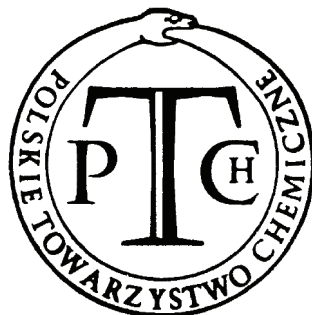
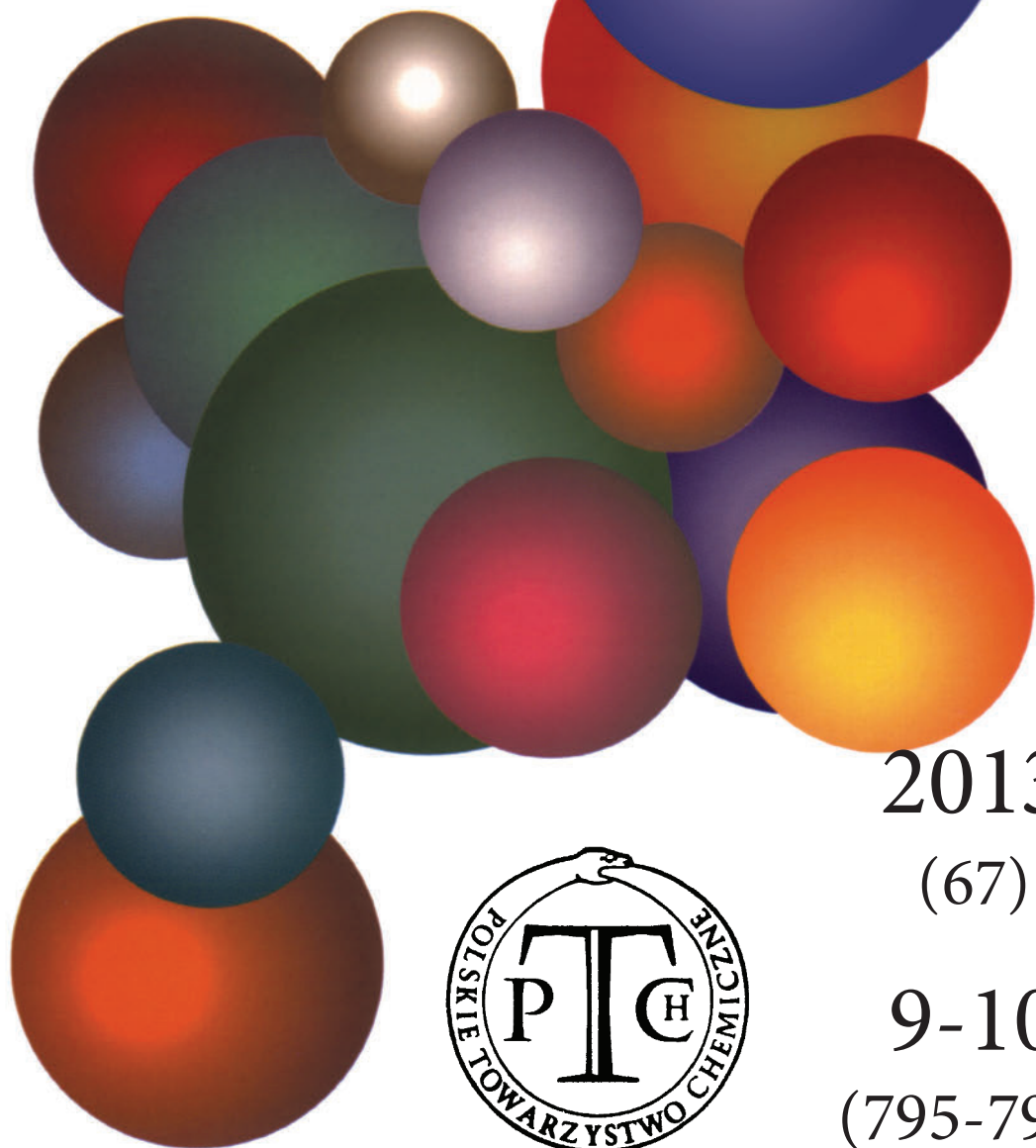


WIADOMOŚCI *chemiczne*



2013

(67)

9-10

(795-796)

CZASOPISMO POLSKIEGO TOWARZYSTWA CHEMICZNEGO

Publikacja dotowana przez MNiSW

RADA REDAKCYJNA

RYSZARD ADAMIAK, IRENA BARANOWSKA, ANDRZEJ BARAŃSKI,
JERZY BŁAŻEJOWSKI, ANATOL KOJŁO, TADEUSZ M. KRYGOWSKI, ANDRZEJ KUTNER,
PIOTR PANETH (PRZEWODNICZĄCY), K. MICHAŁ PIETRUSIEWICZ, DARIUSZ POGOCKI,
MAREK POTRZEBOWSKI, GRZEGORZ SCHROEDER, ANDRZEJ SOKALSKI, ARTUR P. TERZYK

KOMITET REDAKCYJNY

JERZY P. HAWRANEK, ADAM JEZIEFSKI, LUDWIK KOMOROWSKI, MIROSLAW SOROKA,
MARIA SUSZYŃSKA, SŁAWOMIR SZAFERT, ANDRZEJ TROCHIMCZUK

REDAKTOR NACZELNY

ZDZISŁAW LATAJKA

SEKRETARZ REDAKCJI

BEATA ŚWIĄTEK-TRAN

BARBARA LATKO (FINANSE)

KAZIMIERA LUKJAN (KOLPORTAŻ)

Korespondencję należy kierować pod adresem:

Redakcja „Wiadomości Chemicznych”

ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław

tel.: 71 375 73 89, tel./fax: 71 322 14 06

e-mail: wchem@wchuwr.pl

INTERNET

<http://www.wchuwr.pl/wiadchem.htm> (English abstracts)

<http://www.dbc.wroc.pl> (pełne teksty publikacji od roku 2006)

„Wiadomości Chemiczne” są wydawane w ramach serii *Acta Universitatis Wratislaviensis*

© Copyright by Redakcja „Wiadomości Chemicznych”, Wrocław 2013

pISSN 0043-5104

eISSN 2300-0295

Maszynopis niniejszego numeru przekazano Wydawcy w okresie sierpień-październik 2013

Przygotowanie do druku i druk:

Firma Wydawnicza K2, al. Stanów Zjednoczonych 51, 04-026 Warszawa

tel. 22 517 78 12, fax 22 517 78 11, e-mail: k2@druk-k2.pl



15 stycznia 2013 zmarł prof. dr hab. Hubert A. Kołodziej, emerytowany pracownik Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego, nasz nauczyciel i przyjaciel.

Hubert Kołodziej urodził się w 21 lutego 1942 r. w Mokrem koło Mikołowa. Jego ojciec był kowalem i prowadził warsztat, w którym synowie, Hubert i Henryk pomagali zdobywając pierwsze doświadczenia techniczne. Ten etap życia Profesora okazał się mieć duże znaczenie, bowiem mechanika, obok chemii, była jego pasją, a duże umiejętności techniczne miały znaczący wpływ na zadania naukowe, którym się później poświęcił. Liceum Ogólnokształcące im. Karola Miarki w Mikołowie ukończył w 1960 i w tym samym roku podjął studia chemiczne na Wydziale Matematyki Fizyki i Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Po ukończeniu studiów został zatrudniony na Uniwersytecie Wrocławskim i był pracownikiem tej uczelni aż do przejścia na emeryturę w roku 2012.

Zainteresowania naukowe Profesora Huberta Kołodzieja ukształtowały się już na początku Jego kariery, kiedy to podjął staż w Katedrze Chemii Fizycznej Uniwersytetu Wrocławskiego pod kierunkiem Profesora Lucjana Sobczyka. Początkowy okres działalności był związany z pracami nad udoskonaleniem klasycznych technik pomiarowych stosowanych w badaniach dielektrycznych. Jest On twórcą tzw. metody skupionej pojemności, która pozwoliła na znaczne udokładnienie pomiarów dielektrycznych prowadzonych w zakresie radiowym i mikrofalowym, zaś jej ważną zaletą jest niewielka ilość próbki wymaganej do badań. Dzięki opracowaniu tej metody i skonstruowaniu unikalnych przyrządów mógł podjąć badania leżące w obrębie zainteresowań Zespołu i Instytutu (a następnie Wydziału) Chemii. Badania Profesora Kołodzieja dotyczyły zastosowania technik dielektrycznych do poznania struktury i dynamiki cząsteczek w kryształach molekularnych, w ferroelektrykach, w cieczech, jak również analizy anomalii krytycznych w sąsiedztwie przemian fazowych. Badania relaksacji dielektrycznej w kryształach molekularnych z wiązaniem wodorowym doprowadziły do rozprawy doktorskiej zatytułowanej „Pomiary absorpcji dielektrycznej w zakresie 30 Hz do 24 GHz niektórych kryształów z wią-

zaniem wodorowym” obronionej w 1971 roku. Dalsza działalność naukowa dotyczyła zarówno kontynuacji pomiarów dielektrycznych w układach stałych i ciekłych z wiązaniem wodorowym, jak i badań przemian fazowych w sąsiedztwie przemian fazowych ferroelektryk–paraelektryk. Podjęcie tych badań wymagało dalszych prac nad rozwojem metod pomiarowych i poszukiwaniem algorytmów dostosowanych do materiałów o dużych stratnościach dielektrycznych. Rezultatem tych zainteresowań naukowych była rozprawa „Dielectric absorption in ferroelectrics of the order-disorder type, in particular of the $K_4M^{II}(CN)_6 \cdot 3H_2O$ type of cyanocomplexes”, na której podstawie uzyskał On w 1987 roku stopień doktora habilitowanego w zakresie Chemii Fizycznej i Teoretycznej. Kolejny nurt zainteresowań naukowych Profesora Kołodzieja to badania dynamiki molekularnej w grupie kryształów molekularnych z jednoosiową swobodą reorientacji (faza pseudo-rotacyjna), a również w rozcieńczonych roztworach cząsteczek labilnych konformacyjnie: styrylopirydli i podstawionych di-fenyli. Badania dynamiki tego typu związków stały się tematem owocnej współpracy z Uniwersytetem w Perugii i Uniwersytetem w Rzymie.

W latach 70. Profesor odbywał staże naukowe w School of Physical and Molecular Science University College of North Wales w Bangor. Współuczestniczył on w opracowaniu nowej metody pomiaru nieliniowego efektu dielektrycznego (NDE) w roztworach i cieczech o niskiej rezystancji właściwej. Zbudowany zestaw pomiarowy pozwolił na wykonanie, jedyne jak do tej pory, cyklu badań nieliniowego efektu dielektrycznego w wodzie i roztworach wodnych. Następnie zajmował się modyfikacją układu pomiarowego NDE i jego adaptacją do pomiarów efektu Falkenhagena-Debye’a.

W uznaniu dorobku naukowego, w roku 2002 otrzymał tytuł naukowy profesora.

W swojej działalności Profesor Kołodziej wiele uwagi poświęcał badaniom materiałowym i stosowanym. Od połowy lat 90. zainteresował się problemami kompatybilności elektromagnetycznej i inżynierią materiałową wykorzystywaną do tworzenia materiałów o specjalnych właściwościach. Stworzył on międzyuczelniany zespół, który zajmował się poszukiwaniem materiałów pochłaniających energię promieniowania elektromagnetycznego. Zespół otrzymał kilkadziesiąt nowych kompozytowych materiałów o różnych, w zależności od potrzeb, charakterystykach częstotliwościowych, temperaturowych i mechanicznych. Jeden z nich w roku 2000 został wdrożony do seryjnej produkcji kabli EMC. Profesor Kołodziej pracował nad nowymi technologiami uzyskiwania paliw ciekłych na bazie surowców roślinnych, jak również nad suplementami diety o działaniu przeciwcukrzycowym.

W Profesorze Kołodzieju straciliśmy świetnego naukowca, przyjaciela, nauczyciela i nie jest prawdą, że nie ma ludzi niezastąpionych – Jego życzliwości, fachowości, uśmiechu będzie nam brakowało już zawsze.

Kazimierz Orzechowski

**PROLINA – POSPOLITY AMINOKWAS WYJĄTKOWY
KATALIZATOR. CZĘŚĆ I. BIOSYNTeza PROLINY.
WEWNĄTRZCZĄSTECZKOWA KONDENSACJA
ALDOLOWA**

PROLINE AS A COMMON AMINO ACID
AND AN EXCEPTIONAL CATALYST. PART I.
PROLINE BIOSYNTHESIS. INTRAMOLECULAR
ALDOL REACTION

**Marcin Wróblewski, Renata Kołodziejska,
Renata Studzińska, Aleksandra Karczmarzka-Wódzka,
Marcin Dramiński**

*Katedra i Zakład Chemii Ogólnej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika,
Collegium Medicum w Bydgoszczy
ul. Dębowa 3, 85-626 Bydgoszcz
e-mail: marcin.wroblewski@cm.umk.pl*

Spis treści
Abstract
Wprowadzenie
1. Synteza i biosynteza proliny
2. Funkcje proliny
3. Mechanizm reakcji kondensacji aldolowej
4. Wewnątrzcząsteczkowa kondensacja aldolowa
Uwagi końcowe
Piśmiennictwo cytowane



Mgr Aleksandra Karczmarzka-Wódzka, ukończyła chemię na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu. Pracę magisterską wykonała w Zakładzie Chemii Organicznej. Obecnie pracuje w Katedrze i Zakładzie Chemii Ogólnej Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. W ramach pracy doktorskiej zajmuje się enancjoselektywną redukcją analogów nukleozydowych.



Dr Renata Kołodziejska, pracownik Katedry i Zakładu Chemii Ogólnej Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Zainteresowania naukowe Autorki związane są z badaniami nad regio- i stereoselektywnymi właściwościami biokatalizatorów oraz modyfikacją analogów nukleozydów pirymidynowych.



Dr Renata Studzińska, pracownik Katedry i Zakładu Chemii Ogólnej Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Zainteresowania naukowe Autorki związane są z badaniami nad syntezą zmodyfikowanych analogów nukleozydów pirymidynowych.



Dr Marcin Wróblewski, pracownik Katedry i Zakładu Chemii Ogólnej Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Zainteresowania naukowe Autora obejmują syntezę organiczną z wykorzystaniem enzymów jak również syntezę modyfikowanych nukleozydów pirymidynowych.



Prof. dr hab. Marcin Dramiński, kieruje pracą w Zakładzie Chemii Ogólnej Collegium Medicum. Interesuje się chemią i stereochemią syntez związanych z analogami nukleozydów pirymidynowych i dydaktyką przedkliniczną dla studentów medycyny i kierunków pokrewnych.

ABSTRACT

In asymmetric synthesis of organic compounds more effective solutions are being looked for which will result in higher yield(s) of product(s) and their high enantioselectivity [1]. One of such solutions is an use of a multilevel and cheap catalyst. Proline used as a catalyst is a substance of natural origin which was synthetically obtained by Willstätter who was carrying out research on hygric acid (Scheme 1) [10]. The cells of many organisms have a suitable enzymatic system essential for proline biosynthesis [15]. So far, three proline biosynthesis pathways have been described: from glutamate (Scheme 3 and 4), ornithine (Scheme 5 and 6), and arginine (Scheme 7) [16–28]. Proline which is obtained as a result of biosynthesis or supplementation is a substrate for many proteins. Characteristic and significant content (about 23%) of this amino acid was observed in collagen. In cells proline can play an important role of osmoregulator [31–35] – a protective substance regulating the activity of such enzymes as catalase and peroxidase [36]. Proline as a secondary amine shows exceptional nucleophilicity facilitating imine and enamine formation. Used as a catalyst in aldol reaction makes with substrates like imine or enamine transition state imitating the activity of naturally occurring enzymes for this type of reaction, that is aldolases. In their research Hajos and Parrish, and Eder, Sauer and Wiechert used proline in intramolecular aldol reaction obtaining proper enones (Scheme 9) [60–62]. The process of intramolecular aldol reaction was used for a separation of racemic mixture of diketones (Scheme 10) [63, 64], cyclization of ortho-substituted aromatic aldehydes and ketones (Scheme 11) [65], synthesis of cyclic diketones (Scheme 13) [68] and domino reaction to obtain substituted cyclohexanones from beta-diketones and unsaturated ketones (Scheme 14) [69].

Keywords: proline biosynthesis, mechanism of aldol reaction, intramolecular aldol reaction

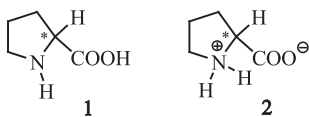
Słowa kluczowe: biosynteza proliny, mechanizm kondensacji aldolowej, wewnątrzcząsteczkowa reakcja aldolowa

WPROWADZENIE

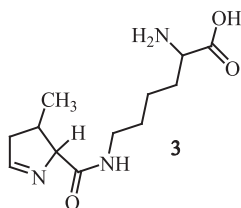
W ostatnim dziesięcioleciu zaobserwowano wzrost zainteresowania małowczątkowymi katalizatorami organicznymi – organokatalizatorami. Katalizatory tego typu ogólnie dzieli się na dwie klasy. Pierwsza z nich zawiera związki, których działanie katalityczne opiera się na tworzeniu wiązań kowalencyjnych z reagentami. W drugiej grupie znalazły się związki wykorzystujące w akcie katalitycznym wiązania wodorowe i oddziaływania jonowe. Zadaniem badaczy jest poszukiwanie takich katalizatorów spośród obu tych klas, dzięki którym będzie można otrzymywać wysokie wydajności produktów, jak również wysoką enancjoselektywność. Występująca powszechnie w organizmach żywych prolina okazała się skutecznym katalizatorem wielu typów reakcji (np.: kondensacji aldolowej, Mannicha, Michaela). Większość organokatalizatorów, w tym prolina, stanowią cząsteczki dwufunkcyjne, zawierające centra aktywne w postaci kwasu Brönsteda jak i zasady Lewisa. Takie cząsteczki aktywują zarówno donor jak i akceptor, co stanowi siłę napędową zachodzących procesów syntezy. We wszystkich reakcjach katalizowanych proliną, transfer protonu z części aminowej lub grupy karboksylowej proliny powoduje utworzenie imidu lub alkoksydu, niezbędnych do stabilizacji ładunku i utworzenia wiązania węgiel–węgiel w stanie przejściowym. Prolina stanowi wydajny, asymetryczny katalizator różnych reakcji zachodzących według mechanizmu enaminyowego, jak również iminowego [1–5].

1. SYNTEZA I BIOSYNTeza PROLINY

Spośród 21, naturalnie występujących i kodowanych przez odpowiednią trójkę zasad w DNA, aminokwasów tylko enancjomer L-proliny (**1**) posiada unikalną strukturę. Tworzy ją pięcioczłonowy pierścień piperidynowy zawierający atom azotu w postaci drugorzędowej grupy aminowej. W punkcie izoelektrycznym ($pK_1 = 6,3$) prolina występuje jako jon obojnaczy (**2**) (Rys. 1). Podobną strukturę ma fragment cząsteczki pirolizyny (**3**) (Rys. 2) kodowanej przez kodon „stop” – UAG, jednak kwalifikacja pirolizyny jako 22 naturalnie występującego aminokwasu wciąż pozostaje dyskusyjna [6–8].

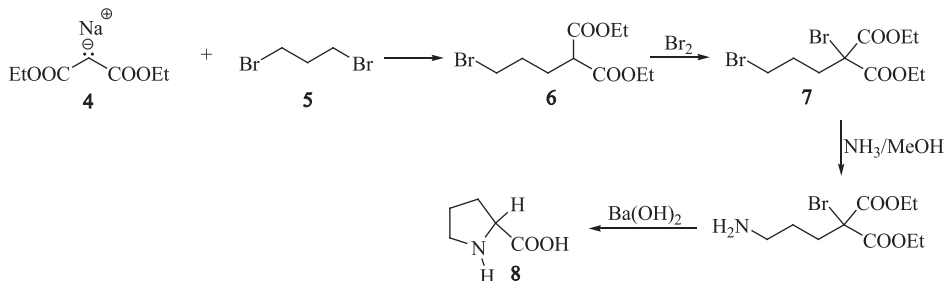


Rysunek 1. Struktura proliny
Figure 1. Structure of proline



Rysunek 2. Struktura pirolizyny
Figure 2. Structure of pyrrolysine

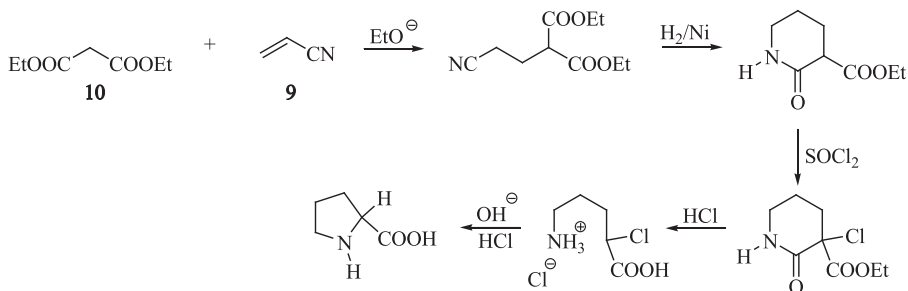
L-prolina należy również do grupy aminokwasów endogennych, których obecność w substancjach odżywczych dla organizmów nie jest niezbędna. Jest to drugi aminokwas [9], po tyrozynie, otrzymany syntetycznie. Dokonał tego Willstätter w 1900 roku. Willstättera interesowało położenie grupy karboksylowej w kwasie higrynowym, otrzymanym przez utlenienie naturalnie występujących, halucynogennych alkaloidów: higryny i kuskohigryny [10]. Opierając się na fakcie zbadanym przez Liebermana i Cybulskiego [11], że podczas suchej destylacji kwasu higrynowego wydziela się łatwo dwutlenek węgla, skłonił się do stwierdzenia obecności α grupy karboksylowej w stosunku do atomu azotu pierścienia pirolidynowego. Willstätter poddał kondensacji sól sodową malonianu dietylu (4) z 1,3-dibromopropanem (5) otrzymując bromopropylomalonian dietylu (6). Następnie potraktował ten produkt bromem przekształcając go w 1,4-dibromopropylomalonian dietylu (7). Przy udziale amoniakalnego roztworu alkoholu metylowego przekształcił ester w amid, który następnie poddał zmydleniu z wodorotlenkiem baru otrzymując kwas α -pirolidynokarboksylowy (8) (Schemat 1) [9].



Schemat 1. Schemat otrzymywania kwasu α -pirolidynokarboksylowego wg Willstättera
Scheme 1. Synthesis of α -pyrrolidinecarboxylic acid (according to Willstätter)

W roku 1901 Fischer, jako pierwszy, wyizolował prolinę z hydrolizatu kazeiny [12]. W 1911 roku razem z Londonem określił, że prolina jest pierwszym produktem hydrolizy białek, zarówno kwasowej (z zastosowaniem kwasu chlorowodorowego), jak i enzymatycznej (z zastosowaniem soków trawiennych). Fischer, również jako pierwszy zasugerował używanie nazwy prolina dla określenia kwasu α -pirolidynokarboksylowego [13]. Racemiczną prolinę otrzymywano w latach

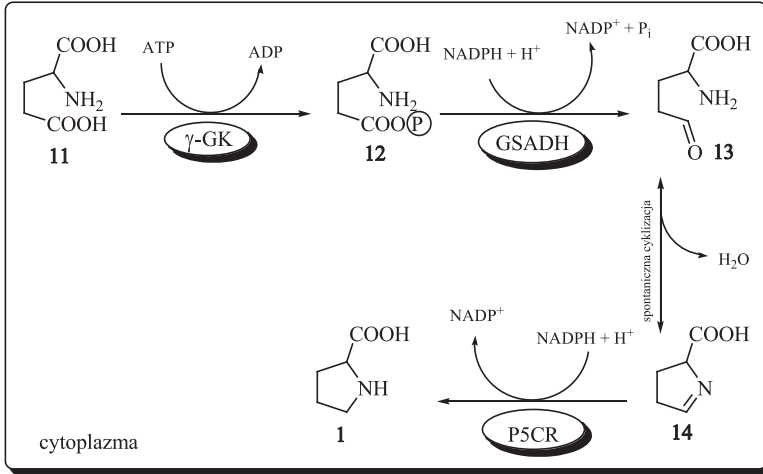
czterdziestych dwudziestego wieku wykorzystując reakcję addycji Michaela akrylonitrylu (**9**) do malonianu dietylu (**10**) (Schemat 2) [8].



Schemat 2. Schemat syntezy proliny w reakcji addycji Michaela

Scheme 2. Michael addition reaction for the synthesis of proline

Komórki różnych organizmów posiadają szlaki enzymatyczne pozwalające zarówno na biosyntezę proliny, jak również jej katabolizm. W zależności od rodzaju organizmu odkryto trzy szlaki metaboliczne. Organizmy odżywiające się cudzożywnie (m.in. ludzie, zwierzęta) dostarczają wraz z pożywieniem odpowiednie ilości tego aminokwasu. Tym samym, przy odpowiedniej suplementacji, nie występuje konieczność wykorzystywania szlaków metabolicznych do biosyntezy proliny jako substratu do biosyntezy białek [14, 15]. Dotychczas opisane trzy szlaki biosyntezy proliny opierają się na trzech substratach: kwasie glutaminowym, ornitynie i argininie. W 1987 roku Leisinger w swojej pracy opisał szlak biosyntezy proliny u bakterii wykorzystujący kwas glutaminowy (**11**). Pierwszy etap biosyntezy proliny obejmuje fosforylację grupy γ -karboksylowej przy udziale kinazy γ -glutaminianowej (γ -GK, EC 2.7.2.11) do γ -fosforanu kwasu glutaminowego (γ -GP, **12**). Następnie produkt ten ulega redukcji do γ -semialdehydu kwasu glutaminowego (GSA, **13**) przy udziale dehydrogenazy γ -semialdehydu kwasu glutaminowego (GSADH, EC 1.2.1.41). GSA spontanicznie cyklizuje do pirolino-5-karboksyylanu (P5C, **14**), który dalej przy udziale reduktazy pirolino-5-karboksylianowej (P5CR, EC 1.5.1.2) zostaje przekształcony do L-proliny (**1**) (Schemat 3) [16, 17].

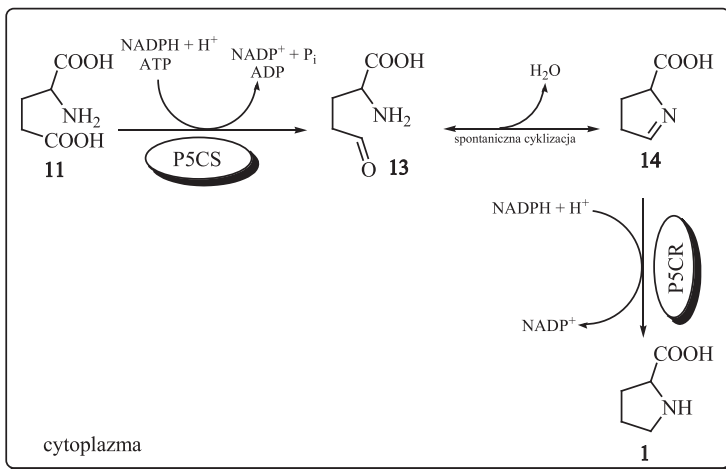


Schemat 3. Szlak glutaminianowy syntezy proliny w komórkach bakterii i drożdży

Scheme 3. Proline biosynthesis pathway from glutamate in bacteria and yeasts

Dehydrogenaza γ -semialdehydu kwasu glutaminowego, kinaza γ -glutamina-nowa i reduktaza pirolino-5-karboksylanowa kodowane są przez trzy geny: odpowiednio *proA*, *proB* i *proC* wyizolowane po raz pierwszy z mutantów *Escherichia coli* [17].

Prace Stewarta z 1981 roku oraz Hu i in. z 1992 roku pokazały różnice w syntezie proliny w komórkach roślin w porównaniu do komórek bakterii i drożdży. Badania wykazały istnienie u roślin dwufunkcyjnego enzymu, syntetazy pirolino-5-karboksylanowej (P5CS), skupiającego aktywność kinazy γ -GK i dehydrogenazy GSADH (Schemat 4) [18, 19].

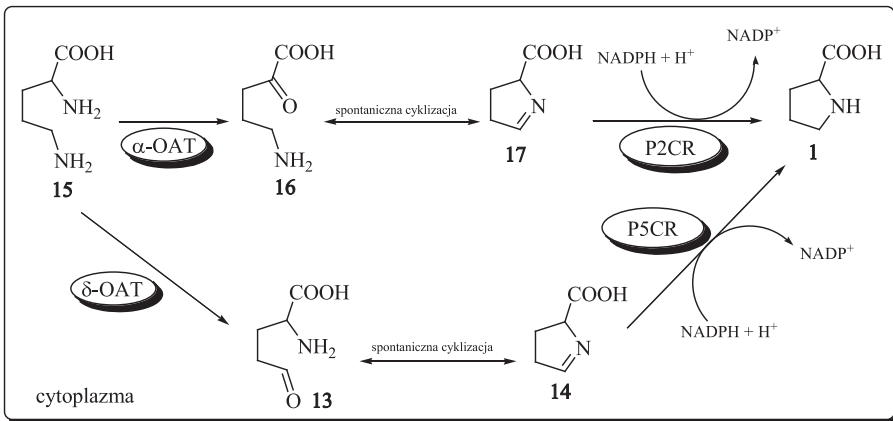


Schemat 4. Szlak glutaminianowy syntezy proliny w komórkach roślinnych

Scheme 4. Proline biosynthesis pathway from glutamate in plant

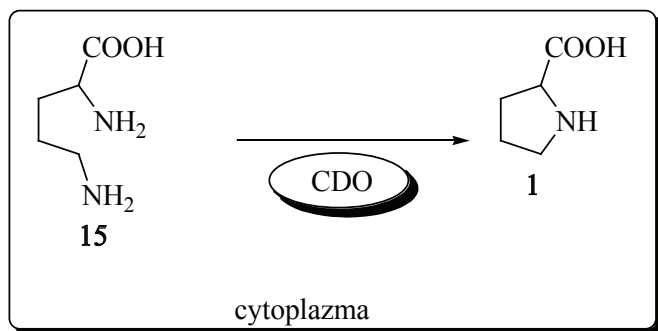
Gen kodujący P5CS, który został wyizolowany z fasoli *Vigna aconitifolia* [19] oraz rzodkiewnika pospolitego *Arabidopsis thaliana* [19, 20] zawiera dwie domeny białkowe P5CS1 i P5CS2 analogiczne z białkami *proB*, *proA* bakterii *E. coli*. Turchetto-Zolet i in. [21] zbadali i opisali sekwencje genów, odpowiedzialnych za powstawanie tego kluczowego enzymu w biosyntezie proliny, dla wielu różnych gatunków roślin m.in.: *Schizolobium parahyba*, *Bombacopsis quinata*, *Ceiba pentandra* (Puchowiec pięciopęcikowy), *Cedrela odorata* (Cedrówka wonna). Biosynteza proliny odbywa się w cytoplazmie lub w plastydach; w przypadku roślin zielonych są to chloroplasty [22, 23].

Rośliny wykorzystują do syntezy proliny również drugi szlak oparty na ornitynie, której przemiana w prolinę odbywać się może w dwojaki sposób. Pierwszy polega na transaminacji grupy α -aminowej z ornityny (**15**) w obecności α -aminotransferazy ornitynowej (α -OAT) dając w produktach kwas α -okso- δ -aminowalerianowy (**16**). Kwas ten ulega spontanicznej cyklizacji do pirolino-2-karboksyłanu (P2C, **17**), który po reakcji redukcji przy udziale reduktazy pirolino-2-karboksyłanowej (P2CR), przekształcony zostaje do L-proliny. Alternatywna transaminacja grupy δ -aminowej przy udziale δ -aminotransferazy ornitynowej (δ -OAT) przekształca ornitynę w GSA (**13**). GSA jako jeden z substratów w szlaku glutaminianowym zostaje przekształcony również do L-proliny (Schemat 5) [16, 24].



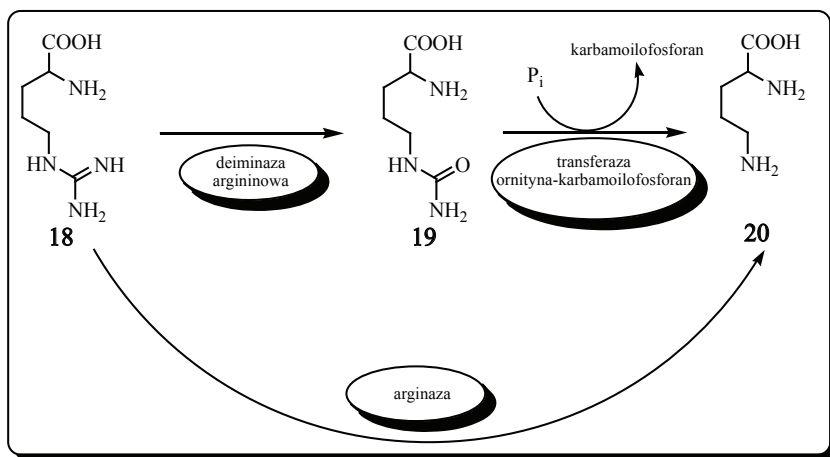
Schemat 5. Dwie drogi szlaku ornitynowego syntezy proliny
Scheme 5. Two routes of proline biosynthesis pathway from ornithine

Procesy, w których ornityna jest prekursorem proliny, odkryto również w komórkach: pierwotniaka *Tetrahymena pyriformis* [25], HeLa wywodzących się z komórek raka szyjki macicy [26]. W komórkach laseczki *Clostridium sticklandii* zaobserwowano przemianę ornityny bezpośrednio w prolinę, przy udziale enzymu cyklodeaminazy ornitynowej (CDO, EC 4.3.1.12) (Schemat 6) [27].



Schemat 6. Bezpośrednia przemiana ornityny w prolinę u *C. sticklandii*
 Scheme 6. Direct synthesis of proline from ornithine

Trzeci rodzaj przemian zachodzących w komórkach, prowadzący do otrzymania proliny, polega na biochemicznym przekształceniu cząsteczek aminokwasu argininy (18). Istnieje kilka sposobów przemiany argininy w prolinę. Jeden z nich polega na wykorzystaniu deiminazy argininowej (EC 3.5.3.6), która przekształca ją w cytrulinę (19). Cytrulina w reakcji z nieorganicznym fosforanem daje w produktach karbamoilofosforan i ornitynę (20) [27].



Schemat 7. Przemiana argininy w komórkach
 Scheme 7. Transformation of arginine in cell

W komórkach bakterii *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* oraz w komórkach grzybów *Aspergillus nidulans*, *Saccharomyces cerevisiae* i *Neurospora crassa* arginina (18) przy udziale arginazy (EC 3.5.3.1) ulega biotransformacji bezpośrednio do ornityny (20) (Schemat 7). Następnie ornityna zostaje włączona w szlak przemian prowadzący do proliny (szlak ornitynowy). U wymienionych bakterii i grzybów, arginina, a nie kwas glutaminowy jest kluczowym substratem do syntezy proliny [28].

2. FUNKCJE PROLINY

Wysoka zawartość proliny występuje w głównym białku tkanki łącznej – kolagenie. Charakterystyczną cechą struktury kolagenu jest występowanie triad aminokwasowych zawierających glicynę oraz dwa inne aminokwasy w układzie -Gly-X-Y-. Aminokwas X to najczęściej prolina, natomiast Y to 4-hydroksyprolina. Występowanie regularnie powtarzających się triad wpływa na przyjmowanie ściśle określonej konformacji kolagenu, gdzie trzy cząsteczki tworzą tropokolagen w strukturze α -helisy. Należy zwrócić uwagę na fakt, że 4-hydroksyprolina powstaje z proliny w enzymatycznym procesie posttranslacyjnym do cząsteczki kolagenu. Na różnorodność typów kolagenu ma wpływ częstość występowania proliny w pozycji X i Y, oraz 4-hydroksyproliny w pozycji Y triad aminokwasowych. Zawartość proliny i 4-hydroksyproliny w kolagenie oscyluje na poziomie 23% [29, 30].

W komórkach roślin, bakterii, protistów i grzybów prolina nagromadza się w cytoplazmie i pełni funkcje osmoregulatora. Charakter osmoregulacyjny przejawia się u roślin podczas stresu osmotycznego, jakim jest susza lub wysokie zasolenie wód i gleby. Aminokwas ten również pełni rolę regulatora zmian środowiskowych, typu: niska temperatura, promieniowanie UV, występowanie metali ciężkich (kadm) i patogenów roślinnych (wirusy, bakterie), stres metaboliczny związany ze zmianami zawartości składników odżywczych [17, 31–35]. Prolina pełni też funkcje ochronne w komórkach, przejawiające się poprzez regulację aktywności enzymów, do których należą katalaza, peroksydaza czy oksydaza polifenolowa [36]. Znaczącą rolę aminokwas ten pełni jako składnik nektaru kwiatowego. Badania wykazały, że nektar zawierający wysokie stężenie proliny (2 mM) był bardziej atrakcyjny dla pszczół. Pszczoły wykorzystują prolinę jako substrat bioenergetyczny w początkowej fazie lotu [37]. Pomimo odkrycia licznych, metabolicznych i regulatorowych funkcji proliny w organizmach ludzi, zwierząt, roślin, grzybów i bakterii, dotychczas nie poznano szczegółowo mechanizmów jej działania [38].

3. MECHANIZM REAKCJI KONDENSACJI ALDOLOWEJ

Jedną z ważniejszych reakcji syntezy wiązania C–C jest kondensacja aldolowa. Jest to reakcja pomiędzy wygenerowanym w układzie enolem lub enolanem (donorem) a cząsteczką elektrofilową (akceptorem) z utworzeniem aldolu [8, 39–58].

W organizmie żywym tego typu reakcje z utworzeniem wiązania C–C są przeprowadzane w obecności biokatalizatora. W reakcji enzymatycznej aldolazy synergicznie aktywują oba reagenty: donor i akceptor. Dodatkowo stereogeniczna struktura białka katalitycznego zapewnia kontrolę stereochemiczną reakcji poprzez odpowiednią orientację przestrzenną substratów. Znanych jest około 30 aldolaz, które ze względu na mechanizm reakcji można najogólniej podzielić na dwie klasy: aldolazy typu I i aldolazy typu II.

Aldolazy typu I katalizują reakcję kondensacji aldolowej poprzez utworzenie enaminowego produktu pośredniego. Kluczowy związek przejściowy – zasada Schiffa – powstaje w reakcji enolizującego związku karbonyłowego z lizyną, która znajduje się w centrum aktywnym aldolazy. Atak cząsteczki elektrofilowej na tak zaktywowany donor (enamina) prowadzi do powstania iminy, która hydrolizując uwalnia ketodiol [48, 54, 55].

Natomiast aldolazy typu II posiadają w centrum aktywnym kofaktor cynkowy. W procesie katalitycznym jon cynku wiąże się z cząsteczką donora tworząc przejściowy związek kompleksowy. Utworzony enolan jest podatny na atak cząsteczki elektrofilowej. Ostatecznie jak w przypadku aldolazy typu I, tworzy się ketodiol [48, 54, 55].

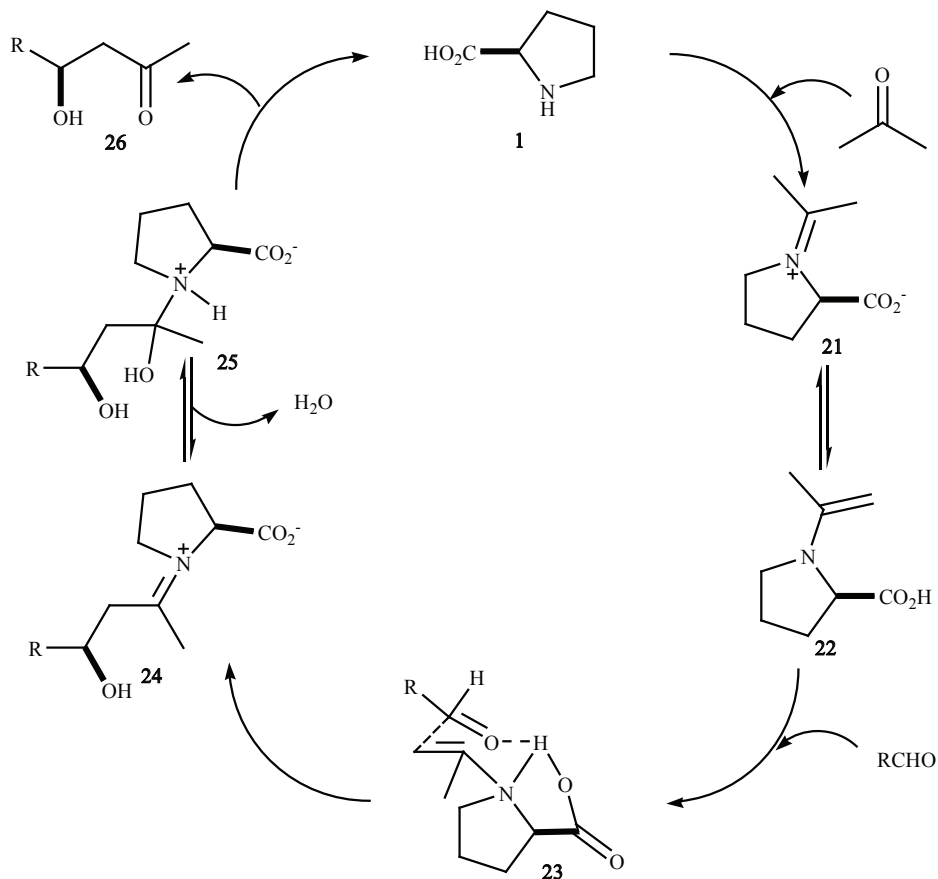
Aldolazy zarówno typu I jak i typu II skutecznie katalizują enancjoselektywną reakcję syntezy wiązania C–C w układzie fizjologicznym, nie mają jednak zastosowania w warunkach laboratoryjnych. W celu przeprowadzenia stereoselektywnej kondensacji aldolowej w laboratorium wykorzystuje się małe cząsteczki organiczne, które swoją budową imitują centra aktywne katalizatorów białkowych.

Aldolazy typu II jako pierwsze udało się zastąpić katalizatorami metaloorganicznymi. Do najczęściej stosowanych metaloorganicznych związków kompleksowych należą cząsteczki zawierające jony cynku, baru i lantanowców.

Jednym z przykładów katalizatora działającego jak aldolazy typu I jest prolina tzw. mikroaldolaza typu I. W porównaniu z innymi aminokwasami prolina jako amina II rzędowa wykazuje wyjątkową nukleofilowość, która ułatwia formowanie imin i enamin.

W reakcji kondensacji aldolowej prolina synergicznie aktywuje substraty karbonyłowe (donor i akceptor), tworząc w kluczowym etapie enaminę jako produkt przejściowy (Schemat 8).

Kataliza mikroenzymem (1) rozpoczyna się od ataku grupy aminowej L-proliny na atom węgla grupy karbonyłowej ketonu (aceton). Dehydratacja otrzymanego połączenia prowadzi do jonu iminowego (21). Jon iminowy ulega deprotonacji, co powoduje utworzenie enaminy (22). Następny etap jest wynikiem reakcji pomiędzy elektrofilem a enaminą z utworzeniem wiązania C–C (23). Na tym etapie istotną rolę odgrywa grupa karboksylowa proliny. Grupa karboksylowa ułatwia aminokatalizę działając jako kokatalizator typu kwas Brönsteda przez protonowanie akceptorowej grupy karbonyłowej aldehydu. W wyniku ataku lica *re* aldehydu na lico *si* (*E*)-enaminy powstaje produkt pośredni o strukturze odpowiadającej konformacji krzesłowej cykloheksanu. Dwustopniowa hydroliza produktów pośrednich (23 i 25) umożliwia otrzymanie aldolu (26) i zregenerowanego katalizatora (1). W reakcji kondensacji katalizowanej L-proliną preferencyjnie otrzymuje się aldol o konfiguracji *anti* [43, 45, 47–58].

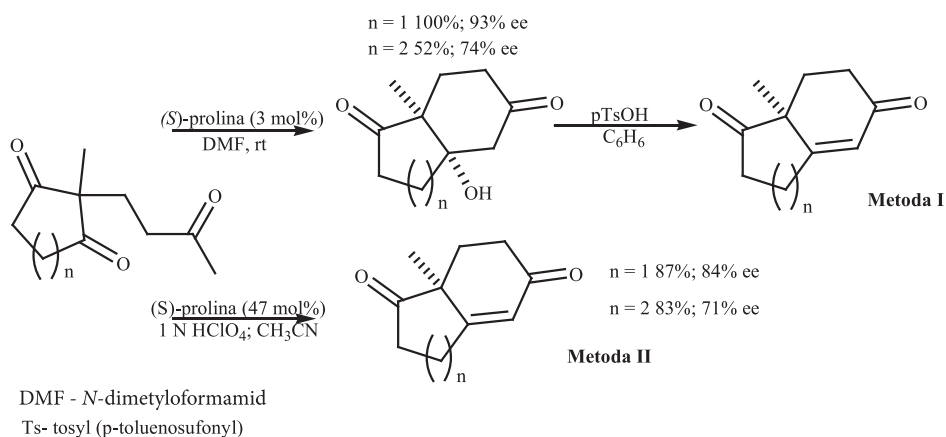


Schemat 8. Mechanizm kondensacji aldolowej katalizowanej L-proliną

Scheme 8. Mechanism of proline-catalyzed aldol reaction

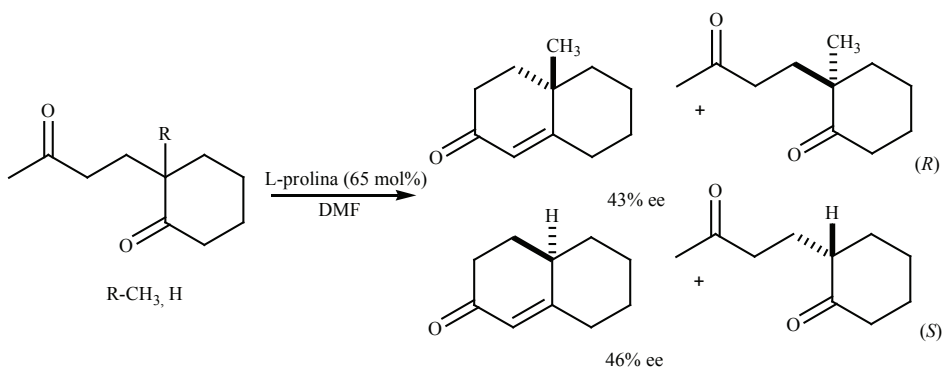
4. WEWNĄTRZCZĄSTECZKOWA REAKCJA ALDOLOWA

W latach siedemdziesiątych po raz pierwszy L-prolina została użyta jako katalizator w wewnątrzcząsteczkowej reakcji aldolowej Hajos-Parrish-Eder-Sauer-Wiechert [59–61]. W dwóch niezależnych ośrodkach w wyniku kondensacji triketonów, otrzymano enony z wysokim nadmiarem enancjomerycznym (Schemat 9). Metoda II przez wiele lat była stosowana w przemyśle, w syntezie bicyklicznych ketoli i α -, β -nienasyconych ketonów.



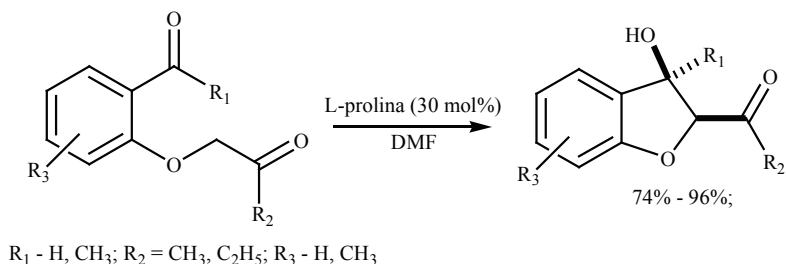
Schemat 9. Wewnętrzcząsteczkowa kondensacja aldolowa Hajos-Parrish-Ender-Sauer-Wiechert
 Scheme 9. Hajos-Parrish-Ender-Sauer-Wiechert intramolecular aldol reaction

Innym przykładem wewnętrzcząsteczkowej reakcji katalizowanej *L*-proliną jest reakcja rozdziału kinetycznego mieszaniny racemicznej diketonów. W zależności od zastosowanych warunków i struktury substratów, obok cyklicznego aldolu, otrzymano czyste optycznie diketony o konfiguracji *R* lub *S* (Schemat 10) [62, 63].



Schemat 10. Rozdział kinetyczny mieszaniny racemicznej diketonów
 Scheme 10. Kinetic separation of racemic mixture of diketones

L-prolina umożliwia przeprowadzenie reakcji cyklizacji *ortho*-podstawionych aromatycznych aldehydów lub ketonów, prowadząc do otrzymania chiralnych 2,3-dihydro-3-hydroksybenzofuranów. Reakcja charakteryzuje się wysoką diastereoselektywnością. W wyniku reakcji uzyskuje się w przewadze *cis*-izomer (*dr* = (93:7) – (>99:1)). Czystość optyczna otrzymanych aldoli wynosiła 76–87% ee (Schemat 11) [64].



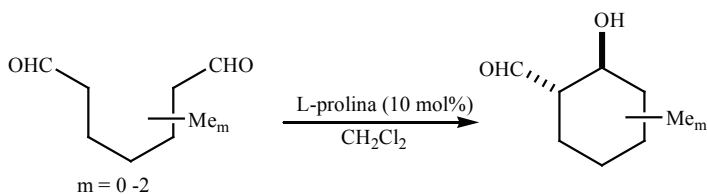
Schemat 11. Cyklizacja orto-podstawionych związków dikarbonylowych

Scheme 11. Cyclization of ortho-substituted dicarbonyl compounds

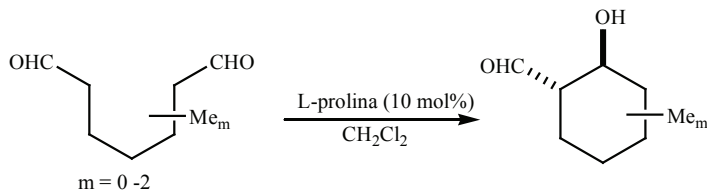
Obecność dwóch grup karbonylowych w cząsteczce umożliwia przeprowadzenie wewnątrzcząsteczkowej aldolizacji enolego. Na przykład w reakcji alifatycznych związków dikarbonylowych otrzymano *anti* pochodne cykloheksanolu o wysokiej czystości optycznej (Tab. 1) [65].

Tabela 1. Cykloaldolizacja enolego związków dikarbonylowych

Table 1. Enolexo cyclo-aldolization of dicarbonyl compounds

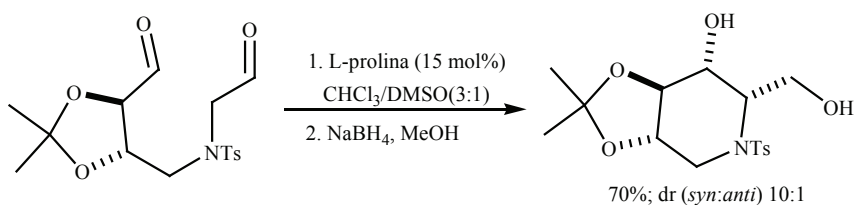


Numer	Produkty	Wydajność (%)	dr (%)	ee (%)
1		95	10:1	99
2		74	>20:1	98
3		75	>20:1	97



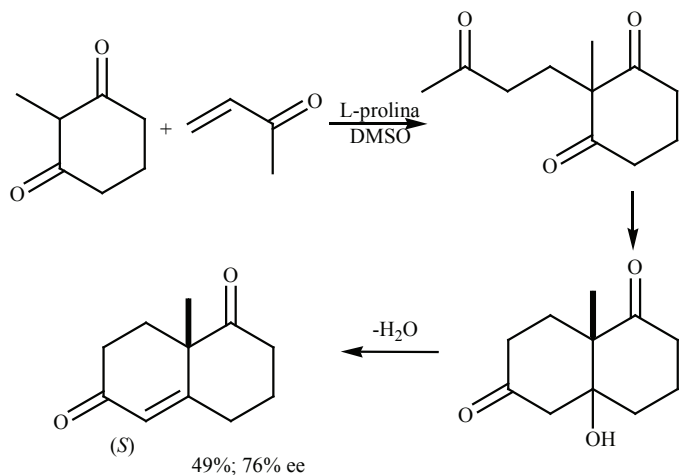
Numer	Produkty	Wydajność (%)	dr (%)	ee (%)
4		76	22:5:5:1	75,89,95,8
5		88	1:1	99
6		92	2:1	99

Natomiast w reakcji dialdehydów pochodnych kwasu winowego wewnątrzcząsteczkowa 6-enolegzo cykloaldolizacja prowadzi do powstania imino cukru o przeciwnej konfiguracji *syn* (dr > 10:1) (Schemat 12) [46].



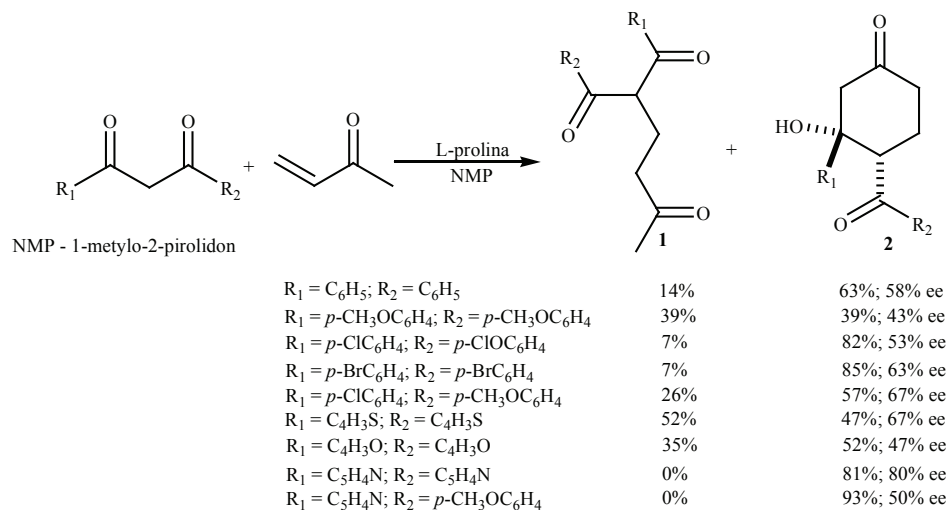
Schemat 12. 6-enolegzo cykloaldolizacja pochodnych kwasu winowego
 Scheme 12. 6-enolexo cyclo-aldolization of tartaric acid derivatives

Cykliczne diketony można zsyntetyzować w dwuetapowej reakcji aldolowej. W pierwszym etapie otrzymuje się triketony z cykloalkano-1,3-dionów i but-1-en-3-onu, które w następnym etapie ulegają wewnątrzcząsteczkowej reakcji cyklizacji (Schemat 13) [67].



Schemat 13. Dwuetapowa synteza związków dikarbonylowych

Scheme 13. Two-step synthesis of dicarbonyl compounds



Schemat 14. Dwuetapowa synteza pochodnych cykloheksanonu

Scheme 14. Two-step synthesis of cyclohexanone derivatives

W reakcji aldolowej domino Michaela otrzymuje się podstawione cykloheksanony. W obecności L-proliny β -diketony reagują z but-1-en-3-onem dając triketony (Schemat 14, związek 1), które cyklizują do chiralnych 3-hydroksycykloheksanów (Schemat 14, związek 2) [68].

UWAGI KOŃCOWE

Prolina to aminokwas występujący powszechnie w organizmach flory i fauny. Powszechność proliny związana jest z różnorodnością szlaków jej biosyntezy. Wieloletnie badania pokazują wiele właściwości proliny m.in. budulcowe, ochronne, regulacyjne i energetyczne. Dzięki specyficznej budowie, z powodzeniem zastępuje enzymy z klasy aldolaz. Odkrycie jej katalitycznych właściwości spowodowało lawinowe badania nad ich wykorzystaniem do syntezy wiązania węgiel-węgiel w reakcji wewnątrzcząsteczkowej kondensacji aldolowej. Reakcje te charakteryzują się wysoką stereoselektywnością. Otrzymane z dużymi wydajnościami produkty charakteryzują się wysoką czystością optyczną.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] P. Dalko, L. Moisan, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004, **43**, 5138.
- [2] A. Erkkilä, I. Majander, P. Pihko, *Chem. Rev.*, 2007, **107**, 5416.
- [3] P. Ha-Yeon Cheong, C. Legault, J. Um, N. Çelebi-Ölçüm, K. Houk, *Chem. Rev.*, 2011, **111**, 5042.
- [4] S. Mukherjee, J. Woon Yang, S. Hoffmann, B. List, *Chem. Rev.*, 2007, **107**, 5471.
- [5] A. Doyle, E. Jacobsen, *Chem. Rev.*, 2007, **107**, 5713.
- [6] G. Drewa, T. Ferenc, *Genetyka medyczna. Podręcznik dla studentów*, Elsevier Urban & Partner, Wrocław, 2011.
- [7] S. Lehmann, D. Funck, L. Szbados, D. Rentsch, *Amino acids*, 2010, **39**, 949.
- [8] S. Panday, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2011, **22**, 1817.
- [9] H. Vickery, C. Schmidt, *Chem. Rev.*, 1931, **9**, 169.
- [10] R. Willstätter, *Ber.*, 1900, **33**, 1160.
- [11] C. Liebermann, G. Cybulski, *Ber.*, 1895, 28, 578.
- [12] E. Fischer, *Z. Physiol. Chem.*, 1901, 33, 151.
- [13] E. Fischer, U. Suzuki, *Ber.*, 1904, 37, 2842.
- [14] T. Wyse, C. Netto, *Metab. Brain Dis.*, 2011, 26, 159.
- [15] A. Beaudet, W. Sly, D. Valle, *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, McGraw-Hill, New York, 2001.
- [16] A. Jaiswal, N. Singh, G. Shekhawat, M. Aktar, J. Jaiswal, *Int. Trans. Appl. Sci.*, 2010, **2**, 651.
- [17] M. Trovato, R. Mattioli, P. Costantino, *Rend. Lincei*, 2008, **19**, 325.
- [18] L. Paleg, D. Aspinall, *Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants*, Academic Press, Sydney, 1981.
- [19] C. Hu, A. Delauney, D. Verma, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1992, **89**, 9354.
- [20] P. Verslues, S. Sharma, *The Arabidopsis Book*, 2010, **8**, e0140.
- [21] A. Zurchetto-Zolet, M. Margis-Pinheiro, R. Margis, *Mol. Genet. Genomics*, 2009, **281**, 87.
- [22] N. Verbruggen, C. Hermans, *Amino Acids*, 2008, **35**, 753.
- [23] E. Sanchez, L. Lopez-Lefebvre, P. Garcia, R. Rivero, J. Ruiz, L. Romero, *J. Plant. Physiol.*, 2001, **158**, 593.
- [24] M. Graupner, R. White, *J. Bacteriol.*, 2001, **183**, 5203.
- [25] D. Hill, P. Chambers, *Biochim. Biophys. Acta*, 1967, **148**, 435.
- [26] H. Eagle, *J. Biol. Chem.*, 1965, **240**, 3944.
- [27] J. Kenklies, R. Ziehn, K. Fritsche, A. Pich, R. Andreesen, *Microbiology*, 1999, **145**, 819.
- [28] D. Townsend, A. Kaenjak, R. Jayaswal, B. Wilkinson, *Microbiology*, 1996, **142**, 1491.

- [29] S. Krane, *Amino Acids*, 2008, **35**, 703.
- [30] A. Barbul, *J. Nutr.*, 2008, **138**, 2021S.
- [31] I. Perez-Arellano, F. Carmona-Alvarez, A. Martinez, J. Rodriguez-Diaz, J. Cervera, *Protein Sci.*, 2010, **19**, 372.
- [32] J. Ambikapathy, J. Marshall, C. Hocart, A. Hardham, *Fungal Genet. Biol.*, 2002, **35**, 287.
- [33] V. Rai, *Biol. Plant.*, 2002, **45**, 481.
- [34] J. Xu, H. Yin, X. Li, *Plant Cell Rep.*, 2009, **28**, 325.
- [35] E. Vendruscolo I. Schuster M. Pileggi C. Scapim C. Molinari C. Marur L. Vieira, *J. Plant Physiol.*, 2007, **164**, 1367.
- [36] L. Öztürk, Y. Demir, *Plant Growth Regul.*, 2002, **38**, 259.
- [37] C. Carter, S. Shafir, L. Yehonatan, R. Palmer, R. Thornburg, *Naturwissenschaften*, 2006, **93**, 72.
- [38] J. Phang, S. Donald, J. Pandhare, Y. Liu, *Amino Acids*, 2008, **35**, 681.
- [39] S.G. Zlotin, A.S. Kucherenko, I.P. Beletskaya, *Russian Chemical Reviews*, 2009, **78**, 737.
- [40] B. List, *Tetrahedron*, 2002, **58**, 5573.
- [41] B. List, *Acc. Chem. Res.*, 2004, **4**, 548.
- [42] P.I. Dalko, *Enantioselective Organocatalysis: Reactions and Experimental Procedures*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2007.
- [43] J. Gawroński, K. Gawrońska, K. Kacprzak, M. Kwit, *Współczesna synteza organiczna*, PWN Warszawa, 2004.
- [44] M.J. Gaunt, C.C.C. Johansson, A. McNally, N.T. Vo, *Drug Discovery Today*, 2007, **12**, 8.
- [45] M. Movassaghi, E.N. Jacobsen, *Science*, 2002, **298**, 1904.
- [46] M. Stodulski, J. Młynarski, *Wiad. Chem.*, 2010, **64**, 5.
- [47] S. Bahmanyar, K.N. Houk, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123**, 12911.
- [48] H. Gröger, J. Wilken, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2001, **40**, 529.
- [49] L. Hoang, S. Bahmanyar, K.N. Houk, B. List, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 16.
- [50] S. Bahmanyar, K.N. Houk, H.J. Martin, B. List, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 2475.
- [51] B. List, L. Hoang, H.J. Martin, *PNAS*, 2004, **101**, 5839.
- [52] B. List, *Chem. Commun.*, 2006, 819.
- [53] D.A. Bock, Ch.W. Lehmann, B. List, *PNAS*, 2010, **107**, 20636.
- [54] B. Alcaide, P. Almendros, *Eur. J. Org. Chem.*, 2002, 1595.
- [55] T.D. Machajewski, Ch.-H. Wong, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2000, **39**, 1352.
- [56] W. Notz, F. Tanaka, C.F. Barbas III, *Acc. Chem. Res.*, 2004, **37**, 580.
- [57] C. Palomo, M. Oiarbide, J. M. García, *Chem. Eur. J.*, 2002, **8**, 37.
- [58] J. Seayad, B. List, *Org. Biomol. Chem.*, 2005, **3**, 719.
- [59] U. Eder, G. Sauer, R. Wiechert, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1971, **10**, 496.
- [60] BRD P. 2014757; *Chem. Abstr.*, 1972, **76**, 14180.
- [61] BRD P. 2102623; *Chem. Abstr.*, 1972, **76**, 59072.
- [62] C. Agami, J. Levisalles, H. Sevestre, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1984, 418.
- [63] C. Agami, N. Platzer, C. Puchot, H. Sevestre, *Tetrahedron*, 1987, **43**, 1091.
- [64] D. Enders, O. Niemeier, L. Straver, *Synlett*, 2006, 3399.
- [65] C. Pidathala, L. Hoang, N. Vignola, B. List, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2003, **42**, 2785.
- [66] I. Kumar, Ch. V. Rode, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2010, **21**, 2703.
- [67] T. Bui, C. F. Barbas III, *Tetrahedron Letters*, 2000, **41**, 6951.
- [68] D. Gryko, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2005, **16**, 1377.

**ENANCJOSELEKTYWNA ENZYMATYCZNA
DESYMETRYZACJA KATALIZOWANA LIPAZAMI.
CZĘŚĆ II. OPTYMALIZACJA WARUNKÓW REAKCJI.
ZWIĄZKI MEZO**

ENANTIOSELECTIVE ENZYMATIC
DESYMMETRIZATION CATALYZED IN THE PRESENCE
OF LIPASE. PART II. OPTIMALIZATION OF REACTION
CONDITIONS. MESO COMPOUNDS

**Aleksandra Karczmarzka-Wódzka¹,
Renata Kołodziejska¹, Agnieszka Tafelska-Kaczmarek²,
Tomasz Przybyła, Marcin Dramiński¹**

¹ *Katedra i Zakład Chemii Ogólnej, Collegium Medicum w Bydgoszczy UMK Toruń
ul. Dębowa 3, 85-626 Bydgoszcz*

² *Katedra Chemii Organicznej, UMK Toruń
ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń*

Abstract

Wprowadzenie

1. Wpływ czynników na enancjoselektywność reakcji enzymatycznej
 - 1.1. Rozpuszczalnik
 - 1.1.1. Stabilność i aktywność
 - 1.1.2. Selektywność
 - 1.2. Wpływ pH
 - 1.3. Wpływ temperatury
2. Przykłady enzymatycznej reakcji desymetryzacji *mezo* związków w obecności lipazy jako katalizatora

Uwagi końcowe

Piśmiennictwo cytowane



Mgr Aleksandra Karczmarzka-Wódzka, ukończyła chemię na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu. Pracę magisterską wykonała w Zakładzie Chemii Organicznej. Obecnie pracuje w Katedrze i Zakładzie Chemii Ogólnej *Collegium Medicum* w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. W ramach pracy doktorskiej zajmuje się enancjoselektywną redukcją analogów nukleozydowych.



Dr Renata Kołodziejska, pracownik Katedry i Zakładu Chemii Ogólnej *Collegium Medicum* w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Zainteresowania naukowe Autorki związane są z badaniami nad regio- i stereoselektywnymi właściwościami biokatalizatorów oraz modyfikacją analogów nukleozydów pirymidynowych.



Dr Agnieszka Tafelska-Kaczmarek, pracownik Katedry Chemii Organicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Zainteresowania naukowe Autorki obejmują badania nad asymetryczną syntezą fluoropochodnych związków biologicznie czynnych.



Mgr Tomasz Przybyła ukończył biotechnologię w *Collegium Medicum* Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Pracę magisterską wykonał w Zakładzie Chemii Ogólnej. W ramach pracy magisterskiej zajmował się enancjoselektywną enzymatyczną desymetryzacją acyklonukleozydów pirymidynowych.



Prof. dr hab. Marcin Dramiński, kieruje pracą w Zakładzie Chemii Ogólnej *Collegium Medicum*. Interesuje się chemią i stereochemią syntez związanych z analogami nukleozydów pirymidynowych i dydaktyką przedkliniczną dla studentów medycyny i kierunków pokrewnych.

ABSTRACT

In the enzymatic asymmetric synthesis, the enzyme allows the desymmetrization of achiral compounds resulting in chiral compounds of high optical purity. *Meso* compounds (bearing a plane of symmetry) are very important group of compounds used in EEDs (Scheme 1) [1–4]. Similarly to prochiral compounds, selective acylation or hydrolysis of *meso* substrates leads to optically active products. Most lipases preferentially convert the same enantiomers in the above mentioned types of reaction. This allows the preparation of the both enantiomers of the product in high chemical and optical yield (Scheme 3–20) [35–58].

An effective enzymatic catalysis should be performed under conditions optimal for a biocatalyst performance. Hence, it is essential to select an appropriate reaction medium, the pH, and temperature [6–34].

Optimization of the reaction conditions in terms of an appropriate solvent selection is effective and most frequently the simplest way to modify the enzyme selectivity. One of the most important criteria for the solvent selection is its nature [25]. The enzyme selectivity is conditioned by its conformational rigidity, which increases in more hydrophobic medium (typical hydrophobic solvents, $scCO_2$). A hydrophobic solvent decreases biocatalyst lability, which does not allow the connection between the structurally mismatched substrate and the active side of an enzyme [10, 26–31]. Ionic liquids are a separate group of solvents which, despite their high hydrophobicity ($\log P \ll 0$) and polarity, can constitute an ideal medium for the biotransformation reactions [18–23].

Keywords: *meso* compounds, desymmetrization, transesterification, hydrolysis, lipase

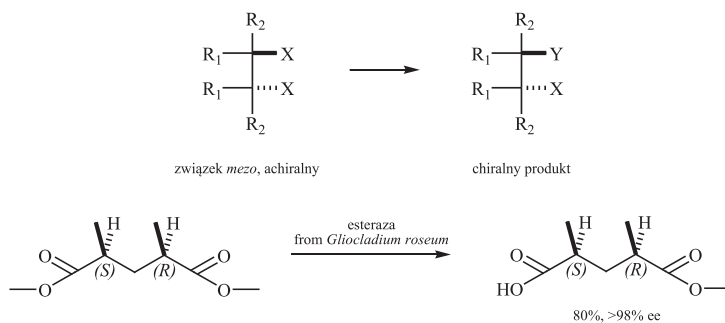
Słowa kluczowe: związki *mezo*, desymetryzacja, transestryfikacja, hydroliza, lipaza

WPROWADZENIE

Jak ważna jest czystość optyczna leków nikogo nie trzeba przekonywać, w historii medycyny jest kilka niechlubnych przykładów zastosowania leku w postaci racemicznej z której tylko jeden z enancjomerów miał właściwości terapeutyczne, na przykład talidomid. Najczęściej dwa enancjomery danego związku wykazują odmienne aktywności biologiczne w żywym organizmie. Dlatego tak istotne jest otrzymywanie związków biologicznie czynnych w postaci czystej enancjomerycznej. Jedną z metodą asymetrycznej syntezy, która pozwala na otrzymanie związków czystych optycznie jest enancjoselektywna enzymatyczna desymetryzacja (EED). Enzymy mają wiele zalet są chemo-, regio-, diastereo- i enancjoselektywne oraz przyjazne dla środowiska. Ponadto reakcje enzymatyczne przebiegają w łagodnych warunkach, dlatego produkty reakcji nie są narażone na reakcje uboczne na przykład izomeryzacji, racemizacji, epimeryzacji, przegrupowania. Dodatkowo wiele reakcji w obecności katalizatora enzymatycznego można prowadzić w rozpuszczalnikach hydrofobowych, co znacznie poszerza zakres zastosowania enzymów. Do grupy enzymów najbardziej eksploatowanych w asymetrycznej syntezie organicznej należą hydrolazy w szczególności lipazy [1].

Enzymatyczna desymetryzacja polega na modyfikacji achiralnego substratu, w wyniku której uzyskuje się związek chiralny. Istotne w enzymatycznej desymetryzacji jest to, że enzym dokonuje selektywnej modyfikacji, dlatego otrzymuje się związki wzbogacone enancjomerycznie. Achiralnymi substratami w EED są najczęściej związki prochiralne lub *mezo* syntony.

Podobnie jak w przypadku prochiralnych reagentów złamanie symetrii w *mezo* substratach prowadzi do otrzymania optycznie czynnych produktów. Na przykład selektywna hydroliza jednej z identycznych grup w symetrycznej cząsteczce związku *mezo* umożliwi uzyskanie chiralnego reagenta. Przykładem takiej reakcji jest enzymatyczny proces desymetryzacji *mezo* estru dikarboksylowego katalizowany karboksyesterazą (Schemat 1) [2–4].

Schemat 1. EED *mezo* diestru katalizowana esteraząScheme 1. EED of *mezo* diacetate catalyzed by esterase

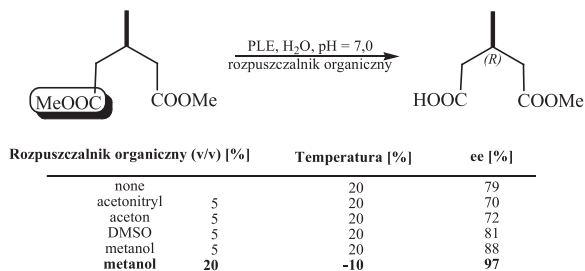
1. WPŁYW CZYNNIKÓW NA ENANCJOSELEKTYWNOŚĆ REAKCJI ENZYMATYCZNEJ

Kataliza enzymatyczna, aby została przeprowadzona efektywnie, powinna być prowadzona w optymalnych warunkach dla działania biokatalizatora, dlatego tak istotny jest dobór odpowiedniego medium reakcji, pH i temperatury.

1.1. ROZPUSZCZALNIK

1.1.1. Stabilność i aktywność

Początkowo uważano, że optymalnym środowiskiem do przeprowadzenia skutecznej katalizy jest woda. Woda, jako naturalne środowisko ewolucyjne i fizjologiczne enzymów, pozwala na zachowanie odpowiedniej konformacji białka. Oddziaływanie pomiędzy cząsteczkami wody, a polarnymi resztami aminokwasowymi enzymu biorą udział w stabilizacji jego struktury II- i III-rzędowej. Ze względu na ograniczenia spowodowane słabą rozpuszczalnością większości substancji organicznych w wodzie, zaczęto prowadzić reakcje z dodatkiem rozpuszczalnika organicznego mieszającego się w sposób nieograniczony z wodą. Szybko okazało się, że dodany rozpuszczalnik organiczny nie tylko zwiększył rozpuszczalność reagentów, ale również wpłynął na poprawę stereoselektywnych właściwości biokatalizatora. Pionierem w tym obszarze badań był Bryan Jones w latach 1970–1980, który jako pierwszy przeprowadził selektywną hydrolizę katalizowaną esterazą ze świńskiej wątroby (PLE) w wodzie z dodatkiem rozpuszczalników organicznych. W reakcji deacylowania prochiralnego estru kwasu 3-metyloglutarowego w 20% MeOH uzyskał *R*-monoester z najwyższym 97% nadmiarem enancjomerycznym (Schemat 2) [4–6].



Schemat 2. Reakcja deacylacji prochiralnego kwasu 3-metyloglutarowego

Scheme 2. The deacylation reaction of prochiral 3-methyl glutarate diester

Reakcję enzymatyczną z układów wodnych po raz pierwszy przeniósł do hydrofobowych rozpuszczalników organicznych Klibanov i współpracownicy. Stałe preparaty enzymatyczne (immobilizowane lub liofilizowane) zawieszano w środo-

wisku hydrofobowym z dodatkiem niewielkiej ilości buforu, która miała zapewnić aktywność katalityczną enzymu. Generalnie zmiana medium reakcji enzymatycznych z układów wodnych na rozpuszczalniki organiczne wiąże się z szeregiem nowych możliwości, spośród których jako najistotniejsze wymienić można zwiększoną rozpuszczalność substratów organicznych, zwiększenie stabilności enzymu oraz ułatwiony w stosunku do wody odzysk produktów. Dla katalizy enzymatycznej w rozpuszczalnikach organicznych kluczowe jest zachowanie pewnej ilości wody niezbędnej do utrzymania prawidłowej konformacji białka. Częsteczki wody tworzą wokół enzymu warstwę monomolekularną, która stabilizuje strukturę białka i uniemożliwia zachodzenie oddziaływań pomiędzy jego resztami, a cząsteczkami rozpuszczalnika. Zaks i Klibanov w badaniach nad aktywnością oksydoreduktaz w różnych rozpuszczalnikach organicznych stwierdzili, że maksymalną enzymatyczną aktywność uzyskuje się, jeśli do układu doda się 1000 cząsteczek wody na cząsteczkę enzymu, która z grubsza stanowi niezbędną ilość wody – warstwę monomolekularną [6–9].

Umieszczenie białka enzymatycznego w bezwodnym, z uwzględnieniem minimalnej, koniecznej ilości wody, środowisku, powoduje związanie się naładowanych polarnych reszt do wnętrza biokatalizatora, zmniejszając tym samym powierzchnię kontaktu białka ze środowiskiem [10, 11]. Konsekwencją owego zjawiska jest zwiększenie stabilności enzymu w rozpuszczalniku organicznym. Brak oddziaływań między resztami aminokwasowymi, a cząsteczkami rozpuszczalnika nie stwarza możliwości rozwijania się białka, jednocześnie generując warunki korzystne do powstania większej ilości wiązań w obrębie cząsteczki biokatalizatora – wiązań wodorowych i mostków solnych, co powoduje zmniejszenie rozmiarów białka i zwiększa jego stabilność [10]. Cechą rozpuszczalników organicznych wywierającą istotny wpływ na zmianę stabilności enzymów, jest ich hydrofobowość ($\log P$). Wzrost hydrofobowości środowiska wiąże się ze wzrostem sztywności konformacyjnej białka.

Drugim istotnym elementem mającym wpływ na stabilność biokatalizatora, a zależnym od hydrofobowości, jest dynamiczna sieć wodna otaczająca białko [10]. Cząsteczki wody stabilizujące konformację białka w bezwodnym środowisku, wykazują mniejszą mobilność w środowisku hydrofobowym. W rozpuszczalnikach o wyższej polarności dochodzi do oddziaływań między cząsteczkami tychże rozpuszczalników, a cząsteczkami wody. Prowadzi to do zwiększenia ruchliwości wodnej warstwy monomolekularnej i sprzyja powstawaniu oddziaływań między resztami aminokwasowymi, a rozpuszczalnikiem, i tym samym zaburzeniu konformacji białka. Niekorzystne zmiany konformacyjne białka katalitycznego w rozpuszczalnikach hydrofilowych wpływają na zmniejszenie aktywności katalitycznej enzymu, która zgodnie z definicją jest funkcją ułamka molowego wody (c_w) i współczynnika aktywności (γ_w). Wykazano, że wraz ze wzrostem hydrofobowości wzrasta aktywność katalityczna enzymu, ponieważ współczynnik aktywności maleje. Z tego wynika, że w celu uzyskania tego samego poziomu hydratacji enzymu konieczna jest mniejsza ilość wody w rozpuszczalnikach hydrofobowych niż hydrofilowych [12–15].

Typowymi rozpuszczalnikami organicznymi, w których prowadzi się syntezy enzymatyczne są głównie alkany (heksan, cykloheksan $\log P > 3$), związki aromatyczne (toluen, benzen $\log P$ odpowiednio 2,5, 2), halogenoalkany (chloroform, dichlorometan $\log P$ odpowiednio 2, 0,85) oraz etery (eter izopropylowy, *tert*-butylowometylowy, dietylowy $\log P$ odpowiednio 1,9, 1,30, 0,85) [4]. Kataliza enzymatyczna staje się w większości przypadków mniej efektywna wraz ze wzrostem polarności rozpuszczalnika. Rozpuszczalniki takie jak dimetyloformamid (DMF), czy dimetylosulfotlenek (DMSO) są w stanie rozpuszczać białko i denaturować je [7, 10].

Wybór rozpuszczalnika zastosowanego do enzymatycznej syntezy nie jest jednak taki oczywisty, najczęściej jest uzależniony od preparatu białkowego. W niektórych przypadkach bardzo dobrze sprawdzają się również rozpuszczalniki polarne dla których $\log P < 0$. Na przykład lipaza B z *Candida antarctica* (CAL-B) nie tylko toleruje środowisko polarne, ale właśnie w tych rozpuszczalnikach wykazuje wyjątkową stabilność [4].

Szczególnie ciekawymi rozpuszczalnikami stosowanymi w biotransformacji są cieczje jonowe oraz płyny nadkrytyczne. Cieczje jonowe są organicznymi solami, które składają się z dużego niesymetrycznego kationu i nieorganicznego lub organicznego anionu towarzyszącego [16, 17]. Ze względu na swoje właściwości fizyczne, takie jak wysoka temperatura wrzenia, niska temperatura topnienia, mała prężność par (nie-lotne), niepalność, termiczna i chemiczna stabilność, stały się atrakcyjną alternatywą dla konwencjonalnych rozpuszczalników organicznych. Cieczje jonowe mogą stanowić idealne środowisko dla enzymu, prowadząc do bardziej zwartej konformacji zdolnej wykazywać dużą aktywność i stabilność. Dodatkowo w reakcjach enzymatycznych ciecz jonowa immobilizując enzym poprzez wiązania wodorowe, siły van der Waalsa, oddziaływania jonowe stabilizuje aktywną konformację białka katalitycznego nawet w niekorzystnych, dezaktywujących warunkach [18–23].

Płyny w stanie nadkrytycznym (specyficzny stan materii pośrednim między stanem gazowym i ciekłym) mogą również spełniać rolę środowiska reakcji enzymatycznych. Stan nadkrytyczny charakteryzuje się lepkością zbliżoną do gazów, gęstością do cieczy oraz wysoką dyfuzyjnością. W biotransformacjach najczęściej stosowanym płynem nadkrytycznym jest ditlenek węgla ($scCO_2$), jego hydrofobowość jest porównywalna z heksanem. Rozpuszczalnik ten jest bezpieczny ekologicznie, ponadto łatwo można go odzyskać i zawrócić do procesu [24].

1.1.2. Selektywność

Optymalizacja warunków reakcji pod kątem wyboru właściwego rozpuszczalnika organicznego jest efektywnym i bardzo często najprostszym sposobem modyfikacji selektywnych właściwości białek katalitycznych.

Jednym z ważniejszych kryterium doboru właściwego rozpuszczalnika jest ich polarność [25]. Selektowność enzymu warunkowana jest sztywnością konfor-

macyjną, a zwiększa ją bardziej hydrofobowe środowisko (typowe rozpuszczalniki hydrofobowe, nadkrytyczny CO_2). Zastosowanie rozpuszczalników hydrofobowych może prowadzić do zwiększenia selektywności enzymu, ponieważ zmniejszona labilność biokatalizatora nie pozwala na przyłączanie substratów niedopasowanych strukturalnie do miejsca aktywnego. W rozpuszczalnikach hydrofobowych dodatkowo można ingerować w konformację białka zmieniając jego selektywność na przykład w reakcji z wykorzystaniem odwracalnego inhibitora. Włączenie jego cząsteczki w centrum aktywne enzymu indukuje w jego obrębie zmiany konformacyjne, które wpływają na selektywność. Usunięcie inhibitora nie powoduje zmiany położenia reszt aminokwasowych do pozycji wyjściowej, ponieważ nie pozwala na to hydrofobowe środowisko rozpuszczalnika, które promuje zwijanie się polarnych reszt aminokwasowych do wnętrza enzymu [10].

Ponadto cząsteczki rozpuszczalnika mogą wiązać się w miejscu aktywnym enzymu tworząc kompleksy enzym–rozpuszczalnik. Zakłócają transformację na przykład jednego z enancjomerów, przyczyniając się do odmiennej enancjoselektywności enzymu [26–31].

1.2. WPLYW pH

Właściwości kwasowo-zasadowe środowiska w przypadku reakcji w roztworach wodnych mają również wpływ na katalizę enzymatyczną. Z danych doświadczalnych wynika, że optymalny zakres pH dla większości enzymów mieści się w przedziale 5,0–9,0, istnieją oczywiście wyjątki, takie jak np. pepsyna, enzym proteolityczny występujący w żołądku. Obserwowany spadek aktywności przy skrajnych wartościach pH tłumaczy się denaturacją białka. Oprócz denaturacji dochodzić może do zmian konformacyjnych, które również obniżają aktywność. Przyczyną jest zmiana ładunku grup aminokwasów niezbędnych do utrzymania aktywnej struktury II- i III-rzędowej enzymu, co prowadzi do zmian labilności. Białko może się rozluźnić lub stać bardziej zbite, istnieje również możliwość rozpadu na podjednostki. Z katalizą enzymatyczną w bezwodnym środowisku reakcji związane jest pojęcie „pamięci pH” enzymu. Białko wytrącone z roztworu wodnego o danym pH i przeniesione do rozpuszczalnika organicznego, wykazuje taki sam stan jonizacji jaki posiadało w roztworze wodnym. Ta właściwość pozwala na sterowanie aktywnością enzymu poprzez dobór optymalnego pH w roztworze wodnym i następnie przeniesienie biokatalizatora do bezwodnego środowiska reakcji [4, 7].

1.3. WPLYW TEMPERATURY

Szybkość reakcji chemicznych wzrasta wraz ze wzrostem temperatury. Dzieje się tak na skutek zwiększenia energii kinetycznej cząsteczek, a tym samym zwiększenia częstotliwości efektywnych zderzeń. Kataliza enzymatyczna regulowana

jest również tą zależnością, ale tylko do pewnego zakresu temperatury, charakterystycznego dla danego enzymu. Aktywność enzymu wzrasta wraz z temperaturą, odmienna zależność dotyczy jednak selektywności procesu. Spadek temperatury reakcji w większości przypadków sprzyja wzrostowi selektywności. W optymalizacji selektywnych procesów, katalizowanych enzymatycznie, istotne jest takie dobranie temperatury, aby zarówno wydajność, jak i selektywność, były możliwie najwyższe [32]. W celu określenia temperatury optymalnej można wyznaczyć tzw. temperaturę racemizacji. Temperatura racemizacji to taka temperatura, dla której nie ma różnicy w energii swobodnej pomiędzy dwoma diastereoizomerycznymi produktami przejściowymi, w wyniku reakcji otrzymuje się racemat.

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger; \text{ jeśli } \Delta G^\ddagger = 0 \text{ wtedy } T = T_{\text{rac}} = \frac{\Delta H^\ddagger}{\Delta S^\ddagger}$$

T_{rac} – temperatura racemiczna

Jeśli temperatura, w której prowadzi się reakcję enzymatyczną jest niższa od T_{rac} to głównym czynnikiem determinującym czystość optyczną produktu jest zmiana entalpii. W takiej sytuacji czystość optyczna produktu maleje wraz ze wzrostem temperatury. Z drugiej strony jeśli temperatura jest wyższa od T_{rac} to głównie czynnik entropowy ma wpływ na selektywność reakcji, dlatego też wraz ze wzrostem temperatury zwiększa się czystość optyczna produktów. W syntezie enzymatycznej prowadzonej w temperaturze większej od T_{rac} otrzymuje się z reguły przeciwny enancjomer w porównaniu z reakcją prowadzoną w temperaturze niższej od T_{rac} [33, 34].

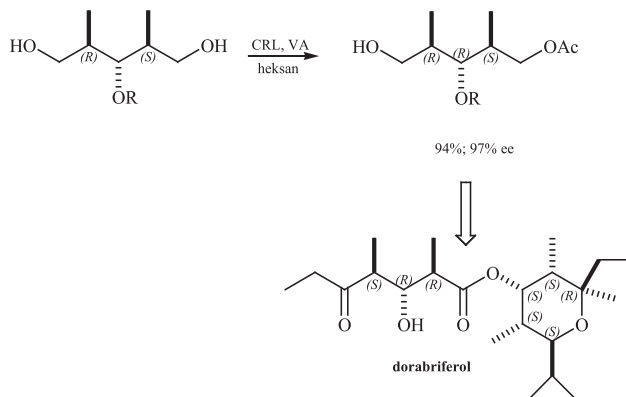
2. PRZYKŁADY ENZYMATYCZNEJ REAKCJI DESYMETRYZACJI MEZO ZWIĄZKÓW W OBECNOŚCI LIPAZY JAKO KATALIZATORA

Substratami w EED z zastosowaniem lipaz jako biokatalizatorów obok związków prochiralnych są również *mezo* związki, posiadające płaszczyznę symetrii. Podobnie jak w przypadku związków prochiralnych, selektywna reakcja acylowania lub hydrolizy chiralnych *mezo* substratów, głównie alkoholi, prowadzi do produktów optycznie czynnych. W większości przypadków lipazy selektywnie przekształcają grupy funkcyjne o tej samej konfiguracji, dlatego w reakcji acylowania najczęściej otrzymuje się produkt o konfiguracji przeciwnej niż w reakcji hydrolizy. Jest to związane z określoną enancjopreferencją zastosowanego katalizatora.

Stereoselektywne właściwości enzymów chętnie wykorzystuje się w chemoenzymatycznych syntezach związków biologicznie czynnych. Etap enzymatycznej syntezy zapewnia wysoką czystość optyczną końcowego produktu.

Najczęściej związkami *mezo* selektywnie desymetryzowanymi enzymatycznie są reagenty cykliczne. Z powodzeniem również desymetryzacji ulegają acykliczne *mezo* związki. W przypadku polifunkcyjnych reagentów reakcja przebiega nie tylko enancjo- ale również regioselektywnie.

Jeden z acyklicznych *mezo* dioli po enzymatycznej modyfikacji katalizowanej lipazą *Candida rugosa* (CRL) wykorzystano do syntezy wtórnego metabolitu wyizolowanego ze skóry *Dolabrifera dolabrifera*. Enzym zapewnił wysoką enancjoselektywność etapu pierwszego. Otrzymano (2*R*,3*R*,5*S*)-monoester w wyniku selektywnej reakcji acylowania jednej z pierwszorzędowych grup –OH (Schemat 3) [35].

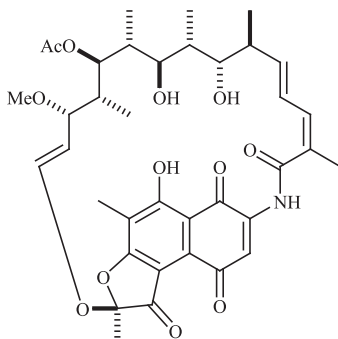


Schemat 3. EED *mezo* 1,5-diolu
Scheme 3. EED of *meso* 1,5-diol

Fragment C(19)-C(27) ryfamycyny S naturalnego antybiotyku pozyskiwanego z bakterii *Amycolatopsis mediterranei*, z powodzeniem zsyntetyzowano w stereoselektywnej reakcji acylowania *mezo* polioli z zastosowaniem octanu winylu (VA) jako rozpuszczalnika i czynnika acylującego. Lipaza ze świńskiej trzustki (porcine pancreatic PPL) regioselektywnie acylowała jedną z pierwszorzędowych grup –OH acyklicznego polialkoholu dając z wysoką wydajnością chemiczną i optyczną (2*R*,3*R*,4*S*,6*R*,7*S*,8*S*)-monoester (Schemat 4) [36].



76%; >98% ee

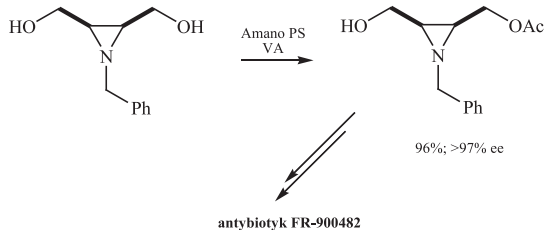


ryfamycyna S

Schemat 4. EED *meso* poliolu
 Scheme 4. EED of *meso* polyol

Następną ważną grupą optycznie czynnych alkoholi otrzymanych za pomocą metody EED są cykliczne alkohole. Poniżej przedstawiono przykłady enzymatycznych reakcji desymetryzacji cyklicznych *meso* związków zawierających od trzech do dziewięciu atomów w pierścieniu.

Meso diole z trójczłonowym pierścieniem stanowią ważną grupę związków budulcowych w syntezie naturalnych reagentów. Na przykład jedna z pochodnych azyrydyny uzyskana w wyniku asymetrycznej reakcji monoacetylowania katalizowanej lipazą Amano PS jest kluczowym związkiem przejściowym w syntezie antybiotyku przeciwnowotworowego FR-900482 (Schemat 5) [37].



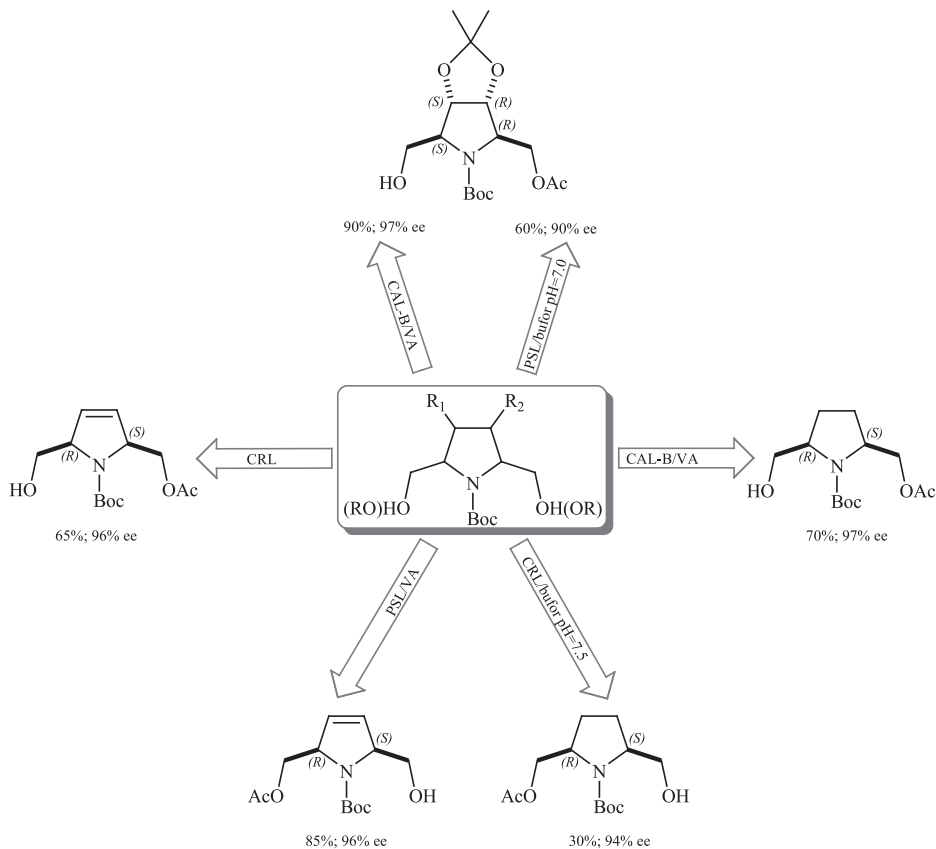
96%; >97% ee

antybiotyk FR-900482

Schemat 5. EED pochodnej azyrydyny
 Scheme 5. EED of aziridine derivative

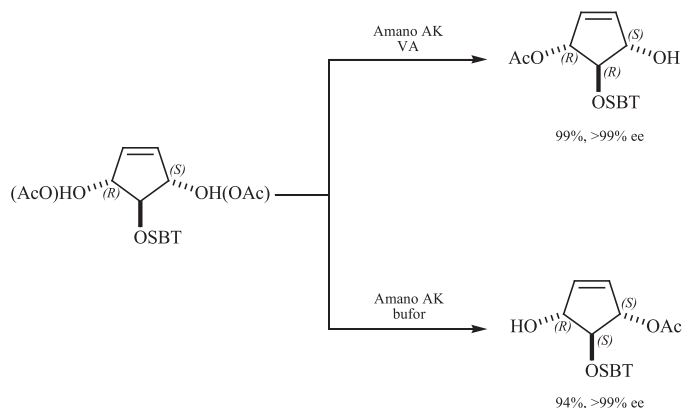
Pięcioczłonowe związki heterocykliczne stanowią istotny fragment strukturalny syntetycznych farmaceutyków i związków agrochemicznych. Polihydroksylowe pochodne pirolidyn znane jako imino i azocukry, są inhibitorami glikozydaz wykazujące terapeutyczne właściwości w leczeniu cukrzycy, AIDS oraz raka. Ponadto

związki te używa się jako organokatalizatory oraz chiralne związki pomocnicze. Różne pochodne *N*-Boc-2,5-*cis* podstawione pirolidyn i piroli otrzymano w enzymatycznej reakcji desymetryzacji. Niezależnie od katalizatora zarówno w reakcji hydrolizy diestrów jak również w reakcji transestryfikacji pięciocząłowych *mezo* dioli uzyskano monoestry o wysokiej czystości optycznej (Schemat 6) [38].



Schemat 6. EED *mezo* *N*-Boc-2,5-*cis*-dipodstawionych pirolidyn i piroli
Scheme 6. EED of *mezo* *N*-Boc-2,5-*cis*-disubstituted pyrrolidines and pyrrolines

Desymetryzacja pięciocząłowych *mezo* 5-*t*-butylo-dimetylosiloksy-2-cyklo-penteno-1,4-dioli i ich diestrowych pochodnych umożliwia w obecności lipazy Amano AK otrzymanie czystych optycznie monoestrów. Lipaza selektywnie acylo-wała i hydrolizowała grupę o tej samej konfiguracji, dzięki temu uzyskano izo-mercyczne produkty o konfiguracjach przeciwnych. Oba enancjomery stosuje się w syntezie wielocząsteczkowych chromoprotein – chromoforów antybiotyków ene-dynowych (Schemat 7) [39].

Schemat 7. EED pochodnej *trans*-4,5-dihydroksy-2-cyklopentenuScheme 7. EED of *trans*-4,5-dihydroxy-2-cyclopenten derivative

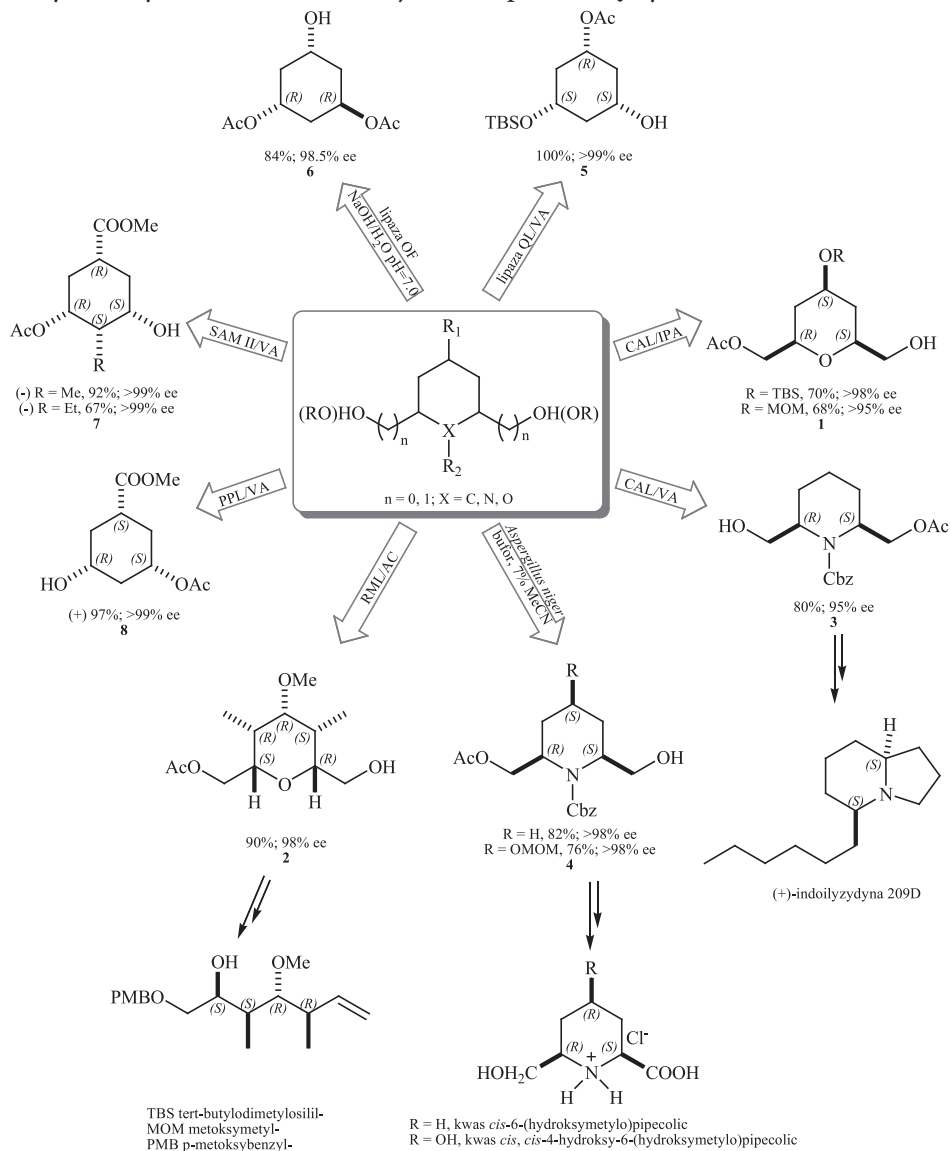
Następną grupą związków używanych jako substraty w asymetrycznej syntezie w obecności lipaz są cykliczne alkohole z sześcioczołowym pierścieniem. Stereoselektywna reakcja acylowania *mezo* tetrahydropiranu w obecności lipazy *Candida antarctica* (CAL) daje (2*R*,4*S*,6*S*)-monoester o wysokiej czystości enancjomerycznej. Enancjomer o konfiguracji przeciwnej (2*S*,4*R*,6*R*) z równie wysokimi nadmiarami enancjomerycznymi uzyskano w reakcji hydrolizy katalizowanej tą samą lipazą odpowiedniej diacetylowej pochodnej (Schemat 8, zw. 1) [40].

Mezo 3,4,5-podstawione tetrahydropirano-1,6-diole biotransformowano w obecności lipazy *Rhizomucor miehei* (RML). Otrzymano z wysoką wydajnością i enancjoselektywnością monoestry z czterema lub pięcioma centrami stereogenicznymi (Schemat 8, zw. 2) [41].

W stereoselektywnej reakcji acetylowania *mezo* piperydyn octanem winylu (rozpuszczalnik i donor acylu) w obecności lipazy CAL otrzymuje się monoestry z wysokimi nadmiarami enancjomerycznymi. Jeden z nich (2*S*,6*R*)-hemiester został użyty jako prekursor w syntezie (5*S*,9*S*)-(+)-indoilyzydiny 209D (Schemat 8, zw. 3) [42]. Natomiast w reakcji hydrolizy katalizowanej lipazą *Aspergillus niger* z odpowiednich diestrów uzyskano (2*R*,6*S*)-monoestry, które zastosowano jako substraty wyjściowe w wieloetapowej syntezie obu enancjomerów piperydyno-2-karboksylowych pochodnych (Schemat 8, zw. 4) [43].

W reakcji enzymatycznej desymetryzacji *mezo* 1,3,5-trihydroksycykloheksanów syntetyzuje się czyste optycznie enancjomery, które można użyć w syntezie pochodnej 19-*nor*, *des*-C,*D* witaminy D₃. Lipaza *Alcaligenes* sp. (QL) efektywnie katalizowała reakcji transestryfikacji *mezo* dioli uzyskując czyste enancjomerycznie monoestry (1*R*,3*S*,5*S*) (Schemat 8, zw. 5). Natomiast lipaza OF (komercyjnie dostępna lipaza z CRL) w reakcji hydrolizy z mieszaniny dwóch izomerów *cis/trans* trioctanów selektywnie deacylowała izomer *trans* umożliwiając otrzymanie (1*R*,3*R*)-diestru (Schemat 41, zw. 6) [44, 45].

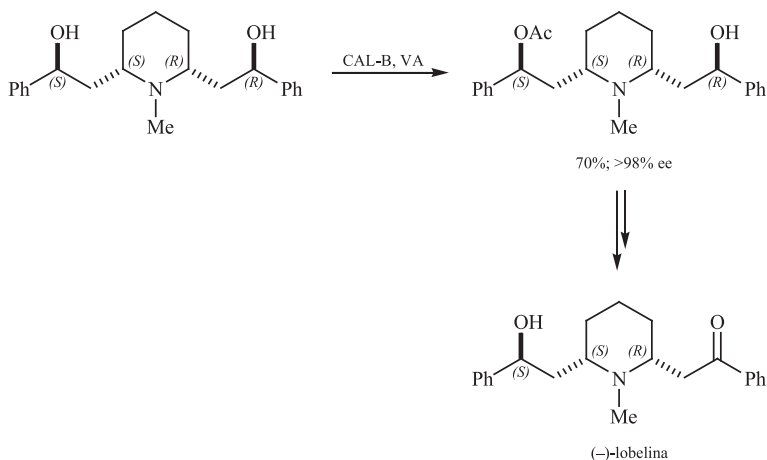
W reakcji desymetryzacji *mezo* all *cis*-3,5-dihydroksy-1-(metylokarbonylo)cykloheksanu oraz 4-metylo- i etylo- podstawionych analogów w zależności od zastosowanej lipazy otrzymano dwa enancjomery. Lipaza PPL wykazywała odmienną enancjopreferencję niż lipaza SAM II (*Pseudomonas*), w reakcji transestryfikacji otrzymano odpowiednio (+) i (-) izomery (Schemat 8, (-)-7, (+)-8). Natomiast hydroliza diestrów kwasu masłowego w obecności lipazy PSL jak i SAM II prowadzi do tych samych izomerów – enancjomerów prawoskrętnych [46].



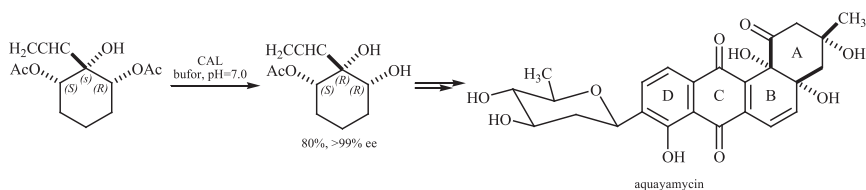
Schemat 8. EED polihydroksylowych pochodnych z sześciocznowymi pierścieniami

Scheme 8. EED of polyhydroxylated derivatives of six-membered rings

Inną pochodną cykliczną zawierającą sześć atomów w pierścieniu o właściwościach biologicznie czynny jest alkaloid (-)-lobelina, zwany tytoniem Indian, którą syntetyzowano poprzez stereoselektywną desymetryzację *mezo* lobelanidyny katalizowanej lipazą CAL-B. Enzym umożliwił otrzymanie *S*-monoestru o wysokiej czystości optycznej (Schemat 9) [47].

Schemat 9. EED *mezo* lobelanidynyScheme 9. EED of *meso* lobelanidine

Pochodną 2-podstawionego monoestru cykloheksano-1,2,3-triolu otrzymanego na drodze enzymatycznej w obecności lipazy CAL użyto jako substrat wyjściowy w syntezie antybiotyku aquayamicyn (Schemat 10) [48].

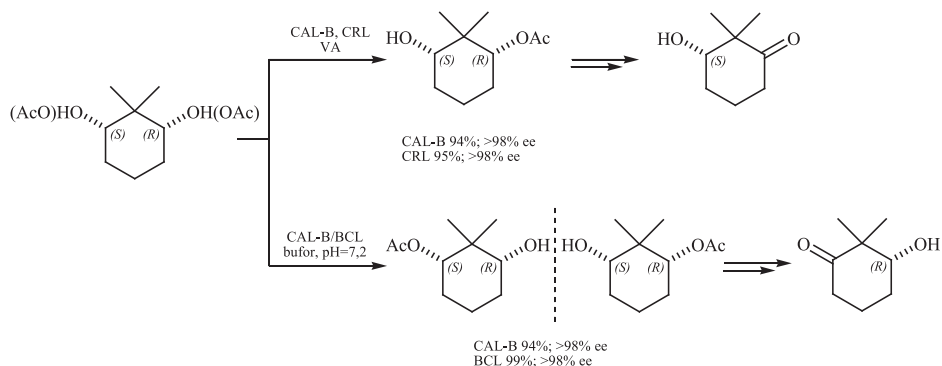


Schemat 10. EED pochodnej cykloheksano-1,2,3-triolu

Scheme 10. EED of cyclohexane-1,2,3-triol derivative

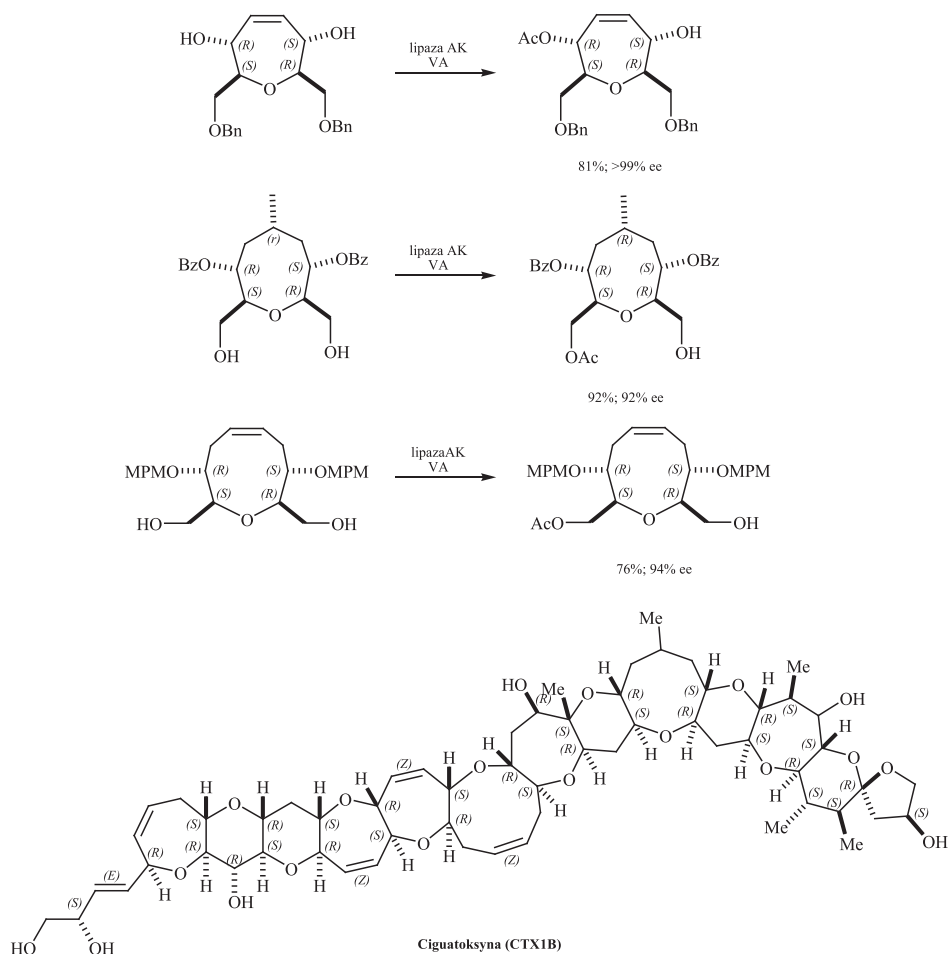
Optycznie aktywne 3-hydroksy-2,2-dimetylocyklohekanony, chiralne bloki budulcowe, uzyskano w syntezie chemoenzymatycznej. Etap desymetryzacji diastereoizomerów *cis/trans* 2,2-dimetylocykloheksano-1,3-diolu i jego diestrowej pochodnej zapewnił wysoką czystość optyczną produktu końcowego. Najlepsze wyniki uzyskano z zastosowaniem lipaz CAL-B, CRL i BCL. Generalnie w reakcji acylowania diolu w obecności lipaz otrzymano (1*R*,3*S*)-monoester. W reakcji hydrolizy w zależności od zastosowanego katalizatora selektywnie była modyfikowana jedna z grup acylowych o konfiguracji *R* lub *S*. W obecności lipazy CAL-B

otrzymano izomer (1*S*,3*R*), natomiast zastosowanie lipazy BCL prowadzi do produktu o konfiguracji przeciwnej (Schemat 11) [49].



Schemat 11. EED 2,2-dimetylocykloheksano-1,3-diolu i jego octanu
Scheme 11. EED of 2,2-dimethylcyclohexane-1,3-diol and its diacetate

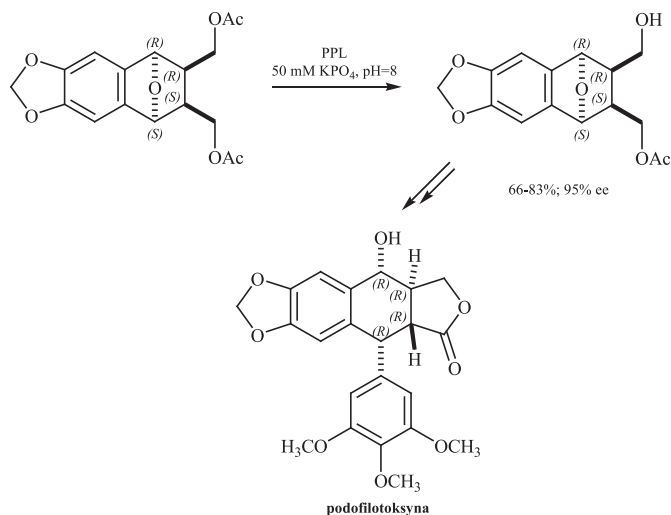
Z sukcesem desymetryzowane są również większe niż sześciocząłowe pierścienie *mezo* pierwszorzędowych dioli. Na przykład enancjoselektywna transestryfikacja octanem winylu *mezo* cyklicznych ośmio i dziewięciocząłowych polioli prowadzi do otrzymania monoestrów z wysoką wydajnością i ee's, które mogą zostać użyte jako związki budulcowe w syntezie D(E) i F pierścieni ciguatoksyny (Schemat 12) [50].



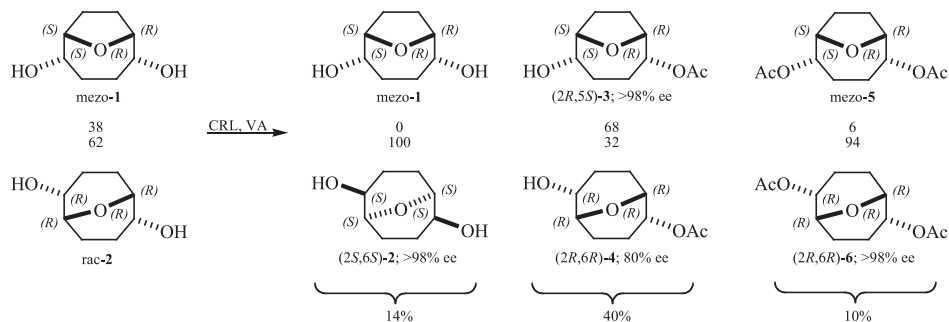
Schemat 12. EED cyklicznych polioli

Scheme 12. EED of cyclic polyols

Desymetryzacja tetracyklicznych *mezo* dioctanów w obecności lipazy PPL prowadzi do (1*R*,2*R*,3*S*,4*S*)-monoestru. Związek ten użyto do produkcji lignanu (–)-podofilotoksyny, leku przeciwwymiotnego, wyizolowanego z amerykańskiego drzewa *Podophyllum peltatum* (Mayapple) i jego C-2 epimeru (Schemat 13) [51].

Schemat 13. EED *mezo* tetracyklicznego diocjanuScheme 13. EED of *meso* tetracyclic diacetate

Mezo bicykliczne izomeryczne diole będące mieszaniną 38:62 *mezo* związku 1 oraz racemicznego związku 2 rozdzielono w reakcji enzymatycznej desymetryzacji i rozdziłu kinetycznego (Schemat 14, zw. 1 i 2). Lipaza CRL desymetryzowała ilościowo *mezo* diol, natomiast rozdział kinetyczny diolu 2 katalizowany tą lipazą zatrzymywał się na etapie 50%. Główną frakcją otrzymaną po enzymatycznej transformacji była mieszanina 68:32 związków 3 i 4. Enzym zapewnił wysoką enancjoselektywność reakcji, czystość optyczna chiralnych produktów wynosiła od 80–98% ee [52].

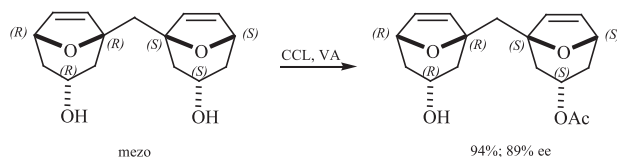


Schemat 14. Rozdział izomerycznych dioli

Scheme 14. Separation of isomeric diols

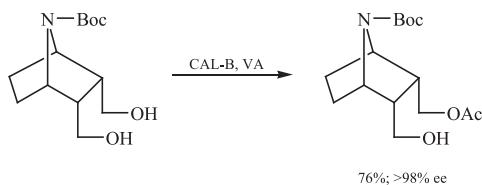
W enzymatycznej desymetryzacji *mezo* bicyklicznego diolu 7 – 1,1'-metyleno-di[(1*R*,1'*S*,3*R*,3'*S*,5*S*,5'*R*)-3-hydroksy-8-okabicyklo[3.2.1]-okt-6-en-1-ylu] otrzymano

w obecności lipazy *Candida cylindracea* (CCL) monoester z 89% nadmiarem enancjomerycznym (Schemat 15) [53].



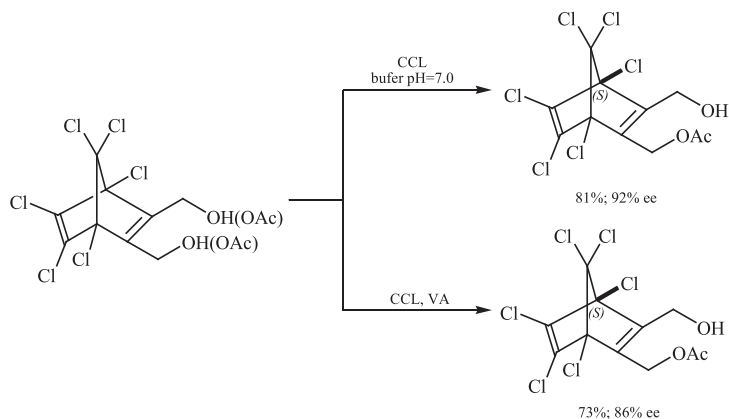
Schemat 15. EED 7 - 1,1'-metylenodi[[1*R*,1'*S*,3*R*,3'*S*,5*S*,5'*R*]-3-hydrokso-8-okabicyklo[3.2.1]-okt-6-en-1-ylu
Scheme 15. EED of 7 - 1,1'-methylenedi[[1*R*,1'*S*,3*R*,3'*S*,5*S*,5'*R*]-3-hydroxy-8-oxabicyclo[3.2.1]-okt-6-ene-1-yl

W reakcji asymetryzacji syntetyzowano również czyste optycznie inne pochodne bicykliczne na przykład bicyklo[2.2.1]heptanu i bicyklo[2.2.1]hepta-2,5-dieniu. *Meso* 7-azabicyklo[2.2.1]heptanodiol biotransformowano w obecności lipazy CAL-B, w wyniku reakcji otrzymano (1*R*,2*R*,3*S*,4*S*)-monoester o wysokiej czystości optycznej (Schemat 16) [54].

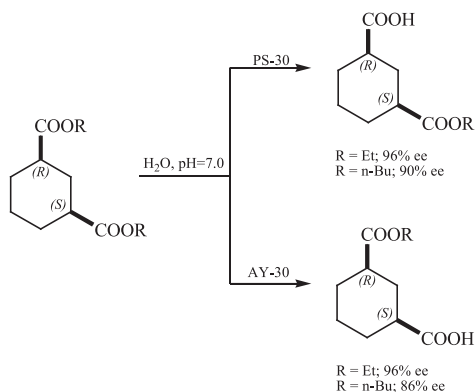


Schemat 16. EED *meso* 7-azabicyklo[2.2.1]heptanodiolu
Scheme 16. EED of *meso* 7-azabicyclo[2.2.1]heptanodiol

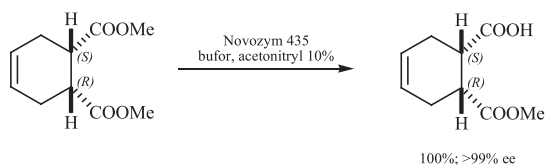
Natomiast lipaza CCL selektywnie przekształca *meso* diol i diester 1,4,5,6,7,7-heksachlorobicyklo[2.2.1]hepta-2,5-dieniu w monoester o konfiguracji (1*S*,4*R*) (Schemat 17) [55]. Pochodne zawierające fragment strukturalny bicyklo[2.2.1]heptanu znalazły zastosowanie w chemii medycznej, syntezie organicznej oraz chemii peptydów.

Schemat 17. EED *meso* pochodnych 1,4,5,6,7,7-heksachlorobicyklo[2.2.1]hepta-2,5-dieniuScheme 17. EED of *meso* 1,4,5,6,7,7-hexachlorobicyclo[2.2.1]hepta-2,5-diene derivatives

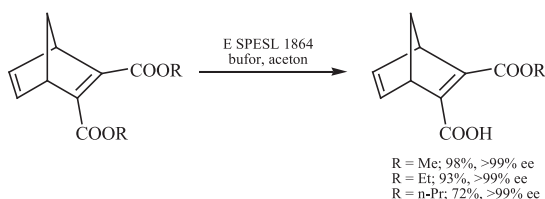
Lipazy podobnie jak esterazy selektywnie hydrolizują również *meso* pochodne kwasów karboksylowych. Na przykład *meso* estry kwas *cis*-cykloheksano-1,3-dikarboksylowe selektywnie hydrolizowano w enzymatycznej desymetryzacji lipazami z *Pseudomonas cepacia* (PS-30) oraz *Candida rugosa* (AY-30). W wyniku reakcji otrzymano oba enancjomery o wysokiej czystości optycznej, ponieważ lipazy wykazywały przeciwną enancjopreferencję w stosunku do grup estrowych (Schemat 18) [56].

Schemat 18. EED *meso* diestru kwasu *cis*-cykloheksano-1,3-dikarboksylowegoScheme 18. EED of *meso cis*-cyclohexane-1,3-dicarboxylic acid diester

Dikarboksylową pochodną cykloheksenu selektywnie deacyluje lipaza z CAL-B (Novozym 435) uzyskuje się *cis*-(1*S*,2*R*)-dimetylocykloheks-4-en-1,2-dikarboksylowy. Chiralny monoester jest kluczowym związkiem przejściowym w syntezie leków modulujących aktywność receptorów chemokinin (Schemat 19) [57].

Schemat 19. EED diestru kwasu *cis*-dimetylocykloheks-4-en-1,2-dikarboksylowegoScheme 19. EED of *cis*-dimethyl-cyclohex-4-ene-1,2-dicarboxylate

Serie symetrycznych *mezo* estrów dikarboksylowych modyfikowano enzymatycznie za pomocą odpornej na działanie wysokich temperatur hydrolazy. Preparat ESPEL 1864 dawał lepsze rezultaty niż esteraza PLE oraz lipaza AY z CRL. Otrzymano w wyniku reakcji desymetryzacji lewoskrętne monoalkilowe pochodne związków bicyklo[2.2.1]hept-2,5-dieno-2,3-dikarboksylowych z wysoką chemiczną i optyczną wydajnością (Schemat 20) [58].



Schemat 20. EED diestru kwasu bicyklo[2.2.1]hept-2,5-dieno-2,3-dikarboksylowego

Scheme 20. EED of bicyclo[2.2.1]hept-2,5-diene-2,3-dicarboxylate

UWAGI KOŃCOWE

Lipazy należą do enzymów najczęściej wykorzystywanych w EED. Reakcje enzymatyczne w porównaniu do tradycyjnych metod chemicznych należą do syntez przyjaznych dla środowiska.

Optymalizacja warunków reakcji, szczególnie dobór rozpuszczalnika zastosowanego jako medium reakcji, wpływa na poprawę selektywnych właściwości enzymów. Generalnie w rozpuszczalnikach hydrofobowych lipazy wykazują zwiększoną selektywność. Obok rozpuszczalników na właściwości enancjoselektywne lipaz ma wpływ charakter użytego reagenta, temperatura oraz pH.

W EED najczęściej selektywnej modyfikacji, spośród związków *mezo*, podaje się alkohole oraz ich acylowe pochodne oraz estry kwasów karboksylowych. W większości przypadków lipazy wykazują określoną enancjopreferencję, selektywnie acylują i hydrolizują grupy o identycznej konfiguracji absolutnej.

PIŚMIENICTWO CYTOWANE

- [1] E. Garcia-Urdiales, I. Alfonso, V. Gotor, *Chem. Rev.*, 2005, **105**, 313.
- [2] Ch.-S. Chen, Y. Fujimoto, Ch. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, **103**, 3580.
- [3] K. Faber, *Biotransformations in organic chemistry*, Springer, Berlin, 1992.
- [4] V. Gotor, I. Alfonso, E. Garcia-Urdiales, *Asymmetric organic synthesis with enzymes*, Wiley-VCH, Weinheim, 2008.
- [5] J.B. Jones, M.M. Mehes, *Canad. J. Chem.*, 1979, **57**, 2245.
- [6] L.K.P. Lam, R.A. Hui, J.B. Jones, *J. Org. Chem.*, 1986, **51**, 2047.
- [7] A. Zaks, A. M. Klivanov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, **82**, 3192.
- [8] A. Klivanov, *Ace. Chem. Res.*, 1990, **23**, 114.
- [9] A. Zaks, A.M. Klivanov, *The Journal of Biological Chemistry*, 1988, **263**, 8017.
- [10] G. Colombo, G. Ottolino, G. Carrea, *Monatsh. Chem.*, 2000, **131**, 527.
- [11] P. Trodler, J. Pleiss, *BMC Structural. Biology*, 2008, **8**:9, 1.
- [12] P.J. Halling, *Enzyme Microb. Technol.*, 1994, **16**, 178.
- [13] P.J. Halling, *Trends in Biotechnol.*, 1989, **7**, 50.
- [14] P.J. Halling, *Enzyme Microb. Technol.*, 1984, **6**, 513.
- [15] H.L. Goderis, G. Ampe, M.P. Feyten, B.L. Fouwe, W.M. Guffenes, S.M. Van Cauwenbergh, P.P. Tobback, *Biotechnology and Bioengineering*, 1987, **30**, 258.
- [16] N. Jain, A. Kumar, S. Chauhan, S.M.S. Chauhan, *Tetrahedron*, 2005, **61**, 1015.
- [17] Z. Yang, W. Pan, *Enzyme Microb. Technol.*, 2005, **37**, 19.
- [18] P. Lozano, T. De Diego, D. Carrié, M. Vaultier, J.L. Iborra, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2003, **21**, 9.
- [19] P. Lozano, T. De Diego, D. Carrié, M. Vaultier, J.L. Iborra, *Chem. Commun.*, 2002, 692.
- [20] M.T. Reetz, W. Wiesenhöfer, G. Franciò, W. Leitner, *Chem. Commun.*, 2002, 992.
- [21] P. Lozano, T. De Diego, S. Gmouh, M. Vaultier, J.L. Iborra, *Biotechnol. Prog.*, 2004, **20**, 661.
- [22] S. Keskin, D. Kayrak-Talay, U. Akman, Ö. Hortaçsu, *J. of Supercritical Fluids*, 2007, **43**, 150.
- [23] O. Miyawaki, M. Tatsuno, *J. Biosci. Bioeng.*, 2008, **105**, 61.
- [24] T. Mastuda, T. Harada, K. Nakamura, T. Ikariya, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2005, **16**, 909.
- [25] P.A. Fitzpatrick, A.M. Klivanov, *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, **113**, 3166.
- [26] F. Secundo, S. Riva, G. Carrea, *Tetrahedron: Asymmetry*, 1992, **3**, 267.
- [27] Y. Hirose, K. Kariya, J. Sasaki, Y. Kurono, H. Ebike, K. Achiwa, *Tetrahedron Letters*, 1992, **33**, 7157.
- [28] K. Nakamura, J. Takebe, T. Kitayama, A. Ohno, *Tetrahedron Letters*, 1991, **32**, 4941.
- [29] K. Nakamura, M. Kinoshita, A. Ohno, *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, **114**, 8799.
- [30] S. Tawaki, A. M. Klivanov, *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, **1143**, 1882.
- [31] J. Ottosson, L. Fransson, J. W. King, K. Hult, *Biochimica and Biophysica Acta*, 2002, **1574**, 325.
- [32] J. Köhler, B. Wünsch, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2006, **17**, 3091.
- [33] R.S. Phillips, *Enzyme Microb. Technol.*, 1992, **14**, 417.
- [34] R.S. Phillips, *Trends Biotechnol.*, 1996, **14**, 13.
- [35] R. Chênevert, Courchesne, G.; Caron, D. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2003, **14**, 2567.
- [36] R. Chênevert, Y. S. Rose, *J. Org. Chem.* 2000, **65**, 1707.
- [37] P. Davoli, E. Caselli, M. Bucciarelli, A. Forni, G. Torre, F. Prati, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2002, 1948.
- [38] R. Chênevert, F. Jacques, P. Giguère, Dasser M., *Tetrahedron: Asymmetry*, 2008, **19**, 1333.
- [39] K. Toyama, S. Iguchi, H. Sakazaki, T. Oishi, M. Hiram, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 2001, **74**, 997.
- [40] R. Chênevert, D. Goupil, Y.S. Rose, E. Bédard, *Tetrahedron: Asymmetry*, 1998, **9**, 4285.
- [41] M. Candy, G. Aundran, H. Bienaymé, C. Bressy, J.-M. Pons, *Org. Lett.*, 2009, **11**, 4950.
- [42] R. Chênevert, G.M. Ziarani, M.P. Morin, M. Dasser, *Tetrahedron: Asymmetry*, 1999, **10**, 3117.
- [43] R. Chênevert, M.-P. Morin, *J. Org. Chem.*, 1999, **64**, 3178.

- [44] H. Hilpert, B. Wirz, *Tetrahedron*, 2001, **57**, 681.
- [45] B. Wirz, H. Iding, H. Hilpert, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2000, **11**, 4171.
- [46] Y. Zhao, Y. Wu, P. De Clerq, M. Vandewalle, P. Maillos, J.-C. Pascal, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2000, **11**, 3887.
- [47] R. Chênevert, P. Morin, *Bioorg. Med. Chem.*, 2009, **17**, 1837.
- [48] T. Matsumoto, T. Konegawa, H. Yamaguchi, T. Nakamura, T. Sugai, K. Suzuki, *Synlett*, 2001, 1650.
- [49] R. Chênevert, C. Lévesque, P. Morin, *J. Org. Chem.*, 2008, **73**, 9501.
- [50] T. Oishi, M. Maruyama, M. Shoji, K. Maeda, N. Kumahara, S.-I. Tanaka, M. Hirama, *Tetrahedron*, 1999, **55**, 7471.
- [51] D.B. Berkowitz, S. Choi, J.H. Maeng, *J. Org. Chem.* 2000, **65**, 847.
- [52] K. Hegemann, H. Schimanski, U. Höweler, G. Haufe, *Tetrahedron Lett.*, 2003, **44**, 2225.
- [53] G. Coste, S. Gerber-Lemaire, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2005, **16**, 2277.
- [54] A. Michaud, C. Lévesque, M. Fila, P. Morin, N. Pelchat, R. Chênevert, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2011, **22**, 919.
- [55] C. Tanyeli, T. Karadağ, A. Mecitoğlu, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2004, **15**, 307.
- [56] N.W. Boaz, *Tetrahedron: Asymmetry*, 1999, **10**, 813.
- [57] A. Goswani, T.P. Kissick, *Organic Process Research & Development*, 2009, **13**, 483.
- [58] Y. Kashima, J. Liu, S. Takenami, S. Niwayama, *Tetrahedron: Asymmetry* 2002, **13**, 953.

Praca wpłynęła do Redakcji 3 czerwca 2013

**REAKCJA MITSUNOBU
– MECHANIZM I ZASTOSOWANIE**

**MITSUNOBU REACTION
– MECHANISM AND APPLICATION**

**Joanna D. Kitkowska*, Żaneta A. Tabaczyńska,
Marcin Dramiński**

*Katedra i Zakład Chemii Ogólnej, Wydział Lekarski,
Collegium Medicum Uniwersytet Mikołaja Kopernika,
ul. Dębowa 3, 85-626 Bydgoszcz
e-mail: j.kitkowska@cm.umk.pl

Abstract

Wprowadzenie

1. Mechanizm reakcji Mitsunobu
2. Zastosowanie reakcji Mitsunobu
 - 2.1. Tworzenie wiązań węgiel–tlen
 - 2.1.1. Synteza pochodnych estrowych
 - 2.1.2. Otrzymywanie laktonów
 - 2.1.3. Synteza eterów
 - 2.2. Tworzenie wiązania węgiel–azot
 - 2.2.1. Synteza amin
 - 2.2.2. Synteza azydków
 - 2.2.3. Tworzenie wiązania *N*-glikozydowego
 - 2.3. Tworzenie wiązania węgiel–siarka
 - 2.4. Synteza pochodnych halogenowych
 - 2.5. Tworzenie wiązania węgiel–węgiel

Piśmiennictwo cytowane



Dr inż. Joanna Kitkowska w roku 2002 ukończyła studia na Wydziale Technologii Chemicznej Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego w Bydgoszczy. W tym samym roku rozpoczęła studia doktoranckie w Collegium Medicum w Bydgoszczy. Jej praca doktorska dotyczyła nienukleozydowych pochodnych pirymidynowych. W roku 2007 obroniła pracę doktorską i otrzymała tytuł doktora. Aktualnie pracuje w Katedrze i Zakładzie Chemii Ogólnej Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Jej zainteresowania skupiają się głównie na syntezie organicznej pochodnych pirymidynowych, jako potencjalnych inhibitorów kinazy tymidynowej.



Dr Żaneta Tabaczyńska – absolwentka analityki medycznej na Akademii Medycznej w Bydgoszczy i studiów doktoranckich w Katedrze Chemii Ogólnej Wydziału Lekarskiego Collegium Medicum w Bydgoszczy UMK w Toruniu. W 2009 roku obroniła pracę doktorską, której tematem były reakcje fotochemiczne pochodnych zasad pirymidynowych, co znajduje się w jej kręgu zainteresowań do dziś.



Prof. dr hab. Marcin Dramiński – kieruje pracą w Zakładzie Chemii Ogólnej Collegium Medicum. Interesuje się chemią i stereochemią syntez związanych z analogami nukleozydów pirymidynowych oraz zajmuje się dydaktyką przedkliniczną dla studentów medycyny i kierunków pokrewnych.

ABSTRACT

The Mitsunobu reaction has been known since 1967, but the research on its modifications as well as on the introduction of new reagents, productivity, improvement and methods of post-reaction mixture separation is still being conducted. The original reaction was used to obtain esters by condensation of carboxylic acids and alcohols using triphenylphosphine and DEAD mixture. This reaction allows formation of not only carbon-oxygen bond, but also carbon-carbon, carbon-nitrogen, and carbon-sulphur to be synthesized. The Mitsunobu reaction is widely applied in organic synthesis as a way of inversion of configuration of secondary alcohols or of aryl ethers synthesis. Numerous studies bring the accounts of using this reaction for the synthesis of steroids, carbohydrates, nucleosides, as well as alkaloids and other heterocyclic compounds containing nitrogen. The popularity of this reaction lies in its stereoselectivity and compatibility with a wide range of functional groups as well as in its moderate requirements considering reaction conditions. However, an isolation of a desirable product from the used up or surplus reagents still causes a lot of difficulties.

Keywords: Mitsunobu reaction, condensation, configuration inversion, stereoselectivity

Słowa kluczowe: reakcja Mitsunobu, kondensacja, inwersja konfiguracji, stereoselektywność

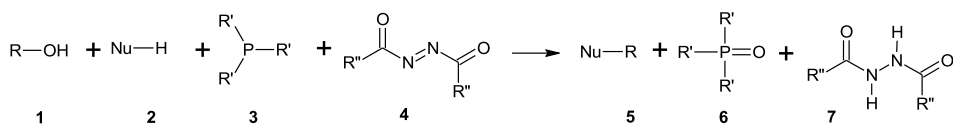
WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ADDP	- 1,1'-(azodikarbonylo)dipiperydyna
AZT	- azydotymidyna, zydowudyna
CMMP	- fosforan cyjanometylenotrimetylu
DBAD	- azodikarboksylan di- <i>tert</i> -butylu
DCC	- 1,3-dicykloheksylokarbodiimid
DEAD	- azodikarboksylan dietylu
DHTD	- 4,7-dimetylo-3,5,7-heksahydro-1,2,4,7-tetrazocyno-3,8-dion
DIAD	- azodikarboksylan diizopropylu
DMAP	- 4-dimetyloaminopirydyna
DMF	- dimetyloformamid
DNAD	- azodikarboksylan bis-(5-norboranen-2-ylometylu)
DPPA	- azydek estru difenylowego kwasu fosforowego
dUTP _{aza}	- deoksyurydyno 5'-trifosforan nukleotydohydrolazy
FDEAD	- fluorowany azodikarboksylan dietylu
HCMV	- wirus cytomegalii (ang. <i>human cytomegalovirus</i>)
HCV	- wirus zapalenia wątroby typu C
HIV	- wirus zespołu nabytego braku odporności (ang. <i>human immunodeficiency virus</i>)
HMPA	- triamid heksametylofosforu
HSV	- wirus opryszczki typu 1
PPh ₃	- trifenylofosfina
TBDMS	- grupa <i>tert</i> -butylodimetylosililowa
TBDPS	- grupa <i>tert</i> -butylodifenylosililowa
TCEAD	- azodikarboksylan bis-(2,2,2-trichloroetylu)
THF	- tetrahydrofuran
TK HSV 1	- kinaza wirusa opryszczki typu 1
TMAD	- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametyloazodikarboksyamid
TsOH	- kwas <i>p</i> -toluenosulfonowy

WPROWADZENIE

W 1967 Oyo Mitsunobu przedstawił nową metodę otrzymywania estru w wyniku kondensacji kwasu karboksylowego i alkoholu, przy wykorzystaniu mieszaniny trifenylfosfiny i azodikarboksylanu dietylu (DEAD) [1]. Zaobserwował, że w wyniku dehydratacji, mieszanina fosfiny i DEAD tworzy w roztworze *in situ* reaktywny produkt pośredni - betainę, która jest zdolna do deprotonowania kwasowego pronukleofila, jak również do aktywacji alkoholowego elektrofila (Schemat 1). Odnotował także, że gdy substratami były alkohole drugorzędowe, reakcja estryfikacji prowadziła do inwersji konfiguracji takiego alkoholu. Metoda ta szybko znalazła szerokie zastosowanie w syntezie organicznej, a użycie tej betainy znane jest obecnie jako „reakcja Mitsunobu” [2–4]. Do dziś reakcja ta doczekała się wielu modyfikacji, głównie w zakresie używanych reagentów [4–14] i stosowanych katalizatorów [15].

W oryginalnej reakcji Mitsunobu alkohol reaguje z kwasowym reagentem HX w obecności azodikarboksylanu dialkilu (4) lub azodikarboksamidu (Schemat 1) i triarylowej lub trialkilowej fosfiny (3) (powszechnie trifenyl- lub tributylfosfiny, R¹ = Ph lub Bu). Oprócz produktu 5, który zawiera nowo utworzone wiązanie C–O, C–N, C–S, C–X lub C–C, tworzą się także: tlenek fosfiny (6) i ester lub amid kwasu hydrazynodikarboksylowego (7) [5].



Schemat 1. Reakcja Mitsunobu. 4 R³ = EtO (DEAD); *i*PrO (DIAD); *t*BuO (DBAD); 5-norbornen-2-ylometyloksy (DNAD); CF₃(CF₂)₇(CH₂)₂O (FDEAD); Me₂N (TMAD); C(CH₂)₃N (ADDP) [5]

Scheme 1. Mitsunobu reaction. 4 R³ = EtO (DEAD); *i*PrO (DIAD); *t*BuO (DBAD); 5-norbornen-2-ylometyloxy (DNAD); CF₃(CF₂)₇(CH₂)₂O (FDEAD); Me₂N (TMAD); C(CH₂)₃N (ADDP) [5]

Reakcja ta zachodzi generalnie w łagodnych, neutralnych warunkach, z tego względu układ ten może być wykorzystany w syntezie i transformacji różnych klas naturalnych produktów [3]. Reakcja Mitsunobu jest szeroko stosowana w syntezie organicznej celem inwersji konfiguracji alkoholi drugorzędowych lub w syntezie arylowych eterów. Wiele opracowań przedstawia również jej zastosowanie w syntezie steroidów, węglowodanów i nukleozydów, alkaloidów i wielu układów heterocyklicznych zawierających azot [3, 14, 16]. Reakcja zawdzięcza swoją popularność przede wszystkim stereoselektywności i kompatybilności z szerokim zakresem grup funkcyjnych oraz temu, że przebiega ona w umiarkowanych warunkach. Jednakże wyodrębnienie pożądanego produktu ze zużytych i nadmiarowych reagentów nadal przysparza wiele trudności [5].

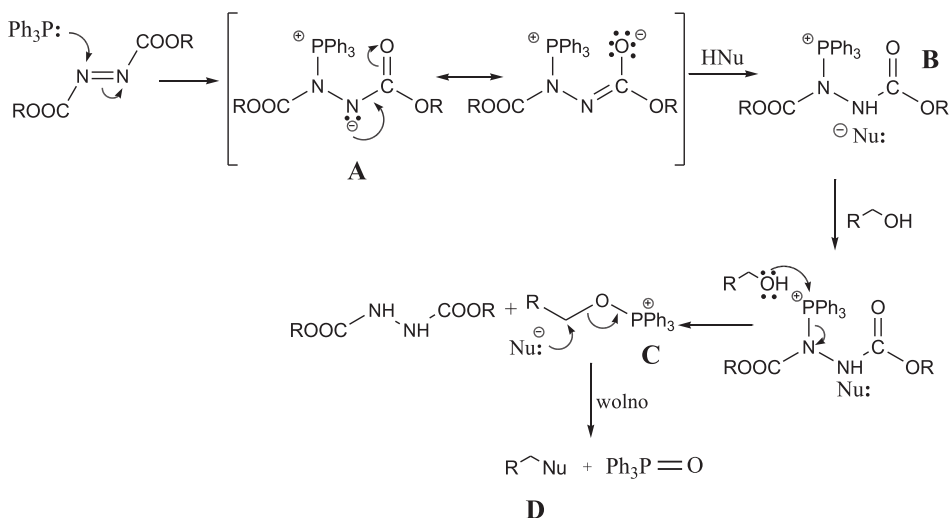
1. MECHANIZM REAKCJI MITSUNOBU

Bezpośrednia reakcja między czynnikiem nukleofilowym a alkoholem jest niemożliwa, ponieważ grupa $-OH$ jest bardzo złą grupą opuszczającą. W reakcji Mitsunobu grupę hydroksylową alkoholu aktywuje się, przekształcając ją w sól alkoksyfosfoniową pod wpływem trifenylfosfiny i azodikarboksylanu dietylu (DEAD) lub diizopropylu (DIAD) [17].

Mechanizm reakcji Mitsunobu był tematem wielu opracowań, głównie skupiających się nad identycznością produktów pośrednich i pełnionej przez nie roli [3, 12, 18–22]. Ustalono, że kluczowym pośrednim etapem tej reakcji jest tworzenie soli alkoksyfosfoniowej [16].

Reakcję Mitsunobu można prowadzić w kilku wariantach. Najczęściej stosowany polega na dodaniu odczynnika pronukleofilowego na samym początku do mieszaniny pozostałych substratów [17]. Taka reakcja (Schemat 2) przebiega w kilku etapach:

- addycja trifenylfosfiny do azodikarboksylanu dialkilu dająca czwartorzędową sól fosfoniową o strukturze betainy (**A**);
- transfer protonu z cząsteczki kwasu ($Nu-H$) do centrum anionowego betainy (**A**) generujący jego anion;
- tworzenie soli alkoksyfosfoniowej (**C**) w reakcji alkoholu z kationem soli (**B**) (reakcja przebiega wolno-wymiana ligandów na atomie fosforu);
- dealkilacja soli **C** przez anion nukleofilowy z utworzeniem tlenku trifenylfosfiny oraz produktu podstawienia [3, 17].

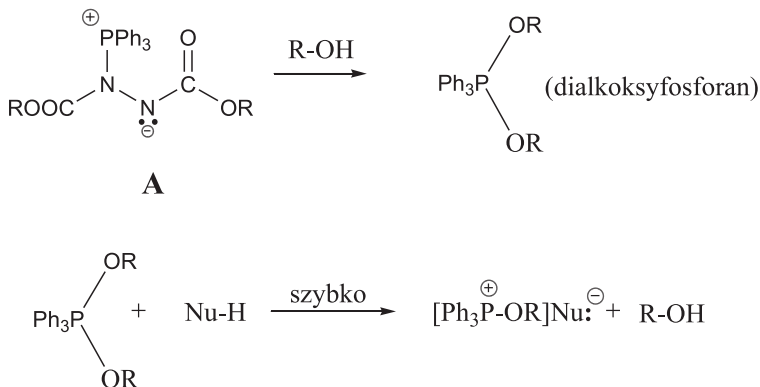


Schemat 2. Mechanizm reakcji Mitsunobu [17, 23]

Scheme 2. Mitsunobu reaction mechanism [17, 23]

Siłą napędową tej reakcji jest układ redoks, a dokładniej utworzenie wiązania P=O o wysokiej energii ($E_{\text{P=O}} \sim 120\text{--}150$ kcal/mol). W układzie tym trifenylfosfina jest utleniana do tlenku trifenylfosfiny a azodikarboksylan dietylu jest redukowany do hydrazynodikarboksylanu dietylu [3, 17].

Inną wersją mechanizmu Mitsunobu jest wariant Zbirala (Schemat 3), gdzie kwasowy komponent (Nu-H) dodaje się na końcu, czyli do utworzonego wcześniej dialkoksyfosforanu. Reakcja ta przebiega szybko, a uwolniona cząsteczka alkoholu (R-OH) reaguje według wspomnianego już wcześniej mechanizmu [17].



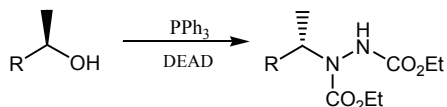
Schemat 3. Mechanizm reakcji Mitsunobu – wariant Zbirala [17]

Scheme 3. Mitsunobu reaction mechanism – Zbiral's wariant [17]

Reakcja Mitsunobu, jak już wspomniano, zachodzi w umiarkowanych, neutralnych warunkach (w temperaturze pokojowej lub poniżej) w bezwodnych i aprotycznych rozpuszczalnikach takich jak eter i tetrahydrofuran (stosuje się również chlorek metylenu, toluen, octan etylu, acetonitryl i DMF) z użyciem 1–1,5 molowej ilości zarówno trifenylfosfiny jak i azodikarboksylanu dialkilo. Zależnie od struktury reagentów czas reakcji waha się od 30 minut do 12 godzin. Jego przedłużanie w temperaturze pokojowej nie wpływa znacznie na podwyższenie wydajności oczekiwanych produktów [3].

Reakcja Mitsunobu zachodzi dla różnych grup funkcyjnych z tym, że wartość pK_a czynnika pronukleofilowego musi być niższa niż pK_a powstającej betainy (~ 13). Jeśli alkohol o niskiej reaktywności jest tylko nieznacznie rozpuszczalny w użytym rozpuszczalniku, roztwór azodikarboksylanu dietylu (lub DEAD i kwasowy komponent) jest dodawany przez okres 1–1,5 h, aby znieść niepożądaną reakcję uboczną, jaką w tym przypadku jest kondensacja kwasowego komponentu. Również użycie triamidu heksametylofosforowego jako rozpuszczalnika może w niektórych przypadkach prowadzić do wzrostu wydajności produktu [3].

W przypadku, gdy w mieszaninie reakcyjnej nie ma pronukleofila lub, gdy betaína nie jest zdolna do wychwycenia protonu prekursora nukleofilowego ($\text{pK}_a > 13$), część hydrazyny reaguje z alkoholowym substratem, jak pokazano na Schemacie 4 [4].



Schemat 4. Reakcja alkoholu z Ph_3P i DEAD, gdy $\text{pK}_a > 13$ [4]

Scheme 4. Reaction of alcohol with Ph_3P i DEAD, when $\text{pK}_a > 13$ [4]

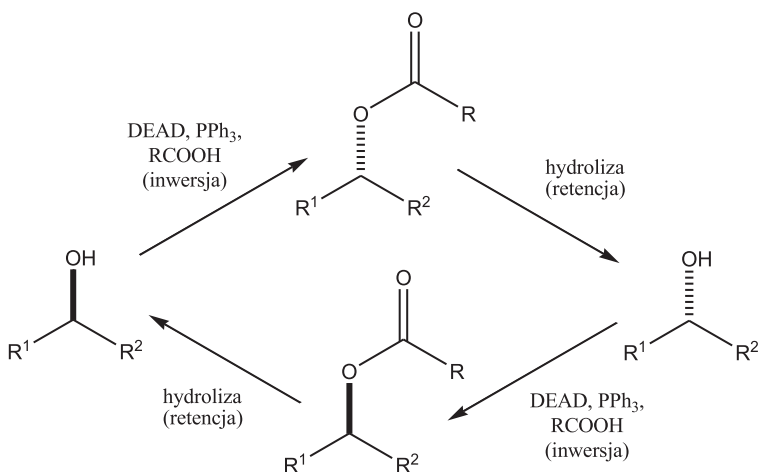
2. ZASTOSOWANIE REAKCJI MITSUNOBU

Reakcję Mitsunobu charakteryzuje duża uniwersalność w zakresie wyboru odczynnika pronukleofilowego i w konsekwencji produktu reakcji. Najpowszechniej stosowane przekształcenia realizowane za pomocą reakcji Mitsunobu zestawiono poniżej.

2.1. TWORZENIE WIĄZAŃ WĘGIEL-TLEN

2.1.1. Synteza pochodnych estrowych

Jednym z najczęstszych zastosowań reakcji Mitsunobu jest wykorzystanie jej w epimeryzacji optycznie czynnych estrów drugorzędowych alkoholi. Reakcja ta zachodzi przez konwersję alkoholu drugorzędowego w ester, a następnie przez hydrolizę estru (Schemat 5).



Schemat 5. Konwersja alkoholu drugorzędowego [23]

Scheme 5. Conversion of secondary alcohol [23]

W procedurze tej optycznie czynny alkohol reaguje z kwasem karboksylowym w obecności trifenylfosfiny i DEAD w temperaturze pokojowej. Ważną rolę odgrywa tu natura anionów otrzymywanych z kwasowych komponentów i struktura alkoholi. Estry otrzymywane są z wydajnością 34–90% (Tab. 1) [3].

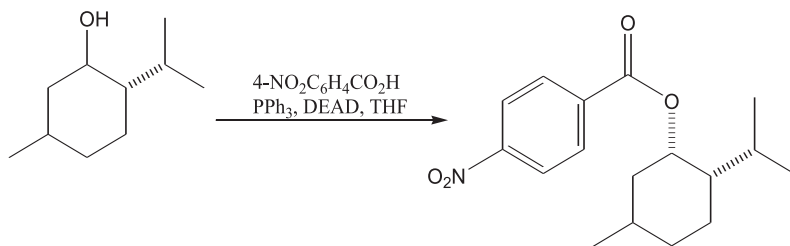
Tabela 1. Estryfikacja alkoholi [3]

Table 1. Alcohol esterification [3]

H-X + R-OH + DEAD + PPh ₃ → R-X + (C ₂ H ₅ O-CO-NH) ₂ + Ph ₃ P=O		
H-X	R-OH	Wydajność [%]
H-OOC-C ₄ H _{9,n}	H ₂ C=CH-CH ₂ -OH	35
H-OOC-C ₄ H _{9,n}	C ₂ H ₅ -OH	34
H-OOC-C ₄ H _{9,n}	<i>i</i> -C ₃ H ₇ -OH	43
H-OOC-C ₆ H ₅	H ₂ C=CH-CH ₂ -OH	85
H-OOC-C ₆ H ₅	C ₂ H ₅ -OH	85
H-OOC-C ₆ H ₅	<i>i</i> -C ₃ H ₇ -OH	90
H-OOC-C ₆ H ₅	(S)-(+)-C ₆ H ₁₃ -CH(CH ₃)-OH	20
H-OOC-C ₆ H ₅	H ₂ C=CH-CHD-OH	92

Najczęściej stosowanymi kwasami w tej reakcji są kwas octowy i benzoesowy, chociaż dają one niską wydajność z osłoniętymi alkoholami drugorzędowymi. Używane są także: kwas mrówkowy lub monochlorooctowy. W większości przypadków moc kwasu nie jest czynnikiem determinującym przebieg reakcji, ale dla przestrzennie osłoniętych alkoholi preferowane są mocne kwasy (z niską wartością pK_a). Kiedy alkohol jest przestrzennie rozbudowany, wyższa kwasowość pronukleofila podnosi wydajność inwertowanych produktów. Jeżeli ester nie jest docelowym produktem syntezy, wymagana jest jego hydroliza. W przypadku związków wrażliwych na działanie kwasów lub zasad, jako odczynnik nukleofilowy reakcji Mitsunobu, można stosować kwas 2-karboksyperydynowy, którego estry hydrolizowane są w tych warunkach z wysoką wydajnością [13, 21].

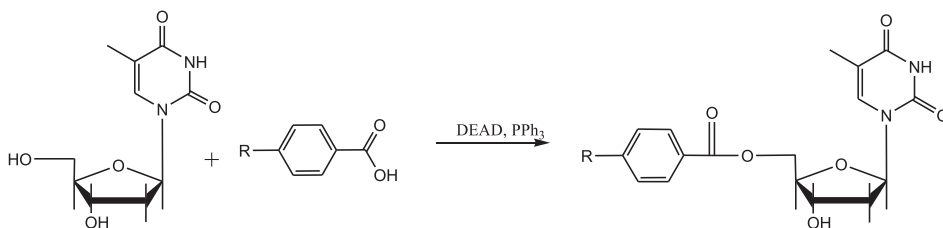
Dodge i współpracownicy w reakcji Mitsunobu z osłoniętymi alkoholami drugorzędowymi zastosowali kwas 4-nitrobenzoesowy (zamiast benzoesowego lub octowego). W wyniku tej procedury zwiększyła się znacząco wydajność inwertowanych produktów (dla mentolu wyniosła 65–75% – Schemat 6) [24].



Schemat 6. Wykorzystanie kwasu 4-nitrobenzoesowego w inwersji przestrzennie osłoniętych alkoholi [24]

Scheme 6. The use of 4-nitrobenzoic acid in inversion of secondary alcohols [24]

Rekcja Mitsunobu znalazła również zastosowanie w estryfikacji nukleozydów [25, 26]. Reakcji poddawano tymidynę [25] oraz urydynę i adenozyne [26]. W pierwszym przypadku przeprowadzano acylowanie grupy hydroksylowej przy atomie węgla 5', otrzymując 5'-*O*-benzoilotymidynę z wydajnością 55%, produktem ubocznym była 3',5'-di-*O*-benzoilotymidyna. Natomiast w reakcji tymidyny z kwasem benzoesowym w warunkach Mitsunobu otrzymano 5'-*O*-benzoilotymidynę z wydajnością 78%. Także w tym przypadku produktem ubocznym była 3',5'-di-*O*-benzoilotymidyna (Schemat 7) [25]. W reakcji tej używano triamidu heksametylofosforowego jako rozpuszczalnika (HMPA), który poprawiał wydajność reakcji i redukował powstawanie produktu ubocznego. W podobnych warunkach uzyskano także 5'-*O*-*p*-nitrobenzoilo- i 5'-*p*-metoksybenzoilowe pochodne z dużą wydajnością [25].



Schemat 7. Acylowanie grupy 5'-hydroksylowej tymidyny [25]

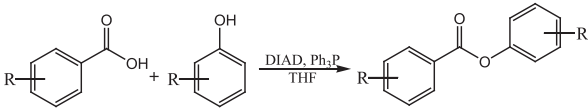
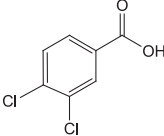
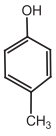
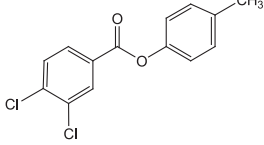
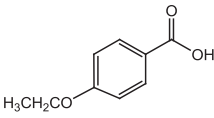
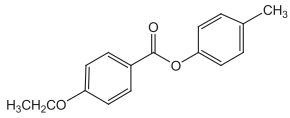
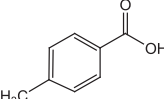

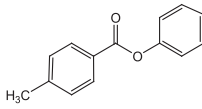
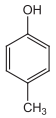
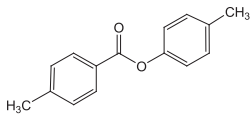
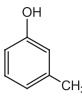
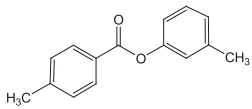
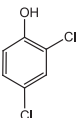
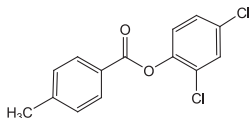
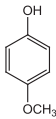
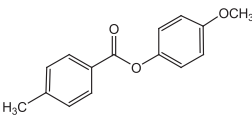
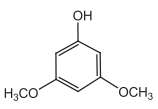
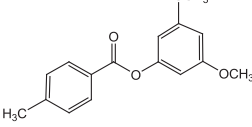
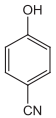
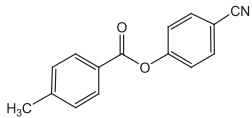
Scheme 7. Acylation of 5'-hydroxyl group of thymidine [25]

Reakcję Mitsunobu stosowano również w celu połączenia kwasów benzoesowych z fenolami [26]. W wyniku przeprowadzonych doświadczeń stwierdzono, że najskuteczniejszym rozpuszczalnikiem w tej reakcji jest THF, a optymalną temperaturą 65°C. Otrzymano w ten sposób wiele ciekawych estrów, które przedstawiono w Tabeli 2. Warto zaznaczyć, że wspomniana metoda estryfikacji okazała się skuteczniejsza, niż powszechnie stosowana reakcja – z użyciem 4-dimetyloaminopirydyny (DMAP) w obecności 1,3-dicykloheksylokarbodiimidu (DCC) [26].

Tabela 2. Otrzymywanie estrów fenylowych w reakcji Mitsunobu [26]

Table 2. Preparation of phenyl ester in Mitsunobu reaction [26]

Kwas benzoesowy	Fenol	Produkt	Wydajność [%]
			92

			
Kwas benzoesowy	Fenol	Produkt	Wydajność [%]
			71
			82
			89
			99
			74
			45
			79
			81
			69

Reakcji z azodiakarboksylationem dietylu i tryfenylofosfiną ulegają także diole. W reakcji tej alkohole posiadające dwie grupy hydroksylowe o różnej rzędowości tworzą estry tylko z pierwszorzędową grupą hydroksylową. W tych warunkach reagują także diole posiadające dwie pierwszorzędowe lub dwie drugorzędowe grupy, dając w efekcie monoestry (Tab. 3) [3].

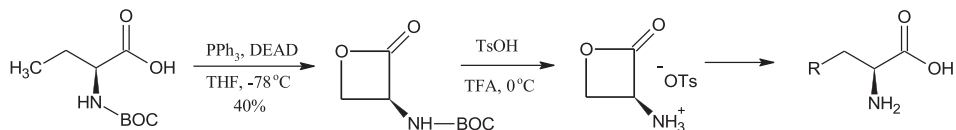
Tabela 3. Estryfikacja dioli [3]
Table 3. Esterification of diols [3]

$\begin{array}{ccc} \text{R}^1 & & \text{R}^2 \\ & \diagdown & / \\ & \text{CH} & - (\text{CH}_2)_n - & \text{CH} \\ & / & & \backslash \\ \text{X}^1\text{O} & & & \text{OH} \end{array} \xrightarrow{\text{DEAD, PPh}_3} \begin{array}{ccc} \text{R}^1 & & \text{R}^2 \\ & \diagdown & / \\ & \text{CH} & - (\text{CH}_2)_n - & \text{CH} \\ & / & & \backslash \\ \text{X}^2\text{O} & & & \text{O}-\text{CO}-\text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$					
n	R ¹	R ²	X ¹	X ²	Wydajność [%]
1	H	H	H	H/COC ₆ H ₅	65/12
2	H	H	H	H/COC ₆ H ₅	66/15
1	CH ₃	H	H	H/COC ₆ H ₅	70/7
1	CH ₃	H	COC ₆ H ₅	COC ₆ H ₅	63
0	ClCH ₂	H	H	H/COC ₆ H ₅	47/7
0	ClCH ₂	H	COC ₆ H ₅	COC ₆ H ₅	81
0	C ₆ H ₅	H	H	H/COC ₆ H ₅	47/5
0	CH ₃	CH ₃	H	H	8
1	CH ₃	CH ₃	H	H/COC ₆ H ₅	57/20
2	CH ₃	CH ₃	COC ₆ H ₅	COC ₆ H ₅	75
0	-(CH ₂) ₄ -	(<i>cis</i>)	H	H (<i>trans</i>)	22
0	-(CH ₂) ₄ -	(<i>trans</i>)	COC ₆ H ₅	COC ₆ H ₅ (<i>cis</i>)	60

2.1.2. Otrzymywanie laktonów

Protokół Mitsunobu został rozszerzony również o warianty wewnątrzcząsteczkowe, dostarczające dogodną drogę syntezy laktonów zarówno o małych, jak i bardzo dużych pierścieniach [4, 14, 17, 23].

Vederas i współpracownicy wykazali, że właściwie zabezpieczona L-seryna może być przekształcona w (*S*)-3-amino-2-oksetanon w dwóch etapach, dając cenny prekursor strukturalnie różnorodnych aminokwasów (Schemat 8) [4].



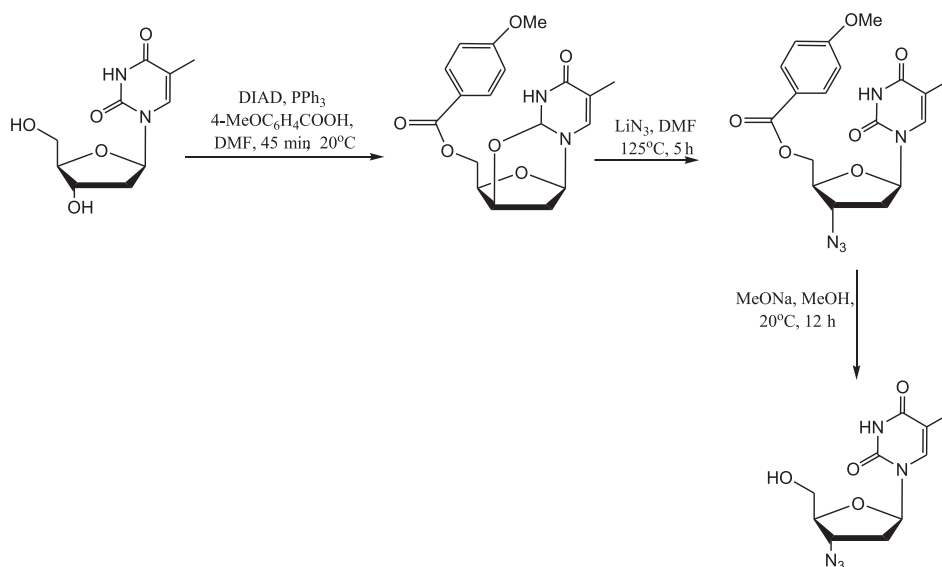
Schemat 8. Przekształcenie zabezpieczonej L-seryny w odpowiedni aminokwas [4]

Scheme 8. Transformation of protected L-serine into the corresponding amino acid [4]

2.1.3. Synteza eterów

Zdolność do tworzenia wiązania estrowego w warunkach Mitsunobu sugeruje, że może być tworzony także inny rodzaj wiązania C–O. Tworzenie alifatycznych eterów jest niestety utrudnione, ponieważ produkt pośredni – betaina nie jest wystarczająco zasadowa, by skutecznie deprotonować słabo kwasową grupę hydroksylową. Możliwe jest natomiast tworzenie eterów cyklicznych dzięki wewnątrzcząsteczkowej kondensacji [13].

Także w przypadku deoksynukleozydów możliwe są takie wewnątrzcząsteczkowe przemiany. W reakcji Mitsunobu tymidyna przekształcana jest w cykliczną pochodną, która dalej służy do syntezy AZT (Schemat 9) [23]. Reakcję otrzymywania z adenozyiny i guanozyiny odpowiedniego N³,5'-cyklicznego nukleozydu jako głównego produktu aryłacji grupy 5'-hydroksylowej, opisał także Juni Kiura [27, 28].



Schemat 9. Otrzymywanie AZT [23]

Scheme 9. Synthesis of AZT [23]

Bittner i Manhas opublikowali natomiast wykorzystanie azodiakarbonylu dietylu i tryfenylofosfiny w syntezie eterów alkilowo-arylowych z fenoli i alkoholi. Przykłady podano w Tabeli 4 [3]. Tworzenie takich eterów zachodzi dobrze dzięki wyższej kwasowości protonu w fenolu. Podobną syntezę wykorzystującą *N*-zabezpieczone aminoalkohole z tryfenylofosfiną związaną z nośniku polimerowym, opisał Lizarzaburu (Tab. 5) [21].

Tabela 4. Alkilowanie fenoli [3]

Table 4. Alkylation of phenols [3]

X	R	Wydajność [%]
H	CH ₃	98
H	C ₂ H ₅	90
4-HO	CH ₃	92
3-HO	CH ₃	89
4-H ₃ CO	CH ₃	98
4-Cl	CH ₃	91
4-Br	C ₂ H ₅	90
4-O ₂ N	CH ₃	88
4-O ₂ N	t-C ₄ H ₉	52

Tabela 5. Synteza eterów arylowych z aminoalkoholi przy użyciu polimerowej trifenylofosfiny. Metoda A: trifenylofosfina związana z polistyrenem + DEAD + roztwór *N*-Boc-aminoalkoholu i fenolu. Metoda B różni się tylko dodaniem trietyloaminy do mieszaniny aminoalkoholu i fenolu [29]Table 5. Synthesis of aryl ethers from amino alcohol with the use of polymer triphenylphosphine. Method A: triphenylphosphine on polystyrene + DEAD + *N*-Boc-amino alcohol and phenol solution. Method B differs in triethylamine adding to amino alcohol and phenol solution [29]

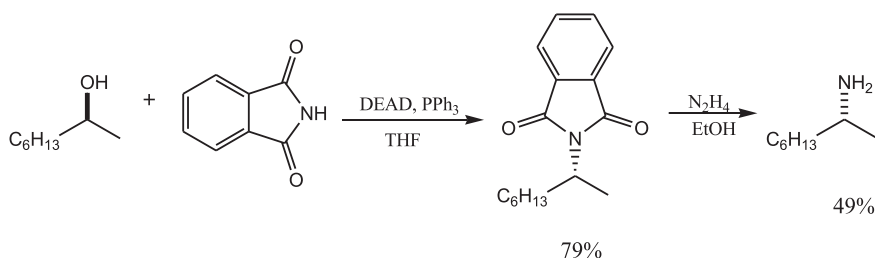
Aminoalkohol	Fenol	Metoda	Konwersja %
1	5	A	72
1	6	A	64
2	5	A	68
2	6	A	98
3	5	B	61
3	6	B	75
4	5	B	75
4	6	B	99

2.2. TWORZENIE WIĄZANIA WĘGIEL-AZOT

Synteza wiązania węgiel-tlen nie jest jedynym zastosowaniem reakcji Mitsunobu. Na uwagę zasługuje także tworzenie wiązania węgiel-azot, szczególnie w syntezie pochodnych nukleozydów, azydków, amin czy imidów.

2.2.1. Synteza amin

Już w 1972, Mitsunobu opublikował, metodę syntezy amin z alkoholi przez ftalimid i następującą potem redukcję z hydrazyną (Schemat 10) [30]. Zastosowanie ftalimidu znalazło później szerokie zastosowanie w chemii Mitsunobu.



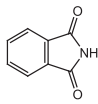


Schemat 10. Synteza amin z ftalimidem jako substratem w warunkach Mitsunobu [30]

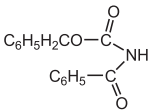
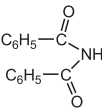
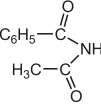
Scheme 10. Synthesis of amines from phthalimide under Mitsunobu conditions [30]

Cykliczne i acykliczne imidy są odpowiednio kwasowymi reagentami, dzięki czemu reakcja alkilowania z układem azodikarboksylan dietylu/trifenylfosfina zachodzi z dobrą wydajnością (Tab. 6).

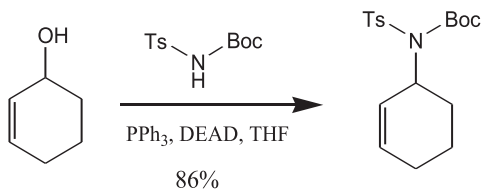
Tabela 6. Otrzymywanie *N*-alkiloimidów [3]

Table 6. Synthesis of *N*-alkylimide [3]

Imid	Alkohol	Wydajność [%]
	C_2H_5-OH	91
	$n-C_3H_7-OH$	83
	$n-C_4H_9OH$	81
	$(\pm) C_2H_5-CH(CH_3)-OH$	75
	$i-C_3H_7-OH$	83
	$n-C_4H_9OH$	76
	$n-C_3H_7-OH$	66
	$i-C_3H_7-OH$	73

Imid	Alkohol	Wydajność [%]
	<i>n</i> -C ₃ H ₇ -OH	66
	<i>n</i> -C ₄ H ₉ OH	68
	C ₆ H ₅ CH ₂ -OH	35
	<i>i</i> -C ₃ H ₇ -OH	85
	(±) C ₂ H ₅ -CH(CH ₃)-OH	82
	<i>i</i> -C ₃ H ₇ -OH	74
	<i>i</i> -C ₃ H ₇ -OH	90

W 1989 Weinreb i współpracownicy wykazali, że zabezpieczone sulfonamidy mogą również ulegać reakcji Mitsunobu, dostarczając różnorodnych amin trzeciorzędowych (Schemat 11) [4].

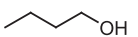

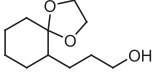
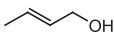
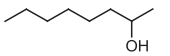
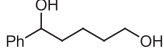


Schemat 11. Reakcja sulfonoamidów według procedury Mitsunobu [4]

Scheme 11. Reaction of sulphonamide according to Mitsunobu procedure [4]

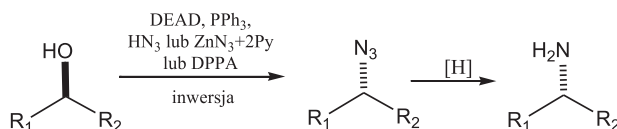
Tetsuto Tsunoda wykazał natomiast, że *p*-toluenosulfonamid, znany z tworzenia fosfino imidów, może być alkilowany w obecności cyjanometylenotributylofosforanu (CMMP) dając z doskonałą wydajnością *N*-podstawiony sulfonamid. Reakcja ta może być zastosowana do syntezy symetrycznych i niesymetrycznych *N,N*-dwupodstawionych amidów. Kiedy połączono tą reakcję z desulfuryzacją, otrzymano nową dogodną metodę tworzenia amin pierwszo- i drugorzędowych, (Tab. 7) [31].

Tabela 7. Reakcja *p*-toluenosulfonamidu z alkoholami w obecności CMMP [31]
 Table 7. Reaction of *p*-toluenesulphonamide with alcohols in the presence of CMMP [31]

TsN=PPh ₃		$\xleftarrow{(EtOOCN)_2-PPh_3}$		ROH + TsNH ₂		$\xrightarrow{NCHC=PBu_3}$		TsNHR + TsNR ₂	
R-OH	Temp. (°C)	Wydajność (%)		R-OH	Temp. (°C)	Wydajność (%)			
		1	2			1	2		
	temp. pok.	93	0		temp. pok.	70	22		
	temp. pok.	88	0		temp. pok.	78	12		
	80	89	0		100	0	46		

2.2.2. Synteza azydków

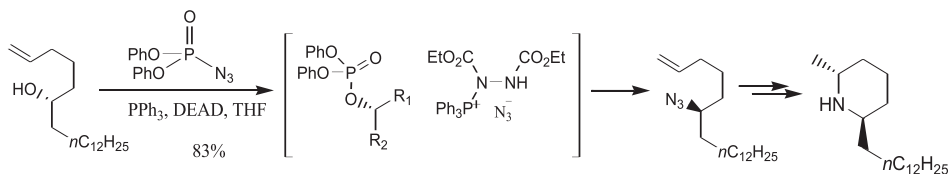
Inną drogą przeprowadzenia bezpośredniego aminowania alkoholu w reakcji Mitsunobu, jest wykorzystanie właściwości azydku. Aminy otrzymywane są wówczas przez redukcję Staudingera odpowiednich azydków. Azydki otrzymywane są z doskonałą wydajnością w warunkach reakcji Mitsunobu, głównie w reakcji z kwasem azotowodorowym (HN₃) [13]. Najczęściej wykorzystywanymi w tej przemianie nukleofilami są oprócz wspomnianego kwasu, azydek cynku w kompleksie z pirydyną lub azydek estru difenylowego kwasu fosforowego (DPPA) (Schemat 12) [23].



Schemat 12. Synteza azydków [23]

Scheme 12. Synthesis of azides [23]

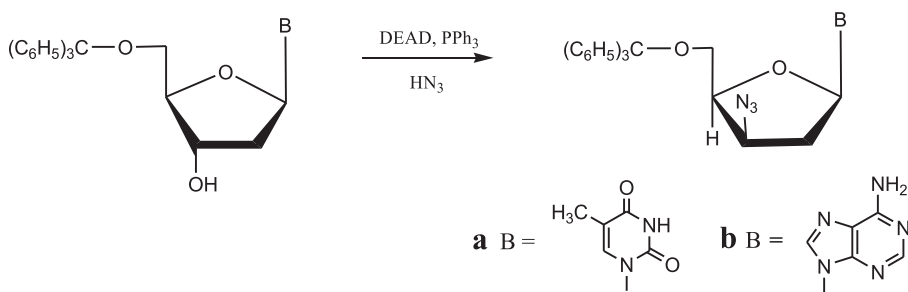
Taber i Decker, zaprezentowali reakcję alkoholu z azydkiem, zachodzącą z dobrą wydajnością w obecności difenylfosorylu (DPPA). Alkohol ulega tu przekształceniu w azydek o przeciwnej konfiguracji (Schemat 13) [4].



Schemat 13. Zastosowanie DPPA w syntezie azydków z inwersją konfiguracji [4]

Scheme 13. Application of DPPA in azides synthesis with inversion of configuration [4]

Grupę azydkową wprowadzić można także w miejsce grupy hydroksylowej cukru w nukleozydach. Loibner i Zbiral opisali, że reakcja kwasu azotowodorowego z nukleozydami przebiega łatwo z inwersją konfiguracji. Na przykład 5'-*O*-trytylo-tymidyna lub 5'-*O*-trytylodeoksyadenozyna reaguje dając związek **a** lub **b** z wydajnością odpowiednio 90% i 65% (Schemat 14) [3].

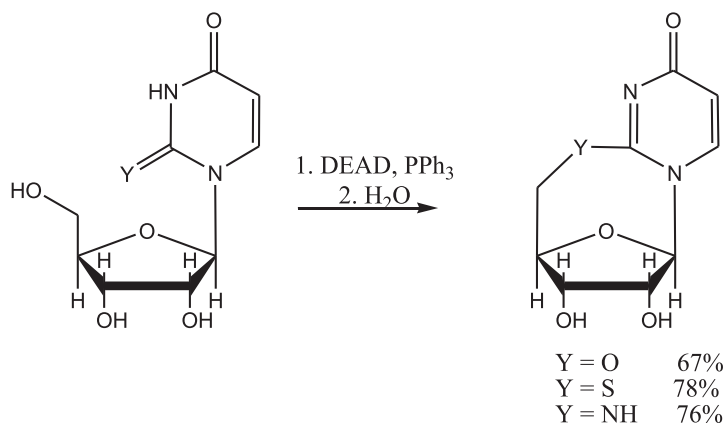


Schemat 14. Reakcja Mitsunobu nukleozydów z kwasem azotowodorowym [3]

Scheme 14. Mitsunobu reaction of nucleosides with hydrazoic acid [3]

Ponieważ grupa azydkowa może być szybko przekształcona w grupę aminową, reakcja ta stanowi dogodną i skuteczną metodę otrzymywania aminonukleozydów i aminocukrów [3].

W reakcji Mitsunobu nukleozydy 2',3'-*O*-alkilidenopirymidynowe mogą być przekształcane w odpowiednie cykliczne nukleozydy, na przykład 2',3'-*O*-alkilideno pochodne *O*², 5'-cyklourydyny, *N*²,5'-cykloizocytydyny, *N*⁴-benzoilo- *O*²,5'-cyklo-*c*ytydyny, i *S*²,5'-cyklo-2-tiourydyny. Shibuya opisywał między innymi dogodną metodę otrzymywania niezabezpieczonych nukleozydów cyklopirymidynowych, w której urydyna, izocytydyna, lub 2-tiourydyna reagowała z DEAD i Ph₃P, a następnie ulegała hydrolizie dając z dobrą wydajnością odpowiednie cykliczne nukleozydy (Schemat 15) [3].

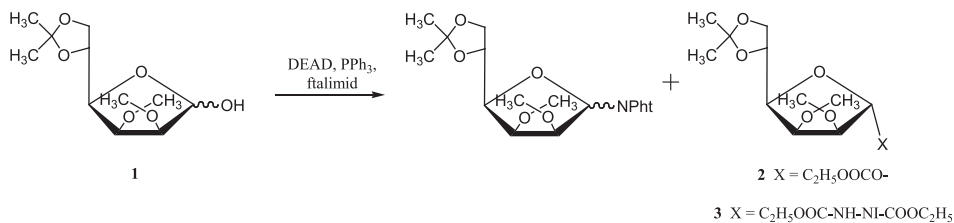


Schemat 15. Synteza cyklicznych nukleozydów w warunkach Mitsunobu [3]

Scheme 15. Synthesis of cyclic nucleosides under Mitsunobu conditions [3]

2.2.3. Tworzenie wiązania *N*-glikozydowego

Począwszy od odkrycia syntezy Mitsunobu obserwowano wiele reakcji, w wyniku których otrzymywano wiązanie *N*-glikozydowe. W 1981 roku Mitsunobu zebrał i opublikował [3] wiele takich syntez. Między innymi reakcją Jurczaka przedstawioną na Schemacie 16, w której otrzymano zarówno α - jak i β -*N*-glikozydy z odpowiednio 5% i 25% wydajnością, wraz z ~2% ilością pochodnych 2 i 3. W podobny sposób otrzymano także kilka *N*-glikozyloftalimidów. Zamiast DEAD można także użyć azodikarboksylationu dibutyli, który zwiększa wydajność produktów (40–80%) [3].

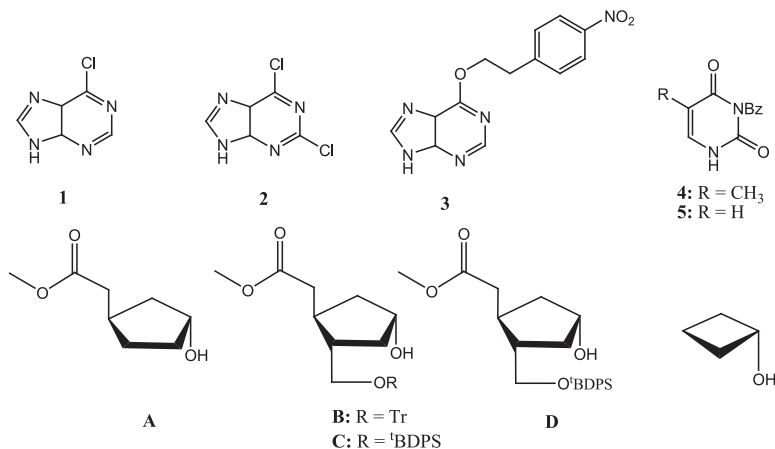
Schemat 16. Synteza α - i β -*N*-glikozydów [3]Scheme 16. Synthesis of α - i β -*N*-glucosides [3]

Natomiast Szarek opisał syntezę purynowych nukleozydów aldoz i ketoz, w której zabezpieczone cukry, posiadające wolną, anomeryczną grupę hydroksylową reagowały z 6-chloropuryną, DEAD i difenylometylofosfiną (Tab. 8) [3].

Tabela 8. Otrzymywanie nukleozydów purynowych. *R*-zasada purynowa [3]
 Table 8. Preparation of purine nucleosides. *R*-purine base [3]

Struktura	Substrat		Produkt	
	Konfiguracja	Konfiguracja	Konfiguracja	Wydajność [%]
	A	β		66
	A	β α		34 37
	A	β α		63 16

Tworzenie nukleozydów i ich analogów używając protokołu Mitsunobu staje się coraz bardziej popularne. Wiele pozycji literaturowych opisuje między innymi otrzymywanie za pośrednictwem tej metody karbocyklicznych analogów nukleozydów [32–36]. Według Jenny [32] powodzenie reakcji Mitsunobu zależy od struktury zasady nukleozydowej działającej w reakcji jako nukleofil oraz od warunków reakcji, natomiast nie zależy w znacznym stopniu od struktury alkoholu. Wydajności i uzyskane związki przedstawione są na Schemacie 17 i Tabeli 9 [32, 33].



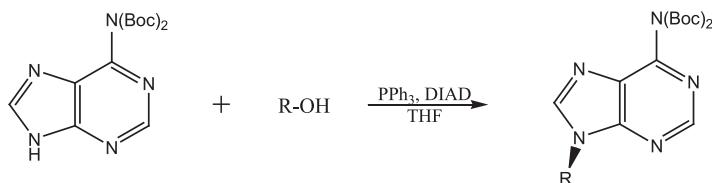
Schemat 17. Synteza nukleozydów karbocyklicznych [32, 33]
 Scheme 17. Synthesis of carbocyclic nucleosides [32, 33]

Tabela 9. Synteza nukleozydów karbocyklicznych [32, 33]
 Table 9. Synthesis of carbocyclic nucleosides [32, 33]

Pierścień karbocykliczny	Pochodna zasady nukleozydowej	Czas reakcji [h]	T [°C]	Wydajność [%]
A	1	18	25	80
A	2	96	-20	81
A	3	18	25	69
A	4	18	-50	52
A	5	18	-50	47
B	3	18	25	71
C	1	18	25	78
D	1	18	25	44
E	3	18	25	53

Metodę syntezy Mitsunobu wykorzystano również do otrzymania innych karbocyklicznych nukleozydów, między innymi karbocyklicznych *L*-2'-deoksynukleozydów, czy *D*- i *L*- karbocyklicznych 4'-fluoro-2',3'-dideoksynukleozydów [34].

Yin i Li opisali metodę Mitsunobu zmodyfikowaną na potrzeby syntezy karbocyklicznych pochodnych adeniny [36]. Adenina jest słabym substratem w reakcji Mitsunobu prowadzącej do nukleozydów karbocyklicznych, jednakże odpowiednio zabezpieczona ulega pomyślnie tej reakcji (Schemat 18). Jest to wynikiem wzrostu rozpuszczalności adeniny i zmniejszenia konkurencyjności nukleofilowej grupy aminowej wolnej adeniny [36].

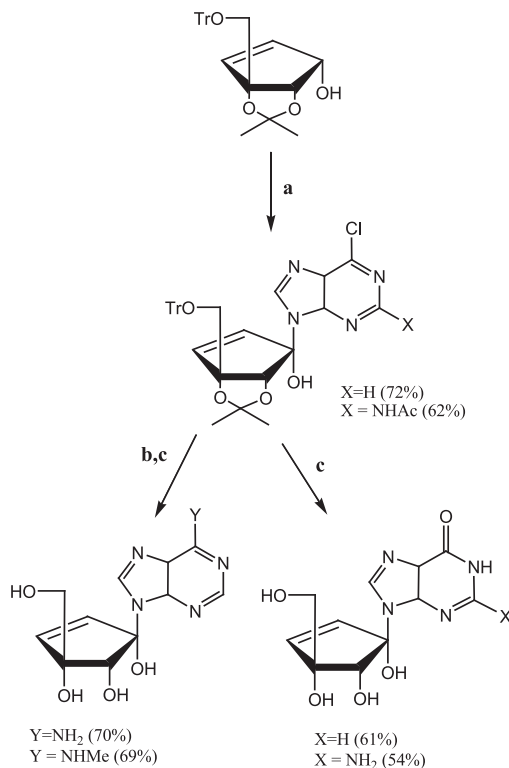


Schemat 18. Reakcja zabezpieczonej adeniny z alkoholem w warunkach Mitsunobu [36]

Scheme 18. Reaction of protected adenine with alcohol under Mitsunobu conditions [36]

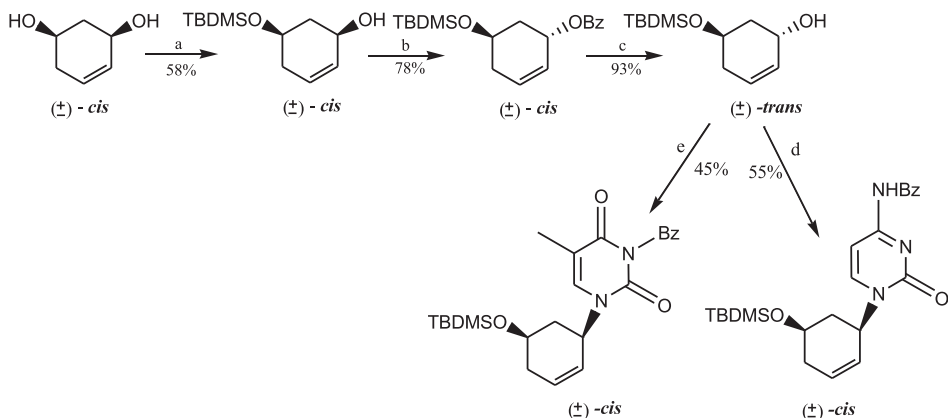
Reakcję Mitsunobu wykorzystano także do otrzymania innych karbocyklicznych nukleozydów, jak na przykład selektywnych agonistów receptora A₃ adenyliny [36]. Reakcję prowadzono z 6-chloropuryną, PPh₃ i DEAD w THF, otrzymując z dobrą wydajnością odpowiednie analogi nukleozydów (Schemat 19) [37].

Barral i współpracownicy opisali, syntezę izomerów *cis*, które były pomyślnie otrzymane przy użyciu dwóch kolejnych reakcji Mitsunobu obejmujących inwersję konfiguracji i kondensację cukier–zasada [29]. W reakcji Mitsunobu otrzymano także (\pm) *cis*-podstawione cykloheksenylo i cykloheksanylo pochodne nukleozydów (Schemat 20) [38].



Schemat 19. Synteza karbocyklicznych analogów nukleozydów. Odczynniki: (a) 6-chloropuryny, Ph_3P , DEAD, THF; (b) NH_3 lub 40% $MeNH_2$, MeOH; (c) 3N HCl, THF [37]

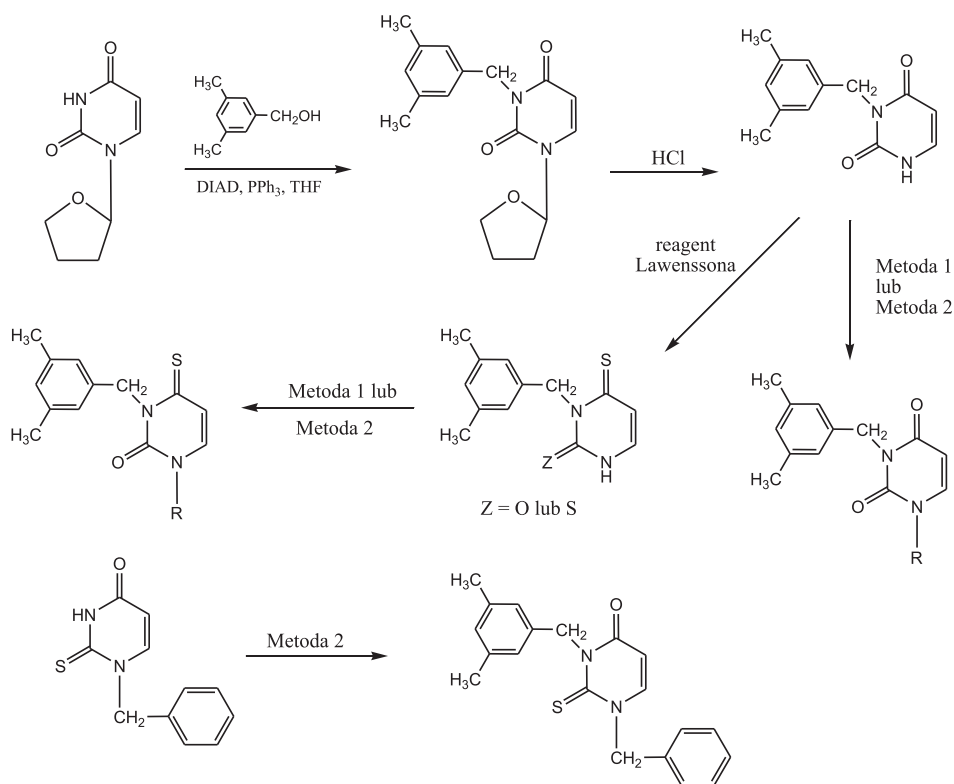
Scheme 19. Synthesis of carbocyclic nucleosides analogues. Reagents: (a) 6-chloropurine, Ph_3P , DEAD, THF; (b) NH_3 or 40% $MeNH_2$, MeOH; (c) 3N HCl, THF [37]



Schemat 20. Reagenty: a) TBDMSCl, imidazol, DMF; b) DEAD, PPh_3 , BzOH, THF; c) $NH_3/MeOH$, NaOH 2N; d) N^4 -benzoylcytosyna, DEAD, PPh_3 , THF; e) N^3 -benzoyltymina, DEAD, PPh_3 , THF [38]

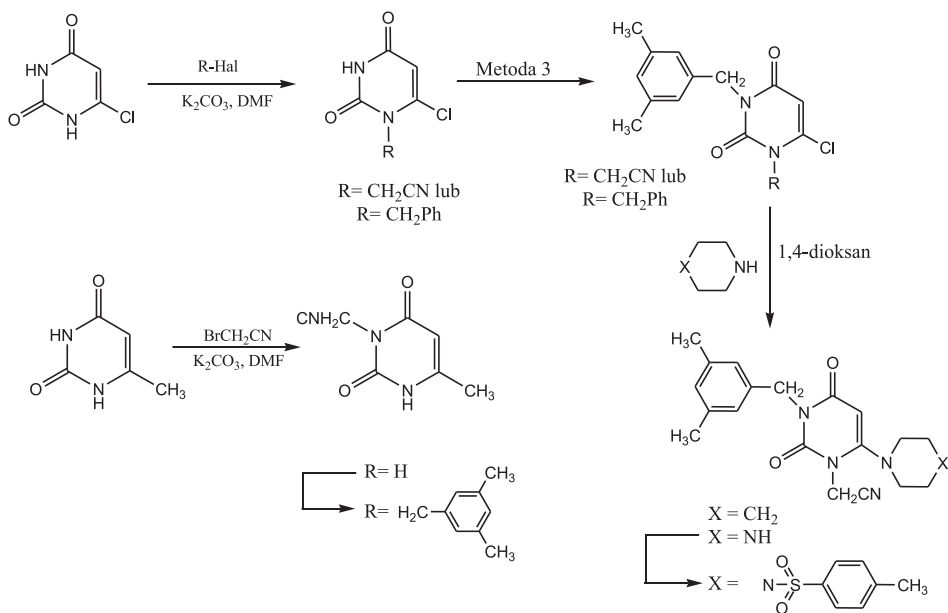
Scheme 20. Reagents: a) TBDMSCl, imidazole, DMF; b) DEAD, PPh_3 , BzOH, THF; c) $NH_3/MeOH$, NaOH 2N; d) N^4 -benzoylcytosine, DEAD, PPh_3 , THF; e) N^3 -benzoylthymine, DEAD, PPh_3 , THF [38]

Synteza wiązania nukleozydowego wykorzystywana była dla wielu celów, między innymi do otrzymywania nukleozydów 1,5-anhydroheksitolowych, pochodnych 5-jodouracylu, 5-etylouracylu, wykazujących wysoką i selektywną aktywność inhibitorową względem kinazy tymidynowej HSV-1 i HSV-2 [39]. Również inne związki, jak seria acyklicznych analogów nukleozydów 5'-O-trytylotymidyny, przedstawione już wcześniej jako skuteczne inhibitory tego enzymu również syntetyzowane były tą metodą [40, 41]. W reakcji Mitsunobu otrzymano także acykliczne pochodne uracylu, które okazały się skutecznymi inhibitorami dUTPazy (deoksyurydno 5'-trifosforan nukleotydohydrolazy) *Plasmodium falciparum* [39]. Procedura Mitsunobu stała się także dogodną metodą syntezy wielu związków wykazujących właściwości przeciwwirusowe, szczególnie poszukiwanych przeciw wirusom HIV-1 i HCMV – pochodnych 3-(3,5-dimetylobenzyl) uracylu, podstawionych w pozycji N-1 pierścienia pirymidynowego (Schemat 21) [42].



Schemat 21. Synteza pochodnych 3-(3,5-dimetylobenzyl)uracylu. Metoda 1: R-Hal, K_2CO_3 , DMF; Metoda 2: R-OH, reagenty Mitsunobu, Metoda 3: $HOCH_2C_6H_3Me_2-3,5$, azobis(*N,N*-dimetyloformamid), PPh_3 , THF [42]

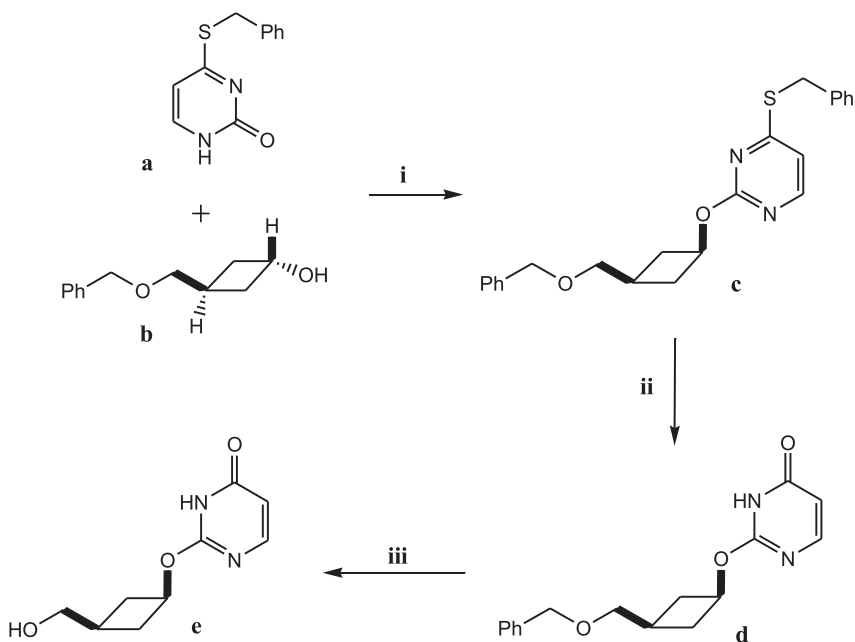
Scheme 21. Synthesis of 3-(3,5-dimethylbenzyl)uracil derivatives. Method 1: R-Hal, K_2CO_3 , DMF; Method 2: R-OH, Mitsunobu reagents, Method 3: $HOCH_2C_6H_3Me_2-3,5$, azobis(*N,N*-dimethylformamide), PPh_3 , THF [42]



Schemat 21. Ciąg dalszy

Scheme 21. Continuation

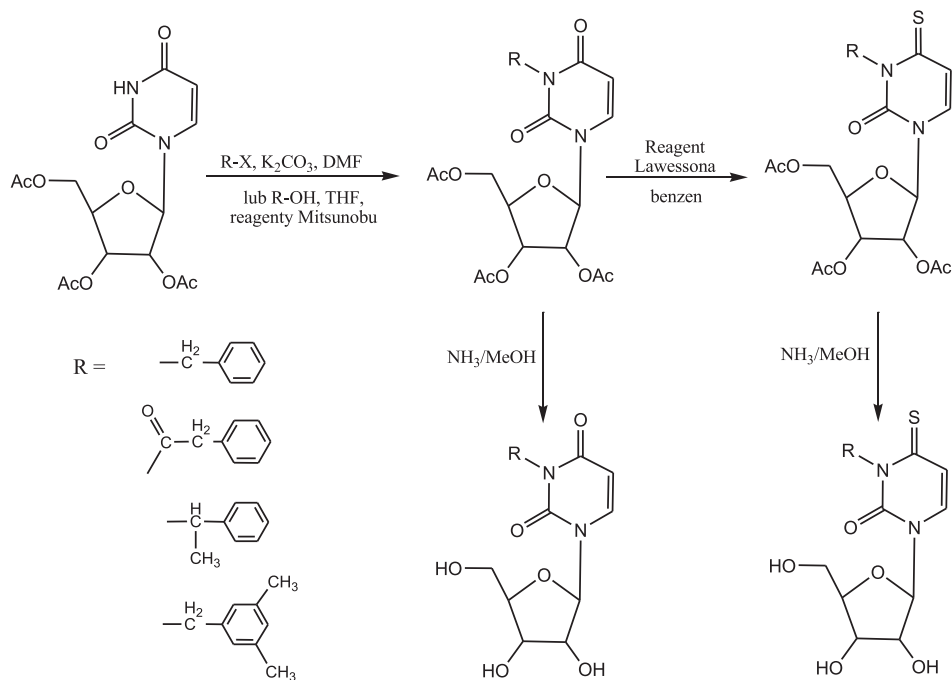
Reakcja Mitsunobu znalazła również zastosowanie w chemii nukleozydów. W 1998 roku Frieden i współpracownicy opublikowali na przykład reakcję, w której *trans*-3-(benzoiłometylo)cyklobutan-1-ol (**b**) reagował z pochodną pirymidynową (**a**) w pozycji O-2 dając związek **c**, który następnie był przekształcany z dobrą wydajnością w 2-[*cis*-3-(hydroksymetylo)-cyklobutoksy]pirymidyn-4(3H)-on (**e**) (Schemat 22) [43].



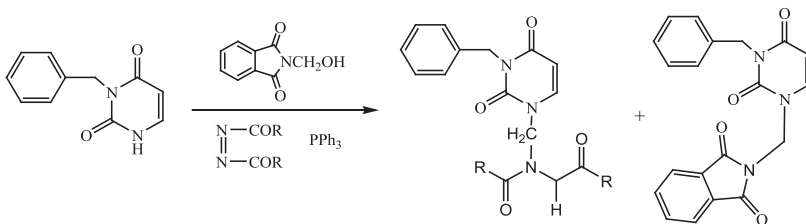
Schemat 22. Odczynniki: i, DEAD, Ph₃P, THF; ii, (a) [2-(HO₃C)C₆H₄CO₂]₂Mg, EtOH; (b) MeC(=O)C(=NOH)Me, (Me₂N)₂C=NH, MeCN; iii, 10% Pd/C, HCO₂H, Mech [43]

Scheme 22. Reagents: i, DEAD, Ph₃P, THF; ii, (a) [2-(HO₃C)C₆H₄CO₂]₂Mg, EtOH; (b) MeC(=O)C(=NOH)Me, (Me₂N)₂C=NH, MeCN; iii, 10% Pd/C, HCO₂H, Mech [43]

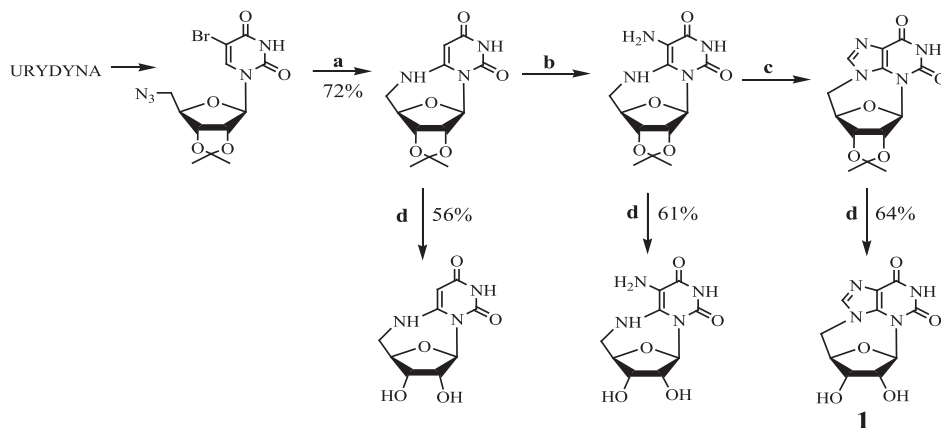
W literaturze przedstawiono także syntezę hipnotycznie aktywnych 4-tioanalogów *N*³-podstawionych urydyn wykorzystującą warunki reakcji Mitsunobu. Reakcją pośrednią do ich otrzymywania była przebiegająca z dobrą wydajnością kondensacja tri-*O*-acetylourydyny z (±)-1-fenyletanołem lub alkoholem 3,5-dimetylobenzylowym (Schemat 23) [44].

Schemat 23. Synteza hipnotycznie aktywnych 4-tio analogów N^3 -podstawionych urydyn [44]Scheme 23. Synthesis of hypnotic N^3 -substituted uridine 4-tio analogues [44]

W reakcji N^3 -benzylouracylu i N -hydroksymetyloftalimidu z reagentami Mitsunobu otrzymywano także hydrazylometylouracyle. Kozai, Takaoka i Maruyama [45] opisali, że w wyniku reakcji pochodnej uracylu z N -hydroksymetyloftalimidem powstają dwa związki: pochodna 1-hydrazylometylowa (2) i/lub produkt kondensacji, N -(3-benzyl-2,4-dioksa-1,2,3,3-tetrahydropirydyn-1-yl)metyloftalimid (3) (Schemat 24) [45]. Można zatem otrzymać zamiast oczekiwanego produktu kondensacji prawie wyłącznie pochodną hydrazylouracylu.

Schemat 24. Otrzymywanie hydrazylometylouracyli w reakcji Mitsunobu. (TMAD, $R=\text{NMe}_2$, DIAD, $R=\text{OPr-}i$) [45]Scheme 24. Preparation of hydrazilmethyluracil in Mitsunobu reaction. (TMAD, $R=\text{NMe}_2$, DIAD, $R=\text{OPr-}i$) [45]

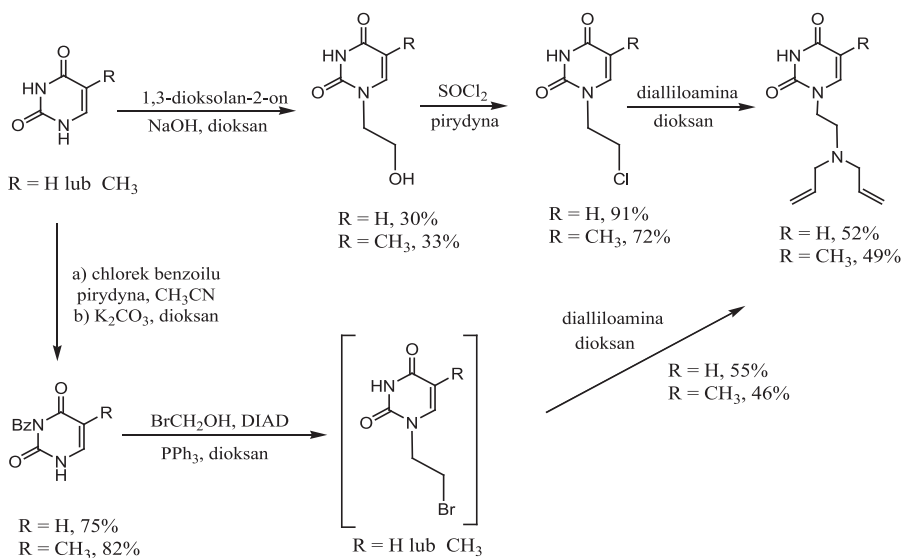
W wyniku reakcji Mitsunobu można otrzymać także anhydronukleozydy lub nukleozydy cykliczne, w których zasada nukleozydowa jest dodatkowo połączona z resztą cukrową. Chun, opisał syntezę 5',9-anhydro-*izo* ksantozyny (**1**) i jej izomerów pozycyjnych, 3,5'-anhydro-ksantozyny (**2**) jako potencjalnych leków przeciw HCV (Schemat 25) [46].



Schemat 25. Reagenty: (a) PPh_3 , THF, NH_4OH ; (b) 1. NaNO_2 , HCl, THF- H_2O , 2. NaHCO_3 , 3. Zn, HCl, MeOH, 4. NaHCO_3 ; (c) octan dietoksymetylu, DMF; (d) HCl, H_2O [46]

Scheme 25. Reagents: (a) PPh_3 , THF, NH_4OH ; (b) 1. NaNO_2 , HCl, THF- H_2O , 2. NaHCO_3 , 3. Zn, HCl, MeOH, 4. NaHCO_3 ; (c) octan dietoxymethyl acetate, DMF; (d) HCl, H_2O [46]

Shatila i Bouhadir przeprowadzili porównanie dwóch prostych dróg otrzymania zasad nukleozydowych podstawionych grupą dialliiloaminoetylenową [47]. Za pomocą dwóch różnych procedur zsyntetyzowali trzy pirymidynowe i jedną purynową zasadę z grupą 2-alliloaminoetylenową. Pierwsza metoda obejmowała reakcję zasady nukleozydowej z cyklicznym węglanem etylenu (1,3-dioksoolan-2-onem), a następnie prowadziła przez chlorowanie i podstawienie nukleofilowe dialliilaminą, podczas gdy druga procedura przebiegała przez zabezpieczenie pierścienia heterocyklicznego, reakcją Mitsunobu i nukleofilowe podstawienie dialliilaminą oraz końcowe usunięcie grup zabezpieczających z produktu (Schemat 26). Wydajności uracylowych i tyminowych pochodnych były większe ponad trzykrotnie w reakcji Mitsunobu, z kolei pochodne cytozyny były otrzymywane z porównywalną wydajnością w obu procedurach. Natomiast pochodne adeniny otrzymano z wyższą wydajnością w reakcji przebiegającej zgodnie z pierwszą metodą [47].



Schemat 26. Porównanie metod syntezy wiązania C-N pochodnych dialiloaminoetylenowych zasad nukleozydowych [47]

Scheme 26. Comparison of methods for C-N bond formation of diallylaminoethylene nucleoside bases [47]

Możliwe jest także tworzenie wiązania podwójnego między węglem a azotem według procedury Mitsunobu. Nukleofile zasad azotowych generowane ze związków karbonylowych przy pomocy azodikarboksyłanu dietylu i trifenylofosfiny stanowią bardzo dobre źródło różnorodnych produktów [48]. Przedstawiona przez Otte reakcja jest użytecznym narzędziem syntezy związków zawierających wiązanie C=N (Tab. 10) [48].

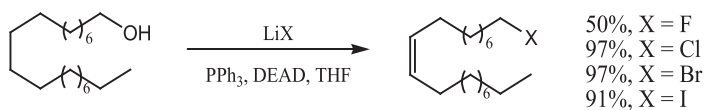
Tabela 10. Związki otrzymane z ketonów w warunkach Mitsunobu [48]

Table 10. Compounds obtained from ketones under Mitsunobu conditions [48]

Keton	Produkt	Wydajność [%]
		R = <i>i</i> -Pr R = Bn 90 71
		R = <i>i</i> -Pr R = Bn 86 83
		R = <i>i</i> -Pr R = Bn 72 55

2.4. SYNTEZA POCHODNYCH HALOGENOWYCH

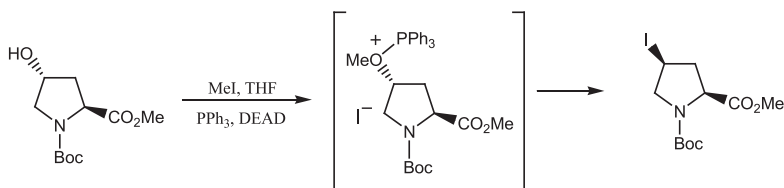
Podstawienie alkoholu halogenkiem według protokołu Mitsunobu nie jest szeroko opisywane w literaturze. Jedną z nielicznych metod takich syntez opracował Falck. Wykazał on, że związki posiadające grupę hydroksylową mogą ulegać substytucji dając alkilowane halogenki z równoczesną dehydrogenacją (Schemat 30) [4].



Schemat 30. Otrzymywanie alkilowych halogenków metodą Mitsunobu [4]

Scheme 30. Synthesis of alkyl halides with Mitsunobu's method [4]

Joullié i współpracownicy pokazali natomiast, że pochodne proliny dają z dobrą wydajnością epimeryczny jodek w dwuetapowej reakcji (Schemat 31) [4]. Deprotonacja 4-hydroksyproliny betainą Mitsunobu ułatwia przyłączenia jodometanu. Pozostała tryfenylofosfina aktywuje otrzymany eter, następnie zachodzi podstawienie jodu z inwersją konfiguracji. Jodek ten został otrzymany jako kluczowy produkt pośredni w syntezie naturalnych morskich produktów (astyn) [4].



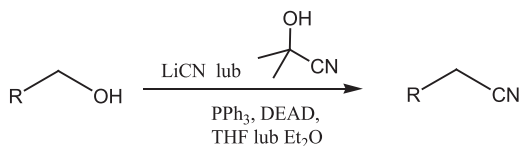
Schemat 31. Synteza jodku pochodnej proliny z inwersją konfiguracji [4]

Scheme 31. Synthesis of iodide proline derivative with inversion of configuration [4]

2.5. TWORZENIE WIĄZANIA WĘGIEL-WĘGIEL

Utworzenia wiązania C–C w warunkach Mitsunobu jest możliwe pod warunkiem niskiej wartości pK_a pronukleofila, co w większości przypadków ogranicza zakres węglowych pochodnych do 1,3-podstawionych związków metylenowych o $pK_a < 11$. Struktura i wydajność produktów są także silnie uzależnione od reagentów i warunków reakcji [3].

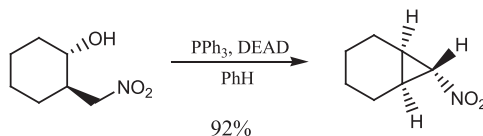
Tworzenie wiązania węgiel–węgiel w reakcji Mitsunobu jest opisane w niewielkiej ilości komunikatów naukowych. Między innymi Falck przedstawił syntezę z zastosowaniem cyjanku litu, który może podstawić alkohol aktywowany przez betainę Mitsunobu, prowadząc do otrzymania nityrylu. Szántay i współpracownicy wykazali natomiast, że cyjanohydryna acetonu wpływa na podstawienie nityrylu w warunkach Mitsunobu, ale ogranicza się to tylko do alkoholi pierwszorzędowych i drugorzędowych bez przeszkód przestrzennych (Schemat 32) [4].



Schemat 32. Wykorzystanie cyjanku litu w reakcji tworzenia wiązania węgiel-węgiel w warunkach Mitsunobu [4]

Scheme 32. The use of lithium cyanide in reaction of carbon-carbon bond creation under Mitsunobu conditions [4]

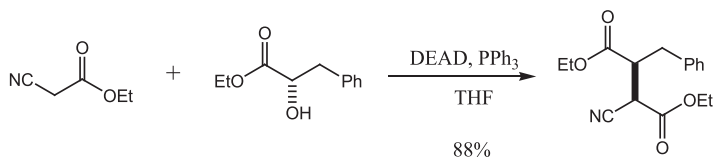
Falck zaprezentował także inne zastosowanie tej metody, w otrzymywaniu α -nitrocyclopropanu (Schemat 33) [4].



Schemat 33. Otrzymywanie α -nitrocyclopropanu według procedury Mitsunobu [4]

Scheme 33. Preparation of α -nitrocyclopropane according to Mitsunobu procedure [4]

Tworzenie wiązania węgiel-węgiel według protokołu Mitsunobu opisał także Kurihura. Prezentowana przez niego synteza przebiegała w obecności typowych reagentów Mitsunobu (DEAD i PPh_3), alkoholu oraz cyanoacetanu etylu i prowadziła do odpowiednich alkilowanych produktów z wydajnością 30–80%. Przykład takiej reakcji przedstawiono na Schemacie 34, gdzie cyanoacetan etylu reaguje z (*S*)-(-)-2-hydroksy-3-fenylpropionianem etylu z doskonałą wydajnością i oczekiwaną inwersją konfiguracji [13, 50]. Niestety, ta sama reakcja z zastosowaniem *n*-propanolu dawała złożoną mieszaninę produktów, włączając mono- i di-alkilowane produkty i alkilowany dietylowy hydrazynodikarboksylan. Stwierdzono wówczas także, że malonian dietylowy nie reagował w tych warunkach [13, 50].

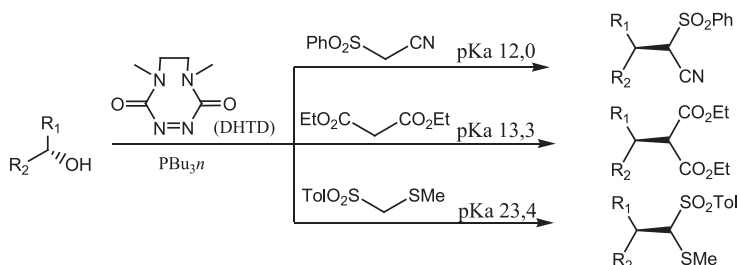


Schemat 34. Reakcja cyanoacetanu etylu z (*S*)-(-)-etylo-2-hydroksy-3-fenylpropionianem w warunkach Mitsunobu [13]

Scheme 34. Reaction of cyanoacetate with (*S*)-(-)-ethyl-2-hydroxy-3-phenylpropanoate under Mitsunobu conditions [13]

W ostatnich latach pojawiło się również wiele ciekawych sposobów tworzenia wiązania węgiel-węgiel z wykorzystaniem reakcji Mitsunobu. Między innymi Tsunoda [51, 52], opisywał reakcję z wykorzystaniem innych reagentów niż standardowy układ DEAD i PPh_3 . Zaobserwował, że połączenie tributylfosfiny

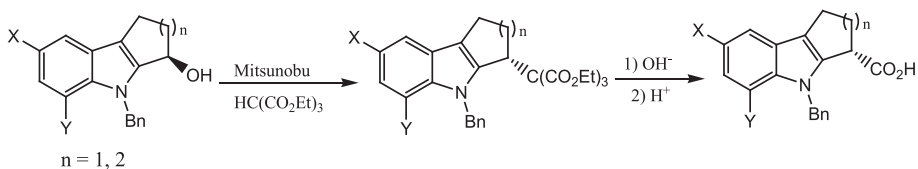
i reagentów azowych 4,7-dimetylo-3,5,7-heksahydro-1,2,4,7-tetraazyno-3,8-dionu (DHTD) było skuteczne dla związków metylenowych z wartościami pK_a powyżej ogólnie akceptowanego poziomu dla pronukleofili w tej przemianie (Schemat 35) [4]. Odkryto, że także malonian dietylu i dwie pochodne sulfonowe ulegają C-alkilowaniu w warunkach Mitsunobu, dając różne pierwszo- i drugorzędowe produkty [4, 6, 53].



Schemat 35. C-alkilowanie malonianu dietylu i nukleofili sulfonowych w warunkach Mitsunobu [4]

Scheme 35. C-alkylation of diethyl malonate and sulphonic nucleophile under Mitsunobu conditions [4]

Szukaniem innych reagentów w syntezie Mitsunobu, dzięki którym tworzenie wiązania C–C byłoby skuteczne, zajął się też Hiller [34]. Jego eksperyment polegał na wykorzystaniu trimetylofosfiny (PMe_3) i azodikarboksylanu bis(2,2,2-trichloroetylu) (TCEAD) w otrzymywaniu cykloalkilo[b]indoli. Stosowali oni stereoselektywne podstawienie S_N2 alkoholowego substratu (indolu) węglowym nukleofilem uzyskując z dobrą wydajnością zamierzone produkty (Schemat 36) [53].



Schemat 36. Zastosowanie PMe_3 i TCEAD w reakcji otrzymywania cykloalkilo[b]indoli [53]

Scheme 36. The use of PMe_3 and TCEAD in reaction of cycloalkyl[b]indoles obtention [53]

Reakcja Mitsunobu wykorzystywana jest także do syntezy i transformacji wielu naturalnych produktów. Oprócz wspomnianej już syntezy nukleozydów, obejmuje reakcje cukrów, otrzymywanie ftaloiloaminocukrów czy azydocukrów. Wśród związków syntetyzowanych tą metodą wymienić można także makrolidy i steroidy [3]. Jak widać reakcja Mitsunobu jest powszechnie używana i wciąż modyfikowana w celu poszerzenia już i tak ogromnej ilości zastosowań.

PIŚMIENICTWO CYTOWANE

- [1] Mitsunobu O., Yamada M., Bull. Chem. Soc. Jpn., 1967, **40**, 2380.
- [2] Mitsunobu O., Eguchi M., Bull. Chem. Soc. Jpn., 1971, **44**, 3427.
- [3] Mitsunobu O., Synthesis, 1981, 1.
- [4] Herr J.R., Albany Molecular Research, Inc. Technical Reports, 1999, **3**, 1.
- [5] Dembinski R., Eur. J. Org. Chem., 2004, 2763.
- [6] Amos R.A., Emblidge R.W., Havens N., J. Org. Chem., 1983, **48**, 3598.
- [7] Bernard M., Ford W.T., J. Org. Chem., 1983, **48**, 326.
- [8] Wentworth P., Vandersteen A.M., Janda K.D., Chem. Commun., 1997, 759.
- [9] Lipshutz B.H., Blomgren P.A., Organic Lett., 2001, **3**, 1869.
- [10] Lan P., Porco J.A., South M.S., Parlow J., J. Comb. Chem., 2003, **5**, 660.
- [11] Véliz E.A., Beal P.A., Tetrahedron Lett., 2006, **47**, 3153.
- [12] Swamy K.C.K., Kumar K.P., Kumar N.N.B., J. Org. Chem., 2006, **71**, 1002.
- [13] K. Jantzi, **2001**, plik pdf z: http://medlibrary.org/medwiki/Mitsunobu_reaction.
- [14] Golantsov N.E., Kavachava A.V., Yuravskaya M.A., Chem. Heterocycl. Compd., 2008, **44**, 263.
- [15] Hirose D., Taniguchi T., Ishibashi H., Angew. Chem. Int. Ed., 2013, **52**, 1.
- [16] Simon C., Hosztafi S., Makleit S., J. Heterocyclic Chem., 1997, **34**, 349.
- [17] Zwierzak A., *Zwięzły kurs chemii organicznej*, Wydawnictwo Politechniki Łódzkiej, 2002.
- [18] Grochowski E., Hilton B.D., Kupper R.J., Michejda Ch.J., J. Am. Chem. Soc., 1982, **104**, 6876.
- [19] Varasi M., Walker K.A.M., Maddox M.L., J. Org. Chem., 1987, **52**, 4235.
- [20] Hughes D.L., Reamer R.A., Bergan J.J., Grabowski E.J.J., J. Am. Chem. Soc., 1988, **110**, 6487.
- [21] Camp D., Jankins I.D., J. Org. Chem., 1989, **54**, 3045.
- [22] Camp D., Jankins I.D., J. Org. Chem., 1989, **54**, 3049.
- [23] Gawroński J., Gawrońska K., Kacprzak K., Kwit M., *Współczesna Synteza Organiczna. Wybór eksperymentów*, PWN, Warszawa, 2004.
- [24] Dodge J.A., Nissen J.S., Presnell M., Organic Synthesis, Coll., 1998, **9**, 607.
- [25] Mitsunobu O., Kimura J., Fujisawa Y., Bull. Chem. Soc. Jpn., 1972, **45**, 245.
- [26] Fitzjarrald V.P., Pgdee R., Tetrahedron Lett., 2007, **48**, 3553.
- [27] Kimura J., Fujisawa Y., Yoshizawa T., Fukuda K., Mitsunobu O., Bull. Chem. Soc. Jpn., 1979, **52**, 1191.
- [28] Shimokawa S., Kimura J., Mitsunobu O., Bull. Chem. Soc. Jpn., 1976, **49**, 3357.
- [29] Lizarzaburu M.E., Shutteleworth S.J., Tetrahedron Lett., 2002, **43**, 2157.
- [30] Mitsunobu O., Wada M., Sano T., J. Am. Chem. Soc., 1972, **94**, 679.
- [31] Tsunoda T., Yamamoto H., Goda K., Ito S., Tetrahedron Lett., 1996, **37**, 2457.
- [32] Jennyl T.F., Previsani N., Benner S.A., Tetrahedron Lett., 1991, **32**, 7029.
- [33] Chong Y., Gumina G., Chu Ch.K., Tetrahedron Asymmetry, 2000, **11**, 4853.
- [34] Choo H., Chong Y., Chu Ch.K., Organic Lett., 2001, **3**, 1471.
- [35] Yin X., Li W., Schneller S.W., Tetrahedron Lett., 2006, **47**, 9187.
- [36] Lee J.A., Moon H.R., Kim H.O., Kim K.R., Lee K.M., Kim B.T., Hwang K.J., Chun M.W., Jacobson K.A., Jeong L.S., J. Org. Chem., 2005, **70**, 5006.
- [37] Barral K., Halfon P., Pe'pea G., Camploa M., Tetrahedron Lett., 2002, **43**, 81.
- [38] Verheggen I., Van Aerschot A., Van Meervelt L., Rozenski J., Wiebe L., Snoeck R., Hdrei G., Balzarini J., Claes P., De Clercq E., Herdewijn P., J. Med. Chem., 1995, **38**, 826.
- [39] Nguyen C., Ruda G., Schipani A., Kasinathan G., Leal I., Musso-Buendia A., Kaiser M., Brun R., Ruiz-Pérez L.M., Sahlberg B.L., Johansson N.G., Gonzalez-Pacanoska D., Gilbert I.H., J. Med. Chem., 2006, **49**, 4183.

- [40] Hernandez A.I., Balzarini J., Karlsson A., Camarasa M.J., Perez-Perez M.J., *J. Med., Chem.*, **45**, 2002, 4254.
- [41] Hernandez A.I., Familiar O., Negri A., Rodriguez-Barrios F., Gago F., Karlsson A., Camarasa M.J., Balzarini J., Perez-Perez M.J., *J. Med. Chem.*, 2006, **49**, 7766.
- [42] Maruyama T., Kozai S., Demizu Y., Witvrouw M., Pannecouque Ch., Balzarini J., Snoecks R., Andrei G., De Clercq E., *Chem. Pharm. Bull.*, 2006, **54**, 325.
- [43] Frieden M., Giraud M., Reese C.B., Song Q., *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, 1998, **1**, 2827.
- [44] Kozai S., Maruyama T., Kimura T., Yamamoto I., *Chem. Pharm. Bull.*, 2001, **49**, 1185.
- [45] Kozai S., Takaoka S., Maruyama T., *Tetrahedron Lett.*, 2002, **43**, 2633.
- [46] Chun B.K., Wang P., Hassan A., Du J., Tharnish P.M., Stuyver L.J., Otto M.J., Schinazib R.F., Watanabe K.A., *Tetrahedron Lett.*, 2005, **46**, 2825.
- [47] Shatila R.S., Bouhadir K.H., *Tetrahedron Lett.*, 2006, **47**, 1767.
- [48] Otte R.D., Sakata T., Guzei I.A., Lee D., *Organic Lett.*, 2005, **7**, 495.
- [49] Nagasawa H., Mitsunobu O., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1981, **54**, 2223.
- [50] Kurihara T., Sugizaki M., Kime I., Wada M., Mitsunobu O., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1981, **54**, 2107.
- [51] Tsunoda T., Nagaku M., Bagino Ch., Kawamura Y., Ozaki F., Hioki H., Ito S., *Tetrahedron Lett.*, 1995, **36**, 2531.
- [52] Tsunoda T., Nagino Ch., Oguri M., Ito S., *Tetrahedron Lett.*, 1996, **37**, 2459.
- [53] Hillier M.C., Marcoux J.F., Zhao D., Grabowski E.J., McKeown A.E., Tillyer R.D., *J. Org. Chem.*, 2005, **70**, 8385.

Praca wpłynęła do Redakcji 11 czerwca 2013

BIOAKTYWNE *N*-ACYLOAMIDOFOSFORANOWE POCHODNE NUKLEOZYDÓW

BIOACTIVE *N*-ACYLPHOSPHORAMIDATE NUCLEOSIDE DERIVATIVES

Katarzyna Kulik

Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych w Łodzi
Polska Akademia Nauk
ul. Sienkiewicza 112, 90-262 Łódź, Poland
e-mail: kpieta@cbmm.lodz.pl

Abstract

Wprowadzenie

1. Synteza *N*-acyloamidofosforanów
 2. Synteza analogów aminoacyloadenylianów (aa-AMP)
 3. Synteza Fosmidozyny oraz jej analogów
 - 3.1. Fosmidozyna i Fosmidozyna B
 - 3.2. Trwałość Fosmidozyny
 - 3.3. Analogi Fosmidozyny
 4. Synteza β -asparaginyloadenylianu – potencjalnego inhibitora syntezy asparaginowej
 5. *N*-Acyloamidofosforanowe pochodne nukleozydów
- Piśmiennictwo cytowane
-

Mgr Katarzyna Kulik ukończyła Wydział Chemii Uniwersytetu Łódzkiego w 2005 roku i w tym samym roku rozpoczęła pracę w Zakładzie Chemii Bioorganicznej CBMM PAN w Łodzi. Jej zainteresowania naukowe dotyczą poszukiwania modyfikacji nukleozydowych leków o działaniu przeciwnowotworowym i przeciwwirusowym, mających na celu zwiększenie transportu dokomórkowego tych leków.

ABSTRACT

Natural nucleotide antibiotics such as Agrocin 84, Dinoguellin, Microcin C and Phosmidosine have a *N*-acylphosphoramidate linkage at the 5'-hydroxyl of the adenosine derivatives (Fig. 1, 2) [1–3]. They exhibit interesting antifungal, antiemetics and anticancer properties. To synthesize these products, the construction of the *N*-acylphosphoramidate linkages seems to be a key step. Many groups have described the preparation of such a type of analogues but none of those methods was general. Grandas has for the first time reported the synthesis, of *N*-acylphosphoramidate peptide-oligonucleotide hybrids *via* condensation of *N*-phosphitylated carboxyamides with alcohols in the presence of 1*H*-tetrazole [9]. Based on this strategy Sekine synthesized aminoacyl adenylate (aa-AMP) analogues which could be useful in the studies on the recognition mechanism of the aminoacylation of tRNA and other biochemical reactions [10]. Since aa-AMPs are extremely unstable under aqueous conditions more stable analogues were required. Aminoacyl-adenylate analogues having an *N*-acylphosphoramidate linkage (aa-AMPN) could behave as potent, selective asparagine synthetase (AS) inhibitors because of its structural similarity to β -aspartyl-AMP (β AspAMP) which is natural product of AS [17].

Among natural *N*-acylphosphoramidates, Phosmidosine which connects a nucleoside analogue, 8-oxoadenosine, with an L-proline residue is unique because of its significant antitumor activities and property of stopping cell growth at the G1 phase in the cell cycle (Fig. 2) [2, 13]. The main difficulty during the synthesis of this compound is an extreme instability under weak basic conditions which excludes the use of labile protecting group of basic properties [14]. Stability studies have shown that under basic conditions phosphoryl group of Phosmidosine underwent rapid N–N migration (Scheme 9) [16]. Many modifications have been introduced to improve Phosmidosine properties [16]. Analogues such as demethylated species (Phosmidosine B) have proven to be stable under both basic and acid conditions and are also potential candidates for antitumor drugs [14].

Keywords: *N*-acylphosphoramidate function, aminoacyl adenylate analogues, nucleoside analogue, Phosmidosine

Słowa kluczowe: ugrupowanie *N*-acyloamidofosforanowe, analogi aminoacyloadenylanów, analogi nukleozydów, Fosmidozyna

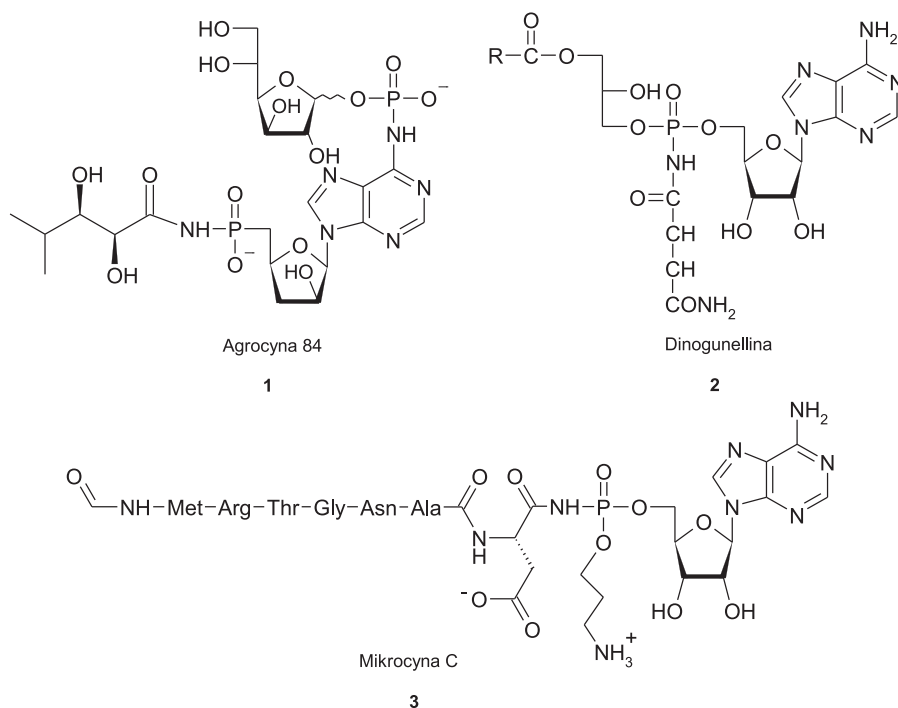
WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ATP	– adenzyno-5'-trifosforan
AMP	– adenzyno-5'-monofosforan
DIEA	– <i>N,N</i> -diizopropylloetyloamina
DBU	– 1,8-diazabicyklo[5.4.0]-undecen-7
Fm	– grupa 9-fluorenometrylowa
Boc	– grupa <i>tert</i> -butoksykarbonylowa
Tr	– grupa trytylowa
MMT	– grupa monometoksytrytylowa
Bn	– grupa benzylowa
Bz	– grupa benzoilowa
TBTr	– grupa 4,4',4''-tris(benzoiloksy)trytylowa
TSE	– grupa 2-(trimetylosililo)etylowa
CNE	– grupa 2-cyjanoetylowa
AZT	– 3'-azydo-2',3'-dideoksytymidyna
D4T	– 2',3'-dideoksy-2',3'-didehydrotymidyna

WPROWADZENIE

N-Acyloamidofosforanowe ugrupowanie stanowi bardzo ważny motyw strukturalny różnych bioaktywnych produktów naturalnych i farmaceutyków takich jak Agrocyna 84 [1] i Fosmidozyna [2], które wykazują przeciwgrzybiczne, przeciwwymiotne i przeciwnowotworowe właściwości.

W latach osiemdziesiątych ubiegłego wieku opublikowano prace dotyczące naturalnych antybiotyków posiadających w swej strukturze takie ugrupowanie. Należały do nich Agrocyna 84 (**1**, wytwarzana przez bakterie szczepu K-84 *Agrobacterium radiobacter* i wykorzystywana jako środek ochrony roślin) oraz Dinogunellina (**2**, toksyczny fosfolipid wyizolowany z ikry morskich ryb gatunku *Stichaeus grigorjewi*), zawierające funkcję *N*-acyloamidofosforanową w pozycji 5' analogu adenylozyny (Rys. 1) [1].

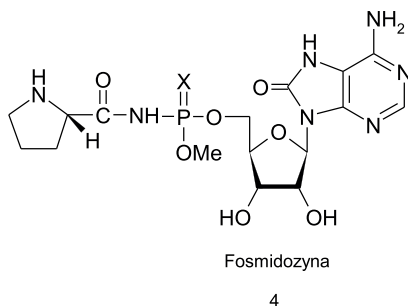


Rysunek 1. Struktury naturalnych antybiotyków zawierających ugrupowanie *N*-acyloamidofosforanowe
Figure 1. Structures of natural antibiotics containing an *N*-acylphosphoramidate linkage

Z kolei Mikrocytna C (**3**, Rys. 1) będąca antybiotykiem syntezowanym przez bakterie należące do rodziny *Escherichia coli* zbudowana jest z heptapeptydu połączonego za pomocą wiązania *N*-acyloamidofosforanowego z modyfikowanym AMP [3]. Peptydowy fragment związku ułatwia transport do wnętrza komórki, w której drogą enzymatycznej hydrolizy następuje jego usunięcie i uwolnienie aktywnego

związku wykazującego silne działanie biologiczne związane z hamowaniem syntezy białek.

Szczególnie atrakcyjnym związkiem okazała się być Fosmidozyna (**4**, Rys. 2) wyizolowana w 1991 roku przez Uramoto i Isono z hodowli *Streptomyces durhamensis*. Ten naturalny antybiotyk łącząc w swej strukturze fragment aminokwasu – proliny z analogiem nukleozydu hamował tworzenie zarodników *Botyitis cinerea*, chorobotwórczych grzybów, owoców i warzyw [2].

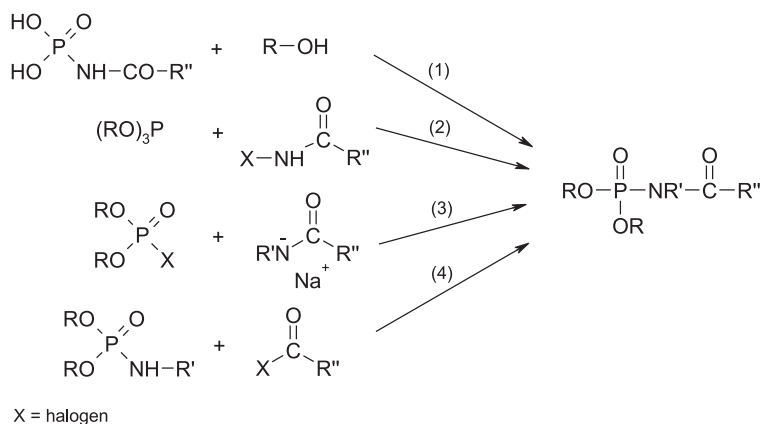


Rysunek 2. Struktura Fosmidozyny
Figure 2. Structure of Phosmidosine

Interesujące właściwości biologiczne *N*-acyloamidofosforanowych pochodnych skłoniły badaczy do poszukiwania dogodnej metody otrzymania tego typu połączeń.

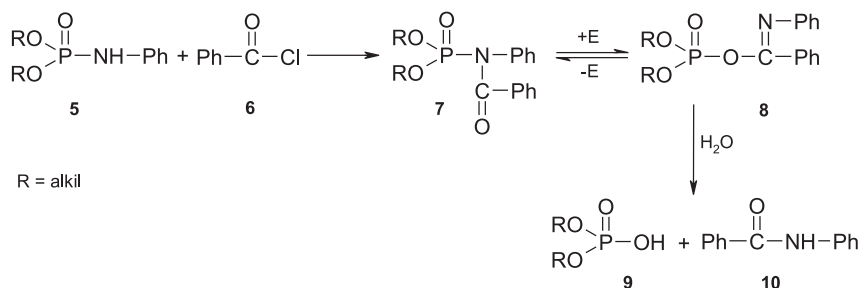
1. SYNTEZA *N*-ACYLOAMIDOFOSFORANÓW

Należy zauważyć, iż *N*-acylowane amidofosforany już w latach 60. minionego wieku były rozpatrywane jako potencjalne odczynniki fosforylujące. W 1962 roku Zioudrou zaproponował syntezę polegającą na estryfikacji kwasów *N*-acyloamidofosforowych lub chloroacyloamidofosforanów przez odpowiednie alkohole (Schemat 1, droga 1) [4]. Jednakże podstawową jej wadę stanowił fakt, iż substraty do tej reakcji mogły być otrzymane jedynie z aromatycznych karboksamidów lub alifatycznych amidów posiadających podstawniki elektronoakceptorowe przy α atomie węgla.

Schemat 1. Metody otrzymywania *N*-acyloamidofosforanowych pochodnychScheme 1. Methods used for the preparation of *N*-acylphosphoramidate derivatives

Następnie Desmarchelier w reakcji fosforynu trialkilowego z cyklicznymi *N*-halogenoamidami lub halogenoiminami otrzymał odpowiednie *N*-acyloamidofosforany (Schemat 1, droga 2) [5]. Inny sposób otrzymania tego typu połączeń obejmował reakcję anionów pierwszo- i drugorzędowych karboksamidów z chlorofosforanem (Schemat 1, droga 3) [6]. Jednakże żadna z wyżej przedstawionych reakcji nie miała charakteru ogólnego. Najprostszą metodą syntezy *N*-acyloamidofosforanów wydawała się być reakcja bezpośredniego arylowania amidofosforanów. Niestety proces ten okazał się być mało wydajny ze względu na towarzyszące rozerywanie wiązania P–N i tworzenie karboksamidów (Schemat 1, droga 4) [7].

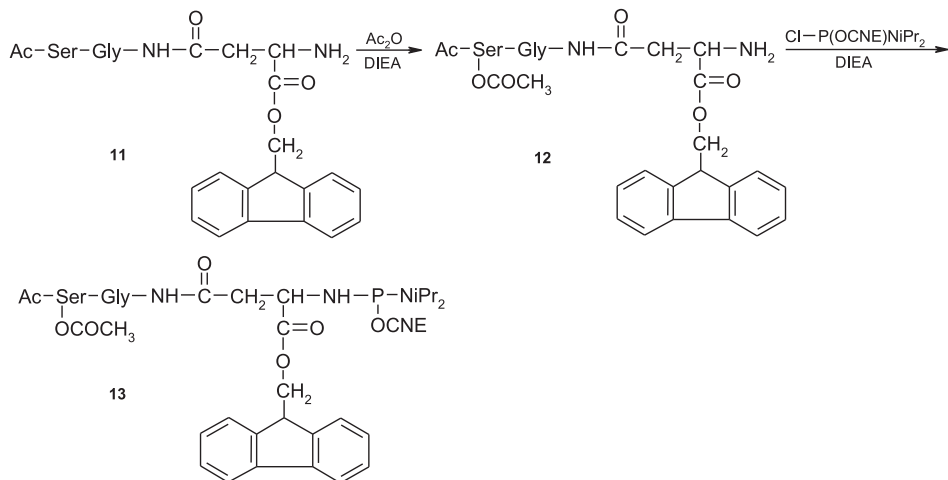
Badania dotyczące bezpośredniego benzoilowania amidodiestrów fosforowych prowadzone w latach 90. ubiegłego wieku w Zakładzie Chemii Bioorganicznej CBMM PAN pozwoliły wyjaśnić mechanizm tej reakcji [8]. Jej pierwszy etap stanowi *N*-benzoilowanie prowadzące do utworzenia odpowiedniego *N*-benzoilo-*O,O*-dialkiloanilidofosforanu (**7**, Schemat 2), który następnie ulega wolnemu przegrupowaniu do mieszanego bezwodnika *O,O*-dialkilofosforo-*N*-fenyloiminobenzoesowego (**8**) na skutek wewnątrzcząsteczkowego ataku karbonyłowego atomu tlenu na atom fosforu z jednoczesnym rozerwaniem wiązania P–N. Zaobserwowano, iż przegrupowanie to katalizowane jest przez odczynniki elektrofilowe takie jak chlorek benzoilu. Solwoliza bezwodnika **8** zachodziła z atakiem *N*- oraz *O*-nukleofili na karbonyłowy atom węgla fragmentu benzoilowego w konsekwencji prowadząc do utworzenia kwasu *O,O*-dialkilofosforowego (**9**) oraz odpowiedniego karboksamidu **10**.



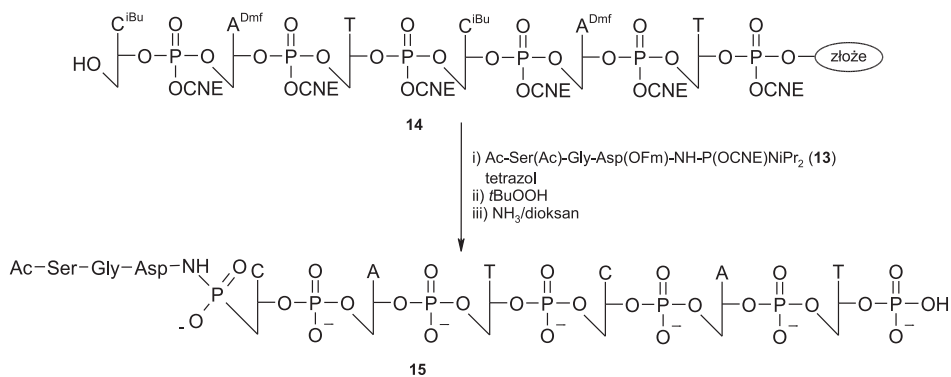
Schemat 2. Katalizowane odczynnikami elektrofilowymi przegrupowanie *N*-benzoilo-*O,O*-dialkiloanilidofosforanów
 Scheme 2. Rearrangement of *N*-benzoyl-*O,O*-dialkyl phosphoranilidates catalysed by electrophilic reagents

Głównie ze względu na dużą ilość reakcji ubocznych żadna z przedstawionych metod syntezy nie mogła znaleźć zastosowania w otrzymywaniu takich związków jak koniugaty peptyd-oligonukleotydy, które były połączone kowalencyjnym wiązaniem *N*-acyloamidofosforanowym. Stąd też zespół Grandas opublikował w 1995 roku metodę opartą na reakcji pierwszorzędowych karboksamidów z P(III) pochodnymi [9].

Pierwszy etap tej syntezy obejmował fosfitylację grupy karboksamidowej asparaginy znajdującej się na C-końcu blokowanego peptydu **12** za pomocą chloroamidofosforynu w obecności zasady (Schemat 3A). Otrzymaną amidofosforynową pochodną **13** kondensowano wobec tetrazolu z 5'-hydroksylową grupą przyłączonego do stałego podłoża oligonukleotydu **14**, a następnie w otrzymanym koniugacie utleniono P(III) atom fosforu za pomocą wodoronadtlenku *tert*-butylowego. W końcowym etapie reakcji stosując roztwór amoniaku w dioksanie usunięto grupy ochronne otrzymując pożądaną koniugat **15** (Schemat 3B).



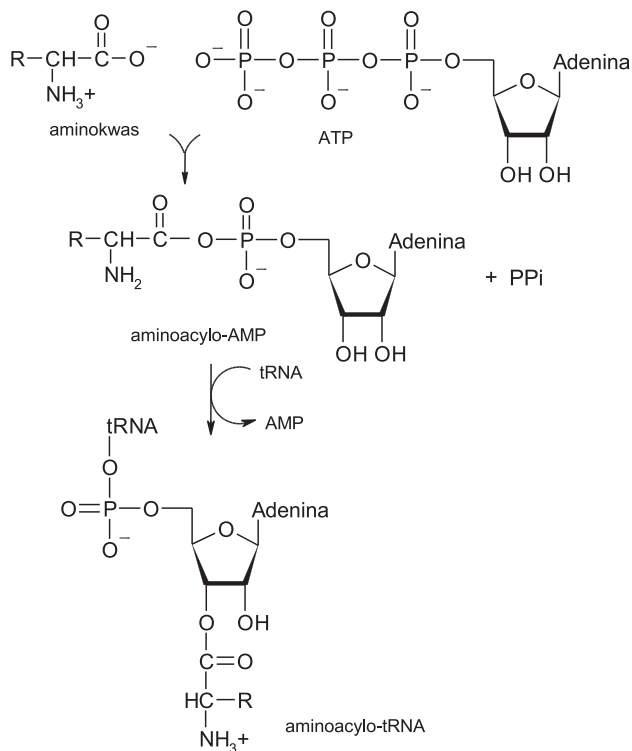
DIEA - *N,N*-diizopropylloetyloamina



Schemat 3. Synteza koniugatu peptyd-oligonukleotydu Ac-Ser-Gly-Asp-NH-p³⁵CATCAT

Scheme 3. Synthesis of the peptide-oligonucleotide conjugate Ac-Ser-Gly-Asp-NH-p³⁵CATCAT

2. SYNTEZA ANALOGÓW AMINOACYLOADENYLANÓW (aa-AMP)

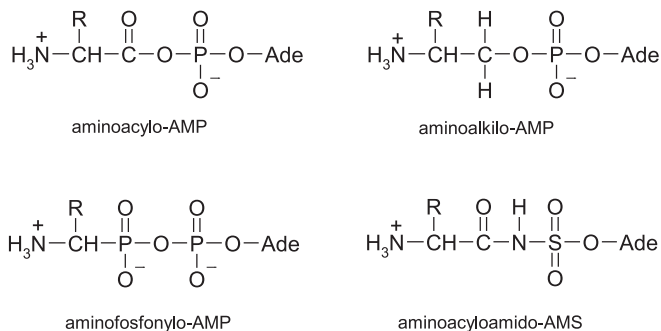


Schemat 4. Mechanizm reakcji katalizowanej przez syntetazę aminoacylo-tRNA

Scheme 4. Mechanism of the reaction catalyzed by aminoacyl-tRNA synthetase

Analogiczną metodologię syntezy nieopisanych w literaturze chemicznej analogów aminoacyloadenylanów (aa-AMP) zaproponował Sekine. aa-AMP są ważnymi związkami pośrednimi w reakcjach z udziałem syntetaz aminoacylo-tRNA (aaRS), katalizujących dwuetapową reakcję przeniesienia aminokwasu na tRNA. W pierwszym etapie zachodzi aktywacja aminokwasu poprzez przyłączenie pochodzącego z cząsteczki ATP fragmentu AMP (Schemat 4). Z utworzonego aa-AMP syntetaza przenosi aminokwas na 3' (lub 2') hydroksylową funkcję rybozy znajdującej się na końcu 3' łańcucha tRNA, prowadząc do utworzenia aminoacylo-tRNA.

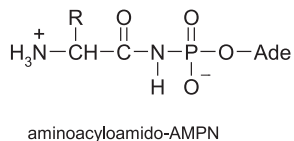
Aminoacyloadenylany będąc pochodnymi bezwodników fosforowokarboksylowych są związkami bardzo niestabilnymi w środowisku wodnym. Mając na uwadze badanie procesów aminoacylowania tRNA poszukuje się trwalszych analogów zawierających takie ugrupowania jak: aminoalkilofosforylowe, aminofosfonylowe czy *N*-acylosulfonamidowe (Rys. 3). Jednakże struktury tych analogów różnią się od aa-AMPs, gdyż nie posiadają podwójnego wiązania C=O, mają dodatkowy ładunek ujemny bądź utraciły ładunek pochodzący z ugrupowania fosforowego.



Rysunek 3. Struktury aminoacyloadenylationów oraz ich analogów

Figure 3. Structures of aminoacyl-adenylates and their analogues

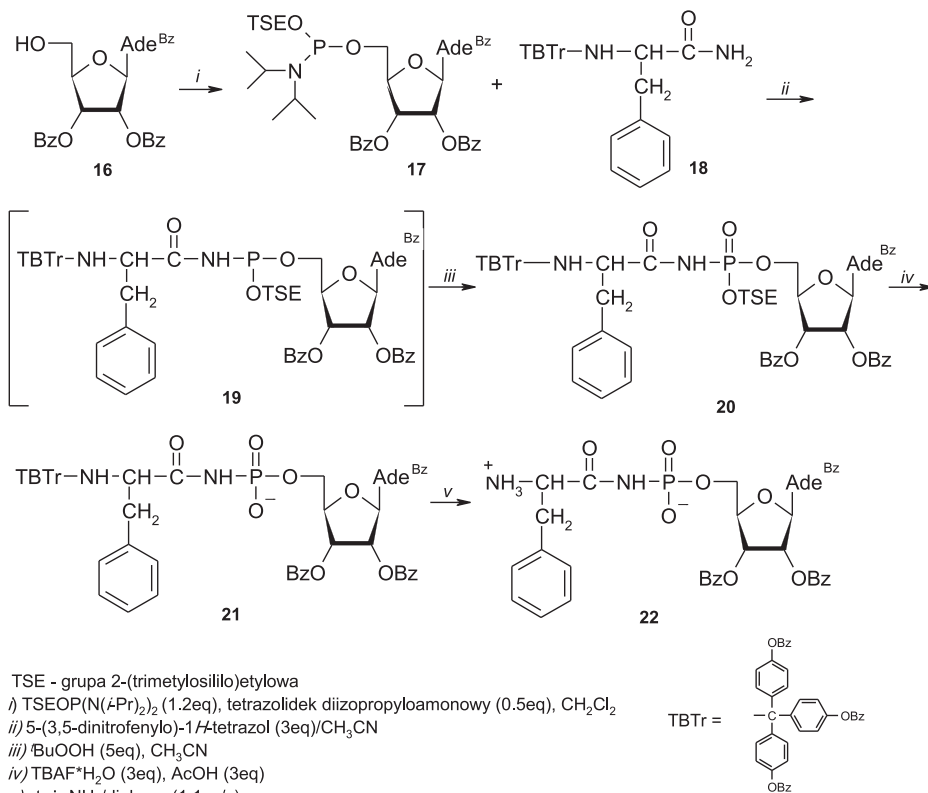
Sekine zaprojektował stabilny w warunkach fizjologicznych analog aa-AMP zawierający ugrupowanie *N*-acyloamidofosforanowe, które pozwala, aby związek zachował strukturę jonu zwitterionowego i w którym zachowana jest podobna odległość między atomem fosforu a grupami aminowymi (Rys. 4) [10].



Rysunek 4. Struktura aminoacyloamidoadenylationów zaprojektowanych przez Sekine

Figure 4. Structure of aminoacyl-adenylates designed by Sekine

Odpowiednią 5'-*O*-amidofosforynową pochodną adenozy (17) otrzymywano w reakcji *N*⁶,*O*²,*O*³'-tribenzoiloadenozy (16) z 2-(trimetylosililo)etylo-*N,N,N',N'*-tetraizopropylamidofosforynem wobec tetrazolidku diizopropylamoniowego (Schemat 5) [11]. Jako grupę ochronną funkcji aminowej aminokwasu zastosowano, ułatwiającą rozpuszczalność w rozpuszczalnikach organicznych, lipofilową, zasadowalną grupę 4,4',4''-tris(benzoiloksy)trytylową (TBTr). Kondensację *N*-TBTr pochodnej aminokwasu (18) z 5'-*O*-amidofosforynową pochodną adenozy (17) prowadzono w obecności 5-(3,5-dinitrofenylo)-1*H*-tetrazolu, następnie utleniano amidofosforynowy związek pośredni nadtlakiem *tert*-butylowym. W końcowym etapie reakcji usuwając grupy ochronne otrzymano pożądany produkt 22, który oczyszczano chromatograficznie na kolumnie wypełnionej silikazalem C-18. Omówiona metoda umożliwiła otrzymanie serii aminoacyloamidoadenylationów pochodnych L-fenylalaniny, L-izoleucyny, L-waliny, L-metioniny, L-proliny oraz formy L- i D-tyrozyny.



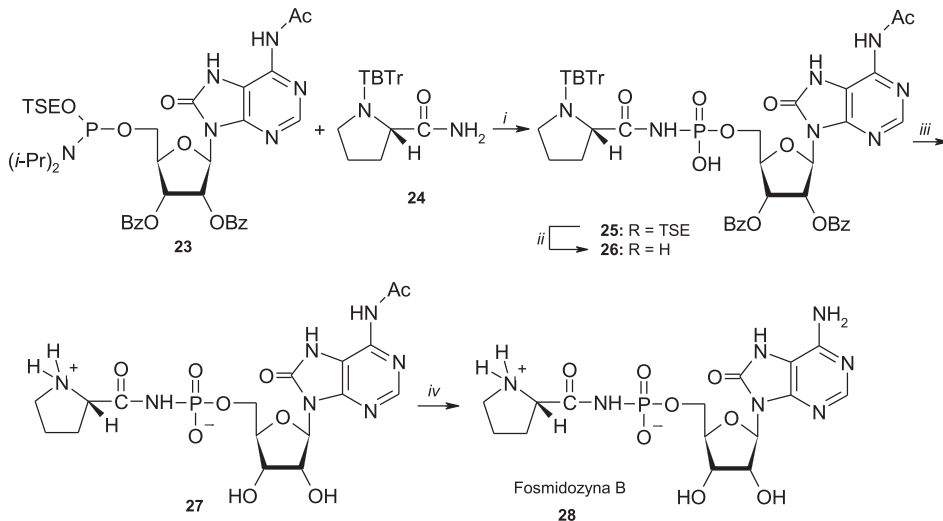
Rysunek 5. Struktura β -aspartylo-AMP oraz jego amidofosforanowego analogu
 Figure 5. Structure of β -aspartyl-AMP and its phosphoramidate analogue

3. SYNTEZA FOSMIDOZYNY ORAZ JEJ ANALOGÓW

Opisana metoda syntezy aminoacyloamidoadenylianów posłużyła zespołowi Sekine do otrzymania Fosmidozyiny oraz jej analogów [12]. Cząsteczka tego nukleotydowego antybiotyku składa się z 8-oksoadenozyny oraz L-proliny połączonych ugrupowaniem *N*-acyloamidofosforanowym. Przesłanką do poszukiwania wydajnej metody otrzymywania analogów Fosmidozyiny były doniesienia literaturowe japońskiego zespołu Osady, który odkrył jej szczególną właściwość związaną ze zdolnością do hamowania wejścia w fazę S cyklu komórkowego i zatrzymywania jej progresji w fazie G₁ [13].

3.1. FOSMIDOZYNA I FOSMIDOZYNA B

Fosmidozyna B (**28**) stanowiącą zdemetylowaną pochodną Fosmidozyny została zsyntezowana w reakcji *N*-acetylo-8-oksoadenozyno-5'-*O*-amidofosforynowej pochodnej **23** z *N*-blokowanym prolinamidem (**24**) w obecności 5-(3,5-dinitrofenylo)-1*H*-tetrazolu pełniącego funkcję kwasowego katalizatora (Schemat 6) [14]. Jako funkcję ochronną ugrupowania fosforanowego wykorzystano grupę 2-(trimehtylosililo)etylową (TSE), która mogła być selektywnie usuwana za pomocą fluorku tetra-*n*-butyloamoniowego.



i) 5-(3,5-dinitrofenylo)-1*H*-tetrazol/ CH_3CN

ii) tBuOOH

iii) $\text{TBAF} \cdot \text{H}_2\text{O}$, AcOH , THF

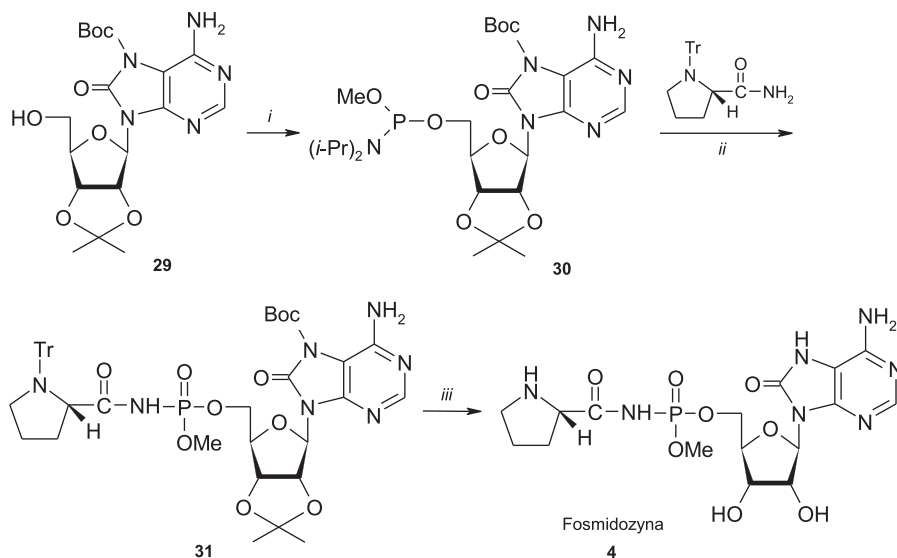
iv) stęż. NH_3 /dioksan (1:1, v/v)

iv) 1M NaOH

Schemat 6. Synteza Fosmidozyny B

Scheme 6. Synthesis of Fosmidosine B

Synteza Fosmidozyny drogą selektywnego metylowania grupy *N*-acyloamidofosforanowej Fosmidozyny B (**28**) za pomocą diazometanu nie powiodła się z powodu niskiej rozpuszczalności tego związku w rozpuszczalnikach organicznych oraz występowania w formie zwitterjonu [15]. Inne podejście polegało na wprowadzeniu grupy metylowej na etapie fosfitylacji pochodnej 8-oksoadenozyny za pomocą bis-(*N,N*-diizopropylamido)fosforynu metylowego. Mimo, iż obserwowano tworzenie się pożądanego produktu kondensacji 5'-*O*-amidofosforynowej pochodnej nukleozydu z *N*-blokowanym aminokwasem to warunki prowadzenia następczej reakcji usunięcia grupy acetylowej z 6-aminowej funkcji pochodnej adenzyny prowadziły do rozkładu tego związku. O ile Fosmidozyna B była trwała zarówno w warunkach kwasowych jak i zasadowych to jej metylowana pochodna okazała się być wyjątkowo niestabilna w środowisku zasadowym.



i) $\text{MeOP}(\text{i-Pr})_2\text{N}$, tetrazolid diizopropylamoniowy, CH_2Cl_2

ii) 5-(3,5-dinitrofenylo)-1*H*-tetrazol, CH_2Cl_2 - CH_3CN (1:1, v/v); $^t\text{BuOOH}$, CH_3CN ; I_2 , pirydyna- H_2O (9:1, v/v)

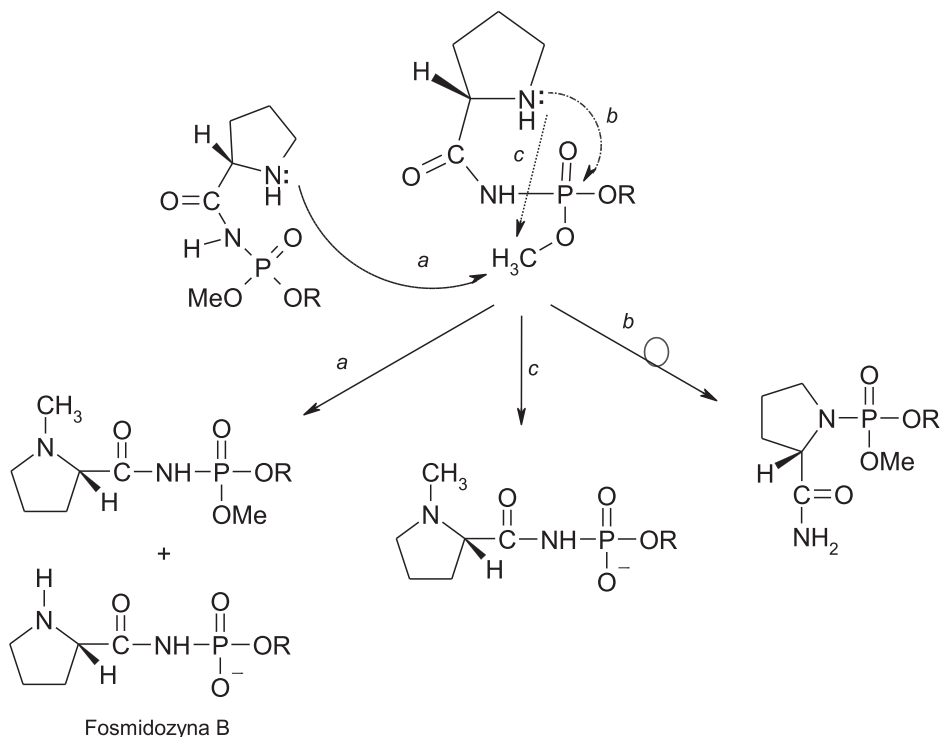
iii) 80% AcOH

Schemat 7. Synteza Fosmidozyny

Scheme 7. Synthesis of Phosmidosine

Ostatecznie wykorzystanie kwasolabilnej grupy *tert*-butoksykarbonylowej (Boc), pozwoliło autorom ominąć problemy związane z niestabilnością Fosmidozyny. Pochodną 8-oksoadenozyny zablokowaną w pozycjach 2'- i 3'- grupą izopropylidenową oraz grupą *tert*-butoksykarbonylową w pozycji *N*-7 (**29**) poddano reakcji z bis-(*N,N*-diizopropylamido)fosforynem metylowym w obecności tetrazolidku diizopropylamoniowego (Schemat 7). Oddziaływania steryczne i elektrostatyczne wynikające z obecności grupy Boc zablokowały fosfitylację funkcji egzoaminowej nukleozasady. Finalna kondensacja otrzymanej 5'-*O*-amidofosforynowej pochodnej adenozyny (**30**) z *N*-Tr-prolinamidem, następcza reakcja utlenienia i deprotekcja grup ochronnych w środowisku kwasowym prowadziły do otrzymania Fosmidozyny (**4**) w formie mieszaniny dwóch diastereoizomerów, które zostały rozdzielone techniką HPLC.

Badania aktywności inhibitorowej otrzymanych związków wobec linii komórkowych raka żołądka, płuc, krtani oraz odbytu wykazały wysoką aktywność przeciwnowotworową Fosmidozyny B [14]. W przypadku Fosmidozyny właściwości inhibitorowe obu wyizolowanych diastereoizomerów były zbliżone i około 10-krotnie wyższe niż w przypadku Fosmidozyny B.

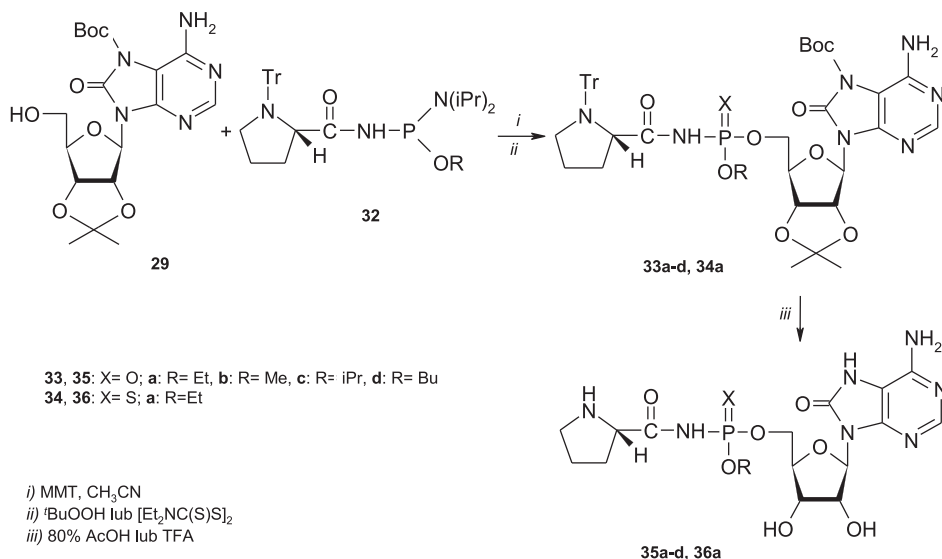


Schemat 9. Mechanizm rozkładu Fosmidozyny w stężonym roztworze

Scheme 9. Mechanism of the decomposition of Phosmidosine in concentrated solution

3.3. ANALOGI FOSMIDOZYNY

Autorzy poszukując stabilniejszych pochodnych Fosmidozyny zsyntezowali serię analogów, w których grupę metylową w ugrupowaniu amidofosforanowym zastąpiono dłuższymi podstawnikami alkilowymi. Związki te otrzymano kondensując *N*-(*N*-trytyloprolilo)amidofosforanową pochodną **32** z blokową kwasolabilnymi grupami ochronnymi pochodną 8-oksoadenozyny (**29**) wobec 5-merkaptot-1-metylo-1*H*-tetrazolu (MMT) (Schemat 10). Spośród otrzymanych pochodnych *O*-etylowa pochodna **35a** była wystarczająco stabilna w roztworze wodnym, natomiast w warunkach zasadowych (0,1 M NaOH) okazała się być 1,5-krotnie stabilniejsza niż Fosmidozyna. W analogiczny sposób przeprowadzono syntezę analogu Fosmidozyny zawierającego ugrupowanie *N*-proliloamidotiofosforanowe (**34a**).



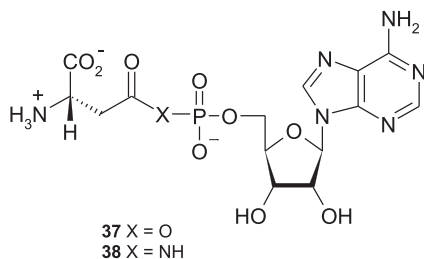
Schemat 10. Synteza analogów Fosmidozyny
 Scheme 10. Synthesis of Phosmidosine analogues

Zespół Sekine otrzymał także serię pochodnych, w których grupę prolinową zastąpiono aminoacylowymi fragmentami aminokwasów jak L- i D- izoleucyna, L-alanina oraz L-metionina.

Badania aktywności przeciwnowotworowej zsyntezowanych analogów Fosmidozyny wykazały, iż zastąpienie fragmentu L-proliny innym L-aminokwasem bądź D-proliną wyraźnie obniża aktywność biologiczną tych związków [16]. W przypadku *N*-prolioloamidotiofosforanowej pochodnej nie obserwowano istotnej zmiany aktywności w stosunku do niemodyfikowanej Fosmidozyny, natomiast w serii pochodnych *O*-alkilowych oba diastereoizomery każdego z analogów Fosmidozyny posiadały podobne właściwości biologiczne.

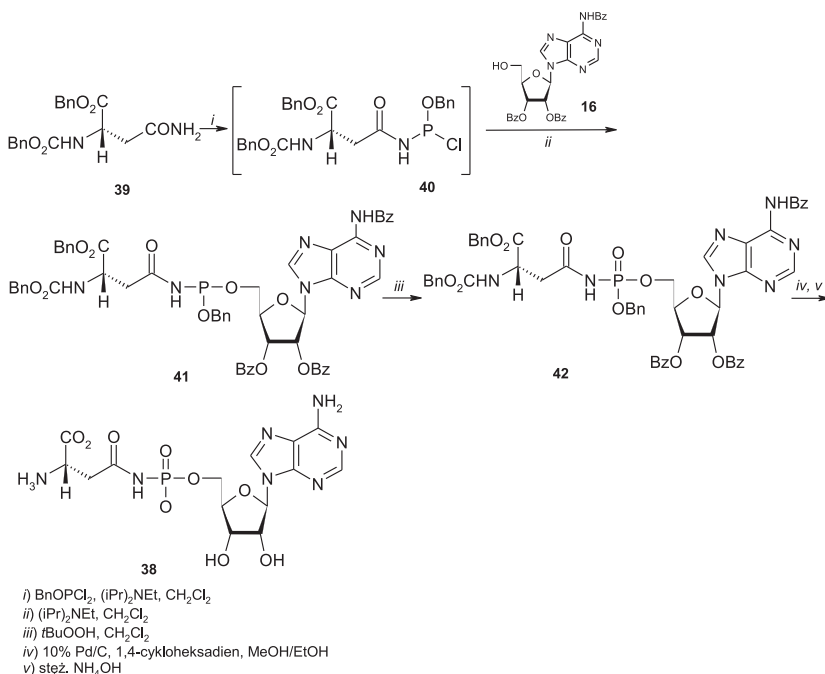
4. SYNTEZA β -ASPARAGINYLOADENYLANU – POTENCJALNEGO INHIBITORA SYNTETAZY ASPARAGINOWEJ

W 2002 roku Richards przedstawił syntezę β -asparaginyloadenyланu jako potencjalnego inhibitora syntetazy asparaginowej [17]. Enzym ten należący do amidotransferaz, pełni funkcję katalizatora syntezy asparaginy z kwasu asparagowego, glutaminy i ATP [18]. Przypuszczano, iż otrzymany β -asparaginyloadenyлан (38, Rys. 5) będąc bliskim analogiem β -aspartylo-AMP (β -AspAMP, 37), naturalnego produktu reakcji katalizowanej przez syntetazę asparaginową, może wykazywać aktywność przeciwnowotworową wobec komórek białaczki.



Rysunek 5. Struktura β -aspartylo-AMP oraz jego amidofosforanowego analogu
 Figure 5. Structure of β -aspartyl-AMP and its phosphoramidate analogue

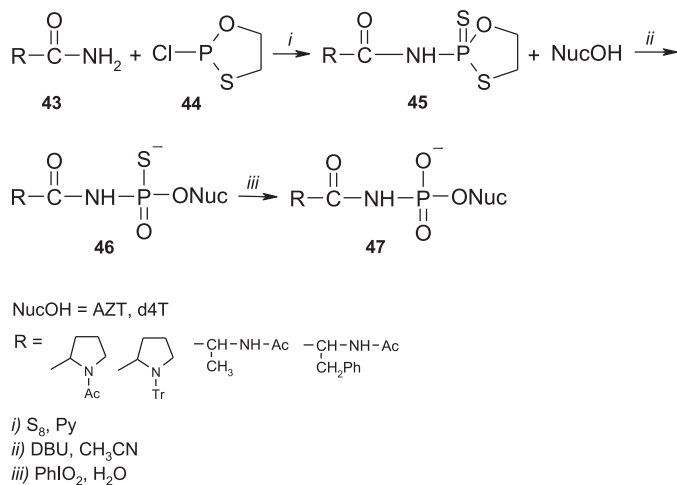
Pierwszy etap syntezy obejmował reakcję blokowanej L-asparaginy (**39**) z dichlorofosforynem *O*-benzylowym prowadzoną w obecności diizopropyletyloaminy (Schemat 11). Otrzymany monochlorofosfinowy związek pośredni **40** kondensowano z N^6, O^2, O^3 -tribenzoiloadenozyną (**16**). Kolejny etap syntezy, jakim było utlenianie otrzymanej pochodnej **41** za pomocą t BuOOH, nie wymagał oczyszczenia substratu i był przeprowadzony bezpośrednio w tym samym naczyniu w obniżonej temperaturze. W końcowym etapie reakcji usunięto grupy ochronne przyłączone do grupy fosforanowej i aminowej otrzymując pożądany *N*-acyloamidofosforan **38** z całkowitą wydajnością 18%.



Schemat 11. Synteza β -asparaginyladenylanu
 Scheme 11. Synthesis of β -asparaginyladenylate

5. *N*-ACYLOAMIDOFOSFORANOWE POCHODNE NUKLEOZYDÓW

W Zakładzie Chemii Bioorganicznej CBMM PAN w Łodzi zaprojektowano serię 5'-*O*-(*N*-acylo)amidofosforanowych pochodnych nukleozydów o właściwościach przeciwwirusowych. Przesłanką do otrzymania tego typu potencjalnych pronukleotydydów była stosunkowo niska stabilność wiązania P–N w medium komórkowym mogąca prowadzić do uwolnienia wewnątrz komórki aktywnego monofosforanu nukleozydu. Kluczowymi związkami w tej syntezie były *N*-2-tiono-(1,3,2-oksatiafosfolanowe) pochodne karboksamidów aminokwasów (**45**). W tym celu prolinaamid, alanyloamid oraz fenyloalanyloamid, których grupy aminowe zablokowane były grupą acetylową bądź grupą trytylową poddawano reakcji z 2-chloro-1,3,2-oksatiafosfolanem (**44**) w obecności siarki elementarnej w pirydynie tworząc odpowiednie produkty **45**. Związki **45** reagowały z 5'-hydroksylową grupą wybranych pochodnych nukleozydów tj. AZT oraz d4T wobec silnej zasady DBU, co w rezultacie prowadziło do powstania *N*-acylo-*O*-nukleozydoamidtiofosforanów (**46**). W końcowym etapie syntezy związki **46** utleniało za pomocą jodoksybenzenu do analogów *N*-acylo-*O*-nukleozydoamidofosforanowych (**47**).

Schemat 12. Synteza 5'-*O*-(*N*-acylo)amidofosforanowych pochodnych nukleozydówScheme 12. Synthesis of nucleoside 5'-*O*-(*N*-acyl) phosphoramidates

Zsyntezowane 5'-*O*-(*N*-acylo)amidofosforany wykazały aktywność inhibitory w obecności wirusa HIV-1 oraz HIV-2 porównywalną z niemodyfikowanymi nukleozydami [19].

PODSUMOWANIE

Otrzymanie związków zawierających ugrupowanie *N*-acyloamidofosforanowe stanowi nadal duże wyzwanie dla syntetyków. Liczne grupy badawcze koncentrują się na poszukiwaniu wydajniejszych i efektywniejszych metod pozyskiwania tego typu pochodnych. Stosunkowo niska stabilność *N*-acyloamidofosforanów wymusza takie dobranie warunków reakcji, aby zapobiegać ich rozkładowi. Jednocześnie mając na uwadze stabilizowanie cząsteczki oraz poprawę właściwości aktywnych biologicznie *N*-acyloamidofosforanów wprowadza się różnego rodzaju modyfikacje w obrębie ich struktury.

Ugrupowanie *N*-acyloamidofosforanowe poza obecnością w naturalnych antybiotykach, stanowi ważny element strukturalny analogów aminoacyloadenylanów. Dzięki zachowaniu struktury zwitterjonu oraz niemal identycznej odległości między atomem fosforu a grupami aminowymi aminoacyloamidoadenylany należą do potencjalnych inhibitorów enzymów biorących udział w biosyntezie białek.

Wyjątkowa właściwość Fosmidozyiny wynikająca ze zdolności do hamowania wejścia w fazę S cyklu komórkowego i zatrzymywania jej progresji w fazie G_1 potwierdza, iż *N*-acyloamidofosforanowe analogi Fosmidozyiny należą do obiecujących związków o szerokim spektrum aktywności inhibitorowej wobec komórek nowotworowych.

PODZIĘKOWANIE

Pani dr hab. Janinie Baraniak składam serdeczne podziękowania za bezcenną pomoc i udzielone wskazówki.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] (a) W.P. Roberts, M.E. Tate, A. Kerr, *Nature*, 1977, **265**, 379; (b) M.E. Tate, P.J. Murphy, A. Kerr, *Nature*, 1979, **280**, 697; (c) M. Hatano, Y. Hashimoto, *Toxicon*, 1974, **12**, 231.
- [2] (a) M. Uramoto, C.J. Kim, K. Shin-ya, H. Kusakabe, K. Isono, *J. Antibiot.*, 1991, **44**, 375; (b) D.R. Phillips, M. Uramoto, K. Isono, J. A. McCloskey, *J. Org. Chem.*, 1993, **58**, 854.
- [3] a) P. Van de Vijver, G.H.M. Vondenhoff, T.S. Kazakov, E. Semenova, K. Kuznedelov, A. Metlitskaya, A. Van Aerschot, K. Severinov, *J. Bacteriol.*, 2009, **191**, 6273, b) K. Severinov, S.K. Nair, *Future Microbiol.*, 2012, **7**, 281.
- [4] C. Zioudrou, *Tetrahedron*, 1962, **18**, 197.
- [5] J.M. Desmarchelier, T.R. Fukuto, *J. Org. Chem.*, 1972, **37**, 4218.
- [6] (a) V. Mizrahi, T.A. Modro, *J. Org. Chem.*, 1982, **47**, 3533, (b) P. K. Chakravarty, W. J. Greenlee, W.H. Parsons, A.A. Patchett, P. Combs, A. Roth, R.D. Busch, T.N. Mellin, *J. Med. Chem.*, 1989, **32**, 1886.
- [7] B.C. Challis, J.N. Iley, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1987, 1489.
- [8] a) J. Baraniak, W.J. Stec, *Tetrahedron Lett.* 1991, **32**, 137; b) J. Baraniak, W.J. Stec, *Tetrahedron Lett.* 1991, **32**, 4193.

- [9] Robles, E. Pedroso, A. Grandas, *J. Org. Chem.*, 1995, **60**, 4856.
- [10] T. Moriguchi, T. Yanagi, T. Wada, M. Sekine, *Tetrahedron Lett.*, 1998, **39**, 3725.
- [11] T. Moriguchi, T. Yanagi, M. Kunimori, T. Wada, M. Sekine, *J. Org. Chem.*, 2000, **65**, 8229.
- [12] T. Moriguchi, N. Asai, T. Wada, K. Seio, T. Sasaki, M. Sekine, *Tetrahedron Lett.*, 2000, **41**, 5881.
- [13] N. Matsuura, R. Onose, H. Osada, *J. Antibiot.*, 1996, **49**, 361.
- [14] T. Moriguchi, N. Asai, K. Okada, K. Seio, T. Sasaki, M. Sekine, *J. Org. Chem.*, 2002, **67**, 3290.
- [15] A.J. Haines, C.B. Reese, R.A. Todd, *J. Chem. Soc.*, 1962, 140.
- [16] M. Sekine, K. Okada, K. Seio, H. Kakeya, H. Osada, T. Obata, T. Sasaki, *J. Org. Chem.*, 2004, **69**, 314.
- [17] Y. Ding, J. Wang, S.M. Schuster, N.G.J. Richards, *J. Org. Chem.*, 2002, **67**, 4372.
- [18] N.G.J. Richards, S.M. Schuster, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 1998, **72**, 145.
- [19] K. Kulik, E. Radzikowska, R. Kaczmarek, J. Baraniak, W.J. Stec, E. De Clercq, J. Balzarini, Ch. Pan-necouque, *Antivir Chem Chemother.*, 2011, **21**, 143.

Praca wpłynęła do Redakcji 12 czerwca 2013

DWUWYMIAROWA SEPARACJA TECHNIKAMI CHROMATOGRAFII I ELEKTROFOREZY ZE SZCZEGÓLNYM UWZGLĘDNIENIEM POŁĄCZENIA ICH W PROCES JEDNOETAPOWY

TWO-DIMENSIONAL SEPARATION WITH CHROMATOGRAPHY AND ELECTROPHORESIS TECHNIQUES WITH SPECIAL FOCUS ON THEIR COMBINATION INTO SINGLE PROCESS

Eryk Łopaciuk^{*}, Tadeusz H. Dzido

*Zakład Chemii Fizycznej, Katedra Chemii, Uniwersytet Medyczny w Lublinie
ul. Chodźki 4A, 20-093 Lublin
e-mail*: eryk.lopaciuk@umlub.pl*

Abstract

Wprowadzenie

1. Techniki chromatograficzne wykorzystywane do celów preparatywnych
2. Chromatograficzne techniki dwuwymiarowe; 2.1. Chromatografia planarna dwuwymiarowa; 2.2. Chromatografia cieczowa kolumnowa dwuwymiarowa; 2.3. Połączenie technik chromatografii cieczowej wysokociśnieniowej i chromatografii cienkowarstwowej; 2.4. Chromatografia gazowa dwuwymiarowa; 2.5. Elektroforeza żelowa dwuwymiarowa; 2.6. Połączenie technik elektrochromatografii planarnej ciśnieniowej i chromatografii cienkowarstwowej
3. Elektroforeza i chromatografia cieczowa połączone ortogonalnie w jednoetapowy proces separacji; 3.1. Technika z przepływem fazy ruchomej wywołanym działaniem sił kapilarnych w warstwie fazy stacjonarnej; 3.2. Technika z przepływem fazy ruchomej wymuszonym ciśnieniem zewnętrznym; 3.3. Elektrochromatografia pierścieniowa ciągła; 3.4. Ortogonalna elektrochromatografia planarna ciśnieniowa – połączenie technik elektrochromatografii planarnej ciśnieniowej oraz chromatografii planarnej ciśnieniowej; 3.4.1. Elektrochromatografia planarna ciśnieniowa; 3.4.2. Chromatografia planarna ciśnieniowa; 3.4.3. Ortogonalna elektrochromatografia planarna ciśnieniowa
4. Techniki „pseudo-dwuwymiarowe”; 4.1. Elektrochromatografia ze zmianą miejsca dostarczenia próbki; 4.2. Mikro-elektroforeza swobodna dwuwymiarowa; 4.3. Ogniskowanie izoelektryczne z ciągłym przepływem

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

Eryk Łopaciuk, absolwent kierunku Fizyka (specjalność techniki komputerowe) Wydziału Fizyki Uniwersytetu w Białymstoku oraz kierunku Fizyka (specjalność fizyka doświadczalna) Wydziału Matematyki, Fizyki i Informatyki Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. W 2010 roku rozpoczął studia doktoranckie na Wydziale Farmacji z Oddziałem Analityki Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. Obecnie zajmuje się badaniami nad konstrukcją urządzenia do ortogonalnej elektrochromatografii planarnej ciśnieniowej i jego wykorzystaniem do ciągłego rozdzielania mieszanin substancji.

Tadeusz H. Dzido, prof. nadzw. Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, urodzony w 1950 r., ukończył studia chemiczne na Uniwersytecie Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie w 1973 r. Uzyskał stopnie naukowe: doktora n. chemicznych – 1980 r., doktora habilitowanego n. chemicznych – 2003 r., oraz tytuł profesora n. farmaceutycznych – 2012 r. Jest kierownikiem Zakładu Chemii Fizycznej Katedry Chemii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. Własne zainteresowania badawcze: mechanizm retencji i selektywności rozdzielania substancji, głównie biologicznie aktywne, w chromatografii cieczowej (HPLC, TLC/HPTLC), mechanizm migracji i selektywności rozdzielania stref substancji w elektrochromatografii planarnej, optymalizacja warunków rozdzielania wspomnianymi technikami, analiza farmaceutyczna i biomedyczna z wykorzystaniem technik chromatograficznych, konstrukcje komór do chromatografii cienkowarstwowej, elektrochromatografii planarnej ciśnieniowej (PPEC) i ortogonalnej elektrochromatografii planarnej ciśnieniowej. Autor/współautor 95 prac naukowych, 25 patentów. Jest jednym z redaktorów *Journal of Planar Chromatography*, należy do Naukowego Komitetu Redakcyjnego *Acta Chromatographica*.

ABSTRACT

Liquid chromatography and electrophoresis techniques are very often applied in contemporary laboratory practice. These techniques usually show different separation selectivity. It is due to various separation mechanisms involved in these two modes. In the former, partition of solutes between stationary and mobile phases influences on separation selectivity and retention contrary to the latter in which electrophoretic effect is involved in separation mechanism. The features mentioned are very useful for combination of these two techniques into two-dimensional separation of complicated samples of biomedical and environmental origin. Development of such approach is a very promising for contemporary separation sciences.

The paper presents an overview of two-dimensional separation techniques, in which both liquid chromatography and electrophoresis have been involved especially in continuous mode.

Keywords: two dimensional separation, electrophoresis, electrochromatography, liquid chromatography, continuous two-dimensional separation

Słowa kluczowe: separacja dwuwymiarowa, elektroforeza, elektrochromatografia, chromatografia cieczowa, rozdzielanie dwuwymiarowe ciągłe

WPROWADZENIE

Metody chromatograficzne i elektroforetyczne są bardzo szeroko włączone w proces analizy farmaceutycznej i biomedycznej oraz do mikropreparatywnego i preparatywnego izolowania oraz oczyszczania składników mieszanin substancji chemicznych. Pierwszy zakres zadań jest realizowany za pomocą takich technik jak wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC), chromatografia gazowa (ang. *Gas Chromatography*, GC), chromatografia cienkowarstwowa/planarna (ang. *Thin Layer Chromatography/Planar Chromatography*, TLC), elektroforeza kapilarna (ang. *Capillary Electrophoresis*, CE), elektrochromatografia kapilarna (ang. *Capillary Electrochromatography*, CEC) oraz klasyczna elektroforeza żelowa płytkowa. Drugi obejmuje chromatografię cieczową preparatywną i mikropreparatywną, wykonywane technikami: chromatografii gazowej, chromatografii cieczowej kolumnowej elucyjnej (np. HPLC), chromatografii kolumnowej elucyjnej z fazą ruchomą w stanie nadkrytycznym (ang. *Supercritical Fluid Chromatography*, SFC), chromatografii cienkowarstwowej, elektroforezy żelowej, chromatografii planarnej ciśnieniowej (ang. *Overpressured Layer Chromatography*, OPLC).

W poszukiwaniu coraz lepszych efektywności i selektywności rozdzielania techniki chromatograficzne są łączone ze sobą, dając procesy dwuwymiarowe, które mogą być prowadzone jednocześnie lub kolejno jeden po drugim przy wykorzystaniu takich metod jak chromatografia planarna, gazowa oraz cieczowa, elektroforeza żelowa, elektrochromatografia planarna ciśnieniowa itp.

Oprócz łączenia klasycznych metod chromatograficznych bardzo cennymi są techniki oparte na połączeniu chromatografii z innymi technikami instrumentalnymi analizy chemicznej, a szczególnie ze spektrometrią mas. W literaturze fachowej można już łatwo znaleźć doniesienia o połączeniu wszystkich technik chromatograficznych z spektrometrią mas.

1. TECHNIKI CHROMATOGRFICZNE WYKORZYSTYWANE DO CELÓW PREPARATYWNYCH

W badaniach naukowych oraz przemyśle chromatografia zajmuje bardzo wysokie miejsce jako technika stosowana do rozdzielania, oczyszczania i zateżniania substancji, wchodzących w skład mieszanin prostych i/lub skomplikowanych. Często spotykanymi zastosowaniami chromatografii preparatywnej są izolacja i rozdzielanie mieszanin: białek i enzymów, produktów naturalnych pochodzenia roślinnego oraz zwierzęcego, izomerów optycznych, produktów syntezy leków, oraz lantanowców i transuranowców.

Najczęściej stosowaną techniką chromatograficzną preparatywną jest wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa kolumnowa, która charakteryzuje się największym zakresem zastosowań. Wadą tej metody jest brak możliwości ciągłego

dozowania próbki. Niedogodność ta została wyeliminowana dzięki zastosowaniu technik chromatografii cieczowej z fazą stałą (złożem) ruchomą (ang. *True Moving Bed*, TMB) lub pseudo-ruchomym złożem (ang. *Simulated Moving Bed*, SMB) [1]. Niestety, w takim przypadku nie można wykorzystywać elucji gradientowej. SMB nadaje się do rozdzielania małej liczby składników, najlepiej dwóch. Technika ta polega na równoległej pracy od kilku (minimum 8) do kilkunastu kolumn. Każda z nich, w procesie rozdzielania, znajduje się w innej fazie elucji, a poszczególne frakcje eluentu, zawierające rozdzielone substancje, są zbierane w sposób ciągły.

Do rozdzielania preparatywnego wykorzystywana jest również chromatografia gazowa. Jej układy charakteryzują się wysoką sprawnością. Niestety, poważną niedogodnością tej metody jest utrudnione odzyskiwanie substancji ze strumienia gazu nośnego oraz ograniczona ilość dozowanej próbki. Przy jej zwiększaniu spada znacząco sprawność kolumny chromatograficznej. Ten rodzaj chromatografii preparatywnej stosuje się najczęściej do izolacji składników olejków eterycznych oraz izolacji substancji zapachowych.

Jedną z nowocześniejszych metod jest chromatografia z fazą ruchomą w stanie nadkrytycznym. W tej technice substancje chromatografowane dają się dość łatwo oddzielić od fazy ruchomej w niskich temperaturach. Zmieniając temperaturę i gęstość fazy ruchomej można kontrolować retencję. Rozdzielane substancje są zbierane do naczyń ciśnieniowych, wypełnionych gazem obojętnym lub powietrzem. Za pomocą tej techniki rozdzielane są związki chemiczne o małej trwałości termicznej, małej lotności i stosunkowo dużych masach cząsteczkowych. Wadą tej metody jest dość skomplikowana aparatura oraz konieczność uwzględniania dużej liczby parametrów podczas realizowania procesu rozdzielania.

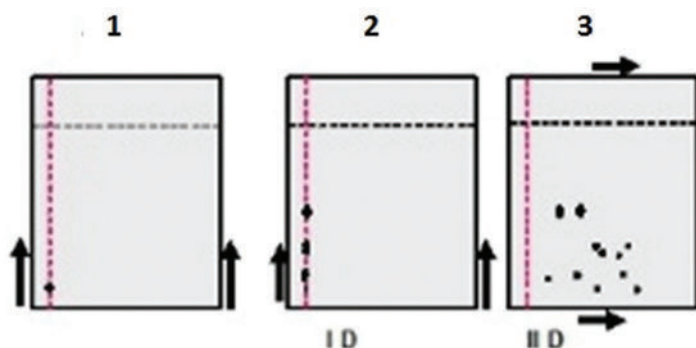
Najszybszą metodą do otrzymania niewielkich ilości substancji jest chromatografia cienkowarstwowa/planarna. Metodą tą można rozdzielać mniej skomplikowane mieszaniny, od kilku do kilkunastu składników, w zależności od rozmiaru płytki chromatograficznej. Po rozwinięciu chromatogramu przeprowadzana jest detekcja, najczęściej promieniowaniem ultrafioletowym, rozdzielonych stref substancji, pozostających w/na warstwie adsorbentu. Następnie strefy adsorbentu, zawierające substancje rozdzielone, są zdrapywane z płytki i w kolejnym etapie, eluowane odpowiednio dobranym rozpuszczalnikiem. Technika ta jest najczęściej wykorzystywana do pozyskiwania składników ekstraktów roślinnych. Zaletą TLC jest możliwość rozdzielania jednocześnie wielu różnych próbek. Poza tym technika ta umożliwia śledzenie stopnia rozdzielania składników na każdym etapie procesu separacji, a także pozwala na zatrzymanie procesu separacji w dowolnej i dogodnej dla operatora chwili. Często próbki z rozdzielanymi składnikami nie muszą być poddawane wstępnemu oczyszczeniu. Ponadto istotną zaletą tej techniki jest możliwość prowadzenia procesu rozdzielania zarówno w laboratoriach wysokobudżetowych, zaopatrzonych w specjalistyczną aparaturę, jak i o niskim finansowaniu.

2. CHROMATOGRAFICZNE TECHNIKI DWUWYMIAROWE

Dwuwymiarowe techniki chromatograficzne polegają na jednoczesnym lub kolejnym zastosowaniu, co najmniej, dwóch różnych mechanizmów i/lub metod rozdzielania składników mieszaniny. Jednakże o dwuwymiarowej separacji przy jednoczesnym zastosowaniu dwóch mechanizmów, i/lub metod, można mówić tylko wtedy, gdy te mechanizmy/metody są skierowane w różniące się kierunki, np. ortogonalnie.

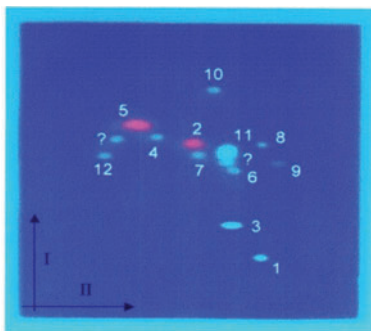
2.1. CHROMATOGRAFIA PLANARNA DWUWYMIAROWA

Technika TLC dwuwymiarowa jest wykorzystywana do rozdzielania substancji o podobnych właściwościach chemicznych. Próbkę mieszaniny substancji nanosi się na warstwę adsorbentu w jednym jej rogu i następnie rozwija chromatogram w pierwszym kierunku (Rys. 1). Po rozwinięciu chromatogramu, osusza się warstwę adsorbentu, obraca płytkę chromatograficzną o 90° i ponownie rozwija chromatogram, tym razem w drugim kierunku, przy użyciu roztworu fazy ruchomej o innym składzie jakościowym i/lub ilościowym. Po odparowaniu rozpuszczalnika uzyskuje się tzw. chromatogram dwuwymiarowy [2]. W niektórych wariantach, płytkę chromatograficzną można ponownie obrócić i rozwinąć kolejny chromatogram fazą ruchomą o zmienionym składzie. W ten sposób otrzymuje się trójwymiarową lub czterowymiarową [3, 4] mapę składników (Rys. 2). Głównymi zaletami TLC są: wszechstronność, szybkość oraz niskie koszty. Wadą natomiast możliwość zmiany składu fazy ruchomej w czasie rozwijania chromatogramu oraz wzrastające rozmycie stref substancji, powodowane zmniejszeniem szybkości przepływu fazy ruchomej w trakcie procesu chromatografowania.



Rysunek 1. Schemat dwuwymiarowego rozdzielania techniką chromatografii cienkowarstwowej; 1 – płytkę chromatograficzną z naniesioną strefą startową próbki, 2 – chromatogram po rozwinięciu w pierwszym wymiarze, 3 – chromatogram po rozwinięciu w drugim wymiarze

Figure 1. The scheme of two dimensional separation with planar chromatography: 1 – chromatographic plate with start solute zone, 2 – chromatogram after the development in the first dimension, 3 – chromatogram after the development in the second dimension

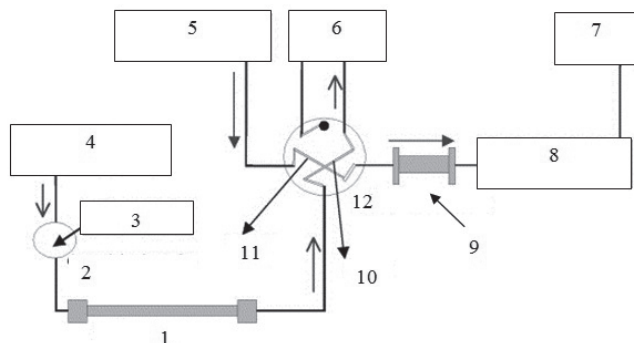


Rysunek 2. Płytkę chromatograficzną (HPTLC CN, Merck) po procesie dwuwymiarowego rozwijania chromatogramu (ang. *Two Dimensional Separation, 2D*) związków fenolowych (ekstrakt z Flos Sambuci). I faza ruchoma 60% acetonu w *n*-heksanie, II faza ruchoma 50% metanolu w wodzie; 1 – myricetyna, 2 – naryngena, 3 – luteolina, 4 – apigenina, 5 – akacetyna, 6 – hiperozyd, 7 – kwercetyna, 8 – naryngina, 9 – rutyna, 10 – hesperetyna, 11 – kwercytryna, 12 – astragalina [5]

Figure 2. Chromatographic plate (HPTLC CN, from Merck) after two dimensional separation (2D) of phenolic compounds (extract of Flos Sambuci), I dimension 60% acetone in *n*-hexane, and II dimension 50% methanol in water; 1 – myricetin, 2 – naringenin, 3 – luteolin, 4 – apigenin, 5 – acacetin, 6 – hyperoside, 7 – quercitrin, 8 – naringin, 9 – rutin, 10 – hesperetin, 11 – quercetin, 12 – astragalinalin [5]

2.2. CHROMATOGRAFIA CIECZOWA KOLUMNOWA DWUWYMIAROWA

W chromatografii kolumnowej dwuwymiarowość polega na tym, że część eluatu z pierwszej kolumny jest wprowadzana do drugiej (Rys. 3) [6–9]. W taki proces można włączyć więcej niż dwie kolumny [10]. Separacja taka może przebiegać metodą „off-line” lub „on-line”. W metodzie „off-line” poszczególne frakcje są zbierane „ręcznie” lub automatycznie do specjalnych pojemników kolektora i następnie wprowadzane (dozowane) do drugiej kolumny [11, 12]. Metoda ta jest, niestety, czasochłonna oraz występuje duże ryzyko zanieczyszczenia badanej próbki [13]. Posiada ona jednak również zalety takie jak: możliwość przygotowania kilku próbek oraz charakteryzuje się prostym wyposażeniem aparaturowym. W zestawie aparatury metody „on-line” występuje zawór przełączający, który umożliwia bezpośrednie przeniesienie wybranej frakcji eluatu do kolejnej kolumny [12]. Zaletą tej techniki jest znacząca poprawa precyzji oraz skrócenie czasu analizy [11, 12]. Niestety, specjalna aparatura wykorzystywana w tej technice jest dość droga.

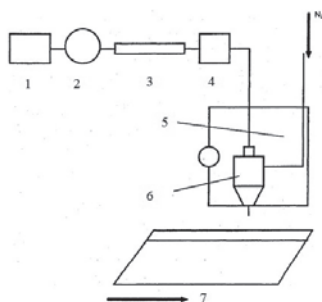


Rysunek 3. Schemat zestawu do prowadzenia procesu dwuwymiarowego rozdzielania techniką HPLC: 1 – pierwsza kolumna, 2 – zawór dozujący pierwszy, 3 – próbka, 4 – pierwsza pompa, 5 – druga pompa, 6 – ścieki, 7 – komputer, 8 – detektor UV, 9 – druga kolumna, 10 – druga pętla, 11 – pierwsza pętla, 12 – zawór dozujący drugi [6]

Figure 3. The scheme of a device for two-dimensional separation with HPLC technique : 1 – 1st column, 2 – 1st injection valve, 3 – sample, 4 – 1st pump, 5 – 2nd pump, 6 – waste, 7 – PC, 8 – detector UV, 9 – 2nd column, 10 – 2nd loop , 11 – 1st loop, 12 – 2nd injection valve [6]

2.3. POŁĄCZENIE TECHNIK CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ WYSOKOCIŚNIENIOWEJ I CHROMATOGRAFII CIENKOWARSTWOWEJ

Rozdzielanie składników badanej mieszaniny za pomocą połączonych technik chromatografii cieczowej wysokociśnieniowej i cienkowarstwowej można przeprowadzić z wykorzystaniem dwóch układów chromatograficznych z różnymi fazami stacjonarnymi. Eluat z kolumny HPLC (np. układu faz odwróconych) jest bezpośrednio nanoszony na płytkę chromatograficzną z żelom krzemionkowym (Rys. 4). Wzrost efektywności rozdzielania uzyskuje się dzięki połączeniu dwóch układów, faz odwróconych (ang. *Reverse Phase*, RP) i normalnych (ang. *Normal Phase*, NP), które posiadają różne charakterystyki selektywności [14].

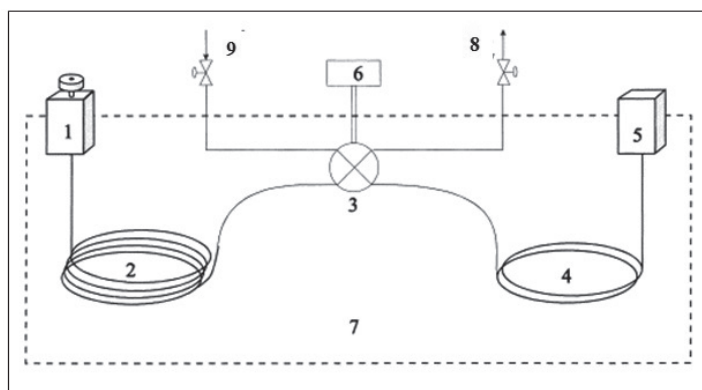


Rysunek 4. Schemat zestawu połączenia technik HPLC i TLC w dwuwymiarowym procesie rozdzielania: 1 – pompa, 2 – dozownik, 3 – mikrokolumna, 4 – detektor UV, 5 – termostat, 6 – dozownik aerozolu, 7 – płytka chromatograficzna [14]

Figure 4. The scheme of a device for two-dimensional separation with HPLC and TLC techniques: 1 – pump, 2 – injection valve, 3 – microcolumn, 4 – detector UV, 5 – thermostat, 6 – aerosol applicator, 7 – chromatographic plate [14]

2.4. CHROMATOGRAFIA GAZOWA DWUWYMIAROWA

W dwuwymiarowej chromatografii gazowej (2D GC) anality opuszczające kolumnę są zbierane w sposób ciągły i stopniowo dozowane do drugiej kolumny, która charakteryzuje się inną selektywnością rozdzielania [15–20]. Kolumny są połączone specjalnym łącznikiem (modulatorem) (Rys. 5), który pobiera frakcje z I kolumny a następnie okresowo wstrzykuje je do II kolumny, z odpowiednią częstotliwością, zapobiegającą ponownemu połączeniu się stref substancji z różnych frakcji. „Sercem” takiej techniki jest modulator. Wyróżnia się dwa rodzaje modulatorów: termiczne (z ogrzewaniem i/lub z chłodzeniem) oraz zaworowe [15]. Do zalet dwuwymiarowej chromatografii gazowej można zaliczyć podwyższoną zdolność rozdzielczą oraz czułość.



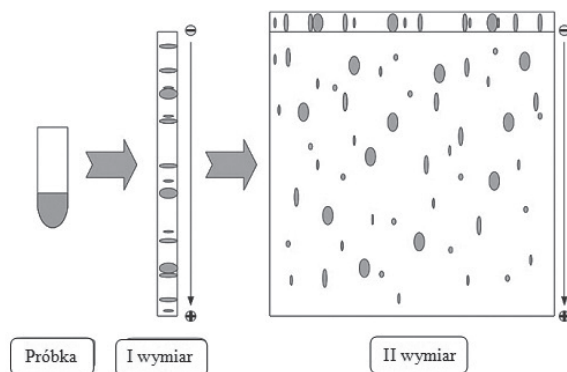
Rysunek 5. Schemat zestawu do dwuwymiarowej chromatografii gazowej (2D GC) z modulatorem zaworowym, 1 – dozownik, 2 – kolumna rozdzielcza wymiaru pierwszego, 3 – zawór, 4 – kolumna rozdzielcza wymiaru drugiego, 5 – detektor, 6 – sterownik zaworu, 7 – termostat, 8 – dzielnik przepływu, 9 – dostarczanie helu [21]

Figure 5. The schematic view of a device for two-dimensional separation with gas chromatography technique (2D GC) with valve modulator, 1 – injector, 2 – column of the first dimension, 3 – valve, 4 – column of the second dimension, 5 – detector, 6 – valve controller, 7 – GC oven, 8 – flow split, 9 –helium supply [21]

2.5. ELEKTROFOREZA ŻELOWA DWUWYMIAROWA

Elektroforeza żelowa dwuwymiarowa jest jedną z podstawowych technik wykorzystywanych w proteomice i genomice. Metoda ta swoją atrakcyjność zawdzięcza wysokiej rozdzielczości oraz selektywności rozdzielania ze względu na dwie niezależne od siebie cechy białek: punkt izoelektryczny (zależność ładunku makrocząsteczek od pH środowiska) oraz masę cząsteczkową (Rys. 6) [22]. Przy wykorzystaniu jednej warstwy żelu można rozdzielać nawet do 10 000 białek. Żel, na którym nastąpiła separacja, należy sfotografować, ponieważ dość szybko zmienia on swoje właściwości. Komputerowa analiza obrazu ułatwia ustalenie położenia stref protein

rozdzielonych. W kolejnym etapie z płytki żelowej wycinane są strefy z rozdzielonymi białkami w celu poddania ich dalszym badaniom. Operacja ta może być wykonana ręcznie lub przy użyciu specjalnych robotów. Metoda ta wymaga jeszcze wielu udoskonaleń, dotyczących pełnej automatyzacji, czy lepszego (dokładniejszego) oprogramowania do analizy dwuwymiarowych elektroferogramów na żelu.

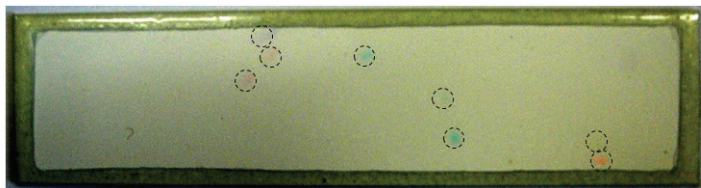


Rysunek 6. Schemat eksperymentu dwuwymiarowej elektroforezy żelowej. Składniki próbki są rozdzielane w pierwszym wymiarze za pomocą metody ogniskowania izoelektrycznego (ang. *Isoelectric Focusing*, IEF), w drugim wymiarze rozdzielanie następuje ze względu na zróżnicowanie wielkości cząsteczek i ich ładunku elektrycznego [23]

Figure 6. The diagram of a two-dimensional gel electropherogram. In the first dimension a sample mixture is separated by the method of isoelectric focusing (IEF). In the second dimension separation is due to differences in particle size and electrical charge [23]

2.6. POŁĄCZENIE TECHNIK ELEKTROCHROMATOGRAFII PLANARNEJ CIŚNIENIOWEJ I CHROMATOGRAFII CIENKOWARSTWOWEJ

Technika elektrochromatografii planarnej ciśnieniowej (ang. *Pressurized Planar Electrochromatography*, PPEC) charakteryzuje się wysoką sprawnością, krótkim czasem prowadzenia procesu rozdzielania oraz inną selektywnością w stosunku do chromatografii cieczowej i elektroforezy [24]. Dlatego połączenie jej z wysokosprawną chromatografią cienkowarstwową (planarną) w dwuwymiarowy proces separacji (2D HPTLC/PPEC) jest bardzo atrakcyjne [25, 26]. W pierwszym etapie może być przeprowadzony proces rozwijania chromatogramu cienkowarstwowego, a następnie elektrochromatogramu techniką PPEC. Rysunek 7 przedstawia płytkę chromatograficzną po procesie dwuwymiarowego rozdzielania technikami HPTLC i PPEC. Technika PPEC jest stosunkowo nową i innowacyjną metodą, która jest również przedmiotem badań naszego zespołu [27–32]. Zgodnie z współczesnym stanem badań metoda ma pewne ograniczenia: brak płytek elektrochromatograficznych, dedykowanych wyłącznie tej technice, oraz brak aparatury komercyjnej, która obecnie istnieje tylko w postaci konstrukcji prototypów, opracowanych w laboratoriach badawczych, zajmujących się rozwojem PPEC.

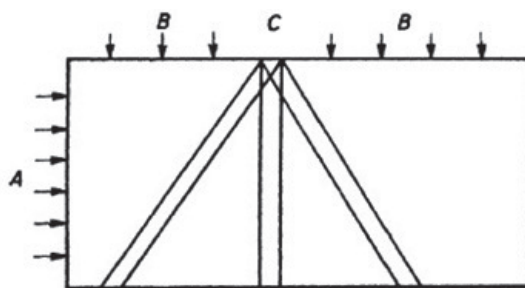


Rysunek 7. Płytkę chromatograficzną (HPTLC RP-18W, Merck) po procesie dwuwymiarowego rozdzielania technikami HPTLC i PPEC; 1 – rodamina 6G, 2 – PAR, 3 – błękit patentowy, 4 – zieleni S, 5 – azorubina, 6 – błękit brylantowy, 7 – czerwień Allura, 8 – czerń brylantowa [25]

Figure 7. The picture of the chromatographic plate (HPTLC RP-18W, Merck) after two-dimensional separation with HPTLC and PPEC techniques; 1 – rhodamine 6G, 2 – PAR, 3 – patent blue, 4 – green S, 5 – azorubine, 6 – brilliant blue, 7 – allura red, 8 – brilliant black [25]

3. ELEKTROFOREZA I CHROMATOGRAFIA CIECZOWA POŁĄCZONE ORTOGONALNIE W JEDNOETAPOWY PROCES SEPARACJI

Zasada prowadzenia jednocześnie dwóch procesów separacji z wykorzystaniem przepływu roztworu fazy ruchomej względem fazy stacjonarnej i pola elektrycznego prostopadłego do tego przepływu w procesie rozdzielania mieszaniny substancji została po raz pierwszy zaproponowana przez Svennsona i Brattstena [33]. Zasadę procesu przedstawia Rysunek 8. Pole elektryczne było przykładane w kierunku prostopadłym do przepływu fazy ruchomej. Strefy substancji migrowały, w zależności od znaku ładunku elektrycznego ich jonów, w kierunku anody lub katody. Składniki mieszaniny substancji były rozdzielane na frakcje, tworzące pasma, które były odchylane od kierunku przepływu fazy ruchomej pod różnymi kątami. Jeżeli w układzie był utrzymywany stały przepływ przy stałej wartości natężenia prądu, wtedy kąty poszczególnych frakcji nie zmieniały się w czasie procesu rozdzielania.



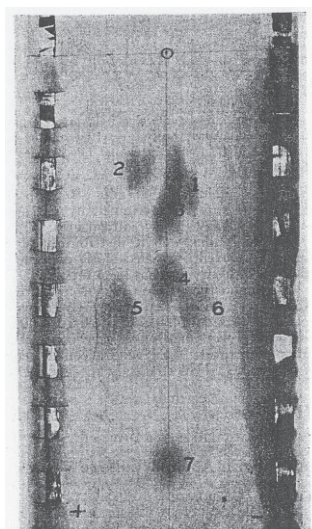
Rysunek 8. Zasada działania dwuwymiarowego rozdzielania z wykorzystaniem ciągłego i jednoczesnego biegu dwóch procesów ortogonalnych: chromatografii cieczowej i elektroforezy; A – kierunek pola elektrycznego, B – kierunek przepływu buforu (fazy ruchomej), C – wprowadzanie próbki [33]

Figure 8. Principle of an action of continuous two-dimensional separation with orthogonally combined and simultaneously performed liquid chromatography and electrophoresis; A – direction of electric field, B – direction of buffer (mobile phase) flow, C – sample introduction [33]

3.1. TECHNIKA Z PRZEPŁYWEM FAZY RUCHOMEJ WYWOŁANYM DZIAŁANIEM SIŁ KAPILARNYCH W WARSTWIE FAZY STACJONARNEJ

W początkowym etapie rozwoju tej techniki rozdzielanie substancji przeprowadzano w układach, w których fazę stacjonarną stanowiła warstwa papieru lub bibuły. Zatem w tej technice chromatografia podziałowa i elektroforeza były dwoma ortogonalnie i jednocześnie biegnącymi procesami.

W latach 50. XX w. badania nad taką techniką rozdzielania prowadzili Haugaard i Kroner [34]. Separację przeprowadzali z zastosowaniem bibuły, do której podłączali z obu stron elektrody aluminiowe, niklowe lub platynowe (Rys. 9). W takim układzie proces przebiegał, niestety, bardzo długo, trwał około 16–18 godz. przy różnicy potencjałów 100 V. Rozdzielana próbka zawierała mieszaninę aminokwasów.



Rysunek 9. Dwuwymiarowy elektrochromatogram otrzymany przez Haugaarda i Kronera; 1 – lizyna, 2 – kwas asparginowy, 3 – seryna, 4 – glicyna, 5 – kwas glutaminowy, 6 – arginina, 7 – alanina [34]

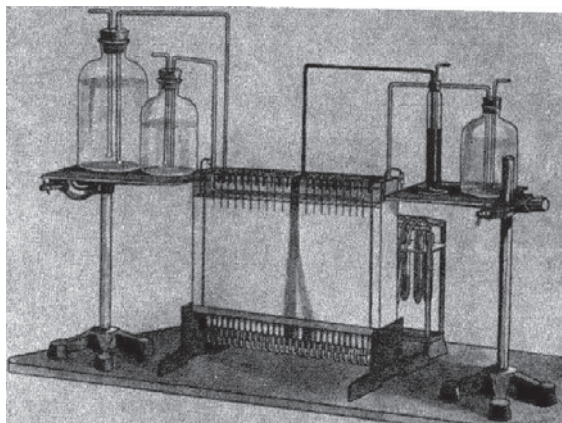
Figure 9. Two-dimensional electrochromatogram obtained by Haugaarda and Kroner; 1 – lysine, 2 – aspartic acid, 3 – serine, 4 – glycine, 5 – glutamic acid, 6 – arginine, 7 – alanine [34]

Do budowy pierwszego urządzenia do rozdzielania preparatywnego z ciągłym dozowaniem próbki i odbieraniem frakcji, opartego na powyższej zasadzie działania, Svensson i Brattsten użyli złoża z rozdrobnionego szkła, umieszczonego w ramie z plexiglasu (Rys. 10) [33]. Elektrolit oraz próbkę dostarczali za pomocą kolb Marriote'a. Elektrody przemywali kwasami i zasadami, aby uniknąć zmian pH, spowodowanych elektrolizą. Pierwsze próby rozdzielania barwników ukazały potrzebę dopracowania urządzenia pod względem stabilności warunków prowadzenia procesu (natężenia prądu oraz temperatury). Mould i Synge rozdzielili kilka kompleksów jodków skrobi, przy wykorzystaniu urządzenia tego typu [35]. Gras-

smann i Hanning skonstruowali urządzenie (Rys. 11) bardzo podobne do urządzenia Svenssona i Brattstena. Jedyną różnicę stanowiło zastosowanie bibuły zamiast rozdrobionego szkła [36]. Elektrody były zaciśnięte na bokach bibuły, której końce miały kształt wypustek (języczków). Każdy „języczek” odbierał inną frakcję z układu. Próbkę można było dostarczać do układu rozdzielczego w trzech różnych miejscach: na środku oraz po bokach, w pobliżu elektrod. Autorzy rozdzielali białka surowicy ludzkiej, aminokwasy oraz barwniki [37]. Firma Bender and Hobein sprzedawała powyższe urządzenie pod nazwą Elphor V.

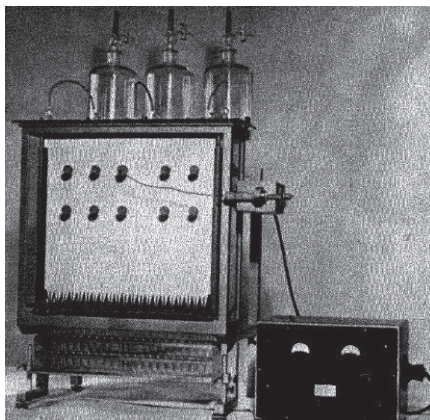
Kolejnym etapem rozwoju badań nad konstrukcją tego typu urządzeń była aparatura Straina i Sullivana (Rys. 12) [38, 39]. Autorzy zastosowali w niej bibułę o około 3 mm grubości, umieszczoną wraz z elektrodami pomiędzy dwiema szklanymi płytami. Boki bibuły pokryli parafiną. Miejsce dozowania próbki umieścili centralnie w górnej części urządzenia. Zamontowane w dolnej części aparatury paski bibuły służyły do odprowadzania poszczególnych frakcji składników rozdzielanej mieszaniny. Zaletą tej aparatury było znaczące ograniczenie odparowania rozpuszczalnika oraz ulepszony system chłodzenia, co umożliwiło stosowanie większego natężenia prądu. Badania dowiodły, że optymalną fazą ruchomą w eksperymentach był roztwór octanu amonu. Za pomocą tej aparatury autorzy rozdzielali mieszaniny kationów metali [39].

Dotychczasowe urządzenia do jednoczesnego i ortogonalnego prowadzenia procesu elektroforezy i chromatografii posiadały elektrody umieszczone wzdłuż przeciwległych brzegów fazy stacjonarnej. Durrum umieścił elektrody w dwóch dolnych rogach warstwy bibuły, stanowiącej fazę stacjonarną (Rys. 13) [40]. W tym przypadku linie sił pola elektrycznego miały kształt łuków. Takie rozmieszczenie elektrod miało wyeliminować lub znacznie ograniczyć zanieczyszczenie otrzymywanych frakcji składników rozdzielanej mieszaniny przez substancje wydzielające się na elektrodach. Urządzenie Durruma wykorzystał Grasmann do rozdzielania aminokwasów (Rys. 14) [41].



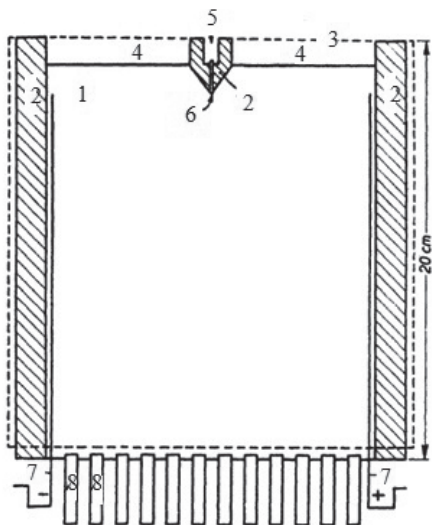
Rysunek 10. Aparatura Svenssona i Brattstena [33]

Figure 10. Apparatus after Svensson and Brattsten [33]



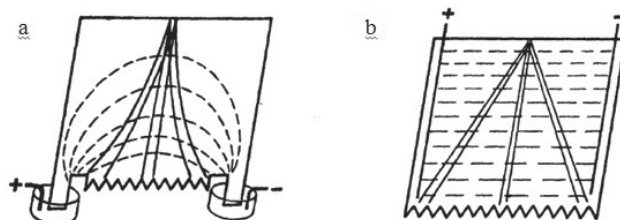
Rysunek 11. Aparatura (Elphor Va) Grassmanna i Hanniga oferowana przez Bender and Hobein (Monachium) – zaprojektowana do zbierania 48 frakcji [37]

Figure 11. The Elphor Va apparatus of Grassmann and Hanning commercialized by Bender and Hobein (Munich) – apparatus designed to give 48 fractions [37]



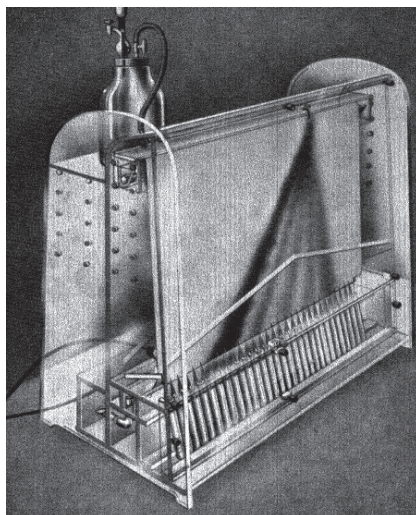
Rysunek 12. Schemat urządzenia Straina i Sullivana; 1 – bibuła, 2 – obszar bibuły zaimpregnowany parafiną, 3 – kontur płytki szklanej, 4 – zbiornik na bufor (roztwór fazy ruchomej), 5 – zbiornik roztworu próbki, 6 – knot z bibuły, 7 – platynowe elektrody, 8 – wypustki bibułowe do zbierania frakcji [38]

Figure 12. Conceptual view of a device by Strain and Sullivan; 1 – filter paper, 2 – regions of paper impregnated with paraffin, 3 – outline of glass plate, 4 – reservoir of buffer solution (mobile phase), 5 – solute mixture reservoir, 6 – paper wick, 7 – platinum electrodes, 8 – paper strips for fraction collection [38]



Rysunek 13. Schemat urządzeń z dwoma sposobami usytuowania elektrod; a) zakrzywione pole – metoda Durruma, b) pole jednorodne – metoda Svenssona i in. [40]

Figure 13. Diagram showing two modes of electrode arrangement; a) curved field – method of Durrum, b) linear field – method of Grassmann et al. [40]



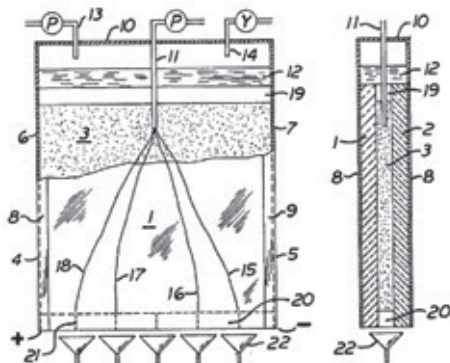
Rysunek 14. Aparatura zaprojektowana przez Durruma i oferowana przez Shandon Scientific (Londyn) [41]

Figure 14. The apparatus designed by Durrum and commercialized by Shandon Scientific (London) [41]

3.2. TECHNIKA Z PRZEPŁYWEM FAZY RUCHOMEJ WYMUSZONYM CIŚNIENIEM ZEWNĘTRZNYM

Dużym postępem w rozwoju dwuwymiarowych technik separacyjnych, wykorzystujących prostopadłe pole elektryczne do kierunku przepływu fazy ruchomej w warstwie adsorbentu, było skonstruowanie urządzenia, w którym faza ruchoma przemieszczała się pod ciśnieniem względem fazy stacjonarnej. Aparatura tego typu została skonstruowana i opatentowana przez E.L. Karlson'a (Rys. 15) [42]. W urządzeniu tym fazę stacjonarną stanowiła bibuła filtracyjna lub ziarno adsorbentu umieszczone pomiędzy dwoma szklanymi płytami. Faza ruchoma była dostarczana do zbiornika umieszczonego tuż nad górnym brzegiem fazy stacjonarnej. Górną część komory ciśnieniowej stanowiła specjalna poduszka powietrzna, służąca do tłoczenia fazy ruchomej przez złożo. Szklane płyty z poduszką powietrza

były umieszczone w specjalnej ramie, wyposażonej w elektrody. W górnej części urządzenia umieszczona została rurka, przez którą za pomocą specjalnej pompy, w sposób ciągły, dostarczano roztwór próbki składników rozdzielanych. Rozdzielone składniki mieszaniny zbierano do pojemników, umieszczonych w dolnej części aparatu (Rys. 15).



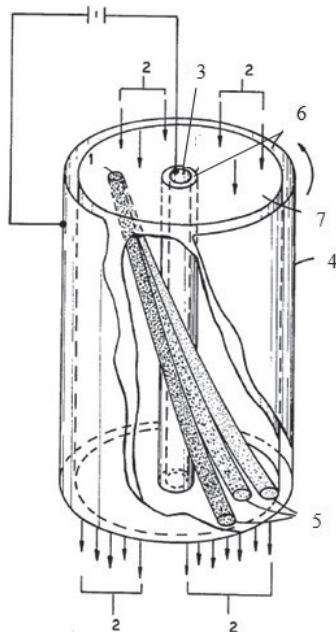
Rysunek 15. Urządzenie do ciągłej dwuwymiarowej elektrochromatografii wg Karlsona; 1, 2 – szklane płyty, 3 – złożo (faza stacjonarna), 4, 5 – metalowe kanały, 6, 7 – tkanina zabezpieczająca, 8, 9 – kołnierze, 10 – zbiornik górny, 11 – rurka doprowadzająca próbkę, 12 – filtr, 13 – pompa eluentu, 14 – zawór kontrolny, 15–18 – pasma rozdzielanych składników próbki, 19, 20 – paski przepuszczalne dla roztworu fazy ruchomej, 21 – gniazda, 22 – lejki do zbierania frakcji [42]

Figure 15. Apparatus for continuous two-dimensional electrochromatography by Karlson; 1, 2 – glass sheet, 3 – bed (stationary phase), 4, 5 – metal channels, 6, 7 – webs, 8, 9 – flanges, 10 – header box, 11 – sample tubing, 12 – filter, 13 – eluent pump, 14 – control valve, 15–18 – separated solute zones, 19, 20 – fluid transfusable strips, 21 – slots, 22 – funnels for collecting the separated components [42]

3.3. ELEKTROCHROMATOGRAFIA PIERŚCIENIOWA CIĄGŁA

Przykład urządzenia, do dwuwymiarowej ciągłej separacji z wymuszonym przepływem fazy ruchomej i polem elektrycznym prostopadłym do tego przepływu, w którym faza stacjonarna tworzy formę cylindryczną, jest przedstawiony na Rysunku 16. [43] Metoda ta została nazwana elektrochromatografią pierścieniową ciągłą (ang. *Continuous Annular Electrochromatography, CAEC*). Urządzenie składa się z dwóch elektrod w kształcie cylindrów oraz dwóch cylindrycznych ścianek, między którymi była umieszczona faza stacjonarna. Przestrzeń pomiędzy ściankami i elektrodami służyła, jako miejsce, do którego wprowadzano ciecz chłodzącą. Podczas procesu elektrochromatograficznego elektrody, zarówno wewnętrzna, jak i zewnętrzna, pozostawały w miejscu, rotowało jedynie złożo adsorbentu. Eluent podawano od góry. Po przepłynięciu mieszaniny przez układ chromatograficzny poszczególne frakcje zbierano do pojemników kolektora frakcji. W omawianym przykładzie istniała możliwość sterowania szybkością przepływu eluentu. Do regulacji szybkości przepływu fazy ruchomej uży-

wano gazu, który doprowadzano do górnej części urządzenia (nie widocznej na Rysunku 16). Każdy składnik mieszaniny rozdzielanej posiadał określone miejsce opuszczania kolumny, opisane przez kąt, θ , i dystans, r , (odległość od osi kolumny), które zależą od powinowactwa substancji rozdzielanych do faz układu i właściwości elektrokinetycznych. Podczas separacji mieszaniny bardziej złożonej należy zwiększyć liczbę odbieralników, których miejsce zamontowania było wyznaczane przy wykorzystaniu odpowiednich równań. Opisane urządzenie zostało wykorzystane do rozdzielania hemoglobiny wołowej oraz skrobi.



Rysunek 16. Schemat urządzenia do ciągłej elektrochromatografii pierścieniowej; 1 – miejsce wprowadzenia próbki, 2 – eluent, 3 – elektroda wewnętrzna, 4 – elektroda zewnętrzna, 5 – pasma substancji rozdzielanych, 6 – zbiornik na ciecz chłodzącą, 7 – złożo adsorbentu [43]

Figure 16. Apparatus for continuous annular electrochromatography; 1 – sample feed, 2 – eluent, 3 – inner electrode, 4 – outer electrode, 5 – solute zones, 6 – cooling liquid reservoir, 7 – adsorbent [43]

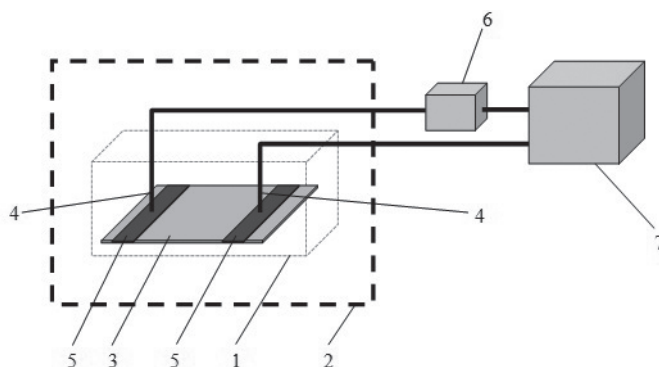
3.4. ORTOGONALNA ELEKTROCHROMATOGRAFIA PLANARNA CIŚNIENIOWA – POŁĄCZENIE TECHNIK ELEKTROCHROMATOGRAFII PLANARNEJ CIŚNIENIOWEJ ORAZ CHROMATOGRAFII PLANARNEJ CIŚNIENIOWEJ

Ortogonalna elektrochromatografia planarna ciśnieniowa (ang. *Orthogonal Pressurized Planar Electrochromatography*, OPPEC) jest nową techniką elektrochromatograficzną, która stanowi połączenie dwóch technik rozdzielczych, elektroforezy, a właściwie elektrochromatografii planarnej ciśnieniowej, oraz chromatografii planarnej ciśnieniowej, przy czym procesy elektroforezy/elektrochromatografii i chromatografii przebiegają równocześnie i ortogonalnie względem siebie. Technika

ta została po raz pierwszy zaprezentowana przez nasz zespół podczas 29. Międzynarodowego Sympozjum Chromatografii w 2012 r. w Toruniu. Ponieważ jest ona połączeniem technik PPEC i OPEC, więc zostaną one wstępnie omówione przed podaniem informacji o technice OPPEC.

3.4.1. ELEKTROCHROMATOGRAFIA PLANARNA CIŚNIENIOWA

Pierwsza praca dotycząca techniki elektrochromatografii planarnej ciśnieniowej (elektrochromatografii planarnej w układzie zamkniętym) ukazała się w 2004 r. [44]. Zatem PPEC jest względnie nową techniką rozdzielczą, w której do separowania substancji wykorzystywane są procesy elektroforezy i podziału substancji pomiędzy dwie fazy, ruchomą i nieruchomą. Proces rozdzielania prowadzony jest w specjalnej komorze (Rys. 17), w której na warstwę adsorbentu płytki chromatograficznej, przykrytej folią teflonową, wywierane jest ciśnienie za pomocą specjalnej przykrywy. Przepływ fazy ruchomej jest generowany działaniem pola elektrycznego, które powstaje po przyłożeniu potencjału do elektrod znajdujących się przy przeciwległych brzegach płytki chromatograficznej. W najnowszym prototypie urządzenia oba procesy, zwilżanie warstwy adsorbentu płytki chromatograficznej i rozwijanie elektrochromatogramu, są realizowane w jednej komorze urządzenia do PPEC [45]. Wcześniej te procesy były wykonywane w odrębnych urządzeniach [30]. Przedstawiona konstrukcja urządzenia do PPEC pozwala na szczelne zamknięcie warstwy adsorbentu, i dzięki temu, wyeliminowanie udziału fazy gazowej z procesu rozdzielania, w przeciwieństwie do tego, jak to ma miejsce w chromatografii cienkowarstwowej. Proces rozdzielania techniką PPEC jest prowadzony w płaskiej kolumnie i jest analogiczny do procesu separacji realizowanego techniką elektrochromatografii kapilarnej. Wyniki zaprezentowane w opublikowanych pracach pokazują, że technikę PPEC charakteryzuje wyższa powtarzalność uzyskiwanych wartości dystansu migracji rozdzielanych stref substancji w stosunku do tych, otrzymywanych za pomocą wcześniejszej wersji tej techniki, wykonywanej w układzie otwartym, i znanej pod nazwą elektrochromatografii planarnej (ang. *Planar Electrochromatography*, PEC). Ponadto, w porównaniu do zwykłej chromatografii cienkowarstwowej, PPEC charakteryzuje się dużo krótszym czasem separacji oraz większą sprawnością [24].



Rysunek 17. Uproszczony schemat zestawu do elektrochromatografii planarnej ciśnieniowej; 1 – komora do PPEC, 2 – kabina zabezpieczająca, 3 – płytka chromatograficzna, 4 – elektroda, 5 – zbiornik fazy ruchomej, 6 – amperomierz, 7 – zasilacz wysokonapięciowy

Figure 17. Conceptual view of a device for pressurized planar electrochromatography: 1 – chamber for PPEC, 2 – cabinet for PPEC chamber, 3 – chromatographic plate, 4 – electrodes, 5 – reservoir of the mobile phase, 6 – ammeter, 7 – high voltage power supply

3.4.2. Chromatografia planarna ciśnieniowa

W chromatografii planarnej ciśnieniowej faza ruchoma jest tłoczona przez złożę adsorbentu na płytce chromatograficznej za pomocą pompy wysokociśnieniowej, np. do HPLC [46]. W chromatografii planarnej ciśnieniowej, podobnie jak w elektrochromatografii planarnej ciśnieniowej, została wyeliminowana faza gazowa z układu separacyjnego. Proces rozdzielania techniką OPLC można przeprowadzać stosując niskie (2–5 atm.), średnie (10–30 atm.) bądź wysokie (50–100 atm.) ciśnienie. Stosowane ciśnienie zależy głównie od rodzaju fazy stacjonarnej oraz zastosowanej fazy ruchomej. Strefy rozdzielonych składników mieszaniny mogą pozostać w warstwie adsorbentu płytki chromatograficznej, lub mogą być eluowane poza układ separacyjny tak, jak to jest prowadzone w typowych technikach kolumnowych. W sprzedaży dostępny jest aparat Personal OPLC Basic System 50 (Rys. 18) [47], który jest wykorzystywany do separacji analitycznych oraz preparatywnych.



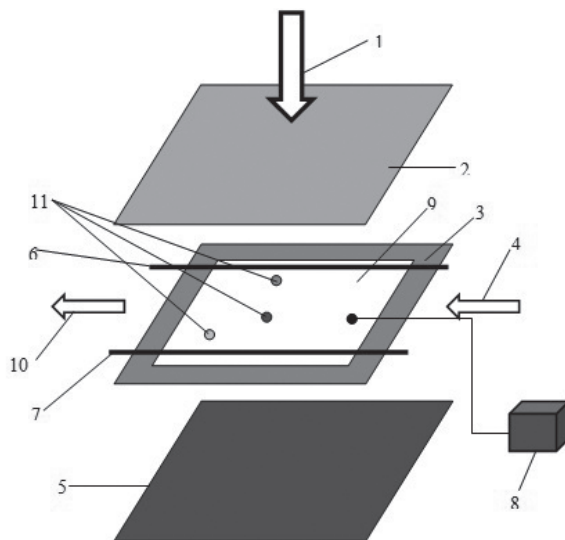
Rysunek 18. Urządzenie do chromatografii planarnej ciśnieniowej, Personal OPLC Basic System 50 [48]

Figure 18. Device for overpressurized layer chromatography, Personal OPLC Basic System 50 [48]

3.4.3. Ortogonalna elektrochromatografia planarna ciśnieniowa

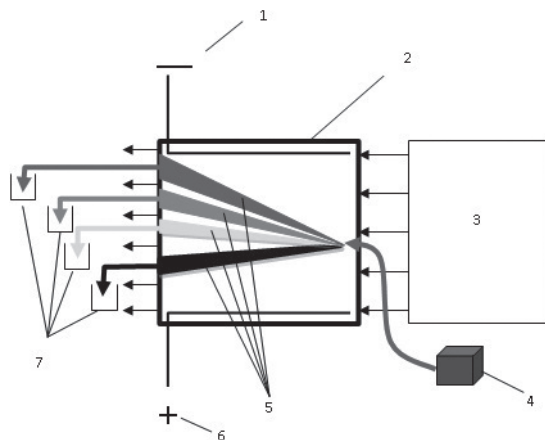
Nie ma jeszcze doniesień literaturowych na temat urządzenia wykorzystującego jednocześnie i ortogonalne prowadzenie procesów elektrochromatografii planarnej ciśnieniowej i chromatografii planarnej ciśnieniowej. Natomiast znane są przykłady kolejnego zastosowania technik PPEC i TLC do dwuwymiarowego rozdzielania mieszanin substancji [25, 26]. Takie podejście charakteryzuje się wysoką efektywnością, wynikającą głównie z odmiennej selektywności rozdzielania zastosowanych układów PPEC i TLC. W celu powiększenia tej efektywności nasz zespół podjął badania nad skonstruowaniem urządzenia, które umożliwiłoby jednocześnie prowadzenie dwuwymiarowej separacji przy wykorzystaniu technik PPEC i OPLC. W nowej technice roztwór fazy ruchomej jest tłoczony w jednym kierunku poprzez złożę fazy stacjonarnej (warstwę adsorbentu płytki chromatograficznej), a pole elektryczne jest przyłożone w kierunku prostopadłym do kierunku migracji fazy ruchomej. Mieszanina składników rozdzielanych może być wprowadzana, impulsowo lub ciągle, do układu rozdzielczego w pobliżu brzegu warstwy adsorbentu, do którego jest dostarczany roztwór fazy ruchomej. W ten sposób tworzy się układ separacyjny, dwuwymiarowy, w którym przebiegają jednocześnie dwa procesy ortogonalne, chromatografia cieczowa (chromatografia planarna ciśnieniowa) i elektroforeza, wpływające w różny sposób na selektywność rozdzielania. Mechanizm rozdzielania substancji w pierwszym procesie (chromatografii planarnej ciśnieniowej) odbywa się przy wykorzystaniu zróżnicowanego podziału składników próbki pomiędzy dwie fazy, stacjonarną i ruchomą. Natomiast w drugim kierunku do mechanizmu rozdzielania włączony jest proces elektroforezy (efekt elektroosmozy fazy ruchomej jest tu zablokowany z powodu zamknięcia układu w kierunku zgodnym z liniami sił pola elektrycznego). Schemat urządzenia i jego zasadę działania ilustrują Rysunki 19 i 20, odpowiednio do celów rozdzielania analitycznego i preparatywnego.

Nasz zespół skonstruował prototypowe urządzenie do OPPEC, którego główny element, komora ciśnieniowa, jest pokazany na Rysunku 19. W skład urządzenia wchodzi ponadto zasilacz wysokonapięciowy, pompa wysokociśnieniowa, dozownik pętlowy, pompa hydrauliczna, ultratermostat. Należy przyznać, że główną trudnością konstruowania urządzenia było zaprojektowanie uszczelnienia warstwy adsorbentu oraz komór elektrodowych, które zapobiegałyby migracji fazy ruchomej w niepożądanym kierunku. Mamy nadzieję, że czytelnicy zrozumieją brak szczegółów na ten temat, ponieważ nasze opracowanie jest przedmiotem prac nad zgłoszeniem patentowym. Na Rysunku 21. jest przedstawiony przykład rozdzielania pasmowego mieszaniny dwuskładnikowej barwników.



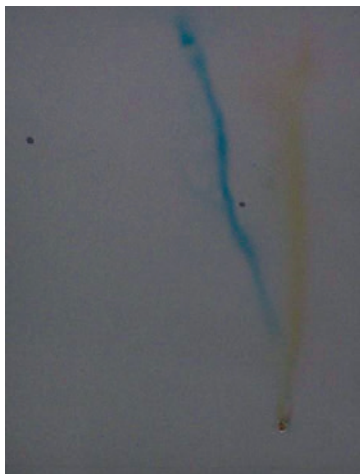
Rysunek 19. Schemat urządzenia OPPEC do pracy w trybie analitycznym; 1 – siłownik hydrauliczny, 2 – przykrywa, 3 – margines uszczelniający warstwę adsorbentu płytki chromatograficznej, 4 – pompa tłocząca fazę ruchomą, 5 – podstawa, 6 – anoda, 7 – katoda, 8 – dozownik próbki, 9 – płytka chromatograficzna, 10 – odbieralnik fazy ruchomej, 11 – rozdzielone strefy składników próbki

Figure 19. The schematic view of a OPPEC device for application to analytical separation; 1 – hydraulic press, 2 – cover, 3 – special sealing margin of adsorbent layer of the chromatographic plate, 4 – mobile phase feed pump, 5 – base, 6 – anode, 7 – cathode, 8 – sample injector, 9 – chromatographic plate, 10 – mobile phase collector, 11 – separated zones of sample component



Rysunek 20. Schemat urządzenia OPPEC do pracy w trybie preparatywnym; 1 – katoda, 2 – płytka chromatograficzna, 3 – pompa tłocząca fazę ruchomą, 4 – dozownik próbki 5 – pasma substancji rozdzielanych, 6 – anoda, 7 – zbiorniki kolektora frakcji

Figure 20. The schematic view of a OPPEC device for application to preparative separation; 1 – cathode, 2 – chromatographic plate, 3 – mobile phase feed pump, 4 – sample injector, 5 – separated solute bands, 6 – anode, 7 – reservoirs of fraction collector



Rysunek 21. Pasmowe rozdzielanie dwuskładnikowej mieszaniny barwników metodą OPPEC

Figure 21. Zone separation of two dyes mixture with OPPEC technique

4. TECHNIKI „PSEUDO-DWUWYMIAROWE”

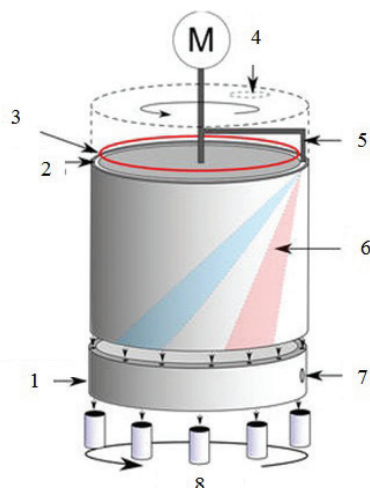
W literaturze fachowej są opracowania na temat technik rozdzielczych, które przypominają, swoim efektem separacji, proces dwuwymiarowy ciągły, ale w rzeczywistości nim nie są.

4.1. ELEKTROCHROMATOGRAFIA ZE ZMIANĄ MIEJSCA DOSTARCZANIA PRÓBKII

Interesującą koncepcję urządzenia do elektrochromatografii przedstawili Laskowski i in. z Uniwersytetu Technicznego w Kaiserslautern [49].

W początkowym etapie badań, w celu sprawdzenia zasady działania techniki, autorzy zbudowali urządzenie z warstwą adsorbentu, podobną do tej, jaka występuje na zwykłej płytce chromatograficznej. Faza stacjonarna została umieszczona pomiędzy dwoma płaskimi płytami szklanymi. Z umieszczonego na górze zbiorniczka, do złoża spływał elektrolit (faza ruchoma), którego migracja względem złoża była powodowana przez pole elektryczne, generowane przyłożonym do elektrod napięciem polaryzującym. Elektrody znajdowały się przy krawędziach górnej i dolnej warstwy adsorbentu. Do górnej części warstwy fazy stacjonarnej była dostarczana, w sposób ciągły, mieszanina rozdzielanych substancji. Przy czym, podczas procesu separacji miejsce dostarczania tej mieszaniny było przemieszczane wzdłuż górnej krawędzi złoża. W dolnej części układu separacyjnego były umieszczone kapilary do odprowadzania frakcji fazy ruchomej ze składnikami rozdzielanej mieszaniny. Podczas procesu rozdzielania strefy substancji formowały się w pasma, skierowane pod różnymi kątami do kierunku przepływu elektroosmotycznego fazy ruchomej.

Obecnie badania zespołu autorów są prowadzone przy wykorzystaniu urządzenia z fazą stacjonarną uformowaną w kształcie cylindra, co przedstawia Rysunek 22. Autorzy nazwali tę technikę elektrochromatografią pierścieniową ciągłą. Nazwa jest identyczna z wcześniej podaną [43] i przedstawioną w rozdziale 3.3. Należy jednak pamiętać, że proces rozdzielania badanej mieszaniny w obydwu urządzeniach przebiega inaczej.



Rysunek 22. Schemat urządzenia do elektrochromatografii pierścieniowej ciągłej; 1 – katoda, 2 – adsorbent, 3 – anoda, 4 – elektrolit, 5 – próbka, 6 – pasma rozdzielanych substancji, 7 – detektor UV/VIS, 8 – kolektor frakcji [49]

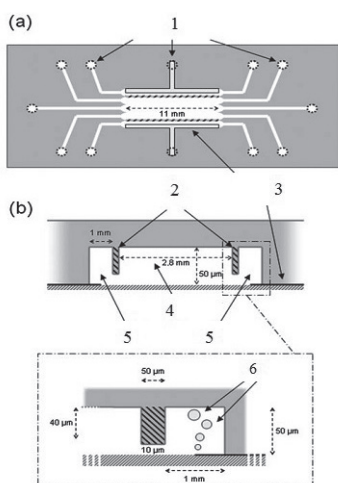
Figure 22. The schematic view of a device for continuous annular electrochromatography; 1 – cathode, 2 – adsorbent, 3 – anode, 4 – electrolyte, 5 – sample, 6 – separation bands, 7 – detector UV/VIS, 8 – fraction collector [49]

4.2. MIKRO-ELEKTROFOREZA SWOBODNA DWUWYMIAROWA

W dwuwymiarowej elektroforezie swobodnej (ang. *Two Dimensional Free Flow Electrophoresis*, 2D FFE) próbka jest wprowadzana pod ciśnieniem do płaskiej komory separacyjnej. Pole elektryczne jest przykładane prostopadle do kierunku przepływu fazy ruchomej, co powoduje odchylenie pasm analitów pod różnymi kątami do tego przepływu [50]. W przeciwieństwie do elektroforezy kapilarnej, próbka może być dostarczana w sposób ciągły do układu rozdzielczego. Technika ta ma zastosowanie do separacji preparatywnej peptydów [51], komórek [52, 53], składników komórek [54], enzymów [55, 56], białek [57–59]. Największym problemem, zakłócającym separację preparatywną tą techniką jest wydzielane ciepło Joule’a w trakcie procesu. Ten problem jest zminimalizowany w układach miniaturowych, tzw. mikroczipach.

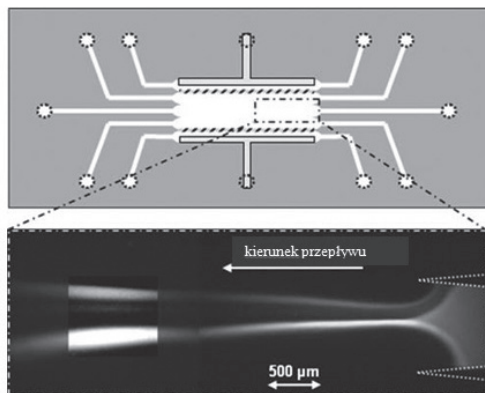
Urządzenie do takiej techniki, dwuwymiarowej mikro-elektroforezy swobodnej (ang. *Two Dimensional Microchip Free Flow Electrophoresis*, 2D μ FFE), posiada

następujące zalety: bardzo małe wymiary układu separacyjnego (co minimalizuje niekorzystne efekty generowanego ciepła Joule'a) bardzo krótki czas separacji, minimalne zużycie odczynników, bardzo małe ilości próbek analizowanych. Wydaje się, że najbardziej istotnym problemem prowadzenia procesu 2D μ FFE jest gromadzenie się pęcherzyków gazu na/przy elektrodach (Rys. 23) [60]. Pęcherzyki te mogą zakłócać przepływ strumienia analitu oraz pole elektryczne. W urządzeniach do rozdzielania analitycznego problem ten był rozwiązywany, m.in., poprzez zastosowanie membran jonowymiennych do oddzielania przestrzeni elektrodowej od pozostałej części układu rozdzielczego. Natomiast w urządzeniach mikro zastosowanie takich błon było praktycznie niemożliwe ze względów technicznych. Próbowano w różny sposób oddzielić pęcherzyki od układu rozdzielczego. Były to, między innymi, specjalne przegrody osłaniające elektrody. Rozwiązanie to powodowało ograniczanie przedostawania się pęcherzyków do przestrzeni układu separacyjnego, ale prowadziło do zwiększenia oporu elektrycznego przy elektrodzie, co skutkowało spadkiem napięcia polaryzującego pozostałej części roztworu (układu rozdzielczego) [61]. Inne warianty rozwiązywania problemu pęcherzyków gazu przy elektrodach zostały opisane w pracach [62–66]. Przykład urządzenia do 2D μ FFE, z przegrodami oddzielającymi przestrzeń elektrodową od układu rozdzielczego, jest przedstawiony na Rysunku 23, a na Rysunku 24 jest pokazany elektroferogram, uzyskany przy wykorzystaniu tego urządzenia [60].



Rysunek 23. Schemat urządzenia do μ FFE; a) przekrój poziomy urządzenia z portami połączeniowymi, b) przekrój wzdłużny urządzenia z powiększonym fragmentem, przedstawiającym komorę elektrodową z przegrodą; 1 – porty połączeniowe, 2 – przegrody, 3 – elektrody, 4 – komora separacyjna, 5 – kanały elektrodowe, 6 – pęcherzyki gazu [60]

Figure 23. Schematic view of μ FFE device; a) top view of a device with connection ports, b) longitudinal cross section of a device and expanded view of the electrode compartment with the partition; 1 – connecting ports, 2 – partitioning bars, 3 – electrode, 4 – separation chamber, 5 – electrode channel, 6 – gas bubbles [60]

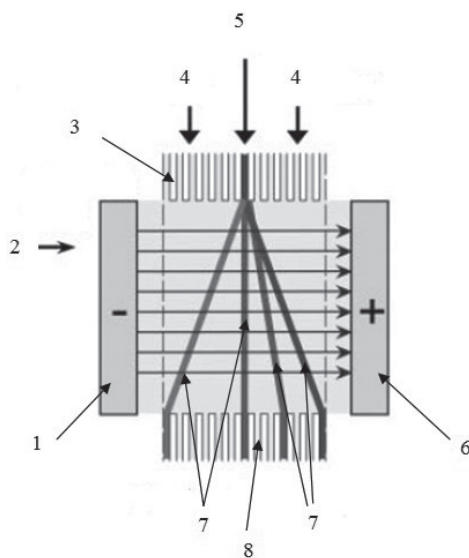


Rysunek 24. Rozdzielanie pasmowe fluoresceiny (dolne pasmo) oraz rodaminę 6G (górne pasmo) techniką 2D μ FFE [60]

Figure 24. Zone separation of fluorescein (lower band) and rhodamine 6G (upper band) with 2D μ FFE technique [60]

4.3. OGNISKOWANIE IZOELEKTRYCZNE Z CIĄGŁYM PRZEPŁYWEM

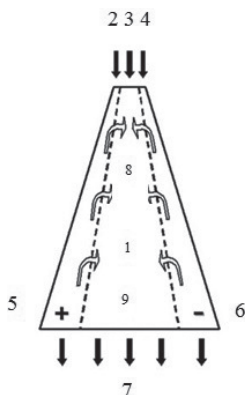
Zasada działania techniki ogniskowania izoelektrycznego z ciągłym przepływem fazy ruchomej (ang *Free-flow Isoelectric Focusing*, FF IEC) jest pokazana na Rysunku 25. Polega na zastosowaniu przepływu hydrodynamicznego roztworu fazy ruchomej w układzie separacyjnym, utworzonym w płaskim pojemniku i pola elektrycznego prostopadłego do tego przepływu. Przy czym roztwór fazy ruchomej charakteryzuje się gradientem pH w kierunku prostopadłym do przepływu hydrodynamicznego, a równoległym do linii sił pola elektrycznego [67]. Roztwór próbki rozdzielanych składników może być wprowadzany do takiego układu, punktowo, lub nawet na całej długości krawędzi wejściowej do układu separacyjnego. Składniki roztworu próbki są rozdzielane dzięki różnicy wartości ich pI (punkt izoelektryczny), a następnie zbierane do naczynek u wyjścia z układu rozdzielczego. W takim układzie roztwór na całym swym obszarze znajduje się pod wpływem jednakowego napięcia polaryzującego.



Rysunek 25. Schemat urządzenia do FF IEF; 1 – katoda, 2 – pole elektryczne, 3 – kanały wejściowe, 4 – bufor, 5 – próbka, 6 – anoda, 7 – pasma składników rozdzielanych, 8 – kanały wyjściowe [67]

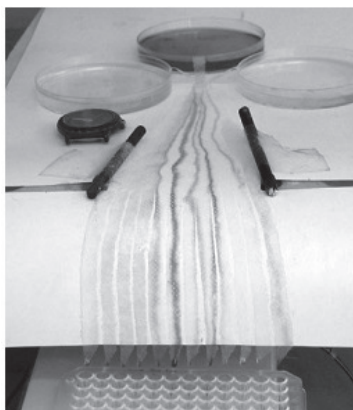
Figure 25. The scheme of a device for FF IEF; 1 – cathode, 2 – electric field, 3 – input channels, 4 – buffer, 5 – sample, 6 – anode, 7 – separation bands, 8 – outer channels [67]

W kolejnym etapie rozwoju FF IEC została opracowana technika izoelektrycznego ogniskowania z rozbieżnym przepływem fazy ruchomej (ang. *Divergent Isoelectric Focusing*, DF IEF) [68], która polega na wytworzeniu płaskiego rozbieżnego przepływu fazy ruchomej i rozdzielanych stref substancji, wchodzących w skład próbki badanej. Zostało to uzyskane poprzez zastosowanie różnej szerokości układu separacyjnego, tzn. wąskiej przy wejściu do układu i szerokiej przy wyjściu z układu (Rys. 26). Urządzenie zostało tak zaprojektowane, aby napięcie polaryzujące układ separacyjny ulegało zwiększeniu wraz ze zwiększaniem jego szerokości. W urządzeniu zastosowano materiał nośny fazy ruchomej w postaci specjalnej włókniny (PEGAS), która, w porównaniu do papieru i podobnych materiałów, wyróżnia się większą odpornością mechaniczną i chemiczną, małymi oporami wobec przepływu fazy ruchomej. Pierwsze próby rozdzielania zostały wykonane przy wykorzystaniu wzorcowej mieszaniny, zawierającej substancje różniące się barwą i wartościami pI: 3,3; 4,7; 6,2; 7,6; 11,0. Jako anolitu i katolitu użyto odpowiednio roztworów 0,05 M H_3PO_4 o przewodności właściwej 5,2 mS/cm, i 0,05 M NaOH o przewodności właściwej 11 mS/cm. Zastosowany nośnik (włóknina) charakteryzował się odpowiednimi: hydrofilowością, aby utrzymać wodny roztwór pomiędzy włóknami, i przepuszczalnością, aby umożliwić przepływ fazy ruchomej pod minimalnym hydrostatycznym ciśnieniem (Rys. 27). Została tu wykorzystana zasada ciągłości strugi przy odpowiedniej różnicy wysokości pomiędzy wejściem i wyjściem układu. Ukazało się szereg nowych prac na temat usprawnień urządzenia do DF IEF [68–70].



Rysunek 26. Schemat urządzenia do DF IEF; 1 – trapezoidalny obszar separacji, 2 – anolit, 3 – amfolit, 4 – katolit, 5 – anoda, 6 – katoda, 7 – wyjście układu rozdzielczego, 8 – obszar o wysokiej przewodności, 9 – obszar o niskiej przewodności [68]

Figure 26. The scheme of a device for DF IEF, 1 – trapezoidal separation area, 2 – anolyte, 3 – amfolite, 4 – catholyte, 5 – anode, 6 – cathode, 7 – exit of separation system, 8 – area of high conductivity, 9 – area of low conductivity [68]



Rysunek 27. Widok urządzenia do DF IEF [68]

Figure 27. View of a DF IEF device [68]

PODSUMOWANIE

Techniki wykorzystujące do rozdzielania składników mieszanin substancji dwa procesy elektroforezy i chromatografii, które są prowadzone jednocześnie i ortogonalnie, stanowią obiecujący kierunek rozwoju metod elektromigracyjnych separacyjnych, zarówno do celów rozdzielania analitycznego, jak i preparatywnego. Wydaje się, że szczególnie ortogonalna elektrochromatografia planarna ciśnieniowa, dzięki zastosowaniu wysokiego ciśnienia, może być tą techniką, która przyczyni się do znacznego zwiększenia efektywności prowadzenia takiego procesu rozdzielania.

PODZIĘKOWANIE

Niniejsza praca powstała w ramach realizacji projektu badawczego własnego finansowanego przez Narodowego Centrum Nauki, nr umowy 3473/B/H03/2011/40.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] A. Rajendran, G. Paredes, M. Mazzotti, J. Chromatogr. A, 2009, **1216**, 709.
- [2] Ł. Cieśla, M. Wakszudzka-Hajnos, J. Chromatogr. A, 2009, **1216**, 1035.
- [3] V.G. Berezkin, N. Yu. Kulakova, Zh. Fiz. Khim., 2009, **83**, 1961.
- [4] V.G. Berezkin, S.S. Khrbetova, N. Yu. Kulakova, Dok Phys. Chem., 2009, **429**, 229.
- [5] M.A. Hawrył, A. Hawrył, E. Soczewiński, J. Planar Chromatogr., 2002, **15**, 4.
- [6] A. van der Horst, P. J. Schoenmakers, J. Chromatogr. A, 2003, **1000**, 693.
- [7] D.R. Stoll, X. Li, X. Wang, P. W. Carr, S.E.G. Porter, S.C. Rutan, J. Chromatogr. A, 2007, **1168**, 3.
- [8] P. Jandera, J. Chromatogr. A, 2012, **1255**, 112.
- [9] I. Francois, K. Sandra, P. Sandra, Anal. Chim. Acta, 2009, **641**, 14.
- [10] L. Riggs, C. Sioma, F.E. Reginer, J. Chromatogr. A, 2001, **924**, 359.
- [11] P. Dugo, O. Favoino, R. Luppino, G. Dugo, L. Mondello, Anal. Chem., 2004, **76**, 2525.
- [12] P.Q. Tranchida, P. Dugo, G. Dugo, L. Mondello, J. Chromatogr. A, 2004, **1054**, 3.
- [13] P.I. Dobrev, L. Havlíček, M. Vágner, J. Malbeck, M. Kaminek, J. Chromatogr. A, 2005, **1075**, 159.
- [14] M.A. Hawrył, E. Soczewiński, T.H. Dzido, Chem. Anal. (Warsaw), 1999, **44**, 15.
- [15] J. Namieśnik, W. Chrzanowski, P. Szpinek, *Nowe horyzonty i wyzwania w analityce i monitoringu środowiskowym, Centrum Doskonałości Analityki i Monitoringu Środowiskowego*, Gdańsk, 2003.
- [16] T. Górecki, J. Harynyk, O. Panić, J. Sep. Sci., 2004, **27**, 359.
- [17] J. Hernan, B. Cortes, B. Winniford, J. Luong, M. Pursch, J. Sep. Sci., 2009, **32**, 883.
- [18] M. Edwards, A. Mostafa, T. Górecki, Anal. Bioanal. Chem., 2011, **40**, 2335.
- [19] T. Górecki, O. Panić, N. Oldridge, J. Liq. Chromatogr. Related Technol., 2006, **29**, 1077.
- [20] D. Ryan, P. Morrison, P. Marriott, J. Chromatogr. A, 2005, **1071**, 47.
- [21] J.B. Phillips, J. Beens, J. Chromatogr. A, 1999, **856**, 331.
- [22] R. Westermeier, T. Naven, H. Hopker, *Proteomics in practice: a guide to successful experimental design*, Wiley-VCH, 2008.
- [23] A. Suchwałko, H. Podbielska, Acta Bio-Opt. Inform. Med., 2010, **16**, 285.
- [24] P.W. Płocharz, P. Ślązak, A. Hałka-Grysińska, A. Chomiccki, T.H. Dzido, Wiad. chem., 2010, **64**, 61.
- [25] A. Chomiccki, P. Ślązak, T.H. Dzido, Electrophoresis, 2009, **30**, 3718.
- [26] A. Chomiccki, K. Kloc, T.H. Dzido, J. Planar Chromatogr., 2011, **24**, 1.
- [27] P.W. Płocharz, A. Klimek-Turek, T.H. Dzido, J. Chromatogr. A, 2010, **1217**, 4868.
- [28] B. Polak, A. Hałka, T.H. Dzido, J. Planar Chromatogr., 2008, **21**, 33.
- [29] A. Hałka, P.W. Płocharz, A. Torbicz, T.H. Dzido, J. Planar Chromatogr., 2010, **23**, 420.
- [30] P.W. Płocharz, T.H. Dzido, P. Ślązak, G.W. Józwiak, A. Torbicz, J. Chromatogr. A, 2007, **1170**, 91.
- [31] T.H. Dzido, P.W. Płocharz, P. Ślązak, Anal. Chem., 2006, **78**, 4713.
- [32] T.H. Dzido, P.W. Płocharz, A. Klimek-Turek, A. Torbicz, B. Buszewski, J. Planar Chromatogr., 2008, **21**, 295.
- [33] H. Svensson and I. Brattsten, Arkiv Kemi., 1949, **1**, 401.
- [34] G. Haugaard, T.D. Kroner, J. Am. Chem. Soc., 1948, **70**, 2135.
- [35] D.L. Mould, R. L. M Synge, Biochem J., 1954, **58**, 585.
- [36] W. Grassmann and K. Hannig, Z. Physiol. Chem., 1953, **292**, 32.
- [37] W. Grassmann, Naturwiss., 1951, **38**, 200.

- [38] T.R. Sato, W.P. Norris, H.H. Strain, *Anal. Chem.*, 1952, **24**, 776.
- [39] H.H. Strain, J.C. Sullivan, *Anal. Chem.*, 1951, **23**, 816.
- [40] M. Lederer, *An Introduction To Paper Electrophoresis And Related Methods*, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, London, New York, Princeton, 1957.
- [41] E.L. Durrum, *J. Am. Chem. Soc.*, 1951, **73**, 4875.
- [42] E.L. Karlson, United States Patent, Patent Number 4,315,812.
- [43] Ch.D. Scott, O. Ridge, Tenn., United States Patent, Patent Number 4,683,042.
- [44] D. Nurok, J.M. Koers, A.L. Novotny, M.A. Carmichael, J.J. Kosiba, R.E. Santini, G.L. Hawkins, R.W. Replogle, *Anal. Chem.*, 2004, **76**, 1690.
- [45] A. Hałka-Grysińska, P. Ślęzak, A. Torbicz, M. Sajewicz, T.H. Dzido, *Chromatographia*, 2013, **76**, 1271.
- [46] E. Tyihák, E. Mincsovcics, H. Kalász, *J. Chromatogr A.*, 1979, **174**, 75.
- [47] Operating Manual for Personal OPLC. OPLC-BS-50. Budapest: OPLC-NIT Co., 1994.
- [48] <http://www.microsolvytech.com/oplc.asp>.
- [49] R. Laskowski, H.J. Bart, H. Gruber-Wölfler, P. Feenstra, M.G. Braunbruck, J. Khinast, C. Hofmann, G. Menges, B. Werner, P. Löb, V. Hessel, 8th European Congress of Chemical Engineering (ECCE), Berlin, Germany, September 25–29, 2011.
- [50] M.C. Roman, P.R. Brown, *Anal. Chem.*, 1994, **66**, 86A.
- [51] Z. Pruski, V. Kasicka, P. Mudra, J. Stepanek, O. Smekal, J. Hlavack, *Electrophoresis*, 1990, **11**, 932.
- [52] K. Zeiller, R. Loser, G. Pascher, K. Hannig, Z. Hoppe-Syler's, *Physiol. Chem.*, 1975, **356**, 1225.
- [53] L.S. Rodkey, *Appl. Theor. Electrophor.*, 1990, **1**, 243.
- [54] R. Kessler, H.J. Manz, *Electrophoresis*, 1990, **11**, 979.
- [55] S. Hoffstetter-Kuhn, H. Wagner, *Electrophoresis*, 1990, **11**, 451.
- [56] S. Nath, H. Schutte, G. Weber, H. Hustedt, W.D Deckwer, *Electrophoresis*, 1990, **11**, 937.
- [57] K.A Knisley, L.S. Rodkey, *Electrophoresis*, 1990, **11**, 927.
- [58] M.J. Clifton, N. Jouve, H. de Balmann, V. Sanchez, *Electrophoresis*, 1990, **11**, 913.
- [59] M. Poggel, T. Melin, *Electrophoresis*, 2001, **22**, 1008.
- [60] S. Kohler, C. Weilbeer, S. Howitz, H. Becker, V. Beushausen, D. Belder, *Lab Chip*, 2011, **11**, 309.
- [61] C.X. Zhang, A. Manz, *Anal. Chem.*, 2003, **75**, 5759.
- [62] H. Lu, S. Gaudet, M.A. Schmidt, K.F. Jensen, *Anal. Chem.*, 2004, **76**, 5705.
- [63] K. Macounova, C.R. Cabrera, M.R. Holl, P. Yager, *Anal. Chem.*, 2000, **72**, 3745.
- [64] J.W. Albrecht, K.F. Jensen, *Electrophoresis*, 2006, **27**, 4960.
- [65] D. Kohlheyer, G.A.J. Besselink, S. Schlautmann, R.B.M. Schasfoort, *Lab Chip.*, 2006, **6**, 374.
- [66] D.P. de Jesus, L. Blanes, C.L. do Lago, *Electrophoresis*, 2006, **27**, 4935.
- [67] N. Pamme, *Lab Chip.*, 2007, **7**, 1644.
- [68] K. Slais, *Electrophoresis*, 2008, **29**, 2451.
- [69] M. Stastna, K. Slais, *Electrophoresis*, 2010, **31**, 433.
- [70] M. Stastna, K. Slais, *Electrophoresis*, 2008, **29**, 4503.

**WZÓR SCHERRERA
– STULECIE BŁĘDNYCH PRAKTYK
SCHERRER FORMULA
– THE CENTURY OF ERRONEOUS PRACTICES**

Paweł E. Tomaszewski

*Institut Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych
Polska Akademia Nauk
P. Nr 1410, 50-950 Wrocław 2
e-mail: p.tomaszewski@int.pan.wroc.pl*

Abstract
Tekst artykułu
Podziękowanie
Piśmiennictwo cytowane

Dr Paweł E. Tomaszewski jest fizykiem-krytalografem, absolwentem Uniwersytetu Wrocławskiego. Zajmuje się badaniami strukturalnych przemian fazowych, ostatnio w nanokryształach; jest autorem baz danych o tych przemianach. Równolegle zbiera i publikuje materiały dotyczące życia i działalności naukowej i społecznej prof. Jana Czochralskiego (1885–1953); ostatnio wydał obszerną biografię pt. „Powrót. Rzecz o Janie Czochralskim” (Oficyna Wydawnicza ATUT, Wrocław 2012; latem 2013 r. ukazało się jej tłumaczenie na język angielski – „Jan Czochralski restored”).

ABSTRACT

We present the sources of uncertainty in the evaluation of grain size in nano-material. The calculations are made for the same diffraction pattern using Scherrer and Williamson-Hall methods. As an example we use the CoCr_2O_4 nanocrystal. The comparison of results from different calculations, methods and programs is made just to show how important is the (correct) choice of a method and its internal parameters. The data from well known Scherrer formula, show that the difference in obtained results exceeds 100% up to even about 350%. This indicates that in any case the Scherrer formula could not give the correct and reliable value for crystallite size. As a consequence, the wide use of this formula is a great error providing the incorrect results.

Keywords: Scherrer formula, nanomaterials, diffraction studies, grain size

Słowa kluczowe: Wzór Scherrera, nanomateriały, badania dyfrakcyjne, rozmiar kry-
stalitów

W dniu 26 lipca 1918 r. Peter Debye (1884–1966) przedstawił, na posiedzeniu Królewskiego Towarzystwa Naukowego w Getyndze, krótką pracę Paula Scherrera (1890–1969) z Instytutu Fizyki miejscowego Uniwersytetu [1], w której znalazło się zdanie, że teoria przewiduje iż szerokość połówkowa linii dyfrakcyjnej zależy od wielkości krystalitów (dokładniej – od długości krawędzi kostki sześcienniej) według podanego wzoru. Dziś ten słynny wzór znany jest dobrze wszystkim krystalografom i badaczom nanomateriałów, i stosowany do rutynowego obliczenia wielkości krystalitów¹ w preparacie proszkowym na podstawie dyfraktogramu rentgenowskiego. Współczesny zapis mówi, że

$$D_v = (K \lambda) / (\beta_r \cos \Theta)$$

gdzie: β_r oznacza szerokość połówkową refleksu leżącego pod kątem 2Θ , K jest stałą Scherrera przyjmującą arbitralne wartości (w wersji oryginalnej $K = 0,93945$), λ oznacza długość fali promieniowania, D_v – objętościowo ważoną wielkość krystalitów w kierunku prostopadłym do płaszczyzny odbijającej promieniowanie.

Autorytet obu badaczy oraz niemożność zweryfikowania poprawności podanego wzoru przez dziesięciolecia, spowodowały niemal bezkrytyczne przyjęcie go jako poprawnej miary wielkości krystalitów. W oryginalnej pracy nie było wyprowadzenia wzoru. Wprawdzie próbowano opisać różne warianty wzoru i opracować konieczne poprawki, ale nie zmieniło to istoty rzeczy – wzoru nie da się stosować w praktyce doświadczalnej. Wzór Scherrera zawdzięcza swoją wyjątkową popularność modzie na badania nanomateriałów, jaka zapanowała w ostatnich latach. Badacze własności nanomateriałów potrzebują bowiem jakiegoś parametru, który w sposób możliwie prosty, czy nawet prymitywny, pozwoli scharakteryzować badany materiał przy pomocy jednej liczby, najlepiej o wymiarze długości. A wzór Scherrera spełnia to oczekiwanie – daje wielkość „pasującą” do wyobrażeń o wielkości krystalitów w granicach – od kilku do kilkudziesięciu nanometrów. Do tego rozwój programów obliczeniowych wyliczających (często błędnie!) m. in. „wielkość ziaren” pozwala na bezkrytyczne podejście do otrzymanych wartości. Tymczasem nawet pobieżna analiza wzoru wskazuje, że nie jest możliwe otrzymanie dobrego wyniku. Gorzej, nie da się nawet oszacować błędu takich wyliczeń!

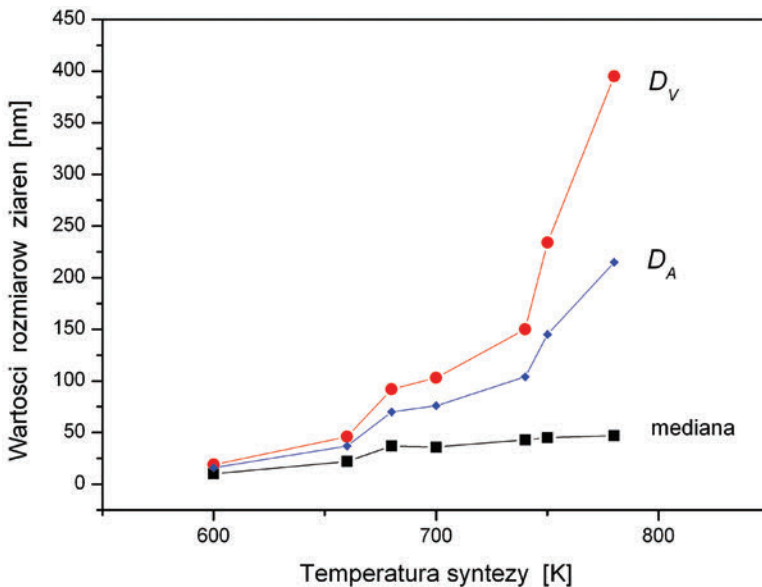
Zobaczymy, jak przebiegają obliczenia wielkości krystalitów i co autorzy podają w swoich publikacjach. Przypomnę, że mam na uwadze prace, w których nie jest analizowana charakterystyka mikrostruktury ziaren nanoproszku, a tylko podana wielkość krystalitów jako pewien „techniczny” parametr badanego materiału.

- Problem zaczyna się już na etapie definicji mierzonej czy też obliczanej wielkości. W publikacjach spotykamy nazwy: *rentgenowski rozmiar ziarna*, *pozorny*

¹ Wielu autorów zamiennie stosuje termin „ziarno” odnoszący się jednak do obiektu, który może być złożony z kilku krystalitów. W niniejszej pracy zakładam, że ziarno ma tylko jeden krystalit, a więc można oba terminy używać zamiennie.

rozmiar krystalitu, *prawdziwy* rozmiar krystalitu, *efektywny średni* rozmiar krystalitu czy *standaryzowany* rozmiar krystalitu, przy czym najczęściej nie wiadomo, co się pod daną nazwą kryje.

- Zazwyczaj mówi się o jakiejś wielkości „średniej”, ale bez sprecyzowania o jaką średnią chodzi. A jest kilka rodzajów średnich związanych z rozkładem wielkości ziaren w preparacie proszkowym, np. średnia arytmetyczna, średnia ważona powierzchniowo, średnia ważona objętościowo, mediana i dominanta. Podawana w publikacjach wartość nie jest najczęściej żadną z tych średnich matematycznych, a tylko pewnym wygodnym wyobrażeniem. Warto zauważyć, że pomiary dyfrakcyjne dla typowego rozkładu (z „ogonem” po stronie większych ziaren) dają wartości dużo większe od średniej najbardziej prawdopodobnej (dominandy) uzyskiwanej np. z analizy w mikroskopie elektronowym (patrz Rys. 1). Tylko dla ziaren o tych samych rozmiarach (co praktycznie nie jest spotykane) obie wartości pokrywają się.



Rysunek 1. Rozbieżność w ocenie wielkości ziaren rośnie wraz z temperaturą otrzymywania nanokrystalicznego żelaza (dane liczbowe z pracy Nattera [2]). D_A – średnia ważona powierzchniowo, D_V – średnia ważona objętościowo

Figure 1. The difference between grain size calculated as a surface weighted mean (D_A), a volume weighted mean (D_V) and a median, grows with the temperature of producing of nanocrystalline iron (data taken from [2])

- Zazwyczaj w próbce mamy ziarna nie tylko o różnych rozmiarach, ale i o różnych kształtach. Ale nawet dla ziaren tego samego kształtu nie podaje się w pracach informacji o rodzaju „rozmiaru”. Jest bowiem kilka definicji rozmiaru, np. średnica Fereta, średnica Martina, średnica równoważnika kołowego czy równoważnika kuli [3]. Dla konkretnego kształtu ziarna wielkości te znacznie

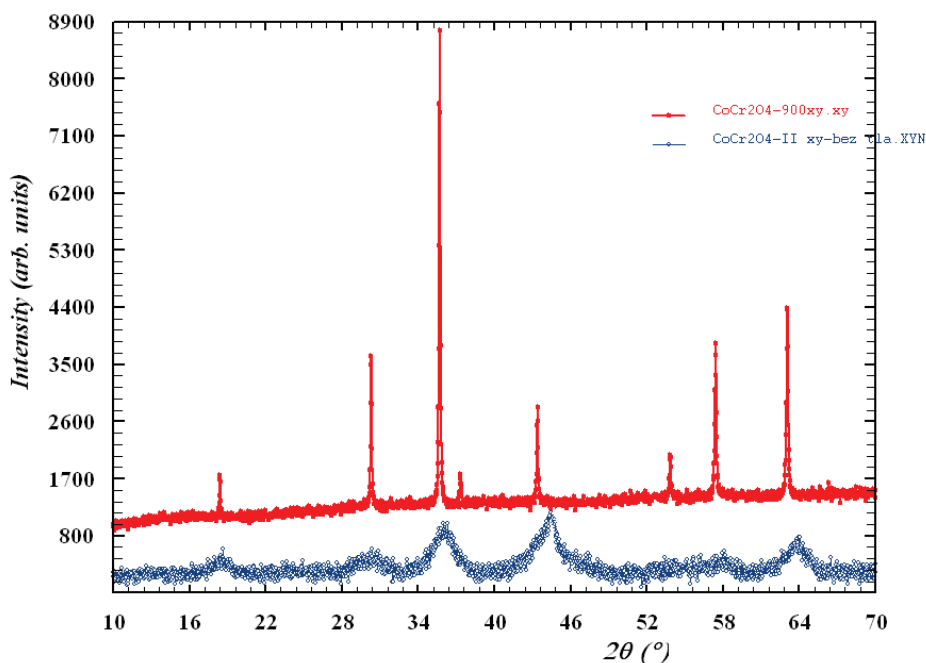
mogą się różnić. Jeśli krystalit ma postać zbliżoną do płytki, to który z nasuwających się w sposób oczywisty rozmiarów jest tym właściwym? Tzw. „standaryzowany” rozmiar krystalitu też nie rozwiązuje problemu; przybliżanie pręcików czy płytek przez sześcian (a więc różnych rozmiarów przez taką jedną liczbę) jest zbyt grubym „przybliżeniem”. A pamiętajmy, że metoda Scherrera daje tylko jedną liczbę! Spotykane czasem twierdzenie, że z różnic w wynikach można odtworzyć kształt ziarna jest tylko w części uzasadnione. Nie wolno zapominać o pomijanym elemencie – deformacjach, które mogą równie dobrze wyjaśniać rozbieżności w „rozmiarach” wyznaczonych metodą Scherrera z różnych refleksów (patrz dalej).

- Zauważmy, że we wzorze Scherrera mamy jeden parametr – stałą Scherrera K . Jej wartość zależy od tak wielu czynników, że dla badanego materiału w praktyce jest nieznana badaczowi, a więc arbitralnie przyjmuje się jakąś wartość. Prowadzi to oczywiście do wyników, które mogą mieć niewiele wspólnego z rzeczywistym rozmiarem krystalitów. W literaturze spotyka się zasadniczo dwie wartości: $K = 0,9$ lub $K = 1$, ale trudno w konkretnej pracy znaleźć uzasadnienie dla takiego a nie innego wyboru. Są prace pokazujące, że tak na prawdę parametr K może przybierać wartości od około 0,62 do około 2,08. Błąd pochodzący tylko od takiej a nie innej wartości K może więc sięgać... 335%.
- Zauważmy, że we wzorze Scherrera mamy zależność od kąta dyfrakcji. Prowadzi to do prostego wniosku – wyliczenia rozmiaru krystalitów z różnych linii dyfrakcyjnych dają różne wyniki. Który jest poprawny? Czy w ogóle można mówić o jakimś jednym poprawnym wyniku? Często wybiera się do obliczeń najsilniejszą linię, co nie ma żadnego uzasadnienia fizycznego. Jeśli dodatkowo taka linia jest lekko rozszczepiona (jako złożona z kilku linii zgodnie z symetrią kryształu), to wynik będzie zafałszowany (ziarna mniejsze niż są w rzeczywistości). Są zwolennicy wyboru linii przy najniższym kącie i tacy preferujący największy kąt braggowski. Znowu bez jakiegokolwiek uzasadnienia. A może policzyć średnią arytmetyczną z wszystkich (czy tylko z kilku wybranych?) linii dyfrakcyjnych? Na ile taka średnia jest miarodajna? Czy choć powie coś o rzędzie wielkości krystalitów? Problem próbowali rozwiązać w 1953 r. G.K. Williamson i W.H. Hall [4] dopisując do wzoru na wielkość krystalitów (a właściwie na poszerzenie linii dyfrakcyjnej) składnik deformacyjny opisany zależnością Taylora: $\beta_d = 4\epsilon \tan\Theta$, gdzie ϵ oznacza średnie ważone odkształcenia sieciowe. Zaproponowali, by wykonać wykres zależności $(B-b)\cos\Theta$ od $4\epsilon \sin\Theta$ dla każdej linii dyfrakcyjnej (B oznacza zmierzoną szerokość linii, b – poszerzenie aparaturowe linii lub szerokość linii dla kryształu wzorcowego czy też dla próbki wzorcowej). Ekstrapolacja do zera prostej aproksymującej wyliczenia dla wielu refleksów (czyli dla $4\epsilon \sin\Theta = 0$) daje jedną wartość $m = \lambda/D$, czyli to, czego zwykły badacz potrzebował – rozmiar krystalitów D . Natomiast nachylenie prostej pokazuje wielkość deformacji krystalitów. Im większe nachylenie, tym wynikowa wielkość krystalitów jest większa od wartości wyliczonych z poszczególnych linii dyfrakcyjnych. Tylko dla sytuacji bezdeformacyjnej (prosta aprok-

symacyjna leży poziomo na wykresie) wartości dla poszczególnych linii są porównywalne z wartością z ekstrapolacji. Piszę „porównywalne”, bo rzadko kiedy punkty doświadczalne leżą dokładnie na prostej aproksymacyjnej.

- We wzorze Scherrera mamy wielkość zdefiniowaną jako szerokość połówkową linii dyfrakcyjnej. W praktyce stosuje się także tzw. szerokość całkową linii (zwaną też szerokością Lauego), która jest zazwyczaj większa od połówkowej. A więc znowu mamy źródło niepewności co do poprawności naszych wyliczeń. Żeby było ciekawiej, spotkałem się niedawno z pracą biorącą do obliczeń... połowę szerokości połówkowej (bo autor myślał, że „szerokość połówkowa” to „połowa szerokości”!).
- Najpoważniejszym źródłem niepewności i błędów jest sam profil linii dyfrakcyjnej. Wiadomo, że aż kilka czynników wpływa na kształt linii i wydobyte z niej wkładu pochodzącego od próbki jest zadaniem bardzo skomplikowanym. Dla wygody przyjmuje się, że linia dyfrakcyjna jest splotem części pochodzącej od próbki i części aparaturowej. W praktyce stosuje się kilka podejść do zagadnienia. Pierwsze – zakładamy, że poszerzenie aparaturowe jest znikome i obliczeń dokonujemy dla całej zmierzonej szerokości połówkowej linii dyfrakcyjnej B (wynik jest więc zaniżony: wielkość ziaren mniejsza niż w rzeczywistości). Takie podejście jest uzasadnione, gdy kryształity są bardzo małe, a więc linie bardzo szerokie. Drugie – to zastosowanie najprostszej poprawki wprowadzonej przez Wooda i Rachingera w 1949 r. – zwykłe odjęcie szerokości połówkowej wzorca od szerokości badanej linii (szerokość połówkowa linii czystej, fizycznej lub inaczej poszerzenie linii pochodzące wyłącznie od wielkości kryształitów wynosi: $\beta = B - b$). W tym przypadku wyliczona wielkość kryształitów jest największa i też zła. Trzecie podejście to zastosowanie poprawki Warrena i Biscoe’a z 1938 r. ($\beta = \sqrt{B^2 - b^2}$) lub poprawki Haldera-Wagnera z 1966 r. ($\beta = (B^2 - b^2)/B$). Takie poprawki powodują, że otrzymane wartości zbliżone są do tych bez stosowania poprawki (por. Rys. 3.). Należy zauważyć, że przyjęcie modelu, w którym poszerzenie linii dyfrakcyjnych pochodzi zarówno od wielkości kryształitów (ich „małości”) jak i deformacji ziaren (a tak jest w większości badanych nanomateriałów), ma poważne konsekwencje. Przede wszystkim opis profilu powinien być robiony przy pomocy funkcji pseudo-Voigta – splotu funkcji Gaussa i Lorentza. Wymusza to na badaczu stosowanie wzorów dotyczących tylko takiej właśnie sytuacji, a więc poprawki Haldera-Wagnera. Nie wolno więc stosować innych poprawek zakładających, że profil linii dyfrakcyjnej jest opisywany tylko funkcją Gaussa lub tylko funkcją Lorentza. Należałoby więc usunąć z przedstawionej poniżej analizy wyniki otrzymane z uwzględnieniem „złych” poprawek. Niestety, wiele osób publikujących wyniki badań zupełnie się tym nie przejmuje i w ich publikacjach znajdujemy wyniki z założenia błędne. Takie rutynowe (czy raczej bezmyślne?) stosowanie metody Scherrera z dowolną z podanych wyżej poprawek sprawia, że w omówionym poniżej przykładzie stało się konieczne pokazanie wyników dla wszystkich rodzajów poprawek.

- Nie jest to koniec kłopotów. Aby dobrze wyznaczyć szerokość połówkową linii dyfrakcyjnej należy profil linii możliwie dobrze dopasować do jakiegoś wzorca, najczęściej do funkcji pseudo-Voigta. Zaawansowane programy komputerowe pozwalają na taką analizę i w efekcie uzyskujemy potrzebne parametry. Wydawałoby się, że aproksymacja powinna być jednoznaczna, a więc nie powinna wpływać na wartość wyznaczonej szerokości połówkowej. Niestety, każdy program pracuje inaczej, każdy pozwala na dość dużą swobodę w doborze parametrów aproksymacyjnych. W efekcie można uzyskać różne szerokości połówkowe prowadzące do różnych wartości wielkości krystalitów. I na to nie ma rady! (patrz dalej!) Warto zauważyć, że program *XPowder* [5] generuje wykresy Williamsona-Halla dla różnych profili (Gauss, Lorentz i pseudo-Voigt), pokazując w ten sposób jak różne wyniki można otrzymać dla rozmiaru krystalitów! Nie wolno też zapominać, że dla nanokrystalłów szerokości połówkowe mogą być istotnie różne dla różnych linii dyfrakcyjnych w przeciwieństwie do obrazu dla klasycznego preparatu proszkowego (pomijając słabą zależność od kąta dyfrakcji, szerokości linii są porównywalne). W krystalografii klasycznej obserwowane poszerzenie jest wynikiem nałożenia się kilku (węższych) linii leżących pod niewiele różniącymi się kątami.



Rysunek 2. Dyfraktogramy nanokrystalłów CoCr_2O_4 . Górny – dla próbki wygrzewanej w 900°C i opisanej w pracy, dolny – dla próbki wygrzewanej w 230°C

Figure 2. X-ray diffraction patterns for CoCr_2O_4 annealed at 900°C and analyzed in the paper (upper curve), and annealed at 230°C (bottom curve)

Zobaczmy teraz, jak wygląda sytuacja w konkretnym przypadku dyfraktogramu nanomateriału. Analiza dotyczy nankoryształów CoCr_2O_4 otrzymanych metodą hydrotermalną a następnie wygrzewanych w kilku temperaturach. Dyfraktogramy zostały wykonane na dyfraktometrze X'Pert firmy PANalytical z zastosowaniem monochromatycznego promieniowania $\text{CuK}\alpha_1$ ($\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$). Na Rysunku 2 przedstawiono dwa dyfraktogramy dla skrajnych temperatur wygrzewania; dalszej analizie poddano tylko dyfraktogram dla próbki wystarzonej w 900°C .

Badany kryształ CoCr_2O_4 ma 6 wyraźnych linii dyfrakcyjnych dostępnych w zakresie kątów 2θ od 18 do 63 stopni. W analizie wyników wykorzystane zostały trzy procedury ręcznego dopasowania profili dyfrakcyjnych: X'Pert, X Powder [5] i WinPLOTR [6]. Choć dopasowanie było dobre we wszystkich przypadkach, to otrzymane szerokości połówek – różne, prowadząc do różnych wyliczonych wielkości kryształitów.

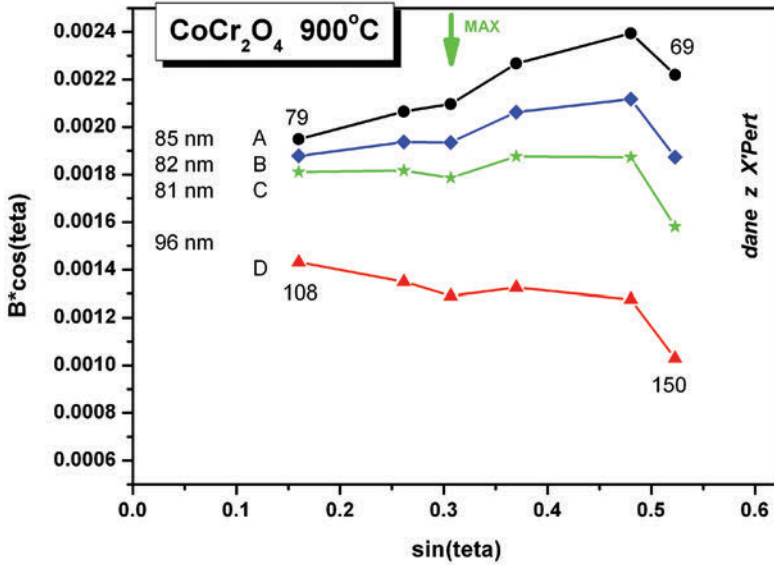
Program dostępny w dyfraktometrze X'Pert pozwalał na wyliczenie wielkości ziaren bez poprawki na poszerzenie aparaturowe lub z prostą poprawką (różnicą); w każdym przypadku możliwe było zastosowanie dwóch wartości stałej Scherrera ($K = 0,9$ i $K = 1$). Jak widać, dla każdej linii dyfrakcyjnej można otrzymać cztery różne wartości na wielkość kryształitów!

Opracowany został program pozwalający na wyliczenie dwóch pozostałych rodzajów poprawek na poszerzenie aparaturowe. Otrzymaliśmy więc osiem różnych wartości dla każdej linii dyfrakcyjnej (cztery rodzaje podejścia do poprawki aparaturowej po dwie wartości parametru K). W ten sposób uzyskaliśmy 48 wartości na rozmiar kryształitów w badanej próbce (8 wartości dla każdej z 6 linii dyfrakcyjnych).

Ale to nie wszystkie możliwości. Zastosowanie analizy Williamsona-Halla dało kolejne 4 wartości pochodzące z aproksymacji danych dla poszczególnych linii dyfrakcyjnych przy czterech założonych rodzajach poprawek na poszerzenie aparaturowe i po dwie możliwości dla stałej K (0,9 i 1). Razem – osiem nowych wartości.

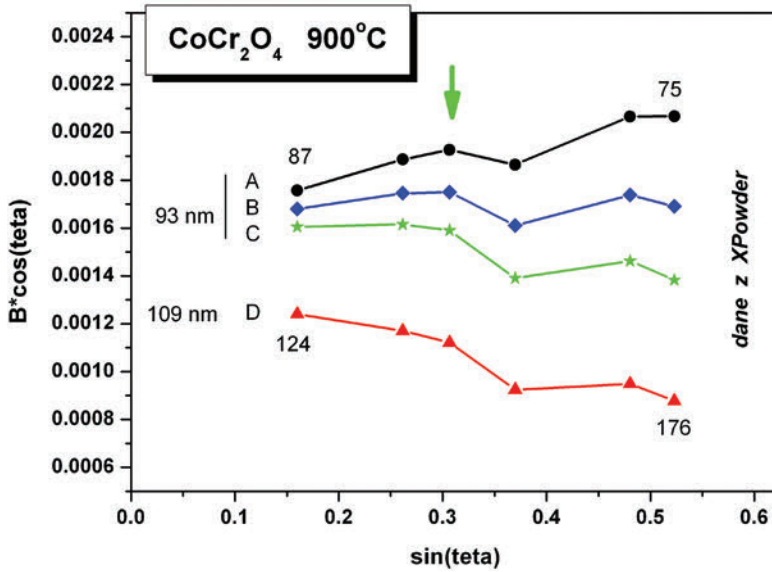
Podsumowując powyższe wyliczenia mamy „do wyboru” 56 wartości uważanych za „rozmiar kryształitów”. Nie zapominajmy, że taką samą liczbę możliwości dostajemy dla każdego typu dopasowania profili dyfrakcyjnych (w naszym przykładzie – dla X'Pert, X Powder i WinPLOTR). W efekcie mamy... **168** wartości.

Wszystkie wymienione wyżej możliwości pokazaliśmy na poniższych wykresach z analiz Williamsona-Halla dla danych pochodzących z programu X'Pert (Rys. 3a), X Powder (Rys. 3b) i WinPLOTR (Rys. 3c). Dla ułatwienia porównania wszystkie trzy rysunki wykonane zostały w tej samej skali. Różnice w wynikach są dobrze widoczne. Ze względu na klarowność obrazu, na rysunkach pominięte zostały wartości otrzymane dla $K = 9,0$.



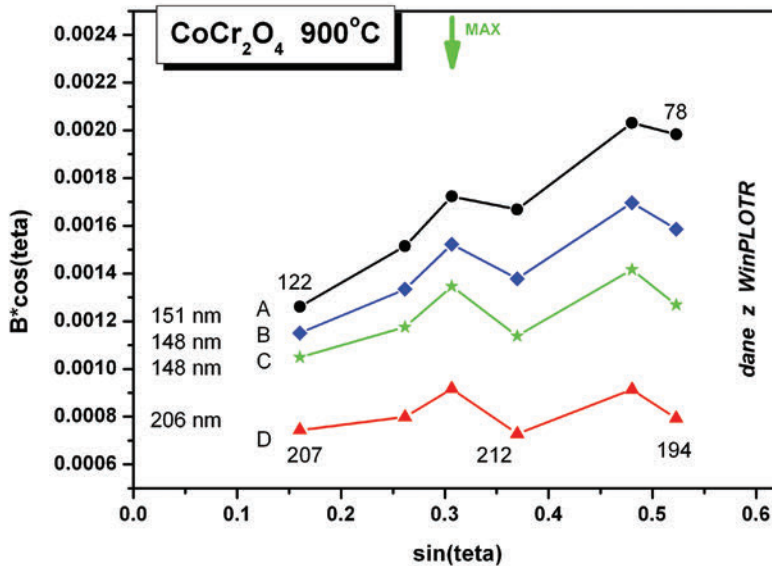
Rysunek 3a. Wykres Williamsona-Halla dla nanokryształów CoCr_2O_4 . Zespół krzywych odpowiada obliczeniom z programu X'Pert. Różne krzywe odpowiadają wynikom uzyskanym z zastosowaniem różnego rodzaju poprawek na poszerzenie aparaturowe linii dyfrakcyjnej (A – bez poprawki, B – z poprawką Warrena-Biscoe, C – z poprawką Haldera-Wagnera, D – z poprawką Wooda-Rachingera). Skrajne punkty na wykresie opisane zostały liczbą będącą wartością rozmiaru kryształitów wyliczoną według wzoru Scherrera przy założeniu, że $K = 1,0$. Liczby z lewej strony rysunku są wartościami otrzymanymi metodą W-H. Strzałka pokazuje wyniki dla najsilniejszej linii dyfrakcyjnej.

Figure 3a. Williamson-Hall plot for nanocrystalline CoCr_2O_4 . The set of data is from diffraction line approximation made by X'Pert program. Different curves correspond to different types of correction for instrumental broadening of diffraction line (A – without any correction, B – Warren-Biscoe correction, C – Halder-Wagner correction and D – Wood-Rachinger correction). Each experimental point on W-H plot is described by the value of grain size calculated by Scherrer formula with $K = 1.0$. Numbers on the left side of figure correspond to data from W-H method. The arrow shows the data for the strongest diffraction line



Rysunek 3b. Wykres Williamsona-Halla dla nanokryształów CoCr₂O₄. Zespół krzywych odpowiada obliczeniom z programu X Powder. Oznaczenia – jak w opisie Rysunku 3a

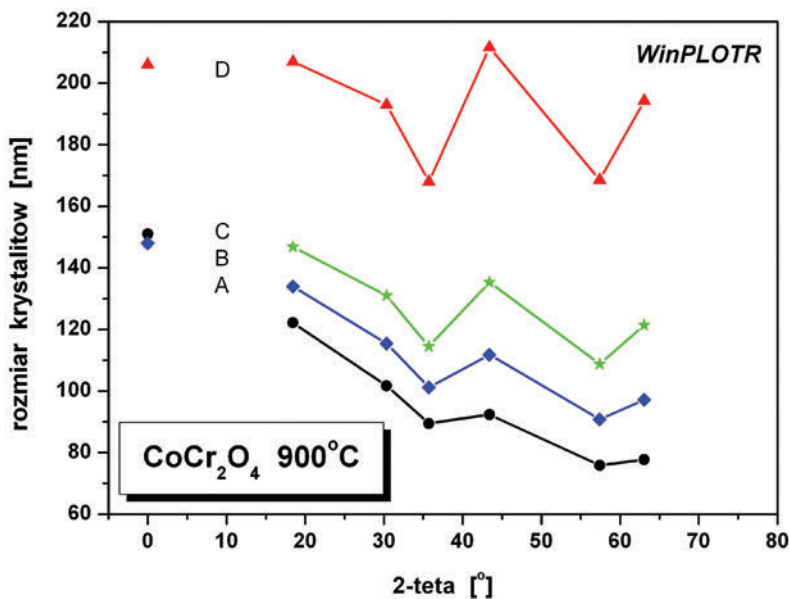
Figure 3b. Williamson-Hall plot for nanocrystalline CoCr₂O₄. The set of data is from diffraction line approximation made by X Powder program. See comments on Figure 3a



Rysunek 3c. Wykres Williamsona-Halla dla nanokryształów CoCr₂O₄. Zespół krzywych odpowiada obliczeniom z programu WinPLOTR. Oznaczenia – jak w opisie Rysunek 3a

Figure 3c. Williamson-Hall plot for nanocrystalline CoCr₂O₄. The set of data is from diffraction line approximation made by FullProf program. See comments on Figure 3a

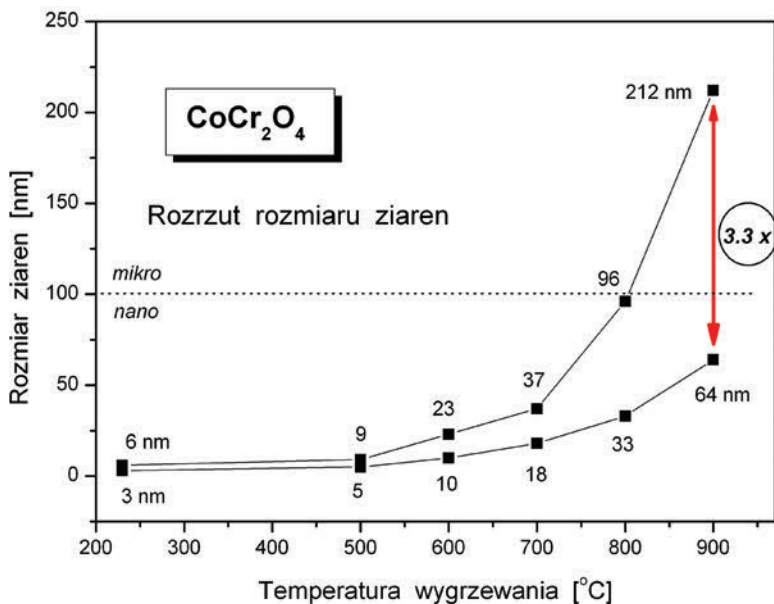
Jako podsumowanie powyższych analiz warto spojrzeć na wartości rozmiaru krystalitów w funkcji kąta dyfrakcji, a więc w zależności od linii dyfrakcyjnej użytej do obliczeń. Dla uproszczenia na Rysunku 4 pokazano wyniki tylko dla danych z programu WinPLOTR.



Rysunek 4. Zależność wyznaczonych rozmiarów krystalitów od wykorzystanej do obliczeń linii dyfrakcyjnej dla nanokrystalłów CoCr_2O_4 . Zespół krzywych odpowiada obliczeniom z programu WinPLOTR. Oznaczenia, jak w opisie Rysunku 3a

Figure 4. The diffraction angle dependence of calculated crystallite size for nanocrystalline CoCr_2O_4 . The set of data is from diffraction line approximation made by WinPLOTR program. See comments on Figure 3a

Na koniec warto zastanowić się, jak zmienia się wielkość „błędu” czyli rozrzut wartości w zależności od wielkości „rzeczywistej” krystalitów. W tym celu przeanalizowano dyfraktogramy dla serii próbek CoCr_2O_4 o różnej zakładanej wielkości krystalitów. Wiadomo, że wygrzewanie próbek w różnych temperaturach prowadzi do zmiany wielkości ziaren. Dla każdego dyfraktogramu sporządzona została analiza podobna do opisanej wyżej. Okazało się, że rozrzut wielkości krystalitów zmienia się od 100% dla najmniejszych ziaren (wyznaczonych jako 3–6 nm) aż do 335% dla ziaren o rozmiarze oszacowanym na 64–212 nm. Rozrzut ten przedstawiono na Rysunku 5.



Rysunek 5. Rozbieżność w ocenie wielkości krystalitów rośnie wraz z temperaturą otrzymywania nanokrystalicznego CoCr_2O_4 . Na wykresie podano skrajne wartości otrzymane zgodnie z zasadami opisanymi w podpisie do Rysunku 3

Figure 5. The difference between crystallite size grows with the temperature of producing of nanocrystalline CoCr_2O_4 . The extreme values taken from Figure 3 are plotted, only.

Problem rozbieżności w wynikach uzyskiwanych różnymi metodami jest znany od dawna. Ukazało się szereg publikacji pokazujących jak wielkie mogą być różnice, gdy do tego samego dyfraktogramu zastosujemy różne metody analizy danych doświadczalnych. I to wydaje się być zrozumiałe w świetle przedstawionych w niniejszej pracy źródeł niepewności. Dlatego badacze zazwyczaj stosują tylko jedną metodę uznając (błędnie), że pomijają w ten sposób problem takiej rozbieżności. Niestety, rozbieżności w uzyskanych wynikach mają głębszą przyczynę i występują także dla tej jednej wybranej metody, co starałem się pokazać w niniejszej pracy.

O ile wiem, nikt nie analizował rozbieżności w wynikach otrzymanych tą samą metodą, np. przy pomocy wzoru Scherrera, przy zastosowaniu różnych wariantów poprawek, różnych metod aproksymacji profili, itp. Znana analiza „okrągłostołowa” przeprowadzona w latach 2000-2004 przez Światową Unię Krystalograficzną [8] nie jest w pełni miarodajna, bo porównywano wyniki pomiarów i obliczeń wykonanych w różnych laboratoriach i różnymi metodami, choć dla takich samych próbek.

Pokazane w pracy wyniki wyraźnie wskazują, że stosowanie wzoru Scherrera lub jego rozwinięcia w metodzie Williamsona-Halla, nie może prowadzić do dobrych wyników; ich wartość jest bez znaczenia wobec tak wielkiego rozrzutu wyznaczonych wartości liczbowych. Gorzej, mamy do czynienia z wprowadzaniem czytelników publikacji w błąd, czyli z pewnego rodzaju fałszowaniem rzeczywistości. Wzór jest poprawny tylko na poziomie bardzo ogólnej teorii. Niestety, w prak-

tyce laboratoryjnej² jest po prostu „niestosowny”. Wielość źródeł błędów oraz koniecznych założeń modelowych sprawiają, że nawet nie jest możliwe oszacowanie błędu obliczenia jakiegoś „średniego rozmiaru” krystalitu. Spotykane w publikacjach szacowanie błędów czy nawet podawanie wartości rozmiaru krystalitu z dwoma miejscami znaczącymi po przecinku (np. [9]), świadczy tylko o niewiedzy autorów i, niestety, recenzentów. W tej sytuacji wzór Scherrera, niezależnie od ewentualnych jego modyfikacji, należy uważać za jedno z większych nieporozumień stulecia. I co ważniejsze – nie powinien być w ogóle stosowany! Niestety, prostota (zgodna!) metody Scherrera nie daje nadziei na zastąpienie jej innymi metodami, bardziej pracochłonnymi. Jedyny ratunek jest w działaniach osób i firm tworzących oprogramowania samodzielne lub dołączone do dyfraktometrów proszkowych – powinni zastąpić metodę Scherrera w tych programach inną metodą lub zestawem metod, jak to zrobił Jose Daniel **Martin** Ramos z Granady w programie *XPowder12* [5]. Do tego czasu jedynym sensownym rozwiązaniem problemu (należy przecież w publikacji podawać jakieś wartości!) jest nie tylko dokładny opis zastosowanej metody obliczeniowej, uwzględnionych poprawek, ale przedstawienie pełnego zakresu wyznaczonych wartości – właśnie w postaci wykresu Williamsona-Halla, jak na Rysunku 3. Każde inne pokazanie rozmiaru krystalitów wprowadza czytelnika w błąd!

PODZIĘKOWANIA

Serdecznie dziękuję panu Maciejowi Ptakowi z INTiBS PAN za udostępnienie dyfraktogramów CoCr_2O_4 .

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] P. Scherrer, *Nachr. Ges. Wiss. Göttingen*, 1918, **26**, 98.
- [2] H. Natter, M. Schmelzer, M.-S. Löffler, C.E. Krill, A. Fitch, R. Hempelmann, *J. Phys. Chem. B*, 2000, **104**, 2467.
- [3] R.J. Matyi, L.H. Schwartz, J.B. Butt, *Catal. Rev. - Sci. Eng.*, 1987, **29**, 41.
- [4] G.K. Williamson, W.H. Hall, *Acta Metall.*, 1953, **1**, 22.
- [5] J.D. Martin, *XPowder12*, ver. 02.12 (2012).
- [6] T. Roisnel, J. Rodriguez-Carvajal – WinPLOT, ver. Sept. 2012.
- [7] M. Bortolotti, L. Lutterotti, I. Lombardelli, *J. Appl. Cryst.*, 2009, **42**, 538.
- [8] D. Balzar, N. Audebrand, M.R. Daymond, A. Fitch, A. Hewat, J.I. Langford, A. Le Bail, D. Louër, O. Masson, C.N. McCowan, N.C. Popa, P.W. Stephens, B.H. Toby, *J. App. Cryst.*, 2004, **37**, 911.
- [9] J.-D. Lin, J.-G. Duh, *J. Mater. Sci.*, 1997, **32**, 5779.

Praca wpłynęła do Redakcji 20 maja 2013

² Opis metody i poprawek w trzecim tomie „*Tablic Międzynarodowych*” nie oznacza, że stosowanie wzoru Scherrera da dobre wyniki!

**SYNTEZA γ -LAKTONÓW
Z PODSTAWNIKAMI AROMATYCZNYMI**
SYNTHESIS OF γ -LACTONES WITH AROMATIC
SUBSTITUENTS

Andrzej Skrobiszewski*, Witold Gładkowski

*Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Katedra Chemii
ul. C.K. Norwida 25/27, 50-375 Wrocław
e-mail: andrzej.skrobiszewski@gmail.com

Abstract

Wprowadzenie

1. Synteza racemicznych γ -laktonów
 - 1.1. Synteza α -benzylideno- γ -laktonów z octanów Baylisa-Hillmana
 - 1.2. Synteza analogów kwasów parakoinowych
 - 1.3. Zastosowanie reakcji Suzuki-Miyaury
 - 1.4. Otrzymywanie laktonów w reakcji ylidów z olefinami
 - 1.5. Synteza laktonów z wykorzystaniem reakcji ozonolizy
 - 1.6. Otrzymywanie laktonów z pochodnych kwasu bursztynowego
 - 1.7. Synteza laktonów z aldehydów aromatycznych z wykorzystaniem kondensacji aldolowej i przegrupowania Claisena
2. Synteza optycznie czynnych γ -laktonów
 - 2.1. Synteza laktonów z chiralnych prekursorów
 - 2.2. Zastosowanie chiralnych katalizatorów chemicznych
 - 2.3. Otrzymywanie laktonów z wykorzystaniem enzymów
 - 2.4. Procesy biotransformacji z użyciem całych komórek drobnoustrojów

Uwagi końcowe

Piśmiennictwo cytowane



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



Publikacja współfinansowana ze środków Unii Europejskiej
w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego

mgr inż. Andrzej Skrobiszewski jest absolwentem kierunku biotechnologia na Wydziału Nauk o Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. W 2010 roku rozpoczął studia doktoranckie w dziedzinie biotechnologii, które realizuje w Katedrze Chemii Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Prowadzi badania w zakresie syntezy oraz biotransformacji γ -laktonów z podstawnikiem fenylovym za pomocą całych komórek drobnoustrojów oraz komercyjnie dostępnych preparatów enzymatycznych.

dr inż. Witold Gładkowski w roku 2001 ukończył Wydział Technologii Żywności i Żywienia Człowieka Akademii Rolniczej we Wrocławiu. W roku 2006 ukończył Studium Doktoranckie na Wydziale Nauk o Żywności uzyskując stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biotechnologii. Od 2006 roku jest adiunktem w Katedrze Chemii Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Jego zainteresowania naukowe obejmują syntezę i optycznie czynnych laktonów z pierścieniem aromatycznym, enzymatyczne modyfikacje fosfolipidów oraz identyfikację związków organicznych metodami spektroskopowymi.

ABSTRACT

Biological activities of lactones are predominantly determined by different substituents on a lactone ring. γ -Lactones with aromatic substituents have interesting biological activities and serve as useful intermediates in the synthesis of many natural and synthetic products. Pulvinic and vulpinic acids exhibit antimicrobial, antioxidant and anticancer activity [1–3]. Paraconic acids have anticancer and antibacterial activity [4, 5]. The interesting biological activities *i.a.* antileukemic, anti-HIV and cytostatic, have been found for dibenzyl- γ -lactones [8].

This review covers some examples of synthetic and biotechnological methods leading to either racemic or optically active γ -lactones with aromatic substituents. The racemic α -benzylidene lactones can be produced from Baylis-Hillman acetates [9]. The multicomponent synthesis of the paraconic acid analogs is performed by a fourfold metallation-conjugate addition-aldol addition-intramolecular transesterification sequence [4]. Suzuki-Miyaura reaction is the key step in the synthesis of asymmetric pulvinic acids [1]. Some other examples of synthetic strategies involving the reactivity of ylides, vicinal dianions, ozonolysis or Claisen rearrangement are also presented [10–13].

Production of optically active γ -lactones with aromatic substituents involves application of biotechnological and chemical methods. The first one includes using commercially available enzymes [16, 17] or whole cells of microorganisms [18–20]. Chemical methods involve application of chiral starting materials like malic acid esters or the derivatives of succinic acid [14, 15] or chiral catalysts like BINAP-Rh or Ru complexes [7].

Keywords: γ -lactones, aromatic rings, Suzuki-Miyaura reaction, enzymatic hydrolysis and acetylation, microbial reduction of a carbonyl group, diastereoselective alkylation, enantioselective hydrogenation of olefinic substrates

Słowa kluczowe: γ -laktony, pierścienie aromatyczne, reakcja Suzuki-Miyaura, enzymatyczna estryfikacja i hydroliza, mikrobiologiczna redukcja grupy karbonylowej, diastereoselektywne alkilowanie, enancjoselektywne uwodornienie podwójnego wiązania

WPROWADZENIE

γ -Laktony są szeroko rozpowszechnione w naturze. Biologiczna aktywność tej grupy związków jest w dużym stopniu związana z obecnością różnych podstawników w pierścieniu laktonowym. Przykładem są kwasy pulwinowe i wulpinowe (estry metylowe kwasów pulwinowych), które wykazują aktywność antymikrobiologiczną, antyoksydacyjną oraz antynowotworową. Związki te są α,β -nienasyconymi γ -laktonami posiadającymi grupę hydroksylową w pozycji β oraz grupę karboksylową przyłączoną za pomocą grupy metylenowej w pozycji γ pięcioczłonowego pierścienia laktonowego [1–3]. Inną grupą związków należących do γ -laktonów są kwasy parakoinowe, posiadające grupę karboksylową w β -pozycji w stosunku do grupy karbonylowej pierścienia laktonowego. Kwasy parakoinowe wykazują przede wszystkim aktywność antynowotworową oraz przeciwbakteryjną [4, 5]. Z kolei α -metyleno- γ -laktony są znane ze swoich właściwości cytotoksycznych [6]. γ -Laktony stosuje się również jako syntony w syntezie związków posiadających aktywność biologiczną oraz farmakologiczną [4, 5, 7].

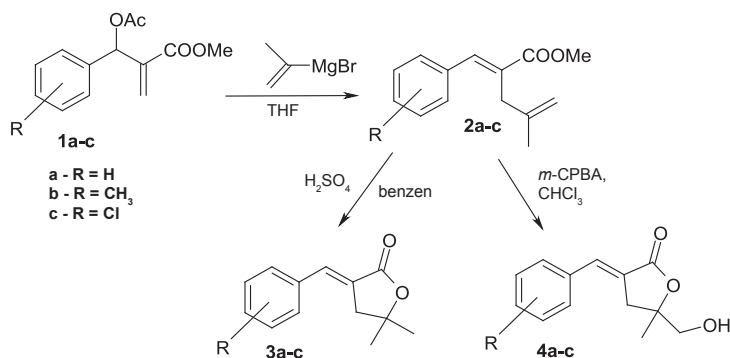
W ostatnich latach uwagę naukowców przyciągnęły γ -laktony posiadające w swojej strukturze podstawniki aromatyczne. Najszersze spektrum właściwości biologicznych posiadają dibenzyllo- γ -laktony, które cechują się aktywnością przeciwnowotworową, anti-HIV, przeciwzapalną, antibakteryjną oraz grzybobójczą [8].

Właściwości biologiczne omawianych połączeń wzbudziły zainteresowanie chemików i zaowocowały opracowaniem licznych metod syntezy tych związków.

1. SYNTEZA RACEMICZNYCH γ -LAKTONÓW

1.1. SYNTEZA α -BENZYLIDENO- γ -LAKTONÓW Z OCTANÓW BAYLISA-HILLMANA

Jedną z powszechnie wykorzystywanych reakcji w syntezie racemicznych laktonów z pierścieniem aromatycznym jest addycja związku Grignarda do octanów Baylisa–Hillmana **1a-c**. Otrzymane w jej wyniku estry **2a-c** poddaje się następnie laktonizacji w środowisku kwaśnym (H_2SO_4) w temperaturze pokojowej, uzyskując α -benzylideno γ -laktony **3a-c** z wydajnością 70–76%. Z kolei reakcja estrów **2a-c** z kwasem *m*-chloronadbenzoesowym (*m*-CPBA) w chloroformie umożliwia otrzymanie α -benzylideno- δ -hydroksy- γ -laktonów **4a-c** (wydajność 56–84%) (Schemat 1) [9]. W drugiej z omawianych reakcji niekiedy konieczny jest dodatek katalitycznych ilości kwasu trifluoroctowego.

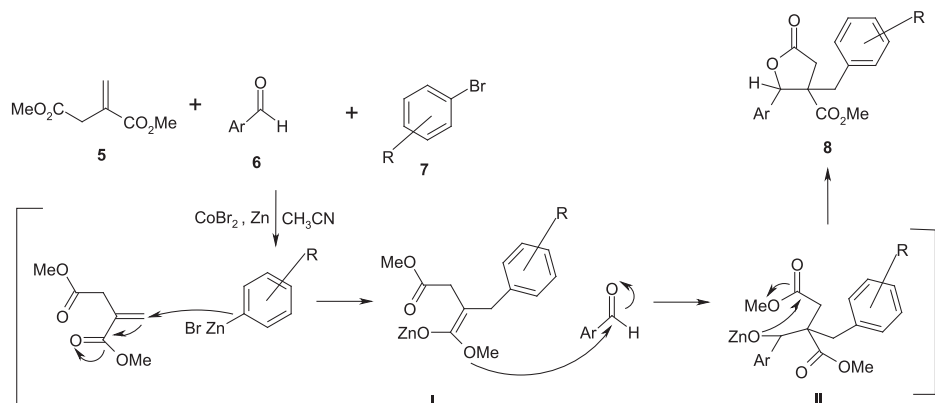


Schemat 1. Synteza γ -laktonów z podstawnikiem aromatycznym **3a-c** oraz **4a-c** z octanów Baylisa–Hillmana **1a-c** (adaptowano z pracy [9])

Scheme 1. Synthesis of aromatic lactones **3a-c** and **4a-c** from Baylis–Hillman acetates **1a-c** (adapted from Ref. [9])

1.2. SYNTEZA ANALOGÓW KWASÓW PARAKOINOWYCH

Floch i in. [4] opracowali syntezę 4,5-dipodstawionych- γ -laktonów, które są analogami kwasów parakoinowych. W jednoetapowym procesie diester metylowy kwasu itakonowego **5**, aromatyczny aldehyd **6** oraz bromek arylowy **7** reagują w obecności katalizatora (Schemat 2). Reakcja bromku **7** z cynkiem powoduje wytworzenie *in situ* związku metaloorganicznego o właściwościach nukleofilowych, który następnie ulega addycji typu 1,4 do podwójnego wiązania w cząsteczce związku pełniącego rolę akceptora Michaela – czyli kwasu itakonowego (**5**). Powstały w trakcie reakcji enolan **I** reaguje z aldehydem **6** tworząc alkohol **II**, którego cyklizacja prowadzi do utworzenia laktonu **8**. W wyniku opisanego procedury otrzymano laktony z różnymi podstawnikami z pierścieniu aromatycznym z wydajnościami 41–99% (Schemat 2) [4].

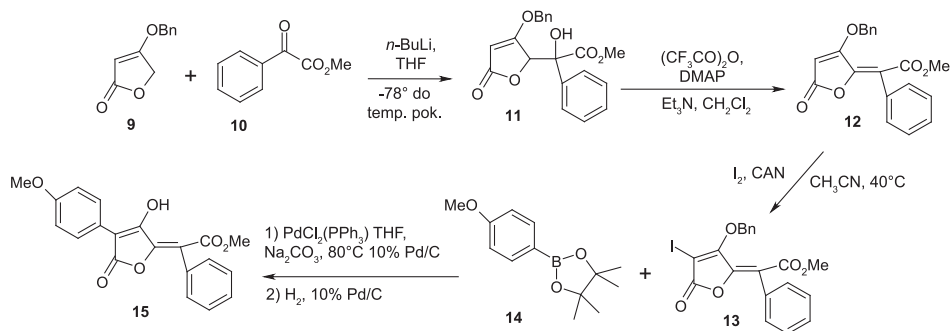


Schemat 2. Jednoetapowa synteza 4,5-dipodstawionego- γ -laktonu **8** (adaptowano z pracy [4])

Scheme 2. One-pot synthesis of 4,5-disubstituted- γ -lactone **8** (adapted from Ref. [4])

1.3. ZASTOSOWANIE REAKCJI SUZUKI-MIYAURY

W literaturze jest wiele opracowanych metod syntezy tzw. „symetrycznych” kwasów pulwinowych i wulpinowych posiadających w pozycjach 4 i 5 pierścienia γ -laktonegotakiesamepodstawnikiaromatyczne. Bourdeaux i in. [1] otrzymali „niesymetryczne” analogi tych związków na drodze kilkietapowej syntezy przedstawionej na Schemacie 3. Pierwszym kluczowym etapem była reakcja benzylovej pochodnej kwasu tetranowego (**9**) z α -fenylo- α -oksooctanem metylu w obecności *n*-butylolitu w temperaturze -78°C . Umożliwiło to powstanie związku **11**, z którego po dehydratacji w obecności 4-(*N,N*-dimetyloamino)pirydyny (DMAP) otrzymywano γ -lakton **12** zawierający fragment typowy dla kwasów pulwinowych i wulpinowych. Drugim etapem syntezy było wprowadzenie atomu jodu w pozycję α w stosunku do grupy karbonylovej pięcioczłonowego pierścienia laktoneowego w reakcji przeprowadzonej przy udziale azotanu cerowo-amonowego (CAN). Powstała jodopochodna **13** przereagowała z arylową pochodną estru kwasu boronowego w obecności katalizatora palladowego $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$. Reakcja ta, zwana reakcją Suzuki-Miyaura, umożliwiła wprowadzenie podstawnika aromatycznego w pozycję α pierścienia laktoneowego **15** z wydajnością 71%. Ostatnim etapem syntezy było usunięcie grupy benzylovej w wyniku wodorolizy przeprowadzonej przy udziale katalizatora palladowego na węglu aktywnym. Produktem syntezy były „niesymetryczne” kwasy wulpinowe (np. związek **15**, Schemat 3) z różnymi podstawnikami aromatycznymi, z których w wyniku hydrolizy można również uzyskać odpowiednie kwasy pulwinowe.



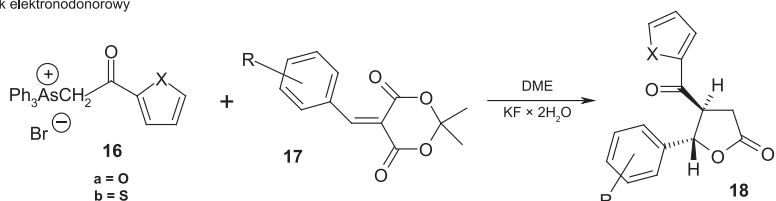
Schemat 3. Synteza kwasu wulpinowego **15** z wykorzystaniem reakcji Suzuki-Miyaura jako jednego z kluczowych etapów syntezy (adaptowano z pracy [1])

Scheme 3. Synthesis of vulpinic acid **15** by Suzuki-Miyaura reaction as one of key steps in the synthetic route (adapted from Ref. [1])

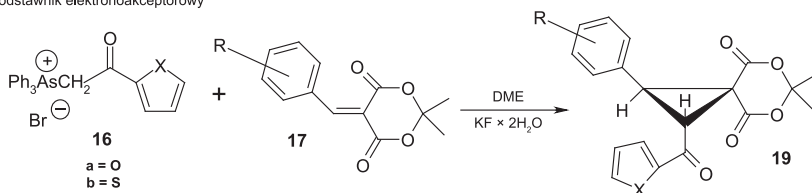
1.4. OTRZYMYWANIE LAKTONÓW W REAKCJI YLIDÓW Z OLEFINAMI

Wu i in. [10] opracowali jednoetapową syntezę β,γ -dipodstawionych γ -laktonów z olefin oraz ylidów tworzących się *in situ* pod wpływem reakcji silnej zasady z bromkiem 2-furoilometylotrifenylloarsenu **16a** lub bromkiem 2-tiofuroilometylotrifenylloarsenu **16b**. Przebieg reakcji w znacznym stopniu zależał od rodzaju podstawnika w pierścieniu aromatycznym. Jeśli zastosowano olefiny z podstawnikami znacząco zwiększającymi gęstość elektronową w pierścieniu aromatycznym, otrzymywano *trans*- β,γ -dipodstawione- γ -laktony (**18**) z wydajnością 74–90% (Schemat 4). Natomiast zastosowanie w tej samej reakcji olefin z podstawnikami słabo aktywującymi lub zmniejszającymi gęstość elektronową w pierścieniu aromatycznym powodowało powstanie produktów z pierścieniem cyklopropanu o konfiguracji *trans* (**19**). W reakcji w układzie aceton/woda w temperaturze 60°C związki te ulegały przekształceniu do pożądaných laktonów (**18**) [10].

R – podstawnik elektronodonorowy



R – podstawnik elektroakceptorowy

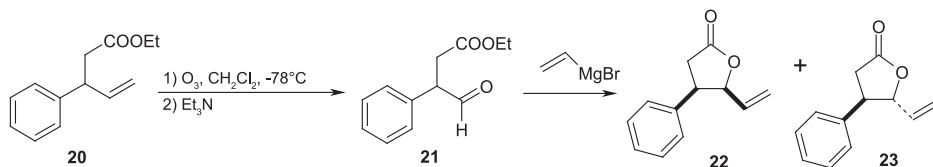


Schemat 4. Synteza β,γ -dwupodstawionych- γ -laktonów **18** z wykorzystaniem reakcji olefin **17** i ylidów **16** (adaptowano z pracy [10])

Scheme 4. Synthesis of β,γ -disubstituted γ -lactones **18** from olefins **17** and ylides **16** (adapted from Ref. [10])

1.5. SYNTEZA LAKTONÓW Z WYKORZYSTANIEM REAKCJI OZONOLIZY

Hon i in. [11] zaproponowali syntezę β -fenylo- γ -winylo- γ -laktonów **22**, **23** z γ,δ -nienasyconego estru **20**, który poddano ozonolizie. Otrzymany aldehyd **21** reagował następnie z odczynnikami Grignarda, w wyniku czego powstawała mieszanina diastereoizomerów *cis* i *trans* γ -laktonów **22**, **23**, którą rozdzielono za pomocą chromatografii kolumnowej (Schemat 5) [11].

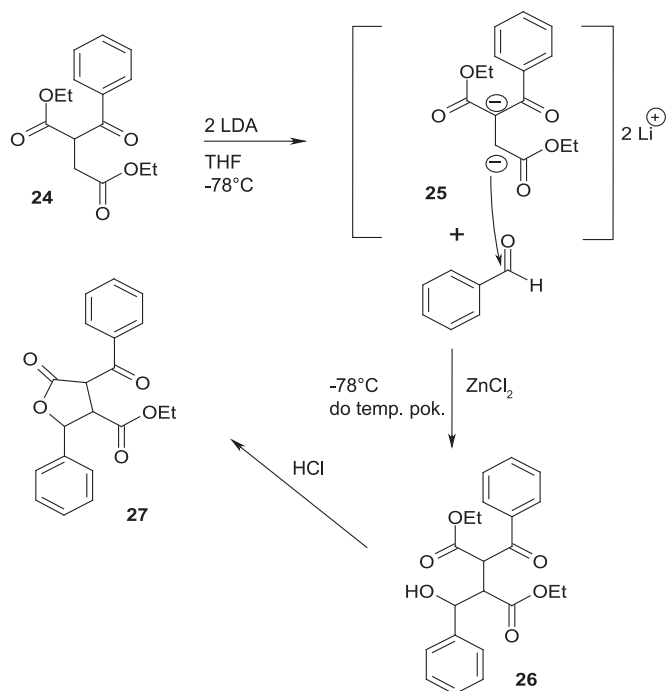


Schemat 5. Synteza β -fenylo- γ -winylo- γ -laktonów **22**, **23** z γ,δ -nienasyconego estru **20** (adaptowano z pracy [11])

Scheme 5. Synthesis of β -phenyl- γ -vinyl- γ -lactones **22**, **23** from γ,δ -unsaturated ester **20** (adapted from Ref. [11])

1.6. OTRZYMYWANIE LAKTONÓW Z POCHODNYCH KWASU BURSZTYNOWEGO

Pohmaktor i in. [12] opracowali syntezę α,β,γ -tripodstawionego- γ -laktonu **27** z estru dietylowego pochodnej kwasu bursztynowego **24** posiadającego grupę benzoilową w pozycji α w stosunku do jednej z grup estrowych [12]. W wyniku działania silnej zasady organicznej, diizopropylamidku litu (LDA) otrzymano wicylnalny dianion **25**. Reakcja otrzymanego dianionu z benzaldehydem w obecności ZnCl_2 prowadziła do powstania β -hydroksypochoodnej **26**. Reakcja jest wysoce regioselektywna, addycji nukleofilowej do grupy karbonylowej benzaldehydu ulega jedynie β -karboanion (Schemat 6). Dehydratacja hydroksyestru **26** za pomocą HCl prowadzi do uzyskania α,β,γ -tripodstawionego laktonu **27** z wydajnością 60%. Opracowana synteza umożliwia otrzymanie wielu α -arylideno- γ -laktonów różniących się podstawnikiem aromatycznym w pozycjach α oraz γ [12].

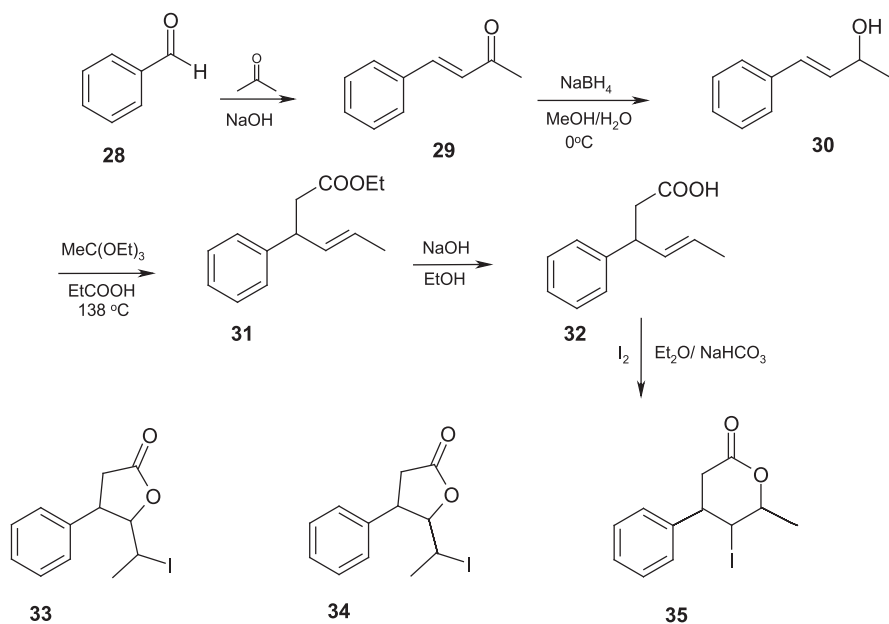


Schemat 6. Synteza α,β,γ -tripodstawionego- γ -laktonu **27** z wycinalnego dianionu **25** (adaptowano z pracy [12])

Scheme 6. Synthesis of α,β,γ -trisubstituted- γ -lactone **27** from vicinal dianions of **25** (adapted from Ref. [12])

1.7. SYNTEZA LAKTONÓW Z ALDEHYDÓW AROMATYCZNYCH Z WYKORZYSTANIEM KONDENSACJI ALDOLOWEJ I PRZEGRUPOWANIA CLAISENA

Laktony z pierścieniem aromatycznym można również uzyskać w pięcioetapowej syntezie z benzaldehydu lub jego pochodnych. Pierwszym etapem jest krzyżowa kondensacja aldehydu aromatycznego **28** z acetonem. Powstały α,β -nienasycony keton **29** jest redukowany do alkoholu allilowego **30**, z którego po przegrupowaniu Johnsona Claisena z udziałem ortoocetanu trietylowego i hydrolizie utworzonego estru otrzymuje się γ,δ -nienasycony kwas **32**. Ostatnim etapem jest jodolaktonizacja w układzie eter dietylowy/wodorowęglansodu, prowadząca do otrzymania mieszaniny γ i δ -laktonów (**33–35**) (Schemat 7). Z kwasu można również otrzymać chloro- i bromolaktony, stosując jako reagenty odpowiednio *N*-bromoimid kwasu bursztynowego (NBS) i *N*-chloroimid kwasu bursztynowego (NCS). W opisany sposób zostały otrzymane halogenolaktony z aldehydu anyżowego [13].



Schemat 7. Synteza jodolaktonów z aldehydów aromatycznych wykorzystująca reakcję kondensacji aromatycznego prekursora z acetonem

Scheme 7. Synthesis of iodolactones from aromatic aldehydes started by condensation of an aromatic precursor with acetone

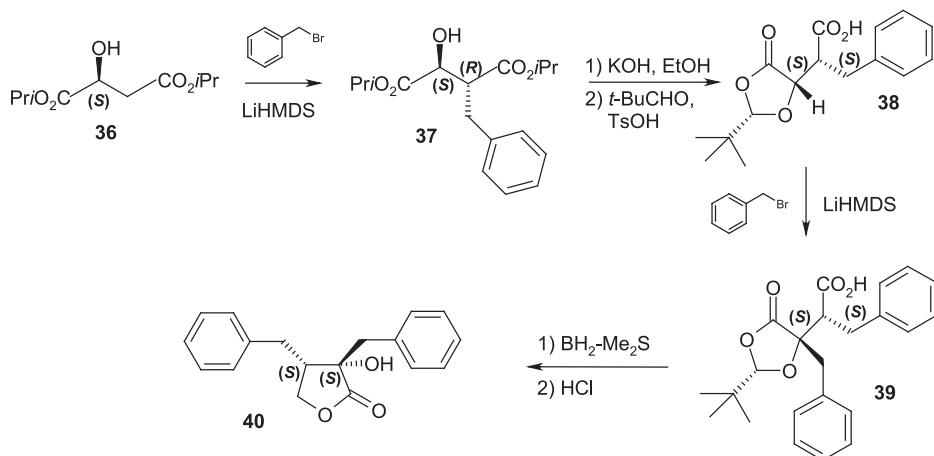
2. SYNTEZA OPTYCZNIE CZYNNYCH γ -LAKTONÓW

Ze względu na wielokrotnie udokumentowaną prawidłowość, iż aktywność biologiczna związków zależy od konfiguracji centrów chiralności obecnych w cząsteczce, wciąż opracowywane są metody otrzymania laktonów z pierścieniem aromatycznym w postaci optycznie czystych stereoisomerów. Metody te można podzielić na trzy rodzaje. W pierwszej z nich substratem w syntezie jest chiralny prekursor natomiast dwie pozostałe zakładają transfer chiralności do cząsteczki w wyniku działania chiralnych katalizatorów chemicznych lub biokatalizatorów w postaci enzymów zawartych w organizmach żywych lub stosowanych w postaci wyodrębnionych preparatów.

2.1. SYNTEZA LAKTONÓW Z CHIRALNYCH PREKURSORÓW

Przykładem pierwszej z metod jest synteza optycznie czynnych α -hydroksy- α,β -diarylo- γ -laktonów z komercyjnie dostępnych estrów kwasu jabłkowego (Schemat 8). Kluczowym etapem jest tej syntezy jest stereoselektywne alkilowanie substratów w pozycjach C-2 oraz C-3 z wykorzystaniem amidku

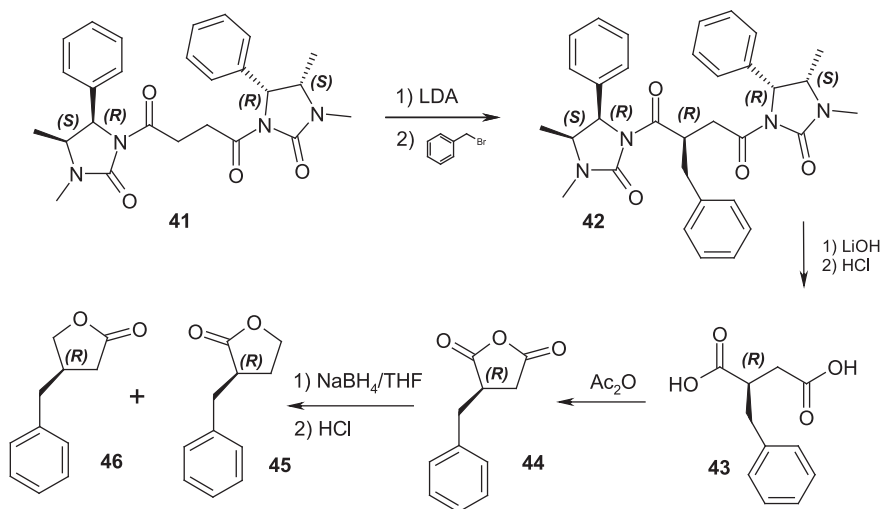
N,N-bis(trimetylosililo)litu (LiHMDS). Wydajność prowadzonej reakcji zależała głównie od rodzaju zastosowanego substratu. Ester metylowy ulegał reakcji wolniej oraz z mniejszą selektywnością niż ester izopropylowy kwasu jabłkowego (**36**). Otrzymaną alkilową pochodną estru izopropylowego kwasu jabłkowego (**37**) poddano hydrolizie. Uzyskano dikarboksyłową pochodną, którą w następnym etapie przeprowadzono w *cis*-1,3-dioksolan-4-on (**38**). Związek **38** ponownie alkilowano diastereoselektywnie w pozycji C-2 według tej samej procedury. Otrzymany produkt **39** został następnie przekształcony w optycznie czynny α -hydroksy- α,β -difenylo- γ -lakton (**40**) w wyniku redukcji kompleksem boranu z siarczkiem dimetylowym ($\text{BH}_3\text{-Me}_2\text{S}$) i laktonizacji indukowanej jonami H^+ (Schemat 8). Opracowana metoda syntezy umożliwia otrzymanie optycznie czynnych α -hydroksy- α,β -diarylo- γ -laktonów zawierających różne podstawniki aromatyczne w pierścieniu laktonowym [14].



Schemat 8. Synteza enancjomerycznie wzbogaconych α -hydroksy- α,β -difenylo- γ -laktonu (**40**) w wyniku stereoselektywnego alkilowania estru kwasu jabłkowego (**36**) (adaptowano z pracy [14])

Scheme 8. Synthesis optically enriched α -hydroxy- α,β -diphenyl- γ -lactone (**40**) by stereoselective alkylation at C-2 and C-3 position of malic acid ester (**36**) (adapted from Ref. [14])

Reakcja alkilowania została również zastosowana przez Pohmaktora i in. [15] do otrzymania optycznie czynnych α - oraz β -benzylo- γ -laktonów (**45**, **46**) (Schemat 9). W wyniku diastereoselektywnego alkilowania chiralnej pochodnej kwasu bursztynowego **41** uzyskano związek **42** o konfiguracji *R* nowego powstałego centrum stereogenego. Jego hydroliza doprowadziła do otrzymania enancjomerycznie wzbogaconej pochodnej kwasu bursztynowego (**43**), która następnie została przekształcona w bezwodnik **44**. Redukcja bezwodnika **44** prowadziła do powstania optycznie czynnych α - oraz β -benzylo- γ -laktonów (**45**, **46**) [15].

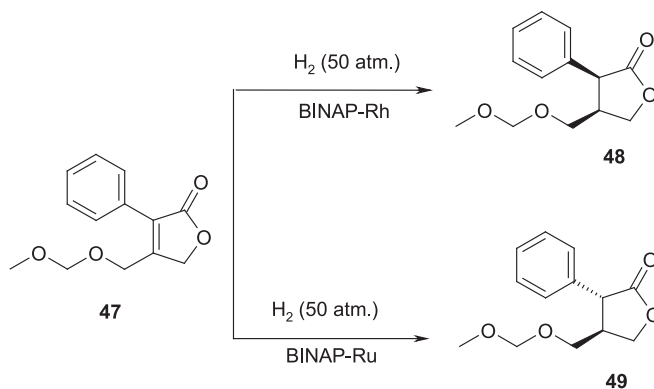


Schemat 9. Synteza (*R*)- α - oraz β -benzyl- γ -laktonów (45, 46) z chiralnej pochodnej kwasu bursztynowego (41) (adaptowano z pracy [15])

Scheme 9. Synthesis of (*R*)- α and β -benzyl- γ -lactones (45, 46) from chiral succinic acid derivative (41) (adapted from Ref. [15])

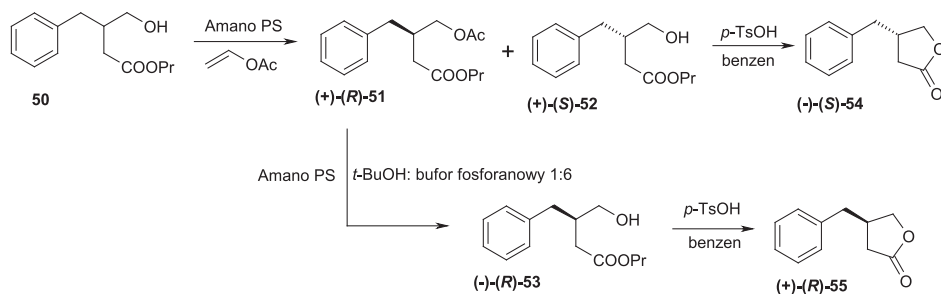
2.2. ZASTOSOWANIE CHIRALNYCH KATALIZATORÓW CHEMICZNYCH

Przykładem zastosowania chiralnych katalizatorów chemicznych w syntezie laktonów z pierścieniem aromatycznym jest enancjoselektywne uwodornienie substratów olefinowych z udziałem chiralnych kompleksów 2,2'-bis(difenylofosfino)-1,1'-binaftyłu z rodem (BINAP-Rh) oraz rutenem (BINAP-Ru) prowadzące do otrzymania optycznie czynnych związków o aktywności biologicznej. Stosując tą metodę Donate i in. [7] zaproponowali syntezę enancjomerycznie wzbogaconych α -fenylo- γ -laktonów 48, 49 z α,β -nienasyconego- γ -laktonu 47 z podstawnikiem fenylowym w pozycji α . Asymetryczne uwodornienie laktonu 47 za pomocą BINAP-Rh doprowadziło do otrzymania *cis*- γ -laktonu 48, z kolei zastosowanie BINAP-Ru skutkowało utworzeniem *trans*-izomeru 49 (Schemat 10) [7].

Schemat 10. Enancjoselektywne uwodornienie α,β -nienasyconego- γ -laktonu **47** (adaptowano z pracy [7])Scheme 10. Enantioselective hydrogenation of α,β -unsaturated- γ -lactone **47** (adapted from Ref. [7])

2.3. OTRZYMYWANIE LAKTONÓW Z WYKORZYSTANIEM ENZYMÓW

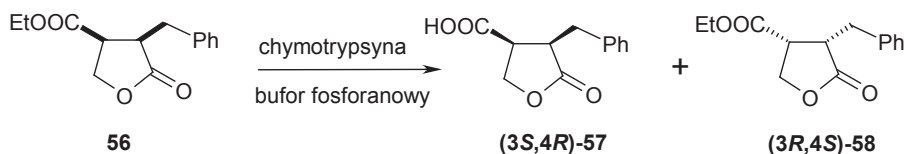
Stosunkowo najliczniej w literaturze opisane są metody otrzymywania optycznie czynnych laktonów z podstawnikiem aromatycznym z wykorzystaniem procesów biotransformacji. Caro i in. [16] zaproponowali chemoenzymatyczną syntezę obu enancjomerów β -benzylo- γ -laktonu (**54**, **55**) z zastosowaniem lipaz. W pierwszym etapie została przeprowadzona enzymatyczna transestryfikacja racemicznego β -benzylo- γ -hydroksy estru **50** z wykorzystaniem octanu winylu jako rozpuszczalnika oraz dawcy grupy acylowej. Najlepszy wynik osiągnięto stosując jako biokatalizator lipazę z *Pseudomonas cepacia* (Amano PS). Otrzymano nieprzereagowany (S)-(+)- γ -hydroksyester **52** (ee = 94%) oraz octan jego drugiego enancjomeru **51** z nadmiarem enancjomerycznym 69% (Schemat 11). W celu zwiększenia nadmiaru enancjomerycznego octanu **51** przeprowadzono jego hydrolizę przy udziale lipazy Amano PS, uzyskując (R)-(-)- γ -hydroksyester **53** z nadmiarem enancjomerycznym 96%. Optycznie czyste γ -hydroksyestry **52**, **53** poddano następnie laktonizacji przy udziale kwasu *p*-toluenosulfonowego w benzenie, otrzymując enancjomerycznie wzbogacone β -benzylo- γ -laktony **54**, **55** (ee odpowiednio 94 i 96%) [16].



Schemat 11. Kinetyczny rozdział racemicznego γ -hydroksyestru **50** przy użyciu lipazy Amano PS oraz synteza optycznie czystych β -benzyl- γ -laktonów **54**, **55** (adaptowano z pracy [16])

Scheme 11. Kinetic resolution of racemic γ -hydroxy ester **50** by lipase Amano PS and synthesis of optically pure β -benzyl- γ -lactones **54**, **55** (adapted from Ref. [16])

Jedną z metod prowadzących do otrzymania optycznie czynnych γ -laktonów jest enzymatyczny rozdział mieszanin racemicznych tych związków. Berti i in. [17] otrzymali optycznie wzbogacone kwasy parakoinowe posiadające podstawnik α -benzylowy w pozycji α pierścienia γ -laktonowego. Do enancjoselektywnej hydrolyzy estrów etylowych γ -laktonu **56** zastosowano komercyjnie dostępne enzymy. Największą enancjoselektywnością charakteryzowały się α -chymotrypsyna (α -CT) oraz lipaza z trzustki wieprzowej (PPL). Otrzymano (-)-(3*S*,4*R*)- γ -lakton **57** z grupą karboksylową w pozycji β (ee > 99%, E > 200) (Schemat 12). Na uwagę zasługuje również fakt, iż zadowalający wynik enzymatycznej hydrolyzy *trans* izomeru laktonu **56** uzyskano jedynie przy zastosowaniu α -CT jako biokatalizatora. Otrzymano (-)- γ -lakton z nadmiarem enancjomerycznym > 92% a enancjoselektywność reakcji wynosiła 29. W obu przypadkach stopień konwersji oraz nadmiar enancjomeryczny nieprzereagowanych estrów był niski [17].

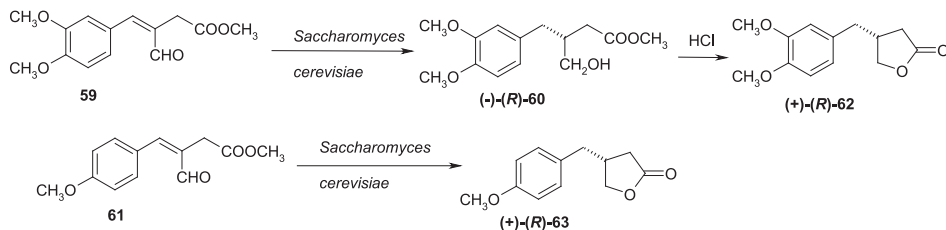


Schemat 12. Enancjoselektywna hydrolyza estru etylowego kwasu α -benzylu parakoinowego **56** (adaptowano z pracy [17])

Scheme 12. Enantioselective hydrolysis of ethyl ester of α -benzyl paraconic acid **56** (adapted from Ref. [17])

2.4. PROCESY BIOTRANSFORMACJI Z UŻYCIEM CAŁYCH KOMÓREK DROBNOUSTROJÓW

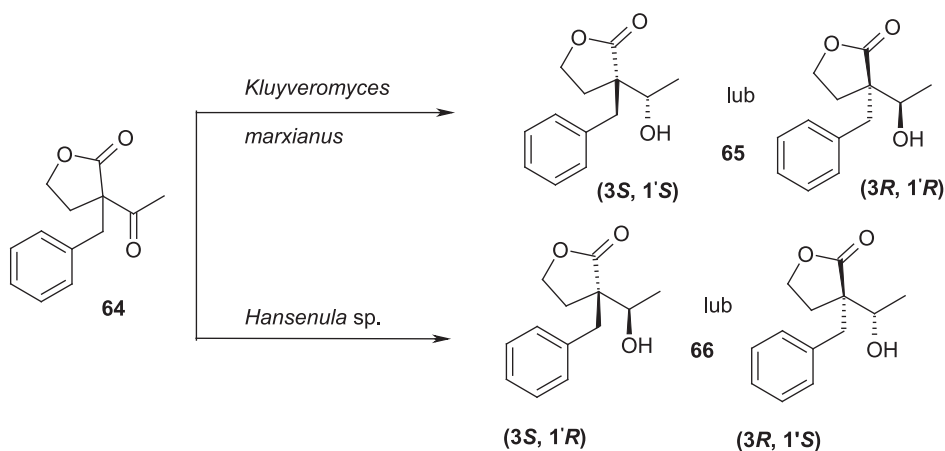
Optycznie czynne γ -laktony z podstawnikiem aromatycznym mogą zostać otrzymane w wyniku biotransformacji z udziałem całych komórek drobnoustrojów. Koul i in. [18] zredukowali α,β -nienasycone aldehydy **59**, **61** za pomocą całych komórek drożdży piekarskich *Saccharomyces cerevisiae* (Schemat 13). Zauważono, iż jeśli do reakcji zastosowano aldehyd zawierający podstawnik 3,4-dimetyksyfenylowy (**59**), wyizolowano enanjomerycznie wzbogacony hydroksyester **60** będący produktem redukcji wiązania podwójnego oraz grupy karbonylowej. Jego laktonizacja w środowisku kwaśnym umożliwiła otrzymanie optycznie czynnego β -benzylo- γ -laktonu **62** (ee = 47%). Z kolei redukcja aldehydu z podstawnikiem *para*-metoksyfenylowym (**61**) za pomocą tego samego biokatalizatora prowadziła bezpośrednio do powstania enanjomerycznie wzbogaconego β -benzylo- γ -laktonu **63** (ee = 46%). W tym przypadku nie wyizolowano produktu pośredniego transformacji czyli optycznie czynnego alkoholu, co świadczy o tym, że reakcje redukcji, hydrolizy i laktonizacji zachodzą z bardzo dużą szybkością [18].



Schemat 13. Synteza enanjomerycznie wzbogaconych β -benzylo- γ -laktonów **62**, **63** z α,β -nienasyconych aldehydów **59**, **61** (adaptowano z pracy [18])

Scheme 13. Synthesis of enantiomerically enriched β -benzyl- γ -lactones **62**, **63** from of α,β -unsaturated aldehydes **59**, **61** by baker's yeast (adapted from Ref. [18])

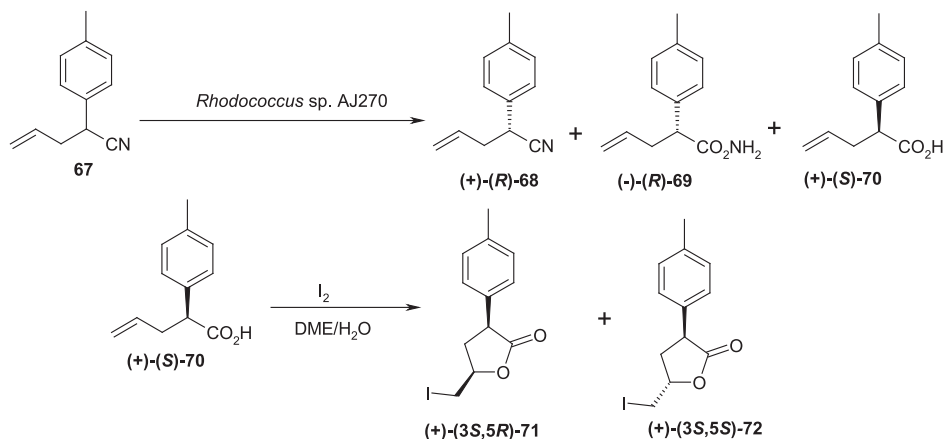
Ribeiro i in. [19] zredukowali grupę karbonylową α -benzylo- α -acetylo- γ -laktonu **64** za pomocą całych komórek drożdży oraz grzybów strzępkowych. Stereospecyficzność prowadzonej reakcji zależała od rodzaju zastosowanego mikroorganizmu. Jeśli jako biokatalizatora użyto szczepów *Geotrichum candidum*, *Kluyveromyces marxianus* lub *Aspergillus niger*, obserwowano powstawanie hydroksylaktonu *anti* (**65**). Z kolei użycie *Hansenula* sp. jako biokatalizatora powodowało powstawanie stereoisomeru *syn* (**66**) (Schemat 14) [19].



Schemat 14. Mikrobiologiczna redukcja α -benzyl- α -acetyl- γ -laktonu **64** (adaptowano z pracy [19])

Scheme 14. Microbial reduction of α -benzyl- α -acetyl- γ -lactone **64** (adapted from Ref. [19])

Mikrobiologiczna hydroliza 2-fenyl-4-pentenitryli stosowana jest do otrzymywania optycznie czynnych kwasów karboksylowych, które mogą być bezpośrednimi prekursorami γ -laktonów. Wang i Zhao [20] przeprowadzili biotransformacje 2-fenyl-4-pentenitryli z różnymi podstawnikami w pierścieniu aromatycznym. Jednym z nich był 2-(4'-metylofenyl)-4-pentenitryl **67**. Mikrobiologiczna hydroliza nitrylu **67** za pomocą całych komórek szczepu *Rhodococcus* sp. AJ270 posiadającego enzymy hydratazę nitrylową oraz amidazę, prowadziła do otrzymania amidu **69** oraz kwasu **70** z nadmiarami enancjomerycznymi wynoszącymi odpowiednio 97 i 99% (Schemat 15). (*S*)-(+)-Kwas **70** poddano jodolaktonizacji otrzymując optycznie czynne δ -jodo- γ -laktony **71**, **72** [20].



Schemat 15. Hydroliza nitrilu **67** przy udziale *Rhodococcus* sp. AJ270 oraz laktonizacja enanjomerycznie czystego kwasu **70** (adaptowano z pracy [20])

Scheme 15. Hydrolysis of nitrile **67** conducted by *Rhodococcus* sp. AJ270 followed by lactonization of enantiomerically enriched acid **70** (adapted from Ref. [20])

UWAGI KOŃCOWE

Przytoczone przykłady ilustrują różne strategie syntezy laktonów zawierających pierścień aromatyczny. Synteza tej grupy połączeń cieszy się wzrastającym zainteresowaniem chemików ze względu na fakt, iż obecność podstawników aromatycznych zwiększa lipofilowość omawianej grupy związków. Może to mieć szczególne znaczenie w przypadku związków o aktywności antynowotworowej, z uwagi na ich ułatwiony transport do docelowych komórek. Przedmiotem szczególnego zainteresowania jest też synteza tych związków w postaci pojedynczych enancjomerów o ściśle zdefiniowanych centrach chiralności.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] Y. Bourdreux, E. Bodio, C. Willis, C. Billaud, T. Le Gall, C. Mioskowski, *Tetrahedron*, 2008, **64**, 8930.
- [2] R. Bandichhor, B. Nosse, O. Reisser, *Top. Curr. Chem.*, 2005, **243**, 43.
- [3] B. Nadal, S.A.-L. Thetiot-Laurent, S. Pin, J.-P. Renault, D. Cressier, G. Rima, A. Le Roux, S. Meunier, A. Wagner, C. Lion, T. Le Gall, *Bioorg. Med. Chem.*, 2010, **18**, 7931.
- [4] C. Le Floch, C. Bughin, E. Le Gall, E. Léonel, T. Martens, *Tetrahedron Lett.*, 2009, **50**, 5456.
- [5] C. Le Floch, E. Le Gall, E. Léonel, T. Martens, T. Cresteil, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2011, **21**, 7054.
- [6] Ł. Albrecht, J. Wojciechowski, A. Albrecht, W. M. Wolf, A. Janecka, K. Studzian, U. Krajewska, M. Różalski, T. Janecki, H. Krawczyk, *Eur. J. Med. Chem.*, 2010, **45**, 710.
- [7] P.M. Donato, D. Frederico, R. da Silva, M.G. Constantino, G. Del Ponte, P.S. Bonatto, *Tetrahedron Asymmetry*, 2003, **14**, 3253.

- [8] B.H. Alizadeh, A. Foroumadi, S. Emami, M. Khoobi, F. Panah, S.K. Ardestani, A. Shafiee, *Eur. J. Med. Chem.* 2010, **45**, 5979.
- [9] S. GowriSankar, C.G. Lee, J. N. Kim, *Tetrahedron Lett.*, 2004, **45**, 6949.
- [10] X. Wu, W. Cao, H. Zhang, J. Chen, H. Jiang, H. Deng, M. Shao, J. Zhang, H. Chen, *Tetrahedron*, 2008, **64**, 10331.
- [11] Y.-S. Hon, H.-F. Chen, C.-Y. Kao, C.-Z. Luo, *Tetrahedron*, 2010, **66**, 8468.
- [12] M. Pohmakotr, L. Sampaongoen, A. Issaree, P. Tuchinda, V. Reutrakul, *Tetrahedron Lett.*, 2003, **44**, 6717.
- [13] M. Mazur, W. Gładkowski, C. Wawrzeńczyk, *Przem. Chem.*, 2011, **90**, 918.
- [14] M. Sefkow, A. Kelling, U. Schilde, *Tetrahedron Lett.*, 2010, **42**, 5101.
- [15] M. Pohmakotr, D. Soorukram, P. Tuchinda, S. Prabpai, P. Kongsaree, V. Reutrakul, *Tetrahedron Lett.*, 2004, **45**, 4315.
- [16] Y. Caro, C.F. Masaguer, E. Raviña, *Tetrahedron Asymmetry*, 2001, **12**, 1723.
- [17] F. Berti, C. Forzato, G. Furlan, P. Nitti, G. Pitacco, E. Valentin, E. Zangrando, *Tetrahedron Asymmetry*, 2009, **20**, 313.
- [18] S. Koul, B. Singh, S.C. Taneja, G.N. Quazi, *Tetrahedron*, 2003, **56**, 3487.
- [19] J.B. Riberio, L.M.A. Sousa, C.A.M. Fraga, S.G.F. Leite, M.C.K.V. Ramos, F.R. de Aquino Neto, L.C.S. Aguiar, R. O.M.A de Souza, O.A.C. Antunes, *Catal. Commun.*, 2008, **9**, 1782.
- [20] M.-X. Wang, S.-M. Zhao, *Tetrahedron Asymmetry*, 2002, **13**, 1695.

Praca wpłynęła do Redakcji 19 lipca 2013

FELIETON NAUKOWY



OKRUCHY XXX.
O TAJEMNICY ZAWARTEJ
W „PAMIĘTNIKU ZNALEZIONYM W SARAGOSSIE”
JANA POTOCKIEGO

Ignacy Z. Siemion

*Wydział Chemii, Uniwersytet Wrocławski
ul. F. Joliot-Curie, 50-383 Wrocław*



Ignacy Z. Siemion, urodzony w 1932 r., ukończył studia chemiczne na Uniwersytecie Moskiewskim w 1955 r. Doktorat nauk technicznych na Politechnice Wrocławskiej – 1964. Doktor habilitowany nauk chemicznych – 1968. Profesor nadzwyczajny – 1974, profesor zwyczajny – 1981. Był kierownikiem Zakładu Chemii Organicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Własne zainteresowania badawcze: chemia i stereochemia peptydów i białek. Wypromował 23 doktorów chemii, z których pięcioro się habilitowało. Autor 9 książek, 275 prac oryginalnych i ponad 140 artykułów przeglądowych oraz dotyczących historii nauki. W latach 1983–1994 Redaktor Naczelny „Wiadomości Chemicznych”. Obecnie opiekun Gabinetu Historii Chemii Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego.

W szkicu tym chcemy przedstawić pewną nową hipotezę na temat przewodniej idei znakomitej powieści naszego oświeceniowego pisarza i uczonego Jana Potockiego. Krótko mówiąc, chcemy tu pokazać, że główną osią tej książki jest historia wzrostu i upadku Zakonu Różokrzyżowców, których bezpośrednim świadkiem był pisarz. W jego wspaniałym dziele wiele jest nawiązań i odwołań do doświadczeń własnego życia. Na szereg takich, zauważalnych w dziele nawiązań zwrócili ostatnio uwagę autorzy obszernej biografii Jana Potockiego [1]. Oczywiście wyobraźnia pisarza ukrywa takie momenty w gąszczu alegorycznych odniesień, co sprawia, że są one niełatwe do odczytania. Oto mały przykład takiego stanu rzeczy. Głównym narratorem jest w powieści naczelnik Cyganów, Avadero. On to głównie wprowadza na kolejne stronicie powieści coraz to nowe postacie, opowiadające swoje przygody. Sam zaś, opowiadając o swoim dzieciństwie i ojcu, don Felipe de Avadero, informuje, że ten, niepokieszony po stracie małżonki, zaczął uczęszczać do teatru, gdzie właśnie wystawiano sztukę, „podtrzymywaną przez stronnictwo Polaccos”, którą wygwizdywało stronnictwo Sorices. Łatwo się można domyśleć, że miano Sorices jest prostym anagramem miana Rosices [2]. Taka identyfikacja tych oznaczeń natychmiast przenosi nas w lata Sejmu Wielkiego, kiedy Potocki osobiście wziął czynny udział w działalności politycznej, wspomagając Stronnictwo Patriotyczne (Polaccos). W tych sporach ważną, jak wiadomo, rolę odegrał teatr i zgodnie z tą wskazówką powieściowy Avadero staje się namiętnym teatromanem, przeciwnikiem Rosicos (to jest oczywiście partia prorosyjska, przeciwna modernizacji ustroju kraju). Podczas rozmowy z literatami „u księgarza Moreno” (aż się prosi, by tu podłożyć nazwisko warszawskiego księgarza Grölla) dowiedział się Avadero, że cierpią oni na brak dobrego inkaustu. Postanowił więc uruchomić w swoim domu wytwórnię atramentu, na użytek potrzebujących. Taką więc fantazyjną postać przybrała na stronicach „Rękopisu” znana działalność Potockiego, który w roku 1788 uruchomił na rzecz stronnictwa patriotycznego własną Drukarnię Wolną, gdzie wydał kilkaset druków własnych i innych autorów i drukował gazetę sejmową, „Journal Hebdomadaire de la Diete”. Życiorys ojca Naczelnika Cyganów obdarzył więc pisarz własnymi przeżyciami. Nie znaczy to, by ich miało zabraknąć w wizerunku samego Naczelnika. Jak niegdyś Jan Potocki służył on jakiś czas na galerach Rycerzy Maltańskich [3].

Osią powieści Potockiego, wokół której owinął on dziesiątek indywidualnych opowieści, jest tajemnica Gomelezów. Ten sięgający czasów władztwa muzułmańskiego w Hiszpanii ród, jest posiadaczem tajnej kopalni złota, z której od lat czerpie na własny użytek solidne dochody. To jest właśnie owa tajemnica rodu. Chcąc, wobec braku męskich potomków, dopuścić do niej odległego kuzyna, kapitana gwardii walońskiej Alfonsa van Wordena i skłonić go do przedłużenia rodu, jego członkowie poddają go próbom, by sprawdzić czy jest należycie odważny, i czy dochowuje tajemnicy, a kiedy po złożeniu tego egzaminu jest wreszcie dopuszczony do sekretu, okazuje się, że kopalnia się wyczerpała i nie będzie nadal dawała zysków. Zawód, jaki musiał dotknąć van Wordena, osładzają wprawdzie miłosne stosunki z siostrami-bliźniaczkami, Eminą i Zibeldą, i pożądane następstwa tych związków, ale przecież, nie ukrywajmy, cały trud poszedł na marne. Nie ma złota! A co się stało

z potężną i wpływową organizacją Gomelezów, tego powieść nie ujawnia, ograniczając się do pobieżnego zarysowania dalszych losów pojedynczych jej członków. W każdym razie, zwołane doraźnie posiedzenie kierownictwa rodu zarządza zakończenie prac wydobywczych i wysadzenie w powietrze resztek kopalni.

Otóż, jak powiedziałem na wstępie, organizacja Gomelezów wydaje się być literacką transpozycją Zakonu Różokrzyżowców. Podstawą długiego trwania Zakonu było poszukiwanie tajemnicy przetwarzania metali nieszlachetnych w złoto. Zgodnie z wyznawaną podówczas powszechnie doktryną taka transmutacja miała być w pełni możliwa. Bardzo wiele majątków i środków utopiono w tych poszukiwaniach, wspomagając prace laboratoryjne praktykami kabalistycznymi i spirytystycznymi oraz ściśle zachowując tajemnicę wobec profanów. Wiara w możliwość transmutacji była wtedy powszechna. Początki natomiast zorganizowanego ruchu Różokrzyżowców odnoszą się do pierwszych lat XVII wieku i do działań kręgu protestanckich intelektualistów, skupionych w Tybindze. Za twórcę ruchu uważa się protestanckiego pastora, Johanna Valentina Andreägo. Początkom ruchu, a zwłaszcza wytworzonej przez ten ruch doktryny, obszerne i zdumiewające swoją erudycją studium poświęcił niedawno T. Cegielski [4]. Cegielski upatruje w organizacji Różokrzyżowców poprzedników wolnomularstwa i uważa, iż „część swoich zasad ideowych, ale równocześnie wszystkie swoje funkcje, a także symboliczny język i inicjacyjny charakter, wolnomularstwo przejęło bezpośrednio lub pośrednio od ruchu Różokrzyżowców” [5]. Dorzućmy tutaj jeden szczegół, świadczący o polskim udziale w tworzeniu towarzystw, łączących poszukiwaczy kamienia filozoficznego. Wśród drukowanych, a przypisywanych naszemu alchemikowi, Michałowi Sędziwojowi, pism, znaleźć można wydane w roku 1691 „Statuty Stowarzyszenia Nieznanych Filozofów”, będące wezwaniem do utworzenia międzynarodowego towarzystwa poszukiwaczy tego kamienia [6]. Polskie tłumaczenie tekstu tych statutów znajduje się w dziele pt „Woda, która nie moczy rąk. Alchemia Michała Sędziwoja” Z. Szydły [7]. Pewne dane wskazują, że organizacja taka istotnie zaistniała. Pracując nad wydaniem tłumaczenia „Chemii filozoficznej” Jakuba Barnera [8] znalazłem w innym, wydanym w Gdańsku w roku 1683, druku tego autora wzmiankę, iż podczas podróży do Lipska napotkał on studenta, który mu opowiadał o swoich kontaktach z „Synami Sędziwoja” (Filiu Sendivogii), odprawiającymi „białe msze” [9].

Historia Zakonu Różokrzyżowców na przełomie XVII i XVIII wieków nie jest jasno zaznaczona. Jednakże prawdziwy renesans ruchu i jego rozkwit nastąpił w połowie wieku XVIII. W całej zachodniej Europie powstały komórki tej organizacji, która działała niezależnie od rozkwitającego podówczas wolnomularstwa. W latach 1756–1757 konfraternia różanego krzyża opanowała całe Niemcy, a w 1767 ogłosiła ostateczną redakcję swojej konstytucji. Szczególnego znaczenia nabrało berlińskie odgałęzienie stowarzyszenia. Jego zwierzchnicy, J.R. Bischofswerder i Woelner, stali blisko następcy tronu pruskiego, Fryderyka Wilhelma, i po jego wstąpieniu na tron zostali nawet jego ministrami. [10]. W Warszawie działały w latach 80. XVIII wieku dwa koła Różokrzyżowców. Do stowarzyszenia należał nawet król. Działali tam m.in. stolnik koronny, przyjaciel króla, August Moszyń-

ski, kurlandzki baron Karol Henryk Heyking, dwaj gdańszczanie, baron Scheffler, królewski dyrektor górniczy, i Antoni Schröder, probierz Skarbu Koronnego, lekarz Czartoryskich Paul Goltz, (ten miał siódmy stopień wtajemniczenia w Zakonie Różokrzyżowym) i inni. O warszawskich Różokrzyżowcach pisał nie tak dawno R. Bugaj [11]. Kronikarz czasów stanisławowskich Warszawy, Antoni Magier, tak pisał o prawdziwej manii alchemicznej, jaka opanowała wówczas miasto: „zaprzętało sobie głowę dochodzeniem i wyszukiwaniem sposobu robienia złota pod nazwiskiem kamienia filozoficznego” (...). Byli panowie, którzy łożyli na to całe majątki. Moszyński, stolnik koronny, zwierzył się królowi, że dużo nad tym wynalazkiem pracuje, i że mu tylko brakuje więcej pieniędzy. Widać było po ulicach sterzące na dwór po różnych domach rury żelazne dla „odchodu dymu” [12] W latach osiemdziesiątych XVIII wieku zarysował się jednak stopniowy upadek towarzystwa. Zawiedzeni brakiem rezultatów prowadzonych prac, a zwiedzeni możliwością poznania tajemnic, rzekomo posiadanych przez Zakon, jego członkowie wycofywali się z czynnej działalności. Do takich należał Jerzy Forster, przez krótki czas profesor historii naturalnej Szkoły Głównej Litewskiej. Zostawił on swoją pracę nauczycielską w Kassel i powoli jechał do Wilna, przez Lipsk, Freiberg, Pragę, Wiedeń, Kraków i Warszawę. Był to rok 1784. W Kassel, był Forster czynnym Różokrzyżowcem w siódmym stopniu wtajemniczenia. Popadł w długi i odzegnał się od Towarzystwa. Dokładniej mówiąc, odrzucił on całą mistyczno-kabalistyczną oprawę prac alchemicznych, i traktował kwestie transmutacji metali jako kwestię czysto badawczą, uważając nadal, że transmutacja jest możliwa. Jadąc do Wilna, odwiedzał po drodze kolejne komórki towarzystwa, prowadził rozmowy, nie ujawniając jednak swojego sceptycyzmu. Obraz, jaki rysuje się stąd w jego listach do przyjaciół i w dzienniku podróży, to obraz napotykanego niemal powszechnego zwątpienia. W Wiedniu, jak stwierdził, Koła Różokrzyżowców całkowicie zawiesiły prace. Warszawa była wtedy jeszcze aktywna. Tak więc, podróż Forstera daje nam poznać Zakon Różokrzyżowców w stanie wyraźnego kryzysu [13]. Jesteśmy zresztą już bliscy kresu działalności Zakonu. Bo oto w styczniu 1787 roku zwierzchnictwo Zakonu, usytuowane wtedy w Berlinie, zarządziło zawieszenie, aż do odwołania, prac Zakonu, we wszystkich jego ogniwach. To odwołanie nigdy nie miało nastąpić [14].

Między losami kopalni złota rodu Gonzalezów, a losami Zakonu Różokrzyżowców rysuje się więc wielka paralela. Nieodparcie nasuwa się wniosek, że losy kopalni mogły być dla Potockiego obrazem losów Zakonu, których był przecież bezpośrednim świadkiem.

W tym miejscu musi się nasuwać pytanie o przyczyny, które sprawiły, że tak bujnie rozwijający się Zakon Różokrzyżowców gwałtownie zszedł ze sceny. Było to niewątpliwie spowodowane dokonującą się właśnie wtedy rewolucją naukową chemii, która zdyskredytowała ostatecznie mrzonki alchemiczne, całą ideę transmutacji. Spójrzmy bowiem na zadziwiającą koincydencję wydarzeń. Głównym sprawcą rewolucji w chemii był francuski uczyony, Antoine Laurent de Lavoisier (1743–1794). Jak sam pisał, prace nad nową teorią spalania, która była główną osią nowej chemii, rozpoczął w roku 1772. Nie znaczy to, aby nowe idee natychmiast się przyjęły.

Przeciwnie, napotkały one żywy opór, zwłaszcza w krajach niemieckich. Dopiero w połowie lat osiemdziesiątych koncepcje Lavoisiera znalazły uznanie i poparcie wśród wybitnych chemików francuskich. W październiku 1786 roku chemik młodszego pokolenia, A.F. Fourcroy, wydał w Paryżu podręcznik pt „Elements d’histoire naturelle et de chimie”, w którym obok dawnej teorii flogistonowej przedstawił teorię spalań Lavoisiera, dając tej ostatniej wyraźnie pierwszeństwo. Rok później Lavoisier, wraz z trzema innymi popierającymi go uczonymi (L.B. de Morveau, C.L. Bertholet i A.F. Fourcroy) wspólnie wydali zarys nowej naukowej nomenklatury chemicznej – „Methode de Nomenclature Chimique”. Została ona oparta na koncepcjach Lavoisiera. W końcu, w 1789 roku, sam Lavoisier wydał podręcznik nowej chemii, „Traite’ elementaire de chimie, presente’ dans un order nouveau et d’apres les decouvertes modernes”. Obszerne fragmenty tego historycznego dzieła ukazały się niedawno w polskim przekładzie R. Mierzeckiego [15] Były to daty oznaczające definitywne rozstanie z dawną tradycją chemiczną.

W tym kontekście fakt, że to w roku 1787 kierownictwo Różokrzyżowców ogłosiło „Silentium” dla swoich kółek, wydaje się być odpowiedzią towarzystwa na dokonania nauki. Ogłoszeniem kapitulacji. Dodajmy, że pierwsza, rękopiśmienna wersja „Rękopisu” datowana jest na rok 1794. To nie może być zbieg okoliczności. Wersja ta zawiera kompletny plan powieści, podział na dni, stanowiące kolejne rozdziały, a także wszystkie najważniejsze postacie: Szejka Gomelezów, Avadoro, naczelnika Cyganów, Kabalistę, Rebekę i Velasqueza [16]. Jak się więc wydaje, „Rękopis” mógł być rodzajem komentarza pisarza do dokonujących się wydarzeń. Nie mamy wprawdzie danych, że pisarz osobiście uczestniczył w praktykach Różokrzyżowców. Nie można jednak wykluczyć, by nie mógł mieć zachęt ze strony choćby króla Stanisława Augusta.

W biografii Potockiego, napisanej przez Rosseta i Triaire’go, znajdujemy informację, że w czasie swojego dłuższego pobytu w Warszawie (lata 1788–1791), dwukrotnie wypożyczał z biblioteki królewskiej ceniony w wieku XVIII podręcznik chemii „Dictionaire de chimie” P. Macquera [17]. A więc Potockiemu znana była dawna chemia we flogistonowym ujęciu. W ogóle ten urodzony humanista zdradzał duże zainteresowanie naukami przyrodniczymi. Pisałem o tym krótko w innym miejscu [18]. Nasuwa się więc tutaj przypuszczenie, że Potocki mógł w jakiejś mierze uczestniczyć w pracach warszawskich Różokrzyżowców. Po cóż mu bowiem był potrzebny dykjonarz Macquera? Jeśli tak było na prawdę, to nadawało by to „Rękopisowi” interesujący odcień autobiograficzny.

Jak wiadomo, główną nowością w koncepcjach Lavoisierera był nowa teoria spalań, przekreślająca istnienie postulowanego czynnika palności, flogistonu. Nie ona jednak odegrała pierwszorzędna rolę w upadku prac Różokrzyżowców. Ważniejsze tu było, jak się wydaje, nowe rozumienie istoty pierwiastka chemicznego. „Wszystkie substancje – pisał Lavoisier – których dotychczas żadnymi środkami nie potrafiliśmy rozłożyć, są dla nas pierwiastkami; nie dlatego, że możemy zapewnić, iż te ciała, które uważamy za proste, nie są same złożone z dwu, lub nawet z więk-

szej liczby początków, lecz ponieważ te początki nigdy się nie rozdzielają, lub raczej ponieważ nie mamy żadnego sposobu, by je rozdzielić, działają one na nas w sposób ciał prostych i nie możemy ich uważać za złożone, póki doświadczenie i obserwacja nie dostarczą nam na to dowodu” [19]. Było to właściwie powtórzenie definicji pierwiastka, jaką podał Robert Boyle. Nie przeszkadzało to temu uczonemu osobiście uczestniczyć w poszukiwaniach kamienia filozoficznego. U Lavoisiera definicja ta nabrała mocy aksjomatu naukowego, na którym oparła się nowa chemia. W ten sposób na sporządzonej przez niego liście „substancji prostych metalicznych, dających się ukwasorodnić” znalazły się obok siebie złoto, srebro, rtęć, ołów. A przecież to właśnie rtęć i ołów były przedmiotem wiekowych prób alchemików nad pozyskaniem szlachetnych metali z nieszlachetnych. Dla takich działań nie było miejsca w nowej chemii.

Pewne szczegóły tekstu „Rękopisu” sugerować mogą, że Potocki mógł też mieć na myśli okoliczności związane z działaniami sekty iluminatów awiniońskich hrabiego Tadeusza Grabianki. Grabianka był właścicielem ziemskim z Podola, a więc ze stron darzonych przez Jana Potockiego szczególną atencją. Działalności Grabianki, J. Ujejski poświęcił specjalne opracowanie monograficzne [20]. Opracowanie to jest naszym przewodnikiem w tej partii naszego tekstu. Grabianka w latach 1779–1782 przeszedł inicjację w Berlinie u dwóch zawziętych poszukiwaczy kamienia filozoficznego, Don Antoniego Józefa Pernety’ego i niejakiego Brumore’go. Tego pseudonimu używał Józef Filibert de Morveau, zresztą brat wybitnego francuskiego chemika, Ludwika Bernarda, który, jak już mówiłem, stał się czynnym zwolennikiem też Lavoisiera. Jak widzimy, stara i nowa chemia często rosły tuż obok siebie. Prace berlińskich nauczycieli Grabianki przesycone były mistyką i elementami kabały. Obydwaj byli gorącymi zwolennikami rewelacji głoszonych przez szwedzkiego proroka tamtych lat, Svedenborga. Pernety uważał, że Starożytni zaszyfrowali dla potomnych swoje tajemnice alchemiczne w postaci legend i bajek egipskich i greckich. Jest on autorem dzieł, w których usiłuje odgadnąć te zagadki, Znaleźć je zresztą można w zbiorach naszego Ossolineum [21]. Jeszcze w 1760 roku założył Pernety w Awinionie towarzystwo *Les Illumines*, któremu nadał ryt hermetyczny. Miało ono poszukiwać na drodze eksperymentów wspomaganymi praktykami spirytystycznymi i kabalistycznymi owego kamienia filozoficznego. Potem był Pernety bibliotekarzem królewskim w Berlinie, a następnie odbudował w Awinionie swoją dawną lożę. Hrabia Grabianka okazał się być wiernym i oddanym uczniem. Uczestniczył w poszukiwaniach mistrza. Prowadził jakieś eksperymenty, wraz ze wspomnianym Brumorem, także w swoich dobrach na Podolu. W końcu został następcą mistrza, jako zwierzchnik loży awiniońskiej. W działalności lożowej utopił własny majątek. W latach 90-tych jego organizacja przeżywała kryzys, właściwie się rozpadała. W poszukiwaniu jakiejś pomocy Grabianka udał się do Petersburga. Podróżował jednak bez pośpiechu, wstępując po drodze do dworów polskiej arystokracji. Jesienią 1804 roku przebywał dość długo na dworze Szczęsnego Potockiego, teścia Jana Potockiego, w Tulczynie. Gospodarz chciał mu nawet podobno popłacić

długi i wykupić jego majątek z rąk wierzycieli, ale przeszkodziła mu w tym własna śmierć. Wiosną 1805 roku Grabianka przybył do stolicy cesarstwa. Tutaj, w kwietniu 1807 roku został aresztowany i osadzony w twierdzy, jako podejrzany o szpiegostwo na rzecz Napoleona. Zwolniony po półrocznym uwięzieniu, zmarł w październiku 1907 roku na apopleksję.

Jak widzimy, życiowe drogi Jana Potockiego i Grabianki wyraźnie się krzyżowały. Nie wiemy, czy mieli okazję osobiście się spotkać. Autor „Rękopisu” był człowiekiem bardzo ruchliwym. Mieli jednak taką okazję w Petersburgu. Jan Potocki większość 1803 roku, spędził z rodziną we Włoszech. Potem wrócił pospiesznie do Petersburga, gdzie w styczniu 1806 roku został powołany do Akademii Nauk. W czerwcu tegoż roku wziął udział w nieudanym poselstwie do Chin, jako szef sekcji naukowej personelu poselstwa. W roku 1807 przebywał w Petersburgu, gdzie rozpoczął wydawanie czasopisma pt. „Journal de Nord”. Sprawa uwięzienia Grabianki była zapewne głośna i Potocki mógł się zainteresować jego osobą.

Grabianka zjawił się w Awinionie w 1786 roku, i rychło zajął miejsce Perney’ego. Jego przywództwo zaznaczyło się wyraźnym zwrotem kierunku prac, tej swojego rodzaju religijnej sekty, w stronę teurgii i magii. Mogło to być związane z kształtowaniem się nowej chemii, która zdyskredytowała mrzonki alchemiczne. A przecież za rządów Pernety’ego w świątyni zgromadzenia obok dwóch salonów było laboratorium, w którym każdy z jego członków mógł eksperymentować i poszukiwać filozoficznego kamienia. W latach 1794-1795 ukształtował się ostateczny ustrój zgromadzenia. Sekta dzieliła się na cztery zakony: najwyższym był zakon Św. Ducha, drugim zakon Trójcy Świętej, trzecim zakon Słowa Wcielonego, a ostatnim zakon Domu Bożego. Na czele sekty stał Wielki Mistrz, jego zaś wspomagali Wielka Matka, Wielki Kanclerz (zarządzający codziennymi sprawami sekty), Wielki Prorok, Wykładacz Snów i dwaj przedstawiciele wybrani przez ogół.

Rzuca się w oczy, że podobną strukturę miała organizacja Gomelezów. Jej twórca wybrał sześciu naczelników rodzin „ze swego pokolenia”. Razem tworzyli siedmioosobową grupę kierowniczą. W grupie, która podjęła decyzję o zamknięciu kopalni złota i wysadzeniu w powietrze jej resztek byli, obok Szejka, jego córka Rebeka, naczelnik Cyganów, Velasquez, Kabalista, trzech braci Zotów i kilkunastu mahometan z trzech wtajemniczonych rodzin. Zwraca uwagę ta okoliczność, że w gremium tym jest tylko jedna kobieta. To Rebeka, wyraźnie odpowiadająca Wielkiej Matce Grabianki. Idąc tym tropem moglibyśmy Naczelnika Cyganów uznać za odpowiednik Wielkiego Kanclerza, Velasqueza - Wielkiego Proroka a Kabalistę za Wykładacza Snów. W sekcie Grabianki wymienieni czterej członkowie Rady byli naczelnikami czterech zakonów. Wielka Matka przez końcowy miesiąc roku miała zastępować Wielkiego Mistrza w zwierzchnictwie nad najwyższym zakonem sekty.

Opowiadając van Wordenowi dzieje organizacji chroniącej tajemnicę kopalni, szejk Gomelezów informuje go, że w pewnym okresie wyłoniono w niej zespół czterech rodzin, do których należał szczególny nadzór nad kopalnią. Do tego zespołu należała rodzina Jezydów na Libanie, Chalilów w Egipcie, Ben-Azarów w Afryce

i Gomelezów w Hiszpanii. Czy nie przypomina nam to czterech zakonów hrabiego Grabianki?

Inne podobieństwo dotyczy pierwszych rozdziałów książki, w których przedstawia pisarz okres doświadczenia pożądanych cnót van Wordena. Zgodnie z powszechnym wtedy obyczajem różnorodnych organizacji wolnomularskich, sprawdzano, czy kandydat do zgromadzenia jest osobiście dostatecznie odważny, i czy umie dochować tajemnicy. Takie doświadczenie w przypadku van Wordena trwa w powieści siedem dni. Siódmego dnia następuje jego połączenie z bliźniaczkami, Eminą i Zibeldą, co można uznać za akceptację przez organizację. Odtąd bohater powieści zamieszkał w zamku Uzedów. Otóż, siedem dni trwała inicjacja w „nie-widzialnym bractwie „Starych Różokrzyżowców [22]. Tak więc, przygody, których w pierwszych „dniach” doświadcza van Worden przypominają rytuały stosowane wobec profanów przez organizacje wolnomularskie. Zakończenie tego okresu próby nie oznacza, by delikwent miał być szybko dopuszczony do tajemnic zgromadzenia. Część tajemnicy pozna on dopiero w dniu trzydziestym pierwszym, ale dopiero w dniu 61-ym pozna ją w całości. Okres „nowicjatu”, pomiędzy dniem siódmym a 61-ym służy do pogłębienia edukacji van Wordena w sprawach zgromadzenia i w gruncie rzeczy zaprezentowaniu mu elementów ideologii stowarzyszeń wolnomularskich, w czym wielki udział mają opowieści Żyda Wiecznego Tułacza i Velasqueza – Geometrę. Ale jest to już sprawa do odrębnego traktowania.

Postać Żyda Wielkiego Tułacza mogła zresztą się znaleźć na stronicach powieści Potockiego prosto z praktyki tajnych stowarzyszeń hermetyczno-alchemicznych. W latach 80. XVIII wieku jako Żyd Wieczny Tułacz przedstawiał się „hrabia” Cagliostro, „Wielki Kopta”, to jest wielki mistrz utworzonego przez siebie rytu egipskiego wolnomularstwa. Odpowiednio też swój wiek obliczał na 1400 lat. Można się dziwić, ale te jego opowieści wielu traktowało wtedy poważnie [23].

Trzeba tu zaznaczyć, że organizacja Grabianki miała w owym czasie duże wzięcie w sferach towarzyskich. W pewnym okresie do sekty należał były rosyjski poseł w Warszawie, książę Mikołaj Repnin. Należał do niej książę wirtemberski Ferdynand, wraz z małżonką, którzy podczas obrządków na kolanach służyli Wielkiemu Mistrzowi [24]. Działalność sekty musiała więc być przedmiotem dysput towarzyskich. Potocki, jako człowiek w towarzystwie bywały, mógł więc i z tej strony z nią się zetknąć.

Tak więc, sławna powieść Jana Potockiego rysuje się nam jako wielki alegoryczny obraz wzrostu i upadku tajnych stowarzyszeń hermetyczno-alchemicznych w XVIII wieku. Co jest szczególnie ciekawe, na taką kolej rzeczy wpłynął w pierwszym rządzie rozwój nauki, swojego rodzaju rewolucja w chemii, która podówczas zachodziła.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] F. Rosset, D. Triaire, *Jan Potocki. Biografia*, Warszawa 2006.
- [2] J. Potocki, *Rękopis znaleziony w Saragossie*, printed In EU, 2005, s. 136.
- [3] Jak wyżej, s. 575.
- [4] T. Cegielski, *Ordo ex Chao. Wolnomularstwo i światopoglądowe kryzysy XVII i XVIII wieku*. Warszawa 1994.
- [5] Jak wyżej, s. 171.
- [6] *Statuts des Philosophes Inconnus*, Paris 1691.
- [7] Z. Szydło, *Woda, która nie moczy rąk, Alchemia Michała Sędziwoja*, Warszawa 1997.
- [8] J. Barner, *Chemia filozoficzna*, Warszawa 2012.
- [9] K. Barner, *Wohlgemeine Nachricht was Er in 22 Jahr hero bei den Studien des hermetischen Kunsts entweder selbst durch eigene Hand-Arbeit erfahren, oder bei Anderen experimentiert gesehen*, Danzig 1683, s. 1.
- [10] R. Bugaj, *Hermetyzm*, Wrocław 1991, s. 393.
- [11] R. Bugaj, *Analecta*, 1993, **2**, 155.
- [12] A. Magier, *Estetyka miasta stołecznego Warszawy*, Wrocław 1963, s. 130.
- [13] Patr: I.Z. Siemion, *Analecta*, 1995, **4**, 73.
- [14] L. Hass, *Sekta farmazonii warszawskiej. Pierwsze stulecie wolnomularstwa w Warszawie*, Warszawa 1980, s. 228.
- [15] A.L. Lavoisier, *Analecta*, 2001, **10**, 7.
- [16] F. Rosset, D. Triaire, dz. cyt., s. 237.
- [17] Jak wyżej, s. 152.
- [18] I.Z. Siemion, *Wiad. Chem.*, 2009, **63**, 330.
- [19] A.L. Lavoisier, dz. cyt., s. 16.
- [20] J. Ujejski, *Król Nowego Izraela, Kartka z dziejów mistyki wieku oświeconego*, Warszawa 1924.
- [21] Dom A.J. Pernety, *Les fables egyptiennes et grecques dévoilees et reduites au meme principe avec une explication des hieroglyphes et de la guerre de Troye*, Paris 1757; *Dictionnaire mytho-hermetique dans lequel on trouve les allegories fabuleuses des poets, les methaphores, les enigmes et les termes barbares des philosophes hermetiques expliques*, Paris 1758.
- [22] T. Cegielski, dz. cyt., s. 61.
- [23] I. Mc Calman, *Alchemik Cagliostro – ostatni mag Europy*, Warszawa 2005, s. 217.
- [24] J. Ujejski, dz.cyt., s. 108 i 117.

INFORMACJE

INFORMACJE REDAKCJI „WIADOMOŚCI CHEMICZNYCH”

CENY PRENUMERATY NA ROK 2014

Redakcja miesięcznika PTCh „Wiadomości Chemiczne” zawiadamia, że wysokość prenumeraty rocznej „Wiadomości Chemicznych” za 2014 r. będzie wynosiła **200 zł + 5% VAT** dla instytucji i niezrzeszonych prenumeratorów indywidualnych. Dla członków PTChem **20 zł**. Należność za prenumeratę prosimy przekazywać na konto:

Bank PEKAO SA
Oddział we Wrocławiu
pl. Powstańców Śl. 9, 50-950 Wrocław
Redakcja „Wiadomości Chemiczne”
NRB 48 1240 6670 1111 0000 5649 8781

Prenumerata „Wiadomości Chemicznych” dla członków PTCh, połączona z opłatą składek członkowskich, jest znacznie niższa i przedstawia się następująco:

- prenumerata „Wiadomości Chemicznych” na rok 2014 wraz ze składką członkowską, w ramach której dostarczany jest „Orbital”, wynosi **70 zł** (składka – 50 zł, prenumerata – 20 zł);
- emeryci, doktoranci oraz studenci płacą **35 zł** (składka – 15 zł, prenumerata – 20 zł); a nauczyciele szkół średnich i podstawowych płacą **40 zł** (składka – 20 zł, prenumerata – 20 zł).

Członkowie PTCh, którzy zechcą zaprenumerować „Wiadomości Chemiczne” na podanych tu warunkach, proszeni są o wnoszenie opłat na konto:

PTCh Warszawa, ul. Freta 16
Bank BGŻ
54 2030 0045 1110 0000 0261 6290

Wyróżnione prace doktorskie lub habilitacyjne

Redakcja „Wiadomości Chemicznych” w porozumieniu z Radą Redakcyjną podjęła decyzję o utworzeniu nowego działu, zatytułowanego „Wyróżnione prace doktorskie i habilitacyjne”. Redakcja przyjmuje do publikacji artykuły oparte na pracach doktorskich lub habilitacyjnych, które zostały wyróżnione przez Rady Wydziałów, przed którymi toczyły się odpowiednie procesy.

Objętość prac nie powinna przekraczać piętnastu stron maszynopisu. Artykuły powinny zawierać: przedstawienie doniosłości podjętej tematyki badawczej, cel rozprawy doktorskiej lub habilitacyjnej oraz w miarę zwięzły opis uzyskanych wyników przedstawiony w możliwie przystępny sposób a także wnioski końcowe.

W notce biograficznej autora poza standardowymi informacjami powinny zostać zamieszczone następujące dane: termin obrony pracy doktorskiej lub kolokwium habilitacyjnego, Rada Wydziału, przed którą toczył się przewód, nazwisko promotora (dotyczy rozpraw doktorskich) oraz nazwiska recenzentów.

Serdecznie zapraszamy doktorów habilitowanych oraz doktorów, których prace zostały wyróżnione w ciągu ostatniego roku do nadsyłania swoich prac.

Redakcja „Wiadomości Chemicznych” informuje, że są u nas do nabycia następujące pozycje „Biblioteki Wiadomości Chemicznych”:

Nomenklatura chemii nieorganicznej. Zalecenia 1990, red. Z. Stasicka, cena 25 zł
Podstawowa terminologia stereochemii oraz Słownik podstawowych terminów w nauce o polimerach. Zalecenia 1996, red. O. Achmatowicz, B. Szechner i P. Kubisa, cena 12 zł

Nomenklatura węglowodanów. Zalecenia 1996, tłum. i red. T. Sokołowska i A. Wiśniewski, cena 18 zł

I.Z. Siemion, *Bronisław Radziszewski i lwowska szkoła chemii organicznej*, cena 18 zł

K. Maruszewski, *Fizykochemia molekuł zamkniętych w zeolitach i zol-żelach*, cena 18 zł

Praca zbiorowa, *Uporządkowane materiały mezoporowate*, red. B. Burczyk, cena 18 zł

Skorygowana nomenklatura rodników, jonów, jonorodników i podobnych indywiduów chemicznych. Zalecenia 1993, red. T. Sokołowska i A. Wiśniewski, cena 15 zł

I.Z. Siemion, *Lutum sapientiae, czyli Notatek chaotycznych część pierwsza*, cena 18 zł

M. Zabłocka-Malicka, *Ruchliwość jonów w podwójnych układach stopionych soli*,
cena 8 zł.

Praca zbiorowa, *Nanomateriały*, red. D. Hreniak, W. Łojkowski, W. Stręć, M. Suszyńska, cena 25 zł.

Praca zbiorowa, *Ogniwa paliwowe – nowe kierunki rozwoju*, red. H. Drulis, J. Hanuza, D. Hreniak, M. Miller, G. Paściak, W. Stręć, cena 20 zł

Glosariusz nazw klas związków organicznych i reaktywnych produktów pośrednich oparty na strukturze (Zalecenia IUPAC 1994), red. i tłum. F. Kaźmierczak i J. Gawroński, cena 16 zł.

Od substacji prostych do życia. Świat RNA – początki życia na Ziemi, Zdzisław Chilmonczyk – NAKŁAD WYCZERPANY.

Profesor Bogusława Jeżowska-Trzebiatowska. 1908–1991 w setną rocznicę urodzin, cena 12,00 zł.

Chemia koordynacyjna w Polsce. Część I, cena 17,50 zł.

Chemia koordynacyjna w Polsce. Część II, cena 17,50 zł.

Chemosensory optyczne oraz materiały rozpoznawcze dla jonów metali w roztworach, Krzysztof Kledzik, cena 22,00 zł.

Obliczenia teoretyczne stałej ekranowania magnetycznego i stałych strzężeń spinowo-spinowych. Teobald Kupka cena 20,00 zł.

Książki wysyłamy na koszt zamawiającego. Zamówienia prosimy kierować pod adresem: Redakcja „Wiadomości Chemicznych”, ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław. Opłaty należy wносить na konto: Bank PEKAO SA O/Wrocław, Redakcja „Wiadomości Chemicznych”, NRB 48 1240 6670 1111 0000 5649 8781.

REGULAMIN I INFORMACJE DLA AUTORÓW PUBLIKUJĄCYCH W CZASOPIŚMIE „WIADOMOŚCI CHEMICZNE”

1. Informacje ogólne

„Wiadomości Chemiczne” są recenzowanym czasopismem naukowym Polskiego Towarzystwa Chemicznego, które publikuje przede wszystkim artykuły przeglądowe. Ponadto publikowane są tutaj inne **wartościowe** materiały o charakterze edukacyjno-informacyjnym takie jak: artykuły oparte na pracach doktorskich lub habilitacyjnych, które zostały wyróżnione przez Rady Wydziałów, przed którymi toczyły się odpowiednie procesy; materiały informacyjne na temat uczonych oraz jednostek naukowych/firm chemicznych lub pokrewnych chemii; materiały o aktualnych osiągnięciach w szeroko pojętych naukach chemicznych.

Dodatkową ofertę Wydawnictwa stanowią dwie odrębne serie, „Biblioteka Wiadomości Chemicznych” oraz seria „Habilitacje”. W serii „Biblioteka Wiadomości Chemicznych” publikowane są dłuższe artykuły przeglądowe lub monografie poświęcone ważnym i aktualnym problemom współczesnej chemii, w ramach serii wydawniczej pod nazwą „Habilitacje” mogą być publikowane prace habilitacyjne z obszaru chemii. Zważywszy, że zgodnie z ustawą, dopuszczalne jest przedstawianie rozpraw habilitacyjnych albo w formie monografii, albo w formie pliku powiązanych publikacji, poprzedzonych omówieniem w języku polskim (tzw. autoreferatem), Redakcja przewiduje drukowanie obydwu tych wariantów. Autorzy, którzy chcieliby takie prace napisać, powinni wcześniej skontaktować się z Redakcją, a następnie przesłać wstępnie przygotowaną publikację (redagowaną na wzór artykułów w czasopiśmie „Wiadomości Chemicznych”) lub informację na temat przygotowywanej pracy – tytuł przygotowywanej publikacji, przybliżoną liczbę stron, tabel, rysunków. W chwili obecnej Redakcja nie posiada środków na finansowanie prac w serii „Biblioteka Wiadomości Chemicznych” oraz serii „Habilitacje”. W zależności od sytuacji finansowej Wydawnictwa, Redakcja zastrzega sobie prawo negocjacji kosztów druku z autorami lub Instytucjami zlecającymi druk.

„Wiadomości Chemiczne” znajdują się na liście czasopism punktowanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Zawartość czasopisma dostępna jest zarówno w formie drukowanej jak i elektronicznej. Elektroniczny dostęp do pełnych tekstów prac jest możliwy poprzez stronę Dolnośląskiej Biblioteki Cyfrowej, <http://www.dbc.wroc.pl/>.

Anglojęzyczne streszczenia wszystkich opublikowanych prac są dostępne na stronie internetowej „Wiadomości Chemicznych”, <http://old.pages.wchuwr.pl/wiadchem.html>.

Czasopismo od wielu lat jest indeksowane/abstraktowane w dwóch bazach danych (Chemical Abstracts oraz AGRO), a od roku 2012 zostały umieszczone w bazie Polskiej Bibliografii Naukowej, <https://pbn.nauka.gov.pl/journals/24384>.

2. Informacje dla autorów na temat wymagań i zasad publikowania prac

- Prace nie były wcześniej publikowane, ani nie są złożone w redakcji innego czasopisma.
- Autorzy prac stosują się do wymagań praw autorskich tzn. w przypadku zamieszczania rysunków, tabel itp., pochodzących z opracowań opublikowanych w innych czasopismach lub publikacjach zwartych, posiadają pisemną zgodę na ich przedruk.
- Opublikowana raz praca bez zgody Redakcji, nie może być wydawana gdzie indziej.
- Autorzy przysyłający prace po raz pierwszy powinni podać swój numer telefonu oraz adresy poczty tradycyjnej i elektronicznej. Jest to niezbędny warunek sprawnego przebiegu opracowania redakcyjnego tekstu.
- Autorzy zobowiązani są do wykonania korekty tekstu. W pracach przyjętych do druku Redakcja ma prawo dokonywania niezbędnej korekty.
- Jeżeli autorzy nie zastrzegą inaczej w momencie zgłoszenia pracy, wydawca nabywa ogólnych praw autorskich do wydrukowanych prac (w tym prawo wydawania na nośnikach elektronicznych oraz w Internecie). Tytułem powyższego wykorzystania utworów autorom nie są wypłacane honoraria.
- Wszystkie nadsyłane prace są poddawane wstępnej ocenie, która określa czy odpowiadają randze i profilowi „Wiadomości Chemicznych” oraz czy zostały przygotowane zgodnie z formalnymi wymogami MNiSW oraz Redakcji.
- Po uzyskaniu pozytywnej wstępnej oceny wszystkie prace są recenzowane przez co najmniej dwóch niezależnych recenzentów, zgodnie ze wskazówkami zawartymi w broszurze informacyjnej Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, http://www.nauka.gov.pl/fileadmin/user_upload/ministerstwo/Publikacje/201110216_MNISW_broszura_210x210.pdf.
- O przyjęciu pracy do druku decyduje Komitet Redakcyjny.
- Prace, które Komitet Redakcyjny na podstawie uzyskanych recenzji stwierdził, że nie należy przyjąć do druku w czasopiśmie, po uwzględnieniu sugestii recenzentów mogą być powtórnie przesłane do czaso-

pisma. W takim przypadku praca traktowana jest jako nowy tekst i ponownie przechodzi pełną procedurę recenzowania.

- Ponadto Komitet Redakcyjny informuje, że tzw. „ghostwiting” (ktoś wniósł znaczący wkład w powstanie publikacji, a nie został przedstawiony jako współautor lub też nie został wymieniony w podziękowaniu zamieszczonym w publikacji) lub „guest authorship” (udział autora jest znikomy lub też w ogóle nie miał miejsca, a mimo to jest współautorem publikacji) są przejawem nierzetelności naukowej. Wszelkie przejawy nierzetelności naukowej, łamanie i naruszanie zasad etyki obowiązującej w nauce będą ujawniane, włącznie z powiadomieniem jednostek zatrudniających autorów.
- Autorzy mają prawo do zaproponowania co najmniej trzech niezależnych recenzentów, jednak ostateczny wybór anonimowych recenzentów dokonuje Redakcja.

3. Koszty

Autorzy czasami mogą ponosić częściowe koszty wydania swoich artykułów. Tak jest w przypadku tzw. **stron nadliczbowych** tj. powyżej 25 stron. Za każdą rozpoczętą nadliczbową stroną jest naliczana opłata w wysokości około 50 zł. Najczęściej kwota ta pokrywana jest z funduszy pozyskiwanych przez Autorów lub przez Wydziały które wspomagają wydawanie „Wiadomości Chemicznych”. Niezależnie od rodzaju pracy opłata pobierana jest również za **kolorowe rysunki i wykresy** (zgodnie z faktycznym kosztem druku).

Redakcja zastrzega sobie możliwość zmiany wysokości opłat, w zależności od wielkości dofinansowania z MNiSW oraz wypracowanych środków własnych. Faktura wystawiana jest po ukazaniu się pracy.

W przypadku prac w serii „Biblioteka Wiadomości Chemicznych” oraz „Habilitatione”, Redakcja nie posiada środków na finansowanie i zastrzega sobie prawo negocjacji kosztów druku z autorami lub Instytucjami zlecającymi druk.

4. Informacje szczegółowe dotyczące przygotowania maszynopisu do druku

4.1. Wymagania merytoryczne

Tekst należy napisać zwięźle, prostym stylem, według zasad pisowni polskiej, z zachowaniem poprawnego i obowiązującego nazewnictwa fachowego. Nie należy zamieszczać nadmiaru szczegółów odsyłając Czytelnika do piśmiennictwa oryginalnego, które to powinno uwzględniać najnowsze informacje, dotyczące napisanej pracy. Literaturę należy cytować ze źródeł oryginalnych.

4.2. Wymagania techniczne składu tekstu

- W przypadku prac współfinansowanych przez autorów, liczba stron oraz forma kolorystyczna manuskryptu nie jest ograniczona (wymagane jest wcześniejsze uzgodnienie z Redakcją).
- Maszynopisy prac autorów którzy nie chcą ponosić dodatkowych kosztów, nie powinny przekraczać 25 stron całej pracy (po wydruku w czasopiśmie) oraz drukowane będą w wersji czarno białej.
- Główny tekst nadsyłanych prac powinien być napisany w edytorze Word, czcionką Times New Roman, 12p z zachowaniem interlinii 1,5 oraz z 5 cm marginesem z prawej strony. Przy podziale tekstu należy stosować numerację cyfrową wielorzędową. Numerujemy tylko tytuły rozdziałów, **nie numerujemy działów**: Abstract, Wykaz stosowanych skrótów, Wprowadzenie, Uwagi końcowe, Podziękowanie, Piśmiennictwo cytowane. Jednolity sposób numeracji konsekwentnie stosuje się wewnątrz tekstu (w całym tekście tj. zarówno przy numerowaniu rozdziałów, przy przytaczaniu piśmiennictwa cytowanego oraz odwoływaniu się do tabel rysunków itp., **nie należy stosować odsyłaczy hipertekstowych**).
- Tekst powinien być napisany poprawnym językiem, wszystkie skróty muszą być wyjaśnione, oznaczenia i jednostki miar należy podawać według układu SI, pozycje cytowanej literatury należy oznaczać numerami umieszczonymi w nawiasach kwadratowych, w kolejności cytowania wg wzorów [1, 5, 7] (dla prac 1, 5 i 7) lub [1-5, 7] (dla prac od 1 do 5 oraz pracy 7).
- Jeśli w artykułach znajdują się przedruki rysunków, czy innych elementów prac cudzych, w opisach (polskich i angielskich) należy zamieścić stosowną informację.
- Zaleca się umieszczać w tekście pracy rysunki, tabele oraz podpisy (jeśli są przygotowane w edytorze Word), jednak w przypadku plików o bardzo dużych rozmiarach należy zaznaczyć miejsca na ich umieszczenie (zob. Pliki jakie należy przekazać do Redakcji).
- **Pierwsza strona pracy powinna zawierać kolejno:**
 - tytuł pracy w języku polskim (Times New Roman, 14 p, pogrubiony, WERSALIKI), i angielskim (Times New Roman, 14 p, WERSALIKI),
 - pełne imię i nazwisko autora (autorów) pracy (Times New Roman, 15p, pogrubione),
 - pełne nazwy ośrodków przypisane do autorów pracy (wraz z adresem ośrodka i adresem e-mail autora korespondującego (Times New Roman, 10,5, kursywa),
 - spis treści pracy z zastosowaniem następującego podziału:

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Tytuł rozdziału

1.1. Tytuł podrozdziału itp.

Uwagi końcowe

Podziękowanie

Piśmiennictwo cytowane

• **Kolejne strony pracy powinny zawierać:**

- **notki o autorach** pracy wraz z tytułami naukowymi (można dołączyć osobno pliki z fotografiami autorów (zob. **Pliki jakie należy przekazać do Redakcji**),
- **obszerne streszczenie pracy w języku angielskim** (od 1800 do 2700 znaków ze spacjami) z uwzględnieniem cytowanego piśmiennictwa oraz odsyłaczami do tabel, rysunków zamieszczonych w tekście (Rys. 1, Tab. 1-2, Schemat 1) oraz **słowa kluczowe** – nie więcej niż 6, uzyskane najlepiej z bazy haseł przedmiotowych podawane w języku angielskim i polskim,
- **wykaz stosowanych skrótów** – w przypadku niewielkiej liczby skrótów lub akronimów nie jest konieczne zamieszczanie tej pozycji, wówczas, skróty wyjaśniamy w tekście przy pierwszym użyciu. Angielskie skróty należy podać i wyjaśnić wg poniżej podanego wzoru lub w oparciu o inne prace zamieszczone w „Wiadomościach Chemicznych”. Przykład: dla skrótu SSRI – selektywne inhibitory zwrotnego wychwytu serotoniny (ang. *Selective Serotonin Reuptake Inhibitor*),
- **dalszy tekst pracy zgodny z podawanym wcześniej spisem treści.**

• **Tabele, rysunki, fotografie**

Jeżeli tabele i rysunki zostały wykonane w edytorze Word, zaleca się, aby były zamieszczone w tekście artykułu, w innym przypadku wymagane jest dołączenie oryginalnych plików.

Tabele i rysunki powinny być przejrzyste, zawierać informacje niezbędne do zrozumienia treści, bez konieczności poszukiwania objaśnień w tekście pracy, należy je numerować cyframi arabskimi oraz podać tytuł (polski/angielski, nad tabelą, pod rysunkiem, Times New Roman, 10 p).

Wszystkie fotografie – należy przesłać w postaci plików zapisanych w formacie tif, jpg lub podobnym, każdą zapisać w oddzielnym pliku o rozdzielczości co najmniej 300 dpi.

• **Piśmiennictwo cytowane**

Piśmiennictwo należy zestawić numerycznie według kolejności cytowania w tekście, należy cytować wyłącznie pozycje istotne dla treści pracy w sposób precyzyjny.

W przypadku **artykułów z czasopism tradycyjnych**, opis powinien zawierać kolejno następujące elementy: inicjały imion i nazwisko autora (autorów), skrót tytułu czasopisma zgodny z przyjętymi normami, rok wydania, **numer wolumenu zaznaczony pogrubioną czcionką**, numer pierwszej strony cytowanej pracy, np.

[1] J. Kowalski, Wiad.Chem., 2007, **61**, 473.

[2] W. Kowalski, A. Nowak, Przem. Spoż. 2010, **51**, 3.

W przypadku **książek** najprostszy opis powinien zawierać: inicjały imion i nazwisko autora (autorów), tytuł książki, nazwę wydawcy, miejsce wydania, rok wydania, np.

[1] J. Malinowski, Tytuł książki, PWN, Warszawa, 2004.

[2] W. Kowalski, Tytuł książki, Volumed, Wrocław, 1999

W przypadku zasobów Internetowych najprostszy opis powinien zawierać: inicjały imion i nazwisko autora (autorów), tytuł (artykułu) dokumentu online, [dostęp], wydawca, [data dostępu]. Warunki dostępu, np.

[7] J. Kowalski, Tytuł artykułu. [online], wydawca, [dostęp: 2010-05-20]. Dostępny w Internecie:

<http://www.....>

4.3. Materiały jakie należy przygotować w celu przesłania pracy do Redakcji

Przed podjęciem decyzji o zakwalifikowaniu pracy do druku w celu oceny merytorycznej należy przesłać **jeden** plik kompletnej pracy zredagowany zgodnie z wymaganiami Redakcji.

Po uzyskaniu pozytywnej recenzji i po ustosunkowaniu się do uwag Recenzenta oraz Redakcji należy przesłać ostateczną wersję pracy w następującej postaci:

- 1 plik tekstu zredagowany zgodnie z wymaganiami Redakcji;
- 1 plik zawierający krótkie notki biograficzne o autorach nadesłanej pracy (każda notka do 150 wyrazów powinna zawierać: tytuł naukowy, miejsce pracy oraz inne ważne informacje o autorze);

- pliki zawierające zdjęcia portretowe autorów, w nazwie powinny wskazywać autora, którego zdjęcie dotyczy (dobrowolne, przesłanie plików jest jednoznaczne ze zgodą na jego opublikowanie);
- 1 plik zawierający: stronę tytułową, streszczenie (abstrakt), słowa kluczowe, podpisy pod rysunki, tabele, schematy (wszystko w obu wersjach językowych); jeśli zachodzi potrzeba to również oddzielne pliki z rysunkami, schematami, tabelami (zob. Tabele, rysunki, fotografie).

Prace nie odpowiadające wyżej wymienionym wymaganiom nie będą przyjmowane do druku. Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania poprawek stylistycznych i skrótów. Autorzy są zobowiązani do wykonania korekty artykułu i jego zwrotu do Redakcji w ciągu kilku dni od otrzymania.

Na etapie przygotowania szczytki, w przypadku przesyłania prac z kolorowymi stronami prosimy o zaznaczenie, stron które w formie druku mają być czarno-białe. Brak tej czynności może **skutkować wystawieniem faktury za wydruk kolorowych stron**. W przypadku zmian kolorowych rysunków na czarno białe prosimy również o zasygnalizowanie, że w postaci elektronicznej, życzą sobie Państwo wersję w kolorze.

Autor wskazany w liście przewodnim jako osoba kontaktowa otrzymuje drogą elektroniczną plik opublikowanej pracy w formacie pdf.

Prace prosimy przysyłać pocztą elektroniczną na adres: beata.swiatek-tran@chem.uni.wroc.pl lub wchem@chem.uni.wroc.pl, zaś dokumenty wymagające podpisów autorów (np. list intencyjny, oświadczenia autorów, kopie zgody na przedruk potwierdzone za zgodność z oryginałem) pocztą tradycyjną na adres Redakcji.

Redakcja „Wiadomości Chemicznych”

SPIS TREŚCI

Kazimierz ORZECZOWSKI: Wspomnienie o Profesorze Hubercie Kołodzieju	799
Marcin WRÓBLEWSKI, Renata KOŁODZIEJSKA, Renata STUDZIŃSKA, Aleksandra KARCZMARSKA-WÓDZKA, Marcin DRAMIŃSKI: Prolina – pospolity aminokwas wyjątkowy katalizator. Część I. Biosynteza proliny. Wewnątrzcząsteczkowa kondensacja aldolowa	801
Aleksandra KARCZMARSKA-WÓDZKA, Renata KOŁODZIEJSKA, Agnieszka TAFELSKA-KACZMAREK, Tomasz PRZYBYŁA, Marcin DRAMIŃSKI: Enancjoselektywna enzymatyczna desymetryzacja katalizowana lipazami. Część II. Optymalizacja warunków reakcji. Związki <i>mezo</i>	819
Joanna D. KITKOWSKA, Żaneta A. TABACZYŃSKA, Marcin DRAMIŃSKI: Reakcja Mitsunobu – mechanizm i zastosowanie	843
Katarzyna KULIK: Bioaktywne <i>N</i> -acyloamidofosforanowe pochodne nukleozydów	877
ERYK ŁOPACIUK, TADEUSZ H. DZIDO: Dwuwymiarowa separacja technikami chromatografii i elektroforezy ze szczególnym uwzględnieniem połączenia ich w proces jednoetapowy	899
Paweł E. TOMASZEWSKI: Wzór Scherrera – stulecie błędnych praktyk	929
Andrzej SKROBISZEWSKI, Witold GŁADKOWSKI: Synteza γ -laktonów z podstawnikami aromatycznymi	943
Felieton naukowy	
I.Z. Siemion: Okruchy XXX. O tajemnicy zawartej w „Pamiętniku znalezionym w Saragossie” Jana Potockiego	961
Informacje	971

W NASTĘPNYM ZESZYCIE UKAŻĄ SIĘ:

- Ewa RADZIKOWSKA: Modyfikowane oligodeoksyrybonukleotydy zawierające w wiązaniu internukleotydowym, w pozycji mostkowej atom azotu
- Anna JAKUBOWSKA: Współczesne surfaktanty i ich struktury micelarne tworzone w roztworach wodnych
- Renata KOŁODZIEJSKA, Marcin WRÓBLEWSKI, Aleksandra KARCZMARSKA-WÓDZKA, Renata STUDZIŃSKA, Marcin DRAMIŃSKI: Prolina – pospolity aminokwas wyjątkowy katalizator. Część II. Międzycząsteczkowa kondensacja aldolowa
- Wanda WEISS-GRADZIŃSKA, Wojciech KRZEMPEK, Lilianna TRYNDA-LEMIESZ: Mechanizm oporności na leki platynowe oraz strategie pokonywania tego zjawiska
- Anna WÓJCICKA: Syntezy pochodnych układu pirazolo[4,3-c]heterocyklicznego