) DNA as platform for new biomaterials. Metal-containing nucleic acids. *Curr. Org. Chem.*, 11, w druku.
50. Zhiqiang Gao, Yuan Hong Yu. (2007) Direct labeling microRNA with an electrocatalytic moiety and its application in ultrasensitive microRNA assays. *Biosens. Bioelectr.*, 22, 933-940.
51. Lesnikowski Z.J. (2003) Boron clusters - A new entity for DNA-oligonucleotide modification, *Eur. J. Org. Chem.* 4489-4500.
52. Olejniczak A.B., Plesek J., Kriz O., Lesnikowski Z.J. (2003) Nucleoside Conjugate Containing Metallacarborane Group and its Incorporation into DNA-oligonucleotide, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 42, 5740-5743.
53. Olejniczak A.B. Praca doktorska: “Nowe sondy oligonukleotydowe. Synteza pochodnych karboranylowanych nukleozydów i wykorzystanie ich do otrzymywania karboranylooligonukleotydów”, Centrum Mikrobiologii i Wirusologii PAN, 2002, Łódź.
54. Geiger, W.E. Jr., *Electrochemistry of Metallaboron Cage Compounds* w “Metal Interactions with boron clusters”, R.N. Grimes, Ed., Plenum Press, N.Y. 1982, rozdział 6.
55. Grimes R.N. (2000) Metallacarboranes in the new millennium, *Coord. Chem. Rev.* 200-202, 773-811.
56. Saxena A.K., Hosmane N.S. (1993) Recent advances in the chemistry of carborane metal complexes incorporating d- and f-block elements, *Chem. Rev.* 93, 1081-1124.
57. Olejniczak, A.B., Plesek, J., Lesnikowski, Z.J. (2007) Nucleoside-metallacarborane conjugates for base-specific metal-labeling of DNA, *Chem. Eur. J.* 13, 311-318.
58. Olejniczak, A.B., Paulina Mucha, P., Grúner, B., Leśnikowski, Z.J. (2007) DNA-dinucleotides bearing cobalt- and iron-biscarborane complex, *Organometallics*, wysłane do druku.

59. Olejniczak, A.B., Corsini, M., Fedi, S., Zanello, P., Lesnikowski, Z.J. (2007)
Nucleoside-metallacarborane conjugates for multipotential electrochemical coding
of DNA. *Electrochem. Commun.*, przyjęte do druku.

Rozdział 7

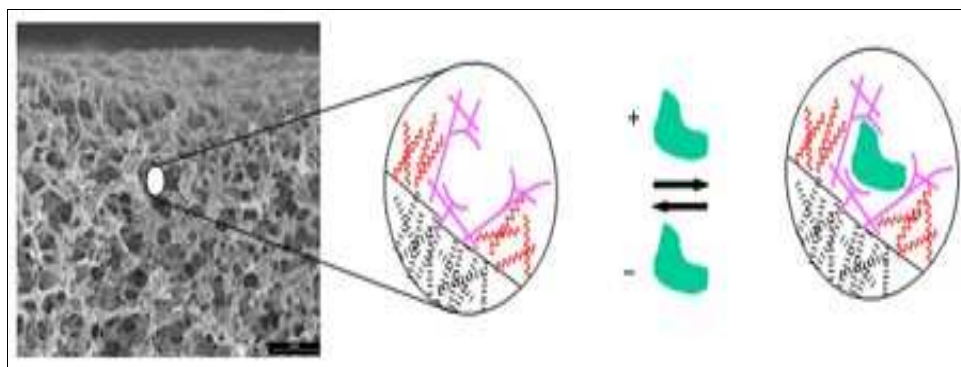
Receptory wdrukowane w polimer

Beata Kolesińska, Justyna Frączyk, Zbigniew J. Kamiński

Instytut Chemii Organicznej Politechniki Łódzkiej, Żeromskiego 116, 90-924 Łódź

1. Wprowadzenie

Receptory wdrukowane w polimer (*Molecularly Imprinted Polymers* – w skrócie *MIPs*) są usieciowanymi polimerami zawierającymi wnęki dopasowane do rozmiaru, kształtu i funkcji chemicznej wybranej cząsteczki (lub jej fragmentu) powstałe w wyniku „odciśnięcia” śladu cząsteczki nazywanej dalej cząsteczką matrycową w polimeryzującej mieszaninie monomerów a następnie jej usunięcia poprzez ekstrakcję.



Rysunek 1. Mikroskopowy obraz wnęki i schemat wiązania ligandu we wnęcie receptorowej MIPs.

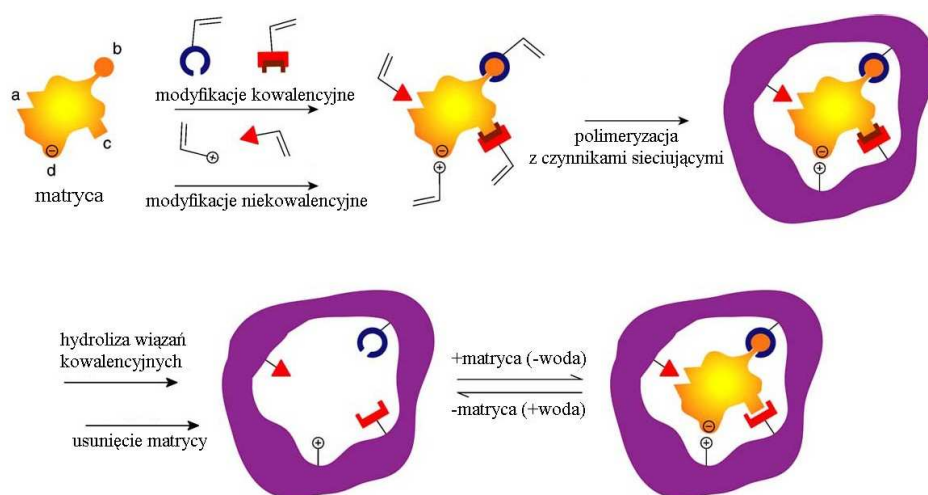
Historia receptorów wdrukowanych w polimer rozpoczyna się w latach 30 XX wieku, kiedy to radziecki chemik M.V Polyakov odkrył, że żel krzemionkowy przygotowany w obecności rozpuszczalnika organicznego wykazuje preferencje do jego wiązania. W 1949 – F. Dickey przeprowadził badania nad przygotowywaniem żelu krzemionkowego w obecności

barwników i stwierdził, że po usunięciu wzorcowego barwnika krzemionka „pamięta” cząsteczkę matrycową i preferuje wiązanie się z barwnikiem użytym jako matryca również w obecności innych barwników.

W 1972 roku grupie Guentera Wulffa udało się otrzymać pierwszy receptor wdrukowany w polimer organiczny (MIPs) zdolny do odróżniania enancjomerów kwasu glicerynowego. Kolejny krok w rozwoju techniki nastąpił w 1981 roku, kiedy to Mosbach i Arshady stworzyli pierwszy organiczny MIPs przy wykorzystaniu jedynie oddziaływań niekowalencyjnych. Niewątpliwie, ukoronowaniem badań nad procesami zachodzącymi pomiędzy cząsteczką gościa i cząsteczką gospodarza, które leżą przecież u podstaw działania każdego receptora, było przyznanie w roku 1987 nagrody Nobla dla Crama, Lehna i Pedersona za ich wielki wkład w poznanie i zrozumienie zjawiska rozpoznawania molekularnego (*molecular recognition*).

2. Synteza receptorów wdrukowanych w polimer

We współcześnie prowadzonych syntezach MIPs uwzględnia się zarówno kształt cząsteczek matrycowych jak i obecność grup funkcyjnych potencjalnie użytecznych to tworzenia słabych oddziaływań z polimerem. W tym celu stosuje się odpowiednio skomponowane mieszaniny monomerów wśród nich monomerów z grupami funkcyjnymi zdolnymi do tworzenia słabych oddziaływań z cząsteczką matrycową, takich jak wiązania wodorowe lub oddziaływania dipol-dipol. Samoorganizacja cząsteczek monomerów w otoczeniu cząsteczki matrycowej zapewnia najkorzystniejsze wzajemne dopasowanie uwzględniające zarówno kształt cząsteczki jak i obecność grup funkcyjnych przed rozpoczęciem procesu polimeryzacji i sieciowania. Często wraz z czynnikiem sieciującym dodaje się rozpuszczalników porogennych, które zapewniają uzyskanie porowatej struktury materiału otaczającego cząsteczkę matrycową wbudowaną w polimer. Usunięcie cząsteczki matrycowej następuje wprost poprzez wymycie rozpuszczalnikiem lub w bardziej złożonym procesie wymagającym dodatkowych przemian chemicznych (Schemat 1). Uzyskany polimer posiada zdolność ponownego wiązania cząsteczki matrycowej lub jej bliskich analogów strukturalnych. Należy podkreślić, że ze względu na różnice w szczegółach postępowania zapewniającego maksymalne wzajemne dopasowanie wyróżnianych jest kilka strategii syntezy MIPs.

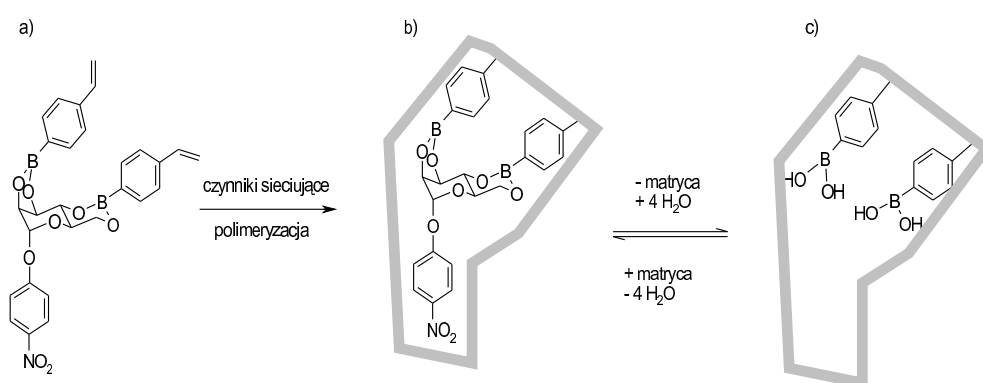


Schemat 1. Proces wdrukowywania matrycy w polimer. Oddziaływania z grupami funkcyjnymi (a-d) cząsteczki matrycowej umożliwiają różne strategie procesu wdrukowywania: a) nie-kowalencyjne, tworzenie wiązań wodorowych z kwasem metakrylowym, akryloamidem, itp.; b) odwracalne oddziaływanie kowalencyjne, np. estry boranowe; c) semi-kowalencyjne (*sacrificial spacer*); d) oddziaływania elektrostatyczne. Usunięcia matrycy z polimeru dokonuje się w wyniku ekstrakcji oraz hydrolizy.

2.1 Kowalencyjne wiązanie cząsteczki matrycowej z monomerem (covalent imprinting)

Strategia, w której cząsteczka matrycowa i jeden lub więcej monomerów są połączone wiązaniem kowalencyjnym tworząc addukt matryca-monomer¹ określana jest w literaturze angielskojęzycznej mianem *covalent imprinting*. Kopolimeryzacja adduktu matryca-monomer z innymi komponentami, włączając w to czynniki sieciujące, rozpuszczalniki porogenne prowadzi do uzyskania polimeru zawierającego cząsteczkę matrycową związaną kowalencyjnie. Usunięcie cząsteczki matrycowej wymaga w tym przypadku rozerwania wiązania kowalencyjnego w operacji dodatkowej poprzedzającej proces wymywania. W tym przypadku wiązaniu cząsteczki - gościa będzie towarzyszyło zajście reakcji chemicznej i ponownie związana cząsteczka matrycowa będzie nierozróżnialna od układu wyjściowego otrzymanego pierwotnie w procesie polimeryzacji. Metody kowalencyjnego wdrukowywania wykorzystujące silne wiązania kowalencyjne² takie jak wiązania estrowe wymagały zastosowania energicznych warunków reakcji niezbędnych do usunięcia cząsteczki matrycowej a przy tym ponowne wiązanie wymagało obecności silnie reaktywnych substratów takich jak chlorki acylowe reagujące z komponentem alkoholowym lub odpowiednie bromki podatne na reakcje z solami kwasów karboksylowych. Z tego powodu

klasyczne, obecnie stosowane metody kowalencyjnego wdrukowywania najczęściej wykorzystują w etapie otrzymywania adduktu matryca-monomer łatwiej zachodzące reakcje odwracalne takie jak tworzenie estrów boranowych, ketali/acetali i zasad Schiffa.



Schemat 2. Wdrukowanie 4-nitrofenylo-a-d-mannopiranozydo-2,3:4,6-di-O-(4-winylofenyl-boranu) (2): Związek matrycowy dołączony do monomeru otrzymany został poprzez kondensację kwasu 4-winylobenzenoboranowego (a) z 4-nitrofenylo-a-d-mannopiranozydem, po kopolimeryzacji z diwinylobenzenem lub dimetylokrylanem glikolu etylenowego tworzy polimer (b). Usunięcie cząsteczki związku matrycowego zachodzi poprzez hydrolizę estru boranowego i wymaga obecności 4 ekwiwalentów wody do utworzenia nieobsadzonej wnęki receptorowej (c). Wiązanie cząsteczki - gościa do receptora i jej uwalnianie jest procesem odwracalnym, zachodzącym dostatecznie szybko w skali czasu do zastosowania MIPs jako fazy stacjonarnej w HPLC.

W praktyce, ich zastosowanie ograniczone jest głównie do wiązania 1,2 i 1,3-dioli (jako estrów boranowych^{3,4,5,6} lub ketali^{7/acetali⁸}), aldehydów (jako acetali i zasad Schiffa⁹), ketonów (ketali) oraz amin (jako zasad Schiffa). Ponowne wiązanie cząsteczki matrycowej do wnęki, ze względu na fakt, że odtwarzana jest struktura identyczna z otrzymywaną pierwotnie w procesie kopolimeryzacji, jest główną zaletą tego rozwiązania, ponieważ w znaczącym stopniu zwiększa to zdolność selektywnego wiązania cząsteczki matrycowej.

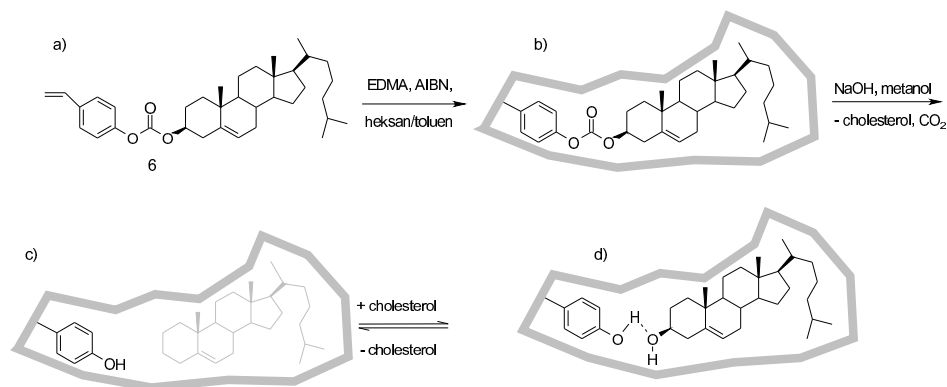
Drugą zaletą metody opartej o wiązanie kowalencyjne jest zmniejszenie możliwości niespecyficznego dokowania do wnęki z uwagi na brak w niej dodatkowych grup funkcyjnych. Najważniejszym ograniczeniem metody jest konieczność tworzenia kowalencyjnie związanych adduktów cząsteczki matrycowej z monomerami, co zasadniczo ogranicza swobodę doboru struktury związków stosowanych jako matryce.

2.2 Wdrukowywanie z częściowym wykorzystaniem wiązań kowalencyjnych (semi-covalent imprinting)

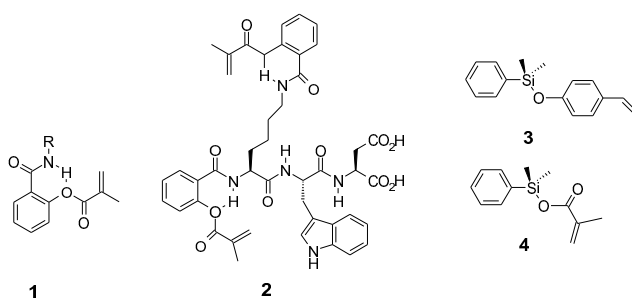
Metoda opisana jako *semi-covalent imprinting* obejmuje wszystkie metody wdrukowywania, w którym cząsteczka matrycowa jest związana kowalencyjnie w procesie polimeryzacji, natomiast po usunięciu związku matrycowego wiązanie do wnęki receptorowej ma naturę całkowicie niekowalencyjną. Najprostszym przykładem jest utworzenie estrów akrylowych cząsteczki matrycowej i następnie ich kopolimeryzacja w obecności czynnika sieciującego. Po hydrolitycznej degradacji i wymyciu cząsteczki matrycowej, jej ponowne wiązanie nie zachodzi poprzez utworzenie wiązania estrowego, lecz w wyniku oddziaływań pomiędzy wolnymi grupami hydroksylowymi cząsteczki matrycowej z wolnymi grupami karboksylowymi zawartymi we wdrukowanej wnęcie polimeru. Ta z pozoru prosta metoda otrzymywania MIPS ma jednak kilka wad. Hydroliza cząsteczki matrycowej zachodzi często z trudnością. Tworzenie wiązań wodorowych i oddziaływania steryczne w procesie ponownego wiązania cząsteczki matrycowej do wnęki są jednak odmienne od pierwotnych stosowanych w syntezie polimeru. Fakt ten utrudnia maksymalnie korzystne wzajemne dopasowanie gościa gospodarza w skutek zastąpienia precyzyjnie zdefiniowanego wiązania estrowego oddziaływaniami pomiędzy wolnymi grupami hydroksylową i karboksylową. Pomimo swoich ograniczeń metoda ta została z powodzeniem zastosowana do wdrukowywania estrów testosteronu¹⁰ i innych steroli¹¹ oraz fenoli¹².

Zastosowanie łączników (*linkerów*) pomiędzy cząsteczką matrycową a monomerem często zmniejsza ograniczenia opisanej powyżej metody. Łącznik odgrywa podwójną rolę: umożliwia połączenie cząsteczki matrycowej z monomerem oraz działa jako „*spacer*” i odsuwa cząsteczkę matrycową od grup funkcyjnych polimeru zmniejszając zawadę przestrzenną towarzyszącą ponownemu wiązaniu, (również wiązaniom o charakterze niekowalencyjnym). Wiązanie łącznika z cząsteczką matrycową musi być łatwe do rozerwania. Jeśli rozrywaniu wiązania chemicznego towarzyszy nieodwracalne usunięcie fragmentu łącznika, to nazywany jest on łącznikiem traconym (*sacrificial spacer*). Najczęściej stosowanymi łącznikami traconymi są węglany¹³ (Schemat 3).

Innymi spośród używanych łączników są pochodne mocznika¹⁴ oraz karbaminiany.¹⁵ Sporadycznie stosowane są również salicylany¹⁶ jako linkery wbudowywane pomiędzy resztę kwasu metakrylowego oraz cząsteczki matrycowe zawierające pierwszorzędowe grupy aminowe. Łącznik ten okazał się efektywny, ponieważ zapewnia tworzenie wiązania wodorowego pomiędzy funkcją amidową i estrową i sprawdził się przy wdrukowaniu tripeptydu Lys-Trp-Asp (Rysunek 2).



Schemat 3. Wdrukowanie cholesterolu¹⁷ za pośrednictwem traconego łącznika węglanowego: (a) monomer z dołączonym związkiem matrycowym – węglanem (4-winylofenylo)cholesterolowym jest polimeryzowany estrem dimetakrylowym glikolu etylenowego (EDMA) w porogennym rozpuszczalniku, (b) po polimeryzacji, cząsteczka matrycowa pozostaje związana chemicznie z polimerem, (c) hydroliza alkaliczna uwalnia związek matrycowy (cholesterol) i łącznik węglanowy (szary kontur pokazuje wnękę zajmowaną pierwotnie przez cholesterol), (d) ponowne wiązanie cholesterolu w przestrzeni wnęki pierwotnie dopasowanej do jego kształtu zapewnia utworzenie wiązania wodorowego z udziałem cząsteczki fenolu polimeru otaczającego wnękę.



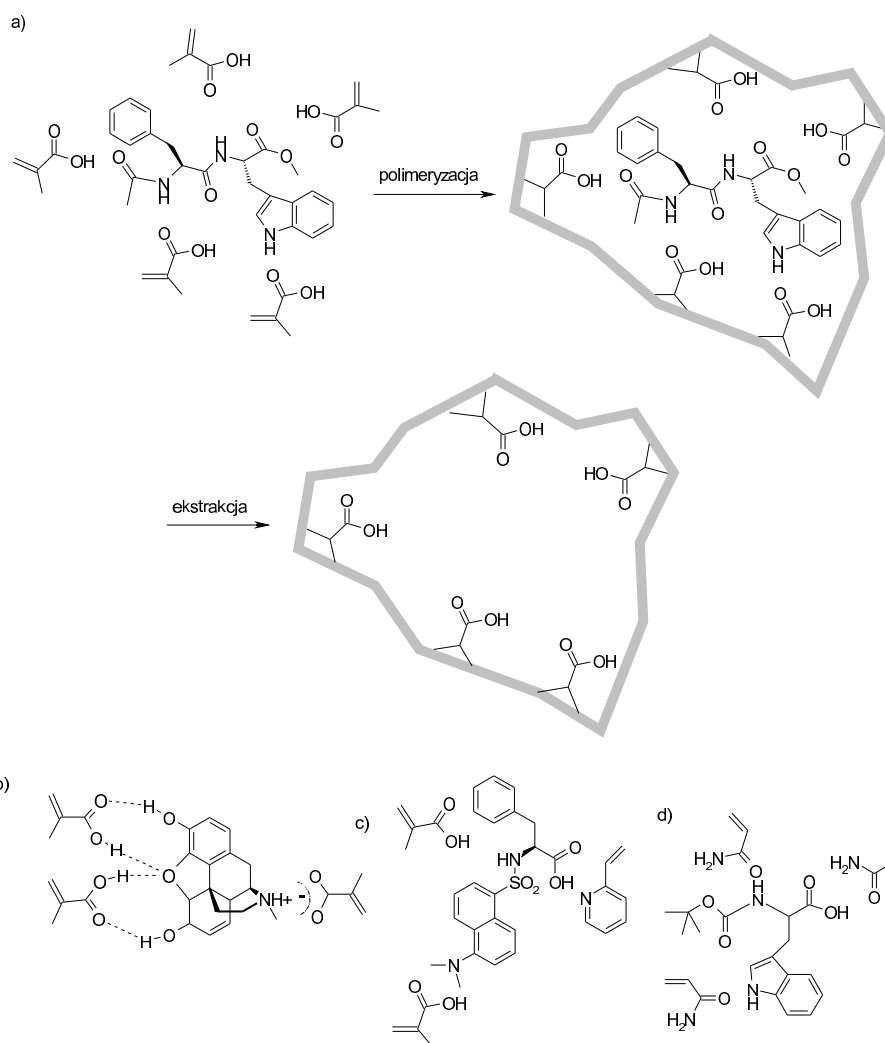
Rysunek 2. Przykłady łączników stosowanych w syntezie MIPS.

Pochodne kwasu 2-hydroxybenzoesowego (salicylowego) zapewniają utworzenie wewnątrzcząsteczkowego wiązania wodorowego pomiędzy amidowym N-H i estrowym atomem tlenu kwasu metakrylowego przy wdrukowywaniu amin pierwszorzędowych jako związków matrycowych (1). Monomery z łącznikiem dimetylosililowym wbudowywane są jako etery 4-winylofenylo (3) bądź estry sililowe kwasu metakrylowego (4) i z powodzeniem zostały zastosowane do wdrukowania aromatycznych zasad heterocyklicznych w polimer¹⁸.

2.3 Wdrukowywanie cząsteczek matrycowych nie tworzących wiązania chemicznego z monomerami

Z powodzeniem wdrukowywano cząsteczki matrycowe w polimer unikając tworzenia wiązania kowalencyjnego we wszystkich stadiach syntezy MIPs. W takim przypadku proces syntezy poprzedza dodatkowe stadium polegające na utworzeniu kompleksu pre-polimeryzacyjnego, w którym wykorzystywane są oddziaływania takie jak: wiązania wodorowe, jonowe, dipol-dipol oraz oddziaływania van der Waalsa. Kompleks pre-polimeryzacyjny jest niestabilny i dynamicznie zmienny w trakcie procesu wdrukowywania. Z tego powodu ważne znaczenia posiadają wszelkie działania zmierzające do zwiększenia jego stabilności, prowadzącej w efekcie końcowym do uzyskania bardziej jednolitych struktur wnęk receptorowych. Podwaliny do tej metodologii wprowadził Mosbach¹⁹, który wdrukowywał cały szereg zróżnicowanych strukturalnie wnęk receptorowych. Dokonany postęp okazał się tak znaczący, że obecnie jest to najczęściej stosowana procedura uzyskiwania MIPs. Wśród jej najważniejszych zalet wymienić należy pewną giętkość struktury otaczającej niszę i łatwość różnicowania grup funkcyjnych wewnątrz niszy a także prostotę procedury i zminimalizowanie reakcji chemicznych niezbędnych w syntezie MIPs. Ogólnie przyjmuje się, że uporządkowanie i wzajemne zorientowanie monomerów z grupami funkcyjnymi w kompleksie pre-polimeryzacyjnym pozostaje zachowane w gotowym polimerze dzięki użyciu czynników sieciujących.

Fakt ten zapewnia zróżnicowanie i dobre dopasowanie oddziaływań poszczególnych fragmentów tworzących wnękę receptorową do wymagań związku matrycowego. O złożoności procesów w fazie pre-polimeryzacyjnej świadczy duża liczba miejsc oddziaływań monomerów z cząsteczką matrycową. Czynniki takie jak polarność użytego rozpuszczalnika, temperatura polimeryzacji wpływają na niektóre oddziaływania wewnątrz kompleksu pre-polimeryzacyjnego. Oddziaływania wodorowe są uprzywilejowane w rozpuszczalnikach polarnych, jednakże w praktyce mamy do czynienia z kompromisem pomiędzy polarnością stosowanych rozpuszczalników a rozpuszczalnością cząsteczki matrycowej oraz porowatością²⁰ tworzącego się MIPs. Bardzo ważnym czynnikiem, który jest związany z funkcjonalnością uzyskanego MIPs jest stosunek ilości sfunkcjonalizowanego monomeru do cząsteczek matrycowych. Zbyt duży nadmiar sfunkcjonalizowanego monomeru może powodować zbyt duże niespecyficzne wiązanie do wnęki MIPs, zaś zbyt mały powoduje niedostateczną ilość grup funkcyjnych zdolnych do oddziaływania z cząsteczkami związanymi we wnęcie. Stosunek ilości sfunkcjonalizowanego monomeru do cząsteczek matrycowych wyznaczany jest z reguły eksperymentalnie. Na uwagę zasługuje przy tym rozwój technik chemii kombinatorycznej umożliwiających tworzenie bibliotek MIPs²¹.

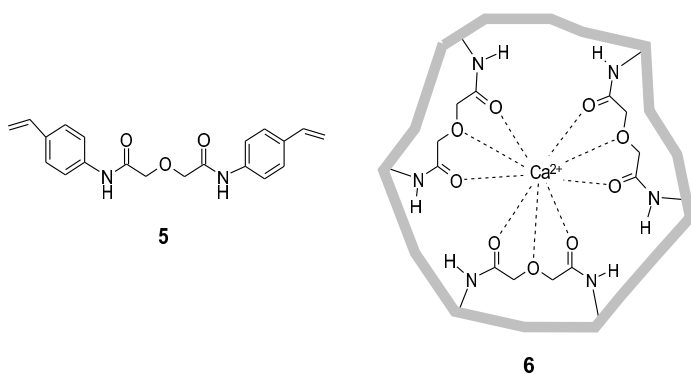


Schemat 4. Wdrukowywanie pochodnej dipeptydu z udziałem licznych oddziaływań niekwalencyjnych z kwasem metakrylowym (a)²²; schemat oddziaływań niekwalencyjnych w kompleksie pre-polimeryzacyjnym utworzonym pomiędzy morfiną i kwasem metakrylowym (b)²³; dansylowa pochodna fenyloalaniny kompleksowana mieszaniną 2-winylopirydyny i kwasu metakrylowego (c)²⁴; elektrostatycznie obojętny kompleks pre-polimeryzacyjny utworzony pomiędzy Boc-Trp-OH i akryloamidem, posiadający miejsca donorowe i akceptorowe dla tworzenia wiązań wodorowych²⁵, niezdolny do tworzenia par jonowych.

2.4 Jony metali w procesie wdrukowywania

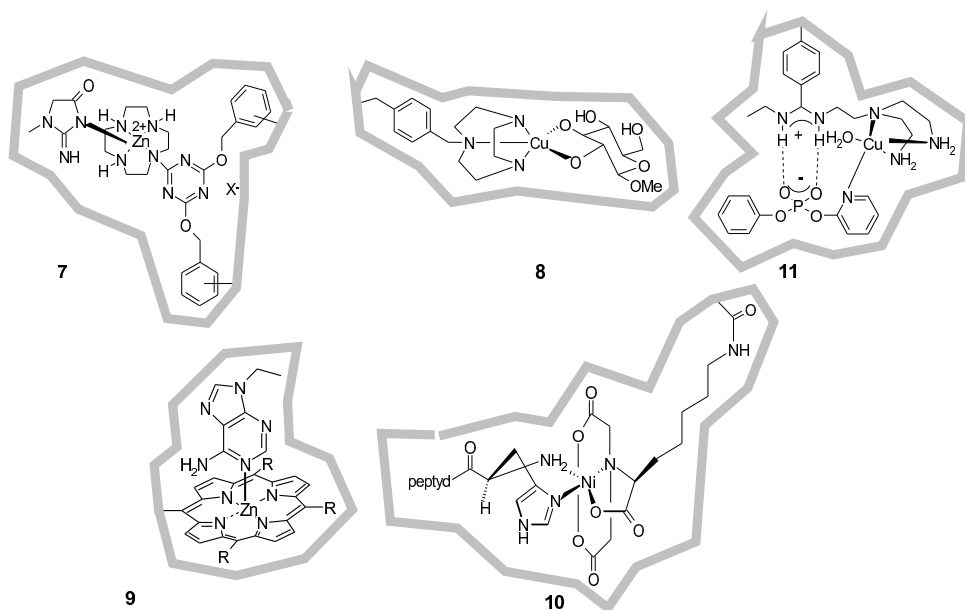
Rola jonów metali w procesie wdrukowywania może być trojaka. Mogą one stanowić cząsteczkę matrycową, wchodzić w skład cząsteczki matrycowej, lub też mogą być użyte jako składnik kompleksu pre-polimeryzacyjnego.

2.4.1 Jony metali jako cząsteczki matrycy



Rysunek 3. Monomer (5) zastosowany do wdrukowania receptora jonu Ca^{2+} (6)²⁵.

2.4.2 Jon metalu jako składnik kompleksu pre-polimeryzacyjnego



Rysunek 4. Przykłady oddziaływań jonów metali spotykane we wdrukowanych receptorach: wdrukowanie kreatyny kompleksowanej jonami cynku (7)²⁷; wiązanie glukozy wspomagane obecnością jonów miedziowych stosowane w sensorach glukozy (8)²⁸; kompleks

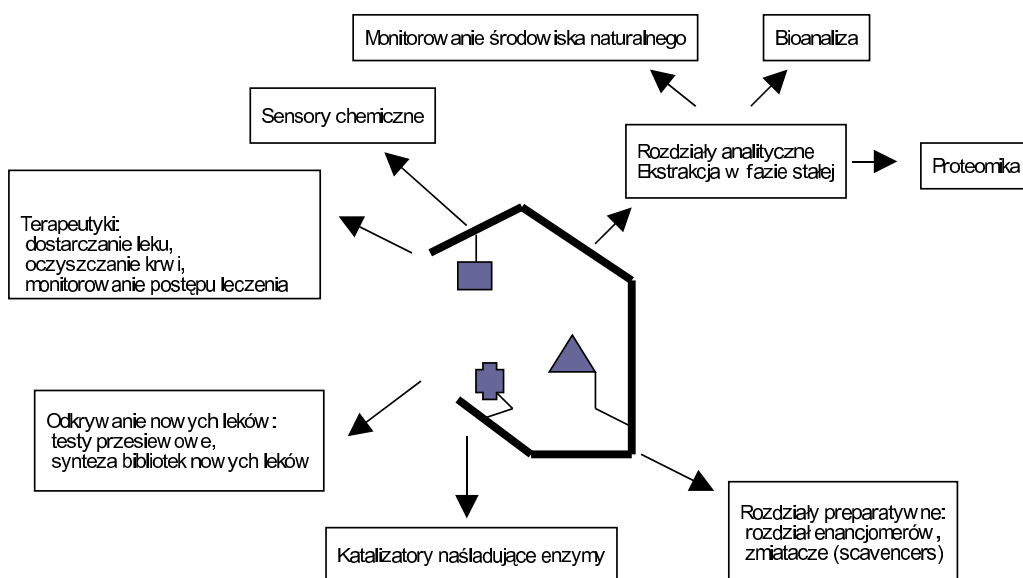
9-etyloadeniny z cynkową pochodną porfiryny (9)²⁹; kompleks nikłowy do wiązania peptydów z N-terminalną resztą histydynową (10)³⁰; kompleks zastosowany do wdrukowania struktury mimikującej aktywne centrum karboksypeptydazy A o zwiększonej aktywności katalitycznej w wyniku zastąpienia w obrębie centrum aktywnego jonu cynkowego jodem miedziowym (11)³¹.

Jak dotychczas nie można jednoznacznie ocenić, która z metod wdrukowywania daje najlepsze rezultaty. Wybór substratów i sposobów postępowania (monomerów, czynników sieciujących itd.) użytych do otrzymywania MIPs zależy od postawionego celu. W każdym przypadku należy jednak uwzględnić kilka aspektów w tym kompromis³² pomiędzy **sztywnością i elastycznością** struktury polimerowej. Struktura wdrukowanej wnęki powinna być na tyle stabilna (sztywna), aby utrzymać konformację w trakcie wymywania cząsteczki matrycowej, ale jednocześnie na tyle elastyczna, aby ułatwić osiągnięcie szybkiej równowagi pomiędzy uwalnianiem i ponownym wiązaniem cząsteczki matrycowej we wnękę. Z tego punktu widzenia metoda wdrukowywania unikająca tworzenia wiązań kowalencyjnych zwykle zapewnia korzystniejszą kinetykę wiązania i sprzyja szybszemu uzyskaniu stanu równowagi. Mechaniczne właściwości MIPs oraz konformacja wdrukowanej przestrzeni (wnęki) zależy od ilości zastosowanych związków sieciujących. Zazwyczaj stosuje się około 25-90% czynników sieciujących³³, które zwiększają hydrofobowość szkieletu polimerowego i zabezpieczają go przed zmianami konformacji w trakcie syntezy. MIPs powinny charakteryzować się wysoką stabilnością chemiczną. Diester kwasu metakrylowego z glikolem etylenowym (EGDMA) używany zazwyczaj jako czynnik sieciujący umożliwia uzyskanie MIPs stabilnych w szerokim zakresie pH i temperatury³⁴.

W przypadku aplikacji MIPs w warunkach *in vivo* muszą one być nietoksyczne i biokompatybilne. Niestety, większość klasycznie uzyskiwanych MIPs jest otrzymywana w rozpuszczalnikach organicznych, które mogą powodować niszczenie komórek. W takich przypadkach preferowane jest zastosowanie hydrofilowych szkieletów polimerowych, które mogą być otrzymywane i oczyszczane w wodzie. Hydrofilowość powierzchni podnosi biokompatybilność i obniża adsorpcję białek i mikroorganizmów na powierzchni polimeru³⁵, jednakże molekularne wdrukowywanie w wodzie jest procesem trudnym z powodu znacząco słabszych oddziaływań elektrostatycznych i wodorowych w polarnym medium, co powoduje, obniżenie powinowactwa i selektywności MIPs do ligandów³⁶. Niemniej jednak, oddziaływania hydrofobowe i tworzenie kompleksów z metalami, tworzenie licznych wiązań wodorowych oraz elektrostatycznych (podobnie jak ma to miejsce w procesie rozpoznawania przez białka) umożliwia otrzymywanie MIPs w środowisku wodnym³⁷.

3. Zastosowanie MIPs

MIPs są tak projektowane, aby mogły rozpoznawać dużą liczbę struktur wybranych tarcz (*targets*) z podobnie wysokim jak w przypadku przeciwciał powinowactwem oraz wysoką selektywnością. Te właściwości MIPs sprawiają, że stosowane są one w wielu dziedzinach: preparatywny rozdział³⁸, ekstrakcja z fazy stałej³⁹, zmiatacze (*scavengers*) do usuwania niepożądanych komponentów z żywności lub płynów biologicznych⁴⁰, i wreszcie w procesie testowania (*screening*) nowych leków⁴¹.



Schemat 5. Główne zastosowania MIPs⁴².

3.1 MIPs w procesie odkrywania leków (*drug discovery*)

Preferowane właściwości MIPs użytecznych w procesie odkrywania nowych leków⁴³ nieco odbiegają od właściwości pożądanых dla klasycznych układów służących do jak najbardziej selektywnego rozpoznawania cząsteczki matrycowej w badanym analizie. W poszukiwaniach leków ważniejszą od selektywności jest zdolność rozpoznania podobnych kształtów i podobnej funkcjonalności przez utworzone wnęki i to nie tylko w obrębie jednej klasy związków. Odkrywanie nowych leków zakłada, że badaniom poddawane są związki dotychczas nieznane, które powinny być wiązane do receptorów i wpływać na efekt biologiczny. W wielu przypadkach docelowy receptor nie jest znany. W takich przypadkach synteza MIPs wraz z odpowiednio zaprojektowanymi miejscami wiążącymi receptora jest możliwa w oparciu o znajomość struktur agonistów i antagonistów.

3.1.1 Mimetyki receptorów steroidowych

Receptor wiążący mimetyki testosteronu⁴⁴ otrzymany był poprzez syntezę MIPs z wdrukowanym kształtem testosteronu przy użyciu dimetakrylanu glikolu etylenowego jako czynnika sieciującego oraz kwasu metakrylowego jako monomeru. Uzyskany receptor wiązał (oprócz testosteronu) również cztery podobne steroidy, szczególnie silnie β -estradiol, ale również progesteron, propionian testosteronu oraz estron. Tarbin i Sharman⁴⁵ otrzymali serię MIPs z wdrukowanym heksestolem (nie-steroidowy związek estrogeniczny) i określili zdolność wiązania zarówno nie-steroidowych związków estrogenicznych, jaki i związków estrogenowych.

Tabela 1. Zestawienie wyników wiązania związków estrogenowych i nie-sterydowych estrogenicznych w MIPs.

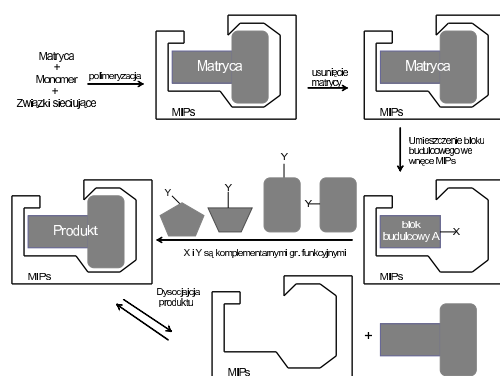
Testowany związek	Współczynnik retencji*	
	MIPs akryloamidowy	MIPs 2-(dietyloamino)etylometakrylanowy
Heksestrol	1.00	1.00
Dietylostilbestrol	0.70	0.90
Dienestrol	0.51	0.70
Zeranol	0.12	0.49
α -Estradiol	0.11	0.31
β -Estradiol	0.12	0.31
Benzoesan 3-estradiolu	0.08	
Octan 17 β -estradiolu	0.12	
Estron	0.11	

*) Współczynnik retencji RI określa retencje testowanej substancji w odniesieniu do retencji cząsteczki matrycowej: $RI = 100[k'_{\text{analitu (MIPs)}}/k'_{\text{analitu (kontrola)}}] / [k'_{\text{cząsteczki matrycy (MIPs)}}/k'_{\text{cząsteczki matrycy (kontrola)}}]$

Uzyskane receptory wykazały wysoką selektywność do nie-steroidowych związków estrogenicznych (dietylostilbestrol), jednakże ich powinowactwo do związków estrogenowych było umiarkowane.

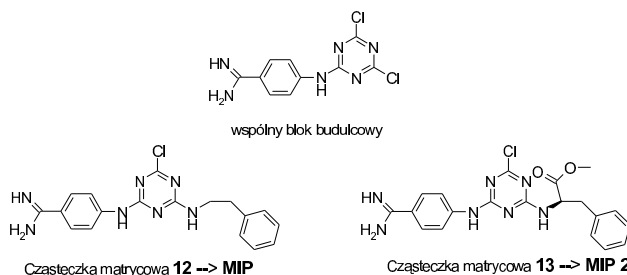
3.1.2 Zastosowanie MIPs w syntezie innych związków biologicznie aktywnych

Do najbardziej spektakularnych i zaskakujących odkryć w obszarze badań nad zastosowaniem molekularnie wdrukowanych polimerów zaliczyć można poszukiwania związków anty-idiotypowych⁴⁶ w procedurze wdrukowania anty-idiotypowego (*anti-idiotypic imprinting*).



Schemat 6. Receptory wdrukowywane w polimer w badaniach procesu wiązania anti-idiotypowego.

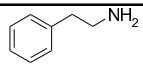
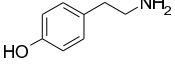
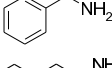
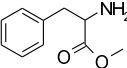
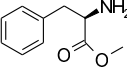
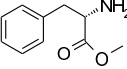
Proces syntezą pod nadzorem receptora rozpoczyna się od utworzenia odpowiedniej cząsteczki matrycowej i uformowania wnęki zdolnej do wiązania dwóch dopełniających się wzajemnie związków. Po związaniu w pustej wnęcie pierwszego z fragmentów, zawierającego odpowiednie grupy funkcyjne, wprowadza się fragment dopełniający pierwszą ze struktur, z grupą funkcyjną umożliwiającą wiązanie się obu fragmentów. W przypadku poprawnego dopasowania się obu fragmentów, wewnątrz wnęki następuje reakcja chemiczna prowadząca do połączenia się obu fragmentów w jedno indywiduum chemiczne. Zachodzący proces nazywany syntezą pod nadzorem receptora (*receptor-guide synthesis*) z powodzeniem został zastosowany w poszukiwaniu nowych inhibitorów kalikreiny; czynnika proteolitycznego uwalniającego z prokininogenu wazoaktywną, prozapalną kininę.



Rysunek 5. Substraty zastosowane w syntezie anty-idiotypowego receptora użytego w poszukiwaniach inhibitorów kalikreiny

Poszukiwania rozpoczęły się od otrzymania MIPS 1 z użyciem związku matrycowego 12, który jest znanym inhibitorem kalikreiny. Po usunięciu związku matrycowego 12, do wnęki receptorowej wprowadzono fragment cząsteczki stanowiący wspólny blok budulcowy (Rysunek 5) jakim jest 2,4-dichloro-6-podstawiona-1,3,5-triazyna i rozpoczęto poszukiwania amin pasujących do nieobsadzonego fragmentu wnęki a przy tym reagujących z fragmentem triazynowym. Badania wykazały, że MIPS z 2,4-dichloro-6 podstawioną 1,3,5-triazyną reaguje z fenetyloaminą cztery razy szybciej niż w przypadku polimeru kontrolnego, zaś reakcja przeprowadzana w roztworze przy takim samym stężeniu obu komponentów nie zachodzi. Fakt ten dowodzi, jak ważną rolę spełnia odpowiednia wnęka wdrukowana w sieć polimerową dla zapewnienia warunków niezbędnych do zachodzenia reakcji pomiędzy blokiem budulcowym a dopełniającym komponentem cząsteczki matrycowej. Oprócz fenetyloaminy; blok budulcowy wprowadzony do wnęki MIPS reagował również z innymi aminami, spośród których za najbardziej obiecującą uznano ester metylowy fenyloalaniny, tworzący cząsteczkę matrycową *R*-13. Uzyskane wyniki syntezy i zdolność do inhibowania kalikreiny zostały zestawione poniżej w Tabeli 2.

Tabela 2. Wydajności reakcji amin pierwszorzędowych z triazynowym blokiem budulcowym we wnękach receptorowych i aktywności tak uzyskanych inhibitorów kalikreiny

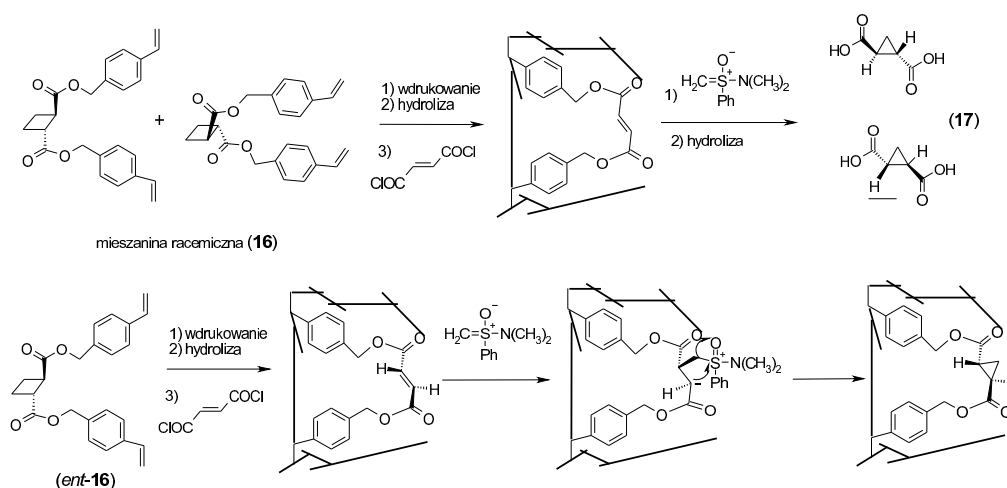
Amina	Produkt	Wydajność produktu w odniesieniu do reakcji tworzenia matrycy		Inhibicja kallikreiny K_i (μM)
		MIPS 1	MIPS 2	
	12	100 % (matryca)	114%	4.5
	14	21%		40
	15	34%	133%	5.2
	<i>rac</i> - 13	0		33
	<i>R</i> - 13		100% (matryca)	32.7
	<i>S</i> - 13		59%	47.1

3.2 MIPs w syntezie i katalizie

3.2.1 MIPs jako „mikroreaktory” do syntezy związków chiralnych

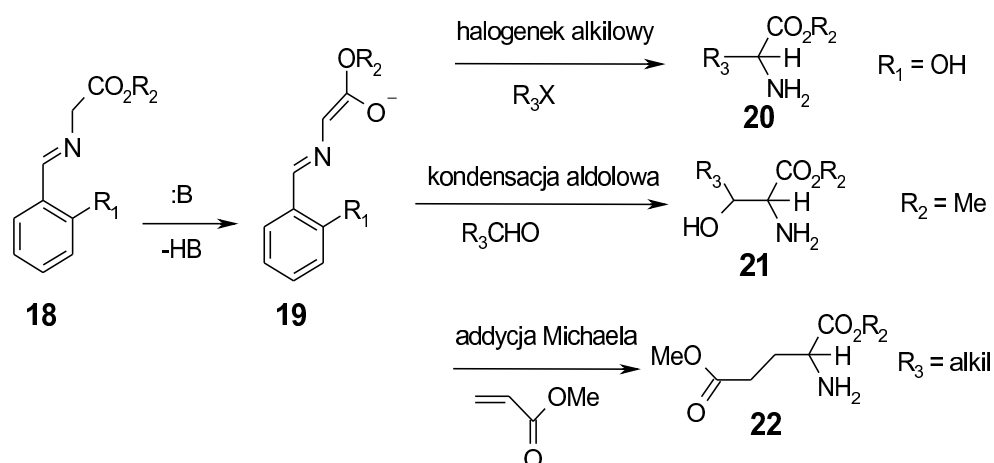
Wnęki wdrukowane z użyciem chiralnych lub prochiralnych cząsteczek matrycowych posiadają asymetrycznie rozmieszczone miejsca rozpoznawania molekularnego, analogicznie jak w centrach aktywnych enzymów. Przez bliską analogię, oczekiwano więc aktywności katalitycznej MIPs⁴⁷. Pierwsze, jeszcze mało obiecujące wyniki stosowania wnęk wdrukowanych przy użyciu chiralnych związków matrycowych uzyskano w syntezie kwasów cyklopropanodikarboksylowych⁴⁸.

Asymetryczna synteza kwasów cyklopropanodikarboksylowych jest procesem wieloetapowym, w którym kluczowe znaczenie ma stadium tworzenia nowych centrów chiralności w wyniku addycji karbenoidu do wiązania podwójnego pochodnej kwasu fumarowego. Jako związku matrycowego do utworzenia chiralnej wnęki katalitycznej użyto pochodnej (-) trans izomeru kwasu 1,2-cyklobutanodikarboksylowego estryfikowanej alkoholem 4-winylobenzoesowym użytym jako monomer.



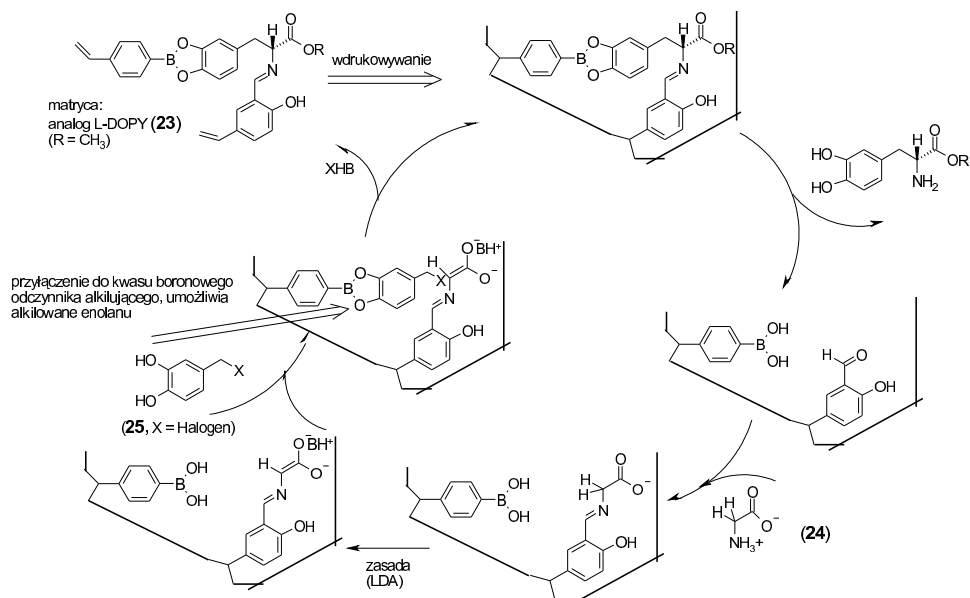
Schemat 7. Schemat otrzymywania MIPs i syntezy kwasów cyklopropanodikarboksylowych.

Chociaż nadmiar enancjomeryczny indukowany we wdrukowanej wnęcie był niski, uzyskany wynik potwierdził poprawność założeń i stanowił zachętę do kontynuowania poszukiwań w stosowaniu asymetrycznych wnęk MIPs w enancjoselektywnym protonowaniu-deprotonowaniu, hydrolizie, itp. Na uwagę zasługują prace Wulffa⁴⁹, który wykorzystał MIPs do asymetrycznej transformacji glicyny w inne α -aminokwasy.



Schemat 8. Otrzymywanie α -aminokwasów 22-22 z glicyny.

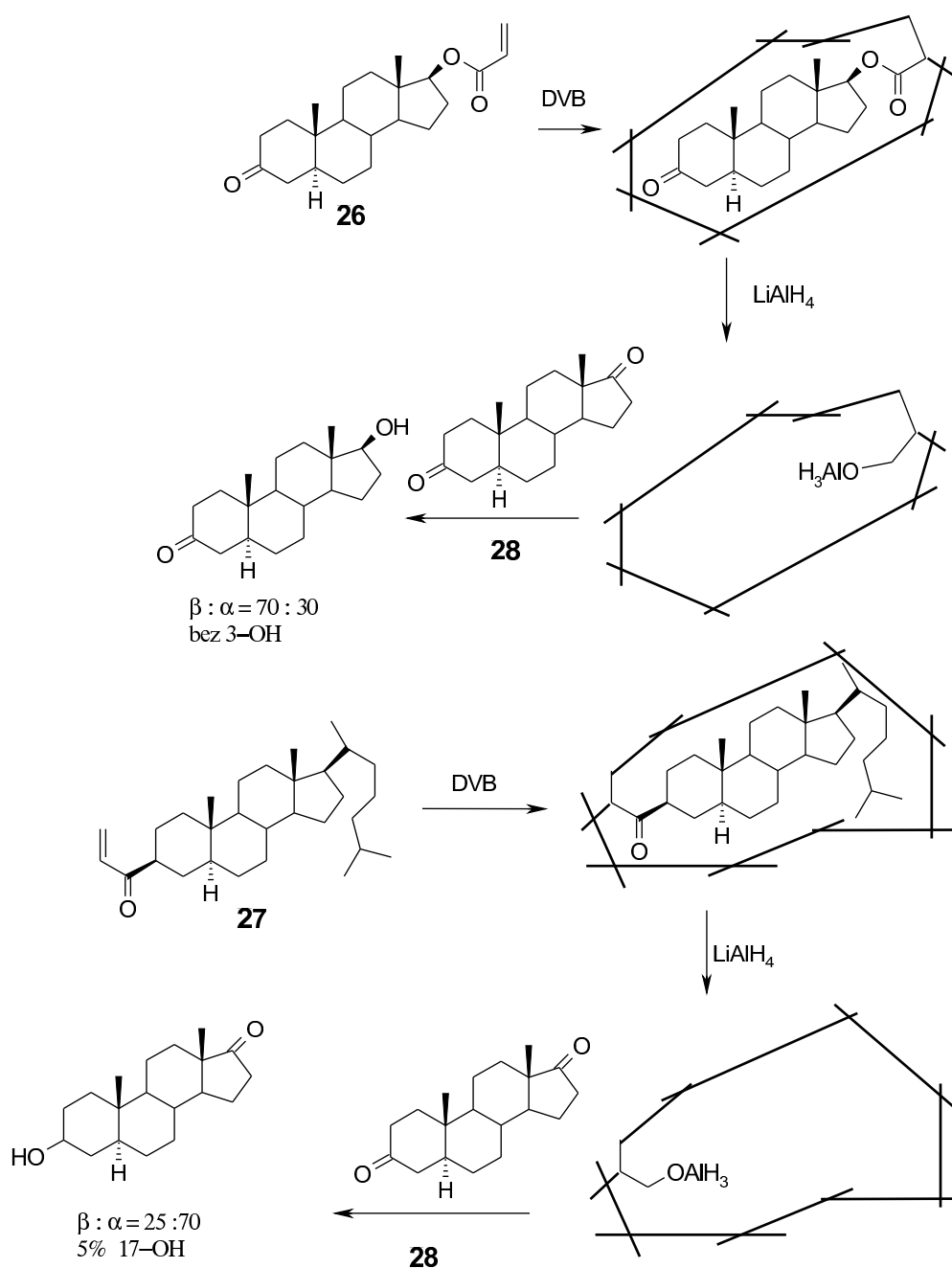
Jako związku matrycowego użył on pochodnej L-3,4-dihydroksyfenyloalaniny (L-DOPA) związanej kowalencyjnie z monomerami wywodzącymi się z winylobenzenu za pośrednictwem estrów boranowych i zasady Schiffa (23). Kopolimeryzacja z diwinylobenzenem (DVB) lub EGDMA i następne usunięcie cząsteczki matrycowej prowadziło do uzyskania wnęki z dwoma punktami wiązania aminokwasu. Glicyna (24) reagowała z uprzednio związanym do polimeru aldehydem dając zasadę Schiffa, która traktowana LDA tworzyła anion enolanowy, w którym położenie enancjotopowych protonów grupy metylenowej były w ścisły sposób zdefiniowane w diastereotopowej wnęcie. W kolejnym etapie syntezy, związany z polimerem kwas boronowy był estryfikowany za pomocą halogenku dihydroksybenzylowego (25), umieszczając fragment alkilujący w sposób stereospecyficznie zorientowany względem pochodnej glicyny, co zapewniało warunki niezbędne do asymetrycznego alkilowania.



Schemat 9. Alkilowanie w MIP. Wdrukowanie chiralnej matrycy (23) prowadzi do uzyskania chiralnej wnęki, w której możliwe jest asymetryczne alkirowanie glicyny (24).

3.2.2. MIPS jako immobilizowane reagenty

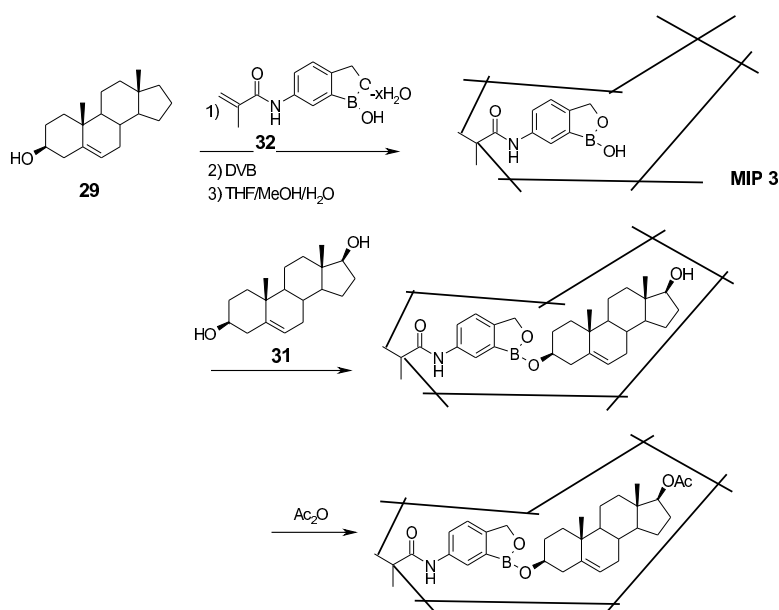
Reagenty immobilizowane są chętnie wykorzystywane w syntezie organicznej ze względu na powszechnie znane ułatwienie procesu izolowania i oczyszczania produktów reakcji na nośnikach stałych w porównaniu do analogicznych procesów zachodzących w roztworze. Reagenty wdrukowane w polimery wykazują, oprócz wymienionych powyżej, szereg innych zalet, takich jak łatwość kontroli kinetyki i stereochemii procesów oraz możliwość dopasowania kształtu i funkcji wnęki do niemalże dowolnych wymagań reagującego układu substratów. Przykładem ilustrującym korzyści z zastosowania zdefiniowanej wnęki uzyskanej po usunięciu cząsteczek matrycowych jest wysoce regio- i enancjoselektywna redukcja androstan-3,17-dionu (28)⁵⁰.

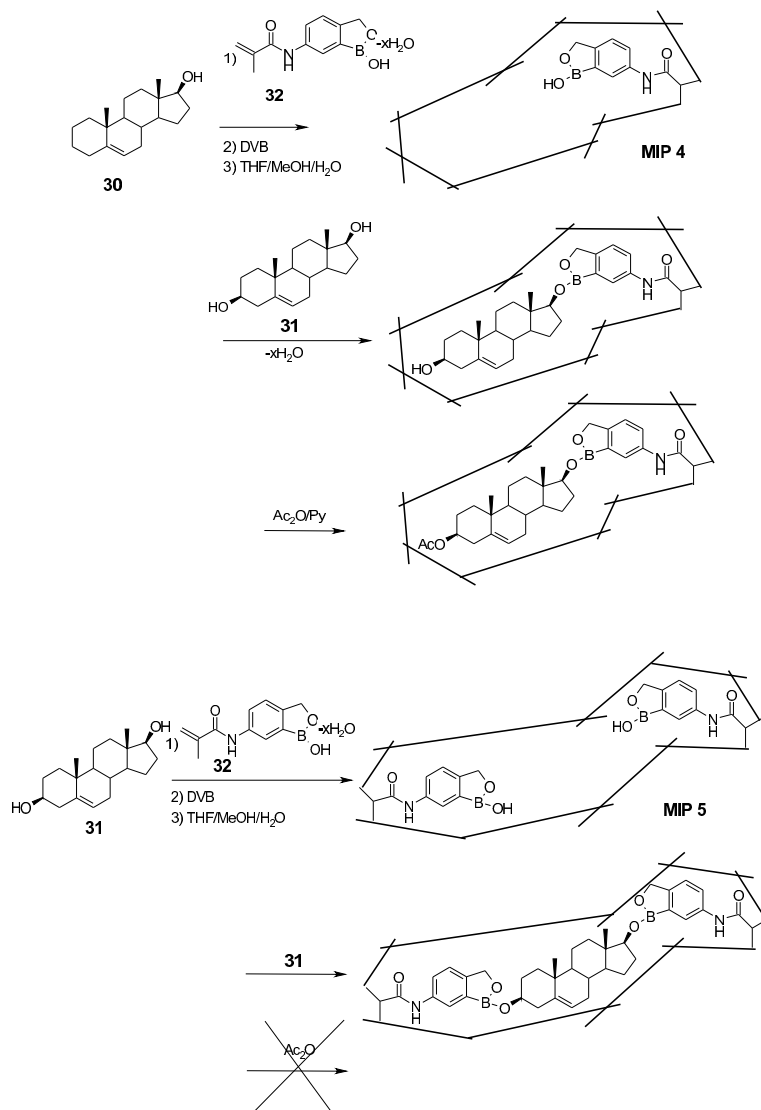


Schemat 10. Akrylany steroidów (26, 27) wdrukowane w polimer po usunięciu cząsteczek matrycowych zostały zastosowane do regioselektywnej redukcji androstan-3,17-dionu (28) za pomocą LiAlH_4 . Produkty redukcji zostały otrzymane z regio- i stereoselektywnością zdefiniowaną przez cząsteczki matrycowe.

Stereochemicznie zdefiniowane miejsca wiążące MIPs znalazły również zastosowanie jako grupy ochronne. Pierwszym z opisanych przykładów jest zastosowanie polimeru z wdrukowanym anilidem L-feniloalaniny⁵¹ jako grupy ochronnej stosowanej w reakcji L i D anilidów feniloalaniny z chlorkiem dansylu. Wydajność reakcji dla L-izomeru była o 46% niższa niż dla D-izomeru co wskazuje, że L-izomer był wydajniej wiązany przez polimer niż enancjomer D. Inna strategia zastosowana do ochrony stereo- i regioselektywnej opiera się na obserwacji wskazującej, że nie wszystkie grupy funkcyjne wiązanej cząsteczki pozostają zaangażowane w oddziaływania z wnęką receptorową. Najwięcej przykładów aplikacji MIPs dostarczyły badania regioselektywnego acylowania steroidów⁵².

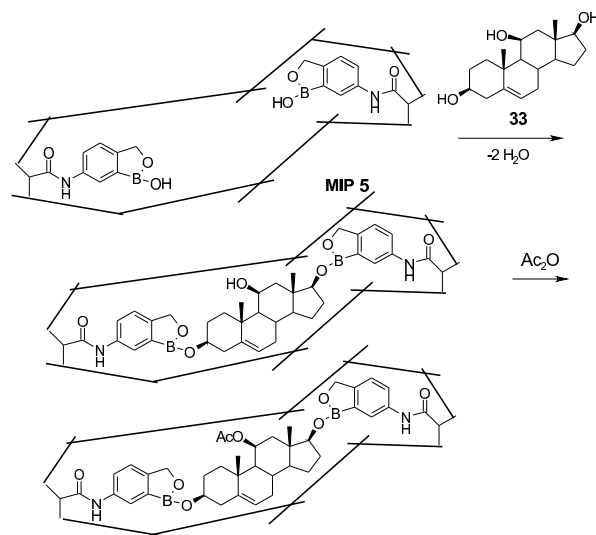
3.2.3 MIPs jako grupy ochronne





Schemat 11. Zastosowanie receptorów wdrukowanych w polimer jako grup ochronnych. Pochodne androst-5-enu (29-31) były polimeryzowane jako estry boronowe (32) tworząc wnęki w polimerach MIP 3-MIP 5. Acetylowanie androst-5-ene-3 β ,17 β -dioli w obecności MIP 3, MIP 4 prowadzi do odpowiednich monoestrów, zaś w obecności polimeru MIP 5 acetylowania nie obserwowano.

Użyteczność opisaną strategii, w której wdrukowany receptor spełnia rolę grupy ochronnej została również wykazana w reakcji selektywnym acetylowaniu androst-5-ene-3 β ,11 β ,17 β -triolu, tym razem przy wykorzystaniu polimeru MIP-5 jako grupy ochronnej.

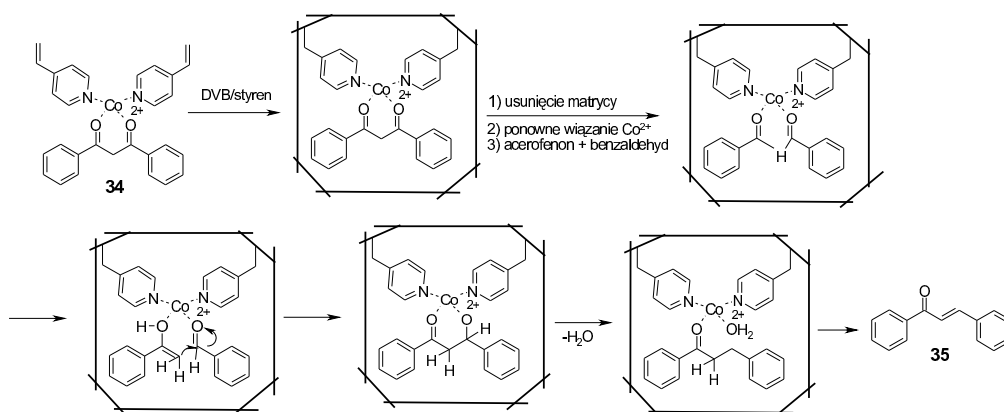


Schemat 12. Acetylowanie androst-5-ene-3β,11β,17β-triolu (33) w obecności polimeru MIP 5. Reakcja acetylowania sterycznie zatłoczonej pozycji 11β zachodzi dużo łatwiej, kiedy grupy hydroksylowe przy C3 i C17 związane są z polimerem.

3.2.4 Zastosowanie MIPs w katalizie

Podobieństwo pomiędzy zdefiniowaną geometrycznie i funkcjonalnie wnęką wdrukowaną w polimer a miejscami aktywnymi enzymów było podstawą do podjęcia prób wykorzystania MIPs jako sztucznych enzymów, czyli systemów mających zdolność do efektywnego obniżania energii aktywacji⁵³. Warunkiem wystąpienia efektu katalitycznego jest bardziej efektywne stabilizowanie stanu przejściowego przez MIPs niż stanu podstawowego $\Delta G_{\text{CTS}}^{\#} > \Delta G_{\text{CS}}$. Ponadto MIPs działający jak katalizator musi silniej wiązać substraty niż produkty reakcji, aby nie doprowadzić do zahamowania procesu przez kumulujący się produkt reakcji. W przypadku enzymów usuwaniu produktów z centrum aktywnego z reguły towarzyszą zmiany jego konfiguracji. Nadmierna więc „sztywność” polimeru uniemożliwia usuwania produktu na tej drodze, dlatego przy projektowaniu wnęki konieczne okazało się zróżnicowanie powinowactwa substratów, intermediatów i produktów względem wnęki pełniącej rolę centrum aktywnego.

Przykładem zastosowania MIPs w syntezie wiązania C-C jest otrzymanie sztucznej aldolazy klasy II⁵⁴ i jej wykorzystanie w kondensacji aldolowej. Do uzyskania MIPs z wnęką o właściwościach katalitycznych wykorzystano dibenzoilometan (34) koordynowany z kompleksem Co²⁺ - bis(4-winylopirydyna) mimikujący stan przejściowy kondensacji aldolowej. Po usunięciu cząsteczki matrycowej, do wnęki wprowadzono jako substraty kondensacji aldolowej: benzaldehyd oraz acetofenon.

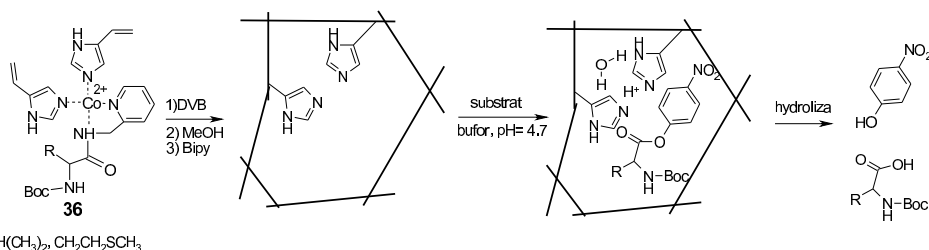


Schemat 13. MIPs jako sztuczna aldolaza klasy II. Synteza α,β -nienasyconych ketonów.

Uzyskany MIPs wykazywał wyraźną selektywność substratową i zwiększył szybkości kondensacji, co pozwoliło uznać stworzony układ za spełniający wymagania przewidywane dla sztucznego enzymu. Inhibicja centrum aktywnego, zależna od stężenia produktu ($K_i = 60 \pm 10 \mu\text{M}$) wskazuje, że reakcja katalizowana jest przez centrum MIPs. Warto tu dodać, że zamiana acetofenonu na keton adamantyłowometylowy lub antranyłowometylowy prowadzi do otrzymywania podstawionych α,β -nienasyconych produktów z dużo niższą szybkością reakcji, co wynika z ich gorszego dopasowania do wnęki MIPs.

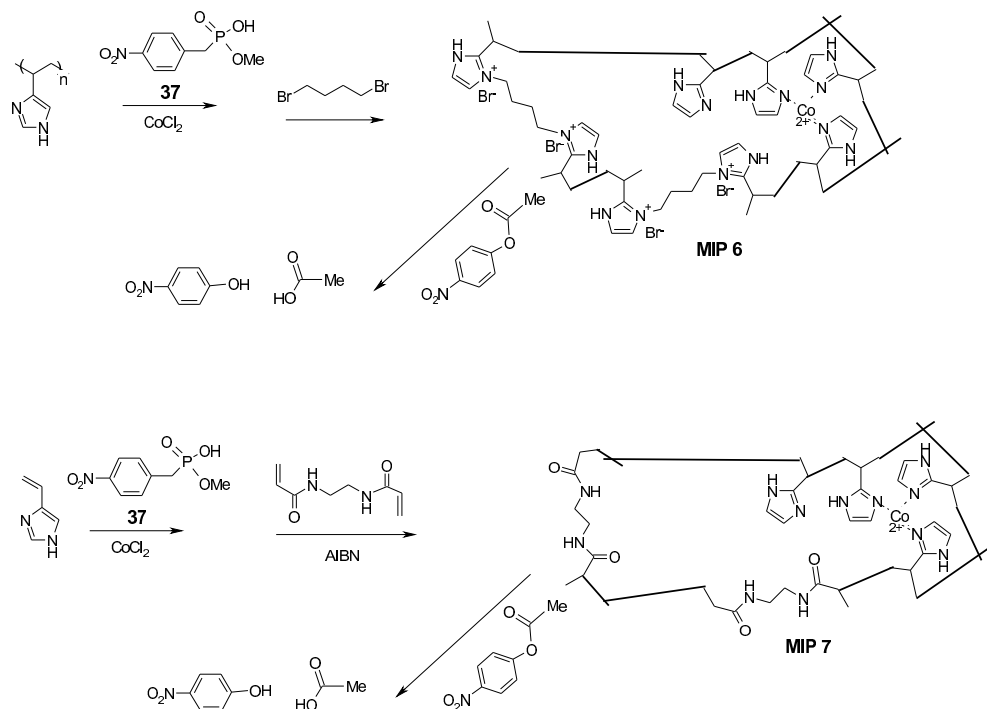
3.2.5 Katalizatory wdrukowane w polimer jako mimetyki enzymów

Obserwacje wskazujące, że odpowiednio skonstruowane MIPs mogą działać jak enzymy stanowiły zachętę do dalszego rozwijania wspomnianego powyżej kierunku badań. Triada katalityczna proteaz serynowych (Ser, His, Asp) została wykorzystana jako modelowy układ wyjściowy w projektowaniu MIPs jako sztucznych enzymów⁵⁵. Poprzez analogię do biopolimerów wykazujących aktywność proteolityczną otrzymane zostały MIPs z wnęką zawierającą wszystkie grupy funkcyjne triady katalitycznej: hydroksylową, imidazolową oraz karboksylową, oraz dla porównania wnęki utworzone tylko z wybranymi funkcjami. Eonhardt i Mosbach otrzymali MIPs zawierający reszty imidazolowe i zastosowali go do badania hydrolizy estrów *p*-nitrofenylowych aminokwasów. Jako cząsteczki matrycowe wykorzystana zostały *N*-Boc pochodne *N*'-2-pirydyłometyloamidów leucyny i metioniny (36).

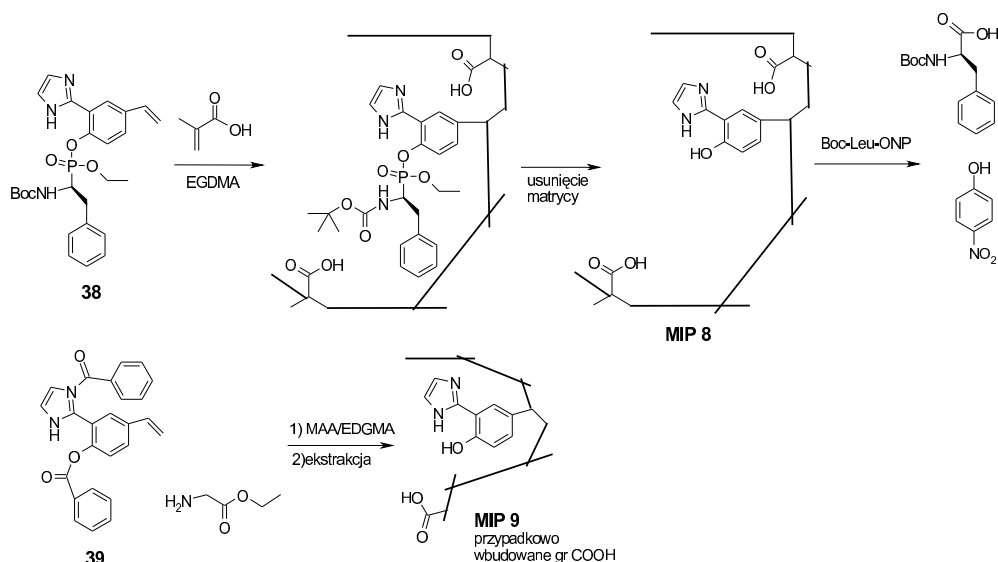


Schemat 14. MIPs mimikujący chymotrypsynę.

Uzyskany MIPs wykazywał aktywność katalityczną jedynie wobec estrów *p*-nitrofenylowych *N*-Boc-leucyny oraz metioniny. Relatywnie niska aktywność katalityczna wynikała z licznych i nie do końca zdefiniowanych oddziaływań pomiędzy substratem a wnęką katalityczną oraz z faktu użycia jako cząsteczki matrycowej substratu a nie analogu stanu przejściowego. Użycie jako matrycy fosfonianu 4-nitrofenylometylowego (37), który można traktować jako dobry analog stanu przejściowego reakcji hydrolizy octanu 4-nitrofenylowego, $CoCl_2$, poliwinylimidazolu oraz 1,4-dibromobutanu (jako odczynnika sieciującego) umożliwiło otrzymanie MIPs, który znacznie przewyższał swoją aktywnością katalizator opisany uprzednio⁵⁶.



Schemat 15. MIPs mimikujący chymotrypsynę otrzymany przy użyciu fosfonianu (37) jako związku matrycowego mimikującego stan przejściowy.



Schemat 16. MIPs mimikujący chymotrypsynę otrzymany przy użyciu fosfonianu (**38**) jako związku matrycowego mimikującego TSA, zawierający funkcje hydroksylową, imidazolową i karboksylową.

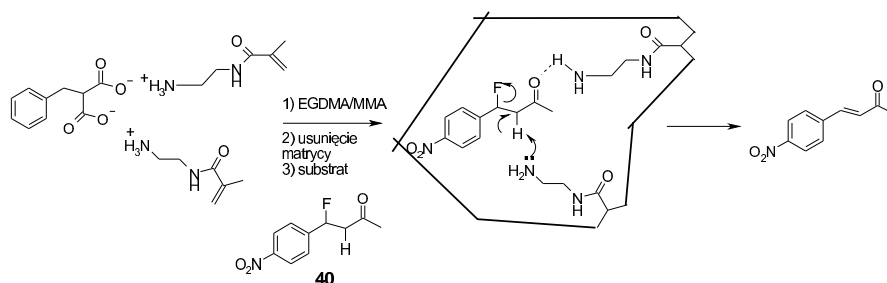
W trakcie prowadzonych badań okazało się ponadto, że MIPs-y różniące się jedynie czynnikiem sieciującym wykazują zróżnicowaną aktywność. Najbardziej aktywnym okazał się polimer zawierający etylenobisakrylamid (MIP 7)⁵⁷ a przy tym jego aktywność w zasadniczy sposób zależała od pH. Przykładowo dla polimeru MIP 6 wartość k_{obs}/k_{uncat} wynosiły 1.3 oraz 2.5 przy pH 7.0 i 8.0, zaś dla MIP 7 wartości te wynosiły odpowiednio 6.7 oraz 1.9 przy tych samych wartościach pH. Dalsze rozszerzenie prac nad mimetykami enzymów proteolitycznych związane było z wprowadzeniem do wnęki katalitycznej obok reszty imidazolowej (His), grupy hydroksylowej (Ser) oraz karboksylowej (Asp)⁵⁸.

Również w tym przypadku wyższą aktywność uzyskano dla MIP 8 otrzymanego przy zastosowaniu analogu stanu przejściowego jako związku matrycowego.

Równolegle do prac nad MIPs będącymi mimetykami enzymów, podjęto próby syntezy wdrukowanych w polimer mimetyków koenzymów. Jako związku matrycowego użyto anilidu N-pirydoksylo-L-feniloalaniny⁵⁹ będącego analogiem fosforanu pirydoksalu, koenzymu biorącego udział w przemianach enzymatycznych aminokwasów. Zaobserwowano 10-krotny wzrost szybkości kondensacji anilidu feniloalaniny z pirydoksałem (pierwszy etap wielu reakcji katalizowanych przez pirydoksał); tym samym udowodniono przydatność MIPs jako układów mimikujących koenzym.

3.2.6 Reakcje eliminacji katalizowane przez MIPs

W wielu przypadkach (szczególnie w procesie tworzenia wiązań) duże cząsteczki produktu wykazują silniejsze powinowactwo do katalizatora w porównaniu do mniejszych substratów co prowadzi do zahamowania aktywności enzymu⁶⁰. Efekt taki obserwowano w przypadku MIPs zaprojektowanego do katalizowania reakcji eliminacji, który ulegał silnej inhibicji przez produkty reakcji. W rezultacie, obserwowano reakcje zachodzące z jego udziałem wyłącznie z 50% wydajnością w odniesieniu do substratów.



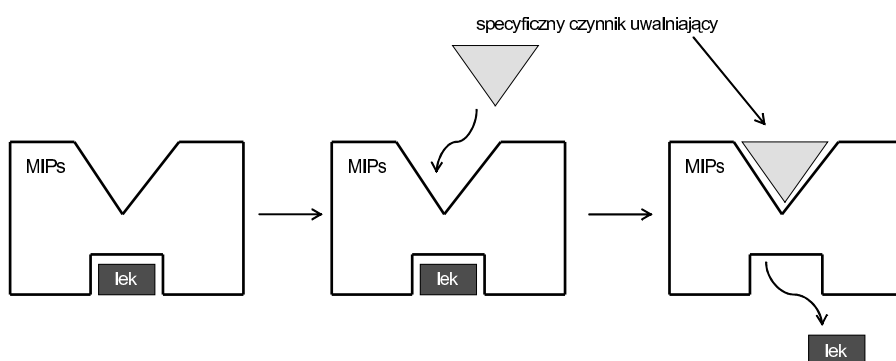
Schemat 17. Katalizowane przez MIPs dehydrofluorowane 4-fluoro-4-nitrofenylbutan-2-onu.

Dla MIPs uzyskanego poprzez wdrukowanie kwasu benzylmalonowego i zastosowanie jako monomeru N-(2-aminoetylo)-metakrylamidu obserwowano 10-krotny wzrost szybkości reakcji dehalogenowania w porównaniu do reakcji w roztworze⁶¹. Postulowany mechanizm zakłada tworzenie wiązań wodorowych pomiędzy substratem 40 a grupami funkcyjnymi wnętrza katalitycznej. Zgodnie z tym mechanizmem rozpuszczalniki niepolarne powinny zwiększać szybkość reakcji, zaś polarne ją obniżać. Istotnie, zastosowanie etanolu jako rozpuszczalnika spowodowało spadek szybkości reakcji (2-krotny wzrost szybkości reakcji w porównaniu do próby kontrolnej w roztworze), podczas gdy dla klasycznej reakcji eliminacji E2 wzrost polarności rozpuszczalnika powoduje sprzyjanie zwiększeniu szybkości reakcji dehydrofluorowania.

3.3 Molekularnie wdrukowane receptory w procesie dostarczania leków

Idealnym rozwiązaniem w procesie dostarczania terapeutycznego (*drug delivery system*, DDS) jest inteligentny system uwalniania leku dostarczonego przy tym w pożądane miejsce. Idealny DDS powinien zapewniać uwalnianie leku w pożądanym miejscu, w pożądaną dawkę oraz przez pożądaną czas. Powinien być biokompatybilny i biodegradowalny, poprzez przekształcenie go w nietoksyczne fragmenty⁶². Najlepszym sposobem zapewniającym uwalnianie leku w ściśle pożądanym miejscu jest tworzenie koniugatów leku z „celowym” wektorem (takim jak przeciwciało, epitopy na powierzchni komórki), umożliwiającym

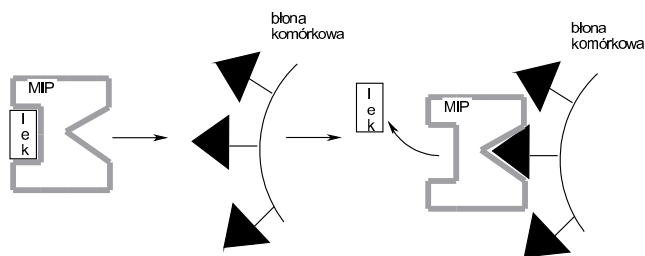
oddziaływania ze zdefiniowanym miejscem. Inteligentny system z wykorzystaniem MIPs może być łatwo zrealizowany poprzez kompetycyjną wymianę leku przez strukturalnie specyficzny czynnik (z reguły drugi analit), ale możliwe jest również zastosowanie systemu wykorzystującego oddziaływania allosteryczne.



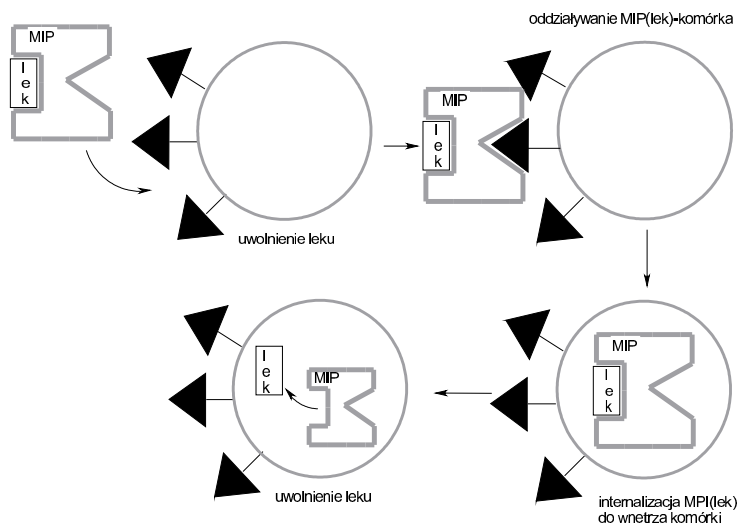
Schemat 18. Inteligentne „allosteryczne” uwalnianie leku z kompleksu MIPs-lek.

Uwalnianie leku w pożądanym miejscu możliwe jest również poprzez wiązanie kompleksu MIPs-lek na powierzchni komórki (A), lub idąc jeszcze dalej, przy zastosowaniu biokompatybilnych polimerów tworzących MIPs transportujący lek do wnętrza komórki i dopiero tam zapewniający jego uwolnienie (B).

A) Uwalnianie leku w pożądanym miejscu



B) Uwalnianie leku w pożądanym miejscu i jego internalizacja przy użyciu MIPs

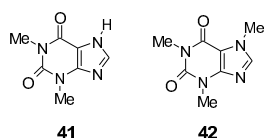


Schemat 19. Uwalnianie leku z MIPs w wyniku wiązania się MIPs z określonymi związkami na powierzchni błony komórkowej.

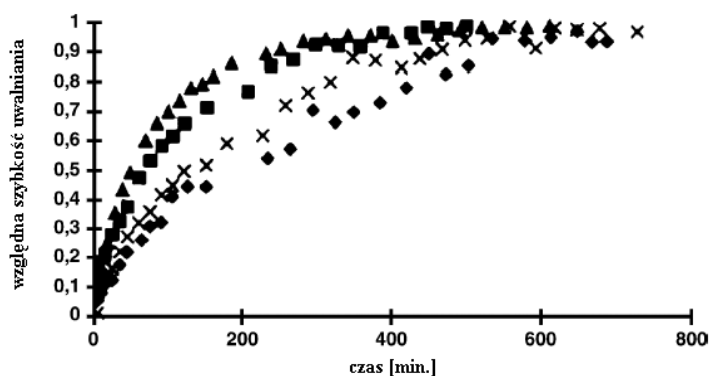
Istotnym parametrem określającym efektywność DDS jest kontrola momentu, w którym powinien rozpocząć się proces uwalniania leku. Znane są trzy podejścia do tego problemu⁶³: a) programowana szybkość dostarczania leku (*rate-programmed drug delivery*); dyfuzja leku z DDS musi zachodzić wg specyficznego profilu szybkości; b) uwalnianie jest aktywowane przez określone fizyczne, chemiczne lub biochemiczne procesy (*activation-modulated drug delivery*); c) dostarczanie leku i jego uwalnianie regulowane przez sprzężenie zwrotne (*feedback-regulated drug delivery*) a szybkość uwalniania leku jest regulowana przez czynnik wyzwalający (*triggering agent*) taki jak określony związek, którego stężenie zależy od stężenia terapeutycznego w organizmie.

3.3.1 System dostarczania leku z programowaną szybkością uwalniania terapeutycznego (*rate-programmed drug delivery*)

Pierwszym opisanym MIPs zastosowanym do wydłużonego w czasie uwalniania leku⁶⁴ był polimer z wdrukowaną teofiliną zastosowany w leczeniu astmy. Problem dawkowania w tym przypadku nie jest błahy, ponieważ teofilina posiada wąskie okno terapeutyczne (30-100 μM) i w stężeniu powyżej 110 μM staje się toksyczna. Polimer z wdrukowaną teofiliną otrzymany został metodą niekowalencyjną z użyciem kwasu metakrylowego (MAA) jako funkcyjnego monomeroeru oraz dimetakrylanem glikolu etylenowego (EGDMA) jako czynnika sieciującego. Uzyskany MIPs rozróżniał teofilinę od kafeiny.

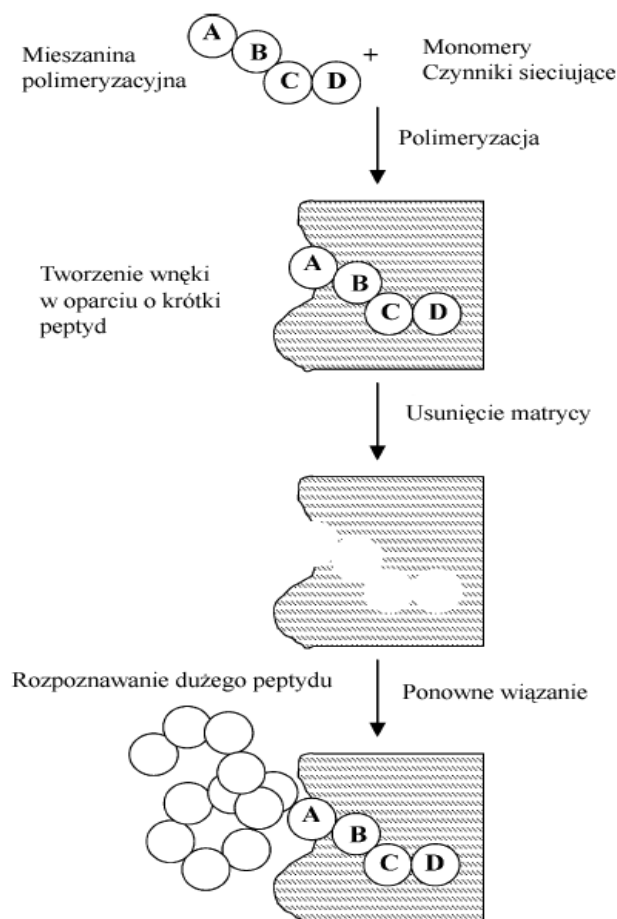


Rysunek 6. Struktury: teofiliny (41); kafeiny (42).



Rysunek 7. Charakterystyka uwalniania teofiliny z MIPs. Obciążenie: $\triangle$ 50 mg teofiliny/g polimeru; $\square$ 10 mg teofiliny/g polimeru; $\times$ 2.0 mg teofiliny/g polimeru; $\diamond$ 0.1 mg teofiliny/g polimeru.

Synteza MIPs selektywnych dla białek stanowi poważne wyzwanie z powodów sterycznych oraz termodynamicznych. Duże cząsteczki białka nie mogą być łatwo transportowane przez szkielet polimerowy z powodu jego niedostatecznej porowatości. I chociaż problem ten może być częściowo rozwiązany poprzez syntezę MIPs makroporowatych lub wdrukowywanie na powierzchni przy użyciu monomerów kompleksowanych metalami, to jednak użycie dużych i elastycznych cząsteczek polipetydów oraz białek jako związków matrycowych prowadzi do uzyskania wnęk o małej specyficzności wiązania. Próbę rozwiązania opisanego problemu przedstawili Rachkov i Minoura.⁶⁵ Uzyskali oni polimery zdolne do wiązania białek poprzez wdrukowanie epitopów, które są ich fragmentami. Przedstawione rozwiązanie zbliżone jest więc do procesu rozpoznawania antygenów przez przeciwciała.



Schemat 20. Proces drukowania wnęki do wiązania białka przy użyciu epitopu.

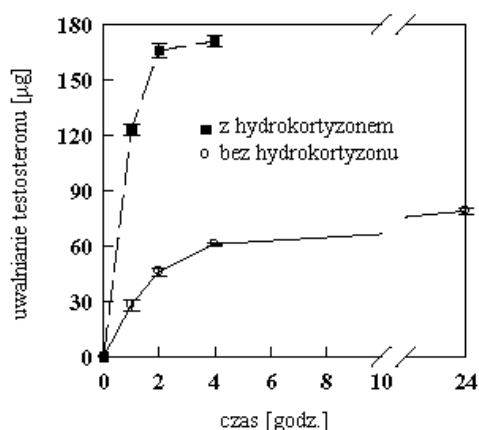
Stosując tetrapeptyd Tyr-Pro-Leu-Gly, stanowiący fragment oksytocyny, jako związek matrycowy, kwasu metakrylowy jako monomer oraz EDGMA jako czynnik sieciujący, w układzie woda-acetonitryl jako medium, w którym dokonano polimeryzacji, uzyskano MIPs rozpoznający zarówno wdrukowany tetrapeptyd jak również oksytocynę w szerokim zakresie wartości pH.

3.3.2 System dostarczania i uwalniania leku poprzez aktywację (*activation-modulated drug delivery*)

Zaproponowane rozwiązanie polega na uwalnianiu leku w odpowiedzi na zmianę warunków otoczenia lub kompetycyjnego wiązanie innego związku powodujących pęcznienie i/lub kurczenie polimeru.

Wiązanie kompetycyjne

Lek związany niespecyficznie we wnękach receptorowych polimeru uwalniany jest pod wpływem obecności w otoczeniu cząsteczki silniej wiążącej się z wnęką receptorową i wypierającej z niej lek. Jeśli stężenie składnika silniej wiążącego maleje, następuje zahamowanie procesu uwalniania. Takie rozwiązanie zostało z dobrymi wynikami zastosowane do uwalniania testosteronu pod wpływem hydrokortyzonu obecnego w medium⁶⁶.

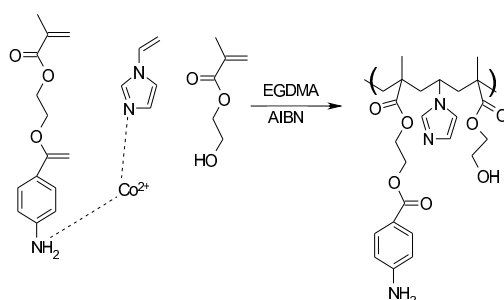


Rysunek 8. Wpływ obecności hydrokortyzonu w wodnym medium (50 mg/l) na szybkość uwalniania testosteronu z polimeru zawierającego wnęki wdrukowane z użyciem hydrokortyzonu jako związku matrycowego. Początkowe obciążenie polimeru testosteronem wynosiło 175 µg na 100 mg hydrokortyzonu wdrukowanego w polimer (polimer: HEMA 1g + EGDMA 4 g)

Hydrolitycznie indukowane uwalnianie leku

Szczególnie użyteczne podejście do modulowanego uwalniania leku polegało na utworzeniu układów uwalniających lek w wyniku degradacji hydrolitycznej. Degradacji może być poddawany polimer lub tylko wybrane wiązania chemiczne. W przypadku organizmu żywego, czynnikami powodującymi degradację może być zmiana pH lub aktywność katalityczna enzymów. Dla przykładu leki, które są niestabilne w silnie kwaśnym środowisku soków żołądkowych mogą być selektywnie uwalniane w jelitach poprzez zastosowanie polimeru degradowanego przez enzymy obecne w jelitach albo przez środowisko słabo alkaliczne. Możliwe jest również uzyskanie DDS, w których szybkość hydrolizy związanego chemicznie do polimeru leku kontroluje szybkość jego uwalniania. Ponieważ jednak dla efektywnego rozerwania wiązania estrowego wymagane jest środowisko silnie alkaliczne, pH 10-11, które nie występuje w organizmie żywym, Karmalkar⁶⁷ zaproponował wbudowanie

dodatkowych grup imidazolowych umiejscowionych w bezpośredniej bliskości wiązania estrowego lub amidowego wiążącego lek z polimerem.

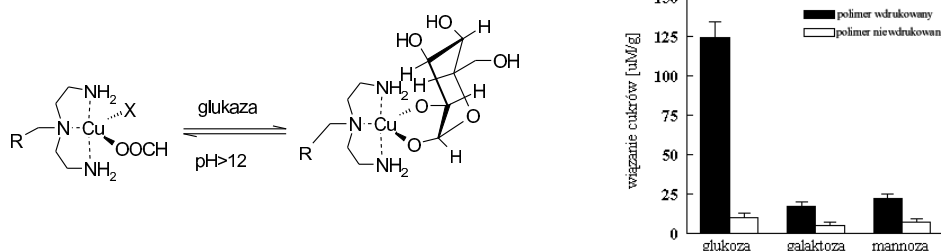


Schemat 21 Droga prowadząca do utworzenia DDS dla kwasu *p*-aminobenzoowego z wbudowaną grupą imidazolową.

W obecności pierścienia imidazolowego, który katalizuje reakcje hydrolizy wiązania estrowego, uwalnianie kwasu *p*-aminobenzoowego następowało w znacznie słabiej alkalicznym środowisku, tolerowanym i występującym w organizmach żywych.

3.3.3 System dostarczania i uwalniania leku regulowany przez sprzężenie zwrotne (*feedback-regulated DDS*)

W wielu przypadkach poziom związków fizjologicznych jest bezpośrednim wskaźnikiem dysfunkcji organizmu. System zdolny do selektywnego i ilościowego rozpoznawania tych substancji i w kolejnym etapie do tworzenia regulowanego przez sprzężenie zwrotne układu uwalniającego lek jest idealnym rozwiązaniem inteligentnego DDS. Większość prac poświęconych w tym obszarze poświęcona opracowaniu regulowanego poziomem glukozy systemu dostarczania insuliny. Striegler opracował MIPs wiążący glukozę w zakresie $5.5 < \text{pH} < 7.5$ wykorzystujący polimer z wdrukowanym α -metylo-D-glukozydem umożliwiając wiązanie glukozy poprzez kompleksowanie metalu, zależne od odczynu środowiska.



Pre-organizacja kompleksu bismurrowianu [(4-(N-winylobenzyl)dietylenotriaminy) z miedzią(II)] i glukozy przygotowanego do polimeryzacji w środowisku alkalicznym stosowanego w sensorach glukozowych.

Selektywność ponownego wiązania glukozy, galaktozy i mannozy w wodzie przez polimer z wdrukowaną glukozą (czarny) i polimer bez wdrukowanych miejsc receptorowych (biały). Polimer powstał przez sieciowanie kompleksu bismurrowianu [(4-(N-winylobenzyl)dietylenotriaminy) z miedzią(II)] (5% mol) zachodzące pod działaniem tetraakrylanu penaerytrytolu (95% mol)

Chociaż w procesie otrzymywania MIPs z wdrukowaną glukozą konieczne okazało się zastosowanie środowiska znacznie silniej alkalicznego niż spotykane w organizmie, to i tak w warunkach fizjologicznych selektywność i zdolność wiązania glukozy przez tak otrzymany sensor okazała się zasadniczo wyższa niż wiązanie do polimeru bez wdrukowanej wnęki glukozowej.

4. Zastosowanie MIPs jako pułapek

Próby zastosowanie MIPs jako pułapek do usuwania związków zwiększających ryzyko rozwoju chorób należą do szczególnie intensywnie rozwijanych kierunków badań. Badane są możliwości usuwania cholesterolu, którego wysoki poziom we krwi sprzyja rozwojowi arteriosklerozy a tym samym zwiększa prawdopodobieństwo wystąpienia zawału mięśnia sercowego. W syntezie receptora cholesterolowego wdrukowanego w polimer Davidson i Hayes⁶⁸ wykorzystali zdolność β -cyklodekstryn do wiązania cholesterolu. W trakcie badań okazało się, że efektywne wiązanie cholesterolu przez β -cyklodekstryny ma miejsce tylko wówczas, gdy równocześnie dwie lub więcej cząsteczek β -cyklodekstryn oddziałują z cząsteczką cholesterolu. Rozwijając tę myśl Komiyama⁶⁹ otrzymał MIPs zawierający trzy cząsteczki β -cyklodekstryny, które wiążą cholesterol w sposób szczególnie skuteczny.

MIPs z wnęką zawierającą trzy fragmenty cyklodekstrynowe wiąże efektywnie i selektywnie cholesterol ze środowiska wodnego, a czynnikami odpowiedzialnymi za wysoką

selektywność wiązania są grupa hydroksylowa w pozycji 3 oraz łańcuch alkilowy w pozycji 17.

5. MIPs w chromatografii

Obszerny materiał eksperymentalny poświęcony zastosowaniu MIPs jako faz stacjonarnych w chromatografii został pominięty w tym opracowaniu, ponieważ jest przedmiotem licznych, specjalistycznych monografii⁷⁰.

Literatura:

1. Mayes, A.G.; Withcombe, M.J., *Advanced Drug Delivery Reviews* 57 (2005) 1742-1778.
2. A) Damen, J.; Neckers, D.C., *Tetrahedron Lett.* 21 (1980) 1913-1916; b) Damen, J.; Neckers, D.C., *J. Org. Chem.* 45 (1980) 1382-1387; c) Damen, J.; Neckers, D.C., *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1980) 3265-3267; d) Shea, K.J.; Thompson, E.A., *J. Org. Chem.* 43 (1978) 4253-4255; e) Shea, K.J.; Thompson, E.A.; Pandey, S.D.; Beauchamp, P.S., *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1980) 3149-3155.
3. a) Wulff, G.; Vesper, R.; Grobe-Einsler, R.; Sarhan, A., *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 11 (1972) 341; b) Wulff, G.; Vesper, R.; Grobe-Einsler, R.; Sarhan, A., *Makromol. Chem.* 178 (1977) 2799-2816; c) Wulff, G.; Schauhoff, S., *J. Org. Chem.* 56 (1991) 395-400.
4. a) Kugimiya, A.; Matsui, J.; Takeuchi, T.; Yano, K.; Muguruma, H.; Elgersma, A.V.; Karube, I., *Anal. Lett.* 28 (1995) 2317-2323; b) Kugimiya, A.; Matsui, J.; Abe, H.; Aburatani, M.; Takeuchi, T., *Anal. Chim. Acta* 365 (1998) 75-79; c) Wulff, G.; Vietmeier, J.; *Makromol. Chem.* 190 (1989) 1727-1735; d) Sallacan, N.; Zayats, M.; Bourenko, T.; Kharitonov, A.B.; Willner, I., *Anal. Chem.*, 74 (2002) 702-712; e) Wulff, G.; Vesper, R., *J. Chromatogr.* 167 (1978) 171-186.
5. a) Wulff, G.; Minarik, M., *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.* 9 (1986) 607-608; b) Wulff, G.; Minarik, M., *J. Liq. Chromatogr.* 13 (1990) 2987-3000; c) Gao, S.H.; Wang, W.; Wang, B.H., *Bioorg. Chem.* 29 (2001) 308-320; d) Piletsky, S.A.; Piletskaya, K.; Piletskaya, E.V.; Yano, K.; Kugimiya, A.; Elgersma, A.V.; Levi, R.; Kahlow, U.; Takeuchi, T.; Karube, I.; Panasyuk, T.I.; Elskaya, A.V., *Anal. Lett.* 29 (1996) 157-170; e) Wang, W.; Gao, S.H.; Wang, B.H., *Org. Lett.* 1 (1999) 1209-1212.
6. a) Kanekiyo, Y.; Sano, M.; Iguchi, R.; Shinkai, S., *J. Polym. Sci., A, Polym. Chem.* 38 (2000) 1302-1310; b) Bossi, A.; Piletsky, S.A.; Piletska, E.V.; Righetti, P.G.; Turner, A.P.F., *Anal. Chem.* 73 (2001) 5281-5286; c) Wulff, G., *Pure Appl. Chem.* 54 (1982) 2093-2102; d) Alexander, C.; Smith, C.R.; Withcombe, M.J.; Vulfson, E.N., *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1999) 6640-6651.
7. a) Shea, K.J.; Dougherty, T.K., *J. Am. Chem. Soc.* 108 (1986) 1091-1093; b) Shea, K.J.; Sasaki, D.Y., *J. Am. Chem. Soc.* 111 (1989) 3442-3444; c) Shea, K.J.; Sasaki, D.Y., *J. Am. Chem. Soc.* 113 (1991) 4109-4120.
8. Wulff, G.; Wolf, G., *Chem. Ber.* 119 (1986) 1876-1889.
9. Wulff, G.; Best, W., *React. Polym.* 2 (1984) 167-174.

10. Cheong, S.H.; McNiven, S.; Rachkov, A.E.; Levi, R.; Yano, K.; Karube, I., *Macromolecules* 30 (1997) 1317-1322.
11. Byström, S.E.; Börje, A.; Akermarck, B., *J. Am. Chem. Soc.* 115 (1993) 2081-2083.
12. a) Joshi, V.P.; Karode, S.K.; Kulkarni, M.G.; Mashelkar, R.A., *Chem. Eng. Sci.* 53 (1998) 2271-2284; b) Joshi, V.P.; Karmalkar, R.N.; Kulkarni, M.G.; Mashelkar, R.A., *Ind. Eng. Chem. Res.* 38 (1999) 4417-4423; c) Caro, E.; Masqué, N.; Marcé, R.M.; Borrull, F.; Cormack, P.A.G.; Sherrington, D.C., *J. Chromatogr., A* 963 (2002) 169-178; d) Ikegami, T.; Mukawa, T.; Nariai, H.; Takeuchi, T., *Anal. Chim. Acta* 504 (2004) 131-135.
13. a) Percival, C.J.; Stanley, S.; Braithwaite, A.; Newton, M.I.; McHale, G., *Analyst* 127 (2002) 1024-1026; b) Petcu, M.; Cooney, J.; Cook, C.; Lauren, D.; Schaare, P.; Holland, P., *Anal. Chim. Acta* 435 (2001) 49-55; c) Joshi, V.P.; Kulkarni, M.G.; Mashelkar, R.A., *J. Chromatogr., A* 849 (1999) 319-330; d) Patel, A.; Fouace, S.; Steinke, J.H.G., *Chem. Commun.* (2003) 88-89; e) Patel, A.; Fouace, S.; Steinke, J.H.G., *Anal. Chim. Acta* 504 (2004) 53-62.
14. Withcombe, M.J.; Rodriguez, M.E.; Villar, P.; Vulfson, E.N.; *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995) 7105-7111.
15. Lübke, M.; Withcombe, M.J.; Vulfson, E.N., *J. Am. Chem. Soc.* 120 (1998) 13342-13348.
16. a) Khasawneh, M.A.; Vallano, P.T.; Remchp, V.T., *J. Chromatogr., A* 922 (2001) 87-97; b) Katz, A.; Davis, M.E., *Nature* 403 (2000) 286-289; c) Graham, A.L.; Carlson, C.A.; Edmiston, P.L., *Anal. Chem.* 74 (2002) 458-467; d) Ki, C.D.; Oh, C.; Oh, S.G.; Chang, J.Y., *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 14837-14839.
17. Klein, J.U.; Withcombe, M.J.; Mulholland, F.; Vulfson, E.N., *Angew. Chem. Int. Ed.* 38 (1999) 2057-2060.
18. A) Kirsch, N.; Alexander, C.; Lübke, M.; Withcombe, M.J.; Vulfson, E.N., *Polymer* 41 (2000) 5583-5590; b) Kirsch, N.; Alexander, C.; Davies, S.; Withcombe, M.J., *Anal. Chim. Acta* 504 (2004) 63-71.
19. a) Arshady, R.; Mosbach, K., *Makromol. Chem.* 182 (1981) 687-692; b) Norrlöw, O.; Glad, M.; Mosbach, K., *J. Chromatogr.* 299 (1984) 29-41.
20. Ramström, O.; Nicholls, I.A.; Mosbach, K., *Tetrahedron: Asymmetry* 5 (1994) 649-656.
21. Ramström, O.; Mosbach, K., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3 (1999) 759-764.
22. Ramström, O.; Andersson, L.I.; Mosbach, K., *J. Org. Chem.* 58 (1993) 7562-7564.
23. Yu, C.; Mosbach, K., *J. Org. Chem.* 62 (1997) 4057-4064.

24. Guyot, A., Synthesis and structure of polymer supports, in: D.C. Sherrington, P. Hodge (Eds.), *Syntheses and Separations Using Functional Polymers*, Wiley, Chichester, 1988, pp. 1-42.
25. a) Batra, D.; Shea, K.J., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7 (2003) 434-442; b) Lanza, F.; Sellergren, B., *Macromol. Rapid Commun.* 25 (2004) 59-68.
26. Yoshida, M.; Uezu, K.; Goto, M.; Nakashio, F., *J. Chem. Eng. Jpn.* 29 (1996) 174-176.
27. Subat, M.; Borovik, A.S.; König, B., *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 3185-3190.
28. Chen, G.H.; Guan, Z.B.; Chen, C.T.; Fu, L.T.; Sundaresan, V.; Arnold, F.H., *Nat. Biotechnol.* 15 (1997) 354-357.
29. Matsui, J.; Tachibana, Y.; Takeuchi, T., *Anal. Commun.* 35 (1998) 225-227.
30. Hart, B.R.; Shea, K.J., *Macromolecules* 35 (2002) 6192-6201.
31. Liu, J.Q.; Wulff, G., *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 7452-7453.
32. Alvarez-Lorenzo, C.; Concheiro, A. *J. Chromatogr. B* 804 (2004) 231-245.
33. Wulff, G.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 34 (1995) 1812.
34. Svenson, J.; Nicholls, I.A. *anal. Chim. Acta* 435 (2001) 19.
35. a) Aydin, O.; Attola, G.; Dogan, A.; Aydin, M.V.; Canacankatan, N.; Kanik, A., *Toxicol. Pathol.* 30 (2002) 350; b) Fiume, M.Z., *Int. J. Toxicol.* 21 (Suppl. 3) (2002) 1; c) Anderson, J.M., *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 40 (1994) 1.
36. Komiyama, M.; Takeuchi, T.; Mukawa, T.; Asanuma, H., *Molecular Imprinting*, Wiley-VCH, Weinheim, 2003, p.119.
37. a) Pande, V.S.; Grosberg, A.Y.; Tanaka, T., *J. Phys., II* 4 (1994) 1771-1784; b) Pande, V.S.; Grosberg, A.Y.; Tanaka, T., *Macromolecules* 28 (1995) 2218-2227; c) Pande, V.S.; Grosberg, A.Y.; Tanaka, T., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91 (1994) 12976-12979; d) Ito, K.; Chuang, J.; Alvarez-Lorenzo, C.; Watanabe, T.; Ando, N.; Grosberg, A.Y., *Prog. Polym. Sci.* 28 (2003) 1489-1515; e) Pande, V.S.; Grosberg, A.Y.; Tanaka, T., *Physica, D* 107 (1997) 316-331.
38. Sellergren, B., Enantiomer separations using designed imprinted chiral phases, in: G. Subramanian (Ed.), *Chiral Separation Techniques*, 2nd edition, Wiley-VCH, Weinheim, 2001, pp. 153-184.
39. a) Lanza, F., Sellergren, B., *Adv. Chromatogr.* 41 (2001) 137-173; b) Andersson, L.I.; Schweitz, L., *Handb. Anal. Sep.* 4 (2003) 45-71.
40. Withcombe, M.J.; Alexander, C.; Vulfson, E.N., *Trends Food Sci. Technol.* 8 (1997) 140-145.
41. Yu, Y.; Ye, L.; Haupt, K.; Mosbach, K., *Angew. Chem.* 114 (2002) 4640-4634.

42. Sellergren, B.; Allender, C.J., *Advanced Drug Delivery Reviews* 57 (2005) 1733-1741.
43. Rathbone, D.L., *Advanced Drug Delivery Reviews* 57 (2005) 1854-1874.
44. Cheong, S.H.; McNiven, S.; Rachkov, A.; Levi, R.; Yano, K.; Karube, I., *Macromolecules* 30 (1997) 1317-1322.
45. Tarbin, J.A.; Sharman, M., *Anal. Chim. Acta* (2001) 71-79.
46. a) Yu, Y.; Ye, L.; Haupt, K.; Mosbach, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* 41 (2002) 4460-4463; b) Rathbone, D.L., *Anal. Chim. Acta* 435 (2001) 129-136.
47. Alexander, C.; Davidson, L.; Hayes, W., *Tetrahedron* 59 (2003) 2025-2057.
48. a) Damen, J.; Neckets, D.C., *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1980) 3265-3267; b) Shea, K.J.; Thompson, E.A.; Pandey, s.D.; Beauchamp, P.S., *J. Am. Chem. Soc.* 102, (1980) 3149-3151.
49. a) Wulff, G.; Vietmeier, J., *Makromol. Chem. Macromol. Chem. Phys.* 190 (1989) 1717-1726; b) Wulff, G.; Vietmeier, J., *Makromol. Chem. Macromol. Chem. Phys.* 190 (1989) 1727-1735.
50. Byström, S.E.; Börje, A.; Akermark, B., *J. Am. Chem. Soc.* 115 (1993) 2081-2083.
51. Hamase, K.; Iwashita, K.; Zaitse, K., *Anal. Sci.* 15 (1999) 411-412.
52. Alexander, C.; Smith, C.R.; Withcombe, M.J.; Vulfson, E.N., *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1999) 6640-6651.
53. a) Motherwell, W.B.; Bingham, M.J.; Six, Y., *Tetrahedron* 57 (2001) 4663-4686; b) Withcombe, M.J.; Vulfson, E.N., *Adv. Mater.* 13 (2001) 467-478.
54. Matsui, J.; Nicholls, I.A.; Karube, I.; Mosbach, K., *J. Org. Chem.* 61 (1996) 5414-5417.
55. Koshland, d.E., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33 (1994) 2408-2412.
56. Robinson, D.K.; Mosbach, K., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1989) 969-970.
57. Ohkubo, K.; Urata, Y.; Hirota, S.; Honda, Y.; Sagawa, T., *J. Mol. Catal.* 87 (1994) L21-L24.
58. a) Sellergren, B.; Shea, K.J., *Tetrahedron: Assymetry* 5 (1994) 1403-1406; b) Sellergren, B.; Karmalkar, R.N.; Shea, K.J., *J. Org. Chem.* 65 (2000) 4009-4027.
59. a) Mosbach, K.; Ramström, O., *Bio/Technology* 14 (1996) 163-170; b) Andersson, L.I.; Mosbach, K., *Makromol. Chem. Rapid Commun.* 10, (1989) 491-495.
60. a) Brady, P.A.; Sanders, J.K.M., *Chem. Soc. Rev.* 26 (1997) 327-336; b) Bruggemann, O., *Biomol. Engng* 18 (2001) 1-7.
61. Beach, J.V.; Shea, K.J., *J. Am. Chem. Soc.* 116 (1994) 379-380.

62. Cunliffe, D.; Kirby, A.; Alexander C., *Advanced Drug Delivery Reviews* 57 (2005) 1836-1853.
63. Chien, Y.W.; Lin, S., *Clin. Pharmacokinet.* 41 (2002) 1267.
64. Norell, M.C.; Andersson, H.S.; Nicholls, I.A., *J. Mol. Recognit.* 11 (1998) 98-102.
65. Rachkov, A.; Minoura, N., *Biochim. Biophys. Acta* 1544 (2001) 255.
66. Sreenivasan, K., *J. Appl. Polym Sci.* 71 (1999) 1819.
67. Karmalkar, R.N.; Kulkarni, M.G.; Mashelkar, R.A., *J. Control. Release* 43 (1997) 235.
68. A) Davidson, L.; Hayes, W., *Curr. Organic Chem.* 6 (2002) 265; b) Hishiya, T.; Shibata, M.; Kakazu, M.; Asanuma, H.; Komiyama, M., *Macromolecules* 32 (1999) 2265.
69. Asanuma, H.; Hishiya, T.; Komiyama, M., *Adv. Mater.* 12 (2000) 1019.
70. a) Lin, J.M.; Nakagama, T.; Uchiyama, K.; Hobo, T., *J. Liquid Chrom. Related Technol.* 20, (1997) 1489-1506; b) Tan, Z.X.J.; Remch, V.T., *Electrophoresis* 19 (1998) 2055-2060; c) Kempe, M.; Mosbach, K., *J. Chrom. A* 694 (1995) 3-13; d) Kempe, M.; Fischer, L.; Mosbach, K., *J. Mol. Recogn.* 6 (1993) 25-29; e) Lanza, F.; Sellergren, B., *Adv. Chromatogr.* 41 (2001) 137-173; f) Andersson, L.I.; Schweitz, L., *Handb. Anal. Sep.* 4 (2003) 45-71; g) Haupt, K.; Mosbach, K., *Chem Rev.* 100 (2000) 2495-2504.

Rozdział 8

Mikroreaktory enzymatyczne

Alicja Filipowicz-Szymańska, Zbigniew Brzózka

Pracownia Miniaturowych Systemów Analitycznych, Wydział Chemiczny,

Politechnika Warszawska, Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa

1. Enzymy – budowa i działanie

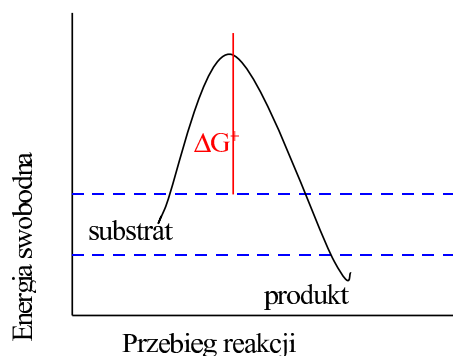
W ostatnich latach bardzo prężnie rozwija się gałąź chemii poświęcona reakcjom chemicznym katalizowanym przez enzymy. Cechą wyróżniającą biokatalizatory jest ich szeroko rozumiana selektywność i działanie w łagodnych warunkach. Te właściwości enzymów są bardzo ważne nie tylko dla organizmów żywych, ale także są istotne z perspektywy biotechnologii, chemii analitycznej i organicznej. Biokataliza jest kluczowa dla biotechnologii i innych dziedzin, ponieważ enzymy katalizują reakcje chemiczne, które są często niemożliwe lub trudne do przeprowadzenia przy użyciu standardowych metod. Biokatalizatory są związkami chiralnymi i występują w formie enancjomerycznie czystej, dlatego w wyniku reakcji biotransformacji powstaje w przewadze jeden stereoizomer produktu. Ma to bardzo duże znaczenie dla medycyny i rolnictwa.

Enzymy są naturalnymi katalizatorami reakcji chemicznych. Mają w większości charakter białkowy (wyjątkiem są katalitycznie czynne cząsteczki RNA). Biokatalizatory katalizują bardzo różnorodne reakcje chemiczne. Widać to w podziale enzymów na sześć klas według rodzaju reakcji, jakie katalizują¹:

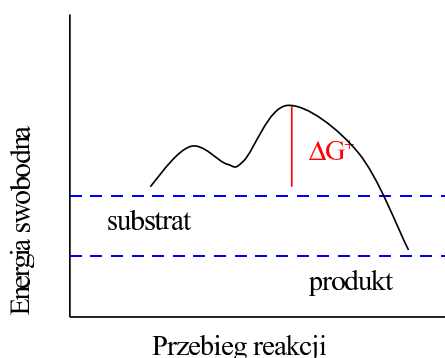
1. Oksydoreduktazy – katalizują reakcje utleniania – redukcji,
2. Transferazy – katalizują przeniesienie grup: karbonylowej, acylowej, cukrowej lub metylowej,
3. Hydrolazy – katalizują reakcje hydrolizy lub tworzenia się estrów, amidów, laktonów, laktamów, epoksydów, nitryli oraz bezwodników,
4. Liazy – katalizują reakcje addycji małych cząsteczek do wiązania: $C=C$, $C=N$, $C=O$, lub ich eliminacji,

5. Izomerazy – katalizują reakcje izomeryzacji, takie jak: racemizacja, epimeryzacja,
6. Ligazy – katalizują reakcje tworzenia się lub rozkładu wiązania: C–O, C–S, C–N, C–C.

Enzymy mogą przyspieszać reakcje chemiczne nawet $10^8 - 10^{10}$ razy². Dzieje się tak ze względu na obniżenie przez biokatalizatory swobodnej energii aktywacji ($\Delta G^\ddagger$). Enzymy stabilizują stany przejściowe katalizowanych reakcji³, nie zmieniają jednak stanu równowagi reakcji chemicznej. Oznacza to, że enzym zwiększa w dokładnie jednakowym stopniu szybkość reakcji zachodzącej w obu kierunkach. Przez selektywność tej stabilizacji użycie enzymów przesądza, która z potencjalnie możliwych reakcji chemicznych zostanie zrealizowana. Na Rysunku 1a i 1b przedstawiono profile energii swobodnej reakcji nie katalizowanej i katalizowanej.

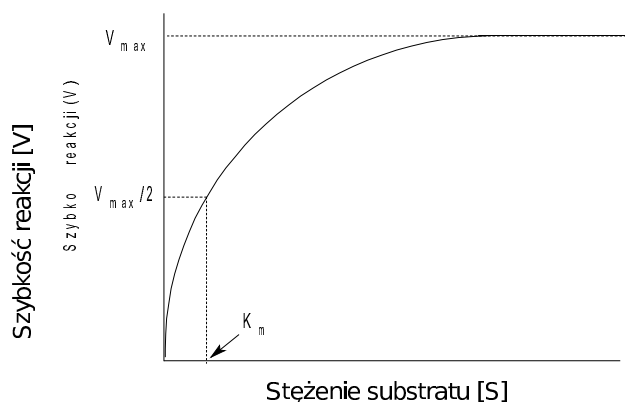


Rysunek 1a. Reakcja nie katalizowana.



Rysunek 1b. Reakcja katalizowana.

Właściwości kinetyczne wielu enzymów można opisać modelem Michaelisa-Menten.



Rysunek 2. Zależność szybkości reakcji od stężenia substratu według modelu Michaelisa-Menten.

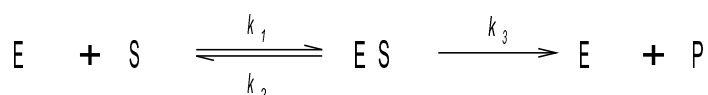
V_{max} - maksymalna szybkość reakcji, K_m - stała Michaelisa

Wykres ten opisany jest zależnością matematyczną opisującą relację między szybkością reakcji, a stężeniem substratu (Rys. 3).

$$V = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}$$

Rysunek 3. Zależność opisująca kinetykę reakcji enzymatycznych, [S] to stężenie substratu.

Model Michaelisa-Menten oparty jest na założeniu odwracalnego powstawania aktywnego kompleksu enzym-substrat (ES), oraz na następczej, nieodwracalnej reakcji rozpadu kompleksu aktywnego na produkt (P) wraz z uwolnieniem cząsteczek enzymu (Rys. 4).



Rysunek 4. Przebieg reakcji enzymatycznej według modelu Michaelisa-Menten, k_1 , k_2 , k_3 to stałe szybkości poszczególnych reakcji.

Ważnym parametrem opisującym kinetykę enzymatycznej katalizy jest wyżej już wspomniana stała Michaelisa-Menten. Można ją definiować na dwa sposoby. Jedną z definicji oparta jest na stałych szybkości (Rys. 4) prowadzących do powstawania i rozpadu kompleksu aktywnego enzym-substrat (Rys. 5).

$$K_m = \frac{k_3 + k_2}{k_1}$$

Rysunek 5. Równanie na stałą Michaelisa-Menten.

Według innej definicji stała Michaelisa-Menten ma wymiar stężenia substratu, takiego, przy którym szybkość reakcji równa się połowie szybkości maksymalnej⁴.

2. Mikroreaktory

Mikroreaktor tworzy sieć kanałów o mikronowych rozmiarach (średnica w przedziale od 10 do kilkuset μm) wygrawerowanych w podłożu stałym⁵. Mogą być wytworzone z bardzo wielu materiałów takich jak krzem, szkło⁶, kwarc, metale⁷ i polimery⁸. Mikroreaktory wytwarzane są za pomocą różnorodnych technik, na przykład laserowej, czy fotolitografii, a także wielu innych^{9,10}.

Mikroreaktory są potężnym narzędziem dla chemii i biotechnologii. Mają wiele zalet w porównaniu do tradycyjnych reaktorów, takich jak: szybkie przeniesienie masy i wymiany ciepła w takim systemie, zużycie bardzo małej ilości próbki (często drogiej lub trudno

dostępnej) oraz odczynników, dzięki czemu po procesie powstaje proporcjonalnie mniejsza ilość odpadów co sprawia że są one przyjazne dla środowiska. Małe wymiary reaktorów¹¹ mogą także zapewniać wysoką wydajność prowadzonych w nim reakcji.

Technologia mikroreaktorów jest interdyscyplinarną dziedziną łączącą inżynierię z zagadnieniami nauk podstawowych. Jest to bardzo młoda gałąź badań i od kilku lat przyciąga wielu badaczy z różnych dyscyplin nauki. Spośród katalizatorów używanych w mikroreaktorach na dużą uwagę zasługują enzymy. Pierwsze mikroreaktory enzymatyczne skonstruowano w latach siedemdziesiątych i osiemdziesiątych, jednakże pierwszy komercyjnie dostępny system ukazał się dopiero w latach dziewięćdziesiątych. Celem skonstruowania mikroreaktorów enzymatycznych była chęć poprawy jakości rutynowych badań w analizach biochemicznych oraz zastosowanie ich w reakcjach biotransformacji. Takie systemy używane są często do przekształcenia analitu, trudnego do oznaczenia w formę mierzalną. Mogą być także projektowane do analizy enzymów i badania ich kinetyki.

3. Podstawowe techniki używane w badaniach w mikroreaktorach enzymatycznych

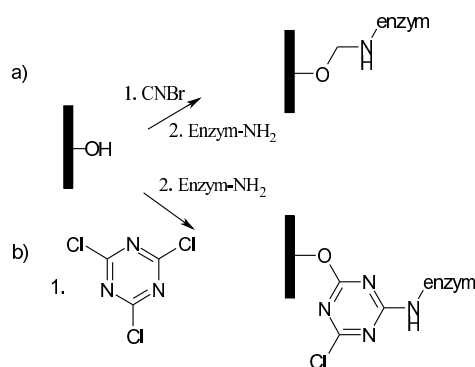
W mikroreaktorach enzymatycznych można prowadzić reakcję przy użyciu biokatalizatorów wolnych albo immobilizowanych. W układzie homogenicznym roztwór enzymu wstrzykiwany jest stale do miejsca reakcji. Biotransformacja przeprowadzana w tym układzie jest mniej korzystna, ponieważ enzym opuszcza przestrzeń reakcyjną. W ten sposób zużywa się większą ilość enzymu - proces recyklingu enzymu jest bardzo trudny do przeprowadzenia, ze względu na dobrą rozpuszczalność białka w wodzie. W drugim przypadku enzymy znajdują się stale w tym samym miejscu i w ciągu procesu nie powinny opuszczać przestrzeni reakcyjnej, dzięki czemu można używać taki mikroukład wielokrotnie, a w konsekwencji zużywana jest mniejsza ilość często bardzo drogich enzymów.

Immobilizacja jest to związanie enzymu na powierzchni nośnika lub w jego wnętrzu, co w efekcie prowadzi do przeprowadzenia enzymu ze stanu rozpuszczalnego w buforze w stan nierozpuszczalny. Immobilizację enzymów wykonuje się z wielu powodów. Jednym z nich jest to, że związanie z nośnikiem zmienia naturę biokatalizatora oraz jego mikrośrodowisko, a tym samym oddziałuje na jego właściwości. W większości przypadków immobilizacja wpływa na zmianę parametrów działania enzymów, takich jak optymalne pH, kinetyka katalizowanej reakcji czy specyficzność substratowa. Immobilizacja wpływa też na termostabilność enzymów poprzez usztywnienie ich cząsteczek. Dzięki temu białka są bardziej odporne na wyższe temperatury i w mniejszym stopniu ulegają zmianom strukturalnym pod wpływem ciepła. Wiele enzymów po immobilizacji zyskuje również odporność na proteolizę¹².

Poniżej przedstawione zostaną wybrane sposoby immobilizacji enzymów w mikroukładach:

a. Immobilizacja enzymów wewnątrz kanałów

Najczęściej stosowaną metodą immobilizacji enzymów ich kowalencyjne unieruchomienie na powierzchni nośnika, który musi być najpierw aktywowany za pomocą na przykład aldehydu glutarowego, chlorku cyjanourylowego lub bromocyjanu (Rys. 6)¹³.



Rysunek 6. Schemat kowalencyjnej immobilizacji enzymów:

a) aktywacja nośnika za pomocą bromocyjanu, b) aktywacja nośnika za pomocą chlorku cyjanourylowego.

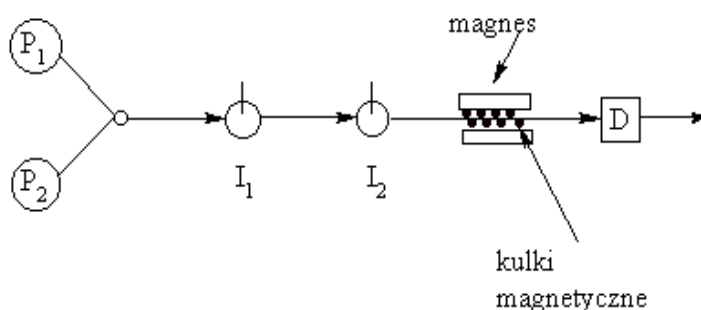
Główną zaletą tego typu immobilizacji jest małe prawdopodobieństwo usunięcia biokatalizatora z powierzchni nośnika. Jednakże ważne jest, żeby katalityczne grupy enzymu nie brały udziału w wiązaniu z nośnikiem, ponieważ może to negatywnie wpłynąć na aktywność biokatalizatora, a nawet całkowicie go dezaktywować. Może zdarzyć się tak, że w immobilizacji enzymu wezmą udział grupy znajdujące się w centrum aktywnym enzymu. Problem ten może być czasem rozwiązany przez immobilizowanie enzymów w obecności ich substratów¹⁴, co pomaga w zachowaniu trzeciorzędowej struktury enzymu.

W procesie kowalencyjnej immobilizacji enzymów ważne jest także stosowanie dodatkowych związków (tzw. spacer), które oddalają centrum aktywne enzymu od nośnika. Podłoże może bowiem negatywnie wpływać na funkcje biokatalizatora.

Jednym z przykładów zastosowania kowalencyjnej immobilizacji enzymów w mikrosystemach jest unieruchomienie biokatalizatora na powierzchni szklanych kulek i wypełnienie nimi przestrzeni mikrokanalu. Takie rozwiązanie zaproponowano do oznaczenia ksantyny. Jest ona związkiem pośrednim w metabolizmie puryn. Konwersja ksantyny przez oksydazę ksantyny jest ciekawa z punktu widzenia medycyny, gdyż w wyniku tej reakcji uwalniany jest anion ponadtlenkowy, który bierze udział w procesach nowotworowych, stanach zapalnych, etc. Oksydazę ksantyny i peroksydazę chrzanową

immobilizowano na szklanych kulkach za pomocą 3-aminopropylsilanu i aldehydu glutarowego¹⁵.

Podobne rozwiązanie, ale przy użyciu kulek magnetycznych, zastosowano do immobilizacji oksydazy glukozy w mikrosystemie¹⁶. Immobilizat bezpośrednio wstrzykiwano do mikrosystemu z analizą przepływową (Rys. 7), a uwalniany w wyniku reakcji nadtlenek wodoru analizowano amperometrycznie.



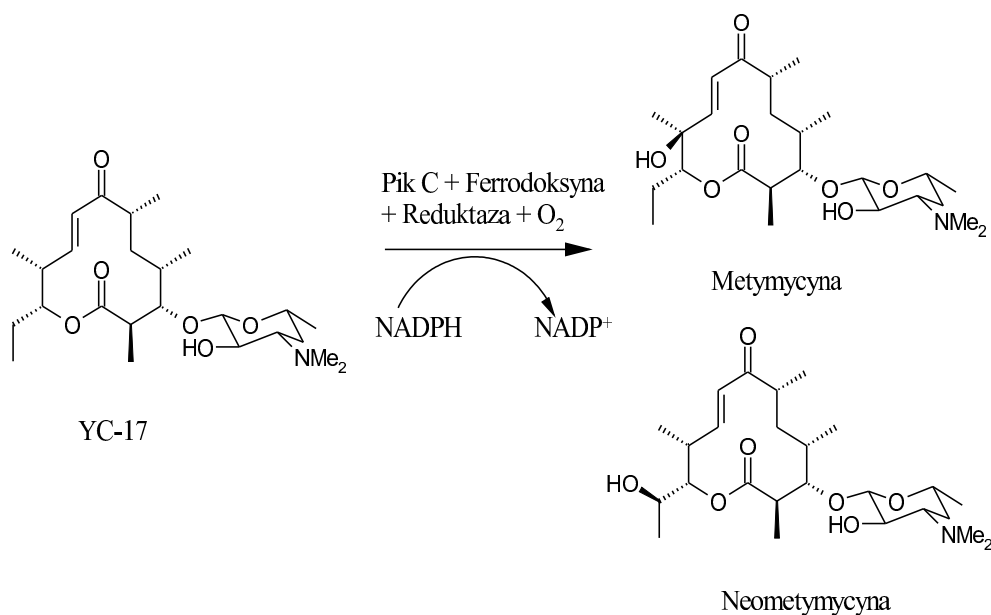
Rysunek 7. Schemat magnetycznego mikroukładu przepływowego: P₁, P₂ – pompy, I₁ – iniektor zawiesiny, I₂ – iniektor próbki, D – elektrochemiczny detektor.

Tak immobilizowany enzym przechowywany w temperaturze 10° C wykazywał aktywność i stabilność przez więcej niż osiem miesięcy, co wskazuje na jego dużą stabilność.

Innym ciekawym pomysłem jest immobilizacja enzymów na zmodyfikowanej agarozie. W literaturze¹⁷ opisany jest przykład takiej immobilizacji hydroksylazy *Streptomyces venezuelae*¹⁸ wewnątrz kanału zbudowanego z poli(dimetylosiloksanu) (PDMS). Najpierw wprowadzano do kanałów kulki agarozowe, zaś immobilizacja enzymu przebiegała *in situ*. Immobilizowany enzym z dużą reaktywnością (konwersja >90 % przy przepływie 70 nl/min) katalizował reakcję hydroksylacji makrolitu YC-17 do metymycyny i neometymycyny (Rys. 8).

Ta wysoka reaktywność sprawiła, że krótszy jest czas reakcji w mikroreaktorze, co może być bardzo ważne z powodu ograniczonej stabilności złożonych enzymów.

Taki mikroukład z immobilizowanym enzymem pozwolił na przeprowadzenie ważnej z punktu widzenia medycyny reakcji, ponieważ badany enzym jest odpowiedzialny za powstawanie wyżej wymienionych makrolidowych antybiotyków w *Streptomyces venezuela*.

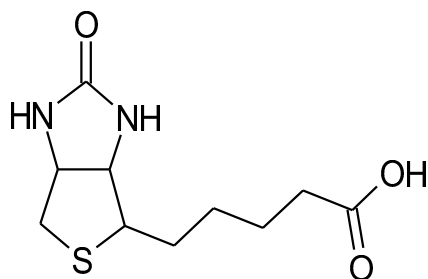


Rysunek 8. Enzymatyczna reakcja hydroksylacji makrolitu YC-17 w obecności NADPH, ferredoksyny, reduktazy ferredoksyna - NADP⁺.

b. Imobilizacja enzymów na powierzchni mikrokanalów

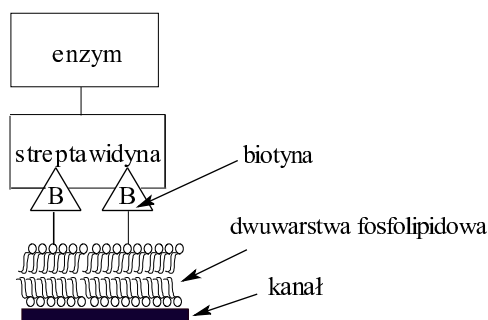
Imobilizacja enzymów na powierzchni kanałów ma tę zaletę, że tak przygotowany mikroreaktor ma większe pole powierzchni, a nie obserwuje się w nim wzrostu ciśnienia.

Jedną z najczęściej stosowanych metod nie kowalencyjnej imobilizacji jest metoda wykorzystująca oddziaływanie biotyny ze streptawidyną lub biotyny z awidyną¹⁹⁻²³ (biotyna jest to witamina H (Rys. 9), streptawidyna i awidyna są białkami posiadającymi silne powinowactwo do biotyny).



Rysunek 9. Struktura biotyny.

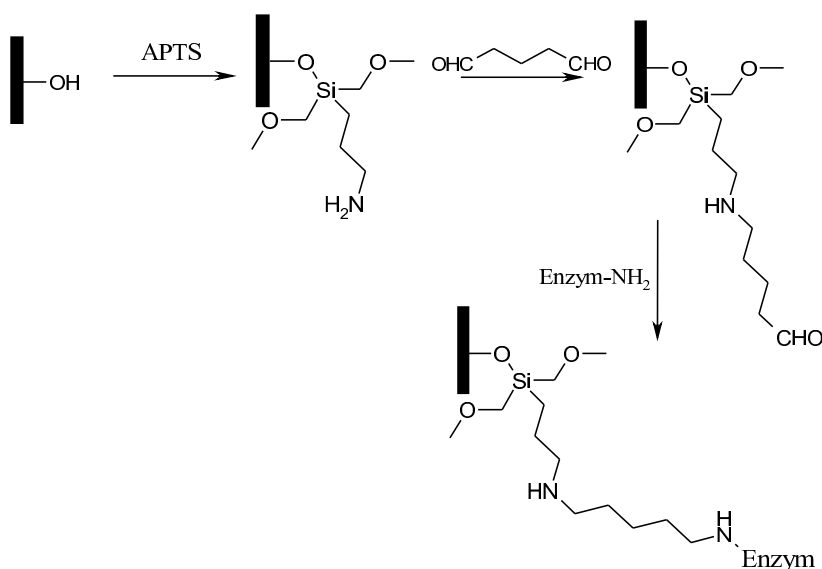
Powierzchnia mikrokanalu wykonanego ze szkła pokryta jest dwuwarstwą fosfolipidową zawierającą biotynylowane lipidy, do których przyłączany jest sprzężony ze streptawidyną enzym (Rys. 10)²⁴.



Rysunek 10. Schematyczny diagram przedstawiający immobilizację enzymu na powierzchni kanału, wykorzystującą oddziaływanie biotyny ze streptawidyną.

Metoda ta w dużym stopniu pozwala na utrzymanie aktywnej struktury białka, ale jej wadą jest wysoka cena enzymów sprzężonych ze streptawidyną.

Immobilizacja enzymów na powierzchni kanału wykonanego ze szkła może przebiegać według standardowej procedury dla sprzęgania enzymów z matrycą krzemową (krzemionką)^{25,26}. Proces rozpoczyna się od reakcji silanizacji powierzchni za pomocą 3-aminopropylotrietoksysilanu (APTES), następnie grupy aminowe łączone są z aldehydem glutarowym, który w ostatnim etapie sprzęgany jest z enzymem (Rys. 11).

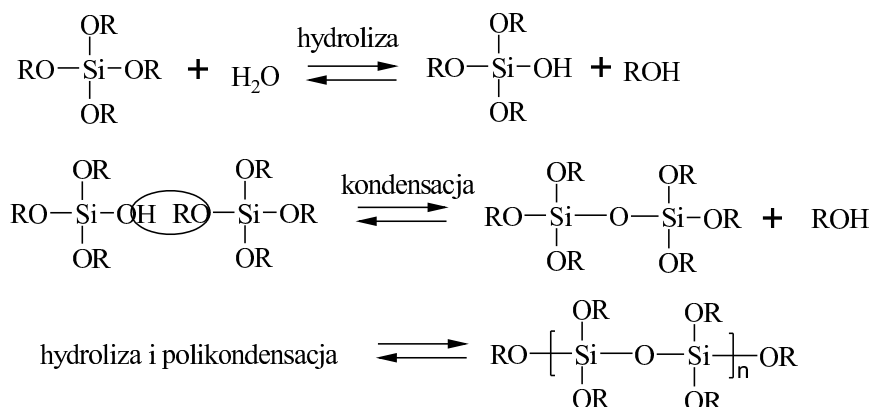


Rysunek 11. Immobilizacja enzymu na powierzchni szkła za pomocą APTES i aldehydu glutarowego.

Czynnikiem, który w dużym stopniu ogranicza immobilizację na powierzchni kanału jest materiał, z którego wykonany jest mikroukład. Jeżeli mikroukład zbudowany jest z hydrofobowego polimeru, jakim jest na przykład poli(dimetylosiloksan) (PDMS), to przed

immobilizacją należy poddać go działaniu plazmy tlenowej²⁷ w celu wytworzenia grup hydrofilowych na jego powierzchni.

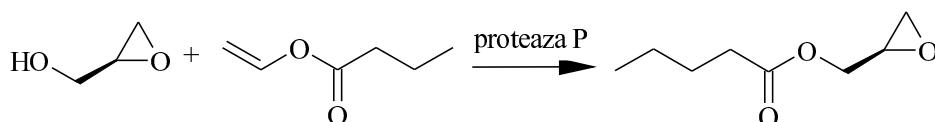
Można również zastosować technikę zol-żel²⁸ w celu utworzenia nanostruktury na powierzchni kanału wykonanego z krzemu²⁶. Modyfikację mikrosystemu wykonuje się za pomocą kopolimerów 3-aminopropylsiloksanu i metylsiloksanu. Technika ta oparta jest jak już wspomniano na procesie zol-żel (Rys. 12), a typowa procedura polega na użyciu wodnego roztworu enzymu, fluorku sodu (spełniającego funkcję katalizatora) i pochodnych alkoksylanów ($\text{Si}(\text{OR})_4$, gdzie R = alkil, aryl lub alkoksyl) jako prekursorów żelu.



Rysunek 12. Mechanizm procesu zol-żel.

Silany ulegają hydrolizie i krzyżowej kondensacji formując matrycę SiO_2 , w której zamykany jest enzym. Immobilizowana na zmodyfikowanej powierzchni proteaza serynowa²⁹ katalizowała reakcję hydrolizy wybranych oligopeptydów 15 razy szybciej niż w procesie periodycznym³⁰. Wydajność tego mikroreaktora była więc bardzo duża.

Innym podobnym przykładem immobilizacji enzymu w mikroreaktorze³¹ w układzie zol-żel jest mikrosystem zawierający proteazę P pochodzącą z organizmów *Aspergillus mellus*. Enzym ten katalizował reakcję transestryfikacji pomiędzy S-(-)-glicydolem i maślanem winylu (Rys. 13) w rozpuszczalniku organicznym.



Rysunek 13. Katalizowana enzymatycznie reakcja transestryfikacji.

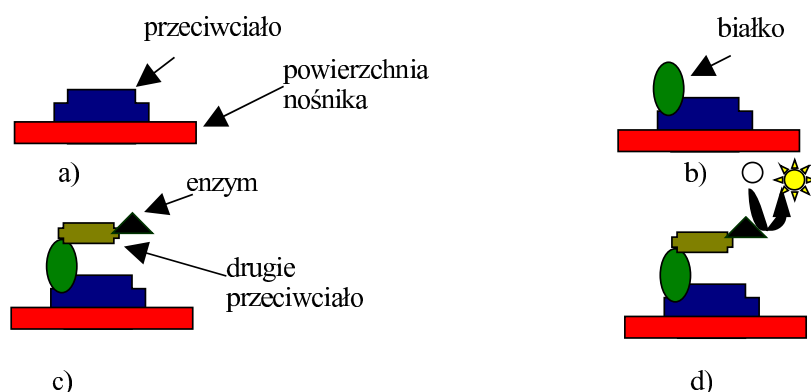
Stopień konwersji przeprowadzonej w mikroukładzie biotransformacji był większy niż w procesie periodycznym.

4. Zastosowanie enzymów w miniaturowych systemach chemicznych

a. Analiza białek

Jednym z najczęściej spotykanych zastosowań mikroukładów enzymatycznych jest identyfikacja i sekwencjonowanie peptydów (proteomika). Rozwój proteomiki może ułatwić między innymi poszukiwanie ważnych leków, dlatego potrzebne są nowe technologie i dlatego tak ważny jest udział mikrosystemów w znajdowaniu coraz to skuteczniejszych metod prowadzenia badań.

Bardzo ciekawym wykorzystaniem mikrosystemów są testy immunoenzymatyczne znane pod nazwą ELISA, ważne narzędzie dla medycyny i biotechnologii. Metoda ta polega na użyciu przeciwciała jako nadzwyczaj specyficznego odczynnika analitycznego do oznaczeń ilościowych białka.



Rysunek 14. Schemat testu immunoenzymatycznego (ELISA)³.

Test ten wykonywany jest w czterech etapach (Rys. 14):

- Związanie swoistego przeciwciała z polimerowym podłożem,
- Nałożenie próbki (utworzenie kompleksu przeciwciało-antygen (białko)) i przemycie w celu usunięcia cząsteczek niezwiązanych,
- Dodanie drugiego przeciwciała (kwalencyjnie związanego z enzymem np. fosfatazą alkaliczną) swoistego dla innego miejsca w oznaczanym białku (antygenie) i przemycie w celu usunięcia niezwiązanego przeciwciała,
- Enzymatyczna reakcja w wyniku, której przekształcany jest na przykład związek nie wykazujący fluorescencji w fluoryzujący produkt.

Granica detekcji tej metody wynosi mniej niż nanogram białka. Taki test może służyć na przykład do wykrywania ciąży (test na obecność gonadotropiny kosmówkowej – białka hormonalnego wytwarzanego przez łożysko), a także do wykrywania przeciwciał anti-HIV w przypadku badań na obecność tego wirusa w organizmie chorego.

W porównaniu do konwencjonalnych metod, test immunoenzymatyczny wykonywany w mikroukładach³²⁻³⁴ ma wiele zalet. Jedną z nich jest mniejsze zużycie reagentów i krótszy czas badania. W mikroreaktorach wykonywano test ELISA na przykład na płycie CD³⁵ wykonanej z tworzywa sztucznego, gdzie każdym kolejnym etapem sterowano za pomocą szybkości rotacji płytki. Przepływy roztworów potrzebnych do wykonania testu były kontrolowane poprzez siły odśrodkowe i kapilarne.

Innym wkładem enzymatycznych mikroreaktorów w rozwój proteomiki³⁶ jest reakcja hydrolizy białek i peptydów za pomocą enzymów proteolitycznych, takich jak trypsyna. Bierze ona udział w pierwszym etapie mapowania masy białek (ang. *Peptide mass mapping*), która jest jedną z najlepszych metod służących do identyfikacji białek a także do analizy ich post-translacyjnych modyfikacji. Dzięki reakcji enzymatycznego trawienia białek powstają mniejsze fragmenty, których masy mogą być dalej analizowane za pomocą spektrometrii mas (np. przy użyciu takich metod jonizacji jak MALDI^{37,38} lub elektrostry³⁹).

Przeprowadzenie tego procesu w mikroukładzie pozwala na użycie mniejszej ilości próbki, co zwiększa stosunek enzymu do substratu i w konsekwencji przyspiesza reakcję. W opisano mikroreaktor zawierający immobilizowaną na szklanych kulkach o kontrolowanych porach (CPG – *controlled pore glass*) trypsynę⁴⁰. W pierwszym etapie białko (β -kazeina) było hydrolizowane enzymatycznie, a następnie produkt analizowano za pomocą elektroforezy kapilarnej. W ciągu 3 godzin otrzymywano mapę β -kazeiny, tymczasem w konwencjonalnie stosowanych metodach etap enzymatycznej hydrolizy peptydu trwa przez całą noc⁴¹.

Innym przykładem jest mikroukład z immobilizowaną na kulkach trypsyną, która katalizuje reakcję hydrolizy cytochromu c w ciągu 3-6 min⁴². Produkty rozdzielane są za pomocą elektroforezy kapilarnej, a następnie analizowane przy użyciu spektrometrii mas (ESI/MS).

Najczęściej używanym enzymem do hydrolizy białek jest trypsyna, jednakże w mikroukładach używane są także inne enzymy proteolityczne takie jak chymotrypsyna, pepsyna⁴³ czy papaina⁴⁴.

b. Analiza kwasów nukleinowych

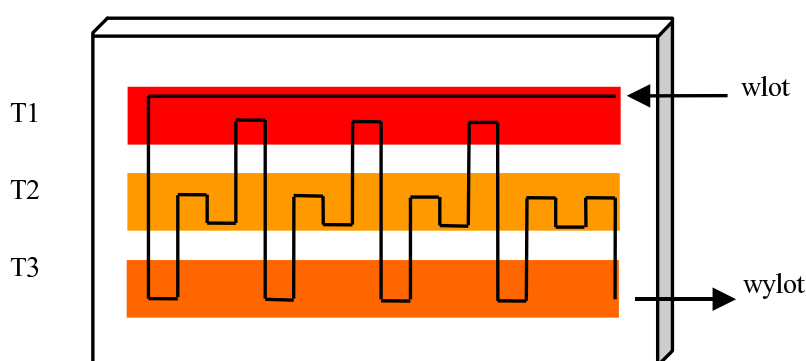
Znacznym osiągnięciem mikrotechnologii jest miniaturyzacja testów genetycznych. Takie systemy odgrywają wielką rolę w diagnostyce medycznej, sądownictwie czy też analizach środowiskowych. Klasyczne badania genetyczne są wieloetapowe, wymagają dużego nakładu pracy, a przede wszystkim są czasochłonne. Miniaturyzacja usprawnia proces analizy materiału genetycznego, czyniąc go prostszym i szybszym.

Podstawowym narzędziem w badaniach materiału genetycznego jest łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR), za pomocą której można powielać wybrane sekwencje DNA. Proces ten przeprowadzany jest w następujący sposób: w roztworze wyjściowym znajduje się sekwencja DNA (którą chcemy namnożyć), trifosforany wszystkich czterech deoksyrybonukleozydów, odcinki starterowe (primery) oraz enzym polimeraza DNA³.

Technika PCR składa się z trzech etapów, z których każdy prowadzony jest w innej temperaturze.

1. W pierwszym etapie w temperaturze 95° C zachodzi denaturacja podwójnej nici DNA (etap denaturacji)
2. Następnie w temperaturze 54° C zachodzi hybrydyzacja obecnych w nadmiarze odcinków starterowych z każdą z nici DNA (etap hybrydyzacji)
3. W ostatnim etapie temperaturze 72° C zachodzi reakcja syntezy komplementarnego DNA za pomocą polimerazy DNA (pochodzi ona z termofilnych bakterii *Thermophilus aquaticus*) przy użyciu deoksyrybonukleozydów. Proces ten rozpoczyna się od miejsc wyznaczonych przez odcinki starterowe.

W typowym mikroukładzie do przeprowadzenia reakcji łańcuchowej polimeryzacji substraty wstrzykiwane są do strefy reakcyjnej, gdzie ustawiony jest cyklicznie temperaturowy program (Rys. 15).⁴⁵⁻⁵⁰



Rysunek 15. Schemat przepływowego mikroukładu do techniki PCR⁵¹.

Pojemność takich mikrosystemów waha się w granicach 10^{-9} – 10^{-6} l. W literaturze można znaleźć przykład urządzenia na 12 nl⁵². Najczęściej systemy do PCR mają wymiary 1cm/1cm, a minimalna wielkość takiego mikroukładu limitowana jest przez trudności w jego obsłudze. W porównaniu z komercyjnymi testami genetycznymi taki mikroukład pozwala na zaoszczędzenie czasu i drogich odczynników (enzymów i innych reagentów). Inną zaletą

mikrosystemów do PCR jest to, że ich elementy grzejne i chłodzące mają mniejszą pojemność cieplną niż tradycyjne termocyklery, co powoduje wzrost szybkości grzania i chłodzenia w miniaturowym urządzeniu. Ponadto elementy grzejne i chłodzące mikrosystemów do PCR wbudowane są zwykle w dno mikroreaktora, dzięki czemu znajdują się w bardzo bliskim sąsiedztwie próbki, co pozwala na szybszą wymianę ciepła między nią a urządzeniem i w konsekwencji zwiększa się efektywność całego procesu.⁵³

W literaturze można znaleźć także urządzenia do dalszej analizy DNA. Zawierają one enzymatyczne mikroreaktory, w których może zachodzić reakcja trawienia DNA za pomocą restryktaz. Systemy te są bardzo przydatne w biologii molekularnej, gdyż umożliwiają sporządzanie map plazmidów⁵⁴⁻⁵⁶.

c. Analiza działania enzymów

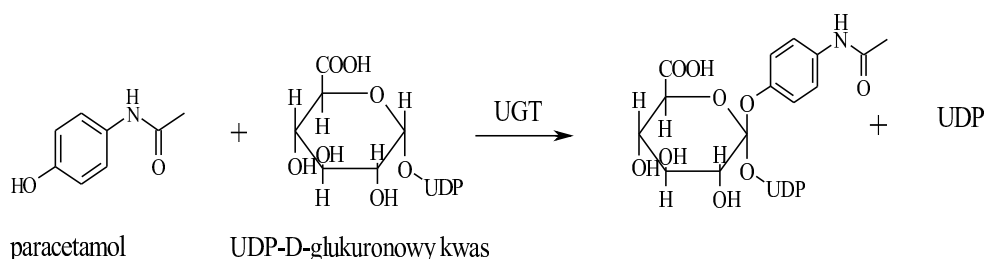
W enzymatycznych mikroreaktorach można badać kinetykę działania biokatalizatorów⁵⁷⁻⁵⁹. Możliwe jest na przykład badanie inhibicji lub aktywacji enzymów, a także wyznaczenie kluczowych parametrów takich jak aktywność enzymatyczna, stała Michaelisa-Menten (K_m) i szybkość maksymalna (v_{max}).

Bardzo ważnym zagadnieniem w chemii leków jest badanie inhibitorów enzymów. W mikrosystemach można wykonywać szybki przegląd enzymów i ich potencjalnych inhibitorów lub aktywatorów. Firmy farmaceutyczne poszukują na przykład nowych inhibitorów lipaz, które mogą być potencjalnymi lekami na otyłość⁶⁰.

Jednym z przykładów analizy działania enzymu w mikroukładzie jest badanie inhibitorów transferazy UGT⁶¹. Jest to enzym ważny dla poprawnego funkcjonowania organizmów, ponieważ katalizuje reakcje przeniesienia grup glikozydowych z nukleotydowych cukrów na inne związki (endogenne i egzogenne)⁶², których obecność w organizmie jest niepożądana. Produktami tej reakcji są β -D-glukuronidy (Rys. 16), które są łatwo rozpuszczalne w wodzie i dzięki temu mogą być usuwane z organizmu w moczu lub żółci.

Wyzolowany mikrosom (zawierający UGT) z wątroby szczurzej immobilizowano metodą zol-żel w mikroukładzie i badano enzymatyczną reakcję glukuronizacji paracetamolu. Reakcja ta jest bardzo ważna z punktu widzenia medycyny, ponieważ w normalnej dawce paracetamol nie jest szkodliwy dla organizmów, zaś w większej ilości może być hepatotoksyczny. Przekształcany jest on wtedy do toksycznego chinonu⁶³. Dlatego też inne związki, które konkurują z acetaminofenonem o udział w reakcji glukuronizacji mogą mieć zarówno terapeutyczny, jak i toksyczny skutek, w szczególności, gdy dawki paracetamolu są duże. W mikroukładzie badano 4-nitrofenol i inne inhibitory transferazy UGT, a produkty

oznaczano za pomocą technik elektroforetycznych. Otrzymano takie same wyniki jak dla wolnego enzymu, aczkolwiek w mikroukładzie zużywano 10^4 razy mniej próbki i 10^3 razy mniej mikrosomów niż w konwencjonalnej metodzie. Fakt ten wskazuje na to, że taki mikroukład może być z powodzeniem stosowany do badania ścieżek metabolicznych i oddziaływań leków, przy zużyciu znacznie mniejszych ilości próbek.

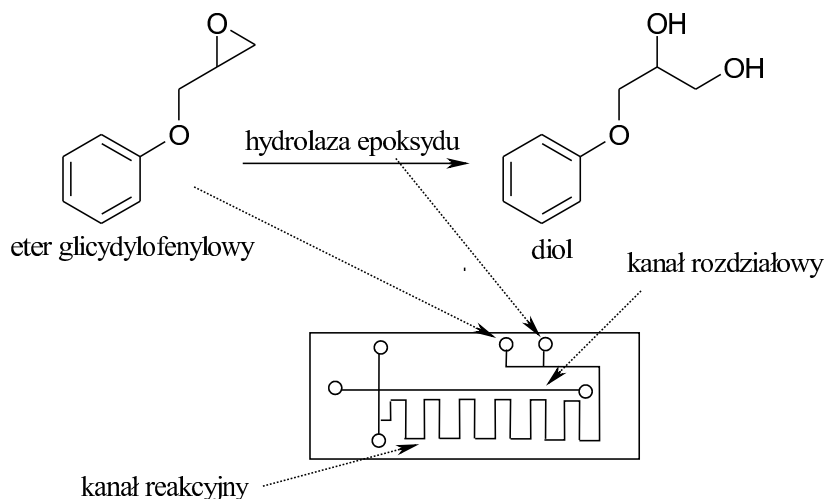


Rys. 16. Reakcja metabolizmu paracetamolu.

Na uwagę zasługuje także prezentowany w literaturze⁶⁴ układ do wyznaczania stałej Michaelisa-Menten dla peroksydazy chrzanowej i β -galaktozydazy. Enzymy te immobilizowano na mikrosferach poprzez oddziaływania z biotyną i streptawidyną. W mikroukładzie z tak immobilizowanym enzymem przeprowadzono reakcję prowadzącą do przemiany substratu nie fluorescencyjnego w fluorescencyjny produkt. W obu przypadkach otrzymane stałe Michaelisa-Menten były podobne do tych wyznaczonych w układzie homogenicznym, a przy tym zużyto małe ilości enzymu.

Analiza parametrów działania immobilizowanych enzymów w mikrosystemie jest łatwiejsza niż w tradycyjnym układzie. Wynika to między innymi z faktu, że pokonuje się w ten sposób trudności w wymieszaniu stałego nośnika zawierającego immobilizowany enzym na swojej powierzchni z roztworem substratu. Inną zaletą takiego mikroukładu jest użycie bardzo małych ilości immobilizowanego enzymu i możliwość powtórnego użycia takiego mikrosystemu.

W mikroukładach można także badać enancjoselektywność różnie modyfikowanych enzymów. W literaturze⁶⁵ omówiono przykład biotransformacji eteru glicydylofenylowego za pomocą hydrolazy epoksydu⁶⁶⁻⁶⁸ (Rys. 17) w wyniku której powstawał w przewadze jeden z enancjomerów diolu.



Rysunek 17. Reakcja hydrolizy eteru glicydylofenylowego za pomocą hydrolazy epoksydu.

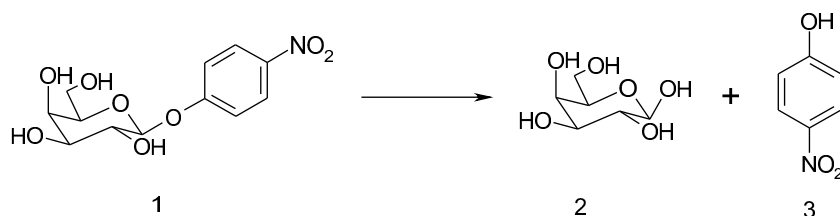
Mikroreaktor enzymatyczny połączono z chiralną mikroelektroforezą kapilarną^{69,70}, dzięki czemu bardzo szybko określano nadmiar enancjomeryczny produktu. W ciągu pojedynczego eksperymentu określono enancjoselektywność dla naturalnego enzymu z *Aspergillus niger*, jak i dla enzymów zmutowanych⁷¹. Mikroukłady pozwalają na szybki przegląd mutantów enzymów i wybranie najbardziej selektywnego biokatalizatora wobec danego substratu. Przeprowadzenie reakcji chemicznej i analizy produktów w jednym systemie powoduje, że zużywane są mniejsze ilości reagentów. Jest to wielką zaletą takich urządzeń, ponieważ odczynniki są często bardzo drogie, a zmutowane enzymy dostępne są w bardzo małych ilościach.

Bardzo ważną zaletą mikroukładów z immobilizowanymi lipazami jest to, że skracany jest czas analizy⁷². W normalnej skali prowadzone reakcje transestryfikacji mogą trwać przez kilka dni dla niektórych immobilizowanych lipaz⁷³, zaś w mikroukładzie czas reakcji skrócony jest nawet do kilku minut.

d. Inne biotransformacje

Biotransformacja jest procesem chemicznym zachodzącym przy udziale enzymów lub zawierających je komórek czy tkanek

Ciekawym przykładem biotransformacji w mikroukładzie jest prowadzona w sposób ciągły⁷⁴ enzymatyczna hydroliza *p*-nitrofenylo- β -D-galaktopiranozydu za pomocą β -galaktozydazy (Rys. 18)⁷⁵.

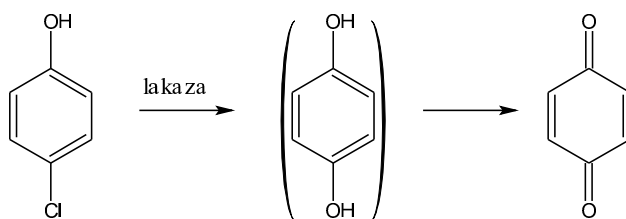


Rysunek 18. Enzymatyczna hydroliza *p*-nitrofenylo- β -D-galaktopiranozydu za pomocą β -galaktozydazy.

Produkty tej reakcji (D-galaktoza i *p*-nitrofenol) analizowano przy użyciu HPLC połączonego ze spektrometrią mas. Reakcje biotransformacji przeprowadzono w mikrokanale wytworzonym z PMMA (poli(metakrylan metylu)), do którego wprowadzano pompą strzykawkową substrat rozpuszczony w acetonitrylu i enzym rozpuszczony w buforze fosforanowym.

Reakcję prowadzono w temperaturze 37° C na płycie grzejnej. Przeprowadzono także reakcję odwrotną do przedstawionej powyżej, transglukozyzację jako metodę syntezy oligosacharydów w mikroukładzie za pomocą β -galaktozydazy. W obu przypadkach badania wykazały, że reakcje prowadzone w mikrokanale są szybsze niż w tradycyjnym procesie okresowym.

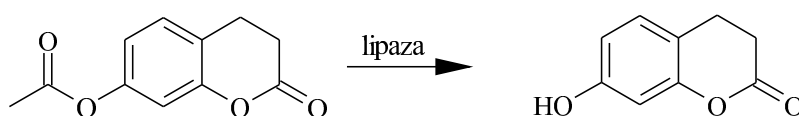
Innym przykładem analizy biotransformacji podczas ciągłego przepływu jest reakcja degradacji *p*-chlorofenolu za pomocą lakazy (Rys. 19)⁷⁶.



Rysunek 19. Biodegradacja *p*-chlorofenolu za pomocą enzymu – lakazy⁷⁷.

Enzymatyczną degradację *p*-chlorofenolu prowadzono w mikrokanale (szerokość - 100 μ m, głębokość - 25 μ m) wykonanym ze szkła (70 x 38 mm) (Rys. 3). Reakcja przebiegała na granicy faz woda – faza organiczna, gdzie lakazę rozpuszczono w buforze natomiast substrat w *izo*-oktanie. Dokonano szczegółowej analizy kinetyki reakcji w takim mikroukładzie i ustalono, że degradacja zachodzi głównie na granicy fazy wodnej i organicznej, zaś dyfuzja substratu w głąb fazy wodnej jest czynnikiem limitującym szybkość reakcji.

W enzymatycznych reaktorach można przeprowadzać także reakcje enzymatycznej hydrolizy za pomocą lipaz. Jednym z przykładów jest katalizowana za pomocą immobilizowanego enzymu hydroliza 7-acetoksykumaryny w kumarynę⁷⁸ (Rys. 20) z 1,5 razy większą wydajnością niż w tradycyjnym układzie.



Rysunek 20. Enzymatyczna hydroliza 7-acetoksykumaryny w kumarynę

5. Podsumowanie

Powyższy przegląd różnych technologii i zastosowań mikroreaktorów enzymatycznych obrazuje wzrost zainteresowania tematem integracji enzymów z systemem mikroprzepływowym oraz rosnący obszar zastosowań takich układów w wielu dziedzinach. Podstawowe zalety, jakie cechują wykorzystanie mikroreaktorów w porównaniu do układów klasycznych, to: zużycie małej ilości próbek i odczynników, zmniejszenie kosztów i czasu analizy, szybsze przeniesienie masy i szybsza wymiana ciepła, przyjazność dla środowiska, a także wysoka efektywność procesu.

Rozwój mikroreaktorów enzymatycznych jest bardzo obiecujący z punktu widzenia testów klinicznych, monitorowania bioprocessów czy też detekcji wielu ważnych analitów bezpośrednio w środowisku naturalnym. Bardzo ciekawym obszarem badań jest wkład w postęp analizy białek czy kwasów nukleinowych, co jest ważne z punktu widzenia medycyny i innych nauk biologicznych. Użycie mikroreaktorów enzymatycznych umożliwia także badanie enzymów pod kątem kinetyki ich działania.

Zalety mikroreaktorów mogą być także wykorzystywane na skalę przemysłową. Zoptymalizowany mikroukład może być stosowany jako reaktor przemysłowy. Dzieje się tak dlatego, że można zastosować reaktory produkcyjne skonstruowane z wielu równoległych urządzeń. Eliminuje to problem z powiększeniem skali, a także daje możliwość szybkiej wymiany zepsutego modułu i poprawia bezpieczeństwo pracy. Enzymatyczne mikroreaktory mogą mieć duży wkład w rozwój tak zwanej „zielonej chemii”.

Jak dotąd ukazało się niewiele patentów⁷⁹⁻⁸² opisujących rozwiązania konstrukcyjne mikroreaktorów enzymatycznych. W ostatnich latach enzymy znajdują zastosowanie w wielu gałęziach nauki i przemysłu. Rozwój i optymalizacja enzymatycznych mikrosystemów może otworzyć wiele możliwości do analizy procesów biochemicznych. Jest to, naszym zdaniem, bardzo interesujące zagadnienie, które jeszcze wymaga wielu badań i wprowadzania nowych

rozwiązań, stąd podjęcie tej tematyki przez naszą Pracownię Miniaturowych Systemów Bioanalitycznych na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej.

Podziękowania:

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

Literatura:

1. K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer 1997
2. F.M. Menger, *Acc. Chem. Res.* 1993, 26, 206
3. L. Stryer, *Biochemia*, PWN 2000, Warszawa
4. R.K. Murray, D.K. Granner, P.A. Mayes, V.W. Rodwell, *Harper's Illustrated Biochemistry*, McGraw-Hill Companies 2003, USA
5. S.J. Haswell, R.J. Middleton, B. O'Sullivan, V. Skelton, P. Watts, P. Styring, *Chem Commun*, 2001, 391-398
6. C-H. Lin, G-B. Lee, Y-H. Lin, G-L. Chang, *J Micromech Microeng*, 2001, 11, 726-732
7. S.J. Haswell, V. Skelton, *Trend Anal Chem*, 2000, 19, 389-395
8. H. Becker, L.E. Locascio, *Talanta*, 2002, 56, 267-287
9. D.R. Reyes, D. Iossifidis, P.A. Auroux, A. Manz, *Anal Chem*, 2002, 74, 2623-2636
10. T. McCreedy, *Anal Chim Acta*, 2001, 427, 39-43
11. W. Ehrfeld, V. Hessel, H. Löwe, *Microreactors*, Wiley-VCH 2000, Weinheim
12. K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer 1997
13. J. Křenková, F. Foret, *Electrophoresis*, 2004, 25, 3550-3563
14. H. Jiang, H. Zou, H. Wang, J. Ni, Q. Zhang, Y. Zhang, *J. Chromatogr A*, 2000, 903, 77-84
15. T. Richter, L.L. Shultz-Lockyear, R.D. Oleschuk, U. Biletewski, D.J. Harrison, *Sens Actuators B*, 2002, 81, 369-376
16. A. Nomura, S. Shigemitsu, O.O. Mehdi, J.M. Kauffmann, *Anal Chem*, 2004, 76, 5498-5502
17. A. Srinivasan, H. Bach, D.H. Sherman, J.S. Dordick, *Biotechnol Bioeng*, 2004, 88, 528-535
18. Y. Xue, D. Wilson, L. Zhao, H. Liu, D.H. Sherman, *Chem Biol*, 1998, 5, 661-667
19. S.A. Darst, M. Ahlers, P.H. Miller, E.W. Kubalek, R. Blankenburg, O.H. Ribi, H. Ringsdorf, R.D. Kornberg, *J Biophys*, 1991, 59, 387-396
20. J.N. Herron, W. Muller, M. Paudler, H. Riegler, H. Ringsdorf, P.A. Suci, *Langmuir*, 1992, 8, 1413-1416
21. P.L. Edmiston, S.S. Saavedra, *J Am Chem Soc*, 1998, 120, 1665-1671
22. N.J. Gleason, J.D. Carbeck, *Langmuir*, 2004, 20, 6374-6381
23. M.A. Holden, *Anal Chem*, 2004, 76, 1838-1843
24. H. Mao, T. Yang, P.S. Cremer, *Anal Chem*, 2002, 74, 379-385
25. L. Xiong, F.E. Regnier, *J Chromatogr A*, 2001, 924, 165-176

26. S. Ekström, P. Önnérfjord, J. Nilsson, M. Bengtsson, T. Laurell, G. Marko-Varga, *Anal Chem*, 2000, 72, 286-293
27. H. Wu, Y. Tian, B. Liu, H. Lu, X. Wang, J. Zhai, H. Jin, P. Yang, Y. Xu, H. Wang, *J Proteome Res*, 2004, 3, 1201-1209
28. A. Ghanema, V. Schurigb, *Tetrahedron Asymmetry*, 2003, 14, 2547–2555
29. K. Arima, H. Yonezawa, T. Uchikoba, M. Shimada, M. Kaneda, *Phytochemistry*, 2000, 54, 451-454
30. M. Miyazaki, J. Kaneno, M. Uehara, M. Fujii, H. Shimizu, H. Maeda, *Chem Commun*, 2003, 5, 648 – 649
31. K. Kawakami, Y. Sera, S. Sakai, T. Ono, H. Ijima, *Ind Eng Chem Res*, 2005, 44, 236-240
32. J.S. Rossier, H.H. Girault, *Lab. Chip*, 2001, 1, 153-157
33. E. Eteshola, D. Leckband, *Sens. Actuators B*, 2001, 72, 129-133
34. E. Eteshola, D. Leckband, *Sensors and Actuators B*, 2001, 72, 129-133
35. S. Lai, S. Wang, J. Luo, L.J. Lee, S.T. Yang, M.J. Madou, *Anal Chem*, 2004, 76, 1832-1837
36. M. Schrader, P. Schultz-Knappe, *Trends in Biotechnology*, 2001, 19, S55-S60
37. A. Tsarbopoulos, M. Karas, K. Strupat, B.N. Pramanik, T.L. Nagabhushan, F. Hillenkamp, *Anal Chem*, 1994, 66, 2062-2070
38. D. Dogruel, P. Williams, R.W. Nelson, *Anal Chem*, 1995, 67, 4343-4348
39. M. Mann, M. Wilm, *Anal Chem*, 1994, 66, 4390-4399
40. E. Bonneil, M. Mercier, K.C. Waldron, *Anal Chim Acta*, 2000, 404, 29– 45
41. S. Mouradian, Lab-on-a-chip: application in proteomics, *Current Opinion in Chemical Biology*, 2002, 6, 51-56
42. C. Wang, R. Oleschuk, F. Ouchen, J. Li, P. Thibault, D. J. Harrison, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2000, 14, 1377-1383
43. M. Kato, K. Sakai-Kato, H.M. Jin, K. Kubota, H. Miyano, T. Toyo'oka, *Anal Chem*, 2004, 76, 1896-1902
44. L. Korecka, Z. Bilkova, M. Holeapek, J. Kralovsky, M. Benes, J. Lenfeld, *J Chromatogr B*, 2004, 808, 15-24
45. C. Ke, H. Berney, A. Mathewson, M.M. Sheehan, *Sens Actuators B Chem*, 2004, 102, 308-314
46. J. Khandurina, T.E. McKnight, S.C. Jacobson, L.C. Waters, R.S. Foote, J.M. Ramsey, *Anal Chem*, 2000, 72, 2995-3000
47. T.M.H. Lee, I. Hsing, A.I.K. Lao, M.C. Carles, *Anal Chem*, 2000, 72, 4242-4247

48. H. Nagai, Y. Murakami, E. Tamiya, *Biosens Bioelectron*, 2001, *16*, 1015-1019
49. I. Schneegass, R. Brautigam, J.M. Kohler, *Lab Chip*, 2001, *1*, 42-49
50. N. Zhang, E.S. Yeung, *J Chromatogr B*, 1998, *714*, 3-11
51. L. Krucka, P. Wilding, Microchip PCR, *Anal Bioanal Chem*, 2003, *377*, 820-825
52. J. Liu, M. Enzelberger, S. Quake, *Electrophoresis*, 2002, *23*, 1531-1536
53. I. Schneegass, J.M. Köhler, *Rev Mol Biotechnol*, 2001, *82*, 101-121
54. C.W. Kan, C.P. Fredlake, E.A.S. Doherty, A.E. Barron, *Electrophoresis*, 2004, *25*, 3564-3588
55. S. Katsura, N. Harada, Y. Maeda, J. Komatsu, S. Matsuura, K. Takashima, A. Mizuno, *J Biosci Bioeng*, 2004, *98*, 293-297
56. E.T. Lagally, R.A. Mathies, *J Phys D Appl Phys*, 2004, *37*, R245-61
57. A.G. Hadd, D.E. Raymond, J.W. Halliwell, S.C. Jacobson, J.M. Ramsey, *Anal Chem*, 1997, *69*, 3407-3412
58. U. Bilitewski, M. Genrich, S. Kadow, G. Mersal, *Anal Bioanal Chem*, 2003, *377*, 556-569
59. H. Jiang, H. Zou, H. Wang, J. Ni, Q. Zhang, Y. Zhang, *J Chromatogr A*, 2000a, *903*, 77-84
60. G. Müller, S. Petry, *Lipases and phospholipases in drug development: from biochemistry to molecular pharmacology*, Wiley-VCH 2004, Weinheim
61. K. Sakai-Kato, M. Kato, T. Toyoka, *J Chromatogr A*, 2004, *1051*, 261-266
62. C.D. King, G.R. Rios, M.D. Green, T. Tephly, R. Curr, *Drug Metab*, 2000, *1*, 143
63. M. Black, *Annu Rev Med*, 1984, *35*, 577
64. G. H. Seong, J. Heo, R. M. Crooks, *Anal Chem*, 2003, *75*, 3161-3167
65. D. Belder, M. Ludwig, L.W. Wang, M.T. Reetz, *Angew Chem Int Ed*, 2006, *45*, 2463-2466
66. M.T. Reetz, C. Torre, A. Eipper, R. Lohmer, M. Hermes, B. Brunner, A. Maichele, M. Bocola, M. Arand, A. Cronin, Y. Genzel, A. Archelas, R. Furstoss, *Org Lett*, 2004, *6*, 177 – 180
67. M.T. Reetz, L.W. Wang, M. Bocola, *Angew Chem Int Ed*, 2006, *45*, 1236 – 1241
68. A. Archelas, R. Furstoss, *Curr Opin Chem Biol*, 2001, *5*, 112 – 119
69. I. Rodriguez, L.J. Jin, S.F.Y. Li, *Electrophoresis*, 2000, *21*, 211 – 219
70. M.T. Reetz, K.M. Khling, A. Deege, H. Hinrichs, D. Belder, *Angew Chem Int Ed*, 2000, *39*, 3891 – 3893
71. M.T. Reetz, *Advances in Catalysis*, 2005, *49*, 1 – 70

72. D.G. Pijanowska, A. Baraniecka, R. Wiater, G. Ginalska, J. Łobarzewski, W. Torbicz, *Sens Actuators B Chem*, 2001, 78, 263-266
73. A. Kamal, M. Sandbhor, K.V. Ramana, *Tetrahedron Assymetry*, 2002, 13, 815-820
74. M. Miyazaki, H. Maeda, *Trends in Biotechnology*, 2006, 24, 463-470
75. K. Kanno, H. Maeda, S. Izumo, M. Ikuno, K. Takeshita, A. Tashiro, M. Fuji, *Lab Chip*, 2002, 2, 15-18
76. T. Maruyama, J. Uchida, T. Ohkawa, T. Futami, K. Katayama, K. Nishizawa, K. Sotowa, F. Kubota, N. Kamiya, M. Goto, *Lab Chip*, 2003, 3, 308-312
77. A.M. Mayera, R. C. Staples, *Phytochemistry*, 2002, 60, 551-565
78. J. Kaneno, R. Kohama, M. Miyazaki, M. Uehara, K. Kanno, M. Fujii, H. Shimizu, H. Maeda, *New J Chem*, 2003, 27, 1765-1768
79. P. Combette, O. Constantin, Microreactor, method for preparing same, and method for producing a biochemical or biological reaction, Patent No. WO03097229, 2003
80. T. Fujii, K. Hosokawa, Microreactor for biochemical reaction, Patent No. JP10337173, 1998
81. M. Miyazaki, H. Maeda, Microreactor and method for producing the same, Patent No. JP2004267097, 2004a
82. M. Miyazaki, H. Maeda, Microreactor with enzyme reversibly bonded therein and its production method, Patent No. JP2004160273, 2004b.

Rozdział 9

Równowagi chemiczne w kompleksach gość – gospodarz. Metodyka badań

Jaromił Kira, Tadeusz Ossowski

*Zakład Chemii Supramolekularnej, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański, Sobieskiego
18/19, 80-852 Gdańsk*

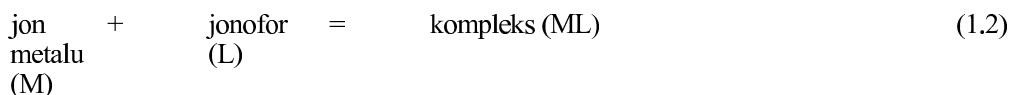
1. Ogólna definicja równowagi powstawania kompleksu supramolekularnego

Wiązanie się gościa z cząsteczką gospodarza, w podejściu ilościowym, jest opisane przez termodynamiczną i kinetyczną stałą tego procesu oraz przez jego selektywność. Końcowy rezultat oddziaływania można zdefiniować jako funkcję czynników takich jak budowa cząsteczek gościa i gospodarza, charakter miejsc wiążących (natura chemiczna i liczba atomów donorowych, rozmieszczenie atomów), wpływ otoczenia.

W najprostszym przypadku powstawanie supramolekuły może być opisane równaniem:



W szczególnym przypadku, jeżeli badane oddziaływanie dotyczy jonu metalu (M) i jonoforu (makrocykle, aminy heterocykliczne) inaczej nazywanego ligandem (L), w zapisie równania 1.1 można zastąpić gościa jonem metalu a cząsteczkę gospodarza jonoforem (ligandem), w rezultacie czego powstaje kompleks (ML):



Stałą równowagi tej reakcji opisuje równanie:

$$K_{ML} = \frac{a_{ML}}{a_M a_L}$$

gdzie a_M , a_M , a_L są aktywnościami ML, M, L w roztworze. W ten sposób zdefiniowana stała równowagi może być wyznaczona poprzez elektrochemiczny pomiar a_M .

Zastępując aktywności iloczynem stężeń i współczynników aktywności oraz zaniedbując te drugie, dla ogólnego przypadku otrzymujemy:



Stała trwałości tej reakcji będzie wynosiła:

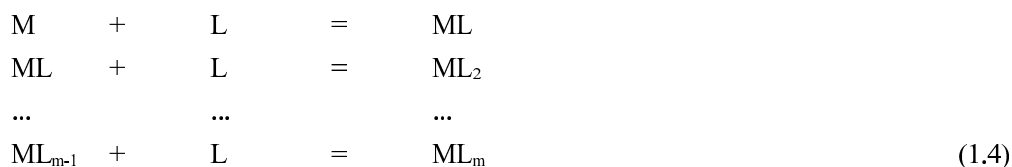
$$\beta_{M_n L_m} = \frac{[M_n L_m]}{[M]^n [L]^m}$$

gdzie $[M_n L_m]$, $[M]$, $[L]$ są stężeniami równowagowymi składników w roztworze.

Tworzenie się supramolekuły może być związane z prostym procesem przyłączania się pojedynczej cząsteczki gościa do jednej cząsteczki gospodarza, lub z procesem bardziej złożonym, w którym może brać udział większa liczba cząsteczek gościa i gospodarza.

2. Równowagi tworzenia się kompleksów jednordzeniowych

Supramolekuły, inaczej nazywane kompleksami tworzą się zwykle stopniowo, w sposób opisany następującymi równaniami:



Kolejne stałe trwałości charakteryzujące powstawanie różnych form kompleksów (1.4) można wyrazić następująco:

$$K_1 = \frac{[ML]}{[M][L]}, \quad K_2 = \frac{[ML_2]}{[ML][L]}, \quad \dots, \quad K_m = \frac{[ML_m]}{[ML_{m-1}][L]}$$

Podstawiając stężenie pierwszego kompleksu, z pierwszego równania, do drugiego równania, drugiego do trzeciego, itd. otrzymujemy następujące zależności:

$$[ML] = K_1 [M][L]$$

$$\begin{aligned}
[\text{ML}_2] &= K_1 K_2 [\text{M}][\text{L}]^2 \\
\ldots &\ldots \\
[\text{ML}_m] &= K_1 K_2 \ldots K_m [\text{M}][\text{L}]^m \quad (1.5)
\end{aligned}$$

Zastępując iloczyny cząstkowych stałych trwałości przez stałe sumaryczne, otrzymujemy:

$$\beta_1 = \frac{[\text{ML}]}{[\text{M}][\text{L}]}, \quad \beta_2 = \frac{[\text{ML}_2]}{[\text{M}][\text{L}]^2}, \quad \ldots, \quad \beta_m = \frac{[\text{ML}_m]}{[\text{M}][\text{L}]^m}$$

gdzie $\beta_1 = K_1$, $\beta_2 = K_1 K_2$, ..., $\beta_m = K_1 K_2 \ldots K_m = \prod_1^m K_m$

Sumaryczną stałą trwałości m-tego kompleksu można również wyrazić:

$$\beta_m = \log K_1 + \log K_2 + \ldots + \log K_m = \sum_{i=1}^m K_i$$

W roztworach zawierających jednocześnie kilka różnych indywiduów, skład ilościowy poszczególnych jonów kompleksowych można wyznaczyć, kiedy znane są wszystkie stałe trwałości, całkowite stężenie jonów metalu, ligandu oraz inne czynniki wpływające na układ równowag. Stałe trwałości kompleksów można obliczyć dopiero po określeniu składu badanego układu. Z tego powodu, ważne są zależności między stałymi i analitycznie mierzalnymi wielkościami ([L], m).

Całkowite stężenie jonów metalu w roztworze, można wyrazić następująco:

$$C_M = [\text{M}] + [\text{ML}] + [\text{ML}_2] + \ldots = \sum_{i=0}^m [\text{ML}_i]$$

Wykorzystując wcześniejsze zależności, można wyprowadzić:

$$C_M = [\text{M}] + \beta_1 [\text{M}][\text{L}] + \beta_2 [\text{M}][\text{L}]^2 + \ldots$$

Wprowadzając $\beta_0 = 1$, otrzymujemy $[\text{M}] = \beta_0 [\text{M}][\text{L}]^0$, w rezultacie mamy:

$$C_M = [\text{M}] \sum_{i=0}^m \beta_i [\text{L}]^i$$

Całkowite stężenie ligandu można wyrazić:

$$C_L = [\text{L}] + [\text{ML}] + 2[\text{ML}_2] + \ldots = [\text{L}] + \sum_{i=0}^m i [\text{ML}_i]$$

Przekształcając oraz wprowadzając sumaryczne stałe trwałości, otrzymujemy:

$$C_L = [L] + \beta_1[M][L] + 2\beta_2[M][L]^2 + \dots = [L] + [M] \sum_{i=1}^m i\beta_i[L]^i$$

Bjerrum⁶⁴ zaproponował wprowadzenie pojęcia średniej liczby ligandów do wyrażania stopnia skompleksowania. Jest to liczba ligandów związana w różnych kompleksach przez jon metalu:

$$\bar{m} = \frac{C_L - [L]}{C_M}, \quad \bar{m} = \frac{\beta_1[M][L] + 2\beta_2[M][L]^2 + \dots}{[M] + \beta_1[M][L] + 2\beta_2[M][L]^2 + \dots}$$

Dzieląc licznik i mianownik przez [M] otrzymujemy funkcję tworzenia kompleksu:

$$\bar{m} = \frac{\beta_1[L] + 2\beta_2[L]^2 + \dots}{1 + \beta_1[L] + 2\beta_2[L]^2 + \dots} = \frac{\sum_{i=1}^m i\beta_i[L]^i}{1 + \sum_{i=1}^m \beta_i[L]^i}$$

W przypadku ligandów jednokleszczowych $\bar{m}$ określa średnią liczbę koordynacyjną. Dla takich kompleksów $\bar{m}$ zależy jedynie od stężenia wolnego ligandu i jest niezależne od stężenia wolnych jonów metalu.

Jeśli całkowite stężenie ligandu jest dużo większe niż stężenie jonów metalu ($C_L \gg C_M$), wówczas $[L] \approx C_L$. Natomiast, gdy metal i ligand występują w porównywalnych ilościach ($C_L < 10C_M$), nie można pominąć stężenia ligandu związanego w kompleks w porównaniu ze stężeniem wolnego ligandu.

Wprowadzenie ułamka molowego i -tego kompleksu w roztworze, pozwala określić część jonów metalu związanych w i -tym kompleksie o składzie ML_i , czyli:

$$\Phi_i = \frac{[ML_i]}{C_M} = \frac{\beta_i[M][L]^i}{[M] + \beta_1[M][L] + \beta_2[M][L]^2 + \dots} = \frac{\beta_i[L]^i}{1 + \beta_1[L] + \beta_2[L]^2 + \dots}$$

$$\Phi_i = \frac{\beta_i[L]^i}{1 + \sum_{i=1}^m \beta_i[L]^i}$$

Ułamek molowy wolnych jonów metalu przedstawia zależność:

$$\Phi_0 = \frac{[M]}{C_M} = \frac{1}{1 + \beta_1[L] + \beta_2[L]^2 + \dots}$$

Ponieważ:

$$\Phi_0 + \Phi_1 + \Phi_2 + \dots = \sum_{i=1}^m \Phi_i = 1$$

Średnia liczba koordynacyjna wynosi:

$$\bar{m} = \sum_{i=1}^m i\Phi_i$$

Ułamki molowe wolnych jonów metalu i poszczególnych kompleksów zależą tylko od stężenia wolnego ligandu i od stałych trwałości. Znajomość stałych trwałości pozwala obliczyć procentowy udział poszczególnych składników w roztworze dla każdego stężenia wolnego ligandu.

Kiedy jon metalu tworzy kompleksy z więcej niż jednym czynnikiem kompleksującym w roztworze, dla znanych stałych trwałości, można wyznaczyć ilości poszczególnych form. Oznaczając dwa ligandy jako L i Y oraz odpowiednie stałe sumaryczne jako β_i i γ_i , otrzymujemy:

$$\Phi_1 = \frac{\beta_1[L]^1}{1 + \beta_1[L] + \beta_2[L]^2 + \dots + \gamma_1[L] + \gamma_2[L]^2 + \dots}$$

3. Równowagi tworzenia się kompleksów wielordzeniowych

Tworzenie się kompleksów wielordzeniowych można opisać:



Wartości n i m zmieniają się wraz ze stężeniem jonu metalu i ligandu a tworzenie kompleksów zachodzi stopniowo. Przy małych stężeniach jonów metalu tworzą się jedynie kompleksy jednordzeniowe. Przy większych stężeniach pojawiają się kompleksy wielordzeniowe. Sumaryczna stała tworzenia β_{nm} równa jest iloczynowi stopniowych stałych trwałości i wynosi:

$$\beta_m = \frac{[M_n L_m]}{[M]^n [L]^m}$$

Całkowite stężenia jonów metalu i ligandu w roztworach kompleksów wielordzeniowych opisane są równaniami:

$$C_M = [M] + \sum_{j=1}^n \sum_{i=1}^m j[M_j L_i] = [M] + \sum_{j=1}^n \sum_{i=1}^m j\beta_{ji}[M]^j[L]^i$$

$$C_L = [L] + \sum_{j=1}^n \sum_{i=1}^m i[M_j L_i] = [M] + \sum_{j=1}^n \sum_{i=1}^m i\beta_{ji}[M]^j[L]^i$$

W przypadku tworzenia się kompleksów jednordzeniowych średnia liczba ligandów jest niezależna od całkowitego stężenia jonów metalu, w przypadku kompleksów wielordzeniowych jest od niej zależna. Sillen wyprowadził odpowiednie zależności badając tworzenie hydroksokompleksów towarzyszących reakcjom hydrolitycznym⁶⁵. Stwierdził, że hydroksokompleksy występują często w postaci $M(ML_t)_s$, gdzie t jest liczbą całkowitą określającą liczbą ligandów w ogniwie łańcucha a s jest liczbą całkowitą, która oznacza ilość ogniw łańcucha tworzącego kompleks. Zależność opisująca $\bar{m}$ jest przedstawiono poniżej:

$$\bar{m} = \frac{[M](\frac{\partial \theta}{\partial [M]})_{[L]}}{[L](1 + (\frac{\partial \theta}{\partial [L]})_{[M]}} = \frac{(\frac{\partial(\theta + [L])}{\partial \ln[M]})_{[L]}}{(\frac{\partial(\theta + [L])}{\partial \ln[L]})_{[M]}}, \text{ gdzie } \theta = \sum_{j=1}^n \sum_{i=1}^m \beta_{ji}[M]^j[L]^i$$

4. Ligandy zawierające kilka miejsc wiążących a efekt statystyczny

Oddziaływania bardziej złożonych jonoforów (ligandów) posiadających więcej niż jedno centrum wiążące ($C_1, C_2, \dots, C_n$) z substratami, mogą być zdefiniowane przez równowagi makroskopowe, opisujące ogólną stechiometrię supramolekuły. Przykładowo ligand L o budowie C_1-X-C_2 , będzie tworzył równowagi (1.7):

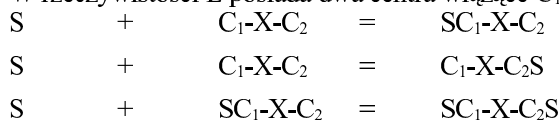


gdzie S – substrat, L – ligand, SL oraz S_2L – kompleksy supramolekularne.

Kolejne stałe równowag możemy zdefiniować:

$$K_{SL} = \frac{[SL]}{[S][L]}, \quad K_{S_2L} = \frac{[S_2L]}{[S]^2[L]}$$

W rzeczywistości L posiada dwa centra wiążące C_1 i C_2 oraz rdzeń X:





W tym przypadku kolejne równowagi możemy zdefiniować:

$$K_1 = \frac{[SC_1-X-C_2]}{[S][C_1-X-C_2]}, \quad K_2 = \frac{[C_1-X-C_2S]}{[S][C_1-X-C_2]},$$

$$K_3 = \frac{[SC_1-X-C_2S]}{[S][SC_1-X-C_2]}, \quad K_4 = \frac{[SC_1-X-C_2S]}{[S][C_1-X-C_2S]}$$

Równowagi (1.8) nazywane równowagami mikroskopowymi, są od siebie zależne:

$$K_1 K_3 = K_2 K_4$$

Przykładem ligandów posiadających dwa centra koordynacyjne mogą być połączone długim łańcuchem alifatycznym kwasy dikarboksylowe oraz aminokwasy.

Ze statystycznego punktu widzenia, kiedy oba centra C_1 i C_2 są w stosunku do siebie ekwiwalentne, $K_1 = K_2 = K_3 = K_4 = k$. Do utworzenia supramolekuły S_2L (SC_1-X-C_2S) prowadzą dwie równocenne drogi o „długości” $2k$. Natomiast do utworzenia SL (SC_1-X-C_2 , C_1-X-C_2S) wystarczy jedna z dróg o „długości k ”. Stąd otrzymujemy, że $K_{S_2L} / K_{SL} = 1/4$. W ten sposób efekt statystyczny powoduje, że makroskopowa stała K_{S_2L} jest czterokrotnie mniejsza od K_{SL} ¹².

W ogólniejszym przypadku, makromolekuła posiadająca n , równocennych miejsc wiążących, może przyłączyć m substratów na $\Omega_{n,m}$ sposobów⁶⁶:

$$\Omega_{n,m} = \frac{n(n-1)(n-2)\dots(n-m+1)}{m!} = \frac{n!}{(n-m)!m!}$$

$\Omega_{n,m}$ sposobów związania odpowiada jednej równowadze makroskopowej. Dla układu zawierającego cztery równocenne miejsca wiążące, kolejne makroskopowe stałe równowagi będą wynosić: $K_1 = 4k$, $K_2 = 3/2 k$, $K_3 = 2/3 k$, $K_4 = 1/4 k$, gdzie k stała pojedynczej równowagi mikroskopowej. $K_1 > K_2 > K_3 > K_4$ oznacza coraz słabsze wiązanie kolejnych substratów. W takim przypadku będziemy mieli do czynienia z systemem zawierającym tzw. niewspółpracujące centra wiążące. Natomiast, jeśli $1/4 K_1 < 2/3 K_2 < 3/2 K_3 < 4K_4$ będzie to przykład systemu zawierającego współpracujące centra wiążące.

Statystyczna różnica wiązania dwóch kolejnych substratów przez ligand, może być przeliczona na związaną z tym efektem energię. Zmiana standardowej energii swobodnej wiązania m -tego substratu w serii będzie wynosiła:

$$\Delta G_m^0 = RT \ln K_m - RT \ln (\Omega_{n,m} / \Omega_{n,m-1})$$

gdzie K_m jest makroskopową stałą wiązania m -tego substratu, $RT \ln (\Omega_{n,m} / \Omega_{n,m-1})$ jest czynnikiem zawierającym element statystyczny, R – stała gazowa, T – temperatura.

Różnica między energią oddziaływania ΔG_{ji}^0 j -tych oraz i -tych substratów w serii dla jednego ligandu, będzie wynosiła:

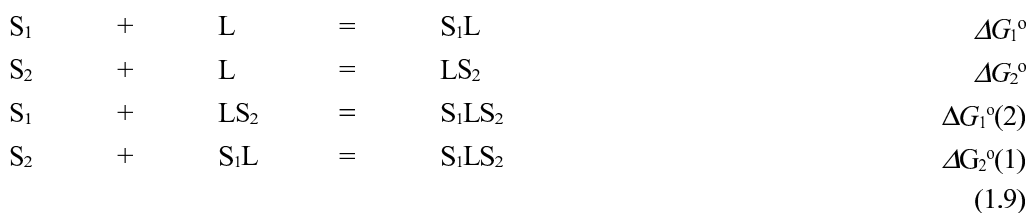
$$\Delta G_{ji}^0 = \Delta G_i^0 - \Delta G_j^0 = -RT \ln (K_j / K_i) + RT \ln \left(\frac{\Omega_{n,j} / \Omega_{n,j-1}}{\Omega_{n,i} / \Omega_{n,i-1}} \right)$$

Zgodnie z definicją ΔG_{ji}^0 , jeśli j -ty substrat będzie wiązany słabiej niż i -ty substrat ($i < j$), wtedy $\Delta G_{ji}^0 < 0$.

Ligandem zawierającym cztery współpracujące ze sobą centra wiążące jest ludzka hemoglobina. ΔG_{ji}^0 między związaniem 4-go i 1-go substratu, w jej przypadku wynosi $-2 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$. Oznacza to, że cząsteczka tlenu jest silniej wiązana przez hemoglobinę nasyconą cząsteczkami tlenu niż przez hemoglobinę posiadającą wolne miejsca wiążące⁶⁶.

5. Energia swobodna reakcji równowagowych

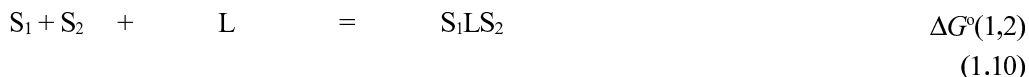
Procesy równowagowe mogą być rozpatrywane pod kątem zmian standardowej energii swobodnej reakcji kompleksowania. Przykładowy układ zawierający ligand L z miejscami wiążącymi oraz dwa różne substraty S_1 i S_2 można zdefiniować za pomocą równań (1.9):



Sumaryczna energia będzie wynosiła:

$$\Delta G^0(1,2) = \Delta G_1^0 + \Delta G_2^0(1) = \Delta G_2^0 + \Delta G_1^0(2)$$

gdzie $\Delta G^\circ(1,2)$ jest standardową energią swobodną reakcji:



Oddziaływanie między substratami a ligandem będzie określała różnica pomiędzy standardową energią reakcji (1.10) a sumą standardowych energii dwóch pierwszych reakcji (1.9), ΔG_{12}° :

$$\Delta G_{12}^\circ = \Delta G_1^\circ(2) - \Delta G_1^\circ = \Delta G_2^\circ(1) - \Delta G_2^\circ = \Delta G^\circ(1,2) - \Delta G_1^\circ - \Delta G_2^\circ$$

Powyższą zależność wyprowadzono przy założeniu, że siła wiązania substratów S_1 i S_2 przez ligand L jest taka sama i nie wpływa wzajemnie na siebie. Jeśli $\Delta G_{12}^\circ = 0$, nie ma znaczenia oddziaływanie między substratami i poszczególne reakcje składowe są od siebie niezależne. Jeśli $\Delta G_{12}^\circ < 0$, związane S_1 lub S_2 ułatwiają przyłączenie kolejnego substratu, jeśli $\Delta G_{12}^\circ > 0$, istnieje antagonizm w wiązaniu substratów.

W ogólnym przypadku, standardowa energia swobodna ΔG° danej reakcji jest zależna od termodynamicznej K stałej trwałości tej reakcji w danej temperaturze:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K$$

W rzeczywistości, opisująca sumaryczny efekt energetyczny reakcji, standardowa energia swobodna ΔG° jest złożona z dwóch czynników:

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$$

gdzie ΔH° jest zmianą standardowej entalpii a ΔS° jest zmianą standardowej entropii reakcji. Czynniki ΔH° nazywany jest ciepłem reakcji, ponieważ związany jest z energią wiązania się cząsteczki gościa do cząsteczki gospodarza, czynnik ΔS° stanowi miarę uporządkowania układu. Reakcja zachodzi spontanicznie, kiedy towarzyszy jej spadek ΔG° wywołany zmniejszeniem ΔH° lub zwiększeniem $T\Delta S^\circ$. $\Delta H^\circ < 0$ odpowiada procesowi korzystnemu pod względem energetycznym, $\Delta S^\circ > 0$ odpowiada procesowi, w którym wzrastające nieuporządkowanie sprzyja beładnym ruchom termicznym.

6. Energia swobodna związana z rozpuszczalnikiem

Środowisko reakcji, które najczęściej reprezentuje rozpuszczalnik, może być opisane przez zmianę standardowej energii swobodnej procesu solwatacji:



gdzie S – substrat, R – rozpuszczalnik, $S_{(R)}$ – substrat solwatowany.

Najważniejszymi składnikami ΔG_s° są oddziaływania niekowalencyjne, a w przypadku jonów metali są to z reguły oddziaływania elektrostatyczne. Dla wielu jonów zachodzi dobra korelacja między ΔG_s° a potencjałem jonowym z^2/r (z – ładunek jonu, r – promień jonu wyrażony w Å). Na rysunku 2.8 przedstawiono wykres zależności ΔG_s° wybranych jonów w zależności od ich potencjału jonowego w wodzie. Liniowa korelacja ma miejsce w przypadku jednowartościowych litowców, jonów halogenkowych oraz Tl^+ . Korelacja zachodzi również dla dwuwartościowych berylowców, Pb^{2+} , Sn^{2+} oraz jonów trójwartościowych. Istotny wzrost ΔG_s° związany z czynnikami nieelektrostatycznymi, pojawia się dla jonów metali przejściowych: Ag^+ , Cu^+ , Hg^{2+} , Cd^{2+} ,

W przypadku rozpuszczalników niewodnych, które często występują w roli analogów układów biologicznych, dla elektrolitów, definiuje się standardową energię swobodną przeniesienia elektrolitu między wodą a rozpuszczalnikiem R, gdzie $\mu^{H_2O}(E)$ i $\mu^R(E)$ są standardowymi potencjałami chemicznymi⁶⁷:

$$\Delta G_{tr}^\circ(E) = \mu^R(E) - \mu^{H_2O}(E)$$

W tabeli 2.5 przedstawiono przykładowe wartości ΔG_{tr}° dla szeregu jonów i wybranych rozpuszczalników niewodnych: metanolu (MeOH), dimetylosulfonamidu (DMF), dimetylosulfotlenku (DMSO), węglanu propyleny (PC), acetonitrylu (AN) i nitrometanu (NM). W przypadku małych anionów o dużej gęstości elektronowej (OAc^- , Cl^- , Br^-) obserwowany jest wzrost energii swobodnej w rozpuszczalnikach protolitycznych (H_2O , MeOH) w stosunku do rozpuszczalników aprotolitycznych (odpowiednie wartości są bardziej ujemne). ΔG_{tr}° zwiększa się wraz ze zmniejszaniem się rozmiaru anionu. Dla kationów litowców, silniejsza solwatacja ma miejsce w przypadku rozpuszczalników, które są silniejszymi zasadami niż woda (DMF, DMSO). Wartość ΔG_{tr}° dla jonu Ag^+ w AN wskazuje, że mamy do czynienia ze specyficznymi oddziaływaniami.

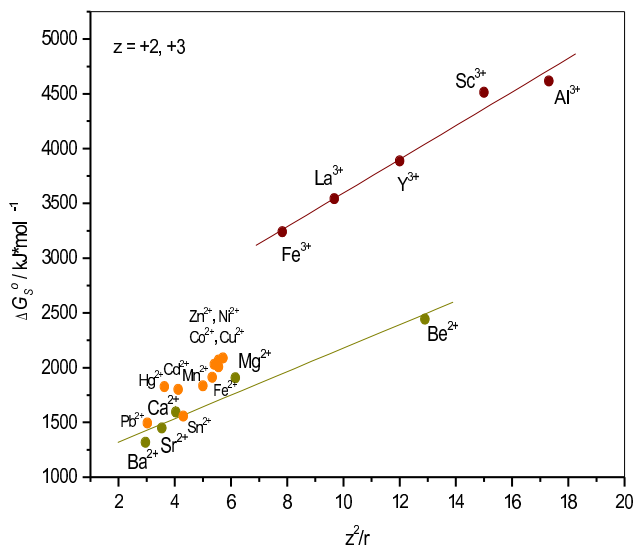
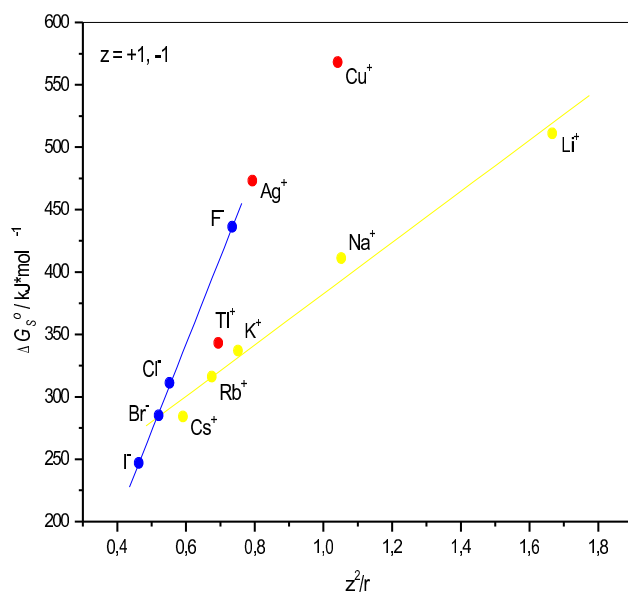
Zmiana trwałości jonu kompleksowego między rozpuszczalnikiem S a rozpuszczalnikiem odniesienia R, może być rozpatrywana jako zmiana energii przeniesienia poszczególnych składników między rozpuszczalnikami. W przypadku kompleksów M z kryptandami, zdefiniowano ją wykorzystując standardowy cykl Borna-Habera⁶⁸:

$$-2.303 RT \log (K_{ML}^S / K_{ML}^R) = \Delta G_{tr}^0 \{ML; R \rightarrow S\} - \Delta G_{tr}^0 \{L; R \rightarrow S\} - \Delta G_{tr}^0 \{M; R \rightarrow S\}$$

gdzie jako rozpuszczalnik odniesienia użyto AN, a reakcję kompleksowania zdefiniowano jak w równaniu (1.2).

Tabela 2.5. Standardowa energia swobodna $\Delta G_{tr}^0/kJ \cdot mol^{-1}$ przeniesienia jonów z wody do wybranych rozpuszczalników niewodnych w 25°C⁶⁷. Odpowiednie wartości ΔG_{tr}^0 w wodzie wynoszą 0,0.

jon	MeOH	DMF	DMSO	PC	AN	NM
Li ⁺	3,6	-15,1	-15,9	19,2	23,0	48,0
Na ⁺	8,6	-9,6	-14,4	12,9	13,8	31,6
K ⁺	9,8	-9,2	-12,7	4,3	7,5	15,4
Rb ⁺	10,5	-9,0	-10,8	2,1	6,5	11,1
Cs ⁺	10,0	-9,4	-13,6	0,5	4,1	5,7
Tl ⁺	2,6	---	-21,6	9,8	11,3	---
Ag ⁺	7,2	-17,7	-33,3	16,7	-22,8	---
OAc ⁻	16,1	---	60,3	---	56,9	---
Cl ⁻	13,4	45,9	39,0	39,4	42,5	37,7
Br ⁻	11,1	31,7	26,2	30,3	30,9	29,0
I ⁻	7,3	20,2	11,7	16,8	18,6	18,8
ClO ₄ ⁻	6,1	7,0	---	-3,0	5,2	4,7



Rysunek 2.8. Standardowa energia swobodna hydratacji ΔG_S^0 ($S = \text{H}_2\text{O}$) w zależności od potencjału jonowego z^2/r w 25°C^{13} . Współczynniki korelacji liniowej wynoszą: $R = 0,990$ dla litowców, $R = 0,999$ dla halogenków, $R = 0,976$ dla berylowców, $R = 0,988$ dla wybranych jonów trójwartościowych.

Wiadomo, że dla ligandów bimakrocyklicznych (kryptandów) typowe kompleksy inkluzyjne tworzą się przez przeniesienie jonu metalu do wnęki makrocyklu przy jednoczesnym pozbyciu się przez jon metalu otoczenia solwacyjnego rozpuszczalnika (*cryptate hypothesis*)⁶⁸. W przypadku, kiedy solwatacja ligandów oraz jonów kompleksowych w obu rozpuszczalnikach jest podobna (słuszne dla większości ligandów bimakrocyklicznych w rozpuszczalnikach aprotolitycznych), zmiana trwałości kompleksu będzie zależała jedynie od ΔG_{tr}° {M; R $\rightarrow$ S}. Trwałość kompleksu ML może być rozpatrywana jako ΔG° przeniesienia poszczególnych składników z fazy gazowej do roztworu. Jeśli zmiana ΔG° związana z przeniesieniem ligandu i jonu kompleksowego będzie niewielka, trwałość kompleksu ML może być dyskutowana jedynie jako ΔG° przeniesienia M z fazy gazowej do roztworu.

Wykorzystanie standardowego cyklu Borna-Habera umożliwia badanie sfery solwacyjnej jonu metalu w kompleksie. Jeśli wartość ΔG_{tr}° związana z solwatacją ligandu i jonu kompleksowego będzie niewielka, a różnica między $2.303 RT \log (K_{ML}^S / K_{ML}^R)$ i ΔG_{tr}° {M; R $\rightarrow$ S} będzie bliska 0, jon metalu w kompleksie będzie oddzielony od sfery solwacyjnej rozpuszczalnika. Wartości odbiegające od 0 będą świadczyły o udziale rozpuszczalnika w solwatacji jonu w kompleksie lub o specyficznych oddziaływaniach ligandu z rozpuszczalnikiem. Jony M mogą więc stanowić narzędzie do określania struktury solwacyjnej kompleksów supramolekularnych przy wykorzystaniu stałych trwałości z dwóch różnych (aprotolitycznych) rozpuszczalników.

7. Metoda matematyczna wyznaczania stałych trwałości kompleksów supramolekularnych

W celu rozwiązania badanego układu należy wyznaczyć parametry opisujące występujące w roztworze supramolekuły złożone z cząsteczek gości i gopodarzy. Konieczne zatem jest określenie stechiometrii powstających kompleksów oraz wyznaczenie charakteryzujących je stałych oddziaływania.

7.1 Macierz stechiometryczna

Reakcje chemiczne mogą być opisane jako macierz zawierająca współczynniki stechiometryczne w postaci algebraicznej. Tak zbudowana *macierz stechiometryczna* (A) zawiera a_{ij} stechiometrycznych współczynników j -tych składników w i -tych reakcjach. Każdy a_{ij} współczynnik przyjmuje wartość dodatnią dla produktu, ujemną dla substratu i zerową dla

składnika nie biorącego udziału w danej reakcji. Fizycznie, współczynniki stechiometryczne odpowiadają ilości określonego składnika biorącego udział w reakcji. W *macierzy stechiometrycznej* są one liczbami opisującymi schemat równowag, np. kwasowo-zasadowych, kompleksowania, redoks, itp.

Przykładem prostego układu równowagowego może być tworzenie jonów kompleksowych przez Ag^+ i trietanolaminę (oznaczoną jako L) w wodzie⁶⁹:

Tabela 2.6. *Macierz stechiometryczna (A)* układu Ag^+ – trietanolamina w wodzie.

Ag^+	+	L	=	AgL^+	$\log K_1 =$	3,6
AgL^+	+	L	=	AgL_2^+	$\log K_2 =$	2,3
H^+	+	L	=	HL^+	$\log K_3 =$	7,9
H_2O			=	$\text{H}^+ + \text{OH}^-$	$\log K_4 =$	-14,0

$[\text{AgL}_2^+]$	$[\text{AgL}^+]$	$[\text{HL}^+]$	$[\text{OH}^-]$	$[\text{Ag}^+]$	$[\text{L}]$	$[\text{H}^+]$
0	1	0	0	-1	-1	0
1	-1	0	0	0	-1	0
0	0	1	0	0	-1	-1
0	0	0	1	0	0	1

Woda jako H_2O nie występuje w macierzy (A) (tabela 2.6) ponieważ jest zawsze dostępna dla wszystkich składników i jej stężenie traktowane jest jako stałe. Oznacza to, że ostatnie równanie chemiczne, z formalnego punktu widzenia, powinno być traktowane jako proces:



7.2 Obliczenia równowagowe

Zmiany stężenia j-tych składników mogą być przedstawione jako $a_{ij} \varepsilon_i$, gdzie ε_i są współczynnikami w i-tej reakcji chemicznej. Sumaryczna zmiana stężenia j-tych składników (ΔC_j) opisana jest równaniem:

$$\Delta C_j = \sum_{i=1}^m a_{ij} \varepsilon_i$$

gdzie m jest liczbą reakcji chemicznych. W zapisie macierzowym otrzymujemy:

$$\Delta C = A^T \varepsilon$$

gdzie $\varepsilon = [\varepsilon_1, \varepsilon_2, \varepsilon_3, \dots, \varepsilon_m]^T$ jest wektorem współczynników kolejnych reakcji.

Można zauważyć, że istnieje $n-m$ liniowo niezależnych kombinacji stężeń, które nie zmieniają się w trakcie zachodzenia danej reakcji. Jest to uwidocznione w macierzy ortogonalnej do A , nazywanej *macierzą równowagową* Q (o wymiarach $(n-m) \times m$):

$$Q \Delta C = Q A^T \varepsilon = 0$$

Ponieważ $Q \Delta C = 0$, otrzymujemy:

$$T_i = \sum_{j=1}^{n-m} q_{ij} C_j \quad \text{dla } i = 1, 2, \dots, n-m$$

w zapisie macierzowym:

$$Q C = T$$

gdzie T jest wektorem stałych (jego składniki nie zmieniają się w czasie reakcji). Stałe $T_1, T_2, \dots, T_{n-m}$ opisują całkowitą liczbę wybranych składników układu lub ich kombinacji liniowych i nazywane są *stałymi równowagi*.

Prawo zachowania masy w układzie równowagowym musi być spełnione. Prowadzi to do następującego wyrażenia:

$$\ln K_i = \sum_{j=1}^m a_{ij} \ln C_j \quad \text{dla } i = 1, 2, \dots, n$$

można to zapisać:

$$\ln K = A \ln C$$

gdzie K_i jest stałą równowagi i -tej reakcji a K jest wektorem *stałych równowag*.

Ponieważ każda kombinacja liniowa reakcji chemicznych również jest reakcją i każda liniowa kombinacja stałych równowag jest stałą równowagi, badany układ może zostać opisany przez nieskończoną liczbę zastępczych stechiometrii i *macierzy równowag*. Porządkując zapis w postaci tzw. normalnej formy Hermitianowej:

$$A = [I_{m \times m} \quad -P] \quad Q = [P^T \quad I_{(n-m) \times (n-m)}]$$

gdzie I jest macierzą jednostkową, a P *macierzą składu*.

Macierz A zawiera reakcje tworzenia pierwszych m składników (kompleksów) wchodzących w skład n - m składników (komponentów). Każdy wiersz w postaci Hermitianowej opisuje stan równowagowy odpowiadający stężeniom całkowitym odpowiednich składników. W przypadku macierzy P , p_{ij} oznaczają ilość j -tego składnika w jednej cząsteczce i -tego kompleksu. W ten sposób składniki i -tego wiersza macierzy P odpowiadają bezpośrednio współczynnikom w równaniu chemicznym i -tego kompleksu:

$$P = - {}^0A^{-1} A^0$$

gdzie 0A oraz A^0 stanowią lewą i prawą część macierzy *stechiometrycznej*, odpowiadającą kompleksom i ich składnikom:

$$A = [{}^0A_{m \times m}; A^0_{m \times (n-m)}] \quad \text{gdzie } \det {}^0A \neq 0$$

7.3 Ogólny algorytm wyznaczania parametrów równowag

Algorytm metody najmniejszych kwadratów zaproponowany przez Marquardta⁷⁰, wykorzystali Kostrowicki i Liwo⁷¹⁻⁷³ do wyznaczania współczynników reakcji równowagowych. Algorytm polega na minimalizacji sumy najmniejszych kwadratów różnic pomiędzy obliczonymi i zmierzonymi wielkościami (np. potencjałem i stężeniami w potencjometrii oraz absorbancją i stężeniami w spektroskopii absorpcyjnej). Uwzględnienie wszystkich parametrów prowadzi do funkcji Φ :

$$\begin{aligned} \Phi(x, y, E^0, S, \omega, V) = & \sum_{i=1}^I \left\{ \left(\frac{1}{\sigma_E} \right)^2 \sum_{j=1}^{r_j} [{}^*\Psi_j^i - \Psi(V_j^i, \omega, E_i^0, S_i, x, y)]^2 + \right. \\ & \left(\frac{1}{\sigma_V} \right)^2 \sum_{j=1}^{r_j} ({}^*V_j^i - V_j^i)^2 + \left(\frac{1}{\sigma_{E^0}} \right)^2 ({}^*E_i^0 - E_i^0) + \left(\frac{1}{\sigma_S} \right)^2 ({}^*S_i - S_i)^2 \} + \\ & \sum_{i=1}^u \left(\frac{1}{\sigma_w} \right)^2 ({}^*\omega_i - \omega_i)^2 + \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^p (W_y)_{ij} ({}^*y_i - y_i) ({}^*y_j - y_j) \end{aligned}$$

gdzie:

$\Phi(x, y, E^0, S, \omega, V)$ – funkcja najmniejszej sumy kwadratów zawierająca wszystkie parametry

$x = [x_1, x_2, x_3, \dots, x_{n_{\text{par}}}]^T$ – wektor parametrów obliczanych np. stałych trwałości

$y = [y_1, y_2, y_3, \dots, y_{n_{\text{par}}}]^T$ – wektor parametrów, które zostały otrzymane z eksperymentu i dla których macierz wariancji-kowariancji (W_y) jest znana (np. znane stałe trwałości)

$E^0 = [E_1^0, E_2^0, E_3^0, \dots, E_t^0]^T$ – wektor standardowej siły elektromotorycznej kolejnych pomiarów

$S = [S_1, S_2, S_3, \dots, S_t]^T$ – wektor współczynników Nersta kolejnych pomiarów

$\omega = [\omega_1, \omega_2, \omega_3, \dots, \omega_u]^T$ – wektor charakterystyk składu roztworu miareczkowanego i titranta (V_j^i, E_j^i) dla $j = 1, 2, \dots, r_i$, $i = 1, 2, \dots, t$ – j-ta objętość titranta i j-ta siła elektromotoryczna w i-tym kroku pomiarowym

σ – odchylenie standardowe odpowiednich wielkości (zależne od rodzaju metody i zastosowanej aparatury)

t – liczba pomiarów

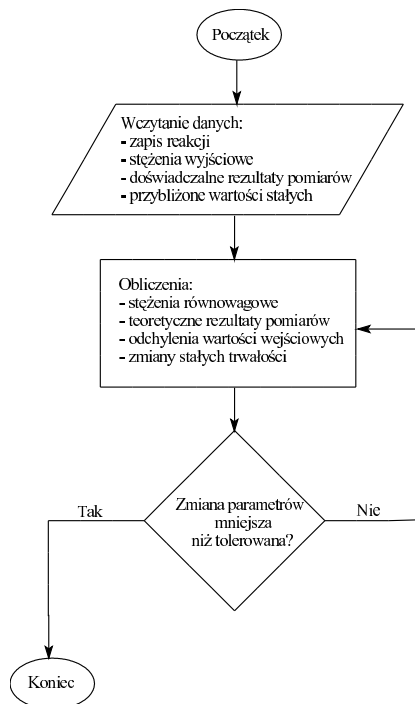
r_i – liczba punktów zawartych w i-tych pomiarach

u – liczba charakterystyk składu

p – liczba parametrów wyznaczonych z wcześniejszych pomiarów

* – oznacza wielkość zmierzoną

Minimalizacja funkcji F , może być przeprowadzona za pomocą iteracyjnej procedury przedstawionej na rysunku 2.9:



Rysunek 2.9. Algorytm wyznaczania parametrów równowag z danych doświadczalnych.

Algebraiczny sposób przedstawienia rozwiązania problemu równowag w roztworze, może być dla chemika niezbyt zrozumiały. Dlatego też, zostały opracowane programy, korzystające z algorytmu najmniejszych kwadratów i procedur minimalizacyjnych funkcji zawierającej określone parametry. W tych programach, iteracyjny proces może być ściśle kontrolowany przez użytkownika, poprzez dobór parametrów wejściowych (wartości wyznaczone doświadczalnie lub przybliżone, błędy parametrów, ilość iteracji, itd.). Typowym przykładem do zastosowań analitycznych jest opracowany przez Liwo zestaw programów pod wspólną nazwą STOICHIO^{74,75}, obejmujący program do wyznaczania parametrów (molowe współczynniki absorpcji, stężenia, stałe trwałości, itd.) przy wykorzystaniu metod spektroskopii absorpcyjnej, fluorescencji czy ¹H NMR. Drugi program przeznaczony dla metod elektrochemicznych, w szczególności potencjometrii, umożliwia obliczenie stężeń, potencjałów, stałych trwałości, objętości roztworów, współczynników stechiometrycznych, itd.. Ciekawostką jest to, że jedna z wersji programów potrafi jednocześnie połączyć wybrane parametry macierzy (współczynniki stechiometryczne i stężenia) otrzymane niezależnie dla obu grup metod (spektroskopowych i elektrochemicznych). Innym przykładem programu przeznaczonego do zastosowań biochemicznych bazującego na algorytmach algebraicznych jest DYNA-FIT⁷⁶. Wykorzystuje się go, między innymi, do badań nad kinetyką reakcji enzymatycznych.

8. Elektrochemiczne metody doświadczalnego wyznaczania trwałości kompleksów supramolekularnych

8.1 Metody potencjometryczne

Szeroko wykorzystywane metody potencjometryczne opierają się na zależności między stężeniem (aktywnością) badanego jonu a potencjałem elektrycznym elektrody wskaźnikowej. Drugim elementem utworzonego ogniwa jest elektroda porównawcza o stałej wartości potencjału. Pomiar siły elektromotorycznej jest możliwy, kiedy obie elektrody zanurzone są w roztworze. Wymagane jest zastosowanie elektrody czulej na stężenie danego składnika, którym najczęściej jest jon metalu, czyli elektrody jonoselektywnej. W trakcie badania wyznacza się stężenie oznaczanego składnika poprzez pomiar potencjału ogniwa, którego kalibracji dokonano za pomocą próbek wzorcowych. Często wykorzystywane miareczkowanie potencjometryczne polega na dodawaniu kolejnych porcji titranta i pomiarze siły elektromotorycznej zmieniającego się układu¹³⁶.

8.2 Potencjał elektrody

Wartość potencjału elektrody zależy od właściwości metalu, stężenia (aktywności) kationu i temperatury¹³⁷. Zależność potencjału elektrody od aktywności jonu metalu, liczby elektronów biorących udział w reakcji oraz temperatury przedstawia równanie Nersta:

$$E = E^{\circ} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{\text{M}}^{n+}}{a_{\text{M}}^{\circ}}$$

gdzie E° – normalny potencjał elektrody (w roztworze o aktywności jonów metalu $a_{\text{M}^{n+}} = 1$, R – stała gazowa $8,31441 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$, T – temperatura bezwzględna K, F – stała Faradaya $96486,7 \pm 0,54 \text{ C}\cdot\text{mol}^{-1}$, n – liczba elektronów biorących udział w reakcji, $a_{\text{M}^{n+}}$ – aktywność jonów metalu, $a_{\text{M}^0} = 1$ (dla stanu podstawowego pierwiastka, czyli postaci metalicznej).

Po zastąpieniu $a_{\text{M}^{n+}}$ przez stężenie, dla logarytmu dziesiętnego w 25°C otrzymujemy:

$$E = E^{\circ} + \frac{0,059}{n} \log [\text{M}^{n+}]$$

8.3 Rodzaje elektrod

Ze względu na rolę elektrody w układzie pomiarowym, dzielimy je na elektrody odniesienia, czyli porównawcze (o stałym potencjale) i wskaźnikowe, czyli pomiarowe. Elektrody porównawcze są najczęściej wykonane z metali szlachetnych nie wchodzących w żadną reakcję chemiczną z jakimkolwiek składnikiem roztworu, w pewnych przypadkach dobre wyniki daje też elektroda węglowa. Natomiast, elektroda wskaźnikowa wchodzi w stan równowagi z jonami oznaczanego pierwiastka w roztworze.

Rodzaj reakcji elektrodowej determinuje odwracalność danej elektrody względem określonego składnika roztworu¹³⁸. *Elektrody pierwszego rodzaju* są odwracalne względem kationu lub anionu, *elektrody drugiego rodzaju* są odwracalne względem anionu, poprzez metal, który styka się z trudno rozpuszczalną solą tego metalu zawierającą taki sam anion, *elektrody trzeciego rodzaju* są odwracalne względem kationu, przez metal pokryty trudno rozpuszczalnymi solami o wspólnym anionie, przy czym jedna z nich posiada kation odpowiadający elektrodzie, druga kationowi w roztworze. Typowymi elektrodami pierwszego rodzaju są elektroda srebrowa, wodorowa i chlorkowa, drugiego rodzaju są elektroda chlorosrebrowa, kalomelowa i siarczano-rtęciowa a trzeciego rodzaju jest elektrodo ołowiowo-węglanowo-wapniowa^{139,140}.

8.4 Elektrody w rozpuszczalnikach niewodnych

Największym problemem w przypadku pomiarów w rozpuszczalnikach niewodnych¹⁴¹, które to mogą pełnić rolę analogów układów biologicznych, jest znalezienie odpowiedniej elektrody odniesienia¹⁴²⁻¹⁴⁴. Zwykle stosuje się tutaj dwa typy elektrod¹⁴⁵. W pierwszym przypadku elektroda zawiera lub ma kontakt z tym samym rozpuszczalnikiem jak elektroda pomiarowa. W drugim, w elektrodach, przede wszystkim w porównawczej, stosuje się roztwór wodny.

Popularnym układem elektrod w środowiskach niewodnych jest elektroda typu srebro-srebro (Ag-Ag) używana, między innymi, w AN¹⁴⁵, w którym jony Ag^+ są silnie solwatowane¹⁴⁶. W przypadku słabo solwatujących Ag^+ rozpuszczalników, takich jak PC czy NM, należy szczególną uwagę zwrócić na czystość soli¹⁴⁷. W rozpuszczalnikach typu DMF, zbyt długie przetrzymywanie roztworu może powodować redukcję Ag^+ do Ag^0 ¹⁴⁸. Typowymi rozpuszczalnikami, w których stosuje się elektrodę Ag-Ag są: MeOH, AN, PC, NM, DMF, DMSO¹⁴⁹⁻¹⁵¹.

8.5 Wyznaczanie pK reakcji kompleksowania

Reakcję kompleksowania bada się za pomocą techniki miareczkowania^{152,153}. W przypadku prostych kompleksów, sprowadza się to do wyznaczenia stężenia wolnych jonów metalu, mierząc potencjał roztworów o wzrastającym stężeniu ligandu. Jeśli tworzy się tylko jeden kompleks o składzie ML_n , sumaryczną stałą tworzenia β_n można policzyć stosując równanie:

$$\beta_n = \frac{[\text{ML}_n]}{[\text{M}][\text{L}]^n} = K_1 \dots K_n = \prod_1^n K_i$$

gdzie $[\text{M}]$, $[\text{L}]$, $[\text{ML}_n]$ – stężenia równowagowe jonu metalu M, liganda L i kompleksu ML_n , $K_1, \dots, K_n$ – cząstkowe stałe trwałości.

Ponieważ:

$$[\text{ML}_n] = C_M - [\text{M}] \quad \text{oraz} \quad [\text{L}] = C_L - n [\text{ML}_n]$$

gdzie C_M , C_L – wyjściowe stężenia jonu metalu i ligandu

otrzymujemy:

$$\log \frac{[\text{ML}_n]}{[\text{M}]} = k \log [\text{L}] + \log \beta_n$$

Wykreślając zależność $\log ([ML_n]/[M])$ od $\log [L]$ otrzymujemy prostą, której nachylenie wynosi k a punkt przecięcia z osią rzędnych daje wartość $\log \beta_n$ ($C_{M,L}$ – wyjściowe stężenie jonu metalu M i ligandu L).

Bardziej złożone obliczenia dotyczą przypadku, kiedy reakcja kompleksowania prowadzi do utworzenia kilku kompleksów typu $[ML_n]$ jednocześnie. Rozważając stosunek całkowitego stężenia jonów metalu do stężenia wolnych jonów metalu, ponieważ:

$$C_M = [M] + [ML] + [ML_2] + \dots = \sum_{i=0}^n [ML_i]$$

oraz:

$$C_M = [M] + \beta_1[M][L] + \beta_2[M][L]^2 + \dots$$

otrzymujemy:

$$\frac{C_M}{[M]} = \frac{[M] + [M][L]b_1 + [M][L]^2b_2 + \dots + [M][L]^nb_n}{[M]} = 1 + \sum_{i=0}^n \beta_i [L]^i = f_{M(L)}$$

Otrzymana funkcja $f_{M(L)}$ jest odwrotnością funkcji przedstawiającej ułamek molowy wolnych jonów metalu¹⁵⁴.

Na podstawie pomiaru potencjału odwracalnej elektrody w roztworze o stężeniu C_M , w nieobecności i w obecności czynnika kompleksującego, można obliczyć wartość funkcji $f_{M(L)}$ z różnicy potencjałów, gdzie w pierwszym przypadku $[M] = C_M$, w drugim $[M] = C_M / f_{M(L)}$. Ponieważ dla reakcji: $M = M^{n+} + ne^-$ potencjały elektrod w opisanych przypadkach wyrażają następujące zależności:

$$E_1 = E_M^o + \frac{0,059}{n} \log C_M \quad E_2 = E_M^o + \frac{0,059}{n} \log \frac{C_M}{f_{M(L)}}$$

różnica potencjałów wynosi:

$$\Delta E = \frac{0,059}{n} \log f_{M(L)}$$

W przypadku kiedy $C_L \gg C_M$ w obrębie całej serii pomiarów, można założyć, że $C_L \approx [L]$. Sumaryczne stałe trwałości poszczególnych kompleksów można policzyć na podstawie wartości $f_{M(L)}$ otrzymanych doświadczalnie. Do obliczenia n różnych stałych, potrzebne jest n równań (n pomiarów). Ponieważ dokładność obliczonych w ten sposób stałych nie jest

wystarczająca, można ją zwiększyć obliczając rzeczywiste wartości [L] na podstawie przybliżonych wartości β_i i powtarzając obliczenia dla rzeczywistych wartości [L] a nie C_L . Często praktykowane jest obliczanie wartości β_i na podstawie większej ilości danych doświadczalnych metodą najmniejszych kwadratów^{70,74,75}. W przypadku, kiedy interesują nas cząstkowe stałe trwałości K_i należy skorzystać z zależności:

$$\log \beta_n = \log K_1 + \log K_2 + \dots + \log K_n = \sum_{i=1}^n \log K_i$$

Podziękowania:

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

Literatura:

1. N. Bjerrum, *Z. Inorg. Chem.*, 1921, 119, 179.
2. L. G. Sillen, *Acta Chem. Scand.*, 1954, 8, 229.
3. C. R. Cantor, P. R. Schimmel, "*Biophysical Chemistry. Part III*", W. H. Freeman and Co., San Francisco, 1980, str 849, 863.
4. B. G. Cox, H. Schneider, "*Coordination and Transport Properties of Macrocyclic Compounds in Solutions*", Elsevier, Amsterdam, 1992, str 29.
5. B. G. Cox and H. Schneider, *Pure Appl. Chem.*, 1989, 61, 171.
6. P. Arłukowicz, E. Arłukowicz, J. Kira i A. Liwo, *Task Quart.*, 1998, 1, 55.
7. D. Marquardt, *J. Soc. Indust. Appl. Math.*, 1963, 11, 431
8. J. Kostrowicki, A. Liwo, *Talanta*, 1990, 37, 645.
9. J. Kostrowicji, A. Liwo, *Comput. Chem.*, 1988, 12, 293.
10. J. Kostrowicki, A. Liwo, *Comput. Chem.*, 1987, 11, 195.
11. J. Kostrowicki, A. Liwo, *Comput. Chem.*, 1984, 8, 91.
12. J. Kostrowicki, A. Liwo, *Comput. Chem.*, 1984, 8, 101.
13. J. Minczewski, Z. Łada, *Miareczkowanie potencjometryczne*, PWN, Warszawa, 1957.
14. E. Szyszko, *Intrumentalne metody analityczne*, PZWL, Warszawa, 1982.
15. *Recommendations for Nomenclature of Ion-Selective Electrodes*, *Pure and Appl. Chem.*, 1976, 48, 127.
16. A. Hulanicki, *Chem. Anal.*, 1972, 17, 217.
17. A. Hulanicki, *Wiad. Chem.*, 1988, 42, 193.
18. J. F. Coetzee, B. K. Deshmukh, C. C. Liao, *Chem. Rev.*, 1990, 90, 827.
19. H. Lund, M. M. Baizer, *Organic Electrochemistry*, Marcel Dekker, New York, 1991.
20. J. N. Butler, *Advances in Electrochemistry and Electrochemical Engineering*, Wiley, New York, 1970.
21. C. K. Mann, *Electroanalytical Chemistry*, Marcel Dekker, New York, 1969.
22. K. Izutsu, *Electrochemistry in Nonaqueous Solutions*, Wiley, Weinheim, 2002.
23. Y. Marcus, "*Ion Solvation*", Wiley, New York, 1985, str 172, 190.
24. I. M. Kolthoff, M. K. Chantooni, *J. Am. Chem. Soc.*, 1965, 87, 4428.
25. I. Pastoriza-Santos, L. M. Liz-Marzan, *Pure Appl. Chem.*, 2000, 72, 83.
26. K. Izutsu, M. Itoh, E. Srai, *Anal. Sci.*, 1985, 1, 341.
27. A. Lewandowski, A. Szukalska, M. Galiński, *New. J. Chem.*, 1995, 19, 1259.

28. J. F. Coetzee, C. W. Gardner, *Anal. Chem.*, 1982, 54, 2530, 2625.
29. A. Cygański, *Metody Elektroanalityczne*, PWN, Warszawa, 1991, str 92.
30. K. Bogusławska, A. Cygański, J. Kobyłecka, *Przegl. Pap.*, 1977, 8, 305.
31. J. Inczedy, *Równowagi Kompleksowania w Chemii Analitycznej*, PWN, Warszawa, 1979.

Rozdział 10

Zastosowanie parametrów spektroskopii NMR w diagnostyce układów supramolekularnych

Piotr Młynarz

Zakład Chemii Bioorganicznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Wrocławska,

Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław

1. Wstęp

Chemia supramolekularna, zwana też chemią gość-gospodarz, jest bardzo szybko rozwijającym się obszarem nauki. Poprzez jej interdyscyplinarny charakter chemia typu gość-gospodarz coraz częściej przedostaje się z laboratoriów chemicznych do życia codziennego. W obecnym czasie nierzadko spotykamy się z jej osiągnięciami w postaci testów diagnostycznych wykrywających coraz to więcej substancji chemicznych, począwszy od biologicznie ważnych molekuł, aż do zanieczyszczeń środowiska. Ten transfer technologiczny możliwy jest dzięki poszerzeniu funkcji oraz zakresu zastosowań zsyntezowanych w laboratorium układów chemicznych. Mimo to, w tej chwili stoimy dopiero u progu ery nanotechnologii, która jest ściśle powiązana z chemią supramolekularną, choć poczynienie milowego kroku do przodu to na pewno kwestia nieodległego czasu. Aby pokonać do końca barierę technologiczną potrzebną do jego wykonania, potrzebne są pionierskie badania nad supramolekułami na poziomie podstawowym. Do badania oddziaływań typu gość-gospodarz stosuje się szeroką gamę technik analitycznych, takich jak: spektrometria mas, spektroskopia IR, UV-Vis, fluorescencyjna, EPR, CD, X-ray oraz kalorymetria i mikroskopia [1]. Nieocenionych informacji dostarcza jednak rozwijająca się w coraz większym tempie spektroskopia NMR.

Opracowanie to jest poświęcone ogólnemu opisowi technik eksperymentalnych metody NMR wykorzystywanych w chemii supramolekularnej roztworów, bez szczegółowego opisu teoretycznego poszczególnych eksperymentów.

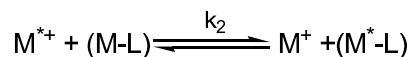
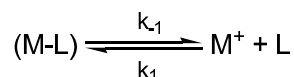
2. Przesunięcie chemiczne – główny parametr układu kompleksującego

Badanie reakcji asocjacji indywiduów chemicznych wymaga „parametru zmiany” układu, który będzie wykazywał stopień ich skompleksowania. W spektroskopii NMR najważniejszym i najłatwiejszym parametrem służącym do diagnozowania oddziaływań międzycząsteczkowych jest przesunięcie chemiczne, wyrażane w *ppm* (*parts per milion*). Z powodzeniem można je badać za pomocą najprostszych technik, czyli widm typu 1D jak i w bardziej zaawansowanych technik dwuwymiarowych. Przesunięcie chemiczne jąder jest głównie zależne od gęstości elektronowej ich otoczenia chemicznego (indukowanego środowiska magnetycznego). Natomiast asocjacja dwóch molekuł na skutek zmiany otoczenia chemicznego powoduje tak zwane przesunięcie chemiczne indukowane kompleksowaniem (Complexed Induced Shift, CIS), które bezpośrednio służy do obliczania stałych trwałości powstających kompleksów. Standardowo wykorzystywanymi w spektroskopii NMR jądrami są ^1H oraz ^{13}C . Przesunięcia chemiczne protonów służą do opisywania praktycznie wszystkich rodzajów oddziaływań w chemii supramolekularnej i wyznaczaniu stałych asocjacji cząsteczek chemicznych. Natomiast izotop węgla ^{13}C jest powszechnie wykorzystywany do opisu oddziaływań międzycząsteczkowych. Zmiany na widmach ^{13}C NMR wskazują głównie na zmiany geometrii badanej molekuly na skutek oddziaływań z drugim reagentem, a jego CIS jest znacznie rzadziej używane do wyznaczania stałych [2-3]. Jądra mniej wykorzystywane w chemii oddziaływań takie jak ^{19}F , czy ^{31}P , wykazują znaczne zmiany przesunięcia chemicznego na skutek reakcji kompleksowania, które mogą być również stosowane do obliczeń trwałości kompleksów [4, 5, 6, 7]. Poza wyznaczaniem wartości CIS przesunięcie chemiczne jąder izotopów aktywnych w spektroskopii NMR obrazuje procesy rozpoznawania chiralności, gdzie poprzez oddziaływanie formy racemicznej gościa z jednym z enancjomerów gospodarza dla tego samego jądra są obserwowane dwa sygnały [8]. Analogicznie, zastosowanie chiralnego gospodarza i racemicznych lub enancjomerycznie wzbogaconych form gościa poprzez rozdział sygnałów jąder (np.: ^1H i ^{31}P) może pokazać stosunek molowy poszczególnych enancjomerów [9]. Należy jednak pamiętać przy wykonywaniu eksperymentów NMR, że na przesunięcie chemiczne jąder w danej molekuole oprócz obecności molekuł oddziaływujących ze sobą, wpływa również polarność roztworów, rodzaj przeciwjonu, temperatura, pH środowiska, a także stężenie analizowanej próbki. Zależności te wykorzystuje się powszechnie również w analizie równowag kompleksowania.

Zatem zmiana polarności rozpuszczalników może prowadzić do powstawania słabszych lub silniejszych kompleksów międzymolekularnych [10, 11]. Ogólnie w roztworach o mniejszej polarności kompleksy te wykazują większą trwałość ze względu na brak konkurencji ze strony rozpuszczalnika w procesie wiązania się dwóch molekuł. Zmiana przeciwjonu lub zmiany jego stężenia może wpłynąć znacząco na równowagę kompleksowania, a przez to również na przesunięcie chemiczne badanych jąder w układzie gość-gospodarz [12]. Poprzez celową zmianę temperatury niejednokrotnie bada się struktury oraz dynamikę gościa lub gospodarza, a także tworzonego przez nich kompleksu z punktu widzenia inter- lub intramolekularnych wiązań wodorowych [13]. Zmiana pH środowiska w sposób oczywisty wpływa na przesunięcie chemiczne danego jądra i często służy do wyznaczania wartości pK_a niezwiązanych cząsteczek organicznych oraz kompleksów molekularnych. Ponadto wyznaczanie metodą NMR wartości pK_a grup oddających protony pozwala na wyznaczenia szeregu wartości mikro stałych protonacji, co bardzo często pomaga w prawidłowym zinterpretowaniu reakcji kompleksowania [14, 15]. Nieobojętnym czynnikiem, wpływającym na przesunięcie chemiczne jest również stężenie próbki, którego zmiana wraz ze zmianą przesunięcia chemicznego może świadczyć o międzycząsteczkowych oddziaływaniach na poziomie niezwiązanego gościa lub gospodarza (np.: procesu autoasocjacji, tworzenia zorganizowanych układów chemicznych).

Reakcje kompleksowania ligandów przez paramagnetyczne jony metali, jak na przykład lantanowców czy Co(II), Fe(III) mogą być monitorowane za pomocą zmian przesunięcia chemicznego [16, 17, 18]. Związanie jonu metalu wywołuje znaczne zmiany położenia sygnałów jąder znajdujących się w jego bliskim sąsiedztwie (od kilku do kilkudziesięciu ppm). W ten sposób można określić bardzo dokładnie miejsce jego oddziaływania z biomolekułą lub metaloreceptorem [19].

Przesunięcie chemiczne jest bardzo przydatnym parametrem do badania mechanizmów reakcji dysocjacji kompleksów oraz międzycząsteczkowej wymiany molekularnej [20, 21, 22].



$$\tau^{-1}[M^+]_{total}^{-1} = k_{-1}[M^+]_{free} + k_2$$

$$\tau^{-1} = k_{-1} \frac{[M^+]_{total}}{[M^+]_{free}} + k_2 [M^+]_{total}$$

$$\tau^{-1} \text{ - średni czas życia kationu w obu formach: } \tau^{-1} = \tau_A^{-1} + \tau_B^{-1}$$

W czasie wykonywania serii pomiarów (równe stosunki reagentów, różne stężenia) w przypadku mechanizmu jednocząsteczkowego nie obserwuje się zmian na widmach. Natomiast w przypadku dwucząsteczkowego mechanizmu obserwuje się poszerzenia i uśrednienia sygnałów.

Pomiary przesunięć chemicznych innych jąder niż wymienione powyżej również służą do analizy układów supramolekularnych lub procesu samoorganizacji molekuł. Badanie układów spinowych o $S > 1/2$, nastęrcza wielu kłopotów związanych z ich interpretacją, ze względu na duże poszerzenie obserwowanego sygnału. Z drugiej strony, przesunięcia chemiczne znajdujące się na widmach jonów metali (w szczególności alkalicznych np. $^{23}\text{Na}^+$, $^7\text{Li}^+$) oraz anionów (np. Cl^-) mogą bezpośrednio odzwierciedlać ilość związanych i niezwiązanych jonów. Tym sposobem wnoszą dużo dodatkowych informacji o geometrii otoczenia związanego jonu oraz w niektórych przypadkach pozwalają na obliczenie stałych trwałości powstających kompleksów [22, 23, 25, 26]. W przypadkach, kiedy na skutek dużych wartości momentów kwadrupolowych jąder jonów metali intensywności ich sygnałów są niskie, a linie bardzo poszerzone do badania równowag kompleksowania stosuje się zamiennie jony talu (^{203}Tl i ^{205}Tl), których spin $S = 1/2$ [26]. Wtedy równowagi kompleksowania kwadrupolowego jonu metalu wyznacza się kompetycyjnie z obliczeniem względną stałej trwałości (punkt 3 opracowania) [22, 27].

Niemal wszystkie oddziaływania międzycząsteczkowe prowadzące do utworzenia kompleksu typu: jon-dipol, stakingowego (nakładkowe), dipol-dipol, wiązania wodorowe, kation- π , mogą być monitorowane za pomocą zmieniającego się przesunięcia chemicznego, które pozwala na obliczenie stałych asocjacji lub w ostateczności, przy bardzo małych zmianach CIS (zmiana przesunięcia jest rzędu szerokości połówkowej sygnału), pomaga w potwierdzeniu istnienia międzymolekularnych oddziaływań.

W niektórych skrajnych przypadkach, kiedy stałe są bardzo duże bądź bardzo małe, nie można zauważyć zmian przesunięcia chemicznego indukowanego kompleksowaniem. Dla takich przypadków należy wykorzystać inne techniki NMR, z których najbardziej przydatne są opisane są poniżej.

3. Metody obliczania stałych asocjacji kompleksów supramolekularnych z wykorzystaniem wartości CIS.

Obliczenia parametrów termodynamicznych takich jak energia swobodna kompleksowania oraz wkłady odpowiednio entalpowe i entropowe tworzących się kompleksów supramolekularnych typu gość G gospodarz H dają podstawowe informacje świadczące o trwałości ich oddziaływania w roztworach. W celu obliczenia stałych asocjacji najczęściej używanym parametrem zmiany układu jest przesunięcie chemiczne. Parametr ten możemy wykorzystać pod warunkiem, że reakcja kompleksowania jest szybka w skali NMR i w odpowiedzi reakcji asocjacji dwóch molekuł otrzymujemy uśrednione widmo gościa i gospodarza oraz tworzącego się między nimi kompleksu. Ze zmiany przesunięcia chemicznego CIS wyznaczamy stochiometrię kompleksów oraz stałe charakteryzujące dany układ supramolekularny. W literaturze istnieje szereg prac podstawowych i przeglądowych opisujących metody i metodykę obliczania stochiometrii kompleksów oraz stałych asocjacji [1, 22, 28].

Jedną z pierwszych czynności wykonywanych przy badaniu równowag kompleksowania jest wyznaczenie stochiometrii tworzącej się supramolekuły. Do tego celu wykorzystuje się dwie techniki stosunków ciągłych-Joba (*continious variation*) [1, 29, 30, 31] oraz stosunków molowych (*mole ratio method*) [32, 33, 34]. W pierwszej z nich wykonuje się serie roztworów o różnych stosunkach H do G (gospodarz do gościa), od 1:0 do 0:1, w których sumaryczne stężenie $[H]_0 + [G]_0$ jest stałe. Następnie wyznacza się wykres iloczynu $[G]_0$ lub $[H]_0$ δ do ułamka molowego $X_{H \text{ lub } G}$ (zdefiniowanego jako: $([H]_0 \text{ lub } [S]_0)/([H]_0 + [S]_0)$) [3]

Pojawienie się na nim maksimum lub minimum (ekstremum) wskazuje na oddziaływanie pomiędzy substratami i tworzenie się kompleksu molekularnego o stochiometrii H_nG_m . Wyznaczenie wartości X (ekstremum) umożliwia oszacowanie stochiometrii zgodnie z równaniem:

$$\frac{n}{m} = \frac{X_{eks}}{(1 - X_{eks})}$$

Tak więc wartość 0.5 wskazuje na tworzenie się kompleksu o stochiometrii 1:1 lub wielokrotności tych liczb np.: 2:2. Różne wartości współczynnika X_{eks} niż 0.5 wskazują na tworzenie się innych od 1:1 form kompleksowych np.: 0.67 równa się stochiometrii 1:2. Wyznaczanie wyższej stochiometrii kompleksów niż 1:1 jest bardzo dobrze opisane przez Sahai et al. [30]

Metodę stosunków molowych wykorzystuje się do badania stechiometrii kompleksów, w których wartości stałej K_a są większe od 10^5 M^{-1} . W metodzie tej stężenie jednego z reagentów pozostaje stałe przy zmieniającym się stężeniu drugiego. W takim wypadku parametr zmiany układu (*CIS*) zmienia się aż do punktu, w którym zwiększenie stężenia zmieniającego się reagenta nie powoduje dalszych zmian przesunięcia chemicznego badanego sygnału, czyli znajduje się w punkcie wysycenia. W tym eksperymencie z porównania stosunków stężeń obu reagentów otrzymujemy stechiometrię tworzącego się kompleksu. Metoda ta jest bardzo wygodna i służy również do wyznaczania stałych asocjacji kompleksów poprzez miareczkowanie NMR. W stosunku do pierwszej posiada taką przewagę, że metoda Joba nie zawsze jednoznacznie wskazuje na stechiometrię tworzących się kompleksów, ponieważ różnicę w ekstremum dla wyższych stosunków typu 4:1, 5:1, 6:1 są bardzo małe [22].

Zgodnie z prawem działania mas reakcje kompleksowania dwóch molekuł, przy założeniu tworzenia się kompleksu o stechiometrii 1:1, możemy opisać równaniem:



$$K_a = \frac{[\text{HG}]}{[\text{H}][\text{G}]}$$

Z tego podstawowego wyrażenia otrzymujemy „siłę” tworzącego się kompleksu K_a . Zakładając w badanym układzie szybką wymianę tak, że każde przesunięcie chemiczne jest średnią ważoną frakcji molowych wolnych i skompleksowanych molekuł, możemy napisać:

$$\delta_{obs} = X_{G \text{ lub } H} \delta_{G \text{ lub } H} + X_{HG} \delta_{HG}$$

W wyrażeniu tym $\delta_{G \text{ lub } H}$ i δ_{HG} oznaczają odpowiednio przesunięcie chemiczne wolnego substratu **G** lub **H** oraz ich kompleksu, a X oznacza frakcję molową każdego z tych dwóch indywiduów chemicznych.

$$[\text{G}]_0 = [\text{G}] + [\text{HG}]$$

$$[\text{H}]_0 = [\text{H}] + [\text{HG}]$$

$$X_{H \text{ lub } G} + X_{HG} = 1$$

Należy zwrócić uwagę na to, że o ile parametry δ_{obs} i $\delta_{G \text{ lub } H}$ można łatwo wyznaczyć to wartość δ_{HG} nie jest łatwa do otrzymania wprost. Wartości stałych można obliczyć z danych uzyskanych z miareczkowania roztworu **H** za pomocą **G** lub roztworu **G** za pomocą **H** (zmiana przesunięcia chemicznego dla cząsteczek **G** lub **H**) uwzględniając ten fakt w wyrażeniach na wartość K_a .

W przypadku, kiedy mamy do czynienia z wolną wymianą chemiczną, każdy ze składników układu, czyli wolne reagenty oraz powstający z nich kompleks, posiada własne przesunięcia chemiczne i ze stosunków powierzchni sygnałów można bezpośrednio obliczyć stałą asocjacji dla supramolekuły.

Obliczenie stałej asocjacji kompleksu przy stechiometrii H:G równej 1:1 może odbywać się za pomocą kilku opisanych poniżej metod. Jedną z najbardziej popularnych jest wyznaczanie wartości K_a metodą Benesi-Hilderbranda, która została przystosowana do spektroskopii NMR niezależnie przez kilka zespołów badawczych [35, 36, 37].

$$\frac{1}{\Delta\delta} = \frac{1}{(K_a \Delta\delta_{\max} [H]_0)} + \frac{1}{\Delta\delta_{\max}}$$

gdzie

$$\Delta\delta = (\delta_G - \delta_{obs});$$

$$\Delta\delta_{\max} = (\delta_G - \delta_{HG})$$

Inną metodą wykorzystywaną do obliczania wartości K_a jest metoda Scatcharda [38] również nazywana metodą Fostera-Fyfe [39,40] w której wykorzystuje się następujące równanie:

$$\frac{\Delta\delta}{[H]_0} = -K_a \Delta\delta + K_a \Delta\delta_{\max}$$

Alternatywnym sposobem wyznaczaniem stałej asocjacji jest metoda Scotta, w której za pomocą równania oblicza się trwałość kompleksów.

$$\frac{[H]_0}{\Delta\delta} = \frac{[H]_0}{\Delta\delta_{\max}} + \frac{1}{(K_a \Delta\delta_{\max})}$$

Kolejną metodą wykorzystywaną do obliczenia stałej asocjacji jest zmodyfikowana przez Watchera i Frieda [41] metoda Rose-Drago [42]. Do obliczenia stałej K_a wykorzystuje się równanie:

$$(\Delta\delta_{\max} - \Delta\delta)K_a = \frac{\Delta\delta \Delta\delta_{\max}}{(\Delta\delta_{\max} [H]_0 - \Delta\delta [G]_0)}$$

Wszystkie te metody obliczeniowe sprawdzają się doskonale w przypadku tworzenia binarnych kompleksów typu 1:1. Natomiast w przypadku większej liczby równowag

w roztworze stosuje się metody iteracyjne [3]. Odrębnym problemem przy obliczaniu stałych asocjacji między gościem a gospodarzem jest bardzo często występujący proces samoasocjacji gospodarza. Wyprowadzając stałą działania mas z uwzględnieniem przesunięcia indukowanego na skutek samoasocjacji otrzymujemy równania [28]:

$$2S \rightleftharpoons S_2$$

$$[S]_t = [S] + 2[S_2]$$

$$K_d = \frac{[S_2]}{[S]^2}$$

W celu obliczenia tej stałej w przypadku, kiedy tworzą się dimeryczne układy należy rozpatrzyć równowagę:

$$\delta_{obs} = \delta_{mono} + \Delta\delta \{1 + 0.25(K_d/[S]_t)(1 - (1 + 8[S]_t/K_d)^{\frac{1}{2}})\}$$

gdzie dla tego przypadku $\Delta\delta$ równa się:

$$\Delta\delta = \delta_{mono} - 0.5\delta_{dimer}$$

W przypadku, gdy tworzą się bardzo mocne kompleksy niemożliwe jest wyznaczenie stałych asocjacji metodami opisanymi powyżej. W celu wyznaczenia stałych trwałości stosuje się wtedy metody kompetycyjne, w których, w kompleksowaniu jednego gościa G biorą udział dwaj gospodarze H_1 i H_2 [1, 3, 43, 44, 45]. Aby wyliczyć stałą asocjacji trwalszego kompleksu muszą być znane następujące wartości: stała asocjacji gościa z jednym gospodarzem (słabszy kompleks K_1) oraz $\Delta\delta_{max}$ dla obu kompleksów (wartości te powinny się znacząco różnić od siebie). W takim wypadku obliczamy K_{wzg} względne oraz K_2 .

$$\delta_{obs} = X_{H1G}\Delta\delta_{H1G} + X_{H2G}\delta_{H2G}$$

$$X_{H2G} = \frac{(\delta_{obs} - \delta_{H1G})}{(\delta_{H2G} - \delta_{H1G})}$$

$$K_{wzg} = \frac{K_2}{K_1} = \frac{[H_2G][H_1]}{[H_2][H_1G]}$$

Również można zastosować inne wyrażenie na K_{wzg} [46]:

$$K_{\text{wzg}} = \frac{\frac{1}{X_{H1G}} - 1}{\frac{1}{X_{H2G}} - 1}$$

gdzie:

$$X_{H1G \text{ lub } H2G} = \frac{(\delta_{H1 \text{ lub } H2} - \delta_{\text{obs}})}{(\delta_{H1 \text{ lub } H2} - \delta_{H1G \text{ lub } H2G})}$$

W obu przedstawionych metodach całkowite stężenie receptora H względem gościa G jest większe i zakłada się jego całkowite skompleksowanie. Druga metoda ma taką zaletę, że nie muszą być dla niej znane stężenia całkowite, każdego z trzech badanych reagentów [3].

4. Sprzężenie skalarne

Sprzężenie skalarne wyrażone w hercach (Hz) pomiędzy poszczególnymi jądrami służy głównie do określania struktur cząsteczek organicznych. Parametr ten jako funkcja kątów dwuściennych pomiędzy jądrami w molekuale może być wykorzystywany w chemii supramolekularnej głównie do określania zmian konformacyjnych poszczególnych reagentów (przed i po reakcji kompleksowania). Sprzężenie jest również pomocne przy wyznaczaniu stałych dla poszczególnych rotamerów [14, 22, 47, 48]. Bardzo rzadko obserwuje się zjawisko widocznego na widmach sprzężenia jądrowego pochodzących z dwóch różnych molekuł [49]. Dlatego użycie stałych sprzężeń ogranicza się głównie do opisu pojedynczych indywiduów chemicznych.

5. Relaksacja podłużna T₁ i poprzeczna T₂

Badanie czasów relaksacji podłużnej T₁ czy poprzecznej T₂ wykonuje się głównie mierząc je dla takich jądrow jak ¹H i ¹³C, choć mniej popularne jak np.: ²³Na⁺, Rb, Cl⁻ są również wykorzystywane do tego celu [50, 51]. Pomimo dobrze poznanych mechanizmów relaksacyjnych wyznaczanie czasów relaksacji dla supramolekularnych układów jest dość sporadycznie stosowane w porównaniu do innych technik analitycznych [52]. Metoda ta jest szczególnie przydatna w reakcjach kompleksowania, w których zmiany wartości CIS są nieznaczne. W szczególności zmiana czasu podłużnego relaksacji T₁ na skutek oddania pochłoniętej porcji energii do sieci (układu) obrazuje zmiany dynamiczne zachodzące podczas oddziaływań międzycząsteczkowych pomiędzy cząsteczką gościa a gospodarza. Najogólniej można napisać, że czas korelacji τ_c, który charakteryzuje ruch cząsteczki jest związany z czasem relaksacji T₁. W przypadku małych molekuł można stwierdzić, iż czas

korelacji τ_c jest szybszy niż częstotliwość Larmora.. Obniżenie jego wartości na skutek procesu kompleksowania powoduje skrócenie czasów relaksacji podłużnej T_1 , a co za tym idzie, zwiększenie szybkości relaksacji R_1 (*relaxation rate*, gdzie $R_1=1/T_1$) [3]. Wyjątek mogą stanowić duże molekuly, których wartość τ_c jest mniejsza niż częstotliwość Larmora. W takim wypadku będzie obserwowane wydłużenie czasu relaksacji T_1 oraz zmniejszenie R_1 . Zmiana czasów relaksacji stanowi nieoceniony parametr zmiany układu na skutek oddziaływania gościa z gospodarzem, dlatego też została wykorzystana do badania dynamiki kompleksowania w wielu układach [53, 54, 55, 56, 57]. Pomiarów czasów relaksacji stanowią cenne źródło informacji również dla opisu struktury samych cząsteczek gospodarza [58].

Mechanizm podłużnej relaksacji spinowej, a więc powrotu spinów do stanu równowagi jest znacznie bardziej efektywny w przypadku obecności paramagnetycznych substancji w roztworze. Wykorzystanie paramagnetycznego NMR-u pozwala na badanie wielu międzymolekularnych oddziaływań głównie z udziałem paramagnetycznych jonów metali lub rodników [59, 60, 61]. W takich przypadkach stosuje się bardzo duże nadmiary molekuł receptora w stosunku do paramagnetycznego jonu metalu (np. 1000:1). Pomiarów czasów relaksacji stosuje się na przykład do wyznaczania miejsc wiążących paramagnetycznych jonów Cu (II) w biologicznie ważnych molekułach (np. peptydach i białkach). Badania te pozwalają również na określenie struktury kompleksu w roztworze poprzez obliczenie odległości między paramagnetycznym centrum koordynacji a badanym jądrem [63, 63, 64]. Paramagnetyczne jony metali można również wykorzystać zamiennie jako sondę wiązania jonów wapnia, a więc nieparamagnetycznego jonu do liganda [65]. W niektórych wypadkach na podstawie zmian czasów relaksacji można znaleźć strukturę tak bardzo skomplikowanych struktur jak kompleks centrum fotosyntetycznego II ze związanym z nim herbicydem [66]. Dzięki pomiarom relaksacyjnym możliwe jest również wyznaczanie stałych trwałości kompleksowania paramagnetycznych jonów metali. Wyznacza się je pośrednio na podstawie pomiarów relaksacji cząsteczek rozpuszczalnika (wody), których szybkość relaksacji rośnie, wraz ze stopniem skompleksowania paramagnetycznych jonów metali z ich ligandami [67].

Pomiary relaksacyjne umożliwiają również obliczenie stałych trwałości kompleksów molekularnych w układach, które znajdują się w stanie szybkiej wymiany chemicznej. W tym celu równanie na δ_{obs} (pkt.3) zostaje zmodyfikowane do równania przedstawionego poniżej, z którego podstawiając R_{1obs} do δ_{obs} otrzymujemy wyrażenie na stałą trwałości kompleksu:

$$R_{1obs} = X_f R_f + X_b R_b$$

f = forma niezwiązana

b = forma związana

Metodę tę wykorzystano z powodzeniem do obliczeń trwałości tworzących się kompleksów molekularnych w roztworach [3, 68, 69, 70]

Również czas relaksacji poprzecznej T_2 lub zamiennie szerokość połówkową sygnału $W_{1/2}$ można użyć do monitorowania reakcji kompleksowania oraz obliczania stałych asocjacji. Wyliczenia te można łatwo wykonać podstawiając do powyżej przedstawionego wzoru szybkość relaksacji R_2 zamiast R_1 [71].

Pomiary relaksacji dostarczają również informacji na temat procesów wymiany chemicznej reagentów [22, 72]. W przypadku wolnej wymiany informacji o szybkości reakcji dostarcza eksperyment mierzący selektywnie wartości T_1 . Natomiast, kiedy mamy do czynienia z szybką wymianą i koalescencją sygnałów wtedy mierzy się czas relaksacji T_2 [72, 73].

Pomiary relaksacyjne jąder posiadających moment kwadrupolowy, a w szczególności jonów metali dostarczają nieocenionych informacji o geometrii kompleksu oraz ich solwatacji poprzez wyznaczenie gradientu pola wokół badanego jądra (e^2Qq) [22].

$$T_{1,2}^{-1} = \frac{3}{40} \frac{2I+3}{I^2(2I+1)^2} (e^2qQ)^2 \tau_{rot}$$

gdzie: h - stała Planca, I - spin jądra kwadrupolowego, eq - gradient pola, eQ - moment kwadrupolowy, τ_{rot} - rotacyjny czas korelacji

Przy pomocy bezpośrednich pomiarów czasów relaksacji jąder metali (np.: $^{23}\text{Na}^+$) można monitorować różne procesy w których biorą udział jony metali np.: transportu ich kompleksów w środowiskach anizotropowych [74].

6. Oddziaływanie typu dipol-dipol przez przestrzeń

Opisanie struktury powstających supramolekuł stanowi, podobnie jak określenie ich stałych asocjacji, wielkie wyzwanie dla chemików, chociaż w obecnej dobie jest to możliwe przy zastosowaniu każdego aparatu NMR. Powszechnie znane jest zjawisko oddziaływania jąder (dipoli), które będąc w odległości do 5 Å oddziałują ze sobą przez przestrzeń. Zjawisko to znane jest jako jądrowy efekt Overhausera. Najczęściej stosowane do diagnostyki tego typu oddziaływań są dwuwymiarowe widma NOESY (*Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy*), na których są obserwowane dipolowe sygnały krzyżowe (korelacyjne) pomiędzy „kontaktującymi” się jądrami (sygnały NOE). Intensywność tych sygnałów jest odwrotnie proporcjonalna do szóstej potęgi odległości między nimi [75]. Dlatego bezpośrednio można obliczyć odległości między jądrami, poprzez pomiar integracji

sygnału pomiędzy badanymi protonami ($\eta_{x\{y\}}$) i porównanie jej do integracji sygnału, pomiędzy, którymi odległość jest znana i stała np.: protonów geminalnych ($\eta_{A\{B\}}$).

$$\frac{\eta_{A\{B\}}}{\eta_{X\{Y\}}} = \frac{r_{AB}^{-6}}{r_{XY}^{-6}}$$

Effekt jądrowy Overhausera jest zależny od czasu korelacji τ_c molekuły, a więc od jej wielkości oraz masy i przyjmuje wartości ujemne dla małych układów, których masa jest mniejsza od 1000 D oraz dodatnie dla dużych >5000 D. Niestety w przypadkach w których masa badanej molekuły lub kompleksu molekuł znajduje się w zakresie 1000-5000 D pomimo istniejących dipolowych kontaktów sygnał jest równy zeru. Dlatego alternatywą dla pomiarów NOESY są pomiary ROESY (*Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy*), w których omawiane zjawisko nie istnieje. Bezpośrednie przeliczenie powstających sygnałów krzyżowych na skutek oddziaływania typu dipol-dipol na odległości pomiędzy badanymi jądrami nie jest możliwe i wymaga uwzględnienia dodatkowych parametrów [76]. Krytycznymi parametrami obu rodzajów eksperymentów są: czas mieszania (*mixing time*) w przypadku NOESY oraz spin lock dla techniki ROESY. Oba te parametry zależą od czasu korelacji molekuły, a nieodpowiednie ich dobranie może prowadzić do powstawania zbyt małych sygnałów korelacyjnych lub artefaktów. Odmianą techniki NOESY dla układów dynamicznych jest technika EXSY (*EXchange Spectroscopy*), gdzie na widmach powstają sygnały korelacyjne pomiędzy tymi samymi jądrami będącymi w dwóch stanach A i B.

Niedocenianymi i częściowo zapomnianymi są selektywne eksperymenty NOE, które mogą być doskonale wykorzystywane do krótkich skринingowych pomiarów inter- lub intramolekularnych oddziaływań w badanych układach.

7. Współczynnik Dyfuzji

Najbardziej zaniedbywanym parametrem zmiany kompleksującego układu w spektroskopii NMR do niedawna był współczynnik dyfuzji. Chociaż sama metoda jest znana już od 1950 roku, a w 1983 roku eksperyment ten był wykorzystany w chemii supramolekularnej, to do początku lat 90-tych ubiegłego stulecia odnotowywano raczej stały, aczkolwiek umiarkowany wzrost zainteresowania tą metodą [77,78,79]. Dopiero w ciągu ostatnich 17 lat wraz z rozwojem instrumentów NMR i ich oprogramowania można zaobserwować olbrzymi wzrost wykorzystania dyfuzyjnego NMR-u w analityce chemicznej. Generalnie metoda ta bazuje na pomiarze współczynnika dyfuzji wykorzystując przypadkowe ruchy translacyjne zespołów molekuł spowodowanych ich energią termiczną. Współczynnik

dyfuzji jest powiązany z wielkością molekuł i jak można wydedukować, małe molekuły posiadają większy współczynnik dyfuzji od większych. Fakt ten może być z powodzeniem wykorzystany w chemii supramolekularnej, podobnie jak przesunięcie chemiczne lub czasy relaksacji do pomiarów stałych asocjacji kompleksów, wykorzystując dobrze znaną już zależność^[3,80]:

$$D_{obs} = X_G D_G + X_{HG} D_{HG}$$

Równanie to może być zastosowane, kiedy badany układ znajduje się w szybkiej wymianie chemicznej. Dodatkowo jednym z warunków i zarazem ograniczeniem tej metody jest konieczna duża różnica w masie oraz kształcie pomiędzy gościem lub gospodarzem, a ich kompleksem molekularnym. Również stała asocjacji molekuł powinna posiadać wartości z zakresu $10\text{-}10^5\text{ M}^{-1}$. Niewątpliwą zaletą wykorzystania współczynnika dyfuzji do pomiarów stałych wiązania jest fakt, że zbędne jest wykonywanie tradycyjnego miareczkowania za pomocą techniki NMR.

W przypadku, kiedy badany układ znajduje się w fazie wolnej wymiany chemicznej pomiary współczynnika dyfuzji pełnią rolę dodatkowego dowodu reakcji kompleksowania, natomiast nie mogą być wykorzystane do obliczenia stałej K_a .

8. Podsumowanie

W oparciu o zaprezentowany w tym opracowaniu materiał śmiało można stwierdzić, że jest to technika bardzo użyteczna w chemii supramolekularnej. Zastosowanie któregośkolwiek parametru, który jest najbardziej odpowiedni dla danego układu prowadzi do dokładnego opisu procesów rozpoznawania molekularnego oraz chiralności molekuł. Spośród wszystkich opisanych metod na największą uwagę zasługuje NMR dyfuzyjny, który w obecnym czasie nabiera coraz to większego znaczenia stając się powoli standardową metodą badania reakcji kompleksowania.

Opisane powyżej zależności dotyczą głównie procesów zachodzących w roztworach, chociaż metoda NMR jest również powszechnie wykorzystywana do badania układów supramolekularnych w ciele stałym.

Podziękowania:

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

Literatura:

1. "Analytical Methods in Supramolecular Chemistry", Ed. Christoph A. Schalley, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2007, Weinheim.
2. Griffith R., Grant D. M., Roberts J. D., *J. Org. Chem.*, 1975, 40, 3726.
3. Fielding L., *Tetrahedron*, 2000, 56, 6151.
4. Friedrichsen B. P., Powell D. R., Whitlock H.W., *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, 112, 8931-894.
5. Doerr A.J., Case M.A., Pelczar I., McLendon, G. L., *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126, 4192.
6. Sundararaman A., Venkatasubbaiah K., Victor M., Zakharov L. N., Rheingold A. N., Jäkle F., *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, 128, 16554.
7. Haake P., Prigodich R.V., *Inorg. Chem.*, 1984, 23, 457.
8. Wehner M., Schrader T., Finocchiaro P., Failla S., Consiglio G., *Org. Lett.*, 2000, 2, 605.
9. Berlicki Ł., Rudzinska E., Mucha A., Kafarski P., *Tetrahedron: Asymmetry*, 2004, 15, 1597.
10. Grawe T., Schäfer G., Schrader T., *Org. Lett.*, 2003, 5, 1641.
11. Asakawa M., Ashton P. R., Ballardini R., Balzani V., Belohradsky M., Gandolfi M. T., Kocian O., Prodi L., Raymo F.M., Stoddart J. F., Venturi M., *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, 119, 302.
12. Sarri P., Venturi F., Cuda F., Roelens S., *J. Org. Chem.*, 2004, 69, 3654.
13. Alfonso I., Burguete M. I., Luis S. V., *J. Org. Chem.*, 2006, 71, 2242.
14. Ishikawa S., Neya S., Funasaki N., *J. Phys. Chem. B*, 1998, 102, 2502.
15. Kuad P., Borkovec M., Desage-El Murr M., Le Gall T., Mioskowski Ch., Spiess B., *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127, 1323.
16. Platas C., Avecilla F., de Blas A., Geraldès C. F. G. C., Rodríguez-Blas T., Adams H. Mahia J., *Inorg. Chem.* 1999, 38, 3190.
17. Epperson J. D., Ming L.-J., *Biochemistry*, 2000, 39, 4037.
18. Hermas R. Jimenez H. R., Moratal J. M., Looock B., *New J. Chem.*, 2002, 26, 323.
19. Bertini I., Fernandez C. O., Karlsson B. G., Leckner J., Luchinat, C., Malmström B. G., Nersissian A. M., Pierattelli, R., Shipp E., Valentine J. S., Vila, A. J., *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122, 3701.
20. Lockhart J. C., McDonnell M. B., Clegg W., Hill M. N. S., Todd M., *J. Chem. Soc.*,

Dalton Trans., 1989, 203

21. Schall O. F., Gokel G. W., *J. Am. Chem. Soc.*, 1994; 116, 3087.
22. „Zastosowanie magnetycznego rezonansu jądrowego w chemii supramolekularnej”,
Seria: Chemia Supramolekularna, Ed. Schroeder G., Gierczyk B., Wyd. „Betagraf”
PHU, Poznań, 2002.
23. Masiker M. C., Mayne Ch. L., Eyring E. M., *Magn. Reson. Chem.*, 2006, 44, 220.
24. Tossell J.A., *J. Phys. Chem. B*, 105, 2001, 11060.
25. Kintzinger J. P., Lehn J. M., Kauffmann E., Dye J. L., Popov A. I., *J. Am. Chem. Soc.*, 1983; 105, 7549.
26. Basu S., Szewczak A. A., Cocco M., Strobel S. A., *J. Am. Chem. Soc.*, 2000; 122, 3240.
27. Srivanavit Ch., Zink J. I., Dechter J. J., *J. Am. Chem. Soc.*, 1977, 99, 5876.
28. “Principles and methods in Supramolecular Chemistry” Ed. H.-J. Schneider, A. K. Yatsimirsky, John Wiley & Sons, LTD, Chichester, New York, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto, 2000.
29. Job P., *Ann. Chim.*, 1928, 9, 113.
30. Sahai R., Loper G. L., Lin S. H., Eyring H., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1974, 71, 1499.
31. Gil V. M. S., Oliveira N. C., *J. Chem. Ed.*, 1990, 473.
32. Meyer A. S., Ayres G. H., *J. Am. Chem. Soc.*, 1957, 79, 49.
33. Chriswell C. D., Schilt A. A., *Anal. Chem.*, 1975, 45, 1623.
34. Vives M., Gargallo R., Tauler R., *Anal. Chem.*, 1999, 71, 4328.
35. Benesi, H. A., Hildebrand J. H., *J. Am. Chem. Soc.*, 1949, 71, 2713.
36. Mathur, R., Becker E. D., Bradley R. B., Li N. C., *J. Phys. Chem.*, 1963, 67, 2190.
37. Hanna, M. W., Ashbaugh A. L., *J. Phys. Chem.*, 1964, 68, 811.
38. Scatchard G., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1949, 51, 660.
39. Foster R., Fyfe C. A., *Trans. Faraday. Soc.*, 1965, 61, 1626.
40. Foster R., Fyfe C. A., *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, 1965, 642.
41. Watcher H. N., Fried V., *J. Chem. Ed.*, 1974, 51, 660.
42. Rose N. J., Drago R. S., *J. Am. Chem. Soc.*, 1959, 81, 6138.
43. DeJong F., Reinhoudt D. N., Smit C. J., *Tetrahedron Lett.*, 1976, 1371.
44. DeJong F., Reinhoudt D. N., Smit C., *Tetrahedron Lett.*, 1976, 1375.
45. DeBoer J. A. A., Reinhoudt D. N., *J. Am. Chem. Soc.*, 1985, 107, 5347.
46. Whitlock B. J., Whitlock H. W., *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, 112, 3910.
47. Funasaki N., Ishikawa S., Neya S., *J. Phys. Chem. B.*, 2002, 106, 6431.

48. Dondon R., Fery-Forgues S., *J. Phys. Chem. B.*, 2001; *105*, 10715.
49. Frey M. H., Wagner G., Vasak M., Soerensen O. W., Neuhaus D., Woergoetter E., Kaegi J. H. R., Ernst R. R., Wuethrich K., *J. Am. Chem. Soc.*, 1985, *107*, 6847
50. Annaka M., Takahashi R., Nakahira T., Tokita M., Matsuura T., *Biomacromolecules*, 2001; *2*, 635
51. Hedin N., Furo I., Eriksson P. O., *J. Phys. Chem. B*, 2000, *104*, 8544
52. Günter H., „NMR Spectroscopy. Second edition. Basic principles and applications in chemistry”, John Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto Singapore., 1998, str. 228-233.
53. Behr J. P., Lehn J. M., *J. Am. Chem. Soc.*, 1976, 1743.
54. Mock W. L., Shih N-Y, *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, *11*, 2697.
55. Gaggelli E., D'Amelio N., Gaggelli N., Valensin G., *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2000, 1699.
56. Morgan M. T., Carnahan M. A., Immoos Ch. E., Ribeiro A. A., Finkelstein S., Lee S. J., Grinstaff M. W., *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 2003, 15485.
57. Choi H. S., Lee S. Ch, Yamamoto K., Yui N., *Macromolecules*, 2005, *38*, 9878.
58. Wyrwał J., Schroeder G., Kowalewski J., Aski S. N., *J. Mol. Struct.*, 2006, *792*, 274
59. Aime S., Bertini I., Luchinat C., *Coord. Chem. Rev.*, 1996, *150*, 77.
60. Summers J.S., Hoogstraten Ch. G., Britt R. D., Base K., Shaw B. R., Ribeiro A. A., Crumbliss A.L., *Inorg. Chem.* 2001, *40*, 6547.
61. Nikitin K., Fitzmaurice D., *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, *127*, 8067
62. Świątek M., Valensin D., Migliorini C., Gaggelli E., Valensin G., Jeżowska-Bojczuk M., *Dalton Trans.*, 2005, 3808.
63. Gaggelli E., Kozłowski H., Valensin D., Valensin G., *Mol. BioSyst.*, 2005, *1*, 79.
64. Młynarz P., Valensin D., Kozłowski H., Kowalik-Jankowska T., Otlewski J., Valensin G., Gaggelli N., *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2001, 645.
65. D'Amelio N., Gaggelli E., Gaggelli N., Mancini F., Molteni E., Valensin D., Valensin G., *J. Inorg. Biochem.*, 2003, *95*, 225.
66. D'Amelio, Gaggelli E., Młynarz P., Molteni E., Valensin G., Lubitz W., *ChemBioChem*, 2004, *5*, 1237.
67. Aime S., Botta M., Panero M., Grandi M., Uggeru F., *Magn. Reson. Chem.*, 1991, *29*, 923.
68. Cahill, C., Bulusan S., *Magn. Res. Chem.* 1993, *31*, 731.
69. James T. L., Noggle J. H., *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 1969, *62*, 644.
70. Vriesenga J. R., Fairchild G. H., *Inorg. Chim. Acta.*, 1984, *82*, L21-L22
71. Yamashoji Y., Fujiwara M., Matsushita T., Tanaka M., *Chem. Lett*, 1993, 1029.

- 72. Bain A. D., *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 2003, 4363.
- 73. Forsen S., Hoffman R. A., *J. Chem. Phys.*, 1964, 40, 1189.
- 74. Chi Y., Mo S., Mota de Freitas D., *Biochemistry*, 1996, 35, 12433
- 75. "High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry", Tetrahedron Organic Chemistry Series Volume 19, Claridge T. D. W., Elsevier, 2005, str. 303.
- 76. E. Ammalahti, M. Bardet, D. Molko, J. Cadet, *J. Magn. Reson. A*, 1996, 122, 230.
- 77. Hahn E. L., *Phys. Rev.*, 1950, 80, 580.
- 78. Stejskal O. E., Tanner J. E., *J. Chem. Phys.*, 1965, 42, 288.
- 79. Ryden, R., Carlfors, J., Stilbs, P., *J. Inc. Phenom.*, 1983, 1, 159.
- 80. Cohen Y., Avram L., Evan-Salem T., Frish L. "Diffusion NMR in Supramolecular Chemistry" w [1].

Rozdział 11

Metody chemii teoretycznej w badaniu oddziaływań gość -gospodarz (kompleksów supramolekularnych)

Jaromił Kira, Tadeusz Ossowski

*Zakład Chemii Supramolekularnej, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański, Sobieskiego
18/19, 80-852 Gdańsk*

Metody

Chemia teoretyczna jest szybko rozwijającą się poddziedziną chemii obliczeniowej, w której metody matematyczne są powiązane z fundamentalnymi prawami fizyki. Zadaniem chemii teoretycznej, w ujęciu chemii supramolekularnej, będzie studiowanie procesu oddziaływania pomiędzy gościem a gospodarzem, z uformowaniem się kompleksu supramolekularnego oraz określenie czynników, które wpływają na jego trwałość⁷⁷⁻⁸⁰. Nie bez znaczenia jest również możliwość przedstawienia studiowanego procesu w przystępnej formie.

Cząsteczki chemiczne uważane są za zbiór atomów, lub w ogólniejszym podejściu, za zbiór naładowanych cząstek, dodatnich jąder i ujemnych elektronów. W takim ujęciu, jedyną ważną fizyczną siłą, którą należy wziąć pod uwagę przy rozpatrywaniu chemicznych procesów, są oddziaływania kulombowskie pomiędzy naładowanymi cząstkami. Cząsteczki chemiczne różnią się między sobą różną liczbą i rodzajem atomów, elektronów a centra atomowe mogą znajdować się w różnych geometrycznych położeniach. Dla takiego zbioru danych, chemia teoretyczna może wyznaczyć parametry centrów atomowych (moment dipolowy, polaryzacja, stałe rozszczepienia elektronowego NMR), ich energie oraz geometryczne rozmieszczenie odpowiadające strukturze stabilnej cząsteczki, sposób, w jaki

jedna molekula może przechodzić w drugą, zależności czasowe pomiędzy strukturą a właściwościami elektronowymi.

Jedynym układem, który może być rozwiązany dokładnie jest układ złożony z jednego lub dwóch składników. Rozbudowanie układu o następne składniki zawsze prowadzi do rozdzielania go na dwa pseudo jedno-składnikowe układy i wprowadzenia centrum masy. Wymaga to przeprowadzenia wielu złożonych matematycznych operacji, gdzie wąskim gardłem staje się wydajność systemów obliczeniowych. Ich wzrastająca moc i dostępność przyczyniła się do gwałtownego rozwoju oraz popularności metod chemii teoretycznej.

Cząsteczka chemiczna zawiera określoną liczbę elektronów otaczających zbiór dodatnio naładowanych jąder atomowych. Kulombowskie oddziaływanie pomiędzy nimi stanowi podstawę opisu właściwości i struktury cząsteczki. Przedstawia się je jako potencjał ładunków q_i i q_j oddzielonych odległością r_{ij} (w odpowiednich jednostkach):

$$V_{ij} = V(r_{ij}) = q_i q_j / r_{ij}$$

Poza potencjałem oddziaływania, obliczenia wymagają opisu dynamiki układu, np. jak zmienia się on w czasie. W przypadku mechaniki klasycznej mówi o tym drugie prawo Newtona (F – siła, a – przyspieszenie, r – wektor położenia, m – masa cząstki):

$$F = m \cdot a$$

$$-\frac{dV}{dr} = m \frac{d^2 r}{dt^2}$$

Elektrony wykazują zarówno cząsteczkowe jak i falowe właściwości oraz są zbyt małe, aby można było je opisać za pomocą praw mechaniki klasycznej. Opis elektronu przedstawia, zawierające funkcję falową Ψ , czasowo-zależne równanie Schrödingera ($\hbar = h/2\pi$, h – stała Plancka):

$$H \Psi = i \hbar \frac{\partial \Psi}{\partial t}$$

Operator Hamiltona H (Hamiltonian) jest niezależny od czasu, dlatego z powyższego równania można wydzielić człon czasowo-niezależny (równanie trzecie):

$$H(r, t) = H(r)$$

$$\Psi(r, t) = \Psi(r) e^{-iEt/\hbar}$$

$$H(r) \Psi(r) = E \Psi(r)$$

Czasowo-niezależne równanie Schrödingera opisuje cząsteczkowo-falową naturę elektronu, a kwadrat funkcji falowej daje prawdopodobieństwo znalezienia elektronu w danym położeniu.

W ogólnym, N-cząstkowym układzie, Hamiltonian zawiera kinetyczną (T) i potencjalną (V) energię dla wszystkich cząstek (operator energii potencjalnej jest operatorem kulombowskim):

$$H = T + V$$

$$T = \sum_{i=1}^N T_i = - \sum_{i=1}^N \frac{\hbar^2}{2m_i} \nabla_i^2, \text{ gdzie } \nabla_i^2 = \left(\frac{\partial^2}{\partial x_i^2} + \frac{\partial^2}{\partial y_i^2} + \frac{\partial^2}{\partial z_i^2} \right)$$

$$V = \sum_{i=1}^N \sum_{j>1}^N V_{ij}$$

Jądra atomowe są o wiele bardziej masywne od elektronów, dlatego prędkości ich poruszania się są o wiele mniejsze. Dobrym przybliżeniem równania Schrödingera, staje się w takim przypadku podział na dwie części, z których jedna opisuje funkcję falową elektronu dla stałej geometrii a druga jądrową funkcję falową, gdzie energia z elektronowej funkcji falowej przyjmuje rolę energii potencjalnej. Jest to przybliżenie Borna-Oppenheimera. W ten sposób funkcja falowa elektronu zależy parametrycznie od położenia jąder atomowych ale nie od ich ruchu. Natomiast, jądra atomowe poruszają się w przestrzeni energii potencjalnej, która jest rozwiązaniem równania Schrödingera dla elektronów. Takie przybliżenie jest zwykle wystarczające i dla cząsteczki wodoru błąd wynosi 0,0001 % a dla układów z cięższymi jądrami jest jeszcze mniejszy. W praktyce, jedynie w niewielkiej ilości przypadków udaje się rozwiązać elektronowe równanie Schrödingera z taką dokładnością, np. zwykle pomija się efekty związane z nakładaniem jądrowo-elektronowym i inne, co znacznie przyspiesza obliczenia.

Rozwiązanie elektronowego równania Schrödingera dla odpowiednio dużej liczby geometrii jądrowych i kilku stanów elektronowych, pozwala na określenie przestrzeni energii potencjalnej, która może być użyta podczas rozwiązywania jądrowej części równania Schrödingera. Dlatego też, metody rozwiązujące równanie Schrödingera, silnie zależą od obliczeń elektronowo-strukturalnych. W praktyce, zbudowanie przestrzeni energii potencjalnej dla cząsteczki zawierającej 3 – 4 atomy jest niemożliwe, np. dla trzech atomów mających po trzy współrzędne, musi być przeprowadzonych 10^3 pojedynczych obliczeń. Większe układy są, więc poza zasięgiem możliwości. Jednak, ograniczenie obliczeń do mającej wpływ na właściwości chemiczne, części przestrzeni energii potencjalnej, umożliwia otrzymanie, chociaż nie całościowych, to jednak użytecznych informacji. Ta ważna część

przestrzeni energii potencjalnej jest zwykle związana z rozmieszczeniem jąder atomowych. Dlatego też, chemia określa energię jako funkcję rozmieszczenia atomów w cząsteczce, natomiast właściwości cząsteczki uzyskuje się badając zmiany energii podczas zmian określonych warunków.

Metody pola siłowego

W obliczeniach opartych na metodach pola siłowego pomija się krok związany z wyznaczeniem energii elektronowej dla danej konfiguracji jąder atomowych. W zamian, energię elektronową definiuje się jako parametryczną funkcję jąder atomowych. Użyte parametry uzyskuje się albo drogą eksperymentalną albo wykorzystując dane z innych obliczeń o wysokiej precyzji. Cząsteczki są zwykle opisane jako atomy połączone wiązaniami. Poszczególne atomy mogą mieć różne rozmiary i „miętkość” a wiązania mogą być mniej lub bardziej „sztywne”. Takie podejście prowadzi do metod mechaniki molekularnej⁸¹⁻⁸³, które używają parametrów Allingera MM2 i MM3^{84,85} w celu opisu specyficznych przypadków. W tabeli 1. przedstawione są parametry MM2 dla wybranych atomów. Idea przedstawienia cząsteczek jako zbioru atomów oraz grup funkcyjnych podzieliła atomy na różne typy atomowe z przypisanymi im numerami i parametrami. Dla przykładu, mający hybrydyzację sp^2 atom C może być typu 2, 3 lub 50 w zależności od tego, jakie posiada atomy sąsiadujące. Przyspiesza to znacznie obliczenia a niezwykle trafne wyjściowe parametry strukturalne otrzymane przy użyciu metod pola siłowego (w szczególności MM2 i MM3) powodują, że metody te są często używane jako metody przedoptymalizacyjne dla innych metod chemii teoretycznej.

Tabela 1. Typy atomów o numerach 1 – 18 dla zestawu parametrów MM2(91), gdzie pełen zestaw zawiera atomy 71 typów.

Typ	Symbol	Opis	Typ	Symbol	Opis
1	C	sp^3	10	N	sp
2	C	sp^2 , alkeny	11	F	
3	C	sp^2 , karbonyl, iminy	12	Cl	
4	C	sp	13	Br	
5	H	z wyjątkiem N i O	14	I	
6	O	sp^3	15	S	R_2S
7	O	sp^2 , karbonyl	16	S+	R_3S^+
8	N	sp^3	17	S	R_2SO
9	N	sp^2 , amidy	18	S	R_2SO_2

Energia pola siłowego jest sumą składników (funkcjonałów) opisujących energię potrzebną do zniekształcenia cząsteczki w określony sposób:

$$E_{FF} = E_{str} + E_{bend} + E_{tors} + E_{vdw} + E_{el} + E_{cross}$$

gdzie E_{str} jest funkcją energii rozciągania wiązania pomiędzy dwoma atomami, E_{bend} odpowiada energii potrzebnej do zmiany kąta wiązania, E_{tors} jest energią torsyjną obrotu wokół wiązania, E_{vdw} i E_{el} opisują oddziaływania nie powiązanych ze sobą atomów, E_{cross} opisuje nakładanie się trzech pierwszych składników energii (E_{str} , E_{bend} , E_{tors}).

Różne podejścia do sposobu rozwiązywania poszczególnych składników równania energii pola siłowego zaowocowały powstaniem szeregu metod, z których najpopularniejsze to MM2, MM3, AMBER⁸⁶, OPLS⁸⁷, GROMOS⁸⁸. Są one zwykle przystosowane do określonych grup związków chemicznych, bądź też można je używać bardziej ogólnie, np. MM2, MM3 mają zastosowanie ogólne, AMBER, GROMOS, OPLS używa się w przypadku protein, kwasów nukleinowych i węglowodorów.

Metody struktury elektronowej

W przypadku, kiedy opis rozkładu elektronowego jest niezbędny i nie może być uproszczony przez wprowadzenie sparametryzowanej funkcji, należy skoncentrować się na rozwiązaniu czasowo-zależnego równania Schrödingera, którego operator można przedstawić:

$$H \Psi = E \Psi$$

Jeśli do rozwiązania nie użyto parametrów doświadczalnych, mamy do czynienia z metodami *ab initio* (od początku), jeśli nie, są to metody pół-empiryczne.

W przybliżeniu Borna-Oppenheimera operator Hamiltona może być zapisany jako suma energii kinetycznej i potencjalnej jąder atomowych oraz elektronów:

$$H_{tot} = T_n + T_e + V_{ne} + V_{ee} + V_{nm}$$

Nie wprowadzając dodatkowych przybliżeń, funkcję falową można opisać jako rozszerzenie zbioru funkcji elektronowych ze współczynnikami będącymi funkcjami położenia jąder atomowych:

$$\Psi_{tot}(R,r) = \sum_{i=1}^{\infty} \Psi_{ni}(R) \Psi_i(R,r)$$

w sumie daje to:

$$\sum_{i=1}^{\infty} (T_n + H_e + H_{mp}) \Psi_{ni}(R) \Psi_i(R,r) = E_{tot} \sum_{i=1}^{\infty} \Psi_{ni}(R) \Psi_i(R,r)$$

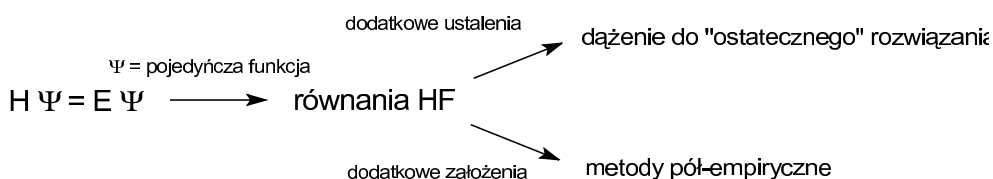
gdzie:

$$H_{\text{tot}} = T_n + H_e + H_{\text{mp}}, H_e = T_e + V_{ne} + V_{ee} + V_{nm}, H_{\text{mp}} = -\frac{1}{2M_{\text{tot}}} \left(\sum_{i=1}^N \nabla_i \right)^2$$

po przeniesieniu Hamiltonianu do centrum masy układu i podzieleniu go na H_e , który staje się elektronowym operatorem Hamiltona i H_{mp} nazywanym masą polaryzacyjną. Złożoność matematyczna tak przedstawionej funkcji, bez zastosowania kolejnych uproszczeń i założeń, umożliwia uzyskanie rozwiązania jedynie dla jednoelektronowych układów, np. H_2^+ .

Pierwszym krokiem na drodze do uproszczenia problemu rozwiązania równania Schrödingera jest pominięcie efektów relatywistycznych przy jednoczesnym wprowadzeniu spinu elektronowego jako efektu kwantowego. Dzięki operacji wprowadzenia funkcji spinowej możliwe staje się rozbitcie pierwotnej funkcji na składowe elektronowe. W ten sposób poszukiwanie rozwiązania będzie polegało na wprowadzeniu takich uproszczeń i/lub zasad, które pozwolą na stwierdzenie, że każda przybliżona funkcja falowa posiada energię zbliżoną lub taką samą, jaką posiada funkcja pierwotna. Jeśli taka funkcja będzie zawierała określoną liczbę parametrów to poszukiwanie rozwiązania będzie polegało na znalezieniu minimum energii funkcji tych parametrów.

Asymetria funkcji falowej, będąca konsekwencją zakazu Pauliego, umożliwia opisanie elektronowego równania Schrödingera za pomocą jedno-elektronowych funkcji (orbitali molekularnych), które są konsekwencją przestrzenno-czasowo-zależnych funkcji spinowych, budujących macierz korelacji. Uproszczenie macierzy korelacji do pojedynczej, wyjściowej do dalszych przybliżeń, funkcji falowej, jest kolejnym ważnym uproszczeniem, zaniebującym korelacje elektronowe i uśredniającym efekt odpychania się elektronów. Dodając, do tak otrzymanej funkcji określone zasady, otrzymujemy równania Hartree-Focka, które, po wprowadzeniu kolejnych uproszczeń, prowadzą do metod pół-empirycznych lub przez dodatkowe ustalenia, dają rozwiązania przybliżające dokładne rozwiązanie równania Schrödingera⁸⁹⁻⁹³. Te pierwsze, umożliwiają rozwiązywanie konkretnych problemów chemii teoretycznej w określonym czasie, te drugie stanowią oddzielną gałąź metod chemii teoretycznej i są wyzwaniem samym w sobie (rysunek 1.).



Rysunek 1. Metody chemii teoretycznej

Metody pół-empiryczne

Bezpośrednim wynikiem zastosowania pojedynczej funkcji falowej i wprowadzeniem efektywnego operatora Focka (na podstawie kolejnych operacji matematycznych) jest możliwość interakcyjnego określenia parametrów zajętych orbitali molekularnych, jako zbioru funkcji, inaczej pola samo-zawierających się orbitali SCF. Potencjał pola SCF odpowiada potencjałowi będącemu wynikiem rozmieszczenia elektronów. W ten sposób energia zależy jedynie od zajętych orbitali molekularnych. Zmniejszenie czasu obliczeń poprzez zredukowanie liczby dwu-elektronowych całek macierzy Focka, jest wstępem do metod pół-empirycznych^{94,95}.

Następnym krokiem upraszczającym obliczenia jest oddzielenie elektronów walencyjnych od rdzenia elektronowo-jądrowego. Oddziaływanie nie-walencyjnych elektronów uwzględnia się poprzez modyfikacje ładunku jądra lub wprowadzenie funkcji odpychania tych elektronów od jądra. Później, dla elektronów walencyjnych dochodzi do ograniczenia zbioru funkcji falowych do niezbędnego minimum. Atom wodoru posiada, więc jedną funkcję a reszta atomów drugiego i trzeciego okresu po cztery (jedną s i trzy p: p_x , p_y , p_z). Warto wspomnieć, że pomimo zwiększenia się mocy obliczeniowej obecnych systemów, to ograniczenie zachowało wiele metod pół-empirycznych używanych do tej pory.

Głównym założeniem metod pół-empirycznych jest zaniedbanie wszystkich wyników podstawowych funkcji falowych w przypadku, kiedy te same współrzędne elektronowe odpowiadają różnym atomom (uproszczenie ZDO). Konsekwencją takiego założenia jest zmniejszenie się macierzy nakładania do jednostkowej, całki jedno-elektronowe zawierające trzy centra przyjmują wartość 0, wszystkie całki trzy i cztero-elektronowe zostają pominięte. Aby zniwelować powyższe uproszczenia, wprowadza się parametry otrzymane z prostych obliczeń (przedoptymalizacja) lub danych eksperymentalnych. Ilość pominiętych całek i sposób przeprowadzenia parametryzacji definiują szereg metod pół-empirycznych.

Metody NDDO

Metody NDDO nie odrzucają uproszczenia związanego z nakładaniem się całek elektronowych. Jedną z odmian INDO, dodatkowo zaniedbuje wszystkie niekulombowskie całki dwu-centrowe, jeśli są dwu-elektronowe. Sumaryczna energia musi być niezależna od obrotu układu a niektóre całki są zdefiniowane jako niezwiązane z rodzajem orbitali. W konsekwencji zanikają całki zawierające dwie różne funkcje dla tego samego atomu. Mimo to, metoda INDO daje dobre przybliżenie rozmieszczenia elektronów walencyjnych i jest stosowana przy wyznaczaniu parametrów elektronowych cząsteczek dla widm UV i Vis⁹⁶.

Całkowite pominięcie nakładających się całek prowadzi do zachowania jedynie jedno i dwu-centrowych całek dwu-elektronowych w metodzie CNDO. Pozostałe uproszczenia pozostają takie same jak w metodzie INDO.

Największą różnicą pomiędzy metodami CNDO, INDO i NDDO jest traktowanie całek dwu-elektronowych. Podczas gdy dwie pierwsze redukują je do zaledwie dwóch parametrów, NDDO zachowuje wszystkie całki jedno i dwu-centrowe. Daje to i tak tylko 27 różnych całek odpowiadających kombinacji orbitali s i p, kiedy ich całkowita liczba wynosi około 500 dla orbitali s, p i d.

Anulowanie części uproszczeń w metodach NDDO/INDO/CNDO nie zmienia faktu znacznego obniżenia jakości funkcji falowej. Wprowadzenie do nich dodatkowych parametrów jest możliwe poprzez wyznaczenie wymaganych stałych z funkcji falowych orbitali atomowych lub przez sparowanie wartości otrzymanych z danych eksperymentalnych. Możliwa jest też parametryzacja w wyniku dopasowania danych obliczonych do dużej liczby danych doświadczalnych.

W zależności od tego, jakie właściwości cząsteczki mają być wyznaczone, stosuje się zwykle pierwszy lub drugi sposób uzyskania parametrów⁹⁷. W ten sposób otrzymano szereg metod do ogólnych lub specyficznych zastosowań: CNDO/1, CNDO/2, INDO/1, INDO/S, SINDO1, itd., gdzie INDO/S⁹⁸ zawiera specjalny zestaw parametrów dla widm elektronowych cząsteczek i jest jedyną, obok SINDO1⁹⁹ używaną do tej pory metodą z grupy INDO.

Metody MINDO

Odpowiednia kombinacja parametrów uzyskanych z danych doświadczalnych i w wyniku dopasowania do nich danych obliczonych, doprowadziła do stworzenia nowej grupy metod nazywanych zmodyfikowanymi, ponieważ ich parametry zostały uzyskane przez fitowanie. Pierwsze dwie wersje MINDO/1 i MINDO/2 z powodu słabych wyników, nie miały zastosowania, natomiast następna wersja MINDO/3 (1975)¹⁰⁰ była pierwszą metodą mechaniki kwantowej dającą dobre rezultaty przy stosunkowo małych nakładach na systemy obliczeniowe. MINDO/3 zawiera parametry dla H, B, C, N, O, F, Si, P, S i Cl jednak większości kombinacji pomiędzy tymi elementami została pominięta, dlatego dzisiaj jej zastosowanie jest sporadyczne. Najnowsza odmiana MNDO zawiera parametry dla większej liczby atomów i dla wszystkich par sparowanych atomów, jednak prawdopodobnie nie będzie dalej rozwijana w przyszłości.

Metody MNDO, AM1, PM3 i PM5

Metody MNDO, AM1, PM3 i PM5 są pochodnymi modelu NDDO¹⁰¹ i podobnie jak on, zawierają parametry odpowiadające naturze pojedynczych atomów. Różnica polega na sposobie przypisania parametrów i potraktowaniu odpychania się rdzeni. Wszystkie te metody biorą pod uwagę tylko elektrony walencyjne jako funkcje orbitali s i p.

Obecnie metoda MNDO¹⁰² i jej pochodna MNDOC^{103,104} zostały zastąpione nowszymi AM1 i PM3, które nie posiadają wielu ograniczeń metody MNDO, takich jak niemożność uwzględnienia oddziaływań wodorowych. Jednak zaletą metody MNDO jest posiadanie zestawu parametrów dla kilku atomów pierwiastków przejściowych.

Metoda AM1 (*Austin Model 1*)¹⁰⁵ została wprowadzona w celu poprawienia funkcji rdzeniowej metody MNDO i jej kilku ograniczeń, zastępując je swoimi własnymi. Podstawowe elementy zawarte w tej metodzie to: H, B, C, N, O, F, Al., Si, P, S, Cl, Zn, Ge, Br, I i Hg.

Zmiana procesu parametryzacji zaowocowała powstaniem metody PM3 zaproponowanej przez Stewarda¹⁰⁶, w wyniku czego scharakteryzowano znacznie większą ilość atomów, np. Ga, Zn, Cd, In, Hg i w dalszym ciągu jest to rozwijane, czego przykładem jest najnowsza PM5. Jednak nadal pozostały wspólne ograniczenia tych metod, takie jak zbyt duże błędy przy określaniu oddziaływań słabych: van der Waalsa i wiązań wodorowych oraz zbyt mała ilość danych eksperymentalnych wykorzystanych przy wyznaczeniu parametrów dla metali ciężkich.

Metody wykorzystujące funkcje orbitali d

Dużym minusem metod MNDO, AM1 i PM3 są trudności z poprawnym wykonaniem obliczeń dla układów zawierających atomy metali ciężkich. Z obliczeń *ab initio* wynika, że uwzględnienie orbitali d znacznie poprawia jakość uzyskiwanych wyników. Jednak dużym problemem jest zwiększenie liczby całek dwu-elektronowych z 22 do 491. Dlatego dopiero niedawno, Thiel i Voityuk zbudowali działający model NDDO, zawierający niektóre funkcje dla orbitali d, będący pochodną metody MNDO: MNDO/d^{107,108}.

Obecnie, metody pół-empiryczne rozwijane są w celu zwiększenia dokładności otrzymywanych wyników i możliwości ich przeprowadzenia na dowolnej kombinacji atomów pierwiastków grup głównych. Takim przykładem jest metoda PM5¹⁰⁹, która zawiera wszystkie takie parametry, między innymi dla Mg i Ca, pierwiastków ważnych biologicznie. Dodatkowo, w niektórych przypadkach, jej dokładność została zwiększona nawet do czterech razy w stosunku do metod AM1 i PM3. Natomiast, w najnowszej odmianie metody AM1:

AM1-d, wprowadzono parametry związane z orbitalami d dla kilku pierwiastków ciężkich: Ti, V, Fe, Cu, Mo, Pd, Ag i Pt^{109,110}. Porównanie średnich ciepł tworzenia dla wybranych pierwiastków wyznaczonych przy użyciu pół-empirycznych Hamiltonianów MNDO, AM1, PM3 i PM5 przedstawia tabela 2.

Tabela 2. Błędy średnie ciepła tworzenia dla wybranych pierwiastków wyznaczonych przy użyciu pół-empirycznych Hamiltonianów MNDO, AM1, PM3 i PM5 (kcal/mol)¹¹⁰.

Symbol	MNDO	AM1	PM3	PM5
H	14.15	9.70	8.06	6.38
Li	7.51	5.30	13.49	8.40
C	15.92	10.72	8.01	6.51
N	15.74	11.53	8.70	6.64
O	22.36	11.57	9.67	7.97
Mg	6.06	6.50	16.07	4.77
Ca	4.68	4.53	3.91	2.83
Co	23.75	14.28	9.32	16.59
Cu	7.03	14.41	13.21	6.43
Zn	25.72	21.94	11.36	1.19
Ga	15.14	25.84	16.99	6.75
Ag	6.82	3.77	6.90	2.76
Pb	25.52	8.94	20.48	3.92

Metody EHM (EHT)

Zaproponowane przez Hoffmanna¹¹¹ metody EHM (Metody Rozszerzonej Teorii Hückla), nie wprowadzają uproszczenia ZDO, jednak pod uwagę biorą tylko elektrony walencyjne. W rezultacie jedynie atomowe potencjały jonizacji są wymagane do parametryzacji, przeprowadzonej dla całego układu okresowego. Dzięki temu metody te mogą zostać wykorzystane przy obliczeniach dużych systemów zawierających atomy pierwiastków ciężkich. Ich stosunkowo duże uproszczenia, powodują, że praktyczne zastosowanie znalazły one jako metody przedoptymalizacyjne do obliczeń *ab initio* lub w powiązaniu z innymi teoriami, np. FMO¹¹² (Graniczna Teoria Orbitali Molekularnych).

Metody struktury elektronowej opierające się na równaniach HF oraz wykorzystujące procedury SCF^{96,110} znajdują szerokie zastosowanie dzięki uproszczeniu i przyspieszeniu procedury obliczeniowej. Jednak, nie mogą być one źródłem dokładnych wyników ze względu na nieuwzględnienie korelacji elektronowej (z założenia). Z drugiej strony dane

eksperymentalne będące podstawą parametrów użytych w tych metodach, korelację elektronową uwzględniają.

Metody korelacji elektronowej

W metodach Hartree-Focka oddziaływanie między elektronami jest uśrednione, co zwykle odpowiada 99% całkowitej energii układu. Niekiedy, pozostałe 1% energii może być równie ważne dla opisu procesu chemicznego. Różnica pomiędzy energią HF a najmniejszą możliwą energią nazywana jest Korelacją Elektronową (EC)^{89-91,113}. Odpowiada ona energii odchylenia ruchu skorelowanych elektronów od opisanej równaniami HF. W metodach korelacji, elektrony są traktowane parami, zajmują te same miejsce w przestrzeni i różnią się funkcją spinową. Wartość funkcji nakładania się elektronów dla tej samej pary wynosi 1 a dla różnych par 0. Jednak całki odpowiadające odpychaniu elektronów z tej samej pary zawierają w sobie elementy wszystkich orbitali molekularnych. W rezultacie, korelacja pomiędzy elektronami pary, stanowi główną część całkowitej korelacji elektronowej. Jest to zgodne z zasadą Pauliego, która postuluje brak międzyorbitalnej korelacji między elektronami o tym samym spinie (korelacja Fermiego) i jej istnienie między elektronami o różnym spinie (korelacja Kulombowska).

Do opisu korelacji elektronowych używane są funkcje falowe w postaci UHF (Unrestricted Hartree-Fock) lub RHF (Restricted Hartree-Fock). Możliwość uwzględnienia stanów wzbudzonych prowadzi do wykorzystania operatorów mogących zawierać od 1 do n orbitali wzbudzonych ($n=1$: Single, S-type, $n=2$: Double, D-type, $n=3$: Triple, T- type, itd.). W ten sposób, im więcej możliwych korelacji będzie uwzględnionych i im większa ilość wielo-elektronowych operatorów będzie użyta, tym dokładniejszy wynik otrzymamy.

W celu wyznaczenia korelacji elektronowej, używana jest metoda Oddziaływania Konfiguracji (CI), metoda MP¹⁴ będąca odmianą Wielo-Wątkowej Teorii Zmian (MBPT) lub metoda Łączenia Grup (CC)¹¹⁵. Najczęściej spotykana, metoda CI uwzględnia korelacje pomiędzy szeregiem możliwych konfiguracji elektronowych (np. pojedynczy elektron zajmujący molekularny orbital antywiązący może znajdować się w $n/2$ możliwych stanach, gdzie n – liczba wszystkich orbitali molekularnych cząsteczki). Ponieważ uwzględnienie pełnej korelacji jest możliwe jedynie dla małych układów, stosuje się różnego rodzaju procedury upraszczające obliczenia, np. MCSCF¹¹⁶, CASSCF i RASSCF¹¹⁷ i jednocześnie pozwalające na podejście typu interakcyjnego oraz ograniczenie przestrzeni funkcji falowej do 10-12 elektrono-orbitali (tabela 3.).

Tabela 3. Liczba konfiguracji operatorów utworzonych przez [n,n]-CASSCF funkcję falową, gdzie n – liczba elektronów.

n	liczba konfiguracji	n	liczba konfiguracji
2	3	10	19 404
4	20	12	226 512
6	175	14	2 760 615
8	1 764		

Uwzględnienie wyższych korelacji prowadzi do bardziej zaawansowanych metod, które, ze względu na zastosowane procedury dzielimy według stopnia korelacji (od najniższego do najwyższego) na metody CI: CISD, CISDT i CISDTQ, metody MP: MP2, MP3, MP4(SDQ), MP5...MP7 oraz metody CC: CC2, CCSD, CCSD(T), CC3, CCSDT, CCSDQ (stopień korelacji wynosi od 5 do 10 w zależności od metody). Warto zaznaczyć, że dla tego samego stopnia korelacji dokładność obliczeń zmienia się wzrastająco w szeregu: CI < MP < CC.

Metody *ab initio*

Metody *ab initio*⁹¹ rozwiązują równanie Schrödingera bez użycia parametrów, które mają odniesienie do danych eksperymentalnych. Dane eksperymentalne mogą być wykorzystane, albo w celu wybrania odpowiedniego modelu obliczeniowego, albo jako metody przedoptymalizacyjne. Jedynym uproszczeniem dla tych metod jest zastosowanie odpowiedniego zestawu funkcji bazowych, które dzielą się na orbitale STO (Slaytera)¹¹⁸ i GTO (Gausa)¹¹⁹.

Po wybraniu rodzaju stosowanych orbitali (w zależności od celu obliczeń), należy dokonać wyboru ilości funkcji, które zostaną użyte. Ilość funkcji zwiększa się wraz ze wzrostem liczby atomowej danego pierwiastka i np. dla pierwiastków trzeciego okresu są to trzy funkcje typu s (1s, 2s i 3s) oraz dwa zestawy funkcji p (2p i 3p). Następnym krokiem jest zwielokrotnienie ilości funkcji bazy podstawowej (DZ – podwójnie, TZ – potrójnie, QZ – poczwórnice, itd.) w celu uwzględnienia różnego stopnia dystrybucji elektronów w różnych kierunkach. W dalszej kolejności zostają wprowadzone funkcje polaryzacyjne biorące pod uwagę nierówny stopień polaryzacji orbitali, np. DZP oznacza podwójny zestaw funkcji bazowych z dodatkiem funkcji polaryzacyjnych.

Największy wkład do sumarycznej energii wyznaczonej przy uwzględnieniu funkcji bazowej, zawierającej wszystkie orbitale, wnoszą orbitale 1s. Energie elektronów 1s są

wyznaczone z o wiele większą dokładnością niż energie elektronów walencyjnych (za wyjątkiem H). Ponieważ to elektrony walencyjne wpływają na właściwości chemiczne pierwiastków, za podstawę do dalszych obliczeń przyjęto umowny zestaw funkcji bazowych wynikający z rozdzielenia funkcji orbitali rdzenia od orbitali walencyjnych. W ten sposób zestaw funkcji podstawowych (PGTO) został zredukowany do jednej funkcji rdzenia zawierającej kombinację pierwotnych orbitali wewnątrzpowłokowych i odpowiedniej liczby orbitali walencyjnych (w sumie: CGTO). Sposób redukcji zestawu funkcji podstawowych określa rodzaj funkcji kombinowanej, z których najczęściej używane dla są: 3-21G¹²⁰ (orbital rdzenia jest kombinacją trzech orbitali PTGO, wewnętrzna część orbitali walencyjnych składa się z 2 orbitali PTGO a zewnętrzna z jednego orbitala PTGO), 6-31G¹²¹ i 6-311G¹²². Dodatkowo, obecność „+” i/lub * oznacza dodanie odpowiednich funkcji dyfuzyjnych¹²³ i/lub polaryzacyjnych.

Wprowadzenie następnego poziomu oznaczeń związanego ze sposobem i poziomem przeprowadzania optymalizacji spowodowało pojawienie się symboli G1¹²⁴, G2^{124,125}, G2(MP2)¹²⁶, G2(MP2,SVP)¹²⁷, CBS-4, CBS-q, CBS-Q, CBS-APNO¹²⁸, itd. (zagadnienie jest zbyt obszerne do omawiania w tym miejscu).

Metody DFT

Wprowadzona przez Hohenberga i Kohna Teoria Gęstości Funkcjonału (DFT)¹²⁹ postuluje zależność energii układu jedynie od gęstości elektronowej. Gęstość elektronowa określona jest w trzech wymiarach. Podczas, gdy złożoność układu rośnie, poprzez wzrost liczby elektronów, gęstość elektronowa posiada ciągle taką samą liczbę zmiennych, niezależną od wielkości systemu. Problemem jest jednak nieznana zależność między różnym rozkładem gęstości elektronowej a energią układu. Celem metod DFT jest, więc poszukiwanie związku pomiędzy tymi dwoma wielkościami¹³⁰⁻¹³⁴.

Metody DFT wprowadzają podział operatora energii na składową kinetyczną, oddziaływania między jądrami i elektronami oraz związaną z odpychaniem się elektronów. Jednocześnie, jedynie całkowita gęstość elektronowa musi zostać wzięta pod uwagę w celu wyznaczenia poszczególnych składowych (zwłaszcza składowej kinetycznej). Nie wchodząc w szczegóły, wprowadzenie uproszczeń, np. LSDA (potraktowanie gęstości elektronowej jako gazu elektronowego o zwykłych właściwościach), zastosowane korekcje gradientu i metod hybrydowych, doprowadziło do powstania szeregu metod: G2, LSDA, LYP, P86, PW91, BLYP, BP86, BPW91, B3LYP, B3P86, B3PW91 różniących się podejściem do

rozwiązywanego problemu, ale i posiadających określone ograniczenia¹³⁵. Różnicę średniej energii otrzymanej dla wybranych metod DFT przedstawia tabela 4.

Tabela 4. Różnica średniej energii (kcal/mol) w stosunku do dokładnego rozwiązania równania Schrödingera dla wybranych metod DFT.

	G2	LSDA	B88	BPW91	B3PW91
Ciepło tworzenia atomu	1.2	35.7	3.9	5.7	2.4
Potencjał jonizacji	1.4	6.3	11.2	4.1	3.8
Nukleofilowość	1.0	5.6	2.4	1.5	1.2

W przypadku metod DFT mamy do czynienia z wykorzystaniem niewielkiej liczby parametrów uzyskanych z danych doświadczalnych oraz z procedurami korekcji gradientu. Z drugiej strony brak jest parametrów odpowiadających energii, która jest funkcją gęstości elektronowej. Metody DFT możemy, więc traktować jako metody *ab initio*, gdzie procedury korekcji w niezwykle efektywny sposób przyspieszają rozwiązanie trudnych teoretycznych problemów. Brak jest jednak możliwości przeprowadzenia systematycznych obliczeń w celu poprawy precyzji wyników i oceny pewnych błędów. Dokładność metod DFT klasyfikuje je w pobliżu metod pół-empirycznych, mimo to, zastosowanie gradientu i metod hybrydowych, powoduje, że wyniki są zwykle bardziej dokładne. Wielką zaletą metod DFT jest niewiele większy czas obliczeń w stosunku do metod HF. Wiązania wodorowe są również dobrze zaimplementowane w tych metodach. Jednocześnie stosunkowo niewielka ilość układów została skalibrowana a wyniki obliczeń dla stanów wzbudzonych pozostawiają wiele do życzenia. Z tych wszystkich powodów, jest to ważna grupa metod dla układów, w przypadku których niezwykle duża dokładność nie jest wymagana.

Obliczenia w chemii teoretycznej

Metody pola siłowego, HF, pół-empiryczne, *ab initio* wraz z określonymi funkcjami bazowymi i dodatkami w postaci algorytmów generowania szeregu konformacji cząsteczki, występują w pakietach i programach obliczeniowych na różne platformy sprzętowe. Z reguły jeden pakiet obliczeniowy zawiera w sobie wybraną grupę metod i dodatek w postaci możliwości przeprowadzenia obliczeń z wykorzystaniem algorytmów innej metody. Jest to spowodowane specjalizowaniem się oprogramowania a wyniki uzyskane przez wykorzystanie drugiego zestawu metod dostępnych w danych pakiecie mogą być ograniczone dostępną bazą funkcji falowych. Przykładowy pakiet przeznaczony do obliczeń pół-empirycznych FUJITSU

CACHE Pro 6.1 zawiera w sobie całe spektrum metod pół-empirycznych i funkcji SCF, natomiast dodatek w postaci metod *ab initio* jedynie trzy podstawowe bazy funkcyjne. Natomiast, specjalizujący się w obliczeniach *ab initio* DGAUSS zawiera o wiele szerszą bazę funkcji falowych, choć umożliwia przeprowadzenie prostych obliczeń pół-empirycznych. W wyniku takiej sytuacji, grupy badawcze specjalizują się w konkretnych metodach obliczeniowych do konkretnych zastosowań. Z drugiej strony, szersze podejście do danego problemu wymaga jednoczesnego zastosowania większej ilości programów obliczeniowych. Najbardziej znane pakiety, to oprócz wymienionych wyżej: SYBYL, AMBER, HYPER-CHEM, MOPAC, CHEM OFFICE, itd.

Dobór platformy obliczeniowej jest również ważny. Systemy przetwarzania równoległego (UNIX, LINUX, klastery, systemy wieloprocesorowe) umożliwiają podział obliczeń na równoległe wątki i znaczne przyspieszenie wykonywania procedur. Systemy jednowątkowe (starsze wersje MS WINDOWS, systemy jednoprocessorowe) przetwarzają procedury *po kolei*. Nie oznacza to jednak, że w przypadku każdego zastosowania obliczenia w systemach jednowątkowych są wolniejsze. Przykładowo, obliczenia pół-empiryczne korzystają z procedur typu interakcyjnego, gdzie każdy następny ciąg obliczeń bazuje na poprzednim. Szybkie systemy mogą, zupełnie dobrze radzić sobie z tego typu problemami i najczęściej służą do generowania struktur przedoptymalizacyjnych dla metod *ab initio*.

Podziękowania:

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

Literatura:

1. H. Eyring, J. Walter, G. E. Kimball, *Chemia Kwantowa*, PWN, Warszawa, 1961.
2. A. Hinchcliffe, *Modelling Molecular Structure*, Wiley, 1996.
3. D. M. Hirst, *A Computational Approach to Chemistry*, Blackwell, 1990.
4. T. Clark, *A Handbook of Computational Chemistry*, Wiley, 1985.
5. L. Piela, *Idee Chemii Kwantowej*, PWN, Warszawa, 2003, str 14.
6. M. Born, *Zeitschrift für Physik*, 1926, 37, 863.
7. E. A. Hylleraas, *Zeitschrift für Physik*, 1930, 65, 209.
8. R. F. Nalewajski, *Podstawy i Metody Chemii Kwantowej*, PWN, Warszawa, 2001, str 24.
9. W. Ritz, *Zeitschrift für Reine and Angewandte Mathematik*, 1909, 135, 1.
10. E. Steiner, *Matematyka dla Chemików*, PWN, Warszawa, 2001, str 499.
11. H. Margenau, G. M. Murphy, *Matematyka w Fizyce i Chemii*, PWN, Warszawa, 1962.
12. J. O. Hirschfelder, W. B. Brown, S. T. Epstein, *Adv. Quantum Chem.*, 1964, 1, 255.
13. J. Hinze, A. Aljiah, L. Wolniwicz, *Pol. J. Chem.*, 1998, 72, 1293.
14. W. Kołos, *Adv. Quantum Chem.*, 1970, 5, 99.
15. M. Born, J. R. Oppenheimer, *Annalen der Physik*, 1927, 84, 457.
16. M. Bixon, S. Lifson, *Tetrahedron*, 1967, 23, 769.
17. U. Dinur, A. T. Hagler, *Rev. Comput. Chem.*, 1991, 2, 99.
18. U. Burkert, N. L. Allinger, *Molecular Mechanics*, ACS Monograph, 1982.
19. A. K. Rappe, C. J. Casewit, *Molecular Mechanics Across Chemistry*, University Science Books, 1997.
20. N. L. Allinger, *J. Am. Chem. Soc.*, 1977, 99, 8127.
21. N. L. Allinger, Y. H. Yuh, J. H. Lii, *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, 111, 8551.
22. W. Fock, *Zeitschrift für Physik*, 1930, 61, 126.
23. J. Slater, *Physical Review*, 1930, 35, 509.
24. C. C. J. Roothaan, *Reviews of Modern Physics*, 1951, 23, 69.
25. G. G. Hall, *Proceedings of the Royal Society (London) A*, 1951, 205, 541.
26. T. C. Koopmans, *Physica*, 1933/1934, 1, 104.
27. C. A. Coulson, *Transactions of the Faraday Society*, 1942, 38, 433.
28. H. Fukutome, *Progress in Theoretical Physics*, 1968, 40, 998.
29. J. Kobus, *Adv. Quantum Chem.*, 1977, 28, 1.
30. R. Bilewicz, A. Więckowska, B. Korybut-Daszkiewicz, N. Feeder, K. Woźniak, *J. Phys. Chem.*, 2000, 104, 11430.

31. A. Szabo, N. S. Ostlund, *Modern Quantum Chemistry*, McGraw-Hill, New York, 1989.
32. T. Helgaker, P. Jorgensen, J. Olsen, *Molecular Electronic-Structure Theory*, Wiley, Chichester, 2000.
33. O. Chalvet, R. Daudel, S. Diner, J. P. Malrieu, *Localizations and Delocalization in Quantum Chemistry*, D. Reidel Publ. Co., Dordrecht, 1975.
34. R. McWeeny, *Methods of Molecular Quantum Mechanics*, Academic Press, 1992.
35. W. J. Hehre, L. Radom, J. A. Pople, P. R. Schleyer, *Ab Initio Molecular Orbital Theory*, Wiley, 1986.
36. J. Simons, *J. Phys. Chem.*, 1991, 95, 1017.
37. J. Simons, J. Nichols, *Quantum Mechanics in Chemistry*, Oxford University Press, 1997.
38. J. Sadley, *Semi-empirical methods of Quantum Chemistry*, Wiley, 1985.
39. M. C. Zerner, *Rev. Comput. Chem.*, 1991, 2, 313.
40. J. Sadlej, *Półempiryczne Metody Chemii Kantowej CNDO, INDO, NDDO*, PWN, Warszawa, 1977.
41. J. Sadlej, *Obliczeniowe Metody Chemii Kwantowej CNDO, INDO, NDDO, ab initio*, PWN, Warszawa, 1988.
42. J. A. Pople, D. P. Santry, G. A. Seal, *J. Chem. Phys.*, 1965, 43, 129, 136.
43. N. Mataga, K. Nishimoto, *Z. Phys. Chem. (Frankfurt)*, 1957, 13, 140.
44. C. E. Ridley, M. C. Zerner, *Theor. Chim. Acta*, 1973, 32, 111.
45. W. P. Anderson, T. Cundari, M. C. Zerner, *Int. J. Quantum Chem.*, 1990, 39, 31.
46. R. C. Bingham, M. J. S. Dewar, D. H. Lo, *J. Am. Chem. Soc.*, 1975, 97, 1285, 1307.
47. K. Jug, D. N. Nanda, *Theor. Chim. Acta*, 1980, 57, 131.
48. M. J. S. Dewar, W. Thiel, *J. Am. Chem. Soc.*, 1977, 99, 4899.
49. J. J. P. Stewart, *QCPE Bull.*, 1990, 10, 86.
50. M. J. S. Dewar, E. G. Zoebisch, E. F. Healy, J. J. P. Stewart, *J. Am. Chem. Soc.*, 1985, 107, 3902.
51. J. J. P. Stewart, *J. Comput. Chem.*, 1989, 10, 209, 221.
52. J. J. P. Stewart, *J. Comput.-Aided Mol. Design*, 1990, 4, 1.
53. J. J. P. Stewart, *Mopac 2000 Manual*, Fujitsu Limited., 1999.
54. J. J. P. Stewart, *Mopac 2002 Manual*, Fujitsu Limited., 2002,
<http://www.cachesoftware.com/mopac/Mopac2002manual/index.html>.
55. W. Kołos, *Chemia Kwantowa*, PWN, Warszawa, 1978.

- 56. A. R. Leach, *Molecular Modelling*, Longman, Singapur, 1996.
- 57. E. I. Shakanovich, A. M. Gutin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, 90, 7195.
- 58. A. Sali, E. I. Shajanovich, M. Karplus, *Nature*, 1994, 369, 248.
- 59. L. Piela, J. Kostrowicki, H. A. Scheraga, *J. Phys. Chem.*, 1989, 93, 3339.

Rozdział 12

Zastosowanie spektroskopii w podczerwieni w badaniach oddziaływań międzycząsteczkowych

Adam Huczyński, Bogumił Brzezinski

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

1. Wstęp

Promieniowanie podczerwone (*ang. infrared*, IR) definiowane jest jako promieniowanie elektromagnetyczne o częstotliwości pomiędzy 14300 do 20 cm⁻¹ (0,7 μm do 500 μm). Zakres ten zwyczajowo dzieli się na trzy podzakresy:

NIR – bliska podczerwień (0,8-2,5 μm, 12500-4000 cm⁻¹, *ang. near infrared*),

MIR – podstawowa (właściwa) podczerwień (2,5-25 μm, 4000-400 cm⁻¹, *ang. mid infrared*)

FIR – daleka podczerwień (25-1000 μm, 10-400 cm⁻¹, *ang. far infrared*).

Absorpcji promieniowania podczerwonego towarzyszą zmiany energii oscylacyjnej i rotacyjnej cząsteczek. Związki chemiczne absorbując promieniowanie IR zmieniają swój moment dipolowy poprzez wykonywanie normalnych drgań cząsteczkowych, cząsteczkowej rotacji i oscylacji, a także drgań sieci oraz złożonych drgań kombinacyjnych, różnicowych i nadtonów normalnych drgań oscylacyjnych. Widma IR gazów nazywa się widmami oscylacyjno-rotacyjnymi, natomiast widma cieczy i ciał stałych widmami oscylacyjnymi, ponieważ rotacja cząsteczek w fazie ciekłej i w ciałach stałych jest zahamowana przez oddziaływania cząsteczkowe, których energia przewyższa energię rotacji molekuł. Częstotliwość i intensywność poszczególnych pasm absorpcji w widmie IR może w pełni charakteryzować związek chemiczny tak, że jego widmo IR może zostać wykorzystane do identyfikacji danego związku. Identyfikacja ta jest w przypadku czystych substancji tak niezawodna, że widma IR wykorzystuje się do badania tożsamościowego substancji np.: przez

Poszczególne grupy funkcyjne związków organicznych charakteryzują się ściśle określonym zakresem absorpcji promieniowania podczerwonego. Częstotliwość, przy której dana grupa funkcyjna absorbuje promieniowanie IR nazywa się częstotliwością grupową. Interpretacja widma IR nieznanego związku polega na przypisaniu zarejestrowanych pasm absorpcji w podczerwieni do znanych częstości grupowych poszczególnych grup funkcyjnych, które są powszechnie znane i stabelaryzowane [3].

The diagram illustrates the typical ranges of vibrational frequencies (in cm⁻¹) for various chemical bonds and functional groups. The x-axis represents the wavenumber from 3000 to 500 cm⁻¹.

- v(C-H)**: ~2850-2960 cm⁻¹
- v(X≡Y)**: ~2100-2260 cm⁻¹
- v(O-H)** (dashed line): ~3200-3600 cm⁻¹
- v(N-H)** (dashed line): ~3300-3500 cm⁻¹
- v(S-H)**: ~2550-2700 cm⁻¹
- v(X=Z)_{asym}**: ~1650-2250 cm⁻¹
- v(P-H), B-H, Si-H**: ~1000-1250 cm⁻¹
- δ(CH_n)**: ~1300-1470 cm⁻¹
- v(C=C)**: ~1620-1680 cm⁻¹
- v(C=O)**: ~1650-1850 cm⁻¹
- δ(NH_n)**: ~1500-1650 cm⁻¹
- C=N, N=O, N=N**: ~2100-2260 cm⁻¹
- v(C-F)**: ~1000-1400 cm⁻¹
- v(S=O)/v(S-O)**: ~1100-1300 cm⁻¹
- v(P=O)/v(P-O)**: ~1000-1300 cm⁻¹
- v(C-X)**: ~500-1000 cm⁻¹
- δ(CCH)**: ~1200-1300 cm⁻¹
- v(C-O)**: ~1000-1300 cm⁻¹
- v(C-Hal) Hal = Cl, Br, I**: ~500-600 cm⁻¹
- v(Si-O)**: ~1000-1200 cm⁻¹
- CH_n rocks**: ~500-1000 cm⁻¹

Z chwilą wprowadzenia do spektroskopii IR pomiarów wykorzystujących transformatę Fouriera, FT-IR (*ang. Fourier transform infrared spectroscopy*) nastąpił gwałtowny skok, tak naukowych jak i komercyjnych zastosowań spektroskopii

w podczerwieni. Informacje uzyskiwane w technice FT-IR są identyczne z tymi uzyskiwanymi w klasycznej spektroskopii w podczerwieni, lecz spektrometry FT-IR cechuje lepsza rozdzielczość spektralna, lepszy stosunek sygnału do szumu oraz krótszy czas wykonania pomiaru. Z tych też powodów spektrometry FT-IR dawno już wyparły klasyczne spektrometry IR.

Wprowadzenie nowych, alternatywnych technik do badań FT-IR, takich jak: technika odbiciowa oraz technika wykorzystująca mikroskop IR ułatwiły analizę mniej standardowych a zarazem „trudniejszych” próbek. Udoskonalenia te sprawiają, że spektroskopia w podczerwieni jest jedną z głównych technik spektroskopowych stosowanych w analizach chemicznych i farmaceutycznych oraz badaniach błon biologicznych, biopolimerów i biosensorów oraz w badaniach mikrobiologicznych [4-6].

2. Metodologia badań w podczerwieni – przygotowanie próbki

Spektroskopia IR jest metodą analityczną, która pozwala badać różne materiały, w różnych ich formach i stanach skupienia, przy wykorzystaniu dwóch metod pomiarowych: transmisyjnej i odbiciowej (refleksyjnej).

2.1 Pomiary transmisyjne

2.1.1 Ciecze

Ciecze bada się jako cienkie filmy pomiędzy płytkami, przepuszczającymi promieniowanie IR. Wybór materiału, z którego wykonane są okienka kuwet determinowany jest ich rozpuszczalnością, odpornością chemiczną i zakresem spektralnym, który jest wymagany do pomiaru. Właściwości najczęściej używanych materiałów w badaniach w podczerwieni zebrane zostały w Tabeli 1. Dla związków organicznych najczęstszym wyborem jest KBr. Dla roztworów wodnych stosuje się często selenek cynku, który jest jednak podatny na działanie kwasów i zasad oraz cechuje się wysokim współczynnikiem załamania światła, co może utrudniać pomiary ilościowe. KBr i inne halogenki metali alkalicznych wrażliwe są na wilgoć i przechowywane muszą być w specjalnych pojemnikach ze środkami suszącymi, ponadto łatwo te materiały zarysować. Doskonałym materiałem optycznym stosowanym powszechnie w pomiarach IR w badaniach większości substancji organicznych i nieorganicznych oraz silnych kwasów jest krzem.

W pomiarach ilościowych cieczy kuwety powinny mieć zdefiniowaną długość drogi optycznej (zazwyczaj w zakresie 0,01mm do 2,0 mm), co nie jest wymagane w typowych

pomiarach roztworów, gdzie absorpcję próbki możemy zmieniać poprzez zmianę stężenia roztworu.

Pomiary w roztworach przysparzają jednak dodatkowych problemów związanych z absorpcją rozpuszczalnika. Intensywne pasma absorpcji rozpuszczalnika mogą się nakładać na ważne, z analitycznego punktu widzenia, pasma badanego związku. Wyjściem z takiej sytuacji jest zmiana rozpuszczalnika na taki, który absorbuje w innym zakresie spektralnym.

Do najczęściej stosownymi rozpuszczalników w pomiarach IR należą chloroform, chlorek metylenu, disiarczek węgla i acetonitryl [6-8].

Tabela 1. Parametry fizyko-chemiczne najczęściej stosowanych materiałów w spektroskopii IR.

Materiał	Uwagi	SWL [cm ⁻¹]	LWL [cm ⁻¹]	Współczyn nik załamania światła	Rozpusz czalność [g/100g]	Twardość [kg/mm ²]	Temp. topnienia [°C]	Zakres pH
AMTIR	GeAsSe szkło, łamliwy	11000	593	2,50	0,00	170	370	1 – 9
BaF ₂	fluorek baru	66600	691	1,45	0,17	82	1280	5 – 8
CaF ₂	fluorek baru	79500	896	1,40	0,0017	158	1360	5 – 8
CsI	jodek ceszu, bardzo higroskopijny	42000	172	1,73	44	20	621	—
Diamant	typ IIa, silna absorpcja IR między 2700-1800 cm ⁻¹ , drogi	30000	< 2	2,40	0,00	5700	—	1 – 14
Ge	german, szkło nieprzezroczyste przy podwyższonej temp, bromek potasu, najczęściej używany w pomiarach MIR	5500	432	4,00	0,00	780	936	1 – 14
KBr	bromek potasu	48800	345	1,52	53	6	730	—
KCl	chlorek potasu	55600	385	1,45	35	7	776	—
KRS-5	bromek talu-jodek talu (44% - 56%), niezwykle toksyczny	17900	204	2,37	0,05	40	414	5 – 8
NaCl	chlorek sodu	52600	457	1,49	36	18	801	—
Polietylen	odpowiedni w FIR, pęcznieje w niektórych rozpuszczalnikach organicznych	625	<4	1,52	0,00	—	110	1,5 – 14
SiO ₂	dwutlenek krzemu	50000	2315	1,53	0,00	460	1713	1 – 14
Si	krzem	8900	624, 30	3,41	0,00	1150	1420	1 – 12
ZnS	siarczek cynku	17000	690	2,20	0,00	240	1830	5 – 9
ZnSe	selenek krzemu	15000	461	2,40	0,00	120	1526	5 – 9

SWL – najkrótsza długość przepuszczanego promieniowania (1 mm, 50% przepuszczalności, ang. *Shortest wavelength for transmission*), LWL – najdłuższa długość przepuszczanego promieniowania (1 mm, 50% przepuszczalności, ang. *Longest wavelength for transmission*), Współczynnik załamania światła (dla stosowanych długość fal).

Poza pomiarami absorpcji promieniowania IR przez roztwory istnieje możliwość przeprowadzenia badań na czystych cieczach. W takim przypadku badaną ciecz umieszcza się

w postaci małej kropli na jednym z okienek i nakłada się drugie okienko pomiarowe, rozprowadzając kroplę między obiema powierzchniami do uzyskania cienkiego filmu. Metoda ta nie nadaje się jednak w żadnym razie do pomiarów ilościowych.

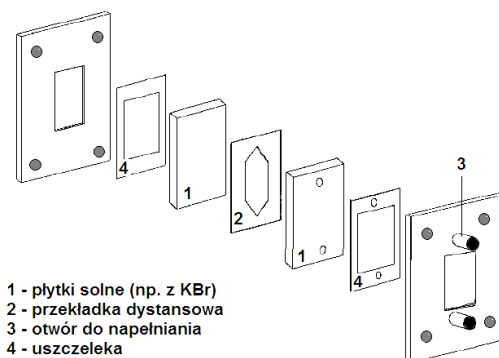
Tabela 2. Częstotliwość absorpcji w podczerwieni ciekłej H₂O, HOD, D₂O (w cm⁻¹) [9]

Przypisanie		H ₂ O	HOD	D ₂ O
O-X				
drgania rozciągające	(ν_{as})	3490 (s)	3380 ^a (s)	2540 (s)
	(ν_s)	3280 (s)	2500 ^b (s)	2450 (s)
drgania asocjacyjne	(ν_A)	2125 (w)	---	1555 (w)
drgania deformacyjne	(δ)	1645 (s)	1450 (s)	1210 (s)

(s), *strong* (intensywne pasmo); (w), *weak* (słabe pasmo).

^{a)} O-H,

^{b)} O-D.



Rysunek 2. Budowa rozbieralnej kuwety do pomiarów FT-IR [10].

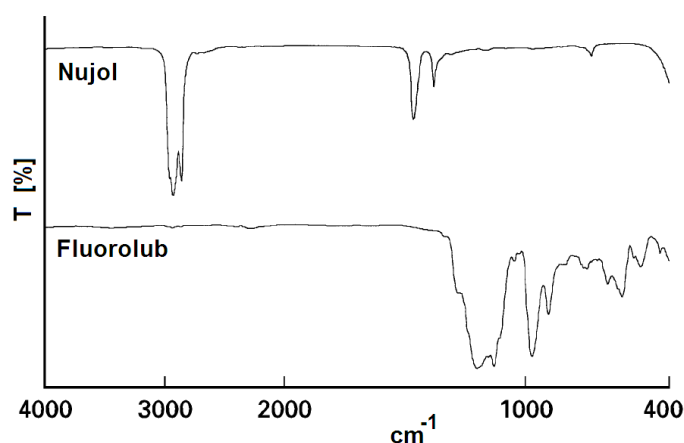
Wykonywanie widm IR substancji rozpuszczonej w wodzie lub w ciężkiej wodzie możliwe jest przy zastosowaniu kuwet o bardzo małej grubości (0,01-0,05mm), ponieważ woda wykazuje silną absorpcję (Tabela 2). Okienka kuwet stosowanych w pomiarach z użyciem wody najczęściej wykonane są z materiałów nierozpuszczalnych w wodzie, takich jak: krzem, chlorek srebra i fluorek baru.

2.1.2 Ciała stałe

Substancje stałe można rozpuścić i badać w postaci roztworów, co zostało omówione powyżej. Ponadto ciała stałe bada się w postaci zawiesin w olejach i w postaci pastylek. W przypadku pierwszym substancję uciera się w agatowym moździerzku z kilkoma kroplami nujolu (oleju parafinowego) bądź kilkoma kroplami fluorolubu (fluorowany węglowodór) do uzyskania równomiernej zawiesiny, którą następnie nakłada się w postaci cienkiej warstwy na płytkę np. z KBr i wykonuje widmo.

Zarówno nujol, jak i fluorolub wykazują absorpcję w określonych zakresach podczerwieni (Rys.3). W celu poprawnej interpretacji pasm absorpcji badanej substancji zalecaną procedurą jest wykonanie widm w obu środkach dyspergujących i nałożenie tych widm z wykorzystaniem fragmentów wolnych od absorpcji matrycy [10].

Technika pastylkowania jest jedną z najczęstszych i najprostszych technik przygotowania próbek ciał stałych do pomiarów w spektroskopii IR. W aby przygotować pastylkę, należy małą ilość badanej substancji (około 1,5 mg) dokładnie rozetrzeć w moździerzu z 100-200 mg bezwodnego KBr służącego jako matryca. Następnie uzyskaną mieszaninę prasuje się w pastylki pod wysokim ciśnieniem. Tej metody przygotowywania próbek nie stosuje się w pomiarach ilościowych.



Rysunek 3. Widma IR nujolu i fluorolubu [10].

2.2 Metody odbiciowe

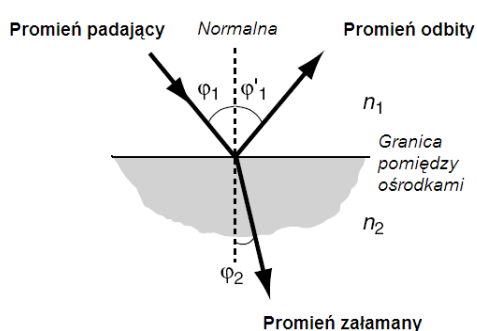
Poza pomiarami transmisyjnymi, w których wiązka promieniowania IR ulega osłabieniu podczas przejścia przez absorbującą promieniowanie próbkę, coraz szerzej stosowanymi technikami pomiarowymi są techniki refleksyjne (odbiciowe). Istotą tych technik rejestracji widm IR jest wykorzystanie promieniowania odbitego od absorbującej je w niewielkim stopniu powierzchni. Techniki te dzieli się na dwie kategorie:

- Metody wykorzystujące zjawisko wewnętrznego (całkowitego) odbicia promieniowania (*ang. internal (total) reflection methods, IRM*),
- metody wykorzystujące zjawisko zewnętrznego odbicia promieniowania (*ang. external reflection methods, ERM*).

Metody IRM są szeroko wykorzystywanymi technikami pomiarowymi w spektroskopii w podczerwieni. Wykorzystuje się je do badania ciał stałych i cieczy. Dzięki nim możliwe staje się badanie powierzchni ciał stałych, polimerów, cienkich warstw, błon biologicznych, tkanin, pianek, farb i pigmentów naniesionych na powierzchnię. Ponadto metody IRM wykorzystywane są obecnie do badań receptorów biologicznych usytuowanych w błonach komórkowych, do badań tkanek i komórek [10-12].

Techniki oparte na ERM nie są tak powszechnie wykorzystane jak w przypadku technik opartych na IRM, niemniej znajdują zastosowania komercyjne do badań powierzchni katalizatorów, polimerów i metali.

Techniki odbiciowe oparte są na prawach odbicia i załamania światła (Rys. 4).

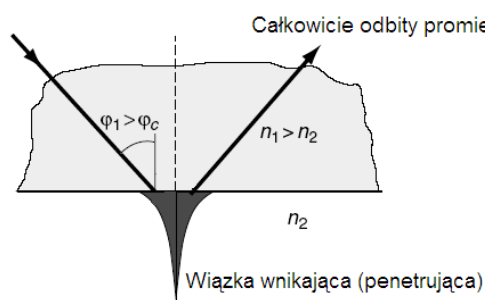


Kąt odbicia promieni świetlnych od granicy dwu ośrodków równy jest kątowi padania.

$$(\varphi_1 = \varphi'_1)$$

Stosunek sinusa kąta padania do sinusa kąta załamania jest wielkością stałą, którą nazywamy względnym współczynnikiem załamania.

$$(\sin \varphi_1 / \sin \varphi_2 = \text{const} = n_{21})$$



Efekt całkowitego wewnętrznego odbicia uzyskuje się, gdy promieniowanie pada od strony ośrodka o większym współczynniku załamania ($n_1 > n_2$) na próbkę (o współczynniku n_2) pod kątem φ_1 większym od kąta granicznego φ_c .

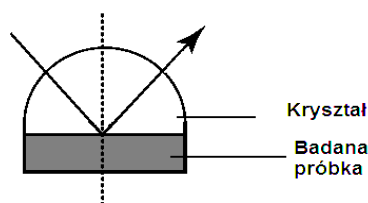
$$\sin \varphi_c = n_1/n_2$$

Rysunek 4. Prawa załamania i odbicia.

Jeżeli kąt padania promieniowania przekracza wartość kąta granicznego, wówczas promieniowanie nie może przenikać przez ośrodek o niższym współczynniku załamania światła i ulega całkowitemu odbiciu. Wiązka promieniowania padającego nie odbija się jednak wprost od granicy ośrodków, lecz wnika na bardzo małą głębokość do drugiego ośrodka. Odległość, na którą wnika promieniowanie jest porównywalna do długości

promieniowania padającego. W metodach wykorzystujących wewnętrzne odbicie światła, promień padający na granicy ośrodków pada od strony ośrodka o wyższym współczynniku załamania na próbkę i ulega całkowitemu wewnętrznemu odbiciu. Element o wyższym współczynniku załamania światła nazywa się kryształem i może być on wykonany z wielu materiałów takich jak; german, chlorek srebra, diament, krzem, selenek cynku.

Absorbującą promieniowanie próbkę umieszcza się na kryształ, tak jak zostało pokazane to na Rys. 5. Takie ustawienie próbki i kryształu, nazywa się układem ATR lub metodą osłabionego całkowitego wewnętrznego odbicia (*ang. attenuated total reflection – ATR*).



Rysunek 5. Schemat biegu promieni w kryształ w układzie ATR.

Podczas odbicia w metodzie ATR promieniowanie IR wnika w próbkę. Głębokość tego wnikania tzw. głębokość penetracji zależy od kąta padania promieniowania, długości fali światła oraz współczynników załamania obu ośrodków i opisywana jest poniższym równaniem:

$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi n_1 \sqrt{\sin^2 \varphi - \left(\frac{n_2}{n_1}\right)^2}}$$

λ - długość promieniowania padającego na kryształ
 n_1 - współczynnik załamania światła kryształu
 n_2 - współczynnik załamania światła kryształu
 φ - kąt padania promieniowania IR

Głębokość penetracji d_p promieniowania elektromagnetycznego ośrodka o niższym współczynniku załamania światła definiowana jest jako odległość, przy której amplituda pola elektrycznego światła zmniejsza się do 1/e jego wartości na powierzchni. Odległość ta waha się od ułamka mikrona do kilku mikronów i zależy od współczynnika załamania kryształu, badanego materiału i kąta padania.

Jeżeli badana próbka absorbuje promieniowanie IR, to mamy do czynienia ze zjawiskiem osłabionego wewnętrznego odbicia. Zjawisko penetracji ośrodka o mniejszej gęstości optycznej (próbki) pozwala na uzyskanie informacji o niej, jeżeli tylko jest ona

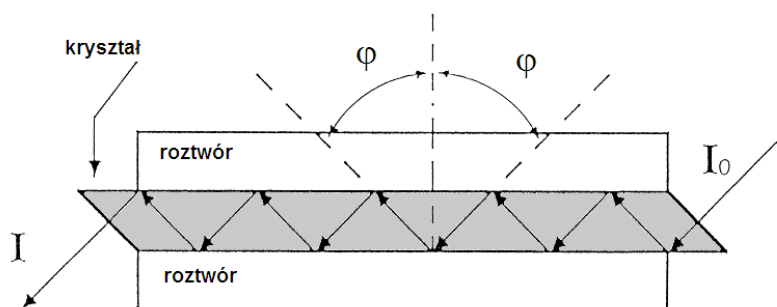
zdolna do selektywnej absorpcji promieniowania IR. Konsekwencją eksponentyjnego osłabiania wiązki wnikaącej w badany materiał jest zmniejszanie się czułości wraz z odległością od powierzchni rozdziału. W praktyce najwyższą czułość osiąga się na granicy ośrodków, dlatego też metoda ta szczególnie dobre wyniki daje w przypadku otrzymywanych *in situ* cienkich nieruchomych warstw.

Intensywność otrzymywanego widma ATR zależy od głębokości penetracji. Najczęściej stosowane materiały do analiz metodą ATR, takie jak: diament czy selenek cynku mają współczynnik załamania wynoszący 2,3; natomiast dla germanu wynosi on 4,0. Kryształy ATR o wyższym współczynniku załamania światła skracają odległość penetracji próbki, przez co dają słabsze widmo IR. Głębokość penetracji próbki jest proporcjonalna do długości promieniowania padającego, dlatego intensywność pasm przy większych długościach fali w widmach uzyskanych techniką ATR w porównaniu z widmem transmisyjnym jest wyższa. Dla kryształu ATR o współczynniku załamania równym 2,2 i przy kącie padania 45° głębokość penetracji dla typowej próbki organicznej wynosi $4\text{ }\mu\text{m}$ przy promieniowaniu o częstotliwości 1000 cm^{-1} .

Technika ATR sprawdzająca się w pomiarach cienkich warstw, nie oddaje prawdziwego widma IR głębszych warstw materiału, a ponadto widma emulsji i zawiesin mogą być niereprezentatywne dla całej próbki, gdyż może następować ich rozdzielanie się na powierzchni kryształu.

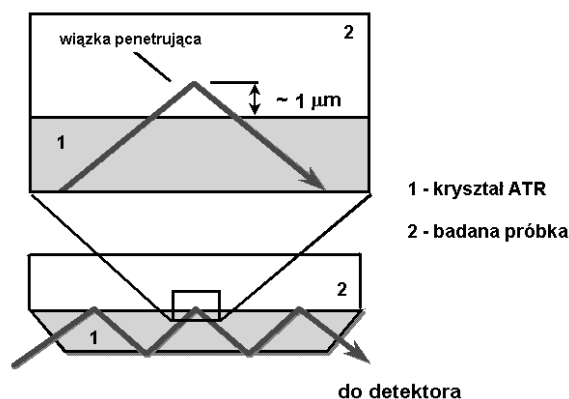
Pojedyncze osłabione wewnętrzne odbicie w pomiarze ATR daje mało intensywne pasma na widmie IR. Wprowadzono zatem modyfikację technik ATR polegającą na wielokrotnym wewnętrznym odbiciu MIR (*ang. multiple internal reflection - MIR*) [12, 13].

W technice MIR kryształ ma kształt równoległocianu i umożliwia wielokrotne, najczęściej 25-krotne wewnętrzne odbicie promieni. Analizowana próbka umieszczana na jednej lub po obu stronach kryształu, jak na Rys. 6.



Rysunek 6. Schemat biegu promieni w metodzie MIR.

Modyfikacją techniki MIR jest technika poziomego ATR (*ang. horizontal ATR - HATR*). W technice HATR pojedynczy kryształ o kształcie równoległoscianu, o typowych wymiarach 5 cm x 1 cm x 0,5 cm z jedną eksponowaną powierzchnią, jak przedstawiono na Rys.7. Promieniowanie przebiega przez cały kryształ ulegając całkowitemu wewnętrznemu odbiciu od dolnej, jak i od górnej powierzchni kryształu. Liczba odbić od każdej z powierzchni wynosi zazwyczaj od pięciu do dziesięciu w zależności od gęstości optycznej i wymiarów kryształu oraz od kąta padania.



Rysunek 7. Schemat biegu promieni w metodzie HATR.

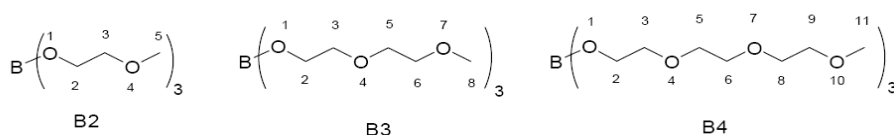
Ciecze mogą być wylewane wprost na kryształ, który zabezpieczony jest przed spływaniem z niego cieczy. Również wszelkiego rodzaju pasty, kremy i inne półstałe próbki mogą być szybko mierzone po rozprowadzeniu ich na powierzchni kryształu. Techniki pomiarowe wykorzystujące metodę HATR są chętniej wykorzystywane w pomiarach ilościowych od technik transmisyjnych, ponieważ są łatwiejsze w użyciu i myciu. Technikę HATR wykorzystuje się między innymi powszechnie w przemyśle do monitorowania przebiegu procesów technologicznych [10].

3. Przykłady zastosowań spektroskopii w podczerwieni do badania oddziaływań międzycząsteczkowych w roztworach

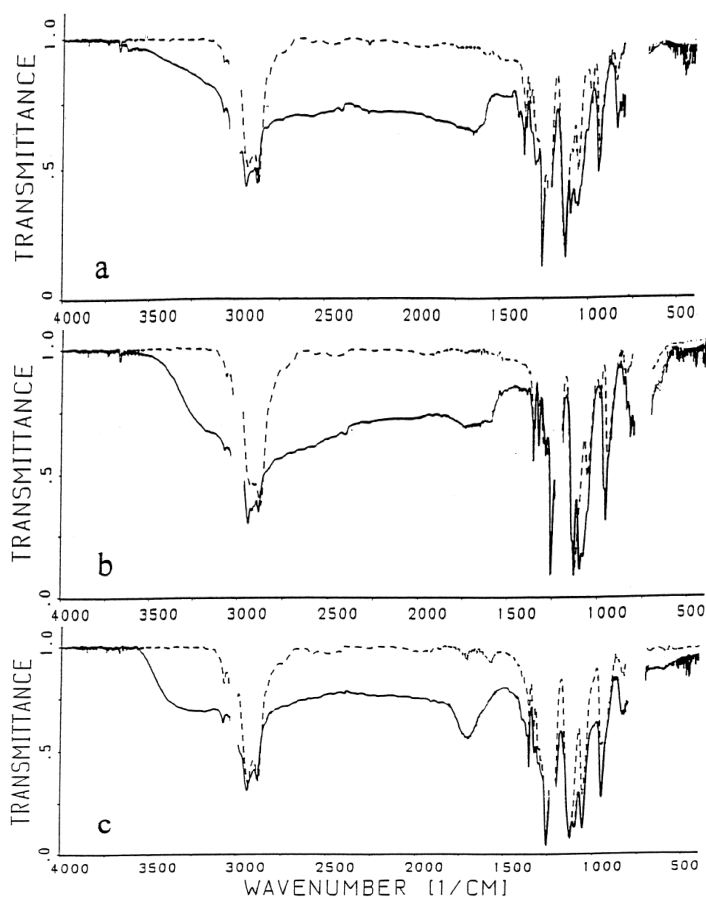
3.1 Oddziaływania podandów z protonami

Oddziaływanie pomiędzy protonem a trzema różnymi receptorami z grupy organicznych boranów, których strukturę przedstawiono na Rys. 8, badano wykorzystując spektroskopię FT-IR [14]. Na widmach tetrachlorozłocianów tych boranów w podczerwieni

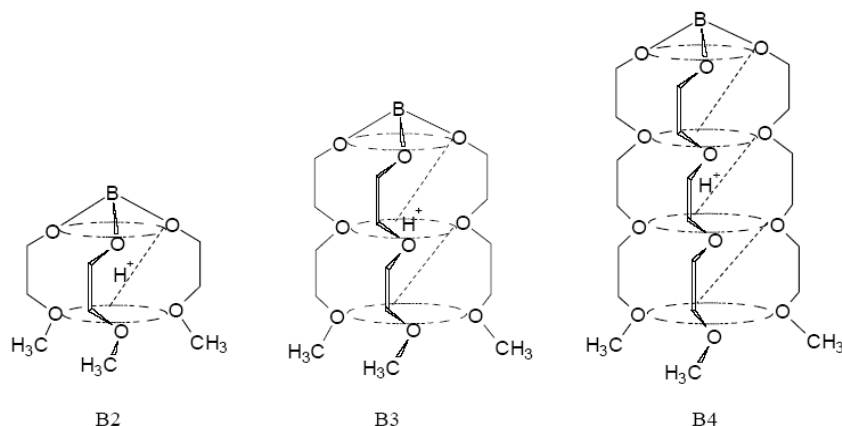
zaobserwowano intensywne kontinuum absorpcji, którego zakres uzależniony był od długości łańcuchów oksalkilowych w cząsteczce boranu, a więc od liczby atomów tlenu w tych łańcuchach (Rys. 9) Wraz ze wzrostem liczby atomów tlenu w łańcuchu kontinuum absorpcji w widmie FT-IR przesuwa się w kierunku niższych wartości liczb falowych, co wskazuje, że proton może fluktuować pomiędzy atomami tlenu, tworząc kanały protonowe o różnej długości. Możliwe fluktuacje protonu w kanale oksalkilowym przedstawiono na Rys. 10.



Rysunek 8. Struktury boranów [14].



Rysunek 9. Widma FT-IR : (---) tris(oksaalkilo) boranów i (—) ich kompleksów z HAuCl_4 w stosunku stechiometrycznym 1:1 (a) **B2**; (b) **B3**; (c) **B4**. Widma wykonano w krzemowej kuwecie, stosując chloroform jako rozpuszczalnik [14].

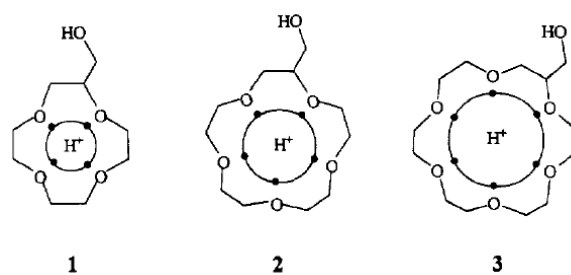


Rysunek 10. Kanały protonowe tworzone przez borany [14].

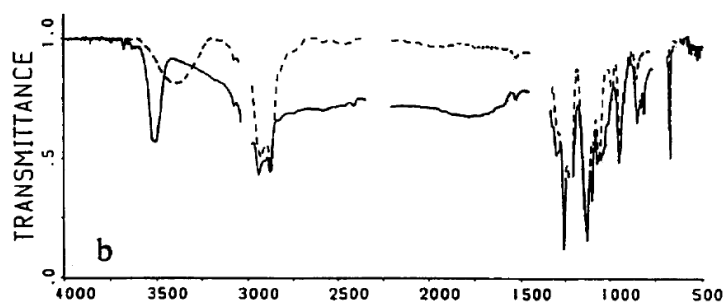
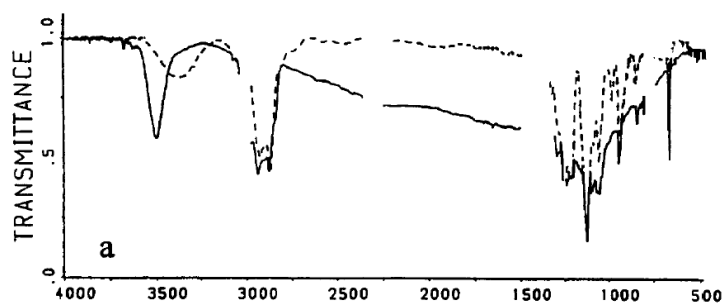
3.2 Oddziaływania eterów koronowych z protonami

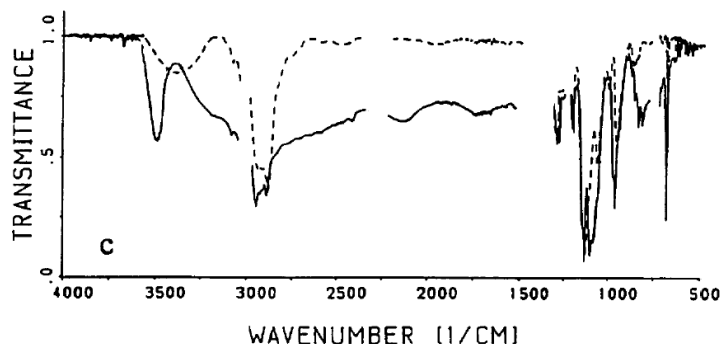
Spektroskopia IR okazała się użyteczna w przypadku badania oddziaływań międzycząsteczkowych w roztworach pomiędzy eterami koronowymi a kwasami. W badaniach tych wykorzystano etery koronowe przedstawione na Rys. 11 [15]. Widma FT-IR badanych eterów, jak i ich kompleksów z HClO_4 przedstawiono na Rys.12.

W przypadku kompleksów eterów koronowych z protonem nadmiarowy proton fluktuuje pomiędzy atomami tlenu w pierścieniu eteru koronowego. Zakres kontinuum zależy od liczby atomów tlenu w pierścieniu eteru koronowego. W przypadku eteru koronowego 3 zakres absorpcji kontinuum wynosi $3500\text{--}700\text{ cm}^{-1}$ wraz ze szczególnym intensywnym regionem pomiędzy $3000\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$. Taki obraz spektralny odpowiada niezwykle szybkiej fluktuacji nadmiarowego protonu pomiędzy sześcioma granicznymi strukturami (miejsce zaznaczone kropką na okręgu na Rys. 11 obrazuje minimum energetyczne dla protonu). Proton w tym eterze wykazuje tzw. polaryzowalność Zundela [16,17]. Podobną sytuację można zaobserwować w przypadku dwóch pozostałych eterów koronowych 1 i 2 oraz ich kompleksów z nadmiarowym protonem. W tych przypadkach kontinuum ulega zawężeniu do zakresu $3500\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$, a jego intensywność maleje w zakresie niższych wartości liczb falowych. Intensywność kontinuum dla kompleksu eteru koronowego 3 zawierającego 6 atomów tlenu rośnie z zakresem wyższych wartości liczb falowych, co tłumaczy się przez zwiększenie bariery energetycznej pomiędzy minimami energetycznymi dla fluktuującego protonu.



Rysunek 11. Struktura eterów koronowych z związanym z nimi nadmiarowym protonem. Proton fluktuuje między atomami tlenu w pierścieniu eteru koronowego. Kropki oznaczają miejscowe minimum energetyczne – maksymalne oddziaływanie protonu z atomem tlenu [15].

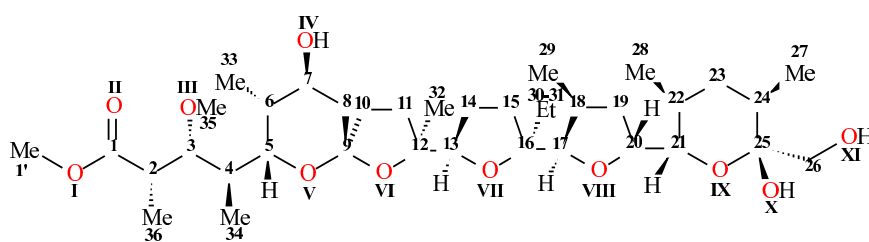




Rysunek 12. Widma FT-IR eterów koronowych i ich kompleksów z HClO_4 : a) eter 1, b) eter 2, c) eter 3. Widma wykonano w kuwecie krzemowej w acetonitrylu [15].

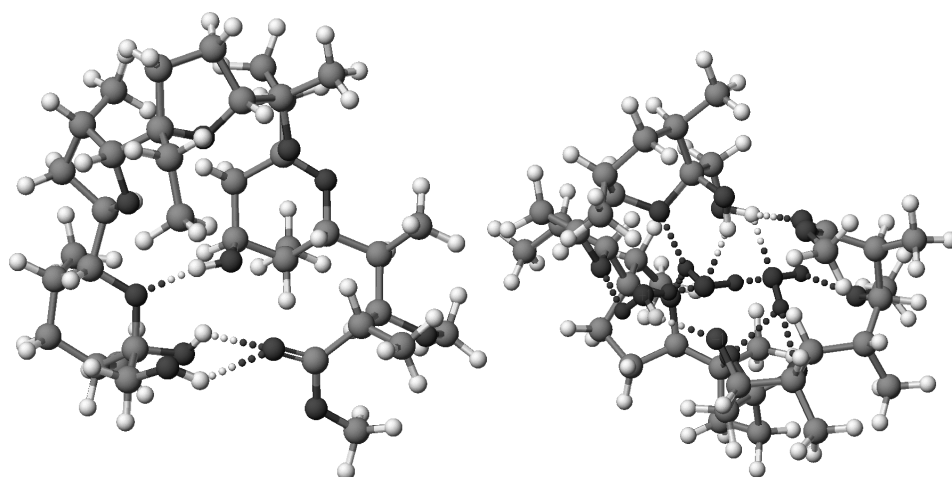
3.3 Formowanie kanału protonowego przez ester metylowy monenzyny A

Monenzyna A należy do grupy antybiotyków jonoforowych, które wykazują zdolność do kompleksowania kationów metali jedno- i dwuwartościowych. Skompleksowany kation może być transportowany przez błonę biologiczną komórki bakteryjnej, co doprowadza do zakłócenia naturalnego gradientu stężeń kationów, a w efekcie do śmierci komórki. Ester metylowy monenzyny A, którego strukturę pokazano na Rys. 13 jest syntetyczną pochodną monenzyny A, która wykazuje nowe, nieoczekiwane właściwości fizykochemiczne [18].

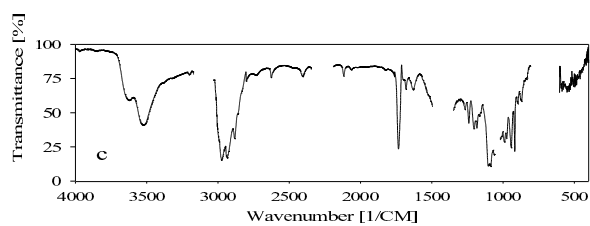
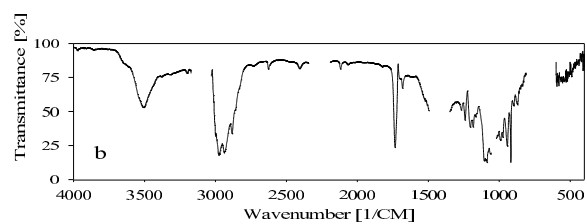
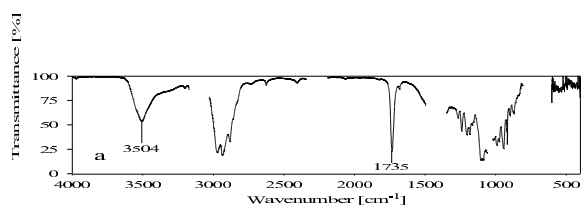


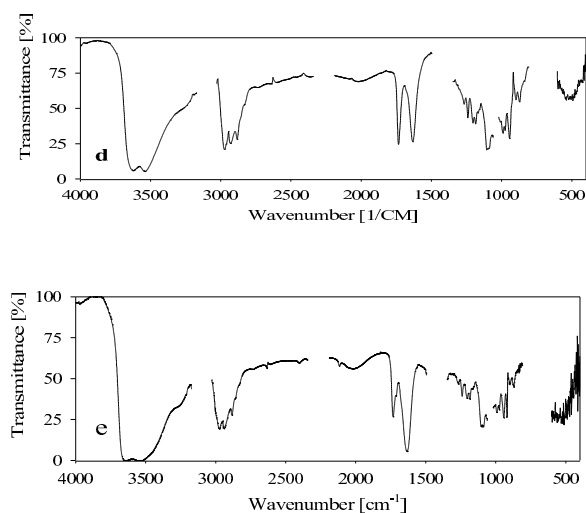
Rysunek 13. Ester metylowy monenzyny A.

Pochodna ta w obecności wody tworzy trwałe hydraty (Rys.14). Przy stosunku wody do estru metylowego monenzyny wynoszącym 2:1 tworzy się kation Zundela H_5O_2^+ , w którym nadmiarowy proton fluktuuje niezwykle szybko pomiędzy dwiema cząsteczkami wody. Fakt ten potwierdza widmo IR (Rys.15b), na którym pojawia się charakterystyczne dla takiego układu kontinuum absorpcji, które w widmie FT-IR czystego estru nie występuje (Rys.15a). Nadmiarowy proton pochodzi z deprotonacji grupy $\text{O}_{\text{IV}}\text{H}$.



Rysunek 14. Struktura estru metylowego monenzyny A (po lewej) i jego trihydratu z nadmiarowym protonem (po prawej) [18].

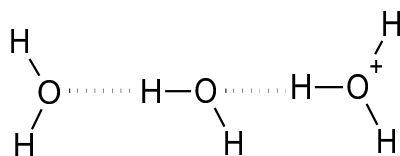




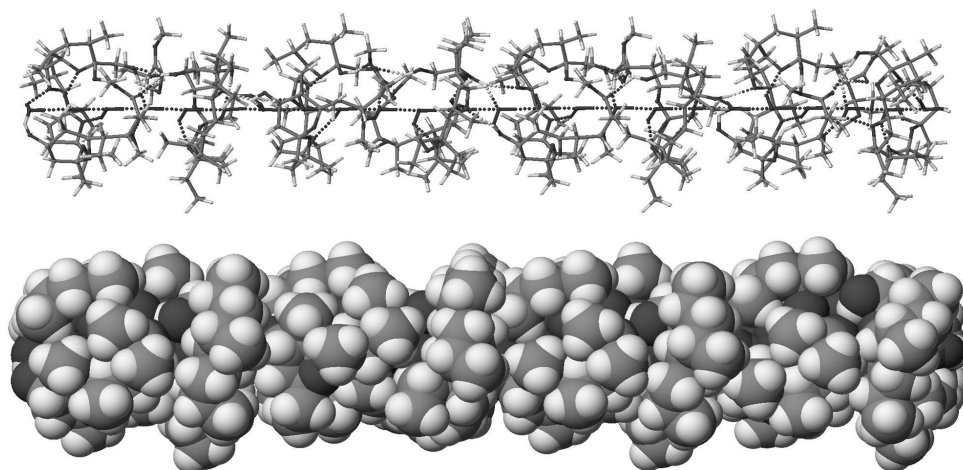
Rysunek 15. Widma FT-IR w acetonitrylu: (a) MON1, (b) MON1:H₂O – 1:2, (c) MON1:H₂O – 1:3, (d) MON1:H₂O – 1:7, (e) MON1:H₂O – 1:12; MON1-ester metylowy monenzyny A [18].

Po dodaniu kolejnej porcji wody (stosunek stechiometryczny do 3:1), intensywność kontinuum w widmie IR wzrasta (Rys. 15c). Obserwowany wzrost absorpcji związany jest z utworzeniem kationu H_7O_3^+ , w którym podobnie jak to było w przypadku kationu Zundela, nadmiarowy proton fluktuuje w łańcuchu (Rys. 14 i 16).

Dalsze zwiększanie nadmiaru wody powoduje wzrost intensywności kontinuum absorpcji (Rys. 15d, 15e), co związane jest z potwierdzoną również metodami osmometrycznymi samoasocjacją trwałych trihydratów estru metylowego monenzyny i tworzeniu kanału protonowego. Schemat takiego utworzonego kanału protonowego przedstawiono w na Rys. 17. Wewnątrz utworzonego kanału protonowego, znajdują się 24 cząsteczki wody, które połączone są niemal liniowymi mostkami wodorowymi. Proton może fluktuować przez całą długość utworzonego kanału.



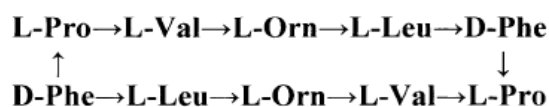
Rysunek 16. Fluktuujący proton w kationie H_7O_3^+ .



Rysunek 17. Struktura kanału protonowego utworzona przez osiem fragmentów trihydratu estru metylowego monenzyny obliczona metodą PM5 [18].

3.4 Badanie oddziaływań kationów metali jednowartościowych z gramicydyną S

Gramicydyna S jest cyklicznym antybiotykiem zbudowanym z dwóch identycznych sekwencji pentapeptydowych o strukturze zaprezentowanej na Rys 18.



Rysunek 18. Struktura gramicydyny S.

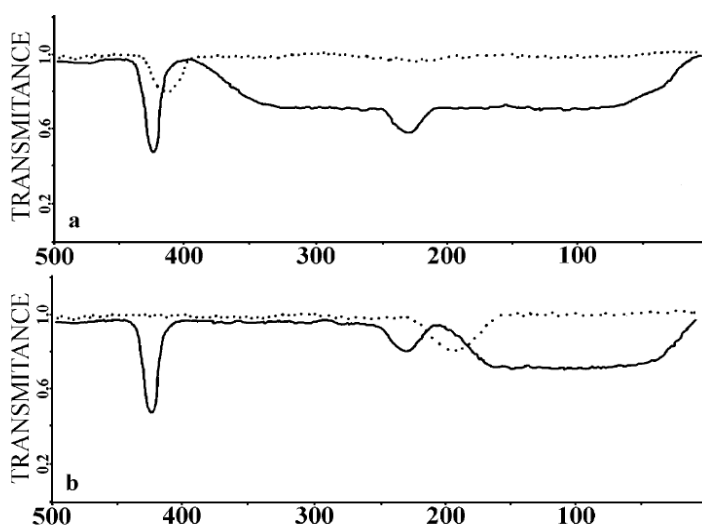
Antybiotyk ten wykazuje zdolność do kompleksowania kationów litowców. Proces kompleksowania kationów przez gramicydynę S badany był przy zastosowaniu spektroskopii w zakresie dalekiej podczerwieni. Widma kompleksów gramicydyny S w dalekiej podczerwieni wykonane w chloroformie zaprezentowane zostały na Rys.19 [19].

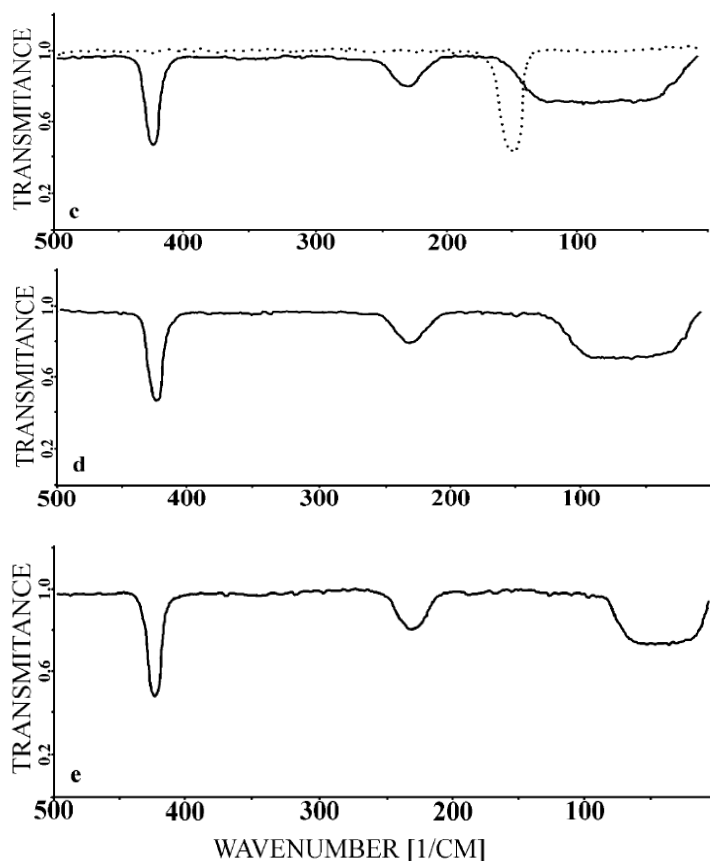
W widmie FT-IR kompleksu gramicydyny S z kationem Li^+ (Rys. 19a, linia ciągła) w zestawieniu z widmem nadchloranu litu (linia kropkowana) zaobserwowano kontinuum absorpcji w zakresie $400\text{--}25\text{ cm}^{-1}$. Pojawienie się tego kontinuum związane jest z szybkim ruchem kationu litu w kompleksie z gramicydyną S. Kation litu może fluktuować wewnątrz cyklicznego kompleksu utworzonego przez gramicydynę S. W kompleksie tym kation Li^+ charakteryzuje się dużą polaryzowalnością, co związane jest z występowaniem wielu możliwych minimów energetycznych w tym układzie. Na widmie Far FT-IR tzw. pasmo „ion

motion” w czystym NaClO₄ w chloroformie (Rys. 19b-linia kropkowana) przy 195 cm⁻¹ przestaje być widoczne w widmie kompleksu gramicydyny S z Na⁺. W widmie tym pojawia się natomiast kontinuum absorpcji w zakresie 200-20 cm⁻¹. Obserwowane zjawisko tłumaczy się analogicznie jak w przypadku omawianego wcześniej kompleksu gramicydyny S z kationem Li⁺. Kation sodu w kompleksie z gramicydyną S fluktuuje wewnątrz cyklicznego kompleksu formowanego przez gramicydynę S. Pojawienie się kontinuum absorpcji zaobserwowano również w przypadku utworzenia kompleksu pomiędzy kolejnymi kationami litowców z gramicydyną S (Rys19 c-e, Tabela 3). Kationy o dużym promieniu jonowym i dużej masie wykazują mniejszą ruchliwość w kompleksie z gramicydyną S. Na widmach Far-IR objawia się to zmniejszeniem zakresem kontinuum absorpcji (Tabela 3).

Tabela 3. Promień, masa atomowa i zakres kontinuum absorpcji w dalekiej podczerwieni w widmach kompleksów gramicydyny S z kationami litowców. Widma wykonano w chloroformie [19].

Kation	Promień kationu [Å]	Masa atomowa	Zintegrowana absorpcja	Kontinuum absorpcji [cm ⁻¹]
Li ⁺	0,68	6,941	19,49	400-25
Na ⁺	0,87	22,990	8,78	200-20
K ⁺	1,33	39,098	6,14	150-20
Rb ⁺	1,47	85,468	4,72	110-20
Cs ⁺	1,67	132,905	3,12	80-15

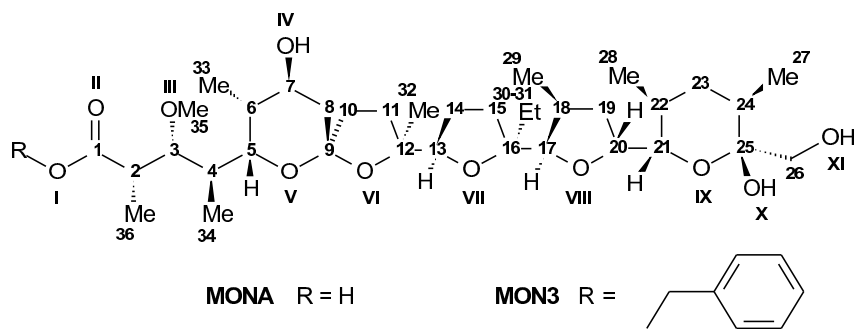




Rysunek 19. Widma Far FT-IR (.....) MClO_4 w chloroformie i (—) kompleksów gramicydyny S z M^+ ; (a) $\text{M}=\text{Li}$, (b) $\text{M}=\text{Na}$, (c) $\text{M}=\text{K}$, (d) $\text{M}=\text{Rb}$, (e) $\text{M}=\text{Cs}$ [19].

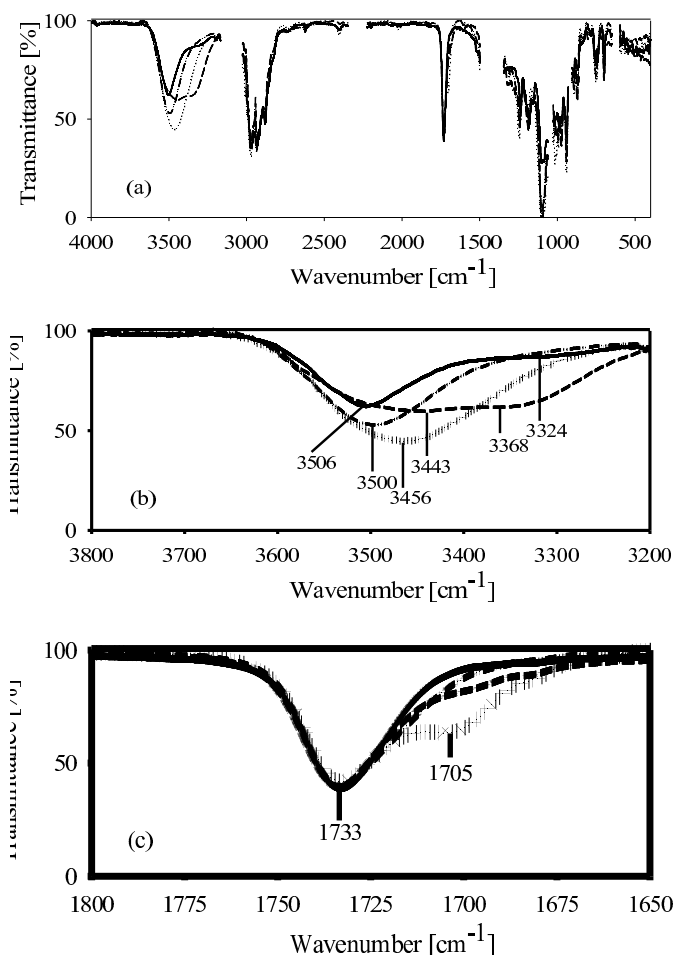
3.5 Kompleksowanie kationów Li^+ , Na^+ i K^+ przez ester benzyłowy monenzyny A

Ester benzyłowy monenzyny A (Rys 20), antybiotyku jonoforowego omawianego wcześniej (p. 3.3) kompleksuje kationy Li^+ , Na^+ , K^+ . Szczegółowa analiza widm FT-IR estru benzyłowego monenzyny A i jego kompleksów z kationami litowców pozwala na zaproponowanie struktury utworzonych kompleksów. Poza badaniami w podczerwieni niezbędne do tego są również inne badania spektroskopowe, takie jak: ^1H i ^{13}C NMR. Strukturę utworzonego kompleksu modeluje się korzystając z obliczeń semiempirycznych, w których zakłada się istnienie wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych w oparciu o wykonane pomiary spektroskopowe [20].



Rysunek 20. Struktura monenzyny A (MONA) i estru benzyłowego monenzyny A (MON3) [20].

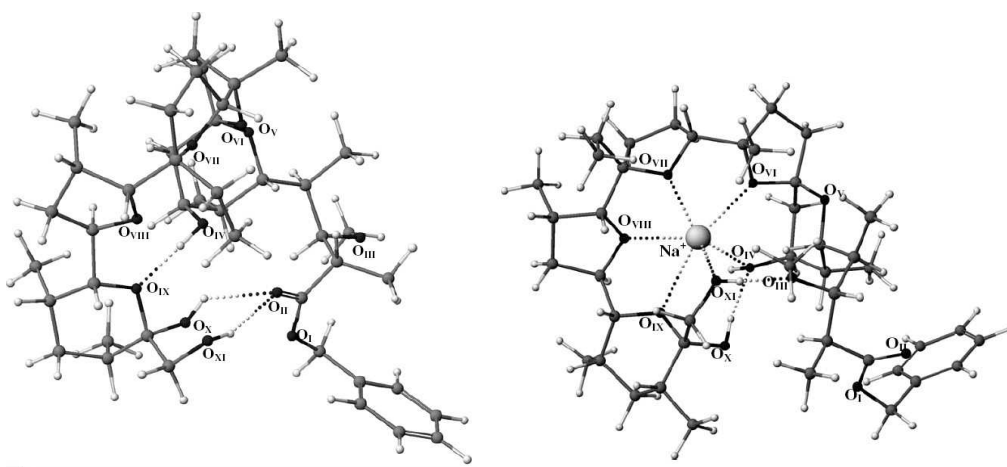
Monenzyna A ma trzy grupy hydroksylowe, $O_{IV}H$, O_XH , $O_{XI}H$. Grupy te uczestniczą w kompleksowaniu kationów metali oraz mogą, w zależności od kompleksowanego kationu, uczestniczyć w różnych wiązaniach wodorowych. W widmie FT-IR estru MON3 (Rys. 21) pasma przypisane drganiom rozciągającym $\nu(OH)$ grup O_XH i $O_{XI}H$ położone są przy 3505 cm^{-1} , a grupy $O_{IV}H$ przy 3324 cm^{-1} . W widmie kompleksu $MON3-Li^+$ (Rys 21b) obserwuje się szerokie pasmo pomiędzy $3550-3250\text{ cm}^{-1}$, co wskazuje na zaangażowanie wszystkich trzech grup hydroksylowych w tworzenie wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych nieznacznie silniejszych od wiązań wodorowych obecnych w strukturze estru MON3. Na widmie FT-IR kompleksu estru benzyłowego monenzyny A z kationem sodu (Rys. 21b) zaobserwować można tylko jedno szerokie pasmo z maksimum około 3456 cm^{-1} , co wskazuje na wzmocnienie wiązań wodorowych, w których uczestniczą grupy O_XH i $O_{XI}H$ oraz na osłabienie wiązania wodorowego z udziałem grupy $O_{IV}H$. W widmie kompleksu $MON3-K^+$ obserwuje się także jedno pasmo położone przy 3500 cm^{-1} , co związane jest z osłabieniem wiązania wodorowego z udziałem grupy $O_{IV}H$ w strukturze utworzonego kompleksu.



Rysunek 21. Widma FT-IR: (—) MON3, (—) MON3- Li^+ , (····) MON3- Na^+ , (---) MON3- K^+ ; w zakresach: (a) 4000-400 cm^{-1} , (b) drgań $\nu(\text{OH})$, (c) drgań $\nu(\text{C}=\text{O})$ [20].

Pozycja pasma przypisanego do drgań $\nu(\text{C}=\text{O})$ przy 1733 cm^{-1} w widmie estru MON3 i jego kompleksów z kationami Li^+ i K^+ jest prawie niezmienną (Rys 21c). Ten fakt demonstruje, iż atom tlenu grupy $\text{C}=\text{O}$ grupy estrowej nie uczestniczy w procesie kompleksowania tych kationów. W przeciwieństwie do tych widm na widmie FT-IR kompleksu MON3- Na^+ , oprócz pasma przy 1733 cm^{-1} zaobserwowano można nowe pasmo przy 1705 cm^{-1} , które przypisać można drganiu $\nu(\text{C}=\text{O})$ grupy karbonylowej oddziałującej z kationem Na^+ . Przytoczony przykład analizy porównawczej widm IR kompleksującego związku (gospodarza) i jego kompleksów ukazuje ważność tej metody spektroskopowej w badaniach oddziaływań międzycząsteczkowych pomiędzy cząsteczką gospodarza

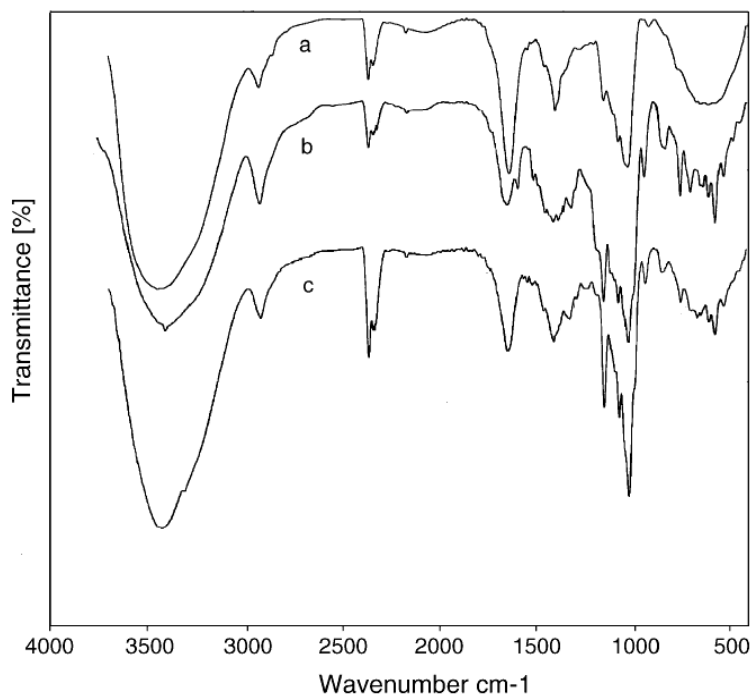
a kationami pełniącymi rolę gości. Zaproponowane struktury dyskutowanego estru benzyłowego monenzyny i jego kompleksu z kationem sodu obliczoną przy pomocy semiempirycznej metody PM5 przedstawiono na Rys. 22.



Rysunek 22. Struktury estru benzyłowego monenzyny A (po lewej) i jego kompleksu z kationem sodu (po prawej) obliczone przy pomocy metody semiempirycznej PM5 [20].

3.5 Badanie oddziaływań gość-gospodarz w inkluzyjnych kompleksach cyklodekstryn

Cyklodekstryny (CD) są wytwarzanymi w wyniku enzymatycznej hydrolizy skrobi cyklicznymi α -(1,4)-oligomerami glukozy, zbudowanymi z sześciu (α -CD), siedmiu (β -CD) lub ośmiu (γ -CD) jednostek glukozowych.. Wszystkie cyklodekstryny mają kształt ściętego stożka, którego promień rośnie wraz z liczbą reszt glukozy w pierścieniu. Cyklodekstryny tworzą kompleksy inkluzyjne typu gość-gospodarz, w których pełnią rolę gospodarza. Wnęka cyklodekstryn ma hydrofobowy charakter i może kompleksować cząsteczki o podobnym charakterze. Zewnętrzna część cyklodekstryn ma charakter hydrofilowy, co ułatwia ich rozpuszczalność w polarnych rozpuszczalnikach. Kompleksy cyklodekstryn z wieloma lekami są obecnie szeroko stosowane w medycynie. Rolą cyklodekstryn w tym przypadku jest zwiększanie rozpuszczalności w wodzie leków trudno w niej rozpuszczalnych, poprawianie stabilności leków oraz zwiększanie ich biodostępności.

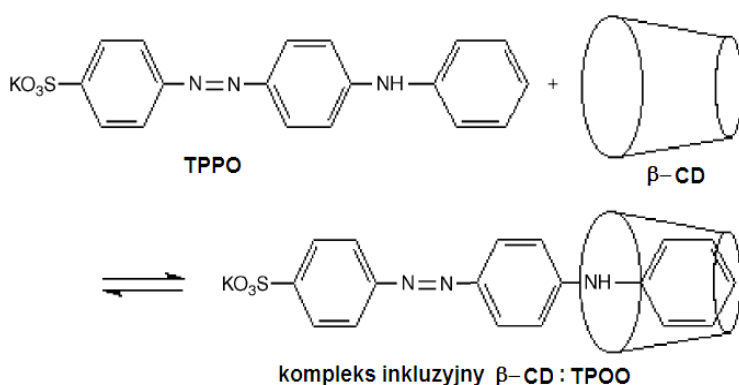


Rysunek 23. Widma IR: (a) β -CD (gospodarz), (b) TPOO (gość) i (c) kompleksu β -CD (gość-gospodarz) [21].

Badania oddziaływań pomiędzy cząsteczkami cyklodekstryny a kompleksowanymi przez nie cząsteczkami gości można prowadzić przy pomocy pomiarów w podczerwieni. Na Rys. 23 przedstawiono widma IR: (a) β -cyklodekstryny (gospodarz), (b) indykatora pH – TPOO (gość) i (c) utworzonego przez oba związki kompleksu gość-gospodarz [21]. Porównanie tych widm pozwala na zaproponowanie sposobu kompleksowania TPOO przez β -cyklodekstrynę.

Przykładowo w widmie kompleksu zaobserwować można zmniejszenie intensywności pasma przy 1325 cm^{-1} , przypisanego drganiom rozciągającym C–N w II rzędowych aminach aromatycznych. Ponadto pasmo przy 759 cm^{-1} przypisane drganiom wachlarzowych N–H również obniżyło swoją intensywność absorpcji po procesie kompleksowania. Podczas tworzenia supramolekularnego, inkluzyjnego kompleksu pomiędzy cząsteczkami β -cyklodekstryny a cząsteczkami TPOO w kompleksowaniu uczestniczy tylko fragment cząsteczki gościa, tak jak pokazano to na Rys. 24.

Obecnie badania kompleksów inkluzyjnych wszystkich trzech cyklodekstryn i ich pochodnych ze związkami wykazującymi aktywność biologiczną i farmakologiczną prowadzone są na szeroka skalę. Badaniom tym towarzyszą zazwyczaj badania spektroskopowe, w których czołową pozycję zajmuje spektroskopia w podczerwieni [22-23].



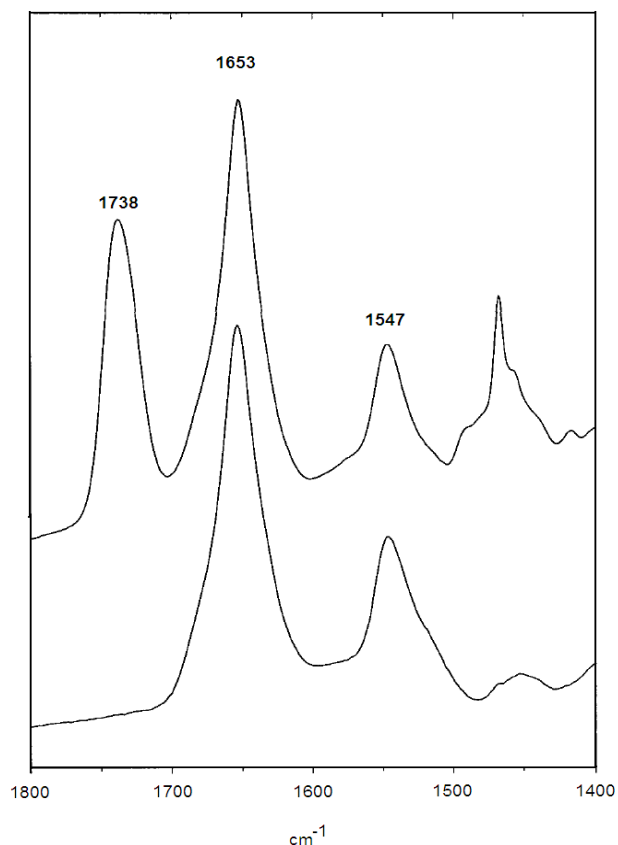
Rysunek 24. Proponowana na podstawie badań w podczerwieni struktura kompleksu inkluzyjnego β -cyklodekstryny (β -CD) z TPPO [21].

4. Wykorzystanie FTIR ATR badaniach receptorów biologicznych

Badanie oddziaływań międzycząsteczkowych w podczerwieni dla stosunkowo niedużych cząsteczek przeprowadzać można stosując techniki transmisyjne. W badaniach receptorów biologicznych (białek, enzymów, kwasów nukleinowych) często wykorzystuje się techniki odbiciowe [24-27]. Przykłady praktycznego zastosowania techniki ATR zostaną omówione w tym podrozdziale.

4.1 Oddziaływanie Apolipoproteiny E z triacyloglicerolami

Apolipoproteina E (apoE) jest biologicznie ważnym białkiem osocza, którego rolą jest transport triacylogliceroli i cholesterolu. ApoE składa się z dwóch niezależnie splecionych domen strukturalnych. C-końcowa domena (reszty 216–299) znana jest z posiadania wysokiej zdolności do wiązania lipidów, podczas gdy N-końcowa domena (reszty 1-191) uczestniczy w procesie wiązania się z receptorami lipoprotein. Technika ATR FT-IR została wykorzystana do badania oddziaływań izostrukuralnej N-końcowej domeny (reszty 1-183) zwanej apoE3 z dimirystylofosfatydylocholiną (DMPC) i oszacowania struktury wolnego białka w roztworze oraz białka związanego z cząsteczkami DMPC [28].

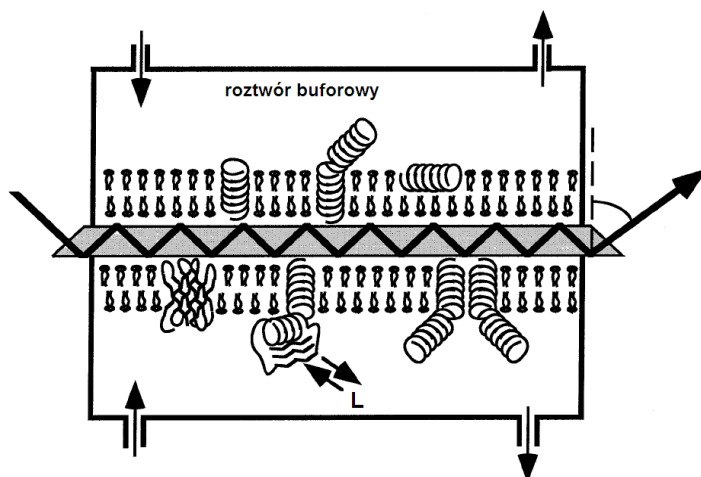


Rysunek 25. Widma w podczerwieni uzyskane metodą FT-IR ATR wolnego od lipidów apoE3 (dolne widmo) oraz kompleksu apoE3-DMPC w zakresie 1800-1400 cm⁻¹ [28].

Pasmo amidowe I (1700-1600 cm⁻¹) jako ostry pik przy 1654 cm⁻¹ dla wolnego od lipidów w widmie apoE3 i przy 1653 cm⁻¹ w widmie apoE3-DMPC jest charakterystyczne dla struktury α -helisy. Maksimum intensywności pasma amidowego II (1600-1500 cm⁻¹) jest położone przy 1547 cm⁻¹, czyli w typowym rejonie odpowiadającym strukturze α -helikalnej (Rys. 25) [28]. Przeprowadzone badania w podczerwieni wraz ze specjalnymi technikami pomiarowymi FT-IR pozwoliły oszacować udział struktury α -helikalnej i β w wolnym od lipidów apoE3 i w kompleksie apoE3-DMPC, który w pierwszym przypadku wynosił 65% α -helisy i 14% struktury β , a w drugim 60 % α -helisy i 15% struktury β . Wynikało stąd, że proces kompleksowania lipidów przez białko apoE3 nie zmienia zasadniczo struktury drugorzędowej łańcucha peptydowego białka.

4.2 Techniki pomiarowe ATR stosowane w badaniach receptorów biologicznych

Nie wszystkie receptory biologiczne można mierzyć stosując standardową technikę odbiciową ATR. Niektóre z białek receptorowych są integralnymi białkami błonowymi i aby możliwe było wiązanie liganda (hormonu) konieczne staje się umieszczenie ich w błonie lipidowej, gdyż dopiero wtedy pozwala to na uzyskanie właściwej (aktywnej) konformacji białka. Pomiary takie można przeprowadzać, korzystając na przykład z układu pomiarowego pokazanego na Rys. 26. W układzie tym możliwy jest przepływ roztworu nad powierzchnią błony z osadzonymi w niej białkami receptorowymi. Umożliwia to wykorzystanie takiego układu jako sensorycznego służącego do wykrywania obecności cząsteczek liganda [9, 29].

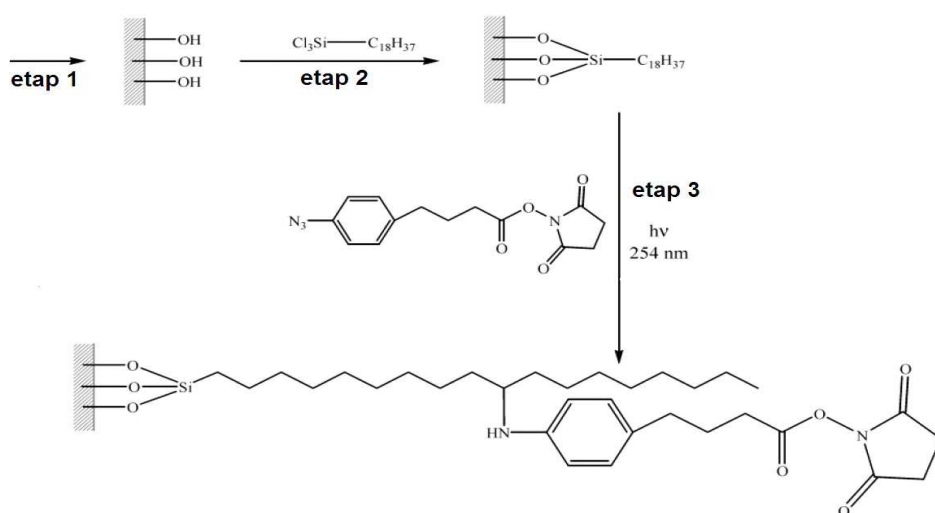


Rysunek 26. Budowa zestawu ATR do badania receptorów białkowych. L-oznacza ligand [9].

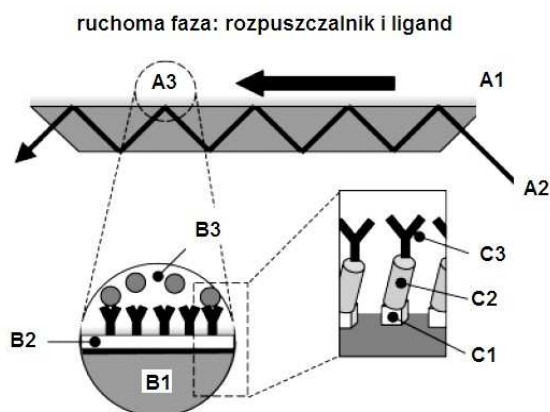
Inną nową techniką ATR FT-IR jest zastosowanie funkcjonalizacji chemicznej powierzchni kryształu ATR i łączenia z nią receptora poprzez trwałe wiązanie kowalencyjne [30, 31]. Technikę taką opisali w 2006 roku Voue i współpracownicy [31]. Schemat funkcjonalizacji powierzchni kryształu ATR pokazano na Rys. 27.

Efektom takiego chemicznego modyfikowania powierzchni kryształu ATR jest otrzymanie warstwy na jego powierzchni, którą schematycznie przedstawić można tak jak zostało zrobione to na Rys. 28.

Kryształ ATR ze zmodyfikowaną powierzchnią został wykorzystany do skonstruowania układu, w którym pełnił on rolę biosensora detekcji biotyny był na poziomie stężenia 10^{-12} mol/l [31]. Tak niska wartość tego progu pretenduje tą nową technikę do komercyjnego zastosowania, co niebawem zapewne nastąpi.



Rysunek 27. Technika funkcjonalizacji powierzchni germanowego kryształu ATR. Etap 1 - aktywacja, powierzchnia germanowego kryształu ATR traktowana roztworem HNO_3 , a następnie aktywowana roztworem H_2O_2 i kwasu szczawiowego; etap 2 – przyłączenie ramienia dystansującego OTS, etap 3 – fotochemiczna reakcja przyłączania grupy zdolnej do kowalencyjnego wiązania białka [31].



Rys. 28. Schemat sfunkcjonalizowanego kryształu ATR użytego do badań oddziaływań ligand-receptor. A1-kryształ ATR, A2-promienianie IR, A3-powierzchnia oddziaływania ligand-receptor, B1 element powierzchni kryształu ATR, B2-funkcjonalizowana powierzchnia, B3-niezwiązane i związane z receptorem cząsteczki liganda, C1-cząsteczka kotwicy, C2-cząsteczka ramienia dystansowego wiążącego receptor, C3-receptor [31].

5. Zastosowanie spektroskopii różnicowej FT-IR w badaniach oddziaływań międzycząsteczkowych w układach biologicznych.

Reakcje przebiegające z udziałem białek mogą przebiegać poprzez wiele stadiów pośrednich, angażując kolejne podjednostki strukturalne białka w określone etapy reakcji. Reakcje te indukują zmiany konformacyjne w białku lub w jego fragmentach odpowiedzialnych za przebieg określonego etapu pośredniego. Badanie przebiegu reakcji chemicznych z udziałem wielkocząsteczkowych białek jest możliwe przy wykorzystaniu spektroskopii w podczerwieni. Badania takie polegają na śledzeniu bardzo niewielkich zmian absorpcji promieniowania IR grup, które biorą udział w reakcji poprzez odjęcie od siebie absorpcji promieniowania IR zarejestrowanych w dobrze zdefiniowanych stanach protein, a więc przed określonym stadium reakcji i po nim.

Zazwyczaj zmiany absorpcji promieniowania IR towarzyszące zmianom strukturalnym w cząsteczce białka podczas reakcji są niezmiernie małe i gdyby nałożyć na siebie widma IR białka przed i po reakcji to w normalnej skali absorpcji nakładałyby się one i były praktycznie nie do rozróżnienia. W związku z tym do pomiarów IR wprowadzono nową technikę uzyskiwania widm – widma różnicowe FT-IR.

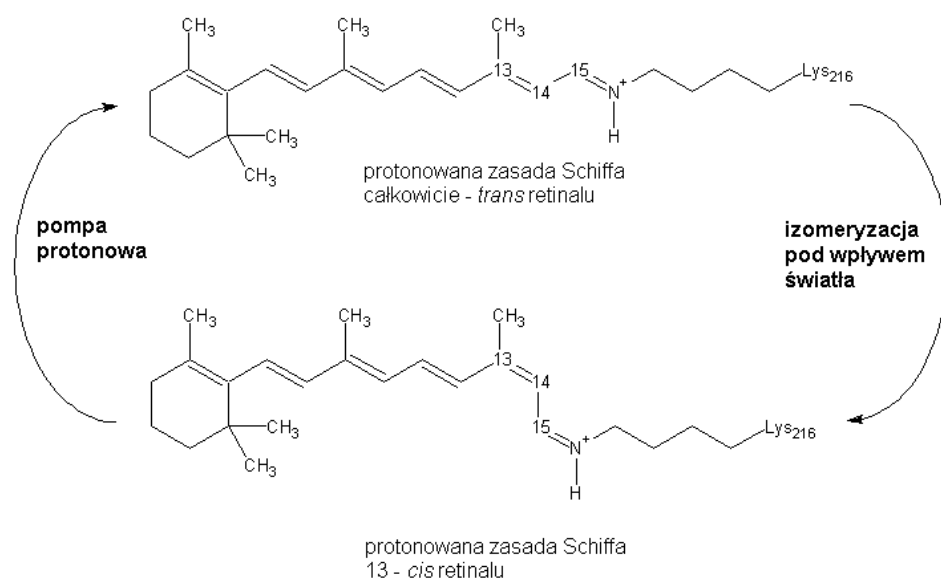
Widma różnicowe FT-IR (*ang. difference FT-IR*) są widmami powstającymi poprzez wzmocnienie wyniku matematycznego odejmowania absorpcji promieniowania IR dla dwóch różnych pomiarów. Przynajmniej 100-krotne wzmocnienie widma różnicowego konieczne jest, aby możliwe było zaobserwowanie niewielkich różnic w absorpcji promieniowania IR, które towarzyszą zmianom konformacyjnym w białkach podczas reakcji chemicznej.

5.1 Wykorzystanie różnicowego FT-IR w badaniach mechanizmu transportu protonów przez bakteriorodopsynę i fotoreceptor rodopsynowy

Różnicowa spektroskopia FT-IR jest coraz szerzej stosowana techniką do uzyskiwania informacji o zmianach konformacji białek i stosowana była już do badań białka GFP (*ang. green fluorescent protein*), Ca²⁺-ATPazy czy fotosystemu I z cyjanobakterii [32-34]. Metoda ta jest szczególnie przydatna do aktywowanych światłem rodopsyn znalezionych w *Halobacterium salinarum* włączając w to bakteriorodopsynę (BR), rodopsynę sensoryczną I (SRI) i II (SRII) oraz halorodopsynę (HR) [35-42].

Halobacterium salinarum to archeobakteria żyjąca w słonych zbiornikach wodnych. Bakteria ta przy niskim stężeniu tlenu zaczyna syntezować integralne białko błonowe - bakteriorodopsynę, która dzięki zawartemu w niej retinalowi może pełnić rolę pompy protonowej. Retinal związany jest z resztą lizyny (Lys 216) z wytworzeniem zasady

Schiffa. Światło wywołuje fotoizomeryzację retinalu z formy całkowicie-*trans* do formy 13-*cis*. Proton pompowany jest z cytozolu na powierzchnię zewnętrzną komórki w czasie powrotnej izomeryzacji do formy całkowicie-*trans*.



Rysunek 29. Fotoizomeryzacja retinalu w bakteriorodopsynie. Po etapie izomeryzacji pod wpływem światła całkowicie-*trans* retinalu następuje przeniesienie protonu z proponowanej zasady Schiffa. Następnie zachodzi zmiana konformacyjna białka i ponowna protonacja zasady Schiffa, po której następują sprzężone zmiany izomeryzacji retinalu i konformacji białka do stanu pierwotnego.

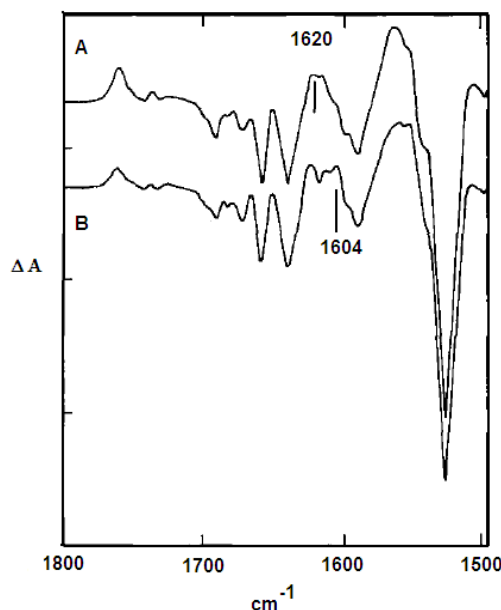
Absorpcja fotonu przez chromoforowy retinal bakteriorodopsyny wywołuje szereg wzajemnie następujących po sobie zmian zarówno chromoforowego retinalu i cząsteczki białka. Poszczególne stadia tego procesu oznaczono w następujący sposób: J₆₂₅, K₆₃₀, L₅₅₀, M₄₁₂, N₅₂₀, O₆₄₀ [43].

Poznanie skomplikowanego mechanizmu przenoszenia protonu przez bakteriorodopsynę stało się możliwe dzięki szeroko zakrojonym badaniom strukturalnym i spektroskopowym oraz ukierunkowanej mutagenezie badanego białka. Różnicowy FT-IR stanowi jak dotąd jedną z najczęściej stosowanych i najważniejszych technik spektroskopowych w badaniu bakteriorodopsyny, a informacje uzyskane z tych badań pozwoliły zaproponować mechanizm transportu protonów przez to białko [41,42].

Zrozumienie przebiegu zmian strukturalnych białka podczas cyklu przenoszenia

protonu pozwoliło na przypisanie roli poszczególnym aminokwasom biorącym aktywny udział w transporcie protonów, bądź też w zmianach konformacyjnych. Jednoznaczne przypisanie roli poszczególnym aminokwasom w mechanizmie zmian strukturalnych białka odbywa się dwoma drogami: znakowaniem izotopowym aminokwasów bądź zamianą ich przez inne aminokwasy. Widma różnicowe FT-IR uzyskane przez nałożenie widm niemodyfikowanej bakteriorodopsyny (BR) i modyfikowanej bakteriorodopsyny ukazują zmiany absorpcji wynikające bezpośrednio z takiej zamiany.

W jednej z pierwszych prac w badaniu mechanizmu transportu protonów przez bakteriorodopsynę wykorzystano znakowanie izotopowe cząsteczki lizyny 216. Znakowaniu izotopem ^{13}C poddano karbonylowy atom węgla, a znakowaniu deuterem ^2H poddano atom wodoru przy $\alpha\text{-C}$ w cząsteczce lizyny [43].

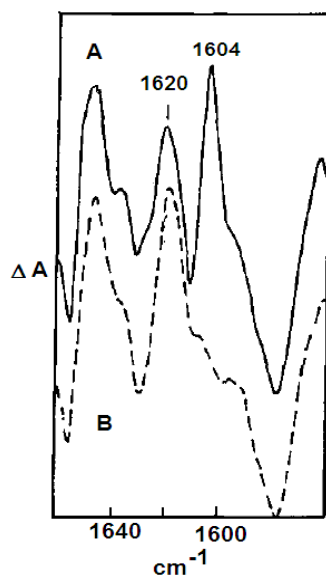


Rysunek 30. M/BR różnicowe widmo FT-IR w zakresie $1800\text{-}1500\text{cm}^{-1}$ w temperaturze 250 K. Widmo A: naturalna BR, Widmo B: BR zawierająca znakowaną $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ Lys [41].

Na Rys. 30 przedstawiono widma różnicowe uzyskane przez nałożenie na siebie widm IR bakteriorodopsyny w stanie przed naświetlaniem i w stanie pośrednim M uzyskanym zarówno dla niemodyfikowanej bakteriorodopsyny oraz dla bakteriorodopsyny zmodyfikowaną izotopowo lizyną. Na widmie różnicowym M/BR dodatkowo pasmo

(odpowiadające stanowi pośredniemu M) przy 1620 cm^{-1} pokazano na Rys. 30A. Gdy porównamy to widmo z widmem bakteriorodopsyny zawierającej znakowaną ^{13}C Lys, to zauważamy, że część tego pasma ulega przesunięciu do 1604 cm^{-1} (Rys. 30B). Wynika z tego wprost, że w skład pasma występującego przy 1620 cm^{-1} wchodzi drganie amidowe I cząsteczki Lys. W skład pasma przy 1620 cm^{-1} pozostałego po znakowaniu ^{13}C wchodzi drgania rozciągające $\text{C}=\text{N}$ zasady Schiffa i karbonyłowe drgania rozciągające proliny [43].

Naświetlanie stanu pośredniego M niebieskim światłem wywołuje powstanie kolejnego stanu pośredniego bakteriorodopsyny (M_{412}) z maksimum absorpcji przy 420 nm , który jest stabilny w temperaturze 100 K . Widma różnicowe FT-IR tego fotochemicznego stanu pośredniego w zakresie pasma amidowego I zostało pokazane na Rys. 31.



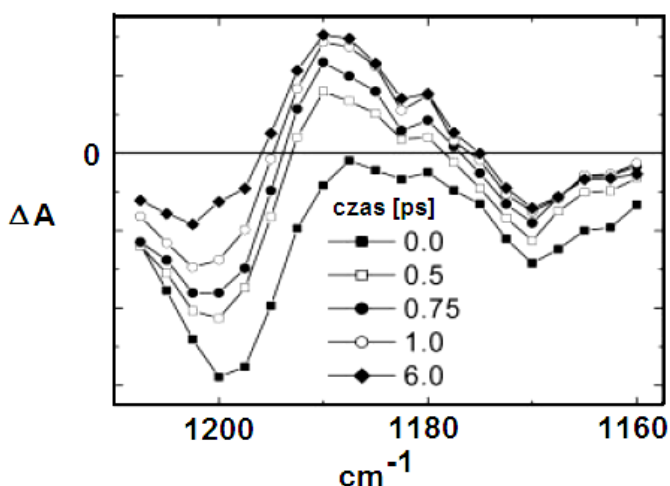
Rys. 31. Widma różnicowe FT-IR stanów pośrednich bakteriorodopsyny: M_{412} M_{420} w zakresie $1660\text{--}1560\text{ cm}^{-1}$ uzyskane w temperaturze 100 K . Widmo A: BR zawierająca znakowaną $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ Lys w H_2O , Widmo B: naturalna BR w H_2O [43].

Na Rys. 31A pokazano zmiany w zakresie pasma amidowego I w znakowanej izotopem ^{13}C lizyny. Dodatkowo pasmo przy 1620 cm^{-1} , które związane jest z zanikaniem części pasma stanu M, po naświetleniu przesunę się do 1604 cm^{-1} , co potwierdza udział reszty lizyny w procesie fototransformacji bakteriorodopsyny [43].

Udział innych aminokwasów np. metioniny w zmianach konformacyjnych bakteriorodopsyny był również badany przy pomocy różnicowej spektroskopii FT-IR. W celu

jednoznacznego przypisania pasm absorpcji zamiast znakować izotopowo metioninę zastąpiono ją jej analogiem selenometioniną [44].

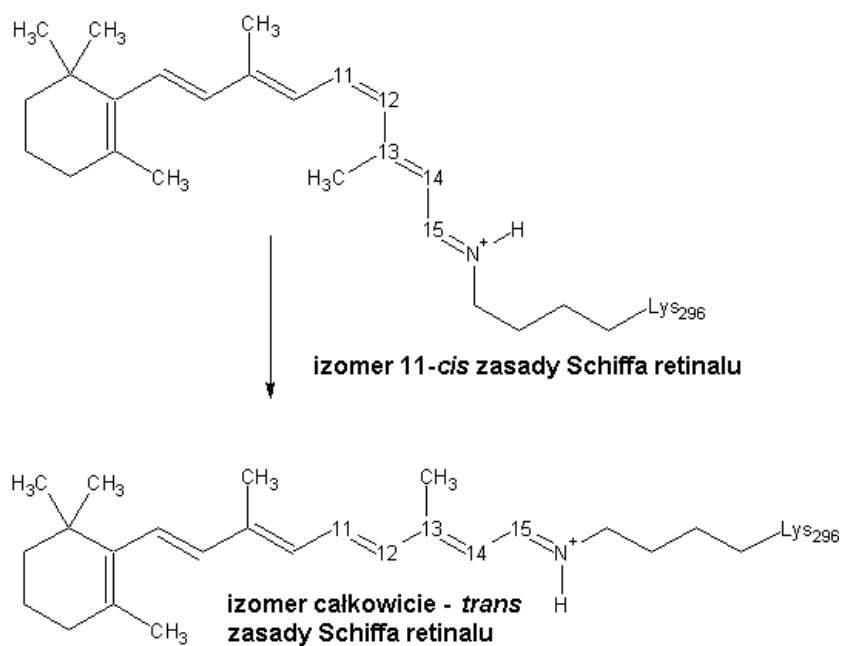
Czasoworozdzielczy różnicowy FT-IR zastosowano również w pomiarach czasu izomeryzacji retinalu w bakteriorodopsynie. Typowe widmo różnicowe FT-IR całkowicie-*trans* do 13-*cis* chromoforowego retinalu w pierwszych momentach po wzbudzeniu światłem pokazano na Rys. 32 [45].



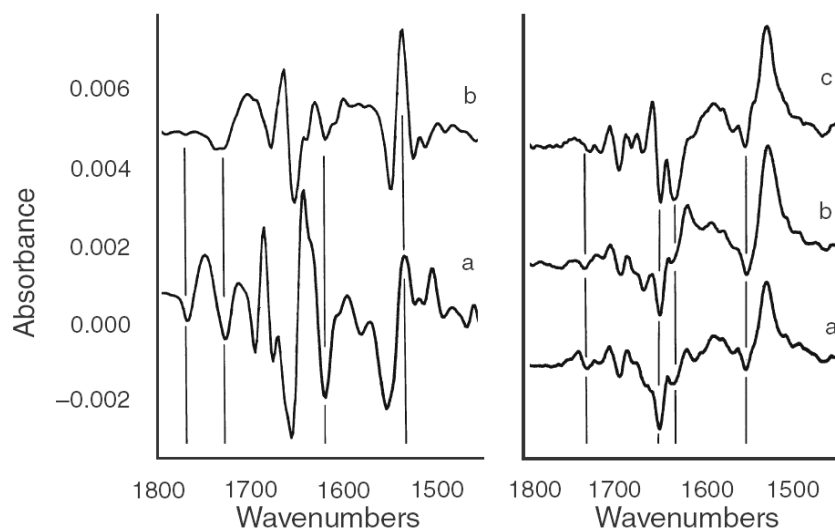
Rysunek 32. Fragment widm różnicowych FT-IR dla BR zarejestrowanych w różnych odstępach czasu od naświetlenia BR. Pojawienie się dodatniego pasma w okolicy 1190 cm^{-1} świadczy o obecności 13-*cis* chromoforowego retinalu [45].

Różnicowy FT-IR posłużył również do badania zmian konformacyjnych rodopsyny, białka obecnego w pręcikach i odpowiedzialnego za proces widzenia. Rodopsyna zawiera 11-*cis* retinal, będący grupą prostetyczną, związaną z resztą lizyny (Lys 296) opsyne przez wiązanie typu zasady Schiffa.

W przeciwieństwie do bakteriorodopsyny, w której po absorpcji światła chromoforowy całkowicie-*trans* retinal ulegał fotoizomeryzacji do 13-*cis* retinalu, w rodopsynie fotoizomeryzacji ulega 11-*cis* retinal do całkowicie-*trans* retinalu (Rys. 33). Zarówno białko, jaki i cząsteczka chromoforu ulegają dalszym przemianom konformacyjnym z utworzeniem pośrednich intermediatów takich jak: metarodopsyna I i metarodopsyna II. Powstanie wymienionych stanów pośrednich było badane przy wykorzystaniu czasoworozdzielczej spektroskopii różnicowej FT-IR (Rys. 34) [46].



Rysunek 33. Pierwszy etap pobudzenia wzrokowego polega na izomeryzacji pod wpływem światła cząsteczka protonowanej zasady Schiffa 11-cis retinalu do izomeru całkowicie *trans*



Rys. 34. Widma różnicowe FT-IR uzyskane przez różnicowanie widm nieoświetlonego receptora z widmem stanu pośredniego po oświetleniu. Rysunek po lewej: (a) przejście rodopsyny do metarodopsyny II w temperaturze 10C, (b) przejście rodopsyny do

metarodopsyny II w temperaturze -28C; Rysunek po prawej: widma różnicowe FT-IR przejścia rodopsyna m etarodopsyna I w temperaturze pokojowej: (a) normalne widmo różnicowe, (b) atom węgla w pozycji 12 chromoforowego retinalu został zastąpiony przez izotop ^{13}C , widmo nie przedstawia znaczących różnic z widmem poprzednim, (c) atom węgla w pozycji 15 zastąpiono izotopem ^{13}C (atom 15 tworzy wiązanie typu zasady Schiffa pomiędzy chromoforem a opsyną). Pasma przypisane drganiom $\text{C}=\text{N}$ oryginalnie przy 1657 cm^{-1} przesuwa się do 1634 cm^{-1} , ponadto obniża się intensywność dodatniego pasma przy 1626 cm^{-1} [46].

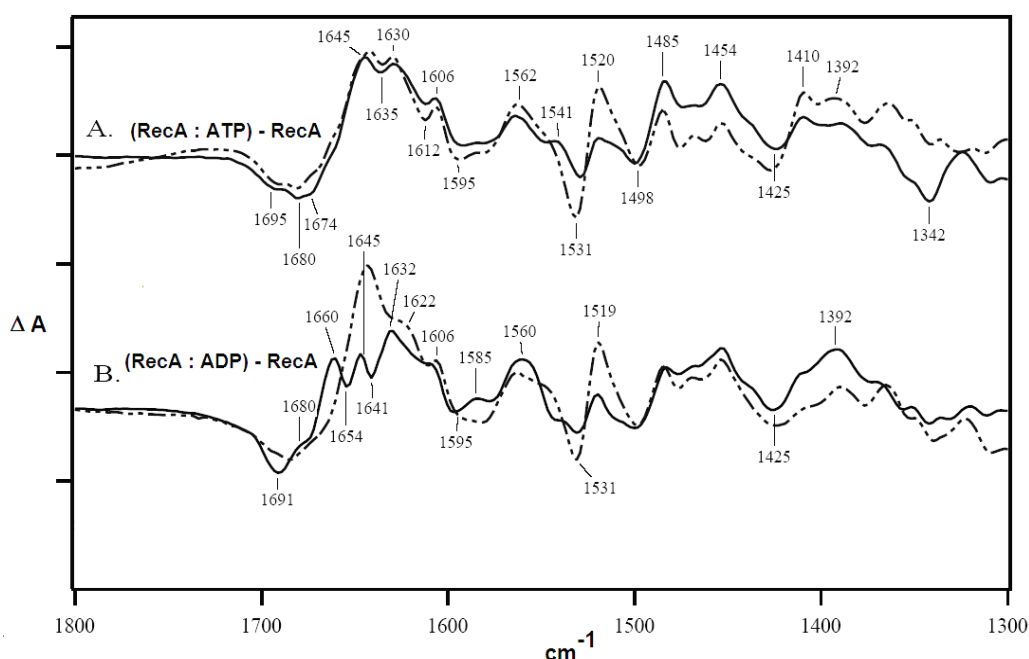
5.2 Wykorzystanie spektroskopii różnicowej FT-IR do badania zmian strukturalnych w białku RecA wywołanych wiązaniem nukleotydów

Białko RecA z *Escherichia coli* jest białkiem spełniającym wiele funkcji. Homologi RecA zostały odnalezione u przedstawicieli wszystkich głównych żywych organizmów. Białko to jest stosowane w genetycznej rekombinacji i procesach naprawy DNA. Wiązanie nukleotydów przez RecA wiąże się pojawieniem się dwóch zasadniczo różnych stanów białka. Wpoważanym RecA z cząsteczką ATP białko przyjmuje aktywną konformację, którą cechuje wysokie powinowactwo do DNA. Natomiast połączenie się RecA z cząsteczką ADP wywołuje takie zmiany konformacyjne, które prowadzą do struktury przejawiającej niskie powinowactwo do cząsteczki DNA. Zatem wiązanie się z odpowiednią cząsteczką nukleotydu ma charakter allosterycznej kontroli tego białka. Ponadto zmiany strukturalne wywołane wiązaniem nukleotydu mają wpływ na strukturę tworzonego kompleksu. Struktura trójwymiarowa białka RecA została określona przy pomocy metod rentgenograficznych. Niestety metody te nie mogły zostać wykorzystane do badań struktur połączeń RecA z ich kofaktorami i z DNA, ponieważ nie otrzymano do tej pory odpowiednich kryształów.

Do analizy zmian strukturalnych towarzyszących łączeniu się białka RecA z ATP i ADP wykorzystano spektroskopię różnicową FT-IR [47].

Na Rys. 35 zastawiono widma różnicowe FT-IR otrzymane dla kompleksów RecA:ATP i RecA:ADP. Szerokie, złożone, dodatnie pasmo w zakresie $1600\text{--}1670\text{ cm}^{-1}$ oraz ujemne w zakresie $1670\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$ obecne na widmach różnicowych RecA:ADP i RecA:ATP (Rys. 35) są związane z wiązaniem nukleotydów przez białko i reorganizacją jego struktury. Pozytywne pasma związane są z drganiami nowych oddziaływań obecnych w strukturach RecA:ADP i RecA:ATP, a ujemne pasma odpowiadają drganiom w cząsteczce białka nieobserwowanym po związaniu nukleotydu. Zestawienie widm różnicowych otrzymanych w H_2O i D_2O pokazuje spadek intensywności pasma amidowego II, obecnego przy około 1550

cm^{-1} (związane z obecnością drgań N-H sprzężonych z C=O) i wzrost intensywności pasma przy 1450 cm^{-1} (związanego z drganiami N-D po wymianie izotopowej wodoru na deuter). Oszacowana wymiana izotopowa wyniosła około 50 %, co może być związane z istnieniem w białku hydrofobowej wnęki lub utrudnioną wymianą [47].



Rysunek 35. Widma różnicowe FT-IR: (A) RecA:ATP minus RecA różnicowe widmo otrzymane w H_2O (—) i w D_2O (---), (B) RecA:ADP minus RecA różnicowe widmo otrzymane w H_2O (—) i w D_2O (---) [47].

Szczegółowa analiza danych uzyskanych z widm różnicowych FT-IR, pozwoliła zaproponować zmiany strukturalne, którym podlega białko RecA podczas wiązania nukleotydów oraz wytypować aminokwasy, które mogą oddziaływać z nukleotydami we wnętrzu białka. Wykazano także, że aminokwasy takie jak: Asp, Glu, Lys, His, Arg, Gln, Asn, and Tyr uczestniczą w zmianie powinowactwa RecA do cząsteczek DNA [47].

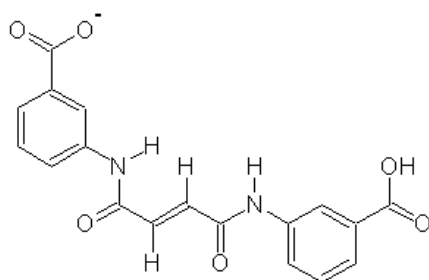
5.3 Badanie mechanizmu katalitycznego proteaz aspartylowych

Proteazy aspartylowe są szeroko rozpowszechnioną grupą enzymów proteolitycznych. Obecne są między innymi w organizmach kręgowców, w grzybach, w roślinach oraz

w retrowirusach. Enzymy te wykazują maksymalną wydajność katalityczną w kwaśnym środowisku. W centrum aktywnym tych enzymów są reszty asparagianu, których rola w procesie katalitycznym polega na aktywacji znajdujących się między nimi cząsteczki wody oraz działają jako donory i akceptory protonów. Doniosłą rolę w badaniach centrum katalitycznego pepsyny, jednego z enzymów proteolitycznych, należących do grupy proteaz aspartylowych, dokonano przy zastosowaniu techniki różnicowego FT-IR [48, 49].

Aby poznać mechanizm katalityczny enzymu często przeprowadza się badania z użyciem odpowiednio zsyntezowanych związków chemicznych, które mogą zastąpić substrat i oddziaływać z centrum katalitycznym enzymu.

Inne podejście do tego problemu, zaproponowane zostało przez Zundela i współpracowników [49]. Autorzy zaprojektowali i zsyntezowali grupę związków, które mogą być analogami miejsca aktywnego pepsyny. Wykorzystując różnicowy FT-IR porównywali oddziaływanie tych związków i pepsyny z tym samym substratem. Jako substratu w badaniach katalitycznej aktywności pepsyny i związku mającego być odpowiednikiem jej miejsca katalitycznego (*m*-FUM, Rys. 36) użyto peptydu: Pro-Thr-Glu-Phe-Phe(4-NO₂)-Arg-Leu.



Rysunek 36. Struktura *m*-FUM, odpowiednika miejsca katalitycznego pepsyny [49].

Na Rys. 36 widmo różnicowe FT-IR [(substratu + pepsyny) minus (substratu)] (linia przerywana) zostało porównane z widmem różnicowym FT-IR [(substratu + *m*-FUM) minus (substratu)] (linia ciągła). Te dwa widma różnicowe są bardzo podobne. W obu widmach przy 3278 cm⁻¹ zaobserwowano ujemne pasmo przypisane drganiom $\nu(\text{N-H})$ wiązania peptydowego (pasmo amidowe A). Z obserwacji tej wynika, że wiązanie peptydowe ulega rozszczepieniu zarówno przy udziale pepsyny jak i *m*-FUM. Sugestię tę potwierdza dodatkowo obecność bardzo silnego ujemnego pasma 1629 cm⁻¹ i ujemnego pasma przy 1542 cm⁻¹ (Rys. 36b). Z faktu, że oba te pasma są obserwowane jako pasma ujemne o tej samej

intensywności w obu przypadkach dowodzi, iż wiązanie peptydowe jest rozszczepiane przez *m*-FUM na tej samej drodze co w pepsynie. Zatem *m*-FUM wykazuje aktywność katalityczną taką jak pepsyna i może służyć jako odpowiednik miejsca aktywnego pepsyny [49].

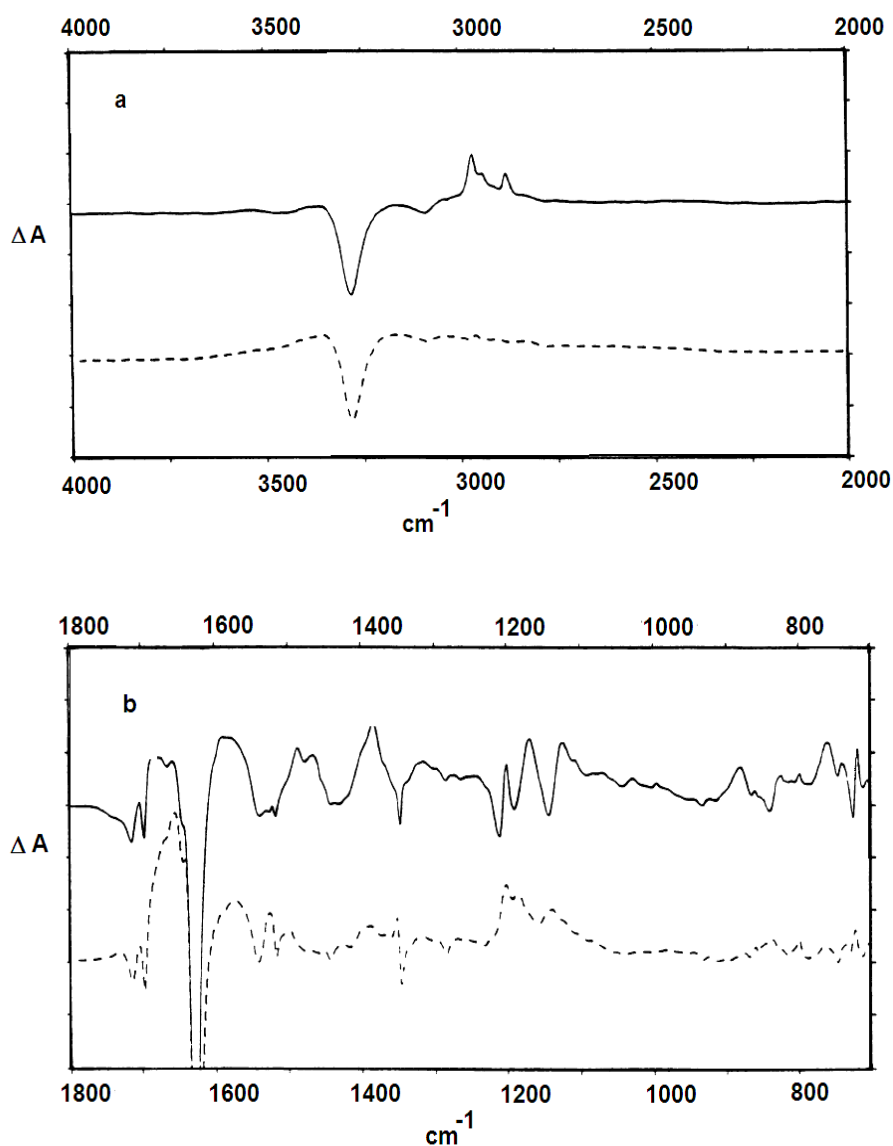


Figura 36. Widma różnicowe FT-IR [substrat + *m*-FUM] minus [substrat](—) i [substrat + pepsyna] minus [substrat] (---) w: (a) zakresie 4000-2000 cm^{-1} i (b) w zakresie 1800-700 cm^{-1} [49].

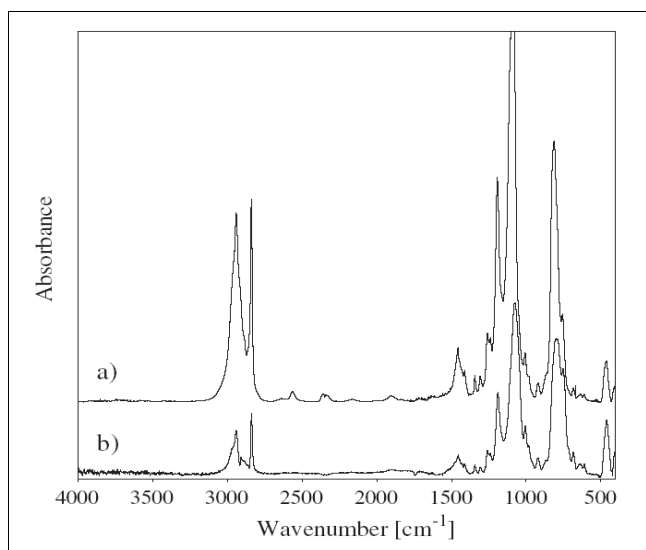
Przytoczone zastosowania spektroskopii różnicowego FT-IR ukazują tylko wąski zakres użyteczności tej techniki spektroskopowej w badaniach receptorów biologicznych i enzymów. Badania receptorów prowadzone obecnie są niemal wyłącznie w oparciu o badania krystalograficzne, fluorescencyjne i różnicowy FT-IR.

6. Zastosowanie techniki RAIRS do badania cienkich warstw na powierzchni metali

Technika RAIRS (*ang. Reflection Absorption Infrared Spectra*) to technika refleksyjna wykorzystująca zjawisko zewnętrznego odbicia promieniowania. W technice tej wiązka promieniowania podczerwonego pada na próbkę i odbija się od niej, przy czym część promieniowania jest pochłaniana przez próbkę w wyniku selektywnej absorpcji. Technika RAIRS powszechnie wykorzystywana jest do badania cienkich warstw (filmów), często osadzonych na powierzchni metali [50.]

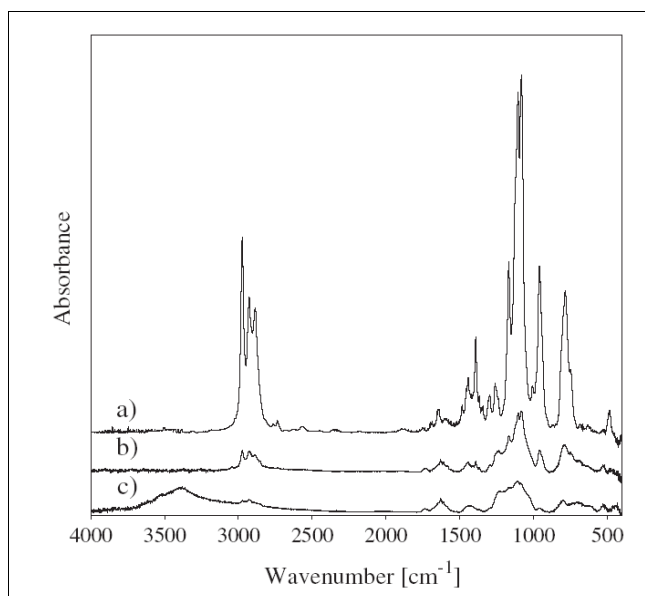
Technikę RAIRS zastosowano między innymi w badaniach chemicznie modyfikowanej powierzchni srebra oraz do badania oddziaływań pomiędzy cienką warstwą powierzchniową a kationami Li^+ [51].

Powierzchnie srebra modyfikowano poprzez reakcję z 3-(trimetoksy-sililo)-propaniolem (SIS1) bądź 3-[tris-(2metoksyetoksy)sililo]-propaniolem (SIS2). Typowe widmo absorpcyjne FT-IR uzyskiwano po 2000 skanów (Rys. 37).



Rysunek 37. Widma FT-IR: (a) transmisyjne widmo SIS1; (b) widmo odbiciowe SIS1 zabsorbowanego na powierzchni Ag [51].

Zmodyfikowana powierzchnia srebra zdolna była do kompleksowania kationów litu. Proces kompleksowania kationów Li^+ przez zaabsorbowany na powierzchni srebra cienki film SIS2 badany był również przy użyciu techniki RAIRS (Rys.38).



Rysunek 38. Widma FT-IR (a) transmisyjne widmo SIS2; (b) widmo odbiciowe SIS2 zabsorbowanego na powierzchni Ag; (c) widmo odbiciowe SIS2 zabsorbowanego na powierzchni Ag w obecności LiClO_4 [51].

Podziękowania:

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

Literatura:

1. C.L. Putzig, M.A. Leugers, M.L. McKelvey, G.E. Mitchell, R.A. Nyquist, R.P. Papenfuss, R. Yurga, *Anal. Chem.*, 66, (1998), 26R-66R.
2. M.L. McKelvey, T.R. Britt, B.L. Davis, J.K. Gillie, F.B. Grave, L.A. Lentz, *Anal. Chem.*, 70, (1998), 119R-177R.
3. A.S. Gilbert, *IR Spectral Group Frequencies of Organic Compounds*, w: *Encyclopedia of Spectroscopy and Spektrometry*, J. Lindon, J. Holmes, G. Tranter (red.), Academic Press, (2000), 1035-1047.
4. H.H. Manstsch, D. Chapman (red.) *Infrared Spectroscopy of Biomolecules*; Wiley-Liss: New York, (1996).
5. J. Coates, *Spectroscopy*, 10, (1995), 14-17.
6. J. Coates, *Appl. Spectrosc. Rev.*, 31, (1996), 179-192.
7. J. Coates, *Spectroscopy*, 12, (1997), 18-20.
8. V.A. Self, P.A. Termon, *Rev. Sci. Instrum.* 67, (1996) 2096-2099.
9. L.K. Tamm, S.A. Tatulian, *Quarterly Reviews of Biophysics* 30, (1997), 365-429.
10. R.A. Spragg, *IR Spectroscopy Sample Preparation Methods*, w: *Encyclopedia of Spectroscopy and Spektrometry*, J. Lindon, J. Holmes, G. Tranter (red.), Academic Press, (2000), 1059-1066.
11. U.P. Fringelli, *ATR and Reflectance IR Spectroscopy Applications*, w: *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, J. Lindon, J. Holmes, G. Tranter (red.), Academic Press, (2000), 58-75.
12. R. G. J. Miller, B.C. Stace (red.), *Laboratory Methods in Infrared Spectroscopy*, Heyden, London, (1979).
13. V.P. Tolstoy, I.V. Chernyshova, V.A. Skryshevsky w: *Handbook of Infrared Spectroscopy of Ultrathin Films*, Wiley Interscience, New Jersey, (2003)
14. B. Brzezinski, B. Gierczyk, B. Różalski, G. Wojciechowski, G. Schroeder, G. Zundel, *J. Mol. Struct.*, 519 (2000) 119-123.
15. B. Brzezinski, G. Schroeder, *J. Mol. Struct.*, 44,1 (1998), 83-88.
16. G. Zundel, w P. Schuster, G. Zundel, C. Sandfory (red.), *The Hydrogen Bond-Recent Developments in Theory and Experiments*, North Holland, Amsterdam, Vol. II, 687.
17. D. Borgis, G. Tarpis, H. Azzouz, *J. Chem. Phys.* 97, (1992), 1390.
18. A. Huczyński, P. Przybylski, B. Brzezinski, F. Bartl, *J. Phys. Chem. B*, 110, (2006), 15615-15623.

19. R. Pankiewicz, A. Gurzkowska, B. Brzezinski, G. Zundel, F. Bartl, *J. Mol. Struct.*, 646, (2003), 67–74.
20. A. Huczyński, P. Przybylski, B. Brzezinski, F. Bartl, *J. Mol. Struct.*, 797, (2006), 99–110.
21. H.Y. Wang, J. Han, X.G. Feng, Y.L. Pang, *Spectrochimica Acta Part A*, 65, (2006), 100–105.
22. R. Ficarra, S. Tommasini, D. Raneri, M.L. Calabro, M.R. Di Bella, C. Rustichelli, M.C. Gamberini, P. Ficarra, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 29, (2002), 1005–1014.
23. V. Bertacche1, N. Lorenzi, D. Nava, E. Pini, C. Sinico, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 55, (2006), 279–287.
24. R.P. Sperling, H. Fisher, w: *Hadbook of Surface Imaging and Visualization*; A. Hubbard (red.), CRC Press: Boca Raton, FL, (1995), 245–263.
25. S. Egist, H. Ishida, *Appl.Spectrosc.*, 50, (1996), 1187–1195.
26. R. Beleli, J.M. Vigoureux, J. Morwan, *J. Opt. Soc. Am. B*, 12, (1995), 2377–2381.
27. H. Qing, H. Yanin, S. Fenlin, T. Zuyi, *Spectrochim. Acta A*, 52, (1996), 1795–1800.
28. V. Raussens, C.A. Fisher, E. Goormaghtigh,, R.O. Ryan. J.M. Ruyschaert, *J. Biol. Chem.*, 273, (1998), 25825–25830.
29. R. Lucena, S. Cardenas, M. Gallego, M. Valcarcel, *Anal. Chem.*, 77, (2005), 7472–7477.
30. A. Sevin-Landais, P. Rigler, S. Tzartos, F. Hucho, R. Hovius, H. Vogel, *Biophys. Chem.*, 85, (2000) 141.
31. M. Voue, E. Goormaghtigh, F. Homble, J. Marchand-Brynaert, J. Conti, S. Devouge, J. De Coninck, *Biochemical Interaction Analysis on ATR Devices: A Wet Chemistry Approach for Surface Functionalization*, (2007) (w druku), *Langmuir*, doi: 10.1021/la061627j.
32. J.J. van Thor, A.J. Pierik, I. Nugteren-Roodzant, A. Xie, K.J. Hellingwerf, *Biochemistry*, 37, (1998), 16915–16921.
33. A. Barth, W. Mantele, *Biophys. J.*, 75, (1998), 538–544.
34. S. Kim, C.A. Sacksteder, K.A. Bixby, B.A. Barry, *Biochemistry*, 40, (2001), 15384–15395.
35. K. Bagley, G. Dollinger, L. Eisenstein, A.K. Singh, L. Zimanyi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, (1982), 4972–4976.

36. V.E. Bergo, N. Spudich, K.L. Scott, J.L. Spudich, K.J. Rothschild, *Biochemistry*, 39, (2000), 2823–2830.
37. O. Bousche, E.N. Spudich, J.L. Spudich, K.J. Rothschild, *Biochemistry*, 30, (1991), 5395–5400.
38. M. Engelhard, B. Scharf, F. Siebers, *FEBS Lett.* 395, (1996), 195–198.
39. Rothschild, K. J., M. Zagaeski, W.A. Cantore, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 103, (1981), 483–489.
40. F. Siebert, W. Maentele, *Eur. J. Biochem.*, 130, (1983), 565–573.
41. J.Olejniki, B. Brzezinski, G. Zundel, *J. Mol. Struct.* 271, (1992), 157-173.
42. J.Olejniki, B. Brzezinski, G. Zundel, *A Proton Pathway with Large Proton Polarizability in Bacteriorhodopsin*, w: *Future Directions of Nonlinear Dynamics in Physical and Biological Systems*, P.L Christiansen (red.), Plenum Press, New York, (1993), 473-476.
43. H. Takei, Y. Gat, Z. Rothmann, A.Lewis, M. Sheves, *J. Biol. Chem.*, 269, (1994), 7387-7389.
44. V. Bergo, S. Mamaev, J. Olejniki, K.J. Rothschild, *Biophys. J.*, 84, (2003), 960–966.
45. J. Herbst, K. Heyne, R. Diller, *Science* 297, (2002), 822-825.
46. A.M.A. Pistorius, *Spectroscopy Europe*, 7/4, (1995), 8-14.
47. B.C. Butler, R.H. Hanchett, H. Rafailov, G. MacDonald *Biophys. J.*, 82, (2002), 2198–2210.
48. G. Iliadis, G. Zundel, B. Brzezinski, *FEBS Letters*, 352, (1994), 315-317.
49. G. Iliadis, G. Zundel, B. Brzezinski, *Biophys. J.*, 71, (1996), 2840-2847.
50. P.A. Antunes, C.J.L. Constantino, R. Aroca, J. Duff, *Appl. Spectrosc.*, 55, (2001), 1341-1346.
51. B Łęska, G. Schroeder, T. Łuczak, P. Przybylski, R. Pankiewicz, M. Bełtowska-Brzezinska, B. Brzezinski, *Thin Solid Films*, 515, (2006), 152-157.

Rozdział 13

Techniki spektroskopii oscylacyjnej w analizie ugrupowań chemicznych typu gość-gospodarz. Teoria i eksperyment

Joanna Łojewska, Kamilla Małek, Leonard Proniewicz

Uniwersytet Jagielloński, Wydział Chemii, Ingardena 3, 30-060 Kraków

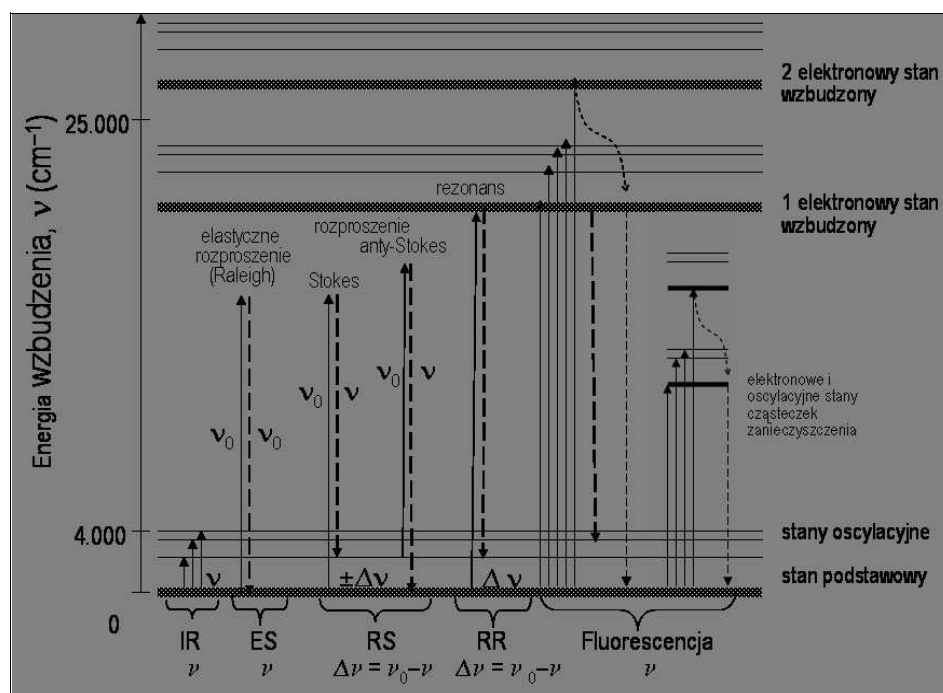
1. Wstęp

Kluczem do projektowania układów biosensorowych typu gość-gospodarz jest nie tylko poznanie ich struktury (wiązania, konformacje, symetria, krystaliczność), lecz również zrozumienie funkcji poszczególnych ugrupowań molekularnych, ich inter- i intramolekularnych oddziaływań oraz mechanizmu ich tworzenia. Współczesna chemia posiada cały szereg coraz to bardziej zaawansowanych doświadczalnych metod badawczych, w tym metod spektroskopowych. Równocześnie osiągnięcia chemii kwantowej pozwalają na zastosowanie teoretycznych narzędzi przewidywań struktury. Dzięki nim można niekiedy otrzymać wynik szybciej i taniej niż to wymaga eksperyment. W ujęciu metodologicznym to model może stawiać pytania, na które odpowiada eksperyment. Tak został pomyślany układ rozdziałów w niniejszej pracy. Z drugiej strony ugrupowania typu gość-gospodarz badane są pod kątem poszukiwania odpowiednich, często nieinwazyjnych metod analiz lub diagnostyki, jak w przypadku biosensorów lub markerów biologicznych¹⁻⁵.

Postęp techniczny nie ominął również metod spektroskopii oscylacyjnej (IR, Raman), a w szczególności spektroskopii ramanowskiej, gdzie praktycznie każdy rok przynosi nowe, przełomowe rozwiązania. w konstrukcji układów optycznych (np. lasery diodowe, holograficzne filtry selektywne – *holographic notch filters*) i detekcyjnych (np. detektory CCD – *charge couple devices*)⁶⁻⁹. Doprowadziło to do znacznego zwiększenia czułości przyrządów a w następstwie dało możliwość rutynowego wykorzystania tej metody w biochemicznych laboratoriach badawczych oraz laboratoriach przemysłowych.

W rozważaniach nad strukturą związków supramolekularnych szerokie możliwości otwiera jednoczesne zaangażowanie obu metod spektroskopowych podczerwieni (IR)

i Ramana (RS) Ze względu na wzajemnie dopełniające się reguły wyboru obie metody nazywane są komplementarnymi^{9,10}, ponieważ dają one dopełniający obraz struktury i symetrii cząsteczek. Mechanizm przejść absorpcyjnych w podczerwieni oraz rozproszenia ramanowskiego ilustruje Rysunek. 1.1. W przypadku spektroskopii IR niezerowy moment przejścia absorpcyjnego dla drgań normalnych występuje wówczas, gdy z danym drganiem związana jest zmiana momentu dipolowego. W przypadku rozproszenia Ramana wartość momentu przejścia uzależniona jest od zmiany przynajmniej jednej składowej tensora polaryzowalności podczas drgania normalnego. O tym, czy dane drganie normalne będzie aktywne w podczerwieni czy w Ramanie decydują zatem momenty dipolowe poszczególnych wiązań (trwale i indukowane), a także symetria cząsteczki. W określaniu symetrii cząsteczek i drgań z pomocą przychodzi teoria grup¹¹.



Rysunek 1.1. Porównanie mechanizmów absorpcji, rozpraszania promieniowania i fluorescencji.

W porównaniu z prostym mechanizmem absorpcji promieniowania IR, mechanizm rozpraszania jest złożony, chociaż oba zjawiska dają obraz struktury oscylacyjnej cząsteczki w tym samym zakresie częstości (Rys. 1.1)^{7,10,12}. Prócz rozpraszania elastycznego (Reyleigh'a) obserwowane jest rozpraszanie nieelastyczne, które generuje fotony o częstości mniejszej (Stokes) i większej (anti-Stokes) od częstości promieniowania wzbudzającego, ν_0 (zwykle laserowe z zakresu światła widzialnego lub nadfioletu).

Towarzyszy temu tworzenie wirtualnych wzbudzonych stanów elektronowych, które ulegają relaksacji z pobudzeniem stanów oscylacyjnych (ekscytacja i deekscytacja) o częstościach równych różnicy pomiędzy częstością promieniowania wzbudzającego i rozproszonego. Intensywności rozproszenia można określić wzorami otrzymanymi z obliczeń kwantowo mechanicznych w przybliżeniu harmonicznym:

$$I(\text{Reyleigh}) \approx \alpha_0^2 \cdot E_0^2 \nu_0^4 \quad 1.1$$

$$I(\text{Raman}) \approx \left(\frac{d\alpha}{dq} \right)_0 Q^2 \cdot E_0^2 \cdot (\nu_0 - \nu_{12})^4 \quad 1.2$$

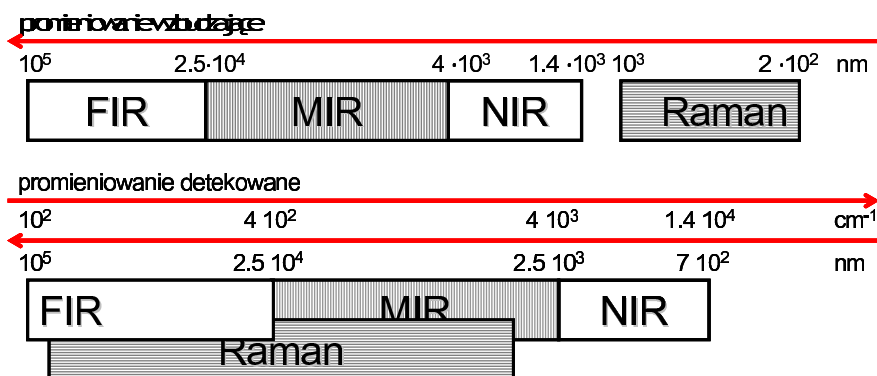
gdzie: α - oznacza polaryzowalność, E_0 – wektor składowej elektrycznej promieniowania wzbudzającego, a ν_0 jego częstość, ν_{12} - częstość przejścia ze stanu 1 do 2, Q – amplitudę drgania normalnego, q – współrzędną drgania normalnego.

Relacje pomiędzy intensywnościami rozproszenia są następujące: $I(\text{Reyleigh}) \approx 10^3 \cdot I(\text{Stokes})$, $I(\text{Stokes}) > I(\text{anty-Stokes})$. Ta druga relacja wynika z różnicy w rozkładzie bolzmanowskim obsadzeń poziomów oscylacyjnych (w temperaturze pokojowej najbardziej obsadzonym stanem jest stan podstawowy). Z tych powodów w klasycznej spektroskopii Ramana mierzone są właśnie linie stokesowskie. Jeżeli energia promieniowania wzbudzającego odpowiada różnicy poziomów elektronowych w cząsteczce obserwowany jest tak zwany rezonansowy efekt Ramana (RR), o znacznie większej intensywności od stokesowskich przejść (rzędu 10^3 - 10^6 razy)¹³. W istocie rozwój metod spektroskopii ramanowskiej to zmagania o intensywność sygnału, zatem wzmocnienie dające intensywności porównywalne z intensywnościami IR, jak w przypadku efektu RR jest znaczące. W tym kontekście podobnie doniosłym odkryciem jest tak zwany powierzchniowy efekt wzmocnienia ramanowskiego (*Surface enhanced Raman Scattering – SERS*)¹⁴. Zależnie od warunków eksperymentalnych wzmocnienia mogą sięgać rzędu 10^{15} razy. Przeszkodą w interpretacji widm ramanowskich jest zjawisko fluorescencji, polegającej na emisji promieniowania o niższej częstości od promieniowania wzbudzającego podczas kaskadowej relaksacji wzbudzonych stanów elektronowych bez zmiany ich multipletowości. Fluorescencja powoduje przesłanianie słabych w stosunku do niej pasm ramanowskich i może pojawiać się wówczas, gdy energia promieniowania wzbudzającego pokrywa się z różnicą poziomów elektronowych grup fluoroforowych zawartych w badanym materiale, często pochodzących od zanieczyszczeń.

Szczegółowe rozważania na temat intensywności i częstości przejść IR i RS znajdują się w dalszych rozdziałach dotyczących modelowania widm. W oparciu o nie można przewidzieć występowanie pasm w komplementarnych widmach otrzymanych omawianymi metodami. Jako regułę można przyjąć, że pasma związane z drganiami grup polarnych (OH, NH) są intensywne w widmach IR i na odwrót, pasma od drgań grup niepolarnych lub słabo polarnych (rozciągające C=C, C=N, N=N, C≡C, C≡N, N≡N) są intensywne w widmie Ramana¹⁵. Wyjątkiem jest drganie grupy karbonylowej (C=O) bardzo aktywne w IR. Z kolei drgania symetryczne rozciągające (cząsteczka trójatomowa) są zwykle znacznie intensywniejsze w widmach Ramana niż w IR, a drgania antysymetryczne przeciwnie. Jeżeli molekuła ma dodatkowo środek symetrii (CO₂, benzen), wówczas wszystkie drgania aktywne w IR (antysymetryczne) są zabronione w widmie Ramana i odwrotnie. O częstości danego drgania (np. C=O) decyduje lokalny potencjał lub inaczej otoczenie chemiczne, na które składają się: typ grupy (-HCO, -COOH itp.), wiązania wodorowe, grupy sąsiadujące, sprzężenie grup, formy izomeryczne, konformacje, naprężenia w przypadku pierścieni (aromatyczne lub sacharydowe) i wreszcie forma krystaliczna. Z tych powodów interpretacja widma i właściwe przypisanie pasm w złożonych układach, jakimi mogą być sensory molekularne, jest właściwie niemożliwa bez wspomagania ze strony kwantowo-mechanicznych metod obliczeniowych.

O ile typowe oscylacyjne techniki spektroskopowe (MIR od *middle*, RS), pracujące w zakresie częstości od 400-4000 cm⁻¹ (Rys. 1.2), dają obraz podstawowych przejść w postaci harmonicznym wzbudzeń drgań normalnych cząsteczek, dobrze udokumentowanych w tablicach korelacyjnych¹⁵, spektroskopia w bliskiej podczerwieni (NIR) w zakresie 4000-14000 cm⁻¹ odzwierciedla przejścia anharmoniczne w tym nadtony i tony kombinacyjne (kombinacje przejść podstawowych)¹. Warto nadmienić, że takie przejścia są praktycznie niewidoczne w widmach ramanowskich. Chociaż w zakresie NIR w widmach występują tylko pasma od drgań CH, NH i OH, to nie są one proste w interpretacji z powodu mnogości rozmaitych kombinacji. Dodatkową komplikacją jest to, że intensywności tych przejść są słabsze aniżeli intensywności przejść w zakresie średniej podczerwieni. Z drugiej jednak strony prostota wykonania eksperymentu, zwłaszcza w porównaniu z metodą MIR, jest kusząca i skłania do stosowania metody NIR jako rutynowego narzędzia diagnostycznego zwłaszcza w zastosowaniu do analizy ilościowej¹⁶. Z pomocą interpretacyjną przychodzi chemometria z całym wachlarzem metod korelacyjnych, takich jak na przykład analiza 2D, analiza głównego komponentu (*Principal Component Analysis*, PCA), o czym będzie mowa w następnych rozdziałach.

Szczególne zastosowanie w analizie metaloorganicznych związków koordynacyjnych oraz analizie ciał stałych ma spektroskopia w dalekiej podczerwieni, a także ostatnio rozwijana, spektroskopia niskiej częstotliwości THz, obejmująca zakres aż do 7.7 mm (1.2 cm^{-1})^{5,17}. W tym zakresie obserwuje się drgania podsieci krystalicznych o wysokich indeksach współczynników Millera, drgania torsyjne oraz drgania wiązań wodorowych. Spektroskopia THz znalazła zastosowanie m.in. w analizie związków organicznych o przeznaczeniu farmaceutycznym⁵.



Rysunek 1.2. Zakresy długości fal stosowane w różnych metodach spektroskopii oscylacyjnej

W badaniach mechanizmów reakcji króluje *operando spectroscopy* pozwalająca na śledzenie postępu reakcji i dająca wgląd w produkty przejściowe na rozmaitych ścieżkach reakcyjnych. W biochemii szczególne zastosowanie mają metoda *time-resolved* oraz powierzchniowego plazmonowego rezonansu (*surface plasmon resonance*), o czym będzie mowa w dalszych rozdziałach monografii.

2. Kwantowo-chemiczne modelowanie widm oscylacyjnych i wybranych właściwości fizykochemicznych

Rozwój metod kwantowo-chemicznych oraz techniki komputerowej pozwala na szczegółowe badania teoretyczne struktur elektronowych układów molekularnych, a co za tym idzie, na interpretację ich eksperymentalnie zmierzonych właściwości fizykochemicznych. Metody obliczeniowe stały się więc niezbędnym narzędziem dla zrozumienia struktury molekularnej i natury wiązań chemicznych. Dodatkowo wobec rozpowszechnienia komercyjnych pakietów obliczeniowych, modelowanie struktury przestaje być domeną teoretyków i powoli wkracza jako rutynowe narzędzie w laboratoriach badawczych, często niestety stosowane bezkrytycznie w abstrakcji od pryncypiów. Z powyższych powodów celowym wydaje się zebranie podstawowych zagadnień związanych

z modelowaniem widm oscylacyjnych dla tych spośród czytelników, których główną dziedziną nie są dyscypliny związane z chemią kwantową.

W wielu dziedzinach chemii, a w szczególności w badaniach spektroskopowych, teoretyczne przybliżenia pozwalają w pełni wyjaśnić strukturę badanych widm. Stopień zaawansowania technik komputerowych pozwala już na modelowanie układów składających się nawet z kilkuset atomów. Teoretycznie modelować można każdy układ: organiczny, nieorganiczny, periodyczny (polimery, warstwy, ciała stałe) czy też zawierający jony metali przejściowych, w praktyce poważnym ograniczeniem pozostaje czas obliczeń. Chemia obliczeniowa pozwala na numeryczne modelowanie struktury molekularnej, reakcji chemicznych czy też właściwości spektroskopowych w oparciu o podstawowe prawa fizyki. Ogólnie obliczenia można sprowadzić do trzech aspektów:

- obliczenia wartości energii i właściwości z nią związanych,
- znalezienia struktury o najniższej wartości energii - „optymalizacja geometrii” (pierwsza pochodna energii względem położenia atomów),
- obliczenia częstości oscylacyjnych molekuly – „rodzaj struktury zoptymalizowanej geometrii” (druga pochodna energii względem położenia atomów).

Przystępując do obliczeń kwantowo-chemicznych należy zapoznać się z dostępnymi metodami obliczeniowymi, a przede wszystkim z ich ograniczeniami i stosownością do badanych układów.

2.1. Przegląd metod kwantowych

Obecnie, najczęściej stosowanymi metodami obliczeniowymi są:

- mechanika molekularna oparta na klasycznych prawach pól siłowych (prawa fizyki klasycznej),

oraz te oparte na prawach mechaniki kwantowej:

- metody półempiryczne wykorzystujące, w celu uproszczenia obliczeń, parametry uzyskane z danych eksperymentalnych,
- metody *ab initio* oparte na równaniu Schrödingera: przybliżenie Hartree-Focka (HF), teoria perturbacyjna Møllera-Plesseta (MP), teoria mieszania konfiguracji (ang. *Configuration Interaction*, CI), teoria sprzężonych klasterów (ang. *Coupled-Cluster theory*, CC),
- metody teorii funkcjonału gęstości DFT (ang. *Density Functional Theory*), gdzie funkcją określającą stan kwantowo-chemiczny układu molekularnego jest jego gęstość elektronowa oparta na teoremacie Kohna-Schama.

Poniżej, przedstawiono pokrótce podstawowe założenia najczęściej stosowanych metod, czyli *ab initio* i DFT.

2.1.1 Metody *ab initio*¹⁸⁻²²

W metodach *ab initio* (łac. od początku) nie korzystamy z danych doświadczalnych. Punktem wyjściowym jest równanie Schrödingera i wartości uniwersalnych stałych (prędkość światła, masa i ładunek elektronu i jądra, stała Plancka) oraz wykorzystanie fundamentalnych praw fizycznych. Niestety obliczenia tego typu są bardzo czasochłonne.

I. Metoda Hartree-Focka – samouzgodnionego pola, SCF (*Self Consistent Field*).

Podstawowym postulatem mechaniki kwantowej jest istnienie funkcji falowej Ψ dającej pełną informację o dowolnym układzie. Jest to funkcja współrzędnych przestrzennych i wszystkich cząstek tworzących dany układ molekularny. Rozwiązanie wieloelektronowego równania Schrödingera (2.1) niezależnego od czasu stanowi fundament tej metody:

$$\hat{H}\Psi = E\Psi \quad 2.1$$

gdzie $\hat{H}$ jest hamiltonianem molekularnym wyrażonym następującym równaniem (2.2):

$$\hat{H} = \hat{T}_{el} + \hat{V}_{el-el} + \hat{V}_{el-N} + \hat{V}_{N-N} + \hat{T}_N \quad 2.2$$

a $\hat{T}_{el}$ i $\hat{T}_N$ operatorami energii kinetycznej elektronu i jądra; $\hat{V}_{el-el}$, $\hat{V}_{N-N}$ i $\hat{V}_{el-N}$ operatorami energii potencjalnej, kolejno: odpychania pomiędzy elektronami, pomiędzy jądrami i przyciągania elektron – jądro. Natomiast E jest wartością własną (energiją) danego hamiltonianu.

Dokładne rozwiązanie wieloelektronowego równania Schrödingera, jak do tej pory, jest niemożliwe z matematycznego punktu widzenia, dlatego też konieczne było wprowadzenie odpowiedniego przybliżenia, zwanego od nazwisk twórców, przybliżeniem Borna-Openheimera. Polega ono na założeniu, iż prędkość ruchu jąder jest znacznie mniejsza od prędkości elektronów i stąd można przyjąć, że ruch tych ostatnich odbywa się przy niezmiennym położeniu jąder. Stąd, jeśli zmiana położenia obu rodzajów cząstek (odpowiednio $\mathbf{r}$, $\mathbf{R}$ dla elektronów i jąder) odbywa się niezależnie, całkowita funkcja falowa może być rozdzielona na część elektronową, $\Psi^{el}(\mathbf{r},|\mathbf{R}|)$, i jądrową, $\Theta(\mathbf{R})$, (2.3):

$$\Psi(r, R) = \Psi^{el}(r, |R|) \cdot \Theta(R) \quad 2.3$$

W konsekwencji, prowadzi to do konieczności rozwiązania jedynie elektronowego równania Schrödingera przy założonym położeniu jąder danego układu molekularnego.

Dla wszystkich możliwych konfiguracji jądro-jądro otrzymuje się F-wymiarową przestrzeń Borna-Openheimera (F - liczba stopni swobody układu molekularnego) opisującą ruch jąder w potencjale elektronów, zwaną też powierzchnią energii potencjalnej (PES, ang. *Potential Energy Surface*).

Innym postulatem mechaniki kwantowej, wykorzystywanym do otrzymania jak najbardziej dokładnego rozwiązania równania Schrödingera jest zasada wariacyjna. Zakłada się, iż wartość spodziewana jakiegokolwiek funkcji falowej danego systemu molekularnego jest zawsze równa lub większa od dokładnej wartości energii jego stanu podstawowego. W obliczeniach wariacyjnych założenie to służy jako swoisty test dokładności otrzymanej funkcji falowej. W praktyce odnosi się to do przybliżenia postaci funkcji Ψ jako liniowej kombinacji skończonej liczby funkcji bazy i rozwiązania jej równania własnego przy użyciu równań sekularnych.

Niestety, metoda wariacyjna jest oparta na przybliżeniu jednoelektronowym, czyli każdy z elektronów danego układu znajduje się w uśrednionym polu pozostałych. W związku z tym, nieuwzględniona jest energia korelacji. Ma to szczególne znaczenie dla obliczeń właściwości zależnych od odległości pomiędzy elektronami. W przypadku, gdy dana wielkość zależy jedynie od całkowitego rozkładu ładunku elektronowego, wyniki uzyskane metodą SCF są dokładniejsze.

2.1.2 Metody *post*-SCF

Pomimo, iż energia korelacji stanowi jedynie około 1% energii całkowitej cząsteczki, to jej zaniedbanie prowadzi do niepoprawnego jakościowego opisu badanego układu, zwłaszcza w przypadku jonów metali przejściowych czy też oddziaływania pomiędzy molekułami. Do metod uwzględniających ten problem należą następujące teorie: perturbacyjna Møllera-Plesseta (MP), mieszania konfiguracji (CI) oraz sprzężonych klasterów (CC). W metodach tych wykorzystane są spinorbitale Hartree-Focka i wyznaczniki Slatera. W metodzie CI, do stanu podstawowego cząsteczki opisanego przez HF dodaje się funkcje falowe angażujące pojedyncze lub podwójne wzbudzenia do orbitali wirtualnych (ang. *Single and Double CI*). Możliwe są wzbudzenia wyższego rzędu, ale zwiększają one w znaczny stopniu czas obliczeń. Natomiast podstawą metody CC jest fakt, iż większą część korelacji obserwuje się dla par elektronów o przeciwnym rzucie spinów i zajmujących ten sam orbital, a następnie uwzględnia się korelację pomiędzy parami. Najszersze jednak zastosowanie wśród metod *post*-SCF znalazła metoda perturbacyjna Møllera-Plesseta (MP), w której

oddziaływanie między elektronami jest traktowane jako zaburzenie. Wyniki metody HF są użyte jako punkt wyjścia w rachunku zaburzeń. Wykazano, iż energia korelacji jest sumą drugiej i wyższych poprawek różniących się od funkcji HF tym, że jeden lub więcej orbitali zastąpiono orbitalami wirtualnymi. Metoda MP jest szczególnie zalecana do modelowania układów zawierających wiązania wodorowe.

2.1.3 Metoda teorii funkcjonału gęstości (DFT)^{20,23,24}

Teoria funkcjonału gęstości stała się w ostatnich latach szeroko stosowanym narzędziem w chemii kwantowej w porównaniu z tradycyjnymi metodami *ab initio*. Jej zaletami są wysoka dokładność i efektywność w badaniu struktur i właściwości wieloelektronowych układów molekularnych oraz uwzględnienie oddziaływań międzyelektronowych, czyli energii wymiany i korelacji. Wadą natomiast jest nie uwzględnianie oddziaływania dyspersyjnego. Dodatkowo obliczenia DFT charakteryzują się niewielką czasochłonnością i poprawnie oddają opis trudnych do modelowania metali czy też kryształów.

Fundamentem tej metody jest teoremat Hohenberga-Kohna mówiący, iż energia N-elektronowego systemu molekularnego jest jednoznacznie zdefiniowana – bez jakiegokolwiek przybliżenia – jako funkcja gęstości elektronowej²⁵ (2.4):

$$E_{el}[\rho] = T_{el}[\rho] + V_{el-el}[\rho] + V_{el-N}[\rho] + E_{XC}[\rho] \quad 2.4$$

gdzie: $T_{el}[\rho]$ opisuje energię kinetyczną nieoddziaływujących elektronów, $V_{el-el}[\rho]$ energię odpychania dwóch elektronów, $V_{el-N}[\rho]$ energię odpychania pomiędzy elektronem i jądrem, a $E_{XC}[\rho]$ jest funkcjonałem wymiennie-korelacyjnym.

Jednoelektronowe równania Kohna-Shama są odpowiednikami równań Hartree-Focka, przy czym korzyścią tych równań jest ich rzeczywista postać. Rozwiązanie równań Kohna-Shama podlega również zasadzie wariacyjnej mówiącej, że energia stanu podstawowego (E_g) jest minimalną wartością funkcjonału $E_{el}[\rho]$. Podobnie również jak dla powyżej omawianych metod, przyjmuje się przybliżenie Borna-Openheimera. Równania DFT, w przeciwieństwie do HF, opisują dokładną energię układu kwantowego, ponieważ oddziaływania wymiennie-korelacyjne są bezpośrednio zawarte, jako funkcjonały w hamiltonianie. Jednakże, podstawowym problem metodologii DFT jest brak dokładnego matematycznego opisu członu wymiennie-korelacyjnego, $E_{XC}[\rho]$. To znaczy, że jego wartość musi być, przynajmniej częściowo, wyrażona empirycznym przybliżeniem.

Podstawowy opis funkcjonału, LDA (ang. *Local Density Approximation*), opiera się na modelu jednorodnego gazu elektronowego. Takie przybliżenie oszacowuje jednak wartość energii wymiennej za nisko (aż do 10%), co powoduje przewidywanie zbyt krótkich długości wiązań, a tym samym zbyt dużych wartości energii wiązania. Konieczne, więc było wprowadzenie pewnych poprawek oddających istnienie efektów nielokalnych. Najlepiej rozwiązywały ten problem poprawki gradientowe określone w tzn. przybliżeniu rozwinięcia gradientowego (GEA, ang. *Gradient Expansion Approximation*). Następnie wprowadzono potencjały hybrydowe będące znacznie lepszymi modelami funkcjonałów gęstości korelacyjno-wymiennej, dzięki włączeniu dokładnej wartości E_X otrzymanej przy zastosowaniu metody Hartree-Focka. Wśród nich najlepszą zgodność obliczonych parametrów fizykochemicznych z danymi eksperymentalnymi^{24,26-32} (a zwłaszcza z danymi spektroskopowymi) znajduje się dla trójparametrowego potencjału hybrydowego B3LYP^{33,34}.

Na potencjał hybrydowy składa się 20% energii wymiennej HF i 80% energii korelacyjnej obliczonej w przybliżeniu LDA. Funkcjonał ten można formułować w następujący sposób (2.5):

$$E_{XC} = E_{XC}^{LDA} + a_0(E_X^{HF} - E_X^{LDA}) + a_X E_X^{B88} + a_C E_C^{LYP} \quad 2.5$$

Zawiera on człon energii wymiennie-korelacyjnej LDA (E_{XC}^{LDA}) i udziały: (a_0) różnicy między wymienną energią HF (E_X^{HF}) i energią wymienną LDA (E_X^{LDA}), (a_X) energii wymiennej Beckego z poprawkami gradientowymi z 1988 r. oraz udziały a_C członu korelacyjnego Lee-Yanga-Paara (E_C^{LYP}).

Opisane powyżej metody chemii obliczeniowej są zaimplementowane w wielu wolno dostępnych lub komercyjnych programach, wśród których najbardziej popularnymi są:

- GAUSSIAN³⁵ - komercyjny program rozwijany przez zespół pierwotnie kierowany przez Johna Pople'a (Nobel 1998). Standardowy w chemii kwantowej.
- MOPAC³⁶ – ogólnie dostępny program stosujący różne przybliżenia półempiryczne.
- GAMESS³⁷ – ogólnie dostępny odpowiednik programu GAUSSIAN.
- ADF (*Amsterdam Density Functional*)³⁸ – akademicki (odpłatny) program używający metody DFT.

2.1.4 Bazy funkcyjne¹⁹

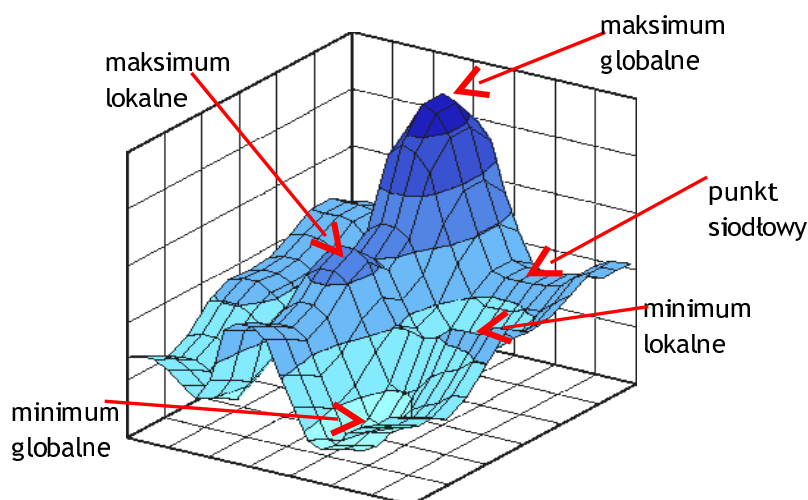
Każda metoda wymaga wstępnego matematycznego opisu wyglądu (stanu) cząsteczki, czyli bazy funkcyjnej. Jest to zbiór orbitali atomowych, których liniowa kombinacja (LCAO MO) stanowi zbiór orbitali molekularnych. Baza minimalna składa się jedynie z tych orbitali,

które są obsadzone w stanach podstawowych odpowiednich atomów. Chcąc otrzymać dokładniejsze orbitale, oddające cechy układu jonowego lub posiadające orbitale typu π , należy zastosować bazę rozszerzoną o funkcje polaryzacyjne (uwzględniające polaryzację orbitali atomowych) i dyfuzyjne (umożliwiające zajmowanie przez elektrony większych obszarów). Standartowymi bazami są te oparte na funkcjach typu Gaussa: 3-21G, 6-31G i 6-311G, które można rozszerzyć o dodatkowe funkcje polaryzacyjne i dyfuzyjne. W przypadku obliczeń dla jonów metali przejściowych stosuje się bazy oparte na przybliżeniu efektywnego potencjału rdzenia, ECP (ang. *Effective Core Potential*)³⁹⁻⁴⁰. Jako rdzeń traktuje się elektrony powłok wewnętrznych (orbitali rdzenia) ze względu na ich znikomy udział w wiązaniu chemicznym.

Wybór bazy i metody obliczeniowej jest zależny od rodzaju badanego układu i jego wielkości, wyznaczanych wielkości fizyko-chemicznych oraz mocy obliczeniowej dostępnego komputera. Należy jednak pamiętać, iż koszt obliczeń wzrasta nieliniowo z ilością elektronów w cząsteczce. W zależności od przyjętej metody jest proporcjonalny nawet do szóstej potęgi ilości elektronów w układzie a dodatkowo zależy od rozszerzenia zastosowanej bazy funkcyjnej.

2.2 Wyznaczanie struktur równowagowych - „optymalizacja geometrii”

Zależność pomiędzy zmianą w wartościach energii cząsteczki a zmianami w jej strukturze jest zilustrowane poprzez powierzchnię energii potencjalnej (PES, ang. *Potential Energy Surface*) (Rys. 2.1).



Rysunek 2.1 Powierzchnia energii potencjalnej (PES)¹⁽⁸⁾.

¹ wykonany przez P. Miśkowca.

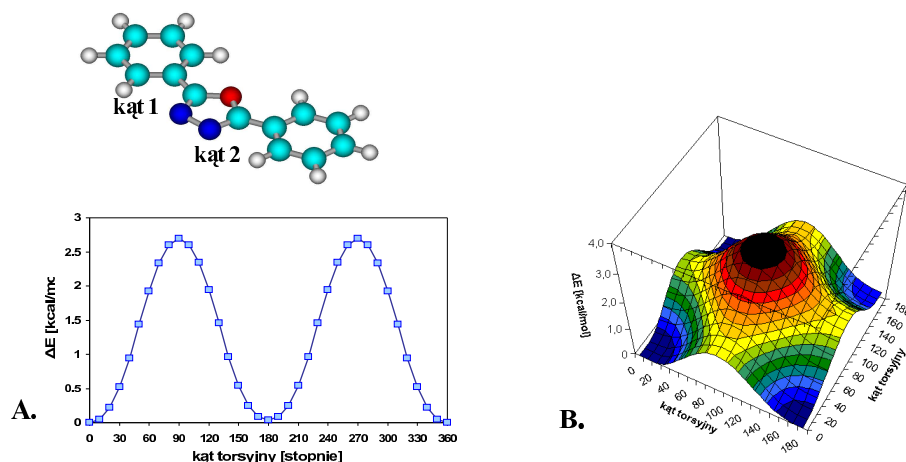
Znajdują się na niej punkty o najwyższej energii w danym obszarze PES, czyli maksima energetyczne. Jedno z nich, o najwyższej wartości energii dla całej PES, jest tak zwanym maksimum globalnym. Jeżeli cząsteczka ma stabilne konformacje, to na powierzchni energii potencjalnej pojawią się również minima energetyczne. Jedno z nich, o najniższej energii, (minimum globalne) będzie reprezentowało najstabilniejszą geometrię molekuly. Na powierzchni energii potencjalnej znajdują się również tak zwane punkty siodłowe. Wyznaczają one najbardziej prawdopodobne (o możliwie najmniejszej wartości energii) stany przejściowe pomiędzy minimami energetycznymi (wykorzystywane są w wyznaczaniu ścieżki reakcyjnej). Optymalizacja geometrii metodami teoretycznymi powinna prowadzić do osiągnięcia minimum globalnego, czyli równowagowej geometrii molekuly. Niestety, optymalizacja przy użyciu dostępnych algorytmów w programach kwantowo-chemicznych nie zapewnia osiągnięcia minimum globalnego, a tylko minimalizuje energię cząsteczki oraz jej gradienty energii. W konsekwencji, nie zawsze otrzymuje się minimum globalne lub w ogóle nie otrzymuje się jakiegokolwiek minimum (gradienty energii w punkcie siodłowym są również równe zero). W związku z tym, przeprowadza się często tak zwaną analizę konformacyjną (lub tautomeryczną) dla danej cząsteczki, czyli „przeszukanie” możliwie dużej części powierzchni PES i zlokalizowanie szeregu minimów, co umożliwia wybranie tego o najmniejszej wartości energii. Poszukiwanie stabilnych konformerów zależy oczywiście od struktury badanego układu i komplikuje się w przypadku występowania rotamerów. W praktyce, badania tego typu ograniczone są do obliczeń PES dla maksymalnie trzech zmiennych, t.j. wybranych parametrów geometrycznych. Dla zilustrowania problemu podano poniżej wyniki obliczeń dla molekuly składającej się z trzech pierścieni⁴¹ (Rys. 2.2), dla której badano zmianę energii w funkcji kątów torsyjnych pomiędzy pierścieniami. W tym przypadku, analiza PES jednoznacznie wskazuje, że pierścienie są wzajemnie koplanarne. Należy jednak pamiętać, iż metody obliczeniowe bazują na przybliżeniach i stąd obarczone są błędem. Jeśli w badanej analizie konformacyjnej otrzymano kilka konformerów, których energia nie różni się więcej niż o 10 kcal/mol, to nie można jednoznacznie stwierdzić, który z nich reprezentuje strukturę równowagową.

Uzupełnieniem tego typu obliczeń jest teoretyczne wyznaczenie stałych równowag konformacyjnych lub tautomerycznych⁴²⁻⁴³, a następnie określenie składu mieszaniny konformacyjnej (tautomerycznej) w fazie gazowej. Stałą równowagi wyznacza się według następującego równania (2.6):

$$\Delta G = -RT \ln K_T \quad 2.6$$

gdzie: ΔG – różnica entalpii swobodnej dla reakcji przemiany konformeru (tautomeru) A w konformer (tautomer) B; T – temperatura bezwzględna; R – stała gazowa; K_T – stała równowagi, $K_T = [B]/[A]$.

Dla układu, w którym istnieje więcej niż jedna równowaga można wyznaczyć skład mieszaniny przy użyciu wyrażenia K_T i założenia, że suma stężeń wszystkich form równa się jedności.



Rysunek 2.2. Zależność pomiędzy różnicą energii i: A. wartością kąta torsyjnego 1 (kąt 1), B. wartościami obu kątów torsyjnych (kąt 1 i 2).

Znalezienie struktury w minimum energetycznym (warunek dla jej otrzymania opisany jest w następnym rozdziale) pozwala również na podanie wartości parametrów geometrycznych, t.j. długości wiązań, kątów walencyjnych i kątów torsyjnych. Ich porównanie z dostępnymi danymi krystalograficznymi weryfikuje słuszność założonego modelu strukturalnego lub umożliwia projektowanie molekularne. To ostatnie, pozwala na przewidywanie struktury lub właściwości fizykochemicznych związków dotąd nie zsyntezowanych, co jest powszechnie stosowane w badaniach nad nowymi materiałami (n.p. Leki).

2.3 Modelowanie widm absorpcyjnych w zakresie podczerwieni i rozproszenia Ramana

2.3.1 Obliczenia harmonicznych częstości oscylacyjnych

Obliczenie harmonicznych częstości oscylacyjnych opiera się na rozwiązaniu równania Schrödingera (2.7) w przybliżeniu Borna-Openheimera przy założeniu, że konfiguracja M jąder dotyczy struktury w punkcie równowagi (R_{eq}), czyli znajdującej się w minimum lokalnym lub globalnym PES¹⁸:

$$\left\{ -\frac{1}{2} \sum_{\alpha=1}^M \sum_{j=1}^3 \frac{1}{2m_{\alpha}} \frac{\partial^2}{\partial R_{\alpha j}^2} + U(R_1 \dots R_M) \right\} \Theta(R_1 \dots R_M) = E \Theta(R_1 \dots R_M) \quad 2.7$$

gdzie $R_j, j = 1, 2, 3$ są współrzędnymi kartezjańskimi dla $R_1 \dots R_M$ jąder.

Zastąpienie współrzędnych kartezjańskich współrzędnymi masowo-ważonymi prowadzi do utworzenia macierzy stałych siłowych $U = (u_{jk})$ (macierzy Hessiana), będącej macierzą drugich pochodnych potencjału względem tychże współrzędnych (2.8):

$$u_{jk} = (m_{\alpha} m_{\beta})^{-1/2} \left(\frac{\partial^2 U(R_1 \dots R_M)}{\partial R_{\alpha j} \partial R_{\beta k}} \right)_{R=R_{eq}} \quad 2.8$$

gdzie $m_{\alpha\beta}$ - masa atomu.

Diagonalizacja tej macierzy powoduje transformację współrzędnych masowo-ważonych (X_k) we współrzędne normalne (ang. *modes*), które zdefiniowane są następująco (2.9):

$$Q_j = \sum_{k=1}^{3M} u_{jk}^T \cdot X_k \quad 2.9$$

Oznaczają one przemieszczenie się atomów względem położenia równowagowego, a więc są opisem harmonicznego oscylacji. Wartości własne macierzy stałych siłowych (λ_j) są bezpośrednio związane z harmoniczną oscylacją, f_j , poprzez zależność (2.10):

$$f_j = \frac{\sqrt{\lambda_j}}{2\pi} \quad 2.10$$

dając w konsekwencji $F = 3M - 5(6)$ oscylacyjnych stopni swobody (gdzie M jest liczbą atomów).

Wartości własne λ_j lub częstości f_j służą również do charakteryzacji punktu stacjonarnego na F wymiarowej powierzchni energetycznej Borna-Openheimera:

- F pozytywnych częstości oznacza lokalne lub globalne minimum, czyli strukturę równowagową,

- n urojonych częstości ($n = 1, 2, \dots, F-1$) oznacza punkt siodłowy n-tego rzędu, przy czym dla $n = 1$ istnieje stan przejściowy
- F urojonych częstości oznacza lokalne lub globalne maksimum, co nie ma jakiegokolwiek interpretacji molekularnej.

Teoretyczne wartości częstości drgań oscylacyjnych, w porównaniu do danych eksperymentalnych, obarczone są błędem zaniedbania anharmoniczności, niedoskonałości baz funkcyjnych i ograniczeniami zaimplementowanej w poszczególne metody (zwłaszcza dla HF) energii korelacji. Dlatego też, w analizie eksperymentalnych widm oscylacyjnych opartej na porównaniu z otrzymanymi wartościami obliczonymi stosuje się skalowanie tych ostatnich. Można zastosować czynniki proponowane w literaturze⁴⁴ dla poszczególnych metod i baz (na przykład: $f_{HF/6-31G(d)}=0.8953$, $f_{B3LYP/6-31G(d)}=0.9614$) lub też wyznaczyć taki czynnik z regresji liniowej zależności między eksperymentalnymi częstościami i dopasowanymi do nich wartościami teoretycznymi. Zazwyczaj, ten ostatni pokrywa się z zakresem literaturowym.

Należy również pamiętać, że obliczenia dotyczą molekuł izolowanych (w stanie gazowym). Tak obliczone częstości oscylacyjne można bezpośrednio porównać do danych doświadczalnych dla stanu gazowego lub wykonanych w matrycach gazu obojętnego (najczęściej argonu lub azotu). W przypadku widm oscylacyjnych wykonanych dla próbek w fazie skondensowanej znaczny wpływ mogą mieć siły między- lub wewnątrzcząsteczkowe, a zwłaszcza wiązania wodorowe. Dlatego też, przy modelowaniu widm oscylacyjnych projektuje się takie modele, które oddają w miarę możliwości obecność tego typu oddziaływania. W zależności od potrzeb, można również uwzględnić czynnik temperaturowy.

2.3.2 Intensywność pasm w absorpcyjnym widmie w zakresie podczerwieni (IR)

Aby mogło pojawić się widmo w zakresie podczerwieni, wzbudzenie oscylacyjne cząsteczki musi zmieniać wartość elektrycznego momentu dipolowego cząsteczki. Cząsteczka nie musi być przy tym trwałym dipolem. Wymagana jest jedynie zmiana momentu

dipolowego⁴⁵, μ_{el} , w czasie drgania normalnego, Q : $\frac{\partial \mu_{el}}{\partial Q_j} \neq 0$. Intensywność, I_{IR} , przejścia pomiędzy dwoma stanami oscylacyjnymi, opisanymi przez funkcje falowe Ψ_a i Ψ_b , jest proporcjonalna do kwadratu elementów macierzowych operatora momentu dipolowego (2.11):

$$I_{IR} \propto |\mu_{x,ab}|^2 + |\mu_{y,ab}|^2 + |\mu_{z,ab}|^2 \quad 2..11$$

gdzie $\mu_{x,ab}$ jest elementem macierzowym w całym elemencie objętościowym τ (2.12):

$$\mu_{x,ab} = \int_{-\infty}^{+\infty} \Psi_a^*(\tau) \mu_x \Psi_b(\tau) d\tau \quad 2.12$$

W przybliżeniu harmonicznym molowa integralna intensywność A_j absorpcji w podczerwieni jest wyrażona przez następującą zależność⁴⁷ (2.13):

$$A_j = 974,86 \cdot g_j \cdot \left| \frac{\partial \mu_{el}}{\partial Q_j} \right|^2 \quad 2.13$$

gdzie A_j jest wyrażona w km/mol, a g_j oznacza degenerację j -tej oscylacji.

2.3.3 Intensywność pasm w widmie rozpraszania Ramana (RS)

Ogólna reguła wyboru⁴⁵ dla oscylacyjnych przejść ramanowskich wymaga,

by w trakcie oscylacji, Q_j , uległa zmianie polaryzowalność cząsteczki, α_{xy} : $\frac{\partial \alpha_{xy}}{\partial Q_j} \neq 0$.

Intensywność rozpraszania w efekcie ramanowskim jest proporcjonalna do kwadratu elementów macierzowych tensora polaryzowalności (2.14):

$$I_{RS} \propto \left| \alpha_{xy,ab} \right|^2 \quad 2.14$$

W zależności od rodzaju eksperymentu ramanowskiego, intensywność jest proporcjonalna do takiego kwadratu lub do liniowej kombinacji poszczególnych elementów macierzowych. Analogicznie do macierzy momentu dipolowego, elementy macierzy tensora polaryzowalności można przedstawić w następujący sposób (2.15):

$$\alpha_{xy,ab} = \int_{-\infty}^{+\infty} \Psi_a^*(\tau) \alpha_{xy} \Psi_b(\tau) d\tau \quad 2.15$$

Doświadczalnie zmierzona intensywność⁴⁷ jest proporcjonalna do wielkości S_j zwanej aktywnością właściwą rozproszenia ramanowskiego o częstotliwości ν_j . Właśnie ten parametr jest otrzymywany w trakcie obliczeń kwantowo-chemicznych (program Gaussian) i nie jest równoważny intensywności eksperymentalnego pasma ramanowskiego. Istnieje jednak

zależność pomiędzy aktywnością a intensywnością pozwalającą dalej na otrzymanie teoretycznych wartości intensywności pasm widma RS⁴⁸ (2.16):

$$I_i = 10^{-12} \cdot (\nu_0 - \nu_i)^4 \cdot \frac{1}{\nu_i} \cdot RA(i) \quad 2.16$$

gdzie: $RA(i)$ – teoretyczna aktywność rozproszenia Ramana (w Å⁴/amu); ν_i – częstość drgania normalnego i (w cm⁻¹); ν_0 – linia wzbudzającego lasera (w cm⁻¹); I_i – teoretyczna intensywność rozproszenia Ramana (w jednostkach względnych). Podkreślenia wymaga fakt wprowadzenia do tego wzoru eksperymentalnie użytego światła wzbudzającego, co pozwala na dokładniejsze modelowanie widma RS. Niestety ograniczeniem obliczeń intensywności ramanowskiej jest ich stosowalność do modelowania jedynie widm klasycznego efektu rozpraszania a nie rezonansowego (RR) czy też powierzchniowo wzmocnionego (SERS). Aczkolwiek, sama obecność drgania oscylacyjnego przy danej częstości jest pomocna w wyjaśnianiu wzmocnienia intensywności we wspomnianych technikach ramanowskich.

2.3.4 Rozkład energii potencjalnej drgań normalnych (PED)

Do kompletnego opisu widm oscylacyjnych potrzeba dokonać przypisania poszczególnych drgań do obecnych w widmie pasm. Drgania normalne molekuly klasyfikuje się według zmiany długości wiązania (drgania rozciągające, ang. *stretching mode*), kąta walencyjnego (drgania zginające, ang. *bending mode*) czy też kąta torsyjnego (drgania torsyjne, ang. *torsion mode*). Ich jakościowe i ilościowe przypisanie do odpowiednich pasm w widmie ma kluczowe znaczenie w wyznaczaniu struktury molekularnej i jej zmian na skutek podstawienia, kompleksowania czy też jakiegokolwiek modyfikacji strukturalnej. Aby określić, który z fragmentów molekuly ulega „deformacji”, obserwuje się zmianę położenia i intensywności pasm pochodzących od drgań dotyczących tego fragmentu. Zwyczajowo, przypisanie drgań przeprowadza się na podstawie charakterystycznych częstości grupowych. Jednakże, ten opis jest przybliżony. Rozkład energii potencjalnej (PED, ang. *Potential Energy Distribution*) jest jedynym sposobem określenia ilościowego wkładu poszczególnych współrzędnych wewnętrznych (S) w drganiu normalnym (Q). Współrzędne te powiązane są relacją $S = LQ$. W tym celu wkład diagonalnej wartości macierzy stałej siłowej danej współrzędnej wewnętrznej j w oscylacyjną wartość własną λ_k może być wyrażony procentowo w następujący sposób⁴⁵ (2.17, 2.18):

$$c_{jk} = \frac{F_{jj} L_{jk}^2}{\lambda_k} \cdot 100\% \quad 2.17$$

$$c_{jk} = \frac{F_{jj} L_{jk}^2}{\sum_i F_{ii} L_{ik}^2} \cdot 100\% \quad 2.18$$

W pierwszej definicji (2.17), wkład diagonalnych elementów macierzy stałych siłowych F_{jj} jest bezpośrednio porównany z wartością własną λ_k , co jest pewną wadą tej metody, gdyż suma poszczególnych wkładów PED może odbiegać od 100%. Ma to miejsce w przypadku znacznych wartości pozadiagonalnych elementów macierzy stałych siłowych. Druga definicja (2.18) jest poprawioną wersją pierwszej poprzez zastosowania normalizacji sumy diagonalnych wkładów. Obliczanie procentowego udziału poszczególnych współrzędnych normalnych w dane pasmo oscylacyjne służy do jego szczegółowego opisu. Zwykle, jeśli wartość %PED jednej ze współrzędnych jest większa niż 50 %, uważa się, że ten rodzaj drgania jest charakterystyczny dla danej częstości oscylacji. W innych przypadkach, jeśli udział wielu drgań ma podobny wkład w rozkład energii potencjalnej danej współrzędnej normalnej, określa się ją jako współrzędną złożoną.

Takie założenie jest zaimplementowane w opisie współrzędnych wewnętrznych Pulay'a i Fogarasi⁴⁹. Ponieważ problemem jest zdefiniowanie współrzędnych pierścieni więcej niż 7-członowych, stąd niekiedy należy posłużyć się programami animującymi drgania normalne.

2.4 Modelowanie wybranych wielkości fizykochemicznych

2.4.1 Rozkład ładunków atomowych

Jedną z podstawowych wielkości interesujących w chemii jest ładunek atomowy, którego rozkład jest modyfikowany na skutek utworzenia wiązania chemicznego. A rodzaj wiązania jest zdefiniowany poprzez rozkład gęstości elektronowej. Stąd, już od wielu lat chemicy opracowują metody pozwalające na ilościowy opis ładunku atomowego. Problemem jest jednak sposób podzielenia gęstości elektronowej na poszczególne atomy molekuly, jeśli z definicji gęstość ta nie należy do żadnego z nich. Dlatego też, dostępne metody wyznaczania ładunków atomowych mogą prowadzić do różnorodnej charakterystyki wiązania chemicznego. Najstarszą i najlepiej znaną definicją ładunku atomowego jest analiza populacyjna Mullikena⁵⁰, bazująca na sumowaniu wkładów do punktowego ładunku od poszczególnych orbitali atomowych. Wyniki jej zależą od rodzaju użytej metody i bazy funkcyjnej i często nie oddają fizycznego charakteru ładunku dla wielu związków organicznych czy też nieorganicznych. Innym podejściem jest metoda AIM (ang. *Atoms in Molecules*) opracowana przez Badera⁵¹. Ładunki punktowe są obliczane na podstawie gęstości elektronowej otrzymanej z funkcji falowej. Podstawą jest podział gęstości elektronowej w przestrzeni rzeczywistej współrzędnych kartezjańskich układu na „baseny atomowe”.

Metoda podaje kompletną i fizyczną informację o wiązaniu chemicznym, jest jednakże ograniczona do wielkości badanego układu i wymaga długiego czasu obliczeniowego.

W 1989 roku Ciosłowski⁵² zaproponował nową analizę populacyjną GAPT (ang. *Generalized Atomic Polar Tensor*). W metodzie tej ładunek na jądrze, Q^A , jest zdefiniowany jako pierwsza pochodna momentu dipolowego danego układu molekularnego względem współrzędnych kartezjańskich (2.19).

$$Q^A = \frac{1}{3} \left(\frac{\partial \mu_x}{\partial x_A} + \frac{\partial \mu_y}{\partial y_A} + \frac{\partial \mu_z}{\partial z_A} \right) \quad 2.19$$

Zaletą tej metody jest jej niezależność od typu układu współrzędnych, odzwierciedlenie symetrii cząsteczki oraz to, iż wyznaczone ładunki sumują się do całkowitego ładunku badanego układu. Wartości ładunków otrzymanych tą metodą są prawie niezależne od użytej w obliczeniach bazy funkcyjnej i oddają dokładniej ich fizyczny charakter. Obliczenia są szybkie i można stosować je do dowolnie dużego układu molekularnego.

2.4.2 Aromatyczność

Nie ma wątpliwości, że inną wielkością mającą fundamentalne znaczenie w chemii, jest aromatyczność. Stabilność pewnych struktur molekularnych i ich reaktywność jest często powiązana ze spadkiem lub wzrostem aromatyczności. Pomimo braku jednoznacznej i jasnej definicji tego terminu, jak i niemożności doświadczalnego wyznaczenia jego wielkości, opracowano kilka kryteriów pozwalających na teoretyczny jakościowy opis aromatyczności. Delokalizacja elektronów π objawia się przede wszystkim wyrównaniem długości wiązań aromatycznego układu, nietypowymi przesunięciami chemicznymi i stabilizacją energetyczną. Stąd też, powstałe dotąd metody określające wielkość aromatyczności oparte są na strukturalnych, magnetycznych i energetycznych kryteriach.

Najbardziej rozpowszechnioną i efektywną metodą jest indeks aromatyczności HOMA (ang. *Harmonic Oscillator Model of Aromaticity*) opracowany przez Krygowskiego i Kruszewskiego^{53,54}. Miarą aromatyczności, według tego indeksu, jest suma kwadratów odchyłeń długości wiązań w rzeczywistym układzie od długości optymalnych, charakterystycznych dla układu czysto aromatycznego (2.20):

$$HOMA = 1 - \left[\frac{\alpha}{n} \sum (R_{opt} - R_i)^2 \right] = 1 - EN - GEO \quad 2.20$$

gdzie: n – liczba wiązań; α – współczynniki normalizacyjne dobrane w taki sposób, aby wartość indeksu HOMA wynosiła 1, jeżeli związek posiada aromatyczność taką jak benzen,

oraz wynosi 0, jeżeli aromatyczność jest taka, jak struktury Kekulego; R_{opt} - optymalna długość dla danego typu wiązania potrzebna do osiągnięcia aromatycznego układu; R_i – długość wiązania w badanym układzie.

Indeks HOMA można rozdzielić na dwie składowe: energetyczną (EN) i geometryczną (GEO). Składowa GEO opisuje zmiany w aromatyczności (jej spadek) jedynie w zależności od wzrostu zróżnicowania długości wiązań pomiędzy pojedynczymi i podwójnymi. Czynniki EN wywołuje zmiany w aromatyczności (również jej spadek) na skutek zwiększenia średniej długości wiązania. Obie składowe EN i GEO nie korelują ze sobą, co świadczy o tym, że istnieją dwie drogi dearomatyzacji. Aby uzyskać wartość indeksu HOMA, można zastosować długości wiązań uzyskane w wyniku obliczeń kwantowo-chemicznych, jak i z danych krystalograficznych. Zaletą indeksu HOMA jest to, że może być zastosowany do określenia aromatyczności zarówno całej cząsteczki jak i również tylko jej części.

Magnetyczne kryterium aromatyczności jest oparte na indukowanym zewnętrznym polem magnetycznym prądzie w pierścieniu π -elektronowym. Szeroko stosowanym kryterium magnetycznym jest indeks NICS (ang. *Nucleus Independent Chemical Shift*), zaproponowany przez Schleyera i współpracowników^{55,56}. Jest zdefiniowany jako ujemna wartość stałej ekranowania w środku pierścienia, w pewnej odległości nad środkiem (najczęściej w odległości 1 Å) i w płaszczyźnie nad pierścieniem. Nie ma określonego zakresu wartości aromatyczności NICS. Przyjmuje się, że im bardziej ujemna wartość NICS, tym bardziej aromatyczny pierścień. Wadą tej metody jest jej stosowalność jedynie do struktur pierścieniowych, a wyniki zazwyczaj nie korelują się z indeksem HOMA. W praktyce, obliczenia ograniczają się do wyznaczenia stałych ekranowania w wymienionych powyżej punktach, które jednakże wymagają zastosowania zaawansowanych metod i baz funkcyjnych.

Natomiast indeksy aromatyczności oparte na właściwościach energetycznych wykorzystują fakt, że cykliczne związki π -elektronowe są stabilniejsze niż ich analogi łańcuchowe⁵⁷. Polegają one na wyznaczeniu energii stabilizacji w sposób eksperymentalny czy też teoretyczny. Jednakże, teoretyczne wyznaczenie tego typu energii jest ograniczone wyborem prawidłowej struktury analogu łańcuchowego i zależnością otrzymanej wartości energii od wykorzystanej metody obliczeniowej.

3. Wybrane techniki spektroskopii oscylacyjnej

Na temat technik spektroskopii oscylacyjnej napisano już wiele tomów^{7,8,58-60}. Poniższe rozdziały koncentrują się na technikach, które znajdują zastosowanie w badaniach związków supramolekularnych i biosensorów.

3.1 Fourierowskie czy dyspersyjne?

O ile fourierowskie spektrometry do podczerwieni (FTIR) są obecnie standardem w laboratoriach biochemicznych i farmaceutycznych⁵, spektrometry ramanowskie stosuje się w układach dyspersyjnych (RS) i fourierowskich (FTR). Podstawowa różnica w budowie tych ostatnich polega na zastąpieniu monochromatorów interferometrami. W przypadku spektrometrów FTIR zmiana ta w sposób oczywisty znacznie polepszyła czułość i rozdzielczość przyrządów oraz zasadniczo skróciła czas analizy.

Istotą działania spektrometrów typu FT, stosowanych nie tylko w spektroskopii oscylacyjnej (także UV/VIS, NMR), jest rozdział częstotliwości wiązki promieniowania poprzez wprowadzenie zmiennej czasowej generowanej przez interferometr z ruchomym lustrem, poruszającym się ze stałą prędkością (np. Michelsona), a następnie transformację uzyskanego interferogramu do domeny częstotliwości przez zastosowanie transformaty Fouriera¹⁰. Wobec znacznie wolniejszego działania spektrometrów dyspersyjnych pojawia się pytanie, dlaczego i do jakich badań stosowane są nadal w spektroskopii ramanowskiej. Poniżej podano pewne wskazówki do rozstrzygnięcia tej kwestii. Szczegóły dotyczące rozwiązań stosowanych w konstrukcji spektrometrów przekraczają zakres tej monografii, a znaleźć je można w odnośniku⁵⁸.

3.1.1 Technika *step-scan*

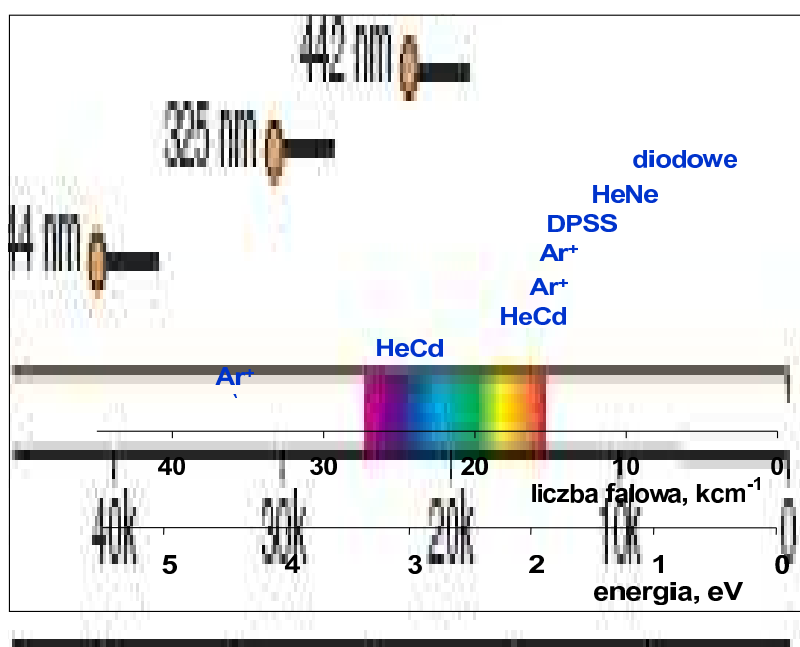
Technika skanowania schodkowego (*step-scan*) jest modyfikacją klasycznej spektroskopii fourierowskiej⁶¹. W klasycznych spektrometrach FT przyrost różnicy dróg optycznych wiązek promieniowania w interferometrze zmienia się liniowo w czasie (stała prędkość lustra). Jeżeli w działaniu interferometru Michelsona wprowadzić innowację, polegającą na zatrzymaniu lustra na krótki odcinek czasu, to skanowanie liniowe zastępuje się skanowaniem schodkowym. Jest to zasada działania *step-scan*. Technika ta pozwala otrzymywać widma rozplecione w czasie (*time-resolved*) lub w fazie (*phase-resolved*) w zależności od tego czy widma rejestrowane są bezpośrednio w funkcji czasu, czy też dodatkowo modulowana jest droga optyczna w chwili zatrzymania lustra interferometru. Technikę tę stosuje się do badań nad mechanizmem i kinetyką szybkich reakcji, obok technik *rapid-scan* czy próbkowania stroboskopowego⁶².

3.2 Ze źródła do detektora

3.2.1 Laser i czułość w rozproszeniu Ramana

Ważnym zagadnieniem związanym z optymalizacją układu pomiarowego w spektroskopii rozproszenia ramanowskiego jest współzawodnictwo pomiędzy czułością

metody, długością fali lasera i jego mocą oraz fluorescencją. W zależności od rodzaju spodziewanych efektów w spektrometrach dyspersyjnych oraz mikroskopach ramanowskich stosuje się lasery o różnej długości fali począwszy od ultrafioletu na bliskiej podczerwieni skończywszy (Rys. 3.1)



Rysunek 3.1. Przykładowe źródła laserowe stosowane w spektrometrach dyspersyjnych i mikroskopach ramanowskich

Jak wynika z równań 1.2 i 2.16 intensywność klasycznego pasma ramanowskiego rośnie z czwartą potęgą częstości promieniowania wzbudzającego (lasera). Wynika z tego, że im krótsze promieniowanie lasera tym większa czułość przyrządu. Jednak w zakresie krótszych fal prawdopodobieństwo wystąpienia fluorescencji zwiększa się, co może całkowicie przesłonić w ten sposób wzmacniony sygnał. Aby uniknąć fluorescencji, w przypadku badania rozważanych układów molekularnych, stosowane są lasery z zakresy bliskiej podczerwieni (np. laser diodowy 783 nm lub neodymowy Nd:YAG 1064 nm)⁵. Pomimo małej spodziewanej czułości wynikającej z długości fali lasera neodymowego, zastosowanie układu fourierowskiego w spektrometrze częściowo kompensuje tę stratę. Szacuje się, że wzmacnienie sygnału w spektrometrach fourierowskich jest dwóch rzędów wielkości w porównaniu ze spektrometrami dyspersyjnymi⁶³. Z tych powodów lasery dające promieniowanie podczerwone są zwykle stosowane w spektroskopii FTR.

Jeżeli linia lasera wzbudzającego pasuje do różnicy poziomów ugrupowań chromoforowych w cząsteczkach (Rys. 1.1) uzyskuje się znaczący wzrost intensywności sygnału związany z efektem rezonansowym¹³. Przejścia w nadfiolecie i świetle widzialnym to zwykle przejścia typu $\pi\text{--}\pi^*$ pochodzące na przykład od sprzężonych wiązań podwójnych lub potrójnych w cząsteczkach związków organicznych, od pierścieni aromatycznych, a także związków koordynacyjnych metali przejściowych⁶⁴. Efekt rezonansowy może zatem służyć do określania pewnych elementów struktury cząsteczki. Należy jednak liczyć się wówczas z tym, że w widmie rezonansowym struktura oscylacyjna, z obszaru charakterystycznego odcisku palca (*finger print*) nie będzie widoczna z powodu małej względnej intensywności pasm. Do pomiaru RR konieczne jest zastosowanie źródeł z możliwością regulowania długości fali. W obszarze widzialnym stosowane są lasery barwnikowe (tytanowo szafirowe) w nadfiolecie – ekscimerowe. W przypadku przejść niskoenergetycznych z zakresu bliskiej podczerwieni stosuje się lasery neodymowe.

Na intensywność sygnału, jak wynika ze wzoru 1.2 ma również wpływ moc lasera. Tym razem należy wziąć pod uwagę, że przy zwiększaniu mocy istnieje ryzyko zniszczenia próbki lub pomiaru próbki zdegradowanej.

3.2.2 Klasyczne i synchrotronowe źródła w spektroskopii IR

W klasycznych zastosowaniach spektroskopii IR wykorzystywane są źródła termiczne (włókna Nernsta, pręty Globar SiC, spirale NiCr)^{58,63}. Przy rozwiązywaniu struktury cząsteczek w klasycznej spektroskopii lub przy sporządzaniu wysokorozdzielczych map IR z pomocą może przyjść synchrotronowe źródło promieniowania⁵⁸. Promieniowanie synchrotronowe emitowane jest podczas przyspieszania elektronu w polu magnetycznym akceleratora. W porównaniu z typowymi źródłami charakteryzuje się ono dużą stabilnością, jest koherentne, skolimowane i o dużej jasności. Znacznie polepsza to stosunek sygnału do szumu w widmie w podczerwieni.

Chociaż w Polsce nie ma jeszcze dostępnych źródeł synchrotronowych, to wykorzystanie dostępnych w Europie źródeł (np. w Grenoble, czy Trieście) jest obecnie już tylko kwestią przedłożenia sensownego projektu badawczego.

3.2.3 Zakres częstotliwości a detektor

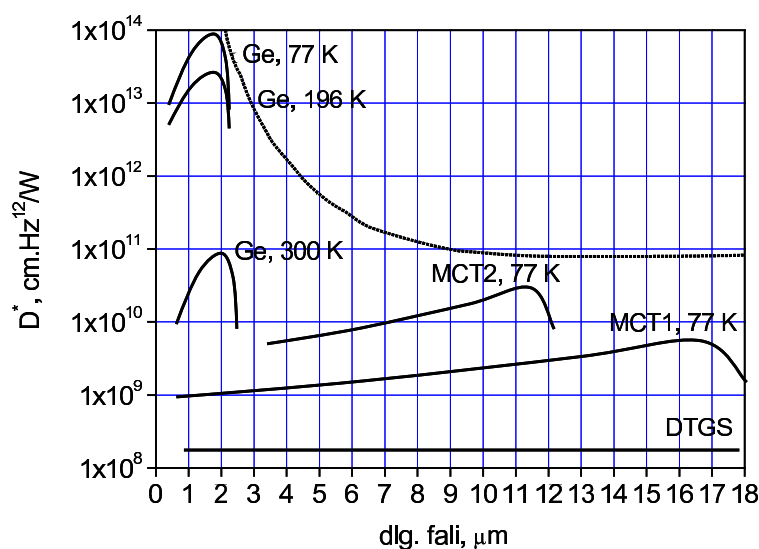
Zasadniczo detektory stosowane w spektroskopii oscylacyjnej można podzielić na dwie klasy: detektory termiczne i detektory fononowe⁵⁸. Niezłym, chociaż nie całkowicie uniwersalnym parametrem stosowanym do porównania pracy detektorów jest parametr D^* , który jest miarą stosunku sygnału do szumu (S/N):

$$D^* = \frac{A^{0.5}}{NEP} \quad 3.1$$

gdzie A oznacza powierzchnię detektora, a NEP (*noise equivalent power* lub *noise power per unit bandwidth*) określić można jako stosunek wartości skutecznej napięcia (lub prądu) szumów do czułości energetycznej detektora. Porównanie najbardziej typowych detektorów przedstawiono na Rysunku 3.2.

W detektorach termicznych rejestrowane zmiany temperatury są proporcjonalne do mocy promieniowania padającego i w idealnym przypadku niezależne od długości fali. Najbardziej typowym przykładem jest detektor piroelektryczny DTGS (*deuterated triglycine sulphate*). Czułość tego detektora nie jest wysoka, o czym świadczy mała wartość parametru D^* , jednak pracuje on stabilnie w dość szerokim zakresie długości fal i nie wymaga chłodzenia.

Podstawą działania detektorów fononowych z materiałów przewodnikowych lub częściej półprzewodnikowych jest efekt fotoelektryczny wywołany promieniowaniem padającym. W przypadku detektorów półprzewodnikowych elektrony okupujące pasmo walencyjne przenoszone są do pasma przewodnictwa przez obszar wzbroniony. Prąd, którego intensywność jest faktycznie mierzona, generowany może być przez zewnętrzną różnicę potencjałów lub wewnętrzną uzyskaną poprzez zestawienie półprzewodników typu p i n (zjawisko fotoelektryczne zewnętrzne lub wewnętrzne). Sygnał detektora fononowego rośnie z długością padającej fali, ponieważ wraz z nią rośnie także liczba fotonów w danym kwancie energii, z których każdy jest w stanie przenieść jeden elektron do pasma przewodnictwa. Wzrost następuje do momentu osiągnięcia granicznej wartości energii pomiędzy pasmem walencyjnym (a dokładnie orbitalami najwyżej obsadzonymi HOMO) i pasmem przewodnictwa (najniżej obsadzonymi orbitalami LUMO), kiedy to czułość detektora gwałtownie spada. Do najpowszechniej stosowanych przedstawicieli tego typu detektorów należą detektory germanowe (Ge), indowo-galowo-arsenowe (InGaAs), stosowane często w spektrometrach FTR oraz rtęciowo-kadmowo-tellurowe (HgCdTe lub MCT) stosowane w spektrometrach FTIR. Wysoką czułość detektorów uzyskuje się w stanie schłodzonym ze względu na korzystną zmianę obsadzenia populacji stanów.



Rysunek 3.2 Porównanie czułości i zakresów działania niektórych detektorów stosowanych w spektroskopii oscylacyjnej. Detektor Ge: zależność czułości od temperatury detektora, detektor MCT: zależność czułości i zakresu działania od składu (stosunku Hg: Cd)².

Do nowej generacji detektorów stosowanych w spektroskopii Ramana należą detektory matrycowe (*array detectors*), a w tym chłodzone detektory działające w oparciu o sprzężenie ładunkowe (*charge couple*) oraz detektory fotodiodowe. Urządzenia te dzięki blokowej konstrukcji umożliwiają detekcję wielu długości fal w jednym czasie. Stosowane są zatem także w kamerach jako analizatory obrazu i stąd ich zastosowanie w mikroskopii ramanowskiej i w podczerwieni.

Matryce CCD wykonywane są jako wieloelementowe struktury w układzie liniowym lub dwuwymiarowym. Podstawowym elementem takiej struktury jest kondensator MOS (*Metal Oxyd Semiconductor*), w którym zachodzą procesy detekcji promieniowania oraz akumulacji powstających ładunków elektrycznych. Łącuchy kondensatorów połączonych w ogniwa tworzą rejestry przesuwające, umożliwiające transfer ładunków spełniających rolę nośników informacji obrazowych. Występujące między kolejnymi ogniwami każdego rejestru sprzężenie ładunkowe tłumaczy nazwę *Charge-Coupled Device*.

3.2.4 Techniki przygotowania próbek (*sampling techniques*)

Techniki preparatyki próbek są opisane w wielu pozycjach^{63,65}, dlatego nie jest intencją autorów powtarzanie tych szczegółowych informacji. W rozdziale tym skoncentrowano się na opisie preparatyki ciał stałych, w tym filmów, gdyż takie formy występują w przypadku

biosensorów i chipów analitycznych, oraz opisie cieczy, a w szczególności roztworów wodnych, ze zrozumiałych względów związanych ze specyfiką układów biologicznych. Podstawowe informacje zestawiono w Tabeli 3.1.

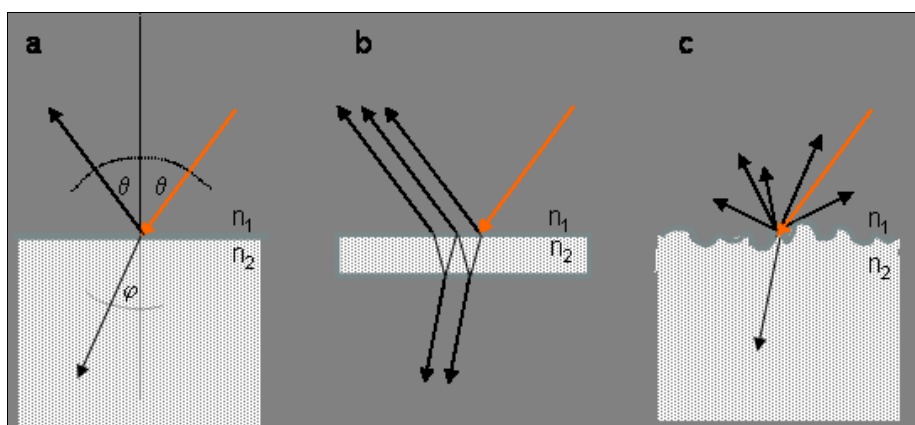
Forma próbki	IR		Raman
	transmisja	refleksja	rozproszenie
Ciecz	kuwety lub szkiełka optyczne z materiałów ZnSe, KBr, KRS5 • roztwór w oleju mineralnym Nujol, • roztwór wodny wymaga kuwety o krótkiej drodze optycznej (2 μm)	przystawki optyczne: • ATR wielokrotne odbicie	kuwety ze szkła, próbówki do NMR, kapilary, itp.
c. stałe	uchwyty, komory reakcyjne do pomiarów <i>in situ</i> ze szkiełkami optycznymi ZnSe, KBr, KRS5 pastylki KBr, CsF spreparowane cienkie dyski zawiesiny cienkie warstwy osadzone na dyskach Si	przystawki optyczne: • ATR jednokrotne odbicie • DRIFT • IS (sfera integrująca)	uchwyty na próbki, światłowody • proszki • pastylki

Tabela 3.1. Techniki przygotowania próbek w metodzie FTIR

Ogólnie rzecz ujmując, spektroskopia ramanowska stawia niewielkie wymagania, co do formy próbek. Analiza przebiega w dwóch geometriach optycznych: pod kątem prostym lub w odbiciu wstecznym^{6,7}. Pierwsza geometria jest bardziej kłopotliwa w użyciu, gdyż wymaga większej manipulacji podczas zogniskowania wiązki na próbce i pozbycia się fluorescencji. Analizy rozproszenia ramanowskiego można wykonywać w naczyniach szklanych, gdyż przekrój czynny rozproszenia Ramana dla jonów krzemu jest niewielki. Stwarza to także możliwość wykorzystania do analiz światłowodów mających ogromne znaczenie w rozwoju niedestrukcyjnych i bezinwazyjnych technik analitycznych.

Ze względu na małą przezroczystość materiałów w zakresie średniej podczerwieni MIR, stosowanie tej metody wymaga pewnego wysiłku i pomysłowości w przygotowaniu próbek, szczególnie w trybie transmisyjnym zbierania widma. Praca w trybie odbiciowym

związana jest z kolei z koniecznością użycia odpowiednich przystawek optycznych. Z powodu niejednorodności powierzchni, różnicy we współczynnikach refrakcji na granicy faz, czy też obecności centrów rozproszenia (Rys. 3.3), odbiciu mogą towarzyszyć dodatkowe efekty optyczne, często trudne do zdiagnozowania. Mogą one prowadzić do deformacji pasm. W technice zewnętrznego odbicia (*external reflection*) na widmie mogą pojawiać się artefakty przypominające widma różnicowe w miejscach, gdzie w widmie transmisyjnym obserwowane są maksima absorpcji. Z kolei w technice rozproszonego odbicia (*diffuse reflectance*) - zniekształcenia pasm. Chociaż w przypadku dobrze zdefiniowanych powierzchni efekty te można opisywać matematycznie⁶⁶, to jednak w rozwiązywaniu struktury związków wciąż podstawowym narzędziem wydaje się technika transmisyjna.



Rysunek 3.3 Rodzaje odbić w zależności od rodzaju powierzchni próbek: a) odbicie zewnętrzne, b) wielokrotne odbicie wewnętrzne, c) odbicie rozproszone. Parametry n_1 i n_2 współczynniki refrakcji dla różnych faz.

3.2.5 Analiza ciał stałych

Podstawowymi narzędziami do analizy powierzchni ciał stałych w spektroskopii FTIR są przystawki odbiciowe: ATR (metoda całkowitego odbicia wewnętrznego, *attenuated total reflection*), DRIFT (metoda rozproszonego odbicia, *diffuse reflectance infrared fourier transformed spectroscopy*) i sfery integrujące. Ich zaletą jest to, że nie wymagają dodatkowych czasochłonnych zabiegów przy próbkach. Dlatego chętnie wykorzystywane są w laboratoriach. Materiały o rozwiniętej powierzchni (proszki) nadają się do analizy DRIFT (Rys. 3.3. c). W tej metodzie rozproszone promieniowanie zbierane jest przez układ luster wklęsłych i kierowane do detektora. Wadą metody jest to, że wzajemna intensywność pasm zależy od dyspersji powierzchni i stopnia jej niejednorodności. Bardziej powtarzalne

ilościowo wyniki otrzymuje się za pomocą techniki całkowitego wewnętrznego odbicia ATR (Rys. 3.3 b). W technice tej promieniowanie źródła kierowane jest na element optyczny wykonany z materiału o dużym współczynniku załamania światła, który swą powierzchnią przylega do powierzchni analizowanego materiału. Światło wzbudzone ulega załamaniu, a następnie wewnętrznemu odbiciu od powierzchni wewnętrznej kryształu, docierając przy tym do powierzchni próbki.. Najbardziej popularnymi materiałami używanymi jako kryształy w których następuje wewnętrzne odbicie jest Ge, ZnSe i diament (współczynniki załamania światła kolejno 4.0, 2.4 i 2.4). Względne intensywności pasm zależą w tej metodzie od częstości promieniowania absorbowanego i rosną jej spadkiem⁶³.

Dobrym, chociaż wciąż rzadko wykorzystywanym rozwiązaniem w spektroskopii w podczerwieni do badań ciał stałych, jest metoda fotoakustyczna (*Photoacoustic Spectroscopy*, PAS)^{5,63}. Działanie przystawki fotoakustycznej do spektrometrów FTIR polega na wykorzystaniu fali dźwiękowej generowanej przez próbkę w następstwie absorpcji promieniowania IR. Relaksacja stanów wzbudzonych następująca po absorpcji powoduje ogrzanie próbki. Rozchodzące się ciepło w atmosferze kuwety wywołuje z kolei fluktuacje ciśnienia w komorze pomiarowej wypełnionej He i tym sposobem generuje falę dźwiękową detekowaną przez czuły mikrofon. W porównaniu z metodami odbiciowymi metoda PAS nie jest wrażliwa na dyspersję i niejednorodność powierzchni i szczególnie nadaje się dla próbek silnie absorbujących promieniowanie podczerwone, dla których klasyczna metoda nie daje rezultatów. Można ją stosować do analiz warstwa po warstwie do wnętrza próbek (*depth profiling*).

Analiza ciał stałych metodą rozproszenia ramanowskiego nie wymaga czynności przygotowawczych próbek. Na uwagę zasługuje jednak fakt, że ze względu na dużą przestrzenną rozdzielczość (w mikroskopii aż $>1\ \mu\text{m}$) objętość analizowana jest mała. Budzi wątpliwości zatem, czy uzyskany obraz jest reprezentatywny dla całej próbki⁵. Pewnym rozwiązaniem tego problemu są rotujące uchwyty, które umożliwiają uśrednienie widma przy kolejnych skanach⁵. Z drugiej strony, warto również zauważyć, że intensywność sygnału ramanowskiego zależy od wielkości ziaren próbki ciała stałego. W przypadku próbek proszkowych można przyjąć, że intensywność nie zmienia się zasadniczo, jeżeli średnica ziarna jest większa od potrojonej długości fali lasera⁶⁷. Zastosowanie spektrometrów FTR z laserem z zakresu bliskiej podczerwieni (1064 nm) stawia z kolei wymagania, co do grubości próbki ($>1\ \text{mm}$). Właściwie wyklucza to zastosowanie tego typu spektrometrów do badań cienkich filmów, co zostało opisane poniżej.

Coraz większą popularnością w spektroskopii oscylacyjnej cieszą się metody mikroskopowe stosowane zarówno w zakresie MIR i NIR oraz w rozproszeniu ramanowskim.

Metody mikroskopowe umożliwiają osiągnięcie wysokich rozdzielczości przestrzennych (*lateral spacial resolution*: IR – $> 10 \mu\text{m}$, Raman $> 1 \mu\text{m}$ w zależności od lasera) na powierzchni analizowanych materiałów, a dzięki współdziałaniu z kamerami CCD pozwalają na precyzyjny wybór analizowanych obiektów mikroskopowych. Metody mikroskopowe stosuje się do tak zwanego mapowania powierzchni. Mapy spektroskopowe obrazują rozkład drgań od wybranego markera (np. grupy funkcyjnej) na powierzchni próbki⁶⁸.

Wyjątkową techniką mikroskopową stosowaną między innymi w mikroskopii ramanowskiej jest mikroskopia konfokalna. Koncept mikroskopii konfokalnej, w porównaniu z klasyczną świetlną-szerokiego pola, opiera się na usunięciu światła, które wpadło do obiektywu spoza płaszczyzny ogniskowania przy wejściu do detektora. Przez zastosowanie przesłony z otworkiem, umieszczonej przed detektorem, usuwa się także wszelkie odbłyски nie pochodzące bezpośrednio z miejsca ogniskowania. Największą zaletą tego rodzaju mikroskopu, prócz bardzo dużej rozdzielczości, a przy tym jasności i kontrastowości obrazów, jest to, że pozwala on na rejestrowanie obrazów (optycznych i spektroskopowych) cienkich warstw preparatu, czyli przekrojów optycznych badanych obiektów na różnych głębokościach. Jest to tak zwana technika profilowania warstwa po warstwie w głąb (*depth profiling*), co umożliwia tworzenie trójwymiarowych widm obiektów (intensywność-częstość-głębokość). Porównanie możliwości analitycznych mikroskopu konfokalnego oraz FTR zaprezentowano w Tabeli 3.2.

	mikroskop konfokalny Ramana	FT-Raman
zakres detekowanych częstotliwości	10 do 9000 cm^{-1}	50 do 3650 cm^{-1}
lasery	do wyboru w danej konfiguracji	głównie 1064 nm
detektory	Si, CCD	Ge, InGaAs
czułość detektorów	duża	InGaAs – mała
pomiar w podw. temperaturze	nawet $>1000^\circ\text{C}$	poniżej 250°C
pomiar roztworów wodnych	tak	trudny, absorpcja światła lasera
pomiar próbek czarnych	tak	emisja
rozdzielczość	$<1 \mu\text{m}$	$> 5 \mu\text{m}$
Fluorescencja	mała przy laserach 785, 830 nm	mała
wzmocnienie sygnału (785 nm/1064 nm)	3.5x	1x

Tabela 3.2. Porównanie metod ramanowskiej mikroskopii konfokalnej i fourierowskiej spektroskopii ramanowskiej.

Realizacją marzeń o podglądaniu przemian chemicznych w rzeczywistym czasie ich przebiegu jest dość szeroka dziedzina spektroskopii zwana *operando spectroscopy*. Do niej zaliczana jest wspomniana już wcześniej technika pomiarowa *time-resolved* (FT-TRIR), niezastąpiona w badaniach mechanizmów szybkich reakcji w skomplikowanych układach biochemicznych (np. reakcji enzymatycznych w białkach)⁶². Metoda ta umożliwia śledzenie zachowania układu pod wpływem wprowadzonej fluktuacji i rejestrację zmian w postaci

widm 3D (intensywność, częstość, czas). Detekowane czasy odpowiedzi układu mogą sięgać nawet nanosekund, jak w przypadku techniki *step-scan*, krótsze czasy rzędu piko czy femtosekund możliwe są do osiągnięcia w układach laserowych – bez interferometrów. Mniej wyrafinowane, lecz także użyteczne w badaniach mechanizmów jest zastosowanie komór temperaturowych umieszczanych w przestrzeni pomiarowej spektrometrów (FTIR, Raman). Komory takie mogą być wyposażone w układy dozowania i ewakuacji reagentów (np. gazowych) umożliwiając śledzenie postępu reakcji heterogenicznych (ciało stałe-gaz/ciecz, np. katalitycznych lub enzymatycznych)^{69,70}.

3.2.6 Analiza cienkich filmów

Pewnym wyzwaniem analitycznym w spektroskopii oscylacyjnej są cienkie (nanokompozytowe) filmy osadzone na powierzchni ciał stałych. Wśród technik pomiarowych stosowanych w analizie wymieniane są techniki zewnętrznego odbicia (*external reflection*), elipsometryczne, czy też powierzchniowy rezonans plazmonowy (*surface plasmon resonance*)⁷¹⁻⁷⁴. Formalizm stosowany do opisu zjawisk optycznych zachodzących podczas odbicia zależy od rodzaju powierzchni substratu (metal, niemetal) oraz grubości filmu. Zasadniczo dla rozmaitych materiałów różnice występują w widmie odbiciowym dla składowych s i p światła spolaryzowanego w zależności od kąta padania wiązki, co ma wpływ na detekcję drgań prostopadłych i równoległych do powierzchni filmu⁷¹. Właściwości te wykorzystywane są w elipsometrii do wyznaczania składu, grubości filmu, jego parametrów optycznych, anizotropii optycznej i szorstkości powierzchni.

Szczególne znaczenie w biochemii ma technika powierzchniowego rezonansu plazmonowego (*surface plasmon resonans*)⁷⁵. Plazmony powierzchniowe powstają na granicach faz ośrodków różniących się wartościami stałych dielektrycznych (dodatnie powietrze/woda, ujemne metale np. Au, Ag, Ti, Cr). W opisie korpuskularnym są hybrydą plazmy elektronowej i fotonu, w falowym – falą rozchodzącą się równoległe do powierzchni metalu na granicy faz. Plazmony zatem reprezentują drgania gazu elektronowego w metalach o częstościach optycznych (IR/VIS, a nanocząstkach metali szlachetnych UV/VIS). Rezonans plazmonowy zachodzi w warstwie przypowierzchniowej metalu w wyniku jej oddziaływania ze spolaryzowaną wiązką padającą, dając wzmocnienie pasm rejestrowanego widma osadzonego filmu. Technika umożliwia nie tylko identyfikację związków (DNA, białka) osadzanych na powierzchni złota lub srebra, ale również śledzenie kinetyki reakcji. Przykładem może być wiązanie antyciała z antygenem lub oddziaływania białka z DNA. Technika rezonansu plazmonowego może być traktowana jako komplementarna w stosunku do technik odbiciowych.

3.2.7 Analiza roztworów wodnych

Zmagania badaczy z problemem analizy roztworów wodnych ilustrują prace⁷⁶⁻⁸¹. Zaletą metody RS w porównaniu z FTIR jest możliwość wykonywania analiz w roztworach wodnych, ponieważ drgania polarnych grup OH są słabo widoczne w widmie ramanowskim. Ograniczeniem metody jest czułość, co w praktyce pozwala na wykonywanie analiz dla roztworów o stężeniach nie mniejszych niż 0.1 mol/dm³. Sposobem na zwiększenie czułości jest zaprzęgnięcie techniki wzmocnienia powierzchniowego (SERS).

Ideą SERS jest pomiar rozproszenia w układzie: cząsteczka zaadsorbowana na powierzchni substratu (sondy). Substratem dla adsorpcji mogą być elektrody (Ag, Au), nanocząsteczki metali w roztworach koloidalnych lub specjalnie preparowane powierzchniowe nanostruktury (np. metale powlekane polimerami lub odwrotnie). Niezwykle wzmocnienie intensywności rozproszenia ramanowskiego w tej metodzie nie jest do końca wyjaśnione⁸². Opisywane są dwa źródła wzmocnienia. Pierwsze fizyczne (elektromagnetyczne), związane jest z tak zwanym efektem rezonansu powierzchniowych plazmonów, omówionym we wcześniejszym rozdziale, a drugie chemiczne - wynika ze zwiększonej polaryzowalności chemisorbowanego układu cząsteczek na powierzchni sondy. Interesującym zastosowaniem SERS jest użycie immobilizowanych monowarstw bioreceptorów (np. oligonukleotydy DNA lub przeciwciała) w diagnostyce medycznej^{83,84}. Ciekawym pomysłem jest także wykorzystanie markerów biochemicznych o własnościach SERS do znaczenia określonej sekwencji DNA, jak również cząsteczek koloidalnych złota pokrytych przeciwciałami do detekowania antygenów w roztworach wodnych. W tym świetle możliwość wykorzystania spreparowanych powierzchni aktywnych w SERS do otrzymywania nanosensorów narzuca się w sposób oczywisty.

Istnieją również sposoby na prowadzenie analiz roztworów wodnych metodą IR. W przypadku MID, może to być analiza wybranych pasm cząsteczek sond wykazujących drgania poza zakresem drgań cząsteczek H₂O (3670, 1590, 3740 cm⁻¹) oraz wiązań wodorowych (3400-3000 cm⁻¹), dających w roztworach szerokie maksima³. Warunkiem uzyskania intensywnych pasm jest wykonanie pomiaru na krótkiej drodze optycznej (rzędu kilku mikrometrów), z zastosowaniem szkiełek optycznych lub przystawki ATR⁸⁵. Pewne możliwości manipulacji w widmie daje również podstawienie izotopowe D₂O^{85,86}.

Pomimo skomplikowanych widm jakie otrzymywane są w zakresie NIR, technika w bliskiej podczerwieni jest potężnym narzędziem do badania roztworów wodnych, co zaprezentowano w następnym rozdziale.

3.3 NIR i chemometria

Tak szybki rozwój metod spektroskopowych w bliskiej podczerwieni (NIR) nie byłby możliwy bez rozwoju metod obliczeniowych oraz postępu technicznego w konstrukcji komputerów. Efektywnym sposobem interpretacji złożonych widm NIR, zarówno ilościowej jak i jakościowej, są rozwiązania statystyczne oferowane przez chemometrię. Chemometria oparta na analizie multiwariancji¹ w układach wieloskładnikowych polega ona na zastosowaniu prostej lub odwróconej macierzowej formy prawa Lamberta-Beera, do kalibracji układu w oparciu o regresję liniową, jak np. częściowych najmniejszych kwadratów odchył (PLS, *Partial Least Squares*) lub regresję nieliniową.

Chemometria ma zastosowanie również do analizy jakościowej widm NIR, która może lecz nie musi polegać na określaniu struktury oscylacyjnej cząsteczek. Rzecz polega na statystycznej klasteryzacji i klasyfikacji obiektów na widmie, określeniu ich wzajemnych relacji i w rezultacie zmniejszeniu wymiaru przestrzeni (liczby pasm), w której analizujemy widmo. Przestrzeń taka może być interpretowana w domenie częstości lub domenie faktorowej (*factor space*), jak to ma miejsce w metodzie analizy głównego składnika (PCA, *Principal Component Analysis*). W przypadku PCA redukcja wymiaru polega na ortogonalizacji układu współrzędnych względem cechy widma wykazującej największą wariancję i określeniu liniowej zależności pomiędzy składowymi wymiarami. Interpretacja jakościowa sprowadza się do oceny przynależności cechy do określonego klastra i jest oparta na analizie odległości od klastra za pomocą metod LDA (*Linear Discriminant Analysis*) lub PLS.

Interesującym sposobem badania zależności cech widma (np. intensywności) od perturbacji w układzie względem wybranego parametru (czas, temperatura, itp.) jest korelacja 2D. Proponowane jest kilka sposobów podejścia matematycznego do zagadnienia: uogólniona korelacja 2D oraz statystyczna korelacja 2D.

W uogólnionej metodzie korelacji 2D⁸⁷ konstruowane są widma względem wybranego parametru opisującego relaksację układu. Konstrukcja widm polega na transformowaniu widm w domenie częstości (lub długości fali) i wybranego parametru (np. czasu) do domeny częstości za pomocą transformaty Fouriera. Prowadzi to ostatecznie do generacji rzeczywistej i urojonej części składowych korelacji intensywności:

$$\Phi(v_1, v_2) + i\Psi(v_1, v_2) = \int_0^{+\infty} \bar{Y}_1(\omega) \bar{Y}_2^*(\omega) d\omega \quad 3.3$$

gdzie $\Phi(v_1, v_2)$ i $\Psi(v_1, v_2)$ są rzeczywistymi i urojonymi składnikami widma 2D, Y – transformata Fouriera widma wyjściowego w domenie częstości (v) i czasu. Rzeczywista

część opisuje tak zwane widmo synchroniczne (*synchronous*), które odzwierciedla jednoczesne zmiany częstości (ν_1 , ν_2). Części urojona określana jest jako widmo asynchroniczne (*asynchronous*) i opisuje zmiany niejednoczesne lub sekwencyjne. Do zalet metody 2D należy: podwyższenie rozdzielczości widma poprzez rozseparowanie pasm, uproszczenie widma, przypisanie pasm i ich zmian względem parametru fizycznego.

W metodzie statystycznej 2D korelowane są cechy widma NIR i MIR układów, w których zmieniany jest skład ilościowy⁸⁸. Można ją zatem określić, jako niestrukturalną metodą przypisania pasm w zakresie częstości NIR.

Metoda NIR przeżywa obecnie rozkwit znajdując szerokie zastosowanie w wielu dziedzinach do analiz w skali laboratoryjnej i przemysłowej. W czysto badawczej formule wykorzystywana była do analizy strukturalnej i modelowania właściwości chemicznych i fizycznych wody, wiązań wodorowych oraz biologicznie istotnych związków organicznych⁸⁹. Szereg zastosowań dotyczy diagnostyki medycznej i analiz klinicznych^{90,91} zarówno jeśli chodzi o badania płynów ustrojowych jak i zmian tkankowych. Szczególnie intensywnie rozwijane są bezinwazyjne techniki diagnostyczne np. do analizy poziomu glukozy we krwi⁹².

4. Podsumowanie

Spektroskopia oscylacyjna oferuje cały wachlarz metod do analiz związków supramolekularnych w układach receptorowych typu gość-gospodarz. Są to zarówno metody obliczeniowe wykorzystujące modelowanie kwantowo-mechaniczne widm oscylacyjnych i służące przewidywaniu struktury, a także techniki pomiarowe dedykowane rozwiązaniu konkretnych problemów badawczych. Metody spektroskopii w podczerwieni oraz rozproszenia ramanowskiego stosowane razem do analizy strukturalnej dają dopełniający obraz drgań cząsteczek. Każda z metod w oparciu o specyficzne rozwiązania optyczne i konstrukcyjne stosowane w spektrometrach oraz zakres czułości służy do opisu różnych stopni organizacji molekuł, ich wzajemnych oddziaływań, a także określania mechanizmów tworzenia połączeń w badanych układach. Monografia stanowi przegląd współcześnie stosowanych metod chemii kwantowej do modelowania widm oscylacyjnych, a także przegląd nowoczesnych technik pomiarowych ze szczególnym uwzględnieniem analizy powierzchni ciał stałych, cienkich filmów oraz roztworów wodnych.

Podziękowania:

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

Literatura:

1. H.W. H.W. Siesler, Y. Ozaki, S. Kawano, H.M. Heise, Near-Infrared Spectroscopy: Principles, Instruments, Applications John Wiley & Sons Inc, 2002, rozdz. 10
2. M. Chalmers, P.R. Griffiths: Handbook of Vibrational Spectroscopy, John Wiley & Sons Inc., Chichester 2002 tom 5, str. 3227-353
3. A.B. Olejniczak, A. Sut, A.E. Wróblewski, Z.J. Leśnikowski, Infrared spectroscopy of nucleoside and DNA-oligonucleotide conjugates labeled with carborane or metallacarborane cage, Vibrational Spectroscopy 39 (2005) 177–185
4. J. Ramesh, J. Kapelushnik, J. Mordechai, A. Moser, M. Huleihel, V. Erukhimovitch, C. Levi, S. Mordechai, Novel methodology for the follow-up of acute lymphoblastic leukemia using FTIR microspectroscopy, J. Biochem. Biophys. Methods 51 (2002) 251–261
5. A. Zakrzewska M. Zakrzewski, Solid State Characterisation of Pharmaceuticals, Pergamon 2006
6. E. Smith, G. Dent, Modern Raman Spectroscopy – A Practical Approach, John Wiley & Sons Inc., Chichester 2005
7. D.A. Long, Raman Spectroscopy, McGraw-Hill Intls. Book Co., New York 1977
8. J.J. Laserna, Modern Techniques in Raman Spectroscopy, John Wiley & Sons Inc., Chichester 1996
9. Z. Kęcki, Podstawy spektroskopii molekularnej, PWN, Warszawa 1992
10. J. Sadlej, Spektroskopia Molekularna, Wydawnictwo Naukowo Techniczne, Warszawa 2002
11. F.A. Cotton, Teoria grup. Zastosowanie w chemii, PWN, Warszawa 1973
12. G. Keresztury, Raman Spectroscopy: Theory, in M. Chalmers, P.R. Griffiths: Handbook of Vibrational Spectroscopy, John Wiley & Sons Inc., 2002, tom 1, str. 71-88
13. J.L. McHale, Resonans Raman Spectroscopy, in M. Chalmers, P.R. Griffiths: Handbook of Vibrational Spectroscopy, John Wiley & Sons Inc., 2002 tom 1, str. 534-557

14. W. Ewen Smith, C. Rodger, Surface Enhanced Raman Scattering, in M. Chalmers, P.R. Griffiths: Handbook of Vibrational Spectroscopy, John Wiley & Sons Inc., 2002 tom 1, str. 775-785
15. G. Socrates, Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies, John Wiley & Sons Inc., Chichester 2004
16. W.F. McClure, D.L. Stanfield, Near-infrared Spectroscopy of Biomaterials, in M. Chalmers, P.R. Griffiths: Handbook of Vibrational Spectroscopy, John Wiley & Sons Inc., 2002 tom 1, str. 212-229
17. P.R. Griffiths, Far-infrared Spectroscopy, in M. Chalmers, P.R. Griffiths: Handbook of Vibrational Spectroscopy, John Wiley & Sons Inc., 2002 tom 1, str. 229-241
18. T.M. Klapötke, A. Schulz, Quantum Chemical Methods in Main-group Chemistry, John Wiley & Sons Ltd., Baffins Lane, Chichester, England, 1998
19. W. Kołos, J. Sadlej, Atom i Cząsteczka, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa, 1998.
20. L. Piela, Idee Chemii Kwantowej, Wydawnictwo Naukowe, Warszawa, 2003.
21. M.A. Ratler, G.C. Schatz, Introduction to Quantum Mechanics in Chemistry, Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, USA, 2001
22. W.B. Smith, Introduction to Theoretical Organic Chemistry and Molecular Modeling, VCH Publishers, Inc., USA, 1996
23. W. Koch, M.C. Holthausen, A Chemist's Guide to Density Functional Theory, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany, 2000
24. B.B. Laird, R.B. Ross, T. Ziegler, Editors, Chemical Applications of Density-Functional Theory, ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington, DC, 1996
25. W. Kohn, L.J. Sham, Phys. Rev. A, 140 (1965) 1113
26. P.J. Wilson, R.D. Amos, N.C. Handy, Molec. Phys., 97 (1999) 757
27. T. Helgaker, P.J. Wilson, R.D. Amos, N.C. Handy, J. Chem. Phys., 113 (2000) 2983
28. G. Rauhut, P. Pulay, J. Phys. Chem., 99 (1995) 3093
29. M.D. Halls, H.B. Schlegel, J. Chem. Phys., 109 (1998) 10587
30. L. Fan, T. Ziegler, J. Chem. Phys., 96 (1992) 9005

31. M.W. Wong, Chem. Phys. Letters, 256 (1996) 391
32. I. Bytheway, M.W. Wong, Chem. Phys. Letters, 282 (1998) 219
33. A.D. Becke, J. Chem. Phys., 98 (1993) 5648
34. C. Lee, W. Yang, R.G. Parr. Phys. Rev. B37 (1988) 785
35. M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, Jr., T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, and J. A. Pople, Gaussian 03, Revision C.02, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2004
36. MOPAC, J. J. P. Stewart, Fujitsu Limited, Tokyo, Japan
37. M.F. Guest, I. J. Bush, H.J.J. van Dam, P. Sherwood, J.M.H. Thomas, J.H. van Lenthe, R.W.A Havenith, J. Kendrick, Molecular Physics, 103 (2005) 719
38. E. J. Baerends, J. Autschbach, A. Bérces, F.M. Bickelhaupt, C. Bo, P. L. de Boeij, P. M. Boerrigter, L. Cavallo, D.P. Chong, L. Deng, R. M. Dickson, D. E. Ellis, L. Fan, T. H. Fischer, C. Fonseca Guerra, S. J. A. van Gisbergen, J. A. Groeneveld, O. V. Gritsenko, M. Grüning, F. E. Harris, P. van den Hoek, C.R. Jacob, H. Jacobsen, L. Jensen, G. van Kessel, F. Kootstra, E. van Lenthe, D. A. McCormack, A. Michalak, J. Neugebauer, V. P. Osinga, S. Patchkovskii, P. H. T. Philipsen, D. Post, C. C. Pye, W. Ravenek, P. Ros, P. R. T. Schipper, G. Schreckenbach, J. G. Snijders, M. Solà, M. Swart, D. Swerhone, G. te Velde, P. Vernooijs, L. Versluis, L. Visscher, O. Visser, F. Wang, T.A. Wesolowski, E. van Wezenbeek, G. Wiesenekker, S. K. Wolff, T. K. Woo, A.L. Yakovlev, and T. ZieglerSCM / Vrije Universiteit, Theoretical Chemistry, Amsterdam, The Netherlands.

39. P.J. Hay, W.R. Wadt, J. Chem. Phys., 82 (1985) 270
40. P.J. Hay, W.R. Wadt, J. Chem. Phys., 82 (1985) 284
41. M. Skrabalak, M. Szczerba, Mini-projekt panelu specjalizacyjnego Fotochemia i Spektroskopia wykonany pod kierunkiem K. Małek, Wyd. Chemii, UJ, 2006
42. H. Meghezzi, A. Boucekkine, J. Mol. Struct., 257 (1992) 175
43. E.D. Raczyńska, R. Taft, Pol. J. Chem., 72 (1998) 1054
44. A.P. Scott, L. Radom, J. Phys. Chem., 100 (1996) 16502
45. J.M. Chalmers, P.R. Griffiths, Eds., Handbook of Vibrational Spectroscopy Vol. 3, John Wiley & Sons, LTD, Chichester, England 2002
46. L. Fan, T. Ziegler, J. Chem. Phys., 96 (1992) 9005
47. D.A. Long, Raman Spectroscopy, Mc Graw-Hill, New York, 1977
48. D. Michalska, R. Wysokiński, Chem. Phys. Lett., 403 (2005) 2111
49. G. Fogarasi, X. Zhou, P.W. Taylor, P. Pulay, J. Am. Chem. Soc., 114 (1992) 8191; P. Pulay, G. Fogarasi, F. Pang, J.E. Boggs, J. Am. Chem. Soc., 101 (1979) 2550; J.M.L. Martin, C. Van Alsenoy, Gar2ped, University of Antwerp, 1995
50. R.S. Mulliken, J. Chem. Phys., 23 (1955) 1833
51. R.F.W. Bader, Atoms in Molecules. A Quantum Theory, Clarendon Press, Oxford, UK, 1990
52. J. Cioslowski, J. Am. Chem. Soc., 111 (1989) 8333
53. J. Kruszewski, T.M. Krygowski, Tetrahedron Lett., 13 (1972) 3839
54. T.M. Krygowski, J. Chem. Inf. Comput. Sci., 33 (1993) 70
55. P.V.R. Schleyer, H. Jiao, Pure Appl. Chem., 7 (1964) 363
56. P.V.R. Schleyer, C. Maerker, A. Dransfeld, H. Jiao, N.J.R. van Eikema Hommes, J. Am. Soc. Chem., 118 (1996) 6317
57. T.M. Krygowski, M.K. Cyrański, Z. Czarnocki, G. Häfeli, A.R. Katritzky, Tetrahedron, 56 (2000) 1783.
58. M. Chalmers, P.R. Griffiths: Handbook of Vibrational Spectroscopy, John Wiley & Sons Inc., Chichester 2002 tom 1

59. D.J. Gardiner, P.R. Graves, Practical Raman Spectroscopy, Springer-Verlag, Berlin 1989.
60. G. Turrell, J. Corset (red.) Raman Microscopy. Developments and Applications, Harcourt Brace and Co., London 199
61. C.J. Manning, Instrumentation for Step-scan FTIR Modulation Spectrometry, in M. Chalmers, P.R. Griffiths: Handbook of Vibrational Spectroscopy, John Wiley & Sons Inc., 2002 tom 1, str. 283-298
62. G.d. Smith, R.A. Palmer, Fast Time Resolved Mid-infrared Spectroscopy, in M. Chalmers, P.R. Griffiths: Handbook of Vibrational Spectroscopy, John Wiley & Sons Inc., 2002 tom 1, str. 625-64
63. B. Schrader, Infrared and Raman spectroscopy, methods and applications. VCH, Weinheim 1995
64. R.M. Silverstein, G.C. Bassler, T.C. Morrill: Spectrometric Identification of Organic Compounds, Wiley, New York 1974
65. M. Chalmers, P.R. Griffiths: Handbook of Vibrational Spectroscopy, John Wiley & Sons Inc., Chichester 2002, tom 2
66. M. Claybourn, External Reflection Spectroscopy, in M. Chalmers, P.R. Griffiths: Handbook of Vibrational Spectroscopy, John Wiley & Sons Inc., 2002 tom 2, str. 969-98
67. P.J. Hendra, Sampling Considerations for Raman Spectroscopy, , in M. Chalmers, P.R. Griffiths: Handbook of Vibrational Spectroscopy, John Wiley & Sons Inc., 2002 tom 2, str. 1263-1289
68. R. Barański, M. Barańska, H. Schulz, Changes in carotenoid content and distribution in living plant tissue can be observed and mapped in situ using NIR-FT-Raman spectroscopy, *Planta* (2005) 222: 448–457
69. J. Łojewska, H. Lubańska, P. Miśkowiec, T. Łojewski, L.M. Proniewicz, FTIR in situ transmission studies on the kinetics of paper degradation via hydrolytic and oxidative reaction paths, *Applied Physics: A* 83 (2006) 597-603
70. J. Łojewska, M. Messori, A. Lubańska, P. Grimaldi, K. Zięba1, L.M. Proniewicz, A. Ccongiu Castellano, Carbonyl groups development on degraded cellulose. Correlation between spectroscopic and chemical results, *Applied Physics: A*, w druku

71. M. Claybourn, External Reflection Spectroscopy, Handbook of Vibrational Spectroscopy, John Wiley & Sons Inc., 2002 tom 2, str. 969-982
72. J. Umemura, Reflection-Absorption spectroscopy of thin films on metallic substrates, Handbook of Vibrational Spectroscopy, John Wiley & Sons Inc., 2002 tom 2, str. 982-999
73. G.T. Merklin, Infrared spectrometry of thick organic films on metallic substrates, Handbook of Vibrational Spectroscopy, John Wiley & Sons Inc., 2002 tom 2, str. 999-1009
74. J. Kattner, H. Hoffmann, External Reflection Spectroscopy thin films on dielectric substrates, Handbook of Vibrational Spectroscopy, John Wiley & Sons Inc., 2002 tom 2, str. 1009-1028
75. H. Raether, Excitation of plasmons and interband transitions by electrons. Springer-Verlag 1980
76. M. Lafleur, M. Pigeon, M. Pcozlet, J.P. Caill, Raman Spectrum of Interstitial Water in Biological Systems, J. Phys. Chem. 1989, 93, 1522-1526
77. M. Purcell, J.F. Neault, H. Malonga, H. Arakawa, R. Carpentier, H.A. Tajmir-Riahi Interactions of atrazine and 2,4-D with human serum albumin studied by gel and capillary electrophoresis, and FTIR spectroscopy, Biochimica et Biophysica Acta 1548 (2001) 129-138
78. J. Ramesh a, J. Kapelushnik b, J. Mordechai c, A. Moser b, M. Huleihel d, V. Erukhimovitch d, C. Levi a, S. Mordechai Novel methodology for the follow-up of acute lymphoblastic leukemia using FTIR microspectroscopy, J. Biochem. Biophys. Methods 51 (2002) 251–261
79. F. Geinguenauda, J.A. Mondragon-Sancheza, J. Liquiera, A.K. Shchyolkinab, R. Klementc, D.J. Arndt-Jovinc, T.M. Jovinc, E. Taillandiera,* Parallel DNA double helices incorporating isoG or m5isoC bases studied by FTIR, CD and molecular modeling, Spectrochimica Acta Part A 61 (2005) 579–587
80. Hiromi Kitano, Kohei Takaha, Makoto Gemmei-Ide, Raman spectroscopic study on the structure of water in aqueous solution of α,ω -amino acids Journal of Colloid and Interface Science 283 (2005) 452–458
81. R. Pouliot, A. Saint-Laurent, C. Chypre, R. Audet, I. Vitte'-Mony, R.C. -Gaudreault, M. Auger, Spectroscopic characterization of nanoErythroosomes in the absence and

presence of conjugated polyethyleneglycols: an FTIR and ³¹P-NMR study, *Biochimica et Biophysica Acta* 1564 (2002) 317– 324

82. A. Campion, P. Kambhampati, Surface-enhanced Raman scattering, *Chem. Society Rev.* 27 (1998) 241-251
83. M. Moskovits, Surface-Enhanced Raman spectroscopy: a brief retrospective, *J. Raman. Spec.*, 2005, 36, 485-496
84. Tuan Vo-Dinh, D.L. Stokes, SERS-based Probes, in M. Chalmers, P.R. Griffiths: *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, John Wiley & Sons Inc., 2002 tom 2, str. 1303-1342
85. H. Fabian, Infrared Spectroscopy of Proteins, , in M. Chalmers, P.R. Griffiths: *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, John Wiley & Sons Inc., 2002 tom 5, str. 3399-3426
86. J. Łojewska, P. Miśkowiec, T. Łojewski, L.M. Proniewicz, Cellulose Oxidative and Hydrolytic Degradation: In Situ FTIR Approach, *Polym. Deg. Stab.*, 88 (2005) 512-520
87. I. Noda, *Appl. Spectrosc.* 47 (1993) 1329
88. F.B. Barton, D.S. Himeslback, J.H. Duckworth, M.J. Smith, *Appl. Spectrosc.* 46 (1992) 420
89. H.W. H.W. Siesler, Y. Ozaki, S. Kawano, H.M. Heise, *Near-Infrared Spectroscopy: Principles, Instruments, Applications* John Wiley & Sons Inc, 2002, rozdz. 9
90. C.P.Schulz, Role of Near-Infrared Spectroscopy in Minimally Invasive Medical Diagnosis, in M. Chalmers, P.R. Griffiths: *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, John Wiley & Sons Inc., 2002 tom 5, str. 3246-3266
91. A. Bittner, R. Marbach, H.M. Heise, Multivariate Calibration for Protein, Cholesterol and Triglycerides in Human Plasma Using Short-Wave Near Infrared Spectrometry, *Journal of Molecular Structure* 349 (1995) 341-344
92. H.M. Heise, Glucose Measurements by Vibrational Spectroscopy, *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, John Wiley & Sons Inc., 2002 tom 5, str. 3280-3295

Rozdział 14

Skaningowa mikroskopia tunelowa związków organicznych

Jan Milecki

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

1. Wprowadzenie

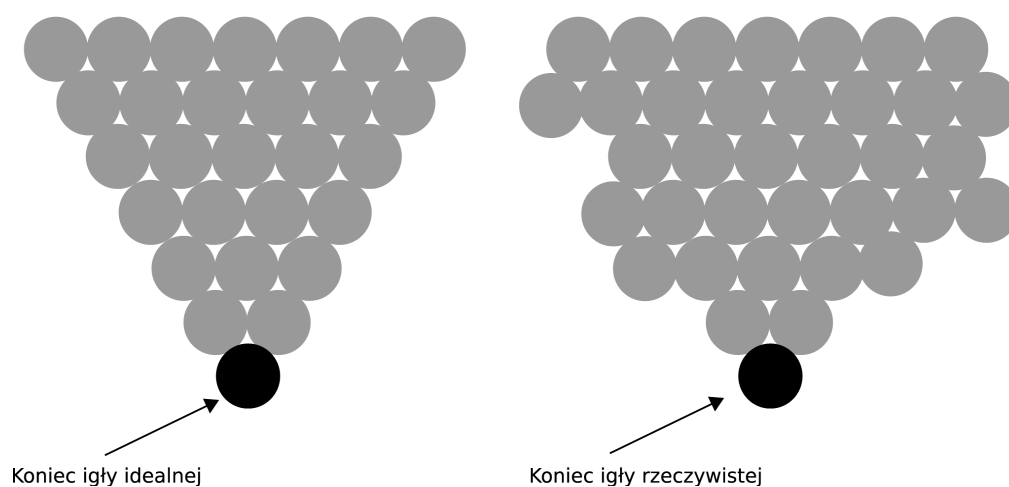
Skaningowa mikroskopia tunelowa (STM-Scanning Tunneling Microscopy) jest to technika badawcza opracowana w latach 80-tych XX wieku w laboratorium IBM w Zurychu przez Gerda Binniga i Heinricha Rohrera [1,2]. Jak ważne było to osiągnięcie świadczy fakt, że zaledwie 4 lata po opublikowaniu wyników swych doświadczeń badacze ci otrzymali Nagrodę Nobla w dziedzinie fizyki (1986).

Metoda została stworzona z myślą o badaniu powierzchni ciał stałych, zwłaszcza bardzo gładkich powierzchni kryształów metali. Materiał badany musi być materiał Em przewodzącym, co wynika z samej zasady działania STM. Technika ta daje możliwość badania pojedynczych atomów i cząsteczek z niespotykana dotąd rozdzielczością i dokładnością. Znalazła szerokie zastosowanie w badaniu materiałów metalicznych, półprzewodników i katalizatorów[3,4]. Czasopisma naukowe i popularnonaukowe opublikowały szereg spektakularnych zdjęć, przedstawiających „rzeźby” i „obrazy” czy napisy tworzone na powierzchni kryształów z pojedynczych atomów. Jest to nie tylko pouczająca zabawa, ale i dowód olbrzymiego potencjału STM jako narzędzia w nanostruktur przez manipulacje poszczególnymi atomami lub cząsteczkami.

2. Zasada działania STM

Badaną próbką może być tylko materiał przewodzący. Nad powierzchnią takiej próbki umieszcza się sondę o postaci bardzo ostrej igły (wykonanej z wolframu lub stopu irydyplatyna). Koniuszek tej igły stanowi pojedynczy atom metalu. Wydaje się nieprawdopodobne

uzyskanie takiego ostrza, ale w rzeczywistości, jeżeli przetnie się ostrym narzędziem cienki drut pod kątem ok. 45° , a następnie wytrawi jego koniec w odpowiednim roztworze (najczęściej KOH), to o wiele prawdopodobniejsze jest uzyskanie na końcu takiej igły jednego samotnego atomu wystającego ponad otoczenie niż równej płaszczyzny, złożonej z wielu atomów.



Rysunek 1. Ułożenie atomów na końcu sondy STM

Ostrze to umieszcza się bardzo blisko powierzchni próbki, ale tak by jej nie dotykało. Jeżeli między igłą i próbką przyłoży się napięcie, to nastąpi przeskok elektronu między ostrzem a atomami próbki. Nie oznacza to, że różnica potencjałów między próbką a ostrzem pozwala elektronowi na pokonanie przyciągania atomów metalu. Istota zjawiska jest zgoła inna i związana ze zjawiskami kwantowymi. Jako że odległości ostrza i próbki jest bardzo mała, rzędu rozmiarów atomowych, możliwe stają się zjawiska nieobserwowane w świecie makroskopowym. W omawianym przypadku zachodzi zjawisko tunelowania elektronu przez barierę potencjału. Oznacza to przejście elektronu od jednego atomu do drugiego, mimo, że różnica potencjałów jest znikoma i w opisie makroskopowym o rzędy wielkości zbyt mała by nastąpił przeskok elektronu według klasycznego mechanizmu. Na tak małe odległości nie jest istotny fakt, że przestrzeń między atomami pełni rolę izolatora, a dominujące staje się znaczenie prawdopodobieństwa znalezienia się elektronu po przeciwnej stronie bariery potencjału. Prawdopodobieństwo to ma istotną i realną wartość jedynie przy bardzo małych odległościach (właśnie rzędu angstromów) i ze wzrostem dystansu bardzo szybko maleje, a z nim maleje i prąd tunelowy. Do powstania tego prądu wystarczą przy tych małych

odległościach napięcia rzędu ułamków wolta. Ponieważ prąd towarzyszący zjawisku tunelowania zależy wykładniczo od odległości, przeto mierząc ten prąd (a pomiar prądu jest bodaj najlepiej opanowanym rodzajem pomiaru dokonywanym w technice) mierzymy w istocie odległość w skali rozmiarów atomowych. Ponieważ prąd bardzo mocno się waha z minimalnymi nawet zmianami dystansu między atomami, to najczęściej zjawisko tunelowania elektronu zachodzi tylko między dwoma atomami – końcem ostrza i tym atomem powierzchni próbki, który znajduje się najbliżej. Gdy będziemy się od tego atomu oddalać (przesuwając igłę „w bok”, tzn. równoległe do powierzchni), prąd będzie wyraźnie malał, aż do momentu, gdy w zasięgu znajdzie się następny atom powierzchni badanej. Prąd zacznie wtedy płynąć w kierunku tego następnego atomu, rosnąc w miarę zbliżania się do niego. Zatem przesunięcie igły od jednego atomu do następnego rejestrowane jest jako wyraźne wahnięcie rejestrowanego prądu. W praktyce częściej wykonuje się pomiar w ten sposób, że przesuwając sondę w poziomie jednocześnie zmienia się jej wysokość tak by prąd był stały. Pionowe ruch sondy oddają więc „ziarnistość” powierzchni, zliczając poszczególne atomy, które ją tworzą.

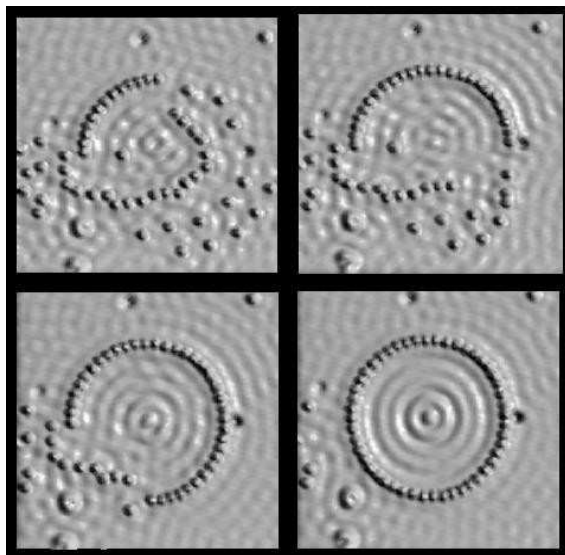
Jest rzecz ą jasną, że tak precyzyjne oddanie budowy powierzchni wymaga bardzo stabilnego mechanizmu zdolnego do dokładnego wykonywania niezwykle subtelnych ruchów, niewrażliwego przy tym na zakłócenia (wstrząsy i vibracje). Realizowane to jest za pomocą uchwytu piezoelektrycznego, w którym tkwi igła. Uchwyt ten ma możliwość poruszania się w trzech prostopadłych kierunkach (dwóch poziomych i pionowym). Zwykle przemiata się próbkę w jakimś zadanym obszarze według założonego schematu, ustalając w poszczególnych punktach wysokość igły tak by prąd tunelowy miał stałą wartość. Położenie sondy jest rejestrowane i zapamiętywane przez komputer, który na koniec pomiaru sporządza „mapę” badanego odcinka powierzchni. Powierzchnia ściany kryształu badanego przypomina w takiej rejestracji równą wybrukowaną płaszczyznę, gdzie poszczególne „kamienie” to atomy tej powierzchni. Wszelkie defekty powierzchni, inkluzje, nieregularności sieci krystalicznej itp. są doskonale uwidocznione [5].

By uniknąć zakłóceń otoczenia, zarówno próbka jak i uchwyt muszą być, jak już wspomniano, niezwykle stabilnie zamontowane. Konieczne jest też doskonałe odizolowanie od drgań. Istnieją obecnie systemy antywibracyjne, pozwalające na umieszczanie aparatury STM nawet na wyższych piętrach normalnych budynków, jednak odpowiednie przygotowanie miejsca pracy aparatu pozostaje bardzo istotnym zagadnieniem. W zasadzie można pomiary dokonywać wprost w powietrzu lub nawet, gdy próbka jest zanurzona w cieczy, ale zwykle pomiary STM wykonywane są w wysokiej próżni, co pozwala uniknąć zanieczyszczeń, które

swobodnie dyfundując w powietrzu lub cieczy (nawet bardzo czystej) mogłyby znacznie utrudnić rejestrację rzeczywistego obrazu powierzchni.

Typowe wielkości prądu tunelowego to 0,1 – 10 nA (nanoamperów), co wymaga odpowiednio czułego i stabilnego układu detekcji. Jeżeli materiał próbki stanowi nie czysty metal (pierwiastek) ale zbudowany jest on z różnych atomów, możemy rozpoznać, z jakim pierwiastkiem sonda w danym momencie oddziałuje. Ponieważ prąd tunelowy silnie zależy nie tylko od odległości, ale i od tego jak silnie atom pierwiastka wiąże elektrony, możliwe jest ich rozróżnienie na podstawie wielkości prądu. Powstała „mapa” obrazuje nie tylko kształt powierzchni, ale i to, jak rozmieszczone są atomy pierwiastków tworzących badany materiał. Ma to olbrzymie znaczenia w badaniu np. centrów aktywnych katalizatorów.

Taka „bierna” obserwacja nie jest jedynym sposobem zastosowania STM. Podczas skanowania między igłą a próbką przyłożone jest niewielkie napięcie, poniżej 1V. Jeżeli to napięcie się zwiększy, oddziaływanie pola elektrycznego na atom, z którym aktualnie igła ma „kontakt” może spowodować, że atom ten zmieni swoje położenie. Może zostać albo odepchnięty, albo przeciągnięty w inne miejsce powierzchni [6,7], albo też może oderwać się od powierzchni i „przykleić się” do końca igły [8] (tzn. potencjał przyciągania igły staje się większy niż oddziaływanie z atomami próbki).



Rysunek 2. Kolejne etapy przemieszczania atomów żelaza zaadsorbowanych na powierzchni miedzi. Koncentryczne kręgi wewnątrz to fala stojąca rozproszonych elektronów metalu [10].

[Reprodukcja z: *Physics Today* 46, 17-19 (1993)]

Po przesunięciu igły z zaadsorbowanym atomem w inne miejsce i odwróceniu potencjału oderwany poprzednio atom opuszcza igłę i na powrót wiąże się z powierzchnią próbki. Zostaje w ten sposób przeniesiony w sposób kontrolowany z jednego miejsca w inne. Skaningowy mikroskop tunelowy staje się w ten sposób narzędziem do „obróbki” materiałów na poziomie molekularnym. Umożliwia to tworzenie produktów należących do dziedziny nanotechnologii. Tak właśnie powstały spektakularne „obrazy”, przedstawiające np. logoIBM, japońskie hieroglify oznaczające „atom”, czy bardziej praktyczne produkty: ciągi atomów zdolne do przekazania informacji z jednego miejsca powierzchni do innego [9].

3. Zastosowania do cząsteczek organicznych

Rozwijając badania nad STM przekonano się, że metoda ta może służyć nie tylko do manipulowania zaadsorbowanymi cząsteczkami związków przewodzących, ale nadaje się również do cząsteczek organicznych[4, 11]. Obserwacje małych cząsteczek takich jak np. CO prowadzono od dawna[5,12], ale ostatnio notuje się ogromne zainteresowanie tworzeniem na powierzchni kryształów struktur zbudowanych z większych cząsteczek organicznych. Molekularne przełączniki, układy logiczne, silniki, przewodniki prądu były od dawna przedmiotem projektów, które w dużej mierze miały charakter futurystyczny. Możliwość manipulowania pojedynczymi cząsteczkami pozwala przejść od wizji do realnych obiektów umożliwiających sprawdzenie i doskonalenie teoretycznych założeń.

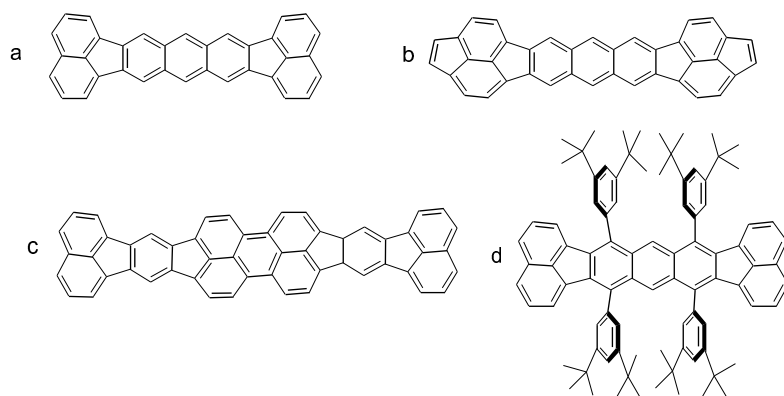
Do przemieszczania cząsteczek na powierzchni kryształu można wykorzystywać zarówno odpychanie cząsteczki przez igłę jak i jej przyciąganie (zależnie od przyłożonego potencjału). Niekiedy wykorzystuje się zjawisko zwiększenia energii wibracyjnej cząsteczki. Jest to równoważne ze zwiększeniem temperatury nie całej próbki, ale jedynie tej wybranej cząsteczki. Ponieważ dyfuzja zaadsorbowanych cząsteczek wymaga odpowiedniej temperatury, to zwiększenie energii wibracji powoduje, że wzbudzona cząsteczka dyfunduje (mówiąc obrazowo „pełza”) po powierzchni kryształu. Jeżeli odpowiednio dobierze się temperaturę eksperymentu, to pozostałe, niewzbudzone cząsteczki będą pozostawały na miejscu, bo ich energia będzie zbyt mała, by dyfuzja mogła zachodzić. Można tą drogą wykonywać „ścieżki” w monowarstwie zaadsorbowanych cząsteczek.

W odróżnieniu od atomów, cząsteczki posiadają więcej stopni swobody. Do ich dokładnego opisu nie wystarczy znajomość lokalizacji, ale także ich konformacji oraz orientacji względem powierzchni [13] (czy przywierają do kryształu swą „górną” czy „dolną” stroną). STM daje unikalną możliwość studiowania poziomów energetycznych pojedynczej cząsteczki w stanie zaadsorbowanym.

Często konformacja cząsteczki ulega zmianie przy wzbudzeniu metodą STM. Cząsteczka organiczna o odmiennej konformacji jest zwykle gorzej dopasowana do struktury powierzchni, przez co powierzchnia wiąże ją znacznie słabiej. Konsekwencją tego jest dużo większa swoboda poruszania się (desorpcji) [14] tej wzbudzonej cząsteczki. Istotnym zjawiskiem towarzyszącym temu procesowi jest znaczna (o kilka rzędów wielkości) zmiana przewodności tunelowania [15], co pozwala konstruować molekularne przełączniki i co za tym idzie układy elektroniczne o rozmiarach cząsteczkowych.

4. Adsorpcyjne modyfikowanie powierzchni kryształu.

Podczas procesu adsorpcji nie tylko adsorbowana cząsteczka ulega deformacji i zmienia się struktura elektronowa jej powłoki walencyjnej, ale również adsorbowana cząsteczka wpływa na powierzchnię kryształu z którym oddziałuje [4, 16]. Wiązania między atomami metalu znajdującymi się bezpośrednio pod zaadsorbowaną cząsteczką organiczną mogą zostać zerwane, a atomy metalu zmienić swą lokalizację. Wielką liczbę danych zebrano badając adsorpcję tzw związków Landera [17], poliaromatycznych struktur bogatych w elektrony.



Rysunek 3. Związki Landera: a. pojedynczy związek Landera (SL), b. „reaktywny” związek Landera (RL), c. fiolet Landera (VL), d. związek Landera z podstawnikami dystansującymi (HtBC)

Należący do tej klasy związek poliaromatyczny, hekso-t- butylodekacyklen (HtBC) adsorbuje się na powierzchni kryształu miedzi, przy czym jego cząsteczki organizują się w podwójne szeregi, utrzymywane przez słabe oddziaływania van der Waalsa (3,5-di-t-butylowe podstawniki dystansujące, tzw. „nogi” nie pozwalają na bliski kontakt orbitali

elektronowych rdzenia aromatycznego i metalu) [18]. Jeżeli za pomocą sondy STM usunie się te zaadsorbowane cząsteczki, to można dostrzec ich „ślady”, pozostawione na powierzchni kryształu. Odciski cząsteczek HtBDC są, jak się okazało, asymetryczne [19] i ponadto przy delikatnym podgrzaniu mają tendencje do powielania się wzdłuż i w szerz powierzchni kryształu, co prowadzi do powstania rozległych domen o powierzchni chiralnie zmodyfikowanej. Nietrudno dostrzec, że jest to potencjalnie doskonała droga do otrzymywania chiralnych katalizatorów metalicznych.

Jeżeli na powierzchni metalu zaadsorbuje się taka liczba cząsteczek HtBDC, że pozostawi się miejsce na swobodną migrację, to w temperaturze pokojowej będą one migrować w kierunku krawędzi uskoków ścian kryształu. Po ochłodzeniu do ok. 150K ta migracja zamiera i cząsteczki nie są w stanie opuścić miejsc, w których się znajdują. Można je natomiast usunąć działając sondą STM. Cząsteczki HtBDC by związać się adsorpcyjnie z powierzchnią kryształu muszą przyjąć naprężoną konformację. Podczas odrywania cząsteczek powracają one do niskoenergetycznej, nienaprężonej konformacji. Energia tych zmian okazała się wystarczająca by przemieścić atomy miedzi leżące pod manipulowaną cząsteczką i pozostawiła charakterystyczne nanostruktury o wymiarach 2x7 atomów Cu [4]. Zatem cząsteczka organiczna spełnia tu rolę formy, albo raczej stempla, pozostawiającego na powierzchni swój ślad. Odmienne cząsteczki pozostawiają odmienne ślady, co być może pozwoli na swobodne projektowanie ugrupowań atomów, jakie da się wytworzyć na powierzchni metalu. Nie jest konieczne żmudne przemieszczanie pojedynczych atomów metalu, wystarczy zamiast tego manipulowanie jedną większą cząsteczką organiczną, by ułożyła ona cały zespół atomów stosownie do swego kształtu. Badając adsorpcję i usuwanie za pomocą STM różnych związków z grupy poliaromatów Landera rzeczywiście stwierdzono, że zależnie od rozmiarów rdzenia π -elektronowego cząsteczki zmienia się kształt pozostawionej nanostruktury na powierzchni metalu.

5. Reakcje chemiczne pojedynczych cząsteczek zaadsorbowanych na powierzchni.

Przekazując energię od sondy STM do cząsteczki, można poprzez odpowiednie dobranie napięcia dopasować tę energię do drgań vibracyjnych poszczególnych wiązań obecnych w cząsteczce. Wiązania te można wzbudzić do tego stopnia, że ulegną rozerwaniu. Jest to prosty sposób wytworzenia w wybranym miejscu powierzchni zaadsorbowanego wolego rodnika. Można również, wytwarzając rodniki w cząsteczkach zaadsorbowanych odpowiednio blisko siebie powodować reakcje między tymi cząsteczkami. Przykładowe syntezy wykonane na powierzchni metalu to tworzenie karbonylków [20], dehydrogenacja

trans-butenu-2 do 1,3-butadienu [21] lub reakcja Ullmana (tworzenie bifenyli, katalizowane miedzią) [22]. Interesujący jest fakt, że reakcję tę można było prowadzić etapami. Najpierw oderwano atom jodu od jodobenzenu, tworząc rodnik fenyłowy, a następnie po zbliżeniu do siebie dwóch takich rodników i zorientowaniu ich tak, by niesmarowane elektrony znalazły się blisko siebie, uzyskano cząsteczkę bifenyłu.

6. Podsumowanie

Jak wynika z tego krótkiego przeglądu, STM pozwala na studiowanie właściwości pojedynczych cząsteczek w stanie zaadsorbowanym, przy czym uzyskiwane dane dotyczą jasno określonej sytuacji, w jakiej się cząsteczka znajduje. Nie operujemy uśrednionymi właściwościami zbioru cząsteczek, ale obserwujemy konkretną cząsteczkę, badając jej oddziaływania elektronowe z powierzchnią, zmiany konformacyjne, modyfikacje poziomów energetycznych wywołane adsorpcją itd. pozwala to o wiele głębiej i dokładniej wnikać w mechanizm procesów katalitycznych.

Inną bezcenną cechą STM jest możliwość nie tylko syntetyzowania związków chemicznych metodami tradycyjnymi, ale i budowania wieloatomowych struktur o zadanych kształtach, właściwościach elektronowych, zdolnych do spełniania roli „maszyn molekularnych”.

Literatura:

1. G. Binning, H. Rohrer, C. Gerber, E. weibel, *Phys. Rev. Lett.* 49, 57 (1982)
2. G. Binning, H. Rohrer, *Helv. Phys. Acta* 55, 726 (1982).
3. C. Joachim, J.K. Gimzewski, A. aviram, *Nature*, 408, 541 (2000).
4. F. Rosei, M. Schunack, P. Jiang, A. Gourdon. E. Laegsgaard, I. Stenggaard, C. Joachim, F. Besenbacher *Science*, 296, 328 (2002).
5. F. Besenbacher *Rep. Prog. Phys.* 59, 1737 (1996).
6. F. Moresco, *Phys. Rep.* 399, 175 (2004).
7. W. A. Hofer, A.S. Foster, A.L. Shluger, *Rev. Mod. Phys.*, 75, 1287 (2003).
8. L. Bartels, G. Meyer, K.-H. Rieder, *Appl. Phys. Lett.*, 71, 213 (1997).
9. A.J. heinrich, C.P. Lutz, J.A. Gupta, D.M. Eigler, *Science*, 298, 1381 (2002).
10. M.F. Crommie, C.P. Lutz, D.M. Eigler, *Science*, 262, 218 (1993).
11. R. Otero, F. Rosei, F. Besenbacher, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 57, 497 (2006).
12. C. Stampfl, M.V. ganduglia-Pirovano, K. reuter, M. Scheffler, *Surf. Sci.*, 500, 368 (2002).
13. D.L. Keeling, M.J. Humphry, R.H.J. Fawcett, P.H. Beton, C. Hobbs, L. Kantorovich, *Phys. Rev. Lett.*, 94, 146104 (2005).
14. R. Otero, F. Hummelink, F. Sato, S.B. Legoas, P. Thstrup. *Nat. Mat.*, 3, 779 (2004).
15. F. Moresco, G. Meyer, K.-H. Rieder, H. Tang, A. Gourdon, C. Joachim, *Phys. Rev. Lett.*, 86, 672 (2001).
16. R. otero. F. rosei. Y. Naitoh, P. Jiang, P. Thstrup, *Nano Lett.*, 4, 75 (2004).
17. A. Gourdon, *Eur. j. Org. Chem.*, 2797 (1998).
18. T. Zambelli, H. Tang, J. Lagoute, S. gauthier, A. Gourdon, C. Joachim, *Chem. Phys. Lett.*, 348, 1 (2001).
19. M. Schunack, E. Laegsgaard, I. Stensgaard, I. Johannsen, F. Besenbacher, *Angew. Chem. Intl. Ed. Engl.*, 40, 2623 (2001).
20. H.J. Lee, W. Ho, *Science*, 286, 1719 (1999).
21. Y. Kim, T. Komeda, M. Kawai, *Phys. Rev. Lett.*, 89, 126104 (2002).
22. S.-W. Hla, L.Bartels, G. Meyer, K.-H. Reiter, *Phys. Rev. Lett.*, 85, 2777 (2000)

Rozdział 15

Zastosowanie metod kinetycznych w badaniach reakcji kompleksowania w układach gość-gospodarz

Bogusława Łęska, Grzegorz Schroeder

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

W 1967 roku amerykański chemik C. Pedersen [1] stwierdził, że otrzymane przez niego etery koronowe tworzą trwałe kompleksy z kationami metali alkalicznych i ziem alkalicznych. Związki te charakteryzowały się tym, iż posiadały niezwykle właściwości rozpuszczania związków jonowych, soli nieorganicznych w rozpuszczalnikach niepolarnych, takich jak: benzen, heksan, czy tetrahydrofuran. Prace C. Pedersena oraz opublikowane przez J. Lehn'a i D. Cram'a [2-4] dały początek nowemu działowi chemii zajmującego się układami makrocyclicznymi – dziś określanego jako chemia supramolekularna.

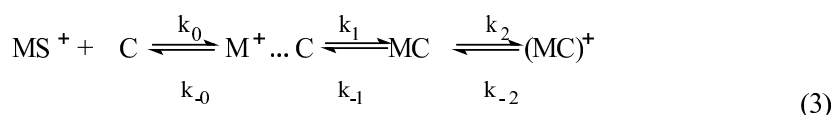
Kinetykę procesów chemicznych, w tym powstawania kompleksów gość-gospodarz, analizuje się w oparciu o różne modele mechanizmów reakcji chemicznych [5]. Określenie stałych szybkości reakcji i parametrów aktywacji ($\Delta H^\ddagger$, $\Delta S^\ddagger$, $\Delta G^\ddagger$) dla otrzymywania kompleksów typu gość-gospodarz w roztworach dostarcza zasadniczych, bardzo istotnych informacji o tych systemach [6-12].

Ogólne równanie reakcji procesu kompleksowania przedstawia się następująco:



gdzie: M^{n+} - jon metalu; L - ligand, ML^{n+} - kompleks, k_f – stała szybkości reakcji kompleksowania, a k_d – stała szybkości reakcji dysocjacji kompleksu.

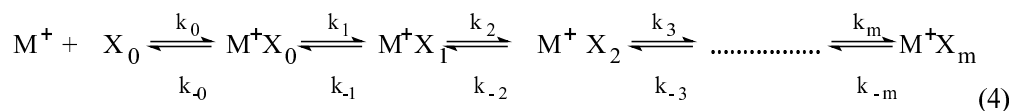
Eigen i Winkler [13] zaproponowali szczegółowy, wieloetapowy mechanizm procesu kompleksowania cząsteczek gości przez molekuły receptorów, czyli gospodarzy (ligandy makrocykliczne), takich jak etery koronowe, kryptandy, kaliksareny itp. Pierwszy etap dotyczy równowagi pomiędzy różnymi konformacjami ligandu, natomiast drugi odnosi się do samego procesu kompleksowania jonu przez ligand o określonej konformacji. Mechanizm można przedstawić za pomocą następujących równań:



gdzie: *C, C – związek makrocykliczny (różne konformacje), MS^+ - solwatowany jon metalu, $M^+ \dots C$ – para jonowa separowaną rozpuszczalnikiem, MC^+ - „bliska” para jonowa, utworzoną z substancji rozpuszczonych, $(MC)^+$ - kation metalu osadzony we wnęce związku makrocyklicznego, k_i - stałe szybkości poszczególnych etapów reakcji.

Według tego mechanizmu w pierwszym etapie (2) następuje konieczna, potrzebna do utworzenia kompleksu, zmiana konformacji ligandu makrocyklicznego. Wstępna asocjacja i utworzenie kompleksu spotkaniowego jonu metalu i cząsteczki związku makrocyklicznego w roztworze powoduje powstanie układu $M^+ \dots C$, nazywanego kompleksem zewnętrznym („exclusive”), w którym jon metalu znajduje się na zewnątrz pierścienia makrocyklicznego. Utworzenie pozostałych wiązań, pomiędzy kationem, a donorowymi atomami ligandu, prowadzi do powstania kompleksu wewnętrznego („inclusive”) $(MC)^+$, w którym jon metalu zajmuje miejsce w środku pierścienia (3).

Przebieg procesu kompleksowania gość-gospodarz oparty jest na tym, że zasocjowane z kationem cząsteczki rozpuszczalnika są skutecznie wypierane poprzez donorowe atomy liganda (równanie 4) [14].



gdzie: M^+ - solwatowany jon metalu; X_0 - solwatowany ligand; M^+X_0 – kompleks zewnętrzny; M^+X_i – jon metalu skoordynowany przez i z ogólnej liczby m atomów donorowych ligandu; k_0, k_{-0} – stałe szybkości reakcji kontrolowanej przez dyfuzję.

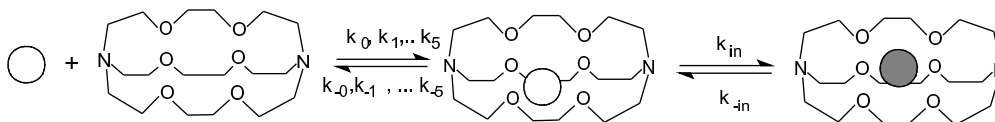
Obserwowane stałe szybkości, k_f i k_d , odnoszące się do przyjętego modelu przedstawiają równania:

$$k_f = k_0 k_1 k_2 \dots k_m / N$$

$$k_d = k_{-0} k_{-1} k_{-2} \dots k_{-m} / N$$

$$\text{gdzie } N = k_1 k_2 k_3 \dots k_m + \dots + k_{-0} k_{-1} k_{-2} \dots k_{-m+1}$$

Schemat 1 przedstawia zastosowanie modelu kinetycznego opisanego równaniem (4) do procesu kompleksowania jonów metali przez etery koronowe i kryptandy.



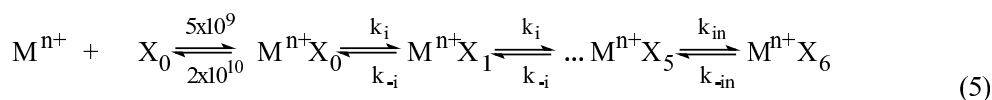
Schemat 1. Model powstawania kompleksu pomiędzy jonem Na^+ oraz kryptandem 222 [14].

W procesie tworzenia kompleksów przez etery koronowe, które ulegają dość łatwo szybkim zmianom konformacyjnym, nie uwzględnia się równania (2). Proces kompleksowania można opisać zatem następującymi stałymi: k_0 , $k_1 \dots k_5$, natomiast powstawanie kryptatów wymaga dodatkowo wzięcia pod uwagę jeszcze jednego etapu tworzenia kompleksu wewnętrznego, opisanego stałymi k_{in} i k_{-in} , w którym kation wchodzi do wnętrza ligandu, jednocześnie wypychając znajdujące się w wewnętrznej sferze koordynacyjnej kationu, cząsteczki rozpuszczalnika (Tabela 1) [14] oraz uwzględnienia równowagi pomiędzy formami konformacyjnymi ligandu w początkowym stanie reakcji.

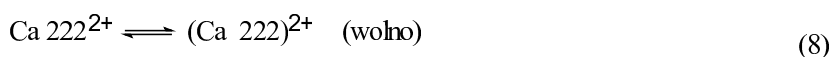
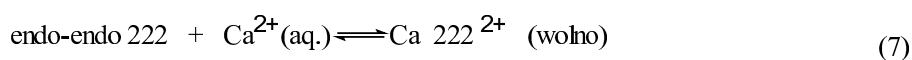
Tabela 1.

Stałe szybkości powstawania kompleksów gość-gospodarz w reakcji pomiędzy eterami koronowymi i kryptandami a jonami metalu w metanolu zgodnie z modelem kinetycznym opisanym równaniem (5) [14].

Kompleks	k_f [$\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$]	k_d [s^{-1}]	k_i [s^{-1}]	k_{-i} [s^{-1}]	k_{in} [s^{-1}]	k_{-in} [s^{-1}]
$\text{Na}(\text{Cy}_{218}\text{C}_6)^+$	3×10^8	$5,2 \times 10^4$	$8,1 \times 10^8$	$1,7 \times 10^8$	-	-
$\text{Na}(2.2.2)^+$	$2,7 \times 10^8$	2,87	$8,1 \times 10^8$	$1,7 \times 10^8$	$8,1 \times 10^8$	1×10^4
$\text{Ca}(2.2)^{2+}$	1×10^5	30	$2,4 \times 10^5$	$4,2 \times 10^4$	-	-
$\text{Ca}(2.2.2)^{2+}$	$3,2 \times 10^4$	$2,2 \times 10^{-4}$	$2,4 \times 10^5$	$4,2 \times 10^4$	$2,4 \times 10^5$	5,6



W przypadku kryptandów istnieje równowaga pomiędzy konformerami *endo-endo*, *endo-exo* i *exo-exo*, z tym, że konfomer *endo-exo* (C) jest najbardziej reaktywny w stosunku do solwatowanego jonu metalu (MS^+). Słowem „*endo*” określa się wolną parę elektronową jednego z atomów azotu, odwróconą w kierunku wnętrza kryptandu, natomiast jako „*exo*” parę ukierunkowaną do wnętrza cząsteczki. Kitano [15] wykorzystując z dobrym skutkiem technikę zatrzymanego przepływu (stopped-flow) do badań szybkości kompleksowania jonów Ca^{2+} , Si^{2+} oraz Ba^{2+} przez kryptand 222 w roztworze wodnym, przyjął inny mechanizm tego procesu niż zaproponowany we wcześniejszych pracach przez Eggers’a [16]. Model ten zakłada, że proces kompleksowania jonów przez kryptandy poprzedza szybsza równowaga pomiędzy konformerami ligandu w stanie początkowym. Trójstopniowy mechanizm przedstawiony przez Kitano wyjaśnia przebieg reakcji w następujący sposób:



Ostatni etap określany jest jako „ujęcie jonu metalu przez wnękę, poprzez utworzenie silnego wiązania pomiędzy jonem metalu, a miejscami wiążącymi we wnękę kryptandu”.

Langford i Gray [17] zaproponowali trzy grupy mechanizmów reakcji tworzenia kompleksów makrocyclicznych z jonami metali. Pierwszy rodzaj, mechanizm typu dysocjacyjnego (D), określany także jako *pseudo-jednocząsteczkowy* z kolejno następującymi po sobie procesami dysocjacji i rekombinacji przedstawiają równania (9) i (10). Podczas takiej reakcji następuje wzrost liczby koordynacyjnej jonu metalu w kompleksie, w stosunku do stanu przejściowego [7].



gdzie: MC^+ - kompleks, M^{*+} - wolny kation metalu, C – ligand.

Drugi typ mechanizmu jest określany jako asocjacyjny lub wymiany dwucząsteczkowej, w którym wymiana jonu w kompleksie makrocyclicznym jest wymuszona przez znajdujący się w nadmiarze wolny kation metalu M^{+*} (równanie 11). Jest to także określane jako mechanizm wymiany kationowej (metal cation interchange) i oznaczany symbolem I_M . W tym przypadku następuje spadek liczby koordynacyjnej jonu metalu w kompleksie, w stosunku do stanu przejściowego [18].



gdzie: MC^+ - kompleks, M^{+*} - wolny kation metalu, C – ligand.

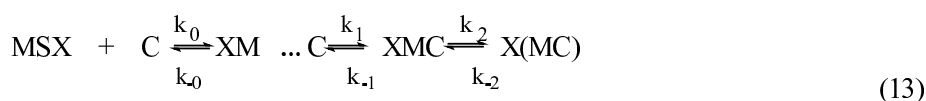
Wymiana typu asocjacyjnego, której towarzyszy wysoka wartość ujemnej entropii aktywacji, jest głównie kontrolowana zmianami konformacji związku makrocyclicznego (C) oraz procesem solwatacji kationu wchodzącego (M^{+*}) i opuszczającego kompleks (M^+) (równanie 12) [16].



Jednakże dla większości procesów kompleksowania trudno jest jednoznacznie określić typ mechanizmu reakcji i najczęściej mamy do czynienia z mechanizmem określanym jako pośredni, pomiędzy dysocjacyjnym a asocjacyjnym, tzw. ligandowym mechanizmem asocjacyjnym (I). Jest on szczególnie ważny w układach, gdzie istotna jest stechiometria kompleksu gość:gospodarz typu 1:2. Nie uwzględnia on również możliwości utworzenia pary jonowej, pomiędzy jonem metalu, a anionem [17].

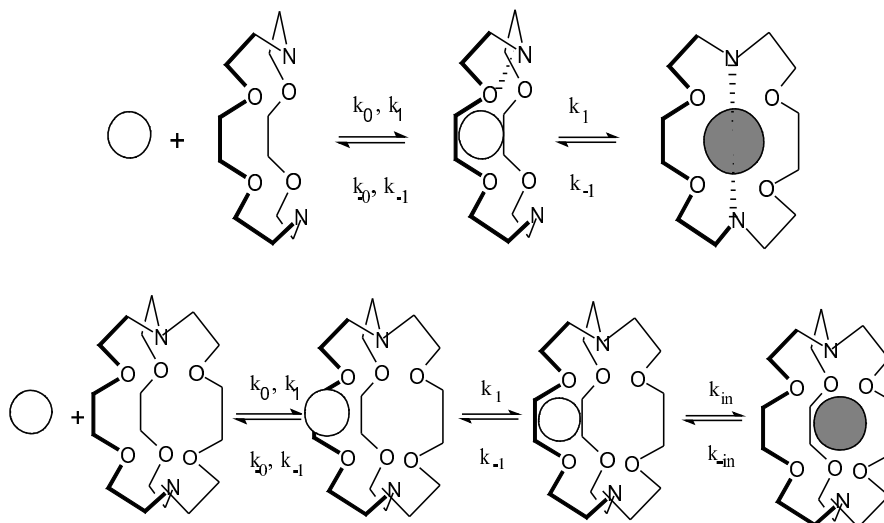
W przypadku wieloetapowej reakcji kompleksowania jonów metali przez ligandy makrocycliczne, szybkości poszczególnych części reakcji oraz etap determinujący szybkość całego procesu, są zależne od budowy gospodarza (ligandu), np. czy jest to ligand acykliczny, czy cykliczny, od obecności, umiejscowienia i ilości atomów o właściwościach donorowych w cząsteczce makrocyclicznej oraz od „giętkości” molekuly liganda. Porównując reaktywności acyklicznej tetraaminy i aromatycznych ligandów porfirytowych zawierających tą samą ilość atomów azotu, stwierdzono znaczny spadek stałej szybkości procesu kompleksowania jonów miedzi(II) w zakresie od dwóch do ośmiu rzędów, przez bardziej sztywne układy aromatyczne [18, 19].

W rozpuszczalnikach o niskiej stałej dielektrycznej, jony metalu dostępne do kompleksowania nie występują jako solwatowane kationy MS^+ , a tylko jako solwatowane pary jonowe MS^+X^- . W tego typu rozpuszczalnikach mechanizm Eigen-Winkler'a procesu kompleksowania musi więc uwzględnić przebieg reakcji z parami jonowymi (równanie 13) [6].



gdzie: MSX – para jonowa wraz z rozpuszczalnikiem, $XM \dots C$ – kompleks spotkaniowy, XMC – kompleks zewnętrzny oraz $X(MC)$ – solwatowany kompleks wewnętrzny.

Schemat 2 przedstawia model kompleksowania jonów Ag^+ z kryptanadami 2.2 oraz 2.2.2.



Schemat 2

W oparciu o równanie (4) obliczono stałe szybkości i równowagi w reakcjach kompleksowania jonów srebra poprzez kryptandy 2.2 oraz 2.2.2 w roztworze acetonitrylu. Wyniki zamieszczono w Tabeli 2. Można zauważyć, że w porównaniu z reakcjami kompleksowania z udziałem jonów metali I i II grupy układu okresowego (Tabela 1), stała równowagi pomiędzy kompleksem zewnętrznym i wewnętrznym w przypadku jonów srebra(I) jest niewielka ($K_{in} = 17$) [14].

Tabela 2.

Stałe szybkości i równowagi dla reakcji kompleksowania jonów srebra poprzez ligandy 2.2 i 2.2.2 w acetonitrylu [14].

Kompleks	k_f [M ⁻¹ s ⁻¹]	k_d [s ⁻¹]	k_1 [s ⁻¹]	k_{-1} [s ⁻¹]	K_1	K_{in}
Ag(2.2) ⁺	2x10 ⁹	35	6,7x10 ⁹	6,2x10 ⁵	1,1x10 ⁴	-
Ag(2.2.2) ⁺	5,4x10 ⁸	0,55	6,7x10 ⁹	6,2x10 ⁵	1,1x10 ⁴	17

Porównując kinetykę procesów kompleksowania jonów przez podobne pod względem budowy wnętrza eteru koronowe można oszacować etap limitujący szybkość całego procesu. Dla reakcji kompleksowania jednowartościowego kationu srebra przez eter 18-korona-6 w roztworze DMF wyznaczono, że etapem determinującym szybkość reakcji kompleksowania jest przegrupowanie się ligandu wokół kationu, ponieważ 18-korona-6 reaguje o wiele szybciej z kationem srebra w tych samych warunkach, niż bardziej sztywny dibenzo 18-korona-6 [7].

W rozpuszczalnikach aprotycznych przeciwjon rywalizuje skutecznie z cząsteczkami rozpuszczalnika i ligandu makrocyclicznego o miejsce w pierwszej sferze koordynacyjnej kationu i można zauważyć znaczącą różnicę w częstotliwościach relaksacji oraz maksimum absorpcji, kiedy w roztworze DMF, AgNO₃ lub AgClO₄ reagują z eterem 18-korona-6. Jeśli natomiast rozpuszczalnik, w którym prowadzona jest reakcja kompleksowania charakteryzuje się niską przenikalnością elektryczną, jon metalu nie występuje jako swobodny, ale tylko jako para jonowa. Dla układu LiAsF₆ i eterów koronowych w 1,3-dioksalenie (DXL) jako rozpuszczalniku, mechanizm Eigen-Winkler'a można przedstawiać w następujący sposób [20]:



gdzie: LiAsF₆ oznacza parę jonową, C-eter koronowy, LiAsF₆ ...C – stan przejściowy uwzględniający desowaltację substratów oraz zapoczątkowanie reorganizacji giętkiego związku makrocyclicznego, LiCAsF₆ –końcowy produkt o określonej konfiguracji eteru koronowego. Dla eterów 12-korona-4 i 15-korona-5 reagujących z LiAsF₆ w DXL obserwuje się mniejszą amplitudą ultradźwiękowej relaksacji i niższą częstotliwością relaksacji, niż w przypadku eteru 18-korona-6 autorzy pracy tłumaczą to, że bardziej sztywne eteru: 12-korona-4 i 15-korona-5 ulegają koniecznej zmianie konformacji wolniej, niż eter

koronowy 18-korona-6. W konsekwencji etery koronowe o mniejszych pierścieniach łatwiej mogą zaatakować kation litu w reakcji z LiAsF_6 w DXL niż etery duże wymagające wcześniejszej zmiany konformacji (Tabela 3).

Tabela 3.

Stałe szybkości i równowagi dla reakcji (2) pomiędzy LiAsF_6 i różnymi związkami makrocyclicznymi w DXL (25°C) [7].

Stałe	18-korona-6	15-korona-5	12-korona-4
k_1 [s^{-1}]	$4,8 \times 10^9$	$1,5 \times 10^9$	
k_{-1} [s^{-1}]	$2,7 \times 10^8$	$7,8 \times 10^8$	$6,9 \times 10^8$
K_1 [M^{-1}]	17,6	1,9	
k_2 [s^{-1}]	$3,9 \times 10^8$	$2,7 \times 10^7$	$\ll k_2$
k_{-2} [s^{-1}]	$4,7 \times 10^7$	$3,4 \times 10^6$	$7,5 \times 10^6$
K_2 [M^{-1}]	8,3	7,9	

Cyklodekstryny (CD) są zdolne do tworzenia kompleksów gość-gospodarz z różnymi molekułami, a system badań kinetycznych nad reakcją kompleksowania jest bardzo szeroki i wykorzystuje wiele różnych technik badawczych [21-23]. Kompleksowanie małych anionów i cząsteczek organicznych, to generalnie rzecz biorąc, procesy bardzo szybkie, w zakresie: od 10^7 do 10^9 [$\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$]. Bardzo dobrze poznanymi reakcjami są procesy kompleksowania przez cyklodekstryny barwników aromatycznych (L), a zaproponowany dwustopniowy mechanizm uwzględnia powstawanie w pierwszym etapie kompleksu przejściowego ($\text{CD} \cdot \text{L}^*$), a następnie w drugim etapie, tworzenie się finalnego kompleksu gość-gospodarz [24]:



Tworzenie kompleksów gość gospodarz z barwnikami z grupą sulfonianową przez α -CD odbywa się wyłącznie przez szerszą górną część kosza cyklodekstryny, w procesie dwuetapowym (równanie 15). Pierwszy, szybki etap jest przypisany powstawaniu kompleksu spotkaniowego pomiędzy barwnikiem, a α -CD i prowadzi do częściowej desolvatacji grupy sulfonianowej barwnika i ujemnej wartości aktywacji ($\Delta V_1^\ddagger = -24 - (-8)$ [$\text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$]). W drugim, wolniejszym etapie, w którym to molekuly gościa przechodzą dalej do wnętrza wnęki, z równoczesnym opuszczaniem przez cząsteczkami wody tej wnęki proces ten jest

opóźniane przez grupy hydroksylowe, znajdujące się w węższej części brzęgu kosza cząsteczki cyklodekstryny ($\Delta V_2^\ddagger = -15 - (-2) \text{ [cm}^3 \text{ mol}^{-1}\text{]}$).

Kompleksowanie prostych anionów, takich jak ClO_4^- , SCN^- , I^- , NO_3^- , Br^- czy Cl^- przez cząsteczki β -cyklodekstryny jest procesem o wolnym dla którego można zastosować technikę ultradźwiękowej spektrometrii absorpcyjnej.



Dla reakcji kompleksowania dużych jonów takich jak ClO_4^- przez β -CD w roztworze wodnym w temperaturze 25°C stałe szybkości reakcji wynoszą odpowiednio: $k_f = 2,0 \times 10^9 \text{ [M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{]}$ oraz $k_d = 7,4 \times 10^7 \text{ [s}^{-1}\text{]}$. Wyznaczona wartość k_f dla tej reakcji pomimo, że nie stwierdzono powstawania kompleksu wewnętrznego z powodu wielkości anionu, ma sens fizyczny ponieważ jon nadchloranowy tworzy specyficzny zewnętrzny kompleks z β -cyklodekstryną („straddle complex”). Natomiast wartości k_f dla tej reakcji, ale z udziałem mniejszych jonów, takich jak SCN^- , I^- , NO_3^- , Br^- czy Cl^- wynoszą około $5,0 \times 10^7 \text{ [M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{]}$, a k_d około $10^7 \text{ [s}^{-1}\text{}]$ [6, 7].

Rodzaj stosowanych kinetycznych metod badawczych zależy w pierwszym rzędzie od skali czasu powstawania lub też dysocjacji kompleksów gość-gospodarz w roztworze (Tabela 4). Wśród używanych technik badawczych, pozwalających w sposób eksperymentalny śledzić postęp reakcji kompleksowania związków supramolekularnych w roztworach w czasie, można wyróżnić dwie zasadnicze kategorie. Pierwszą, bezpośrednią obserwację (monitoring) tworzenia się kompleksu, najczęściej w warunkach pseudo-pierwszorzędowych oraz drugą polegającą na zaburzaniu istniejącej stałej równowagi.

Do najczęściej stosowanych technik badawczych, pozwalających na wyznaczenie kinetyki reakcji tworzenia kompleksów gość-gospodarz zaliczamy: spektroskopię UV-VIS, metodę zatrzymanego przepływu (stopped-flow), spektroskopię FTIR, spektroskopię konwencjonalnego i dynamicznego jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR), metodę skoku temperatury (temperature jump) lub ciśnienia (pressure jump), spektrometrię ultradźwiękowej absorpcji relaksacyjnej (ultrasonic absorption relaxation spectrometry), fluorescencję oraz EPR (spektroskopię elektronowego rezonansu paramagnetycznego) [6, 18-24]. Metody te, pomimo wielu ograniczeń narzucanych przez charakter i właściwości badanych układów oraz przyjęty model matematyczny, dostarczają nam nieocenionych informacji o przebiegu reakcji chemicznej.

W Tabeli 4 zawarte są dostępne techniki badawcze stosowane w badaniach kinetycznych reakcji kompleksowania gość-gospodarz w roztworach wraz z zakresem czasów pomiarowych [6]

Tabela 4.

Techniki badawcze stosowane w badaniach kinetycznych reakcji kompleksowania gość-gospodarz w roztworach i zakres czasów pomiarowych

Technika badawcza	Czas pomiarowy
Spektroskopia z klasycznym mieszaniem	$\geq 10^2$
Metody stopped-flow (zatrzymanego przepływu)	$10^{-3} - 10^3$
Metody temperature jump (skoku temperaturowego)	$10^{-9} - \geq 10^3$
NMR- transfer nasycenia oraz 2D EXSY	$10^{-2} - 10^2$
Dynamiczny NMR	$10^{-5} - 10^{-2}$
EPR (spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego)	$10^{-10} - 10^{-5}$
Spektrometria ultradźwiękowej absorpcji relaksacyjnej	$10^{-11} - 10^{-4}$
Fluorescencja	$10^{-12} - 10^{-6}$

Podziękowania:

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

Literatura:

1. C.J. Pedersen, J. Am. Chem. Soc., 89, 2495 (1967).
2. B. Dietrich, J. -M. Lehn, J. P. Sauvage, Tetrahedron Lett., 2885 (1969).
3. D.J. Cram, J.M. Cram, Container Molecules and Their Guests, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1994.
4. C. J. Pedersen, H. K. Frensdorff, Usp. Khim., 42, 492 (1973).
5. K. Schwetlick, Kinetyczne metody badania mechanizmów reakcji, PWN, Warszawa 1975.
6. D.H. Macartney, Kinetics of Complexation. *Encyclopedia of Supramolecular Chemistry*; Atwood, J. L.; Steed J. W., Ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, USA, 2004; Vol. 1, 776-781.
7. S. Petrucci, E.M. Eyring, G. Konya, Kinetics of Complexation, *Comprehensive Supramolecular Chemistry- Molecular Recognition: Receptors for Cationic Guests*; Gokel, G. W., Ed.; Elsevier: Oxford, UK, 1996; Vol. 8, 483-497.
8. L.J. Rodriguez, M. Xu, E.M. Eyring, S. Petrucci, Pure & Appl. Chem., 61, 1593-1596 (1989).
9. G.W. Liesegang, M.M. Farrow, F.A. Vazquez, N. Purdie, E.M. Eyring, J. Am. Chem. Soc., 99, 3240 (1977).
10. L.J. Rodriguez, G.W. Liesegang, M.M. Farrow, N. Purdie, E.M. Eyring, J. Phys. Chem., 82, 647 (1978).
11. M. Eigen, R.G. Wilkins, A.C.S. Adv. Chem. Series, 49, 55 (1965).
12. R.M. Izatt, K. Pawlak, J.S. Bradshaw, R.L. Bruening, Chem. Rev., 95, 2529 (1995).
13. M. Eigen, R. Winkler, Alkali-Ion Carriers: Dynamics and Selectivity, *Neurosciences: Second Study Program*; Rockefeller University Press, New York, 1970, 685-696.
14. B.G. Cox, H. Schneider, Pure & Appl. Chem, 82, 2259 (1990).
15. H. Kitano, J. Hasegawa, S. Iwai, T. Okubo, J. Phys. Chem., 90, 6281 (1986).
16. F. Eggers, T. Funck, K.H. Richmann, H. Schneider, E.M. Eyring, S. Petrucci, J. Phys. Chem., 91, 1961 (1987).
17. C.H. Langford, H.B. Gray, *Ligand Substitution Processes*, W.A. Benjamin, New York, 1966.
18. K.M. Briere, C. Detellier, J. Phys. Chem., 96, 2185 (1992).
19. C. Detellier, Reaction Kinetics and Exchange, *Modern NMR Techniques and Their Applications in Chemistry*, Dekker, New York, 1986, vol.11, 521-566.
20. M. Xu, N. Inoue, E.M. Eyring, S. Petrucci, J. Phys. Chem., 92, 2781 (1988).
21. M. Lucarini, B. Luppi, G.F. Pedulli, B.P. Roberts, Chem. Eur. J., 5, 2048 (1999).

- 22. K.A. Connors, *Chem. Rev.*, 97, 1325 (1991).
- 23. F. Cramer, W. Saenger, H.-Ch. Spatz, *J. Am. Chem. Soc.*, 89, 14 (1967).
- 24. N. Yoshida, K. Hayashi, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 6, 1285 (1994).

Rozdział 16

Kinetyka i mechanizm tworzenia kompleksów przez układy makrocycliczne typu cyklam

Joanna Wyrwał, Grzegorz Schroeder

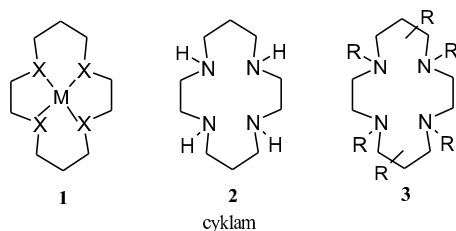
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Wydział Chemii, Grunwaldzka 6, 60-780 Poznań

Ligandy makrocycliczne stanowią istotną część układów biologicznych. Znaczenie takich systemów stanowiło bodziec do badania chemii jonów metali w układach biologicznych i cyklicznych ligandach. Możliwość wykorzystania syntetycznych makrocyclicznych związków jako odpowiedników ważnych biologicznie układów, wpłynęła na szeroki rozwój badań obejmujących syntezę nowych układów pierścieniowych z bocznymi ramionami, badanie właściwości i funkcji kompleksów makrocyclicznych ligandów, a także ich zastosowanie w przemyśle, medycynie i innych obszarach.

Z kinetycznego punktu widzenia ligandy makrocycliczne reprezentują interesującą grupę. W porównaniu do liniowych wielodonorowych ligandów, charakteryzują się, w szczególności te podstawione, mniejszą labilnością i skłonnością do fałdowania.¹ Zatem można by przypuszczać, że proces koordynacji metali w przypadku ligandów cyklicznych jest znacznie bardziej złożony i niekoniecznie kontrolowany przez metal, jak ma to miejsce w przypadku mechanizmu Eigen-Wilkins'a. Zawada przestrzenna w układach cyklicznych może prowadzić do zmiany czynnika kierującego szybkością reakcji – z metalu na ligand.

Właściwości i struktura kompleksów ligandów makrocyclicznych zależą od wielkości pierścienia, liczby i rodzaju atomów donorowych, a także rozmiaru i ilości pierścieni chelatujących, powstających na skutek koordynowania. Pierścień złożony z czternastu elementów z czterema atomami donorowymi X (**1**), charakteryzuje się wnęką wystarczającą do przyjmowania płaskiej koordynacji X_4 . Szczególnie N_4 -donorowy makrocycliczny cyklam

(1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan), 2, stanowi przedmiot szeregu badań dotyczących struktury kompleksów z metalami przejściowymi 3d (nikiel, kobalt, miedź).



Ligand 3² to z kolei pochodna cyklamu, zawierająca różną ilość podstawników metylowych przy N-donorowych atomach lub przy atomach węgla w pierścieniu.

Podstawy teoretyczne

Kinetykę powstawania kompleksów z ligandami jednokleszczowymi można opisać w oparciu o mechanizm Eigen-Wilkins'a. Nasuwa się jednak pytanie, czy wspomniany mechanizm odnosi się również do wielokleszczowych otwartołańcuchowych i cyklicznych chelatowych ligandów.

Mechanizm Eigen-Wilkins'a³ opisuje sekwencja reakcji 1, gdzie M to jon metalu, S-rozpuszczalnik, L-jednokleszczowy ligand (w nadmiarze):

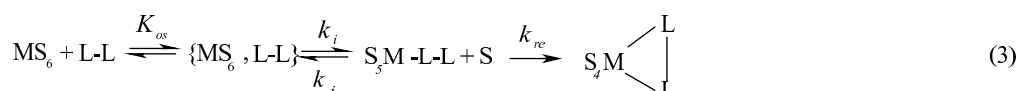


Stała trwałości K_{os} określa szybkość osiągania stanu równowagi przez solwatowane jony metali MS_x i ligand L z utworzeniem kompleksu $\{MS_x, L\}$. Ligand L, związany zewnętrznie w kompleksie $\{MS_x, L\}$, na skutek wewnętrznej przemiany, polegającej na zamianie liganda z cząsteczką rozpuszczalnika, przyjmuje korodynację wewnętrzną. Szybkość tego procesu opisuje stała pierwszego rzędu k_i , decydująca o szybkości procesu tworzenia kompleksu. Wielkość k_i powinna być w obszarze wielkości k_{ex} dopóki mechanizm wymiany rozpuszczalnika kontrolowany jest przez dysocjację (typ I_d). Stała szybkości k_{ex} określa wymianę rozpuszczalnika na solwatowany kation metalu MS_x zgodnie z reakcją 2:



Znając wartość k_{ex} dla danego jonu metalu i rozpuszczalnika, można zmierzyć stałą k_i . Z kolei wielkość K_{os} określa się w oparciu o ładunki metalu i liganda, Zatem znana wartość k_{ex} i obliczona K_{os} ⁴ pozwalają przewidzieć szybkość tworzenia kompleksu w przypadku jonów metali, gdzie wymiana z rozpuszczalnikiem kontrolowana jest zgodnie z równaniem 2.

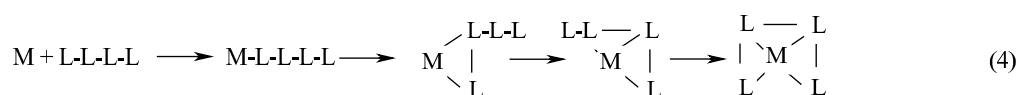
W przypadku oktaedrycznie solwatowanych jonów metali, przejście od jednokleszczowego do dwukleszczowego liganda L-L prowadzi do kolejnego etapu – cyklizacji pierścienia (reakcja 3):



Stosunek stałych szybkości k_{re}/k_{-i} decyduje o kinetyce, i tak: dla $k_{re} \gg k_{-i}$ etap powstawania S_5M-L-L , a w sytuacji odwrotnej, $k_{re} \ll k_{-i}$, cyklizacja pierścienia.

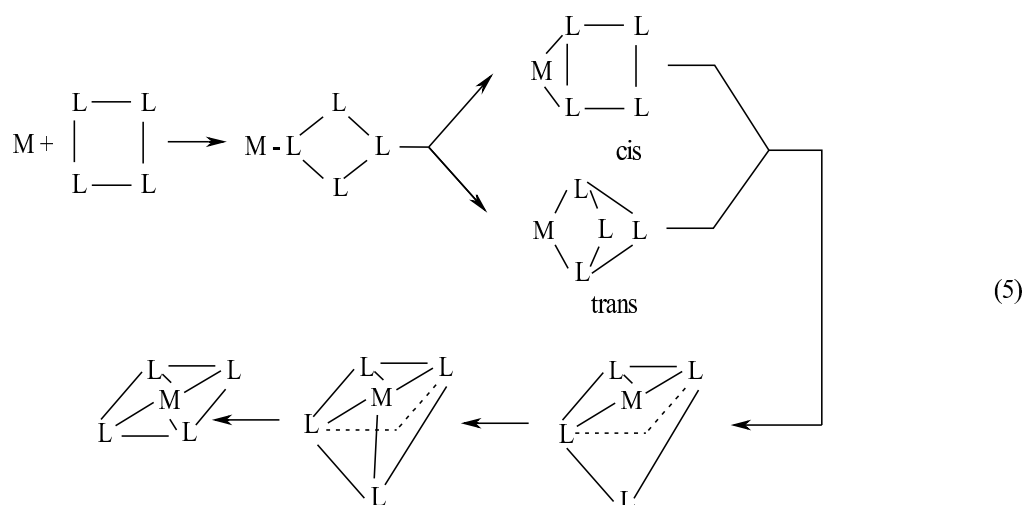
Na przykładzie powstawania kompleksów z Ni(II), Co(II) i Cu(II) z dwukleszczowymi ligandami L-L', jak α - czy β -aminokwasy, stwierdzono, że przesunięcie etapu kontrolującego szybkość procesu od powstawania pierwszego wiązania do zamknięcia pierścienia zależy od rozmiaru powstającego pierścienia i czynników sterycznych wpływających na labilność układu L-L'. W momencie, kiedy cyklizacja pierścienia decyduje o szybkości procesu, mówi się o mechanizmie sterycznie kontrolowanej substytucji (SCS, *ang. sterically controlled substitution*).

Sekwencja reakcji 4 pokazuje schematycznie, iż w przypadku liniowych czterokleszczowych ligandów L-L-L-L wielokrotność etapów wpływa na skomplikowanie procesu i utrudnia określenie etapu decydującego o szybkości procesu, a także zrozumienie mechanizmu.



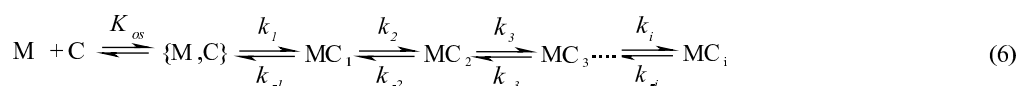
Zasadniczo tworzenie pierwszego wiązania M-L mogłoby nadal decydować o szybkości procesu (wymiana rozpuszczalnika na metal zgodnie z mechanizmem Eigen-Wilkins'a). Jednakże istnieje duże prawdopodobieństwo, że to kolejny etap determinuje szybkość całego procesu (mechanizm SCS).

Cykliczne odpowiedniki czterokleszczowych ligandów liniowych charakteryzuje brak końca i bliskość czterech atomów donorowych. Powstawanie drugiego wiązania (reakcja 5) zachodzi z udziałem atomu donorowego w pozycji *cis* lub *trans*.



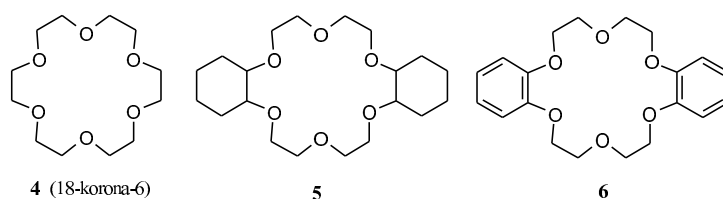
Wraz z tworzeniem drugiego wiązania, trzeci i czwarty atom donorowy zbliżają się do metalu, stąd ich koordynacja zdecydowanie dominuje nad tworzeniem tego wiązania.

Etery koronowe, podobnie jak tlenowe związki makrocykliczne i twarde ligandy, preferują kompleksowanie jonów metali alkalicznych i ziem alkalicznych. W przypadku tego typu układów mechanizm powstawania kompleksów⁵ jest znacznie bardziej złożony niż w założeniach Eigen-Wilkins'a. Poza tworzeniem zewnętrznego kompleksu i pierwszego wiązania metal-ligand, należy dodatkowo uwzględnić jedną lub więcej cyklizacji wraz z towarzyszącymi im zmianami w konformacji liganda. Rozszerzeniem mechanizmu Eigen-Wilkins'a jest wersja pozbawiona mechanicznej dysocjacji tworzenia kompleksu z udziałem biologicznych i syntetycznych eterów koronowych. Zgodnie z takim mechanizmem (reakcja 6), po etapie powstawania zewnętrznego kompleksu {M,C} kontrolowanego dyfuzyjnie, następuje koordynacja atomów donorowych C w eterze koronowym do momentu jej wysycenia, czyli powstania Mc_i .



W każdym etapie sukcesywnie odchodzą cząsteczki rozpuszczalnika, a powstają kolejne wiązania M-C, zatem równowaga między solwatacją a energią wiązania liganda jest zawsze pomijana.

Podobnie jak w mechanizmie Eigen-Wilkins'a musi być spełniony warunek $k_1(\equiv k_i) \approx k_{ex}$. Można to interpretować, iż w przypadku bardzo labilnego eteru koronowego C, tworzącego trwałe kompleksy MC_i, obserwuje się tylko jeden etap reakcji, gdyż $k_1 \approx k_2 \approx k_3 \approx k_i$, a całkowita stała szybkości powstawania kompleksu k_f jest zbliżona do k_{ex} . Z drugiej jednak strony większa sztywność liganda mogłaby prowadzić do zwolnienia kolejnych etapów, a tym samym możliwości ich obserwowania. Potwierdzeniem takich przypuszczeń są badania przeprowadzone na układach 4-6 z kationami sodowymi w *N,N*-dimetyloformamidzie⁶.



Na skutek wprowadzenia pierścienia cykloheksanowego (5) czy benzenowego (6) labilność układów spada i obserwuje się dwa etapy formowania kompleksu – pierwszą wahającą się w przedziale od 4 do $6 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ dla wszystkich trzech ligandów i drugą o wartościach kolejno $3,5 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ (4), $2 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ (5) i poniżej $1 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ (6) w 313 K. Z tego wynika, że po pierwszorzędowym tworzeniu wiązania następują kolejne wolniejsze etapy, zależne od dynamiki zmian konformacyjnych w ligandzie.

Kinetyka powstawania kompleksów w przypadku N₄-donorowych układów makrocyklicznych w roztworach wodnych

14-stopierścieniowy ligand makrocykliczny, cyklam, posiada wnękę idealną dla koordynowania kationów metali przejściowych 3d zgodnie z reakcją 7:



Stałe tworzenia kompleksów $K = k_f/k_d$ dla $[\text{Ni}(\text{cyklam})]^{2+}$ ($\log K = 20,1$) i $[\text{Cu}(\text{cyklam})]^{2+}$ ($\log K = 26,5$) są wysokie⁷ ze względu na niską wartość stałych dysocjacji k_d . Oznacza to, iż nawet

w warunkach stosunku 1:1, powstawanie kompleksu z metalami Cu i Ni zachodzi całkowicie, a reakcję przeciwną można zaniedbać.

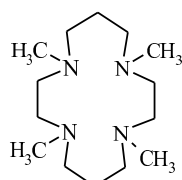
W odróżnieniu od siarkowych czy tlenowych związków makrocyklicznych, cykliczne poliaminy są znacznie bardziej zasadowe i podatne na protonowanie. Cyklam dopiero przy pH powyżej 12 staje się obojętnym nieprotonowanym ligandem. W takich warunkach dochodzi do wytrącania wodorotlenków metali lub tworzenia kompleksów z grupami hydroksylowymi. Zatem stała równowagi protonowania i deprotonowania wpływa zasadniczo na powstawanie kompleksów ligandów typu N_4 z uwodnionymi kationami metali przejściowych przy niskiej wartości odczynu pH.

Cztery atomy azotu w N_4 -ligandach typu cyklam to centra prochiralne. Pod wpływem kompleksowania metali przechodzą w centra chiralności, co zgodnie z Bonisch'em i współpracownikami⁸, prowadzi do stereoizomerów *trans*-I (RSRS) i *trans*-V (RRRR). W cieple stałym większość kompleksów cyklamu preferuje układ *trans*-III, podczas gdy w przypadku monopodstawionych pochodnych dominuje forma *trans*-I. Całkowity proces tworzenia kompleksu z ligandami typu N_4 silnie zależy od czynników stereochemicznych.

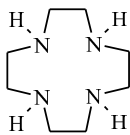
Wpływ pH na kinetykę tworzenia kompleksów w przypadku wodnych roztworów jest znaczący. Przedstawione dotychczas dane kinetyczne z badań w środowisku wodnym są zatem źródłem dodatkowych informacji, ale nie wnoszą nic w kwestii zasadniczej, tj. mechanizmu powstawania kompleksu kontrolowanego przez metal lub ligand.

W roku 1970 Kaden⁹ jako pierwszy podjął się badania kinetyki powstawania kompleksów z udziałem N_4 -donorowych związków makrocyklicznych w środowisku wodnym. Dokonał porównania układów Ni^{2+} /cyklam i Ni^{2+} /trien (trietylenotetraamina) i stwierdził, że uwodniony kation niklu reaguje 3×10^4 razy szybciej z otwartołańcuchową N_4 -donorową aminą, niż z cyklicznym cyklamem. Ponadto uznał, iż w reakcji z bardziej sztywną cykliczną cząsteczką o szybkości procesu decyduje powstawanie drugiego wiązania Ni-N. W dalszych badaniach okazało się, że szybkość tworzenia kompleksów tetrametylocyklamu 7 (TMC) z dwuwartościowymi kationami metali przejściowych zachodzi w następującej kolejności: $Cu^{2+} > Zn^{2+} > Co^{2+} > Ni^{2+}$ ¹⁰.

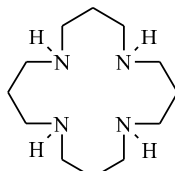
Stała powstawania kompleksu jest średnio 10^{-3} - 10^{-4} wolniejsza od stałej wymiany cząsteczek wody, co miało miejsce w przypadku zmian konformacyjnych liganda TMC. Analogiczne wyniki otrzymano z badań nad wpływem rozmiaru pierścienia, prowadzonych na ligandach od 12sto- (8) do 16stoatomowych (9)¹¹. Z kolei N- lub/i C-metylowanie 13stoatomowego makrocykla (10) powoduje spadek szybkości kompleksowania jonów niklu i miedzi¹². Istotnym jest zarówno liczba, jak i miejsce podstawienia grupy metylowej.



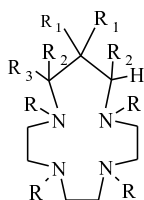
7 (TMC)



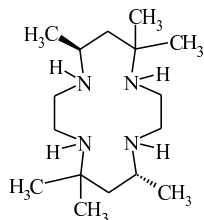
8



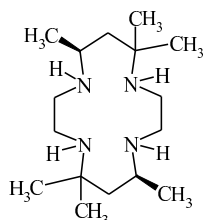
9



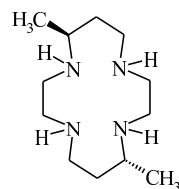
10



11a (tet a)



11b (tet b)



12 (5,12-DMC)

Wśród serii metylowanych ligandów, pochodna 10 ($R=CH_3$, $R^1=R^2=R^3=H$) charakteryzuje się najniższą stałą szybkości tworzenia kompleksów. W przypadku badań kinetycznych nad 14-stoatomowymi ligandami typu N_4 , gdzie wprowadzono fragment pirydynowy¹³, okazało się, że szybkość kompleksowania spada na skutek podstawienia ze względu na wzrost sztywności cząsteczki wywołany wprowadzeniem pierścienia pirydynowego.

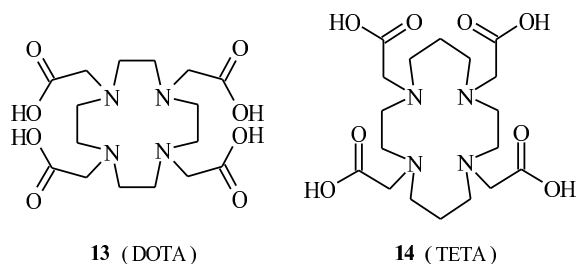
Z punktu widzenia zachodzących zjawisk i procesów interesujące wydają się uzyskane przez Wu i Kaden'a¹⁴ wyniki badań nad częściowo skompleksowanymi przez monoprotonowany cyklam uwodnionymi metalami NiX^z i CuX^z ($z = +2, +1, 0, -1$). W przypadku NiX^z , gdzie kolejno $z = +2$ (woda), $+1$ (octan), 0 (szczawian), -1 (ester kwasu trikarbalilowego), szybkość wzrasta o czynnik 10, a o szybkości procesu decyduje powstawanie pierwszego wiązania Ni-N.

Kinetyką powstawania kompleksów tworzonych przez nieprotonowane makrocycyle typu N_4 z miedzią w silnie zasadowym środowisku wodnym była przedmiotem badań Margerum'a i współpracowników¹⁵. Przy zachowaniu takich warunków miedź występuje jako $Cu(OH)_3^-$, $Cu(OH)_4^{2-}$, przy czym $Cu(OH)_3^-$ charakteryzuje się większą reaktywnością. W przeciwieństwie do układu badanego przez Kaden'a, Ni^{2+} /cyklam i Ni^{2+} /trien, spadek szybkości procesu na skutek cyklizacji jest znacznie mniejszy dla reakcji $Cu(OH)_3^-$ z cyklamem i 2,3,2-tet (1,4,8,11-tetraazaundekana). Z kolei $Cu(OH)_4^{2-}$ reaguje 10^2 wolniej z

formą cykliczną poliaminy. Porównując ligandy 2,3,2-tet, Et₂-2,3,2-tet (1,1-dietyl-1,4,8,11-tetraazaundekan), cyklam, (5,12-DMC), widać wyraźnie wpływ nie tylko cyklizacji, ale również alkilowania, które działa hamująco na proces kompleksowania Cu(OH)₃⁻ i Cu(OH)₄²⁻. Podobne rezultaty uzyskano w badaniach kompleksowania Cu(OH)₃⁻ i Cu(OH)₄²⁻ przez 11b (tet b)¹⁶.

Ciekawym obiektem badań kinetycznych są również makrocykle typu N₄, posiadające boczne ramiona, np. grupę karboksylową. W przypadku tego typu układów kompleksowanie różni się od dotychczas omawianych struktur, gdyż wiązaniu do bocznego ramienia towarzyszy koordynowanie metalu.

Ligandy makrocykliczne z bocznymi ramionami charakteryzuje połączenie cech sztywniejszej struktury cyklicznej z labilną strukturą układów otwartołącuchowych. Ligandy 13 i 14 to przykłady N-podstawionych makrocykli z bocznymi grupami octanowymi.



Kasprzyk i Wilkins¹⁷ zajmowali się badaniem kinetyki powstawania kompleksów 13 i 14 z serią uwodnionych kationów dwuwartościowych. Okazało się, że ligand w postaci HL³⁺ jest zdecydowanie bardziej reaktywny niż taki bez podstawników. Obecność podstawnika octanowego wzmacnia szybkość kompleksowania, gdyż powstający produkt pośredni powoduje zbliżenie metalu do pierścienia makrocyklicznego. Dalsze badania potwierdziły występowanie innego typu mechanizmu, kierującego powstawaniem kompleksów w podstawionych makrocyklach. Jon metalu jest początkowo przechwytywany przez jedną z grup octanowych, co sprzyja szybkiemu tworzeniu protonowanego produktu pośredniego. Deprotonowanie pośrednich kompleksów decyduje o szybkości powstawania produktu końcowego¹⁸.

Podobnie boczne grupy hydroksylowe mają istotny wpływ na szybkość wnikania metalu do wnęki makrocyklicznej¹⁹. Także w przypadku takich bocznych ramion w pierwszej kolejności tworzy się addukt poprzez oddziaływanie grup hydroksylowych z donorowymi atomami azotu. Niemniej jednak przyspieszenie procesu powstawania kompleksu następuje

wyłącznie w sytuacji, kiedy makrocykl podstawiony jest przez minimum dwie grupy hydroksylowe.

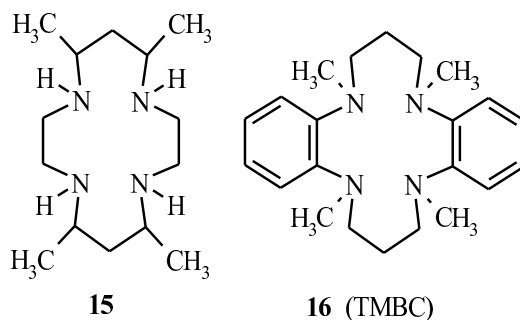
Kinetyka powstawania kompleksów w przypadku N₄-donorowych układów makrocyklicznych w środowisku organicznym

Mechanizm Eigen-Wilkins'a sprawdza się w przypadku powstawania $\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_5\text{X}^+$ w wyniku reakcji $\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ z uwodnionymi jonami X^- , natomiast zawodzi w przypadku otrzymywania $\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_5\text{X}^+$ z $\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4^{2+}$ i jonów X^- , gdyż nie istnieją dane opisujące labilność jonów hydroksylowych w grupie $\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4^{2+}$. Ponadto szybkość reagowania jonów $\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ z HX z utworzeniem $\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_5\text{X}^+$ może być brana pod uwagę tylko wtedy, jeśli znane jest pK HX a reakcję miedzi z HX można wykluczyć. Innymi słowy mechanizm Eigen-Wilkins'a będzie stosował się tylko do takich makrocyklicznych ligandów L, które są solwatowane i nieprotonowane, a reagują z solwatowanymi nieskompleksowanymi jonami metali.

Badanie procesu powstawania kompleksów w roztworach wodnych utrudnia protonowanie ligandów w niskim pH. Charakterystyka procesów kinetycznych powstawania kompleksu ML poprzez produkt pośredni $\text{M}(\text{LH})_x$ jest niezwykle trudna.

Wspomniane ograniczenia skłoniły do zastosowania zamiast wody dipolowych aprotowych rozpuszczalników S. Rozpuszczalniki powinny charakteryzować się zdolnością do wydajnego rozpuszczania i dysocjowania soli metali, zatem dla układów z kationami metali przejściowych acetonitryl czy dimetyloforamid (DMF) powinny stanowić właściwe środowisko dla procesu kompleksowania.

Jako pierwsi badaniem kinetyki wnikania metali do ligandów makrocyklicznych typu N₄ w dipolowych aprotowych rozpuszczalnikach zajęli się Hay i Norman²⁰. Badali reakcję pomiędzy niklem (II) a 2 (cyklam), C-metylowanymi pochodnymi – 12 (5,12-DMC), 15, 11a (tet-a) i 11b (tet-b) w acetonitrylu.



We wszystkich badanych przypadkach etap inkorporacji jest bardzo szybki (zarówno niklu, jak i liganda zgodnie z kinetyką pierwszego rzędu), a poprzedza go jeden lub kilka wolniejszych etapów izomeryzacji. Z kolei drugorzędowa stała szybkości inkorporowania niklu jest mniej więcej jednakowa w przypadku wszystkich badanych ligandów łącznie z otwartołańcuchowymi tetraaminami²¹.

Badaniem kompleksów niklu (II) z cyklamem (2) i TMC (7) w dimetylosulfotlenku (DMSO) i DMF zajmowali się Hertli i Kaden. W przypadku obu rozpuszczalników i ligandów, etap inicjujący reakcję jest drugorzędowy, dające typowe widma elektronowe dla niklu w płasko-kwadratowej sferze koordynacyjnej N₄. Drugorzędowe stałe szybkości reakcji kompleksowania dla związku TMC są 300 (w DMSO) lub 23krotnie (w DMF) niższe niż dla cyklamenu. Zgodnie z reakcją 8 w przypadku reakcji niklu (II) z L-cyklamem w DMF lub DMSO występował późniejszy etap pierwszorzędowy.



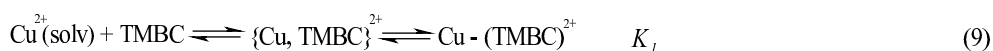
Etap pośredni związany jest z przegrupowaniem koordynowanego liganda w formę pośrednią (NiL²⁺)_{nt}, a ostatecznie powstaje najbardziej stabilny termodynamicznie stereoizomer NiL²⁺.

W przypadku układów Ni²⁺/cyklam/DMF drugorzędowa stała szybkości dla etapu wnikania metalu wynosiła 1,8x10³ M⁻¹s⁻¹. Przy zastosowaniu DMSO lub DMF o szybkości procesu decyduje podstawianie cząsteczek rozpuszczalnika. Stopniowy spadek szybkości w przypadku N-metylowanego liganda TMC to wynik efektów sterycznych.

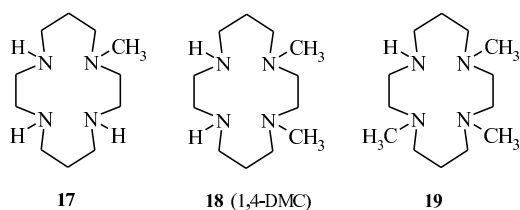
Elias z współpracownikami²² badali kinetykę powstawania kompleksów miedzi (II) z wysokopodstawionymi makrocyclami typu N₄, jak TMBC (16). Model kinetyczny pokrywał się z układem Ni²⁺/cyklam/DMF, tj. szybkie tworzenie produktu pośredniego zgodnie z kinetyką drugiego rzędu i wolne pierwszorzędowe przegrupowanie zgodnie z reakcją 8. W porównaniu do szybkiej wymiany rozpuszczalnika w Cu(DMF)₆²⁺, wielkość drugorzędowej stałej szybkości reakcji miedzi (II) z TMBC jest zbyt niska, aby dowieść obecności mechanizmu Eigen-Wilkins'a. Zatem zaproponowano (zgodnie z reakcjami 9-12) szybkie powstawanie pierwszego wiązania, na granicy wykrywalności.

Wolna szybkość inkorporowania miedzi do wnętrza TMBC to według Elias'a i współpracowników efekt powstawania drugiego wiązania zgodnie z reakcją 11, które ma miejsce wyłącznie wtedy, kiedy pojedynczo związany makrocycl typu N₄ w układzie Cu-(TMBC)²⁺ jest w najbardziej korzystnej konformacji względem miedzi, co umożliwia

zamknięcie pierścienia, a w konsekwencji pełną koordynację N₄. Produkt pośredni Cu(TMBC)²⁺(int) izomeryzuje zgodnie z reakcją 12 celem zoptymalizowania stechiometrii. Według reakcji osiągania stanu równowagi (10), interpretacja zjawisk i procesów odnosi się do dynamiki zmian konformacyjnych w częściowo koordynowanych ligandzie makrocyklicznym decydujących o szybkości procesu. Eksperymentalnie otrzymana drugorzędowa stała szybkości wynosi $k = 39 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, co odpowiada $k = K_I * K_{con} * k_{ex}$. Mała wartość k względem k_{ex} dla solwatowanej miedzi Cu(DMF)₆²⁺ to wynik niskich wartości K_{con} i prawdopodobnie K_I .



Roper i Elias²³ zajmowali się badaniem kinetyki powstawania kompleksów między niklem i miedzią a serią ligandów L o wzrastającym stopniu N-metylowania: 2 (cyklam), 17, 18 (1,4-DMC), 19, 7 (TMC) w DMF.

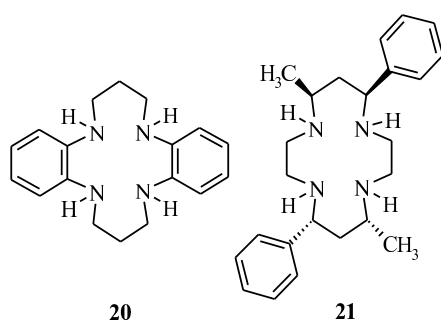


Nawet w zmniejszonej temperaturze 218K, początkowa reakcja drugorzędowa miedzi z ligandami 2, 17, 18 i 19 była zbyt szybka, żeby można ją było obserwować techniką *stopped-flow*. Wyjątek stanowi całkowicie podstawiony TMC (7), dla którego kompleksowanie można już obserwować w temperaturach 215-230K. Z kolei drugorzędowe stałe szybkości dla reakcji z niklem mają się do siebie jak:

$$k(2):k(17):k(18):k(19):k(7) = 130:38:21:9:1.$$

Spadek szybkości wraz ze wzrostem grup metylowych to wynik stopniowej redukcji labilności liganda L. Z kolei szybkość powstawania formy przejściowej (zgodnie z reakcją 8) jest znacznie mniej zależna od ilości grup metylowych.

Roper i Elias²⁴ zajmowali się wpływem podstawników przy atomach węgla w cyklu na kinetykę powstawania kompleksów ligandów 11a, 11b, 12, 16, 20 i 21 z niklem i miedzią w DMF.



Podobnie jak poprzednio, tak i w tym przypadku, kompleksy powstają zgodnie ze schematem reakcji 8. Jednak w porównaniu do N-metylowania, w przypadku C-metylowania wpływ na drugorzędową stałą szybkości k jest mniej wyraźny. Dla kompleksów z niklem, wartości z 11a/b (sześć grup metylowych), 12 (dwie grupy metylowe) i 21 (dwie grupy metylowe i dwie fenylowe) są tego samego rzędu, a w przypadku kompleksów z miedzią podobne. Zatem grupy metylowe czy fenylowe w łańcuchu propylenowym cyklu mają jedynie nieznaczny wpływ na szybkość inkorporowania metalu. Jednakże wprowadzenie układów pierścieniowych jak w przypadku liganda 20 (dibenzocyklam) ma widoczniejszy efekt redukujący na szybkość procesu, a połączenie N-metylowania z obecnością pierścieni w 16 (TMBC) prowadzi do spadku szybkości o rząd 10^4 (nikiel) i 10^6 (miedź).

Kinetykę powstawania kompleksów z udziałem ligandów makrocyclicznych typu N_4 z jonami metali przejściowych w dipolowych aprotonowych rozpuszczalnikach podsumowuje reakcja 13:



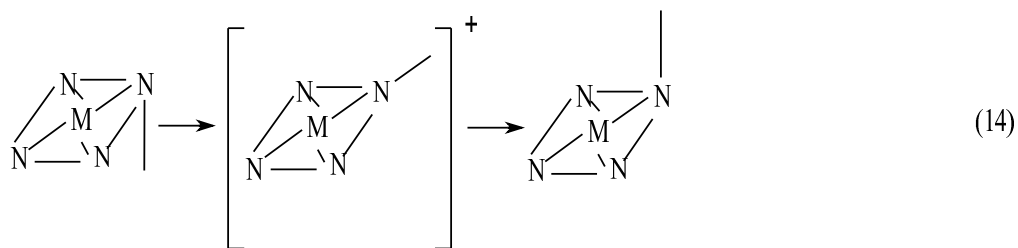
Całkowity proces kompleksowania składa się z dwóch etapów. Początkowy etap, powiązany z indywidualnymi zmianami spektralnymi, jest szybki i drugorzędowy. Drugi etap, powiązany ze znaczącymi zmianami spektralnymi, jest wolniejszy i pierwszorzędowy. Dane

z otrzymanych wartości drugorzędowych stałych szybkości k w przypadku N- i C-podstawionych pochodnych cyklaminy sugeruje, że powstawanie drugiego wiązania M-N decyduje o szybkości pierwszego etapu (wyjątek to niepodstawiony ligand, cyklamin, gdzie o szybkości decyduje powstawanie pierwszego wiązania M-N). Widma absorpcyjne produktów pośrednich potwierdzają płaską koordynację metalu. Oznacza to, że powstawanie kolejnych wiązań zachodzi znacznie szybciej w porównaniu do drugiego wiązania M-N.

Cztery atomy azotu w ligandach typu N_4 na skutek koordynowania stają się chiralne. Przy szybkim koordynowaniu trzeciego i czwartego atomu azotu ligand nie ma wystarczającej ilości czasu, aby przyjąć metal w najbardziej korzystnej stereochemicznie konfiguracji. Zatem pierwszorzędowa stała szybkości k_{int} charakteryzuje stereochemiczną przemianę produktu pośredniego $(ML^{2+})_{int}$, prowadzącą do termodynamicznie stabilniejszego stereoizomeru – ML^{2+} - jednocześnie produktu końcowego.

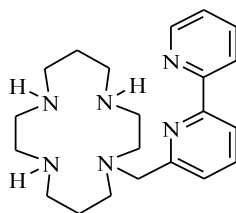
Bardziej szczegółowy opis przegrupowania można uzyskać śledząc reakcję $(Ni(TMC)^{2+})_{int} \rightarrow Ni(TMC)^{2+}$ za pomocą 1H -NMR w $DMF-d_7$ ²⁵. Potwierdza się, iż ten etap odpowiada stereochemicznej izomeryzacji *trans*-II(RSRR) $\rightarrow$ *trans*-I(RSRS). Udział rozpuszczalnika S prowadzi do paramagnetycznego przesunięcia w widmie NMR.

Przegrupowanie produktu pośredniego $(Ni(TMC)^{2+})_{int}$, zgodnie z reakcją 14, to jedyne dobrze opisane stereochemicznie. Można przypuszczać, że pierwszorzędowe przegrupowanie wszystkich badanych produktów pośrednich zgadza się z inwersją konfiguracji jednego z chiralnych atomów azotu (reakcja 15).



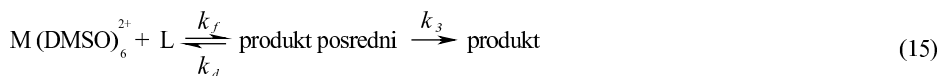
Niska wartość szybkości reorganizacji to skutek wysokiej bariery energetycznej stanów przejściowych dla takiego typu procesu inwersji.

Analiza powstawania kompleksów liganda 22 z dwuwartościowymi jonami metali M^{2+} ($M = Zn, Ni, Co, Cu$) w DMSO to przykład badania wpływu wprowadzenia grupy funkcyjnej do makrocukła na mechanizm wnikania metalu²⁶.



22

Podobnie jak w środowisku wodnym, to boczna grupa donorowa inicjuje proces kompleksowania przez wyłapywanie metalu. Całkowity proces (reakcja 15) składa się z dwóch etapów.



Szybki początkowy proces jest drugorzędowy i odwracalny, a ostatecznie prowadzi do produktu pośredniego wiążącego metal do grupy bipyrydylowej. Wolniejszy drugi etap odbywa się zgodnie z kinetyką pierwszego rzędu praktycznie bez możliwości reakcji odwrotnej, a towarzyszy mu chelatowanie pierścienia makrocyclicznego.

W dotychczasowo opisanych badaniach, celem zaoszczędzenia materiału, w syntezach stosowano stechiometryczne ilości. W momencie wprowadzenia warunków pseudopierwszorzędowych zastosowano nadmiar metalu w stosunku do liganda. W międzyczasie techniki syntetyczne uległy ulepszeniu i metody do monitorowania reakcji w *UV-VIS* stały się znacznie bardziej wyszukane. Dopiero odejście od konwencjonalnej techniki *stopped-flow* i przejście do zaawansowanej wersji *rapid scan* umożliwiło uzyskanie widma z interwałami rzędu milisekund. Analiza serii takich widm daje dokładniejsze wartości stałych szybkości, jak również umożliwia charakterystykę spektroskopową produktów pośrednich.

W ostatnim czasie dzięki zastosowaniu wydajniejszych technik okazało się, że kinetyka całkowitego procesu kompleksowania metali jest znacznie bardziej skomplikowana niż dotychczas przypuszczano. Z tego względu dwustopniowa sekwencja reakcji 13 wymaga rozbudowania. Nowe wyniki umożliwiają i wymagają szczegółowego opisu inicjującego szybkiego etapu wnikania metalu, jak również późniejszego wolniejszego etapu przegrupowania.

Z analizy wielofalowej reakcji L – cyklam 2 z nadmiarem niklu (II) w DMF wynika, że eksperymentalna stała szybkości początkowego szybkiego etapu reakcji k_{obs1} nie zależy jedynie liniowo od stężenia $[Ni^{2+}]$ zgodnie z $k_{obs1} = k^*[Ni^{2+}]$, natomiast przedstawia się następująco²⁷:

$$k_{obs1} = ab [Ni^{2+}]/(1 + b [Ni^{2+}]) \quad (16)$$

Tego rodzaju zależność sugeruje obecność szybkiego osiągnięcia stanu równowagi, poprzedzającego powstawanie produktu pośredniego $(ML)_{int}$ (reakcja 17b), zgodnie z reakcją 17a ($M = Ni^{2+}$).



Parametry a i b odpowiadają kolejno $a \equiv k_I = 27 \pm 1 \text{ s}^{-1}$ i $b \equiv K = 210 \pm 20 \text{ M}^{-1}$ w temperaturze 298K. Przypuszczalnie produkt pośredni, $\{ML\}$, to prekursor kompleksu z pojedynczo związanym, M-L, cyklamem, przyjmującego formę podwójnie związaną, M=L, w reakcji biegnącej z kinetyką pierwszego rzędu k_I . Konwersja M=L do całkowicie koordynowanego produktu pośredniego $\{ML\}_{int}$ to szybki proces, nie wykrywalny techniką *stopped-flow* w temperaturze pokojowej.

W przypadku kompleksów liganda 11a z nadmiarem niklu w DMF, schemat kinetyczny pokrywa się z opisanym powyżej dla cyklam. Szybki proces powstawania produktu pośredniego charakteryzuje się stałymi szybkości k_{obs1} , k_{obs2} i k_{obs3} . Zależność stałej k_{obs1} pokrywa się z przypadkiem liganda 2, natomiast dwie pozostałe stałe szybkości są niezależne od stężenia jonów niklu.



Produkt pośredni $\{ML\}_{int}$ powstaje w reakcji 18a i szybko przechodzi poprzez A w produkt, B, który ostatecznie wolno izomeryzuje ze stałą szybkości $k_{int3} = 0,30 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Wielkość stałej równowagi $K = 8,9 \pm 1,7 \text{ M}^{-1}$ sugeruje pojedyncze związanie liganda tet-a w formie $\{ML\}$.

W porównaniu do pokrewnego liganda 2, tet-a 11a charakteryzuje się spadkiem labilności, co wpływa na złożoność kinetyki początkowego szybkiego procesu powstawania produktu pośredniego. Ponadto wartość stałej równowagi K dla tworzenia prekursora liganda z pojedynczym wiązaniem jest także niższa w stosunku do cyklamu.

W przypadku, kiedy $b^*[Ni^{2+}] \equiv K^*[Ni^{2+}] \ll 1$, zależność dla k_{obs1} przyjmuje postać, gdzie $k_1 \cdot K$ odpowiada drugorzędowej stałej szybkości k w reakcji 13.

$$k_{obs1} = ab [Ni^{2+}] = k_1 K [Ni^{2+}]$$

W przypadku obu związków (2 i 11a) o szybkości procesu powstawania produktu pośredniego decyduje wysoka wartość stałej równowagi.

W przypadku badania kinetyki powstawania kompleksu $Ni(5,12-DMC)^{2+}$, produkt pośredni również nie tworzy się w wyniku prostego procesu drugorzędowego. Szybki etap można rozbić na szybkie osiągnięcie stanu równowagi, po którym mają miejsce dwa etapy zgodnie z reakcjami 19a-c:



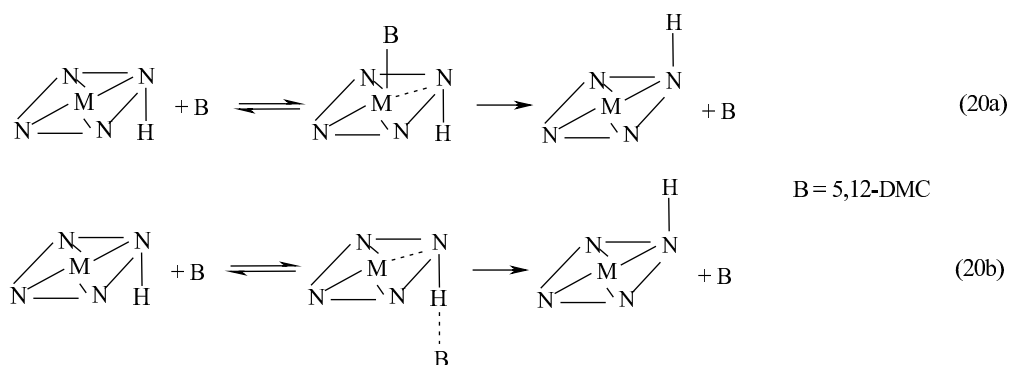
Interpretacja procesów i zjawisk jest podobna jak w przypadku reakcji 18a-c. Prekursor kompleksu $\{ML\}$ to ponownie pojedynczo związany 5,12-DMC (12). Reaguje on z szybkością k_1 do powstania całkowicie koordynowanego $\{ML\}_{int}$, który z kolei ulega przekształceniu z szybkością k_{int1} do A. Ten ostatni powoli izomeryzuje w dwóch pierwszorzędowych etapach do powstania termodynamicznie trwałego produktu $Ni(5,12-DMC)(DMF)_2^{2+}$.

W sytuacji, kiedy wykorzystuje się nadmiar liganda 12, obserwuje się trzy szybkie etapy opisane za pomocą stałych k_{obs1} , k_{obs2} i k_{obs3} . Wszystkie stałe wykazują linowy wzrost wraz ze wzrostem stężenia liganda. Przy założeniu, że wartość stałej równowagi będzie analogiczna jak w sytuacji zastosowania nadmiaru niklu, wartość stałej k_{obs1} wyniesie:

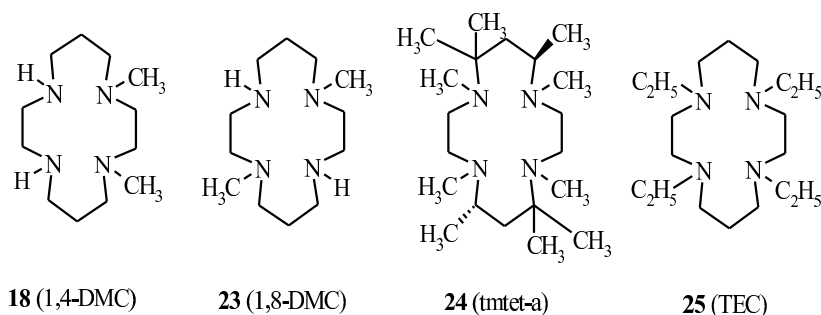
$$k_{obs1} = k_1 K [L] / (1 + K [L])$$

Zgodnie z dotychczasową interpretacją zależności liganda od stałej k_{obs1} , pierwszy etap prowadzi do powstania produktu pośredniego $\{ML\}_{int}$, który stopniowo izomeryzuje. Co ciekawe, nic takiego nie jest obserwowane. Produkt *trans*-III- Ni(5,12-DMC)(DMF) $_2^{2+}$ powstaje natomiast w dwóch szybkich etapach, a odpowiadające im stałe szybkości k_{obs2} i k_{obs3} rosną liniowo ze wzrostem stężenia liganda 12. Prawdopodobnie dwa ostatnie etapy całkowitego procesu to przegrupowanie stereochemiczne, stanowiące warunek katalizy zasadowej. Zgodnie ze schematem reakcji 20 zasada, czyli B = 5,12-DMC, ułatwia proces inwersji wiązania N-H (reakcja 20a).

Alternatywą lub uzupełnieniem może być powstawanie wiązania wodorowego między koordynowanym ligandem a „luźnym” ligandem (reakcja 20b), prowadzące do spadku bariery energetycznej dla procesu inwersji.



Celem uzyskania dalszych danych kinetycznych dotyczących wpływu specyficznego położenia i ilości grup metylowych na powstawanie kompleksu w reakcji $M + L \rightarrow ML$ z niklem i miedzią (M) w odniesieniu do macierzystego liganda 2, przebadano serię kolejnych ligandów typu N₄: 18, 23 i 24²⁸.



Ligandy 18 i 23 różnią się jedynie pozycją N-podstawionych grup metylowych (*cis* i *trans*), podczas gdy związek 24 ma aż 4 podstawniki N-metylowe i 6 C-metylowych, dlatego warto porównać go z ligandami 11a (6 C-metylowych grup) i 7 (4 N-metylowe grupy).

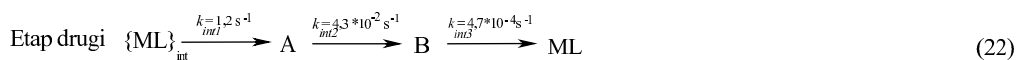
Analiza krystalograficzna kompleksów Ni(1,8-DMC)(ClO₄)₂, Ni(tmtet-a)(ClO₄)₂ i Cu(tmtet-a)(ClO₄)₂ wykazała konfigurację *trans*-III(RRSS). Natomiast kompleks Ni(1,4-DMC)(ClO₄)₂ przyjmuje konfigurację *trans*-I(RSRS), a most etylenowy w położeniu *trans* w stosunku do dwóch podstawników metylowych jest nieuporządkowany.

Z badań w warunkach stechiometrycznych wynikało, że kompleks 1,4-DMC z nikiem w DMF powstaje na drodze dwuetapowego procesu. Niemniej jednak z analizy takiego układu przy nadmiarze niklu lub liganda okazało się, że oba etapy można jeszcze rozłożyć.

Według reakcji 21 (M = Ni²⁺, L = 1,4-DMC) w pierwszym szybkim etapie rozpoczynającym się od stanu równowagi, przechodzącym przez {ML} z prawdopodobnie pojedynczo związanym ligandem, powstaje całkowicie koordynowany, ale nietrwały termodynamicznie i stereochemicznie produkt pośredni {ML}_{int}.

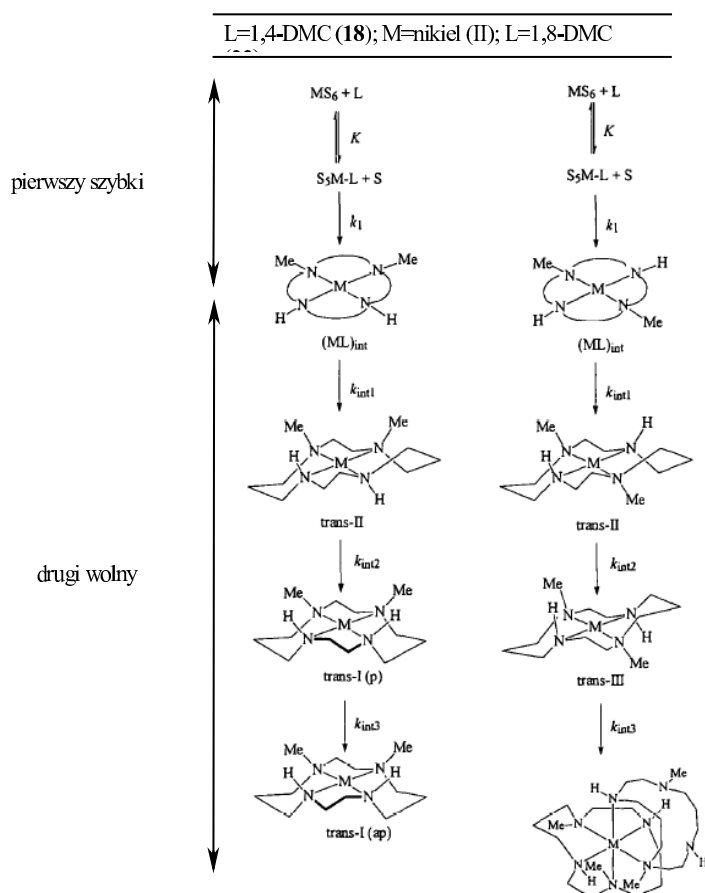


Zgodnie z reakcją 22 (A, B = produkty pośrednie) drugi wolniejszy etap zawiera w sobie kilka etapów przegrupowań stereochemicznych i prowadzi ostatecznie do stabilnego stereochemicznie produktu ML = *trans*-I-Ni(1,4-DMC)²⁺.



Stałe szybkości $k_{\text{int}1}$, $k_{\text{int}2}$ i $k_{\text{int}3}$ są niezależne od stężenia czynnika w nadmiarze.

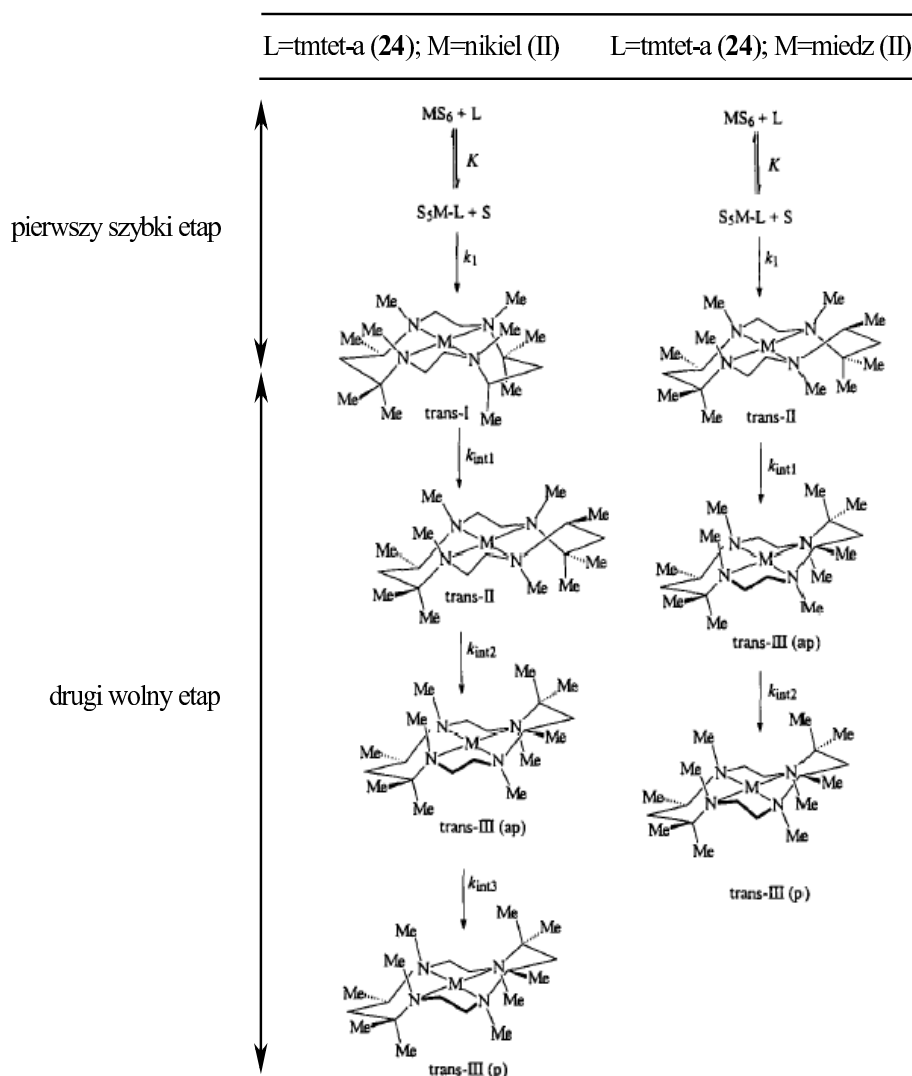
Stała równowagi $K = 4\text{ M}^{-1}$ dla powstawania {Ni(1,4-DMC)}²⁺ jest tego samego rzędu wielkości, co w przypadku układów nikiel (II)/tet-a (11a) i nikiel (II)/5,12-DMC (12). Wynika z tego, że produkt kompleksowania Ni(1,4-DMC)²⁺ ma konfigurację *trans*-I. Z punktu widzenia zachodzących procesów, przegrupowania opisane stałymi $k_{\text{int}1}$ i $k_{\text{int}2}$ odpowiadają kolejno konwersji {ML}_{int} → *trans*-II i *trans*-II → *trans*-I, (Rys. 1). Ostatniemu etapowi ($k_{\text{int}3}$) przypisuje się konwersję izomeru *trans*-I z równoległym rozmieszczeniem dwóch mostów etylenowych (*trans*-I(p)) do przeciwrównoległego, bardziej korzystnego energetycznie (*trans*-I(ap))²⁹. Prawdopodobny przebieg całej reakcji przedstawia schematycznie rysunek 1.



Schemat reakcji prawdopodobnego przebiegu powstawania kompleksu z ligandami 18 i 23 oraz niklem (II) w DMF

W przypadku reakcji liganda 1,8-DMC (23) z niklem, stała równowagi jest niższa, stąd $K^*[L]_{\max}$ i $K^*[Ni]_{\max} < 0,1$. W konsekwencji eksperymentalna stała szybkości k_{obs1} wzrasta linowo ze wzrostem stężenia czynnika występującego w nadmiarze. W sytuacji, kiedy zastosuje się nadmiar niklu, obserwuje się pierwszorzędowe przegrupowania. Odpowiadające im stałe szybkości k_{int1} i k_{int2} , niezależne od nadmiaru niklu, są zbliżone do wartości uzyskanych dla liganda 1,4-DMC (18). Przy nadmiarze liganda 1,8-DMC (23) wartości K , k_{int1} i k_{int2} są zgodne z wariantem z nadmiarem metalu. Jednakże po etapie k_{int2} ma miejsce kolejny, liniowo zależny od nadmiaru liganda i przebiegający z kinetyką drugiego rzędu (k_{int3}).

Porównując ligandy 1,4-DMC, 1,8-DMC i tmtet-a (24), ten ostatni ma najbardziej sztywną budowę. Spadek labilności cząsteczki przejawia się w wartościach stałych szybkości. Pseudo-piewszorzędowa stała szybkości $k_1 \cdot K$, jak również stałe k_{int1} i k_{int2} mają o trzy rzędy wielkości niższe wartości. Ponadto miedź reaguje znacznie szybciej niż nikiel, a różnica w wartościach szybkości jest wielkości 10^4 dla pierwszego etapu i 10^2 dla drugiego.



Rysunek 2

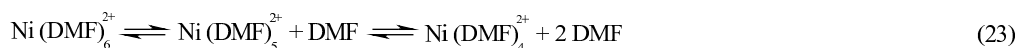
Schemat reakcji prawdopodobnego przebiegu powstawania kompleksu z ligandem 24 i niklem (II) lub miedzią (II) w DMF

Rysunek 2 przedstawia prawdopodobny przebieg reakcji między tmtet-a (24) a niklem lub miedzią. Przypisanie ligandom określonych konfiguracji w poszczególnych etapach opiera się na: znanej konfiguracji produktu ML; danych ze spektroskopii VIS; badań mechaniki cząsteczek kompleksów niklu z makrocyclami typu N_4 .

Większość z wyników przytoczonych w rozdziale 3.3.4 dotyczy badań prowadzonych w aprotonowym rozpuszczalniku DMF. Stałe szybkości dla reakcji niklu (II) z cyklamem i TMC w DMF różnią się jednak od tych prowadzonych w DMSO. Efekt rozpuszczalnikowy ma swój początek w solwataowaniu zarówno metalu, jak i liganda, jednak solwatowany kation powinien teoretycznie odgrywać bardziej znaczącą rolę. W środowisku wodnym labilność cząsteczek koordynowanej wody w kompleksach z niklem zmienia się w zależności od właściwości i składu pierwszej sfery koordynacyjnej. Zmianę wewnętrznej powłoki solwatacyjnej metalu można osiągnąć poprzez zastosowanie innego rozpuszczalnika S. Ponadto wprowadzenie anionu X^- prowadzi w przypadku niklu do powstawania NiS_5X^+ . W porównaniu do całkowicie solwatowanego kationu NiS_6^{2+} , NiS_5X^+ charakteryzuje się inną labilnością koordynowanego rozpuszczalnika, a w konsekwencji inną reaktywnością w stosunku do liganda makrocyclicznego.

Reakcja pomiędzy 5,12-DMC (12) a niklem prowadzi do powstania w pierwszym etapie produktu pośredniego $(Ni(5,12-DMC))_{int}^{2+}$. Z kolei przy nadmiarze niklu eksperymentalna stała szybkości k_{obs1} zależy od stężenia kationów niklu. Wartość k_{obs1} rośnie w środowisku DMF przy dodatku nitrometanu. W czystym DMF stała szybkości w określonych warunkach temperatury i stężenia wynosi $7,3\text{ s}^{-1}$. W takich samych warunkach następuje wzrost wartości stałej przy stopniowym dodatku nitrometanu. Przy bardzo niskim stężeniu DMF = 0,5 M stała k_{obs1} wzrasta do 165 s^{-1} . Zależność stałej od stężenia DMF przedstawia się jako $k_{obs1} \sim [DMF]^{-1}$. Analogiczny wpływ na szybkość procesu ma dodatek niekoordynującego rozpuszczalnika 1,2-dichloroetanu.

Wstępnie uzyskane wyniki wskazują na znaczącą rolę rozpuszczalnika. Niemniej jednak ujęcie kinetyczne obserwowanych efektów jest niezwykle trudne. Rozsądnym wydaje się założenie, że słabiej koordynujący rozpuszczalnik, nitrometan, częściowo wnika do obojętnej warstwy solwatacyjnej jonu niklu z utworzeniem $Ni(DMF)_5(NM)^{2+}$, $Ni(DMF)_4(NM)_2^{2+}$ i $Ni(DMF)_3(NM)_3^{2+}$. W tego typu układach labilność koordynowanych cząsteczek rozpuszczalnika jest prawdopodobnie zwiększona. W przypadku niekoordynowanego rozpuszczalnika, 1,2-dichloroetanu, częściowa dysocjacja kationu $Ni(DMF)_6^{2+}$ i zmiany liczby koordynacyjnej oraz geometrii zgodnie z równaniem 23 jest także prawdopodobna:



W porównaniu do $\text{Ni}(\text{DMF})_6^{2+}$, układy typu $\text{Ni}(\text{DMF})_5^{2+}$ i $\text{Ni}(\text{DMF})_4^{2+}$ ze zredukowaną liczbą koordynacyjną są znacznie bardziej reaktywne w odniesieniu do zdolności tworzenia kompleksów z makrocyclicznymi ligandami typu N_4 .

Reakcja powstawania kompleksu, między TMC (7) a niklem w DMF w warunkach 1:1i przy stężeniu 0,1M (NaClO_4) odpowiada schematowi 13. Po szybkim powstawaniu produktu pośredniego zgodnie z kinetyką drugiego rzędu następuje wolny etap pierwszorzędowego przegrupowania izomeru *trans*-II do izomeru *trans*-I $\text{Ni}(\text{TMC})(\text{DMF})^{2+}$ według reakcji 14.

W obecności anionów chlorkowych ($[\text{Cl}^-]/[\text{Ni}^{2+}] = 1:3:1$; $[\text{TMC}]/[\text{Ni}^{2+}] = 1:1$), szybki etap inkorporowania, opisany drugorzędową stałą szybkości k , wzrasta 117-krotnie³⁰. Co ciekawe, kolejny etap izomeryzacji, opisany pierwszorzędową stałą szybkości k_{int} , pozostaje niezmienny. Produkt pośredni to $\text{Ni}(\text{TMC})\text{Cl}_{\text{int}}^-$ (w przeciwieństwie do $\text{Ni}(\text{TMC})_{\text{int}}^{2+}$), a produkt końcowy to $\text{Ni}(\text{TMC})\text{Cl}^+$ (zamiast $\text{Ni}(\text{TMC})(\text{DMF})^{2+}$).

Ishiguro i współpracownicy³¹ określili stałe równowagi dla stopniowego powstawania nikiel-chlorokompleksów w DMF zgodnie z równowagą 24:



Przy określonych warunkach dla $\text{TMC}/\text{Ni}^{2+}/\text{Cl}^-$, monochlorowany układ $\text{Ni}(\text{DMF})\text{Cl}^+$ jest dominujący (61%).

W sytuacji, kiedy chlorek zastąpi się bromkiem-wzrost szybkości reakcji jest jedynie 4-krotny. Prawdopodobnie przyczynia się do tego niższa wartość stałej tworzenia $\text{Ni}(\text{DMF})_5\text{Br}$ w układzie nikiel/bromek/DMF. Zasadniczym wydaje się trwałość formy $\text{Ni}(\text{TMC})\text{X}^+$ (reakcja 25):



W roztworze DMF stała $K(\text{Cl})$ jest bardzo wysoka ($K(\text{Cl}) > 10^6 \text{M}^{-1}$), podczas gdy dla $K(\text{Br})$ – zdecydowanie niższa ($2,4 \cdot 10^4 \text{M}^{-1}$).

Podsumowanie

Wczesne prace nad kinetyką powstawania kompleksów z udziałem makrocycli typu N₄ (o budowie cyklamu), L, i niklu (II) lub miedzi (II) w aprotonowych środowiskach organicznych, prowadziły - zgodnie z reakcją (a) – do dwuetapowego szlaku (b).



Po wstępnym drugorzędowym etapie powstawania produktu pośredniego następuje wolny pierwszorzędowy etap tworzenia końcowego produktu.

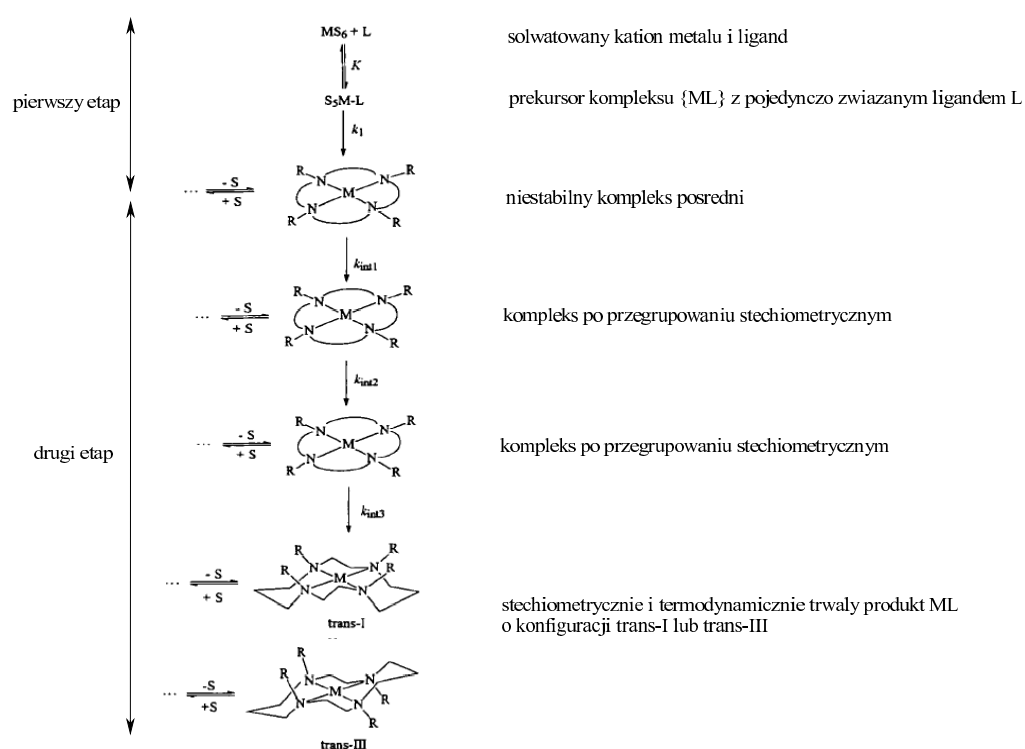


Wielkość drugorzędowej stałej szybkości k zależy istotnie od położenia, ilości i typu podstawników liganda L. W przeciwieństwie do k , wartość k_{int} znacznie mniej zależy od podstawników w pierścieniu makrocyclicznym. W kompleksie pośrednim $(ML^{2+})_{\text{int}}$ metal przyjmuje płaską koordynację.

Ze względu na proponowany mechanizm, sugerowano, iż powstawania drugiego wiązania M-N kontroluje szybkość powstawania produktu pośredniego. Kolejny pierwszorzędowy etap (k_{int}) określano jako reakcje przegrupowania stereochemicznego.

Nowsze badania wykazały, że dwuetapowy szlak reakcji (b) jest zasadniczo poprawny, ale zbyt ogólny. Zgodnie z rysunkiem 3.3.3, oba etapy wymagają rozbudowania. W pierwszym o szybkość decyduje powstawanie drugiego wiązania M-N, a poprzedza je szybki etap osiągania stanu równowagi między solwatowanym kationem metalu a prekursorem kompleksu z pojedynczo związanym ligandem. Stała równowagi K i pierwszorzędowa stała szybkości k_1 kontrolują szybkość powstawania produktu pośredniego. Pierwszy etap daje ostatecznie stereochemicznie i termodynamicznie nietrwały kompleks pośredni z płaską koordynacją liganda. Drugi etap zależy od typu i ilości podstawników w ligandzie i składa się ze szlaku maksymalnie trzech reakcji przegrupowania, w trakcie których zachodzi przegrupowanie łańcucha węglowego i inwersja wiązania M-N. Ostatecznie powstaje trwały termodynamicznie i stereochemicznie kompleks o konfiguracji *trans*-I lub *trans*-III.

Sekwencja reakcji na rysunku 3.3.3 odnosi się do kompleksów z niklem lub miedzią. Specyficzność badanych ligandów wyraża się w wartościach stałych K i k_1 (pierwszy etap), a także liczbie przegrupowań w drugim etapie.



Rysunek 3.3.3

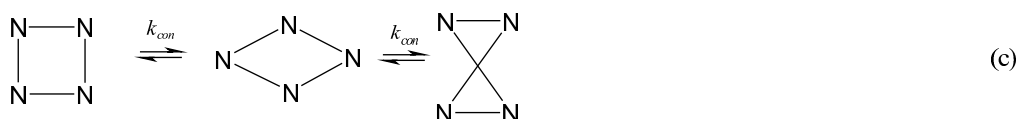
Schemat reakcji prawdopodobnego przebiegu powstawania kompleksu z ligandem L i kationem dwuwartościowego metalu w aprotonowym rozpuszczalniku S jak DMF

Według mechanizmu Eigen-Wilkins'a szybkość powstawania kompleksu łączy się z szybkością wymiany rozpuszczalnika na metal, a modyfikowana postać mechanizmu Eigen-Winkler'a zakłada szybkość zmian konformacyjnych liganda L za etap decydujący o szybkości procesu. Trudno jednoznacznie odpowiedzieć czy schemat na rysunku 3 odpowiada któremuś z mechanizmów.

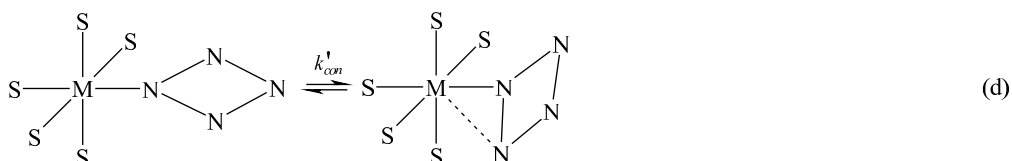
Wysoko podstawione pochodne cyklaminy, jak np. tmtet-a (24), tworzą pośrednie kompleksy z miedzią i niklem (II) przy tak niskiej wartości stałych szybkości, że idea kontroli szybkości za pomocą wymiany rozpuszczalnika na metale musi być odrzucona. Z drugiej

strony powstawanie produktu pośredniego z miedzią zachodzi szybciej niż z niklem, który charakteryzuje się mniejszą labilnością.

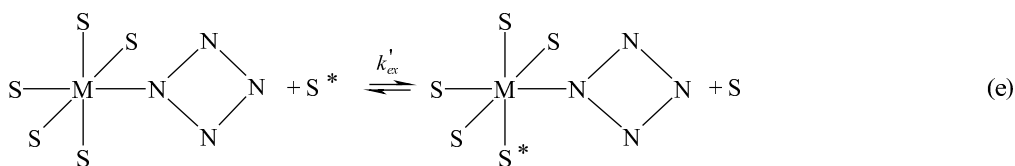
Rozważania dotyczące sztywności liganda i labilności metalu dostarczają bardzo cennych informacji. Generalnie reakcje z miedzią zachodzą szybciej niż z niklem. Reakcja (c) przedstawia szybkie zmiany konformacyjne liganda L (stała szybkości k_{con}).



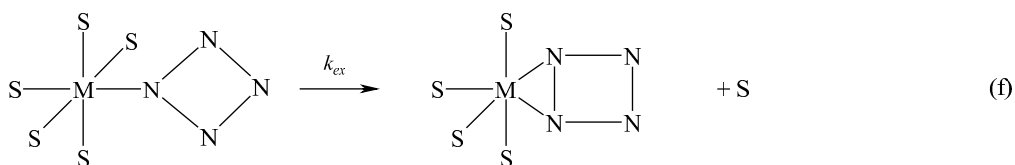
Szybkość zmian konformacyjnych spada przy pojedynczo związanym metalu w prekursorze kompleksu (reakcja d): $k_{con} > k'_{con}$.



Zgodnie ze schematem (e), szybkość wymiany rozpuszczalnika na metal w prekursorze kompleksu jest także zmienna.



Jeżeli tworzenie drugiego wiązania M-N, zgodnie z reakcją (f), decyduje o szybkości procesu powstawania produktu pośredniego, to szybkość tego etapu zależy od stałych k'_{con} i k'_{ex} .



Przedstawione badania świadczą o szczególnej naturze makrocyclicznych ligandów typu cyklam. W celu wyjaśnienia powstawania kompleksów z ich udziałem należy posłużyć się zarówno mechanizmem Eigen-Wilkins'a, jak i Eigen-Winkler'a.

Podziękowania:

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

Literatura:

1. H. Elias, *Coord. Chem. Rev.*, 187, 37 (1999)
2. (a) L. F. Lindoy, *The Chemistry of Macrocyclic Ligand Complexes*, ch. 7, Cambridge University Press, Cambridge, 1989; (b) R. G. Wilkins, *Kinetics and Mechanism of Reactions of Transition Metal Complexes*, ch. 4, 2nd edn., VCH Publishers, New York, 1991
3. (a) J. Burgess, *Ions in Solution: Basic principles of Chemical Interactions*, ch. 10, Ellis Herwood, Chichester, 1988; (b) M. Eigen, K. Tamm, *Z. Elektrochem.*, 66, 93 (1962); (c) M. Eigen, R. G. Wilkins, *Adv. Chem. Ser.*, 49, 55 (1965)
4. (a) S. F. Lincoln, A. E. Merbach, *Adv. Inorg. Chem.*, 42, 1 (1995); (b) D. H. Powell, P. Furre, P.-A. Pittet, A. E. Merbach, *J. Phys. Chem.*, 99, 16622 (1995)
5. a) M. Eigen, Winkler, in F. O. Schmitt (ed.), *The Neurosciences: Second Study Program*, p. 685, Rockefeller University Press, New York, 1975; (b) R. Winkler, *Kinetik und Mechanismus der Alkali- und Erdalkalimetalkomplexbildung in Methanol, Dissertation*, Gottingen/Wien, 1969; (c) E. Grell, T. Funck, F. Eggers, in: G. Eismen (ed.), *Membranes*, v. III, p. 1, Marcel Dekker, New York, 1975; (d) W. Burgermeister, R. Winkler-Oswatisch, *Top. Curr. Chem.*, 69, 91 (1977); (e) H. Farber, S. Petrucci, *J. Phys. Chem.*, 85, 1396 (1981); (f) C. C. Chen, S. Petrucci, *J. Phys. Chem.*, 86, 2601 (1982); (g) S. Petrucci, R. J. Adamie, E. M. Eyring, *J. Phys. Chem.*, 90, 1677 (1986); (h) F. Eggers, T. Funck, K. H. Richmann, H. Schneider, E. M. Eyring, S. Petrucci, *J. Phys. Chem.*, 91 (1987); (i) L. J. Rodriguez, E. M. Eyring, S. Petrucci, *J. Phys. Chem.*, 89, 1357 (1985); (j) W. Wallace, C. Chen, E. M. Eyring, S. Petrucci, *J. Phys. Chem.*, 89, 1357 (1985)
6. W. Wallace, C. Chen, E. M. Eyring, S. Petrucci, *J. Phys. Chem.*, 89, 1357 (1985)
7. (a) A. Bianchi, M. Micheloni, P. Paoletti, *Coord. Chem. Rev.*, 110, 17 (1991); (b) R. W. Hay, M. M. Hassan, *Polyhedron*, 13, 2205 (1997)
8. B. Bosnich, C. K. Poon, M. L. Tobe, *Inorg. Chem.*, 4, 1102 (1965)
9. Th. A. Kaden, *Helv. Chim.*, 53, 617 (1970)
10. L. Herlti, Th. A. Kaden, *Helv. Chim. Acta*, 58, 2296 (1978)
11. A. Leugger, L. Hertli, Th. A. Kaden, *Helv. Chim. Acta*, 61, 2296 (1978)
12. W. Steinmann, Th. A. Kaden, *Helv. Chim. Acta*, 58, 1358 (1975)
13. P. Schultz-Grunow, Th. A. Kaden, *Helv. Chim. Acta*, 61, 2291 (1978)
14. P. Schultz-Grunow, Th. A. Kaden, *Helv. Chim. Acta*, 61, 2291 (1978)

15. D. K. Cabbiness, D. W. Margerum, *J. Am. Chem. Soc.*, 92, 2151 (1970); (b) C. T. Lin, D. B. Rorabacher, G. R. Cayley, D. W. Margerum, *Inorg. Chem.*, 14, 919 (1975)
16. F.-T. Chen, C.-S. Lee, C. S. Chung, *Polyhydron*, 2, 1301 (1983)
17. S. P. Kasprzyk, R. G. Wilkins, *Inorg. Chem.*, 21, 3349 (1982)
18. (a) X. Wang, T. Jin, V. Comblin, A. Lopez-Mut, E. Merciny, J. F. Desreux, *Inorg. Chem.*, 31, 1095 (1992);
(b) S. L. Wu, W. de W. Horrocks, *Inorg. Chem.*, 34, 3724 (1995); (c) K. Kumar, M. F. Tweedle, *Inorg. Chem.*, 32, 4193 (1993); (d) S. L. Wu, K. A. Johnson, W. de W. Horrocks, *Inorg. Chem.*, 36, 5 (1997);
19. (a) B. Dey, J. H. Coates, P. A. Duckworth, St. F. Lincoln, K. P. Wainwright, *Inorg. Chim. Acta*, 214, 77 (1993); (b) R. W. Hay, M. M. Hassan, *Polyhydron*, 16, 29 (1997)
20. R. W. Ray, P. R. Norman, *Inorg. Chim. Acta*, 45, 139 (1980)
21. L. Hertli, Th. A. Kaden, *Helv. Chim. Acta*, 64, 33 (1981)
22. D.-D. Klaehn, H. Paulus, R. Grewe, H. Elias, *Inorg. Chem.*, 23, 483 (1984)
23. J. R. Roper, H. Elias, *Inorg. Chem.*, 31, 1202 (1992)
24. J. R. Roper, H. Elias, *Inorg. Chem.*, 31, 1220 (1992)
25. (a) P. Moore, J. Sachinidis, G. R. Willey, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 522 (1983);
(b) S. F. Lincoln, J. H. Coates, D. A. Hadi, *Inorg. Chim. Acta*, 81, 9 (1984); (c) S. F. Lincoln, T. W. Hambley, D. L. Pisaniello, J. H. Coares, *Aust. J. Chem.*, 37, 713 (1984)
26. F. McLaren, P. Moore, A. M. Wynn, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 798 (1989)
27. R. Sanzenbacher, H. Elias, *Inorg. Chim. Acta*, 246, 267 (1996)
28. J. Schwanberger, Dr. Ing. Dissertation, Technische Universität Darmstadt, D 17., 1998
29. K. R. Adam, M. Antolovic, L. G. Bridgen, L. F. Lindoy, *J. Am. Chem. Soc.*, 113, 3346 (1991)
30. K. R. Adam, M. Antolovic, L. G. Bridgen, L. F. Lindoy, *J. Am. Chem. Soc.*, 113, 3346 (1991)
31. S. Ishiguro, K. Ozutsumi, H. Ohtaki, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 60, 531 (1987)

Rozdział 17

Aparatura stosowana w spektroskopii w podczerwieni

Marta Rucińska

Bruker Polska Sp. z o.o. ul. Budziszewska 69, 60-179 Poznań

MIR czyli średnia podczerwień (**MidInfraRed**), jest to promieniowanie elektromagnetyczne o długości fali od 25000 nm do 2500 nm (tj. o liczbie falowej 400-4000 cm^{-1}) najczęściej używane w analizie chemicznej. Granice dla tego zakresu są umowne i mogą się różnić w zależności od przyjętego podziału. Promieniowanie to od strony fal krótszych sąsiaduje z promieniowaniem NIR (**NearInfraRed**) a od strony fal dłuższych z promieniowaniem FIR (**FarInfraRed**).

Upraszczając, każdą molekułę można przedstawić jako zbiór atomów (mas) połączonych między sobą wiązaniami chemicznymi. Taki układ może wykonywać drgania, czyli oscylować wokół środka masy. Dlatego spektroskopia IR określana jest często mianem spektroskopii oscylacyjnej. Znając częstość drgań takiego oscylatora (a tym samym jego energię), możemy określić nie tylko różne parametry wiązania chemicznego lecz także identyfikować związki chemiczne (na podstawie znajomości częstości drgań innych oscylatorów w molekułe).

Drgania wywołujące zmianę kwantowej liczby oscylacji o ± 1 nazywamy tonami podstawowymi, o ± 2 pierwszym Dantonem, o ± 3 drugim Dantonem itd. Czasami występują tony złożone. Oznacza to, że w molekułe wzbudzone kilka częstotliwości równocześnie.

Do obserwacji tonów podstawowych wykorzystujemy spektroskopię MIR, natomiast nadtony i tony złożone obserwowane są w paśmie NIR i wyższych. Dla przykładu: ton podstawowy ν dla drgania rozciągającego wiązania CH w molekułe trichlorometanu (CHCl_3) przypada przy 3040 cm^{-1} , pierwszy nadton 2 ν obserwowany jest przy 5907 cm^{-1} , drugi 3 ν przy 8666 cm^{-1} , trzeci 4 ν przy 11338 cm^{-1} itd. Jednocześnie amplitudy poszczególnych pasm są coraz niższe, co wynika z prawdopodobieństwa przejść między poziomami

energetycznymi. Im wyższy nadton, tym mniejsze prawdopodobieństwo wystąpienia takiego przejścia i tym niższa amplituda pasma odpowiadającego temu przejściu.

Aparatura do rejestracji widm w podczerwieni bazuje na absorpcji promieniowania padającego na próbkę.

Absorpcję promieniowania opisuje prawo Lamberta- Beer'a:

$$\frac{I}{I_0} = \exp[-\varepsilon c l]$$

Spektrometr IR musi być tak skonstruowany, aby mógł rejestrować stosunek intensywności promieniowania wychodzącego I do intensywności promieniowania padającego I_0 .



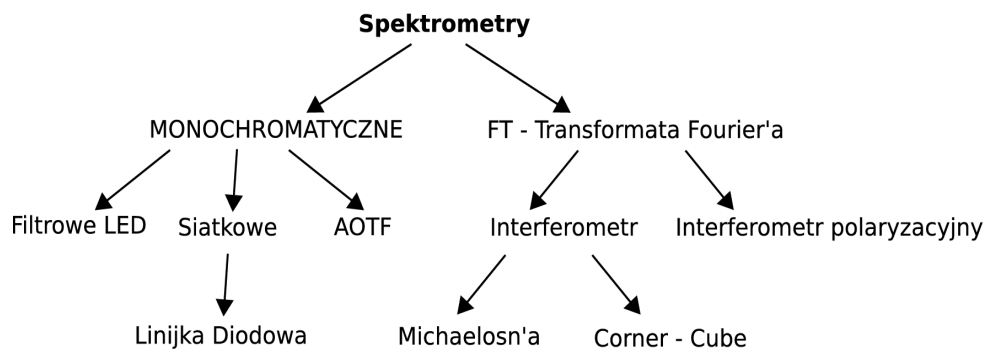
Rysunek 1. Schemat działania spektrometru IR.

Stosunek I/I_0 to przepuszczalność lub inaczej transmisja T , i jest często wyrażona w procentach jako wielkości $I/I_0 \cdot 100$. Wartość przepuszczalności mieści się w przedziale od 0, gdy następuje całkowita absorpcja do 1, gdy promieniowanie nie jest absorbowane. Spektrometr powinien rejestrować przepuszczalność jako funkcję częstości promieniowania.

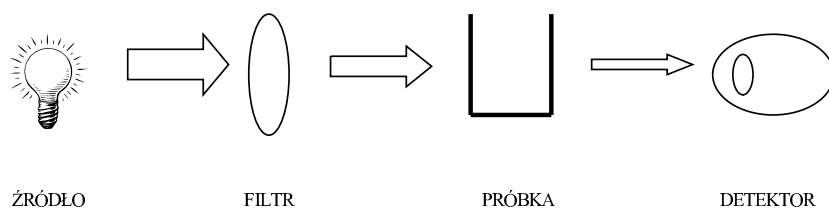
Wyróżniamy dwa podstawowe typy spektrometrów IR:

1. Spektrometry monochromatyczne – zależnie od użytego elementu układu optycznego można jeszcze podzielić na:
 - filtrowe/LED (diodowe)
 - siatkowe (siatka dyfrakcyjna lub linijka diodowa)
 - AOTF (strojone filtry akustyczno-optyczne)
2. Spektrometry FT-IR – technika oparta na rejestrowaniu w pamięci komputera obrazu interferencyjnego – interferogramu, który następnie poddawany jest transformacji Fouriera. Spektrometry te można podzielić ze względu na typ użytego interferometru na:
 - polaryzacyjne
 - z interferometrem Michaelson'a
 - z interferometrem Corner-Cube (lustra kubiczne)

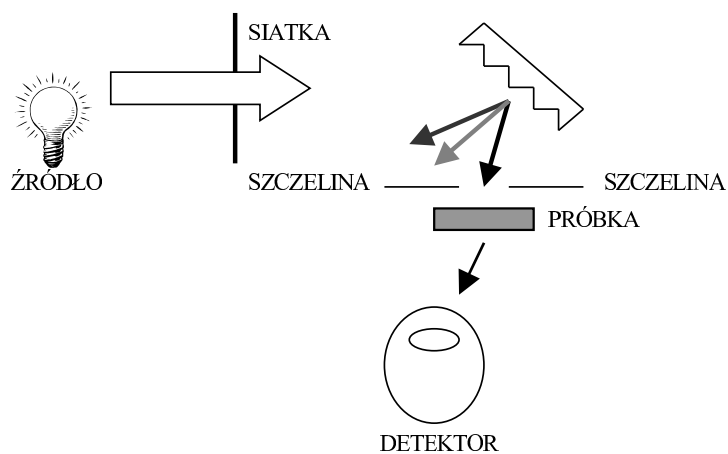
Podział spektrometrów przedstawić można w następujący sposób:



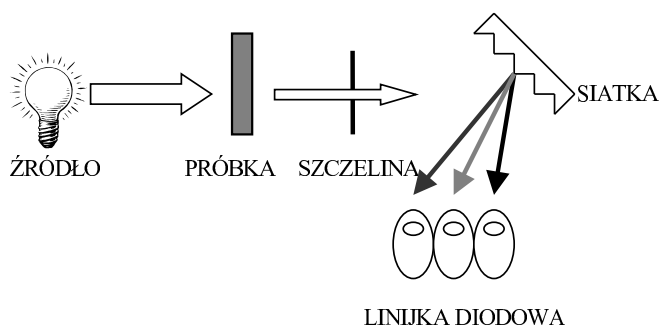
Schematy blokowe opisanych typów spektrometrów przedstawiają rysunki 2-7.



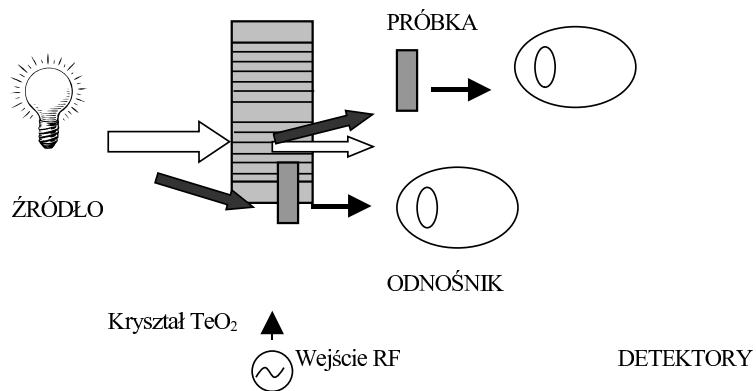
Rysunek 2. Schemat blokowy spektrometru monochromatycznego filtrowego/LED.



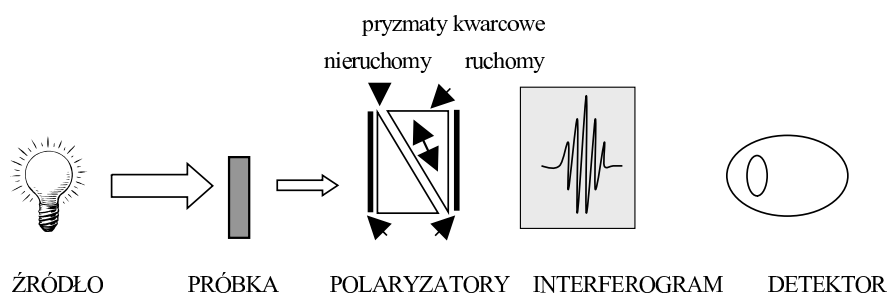
Rysunek 3. Schemat blokowy spektrometru monochromatycznego siatkowego.



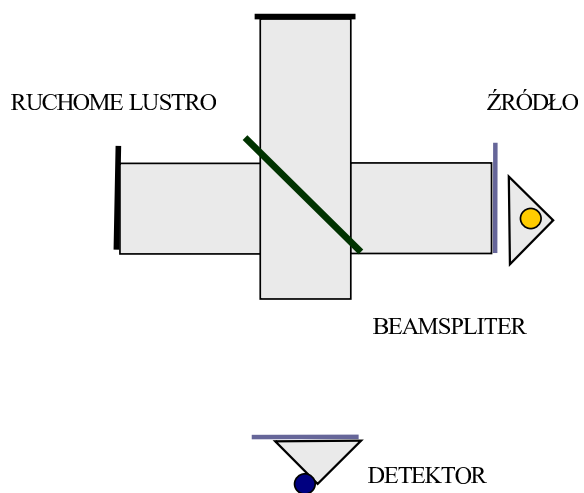
Rysunek 4. Schemat blokowy spektrometru monochromatycznego siatkowego z linijką diodową.



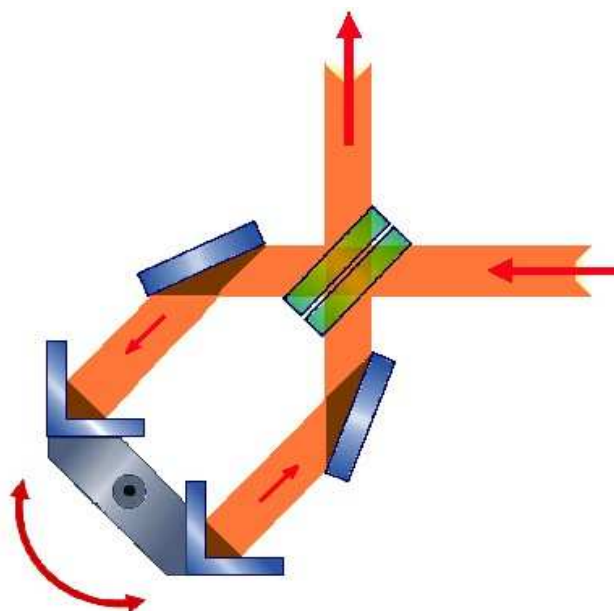
Rysunek 5. Schemat blokowy spektrometru monochromatycznego AOTF.



Rysunek 6. Schemat blokowy spektrometru FT-IR z interferometrem polaryzacyjnym.



Rysunek 7. Schemat działania interferometru Michaelson'a.



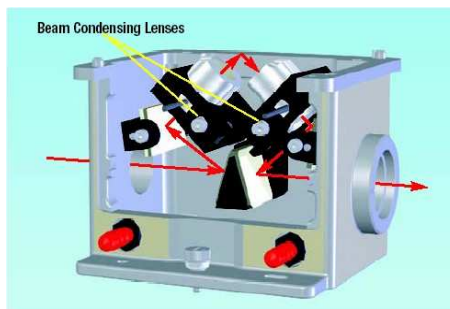
Rysunek 8. Schemat działania interferometru ROCKSOLID® z lustrami kubicznymi (Cormer-Cube).

Obecnie najczęściej stosowana jest spektrometria FT-IR, ze względu na swoje niezaprzeczalne zalety analityczne.

Rozwiązania techniczne stosowane do analizy substancji ciekłych w trakcie reakcji.

Istnieje bardzo wiele rozwiązań technicznych umożliwiających badanie cieczy za pomocą spektrometrii FT-IR, jednak wybór przystawek ogranicza się znacznie jeśli chcemy badać substancje ciekłe w trakcie reakcji.

Popularne przystawki stosowane do tego celu oparte są na technice ATR, czyli na kryształach ustawionych horyzontalnie lub wertykalnie (attenuated total reflection). Przykładem może być najbardziej znana – Golden Gate. Jest to diamentowa przystawka ATR, z kryształem ustawionym horyzontalnie. Urządzenie to bardzo dobrze nadaje się do analizy silnie absorbujących próbek, cieczy żrących, próbek reagujących z powietrzem oraz wielu substancji stałych. Przy zastosowaniu specjalnej komory reakcyjnej można obserwować zmiany następujące w procesie reakcji, bezpośrednio na widmie podczerwieni.



Rysunek 9. Zdjęcie i schemat działania przystawki Golden-Gate firmy Specac.

Bardzo dobrym rozwiązaniem do badania próbek ciekłych w trakcie reakcji jest przystawka IMAC pozwalająca na makroobrazowanie spektralne. Jest to zewnętrzna komora pomiarowa z możliwością przedmuchiwania, przeznaczona do spektroskopii obrazowania przy użyciu nowoczesnej techniki detekcji FPA (ang. Focal plane array). Z pomocą tego układu możliwa jest równoczesna analiza dużych powierzchni próbek (4x4mm) w wysokiej rozdzielczości w płaszczyźnie (60µm), a czas pomiaru nie przekracza kilku sekund. Układ optyczny zapewnia odwzorowanie obrazu w ognisku bez żadnych zniekształceń na detektorze. Kanał detekcji może być automatycznie przełączany pomiędzy kamerą CCD służącą do obserwacji próbki a detektorem FPA do obrazowania w podczerwieni. Aby mieć możliwość zapisu uśrednionego widma z całej próbki, opcjonalnie można zainstalować detektor MCT równolegle do FPA (przełączanie między nimi kontrolowane jest z poziomu oprogramowania).



Rysunek 10. Zdjęcie przystawki IMAC.

Kolejną przystawką bazującą na technice ATR jest Helios. Jest to mikroskop, który można wmontować w komorę pomiarową spektrometru FT-IR. Umożliwia pomiary techniką ATR (attenuated total reflection): odbicia zewnętrznego, odbicia rozproszonego i absorpcji współczynnika odbicia. Helios to nowoczesne akcesorium do analizy mikropróbek. Łączy w sobie wysoką wydajność i łatwość użycia przystawki ATR z obrazem video oraz elastycznym pozycjonowaniem próbki mikroskopu w pełnym zakresie podczerwieni. Ergonomiczna konstrukcja i regulowany w 3 wymiarach stół powodują, że pozycjonowanie próbki jest bezproblemowe. Opatentowany kształt kryształu ATR i optyka skupiająca wiązkę zapewniają doskonałą rozdzielczość mikropomiarów (250 mikronów). Wykorzystanie odbicia i transmisji iluminacji zapewnia optymalny obraz prawie każdej próbki, nawet w trakcie pomiaru w spektrometrze.



Rysunek 11. Zdjęcie przystawki HELIOS.

Jednym z najdoskonalszych rozwiązań do analizy substancji ciekłych w trakcie reakcji jest mikroskop IR Hyperion 3000. Idealny do obserwacji zmian dokonujących się podczas

reakcji chemicznej czy to na powierzchni, czy też wewnątrz struktury. Hyperion 3000 jest systemem obrazowania widmowego opartego na podstawowym mikroskopie Hyperion. Wyposażony jest w dwa różne układy optyczne i detektory. Pierwszy układ optyczny skupia światło pochodzące z próbki na pojedynczy kryształ detektora dla osiągnięcia klasycznego mapowania. Równolegle drugi układ optyczny tworzy wolny od zniekształceń obraz próbki na detektorze FPA (ang. Focal plane array) dla osiągnięcia obrazowania widmowego.



Rysunek 12. Zdjęcie mikroskopu HYPERION 3000.

Do analizy cieczy podczas reakcji możemy również skorzystać z kuwety cieczonej, do której nastrzykuje się substancje. Jest to rozmontowywana kuweta cieczowa z możliwością zmiany okienek (odpowiedni materiał i dystansory do typu substancji badanej).



Rysunek 13. Zdjęcie kuwety cieczonej.

Literatura:

1. Z. Kęcki, Podstawy spektroskopii molekularnej”, PWN, Warszawa 1992

2. Product Note M56-12/03, Bruker Optics, „Golden Gate, A 531-G”
3. Product Note B12-01/04, Bruker Optics, “IMAC, A 174”
4. Folder Microanalysis, Bruker Optics, “HELIOS”
5. Product Note B09-12/03, Bruker Optics, “Hyperion 3000”
6. Product Note M16-12/03, Bruker Optics, “Liquid Cell A 140”
7. Prezentacja “Podstawy spektroskopii IR”, Bruker Optics



**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

BETAGRAF P.U.H.
ul. Św. Antoniego 24, 61-359 Poznań

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

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

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

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