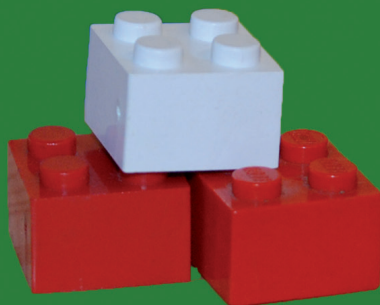
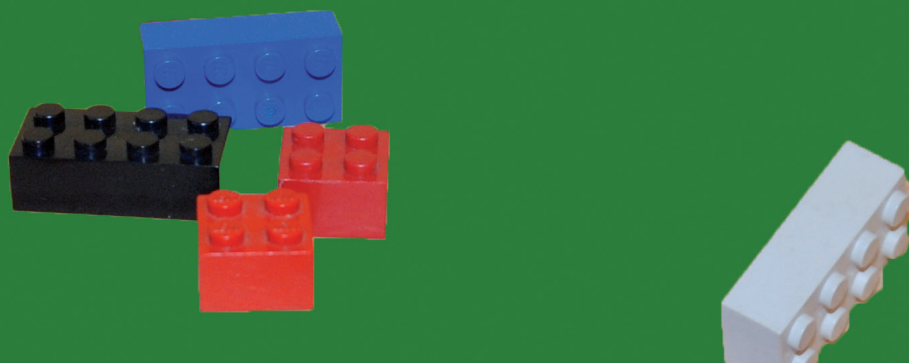




RECEPTORY MOLEKULARNE - WŁAŚCIWOŚCI I ZASTOSOWANIE



Praca zbiorowa pod redakcją
Grzegorza Schroedera



RECEPTORY MOLEKULARNE - WŁAŚCIWOŚCI I ZASTOSOWANIE

**Praca zbiorowa pod redakcją
Grzegorza Schroedera**



Cursiva
2009

Recenzenci

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

Wydanie I
2009

Cursiva

<http://www.cursiva.pl>

ISBN 978-83-62108-02-2

Spis treści

Książka adresowa	5
Rozdział 1	9
Metody przygotowania próbki oraz rola matrycy w spektrometrii mas z jonizacją przez desorpcję laserową wspomaganą matrycą (MALDI MS)	
<i>Grażyna Bartkowiak, Grzegorz Schroeder</i>	
Rozdział 2	49
Właściwości warstw samoorganizujących na powierzchni złota - chemiczna modyfikacja i wybrane zastosowania	
<i>Paweł Niedziałkowski, Tadeusz Ossowski, Justyna Czupryniak, Dorota Zarzeczńska</i>	
Rozdział 3	71
Funkcjonalizacja powierzchni	
<i>Michał Ceglowski, Grzegorz Schroeder</i>	
Rozdział 4	91
Właściwości wybranych jonoforów i makrolidów	
<i>Radosław Pankiewicz, Grzegorz Schroeder</i>	
Rozdział 5	105
Peptydy jako nowe syntetyczne składniki preparatów kosmetycznych	
<i>Anna Olejnik, Izabela Nowak</i>	
Rozdział 6	123
Zastosowanie spektroskopii ^{19}F NMR w badaniach związków boroorganicznych	
<i>Agnieszka Adamczyk-Woźniak, Andrzej Sporzyński</i>	

Książka adresowa

Grzegorz Schroeder

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza

Wydział Chemii

Grunwaldzka 6

60-780 Poznań

Agnieszka Adamczyk-Woźniak

Politechnika Warszawska

Wydział Chemiczny

Noakowskiego 3

00-664 Warszawa

Grażyna Bartkowiak

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza

Wydział Chemii

Grunwaldzka 6

60-780 Poznań

Michał Ceglowski

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza

Wydział Chemii

Grunwaldzka 6

60-780 Poznań

Justyna Czupryniak

Uniwersytet Gdański

Wydział Chemii

Sobieskiego 18/19

80-952 Gdańsk

Paweł Niedziałkowski

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

Izabela Nowak

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

Anna Olejnik

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

Tadeusz Ossowski

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

Radosław Pankiewicz

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

Andrzej Sporzyński

Politechnika Warszawska

Wydział Chemiczny

Noakowskiego 3

00-664 Warszawa

Dorota Zarzeczańska

Uniwersytet Gdański

Wydział Chemii

Sobieskiego 18/19

80-952 Gdańsk

Rozdział 1

Metody przygotowania próbki oraz rola matrycy w spektrometrii mas z jonizacją przez desorpcję laserową wspomaganą matrycą (MALDI MS)

Grażyna Bartkowiak, Grzegorz Schroeder

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

Różnorodne techniki spektrometrii mas są szeroko stosowane w badaniu i analizie związków chemicznych, często o bardzo złożonej budowie. Ponieważ na widmie masowym widoczne są tylko cząstki, obdarzone ładunkiem elektrycznym (dodatnim lub ujemnym), techniki MS wymagają zjonizowania badanej substancji. Można tego dokonać różnymi metodami, z których najstarsza – jonizacją strumieniem elektronów (EI-MS) – pociąga za sobą wieloetapowy rozpad cząsteczek na fragmenty, prowadzący do całkowitego zniszczenia ich struktury. Niekiedy rozpad ten zachodzi tak szybko, że nie rejestruje się w ogóle cząsteczki jako całości, a na widmie MS widoczne są jedynie fragmenty, powstałe z jej rozpadu. W tych wypadkach spektrometria mas nie umożliwia wyznaczenia masy cząsteczkowej badanego związku.

Szerokie zastosowanie spektrometrii masowej do analizy makromolekuł, a zwłaszcza złożonych biocząsteczek, stało się możliwe po wprowadzeniu technik łagodnej, tzw. „miękkiej” jonizacji (ang. *soft ionization*), zwłaszcza takich jak jonizacja przez elektrorozpylanie (*electrospray ionization*, ESI) [1] oraz jonizacja przez desorpcję laserową wspomaganą matrycą (*matrix-assisted laser desorption ionization*, MALDI) [2]. Ta ostatnia technika jonizacji umożliwiła nie tylko identyfikację i analizę dużych molekuł jak polipeptydy i białka, ale nawet

nienaruszonych mikroorganizmów [3, 4]. Proteomika to dzisiaj dynamicznie rozwijająca się dziedzina analityki medycznej [5, 6, 7, 8].

Technika MALDI MS rozwinęła się w końcu lat osiemdziesiątych XX wieku na bazie podobnych metod miękkiej jonizacji jak FAB (bombardowanie szybkimi atomami, ang. *fast atom bombardment*) i LDI (ang. *laser desorption ionization*). Polega ona na wprowadzeniu próbki do matrycy chemicznej, która obecna jest w nadmiarze (ok. 1000-krotny lub większy nadmiar molowy) i która umożliwia łatwe generowanie w fazie gazowej jonów nawet z dużych, nielotnych i nietrwałych termicznie cząsteczek, takich jak białka, bez naruszenia ich struktury. Desorpcji i jonizacji cząsteczek dokonuje się za pomocą wiązki lasera, przeważnie UV, a niekiedy IR. Kluczową rolę w tej technice jonizacji odgrywa matryca.

Rola matrycy w technice jonizacji MALDI MS

Głównym zadaniem matrycy jest pochłonięcie energii promieniowania lasera i przekazanie jej próbce oraz ułatwienie jej odparowania do fazy gazowej. Oprócz tego matryca spełnia jeszcze wiele innych ról i dlatego jej materiał musi odpowiadać licznym wymaganiom:

- a) absorbować promieniowanie o odpowiedniej długości fali, odpowiadającej długości fali promieniowania lasera;
- b) rozpuszczać się w tym samym lub podobnym rozpuszczalniku, co próbka;
- c) mieć zdolność wchłonięcia próbki i rozseparowania jej cząsteczek, np. na drodze ko-kryształizacji;
- d) ułatwiać jonizację i desorpcję próbki;
- e) wykazywać odporność termiczną;
- f) chronić próbkę przed intensywnym promieniowaniem lasera;
- g) nie reagować z próbką i nie zakłócać jej obrazu w widmie.

Rzadko, która matryca spełnia wszystkie te warunki jednocześnie i dlatego stale trwają poszukiwania nowych, doskonalszych, często wieloskładnikowych lub warstwowych matryc jak i różnych metod przygotowania próbki i sposobów mieszania jej z matrycą lub nanoszenia jej na powierzchnię sondy MALDI.

Typowymi, klasycznymi już matrycami MALDI są aromatyczne kwasy

karboksylowe, zawierające grupy chromoforowe, zdolne do intensywnej absorpcji promieniowania lasera o odpowiedniej długości fali. Obecność kwasowych protonów ułatwia jonizację obojętnych cząsteczek analitu, jeżeli mają one zdolność przyjmowania protonów. Jednak niekiedy środowisko kwasowe jest niepożądane i stosuje się matryce obojętne [9, 10, 11]. Nie wszystkie też związki ulegają protonowaniu (przykładami mogą być polietylen lub polistyren [12]), niekiedy jonizację osiąga się przez kationizowanie jonami metali [13] – srebra, miedzi lub pierwiastków I grupy. Związki o charakterze kwasowym, które łatwo ulegają deprotonowaniu, jak kwasy karboksylowe, fenole, oligonukleotydy, są zwykle analizowane w trybie jonów ujemnych (MALDI⁻).

Techniki przygotowywania próbek

Rzetelność wyników analizy metodą MALDI MS zależy w dużej mierze od doboru matrycy, środka kationizującego i rozpuszczalnika, od odpowiedniego przygotowania próbki, metody mieszania jej z matrycą oraz aplikacji na powierzchni sondy. Wiele prac [10] poświęcono tym zagadnieniom, badając różne kombinacje analit-matryca-kationizująca sól nieorganiczna-rozpuszczalnik oraz różne metody nanoszenia tych związków bądź ich mieszanin na płytkę MALDI. Wykazano, że istotne jest nawet tempo odparowywania z powierzchni sondy MALDI rozpuszczalnika, zawierającego próbkę, matrycę i kation, gdyż od szybkości parowania zależy równomierność współkrystalizacji wymienionych składników. Gdy rozpuszczalnik odparowuje zbyt wolno, następuje separacja i wykluczanie kryształów analitu i kryształów soli kationizującej (jeżeli jej dodano) z kryształów matrycy [14]. Aby uzyskać dobre, powtarzalne wyniki, mieszanina ta powinna być homogenna a dystrybucja analitu i kationu w matrycy równomierna. Aby uzyskać ten efekt, wprowadzono m. in. nanoszenie przez elektrorozpylanie (ang. *electrospray deposition*, ED lub ESD) roztworu analit-matryca-kation na sondę MALDI. Strukturę uzyskanych powierzchni i rozmieszczenie poszczególnych jonów badano metodą obrazowania ToF-SIMS. Porównanie wyników pomiarów MALDI z wynikami, uzyskanymi podobną metodą ME-SIMS [15] (*Matrix-Enhanced Secondary Ion Mass Spectrometry*)

pozwoiliło wyciągnąć wniosek, że MALDI (w przeciwieństwie do ME-SIMS) nie jest techniką powierzchniową, lecz daje obraz spektralny również głębszych warstw próbki.

Wśród różnych, często stosowanych technik przygotowania próbek i matryc można wymienić:

Dla matryc stałych (SOLID MATRIX):

Dried-Droplet [16] (“wyschnięta kropelka”)

- roztwór analitu miesza się z roztworem matrycy, nanosi na sondę MALDI i pozostawia do wyschnięcia.

Matrix-first [13] („najpierw matryca”):

- na płytkę MALDI nanosi się roztwór matrycy w rozpuszczalniku i pozostawia do wyschnięcia; roztwór analitu nakrapla się na wysuszoną plamkę matrycy.

Sample-first [17] (“najpierw próbka”)

- roztwór próbki nanosi się na studzienkę sondy MALDI i pozostawia do wyschnięcia, następnie roztwór matrycy nakłada się na wierzch.

Sandwich [18] (“kanapka”)

- na płytkę MALDI nakłada się kolejno: roztwór matrycy, roztwór analitu i roztwór matrycy, za każdym razem pozwalając wyschnąć poprzedniej warstwie przed nałożeniem następnej.

Spin-Coating

- metoda, opisana w literaturze przez Pererę [19], służy do przygotowania prawie jednorodnych próbek wielkich biocząsteczek przez nanoszenie dość dużych objętości (3-10 μ l) roztworu próbki z matrycą na płytki stalowe i kwarcowe o średnicy 1 cala; daje dobrą powtarzalność wyników.

Matrix-precoated Layers

- płytka MALDI jest wstępnie pokryta warstwą matrycy; przygotowanie próbki jest uproszczone – sprowadza się do naniesienia pojedynczej kropli nierozcieńczonego analitu na matrycę; istnieje możliwość nanoszenia bezpośrednio wycieku z kolumn LC lub CE; jako podłoża służą cienkie membrany z nylonu, PVDF, nitrocelulozy, celulozy modyfikowane anionowo lub kationowo i in.

Crushed-Crystal [20]

- jako pierwsza warstwa nanoszone są kryształy matrycy, zmiażdżone mechanicznie, a następnie na tę ziarnistą warstwę aplikuje się stopniowo roztwór analit-matryca; tworzy się jednolity film, o dużej tolerancji zanieczyszczeń, dający wysoki prąd jonowy.

Quick&Dirty (metoda “szybka i brudna”)

- oddzielnie sporządza się roztwór matrycy i roztwór analitu; przeważnie używa się nieoczyszczonej próbki; kroplę roztworu matrycy dodaje się na wierzch kropli roztworu analitu, miesza razem końcówką mikropipety i suszy na powietrzu lub w strumieniu azotu. Metoda szybka, umożliwia łatwe dodanie standardu do kalibracji.

Vacuum-Drying [21] (suszenie próżniowe)

- modyfikacja metody „dried-droplet”; kropla mieszaniny matrycy z analitem na płytce MALDI jest suszona w komorze próżniowej (otrzymuje się drobne kryształki analitu i matrycy, o dużej homogenności i dobrej powtarzalności wyników).

Fast-Evaporation [22] (szybkie odparowanie)

- matryca i próbka na traktowane oddzielnie; najpierw nanoszony jest roztwór matrycy i szybko odparowywany, następnie roztwór próbki jest aplikowany na wierzch i również poddany odparowaniu

rozpuszczalnika.

Overlayer

- kombinacja metody “crushed crystals” i “fast-evaporation” (szybkie odparowanie rozpuszczalnika z cienkiej warstwy drobnych kryształów, a następnie nałożenie na tę warstwę roztworu mieszaniny matrycy z analitem); różni się od poprzedniej tym, że do aplikowanej próbki dodaje się również matrycę.

Electrospray deposition (nakładanie przez elektrorozpylanie)

- metoda wprowadzona przez Speira [23]; roztwór analitu rozpyła się elektrycznie na wierzch warstwy, utworzonej przez elektrorozpylanie roztworu kwasu synapowego (ang. *sinapic acid*). Metoda dała dobre wyniki tylko dla peptydów mniejszych niż 10 jednostek aminokwasowych.

Dla matryc ciekłych (LIQUID MATRIX) [24]:

Chemical liquid (ciecz)

- analit rozpuszczony w odpowiednim stężeniu molowym w ciekłej matrycy.

Particle-Doped (two-phase) Liquid (ciecz domieszkowana cząstkami stałymi, dwufazowa)

- drobne cząstki metalu lub grafitu, zawieszone w rozpuszczalniku, zmieszane z analitem i substancją wiążącą; po odparowaniu rozpuszczalnika tworzy się pasta, którą nanosi się na płytkę MALDI; drobnitkie cząstki absorbują silnie energię lasera, ułatwiając desorpcję analitu; wadą metody jest możliwość zanieczyszczenia pomp próżniowych i elementów optyki jonowej drobkami pyłu.

Chemical-doped Liquid (ciecz domieszkowana chemicznie)

- do ciekłego medium dodaje się związek organiczny, silnie absorbujący promieniowanie lasera i ułatwiający jonizację próbki.

Metody specjalne (SPECIAL PREPARATIONS):

Solid Supports (podłoża stałe), m. in. metoda DIOS [65], desorpcji/ionizacji na porowatym krzemie

W tej metodzie stosuje się stałe podłoża, najczęściej porowaty krzem (ang. *desorption/ionization on porous silicon*, DIOS) lub modyfikowaną krzemionkę, odgrywające rolę matrycy. Wadą jest często ograniczony zakres mas badanych związków.

2D-Gels

Metoda stosowana do złożonych próbek biologicznych, badanych bezpośrednio w MALDI-MS, np. przez analizę żelu po elektroforezie.

Insoluble Samples [25] (próbki nierozpuszczalne)

Próbki nierozpuszczalne w rozpuszczalnikach ani w matrycy nanosi w formie drobno zmielonego proszku, zmieszanego z matrycą i sprasowanego. Stosowane do wielkocząsteczkowych polimerów syntetycznych.

Wybór matrycy zależnie od zastosowania (matryce klasyczne i alternatywne)

Ważnym zagadnieniem jest dobór matrycy do analizy MALDI, gdyż trzeba ją dostosować do klasy badanych związków i parametrów stosowanego lasera. Klasyczne, najczęściej stosowane matryce MALDI zestawiono w Tabeli 1.

Klasyczne matryce stosuje się głównie w analizie MALDI-TOF MS dużych cząsteczek, często o biochemicznym znaczeniu, jak białka, peptydy, węglowodany, oligonukleotydy czy polimery syntetyczne. W przypadku małych cząsteczek w analizie przeszkadza interferencja jonów matrycy, które zakłócają widmo badanej substancji, zwłaszcza, że stężenie matrycy jest dużo większe niż analitu. Problem ten rozwiązuje się, stosując **matryce alternatywne**, np.

cząsteczki nieorganiczne [27], matryce z supresją surfaktantem [28], fulereny [29], względnie związki o wysokiej masie cząsteczkowej [30], znacznie wyższej od mas cząsteczek analitu, np. modyfikowane porfiryny [31]. Oprócz wymienionych matryc, coraz większą rolę w technice MALDI odgrywają **materiały nanostrukturalne**, wśród których można wymienić: porowaty krzem [32], krzemiany [33, 34], nanocząsteczki krzemu [35], nanorurki węglowe [36] i nanocząsteczki złota [37]. Są one stosowane w charakterze matryc MALDI, niedających w widmie masowym wcale lub prawie wcale jonów tła.

Tabela 1. Najczęściej używane matryce MALDI dla różnych klas oznaczanych związków, zakresów mas cząsteczkowych i stosowanych laserów

Oznaczane związki	Matryca	Skrót
Peptydy i białka Masa < 10 kDa [26] Masa > 10 kDa Laser IR Laser UV Matryce ciekłe	Kwas α -cyjano-4-hydroksycynamonowy Kwas synapowy (ang. <i>sinapic acid</i>) Kwas 2-(4-hydroksyfenylazo)benzoesowy Kwas bursztynowy (ang. <i>succinic acid</i>) 2,6-dihydroksyacetofenon Kwas ferulowy (ang. <i>ferulic acid</i>) Kwas kawowy (ang. <i>caffeic acid</i>) Gliceryna 4-nitroanilina	CHCA SA HABA FA
Oligonukleotydy Masa < 3,5 kDa masa > 3,5 kDa	2,4,6-trihydroksyacetofenon Kwas 3-hydroksypikolinowy Kwas antranilowy Kwas nikotynowy salicylamid	THAP HPA
Cząsteczki organiczne (w tym małe)	Kwas 2,5-dihydroksybenzoesowy (ang. <i>2,5-dihydroxybenzoic acid</i>)	DHB

Polimery syntetyczne - niepolarne - polarne Laser IR	Kwas <i>trans</i> -3-indoloakrylowy (<i>trans</i> -3- <i>indoleacrylic acid</i>) Ditranol	IAA
	Kwas 2,5-dihydroksybenzoesowy (ang. <i>2,5-dihydroxybenzoic acid</i>)	DIT
	Kwas bursztynowy (ang. <i>succinic acid</i>)	DHB
Węglowodany - kwasowe	Kwas 2,5-dihydroksybenzo-esowy	DHB
	Kwas α -cyjano-4-hydroksycynamonowy	CHCA
	2,4,6-trihydroksyacetofenon	THAP
Lipidy	Ditranol	DIT
Dendrymery	Kwas synapowy (ang. <i>sinapic acid</i>)	SA
	Ditranol	DIT
Fulereny	Kwas synapowy (ang. <i>sinapic acid</i>)	SA
Oligosacharydy	1-izochinolinol	
Cząsteczki nieorganiczne	T-2-(3-{4-t-butylo-fenilo}-2-metylo-2-propenylideno) malononitryl	DCTB

MALDI na podłożach stałych

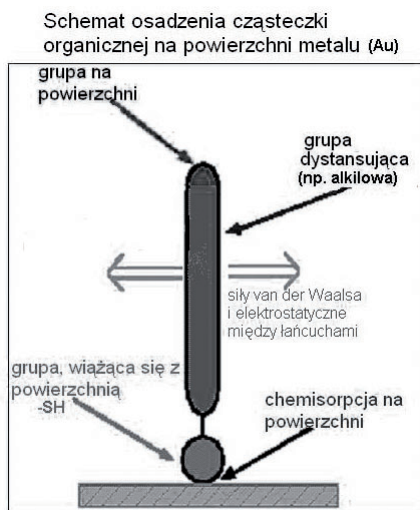
Monowarstwy samozorganizowane w MALDI

W toku poszukiwania coraz lepszych matryc do desorpcji i jonizacji laserowej dla jak najszerszego zakresu badanych związków zrodził się pomysł, by powierzchnię sondy MALDI pokryć warstwą, która będzie selektywnie wiązała niektóre, wybrane związki z podłożem, umożliwiając ich analizę, a jednocześnie usunięcie innych, niezwiązanych substancji, przeszkadzających w analizie i zanieczyszczających próbkę, np. przez odmycie ich bezpośrednio z powierzchni sondy.

Wiele metod przygotowania próbki do analizy metodą MALDI MS wiąże się

z modyfikacją powierzchni płytki (sondy) MALDI z zastosowaniem membran [38, 39, 40] cienkich filmów i monowarstw samoorganizujących (SAMs).

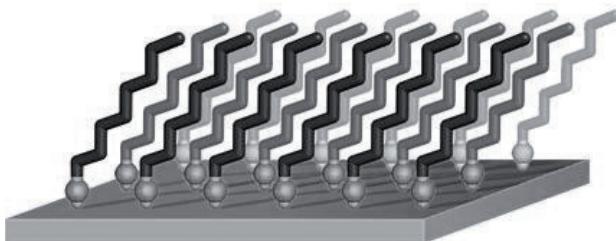
SAM to supramolekularne warstwy (filmy) cząsteczek, związane z podłożem drogą chemisorpcji, czyli przez utworzenie wiązania chemicznego pomiędzy podłożem (inaczej zwanym substratem) a odpowiednią grupą funkcyjną cząsteczek monowarstwy. Po pierwszym, bardzo szybkim etapie adsorpcji fizycznej cząsteczek na powierzchni, zachodzi reakcja chemiczna między cząsteczkami a substratem (chemisorpcja, rys. 1.), która z reguły trwa znacznie dłużej.



Rysunek 1. Osadzanie cząsteczki tiolu na powierzchni złota.

Gdy pokrycie substratu cząsteczkami monowarstwy zbliża się do maksymalnego, następuje dalszy etap porządkowania monowarstwy – „wstawanie” cząsteczek i ich orientacja prostopadłe do podłoża. Wolne przestrzenie są zapełniane nowymi cząsteczkami, warstwa gęstnieje i samoorganizuje się, tworząc zwarty film, trwały dzięki silnym siłom van der Waalsa i oddziaływaniom hydrofobowym pomiędzy cząsteczkami.

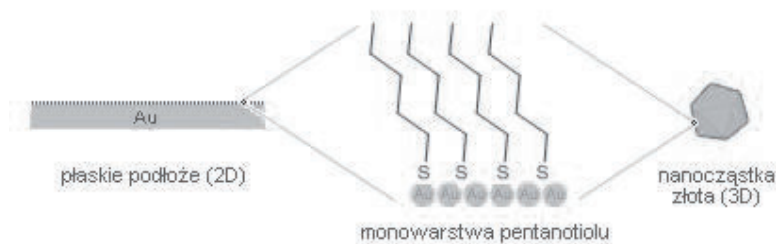
Tworzenie się samorganizowanej monowarstwy cząsteczek o długich łańcuchach alkilowych na powierzchni metalu przedstawia rys. 2.



Rysunek 2. Tworzenie się monowarstwy samorganizowanej (SAM) [37].

Niektóre substraty są szczególnie podatne na oddziaływanie specyficznych grup funkcyjnych modyfikujących je cząsteczek. Do takich klasycznych procesów modyfikacji powierzchni i zestawów substrat-grupa funkcyjna należą [41]:

- osadzanie się związków siarkowych, zwłaszcza tioli $R-SH$ i disulfidów $R-SS-R$ na powierzchni złota, srebra i palladu (rys. 3);



Rysunek 3. Tiole tworzą monowarstwy nie tylko na płaskiej powierzchni, ale i na nanocząsteczkach złota [37].

- osadzanie amin ($R-NH_2$) na powierzchni półprzewodnika, selenku kadmu ($CdSe$);

- osadzanie alkoholi R-OH i alkenów terminalnych na powierzchni krzemu.

Zależnie od właściwości grupy terminalnej takiej monowarstwy można zmienić charakter modyfikowanej powierzchni, np. jej hydrofilowość. rys. 4 przedstawia:

- hydrofilową powierzchnię czystego złota przed modyfikacją (kropla wody przylega dobrze do podłoża),
- powierzchnię złota zmodyfikowaną hydroksyalkanotiolami, gdzie terminalne grupy –OH powodują jeszcze większą hydrofilowość (kropla wody zupełnie rozplywa się na powierzchni, kąt zwilżania wynosi 0°)
- powierzchnię złota zmodyfikowaną tiolami z terminalnymi grupami trifluorometylowymi, które nadają powierzchni charakter hydrofobowy (kropla wody kurczy się, kąt zwilżania zmienia się na 118°).

Monowarstwy samoorganizujące, osadzone na złocie, mają duże znaczenie dla modelowania powierzchni w biochemii i biologii. Znaczenie to wynika z następujących właściwości monowarstw SAM:

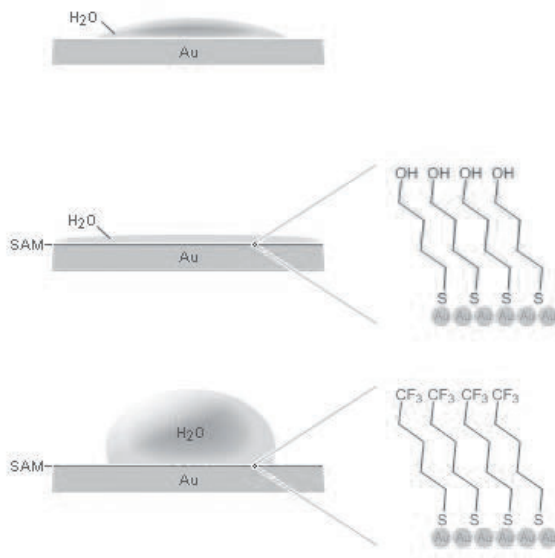
a) monowarstwy o odpowiedniej budowie, np. posiadające grupy polioksaetylenowe, zapobiegają nie-specyficzej adsorpcji białek [42] na powierzchni (do większości powierzchni białka adsorbują niespecyficycznie, co jest przyczyną wielu niekontrolowanych reakcji powierzchniowych);

b) monowarstwy można projektować pod względem struktury i właściwości, dobierając cząsteczki z odpowiednimi grupami funkcyjnymi na końcu łańcucha do osadzenia lub też modyfikując grupy terminalne monowarstwy już po jej osadzeniu na powierzchni; sprawia to, że warstwy SAM można „kroić na miarę”, dostosowując je do potrzeb, np. do immobilizacji wybranych ligandów;

c) istnieją metody, pozwalające na warstwach SAM „drukować” wzory, co umożliwia kontrolę kształtów przyczepianych cząsteczek i tworzenie macierzy o określonej zawartości [43];

d) dobre przewodnictwo warstwy złota, na której osadza się monowarstwę, sprawia, że do SAM można przykładać napięcie, wywołujące reakcje redox,

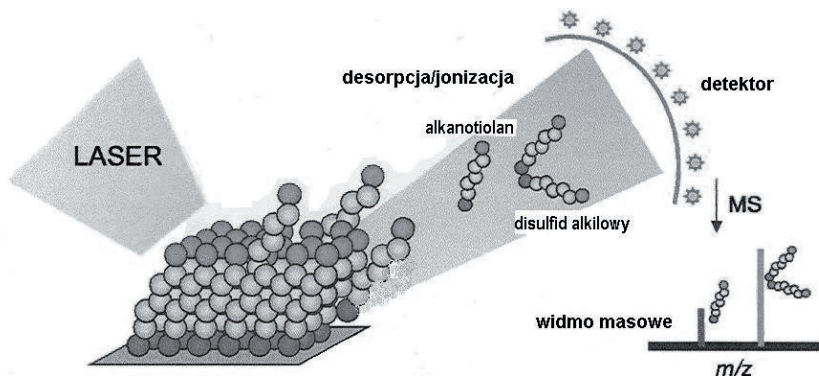
wpływające na strukturę i właściwości monowarstwy. Fakty te stały się podstawą elektroniki molekularnej.



Rysunek 4. Zmiana kąta zwilżania powierzchni złota zależnie od charakteru chemicznego pokrywającej je monowarstwy [37].

Wymienione właściwości monowarstw samozorganizowanych spowodowały nie tylko to, że zainteresowanie nimi i ilość aplikacji stale rośnie, ale też wywołały zapotrzebowanie na techniki analityczne, które umożliwią dokładne zbadanie budowy i właściwości powierzchniowych SAM, a także dadzą możliwość szybkiego i łatwego śledzenie przebiegu reakcji na monowarstwie, połączonego z analizą produktów i wydajności reakcji. Wśród wielu stosowanych metod analitycznych szczególnie cenna okazała się spektrometria mas, oparta na desorpcji i jonizacji laserowej. Pionierskie prace Wilkinsa i Hanleya, dotyczące badania SAM za pomocą MS z desorpcją laserową, pozwoliły zaobserwować alkanotiole, disulfidy (rys. 5) i ich kompleksy z atomami złota [44, 45]. Prace te

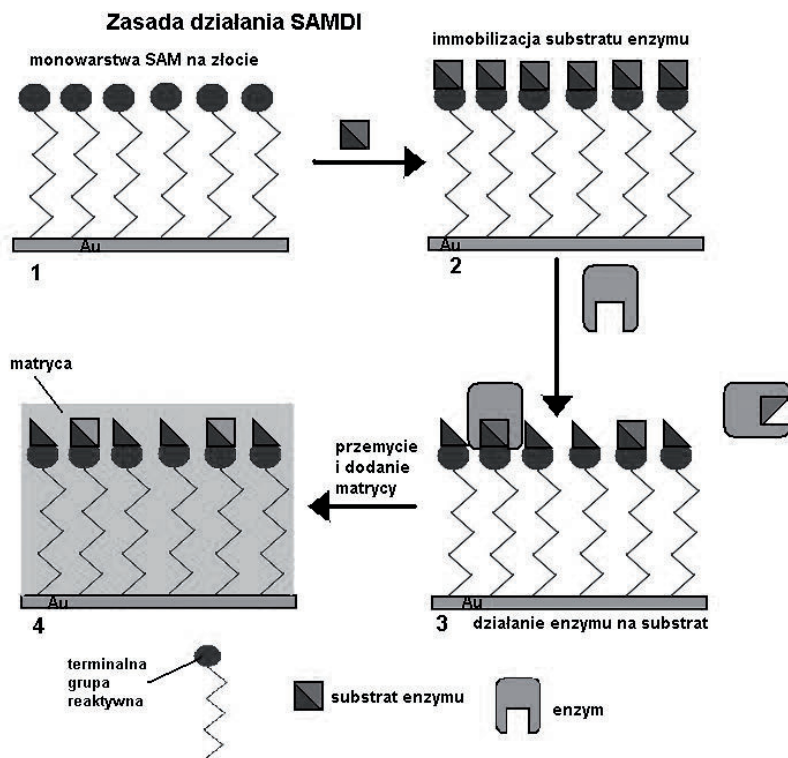
dały początek zastosowaniu techniki MALDI do badania powierzchni i procesów na nich zachodzących. Naniesienie na badaną powierzchnię standardowej substancji, absorbującej silnie promieniowanie lasera (matrycy) i wykonanie pomiaru MALDI-TOF dostarcza bezpośredniej informacji o składzie monowarstwy. Można też na monowarstwie przeprowadzić reakcję chemiczną i porównując widma MALDI przed i po reakcji wnioskować o obecności, ilości i przybliżonej wydajności produktów oraz ich charakterze chemicznym.



Rysunek 5. Desorbowane z monowarstwy zjonizowane cząsteczki alkanotiolei i disulfidów alkilowych są analizowane w spektrometrze mas [42].

Technika, łącząca wykorzystanie monowarstw samozorganizowanych, osadzanych na powierzchni z analizą za pomocą spektrometrii mas z jonizacją MALDI określana jest często jako SAMDI (*self-assembled monolayer desorption/ionization*) [46]. Jest ona stosowana do śledzenia przebiegu reakcji elektrochemicznych, zachodzących w monowarstwach, w biochemii i chemii medycznej, do badania przebiegu reakcji enzymatycznych, przemian biomolekuł i testowania leków. Monowarstwa samozorganizowana może służyć do selektywnej immobilizacji analitów, które następnie pokrywa się warstwą matrycy i analizuje za pomocą spektrometrii mas MALDI-ToF. Zasadę działania SAMDI na przykładzie reakcji enzymu z substratem, osadzonym na

monowarstwie SAM przedstawia rys. 6. [47]

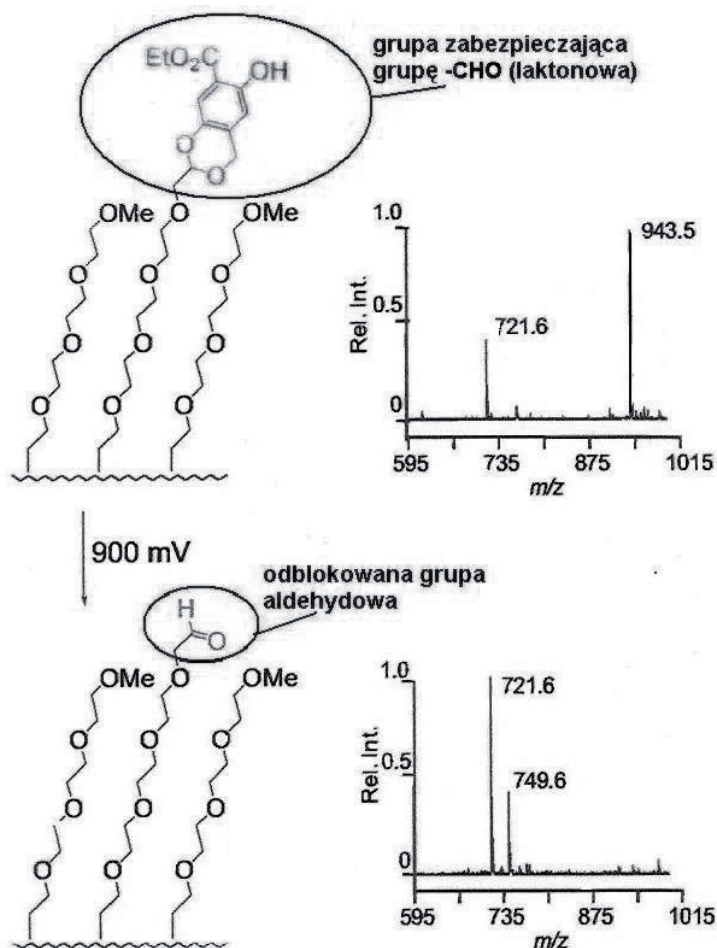


Rysunek 6. Schemat działania SAMDI. 1- monowarstwa z aktywnymi grupami, osadzona na złocie. 2 – substrat enzymu zostaje unieruchomiony na monowarstwie. 3 – monowarstwa z immobilizowanym substratem zostaje poddana działaniu enzymu i inkubacji. 4 – reakcja zostaje przerwana przez przemycie powierzchni; po dodaniu matrycy następuje analiza przy użyciu MALDI-MS.

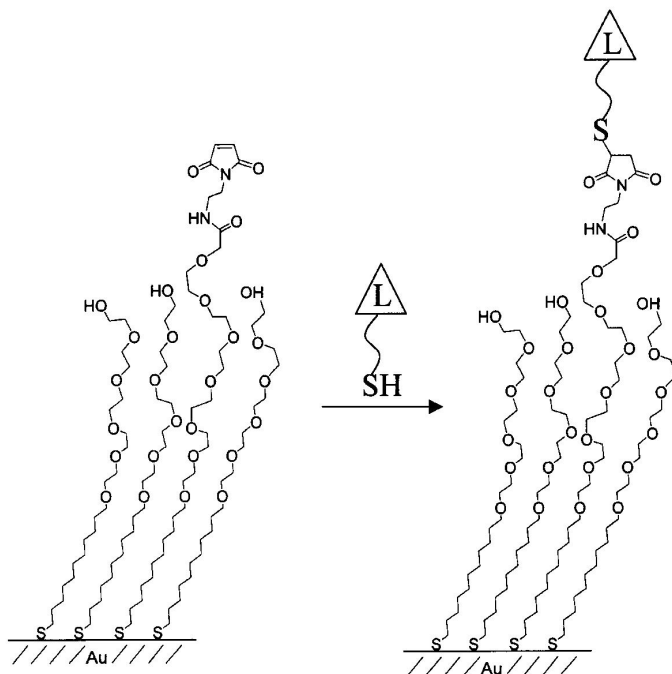
Przykład zastosowania SAMDI do charakteryzowania produktów reakcji elektrochemicznych ilustruje rys. 7. Monowarstwa, naniesiona na powierzchnię złota, jest funkcjonalizowana grupami acetalowymi pochodnej hydrochinonu, która jest reaktywna w reakcjach utleniania-redukcji. Taka funkcjonalizacja

służy do zabezpieczenia terminalnych grup aldehydowych. Grupy acetalowe są trwałe w warunkach obojętnych, ale dają się efektywnie usuwać przez utlenienie pierścienia hydrochinonowego. Przyłożenie do podłoża Au napięcia 900 mV powoduje reakcję redox - utleniającą hydrolizę acetalu do aldehydu. Widma SAMDI przed i po reakcji wykazują obecność tych samych pików tła, pochodzących od disulfidów alkanotiolowych (m/z 721 Da). Przed reakcją w widmie obecne są piki disulfidów z ochronną grupą acetalu hydrochinonowego (m/z 944), natomiast po reakcji tych pików już nie widać, a zamiast nich widoczne są sygnały od disulfidów z wolną grupą aldehydową na końcu łańcucha (m/z 750). Wskazuje to na efektywny proces zdejmowania grupy zabezpieczającej, zachodzący pod wpływem przyłożonej różnicy potencjałów. Uwolnione grupy aldehydowe mogą teraz służyć do immobilizacji ligandów [48].

W trakcie przygotowywania powierzchni aktywnych biologicznie ważnym etapem jest immobilizacja na ich powierzchni cząsteczek o określonych, pożądanych właściwościach chemicznych. Do takich cząsteczek należą aktywowane estry, maleimidy, epoksydy czy nukleofile. Ważne jest sprawdzenie, czy immobilizacja przebiegła pomyślnie i do końca oraz czy inne, konkurujące z pożądanymi cząsteczki nie zostały unieruchomione na monowarstwie. Tu również dogodnym narzędziem jest SAMDI. W tym przypadku [49] (rys. 8) zastosowano monowarstwę, zawierającą grupy maleimidowe, rozmieszczone z małą gęstością w porównaniu z grupami oligo(glikolu etylenowego), stanowiącymi tło i poddano ją reakcji z ligandami, zakończonymi grupami tiolowymi. Grupy maleimidowe reagują z tiolową grupą funkcyjną ligandu, „wyłapując” go w sposób selektywny, natomiast grupy glikolowe, stanowiące bazę monowarstwy, zabezpieczają powierzchnię przed adsorpcją niepożądanych białek w późniejszym etapie testów biologicznych. Powierzchnię charakteryzowano przy użyciu spektrometrii masowej, wykazując obecność grup alkanotiolanów, zakończonych grupą maleimidową **przed** reakcją oraz immobilizowanych adduktów **po** reakcji.



Rysunek 7. Charakterystyka reakcji elektrochemicznej, zachodzącej na monowarstwie. Na górze – monowarstwa Au funkcjonalizowana acetalem i widmo SAMDI tej monowarstwy przed reakcją (721 Da – disulfidy z grupami terminalnymi –OMe, 944 Da – disulfidy z laktonowymi grupami terminalnymi). Na dole – obraz monowarstwy po reakcji elektrochemicznej pod wpływem napięcia 900 mV (obecne wolne grupy aldehydowe) i widmo SAMDI tej monowarstwy (750 Da – disulfidy z terminalnymi grupami –CHO).



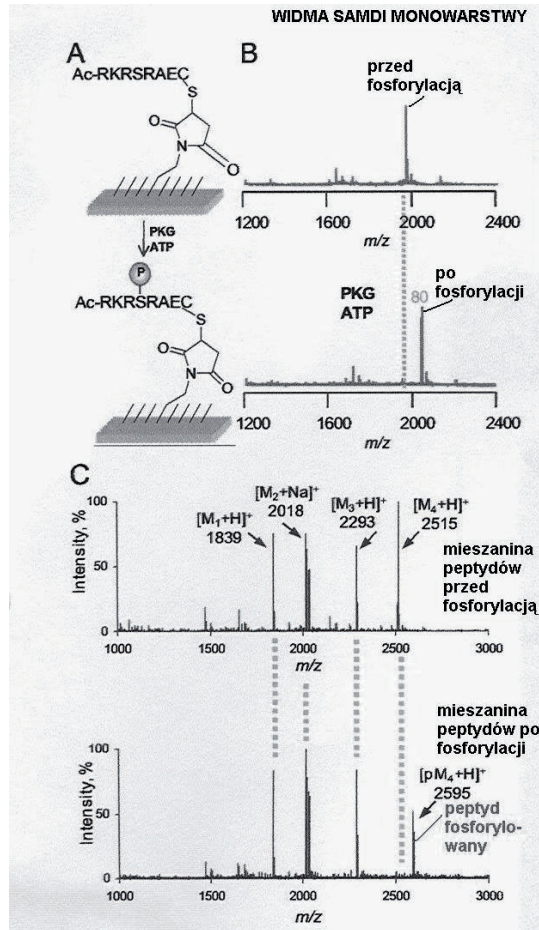
Rysunek 8. Immobilizacja ligandów z grupą tiolową na monowarstwie, posiadającej terminalne grupy maleimidowe. Efektywność takiego unieruchamiania można kontrolować przy użyciu MS⁴⁵.

Konkretnym przykładem skojarzenia technik spektrometrii masowej z desorpcją laserową oraz zastosowania warstw samoorganizujących jest badanie aktywności kinaz⁵⁹, tj. enzymów, odpowiedzialnych za fosforylację białek, reakcji o kluczowym znaczeniu w przebiegu procesów komórkowych.

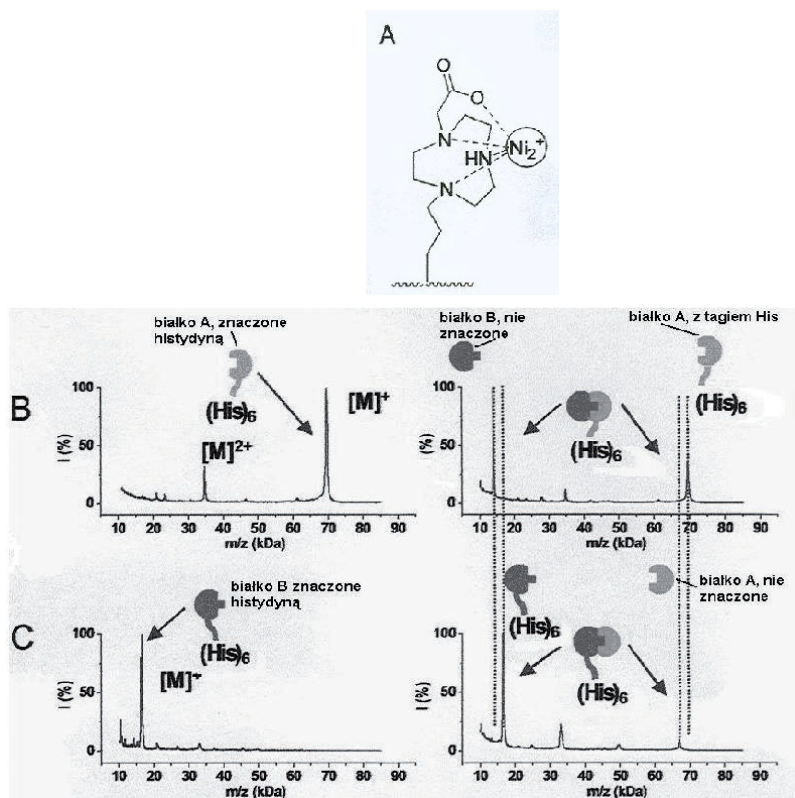
W opisywanym doświadczeniu⁴² na monowarstwę zawierającą peptyd RKRSRAE działano kinazą proteinową G (PKG, ang. *protein kinase G*) i ATP. Porównanie widm masowych SAMDI przed reakcją fosforylacji i po (rys. 9) wykazuje, że masa badanego peptydu wzrosła o 80 Da, jak można było oczekiwać (wprowadzono jedną grupę fosforylową) oraz że cały peptyd przereagował (brak sygnału niepodstawionego peptydu po reakcji).

Podobny eksperyment przeprowadzono na mieszaninie peptydów (rys. 9c), immobilizowanej na wspólnej powierzchni (w tym przypadku widmo SAMDI wykazuje sygnał od każdego koniugatu peptyd-alkanotiol), a następnie poddanej działaniu kinazy kazeinowej 1 (wynikowe widmo SAMDI wykazuje charakterystyczne dla fosforylacji przesunięcie sygnału jednego z peptydów, który jest substratem dla tej właśnie kinazy, o 80 jednostek, podczas gdy sygnały pozostałych peptydów pozostają niezmienione).

Metoda SAMDI jest też stosowana do badania oddziaływań między proteinami, gdy chcemy zmierzyć wiązanie się białka z ligandem na powierzchni biochipu. Powszechnie stosowane do tej pory metody fluorescencyjne i spektroskopia rezonansu plazmonowego są dosyć kosztowne i mają liczne ograniczenia, m. in. nie pozwalają odróżnić specyficznego i nie-specyficznego wiązania substratu z podłożem. Metody, oparte na desorpcji laserowej, umożliwiają identyfikację związków o masach do 100 000 Da i dlatego dobrze nadają się do badania oddziaływań białko-białko. Przykładowe doświadczenie ilustruje rys. 10. Zastosowana monowarstwa, zawierająca chelat jonów Ni, została użyta do immobilizacji białka, znakowanego histydyną. Widmo masowe powierzchni dało sygnał, odpowiadający temu białku przy m/z 70 kDa. Następnie na powierzchnię podziałano mieszaniną białka znakowanego histydyną i drugiego białka ($M = 14$ kDa), nie znakowanego, o którym wiadomo, że oddziałuje z poprzednim. W tym wypadku w widmie masowym widoczne były sygnały, pochodzące od obu białek (m/z 70 kDa i m/z 14 kDa). Gdy na powierzchnię sondy, pokrytej monowarstwą, naniesiono tylko białko nieznakowane, nie zarejestrowano jego obecności w widmie masowym, co świadczy o tym, że monowarstwa z terminalnymi grupami tri(etylenoglikolowymi) skutecznie zapobiega nie-specyficzej adsorpcji białek na powierzchni monowarstwy. Doświadczenie w odwrotnej kolejności (znakowanie tagiem histydynowym drugiego białka) wykazało analogiczną zależność. Małe ilości (rzędu mikrolitra) próbki i mało rygorystyczne wymogi co do jej oczyszczenia sprawiają, że metoda jest dogodna dla mapowania oddziaływań między białkami.



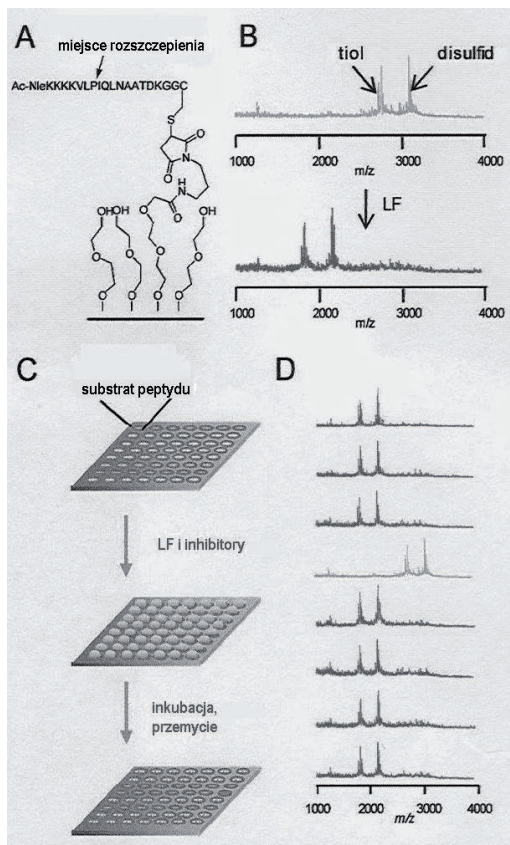
Rysunek 9. Zastosowanie SAMDI MS do badania aktywności enzymatycznej. Substrat peptydowy enzymu kinazy G został unieruchomiony na monowarstwie, posiadającej grupy maleimidowe (A) i poddany działaniu kinazy. Widma SAMDI monowarstwy przed i po reakcji fosforylacji enzymatycznej (B) wykazują, że masa alkanotiolu, zakończonego peptydem wzrosła o 80 Da (o PO_3 , zgodnie z oczekiwaniem). Widma C przedstawiają mieszaninę wieloskładnikową – czterech immobilizowanych peptydów przed reakcją (góra) i poddanych fosforylacji enzymatycznej kinazą kazeinową 1 (dół); tylko jeden z peptydów (M_4) jest aktywny względem tej kinazy (wzrost masy o 80 Da), pozostałe są substratami innych kinaz [42].



Rysunek 10. Monitorowanie oddziaływań białko-białko za pomocą SAMDI. Do immobilizacji protein, znakowanych histydynowo, użyto monowarstwy, zawierającej chelat jonów Ni^{2+} (A). Widma SAMDI białka A z tagiem $(\text{His})_6$ 70 kDa – (B), po lewej i tego białka po oddziaływaniu z białkiem B, bez znacznika, 14 kDa – (B), po prawej. (C), po lewej – widmo SAMDI białka B z tagiem $(\text{His})_6$; (C), po prawej – widmo SAMDI białka B po oddziaływaniu z nieznakowanym białkiem A [42].

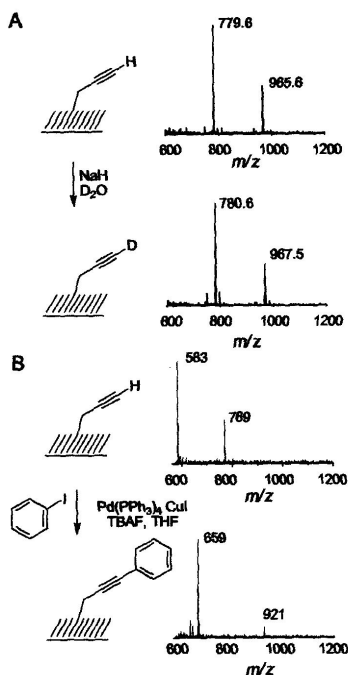
Nieocenione usługi oddaje SAMDI w screeningu chemicznym wielkiej ilości próbek. Tę metodę zastosowano w poszukiwaniu inhibitora proteazy *Anthrax lethal factor* [50], czynnika odpowiadającego za zabójcze działanie

bakterii wąglika. Metoda SAMDI umożliwiła dość szybkie przetestowanie biblioteki 10 000 związków niskocząsteczkowych (rys. 11) i wyłonienie spośród nich jednego, który inhibituje czynnik śmiertelny wąglika, tj. toksynę, niszczącą kinazy i prowadzącą do śmierci komórek zakażonego organizmu.



Rysunek 11. SAMDI w screeningu 10 000 związków niskocząsteczkowych w poszukiwaniu inhibitora proteazy Anthrax Lethal Factor: (A) – substrat proteazy, immobilizowany na monowarstwie. (B) – widmo monowarstwy przed działaniem proteazy LF i po (widać rozszepienie łańcucha peptydowego). (C) – testowanie biblioteki potencjalnych inhibitorów LF na mikromacierzach. (D) – analiza wyników testu za pomocą MS; widać jeden wynik pozytywny inhibicji (różowe widmo, brak rozszepienia peptydu) [42].

Dużą korzyścią, płynącą z zastosowania spektrometrii mas z desorpcją laserową przy użyciu warstw samoorganizujących się jest możliwość identyfikacji dowolnych produktów reakcji i odróżnienia ich od substratów, jeżeli tylko różnią się one masami, przy czym wystarczy, gdy ta różnica jest jednostkowa (1 Da). Metoda ta nadaje się dobrze do analizy produktów reakcji substancji immobilizowanych na podłożach stałych. Jak pokazano na rys. 12, umożliwia ona zarejestrowanie nawet tak niedużych zmian w masie cząsteczki, jak wymiana atomu wodoru na deuter [51]. Dolne widma pokazują monitorowanie reakcji wymiany atomu wodoru grupy terminalnej monowarstwy na grupę fenylową.



Rysunek 12. Monitorowanie reakcji chemicznych cząsteczek, przyczepionych do monowarstwy. (A) – deuterowanie terminalnego alkinu, wymiana H na D, widmo wykazuje wzrost masy obserwowanych jonów o 1 Da. (B) – reakcja grupy alkinowej z jodobenzenem (sprzęganie Sonogashira), w widmie obecne jony adduktów fenyłowych [42].

Opisano wiele przykładów użycia powierzchni, pokrytych monowarstwami samorganizowanymi, jako bazy do przygotowania próbek MALDI [52, 53].

Jednym z pierwszych zastosowań SAM w technikach MALDI MS było kowalencyjne wiązanie przeciwciał bezpośrednio na powierzchni sondy MALDI [54], umożliwiające rozdziały na bazie powinowactwa bezpośrednio na sondzie z pominięciem etapu elucji.

Orlando [55] i współpracownicy zastosowali różne monowarstwy samorganizowane w analizie peptydów i białek, jako medium do ekstrakcji *on-probe* (bezpośrednio na sondzie) do fazy stałej SPE (ang. *solid-phase extraction*), wykorzystując oddziaływania hydrofobowe albo tworzenie par jonowych. Sondy MALDI, pokryte takimi warstwami nadają się do analizy bardzo małych objętości roztworów peptydowo-białkowych, nawet w wysokim stopniu zanieczyszczonych solami nieorganicznymi, detergentami, buforami, czynnikami solubilizującymi i chaotropowymi.

Dla poprawy zdolności wiążącej z podłożem zastosowano polimery szczepione na powierzchni warstwy SAM [56] w analizie zasolonych lub rozcieńczonych próbek białkowych. Modyfikacja powierzchni płytki MALDI różnymi grupami funkcyjnymi skutkuje wprowadzeniem miejsc hydrofobowych, anionowych lub kationowych, co znalazło zastosowanie w sekwencjonowaniu peptydów. Selekttywne wykrywanie fosforylowanych peptydów można uzyskać także przez użycie powierzchni z immobilizacją jonów metali względnie powierzchni polikationowych [57]. Hydrofobowe obrzeża z warstw SAM, wytwarzane metodą drukowania mikrokontaktowego [58], umożliwiają koncentrację plamek analitu na bardzo małej powierzchni. Brockman et al. [59] stwierdzili, że modyfikacja powierzchni złota sondy MALDI samoorganizującą warstwą hydrofobową z metylowymi grupami terminalnymi (CH_3 -SAM), złożoną z cząsteczek merkaptanu oktadecylowego (C18) pozwala na odwracalne wiązanie polipeptydów dzięki oddziaływaniom hydrofobowym oraz że taka modyfikacja powierzchni prowadzi do koncentracji analitu i zwiększa tolerancję na zasolenie próbki.

W pracach Ouyanga [60] i współpracowników użyto różnych warstw

samorganizowanych i/lub cienkich filmów ciekłych na hydrofilowych powierzchniach SAM jako podłożu do miękkiego osiadania jonów biomolekuł. Aktywność biologiczną tak osadzonych enzymów badano *in situ*, analizując metodą MALDI produkty testów biologicznych.

Warstwy SAM, zbudowane z kompleksów pochodnych pirydyny z rutenem, osadzonych na złocie, badali techniką MALDI Fukuo i współpracownicy [61]. Mouradian et al. [62] zastosowali w charakterze matrycy MALDI monowarstwę, zbudowaną z małych cząsteczek organicznych, pochłaniających dobrze promieniowanie UV, związanych z powierzchnią złota grupami tiolowymi. Jako monomerów, tworzących monowarstwę, użyli kwasu 6-merkaptonikotynowego (MNA), N-(4-merkaptofenylo)karbaminianu metylu (MMCP), kwasu α -merkapto-*p*-toluolowego (MPTA), 2-merkapto-5-nitropirydyny (MNP) i 4-acetamidotiofenolu (ATP) a wykrywając metodą MALDI MS substancjami były: peptyd LHRH (*luteinizing hormone releasing hormone*, 1180 Da), białka: insulina (5734 Da) i cytochrom C (12 327 Da) oraz oligonukleotydy d(ACGT)₂AC (3012 Da) i dT₁₀ (2980 Da). Najlepsze z pośród przebadanych monowarstw właściwości dla celów desorpcji/ionizacji i detekcji w MALDI białek i oligonukleotydów o średnich masach molowych wykazała SAM, złożona z MMCP. Na tym podłożu uzyskano sygnały jonów molekularnych o dobrej intensywności nawet od cząsteczek o tak dużej masie molowej jak cytochrom C (12 327 Da).

Monowarstwy o niskiej gęstości, zakończone terminalną grupą karboksylową –COOH, osadzone na złocie umożliwiają selektywne uporządkowanie białek, obdarzonych ładunkiem elektrycznym: awidyny i streptawidyny [63]. Powierzchnia złota, pokryta samoorganizującą monowarstwą maleimidową umożliwia selektywną immobilizację peptydów, zawierających cysteinę [64].

Użycie warstw samoorganizujących się w skojarzeniu z techniką MALDI-MS i/lub z innymi technikami powierzchniowymi jest obecnie powszechne w analizie skomplikowanych układów biologicznych, np. w konstrukcji chipów peptydowych [65], do badania protein znakowanych histydyną techniką rezonansu plazmonów powierzchniowych [66], wytwarzaniu mikromacierzy

proteinowych [67] czy do wzbogacania i oczyszczania *on-probe* („na sondzie”) białek i peptydów, znaczonych histydyną [68] jako znacznikiem powinowactwa.

Desorpcja/ionizacja na porowatym krzemie (*desorption/ionization on porous silicon*), DIOS

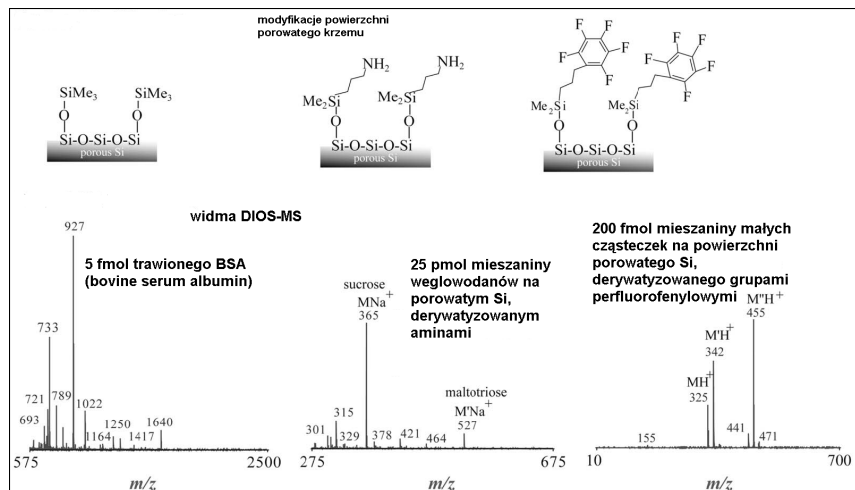
Szeroko stosowane są obecnie stałe podłoża, wspomagające jonizację w technice MALDI MS, używane oprócz albo zamiast matrycy. Najlepiej znana jest technika użycia jako podłoża „aktywnego” porowatego krzemu, który eliminuje konieczność stosowania matrycy organicznej, takiej jak np. kwas α -cyjano-4-hydroksycynamonowy CHCA. Technika ta jest popularnie określana jako DIOS (ang. *desorption/ionization on silicon*) [69] i pozwala na uzyskanie „czystych” widm, pozbawionych jonów tła, matrycy i jej klasterów, a zawierających wyłącznie jony pochodzące z próbki. Umożliwia ona analizę związków niskocząsteczkowych, które w innych technikach MALDI są trudne do badania ze względu na interferencję matrycy.

Porowaty krzem, uzyskany przez odpowiednie trawienie płytek krzemowych, np. metodą galwanostatyczną [70], ma dobrze rozwiniętą zewnętrzną warstwę powierzchni, co umożliwia nie tylko doskonałe osadzanie na niej analitu, ale i intensywną absorpcję promieniowania laserowego. Pochłonięta przez warstwę krzemu energia promieniowania ulega następnie transferowi do analitu, co ułatwia desorpcję i jonizację próbki. Ten transfer energii możliwy jest na drodze wibracyjnej lub też wskutek gwałtownego ogrzania porowatego krzemu z wytwarzaniem H_2 [71].

Zastosowania techniki DIOS-MS są potencjalnie bardzo szerokie z uwagi na tanią i dostępną podłoża krzemowych, jak i na możliwość zmian właściwości takich powierzchni. Hydrofobowa początkowo, po trawieniu, powierzchnia porowatego krzemu może być łatwo modyfikowana, np. derywatyzowana receptorami [72], które będą umożliwiały identyfikację ligandów. Zmodyfikowane płytki krzemowe mogą być użyte w zaawansowanych technologiach: do wytwarzania biochipów, mikromacierzy analitycznych, mikrofluidalnych reaktorów chemicznych i in. W spektrometrii mas ich zaletą jest duża czułość, wysoka tolerancja na zanieczyszczenia, brak jonów tła,

pochodzących z matrycy i duże możliwości modyfikacji powierzchni, zależnie od potrzeb.

Modyfikacja porowatego krzemu grupami perfluorofenylosililowymi i aminosililowymi prowadzi do podwyższenia czułości wykrywania Des-Arg-bradykininy metodą DIOS-MS [73]. Stosuje się różnorodne, dostępne handlowo, czynniki sililujące, specyficznie dobrane do typu analizowanej substancji, uzyskując często znaczne podwyższenie jakości widma MS. Niektóre modyfikacje powierzchni i uzyskane przy ich użycie widma DIOS-MS pokazano na rys. 13.



Rysunek 13. Funkcjonalizacja powierzchni porowatego krzemu dla selektywnej adsorpcji różnych analitów.

Widma masowe DIOS-MS pokazują wpływ grupy funkcyjalizującej na jakość wyników: **po lewej** - BSA (bovine serum albumine) digest na 8-miesięcznej powierzchni porowatego krzemu, funkcyjalizowanego grupami metylosililowymi; **pośrodku** - mieszanina węglowodanów, zawierająca maltotriozę [M'Na⁺ 527] i sacharozę [MNa⁺ 365], krzem funkcyjalizowany grupami aminosililowymi; **po prawej** - mieszanina związków niskocząsteczkowych, zawierająca midazolam [MH⁺ 325], propafenon [M'H⁺ 342] i werapamil [M''H⁺ 455], krzem funkcyjalizowany grupami perfluorosililowymi [74].

Użycie jako podłoża/matrycy modyfikowanej krzemionki

Zamiast krzemu można stosować porowaty dwutlenek krzemu jako podłoże do MALDI. Taki wariant techniki DIOS określa się jako DIOSD (*desorption/ionization on silicoon dioxide*).

Li i współpracownicy [75] zastosowali do analizowania małych cząsteczek w MALDI- TOF MS mezoporowatą krzemionkę, funkcjonalizowaną grupami 8-hydroksy-chinolinowymi. W przypadku stosowania modyfikowanych materiałów mezoporowatych należy zwrócić uwagę na ich właściwości, takie jak skład, rozmiar porów oraz powierzchniowe grupy funkcyjne. Na powierzchni porów mezoporowatej krzemionki znajduje się warstwa grup silanolowych (Si-OH), które mogą działać jako miejsca wiążące pożądane grupy funkcyjne kowalencyjnie z podłożem. W cytowanej pracy wyprażona krzemionka SBA-15 została poddana funkcjonalizacji 8-(3-(trietoksylopropoxy)-chinoliną 8QSi (produkt modyfikacji oznaczono SBA-15-8QSi) i zastosowana z sukcesem jako matryca MALDI do analizy niskocząsteczkowych cukrów, aminokwasów, metabolitów i miodu naturalnego. Grupy 8QSi wprowadzono na powierzchnię krzemionki dla intensywnej absorpcji energii lasera. Porównano widma MALDI-TOF sacharozy (jako modelowej cząsteczki organicznej o małej masie molowej: $C_{12}H_{22}O_{11}$, MW = 342), zmierzone przy użyciu jako matrycy: a) DHB, b) samej krzemionki SBA-15 i c) krzemionki modyfikowanej SBA-15-8QSi. W widmie sacharozy na matrycy DHB dominują jony pochodzące od matrycy, które w przypadku SBA-15 i SBA-15-8QSi są zupełnie wyeliminowane. Użycie krzemionki modyfikowanej skutkuje znacznym podwyższeniem intensywności i efektywności desorpcji/ionizacji analitu. Ma ona także duży wpływ na poprawę powtarzalności wyników. Jednym z najważniejszych czynników, które wpływają na powtarzalność widm MALDI, jest równomierne, jednorodne rozmieszczenie substancji na powierzchni płamki, poddawanej promieniowaniu lasera. Użycie jako matrycy krzemionki niemodyfikowanej nie sprzyja tej jednorodności, gdyż powierzchnia pokryta grupami silanolowymi Si-OH ma wysoką energię powierzchniową, tj. wysoką aktywność fizyczną i chemiczną. Wprowadzenie do krzemionki grup modyfikujących, zawierających pierścienie chinolinowe,

powoduje obniżenie energii powierzchniowej, m. in. przez zmniejszenie sił Coulomba, co poprawia homogenność dyspersji próbki na powierzchni i daje w efekcie doskonałą powtarzalność wyników pomiarowych.

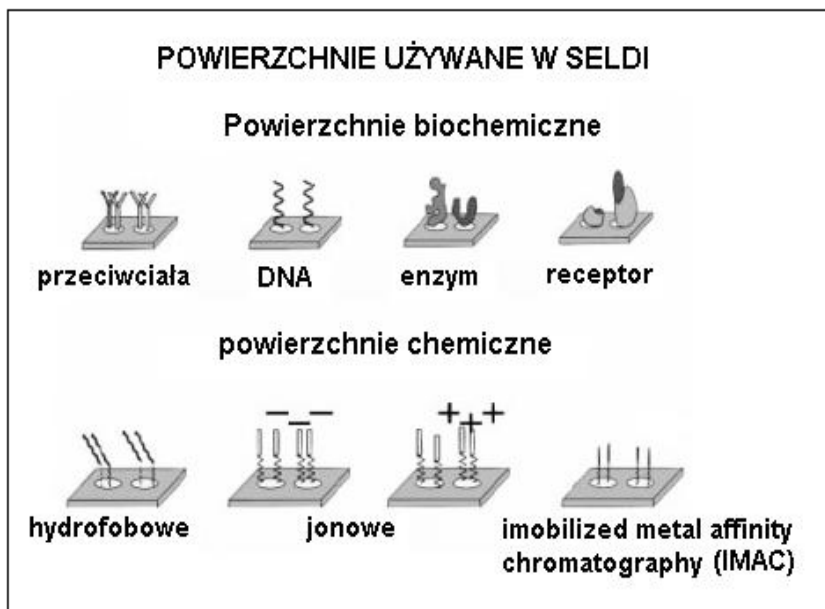
Modyfikowaną krzemionkę SBA-15-8QSi przetestowano również jako matrycę dla innych małych cząsteczek organicznych, tj. mieszaniny aminokwasów (L-arginina.HCl, L-histydyna, L-lizyna.HCl, L-feniloalanina), metabolitów (L-karnozyna, cytydyna) i cukrów (ksyloza, glukoza, sacharoza). W porównaniu z klasyczną matrycą DHB, użycie SBA-15-8QSi dało mniejszą interferencję matrycy, lepszą powtarzalność wyników (względne odchylenie standardowe RSD, ang. *relative standard deviation*, dla intensywności sygnałów było poniżej 29%) i obniżenie limitu detekcji do rzędu pikomoli (np. dla L-Arg-HCl limit wyniósł 8 pm).

Podstawy desorpcji/ionizacji laserowej wspomaganej powierzchnią (*Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization, SELDI*)

SELDI to specyficzna forma techniki spektrometrii mas z jonizacją przez desorpcję laserową, w której dużą rolę odgrywa medium, zawierające analit. Ma ono wpływ nie tylko na umożliwienie desorpcji i jonizacji substancji analizowanych, ale również uczestniczy w procesach oczyszczania, ekstrakcji, modyfikacji i wzbogacania analitu [76]. Rozwój SELDI wiąże się ściśle z postępami technik separacyjnych, zwłaszcza stosowanych dla próbek biologicznych i biochemicznych. Wśród wielu nowoczesnych technik, które przyczyniły się do rozwoju SELDI wymienić należy elektroforezę, techniki membranowe i chromatografię powinowactwa. Po rozdziale próbki pochodzenia biologicznego na żelu czy membranie, np. na nitrocelulozie lub difluoropoliwinylidenie (PVDF), można przenieść taką membranę na płytkę MALDI i wykonać analizę TOF-MS bezpośrednio z membrany. Stwierdzono przy tym, że niektóre substancje, np. białka, wiążą się z membraną tak silnie, że umożliwia to dość łatwe oczyszczanie analitu [77].

Hutchens i Yip [78] związali z podłożem agarowym jednoniciowy DNA, a następnie użyli tego modyfikowanego podłoża do wychwytywania laktoferryiny, glikoproteiny wiążącej żelazo, z badanego moczu. Przenoszenie podłoża

(membrany, żelu, wypełnienia kolumny) na płytkę MALDI było niedogodne eksperymentalnie, dlatego też następnym etapem było bezpośrednie pokrycie powierzchni płytki MALDI powłoką, która miała zdolność wychwytywania odpowiednich cząsteczek [79]. Można to było osiągnąć, tworząc monowarstwę samoorganizującą się na złocie. Brockman i Orlando [80] nanieśli na pokrytą złotem sondę MALDI ditiobis-(propionian sukcydimidylu) DSP, który utworzył monowarstwę, a następnie związali z nią kowalencyjnie przeciwciało IgG anty-biotynowe. Wykazali w ten sposób, że białka biotynylowane mogą zostać specyficznie związane z podłożem i oddzielone od pozostałych, niebiotynylowanych białek, a następnie oczyszczone przez odmywanie z podłoża zanieczyszczeń, np. nietłocznych soli i poddane analizie SELDI-TOF.



Prace Nelsona [81] nad rozwojem testów immunologicznych przy użyciu SELDI doprowadziły do metod identyfikacji markerów nowotworowych [82].

Podziękowanie

Praca finansowana ze środków na naukę w latach 2009-2012 jako projekt badawczy N 204 028636.

Literatura

1. J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse; Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules; *Science* **246**, 64-71 (1989)
2. F. Hillenkamp, M. Karas, R. C. Beavis, B. T. Chait; Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers; *Anal. Chem.* **63**, 1193A-1203A (1991)
3. S. D. Fuerstenau, W. H. Benner, J. J. Thomas, C. Brugidou, B. Bothner, G. Siuzdak; Mass spectrometry of an intact virus; *Angew. Chem. Int. Ed.* **40**, 541-544 (2001)
4. C. Fenselau, P. A. Demirev; Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry; *Mass Spectrom. Rev.* **20**, 157-171 (2002)
5. A. Kraj, J. Silberring, Proteomika, WChUJ, Kraków 2004
6. A. Kraj, J. Silberring, Proteomics, Introduction to methods and applications, Wiley, 2008
7. R. Ekman, J. Silberring, A.M. Westman-Brinkmalm, A. Kraj, Mass spectrometry, Instrumentation, interpretation and applications, Wiley, 2009
8. A. Manz, N. Pamme, D. Iossifidis, Bioanalytical Chemistry, Imperial College Press, London, 2004
9. D. A. Walters, M. P. Washburn, J. R. Yates III; An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics; *Anal. Chem.* **73**, 5683-5690 (2001)
10. <http://cbs.umn.edu/msp/instrumentation/maldi.shtml>
11. A. M. Schaiberger, J. A. Moss; Optimized sample preparation for MALDI mass spectrometry analysis of protected synthetic peptides; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **19** (4), 614-619, 2008
12. Rashidezadeh H, Baochuan G; "Investigation of metal attachment to

- polystyrenes in matrix-assisted laser desorption ionization”, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **9**, 1998, 724-730
13. I. A. Mowat, R. J. Donovan, Metal-ion attachment to nonpolar polymers during laser desorption/ionization at 337 nm, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **9**, 1995, 82
 14. S. D. Hanton, P. A. Cornelio Clark, K. G. Owens; Investigations of matrix-assisted laser desorption/ionization sample preparation by time-of flight secondary ion mass spectrometry; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **10**, 104-111, 1999
 15. K. J. Wu, R. W. Odom; Matrix-Enhanced Secondary Ion Mass Spectrometry: A method for molecular analysis of solid surfaces; *Anal. Chem.* **68**, 873-882, 1996
 16. M. Karas, F. Hillenkamp; Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 Daltons; *Anal. Chem.* **60**, 2299-2301, 1988
 17. H. P. Wu, C. L. Su, H. C. Chang, W. L. Tseng; Sample-first preparation: A method for surface-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis of cyclic oligosaccharides; *Anal. Chem.* **79**, 6215-6221, 2007
 18. J. R. Whiteaker, C. C. Fenselau, D. Fetzolf, D. Steele, D. Wilson; Quantitative determination of heme for forensic characterization of *Bacillus* Spores using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry; *Anal. Chem.* **76**, 2836-2841, 2004
 19. I. K. Perera, J. Perkins, S. Kantartzoglou; Spin-coated samples for high resolution matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of large proteins, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **9**, 180-187, 1995
 20. F. Xiang, R. C. Beavis; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **8**, 199-204, 1994
 21. D. I. Papac, A. Wong, A. J. S. Jones; Analysis of acidic oligosaccharides and glycopeptides by matrix-assisted laser desorption/ionization time-

- of-flight mass spectrometry; *Anal. Chem.* **68**, 3215-3223, 1996
22. O. Vorm, P. Roepstorff, M. Mann; Improved resolution and very high sensitivity in MALDI TOF of matrix surfaces made by fast evaporation; *Anal. Chem.* **66**, 3281-3287, 1994
23. J. P. Speir, I. J. Amster; Substrate-assisted laser desorption of neutral peptide molecules; *Anal. Chem.* **64**, 1041-1045, 1992
24. A. Tholey, E. Heinze; Ionic (Liquid) Matrices for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry – Applications and Perspectives; *Anal. Bioanal. Chem.* **386**, 24-37, 2006
25. R. Skelton, F. Dubois, R. Zenobi; *Anal. Chem.* **72**, 1707-1710, 2000.
26. J. A. Crank, D. W. Armstrong; Toward a second generations of Ionic Liquid Matrices (ILMs) for MALDI-MS of peptides, proteins and carbohydrates; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **20**, 1790-1800, 2009
27. T. Kinumi, T. Saisu, M. Takayama, H. Niwa; Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry using an inorganic particle matrix for small molecule analysis. *J. Mass Spectrom.*, **35**, 417–422, 2000
28. Z. Guo, Q. Zhang, H. Zou, B. Guo, J. Ni; A method for the analysis of low-mass molecules by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **74**, 1637–1641, 2002
29. L. Michalak, K. J. Fisher, D. S. Alderdice, D. R. Jardine, G. D. Willett; C60-Assisted Laser Desorption-Ionization Mass Spectrometry.; *Org. Mass Spectrom.* **29**, 512–515, 1994
30. F. O. Ayorinde, K. Garvin, K. Saeed; Determination of the fatty acid composition of saponified vegetable oils using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **14**, 608–615, 2000
31. F. O. Ayorinde, P. Hambright, T. N. Porter, Q. L. Keith Jr.; Use of meso-Tetrakis(Pentafluorophenyl) Porphyrin as a Matrix for Low Molecular Weight Alkylphenol Ethoxylates in Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **13**,

2474–2479, 1999

32. Z. Shen, J. J. Thomas, C. Averuj, K. M. Broo, M. Engelhard, J. E. Cromwell, M. G. Finn, G. Siuzdak; Porous silicon as a versatile platform for laser desorption/ionization mass spectrometry; *Anal. Chem.* **73**, 612-619, 2001
33. C. S. Lee, J. H. Lee, K. K. Kang, H. M. Song, I. H. Kim, H. K. Rhee, B. G. Kim; Laser desorption/ionization –mass spectrometry using mesoporous silicate as matrix for the analysis of various molecules; *Biotechnol. Bioprocesses Eng.* **12**, 174-179, 2007
34. C. S. Lee, K. K. Kang, J. H. Kim, Y.G. Kim, H. W. Shim, T. S. Hwang, H. K. Rhee, B. G. Kim; Analysis of small molecules by desorption/ionization on Mesoporous Silicate (DIOM)-Mass Spectrometry (MS), *Microporous Mesoporous Mater.* **98**, 200-207, 2007
35. X. Wen, S. Dagan, V. H. Wysocki; Small-Molecule Analysis with Silicon-Nanoparticle-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* **79**, 434–444, 2007
36. S. Xu, Y. Li, H. Zou, J. Qiu, Z. Guo, B. Guo; Carbon Nanotubes as Assisted Matrix for Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry; *Anal. Chem.* **75**, 6191–6195, 2003
37. J. A. McLean, K. A. Stumpo, D. H. Russell, Size-Selected (2–10 nm) Gold Nanoparticles for Matrix Assisted Laser Desorption Ionization of Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 5304–5305, 2005
38. D. Schleuder, F. Hillenkamp, K. Strupat; IR-MALDI-mass analysis of electroblotted proteins directly from membrane: comparison of different membranes, application to on-membrane digestion, and protein identification by database searching; *Anal. Chem.* **71**, 3238-3247 (1999)
39. J. A. Blackledge, A. J. Alexander; Polyethylene membrane as a sample support for direct matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometric analysis of high mass proteins; *Anal. Chem.* **67**, 843-848 (1995)

40. M. M. Vestling, C. Fenselau; Poly(vinylidene difluoride) membranes as the interface between laser desorption mass spectrometry, gel electrophoresis, and in situ proteolysis; *Anal. Chem.* **66**, 471-477 (1994)
41. <http://www.molekularne.info/monowarstwy.html>
42. M. Mrksich, G. M. Whitesides; Using self-assembled monolayers that present oligo (ethylene glycol) groups to control the interactions of proteins with the surfaces; w: "Poly(ethylene glycol): Chemistry and biological applications" *ACS Symposium Series 680*; 361-373, 1997
43. Y. Xia, J. A. Rogers, K. E. Paul, G. M. Whitesides; Unconventional methods for fabricating and patterning nanostructures; *Chem. Soc. Rev.* **99**, 1823-1848, 1999
44. J. L. Trevor, K. R. Lykke, M. J. Pellin, L. Hanley; Two-laser mass spectrometry of thiolate, disulfide and sulfide self-assembled monolayers; *Langmuir* **14**, 1664-1673, 1998
45. W. Gong, V. I. Elitzin, S. Janardhanam, C. L. Wilkins, I. Fritsch; Effect of laser fluence on laser desorption mass spectra of organothiol self-assembled monolayers on gold; *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 769-770, 2001.
46. M. Mrksich; Mass Spectrometry of Self-Assembled Monolayers: A New Tool for Molecular Surface Science; *ACS Nano* **2**, 7-18, 2008
47. „Mass Spectrometry in Medicinal Chemistry”, Vol. 36, Ed. Klaus Wanner, Georg Höfner; Wiley 2007, ISBN 978-3-527-31456-0
48. W. S. Yeo, M. Mrksich; Electroactive substrates that reveal aldehyde groups for bio-immobilization; *Adv. Mater.* **16**, 1352-1356, 2004
49. B. T. Houseman, E. S. Gawalt, M. Mrksich; Maleimide-functionalized self-assembled monolayers for the preparation of peptide and carbohydrate biochips; *Langmuir* **19**, 1522-1531, 2003
50. D. H. Min, W. Tang, M. Mrksich; Chemical screening by mass spectrometry to identify inhibitors of Anthrax Lethal Factor; *Nat. Biotechnol.* **22**, 717-720, 2004
51. J. Li, P. S. Thiara, M. Mrksich; Rapid evaluation and screening of interfacial reactions on self-assembled monolayers; *Langmuir* **23**,

11826-11835, 2007

52. Y. Xu, M. L. Bruening, J.T. Watson; Non-specific, on-probe cleanup methods for MALDI-MD samples; *Mass Spectrom. Rev.* **22**, 429-440, 2003
53. N. Tang, P. Tornatore, S. R. Wienberger; Current developments in SELDI affinity technology; *Mass Spectrom. Rev.* **23**, 34-44, 2004
54. A. H. Brockman, R. Orlando; Probe-immobilized affinity chromatography/ mass spectrometry; *Anal. Chem.* **67**, 4581-4585, 1994
55. M. E. Warren, A. H. Brockman, R. Orlando; On-probe solid-phase extraction/MALDI-MS using ion-pairing interactions for the cleanup of peptides and proteins; *Anal. Chem.* **70**, 3757-3761, 1998
56. Y. Xu, J. T. Watson, M. L. Bruening; Patterned monolayer /polymer films for analysis of dilute or salt-contaminated protein samples by MALDI-MS, *Anal. Chem.* **75**, 185-190, 2003
57. Y. Xu, J. T. Watson, M. L. Bruening; Use of polymer –modified MALDI-MS probes to improve analyses of protein digest and DNA; *Anal. Chem.* **76**, 3106-3111, 2004
58. J. L. Wilbur, A. Kumar, H. A. Biebuyck, E. Kim,. G. M. Whitesides; Microcontact printing of self-assembled monolayers: applications in microfabrication; *Nanotechnology* **7**, 452-457, 1996
59. A. H. Brockman, B. S. Dodd, R. Orlando; A desalting approach for MALDI-MS using on-probe hydrophobic self-assembled monolayers, *Anal. Chem.* **69**, 4716-4720, 1997
60. Z. Ouyang, Z. Takats, T. A. Blake, B. Gogolan, A. J. Guymon, J. M. Wiseman, J. C. Oliver, V. J. Davisson, R. G. Cooks; Preparing protein microarrays by soft landing of mass-selected ions; *Science* **301**, 1351-1354, 2003
61. T. Fukuo , H. Monjushiro , H. Hong , M. Haga , R. Arakawa ; Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of self-assembled monolayers of ruthenium complexes on gold; *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **14**(14), 1301-1314, 2000

62. S. Mouradian, C. M. Nelson, L. M. Smith; A self-assembled monolayer for UV-MALDI mass spectrometry; *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 8639-8645, 1996
63. L. Mu, Y. Liu, S. Zhang, B. Liu, J. Kong; Selective assembly of specifically charged proteins on electrochemically switched surface, *New J. Chem.* **29**, 847, 2005
64. D.-H. Min, W.-S. Yeo, M. Mrksich, A method for connecting solution-phase enzyme activity assays with immobilized format analysis by mass spectrometry, *Anal. Chem.* **76**, 3923, 2004
65. D.-H. Min, J. Su, M. Mrksich; Profiling kinase activities by using a peptide chip and mass spectrometry; *Angew. Chem. Int. Ed.* **43**, 5973-5977, 2004
66. G. B. Sigal, C. Bamdad, A. Barberis, J. Strominger, G. M. Whitesides; A self-assembled monolayer for the binding and study of histidine-tagged proteins by surface plasmon resonance; *Anal. Chem.* **68**, 490-497, 1996
67. G. J. Wegner, H. J. Lee, G. Mariott, R. M. Corn; Fabrication of histidine-tagged fusion protein arrays for surface plasmon resonance imaging studies of protein-protein and protein-DNA interactions; *Anal. Chem.* **75**, 4740-4746, 2003
68. J. Shen, T. Ahmed, A. Vogt, J. Wang, J. Severin, R. Smith, S. Dorwin, R. Johnson, J. Harlan, T. Holzman; Preparation and characterization of nitrilotriacetic-acid-terminated self-assembled monolayers on gold surfaces for matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry analysis of proteins and peptides; *Anal. Biochem.* **345**, 258-269, 2005
69. J. Wei, J. M. Buriak, G. Siuzdak; Desorption-ionization mass spectroscopy on porous silicon; *Nature* **399**, 243, 1999
70. A. G. Cullis, L. T. Canham, P. D. J. Calcott; The structural and luminescence properties of porous silicon; *J. Appl. Phys.* **82**, 909-965, 1997
71. Y. H. Ogata, F. Kato, T. Tsuboi, T. J. Sakka; Changes in the environment

- of hydrogen in porous silicon with thermal annealing; *Electrochem. Soc.* **145**, 2439-2444, 1998
72. M. O'Donnell, K. Tang, H. Koster, L. C. Smith; High density covalent attachment of DNA to silicon wafers for analysis by MALDI-TOF mass spectrometry; *Anal. Chem.* **69**, 2438-2443, 1997
73. S. A. Trauger, E. P. Go, Z. Shen, J. V. Apon, B. J. Compton, E. S. P. Boyvier, M. G. Finn, G. Siuzdak; High sensitivity and analyte capture with desorption/ionization mass spectrometry on silylated porous silicon, *Anal. Chem.* **76**, 4484, 2004
74. F. Hillenkamp, J. Peter-Katalinic [editors], MALDI-MS, A practical guide to instrumentation, methods and applications; Wiley-VCH 2007, ISBN 978-3-527-31440-9
75. X. Li, X. Wu, J. M. Kim, S. S. Kim, M. Jin, D. Li; MALDI-TOF-MS analysis of small molecules using modified mesoporous material SBA-15 as assisted matrix; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **20**, 2167-2173, 2009.
76. M. Merchant, S. R. Weinberger; Recent advances in surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry; *Electrophoresis* **21**, 1164-1177, 2000
77. M. Karas, U. Bahr, A. Ingendoh, E. Nordhoff, B. Stahl, K. Strupat, F. Hillenkamp; Principles and applications of matrix-assisted UV-laser desorption/ionization mass spectrometry; *Anal. Chim. Acta* **241**, 175-185, 1990
78. T. W. Hutchens, T. T. Yip; New desorption strategies for the mass spectrometric analysis of macromolecules; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **7**, 576-580, 1993
79. A. H. Brockman, R. Orlando; Probe-immobilized affinity chromatography/mass spectrometry; *Anal. Chem.* **67**, 4581-4585, 1994.
80. A. H. Brockman, R. Orlando; New immobilization chemistry for probe affinity mass spectrometry; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **10**, 1460-1463, 1999
81. D. Nedelkov, R. W. Nelson; Surface Plasmon Resonance Mass

- Spectrometry: Recent progress and outlooks; *Trends Biotechnol.* **21**, 301-305, 2003
82. J. Y. Engwegen, M. C. Gast, J. H. Schellens, J. H. Beijnen; Clinical proteomics: Searching for the better tumor markers with SELDI-TOF Mass Spectrometry; *Trends Pharmacol. Sci.* **27**, 251-259, 2006

Rozdział 2

Właściwości warstw samoorganizujących na powierzchni złota - chemiczna modyfikacja i wybrane zastosowania

Paweł Niedziałkowski, Tadeusz Ossowski, Justyna Czupryniak,
Dorota Zarzeczańska

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

Wprowadzenie

Samoorganizujące warstwy (SAMs) od wielu lat cieszą się szczególnym zainteresowaniem ze względu na ich możliwość praktycznego zastosowania jako biosensory, które znajdują wykorzystanie nie tylko w chemii supramolekularnej, ale także w nanotechnologii i elektronice. Szczególnie badania prowadzone na przestrzeni ostatnich lat, podążające w kierunku miniaturyzacji i budowy nowych mikrosystemów z wykorzystaniem monowarstw samoorganizujących doprowadziły do rozkwitu nowej dziedziny jaką jest elektronika biomolekularna [1], która wykorzystuje specyficzne właściwości materiałów biomolekularnych.

Zjawisko tworzenia się samoorganizujących warstw stanowi nieograniczoną możliwość funkcjonalizowania powierzchni elektrod metali szlachetnych biomolekułami organicznymi zawierającymi w swojej budowie grupy nazywane stabilizującymi grupami kotwiczącymi, którymi są przede wszystkim grupa tiolowa, disulfidowa i silanowa, rzadziej karboksylowa i aminowa. Szczególnym zainteresowaniem cieszą się molekuły zakończone grupami tiolowymi, które ze względu na duże pokrewieństwo do metali, znalazły najwięcej zastosowań jako biosensory oraz biomolekularne urządzenia elektroniczne. Związki tiolowe tworzą najmocniejsze i najstabilniejsze warstwy samoorganizujące (SAMs)

głównie na powierzchni złota, ale także na takich metalach jak srebro, miedź, platyna, czy pallad lub powierzchni węgla [2].

W ostatnich latach warstwy samoorganizujące (SAMs) stały się jednym z najważniejszych celów badawczych wielu ośrodków naukowych. Skupiają się one głównie na ustaleniu struktury molekularnej, składu oraz makroskopowych właściwości utworzonych monowarstw. Utworzone monowarstwy stanowią organiczne powierzchnie, których struktura oraz właściwości mogą być zróżnicowane. Kontrola rozmiarów tworzonych monowarstw ma istotny wpływ na charakter oraz ich właściwość fizykochemiczne, co pozwala na zrozumienie fundamentalnych zjawisk zachodzących na powierzchniach [3]. Na właściwości tworzonych monowarstw bardzo istotny wpływ ma również rodzaj końcowych grup kotwiczących. Fenomen ten zostaje wykorzystywany w celu tworzenia określonych monowarstw w żądanych celach aplikacyjnych [4]. Zjawisko selektywność biomolekuł (przeciwciał, enzymów, kwasów nukleinowych) lub układów biologicznych (receptorów, lub dużych układy komórek) znajduje szerokie zastosowania do budowy nowych sensorów, w których część układu biologicznego zintegrowana jest z elektrochemicznym, optycznym bądź piezoelektrycznym przełącznikiem [5].

Warstwy samoorganizujące (SAMs)

W przeciągu ostatnich dziesięciu lat nastąpił znaczący postęp nad badaniami samoorganizujących warstw amfifilowych cząsteczek. Możliwość kontroli grubości monowarstwy, modyfikacja struktury oraz wpływ na właściwości zewnętrznej powierzchni tworzonych monowarstw umożliwił znaczny postęp w kierunku rozwoju powłok, co spowodowało z kolei postęp w kierunku projektowania i budowy nowych urządzeń elektronicznych i optycznych. Samoorganizujące warstwy (SAMs) porządkują się spontanicznie przez adsorpcję na powierzchni, ze szczególnym powinowactwem określonych grup do konkretnego podłoża. Warstwy te umożliwiają potencjalne dostosowanie i zoptymalizowanie właściwości powierzchni dla zastosowań technologicznych i umożliwiają badania nad zjawiskami powierzchniowymi. Zainteresowanie

nad samoorganizującymi warstwami skupia się nad wieloma związkami organicznymi, szczególnie nad związkami zawierającymi grupy karboksylowe kotwiczone na powierzchni tlenków metali (glinu, srebra), zawierające grupy hydroksylowe i aminowe kotwiczone na powierzchni platyny oraz związkami krzemoorganicznymi kotwiczonymi na hydroksylowych powierzchniach. Szczególnym zainteresowaniem cieszą się związki siarkoorganiczne, które mogą być kotwiczone na powierzchni złota, srebra miedzi, niklu oraz powierzchni półprzewodników [6]. Znaczna większość badań nad warstwami samoorganizującymi opiera się na wykorzystaniu monowarstw złota, ponieważ utworzone tego typu warstwy tworzą najtrwalsze połączenia strukturalne, o bardzo dobrym uporządkowaniu. Dodatkowym zaletą otrzymywania monowarstw złota jest szeroka dostępność substratów oraz łatwość przygotowywania analiz.

W 1983 roku opublikowano pierwszą pracę dotyczącą otrzymywania i właściwości monowarstw na powierzchni złota [7]. Wykazano, że dialkilo i disulfidowe związki tworzą uporządkowane pojedyncze warstwy na powierzchni złota. Zjawisko adsorpcji związków tiolowych, sulfidowych i disulfidowych na powierzchni złota wynika głównie z jego właściwości. Złoto jest metalem stosunkowo obojętnym i nie tworzy stabilnych tlenków na swojej powierzchni oraz specyficznie oddziałuje z siarką tworząc stabilne monowarstwy [8]. W 1989 roku przedstawiono pierwsze prace ukazujące wpływ oddziaływania grup wiążących na zdolność tworzenia monowarstw na powierzchni złota. Dowiodły one, że pochodne tiolowe oddziałują najmocniej ze złotem tworząc najstabilniejsze zorganizowane monowarstwy [9].

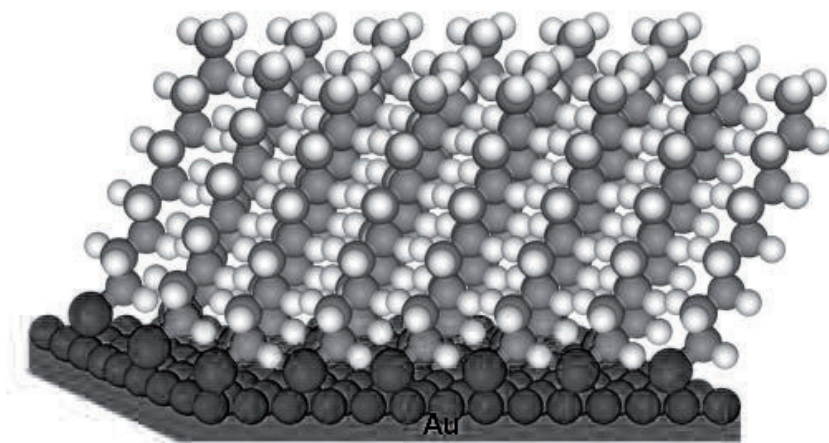
Modyfikacja powierzchni złota warstwami samoorganizującymi z wykorzystaniem pochodnych tiolowych pozwala na nieograniczoną możliwość manipulacji architektury powierzchni. Wprowadzenie terminalnych grup łańcuchów tiolowych stwarza możliwość wykorzystania nieograniczonej ilości związków organicznych w celu modyfikacji powierzchni różniących się właściwościami fizycznymi i chemicznymi. Istnieje również możliwość otrzymywania bardziej złożonych układów w wyniku wykorzystania różnych grup terminalnych, bądź użycia łańcuchów węglowych różniących się

długością. Właściwości fizyczne i chemiczne modyfikowanych powierzchni pozwalają na wykorzystanie ich w wielu dziedzinach, dzięki czemu znajdują szerokie zastosowanie w takich procesach jak: kataliza, ochrona przed korozją, smarowaniu, zwiększeniu przyczepności, zwilżalności, elektrochemii.

Procedura otrzymywania monowarstw na powierzchni złota nie jest skomplikowana. Aby utworzyć monowarstwę alkanotiolu, należy czyste podłoże złota, wolne od zanieczyszczeń organicznych zanurzyć w rozcieńczonym roztworze (ok. 10^{-3}) roztworu tiolu w organicznym rozpuszczalniku, w temperaturze pokojowej. Czas zanurzenia zazwyczaj jest uzależniony od rodzaju warstwy i wynosi od kilku minut do kilku godzin, a nawet kilku dni. Alkanotiole mogą być również przygotowane z fazy gazowej. Do tego celu wykorzystuje się komorę ultra wysokiej próżni UHV (Ultra High Vacuum), w której początkowo przeprowadza się oczyszczanie powierzchni, a następnie poprzez kontrolowany strumień natrysku substratów nanosi się alkanothiol na powierzchnie złota, miki, silikonu lub monokryształów w zależności od aplikacji otrzymywanej monowarstwy.

Chemisorpcja tiolu (RSH) na powierzchni złota zakłada tworzenie wiązania RS-Au. Mechanizm reakcji przyłączania związków tiolowych do powierzchni nie jest do końca zrozumiały, jednakże jego podstawy zostały poznane dzięki pomiarom z wykorzystaniem spektroskopii fotoelektronów w zakresie promieniowania X (X-ray Photoelectron Spectroscopy), który potwierdza tworzenie się tiolanów na powierzchni metalu [10]. Reakcja ta wymaga związanie wydzielającego się wodoru, który prawdopodobnie wiązany jest w wodór cząsteczkowy. Z kinetycznego punktu widzenia proces ten składa się z dwóch odrębnych faz: bardzo szybkiego procesu adsorpcji cząsteczki na podłoże, które trwa kilka minut oraz wolniejszego procesu (organizacji struktury), który może trwać nawet kilka godzin. W pierwszym etapie, kąty i rozmiary składników warstwy zbliżone są do ich maksimum, natomiast pod koniec drugiego etapu osiągają one żądaną wartość. Podczas procesu tworzenia monowarstw powstają gęsto upakowane, termodynamicznie stabilne i mechanicznie stałe, wolne przestrzenie międzymolekularne, które są rezultatem

samoorganizacji cząsteczek na powierzchni. Łańcuchy węglowodorowe ulegają *trans*-rozszerzeniu, poczym nachylają się pod kontem 25-30° do powierzchni, co jest spowodowane oddziaływaniami van der Waals'a pomiędzy poszczególnymi łańcuchami które oddalone są od siebie o około 5Å (wiązanie S-S). W przypadku gdyby łańcuchy te byłyby skierowane prostopadle odległość ta była by większa i wynosiła około 4.6Å [11]. W pierwszym etapie, po wprowadzeniu alkanotiooli na powierzchnię tworzą się bardzo gęsto upakowane aglomeraty, poczym następuje proces samoorganizacji. Prawdopodobnie nie ma reguł pierwszeństwa tworzenia quasi krystalicznych monowarstw. Gdy cząsteczki są na tyle blisko siebie, dyspersyjne oddziaływanie sił van der Waals'a powoduje rozdzielenie poszczególnych łańcuchów molekuł między siebie (rys. 1).



Rysunek 1. Schemat monowarstwy *n*-dodekanotiołu na płaskim podłożu złota. Samoorganizacja utrzymywana jest przez przyłączenie atomów siarki do powierzchni złota oraz oddziaływań sił van der Waals'a pomiędzy sąsiadującymi ze sobą łańcuchów węglowodorowych.

Głównym kryterium determinującym poprawne otrzymanie monowarstw jest pomiar kąta kontaktu monowarstwy z powierzchnią. W przypadku molekuł

z długimi łańcuchami alkilowymi kąt nachylenia utworzonej monowarstwy, powinien wynosić odpowiednio 100° w przypadku wody i 40° w przypadku heksadekanu. Dla alkanów zawierających powyżej 10 jednostek $-\text{CH}_2-$ w łańcuchu alkilowym wartości te wynoszą od $111-114^\circ$ dla wody i $45-48^\circ$ dla heksadekanu. Dla krótszych łańcuchów utworzone kąty są coraz mniejsze. Tendencja ta może wynikać nie tylko z niedoskonałości podłoża metalicznego, ale też z niedoskonałości utworzonych monowarstw [12, 13]. Pomiar kątów kontaktu monowarstwy z powierzchnią stanowi jej chemiczny wyznacznik [14], wskazujący na jej gęstość oraz orientację.

Spektroskopia w podczerwieni IRAS (*Infrared Reflection-Absorption Spectroscopy*), jest również bardzo użyteczną techniką, często wykorzystywaną w badaniu powierzchni monowarstw, dostarczającą informacji na temat lokalnego upakowania warstwy łańcuchami alkilowymi [15]. Badania te wskazują na różny stopień upakowania powierzchni nadający jej charakter krystaliczny, bądź ciekły w zależności od występujących oddziaływań. Podczas gdy na powierzchni występują długie łańcuchy alkilowe staje się ona bardziej upakowana i zoorganizowana ze względu na większy wpływ oddziaływań van der Waals'a. Analizy FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) dowodzą, że monowarstwy utworzone przez krótsze łańcuchy alkilowe zawierające 9, bądź mniej atomów węgla w łańcuchu tworzą powłoki o charakterze cieczy, natomiast długie alkanotiole zawierające powyżej 10 atomów tlenu w łańcuchu tworzą krystaliczne powierzchnie.

Do oznaczania grubości oraz właściwości optycznych i morfologii powierzchni monowarstw poprzez pomiary zmiany stanu polaryzacji światła spolaryzowanego po jego odbiciu od badanej próbki wykorzystywana jest ellipsometria [16].

Monowarstwy zawierające długie łańcuchy alkilowe tworzą skuteczną barierę przeniesienia elektronu oraz przenikania jonów [17]. Efektywność utworzonej bariery jest obniżona w przypadku, nieskutecznie utworzonej monowarstwy, lub gdy monowarstwa ta utworzona jest z krótkich łańcuchów alkilowych. Szczątkowa elektroaktywność elektrod pokryta monowarstwami

długich łańcuchów alkilowych na poziomie nano, lub mikroskopowym jest częstą metodą oceny poprawnego nałożenia monowarstwy.

We wczesnych studiach nad symetrią alkanotiooli na powierzchni złota, Strong i Whitesides [18] wykorzystując zjawisko dyfrakcji elektronów wykazali, cząsteczka dokosane-1-tiolu ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{21}\text{SH}$) zakotwiczonego na złocie jest umieszczona centralnie na powierzchni oraz, że posiada on symetrię heksagonalną. Dowiedziono również, że odległości pomiędzy dwoma wolnymi miejscami na powierzchni wynoszą $4.99\text{\AA}$, a odległości pomiędzy zakotwiczonymi dwoma atomami siarki wynoszą $4.97\text{\AA}$.

Spektroskopia fotoelektronów w zakresie promieniowania X (X-ray Photoelectron Spectroscopy) jest bardzo powszechnym narzędziem charakteryzacji struktury molekularnej warstw organicznych, w celu potwierdzenia obecności pożądaných elementów i oceny składu atomowego. W metodzie tej atomowe współczynniki muszą być jednak interpretowane z dużą ostrożnością, ponieważ fotoelektrony pochodzące z atomów, przy powierzchni mogą być osłabiane przez pokrywający materiał. Sygnał siarki jest również osłabiony z powodu nieelastycznego rozpraszania fotoelektronów przez monowarstwę.

Mechanizm tworzenia się warstw samoorganizujących

Na mechanizm tworzenia się warstw samoorganizujących na powierzchni metalicznej wpływa wiele czynników zarówno kinetycznych, jak i termodynamicznych. Pomimo, że dynamika samoorganizacji nie jest dotąd jeszcze wyjaśniona, wiadomo, że na proces ten wpływają parametry energetyczne determinujące tworzenie się wiązania siarka-metal, jak i niekowalencyjne oddziaływania występujące w bocznych grupach organicznych. W większości przypadków, określenie parametrów położenia siarki na powierzchni metalu definiuje położenie, istotnych dla geometrii przestrzennej całej cząsteczki wolnych przestrzeni międzycząsteczkowych. Organizacja warstwy organicznej jest efektem sił międzycząsteczkowych, występujących w bocznych fragmentach molekuly, na które wpływają oddziaływania van der Waals'a, i oddziaływania wodorowe, dlatego też bardzo istotna jest budowa organiczna molekuly

kotwiczącej. Wpływ grup bocznych oraz efekt zatłoczenia sterycznego grup organicznych może spowodować mniejsze osadzenie się atomów siarki na powierzchni metalu (powierzchnia ta w przypadku złota wynosi $\sqrt{3} \cdot \sqrt{3}$ i promieniu 30° [19]), a co za tym idzie defekt utworzenia warstwy samoorganizującej [20].

Termodynamiczna stabilność związków siarkoorganicznych zaadsorbowanych na powierzchni złota zależna jest od natury struktury organicznej przyłączonego związku. Związki długo-łańcuchowe zawierające 10, bądź więcej atomów węgla łańcuchu znajdują szersze zastosowania aplikacyjne, niż ich odpowiedniki z mniejszą ilością atomów węgla w łańcuchu węglowym. Uważa się, że związki te tworzą fazę przejściową, która tworzy zarodki stanowiące podwaliny do dalszego wzrostu i wyższego pokrycia warstw samoorganizujących, o dużym uporządkowaniu strukturalnym. Związki te formują gęsto upakowane struktury ukierunkowane w kierunku poziomym, które stanowią podwaliny do dalszego tworzenia się uporządkowanych warstw samoorganizujących.

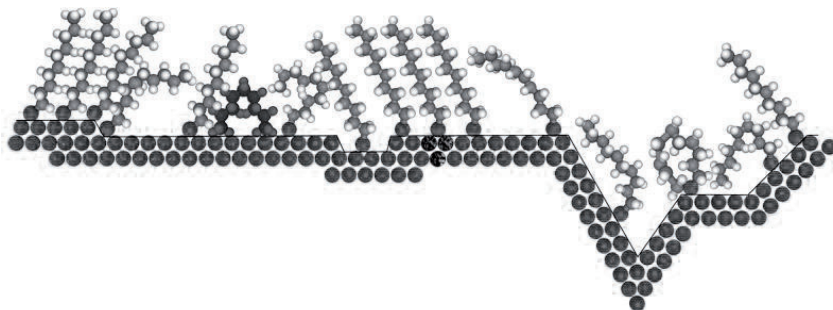
Tworzenie się warstw samoorganizujących na powierzchni złota w fazie gazowej obejmuje również proces tworzenia się niekryształicznych uporządkowanych warstw, opierającym się głównie na procesie chemisorpcji [21].

Czynniki wpływające na tworzenie się warstw SAMs oraz ich defekty.

Na równomierne rozmieszczenie związku chemicznego na powierzchni metalu, jego gęstość, strukturę i upakowanie ma wpływ wiele parametrów, na które składają się takie czynniki jak: rodzaj rozpuszczalnika, temperatura, stężenie związku absorbowanego, czas zanurzania powierzchni w roztworze, czystość substancji adsorbowanej, obecność tlenu roztworze, natura i rodzaj przygotowanej powierzchni, czystości substratu oraz długość łańcucha. Dlatego też, ze względu na złożoność parametrów wpływających na proces samoorganizacji istnieje możliwość racjonalnego projektowania sposobu otrzymywania warstw samoorganizujących.

Zazwyczaj struktury warstw samoorganizujących (SAMs) zawierają wady, których specyfika zależy w głównej mierze od rodzaju podłoża oraz

wady, których istnienie można wyeliminować. Wady te głównie wynikają z niedostatecznej czystości użytych substratów i używanych roztworów oraz od rodzaju techniki i metody przygotowania monowarstwy (rys. 2).



Rysunek 2. Schemat zewnętrznych i wewnętrznych wad występujących w samoorganizujących monowarstwach. a) defekty spowodowane nierównościami powierzchni złota, b) defekty spowodowane zanieczyszczeniami na powierzchni złota, c) defekty spowodowane deformacjami powierzchni złota, d) defekty spowodowane zanieczyszczeniami powierzchni, e) defekty spowodowane pękniętą powierzchnią [20].

Bardzo często zdarza się, że użyte powierzchnie, służące do wytworzenia monowarstw zawierają dużo defektów. Polikrystaliczne złote powierzchnie nierzadko zawierają na swojej powierzchni różnego rodzaju nieregularność, które z kolei są przyczyną defektów wytwarzanych monowarstw [22].

Usuwanie SAMs z powierzchni

Istnieje wiele technik pozwalających na usunięcie utworzonych warstw z powierzchni złota, srebra, lub innych. Termiczna desorpcja i czyszczenie jonowe [23] to najpopularniejsze metody usuwania monowarstw w środowisku wysokiej próżni. Ze względu kruchość większości otrzymywanych monowarstw, bardzo popularną metodą jest możliwość polerowania powierzchni metalicznej w celu usunięcia wytworzonej warstwy. Powszechne oksydanty lub reduktory takie jak stężone kwasy, lub zasady, bądź też bardzo popularny roztwór stężonego kwasu siarkowego i perhydrolu potocznie nazywany „piranią” [24], to bardzo

efektywne środki służące do oczyszczania powierzchni metalicznej. Inną bardzo często używaną metodą oczyszczania powierzchni jest utlenianie w plazmie [25]. Niektóre związki tworzące bardzo cienkie warstwy, bądź zawiesiny nanocząstek (koloidy lub nanorurki) na powierzchni, w celu ich usunięcia, wymagają bardzo silnych środków chemicznych, bądź mechanicznego oczyszczenia. Użycie plazmy umożliwia uzyskanie bardzo łagodnych warunków oraz selektywność oczyszczania.

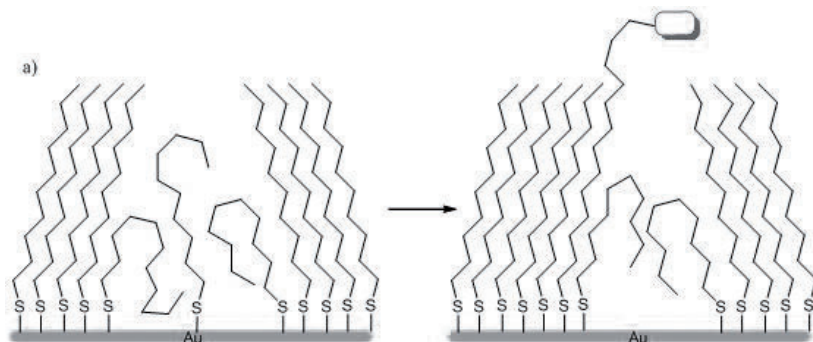
Modyfikacje struktur warstw samoorganizujących (SAMs)

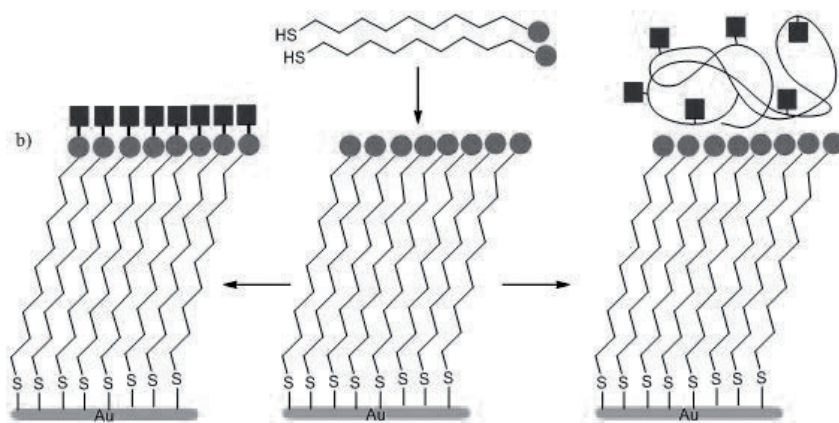
Samoorganizujące warstwy (SAMs) alkanotiole stwarzają możliwość nieograniczonej sposobności ich funkcjonalizowania zarówno związkami polarnymi, związkami nie polarnymi, jak i związkami elektro-, czy biologicznie aktywnymi, w celu śledzenia oddziaływań zarówno kowalencyjnych jak i nie kowalencyjnych. Modyfikacje te znajdują szereg zastosowań aplikacyjnych w wielu dziedzinach nauki takich jak: medycyna, nanotechnologia, czy biologia molekularna. Rozróżnia się trzy podstawowe strategie modyfikacji powierzchni:

a) Bezpośrednia synteza funkcjonalizowanych tiole w celu wytworzenia pojedynczych, bądź mieszanych warstw samoorganizujących (poprzez adsorpcję) [26].

b) Umieszczenie syntezowanych pochodnych tiolowych w miejsce defektu warstwy SAMs (rys. 3a) [27].

c) Modyfikacja powierzchni monowarstw SAMs specyficznymi, bądź selektywnymi pochodnymi (rys. 3b).



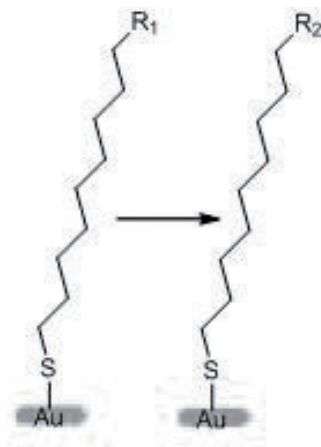


Rysunek 3. Sposoby modyfikacji powierzchni SAM.

Proste, niewielkie grupy funkcyjne takie, jak grupa hydroksylowa, czy karboksylowa stwarzają nieograniczone możliwości modyfikacji warstw samoorganizujących. Grupy te w znacznym stopniu wpływają na zmniejszenie, bądź zwiększenie zwilżalności, tarcia, przyczepności czy odporności na korozję [28]. Aktualne badania nad rozwojem warstw samoorganizujących i modyfikacją ich powierzchni koncentrują się głównie nad dużymi skomplikowanymi ligandami i molekułami na potrzeby biologii i biotechnologii. Jednakże synteza funkcjonalizowanych tioli obejmujących takie związki jak: peptydy, białka, czy cukry jest bardzo pracochłonna i wymaga dużego doświadczenia. Wiele technik modyfikacji warstw samoorganizujących ma swoje korzenie sięgające lat siedemdziesiątych i osiemdziesiątych XX wieku, które to początkowo były wykorzystywane do modyfikacji materiałów używanych na potrzeby elektrochemii [29] oraz chromatografii. Modyfikacja warstw powierzchni warstw samoorganizujących SAMs ma wiele zalet, przede wszystkim: metody te pozwalają na wykorzystanie procedur syntetycznych używanych powszechnie w chemii organicznej, dodatkowo metody te pozwalają na przyłączenie do modyfikowanej powierzchni ligandów, które w swojej strukturze nie posiadają grup tiolowych. Modyfikowanie warstw samoorganizujących umożliwia

powtarzalność wyników oraz powtarzalność prób, ze względu na relatywny łatwy sposób przygotowania powierzchni SAM. Dodatkową zaletą modyfikacji powierzchni SAM jest ich stosunkowo niski koszt, ze względu na bardzo małe zużycie ligandów, których zużywa się zazwyczaj w ilościach nanomolowych. Szczególnie istotne jest w przypadku ligandów biologicznych, które zazwyczaj posiadają dużą masę molową. Modyfikacja warstw samoorganizujących posiada również kilka wad. Główną wadą jest to, że nie zawsze znany jest stopień pokrycia modyfikowanej warstwy oraz, że reakcje te nie zawsze są selektywne.

W celu modyfikacji samoorganizujących powierzchni SAMs wykorzystuje się zarówno oddziaływania kowalencyjne, jak i oddziaływania niekowalencyjne. W grupie oddziaływań kowalencyjnych, szczególnie wykorzystuje się reakcje podstawienia nukleofilowego, estryfikacji, acylowania czy reakcję addycji. W odpowiednich warunkach terminalne grupy funkcyjne zakotwiczone na powierzchni SAM po zanurzeniu w roztworze ligandów, mogą z nimi reagować w sposób gwałtowny i selektywny, z bardzo dużą wydajnością. Zjawisko to zostało wykorzystane do modyfikacji warstw samoorganizujących takimi molekułami jak: DNA, polipeptydami i białkami (rys. 4).



Rysunek 4. Wpływ bezpośredniego, międzycząsteczkowego oddziaływania zewnętrznych grup funkcyjnych.

Mrksich, wraz ze współpracownikami wykazał, grupa maleimidowa, będąca grupą terminalną łańcucha węglowego zakotwiczonego grupą tiolową na powierzchni złota reaguje z bardzo dobrą wydajnością z biologicznie czynnymi ligandami (tab. 1) [31].

Bardzo interesującą jest również reakcja pochodnych disulfidowych zakotwiczonych na powierzchni złota, które oddziałują z modyfikowanym grupą tiolową DNA, peptydami, czy cukrami. Bardzo charakterystyczne w tej reakcji jest to, że proces wymiany pochodnych tiolowych w fragmencie grup terminalnych zachodzi o wiele szybciej, niż proces zakotwiczenia tioli na powierzchni metalu, na co ma niewątpliwie wpływ eteryczny modyfikowanych biomolekul [32].

Przykładem wykorzystania reakcji organicznej na powierzchni warstwy samoorganizującej jest reakcja metatezy olefin katalizowana rutenem, zachodząca w łagodnych warunkach, w której akrylamid, kwasu akrylowy bądź akrylanu metylu reaguje z winylową terminalną grupą powierzchni SAMs [34].

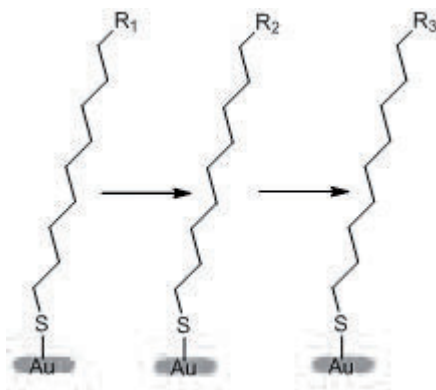
W ostatnich latach szczególnym zainteresowaniem, z wykorzystaniem powierzchni złota cieszy się (tzw. reakcja „click”) [30], w której tworzą się pochodne tiazolu, powstałe w wyniku w reakcji cykloadycji grupy acetylowej z grupą azydkow. Jest to reakcja bardzo selektywna biegnąca z utworzeniem termicznych i hydrolitycznych stabilnych powiązanie dwóch cząsteczek [35-38].

Innym typem reakcji, w której wykorzystuje się azydki jest reakcja Staudinger’a, w której podstawione fosforany reagują z azydkami tworząc wiązania amidowe. Reakcja ta, jak dotąd znalazła zastosowanie do modyfikacji powierzchni szkła, jednakże nie została wykorzystana do modyfikacji powierzchni złota. Zaletą reakcji Staudinger’a i chemii „click” jest ich wysoka selektywność. Przebieg tych reakcji nie zostaje zakłócony obecnością takich grup funkcyjnych, jak grupa aminowa, hydroksylowa czy tiolowa, zarówno w roztworze, jak i na powierzchni [39].

Tabela 1. Oddziaływanie terminalnych grup osadzonych na powierzchni, z wybranymi grupami funkcyjnymi związków organicznych.

Grupa powierzchniowa (R_1)	Ligand	Tworzony Kompleks (R_2)	Odnosnik literaturowy
	$\text{HS}-\text{CH}_2-\text{R}$		[31]
	$\text{HS}-\text{CH}_2-\text{R}'$		[32]
	$\text{S}=\text{C}=\text{N}-\text{R}$		[33]
	$\text{CH}=\text{CH}-\text{R}$		[34]
	$\text{C}\equiv\text{C}-\text{R}$		[35-37]
	$\text{R}-\text{N}=\text{N}=\text{N}^-$		[38]
	$\text{R}-\text{N}=\text{N}=\text{N}^-$		[39]
			[40]

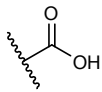
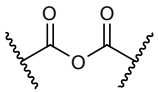
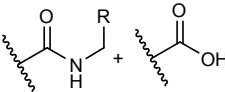
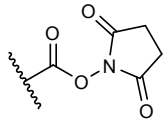
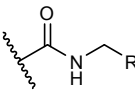
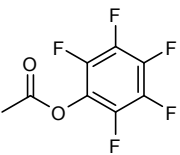
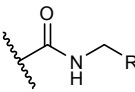
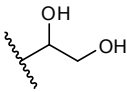
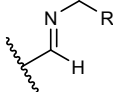
Istnieje również inny sposób funkcjonalizowania powierzchni SAMs, opierający się na wytworzeniu aktywnych jej form, która następnie reaguje z określonymi ligandami (rys. 5). Główną zaletą tej metody jest jej wszechstronność i możliwość szerokiego zastosowania w reakcji z wieloma ligandami. Dodatkowym atutem aktywacji jest możliwość włączania (aktywacji) lub wyłączania (dezaktywacji) na poszczególnych obszarach, co pozwala na wykorzystanie tej metody w litografii [41]. Najprostszą i najbardziej rozpowszechnioną metodą modyfikacji powierzchni SAMs jest utworzenie wiązania amidowego w wyniku reakcji „aktywnej formy” grupy karboksylowej z odpowiednią pochodną aminową. Metoda ta jest bardzo szybka, zachodzi z bardzo wysoką wydajnością oraz pozwala na otrzymywanie szerokiej gamy pochodnych ze względu na bardzo łatwa dostępność pochodnych grup aminowych.



Rysunek 5. Etapowe reakcje powierzchniowe obejmujące grupy pośrednie.

Aktywacji grup karboksylowych dokonuje się zazwyczaj poprzez wykorzystanie reakcji z utworzenia bezwodników, lub poprzez wytworzenie aktywnych estrów N-hydroksysukcinimidu, pentafluorofenolu, lub innych dostępnych związków wykorzystywanych najczęściej w chemii peptydów (tab. 2).

Tabela 2. Aktywacja terminalnych grup karboksylowych powierzchni oraz jej produkty reakcji z ligandami.

Grupa powierzchniowa (R_1)	Grupa pośrednia powierzchniowa (R_2)	Ligand	Tworzony kompleks (R_3)	Odnosićnik literaturowy
2 		H_2N-CH_2-R		[42]
		H_2N-CH_2-R		[43]
		H_2N-CH_2-R		[43]
		H_2N-CH_2-R		[44]

Dane literaturowe donoszą, również o innych sposobach aktywacji terminalnych grup powierzchniowych monowarstw, głównie z wykorzystaniem potencjałów elektrochemicznych, bądź fotoradiacji [45], w celu wymuszenia reakcji z ligandem. Miksich wraz z współpracownikami przedstawił sposób elektrochemicznego utleniania powierzchni SAMs zawierającej hydrochinon jako grupę terminalną, który utleniony do chinonu reagował z cyklopentadienem poprzez reakcję *Dielsa-Aldera* [40].

Trzecia strategia modyfikowania powierzchni warstw samoorganizujących polega na rozerwaniu wiązań kowalencyjnych terminalnej grupy funkcyjnej [46]. Mrksich wykazał, że w pochodnych chinonów, modyfikowanych estrami propionowymi, w wyniku redukcji elektrochemicznej mogą zachodzić wewnątrz cząsteczkowe cyklizacje, w wyniku których ligand może wiązać się z

propionianem tworząc lakton [47].

Wykorzystując swoiste właściwości powierzchni (hydrofobowość, oddziaływania elektrostatyczne), lub też selektywne oddziaływania grup powierzchniowych, można również dokonać modyfikacji powierzchni. Metody te, wykorzystujące niekowalencyjne oddziaływania bardziej niż metody modyfikacji wykorzystujące kowalencyjne oddziaływania stabilizują adsorbowany substrat. Powierzchniowo czynne polimery, białka, barwniki organiczne czy cząstki koloidalne są przykładami rodzajów materiałów, które mogą ulegać adsorpcji na powierzchni monowarstwy. Oddziaływania pomiędzy powierzchnią, a zaadsorbowanym materiałem opierają się głównie na oddziaływaniach van der Waalsa, bądź sił elektrostatycznych. Przykładem są hydrofobowe powierzchnie monowarstw SAMs składające się głównie z n-alkanotiooli, bardzo łatwo adsorbują nie tylko niektóre polimery ale większość znanych białek [48]. Podstawową wadą tej metody jest ograniczona kontrola grubości warstwy, dlatego też modyfikowane w ten sposób monowarstwy mogą być używane w adhezji komórek, bądź też w elektronice molekularnej, ale nie mogą być używane jako czujniki biomolekuł.

Zastosowania warstw samoorganizujących (SAMs)

Zastosowanie warstw samoorganizujących SAMs jest bardzo szerokie. Warstwy te, bardzo często używane są jako sensory elektrochemiczne, czujniki mikrowąg rezonatora kwarcowego, sensory wykorzystujące powierzchniowy rezonans plazmonowy (SPR) i jako urządzenia biomolekularne. Modyfikacja powierzchni monowarstwy dostarcza zazwyczaj nowy model sensora wykazującego specyficzne właściwości, o potencjalnych możliwościach aplikacyjnych. Aby samoorganizujące warstwy mogły być rozpatrywane w celach aplikacyjnych muszą spełniać kilka warunków. Przede wszystkim muszą być łatwe do produkcji i łatwo tworzyć stabilną jednolitą strukturę bez uszkodzeń, a w przypadku sensorów biochemicznych wytworzone warstwy nie mogą ulegać denaturacji.

Sensory elektrochemiczne

Ograniczeniem zastosowań elektrochemicznych warstw samoorganizujących SAMs opartych na pochodnych tiolowych jest ich desorpcja na powierzchni w roztworze. Warstwy te mogą być wykorzystane zarówno ze względu na ich nie elektroaktywne blokujące właściwości, jak i selektywne elektroaktywne powierzchnie. Wiadomo, że powierzchnie zawierające długie łańcuchy alkanotiole ($n > 10$) powodują dramatyczny spadek pojemności na granicy elektroda/elektrolit w porównaniu z gołą powierzchnią złota [49].

W amperometrycznych sensorach monowarstwy SAMs zakończone terminalnymi grupami karboksylowymi zawierającymi 11, lub 15 atomów węgla są używane do wychwytywania cytochromu c (mediator w reakcjach redoks komórki), poprzez utworzenie karbodiimidu, który to w odróżnieniu od elektrostatycznie zaadsorbowanego można usunąć poprzez użycie nasyconego roztworu azotanu potasu [50]. Innymi sensorami zawierające terminalne grupy karboksylowe o długości łańcucha ($n = 2, 5$, lub 10), są sensory selektywne na dopaminę w obecności kwasu askorbinowego. W pH naturalnym ujemnie naładowana powierzchnia monowarstwy SAMs odpycha kwas askorbinowy, podczas gdy dodatnio naładowana dopamina może być wykrywana na poziomie milimoli, przy czym najlepszą selektywność osiąga się przy zastosowaniu alkanotiole zawierających 5 atomów węgla w łańcuchu [51].

Do sensorów typu redoks- enzym, należy sensor glukozy oparty na oksydazie glukozowej zakotwiczonej na samoorganizującej powierzchni SAMs opartej na ω -hydroksy-alkanotiole [52].

Kwas liponowy (kwas 6,8-ditiooktanowy, lub tiooktanowy) - cykliczny disulfid zawierający grupę karboksylową zakotwiczoną na powierzchni SAMs znalazł szereg zastosowań jako sensor i biosensor. Szczególnie jako wskaźnik pH [53], dla reakcji redoks $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ i $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$. Przy coraz wyższych wartościach pH warstwa SAMs staje się bardziej ujemnie naładowana, co powoduje obniżenie ładunku prądu przepływającego dla $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$. Przy niskich wartościach pH, gdy ładunek kwasu karboksylowego jest obojętny, zarówno $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ jak i $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ wykazują bardzo szybką odpowiedź. Aktywowany

kwas tiooktanowy, osadzony na powierzchni złota, wykorzystywany jest również jako system wykrywania pojedynczej nici DNA [54].

Zakończenie

Podsumowując, można stwierdzić, że warstwy samoorganizujące, oparte na pochodnych tiolowych tworzące się na powierzchni złota stanowią ogromny potencjał. Pomimo znacznego postępu w zrozumieniu ich chemicznych i fizykochemicznych właściwości nadal znajdują się w obszarze zainteresowań wielu ośrodków naukowych. Warstwy samoorganizujące, wydają się być szczególnie interesujące z punktu widzenia modyfikacji ich powierzchni, a co za tym idzie, szerokiej możliwości zastosowań aplikacyjnych. Powyższa praca przedstawia temat powierzchni od strony strukturalnej i opiera się głównie na metodach ich modyfikacji. Ze względu na znaczną ilość prac przedstawiających zastosowania modyfikowanych powierzchni występujących w literaturze, w niniejszym opracowaniu skupiono się na przedstawieniu wybranych przykładów zastosowań modyfikowanych powierzchni, na potrzeby elektrochemii, a inne zastosowania, zostały jedynie poruszone, bądź wspomniane.

Podziękowanie

Praca finansowana ze środków na naukę w latach 2009-2012 jako projekt rozwojowy N R02 0010 06.

Literatura

1. Frago, A., Latoria, N., Latta, D., O'Sullivan, C. K., Anal. Chem., 2008, 80, 2556–2563
2. Aryaa, S. K., Solanki, P. R., Datta, M., Malhotra, B. D., Biosens. Bioelectron., 2009, 24, 2810–2817
3. Hwang, S., Chi, Y. S., Lee, B. S., Lee, S., Choi, I. S., Kwak, J., Chem. Commun., 2006, 183–185
4. Hahn, C. D., Leitner, C., Weinbrenner, T., Schlapak, R., Tinazli, A., Tampe, R., Lackner, B., Steindl, C., Hinterdorfer, P., Gruber, H. J., Holzl, M., Bioconjug. Chem., 2007, 18, 247–253

5. Byfield, M. P., Abuknesha, R. A., *Biosens. Bioelectron.*, 1994, 9, 373-379
6. Duwez, A-S., *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.*, 2004, 134, 97-138
7. Nuzzo, R. G., Allara, D. L., *J. Am. Chem. Soc.*, 1983, 105, 4481-4483
8. Bain, C. D., Troughton, E. B., Tao, Y.-T., Evall, J., Whitesides, G. M., Nuzzo, R. G., *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, 111, 321-335
9. Bain, C. D., Evall, J., Whitesides, G.M., *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, 111, 7155-7164
10. Nuzco, R. G., Zegarski, B. R., Dubois, L. H., *J. Am. Chem. Soc.*, 1987, 109, 733-740
11. Porter, M. D., Bright, T. B., Allara, D. L., Chidsey, C. E. D., *J. Am. Chem. Soc.*, 1987, 109, 3559-3568
12. Bain, C. D., Whitesides, G. M., *Science*, 1988, 240, 62-63
13. Nuzzo, R.G., Dubois, L.H., Allara, D.L., *J. Am. Chem. Soc. J. Am. Chem. Soc.*, 1990, 112, 558-569
14. Bain, C. D., Whitesides, G. M., *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, 111, 7164-7164
15. Evans, S. D., Urankar, E., Ulman, A., Ferris, N., *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, 113, 4121-4131
16. Liedberg, B., Tengvall, P., *Langmuir*, 1995, 11, 3821-3827
17. Finklea, H.O., Snider, D. A., Fedyk, J., Sabatini, E., Gafni, Y., Rubinstein, I., *Langmuir*, 1993, 9, 3660-3667
18. Strong, L., Whitesides, G.M., *Langmuir*, 1988, 4, 546-558
19. Poirier, G. E., *Chem. Rev.*, 1997, 97, 1117-1128
20. Love, J. C., Estroff, L. A., Kriebel, J. K., Nuzzo, R.G., Whitesides, G. M., *Chem. Rev.*, 2005, 105, 1103-1169
21. Schreiber, F., *Prog. Surf. Sci.*, 2000, 65, 151-256
22. Sun, L., Crooks, R. M., *Langmuir*, 1993, 9, 1951-1954
23. Chenakin, S. P., Heinz, B., Morgner, H., *Surf. Sci.*, 1999, 421, 337-368.
24. Tam-Chang, S.-W., Biebuyck, H. A., Whitesides, G. M., Jeon, N., Nuzzo, R. G., *Langmuir*, 1995, 11, 4371-4382

25. Ron, H., Matlis, S., Rubinstein, I., Langmuir, 1998, 14, 1116-1121
26. Bain, C. D., Whitesides, G. M., J. Am. Chem. Soc., 1989, 111, 7164-7175
27. Cygan, M. T., Dunbar, T. D., Arnold, J. J., Bumm, L. A., Shedlock, N. F., Burgin, T. P., Jones, L., Allara, D. L., Tour, J. M., Weiss, P. S., J. Am. Chem. Soc., 1998, 120, 2721-2732
28. Colorado, R., Jr., Lee, T. R., Langmuir, 2003, 19, 3288-3296
29. Itaya, K., Bard, A. J., Anal. Chem., 1978, 50, 1487-1489
30. Kolb, H. C., Finn, M. G., Sharpless, K. B., Angew. Chem., Int. Ed. Engl., 2001, 40, 2004-2021
31. Houseman, B. T., Gawalt, E. S., Mrksich, M., Langmuir, 2003, 19, 1522-1531
32. Smith, E. A., Thomas, W. D., Kiessling, L. L., Corn, R. M. J. Am. Chem. Soc., 2003, 125, 6140-6148
33. Delamarche, E., Sundarababu, G., Biebuyck, H., Michel, B., Gerber, C., Sigrist, H., Wolf, H., Ringsdorf, H., Xanthopoulos, N., Mathieu, H. J., Langmuir, 1996, 12, 1997-2006
34. Lee, J. K., Lee, K.-B., Kim, D. J., Choi, I. S., Langmuir, 2003, 19, 8141-8143
35. Hudalla, G.A., Murphy, W. L., Langmuir, 2009, 25, 5737-5746
36. Matsumoto, E., Yamauchi, T., Fukuda, T., Miura, Y., Sci. Technol. Adv. Mater., 2009, 10, 1-7
37. Chikae, M., Fukuda, T., Kerman, K., Idegami, K., Miura, Y., Tamiya, E., Bioelectrochemistry, 2008 74, 118-123
38. Lee, J. K., Chi, Y. S., Choi, I. S., Langmuir, 2004, 20, 3844-3847
39. Saxon, E., Luchansky, S. J., Hang, H. C., Yu, C., Lee, S.C., Bertozzi, C. R., J. Am. Chem. Soc., 2002, 124, 14893-14902
40. Murphy, W. L., Mercurius, K. O., Koide, S., Mrksich, M., Langmuir, 2004, 20, 1026-1030
41. Kraemer, S., Fuierer, R. R., Gorman, C. B., Chem. Rev., 2003, 103, 4367-4418

42. Yan, L., Marzolin, C., Terfort, A., Whitesides, G. M., *Langmuir*, 1997, 13, 6704-6712
43. Lahiri, J., Isaacs, L., Tien, J., Whitesides, G. M., *Anal. Chem.*, 1999, 71, 777-790
44. Jang, C.-H., Stevens, B. D., Phillips, R., Calter, M. A., Ducker, W. A., *Nano Lett.*, 2003, 3, 691-694
45. Dillmore, W. S., Yousaf, M. N., Mrksich, M., *Langmuir*, 2004, 20, 7223-7231
46. Sortino, S., Petralia, S., Compagnini, G., Conoci, S., Condorelli, G., *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 2002, 41, 1914-1917
47. Hodneland, C. D., Mrksich, M. J., *Am. Chem. Soc.*, 2000, 122, 4235-4236
48. Martins, M. C. L., Ratner, B. D., Barbosa, M. A., *J. Biomed. Mater. Res.*, 2003, 67A, 158-171
49. Wink, Th., Zuilen, S. J., Bult, A., Bennekom, W. P., *Analyst*, April 1997, 122, 43R-50R
50. Collison, M., Bowden, E. F., Tarlov, M. J., *Langmuir*, 1992, 8, 1247-1250
51. Malem, F., Mandler, D., *Anal. Chem.*, 1993, 65, 37-41
52. Creager, S. E., Olsen, K. G., *Anal. Chim. Acta*, 1995, 307, 277-289
53. Cheng, Q., Brajter-Toth, A., *Anal. Chem.*, 1992, 64, 1998-2000
54. Millan, K. M., Mikkelsen, S. R., *Anal. Chem.*, 1993, 65, 2317-2323

Rozdział 3

Funkcjonalizacja powierzchni

Michał Cegłowski, Grzegorz Schroeder

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

W latach 50-tych ubiegłego wieku rozpoczęła się nowa era badań biologicznych nazywana dzisiaj genomiką. Jej uwieńczeniem i ogromnym sukcesem był opis genomu człowieka, opublikowany po raz pierwszy w 2001 roku w ramach globalnego projektu poznania ludzkiego genomu (ang. *Human Genome Project*, *HUGO Projekt*). Pod pojęciem genomiki rozumiemy obecnie dziedzinę nauki, która określa i opisuje dokładnie genom typowych komórek różnych gatunków organizmów oraz cały materiał genetyczny i wszystkie zależności i interakcje wewnątrz genomu. W 1994 roku M. Wilkins wprowadził pojęcie proteomiki – nowego, szerszego terminu, utworzonego przez analogię do genomiki, dla opisu zjawisk zachodzących w genomach komórek. Termin proteom zaczerpnął z angielskiego określenia *PROTEin complement of the genOME*, oznaczającego zbiór wszystkich białek kodowanych przez dany genom. Należy podkreślić, że proteomika jest dziedziną znacznie szerszą i bardziej złożoną od genomiki, ponieważ białka są trudniejszym obiektem badań od DNA, ze względu na ich przestrzenną strukturę i występowanie w wielocząsteczkowych kompleksach. Ponadto identyfikacja proteomu nie polega wyłącznie na stworzeniu listy białek znajdujących się w określonej komórce czy tkance. Istotą proteomiki jest poszukiwanie różnic w profilach białkowych osób zdrowych i chorych. W przeciwieństwie do genomu, który ma charakter statyczny i podlega zmianom w bardzo małym stopniu, proteomy zmieniają się

nieustannie pod wpływem czynników zewnętrznych.

Równoległe przeprowadzanie w mikroskali wielu zautomatyzowanych eksperymentów chemicznych jest kluczem do szybkiego i wydajnego uzyskiwania informacji na temat przedmiotu badań. Wszelkie metody, które spełniają przedstawione założenia, cieszą się ogromnym zainteresowaniem dzięki zwiększeniu ilości uzyskiwanych informacji w jednostce czasu w stosunku do eksperymentów przeprowadzanych konwencjonalnymi sposobami. Technika, która obecnie bardzo szybko się rozwija, jest otrzymywanie macierzy złożonych z trwale osadzanych na stałym podłożu łańcuchów DNA oraz RNA, małych molekuł, a nawet całych komórek.

Rozwój mikromacierzy DNA został zapoczątkowany próbami zanalizowania wielokrotnych mutacji genów [1]. Szeroki zakres obecnego wykorzystania mikromacierzy DNA obejmuje między innymi detekcję patogenów, badania różnic w ekspresji genów między różnymi populacjami komórek oraz polimorfizmu genów. Dostępne w handlu mikromacierze, o powierzchni zaledwie kilku cm², umożliwiają badanie nawet kilkudziesięciu tysięcy genów jednocześnie. Uważa się, że dzięki tej technice będzie możliwe lepsze poznanie budowy oraz reakcji na określone czynniki złożonych tkanek.

Analitem są najczęściej wyizolowane z komórek cząsteczki DNA lub RNA, do których przyłączono barwniki fluorescencyjne. Po skrzyżowaniu z oligonukleotydami przyłączonymi do powierzchni rejestruje się widma fluorescencji, które następnie można porównać z widmami fluorescencji ekstraktów pochodzących z komórek w innym stanie.

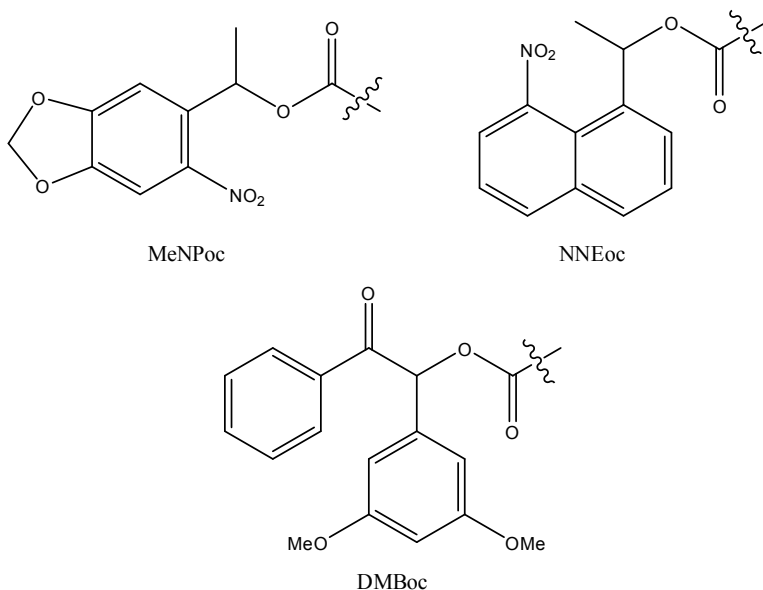
Stworzenie mikromacierzy DNA może się odbyć w dwojaki sposób. Do szklanej powierzchni można przyłączyć cDNA otrzymane w wyniku biochemicznych reakcji z mRNA lub zastosować syntetyczne oligonukleotydy. W pierwszym przypadku, do badanych cząsteczek należy na drodze syntezy [3, 4] przyłączyć grupy funkcyjne zdolne do szybkiego reagowania ze swoimi komplementarnymi odpowiednikami znajdującymi się na powierzchni szkła. W drugim przypadku automatyczna synteza pożądaných oligonukleotydów odbywa się bezpośrednio na podłożu. Syntezę na podłożu można przeprowadzić

stosując dwie strategie odnośnie użycia grup ochronnych:

- zastosować grupy ochronne takie jak: MeNPoc [5], DMBOc [6], NNEoc [7] (rys. 1), które można następnie usunąć poprzez naświetlanie promieniowaniem o odpowiedniej długości fali,
- zastosować ugrupowanie dimetoksytrytylowe (DMT), które można usunąć dzięki kwasom generowanym fotochemicznie w miejscu naświetlenia [8].



Zdjęcie 1. Mikromacierze DNA firmy Affymetrix [2].



Rysunek 1. Grupy ochronne odłączane pod wpływem działania światła o określonej długości fali, używane przy syntezie mikromacierzy DNA.

W przypadku syntezy oligonukleotydów bezpośrednio na podłożu, układ naniesionego związku uzyskuje się dzięki zastosowaniu metod używanych w fotolitografii. W ostatnim czasie zaprezentowano dwie nowe metody podobne do wspomnianej fotolitografii, w których zastosowano komputerowo programowane mikrolustra [9, 10].

Mikromacierze DNA stały się miniaturowym użytecznym narzędziem badawczym dla genetyków [11]. Kolejnym wezwaniem dla szybkiej analizy biomedycznej była konstrukcja mikromacierzy białkowych. Uzyskanie tego typu mikromacierzy okazuje się trudniejszym procesem, niż otrzymanie równoważnym im mikromacierzy DNA. Dzieje się tak, ponieważ funkcję DNA można przewidzieć znając praktycznie wyłącznie sekwencję nukleotydów, natomiast w przypadku białek bardzo ważne staje się poznanie przestrzennej struktury cząsteczki. Dodatkowo należy zwrócić uwagę na to, że białko po

procesie translacji może ulec lipidacji, fosforylacji lub glikolizacji, które to procesy mogą w istotny sposób wpłynąć na pełnione przez nie funkcje. Niezbędne w tym momencie staje się przyłączenie całej cząsteczki do podłoża w celu badania jej oddziaływań z innymi substancjami [12].

Oznaczanie białek przy użyciu uporządkowanych macierzy pojawiło się pod koniec lat dziewięćdziesiątych [13]. W ostatnim czasie zaprezentowano technikę umożliwiającą uzyskanie mikromacierzy dla białek błonowych [14]. Białka naniesione na powierzchnię γ -aminopropylosilanu są odporne mechanicznie niezależnie od faktu, czy znajdują się one w fazie żelowej, czy ciekłej.

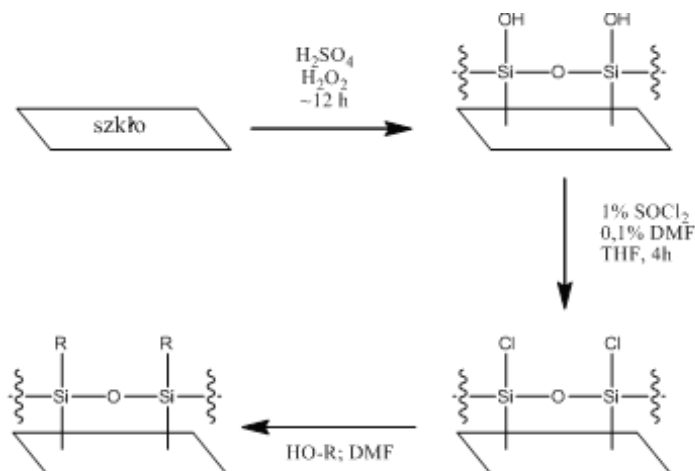
Największą zaletą mikromacierzy białkowych jest możliwość przeanalizowania w bardzo krótkim czasie szeregu białek pod względem ich aktywności chemicznej, co umożliwia zbadanie ich właściwości enzymatycznych oraz interakcji z różnymi lekami. Do tej pory jednakże, największą niedogodnością jest konieczność uzyskania określonych białek w stanie czystym, na szczęście w kierunku przyspieszenia i tego procesu prowadzone są liczne badania.

Metody badań dostarczają wiele ważnych informacji, jednak nie należy zapominać o tym, iż mają one tylko i wyłącznie charakter modelowy. Dopiero wykorzystanie komórek, które są podstawą ludzkiego życia, pozwoliłoby na prowadzenie istotnych, biologicznych badań [15]. W ostatnim czasie zaprezentowano metodę umożliwiającą otrzymanie mikromacierzy opartych na żywych komórkach [16]. W celu uzyskania takiego układu nanolitrowe objętości wodnego roztworu, zawierającego plazmidy, naniesiono na powierzchnię szkła. Następnie na otrzymaną powierzchnię podziałano związkiem wywołującym transfekcję i pokryto ją komórkami ssaków umieszczonymi w medium. Komórki po podziale tworzą mikromacierze składające się ze skupisk komórek, które uległy transfekcji.

Tradycyjne metody identyfikacji nowo uzyskanych białek są mało efektywne. Aby sprostać obecnemu zapotrzebowaniu na szybkie i stosunkowo tanie metody analityczne opracowano syntezę w ciele stałym w połączeniu z metodami kombinatorycznymi. Technika one-bead-one-compound (OBOC) umożliwiła błyskawiczną produkcję wielu związków w bardzo krótkim

czasie [17]. Ponieważ każdy związek w omawianej metodzie jest możliwy do oddzielenia, technikę OBOC postrzega się jako metodę szybkiego uzyskiwania mikromacierzy [18].

W roku 1999 po raz pierwszy osadzono małe cząsteczki na nieorganicznym podłożu w celu badania oddziaływań, pomiędzy ligandami a białkami [19]. Przeprowadzono to doświadczenie modyfikując standardowe szkło mikroskopowe poprzez przyłączenie do niego grup maleimidowych. Następnie uzyskaną powierzchnię zmodyfikowano dalej, używając rodaminy jako barwnika oraz trzech innych związków, co, do których było wiadome, iż posiadają zdolność przyłączania białek, a ponadto w ich cząsteczkach znajdują się grupy tiolowe. Owe grupy tiolowe uległy addycji 1,4 do cząsteczki maleimidu, co pozwoliło na trwałe, kowalencyjne związanie z powierzchnią wspomnianych białkowych receptorów. Tak jak oczekiwano, wszystkie trzy ligandy utworzyły trwałe oddziaływania ze swoimi białkowymi odpowiednikami. Całą powyższą procedurę usprawniono później w celu umożliwienia osadzania na powierzchni szkła związków zawierających grupę hydroksylową (rys. 2) [20].



Rysunek 2. Aktywacja powierzchni szkła w celu przyłączenia alkoholi.

Innym przykładem osadzania cząsteczek na podłożu jest tworzenie mikromacierzy o ściśle sprecyzowanej powierzchni z mieszaniny rozdzielonych związków (OBOC) [21]. Dzięki zastosowaniu standardowych technik syntezy w ciele stałym uzyskano kwas peptydonukleinowy (PNA) zmodyfikowany małymi cząsteczkami. Chemicznie odporne, dzięki tworzeniu wielu połączeń amidowych, ugrupowania PNA służą dwóm celom, po pierwsze w nich zakodowana jest historia syntezy małej cząsteczki, a po drugie dzięki nim cząsteczki o określonych właściwościach znajdują się w ściśle sprecyzowanym miejscu na mikromatrycy. Ponadto w opisywanej metodzie flouorofory przyłączone są do cząsteczek PNA, w przeciwieństwie do innych metod, w których musiały być one związane z białkami. Po wystawieniu uzyskanej mikromacierzy na działanie białka, nadmiar niepowiązanych ligandów oddziela się od reszty wykorzystując techniki sączenia. Po hybrydyzacji nukleotydów znajdujących się na macierzy, związki, które wiązały się z białkiem, można wykryć dzięki obecności fluoryzujących punktów.

Przygotowanie mikromacierzy jest możliwe dzięki opanowaniu metod funkjonanalizacji podłoża stałego typu szkło, powierzchnia krzemu, miki, plastyku itp. Proces ten składa się z kilku etapów:

- przygotowania jednorodnego podłoża, w wyniku procesów fizycznych i chemicznych,
- naniesienia na podłoże samoorganizującej się monowarstwy (SAM) związków z terminalnymi reaktywnymi podstawnikami,
- przeprowadzenia reakcji wiązania substancji bioaktywnych, bardzo często z barwnikami wykazującymi silną absorpcję lub fluorestencję, z naniesioną monowarstwą, poprzez terminalne podstawniki.

Przygotowanie jednorodnego podłoża jest procesem trudnym i stwarzającym znaczne kłopoty eksperymentalne. Istnieje wiele procedur zalecanych w celu uzyskania dobrego jednorodnego podłoża.

Zalecane procedury przygotowanie szkła [22], po wstępnym odtłuszczeniu acetonem i wysuszeniu, do dalszego nanoszenia SAM są następujące:

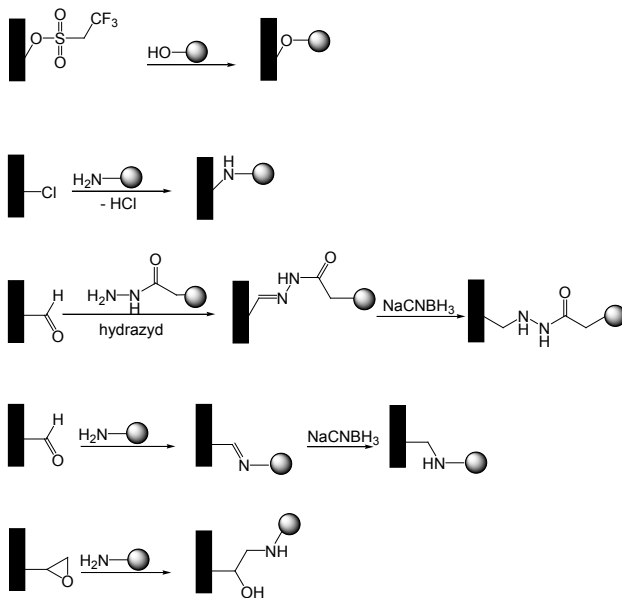
1. szkło zanurzyć przez 30 min w roztworze 1:1 MeOH:HCl, następnie

- płukać H_2O , suszyć suchym azotem,
2. szkło zanurzyć przez 30 min w roztworze 1:1 MeOH:HCl, następnie płukać H_2O , następnie zanurzyć przez 30 min w st. H_2SO_4 , płukać H_2O , suszyć suchym azotem,
 3. szkło zanurzyć przez 30 min w roztworze 1:1 MeOH:HCl, następnie płukać H_2O , zanurzyć przez 30 min w st. H_2SO_4 , płukać w 100°C H_2O , suszyć suchym azotem ,
 4. szkło zanurzyć przez 5 min w roztworze 1:1:5 $NH_4OH:H_2O_2$ (30%): H_2O o temp. 80°C płukać H_2O , suszyć suchym azotem,
 5. szkło zanurzyć przez 5 min w roztworze 1:1:5 $NH_4OH:H_2O_2$ (30%): H_2O o temp. 80°C, płukać H_2O , (5 min) w roztworze 1:1:5 HCl: H_2O_2 (30%): H_2O o temp. 80 ° C płukać H_2O , suszyć suchym azotem,
 6. szkło zanurzyć przez 30 min w roztworze 10% KOH w izopropanolu, płukać H_2O , suszyć suchym azotem,
 7. szkło zanurzyć przez 20 min w roztworze 1 M NaOH, płukać H_2O , suszyć suchym azotem,
 8. szkło zanurzyć przez 20 min w roztworze 1 M NaOH, płukać H_2O , następnie zanurzyć przez 30 min w roztworze piranii - 1:2 $H_2O_2:H_2SO_4$, płukać H_2O , suszyć suchym azotem,
 9. szkło zanurzyć w roztworze 2,5 M NaOH na okres 24 h, po wyciągnięciu z roztworu przemyć wodą, a następnie poddać sonifikacji w wodzie przez okres 10 min, zanurzyć próbkę w roztworze 0.1 M HCl przez okres 15 min, wyciągnąć przemyć wodą i poddać sonifikacji w wodzie przez 10 min i przemyć przez zanurzenie w alkoholu metylowym na okres 5 min, suszyć suchym azotem,
 10. szkło zanurzyć w roztworze piranii (3:1 $H_2SO_4:H_2O_2$) na okres 1 h, po wyciągnięciu z roztworu przemyć wodą, a następnie wysuszyć w atmosferze gazu obojętnego (azotu).

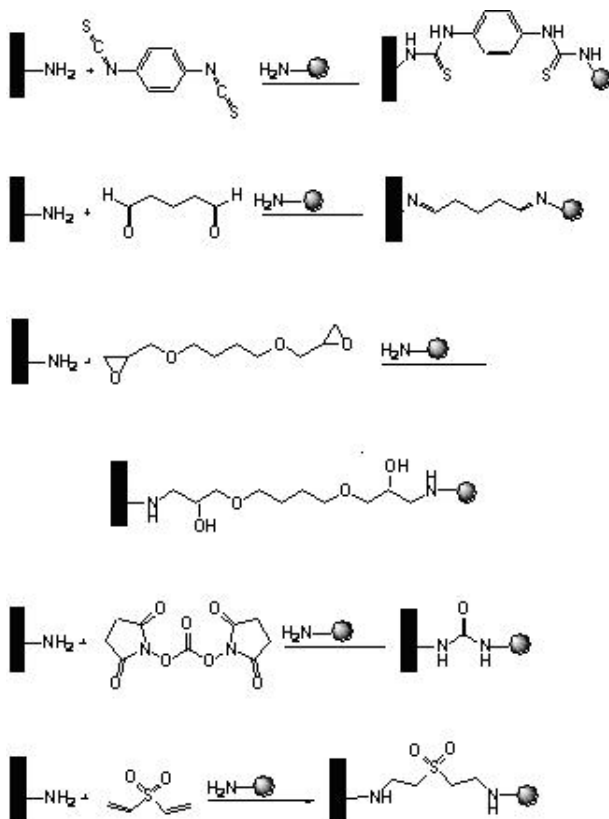
Procedura przygotowanie powierzchni krzemu [23-25] do dalszego nanoszenia SAM przedstawia się następująco: powierzchnię krzemu przemyć acetonem, wysuszyć, następnie krzem zanurzyć w roztworze piranii (7:3

$\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2$) w temp. 90°C na okres 10 min., następnie zanurzyć w roztworach: buforu o składzie $40\%\text{HF}/40\%\text{NH}_4\text{F}$ (1:7 v/v) na okres 1 minuty, $\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ (1:1:5 v/v) w temp. 80°C na okres 10 min., $\text{HCl}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ (1:1:6 v/v) w temp. 80°C na okres 10 min. Po wyciągnięciu z roztworu przemyć trzykrotnie dejonizowaną wodą a następnie wysuszyć w atmosferze gazu obojętnego (azotu).

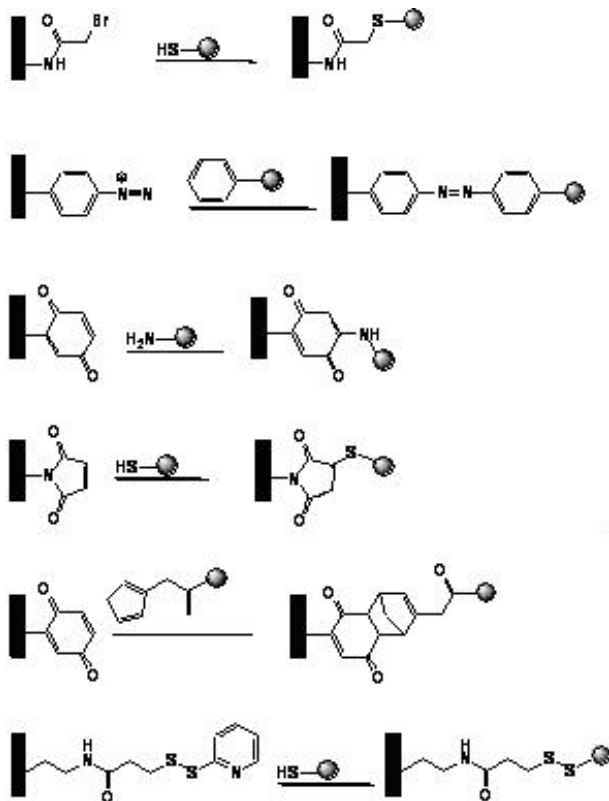
Pod względem funkcjonalizacji powierzchni receptorami molekularnymi mogącymi wiązać analit z roztworu, istotną rolę odgrywają dwa czynniki. Pierwszy to molekuły wiążące się z podłożem z aktywnymi grupami funkcyjnymi, przede wszystkim na bazie dwóch grup funkcyjnych $-\text{SiOR}_3$, $-\text{SiCl}_3$. Drugim czynnikiem jest rodzaj linkiera wiążącego grupę funkcyjną podłoża z oznaczanym analitem. Odbywa się głównie za pomocą czterech różnych typów linkerów: zerowej długości (*zero-length cross linkers*), homobifunkcyjnych (*homobifunctional cross linkers*), heterobifunkcyjnych (*heterobifunctional cross linkers*) oraz trójfunkcyjnych (*trifunctional cross linkers*) [23] (rys. 3-6).



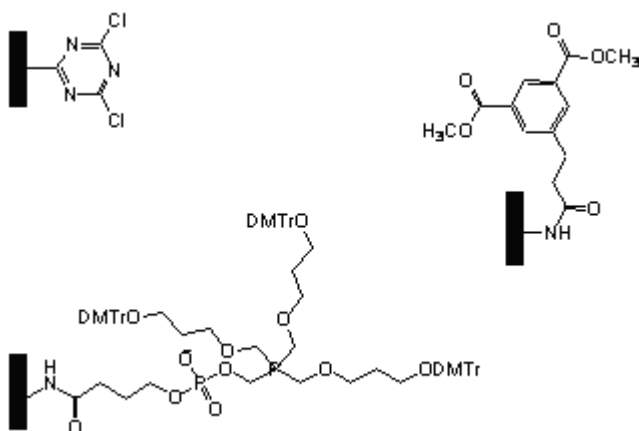
Rysunek 3. Przykład sieciowania materiału genetycznego do podłoża za pomocą związków sieciujących zerowej długości.



Rysunek 4. Przykład sieciowania materiału genetycznego  do podłoża  za pomocą homobifunkcyjnych związków sieciujących.



Rysunek 5. Przykład sieciowania materiału genetycznego  do podłoża  za pomocą heterobifunkcyjnych związków sieciujących.

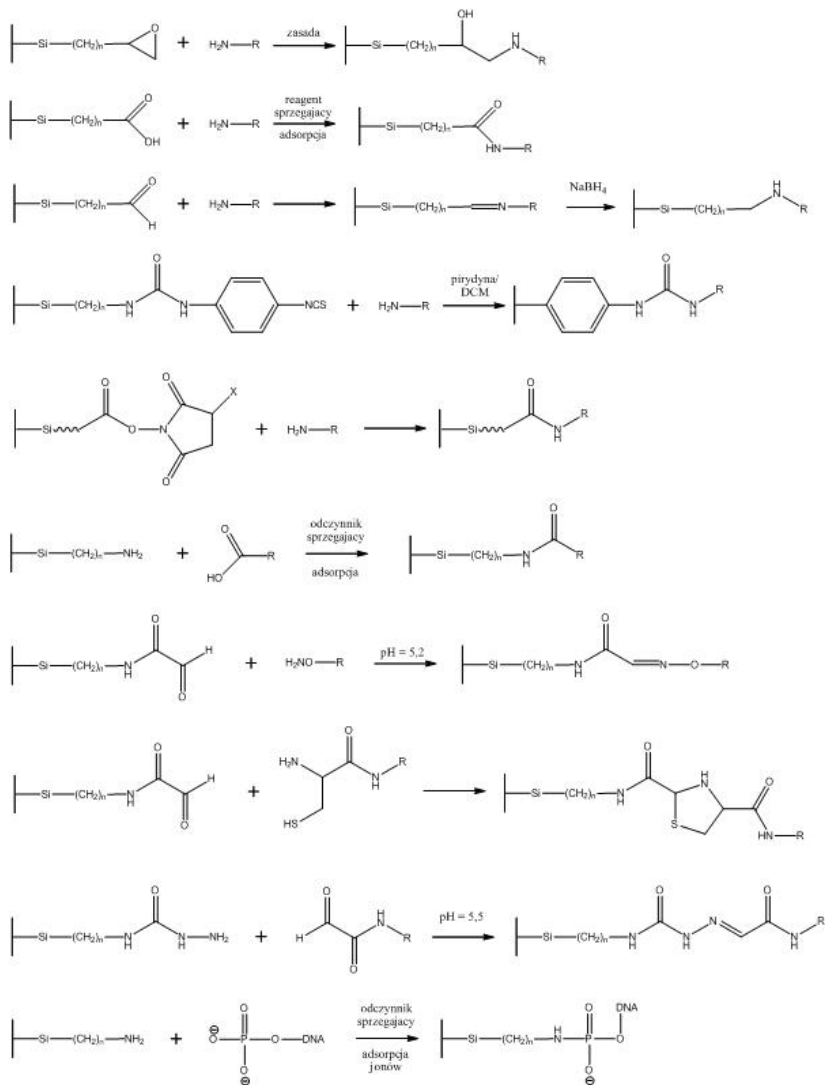


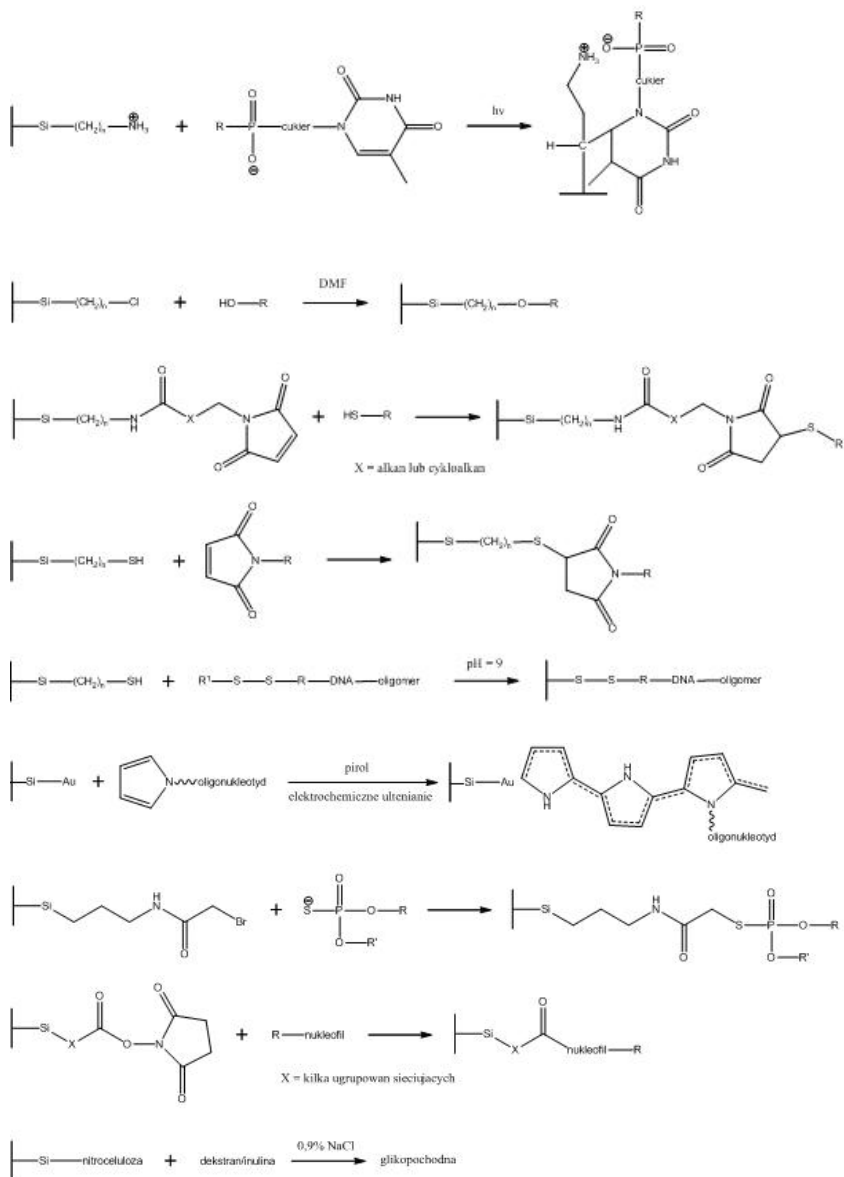
Rysunek 6. Przykład sieciowania materiału genetycznego  do podłoża  za pomocą trójfunkcyjnych związków sieciujących.

Proces silanizacji powierzchni z zastosowaniem trialkoksy silanów przeprowadza się w oparciu o następujące procedury [24-26]:

1. Silanizację próbek wykonać poprzez zanurzenia oczyszczonego szkła w 1% wodnym roztworze silanu przez okres 15 min. Po zakończeniu procesu próbkę zanurzyć w alkoholu metylowym na okres 5 min, płukać w wodzie przez 10 min i wysuszyć próbkę odwirowując rozpuszczalnik. Próbkę wysuszyć w temperaturze 110°C przez okres 15 minut.
2. Silanizację próbek wykonać poprzez zanurzenia oczyszczonego szkła w 1% roztworze silanu w bezwodnym toluenie przez okres 24 godzin. Po tym okresie próbkę przemyć bezwodnym tolueniem, dejonizowaną wodą oraz etanolem. Próbkę wysuszyć w atmosferze gazu obojętnego (azotu).
3. Silanizację próbek wykonać poprzez zanurzenia oczyszczonego krzemu w roztworze 1 mM silanu w etanolu przez okres 40 minut. Po tym okresie próbkę przemyć etanolem, a następnie dejonizowaną wodą. Próbkę wysuszyć w atmosferze gazu obojętnego (azotu). Próbkę wygrzać w temperaturze 120°C przez okres 30 minut.

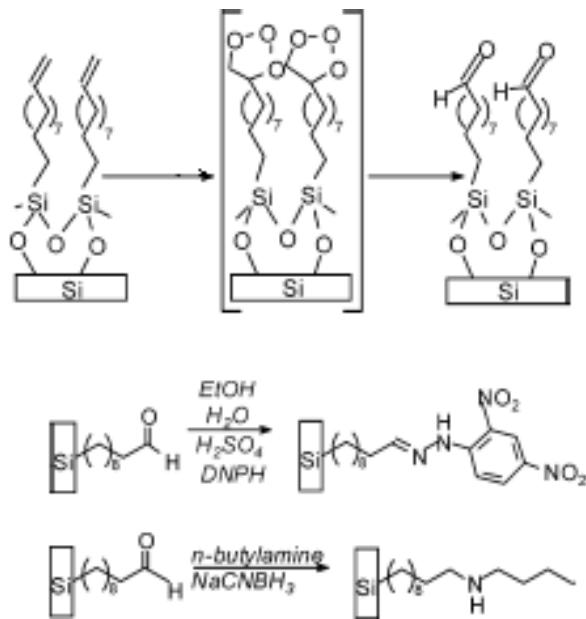
W wyniku tak przeprowadzonego procesu można uzyskać wiele funkcyjonalizowanych powierzchni mających dalsze zastosowanie w osadzaniu kolejnych warstw bioreagentów (rys. 7).





Rysunek 7. Reakcje tworzenia kolejnych warstw na funkcjonalizowanym podłożu krzemowym [27].

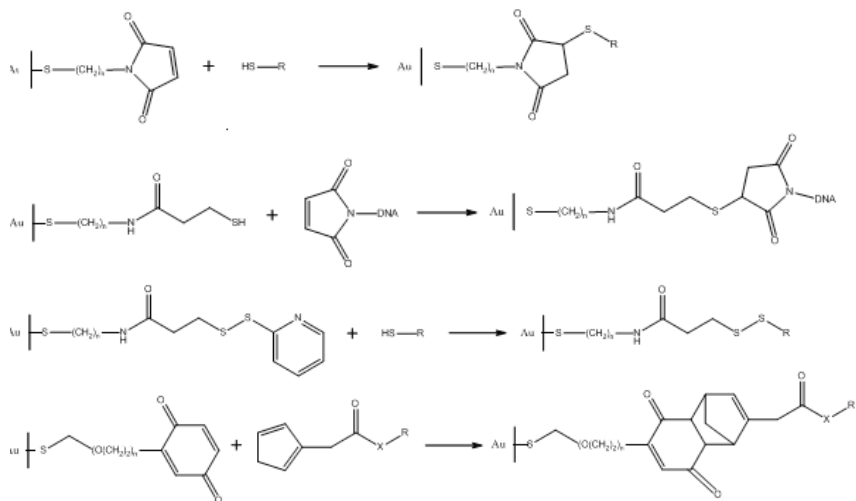
Razgon i współpracownicy przedstawili koncepcję funkcjonalizowania powierzchni krzemu poprzez terminalne wiązania podwójne z zastosowaniem metody ozonowania [28] (rys. 8).



Rysunek 8. Reakcje tworzenia kolejnych warstw na funkcjonalizowanej powierzchni krzemu [28].

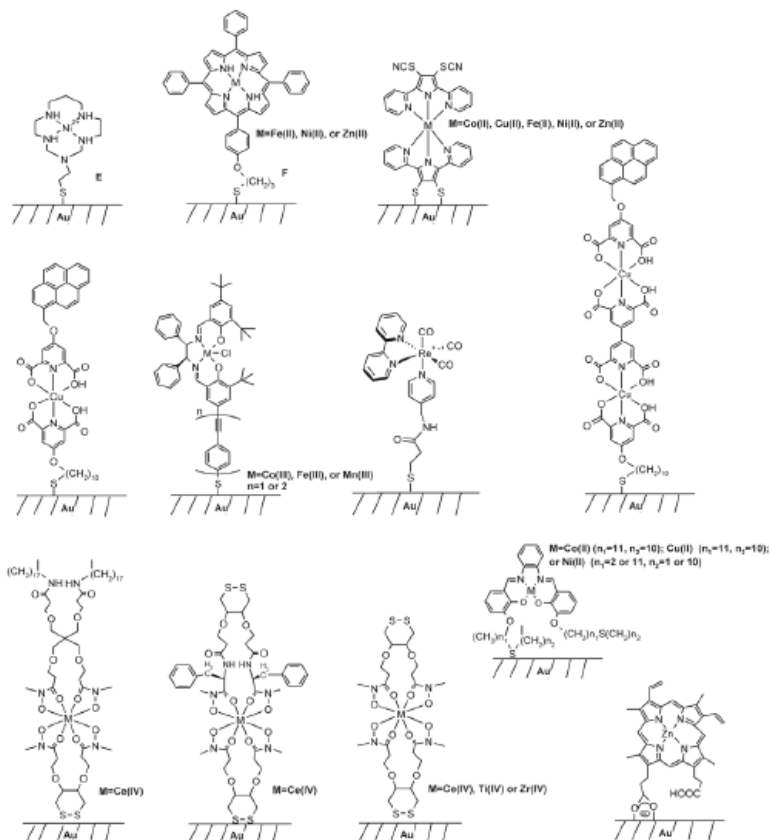
Podobne efekty można uzyskać stosując płytki złote z naniesionymi monowarstwami z zastosowaniem odczynników posiadających ugrupowanie $-SH$. W wyniku takiego procesu uzyskujemy kowalencyjnie związane monowarstwy (rys. 9).

Raisanen przedstawił zastosowanie zasad Schiffa i ich kompleksów z jonami metali do otrzymywania monowarstw na powierzchni złota [29] (rys. 10).



Rysunek 9. Reakcje tworzenia kolejnych warstw na funkcjonalizowanym złocie [27].

Przedstawione przykładowe schematy postępowania w celu chemicznej modyfikacji powierzchni lub podłoża urządzeń diagnostycznych otwierają nowe możliwości analityczne z powodu nadania powierzchni funkcji rozpoznawania molekularnego. Nanourządzenia diagnostyczne o zdolnościach rozpoznania molekularnego to w dzisiejszym świecie analitycznym najważniejsze wyzwanie dla konstruktorów i chemików w celu uzyskania szybkiej i taniej metody diagnostycznej.



Rysunek 10. Reakcje tworzenia kolejnych warstw na funkcjonalizowanej powierzchni złota [29].

Podziękowanie

Praca finansowana ze środków na naukę w latach 2009-2012 jako projekt rozwojowy N R02 0010 06.

Literatura

1. D. J. Lockhart, E. A. Winzler, *Nature* 2000, 405, 827-836
2. Mikromacierz, licencja: GNU FDL

3. M. C. Pirrung, *Angew. Chem.* 2002, 114, 1326-1341; *Angew. Chem. Int. Ed.* 2002, 41, 1276-1289
4. C. M. Niemeyer, *Angew. Chem.* 2001, 113, 4254-4287; *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001, 40, 4128-4158
5. G. H. McGall, A. D. Barone, M. Diggelmann, S. P. A. Fodor, E. Gentalen, N. Ngo, *J. Am. Chem. Soc.* 1997, 119, 5081-5090
6. M. C. Pirrung, I. Fallon, G. H. McGall, *J. Org. Chem.* 1998, 63, 241-246
7. A. D. Barone, J. E. Beecher, P. Bury, C. Chen, T. Doede, J. A. Fidanza, G. H. McGall, *Nucleos. Nucleot. Nucl. Acids* 2001, 20, 525-531
8. G. Wallraff, J. Labadie, P. Brock, T. Nguyen, T. Huynh, W. Hinsberg, G. H. McGall, *Chemtech* 1997, 22-32
9. S. Sing-Gasson, R. D. Green, Y. Yue, C. Nelson, F. Blattner, M. R. Sussman, F. Cerrina, *Nat. Biotechnol.* 1999, 17, 974-978
10. E. LeProust, J. P. Pellois, P. Yu, H. Zhang, X. Gao, O. Srinnavit, E. Gulari, Z. Zhou, *J. Comb. Chem.* 2000, 2, 349-354
11. R. E. Jenkins, S. R. Pennington, *Proteomics* 2001, 1, 13-29
12. T. Kodadek, *Chem. Biol.* 2001, 8, 105-115
13. B. B. Habb, M. J. Dunham, P. B. Brown, *Genome Biol.* 2000, 1, 1-22
14. Y. Fang, A. G. Frutos, J. Lahiri, *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 2394-2395
15. S. A. Sundberg, *Curr. Opin. Biotechnol.* 2000, 11, 47-53
16. J. Ziauddin, D. M. Sabatini, *Nature* 2001, 411, 107-110
17. K. S. Lam, S. E. Salmon, E. M. Hersh, V. J. Hruby, W. M. Kazmierski, R. J. Kanpp, *Nature* 1991, 354, 82-84
18. K. S. Lam, M. Renii, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2002, 6, 353-358
19. G. MacBeath, A. N. Koehler, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* 1999, 121, 7967-7968
20. P. J. Hergenrother, K. M. Depew, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* 2000, 122, 7849-7850
21. N. Winssinger, J. L. Harris, B. J. Backes, P. G. Schultz, *Angew. Chem.*

- Int. Ed.* 2001, 40, 3152-3155
22. J.J. Cras, C.A. Rowe-Taitt, D.A. Nivens, F.S. Ligler, *Biosensors & Bioelectronics* 1999, 14, 683
 23. Ch. Heise, F. F. Bier, *Topics in Current Chemistry*, 2006, 261, 1
 24. E. Metwalli, D. Haines, O.Beckerr, S. Conzone, C. G. Pantano, J. *Colloid Inteferance Sci.*, 2006, 298, 825
 25. G.Arslan, M. Ozmen, B. Gunduz, X. Zhang, M. Ersoz, *Turk J. Chem.*, 2006, 30, 203
 26. S. Liu, T.R.Hu, Z. Liu, *Phys. Chem.Chem. Phys.* 2002, 4, 6059
 27. C. Schmuck, H. Wennemers, *Highlights in Bioorganic Chemistry, Methods and Applications*, Willey-VCH, 2004
 28. A. Razgon, R.G. Bergman, C.N. Sukenik, *Langmir*, 2008,14, 2545
 29. M. Raisanen, *Schiff base complexes and their assemblies on surfaces*, Academic Dissertation, Faculty of Science, University of Helsinki, Finlandia, 2004

Rozdział 4

Właściwości wybranych jonoforów i makrolidów

Radosław Pankiewicz, Grzegorz Schroeder

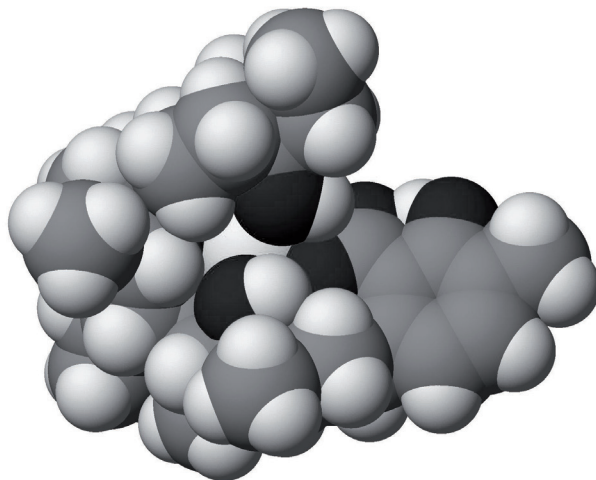
*Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Wydział Chemii, Grunwaldzka 6,
60-780 Poznań*

Jonofory to molekuły, których charakterystyczną cechą jest zdolność transferu jonów z roztworów wodnych do fazy hydrofobowej, a równocześnie są to związki chemiczne, zdolne do transportowania jonów przez błonę lipidową komórki. Jonofor pełni rolę gospodarza, który koordynuje w roli gościa jony, a następnie transportuje je poprzez lipofilową membranę.

Mianem „makrolidy” określa się rodzinę naturalnych i syntetycznych związków chemicznych, o budowie głównie laktonowej, mających kilkunastocząłowy pierścień z podstawnikami metylowymi i hydroksylowymi oraz 1-3 reszty cukrowe, z których jedna jest aminocukrowa. Cechą charakterystyczną tej grupy, dzięki dużej liczbie atomów tlenu zawartych w strukturze cząsteczki, jest zdolność do tworzenia kompleksów typu: gość-gospodarz.

Jonofory, podobnie jak makrolidy, mogą tworzyć połączenia typu gość-gospodarz. Cząsteczka jonoforu zawiera w swojej strukturze zarówno lipofilowy „szkielet” oraz grupy hydrofilowe ($-\text{OH}$, $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}-\text{O}-\text{C}$). Dzięki takiej budowie cząsteczki, możliwe są podczas procesu kompleksowania przekształcenia konformacyjne polegające na zamknięciu jonu w hydrofilowej „klatce” i skierowaniu „na zewnątrz” części lipofilowej (rys. 1). W ten sposób jonofor może „rozpuścić” naładowany jon wewnątrz błony lipidowej. Mechanizm transportu przebiega według następującego schematu: cząsteczka gospodarza na granicy

faz w fazie hydrofobowej wiąże jon, następnie kompleks dyfunduje w błonie lipidowej do przeciwległej powierzchni, gdzie kompleks ulega rozpadowi, a jon uwalniany jest do fazy wodnej. Następnie jonofor dyfunduje do poprzedniej powierzchni i cykl się powtarza, aż do osiągnięcia stanu równowagi.



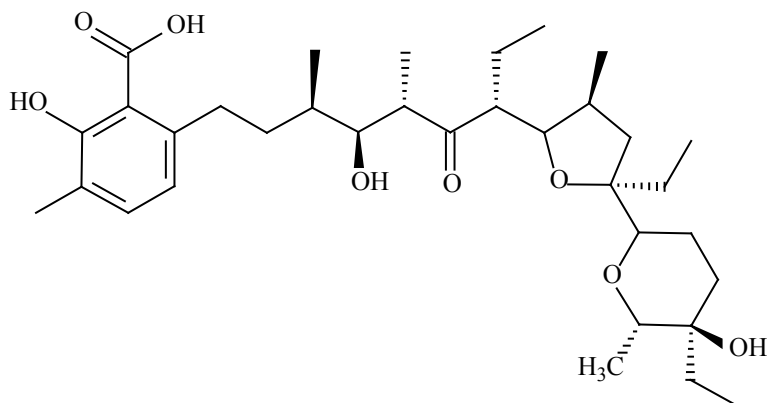
Rysunek 1. Obliczona metodą semiempiryczną PM5 struktura kwasu lasalowego „otulającego” kation Na^+ .

Większość makrolidów i jonoforów wykazuje właściwości bakteriobójcze i zaliczana jest do grupy antybiotyków. Mają one szeroki zakres działania antydrobnoustrojowego i są stosowane zarówno w medycynie, jak i weterynarii, głównie jako dodatki paszowe w hodowli zwierząt.

Zdolność jonoforów do przenoszenia jonów oraz wysoka selektywność w ich kompleksowaniu wykorzystana została przy konstruowaniu elektrod jonoselektywnych. Specyficzne powinowactwo chemiczne nie tylko do jonów, ale także do obojętnych cząsteczek predestynuje te związki do zajęcia istotnego miejsca w rodzinie receptorów chemicznych. W dodatku, co stwierdzono na podstawie własnych prac badawczych dotyczących kwasu lasalowego, to powinowactwo chemiczne może być stosunkowo łatwo modyfikowane poprzez

przyłączenie do cząsteczki jonoforu łańcuchów oksaalilowych o różnej długości. Przyłączenie łańcuchów alkilowych praktycznie nie zmienia właściwości kompleksujących, za to wyraźnie poprawia rozpuszczalność zarówno samej cząsteczki, jak i kompleksu gość–gospodarz w warstwach lipidowych. Tak zmodyfikowane cząsteczki jonoforu nie tylko mają zmienione właściwości chemiczne, lecz również mikrobiologiczne. Na podstawie własnych badań stwierdzono, że właściwości przeciwbakteryjne mogą ulec wzmocnieniu lub osłabieniu w zależności od długości łańcucha.

Kwas lasalowy



Rysunek 2. Kwas lasalowy.

Kwas lasalowy (rys. 2) został po raz pierwszy wyizolowany ze *Streptomyces lasaliensis* w 1951 roku przez Bergera i współpracowników [1]. Dokładna struktura kwasu lasalowego została określona dopiero w 1970 roku przez Westleya i współpracowników [2]. Konfiguracja na wszystkich 10 centrach asymetrii została określona dzięki rentgenografii strukturalnej kryształu uwodnionej soli barowej kwasu lasalowego

Przeprowadzono wiele badań dotyczących oddziaływania kwasu lasalowego z kationami metali w roztworach. J. Juillard i wsp. [3-9] opisali badania procesu

kompleksowania kationów metali przez kwas lasalowy, wyznaczając w różnych rozpuszczalnikach parametry termodynamiczne. Z badań [3-11] wynika, że kwas lasalowy kompleksuje szeroki wachlarz kationów metali oraz że w procesie tym znaczącą rolę odgrywa zastosowany rozpuszczalnik.

Przez trzy ostatnie dekady, przedmiotem szczególnej uwagi były oddziaływania kwasu lasalowego z metalami alkalicznymi. Do badań wykorzystywano różne techniki badawcze, włączając w to NMR, FT-IR i dichroizm kołowy (CD). Przeprowadzono, między innymi badania oddziaływań jonów litu z kwasem lasalowym w acetonitrylu z zastosowaniem CD, ^1H , ^{13}C i ^7Li NMR [12-16]. Stwierdzono występowanie w roztworze mieszaniny kompleksów o stechiometrii 1:1 oraz 1:2 typu kanapkowego.

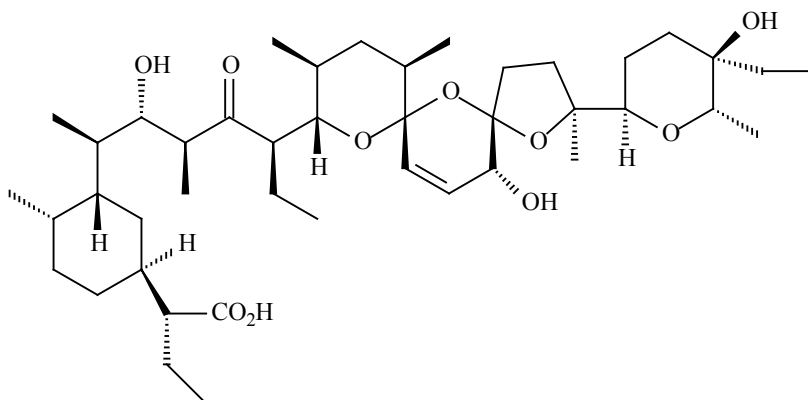
W badaniach zastosowano również metody potencjometryczne, spektroskopię UV-vis oraz kalorymetrię do określenia właściwości i stabilności kompleksów kwasu lasalowego (i jego 5-bromo pochodnej) z szeregiem metali alkalicznych w metanolu [4]. Wyniki zostały zinterpretowane w warunkach, w których tworzyły się wyłącznie neutralne kompleksy o stechiometrii 1:1, w których grupa karboksylowa nie pełniła dominującej roli w wiązaniu jonu metalu. Sposób kompleksowania zmieniał się dosyć regularnie wraz ze zmieniającym się promieniem jonowym użytego kationu. Sugeruje to, że kwas lasalowy przystosowuje się płynnie do rozmiaru kompleksowanego kationu, i nie wykazuje szczególnej selektywności ze względu na jego rozmiar.

Kwas lasalowy może transportować przez błony lipidowe szeroki wachlarz kationów, w tym jedno-, dwu- i trójwartościowe [17-21]. Tworzy on tak jak wszystkie jonofory kompleksy z przenoszonymi jonami, odmiennie do innych klas antybiotyków, które zwiększają tylko przepuszczalność błon biologicznych dla tej klasy związków [22-25].

Salinomycyna

Salinomycyna (rys. 3) wyizolowana ze *Streptomyces albus* jest skutecznym środkiem antydrobnoustrojowym, działa przeciwko bakteriom gram-dodatnim, mykobakteriom oraz grzybom. Najszersze zastosowanie znalazła, jednak jako kokcydiostatyk w hodowli bydła i drobiu. Kokcydiostatyki to chemioterapeutyki

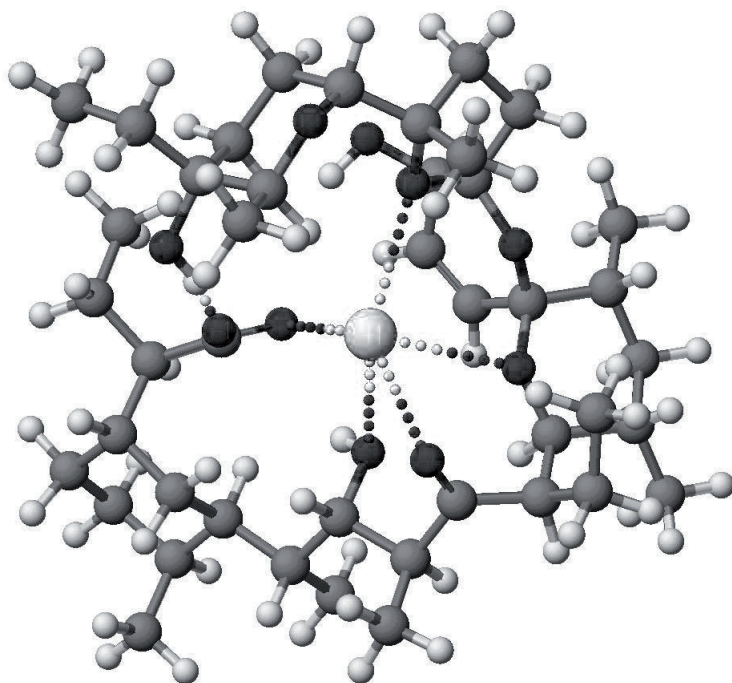
dozwolone do stosowania u zwierząt, głównie drobiu, w profilaktyce lub leczeniu choroby zwanej kokcydiozą, wywoływanej przez pierwotniaki *Eimeria*. Związki te mogą działać kokcydiostatycznie czyli wstrzymywać rozwój pierwotniaków lub kokcydiobójczo czyli zabijać pierwotniaki. Pozostałości kokcydiostatyków w tkankach zwierząt i jajach mogą stanowić zagrożenie toksykologiczne dla konsumentów, stąd istnieje konieczność ścisłej kontroli ich stosowania. Uwzględniając rozporządzenie (WE) nr 1831/2003 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 22 września 2003 r. w sprawie dodatków stosowanych w żywieniu zwierząt, Dodatek salinomycyna – sól sodowa („Saxoc 120 micro-Granulate”) został dopuszczony pod pewnymi warunkami zgodnie z dyrektywą Rady 70/524/EWG. Rozporządzenie Komisji (WE) nr 1463/2004 zezwoliło na stosowanie tego dodatku przez dziesięć lat w odniesieniu do kurcząt przeznaczonych na tucź, łącząc zezwolenie z osobą odpowiedzialną za wprowadzanie tego dodatku do obrotu. Dodatek ten został zgłoszony jako istniejący produkt na mocy art. 10 rozporządzenia (WE) nr 1831/2003.



Rysunek 3. Salinomycyna.

Aktywność biologiczna salinomycyny, tak jak innych jonoforów, jest ściśle powiązana z jej właściwościami fizykochemicznymi. Salinomycyna może dynamicznie dopasowywać się do kompleksowanego kationu, jednakże

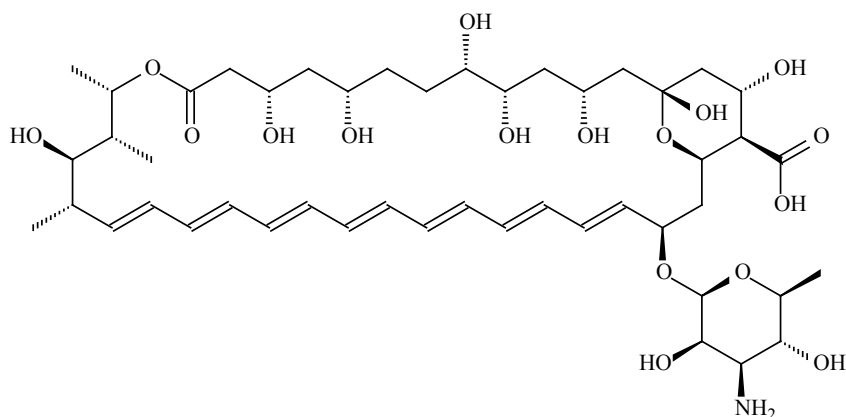
dzięki możliwości tworzenia pseudopierścienia, podobnie jak wiele jonoforów, podczas procesu kompleksowania preferuje zamykanie w tej strukturze najlepiej dopasowanego geometrycznie kationu, w tym przypadku – kationu potasu. Pseudopierścień tworzy się dzięki utworzeniu wiązania wodorowego „głowa do ogona” pomiędzy grupą karboksylową i grupą hydroksylową przyłączoną do ostatniego pierścienia pyranowego. Zbadanie tej struktury związku jest utrudnione ze względu na problemy z otrzymaniem struktury krystalicznej salinomycyny. Dobrze wykształcone kryształy otrzymano wyłącznie dla jej pochodnych [26]. Za pomocą symulacji komputerowych, możemy wizualizować struktury kompleksów (rys. 4) oraz określić parametry strukturalne otrzymanych kompleksów.



Rysunek 4. Obliczona za pomocą metody PM5 struktura kompleksu salinomycyna- K^+ .

Amfoterycyna B

Amfoterycyna B (rys. 5) jest naturalnym antybiotykiem otrzymywanym z bakterii Gram-dodatniej – *Streptomyces nodosus*. Amfoterycyna B została wyizolowana w 1955 roku, natomiast już w roku 1960 wprowadzona do terapii jako jedyny skuteczny lek w leczeniu grzybic układowych. Budowę przestrzenną cząsteczki tego antybiotyku ustalono w roku 1970, a następnie podjęto próby syntezy chemicznej [39] Amfoterycyna B wykazuje szeroki zakres działania przeciwgrzybowego. Zapobiega skutecznie przerostowi gruczołu prostaty i hypercholesterolemii. Produkowana jest w wielu formach farmaceutycznych przez liczne firmy i znana jest pod nazwą: Fungillin, Amphotericin B, Amphozone, Ampho-Moronal, Wypicil i Ampho-Moronal V.

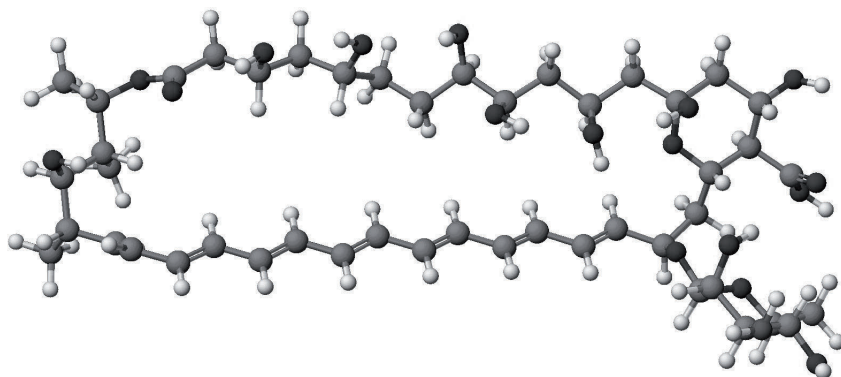


Rysunek 5. Amfoterycyna B.

Antybiotyk ten ma szerokie działanie antygrzybicze, stosowany jest, również jako fungicyd w zakażeniach u pacjentów chorych na AIDS. Przypuszcza się, że toksyczność Amfoterycyny B oddziałującej ze sterolami błony lipidowej komórki polega na tworzeniu w niej agregatów molekularnych w formie porów, zaburzających fizjologiczny transport jonów (K^+ , Na^+ , H^+ , Cl^-), co w konsekwencji prowadzi do śmierci komórki. Niestety, stosowalność amfoterycyny jako

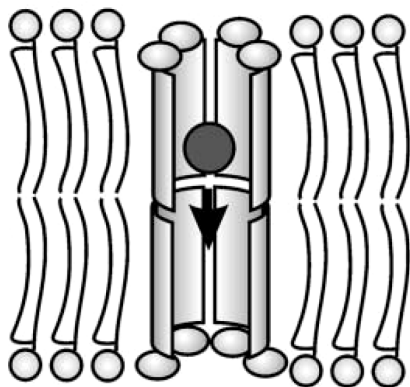
antybiotyku jest ograniczone ze względu na słabą rozpuszczalność w większości rozpuszczalników organicznych i praktycznie brak rozpuszczalności w roztworach wodnych [30-36].

Właściwości fizykochemiczne tego antybiotyku związane są z jego strukturą w której można wyróżnić dwa dominujące elementy: łańcuch sprzężonych wiązań podwójnych oraz alkilowy łańcuch z przyłączonymi grupami hydroksylowymi. Sztywny łańcuch olefinowy (rys. 6) uniemożliwia cząsteczce zmianę konformacji („zwinienie się”) w procesie kompleksowania jonów tak charakterystyczne dla jonoforów, takich jak kwas lasalowy czy monensyna.



Rysunek 6. Obliczona za pomocą metody semiempirycznej PM5 sztywna struktura amfoterycyny B.

Antybiotyk ten tworzy kanały jonowe w błonach komórkowych. [27, 37, 38] Takie struktury złożone są z ośmiu cząsteczek amfoterycyny, w których część olefinowa związku zwrócona jest w kierunku lipofilowej błony komórkowej, natomiast część lipofobowa skierowana jest do środka tworząc hydrofilowy kanał. Przez taki kanał mogą być swobodnie transportowane, zgodnie z gradientem stężeń, jony sodu i potasu (rys. 7) co zaburza funkcjonowanie komórki prowadząc do jej śmierci.



Rysunek 7. Schemat budowy kanału amfoterycynowego w dwuwarstwie lipidowej [39].

Antybiotyk ten nie jest specyficzny i oddziałuje również z cholesterolem, składnikiem budulcowym błon biologicznych ssaków [28]. Efekt toksyczny jest najsilniejszy w centralnym układzie nerwowym, nerkach i wątrobie, co znacząco ogranicza stosowalność tego antybiotyku [29].

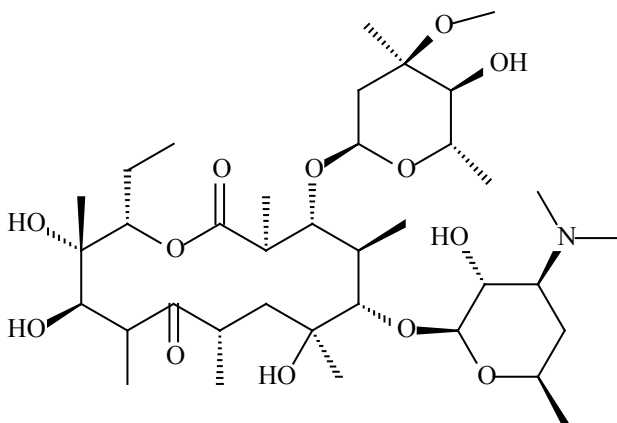
Mechanizm agregacji molekuł antybiotyku, ma ścisły związek z procesem wychwytu jonów Na^+ i K^+ przez molekuły amfoterycyny B. Analiza widm absorpcji oraz emisji i wzbudzenia fluorescencji amfoterycyny B w roztworach wodnych o zmiennej kwasowości wykazują na wyższy poziom agregacji związku w obecności jonów potasu niż jonów sodu. Najbardziej znaczące zmiany spektralne typowe dla zagregowanej amfoterycyny B występują w obszarze fizjologicznych wartości stężenia jonów wodorowych ($\text{pH} \sim 7$). Wyjaśnienie mechanizmów formowania agregatów molekularnych ma kluczowe znaczenie dla zmniejszenia u pacjentów pierwotnych efektów toksycznych występujących bezpośrednio po zastosowaniu antybiotyku [30].

Preobrazhenskaya i współpracownicy przedstawili metody chemicznej modyfikacji amfoterycyny oraz oznaczyli aktywność biologiczną nowo otrzymanych związków [40].

Erytromycyna

Makrolidy to grupa antybiotyków o działaniu bakteriostatycznym. Nazwa pochodzi od słów makro (duży) i oligo (lakton), ponieważ cząsteczki tych antybiotyków mają 12-16 atomowy rdzeń laktonowy. Erytromycyna to najbardziej znany naturalny antybiotyk makrolidowy, otrzymuje się ją go ze *Streptomyces erythreus*. Związek ten wykazuje znaczną toksyczność LD_{50} (doustnie) = około 4600 mg/kg (szczur), LD_{50} (doustnie) = około 2580 mg/kg (mysz). Może powodować również uczulenie w następstwie narażenia drogą oddechową, w kontrakcie ze skórą i po spożyciu.

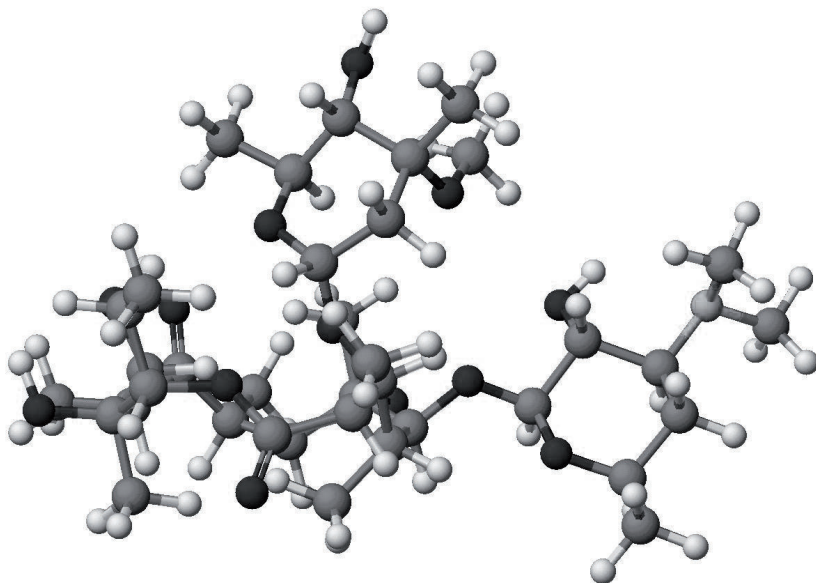
Erytromycyna to polihydroksylakton zawierający w swojej strukturze dwa pierścienie cukrowe (rys. 8.). Aglikonową część molekuly stanowi czternastoczłonowy pierścień laktonowy. O zasadowym charakterze całej cząsteczki ($pK_a=8,8$) decyduje amino cukier przyłączony do tego pierścienia za pomocą wiązania β -glikozydowego [41]. Drugim przyłączonym, za pomocą wiązania β -glikozydowego, cukrem jest, unikalna dla erytromycyny, L-kladynoza.



Rysunek 8. Erytromycyna.

Cząsteczki cukrów wchodzące w skład erytromycyny nie są zaangażowane

w wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe (rys. 9.) co umożliwia im łatwe wchodzenie w interakcje z innymi cząsteczkami w tym z dużymi cząsteczkami organicznymi.



Rysunek 9. Obliczona za pomocą metody semiempirycznej PM5 struktura erytromycyny.

Erytromycyna zawdzięcza swoją antybakteryjną aktywność zdolnością do inhibicji biosyntezy białek [42]. Makrolid ten inhibuje biosyntezę białek przez przyłączenie się rybosomalnego RNA, powodując, następnie oddysocjowanie *t*-RNA podczas translokacji [43].

Erytromycyna podobnie jak wiele makrolidów wykazuje najsilniejsze właściwości antybakteryjne przeciwko bakteriom Gram-dodatnim, części Gram-ujemnym oraz *Mycoplasmas*, *Chlamydia* i *Rickettsia*. Stosuje się ją głównie w antybiotykoterapii u pacjentów uczulonych na penicylinę.

Podziękowanie

Praca finansowana ze środków na naukę w latach 2009-2012 jako projekt badawczy N 204 005536.

Literatura

1. J. Berger, A.I. Rachlin, W.E. Scott, L.H. Sternbach, M.W. Goldberg, J. Am. Chem. Soc. 73 (1951) 5295
2. J.W. Westley, R.H. Evans, T. Williams, Chemical Communications (1970) 71
3. J. Juillard, C. Tissier, G. Jeminet, J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1 84 (1988) 951
4. Y. Pointud, J. Juillard, J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1 84 (1988) 959
5. P. Laubry, C. Tissier, G. Mousset, J. Juillard, J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1 84 (1988) 969
6. Y. Pointud, E. Passelaigue, J. Juillard, J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1 84 (1988) 1713
7. P. Laubry, G. Mousset, P. Martinet, M. Tissier, C. Tissier, J. Juillard, J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1 84 (1988) 3175
8. M. Tissier, G. Mousset, J. Juillard, J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1 85 (1989) 1337
9. J. Woznicka, C. Lherrnet, N. Morel-Desrosiers, J.-P. Morel, J. Juillard, J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1 85 (1989) 1709
10. B. Ehrenberg, L.Z. Steinberg, R. Panigel, G. Navon, Biophys. Chem. 7 (1977) 217
11. J. Grandjean, P. Laszlo, Angew. Chem. 91 (1979) 166
12. P. Malfreyt, Y. Pascal, J. Juillard, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2 (1994) 2031
13. J.C. Beloeil, M.A. Deluc, J.Y. Lallemant, G. Dauphin, J. Org. Chem. 49 (1984) 1797
14. R. Lyazghi, A. Cueur, G. Dauphin, J. Juillard, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2 (1992) 35

15. G. Schroeder, B. Gierczyk, B. Brzezinski, B. Różalski, F. Bartl, G. Zundel, J. Sośnicki, E. Grech, *J.Mol. Str.* 516 (2000) 91
16. H. Saito, R. Tabeta, *Bull. Chem. Sci. Jpn.* 60 (1987) 61
17. J.A. Harris, C.A.L. Russell, J.P.G. Wilkins, *Analyst* 123 (1998) 2625
18. D.K. Matabudul, B. Conway, I. Lumley, S. Sumara, *Food Chemistry* 75 (2001) 345
19. D.K. Matabudul, N.T. Crosby, I. Lumley, S. Sumara, *Food Chemistry* 75 (2001) 465
20. G. Dusi, V. Gamba, *J. Chromatogr. A* 835 (1999) 243
21. W.J. Blanchflower, D.G. Kennedy, *J. Chromatogr. B* 675 (1996) 225
22. J.W. Westley, *Polyether Antibiotics: Naturally Occurring Acid Ionophores*, 1, Marcel Dekker Inc. (1982)
23. J.F. Kinsel, E.I. Melnik, S. Lindenbaum, L.A. Sternson and Y.A. Ovchinnikov, *Intern. J. Pharm.* 12 (1982) 97
24. J.F. Kinsel, E.I. Melnik, S. Lindenbaum, L.A. Sternson, Y.A. Ovchinnikov, *Biochim. Biophys. Acta* 684 (1982) 233
25. J.F. Kinsel, E.I. Melnik, L.A. Sternson, S. Lindenbaum, Y.A. Ovchinnikov, *Biochim. Biophys. Acta*, 692 (1982) 377
26. E. Ebata, H. Kasahara, K. Sekine, Y. Inoue, *J. Antibiot.* 28 (1975) 118
27. T K. C. Nicolaou, R. A. Daines, T. K. Chakraborty, Y. Ogawa, *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987) 2821
28. M. Bagiński, H. Resat, E. Borowski, *Biochim Biophys Acta* 1567 (2002) 63
29. I.I. Bekersky, R.M. Fielding, D. Buell, I.I. Lawrence, *Pharm Sci Technol Today* 2(6) (1999) 230
30. W. I. Gruszecki, R. Luchowski, M. Gagoś, M. Arczewska, P. Sarkar, M. Hereć, B. Myśliwa-Kurdziel, K. Strzałka, I. Gryczynski, Z. Gryczynski, *Biophys. Chem.* 143 (2009) 95
31. Gagoś M, Gruszecki W. I., *Biophys. Chem.* 137 (2008) 110
32. M. Gagoś, M. Hereć, M. Arczewska, G. Czernel, M. Dalla Serra, W.I. Gruszecki, *Biophys. Chem.* 136 (2008) 44

33. Gabrielska, J., M. Gagoś, J. Gubernator, W.I. Gruszecki, *FEBS Lett*, 580 (2008) 2677
34. M. Baginski, K. Sternal, J. Czub, E. Borowski, *Acta Biochemica Polonica* 52 (2005) 655
35. S. Meddeb, J. Berges, J. Caillet, J. Langlet, *Biochim Biophys Acta* 1112 (1992) 266
36. K. Sternal, J. Czub, M. Baginski, *J Mol Model* 10 (2004) 223
37. F. C. Szoka, M. Tang, *J. Liposome Research*, 3 (1993) 363.
38. M. Sedlak, *Medicinal Chemistry*, 9 (2009) 1306
39. M. N. Preobrazhenskaya, E. N. Olsufyeva, S.E. Solovieva, A. N. Tevyashova, M. I. Reznikova, Y. N. Luzikov, L. P. Terekhova, A. S. Trenin, O. A. Galatenko, I. D. Treshalin, E.P. Mirchink, V. M. Bukhman, H. Sletta, S. B. Zotchev, *J. Med. Chem.* 52 (2009) 189
40. M. Fyles, *Chem. Soc. Rev.*, 36 (2007) 335
41. I. Kanfer, M. F. Skinner, R. B. Walker, *J. Chromatogr. A* 812 (1998) 255
42. S. Pal, *Tetrahedron* 62 (2006) 3171
43. A. Brisson-Noel, P. Trieu-Cuot, P. Courvalin, *J. Antimicrob. Chemother.* 22 (1988) 13

Rozdział 5

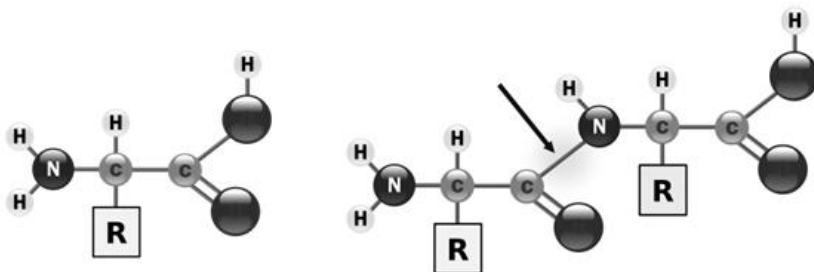
Peptydy jako nowe syntetyczne składniki preparatów kosmetycznych

Anna Olejnik, Izabela Nowak

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

Peptydy to krótkie łańcuchy złożone z aminokwasów (rys. 1), w szczególności zaś wyróżniamy:

- polipeptydy, kiedy mamy do czynienia z pojedynczym łańcuchem peptydowym składającym się z maksymalnie 100 aminokwasów,
- oligopeptydy – polipeptydy składające się z 2-9 aminokwasów, czyli di-, tri-, tetra-, penta-, hekso-, hepta-, okta i nonapeptydy;



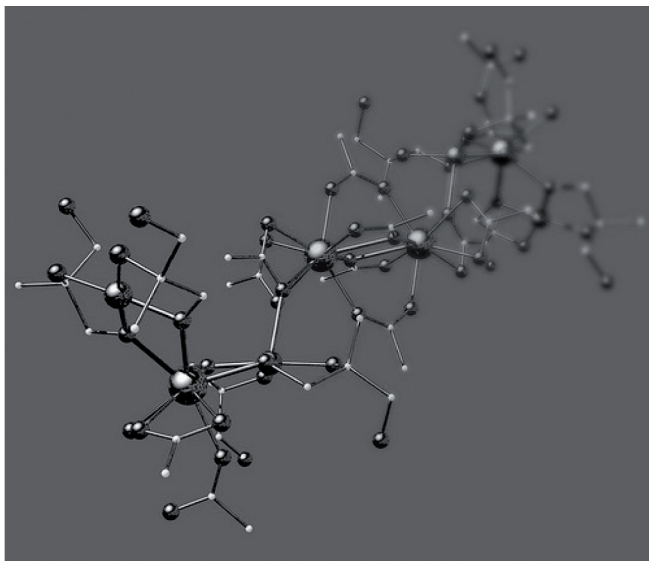
Rysunek 1. Wzory strukturalne aminokwasu oraz dipeptydu, z zaznaczonym wiązaniem peptydowym.

Naturalne peptydy występują w produktach zwierzęcych i roślinnych, takich jak mleko, jedwab, soja, pszenica, ryż. Z kolei do naturalnych peptydów

organizmu ludzkiego należy wiele hormonów (np. melanotropina, glutation), neuroprzekazników oraz związków odpowiedzialnych za przekaz informacji wewnątrzkomórkowej. Aktywność biologiczna peptydów jako przekazników informacji w żywych tkankach sprawia, że istnieje duże zapotrzebowanie na te składniki w kosmetyce. W szczególności osiągnięcia z zakresu biotechnologii pozwalają przewidywać, który fragment cząsteczki odpowiada za jej aktywność biologiczną i na tej podstawie projektować mniejsze i tańsze odpowiedniki pierwowzorów, o ściśle ukierunkowanym, zamierzonym wpływie na konkretny proces biologiczny, np. odnowy skóry. Kosmetyki z peptydami zaliczane są do kosmeceutyków, czyli produktów o działaniu z pogranicza kosmetologii i farmakologii.

Kremy zawierające dodatek działających kierunkowo na nasz organizm biologicznie aktywnych związków lub ich mieszanin stają się coraz bardziej powszechne w wyrobach przemysłu kosmetycznego. Peptydy (rys. 2) stanowią składnik aktywny wielu kosmetyków przeznaczonych do pielęgnacji skóry dojrzałej, w bardzo popularnych seriach *anti-age* lub *anti-wrinkle cosmetics*. Z tego względu kosmeceutyki te są szczególnie poszukiwane przez konsumentów. Peptydy w kosmetykach to najczęściej tzw. „peptydomimetyki” (peptydy biomimetyczne) czyli substancje wiernie naśladujące mechanizm działania i skutki wywierane przez ich naturalne odpowiedniki. Pojawiło się także ostatnio pojęcie „peptydy IQ”, czyli peptydy inteligentne, którym określa się peptydy z dołączonym łańcuchem kwasu tłuszczowego (np. palmitynowego), dzięki czemu specyfik lepiej przenika przez skórę i łatwiej dociera do miejsca przeznaczenia. Dodatkową zaletą jest mały rozmiar cząsteczek, co ułatwia peptydom pokonywanie barier skórnych i nie ma konieczności zamykania ich w nośnikach transdermalnych. Pierwszy drogerijny krem przeciwmarszczkowy z peptydami pojawił się w 2005 roku (StriVectin-SD), ale informacje działaniu jego składnika aktywnego, tj. oligopeptydzie opatentowanych pod nazwą Pal-KTTKS (Pal-Lys-Thr-Thr-Lys-Ser) podano w 2002 roku, podczas 20-go Kongresu Dermatologicznego w Paryżu. Światowym pionierem w syntezie krótkołańcuchowych endogennych peptydów jest francuski IEB (Institut

Europèen de Biologie cellulaire), a w tworzeniu peptydów na użytek przemysłu kosmetycznego specjalizuje się hiszpańska firma Lipotec S.A.



Rysunek 2. Przestrzenna budowa peptydu [1].

Podsumowując, zainteresowanie surowcami peptydowymi wynika przede wszystkim z faktu, że są istotnymi elementami strukturalnymi wszystkich żywych organizmów i pełnią rolę kluczowych cząsteczek biologicznych odpowiedzialnych za regulację proliferacji, różnicowania, przeżycia komórki i ekspresji genów [2]. Charakteryzują się dużą funkcjonalnością zarówno w stosunku do skóry, jak i samych produktów kosmetycznych, do których są one wprowadzane. Ich właściwości wpływają na poprawienie cech dermatologicznych preparatu, zdolność tworzenia żeli, wiązanie wilgoci, oddziaływanie na teksturę tkanki, tworzenie błonek na stosowanych powierzchniach, zwiększanie adhezji. Z punktu widzenia produktów kosmetycznych peptydy są związkami stabilnymi, przyjaznymi skórze, praktycznie niepowodującymi podrażnień ani uczuleń.

Dzięki zastosowaniu nowych technik naukowcom udało się opracować

metody otrzymywania syntetycznych peptydów o ukierunkowanym, efektywnym oddziaływaniu na skórę - w odróżnieniu od białek mogą one przenikać do głębszych warstw skóry [3, 4]. Tabela 1 przedstawia wybrane syntetyczne peptydy stosowane powszechnie w produktach kosmetycznych. Działanie peptydów można porównać do pracy posłańców. Każdy peptyd w zależności od rodzaju i kolejności ułożenia tworzących go aminokwasów niesie w sobie określoną wiadomość dla komórek skóry i w ten sposób wpływa na ich funkcjonowanie [5].

Tabela 1. Komercyjnie dostępne bioaktywne peptydy [m.in. 4].

Firma	Nazwa wg INCI	Działanie	Nazwa handlowa
Atrium	Tripeptyd-2	Pobudzanie zewnątrzkomórkowej macierzy	ECM-protect
Atrium	Tripeptyd-1	Pobudzanie zewnątrzkomórkowej macierzy	Kollaren
Atrium	Acetylowany pentapeptyd-1	Zwiększenie produkcji melaniny	Melitane
Cognis.	Acetylowany tetrapeptyd-9	Pobudzanie syntezy proteoglikanów	DERMICAN
Cognis	Acetylowany tetrapeptyd-11	Pobudzanie syntezy proteoglikanów	SYNiorage
Grand Indust.	Oligopeptyd-10	Ochrona skóry	InvisaSkin-64
Lipotec	Acetylowany heksapeptyd-8 (dawna nazwa acetylowany heksapeptyd-3)	Imitowanie enkefaliny	Leuphasyl
Lipotec	Acetylowany heksapeptyd-3	Blokowanie kompleksu SNARE	Argireline
Lipotec	Acetylowany oktapeptyd-1	Blokowanie kompleksu SNARE	SNAP-8
Lipotec	Heksapeptyd-10	Zwiększenie proliferacji komórek i laminy V	Serilesine

Pentapharm	Pentapeptyd-3	Neuroinhibitor	Vialox
Pentapharm	Dipeptyd	Naśladuje działanie toksyny Temple Viper	Syn-ake
Peter Thomas Roth Wrinkle Preventer.	Palmitynowytripeptyd-1 PTri-1	Zwiększa produkcję kolagenu I i IV	Trylagen/ Aldenine
Procyte	Kompleks GHK-Cu	Gojenie ran	Novea
Sederma	Palmitynowy tetrapeptyd 7	Zwiększa elastyczność	Matrixyl 3000, Rigin
Sederma	Palmitynowy pentapeptyd-4	Stymulacja produkcji kolagenu	Matrixyl
Sederma	Palmitynowy oligopeptyd	Zwiększenie produkcji kolagenu i kwasu hialuronowego	Biopeptide-EL

Długoletnie badania oraz analiza podstawowych biochemicznych mechanizmów oddziaływania na zmarszczki doprowadziły do odkrycia substancji, które zrewolucjonizowały świat kosmetyczny. Dowiedziono, że to właśnie peptydy wykazują biochemiczną aktywność i skuteczność w walce ze zmarszczkami mimicznymi na czole i wokół oczu. Na szczególną uwagę zasługuje także synergiczny efekt, wywołany równoczesnym działaniem kilku peptydów [6]. Badania wykazały, że peptydy są bezpieczniejszym, tańszym i delikatniejszym rozwiązaniem niż botoks, który wpływa na te same mechanizmy tworzenia zmarszczek, ale w odmienny, bardziej inwazyjny sposób.

Peptydy stosowane w kosmetyce można podzielić na trzy grupy:

1. *Peptydy sygnalizacyjne* – stymulujące syntezę białek skóry – mają zdolność spłykania zmarszczek, pobudzając produkcję elastyny i kolagenu - włókien podporowych skóry.
2. *Inhibitory neurotransmiterów (neuropeptydy)* - rozkurczają skórę wokół zmarszczek.
3. *Peptydy transportujące* substancje aktywne w głąb skóry [7].

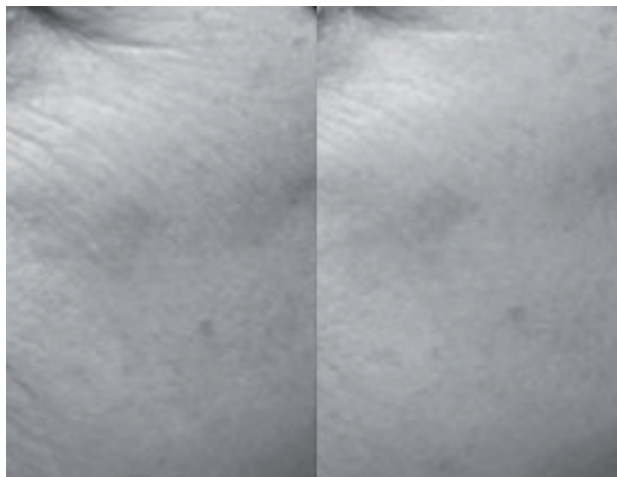
1. Peptydy sygnałowe - stymulujące

Peptydy wykazują zdolność do inicjowania procesów wewnątrzkomórkowych, zwiększenia produkcji fibroblastów skóry właściwej, wpływając na syntezę kolagenu, a w konsekwencji na poprawienie wyglądu skóry.

Jednym z przedstawicieli peptydów sygnałowych jest heksapeptyd o następującej sekwencji aminokwasów Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly. Znacząco stymuluje produkcję fibroblastów, jednocześnie obniżając ekspresję elastyny [8, 9]. Dodatkowo peptyd ten został zmodyfikowany kwasem palmitynowym, aby łatwiej mógł wnikać w głąb naskórka, dlatego w przemyśle kosmetycznym znany jest pod nazwą oligopeptydu palmitynowego [10].

Na szczególne zainteresowanie zasługuje pentapeptyd składający się z pięciu aminokwasów: Lys-Thr-Thr-Lys-Ser (KTTKS), który jest fragmentem struktury prokolagenu typu I. Badania wykazały, że pentapeptyd może stymulować fibroblasty do syntezy molekuł tkanki łącznej, kolagenu i glikozoaminoglikanów, regulując w ten sposób macierz skóry [11]. Choć potencjalne użycie peptydów może być skuteczne, jednak dostarczenie ich w głąb skóry jest utrudnione z powodu ich jonowej natury. W celu zwiększenia ich stabilności i ułatwienia penetracji w głąb skóry użyto pochodnych kwasów tłuszczowych, które zwiększały liofilowość peptydów [12]. Naukowcy dowiedli, że polipeptydy zmodyfikowane kwasami tłuszczowymi przenikają przez skórę 5 razy łatwiej niż niemodyfikowane peptydy [13]. Z tego względu w formach kosmetycznych wykorzystuje się KTTKS jako pochodną palmitynową (pal-Lys-Thr-Thr-Lys-Ser). Wyżej wymieniony peptyd, znany również pod nazwą Matrixyl, zasługuje na szczególną uwagę, ponieważ jako pierwszy został zastosowany w kosmetyce. Badania wykazały, że pal-KTTKS stymuluje komórki skóry do produkcji kolagenu (I i IV), fibronektyny, elastyny i kwasu hialuronowego, wpływając na sprężystość i jędrność skóry. Kliniczne testy przeprowadzone na kobietach w wieku od 35 do 55 wykazały, że pentapeptydy (pal-KTTKS) nie podrażniają skóry i nie powodują niekorzystnych skutków ubocznych. Dodatkowo po 8 i 12 tygodniach można było zaobserwować znaczną redukcję zmarszczek, cieni pod oczami oraz zwiększenie jędrności skóry (rys. 3)

[10]. Działanie przeciwzmarszczkowe peptydów typu Matrixyl™ porównywane jest w badaniach do efektów, jakie dają kwasy hydroksylowe (AHA, BHA) oraz retinol.



A

B

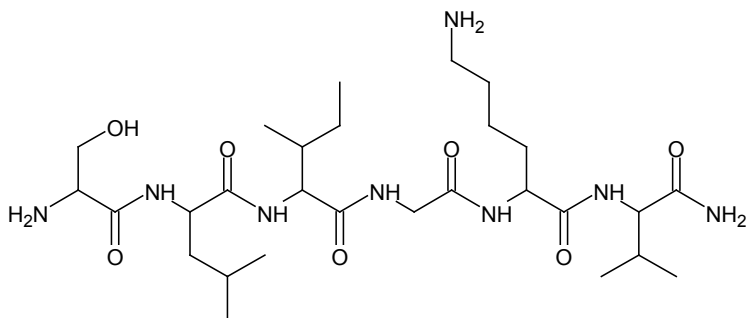
Rysunek 3. Efekt działania *pal-KTTKS* na zmarszczki po 12 tygodniach (B). Stan skóry dla porównania przed zastosowaniem *pal-KTTKS* (A) [14].

Badania *in vitro* i *in vivo* wykazują podobne działanie tripeptydu Gly-His-Lys, który powoduje zwiększenie produkcji kolagenu poprzez stymulację fibroblastów [15]. Potwierdzeniem tego jest redukcja długości i głębokości zmarszczek oraz zmniejszenie szorstkości skóry. Peptydy sygnalizujące mogą naśladować podstawowe etapy produkcji kolagenu, tym samym wpływając na polepszenie wyglądu skóry [16].

1.1. Heksapeptyd (Serilesine) peptyd sygnałowy (stymulujący)

Jednym z przedstawicieli peptydów sygnałowych jest heksapeptyd-10 (nazwa handlowa: Serilesine®) o następującej sekwencji aminokwasów H-Ser-Leu-Ile-Gly-Lys-Val-NH₂ (rys. 4). Heksapeptyd ten odpowiedzialny jest za spajanie komórek naskórka i skóry właściwej. Działa na błonę podstawną skóry, czyli na granicę naskórkowo-skórną. Stymuluje produkcję nowych komórek

skóry, dzięki czemu powoduje zwiększenie spoistości, gęstości i gładkości skóry. Odpowiada fragmentowi łańcucha lamininy (białka pełniącego ważną rolę w oddziaływaniach komórek nabłonka i śródbłonka z innymi składnikami błony podstawnej) i w ten sposób wpływa na wzrost jej syntezy. Serilesine zwiększa również syntezę $\alpha 6$ -integryny, białek adhezyjnych, które współdziałając z innymi receptorami białkowymi umożliwiają agregację komórek.



Rysunek 4. Wzór strukturalny heksapeptydu.

Powoduje również wzrost syntezy hemidesmosomów (półdesmosomy), które łączą spód tkanki nabłonkowej z błoną podstawną. Dzięki wyżej przedstawionym właściwościom Serilesine może wpływać na zwiększenie połączeń dermo-epidermalnych, dlatego w kosmetyce jest wprowadzany do emulsji, żeli i kremów, w celu zregenerowania i odświeżenia skóry [17].

2. Inhibitory neurotransmiterów (neuropeptydy)

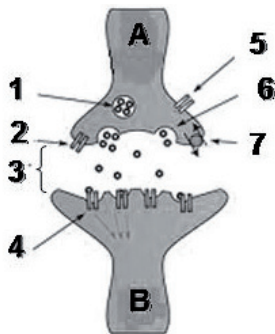
Wśród polipeptydów popularność zdobyły również neuropeptydy, które mogą działać, jako neuromodulatory, neuroprzekazniki lub neurohormony. Ich działanie związane jest ze zdolnością blokowania w skórze receptorów wpływających na przepuszczalność jonów sodu, tym samym ograniczając przepływ impulsów z komórek nerwowych. Głównym zadaniem neuropeptydów jest przekazywanie komórkom skóry sygnału, by nie pozwalały mięśniom twarzy zbyt intensywnie się kurczyć. Zapobiegają w ten sposób tworzeniu się zmarszczek mimicznych. Dzięki tym funkcjom mogą zastępować neurotoksynę

botulinową (BOTOX®) stosowaną w medycynie estetycznej do usuwania zmarszczek mimicznych. Zabieg polega na wstrzyknięciu toksyny w okolice zmarszczek, a efekt wygładzenia skóry po jednej sesji utrzymuje się od 3 do 6 miesięcy. Z powodu dużej toksyczności neurotoksyny botulinowej nie można stosować jej w produktach kosmetycznych. Z tego względu naukowcy pracowali nad otrzymaniem związku, który będzie wykazywał mniejszą toksyczność, ale podobne efekty terapeutyczne. Tymi odpowiednikami okazały się być właśnie oligopeptydy.

2.1. Biochemiczny mechanizm działania peptydów.

Udowodniono, że zmianom struktury skóry można w znacznym stopniu zapobiegać poprzez redukcję skurczów mięśniowych, dlatego istotne jest zrozumienie mechanizmu, jaki je powoduje. Gdy z wnętrza synapsy zostanie uwolniony neurotransmitter dochodzi do skurczów mięśni. W procesie uwalniania neurotransmitera istotną rolę odgrywa kompleks SNARE (*SNAP REceptor*), który pełni funkcję receptora impulsu [18]. Składa się on z trzech składników – proteiny VAMP (*vesicle associated membrane protein*), syntaksyny i proteiny synaptycznej SNAP-25 (*SyNaptosomal Associated Protein of 25kDa*), dzięki którym neurony mogą przeprowadzać egzocytozę. (rys. 5) Egzocytaza jest to proces uwalniania metabolitów powstających wewnątrz komórki do przestrzeni pozakomórkowej. Kompleks SNARE wychwytuje pęcherzyki synaptyczne i łączy je z membraną w celu uwolnienia neurotransmitera, działa więc jak komórkowy zacisk.

1. Pęcherzyk synaptyczny z neurotransmiterem;
2. Autoreceptor;
3. Synapsa z uwolnionym neurotransmiterem;
4. Receptory postsynaptyczne
5. Kanał wapniowy;
6. Egzocytaza pęcherzyka;
7. Odzyskany neurotransmitter

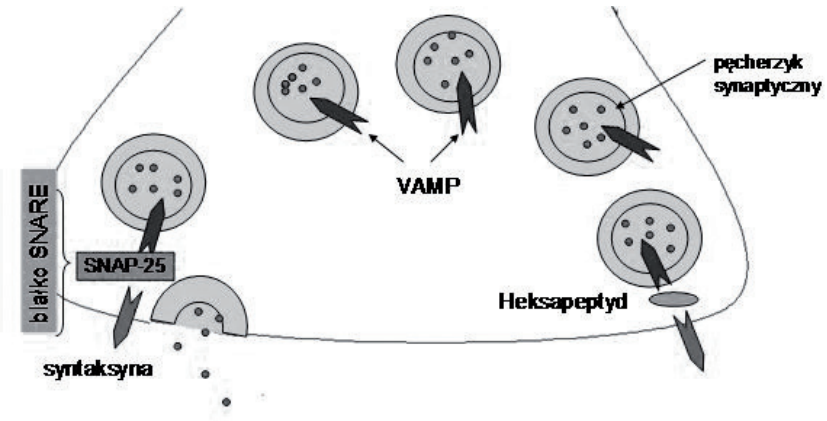


Rysunek 5. Połączenie synaptyczne neuron A (wysyłający) do neuron B (otrzymujący) [19].

Innowacyjne peptydy (np. acetylowany heksapeptyd-3 – Argireline®, acetylowany glutamyl heptapeptydu-1 – SNAP-7®, acetylowany oktapeptyd-1 – SNAP-8®) zostały zaprojektowane w ten sposób, by strukturą były podobne do N-terminalnie zakończonych protein synaptycznych SNAP-25. W ten sposób mogą rywalizować z naturalnym białkiem o pozycję w kompleksie SNARE, co w rezultacie powoduje zmianę jego składu. Jeśli dojdzie do destabilizacji kompleksu SNARE, wówczas pęcherzyk nie może uwolnić neurotransmiterów, zostanie przerwana egzocytoza, co powoduje stłumienie kontrakcji mięśniowej, dzięki czemu zapobiega się tworzeniu zmarszczek (rys. 6) [20]. Skurcz mięśni nastąpi, wtedy gdy podczas egzocytozy zostanie uwolniona acetylocholina.

W celu połączenia pęcherzyka z błoną komórkową potrzebne są dwa procesy:

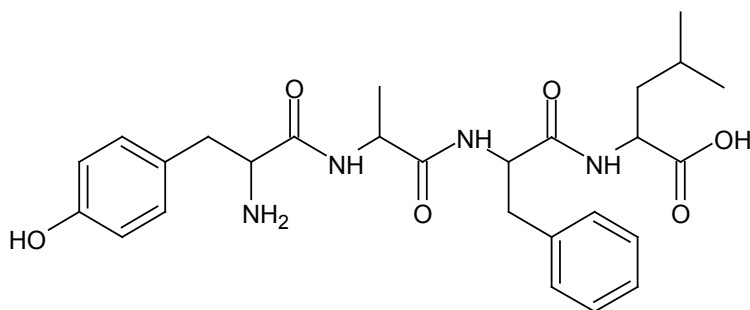
- tworzenie się kompleksu SNARE
- wejście jonu wapniowego do neuronu



Rysunek 6. Biochemiczny mechanizm działania peptydów [22].

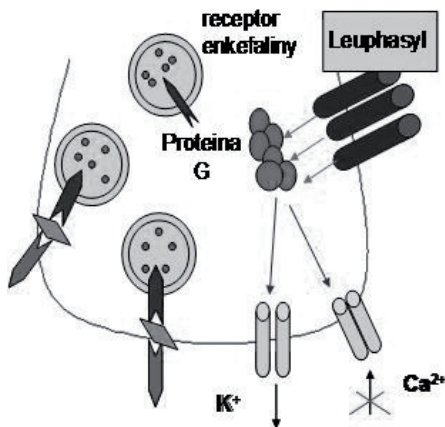
2. 2. Pentapeptyd Leuphasyl®

Jednym z reprezentantów neuropeptydów jest pentapeptyd o następującej sekwencji aminokwasów Tyr-Ala-Gly-Phe-Leu (nazwa handlowa: Leuphasyl®) (rys. 7) [21].



Rysunek 7. Wzór strukturalny pentapeptydu.

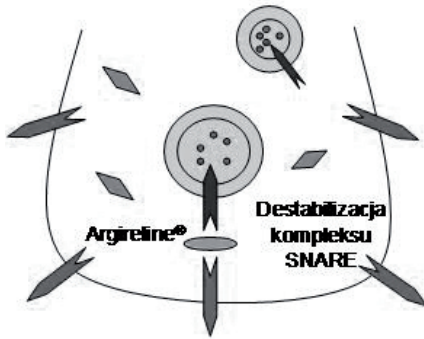
Pentapeptyd ma za zadanie funkcjonować jako modyfikowana enkefalina (neuroprzekaznik peptydowy), która łączy się z receptorem enkefaliny poza komórką nerwową. To połączenie powoduje uwolnienie podjednostek (α , β , γ) białka G, które zamykają kanały wapniowe zapobiegając w ten sposób fuzji pęcherzyka oraz nie dopuszczają do uwolnienia acetylocholiny przez synapsę do mięśni (rys. 8) [22]. Ten proces utrzymuje neuron w fazie spoczynku, osłabia kurczenie się mięśni i zapobiega tworzeniu się zmarszczek.



Rysunek 8. Mechanizm działania pentapeptydu. [23]

2.3. Heksapeptyd – neuropeptyd Argireline®

Najbardziej wykorzystywanym w kosmetologii związkiem o działaniu hamującym uwalnianie acetylocholiny jest heksapeptyd-3 Argireline® (Ac-Glu-

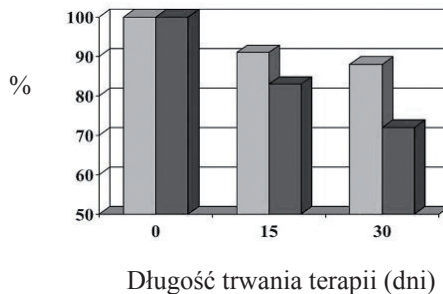


Rysunek 9. Mechanizm działania Argireline® [12]

Glu-Met-Gln-Arg-Arg-NH₂), którego budowa strukturalna wzorowana jest na proteinie SNAP 25.

Heksapeptyd ma za zadanie konkurować z proteiną SNAP-25 o pozycję w kompleksie SNARE i w ten sposób ma wpływać na jego destabilizację (rys. 6 i 9) [12]. Peptyd ten wykazuje znaczące przenikanie przez skórę. Badania kliniczne wykazały, że użycie emulsji o/w (olej w wodzie), w której peptyd stanowi

10% wagowych wszystkich składników, redukuje intensywność zmarszczek do 30% po 30-dniowej terapii. Pomiary głębokości zmarszczek zostały wykonane przed zastosowaniem kremu oraz w 15 dniu i w 30 dniu jego stosowania (rys. 10) [23]. Dodatkowo heksapeptyd (Argireline) nie wykazuje neurotoksyczności i stanowi bezpieczną alternatywę dla neurotoksyny *botulinowej* (BoNTs). Z tego względu może być wprowadzony do kosmetyków takich jak kremy, żele czy emulsje, których głównym zadaniem jest usunięcie głębokich zmarszczek na czole lub w okolicy oczu [24].



Rysunek 10. Zastosowanie Argireliny w terapii przeciwzmarszczkowej. Tworzenie się zmarszczek wyrażone w procentach w stosunku do długości trwania terapii przy użyciu emulsji o/w niezawierającej heksapeptydu (szare słupki) i zawierającą 10% heksapeptydu (niebieskie słupki) [24].

Badania wykazały, że synergiczne działanie pentapeptydu Leuphasyl oraz heksapeptydu Argireline powoduje podwójne osłabienie skurczów mięśniowych, ponieważ Leuphasyl blokuje jony wapnia natomiast Argireline wpływa na destabilizację kompleksu SNARE.

2.4. Oktapeptyd – neuropeptyd

Kolejnym reprezentantem neuropeptydów jest antyzmarszczkowy oktapeptyd powstały w wyniku elongacji heksapeptydu (Argireline) znany pod nazwą handlową jako SNAP-8. Mechanizm jego działania jest taki sam jak wyżej przedstawionego heksapeptydu. W celu zaobserwowania właściwości antyzmarszczkowych zawartość SNAP-8 w roztworze powinna wynosić od 3 do 10 %. Przeprowadzone badania *in vitro* i *in vivo* wykazały większą skuteczność przeciwmarszczkową SNAP-8 aż do 30% porównaniu z jego prekursorem heksapeptydem Argireline. Z badań *in vitro* wynika, że dwa dodatkowe aminokwasy w znacznym stopniu wpłynęły na aktywność przeciwmarszczkową tego związku [25].

Obserwacja natury pozwoliła na odkrycie ciekawego źródła bioaktywnych peptydów. Zaobserwowano, że żmija *Tropidolaemus wagler* produkuje toksynę, która blokuje komunikację nerwowo-mięśniową, co w rezultacie prowadzi do sparaliżowania ofiary. Badania wykazały, że w składzie jadu obecna jest proteina Waglerin 1, hamująca uwolnienie acetylocholin. Na podstawie tych obserwacji zsyntetyzowano tripeptyd znany handlowo jako Syn-ake (Pentapharm), który ma imitować efekt działania wyżej wymienionej proteiny [26].

3. Peptydy transportujące [7, 10]

Kolejną istotną funkcją peptydów w kosmetykach jest ich zdolność do stabilizacji oraz transportu kationów miedzi. Pierwiastek ten jest niezbędny w procesie gojenia ran, wspomaga wiele procesów enzymatycznych oraz ma wpływ na rozwój naczyń krwionośnych. Miedź działa przeciwstarzeniowo pełniąc istotną funkcję w procesie neutralizowania wolnych rodników w skórze. Dodatkowo, od tego pierwiastka zależna jest oksydaza lizylowa, która pełni funkcję w procesie tworzenia kolagenu i elastyny. Tripeptyd Gly-His-Lys

(GHK-Cu) może tworzyć kompleks z miedzią i odgrywa kluczową funkcję w skórze [27]. Kompleks GHK-Cu stymuluje syntezę kolagenu i substancji z grupy glikozaminoglikanów, które zapewniają stałe stężenie wody w skórze właściwej. Kompleks poprawia wygląd skóry poprzez stymulację działania metaloproteinazy I i II, która usuwa uszkodzony kolagen i elastynę. Oprócz tego pobudza syntezę nowych cząsteczek białek w fibroblastach. Uważa się, że miedziowy peptyd jako kosmeceutyk może wpływać na:

- poprawienie elastyczności, jędrności skóry;
- zwiększenie grubości skóry właściwej i naskórka;
- redukcję głębokości zmarszczek;
- usuwanie przebarwień skóry;

Analizy wykazały, że zarówno tripeptyd jak i kompleks tripeptydu z miedzią znacząco wpływają na stymulację produkcji kolagenu, poprawiając w ten sposób wygląd skóry, jej grubość i gęstość [24]. Kliniczne badania przeprowadzone na grupie 41 kobiet w ciągu 12 tygodni dowodzą, że kremy do pielęgnacji twarzy zawierające kompleks peptydu z miedzią wykazują pozytywne działanie przeciwzmarszczkowe oraz wygładzają skórę [18].

Istotnym parametrem odpowiedzialnym za terapeutyczne działanie peptydu jest jego odpowiednia zawartość w recepturze. Należy pamiętać, że ilość substancji aktywnej w preparacie odróżnia kosmetyki od farmaceutyków. Z tego względu firmy produkujące kosmetyki nie mogą stosować substancji aktywnych powyżej określonego stężenia. Tabela 2 przedstawia zebrane najważniejsze funkcje peptydów stosowanych w kosmetologii. Nie ulega wątpliwości, że kosmetyki zawierające w swym składzie peptydy umożliwią walkę z efektami starzenia bez konieczności podejmowania decyzji o stosowaniu zastrzyków z toksyną botulinową.

Peptydy mogą być modyfikowane na różne sposoby w celu zwiększenia ich specyficzności, stabilności, rozpuszczalności, ułatwienia przenikalności przez skórę oraz zmniejszenia toksyczności. Z tego względu bioaktywne peptydy mają wielokierunkowe możliwości zastosowania w dermatologii oraz kosmetologii, co doprowadziło w ostatnich latach do zwiększenia ich znaczenia. Rozwój

technologii pozwala na syntezę odpowiedniej kombinacji aminokwasów, które dopasowane są do potrzeb skóry. Syntetyczne krótkołańcuchowe peptydy są zaprojektowane w taki sposób, by mogły naśladować niektóre procesy biologiczne lub w celu zahamowania objawów starzenia się skóry [28].

Tabela 2. Peptydy w kosmetologii [m.in. 18].

Typ	Działanie <i>in vitro</i>	Oczekiwane efekty badań klinicznych <i>in vivo</i>
Peptydy sygnalizujące (stymulujące)	inicjują mechanizm gojenia ran poprzez aktywację fibroblastów produkujących kolagen	zwiększają produkcję kolagenu, by poprawić wygląd skóry
Neuropeptydy (rozkurczające)	inhibują uwalnianie acetylocholino, blokując tym samym przekazywanie informacji o skurczu mięśni	zmniejszają skurcze mięśni
Peptydy transportujące	dostarczają miedź w głąb skóry, powodując aktywację enzymów odpowiedzialnych za gojenie ran	zwiększają produkcję kolagenu, wygładzając skórę

Jednak formułacje z peptydami nadal budzą kontrowersje, gdyż nie do końca poznano efekty ich długotrwałego stosowania. Istnieje możliwość, że łańcuchy aminokwasów mogą aktywować procesy o nieznanym dotąd mechanizmach, wywołujące niepożądane konsekwencje. Z tego względu istotne są dalsze badania *in vitro* i *in vivo*, które dokładnie określą korzyści ich stosowania.

Jak dotąd wiadomo, że peptydy działają jako regulatory komórkowe, są łagodne i efektywne, dlatego najprawdopodobniej przyszłość na rynku kosmetycznym należy właśnie do nich.

Literatura

1. http://1.bp.blogspot.com/_Ye2zI6pKA50/SbVORe5MLxI/AAAAAAAAABaI/_vRZ5znxVbM/s1600-h/Molecule_by+Combined+Media.jpg
2. Wieteska-Skrzeczyńska W. Zastosowanie niskocząsteczkowych peptydów w kosmetologii, Konferencja HPCI, 24-25 Listopad Warszawa
3. Zhang L., Falla T. J. Clinics in Dermatology 27, 485–494, 2009
4. Fields K., Falla T.,J., Rodan K., Bush L., Journal of Cosmetic Dermatology 8, 8–13, 2009
5. Kwiatkowska, B., Mali Posłańcy, Wysokie obcasy, 2008-10-05
6. Lupo, M. P Dermatol Surg 31:7 Part 2:July, 2005
7. Bosacka, K., Peptydy-nowość na zmarszczki, Wysokie obcasy, 2006-04-10
8. Kamoun, A., Landreau JM, Cell Adhes Commun, 3, 273–281, 1995
9. Tajima, S., Wachi, H., Uemura, Y., Arch Dermatol Res. 289,489–492, 1997
10. Robinson, L.R., Fitzgerald N.C., Doughty D.G., Int J Cosmet Sci 27, 155, 2005
11. Katayama, K., Armendariz-Borunda, J., Raghow, R., Kang, A.H., Seyer, J.M. J. Biol. Chem. 268, 9941–9944, 1993
12. Lupo, M. P., Cole, A. L., Dermatologic Therapy, 20, 343–349, 2007
13. Foldvari, M., Attah-Poku, S., Hu, J., J. Pharm. Sci. 87, 1203–1208, 1998
14. Draelos, Z., D., Journal of Cosmetic Dermatology 6,2–6, 2007
15. Maquart, F.X., Pickart, L., Laurant, M., FEBS Lett 238, 343–346, 1988
16. Lupo, M.P., Dermatol Surg; 31, 832–836,2005
17. <http://www.centerchem.com/PDFs/Serilesine%20E9Bs.pdf>
18. Ferrer-Montiel, A., et al. J Biol Chem, 272, 2634-2638, 1997
19. <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/c/c1/>

Synapse_diag1.png/260px-Synapse_diag1.png

20. US Patent 7015192 - Neuronal exocytosis inhibiting peptides and cosmetic and pharmaceutical compositions containing said peptides US Patent Issued on March 21, 2006
21. <http://www.centerchem.com/PDFs/Leuphasyl%20Tech%20Lit%20June%2005.pdf>
22. <http://www.centerchem.com/PDFs/DLeuphasyl%20w%20stamp.pdf>, Barcelona, Spain accessed 2006
23. <http://www.lipotec.com/ficha.php?producto=3>
24. Blanes-Mira, C., Clemente, J., Jodas, G., Gil, A., Fernández-Ballester, G., Ponsati, B., Gutierrez, L., Pérez-Payá, E., Ferrer-Montiel, A. *Int J Cosmet Sci* 24, 303-310, 2002
25. http://www.lotioncrafter.com/reference/tech_data_snap_8.pdf
26. Sellin L.C. , Mattila K., Annala A. *Biophys J*, 70, 3–13, 1996
27. Pickart L, Freedman JH, Loher WJ, et al. *Nature* 288, 715–717, 1980
28. Z.D. Draelos, *Kosmeceutyki*, Elsevier-Urban&Partner, 2006

Rozdział 6

Zastosowanie spektroskopii ^{19}F NMR w badaniach związków boroorganicznych

Agnieszka Adamczyk-Woźniak, Andrzej Sporzyński
*Politechnika Warszawska, Wydział Chemiczny, Noakowskiego 3,
00-664 Warszawa*

1. Wprowadzenie

Związki boroorganiczne znajdują szerokie zastosowanie we wszystkich dziedzinach chemii: w syntezie organicznej (np. reakcje Suzukiego i Petasisa), katalizie, chemii supramolekularnej (receptory molekularne różnych ważnych grup związków) oraz w biologii i medycynie [1]. Spektroskopia NMR jest bardzo ważnym narzędziem w badaniach struktur, przebiegu reakcji i ich kinetyki, równowag czy oddziaływań molekularnych.

Wykorzystanie rezonansu różnych jąder zależy od rodzaju badanych związków. Rezonans ^1H NMR ma w przypadku związków boroorganicznych ograniczone zastosowanie ze względu na to, że często istotne z punktu widzenia zastosowań tych związków, zmiany podstawników przy atomie boru, liczby koordynacyjnej, stopnia utlenienia, tworzenia różnego rodzaju kompleksów, mają niewielki wpływ na wygląd widma protonowego [2]. Więcej informacji można otrzymać z rezonansu ^{13}C NMR, jednak specyfika tego rodzaju spektroskopii ogranicza jej zastosowanie. Należy dodać, że z powodu momentu kwadrupolowego jądra ^{11}B ($eQ = 0,0355 \cdot 10^{-28} \text{ m}^2$) sygnały atomów węgla B–C i związanych z nimi protonów są znacznie poszerzone i najczęściej niewidoczne w widmie.

Bardzo użyteczną techniką NMR w badaniach związków boroorganicznych

jest spektroskopia ^{11}B NMR [3]. Wysoka zawartość naturalna izotopu ^{11}B (Tabela 1) pozwala na szybką rejestrację widm, a przesunięcia chemiczne obejmują zakres ok. 250 ppm i zależą od ładunku, liczby koordynacyjnej i rodzaju podstawników przy atomie boru. Widma ^{11}B NMR dostarczają więc istotnych informacji o strukturach i mechanizmach reakcji oraz mogą być wykorzystane do ilościowej analizy mieszanin związków boru.

Tabela 1. Właściwości magnetyczne wybranych jąder:

Jądro	^1H	^{11}B	^{13}C	^{19}F	^{17}O	^{31}P
współczynnik giromagnetyczny [10^7 rad/(T*s)]	25,75	8,583	6,73	2,52	-3.63	10,83
zawartość w naturalnym pierwiastku [%]	99,98	80,42	1,08	100	$3,7 \cdot 10^{-2}$	100
względna czułość detekcji	1000	165	15,9	834	29,1	66,4
liczba spinowa	1/2	3/2	1/2	1/2	5/2	1/2

Do doskonałym narzędziem w badaniach tlenowych związków boroorganicznych jest spektroskopia ^{17}O NMR [4]. Jednak naturalna zawartość tego izotopu ($3,7 \cdot 10^{-2}$ %) znacznie ogranicza stosowanie tej techniki: we wcześniejszych pracach najczęściej badano związki wzbogacane izotopowo. Obecnie stosowane spektrometry umożliwiają znaczne przyspieszenie rejestracji widm dla związków o naturalnym składzie izotopowym, jednak w dalszym ciągu metoda ta pozostaje specjalistycznym narzędziem, również ze względu na niezbyt obszerną literaturę.

Atom fluoru ma szczególne znaczenie w chemii związków boru. Fluorek boru BF_3 jest jednym z najmocniejszych kwasów Lewisa i łatwo reaguje z większością zasad Lewisa, takich jak etery, alkohole, aminy lub woda, tworząc addukty, a także z anionem fluorkowym z utworzeniem jonu tetrafluoroboranowego BF_4^- . Zastąpienie atomów wodoru przez atomy fluoru w grupach alkilowych czy arylowych związków boroorganicznych zwiększa kwasowość Lewisa

atomu boru i jest podstawą licznych zastosowań tych związków. Można tu wymienić ich wykorzystanie jako dodatków do elektrolitów polimerowych zwiększających przewodność elektrolitów dzięki kompleksowaniu anionów [5] bądź jako katalizatorów reakcji organicznych [6]. Specyficzne oddziaływanie kwasów boronowych z anionem fluorkowym jest podstawą wykorzystania tych związków jako receptorów molekularnych do konstrukcji sensorów. Należy też wspomnieć o zastosowaniu fluoropodstawionych związków boroorganicznych w medycynie, np. jako skutecznych środków przeciwrzybiczych [7].

Już kilka podanych wyżej wybranych przykładów wskazuje na ogromne możliwości wykorzystania rezonansu ^{19}F NMR jako doskonałego narzędzia badawczego. Obecne opracowanie ma na celu przybliżenie Czytelnikowi tej techniki przez podanie podstawowych informacji o rezonansie ^{19}F NMR oraz przykładów zastosowania tej metody, a także perspektyw dalszych badań w tej dziedzinie.

2. Podstawowe informacje o spektroskopii ^{19}F NMR

Spektroskopia ^{19}F należy obok ^1H i ^{13}C do najczęściej wykorzystywanych technik NMR [8]. Obecnie widma fluorowe wykonuje się standardowo, wykonując pomiary w tym samym co widma protonowe kanale pomiarowym. Spektroskopia ^{19}F NMR charakteryzuje się dużą czułością ze względu na 100% zawartość jądra ^{19}F oraz wysoki współczynnik giromagnetyczny (Tabela 1). ^{19}F jest jądrem o liczbie spinowej $\frac{1}{2}$, co powoduje, że sygnały w widmie charakteryzują się małą szerokością połówkową rzędu 1 Hz, a widma przypominają widma protonowe. Zakres pomiarowy jest bardzo szeroki i wynosi ok. 1000 ppm [9], dlatego znacznie rzadziej niż w przypadku widm protonowych dochodzi do nakładania się sygnałów. W związku z tym, widma ^{19}F są najczęściej łatwe w interpretacji, pomimo dużych wartości stałych sprzężenia. Podobnie jak w przypadku widm protonowych, intensywność sygnałów w widmie fluorowym jest proporcjonalna do liczby atomów fluoru, a wygląd multipletów jest, przynajmniej teoretycznie, zgodny z zasadą tzw. trójkąta Pascala. W przypadku widm fluorowych obserwuje się nie tylko sprzężenia pomiędzy sąsiadującymi atomami fluoru, ale również z sąsiadującymi protonami, stąd struktura multipletowa większości związków

fluoroorganicznych jest dosyć złożona.

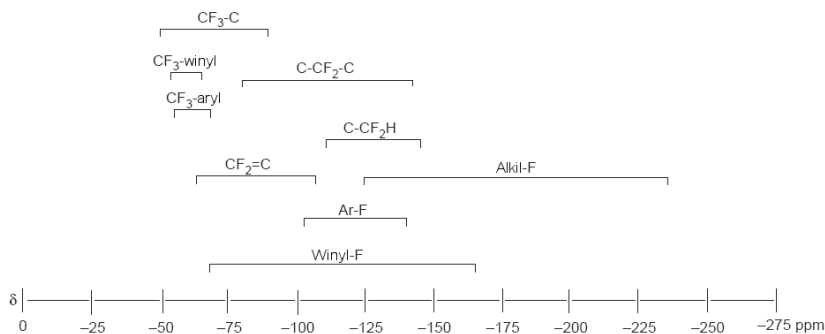
2a. Przesunięcia chemiczne ^{19}F NMR

Uznany wzorcem w ^{19}F NMR jest CFCl_3 (0 ppm), a sygnały większości atomów fluorów związanych z węglem mają ujemną wartość przesunięcia chemicznego. Do innych związków często stosowanych jako wzorce przesunięcia chemicznego ^{19}F NMR należą: $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ (–76,2 ppm), heksafluorobenzen (–162,2 ppm), trifluorometylobenzen (–63,2 ppm) oraz trifluorooctan etylu (–75,8 ppm).

Chcąc przewidzieć przesunięcie chemiczne określonej grupy w widmie ^{19}F NMR nie można kierować się regułami znanymi z interpretacji widm ^1H NMR. Wynika to odmiennego mechanizmu ekranowania jąder ^{19}F . W przypadku interpretacji widm fluorowych obowiązują następujące reguły:

1. Grupy zawierające pojedynczy atom fluoru są znacznie bardziej wrażliwe na zmianę otoczenia chemicznego niż grupy zawierające 2 lub 3 atomy fluoru. Zakres przesunięć chemicznych pojedynczych atomów fluoru związanych z grupami winylowymi, aromatycznymi oraz alifatycznymi zawiera się w granicach od –70 do –238 ppm, podczas gdy analogiczne sygnały grupy CF_2 ograniczają się do zakresu od –80 do –130 ppm, natomiast grupy CF_3 występują w zakresie od –52 do –87 ppm.
2. Im więcej atomów fluoru w grupie, tym mniejsze przesunięcie chemiczne. Na przykład w przypadku pochodnych butanu: $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{F}$ (–219 ppm), $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHF}_2$ (–116 ppm), $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CF}_3$ (–68 ppm).
3. Sąsiedztwo silnie rozbudowanych sterycznie grup obniża przesunięcie chemiczne sygnału odpowiedniego atomu fluoru.
4. Wpływ rozpuszczalnika na przesunięcia chemiczne jest niewielki, np.: różnice między CDCl_3 , acetonem a DMSO nie przekraczają zwykle 1 ppm, co przy tak dużym zakresie pomiarowym jest pomijalne.

Na rysunku 1 przedstawiono zakresy przesunięć chemicznych w widmach ^{19}F różnych fluorowanych związków organicznych.



Rysunek 1. Zakresy przesunięć chemicznych w widmach ^{19}F (CFCl_3 ; $\delta = 0$ ppm).

Przesunięcia chemiczne ^{19}F większości związków organicznych zawierających atomy fluoru charakteryzują się ujemnymi wartościami, należy jednak mieć świadomość, że niektóre związki fluoru mają dodatnie wartości przesunięć chemicznych. Oprócz monografii poświęconych spektroskopii ^{19}F NMR wartości przesunięć chemicznych można znaleźć w innych źródłach. Bardzo obszerne zestawienie zawiera seria Landolt-Börnstein [10], przydatne mogą być również pozycje [11, 12].

2b. Stałe sprzężenia

Ze względu na liczbę spinową atomu fluoru ($1/2$), multipletowość sygnałów jest zgodna z regułą $n+1$, gdzie n jest liczbą atomów powodujących rozszczepienie, przy czym w widmach fluorowych obserwuje się również rozszczepienie przez protony, co powoduje często komplikację widm. Znaczne uproszczenie widma można osiągnąć poprzez zastosowanie tzw. odsprężania, które jednak pociąga za sobą pewne wymagania sprzętowe. Często obserwuje się również tzw. sprzężenie przez przestrzeń, kiedy sprzęgające się atomy są oddzielone większą liczbą wiązań, ale ich promienie Van der Waalsa częściowo się nakładają.

Stałe sprzężenia F–F są duże w porównaniu ze stałymi sprzężenia H–H, jednakże różnią się znacząco między sobą w zależności od otoczenia

chemicznego atomów fluoru, dlatego praktycznie każda klasa związków wymagałaby osobnego omówienia.

2c. ^{19}F NMR związków aromatycznych

Przesunięcia chemiczne ^{19}F związków aromatycznych są zbliżone do związków alifatycznych, ponieważ w przypadku spektroskopii ^{19}F NMR efekt anizotropowy nie ma takiego znaczenia, jak w spektroskopii ^1H NMR. Obserwuje się natomiast znaczący wpływ rozpuszczalnika na wartości przesunięć chemicznych sygnałów ^{19}F fluorowanych związków aromatycznych. Zaobserwowano również, że im silniej elektronoakceptorowy podstawnik znajduje się w pozycji *para* w stosunku do atomu fluoru, tym silniejsze odsłanianie tego atomu. W przypadku podstawników w pozycji *orto* korelacje już nie są takie proste, natomiast w przypadku podstawników w pozycji *meta* nie obserwuje się takich zależności. Wprowadzenie kolejnego atomu fluoru w pozycje *orto* i *para* powoduje przesłanianie (niższe wartości przesunięć chemicznych) w porównaniu z fluorobenzenem, natomiast wprowadzenie drugiego atomu fluoru w pozycję *meta* powoduje odsłanianie, stąd 1,3,5-trifluorobenzen charakteryzuje się najniższym przesunięciem chemicznym spośród fluorowanych pochodnych benzenu (Tabela 2) [13].

Tabela 2. Przykłady przesunięć chemicznych ^{19}F NMR fluorowanych pochodnych benzenu.

Związek	PhF	1,2FPh	1,3FPh	1,4FPh	1,3,5FPh	1,2,3,4,5,6FPh
^{19}F δ (ppm)	–113	–119	–110	–139	–101	–162

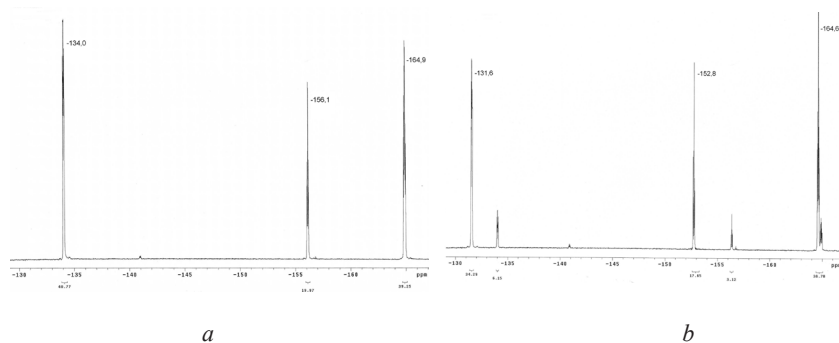
2d. Widma protonowe związków fluorowanych

W wyniku efektu indukcyjnego atomu fluoru następuje zmniejszanie gęstości elektronowej sąsiadujących atomów i protony w związkach fluorowanych są odsłaniane. Efekt ten w najwyższym stopniu dotyczy protonów w pozycji α , natomiast praktycznie nie jest już obserwowany dla protonów w pozycji γ . Wartości stałych sprzężenia przez 2 wiązania ($^2J(\text{F},\text{H})$) wynoszą zwykle 40-60 Hz i są charakterystyczne dla widm ^1H i ^{19}F NMR takich grup jak: $-\text{CF}_2\text{H}$, –

CFH_2 oraz $-\text{CFH}$. Wicynalne stałe sprzężenia (przez 3 wiązania) w związkach alifatycznych przybierają zróżnicowane wartości: od bardzo małych do 15 Hz. Stałe sprzężenia przez trzy, cztery i pięć wiązań w związkach aromatycznych są zbliżone do analogicznych stałych sprzężenia H-H [14].

3. Przykłady wykorzystania spektroskopii ^{19}F NMR do badań struktur fluorowanych związków boroorganicznych, ich oddziaływań międzycząsteczkowych i badań kinetycznych

Na rysunku 2 przedstawiono widmo ^{19}F NMR kwasu pentafluorofenyloboronowego i jego mieszaniny z estrem pinakolowym [15].



Rysunek 2. Widmo ^{19}F NMR kwasu pentafluorofenyloboronowego (a) i jego mieszaniny z estrem pinakolowym (b) (w acetonie- d_6).

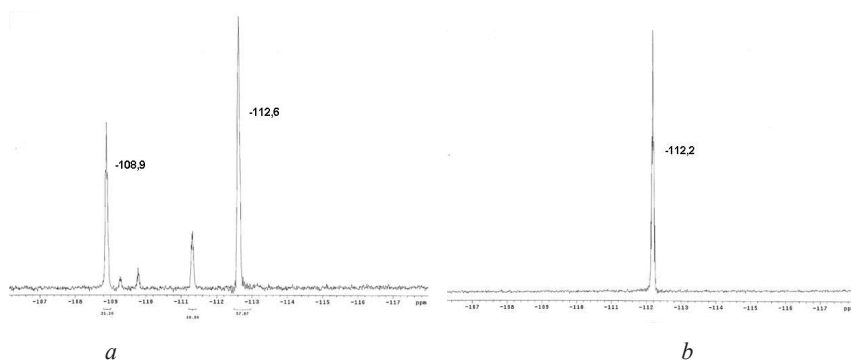
Różnice w przesunięciach chemicznych poszczególnych atomów fluoru są znaczne, a sygnały ulegają wyraźnemu przesunięciu po utworzeniu estru, szczególnie dla pozycji *orto* i *para*. Przykłady przesunięć chemicznych dla innych fluorowanych kwasów boronowych i ich estrów podano w Tabeli 3.

Inny przykład dużych różnic położenia sygnałów różnych związków zawierających fragment $p\text{-FC}_6\text{H}_5\text{-B(O-)}_2$ przedstawia Rys. 3. Handlowy kwas p -fluorofenyloboronowy (a) jest mieszaniną kwasu i jego bezwodnika, tris(p -fluorofenylo)boroksynu, któremu odpowiada sygnał $-108,9$ ppm. Słabsze

sygnały odpowiadają prawdopodobnie formom częściowo odwodnionym. Po dodaniu niewielkiej ilości wody do próbki w widmie (b) pozostaje jeden sygnał kwasu boronowego (−112 ppm) [15].

Tabela 3. Przesunięcia chemiczne w widmach ^{19}F fluorowanych kwasów fenyloboronowych i ich estrów pinakolowych (w acetonie- d_6) [15].

Kwas fenyloboronowy (podstawniki)	$\delta \text{ } ^{19}\text{F}$ /ppm	
	kwas	ester
2-F	−107,4	−103,5
2,6-F ₂	−104,6	−102,2
4-F	−112,1	−110,5
2,3,4,5,6-F ₅	−134,0 (<i>orto</i>)	−131,6
	−156,1 (<i>para</i>)	−152,8
	−164,9 (<i>meta</i>)	−164,6
4-CF ₃	−63,9	−63,7



Rysunek 3. Widma kwasu *p*-fluorofenyloboronowego (b) i mieszaniny tego kwasu i jego bezwodników (a) (w acetonie- d_6).

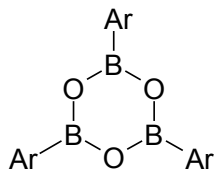
Frohn i wsp. [16, 17] otrzymali i scharakteryzowali spektroskopowo dużą grupę polifluorowanych aromatycznych tlenowych związków boru, podając

obszerny zestaw wartości przesunięć chemicznych ^{19}F i stałych sprzężenia H–F. Spektroskopia ^{19}F NMR była przez nich wykorzystana do badania kinetyki reakcji hydrolizy wiązania B–C.

Perrin i wsp. [18] wykorzystali spektroskopię ^{19}F NMR do badania kinetyki reakcji hydrolizy arylotrifluoroboranów wykorzystując różnicę przesunięć chemicznych sygnałów jonu F^- (ok. 42 ppm) i grupy BF_3^- (ok. 65 ppm).

D'Alfonso i wsp. prowadzili systematyczne badania fluorowanych triaryloboranów i kwasów borinowych z wykorzystaniem spektroskopii ^{19}F NMR. Analizując przesunięcia chemiczne ^{19}F wykazali oni, że kwas bis(pentafluorofenylo)borinowy, $(\text{C}_6\text{F}_5\text{B})_2\text{BOH}$, występujący w roztworze w równowadze między monomerem a trimerem z mostkami wodorowymi, po dodaniu tetrahydrofuranu tworzy addukt przez wiązanie wodorowe $\text{B}-\text{O}-\text{H}\cdots\text{O}$, a nie wiązanie $\text{O}\rightarrow\text{B}$, stwierdzono też obecność struktur jonowych. Proponowane struktury zostały potwierdzone widmami dwuwymiarowymi NMR (^{19}F – ^1H HOESY, ^{19}F – ^1H COSY i ^{19}F COSY), a dynamika procesów badana z użyciem techniki [^{19}F – ^{19}F] EXSY [19]. W dalszych pracach autorzy badali oddziaływanie tego kwasu z metanolem [20] oraz gąbką protonową [21], stosując wymienione wyżej techniki. Podsumowaniem prowadzonych badań jest praca przeglądowa rozszerzona o wyniki badań spektroskopowych ^{11}B i ^1H NMR, obejmująca także tris(pentafluorofenylo)boran [22].

Prowadzone przez Reddy'ego i wsp. [23] badania serii fluorowanych trifenyloboroksynów (Schemat 1) pozwoliły określić efekt solwatowania tych związków w różnych rozpuszczalnikach ze zmiany przesunięć chemicznych ^{19}F . Dane doświadczalne wykazują dobrą zgodność z wynikami obliczeń (DFT-GIAO).



Ar = 2,6-difluorofenyl, 2,4,6-trifluorofenyl
lub pentafluorofenyl

Schemat 1.

Autorzy badali również wiązanie jonów fluorkowych przez te związki. Podobnie jak dla innych zasad Lewisa (np. aminy) [2], kompleksowany jest jeden z atomów boru, a w temperaturze pokojowej następuje szybka wymiana cząsteczki zasady Lewisa między poszczególnymi atomami boru.

London i Gabel [24] badali kinetykę oddziaływanie kwasów 4-fluorofenyloboronowych z jonami OH^- w obecności biologicznie ważnych ligandów z pomiarów szerokości linii rezonansowych. W widmach ^{19}F NMR zaobserwowano duże różnice przesunięć chemicznych dla kwasu i kompleksu, potwierdzono także obecność form z trój- i czterokoordynacyjnym atomem boru w zależności od pH. Prowadzono również badania oddziaływania tych kwasów z enzymem subtylizyną Carlsberg [25].

Omówione wyżej przykłady badań struktur pokazują, jak bardzo ważną metodą badawczą jest spektroskopia ^{19}F NMR. Zmiany przesunięcia chemicznego ^{19}F w określonym fluorowanym podstawniku wywołane zmianami struktury nawet oddalonego fragmentu cząsteczki są znaczne (zwykle kilka ppm), można więc uzyskać istotne informacje już z prostych widm jednowymiarowych. Uzupełnienie badań o inne techniki spektroskopowe i zastosowanie widm korelacyjnych rozszerza możliwości badawcze, a wykorzystanie metod obliczeniowych pozwala na weryfikację przypisania sygnałów.

Ze względu na małą szerokość połówkową i dobre rozdzielenie sygnałów nawet w przypadku małych różnic przesunięć chemicznych można wykorzystać spektroskopię ^{19}F NMR do badań ilościowych. Przykładem może być wykorzystanie tej metody do określania czystości enancjomerycznej chiralnych dioli [26]. Autorzy wykorzystali zasady Schiffa powstałej z kwasu 2-formylo-5-fluorofenyloboronowego i chiralnej aminy. Estrы tych związków z chiralnymi diolami wykazują różnice przesunięć chemicznych ^{19}F w zakresie od 0,05 do 0,75 ppm dla różnych diastereoizomerów.

4. Związki boroorganiczne jako dodatki do elektrolitów polimerowych

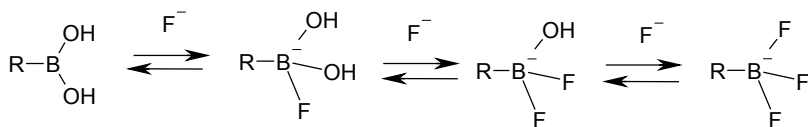
Prowadzone badania wskazują na możliwość zastosowania różnych fluorowanych związków boru jako dodatków do elektrolitów polimerowych [5, 23, 27-30]. Zaobserwowano znaczny wzrost przewodnictwa elektrolitów

polimerowych modyfikowanych estrami kwasów boronowych. Przypuszcza się, że zastosowanie tych dodatków powoduje zwiększenie rozpuszczalności soli nieorganicznych w układach bezwodnych, a co za tym idzie, znaczne zwiększenie przewodnictwa elektrolitów, przy jednoczesnym zachowaniu dobrej stabilności. Spektroskopia ^{19}F NMR jest prostą metodą badania trwałości tych związków [28] oraz umożliwia potwierdzenie tworzenia się kompleksów z anionami, które powoduje znaczącą zmianę przesunięcia chemicznego w stronę bardziej ujemnych wartości [23].

5. Wykorzystanie kwasów boronowych i ich estrów jako receptorów molekularnych jonów fluorkowych

Selektywne i czułe metody oznaczania jonów fluorkowych i skonstruowanie odpowiednich sensorów ma znaczenie w oznaczaniu tych jonów w wodzie pitnej, jest związane z profilaktyką dentystyczną, lekami stosowanymi w leczeniu osteoporozy, wiąże się też z oczyszczaniem uranu i gazami bojowymi. Kwasy boronowe są bardzo selektywnymi receptorami jonów fluorkowych, co daje możliwość oznaczania tych jonów w obecności Br^- , Cl^- , I^- . Z bardzo obszernej literatury dotyczącej zastosowania związków boroorganicznych jako receptorów jonów F^- omówiono tylko kilka istotnych tematów, dotyczących oddziaływania w układzie kwas boronowy – jon fluorkowy i mechanizmów detekcji.

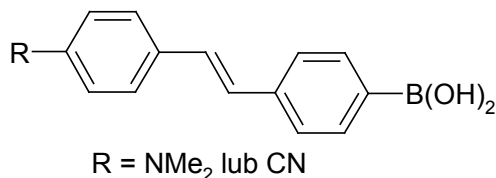
Kwasy boronowe reagują z jonami fluorkowymi zgodnie ze schematem 2:



Schemat 2.

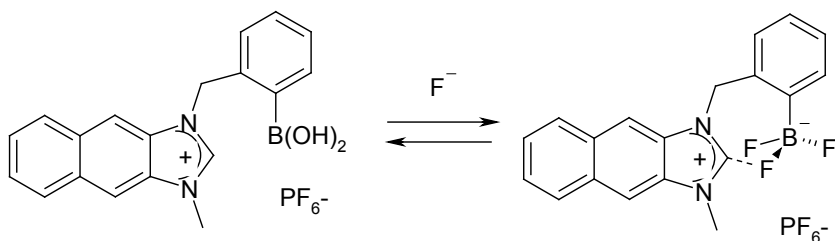
Przesunięcia chemiczne poszczególnych związków fluorowych na tym schemacie różnią się między sobą o ok. 10 ppm [31], spektroskopia ^{19}F NMR jest więc doskonałym narzędziem do badania tego typu równowag.

Tak jak w przypadku wykorzystania kwasów boronowych jako receptorów cukrów, najczęściej wykorzystywane są receptory fluorescencyjne. Zastąpienie elektronoakceptorowej grupy B(OH)_2 obojętnej formy kwasu boronowego przez elektronodonorową grupę BF_3^- w formie anionowej powoduje zmiany w widmach fluorescencyjnych. Wprowadzenie do cząsteczki dodatkowego podstawnika elektronodonorowego (NMe_2) lub elektronoakceptorowego (CN) (schemat 3) powoduje duże zmiany we fluorescencji wywołane mechanizmem wewnętrznego przesunięcia ładunku (ICT, intramolecular charge transfer) [32].



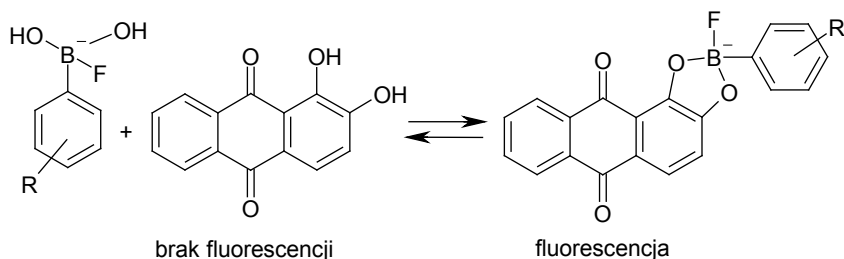
Schemat 3.

Yoon i wsp. [33] otrzymali kwas boronowy zawierający grupę imidazoliową, tworzącą dodatkowe wiązanie z jonem fluorkowym (schemat 4). Jego struktura została potwierdzona na podstawie badań ^{19}F NMR.



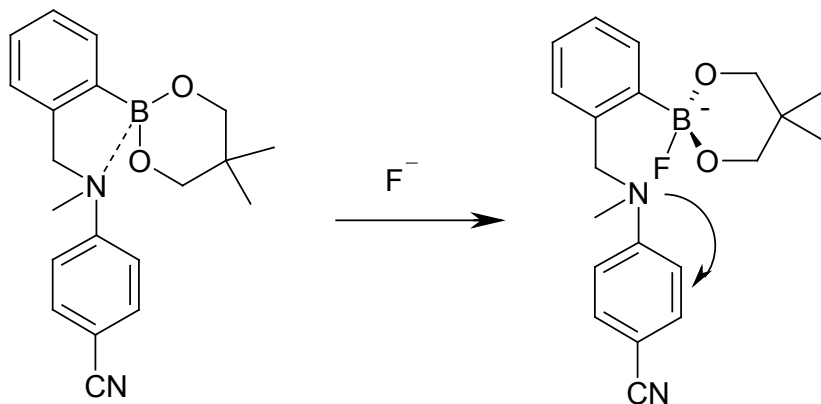
Schemat 4.

Estry podstawionych kwasów fenyloboronowych z alizaryną S są doskonałymi receptorami jonów fluorkowych (schemat 5) [34].



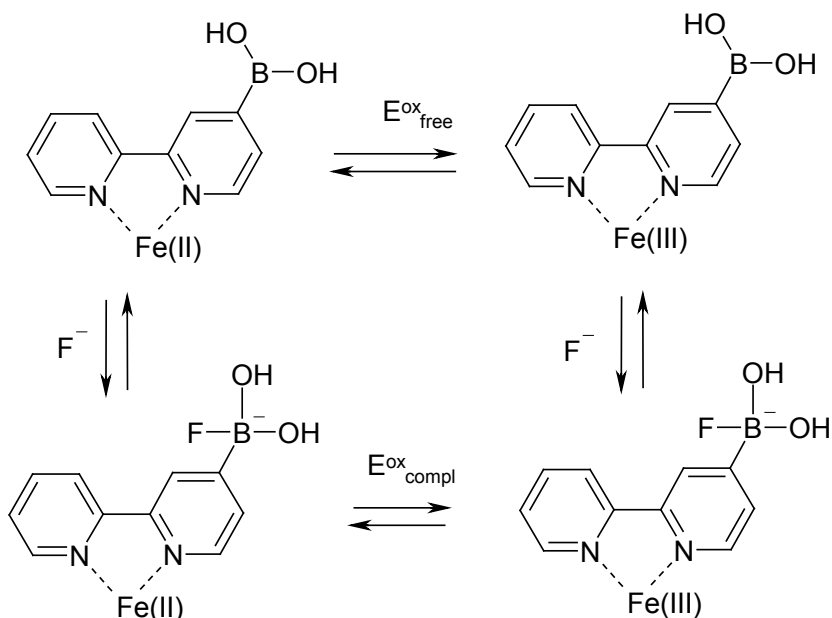
Schemat 5.

W przypadku estrów kwasów fenyloboronowych zawierających grupę aminometylową w pozycji *ortho* utworzenie kompleksu z jonem fluorkowym wiąże się z mechanizmem TICT (twisted intramolecular charge transfer) [35] (schemat 6).



Schemat 6.

Inną ważną grupę receptorów jonów fluorkowych stanowią receptory elektrochemiczne, w których potencjał oksydacyjno-redukcyjny zmienia się po utworzeniu kompleksu (schemat 7). [36].



Schemat 7.

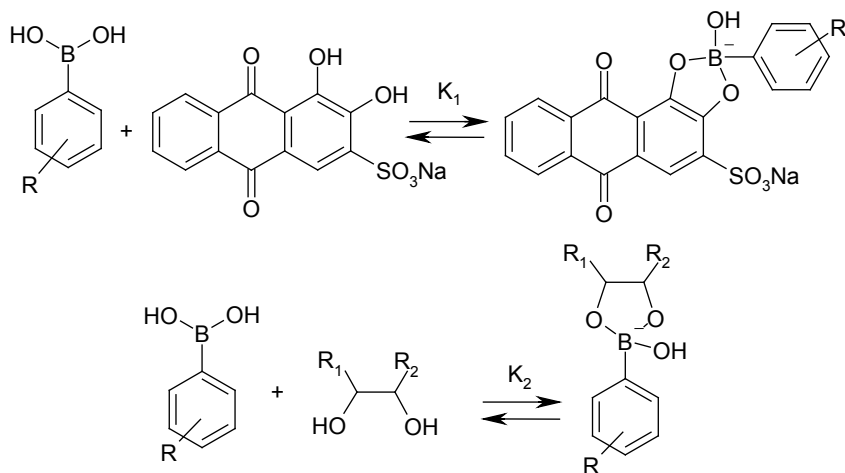
Jako receptory wykorzystujące zmianę potencjału po związaniu jonów fluorkowych wykorzystywane są również estry kwasów ferrocenyloboronowych [37].

6. Związki z wprowadzonymi znacznikami fluorowymi i układy z wykorzystaniem reakcji konkurencyjnych

Opisane powyżej wyniki badań dotyczyły związków zawierających w cząsteczce atomy fluoru i wskazują na to, że jest to doskonałe narzędzie badania struktur i przebiegu reakcji. Wydaje się więc celowe wprowadzania atomu fluoru do cząsteczki związku boroorganicznego jako znacznika („tag”). W wielu przypadkach wprowadzenie do cząsteczki atomu fluoru nie zmienia w istotny sposób jej właściwości, umożliwiając śledzenie zmian struktury czy przebiegu reakcji. Przykładem takiej metody jest wykorzystanie spektroskopii ^{19}F NMR do oznaczania czystości enancjomerycznej chiralnych dioli, opisane w p. 3 [26],

jednak potencjalne możliwości są znacznie szersze.

Inną możliwością jest wykorzystanie badania reakcji konkurencyjnych do badania równowag dla związków niefluorowanych. Analogiczna koncepcja została z powodzeniem zastosowana dla wyznaczania stałych równowagi wiązania cukrów przez kwasy boronowe i ich pochodne metodami miareczkowania fluorometrycznego. Po wyznaczeniu stałej równowagi w układzie kwas boronowy – związek zawierający ugrupowanie fluoroforowe (czerwień alizarynowa S) (K_1) prowadzi się miareczkowanie roztworem cukru, co pozwala na wyznaczenie stałej równowagi drugiej reakcji K_2 (schemat 8) [38].



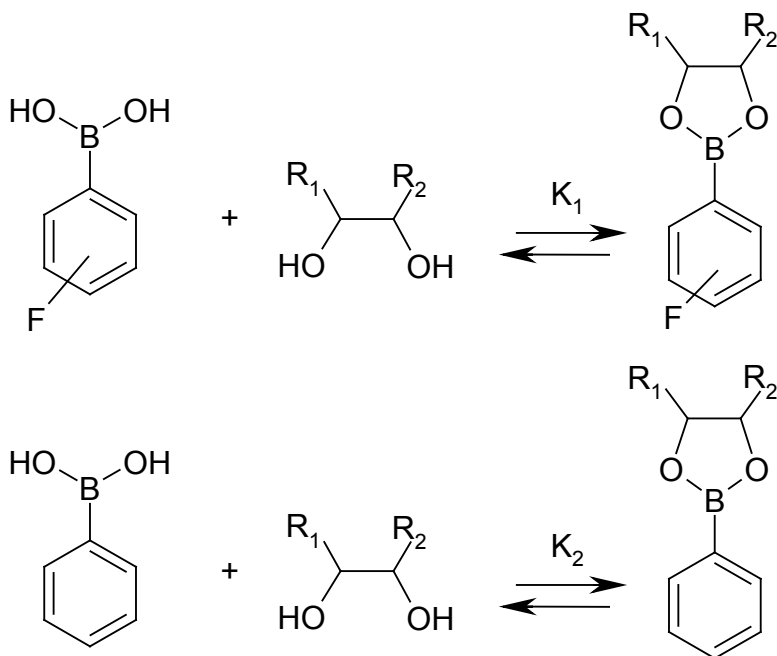
Schemat 8.

Zastosowanie tej koncepcji z wykorzystaniem spektroskopii ^{19}F NMR jako metody analitycznej przedstawiono na schemacie 9 [15].

Pierwszym etapem jest wyznaczenie stałej równowagi reakcji K_1 metodą Benesiego-Hildebranda [39] przez całkowanie sygnałów kwasu boronowego i jego estru w widmie ^{19}F NMR. Następnie wyznacza się stałą równowagi reakcji niefluorowanego

kwasu boronowego K_2 przez miareczkowanie układu fluorowany kwas boronowy/diol niefluorowanym kwasem boronowym.

Velders [40] badał możliwość zastosowania mikroukładu pomiarowego (microfluidic chip) do rejestracji widm ^{19}F NMR. Próby zastosowania tej metody do fluorowanych związków boroorganicznych dały bardzo dobre wyniki [15] i są przedmiotem dalszych badań.



Schemat 9.

Literatura

1. *Boronic Acids. Preparation, Applications in Organic Synthesis and Medicine*, D. G. Hall (red.), Wiley-VCH, Weinheim, 2005
2. A. Sporzyński, *Otrzymywanie i właściwości trialkilo- i triaryloboroksynów*, Wydawnictwa Politechniki Warszawskiej,

Warszawa, 1993

3. H. Nöth, B. Wrackmeyer: Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Boron Compounds, w: *NMR Basic Principles and Progress*, red. P. Diehl, E. Fluck, R. Kosfeld, t. 14, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1978
4. J.-P. Kintzinger: Oxygen NMR. Characteristic Parameters and Applications, w: *NMR Basic Principles and Progress*, red. P. Diehl, E. Fluck, R. Kosfeld, t. 17, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1981
5. H. S. Lee, X. Sun, X. Q. Yang, J. McBreen, Synthesis and study of new cyclic boronate additives for lithium battery electrolytes, *J. Electrochem. Soc A*, 149 (2002) 1460
6. K. Ishihara, Organoboronic and Organoborinic Acids as Brønsted-Lewis Acid Catalysts in Organic Synthesis, w: *Boronic Acids. Preparation, Applications in Organic Synthesis and Medicine*, D. G. Hall (red.), Wiley-VCH, Weinheim, 2005 (rozdz. 10)
7. F. L. Rock, W. Mao, A. Yaremchuk, M. Tukalo, T. Crepin, H. Zhou, Y.-K. Zhang, V. Hernandez, T. Akama, S. J. Baker, J. J. Plattner, L. Shapiro, S. A. Martinis, S. J. Benkovic, S. Cusack, M. R. K. Alley, An antifungal agent inhibits an aminoacyl-tRNA synthetase by trapping tRNA in the editing site, *Science*, 316 (2007) 1759
8. T. N. Mitchell, B. Costisella, *NMR – From Spectra to Structures – An Experimental Approach*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 2007
9. E. Breitmaier, *Structure Elucidation by NMR in Organic Chemistry – A Practical Guide*, John Wiley & Sons, Chichester, England, 2002
10. [10] R. R. Gupta, M. D. Lechner, Chemical shifts and coupling constants for fluorine-19 and nitrogen-15, w: Landolt-Börnstein, Vol. 35 (Nuclear Magnetic Resonance Data)
11. R. A. Olivera, R. O. Silva, G. A. Molander, P. H. Menezes, ^1H , ^{13}C , ^{19}F and ^{11}B NMR spectral reference data of some potassium organotrifluoroborates, *Magn. Reson. Chem.*, 47 (2009) 873

12. F. J. Weigert, K. J. Karel, A fluorine NMR database, *J. Fluorine Chem.*, 37 (1987) 125
13. W. R. Dolbier, *Guide to Fluorine NMR for Organic Chemists*, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2009
14. W. S. Brey, M. L. Brey, Fluorine-19 NMR, w: *Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance*, red. D. M. Grant, R. K. Harris, John Wiley & Sons, Chichester, England, 1996
15. A. Adamczyk-Woźniak, R. M. Fratila, A. H. Velders, A. Sporzyński, w przygotowaniu do druku
16. H.-J. Frohn, N. Y. Adonin, V. V. Bardin, V. F. Starichenko, Polyfluorinated aryl(dihydroxy)boranes and tri(aryl)boroxins, *Z. Anorg. Allg. Chem.*, 628 (2002) 2827
17. H.-J. Frohn, N. Y. Adonin, V. V. Bardin, V. F. Starichenko, Base-catalysed hydrodeboration of polyfluorophenyl(dihydroxy)boranes, *Z. Anorg. Allg. Chem.*, 628 (2002) 2834
18. Y. Li, A. Asadi, D. M. Perrin, Hydrolytic stability of nitrogenous-heteroaryltrifluoro-borates under aqueous conditions at near neutral pH, *J. Fluorine Chem.*, 130 (2009) 377
19. T. Beringhelli, D. D'Alfonso, D. Donghi, D. Maggioni, P. Mercandelli, A. Sironi, Aggregation and ionization equilibria of bis(pentafluorophenyl)borinic acid driven by hydrogen-bonding with tetrahydrofuran, *Organometallics*, 26 (2007) 2088
20. D. Donghi, D. Maggioni, T. Beringhelli, G. D'Alfonso, P. Mercandelli, A. Sironi, Hydrogen bonding and Lewis acid-base interactions in the system bis(pentafluorophenyl)-borinic acid/methanol, *Eur. J. Inorg. Chem.*, (2008) 1645
21. D. Donghi, D. Maggioni, T. Beringhelli, G. D'Alfonso, ¹⁹F spectroscopic investigation of the reaction of bis(pentafluorophenyl)borinic acid with a "proton sponge": deprotonation, trimerization and stepwise dearylation, *Eur. J. Inorg. Chem.*, (2008) 3606
22. T. Beringhelli, D. Donghi, D. Maggioni, G. D'Alfonso, Solution

- structure, dynamics and speciation of perfluoroaryl boranes through ^1H , ^{11}B and ^{19}F spectroscopy, *Coord. Chem. Rev.*, 252 (2008) 2292
23. N.G. Nair, M. Blanco, W. West, F. Ch. Weise, S. Greenbaum, V. P. Reddy, Fluorinated boroxin-based anion receptors for lithium ion batteries: fluoride anion binding, ab initio calculations, and ionic conductivity studies, *J. Phys. Chem. A*, 113 (2009) 5918
 24. R. E. London, S. A. Gabel, Fluorine-19 NMR studies of fluorobenzeneboronic acids. 2. Interaction kinetics with biologically significant ligands, *J. Am. Chem. Soc.*, 116 (1994) 2562
 25. R. E. London, S. A. Gabel, Fluorine-19 NMR studies of fluorobenzeneboronic acids. 1. Kinetics characterization of the interaction with Subtilisin Carlsberg and model ligands, *J. Am. Chem. Soc.*, 116 (1994) 2562
 26. S. L. Yeste, M. E. Powell, S. D. Bull, T. D. James, Simple chiral derivatization protocols for ^1H and ^{19}F NMR spectroscopic analysis of the enantiopurity of chiral diols, *J. Org. Chem.*, 74 (2009) 427
 27. H. S. Lee, Z. F. Ma, X. Q. Yang, X. Sun, J. McBreen, Synthesis of a series of fluorinated boronate compounds and their use as additives in lithium battery electrolytes, *J. Electrochem. Soc. A.*, 151 (2004) 1429
 28. Z. Żukowska, M. Szczechura, M. Marcinek, A. Żubrowska, A. Adamczyk-Woźniak, A. Sporzyński, W. Wieczorek, Investigation on the anion complexation ability of organoboron additives in lithium-ion battery electrolytes – spectroscopic approach, *ECS Trans.*, 16 (2009) 105
 29. H. Shin, C. Nguyen, B. Kim, M. Han, J. S. Kim, J. Kim, Synthesis and characterization of acrylol borate as new acrylic gelator for lithium secondary battery, *Macromol. Res.*, 16 (2008) 134
 30. L. F. Li, H. S. Lee, H. Li, X. Q. Yang, K. W. Nam, W. S. Yoon, J. McBreen, X. J. Huang, New electrolytes for lithium ion batteries using LiF salt and boron based anion receptors, *J. Power Sources*, 184 (2008) 517
 31. C. R. Cooper, N. Spencer, T. D. James, Selective fluorescence detection

- of fluoride using boronic acids, *Chem. Commun.*, (1998) 1365
32. N. DiCesare, J. R. Lakowicz, New sensitive and selective fluorescent probes for fluoride using boronic acids, *Anal. Biochem.*, 301 (2002) 111
33. Z. Xu, S. K. Kim, S. J. Han, C. Lee, G. Kociok-Kohn, T. D. James, Y. Yoon, Ratiometric fluorescence sensing of fluoride ions by an asymmetric bidentate receptor containing a boronic acid and imidazolium group, *Eur. J. Org. Chem.*, (2009) 3058
34. Y. Kubo, T. Ishida, A. Kobayashi, T. D. James, Fluorescent alizarin-phenylboronic acid ensembles: design of self-organized molecular sensors for metal ions and anions, *J. Material Chem.*, 15 (2005) 2889
35. W. Tan, D. Zhang, D. Zhu, 4-*N*-Methyl-*N'*-(2-dihydroxyboryl-benzyl) amino benzonitrile and its boronate analogue sensing saccharides and fluoride ion, *Bioorg. Med. Lett.*, 17 (2007) 2629
36. M. Nicolas, B. Fabre, J. Simonet, Electrochemical sensing of fluoride and sugars with a boronic acid-substituted bipyridine Fe(II) complex in solution and attached onto an electrode surface, *Electrochim. Acta*, 46 (2001) 1179
37. C. Bresner, J. K. Day, N. D. Coombs, I. A. Fallis, S. Aldridge, S. J. Coles, M. B. Hursthouse, Fluoride anion binding by cyclic boronic esters: influence of backbone chelate on receptor integrity, *Dalton Trans.*, (2006) 3660
38. G. Springsteen, B. Wang, Alizarin Red S. as a general optical reporter for studying the binding of boronic acids with carbohydrates, *Chem. Commun.*, (2001) 1608
39. M. Bérubé, M. Dowlut, D. G. Hall, Benzoboroxoles as efficient glycopyranoside-binding agents in physiological conditions: structure and selectivity of complex formation, *J. Org. Chem.*, 73 (2008) 6471
40. M. V. Gomez, D. N. Reinhoudt, A. H. Velders, Supramolecular interactions at picomole level studied by ^{19}F NMR spectroscopy in a microfluidic chip, *Small*, 4 (2008) 1293

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

**Zastosowanie magnetycznego rezonansu jądrowego w chemii
supramolekularnej**

G. Schroeder, B. Gierczyk, 2002

Kompleksy typu gość-gospodarz

Pod redakcją G. Schroedera, 2003

Zastosowanie spektrometrii mas w chemii supramolekularnej

R. Frański, G. Schroeder, 2003

Maszyny molekularne

G. Schroeder, J. Wyrwał, 2004

Syntetyczne receptory jonowe

Pod redakcją G. Schroedera, 2005

Syntetyczne receptory molekularne

Pod redakcją G. Schroedera, 2007

Receptory supramolekularne

Pod redakcją G. Schroedera, 2007

Materiały supramolekularne

Pod redakcją G. Schroedera, 2008

Wybrane aspekty chemii supramolekularnej

Pod redakcją G. Schroedera, 2009

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

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

