

**NANOSTRUKTURY
KRZEMIONKOWO-METALICZNE
I. OTRZYMYWANIE I MODYFIKACJA
NANOCZĄSTEK KRZEMIONKOWYCH**

**SILICA-METAL NANOSTRUCTURES
I. SYNTHESIS AND MODIFICATION
OF SILICA NANOPARTICLES**

**Bartłomiej J. Jankiewicz¹, Jerzy Choma²,
Dominik Jamiola², Mieczysław Jaroniec³**

¹ *Institut Optoelektroniki, Wojskowa Akademia Techniczna,
ul. Kaliskiego 2, 00-908 Warszawa
e-mail: bjankiewicz@wat.edu.pl*

² *Institut Chemii, Wojskowa Akademia Techniczna,
ul. Kaliskiego 2, 00-908 Warszawa
e-mail: jchoma@wat.edu.pl*

³ *Department of Chemistry, Kent State University,
Kent, Ohio 44 242, USA
e-mail: jaroniec@kent.edu.pl*

Abstract

Wstęp

1. Ogólne wiadomości o nanostrukturach krzemionkowo-metalicznych
2. Otrzymywanie nanocząstek krzemionkowych
3. Modyfikacja powierzchni nanocząstek krzemionkowych

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane



Dr inż. Bartłomiej Jankiewicz urodził się w 1980 r. w Reszlu. Studiował chemię w Wojskowej Akademii Technicznej w Warszawie. Stopień doktora uzyskał w 2008 r. na Uniwersytecie Purdue w West Lafayette, USA. Aktualnie jest zatrudniony na stanowisku inżyniera w Instytucie Optoelektroniki Wojskowej Akademii Technicznej w Warszawie. Jego praca badawcza dotyczyła dotychczas dwóch dziedzin. Podczas studiów magisterskich oraz w pierwszym roku po ukończeniu studiów doktoranckich, w grupie Prof. R. Dąbrowskiego zajmował się on syntezą i badaniem właściwości związków ciekło-

krystalicznych. Natomiast, podczas studiów doktoranckich w grupie Prof. Kenttämää na Purdue University zajmował się badaniem reaktywności organicznych rodników w fazie gazowej przy użyciu spektrometrii mas FT-ICR. Najważniejszym jego osiągnięciem jest pierwsza na świecie charakteryzacja reaktywności organicznych *s,s,s*-trójrodników. Jego praca naukowa została doceniona przez Fundację na Rzecz Nauki Polskiej, która przyznała mu w roku 2010 stypendium START. W chwili obecnej jego zainteresowania dotyczą nanostruktur plazmonowych do zastosowań w detekcji związków chemicznych i materiałów biologicznych.



Prof. dr hab. inż. Jerzy Choma urodził się w 1952 r. w Lublinie. Studiował chemię w Wojskowej Akademii Technicznej w Warszawie. Stopień doktora i doktora habilitowanego uzyskał odpowiednio w 1981 i 1985 r., a tytuł profesora w 1993 r. Aktualnie jest zatrudniony na stanowisku profesora zwyczajnego w Instytucie Chemii Wojskowej Akademii Technicznej w Warszawie oraz w Instytucie Chemii Uniwersytetu Humanistyczno-Przyrodniczego Jana Kochanowskiego w Kielcach. Jego główne zainteresowania naukowe dotyczą: teoretycznego opisu adsorpcji pojedynczych gazów na mikro i mezoporowatych

adsorbentach, eksperymentalnego charakteryzowania równowag adsorpcyjnych na granicy faz ciało stałe–gaz i ciało stałe–ciecz, otrzymywania i modyfikacji impregnowanych węgli aktywnych, otrzymywania i adsorpcyjnej charakterystyki właściwości strukturalnych i powierzchniowych nanoporowatych uporządkowanych adsorbentów krzemionkowych (MCM-41, MCM-48, SBA-15), otrzymywania i charakterystyki właściwości adsorpcyjnych uporządkowanych mezoporowatych materiałów węglowych z wykorzystaniem „twardych” i „miękkich” matryc. Ostatnio jego grupa badawcza zajmuje się otrzymywaniem i charakterystyką fizykochemicznych właściwości nanostruktur krzemionkowo-metalicznych.

Jest autorem i współautorem ponad 300 artykułów naukowych i ponad 100 komunikatów i referatów na konferencjach oraz współautorem dwóch monografii i kilku obszernych artykułów monograficznych. Od 1986 r. ściśle współpracuje naukowo z prof. Mieczysławem Jaroncem z Kent State University, Kent, Ohio, USA.



Mgr inż. Dominik Jamiola urodził się w 1985 r. Studiował materiały niebezpieczne i ratownictwo chemiczne na Wydziale Nowych Technologii i Chemii Wojskowej Akademii Technicznej w Warszawie. W pracy dyplomowej zajmował się problematyką otrzymywania i zastosowania spieków ciężkich wytwarzanych za pomocą syntezy spaleniowej. Studia ukończył z oceną bardzo dobrą w 2009 r.

W 2009 r. rozpoczął studia doktoranckie w Wojskowej Akademii Technicznej w Warszawie pod opieką naukową prof. dr hab. inż. J. Chomy. Zajmuje się problematyką syntezy i badania właściwości struktur krzemionkowo-metalicznych. Jest współautorem dwóch artykułów naukowych.



Prof. dr hab. Mieczysław Jaroniec urodził się w 1949 r. Studiował chemię na Uniwersytecie M. Curie-Skłodowskiej w Lublinie. Stopień doktora i doktora habilitowanego uzyskał odpowiednio w 1976 i 1979 r., a tytuł profesora nadzwyczajnego i zwyczajnego w 1985 i 1989 r. Od 1972 do 1991 pracował na UMCS zaczynając od asystenta a kończąc na stanowisku profesora zwyczajnego. Od 1991 r. jest profesorem w Zakładzie Chemii, Kent State University, Kent, Ohio, USA. Wciąż utrzymuje bliskie kontakty naukowe z wieloma ośrodkami w kraju, o czym może świadczyć nadanie mu doktoratów *honoris causa* Uniwersytetu M. Kopernika (2009) oraz Wojskowej Akademii Technicznej (2010). Jego główne zainteresowania naukowe dotyczą adsorpcji i chromatografii na granicy faz gaz/ciało stałe i ciecz/ciało stałe, jak również chemii materiałów nanoporowatych ze szczególnym uwzględnieniem mikro- i mezoporowatych adsorbentów węglowych i żeli krzemionkowych. Obecnie jego grupa koncentruje się na syntezie (w obecności surfaktantów i kopolimerów blokowych) oraz badaniu właściwości uporządkowanych materiałów mezoporowatych takich jak krzemionki, organokrzemionki, węgle, tlenki nieorganiczne o strukturach heksagonalnych (MCM-41, SBA-15) i sześciennych (MCM-48, SBA-16, FDU-1). Jego obecne zainteresowania koncentrują się także na zastosowaniu materiałów o uporządkowanej strukturze porowatej

w adsorpcji, katalizie, chromatografii, ochronie środowiska i innych dziedzinach w odniesieniu do energii i nanotechnologii.

Jest autorem i współautorem kilkaset artykułów naukowych, współautorem jednej monografii, współedytorem 4 książek nt. nanoporowatych materiałów i współautorem wielu obszernych artykułów monograficznych. Jego prace naukowe są często cytowane przez innych badaczy, o czym świadczy wysoka wartość indeksu Hirscha, $h = 59$, oraz włączenie go przez ISI do grona „highly cited” badaczy w dziedzinie chemii materiałów (<http://isihighlycited.com/>). Ponadto prof. Jaroniec jest lub był członkiem komitetów redakcyjnych w takich czasopismach jak *Adsorption*, *Adsorption Science & Technology*, *Chemistry Materials*, *Heterogeneous Chemistry Reviews*, *Journal of Liquid Chromatography*, *Journal of Colloid and Interface Science*, *Thin Solid Films*, *Journal of Porous Materials* oraz *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*.

ABSTRACT

Silica-metal nanostructures consisting of siliceous cores and metal nanoshells attract recently a lot of attention because of their unique properties, mainly catalytic and spectroscopic. The core of these nanostructures is coated with a thin layer (nanoshell) of another material, often being a noble metal, of a thickness between 1 and 20 nm. The silica-metal nanostructures are highly functional materials of properties different from those of the siliceous core and the metal nanoshell. Already nowadays these nanostructures have found various applications such as for an exaltation of chemical stability of colloids, for an enhancement of luminescence properties of materials, for biosensing, drug delivery and other medical applications.

The main goal of this two-part review is the presentation of various methods for the preparation of silica-metal nanostructures, description of the most important physicochemical properties of these materials, and presentation of their potential applications. The first part is focused on the main preparation methods of silica particles being used as cores for the aforementioned core-shell nanostructures and methods for their surface modification.

A special emphasis is given on the Stöber method, which is relatively simple, effective and well verified for the synthesis of large silica particles (with diameters from 100 nm to several microns). A typical preparation of silica particles is based on mixing ethanol, ammonia (as a catalyst), and often small amount of water, followed by rapid or gradual addition of tetraethyl orthosilicate (TEOS) under vigorous stirring. This article reviews numerous studies reporting the effects of various factors on the structural properties of silica particles, especially the steps required for controlling their size, assuring narrow particle size distribution and high uniformity of the resulting particles.

The surface chemistry of siliceous cores is essential in the process of metal nanoshells formation. Therefore, in this work the main methods for modification of the silica surface are presented in details in order to prepare this surface for the formation of metal nanoshells. This modification is often based on the replacement of silanols with specific organic groups (often aminopropyl and mercaptopropyl groups), which interact strongly with metal nanoparticles. In 1998 Halas and co-workers elaborated a simple method for the preparation of core-shell nanostructures involving attachment of specific organic groups to the silica surface followed by deposition of gold nanoparticles and subsequent reduction of tetrachloroauric acid in order to obtain continuous gold nanoshells. The first modifier of the silica surface was 3-aminopropyltriethoxysilane. Later, several other modifiers have been tested. The aforementioned modification of the silica surface can be single- or two-step process. The single-step process involves hydrolysis and condensation of TEOS in the presence of functional organosilane, which results in silica particles with desired organic groups attached. The two-step process involves the synthesis of silica particles in the first step and their surface modification with organosilanes in the second step. The presented literature survey shows that the proper modification of the surface of silica particles is a necessary condition for the formation of uniform metal nanoshells.

Keywords: silica-metal nanostructures, preparation of silica nanoparticles, modification of silica surface

Słowa kluczowe: nanostruktury krzemionkowo-metaliczne, otrzymywanie nanocząstek krzemionkowych, modyfikacja powierzchni krzemionki

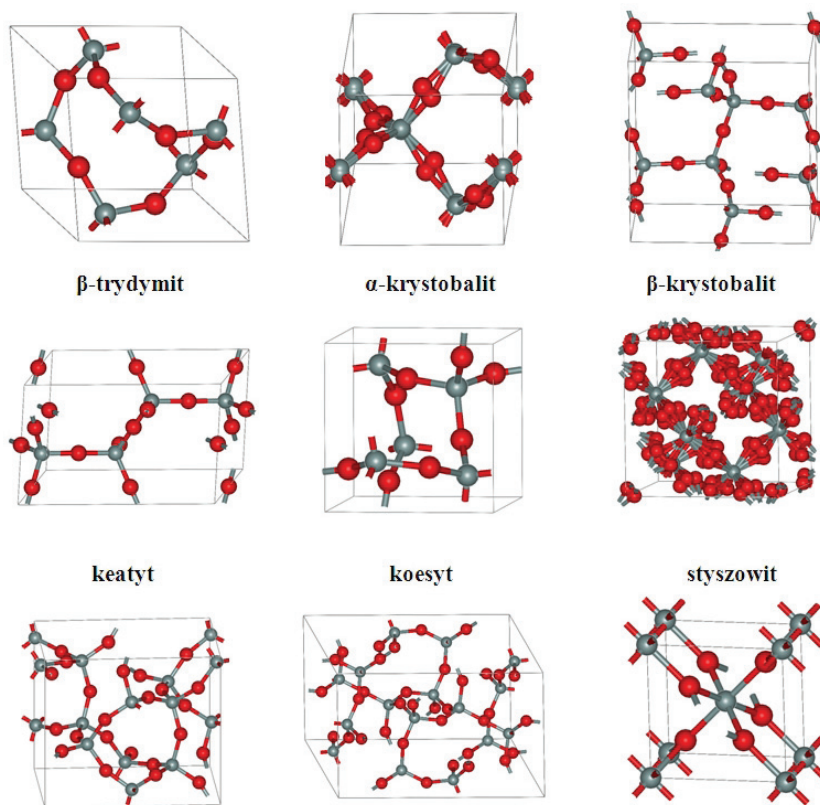
WSTĘP

W ostatnim dziesięcioleciu obserwuje się dynamiczny rozwój nauki i technologii obiektów o wymiarach od 1 do 100 nm, czyli nanotechnologii. Szczególnie jest to widoczne w odniesieniu do nanocząstek, gdzie badania koncentrują się na projektowaniu, wytwarzaniu, charakteryzowaniu oraz stosowaniu struktur i przyrządów pomiarowych, których właściwości oraz specyficzne funkcje, jakie pełnią, można kontrolować poprzez ich kształt i wymiar w skali nanometrycznej [1]. Potencjalne możliwości zastosowań tzw. nanomateriałów, tj. materiałów mających choć jedną właściwość taką jak wymiar cząstki, wymiar porów lub grubość filmu w przedziale od 1 do 100 nm, są ogromne, a intensywny rozwój w tej dziedzinie sprawia, że początek XXI wiek jest określany początkiem ery nanotechnologii.

Nanotechnologia i nauka o nanomateriałach są nierozłącznie związane z różnego rodzaju materiałami wykorzystywanymi do tworzenia nanostruktur. Jednym z częściej wykorzystywanych materiałów w nanotechnologii jest ditlenek krzemu (krzemionka SiO_2), którego krótką charakterystykę przedstawiono poniżej.

Ditlenek krzemu jest bardzo popularny w nanotechnologii, choć jest to tylko jedno z wielu możliwych zastosowań. Krzemionka jest wykorzystywana do produkcji wielu materiałów i przedmiotów codziennego użytku. Ditlenek krzemu jest używany w przemyśle szklarskim do produkcji szkła i ceramiki, w przemyśle metalurgicznym, w budownictwie i w wielu innych dziedzinach. Cały przemysł planarnej elektroniki i nowoczesnych układów scalonych istnieje dzięki unikalnym właściwościom krzemu otrzymywanego z krzemionki. Porowata krzemionka jest również jednym z najbardziej rozpowszechnionych adsorbentów, będących nośnikami np. chemicznie związanych faz stacjonarnych.

Szerokie zastosowanie ditlenku krzemu związane jest zarówno z ogólną dostępnością tego materiału, jak również z jego specyficznymi właściwościami wykorzystywanymi w badaniach naukowych jak i w przemyśle. Krzemionka, najpowszechniej występująca substancja w skorupie ziemskiej, jest składnikiem wielu skał, minerałów oraz kamieni szlachetnych i półszlachetnych. SiO_2 występuje w formie amorficznej oraz w różnych formach krystalicznych takich jak np.: kwarc, krystobalit czy trydymit [2–13] (Rys. 1). Ditlenek krzemu jest jedynym naturalnym tlenkiem pospolitego półprzewodnika – krzemu. Jest on trwały i w wodzie i w podwyższonych temperaturach, a dodatkowo jest bardzo dobrym izolatorem. Zaletą SiO_2 jest również brak absorpcji promieniowania elektromagnetycznego w zakresie od 300 do 800 nm. Krzemionka jest generalnie chemicznie inerta i ulega reakcjom jedynie z wrzącymi, stężonymi roztworami wodnymi KOH i NaOH, stopionymi Na_2CO_3 i K_2CO_3 oraz fluorowodorem lub jego wodnymi roztworami. Kwas fluorowodorowy (HF) reaguje z krzemionką z wytworzeniem kwasu fluorokrzemowego [14]. Reakcja ta wykorzystywana jest między innymi w przemyśle półprzewodników do usuwania lub wytrawiania warstw ditlenku krzemu, a także do wytwarzaniu nanostruktur.



Rysunek 1. Niektóre krystaliczne struktury SiO_2 (http://en.wikipedia.org/wiki/Silica#Crystal_structure)
 Figure 1. Some crystalline structures of SiO_2 (http://en.wikipedia.org/wiki/Silica#Crystal_structure)

Ditlenek krzemu, jak wspomniano, znalazł zastosowanie w nanotechnologii do tworzenia różnego rodzaju nanostruktur krzemionkowych (składających się tylko z SiO_2) lub hybrydowych (SiO_2 z innym materiałem). Nanomateriały, nanocząstki są niekiedy materiałami o dużej powierzchni właściwej. Średnica otrzymywanych nanocząstek ditlenku krzemu jest zawarta przeważnie w przedziale od 5 do 1000 nm (możliwe są i większe cząstki), a ich powierzchnia właściwa (ang. *Specific Surface Area*, SSA) jest zawarta w przedziale od 545 do 2,73 m^2/g . Głównymi formami nanocząstek krzemionkowych są strącana amorficzna krzemionka, żele, zole, koloide, krzemionki płomienniowa i pirogeniczna [15].

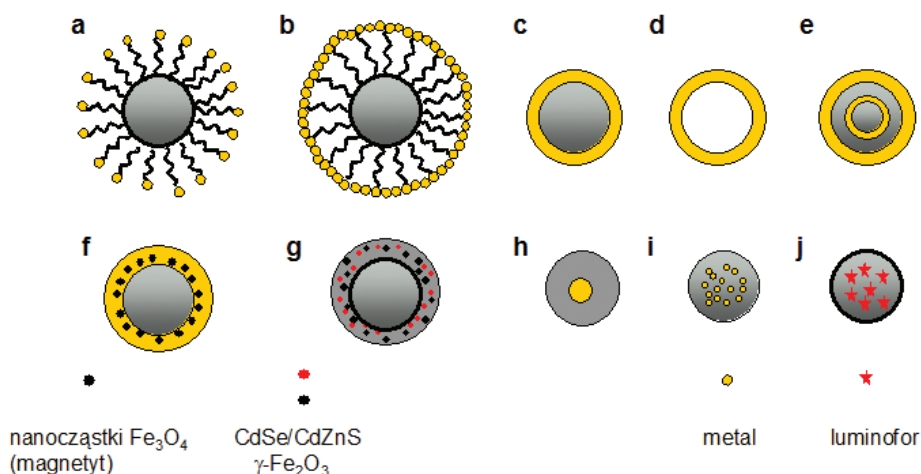
Nanocząstki krzemionkowe są używane jako dodatki do polimerów i gum w celu poprawy ich właściwości mechanicznych oraz w fazach ciekłych w celu stabilizacji zawiesin [16]. Nanocząstki krzemionkowe wykorzystywane są również jako wypełniacze w szerokiej gamie wyrobów polimerowych, włączając w to również wypełnienia stomatologiczne [17]. Największym przemysłowym zastosowaniem nanocząstek krzemowych, a zwłaszcza krzemionki pirogeniczej i zoli krzemionkowych jest chemiczno-mechaniczna obróbka półprzewodników techniką pla-

narną (ang. *Chemical Mechanical Planarization*, CMP) [15], a sama krzemionka służy do tworzenia warstw dielektrycznych w materiałach półprzewodnikowych. Równie ważnymi aplikacjami SiO_2 jest użycie tego materiału do produkcji ogniw słonecznych, jako izolatora cieplnego oraz jako czujnika gazów.

W nanotechnologii nanocząstki krzemionki są często używane do wytwarzania różnego rodzaju hybrydowych kulistych cząstek składających się z rdzenia i nanowarstwy (nanopowłoki), określanych jako nanostruktury (*nanoshells*, *core-shell*) [18]. Nanostruktury mogą być otrzymywane, jako kombinacja różnego rodzaju materiałów dielektrycznych, metali, półprzewodników oraz barwników, z których materiał jednego rodzaju jest rdzeniem, a materiał innego lub tego samego rodzaju tworzy warstwę [18]. Rdzeń nanostruktury wytworzony z jednego materiału, w prezentowanym artykule dotyczy to SiO_2 , jest pokryty cienką warstwą drugiego materiału, zazwyczaj metalu szlachetnego, o grubości około 1–20 nm (Rys. 2). Otrzymywane są również i grubsze warstwy, jednakże ich synteza jest ograniczona głównie do uzyskiwania określonych właściwości, jak na przykład zwiększenie termicznej stabilności cząstek rdzenia. Pokrywanie materiału stanowiącego rdzeń nanostruktury jest wykonywane przy użyciu różnych metod w zależności od typu i właściwości nanopowłoki [18–23]. Niektóre z tych metod zostaną omówione w dalszej części artykułu.

Nanostruktury są wysoce funkcjonalnymi materiałami o wyjątkowych właściwościach. Ponadto nanostruktury łącznie wykazują zmodyfikowane i ulepszone właściwości w porównaniu z właściwościami tworzących je elementów lub jednoskładnikowych nanocząstek o tym samym wymiarze. Właściwości materiałów typu rdzeń–warstwa mogą być zmieniane poprzez odpowiedni dobór komponentów lub poprzez zmianę stosunku wielkości średnicy rdzenia do grubości nanowarstwy.

Materiały te są również interesujące z ekonomicznego punktu widzenia, zwłaszcza gdy możliwe jest pokrywanie niedrogich rdzeni cienką warstwą bardzo drogiego materiału. Pozwala to ograniczyć koszty związane z małym zużyciem droższego materiału, przy zachowaniu lub polepszeniu właściwości nanostruktur. Cząstki te znajdują wiele rozmaitych zastosowań m.in. do zwiększania chemicznej stabilności koloidów [18, 24], wzmacniania właściwości luminescencyjnych układów [25], w inżynierii struktur pasmowych [26], w biosensorach [27, 28], w dozowaniu leków [29] itp.



Rysunek 2. Różne nanostruktury typu rdzeń–nanowarstwa. **a)** Cząstka rdzenia ze zmodyfikowaną powierzchnią i z przyłączonymi cząstkami nanowarstwy; **b)** Cząstka **a** po redukcji metalu na jej powierzchni; **c)** Gładka powłoka nanowarstwy metalu na dielektrycznym rdzeniu; **d)** Kwantowa banieczka; **e)** Nanocząstka wielowarstwowa; **f)** Cząstka z ziarnami magnetytu wbudowanymi w metaliczną nanowarstwę metalu; **g)** Nanocząstka z kulkami kwantowymi i magnetycznymi cząstkami wbudowanymi w nanowarstwę metalu; **h)** Kapsułkowanie bardzo małych cząstek metalu w materiale dielektrycznym. Nanocząstki z dużą ilością małych cząstek, **i** – metalu oraz **j** – organicznych luminoforów, zatopionych wewnątrz pojedynczej dielektrycznej cząstki (po modyfikacji z pracy [18])

Figure 2. Different core-shell nanostructures. **a)** core with modified surface and attached nanoparticles; **b)** particle **a** after reduction metal species on its surface; **c)** continuous metal nanolayer on a dielectric core; **d)** quantum dot; **e)** core-multilayer shell particle; **f)** core particle with metallic shell containing magnetic nanoparticles; **g)** core particle with metallic shell containing magnetic nanoparticles and quantum dots; **h)** encapsulation of small metal nanoparticles in larger dielectric particle. Nanoparticles containing several small nanoparticles, **i** – metal or **j** – organic lumiphore, encapsulated inside single dielectric particle (after modification from [18])

Na Rysunku 2 przedstawiono różne sferyczne struktury typu rdzeń–warstwa, w których krzemionka może być użyta jako rdzeń, jako warstwa lub medium do zatapiania w nim nanocząstek [18]. W rzeczywistości spotkać można o wiele więcej rozwiązań dotyczących zarówno kształtów (nanopierścienie, nanopręty), jak i sposobu rozmieszczenia komponentów nanowarstw. Nanostruktury, jak na Rysunku 2a, mogą być otrzymywane poprzez modyfikację powierzchni rdzenia za pomocą dwufunkcyjnych cząsteczek, do których przyłączają się następnie małe cząstki materiału tworzącego warstwę. Narastanie warstwy małych cząstek prowadzi do wytworzenia pełnej powłoki (Rys. 2c) [30]. Cząstki tworzące rdzeń mogą być usunięte ze struktury (tak jak na Rys. 2d) poprzez cieplną kalcynację lub ekstrakcję za pomocą odpowiedniego rozpuszczalnika. Do rozpuszczenia krzemionki można wykorzystać kwas fluorowodorowy lub roztwór wodorotlenku sodu. Reakcje te prowadzą do nanostruktur typu dziura zwanych również kwantowymi banieczkami (Rys. 2d).

Możliwa jest również synteza nanostruktur typu *core-shell* posiadających więcej współśrodkowych warstw wokół rdzenia, tak zwanych nanostruktur wielowar-

twowych [31, 32]. Struktury te powstają w wyniku dalszej modyfikacji nanostruktur typu *core-shell* z pojedynczą warstwą (Rys. 2c), poprzez naniesienie warstwy materiału rdzenia a następnie kolejnej warstwy materiału powłoki. Cząstki o współrodkowych warstwach określane są również jako nanomatrioszki. Struktury tego typu wykazują właściwości absorpcyjne względem promieniowania elektromagnetycznego w zakresie od widzialnego do podczerwonego przy odpowiednim doborze materiałów tworzących rdzeń i warstwę.

Nanocząstki przedstawione na Rysunku 2f są kolejną modyfikacją struktur pokazanych na Rysunku 2c. Cząstki tego typu są wytwarzane poprzez nanoszenie nanocząstek Fe_3O_4 na rdzeń przed wytworzeniem ciągłej nanowarstwy [33]. Inny, interesujący przykład nanowarstw pokazano na Rysunku 2g, w których to rdzeń stanowi krzemionka, natomiast nanowarstwę krzemionka z wbudowanymi „kropkami” kwantowymi oraz magnetycznymi cząstkami [34]. „Kropki” kwantowe oraz magnetyczne cząstki są wprowadzane do nanowarstwy w procesie zol–żel i muszą spełniać określone kryteria, aby w odpowiedni sposób wbudowywać się w strukturę warstwy. Materiały tego typu mogą znaleźć zastosowanie w biomedycznych aplikacjach jako sondy czułe na zmiany pola magnetycznego i jednocześnie mające właściwości luminescencyjne.

Innym rodzajem nanostruktur typu *core-shell* są cząstki, w których rdzeń stanowią małe cząstki (10–50 nm) metali (takich jak złoto czy srebro), a powłoką jest jednolita warstwa krzemionki (Rys. 2h). Nanostruktury pokazane na Rys. 2i i 2j otrzymywane są poprzez kapsułkowanie w krzemionce większej ilości metalicznych nanocząstek koloidalnych lub cząsteczek związków organicznych (najczęściej luminoforów) [35].

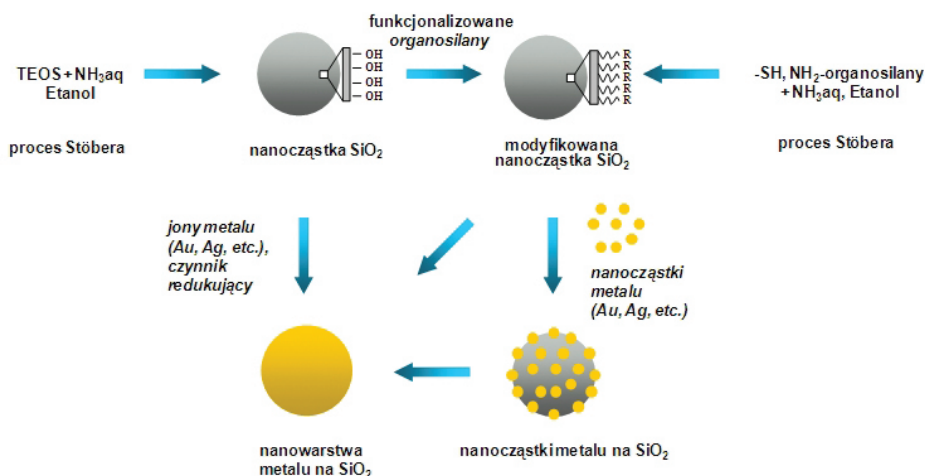
Zasadniczym celem prezentowanej pracy (zarówno części I jak i II) było omówienie metod otrzymywania nanocząstek krzemionkowych, ich modyfikacji, dalej metod otrzymywania nanostruktur metaliczno-krzemionkowych typu *core-shell* (pokazanych na Rys. 2b i 2c), charakterystykę ich właściwości oraz możliwych zastosowań.

1. OGÓLNE WIADOMOŚCI O NANOSTRUKTURACH KRZEMIONKOWO-METALICZNYCH

Otrzymywanie nanostruktur typu *core-shell* może być realizowane przy użyciu wielu metod takich jak: osadzanie [36, 37], polimeryzacja [38], poprzez mikroemulsje, odwrócone micle [39–42], kondensację zol–żel [43], technikę adsorpcji warstwu-po-warstwie [44, 45] oraz innych [19–23]. Wytwarzanie nanocząstek jest procesem wieloetapowym i wymaga dokładnej kontroli przebiegu każdego etapu syntezy w celu otrzymania struktur o pożądanym parametrach (Rys. 3). Kontrola poszczególnych etapów syntezy pozwala na otrzymywanie nanostruktur o małej dyspersji średnic, pożądanym stopniu pokrycia rdzenia nanocząstki metaliczną warstwą, uniknięcie samodzielnego wytrącania się nanocząstek materiału warstwy oraz nie-

dopuszczenie do koagulacji nanocząstek. Pomimo opracowania wielu metod wytwarzania warstw na powierzchni dielektrycznego rdzenia, kontrola ich grubości i jednorodności wciąż jest trudnym zadaniem.

Wieloetapowa synteza nanostruktur może być realizowana na co najmniej cztery sposoby (Rys. 3, 4 i 5). Pierwszy sposób polega na syntezie rdzenia, czyli w naszym przypadku amorficznej krzemionki, a następnie modyfikacji jej powierzchni najczęściej za pomocą funkcjonalizowanych organosilanów (Rys. 3). W kolejnym etapie na modyfikowanej powierzchni rdzenia krzemionkowego osadzone są koloidalne nanocząstki metalu, zazwyczaj złota. Nanocząstki metalu osadzone na powierzchni mogą stanowić zarodek dla tworzącej się warstwy (powłoki, skorupki – ang. *shell*) wytwarzanej przez redukcję jonów metali, będących dalszym budulcem warstwy. Warstwa może być również wytwarzana bezpośrednio przez redukcję soli metalu z pominięciem etapu osadzania koloidalnych nanocząstek metalu (Rys. 3).



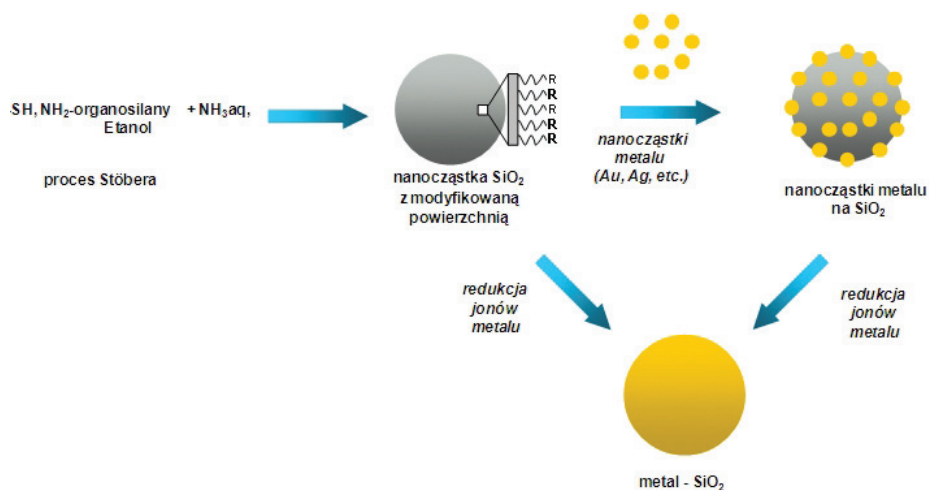
Rysunek 3. Schemat otrzymywania nanostruktur metaliczno-krzemionkowych poprzez funkcjonalizację powierzchni rdzenia i osadzanie nanocząstek metalu

Figure 3. Schematic illustration of the fabrication of silica-metal nanostructures by modification of the core surface and deposition of metal nanoparticles

Kolejne dwie metody są powiązane ze sobą pierwszym etapem, w którym to zamiast tetraetoksyasilanu (TEOS) użyte są funkcjonalizowane organosilany (Rys. 4). Zastosowanie tych związków pozwala na uzyskanie w jednym etapie rdzenia krzemionkowego z modyfikowaną powierzchnią. W kolejnych stadiach syntezy następuje wytworzenie warstwy podobnie jak w metodach omawianych wcześniej, czyli bezpośrednio poprzez redukcję soli metalu lub pośrednio poprzez etap osadzania koloidalnych nanocząstek metalu, a następnie redukcję soli tego metalu (Rys. 4).

Metodą, o której również należy wspomnieć jest metoda bezpośredniego nanoszenia warstwy metalicznej na niefunkcjonalizowaną powierzchnię krzemionki

(Rys. 5). Jedną z metod pozwalającą na otrzymanie nanostruktur *core-shell*, bez wcześniejszej funkcjonalizacji powierzchni rdzenia, jest metoda kontrolowanego strącania, w której synteza nanocząstek materiału warstwy jest prowadzona w obecności rdzenia. Zhydrolizowany materiał warstwy osadza się na cząstkach rdzenia, które zachowują się jak nukleofile ułatwiające wytworzenie nanowarstwy. Grubość warstwy zależna jest od stężenia reagentów i ilości cząstek rdzenia, na których ma zostać wytworzona nanowarstwa [18].



Rysunek 4. Schemat otrzymywania nanowarstwy metalicznej na rdzeniu krzemionkowym funkcjonalizowanym w trakcie syntezy

Figure 4. Schematic illustration of the preparation of a metallic shell on the siliceous core functionalized during its synthesis



Rysunek 5. Schemat otrzymywania nanowarstwy metalicznej na rdzeniu krzemionkowym poprzez bezpośrednią redukcję jonów metalu

Figure 5. Schematic illustration of the preparation of a metallic shell on the siliceous core by reduction of metal ions

Metody opisane powyżej to metody syntezy nanostruktur składających się tylko z krzemionki jako materiału rdzenia i metalu bądź metali jako materiału warstwy. W praktyce metody te znajdują również zastosowanie w syntezie bardziej złożonych nanostruktur.

zonych układów, których przykłady pokazano na Rysunku 2, a które nie zostały szczegółowo opisane w niniejszym opracowaniu.

W dalszej części pracy omówiono poszczególne etapy syntezy nanocząstek SiO_2 , modyfikację tych nanocząstek, wytwarzanie powłok metalicznych na nanocząstkach krzemionkowych, a także wpływ różnych czynników na właściwości strukturalne w ten sposób otrzymywanych nanomateriałów.

2. OTRZYMYWANIE NANOCZĄSTEK KRZEMIONKOWYCH

Krzemionka jest bardzo popularnym materiałem stosowanym jako rdzeń w nanostrukturach, głównie dzięki bardzo korzystnym właściwościom. Do wcześniej omówionych właściwości takich jak: transparentność w zakresie widzialnym czy chemiczna bierność, należy również dodać odporność na koagulację (niska stała Hamakera) oraz brak wpływu na reakcje redoks przebiegające na powierzchni rdzenia krzemionkowego [46, 47].

Sferyczne nanocząstki krzemionkowe, o średnicy od 5 nm do kilku mikronów, mogą być otrzymywane za pomocą takich metod jak:

- odwróconych miceli oraz zol-żel [48–53],
- synteza w płomieniowym reaktorze aerozoli (ang. *flame aerosol reactor*) [54–57],
- wysokotemperaturowa hydroliza SiCl_4 w reaktorze płomieniowym [56],
- termiczne utlenianie tetraetoksyilanu (TEOS) w fazie gazowej [58, 59],
- technika matrycy koloidalnej i matrycy na bazie surfaktantu [60, 61],
- mikroemulsji woda-w-oleju [62, 63],
- rozdrabnianie w młynie kulowym [64],
- ciągła hydrotermiczna synteza mikrofalowa [65],
- samoorganizowanie się nanocząstek krzemionkowych w zasadowych roztworach organicznych i nieorganicznych kationów [66].

Techniki te pozwalają na otrzymywanie nanocząstek o określonych wymiarach i dyspersji rozkładu ich wielkości – większej bądź mniejszej w zależności od zastosowanej metody syntezy. Metodą najczęściej wybieraną przez naukowców pracujących z nanocząstkami krzemionkowymi jest metoda zol-żel, a dokładniej metoda Stöbera i jej modyfikacje [48, 67–69]. Procedura opracowana przez Stöbera była pierwszą metodą otrzymywania wysoce sferycznych, jednorodnie zdyspergowanych nanocząstek krzemionkowych o dobrej jakości, które mogły być użyte między innymi jako półprodukt do otrzymywania bardziej zaawansowanych nanomateriałów. Metoda Stöbera jest relatywnie prosta, efektywna i bardzo dobrze sprawdza się w przypadku syntezy dużych cząstek krzemionkowych (o średnicach od setek nm do kilka μm) [48, 67–69]. Jednakże, w przypadku mniejszych cząstek o średnicach od 5 do 50 nm wyniki nie zawsze są zadowalające.

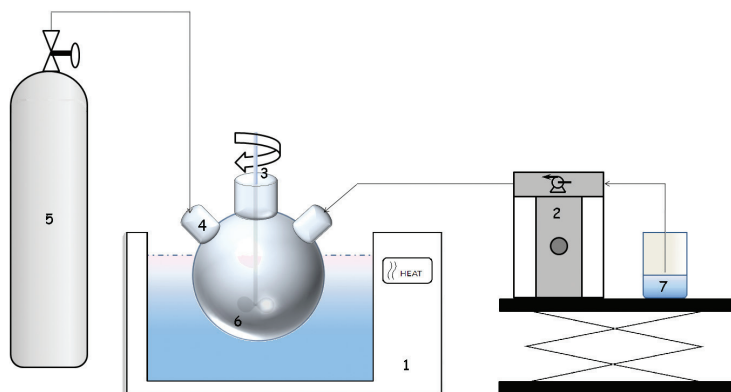
Typowa procedura otrzymywania nanocząstek krzemionkowych polega na wymieszaniu etanolu, wody amoniakalnej (jako katalizatora), często małej ilości

Procedura Stöbera umożliwia kontrolę wymiaru, porowatości oraz morfologii wytwarzanych nanocząstek [48]. Poprzez zmianę stosunku TEOS do rozpuszczalnika (rozcieńczenie), ilości wody oraz ilości katalizatora (NH_3aq), czyli stężenia reagentów, można kontrolować wymiary otrzymywanych nanocząstek, które wahają się od kilkunastu–kilkudziesięciu nm do kilku μm . Wymiary struktur otrzymanych oryginalnie przez Stöbera i in. były rzędu 0.05–2 μm [48]. Od tego momentu prowadzono intensywne badania w tej dziedzinie i otrzymywano struktury o różnych wymiarach w wyniku odpowiednich modyfikacji procedury Stöbera. Na przykład Chen [72] otrzymał cząstki o wymiarach rzędu 73–730 nm używając stężeń TEOS w przedziale 0,068–0,22 M, natomiast Wang i in. [73] otrzymali cząstki o wielkości od 20 nm do 880 nm przy stężeniach TEOS 0,05–0,67 M.

Największy wpływ na strukturę nanocząstek krzemionkowych ma ich główny budulec, TEOS. Ogólnie zmniejszenie ilości dodawanego TEOS do mieszaniny reakcyjnej prowadzi do zmniejszenia wymiaru nanocząstek. Jednym z czynników wpływających na jednorodność nanocząstek jest również jakość TEOS. Odczynnik ten należy przechowywać w obojętnym środowisku, aby uniknąć polimeryzacji cząsteczek TEOS przed syntezą, która może spowodować duży rozrzut wymiarów nanocząstek. Struktura wytwarzanych cząstek jest również zależna od temperatury i pH mieszaniny reakcyjnej. Generalnie w niższych temperaturach otrzymuje się większe cząstki. Bardzo interesującą obserwacją jest to, że kondensacja TEOS w kwaśnym pH prowadzi do wytworzenia makroskopowych materiałów zol–żel, natomiast w środowisku silnie zasadowym reakcja ta zachodzi z wytworzeniem wysoce jednorodnych kulistych nanocząstek krzemionkowych, stąd stosowanie NH_3aq w metodzie Stöbera [74].

Poniżej zostaną przedstawione i omówione rezultaty niektórych badań uwzględniających wpływ różnych czynników na właściwości strukturalne nanocząstek krzemionkowych w syntezie metodą Stöbera. Park i in. [75] opublikowali wyniki badań, w których mierzono wpływ szybkości wkraplania mieszaniny TEOS i etanolu, ilości TEOS, stężenia NH_3 oraz temperatury na wielkość nanocząstek oraz rozrzut ich wymiarów. Syntezy prowadzone były z wykorzystaniem zestawu, którego schemat przedstawiono na Rysunku 7.

Eksperyment prowadzono w następujący sposób. Do roztworu EtOH/woda/ NH_3 o określonym składzie i temperaturze wkraplano z określoną prędkością roztwór TEOS/EtOH. Reakcja prowadzona była w środowisku gazu inertnego (azotu). Wymiary cząstek i ich rozrzut a także ich kształt określono na podstawie badań za pomocą skaningowego elektronowego mikroskopu (FE-SEM) i transmisyjnego elektronowego mikroskopu (TEM) oraz przy użyciu laserowego analizatora wielkości cząstek. Wyniki badań Parka i in. zostały przedstawione w Tabeli 1 [75].



Rysunek 7. Schemat zestawu do wytwarzania nanocząstek krzemionkowych: 1) łaźnia wodna, 2) pompa mikrodozująca, 3) mieszadło, 4) reaktor, 5) butla z azotem, 6) roztwór EtOH/woda/ NH_3 , 7) roztwór EtOH/TEOS (po modyfikacji z pracy [75])

Figure 7. Scheme of the set-up for the synthesis of silica nanoparticles: 1) water bath, 2) microdosing pump, 3) mixer, 4) reactor, 5) nitrogen tank, 6) ethanol/water/ NH_3 solution; and 7) ethanol/TEOS solution (after modification from [75])

Czynnikiem mającym największy wpływ na formowanie nanocząstek SiO_2 według autorów omawianej pracy jest temperatura reakcji, a w dalszej kolejności stosunek molowy wody do TEOS ($R = [\text{H}_2\text{O}]/[\text{TEOS}]$), stężenie wody amoniakalnej (NH_3aq) i wreszcie szybkość dodawania roztworu TEOS w etanolu. Na podstawie wyników badań optymalne warunki syntezy są następujące: $R = [\text{H}_2\text{O}]/[\text{TEOS}] = 30\text{--}55$, stężenie roztworu NH_3aq $0,2\text{--}0,35$ mol/l, szybkość wkraplania roztworu TEOS/EtOH $13\text{--}17$ cm^3/min i temperatura reakcji $55\text{--}65^\circ\text{C}$. Takie warunki reakcji pozwalają na otrzymanie nanocząstek krzeminkowych o wielkości minimalnej < 30 nm przy rozrzucie wielkości mniejszym od 5 nm. Najmniejsze cząstki otrzymane w tych warunkach miały średnicę 13 nm.

Tabela 1. Porównanie wyników badań syntezy nanocząstek krzemionkowych według Parka i in. [75]

Table 1. A comparison of systematic studies on the synthesis of siliceous nanoparticles according to Park et al. [75]

Lp.	Warunki syntezy				Wyniki	
	Temperatura ($^\circ\text{C}$)	$\text{H}_2\text{O}/\text{TEOS}$	Szybkość dozowania ($\text{cm}^3\text{min}^{-1}$)	NH_3 (mol dm^{-3})	Średni wymiar cząstek (nm)	Odchylenie standardowe ($\pm\text{nm}$)
1	15	25	0,6	0,2	70,4	26,5
2	15	25	18	1,0	64,8	11,3
3	70	25	0,6	1,0	38,6	6,5
4	70	25	18	0,2	10,2	6,1
5	15	155	0,6	1,0	236,4	76,1

Tabela 1. Ciąg dalszy
Table 1. Continuation

Lp.	Warunki syntezy				Wyniki	
	Temperatura (°C)	H ₂ O/TEOS	Szybkość dozowania (cm ³ min ⁻¹)	NH ₃ (mol dm ⁻³)	Średni wymiar cząstek (nm)	Odchylenie standardowe (±nm)
6	15	155	18	0,2	129,6	7,7
7	70	155	0,6	0,2	21,6	6,3
8	70	155	18	1,0	136,7	80,4
9	42,5	90	9,3	0,6	123,0	2,5
10	42,5	90	9,3	0,6	121,5	3,2
11	42,5	90	9,3	0,6	124,9	3,8
12	42,5	90	9,3	0,6	120,1	2,1

Wpływ stężenia reagentów wyjściowych na wymiary nanocząstek krzemionkowych badali Beganskienė i in. [76]. W przeprowadzonych eksperymentach wszystkie reakcje przebiegały w temperaturze pokojowej i przy stałej ilości TEOS. Czynniki, które ulegały zmianom były czas reakcji, ilości wody i NH₃, oraz ilość i rodzaj rozpuszczalnika organicznego. Wyniki badań Beganskienė i in. zostały przedstawione w Tabeli 2. Na podstawie uzyskanych rezultatów autorzy stwierdzili, że wymiary cząstek maleją wraz z malejącą ilością wody i NH₃. Wymiary cząstek wydają się być zależne od polarności rozpuszczalnika. Najmniejsze cząstki otrzymano w metanolu, natomiast największe w acetonie. Zmniejszenie stężenia NH₃ w etanolu pozwoliło na otrzymanie cząstek o takich samych wymiarach jakie miały cząstki otrzymane w roztworze metanolu.

Tabela 2. Porównanie wyników badań przeprowadzonych przez Beganskienė i in. [76]
Table 2. A comparison of systematic studies carried out by Beganskiene et al. [76]

Lp.	Mieszanina reakcyjna Rozpuszczalnik: NH ₃ : H ₂ O : TEOS (stosunki molowe)	Starzenie (dni)	Wymiar (nm)
1	37,71 : 1,10 : 2,78 : 1,00	13	55–65
2	16,00 : 0,56 : 2,40 : 1,00	13	35–40
3	15,40 : 0,11 : 4,60 : 1,00	13	50–60
4	15,40 : 0,11 : 2,40 : 1,00	5	25–35
5	15,40 : 0,11 : 2,40 : 1,00	13	35–40
6	9,00 : 0,06 : 2,40 : 1,00	5	< 10
7 ¹	23,00 : 0,11 : 2,40 : 1,00	5	< 10
8 ²	16,70 : 0,11 : 2,40 : 1,00	5	35–45
9 ³	17,20 : 0,11 : 2,40 : 1,00	5	75–100

Rozpuszczalnik – etanol, ¹ metanol, ² 2-propanol, ³ aceton.

Innym przykładem badań wpływu różnych czynników na wymiar nanocząstek krzemionkowych jest otrzymywanie nanocząstek o wymiarach 30–1000 nm według metody Stöbera przy użyciu dużych stężeń TEOS. Badania te zostały przeprowadzone przez Wanga i in. [77]. Nanocząstki krzemionkowe otrzymywane były poprzez hydrolizę i kondensację TEOS w alkoholowym roztworze w obecności wody amoniakalnej. Reakcje prowadzono w izopropanolu przy stężeniu $[\text{TEOS}] = 0,22\text{--}1,24$ M, małym stężeniu $[\text{NH}_3] = 0,81$ M i stężeniu wody równym $[\text{H}_2\text{O}] = 6,25 \cdot [\text{TEOS}]$. W celu zbadania wpływu rozpuszczalnika przeprowadzono również syntezę przy użyciu metanolu i etanolu. Procedura polegała na wymieszaniu dejonizowanej wody, NH_3 i izopropanolu (metanolu, etanolu), a następnie wkraplaniu do tak otrzymanej mieszaniny ściśle określonej objętości TEOS. Czynności te wykonywano przy określonych temperaturach roztworu i mieszaniu za pomocą mieszadła magnetycznego. Reakcje prowadzono przez około 5 godzin, po czym otrzymane nanocząstki były oddzielane od roztworu, przemywane, a następnie suszone. Wymiary, morfologia i skład próbek badane były przy użyciu skaningowej elektrońskiej mikroskopii (FE-SEM), rozpraszania światła (DSL) i spektroskopii w podczerwieni (FT-IR). Warunki syntezy oraz parametry cząstek otrzymanych przez Wanga i in. [77] zostały przedstawione w Tabelach 3 i 4.

Tabela 3. Warunki syntezy i charakterystyka otrzymanych cząstek krzemionkowych.

Wyniki uzyskano dla $[\text{NH}_3] = 0,81$, $[\text{TEOS}]$, $[\text{H}_2\text{O}] = 6,25 [\text{TEOS}]$ [77]

Table 3. Synthesis conditions and characteristics of as-prepared silica particles.

Data below were obtained for $[\text{NH}_3] = 0,81$, $[\text{TEOS}]$, $[\text{H}_2\text{O}] = 6,25 [\text{TEOS}]$ [77]

Lp.	Rozpuszczalnik	Temperatura (°C)	TEOS (mol dm ⁻³)	Średnica cząstek (nm)	Odchylenie standardowe (±nm)
1	2-propanol	20	0,22	30	rozkład bimodalny
2	2-propanol	20	0,45	275	rozkład bimodalny
3	2-propanol	20	0,56	403	rozkład bimodalny
4	2-propanol	20	0,67	680	50
5	2-propanol	20	0,75	783	42
6	2-propanol	20	0,90	820	33
7	2-propanol	20	1,115	860	25
8	2-propanol	20	1,24	agregacja	–
9	2-propanol	5	1,24	930	30
10	metanol	5	1,24	agregacja	–
11	etanol	5	1,24	agregacja	–

Tabela 4. Warunki syntezy i charakterystyka otrzymanych cząstek krzemionkowych.

Wyniki uzyskano dla 0,75 M TEOS w temperaturze 20°C [77]

Table 4. Synthesis conditions and characteristics of as-prepared silica particles.

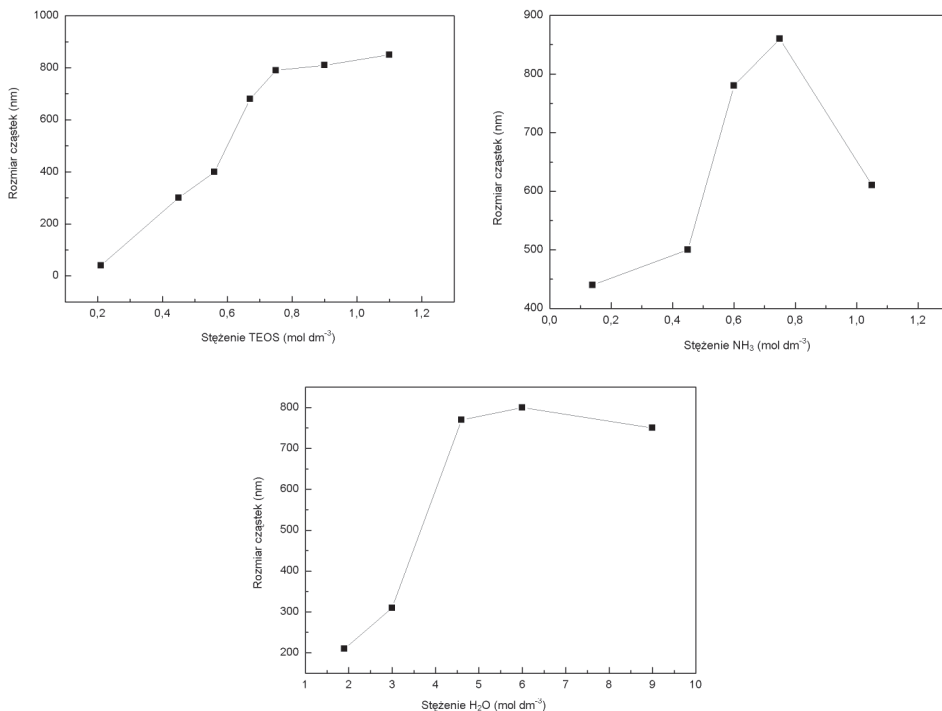
Data below were obtained for 0,75 M TEOS at 20°C [77]

Lp.	NH ₃ (mol dm ⁻³)	H ₂ O (mol dm ⁻³)	Rozpuszczalnik	Średnica cząstek (nm)	Odchylenie standardowe (±nm)
1	0,15	4,7	2-propanol	445	rozkład bimodalny
2	0,46	4,7	2-propanol	508	75
3	0,61	4,7	2-propanol	783	25
4	0,76	4,7	2-propanol	873	30
5	1,06	4,7	2-propanol	616	agregacja
6	0,61	1,9	2-propanol	218	polidispersyjność
7	0,61	3,0	2-propanol	313	polidispersyjność
8	0,61	4,7	2-propanol	783	25
9	0,61	6,0	2-propanol	799	40
10	0,61	9,0	2-propanol	753	50
11	0,61	4,7	metanol	105	agregacja
12	0,61	4,7	etanol	170	50

Na podstawie otrzymanych wyników Wang i in. [77] wyciągnęli wnioski, które są zgodne z wnioskami zaproponowanymi przez innych badaczy [75, 76, 78]. Głównymi czynnikami wpływającymi na wymiar, strukturę i morfologię nanocząstek krzemionkowych są stężenie TEOS, amoniaku i wody, rodzaj rozpuszczalnika organicznego oraz temperatura prowadzenia procesu. Wang i in. [77] badali wpływ stężenia TEOS w szerokim zakresie od 0,22 do 1,24 M. Jak pokazano na Rysunku 8 wymiary cząstek wzrastają wraz ze zwiększającą się ilością TEOS. Ponadto, w przedziale stężeń 0,67–1,115 M cząstki były jednorodne, a w przedziale 0,22–0,56 M rozrzut wymiarów był bimodalny. Natomiast dla największego stężenia (1.24 M) i temperatury 20°C obserwowano koagulację cząstek krzemionkowych. Stężenie amoniaku, który między innymi katalizuje reakcję hydrolizy i kondensacji TEOS, odgrywa istotną rolę. Jak pokazano na Rysunku 8b stężenie amoniaku nie może być ani za duże ani za małe. W przypadku zbyt małych stężeń NH₃ wydłuża się czas reakcji lub nie tworzą się cząstki krzemionki, natomiast przy zbyt dużych stężeniach NH₃ może następować koagulacja [77]. W procesach zrealizowanych przez Wang i in. [77] optymalne stężenie amoniaku wynosiło 0,81 M. Podobną zależność jak dla amoniaku zaobserwowano dla wody. Dla małych stężeń woda katalizuje reakcję hydrolizy TEOS i wpływa na wzrost wielkości cząstek, natomiast dla większych stężeń rozcieńcza oligomery i sprawia, że tworzą się mniejsze cząstki (Rys. 8). W przypadku organicznych rozpuszczalników pod uwagę należy wziąć związki badane w pracach [75–78], tj. metanol, etanol, 2-propanol i aceton. Etanol jest, powszechnie używany w reakcjach syntezy metodą Stöbera. Natomiast jak pokazano w pracy

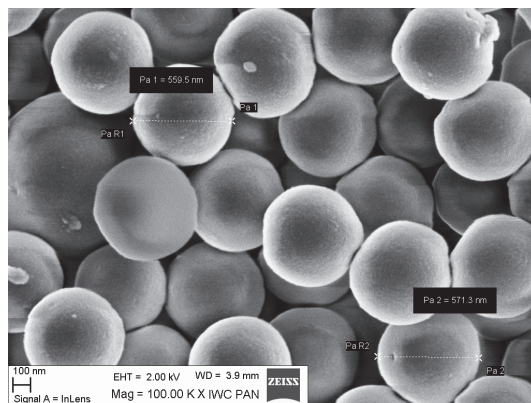
[76], metanol powinien być używany w celu otrzymania mniejszych cząstek rzędu kilkunastu lub kilkudziesięciu nm. Natomiast, jeżeli zamiast metanolu stosuje się etanol w celu otrzymania tak małych cząstek, to powinno się dobrać odpowiedni stosunek EtOH i NH_3aq . Metanol i etanol nie sprawdzają się jednak w przypadku syntezy cząstek rzędu kilkuset nm, ponieważ mogą prowadzić do koagulacji. Rozpuszczalnikiem, który sprawdził się dość dobrze zarówno dla małych [76], jak i dla dużych cząstek jest 2-propanol [77]. Zaletą tego rozpuszczalnika w syntezie dużych cząstek jest jego mała polarność oraz efekt steryczny, który zapobiega tworzeniu się agregatów [77]. Wpływ temperatury na wielkość tworzonych cząstek został dobrze pokazany w pracach [75] i [77]. Ogólnie niższe temperatury sprzyjają tworzeniu się większych cząstek, jak również ograniczają ich agregację.

Podsumowując, synteza nanocząstek krzemionkowych metodą Stöbera wymaga wiedzy o wpływie pięciu głównych czynników na wielkość cząstek, dyspersję ich wymiarów i morfologię w celu uzyskania pożądaných struktur. Na Rysunku 9 pokazano zdjęcia SEM nanocząstek krzemionkowych otrzymanych metodą zol-żel.



Rysunek 8. Wpływ ilości (a) TEOS, (b) NH_3 , i (c) H_2O na wymiary cząstek krzemionkowych [77]

Figure 8. Influence of the amount of (a) TEOS, (b) NH_3 , and (c) H_2O on the size of silica particles [77]



Rysunek 9. Zdjęcie SEM nanocząstek krzemionkowych o wymiarach ok. 600 nm otrzymanych metodą zol-żel

Figure 9. SEM image of silica particles of about 600 nm obtained by sol-gel method

W syntezie nanocząstek krzemionkowych możliwym rozwiązaniem jest użycie jednej z metod będących modyfikacją metody Stöbera. Poniżej krótko omówiono te metody.

Metoda Stöbera doczekała się wielu modyfikacji mających na celu polepszenie kontroli wymiarów, małej dyspersji i jednorodnej morfologii cząstek. Przykładem może być zastosowanie surfaktantów do kontroli morfologii tworzonych nanocząstek [78]. Inną modyfikacją syntezy Stöbera, którą można użyć do syntezy nanocząstek krzemionkowych jest metoda mikroemulsyjna woda-w-oleju [79]. Wiele badań prowadzono w celu oszacowania wpływu warunków syntezy na wymiary i dyspersję nanocząstek krzemionkowych metodą mikroemulsyjną woda-w-oleju. Badania obejmowały zmianę ilości użytej wody, wody amoniakalnej, TEOS [80–82] oraz stosunku ilości wody do ilości surfaktanta, ilości surfaktanta do ilości użytego rozpuszczalnika organicznego, itp. [80, 81]. Metoda mikroemulsyjna, sprawdza się wyjątkowo dobrze dla cząstek o wymiarach 30–60 nm i pozwala otrzymać cząstki o mniejszej dyspersji wymiarów w porównaniu z syntezą metodą Stöbera. Wadą tej metody jest konieczność używania dużych ilości surfaktanta, którego nadmiar musi być usunięty podczas oczyszczania otrzymanych nanocząstek. Przykładem zastosowania metody mikroemulsyjnej może być otrzymywanie cząstek krzemionkowych o wymiarach rzędu kilkudziesięciu nanometrów zaproponowane przez Pileniego [83].

Otrzymywanie cząstek większych od 1 μm może być realizowane za pomocą metody narastania ziaren, która jest oparta na procesie Stöbera. Metoda ta polega na umieszczeniu małej ilości cząstek SiO_2 , otrzymanych w procesie Stöbera, w alkoholowym roztworze zawierającym amoniak i wodę. Do tak otrzymanego roztworu alkoholowego dodaje się określoną ilość TEOS, który ulega hydrolizie i krzemionka wytrąca się na pierwotnych ziarnach krzemionki znajdujących się w roztworze powodując ich wzrost. Konkurencyjny proces tworzenia się nowych cząstek jest ograniczony poprzez odpowiedni dobór parametrów reakcji [73, 84, 85].

Nanocząstki krzemionkowe mogą być również otrzymywane poprzez polimeryzację kwasów krzemowych w wodnych roztworach [67, 86]. Metoda ta różni się od metody Stöbera mechanizmem tworzenia nanocząstek. Badania za pomocą jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR) przeprowadzone na komercyjnych nanocząstkach otrzymanych metodą polimeryzacji oraz na nanocząstkach otrzymanych według procedury Stöbera w środowisku kwaśnym, pokazały różnice w ich budowie. Częstki otrzymane pierwszą z wymienionych metod są zdominowane przez monomery i czterofunkcyjne związki, natomiast cząstki otrzymane drugą metodą są zdominowane przez dwu- i trójfunkcyjne cząsteczki. Różnice w budowie widoczne są również przy porównaniu wyników pomiarów małokątowego rozpraszania promieniowania rentgenowskiego SAXS [87]. Zole otrzymane poprzez polimeryzację w środowisku wodnym przy użyciu standardowych metod są całkowicie zhydrolizowane i narastały poprzez klasyczne przyłączanie pojedynczych merów, co skutkuje jednorodnymi cząstkami polimerów. Natomiast cząstki w metodzie Stöbera, wzrastają poprzez agregację klastrów i zachowują wewnętrzną fraktalną morfologię. Bardziej dokładny opis tych dwóch metod został przedstawiony w pracy Naomi i Halas [67].

Alternatywna metoda syntezy nanocząstek krzemionkowych została zaproponowana przez Zawrah i in. [88]. W metodzie tej jako materiały wyjściowe do syntezy nanocząstek krzemionkowych użyte zostały krzemian sodu oraz kwas solny. W wyniku reakcji prowadzonej w temperaturze 60°C otrzymano amorficzne nanocząstki krzemionki o średnicy ok. 25 nm i regularnym sferycznym kształcie.

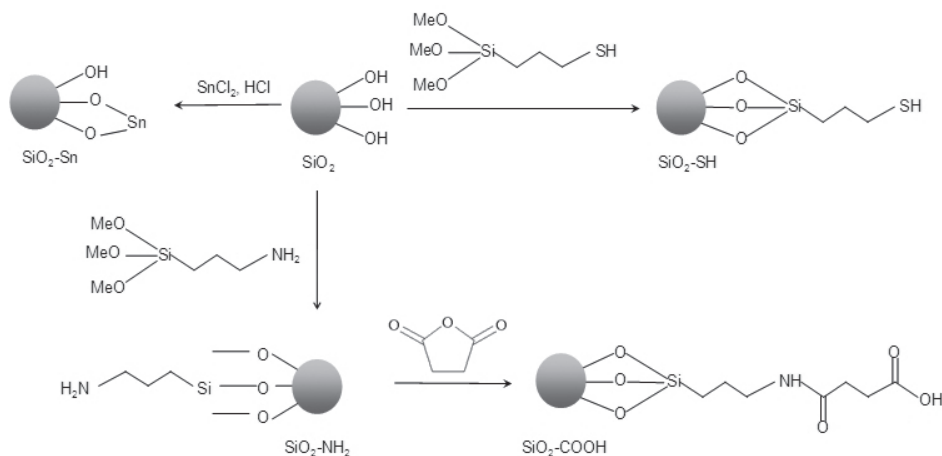
3. MODYFIKACJA POWIERZCHNI NANOCZĄSTEK KRZEMIONKOWYCH

Powierzchnia niemodyfikowanych nanocząstek krzemionkowych, których synteze omawiano wcześniej, pokryta jest głównie grupami silanolowymi ($-\text{Si}-\text{OH}$), które sprawiają, że jest ona ujemnie naładowana. W związku z tym przyłączanie do niej ujemnie naładowanych nanocząsteczek złota jest raczej ograniczone. Sposobem na rozwiązanie tego problemu jest modyfikacja powierzchni krzemionki, która prowadzi do zmiany ładunku powierzchni i w konsekwencji pozwoli na przyłączanie nanocząstek złota.

Grupy OH na powierzchni krzemionki umożliwiają, kowalencyjne przyłączenie różnego rodzaju trialkoksyorganosilanów funkcjonalizowanych grupami funkcyjnymi takimi jak aminowa ($-\text{NH}_2$) czy merkaptylowa ($-\text{SH}$) (Rys. 10). Dzięki takiej możliwości wiązania różnego rodzaju grup funkcyjnych możliwe jest również przyłączanie wielu różnych nanocząstek materiałów, włącznie z nanocząstkami metali, półprzewodników lub związków biologicznie czynne. Modyfikatorami mogą być nie tylko organosilany, ale również pojedyncze atomy lub polimery (Tab. 5). W tym miejscu należy również podkreślić, że istnieją metody, które pomimo ujemnie naładowanej powierzchni krzemionki, pozwalają na przyłączanie do niej nano-

cząstek metali. Jednak problemem w tym przypadku jest nierównomierne nanoszenie nanocząstek metali na powierzchnię krzemionkową. W przypadku modyfikowanej powierzchniowo krzemionki uzyskuje się zazwyczaj bardzo równomierne naniesienie na tę powierzchnię nieskoagulowanych cząstek metalu. Przyłączanie modyfikatorów może być kontrolowane między innymi za pomocą spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FT-IR).

W dalszej części tej pracy omówiono wyniki badań modyfikacji powierzchni SiO_2 , wymieniono najczęściej stosowane modyfikatory (Tab. 5), a także wpływ modyfikacji na dalszy proces tworzenia nanostruktur metaliczno-krzemionkowych poprzez osadzanie warstwy metalicznej.



Rysunek 10. Wybrane sposoby modyfikacji powierzchni krzemionkowej

Figure 10. Selected methods for surface modification of silica

Tabela 5. Substancje wykorzystywane do modyfikacji powierzchni krzemionkowej

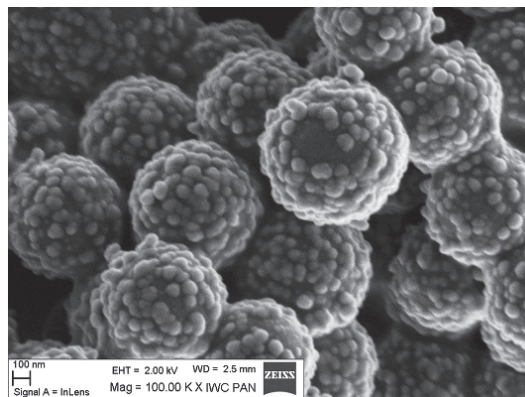
Table 5. Compounds used for surface modification of silica

Modyfikator powierzchni SiO_2	Wprowadzana grupa funkcyjna
(3-Aminopropyl)trimetoksylsilan (APTMS, APS)	NH_2
(3-Aminopropyl)trietoksylsilan (APTES)	NH_2
N-(2-Aminoetylo)-3-aminopropylotrimetoksylsilan (AEAPTMS)	NH_2
(3-Aminopropyl)dimetylotetoksylsilan (APMS),	NH_2
Polietylenoimina (PEI)	NH_2
Chlorek polidiallilodimetyloammoniumowy (PDADMAC),	$[\text{N}(\text{CH}_3)_2]^+$
(3-Mercaptopropyl)trimetoksylsilan (MPTS, MPTMS).	SH
(3-Mercaptopropyl)trietoksylsilan (MPES)	SH
(3-Mercaptopropyl)metylodimetoksylsilan (MPDMS)	SH

Tabela 5. Ciąg dalszy
Table 5. Continuation

Modyfikator powierzchni SiO ₂	Wprowadzana grupa funkcyjna
2-(Difenylfosfino)etylotrietoksylan (DPPETES)	PPh ₂
Propylotrimetoksylan (PTMS)	CH ₃
Metylotrimetoksylan (MTMS),	CH ₃
Metylotrietoksylan (MTES),	CH ₃
Winylotrimetoksylan (VTMS)	-CH=CH ₂
Winylotrietoksylan (VTES)	-CH=CH ₂
APTES + kwas bursztynowy	COOH
Chlorek cyny(II) SnCl ₂	Sn

W 1998 roku Halas i in. [89, 90] opracowali metodę otrzymywania nanomateriałów typu *core-shell* poprzez modyfikację powierzchni nanocząstek krzemionkowych za pomocą funkcjonalizowanych organosilanów, przyłączanie do grup funkcyjnych nanocząstek złota, a następnie redukcję na tych cząstkach większej ilości złota w celu otrzymania ciągłych powłok. Pierwszym zbadanym modyfikatorem był organosilan 3-aminopropylotrimetoksylan (APTMS), za pomocą którego wprowadzano grupy aminowe na powierzchnię krzemionki. Nanocząstki złota przyłączały się do grup aminowych pokrywając około 30% powierzchni krzemionki. Dalsza redukcja soli złota na takich cząstkach prowadziła do stopniowego pokrywania całej powierzchni krzemionki warstwą złota (Rys. 11).



Rysunek 11. Zdjęcia SEM cząstek krzemionki pokrywanej stopniowo złotem poprzez redukcję HAuCl₄ (wyniki naszych prac)

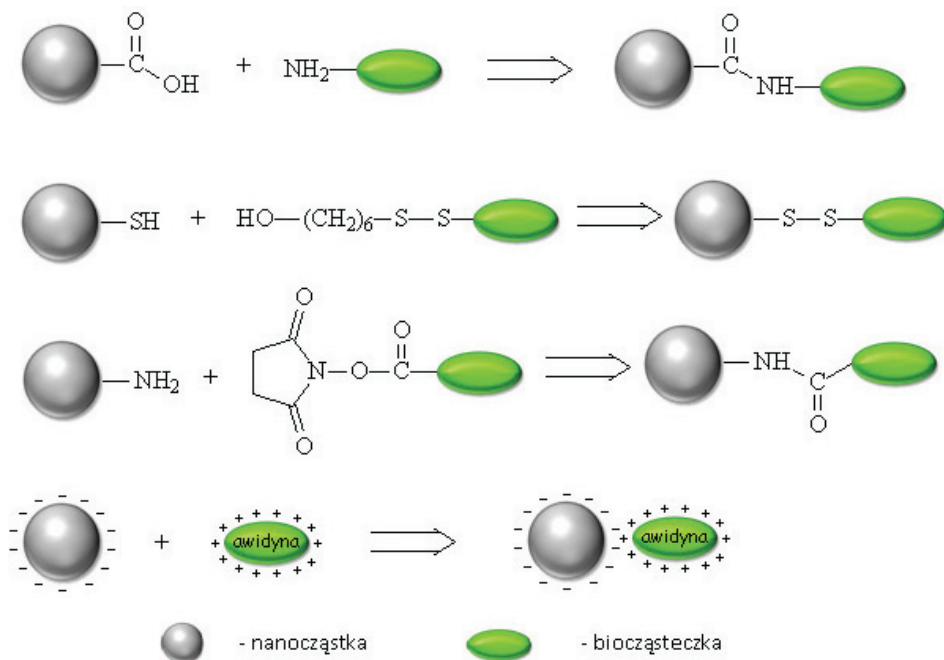
Figure 11. SEM image of silica particles gradually covered by reduction of HAuCl₄ (the authors' reserach)

W tym samym roku Halas i in. [90] opublikowali raport z badań wpływu różnych organosilanów (APTMS, AEAPTMS, MPTMS, DPPETES i PTMS, Tab. 5) modyfi-

kujących powierzchnię SiO_2 i warunków osadzania nanocząstek Au, na stopień i morfologię pokrycia powierzchni SiO_2 tymi cząstkami [90]. Wyniki badań pokazały, że dyspergowanie nanocząstek złota w roztworze wodno-alkoholowym prowadziło do tworzenia agregatów o jednorodnych wymiarach i regularnych kształtach, osadzających się na modyfikowanej powierzchni SiO_2 .

Pokrycie powierzchni krzemionkowej nanocząstkami lub klastrami złota silnie zależy od rodzaju grup funkcyjnych przyłączonych do powierzchni krzemionkowej. Obydwie hydrofilowe grupy funkcyjne, $-\text{NH}_2$ i $-\text{SH}$, mocno wiązały cząstki złota, jednak większe pokrycie powierzchni nanocząstkami Au obserwowano dla grup $-\text{NH}_2$. W przypadku dwóch modyfikujących, hydrofobowych grup funkcyjnych, $-\text{CH}_3$ i $-\text{PPh}_2$, dla większości nanocząstek krzemionkowych, nie obserwowano pokrywania ich powierzchni nanocząstkami złota.

Odkrycie Halas i in. sprawiło, że funkcjonalizacja powierzchni krzemionki różnego rodzaju modyfikatorami jest obecnie powszechnie stosowana i ciągle rozwijana z zamiarem praktycznego stosowania tych nowych nanomateriałów typu *core-shell*. Na przykład powierzchniowo i strukturalnie funkcjonalizowane nanocząstki krzemionkowe mogą być używane jako markery w bioanalizie [91] (Rys. 12).



Rysunek 12. Schemat przyłączania biomolekuł do modyfikowanych nanocząstek SiO_2 w celach bioanalitycznych (po modyfikacji z pracy [91])

Figure 12. Schematic illustration of the attachment of biomolecules to the surface modified silica nanoparticles for bioapplications (after modification from [91])

Funkcjonalizacja powierzchni krzemionkowej za pomocą różnego rodzaju modyfikatorów może zachodzić jedno- lub dwuetapowo. W jednoetapowym procesie następuje jednoczesna hydroliza i kondensacja organosilanu oraz TEOS lub tylko organosilanu. W dwuetapowym procesie kondensacja organosilanów następuje na uprzednio zsyntetyzowanych nanocząstkach krzemionki. Poniżej omówiono sposoby modyfikacji powierzchni krzemionkowej za pomocą najczęściej stosowanych modyfikatorów.

Modyfikacja nanocząstek krzemionkowych (spośród innych nanocząstek) jest chyba najbardziej rozpowszechniona i najczęściej stosowana [92–105]. Wprowadzenie grup aminowych, jak już wspomniano, może zachodzić jednoetapowo, kiedy przeprowadza się jednoczesną hydrolizę aminoorganosilanu oraz TEOS. Natomiast, typowa dwuetapowa procedura funkcjonalizacji nanocząstek krzemionkowych aminoalkiltrialkoksylanem obejmuje zdyspergowanie, wcześniej otrzymanych, nanocząstek SiO_2 w alkoholu, a następnie dodanie organosilanu z grupą aminową. Dalej należy kilka godzin ogrzewać (przy ciągłym mieszaniu), kilkakrotnie przemywać etanolem w celu usunięcia nieprzyłączonych cząsteczek aminoorganosilanu i innych zanieczyszczeń oraz odwirowywać końcowy produkt. Modyfikacja grupami aminowymi jest procesem wysoce wydajnym i zapewniającym równomierne pokrycie powierzchni nanocząstek krzemionkowych grupami funkcyjnymi. Nanocząstki krzemionki z grupami aminowymi mogą być następnie użyte do otrzymania cząstek krzemionki z grupami karboksylowymi [106]. Typowa procedura obejmuje dyspersję cząstek $\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ w dimetyloformamidzie (DMF), a następnie dodawanie do tak otrzymanej mieszaniny roztworu bezwodnika kwasu cyanomonowego w DMF. Oczyszczanie w ten sposób otrzymanych modyfikowanych cząstek krzemionkowych odbywa się poprzez kilkukrotne ich przemywanie DMF i odwirowywanie.

W identyczny sposób jak w przypadku aminoorganosilanów, czyli w procesie jednoetapowym lub dwuetapowym, można otrzymywać nanocząstki krzemionkowe z grupami merkaptylowymi [107]. Przykładem jednoetapowej syntezy jest otrzymywanie nanostruktur krzemionkowych z grupami SH przy użyciu MPTMS, MPES i MPDMS (Tab. 5) [108]. Ponadto, nanocząstki $\text{SiO}_2\text{-SH}$ mogą być przekształcane w grupy SO_3H poprzez ich utlenianie za pomocą H_2O_2 w środowisku kwaśnym [109].

Innym rodzajem modyfikatora są sole cyny, które w wyniku reakcji z SiO_2 tworzą struktury takie jakie pokazano na Rysunku 10. W typowej procedurze nanocząstki krzemionki dodawane są do kwaśnego roztworu SnCl_2 , a po zakończeniu syntezy nanocząstki krzemionkowe modyfikowane Sn są przemywane w celu usunięcia zanieczyszczeń i odwirowywane [110, 111].

Funkcjonalizacja nanostruktur krzemionkowych może być również realizowana za pomocą modyfikatorów polimerowych PEI i PDADMAC (Tab. 5) [112, 113]. W obu przypadkach, według autorów prac [112, 113], modyfikatory wykazują lepsze cechy niż APTMS. Nanocząstki krzemionkowe modyfikowane za pomocą PEI przyłączają nanocząstki złota o wymiarach od 13 do 32 nm, podczas gdy cząstki

sfunkcjonalizowane przy użyciu APTMS nie. Natomiast, nanocząstki SiO₂ modyfikowane za pomocą PDADMAC wykazują większe i bardziej jednorodne pokrycie, w porównaniu z APTMS, zarówno podczas tworzenia zarodków jak i tworzenia nanowarstwy.

PODSUMOWANIE

W tej części pracy omówiono wyniki badań związanych z otrzymywaniem jednorodnych, pod względem wymiarów i morfologii, nanocząstek krzemionkowych. Nanocząstki te otrzymuje się między innymi w celu wykorzystania ich jako rdzenie nanostruktur krzemionkowo-metalicznych. Staranne przestrzeganie warunków syntezy, w tym temperatury, stężenia i szybkości dozowania reagentów, a także czasu reakcji hydrolizy najczęściej tetraetoksylanu (TEOS) i polimeryzacji tetraedrów krzemotlenowych oraz ilości stosowanego katalizatora (najczęściej amoniaku) pozwala otrzymywać nanocząstki krzemionkowe o oczekiwanych wymiarach i małej dyspersji rozkładu.

Omówiono również metody modyfikacji nanocząstek krzemionkowych z punktu widzenia ich dalszej modyfikacji do preparatyki nanostruktur krzemionkowo-metalicznych typu *core-shell*. Najlepsze właściwości w tym względzie mają hydrofilowe grupy funkcyjne takie jak aminowa i merkaptylowa przyłączane do powierzchni krzemionkowej w miejsce grup silanolowych. Natomiast zdecydowanie nie poprawiają w tym względzie właściwości powierzchni krzemionkowej grupy o charakterze hydrofobowym takie jak np. metylowa czy difenylowa. Właściwe przygotowanie chemicznej budowy powierzchni nanocząstek krzemionkowych jest warunkiem koniecznym do odpowiedniego pokrycia tych cząstek warstwą metalu w celu otrzymania struktur krzemionkowo-metalicznych o oczekiwanych właściwościach.

PODZIĘKOWANIE

Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2009–2011 jako projekt rozwojowy Nr OR00 005408.

BJJ – Publikacja powstała częściowo przy wsparciu finansowym Fundacji na rzecz Nauki Polskiej.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] V. Balzani, *Pure Appl. Chem.*, 2008, **80**, 1631.
- [2] G.A. Lager, J.D. Jorgensen, F.J. Rotella, *J. Appl. Phys.*, 1982, **53**, 6751.
- [3] A.F. Wright, M.S. Lehmann, *J. Solid State Chem.*, 1981, **36**, 371.
- [4] K. Kuniaki, T. Matsumoto, M. Imamura, *Zeitschrift fur Kristallographie*, 1986, **177**, 27.
- [5] T.R. Downs, D.C. Palmer, *American Mineralogist*, 1994, **79**, 9.

- [6] A.F. Wright, A.J. Leadbetter, *Philosophical Magazine*, 1975, **31**, 139.
- [7] J. Shropshire, P.P. Keat, P.A. Vaughan, *Zeitschrift für Kristallographie* 1959, **112**, 409.
- [8] L. Levien, C.T. Prewitt, *American Mineralogist*, 1981, **66**, 324.
- [9] J.R. Smyth, R.J. Swope, A.R. Pawley, *American Mineralogist*, 1995, **80**, 454.
- [10] B.J. Skinner, D.E. Appleman, *American Mineralogist*, 1963, **48**, 854.
- [11] R. Szostak, *Molecular sieves: Principles of Synthesis and Identification*, Springer, New York 1998.
- [12] A. Weiss, *Zeitschrift für Anorganische und Allgemeine Chemie*, 1954, **276**, 95.
- [13] J.A. Hriljac, M.M. Eddy, A.K. Cheetham, J.A. Donohue, G.J. Ray, *J. Solid State Chem.*, 1993, **106**, 66.
- [14] A.F. Holleman, E. Wiberg, *Inorganic Chemistry*, Academic Press, San Diego 2001.
- [15] L. Theodore, R.G. Kunz, *Nanotechnology: Environmental implications and solutions*, Wiley, New York 2005.
- [16] H.D. Jang, *Aerosol Sci. and Technol.*, 1999, **30**, 447.
- [17] National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH), Approaches to safe nanotechnology, An information exchange with NIOSH, New York, 13 November 2008.
- [18] S. Kalele, S.W. Gosavi, J. Urban, S.K. Kulkarni, *Current Sci.* 2006, **91**, 1038.
- [19] L.M. Liz-Marzan, M.A. Correa-Duarte, I. Pastoriza-Santos, P. Mulvaney, T. Ung, M. Giersig, N.A. Kotov, Core-shell nanoparticles and assemblies thereof. In *Hand Book of Surfaces and Interfaces of Materials* (ed. H.S. Nalwa), Vol. 3: Nanostructured Materials, Micelles and Colloids, Elsevier, Amsterdam 2001, 189.
- [20] R. Davies, G.A. Schurr, P. Meenam, R.D. Nelson, H.E. Bergna, C.A.S. Brevett, R.H. Goldbaum, *Adv. Mater.*, 1998, **10**, 1264.
- [21] A.C. Templeton, W.P. Wuelfing, R.W. Murray, *Acc. Chem. Res.*, 2000, **33**, 27.
- [22] F. Caruso, *Adv. Mater.*, 2001, **13**, 11.
- [23] Y. Xia, B. Gates, Y. Yin, Y. Lu, *Adv. Mater.*, 2000, **12**, 693.
- [24] J.N. Smith, J. Meadows, P.A. Williams, *Langmuir*, 1996, **12**, 3773.
- [25] A. Ethiraj, Neha Hebalkar, S. K. Kulkarni, Renu Pasricha, J. Urban, C. Dem, M. Schmitt, W. Kiefer, L. Weinhardt, S. Joshi, R. Fink, C. Heske, C. Kumpf, E. Umbach, *J. Chem. Phys.*, 2003, **118**, 8945.
- [26] S. Kim, B. Fisher, H.J. Eisler, M. Bawendi, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 11466.
- [27] S.A. Kalele, S.S. Ashtaputre, N.Y. Hebalkar, S.W. Gosavi, D.N. Deobagkar, D.D. Deobagkar, S.K. Kulkarni, *Chem. Phys. Lett.*, 2005, **404**, 136.
- [28] S.A. Kalele, A.A. Kundu, S.W. Gosavi, D.N. Deobagkar, D.D. Deobagkar, S. Kulkarni, S.K. Small, 2006, **2**, 335.
- [29] J.L. West, N.J. Halas, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 2003, **5**, 285.
- [30] N. Hebalkar, S. Kharrazi, A. Ethiraj, J. Urban, R. Fink, S.K. Kulkarni, *J. Colloid Interface Sci.*, 2004, **278**, 107.
- [31] E. Prodan, C. Redloff, N.J. Halas, P. Nordlander, *Science*, 2003, **302**, 419.
- [32] Z. Chen, Z.L. Wang, P. Zhan, J.H. Zhang, W.Y. Zhang, H.T. Wang, N.B. Ming, N.B., *Langmuir*, 2004, **20**, 3042.
- [33] J. Kim, S. Park, J.E. Lee, S.M. Jin, J.H. Lee, I.S. Lee, I. Yang, J.S. Kim, S.K. Kim, M.H. Cho, T. Hyeon, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, **45**, 7754.
- [34] N. Insin, J.B. Tracy, H. Lee, J.P. Zimmer, R.M. Westervelt, M.G. Bawendi, *ACS Nano*, 2008, **2**, 197.
- [35] L.M. Rossi, L. Shi, F.H. Quina, Z. Rosenzweig, *Langmuir*, 2005, **21**, 4277.
- [36] A. Imhof, *Langmuir*, 2001, **17**, 3579.
- [37] M. Ocana, W.P. Hsu, E. Matijevic, *Langmuir*, 1991, **7**, 2911.
- [38] M. Okaniwa, *J. Appl. Polym. Sci.*, 1998, **68**, 185.

- [39] T. Li, J. Moon, A.A. Morrone, J.J. Mecholsky, D.R. Tallman, J.H. Adair, *Langmuir*, 1999, **15**, 4328.
- [40] G.C. Chen, C.Y. Kuo, S.Y. Lu, *J. Am. Ceram. Soc.*, 2005, **88**, 277.
- [41] J. Lin, W. Zhou, A. Kumbhar, J. Wiemann, J. Fang, E.E. Carpenter, C.J. O'Connor, *J. Solid State Chem.*, 2001, **159**, 26.
- [42] H. Huang, E.E. Remsen, T. Kowalewski, K.L. Wooley, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 3805.
- [43] K.H. See, M.E. Mullins, O.P. Mills, P.A. Heiden, *Nanotechnology*, 2005, **16**, 1950.
- [44] F. Caruso, R.A. Caruso, H. Möhwald, *Chem. Mater.*, 1999, **11**, 3309.
- [45] F. Caruso, M. Spasova, V. Salgueiriño-Maceira, L.M. Liz-Marzán, *Adv. Mater.*, 2001, **13**, 1090.
- [46] L.M. Liz-Marzán, M.A. Correa-Duarte, I. Pastoriza-Santos, P. Mulvaney, T. Ung, M. Giersig, N.A. Kotov, *Micelles and Colloids*, 2001, **5**, 189.
- [47] T. Ung, L.M. Liz-Marzán, P. Mulvaney, *Langmuir*, 1998, **14**, 3740.
- [48] W. Stöber, A. Fink, E. Bohn, *J. Colloid Interface Sci.*, 1968, **26**, 62.
- [49] P. Kulpinski, *J. Appl. Polym. Sci.*, 2005, **98**, 1793.
- [50] F. Tsagkogeorgas, M. Ochsenkuhn-Petropoulou, R. Niessner, D. Knopp, *Anal. Chim. Acta*, 2006, **573–574**, 133.
- [51] F. Cellesi, N. Tirelli, *Colloids Surf. A*, 2006, **288**, 52.
- [52] J. Kim, J.E. Lee, J. Lee, J.H. Yu, B.C. Kim, K. An, Y. Hwang, C.H. Shin, J.G. Park, J. Kim, T. Hyeon, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 688.
- [53] F.J. Arriagada, K. Osseo-Asare, *J. Colloid Interface Sci.*, 1995, **170**, 8.
- [54] S.E. Pratsinis, *Science*, 1998, **24**, 1998, 197.
- [55] S.E. Pratsinis, *J. Aerosol Sci.*, 1996, **27**, 153.
- [56] S.H. Ehrman, S.K. Friedlander, M.R. Zachariah, *J. Aerosol Sci.*, 1998, **29**, 687.
- [57] H.D. Jang, H. Chang, Y. Suh, K. Okuyama, *Curr. Appl. Phys.* 2006, **6**, e110.
- [58] H.D. Jang, *Aerosol Sci. and Technol.*, 1999, **30**, 447.
- [59] M. Shimada, H. Setyawan, Y. Hayashi, N. Kashihara, K. Okuyama, S. Winardi, *Aerosol Sci. and Technol.*, 2005, **39**, 408.
- [60] F. Caruso, R.A. Caruso, H. Mohwald, *Science*, 1998, **282**, 1111.
- [61] K. Suzuki, K. Ikari, H. Imai, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 462.
- [62] S. Santra, P. Zhang, K. Wang, R. Tapeç, W. Tan, *Anal. Chem.*, 2001, **73**, 4988.
- [63] M. Qhobosheane, S. Santra, P. Zhang, W. Tan, *Analyst*, 2001, **126**, 1274.
- [64] Y. Wang, E. Forssberg, *Int. J. Mineral Process.*, 2006, **81**, 1.
- [65] A.B. Corradi, F. Bondioli, A.M. Ferrari, B. Focher, C. Leonelli, *Powder Technol.*, 2006, **167**, 45.
- [66] J.M. Fedeyko, D.G. Vlachos, R.F. Lobo, *Langmuir*, 2005, **21**, 5197.
- [67] J. Naomi, N.J. Halas, *ACS Nano*, 2008, **2**, 179.
- [68] S.L. Westcott, S.J. Oldenburg, T.R. Lee, N.J. Halas, *Langmuir*, 1998, **14**, 539.
- [69] K. Suzuki, K. Ikari, H. Imai, *J. Am. Chem. Soc.* 2004, **126**, 462.
- [70] L. Lehui, A. Eychmüller, *Acc. Chem. Res.* 2008, **41**, 244.
- [71] J. Chruściel, M. Ślusarski, *Mater. Sci.*, 2003, **21**, 461.
- [72] S.-L. Chen, *Colloids Surf. A*, 1998, **142**, 59.
- [73] H.C. Wang, C.Y. Wu, C.C. Chung, M.H. Lai, T.W. Chung, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2006, **45**, 8043.
- [74] C.L. Pienaar, G.J.A. Chiffoleau, L.R.A. Follens, J.A. Martens, C.E.A. Kirschhock, T.A. Steinberg, *Chem. Mater.*, 2007, **19**, 660.
- [75] S.K. Park, K.D. Kim, H.T. Kim, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2002, **197**, 7.
- [76] A. Beganskienė, V. Sirutkaitis, M. Kurtinaitiene, R. Juskenas, A. Kareiva, *Mater. Sci. (Medziagotyra)*, 2004, **10**, 287.

- [77] X.-D. Wang, Z.-X. Shen, T. Sang, X.-B. Cheng, M.-F. Li, L.-Y. Chen, Z.-S. Wanga, *J. Colloid Interface Sci.*, 2010, **341**, 23.
- [78] N. Shimura, M. Ogawa, *J. Mater. Sci.*, 2007, **42**, 5299.
- [79] Y. Jin, S. Lohstreter, D. T. Pierce, J. Parisien, M. W. C. Hall III, J. X. Zhao, *Chem. Mater.* 2008, **20**, 4411.
- [80] R.P. Bagwe, C. Yang, L.R. Hilliard, W. Tan, *Langmuir*, 2004, **20**, 8336.
- [81] C. Chang, H. Fogler, *Langmuir*, 1997, **13**, 3295.
- [82] F. Arriagada, K. Osseo-Asare, *Colloids Surf.*, 1999, **154**, 311.
- [83] M.P. Pileni, *Nat. Mater.*, 2003, **2**, 145.
- [84] S.L. Chen, P. Dong, G.H. Yang, *J. Colloid Interface Sci.*, 1997, **189**, 268.
- [85] G.H. Bogush, M.A. Tracy, C.F. Zukoski IV, *J. Non-Cryst. Solids*, 1988, **104**, 95.
- [86] T. Tarutani, *Analytical Sci.*, 1989, **5**, 245.
- [87] D.W. Schaefer, J.E. Martin, K.D. Keefer, In *Physics of Finely Divided Matter*; N. Bocarra, M. Daoud, Eds., Springer-Verlag: Berlin, 1985, 31.
- [88] M.F. Zawrah, A.A. El-Kheshen, H.M. Abd-El-Aal, *J. Ovonic Res.*, 2009, **5**, 129.
- [89] S.J. Oldenburg, R.D. Averitt, S.L. Westcott, N.J. Halas, *Chem. Phys. Letters*, 1998, **288**, 243.
- [90] S. Westcott, S. Oldenburg, T. R. Lee, and N. J. Halas, *Langmuir*, 1998, **14**, 5396.
- [91] L. Wang, K. Wang, S. Santra, X. Zhao, L. R. Hilliard, J. E. Smith, Y. Wu, W. Tan, *Anal. Chem.*, 2006, **78**, 646.
- [92] T. Pham, J.B. Jackson, N.J. Halas, T.R. Lee, *Langmuir*, 2002, **18**, 4915.
- [93] L. Lu, H. Zhang, G. Sun, S. Xi, H. Wang, X. Li, X. Wang, B. Zhao, *Langmuir*, 2003, **19**, 9490.
- [94] L.R. Hirsch, J.B. Jackson, A. Lee, N.J. Halas, J.L. West, *Anal. Chem.*, 2003, **75**, 2377.
- [95] L. Lu, G. Sun, S. Xi, H. Wang, H. Zhang, T. Wang, X. Zhou, *Langmuir*, 2003, **19**, 3074.
- [96] J. Gao, F. Tang, J. Ren, *Surface & Coatings Technol.*, 2005, **200**, 2249.
- [97] M. Morra, C. Della Volpe, S. Siboni, *J. Biomed. Mat. Res.*, 2006, Part A, 752.
- [98] Y. Wang, W. Qian, Y. Tan, S. Ding, H. Zhang, *Talanta*, 2007, **72**, 1134.
- [99] J. Xue, C. Wang, Z. Ma, *Materials Chem. Phys.*, 2007, **105**, 419.
- [100] N. Phonthammachai, J.C.Y. Kah, G. Jun, C.J.R. Sheppard, M.C. Olivo, S.G. Mhaisalkar, T.J. White, *Langmuir*, 2008, **24**, 5109.
- [101] J.H. Kim, W.W. Bryan, T.R. Lee, *Langmuir*, 2008, **24**, 11147.
- [102] B.E. Brinson, J.B. Lassiter, C.S. Levin, R. Bardhan, N. Mirin, N.J. Halas, *Langmuir*, 2008, **24**, 14166.
- [103] J.C.Y. Kah, N. Phonthammachai, R.C.Y. Wan, J. Song, T. White, S. Mhaisalkar, I. Ahmad, C. Sheppard, M. Olivo, *Gold Bulletin*, 2008, **41**, 23.
- [104] F.Y. Cheng, C.T. Chen, C.S. Yeh, *Nanotechnology*, 2009, **20**, 425104.
- [105] B. Storti, F. Elisei, S. Abbruzzetti, C. Viappiani, L. Latterini, *J. Phys. Chem. C*, 2009, **113**, 7516.
- [106] Y. An, M. Chen, Q. Xue, W. Liu, *J. Colloid Interface Sci.*, 2007, **311**, 507.
- [107] J.H. Kim, J.S. Kim, H. Choi, S.M. Lee, B.H. Jun, K.N. Yu, E. Kuk, Y.K. Kim, D.H. Jeong, M.H. Cho, Y.S. Lee, *Anal. Chem.*, 2006, **78**, 6967.
- [108] M. Nakamura, K. Ishimura, *Langmuir*, 2008, **24**, 5099.
- [109] Ch. S. Gill, B.A. Price, Ch.W. Jones, *J. Cat.*, 2007, **251**, 145.
- [110] Y.T. Lim, O. Park, H.T. Jung, *J. Colloid Interface Sci.*, 2003, **263**, 449.
- [111] D. Chen, H.Y. Liu, J.S. Liu, X.L. Ren, X.W. Meng, W. Wu, F.Q. Tang, *Thin Solid Films*, 2008, **516**, 6371.
- [112] J. Xue, C. Wang, Z. Ma, *Mater. Chem. Phys.*, 2007, **105**, 419.
- [113] T. Saarinen, M. Österberg, J. Laine, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 2008, **329**, 134.

**NANOSTRUKTURY
KRZEMIONKOWO-METALICZNE
II. OTRZYMYWANIE, WŁAŚCIWOŚCI
I ZASTOSOWANIE**

**SILICA-METAL NANOSTRUCTURES
II. SYNTHESIS, PROPERTIES AND APPLICATION**

**Bartłomiej J. Jankiewicz¹, Jerzy Choma²,
Dominik Jamiola², Mieczysław Jaroniec³**

¹ *Instytut Optoelektroniki, Wojskowa Akademia Techniczna,
ul. Kaliskiego 2, 00-908 Warszawa
e-mail: bjankiewicz@wat.edu.pl*

² *Instytut Chemii, Wojskowa Akademia Techniczna,
ul. Kaliskiego 2, 00-908 Warszawa
e-mail: jchoma@wat.edu.pl*

³ *Department of Chemistry, Kent State University,
Kent, Ohio 44 242, USA
e-mail: jaroniec@kent.edu.pl*

Abstract

Wstęp

1. Otrzymywanie metalicznych powłok nanostruktur krzemionkowo-metalicznych
2. Charakteryzacja nanostruktur krzemionkowo-metalicznych
3. Zastosowanie nanostruktur krzemionkowo-metalicznych

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane



Dr inż. Bartłomiej Jankiewicz urodził się w 1980 r. w Reszlu. Studiował chemię w Wojskowej Akademii Technicznej w Warszawie. Stopień doktora uzyskał w 2008 r. na Uniwersytecie Purdue w West Lafayette, USA. Aktualnie jest zatrudniony na stanowisku inżyniera w Instytucie Optoelektroniki Wojskowej Akademii Technicznej w Warszawie. Jego praca badawcza dotyczyła dotychczas dwóch dziedzin. Podczas studiów magisterskich oraz w pierwszym roku po ukończeniu studiów doktoranckich, w grupie Prof. R. Dąbrowskiego zajmował się on syntezą i badaniem właściwości związków ciekło-

krystalicznych. Natomiast, podczas studiów doktoranckich w grupie Prof. Kenttämää na Purdue University zajmował się badaniem reaktywności organicznych rodników w fazie gazowej przy użyciu spektrometrii mas FT-ICR. Najważniejszym jego osiągnięciem jest pierwsza na świecie charakteryzacja reaktywności organicznych *s,s,s*-trójrodników. Jego praca naukowa została doceniona przez Fundację na Rzecz Nauki Polskiej, która przyznała mu w roku 2010 stypendium START. W chwili obecnej jego zainteresowania dotyczą nanostruktur plazmonowych do zastosowań w detekcji związków chemicznych i materiałów biologicznych.



Prof. dr hab. inż. Jerzy Choma urodził się w 1952 r. w Lublinie. Studiował chemię w Wojskowej Akademii Technicznej w Warszawie. Stopień doktora i doktora habilitowanego uzyskał odpowiednio w 1981 i 1985 r., a tytuł profesora w 1993 r. Aktualnie jest zatrudniony na stanowisku profesora zwyczajnego w Instytucie Chemii Wojskowej Akademii Technicznej w Warszawie oraz w Instytucie Chemii Uniwersytetu Humanistyczno-Przyrodniczego Jana Kochanowskiego w Kielcach. Jego główne zainteresowania naukowe dotyczą: teoretycznego opisu adsorpcji pojedynczych gazów na mikro i mezoporowatych

adsorbentach, eksperymentalnego charakteryzowania równowag adsorpcyjnych na granicy faz ciało stałe–gaz i ciało stałe–ciecz, otrzymywania i modyfikacji impregnowanych węgla aktywnych, otrzymywania i adsorpcyjnej charakterystyki właściwości strukturalnych i powierzchniowych nanoporowatych uporządkowanych adsorbentów krzemionkowych (MCM-41, MCM-48, SBA-15), otrzymywania i charakterystyki właściwości adsorpcyjnych uporządkowanych mezoporowatych materiałów węglowych z wykorzystaniem „twardych” i „miękkich” matryc. Ostatnio jego grupa badawcza zajmuje się otrzymywaniem i charakterystyką fizykochemicznych właściwości nanostruktur krzemionkowo metalicznych.

Jest autorem i współautorem ponad 300 artykułów naukowych i ponad 100 komunikatów i referatów na konferencjach oraz współautorem dwóch monografii i kilku obszernych artykułów monograficznych. Od 1986 r. ściśle współpracuje naukowo z prof. Mieczysławem Jaroncem z Kent State University, Kent, Ohio, USA.



Mgr inż. Dominik Jamiola urodził się w 1985 r. Studiował materiały niebezpieczne i ratownictwo chemiczne na Wydziale Nowych Technologii i Chemii Wojskowej Akademii Technicznej w Warszawie. W pracy dyplomowej zajmował się problematyką otrzymywania i zastosowania spieków ciężkich wytwarzanych za pomocą syntezy spaleninowej. Studia ukończył z oceną bardzo dobrą w 2009 r.

W 2009 r. rozpoczął studia doktoranckie w Wojskowej Akademii Technicznej w Warszawie pod opieką naukową prof. dr hab. inż. J. Chomy. Zajmuje się problematyką syntezy i badania właściwości struktur krzemionkowo-metalicznych. Jest współautorem dwóch artykułów naukowych.



Prof. dr hab. Mieczysław Jaroniec urodził się w 1949 r. Studiował chemię na Uniwersytecie M. Curie-Skłodowskiej w Lublinie. Stopień doktora i doktora habilitowanego uzyskał odpowiednio w 1976 i 1979 r., a tytuł profesora nadzwyczajnego i zwyczajnego w 1985 i 1989 r. Od 1972 do 1991 pracował na UMCS zaczynając od asystenta a kończąc na stanowisku profesora zwyczajnego. Od 1991 r. jest profesorem w Zakładzie Chemii, Kent State University, Kent, Ohio, USA. Wciąż utrzymuje bliskie kontakty naukowe z wieloma ośrodkami w kraju, o czym może świadczyć nadanie mu doktoratów *honoris causa* Uniwersytetu M. Kopernika (2009) oraz Wojskowej Akademii Technicznej (2010). Jego główne zainteresowania naukowe dotyczą adsorpcji i chromatografii na granicy faz gaz/ciało stałe i ciecz/ciało stałe, jak również chemii materiałów nanoporowatych ze szczególnym uwzględnieniem mikro- i mezoporowatych adsorbentów węglowych i żeli krzemionkowych. Obecnie jego grupa koncentruje się na syntezie (w obecności surfaktantów i kopolimerów blokowych) oraz badaniu właściwości uporządkowanych materiałów mezoporowatych takich jak krzemionki, organokrzemionki, węgle, tlenki nieorganiczne o strukturach heksagonalnych (MCM-41, SBA-15) i sześciennych (MCM-48, SBA-16, FDU-1). Jego obecne zainteresowania koncentrują się także na zastosowaniu materiałów o uporządkowanej strukturze porowatej

w adsorpcji, katalizie, chromatografii, ochronie środowiska i innych dziedzinach w odniesieniu do energii i nanotechnologii.

Jest autorem i współautorem kilkaset artykułów naukowych, współautorem jednej monografii, współedytorem 4 książek nt. nanoporowatych materiałów i współautorem wielu obszernych artykułów monograficznych. Jego prace naukowe są często cytowane przez innych badaczy, o czym świadczy wysoka wartość indeksu Hirscha, $h = 59$, oraz włączenie go przez ISI do grona „highly cited” badaczy w dziedzinie chemii materiałów (<http://isihighlycited.com/>). Ponadto prof. Jaroniec jest lub był członkiem komitetów redakcyjnych w takich czasopismach jak *Adsorption*, *Adsorption Science & Technology*, *Chemistry Materials*, *Heterogeneous Chemistry Reviews*, *Journal of Liquid Chromatography*, *Journal of Colloid and Interface Science*, *Thin Solid Films*, *Journal of Porous Materials* oraz *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*.

ABSTRACT

In the past decade the silica-metal nanostructures consisting of siliceous cores and metallic nanoshells have been intensively studied. The second part of this review article presents recent advances in the synthesis, characterization and application of silica-gold core-shell nanostructures. A special emphasis is given to the nanostructures composed of the silica core and gold or silver nanoshell.

Nowadays gold is often used metal for the formation of nanoshells. The reason for this interest is a great application potential of SiO_2 -Au nanostructures in catalysis, chemical and biological detection of various substances, optoelectronics, photonic crystals, plasmonics, and in analytical techniques utilizing surface enhanced Raman spectroscopy. Silver nanoshells formed on siliceous cores show similar properties as those of gold nanoshells. Silica-gold nanostructures can be prepared using various methods, for instance, by growing up gold nanoshells on the siliceous cores with deposited gold nanoparticles, by precipitating gold nanoparticles with their simultaneous deposition on modified silica cores, by reducing gold ions on Sn-modified silica particles, or by forming gold nanoshells under ultrasonic conditions.

This article presents several methods for the formation of silica-metal nanostructures. A special emphasis is given to the method of growing up gold nanoshell on the modified silica core with deposited gold nanoparticles. This method assures a good control of the nanoshell thickness as well as its surface properties. In this method the organically modified silica particles are initially covered with gold nanoparticles, which facilitate a further growth of gold nanoshell by reduction of tetrachloroauric acid with agents such as formaldehyde. In the case of aminopropyl-modified silica particles, about 25–30% coverage of the silica surface with gold nanoparticles can be achieved. The effect of other than aminopropyl organic groups on the coverage of the silica surface with gold nanoparticles was studied showing that amino and mercaptopropyl groups assure about 30% surface coverage with gold, while this coverage is very small when methyl and diphenylphosphine groups are on the silica surface.

The aforementioned reduction of gold ions and growth of gold nanoparticles depend on the uniformity of the initial coverage of the silica surface with gold nanoparticles, the concentration of reduced gold ions as well as the nature and the concentration of reducing agent. The most often used reducing agents are formaldehyde and sodium borohydride, although hydroxylamine hydrochloride, carbon monoxide, hydrogen peroxide and trisodium citrate are also used. Silver is the next popular metal after gold used for the formation of nanoshells. The other metal used are platinum, palladium, nickel and copper.

The final sections of this review are devoted to a brief presentation of various techniques used for characterization of core-shell nanostructures as well as to their applications. The most often used methods include scanning (SEM) and transmission (TEM) electron microscopy, wavelength (WDS) and energy (EDS, EDX) dispersion spectroscopy, photoacoustic spectroscopy (PAS), dynamic light scattering (DLS), surface plasmon resonance (SPR), powder X-ray diffraction (XRD), IR and UV-Vis spectroscopy, Raman spectroscopy, differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetry (TG) and adsorption (ADS).

As regards applications of silica-metal core-shell nanostructures, the prospects are enormous ranging from catalysis, optoelectronics, to drug delivery, and other medical applications.

Keywords: silica-metal nanostructures (core-shell), synthesis, properties, characterization, application
Słowa kluczowe: nanostruktury krzemionkowo-metaliczne, synteza, właściwości, charakterystyka, zastosowanie

WSTĘP

Otrzymywanie nanostruktur krzemionkowo-metalicznych typu rdzeń–warstwa (rdzeń–powłoka) (*core-shell*) może być realizowane przy wykorzystaniu wielu metod takich jak: osadzanie, polimeryzacja, poprzez mikroemulsje, odwrócone micle, kondensację zol–żel, technikę adsorpcji warstwa-po-warstwie [1], bezprądowe platerowanie [2], osadzanie chemiczne [3], osadzanie indukowane ziarnami [4], osadzanie przy użyciu ultradźwięków [5] oraz innych sposobów. O niektórych z nich wspomniano w poprzedniej pracy (część I). Wytwarzanie nanostruktur jest procesem wieloetapowym i wymaga dokładnej kontroli przebiegu każdego etapu syntezy w celu otrzymania struktur o pożądanych właściwościach. Kontrola poszczególnych etapów syntezy pozwala na otrzymywanie nanostruktur o małej dyspersji średnic, pożądanym stopniu pokrycia rdzenia nanocząstką metaliczną warstwą, uniknięcie samodzielnego wytrącania się nanocząstek materiału warstwy oraz niedopuszczenie do koagulacji nanocząstek. Pomimo opracowania wielu metod wytwarzania warstw na powierzchni dielektrycznego rdzenia, kontrola ich grubości i jednorodności wciąż jest trudnym zadaniem. Dlatego interesującym może wydawać się przegląd metod służących otrzymywaniu nanostruktur krzemionkowo-metalicznych o ściśle określonych właściwościach z punktu widzenia konkretnego zastosowania. Celem więc tej części pracy będzie omówienie metod otrzymywania, charakteryzacji właściwości i zastosowania nanostruktur krzemionkowo-metalicznych.

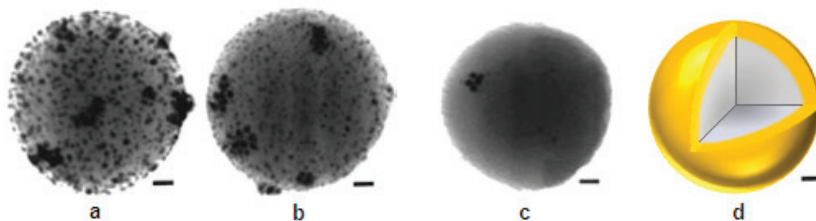
1. OTRZYMYWANIE METALICZNYCH POWŁOK NANOSTRUKTUR KRZEMIONKOWO-METALICZNYCH

Otrzymywanie powłok metalicznych nanostruktur, jak wspomniano we wstępie części I tej pracy, może być realizowane na wiele sposobów. Proces ten będzie jednoetapowy, gdy do syntezy użyje się komercyjnie dostępnych nanocząstek krzemionki oraz jednej z metod bezpośredniego osadzania metalu na SiO_2 . W każdym przypadku wybór odpowiedniej metody, a także materiału powłoki będzie uzależniony od pożądanych właściwości otrzymywanych nanocząstek. Wybór syntezy jest również zależny od rodzaju metalu, który chcemy osadzić na krzemionce. Niezależnie od wybranej metody, formowanie metalicznej nanowarstwy jest końcowym etapem procesu syntezy krzemionkowo-metalicznych nanostruktur. Poniżej opisane zostały metody wytwarzania metalicznych powłok złota, srebra, palladu, platyny, niklu i miedzi na krzemionce.

Złoto jest obecnie najczęściej stosowanym metalem do wytwarzania nanostruktur. Wynika to przede wszystkim z dużych możliwości zastosowania nanocząstek SiO_2 -Au między innymi w katalizie, chemicznej i biologicznej detekcji różnych substancji, w optoelektronice, w fotonicznych kryształach, plazmonice i w urządzeniach analitycznych wykorzystujących powierzchniowo wzmocnione rozproszenie ramanowskie [6–10]. Podobne właściwości do złotych nanowarstw wykazują nano-

warstwy Ag naniesione na nanocząstki SiO_2 . Nanocząstki krzemionkowo-złote mogą być otrzymywane między innymi przy użyciu metody narastania warstw na koloidalnych nanocząstkach złota osadzonych na krzemionce [11–25], metody wytrącania-osadzania [24], poprzez redukcję jonów złota na powierzchni SiO_2 modyfikowanej cyną [2] oraz poprzez osadzanie złota stymulowane ultradźwiękami [26].

Najczęściej stosowaną techniką, która umożliwia dobrą kontrolę zarówno grubości powłoki metalicznej, jak również właściwości powierzchniowych jest pierwsza z wyżej wymienionych, tj. metoda narastania warstw. W metodzie tej na modyfikowane (najczęściej grupami aminowymi) nanocząstki krzemionkowe nanoszone są wcześniej przygotowane nanocząstki koloidalnego złota, które oddziałują silnie z grupami przyłączonymi do powierzchni krzemionkowej. W przypadku stosowania 3-aminopropylotrimetoksylanu (APTMS), jako związku modyfikującego powierzchnię nanocząstek krzemionkowych, pokrycie powierzchni koloidalnym złotem wynosi od 25 do 30%. Stopień pokrycia powierzchni jest najprawdopodobniej ograniczony poprzez odpychające międzycząsteczkowe oddziaływania kulombowskie [27]. Stopień pokrycia powierzchni krzemionki nanocząstkami złota jest zależy od tego, jaki związek był użyty do modyfikacji powierzchni SiO_2 . Dla APTMS pokrycie waha się od 25 do 30%, podczas gdy użycie chlorku poli-diallilo-dimetyloamoniowego (PDADMAC) pozwala na zwiększenie pokrycia powierzchni nanocząstkami złota do 40% [28]. Xue i in. [29] porównali zdolność przyłączania koloidalnego złota przez APTMS i polietylenoiminę (PEI). Polietylenoimina będąca związkiem bogatszym w grupy aminowe pozwala na otrzymanie większego i bardziej jednorodnego pokrycia powierzchni niż APTMS. Ponadto, nanocząstki krzemionki modyfikowane za pomocą PEI wiążą nanocząstki złota (13–32 nm), podczas gdy modyfikowane przy użyciu APTMS już nie. Westcott i in. [30] badali wpływ grup innych niż aminowa na pokrycie powierzchni nanocząstek krzemionkowych. Podczas gdy grupy funkcyjne: aminowa $-\text{NH}_2$ i merkaptylowa $-\text{SH}$, pozwalają na pokrycie około 1/3 powierzchni nanocząstek krzemionkowych to minimalne pokrycie obserwuje się dla hydrofobowych grup funkcyjnych takich jak: metylowa $-\text{CH}_3$ i difenylofosfinowa ($-\text{PPh}_2$) (Rys. 1) [30].



Rysunek 1. Zdjęcia TEM nanocząstek SiO_2 po procesie nanoszenia cząstek złota. Nanocząstki SiO_2 były modyfikowane za pomocą (a) AEAPTMS ($-\text{NH}_2$), (b) MPTMS ($-\text{SH}$), (c) DPPETES ($-\text{PPh}_2$) oraz (d) model nanostruktury krzemionkowo-złotej (po modyfikacji z pracy [30])

Figure 1. TEM images of silica nanoparticles after deposition of Au nanoparticles. Silica particles were modified by using (a) AEAPTMS ($-\text{NH}_2$), (b) MPTMS ($-\text{SH}$), (c) DPPETES ($-\text{PPh}_2$) and (d) model of silica-gold nanostructure (after modification from [30])

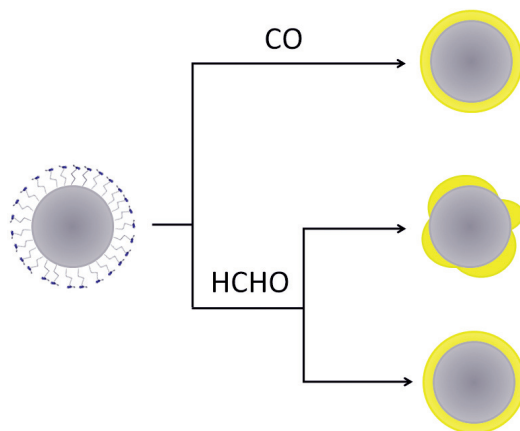
W przypadku gdy istnieje powód, aby zmniejszyć stopień pokrycia powierzchni krzemionki nanocząstkami złota, należy przy modyfikacji powierzchni użyć mieszaniny organosilanów, z których co najmniej jeden będzie posiadał grupę silnie oddziałującą z nanocząstkami metalu i co najmniej jeden będzie posiadał grupę hydrofobową słabo oddziałującą z tym metalem. Przykładem takiego celowego działania są wyniki badań opublikowanych przez Westcott i in. [31], w których do modyfikacji została użyta mieszanina 2% wag. 3-aminopropylotrimetoksylanu (APTMS) i 98% wag. *n*-propylo-trimetoksylanu (PTMS).

Wpływ na pokrycie powierzchni nanocząstek krzemionkowych koloidalnym złotem może mieć również czas starzenia koloidalnego złota. Park i in. [32] stwierdzili, że koloidalne złoto, które ulegało procesowi starzenia w ciągu jednego tygodnia pozwalało uzyskać jednorodne pokrycie krzemionki złotem. Podczas gdy jednodniowe koloidy złota dawały nanostruktury SiO₂-Au o nierównomiernym pokryciu powierzchni. W tym miejscu należy wspomnieć, że proces starzenia pozwala na uzyskanie jednorodnych wymiarów nanocząstek złota i w większości opublikowanych wyników badań jest dłuższy od tygodnia [15–25]. Wymiary koloidalnych nanocząstek złota najczęściej zawarte są w przedziale od 1 do 3 nm. Jednak jak pokazano w pracy [29] przy pewnych pokryciach korzystne jest również użycie większych nanocząstek złota.

Ostatnim etapem po osadzeniu cząstek złota na powierzchni krzemionki jest wytworzenie nanopowłoki złota. Proces wytwarzania powłoki Au polega na redukcji jonów złota AuCl₄⁻ na cząstkach złota, co prowadzi początkowo do wzrostu ich wymiarów a następnie do ich łączenia się na powierzchni nanocząstki krzemionki. Produktem końcowym redukcji jest powstająca ciągła, metaliczna warstwa na powierzchni dielektrycznego rdzenia. Wytworzenie warstwy przebiega zazwyczaj w ciągu kilku sekund z wydajnością większą niż 95% [31]. Przebieg procesu redukcji i jego końcowy efekt zależny jest od stopnia i jednorodności pokrycia cząstek krzemionki nanocząstkami złota, jak również od stężenia redukowanych związków złota, a także od rodzaju i stężenia czynnika redukującego [32]. Odpowiednio gęste upakowanie cząstek złota na SiO₂ pozwala uzyskać ciągłą i stosunkowo cienką warstwę. Stężenie redukowanych związków złota wpływa na grubość warstwy. Natomiast właściwie dobrany czynnik redukujący pozwala na otrzymanie powłoki odpowiedniej jakości przy różnej jej grubości.

Najczęściej stosowanymi reduktorami są formaldehyd [11–22, 33] i borowodorek sodu [23, 24, 34], chociaż redukcję prowadzono również przy użyciu chlorowodoru hydroksyloaminy [9], tlenku węgla [35], nadtlenu wodoru [25] oraz cytrynianu trisodu [34]. Nanostruktury powstałe w wyniku użycia różnych reduktorów nie są jednakowe. Pokazano to na przykładzie formaldehydu, borowodoru sodu i chlorowodoru hydroksyloaminy [36]. Najczęściej stosowany reduktor – formaldehyd pomimo, że ma dobre właściwości redukujące, wymaga długich czasów reakcji i powoduje strącanie dużej ilości koloidalnego złota w roztworze. Badania eksperymentalne pokazały, że użycie HCHO dla cząstek krzemionki większych od 250 nm

umożliwia utworzenie powłok w szerokim przedziale grubości, jednak dla cząstek większych od 400 nm minimalna grubość wynosi ok. 25 nm [36]. Borowodorek sodu (NaBH_4) z drugiej strony reaguje bardzo szybko, jednak podobnie jak formaldehyd powoduje strącanie dużej ilości koloidalnego złota w roztworze, a dodatkowo ulega szybkiemu utlenianiu. W porównaniu tym korzystnie wypada chlorowodorek hydroksyloaminy, którego szybkość redukcji jest pośrednia pomiędzy wyżej wymienionymi reduktorami, a dodatkowo zminimalizowane jest strącanie koloidalnego złota do roztworu. Efektem tego są mniejsze straty złota. Chlorowodorek hydroksyloaminy sprawdza się dobrze dla cząstek krzemionki o wymiarach mniejszych od 200 nm. Natomiast przy większych wymiarach cząstek SiO_2 ograniczona jest grubość warstwy wytwarzanej przez ten reduktor. Ważną zaletą stosowanego $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ jest stabilność produktów jego reakcji. Innym reduktorem, który może stanowić alternatywę dla formaldehydu jest gazowy tlenek węgla. Użycie CO pozwala na otrzymanie cienkiej, jednorodnej powłoki dobrej jakości niezależnie od czasu starzenia prekursorów, czego nie osiąga się dla HCHO (Rys. 2) [35].



Rysunek 2. Schemat tworzenia nanowarstwy złota na modyfikowanych nanocząstkach krzemionki przy użyciu tlenku węgla i formaldehydu jako reduktorów [35]

Figure 2. Schematic illustration of a formation of gold nanoshells on modified silica particles by using carbon monoxide and formaldehyde as reducing agents [35]

Przykład optymalizacji właściwości nanowarstw poprzez dobór warunków prowadzenia reakcji: starzenia koloidów złota, stężenia redukowanych soli złota oraz ilości dodawanego czynnika redukującego – formaldehydu, został opublikowany przez Parka i in. [32] (Tab. 1). Przy optymalnej ilości dodanego formaldehydu, zwiększenie stężenia redukowanych soli powoduje zwiększenie grubości warstwy złota, a w konsekwencji powstanie jednorodnej morfologii oraz silniejszego rezonansu plazmonowego nanowarstwy. Jednak znaczne zwiększenie stężenia redukowanych soli i/lub czynnika redukującego w znaczącym stopniu może zaburzyć tę korelację w związku z agregacją nanocząstek złota.

Tabela 1. Charakterystyka właściwości optycznych nanowarstw złota otrzymanych dla różnych ilości soli złota i formaldehydu jako czynnika redukującego (po modyfikacji z pracy [32])

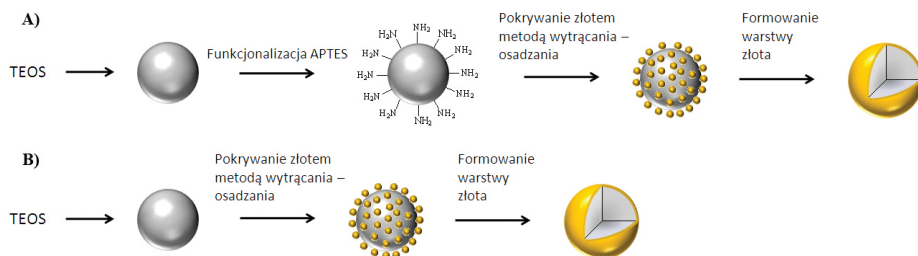
Table 1. Characteristics of optical properties of gold nanoshells obtained by varying the amounts of a gold salt and formaldehyde as reducing agents (after modification from [32])

Średnica rdzenia (nm)	Ilość dozowanego formaldehydu (μl)	Objętość roztworu soli złota (ml)	Stężenie roztworu soli złota (mM)	Grubość warstwy złota (nm)	Stosunek rdzeń / nanowarstwa	Maksimum pików widma spektralnego (nm)	Różnica absorbancji ($\Delta\lambda^a$)
185	3,4	4	0,38	–	–	707	0,07
185	13,4	4	0,38	20	9,3	853	0,06
185	3,4	4	0,38	22	8,6	–	–
185	26,8	4	0,38	27	7,0	–	–
150	120	3	1,52	28	5,4	813	0,71
150	120	4	1,52	23	6,5	825	0,34
150	120	5	1,52	26	5,7	815	0,67
150	50	4	1,52	14	10,7	964	0,25
150	80	4	1,52	30	5,0	845	0,89
150	120	4	1,52	30	5,0	825	0,81
150	80	4	1,52	–	–	856	0,45
110	26,8	4	1,14	–	–	699	0,37
110	40	4	1,14	–	–	810	0,41
110	53,6	4	1,14	–	–	810	0,51
110	53,6	4	1,52	–	–	810	0,74
110	67	4	1,52	–	–	810	1,06
110	80	4	1,52	28	4,0	811	1,09

^a Różnica absorbancji pomiędzy wysokościami pasm plazmonowego rezonansu.

^{*} – oznacza niedostępne (lub niezmierzone) dane eksperymentalne wynikające z ograniczonej rozdzielczości SEM i/lub aglomeracji nanocząstek złota.

Park i in. [37] badali również wpływ pH koloidów złota na tworzenie się klas-
trów złota na modyfikowanych nanocząstkach krzemionkowych. pH koloidów złota
w sposób istotny wpływa na morfologię oraz powierzchniowy rezonans plazmo-
nowy. Koloidy złota o kwaśnym pH pozwalają na osiągnięcie jednorodnego roz-
łożenia cząstek złota na powierzchni SiO_2 , co pozwala na otrzymanie gładkich pow-
łok. W środowisku zasadowym zachodzi natomiast nierównomierne rozłożenie
nanocząstek złota, co niekorzystnie wpływa na morfologię powłok.



Rysunek 3. Schemat tworzenia nanowarstw złota na modyfikowanych (A) i niemodyfikowanych (B) nanocząstkach krzemionki przy użyciu metody wytrącania-osadzania [24]

Figure 3. Schematic illustration of a formation of gold nanoshells on modified (A) and unmodified (B) silica particles by using precipitation-deposition method [24]

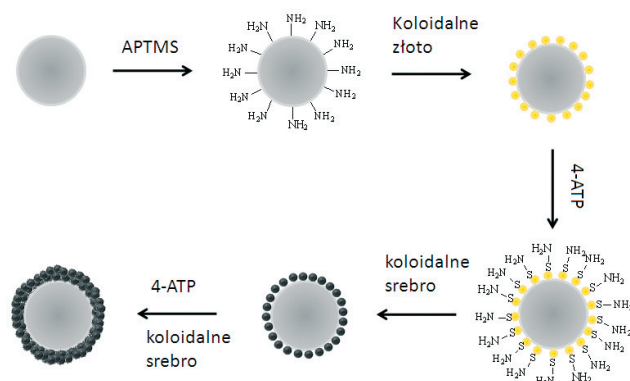
Metodą, która również może być użyta do wytwarzania nanopowłok jest metoda wytrącania-osadzania. Metoda ta pozwala na otrzymywanie nanostruktur $\text{SiO}_2\text{-Au}$ bez potrzeby wcześniejszej syntezy koloidalnego złota. Dzięki temu ograniczony zostaje czas i koszt syntezy w porównaniu do metody wcześniejszego wytrącania koloidalnego złota a następnie osadzania go na nanocząstkach krzemionkowych. Metoda ta może być użyta do tworzenia nanopowłok złota zarówno na modyfikowanych jak i niemodyfikowanych nanocząstkach krzemionkowych [24, 38].

Proces wytrącania-osadzania opisany przez Kah i in. [38] wymaga ogrzewania HAuCl_4 w środowisku zasadowym w celu otrzymania nanocząstek SiO_2 z osadzonymi nań cząstkami wodorotlenku złota Au(OH)_3 bez potrzeby ich wcześniejszej syntezy. Dalej następuje redukcja wodorotlenku złota przy użyciu NaBH_4 . Kah i in. [38] badali wpływ pH, temperatury, czasu reakcji oraz modyfikacji powierzchni SiO_2 grupami aminowymi na proces osadzania złota. Grupy aminowe odgrywają w tym procesie istotną rolę, ponieważ umożliwiają osadzanie nanocząstek Au(OH)_3 , dzięki czemu polepszają jednorodność i gęstość pokrycia nimi powierzchni krzemionki. Poprzez zmianę pH roztworu HAuCl_4 oraz czasu reakcji możliwa jest kontrola gęstości pokrycia oraz wymiaru ziaren nanocząstek Au(OH)_3 . Największą gęstość pokrycia osiągnięto przy $\text{pH} = 8$. Metoda wytrącania-osadzania, jak już wspomniano, nie jest ograniczona do modyfikowanej powierzchni SiO_2 i może być użyta dla nanocząstek SiO_2 tylko z grupami silanolowymi (bez uprzedniej modyfikacji). Na podstawie wyników badań Phonthammachai i in. [24] można stwierdzić, że metoda wytrącania-osadzania pozwala na uzyskanie wysokiej dyspersji nanocząstek złota zarówno dla SiO_2 jak i SiO_2 modyfikowanego za pomocą 3-aminopropylotrietoksylsilanu (APTES) w tej samej temperaturze (65°C), jednak czas reakcji jest dwukrotnie krótszy dla krzemionki niemodyfikowanej.

Wytwarzanie nanostruktur $\text{SiO}_2\text{-Au}$ może być również osiągnięte za pomocą ultradźwięków [39]. Pod wpływem ultradźwięków w mieszaninie submikronowych cząstek krzemionki, kwasu tetrachlorozłotowego HAuCl_4 i amoniaku w wodzie, w temperaturze pokojowej i w atmosferze argonu zachodzi redukcja, której produktem jest nanokompozyt krzemionkowo-złoty. W efekcie tak przeprowadzonego pro-

się, że w przypadku srebra zaproponowano więcej różnych metod wytwarzania nanostruktur $\text{SiO}_2\text{-Ag}$. Nanostruktury krzemionkowo-srebrne typu *core-shell* mogą być otrzymywane między innymi przy użyciu metody narastania warstw na koloidalnych nanocząstkach srebra osadzonych na krzemionce [41–46], poprzez osadzanie srebra stymulowane ultradźwiękami [47, 48], poprzez redukcję jonów srebra na powierzchni SiO_2 modyfikowanej cyną [49–51] lub poprzez syntezę metodą Tollensa [52] i innych [53–61].

Metoda narastania z wykorzystaniem nanocząstek srebra lub złota, znajduje zastosowanie do wywarzania nanowarstw srebra. Jednak, w przypadku srebra, nanocząstki nie zawsze są ze srebra, co ma silny wpływ na rezonans optyczny. Najczęściej wzrost nanopowłoki ze srebra prowadzony jest na cząstkach złota [41, 43, 45, 46]. Autorzy pracy [41] użyli koloidów złota ze względu na łatwość i niezawodność syntezy z uwzględnieniem wymiarów nanocząstek krzemionkowych. Chen i in. [43] opisali otrzymywanie wielofunkcyjnych nanostruktur srebra o właściwościach magnetycznych. Cząstkami były koloidy złota, a reduktorem podczas wytwarzania nanowarstwy był formaldehyd. Lu i in. w pracy [46] zaproponowali otrzymywanie ciekawych struktur. W pierwszym etapie otrzymali według standardowych procedur nanocząstki $\text{SiO}_2\text{-Au}$ (z wykorzystaniem modyfikatora APTMS), a następnie zamiast bezpośrednio tworzyć powłoki srebra wokół nanocząstek krzemionkowych strukturę $\text{SiO}_2\text{-Au}$ poddali modyfikacji 4-aminotiofenolem (4-ATP). Grupy merkaptylowe oddziaływały silnie z cząstkami złota, natomiast grupy aminowe (w tym dwufunkcyjnym związku) stanowiły podłoże do tworzenia warstw srebra (Rys. 5). Kolejny przykład otrzymywania nanostruktur krzemionkowo-srebrnych stanowiły badania Jackson i Halas [41]. Autorzy opisali otrzymywanie nanostruktur krzemionkowo-srebrnych trzema metodami: Danschera, Burry’ego i Zsigmondy. Zmiana reduktora i warunków reakcji w tych trzech metodach w bardzo istotny sposób wpływała na morfologię otrzymanych nanostruktur, które to zmieniały się od kolczastej, poprzez chropowatą aż do gładkiej powierzchni i otrzymywane były z dobrą powtarzalnością

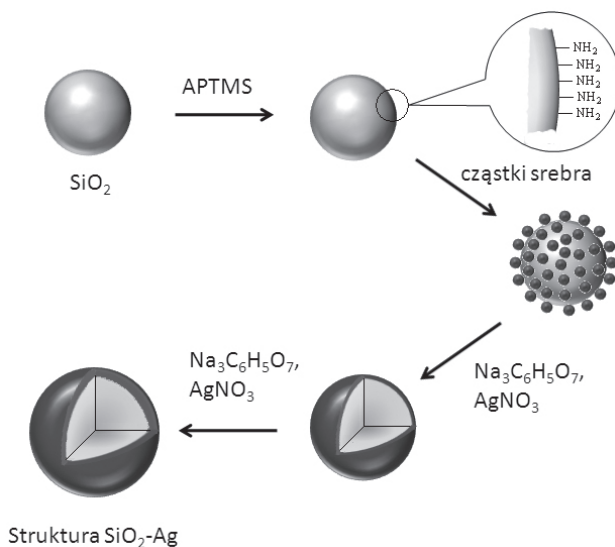


Rysunek 5. Schemat wytwarzania nanocząstek $\text{SiO}_2\text{-Ag}$ [46]

Figure 5. Schematic illustration of $\text{SiO}_2\text{-Ag}$ core-shell nanoparticles [46]

We wszystkich trzech metodach, narastanie powłoki ze srebra odbywało się na nanocząstkach krzemionkowych modyfikowanych za pomocą APTMS (z grupami $-NH_2$), na których wcześniej, przed osadzaniem srebra, osadzono koloidalne złoto. W metodzie Danschera reduktorem jest hydrochinon, podczas gdy roztwór cytrynianu i gumy arabskiej (*Acacia*) stabilizują jony srebra i spowalniają kinetykę redukcji [61]. W rezultacie powstają duże kolczaste struktury, o szerokim rezonansie plazmonowym, pokrywające powierzchnię krzemionkową niejednorodną warstwą. W metodzie Burry'ego czynnikiem redukującym jest ester propylowy kwasu galusowego i roztwór NH_3 aq [62]. W metodzie tej uzyskuje się struktury z dużymi agregatami srebra na powierzchni nanocząstek krzemionkowych razem z dużymi koloidami srebra w roztworze. W metodzie Zsigmondy [63] redukcja jest inicjowana małą ilością formaldehydu, a następnie w wyniku szybkiego wzrostu pH, wywołanego dodatkiem roztworu NH_3 aq, redukcja jest przyspieszana. W efekcie tak przeprowadzonego eksperymentu otrzymuje się gładkie nanowarstwy.

Kolejnym przykładem wytwarzania nanowarstw srebra są wyniki opublikowane przez Kim i in. [45.] Ponownie jako rdzeń do wytworzenia nanopowłok metalicznych posłużyły nanocząstki krzemionki modyfikowane za pomocą APTMS (z grupą $-NH_2$) wraz z osadzonymi na nich koloidalnymi cząstkami złota. Nanopowłoki nanocząstek otrzymywane były ze złota, srebra oraz stopu złota ze srebrem.



Rysunek 6. Schemat otrzymywania nanostruktur SiO_2-Ag [42]

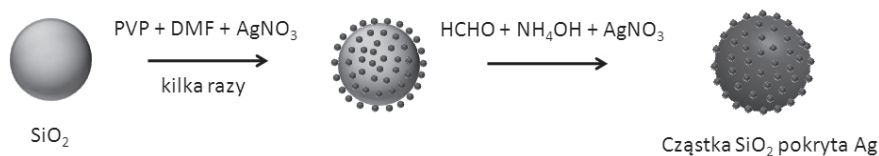
Figure 6. Schematic illustration of SiO_2-Ag core-shell nanoparticles [42]

Przykłady narastania niedomieszkowanych srebrnych powłok na koloidalnym srebrze opublikowane zostały przez Jianga i Liu [42] oraz Zhanga i in. [44]. Zhang i in. otrzymali nanostruktury krzemionkowo-srebrne poprzez funkcjonalizację krzemionki grupami merkaptylowymi, przyłączenie do nich koloidalnego srebra, a następ-

nie poprzez redukcję kationów srebra na powierzchni nanocząstek i narastanie kolejnych warstw [44]. Jako reduktor wykorzystano glukozę. Jiang i Liu otrzymali nanostruktury krzemionkowo-srebrne poprzez naniesienie koloidalnego srebra na krzemionkę funkcjonalizowaną grupami aminowymi [42]. Dalsza stopniowa redukcja soli srebra za pomocą cytrynianu trisodu doprowadziła do wytworzenia nanostruktury (Rys. 6).

Nanostruktury krzemionkowo-srebrne mogą być otrzymywane również za pomocą innych metod. Jedną z nich jest metoda z wykorzystaniem ultradźwięków [47, 48]. Sonikacja mieszaniny submikronowych cząstek krzemionki, azotanu srebra i amoniaku w wodzie, w temperaturze pokojowej oraz atmosferze argonu i wodoru (95:5) prowadzi do redukcji jonów srebra na powierzchni nanocząstek krzemionki [47]. W wyniku tego procesu uzyskuje się jednorodne pokrycie powierzchni krzemionki nanocząstkami srebra o wymiarach ok. 5 nm. Dodatkowo zaletami tej metody są prostota i duża wydajność. W przypadku tej metody ważne jest prowadzenie procesu w atmosferze beztlenowej, dzięki czemu unika się powstawania na powierzchni krzemionki mieszaniny srebra i tlenków srebra.

Innym przykładem wykorzystania ultradźwięków jest synteza opisana przez Ye i in. [48]. W pierwszym etapie tej syntezy wytwarzano nanocząstki srebra i osadzano je na powierzchni nanocząstek krzemionkowych w wyniku redukcji soli srebra za pomocą dimetyloformamidu (DMF) w obecności poliwinylpirolidonu (PVP) (Rys. 7). PVP, według opinii autorów, odgrywa istotną rolę w procesie wytwarzania i osadzania się nanocząstek srebra. W kolejnym etapie następowała redukcja soli srebra w środowisku zasadowym przy użyciu formaldehydu w wyniku czego otrzymywano nanopowłokę srebra na powierzchni cząstek krzemionkowych (Rys. 7). Zaletami tej metody jest krótki czas reakcji (ok. 30 min) oraz możliwość prowadzenia procesu w temperaturze pokojowej.



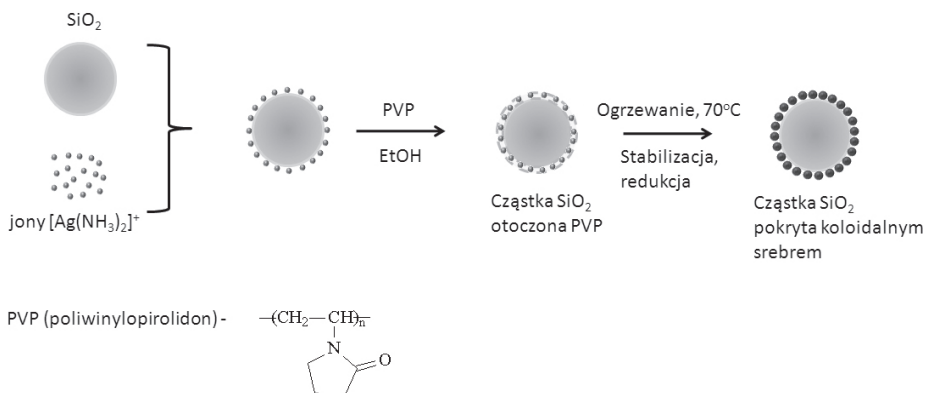
Rysunek 7. Schemat wytwarzania nanopowłoki Ag za pomocą ultradźwięków [48]

Figure 7. Schematic illustration of a formation of Ag nanoshell by using ultrasonication [48]

Zastosowanie PVP do syntezy nanocząstek SiO_2 -Ag, ale już bez użycia ultradźwięków, zaproponowali Deng i in. [49] (Rys. 8). W metodzie tej jony $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ wiążą się z powierzchnią cząstek krzemionkowych w wyniku elektrostatycznego oddziaływania z grupami silanolowymi, a następnie są redukowane i stabilizowane przez PVP. Grubość nanowarstwy srebra może być kontrolowana poprzez odpowiedni dobór stężenia jonów $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$.

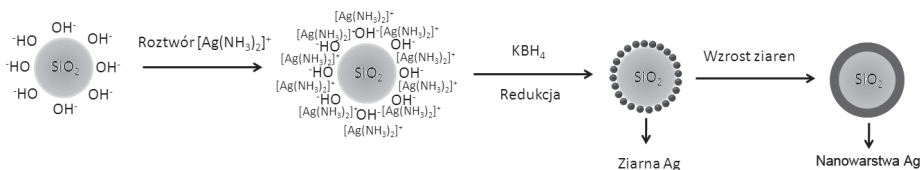
PVP używano podczas syntezy nanopowłok srebra zaproponowanej przez Zhanga i in. [59] (Rys. 9). Wytwarzano koloidalne nanocząstki srebra na powierzchni

SiO_2 , poprzez redukcję $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ za pomocą KBH_4 wspomaganą przez PVP. Narastanie warstw srebra prowadzono przy użyciu HCHO , który redukuje sole srebra.



Rysunek 8. Schemat wytwarzania nanowarstwy Ag z wykorzystaniem PVP [49]

Figure. 8. Schematic illustration of a formation of Ag nanoshell in the presence of PVP [49]



Rysunek 9. Schemat wytwarzania nanowarstwy Ag metodą Zhanga [59]

Figure 9. Schematic illustration of a formation of Ag nanoshell by using Zhang method [59]

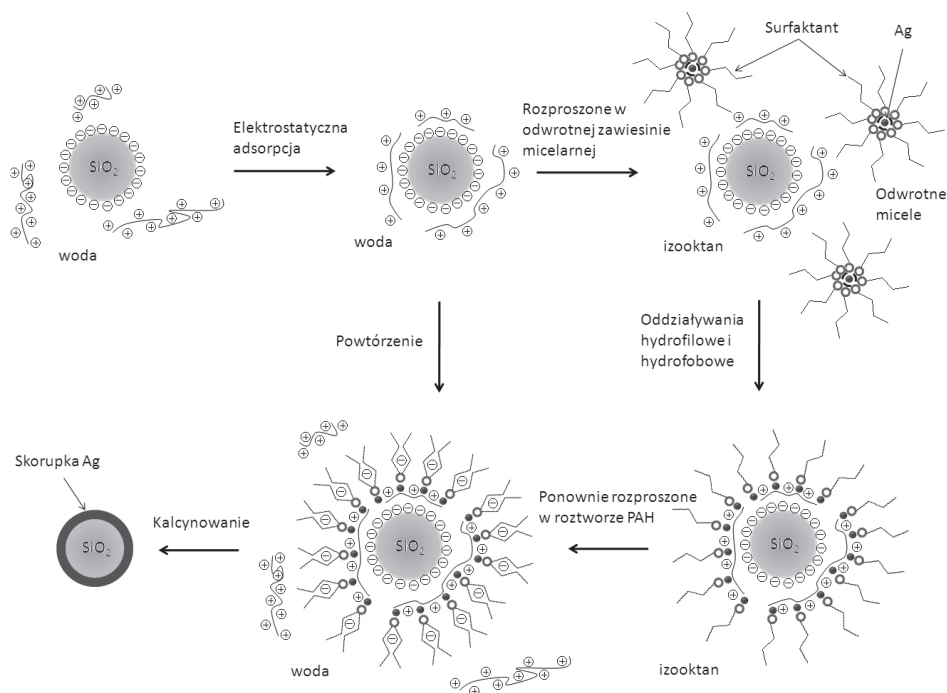
Synteza nanowarstw srebra może być również realizowana przy wykorzystaniu jonów cyny [50, 51]. W metodzie opisanej w pracy [50] kationy Sn^{2+} są adsorbowane na powierzchni nanocząstek krzemionkowych, a następnie, po dokładnym wymyciu soli cyny, do roztworu dodawany jest amoniakalny roztwór azotanu srebra (jony $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$) (Rys. 9). W wyniku redukcji jonów srebra na powierzchni krzemionki tworzy się cienka warstwa srebra. Proces osadzania srebra może być powtarzany w celu uzyskania bardziej jednorodnego pokrycia srebrem nanocząstek SiO_2 . Jednak uzyskanie całkowitego pokrycia powierzchni nanocząstek krzemionki tą metodą było trudne. Pewną modyfikacją tej metody jest sposób zaproponowany przez Chen i in. [51], w którym to zamiast amoniaku używa się trietanolaminy (jony $[\text{Ag}(\text{TEA})_2]^+$).

Peterson i in. [52] zaproponowali dwie metody oparte na reakcji Tollensa, które mogą być użyte do wytwarzania nanowarstw srebra. Są to metody temperaturowo i stechiometrycznie kontrolowanego wzrostu nanopowłok srebra na powierzchni nanocząstek krzemionkowych. Kontrola temperatury i stężenia reagentów pozwala

na spowolnienie kinetyki reakcji, dzięki czemu preferowane jest wytwarzanie nanopowłok srebra na nanocząstkach SiO_2 . Otrzymywane powłoki są polikrystaliczne, o dużej granulacji i cechują się wysoce jednorodnym pokryciem powierzchni krzemionkowej. Grubość otrzymywanych nanowarstw waha się od ~20 do ~140 nm. Synteza polega na dodawaniu amoniakalnego roztworu azotanu srebra do mieszaniny nanocząstek krzemionki i czynnika redukującego – glukozy. Glukoza zastępuje w tym przypadku formaldehyd tradycyjnie używany w metodzie Tollensa. Formaldehyd sprawia, że proces redukcji zachodzi bardzo szybko w wyniku czego uzyskuje się niejednorodne pokrycie powierzchni oraz obserwuje się znaczną agregację srebra w roztworze. Glukoza znacznie spowalnia proces redukcji i powoduje, że preferowane jest osadzanie się srebra na powierzchni krzemionki, jednak nadal obserwuje się agregację cząstek Ag w roztworze.

Nanowarstwy srebra mogą być tworzone w wyniku micelnarnego procesu warstwa-po-warstwie. W procesie tym wykorzystuje się adsorpcję na nanocząstkach wywołaną oddziaływaniami elektrostatycznymi i hydrofilowo-hydrofobowymi [53]. Schematyczny przebieg procesu pokazano na Rysunku 10. W procesie tym polielektrolity i nanocząstki określonego materiału nanowarstwy (np. Ag), otrzymywane są w procesie odwróconych miceli. Dalej są stopniowo adsorbowane na powierzchni nanocząstek krzemionki w wyniku oddziaływań elektrostatycznych i hydrofilowo-hydrofobowych. W przypadku nanocząstek krzemionki, jako elektrolitu można użyć poli(chlorowodoru alliloaminy) (PAH).

Cząstki krzemionki pokryte PAH były rozpraszane w zawiesinie utworzonej przez micelarne nanocząstki Ag w hydrofobowym rozpuszczalniku, w tym przypadku w izooktanie. Jako surfaktanta użyto anionowego związku AOT (1,4-bis(2-etyloheksoksy)-1,4-dioksobutano-2-sulfonian sodu). W wyniku oddziaływań hydrofilowo-hydrofobowych (PAH i AOT) micelarne nanocząstki Ag były adsorbowane na powierzchni nanocząstek krzemionki pokrytych PAH. Następnie, w celu przeprowadzenia powtórnej adsorpcji PAH, nanocząstki krzemionki z przyłączonymi do powierzchni micelnarnymi nanocząstkami Ag były dyspergowane w wodnym roztworze PAH. W dalszym etapie następowała adsorpcja PAH na powierzchni zdyspergowanych nanocząstek. Proces ten może być powtarzany wielokrotnie w celu osiągnięcia odpowiedniej grubości powłoki. Ponadto możliwe jest otrzymywanie powłok wieloskładnikowych. Ostatnim etapem syntezy jest wygrzewanie tak otrzymanych cząstek w celu usunięcia związków organicznych i spiekania nanocząstek, by ostatecznie uzyskać nanostrukturę typu *core-shell*.



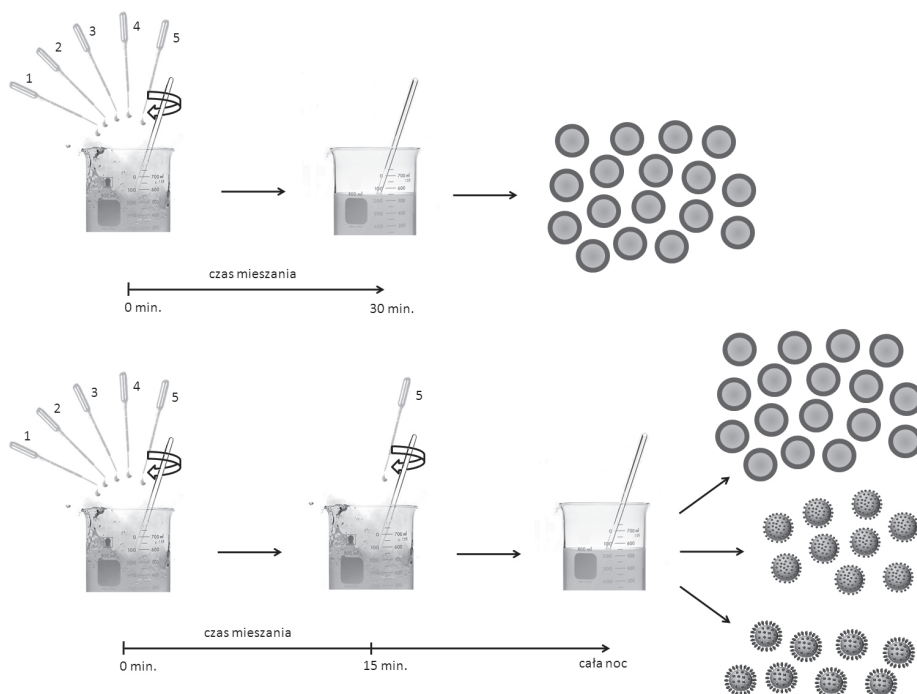
Rysunek 10. Otrzymywanie nanostruktur krzemionkowo-metalicznych w wyniku osadzania micelarnych nanocząstek Ag na cząstkach krzemionkowych [53]

Figure 10. Formation of silica-metal nanostructures as a result of deposition of micellar Ag nanoparticles on silica particles [53]

Nanostruktury SiO_2 -Ag mogą być również otrzymywane poprzez redukcję soli srebra (np. AgNO_3) na nanocząstkach krzemionkowych rozproszonych w etanolu przy użyciu butyloaminy w podwyższonej temperaturze (50°C) [54]. Butyloamina jest bardzo słabym reduktorem dzięki czemu do minimum ograniczone jest tworzenie agregatów Ag w roztworze.

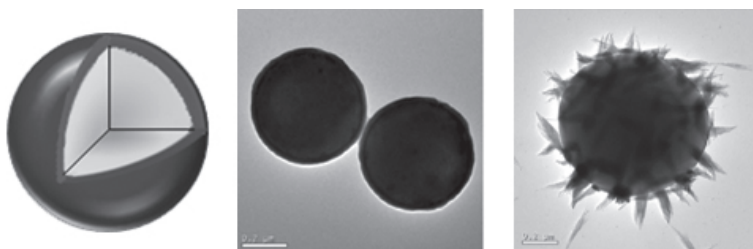
Flores i in. [55, 56] przedstawili metodę otrzymywania nanopowłok srebra bez użycia substancji wiążących lub modyfikujących powierzchnię krzemionkową. Metoda ta jest oparta na metodzie Stöbera otrzymywania nanocząstek krzemionkowych (patrz część I). Modyfikacja polega na dodaniu do reagentów używanych w metodzie Stöbera (TEOS, NH_3 , etanol, woda) koloidalnych cząstek srebra rozproszonych w metoksyetanolu stabilizowanych PVP i cytrynianem trisodu (Rys. 11). Tak więc w jednym etapie otrzymuje się nanocząstki krzemionki i jednocześnie pokrywa się je warstwą srebra. Poprzez zmianę warunków reakcji możliwe jest otrzymywanie powłok srebra o różnej morfologii (Rys. 12). Ciągłe nanowarstwy otrzymywane były poprzez dodanie wszystkich składników 1–5 (górna część Rys. 11), mieszanie ich w temperaturze pokojowej w ciągu 30 min. i przechowywanie tak otrzymanych nanocząstek. Kolczastą morfologię nanostruktury otrzymano poprzez dodanie wszystkich składników 1–5 (dolna część Rys. 11), mieszanie ich w tempe-

raturze pokojowej w ciągu 15 min., dodanie dużej ilości nanocząstek srebra i kontynuowanie mieszania przez całą noc.



Rysunek 11. Pokrywanie krzemionki nanocząstkami srebra przy użyciu następujących reagentów: (1) TEOS, (2) etanol, (3) amoniak, (4) woda, i (5) nanocząstki Ag [55, 56]

Figure 11. Coating of silica by Ag nanoparticles by using the following reagents: (1) TEOS, (2) ethanol, (3) ammonia, (4) water, and (5) Ag nanoparticles [55, 56]



Rysunek 12. Różne morfologie otrzymywanych nanostruktur SiO₂-Ag (modelowa i rzeczywiste) [55]

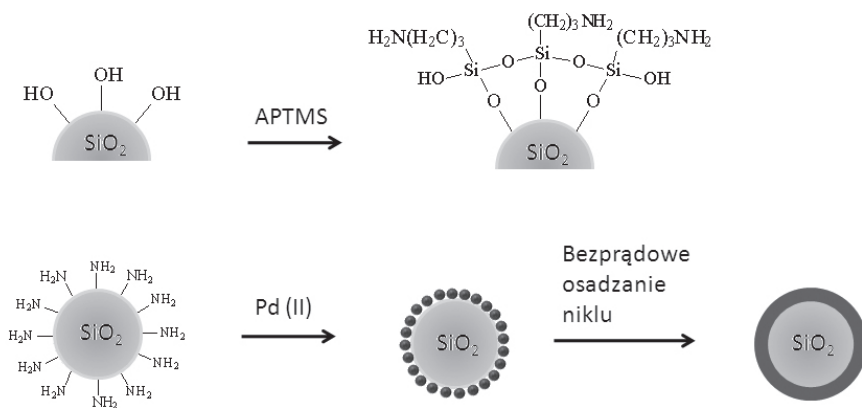
Figure 12. Different morphologies of as-prepared SiO₂-Ag nanostructures (model and real structures) [55]

Ling i in. [60] opisali otrzymywanie nanopowłok srebra metodą bezprądowego platerowania przy użyciu roztworu CuSO₄. Wstępna obróbka nanocząstek krzemionkowych roztworem CuSO₄ pozwoliła na zmniejszenie nanocząstek srebra i gęstsze

ich upakowanie na powierzchni SiO_2 w porównaniu z doświadczeniami, w których nie używano roztworu CuSO_4 . Wraz ze wzrostem stężenia CuSO_4 nanocząstki srebra tworzyły bardziej zwarte warstwy. Sole srebra w tych eksperymentach redukowane były za pomocą HCHO , EDTA-2Na i NH_3aq jako czynnika kompleksującego. Proces bezprądowego platerowania prowadzony był w roztworze wodnym w obecności ultradźwięków, które zapobiegały agregacji cząstek krzemionki.

Jak pisano wcześniej tworzenie nanopowłok srebra na powierzchni nanocząstek krzemionki wymaga zazwyczaj dość złożonych procedur. Według Zhanga i in. [57] niemodyfikowana krzemionka może być także pokrywana warstwą srebra poprzez zwykłą redukcję jonów srebra w rozcieńczonym roztworze etanolu za pomocą dużej ilości formaldehydu. W metodzie tej obserwuje się również agregację koloidalnego srebra. Może być ono oddzielone od nanostruktur w procesie odwirowania.

Złoto i srebro, jak już wspomniano na początku tego rozdziału, są obecnie najczęściej używanymi metalami do wytwarzania struktur typu *core-shell*. Jednak potencjalne możliwości zastosowań nanostruktur zachęcają do badań właściwości innych metali stosowanych w nanostrukturach typu *core-shell*. Poniżej zostaną zaprezentowane metody otrzymywania nanopowłok niklu, miedzi, platyny i palladu.



Rysunek 13. Schemat otrzymywania nanostruktur SiO_2 -Ni w wyniku bezprądowego platerowania [64]

Figure 13. Schematic illustration of a formation of SiO_2 -Ni nanostructures by using electroless plating [64]

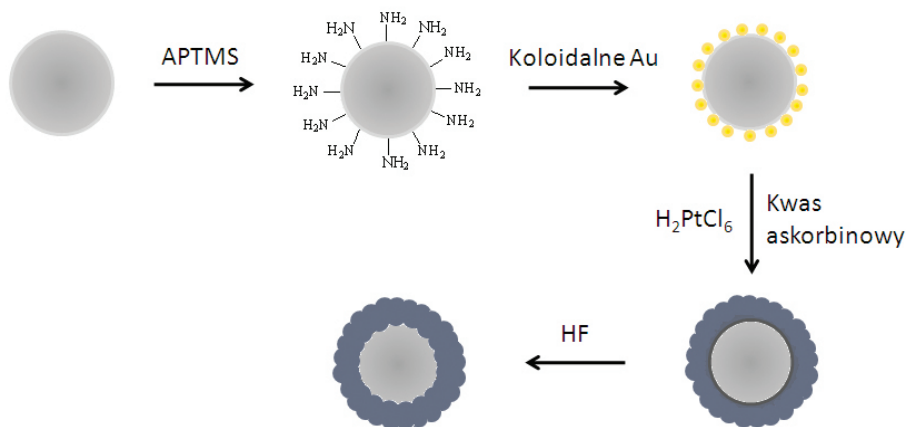
Nanostruktury SiO_2 -Ni otrzymano metodą bezprądowego platerowania nanocząstek krzemionkowych z przyłączonymi grupami aminowymi (Rys. 13) [64]. W metodzie tej na nanocząstkach krzemionki modyfikowanych za pomocą APTMS są chemisorbowane jony palladu, a następnie tak otrzymane kompozyty traktuje się roztworem zawierającym $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, NH_4Cl i $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ przy pH równym 8,25. W wyniku procesu bezprądowego platerowania otrzymuje się gładką powłokę Ni. W metodzie tej ważną rolę odgrywa zarówno modyfikacja SiO_2 za pomocą APTMS, jak i obecność Pd na powierzchni nanocząstek krzemionki. Bezprądowe platerowanie niklem nie zachodzi dla nanocząstek SiO_2 pokrytych palla-

dem, ale bez uprzedniej modyfikacji za pomocą APTMS oraz dla nanocząstek SiO_2 modyfikowanych za pomocą APTMS, ale nie pokrytych Pd.

Nanostruktury SiO_2 -Cu otrzymano poprzez pokrywanie powierzchni SiO_2 nanokrystaliczną miedzią w procesie utleniania–redukcji [65]. Grubość warstwy miedzi kontrolowano poprzez zmianę wielkości użytych nanocząstek SiO_2 . W metodzie tej sole miedzi (np. CuSO_4) redukowane są bezpośrednio na nanocząstkach krzemionki za pomocą Fe jako reduktora.

Wytwarzanie nanostruktur SiO_2 -Pd opisali między innymi Lu i in. [66] oraz Kim i in. [67, 68]. Metoda zaproponowana przez Lu i in. pozwala również na otrzymywanie nanostruktur SiO_2 -Pt. W metodzie tej pierwszy etap polega na standardowej syntezie krzemionki modyfikowanej za pomocą APTMS oraz na nanoszeniu na nią koloidalnego złota (Rys. 14) [66]. W ten sposób otrzymane nanocząstki traktuje się roztworem kwasu askorbinowego i H_2PtCl_6 w celu otrzymania nanostruktur SiO_2 -Pt, choć w tym przypadku należałoby te struktury opisywać raczej jako SiO_2 -Au/Pt. Nanostruktury SiO_2 -Au/Pd wytwarzane są w identyczny sposób przy czym źródłem palladu jest roztwór H_2PdCl_4 ($\text{PdCl}_2 + \text{HCl} + \text{H}_2\text{O}$).

Kim i in. [67, 68] otrzymali nanostruktury SiO_2 -Au/Pd taką samą metodą jak Lu i in. [66]. Należy wspomnieć, że Kim i in. [68] badali również wpływ zawartości Au w nanowarstwie Pd na widmo rezonansu plazmonowego. W związku z tym otrzymali nanopowłoki w postaci stopu złota i palladu o różnej procentowej zawartości tych metali.



Rysunek 14. Schemat otrzymywania nanostruktur SiO_2 -Au/Pt [66]

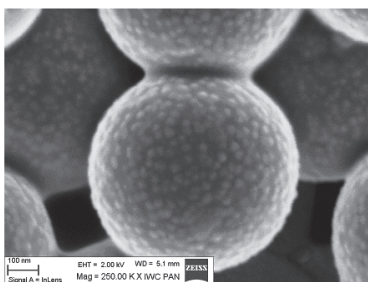
Figure 14. Schematic illustration of a preparation of SiO_2 -Au/Pt nanostructures [66]

Podsumowując ten fragment przeglądu literaturowego należy stwierdzić, że badania związane z wytwarzaniem nanopowłok metali na powierzchni nanocząstek krzemionkowych cieszą się bardzo dużym zainteresowaniem badaczy.

2. CHARAKTERYZACJA NANOSTRUKTUR KRZEMIONKOWO-METALICZNYCH

Nanostruktury krzemionkowo-metaliczne są projektowane i wytwarzane w celu uzyskania odpowiednich ich właściwości pod kątem potencjalnych zastosowań. Możliwości analizy tych właściwości w znacznym stopniu wpływają na wybór metod charakteryzacji nanostruktur. Teoretycznie do badań użyta może być praktycznie każda z wielu powszechnie stosowanych technik spektroskopowych i mikroskopowych, a dodatkowo uwzględnione mogą być na przykład metody termogravimetryczne lub fotoakustyczne. W praktyce wybór metod charakteryzacji nanostruktur, jest związany z tym jakie parametry nanostruktur są kontrolowane z myślą o określonej aplikacji. Poniżej krótko opisano najczęściej stosowane techniki badawcze.

Jedną z ważniejszych metod badania nanostruktur typu *core-shell* jest skaningowa mikroskopia elektronowa (ang. *Scanning Electron Microscopy*, SEM). Technika ta polega na „bombardowaniu” próbki wiązką elektronów w wyniku tego oddziaływania następuje między innymi odbicie elektronów oraz emisja niskoenergetycznych elektronów wtórnych. Wyemitowane lub odbite elektrony są rejestrowane za pomocą odpowiednich detektorów, a wytworzony w ten sposób sygnał przetwarzany na obraz powierzchni próbki. Na podstawie otrzymanego obrazu możliwe jest określenie wymiarów (średnica, rozrzut wymiarów) oraz morfologii wytwarzanych nanocząstek. Badania te można przeprowadzić zarówno na dielektrycznym rdzeniu – SiO_2 , jak i na wytworzonych nanostrukturach krzemionkowo-metalicznych. Przykładowe zdjęcie otrzymane za pomocą techniki skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) dla nanostruktury krzemionkowo-złotej pokazane jest na Rysunku 15.

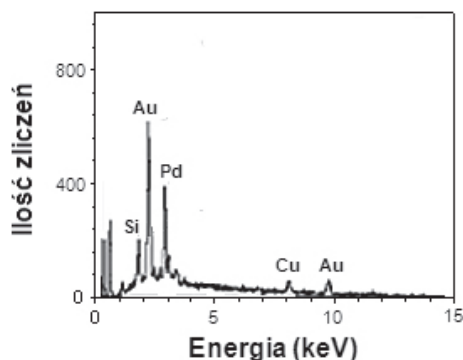


Rysunek 15. Zdjęcie SEM nanostruktury typu *core-shell*, w której na rdzeń SiO_2 naniesiono koloidalne złoto [69]

Figure 15. SEM image of a core-shell nanostructure, in which colloidal gold was deposited on the siliceous core [69]

Mikroskopy SEM mogą być dodatkowo wyposażone w detektory pozwalające na pomiar natężenia promieniowania rentgenowskiego będącego jednym z produktów oddziaływania elektronów z próbką. Detektory te pozwalają na charakterystykę

nanostruktur przy użyciu różnych metod spektroskopowych takich jak: spektroskopia długości fal (ang. *Wavelength Dispersion Spectroscopy*, WDS) lub energii (ang. *Energy Dispersion Spectroscopy*, EDS zwana także ang. *Energy Dispersive X-ray Analysis*, EDX) wzbudzanego promieniowania. W wyniku detekcji promieniowania przy użyciu tych wyżej wspomnianych metod otrzymuje się widmo promieniowania rentgenowskiego, które pozwala między innymi, na uzyskanie informacji dotyczącej procentowego składu pierwiastkowego nanopowłoki. Informacja ta jest szczególnie ważna przy otrzymywaniu nanostruktur z dwu- lub wieloskładnikowymi otoczkami. Przykładowe widmo EDX nanostruktur typu *core-shell* z dwuskładnikową nanopowłoką pokazane jest na Rysunku 16 [68].



Rysunek 16. Widmo EDX nanostruktury krzemionkowej z otoczką z mieszaniny złota i palladu (Pd:Au = 50:50) [68]

Figure 16. EDX spectrum of a siliceous core with mixed nanoshell composed of gold and palladium (Pd:Au = 50:50) [68]

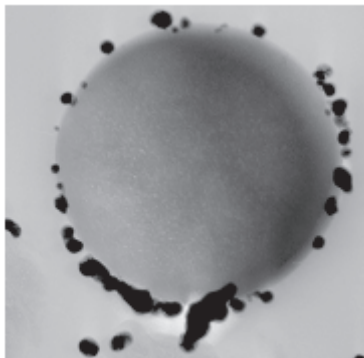
Dodatkowo w Tabeli 2 zamieszczono wyniki analizy EDX uzyskane przez Kim i in. [68]. Pokazują one, że za pomocą metody EDX można określić skład pierwiastkowy otoczki z bardzo dużą dokładnością [68].

Tabela 2. Skład atomowy nanowarstwy otrzymany za pomocą analizy metodą EDX [68]

Table 2. Atomic composition of nanoshell obtained by EDX elemental analysis [68]

Udział atomowy (%)	
Pd	Au
98 ± 1	2 ± 1
79 ± 3	21 ± 3
64 ± 4	36 ± 4
54 ± 4	46 ± 4
46 ± 3	54 ± 3
28 ± 4	72 ± 4
0	99 ± 1

Transmisyjna mikroskopia elektronowa (ang. *Transmission Electron Microscopy*, TEM) jest kolejną metodą stosowaną do charakteryzacji nanocząstek. W metodzie tej obraz próbki wytwarzany jest przez elektrony przechodzące przez próbkę, które są rejestrowane za pomocą detektora. Metoda ta służy do uzyskiwania identycznych charakterystyk jak w przypadku SEM, czyli wymiarów oraz morfologii nanocząstek. TEM pozwala na uzyskanie zdjęć o dużej rozdzielczości dzięki czemu możliwa jest dokładna analiza powierzchni nanocząstek. Przykładowe zdjęcie TEM nanostruktury SiO_2 -Au pokazane jest na Rysunku 17 [69].



Rysunek 17. Zdjęcie TEM nanocząstki krzemionkowej nieregularnie pokrytej nanocząstkami złota [69]
Figure 17. TEM image of a silica particle with irregular coating of gold nanoparticles [69]

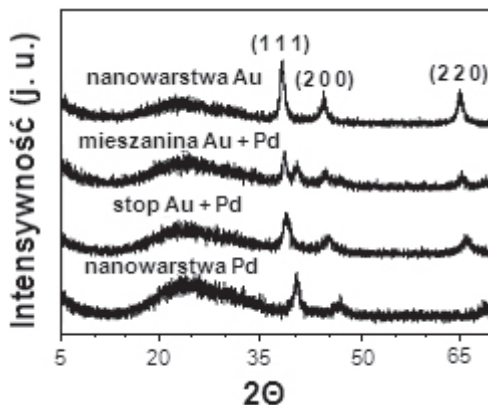
Rzadziej stosowanymi pomiarami są pomiary dynamicznego rozpraszania cząstek (ang. *Dynamic Light Scattering*, DLS) służące do mierzenia średnich hydrodynamicznych średnic otrzymanywanych nanocząstek [45]. Metoda ta polega na oświetlaniu monochromatyczną wiązką światła (np. lasera) roztworu zawierającego sferyczne cząstki poruszające się ruchami Browna. Gdy wiązka światła oddziałuje z poruszającymi się cząstkami ulega ona efektowi Dopplera, który powoduje zmianę długości padającej fali. Zmiana ta jest zależna od wielkości cząstki. Poprzez pomiar współczynnika dyfuzji i wykorzystanie funkcji autokorelacyjnej możliwe jest obliczenie rozrzutu wielkości kulistych cząstek i określenie ich ruchu w ośrodku.

Alternatywą dla TEM, SEM oraz DLS jako metod charakteryzacji nanocząstek, może być wykorzystanie metody badania zmętnienia zaproponowanej przez Khlebtsova i in. [70] Metoda ta według autorów pozwala na wyznaczenie wymiarów nanocząstek, ich stężenia oraz współczynnika załamania światła przy użyciu jakiegokolwiek komercyjnie dostępnego spektrofotometru.

Metoda proszkowej dyfraktometrii rentgenowskiej (ang. *Powder X-ray Diffraction*, PXRD) stosowana jest w przypadku wytwarzania powłok wieloskładnikowych w celu potwierdzenia występowania poszczególnych składników nanopowłoki, analizy właściwości strukturalnych i składowych wytworzonej nanowarstwy. Metoda ta polega na rejestracji obrazów dyfrakcyjnych promieni rentgenowskich próbek

polikrystalicznych (proszków). Przykładowe widma XRD czystych nanowarstw złota i palladu, ich mieszaniny oraz stopu przedstawione są na Rysunku 18 [68]. W przypadku nanocząstek krzemionkowych zastosowanie znalazła również małokątowa dyfraktometria rentgenowska (SAXS), która pozwala na określenie ich struktury i jednorodności [71].

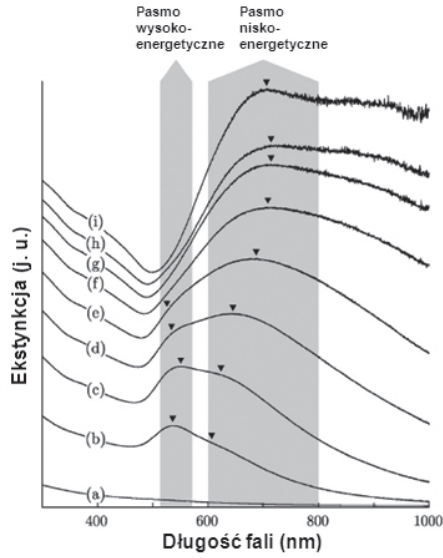
Struktura nanocząstek krzemionkowych, a dokładniej stopień modyfikacji ich powierzchni, może być również badany za pomocą magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) [72].



Rysunek 18. Widmo XRD nanopowłok z czystego złota, mieszaniny nanocząstek czystego złota i z czystego palladu w stosunku 1:1, nanocząstek ze stopu złota i palladu (1:1) oraz nanopowłok z czystego palladu [68]

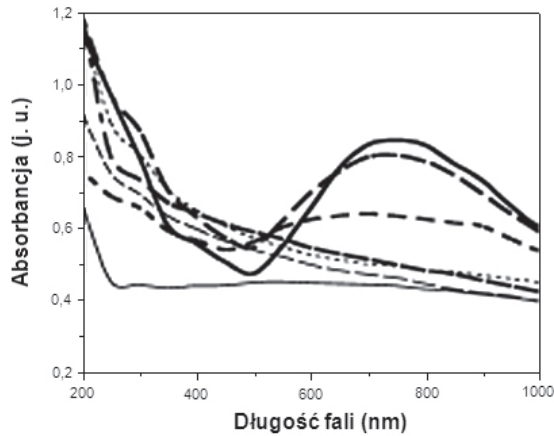
Figure 18. XRD patterns of nanoshells consisting of pure gold, 1:1 gold-palladium mixture, 1:1 gold-palladium alloy, and pure palladium [68]

Zastosowania nanopowłok w plazmonice są ściśle powiązane z ich właściwościami optycznymi, między innymi z absorpcją promieniowania elektromagnetycznego i określaniem plazmonowego rezonansu powierzchniowego (ang. *Surface Plasmon Resonance*, SPR). Jak pokazano na Rysunkach 19 i 20 właściwości optyczne są silnie uzależnione między innymi od ilości (grubość powłoki – Rys. 19, zmiana składu – Rys. 20) i rodzaju metalu stanowiącego otoczkę metaliczną [21,68]. Badania właściwości optycznych nanocząstek krzemionkowo-metalicznych wykonuje się zazwyczaj w przedziale od 200 do 1000 nm na nanocząstkach zdyspergowanych w wodzie i umieszczonych w kwarcowych komórkach pomiarowych [21, 68]. Spektroskopową metodą, która również pozwala na pomiar plazmonowego rezonansu powierzchniowego jest spektroskopia fotoakustyczna (ang. *PhotoAcoustic Spectroscopy*, PAS). Metoda ta jest mniej rozpowszechniona niż spektroskopia absorpcyjna, a jej użycie do pomiaru plazmonowego rezonansu powierzchniowego małych nanocząstek ograniczone jest do pojedynczych pików [47] (Rys. 21).



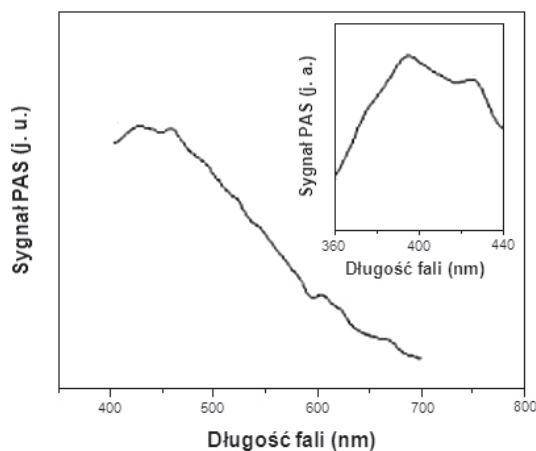
Rysunek 19. Widma ekstynkcji UV-Vis-NIR wodnych roztworów nanostruktur SiO_2 -Au o różnej grubości warstwy; (a) nanocząstki SiO_2 z grupami aminowymi bez warstwy Au, (b)–(i) nanostruktury SiO_2 -Au od najcięższej do najgrubszej warstwy złota [21]

Figure 19. UV-Vis-NIR spectra of aqueous solutions of SiO_2 -Au nanostructures having different shell thickness; (a) SiO_2 particles with amine groups and without Au layer, (b)–(i) SiO_2 -Au nanostructures from thinnest to thickest gold shell [21]



Rysunek 20. Widma UV-Vis nanowarstw złota, palladu oraz stopu złota i palladu dla wzrastających ilości palladu [68]

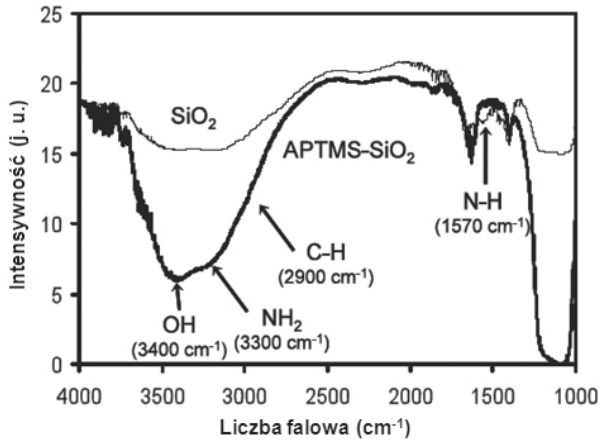
Figure 20. UV-Vis spectra of gold, palladium and gold-palladium alloy nanoshells with increasing palladium amount [68]



Rysunek 21. Fotoakustyczne widmo krystalicznych nanocząstek srebra osadzonych na nanocząstkach krzemionkowych [47]

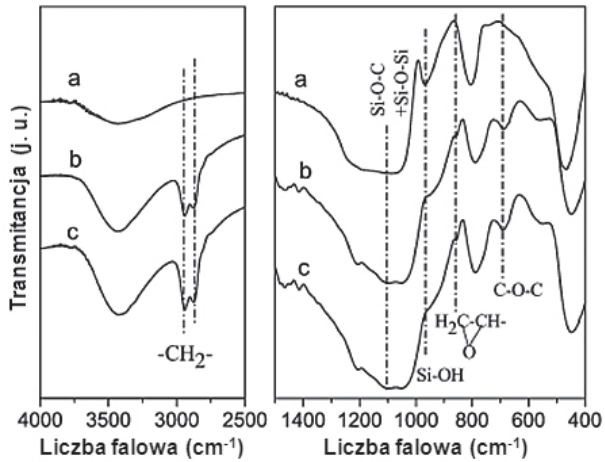
Figure 21. Photoacoustic spectrum of silver crystalline nanoparticles deposited on silica particles [47]

Metody spektroskopowe stosowane do charakteryzacji nanocząstek krzemionkowo-metalicznych obejmują również spektroskopię w podczerwieni (Rys. 22 i 23) i spektroskopię ramanowską (Rys. 24). Najczęściej jednak do charakteryzacji nanocząstek modyfikowanych powierzchniowo organosilanami wykorzystywana jest spektroskopia w podczerwieni (FT-IR) [45,73]. Wówczas metodę FT-IR stosuje się do kontroli procesu modyfikacji nanocząstek krzemionkowych [45, 73]. Spektroskopię ramanowską stosuje się w przypadku bardziej złożonych układów. W celu wzmocnienia sygnału ramanowskiego realizowany jest proces przyłączania nanocząstek SiO_2 -metal do określonych związków (ang. *Surface Enhanced Raman Scattering*, SERS). Podobne rozwiązanie może być stosowane w spektroskopii IR (ang. *Surface Enhanced IR Absorption*, SEIRA). Warto podkreślić, że nanostruktury SiO_2 -metal znacznie wzmacniają sygnał w SERS, podczas gdy same dają sygnał raczej o niskiej intensywności (Rys. 24) [74].



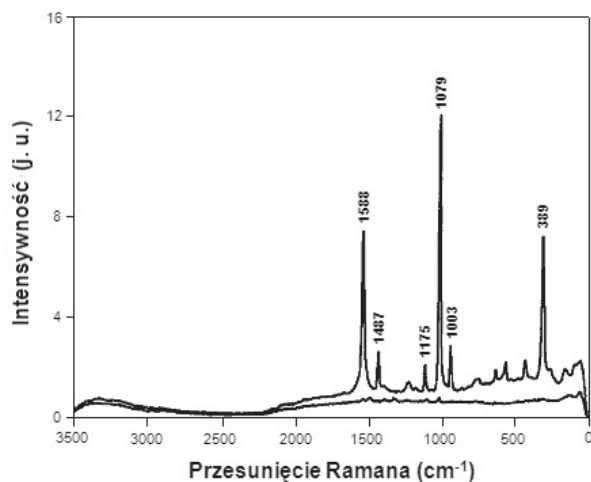
Rysunek 22. Widma FT-IR dla niemodyfikowanych i modyfikowanych (za pomocą APTMS) cząstek krzemionki [45]

Figure 22. FT-IR spectra of unmodified and modified with APTMS silica particles [45]



Rysunek 23. Widmo FT-IR cząstek krzemionkowych niemodyfikowanych (a), modyfikowanych za pomocą 3-glycidoksypropylotrimetoksyilanu (GPTMS, $-\text{CHCH}_2\text{O}-\text{SiO}_2$) (b), modyfikowanych przy użyciu GPTMS i pokrytych Au ($\text{SiO}_2\text{-Au}$) [73]

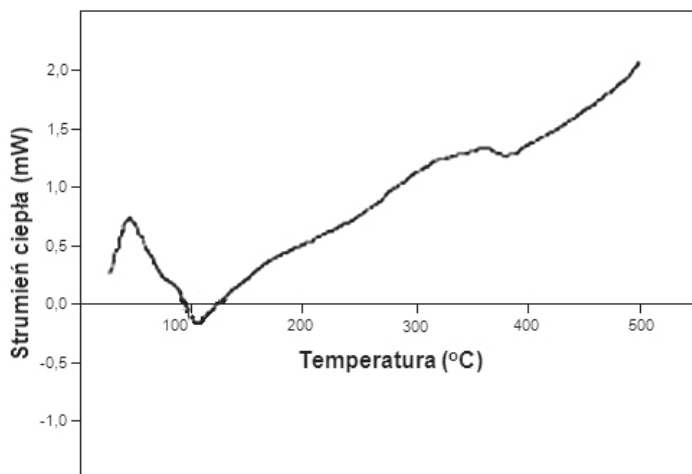
Figure 23. FT-IR spectra of silica particles: unmodified (a), modified with 3-glycidoxypropyltrimetoxysilane (GPTMS, $-\text{CHCH}_2\text{O}-\text{SiO}_2$) (b), modified with GPTMS and covered with Au ($\text{SiO}_2\text{-Au}$) [73]



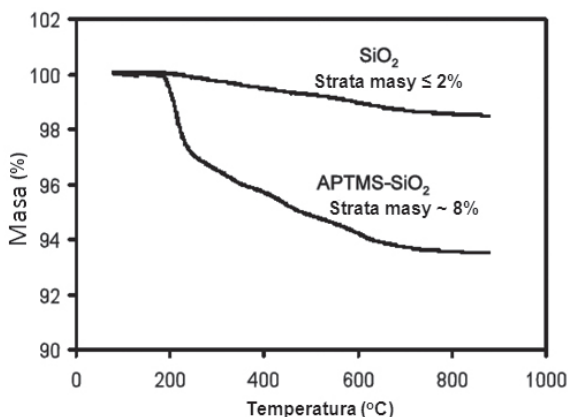
Rysunek 24. Widmo Ramana wodnego roztworu 10 mM *p*-merkaptoaniliny w obecności nanostruktur krzemionka-złoto o stężeniu $5 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ (górne widmo). Widmo ramanowskie z transformacją Fouriera zawiesiny nanostruktur krzemionka-złoto (dolne widmo) [74]

Figure 24. Raman spectrum of aqueous solution of 10 mM *p*-mercaptoaniline in the presence of silica-gold nanostructures having concentration of $5 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ (top spectrum). Raman spectrum with Fourier transform of silica-gold nanostructures in aqueous phase [74]

Wśród metod charakteryzacji nanocząstek krzemionkowo-metalicznych wymienianych w literaturze znajdują się również metody za pomocą, których bada się właściwości termofizyczne nanocząstek, jak skaningowa kalorymetria różnicowa (ang. *Differential Scanning Calrimetry*, DSC) (Rys. 25) i analiza termogravimetryczna (ang. *Thermogravimetric Analysis*, TGA) (Rys. 26) [45, 47]. Metody te pozwalają na pomiar zmian zachodzących w próbce pod wpływem dostarczanej energii cieplnej. DSC dostarcza między innymi informacji o ciepłe przemian fazowych, ciepłe właściwym substancji oraz pozwala na dokonanie analizy fazowej. TGA jest metodą pokrewną z DSC i dostarcza dodatkowych informacji na temat zmian masy danej substancji w zależności od zmian temperatury lub od czasu. Techniki te pozwalają na charakteryzację zarówno modyfikowanych nanocząstek krzemionkowych, jak i nanostruktur krzemionkowo-metalicznych.



Rysunek 25. Widmo DSC submikronowych cząstek krzemionkowych pokrytych nanocząstkami srebra [47]
 Figure 25. DSC spectrum of submicron silica particles covered with silver nanoparticles [47]



Rysunek 26. Analiza termogravimetryczna (TGA) niemodyfikowanych i modyfikowanych za pomocą APTMS nanocząstek krzemionki [45]
 Figure 26. Thermogravimetric analysis (TGA) of unmodified and modified with APTMS silica particles [45]

Podsumowując ten fragment przeglądu literaturowego należy podkreślić, że do charakteryzacji właściwości fizykochemicznych nanostruktur krzemionkowo-metalicznych wykorzystywane są różnorodne techniki badawcze, w tym: elektronowe, spektroskopowe, optyczne, adsorpcyjne, termogravimetryczne i inne. Każda nowa metoda badawcza może być z powodzeniem stosowana w celu analizy wymiaru nanocząstek rdzenia krzemionkowego, chemicznej budowy powierzchni tego rdzenia, grubości, składu fazowego i ilościowego nanowarstwy metalicznej pokrywającej ten rdzeń oraz łącznych właściwości nanostruktur krzemionkowo-metalicznych.

3. ZASTOSOWANIE NANOSTRUKTUR KRZEMIONKOWO-METALICZNYCH

Nanostruktury typu *core-shell*, jak już wspomniano, są wysoce funkcjonalnymi materiałami o właściwościach istotnie różniących się od właściwości tworzących je składników. Właściwości tych nanostruktur mogą być modyfikowane pod kątem konkretnych aplikacji poprzez odpowiedni dobór materiałów, z których się składają, a także poprzez zmianę stosunku średnicy rdzenia do grubości nanowarstwy. Modyfikacje mogą również polegać na wbudowywaniu w rdzeń lub w nanopowłokę różnego rodzaju związków lub struktur, a także na tworzeniu wielowarstwowych nanopowłok (nanomatryoszek) lub przyłączaniu do powłoki związków chemicznych o określonych właściwościach. Jeżeli pod uwagę zostaną wzięte wszystkie możliwe i znane kombinacje struktur typu *core-shell* to możliwości ich zastosowań, jak się wydaje, są ogromne. Pośród wielu aplikacji wyróżnić można: wykorzystanie nanostruktur typu *core-shell* jako znaczników w diagnostyce fluorescencyjnej [75], w katalizie [76], w celu ochrony przed fotodegradacją [77], wzmocnienia fotoluminescencji [78], w wytwarzaniu kryształów fotonicznych [79–81], w wytwarzaniu biopoleceń [82, 83], w celu zwiększenia trwałości chemicznej i koloidalnej [84, 85], w dozowaniu leków [86] i nanolaserach bazujących na spaserach [87] itp.

W prezentowanej pracy skoncentrowano się prawie wyłącznie na analizie otrzymywania i badania właściwości nanostruktur zbudowanych z nanocząstek krzemionkowych (jako rdzenia) oraz metalicznej nanopowłoki Au, Ag, Ni, Cu, Pd, Pt oraz ze stopów lub warstw bimetalicznych Au-Ag, Au-Pd i Au-Pt. W związku z tym, poniżej zostaną zaprezentowane najważniejsze obecne i potencjalne zastosowania niektórych z wymienionych nanostruktur. Opis aplikacji powiązано z krótkim opisem właściwości, które sprawiają, że dane struktury mogą być wykorzystane w określonej dziedzinie.

Chyba najważniejszą właściwością nanostruktur jest zdolność absorbowania lub rozpraszania promieniowania elektromagnetycznego w zakresie widzialnym i podczerwieni, teoretycznie o dowolnej długości fali, nie absorbowanych przez naturalnie występujące materiały. Zakres długości fal może być modyfikowany pod kątem określonej aplikacji poprzez odpowiedni dobór materiałów oraz wytwarzanie struktur o określonych wymiarach i proporcjach średnicy rdzenia do grubości nanowarstwy. W przypadku zastosowań nanostruktur w żywych organizmach najodpowiedniejszym zakresem promieniowania jest bliska podczerwień w przedziale długości fali 800–1200 nm. Możliwe jest również wytworzenie nanostruktur absorbujących promieniowanie elektromagnetyczne w wąskim wycinku tego pasma na przykład od 700 do 900 nm. W tym przedziale promieniowanie nie jest absorbowane ani przez wodę znajdującą się w tkankach, ani przez hemoglobinę krwi ani przez melaninę w skórze, dzięki czemu unika się uszkodzania tkanek otaczających komórki ze zgromadzonymi w niej nanostrukturami. Absorbowanie lub rozpraszanie światła przez nanostruktury znalazło zastosowanie głównie w biologii i medycynie, do wizualnej detekcji oraz leczenia różnych chorób np. raka. W zależności od

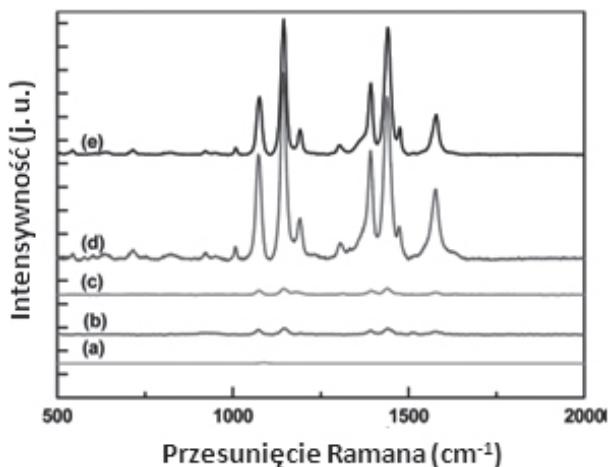
rodzaju użytej nanostruktury i jej właściwości absorbowania-rozpraszania promieniowania możliwe jest lokalne ogrzewanie tkanek rakowych w celu ich zniszczenia, odbijanie światła w celu poprawy ich zobrazowania lub realizacja obu tych procesów równocześnie w dość szerokim zakresie długości fal. W tym miejscu należy wspomnieć o zjawisku powierzchniowego rezonansu plazmonowego (ang. *Surface Plasmon Resonance*, SPR), które sprawia, że nanostruktury metali takich jak złoto czy srebro posiadające takie właściwości można różnie wykorzystywać. Należy jednak podkreślić, że zjawisko powierzchniowego rezonansu plazmonowego w zakresie widzialnym, wśród metali obserwowane jest tylko dla złota, srebra i miedzi [88]. Jedynie te metale mogą więc znaleźć zastosowanie w aplikacjach optycznych.

Absorbowanie-rozpraszanie światła wykorzystywane jest w wizualnej detekcji połączonej z terapią fototermiczną, czyli niszczeniem komórek chorych lub rakowych za pomocą energii cieplnej. Metoda ta wymaga przyłączenia do powierzchni struktur typu *core-shell* przeciwciał specyficznych dla danych chorób. Powoduje to, że funkcjonalne nanostruktury wprowadzone do organizmu, mogą zlokalizować i przyłączyć się do chorych komórek. Dzięki temu można zobrazować miejsca zmienione chorobowo. Chore komórki są następnie niszczone energią cieplną pochodzącą z naświetlania nanocząstek promieniowaniem o odpowiedniej długości fali. Zaletą tej metody jest ograniczone niszczenie zdrowych komórek w przeciwieństwie do chemioterapii czy radioterapii. Wynika to z selektywnej absorpcji promieniowania przez nanostruktury metaliczno-krzemionkowe oraz mniejszej mocy wymaganej do zniszczenia komórek chorych niż zdrowych.

Ważną biomedyczną aplikacją nanostruktur jest wykorzystywanie ich w procesie dozowania leków. Nanostruktury z enzymami i przeciwciałami przyłączonymi do powierzchni nanowarstwy lub zatopionymi w rdzeniu umieszczane są w niskotopliwej matrycy polimerowej (np. *N*-izopropylodakryloamidzie (NIPAAm) lub akryloamidzie (AAm)). Temperatura topnienia stosowanych polimerów jest nieznacznie większa od temperatury ciała ludzkiego. Naświetlanie takich struktur promieniowaniem o długościach rezonansowych nanostruktur, powoduje degradację matrycy polimerowej i uwolnienie leku w pożądanym miejscu.

Zarówno w wizualnej detekcji, fototerapii jak i aplikowaniu leków, niezbędna jest modyfikacja powierzchni nanocząstek typu *core-shell* w celu uzyskania pożądanego efektu. Przyłączanie odpowiednich biomolekuł, zazwyczaj przeciwciał, pozwala między innymi na wykonanie testów immunologicznych ułatwiających wykrycie różnych analitów [89], komórek rakowych [90, 91], antyciał [82] i mikroorganizmów [83]. Detekcja biomolekuł, która jest czuła, rzetelna i szybka, odbywa się poprzez monitorowanie zmian w widmach ekstynkcji w zakresie UV-Vis. Przykładem zastosowań nanostruktur w biodetekcji może być wykrywanie obecności bakterii *E. Coli* w wodzie za pomocą nanocząstek SiO_2 -Ag z przyłączonymi przeciwciałami [83]. Niemodyfikowane nanocząstki SiO_2 -Ag mogą być natomiast użyte do detekcji jonów metali ciężkich, o toksycznych właściwościach, takich jak Cd, Hg lub Pb, w wodzie [92]. Te same nanostruktury krzemionkowo-srebrne mogą być

użyte do wzmocnienia sygnału w SERS, jak to pokazano na Rysunku 27 dla 4-aminobenzenotiolu (4-ABT) [93].



Rysunek 27. Widma Ramana 4-aminobenzenotiolu (4-ABT): (a) 5×10^{-3} mol/L, bez nanostruktur $\text{SiO}_2\text{-Ag}$; (b) 5×10^{-6} mol/L, z nanostrukturami $\text{SiO}_2\text{-Ag}$; (c) 5×10^{-5} mol/L, z nanostrukturami $\text{SiO}_2\text{-Ag}$; (d) 5×10^{-4} mol/L, z nanostrukturami $\text{SiO}_2\text{-Ag}$; (e) 5×10^{-3} mol/L, z nanostrukturami $\text{SiO}_2\text{-Ag}$ [93]

Figure 27. Raman spectra of 4-aminobenzene-1-thiol (4-ABT): (a) 5×10^{-3} mol/L, without $\text{SiO}_2\text{-Ag}$ nanostructures; (b) 5×10^{-6} mol/L with $\text{SiO}_2\text{-Ag}$ nanostructures; (c) 5×10^{-5} mol/L, with $\text{SiO}_2\text{-Ag}$ nanostructures; (d) 5×10^{-4} mol/L, with $\text{SiO}_2\text{-Ag}$ nanostructures; (e) 5×10^{-3} mol/L, with $\text{SiO}_2\text{-Ag}$ nanostructures [93]

Ważną właściwością srebra, a właściwie koloidalnego srebra jest wykazywanie silniejszego i ostrzejszego rezonansu w porównaniu ze złotem, który ponadto występuje przy krótszych długościach fal. Dzięki temu istnieje możliwość kontrolowanego sterowania rezonansem, poprzez zmianę geometrii nanowarstwy, w szerszym zakresie widmowym w porównaniu z nanokompozytami złota [94].

W zastosowaniach biomedycznych ważnym czynnikiem jest biokompatybilność [95]. Bardzo dobrą biokompatybilnością charakteryzują się Au, Pt i Pd, natomiast słabszą Ag. Biokompatybilność jest jednym z powodów, dla których najczęściej używanymi metalami do syntezy nanostruktur pod aplikacje biomedyczne obejmujące między innymi biodetekcję, terapię różnych chorób oraz dawkowanie leków są złoto i srebro [86, 87, 89, 90, 96–99]. O przykładach zastosowań nano cząstek srebra wspomniano powyżej, natomiast w dalszej części artykułu pokazane zostaną obecne i potencjalne aplikacje nanostruktur zbudowanych z innych metali.

Zredukowane złoto tworzące nanopowłokę charakteryzuje się odpornością na korozję i wysoką biokompatybilnością. Cechy te sprawiają, że złoto jest chyba najczęściej stosowanym i najważniejszym metalem z punktu widzenia aplikacji biomedycznych, ale nie tylko. Obecne i przyszłe zastosowania nanostruktur ze złota obejmują między innymi fototermiczną terapię raka i innych chorób [91, 100–106], wizualizację biologiczną (jak na przykład optyczna tomografia koherencyjna

[101,107–109]), kontrolowane uwalnianie leków [103, 110, 111], powierzchniowo wzmacnianą spektroskopię Ramana (SERS) i w podczerwieni [112–116], wygaszanie reakcji utleniania polimerów o układach sprzężonych [117], tworzenie nano-platform dozowania leków [118], wzmocnienie fluorescencji słabych emiterów cząsteczkowych [119] oraz wykorzystanie w materiałach z przerwą foniczną [9].

Większość wymienionych do tej pory aplikacji nanostruktur wiązała się z ich właściwościami optycznymi, zależnymi od materiałów, z których zostały zbudowane oraz ich wymiarami. Należy wspomnieć, że również właściwości magnetyczne, mechaniczne, termiczne, elektryczne, elektro-optyczne oraz katalityczne mogą być wykorzystywane w określonych aplikacjach w wyniku odpowiedniego doboru materiałów nanopowłoki i rdzenia oraz zmiany proporcji ich wymiarów [120–126]. Dobrym przykładem jest wykorzystywanie właściwości katalitycznych nanomateriałów. Praktycznie każdy metal, który był do tej pory wykorzystywany jako materiał powłoki w nanostrukturach typu core-shell posiada właściwości katalityczne [127, 128]. Ogromne znaczenie ma użycie Au, Ag, Ni, Cu, Pd, Pt, a zwłaszcza stopów tych metali takich jak Au-Pt, Au-Pd czy Cu-Pt, jako materiałów w nanostrukturach do otrzymywania fotoaktywowanych i fotowzmacnianych katalizatorów. Połączenie metalu o dobrych właściwościach optycznych oraz metalu o dobrych właściwościach katalitycznych, jak na przykład Au i Pd, sprawia, że energia nanostruktury pochodzi z absorbowanego światła. Ponadto powoduje również szybkie nagrzanie powierzchni nanostruktury. Ciepło to może być wykorzystane do zainicjowania lub wzmocnienia katalitycznej aktywności stopu. Przykładem stopu, który jest bardzo ciekawy pod kątem katalitycznych zastosowań jest stop Au-Pt. Stop ten, w postaci stabilizowanego polimerem bimetalicznego koloidalnego zolu Au-Pt, jest bardziej wydajnym katalizatorem w reakcji uwodorniania olefin i indukowanego światłem widzialnym otrzymywania wodoru z wody niż monometaliczny zol Pt [129, 130]. Innym przykładem katalitycznej aktywności stopów metali są nanocząstki Au-Pd, które są bardziej aktywne w katalizowanym uwodornieniu 1,3-cyklooktadienu niż nanocząstki czystego złota czy czystego palladu [131, 132]. Wytworzenie struktur typu core-shell ze stopów Au-Pt i Au-Pd powoduje, że właściwości katalityczne tych materiałów są jeszcze lepsze.

PODSUMOWANIE

Nanostruktury krzemionkowo-metaliczne składające się z krzemionkowego rdzenia i metalicznej nanowarstwy, otaczającej ten rdzeń, w ostatnich latach cieszą się ogromnym zainteresowaniem badaczy. Powodem tego zainteresowania są wyjątkowe właściwości tych nanomateriałów – głównie spektroskopowe i katalityczne. O tym zainteresowaniu świadczą liczne prace. Większość z nich omówiono w niniejszym przeglądzie. Szczególną uwagę zwrócono na nanostruktury zbudowane z krzemionkowego rdzenia oraz nanopowłoki (nanowarstwy) otaczającej ten rdzeń zbudowanej ze złota lub srebra.

Znanych jest wiele metod otrzymywania nanostruktur krzemionkowo-metalicznych. Najczęściej stosowaną techniką, która umożliwiła dobrą kontrolę zarówno grubości powłoki metalicznej, jak również właściwości powierzchniowych jest metoda narastania warstw. W metodzie tej na modyfikowane (najczęściej grupami aminowymi) nanocząstki krzemionkowe nanoszone są wcześniej przygotowane nanocząstki np. koloidalnego złota, które są osadzane na powierzchni krzemionkowej. Ostatnim etapem po osadzeniu cząstek złota na powierzchni krzemionki jest wytworzenie nanopowłoki złota. Proces wytwarzania powłoki Au polega na redukcji jonów złota AuCl_4^- na cząstkach złota, co prowadzi początkowo do wzrostu ich wymiarów a następnie do ich łączenia się na powierzchni nanocząstki krzemionkowej. Produktem końcowym redukcji jest powstająca ciągła, metaliczna warstwa na powierzchni dielektrycznego (krzemionkowego) rdzenia. Wytworzenie warstwy przebiega zazwyczaj w ciągu kilku sekund z wydajnością większą niż 95%. Przebieg procesu redukcji i jego końcowy efekt zależny jest od stopnia i jednorodności pokrycia cząstek krzemionki nanocząstkami złota, jak również od stężenia redukowanych związków złota, a także od rodzaju i stężenia czynnika redukującego. Odpowiednio gęste upakowanie nanocząstek złota na cząstkach SiO_2 pozwala uzyskać ciągłą i stosunkowo cienką warstwę. Stężenie redukowanych związków złota wpływa na grubość warstwy. Natomiast właściwie dobrany czynnik redukujący pozwala na otrzymanie powłoki odpowiedniej jakości przy różnej jej grubości.

Nanostruktury typu rdzeń-nanopowłoka mają przed sobą ogromne możliwości zastosowań w różnych dziedzinach techniki. Wystarczy wspomnieć tylko o omawianych materiałach typu SiO_2 -metal czy SiO_2 -stop metali, które już są stosowane albo badane z punktu widzenia zastosowań biomedycznych, wizualizacji czy katalizy. Praktycznie nieograniczona liczba modyfikacji tego typu struktur sprawia, że badania tych materiałów jeszcze w ciągu długiego okresu czasu będą przynosiły nowe interesujące rezultaty oraz poszerzały zakres ich potencjalnych zastosowań.

PODZIĘKOWANIE

Praca naukowa częściowo finansowana ze środków na naukę w latach 2009–2011 jako projekt rozwojowy Nr OR00 005408.

BJJ – Publikacja powstała częściowo przy wsparciu finansowym Fundacji na rzecz Nauki Polskiej

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] F. Caruso, M. Spasova, V. Salgueiriño-Maceira, L.M. Liz-Marzán, *Adv. Mater.*, 2001, **13**, 1090.
- [2] Y.T. Lim, O. Ok. Park, H.-T. Jung, *J. Colloid Interface Sci.*, 2003, **263**, 449.
- [3] L.M. Liz-Marzán, M. Giersig, P. Mulvaney, *Langmuir*, 1996, **12**, 4329.
- [4] S.J. Oldenburg, J.B. Jackson, S.L. Westcott, N.J. Halas, *Appl. Phys. Lett.*, 1999, **75**, 2897.

- [5] V.G. Pol, H. Grisar, A. Gedanken, *Langmuir*, 2005, **21**, 3635.
- [6] Z.M. Chen, T. Gang, X. Yan, X. Li, J.H. Zhang, Y.F. Wang, X. Chen, Z.Q. Sun, K. Zhang, B. Zhao, B. Yang, *Adv. Mater.*, 2006, **18**, 924.
- [7] Z.J. Jiang, C.Y. Liu, *J. Phys. Chem. B*, 2003, **107**, 12411.
- [8] W. Wang, S.A. Asher, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123**, 12528.
- [9] C. Graf, A. van Blaaderen, *Langmuir*, 2002, **18**, 524.
- [10] O. Siiman, A. Burshteyn, *J. Phys. Chem. B*, 2000, **104**, 9795.
- [11] L.R. Hirsch, J.B. Jackson, A. Lee, N.J. Halas, J.L. West, *Anal. Chem.*, 2003, **75**, 2377.
- [12] C.M. Aguirre, C.E. Moran, J.F. Young, N.J. Halas, *J. Phys. Chem. B*, 2004, **108**, 7040.
- [13] X. Xia, Y. Liu, V. Backman, G.A. Ameer, *Nanotechnology*, 2006, **17**, 5435.
- [14] A.W.H. Lin, N.A. Lewinski, M.-H. Lee, R.A. Drezek, *J. Nanopart. Res.*, 2006, **8**, 681.
- [15] M. Bikram, A.W. Gobin, R.E. Whitmire, J.L. West, *J. Control. Release*, 2007, **123**, 219.
- [16] Y. Wang, W. Qian, Y. Tan, S. Ding, H. Zhang, *Talanta*, 2007, **72**, 1134.
- [17] X. Ji, R. Shao, A.M. Elliott, R.J. Stafford, E. Esparza-Coss, J.A. Bankson, G. Liang, Z.-P. Luo, K. Park, J.T. Markert, C. Li, *J. Phys. Chem. C*, 2007, **111**, 6245.
- [18] B.N. Khlebtsov, V.A. Bogatyrev, L.A. Dykman, N. G. Khlebtsov, *Optics and Spectroscopy*, 2007, **102**, 233.
- [19] B.N. Khlebtsov, V.A. Khanadeyev, N.G. Khlebtsov, *Optics and Spectroscopy*, 2008, **104**, 282.
- [20] Y. Wang, W. Qian, Y. Tan, S. Ding, *Biosensors and Bioelectronics*, 2008, **23**, 1166.
- [21] T.C. Preston, R. Signorell, *ACS Nano*, 2009, **3**, 3696.
- [22] M.R. Rasch, K.V. Sokolov, B.A. Korgel, *Langmuir*, 2009, **25**, 11777.
- [23] Y.-L. Shi, T. Asefa, *Langmuir*, 2007, **23**, 9455.
- [24] N. Phonthammachai, J.C.Y. Kah, G. Jun, C.J.R. Sheppard, M.C. Olivo, S.G. Mhaisalkar, T.J. White, *Langmuir*, 2008, **24**, 5109.
- [25] H. Li, X. Ma, J. Dong, W. Qian, *Anal. Chem.*, 2009, **81**, 8916.
- [26] V.G. Pol, A. Gedanken, J. Calderon-Moreno, V. Palchik, M. A. Slifkin, A. M. Weiss, *Chem. Mater.*, 2003, **15**, 1111.
- [27] S.J. Oldenburg, R.D. Averitt, S.L. Westcott, N.J. Halas, *Chem. Phys. Lett.*, 1998, **288**, 243.
- [28] R. Ashayer, S.H. Mannan, S.S. ajjadi, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 2008, **329**, 134.
- [29] J. Xue, C. Wang, Z. Ma, *Mat. Chem. Phys.* 2007, **105**, 419.
- [30] S.L. Westcott, S.J. Oldenburg, T.R. Lee, N.J. Halas, *Langmuir* 1998, **14**, 5396.
- [31] S.L. Westcott, S.J. Oldenburg, T.R. Lee, N.J. Halas, *Chem. Phys. Letters*, 1999, **300**, 651.
- [32] S.-E. Park, M.-Y. Park, P.-K. Han, S.-W. Lee, *Korean J. Ind. Eng. Chem.*, 2007, **13**, 65.
- [33] T. Pham, J.B. Jackson, N.J. Halas, T.R. Lee, *Langmuir*, 2002, **18**, 4915.
- [34] D. Kandpal, S. Kalele, S.K. Kulkarni, *Pramana journal of physics*, 2007, **69**, 277.
- [35] B.E. Brinson, J.B. Lassiter, C.S. Levin, R. Bardhan, N. Mirin, N.J. Halas, *Langmuir*, 2008, **24**, 14166–14171.
- [36] C.J. Radloff, *Concentric nanoshells and plasmon hybridization*, Ph. D. Thesis, Rice University, Houston, TX, USA 2003.
- [37] S.-E. Park, M.-Y. Park, P.-K. Han, S.-W. Lee, *Bull. Korean Chem. Soc.* 2006, **27**, 1341.
- [38] J.C.Y. Kah, N. Phonthammachai, R.C.Y. Wan, J. Song, T. White, S. Mhaisalkar, I. Ahmad, C. Sheppard, M. Olivo, *Gold Bulletin*, 2008, **41**, 23.
- [39] V.G. Pol, A. Gedanken, J. Calderon-Moreno, V. Palchik, M.A. Slifkin, A.M. Weiss, *Chem. Mater.*, 2003, **15**, 1111.
- [40] B. Storti, F. Elisei, S. Abbruzzetti, C. Viappiani, L. Latterini, *J. Phys. Chem. C*, 2009, **113**, 7516.
- [41] J.B. Jackson, N.J. Halas, *J. Phys. Chem. B*, 2001, **105**, 2743.
- [42] Z. Jiang, C. Liu, *J. Phys. Chem. B*, 2003, **107**, 12411.

- [43] M. Chen, Y.N. Kim, H.M. Lee, C. Li, S.O. Cho, *J. Phys. Chem. C*, 2008, **112**, 8870.
- [44] J. Zhang, Y. Fu, J.R. Lakowicz, *J. Phys. Chem. C* 2009, **113**, 19404.
- [45] J.-H. Kim, W.W. Bryan, T.R. Lee, *Langmuir*, 2008, **24**, 11147.
- [46] L. Lu, H. Zhang, G. Sun, S. Xi, H. Wang, X. Li, X. Wang, B. Zhao, *Langmuir*, 2003, **19**, 9490.
- [47] V.G. Pol, D.N. Srivastava, O. Palchik, V. Palchik, M.A. Slifkin, A.M. Weiss, A. Gedanken, *Langmuir*, 2002, **18**, 3352.
- [48] X. Ye, Y. Zhou, J. Chen, Y. Sun, *Applied Surface Sci.*, 2007, **253**, 6264.
- [49] Z. Deng, M. Chen, L. Wu, *J. Phys. Chem. C*, 2007, **111**, 11692.
- [50] Y. Kobayashi, V. Salgueiriño-Maceira, L. M. Liz-Marzán, *Chem. Mater.*, 2001, **13**, 1630.
- [51] D. Chen, H.-Y. Liu, J.-S. Liu, X.-L. Ren, X.-W. Meng, W. Wu, F.-Q. Tang, *Thin Solid Films*, 2008, **516**, 6371.
- [52] M.S.M. Peterson, J. Bouwman, A. Chen, M. Deutsch, *J. Colloid Interface Sci.*, 2007, **306**, 41.
- [53] G.-C. Chen, C.-Y. Kuo, S.-Y. Lu, *J. Am. Ceram. Soc.*, 2005, **88**, 277.
- [54] K. Kim, H.S. Kim, H.K. Park, *Langmuir*, 2006, **22**, 8083.
- [55] J.C. Flores, V. Torres, M. Popa, D. Crespo, J.M. Calderón-Moreno, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 2008, **330**, 86.
- [56] J.C. Flores, V. Torres, M. Popa, D. Crespo, J.M. Calderón-Moreno, *J. Non-Crystalline Solids*, 2008, **354**, 5435.
- [57] Y. Zhang, M. Ma, N. Gu, L. Xu, K.J. Chen, *Chinese Chemical Letters*, 2004, **15**, 1005.
- [58] D. Chen, H.-Y. Liu, J.-S. Liu, X.-L. Ren, X.-W. Meng, W. Wu, F.-Q. Tang, *Thin Solid Films*, 2008, **516**, 6371.
- [59] J. Zhang, J. Liu, S. Wang, P. Zhan, Z. Wang, N. Ming, *Adv. Funct. Mater.*, 2004, **14**, 1089.
- [60] G. Ling, J. He, L. Huang, *J. Mat. Sci.*, 2004, **39**, 2955.
- [61] G. Danscher, *Histochem.*, 1981, **71**, 177.
- [62] R.W. Burry, D.D. Vandre, D.M. Hayes, *J. Histochem. Cytochem.*, 1992, **40**, 1849.
- [63] R. Zsigmondy, *Kolloidchemie I and II*, Spamer, Leipzig, 1927.
- [64] J. Gao, F. Tang, J. Ren, *Surface & Coatings Technology*, 2005, **200**, 2249.
- [65] Z. Nan, N. Liu, C. Wei, *Materials Science and Engineering C*, 2009, **29**, 1124.
- [66] L. Lu, G. Sun, S. Xi, H. Wang, H. Zhang, T. Wang, X. Zhou, *Langmuir* 2003, **19**, 3074.
- [67] J.-H. Kim, H.-W. Chung, T.R. Lee, *Chem. Mater.* 2006, **18**, 4115.
- [68] J.-H. Kim, W.W. Bryan, H.-W. Chung, C.Y. Park, A.J. Jacobson, T.R. Lee, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2009, **1**, 1063.
- [69] J. Choma, A. Dziura, D. Jamiola, P. Nyga, M. Jaroniec, *Colloids and Surfaces A*, doi: 10.1016/j.colsurfa.2010.10.046.
- [70] B.N. Khlebtsov, V.A. Khanadeev, N.G. Khlebtsov, *Langmuir*, 2008, **24**, 8964.
- [71] D.W. Schaefer, J.E. Martin, K.D. Keefer, In *Physics of Finely Divided Matter*; N. Bocarra, M. Daoud, Eds.; Springer-Verlag: Berlin, 1985, 31.
- [72] C.J. Brinker. In *The Colloid Chemistry of Silica*, H.E. Bergna, Ed., American Chemical Society, Washington, D.C., 1994, 31.
- [73] Y. Chen, J. Qiu, X. Wang, J. Xiu, *J. Catal.* 2006, **242**, 227.
- [74] S.J. Oldenburg, S.L. Westcott, R.D. Averitt, N.J. Halas, *J. Chem. Phys.* 1999, **111**, 4729.
- [75] O.V. Makarova, A.E. Ostafin, H. Miyoshi, J.R. Norris Jr., D. Meisel, *J. Phys. Chem. B*, 1999, **103**, 9080.
- [76] A. Hanprasopwattana, S. Srinivasan, A.G. Sault, A.K. Datye, *Langmuir*, 1996, **12**, 3173.
- [77] A.S. Ethiraj, N. Hebalkar, S.R. Sainkar, S.K. Kulkarni, *J. Lumin.*, 2005, **114**, 15.
- [78] A.S. Ethiraj, N. Hebalkar, S.K. Kulkarni, R. Pasricha, J. Urban, C. Dem, M. Schmitt, W. Kiefer, L. Weinhardt, S. Joshi, R. Fink, C. Heske, C. Kumpf, E. Umbach, *J. Chem. Phys.*, 2003, **118**, 8945.
- [79] P. Jiang, J.F. Bertone, V.L. Colvin, *Science*, 2001, **291**, 453.

- [80] K.P. Velicov, A. Moroz, A. van Blaaderen, *Appl. Phys. Lett.*, 2002, **80**, 49.
- [81] C. Graph, A. Van Blaaderen, *Langmuir*, 2002, **18**, 524.
- [82] S.A. Kalele, S.S. Ashtaputre, N.Y. Hebalkar, S.W. Gosavi, D.N. Deobagkar, D.N. Deobagkar, S.K. Kulkarni, *Chem. Phys. Lett.*, 2005, **404**, 136.
- [83] S.A. Kalele, A.A. Kundu, S.W. Gosavi, D.N. Deobagkar, D.D. Deobagkar, S.K. Kulkarni, *Small*, 2006, **2**, 335.
- [84] L.M. Liz-Marzan, M.A. Correa-Duarte, I. Pastoriza-Santos, P. Mulvaney, T. Ung, M. Giersig, N.A. Kotov, Core-shell nanoparticles and assemblies thereof. In *Hand Book of Surfaces and Interfaces of Materials* (Ed. H.S Nalwa), Vol. 3: Nanostructured Materials, Micelles and Colloids, 2001, ch. 5, 189.
- [85] J.N. Smith, J. Meadows, P.A. Williams, *Langmuir*, 1996, **12**, 3773.
- [86] J.L. West, N.J. Halas, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 2003, **5**, 285.
- [87] C. Loo, A. Lin, L. Hirsch, M.-H. Lee, J. Barton, N.J. Halas, J. West, R. Drezek, *Technol. Cancer Res. Treat.* 2004, **3**, 33.
- [88] U. Kreibig, M. Vollmer, *Optical properties of metal clusters*, 1995, Vol. 25. Springer, Berlin.
- [89] L.R. Hirsch, J.B. Jackson, A. Lee, N.J. Halas, J. West, *Anal. Chem.*, 2003, **75**, 2377.
- [90] M. Brongersma, *Nature Mater.*, 2003, **2**, 296.
- [91] L.R. Hirsch, R.J. Stafford, J.A. Bankson, S.R. Sershen, B. Rivera, R.E. Price, J.D. Hazle, J.N. Halas, J.L. West, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2003, **100**, 13549.
- [92] S. Kalele, S.W. Gosavi, J. Urban, S.K. Kulkarni, *Current Sci.*, 2006, **91**, 1038.
- [93] Z. Deng, M. Chen, L. Wu, *J. Phys. Chem. C*, 2007, **111**, 11692.
- [94] J.B. Jackson, N.J. Halas, *J. Phys. Chem. B*, 2001, **105**, 2743.
- [95] R.A. Freitas Jr., *Nanomedicine, Volume IIA: Biocompatibility*, Landes Bioscience, Georgetown, TX, 2003.
- [96] T.A. Erickson, J.W. Tunnell, *Gold Nanoshells in Biomedical Applications, Nanomaterials for the Life Sciences Vol. 3: Mixed Metal Nanomaterials*, Ed. C.S.S.R. Kumar, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2009.
- [97] S. Lal, S.E. Clare, N.J. Halas, *Acc. Chem. Res.*, 2008, **41**, 1842.
- [98] P.K. Jain, X. Huang, I.H. El-Sayed, M.A. El-Sayed, *Plasmonics*, 2007, **2**, 107.
- [99] N. Sounderya, Y. Zhang, *Recent Patents on Biomedical Engineering*, 2008, **1**, 34.
- [100] D.P. O'Neal, L.R. Hirsch, N.J. Halas, J.D. Payne, J.L. West, *Photo-Thermal Cancer Lett.*, 2004, **209**, 171.
- [101] C. Loo, A. Lowery, N.J. Halas, J. West, R. Drezek, *Nano Lett.*, 2005, **5**, 709.
- [102] Z.X. Liu, H.W. Song, L.X. Yu, L.M. Yang, *Appl. Phys. Lett.*, 2005, **86**, 113109.
- [103] D. Pissuwan, S. Valenzuela, M.B. Cortie, *Trends Biotechnol.*, 2006, **24**, 62.
- [104] S. Lal, S.E. Clare, N.J. Halas, *Acc. Chem. Res.*, 2008, **41**, 1842.
- [105] A.M. Gobin, M.H. Lee, N.J. Halas, W.D. James, R.A. Drezek, J.L. West, *Nano Lett.*, 2007, **7**, 1929.
- [106] L.R. Hirsch, A.M. Gobin, A.R. Lowery, F. Tam, R. Drezek, N.J. Halas, J.L. West, *Ann. Biomed. Eng.*, 2006, **34**, 15.
- [107] C. Loo, A. Lin, L. Hirsch, M. Lee, J. Barton, N.J. Halas, J. West, R. Drezek, *Technol. Cancer Res. Treat.*, 2004, **3**, 33.
- [108] Y. Wang, X. Xie, G. Ku, K.L. Gill, D.P. O'Neal, G. Stoica, L.V. Wang, *Nano Lett.*, 2004, **4**, 1689.
- [109] C.F. Wu, X.P. Liang, H.B. Jiang, *Opt. Commun.*, 2005, **253**, 214.
- [110] M. Bikram, A.M. Gobin, R.E. Whitmire, J.L. West, *J. Controlled Release*, 2007, **123**, 219.
- [111] T.S. Troutman, S.J. Leung, M. Romanowski, *Adv. Mater.*, 2009, **21**, 2334.
- [112] S.J. Oldenburg, S.L. Westcott, R.D. Averitt, N.J. Halas, *J. Chem. Phys.*, 1999, **111**, 4729.
- [113] J.B. Jackson, S.L. Westcott, L.R. Hirsch, J.L. West, N.J. Halas, *Appl. Phys. Lett.*, 2003, **82**, 257.

- [114] C.E. Talley, J.B. Jackson, C. Oubre, N.K. Grady, C.W. Hollars, S.M. Lane, T.R. Huser, P. Nordlander, N.J. Halas, *Nano Lett.*, 2005, **5**, 1569.
- [115] F. Le, D.W. Brandl, Y.A. Urzhumov, H. Wang, J. Kundu, N.J. Halas, J. Aizpurua, P. Nordlander, *ACS Nano*, 2008, **2**, 707.
- [116] Z.E. Goude, P.T. Leung, *Solid State Commun.*, 2007, **143**, 416.
- [117] G.D. Hale, J.B. Jackson, O.E. Shmakova, T.R. Lee, N.J. Halas, *Appl. Phys. Lett.*, 2001, **78**, 1502.
- [118] J.-H. Kim, T.R. Lee, *J. Biomed. Pharm. Eng.*, 2008, **2**, 29.
- [119] F. Tam, G.P. Goodrich, B.R. Johnson, N.J. Halas, *Nano Lett.*, 2007, **7**, 496.
- [120] X. Ji, R. Shao, A.M. Elliott, R.J. Stafford, E. Liang, Z. Luo, K. Park, J.T. Markert, C. Li, *J. Phys. Chem. C*, 2007, **111**, 6245.
- [121] D.A. Mazurenko, X. Shan, J.C.P. Stiefelhagen, C.M. Graf, A. van Blaaderen, J.I. Dijkhuis, *Phys. Rev. B*, 2007, **75**, 161102.
- [122] R. Bardhan, W. Chen, C. Perez-Torres, M. Bartels, R.M. Huschka, L. Zhao, E. Morosan, R. Pautler, A. Joshi, N.J. Halas, *Adv. Func. Mater.*, 2009, **19**, 3901.
- [123] Y. Liao, W. Li, S. He, *Nanotechnology*, 2007, **18**, 375701.
- [124] Z. Jian, C. Zhang, *J. Appl. Phys.*, 2006, **100**, 026104.
- [125] J.-H. Kim, H.W. Chung, T.R. Lee, *Chem. Mater.*, 2006, **18**, 4115.
- [126] R.D. Averitt, D. Sarkar, N.J. Halas, *Phys. Rev. Lett.*, 1997, **78**, 4217.
- [127] L. Lu, G. Sun, S. Xi, H. Wang, H. Zhang, T. Wang, X. Zhou, *Langmuir* 2003, **19**, 3074.
- [128] J.-H. Kim, W.W. Bryan, H.-W. Chung, C.Y. Park, A.J. Jacobson, T.R. Lee, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2009, **1**, 1063.
- [129] C.W. Chen, M. Akashi, *Polym. Adv. Technol.*, 1999, **10**, 127.
- [130] N. Toshima, T. Yonezawa, *Makromol. Chem. Macromol. Symp.*, 1992, **59**, 281.
- [131] N. Toshima, M. Harada, Y. Yamazaki, K. Asakura, *J. Phys. Chem.*, 1992, **96**, 9927.
- [132] M. Harada, K. Asakura, N. Toshima, *J. Phys. Chem.*, 1993, **97**, 5103.

Praca wpłynęła do Redakcji 24 sierpnia 2010

**METODY SYNTEZY SULFIDÓW
FENYLOWO-FLUOROMETYLOWYCH**

**THE METHODS OF SYNTHESIS
OF PHENYL-FLUOROMETHYL SULFIDES**

Łukasz Banach, Zbigniew Ochal

*Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska
ul. Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa*

Abstract

Wstęp

Metody syntezy sulfidów fenylo- fluorometylowych

1. Fluorowanie grupy metylosulfanylowej
2. Metody wymiany chloru na fluor w sulfidach fenylo- chlorometylowych
3. Fluorometylowanie fenylotoli

Piśmiennictwo cytowane



Łukasz Banach, student III roku Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej na kierunku technologia chemiczna o specjalności „Technologia związków biologicznie czynnych i kosmetyków”. Jego zainteresowania dotyczą głównie syntezy organicznej halogenopochodnych sulfidów i sulfonów alkilowo-arylowych jako potencjalnych środków ochrony roślin.



Dr inż. Zbigniew Ochal jest adiunktem na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej w Zakładzie Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych. Zainteresowania naukowe dr Zbigniewa Ochala dotyczą poszukiwań nowych środków agrochemicznych oraz sposobów ich syntezy w tym wykorzystania biotransformacji. Badania te dotyczą głównie pochodnych sulfonów halogenometylowoarylowych, kwasów fenoksyalkanokarboksylowych i pochodnych benzoazoli.

ABSTRACT

Aromatic compounds containing halogenomethylsulfonyl or halogenomethylsulfanyl group are often biologically active as fungicides or herbicides [1–6]. Especially important plant protection agents are fluorine compounds [7–12].

Through to specific activity in living organisms, fluorine compounds found wide application. One of the reasons of high activity of these compounds is their high lipophilicity, which provides increase of solubility in lipides. Due to this fact absorption of fluorine compounds is easier and their transport in organism is faster what increase their efficiency [13–15].

In this paper the methods of synthesis of aromatic compounds containing fluoromethylsulfanyl group are described. Aryl-fluoromethyl sulfides can be easily transformed into sulfones by oxidation [16–18].

Methods of preparation of aryl-fluoromethyl sulfides can be divided into three groups:

1. Fluorination of methylsulfanyl group [19–31]
2. Substitution of chlorine atom into fluorine in phenyl-chloromethyl sulfides [32–34]
3. Fluoromethylation of phenylthiols [35, 36].

Keywords: flouromethylphenyl sulfides, flouromethylphenyl sulfones, pesticides, herbicides, fluoromethylation, fluorination

Słowa kluczowe: sulfidy fenylo- fluorometylowe, sulfony fenylo- fluorometylowe, pestycydy, herbicydy, fluorometylowanie, fluorowanie

WSTĘP

Związki aromatyczne zawierające ugrupowanie halogenometylosulfonyłowe i halogenometylosulfanyłowe często wykazują interesującą aktywność fungicydową lub herbicydową [1–6]. Szczególne znaczenie w tej klasie chemicznych środków ochrony roślin mają związki zawierające w swojej strukturze fluor [7–12].

Dzięki specyficznemu działaniu fluoru w żywym organizmie, fluorowane związki biologicznie czynne znalazły szerokie zastosowanie. Jedną z przyczyn wysokiej aktywności tych związków jest ich duża lipofilowość. Obserwuje się zwiększenie rozpuszczalności związków zawierających fluor w tkankach lipidowych, dzięki czemu ułatwiona jest absorpcja fluorozwiązków i przyspieszony ich transport w organizmie. Powoduje to podwyższenie skuteczności i szybkości działania związku [13–15]. Innym czynnikiem powodującym wyjątkową aktywność związków zawierających fluor jest zbliżona wielkość atomu fluoru i wodoru, co powoduje że organizmy mogą nie rozróżniać tych atomów włączając związki fluoru do swoich biochemicznych cykli przemian, powodując tym samym ich blokowanie, np. cykl Krebsa.

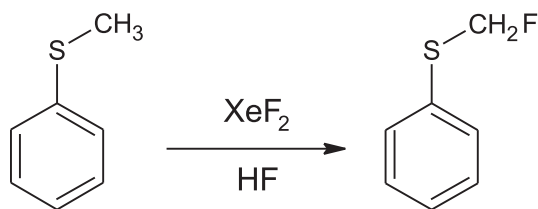
Zainteresowano się zatem syntezą pochodnych aromatycznych zawierających w swej strukturze ugrupowanie fluorometylosulfanyłowe. Sulfidy aryłowo-fluorometylowe można łatwo przekształcić w odpowiednie sulfony przez utlenienie [16–18]. Niniejszy przegląd obejmuje więc metody syntezy sulfidów fenyłowo-fluorometylowych.

METODY SYNTEZY SULFIDÓW FENYŁOWO-FLUROMETYLOWYCH

Spośród opisanych metod syntezy sulfidów fenyłowo-fluorometylowych można wydzielić trzy zasadnicze grupy. Pierwsza grupa obejmuje fluorowanie grupy metylosulfidowej, druga natomiast wymianę atomu chloru na fluor w sulfidach fenyłowo-chlorometylowych. Kolejnym podejściem syntetycznym prowadzącym do sulfidów fenyłowo-fluorometylowych jest fluorometylowanie odpowiednich tiofenoli.

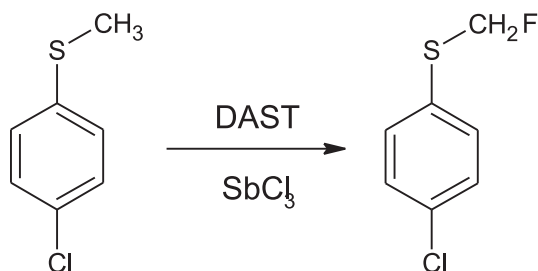
1. FLUOROWANIE GRUPY METYLOSULFANYŁOWEJ

Pierwszą opisaną metodą syntezy sulfidów monofluorometyloowoaryłowych jest reakcja sulfidu fenyłowo-metylowego z równomolową ilością difluorku ksenonu, ponadto do mieszaniny reakcyjnej dodaje się śladowe ilości fluorowodoru [19, 20] (Rys. 1). Reakcja zachodzi w temperaturze pokojowej. Wydajność procesu wynosi 74%.



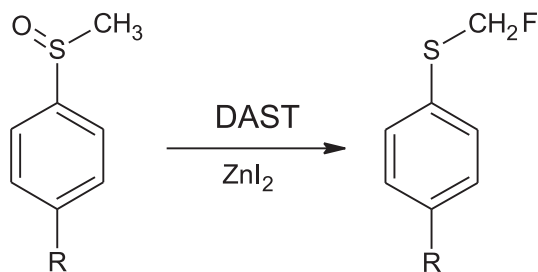
Rysunek 1
Figure 1

Kolejną metodą substytucji wodoru na fluor w sulfidach alkilowo-arylowych jest reakcja z wykorzystaniem jako czynnika fluorującego trifluorku (N,N'-dietyloamino)sulfuranu ($F_3S-N(C_2H_5)_2$), znanego pod nazwą handlową DAST. Jako katalizator stosuje się $SbCl_3$ [21] (Rys. 2), jego ilość musi być odpowiednio dobrana, gdyż zbyt duży nadmiar hamuje przemianę i powoduje powstawanie niepożądanych produktów. Reakcję w obecności katalizatora prowadzono przez 2 godziny a jako rozpuszczalnik stosowano chlorek metylenu, uzyskując przy tym 92% wydajność.



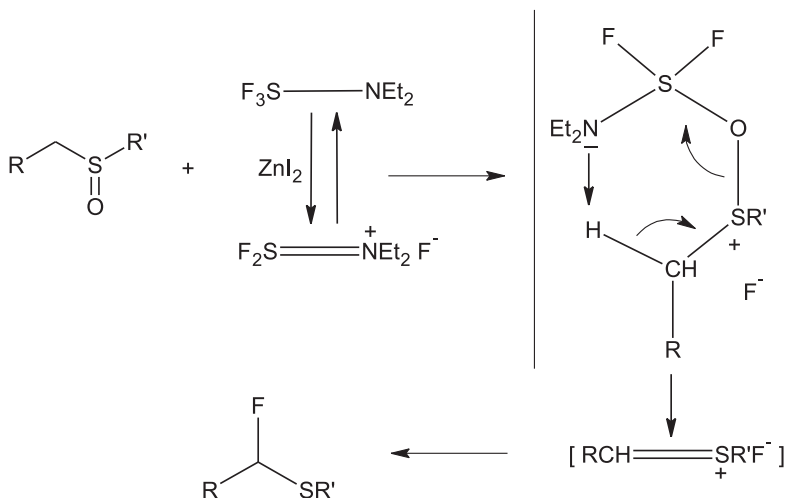
Rysunek 2
Figure 2

Warto nadmienić, że DAST jako czynnik fluorujący był początkowo użyty do fluorowania sulfotlenku fenylo-metylowego, co prowadzi do odpowiedniej pochodnej sulfidowej [22] (Rys. 3), lecz zamiast trifluorku antymonu jako katalizator stosowano jodek cynku:



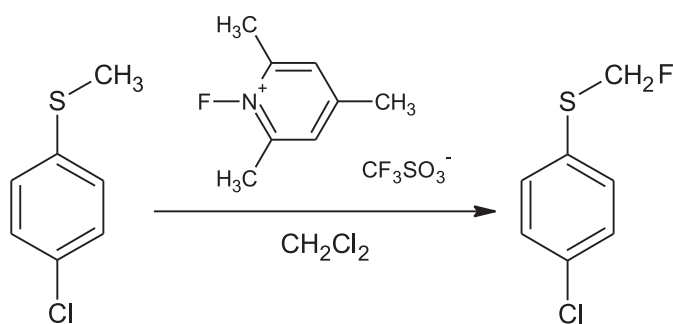
Rysunek 3
Figure 3

Mechanizm działania DAST-u w obecności jodku cynku jako katalizatora, sugerowany przez autorów przedstawia schemat:



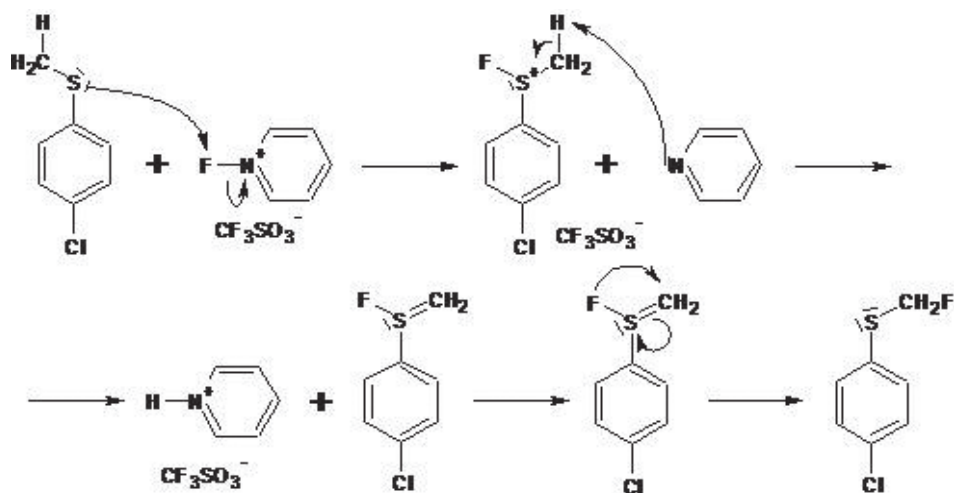
Rysunek 4
Figure 4

W latach osiemdziesiątych do otrzymania sulfidu 4-chlorofenylowo-fluorometylowego zastosowano sól *N*-fluoropirydyniową kwasu trifluorometanosulfonowego [23, 24] (Rys. 5). Najlepszą wydajność uzyskano stosując jako czynnik fluorujący sól *N*-fluoro-2,4,6-trimetylopirydyniową kwasu trifluorometanosulfonowego. Reakcja z sulfidem 4-chlorofenylowo-metylowym prowadzona w chlorku metylenu przez 8 godzin w temperaturze pokojowej daje produkt z 87% wydajnością.



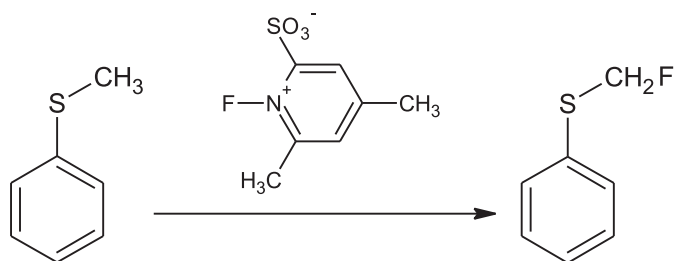
Rysunek 5
Figure 5

Dla powyższej reakcji postuluje się następujący mechanizm:



Rysunek 6
Figure 6

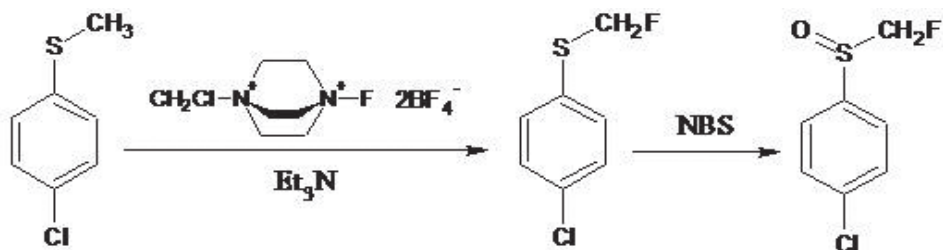
Bardzo interesujące rezultaty otrzymano fluorując tioanizol z zastosowaniem soli *N*-fluoropirydyniowej w postaci jonu obojnego, jako sulfonian wewnętrzny [25] (Rys.7). Umemoto i Tomizawa wykazali, iż wydajność tej reakcji zależy głównie od rozpuszczalnika. Zastosowanie chlorku metylenu nie prowadziło do otrzymania pożądanego produktu, zmiana rozpuszczalnika na acetonitryl zapewniła 42% wydajności, natomiast użycie mieszaniny dichlorometanu i acetonitrylu w stosunku 1:1 zaowocowało 80% wydajnością reakcji.



Rysunek 7
Figure 7

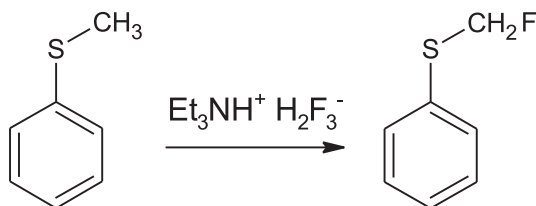
Inną metodą wprowadzania atomu fluoru jest reakcja z 1-(chlorometylo)-4-fluoro-1,4-diazabicyklo[2,2,2]oktano bis(tetrafluoro-borem), w skrócie nazywanym F-TEDA-BF₄ [26] (Rys. 8). Mieszaninę sulfidu 4-chlorofenylo-metylowego i F-TEDA-BF₄ mieszało przez 10 minut w temperaturze pokojowej, w atmosferze

azotu, stosując acetonitryl jako rozpuszczalnik. Następnie do roztworu dodano trietyloaminę i mieszano przez dalsze 10 minut. Produkt otrzymano po utlenieniu go NBS do sulfotlenku z końcową wydajnością 51%.



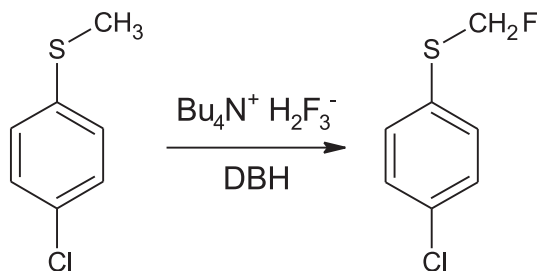
Rysunek 8
Figure 8

W literaturze opisano również metodę substitucji wodoru fluorem wykorzystującą fluorowodorek trietyloaminy w acetonitrylu, stosując elektrochemiczną inicjację reakcji [27] (Rys. 9). Wykorzystując różne substraty otrzymywano odpowiednie produkty z wydajnościami w zakresie 18–62%. Bardzo istotny jest fakt, iż wyższe wydajności produktu fluorowania, w standardowych warunkach prowadzenia reakcji, otrzymuje się dla substratu z metylem podstawionym grupą elektrossącą. Jednakże zmiana rozpuszczalnika na THF z jednoczesnym podwyższeniem potencjału anodowego jest w stanie zapewnić zadowalające wydajności reakcji fluorowania dla sulfidów fenylowo-metylowych na poziomie 50%.



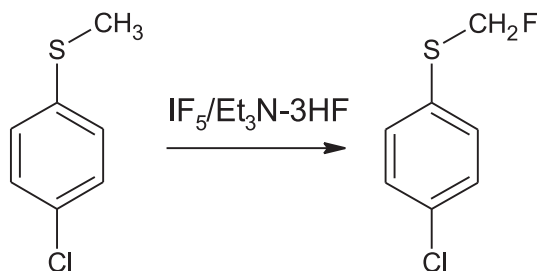
Rysunek 9
Figure 9

Kolejna metoda fluorowania grupy metylosulfidowej wykorzystuje fluorowodorek tetrabutylamoniowy ($\text{Bu}_4\text{N}^+\text{H}_2\text{F}_3^-$) w obecności 1,3-dibromo-5,5-dimetylohydantoiny (DBH) [28, 29] (Rys. 10). Już po 20 minutach prowadzenia reakcji w chlorku metylenu w temperaturze pokojowej uzyskano wydajność 90%. Podobnie, z wysoką 75% wydajnością, otrzymano produkt fluorowania 4-(metylosulfanylo)benzonitrylu. Jednak dla niepodstawionego tioanizolu oraz jego pochodnej z grupą metoksyłową w pozycji 4 wydajności są dużo niższe i wynoszą odpowiednio 52 i 59%.



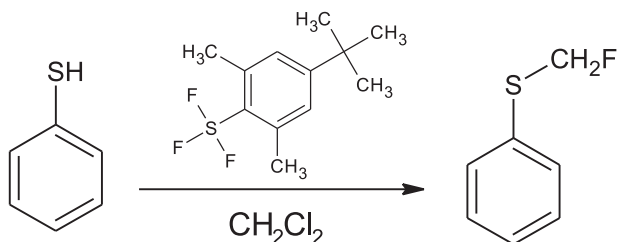
Rysunek 10
Figure 10

Ciekawą metodą prowadzącą do otrzymania sulfidów fluorometylowo-fenylo-
wych jest zastosowanie IF_5 w $\text{Et}_3\text{N}\cdot 3\text{HF}$ [30, 31] (Rys. 11). Roztwór IF_5 w $\text{Et}_3\text{N}\cdot 3\text{HF}$
jest, zdaniem autorów, trwałym i łatwym w użyciu środkiem fluorującym. Jest to
produkt handlowy o niezbyt wysokiej cenie. Reakcję prowadzi się w heksanie,
w temperaturze 40°C przez 4 godziny otrzymując produkt z wydajnością 71%.



Rysunek 11
Figure 11

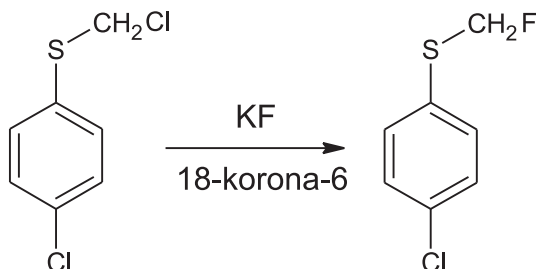
Opatentowana ostatnio metoda otrzymywania sulfidów monofluorometylowo-
arylowych polega na bezpośrednim fluorowaniu grupy metylosulfidowej z zastoso-
waniem trifluorku (2,6-dimetylo-4-*tert*-butylofenylo)sulfuranu [32] (Rys. 12). Reak-
cję prowadzi się przez dwadzieścia minut w temperaturze pokojowej, jako rozpusz-
czalnik wykorzystuje się chlorek metylenu, Produkt uzyskiwano z wydajnością 61%.



Rysunek 12
Figure 12

2. METODY WYMIANY CHLORU NA FLUOR W SULFIDACH FENYLOWO-CHLOROMETYLOWYCH

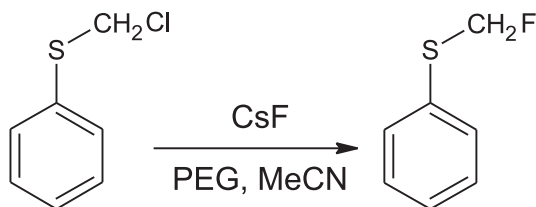
W 1977 roku Moore i Wemple przedstawili interesującą metodę wymiany chloru na fluor w sulfidzie 4-chlorofenylo- chlorometylowym stosując bezwodny fluorek potasu w obecności eteru koronowego 18-korona-6 [33, 34] (Rys. 13):



Rysunek 13
Figure 13

Wadą powyższej przemiany jest długi czas prowadzenia reakcji. Sulfid 4-chlorofenylo- fluorometylowy otrzymano po 110 godzinach ogrzewania substratów we wrzącym acetonitrylu, z wydajnością 79%.

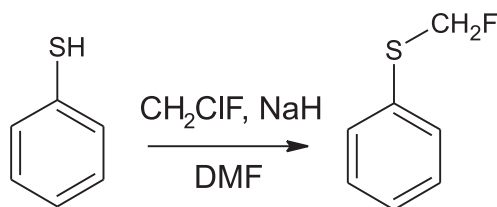
W latach dziewięćdziesiątych opracowano reakcje wymiany, w której jako czynnik fluorujący zastosowano fluorek cezu w mieszaninie glikolu polietylenowego (PEG) i acetonitrylu w stosunku 1:2 [34, 35] (Rys. 14).



Rysunek 14
Figure 14

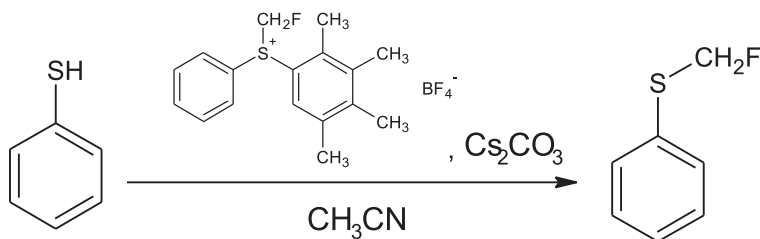
3. FLUOROMETYLOWANIE TIOFENOLI

Grupa fluorometylowa może zostać połączona z atomem siarki odpowiedniego tiofenolu, w jego reakcji z chlorofluorometanem z zastosowaniem wodoru sodu jako zasady [36] (Rys. 15). Reakcję prowadzi się w 80°C w DMF otrzymując produkt z wydajnością 72%. Przykłady przedstawione przez autorów wykazują, iż charakter podstawnika w pierścieniu benzenowym nie ma większego wpływu na wydajności, które mieszczą się w przedziale 72–80%.



Rysunek 15
Figure 15

Innym sposobem prowadzącym do sulfidu fenylo- fluorometylowego jest przeniesienie grupy fluorometylowej do tienofolu z tetrafluoroboranu *S*-fluorometylo-*S*-fenylo-2,3,4,5-tetrametylofenylosulfoniowego [37] (Rys. 16). Przemiana ta prowadzi do produktu z 88% wydajnością.



Rysunek 16
Figure 16

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] Patent USA US 2.484.489, 1949.
- [2] Patent niemiecki, DE 100.768, 1957.
- [3] Patent brytyjski, GB 875.533, 1960.
- [4] Patent japoński, JP 7.990.145, 1979.
- [5] Patent polski, PL 202 745 B1, 2009.
- [6] M. Krawczyk, Z. Zimińska, Z. Ochal, A. Mizerski, D. Kalthorn, *Pol. J. Appl. Chem.*, 2003, **47**, 155.
- [7] B. Malichenko, L.M. Yagupolskii, *Ukr. Khim. Zh.*, 1968, **34**, 486.
- [8] Patent japoński, JP 7.594.126, 1975.
- [9] Patent japoński, JP 61.221.170, 1986.
- [10] Patent niemiecki, DE 3.621.301, 1988.
- [11] Patent polski PL 195 100 B1, 2007.
- [12] *The Pesticide Manual, A World Compendium*, 13 th. edition, The British Crop Protection Council, Farnham, UK, 2003.
- [13] M. Schlosser, *Tetrahedron*, 1978, **34**, 3.
- [14] R.E. Banks, *Organofluorine Chemicals and Their Industrial Applications*, Ellis Horwood Ltd., Chichester 1979.
- [15] R. Filler, Y.Kobayashi, *Biochemical Aspects of Fluorine Chemistry*, Kadanian Ltd., Elsevier Biochemical Press, Tokyo 1982.

- [16] B.M. Trost, D.P. Curran, *Tetrahedron Lett.*, **22**, 1287 (1981).
- [17] E.A. Nodiff, S. Lipschutz, P.N. Craig, *J. Org. Chem.*, 1960, **25**, 60.
- [18] J. Eisch, M. Behrooz, S.K. Dua, *J. Organomet. Chem.*, 1985, **285**, 121.
- [19] M. Zupan, *J. Fluor. Chem.*, 1976, **8**, 305.
- [20] R.K. Marat, A.F. Janzen, *Canadian J. Chem.*, 1977, **55**, 3031.
- [21] M.J. Robins, S.F. Wnuk, *J. Org. Chem.*, 1993, **58**, 3800.
- [22] J.R. McCarthy, N.P. Peet, M.E. LeTourneau, M. Inbasekaran, *J. Am. Chem. Soc.*, 1985, **107**, 735.
- [23] T. Umemoto, G. Tomizawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1986, **59**, 3625.
- [24] Patent japoński, JP 62.181.230, 1988.
- [25] T. Umemoto, G. Tomizawa, *J. Org. Chem.*, 1995, **60**, 3563.
- [26] G.S. Lal, *J. Org. Chem.*, 1993, **58**, 2791.
- [27] A. Konno, K. Nagakagawa, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1991, **15**, 1027.
- [28] S. Furuta, M. Kuroboshi, T. Hiyama, *Tetrahedron Lett.*, 1995, **36**, 8243.
- [29] S. Furuta, M. Kuroboshi, T. Hiyama, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1998, **71**, 2687.
- [30] N. Yoneda, T. Fukuhara, *Chem. Lett.*, 2001, **3**, 222.
- [31] S. Ayuba, N. Yoneda, T. Fukuhara, S. Hara, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 2002, **75**, 1603.
- [32] Patent USA, US 7.265.247, 2007.
- [33] K.M. Moore, J. Wemple, *Synthesis*, 1977, **11**, 791.
- [34] D.P. Matthews, J.R. McCarthy, *Org. Prep. Proced. Int.* 1994, **26**, 605.
- [35] Patent USA, 9,323,370, 1993.
- [36] W. Zhang, L. Zhu, J. Hu, *Tetrahedron*, 2007, **63**, 10569.
- [37] G.K. Surya Prakash, I. Ledneczki, S. Chacko, G.A. Olah, *Org. Lett.*, 2008, **10**, 557.

Praca wpłynęła do Redakcji 7 września 2010

**ANALOGI GLUTAMINY
JAKO INHIBITORY SYNTAZY GLCN-6-P**

**ANALOGS OF GLUTAMINE AS INHIBITORS
OF SYNTHASE GLCN-6-P**

Anna Melcer

*Politechnika Gdańska, Wydział Chemiczny,
Katedra Aparatury i Maszynoznawstwa Chemicznego,
ul G. Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk Wrzeszcz
e-mail: anna.melcer@pg.gda.pl*

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Funkcja syntazy glukozamino-6-fosforanu
2. Inhibitory syntazy glikozamino-6-fosforanu
 - 2.1. Analogi glutaminy jako inhibitory syntazy GlcN-6-P
3. Synteza wybranych inhibitorów syntazy GlcN-6-P będących analogami glutaminy
 - 3.1. Synteza amidowych pochodnych kwasu N^3 -(4-metoksyfumaroil)-(*S*)-2,3-diaminopropanowego (**20–23**)
 - 3.2. Synteza estrowych pochodnych kwasu N^3 -(4-metoksyfumaroil)-(*S*)-2,3-diaminopropanowego (**24, 25**)
 - 3.3. Synteza estrów latentnych kwasu N^3 -(4-metoksyfumaroil)-(*S*)-2,3-diaminopropanowego (**26, 27**)

Piśmiennictwo cytowane



dr Anna Melcer w roku 2002 ukończyła studia na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej, a następnie w roku 2007 obroniła pracę doktorską pt. „*N*-alkilowe pochodne ADGP jako potencjalne chemoterapeutyki przeciwgrzybowe”, którą wykonywała pod kierunkiem prof. dr. hab. Andrzeja Wiśniewskiego. Dotychczas opublikowała 7 prac, posiada dwa zgłoszenia patentowe. Obecnie jest adiunktem na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej.

ABSTRACT

Glucosamine-6-P (GlcN-6-P) synthase catalyzes the first committed step in chitin biosynthesis pathway, that is, transformation of D-fructose-6-phosphate (Fru-6-P) to D-glucosamine-6-phosphate [1]. Although the enzyme is also present in mammalian systems, substantial difference in physiological consequences of GlcN-6-P synthase inhibition in fungi and in mammals, constitute a firm molecular basis for the selective toxicity of specific enzyme inhibitors. The enzyme was proposed as a target for antifungal chemotherapy and a search for its selective inhibitors as potential antifungals has been continued. So far, two main groups of such compounds were identified: L-glutamine analogs and mimics of a putative *cis*-enolamine transition state intermediate but none of them demonstrated high antifungal activity, due to the inefficient uptake by the fungal cells. Among a number of known glutamine analogues some are selective inhibitors of GlcN-6-P synthase, not interacting with other enzymes utilising L-glutamine as substrate. One of them, *N*³-(4-methoxyfumaryl)-1-2,3-diaminopropanoic acid (FMDP), gave rise to oligopeptidic compounds demonstrating remarkable antifungal activity [2]. Incorporation of FMDP into peptide structure allowed effective internalisation of the enzyme inhibitor by the way of peptide permeases, but on the other hand was a reason of substantial specific resistance, since peptides permeases are not essential for fungal cells [3, 4].

The second group of compounds comprises derivatives of phosphorylated amino-sugars, including: 2-amino-2-deoxy-D-glucitol-6-phosphate (ADGP), arabinose-5-phosphate oxime and 5-methylenephosphono-D-arabinohydroximolactone, as the most powerful GlcN-6-P synthase inhibitors [5–7]. These compounds exhibit very poor, if any, antifungal activity. This article provides a comprehensive overview of the present knowledge about inhibitors of glucosamine-6-phosphate and their synthesis.

Keywords: glucosamine-6-P synthase. inhibitors of GlcN-6-P, antifungals, glutamine analogues, enzyme active center

Słowa kluczowe: syntaza glukozamino-6-fosforanu, inhibitory syntazy GlcN-6-P, analogi glutaminy, centrum aktywne enzymu

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

AADP	– kwas (<i>S</i>)-2-amino- {[(<i>E</i>)-4-okso-2-pentenoilo] amino}propanowy
BADP	– kwas (<i>S</i>)-2-amino- {[(<i>E</i>)-4-fenyl-4-okso-2-butenilo]-amino}propanowy
Boc	– grupa <i>tert</i> -butoksykarbonylowa
DBU	– 1,8-diazabicyklo[5,4,0]undec-7-en
DCC	– dicykloheksylokarbodiimid
DCE	– 1,2-dichloroetan
DMF	– <i>N,N</i> -dimetyloformamid
DON	– 6-diazo-5-okso-L-norleucyna
DPPA	– azydofosforan fenylu
EADP	– kwas <i>N</i> ³ -(DL- <i>trans</i> -epoksybursztynamoilo)-L-,3-diaminopropanowy
Et ₃ N	– trietyloamina
FCDP	– kwas <i>N</i> ³ -fumarilo-(<i>S</i>)-2,3-diaminopropanowy
FMDP	– kwas <i>N</i> ³ -(4-metoksyfumarilo)-(<i>S</i>)-2,3-diaminopropanowy
Fru-6-P	– fruktozo-6-fosforan
GlcN-6-P	– glukozamino-6-fosforan
TFA	– kwas trifluorooctowy
THF	– tetrahydrofuran
UDP	– urydynodifosforan
γ-Glu	– kwas γ-glutamylhydroksymowy

WPROWADZENIE

W ostatnich latach obserwuje się znaczny wzrost różnego rodzaju infekcji, zarówno bakteryjnych jak i grzybiczych. Dużo więcej uwagi poświęca się chorobom o podłożu bakteryjnym. Grzyby mogą wywoływać grzybice powierzchowne oraz o wiele poważniejsze grzybice głębokie, czyli układowe. Grzybicze zakażenia skóry, włosów czy paznokci, aczkolwiek często długotrwałe i odporne w leczeniu, rzadko bywają przyczyną trwałego pogorszenia ogólnego stanu zdrowia chorego. Zagrożeniem dla zdrowia, a nawet życia człowieka mogą być grzybice układowe. Zakażenia tego rodzaju są coraz trudniejsze do wyleczenia, ponieważ wraz z gwałtownym wzrostem częstotliwości infekcji grzybiczych równie szybko wzrasta oporność szczepów na skuteczne do tej pory leki. Przyczyn takiego stanu rzeczy należy szukać także w zmieniającym się środowisku. Wzrost częstości występowania grzybic jest ściśle związany z wprowadzaniem w medycynie coraz to nowych antybiotyków antybakteryjnych, zwłaszcza tych o szerokim spektrum działania. Ich powszechne stosowanie, często nieuzasadnione, narusza równowagę mikroflory człowieka, prowadzi do dysbakteriozy i w ten sposób stwarza korzystne warunki do niekontrolowanego wzrostu saprofitycznych dotychczas grzybów. Grzybice układowe stają się coraz poważniejszym wyzwaniem dla współczesnej chemioterapii. Oczywiście, więc potrzebą staje się poszukiwanie nowych związków, potencjalnych chemoterapeutyków przeciwgrzybowych.

Grzyby są organizmami eukariotycznymi stąd wiele preparatów, które *in vitro* hamują ich wzrost jest toksycznych dla organizmu ludzkiego, co w poważny sposób ogranicza ich zastosowanie w lecznictwie. Dotychczasowe strategie w zwalczaniu patogennych grzybów polegają na klasycznym testowaniu substancji syntetycznych lub pochodzenia naturalnego oraz na projektowaniu związków, które mogłyby mniej lub bardziej specyficznie atakować wybrane procesy komórkowe. Obecnie poszukuje się coraz to nowych celów (organelli, ich składników, enzymów), których zablokowanie lub uszkodzenie doprowadzałoby do zahamowania rozwoju komórki grzyba i jej obumarcia. Idealnym rozwiązaniem wydaje się znalezienie takiego, który byłby charakterystyczny tylko dla grzyba, wówczas specjalnie zaprojektowane lekarstwa, oddziaływałyby na grzyb, nie wyrządzając szkód w komórkach gospodarza. Na obecnym etapie wiedzy bierze się pod uwagę kilka ważnych w terapii przeciwgrzybowej celów w komórce.

Celami molekularnymi, które mogą zostać wykorzystane w poszukiwaniu skutecznych chemoterapeutyków przeciwgrzybowych są elementy różnicujące jakościowo komórki grzyba od komórek ssaka. Do celów takich należą m.in. enzymy zaangażowane w biosyntezie elementów grzybowej ściany komórkowej. Jednym z takich enzymów, szeroko rozpowszechnionym w przyrodzie, jest syntaza glukozaamino-6-fosforanu, która katalizuje reakcję powstawania glukozaamino-6-fosforanu (GlcN-6-P).

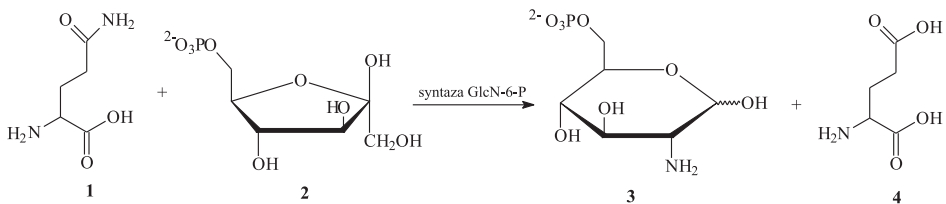
Potencjalnego leku przeciwgrzybicznego można poszukiwać w gronie inhibitorów syntazy GlcN-6-P, będących analogami stanu przejściowego reakcji katalizo-

wanej przez ten enzym. Jest to możliwe, ponieważ molekularny mechanizm tej reakcji został już poznany.

Artykuł stanowi przegląd stanu wiedzy z ostatnich trzyciestu lat dotyczący inhibitorów syntazy glukozamino-6-fosforanu będących analogami glutaminy, ze szczególnym naciskiem na właściwości wybranych inhibitorów oraz ich syntezę.

1. FUNKCJA SYNTAZY GLUKOZAMINO-6-FOSFORANOWEJ

Syntaza glukozamino-6-fosforanu jest enzymem o nazwie systematycznej L-glutamina: D-fruktozo-6-fosforan amidotransferaza EC 2.6.1.16 [8], katalizującym biosyntezę D-glukozaminy, która jest podstawowym elementem budulcowym chityny, a tym samym ściany komórkowej grzyba [9–11]. Enzym ten uczestniczy w reakcji, podczas której dochodzi do przeniesienia grupy aminowej z ugrupowania amidowego glutaminy (**1**) na cząsteczkę D-fruktozo-6-fosforanu (**2**) z jednoczesną izomerizacją ketozaminy do D-glukozamino-6-fosforanu (**3**) (Schemat 1). [12]. Z uwagi na swoją podwójną funkcję glukozamino-6-fosforan (GlcN-6-P) jest prekursorem UDP-N-acetyloglukozaminy, stanowiącej produkt pośredni w biosyntezie wszelkich makrocząsteczek zawierających aminocukry, zarówno w komórkach prokariotycznych jak i eukariotycznych.



Schemat 1. Reakcja katalizowana przez syntazę glukozamino-6-fosforanową
Scheme 1. Reaction catalysed by GlcN-6-P synthase

Syntaza glukozamino-6-fosforanu należy jednocześnie do dwóch klas enzymów: amidotransferaz glutaminowych oraz izomeraza 2R ketonowo/aldozowa [13]. Wynika to z faktu, że enzym ten katalizuje dwie sprzężone reakcje. Pierwsza z nich to hydroliza wiązania amidowego glutaminy, połączona z przeniesieniem powstałego amoniaku na akceptor, którym jest D-fruktozo-6-fosforan (funkcja glutaminazy). Druga reakcja to konwersja powstałego D-fruktozimidino-6-fosforanu do końcowego produktu, jakim jest D-glukozamino-6-fosforan (funkcja izomerazy).

2. INHIBITORY SYNTAZY GLUKOZAMINO-6-FOSFORANU JAKO POTENCJALNE CHEMOTERAPEUTYKI PRZECIWRZYZBOWE

Główną aktywnością syntazy GlcN-6-P jest utworzenie glukozamino-6-fosforanu zachodzące w wyniku przeniesienia grupy aminowej z glutaminy na fruktozo-6-fosforan oraz następująca dalej izomeryzacja ketozy do aldozy. Pod nieobecność Fru-6-P, enzym katalizuje hydrolizę glutaminy [14], natomiast w nieobecności glutaminy wykazuje aktywność izomerazy fosfoglukozowej [15].

Aktywność syntazy glukozamino-6-fosforanowej jest hamowana przez szereg związków oddziaływujących z resztami aminokwasowymi obecnymi w centrum aktywnym enzymu (jodoacetamid, *N*-etylomaleinimid, 1,1'-ditioldiformamidyna, kwas 6,6'-ditiudinikotynowy oraz kwas *p*-chlorortęciobenzoesowy). Związki te nieodwracalnie inaktywują enzym na wskutek alkiłowania reszty tiolowej cysteiny znajdującej się w jego centrum aktywnym [12, 16–18].

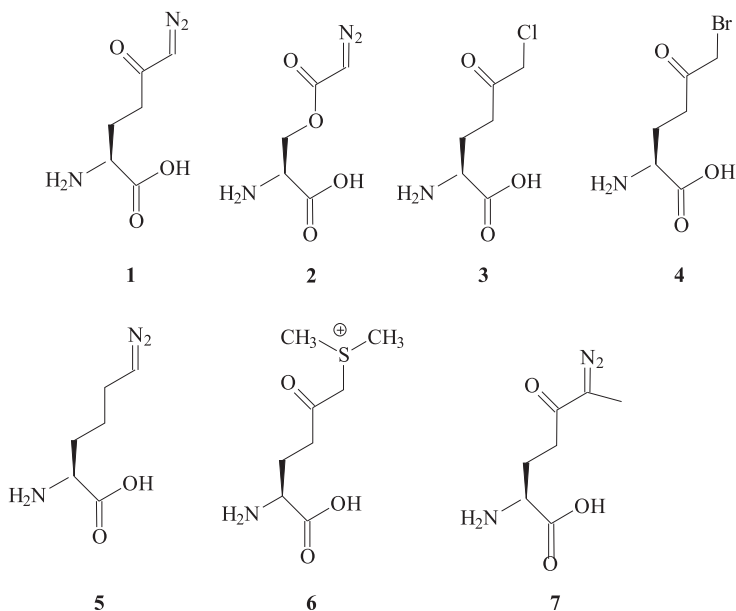
Poszukiwanie selektywnych wobec syntazy glukozamino-6-fosforanowej inhibitorów prowadzi się wśród analogów glutaminy (Rys. 1) oraz analogów stanu przejściowego reakcji katalizowanej przez syntazę glukozamino-6-fosforanu. Warunkiem stworzenia skutecznego inhibitora analogu glutaminy jest wprowadzenie do niego ugrupowania zdolnego do reakcji z grupą tiolową Cys1 enzymu ale równocześnie nie reagującego z innymi grupami, o charakterze nukleofilowym, obecnymi w układzie. Takie wymagania spełniają między innymi ugrupowania oksiranowe, halogenoacylowe lub zawierające układ sprzężonych wiązań podwójnych.

Z kolei domenę wiążącą D-fruktozo-6-fosforan blokują analogi produktu przejściowego, w którym jest *cis*-enolamina.

2.1. ANALOGI GLUTAMINY JAKO INHIBITORY SYNTAZY GLUKOZAMINO-6-FOSFORANU

Kluczową rolą w oddziaływaniu inhibitora z enzymem pełni grupa tiolowa zlokalizowana w centrum aktywnym syntazy GlcN-6-P. Jest to *N*-terminalna reszta cysteiny (Cys1). Grupa ta odpowiedzialna za reakcję z glutaminą, jest nieodwracalnie alkiłowana przez analogi glutaminy posiadające ugrupowania reaktywne o charakterze elektrofilowym, typu: diazoketon, diazoester, chloroketon lub 2,3 epoksyketon, które nieodwracalnie wiążą się z Cys1 w centrum aktywnym enzymu [19–24].

Podobnie jak w przypadku innych amidotransferaz glutaminowych, aktywność syntazy GlcN-6-P jest hamowana przez niespecyficzne inhibitory, do których zaliczyć możemy: 6-diazo-5-oxonorleucyna (DON, **1**), oraz *o*-diazoacetylo-L-seryna (azaseryna, **2**), oraz inne analogi glutaminy zawierające grupę elektrofilową (**3–7**, Rys. 1) [25, 26]. W przypadku syntazy glukozamino-6-fosforanu DON trwale wiąże się z enzymem, powodując jego trwałą inaktywację. Pozostałe analogi glutaminy są jedynie inhibitorami kompetywnymi tego enzymu [12, 27].



Rysunek 1. Elektrofilowe analogi glutaminy [26]
Figure 1. Electrophilic analogues of glutamine [26]

Do analogów glutaminy posiadającego ugrupowanie elektrofilowe można także zaliczyć *L*- γ -glutamyl-2-[[*p*-difluorometylo]fenylo]tio]glicynę (**8**, Rys. 2), która jest inhibitorem syntazy GlcN-6-P racjonalnie zaprojektowanym w oparciu o mechanizm działania [28]. Związek ten posiada latentną funkcję elektrofilową aktywowaną wewnątrz komórki po zhydrolizowaniu przez enzym wiązania peptydowego. Uwalniana wówczas α -arylotioglicyna spontanicznie się rozkłada do 4-(fluorometyleno)cykloheksan-2,5-dieno-1-tionu, który reaguje z niezidentyfikowaną resztą aminokwasową w centrum aktywnym enzymu.

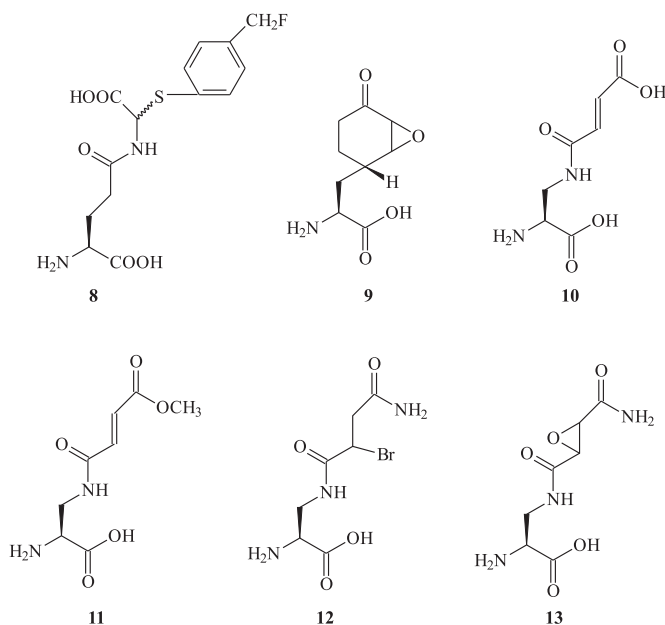
W odróżnieniu od grupy inhibitorów niespecyficznych istnieją również inhibitory będące analogami glutaminy, które nie hamują aktywności innych enzymów wykorzystujących glutaminę jako substratu. Tym samym są selektywnymi inhibitorami wobec syntazy glukozamino-6-fosforanu. Pierwszym takim poznany selektywnym inaktywatorem syntazy GlcN-6-P zarówno pochodzenia bakteryjnego jak i drożdżowego jest antykapsyna (**9**, Rys. 2) [29–32].

Antykapsyna została poraz pierwszy wyizolowana w 1970 r. przez Witney'a z brzeczki fermentacyjnej *Streptomyces griseoplanus* NRRL 3507 [22, 26, 30, 32]. Stanowi ona *C*-końcowy aminokwas antybiotyku tetainy odkrytego w latach pięćdziesiątych w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej.

Badania nad kinetyką inhibicji przez antykapsynę wykazały, że inhibitor ten jest kompetycyjny w stosunku do glutaminy i akompetycyjny w stosunku do Fru-6-P [22]. Inhibitor wiąże się zarówno z wolnym enzymem jak i kompleksem enzym–

–Fru-6-P przy czym związanie tego substratu znacznie ułatwia inhibicję. Antykapsyna jest znacznie silniejszym inaktywatorem syntazy GlcN-6-P niż DON. Wykazuje ona znacznie większe powinowactwo do miejsca wiązania glutaminy w niszy enzymatycznej niż sama glutamina – naturalny substrat syntazy GlcN-6-P [17, 27, 28, 34,]. Antykapsyna, w odróżnieniu od inhibitorów niespecyficznych, nie oddziałuje z innymi enzymami przekształcającymi glutaminę takimi jak: syntetaza GMP, γ -glutarylotransferaza, glutaminaza [31].

W ostatnich latach udało się przeprowadzić syntezę stereoselektywną antykapsyny, wykazując, że tylko jeden z enancjomerów tego inhibitora jest aktywny biologicznie [35, 36]. Zasugerowano, że aktywną formą inhibitora jest hydrat, który umożliwia powstawanie korzystnego układu wiązań wodorowych, orientujących odpowiednio ten związek w centrum aktywnym enzymu [36].



Rysunek 2. Wybrane selektywne inhibitory syntazy GlcN-6-P
Figure 2. Selected selective inhibitors of GlcN-6-P synthase

Innym ciekawym i selektywnym inhibitorem okazał się otrzymany przez Andruszkiewiczza i in. kwas N^3 -furnailo-(*S*)-2,3-diaminopropanowy (FCDP, **10**, Rys. 2). Jest on silnym inhibitorem i inaktywatorem bakteryjnej syntazy GlcN-6-P [37, 38]. Ten inhibitor stał się substancją wiodącą w programie badawczym ukierunkowanym na projektowanie i syntezę pochodnych kwasu fumaroilodiaminowego. Wynikiem tego było otrzymanie szeregu skutecznych inhibitorów syntazy glukozamino-6-fosforanu (FMDP, BSDP, **11–12**, Rys. 2) wśród, których najlepszym okazał się ester metylowy kwasu N^3 -metoksyfurnailo-(*S*)-2,3-diaminopropanowego (FMDP) [39–41].

Badania kinetyki inhibicji GlcN-6-P przez FMDP (11), wykazały, że inhibitor ten jest kompetycyjny wobec glutaminy i akompetycyjny w stosunku do Fru-6-P. Stwierdzono również, że inaktywacja enzymu przez FMDP polega na utworzeniu wiązania kowalencyjnego pomiędzy enzymem a inhibitorem na wskutek addycji Michaela grupy tiolowej *N*-końcowej cysteiny do wiązania podwójnego w furmailowym fragmencie inhibitora, a konkretnie do Ce [41–43]. Powstały w ten sposób addukt ulega dalszej cyklizacji wewnątrzcząsteczkowej, odłącza się cząsteczka metanolu, a powstający sukcynimid ulega przegrupowaniu do 1,4-ditiazyn-3-onu, którego fragment stanowi reszta cysteiny, co w rezultacie powoduje nieodwracalną inaktywację enzymu. Zaobserwowano także, że reakcja cyklizacji jest wysoce stereoselektywna. Potwierdzili to Tarnowska i in. badając za pomocą chemii obliczeniowej możliwości utworzenia różnych stereoisomerów przed inaktywacją. W tym celu użyto metod MNDO i PM3 [41, 42]. Wyjaśniono również przyczyny wysokiej stereoselektywności reakcji cyklizacji [44].

Niestety duża reaktywność ugrupowania furmailowego powoduje, że FMDP jest bardzo szybko inaktywowany przez składniki osocza krwi a tym samym wykorzystanie jego jako chemoterapeutyku staje się problematyczne. Dlatego też zajęto się poszukiwaniem innych pochodnych kwasu (*S*)-2,3-diaminopropanowego. Jednym z takich związków był wyizolowany w 1988 roku z hodowli *Micromonospora* przez Coopera i in. peptydowy antybiotyk, którego C-końcowym aminokwasem jest kwas *N*³-*trans*-epoksybursztynamoilo-(*S*)-2,3-diaminopropanowy (EADP, 13, Rys. 2) [45].

Związek ten podobnie jak FMDP inaktywuje GlcN-6-P, i wykazuje znacznie mniejszą reaktywność wobec czynników nukleofilowych zawartych w surowicy co czyni ten związek potencjalnie lepszym chemoterapeutykiem aniżeli FMDP [41, 46].

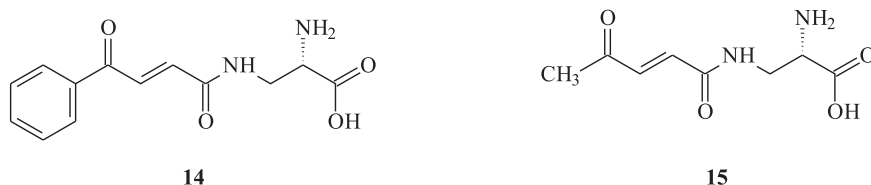
Badania kinetyki inhibicji GlcN-6-P przez EADP, wykazały, że w wyniku nukleofilowego ataku grupy tiolowej cząsteczki cysteiny w centrum aktywnym enzymu na atom węgla w pierścieniu oksiranowym następuje jego otwarcie, a następnie przeniesienie na epoksydowy atom tlenu [24].

Niestety zarówno FMDP, EADP, BSDP są zbyt polarne aby mogły być transportowane do wnętrza komórki na drodze prostej dyfuzji [47–49]. Muszą być podawane w formie latentnej np. wbudowane w cząsteczkę peptydu. Transportowane są wówczas przez peremazy peptydowe a wewnątrz komórki peptydazy uwalniają właściwą cząsteczkę inhibitora. Permeazy te nie są niezbędne do życia komórki grzybiczej i bakteryjnej, w efekcie stosowanie tych związków prowadzi do szybkiego pojawiania się oporności u mikroorganizmów, przeciwko, którym są one stosowane. Związki te charakteryzują się niewielką stabilnością w surowicy krwi.

Innym sposobem ułatwiającym transport cząsteczki inhibitora przez błonę cytoplazmatyczną jest zwiększenie jego lipofilowości. Przykładem takiego związku jest dipeptyd NvaFMDP, w którym wolne grupy aminowe są acylowane lipofilowymi kwasami organicznymi lub pochodne FMDP, w których grupa COOH kwasu 2,3-diaminopropanowego jest przekształcona w odpowiednie estry i amidy [12, 50,

51]. Związek ten ulega wewnątrz komórki hydrolizie uwalniając właściwości inhibicyjne inhibitora.

Istotną wadą FMDP jest obecność ugrupowania estrowego, które łatwo hydrolizuje *in vivo*. Powstający wówczas wolny kwas nie wykazuje praktycznie właściwości inhibitorycznych, stąd też zaprojektowano nowe związki nie posiadające w swojej strukturze łatwo hydrolizującego estru metylowego obecnego w FMDP czy pierwszorzędowego amidu w EDAP [39, 52]. Są one słabszymi inhibitorami syntazy GlcN-6-P ale są stabilniejsze chemicznie. Przykładami takich inhibitorów są kwas (*S*)-2-amino-3 {[*E*-4-fenyl-4-okso-2-butenyl]amino}propanowy (BADP, **14**, Rys. 3) i kwas (*S*)-2-amino-3 {[*E*-4-okso-2-pentyl]amino}propanowy (AADP, **15**, Rys. 3) [39, 52, 53].



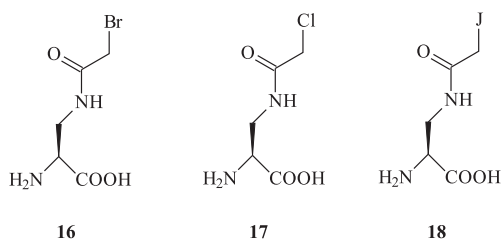
Rysunek 3. Struktura BADP (**14**) i AADP (**15**)
Figure 3. Structure of BADP (**14**) i AADP (**15**)

AADP jest słabym inhibitorem syntazy glukozamino-6-fosforanu ale jego peptyd wykazuje znaczącą aktywność biologiczną, natomiast peptydy zawierające BADP nie wykazują wysokiej aktywności prawdopodobnie na wskutek mało skutecznego transportu do wnętrza komórki. W celu poprawienia transportu cząsteczki inhibitora prowadzi się modyfikacje zwiększające lipofilowość związku co ułatwia jego dyfuzję na drodze prostej. Potencjalne miejsca umożliwiające wprowadzenie lipofilowego podstawnika w BADP i AADP to grupa karboksylowa i aminowa kwasu (*S*)-2,3-diaminopropanowego, pierścień aromatyczny w BADP oraz reszta kwasu 4-okso-2-pentylowego w AADP.

Modyfikacji takich podjęła się Walkowiak i in. w 2005 roku uzyskując szereg pochodnych BADP i AADP [54]. Otrzymane inhibitory wykazywały jednak słabszą aktywność przeciwgrzybową. Wynika to z faktu, że choć otrzymane związki charakteryzują się zwiększoną lipofilowością w porównaniu do wyjściowych inhibitorów AADP i BADP, są zbyt polarne a co za tym idzie są mało efektywnie transportowane do wnętrza komórki na drodze biernej dyfuzji. Szczególnie widoczne jest to dla związków alifatycznych i heterocyklicznych charakteryzujących się stosunkowo małym powinowactwem do błony biologicznej. W przypadku bardziej lipofilowych czynnikiem ograniczającym aktywność biologiczną jest ich słaba rozpuszczalność w wodzie tak jak w przypadku związków estryfikowanych grupą 4-*n*-decylofenylową, 4-*n*-nonadecylofenylową i metylową. Natomiast dipeptydy zawierające norwalinę wykazały znaczną aktywność przeciwko *S. cerevisiae* i *C. glabrata* i tylko słabe

działanie przeciw *C. albicans* szczepu. Peptydy te nie wydają się być toksyczne wobec komórek ludzkich [54, 55].

Kolejną grupą inhibitorów syntezy GlcN-6-P badaną w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej były *N*³-haloacetylowe pochodne kwasu (*S*)-2,3-diaminopropanowego (bromo **16**, chloro **17**, jodoacetylo-, **18**, Rys. 4). Spośród trzech otrzymanych związków, najsilniejszym inhibitorem i inaktywatorem syntezy GlcN-6-P okazał się kwas *N*³-bromoacetylo-(*S*)-2,3-diaminopropanowy. Jest to jak dotychczas najsilniejszy inaktywator tego enzymu z *Candida albicans* [56]. Niestety zastosowanie ich jako chemoterapeutyków jest niemożliwe ze względu na ich dużą reaktywność. Interesujący jest fakt, że inhibitory też wykazują cechy niekompetetywnej inhibicji w stosunku do Fru-6-P (w odróżnieniu od akompetetywnej inhibicji wykazywanej przez antykapsynę, FMDP) co świadczy, że pochodne *N*³-haloacetylowe posiadają podobną zdolność wiązania się zarówno z enzymem jak i kompleksem enzym-Fru-6-P [56]



Rysunek 4. Pochodne *N*³-haloacetylowe kwasu L-2,3-diaminopropanowego
Figure 4. *N*-haloacetyl derivatives of L-2,3-diaminopropanoic acid

3. SYNTEZA WYBRANYCH INHIBITORÓW GLCN-6-P BĘDĄCYCH ANALOGAMI GLUTAMINY

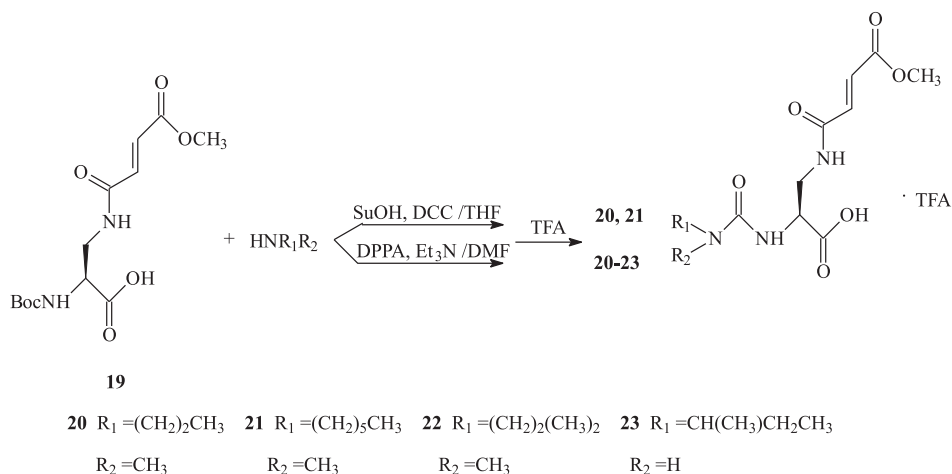
Jednym ze sposobów poprawienia transportu cząsteczki inhibitora przez błonę cytoplazmatyczną do wnętrza komórki jest zwiększenie jego lipofilowości. Przykładem takiej modyfikacji są pochodne FMDP, w których grupa karboksylowa kwasu (*S*)-2,3-diaminopropanowego jest przekształcona w odpowiednie estry i amidy [12, 50, 51, 57–59].

3.1. SYNTEZA AMIDOWYCH POCHODNYCH KWASU *N*³-(4-METOKSYFUMAROILO)-(*S*) 2,3-DIAMINOPROPANOWEGO (20–23)

W wyniku reakcji chronionego kwasu *N*²-*tert*-butoksykarbonylo-*N*³-(4-metoksyfumaroilo)-(*S*)-2,3-diaminopropanowego (BocFMDP) z *N*-metylo-*N*-propyloaminą i *N*-metylo-*N*-heksyloaminą uzyskano amidy kwasu *N*³-(4-metoksyfumaroilo)-(*S*)-2,3-diaminopropanowego (**20**, **21**). Reakcje były prowadzone dwoma metodami (Schemat 2, Tabela 1):

1. w THF w temperaturze pokojowej i z wykorzystaniem metody aktywnych estrów [59],
2. w DMF w temperaturze pokojowej w obecności trietyloaminy jako zasady, stosując do aktywacji grupy karboksylowej DPPA [57].

W obu reakcjach był stosowany 10% nadmiar odpowiednich amin w stosunku do wyjściowego substratu.



Schemat 2. Synteza amidowych pochodnych FMDP

Scheme 2. Synthesis of amide derivatives FMDP

Tabela 1. Optymalne warunki otrzymywania *N*-metylo-*N*-propyloamidu (**20**) i *N*-metylo-*N*-hesyloamidu (**21**) FMDP

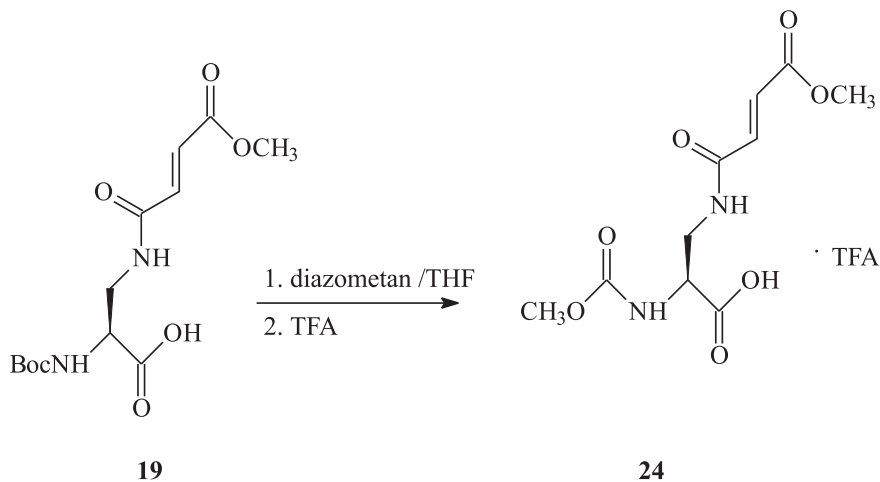
Table 1. Optimal conditions of *N*-methyl-*N*-propyloamide (**20**) and *N*-methyl-*N*-hexyloamide (**21**) FMDP synthesis

Substraty	Metoda aktywnych estrów			Metoda DPPA		
	Odczynniki	Czas reakcji	Wydajność	Odczynniki	Czas reakcji	Wydajność
BocFMDP <i>N</i> -metylo- <i>N</i> -propyloamina	THF SuOH DCC	5 h	33%	DMF DPPA Et ₃ N	24 h	65%
BocFMDP <i>N</i> -heksylo- <i>N</i> -propyloamina	THF SuOH DCC	24 h	39%	DMF DPPA Et ₃ N	24 h	81%

Ponieważ związki **20** i **21** otrzymano z wydajnościami dwukrotnie większymi metodą DPPA, pozostałe dwa amidy kwasu FMDP (**III**, **IV**) były otrzymane wyłącznie tą metodą. *N*-Izopropyl-*N*-metyloamid kwasu *N*³-(4-metoksyfumaroiło)-(*S*)-2,3-diaminopropanowego (**22**) otrzymano z wydajnością 69% zaś *N*-*sec*-butyloamid kwasu *N*³-(4-metoksyfumaroiło)-(*S*)-2,3-diaminopropanowego (**23**) z 73% wydajnością.

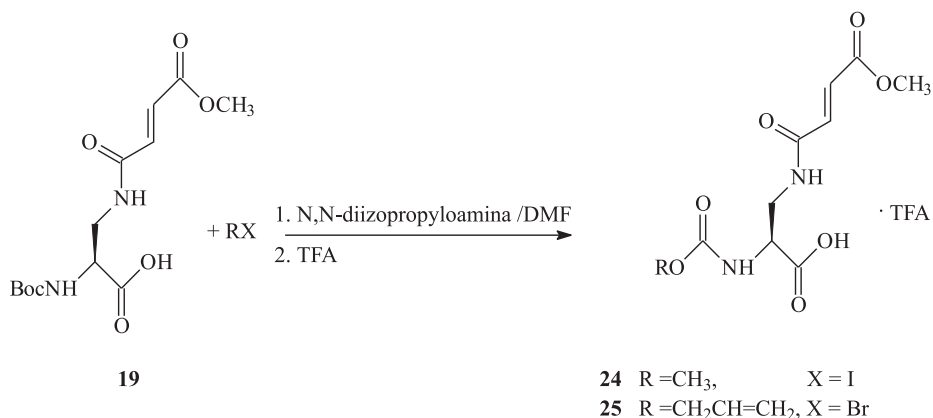
3.2. SYNTEZA ESTROWYCH POCHODNYCH KWASU *N*³-(4-METOKSYFUMAROILO)-(S)-2,3-DIAMINOPROPANOWEGO (24, 25)

Estrowe pochodne kwasu *N*³-(4-metoksyfumaroilo)-(S)-2,3-diaminopropanowego otrzymano w wyniku reakcji BocFMDP z diazometanem prowadzonej w THF – synteza estru metylowego (24) (Schemat 3) lub podczas reakcji BocFMDP z jodkiem metylu lub z bromkiem allilu w DMF w temperaturze pokojowej, z zastosowaniem *N,N*-diizopropylaminy jako zasady – synteza estru metylowego (24) i allilowego (25) (Schemat 4) [58].



Schemat 3. Synteza estru metylowego FMDP (24)

Scheme 3. Synthesis of methyl ester FMD (24)

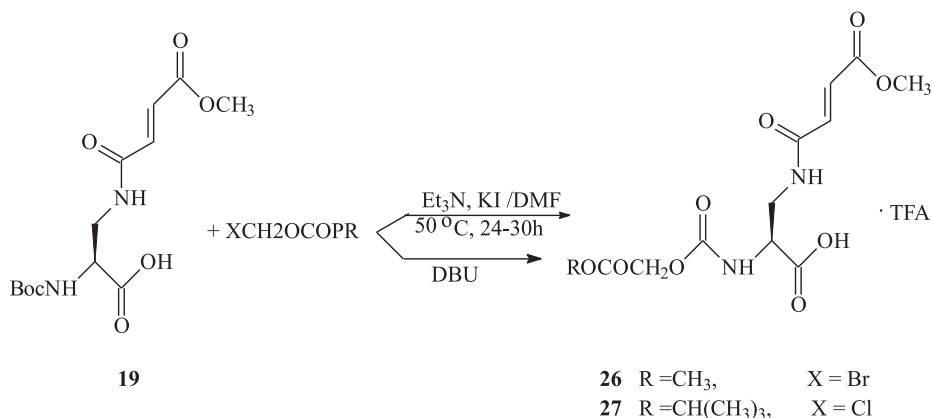


Schemat 4. Synteza estrowych pochodnych FMDP (24, 25) za pomocą bromku halogenku allilu i jodku metylu

Scheme 4. Synthesis of ester derivatives FMDP (24, 25) with allyl and methyl halides

3.3. SYNTEZA ESTRÓW LATENTNYCH KWASU N³-(4-METOKSYFUMAROILO)-(S)-2,3-DIAMINOPROPANOWEGO (26, 27)

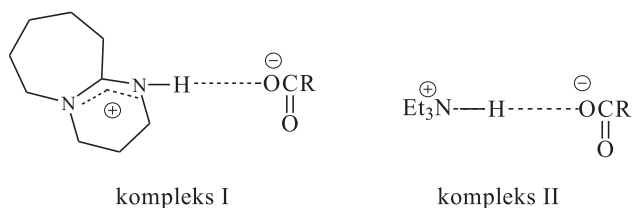
Estry acetoksymetylowy (**26**) i piwaloiloksymetylowy (**27**) otrzymano w reakcji BocFMDP odpowiednio z bromkiem acetoksymetylu i chlorkiem piwaloiloksymetylu w DMF w obecności trietyloaminy i katalitycznej ilości jodku potasu (Schemat 5). Jednakże ze względu na niskie wydajności tych reakcji zmieniono zasadę z trietyloaminy na DBU.



Schemat 5. Synteza estrów latentnych FMDP (**26**, **27**)

Scheme 5. Synthesis of latent esters FMDP (**26**, **27**)

Wg Naboru i in. reakcja przy użyciu DBU przebiega szybko w łagodnych warunkach i nie wymaga stosowania drogich, polarnych rozpuszczalników aprotowych. Jest to spowodowane faktem iż kompleks I (kompleks tworzący się w reakcji jonów karboksylanowych z protonowanym DBU – Rys. 5) jest zdecydowanie lepiej rozpuszczalny w rozpuszczalniku nie polarnym niż kompleks II (protonowana trietyloamina) co w konsekwencji zwiększa wydajność końcowego produktu estryfikacji [57].



Rysunek 5. Struktura tworzących się kompleksów

Figure 5. Structure of forming complexes

Na podstawie przeprowadzonych badań zsyntetyzowanych pochodnych FMDP ustalono, że [60]:

1. Uzyskane nowe pochodne FMDP różnią się znacznie pod względem aktywności biologicznej od macierzystego FMDP. Modyfikacje w obrębie grupy karboksylowej FMDP powodują wyraźny spadek aktywności hamującej wobec enzymu i przeciwgrzybiczej otrzymanych pochodnych. Jedynie w przypadku estru acetoksymetylowego FMDP stwierdzono wysoką aktywność biologiczną, porównywalną do aktywności niezmodyfikowanego FMDP. Związek ten w niskich stężeniach powodował zahamowanie aktywności syntazy glukozamino-6-fosforanu oraz zahamowanie wzrostu komórek *Candida albicans*.
2. Wzrost lipofilowości powoduje spadek aktywności biologicznej pochodnych FMDP.
3. Uzyskano wartości wykładnika transportu WT ($WT = IC_{50 \text{ enz}} / IC_{50 \text{ kom.}}$) większe lub równe jedności, co sugeruje, że struktury tych związków nie przeszkadzają im w pokonaniu bariery błony biologicznej.
4. Uzyskanie wartości liczbowych $WT > 1$ dla pochodnych estrowych może dowodzić wewnątrzkomórkowej hydrolizy wiązania estrowego pod wpływem niespecyficznego estera z uwolnieniem silnego, selektywnego inhibitora.

Wszystkie otrzymane amidowe i estrowe pochodne kwasu *N*³-(4- metoksyfumarolo)-(*S*)-2,3-diaminopropanowego są względnie silnymi inhibitorami aktywności syntazy glukozamino-6-fosforanowej. Wykazują jednak małą trwałość w surowicy krwi i dlatego konieczne jest poszukiwanie innych inhibitorów syntazy GlcN-6-P [60].

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] A. Herscovics, P. Orlean, FASEB J., 1993, **7**, 540.
- [2] S. Mizerski, H. Chmara, R. Andruszkiewicz, E. Borowski, M. Zaremba, J. Borowski, Drugs Exptl. Clin. Res., 1988, **14**, 461.
- [3] S. Milewski, R. Andruszkiewicz, E. Borowski, FEMS Microbiol. Lett., 1988, **50**, 73.
- [4] J. Horak, Biochim. Biophys. Acta., 1997, **1331**, 41.
- [5] M.-A. Badet-Denisot, C. Leriche, F. Masserie, B. Badet, Bioorg. Med. Chem. Lett., 1995, **5**, 815.
- [6] C. Le Camus, M.-A. Badet-Denisot, B. Badet, Tetrahedron Lett., 1998, **39**, 2571.
- [7] C. Le Camus, A. Chassange, M.-A. Badet-Denisot, B. Badet, Tetrahedron Lett., 1998, **39**, 287.
- [8] F. Massiere, M.-A. Badet-Denisot, Cell. Mol. Life Sci., 1998, **54**, 205.
- [9] A. Basak, A. Boudreault, A. Chen, M. Chretien, C. Lazure, J. Pept. Sci., 1995, **1**, 385.
- [10] M. Badet-Denisot, L. René, B. Badet, Bull. Soc. Chim. Fr., 1993, **130**, 249–255.
- [11] B. Badet, P. Vermoote, P. Y. Haumont, F. Lederer, F. Le Goffic, Biochemistry, 1987, **26**, 1940.
- [12] P.J. Winterburn, C. Phelps, Biochem. J., 1971, **121**, 721.
- [13] M.-A. Denisot, F. Le Goffic, B. Badet, Arch. Biochem. Biophys., 1991, **266**, 225.
- [14] B. Badet, M.A. Badet-Denisot, B. Rene, Bull. Soc. Chim. Fr., 1993, **130**, 155

- [15] C. Leriche, M.A. Badet-Denisot, B. Badet, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 1797.
- [16] H. Zalkin, *Meth. Enzymol.*, 1985, **113**, 263.
- [17] R. Andruszkiewicz, H. Chmara, E. Borowski, *J. Antibiot.*, 1984, **37**, 1479.
- [18] S.L. Bearne, *J. Biol. Chem.*, 1996, **271**, 3052.
- [19] R. Andruszkiewicz, H. Chmara, S. Milewski, T. Zieniawa, E. Borowski, *J. Med. Chem.*, 1990, **33**, 2755.
- [20] R. Andruszkiewicz, H. Chmara, T. Zieniawa, E. Borowski, *Eur. J. Med. Chem.*, 1994, **29**, 61.
- [21] S. Auvin, O. Cochet, N. Kucharczyk, F. Le Goffic, B. Badet, *Bioorg. Chem.*, 1991, **19**, 143.
- [22] H. Chmara, *Biochim. Biophys. Acta* 1984, **787**, 45.
- [23] M.-A. Lacoste, L. Rene, B. Badet, *Bull. Soc. Chim. Fr.* 1993, 130, 249.
- [24] M. Wojciechowski, J. Mazerski, E. Borowski, *J. Enzyme Inhib.*, 1995, **10**, 17.
- [25] S. Milewski, D. Kuszczak, R. Jędrzejczak, R.J. Smith, A.J.P. Brown, G.W. Gooday, *J. Biol. Chem.*, 1999, **274**, 4000.
- [26] B. Walker, M.F. Brown, J.F. Lynas, S.L. Martin, A. McDowell, B. Badet, A.J. Hill, *Bioorg. Med. Chem.*, 2000, **10**, 2795.
- [27] S. Milewski, H. Chmara, E. Borowski, *Drugs Expl. Clin.* 1986, **12**, 577.
- [28] F. Massiere, M.-A. Badet-Denisot, B. Badet, *J. Am. Chem. Soc.* 1997, **119**, 5748.
- [29] S. Milewski, H. Chmara, E. Borowski, *Arch. Microbiol.*, 1986, **145**, 234.
- [30] H. Chmara, H. Zähler, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1984, **45**, 787.
- [31] H. Chmara, H. Zähler, E. Borowski, *J. Antibiot.*, 1984, **37**, 1038.
- [32] H. Chmara, *J. Gen. Microbiol.*, 1985, 131, 265.
- [33] E. Borowski, *Acta Biochim. Polonic.*, 1957, 4, 231.
- [34] H. Chmara, M. Smulkowski, E. Borowski, *Drugs Exptl. Clin. Res.*, 1980, 6, 7.
- [35] M.J. Crossley, A. Stamford, W. Aust., *J. Chem.* 1993, **46**, 1443.
- [36] J.E. Baldwin, R.M. Adlington, M.B. Mitchell, *Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1993, 1332.
- [37] H. Chmara, R. Andruszkiewicz, E. Borowski, *Biochim. Biophys. Acta*, 1986, **870**, 357.
- [38] H. Chmara, R. Andruszkiewicz, E. Borowski, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 1984, **120**, 865.
- [39] R. Andruszkiewicz, H. Chmara, S. Milewski, E. Borowski, *Int. J. Pept. Protein. Res.* 1986, **27**, 449.
- [40] R. Andruszkiewicz, H. Chmara, S. Milewski, L. Kasprzak, E. Borowski, *Pol. J. Chem.*, 1993, **67**, 673.
- [41] R. Andruszkiewicz, S. Milewski, E. Borowski, *J. Enzyme Inhib.*, 1995, **9**, 123.
- [42] N. Kucharczyk, M.A. Badet-Denisot, F. Le Goffic, B. Badet, *Biochemistry*, 1990, **29**, 3668.
- [43] R. Andruszkiewicz, H. Chmara, T. Zieniawa, E. Borowski, *Eur. J. Med. Chem.*, 1994, **29**, 109.
- [44] M. Tarnowska, S. Oldziej, A. Liwo, Z. Grzonka, E. Borowski, *Eur. Biophys. J.*, 1992, **21**, 273.
- [45] R. Cooper, A.C. Horan, F. Gentile, V. Gullo, D. Loebenberg, J. Marquez, M. Patel, M.S. Puar, I. Truumees, *J. Antibiot.*, 1988, 41, 13.
- [46] R. Andruszkiewicz, T. Zieniawa, *J. Antibiot.*, 1994, **47**, 13.
- [47] S. Milewski, R. Andruszkiewicz, L. Kasprzak, J. Mazerski, F. Mignini, E. Borowski, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1991, **35**, 36.
- [48] R. Andruszkiewicz, H. Chmara, S. Milewski, E. Borowski, *J. Med. Chem.*, 1987, **30**, 1715.
- [49] R. Andruszkiewicz, S. Milewski, T. Zieniawa, E. Borowski, *J. Med. Chem.*, 1990, **33**, 132.
- [50] M.A. Denisot, F. Le Goffic, B. Badet, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1991, **266**, 225.
- [51] R.J. Smith, S. Milewski, A.J.P. Brown, G.W. Goodway, *J. Bacteriol.*, 1996, **178**, 2320.
- [52] M.-A. Badet-Denisot, C. Leriche, B. Badet, R.A.A. Muzzarelli, *Chitin Enzymology.*, 1993, 161.
- [53] R. Andruszkiewicz, R. Jędrzejczak, T. Zieniawa, M. Wojciechowski, E. Borowski, *J. Enzyme Inhib.*, 2000, **15**, 420.
- [54] R. Andruszkiewicz, Zieniawa T., A. Walkowiak, *J. Inhib. Med. Chem.*, 2005, **20**, 115.

- [55] A. Walkowiak, R. Wakieć, M.M. Bontemps-Gracz, R. Andruszkiewicz, J. Enzyme Inhib. Med. Chem., 2005, **20**, 439.
- [56] Milewski, H. Chmara, Biochim. Biophys. Acta., 1992, **225**, 1115.
- [57] G. Shiorii, T. Yamadam, Chem. Pharm. Bulletin, 1974, **22**, 859.
- [58] S. Friedrich-Bochnitscheh, H. Walkmana, H. Kunz, J. Org. Chem., 1989, **54**, 751–758.
- [59] N. Ono, T. Hamada, T. Sato, Bull.Chem. Soc. Japan, 1978, **51**, 2401.
- [60] D. Zgódka, R. Jędrzejczak, S. Milewski, E. Borowski, Bioorg. Med. Chem., 2001, **9**, 931.

Praca wpłynęła do Redakcji 25 maja 2010

5',8-CYKLO-2'-DEOKSYADENOZYNA. PODWÓJNE USZKODZENIE W OBRĘBIE POJEDYNCZEGO NUKLEOZYDU/NUKLEOTYDU

5',8-CYCLO-2'-DEOXYADENOSINE. TANDEM LESION OF SINGLE NUCLEOSIDE/NUCLEOTIDE

Bolesław T. Karwowski

*Zakład Biofarmacji, Katedra Biofarmacji,
Wydział Farmaceutyczny Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
ul. Muszyńskiego 1, 90-151 Łódź
e-mail: Bolek.Karwowski@wp.pl*

Abstract

1. Wstęp
 - 1.1. Reaktywne formy tlenu
 - 1.2. Solwatacja DNA
 - 1.3. Promieniowanie jonizujące
 - 1.4. Uszkodzenia kwasów nukleinowych
2. 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyna
 - 2.1. Częstotliwość występowania 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyny w komórkach
 - 2.1.1. Konwersja (5'S)-cdA do (5'R)-cdA pod wpływem UV
 - 2.1.2. Stabilność wiązania glikozydowego w cdA
 - 2.2. Mechanizm powstawania cdA
 - 2.3. Struktura przestrzenna cdA
 - 2.3.1. Moment dipolowy i rozkład ładunków w 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozynie
 - 2.3.2. Potencjał jonizacji i powinowactwo elektronowe 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyny
 - 2.4. Wpływ cdA na strukturę przestrzenną ss-DNA
 - 2.5. Wpływ (5'S)-cdA na mechanizmy naprawcze DNA

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

dr Bolesław T. Karwowski, adiunkt w Zakładzie Biofarmacji UM w Łodzi. W 1992 roku ukończył studia na Wydziale Farmaceutycznym Akademii Medycznej w Łodzi. W 2002 roku uzyskał tytuł doktora nauk chemicznych w Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi. W 2006 uzyskał Habilitation à Diriger des Recherches z zakresu nauk farmaceutycznych na Uniwersytecie J. Fouriera w Grenoble, Francja. Był beneficjentem stypendiów: Rządu Duńskiego (1999 r.), Japan Science Technology Agency (2003/04 r.) oraz Unii Europejskiej *im. Marii Curie* (2004/06 r.).

ABSTRACT

Free radicals can react with different biomolecules present in the cells such as lipids, sugars or nucleic acid peptides. These free radicals initiate reactions with DNA or RNA molecules and then can lead to changes in the genome sequence. These mutations are most probably responsible for a number of different diseases (involving a change in the genome sequence) or, at least, can accompany them.

Reactive oxygen species and more specifically – hydroxyl radical can react with DNA molecules and lead to changes in their structures. Formation of radicals at C5' and C8 atoms of 2'-deoxyadenosine leads, through intramolecular cyclisation, to 5',8-cyclo-2'-deoxyadenosine (**cdA**) derivatives.

Frequency of DNA damage occurrence surges with an increase of an ionizing radiation dose. Different repair systems are however present in cellular machinery: BER, which exploits glycosylase and NER – a more complex process involving the removal of damaged oligonucleotides. The later is the basic mechanism for removal the 5',6-cyclo-2'-deoxynucleosides and 5',8-cyclo-2'-deoxynucleosides like **cdA**.

Their defective activity may be responsible for many types of diseases, such as Parkinson, Alzheimer, chronic hepatitis, HCV, atopic dermatitis and different types of cancer.

The mechanistic, structural and biochemical studies presented in this work produce quite clear answer as to the approximate range level of the (**5'R**)-**cdA** and (**5'S**)-**cdA** accumulation in the genome after the lesion period.

Using quantum chemistry methods (DFT) paths of the cyclisation reaction have been determined. From the structural analysis point of view, it has been demonstrated that the covalent bond between C(5') and C(8) in nucleoside induces an unusual *West* conformation of the furanose ring. Based on the NMR data analysis it can be postulated that the rigid and fixed structure of **cdA** can strongly influence the global geometry of oligonucleosides. Moreover, using the quantum mechanic study of double strand DNA it has been demonstrated that the presence of (**5'S**)-**cdA** provokes a “*domino effect*” extending towards the 5'-end of the strand with this lesion. No domino effect is observed for the 3'-end. The obtained biological results indicate that the presence of (**5'S**)-**cdA** in the complementary strand to the strand under repair on the 5'-end side is the critical factor for the inhibition of the BER process of DNA.

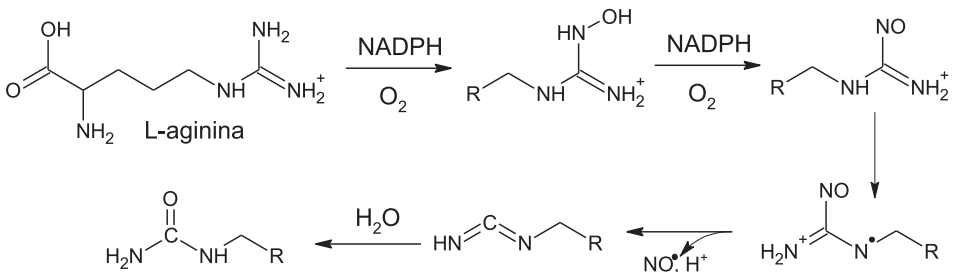
Keywords: DNA damage, 5',8-cyclo-2'-deoxyadenosine, free radicals, reactive oxygen species, ionisation radiation

Słowa kluczowe: uszkodzenia DNA, 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyna, wolne rodniki, reaktywne formy tlenu, promieniowanie jonizujące

1. WSTĘP

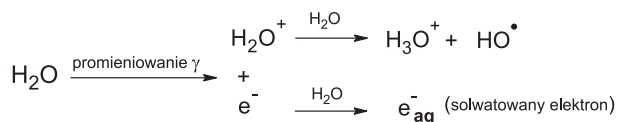
1.1. REAKTYWNE FORMY TLENU

Każda komórka ludzkiego ciała jest w sposób ciągły narażona na działanie reaktywnych form tlenu (RFT) [1]. Szacuje się, że w pojedynczej komórce w ciągu doby inicjowanych jest około $1,5 \times 10^5$ procesów utleniania, spowodowanych przez różne rodniki tlenowe [2]. RFT mogą być generowane nie tylko przez źródła zewnętrzne takie jak: promieniowanie jonizujące (UV, gamma(γ), rentgenowskie), zanieczyszczenia środowiska, środki lecznicze, lecz również przez procesy wewnątrzkomórkowe np.: reakcje katalizowane jonami metali (Fe, Cu, Cr), przemiany energetyczne zachodzące w mitochondriach lub jako formy obronne organizmu podczas zwalczania różnego rodzaju infekcji (neutrofile, makrofagi). Do reaktywnych form tlenu zalicza się [3]: O_2^- (anionorodnik ponadtlenkowy) oraz sprzężony z nim HO_2^{\cdot} (rodnik wodoronadtlenkowy), $\cdot OH$ (rodnik hydroksylowy), 1O_2 (tlen singletowy), O_3 (ozon), H_2O_2 (nadtlenek wodoru) oraz NO^{\cdot} (tlenek azotu) powstający w wyniku tleno-zależnych przemian L-argininy [4] (Rys. 1).



Rysunek 1. Reakcja degradacji L-argininy prowadząca do powstawania tlenu azotu NO^{\cdot}
 Figure 1. Degradation reaction of L-arginine leading to NO^{\cdot} formation

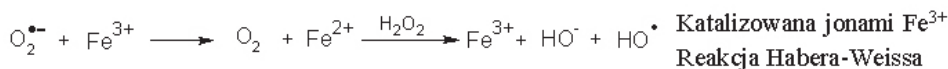
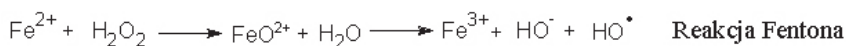
Na szczególną uwagę zasługuje reaktywny rodnik hydroksylowy powstający w wyniku radiolizy wody pod wpływem promieniowania jonizującego o różnej energii [5] (Rys. 2), jako produkt reakcji Habera-Weissa katalizowanej jonami metali [6] lub jako produkt uboczny metabolizmu ksenobiotyków [7] (Rys. 3).



Rysunek 2. Powstawanie rodnika hydroksylowego w wyniku radiolizy wody

Figure 2. Formation of hydroxyl radical during water radiolysis

Rozszczępienie wiązania H–O w H₂O wymaga użycia źródła generującego energię o wartości co najmniej 498 kJ/mol (10,56 eV) [8]. Dla przykładu energia dysocjacji wiązania H–CH₃ wynosi 438 kJ/mol [8]. Reakcja Habera-Weissa katalizowana jonami metali jest połączeniem dwóch procesów: reakcji przeniesienia jednego elektronu z jonu metalu (reakcja Fentona [9]) oraz przeniesienia jednego elektronu z anionorodnika ponadtlenkowego (reakcji Habera-Weissa [10]) (Rys. 3). Ten ostatni proces charakteryzuje się niską wartością stałej szybkości reakcji, rzędu 1–2 M⁻¹s⁻¹ co znacznie zmniejsza jego znaczenie dla procesów wolnorodnikowych prowadzących do powstania uszkodzeń w obrębie kwasów nukleinowych [11]. Natomiast stała szybkości powstawania ·OH w reakcji katalizowanej jonami Fe³⁺ wynosi 70 M⁻¹s⁻¹ [12].



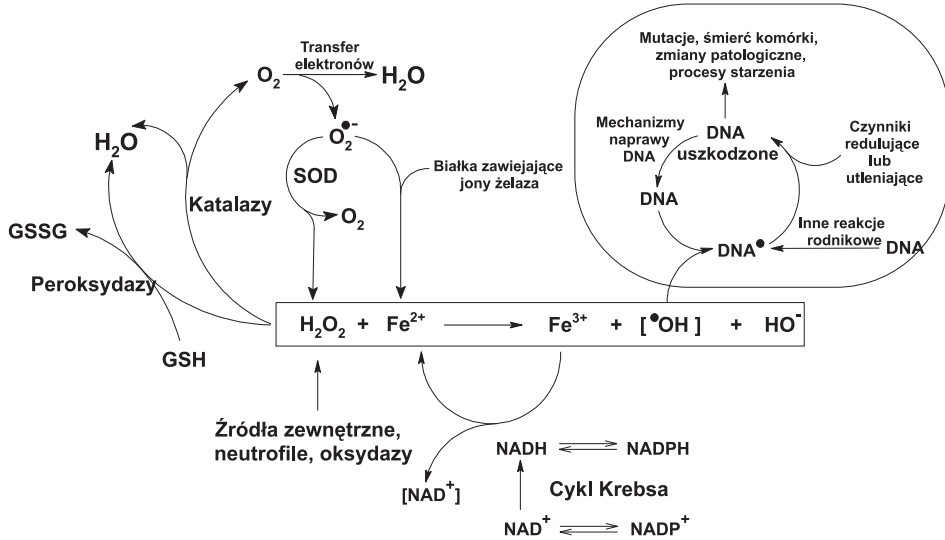
Rysunek 3. Schemat reakcji Fentona oraz Habera-Weissa z i bez katalizowania jonami metali

Figure 3. The scheme of Fenton and Haber-Weiss reactions with and without metal ion catalysis

Rodnik hydroksylowy jest jednym z najsilniejszych środków utleniających, jego potencjał utleniania wynosi 2,8 V. Dla porównania potencjał ten dla H₂O₂ waha się pomiędzy 0,87 V a 1,8 V, w zależności od wartości pH [13]. Ponadto stała szybkości reakcji ·OH z jonami Fe²⁺ wynosi 3,2 × 10⁸ M⁻¹s⁻¹ i jest ona o rząd wielkości większa niż dla reakcji z H₂O₂ (3,3 × 10⁷ M⁻¹s⁻¹) [14]. Dane te jednoznacznie wskazują, iż pojawienie się rodnika hydroksylowego w środowisku komórki może prowadzić do wielu przypadkowych niepożądanych reakcji z ważnymi makrocząsteczkami jak peptydy, oligonukleotydy, lipidy powodując ich modyfikację (Rys. 4).

Jednakże, w trakcie procesu ewolucji organizmy wytworzyły mechanizmy obronne zapobiegające pojawieniu się niepożądanych reaktywnych form tlenu wewnątrz komórki. Należą do nich enzymy np.: (a) dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), obecna zarówno w komórkach prokariotycznych jak i eukariotycznych (jej biosynteza kontrolowana jest przez poziom O₂⁻) [15], (b) peroksydaza glutationowa, zawierająca

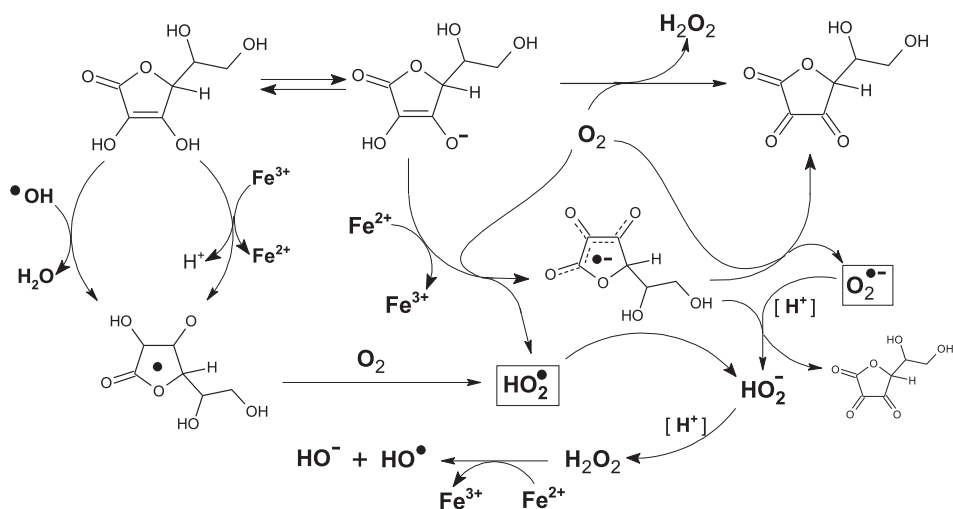
w swym centrum aktywnym jon selenu, katalizująca rozkład H_2O_2 do H_2O [16], c) peroksydaza hemowa [17], d) katalaza [18].



Rysunek 4. Powstawanie rodnika hydroksylowego (reakcja Habera-Weissa katalizowana jonami żelaza), a uszkodzenia DNA

Figure 4. Hydroxyl radical formation versus DNA damage (Haber-Weiss reaction with metal ion catalysis)

Odmianą grupę molekuł biorących udział w usuwaniu wolnych rodników stanowią tzw. nieenzymatyczne antyoksydanty, małe cząsteczki przekształcające RFT w ich nieaktywne formy, jednocześnie same ulegając wzbudzeniu. Jako znaczące przykłady można wymienić: kwas askorbinowy, α -tokoferol, glutation, karotenoidy, flawonoidy [19]. Należy podkreślić, iż stosowanie antyoksydantów musi być dostosowane do wieku organizmu np. wykorzystywanie witamin C i E przez komórki ludzkie zmienia się w różnych fazach życia [20]. Ponadto należy podkreślić, iż układ: „siły obronne organizmu” vs „wolne rodniki” utrzymywany jest w stanie delikatnej równowagi, której naruszenie może prowadzić do niepożądanych efektów. Przykładem może być stosowanie nadmiernych ilości witaminy C w codziennej diecie np. razem z preparatami zawierającymi żelazo lub inne jony metali przejściowych. Zestawienie takie może potencjalnie prowadzić do powstawania reaktywnych form tlenu [21] (Rys. 5). Obserwacje te przeprowadzone przez Halliwell i Gutteridge potwierdzają tezę von Hohenheima: *Alle Dinge sind Gift, und nichts ist ohne Gift. Allein die Dosis macht, daß ein Ding kein Gift ist*[22] (Wszystko jest trucizną i nic nie jest trucizną, tylko dawka czyni, że dana substancja jest trucizną).



Rysunek 5. Prooksydacyjne i antyoksydacyjne właściwości witaminy C
Figure 5. Prooxidative and antioxidant properties of vitamin C

Zwiększone stężenie reaktywnych form tlenu jest najczęściej związane z czynnikami patogennymi takimi jak palenie papierosów, niedokrwienie, wysoka temperatura, zamrażanie, toksyny, promieniowanie jonizujące, infekcje, ciężki wysiłek fizyczny, uszkodzenia ciała. Zaburzenie równowagi RFT/antyoksydanty może prowadzić do powstania stresu oksydacyjnego, w wyniku którego reaktywne formy tlenu i ich metabolity po niezaplanowanej śmierci komórki wydostają się do przestrzeni międzykomórkowej uszkadzając sąsiadujące komórki [23]. W przeciwieństwie do procesu nekrozy proces apoptozy indukowany przez RTF nie stanowi zagrożenia – w procesie tym następuje stopniowe wygaszanie funkcji komórki [24].

Szczególnie niebezpieczne jest uwolnienie zawartości mitochondriów, peroksysomów, mikrosomów, w których zgromadzone są znaczne ilości H₂O₂ oraz innych reaktywnych form tlenu. Mitochondria wytwarzają około 2–3 nmoli nadtlenków na minutę na miligram białka [25]. Źródłem ich powstawania są procesy związane z reakcjami przeniesienia elektronu, w wyniku których około 5% zaabsorbowanego tlenu ulega konwersji najpierw do O₂^{•-} a następnie do H₂O₂ [26]. Większość komórek w fizjologicznych warunkach przekształca około 2% pobranego tlenu w nadtlenek wodoru. Na uwagę zasługuje fakt, iż w warunkach hipoksji w mikrosomach wytwarzane jest około 80% całkowitej ilości H₂O₂ powstającego w komórce [27]. Peroksysomy odpowiedzialne są natomiast za wytwarzanie H₂O₂ w warunkach fizjologicznych. Powyższe organella są oddzielone od cytozolu nieprzepuszczalnymi dla RFT barierami, skutecznie zapobiegającymi wydostaniu się ich do światła komórki. Jednakże, ze względu na brak ładunku oraz długi czas życia H₂O₂, obserwuje się jego „przeciekanie” przez błony organelli [28]. Ponadto H₂O₂ wykazuje zdolność migrowania daleko od miejsca powstania. Ze względu na swoją małą reaktywność nadtlenek wodoru sam nie stanowi większego zagrożenia dla biolo-

gicznie ważnych makrocząsteczek komórki. Jednakże, w sprzyjających warunkach (takich jak pojawienie się jonów metali przejściowych, rodników, promieniowania jonizującego) H_2O_2 może stać się prekursorem rodnika hydroksylowego (Rys. 3 i 4).

Jony metali np. Fe^{3+} niezbędne do przeprowadzenia reakcji Habera-Weissa (Rys. 3) występują w niezmienionej komórce w formie związanej z białkami stanowiącymi na przykład magazyn jonów żelaza (ferrytyna) bądź wchodząc w strukturę centrum aktywnego enzymów [29]. Uwolnienie ich może nastąpić w wyniku reakcji pomiędzy układem $nFe-mS$ a O_2^- [30]. Omawiany proces dezaktywacji anionorodnika ponadtlenkowego zachodzi według schematu:



ze stałą szybkości reakcji rzędu $10^8-10^9 M^{-1}s^{-1}$ [31] z następczym uwolnieniem Fe^{2+} . Należy podkreślić, że enzymy zawierające klastry $[4Fe-2S]$ ulegają dezaktywacji w wyniku tego procesu (np.: fumaraza A i B, akonitaza), natomiast fumaraza C posiadająca układ $[Fe-S]$ jest w tych warunkach stabilna.

Innym źródłem jonów metali biorących udział w reakcji powstawania RFT mogą być np. drobniny azbestu zawierającego sole żelaza. Po wnikięciu do organizmu zostają one otoczone przez neutrofile i makrofagi, które rozkładają je przez wydzielanie reaktywnych form tlenu (H_2O_2) co przy jednoczesnej obecności jonów Fe^{2+} lub Fe^{3+} prowadzi do niekontrolowanego uwolnienia dużych ilości wolnych rodników [32]. Powstałe pod wpływem $\cdot OH$ uszkodzenia makromolekuł mogą indukować zmiany nowotworowe. Azbest jest drugą po dymie tytoniowym przyczyną powstawania raka płuc [33]. Oprócz przyczyn zewnętrznych związanych z rozwojem cywilizacyjnym, również niezależne procesy chorobowe mogą prowadzić do nagromadzenia w organizmie nadmiernych ilości wolnych jonów metali przejściowych w organizmie. Jako przykład można podać, iż u osób cierpiących na hemochromatozę pochodzenia genetycznego obserwuje się podwyższony poziom wolnego żelaza we krwi, któremu towarzyszy zwiększona zapadalność na nowotwory wątroby [34, 35]. Również zbyt wysokie poziomy jonów żelaza obserwuje się w schorzeniach neurodegeneracyjnych: chorobie Parkinsona, Huntingtona, Alzheimera [36]. Również podwyższone stężenie wolnych jonów metali można obserwuje się w procesach niedokrwienych tkanek (np. serca) lub u pacjentów cierpiących na choroby genetyczne (np. zespół Downa) [30, 37, 38]. Odmienne, zahamowanie wchłaniania jonów miedzi a tym samym obniżenie jej stężenia w organizmie pacjentów chorych na różnego typu nowotwory złośliwe przez TTM (*ammonium tetrathiomolybdate*), prowadziło do ograniczenia wzrostu komórek zmienionych oraz ich propagacji do miejsc odległych w trakcie prowadzonej chemioterapii [39].

Podsumowując, jednoczesne uwolnienie jonów metali przejściowych (Fe, Cu, Cr) oraz nadtlenku wodoru do światła komórki może prowadzić do powstania niezwykle reaktywnego rodnika hydroksylowego (Rys. 3). W przeciwieństwie do H_2O_2 , $\cdot OH$ jest krótko żyjącą formą RTF, jego czas istnienia w środowisku reakcji określa się na około 10^{-9} s [40]. Oznacza to, iż rodnik ten może reagować ze znajdującymi

się w bezpośrednim sąsiedztwie biomolekułami: białkami, lipidami, kwasami nukleinowymi. Stała szybkości reakcji dla addycji $\cdot\text{OH}$ do podwójnego wiązania wynosi $3\text{--}10 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, natomiast stała szybkości procesu abstrakcji protonu przez rodnik hydroksylowy wynosi $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [41].

1.2. SOLWATACJA DNA

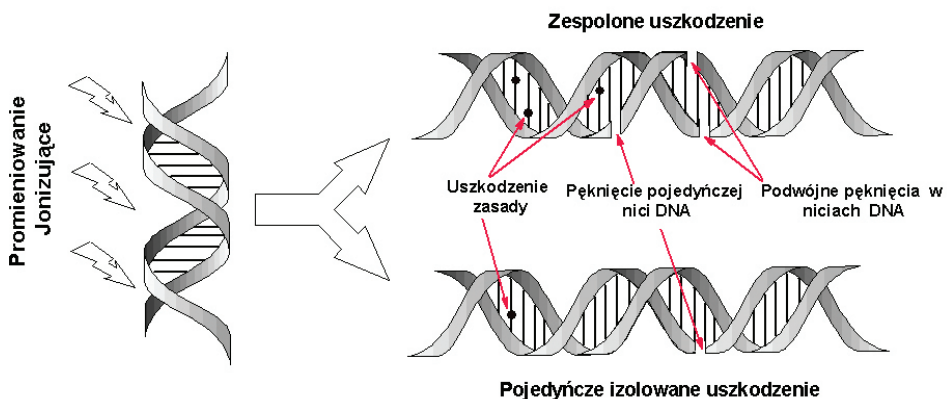
DNA jest jedną z najbardziej istotnych biomolekuł komórki. W jego strukturze zapisana jest informacja genetyczna gwarantująca przetrwanie danego gatunku. Dlatego też w trakcie ewolucji komórki zostały wyposażone w odpowiednie narzędzia zapewniające stabilność informacji genetycznej. Należy podkreślić, iż celem zmian ewolucyjnych nie było wydłużenia czasu życia organizmów lecz zapewnienie przetrwania i przekazania materiału genetycznego w formie niezmienionej organizmom potomnym [21].

Kwasy nukleinowe zbudowane są z podjednostek nukleozydowych połączonych ze sobą wiązaniami fosforanowymi. Każdy nukleozyd zawiera w swojej budowie resztę cukrową połączoną wiązaniem glikozydowym z jedną z zasad purynowych lub pirymidynowych. Dwuniciowe DNA (ds-DNA) zbudowane jest z komplementarnych łańcuchów nukleotydowych ułożonych antyrównolegle względem siebie. Zasady nukleinowe skierowane do wewnątrz podwójnej helisy tworzą między sobą wiązania wodorowe: trzy pomiędzy cytozyną i guaniną oraz dwa pomiędzy adeniną i tymidyną, determinując w ten sposób drugorzędową strukturę DNA [42]. Ponadto, dwuniciowa struktura stabilizowana jest przez zewnętrzne cząsteczki wody tworzące tak zwany szkielet hydratacyjny [43]. Przyjmuje się, że na pojedynczy nukleotyd zawarty w genomie przypada średnio 18–19 cząsteczek wody dla formy B-DNA, natomiast dla formy A-DNA ilość ta jest mniejsza i wynosi około 13–14. Ponadto w zależności od tworzonych przez zasady par, w formie B-DNA, występują różnice w wiązaniu cząsteczek H_2O (pary CG wiążą 27, a pary AT 44 cząsteczki wody) [44]. Stabilność sekwencji zasad nukleinowych w łańcuchu DNA decyduje o poprawnej replikacji materiału genetycznego, transkrypcji RNA, odpowiada pośrednio za syntezę oraz strukturę różnego rodzaju białek. Pojawienie się zmian w komplementarności zasad zwykle prowadzi do powstania zmian w informacji genetycznej [45]. Inicjowanie mutacji może być spowodowane zarówno przez czynniki endogenne (np. reaktywne formy tlenu) jak i przez czynniki zewnętrzne np.: chemiczne (związki alkilujące), farmakologiczne (talidomid), fizyczne (promieniowanie jonizujące). Oddziaływanie ich z DNA może prowadzić do: uszkodzenia zasad nukleinowych, reszt cukrowych, utworzeniu połączeń kowalencyjnych pomiędzy komplementarnymi niciami DNA bądź w obrębie tej samej nici [46].

1.3. PROMIENIOWANIE JONIZUJĄCE

Dla procesu powstawania uszkodzeń w obrębie DNA niezwykle istotny jest czynnik fizyczny, gdyż wszystkie komórki podlegają ciągłej ekspozycji na różnego rodzaju promieniowanie jonizujące: (ultrafioletowe (UV: A – 380–320 nm, 3,3–3,9 eV; B – 320–290 nm, 3,9–4,3 eV; C – 290–190 nm, 4,3–6,5 eV) rentgenowskie (promieniowanie X: 100 eV–100 keV), gamma (γ) (100 keV–10 MeV), beta (β) (15 keV–3000 keV), alfa (α) (3 MeV–5 MeV). W zależności od wartości energii jaką jest ono obdarzone wyróżnia się dwa rodzaje promieniowania: 1) Low-LET (ang. *Linear Energy Transfer*) przyjmujące wartości poniżej 10 keV/mm (protony, promieniowanie γ i X) oraz 2) High-LET przyjmujące wartości powyżej 10 keV/mm (cząsteczki α , ciężkie jony). Oddziaływanie ich z makromolekułami komórkowymi może prowadzić do różnych efektów biologicznych i biochemicznych [47–50].

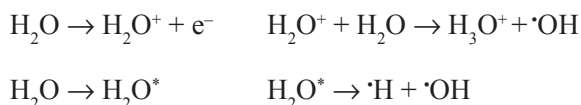
Zasięg promieniowania High-LET szacuje się na około 90 mm od miejsca rozpadu promieniotwórczego pierwiastka. Ekspozycja komórek na tego typu radiację, prowadzi do powstania w niewielkim obrębie genomu tzw. miejsc zwielokrotnionych uszkodzeń – *multiply damaged sites* (MDS) lub *clustered damage* (Rys. 6). Przyjmuje się, iż w wyniku pojedynczego rozpadu promieniotwórczego o energii High-LET może zostać utworzonych do około 25 uszkodzeń w obrębie jednego lub dwóch skrętów helisy DNA. W wyniku jego działania powstają znaczne ilości uszkodzeń takich jak SSB (ang. *single strand brake*), DSB (ang. *double strand brake*) w genomie, jednakże pojawiają się one tylko w obrębie przemieszczania się np.: cząstek i są one efektem ich bezpośredniego oddziaływania z DNA. Należy zaznaczyć, iż pojedyncze bądź podwójne pęknięcia w dwuniciowym DNA mogą być wynikiem działania zarówno Low- jak i High-LET, jednakże częstotliwość ich występowania jest o około 1,8–4,4 razy większa dla promieniowania o energii z zakresu 50–160 keV/mm niż dla Low-LET.



Rysunek 6. Izolowane i zespolone typy uszkodzeń DNA powstałe pod wpływem promieniowania jonizującego

Figure 6. Isolated and clustered types of DNA damage formed under ionisation radiation

W odróżnieniu od promieniowania High-LET promieniowanie o niższych energiach prowadzi do jonizacji środowiska komórkowego, poprzez propagację efektów jonizacji. Przyjmuje się, iż w wyniku jednego rozpadu promieniotwórczego o energii Low-LET może być generowane około 10 modyfikacji w obrębie jednego lub dwóch skrętów helisy ds-DNA. Jednakże, utworzone uszkodzenia zasad nukleinowych, reszt cukrowych, SSB, DSB, kowalencyjne połączenia DNA-DNA czy addukty DNA-białko nie są bezpośrednim wynikiem promieniowania jonizującego o małej energii, lecz skutkiem powstania w wyniku radiolizy wody rodników hydroksylowych. Ze względu na niską energię jonizacji, cząsteczki wody mogą ulegać różnym przemianom pod wpływem promieniowania (Rys. 7) [51a].



Rysunek 7. Reaktywne produkty radiolizy wody

Figure 7. Highly reactive species appearing during water radiolysis

Radiolizę H_2O można zapisać schematycznie (w nawiasach podane są wartości wydajności radiolizy w mmol/J)[51b] jako: $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{e}_{\text{aq}}^- (0,27) + \cdot\text{OH} (0,28) + \cdot\text{H} (0,062)$.

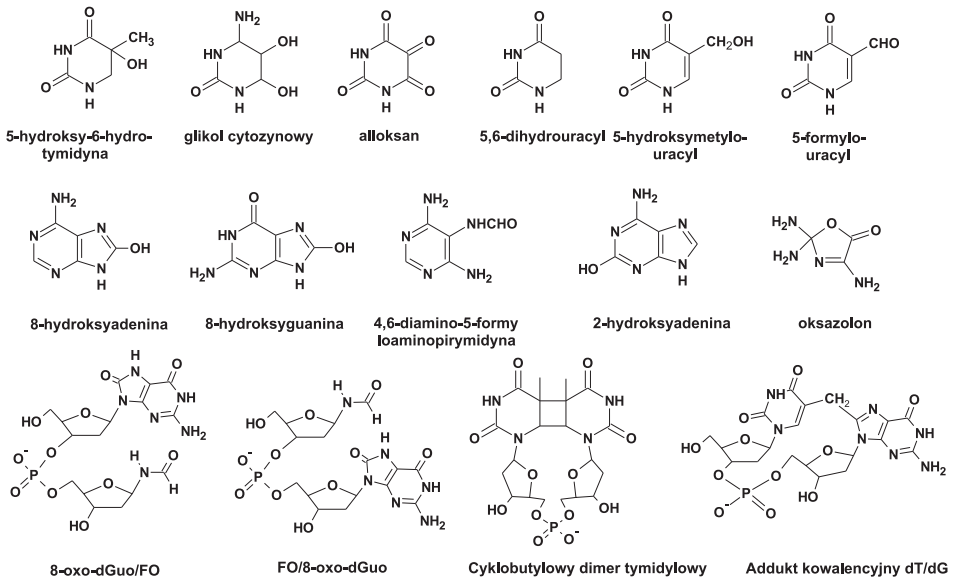
Powstałe produkty radiolizy H_2O w bezpośredniej bliskości zasad nukleinowych bądź reszt cukrowych nukleotydów mogą reagować z nimi prowadząc do generowania różnego typu uszkodzeń [49].

1.4. USZKODZENIA KWASÓW NUKLEINOWYCH

W rozważaniach nad powstawaniem RFT i ich wpływem na fizjologię komórki ludzkiej należy zwrócić uwagę na promieniowanie jonizujące (pochodzące z różnych źródeł) powszechnie stosowane w medycynie: radio- i foto-terapia, diagnostyka obrazowa w tym rentgenografia, scyntygrafia, *etc.* Podkreślenia wymaga również fakt, iż dla lepszego uwidocznienia zmian patologicznych narządów w diagnostyce obrazowej często stosowane są kompleksy metali (kontrasty), takich jak: Tc, Cu, Fe, Mn, Gd [52]. Jony tych pierwiastków mogą powodować wzrost stężenia wolnych rodników w komórce poprzez katalizowanie reakcji Habera-Weissa (Rys. 3). Drugorzędowa struktura kwasów nukleinowych stabilizowana jest przez otoczkę solwatacyjną, dlatego też powstanie $\cdot\text{OH}$ w bezpośredniej bliskości DNA jest wysoce niepożądane bez względu na to czy jego źródłem inicjacji jest promieniowanie jonizujące czy reakcja Habera-Weissa katalizowana jonami metali przejściowych, uwolnionymi do światła komórki z różnych źródeł.

Rodnik hydroksylowy może reagować z nukleozydami/nukleotydami w dwojaki sposób: poprzez addycję do podwójnego wiązania lub poprzez abstrakcję protonu zarówno z reszty cukrowej jak i zasadowej. Do chwili obecnej zweryfikowano

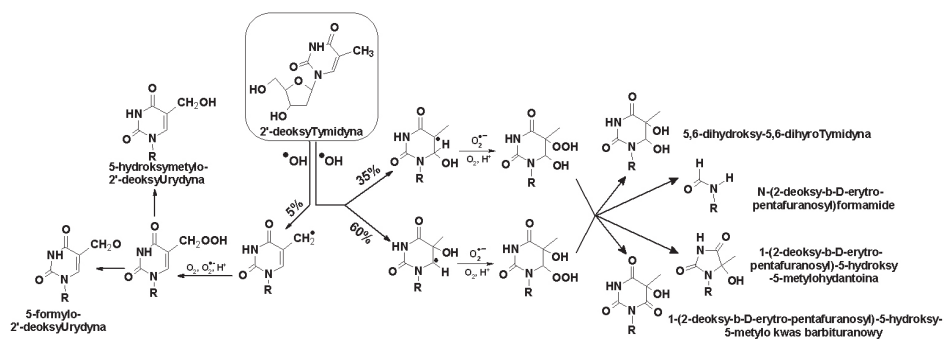
około 70 różnych uszkodzeń DNA obejmujących zarówno modyfikację w części 2-deoksyrybozy jak i w części purynowej lub pirymidynowej [47]. Powstałe w DNA zmiany mogą powodować inicjację różnego rodzaju mutacji będących przyczynami wielu schorzeń [53]. Addycja $\cdot\text{OH}$ do podwójnego wiązania w zasadach nukleinowych prowadzi do powstania na przykład: glikolu tymidylowego lub cytydylowego, 8-okso-2'-deoksyguanozyny (8-oxo-dGuo) (Rys. 8) [54]. Natomiast w wyniku abstrakcji jednego z protonów w obrębie zasady powstają między innymi 5-(hydroksymetylo)-2'-deoksyurydina czy 5-formylo-2'-deoksyurydina (Rys. 8) [54, 55]. Przykładowe różnice pomiędzy produktami addycji do podwójnego wiązania i abstrakcji protonu z części zasadowej nukleozydu/nukleotydu prezentuje Rysunek 9.



Rysunek 8. Przykładowe modyfikacje zasad nukleinowych powstałe w wyniku reakcji z RFT lub w wyniku bezpośredniego działania promieniowania jonizującego

Figure 8. Examples of nucleic acid base damages formed by ROS or during direct ionization radiation

Powstałe w ten sposób modyfikacje w obrębie kwasów nukleinowych są usuwane z ich struktur głównie przez mechanizm wycięcia zasady (Base Excision Repair - BER) pojedynczej (Short Patch - SP) lub całego fragmentu nukleotydowego zawierającego od 2 do 12 zasad, (Long Patch - LP) [56]. Przyjmuje się, iż większość modyfikacji (około 90%) jest naprawiana przez SP-BER [20]. Również tak zwane podwójne uszkodzenia zasad (tandem base damage) FO(formyloamino)/8-oxo-dGua i 8-oxo-dGua/FO (Rys. 8), powstałe w wyniku reakcji pomiędzy odpowiednim rodnikiem tymidylowym lub cytydylowym a atomem węgla C8 przyległej guanozyny, ulegają wycięciu przez system BER [57].

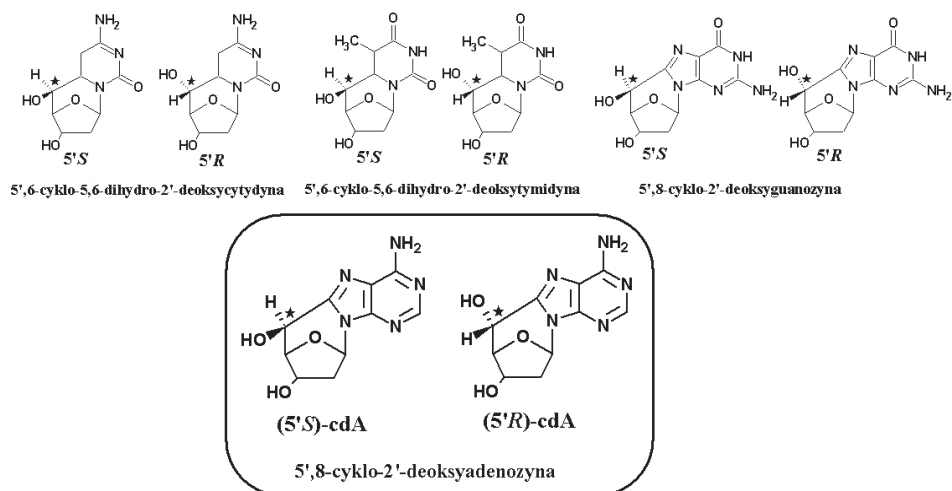


Rysunek 9. Produkty addycji wolnego rodnika hydroksylowego do podwójnego wiązania lub abstrakcji protonu przez $\cdot\text{OH}$ z części zasadowej tymidyny [54]

Figure 9. Products of hydroxyl radical addition to double bond of thymine or proton abstraction from thymine aromatic ring by $\cdot\text{OH}$

Do grupy podwójnych uszkodzeń należą również: dimery cyklobutylowe pirymidyn, kowalencyjne addukty pomiędzy atomem C8 guaniny a atomem C5 lub grupą metylową tyminy [58–61] (Rys. 8). Ze względu na znacznie ograniczoną rotację wokół wiązania glikozydowego są one eliminowane z genomu przez skomplikowany system NER (ang. *Nucleotide Excision Repair*), rozpoznający zmiany w geometrii przestrzennej ds-DNA. W trakcie procesu NER wycinany jest fragment zawierający co najmniej 20 zasad nukleinowych. Osobną grupę modyfikacji stanowią produkty reakcji abstrakcji jednego z protonów 2-deoksyrybozy prowadzące, w większości przypadków, do powstania pęknięcia łańcucha (ang. *single strand brake*, SSB) DNA lub do rozszczepienia wiązania glikozydowego, pomiędzy resztą cukrową a zasadą purynową (C1'-N9) lub pirymidynową (C1'-N1) [62]. Ze względu na swoją specyfikę pęknięcia DNA lub produkty depurynacji/depurymidynacji) mogą być naprawiane przez BER, NER, NIR (ang. *Nucleotide Inscison Repair*) a także przez homologiczne i niehomologiczne łączenie końców [63].

Odmianą, bardzo interesującą grupę uszkodzeń w obrębie genomu stanowią cyklonukleotydy (**cdN**): 5',6-cyklo-5,6-dihydro-2'-deoksytymidyna [64], 5',6-cyklo-5,6-dihydro-2'-deoksycytydina [65] oraz 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyna (**cdA**) [66] i 5',8-cyklo-2'-deoksyguanozyna [67], będące produktami reakcji wolnorodnikowych w obrębie nukleotydy/nukleozydów, inicjowanymi przez $\cdot\text{OH}$ (Rys. 10). Na uwagę zasługuje fakt, iż atom węgla 5'C jest w nich atomem chiralnym, w przeciwieństwie do naturalnych nukleozydów. **CdN** ze względu na jednoczesną modyfikację reszty cukrowej i zasady nukleinowej należą do grupy podwójnych uszkodzeń DNA.

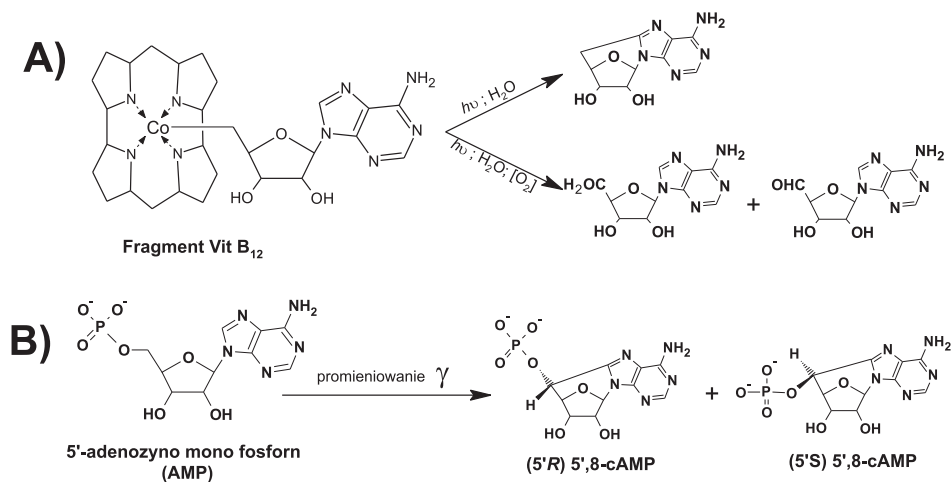


Rysunek 10. Graficzne przedstawienie struktur 5',6-cyklo-2'-deoksyprymidyn i 5',8-cyklo-2'-deoksy puryn z zaznaczeniem nowopowstałego centrum chiralnego na atomie węgla 5'C

Figure 10. Graphical representation of 5',6-cyclo-2'-deoxypyrimidine and 5',8-cyclo-2'-deoxypurine structures with new chiral center indication

2. 5',8-CYKLO-2'-DEOKSYADENOZYNA

Pochodna cykliczna 5',8-cyklo-5'-deoksyadenozyna została po raz pierwszy zaobserwowana jako produkt degradacji witaminy B12 (cyjanokobalaminy) w 1961 przez Shawna i in. [68]. Sugerowali oni, iż w warunkach beztlenowych pod wpływem promieniowania UV następuje degradacja witaminy B12 z jednoczesnym utworzeniem cyklicznej pochodnej adenozyzny. Natomiast w obecności tlenu nie obserwowali oni pochodnej cyklicznej, lecz odpowiednie kwasowe lub aldehydowe pochodne adenozyzny (Rys. 11A). Wyniki te zostały potwierdzone przez Hogenkampa w 1963 r. [69]. Po raz pierwszy 5',8-cyklo-adenozyna, jako produkt degradacji nukleotydów, została zaobserwowana przez Kecka podczas radiolizy roztworu wodnego AMP promieniami gamma w warunkach beztlenowych [70] (Rys. 11B).



Rysunek 11. Powstawanie 5',8 cyklicznych nukleozydów/nukleotydu w wyniku degradacji witaminy B₁₂ (A) oraz AMP (B)

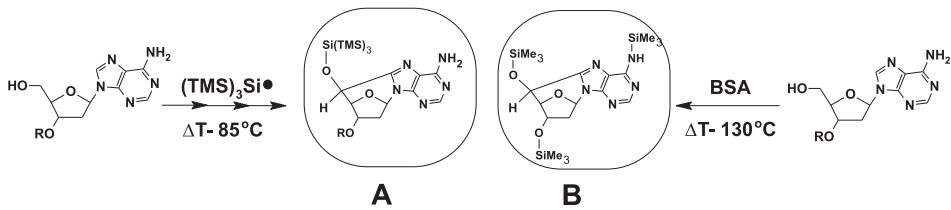
Figure 11. Formation of 5',8 cyclic nucleosides/nucleotides during vitamin B₁₂ (A) and AMP (B) radiation

Dalsze prace prowadzone nad uszkodzeniami kwasów nukleinowych doprowadził do zidentyfikowania w 1976 r przez Mariaggiego i in. 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyny jako produktu degradacji promieniowaniem γ 2'-deoksyadenozyny [71]. Jednakże, dopiero dziesięć lat później, w 1986 r, Dizdaroglu i in. wykazali powstawanie **cdA** jako produktu radiacji DNA [72].

2.1. CZĘSTOTLIWOŚĆ WYSTĘPOWANIA 5',8-CYKLO-2'-DEOKSYADENOZYNY W KOMÓRKACH

Uszkodzenia kwasów nukleinowych są dogodnymi markerami procesów patologicznych np. wzrost poziomu 8-oxo-dG obserwowany jest w chorobach nowotworowych i jest on proporcjonalny do rozmiaru powstałego guza [73]. Fizjologiczny poziom 8-oxo-dG dla monocytów (wyznaczony na podstawie wyników analiz techniką HPLC-MS/MS) wynosi około 0,5–1 modyfikacji na 10⁶ zasad w DNA [74]. Mimo ciągłego rozwoju technik analitycznych właściwe oznaczenie ilości powstających uszkodzeń w DNA na poziomie jednej modyfikacji na 10⁷ zasad nukleinowych w 30 μ g kwasu nukleinowego, nadal stanowi wyraźny problem. Obecnie najbardziej popularne techniki charakteryzują się czułością detekcji na poziomie: HPLC/ECD 1 \times 10⁻⁵ w 25–50 μ g materiału DNA, HPLC-MS/MS 10⁻⁵–10⁻⁶ w 30–40 μ g materiału DNA, GC/SIM-MS 1 \times 10⁻⁵ w 50–100 μ g materiału DNA. Obiecującą metodą wydaje się być połączenie techniki HPLC ze znakowaniem radioaktywnym fosforem (³²P) materiału przeznaczanego do badania, czułość wykrywania uszkodzeń w genomie dla takiego układu szacuje się na poziomie 1 \times 10⁻⁷ dla 1–5 μ g materiału [55]. Jednakże, z uwagi na stosowanie pierwiastków promieniotwórczych,

wymagana jest specjalistyczna aparatura badawcza oraz odpowiednio przygotowane laboratorium. Należy podkreślić, iż istotny problem, podczas determinacji ilości uszkodzeń w DNA, stanowi określenie poziomu podstawowego (background) badanych modyfikacji powstających w trakcie przygotowywania materiału biologicznego do analiz (ekstrakcja, reakcje enzymatyczne, działanie buforów, temperatury, UV) [75]. Problem ten był obserwowany w przypadku oznaczania zawartości **cdA** w komórkach techniką GC/MS. Początkowo metodą tą określono ilość powstającego **cdA** w genomie na poziomie 10^{-2} , był on znacznie wyższy niż oznaczony dla 8-oxo-dG [73, 55]. Późniejsze prace wykazały, iż podczas przygotowania materiału do badań **cdA** powstaje z częstotliwością około 10^{-4} [76]. Tak wysoki poziom oznaczeń poziomu podstawowego był spowodowany koniecznością poddawania DNA procesowi derywatywacji, poprzedzającemu wykonanie właściwych analiz techniką GC/MS. Dokonuje się tego przez przeprowadzenie analizowanych związków w ich pochodne silylowe. Jednakże, otrzymane produkty silylowania mogą ulegać reakcjom rodnikowym w temperaturze stosowanej podczas chromatografii gazowej, prowadząc do utworzenia pochodnych cyklicznych **cdA**, tym samym zaburzając wynik pomiaru (Rys. 12). Należy zauważyć, iż jedna z metod otrzymywania 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyny opracowana przez Navacchia i in. oparta jest na reakcjach rodnikowych pochodnych silylowych **dA** [77].



Rysunek 12. Powstawanie 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyny w trakcie: A – syntezy oraz B – analizy GC/MS (BSA: bis(trimetylosililo)trifluoroacetamid)

Figure 12. Formation of 5',8-cyclo-2'-deoxyadenosin: A – chemical synthesis, B – GC/MS analysis

Zastosowanie techniki analitycznej HPLC-MS pozwoliło na oszacowanie ilości 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyny w komórkach grasicy płodów i noworodków szczurzych na poziomie 1200 **cdA**/komórkę [78]. Natomiast dla komórek wątroby wartość ta wynosiła 120–320 **cdA**/komórkę i została oznaczona techniką dwuwymiarowej chromatografii cienkowarstwowej ze znakowaniem materiału ^{32}P [79]. Szacuje się, że pojedyncza komórka zawiera 12×10^9 nukleotydów. Dane te wskazują, że częstość występowania 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyny jest zależna od pochodzenia tkankowego komórek.

Dalszy rozwój technik analitycznych pozwolił na określenia częstości występowania tej modyfikacji na poziomie $1,33 \times 10^{-8}$ (**5'R**)-**cdA** i $4,8 \times 10^{-8}$ (**5'S**)-**cdA** w komórkach wątroby szczurzej (do oznaczeń wykorzystano HPLC-MS/MS z zastosowaniem wzorców wewnętrznych **cdA** znakowanych ^{15}N) [80]. Wartości te są prawie dwukrotnie większe dla DNA wyizolowanego z komórek grasicy cielęcej

i wynoszą odpowiednio $4,0 \times 10^{-8}$ (**5'R**)-cdA i $9,5 \times 10^{-8}$ (**5'S**)-cdA [81]. Badania przeprowadzone przez Jarugę i in. [81] potwierdziły wcześniejsze obserwacje: A – nierównomierność występowania tkankowego cdA, B – zawartość diastereoizomeru 5'S wydaje się być wyższa niż 5'R bez względu na zastosowaną technikę analityczną i rodzaj tkanki z jakiej materiał został pobrany (Tab. 1) [81–85].

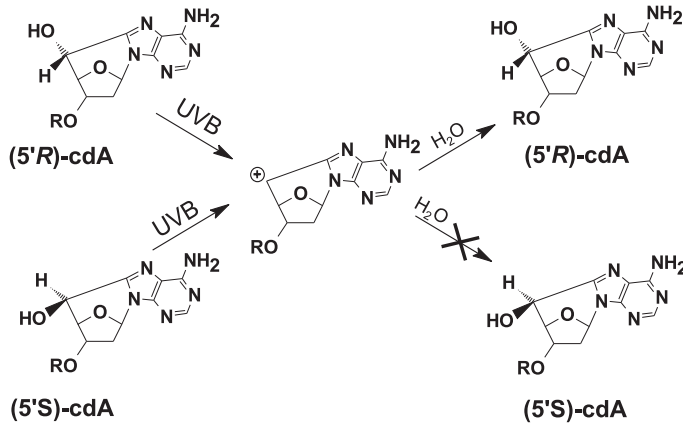
Tabela 1. Poziomy 5,8-cyklo-2'-deoksyadenozyny w różnych komórkach
Table 1 The level of 5',8-cyclo-2'-deoxyadenosin in different cells

cdA	Komórki mysie				Rybie skrzela [81]	Komórki ludzkie	
	Wątroba [82, 83, 81]		Grasica [81]			Rak piersi [84]	Krew [85]
5'R	$2,2 \times 10^{-8}$	–	$1,3 \times 10^{-8}$	$4,0 \times 10^{-8}$	----	----	----
5'S	$19,2 \times 10^{-8}$	$4,0 \times 10^{-8}$	$4,8 \times 10^{-8}$	$9,5 \times 10^{-8}$	$7,0 \times 10^{-8}$	$2,6 \times 10^{-8}$	$2,6 \times 10^{-8}$

Na uwagę zasługuje również fakt, iż izomer (**5'R**)-cdA powstaje w przeważającej ilości podczas radiacji promieniami gamma 2'-deoksyadenosyny w formie wolnej oraz związanej w ss-DNA, natomiast izomer (**5'S**)-cdA wydaje się być dominujący dla formy dwuniciowej DNA [86].

2.1.1. Konwersja (**5'S**)-cdA do (**5'R**)-cdA pod wpływem UV

Nie bez znaczenia na wyniki pomiaru częstotliwości występowania izomerów 5'R i 5'S wydają się obserwacje Mirandy i in. nad procesem transformacji izomeru (**5'S**)-cdA do (**5'R**)-cdA pod wpływem promieni słonecznych. Zaobserwowali oni pojawianie się dodatkowego sygnału, w analizie RP-HPLC odpowiadającego (**5'R**)-cdA, podczas naświetlania promieniowaniem UVB o długości fali $\lambda = 295\text{nm}$ roztworu (**5'S**)-cdA [86]. Odwrotny proces natomiast nie był obserwowany podczas fotoradiacji roztworu (**5'R**)-cdA (Rys. 13). Omawiana reakcja izomeryzacji może zachodzić zgodnie z mechanizmem opisanym dla fotolizy alkoholu benzyłowego [87]. Zakłada się, iż w pierwszym etapie diskutowanego procesu rozszczepieniu ulega wiązanie C–O w (**5'S**)-cdA z utworzeniem produktu pośredniego o charakterze 5'C karbokationu, który ulega następcej reakcji z H_2O . Energia heterolizy wiązania C–O wynosi 60 kcal/mol. Ponieważ atak cząsteczki wody lub innego rozpuszczalnika jest uprzywilejowany od strony mniej zawadzonej przestrzennej, preferowane jest tworzenie izomeru 5'R. Wydaje się zatem, iż brak przekształceń 5'R→5'S nie jest spowodowany wyższą energią aktywacji dla formy 5'R 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyny, lecz preferencją cząsteczki rozpuszczalnika do addycji od strony tlenu 4O w 2-deoksyrybozie (Rys. 13).

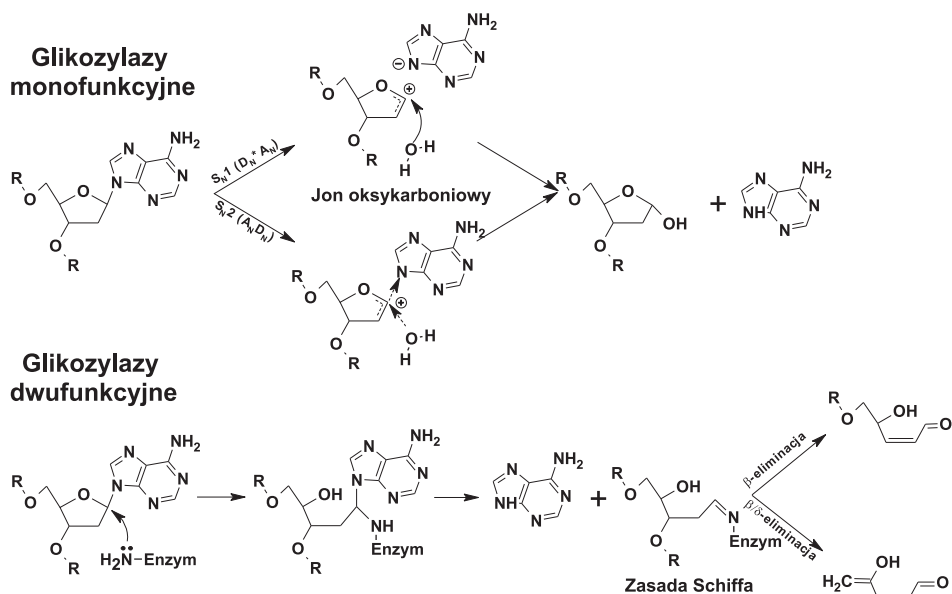


Rysunek 13. Mechanizm fotoizomerizacji pod wpływem promieniowania UV ($\lambda = 295$ nm) 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyny

Figure 13. The mechanism of 5',8-cyclo-2'-deoxyadenosin photoisomerisation under UV radiation ($\lambda = 295$ nm)

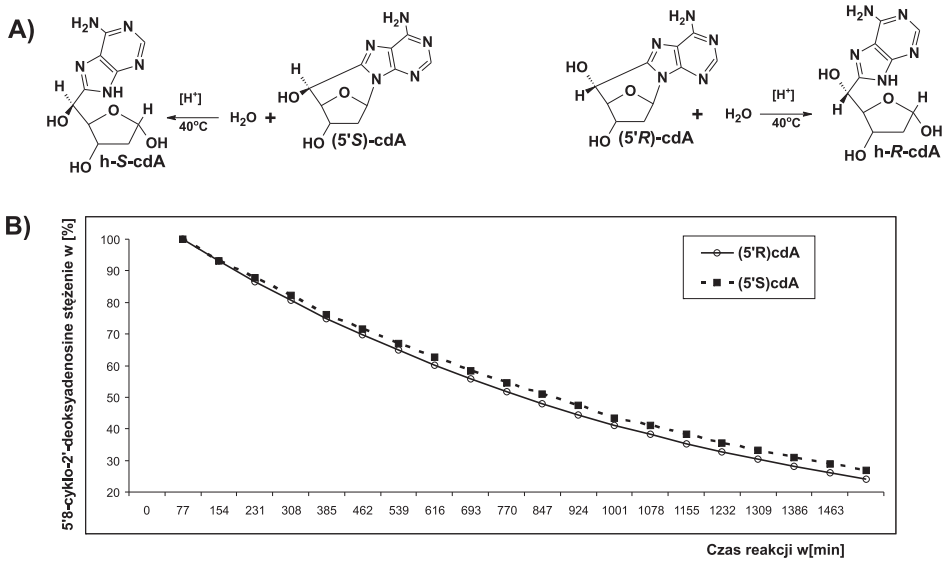
2.1.2. Stabilność wiązania glikozydowego w cdA

Kolejnym aspektem mogącym mieć wpływ na obserwowany poziom 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyny oraz jej skład diastereoizomeryczny w trakcie oznaczeń jest stabilność wiązania *N*-glikozydowego. W naturalnych nukleotydach purynowych wiązanie pomiędzy C1'-N9 jest około dziesięciokrotnie stabilniejsze niż w odpowiednich nukleozydach. Dodatkowo trwałość tego wiązania jest około 4 razy większa dla natywnej formy DNA niż dla jego formy zdenaturowanej [88]. Na uwagę zasługuje również fakt, iż wprowadzenie podstawnika metylowego w pozycję 7 guaniny zwiększa stabilność wiązania C1'-N9 (*N*7-metylo-2'-deoksyguanozyny jest około 25-krotnie trwalsza niż **dG**) [89]. Podobne wyniki zostały uzyskane dla pochodnej 8-okso-2'-deoksyadenozyny charakteryzującej się większą stabilnością niż 2'-deoksyadenozyna, w warunkach hydrolizy kwaśnej [89]. Natomiast hydroliza połączenia C1'-N9 jest dwudziestokrotnie szybsza w porównaniu z układem C1'-N1 w nukleozydach pirymidynowych. Obserwacje te świadczą o wpływie podstawników umieszczonych w obrębie zasad nukleinowych na stabilność wiązania glikozydowego. Proces depuracji/depirymidynacji, zarówno spontaniczny jak i wymuszony, prowadzi do powstania w DNA miejsc bezzasadowych (ang. *apurinic/apirymidinic site*, AP). Szacuje się, iż w ciągu doby w komórce generowane jest około 10^4 AP [90]. Istotnym źródłem powstawania AP jest aktywność hydrolityczna *N*-glikozylaz, enzymów rozpoznających zmodyfikowane zasady takie jak dU, 8-oxo-dG [89]. Powstałe w genomie produkty depuracji/depirymidynacji są naprawiane głównie przez system BER. Enzymy tego mechanizmu chronią w ten sposób materiał genetyczny komórki przed wprowadzeniem niechcianych modyfikacji wynikających z zaburzeń komplementarności zasad [91].



Rysunek 14. Mechanizm hydrolizy wiązania *N*-glikozydowego przez mono- i dwufunkcyjne glikozylazy
 Figure 14. Mechanism of *N*-glycosidic bond hydrolysis by mono- and bifunctional glycosylases

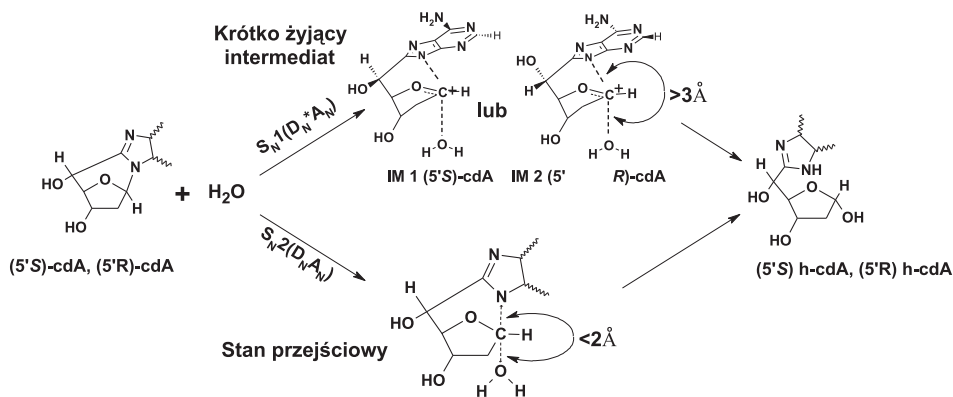
Wiązanie C1'-N1 lub C1'-N9 może być rozszczepiane w centrum aktywnym enzymu według jednego z trzech mechanizmów przedstawionych na Rysunku 14. Przy czym według mechanizm $D_N^*A_N (S_N1)$ lub $A_N D_N (S_N2)$ (A_N – nucleophile approach, D_N – leaving group departure, * – discret intermediat), z utworzeniem pośredniego jonu oksokarboniowego, hydroliza zachodzi w glikozylazach monofunkcyjnych. Natomiast, w glikozylazach dwufunkcyjnych, wykazujących aktywność zarówno glikolityczną, jak i endolityczną, reakcja przebiega z utworzeniem produktu pośredniego o strukturze zasady Schiffa [92] (Rys. 14). Ze względu na dodatkowe wiązanie pomiędzy atomami C5' i C8 w 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozynie nie jest ona substratem dla żadnej ze znanych glikozylaz, czego implikacją jest brak aktywności naprawczej ze strony BER w jej kierunku. Jednakże różnice w stabilności wiązania C1'-N9 pomiędzy izomerami 5'R i 5'S mogą mieć wpływ na częstotliwość ich występowania w natywnym DNA, jak również mogą mieć znaczenie dla wykonywanych oznaczeń zawartości **cdA** w materiale biologicznym. Jaruga i in. wykazali, iż (**5'S**)-**cdA** jest około 40 razy stabilniejsza od **da** w warunkach hydrolizy kwasowej (15% kwas mrówkowy) w temperaturze 37°C [89]. Należy podkreślić, iż w wyniku rozszczepienia wiązania glikozydowego w **cdA** nie następuje oddysocjowanie wolnej zasady nukleinowej od reszty cukrowej, jak to ma miejsce w przypadku **da** z utworzeniem AP (Rys. 14), lecz otwarcie sześciocząłowego pierścienia (C1'-O4'-C4'-C5'-C8-N9). W powstałych produktach reakcji **h-R-cdA** i **h-S-cdA** (Rys. 15A) adenina połączona jest nadal kowalencyjnym wiązaniem C5'-C8 z 2'-deoksyrybozą.



Rysunek 15. A) Schemat reakcji hydrolizy (**5'R**)-cdA i (**5'S**)-cdA oraz B). Profil zaniku cdA w trakcie reakcji hydrolizy 15% kwasem mrówkowym w temperaturze 40°C

Figure 15. A) Graphical representation of hydrolysis reaction of *N*-glycosidic bond of (**5'R**)-cdA and (**5'S**)-cdA, B). The profile of *N*-glycosidic cleavage of cdA in 15% formic acid at 40°C

Wiązanie *N*-glikozydowe może ulec rozerwaniu według mechanizmu $A_D^*D_N$ lub A_DN_A , w dyskutowanej reakcji (Rys. 14,16). Ponadto należy zauważyć, iż addycja cząsteczki wody do atomu węgla C1' może zachodzić od strony przeciwnej do atomu: N9, H1' lub O4'. Ze względu na dużą sztywność struktury cdA, najprawdopodobniejszy wydaje się jednak atak H_2O w kierunku atomu azotu N9 adeniny. Wyniki przeprowadzonych obliczeń metodami chemii kwantowej (QM), w fazie gazowej jak i wodnej, wykazały, iż omawiany proces przebiega według mechanizmu S_N1 [93]. W strukturze powstałych produktów przejściowych (**IM1** (**5'S**)-cdA i **IM2** (**5'R**)-cdA) obserwowano charakterystyczne dla procesu $A_D^*D_N$ odległości pomiędzy atomem tlenu z H_2O a atomem węgla C1' 2-deoksyrybozy oraz atomem węgla C1' i atomem azotu N9 grupy odchodzącej (Rys. 16). Przy czym intermedial **IM2** powstały z (**5'R**)-cdA obdarzony był niższą energią niż **IM1** utworzony z (**5'S**)-cdA, w środowisku wodnym. Przeprowadzone obliczenia QM wskazują, iż reakcja hydrolizy wiązania glikozydowego jest uprzywilejowana dla formy 5'R. Wyniki badań teoretycznych zostały potwierdzone przez wyniki przeprowadzonych eksperymentów, w których zarówno pochodna (**5'R**)-cdA jak i (**5'S**)-cdA poddane zostały reakcji hydrolizy 15% kwasem mrówkowym w temperaturze 40°C w czasie 24 godzin. Analiza, metodą RP-HPLC, produktów procesu degradacji wykazała, iż izomer 5'R ulegał szybszej hydrolizie niż 5'S (Rys. 15B) [93]. Można przypuszczać, iż obserwowane różnice w składzie diastereoizomerów R/S cdA są, w pewnym stopniu, wynikiem mniejszej stabilności wiązania *N*-glikozydowego w formie 5'R niż



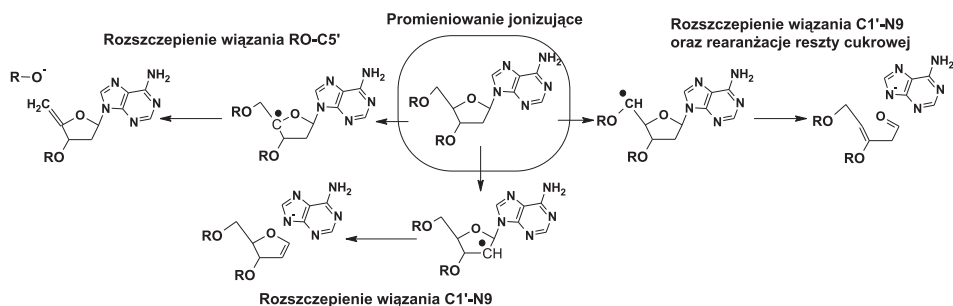
5'S 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyny.

Rysunek 16. Schemat dwóch możliwych mechanizmów reakcji hydrolizy wiązania glikozydowego w 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozynie

Figure 16. Two possible hydrolysis mechanisms of *N*-glycosidic bond present in 5',8-cyclo-2'-deoxyadenosin

2.2. MECHANIZM POWSTAWANIA CDA

Niski poziom obecności **cdA** w komórkach jest spowodowany specyficznym mechanizmem jej powstawania oraz warunkami w jakich reakcja cyklizacji może przebiegać. Zarówno (5'R) jak i (5'S) 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyna jest produktem reakcji pomiędzy **da** a rodnikiem $\cdot\text{OH}$. Należy zauważyć, iż żadna z innych reaktywnych form tlenu nie indukuje powstawania **cdA**. Jak zostało to przedstawione we wstępie, rodnik hydroksylowy powstaje w komórce w wyniku działania promieniowania jonizującego lub jako produkt reakcji Habera-Weissa katalizowanej jonami metali. Jego reakcja z **da** może prowadzić do abstrakcji jednego z protonów 2-deoksyrybozy bądź adeniny z następczym utworzeniem odpowiedniego rodnika. Schaeffer w swoich systematycznych badaniach teoretycznych metodami QM zaproponował następującą kolejność stabilności rodników powstałych w obrębie **da**: C1', C4', C5', C3', C2', N6, O5', O3', C2, C8 [62]. Przyjmuje się iż rodniki C (alifatyczne) są stabilniejsze od N (aminowych), O (hydroksylowych) oraz od C (aromatycznych). Należy jednak zauważyć, iż informacja genetyczna zapisana jest w strukturze ds-DNA, istniejącej w większości w formie B, w której ze względu na budowę przestrzenną podatność protonów na proces abstrakcji przez $\cdot\text{OH}$ jest następująca C1' < C2' < C3' < C4' < C5' [94]. Ponadto Sevilla w swoich pracach eksperymentalnych wykazał, iż w wyniku procesu jednoelektonowego utlenienia **da**, w środowisku o neutralnym pH, generowany jest głównie rodnik C5' [95]. Powstanie jednego z w/w rodników w obrębie nukleotydu/nukleozydu może prowadzić do rozszczepienia wiązania RO-C5', C1'-N9 lub do procesu depurynacji z jednoczesnym przegrupowaniem reszty cukrowej (Rys. 17) [62].

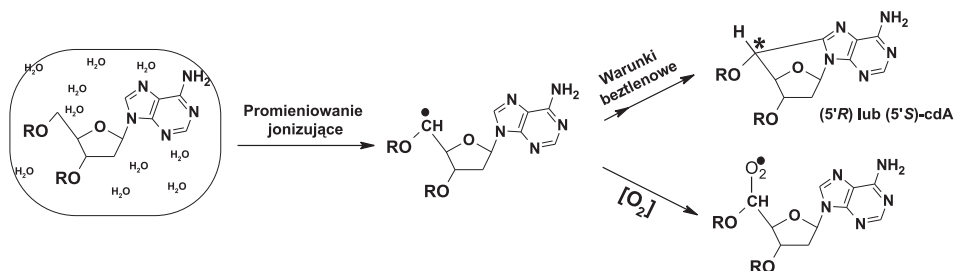


Rysunek 17. Przykładowe konsekwencje powstania rodnika w obrębie dA w DNA [63]

Figure 17. The consequence of different radical formation in dA in DNA structure

W 1988 roku Dirksen i in. zaproponowali, iż 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyna może powstawać w wyniku dwuetapowej reakcji. W pierwszej fazie procesu następuje abstrakcja jednego z protonów funkcji C5', przez $\cdot\text{OH}$, ze stałą szybkości reakcji $k_1 = 2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Rys. 18). W następnym etapie następuje atak powstałego 2'-deoksyadenozyno-5'-yl rodnika na atom węgla C8 adeniny w wyniku czego dochodzi do cyklizacji (stała szybkości tego procesu $k_2 = 1,6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [96].

Ze względu na relatywnie niską wartość k_2 proces ten może mieć miejsce tylko w środowisku beztlenowym. Stała szybkości reakcji addycji O_2 do rodnika C5' jest rzędu $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [97] i jest porównywalna ze stałą k_1 dla abstrakcji protonu przez $\cdot\text{OH}$. Należy podkreślić, iż w DNA mitochondrialnym nie znaleziono pochodnych 5',8-cyklo-2'-deoksyapurynowych lub 5',6-cyklo-5,6-dihydro-2'-deoksyprymidynowych ze względu na duże stężenia O_2 , który w tym przypadku pełni funkcję protekcyjną – jest inhibitorem reakcji cyklizacji. Wartym zaznaczenia jest fakt, iż w mitochondriach nie obserwuje się aktywności mechanizmu NER. Odmiennie w jądrze komórkowym poziom tlenu jest relatywnie niski, w związku z czym możliwe jest powstawanie **cdA** na drodze reakcji rodnikowych [98].

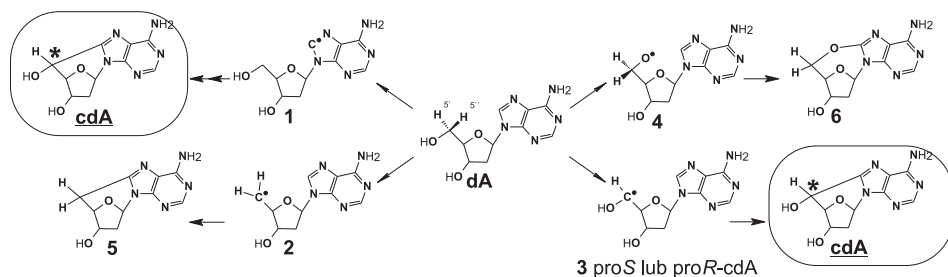


Rysunek 18. Schemat reakcji powstawania **cdA**

Figure 18. Scheme of **cdA** formation

Mechanizm powstawania **cdA** z 2'-deoksyadenozyny był przedmiotem badań zespołów Miaskiewiczza [99], Chatgialiloglu [96, 100], Erikssona [101]. Jednakże

prace te oparte były na obliczeniach QM prowadzonych tylko w fazie w gazowej lub dotyczyły tylko jednego izomeru. Należy zauważyć, iż pojedynczy nukleozyd czy nukleotyd charakteryzuje się bardzo dużą liczbą stopni swobody, która prowadzi do powstania 41 472 różnych konformerów [62]. Z punktu widzenia stereochemii reakcji cyklizacji geometria substratów wydaje się być niezwykle istotna np.: znaczącą rolę może odgrywać położenie grupy 5' hydroksylowej względem C3' (kąąt dwuścienny γ wyznaczony przez O5'-C5'-C4'-C3'). W wyniku rotacji wokół wiązania C4'-C5' najniższą energią charakteryzują się rotamery *gauche*(+), *trans*(t) i *gauche*(-) [102]. Można przyjąć, iż rotamer *trans* **dA** może być prekursorem (**5'R**)-**cdA**, a rotamer *gauche*(-) diastereoizomeru (**5'S**)-**cdA**. Natomiast, forma najbardziej stabilna *gauche*(+), ze względu na zbyt dużą barierę rotacji wokół wiązania C4'-C5', nie powinna być substratem w reakcji prowadzącej do powstania **cdA** [103]. Ze względu na dużą reaktywność rodnika hydroksylowego oraz przegrupowanie powstałych rodników w obrębie 2-deoksyrybozy i adeniny, hipotetycznie możliwe jest utworzenie czterech form rodnikowych **dA** (**1–4**, Rys. 19), będących prekursorami różnych związków cyklicznych ((**5'R**) i (**5'S**) 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyna (**cdA**), 5',8-cyklo-5',2'-dideoksyadenozyna(**5**) [97, 102, 103], O5',C8-cyklo-2'-deoksyadenozyna (**6**) [104]) przedstawionych na Rysunku 19.



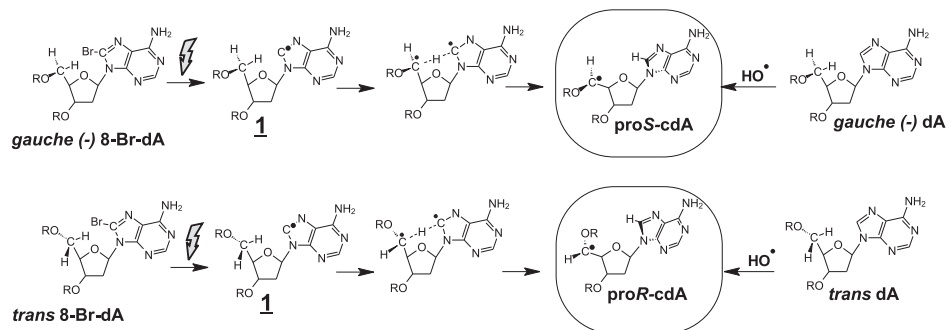
Rysunek 19. Formy rodnikowe **dA** oraz produkty reakcji cyklizacji

Figure 19. The different free radical forms of **dA** and products of their cyclization reaction

W odróżnieniu od **cdA** powstałe produkty cyklizacji **6** i **5** nie posiadają dodatkowego centrum asymetrii na atomie węgla C5'. Z powodu braku wolnej grupy 5' hydroksylowej nie mogą również uczestniczyć w procesie elongacji łańcucha DNA, nie są substratami dla enzymów typu ligaz bądź polimeraz. Powstanie ich w obrębie genomu, ze względu na terminację końca 5', wydaje się być wysoce toksyczne.

Jak to zostało przedstawione na Rysunku 19 do prekursorów pochodny cyklicznych **cdA** można zaliczyć rodniki **1** i **3**. Badania eksperymentalne nad mechanizmem powstawania **cdA** z 8-Br-dA (prowadzone przez Chatgililoglu i in. [96]) sugerowały, iż w pierwszym etapie reakcji następuje rozszczepienie wiązania Br-C z powstaniem **1**, który następnie ulega przegrupowaniu do rodnika **proS** lub **proR-cdA**. Stała szybkości reakcji tworzenia rodnika C5' z 8-Br-dA wynosi $k_3 = 1,6 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [96]. Badania teoretyczne tego procesu uwiaryściły, iż w przypadku pochodnych

nukleozydowych proces ten wymaga pokonania nieznaczącej bariery energetycznej dla utworzenia odpowiednich prekursorów **proS-** i **proR-cdA** (Rys. 20) [103]. Natomiast analogiczne obliczenia przeprowadzone dla pochodnych nukleotydydowych wykazały, iż reakcja przeniesienia rodniczka prowadząca do utworzenia prekursora **proR-cdA** jest zarówno w fazie gazowej jak i wodnej uprzywilejowana energetycznie [105]. W obydwu przypadkach wyniki obliczeń były zgodne z danymi eksperymentalnymi oraz z powszechnie przyjętym szeregiem stabilności pochodnych rodniczkowych **dA**.



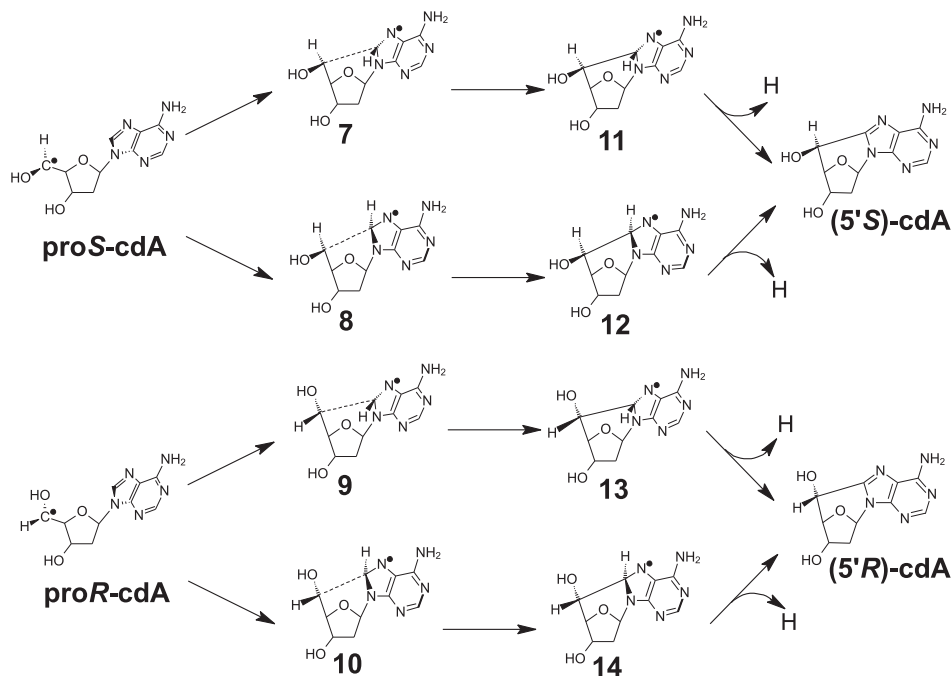
Rysunek 20. Schemat powstawania 2'-deoksyadenozyno-5'-yl rodników **proS** i **proR-cdA** w wyniku gamma radiacji 8-Br-dA lub reakcji **dA** z rodnikami hydroksylowymi

Figure 20. Formation of 2'-deoxyadenosine-5'-yl radicals **proS** and **proR-cdA** from 8-Br-dA under gamma radiation or as products of **dA** reaction with hydroxyl radicals

Podobne rezultaty uzyskano dla reakcji **dA** z rodnikiem hydroksylowym. W wyniku abstrakcji jednego z protonów funkcji CH₂ 5' powstaje produkt pośredni (omawianej reakcji cyklizacji) – **proS-cdA** lub **proR-cdA** (Rys. 20), w którym atom węgla C5' przyjmuje hybrydyzację *sp*². Z punktu widzenia termodynamicznego powstanie rodniczka 2'-deoksyadenozyno-5'-yl jest energetycznie uprzywilejowane w stosunku do rodniczka C8 **dA**. W przeciwieństwie do poprzedniego procesu reakcja cyklizacji C5'-C8 jest procesem stosunkowo wolnym – stała szybkości reakcji wynosi $k_4 = 1,6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [96]. Ze względu na stosunkowo długi czas życia rodników **proS** i **proR-cdA** do zaistnienia procesu cyklizacji wymagane są warunki bez-tlenowe.

Proces tworzenia **cdA** został przedstawiony na Rysunku 21. Kluczową rolę dla stereochemii reakcji cyklizacji odgrywa utworzenie stanu przejściowego **7–10**, w którym rodniczka skumulowany jest częściowo na C5' i C8, a pierścień 2-deoksyrybozy przyjmuje konformację O4'-*egzo* (*W-west*). Zarówno dla pochodnych nukleozydowych jak i nukleotydydowych produkty przejściowe **11–14**, w których nowo powstały sześcioczłonowy pierścień (C5'-C8-N9-C1'-O4'-C4') przyjmował konformację krzesła, były obdarzone najniższą energią. Ponadto w przypadku nukleozydów wydaje się, iż decydującą rolę w stereochemii reakcji odgrywa powstanie uprzywilejowanego energetycznie produktu przejściowego **proR-cdA** [103]. Natomiast

dla pochodnych nukleotydowych, zarówno w fazie wodnej jak i gazowej, każdy z etapów procesu prowadzący do powstania diastereomeru (**5'R**)-**cdA** jest energetycznie preferowany zarówno pod względem termodynamicznym jak i kinetycznym [105].



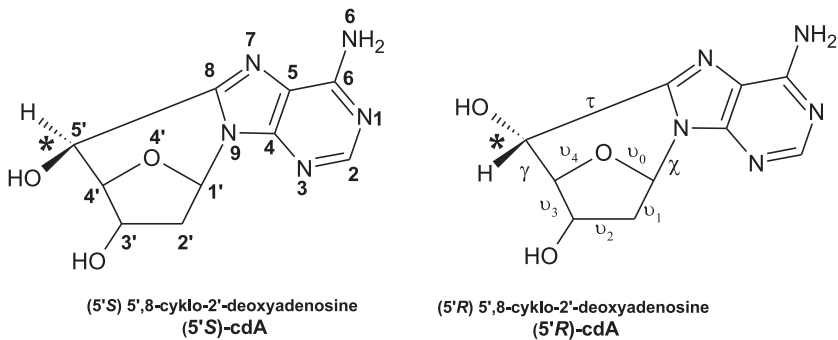
Rysunek 21. Graficzne przedstawienie możliwych kierunków reakcji cyklizacji prowadzącej do powstania 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyny

Figure 21. Graphical representation of different paths of cyclisation reaction leading to 5',8-cyclo-2'-deoxyadenosine

Na podstawie wyników badań teoretycznych można przypuszczać, iż niska częstotliwość występowania **cdA** w genomie komórki spowodowana jest: A – koniecznością przyjęcia przez pierścień 2-deoksyrybozy nieuprzywilejowanej konformacji O4'-*egzo* oraz B – małą szybkością reakcji cyklizacji C5'-C8. Ponadto badania QM przeprowadzone nad mechanizmem powstawania dwóch pozostałych cyklicznych pochodnych **dA**: 5',8-cyclo-5',2'-dideoksyadenozyny (**5**) i O5',C8-cyclo-2'-deoksyadenozyny (**6**) wykazały, iż proces cyklizacji prowadzący do ich powstania przebiegał według podobnego dwuetapowego mechanizmu [103–105].

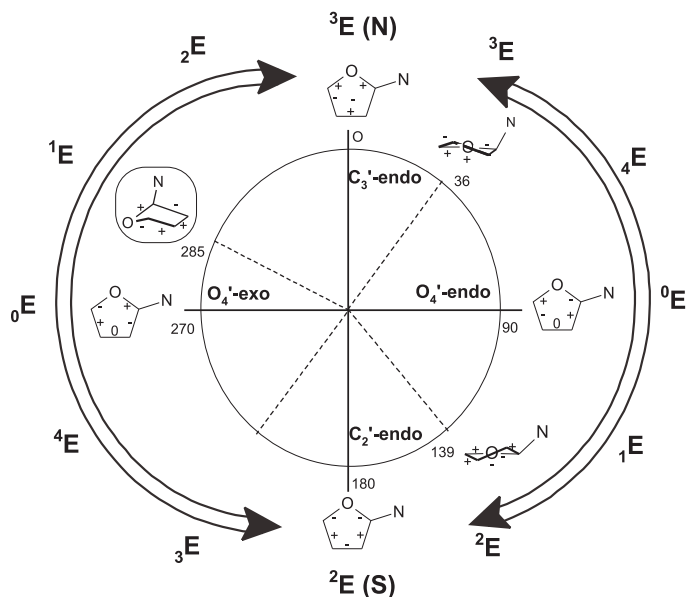
2.3. STRUKTURA PRZESTRZENNA CDA

Obecność dodatkowego wiązania pomiędzy atomami C5' a C8 w obrębie tego samego nukleozydu powoduje zahamowanie rotacji wokół wiązania glikozydowego (δ -C1'-N9) oraz wiązania pomiędzy C4'-C5' (γ) (Rys. 22). W wyniku tego pozycja adeniny w stosunku do reszty cukrowej zostaje „zamrożona” w układzie *anti*. Natomiast dla grupy 5' hydroksylowej, determinującej kierunek elongacji łańcucha DNA, dozwolone są dwa położenia w układzie *gauche(-)* lub *trans*. Dodatkowo pierścień 2-deoksyrybozy przyjmuje najmniej uprzywilejowaną konformację O4'-*egzo* (Rys. 23). W konformacji 0E atom C5' i atom C8 ulegają zbliżeniu na odległość 2,9 Å zajmując pozycje aksjalne, w **cdA** wartość ta zredukowana jest dodatkowo do około 1,5 Å. Natomiast w zrelaksowanej formie 0E odległość między tymi samymi atomami wynosi 4,6 Å [106]. Ponadto w przeciwieństwie do **cdA** w naturalnych nukleozydach reszta cukrowa ulega ciągłym przemianom w procesie pseudorotacji pomiędzy konformacją N i S [107]. Przy czym przejście 3E - 4E - 1E - 2E jest energetycznie uprzywilejowane w stosunku do 3E - 2E - 1E - 0E - 4E - 3E - 2E [43]. Ta elastyczność pierścieni 2-deoksyrybozy pozwala na zachowanie stabilności wiązań wodorowych w ds-DNA, dopasowanie się odpowiednich nukleotydotrifosforanów (NTP) do matrycowego oligonukleotydu, w procesie polimeryzacji, odpowiednie umieszczenie modyfikowanej zasady nukleinowej w centrum aktywnym glikozylazy, *etc.* Natomiast sztywna struktura **cdA**, w której reszta cukrowa obdarzona jest konformacją ${}^0T^1$ (bliższą 0E), skutecznie zaburza w/w procesy. Z danych eksperymentalnych wynika, iż inkorporacja (**5'S**)-**cdA** w strukturę ds-DNA obniża stabilność dupletu o około 6°C przez pojedynczą modyfikację [108]. Powoduje to również zaburzenie w stakingu zasad nukleinowych, tym samym ingerując w proces transferu elektronów/ładunków/rodników w obrębie ds-DNA [109].



Rysunek 22. Graficzne przedstawienie struktur (5'R) i (5'S) 5',8-cyko-2'-deoksyadenozyny z zaznaczeniem numeracji atomów oraz kątów torsyjnych: u_0 (C4'-O4'-C1'-C2'), u_1 (O4'-C1'-C2'-C3'), u_2 (C1'-C2'-C3'-C4'), u_3 (C2'-C3'-C4'-O4'), u_4 (C3'-C4'-O4'-C1'), t (C4'-C5';-C8-N9), c (O4'-C1'-N9-C4), d (C3'-C4'-C5'-O5')

Figure 22. Graphical representation of (5'R) and (5'S) 5',8-cyclo-2'-deoxyadenosine with main dihedral angles u_0 (C4'-O4'-C1'-C2'), u_1 (O4'-C1'-C2'-C3'), u_2 (C1'-C2'-C3'-C4'), u_3 (C2'-C3'-C4'-O4'), u_4 (C3'-C4'-O4'-C1'), t (C4'-C5';-C8-N9), c (O4'-C1'-N9-C4), d (C3'-C4'-C5'-O5')



Rysunek 23. Schemat cyklu pseudortacji pięciocłonowego pierścienia reszty cukrowej nukleozydów/nukleotydów

Figure 23. Scheme of pseudorotation cycle of five member sugar ring in nucleoside/nucleotide

2.3.1. Moment dipolowy i rozkład ładunków w 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozynie

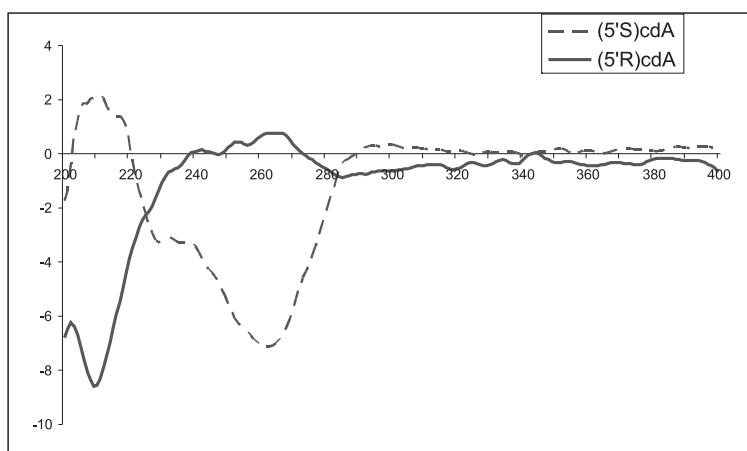
Usztywnienie struktury w **cdA** prowadzi do obniżenia momentu dipolowego (DM) dla formy *5'R* jak i *5'S*, w porównaniu z wartościami otrzymanymi dla **dA**. Badania metodami chemii kwantowej wykazały, iż wartości DM obliczone dla diastereizomeru (**5'R**)-**cdA** przyjmują większe wartości niż dla (**5'S**)-**cdA**, zarówno w fazie gazowej jak i wodnej (Tab. 2) [110]. Podobne trendy były obserwowane dla form **dA**; rotamer *gauche*(-) wykazywał mniejszą wartość niż rotamer *trans* 2'-deoksyadenozyny [110]. Dodatkowo wartości DM uzyskane w fazie wodnej były wyższe niż dla fazy gazowej. Należy podkreślić, iż momenty dipolowe dla (**5'R**)-**cdA** i **dA trans** były zbliżone w fazie gazowej w przeciwieństwie do wartości otrzymanych dla (**5'S**)-**cdA** i **dA gauche**(-). Wydaje się zatem, iż na wartość momentu dipolowego ma wpływ położenie grupy 5' hydroksylowej względem atomu tlenu O4' oraz sztywność struktury **cdA**. Sugestie te zostały potwierdzone przez dane eksperymentalne uzyskane techniką dichroizmu kołowego (CD) dla obydwu diastereoizomerów (Rys. 24). W widmie CD dla (**5'R**)-**cdA** obserwowano dodatnie maksimum przy $\lambda = 265$ nm natomiast dla formy (**5'S**)-**cdA** przy $\lambda = 260$ nm obserwowane było minimum [110]. Analiza rozkładu ładunku w obrębie *5'R* i *5'S* 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyny w formie neutralnej, kationowej i anionowej (wykonana przy pomocy obliczeń QM dla fazy gazowej) wykazała równomierną dystry-

bucję ładunku pomiędzy 2-deoksyrybozę a adeninę. Natomiast wyniki uzyskane w fazie wodnej dla formy anionowej wykazały kumulację ładunku ujemnego wyłącznie na części zasadowej nukleozydów [110]. Porównanie parametrów geometrycznych, rozkładu ładunku oraz DM, dla pochodnych (**5'R**)-cdA i (**5'S**)-cdA wskazuje, iż struktury tych cząsteczek są niewrażliwe na utratę lub pojawienie się dodatkowego ładunku w ich układzie. Jedyne zmiany geometryczne obserwowane były w obrębie egzoaminowej grupy N6 [111]. Dane te świadczą o wysokiej konserwatywności układu 5',8-cyklo-2'-deoksyapurynowego.

Tabela 2. Wartości momentów dipolowych w Debajach dla adeniny, 2'-deoksyadenozyny i 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyny

Table 2. The value of dipole moment in Debays of 2'-deoxyadenosine and 5',8-cyclo-2'-deoxyadenosine

Adenina			5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyna				
Wartość eksperymentalna [112]		2,27	Faza gazowa		Faza wodna		
DFT B3LYP/DZP++ [113]		2,51	Forma neutralna				
DFT B3LYP/6-311++G**			5'R	5'S	5'R	5'S	
Faza wodna	3,62	Faza gazowa	2,46	3,99	1,99	6,44	4,14
2'-deoksyadenozyna [110]			Forma anionowa				
DFT B3LYP/6-311++G**Faza wodna / Faza gazowa			5'R	5'S	5'R	5'S	
<i>gauche</i> (+)	<i>Trans</i>	<i>gauche</i> (-)	4,92	4,30	10,46	8,52	
7,36 / 5,18	8,56 / 4,24	7,21 / 4,22	Forma kationowa				
DFT B3LYP/DZP++ Faza gazowa [113]		2,39	5'R	5'S	5'R	5'S	
			7,77	7,11	9,51	9,42	



Rysunek 24. Widmo CD dla (**5'R**) i (**5'S**) 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyna [110]

Figure 24. CD spectra of (**5'R**) and (**5'S**) 5',8-cyclo-2'-deoxyadenosine [111]

2.3.2. Potencjał jonizacji i powinowactwo elektronowe 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyny

Jedną z przyczyn powstawania uszkodzeń w obrębie ds-DNA jest migracja elektronów/rodników, powstałych w wyniku procesu radiacji, pomiędzy zasadami nukleinowymi. W swoich pracach Giese i Schuster wykazali, iż elektron może być przeniesiony w ds-DNA na odległości około 100 Å [114]. Na uwagę zasługuje fakt, iż w genomie istnieją uprzywilejowane miejsca kumulacji rodników/ładunków. Należą do nich sekwencje bogate w **dG** (5'-GGG-3'), wynika to z faktu, iż 2'-deoksyguanozyna posiada najniższy potencjał jonizacji (IP) wśród niemodyfikowanych zasad nukleinowych. Przyjmuje się następującą kolejność potencjałów jonizacji dla zasad nukleinowych $U > T > C > A > G$ [115]. Interesujący jest również fakt, iż modyfikacja 8-oxo-dG ma niższy IP od swojego prekursora (dG) o około 0,3 eV [116]. 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyna ze względu na swoją sztywną strukturę (zaburzenie stakingu zasad) może odgrywać istotną rolę w inhibicji transferu elektronów do odległych miejsc genomu. Dodatkowo wskazują na to obliczone metodami QM potencjały jonizacji, zarówno adiabatyczne (AIP) jak i wertykalne (VIP) w fazie gazowej i wodnej, przyjmujące wartości niższe niż dla **dG** (8,6eV). Obliczono następujące wartości dla **cdA**:

AIP (faza wodna/faza gazowa): **5'R** 7,77 / 5,97; **5'S** 7,84 / 5,94

VIP (faza wodna/faza gazowa): **5'R** 8,07 / 6,22; **5'S** 8,18 / 6,16.

Ponieważ obliczone wartości potencjałów jonizacyjnych zarówno wertykalnych jak i adiabatycznych dla (5'R)-**cdA** i (5'S)-**cdA** są niższe od wartości energii jonizacji wody (10,56–12,61 eV) można przypuszczać, iż diastereizomery 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyna mogą ulegać następczym przemianom chemicznym. Oprócz potencjału jonizacyjnego na migrację elektronu w ds-DNA ma wpływ powinowactwo elektronowe (EA) poszczególnych nukleotydów, świadczące o zdolności danego układu do przyłączenia nadmiarowego elektronu. Dla zasad nukleinowych została określona następująca kolejność adiabatycznego powinowactwa elektronowego (AEA): $C(0,56) < T(0,79) < U(0,80) < A(0,95) < G(1,5)$ [117], natomiast dla wolnych nukleozydów $dT(0,44) > dC(0,33) > dG(0,09) \approx dA(0,06)$ [118] (wartości w nawiasach podano w eV). Obliczone wartości AEA i VEA (wertykalne powinowactwo elektronowe), metodami QM, dla pochodnych 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyna wynosiły odpowiednio (faza wodna/gazowa):

AEA : **5'R** + 1,81/ + 0,19; **5'S** + 0,03/ + 1,76

VEA : **5'R** - 0,01/ + 1,40; **5'S** - 0,19/ + 1,35

Deka [119] i Adamowicz [120] w swoich pracach zasugerowali, iż cząsteczki obdarzone dużym DM są zdolne do utrzymania nadmiarowego elektronu poprzez efekt momentu dipolowego, bez wywierania znacznych zmian w geometrii cząsteczki. Natomiast molekuly wykazujące małą wartość momentu dipolowego mogą wiązać elektron poprzez wykorzystanie orbitali LUMO, wymuszając znaczące zmiany w ich geometrii. Ponieważ obydwa diastereoisomery (**5'R**)-**cdA** i (**5'S**)-**cdA** charakteryzują się małymi wartościami zarówno DM (Tab. 2) jak i VEA można przypusz-

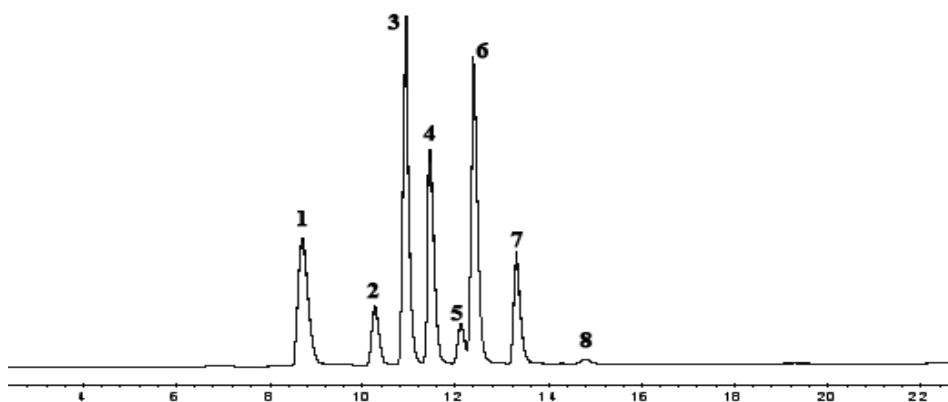
czać, iż nadmiarowy elektron został umieszczony na LUMO. Założenie to zostało potwierdzenie poprzez obserwowane zmiany geometrii jedynie w obrębie grupy egzoaminowej N6 **cdA** [111].

Dogodnym parametrem wartościującym trwałość powstałego anionu jest wertykalna energia oderwania elektronu (VED) [112]. Dla **cdA** wynosi ona odpowiednio (faza gazowa/wodna): 5'R 0,31/2,02 i 5'S 0,27/2,18. Te relatywnie małe wartości VED, obliczone metodami QM, sugerują, iż aniony **cdA** nie powinny być obserwowane w środowisku reakcji, przemawiają za tym również obliczone niskie wartości AEA. Zatem można się spodziewać, iż jeśli nawet odpowiednie aniony zostaną utworzone to powinny one wykazywać znikomą trwałość, ze względu na konserwatywność struktury **cdA** wytworzoną przez dodatkowe wiązanie C5'-C8, uniemożliwiająca stosowną zmianę geometrii w obrębie cząsteczki.

2.4. WPŁYW CDA NA STRUKTURĘ PRZESTRZENNĄ SS-DNA

Diastereoizomery 5'R i 5'S 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyny mogą istnieć w komórce w postaci wolnych nukleozydów lub jako nukleotydy w ss-DNA lub ds-DNA. Wydaje się mało prawdopodobne, aby **cdA** była najpierw przekształcona w formę trifosforanu a następnie włączona w łańcuch DNA. Jednakże pojawienie się fragmentu o sztywnej strukturze w obrębie oligonukleotydu może prowadzić do zmian geometrycznych obejmujących znaczące jego fragmenty. Jest to szczególnie widoczne podczas analizy RP-HPLC mieszaniny 2'-deoksynukleozydów i pochodnych 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyny (Rys. 25) [121]. W analizie tej widoczne jest skrócenie czasu retencji dyskutowanych pochodnych cyklicznych względem 2'-deoksynukleozydów. Należy zauważyć, iż konfiguracja na atomie węgla C5' w 2-deoksyrybozie ma wyraźny wpływ na różnice w mobilności pomiędzy diastereomerami: diastereomer *R* migruje szybciej przez kolumnę chromatograficzną wypełnioną odwrotną fazą niż diastereoizomer *S*. Podobne obserwacje przeprowadzono dla dinukleotydydowych fragmentów zawierających **cdA**.

Wpływ 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyny na działanie enzymów hydrolizujących internukleotydydowe wiązanie fosforanowe został dobrze udokumentowany przez Jarugę i in. [122]. Wykazali oni, iż wiązanie to w dinukleotydach zawierających (**5'S**)-**cdA** ulega rozszczepieniu z uwolnieniem **cdA**. Wyjątek stanowił dinukleotydyd **T_{po}cdA**, który w obecności mieszaniny enzymów hydrolizował jedynie w sześćdziesięciu procentach. Ponadto obserwowana była zmienna szybkość hydrolizy oligonukleotydydów zawierających różne nukleozydy w bezpośrednim otoczeniu **cdA** – sekwencja **T_{po}cdA** powodowała wydłużenie czasu reakcji enzymatycznych [122]. Sugeruje to, iż na usuwanie (**5'S**)-**cdA** z genomu mogą mieć również wpływ sąsiadujące zasady, podobnie jak w procesie powstawania pojedynczych pęknięć w ds-DNA [123].

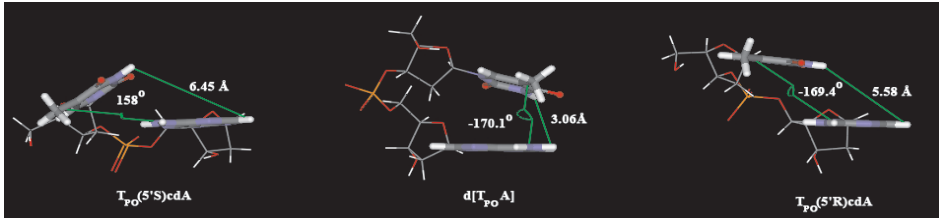


Rysunek 25. Chromatogram RP-HPLC mieszaniny 2'-deoksynukleozydów **1** – dC, **3** – dG, **4** – T, **7** – dA, pochodnych 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyny (5'*R* – **2**, 5'*S* – **5**) oraz dinukleotydu ($T_{PO}(5'R)\text{-cdA}$ (**6**), $T_{PO}(5'S)\text{-cdA}$ (**8**))

Figure 25. Reverse-phase HPLC analysis of the mixture of natural 2'-deoxynucleosides: **1** – dC, **3** – dG, **4** – T, **7** – dA, 5',8-cyclo-2'-deoxyadenosine derivatives (5'*R*-**2**, 5'*S*-**5**) and dinucleotides ($T_{PO}(5'R)\text{-cdA}$ (**6**), $T_{PO}(5'S)\text{-cdA}$ (**8**))

Przeprowadzone badania strukturalne technikami NMR dla dinukleotydu $T_{PO}[(5'R)\text{-cdA}]$ i $T_{PO}[(5'S)\text{-cdA}]$ wykazały wyraźny wpływ reszt 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozynowych na ich geometrię przestrzenną [121, 124], mimo iż w dinukleotydach tych nie obserwowano wyraźnych zmian w konformacji cukru reszty tymidylowej względem wolnej tymidyny. Reszta cukrowa w wolnej tymidynie przyjmuje konformację ${}^3T^2$ oraz fazę: 187° i amplitudę: 38° [125], w $T_{PO}\text{cdA}$ dla formy 5'*R*: ${}^3T^2$, faza: 166° , amplituda: 37° dla 5'*S*: 2T_3 , faza: 193° , amplituda: 45° [121, 124]. Z drugiej strony pierścien 2-deoksyrybozy uwikłany w układ 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyny nie wykazuje wrażliwości na zmiany podstawników w obrębie zarówno reszty cukrowej jak i zasadowej. Analiza widm NMR otrzymanych w zakresie temperatur 23–41°C nie wykazała zmian w geometrii reszty cukrowej w podjednostce **cdA**. We wszystkich dyskutowanych przypadkach 2-deoksyryboza przyjmowała konformację ${}^0T^1$ o fazie 272–279° i amplitudzie 44–47° bez względu na chiralność atomu węgla C5' [121, 124]. Wyniki tych badań zostały potwierdzone przez rezultaty obliczeń teoretycznych wykonanych metodami chemii kwantowej [121]. Zatem wydaje się, iż decydujący wpływ na położenie przestrzenne tymidyny w dyskutowanych dinukleotydach ma ułożenie grupy 5' hydroksylowej w **cdA**. Obliczenia metodami mechaniki molekularnej w fazie wodnej, z wcześniej zaimplementowanymi parametrami geometrycznymi uzyskanymi z eksperymentów NMR dla $T_{PO}[(5'R)\text{-cdA}]$ i $T_{PO}[(5'S)\text{-cdA}]$ oraz ich porównanie ze strukturą $T_{PO}\text{dA}$ pochodzącą ze struktury ds-DNA [126], potwierdziły powyższe przypuszczenia. W naturalnym dinukleotydzie odległość pomiędzy zasadami wynosi 3,06 Å (odległość pomiędzy H2 adeniny i H3 tyminy), natomiast dla $T_{PO}[(5'R)\text{-cdA}]$ i $T_{PO}[(5'S)\text{-cdA}]$ odpowiednio 5,6 Å i 6,5 Å. Ponadto wartości obliczone dla kąta dwuściennego wyznaczonego przez atomy N9,C8 adeniny i N1,C2 tyminy, określające

wzajemne ułożenie zasad nukleinowych, wynosiły odpowiednio dla: $T_{PO}dA$ -170° , $T_{PO}[(5'R)-cdA]$ $-169,4^\circ$, $T_{PO}[(5'S)-cdA]$ $-158,2^\circ$ (Rys. 26) [121]. Można zatem przypuszczać, iż wysoka stabilność w warunkach hydrolizy enzymatycznej wiązania fosforanowego w dinukleotydzie $T_{PO}[(5'S)-cdA]$ spowodowana jest wywołanymi przez $(5'S)-cdA$, dużymi zmianami w jego geometrii wpływającymi na aktywność enzymów. Porównanie parametrów geometrycznych powyższych dinukleotydów wskazuje, iż diastereomer R w mniejszym stopniu powinien zaburzać strukturę przestrzenną ss -DNA i ds -DNA (Rys. 26).

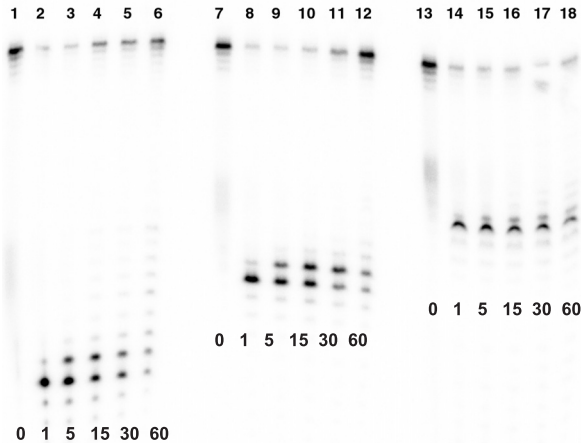


Rysunek 26. Graficzna wizualizacja różnic pomiędzy $T_{PO}dA$, $T_{PO}[(5'R)-cdA]$ i $T_{PO}[(5'S)-cdA]$
 Figure 26. Graphical visualization of the difference in 3D structure between $d[T_{POA}]$, $T_{PO}[(5'S)-cdA]$ and $T_{PO}[(5'R)-cdA]$

Ze względu na ograniczoną rotację wokół wiązań $C1'-N9$ i $C4'-C5'$ oraz ze względu na obecność dodatkowego wiązania kowalencyjnego ($C5'-C8$) pomiędzy 2-deoksyrybozą a adeniną, 5',8-cyko-2'-deoksyadenozyna obecna w łańcuchu DNA nie jest substratem dla systemu naprawczego BER, zarówno w formie $5'R$ jak i $5'S$. Obecnie żadna ze znanych glikozylaz nie jest zdolna do przeprowadzenia hydrolizy wiązania $C1'-N9$ z następczym uwolnieniem wolnej adeniny. Należy zauważyć, iż po rozszczepieniu reszta cukru i zasadowa nukleozydu pozostają nadal trwale związane. Wnioski te zostały potwierdzone przez wyniki eksperymentów z użyciem izolowanych enzymów [127] jak i z zastosowaniem ekstraktów jądrowych z komórek mózgow dorosłych szczurów [128] lub komórek HeLa-60 [129]. Systematyczne prace grup badawczych Brooksa [128] i Lindahla [129] wykazały, iż cdA jest usuwana z genomu przez system naprawczy NER. Przy czym diastereizomer $5'R$ jest lepszym substratem dla NER niż $5'S$. Należy podkreślić, iż obydwie formy cdA są wycinane z genomu wolniej niż addukty platyny Pt-GTG ($(5'S)-cdA$ – 150 razy wolniej, $(5'R)-cdA$ – 40 razy wolniej) [129]. Obserwowano również ich wyraźny wpływ na aktywność 3' egzolityczną polimeraz Pol-T7 [129] i Pol-T4 [130]. Oligonukleotyd zawierający $(5'S)-cdA$ dla obydwu enzymów stanowił „stop punkt” w procesie hydrolizy wiązań internukleotydu [129, 130], podobne wyniki uzyskano dla eksperymentów przeprowadzonych z użyciem DNazy III [130]. Natomiast fragment DNA zawierający $(5'R)-cdA$ był całkowicie degradowany przez podjednostkę 3' egzolityczną polimerazy Pol-T4 [130]. Umieszczenie dyskutowanej modyfikacji ($(5'R)-cdA$ lub $(5'S)-cdA$) w matrycowym fragmencie DNA powodowało zatrzymanie procesu polimeryzacji łańcucha DNA przez polimerazę d (Pol- δ)

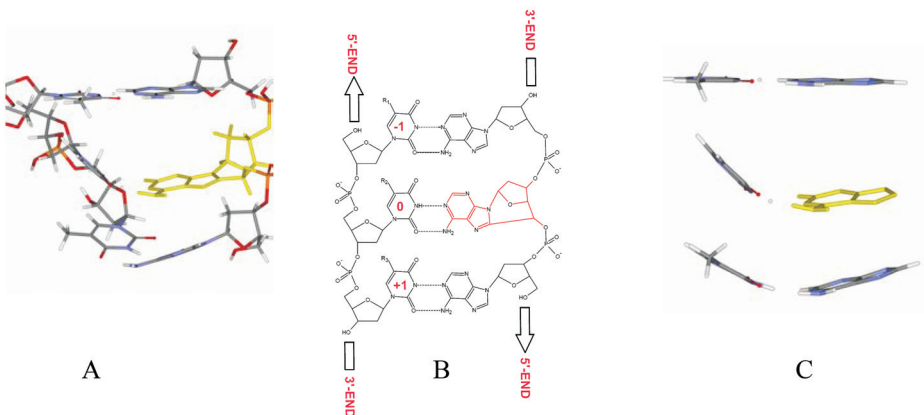
sprzężoną z PCNA (jądrowy antygen komórek proliferujących) [130]. Pol- δ należy do grupy polimeraz o wysokiej dokładności odwzorowania. Odmiennie rezultaty uzyskano przez zastosowanie, w obecności mieszaniny dNTP, polimerazy η (Pol- η – polimeraza o niskiej dokładności odwzorowania) lub Pol-T7 w procesie elongacji łańcucha potomnego DNA. Wyniki tych eksperymentów pozwoliły stwierdzić, iż diastereoizomer 5'R obecny w matrycy DNA nie stanowi znaczącej bariery dla reakcji polimeryzacji w przeciwieństwie do formy 5'S, która blokuje omawiany proces [130].

Nie bez znaczenia pozostaje również wpływ **cdA** na mechanizm naprawy (BER) innych typów uszkodzeń powstałych w nici DNA komplementarnej do nici zawierającej 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozynę. Należy zauważyć, iż w pierwszym etapie procesu BER wycięciu ulega modyfikowana zasada z utworzeniem miejsca AP, które jest następnie usuwane przez endonukleazy, z utworzeniem ssb-DNA (pojedyncze pęknięcie nici DNA). Alternatywnie ssb-DNA może powstawać w wyniku aktywności glikozylaz dwufunkcyjnych. Powstała przerwa pomiędzy sąsiadującymi końcami 5' i 3' łańcucha DNA jest wypełniona przez polimerazy z następczym połączeniem obydwu końców DNA przez enzymy typu ligaz [57, 103]. Obecność (**5'S**)-**cdA** w nici komplementarnej do nici DNA podlegającej naprawie w odległości ± 5 zasad od powstania miejsca AP powoduje zaburzenia w reakcjach enzymatycznych biorących udział w dyskutowanym procesie [103]. Szczególnie jest to widoczne w efektywności procesu polimeryzacji. Nie obserwowano elongacji naprawianego łańcuch DNA jeśli (**5'S**)-**cdA** umiejscowiona była naprzeciwko ssb-DNA [103]. Zwiększenie dystansu pomiędzy AP i (**5'S**)-**cdA** do 8 zasad w kierunku końca 3' nici zawierającej (**5'S**)-**cdA** (-8) nie wpływało znacząco na rekonstrukcję nici podlegającej naprawie (obserwowano aktywność mechanizmu LP-BER). Natomiast jeśli AP zostało przesunięte o taką samą liczbę jednostek nukleozydowych ($+8$) w kierunku przeciwnym (koniec 5' nici zawierającej (**5'S**)-**cdA**) efekt inhibicji odtwarzania uszkodzonej nici był wciąż obecny (Rys. 27) [103]. Analiza wpływu **cdA** na strukturę ds-DNA metodami chemii kwantowej wykazała wyraźne zaburzenia w komplementarności jak i w stakingu pomiędzy zasadami nukleinowymi w kierunku końca 5' nici zawierającej **cdA** – obserwowany był tzw. „*efekt domina*”. Natomiast zaburzeń tych nie obserwowano w kierunku końca 3' (Rys. 28) [103]. Rezultaty te zostały potwierdzone przez badania strukturalne technikami NMR [131]. Uzyskane wyniki eksperymentów wyraźnie wskazują na wysoką toksyczność obecnej (5'S)-5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyny w genomie, przy czym wydaje się, iż zmian w geometrii ds-DNA odpowiedzialne za inhibicję procesów naprawczych są wywierane w określonym kierunku ds-DNA (koniec 5' nici zawierającej (**5'S**)-**cdA**).



Rysunek 27. Wpływ (5'S)-cdA w nici komplementarnej na naprawę nici DNA zawierającej miejsce AP przez mechanizm NER. Pozycja (5'S)-cdA względem AP: **a)** –8, tor 1–6; **b)** +8, tor 13–18; **c)** Kontrola, tor 7–12. Cyfry pod radiogramami żeli oznaczają czasy reakcji z użyciem ekstraktu jądrowego z komórek XRS-5 wyrażone w minutach 0, 1, 5, 15, 30, 60 [103]

Figure 27. Repair of an AP-site, by NER, is impaired by the presence of (5'S)-cdA. Representative denaturing polyacrylamide gel showing the rejoining of the AP-site at position towards the (5'S)-cdA: **a)** –8, Lane 1–6; **b)** +8, Lane 13–18; **c)** Con.1, Lane 7–12. The numbers, under radiograms, describe the times of rejoining reaction by nuclear extract from XRS-5 cells given in minutes 0, 1, 5, 15, 30, 60 [103]



Rysunek 28. **A)** Struktura dupleksu (d[TUT]/d[AcAA]) zawierającego (5'S)-cdA (zaznaczona kolorem żółtym) oraz 2'-deoksyuridyne (dU) w układzie komplementarnym (cdA::dU) otrzymane w wyniku obliczeń metodami QM; **B)** Przedstawienie graficzne umiejscowienia dU vs (5'S)-cdA (pozycja +1 R₁; R₂=CH₃, R₃=H; pozycja 0 R₁; R₃=CH₃, R₂=H; pozycja -1 R₂; R₃=CH₃, R₁=H.); **C)** Przestrzenne ułożenie komplementarnych zasad w dupleksie d[TUT]/d[AcAA] zawierającym (5'S)-cdA (zaznaczona kolorem żółtym) [104]

Figure 28. **A)** Structure of a duplex obtained by quantum mechanic study, in yellow the (5'S)-cdA is indicated; **B)** Graphic representation of the position of dU versus (5'S) diastereoisomer of 5',8-cyclo 2'-deoxyadenosine. (Position +1 R₁ and R₂ = CH₃, R₃=H. Position 0 R₁ and R₃ = CH₃, R₂=H. Position -1 R₂ and R₃ = CH₃, R₁=H.) **C)** The shape of base pairing in duplex d[TUT]/d[AcAA] in the presence of (5'S)-cdA is indicated in yellow [104]

PODSUMOWANIE

W ciągu ostatnich 50 lat odkryto około 70 rodzajów uszkodzeń DNA, większość z nich jest naprawiana przez system BER. Jednakże modyfikacje nukleozydów/nukleotydów, w których możliwość hydrolizy wiązania *N*-glikozydowego jest ograniczona, eliminowane są z genomu poprzez skomplikowany mechanizm NER. 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyna poprzez obecność wiązania pomiędzy atomami C5'-C8 należy do podwójnych uszkodzeń kwasów nukleinowych – w cząsteczce tej modyfikacji uległa zarówno podjednostka cukrowa jak i zasada nukleinowa. Obecność dodatkowego połączenia C-C powoduje usztywnienie struktury **cdA** poprzez zablokowanie rotacji wokół wiązania C1'-N9 i C4'-C5' oraz trwałe „zamrożenie” konformacji pięcioczłonowego pierścienia 2-deoksyrybozy w najmniej energetycznie uprzywilejowanej formie ${}_0T^1$ bliskiej O4'-*egzo* (w cząsteczce tej atom węgla C5' jest atomem chiralnym).

Ze względów strukturalnych (**5'R**)-**cdA** i (**5'S**)-**cdA** są eliminowane z DNA poprzez system NER, przy czym diastereoizomer 5'R jest efektywniej usuwany z genomu. Dodatkowo wiązanie glikozydowe w **cdA** wykazuje około 40-krotnie większą trwałość w porównaniu z **dA** w warunkach hydrolizy kwasowej. Przeprowadzone badania teoretyczne nad procesem rozszczepienia wiązania glikozydowego ujawniły, iż proces ten przebiega według mechanizmu $D_N^*A_N$. Ponadto wyniki badań eksperymentalnych nad trwałością wiązania glikozydowego w **cdA** w warunkach hydrolizy kwasowej wskazują, iż diastereoizomer 5'S charakteryzuje się nieznacznie wyższą stabilnością niż diastereoizomer 5'R.

Przyjmuje się że **cdA** powstaje w komórce, w warunkach beztlenowych, w wyniku dwuetapowej reakcji, w pierwszym etapie następuje oderwanie jednego z protonów z funkcji C5' hydroksylowej poprzez rodnik 'OH z jednoczesnym utworzeniem rodnika alkilowego (2'-deoksyadenozyn-5'-yl), który ulega procesowi C5'-C8 cyklizacji (etap drugi) z utworzeniem **cdA**. Wyniki obliczeń DFT sugerują, iż proponowany mechanizm reakcji jest słuszny zarówno dla form nukleozydowych jak i nukleotydowych [102,105]. Ze względu na konieczność adaptacji przez 2-deoksyrybozę konformacji bliskiej O4'-*egzo* w trakcie procesu cyklizacji, **cdA** powstaje w komórce z częstotliwością jednej modyfikacji na 10^8 zasad nukleinowych. Analiza produktów γ -radiacji ds-DNA wykazała, iż diastereoizomer 5'S jest bardziej rozpowszechniony niż forma 5'R. Te same eksperymenty przeprowadzone dla pochodnych nukleozydowych i ss-DNA ujawniły dominującą obecność (**5'R**)-**cdA**.

Obliczone metodami chemii kwantowej parametry IP, EA, VED wskazują wyraźnie, iż obydwie diastereoizomeryczne formy **cdA** powinny ulegać łatwo procesowi jonizacji (IP dla **cdA** jest niższy niż IP dla **dG**). Z drugiej strony utworzone formy anionowe nie powinny być obserwowane w środowisku reakcji ze względu na niską wartość VED [111].

Porównanie parametrów geometrycznych, rozkładu ładunku oraz DM dla pochodnych (**5'S**)-**cdA** i (**5'R**)-**cdA** wskazuje, iż struktury tych cząsteczek są niewrażliwe na utratę lub pojawienie się dodatkowego ładunku w ich obrębie. Dane

te świadczą o wysokiej konserwatywności układu 5',8-cykol-2'-deoksy purynowego [110]. Dodatkowo badania przeprowadzone technikami NMR nad wpływem obydwu diastereoizomerów **cdA** na geometrię krótkich fragmentów ss-DNA uwidoczniły, iż chiralność grupy 5' hydroksylowej w **cdA** wywiera decydujący wpływ na geometrię położenia 5' nukleotydu. Porównanie parametrów strukturalnych $T_{po}[(5'R)\text{-cdA}]$ i $T_{po}[(5'S)\text{-cdA}]$ obliczonych na podstawie wyników eksperymentów NMR i DFT oraz ich porównanie ze strukturą $T_{po}\text{dA}$, ujawniło, iż **(5'S)-cdA** wymusza wyraźne zmiany w geometrii dinukleotydu w przeciwieństwie do diastereomeru 5'R. Badania te również potwierdziły znaczną odporność układu **cdA** na wprowadzane zmiany podstawników zarówno w obrębie reszty cukrowej jak i zasadowej 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyny [121, 124].

Pojawienie się **(5'S)-cdA** w jednej z nici genomu wywiera negatywny wpływ na naprawę powstałych uszkodzeń w nici komplementanej. Przy czym **(5'S)-cdA** hamuje aktywność enzymów biorących udział w mechanizmie BER, jeśli ssb-DNA umiejscowione jest w odległości ± 5 zasad od 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyny. Wpływ ten jest nieznaczny po zwiększeniu tego dystansu do 8 zasad w kierunku końca 3' nici zawierającej **cdA**, jednakże jest on wciąż obserwowany po przesunięciu ssb-DNA o 8 nukleotydów w kierunku końca 5' [103]. Efekt kierunkowy działania **(5'S)-cdA** na proces naprawczy DNA, poprzez indukowanie zmian w geometrii ds-DNA, został potwierdzony przez wyniki analiz strukturalnych wykonanych metodami NMR [131] i DFT [103].

Ze względu na swoje unikalne właściwości fizyko-chemiczne, strukturalne (wpływ na geometrię przestrzenną ss-DNA i ds-DNA) **cdA** może odgrywać istotną rolę w procesach nowotworzenia, karcenogenezy, chorobach neurodegeneracyjnych, alergicznych. Z drugiej strony jej powstawanie w genomie komórek nowotworowych pod wpływem chemioterapeutyków takich jak Tirapazamina może być odpowiedzialne za ich aktywność przeciwnowotworową. Należy podkreślić, iż **cdA** jest znacznie gorszym substratem dla mechanizmu NER niż cisplatyna. Wydaje się zatem, iż dalsze badania nad **cdA** są konieczne dla zrozumienia biologicznych efektów jakie może ona wywierać w procesach chorobotwórczych jak i terapeutycznych.

PODZIĘKOWANIA

Publikacja powstała w ramach projektów: MNiSW/SGI3700/UMŁódź/039/2010 oraz MNiSW N N405 615838.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, *Free Radical in Biology and Medicine*, 4th ed., Oxford University press, 2007.
- [2] K.B. Beckman, B.N. Ames, *J. Biol. Chem.*, 1997, **272**, 19633.
- [3] G. Bartosz, *Druga Twarz Tłenu*, Wydanie pierwsze, Wydawnictwo Naukowe PWN Sp. z o.o. 1995.
- [4] N.S. Kwon, C.F. Nathan, C. Gilker, O.W. Griffith, D.E. Matthews, D.J. Stuehr, *J. Biol. Chem.*, 1990, **265**, 422.
- [5] (a) A.J. LaVerne, H.R. Schuler, *J. Phys. Chem.*, 1983, **87**, 4564, (b) E. Hoglund, E. Blomquist, J. Carlsson, J. Stenerlow, *Int. J. Radiat. Biol.*, 2000, **76**, 539.
- [6] J.D. Rush, B.H.J. Bielski, *J. Phys. Chem.*, 1985, **89**, 5062.
- [7] F. Bosca, M.L. Marin, A. Miranda, *Photochem. Photobio.*, 2001, **74**, 637.
- [8] *Handbook of Chemistry and Physics*, 75th ed, CRC Press, Boca Raton, FL. 1995.
- [9] H.J.H. Fenton, *J. Chem. Soc.*, 1894, **65**, 899.
- [10] F. Haber, J. Weiss, *Proc. R. Soc. Lond. Ser. A. Biol. Sci.*, 1934, **147**, 332.
- [11] B.H.J. Bielski, A.O. Allen, *J. Phys. Chem.*, 1977, **81**, 1977.
- [12] T. Rigg, W. Taylor, J. Weiss, *J. Chem. Phys.*, 1954, **22**, 575.
- [13] E. Neyens, J. Baeyens, *J. Hazard. Mater.*, 2003, **98**, 33.
- [14] V.C. Buxton, L.C. Greenstock, *J. Phys. Chem.*, 1988, **17**, 513.
- [15] I. Fridovitch, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1986, **247**, 1.
- [16] A. Meister, M.E. Anderson, *Annu Rev. Biochem.*, 1983, **52**, 711.
- [17] R.K. Banerjee, *Mol. Cell. Biochem.*, 1988, **83**, 105.
- [18] A. Deisseroth, A.L. Dounce, *Physiol. Rev.*, 1970, **50**, 319.
- [19] M. Valko, D. Leibfritz, J. Monocol, D.T.M. Cronin, M. Mazur, J. Telser, *Int. J. Bichem. Cell Biol.*, 2007, **39**, 44.
- [20] R. Oliński, A. Siomek, R. Różalski, D. Gackowski, M. Foksiński, J. Guz, T. Dziaman, A. Szpila, B. Tudek, *Acta Biochemica Polonica*, 2007, **54**, 11.
- [21] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, *Biochem. J.*, 1984, **219**, 1.
- [22] *The hermetic and alchemical writings of Paracelsus*, w tłumaczeniu A.E. Waite, BiblioBazar 2008.
- [23] B. Halliwell, *Biochem. Soc. Trans.*, 2007, **35**, 1147.
- [24] L. Stryer, *Biochemia*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1999.
- [25] M. Inoue, E.F. Sato, M. Nishikawa, A.M. Park, Y. Kira, I. Imada, K. Utsumi, *Curr. Med. Chem.*, 2003, **10**, 2495.
- [26] G. Loschen, B. Flohe, *FEBS*, 1971, **18**, 261.
- [27] M. Gupta, K. Dobashi, E.L. Greene, J.K. Orak, I. Singh, *Mol. Cell. Biochem.*, 1997, **176**, 337.
- [28] J.F. Turrens, A. Boveris, *Biochem. J.*, 1980, **191**, 421.
- [29] J.S. Lipard, M.J. Berg, *Podstawy Chemii Bionieorganicznej*, tłumaczenie J. Kuryłowicz, wyd. 1, Wydawnictwo Naukowe PWN, 1998.
- [30] K.M. Eberhardt, *Reactive Oxygen Metabolites*, 1st ed., CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington D.C. 2001.
- [31] C.K. Kou, T. Mashino, I. Fidorovitch, *J. Biol. Chem.*, 1987, **262**, 4724.
- [32] T.E. DeCoursey, E. Ligeti, *Cell. Mol. Life. Sci.*, 2005, **62**, 2173.
- [33] T.L. Stayner, D.A. Dankovic, R.A. Lemen, *Am. J. Public. Health.*, 1996, **86**, 179.
- [34] V.K. Kowdley, *Gastroenterology*, 2004, **127**, S79.
- [35] E. Sokółowska, J. Klimek, *Postępy Biologii Komórki*, 2007, **34**, 15.
- [36] H. Kozłowski, A. Janicka-Kłós, J. Brasun, E. Gaggelli, *Coordination Chemistry Rev.*, 2009, **253**, 2665.

- [37] U. Bandyopadhyay, D. Das K.R. Banerjee, K.R., *Current Science*, 1999, **77**, 658.
- [38] E. Antila, T. Westermack, *Int. J. Dev. Biol.*, 1989, **33**, 183.
- [39] G.J. Brewer, D.R. Dick, K.D. Grover, V. LeClarie, M. Tseng, M. Wicha, K. Pienta, G.B. Redman, T. Jahan, K.B. Sondak, M. Strawderman, G. LeCarpantier, S.D. Merajver, *Clin. Cancer Res.*, 2000, **6**, 1.
- [40] N. Pastor, H. Weinstein, E. Jamison, M. Brenowitz, *J. Mol. Biol.*, 2000, **304**, 55.
- [41] M. Dizdaroglu, P. Jaruga, M. Birincioglu, H. Rodriguez, *Free Rad. Biol. Med.*, 2002, **32**, 1102.
- [42] W. Saenger, *Principles of nucleic acid structure*, Cantor ChR, 1st eds, Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, Tokyo, 1984.
- [43] P.V. Chuprina, U. Heinemann, A.A. Nurislamov, P. Zielenkiewicz, R.E. Dickerson, W. Saenger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, **88**, 539.
- [44] G. Albiser, A. Lamiri, S. Premilat, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2001, **28**, 199.
- [45] K.K. Khanna, Y. Shiloh, *The DNA damage response: Implication on cancer formation and treatment*, Springer Dordrecht Heidelberg, London, New York, 2009.
- [46] M.D. Evans, S.M. Cook, *Oxidative damage to Nucleic Acids*, Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, LLC, 2007.
- [47] M. Gulston, J. Fulford, T. Jenner, C. de Lara, P. O'Neill, *Nucleic Acids Research*, 2002, **30**, 3464.
- [48] H. Terato, H. Ide, *Biol. Sci. Space*, 2004, **18**, 206.
- [49] T. Nayak, J. Norenerg, T. Anderson, R. Atcher, *Canc. Biother. Radiopharm.*, 2005, **20**, 52.
- [50] J.-P. Pouget, S. Frelon, J.-L. Ravanat, I. Testard, F. Odin, J. Cadet, *J. Radiation Res.*, 2002, **157**, 589.
- [51] (a) J. Sobkowski, *Chemia radiacyjna i ochroa radiologiczna*, Wydawnictwo Adamantan, 2009; (b) G.V. Buxton, C.L. Greenstock, W.P. Helman, A.B. Ross, *J. Phys. Chem. Ref. Data.*, 1988, **17**, 513; (c) K.N. Josphura, S. Gangopadhyay, C.G. Limbachiya, M. Vinodkumar, *J. Phys.: Conf. Ser.*, 2007, **80**, 012008, doi:10.1088/1742-6596/80/1/012008.
- [52] C.P. Preusch, *Medicinal Inorganic Chemistry, ACS Symposium Series*, 2005, **903**, 15.
- [53] M.S. Cooke, M.D. Evans, M. Dizdaroglu, J. Lunec, *FEBS.*, 2003, **17**, 1195.
- [54] J. Cadet, T. Douki, J.-L. Ravanat, *Redox-Genom Interaction in Health and Disease*, eds. Marcel Dekker, Inc. New York, 2003, 145.
- [55] H. Kasai, A. Iida, Z. Yamaizumi, S. Nishimura, H. Tanooka, *Mutat. Res.*, 1990, **243**, 249.
- [56] A. Sancar, L.A. Lindsey-Boltz, K. Ünsal-Kaçmaz, S. Linn, *Annu. Rev. Biochem.* 2004, **73**, 39.
- [57] T. Douki, J. Riviere, J. Cadet, *Chem. Res. Toxicol.*, 2002, **15**, 445.
- [58] R. Beukers, A.M.P. Eker, P.H.M. Lohman, *DNA Repair*, 2008, **7**, 530.
- [59] T.P. Begly, *Acc. Chem. Res.*, 1994, **27**, 394.
- [60] S. Bellon, D. Gasparutto, Ch. Saint-Pierre, J. Cadet, *Org. Biomol. Chem.*, 2006, **4**, 3831.
- [61] C.H. Box., E.E. Budziński, J.B. Dzwidzik, J.S. Gobey, H.G. Freund, *Free Radi. Biol. Med.*, 1997, **23**, 1021.
- [62] A.F. Evangelista, F.H. Schaefer III, *J. Phys. Chem. A.*, 2004, **108**, 10258.
- [63] P. Fortini, E. Dogliotti, *DNA Repair*, 2007, **6**, 398.
- [64] A. Romieu, D. Gasparutto, J. Cadet, *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. 1*, 1999, 1257.
- [65] J.R. Wagner, Ch. Decarroz, M. Berger, J. Cadet, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 4101.
- [66] M. Dizdaroglu, P. Jaruga, H. Rodriguez, *Free Radical Biol. Med.*, 2001, **30**, 774.
- [67] M. Dizdaroglu, *Biochem. J.*, 1986, **238**, 247.
- [68] (a) A.W. Johnson, N. Shaw, *Proc. Chem. Soc.*, 1961, 447, (b)D. Dolphin, A.W. Johnson, R. Rodrigo, N. Shawn, *Pure Appl. Chem.*, 1963, **7**, 539.
- [69] P.C. Hogenkamp, *J. Biol. Chem.*, 1963, 238, 477.
- [70] K. Keck, *Z. Naturforsch. B*, 1968, **23**, 1034.
- [71] N. Mariaggi, J. Cadet, R. Teoule, *Tetrahedron*, 1976, **32**, 2385.

- [72] M.L. Dirksen, W.F. Blakely, E. Holwitt, M. Dizdaroglu, *Int. J. Radiat. Biol.*, 1988, **54**, 195.
- [73] M. Fokiński, R. Kotzbach, W. Szymański, R. Oliński, *Free. Radi. Biol. Med.*, 2000, **29**, 597.
- [74] J. Cadet, T. Douki, D. Gasparutto, J-L. Ravanat, *Mutation Res.*, 2003, **531**, 5.
- [75] J. Cadet, T. Douki, D. Gasparutto, J-L. Ravanat, *Radiat. Phys. Chem.*, 2005, **71**, 293.
- [76] J. Cadet, T. Douki, J-L. Ravanat, *Environ. Health. Perspect.*, 1997, **18**, 1833.
- [77] M.L. Navacchia, A. Manetto, P.C. Montevecchi, Ch. Chatgililoglu, *Eur. J. Org. Chem.*, 2005, 4640.
- [78] M. Dizdaroglu, P. Jaruga, H. Rodriguez, *Free. Radic. Biol. Med.*, 2001, **30**, 22.
- [79] K. Randerath, G-D. Zhou, R.L. Somers, J.H. Robbins, P.J. Brooks, *J. Biol. Chem.*, 2001, **38**, 36051.
- [80] P. Jaruga, Y. Xiao, B.C. Nelson, M. Dizdaroglu, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2009, **386**, 656.
- [81] D.C. Malins, K.M. Anderson, J.J. Stegeman, P. Jaruga, V.M. Green, N.K. Gilman, M. Dizdaroglu, *Health Perspect.*, 2006, **114**, 823.
- [82] R.A. Eglar, E. Fernandes, K. Rothermund, S. Sereika, N. de Souza-Pinto, P. Jaruga, M. Dizdaroglu, E.V. Prochownik, *Oncogene*, 2005, **24**, 8038.
- [83] G. Kirkali, N. de Souza-Pinto, P. Jaruga, V.A. Bohr, M. Dizdaroglu, *DNA Repair*, 2009, **8**, 274.
- [84] Kirkali G., de Souza-Pinto N., Genc S., Jaruga P., Dizdaroglu M., *Free Radi. Biol. Med.*, 2008, **44**, 386.
- [85] K.M. Anderson, P. Jaruga, C.R. Ramsey, N.K. Gilman, V.M. Green, S.W. Rostad, J.T. Emerman, M. Dizdaroglu, D.C. Malins, *Cell Cycle*, 2006, **5**, 1240.
- [86] L.B. Jimenez, S. Encinas, Ch. Chatgililoglu, M. Miranda, *Org. Biomol. Chem.*, 2008, **6**, 1083.
- [87] S.A. Fleming, J.A. Pincock, *Organic Molecular Photochemistry*, Vol. 3, ed. V. Ramamurth, K.S.Schanze, M. Deckker, New York 1999.
- [88] P. Berti, J.A.B. McCann, *Chem. Rev.*, 2006, **106**, 506.
- [89] J.A. Theruvathu, P. Jaruga, M. Dizdaroglu, P.J. Brooks, *Mech. Angeing Develop.*, 2007, **128**, 494.
- [90] T. Lindhal, B. Nyberg, *Biochemistry*, 1967, **11**, 3610.
- [91] (a) D. Wang, D. Kreutzer, J.M. Essigmann, *Mutat. Res.*, 1998, **400**, 99, (b) H.E. Krokan, F. Drabløs, G. Slupphaug, *Oncogen*, 2002, **21**, 8935.
- [92] R. Rios-Font, L. Rodriguez-Santiago, J. Bertran, M. Sodupe, *J. Phys. Chem. B*, 2007, **111**, 6071.
- [93] B. Karwowski, *Centr. Eur. J. Chem.*, 2010, **8**(1), 134.
- [94] (a) K. Miaskiewicz, R. Osman, *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, **116**, 232, (b) D.Sy. Savoye, C. Begusova, M. Michalik, V. Charlier, M.I. Spothem-Maurizot, *Int. J. Radiat. Biol.*, 1997, **72**, 147.
- [95] A. Adhikary, D. Becker, S. Collins, J. Koppen, M. Sevilla, *Nuc. Acid Res.*, 2006, **34**, 1501.
- [96] Ch. Chatgilaloglu, M. Guerra, Q.G. Mulazzini, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 3839.
- [97] N. Pedastur, J. Grodkowski, A.B. Ross, *J. Phys. Chem. Ref. Data.*, 1996, 25, 709.
- [98] P.J. Brooks, *DNA Repair*, 2008, **7**, 1168.
- [99] K. Miaskiewicz, H.J. Miller, F.A. Furciarelli, *Nucleic Acid Res.*, 1995, **23**, 515.
- [100] R. Flyunt, R. Bazzanini, Ch. Chatgilaloglu, Q.G. Mulazzani, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 4225.
- [101] R. Zhang, L.A. Eriksson, *Chem. Phys. Lett.*, 2006, **417**, 303.
- [102] B. Karwowski, A. Grand, J. Cadet, *Acta Biochem. Polon.*, 2009, **56**, (4), 655.
- [103] B. Karwowski, *(5'S) 5,8-cyclo-2-deoksyadenosine, from chemistry to biochemical effects.*, 2008, Wydawnictwo UM w Łodzi, ISBN 978-83-61058-01-4.
- [104] B. Karwowski, *Centr. Eur. J. Chem.*, 2008, **6**, 450.
- [105] B. Karwowski, *Org. Bio. Chem.*, 2010, 2010, **8**, 1603.
- [106] C. Altona, M. Sundaralingam, *J. Am. Chem. Soc.*, 1973, **95**, 2333.
- [107] (a) E.J. Klipartic. K.S. Pitzer, R. Spitzer, *J. Am. Chem. Soc.*, 1947, **49**, 2483, (b) C. Altona, M. Sundaralingam, *J. Am. Chem. Soc.*, 1972, **15**, 8205.
- [108] A. Romieu, D. Gasparutto, D. Molko, J. Cadet, *J. Org. Chem.*, 1998, **63**, 5245.
- [109] W. Yang, *DNA Repair*, 2006, **5**, 654.

- [110] B. Karwowski, *J. Mol. Struct.: Theochem*, 2009, **915**, 73.
- [111] B. Karwowski, *Centr. Eur. J. Chem.*, 2010, **8**, 70.
- [112] N.A. Oyler, L. Adamowicz, *J. Phys. Chem.*, 1993, **97**, 11122.
- [113] A.N. Richardson, J. Gu, S. Wang, Y. Xie, H.F. Schaefer III, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 4404.
- [114] (a) B. Giese, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2002, **6**, 2002; (b) A.K. Ghosh, G.B. Shuster, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 4172.
- [115] N. Russo, M. Toscano, A. Grand, *J. Comput. Chem.*, 2000, **21**, 1243.
- [116] C. Dherin, D. Gasparutto, T.R. O'Connor, J. Cadet, S. Bpitex, *Int. J. Radiat. Biol.*, 2004, **80**, 21.
- [117] J.R. Wiely, J.M. Robinson, S. Ehdiaie, E.C.M. Chen, E.S.D. Chen, W.E. Wentworth, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1991, **180**, 841.
- [118] A.N. Rihardson, J. Gu, S. Wang, Y. Xie, H.F. Schaefer III, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 4404.
- [119] P. Sarmah, R.C. Deka, *Mol. Simulat.*, 2008, **34**, 879.
- [120] N.A. Oyler, L. Adamowicz, *J. Phys. Chem.*, 1993, **97**, 11122.
- [121] B. Karwowski, *Tetrahedron Asymm.*, 2008, **19**, 2390.
- [122] P. Jaruga, J. Theruvathu, M. Dizdaroglu, P.J. Brooks, *Nucl. Acid. Res.*, 2004, **32**, e87.
- [123] P.-L. Loos, E. Dumont, A.D. Laurent, X. Assfeld, *Chem. Phys. Lett.*, 2009, **475**, 120.
- [124] B.T. Karwowski, J. Gaillard, A. Grand, J. Cadet, *Org. Biomol. Chem.*, 2008, **6**, 34.
- [125] R. Surma, M. Alejska, M. Gawron, *Pol. J. Chem.*, 1994, **68**, 2553.
- [126] D.S. Goodsell, M. Kaczor-Grześkowiak, R.E. Dickerson, *J. Mol. Biol.*, 1994, **239**, 79.
- [127] A. Romieu, D. Gasparutto, J. Cadet, *Chem. Res. Toxicol.*, 1999, **5**, 412.
- [128] P.J. Brooks, D.S. Wise, D.A. Berry, J.V. Kosmoski, M.J. Smerdon, K. Coleman, R.E. Tarone, J.H. Robbins, *J. Biol. Chem.*, 2000, **275**, 22355.
- [129] I. Kuraoka, Ch. Bender, A. Romieu, J. Cadet, R.D. Wood, T. Lindahl, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2000, **97**, 3832.
- [130] I. Kuraoka, P. Robins, F. Masutani, F. Hanaoka, D. Gasparutto, J. Cadet, R.D. Wood, T. Lindahl, *J. Biol. Chem.*, 2000, **276**, 49283.
- [131] Y. Boulard, *7th Conférence de recherche hivernales*, Les Houches, France, 19-24 Mars 2006.

Praca wpłynęła do Redakcji 11 października 2010

ROLA SKŁADNIKÓW AKTYWNYCH W PROCESIE STARZENIA SIĘ SKÓRY

THE ROLE OF ACTIVE INGREDIENTS IN THE PROCESS OF SKIN AGING

**Beata Łubkowska¹, Beata Grobelna²,
Zbigniew Maćkiewicz¹**

¹ *Pracownia Chemii Polipeptydów,*

² *Katedra Chemii Analitycznej,*

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

e-mail: b.lubkowska@gmail.com

Abstract

Wprowadzenie

1. Budowa skóry i jej właściwości
2. Starzenie się warstw skóry
3. Zapobieganie procesom starzenia się skóry
4. Niskocząsteczkowe składniki aktywne

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

mgr Beata Lubkowska – urodziła się w 1985 roku w Gdańsku. W latach 2004–2009 studiowała na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego – w roku 2009 uzyskała tytuł magistra. Równoległe ze studiami magisterskimi uczyła się w Zaocznym Studium Kosmetyki Naturalnej – w roku 2008 uzyskała dyplom Technika Usług Kosmetycznych. Obecnie jest słuchaczką Stacjonarnych Studiów Doktoranckich Chemii i Biochemii na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, gdzie wykonuje prace doktorską pod kierunkiem prof. dr hab. Zbigniewa Maćkiewicza. Prowadzone przez nią badania dotycząca peptydów o właściwościach przeciwmarszczkowych.

dr Beata Grobelna – starszy wykładowca w Katedrze Chemii Analitycznej. Autorka i współautorka kilkudziesięciu prac naukowych i ponad pięćdziesięciu komunikatów zamieszczanych na polskich oraz międzynarodowych konferencjach. W roku 2008 ukończyła studia podyplomowe o kierunku Kosmetologia na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywnieniu Politechniki Łódzkiej. Autorka licznych wykładów oraz ćwiczeń z chemii kosmetycznej. Jej praca naukowa obejmuje syntezę i badania spektroskopowe nieorganicznych materiałów luminescujących otrzymywanych metodą zol-żel. Ostatnio opracowuje i bada własności receptur kosmetycznych zawierających peptydy.

prof. dr hab. Zbigniew Maćkiewicz – kierownik Pracowni Chemii Polipeptydów w Katedrze Syntezy Organicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego – zajmuje się syntezą w roztworze i na nośniku stałym polipeptydów stosowanych w badaniach immunologicznych. Główne kierunki pracy jego zespołu to: syntezy, badania immunogenności fragmentów antygenów wirusa zapalenia wątroby typu B (HBV) i C (HCV) oraz opracowywanie testów diagnostycznych na wykrywanie WZW typu B i C. W ostatnich latach zespół prof. Maćkiewicza zajmuje się otrzymywaniem peptydów biologicznie czynnych i ich oddziaływaniem z kationami metali ciężkich (Cu, Zn) oraz chemiczną syntezą fragmentów parahormonu (PTH) i wybranych fragmentów ludzkich białek szoku termicznego (Hsp). Nowy kierunek badań zespołu to: polipeptydy w kosmetyce, ich synteza, opracowanie receptur kosmetyków oraz badania właściwości peptydów w wybranych preparatach kosmetycznych.

ABSTRACT

Skin is the coating of all human and animal organisms. It is a kind of space where different processes take place. Skin is the largest and the heaviest organ in the body. Also, it is a barrier, that stops water and the part of body, which should be particularly protected [1]. The skin is composed of three main layers: epidermis (Fig. 1), dermis (Fig. 3) and subcutaneous tissue (Fig. 5). Each of these layers has completely different role and is characterized by various properties.

Epidermis is the outermost layer of skin. It consists of a living and a dead zone. The living area forms new cells which are the subject to further changes, while in the zone of dead cells they are highly flattened and devoid of nuclei [2]. In the epidermis, exactly in the reproductive output layer there are melanocytes, which are cells responsible for production of the pigment – melanin (Fig. 2). Melanin is responsible for color of hair, eyes and skin. It is formed from tyrosine as a result of numerous biochemical reactions [3]. Biological activity of melanin is determined by the presence of appropriate peptide. The sequences of its active components are: Ser–Tyr, Ser–Met–Glu–His–Phe–Arg, and Trp–Gly–Lys–Pro–Val.

It is possible to protect the skin also against the solar radiation. The hormone MSH absorbs and reflects UV radiation. Under the influence of UV radiation the amount of melanin increases, causing temporary changes in skin color [3].

Under the epidermis there is a proper skin, which is composed of elastic fibers, collagen fibers, and the basic substance, which fuses the fiber elements. The elastic fibers are scattered among collagen fibers. Proper skin is the place where a valuable protein – very important in cosmetics – occurs – the native collagen. It is the main protein of connective tissue. Collagen has a very high tensile strength and is a major component of tendons. It is responsible for skin elasticity. Loss of collagen from the skin causes wrinkles [4].

A distinctive layer of skin is the subcutaneous tissue. It combines dermis with muscles. It is composed of fat cells separated by connective tissue. The size and the shape of fat cells vary depending on gender, diet and also age [5].

Skin, like other authorities is aging. These process may be accelerated or delayed under the influence of various endogenous and exogenous elements (Tab. 1). Also genetic predisposition are of significant importance. It seems that, as soon as we age, we inherit from our ancestors. To delay the aging process, it is necessary to properly take care of and protect the skin. There are many ways to delay aging of the skin. The most successful, for example cosmetics with active ingredients such as peptides, will be presented here.

Keywords: skin, aging process, collagen, elastin, peptides, MSH hormone

Słowa kluczowe: skóra, procesy starzenia, kolagen, elastyna, peptydy, hormon MSH

WPROWADZENIE

Skóra (grec. *derma*) jest powłoką wszystkich organizmów ludzkich oraz zwierzęcych. Stanowi swoistą przestrzeń, która podobnie jak inne organy ulega procesom starzenia. Procesy te mogą ulec przyśpieszeniu lub opóźnieniu pod wpływem różnych czynników wewnątrzpochodnych i zewnątrzpochodnych. Nie bez znaczenia pozostają także uwarunkowania genetyczne. To jak szybko się starzejemy dziedziczymy po naszych przodkach. Chcąc jednak opóźnić procesy starzenia niezbędna jest właściwa pielęgnacja i ochrona [2, 3]. Do tego celu mogą służyć białka i peptydy, które nie tylko w kosmetykach, ale również w skórze stanowią istotny element. Kolagen i elastyna to białka podporowe skóry. Umieszczone w kosmetyku, zwykle w postaci hydrolizatów, odpowiadają za jędrność, elastyczność oraz utrzymanie prawidłowego nawilżenia skóry. Niskocząsteczkowe peptydy, które odkryto ponad dekadę temu, dzięki swojej aktywności przenikają przez skórę i wędrują tam, gdzie są najbardziej potrzebne. Zatem posiadają obok właściwości pielęgnacyjnych, również właściwości regeneracyjne. To właśnie ta zaleta sprawiła, iż zaliczono je do grupy kosmeceutyków posiadających zdolności naprawcze skóry.

Skóra to ważny narząd, będący miejscem działania polipeptydów oraz innych związków wykazujących aktywność biologiczną. Jest największym i najcięższym narządem ciała. Jej powierzchnia u dorosłego człowieka wynosi 1,5–2 m², natomiast waga to około 4 kg. Skóra to bariera, która zatrzymuje wodę oraz organ, o który należy szczególnie dbać [4]. Zatem kontynuując nasze badania związane z biologicznie czynnymi związkami [6–8] w niniejszej pracy prezentujemy budowę oraz właściwości fizyczne i chemiczne polipeptydów i białek zapobiegających procesom starzenia się skóry.

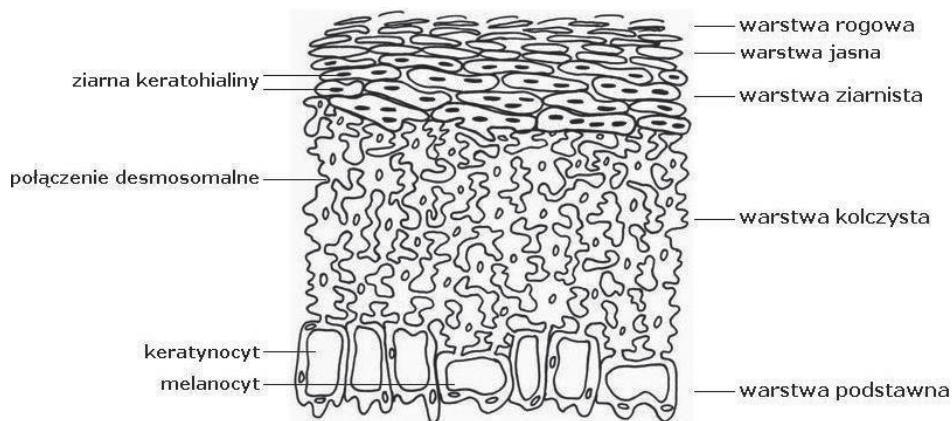
Artykuł dokonuje przeglądu najpopularniejszych białek oraz peptydów, posiadających właściwości przeciwzmarszczkowe. Obecnie są to składniki, najbardziej pożądane przez różnego rodzaju konsumentów, szczególnie w grupie wiekowej 30+. Stało się to siłą napędową dla producentów i przyczyną poszukiwań coraz to nowszych sekwencji aminokwasów, które wygładzą, ujędrnią, a także poprawią nawilżenie skóry.

1. BUDOWA SKÓRY I JEJ WŁAŚCIWOŚCI

Skóra zbudowana jest z trzech głównych warstw: naskórka, skóry właściwej oraz tkanki podskórnej. Każda z tych warstw pełni inną rolę i charakteryzuje się różnymi właściwościami [4].

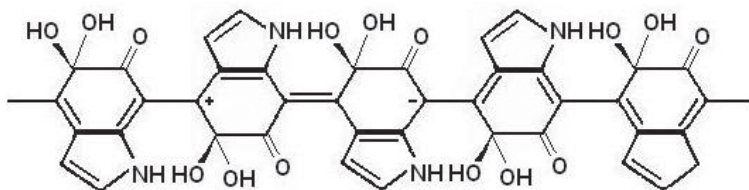
Pierwszą i najbardziej zewnętrzną warstwą skóry jest naskórek (*epidermis*). Spełnia on najważniejsze funkcje ochronne przed czynnikami fizycznymi i chemicznymi oraz chorobotwórczymi, poza tym nie przepuszcza wody [9]. Składa się głównie z keratynocytów, czyli komórek ściśle przylegających do siebie, ułożonych w zachodzące na siebie warstwy [10]. Komórki nabłonkowe naskórka odnawiają się

przeciętnie co 28 dni. W trakcie procesu keratynizacji stopniowo przekształcają się, tworząc różne warstwy, każdą o odmiennej specyfice. Od wewnątrz do zewnątrz wyróżniamy: warstwę podstawną (zwaną rozrodczą), warstwę kolczystą, warstwę ziarnistą, warstwę jasną oraz warstwę rogową (Rys. 1).



Rysunek 1. Budowa naskórka [Wykonała B. Łubkowska na podstawie opisów w literaturze 4, 5, 9]
Figure 1. Construction of epidermis

Warstwa podstawna inaczej zwana rozrodczą lub bazalną (*stratum basale*) – to najgłębsza warstwa naskórka. Ma zdolność tworzenia nowych komórek, które zastępują złuszczone. Zbudowana jest ze ściśle przylegających do siebie komórek o wydłużonych jądrach, które połączone są ze sobą oraz z komórkami warstwy kolczystej za pomocą tzw. desmosomów [4]. W warstwie twórczej znajdują się: melanocyty, czyli komórki, które produkują melaninę. Melanina jest barwnikiem odpowiedzialnym za barwę włosów, oczu oraz skóry (Rys. 2).



Rysunek 2. Budowa melaniny [Wykonała B. Łubkowska na podstawie literatury 3]
Figure 2. Construction of melanin

Melanina chroni głębsze warstwy skóry przed szkodliwym działaniem promieni ultrafioletowych (pochłania je i odbija) [3]. Wyróżnia się 3 rodzaje melanin: eumelaniny, feomelaniny i neuromelaniny. Melaniny to polimery, których skład chemiczny zależy przede wszystkim od natury substratu i warunków lokalnych, w jakich te substancje powstają. Melanina powstaje z tyrozyny w wyniku licznych reakcji biochemicznych. Enzymem, który jest odpowiedzialny za przekształcenia prowadzące

do powstania melaniny, jest tyrozy-naza. Jednym z czynników aktywujących tyrozy-nazę są jony miedzi [10]. Melanina jest syntezowana przez melanotropinę, czyli hormon polipeptydowy tylnej części przysadki mózgowej. Melanotropina zwana również hormonem MSH lub hormonem melanotropowym reguluje stężenie melaniny w komórce, aktywuje procesy melanogenezy. Rozróżnia się trzy formy melanotropiny: α , β i γ . Hormon α -melanotropowy, melanotropina α lub (α -MSH) jest zbudowana z 13 reszt aminokwasowych niezależnie od gatunku, podczas gdy, łań-cuch melanotropiny β (β -MSH) ma długość zależną od gatunku, najczęściej zbudowa-ną (u większości ssaków) z 18 reszt aminokwasowych (u człowieka 22 reszty). Wydzielany jest również 11-aminokwasowy hormon γ -melanotropowy (γ -MSH). Wszystkie formy są pochodnymi proopiomelanokortyny, z której odpowiednie sek-wencje aminokwasowe wycinane są w trakcie procesu potranslacyjnej proteolizy [10]. Aktywność biologiczna melanotropiny jest uwarunkowana obecnością odpo-wiedniego peptydu, którego aktywna część zawiera następujące reszty aminokwa-sowe: Ser–Tyr, Ser–Met–Glu–His–Phe–Arg, oraz Trp–Gly–Lys–Pro–Val.

Ponadto w warstwie podstawnej występują komórki Langerhansa odpowiedzialne za mechanizmy odpornościowe oraz komórki Merkela, połączone z zakończeniami nerwowymi naskórka. Komórki Langerhansa są to inaczej makrofagi, które rozpo-znają i unieszkodliwiają ciało obce, jakie wniknęło w skórę. Komórki Merkela są to szczególnego typu keratynocyty wykazujące czynność neuroendokrynną. Ich zakoń-czenia stykają się z włóknami nerwowymi, co pozwala wysunąć teorię, że komórki te pełnią rolę przekaźników [4].

Podczas procesów rozrodczych komórki mnożą się, a następnie wędrują od warstwy rozrodczej do warstwy rogowej. W czasie tego procesu komórki tracą swą miękkość i pozbywają się wody, aż w końcu wysychają, obumierają i ulegają oddzie-leniu w procesie złuszczenia [11]. Z wiekiem proces ten wydłuża się i może trwać nawet około 60 dni. Podziały stają się nieregularne, gdyż pewna ilość komórek utra-ciła już zdolność do podziałów. Komórki warstwy twórczej – niedożywione i nie dotlenione, spowalniają mechanizm podziałów komórkowych [12].

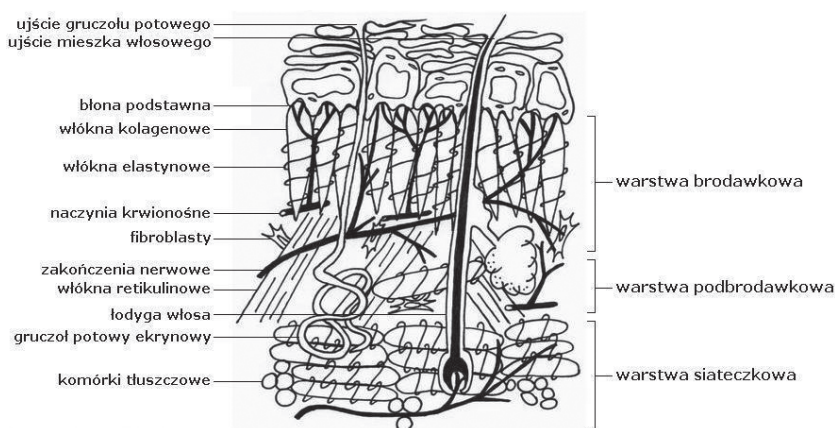
Warstwa koleczysta (*stratum spinosum*) – to najgrubsza warstwa naskórka, zbu-dowana jest z kilku rzędów (do 12) wielobocznych komórek, które ulegają spłasz-czeniu przy przechodzeniu w kierunku powierzchni naskórka. Warstwa ta jest kon-strukcją oporową nadającą skórze spoistość i jędrność. Warstwy podstawna i kol-czysta stanowią żywy, czynny metabolicznie naskórek i określane są razem mianem warstwy Malpighiego [3].

Warstwa ziarnista (*stratum granulosum*) – składa się z kilku szeregów wrzecio-nowatych komórek o spłaszczonych jądrach wypełnionych ziarnami keratohialiny, które biorą udział w procesie wytwarzania białka – keratyny. W grubym naskórku warstwa ziarnista składa się z 3–4 warstw tych komórek, natomiast w cienkim może występować tylko jeden szereg [2]. W tej warstwie następuje proces keratynizacji, w wyniku, którego powstają m.in.: ceramidy (sfingolipidy), sterole i wolne kwasy tłuszczowe.

Warstwa jasna (*stratum intermediale, stratum lucidum*) – jest wąskim pasmem położonym między warstwą ziarnistą a rogową. Komórki tej warstwy są silnie spłaszczone, zawierają białko załamujące światło zwane eleidyną. Stąd też warstwa ta jest nieprzepuszczalna dla światła. Jest ona widoczna jedynie w zrogowaciałym naskórku dłoni i stóp lub przy użyciu mikroskopu elektronowego [3].

Warstwa rogowa (*stratum corneum*) – jest to najbardziej zewnętrzna warstwa naskórka, składająca się ze spłaszczonych komórek pozbawionych jąder, czyli korneocytów, które wypełnione są keratyną oraz substancjami tworzącymi NMF [9]. Keratyna chroni skórę przed promieniowaniem UV, przed czynnikami chemicznymi i mechanicznymi oraz wiąże wodę zapobiegając jej ucieczce. Tworzy sieć włókien i stanowi podstawę cytoszkieletu. Głównym aminokwasem wchodzący w skład keratyny jest L-cysteina, której brak jest w elastynie, natomiast w kolagenie są zawarte małe ilości. Rozróżniamy dwa podstawowe typy keratyn: α -keratyny o budowie α -heliakalnej oraz β -keratyny o budowie β -kartki. α -keratyny są bogate w L-cysteinę, występują we włosach, wełnie, paznokciach, szponach i kopytach. Natomiast β -keratyny są ubogie w L-cysteinę, dlatego są sztywne i nierozciągliwe, występują u ptaków (pióra) i gadów.

Naskórek opiera się na błonie podstawnej, która stanowi granicę skórno-naskórkową i przebiega regularną, falistą linią [10]. Tuż pod błoną podstawną znajduje się skóra właściwa (*corium, cutis*) (Rys. 3), która zbudowana jest ze ściśle ułożonych włókien tkanki łącznej zawierającej kolagen [2]. Jest bardzo wytrzymała i elastyczna, dzięki włóknom sprężystym, retikuliny, kolagenowym oraz substancji podstawowej, która zespała elementy włókniste. Włókna retikuliny i sprężyste są rozsiane między włóknami kolagenowymi [4]. W skórze właściwej znajdują się także liczne naczynia krwionośne i zakończenia nerwowe. W skórze właściwej i częściowo w tkance podskórnej zanurzone są torebki włosów oraz wydzielnicze części gruczołów łojowych i potowych.

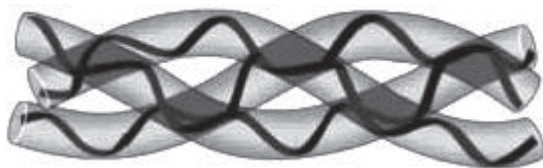


Rysunek 3. Budowa skóry właściwej [Wykonała B. Łubkowska na podstawie opisów w literaturze 4, 5, 9]

Figure 3. Construction of cutis

Skóra właściwa składa się z trzech kolejno leżących nad sobą i przechodzących w siebie warstw. Począwszy od warstwy leżącej tuż pod błoną podstawną, rozróżnia się warstwy: brodawkową, podbrodawkową oraz siateczkową [4].

Warstwa brodawkowa (*stratum papillae*) charakteryzuje się obecnością brodawek oraz zawiera liczne drobne naczynia krwionośne [5]. Warstwa ta składa się z licznych włókien kolagenowych i elastynowych, które odpowiadają za spajanie elementów komórkowych oraz elastyczność i sprężystość skóry. Kolagen jest głównym białkiem tkanki łącznej. Posiada on bardzo wysoką odporność na rozciąganie i stanowi główny składnik ścięgien. Jest odpowiedzialny za elastyczność skóry. Ubytek kolagenu ze skóry powoduje powstawanie zmarszczek, w trakcie jej starzenia. Kolagen wypełnia także rogówkę oka, gdzie występuje w formie krystalicznej [13]. Kolagen ma nietypowy skład aminokwasowy. Około 30% reszt aminokwasowych kolagenu stanowi glicyna, a około 20–25% stanowią cykliczne iminokwasy: L-prolina i L-hydroksyprolina. Obok nich znajdują się również duże ilości L-hydroksylizyny. Hydroksyaminokwasy kolagenu formowane są z L-proliny i L-lizyny już w gotowym produkcie translacji w procesie enzymatycznym, który wymaga obecności witaminy C [13]. Inną rzadką cechą kolagenu jest regularność rozmieszczenia aminokwasów, w każdym z jego α -łańcuchów. Łańcuchy te składają się z regularnych triad aminokwasów: Gly–X–Y, gdzie X to najczęściej L-prolina, a Y to L-hydroksyprolina. Niewiele innych białek wykazuje taką regularność. Regularność ta powoduje, że łańcuchy α mają tendencję do przyjmowania ściśle określonej konformacji, na skutek oddziaływań między sobą. Jest to konformacja helisy typu poliproliny. Istnieją 4 rodzaje struktur poliproliny: PPI, PPII, PPIII oraz PPIV. Aminokwasami preferowanymi w helisie PP są: L-prolina, L-glutamina, L-kwas asparaginowy, glicyna, L-alanina, L-leucyna. Różnice pomiędzy poszczególnymi typami helis poliprolinowych są związane z konfiguracją wiązań amidowych, kierunkiem skrętu helisy oraz wartością kąta torsyjnego ψ . Najczęściej spotykaną strukturą poliproliny jest helisa typu PPII. Konformacja ta jest helisą lewoskrętną, w której wszystkie wiązania peptydowe mają konfigurację *trans*. Helisy PPII są głównymi składnikami kolagenu oraz białek ściany komórkowej roślin. Helisa kolagenowa zbudowana jest z 3 łańcuchów polipeptydowych, z których każdy znajduje się w konformacji poliproliny (Rys. 4). Każdy łańcuch poliproliny składa się z około 1000 reszt aminokwasowych. Częsteczką kolagenu stanowi potrójną helisę prawoskrętną, utworzoną z trzech skręconych wokół siebie łańcuchów polipeptydowych. W utrzymaniu prawidłowej konformacji cząsteczki uczestniczą oddziaływania hydrofobowe oraz wiązania wodorowe między łańcuchami tworzącymi superhelisę kolagenową. Wiązania wodorowe tworzą się po między protonem amidowym reszt glicyny jednego łańcucha, a tlenem karbonylowym reszt znajdujących się na sąsiednim łańcuchu polipeptydowym [13].



Rysunek 4. Model helisy kolagenowej (tzw. tropokolagen) [13]

Figure 4. Helix model of collagen (tropocollagen)

Kolagen występuje w wielu tkankach organizmu, a jego budowa jest zróżnicowana w zależności od funkcji i miejsca występowania. Kolagen jest białkiem niejednorodnym. Istnieje co najmniej 28 genetycznie odrębnych typów tego białka. 95% całego kolagenu w organizmie człowieka stanowi kolagen typu I, II, i III. Typ I obecny jest w skórze, tkance tworzącej blizny, w ścięgnach i tkance łącznej kości. Typ II występuje w chrząstkach stawowych, a typ III występuje w tkance granulowej, tworzącej się z fibroblastów, w trakcie zablizniania ran, zanim zostanie wytworzony kolagen typu I [14].

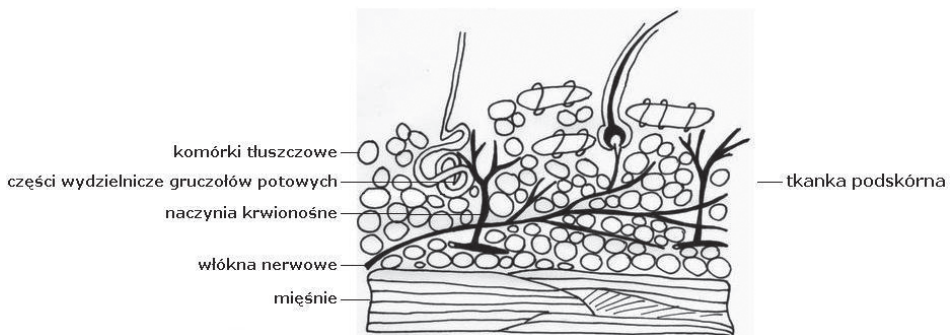
W warstwie brodawkowej występują także włókna sprężyste, zwane inaczej elastycznymi, które nadają skórze sprężystość oraz jędrność. Występują jako pojedyncze włókna tworzące sieć. Taka struktura jest możliwa dzięki łączeniu się łańcuchów polipeptydowych poprzez tak zwane wiązania krzyżowe, które są charakterystyczne zarówno dla kolagenu jak i elastyny. Elastyna zbudowana jest z rozpuszczalnej tropoelastyny (masa cząsteczkowa ok. 64–66 kDa), która po sieciowaniu tworzy nierozpuszczalny kompleks, czyli włókna elastyny. Tropoelastyna jest sieciowana przez desmozynę podobnie jak w przypadku kolagenu [3]. Charakterystyczną cechą elastyny jest podatność na rozciąganie tak, że może osiągnąć kilkakrotnie większą długość, a po usunięciu siły rozciągającej wraca do pierwotnego kształtu. Elastyna zbudowana jest w 80% z 4 reszt aminokwasów: glicyny, L-waliny, L-proliny i L-alaniny. Posiada mniej L-hydroksyproliny niż kolagen i nie zawiera L-hydroksylizyny ani L-cysteiny. W elastynie jest dużo reszt niepolarnych, co nadaje jej charakter wysoce hydrofobowy. Jest ona syntezowana przez komórki nabłonka naczyń oraz komórki mięśni gładkich. Wysoką zawartością elastyny odznaczają się więzadła, ściany naczyń krwionośnych i tkanka płuc a mniejszą ilością tkanka skórna i ścięgna. Elastyna jest najdoskonalszym biologicznym elastomerem. Jest ona jednak syntezowana przez organizm tylko do 25 roku życia. Całkowicie zanika w wieku 40–45 lat [5].

Trzecim rodzajem włókien występującym w warstwie brodawkowej są włókna retikulinoe, które tworzą siatkę w otoczeniu naczyń krwionośnych włosowatych, gruczołów łojowych i potowych oraz mieszków włosowych i włókien nerwowych. Z naczyń krwionośnych substancje odżywcze, tlen i woda przedostają się do limfy a stamtąd do naskórka. Warstwa brodawkowa spełnia więc ważną rolę w metabolizmie skórno-naskórkowym, zaopatrując naskórek oraz odprowadzając produkty przemiany materii i ciała obce.

Warstwa podbrodawkowa (*stratum subpapillae*) jest cienka, znajdują się w niej elementy podstawowe skóry: włókna i komórki, głównie fibroblasty, naczynia krwionośne oraz włókna nerwowe. Nie występują tu brodawki. W głąb warstwa ta przechodzi stopniowo w warstwę siateczkową [9].

Warstwa siateczkowa (*stratum reticulare*) zwana także warstwą zbitą (*stratum compactum*) ze względu na bardziej zbitą strukturę kolagenu. Obejmuje głębsze warstwy aż do tkanki podskórnej. Znajdują się w niej włókna kolagenowe i elastynowe. W stosunku do siebie włókna kolagenowe układają się przeważnie skośnie, a w stosunku do powierzchni skóry przebiegają one prawie równolegle. Przestrzenny układ tych włókien sprawia, że skóra jest wytrzymała. Odpowiedzialny jest on również za to, że po odkształceniu skóra przyjmuje z powrotem kształt wyjściowy. W tej warstwie znajdują się również komórki tłuszczowe, naczynia krwionośne i chłonne, gruczoły łojowe i potowe, mięśnie przywłosowe (powodują powstanie gęsiej skórki) oraz mieszki włosowe [9].

Ostatnią charakterystyczną warstwą skóry jest tkanka podskórna (*subcutis*). Jest to warstwa leżąca pod skórą właściwą, która łączy się z mięśniami położonymi niżej. Zbudowana jest ze zrazików tłuszczowych złożonych z komórek tłuszczowych oddzielonych tkanką łączną. W przestrzeniach międzyzrazikowych znajdują się części wydzielnicze gruczołów potowych, naczynia krwionośne i włókna nerwowe [5]. Nie ma wyraźnej granicy między skórą właściwą a tkanką podskórną. Widoczna jest jedynie stopniowa zmiana wyglądu tkanki łącznej. Jest ona wiotka, niejednolita w różnych częściach ciała (Rys. 5) [14].



Rysunek 5. Budowa tkanki podskórnej [Wykonała B. Lubkowska na podstawie opisów w literaturze 3, 9]
Figure 5. Construction of subcutis

Tkanka podskórna pełni rolę ochronną w przypadku urazów mechanicznych. Chroni przed uciskiem i uderzeniem, umożliwia przesuwanie skóry, izoluje narządy wewnętrzne, nadaje skórze gładkość oraz wzmacnia ją. Komórki tłuszczowe stanowią zapas energii oraz przechowują składniki odżywcze. Grubość tkanki podskórnej ma ścisły związek z odżywianiem. Poza tym ważne są czynniki genetyczne, takie jak: wpływ hormonów i przemiana materii. Przekarmianie prowadzi do nad-

miernego odkładania się tkanki tłuszczowej, co rzutuje w przyszłości zwiększoną podatnością na gromadzenie tłuszczu [2].

2. STARZENIE SIĘ WARSTW SKÓRY

Starzenie się skóry objawia się głównie poprzez jej wysuszenie. Jest to pierwsze widoczne pogorszenie stanu skóry wiążące się z utratą elastyczności. Na początku tylko wnikliwe badanie ujawnia bardzo delikatne zmarszczki i słabo widoczne rozluźnienie skóry. Następnie wysuszenie nasila się, prowadząc do powstania skóry szorstkiej, matowej, bladej i w końcu złuszczonej się. Pojawiają się coraz głębsze zmarszczki [15].

Pod względem fizjologicznym skóra zaczyna się starzeć około 30-tego roku życia. Często jednak ten proces rozpoczyna się wcześniej, jeżeli narażamy skórę na działanie szkodliwych czynników endogennych i egzogennych (Tab. 1).

Tabela 1. Czynniki wpływające na stan skóry [9]

Table 1. Endogenous and exogenous elements

WEWNĄTRZPOCHODNE (endogenne)	ZEWNĄTRZPOCHODNE (egzogenne)
<ul style="list-style-type: none"> - uwarunkowania genetyczne - utlenianie lipidów - uszkodzenie procesu wytwarzania NMF - zanik warstwy rogowej a także rozrodzej naskórka - zmniejszenie z wiekiem produkcji fibroblastów - spowolnienie wzrostu komórek - zmiana struktury włókien kolagenowych - utrata elastyczności - destruktywne działanie wolnych rodników 	<ul style="list-style-type: none"> - niehigieniczny tryb życia - brak relaksu na świeżym powietrzu - nie uprawianie sportu - za mało snu - palenie papierosów - destruktywne działanie promieni słonecznych - zanieczyszczenia środowiska - stres - długotrwałe przebywanie w zadymionych i nie wietrzonych pomieszczeniach lub niskich temperaturach

Na szybkość starzenia się skóry zależną od czynników endogennych mamy niewielki wpływ. Działanie czynników egzogennych można spowolnić, np. przez właściwą pielęgnację (tzn. higieniczny tryb życia, sporty na świeżym powietrzu, spacer, unikanie stresów, odpowiednią ilość snu) oraz neutralizowanie zmian zachodzących w skórze poprzez głębokie nawilżanie i odżywianie [4].

Tak jak skóra zbudowana jest z trzech podstawowych warstw, tak w tych poszczególnych warstwach zachodzą procesy starzenia [3]. W obrębie naskórka, skóry właściwej oraz tłuszczowej tkanki podskórnej zachodzą inne mechanizmy. Warstwy żywe naskórka stają się coraz cieńsze, brodawki łączące naskórek ze skórą właściwą ulegają spłaszczeniu i częściowo zupełnie zanikają. Zmiany te polegają na zmniejszeniu liczby komórek warstwy podstawnej naskórka. Spłaszczenie brodawek prowadzi do zwiększenia wrażliwości na urazy, głównie przesunięcia skóry. Częściowy

zanik komórek warstwy podstawnej i mniejsza częstość podziału pozostałych komórek tej warstwy spowalnia proces odbudowy powodując, że wydłużony jest czas, w jakim keratynocyt przemierza warstwy naskórka i ulega złuszczeniu. Przez to spowolnienie opóźnia się także gojenie ran i urazów [4]. Na niektórych obszarach zwiększa się grubość warstwy rogowej. Funkcja ochronna tej warstwy zostaje zaburzona za sprawą zmienionego składu tłuszczów, co objawia się głównie większą wrażliwością na rozpuszczalne w wodzie substancje drażniące. Ta zmiana ma związek ze szczególnie suchą skórą w starszym wieku. Liczba melanocytów i komórek Langerhansa maleje wraz z postępującym procesem starzenia. Zmniejszenie liczby melanocytów powoduje gorszą ochronę przed promieniowaniem słonecznym. Ponadto nierównomierne wytwarzanie melaniny powoduje powstanie typowych plam i przebarwień starczych, a zanik tego barwnika w mieszczkach włosowych rozpoczyna proces siwienia. Ilość komórek Langerhansa zmniejsza się aż o 50%, co prowadzi do osłabienia układu odpornościowego. Wydzielanie łoju również ulega zmniejszeniu i wpływa znacząco na wysuszenie skóry. W wyniku tego procesu następują zmiany składu błony hydrolipidowej, a w rezultacie zmiana pH skóry, które staje się bardziej zasadowe i mniej odporne na szkodliwy wpływ środowiska oraz mikroorganizmów [2].

W skórze właściwej następuje zmniejszenie liczby i wielkości fibroblastów. Obserwuje się spadek zużycia tlenu i zmniejszenie poziomu ATP międzykomórkowego, powodujące pogorszenie zdolności syntezy białek z wyraźnym zmniejszeniem zdolności przechodzenia do wnętrza komórki. Zanika żel proteoglikanowy (traci kwas hialuronowy i siarczan dermatanu), który wypełnia przestrzeń między włóknami tkanki łącznej. Powoduje to ograniczenie zdolności wiązania wody w tkance i przez to gwałtownie zmniejsza się jędrność i elastyczność skóry [14]. Wraz ze starzeniem się organizmu stopniowo zmniejsza się ilość i jakość włókien. Skóra traci napięcie, zaczyna się marszczyć, zwiślać i staje się sztywna. W trzeciej dekadzie życia zmniejsza się wytwarzanie kolagenu. Włókna kolagenu ulegają fragmentacji, postępuje tzw. sieciowanie kolagenu, czyli tworzenie splotów poprzecznych, co oznacza, że z biegiem procesu starzenia kolagen staje się nierozpuszczalny, mniej elastyczny i bardziej kruchy [13]. Bez kolagenu nie ma życia, jest on najpotężniejszym białkiem kręgowców. Zawartość kolagenu w skórze zaczyna spadać już po 20-tym roku życia o 1% rocznie. Przez cały okres życia człowieka istnieje obrót kolagenu. Zużyty ulega degradacji, a braki są natychmiast uzupełniane. Jednak w okresie przekwitania u kobiet i mężczyzn, w wyniku stresogennego trybu życia, a także w wyniku wyniszczających chorób, przy ciągłych przeciążeniach (aktywność fizyczna, sport wyczynowy) więcej kolagenu ulega degradacji niż jest produkowane, czyli rozpoczyna się proces starzenia. Przy niedoborze kolagenu pojawiają się starcze zmiany ciała: zmarszczki, przebarwienia, cellulit, suchość skóry, matowienie paznokci i włosów, przykurczenie sylwetki. Najgroźniejsze dla zdrowia i życia są zaburzenia w układzie odpornościowym, gdzie kolagen sprawuje bardzo ważną funkcję obronną, tzn. ogranicza wnikanie i rozprzestrzenianie się ciał pato-

genny, takich jak: toksyny środowiskowe, drobnoustroje i komórki nowotworowe. W miarę starzenia się organizmu wzrasta liczba wiązań sieciujących (głównie kowalencyjnych), co powoduje, że struktura kolagenu staje się bardziej sztywna, a kolagen z formy rozpuszczalnej przechodzi w formę nierozpuszczalną. Z wiekiem traci też swoją wytrzymałość, co spowodowane jest uszkodzeniem struktury białek, np. przez działanie promieni UV. Z wiekiem także włókna sprężyste (elastyny) ulegają zwyrodnieniu i wraz z włóknami kolagenowymi zbijają się w bezpostaciową masę. Włókna elastyny często zbijają się w bryłki, ulegają rozrzedzeniu lub zanikają w warstwie brodawkowej skóry, a rezultatem tego jest utrata elastyczności i powstanie zmarszczek [14]. Ponadto dochodzi do zmniejszenia syntezy kolagenu, proteoglikanów oraz do zaniku tworzenia się nowych naczyń krwionośnych. Konsekwencją tych zmian w tkance łącznej jest pojawienie się zmarszczek, bruzd, zmniejszenie elastyczności oraz zwiększenie wrażliwości skóry [4].

W porównaniu do procesów starzenia się innych warstw skóry, zmiany zachodzące w warstwie tkanki podskórnej nie są tak wyraźne. W starszym wieku może nastąpić zarówno ubytek, jak i powiększenie się tkanki tłuszczowej. Całość tych zmian prowadzi do powstania skóry starczej. Taka skóra jest cienka i pergaminowa, może się lekko łuszczyć i bardzo często jest sucha. Widoczne są zmarszczki powierzchniowe, głębsze oraz bruzdy, słabe ukrwienie (bładość) i ogólne zwiótnienie. Często są także typowe zmiany starcze, takie jak: plamy soczewicowate oraz brodawki skórne [14].

Proces starzenia się skóry nie jest łatwo powstrzymać, szczególnie, gdy skóra przez dłuższy czas poddawana była szkodliwym wpływom zarówno czynników wewnętrznych jak i zewnętrznych. W młodości szczególną uwagę należy zwracać na zdrowe żywienie, wystarczającą ilość snu, unikanie nadmiernego nasłonecznienia, a także nie palić tytoniu. Starzenie się skóry jest częściowo uwarunkowane genetycznie. Zatem to, jak szybko będziemy się starzeć, dziedziczymy po naszych przodkach. Dzięki jednak odpowiedniej pielęgnacji, stosując właściwe i systematycznie preparaty kosmetyczne, można spowolnić proces starzenia się skóry a także osiągnąć poprawę stanu skóry u osób starszych [2].

3. ZAPOBIEGANIE PROCESOM STARZENIA SIĘ SKÓRY

Z wiekiem zmienia się stan skóry. Warunkiem utrzymania dobrego wyglądu jest stała obserwacja. Trzeba nauczyć się patrzeć na swoją twarz i dostrzegać na niej najdrobniejsze nawet zmiany, po czym dostosować do nich pielęgnację. Pojawienie się na twarzy pierwszych zmarszczek odzwierciedla efekty naszego trybu życia, samopoczucia i nastawienia do świata. Spowolniają się procesy regeneracji skóry i pojawiają się pierwsze zmarszczki. Na początku drobne, z czasem coraz wyraźniejsze. To czas, kiedy warto rozpocząć zabiegi hamujące procesy starzenia się skóry [15].

Najbardziej rozpowszechnioną metodą walki z upływającym czasem jest pielęgnacja skóry za pomocą kosmetyków zawierających składniki aktywne. Jednym

z najbardziej znanych i cenionych składników aktywnych jest kolagen, zwany popularnie „białkiem młodości”. Z wiekiem każdemu organizmowi ludzkiemu ubywa kolagenu, stąd pojawiają się zmarszczki [13]. Kolagen skleja włókna stanowiąc doskonałą podporę. Wspomaga wytrzymałość skóry na nacisk zewnętrzny oraz podczas rozciągania skóry. W kosmetyce wykorzystuje się kolagen typu III, inaczej zwany tropokolagenem lub kolagenem natywnym. Izolowany jest z zarodków młodych cieląt. Posiada on najsilniejsze właściwości nawilżające oraz zdolność przenikania w głąb naskórka. Dobre właściwości posiada również kolagen typu I, izolowany z ryb. Nie jest on jednak tak stabilny kosmetycznie jak typ III. Ponadto w kosmetykach stosuje się hydrolizaty kolagenu oraz elastyny. Mają one znane i wielokrotnie potwierdzone działania pielęgnacyjne; tworząc na skórze ochronny film, ograniczają transepidermalną utratę wody, natomiast w kosmetykach myjących chronią przed powstaniem podrażnień [15]. Jednak tym polipeptydom brakuje aktywności regeneracyjnej lub biologicznej w odniesieniu do skóry, stąd też ich miejsce obecnie zastępują mniejsze peptydy aktywne biologicznie.

4. NISKOCZĄSTECZKOWE SKŁADNIKI AKTYWNE

Preparaty kosmetyczne są szeroko stosowane na całym świecie do walki z upływającym czasem. Naukowcy opracowują coraz to nowsze receptury kremów „działających cuda”. Obecnie przemysł kosmetyczny rozwinął się tak bardzo, że praktycznie każdy krem czy maska kosmetyczna znajdują swoich odbiorców. Nie każdy jednak kosmetyk sprzyja zachowaniu młodej skóry. Warto więc wybrać preparaty, które zawierają składniki aktywne [16].

Do składników aktywnych i coraz chętniej stosowanych w kosmetyce zalicza się peptydy, które zawierają w swym składzie do 7 reszt aminokwasów, dzięki czemu łatwo mogą przenikać przez naskórek. Peptydy lokalizują się w skórze właściwej, a szybkość ich przenikania przez naskórek zależy od wielu czynników, np.: charakteru chemicznego aminokwasów oraz rodzaju kosmetyku. Niskocząsteczkowe peptydy zawierają ściśle zdefiniowaną sekwencję aminokwasów, dokładnie taką, która umożliwia przekazywanie sygnału biologicznego [16]. Mogą wykazywać bardzo szeroki wachlarz aktywności. Mają działanie przeciwmarszczkowe, co wykazano w badaniach *in vivo* oraz *in vitro* na przestrzeni ostatnich kilku lat. Działają głównie na trzech płaszczyznach, stąd mogą stymulować, rozkurczać oraz transportować [17]. W zależności od tego, można podzielić je na 3 zasadnicze grupy:

- peptydy sygnałowe,
- inhibitory neurotransmiterów,
- peptydy transportujące.

Peptydy sygnałowe, inaczej peptydy stymulujące uczestniczą w odbudowie warstwy sprężystej skóry. Stymulują skórę do produkcji białek podporowych, które z wiekiem ulegają degradacji. Stanowią sygnał dla fibroblastów do zwiększonej produkcji białek, stąd ich nazwa. Stymulują również: peptydoglikany, fibronektynę,

glikozaminoglikany. Peptydy sygnałowe są fragmentami sekwencji białka kolagenu lub elastyny. Efektem zrekonstruowanej siatki kolagenu jest wygładzenie skóry i poprawa jej jędrności [18]. Peptydy te są najczęściej wzbogacone w część lipofilową (kwas tłuszczowy, zwykle kwas palmitynowy), w celu ich stabilizacji w preparatach kosmetycznych oraz w celu zwiększenia ich zdolności do przenikania przez skórę. Taki peptyd z częścią lipofilową działa od 5 do 10-krotnie razy lepiej. W skórze trudno dyfundują hydrofilowe substancje, a peptydy i białka mają charakter hydrofilowy, gdyż zawierają grupy amidowe oraz tworzą wiązania wodorowe. Dlatego, w skład peptydów stosowanych w kosmetykach wchodzi najczęściej nie naładowane aminokwasy, ponieważ lepiej rozpuszczają się w skórze, lepiej dyfundują i są zwykle hydrofobowe [19]. Peptydy stymulujące są krótkie, zawierają do 6 reszt aminokwasów, ale zdarzają się też 8 i 20-peptydy, które wykazują aktywność biologiczną. Oto najpopularniejsze z nich:

Heksapeptyd **Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly** odkryto podczas studium pochodnej elastyny i wykazano, że istotnie stymuluje proliferację fibroblastów w skórze właściwej, podczas równoczesnego regulowania mechanizmu fizjologicznego elastyny. Sekwencja ta ma również istotny wpływ na chemotaksję fibroblastów [17]. Dodatkowo peptyd ten pośredniczy w regulacji działania metaloproteinaz MMP-1 i MMP-3 w stanach zapalnych skóry. W starzejącej się skórze fibroblasty wykazują zmniejszoną szybkość syntezy kwasu rybonukleinowego (mRNA), będącego matrycą dla syntezy kolagenu I, który w największym stopniu wpływa na prawidłowy wygląd skóry. Naturalne starzenie jest także wynikiem ograniczenia szybkości replikacji fibroblastów oraz zwiększenia aktywności metaloproteinazy matrycy I (MMP-1). Końcowym efektem zwiększonej aktywności MMP-1 jest zmniejszenie grubości skóry. Tak, więc wszystkie czynniki stymulujące biosyntezę białek pozakomórkowej matrycy, włączając w to produkcję kolagenu i elastyny, jak i zmniejszające efektywność działania enzymów rozkładających oba białka będą miały wpływ na zmniejszenie zmarszczek, a tym samym na poprawę wyglądu skóry [20, 21].

Palm-Lys-Thr-Thr-Lys-Ser to sekwencja będąca fragmentem struktury prokolagenu typu I [19]. Peptyd ten jest połączony z kwasem palmitynowym, aby przyspieszyć transport przez naskórek i dotrzeć do skóry właściwej. Jego działanie polega na stymulowaniu fibroblastów do produkcji makromolekuł tkanki łącznej, szczególnie kolagenu, fibronektyny i glikozaminoglikanów, co prowadzi do zwiększenia ilości białka pozakomórkowej matrycy skóry właściwej. Regeneruje także strukturę skóry redukując plamy skórne, które pojawiły się w procesie starzenia [22, 23].

Aktywność peptydów rozkurczających polega na rozkurczaniu mięśni odpowiedzialnych za powstawanie tzw. zmarszczek mimicznych. Mechanizm działania tej grupy peptydów polega na blokowaniu przepływu impulsów z komórek nerwowych znajdujących się w skórze do mięśni. W wyniku tego mięśnie nie dostają sygnału aby się skurczyć i pozostają rozluźnione. Tak działające związki określa się również jako neuropeptydy bądź inhibitory neurotransmiterów [18]. Ich aktywność jest porównywalna z działaniem toksyny botulinowej, jednakże efekty ich działania

nie są tak silne, ale regularne ich stosowanie daje doskonale efekty. Dodatkową ich zaletą jest nieinwazyjność i brak powikłań. Peptydy te powodują nawilżenie, ujędrnienie, zmniejszenie szorstkości skóry oraz wygładzenie zmarszczek [19]. Warto dodać, iż kremy z udziałem peptydów rozkurczających stosuje się w okolicach zmarszczek, a nie bezpośrednio na zmarszczki. Najlepiej poznane peptydy tej grupy występują pod opatentowanymi nazwami: Argireline[®] oraz Syn[®]-Ake.

Argireline[®] (McEit [Tianjin] International TradeCo., Ltd.), zwana inaczej Acetylem hexapeptydu posiada następującą sekwencję: Ac-Gly-Glu-Met-Gln-Arg-Arg. Jest to syntetyczny peptyd ukształtowany z N-końcowego białka SNAP-25 [18]. Ten neuropeptyd zmniejsza intensywność napięcia mięśni, co z kolei sprzyja złagodzeniu i zmniejszeniu zmarszczek mimicznych, indukowanych przez ciągłe ruchy twarzy. Mechanizm działania polega na hamowaniu tworzenia kompleksu SNARE i uwalnianiu neurotransmiterów. Inhibujące uwalnianie acetylocholinę blokuje tym samym przekazywanie informacji o skurczu mięśni [24].

Innym neuropeptydem zmniejszającym skurcz mięśni jest tripeptyd o nazwie handlowej **Syn[®]-Ake** (Lipotec S.A.) i sekwencji β -Ala-Pro-Dab-benzyl \times 2 AcOH. Wykazuje on podobne działanie jak neurotoksyna Walglerin-1, odnaleziona w jadzie żmiji, czyli jest antagonistą acetylocholinę będącej neurotransmiterem w acetylocholinowych receptorach (mnAChR). Tripeptyd wiążąc się z receptorami w strefie postsynaptycznej synapsy uniemożliwia związanie acetylocholinę, czego wynikiem jest blokowanie informacji o skurczu i mięśnie pozostają rozluźnione [25]. Podobnie jak w przypadku **Argireline[®]**, zmniejszenie częstości występowania skurczów mięśni daje efekt zmniejszenia zmarszczek i poprawienia wyglądu skóry.

Peptydy transportujące transportują jony metali do wnętrza komórki. Zwykle jest to miedź, ale transportują również mangan i cynk. Dzięki zdolnościom kompleksowania jonów metali, zyskują szersze spektrum aktywności. Natomiast metale są potrzebne białkom, które uczestniczą w procesach metabolicznych skóry, w procesach enzymatycznych oraz do leczenia stanów zapalnych skóry [19].

Gly-His-Lys to tripeptyd o właściwościach transportujących, a także stymulujących, który kompleksuje jony miedzi i odgrywa kluczową funkcję w naszej skórze. Ta sekwencja peptydowa zgodna jest z tą znajdującą się w białkach matrycy zewnątrzkomórkowej jako fragment łańcucha α -kolagenu i jest uwalniana z kolagenu podczas gojenia ran, stanów zapalnych, a także ma bezpośredni wpływ na stymulację syntezy nowej struktury kolagenowej. Kompleks GHK-Cu został stworzony w celu poprawy zdolności przenoszenia miedzi, zwiększenia elastyczności skóry, zagęszczenia układu włókien oraz redukcji niedoskonałości spowodowanych fotostarzeniem (zmarszczki, przebarwienia) [26]. Oprócz syntezy kolagenu typu I w fibroblastach, powoduje syntezę siarczanu dermatanu, siarczanu heparyny, oksydazy cytochromowej-C i tyrozynazy. Siarczan dermatanu i siarczan heparyny to substancje z grupy glikozoaminoglikanów, czyli mukopolisacharydów o właściwościach higroskopijnych, zapewniające stałe stężenie wody w skórze właściwej. Kompleksy peptydowe wpływają na poprawę wyglądu poprzez pobudzanie odnowy uszkodzo-

nej skóry. Kompleks z jednej strony stymuluje działanie metaloproteiny I i II (usu-
wając uszkodzony kolagen i elastynę z pozakomórkowej matrycy), z drugiej zaś
pobudza syntezę fibroblastów [27, 28]. Badania wykazały, że tak zmodyfikowany
peptyd ma nie tylko działanie przyspieszające procesy regeneracji, ale także odbu-
dowania zniszczonych tkanek. Wykazuje aktywność zarówno w procesach degrada-
cji starego kolagenu, jak i budowy nowego. Co ciekawe, peptyd ten stymuluje syn-
tezę kolagenu lepiej niż witamina C i witamina A. Podczas aplikacji kosmetyku
zawierającego peptyd widocznym efektem jego działania jest redukcja zmarszczek,
zwiększenie elastyczności i gęstości skóry, ale również przyspieszenie bliznowace-
nia skóry uszkodzonej. Jednym z możliwych zastosowań peptydu jest stosowanie
go po zabiegach: dermabrazji, peelingu chemicznym, a także laserowym odmładza-
niu skóry. Zastosowanie peptydu w ciągu dwóch godzin po zabiegu pozwala unik-
nąć zaczerwienień i miejscowych podrażnień towarzyszących złuszczeniu [28].

PODSUMOWANIE

Skóra podobnie jak i inne organy ulega procesom starzenia. Nieuchronnie postę-
pują zmiany w obrębie wszystkich warstw skóry. Zmniejsza się ilość podziałów
komórkowych, spada elastyczność włókien, skóra wysycha i zaczyna się marszczyć.
Tempo procesu starzenia nie zależy tylko od genetyki, ale również od tego jak o nią
dbamy. Proces starzenia się skóry nie jest łatwo powstrzymać, szczególnie, gdy skóra
przez dłuższy czas poddawana była szkodliwym wpływom zarówno czynników wew-
nątrzpochodnych jak i zewnątrzpochodnych. W młodości szczególną uwagę należy
zwracać na zdrowe żywienie, wystarczającą ilość snu, unikanie nadmiernego nasł-
onecznienia, a także nie palić tytoniu. W późniejszym wieku popularna jest pielęgn-
acja skóry za pomocą kosmetyków zawierających substancje aktywne, które stano-
wią jeden z ważniejszych czynników w walce z upływającym czasem.

Do niedawna w kosmetyce popularnie stosowano polipeptydy, takie jak: hydro-
lizaty kolagenu oraz elastyny, które mają znane i wielokrotnie potwierdzone działa-
nia pielęgnacyjne; tworząc na skórze ochronny film, ograniczają transepidermalną
utrata wody; natomiast w kosmetykach myjących chronią przed powstawaniem pod-
rażnień. Jednak tym polipeptydom brakuje aktywności regeneracyjnej lub biologicz-
nej w odniesieniu do skóry, stąd też ich miejsce obecnie zastępują peptydy aktywne
biologiczne [16].

Kosmetyki z peptydami zaliczane są do kosmeceutyków, czyli produktów
z pogranicza kosmetologii i farmakologii. Wprowadzenie do produktów kosmetycz-
nych peptydów jest wynikiem przeprowadzonych badań *in vitro* oraz *in vivo*, potwier-
dzających terapeutyczne działanie tych substancji w wielu procesach biologicznych.
Niskocząsteczkowe peptydy mogą wykazywać bardzo szeroki wachlarz aktywności
od działania przeciwzmarszczkowego do wpływu na aktywność melanocytów, przy
czym kierunek i mechanizm działania są uzależnione od struktury peptydów. Wyko-
rzystywane peptydy najnowszej generacji są stabilne, nie wymagają specjalnych

nośników, nie są wrażliwe na czynniki zewnętrzne. Przenoszą informacje w tkankach w skórze. Peptydy te są także zdolne do regulowania aktywności komórek przez działanie na ich specyficzne receptory. Aktywują pewne geny, które uczestniczą w procesie odnowy matrycy zewnątrzkomórkowej i powielania komórek. Wykazują dużą skuteczność, co potwierdzono w licznych badaniach naukowych. Te niewielkie cząsteczki stymulują syntezę białek podporowych skóry w efekcie czego, następuje poprawa twardości, wytrzymałości i elastyczności skóry. Te właśnie cechy sprawiają, że peptydy jako składniki aktywne są coraz chętniej włączane do receptur kosmetyków.

Podsumowując można powiedzieć, że peptydy jako składniki aktywne odgrywają ważną rolę w procesie starzenia się skóry. Stymulują one naturalne procesy fizjologiczne w skórze, są aktywne w niewielkich stężeniach oraz spełniają światowe wymagania stawiane komponentom kosmetycznym, takie jak: doskonała czystość chemiczna i mikrobiologiczna oraz gwarantowana stabilność. Firmy kosmetyczne wykorzystują peptydy i włączają je jako składniki do produktów chroniących skórę. Praktyki dermatologiczne sugerują, że wyniki nie zawsze da się przełożyć na reakcje *in vivo*. Każdy aktywnie pracujący składnik musi zostać zaabsorbowany w stabilnej formie, w zdolnej do życia i mogącej spełniać swe funkcje w skórze właściwej [18]. Zaletą peptydów jest mały rozmiar cząsteczek, który ułatwia im pokonywanie barier skórnych i nie ma konieczności zamykania ich w nośnikach transdermalnych. Zatem kosmeceutyki peptydowe mogą powodować realne korzyści dla swoich pacjentów jeśli wiedzą jak i kiedy można je zastosować.

PODZIĘKOWANIA

Praca finansowana z DS/8452-4-0135-10 (prof. dr hab. Z. Maćkiewicz) oraz DS/8210-4-0177-10 (Dr B. Grobelna) Uniwersytetu Gdańskiego.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] S. Drega, *Zdrowa skóra. Rady dla każdego*, ABA International, Warszawa 2006.
- [2] B. Jaroszevska, *Kosmetologia*, Atena, Warszawa 2008.
- [3] I.B. Peters, E. Kerkhoff, S. Kuska, W. Schweig, B. Wulforth, *Kosmetyka*, Stam Rea, Warszawa 2007.
- [4] S. Tourles, *Piękna i zdrowa skóra*, Bertelsmann Media Sp. z o.o., Warszawa 2006.
- [5] B. Kowalczyk, *Skóra człowieka – anatomia i fizjologia skóry*, Inventia Polish Technologies, Warszawa 2006.
- [6] M. Kukowska, K. Dzierzbicka, Z. Maćkiewicz, *Wiad. Chem.*, 2006, **60**, 523.
- [7] A. Komoszyńska, Z. Maćkiewicz, *Wiad. Chem.*, 2007, **61**, 547.
- [8] D. Jackiewicz-Barańska, E. Kamysz, Z. Maćkiewicz, *Wiad. Chem.*, 2008, **62**, 595.
- [9] J. Dylewska-Grzelakowska, *Kosmetyka stosowana*, Wydawnictwo Szkolne i Pedagogiczne Spółka Akcyjna, Warszawa, 1999.

- [10] W. Hartwig, *Endokrynologia praktyczna*, Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa 1989.
- [11] A. Drobny, *Budowa skóry i jej przydatków*, ITB Vega, Kraków 2007.
- [12] Z. Adamski, A. Kaszuba, *Dermatologia dla kosmetologów*, AM Poznań 2008.
- [13] S.A. Banieczko, A.M. Liedzjewirow, *Kolagen nowa strategia zachowania zdrowia i przedłużenia młodości*, Wydawnictwo Hobbit Plus, Koleczkowo, 2009.
- [14] M.C. Martini, *Kosmetologia i farmakologia skóry*, Wydawnictwo lekarskie PZWL, Warszawa 2007.
- [15] J. Arct, K. Pytkowska, *Nawilżanie i surowce nawilżające*, Innovia, Warszawa, 2008.
- [16] M. Stepułak, Peptydy w walce ze zmarszczkami, BEAUTY FORUM numer 3/2008, Warszawa 2008.
- [17] A. Kamoun, J.M. Landreau, G. Godetu, *Cell Adhes. Commun*, 1995, **3**, 273.
- [18] M.P. Lupo, A.L. Cole, *Dermatol. Ther.*, 2007, **20**, 343.
- [19] Ł. Pyziół, *Przyszłość peptydów*, Serwis Biotechnologiczny, Dział Kosmetologia, Łódź, 2007, [dostęp: 2009-12-10].
- [20] S. Tajima, H. Wachi, Y. Uemura, *Arch. Dermatol. Res.*, 1997, **289**, 489.
- [21] R.M. Senior, G.L. Griffen, R.P. Mecham, *J. Cell. Biol.*, 1984, **99**, 870.
- [22] L.R. Robinson, N.C. Fitzgerald, D.C. Doughty, N.C. Dawes, C.A. Berge, D.L. Bissett, *Int. J. Cosmet. Sci.*, 2005, **27**, 155.
- [23] K. Katayma, J. Armendariz-Borunda, R. Raghov, *J. Biol. Chem.*, 1993, **268**, 9941.
- [24] C. Blanes-Mira, J. Clemente, G. Jodas, A. Gil, G. Fernandez-Ballester, B. Ponsati, L. Gutierrez, E. Perez-Payas A. Ferrer-Montiel, *Int. J. Cosmet. Sci.*, 2002, **24**, 303.
- [25] J.J. McArdle, T.L. Lentz, V. Witzemann, H. Schwarz, S.A. Weinstein, J.J. Schmidt, *J. Pharm. Exp. Ther.*, 1999, **289**, 543.
- [26] L. Pickart, J.H. Freedman, W.J. Loher, J. Peisach, C.M. Perkins, R.E. Stenkamp, B. Weinstein, *Nature*, 1980, **288**, 715.
- [27] A. Simeon, H. Emonard, W. Hornebeck, *Life Sci.*, 2000, **67**, 2257.
- [28] A. Simeon, Y. Wegrowsky, J. Bontemps, *J. Invest. Dermatol.*, 2000, **115**, 962.

Praca wpłynęła do Redakcji 18 października 2010

MODYFIKOWANE I ALTERNATYWNE REAGENTY REAKCJI MITSUNOBU

MODIFIED AND ALTERNATIVE MEDIATORS OF THE MITSUNOBU REACTION

Aleksandra S. Kołodziejczyk

*Katedra Chemii Medycznej, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański,
ul. Sobieskiego 18, 80-952 Gdańsk
e-mail: ola@chem.univ.gda.pl*

Abstract

1. Reakcja Mitsunobu – wiadomości ogólne
2. Modyfikacje klasycznej reakcji Mitsunobu – nowe procedury/nowe reagenty
 - 2.1. Strategie ułatwiania separacji produktu
 - 2.1.1. Reagenty reakcji Mitsunobu związane z polimerami
 - 2.1.2. Modyfikacje umożliwiające usuwanie produktów ubocznych przez ekstrakcję chemiczną/żywice jonowymienne
 - 2.1.3. Reakcje Mitsunobu z reagentami fluorowanymi
 - 2.1.4. Zastosowanie innych znaczników ułatwiających izolację produktu reakcji Mitsunobu
 - 2.1.5. Modyfikowane pochodne kwasu azodikarboksylowego
 - 2.2. Alternatywne mediatory w reakcji Mitsunobu

Uwagi końcowe

Piśmiennictwo cytowane

dr inż. Aleksandra Kołodziejczyk, absolwentka Wydziału Chemii Politechniki Gdańskiej, od 1986 r. adiunkt w Katedrze Chemii Organicznej (obecnie – Medycznej) Uniwersytetu Gdańskiego. W latach 1988–1990 przebywała w Medical College of Ohio zajmując się syntezą analogów wazopresyn i immunostymulujących pochodnych kwasu diaminopimelinowego. Przez wiele lat zajmowała się reakcją Mitsunobu i jej zastosowaniami w chemii aminokwasów i peptydów. Główne zainteresowania naukowe to: stereochemia, synteza peptydów i peptydomimetyków. Obecnie zaangażowana jest w prace związane z badaniem rozmaitych aspektów chorób neurodegeneracyjnych.

ABSTRACT

The Mitsunobu reaction provides an extremely useful and versatile synthetic route for a large array of products involving formation of a new C-O, C-N, C-S, C-X, or C-C bond. The reaction is a dehydrative coupling of an alcohol with an acid/pronucleophile using a combination of an oxidizing azo reagent and a reducing phosphine reagent – equation (1). The reaction is very popular due to its stereoselectivity and compatibility with a wide range of functional groups. However, the use of this method is complicated by the resulting complex reaction mixtures containing a product, triphenylphosphine oxide and the reduced azodicarboxylate, as well as unreacted starting material.

Due to omnipresence of the Mitsunobu reaction, it was a subject of numerous reviews [1–12]. The mechanism and the stereochemical result of the reaction are still thoroughly studied [22–38] and the current, generally accepted mechanism is outlined in Scheme 1.

This article provides an overview of the separation-friendly strategies introduced to facilitate product isolation in the Mitsunobu reaction and its modified and alternative mediators. As two comprehensive reviews devoted to modified Mitsunobu reagents and separation techniques facilitating isolation of the condensation product appeared fairly recently [7, 8], this work concentrates on examples of isolation-friendly strategies and studies subsequent to mentioned reviews.

Separation facilitating strategies are based on tagging one of Mitsunobu reagents or substrates with a “separation tag” (phase tag, affinity tag), which controls the behaviour of the component and allows to separate the tagged reaction component from untagged ones.

There are four main separation techniques used in the Mitsunobu reaction: polymer-assisted phase-switching or solid phase immobilization (2.1.1.), acidic/basic aqueous work-up (2.1.2.), fluororous approach (2.1.3.), and post-reaction sequestration.

Both phosphine and azodicarboxylate can be attached to insoluble polymer and the derived side-products (phosphine oxide or hydrazodicarboxylate) can be removed by filtration at the end of the reaction.

Fluororous tagging makes possible the separation of a fluororous compound from non-fluororous ones either by partitioning between a fluororous and an organic liquid or by fluororous solid-phase extraction (FSPE) – Scheme 6. A fluororous-tagged acid was also applied to achieve inversion of an alcohol configuration (Scheme 8).

Another separation-facilitating strategy uses polymerizable Mitsunobu reagents and post-reaction sequestration, *e.g.* by ring opening metathesis polymerization (ROMP), either of a condensation product (Scheme 9), or side products (impurity annihilation).

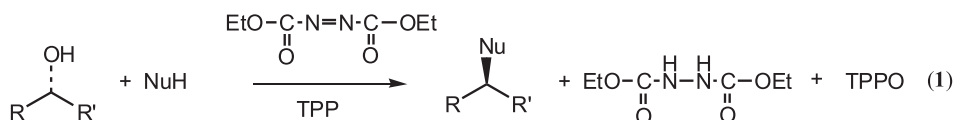
The scope of the Mitsunobu reaction was greatly widened by introduction of alternative Mitsunobu reagents by the Tsunoda-Itô group [69–79]. Some of these reagents (1–4, Scheme 12) mediate C-alkylation reactions of very weak acids ($pK_a > 23$) [77, 78]. Several other modified Mitsunobu reagents are also described.

Keywords: Mitsunobu reaction, condensation, phosphines, separation tags, azo reagents

Słowa kluczowe: reakcja Mitsunobu, kondensacja, fosfiny, znaczniki separacyjne, reagenty azowe

1. REAKCJA MITSUNOBU – WIADOMOŚCI OGÓLNE

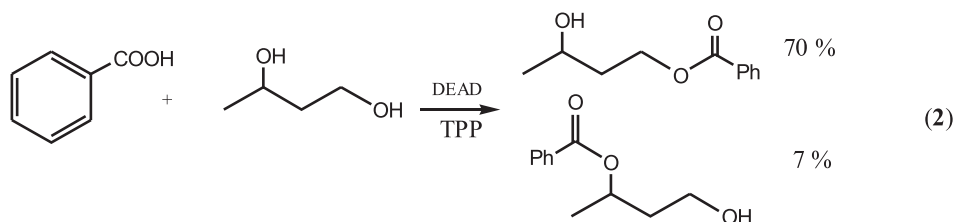
Reakcja Mitsunobu jest szeroko używaną i niezwykle uniwersalną metodą oksydacyjno-redukcyjnej kondensacji związku o charakterze kwasowym (pronukleofila) z pierwszo- lub drugorzędowym alkoholem przy użyciu odczynnika utleniającego, którym zazwyczaj jest pochodna kwasu azodikarboksyłowego (najczęściej jego ester dietylowy, DEAD) oraz odczynnika redukującego, którym tradycyjnie jest tryfenylofosfina (Ph_3P , TPP) [1–12] – równanie (1). Niezwykle cenną właściwością tej reakcji jest fakt, iż zachodzi w łagodnych, praktycznie neutralnych warunkach, jest kompatybilna z większością grup funkcyjnych, a głównym jej ograniczeniem jest wystarczająca kwasowość pronukleofila.



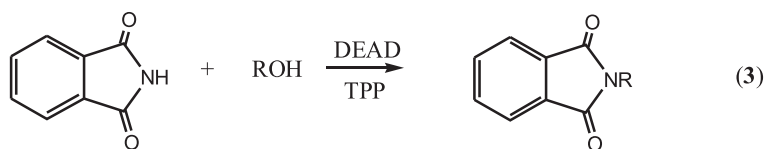
Jako kwasowy reagent w tej reakcji (pronukleofil) wykorzystywane były zarówno kwasy karboksylowe, jak i diole, fenole, imidy, sulfonamidy, a także aktywne C-kwasy. Stąd też reakcja może prowadzić do otrzymywania szerokiej gamy produktów, w tym estrów i laktonów, eterów arylowych, eterów cyklicznych, a także do tworzenia produktów kondensacji powstałych przez tworzenie wiązania C–N czy C–C. Prócz pożądaných produktów kondensacji, jako produkty uboczne reakcji Mitsunobu powstają pochodne kwasu hydrazynodikarboksyłowego (np. DEAD- H_2) i tlenek tryfenylofosfiny (TPPO) lub utleniona postać innego redukującego mediatora reakcji Mitsunobu.

Historia reakcji Mitsunobu sięga roku 1967, kiedy to jej odkrywcy opisali reakcję oksydacyjno-redukcyjnej kondensacji w formie zaprezentowanej ogólnie w równaniu (1) [13]. Reakcja ta została przebadana przez O. Mitsunobu w aspekcie:

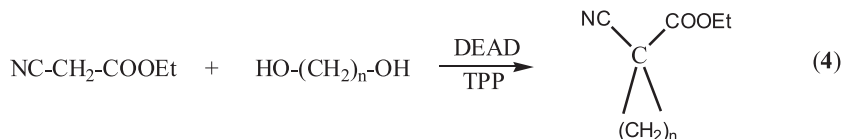
- tworzenia estrów kwasu *p*-nitrobenzoesowego i zatłoczonych alkoholi [14],
- preferencji reakcji z 1^o grupą alkoholową względem 2^o grupy alkoholowej w diolu – równanie (2) [15],



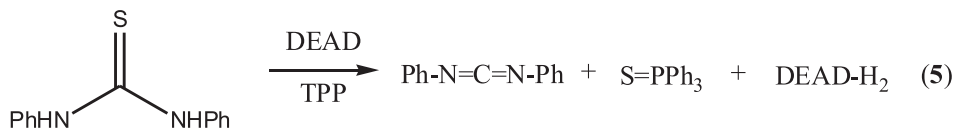
- zastosowania ftalimidu jako pronukleofila do przekształcania alkoholi w aminy – równanie (3),



- badania wewnątrzcząsteczkowych wersji reakcji [12, 17],
- użycia zaktywowanych grup metylenowych jako C-kwasów – równanie (4) [18],



- przekształcania tiomoczników w karbodiimidy – równanie (5),



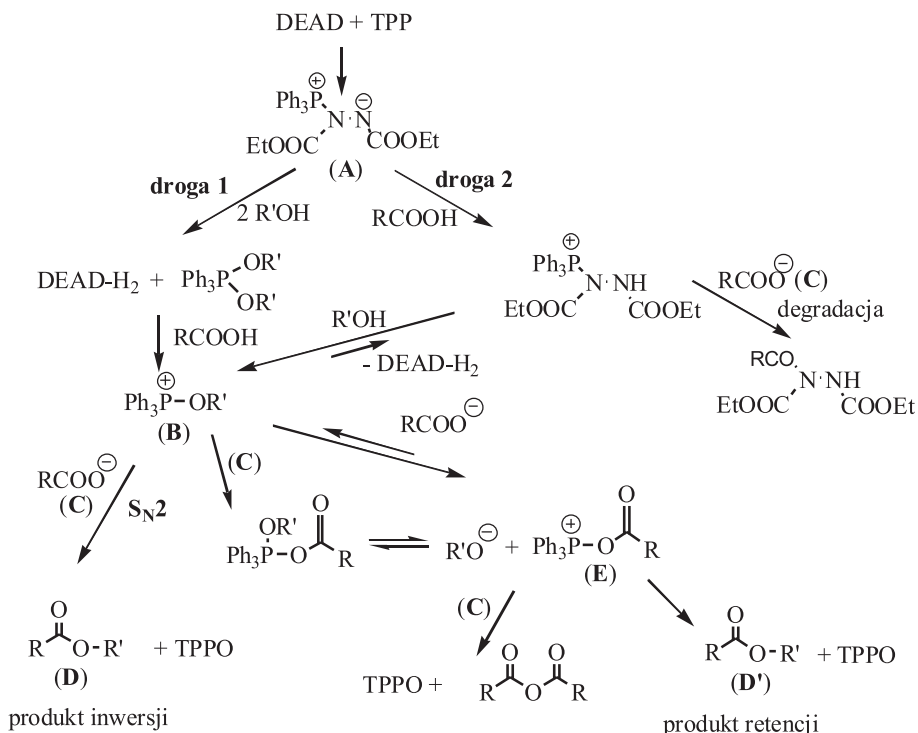
- czy tioli w disulfidy – równanie (6) [20],



Obserwowana aktualnie wszechobecność reakcji Mitsunobu w syntezie organicznej wynika m.in. z jej stereochemicznego przebiegu i obserwowanej zwykle inwersji konfiguracji na karbinolowym atomie węgla, co zauważyli już Mitsunobu i Eguchi [21].

Stereochemiczny wynik reakcji jest ściśle związany z mechanizmem reakcji, który był niezwykle skrupulatnie badany [22–38], a powszechnie akceptowany jej przebieg podsumowuje ciąg równowagowych, konkurencyjnych reakcji przedstawionych na Schemacie 1, opracowanym w oparciu o pracę Schenka [38]. Pierwszym etapem reakcji Mitsunobu jest nukleofilowa addycja tryfenylofosfiny do estru kwasu azodikarboksyłowego z utworzeniem betainy (**A**), która może reagować z dwiema cząsteczkami alkoholu prowadząc ostatecznie do pochodnej alkoksyfosfoniowej (**B**) i nukleofila (**C**) (**droga 1**) lub deprotonować pronukleofil/kwas prowadząc finalnie także do utworzenia **B**, **C** i DEAD-H₂ (**droga 2**). Nukleofilowy atak **C** na pochodną alkoksyfosfoniową **B** prowadzi do utworzenia produktu kondensacji **D** o chiralności przeciwnej względem chiralności wyjściowego alkoholu (S_N2). Wykazano [25, 30], że pochodna alkoksyfosfoniowa **B** jest w równowadze z odpowiednią pochodną acyloksyfosfoniową, **E**, co w rzadkich przypadkach może prowadzić do

produktu **D'**, w którym została zachowana wyjściowa chiralność karbinolowego atomu węgla i do utworzenia bezwodnika **F**. Położenie tej równowagi wydaje się być zależne od kwasowości pronukleofila, przy czym generalnie tworzenie pochodnej **B** jest zdecydowanie faworyzowane względem tworzenia **E** i w absolutnej większości wypadków reakcji Mitsunobu towarzyszy inwersja konfiguracji karbinolowego stereocentrum.



Schemat 1. Mechanizm reakcji Mitsunobu (wg [38])

Scheme 1. Mechanism of the Mitsunobu reaction (in accordance with [38])

Szczegółowa dyskusja wpływu różnorodnych parametrów na położenie stanu równowagi konkurencyjnych reakcji składających się na reakcję Mitsunobu przedstawiona jest w pracy Schenka [38].

Popularność reakcji Mitsunobu sprawiła, iż stała się ona przedmiotem bardzo wielu badań i opracowań podsumowanych w obszernych pracach przeglądowych [1–9]. Ukazały się także bardziej specjalistyczne prace przeglądowe dotyczące na przykład zastosowania reakcji Mitsunobu do makrolaktonizacji w syntezie produktów naturalnych [12], czy będąca naszym udziałem praca poświęcona zastosowaniu tej reakcji w chemii aminokwasów i peptydów [10].

2. MODYFIKACJE KLASYCZNEJ REAKCJI MITSUNOBU – NOWE PROCEDURY/ NOWE REAGENTY

Wadą reakcji Mitsunobu skłaniającą do ciągłego poszukiwania ulepszeń jest fakt, iż prócz dwóch podstawowych substratów ulegających kondensacji wymaga ona przynajmniej stechiometrycznych ilości dwóch dodatkowych reagentów, z jednej strony zapewniających układ utleniająco-redukujący, z drugiej jednak – prowadzących do powstawania dwóch produktów ubocznych, które utrudniają i komplikują izolację właściwego produktu kondensacji Mitsunobu. Nawet w przypadku, gdy reakcja zachodzi z dobrą wydajnością, uzyskany produkt może być trudny do izolacji z mieszaniny reakcyjnej zawierającej prócz niego dwa produkty uboczne i nadmiar bądź nieprzereagowane substraty oraz reagenty tworzące układ utleniająco-redukujący. Stąd też izolacja produktu kondensacji Mitsunobu wymaga zazwyczaj rozdziłu chromatograficznego zaniżającego wydajność, komplikującego i przedłużającego uzyskanie oczekiwanego związku. Konieczność stosowania chromatografii ogranicza też możliwość stosowania reakcji Mitsunobu w kombinatoryjnej syntezie bibliotek związków.

Innym ograniczeniem reakcji Mitsunobu jest fakt, iż w klasycznej wersji zachodzi ona wydajnie jedynie dla pronukleofili (NuH) o wystarczająco dużej kwasowości ($pK_a < 12$), co implikuje potrzebę poszukiwania modyfikacji umożliwiających przeprowadzenie tej reakcji dla pronukleofili o zdecydowanie mniejszej kwasowości.

Analiza danych literaturowych wskazuje, że spośród niezliczonej liczby modyfikacji reakcji Mitsunobu, większość opisanych ostatnio skierowanych jest na opracowanie nowych możliwości ułatwienia izolacji i oczyszczania produktu niż kreowanie nowych reagentów zapewniających szerszy wachlarz stosowanych pronukleofili, dlatego też pierwsza część tej pracy zostanie poświęcona zmodyfikowanym względem klasycznego DEAD i TPP odczynnikom ułatwiającym separację i oczyszczanie oczekiwanego produktu kondensacji. Ze względu na to, iż ukazały się stosunkowo niedawno dwie wyczerpujące prace przeglądowe dotyczące tej tematyki [7, 8] w niniejszym opracowaniu zaprezentuję pokrótce tylko przykłady strategii modyfikacji umożliwiających uproszczoną, najchętniej pozbawioną etapu chromatograficznego oczyszczania, separację produktu reakcji Mitsunobu oraz istotne późniejsze względem opracowań przeglądowych propozycje udoskonalania tego procesu.

2.1. STRATEGIE UŁATWIANIA SEPARACJI PRODUKTU

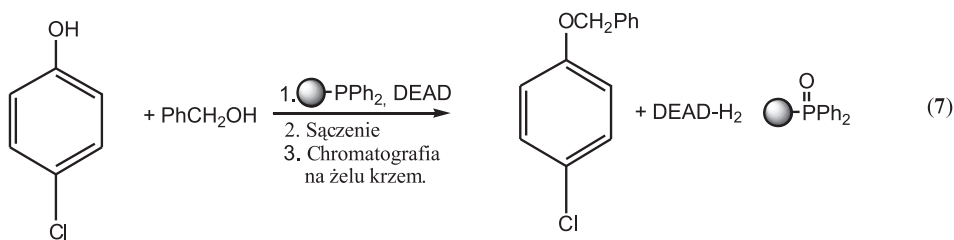
Stosunkowo często stosowaną techniką ułatwiającą separację produktu reakcji Mitsunobu jest przyłączanie do jednego z komponentów reakcji znacznika separacyjnego (ang. *separation tag*, *phase tag*), który umożliwia prosty rozdział „znakowanych” komponentów reakcji od tych, które znacznika nie posiadają. Do ułatwiających oczyszczanie produktu znaczników należą m.in. rozpuszczalne i nierozpuszczalne polimery, pochodne jonowe i lipofilowe, pochodne fluorowane czy umożli-

wiające wytrącanie reagenta grupy polimeryzowalne. Przykładami znaczników separacyjnych i kompatybilnych względem nich technik rozdziału są np.: polimery – odsączenie; znaczniki jonizowalne – ekstrakcja kwasowo-zasadowa; znaczniki fluorowane – fluorowa ekstrakcja z fazy stałej (ang. *fluorous solid-phase extraction*, FSPE).

2.1.1. Reagenty reakcji mitsunobu związane z polimerami

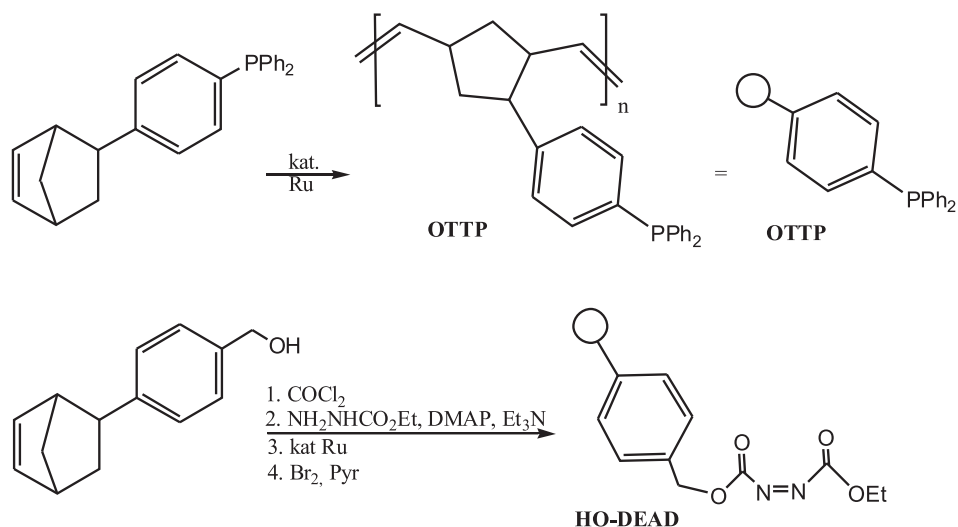
Zarówno fosfina [39], jak i reagent azodikarboksylowy może być związany z nierozpuszczalnym polimerem, co sprawia, że produkt uboczny powstający z tego „znakowanego” odczynnika, jak i jego nadmiar może być łatwo usunięty ze środowiska reakcji przez odsączenie.

Przykładem tego typu modyfikacji może być reakcja (7) [39a]:



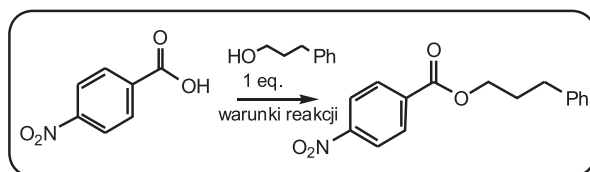
Alkohol benzylowy i *p*-chlorofenol, skondensowane za pomocą związanej z polimerem fosfiny i rozpuszczalnego DEAD dają eter, który po odsączeniu związanego z żywicą tlenku trifenylfosforyny zostaje łatwo odizolowany chromatograficznie od pochodnej kwasu hydrazynodikarboksylowego. Gentles i in. opracowali procedurę zautomatyzowanej syntezy eterów alkilowo-arylowych z użyciem difenylfosforynopolistyrenu i estru *tert*-butylowego kwasu diazodikarboksylowego (DBAD) [40].

Związane z polimerem pochodne fosfiny i kwasu azodikarboksylowego z założenia nie mogą być stosowane równocześnie ze względu na znikomą szansę zajścia reakcji między izolowanymi ziarnami polimeru. Jednak Hanson i in. dowiedli, że możliwe jest zastosowanie obu reagentów reakcji Mitsunobu osadzonych na polimerycznym nośniku [41]. Niezbędne do przeprowadzenia reakcji polimeryczne pochodne fosfiny i estru kwasu azodikarboksylowego uzyskano z odpowiednich substratów przez metatezę z otwarciem pierścienia jako rozpuszczalne oligomery (Schemat 2). Reagenty te wykorzystano do przeprowadzenia reakcji estryfikacji kwasu *p*-nitrobenzoesowego 3-fenylpropanolem. Najlepsze wyniki uzyskano dla dwukrotnego nadmiaru polimerycznych reagentów, a próba użycia polistyrenowych (PS) pochodnych fosfiny i kwasu azodikarboksylowego nie doprowadziła do uzyskania oczekiwanego estru (Tab. 1).



Schemat 2. Budowa i otrzymywanie odczynników Mitsunobu osadzonych na oligomerycznym podłożu [41]
 Scheme 2. Structure and synthesis of the Mitsunobu reagents on soluble ring-opening methathesis (ROM) oligomers [41]

Tabela 1. Estryfikacja metodą Mitsunobu z zastosowaniem układu multipolimerowego [41]
 Table 1. Mitsunobu esterification with multipolymer systems [41]

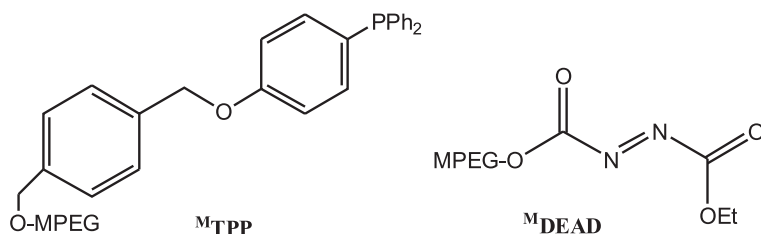


Warunki reakcji:	% konwersji (NMR)	Wyd.(%)
2 eq. OTTP, 2 eq. HO-DEAD	92	88
5 eq. OTTP, 5 eq. HO-DEAD	> 95	64
2 eq. PS-TTP, 2 eq. HO-DEAD	0	-
2 eq. OTTP, 2 eq. PS-DEAD	0	-

Problemem, który wiąże się ze stosowaniem reagentów związanych z polimerem jest obniżenie reaktywności odczynników w układzie heterogenicznym i konieczność stosowania znacznych nadmiarów osadzonego na polimerze związku. Aby ominąć tę niedogodność proponowano stosowanie polimerów rozpuszczalnych/niesieciowanych [42, 43] (np pochodnych glikolu polietylenowego, **1**, Schemat 4), które usuwano np. przez dodatek metanolu do surowej mieszaniny reakcyjnej.

Rozwój modyfikacji ułatwiających izolację produktu doprowadził do opracowania zestawu odczynników Mitsunobu osadzonych na ω -monometylowym eterze niskocząsteczkowego polimeru glikolu etylenowego (MPEG, Schemat 3) [43]. Znaczone MPEG związki łatwo oddzielić na żelu krzemionkowym, gdyż pozostają one

na złożu podczas przemywania go rozpuszczalnikami aprotycznymi typu dichlorometanu (DCM) czy AcOEt (ekstrakcja z fazy stałej pochodnych MPEG, MSPE). Autorzy pracy przebadali m.in. acylowanie 1-fenyletanolu kwasem benzoesowym, reakcja (8), przy użyciu otrzymanych MPEG pochodnych TPP i DEAD uzyskując z dobrą wydajnością produkt o wysokiej czystości. Uzyskane odczynniki umożliwiają szybką, możliwą do automatyzacji syntezę serii związków w fazie ciekłej.



Schemat 3. Odczynniki Mitsunobu osadzone na niskocząsteczkowych polimerach glikolu etylenowego [43]
Scheme 3. Low molecular weight MPEG-supported Mitsunobu reagents [43]

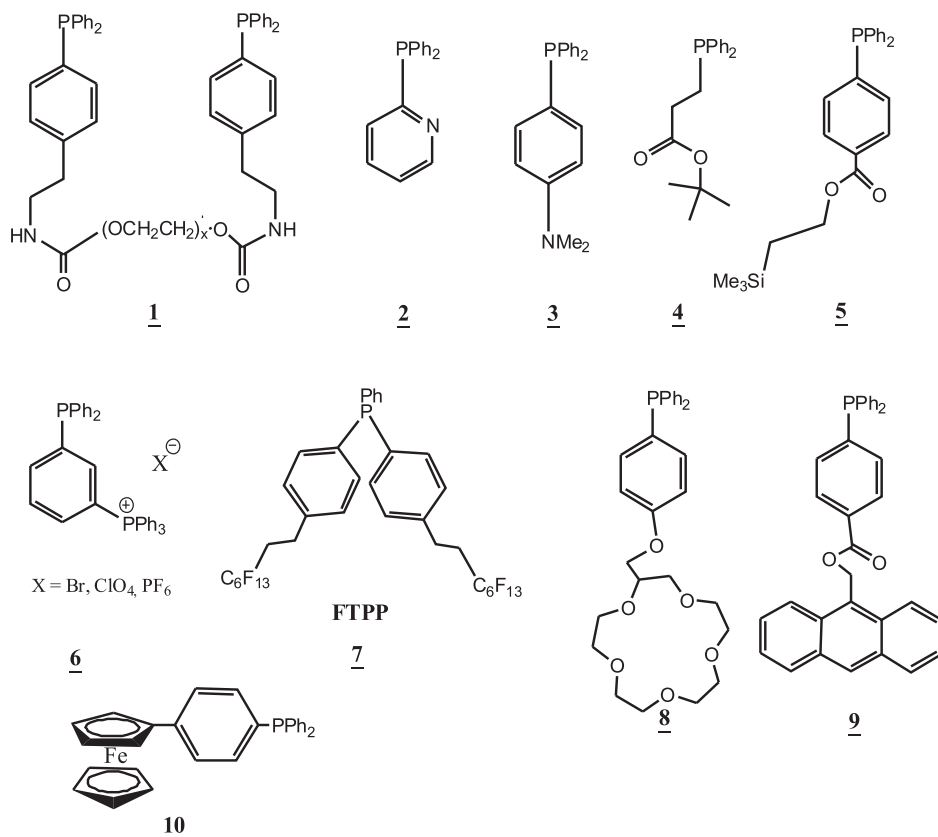
Zastosowanie w reakcji Mitsunobu związanego z polimerem któregośkolwiek z substratów (alkoholu lub pronukleofila) sprawia, że otrzymywany produkt jest związany z polimerem i może być łatwo oddzielony przez proste odsączenie. Tego typu układ reagentów jest szczególnie korzystny, gdy reakcja Mitsunobu jest tylko jednym z ciągu przekształceń dokonywanych w wygodnej technice reakcji na fazie stałej. Przy zastosowaniu takiego układu reagentów konieczne jest oczywiście przeprowadzenie reakcji odszczepienia produktu od nośnika. Szereg reakcji Mitsunobu na nośniku stałym przy zastosowaniu bardzo zróżnicowanych substratów cytowych jest i omówionych w pracy przeglądowej Dandapani [7].

2.1.2. Modyfikacje umożliwiające usuwanie produktów ubocznych przez ekstrakcję chemiczną/żywice jonowymiennie

Jenkins i Camp zaproponowali difenyl-2-pirydylofosfinę (2, Schemat 4) jako alternatywę TPP umożliwiającą usuwanie jej utlenionej postaci przez kwasową przeróbkę poreakcyjną [44]. Uzyskany, częściowo oczyszczony produkt oddzielono od DIAD-H₂ na drodze chromatografii na żelu krzemionkowym. Związek ten został wykorzystany także w kombinacji z DBAD [45], co umożliwiło usunięcie obu produktów ubocznych przez potraktowanie mieszaniny poreakcyjnej 4 M HCl w dioksanie (rozpad DBAD do izobutyleny, dwutlenku węgla i rozpuszczalnej w wodzie hydrazyny), a następnie ekstrakcję produktów ubocznych. Innym typem fosfiny, której utleniona postać może być łatwo usunięta na drodze przeróbki kwasowej jest (*p*-dimetyloaminofenyl)difenylfosfina (3, Schemat 4) [46].

Przykładami pochodnych fosfiny o potencjalnym charakterze kwasowym, był proponowany przez Flynn i in. w kombinacji z DBAD ester *tert*-butylowy pochod-

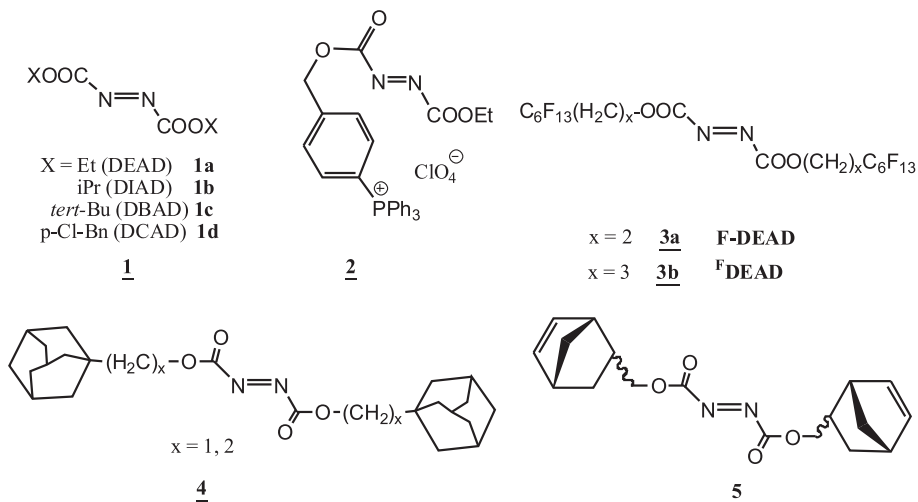
nej alkilodifenylofosfiny (**4**, Schemat 4). Potraktowanie mieszaniny poreakcyjnej kwasem trifluoroctowym (TFA) umożliwiło izolację produktu przez oddzielenie produktów ubocznych o charakterze kwasowym na zasadowej kolumnie jonowymiennej [47]. Ukryty charakter kwasowy nosi także 4-difenylofosfinylobenzoestan 2-trimetylosiloetylowy (**5**, Schemat 4), którego tlenek, po rozpadzie estru pod wpływem fluorku czterobutyloamoniowego (Bu_4NF) usuwany jest przez przemywanie wodną zasadą. Oczywistym ograniczeniem stosowania przeróbki kwasowej/zasadowej jest występowanie w produkcie reakcji grup wrażliwych na działanie kwasów/zasad.



Schemat 4. Wybrane modyfikowane pochodne tryfenylofosfiny
 Scheme 4. Selected modified phosphines used in the Mitsunobu reaction

Innym typem zjonizowanych grup ułatwiających oczyszczanie produktu są pochodne czteroarylofosfoniowe, stanowiące grupy kontrolujące rozpuszczalność. Otrzymane przez Charettę i in. [48] pochodne zarówno TPP (**6**, Schemat 4), jak i DEAD (**2**, Schemat 5) umożliwiają łatwe usuwanie produktów ubocznych (pochodnych tlenku fosfiny i hydrazyny) przez praktycznie ilościowe wytrącanie eterem

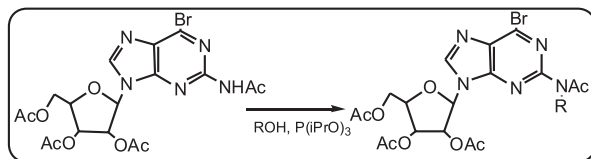
dietylowym. Dodatkowym atutem proponowanych związków jest ich forma (ciała stałe) i brak higroskopijności.



Schemat 5. Wybrane pochodne kwasu azodikarboxylowego
 Scheme 5. Selected azodicarboxylic acid esters

Oryginalny substytut TPP przedstawił Beal i Veliz [49]. Zaproponowali on użycie w syntezie analogu nukleozydu triizopropoksyfosfiny, która po utlenieniu w warunkach reakcji przekształca się w łatwo usuwalny przez przemycie wodą fosforan (Tab. 2).

Tabela 2. Zastosowanie triizopropoksy fosfiny jako substytutu TPP w syntezie analogów nukleozydu [49]
 Table 2. The use of triisopropyl phosphite as an effective substitute for TPP in the Mitsunobu reaction of nucleoside analogs [49]



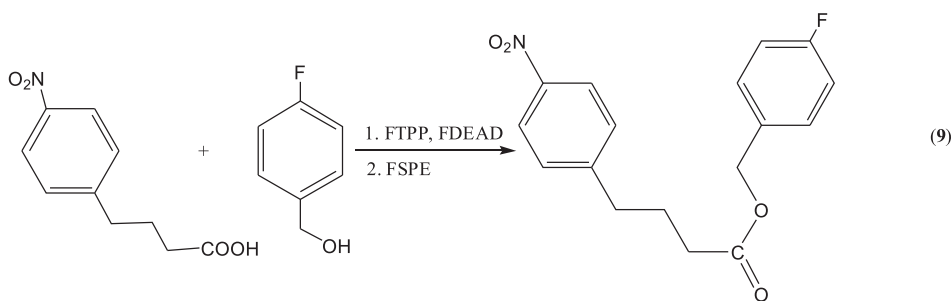
R	poch. azo	rozpuszczalnik	czas [h]	wydajność [%]
benzyl	DIAD	dioksan	5	95
2-Br-benzyl	DIAD	dioksan	18	97
2-Br-benzyl	DEAD	THF	24	97
p-CF ₃ -benzyl	DIAD	THF	24	95
1-Ph-etanol	DIAD	dioksan	24	–
butan-2-ol	DIAD	dioksan	5	–

Niestety, w badanych warunkach reakcji alkohole nieaktywowane i charakteryzujące się większym zatłoczeniem nie dały oczekiwanego produktu.

2.1.3. Reakcje Mitsunobu z reagentami fluorowanymi

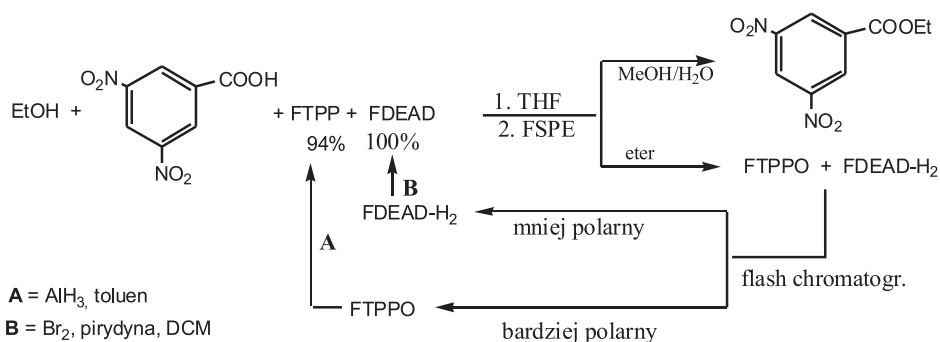
Pochodne fluorowe charakteryzujące się wysoką zawartością tego pierwiastka (wagowo – powyżej 60%) mogą być łatwo oddzielone od innych związków organicznych przez rozdział mieszaniny pomiędzy fazę fluorową i organiczną (ekstrakcja ciecz–ciecz). Dla związków z niższą zawartością fluoru bardziej efektywne okazało się sączenie przez żel krzemionkowy modyfikowany pochodnymi fluorowymi (fluorowa ekstrakcja z fazy stałej – ang. *fluorous solid-state extraction*, FSPE). Polega ona na aplikowaniu na kolumnę mieszaniny związków fluorowanych i niefluorowanych, przemywaniu kolumny fluorofobowym układem rozpuszczalników (zwykle 80% wodny roztwór metanolu), który wymywa nieznakowane fluorem związki organiczne, a następnie rozpuszczalnikiem fluorofilnym (THF lub eter dietylowy) wymywającym związki znakowane fluorem.

Niezależnie od siebie, Dobbs [50] i Curran [51] zaproponowali syntezę fluoro-owego analogu DEAD (FDEAD, **3**, Schemat 5) i jego zastosowanie w reakcji Mitsunobu. Dobbs i in. wykorzystali ten odczynnik wraz z klasyczną TPP do przeprowadzenia reakcji kwasu benzoesowego z etanolem [50]. Otrzymany ester został wyizolowany chromatograficznie po uprzednim usunięciu fluorowanej pochodnej kwasu hydrazynodikarboksylowego (FDEAD-H₂) przez rozdział mieszaniny poreakcyjnej między dichlorometan i mieszaninę pefluorowanych heksanów. Dadapani i Curran użyli tego związku w kombinacji z fluorowaną fosfiną [51] (**7** lub **8**, Schemat 4) do przeprowadzenia reakcji estryfikacji (**9**). Uzyskany produkt został wyizolowany w oparciu o fluorową ekstrakcję z fazy stałej (FSPE).



Autorzy przebadali różne kombinacje reagentów, zarówno fluorowanych, jak i w kombinacji z niefluorowanymi, różnorodne substraty kwasowe (kwasy karboksylowe, sulfonamidy, ftalimid) i różne procedury. Wyniki wskazują, że oba fluorowane analogi TPP (**7** i **8**, Schemat 4) wykazują porównywalną reaktywność, a najskuteczniejszą zwykle procedurą jest ta z dodawaniem do roztworu FTTP kolejno: pronukleofila, alkoholu i FDEAD.

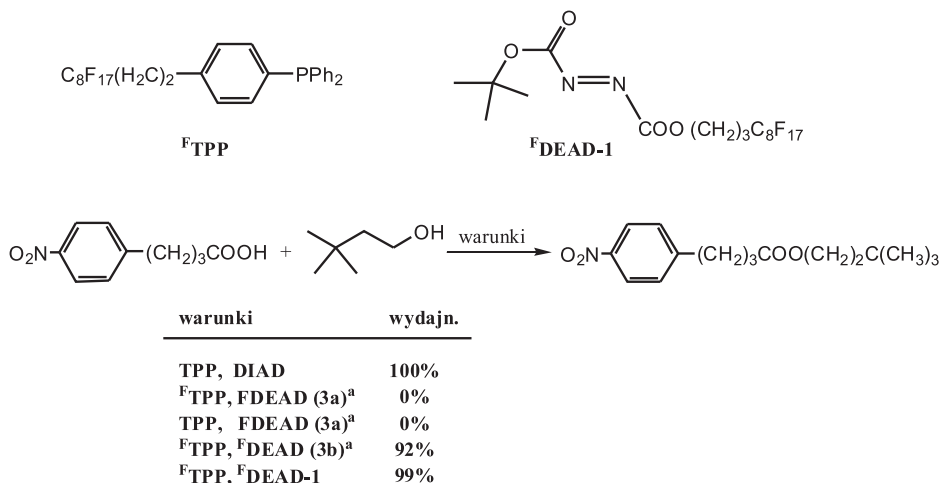
Opracowane przez Currana i in. procedury z użyciem obu mediatorów reakcji Mitsunobu w wersji fluorowanej [51] umożliwiają łatwe oddzielenie produktu (przemycie kolumny do FSPE wodnym roztworem metanolu) od fluorowanych produktów ubocznych (późniejsze przemycie kolumny eterem), ich rozdział w warunkach chromatografii „flash” i zawrócenie do reakcji po uprzednim utlenieniu (FDEAD-H₂) bądź redukcji (TPPO). Przykład przedstawia Schemat 6 [51].



Schemat 6. Schemat oddzielania i recyklingu fluorowanych produktów ubocznych w reakcji estryfikacji [51]
Scheme 6. Fluorous Mitsunobu reaction with separation of fluorous byproducts and their recycling [51]

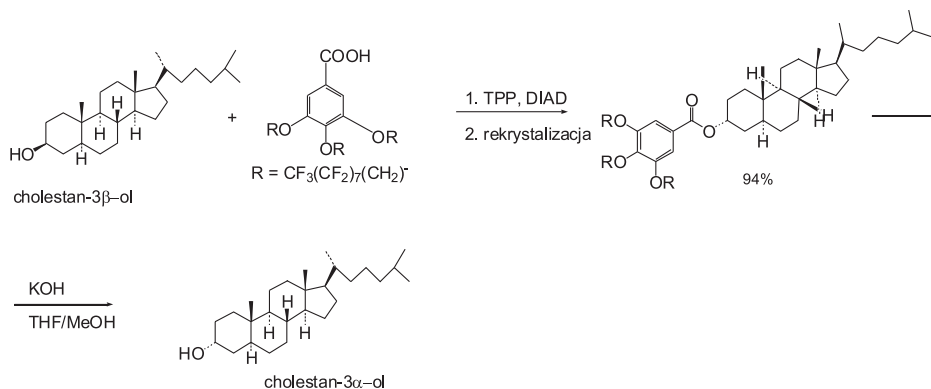
W toku dalszych badań stwierdzono, że FDEAD jest niezbyt skuteczny w przypadku sterycznie rozbudowanych alkoholi i słabszych kwasów i wprowadzono szereg nowych pochodnych fluorowych, tzw. pochodnych fluorowych drugiej generacji [52], m.in. pochodną o przedłużonym o jedną grupę metylenową łańcuchu alkilowym względem ^FDEAD (**3b**, Schemat 5) czy ^FDEAD-1. Porównanie skuteczności niektórych fluorowanych reagentów Mitsunobu przedstawia Schemat 7.

Dla przypadku, gdy reakcja Mitsunobu wykorzystywana jest do zmiany konfiguracji alkoholu proponowano użycie fluorowanego kwasu (pronukleofila) [53], który sprawia, że uzyskany ester jest łatwo wydzielany przez wytrącanie, a po hydrolizie otrzymuje się alkohol o zinvertowanej konfiguracji. Procedurę taką przeprowadzono dla cholestanolu (Schemat 8) [53]. Umożliwia ona otrzymanie alkoholu o przeciwnej względem wyjściowej konfiguracji bez zastosowania chromatografii czy fluorowanych rozpuszczalników.



Schemat 7. Porównanie reakcji estryfikacji metodą Mitsunobu z zastosowaniem reagentów fluorowanych (^a – patrz Schemat 5)

Scheme 7. Mitsunobu esterification with fluoruous reagents (^a – see Scheme 5)



Schemat 8. Inwersja konfiguracji alkoholu przy zastosowaniu fluorowanego pronukleofila [53]

Scheme 8. Inversion of alcohol configuration with the use of a highly fluoruous nucleophilic partner in the Mitsunobu reaction [53]

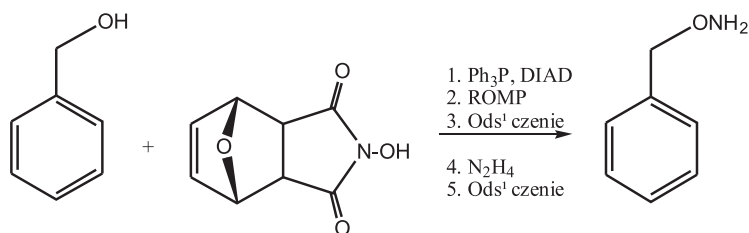
2.1.4. Zastosowanie innych znaczników ułatwiających izolację produktu reakcji Mitsunobu

Wiele modyfikacji mediatorów reakcji Mitsunobu (głównie tryfenylofosfiny) skierowanych jest na możliwość ułatwionej izolacji produktu przez usuwanie znaczonego produktu ubocznego (tlenku tryfenylofosfiny) na drodze jego chemoselektywnego oddziaływania. Do pochodnych takich należy tryfenylofosfina znakowana

eterem koronowym, np 15-koroną-5 [54] (**8**, Schemat 4), umożliwiającą usunięcie jej nadmiaru i powstałego z niej produktu ubocznego przez związanie z fazą stałą funkcjonalizowaną grupami amoniowymi czy fosfina znakowana antracenenem [55] (**9**, Schemat 4), umożliwiającą chemoselektywne wiązanie jej tlenu ze związanym z polimerem maleimidem, stanowiącym dienofil w reakcji Dielsa-Aldera i umożliwiającym przeniesienie pochodnej fosfiny do fazy stałej. Pochodna znaczone antracenenem została zastosowana w kombinacji z pochodną kwasu azodikarboksylowego osadzoną na nośniku, co stanowiło dalsze ułatwienie w procesie usuwania powstających produktów ubocznych i nadmiaru komponentów oksydacyjno-redukcyjnych.

Niewymagająca jakiegokolwiek chromatografii reakcja Mitsunobu została zaproponowana przez Plenio i in. [56] W reakcji tej zastosowano trifenylofosfinę znakowaną ferrocenylem (**10**, Schemat 4) i ester *tert*-butylowy kwasu azodikarboksylowego. Nadmiar pierwszego odczynnika i jego postać utlenioną usuwano przez wymycie wodą po utlenieniu żelaza, natomiast DBAD (**1**, Schemat 5) i jego zredukowana pochodna były hydrolizowane i wymywane podczas ekstrakcji wodnym roztworem HCl. Dodatkowym atutem tego układu reagentów jest możliwość regeneracji pochodnej trifenylofosfiny przez redukcję [56].

Metodą znacznie upraszczającą izolację jest wytrącanie produktu po uprzednim spolimeryzowaniu. •ródłem grupy polimeryzowalnej może być zarówno pronukleofil, jak i alkohol. Jako modyfikowane pronukleofile stosowane były np. pochodne bornenyli i oxanorborenyli, które po reakcji Mitsunobu poddawano polimeryzacji z metatetycznym otwarciem pierścienia (ang. *Ring-Opening Metathesis Polymerization*, ROMP). Wytrącanie metanolem produktu polimeryzacji umożliwiło wydzielenie produktu przez proste odsączenie. Przykładem takiej syntezy jest otrzymywanie *O*-benzylohydroksyloaminy w reakcji alkoholu benzyloвого z polimeryzowalną oxanorborenylową pochodną *N*-hydroksysukcynimidu (Schemat 9) [57].



Schemat 9. Otrzymywanie pochodnych hydroksyloaminy z użyciem polimeryzowalnego pronukleofila
Scheme 9. Synthesis of hydroxylamine derivatives with the use of polymerizable pronucleophile [57]

Po wytrąceniu i odsączeniu spolimeryzowanego produktu, właściwy produkt reakcji był uwalniany przez hydrazynolizę. Strategia taka była stosowana zarówno z użyciem polimeryzowalnego pronukleofila, jak i kwasu. Produktami reakcji były aminy, alkilohydrazyny [58], sulfonamidy [59] i *O*-alkilohydroksyloaminy [57].

2.1.5. Modyfikowane pochodne kwasu azodikarboksyłowego

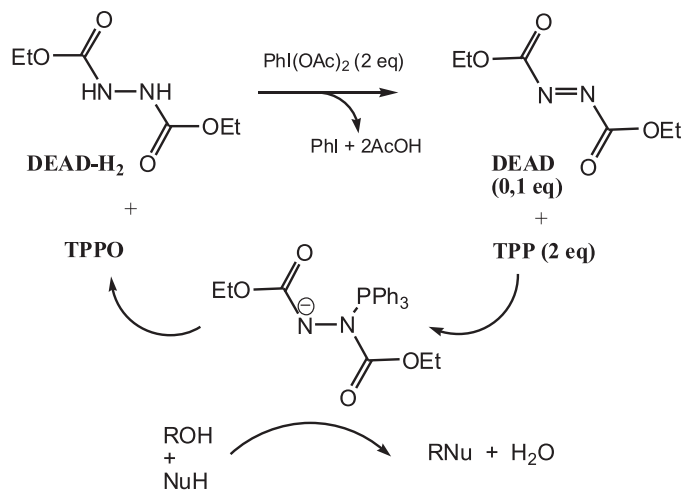
Usuwanie powstających ubocznie pochodnych kwasu hydrazynodikarboksyłowego stanowi znaczne wyzwanie przy planowaniu racjonalnej i prostej przeróbki mieszaniny po reakcji Mitsunobu. Stąd też wiele prac poświęconych modyfikacji zastosowanego pierwotnie przez O. Mitsunobu estru dietyłowego kwasu azodikarboksyłowego (DEAD, **1a**, Schemat 5). Aktualnie, związek ten, z uwagi na toksyczność, brak stabilności termicznej, fotoczułość i wybuchowość [60] został praktycznie całkowicie wyparty przez tańszą i łatwiejszą w stosowaniu drugą „klasyczną” pochodną – ester diizopropylowy (DIAD, **1b**, Schemat 5).

Do wspomnianych już wcześniej w tej pracy modyfikacji klasycznych pochodnych kwasu azodikarboksyłowego należą: pochodne osadzone na polimerach (patrz – II.1.1), pochodne fluorowane (patrz – II.1.3), czy często wykorzystywany ester di-*tert*-butylowy (DBAD, **1c**, Schemat 5), umożliwiający łatwe usunięcie powstającego estru kwasu hydrazynodikarboksyłowego po jego rozkładzie w warunkach kwasowych i ekstrakcję powstającej, rozpuszczalnej w wodzie hydrazyny. Alternatywą dla DEAD i DIAD jest zaproponowany przez Lipszutza [61] stabilny, krystaliczny ester di-*p*-chlorobenzylowy kwasu azodikarboksyłowego (DCAD, **1d**, Schemat 5). Powstający z niego w warunkach reakcji produkt uboczny jest w znacznej mierze usuwany przez proste wytrącanie za pomocą chlorku metylenu, a jego polarność umożliwia znacznie łatwiejsze oddzielenie pozostałości niż w przypadku DEAD/DIAD. Curran i in. zaproponowali [62] znaczenie DEAD grupami adamantylowymi (**4**, Schemat 5). Wykazano, że pochodne takie mają znacznie dłuższe czasy retencji na kolumnach krzemionkowych modyfikowanych cyklodekstryną, co bardzo upraszcza oddzielenie **4** i powstającego z niego związku ubocznego od produktu kondensacji Mitsunobu.

Interesujące podejście do problemu usuwania powstającej ubocznie pochodnej kwasu hydrazynodikarboksyłowego zaproponował Barrett i in. [63]. Rozwiązanie to polega na zastosowaniu znacznika umożliwiającego polimeryzację produktu ubocznego po zakończeniu reakcji Mitsunobu (*impurity anihilation*). Modyfikowany grupą norbornenyliową azodikarboksylan (**5**, Schemat 5) po redukcji zachodzącej podczas reakcji był usuwany przez odsączenie po katalizowanej rutenem reakcji polimeryzacji (polimeryzacja z metatetycznym otwarciem pierścienia (ang. *Ring-Opening Metathesis Polymerization*, ROMP). Równoczesne zastosowanie osadzonej na polimerze fosfiny pozwoliło na jej wcześniejsze usunięcie przez filtrację i uzyskanie czystego produktu Mitsunobu z wydajnością ok. 100% [63]. Ograniczeniem tego rozwiązania jest możliwość inhibicji polimeryzacji przez związki koordynujące rutenowy katalizator. Nie udało się na przykład przeprowadzić reakcji, w której oba oksydacyjno-redukcyjne reagenty (fosfina i pochodna kwasu azodikarboksyłowego) były znaczone norbornenylem.

W celu znacznego ograniczenia problemu stwarzanego przez powstającą ubocznie w reakcji pochodną kwasu hydrazynodikarboksyłowego zaproponowano użycie klasycznego DEAD w ilości katalitycznej [64]. Rolę stechiometrycznego reagenta

utleniającego małe ilości powstającego DEAD-H₂ pełni diocjan jodozobenzenu (Schemat 10). W warunkach reakcji z katalityczną ilością DEAD otrzymano ester 2-fenyletylowy kwasu *p*-nitrobenzoesowego z wydajnością 90% [64]

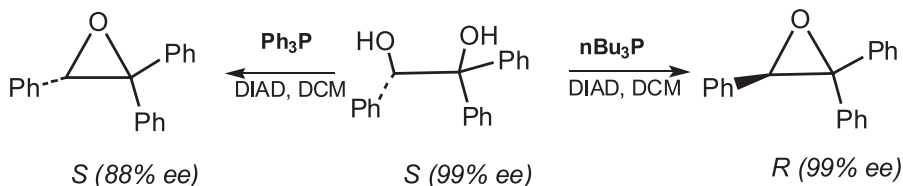


Schemat 10. Cykl reakcji Mitsunobu z zastosowaniem katalitycznej ilości DEAD [64]

Scheme 10. Mitsunobu reaction cycle with catalytic amount of DEAD [64]

2.2. ALTERNATYWNE MEDIATORY W REAKCJI MITSUNOBU

Początkowo jako mediatory w reakcji Mitsunobu stosowano głównie trifenylofosfinę (TPP) i ester dietylowy (DEAD), bądź bezpieczniejszy i tańszy – diizopropylowy (DIAD) kwasu azodikarboksyowego. Rzadziej używane były alkilowe analogi TPP, takie jak trimetylofosfina (TMP) czy tributylfosfina (Bu₃P, TBP) oraz ester dimetylowy lub di-*tert*-butylowy (DBAD) kwasu azodikarboksyowego. Alkilofosfiny, takie jak trimetylofosfina (Me₃P), czy tributylfosfina (TBP) dają najlepsze wyniki w przypadku reakcji charakteryzujących się dużym zatłoczeniem przestrzennym (patrz – prace przeglądowe [8, 65, 66]). Niezwykle ciekawy przypadek zależności stereochemicznego przebiegu reakcji od typu zastosowanej fosfiny zaprezentowali Verdaguer i in. [67] (Schemat 11).

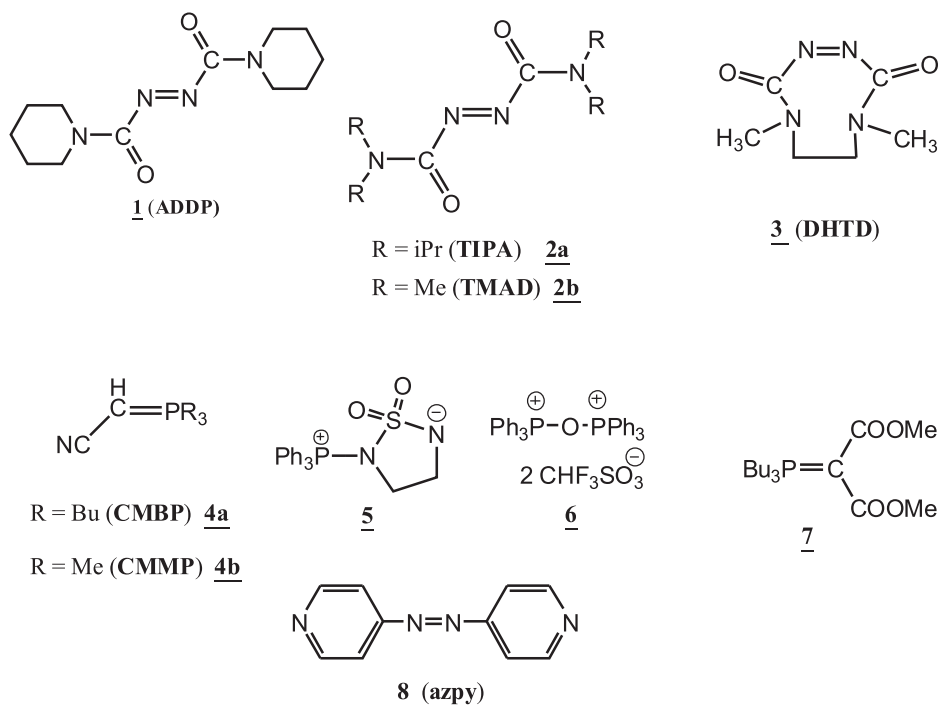


Schemat 11. Zależna od fosfiny stereoselektywność dehydratacji 1,2-dioli [67].

Scheme 11. Phosphine-dependent stereoselectivity in the Mitsunobu cyclodehydration of 1,2-diols [67]

Ester di-*tert*-butylowy kwasu azodikarboksylowego zyskał natomiast sporą popularność z racji swoich potencjalnych właściwości kwasowych (po hydrolizie) i możliwości łatwego usuwania jego nadmiaru i zredukowanej pochodnej przez ekstrakcję po wcześniejszym acydolitycznym usunięciu grup *tert*-butylowych [45, 47, 68].

Klasykzne reagenty reakcji Mitsunobu zostały w różnoraki sposób modyfikowane w celu ułatwienia izolacji produktu kondensacji, co zostało omówione we wcześniejszych rozdziałach tej pracy.

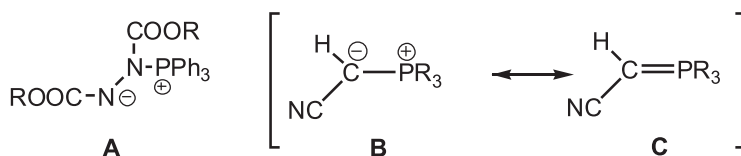


Schemat 12. Alternatywne mediatory reakcji Mitsunobu
 Scheme 12. Alternative Mitsunobu reaction mediators

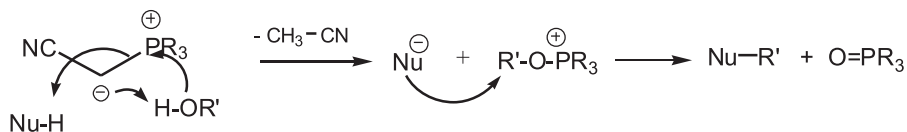
Typem reagentów azowych, nienależących do estrów kwasu azodikarboksylo-owego są wprowadzone przez Itô i Tsunodę diamidy kwasu azodikarboksylo-wego, które ze względu na lepsze zlokalizowanie ładunku ujemnego na azocie, wykazują większą zasadowość produktu przejściowego (**A**, Schemat 1) umożliwiając tym samym zastosowanie pronukleofili o mniejszej kwasowości. Do związków tych należy dipiperyd kwasu azodikarboksylo-wego [69] (ADDP, **1**, Schemat 12), jego *N,N,N',N'*-tetraizopropyl- i *N,N,N',N'*-tetrametylodiamid [70] (TIPA i TMAD, **2a** i **2b**, Schemat 12). Związki te w kombinacji z TBP posłużyły do efektywnego *N*- i *C*-alkilowania pronukleofili o pK_a do ok. 13. Reagenty te okazały się znacznie skuteczniejsze od klasycznych reagentów Mitsunobu w przypadku stosowania alkoholi sterycznie rozbudowanych, a optymalnym rozpuszczalnikiem okazał się ben-

zen. Wyjątkowo korzystnym odczynnikiem okazał się 4,5,6,7-tetrahydro-4,7-dimetylo-1,2,4,7-tetraazocyno-3,8-dion [71–73] (DHTD, **3**, Schemat 12), którego wprowadzenie umożliwiło skuteczne przeprowadzanie redoksowej kondensacji przy użyciu alkoholi drugorzędowych z utworzeniem zarówno wiązania C-C, jak i C-N. Stwierdzono, że w zastosowanych warunkach reakcja z użyciem chiralnego 2-oktanolu prowadzi do odpowiedniej pochodnej *N*-metylotoluenosulfonamidu z pełną inwersją [72].

Przełomowymi w aspekcie użycia w reakcji Mitsunobu słabo kwasowych pronukleofili okazały się wprowadzone także przez grupę Tsunoda-Itô i wsp. stabilizowane metylenotrialkilfosforany [71, 73–77] (**4a** i **4b**, Schemat 12) wykazujące strukturalne i elektronowe podobieństwo do betajny stanowiącej produkt pośredni w reakcji Mitsunobu (**A**, Schemat 1) – patrz schemat 13. Związki te działają jako redokso-we komponenty reakcji Mitsunobu prawdopodobnie przez pochodne alkoksyfosfoniowe (Schemat 14).



Schemat 13. Strukturalne podobieństwo między betainą **A** i cyjanometylenotrialkilfosforanami **B/C**
 Scheme 13. Structural similarity between betaine **A** and cyanomethylenetrialkylphosphoranes **B/C**



Schemat 14. Proponowany przez Itô mechanizm działania cyjanometylenotrialkilfosforanów jako reagentów w reakcji typu Mitsunobu [78]

Scheme 14. Mechanism of cyanomethylenetrialkylphosphorane action in the Mitsunobu reaction, as proposed by Itô [78]

Z racji struktury, układu elektronowego i mechanizmu działania tego typu reagenty zastępują w reakcjach typu Mitsunobu zarówno fosfinę, jak i pochodną kwasu azodikarboksylowego.

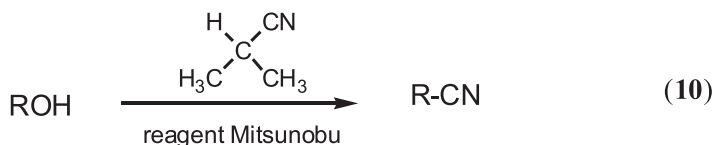
Ponad dziesięciolecie dokonania grupy Tsunoda-Itô i in. w dziedzinie alternatywnych mediatorów reakcji Mitsunobu podsumował Itô [78, 79]. Udowodniono, że wszystkie nowe mediatory są znacznie bardziej efektywne w reakcji *N*-alkilowania za pomocą pierwszorzędowych alkoholi niż kombinacja DEAD-TPP, ale metylenotrialkilfosforany, w przeciwieństwie do amidów kwasu azodikarboksylowego, działają lepiej w podwyższonej temperaturze (100–120°C) i mogą pośredniczyć w reakcjach nawet z tak słabymi kwasami, jak np. arylometylofenylosulfony o $\text{pK}_a = 23,5$

[77, 78]. Związki te są jedynymi reagentami, które prowadzą do efektywnego alkirowania *p*-toluenosulfonamidu niepodstawionego na atomie azotu [75]. Alkirowanie TsNH₂ i jego pochodnych, w połączeniu z desulfurylacją otrzymanego produktu stanowi łatwą drogę do otrzymywania amin pierwszo- i drugorzędowych.

Studia porównawcze wykazały, że względna reaktywność wprowadzonych przez zespół Tsunoda–Itô mediatorów reakcji Mitsunobu (dla tworzenia wiązań C–C) kształtuje się następująco [77, 78]:

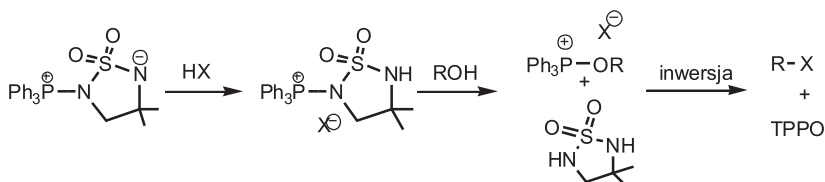


Reagenty te były także wykorzystywane do tworzenia *O*- i *N*-heterocykli przez dehydrocyklizację dioli czy aminoalkoholi [74] oraz przedłużania łańcucha węglowego alkoholi za pomocą cyjanohydryny acetonu – równanie (10) [76].



CMMP został niedawno zastosowany do utworzenia naprężonego pierścienia dehydropiranu w pseudodehydrotyrsiferolu przez dehydratację 1,5-diolu [80]. Opublikowana niedawno procedura syntezy pochodnych metylenotrialkilfosforanów [81] pozwoliła na szerszy dostęp do tych nietypowych reagentów, jednak ich spora wrażliwość na powietrze i wilgoć stanowią ciągle utrudnienie ich powszechnego stosowania.

Do innych alternatywnych redokswych reagentów wprowadzonych w reakcjach typu Mitsunobu należy m.in. wprowadzona przez Castro betaina stanowiąca addukt TPP i cyklicznego sulfonamidu (5, Schemat 12), skutecznie sprzęgająca alkohole z kwasami karboksylowymi czy imidami [82], która z racji swej budowy i mechanizmu działania (Schemat 15) także nie wymaga drugiego komponenta redokswego, co czyni przeróbkę po reakcji znacznie prostszą (szybka chromatografia kolumnowa).

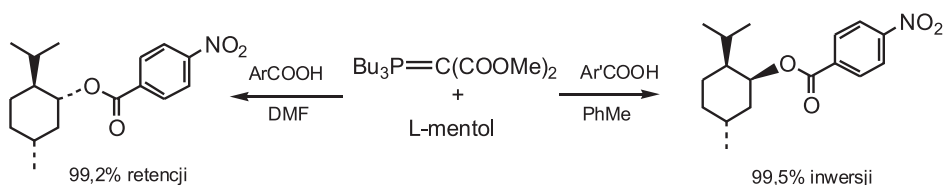


Schemat 15. Proponowany mechanizm działania wprowadzonej przez Castro betainy [82]

Scheme 15. Mechanism of action Castro's betaine [82]

Źródłem jonu alkoksyfosfoniowego może być także sól tlenku bis(trifenylfosfoniowego) (**6**, Schemat 12)[83], skutecznie zastosowana do otrzymania eterów tetrahydrofurano-2,4-dionu [83] czy estryfikacji alkoholi [84].

Reagentem pozwalającym na kontrolę stereochemicznego przebiegu reakcji Mitsunobu jest wprowadzony przez McNulty tributylfosforanylidenomalonian dymetylu (**7**, Schemat 12) [36], który w zależności od warunków reakcji prowadzi do estru chiralnego alkoholu z inwersją lub retencją konfiguracji (Schemat 16)



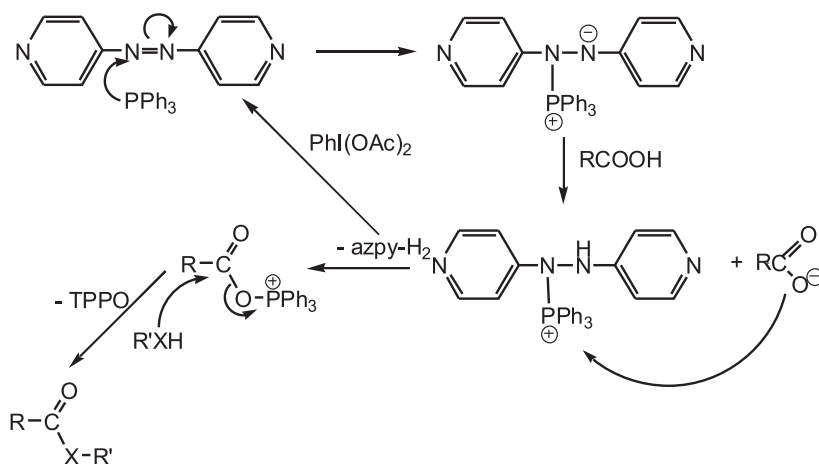
Schemat 16. Przebieg reakcji estryfikacji L-mentolu przy użyciu pochodnej malonianu jako reagenta w reakcji Mitsunobu [36]

Scheme 16. Dimethylmalonyltributylphosphorane as a new reagent for esterification allowing controlled inversion or retention of configuration on chiral alcohols [36]

Stosunkowo niedawno wprowadzonym, innym typem alternatywnej pochodnej azowej jest zaproponowana przez Iranpoora i wsp. 4,4'-azopirydyna [85] (azpy, **8**, schemat 12). Związek ten okazał się najbardziej odpowiedni ze wszystkich badanych azopirydyn (2,2' i 3,3') i ich pirydyniowych cieczy jonowych do przeprowadzenia reakcji estryfikacji i tioestryfikacji (**11**).



Azpy, jako alternatywa DEAD, w kombinacji z TPP oferuje prostą i wygodną metodę przekształcania alkoholi, fenoli i tioli w odpowiednie estry. Otrzymywana w reakcji pochodna hydrazyny jest łatwo wytrącana, usuwana z mieszaniny i poddawana recyklingowi. Badanie przebiegu reakcji otrzymywania chiralnych estrów mentolu i stwierdzenie, iż reakcja zachodzi z pełną retencją konfiguracji wskazuje na fakt, iż raczej przez atak bardziej nukleofilowego anionu karboksylanowego niż alkoholu na centrum fosfoniowe tworzony jest jon acyloksyfosfoniowy (patrz schemat 17)



Schemat 17. Proponowany mechanizm reakcji Mitsunobu przy zastosowaniu 4,4'-azopyridyny (azpy) i TPP i recyklingu azpy (wg [85])

Scheme 17. Mechanism of esterification with the use of TPP and 4,4'-azopyridine and its recycling [85]

PODSUMOWANIE

Opisywane ostatnio modyfikacje mediatorów reakcji Mitsunobu dotyczą głównie ułatwienia izolacji produktów, oddzielenia powstających produktów ubocznych i nadmiaru zastosowanych reagentów. Znacznie mniejsze zainteresowanie wzbudzają mediatory alternatywne i ich praktyczne zastosowanie, prawdopodobnie z uwagi na ich praktyczną niedostępność handlową i konieczność zwykle wieloetapowej syntezy, aczkolwiek niektóre mediatory, z uwagi na swoją wyjątkową charakterystykę otwierają nieznane wcześniej możliwości zastosowania reakcji Mitsunobu. Większość jednak prac poświęconych jest opracowaniu procedur umożliwiających uproszczoną izolację produktów (optymalnie – z pominięciem rozdziału chromatograficznego), zmianę skali przeprowadzanych reakcji, a nawet kontrolę ich przebiegu stereochemicznego. Wszystkie modyfikacje sprawiają, iż reakcja Mitsunobu nie przestaje być jedną z najbardziej wszechstronnych i szeroko stosowanych reakcji w chemii organicznej.

PIŚMIENICTWO CYTOWANE

- [1] O. Mitsunobu, *Synthesis*, **1981**, 1.
- [2] B.R. Castro, *Org. React.*, 1983, **29**, 1.
- [3] D.L. Hughes, *Org. React.*, 1992, **42**, 335.
- [4] D.L. Hughes, *Org. Prep. Proced. Int.*, 1996, **28**, 127.
- [5] X.-F. Ren, J.-L. Xu, S.-H. Chen, *Chin. J. Org. Chem.*, 2006, **26**, 454.
- [6] T.Y.S. But, P.H. Toy, *Chem. Asian J.*, 2007, **2**, 1340.

- [7] S. Dandapani, D.P. Curran, *Chem. Eur. J.*, 2004, **10**, 3130.
- [8] R. Dembinski, *Eur. J. Org. Chem.*, **2004**, 2763.
- [9] K.C.K. Swamy, N.N.B. Kumar, E. Balaraman, K.V.P.P. Kumar, *Chem. Rev.*, 2009, **109**, 2551.
- [10] K. Wiśniewski, A.S. Kołodziejczyk, B. Falkiewicz, *J. Pept. Sci.*, 1998, **4**, 1.
- [11] S.K. Nune, *Synlett*, **2003**, 1221.
- [12] A. Parenty, X. Moreau, J.-M. Campagne, *Chem. Rev.*, 2006, **106**, 911.
- [13] O. Mitsunobu, M. Yamada, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1967, **40**, 2380.
- [14] O. Mitsunobu, J. Kimura, Y. Fujisawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1972, **45**, 245.
- [15] O. Mitsunobu, J. Kimura, K.-I. Iizumi, N. Yanagida, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1976, **49**, 510.
- [16] a) O. Mitsunobu, M. Wada, T. Sano, *J. Am. Chem. Soc.*, 1972, **94**, 679; b) M. Wada, T. Sano, O. Mitsunobu, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1973, **46**, 2833.
- [17] T. Kurihara, Y. Nakajima, O. Mitsunobu, *Tetrahedron Lett.*, 1976, **17**, 2455.
- [18] T. Kurihara, M. Sugizaki, I. Kime, M. Wada, O. Mitsunobu, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1981, **54**, 2107.
- [19] a) O. Mitsunobu, K. Kato, F. Kakese, *Tetrahedron Lett.*, 1969, **10**, 2473; b) O. Mitsunobu, K. Kato, M. Tomari, *Tetrahedron*, 1970, **26**, 5731.
- [20] K. Kato, O. Mitsunobu, *J. Org. Chem.*, 1970, **35**, 4227.
- [21] O. Mitsunobu, M. Eguchi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1971, **44**, 3427.
- [22] J. Mulzer, G. Bruntrup, A. Chucholowski, *Angew. Chem.*, **1979**, **91**, 654; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1979, **18**, 622.
- [23] E. Grochowski, B.D. Hilton, R.J. Kupper, C.J. Michejda, *J. Am. Chem. Soc.*, 1982, **104**, 6876.
- [24] W. Adam, N. Narita, Y. Nishizawa, *J. Am. Chem. Soc.*, 1984, **106**, 1843.
- [25] M. Varasi, K.A.M. Walker, M.L. Maddox, *J. Org. Chem.*, 1987, **52**, 4235.
- [26] D.L. Hughes, R.A. Reamer, J.J. Bergan, E.J.J. Grabowski, *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, **110**, 6487.
- [27] D. Crich, H. Dyker, R.J. Harris, *J. Org. Chem.*, 1989, **54**, 257.
- [28] A. Pautard-Cooper, S.A. Evans, Jr., *J. Org. Chem.*, 1989, **54**, 2485.
- [29] D. Camp, I.D. Jenkins, *J. Org. Chem.*, 1989, **54**, 3045 i 3049.
- [30] S.R. Wilson, J. Perez, A. Pasternak, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 1994.
- [31] C.M. Afonso, M.T. Barros, L.S. Godinho, C.D. Maycock, *Tetrahedron*, 1994, **50**, 9671.
- [32] D.L. Hughes, R.A. Reamer, *J. Org. Chem.*, 1996, **61**, 2967.
- [33] P.J. Harvey, M. von Itzstein, I.D. Jenkins, *Tetrahedron*, 1997, **53**, 3933.
- [34] T. Watanabe, I. D. Gridnev, T. Imamoto, *Chirality*, 2000, **12**, 346.
- [35] C. Ahn, R. Correia, P. DeShong, *J. Org. Chem.*, 2003, **68**, 1176.
- [36] J. McNulty, A. Capretta, V. Laritchev, J. Dyck, A.J. Robertson, *J. Org. Chem.*, 2003, **68**, 1597.
- [37] J. McNulty, A. Capretta, V. Laritchev, J. Dyck, A.J. Robertson, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2003, **42**, 4051.
- [38] S. Schenk, J. Weston, E. Anders, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 12566.
- [39] a) A.R. Tunoori, D. Dutta, G.I. Georg, *Tetrahedron Lett.*, 1998, **39**, 8751; b) M.K.W. Choi, H.S. He, P.H. Toy, *J. Org. Chem.*, 2003, **68**, 9831.
- [40] R.G. Gentles, D. Wodka, D.C. Park, A. Vasudevan, *J. Comb. Chem.*, 2002, **4**, 442.
- [41] A.M. Harned, H.S. He, P.H. Toy, D.L. Flynn, P.R. Hanson, *JACS*, 2005, **127**, 52.
- [42] a) P. Wentworth, Jr., A.M. Vandersteen, K.D. Janda, *Chem. Commun.*, **1997**, 759; b) A.B. Charette, M.K. Janes, A.A. Boezio, *J. Org. Chem.*, 2001, **66**, 2178; c) T.J. Dickerson, N.N. Reed, K.D. Janda, *Chem. Rev.*, 2002, **102**, 3325.
- [43] M. Figlus, A.C. Tarruella, A. Messer, S. Sollis, R. C. Hartley, *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 4405.
- [44] D. Camp, I.D. Jenkins, *Aust. J. Chem.*, 1988, **41**, 1835.
- [45] M. Kiankarimi, R. Lowe, J.R. McCarthy, J. Whitten, *Tetrahedron Lett.*, 1999, **40**, 4497.
- [46] M. von Itzstein, M. Mocerino, *Synth. Commun.*, 1990, **20**, 2049.

- [47] a) G.W. Starkey, J.J. Parlow, D.L. Flynn, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1998, **8**, 2385; b) D.L. Flynn, *Med. Res. Rev.*, 1999, **19**, 408.
- [48] J.-C. Poupon, A.A. Boezio, A.B. Charette *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, **45**, 1415.
- [49] E.A. Veliz, P.A. Beal, *Tetrahedron Lett.*, 2006, **47**, 3153.
- [50] A.P. Dobbs, C. McGregor-Johnson, *Tetrahedron Lett.*, 2002, **43**, 2807.
- [51] S. Dandapani, D.P. Curran, *Tetrahedron*, 2002, **58**, 3855.
- [52] S. Dandapani, D.P. Curran, *J. Org. Chem.*, 2004, **69**, 8751.
- [53] M.W. Markowicz, R. Dembinski, *Org. Lett.*, 2002, **4**, 3785.
- [54] T. Jackson, A. Routledge, *Tetrahedron Lett.*, 2003, **44**, 1305.
- [55] P. Lan, J.A. Porco Jr., M.S. South, J.J. Parlow, *J. Comb. Chem.*, 2003, **5**, 660.
- [56] C.A. Fleckenstein, H. Plenio, *Adv. Synth. Catal.*, 2006, **348**, 1058.
- [57] A.M. Harned, P.R. Hanson, *Org. Lett.*, 2002, **4**, 1007.
- [58] S. Mukherjee, K.W.C. Poon, D.L. Flynn, P.R. Hanson, *Tetrahedron Lett.*, 2003, **44**, 7187.
- [59] A.M. Harned, S. Mukherjee, D.L. Flynn, P.R. Hanson, *Org. Lett.* 2003., **5**, 15; 2003, **5**, 2015.
- [60] D.H. Jr. Valentine, J.H. Hillhouse, *Synthesis*, 2003, **3**, 317.
- [61] B.H. Lipshutz, D.W. Chung, B. Rich, R. Corral, *Org. Lett.*, 2006, **8**, 5069.
- [62] S. Dandapani, J.J. Newsome, D.P. Curran, *Tetrahedron Lett.*, 2004, **45**, 6653.
- [63] A.G.M. Barrett, R.S. Roberts, J. Schroder, *Org. Lett.*, 2000, **2**, 2999.
- [64] T.Y.S. But, P.H. Toy, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 9636.
- [65] B. Falkiewicz, K. Wiśniewski, A.S. Kołodziejczyk, *Wiad. Chem.*, 2001, **55**, 9.
- [66] D.H. Valentine Jr., J.H. Hillhouse, *Synthesis*, **2003**, 317.
- [67] N. Garcia-Delgado, A. Riera, X. Verdager, *Org. Lett.*, 2007, **9**, 635.
- [68] M. Kiankarimi, R. Lowe, J.R. McCarthy, J.P. Whitten, *Tetrahedron Lett.*, 1999, **40**, 4497.
- [69] T. Tsunoda, Y. Yamamiya, S. Itô, *Tetrahedron Lett.*, 1993, **34**, 1639.
- [70] a) T. Tsunoda, J. Otsuka, Y. Yamamiya, S. Itô, *Chemistry Lett.*, **1994**, 539; b) T. Tsunoda, Y. Yamamiya, Y. Kawamura, S. Itô, *Tetrahedron Lett.*, 1995, **36**, 2529.
- [71] T. Tsunoda, M. Nagaku, C. Nagino, Y. Kawamura, F. Ozaki, F.; Hioki, H.; Itô, S. *Tetrahedron Lett.*, 1995, **36**, 2531.
- [72] T. Tsunoda, Y. Kawamura, K. Uemoto, S. Itô, *Heterocycles*, 1998, **47**, 177.
- [73] T. Tsunoda, C. Nagino, M. Oguri, S. Itô, *Tetrahedron Lett.*, 1996, **37**, 2459.
- [74] T. Tsunoda, F. Ozaki, N. Shirakata, Y. Tamaoka, H. Yamamoto, Itô S., *Tetrahedron Lett.*, 1996, **37**, 2463.
- [75] T. Tsunoda, H. Yamamoto, K. Goda, S. Itô, *Tetrahedron Lett.*, 1996, **37**, 2457.
- [76] T. Tsunoda, K. Uemoto, Ch. Nagino, M. Kawamura, H. Kaku, S. Itô, *Tetrahedron Lett.*, 1999, **40**, 7355.
- [77] T. Tsunoda, K. Uemoto, T. Ohtani, H. Kaku, S. Itô, *Tetrahedron Lett.*, 1999, **40**, 7359.
- [78] S. Itô, T. Tsunoda, *Pure Appl. Chem.*, 1999, **71**, 1053.
- [79] S. Itô, *Yakugaku, Zasshi*, 2001, **121**, 567.
- [80] H. Hioki, M. Motosue, Y. Mizutani, A. Noda, T. Shimoda, M. Kubo, K. Harada, Y. Fukuyama, M. Kodama *Org. Lett.*, 2009, **11**, 579.
- [81] a) I. Sakamoto, H. Kaku, T. Tsunoda, *Chem. Pharm. Bull.*, 2003, **51**, 474, b) I. Sakamoto, T. Nishii, F. Ozaki, H. Kaku, M. Tanaka, T. Tsunoda, *Chem. Pharm. Bull.*, 2005, **53**, 1508.
- [82] J.L. Castro, V.G. Matassa, R.G. Ball, *J. Org. Chem.*, 1994, **59**, 2289.
- [83] F.F. Paintner, L. Allmendinger, G. Bauschke, *Synlett*, **2003**, 83.
- [84] K.E. Elson, I.D. Jenkins, W.A. Loughlin, *Org. Biomol. Chem.*, 2003, **1**, 2958.
- [85] N. Iranpoor, H. Firouzabadi, D. Khalili, S. Motevalli, *J. Org. Chem.*, 2008, **73**, 4882.

NOWE WYDAWNICTWA



Jadwiga Demichowicz-Pigoniowa, Andrzej Olszowski, *Chemia fizyczna, Obliczenia fizykochemiczne*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2010. Wyd. 1, str. 764, oprawa miękka, cena 71,90 zł.

Zmienione i rozszerzone wydanie podręcznika „Obliczenia fizykochemiczne” stanowi integralną część tomu 1 i 2 podręcznika „Chemii Fizycznej” K. Pigonia i Z. Ruzewicza, też zmienionego i uaktualnionego przez zespół specjalistów z Politechniki Wrocławskiej (pod redakcją profesorów L. Komorowskiego i A. Olszowskiego). Kolejność i zawartość poszczególnych rozdziałów w „Obliczeniach fizykochemicznych” odzwierciedla też układ tych tomów. Prezentowany podręcznik stanowi wprowadzenie do problemów obliczeniowych chemii fizycznej i, jak pisała pierwsza autorka tego podręcznika – J. Demichowicz-Pigoniowa, nie jest on zbiorem zadań z chemii fizycznej. Przedstawia złożone problemy fizykochemiczne i uczy ich rozwiązywania na drodze rachunkowej. W książce zamieszczono również zadania do samodzielnego rozwiązania, pozwalające studiującemu ćwiczyć i sprawdzać stopień opanowania sztuki obliczeń fizykochemicznych z zakresu: termodynamiki, elektrochemii, kinetyki, spektroskopii, chemii kwantowej, struktury i własności ciał stałych. Jak piszą Autorzy, podręcznik przeznaczony jest dla studentów wydziałów chemii, biologii, fizyki i farmacji, a także dla wykładowców i pracowników naukowych. Jeśli jednak podręcznik „Obliczenia fizykochemiczne”, jak należałoby oczekiwać, miałyby być ilustracją do tomów 1 i 2, to stanowczo za mało jest w nim przykładów podstawowych i rozwiązań ogólnych. Stąd trudno jest nazwać ten podręcznik przyjaznym dla studenta (nie jest „student friendly” – określenie bardzo często stosowane w recenzjach zagranicznych podręczników, w celu określenia ich przydatności). Kiedy przyjrzymy się nowoczesnym podręcznikom, zwłaszcza amerykańskim, rzuca się w oczy dążenie do przedstawienia zagadnienia w sposób jak najprostszy i czytelny, przede wszystkim dla mniej zaawansowanego czytelnika. W typowych podręcznikach przedstawia się zestaw danych, podstawowe wzory, z których się korzysta, wyprowadzenie – aż do wzoru końcowego, podstawienie do wzoru i wyliczenie jednostki otrzymanej wartości. Niestety w „Obliczeniach” nie da się zaobserwować tego schematu, co znacznie utrudnia prześledzenie rozwiązania. W recenzowanym podręczniku często stosuje się podstawienia do nieprzekształconych jeszcze wzorów cząstkowych. Nagminny jest brak wyprowadzenia jednostek, a niekiedy błędy w ich użyciu (np. na str. 274), mimo że w oryginalnym podręczniku J. Demichowicz-Pigoniowej tych błędów nie było. Autorzy myślą też anodę z katodą (str. 578).

W rozwiązaniach zadań zdarzają się błędy mogące zmylić studentów, którzy obecnie są bardzo słabo przygotowani z matematyki i mają problemy nawet z wykonywaniem zwykłych algebraicznych przekształceń. Kuriozalne jest też odwoływanie się to tablic obliczeniowych (str. 276). Oczywiście w czasach pisania skryptu przez J. Demichowicz-Pigoniową (połowa lat 70-tych) było to przydatne, lecz w dobie powszechnego używania komputerów i kalkulatorów odwoływanie się do tych tablic jest raczej archaiczne.

Mankamentem jest brak tabeli ze stosowanymi symbolami. Niektóre symbole są inne niż w oryginalnym podręczniku J. Demichowicz-Pigoniowej, utrudnia to pracę z tekstem gdyż każdy zaawansowany czytelnik

jest przyzwyczajony do swojego zestawu symboli. Ponadto w innych podręcznikach używa się odmiennego ich zestawu, co nawet u doświadczonego czytelnika prowadzi do pewnego zamętu, nie wspominając już o początkującym adeptcie chemii fizycznej. Ciągłe odnoszenie się do tomu 1 i 2 jest bardzo uciążliwe, a więc taka tabela byłaby ze wszech miar przydatna.

W wielu zagadnieniach fizykochemicznych stosuje się „fitowanie” funkcji. W trakcie przeglądania podręcznika zabrakło mi krytycznego ustosunkowania się do niebezpieczeństw estymacji parametrów funkcji, a zwłaszcza do linearyzacji funkcji nieliniowych, przez co często otrzymuje się tzw. estymatory obciążone. Parametry funkcji otrzymane po jej zlinearyzowaniu mają więc często wartości odmienne niż te, które otrzymuje się dopasowując do danych doświadczalnych funkcję wyjściową, nie zlinearyzowaną. Nawiasem mówiąc linearyzację funkcji Autorzy nazywają anamorfozą, co w obecnych czasach nie jest zbyt często używanym terminem.

Skrypt J. Demichowicz-Pigoniowej w minionych czasach kiedy po raz pierwszy powstawał, był przedsięwzięciem bardzo ambitnym. Opierał się na danych literaturowych, które na owe czasy były nowe. W chwili obecnej jednak niektóre z nich mają ponad 70 lat i niestety straciły na swej aktualności. Niemniej podstawową zaletą podręcznika są tabele umieszczone na końcu, zawierające dane termodynamiczne dla dużej liczby substancji. Jest to nieograniczona skarbnica przy obmyślanu nowych problemów i zadań.

Opracowanie jest obszerne i może być przydatne, głównie dla specjalistów. Jednak odnosi się wrażenie, że powinno być porządnie przepracowane. Przydałoby się więcej prostych przykładów z ogólnymi rozwiązaniami, nawet przy wykorzystaniu obecnego zestawu danych. Zbyt dużo jest przykładów z chemii zaliczanej obecnie do chemii analitycznej. Brakuje zadań dla problemów bardziej współczesnych, zwłaszcza dotyczących ciała stałego, półprzewodników, materiałów ferroicznych czy polimerów.

Grażyna Bator

INFORMACJE

INFORMACJE REDAKCJI „WIADOMOŚCI CHEMICZNYCH”

*Radości i szczęśliwych chwil w gronie najbliższych
w czasie świąt Bożego Narodzenia,
a w nadchodzącym Nowym Roku
zdrowia, sukcesów zawodowych oraz spełnienia
wszystkich marzeń
życzy swoim Czytelnikom*

Redakcja „Wiadomości Chemicznych”



PODZIĘKOWANIA DLA PANA PROF. DR HAB. ADOLFA KISZY ZA PRACĘ W KOMITECIE REDAKCYJNYM *WIADOMOŚCI CHEMICZNYCH*

W imieniu Komitetu Redakcyjnego oraz moim własnym składam wyrazy serdecznego podziękowania Panu prof. dr hab. **Adolfowi Kiszy**, za wieloletni owocny wkład w prace redakcyjne oraz duże zaangażowanie w sprawy *Wiadomości Chemicznych*.

Życząc Panu kolejnych sukcesów oraz satysfakcji z codziennej pracy proszę o dalszą współpracę z naszą Redakcją.

prof. dr hab. Zdzisław Latajka
Redaktor Naczelny

CENY PRENUMERATY NA ROK 2011

Redakcja miesięcznika PTCh „Wiadomości Chemiczne” zawiadamia, że wysokość prenumeraty rocznej „Wiadomości Chemicznych” za 2011 r. wynosi **168 zł** dla instytucji i niezrzeszonych prenumeratorów indywidualnych oraz **78 zł** dla bibliotek szkół średnich i podstawowych. 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 2011 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
Millennium BIG BG SA
NRB 57 1160 2202 0000 0000 2720 2458

Informacje bieżące

Informujemy, że od roku 2010, rezygnujemy z przesyłania do Autorów bezpłatnych odbitek manuskryptu – w zamian będziemy przysyłać elektroniczną wersję opublikowanej pracy. Decyzja ta została podjęta na prośbę wielu autorów jak również ze względu na obniżenie kosztów wydawania czasopisma.

Redakcja „Wiadomości Chemicznych”

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 indywidualności 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. Stręk, M. Suszyńska, cena 25 zł.

Praca zbiorowa, *Ogniwa paliwowe – nowe kierunki rozwoju*, red. H. Drulis, J. Hanuza, D. Hreniak, M. Miller, G. Paściak, W. Stręk, 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 substancji prostych do życia. Świat RNA – początki życia na Ziemi, Zdzisław Chilmonczyk, cena 18 zł.

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.

Obliczenia teoretyczne stałej ekranowania magnetycznego i stałych strzeżeń spinowo-spinowych. Teobald Kupka.

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 DLA AUTORÓW

„Wiadomości Chemiczne” publikują artykuły przeglądowe, dotyczące wszystkich dziedzin chemii i wcześniej niedrukowane w innych czasopismach. Prace raz opublikowane w „Wiadomościach Chemicznych”, bez zgody Redakcji, nie mogą być wydane gdzie indziej.

Treść artykułów powinna odpowiadać aktualnemu stanowi wiedzy i uwzględniać najnowsze osiągnięcia z dziedziny, której artykuł dotyczy.

„Wiadomości Chemiczne” nie przyjmują do druku oryginalnych prac własnych. W wyjątkowych przypadkach mogą zostać wydane prace przeglądowe dotyczące dorobku własnego autora (np. nowo mianowanego profesora lub laureata ważnej nagrody) albo prace podsumujące dorobek Instytutu, Wydziału itp. Zamiar złożenia takiego artykułu do druku powinien być jednak wcześniej uzgodniony z Redakcją.

Ponadto w serii „Biblioteka Wiadomości Chemicznych” publikowane są prace, będące z założenia dłuższymi artykułami przeglądowymi lub monografiami poświęconymi ważnym i aktualnym problemom współczesnej chemii. Autorzy, którzy chcieliby dla „Wiadomości Chemicznych” taki artykuł napisać, powinni wcześniej skontaktować się z Redakcją i przesłać pocztą elektroniczną (**e-mail: wchem@wchuwr.pl**) lub zwykłą informację zawierającą tytuł przygotowywanej publikacji oraz przybliżoną liczbę stron, tabel i rysunków itp.

W ramach nowej serii wydawniczej „WCh” pod nazwą „Habilitatione” mogą być publikowane prace habilitacyjne z szeroko pojmowanego obszaru chemii. Zważywszy, że zgodnie z ustawą, dopuszczalne jest przedstawianie rozpraw habilitacyjnych albo w formie monografii, albo w formie pliku bliskotematycznych publikacji, poprzedzonych omówieniem w języku polskim (tzw. autoreferatem), Redakcja przewiduje drukowanie (również w kolorach) obydwu tych wariantów. W zależności od sytuacji finansowej Wydawnictwa lub w przypadku specjalnych wymagań Autorów, Redakcja zastrzega sobie prawo negocjacji kosztów druku z Autorami lub Instytucjami zlecającymi druk.

Prace należy przysyłać do Redakcji pocztą elektroniczną (**e-mail: wchem@wchuwr.pl**) oraz **równoległe** – pocztą zwykłą (na adres: Redaktor Naczelny/Sekretarz Redakcji „Wiadomości Chemicznych”; ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław), dwa egzemplarze jednostronnego wydruku komputerowego publikacji z dołączoną płytą CD, zawierającą tekst, tabele i ilustracje.

Tekst powinien być przygotowany w edytorze **Word** lub innym kompatybilnym z MS Office. Artykuły należy opracowywać zwięźle i nie zamieszczać nadmiaru szczegółów, odsyłając Czytelnika do piśmiennictwa oryginalnego, które powinno uwzględniać najnowsze prace z dziedziny, której dotyczy artykuł.

Maszynopis nie powinien przekraczać 25 stron, wliczając wykaz piśmiennictwa w przypadku krótkiego przeglądu, lub 100 stron, w przypadku monografii przeznaczonej do druku w Bibliotece „Wiadomości Chemicznych”. Strona powinna zawierać **1800** znaków (razem ze spacjami), co przy interlinii 1,5 oznacza 30 wierszy po 60 znaków oraz margines z prawej strony ok. 5 cm.

Na pierwszej stronie, pod tytułem polskim, należy umieścić tytuł w języku angielskim, nazwisko(a) i adres autora(ów) oraz spis rozdziałów. Dalej powinno się znaleźć obszernie streszczenie pracy w języku angielskim (do 2700 znaków, z cytowaniem piśmiennictwa i odsyłaczami do tabel i rysunków w tekście) oraz wykaz słów kluczowych, osobno w języku polskim i osobno w angielskim. Redakcja prosi o przysyłanie tekstów angielskich adjustowanych.

Na oddzielnej karcie prosimy dołączyć krótką (do 150 wyrazów) **notkę biograficzną**, zawierającą tytuły naukowe i miejsca pracy oraz inne informacje wg uznania Autora/Autorów, w tym aktualne zdjęcie. Nadesłanie tych informacji będziemy traktować jako zgodę na ich publikację.

Rysunki (mogą być kolorowe, ale trzeba się liczyć z dopłatą do druku) w formie wydruku należy przesłać w dwóch egzemplarzach. Muszą mieć odpowiednią formę graficzną, by w razie potrzeby nadawały się do reprodukcji. Na odwrocie należy wpisać ołówkiem nazwisko autora i numer rysunku – ten sam, który w odpowiednim miejscu został wpisany w manuskrypcie. Na osobnej stronie dołączyć podpisy pod rysunki w języku polskim i angielskim. Osobno należy dołą-

czyć ponadto jeden komplet wzorów i schematów, narysowanych oddzielnie w formie nadającej się do reprodukcji. W wersji elektronicznej rysunki czarno-białe należy zapisać w formacie .doc, .cdr, .jpg, .tif, .pdf, natomiast rysunki kolorowe – w formacie .jpg lub .tif. Rozdzielczość rysunków ≥ 300 dpi. Każdy z rysunków zapisać w oddzielnym pliku.

Tabele należy ponumerować cyframi arabskimi, a ich tytuły w języku polskim i angielskim zapisać nad tabelami.

Piśmiennictwo należy zestawić w kolejności cytowania w tekście: powinno ono zawierać kolejno inicjały imion i nazwisko, skrót tytułu czasopisma zgodny z przyjętymi normami, rok wydania, tom podkreślony i numer pierwszej strony cytowanej pracy, przykład: J. Kowalski, *Wiad.Chem.*, 2007, **61**, 473. Wykaz skrótów ważniejszych czasopism chemicznych jest podany w „Wiadomościach Chemicznych”, 1989, **43**, 979. Jeśli część piśmiennictwa zebrana jest w monografiach lub innych wydawnictwach, nie należy podawać szczegółowo wykazu tego piśmiennictwa, lecz cytować odnośne wydawnictwo.

O **przyjęciu** pracy do druku decyduje Komitet Redakcyjny. Przed podjęciem decyzji wszystkie prace są przesyłane recenzentom. Artykuły niezakwalifikowane do druku Redakcja zwraca, zachowując kopię maszynopisu.

Autorzy zobowiązani są do wykonania jednej korekty tekstu.

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

Redakcja
„Wiadomości Chemicznych”

