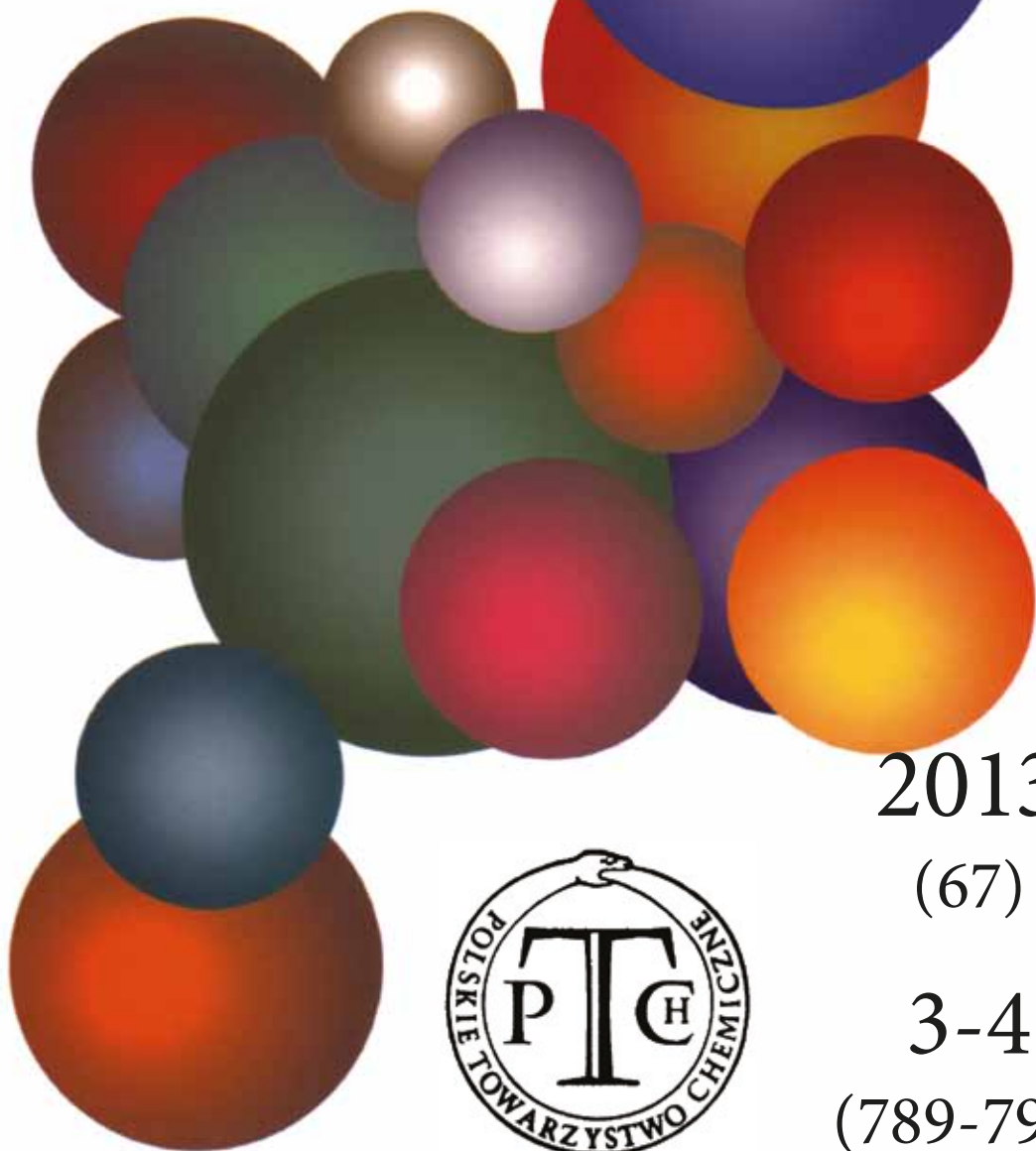


# WIADOMOŚCI *chemiczne*



2013

(67)

3-4

(789-790)



# **CZASOPISMO POLSKIEGO TOWARZYSTWA CHEMICZNEGO**

Publikacja dotowana przez MNiSW

## **RADA REDAKCYJNA**

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

## **KOMITET REDAKCYJNY**

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

## **REDAKTOR NACZELNY**

ZDZISŁAW LATAJKA

## **SEKRETARZ REDAKCJI**

BEATA ŚWIĄTEK-TRAN

BARBARA LATKO (FINANSE)

KAZIMIERA LUKJAN (KOLPORTAŻ)

Korespondencję należy kierować pod adresem:

Redakcja „Wiadomości Chemicznych”

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

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

e-mail: [wchem@wchuwr.pl](mailto:wchem@wchuwr.pl)

## **INTERNET**

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

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

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

© Copyright by Redakcja „Wiadomości Chemicznych”, Wrocław 2013

pISSN 0043-5104

eISSN 2300-0295

Maszynopis niniejszego numeru przekazano Wydawcy w lutym/marcu 2013

Przygotowanie do druku i druk:

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

tel. 22 517 78 12, fax 22 517 78 11, e-mail: [k2@druk-k2.pl](mailto:k2@druk-k2.pl)

**SYNTEZY WYBRANYCH, NOWYCH POCHODNYCH  
2-AMINO-1H-BENZIMIDAZOLU  
I ICH MECHANIZMY DZIAŁANIA BIOLOGICZNEGO**

**SYNTHESIS OF SELECTED,  
NEW 2-AMINO-1H-BENZIMIDAZOLE DERIVATIVES  
AND THEIR MECHANISM OF BIOLOGICAL ACTIVITY**

**Anna Nowicka\*, Wanda Paulina Nawrocka**

*Katedra i Zakład Technologii Leków  
Uniwersytet Medyczny im Piastów Śląskich we Wrocławiu  
pl. Nankiera 1, 50-140 Wrocław  
\*e-mail: anna.nowicka@umed.wroc.pl*

---

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Syntezy pochodnych 2-amino-1H-benzimidazolu o aktywności przeciwnowotworowej i ich mechanizmy działania
2. Syntezy pochodnych 2-amino-1H-benzimidazolu o aktywności przeciwbakteryjnej i ich mechanizmy działania
3. Syntezy pochodnych 2-amino-1H-benzimidazolu o różnej aktywności biologicznej i ich mechanizmy działania

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

---

**Mgr inż. Anna Nowicka** ukończyła Inżynierię Materiałową na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej. Jest również absolwentką Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej we Wrocławiu. Od 2010 roku jest asystentem w Katedrze i Zakładzie Technologii Leków Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. Zajmuje się syntezą nowych pochodnych 2-aminobenzimidazolu o potencjalnej aktywności biologicznej.

**Prof. dr hab. Wanda Paulina Nawrocka** jest absolwentką Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej i pracuje na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Stopień naukowe doktora nauk farmaceutycznych i doktora habilitowanego w zakresie chemii i technologii środków leczniczych uzyskała na tutejszym Wydziale. W 2009 roku Prezydent RP Lech Kaczyński nadał jej tytuł naukowy profesora dr hab. w zakresie chemii i technologii środków leczniczych. Od 2009 jest kierownikiem Katedry i Zakładu Technologii Leków. Kierunki badań naukowych: synteza i struktura związków heterocyklicznych w tym 1,5-benzo- i 1,5-pirydodiazepin, chinazolinonu-4, 2-aminobenzimidazolu, o potencjalnej aktywności biologicznej: psychotropowej, immunotropowej i przeciwnowotworowej.

---

**ABSTRACT**

Many 2-amino-1*H*-benzimidazole drugs such as antihistaminic mizolastine and norastemizole or antiparasitic mebendazole, albendazole and thiabendazole have been used in clinic [1, 2]. Benomyl and its metabolite Carbendazim are both antifungal and anticancer drugs [4].

Recently, a lot of literature has revealed that 2-amino-1*H*-benzimidazole derivatives could effectively inhibit the growth of various microorganisms, what suggests that 2-aminobenzimidazole compounds should have large potential as a new type of antibacterial [15] and antifungal [18] agents.

A number of 2-aminobenzimidazoles have exhibited antiproliferative *in vitro* properties [11]. Some new compounds, containing in their structures 2-aminobenzimidazole, show interesting and diverse cytotoxic mechanism of action, e.g. induce apoptosis of cancer cells [13]. Some of 2-aminobenzimidazole analogues are histamine and serotonin receptors antagonists [32]. 2-Aminobenzimidazoles derivatives have been frequently found to display a variety of biological activities like anti-inflammatory, antioxidant and anticoagulant [32] properties.

Keywords: 2-amino-1*H*-benzimidazole derivatives, synthesis, biological activity

Słowa kluczowe: pochodne 2-amino-1*H*-benzimidazolu, syntezy, aktywność biologiczna

---

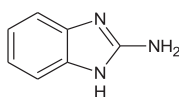
---

## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

DIEA lub DIPEA	– diizopropylloetyloamina (ang. <i>N,N-diisopropylethylamine</i> )
h	– godzina (ang. <i>hour</i> )
THF	– tetrahydrofuran (ang. <i>tetrahydrofuran</i> )
DMF	– dimetyloformamid (ang. <i>dimethylformamide</i> )
Boc	– grupa <i>tert</i> -butoksykarbonylowa (ang. <i>t-butoxycarbonyl group</i> )
HATU	– (ang. <i>O</i> -(7-azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium hexafluorophosphate)
DCM	– dichlorometan (ang. <i>dichloromethane</i> )
DME	– dimetoksyetanol (ang. <i>dimethoxyethanol</i> )
MW	– promieniowanie mikrofalowe (ang. <i>microwave</i> )
TEA	– trietyloamina (ang. <i>triethylamine</i> )
Me	– metyl (ang. <i>methyl</i> )
Et	– etyl (ang. <i>ethyl</i> )
Ac	– acetyl (ang. <i>acetyl</i> )
Ph	– fenyl (ang. <i>phenyl</i> )
DCC	– <i>N,N'</i> -Dicykloheksylokarbodiimid (ang. <i>N,N'-dicyclohexylcarbodiimide</i> )
m-TOR	– kinaza tzw. ssaczy cel rapamycyny (ang. <i>mammalian target of rapamycin kinase</i> )
VEGF	– czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (ang. <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> )
NMP	– <i>N</i> -metylo-2-pirolidon (ang. <i>N-methyl-2-pyrrolidone</i> )
DBU	– 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undek-7-enu (ang. <i>1,8-diazabicycloundec-7-ene</i> )
MCH	– hormon koncentrujący melaninę (ang. <i>melanin-concentrating hormone</i> )
CDPK	– kinaza zależna od wapnia (ang. <i>calcium dependent protein kinases</i> )
EDC	– 1-Etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimid (ang. <i>1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide</i> )

## WPROWADZENIE

W poprzednich naszych pracach, dotyczących 2-amino-1H-benzimidazolu (**1**) i jego pochodnych, zaprezentowano wybrane struktury oraz ich aktywność biologiczną [1, 2]. W następnych pracach przedstawiono wybrane metody syntezy: 2-amino-1H-benzimidazolu i jego pochodnych [3] oraz aktualnie stosowanych leków o różnych mechanizmach działania farmakologicznego [4].



**1**

Rysunek 1  
Figure 1

Piśmiennictwo dotyczące syntezy i aktywności biologicznej oraz zastosowań pozamedycznych nowych pochodnych 2-amino-1H-benzimidazolu jest bardzo obszerne. Z tego względu, w tej pracy przedstawiono wybrane, najbardziej interesujące naszym zdaniem, syntezy pochodnych 2-amino-1H-benzimidazolu, o nowych mechanizmach działania biologicznego, opisane w piśmiennictwie chemicznym ostatnich pięciu lat. Zaprezentowane zostaną związki wykazujące m.in. aktywność: przeciwnowotworową, przeciwbakteryjną, przeciwprzotniakową, przeciwzapalną i inną.

### 1. SYNTEZY POCHODNYCH 2-AMINO-1H-BENZIMIDAZOLU O AKTYWNOŚCI PRZECIWNOWOTWOROWEJ I ICH MECHANIZMY DZIAŁANIA

Kinazy białkowe są enzymami (transferazami), których substratami są białka. Kinazy katalizują reakcje fosforylacji cząsteczki specyficznego białka, co powoduje zmiany jego konformacji, a w konsekwencji zmiany aktywności, zdolności do wiązania się z innymi białkami lub przemieszczenia cząsteczki w obrębie komórki [5].

Kinazy białkowe dzielimy na rodziny:

- kinaz serynowo-treoninowych
- kinaz tyrozynowych.

Zaburzenia aktywności kinaz są częstą przyczyną chorób, zwłaszcza nowotworowych, a ich inhibitory mogą być stosowane w terapiach. Kilka leków będących inhibitorami kinaz białkowych jest obecnie dopuszczonych do leczenia. Trwają również badania kliniczne nowych związków – inhibitorów kinaz.

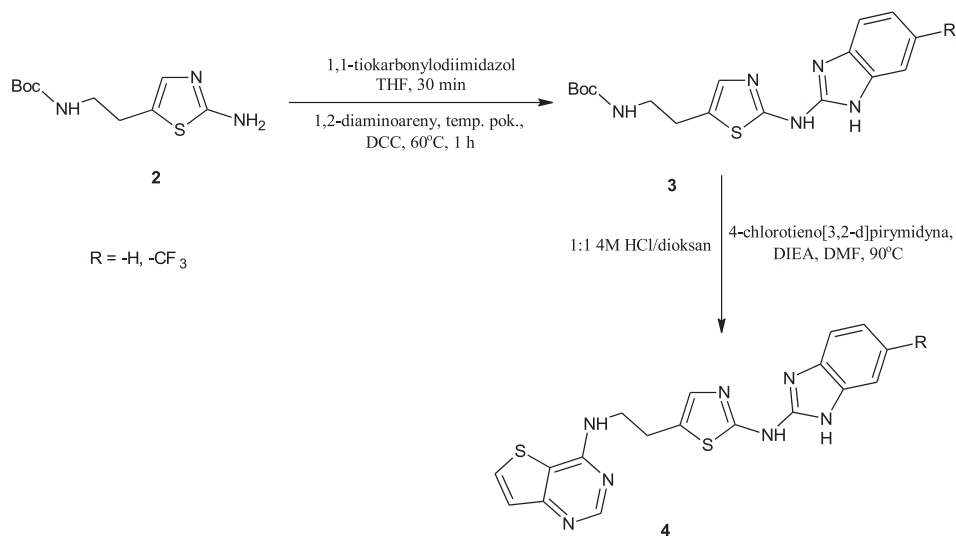
Kinazy Aurora A, B i C są to enzymy należące do kinaz serynowo-treoninowych. Kontrolują procesy mitozy i mejozy w komórce. Ich aktywność jest największa w fazie G2 i M cyklu komórkowego i jest regulowana na drodze jednej lub więcej

fosforylacji [6]. Ze względu na mutację komórek nowotworowych, kinazy Aurora są produkowane w nadmiernych ilościach w wielu typach nowotworów np. piersi, jajnika, okrężnicy czy jąder.

Hamowanie aktywności kinaz zaburza tworzenie wrzeciona podziałowego, co może być wykorzystane w leczeniu nowotworów.

Potencjalnymi inhibitorami kinaz Aurora są serie pochodnych 2-amino-1*H*-benzimidazolu, zawierające w swej strukturze różne pierścienie i układy heterocykliczne. Zostały one zsyntezowane na dwóch różnych drogach przez zespół amerykańskich naukowców [7] (Schematy 1, 2).

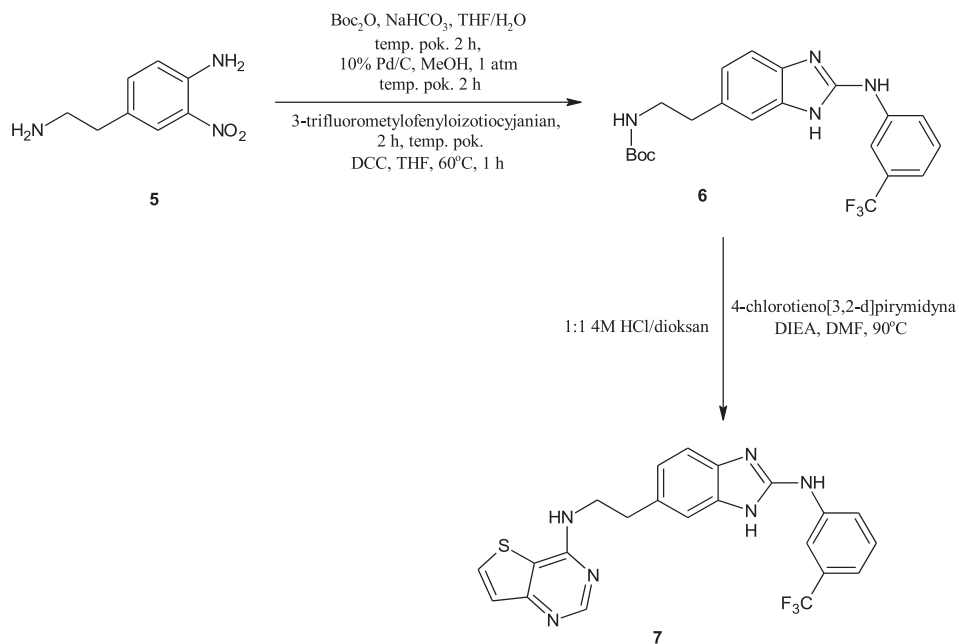
2-Aminotiazol **2** w reakcjach z 1,1-tiokarbonylo-diimidazolem i 1,2-diaminoarenami utworzył tiomocznikowe pochodne, które cyklizowano wobec DCC, uzyskując związki **3**. Ich kwaśna hydroliza a następnie reakcja z 4-chlorotieno[3,2-*d*]pirymidyną dały pochodne **4**.



Schemat 1  
Scheme 1

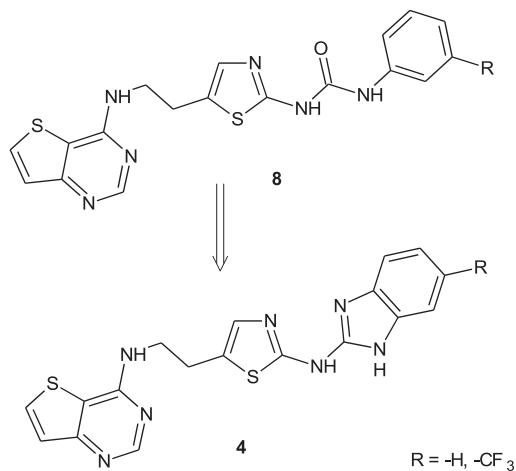
W następnej syntezie substratem była 2-nitro-4-aminoetyloanilina (**5**), którą po redukcji i reakcji z izotiocyanianem 3-fluorometylofenylu cyklizowano wobec *N,N'*-Dicykloheksylokarbodiimidu (DCC), uzyskując pochodną 2-aminobenzimidazolu **6**. Jej alkilowanie 4-chlorotieno[3,2-*d*]pirymidyną wobec DIEA w DMF dało produkt **7**.





Schemat 2  
Scheme 2

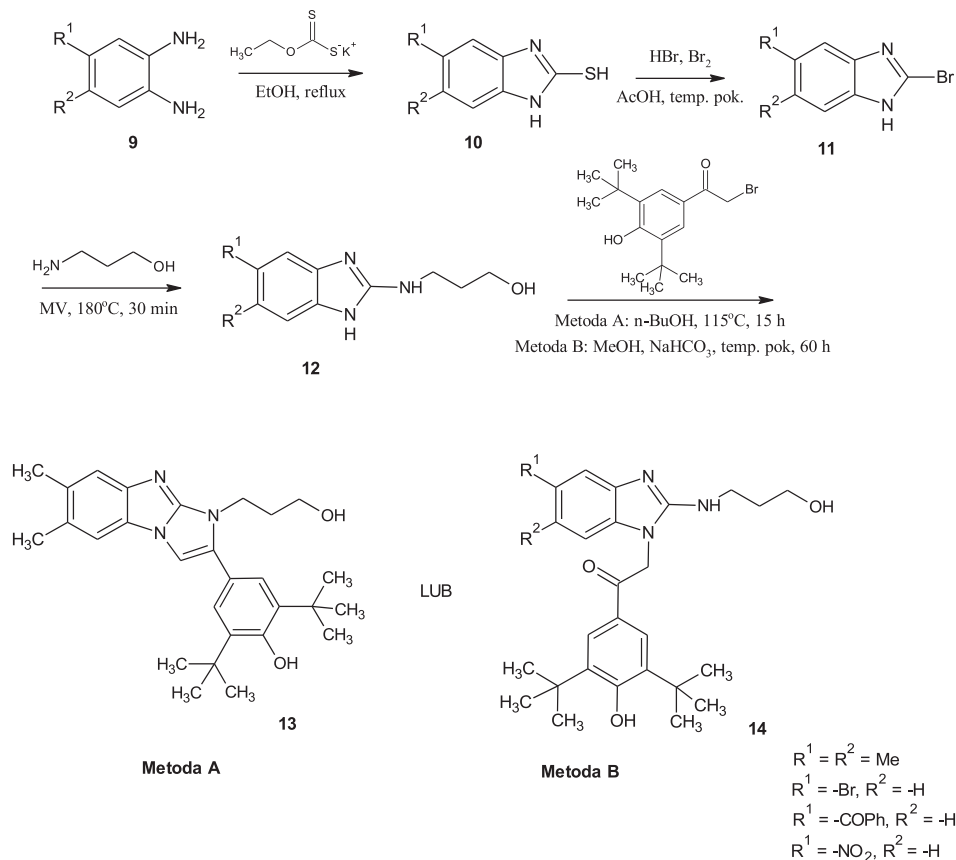
Związki **4**, według autorów pracy, są bioizosterami z pochodnymi biarylo mocznika **8**, które są obecnie w I fazie badań klinicznych.



Rysunek 2  
Figure 2

Kinaza białkowa C jest aktywowana proteolitycznie i zależna od fosfolipidów. Bierze udział w przekazywaniu sygnałów wewnątrz komórki. Aktywna kinaza białkowa C znajduje się w błonach komórkowych, w jądrze komórkowym i cytoplazmie, gdzie katalizuje fosforylacje białek komórkowych [8]. Prowadzi to do istotnych zmian biologicznych, różnicowania się komórek oraz indukcji fenotypu nowotworowego. W komórkach nowotworowych oraz w przerzutach obserwuje się wysoki poziom ekspresji kinazy białkowej C.

Peddibholta i in. [9] otrzymali serię pochodnych 2-amino-1*H*-benzimidazolu, inhibitorów kinazy białkowej C (Schemat 3).



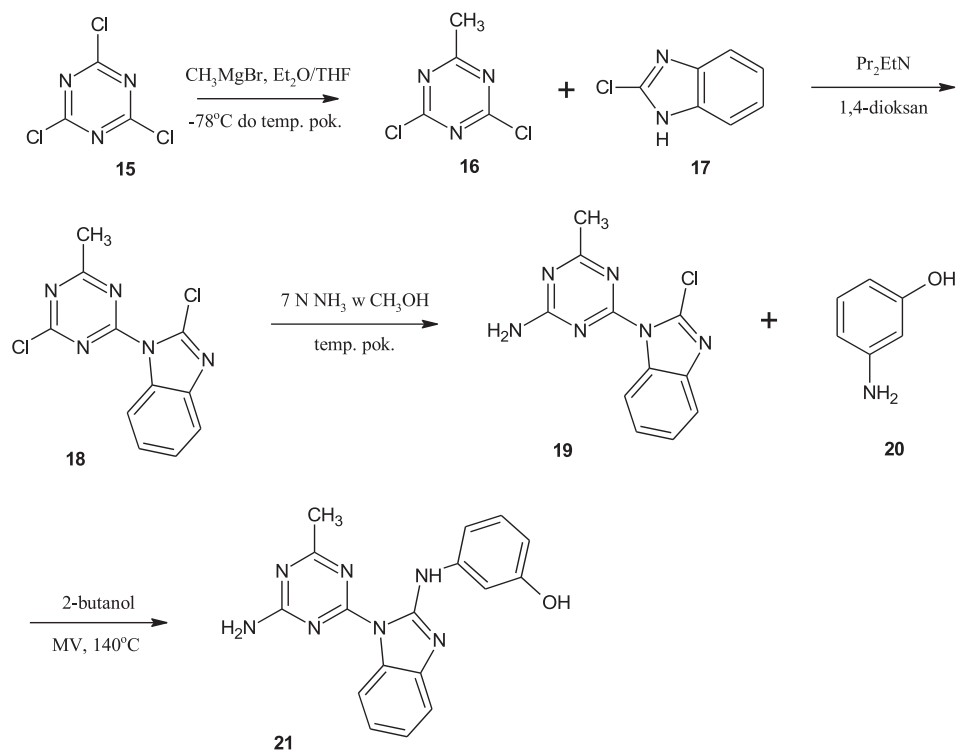
Schemat 3  
Scheme 3

Substratami syntez były podstawione *o*-fenylenodiaminy **9**, które w reakcji z ksantogonianem potasu tworzyły tiole **10**. Ich bromowanie, a następnie amonoliza w reaktorze mikrofalowym w temperaturze  $180^\circ\text{C}$  dały pochodne 2-(1-hydroksypropyloamino)-benzimidazolu **12**. W końcowym etapie syntez związki **12** alkilowano 1-(3,5-di-*t*-butylo-4-hydroksyfenylo)-2-bromoetanonem. Alkilowanie związków

metodą A, w podwyższonej temperaturze we wrzącym butanolu dało nieaktywną tricykliczną pochodną **13**. Natomiast alkilowanie metodą B, w temperaturze pokojowej w metanolu wobec wodorowęglanu sodu dało 1-podstawione pochodne **14**, które były inhibitorami kinazy białkowej C.

Kinaza treoninowo-serynowa m-TOR reguluje wzrost, proliferację i ruch komórki, jak również procesy translacji oraz transkrypcji. Integruje wiele szlaków sygnalizacyjnych komórki np. insulinowy i czynników wzrostu czy szlak mitogenów [10]. Zaburzenie szlaku kinazy mTOR może być czynnikiem patogenezy wielu chorób, w tym nowotworowych. Inhibitorami kinazy mTOR są m.in. stosowane w transplantologii leki immunosupresyjne.

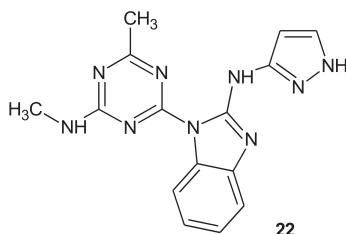
Selektywnymi inhibitorami mTOR są także pochodne triazynobenzimidazolu otrzymane wg Schematu 4 [11]. W pierwszym etapie 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazynę (**15**) poddano reakcji Grignarda uzyskując 2,6-dichloro-4-metylo-1,3,5-triazynę (**16**). Alkilowanie 2-chloro-1H-benzimidazolu (**17**) triazyną **16** dało 1-(triazyn-2-yl)-2-chloro- pochodną benzimidazolu **18**. W następnych etapach związek **18** poddano dwukrotnie amonolizie. W łagodnych warunkach w reakcji z amoniakiem w metanolu amonolizie uległ chlor w pozycji 6 pierścienia triazyny. Kolejna amonoliza prowadzona m-hydroksyaniliną (**20**) w reaktorze mikrofalowym, w drastycznych warunkach, doprowadziła do powstania związku **21**.



Schemat 4  
Scheme 4

W analogicznych syntezach otrzymano związki, które zawierały w pozycji 2 benzimidazolu różne pierścienie heterocykliczne. Pochodne te wykazywały wysoką selektywność i zdolność hamowania kinazy mTOR.

82% Inhibicję mTOR, selektywność względem innych kinaz oraz najlepsze parametry farmakologiczne wykazywała pochodna 2-(pirazol-5-ylo)-aminobenzimidazolu **22**. Była ona także testowana *in vivo* na zwierzętach.



Rysunek 3  
Figure 3

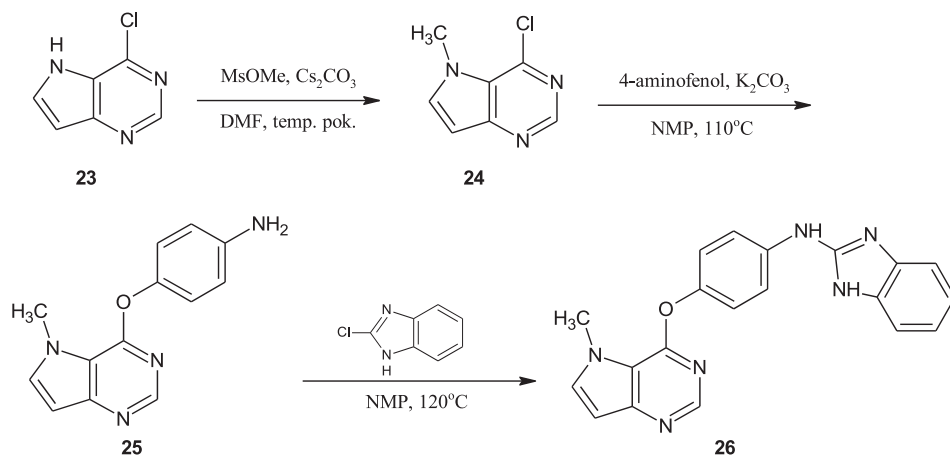
Angiogeneza jest procesem tworzenia nowych naczyń włosowatych w guzach nowotworowych, umożliwiając im rozrost przez zaopatrzenie w substancje odżywcze i tlen.

VEGF (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor*) jest grupą ważnych białek sygnalizacyjnych, które biorą udział w tworzeniu sieci naczyń krwionośnych – angiogenezie. Stymulują odpowiedź komórkową poprzez wiązanie do receptorów kinaz tyrozynowych (VEGFR) na powierzchni komórki. Wyróżnia się trzy receptory kinaz tyrozynowych (VEGFR1,2,3) [12]. Receptor VEGFR-2 pośredniczy niemal we wszystkich znanych odpowiedziach komórkowych na VEGF.

Jedną ze strategii leczenia guzów nowotworowych jest blokowanie aktywności białek VEGF lub receptorów VEGFR.

Inhibitorami receptora kinazy tyrozynowej VEGFR-2 były serie związków otrzymane przez japońskich uczonych [13] (Schemat 5).

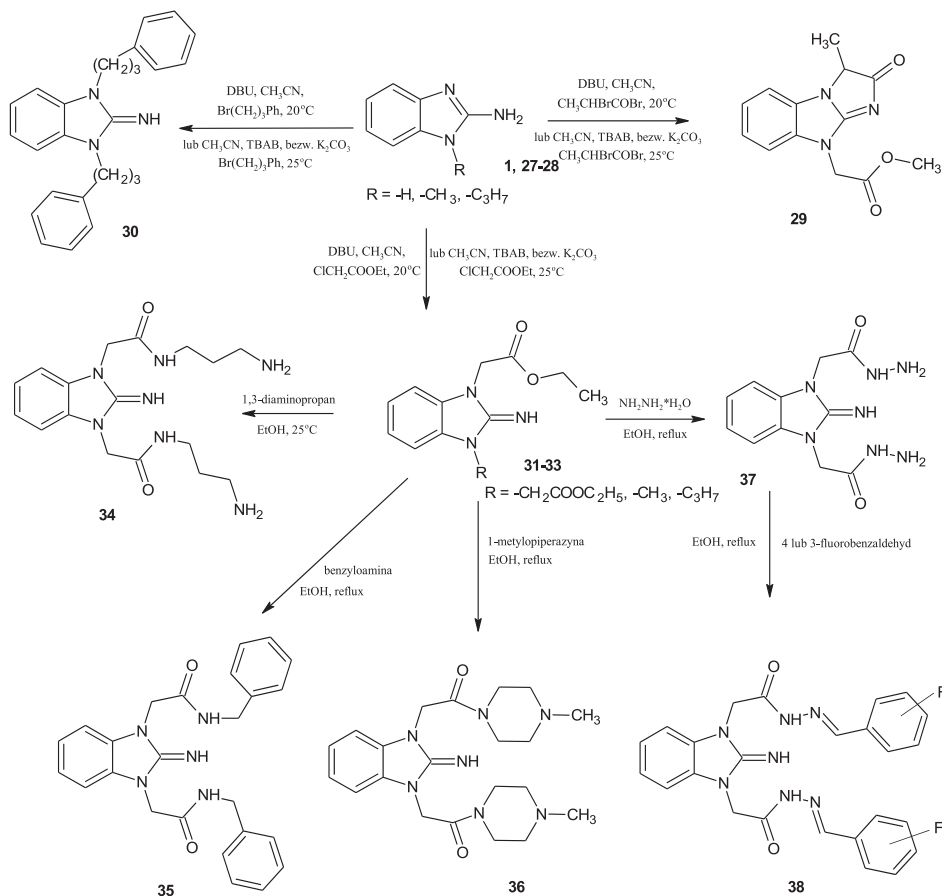
W pierwszym etapie syntezy 4-chloro-pirol[3,2-d]pirymidynę (**23**) poddano alkilowaniu metylosulfonianem metylu (mesylan metylu) uzyskując 4-chloro-5-metylo-pirol[3,2-d]pirymidynę (**24**). Utworzyła ona z *p*-aminofenolem 4-aminofenylenookso-5-metylo-pirol[3,2-d]pirymidynę (**25**) – substrat do amonolizy 2-chlorobenzimidazolu. Amonoliza prowadzona w podwyższonej temperaturze doprowadziła do powstania związku **26**, który był inhibitorem kinazy VEGFR.



Schemat 5  
Scheme 5

Serię nowych 1,3-dipodstawionych pochodnych 2,3-dihydro-1-iminobenzimidazoli, otrzymali Mavrova i in. [14] (Schemat 6). 2-Amino-1*H*- lub 1-alkilo-2-amino-benzimidazol poddano reakcjom z halogenkami: 1-bromo-3-fenylpropanu, bromkiem kwasu  $\alpha$ -bromopropionowego, estrem etylowym kwasu chloroocotwego wobec katalizatorów. Uzyskane pochodne 3-etoksykarbonylowe **31-33** poddano amonolizie 1,3-diaminopropanem, benzyloaminą, 4-metylopiperyzną oraz hydrazyną, uzyskując związki **34-37**. Powstały hydrazyd **37** w reakcjach z 3- lub 4-fluorobenzaldehydem utworzył zasady Schiffa **38**.

Najwyższą aktywność cytotoksyczną wobec ludzkich linii komórek nowotworowych: raka odbytu HT-29, raka piersi MDA-MB-231 i raka śledziony wykazywały związki **30, 34, 36**.



Schemat 6  
Scheme 6

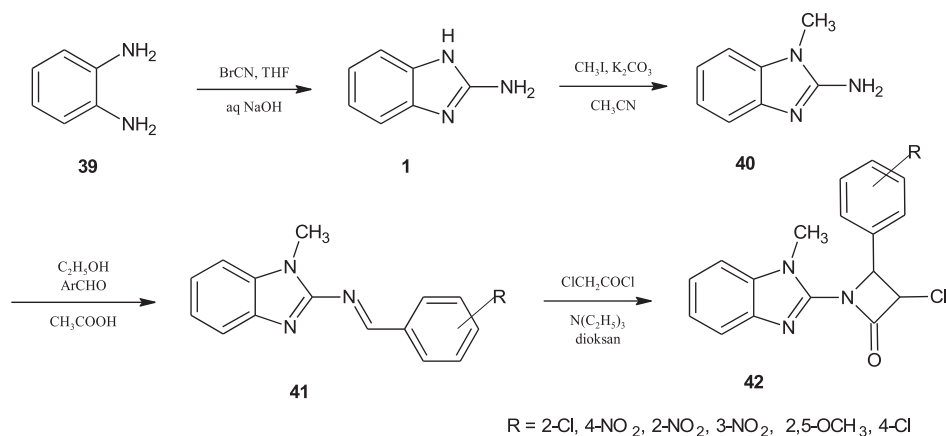
## 2. SYNTEZY POCHODNYCH 2-AMINO-1H-BENZIMIDAZOLU O AKTYWNOŚCI PRZECIWBAKTERYJNEJ I ICH MECHANIZMY DZIAŁANIA

Zakażenia bakteryjne stanowią w dalszym ciągu nieprzejdany problem współczesnej medycyny. Działania niepożądane dotychczas stosowanych środków, narastająca oporność bakterii ogranicza skuteczność antybiotyków, co wymusza poszukiwanie nowych leków o działaniu przeciwbakteryjnym, również wśród pochodnych 2-amino-1H-benzimidazolu.

Noolvi i in [15] otrzymali serię zasad Schiffa, pochodnych 1-metylo-2-amino-benzylidenbenzimidazolu, którą poddali cyklizacji chlorkiem kwasu chlorooctowego, uzyskując azetydynony **42**.

W badaniach skiriningowych *in vitro* silne właściwości przeciwbakteryjne przeciwko bakteriom Gram(+) (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus pumillus*) i Gram(-) (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*) wykazywały zasady Schiffa **41** oraz pochodne azytydynonu **42**. W prowadzonych badaniach Ampicilina stosowana była jako lek referencyjny.

Dodatkowo pochodne azytydynonu w badaniach *in vitro* wykazywały aktywność cytotoksyczną, porównywalną z cyklofosfamidem.

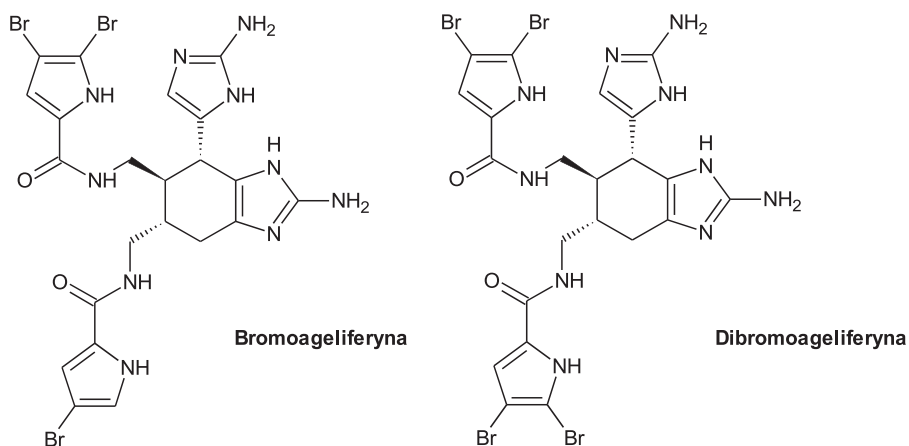


Schemat 7  
Scheme 7

Istotne utrudnienie w leczeniu zakażeń bakteryjnych, szczególnie wewnątrzszpitalnych, stanowią biofilmy bakteryjne. Biofilm bakteryjny to społeczność komórek, która jest nieodwracalnie związana z jakimś podłożem. Złożona struktura biofilmu oraz odmienne cechy fizjologiczne mikroorganizmów go tworzących powoduje powstawanie lekooporności na antybiotyki oraz na działanie różnych czynników bakteriobójczych.

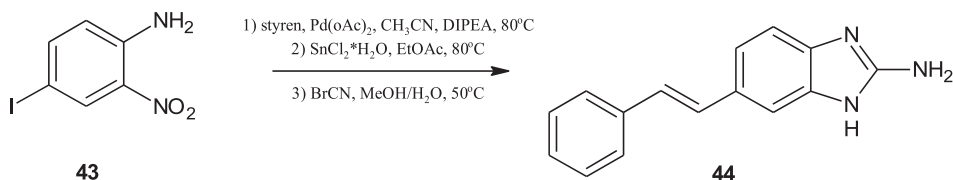
Przykładami bakterii tworzących biofilmy są *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*.

*Bromoageliferyna* i *dibromoageliferyna* są naturalnymi, wyizolowanymi z gąbek morskich *Agelas conifera* alkaloidami, zawierającymi w swej strukturze 2-aminocykloheksyloimidazol. Alkaloidy te hamują m.in. biofilm bakterii Gram – *Rhodospirillum salexigens* [16].



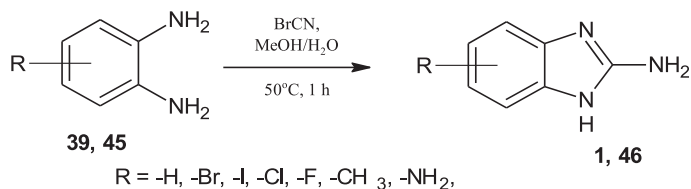
Rysunek 4  
Figure 4

Amerykańscy uczeni Frei in. [17] zsyntezowali 5-styrylo-2-amino-1H-benzimidazol (**44**), który silnie hamował biofilmy bakteryjne szczepów *Pseudomonas aeruginosa*.



Schemat 8  
Scheme 8

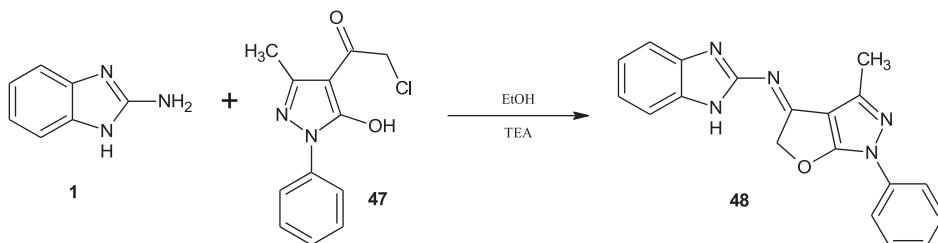
Kontynuując syntezy i badania mikrobiologiczne uzyskali pochodne 2-amino-1H-benzimidazolu, podstawione w pierścieniu fenylowym (Schemat 9). Otrzymane związki **1**, **46** hamowały wzrost biofilmu dzikiego szczepu *Pseudomonas aeruginosa*. Najwyższą zdolność hamowania, i dodatkowo rozprzestrzeniania się biofilmu bakteryjnego wykazywały 2-amino-1H-benzimidazol (**1**) oraz 5,6-dimetylo-2-amino-1H-benzimidazol.



Schemat 9  
Scheme 9



*N*-[(4*Z*)-3-metylo-1-fenylo-1*H*-furo[2,3-*c*]pirazol-1(5*H*)-ylideno-2-amino-1*H*-benzimidazol (**48**) został otrzymany w reakcji alkilowania 2-amino-1*H*-benzimidazolu (**1**) 2-chloro-1-(5-hydroksy-3-metylo-1-fenylo-1*H*-pirazol-4-yl)etenem (**47**) [18] przez Bandock'a i in. [19] (Schemat 10). W testach *in vitro* związek **48** wykazywał wysoką aktywność wobec wielu szczepów bakterii Gram(+) (*Bacillus subtilis* i *Bacillus thuringiensis*) i Gram(-) (*Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*) oraz dodatkowo wysoką aktywność wobec grzybów *Botrytis fabae* i *Fusarium oxysporum*.



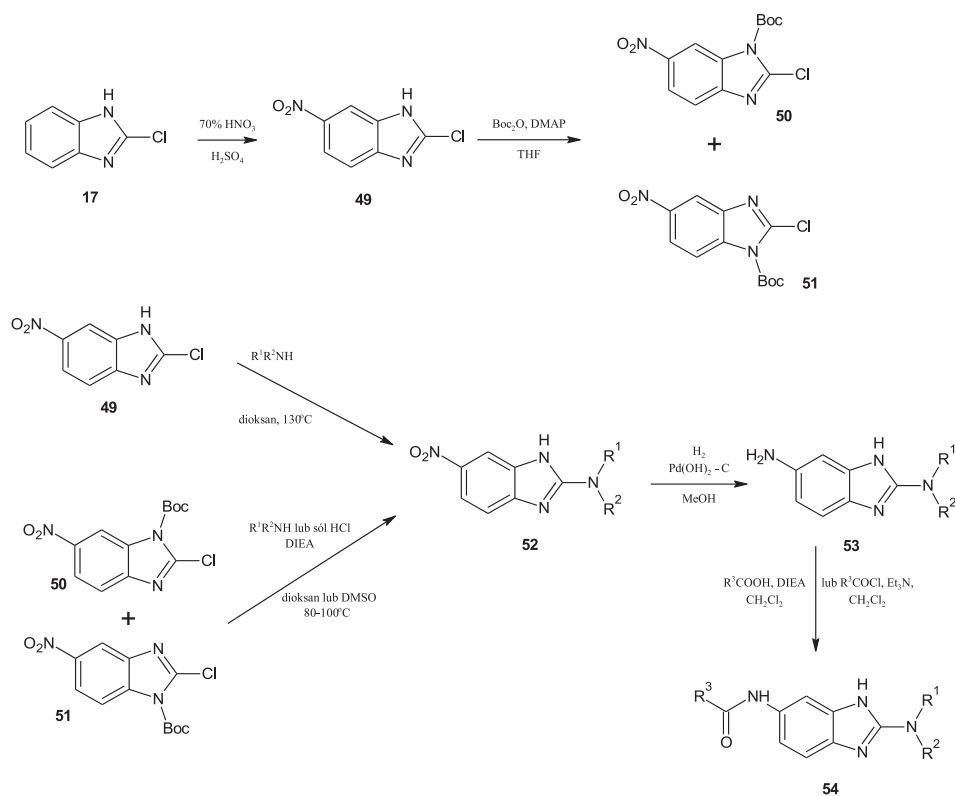
Schemat 10  
Scheme 10

### 3. SYNTEZY POCHODNYCH 2-AMINO-1H-BENZIMIDAZOLU O RÓŻNEJ AKTYWNOŚCI BIOLOGICZNEJ I ICH MECHANIZMY DZIAŁANIA

Otyłość jest wynikiem współdziałania wielu czynników natury środowiskowej, uwarunkowań genetycznych, zaburzeń ośrodkowych, endokrynopatii. Ostatnie badania chińskich naukowców z Shanghai Jiao Tong University wskazują, że za otyłość mogą być odpowiedzialne toksyny wydzielane przez bakterie *Enterobacter*, obecne w okrężnicy przy niskim pH [20].

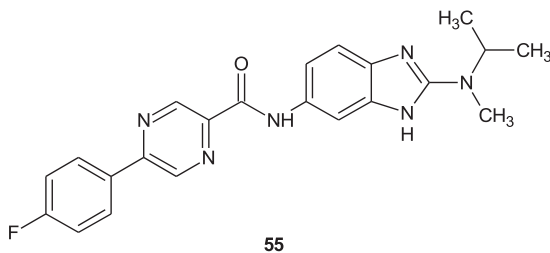
Hormon koncentrujący melaninę (MCH) jest istotnym mediatorem homeostazy energetycznej, a jego nadaktywność zaobserwowano u otyłych zwierząt. Zakłócenie ekspresji genu MCH sprzyja zmniejszeniu spożycia pokarmu i zwiększeniu tempa przemiany materii. Wykazano, że przewlekłe podawanie peptydowych antagonistów MCH-R1 hamuje łaknienie i przyrost masy ciała u zwierząt z otyłością wywołaną dietą. Antagoniści receptora MCH-R1 mogą mieć więc zastosowanie w leczeniu otyłości [21], dodatkowo stanów lękowych i depresji [22], natomiast agoniści w leczeniu osteoporozy [23].

Silnymi antagonistami MCH-R1 są pochodne 2-aminobenzimidazolu, przedstawione wzorem ogólnym **54** (Schemat 11), otrzymane przez japońskich naukowców [24].



Schemat 11  
Scheme 11

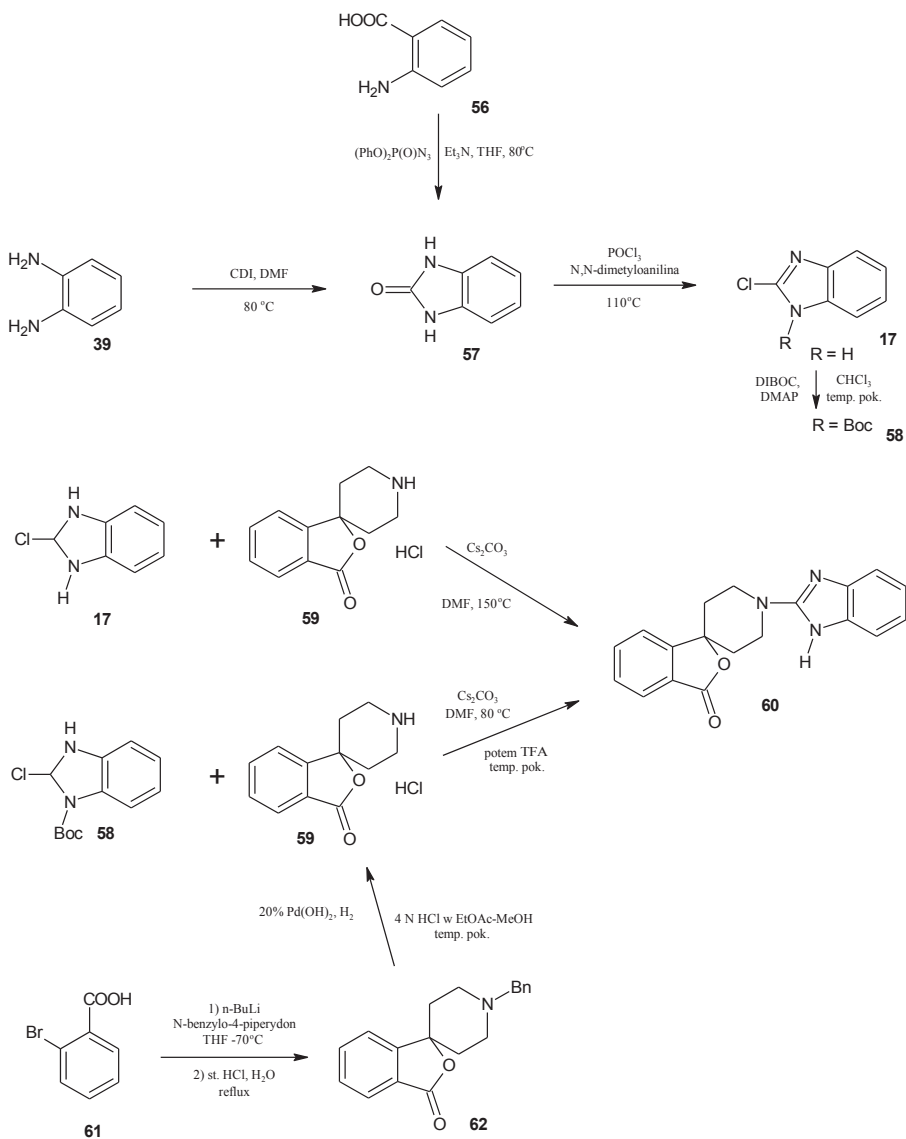
Najsilniejszą antagonistą receptora MCH-R1 *in vitro*, przy dobrej przenikalności do mózgu, był 2-(N-izopropyl-N-metylo)-5-[[5-(4-fluorofenyl)pirazylo-2-yl]karbonylamino]-2-aminobenzimidazol (55).



Rysunek 5  
Figure 5

Neuropeptyd Y (NPY) jest przekazywaczem, który występuje w rdzeniu przedłużonym, podwzgórzu i autonomicznym układzie nerwowym. Wpływa na wiele

procesów zależnych od OUN, m.in. modyfikuje przyjmowanie pokarmów, spożycie etanolu, wpływa na rytmy okołodobowe, procesy pamięciowe czy zachowania lękowe [25]. NPY ma zdolność łączenia się z 6 typami receptorów Y1-6. Receptor Y5, występuje w obszarach mózgu związanych z regulacją przyjmowania pokarmów: hipokampie, korze węchowej. Pobudzenie receptora Y5 nasila przyjmowanie pokarmu.



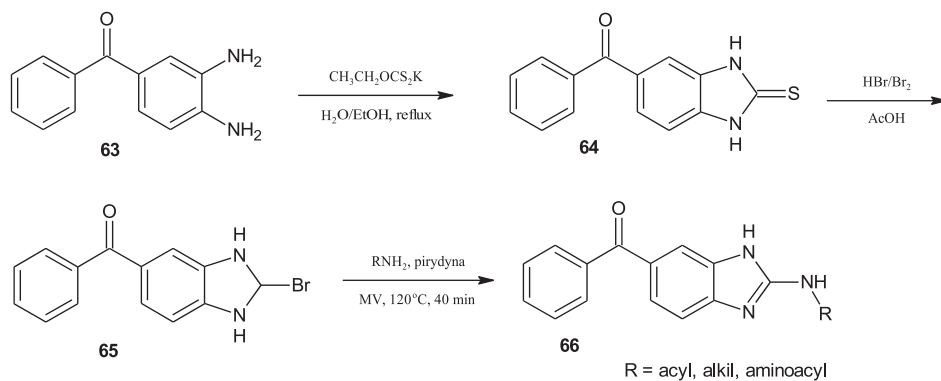
Schemat 12  
Scheme 12

Projekt, syntezy oraz zależność między strukturą a aktywnością, nowej klasy 2-[3-oksospiro(izobenzofurano-1(3H),4'-piperdyn)-1ylo]benzimidazoli opisali w swojej pracy Ogino i in [26]. Otrzymane związki **60** są selektywnymi antagonistami receptora Y5 (Schemat 12).

*Toxoplasma gondii* i *Cryptosporidium parvum* są pierwotniakami chorobotwórczymi, które wywołują infekcje u ludzi i zwierząt domowych. *T. gondii* powoduje u ludzi chorobę odzwierzęcą – toksoplazmozę, a *C. parvum* wywołuje groźne zakażenia układu pokarmowego. Aktualnie stosowanym na świecie lekiem przeciw pierwotniakowi *C. parvum* jest Nitazoxanid.

U obu pasożytów stwierdzono obecność zależnych od wapnia kinaz białkowych TgCDPK1 i CpCDPK1, które są punktem uchwytu dla nowo zsyntezowanych przez Zhang'a i in. [27] pochodnych benzoilobenzimidazoli **66**, **68**, **70**, **75** (Schematy 13–16).

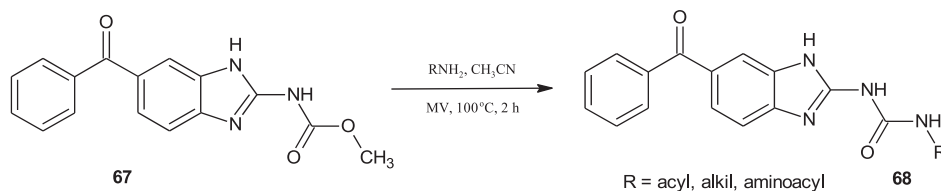
Substratami syntezy, przedstawionej na Schemacie 13, była 4-benzoilo-*o*-fenyldiamina (**63**), która w reakcji z ksantogianem potasu utworzyła 5-benzoilo-2-tioksa-1,3-*H*-benzimidazol (**64**). Jego bromowanie w kwasie octowym i następnie amonoliza aminami II-rzędowymi dały 2-acyloamino-, 2-alkiloamino pochodne **66**.



Schemat 13

Scheme 13

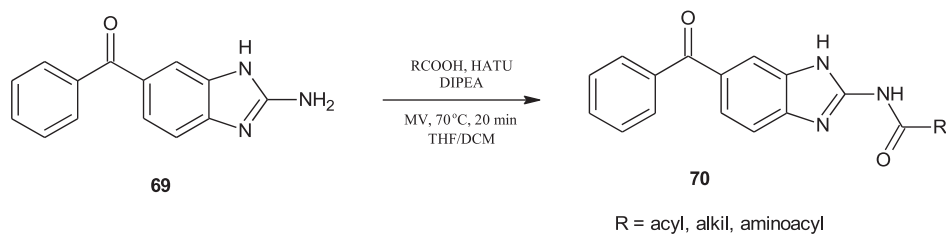
W syntezy, przedstawionej na Schemacie 14 *N*-(6-benzoilo-1*H*-benzimidazol-2-yl)karbaminian metylu (**67**) (Mebendazol – lek przeciworobaczy) poddano amonolizie uzyskując pochodne mocznika **68**.



Schemat 14

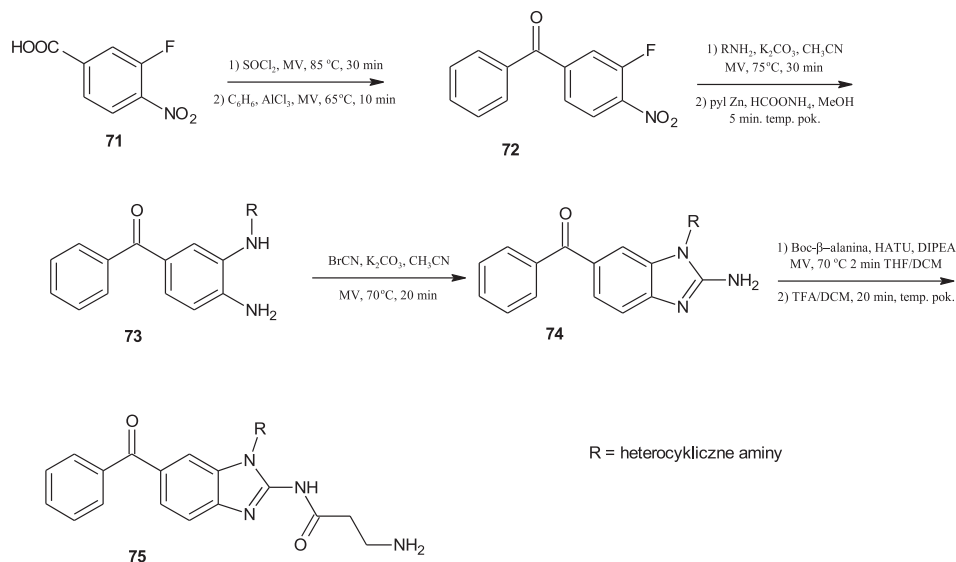
Scheme 14

Kontynuując prace, ci sami autorzy, poddali acylowaniu w reaktorze mikrofalowym 2-amino-6-benzoilo-1H-benzimidazol (**69**) uzyskując amidy **70** (Schemat 15).



Schemat 15  
Scheme 15

Właściwości przeciwprzeciwniakowe wykazywały także pochodne, otrzymane z kwasu 3-fluoro-4-nitrobenzoesowego (**71**), kolejno w reakcjach chlorowania i acylowania metodą Friedla-Craftsa – **72**, amonolizy i redukcji – **73**, a następnie w cyklokondensacji Leonarda – **74**. Uzyskaną pochodną 6-benzoilo-2-aminobenzimidazolu **74** acylowano Boc- $\beta$ -alaniną, uzyskując aktywny produkt **75**.



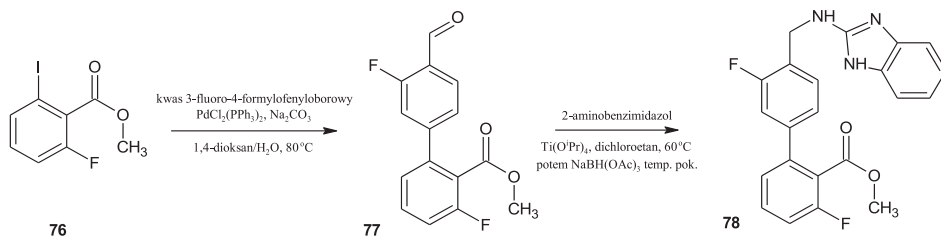
Schemat 16  
Scheme 16

Bradykinina jest peptydowym hormonem tkankowym, który uczestniczy w reakcjach zapalnych i alergicznych. Zwiększa przepuszczalność naczyń włosowatych, w wyniku czego powstaje obrzęk i zapalenie, a w tkankach zależnych od insuliny zwiększa transport glukozy do komórek [28]. Większość z wyżej wymienionych działań jest związana z funkcją bradykininowego receptora B2. Natomiast w sytuacji

działania czynnika uszkodzającego (infekcje, uszkodzenie tkanek czy stany zapalne) indukowany jest receptor B1 dla bradykininy.

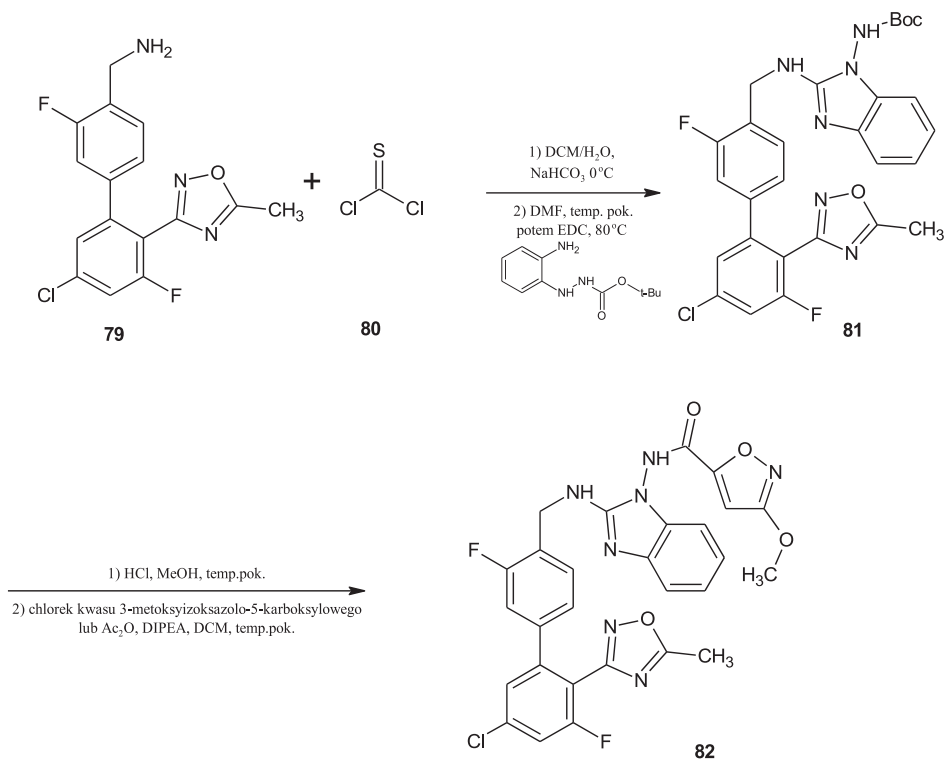
Niemieccy naukowcy Zischinsky i in. w serii trzech prac opisali syntezę nowych antagonistów receptorów bradykininy B1 [29–31]. Wśród zsyntezowanych związków są również pochodne 2-amino-1*H*-benzimidazolu [30] (Schematy 17, 18).

W jednej z syntez substratem był ester metylowy kwasu 2-fluoro-6-jodo-benzoesowego (76), który po alkiowaniu utworzył formylopo pochodną 77. Jej redukcyjne alkiowanie dało 2-[4-(3-fluoro-2-metoksykarbonylofenylo)-2-fluorobenzyl]-amino-1*H*-benzimidazol (78) (Schemat 17).



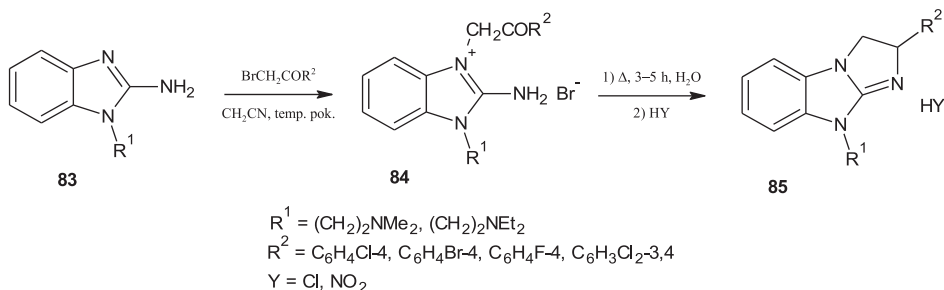
Schemat 17  
Scheme 17

W następnej syntezie (Schemat 18) pochodną 1,2,4-oksadiazolu 79 poddano kolejno reakcjom z tiofosgenem (80) i z pochodną fenylhydrazyny uzyskując pochodną 1-tertbutyloamino-2-aminobenzimidazolu 81. Jej acylowanie chlorkiem kwasu 3-metoksyizoksazolo-5-karboksylowego dało produkt 82, zawierający w swej strukturze trzy pięciocłonowe pierścienie heterocykliczne: izooksazol, imidazol, 1,2,4-oksadiazol. Według autorów, obecność małych – heterocyklicznych pierścieni w cząsteczce związku jest konieczna, by miał on zdolność blokowania receptora B1 dla bradykininy.



Schemat 18  
Scheme 18

Serię pochodnych imidazo[1,2-a]benzimidazoli, w postaci rozpuszczalnych w wodzie soli, o różnorodnej aktywności biologicznej otrzymali rosyjscy uczeni [32] (Schemat 19). 1-Podstawiony-2-aminobenzimidazol **83** w reakcjach z *o*-bromoacetofenonami utworzył 3-fenacylo pochodne **84**, które w wyniku termicznej cyklizacji, dały pochodne imidazo[1,2-a]benzimidazolu **85**. Związki te wykazywały wielokierunkową aktywność biologiczną. Działały m.in. antyagregacyjnie na płytki krwi, antyarytmicznie i antyoksydacyjnie. Były antagonistami receptorów serotoninowych 5HT<sub>2</sub>, 5HT<sub>3</sub>, histaminowych H1 i agonistami receptorów opioidowych  $\kappa$ .



Schemat 19

Scheme 19

## PODSUMOWANIE

W pracy przedstawiono, na 19 schematach, wybrane syntezy pochodnych 2-amino-1*H*-benzimidazolu o różnorodnej aktywności biologicznej oraz ich mechanizmy działania. Są to związki opublikowane w ciągu ostatnich 5 lat. Działają one przeciwnowotworowo *in vitro*, przeciwbakteryjnie, przeciwpierwotniakowo. Wśród związków o różnej aktywności biologicznej są antagoniści receptorów: bradykininowego B1, Y5, serotoninowych 5HT<sub>2</sub>, 5HT<sub>3</sub> i histaminowych H1.

## PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] W.P. Nawrocka, A. Nowicka, H. Liszkiewicz, *Wiad. Chem.*, 2012, **66**, 811.
- [2] W.P. Nawrocka, A. Nowicka, H. Liszkiewicz, *Wiad. Chem.*, 2012, **66**, 839.
- [3] W.P. Nawrocka, A. Nowicka, *Wiad. Chem.*, 2013, **67**, 7-8 (przyjęta do druku).
- [4] A. Nowicka, W.P. Nawrocka, *Wiad. Chem.*, 2013, **67**, 7-8 (przyjęta do druku).
- [5] W. Kostowski, Z.S. Herman, *Farmakologia. Podstawy farmakoterapii*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2003.
- [6] R. Crane, B. Gadea, L. Littlepage, H. Wu, J.V. Ruderman, *Biol. Cell.*, 2003, **96**, 215.
- [7] M. Zhong, M. Bui, W. Shen, S. Baskaran, D.A. Allen, R.A. Elling, W. M. Flanagan, A.D. Fung, E.J. Hanan, S.O. Harris, S.A. Heumann, U. Hoch, S.N. Ivy, J.W. Jacobs, S. Lam, H. Lee, R.S. McDowell, J.D. Oslob, H.E. Purkey, M.J. Romanowski, J.A. Silverman, B.T. Tangonan, P. Taverna, W. Yang, J.C. Yoburn, C.H. Yu, K.M. Zimmerman, T. O'Brien, W. Lew, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2009, **19**, 5158.
- [8] H. Mellor, J. Parker, *Biochem. J.*, 1998, **332**, 281.
- [9] S. Peddibhotla, R. Shi, P. Khan, L.H. Smith, A. Mangravita-Novo, M. Vicchiarelli, Y. Su, K.J. Okolotowicz, J.R. Cashman, J.C. Reed, G.P. Roth, *J. Med. Chem.*, 2010, **53**, 4793.
- [10] C. Beevers, F. Li, L. Liu, S. Huang, *Int. J. Cancer*, 2006, **119**, 757.
- [11] E. A. Peterson, P.S. Andrews, X. Be, A.A. Boezio, T.L. Bush, A.C. Cheng, J.R. Coats, A.E. Colletti, K.W. Copeland, M. DuPont, R. Graceffa, B. Grubinska, J.C. Harmange, J.L. Kim, E.L. Mullady, P. Olivieri, L.B. Schenkel, M.K. Stanton, Y. Teffera, D.A. Whittingtonf, T. Cai, D.S. Laa, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2011, **21**, 2064.
- [12] P. Gerwins, L. Claesson-Welsh, *Encyclopedia of Cancer*, 2002, **1**, 135.



- [13] Y. Oguro, N. Miyamoto, K. Okada, T. Takagi, H. Iwata, Y. Awazu, H. Miki, A. Hori, K. Kamiyama, S. Imamura, *Bioorg. Med. Chem.*, 2010, **18**, 7260.
- [14] A.T. Mavrova, D. Wesselinova, N. Vassilev, J.A. Tsenov, *Eur. J. Med. Chem.*, 2011, **46**, 3362.
- [15] M. Noolvi, S. Agrawal, H. Patel, A. Badiger, M. Gaba, A. Zambre, *Arabian Journal of Chemistry*, dostępny online 19 luty 2011.
- [16] U. Bickmeyer, *Toxicol.*, 2005, **45**, 627.
- [17] R. Frei, A.S. Breitbach, H.E. Blackwell, *Angew. Chem.*, 2012, **124**, 5316.
- [18] B.S. Jensen, *Acta Chem. Scand.*, 1959, **13**, 1668.
- [19] S. Bondock, W. Khalifa, A.A. Fadda, *Eur. J. Med. Chem.*, 2011, **46**, 2555.
- [20] L. Zhao, *New Scientist*, 2012, **2896**, 13.
- [21] D.R. Luthin, *Life Sci.*, 2007, **81**, 423.
- [22] T. Shimazaki, T. Yoshimizu, S. Chaki, *CNS Drugs*, 2006, **20**, 801.
- [23] Y.M. Bohlooly, M. Mahlapuu, H. Andersén, A. Astrand, S. Hjorth, L. Svensson, J. Törnell, M.R. Snaith, D.G. Morgan, C. Ohlsson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004, **318**, 964.
- [24] M. Moriya, H. Kishino, S. Sakuraba, T. Sakamoto, T. Suga, H. Takahashi, T. Suzuki, M. Ito, J. Ito, R. Moriya, N. Takenaga, H. Iwaasa, A. Ishihara, A. Kanatani, T. Fukami, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2009, **19**, 3568.
- [25] K. Bobińska, J. Szemraj, T. Pietras, K. Zboralski, P. Gałecki, *Psychiatria Polska*, 2008, **XLII**, 889.
- [26] Y. Ogino, N. Ohtake, Y. Nagae, K. Matsuda, M. Moriya, T. Suga, M. Ishikawa, M. Kanesaka, Y. Mitobe, J. Ito, T. Kanno, A. Ishihara, H. Iwaasa, T. Ohe, A. Kanatani, T. Fukami, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2008, **18**, 5010.
- [27] Z. Zhang, K.K. Ojo, S.M. Johnson, E.T. Larson, P. He, J.A. Geiger, A. Castellanos-Gonzalez, A. Clinton White Jr., M. Parsons, E. A. Merritt, D.J. Maly, C.L.M.J. Verlinde, W.C. Van Voorhis, E. Fan, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2012, **22**, 5264.
- [28] I. Duka, S. Shenouda, C. Johns, E. Kintsurashvili, I. Gavras, H. Gavras, *Hypertension*, 2001, **38**, 1355.
- [29] M. Schaudt, E. Locardi, G. Zischinsky, R. Stragies, J.R. Pfeifer, C. Gibson, D. Scharn, U. Richter, H. Kalkhof, K. Dinkel, K. Schnatbaum, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2010, **20**, 1225.
- [30] G. Zischinsky, R. Stragies, M. Schaudt, J.R. Pfeifer, C. Gibson, E. Locardi, D. Scharn, U. Richter, H. Kalkhof, K. Dinkel, K. Schnatbaum, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2010, **20**, 1229.
- [31] K. Schnatbaum, M. Schaudt, R. Stragies, J.R. Pfeifer, C. Gibson, E. Locardi, D. Scharn, U. Richter, H. Kalkhof, K. Dinkel, G. Zischinsky, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2010, **20**, 1233.
- [32] V.A. Anisimova, A.A. Spasov, I.E. Tolpygin, V.I. Minkin, M.V. Chernikov, D.S. Yakovlev, A. Yu. Stukovina, I.I. Goryagin, O. Yu. Grechko, N.V. Kirillova, V.A. Kosolapov, E.V. Tibir'kova, O.A. Salaznikova, L.V. Naumenko, N.A. Gurova, *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 2010, **44**, 345.

Praca wpłynęła do Redakcji 28 stycznia 2013



**SYNTEZY, STRUKTURY I AKTYWNOŚĆ  
BIOLOGICZNA POCHODNYCH IMIDAZO[4,5-*b*]  
PIRYDINY. CZĘŚĆ II**

**SYNTHESIS, STRUCTURES AND BIOLOGICAL  
ACTIVITY OF IMIDAZO[4,5-*b*]PYRIDINE  
DERIVATIVES. PART 2**

**Hanna Liszkiewicz, Anna Nowicka\*,  
Wanda Paulina Nawrocka**

*Katedra i Zakład Technologii Leków  
Uniwersytet Medyczny im Piastów Śląskich we Wrocławiu  
pl. Nankiera 1, 50-140 Wrocław  
\*e-mail: anna.wojcicka@umed.wroc.pl*

---

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Pochodne imidazo[4,5-*b*]pirydyny o aktywności hipotensyjnej
2. Pochodne imidazo[4,5-*b*]pirydyny o aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwgruźliczej
3. Pochodne imidazo[4,5-*b*]pirydyny o aktywności przeciwzapalnej
4. Pochodne imidazo[4,5-*b*]pirydyny o aktywności przeciwbólowej

Podsumowanie

Piśmiennictwo

---

**Dr n. farm. Hanna Liszkiewicz** ukończyła Wydział Farmaceutyczny Akademii Medycznej we Wrocławiu. Pracuje w Katedrze i Zakładzie Technologii Leków Uniwersytetu Medycznego. Stopień doktora nauk farmaceutycznych uzyskała na tutejszym Wydziale. Kierunki badań naukowych: synteza i struktura związków heterocyklicznych w tym 1,5-benzo- i 1,5-pirydodiazepin, chinazolinonu-4, 2-aminobenzimidazolu, imdazo[4,5-*b*]pirydiny, o potencjalnej aktywności biologicznej: psychotropowej, immunotropowej i przeciwnowotworowej.

**Mgr inż. Anna Nowicka** ukończyła Inżynierię Materiałową na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej. Jest również absolwentką Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej we Wrocławiu. Od 2010 roku jest asystentem w Katedrze i Zakładzie Technologii Leków Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. Zajmuje się syntezą nowych pochodnych 2-aminobenzimidazolu o potencjalnej aktywności biologicznej.

**Prof. dr hab. Wanda Paulina Nawrocka** jest absolwentką Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej i pracuje na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Stopienie naukowe doktora nauk farmaceutycznych i doktora habilitowanego w zakresie chemii i technologii środków leczniczych uzyskała na tutejszym Wydziale. W 2009 roku Prezydent RP Lech Kaczyński nadał jej tytuł naukowy profesora dr hab. w zakresie chemii i technologii środków leczniczych. Od 2009 jest kierownikiem Katedry i Zakładu Technologii Leków. Kierunki badań naukowych: synteza i struktura związków heterocyklicznych w tym 1,5-benzo- i 1,5-pirydodiazepin, chinazolinonu-4, 2-aminobenzimidazolu, o potencjalnej aktywności biologicznej: psychotropowej, immunotropowej i przeciwnowotworowej.

---

**ABSTRACT**

The main goal of this article is to present selected syntheses, structures and a various biological activity of imidazo[4,5-*b*]pyridine derivatives. During the past 20 years the biological activity of imidazo[4,5-*b*]pyridine have been intensively studied.

Based on the review of the chemical literature, it was shown that derivatives of imidazole[4,5-*b*]pyridine showed a multipharmacological effects such as antibacterial effect [20–22] and antituberculotic activity [25–33], nonsteroidal antiinflammatory activity [35–43] and analgesic [44, 45] effect. Among compounds of this class antagonists of angiotensin II receptors that exhibit hypotensive activity are also known [9–11].

Compounds containing imidazo[4,5-*b*]pyridine moiety can be synthesized from different substrates. The most useful starting compounds for the synthesis of imidazo[4,5-*b*]pyridine are derivatives of 2,3-diaminopyridine [1–3].

Keywords: imidazo[4,5-*b*]pyridine derivatives, biological activity, synthesis, structures

Słowa kluczowe: pochodne imidazo[4,5-*b*]pirydyny, aktywność biologiczna, syntezy, struktury

---

---

## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

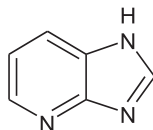
AT1/2	– receptor angiotensynowy typu 1/2 (ang. <i>angiotensin II receptor type 1/2</i> )
PPAR $\gamma$	– receptory aktywowane przez proliferatory peroksy-somów (ang. <i>peroxisome proliferator-activated receptors</i> )
NAD	– dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (ang. <i>nicotinamide-adenine dinucleotide</i> )
NOS	– syntaza tlenku azotu (ang. <i>nitric oxide synthase</i> )
LTA <sub>4</sub>	– leukotrieny A4 (ang. <i>leukotriene A4</i> )
LTB <sub>4</sub>	– leukotrieny B4 (ang. <i>leukotriene B4</i> )
VLA-4	– integryny z grupy VLA-4 (ang. <i>Very Late Antigen</i> )
DIPEA	– N,N-diizopropylomina (ang. <i>N,N-diisopropylethylamine</i> )
TFA	– kwas trifluorooctowy (ang. <i>trifluoroacetic acid</i> )
DCM	– dichlorometan (ang. <i>dichloromethane</i> )
EDC	– 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimid (ang. <i>1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide</i> )
HOBT	– hydroksybenzotriazol (ang. <i>hydroxybenzotriazole</i> )
NBS	– N-bromosukcynoimid (ang. <i>N-bromosuccinimide</i> )
THF	– tetrahydrofuran (ang. <i>tetrahydrofuran</i> )
MAPK	– kinazy aktywowane mitogenami (ang. <i>mitogen activated protein kinase</i> )
TNF- $\alpha$	– czynnik martwicy guza (ang. <i>tumor necrosis factor</i> )
IL-1	– interleukina 1 (ang. <i>Interleukin-1</i> )

## WPROWADZENIE

W poprzedniej pracy przedstawiono syntezy, struktury, mechanizmy działania farmakologicznego i biologicznego leków oraz wybranych pochodnych imidazo[4,5-*b*]pirydyny o wysokiej aktywności przeciwwrzodowej, przeciwnowotworowej *in vitro* a także antyneurodegeneracyjnej.

W piśmiennictwie chemicznym opisanych jest kilka głównych metod syntezy układu imidazo[4,5-*b*]pirydyny. Można je otrzymać m.in. w reakcjach cyklocondensacji pochodnych 2,3-diaminopirydyny z czynnikami monowęglowymi lub wielowęglowymi [1–3]. Inną możliwością jest dobudowanie pierścienia pirydyny do pierścienia imidazolu [4] lub konwersja pierścieni 6- czy 7-członowych do 5-członowego pierścienia imidazolu [5].

W tej części zostaną zaprezentowane syntezy najbardziej aktywnych pochodnych imidazo[4,5-*b*]pirydyny o aktywności hipotensyjnej, przeciwbakteryjnej i przeciwgruźliczej, przeciwzapalnej oraz przeciwbólowej.

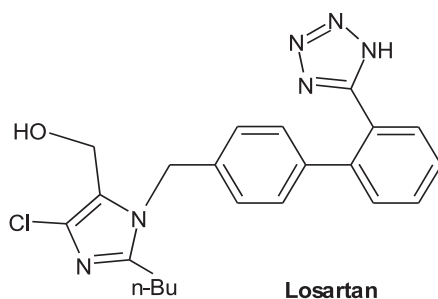


1

Rysunek 1  
Figure 1

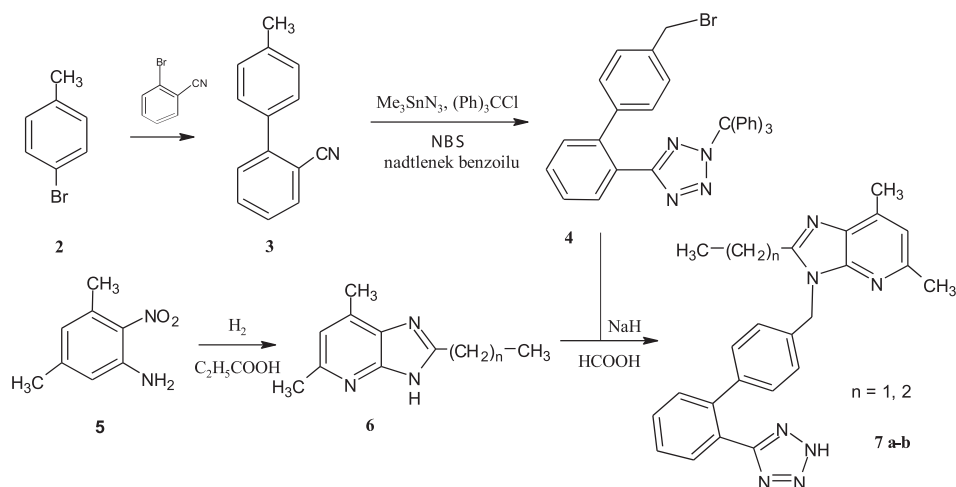
## 1. POCHODNE IMIDAZO[4,5-*b*]PIRYDYNY O AKTYWNOŚCI HIPOTENSYJNEJ

Ważną grupę leków hipotensyjnych stanowią inhibitory receptorów AT1 i AT2 angiotensyny II. W układzie enzymatycznym renina-angiotensyna-aldosteron (RAA) zachodzi szereg przemian prowadzących do powstania angiotensyny II, która łącząc się z receptorami angiotensynowymi powoduje skurcz mięśni gładkich naczyń krwionośnych, a tym samym wzrost ciśnienia krwi. Pierwszym przedstawicielem tej grupy leków jest Losartan [6–8].



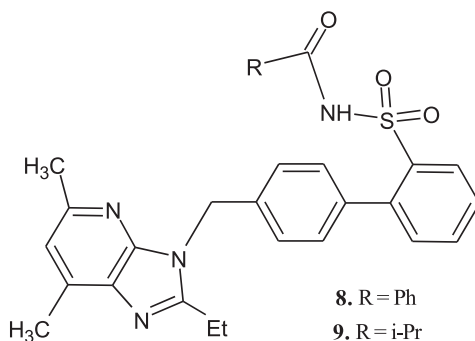
Rysunek 2  
Figure 2

Matsuda [9] otrzymał inhibitory angiotensyny II, analogi Losartanu, zawierające w swojej strukturze zamiast pierścienia imidazolowego układ imidazo[4,5-*b*]pirydyny. Najwyższą aktywność hipotensyjną wykazały związki **7a-b** posiadające w pozycji 2 układu imidazopirydynowego podstawniki etylowy lub propylowy.

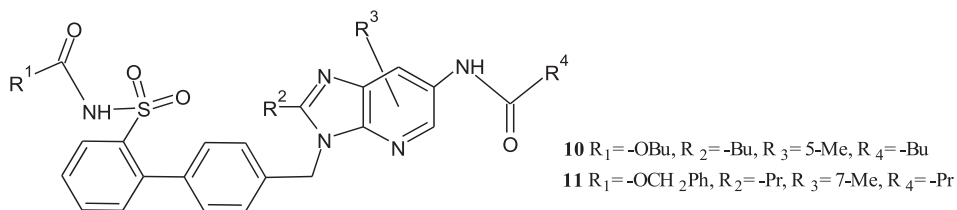


Chakravarty i in. [10] uzyskali związki **8** i **9** o wysokiej aktywności hipotensyjnej, które posiadały silne i wybiórcze działanie antagonistyczne wobec receptora AT1.

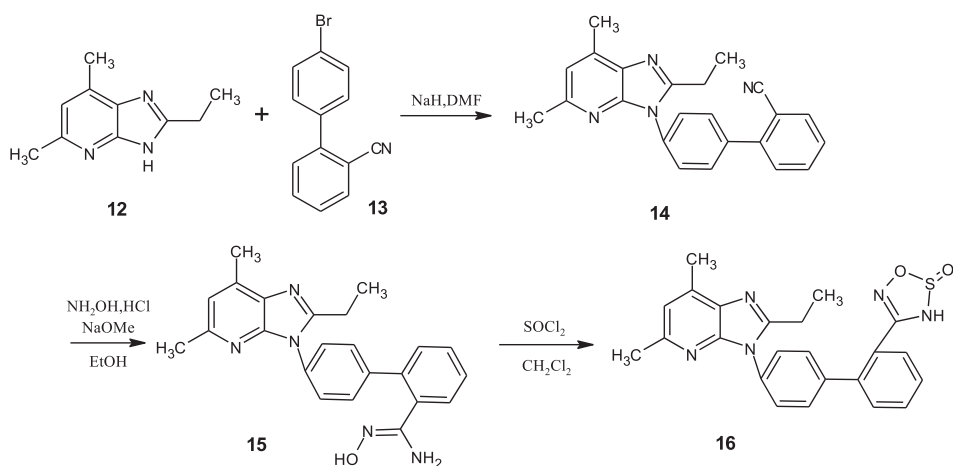


Rysunek 3  
Figure 3

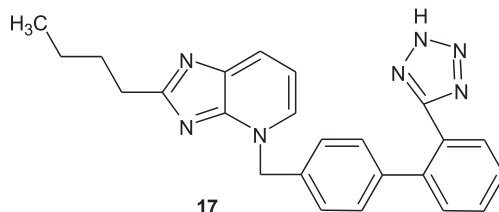
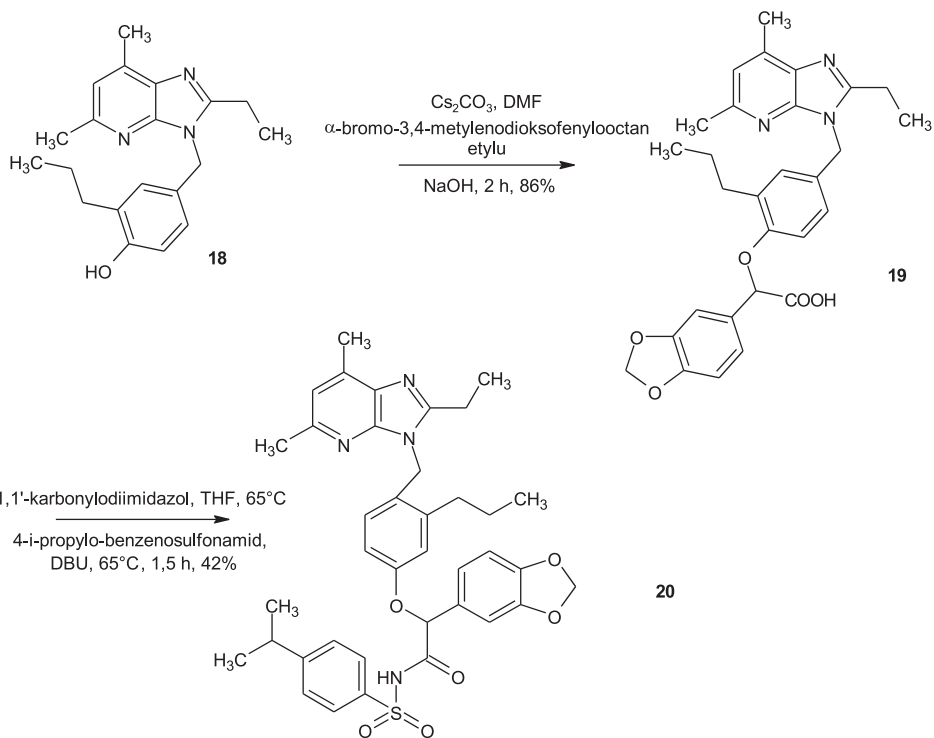
Silne powinowactwo do receptorów AT1 i AT2, potwierdzone w badaniach na zwierzętach, wykazały związki **10** i **11** [11].

Rysunek 4  
Figure 4

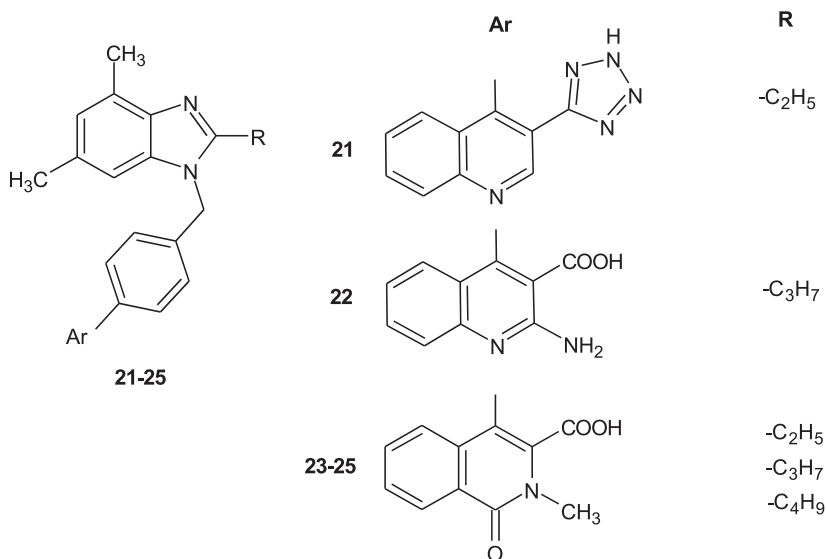
Podobną jak Losartan zdolność łączenia się z receptorem AT1, wykazywał związek, przedstawiony wzorem **16** [12].

Schemat 2  
Scheme 2

2-*n*-Butylo-3-[2'-(1*H*-tetrazo-5-yl)-4-difenylometrylo]-3*H*-imidazo[4,5-*b*]pirydyna (**17**) otrzymana przez Mederskiego [13], a także pochodna **20** otrzymana przez Walsh i in. [14] wykazywały silne działanie antagonistyczne wobec receptora AT1.

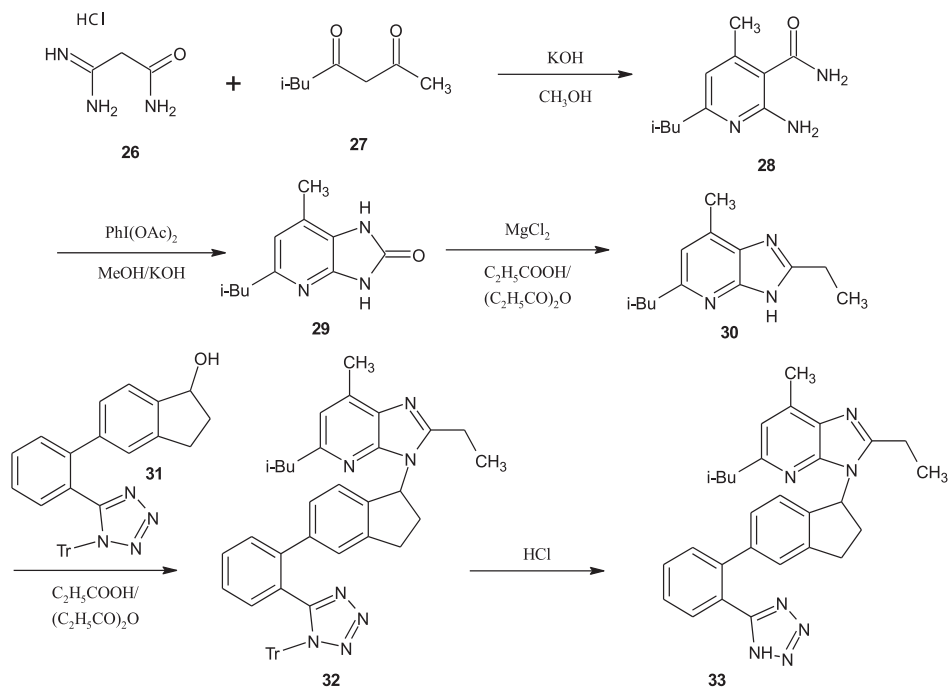
**17**Rysunek 5  
Figure 5Schemat 3  
Scheme 3

Z serii pochodnych otrzymanych przez Cappelliego i in. [15, 16] najwyższą aktywność hipotensyjną wykazywały związki **21** i **22**.



Rysunek 6  
Figure 6

(*S*)-3-(5-(2-(1*H*-Tetrazol-5-yl)fenyleno)-2,3-dihydro-1*H*-inden-1-yl)-2-etylo-5-izobutylo-7-metylo-3*H*-imidazo[4,5-*b*]pirydyna (**33**), otrzymana przez Casimiro-Garcia i in. [17], w badaniach *in vivo* na zwierzętach wykazywała właściwości hipotensyjne oraz przeciwcukrzycowe. Działała ona antagonistycznie wobec receptorów AT1, i agonistycznie w stosunku do receptorów PPAR $\gamma$ , które wpływają na różnicowanie i dojrzewanie adipocytów, a także zwiększają insulinowrażliwość tkanek [18]. Dodatkowo zaobserwowano korzystne działanie na profil lipidowy.



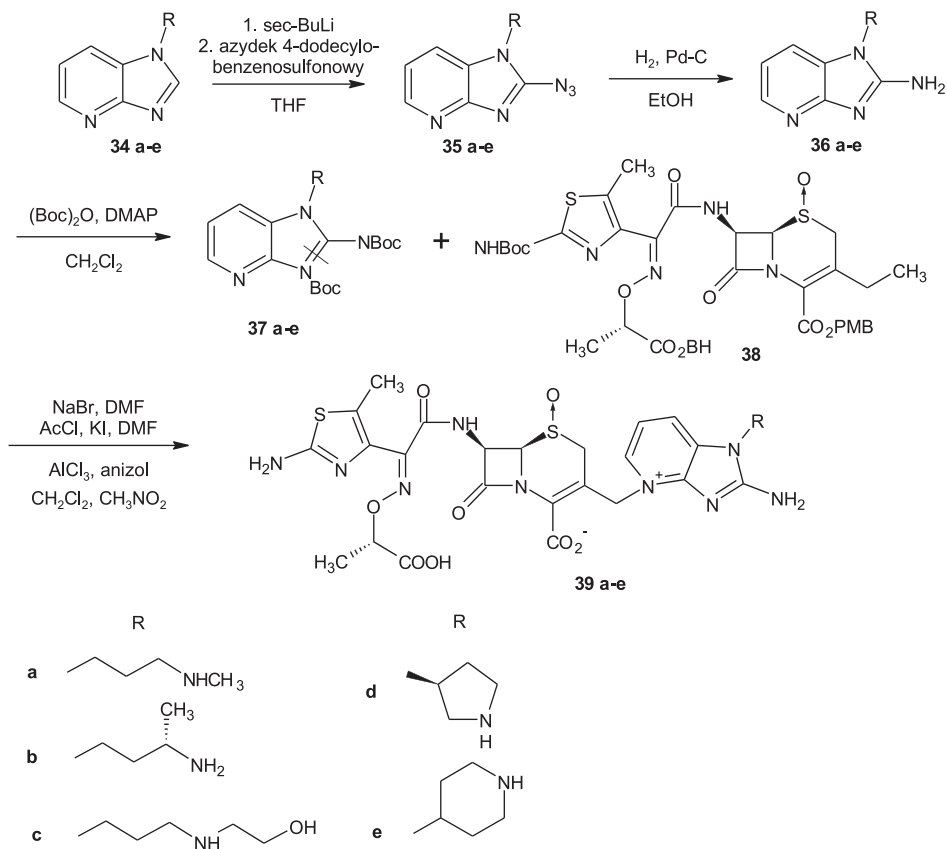
Schemat 4

Scheme 4

## 2. POCHODNE IMIDAZO[4,5-*b*]PIRYDINY O AKTYWNOŚCI PRZECIWBAKTERYJNEJ I PRZECIWGRUŻLICZEJ

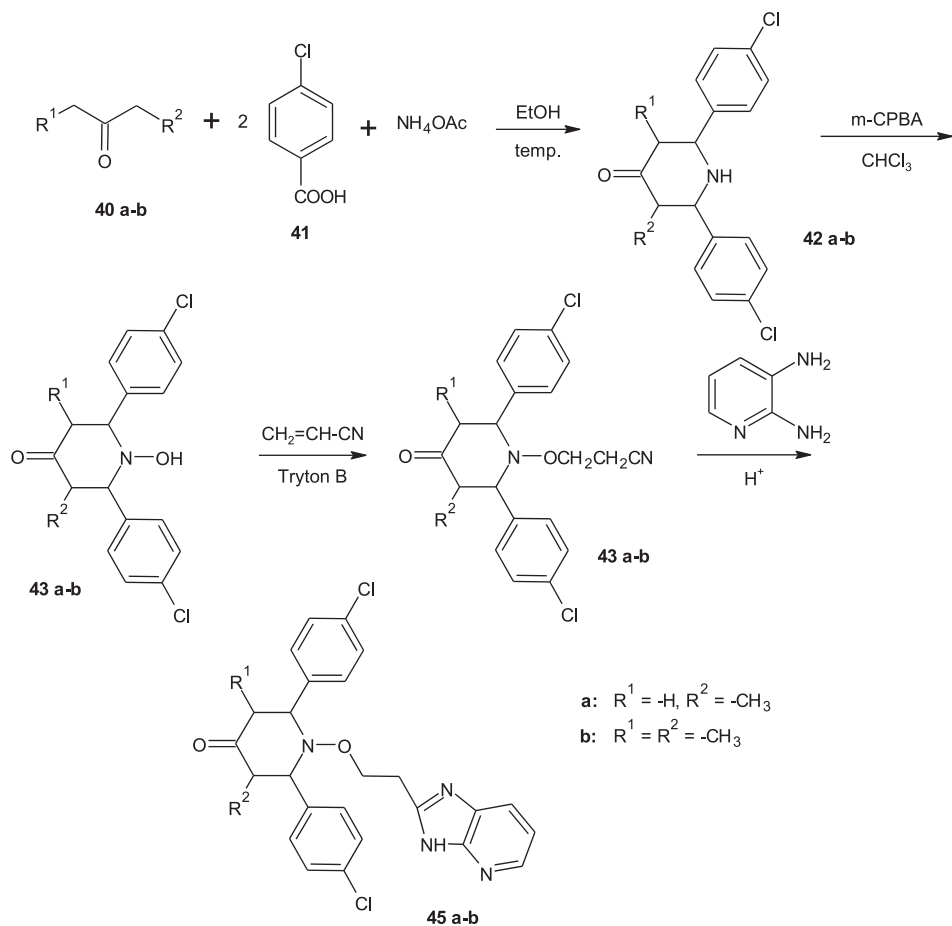
Choroby wywoływane przez bakterie towarzyszą ludzkości od zarania dziejów. Przełomem w ich leczeniu było odkrycie sulfonamidów, a następnie penicyliny [19]. Wydawało się wówczas, że problem chorób wywołanych przez bakterie został ostatecznie rozwiązany. Jednak nieracjonalna antybiotykoterapia, powszechność stosowania antybiotyków w rolnictwie, weterynarii spowodowały występowanie lekooporności na znane leki, w tym antybiotyki. Wymusiło to poszukiwanie skuteczniejszych związków chemicznych, w tym wśród pochodnych imidazo[4,5-*b*]pirydyny.

Yamawaki i in. [20] zmodyfikowali strukturę antybiotyku: cefepimu z grupy cefalosporyn. Otrzymali serię imidazopirydynowych 7- $\beta$ -(2-(2-amino-5-chlorotiazol-4-yl)-2-(*Z*)-((*S*)-1-karboxyetyksymino)-acetamido)-cefalosporyn **39a-e**. Najsilniejsze właściwości przeciwbakteryjne wobec szczepów *Pseudomonas aeruginosa* opornych na ceftazidim oraz aktywność bakteriobójczą wobec *Staphylococcus aureus* i penicylioopornego *Streptococcus pneumoniae* wykazał związek **39a**.



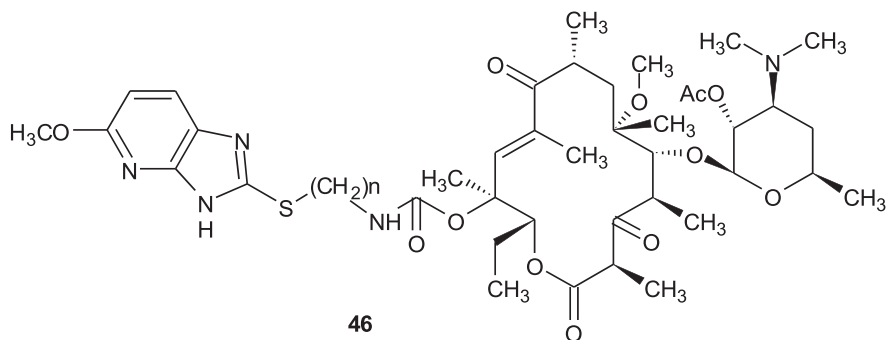
Schemat 5  
 Scheme 5

Aridoss i in. [21] otrzymali serię imidazo[4,5-*b*]pirydinylo-etoksypiperidonów działających przeciwbakteryjnie i przeciwgrzybiczo. Najwyższą aktywność w badaniach *in vitro* wobec szczepów *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* wykazały związki **45 a i b**.



Schemat 6  
Scheme 6

Z serii nowych ketolidów (grupa nowych antybiotyków, półsyntetycznych pochodnych erytromycyny), otrzymanych przez Xu i in [22] silne właściwości przeciwbakteryjne wobec erytromycynoopornych szczepów *Streptococcus pneumoniae* i *Streptococcus pyogenes* wykazał związek **46**.

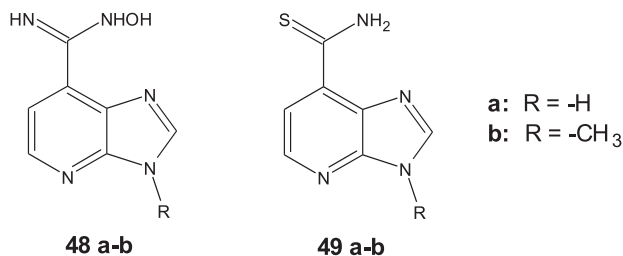


Rysunek 7  
Figure 7

Gruźlica, nazywana chorobą Kocha, jest chorobą zakaźną, wywoływaną przez prątki *Mycobacterium tuberculosis*, rzadziej *Mycobacterium bovis* lub *Mycobacterium africanum*. Ze względu na specyficzną budowę prątków, leczenie gruźlicy jest bardzo trudne [23]. Pierwszym wprowadzonym lekiem w terapii gruźlicy był izoniazyd, który do chwili obecnej jest lekiem pierwszego wyboru. Przypuszcza się, że działa on poprzez hamowanie enzymów oddechowych bakterii, dzięki wbudowywaniu się w miejsce kwasu nikotynowego w cząsteczce NAD [24]. Jednakże bakterie dość szybko uodparniają się na izoniazyd i inne leki. Wymusza to poszukiwanie nowych, skutecznych leków, również wśród pochodnych imidazo[4,5-*b*]pirydiny.

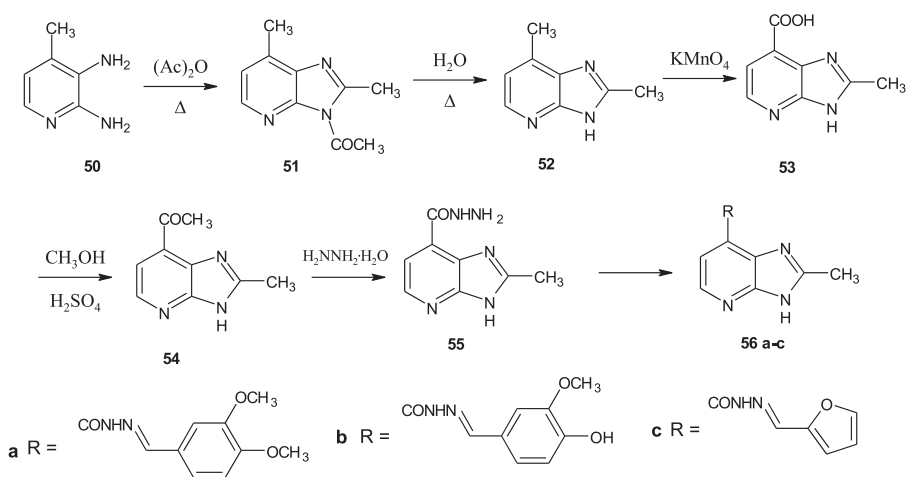
W ostatnich latach szeroko zakrojone badania nad poszukiwaniem nowych leków przeciwgruźliczych, pochodnych imidazo[4,5-*b*]pirydiny, podjął polski uczony Bukowski ze współpracownikami [25–32]. Pochodne imidazo[4,5-*b*]pirydiny zostały podstawione w pozycjach 2, 3, 7 lub były tricykliczne. Syntezy, struktury chemiczne wybranych związków o wysokiej aktywności przeciwgruźliczej przedstawiono poniżej.

Najwyższą aktywność tuberkulostatyczną *in vitro* wykazały pochodne **48a-b** i **49a-b**, podstawione w pozycji 7 [25].



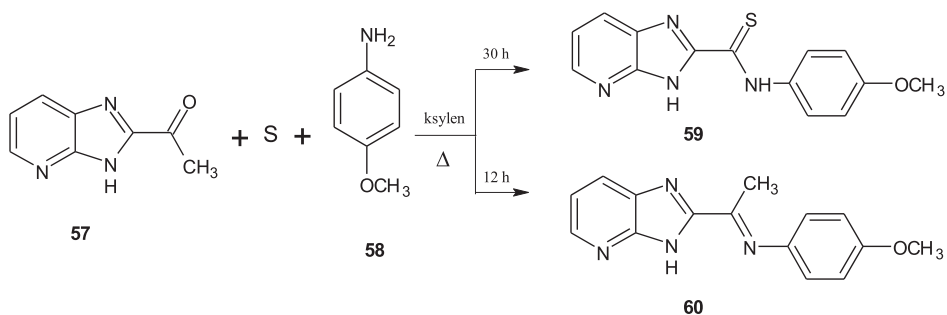
Rysunek 8  
Figure 8

Kontynuując prace Bukowski i Janowiec opublikowali syntezę kolejnych wysokoaktywnych związków **56a-c** [26].



Schemat 7  
Scheme 7

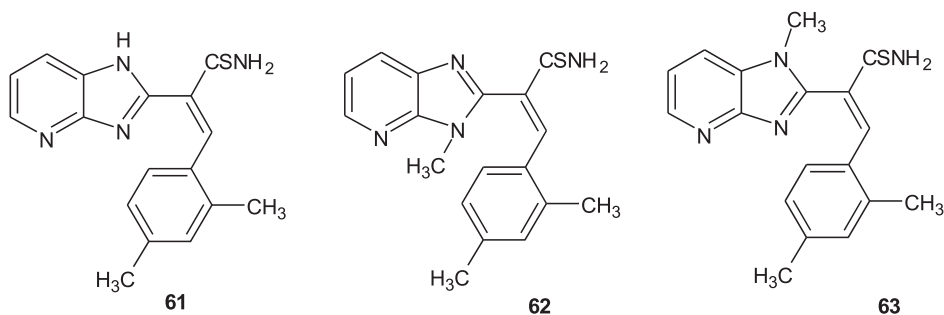
Ci sami autorzy [30] otrzymali związki **59** i **60** o wysokiej aktywności przeciwgruźliczej.



Schemat 8  
Scheme 8

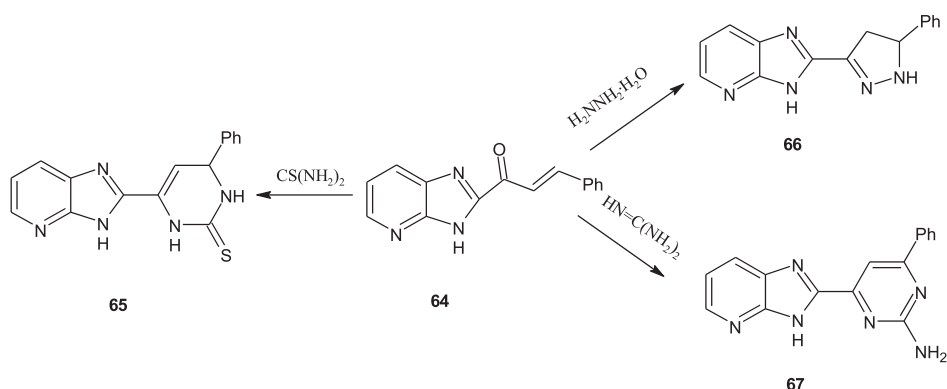
Wyjątkowo wysoką aktywność tuberkulostatyczną wobec opornych na klasyczne leki szczepów *Mycobacterium tuberculosis* wykazywały związki **61–63** [28].





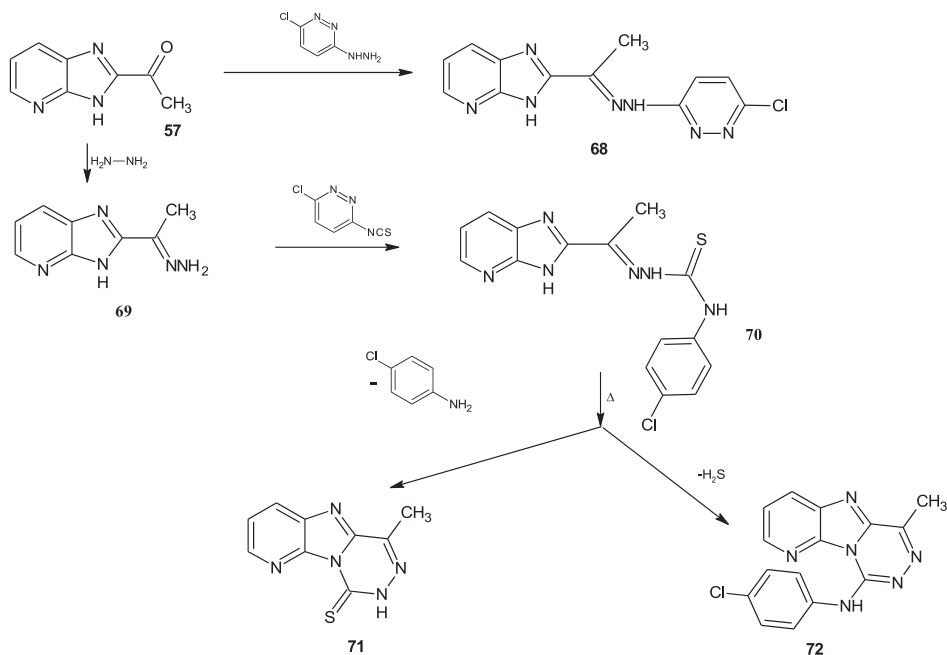
Rysunek 9  
Figure 9

Pochodne imidazol[4,5-*b*]pirydyny **65-67**, zawierające w pozycji 2 częściowo uwodornione pierścienie pirymidyny lub pirazyny były również aktywne *in vitro* wobec szczepów *Mycobacterium tuberculosis*, opornych na niektóre stosowane leki [31].

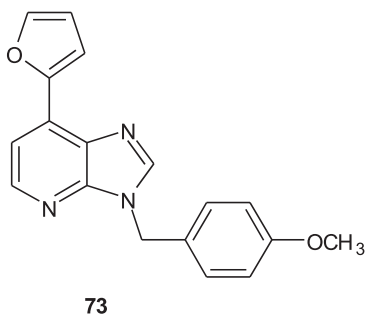


Schemat 9  
Scheme 9

W testach na aktywność tuberkulostatyczną szczególnie silne właściwości bakteriostatyczne wykazały: hydrazon **68** oraz tiosemikarbazyd **70** i związki tricykliczne pochodne pirydo[3'2':4,5]imidazo[1,2-*d*][1,2,4]triazyny **71** i **72** [32].



W 2011 norwescy naukowcy [33] przedstawili wyniki badań dotyczące analogów purynowych, jako potencjalnych leków w farmakoterapii gruźlicy. Najsilniej działała 1-deazapurna: 7-(furan-2-yl)-3-(4-metoksybenzyl)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]pirydyna (**73**).



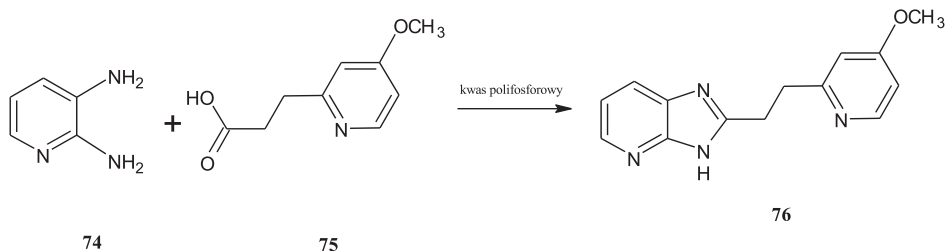
Rysunek 10  
Figure 10

### 3. POCHODNE IMIDAZO[4,5-*b*]PIRYDYNY O AKTYWNOŚCI PRZECIWZAPALNEJ

Stan zapalny jest to odpowiedź obronna organizmu, na bodziec zakłócający jego naturalną homeostazę i może mieć przebieg ostry, a następnie przejść w stan przewlekły [34]. U zdrowych ludzi, proces zapalny wpływa korzystnie – chroni organizm przed czynnikami szkodliwymi. Jednak kontrola zapalenia nie zawsze przebiega właściwie. Czasami jego nasilenie jest zbyt duże i może prowadzić do uszkodzenia tkanek, co w konsekwencji powoduje konieczność rozpoczęcia farmakoterapii.

Indukowalna syntetaza tlenu azotu (iNOS) odpowiada za powstawanie tlenu azotu z L-argininy, w odpowiedzi na działanie czynników prozapalnych. Proces ten pomaga w niszczeniu substancji patogennych, jednak zwiększona ilość tlenu azotu może skutkować nadmiernym rozszerzeniem naczyń krwionośnych i hipotensją. Dlatego indukowalna NOS prawdopodobnie bierze udział w patofizjologii różnych chorób: wstrząsie septycznym, sepsie, przewlekłym zapaleniu stawów, astmie, stwardnieniu rozsianym i schorzeniach jelit o podłożu zapalnym.

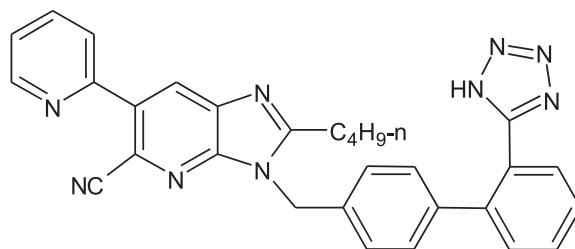
2-[2-(4-Metoksypirydyn-2-yl)-etylo]-3*H*-imidazo[4,5-*b*]pirydyna (**76**), otrzymana i opatentowana przez Ulrich'a i in. [35] jest inhibitorem syntetazy NO (NOS). Lehner i in. [36] stwierdzili, że związek **76** konkurencyjnie wypierał L-argininę z centrum katalitycznego enzymu, przez co w znaczny sposób zmniejszał syntezę tlenu azotu. Normalizował także zwiększone napięcie naczyń i ciśnienie krwi, poprzez blokowanie uwalniania nadmiaru NO.



Schemat 11

Scheme 11

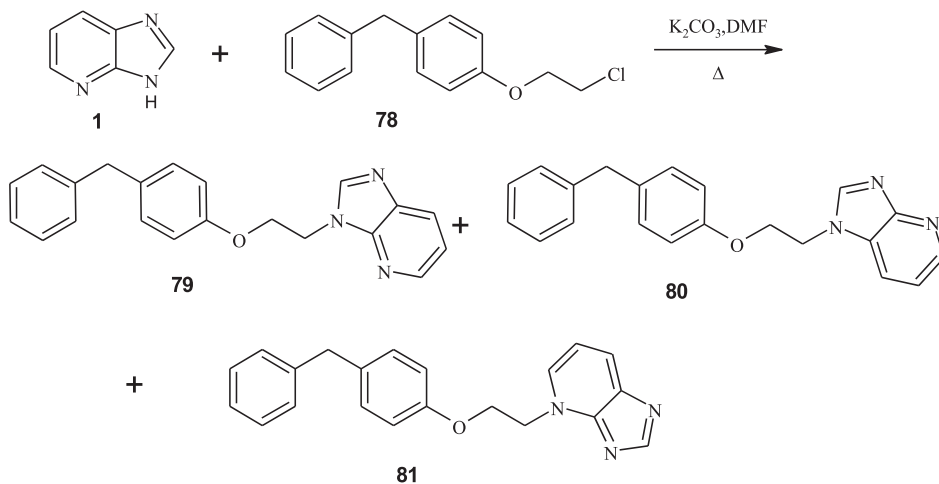
Dalsze badania nad inhibitorami NOS prowadzili Ock i in. [37], a otrzymany przez nich związek **77** (KR-31360), charakteryzował się wysoką aktywnością przeciwzapalną.



77

Rysunek 11  
Figure 11

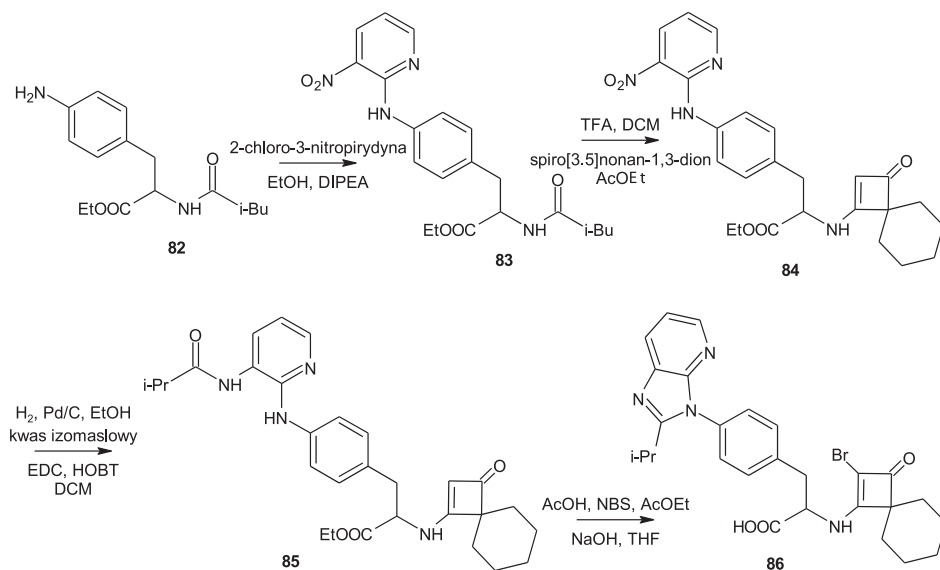
Leukotrieny (LTB<sub>4</sub> – lipidy związane z układem immunologicznym) należą do mediatorów prozapalnych. Posiadają właściwości chemotaktyczne i determinują migrację leukocytów do tkanek objętych procesem zapalnym. LTB<sub>4</sub> są produkowane w granulocytach obojętnochłonnych i monocytach jako wynik hydrolizy leukotrienu A<sub>4</sub> pod wpływem enzymu hydrolazy LTA<sub>4</sub> [24]. Najsilniejszą zdolność inhibicji hydrolazy leukotrienowej A<sub>4</sub> (LTA<sub>4</sub>) wykazywał związek **81**, otrzymany przez Penninga i in. [38].

Schemat 12  
Scheme 12

Integryny VLA-4 (ang. *Very Late Antigen*) są zróżnicowaną grupą cząstek adhezyjnych, występujących na powierzchni komórek: limfocytów T i B, eozynofili, makrofagów. W odpowiedzi na aktywność prozapalnych cytokin, integryny łączą się z immunoglobulinami (ang. *VCAM-1 – vascular cell adhesion molecule 1*) obecnymi w śródbłonku naczyń. Cząsteczki VLA-4 są zaangażowane w toczenie, przyleganie

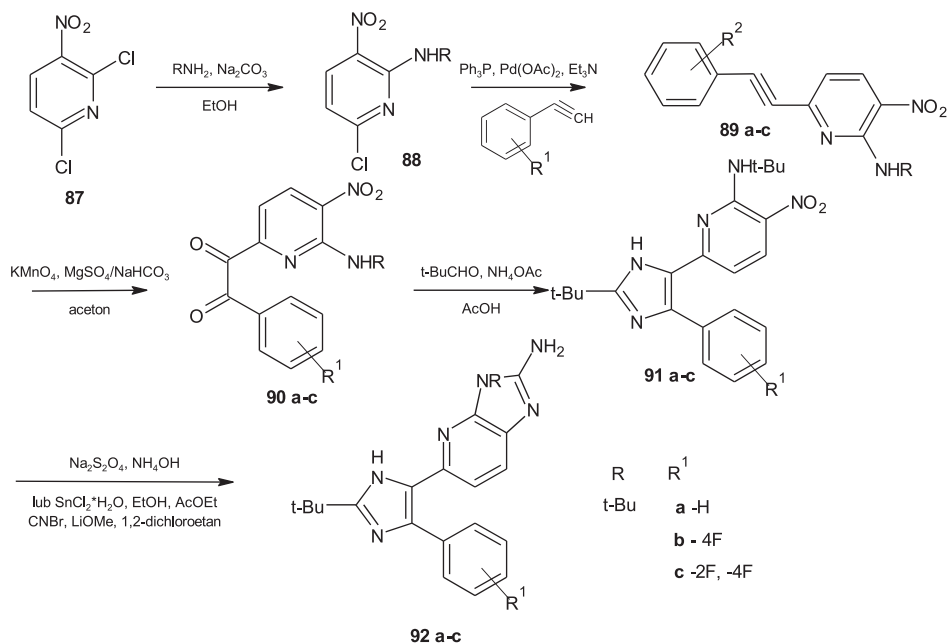
i migrację leukocytów do miejsca zapalnego [39]. Ich blokowanie jest celem terapii stwardnienia rozsianego czy choroby Leśniewskiego-Crohna.

Phillips i in. [40] otrzymali szereg pochodnych imidazo[4,5-*b*]pirydyn o właściwościach antagonistycznych w stosunku do VLA-4. Związek **86** w badaniach *in vitro* hamował VLA-4, co powodowało zatrzymanie napływu prozapalnych cytokin do ogniska zapalnego.



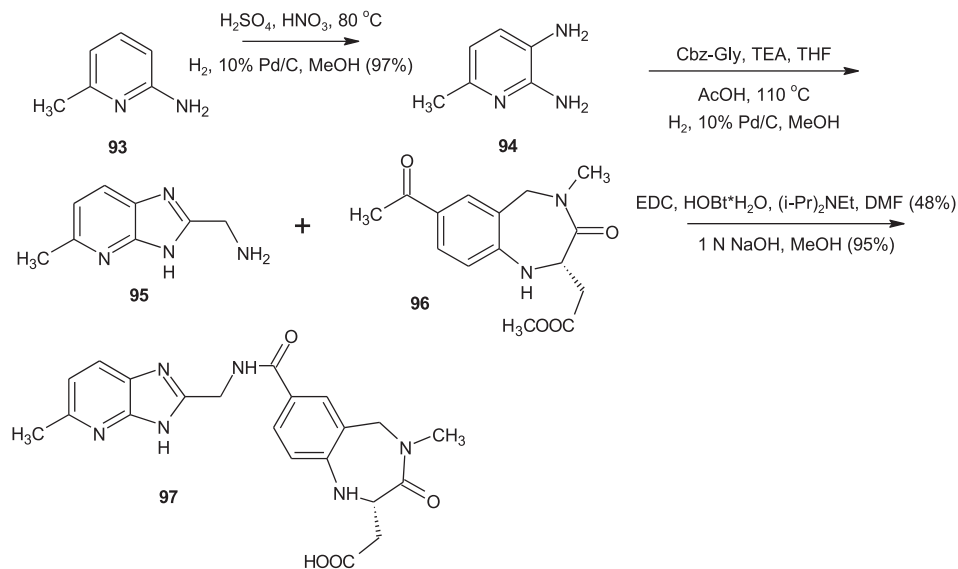
Kinazy aktywowane mitogenem (ang. *Mitogen activated protein kinase*, MAPK) są to enzymy, które biorą udział w wewnątrzkomórkowym przekazywaniu informacji. Działają na zasadzie kaskady enzymatycznej (kinazy MAPK wraz z substratami białkowymi), aktywowanej odbiorem bodźców zewnętrznych przez receptory, w wyniku której możliwa jest odpowiedź biologiczna komórki [41].

Mader i in. [42] opisali syntezę związku **92b**, który w testach *in vitro* oraz *in vivo* wykazywał właściwości hamujące enzym odpowiedzialny za uwalnianie czynników prozapalnych TNF- $\alpha$  i IL-1.



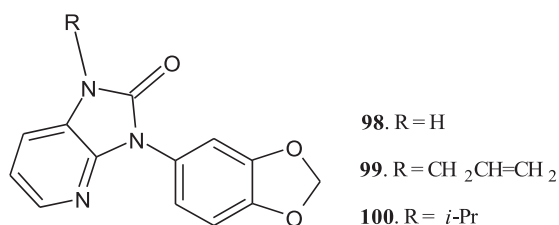
Schemat 14  
Scheme 14

Pochodna imidazo[4,5-*b*]pirydyny **97**, zawierająca w swej strukturze benzodiazepinę-1,4, według autorów [43], może być wykorzystywana w leczeniu restenozy (zwężenie leczonej tętnicy po zabiegach angioplastyki). Wykazuje ona działanie antagonistyczne wobec receptora dla białka adhezyjnego, witronektyny ( $\alpha\nu\beta3$ ). Jego zablokowanie skutkuje zahamowaniem adhezji i migracji komórek śródbłonna oraz komórek mięśni gładkich tętnic.



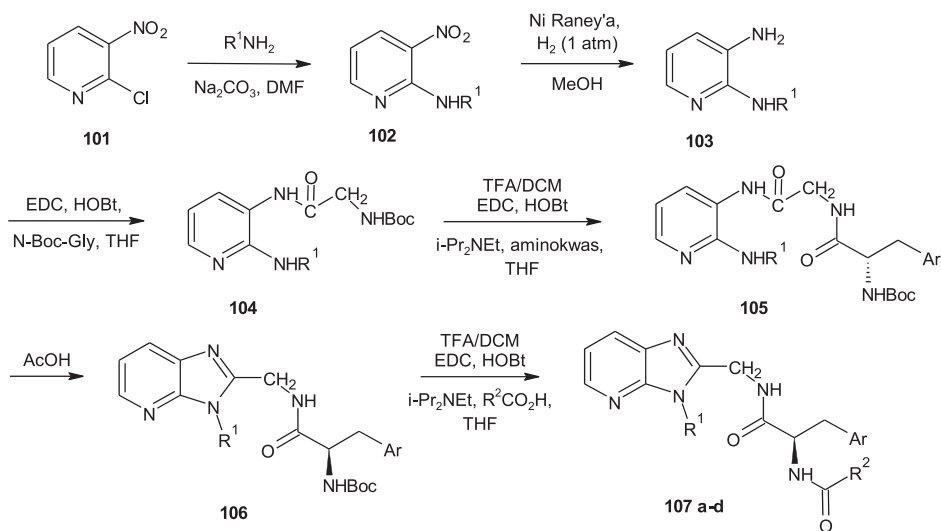
#### 4. POCHODNE IMIDAZO[4,5-*b*]PIRYDYNY O AKTYWNOŚCI PRZECIWBÓLOWEJ

Otrzymane przez Clarka i in. [44] pochodne **98-100**, wykazywały aktywność przeciwbólową zbliżoną do kodeiny i dekstropropoksyfenu, przy braku działania narkotycznego.



Rysunek 12  
Figure 12

London i in. [45] otrzymali szereg pochodnych imidazo[4,5-*b*]pirydyny **107a-d**, które blokowały kanały sodowe (hNav1.7) odpowiedzialne za ból neuropatyczny. Działanie przeciwbólowe zbliżone do meksyletyny oraz indometacyny wykazały pochodne **107a-c**.



Schemat 16

Scheme 16

107	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Ar	107	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Ar
a	Bn	O-t-Bu	2-CF <sub>3</sub> -Ph	c			2-Cl-Ph
b		O-t-Bu	2-CF <sub>3</sub> -Ph	d			2,6-di-F-Ph

## PODSUMOWANIE

Brak skutecznych leków w wielu schorzeniach, a także działania uboczne już stosowanych leków, wymuszają poszukiwanie nowych, syntetycznych związków o różnej strukturze chemicznej. Pochodne imidazo[4,5-*b*]pirydyny okazały się być atrakcyjnymi kandydatami na leki innowacyjne.

Na podstawie ponad 40 pozycji piśmiennictwa przedstawiono wybrane syntezy, oraz struktury chemiczne pochodnych imidazo[4,5-*b*]pirydyny o różnorodnej aktywności biologicznej i o różnych mechanizmach działania. Zaprezentowano związki wykazujące wysoką aktywność hipotensyjną, przeciwbakteryjną i przeciwcukrzyczą, przeciwzapalną oraz przeciwbólową.



## PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] K. Bukhryakov, A. Kurkin, M. Yurovskaya, *Chem. Heterocycl. Compd.*, 2011, **47**, 534.
- [2] D.V. Dekhane, S.S. Pawar, S.V. Gupta, S. Murlidhar, S.N. Thore, *Chin. Chem. Lett.*, 2010, **21**, 519.
- [3] Y. Liu, W. Zhang, L.M. Sayre, *J. Heterocycl. Chem.*, 2011, **48**, 426.
- [4] J. Wu, X. Xing, G.D. Cuny, *Org. Chem.* 2009, **40**, 203.
- [5] H. Liszkiewicz, W.P. Nawrocka, B. Sztuba, J. Wietrzyk, J. Jaroszewicz, A. Nasulewicz, M. Pełczyńska, *Acta Pol Pharm.*, 2011, **68**, 349.
- [6] P. Naik, P. Murumka, R. Giridhar, M.R. Yadav, *Bioorg. Med. Chem.* 2010, **18**, 8418.
- [7] W. Kostowski, Z.S. Herman, *Farmakologia, Podstawy farmakoterapii*, Wyd. PZWL, Warszawa Wydanie III 2005, Tom I-II.
- [8] A. Zejc, M. Gorczyca, *Chemia Leków*, Wyd. PZWL, Warszawa 1999.
- [9] A. Matsuda, J.Y. Nakajima, A. Azumat, M. Tanaka, T.J. Sasaki, *J. Med. Chem.*, 1991, **34**, 2919.
- [10] P.K. Chakravarty, E.M. Naylor, A. Chen, R.S.L. Chang, T. Chen, K.A. Faust, V.J. Lott, S.D. Kivlighn, R.A. Gable, G.J. Zingaro, T.W. Shorn, L.W. Schaffer, T.P. Broten, P.K.S. Siegl, A.A. Patchett, W.J. Greenlee, *J. Med. Chem.*, 1994, **37**, 4068.
- [11] N.B. Mantlo, D. Kim, D. Ondeyka, R.S.L. Chang, S.D. Kivlighn, P.K.S. Siegl W.J., Greenlee, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, **4**, 17.
- [12] D. Kim, N.B. Mantlo, R.S.L. Chang, S.D. Kivlighn, W.J. Greenlee, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, **4**, 41.
- [13] W.W.K.R. Mederski, K.G.R. Pachler, *Tetrahedron*, 1992, **48**, 10549.
- [14] T.F. Walsh, K.J. Fitch, D.L. Williams, K.L. Murphy, N.A. Nolan, D.J. Pettibone, R.S.L. Chang, S.S. O'Malley, B.V. Clineschmidt, D.F. Veber, W.J. Greenlee, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1995, **5**, 1155.
- [15] A. Cappelli, G. Pericot Mohr, G. Gallelli, M. Rizzo, M. Anzini, S. Vomero, L. Mennuni, F. Ferrari, F. Makovec, M.C. Menziani, P.G. De Benedetti, G. Giorgi, *J. Med. Chem.*, 2004, **47**, 2574.
- [16] A. Cappelli, Gal.ia Pericot Mohr, G. Giuliani, S. Galeazzi, M. Anzini, L. Mennuni, F. Ferrari, F. Makovec, E.M. Kleinrath, T. Langer, M. Valoti, G. Giorgi, S. Vomero, *J. Med. Chem.*, 2006, **49**, 6451.
- [17] A. Casimiro-Garcia, G.F. Filzen, D. Flynn, C.F. Bigge, J. Chen, J.A. Davis, D.A. Dudley, J.J. Edmunds, N. Esmaeil, A. Geyer, R.J. Heemstra, M. Jalaie, J.F. Ohren, R. Ostroski, T. Ellis, R.P. Schaum, C. Stoner, *J. Med. Chem.*, 2011, **54**, 4219.
- [18] M. Sokołowska, M.L. Kowalski, R. Pawliczak, *Postepy Hig. Med. Dosw.*, 2005, **59**, 472.
- [19] E. Mutschler, G. Geisslinger, H.K. Kroemer, P. Ruth, M. Schaefer-Korting, *Farmakologia i Toksykologia*, Wyd. II, MedPharm Polska, 2010.
- [20] K. Yamawaki, T. Nomura, T. Yasukata, N. Tanimoto, K. Uotani, H. Miwa, Y. Yamano, K. Tekeda, Y. Nishitani, *Bioorg. Med. Chem.*, 2008, **16**, 1632.
- [21] G. Aridoss, S. Balasubramanian, P. Parthiban, S. Kabilan, *Eur. J. Med. Chem.*, 2006, **41**, 268.
- [22] P. Xu, L. Liu, X. Chen, Y. Li, J. Liu, Z. Jin, G. Wang, P. Lei, *Bioorg. Med. Chem.*, 2006, **41**, 268.
- [23] D. Michałowska-Mitczuk, *Postępy Farmakoterapii*, 2009, **65**, 51.
- [24] W. Janiec, J. Krupińska, *Farmakodynamika*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2008.
- [25] L. Bukowski, *Pol. J. Pharmacol., Pharm.*, 1980, **32**, 767.
- [26] L. Bukowski, M. Janowiec, *Pharmazie.*, 1988, **5**, 315.
- [27] L. Bukowski, M. Janowiec, *Pharmazie.*, 1989, **4**, 267.
- [28] L. Bukowski, M. Janowiec, *Pharmazie.*, 1996, **1**, 27.
- [29] L. Bukowski, M. Janowiec, Z. Zwolska-Kwiec, Z. Andrzejczyk, *Pharmazie.*, 1998, **6**, 373.
- [30] L. Bukowski, M. Janowiec, Z. Zwolska-Kwiec, Z. Andrzejczyk, *Pharmazie.*, 1999, **54**, 651.
- [31] L. Bukowski, *Chem. Heterocycl. Compd.*, 2002, **7**, 828.

- [32] L. Bukowski, Z. Zwolska, E. Augustynowicz-Kopec, *Chem. Heterocycl. Compd.*, 2006, **42**, 1358.
- [33] A.D. Khoje, C. Charnock, B. Wan, S. Franzblau, L.L. Gundersen, *Bioorg. Med. Chem.*, 2011, **19**, 3483.
- [34] S. Maśliński, M. Smagorzewski, *Patofizjologia*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2010.
- [35] W. Ulrich, patent US 2005/0171125A1, [www.ip.com](http://www.ip.com) (accessed 27.04 2012).
- [36] M.D. Lehner, D. Marx, R. Boer, A. Strub, C. Hesslinger, M. Eltze, W. Ulrich, F. Schwoebel, R.T. Schermuly, J. Barsig, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2005, **1**, 181.
- [37] J. Ock, S. Kim, K.Y. Yi, N.J. Kim, H.S. Han, J.Y. Cho, K. Suk, *Biochem. Pharm.*, 2010, **79**, 596.
- [38] T.D. Penning, N.S. Chandrakumar, B.N. Desai, S.W. Djuric, A.F. Gasiiecki, J.W. Malecha, J.M. Miyashiro, M.A. Russell, L.J. Askonas, J.K. Gierse, E.I. Harding, M.K. Highkin, J.F. Kachur, S.H. Kim, D. Villani-Price, E.Y. Pyla, N.S. Ghoreishi-Haack, W.G. Smith, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2003, **13**, 1137.
- [39] K. Borowska, B. Jędrych, K. Czerny, S. Zabielski, *Pol/Merk. Lek.*, 2006, **XXI**, 362.
- [40] D.J. Phillips, R.J. Davenport, T.A. Demaude, F.P. Galleway, M.W. Jones, L. Knerr, B.G. Perry, A.J. Ratcliffe, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2008, **18**, 4146.
- [41] M. Krzyżanowska, W. Świątek, B. Fijałkowska, M. Niemiałtowski, A. Schollenberger, *Post. Biol. Komorki*, 2009, **36**, 295.
- [42] M. Mader, A. de Dios, C. Shih, R. Bonjouklian, T. Li, W. White, B. López de Uralde, C. Sánchez-Martinez, M. del Prado, C. Jaramillo, E. de Diego, L. M. Martín Cabrejas, C. Dominguez, C. Montero, T. Shepherd, R. Dally, J.E. Toth, A. Chatterjee, S. Pleite, J. Blanco-Urgoiti, L. Perez, M. Barberis, M.J. Lorite, E. Jambrina, C.R. Jr. Nevill, P.A. Lee, R.C. Schultz, J.A. Wolos, L.C. Li, R.M. Campbell, B.D. Anderson, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2008, **18**, 179.
- [43] R.M. Keenan, M. Amparo Lago, W. Miller, F. Ali, R. Cousins, L. Hall, S. Hwang, D. Jakas, C. Kwon, C. Loudren, T. Nguyen, E. Ohlstein, D. Rieman, S. Ross, J. Samanen, B. Smith, J. Stadel, D. Takata, L. Vickery, C. Yuan, T. Yue, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1998, **8**, 3171.
- [44] R.L. Clark, A.A. Pessolano, T.Y. Shen, D.P. Jacobus, H. Jones, V.J. Lotti, L.M. Flataker, *J. Med. Chem.*, 1978, **21**, 965.
- [45] C. London, S.B. Hoyt, W.H. Parsons, B.S. Williams, V.A. Warren, R. Tschirret-Guth, M.M. Smith, B.T. Priest, E. McGowan, W.J. Martin, K.A. Lyons, X. Li, B.V. Karanam, N. Jochnowitz, M.L. Garcia, J.P. Felix, B. Dean, C. Abbadie, G.J. Kaczorowski, J.L. Duffy, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2008, **18**, 1696.

Praca wpłynęła do Redakcji 2 października 2012

## SYNTEZA I AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA POCHODNYCH PIROLO[3,4-*c*]PIRYDYNY

### SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF PYRROLO[3,4-*c*]PYRIDINE DERIVATIVES

**Anna Wójcicka**

*Katedra i Zakład Technologii Leków,  
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu,  
pl. Nankiera 1, 50-140 Wrocław  
email: anna.wojcicka@umed.wroc.pl*

---

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Syntezy układu pirolo[3,4-*c*]pirydyny
  - 1.1. z pochodnych pirydyny
    - 1.1.1. z pochodnych kwasu pirydynokarboksyłowego
    - 1.1.2. z pirydynokarbonitryli
    - 1.1.3. z pochodnych nikotynamidu
    - 1.1.4. z innych pochodnych pirydyny
  - 1.2. z pochodnych pirolo
  - 1.3. z innych substratów
    - 1.3.1. z substratów cyklicznych
    - 1.3.2. z substratów niecyklicznych

2. Aktywność biologiczna

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

---

**Dr inż. Anna Wójcicka** ukończyła biotechnologię na Wydziale Chemii Politechniki Wrocławskiej. Jest adiunktem w Katedrze i Zakładzie Technologii Leków Akademii Medycznej im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. Stopień doktora nauk farmaceutycznych uzyskała w 2009 roku na Wydziale Farmaceutycznym AM we Wrocławiu. Zajmuje się syntezą nowych pochodnych 2,7-naftyrydiny o potencjalnej aktywności biologicznej.

## ABSTRACT

Pyrrolo[3,4-*c*]pyridine is one of the six structural isomers of the bicyclic ring system containing pyrrole moiety condensed with a pyridine nucleus. This review presents most of the literature data about synthetic pyrrolo[3,4-*c*]pyridine derivatives and their biological activity.

S. Gabriel and J. Colman [4] discovered this isomer for the first time and named it “merimine” [Fig. 3]. The main goal of this study is the presentation of various methods for the preparation of pyrrolo[3,4-*c*]pyridine derivatives. Compounds containing the pyrrolo[3,4-*c*]pyridine scaffold can be synthesized from different substrates, but the syntheses may be classified into two main categories: annulation of pyrrole ring onto pyridine derivatives or annulation of pyridine ring onto pyrrole derivatives.

Biological investigations have shown that pyrrolo[3,4-*c*]pyridine derivatives have a wide spectrum of actions. Most of them have been studied as analgesic and sedative agents [35–40]. Antitumor [19, 42, 45], antiviral [27], antituberculostatic [43] activities have been found. Pyrrolo[3,4-*c*]pyridine derivatives can also be used in the treatment of nervous [20, 41] and immune [19, 42] system diseases.

Keywords: pyrrolo[3,4-*c*]pyridine derivatives, synthesis, biological activity

Słowa kluczowe: pochodne pirolo[3,4-*c*]pirydyny, synteza, aktywność biologiczna

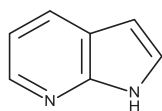
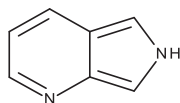
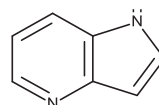
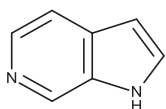
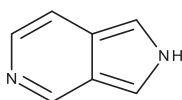
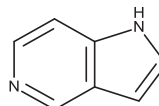
---

## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

DMSO	- dimetylosulfotlenek (ang. <i>dimethylsulfoxide</i> )
DMAD	- ester dimetylowy kwasu acetylenodikarboksylowego (ang. <i>acetylenedicarboxylic acid dimethyl ester</i> )
HIV-1	- ludzki wirus niedoboru odporności typu 1 (ang. <i>human immunodeficiency virus type 1</i> )
THF	- tetrahydrofuran (ang. <i>tetrahydrofuran</i> )
Me	- metyl (ang. <i>methyl</i> )
Et	- etyl (ang. <i>ethyl</i> )
Ph	- fenyl (ang. <i>phenyl</i> )
LDA	- diizopropylamidek litu (ang. <i>lithium diisopropylamide</i> )
LiHMDS	- bis(trimetylosililo)amidek litu (ang. <i>lithium bis(trimethylsilyl)amide</i> )
pTsOH	- kwas <i>para</i> -toluenosulfonowy (ang. <i>p-toluenesulfonic acid</i> )
MMP	- metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. <i>matrix metalloproteinases</i> )
CUN	- centralny układ nerwowy (ang. <i>central nervous system</i> )

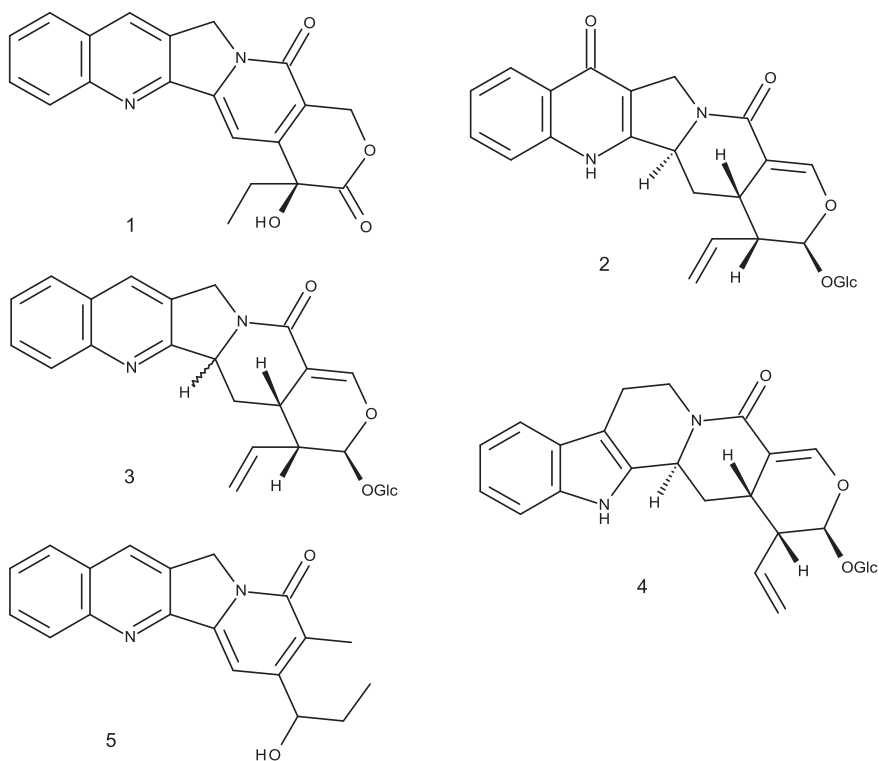
## WPROWADZENIE

Układ zawierający sześcioczłonowy pierścień pirydyny sprzężony z pięcioczłonowym pierścieniem pirolowym może występować w postaci sześciu izomerów strukturalnych:

1H-pirol[2,3-*b*]pirydyna6H-pirol[3,4-*b*]pirydyna1H-pirol[3,2-*b*]pirydyna1H-pirol[2,3-*c*]pirydyna2H-pirol[3,4-*c*]pirydyna1H-pirol[3,2-*c*]pirydynaRysunek 1  
Figure 1

Pirolopirydyny w piśmiennictwie chemicznym nazywane są także azaindolami lub azaizoindolami w zależności od układu atomów azotu w strukturze bicyklicznej.

Układ pirolopirydyny występuje w poliheterocyklicznych związkach pochodzenia naturalnego. Najlepiej poznanym jest alkaloid kamptotecyna **1** wyizolowany z drzewa *Camptotheca acuminata*. Jako inhibitor topoizomerazy I znalazł zastosowanie w leczeniu nowotworów, a także wykazuje aktywność wobec HIV-1 [1]. Innymi alkaloidami zawierającymi w swojej strukturze układ pirolopirydyny są m.in. pumilozyd **2**, deoksypumilozyd **3** i strictosamid **4** wyizolowane z *Ophiorrhiza pumila* [2] oraz przeciwwirusowy alkaloid mappicyna **5**, który wyizolowano z *Mappia foetida* [3].

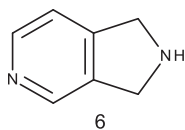


Rysunek 2  
Figure 2

W niniejszej pracy zostaną przedstawione dotychczas poznane i opisane w piśmiennictwie chemicznym pochodne izomeru pirolo[3,4-c]pirydyny.

### 1. SYNTEZY UKŁADU PIROLO[3,4-c]PIRYDYNY

Po raz pierwszy układ ten otrzymali Gabriel i Colman w 1902 roku [4] jako 2,3-dihydro-1H- pirolo[3,4-c]pirydnę (**6**), którą nazwali „meriminą”.



Rysunek 3  
Figure 3

W piśmiennictwie chemicznym przedstawiono kilkadziesiąt metod syntezy układu pirolo[3,4-c]pirydyny. W zależności od zastosowanych substratów można je podzielić na kilka grup.



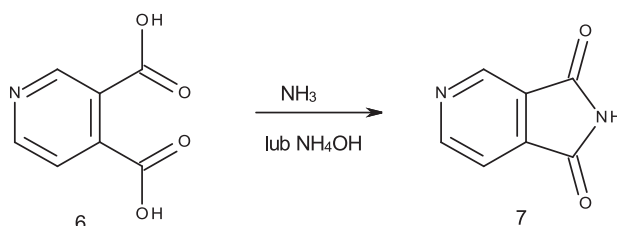
## 1.1. Z POCHODNYCH PIRYDINY

Najczęściej opisywanymi metodami syntez są reakcje, w których do pierścienia pirydyny dobudowany zostaje pierścień pirolowy.

## 1.1.1. z pochodnych kwasu pirydynokarboksylowego

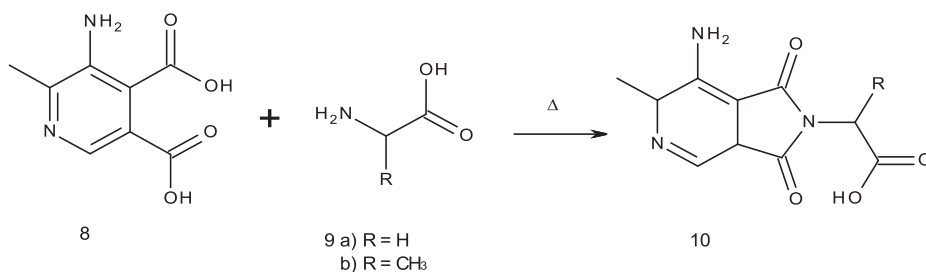
Związki zawierające sąsiadujące podstawniki dikarboksylowe w pierścieniu pirydyny ulegają cyklizacji z utworzeniem pięcioczłonowego pierścienia pirolo-1,3-dionu pod wpływem amoniaku lub amin.

Pod koniec XIX w. Strache [5] otrzymał pirolo[3,4-*c*]pirydyno-1,3-dion (7) w reakcji kwasu cynchomeronowego **6** z amoniakiem. Ten sam produkt otrzymano kilkadziesiąt lat później w reakcji z wodorotlenkiem amonu [6].



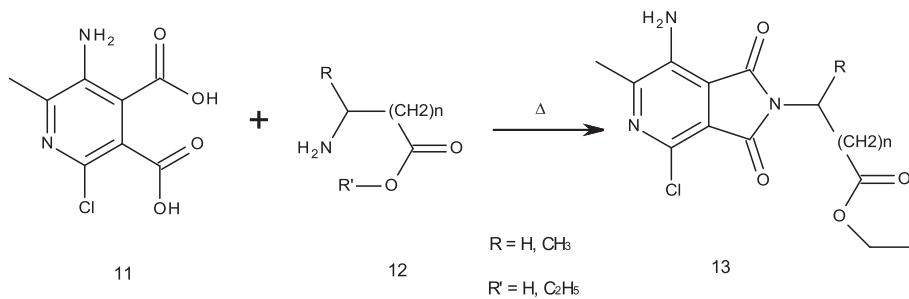
Schemat 1  
Scheme 1

W reakcji cyklokondensacji kwasu 5-amino-6-metylopirydyno-3,4-dikarboksylowego (**8**) z alaniną lub glicyną **9a-b** uzyskano odpowiednie *N*-podstawione pochodne 7-amino-6-metylopirolo[3,4-*c*]pirydyno-1,3-dionu **10** [7].



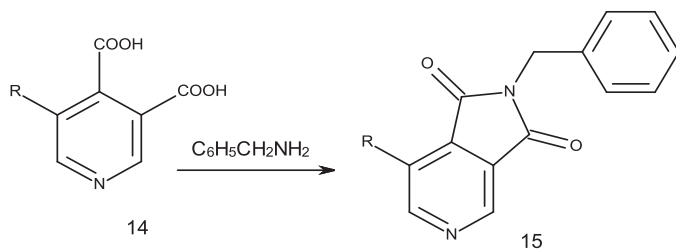
Schemat 2  
Scheme 2

Ogrzewając kwas 5-amino-2-chloro-6-metylopirydyno-3,4-dikarboksylowy (**11**) z odpowiednimi aminoestrami lub aminokwasami **12** otrzymano odpowiednie pochodne 7-amino-4-chloro-6-metylo-pirolo[3,4-*c*]pirydyn-2-ylo-1,3-dionu **13** [7].



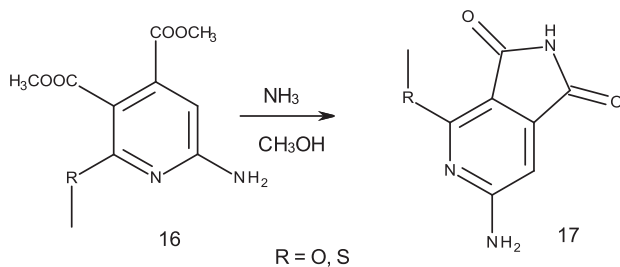
Schemat 3  
Scheme 3

W reakcji cyklocondensacji benzyloaminy z 5-podstawioną pochodną kwasu pirydyno-3,4-dikarboksylowego **14** otrzymano pochodne 2-benzylopirolo[3,4-c]pirydyno-1,3-dionu **15** [8].



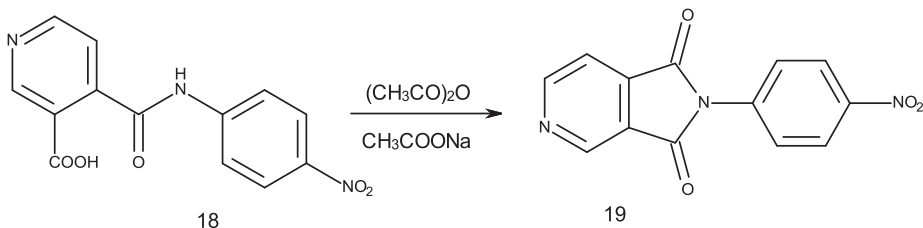
Schemat 4  
Scheme 4

Reakcjom cyklizacji ulegają również pochodne diestrów pirydyny. Pochodne estrów metylowych kwasu 6-aminopirydyno-3,4-dikarboksylowego **16** w metanowym roztworze amoniaku cyklizowano do odpowiednich pochodnych 5-amino-pirolo[3,4-c]pirydyno-1,3-dionu **17** [9].



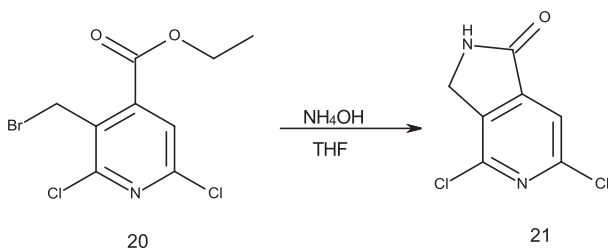
Schemat 5  
Scheme 5

W wyniku cyklizacji kwasu 4-(4-nitrofenylo)aminokarbonylopirydyno-3-karboxylowego (**18**) w bezwodniku octowym otrzymano 2-(4-nitrofenylo)pirolo[3,4-*c*]pirydyno-1,3-dion (**19**) [10].



Schemat 6  
Scheme 6

4,6-Dichloro-2,3-dihydropirol[3,4-*c*]pirydyn-1-on (**21**) otrzymano w reakcji cyklizacji 3-bromometylo-2,6-dichloronikotynianu etylu (**20**) z wodorotlenkiem amonu w THF [11].

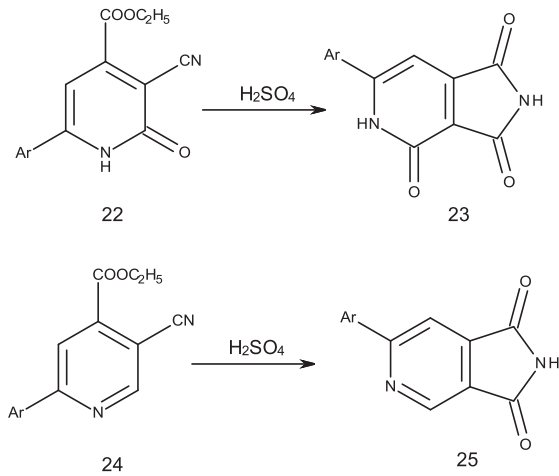


Schemat 7  
Scheme 7

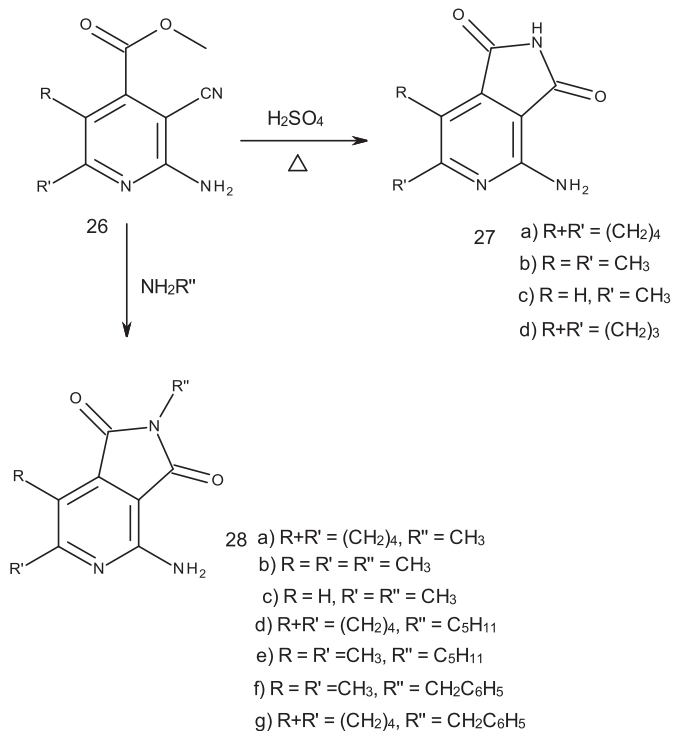
### 1.1.2. z pirydynokarbonitryli

Poddając pochodne pirydyny z sąsiadującymi podstawnikami estrowym i nitrylowym działaniu stężonego kwasu siarkowego można uzyskać pochodne pirolo[3,4-*c*]pirydyno-1,3-dionu.

W reakcji cyklizacji estru etylowego kwasu 6-arylo-3-cyjano-2-okso-1,2-dihydro-pirydyno-4-karboxylowego **22** w stężonym kwasie siarkowym otrzymano pochodne 6-arylo-5H-pirol[3,4-*c*]pirydyno-1,3,4-trionu **23**. W takich samych warunkach ester etylowy kwasu 6-arylo-3-cyjano-pirydyno-4-karboxylowego **24** cyklizowano z utworzeniem pochodnych 6-arylo-pirol[3,4-*c*]pirydyny **25** [12].



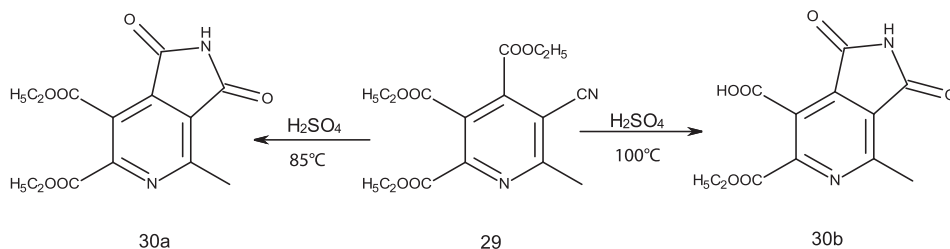
Schemat 8  
Scheme 8



Schemat 9  
Scheme 9

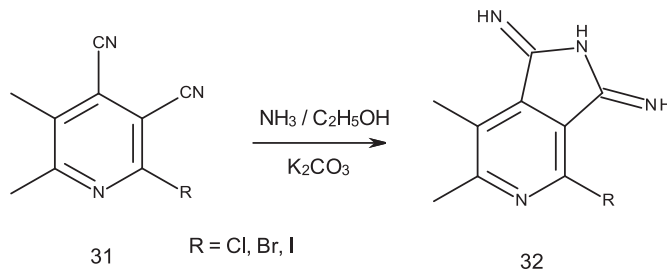
Ester metylowy kwasu 5,6-dialkilo-2-amino-3-cyjanopirydyno-4-karboxyloвого **26** w gorącym, stężonym kwasie siarkowym dał odpowiednie pochodne 6,7-dialkilo-4-aminopirolo[3,4-*c*]pirydyno-1,3-dionu **27** [12]. Ester cyjanopirydyny **26** poddany reakcji z pierwszorzędowymi aminami cyklizował do odpowiednich 2-podstawionych pochodnych pirolo[3,4-*c*]pirydyno-1,3-dionu **28** [13]. Cyklizacja wewnątrzcząsteczkowa pochodnej **26** do **27** zachodzi również wobec kwasu masłowego, formamidu lub acetamidu [14].

Cyklizacji w stężonym kwasie siarkowym poddano również inną pochodną estru cyjanopirydyny **29** otrzymując w zależności od temperatury przeprowadzonej reakcji odpowiednie pochodne pirolo[3,4-*c*]pirydyno-1,3-dionu **30a-b** [15].



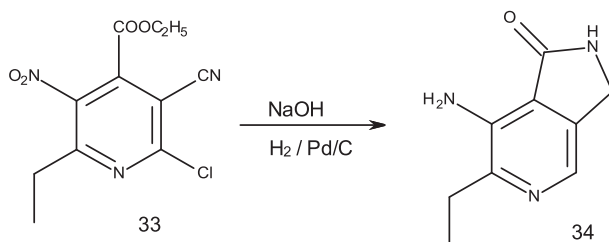
Schemat 10  
Scheme 10

W reakcji cyklizacji halogenopochodnej 3,4-dicyjano-5,6-dimetylopirydyny **31** z amoniakiem powstały odpowiednie halogenopochodne 6,7-dimetylopirolo[3,4-*c*]pirydyno-1,3-diiminy **32** [16].



Schemat 11  
Scheme 11

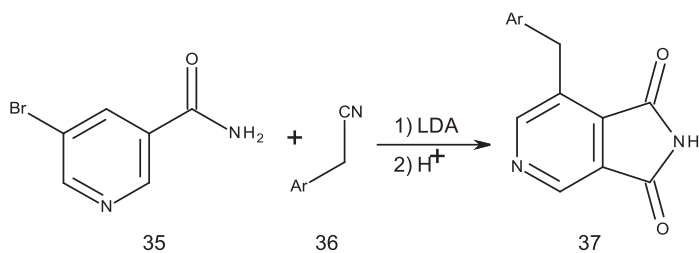
Ester etylowy kwasu 2-chloro-3-cyano-5-etylo-4-nitropirydyno-3-karboxyloвого (**33**) w wyniku reakcji cyklizacji wobec NaOH połączonej z redukcją dał 7-amino-6-etylopirolo[3,4-*c*]pirydyn-1-on (**34**) [8].



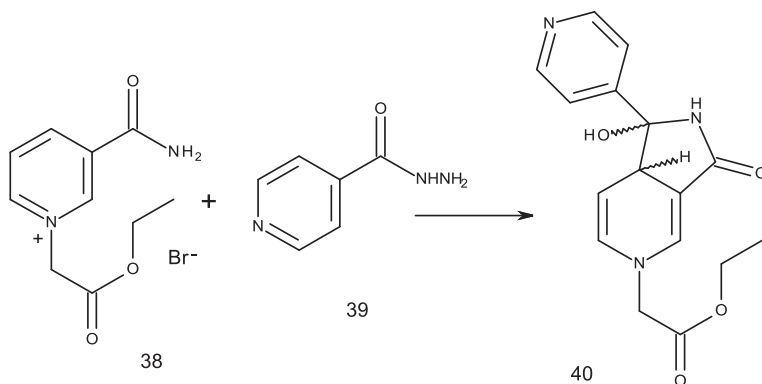
Schemat 12  
Scheme 12

### 1.1.3. z pochodnych nikotynamidu

W reakcji cyklocondensacji amidu kwasu 5-bromonikotynowego (35) i aryloacetonitrylu 36 otrzymano odpowiednie pochodne 7-arylometylopirolo[3,4-*c*]pirydino-1,3-dionu 37 [17].



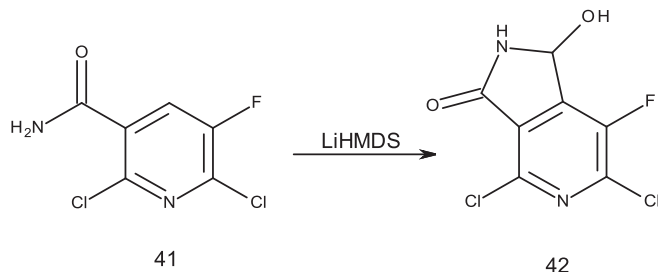
Schemat 13  
Scheme 13



Schemat 14  
Scheme 14

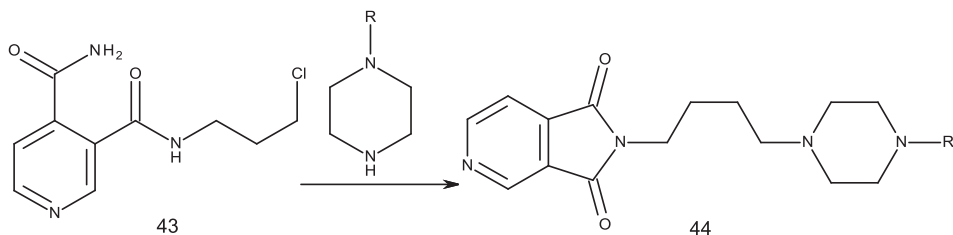
W wyniku cyklokondensacji *N*-podstawionego estru nikotynamidu **38** z hydrazdem kwasu izonikotynowego (**39**) powstał ester etylowy kwasu 2-[1-hydroksy-3-okso-1-(pirydyn-4-ylo)-2,7a-dihidropirol[3,4-*c*]pirydyn-5-ylo]octowego (**40**) [18].

Cyklizacja amidu kwasu 2,6-dichloro-5-fluoronikotynowego (**41**) wobec LiHMDS dała 4,6-dichloro-7-fluoro-1-hydroksypirol[3,4-*c*]pirydyn-3-on (**42**) [19].



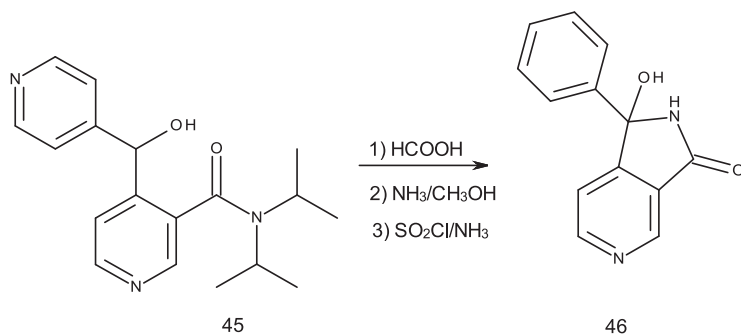
Schemat 15  
Scheme 15

W reakcji cyklokondensacji pochodnej pirydyno-3,4-dikarboksamidu **43** z pochodnymi piperazyny otrzymano odpowiednie pochodne *N*-(4-piperazylo) butylopirol[3,4-*c*]pirydyno-1,3-dionu **44** [20].



Schemat 16  
Scheme 16

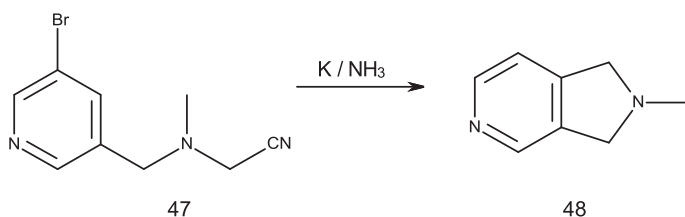
Pochodną diizopropylonikotynamidu **45** poddano kilkietapowej reakcji z kwasem mrówkowym, amoniakiem i chlorkiem tonylu otrzymując ostatecznie 1-hydroksy-1-(pirydyn-4-ylo)-1,2-dihidropirol[3,4-*c*]pirydyn-3-on (**46**) [18].



Schemat 17  
Scheme 17

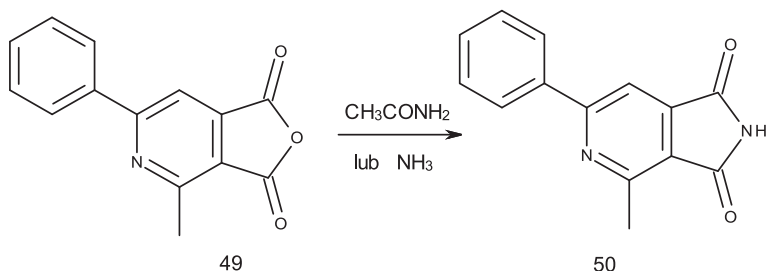
### 1.1.4. z innych pochodnych pirydyny

Reakcji cyklizacji wobec potasu w amoniaku poddano 5-bromo-3-(*N*-cyjanometylo-*N*-metylo)aminometylopirydynę (**47**) uzyskując 2-metylo-1,3-dihydropirolo[3,4-*c*]pirydynę (**48**) [21].



Schemat 18  
Scheme 18

6-Fenyl-4-metylofuro[3,4-*c*]pirydyno-1,3-dion (**49**) w reakcji z amoniakiem [22] lub wobec acetamidu [23] uległ przegrupowaniu do 6-fenyl-4-metylopirolo[3,4-*c*]pirydyno-1,3-dionu (**50**).

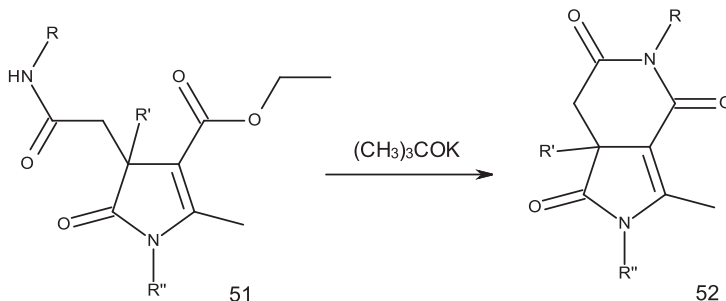


Schemat 19  
Scheme 19



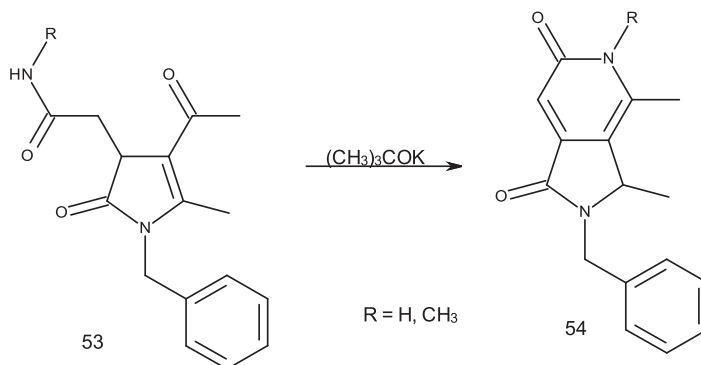
## 1.2. Z POCHODNYCH PIROLU

W reakcji cyklizacji pochodnych estru etylowego kwasu 2-metylo-5-oksopirolidyno-3-karboksylowego **51** wobec *tert*butanolanu potasu otrzymano odpowiednie pochodne 3-metylopirolo[3,4-*c*]pirydyno-1,4,6-trionu **52** [24].



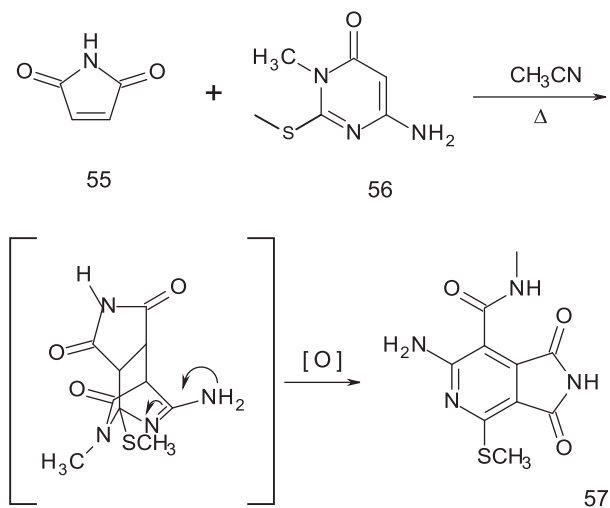
Schemat 20  
Scheme 20

Analogicznej reakcji poddano keton metylowy **53** uzyskując diokso pochodne **54** [24].

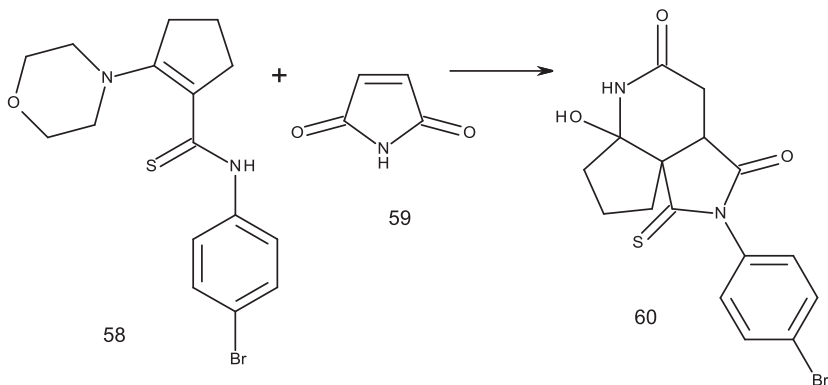


Schemat 21  
Scheme 21

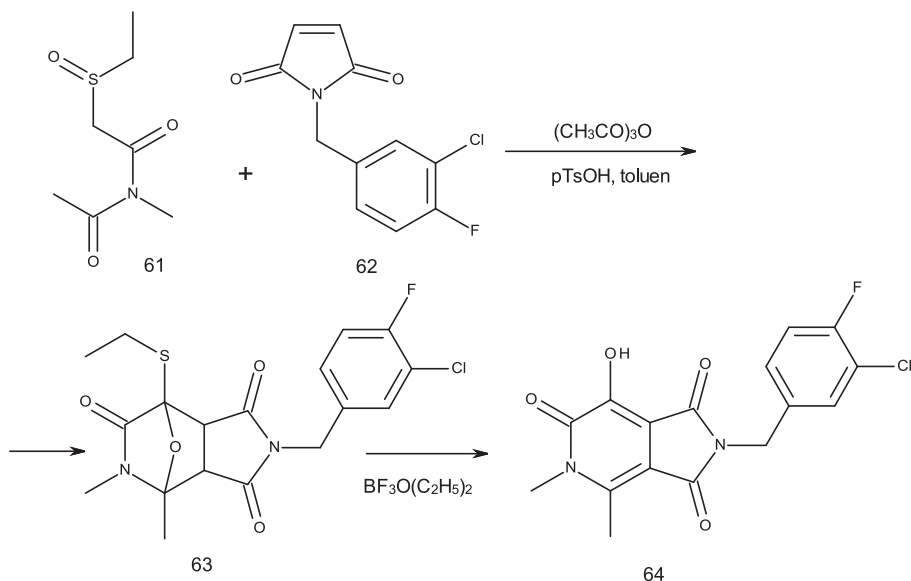
W reakcji Dielsa-Aldera imidu kwasu maleinowego (**55**) i 6-amino-3-metylo-2-metylosulfonylpirymidyn-4-onu (**56**) w acetonitrylu otrzymano bicykliczny związek przejściowy, który w wyniku przegrupowania dał 6-amino-*N*-metylo-4-metylosulfonylo-1,3-dioksopirolo[3,4-*c*]pirydyno-7-karboksamid (**57**) [25].



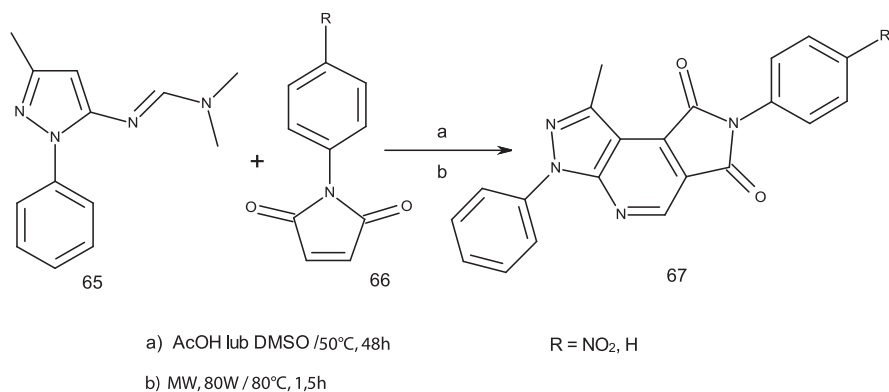
Pirol-2,5-dion (**58**) poddano reakcji cyklokondensacji z *N*-4-bromofenylo-2-(morfolin-4-ylo)cyklopent-1-eno-1-karbotioamidem (**59**) otrzymując 2-(4-bromofenylo)-6a-hydroksy-1-tioksodekahydro-1*H*-cyklopenta[*b*]pirolo[3,4-*c*]pirydino-3,5-dion (**60**) [26].



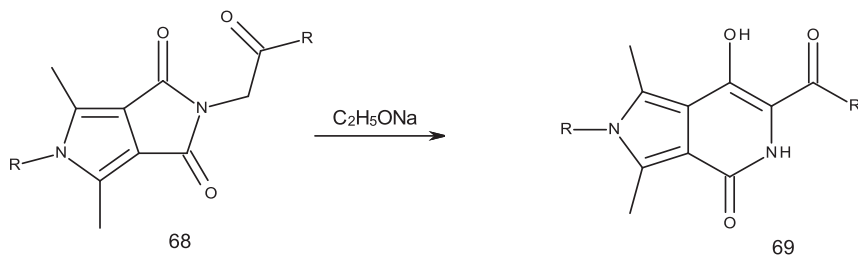
W reakcji cyklokondensacji *N*-acetylo-2-etylosulfinylo-*N*-metyloacetamidu (**61**) z 1-(3-chloro-4-fluorobenzyl)pirolo-2,5-dionem (**62**) poprzez pośredni związek **63** otrzymano 2-(3-chloro-4-fluorobenzyl)-7-hydroksy-4,5-dimetylopirolo[3,4-*c*]pirydino-1,3,6-trion (**64**) [27].



Trójcykliczne związki zawierające układ pirolo[3,4-*c*]pirydyny **67** otrzymano w wyniku heterocyklicznej reakcji Dielsa-Aldera *N,N*-dimetylo-*N'*-(1-fenyl-3-metylo-1*H*-pirazol-5-yl)imidoformamidu (**65**) z pochodnymi 1-fenylopirolo-2,5-dionu **66** w kwasie octowym lub DMSO. Ten sam produkt otrzymano w reaktorze mikrofalowym bez użycia rozpuszczalnika [10].



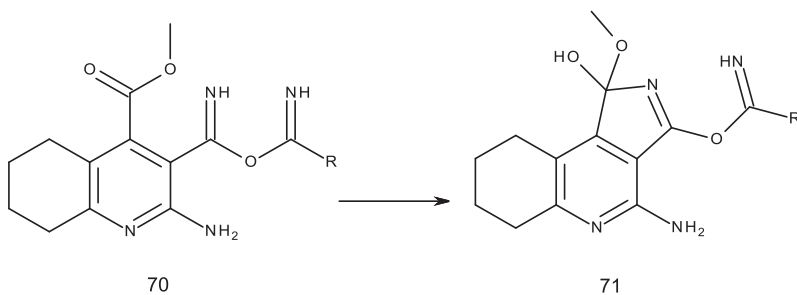
W wyniku przegrupowania pierścienia pirolowego w pochodnych 4,6-dimetylo-1,3-dioksa-1,2-dihydropirol[3,4-*c*]pirolu **68** do pirydynowego uzyskano odpowiednie pochodne pirolo[3,4-*c*]pirydyny **69** [28].



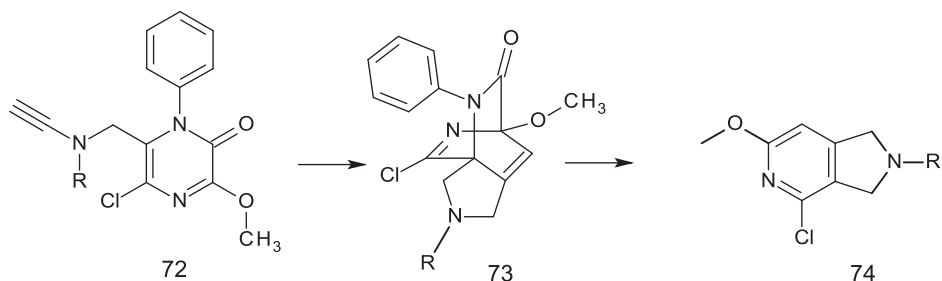
### 1.3. INNYCH SUBSTRATÓW

#### 1.3.1. z substratów cyklicznych

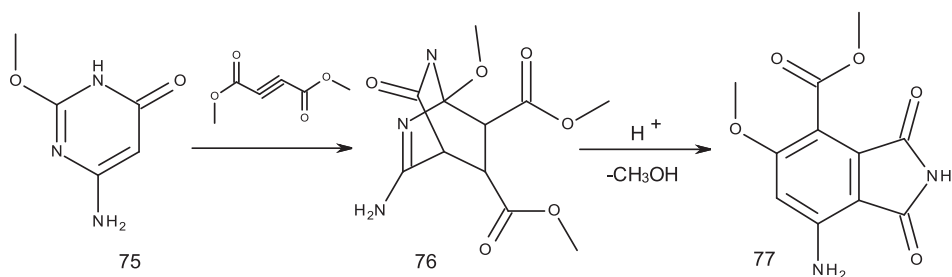
W wyniku cyklizacji pochodnych estru metylowego kwasu 2-amino-3-iminooksoimino-5,6,7,8-tetrahydrochinolino-4-karboksyowego **70** otrzymano 3-imidopochodne 4-amino-1-hydroksy-1-metoksy-6,7,8,9-tetrahydropirol[3,4-*c*]chinoliny **71** [12].



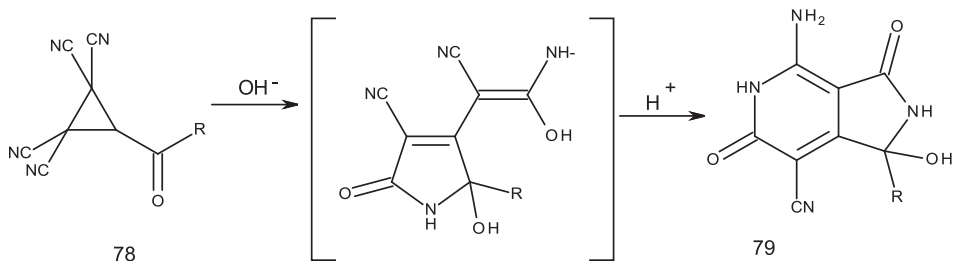
W wyniku poddania wewnątrzcząsteczkowej reakcji Diels-Aldera pochodnych 5-chloro-6-(etynyloamino)metylo-1-fenyl-3-metoksy-pirazy-2-onu **72** powstał pośredni związek **73**, z którego po przegrupowaniu otrzymano pochodne 4-chloro-6-metoksy-1,3-dihydropirol[3,4-*c*]pirydyny **74** [29].

Schemat 28  
Scheme 28

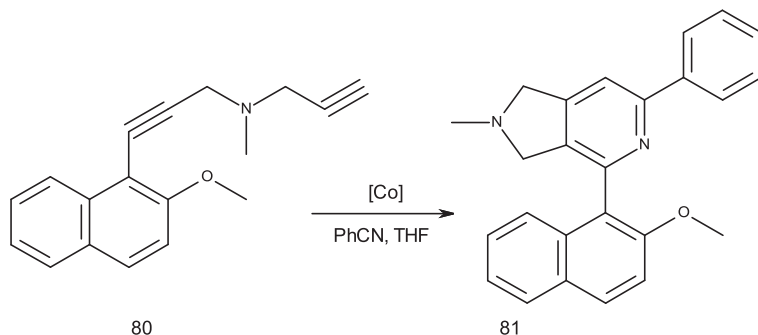
Reakcji Diels-Aldera z acetylenodikarboksylanem dimetylu (DMAD) poddano również 4-amino-2-metoksy-1H-pirymidyn-6-on (75) otrzymując przejściowy związek bicykliczny 76, który w kwaśnym środowisku uległ przegrupowaniu do estru metylowego kwasu 4-amino-6-metoksy-1,3-dioskopirolo[3,4-*c*]pirydno-7-karboksylowego (77) [30].

Schemat 29  
Scheme 29

W zasadowym środowisku przeprowadzono przegrupowanie pochodnych ketonu tetracyjanocyklopropylowego 78 do pochodnych pirolu, a następnie cyklizowano w kwasie siarkowym do 4-amino-1-hydrokso-3,6-diokso-2,3,4,6-tetrahydro-1H-pirolu[3,4-*c*]pirydno-7-karbonitrylu 79 [31].

Schemat 30  
Scheme 30

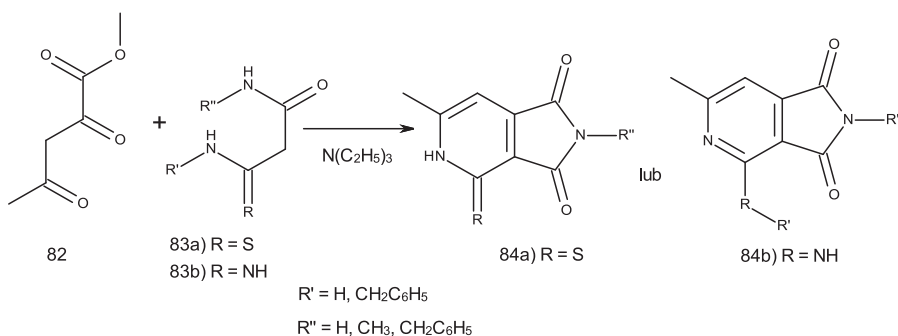
1-[3-(Prop-2-ynylo(metylo)amino)prop-1-ynylo]-2-metoksynaftalen (**80**) w reakcji cykloaddycji z benzonitrylem katalizowanej kompleksem kobaltu dał 2-(2-metoksy-1-naftylo)-*N*-metylo-6-fenylo-1,3-dihydro-1*H*-pirolo[3,4-*c*]pirydynę (**81**) [32].



Schemat 31  
Scheme 31

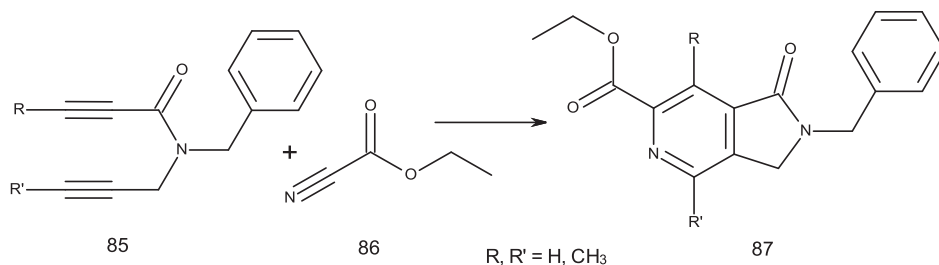
### 1.3.2. Z SUBSTRATÓW NIECYKLICZNYCH

Ester kwasu 2,4-dioksowalerianowego (**82**) w reakcji cyklokondensacji z pochodnymi malonotioamidu **83a** lub malonoamidyny **83b** dał odpowiednie pochodne 6-metylo-4,5-dihydropirolo[3,4-*c*]pirydyno-1,3-dionu **84a-b** [33].



Schemat 32  
Scheme 32

W reakcji cyklizacji niesymetrycznych dienów **85** z estrem etylowym kwasu cyjanomrówkowego (**86**) otrzymano odpowiednie pochodne estru etylowego kwasu 2-benzylo-3-oksopirolo[3,4-*c*]pirydyno-6-karboxylowego **87** [34].

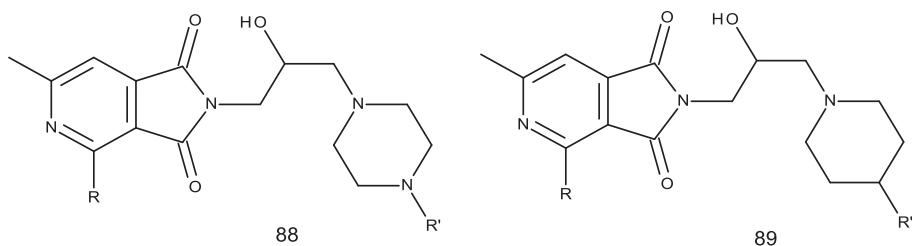


Schemat 33  
Scheme 33

## 2. AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA

Pochodne pirolo[3,4-*c*]pirydyny nie zostały dotychczas wprowadzone do lecznictwa, lecz jak wynika z przedstawionych w piśmiennictwie badań, wiele z nich wykazuje aktywność biologiczną.

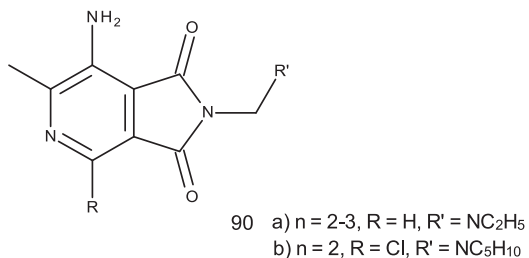
Pochodne pirolo[3,4-*c*]pirydyno-1,3-dionu okazały się być związkami o silnej aktywności przeciwbólowej. Otrzymano szereg pochodnych z podstawnikiem zawierającym pierścień piperazyny, dla których zbadano zależność aktywności analgetycznej od struktury. W zależności od zastosowanych podstawników pochodne wykazywały niższą lub wyższą aktywność przeciwbólową, jednak w większości silniejszą od ASA. Uzyskano również połączenia tego układu z pierścieniem pirydynowym w miejscu piperazyny, które okazały się jeszcze bardziej aktywne analgetycznie [35].



Rysunek 4  
Figure 4

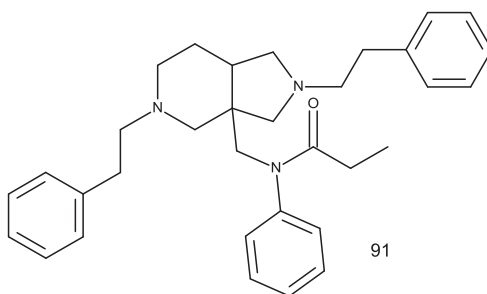
Część pochodnych związków **88-89** zawierających podstawnik metoksyłowy lub etoksyłowy w pierścieniu pirydyny ( $R = OMe, OEt$ ) wykazała również działanie uspokajające lub/i nasenne [36–38].

Działanie anestetyczne wykazały pochodne 7-amino-6-metylopirolo[3,4-*c*]pirydyno-1,3-dionu **90a-b** [39].



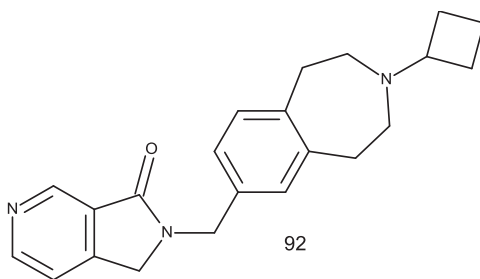
Rysunek 5  
 Figure 5

*N*-[(2,5-difenetylo-1,3,4,6,7,7a-heksahidropirol[3,4-*c*]pirydyn-3a-ylo)metylo]-*N*-fenylo-propionamid (**91**) również wykazał aktywność przeciwbólową [40].



Rysunek 6  
 Figure 6

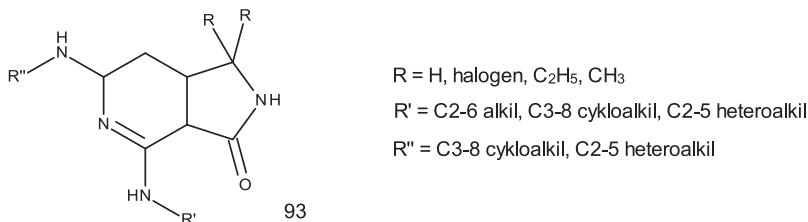
Otrzymano 2-(3-cyklobutylo-1,2,4,5-tetrahydro-3-benzazepin-7-ylo)metylo-1*H*-pirolo[3,4-*c*]pirydyn-3-on (**92**) aktywny wobec CUN [41].



Rysunek 7  
 Figure 7

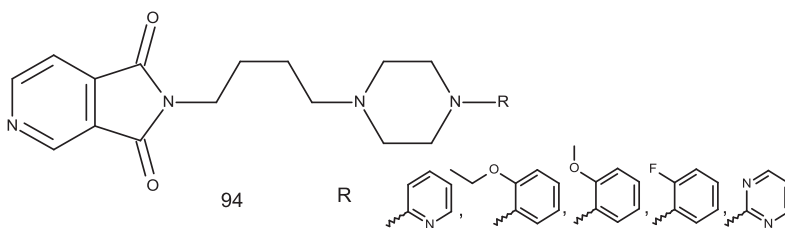
Pochodne 4,6-diaminopirolo[3,4-*c*]pirydyn-3-onu **93** działają na układ immunologiczny, w kierunku takich schorzeń jak: reumatoidalne zapalenie stawów, białaczki, nowotwory nabłonkowe [19].





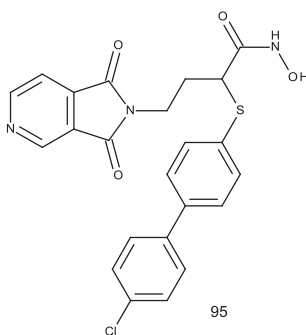
Rysunek 8  
Figure 8

Otrzymano pochodne *N*-(4-piperazynylo)butylopirolo[3,4-*c*]pirydino-1,3-dionu **94**, jako analogi buspironu o aktywności anksjolitycznej [20].



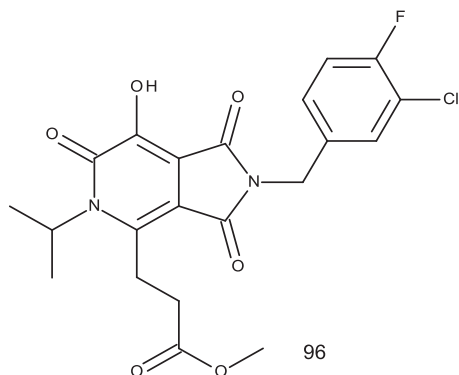
Rysunek 9  
Figure 9

Wykazano, że kwas 2-[4-(4-chlorofenylo)fenylo]sulfanylo-4-(1,3-diokspirolo[3,4-*c*]pirydyn-2-yl)butanohydroksamowy (**95**) jest inhibitorem MMP, dzięki czemu może hamować rozwój chorób naczyniowych, autoimmunologicznych i nowotworowych [42].



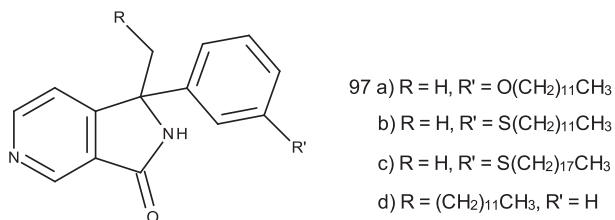
Rysunek 10  
Figure 10

Ester metylowy kwasu 3-[2-[(3-chloro-4-fluoro-fenyl)metylo]-5-izopropyl-7-hydroksy-1,3,6-trioksopirolo[3,4-c]pirydyn-4-yl]propionowego (**96**) jest inhibitorem integrazy HIV-1 [27].



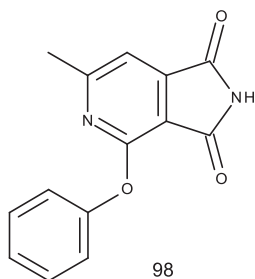
Rysunek 11  
Figure 11

Przeciwwgruźliczą aktywność wykazały pochodne 1-fenylpirolo[3,4-c]pirydyn-3-onu **97a-d** [43].



Rysunek 12  
Figure 12

6-Metylo-4-fenoksy-1H-pirol[3,4-c]pirydyno-1,3-dion (**98**) zwiększa wrażliwość adipocytów na insulinę [44].



Rysunek 13  
Figure 13

## PODSUMOWANIE

Z kilkudziesięciu przedstawionych w piśmiennictwie metod syntez, układ pirolo[3,4-*c*]pirydyny najczęściej otrzymywano z pochodnych pirydyny poprzez cyklizację sprzężonego z nim pierścienia pirolowego. Pochodne pirolo[3,4-*c*]pirydyny nie zostały do tej pory wprowadzone do leczenia, lecz jak wynika z przedstawionych w piśmiennictwie badań wiele z nich wykazuje aktywność biologiczną. Zdecydowanie największą grupę stanowią pochodne o aktywności przeciwbólowej [35, 39, 40]. Związki zawierające układ pirolo[3,4-*c*]pirydyny wykazują również działanie na układ immunologiczny [19, 42] i CUN [20, 41]. Udowodniono ich aktywność przeciwgruźliczą [43], przeciwwirusową [27] oraz przeciwnowotworową [19, 42, 45].

## PIŚMIENICTWO CYTOWANE

- [1] Y. Kawato, H. Terasawa, *Prog. Med. Chem.*, 1997, **34**, 69.
- [2] M. Kitajima, S. Yoshida, K. Yamagata, M. Nakamura, H. Takayama, K. Saito, H. Seki, N. Aimi, *Tetrahedron*, 2002, **58**, 9169.
- [3] T.R. Govindachari, K.R. Ravindranath, N. Viswanathan, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1974, 1215.
- [4] S. Gabriel, J. Colman, *Ber.*, 1902, **35**, 2832.
- [5] H. Strache, *Monatsh. fur Chem.* 1890, **11**, 142.
- [6] H.H. Fox, *J. Org. Chem.*, 1952, **17**, 547.
- [7] A. da Settimo, G. Primofiore, F. da Settimo, F. Simorini, C. LaMotta, A. Martinelli, E. Boldrini, *Eur. J. Med. Chem.*, 1996, **31**, 49.
- [8] S.M. Gadekar, J.L. Frederick, J. Semb, J. Vaughan, *J. Org. Chem.*, 1961, **26**, 468.
- [9] J. Cobo, A. Sanchez, M. Nogueras, *Tetrahedron*, 1997, **53**, 8225.
- [10] N.M. Nascimento Jr., T.C. Mendes, D.M. Leal, C.M. Correa, R.T. Sudo, G. Zapata-sudo, E.J. Barreiro, C.A. Fraga, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2010, **20**, 74.
- [11] E. Meredith, K. Beattie, R. Burgis, M. Capparelli, J. Chapo, L. DiPietro, G. Gamber, I. Enyedy, D.B. Hood, V. Hosagrahara, Ch. Jewell, K.A. Koch, W. Lee, O. Rozhitskaya, N. Soldermann, C. Springer, M. van Eis, R.B. Vega, W. Yan, Q. Zhu, L.G. Monovich, *J. Med. Chem.*, 2010, **53**, 5422.
- [12] Y. Oka, K. Itoh, A. Miyake, N. Tada, K. Omura, M. Tomimoto, S. Yurugi, *Chem. Pharm. Bull.*, 1975, **23**, 2306.
- [13] A.N. Vasiliev, Y.S. Kayukov, A.N. Lyshchikov, O.E. Nasakin, O.V. Kayukova, *Chem. Heterocycl. Comp.*, 2003, **39**, 1182.
- [14] A.N. Vasiliev, A.N. Lyshchikov, O.E. Nasakin, Y.S. Kayukov, *Chem. Heterocycl. Comp.*, 2004, **40**, 460.
- [15] R.G. Jones, *J. Am. Chem. Soc.*, 1951, **72**, 5610.
- [16] V.N. Maksimova, O.V. Ershov, K.V. Lipin, A.V. Eremkin, O.E. Nasakin, *J. Org. Chem.*, 2012, **48**, 426.
- [17] A. Wang, S. Tandel, H. Zhang, Y. Huang, T.C. Holdeman, E. Biehl, *Tetrahedron*, 1998, **54**, 3391.
- [18] T. Delaine, V. Bernardes-Genisson, B. Meunier, J. Bernardou, *J. Org. Chem.*, 2007, **72**, 675.
- [19] Y. Arikawa, Q. Dong, V. Feher, B. Jones, B. Lam, Z. Nie, C. Smith, M. Takahashi, *U.S. Pat. Appl. Publ.*, 2011, WO2011/079051 A1 20110623,46.
- [20] J. Kossakowski, T. Zawadowski, *Acta Pol. Pharm.*, 1995, **52**, 245.
- [21] I. Ahmed, G.W.H. Cheeseman, B. Jaques, *Tetrahedron*, 1979, **35**, 1145.
- [22] O. Mumm, O. Bohme, *Chem. Ber.*, 1921, **54**, 730.

- [23] E. Wagner, A. Wójcicka, I. Bryndal, T. Lis, *Polish J. Chem.*, 2009, **83**, 207.
- [24] K.R. Shah, C.D. Blanton Jr, *J. Org. Chem.*, 1982, **47**, 502.
- [25] J. Cobo, A. Sanchez, M. Nogueras, *Tetrahedron*, 1998, **54**, 5753.
- [26] A. Budzowski, M. Pitak, K. Stadnicka, *Monat. Chem.*, 2007, **138**, 1257.
- [27] X.Z. Zhao, K. Maddali, M. Metifiot, S.J. Smith, S.C. Vu, C. Marchand, S.H. Hughes, Y. Pommier, T. Burke Jr, *Chem. Biol. Drug. Des.*, 2012, **79**, 157.
- [28] W. Malinka, T. Bodalski, *Pol. J. Chem.*, 1995, **69**, 95.
- [29] K.J. Buysens, D.M. Vandenberghe, G.J. Hoornaert, *Tetrahedron*, 1996, **27**, 9161.
- [30] J.N. Low, J. Cobo, C. Garcia, M. Melguizo, M. Nogueras, A. Sanchez, C. Gildewell, *Acta Crystallogr. Sect. C*, 2001, **C57**, 597.
- [31] Y.S. Kayukov, I.N. Bardasov, O.V. Kayukova, O.V. Ershov, O.E. Nasakin, *J. Org. Chem.*, 2010, **46**, 1266.
- [32] M. Hapke, K. Kral, Ch. Fischer, A. Spannenberg, A. Gutnov, D. Redkin, B. Heller, *J. Org. Chem.*, 2010, **75**, 3993.
- [33] V.S. Barseneva, V.A. Bakulev, W. Dehaen, S. Toppet, M. Borovkova, *Tetrahedron*, 2007, **63**, 4491.
- [34] M.R. Shaaban, R. El-Sayed, A.H.M. Elwahy, *Tetrahedron*, 2011, **67**, 6111.
- [35] H. Śladowska, D. Szkatuła, B. Filipek, D. Maciąg, J. Sapa, M. Zygmunt, *Pharmazie*, 2001, **56**, 133.
- [36] H. Śladowska, B. Filipek, D. Szkatuła, A. Sabiniarz, M. Kardasz, J. Potoczek, M. Sieklucka-Dziuba, G. Rajtar, Z. Kleinrok, T. Lis, *Il Farmaco*, 2002, **57**, 897.
- [37] H. Śladowska, B. Filipek, D. Szkatuła, J. Sapa, M. Bednarski, M. Ciofkowska, *Il Farmaco*, 2005, **60**, 53.
- [38] H. Śladowska, A. Sabiniarz, D. Szkatuła, B. Filipek, J. Sapa, *Acta Pol. Pharm.*, 2006, **63**, 245.
- [39] F. Da Settimo, A.M. Marini, C. La Motta, F. Simorini, E. Luchetti, S. Bertini, *Farmaco*, 1996, **51**, 725.
- [40] X. Wu, *PCT Int. Appl.*, 2002, WO 20020613 A1 20020613.
- [41] P.K. Pooni, K.J. Merchant, C.M. Kerr, D. Harrison, *PCT Int. Appl.*, 2011, WO 2011083316 A1 20110714.
- [42] A.M. Chollet, T. Le Diguarher, N. Kucharczyk, A. Loynel, M. Bertrand, G. Trucker, N. Guilbaud, M. Burbridge, P. Pastoureau, A. Fradin, M. Sabatini, J-L. Fauchere, P. Casara, *Bioorg. Med. Chem.*, 2002, **10**, 531.
- [43] C. Deraeve, I.M. Dorobantu, F. Rebbah, F. Le Quemener, P. Constant, A. Quemard, V. Bernardes-Genisson, J. Bernardou, G. Pratiel, *Bioorg. Med. Chem.*, 2011, **19**, 6225.
- [44] L.J.S. Knutsen, A.G. Lundemose, C.B. Jeppesen, A.R. Sorensen, G.M. Danielsen, *PCT Int. Appl.*, 1999, WO, 9931098 A1 19990624.
- [45] G.W. Muller, *PCT Int. Appl.*, 1995, WO 9501348 A2 19950112.

Praca wpłynęła do Redakcji 25 stycznia 2013

# NANOPORY: BUDOWA, WŁAŚCIWOŚCI, MODELE, ZASTOSOWANIA

## NANOPORES: STRUCTURE, PROPERTIES, MODELS, APPLICATIONS

**Anna Stachiewicz, Andrzej Molski**

*Zakład Chemii Fizycznej, Wydział Chemii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza  
ul. Grunwaldzka 6, 61-606 Poznań  
e-mail: [anna.st@amu.edu.pl](mailto:anna.st@amu.edu.pl), [amolski@amu.edu.pl](mailto:amolski@amu.edu.pl)*

---

Abstract

Wprowadzenie

1. Budowa nanoporów
  - 1.1. Nanopory białkowe
  - 1.2. Nanopory syntetyczne
2. Właściwości nanoporów
  - 2.1. Prąd jonowy
  - 2.2. Translokacja biopolimerów
  - 2.3. Nanoporowa spektroskopia sił
3. Modele nanoporów
  - 3.1. Metody modelowania
  - 3.2. Prąd jonowy
  - 3.3. Translokacja biopolimerów
  - 3.4. Nanoporowa spektroskopia sił
4. Perspektywy: sekwencjonowanie DNA

Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane

---



**Mgr Anna Stachiewicz** jest doktorantką w Zakładzie Chemii Fizycznej, na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, gdzie ukończyła w 2010 roku studia. Obecnie prowadzi badania polegające m.in. na symulacjach komputerowych przepływu niewielkich cząstek przez nanopory. Celem jej pracy zastosowanie modelowania i symulacji komputerowych do wyjaśnienia eksperymentów przepływu jonów oraz translokacji biopolimerów przez nanopory.



**Prof. dr hab. Andrzej Molski** jest absolwentem Wydziału Matematyki, Fizyki i Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Od roku 2009 kieruje Zakładem Chemii Fizycznej na Wydziale Chemii. Obecnie prowadzi badania dotyczące modelowania i symulacji dynamiki procesów fizykochemicznych a w szczególności procesów badanych z rozdzielczością do pojedynczych cząsteczek. Jest członkiem Polskiego Towarzystwa Chemicznego.

## ABSTRACT

Nanopores are small (1–100 nm diameter) holes/channels formed in biological membranes (Fig. 1) or fabricated in synthetic materials (Fig. 2). Permeation of ions and small molecules through nanopores is common in biological systems. The first experiments where nanopores were used as single-molecule sensors were performed in the 90s [1, 2]. The detection principle is based on a monitoring of an ionic current passing through a nanopore as an electric field is applied across the membrane. Electrically charged particles (e.g. DNA) move in the electric field and block the ionic current as they pass through the nanopore. A sudden drop of the ionic current signals a single-molecule translocation event (Fig. 3–5). Nanopore sensors can give an information about the analyte: its size, structure and bonds stability. Today, a major topic of interest is the possibility of nanopore DNA sequencing.

In this work we present an introduction to nanopore technology and to current research related to potential nanopore applications. First, we describe biological and synthetic nanopores: their structure and methods of fabrication. Next, different modes of nanopore experiments are presented. In the third section, we focus on theoretical models and simulations of nanopores. Finally, we present future perspectives for applications with particular reference to DNA sequencing.

Keywords: nanopores, ion current, (bio)-polymer translocation, Poisson-Boltzmann equation, Poisson-Nernst-Planck equation, molecular dynamics

Słowa kluczowe: nanopory, prąd jonowy, translokacja (bio)-polimerów, równanie Poissona-Boltzmann, równanie Poissona-Nernsta-Plancka, dynamika molekularna

---

---

## WPROWADZENIE

Nanopory są niewielkimi otworami (średnica rzędu 1–100 nm) w błonach biologicznych (np. kanały jonowe, Rys. 1) lub wytworzonymi w membranach syntetycznych (Rys. 2). Przepływ jonów i translokacja biocząsteczek przez nanopory są powszechnymi zjawiskami w układach biologicznych. W roku 1991 Bertowi Sakmannowi i Erwinowi Neherowi przyznano Nagrodę Nobla z medycyny za opracowanie i wykorzystanie metody pomiaru prądu jonowego w kanałach jonowych.

Pierwsze udane eksperymenty wykorzystujące właściwości kanałów jonowych do badania przepływającego przez niego analitu przeprowadzone zostały w latach dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku [1, 2]. Idea tych eksperymentów oparta jest na koncepcji licznika Coultera [3], urządzenia skonstruowanego w latach pięćdziesiątych służącego do pomiaru liczby oraz objętości cząstek, np. komórek, bakterii lub wirusów, umieszczonych w elektrolicie. Układ pomiarowy składa się z dwóch komór wypełnionych elektrolitem, oddzielonych przegrodą z otworem o średnicy niewiele większej od średnicy cząstek analitu. Za pomocą elektrod umieszczonych w komorach przykładane jest napięcie elektryczne, powodujące przepływ jonów przez otwór. Jeżeli w otworze znajdzie się cząstka analitu, ruch jonów zostaje częściowo zablokowany co powoduje, że wartość mierzonego prądu jonowego maleje.

W przypadku badań nanoporów układ pomiarowy wygląda analogicznie. Pod wpływem przyłożonego pola elektrycznego cząsteczki posiadające ładunek elektryczny poruszają się w kierunku elektrody o ładunku przeciwnym. Jeżeli znajdują się w nanoporze, następuje spadek mierzonego prądu jonowego (Rys. 3–5). Wartość mierzonego prądu zależy od przyłożonego napięcia, geometrii i statycznego ładunku elektrycznego na powierzchni nanoporu. Analiza wartości skoków prądu oraz ich czasu trwania pozwala na uzyskanie informacji na temat analitu, jego rozmiarów, struktury a nawet trwałości wiązań. Eksperymenty z wykorzystaniem nanoporów cieszą się zainteresowaniem m.in. ze względu na możliwość zastosowania w sekwencjonowaniu DNA [4].

W ostatnich latach ukazał się szereg prac przeglądowych omawiających różne aspekty badań i zastosowań nanoporów [4–10]. Niniejsza praca omawia budowę i podstawowe właściwości nanoporów, a także podaje przykłady modeli teoretycznych, które pozwalają zrozumieć wyniki eksperymentalne dotyczące przepływu jonów i translokacji polimerów.

Rysunki przedstawione w niniejszej pracy zostały wykonane na podstawie symulacji komputerowych oraz wizualizacji wykonanych w grupie badawczej dynamiki procesów fizykochemicznych Wydziału Chemii UAM.



## 1. BUDOWA NANOPORÓW

### 1.1. NANOPORY BIAŁKOWE

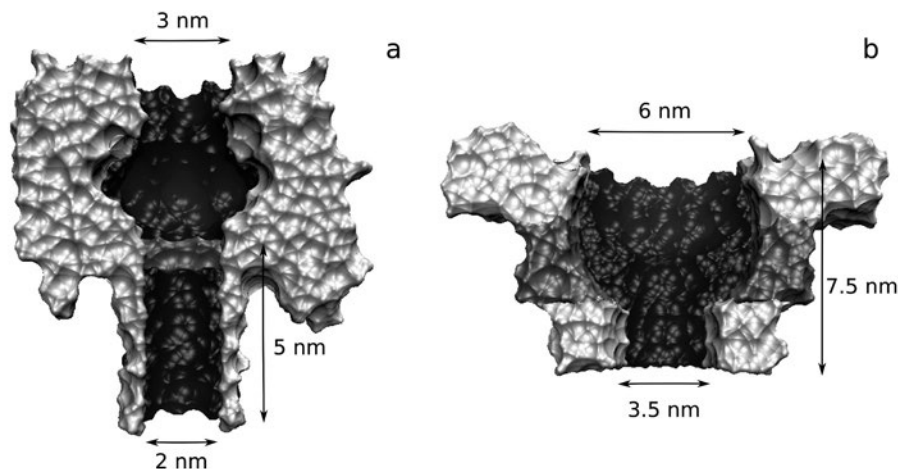
W organizmach żywych występuje wiele rodzajów białkowych nanoporów, regulujących przepływ jonów i cząsteczek do wewnątrz i na zewnątrz komórki. Odgrywają one kluczową rolę w komunikacji zarówno między komórkami, jak i poszczególnymi organellami. Aby nanopor białkowy mógł być stosowany w eksperymentach *in vitro* translokacji biopolimerów, musi spełniać szereg warunków. Po pierwsze, nanopor nie powinien wykazywać dużych fluktuacji prądu jonowego. Po drugie, wymiary nanoporu powinny być odpowiednie dla średnicy analizowanego biopolimeru, aby umożliwić jego translokację. Po trzecie, struktura nanoporu powinna być znana, co umożliwi modyfikacje bez utraty funkcjonalności.

Jeden z pierwszych eksperymentów ukazujących nanopory jako detektory translokacji pojedynczych cząsteczek został przeprowadzony w 1994 roku z użyciem alametycyny [2]. Do najczęściej badanych układów należą konektor phi29 [11] oraz, przede wszystkim, alfa-hemolizyna [1].

#### 1.1.1. Alfa-hemolizyna

Alfa-hemolizyna jest naturalnym kompleksem białkowym wydzielanym przez bakterie *Staphylococcus aureus*. Cząsteczka hemolizyny umieszczona w dwuwarstwie lipidowej, tworzy stabilną strukturę o charakterystycznym, podobnym do grzyba kształcie (Rys. 1a). Cząsteczka hemolizyny składa się z siedmiu identycznych monomerów ułożonych symetrycznie, tworzących wewnątrz kanał o zmiennej średnicy od 1,4 do 4,6 nm. Kanał przebiegający wzdłuż całej cząsteczki, umożliwia przenikanie wody, jonów i niewielkich biocząsteczek. W organizmach żywych, wydzielane przez bakterie monomery alfa-hemolizyny tworzą kanał w błonie zaatakowanej komórki, powodując niekontrolowany przepływ substancji z i do jej wnętrza, doprowadzając w końcu do apoptozy [12].

Dla pH 7-9 i w stałej temperaturze natężenie prądu jonowego płynącego przez alfa-hemolizynę jest bardzo stabilne, np. dla 1M KCl i napięcia 120 mV wynosi ok. 120 pA, zaś wahania natężenia są poniżej 2% [13]. W roku 1996 Kasianowicz wraz ze współpracownikami [1] przeprowadzili pierwszy eksperyment translokacji jednoniciowego DNA oraz RNA przez nanopor utworzony przez alfa-hemolizynę umieszczoną w dwuwarstwie fosfolipidowej. Stwierdzono, iż pomiar prądu jonowego umożliwia wyznaczenie długości biopolimeru.



Rysunek 1. (a) Przekrój poprzeczny cząsteczki alfa-hemolizyny. (b) Przekrój poprzeczny cząsteczki konektora phi29

Figure 1. (a) Cross-section of the alpha-hemolysin molecule. (b) Cross-section of the phi29 connector molecule

### 1.1.2. Konektor phi29

Genomy wirusów znajdują się w białkowych otoczkach zwanych kapsydami. Do utworzenia kapsydu, a także do transportu DNA lub RNA do jego wnętrza potrzebna jest energia uzyskiwana z hydrolizy ATP. Transport odbywa się przez nanopor zwany konektorem phi29 [14].

Konektor phi29 (Rys. 1b), ma kształt stożka, składa się z 12 identycznych monomerów ułożonych symetrycznie wokół nanoporu o średnicy od 3,6 do 6,0 nm i długości ok. 7,5 nm. Powierzchnia cząsteczki w górnej i dolnej części jest hydrofilowa, pomiędzy nimi znajduje się pasmo hydrofobowe [15]. Po modyfikacji struktury w taki sposób, aby zwiększyć hydrofilowość jej górnej i dolnej części, możliwe staje się umieszczenie cząsteczki w dwuwarstwie lipidowej. Otrzymany w ten sposób układ wykazuje stabilną i powtarzalną przewodność [11]. Ze względu na większą średnicę nanoporu, możliwa jest translokacja większych cząsteczek niż przez alfa-hemolizynę, np. dwuniciowego DNA i niektórych białek.

## 1.2. NANOPORY SYNTETYCZNE

Wraz z postępem w nanotechnologii, coraz większym zainteresowaniem cieszą się nanopory syntetyczne, które są bardziej odporne chemicznie, termicznie i mechanicznie niż nanopory białkowe a także mogą być stosowane w szerokim zakresie pH i napięcia. Metody produkcji nanoporów syntetycznych są wciąż udoskonalane, umożliwiając wytwarzanie na masową skalę nanoporów o różnej śred-

nicy, długości i kształcie (Rys. 2). Do najczęściej stosowanych materiałów należą: polimery, azotek krzemu ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ), tlenki krzemu ( $\text{SiO}_2$ ) i glinu ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), oraz – od niedawna – grafen.

### 1.2.1. Polimery

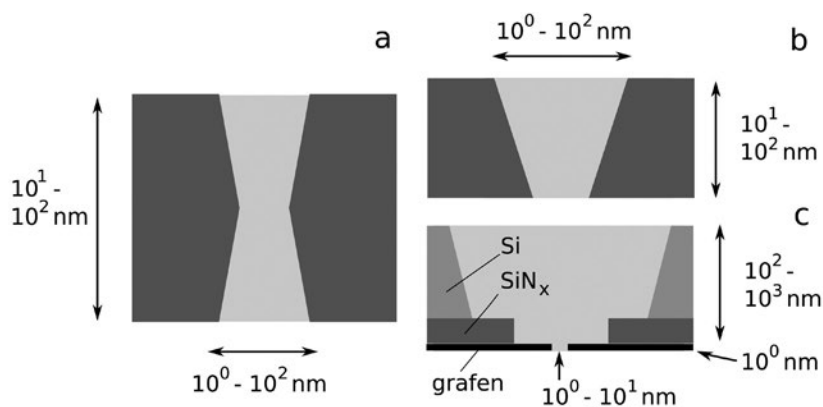
W materiałach polimerowych nanopory wytwarzane są metodą wytrawiania chemicznego. Najpierw membrana bombardowana jest ciężkimi jonami (najczęściej wykorzystywane pierwiastki to Xe, Pb, Au i U) o bardzo wysokiej energii (giga eV), co powoduje uszkodzenie jej powierzchni. Następnie membranę umieszcza się pomiędzy dwiema komorami z elektrodami, wypełnionymi odpowiednio roztworami: kwasu lub soli i silnej zasady. Pod wpływem prądu elektrycznego następuje żłobienie powierzchni membrany od strony zasady, a po przewierceniu jej na wylot następuje zetknięcie obu roztworów i ich zobojętnienie. W przypadku tereftalanu polietylenu [16] oraz poliwęglanu [17] stosowany jest słaby kwas i NaOH, w przypadku poliimidu [18] – KI i NaOCl.

### 1.2.2. Półprzewodniki

Nanopory w cienkich membranach z materiałów półprzewodnikowych wytwarzane są kilkoma metodami. Jedna z nich [19] polega na żłobieniu nanoporu w azotku krzemu za pomocą strumienia jonów  $\text{Ar}^+$  o dużej energii (rzędu kilku keV). Pozwala ona na uzyskanie otworów o średnicy nawet 1,5 nm.

Wiercenie nanoporów w membranie może też nastąpić przy użyciu strumienia elektronów emitowanych przez TEM (elektronowy mikroskop transmisyjny). Metoda ta umożliwia uzyskanie otworów rzędu kilku nanometrów w cienkich i ultracienkich (nawet 10 nm [20]) membranach wykonanych z azotku krzemu, tlenku krzemu, tlenku glinu lub krzemu poddanego utlenieniu. Wytworzony nanopor ma kształt klepsydry lub dwóch połączonych stożków. Zaletą metody z wykorzystaniem TEM jest możliwość sprawdzania wymiarów nanoporu już w trakcie jego wytwarzania.

Do materiałów krzemowych stosuje się żłobienie i wytrawianie metodami chemicznymi [21].



Rysunek 2. Przykładowe kształty i rozmiary nanoporów syntetycznych. (a) Nanopor symetryczny w kształcie podwójnego stożka. (b) Nanopor asymetryczny o kształcie pojedynczego stożka. (c) Nanopor grafenowy

Figure 2. Examples of shapes and dimensions of synthetic nanopores. (a) Symmetric double-conical nanopore. (b) Asymmetric conical nanopore. (c) Graphene nanopore

### 1.2.3. Grafen

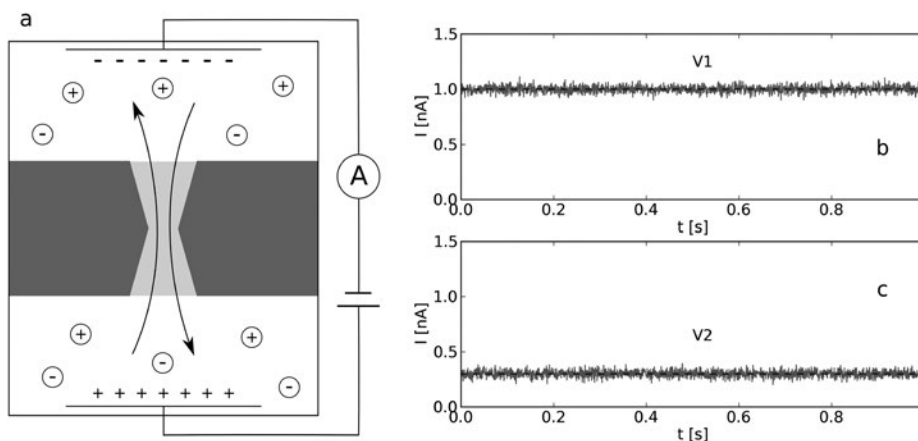
W ostatnich latach popularność zyskały nanopory w grafenie, ultracienkiej membranie o grubości jednego atomu (poniżej 1 nm). Metoda wytwarzania, użyta po raz pierwszy w roku 2008, polegała na umieszczeniu grafenu na membranach z azotku krzemu, a następnie wywierceniu w nich otworów przy pomocy TEM [22]. Uzyskane nanopory (o średnicy 2–25 nm) odznaczają się dużą wytrzymałością.

Nanopory grafenowe badane są głównie pod kątem możliwości wykorzystania w sekwencjonowaniu DNA, zwłaszcza, że grubość pojedynczej warstwy jest porównywalna z odległością między nukleotydami. Przeprowadzone dotychczas eksperymenty [23–25] wykazują jednak, że translokacja DNA następuje zbyt szybko, by możliwy był pomiar natężenia strumienia jonów dla pojedynczych nukleotydów i konieczne są dalsze modyfikacje, pozwalające na spowolnienie ruchu cząsteczki.

## 2. WŁAŚCIWOŚCI NANOPORÓW

### 2.1. PRĄD JONOWY

Jednym z najważniejszych parametrów nanoporu jest jego przewodność elektryczna. Nanopor umieszczony jest pomiędzy dwoma izolowanymi elektrycznie pojemnikami z elektrolitem, w każdym z nich umieszczona jest elektroda, np. Ag/AgCl (Rys. 3). Stężenie roztworu (np. KCl) jest dużo wyższe niż fizjologiczne, często rzędu 1 M.



Rysunek 3. (a) Schemat układu do pomiaru prądu jonowego w nanoporze podczas przepływu jonów pod wpływem przyłożonego napięcia. (b, c) Przykład sygnału rejestrowanego dla dwóch różnych napięć  $V_1 > V_2$

Figure 3. (a) Scheme of a setup for measuring the ion current in a nanopore during ion flow under applied voltage. (b, c) Example of a signal registered for two different voltages  $V_1 > V_2$

Mierzona zależność natężenia prądu od przyłożonego napięcia zależy od geometrii nanoporu, a ta z kolei – od sposobu jego wytworzenia. Nanopory półprzewodnikowe wykonane przy pomocy TEM wykazują liniową zależność natężenia od napięcia [20], obserwowaną dla szerokiego zakresu stężeń [26], co sugeruje, że badane nanopory są symetryczne. Na podstawie zależności przewodności od średnicy nanoporu stwierdzono, że ich kształt jest zbliżony do kształtu symetrycznego podwójnego stożka [27].

Przewodność nanoporów zależna jest także od ładunku powierzchniowego. Ładunek powierzchniowy nanoporów nieorganicznych jest stosunkowo niewielki, np. dla  $\text{Si}_3\text{N}_4$  wynosi około  $0,1 \text{ e/nm}^2$  [28]. Dla nanoporów z politereftalanu etylenu o niesymetrycznym kształcie pojedynczego stożka i powierzchniowym ładunku elektrycznym rzędu  $1 \text{ e/nm}^2$  natężenie prądu wzrasta z napięciem w sposób nieliniowy, oraz preferowany jest ruch kationów w kierunku od wąskiej do szerokiej części nanoporu [16].

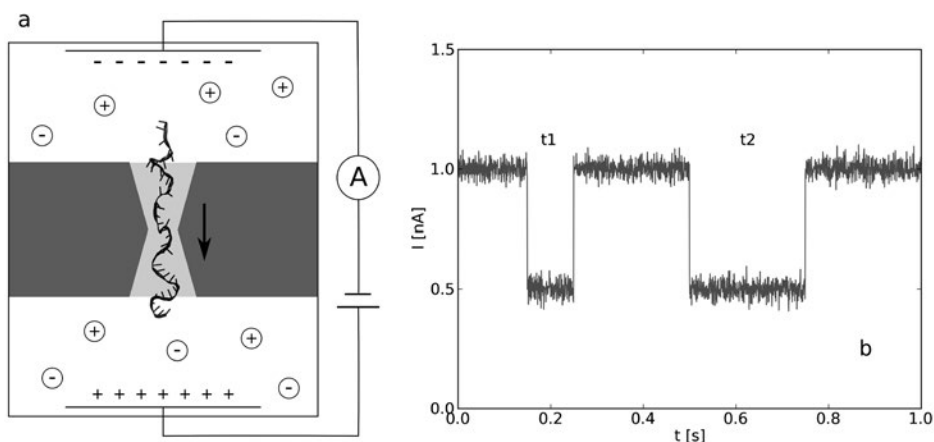
W przypadku azotku krzemu ściany nanoporu są naładowane ujemnie, co powoduje zmniejszenie ruchliwości kationów, szczególnie tych znajdujących się w pobliżu, dlatego też efekt ten jest szczególnie widoczny dla dużych stężeń roztworu [28]. Podobne zachowanie obserwowane jest dla nanoporów z tlenku krzemu [27]. W przeciwieństwie do materiałów krzemowych, ścianki nanoporów wykonanych z tlenku glinu naładowane są dodatnio, dlatego też powodują zmniejszenie ruchliwości jonów oraz spowolnienie ruchu cząsteczek obdarzonych ładunkiem ujemnym, jak np. DNA [29].

Ładunek powierzchniowy jest przyczyną selektywności nanoporów polimero- wych: w przypadku ładunku ujemnego, kationy oddziałują ze ściankami nanoporu

i mierzony prąd dla napięć ujemnych (anoda umieszczona po stronie szerszego ujęcia nanoporu) jest większy niż dla dodatnich (anoda umieszczona po stronie węższego ujęcia nanoporu). Jeżeli jednak użyte zostaną kationy wielowartościowe, np.  $\text{Ca}^{2+}$  lub  $\text{Co}^{3+}$ , w wyniku oddziaływań przyciągających ze ściankami nanoporu może ich być w jego wnętrzu na tyle dużo, że całkowity lokalny ładunek stanie się dodatni (tzw. inwersja ładunku) i mierzony prąd będzie przyjmował większe wartości dla napięć dodatnich [30].

## 2.2. TRANSLOKACJA BIOPOLIMERÓW

Nanopory, ze względu na swoją niewielką średnicę, umożliwiają badanie przemieszczających się przez nie pojedynczych cząsteczek. W typowym eksperymencie do membrany z nanoporem, rozdzielającej dwie komory, za pomocą pary elektrod przykładane jest napięcie elektryczne. Ponieważ w komorach znajduje się elektrolit o wysokiej sile jonowej, nawet niewielkie napięcie rzędu 0,1 V wiąże się z powstaniem w nanoporze silnego pola elektrycznego, które powoduje translokację cząsteczki przez otwór. Jeśli w nanoporze znajduje się biopolimer, blokuje on częściowo przepływ jonów, co jest widoczne na otrzymanej trajektorii natężenia prądu jonowego (Rys. 4). Analiza rozkładu czasu, przez jaki cząsteczki blokowały nanopor, pozwala na uzyskanie informacji o ich strukturze [1].



Rysunek 4. (a) Schemat układu do pomiaru prądu jonowego w nanoporze podczas translokacji polimeru pod wpływem napięcia. (b) Przykład rejestrowanego sygnału

Figure 4. (a) Scheme of a setup for measuring the ion current in a nanopore during polymer translocation under applied voltage. (b, c) Example of the registered signal

Eksperymenty z zastosowaniem nanoporów dotyczyły translokacji między innymi: glikolu polietylenowego [2], jonów metali [30], związków kompleksowych [31] a przede wszystkim polinukleotydów [1] i polipeptydów [32].

Kinetyka translokacji biopolimeru zależy od wielu czynników. Szybkość translokacji zwiększa się wraz ze wzrostem średnicy nanoporu, jednak nie w sposób liniowy, lecz logarytmiczny. Oznacza to, że ruch cząsteczki spowalniany jest, oprócz lepkości, także przez oddziaływania ze ściankami nanoporu [33]. Im dłuższy biopolimer, tym dłuższy czas przebywania w nanoporze. Zależność ta również ma charakter logarytmiczny, co również wiąże się z oddziaływaniami cząsteczka – ścianki nanoporu. W przypadku długich łańcuchów wpływ mają także siły działające na zewnątrz nanoporu, zarówno pomiędzy fragmentami polimeru jak i między anionem a membraną [33]. Kluczowa rola oddziaływań międzycząsteczkowych potwierdzona została również eksperymentami przeprowadzonymi dla różnych temperatur, które wykazały, że czas translokacji zmienia się w inny sposób niż wynikałoby to jedynie ze zmian lepkości rozpuszczalnika [33].

Innym ważnym czynnikiem wpływającym na szybkość translokacji jest stężenie elektrolitu. Dzieje się tak w wyniku oddziaływań biopolimeru posiadającego ładunek z jonami o przeciwnym znaku. Na przykład w przypadku DNA o ładunku ujemnym, pole elektryczne wywołujące jego ruch przez nanopor jednocześnie powoduje przepływ kationów w kierunku przeciwnym, co spowalnia translokację. Tak więc wypadkowa szybkość translokacji rośnie wraz ze wzrostem stężenia elektrolitu, jednak efekt ten jest łagodzony przez obecność oddziaływań z poruszającymi się przeciwnie jonami, powodującymi zmniejszenie efektywnego pola elektrycznego [34].

Do najczęściej badanych polimerów organicznych należy glikol polietylenowy (PEG), ze względu na swoje wymiary: średnica cząsteczki umożliwia jej translokację przez alfa-hemolizynę [35, 36]. Po wprowadzeniu PEG do układu, wartości przewodności zmalały, a zmierzona amplituda szumu wzrosła, co świadczy o interakcji cząsteczek PEG z nanoporem [2]. W przypadku alfa-hemolizyny zaobserwowano, że czas przebywania cząsteczki polimeru w nanoporze rośnie wraz z jej długością, od pewnego momentu jednak zaczyna maleć, co powiązano z oddziaływaniem wywieranym przez znajdującą się na zewnątrz częśćią molekuly [35].

Ponieważ średnica nanoporów białkowych umożliwia jedynie translokację polipeptydów i białek po denaturacji, stosowane są głównie nanopory syntetyczne. Za ich pomocą zmierzono objętość między innymi surowiczej albuminy wołowej, owoalbuminy, awidyny, streptawidyny i gonadotropiny kosmówkowej [32], [37]. Możliwe jest także wyznaczenie ładunku, jaki posiada cząsteczka białka, np. w zależności od pH roztworu [38]. Ponieważ objętość molekuly przyjmuje różne wartości dla stanu natywnego, częściowo i całkowicie rozplecionego, można rozróżnić poszczególne konformacje [39]. Za pomocą nanoporów wyznaczana jest także liczba ligandów przyłączonych do cząsteczki białka oraz stała dysocjacji takiego wiązania. Przeprowadza się w tym celu pomiary dla białek przed i po dodaniu ligandu, a z nich możliwe jest wyznaczenie objętości białka lub kompleksu oraz ich stężenia [40].

W ostatnich latach przeprowadzane są eksperymenty translokacji DNA przez nanopor. Pierwsze wyniki, dla alfa-hemolizyny, zostały opublikowane w 1996 roku

przez zespół Kasianowicza [1]. Zaobserwowano, że liczba skokowych spadków natężenia prądu (blokad) rosła wraz ze stężeniem DNA w roztworze, czas blokady nanoporu był proporcjonalny do długości badanej cząsteczki, a amplituda prądu jonowego zależała od rodzaju nukleotydów, z których zbudowany był biopolimer [1]. W przypadku nanoporów syntetycznych, po odpowiednim dobraniu średnicy otworu, możliwe jest badanie zarówno jedno- jak i dwuniciowego DNA. W obu przypadkach kinetyka translokacji zależy od przyłożonego napięcia, długości i konformacji fragmentu DNA [41].

### 2.3. NANOPOROWA SPEKTROSKOPIA SIŁ

Spektroskopia sił polega na badaniu zachowania biocząsteczek pod wpływem działania zewnętrznej siły. Zaletą nanoporowej spektroskopii sił (NFS) jest możliwość przeprowadzania eksperymentu bez uprzedniego poddawania analitu chemicznym modyfikacjom ani unieruchamiania go, jak to ma miejsce w atomowej spektroskopii sił AFM.

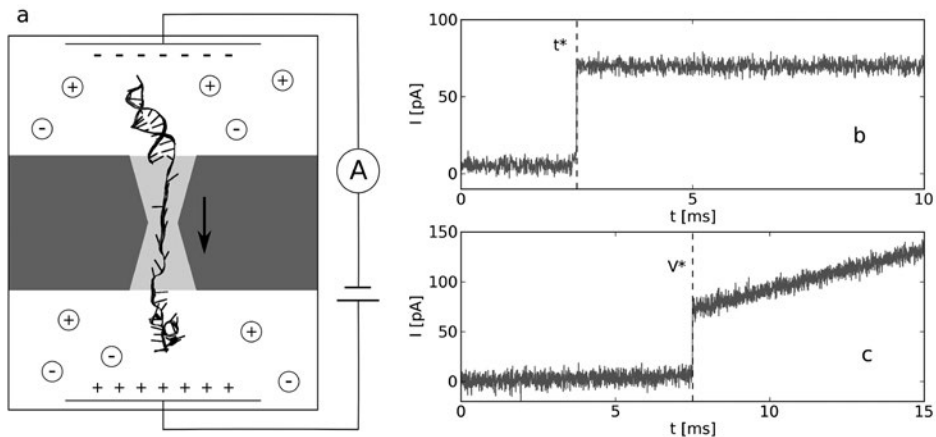
NFS umożliwia badanie cząsteczek, które składają się z dwóch części o różnej średnicy, przy czym tylko węższa może przemieścić się przez nanopor. Ponieważ szersza część nie może przedostać się przez nanopor, powstają naprężenia mechaniczne pomiędzy obiema częściami molekuly, które mogą doprowadzić do zmiany struktury np. do rozpadu kompleksu DNA-białko lub rozplecenia spinki DNA.

Układ pomiarowy jest podobny jak układu stosowanego w przypadku translokacji biopolimeru. Eksperymenty nanoporowej spektroskopii sił przeprowadzane są na dwa sposoby [42]. Po przyłożeniu niewielkiego napięcia początkowego obserwuje się przepływ prądu jonowego i oczekuje się na moment skokowego spadku prądu (blokady), świadczącym o tym, że jakaś cząsteczka dostała się do wnętrza nanoporu. Następnie, przykłada się albo zwiększone napięcie o stałej wartości (rzędu kilkudziesięciu do kilkuset mV), lub też przykłada się napięcie rosnące liniowo (1–10 V/s). Mierzac prąd oczekuje się na zdarzenie polegające na skokowym wzroście prądu (Rys. 5), co jest interpretowane jako odblokowanie nanoporu np. w wyniku dysocjacji kompleksu, którego jeden fragment opuszcza nanopor. Rejestrowany jest czas blokady nanoporu (rzędu ms) lub wartość napięcia krytycznego (rzędu  $10^2$  mV), przy którym nastąpił skokowy wzrost prądu. Po zajściu zdarzenia napięcie jest obniżane do czasu, aż nastąpi blokada nanoporu przez kolejną cząsteczkę. W eksperymencie rejestruje się wiele (np. kilkaset) zdarzeń, a uzyskane wartości czasów blokady lub napięć krytycznych poddawane są dalszej analizie [42].

Do najczęściej badanych układów należą kompleksy DNA z białkami [32] oraz spinki DNA [43] w nanoporach zarówno syntetycznych, jak i alfa-hemolizynie. DNA używane jest nie tylko ze względu na jego ważną rolę w biologii i biotechnologii, ale też znaczny ładunek ujemny, który ułatwia jego umieszczenie w polu elektrycznym nanoporu. W zależności od badanego układu, odpowiednio dobierana jest średnica otworu. Dla kompleksów DNA z enzymami jest to ok. 3,0 nm, ponieważ średnica



jest na tyle duża, aby mogło się przemieścić dwuniciowe DNA, a jednocześnie zbyt mała aby przepuścić część białkową. W przypadku badania spinek DNA średnica nanoporu to ok. 2,0 nm, co pozwala na translokacje pojedynczej nici DNA, a jednocześnie zatrzymuje np. podwójną helisę [43].



Rysunek 5. (a) Schemat układu do pomiaru prądu jonowego w nanoporze podczas rozplatania spinki DNA pod wpływem napięcia. (b) Przykład sygnału rejestrowanego dla stałego napięcia. (c) Przykład sygnału rejestrowanego dla rosnącego liniowo napięcia

Figure 5. (a) Scheme of a setup for measuring the ion current in a nanopore during hairpin DNA unzipping under applied voltage. (b) Example of a signal measured under constant voltage. (c) Example of a signal measured under voltage ramp

Kompleksy DNA z enzymami badane są ze względu na potencjalne zastosowania w wykrywaniu mutacji DNA. Przykładem mogą być dwa enzymy restrykcyjne: EcoRI (wyzolowana z *E. coli*) oraz BamHI (wyzolowana z *Bacillus amyloliquefaciens*), rozcinające DNA w miejscach o określonej sekwencji nukleotydów w obecności jonów  $Mg^{2+}$ . Kompleks enzymu z DNA dysocjuje w nanoporze, jeśli napięcie jest odpowiednio wysokie. Wykazano, że wartość napięcia krytycznego zależy od zastosowanego enzymu [44] oraz jest silnie skorelowana z sekwencją nukleotydów, nawet pojedyncza mutacja powoduje jej obniżenie [44, 45].

Rozplatanie DNA ma miejsce podczas licznych procesów biologicznych, takich jak np. replikacja DNA, transkrypcja i interferencja RNA. Eksperymenty nanoporowej spektroskopii sił pomagają określić mechanizm tego typu procesów. W roku 2003 przeprowadzono pierwszy eksperyment z użyciem alfa-hemolizyny oraz dwuniciowego DNA [43]. Zaobserwowano, że dwuniciowego DNA ulega rozpleceniu i tylko jedna z nici przemieściła się przez nanopor. Eksperymenty przeprowadzone dla trzech różnych struktur spinek DNA i dla szerokiego zakresu napięć wykazały, że rozkład czasów rozplatania można opisać funkcją wykładniczą, co wskazuje na kinetykę reakcji pierwszego rzędu dla procesu rozplatania [46]. W badaniach z nanoporami syntetycznymi można określić wpływ średnicy otworu na kinetykę procesu. Poniżej średnicy 1,0 nm translokacja nie następuje, a dla szerszych nano-

porów rozplatanie następuje powyżej napięcia krytycznego. Jeżeli średnica wynosi więcej niż około 1,5 nm, wartość napięcia krytycznego rośnie, co zinterpretowano jako translokację zniekształconej helisy, kiedy przez nanopor przemieszczają się obie nici jednocześnie [47].

### 3. MODELE NANOPORÓW

#### 3.1. METODY MODELOWANIA

Modele nanoporów można podzielić na modele fenomenologiczne, które nie uwzględniają struktury molekularnej nanoporu, elektrolitu i membrany oraz modele molekularne uwzględniające dyskretny charakter jonów, atomów i molekuł tworzących układ nanoporowy. Wśród modeli fenomenologicznych można wyróżnić modele stochastyczne stosowane do opisu losowych rozkładów czasu blokady i napięcia krytycznego w nanoporowej spektroskopii sił oraz modele ciągłe wykorzystując równania makroskopowe Poissona, Boltzmanna i Nernsta dla obliczenia (zwykle numerycznego) przestrzennego rozkładu potencjału, gęstości ładunku, natężenia prądu jonowego, selektywności i innych wielkości charakteryzujących nanopor. Modele molekularne opisują układ na różnych poziomach szczegółowości: pełnym (ang. *all-atom*) lub uproszczonym (ang. *coarse-grained*), wykorzystując symulacje komputerowe dynamiki molekularnej do wyznaczenia właściwości nanoporów. Metoda dynamiki molekularnej może być zastosowana w przypadkach gdy opis za pomocą równań makroskopowych jest nieadekwatny, np. dla bardzo wąskich nanoporów [48].

##### 3.1.1. Modele stochastyczne

Modele stochastyczne opisują translokacje i rozplatanie polimeru w nanoporze jako błądzenie przypadkowe lub dyfuzję po powierzchni energii swobodnej. Najpierw definiowana jest dyskretna (lub ciągła) współrzędna translokacji lub rozplatania i konstruowana jest powierzchnia potencjału średniej siły  $U$  uwzględniająca obecność (stałego lub zmiennego) potencjału zewnętrznego. Współrzędną procesu może być np. liczba nukleotydów po stronie *trans* nanoporu lub liczba rozplecionych par nukleotydów. Dla dyskretnej współrzędnej  $m$  losowy skok w kroku czasowym  $\Delta t$  do wartości  $m+1$  lub  $m-1$  następuje zgodnie ze stosowaniem dobranymi stałymi szybkości  $k_+(m)$  i  $k_-(m)$ , zależnymi od wartości potencjału średniej siły  $U(m-1)$ ,  $U(m)$ ,  $U(m+1)$  [49, 50]. Dla ciągłej współrzędnej  $x$ , wartość w momencie  $t + \Delta t$  obliczana jest zgodnie z równaniem:

$$x(t + \Delta t) = x(t) - \beta D \frac{\partial U(x, t)}{\partial x} \Delta t + r \sqrt{2D\Delta t} \quad (1)$$

gdzie  $\beta = 1/kT$  jest odwrotnością iloczynu stałej Boltzmanna  $k$  i temperatury  $T$ ,  $D$  oznacza współczynnik dyfuzji, a  $R$  liczbę losową z rozkładu normalnego [42]. Z teoretycznego punktu widzenia translokacja i rozplatanie polimerów przedstawiają problem czasu pierwszego przejścia, gdy proces wychodzi w momencie  $t = 0$  z punktu  $m_0$  (lub  $x_0$ ) i w losowym czasie  $T$  osiąga współrzędną  $m_f$  (lub  $x_f$ ) oznaczającą pełną translokację lub rozplecenie.

Modele stochastyczne są stosunkowo proste i dlatego czas obliczeń jest dużo krótszy niż np. w symulacjach dynamiki molekularnej. Modele te pozwalają na wyjaśnienie i przewidywanie niektórych wartości eksperymentalnych, jednak ilość dostarczanych informacji jest ograniczona.

### 3.1.2. Modele ciągłe

W modelach ciągłych roztwór elektrolitu, ścianki nanoporu oraz membrana przedstawione są jako ośrodki ciągłe, charakteryzujące się określoną względną przenikalnością elektryczną  $\epsilon(r)$ , różną w różnych punktach  $r$  ośrodka. Jony w roztworze opisane są za pomocą gęstości ładunku elektrycznego  $\rho$ . Równanie Poissona:

$$\epsilon_0 \nabla \cdot (\epsilon(r) \nabla \varphi(r)) = -(\rho_p + \rho_e) \quad (2)$$

wiąże wartość potencjału  $\varphi$  elektrycznego w punkcie  $r$  z gęstością ładunku  $\rho = \rho_p + \rho_e$ . Indeks  $p$  odnosi się do nanoporu, indeks  $e$  do elektrolitu, a  $\epsilon_0$  oznacza przenikalność elektryczną próżni. Równanie Poissona pozwala wyznaczyć rozkład potencjału  $\varphi$  jeśli dany jest rozkład ładunku  $\rho$  (Rys. 6a,b). W roztworze elektrolitu rozkład gęstości jonów w stanie równowagi można opisać za pomocą równania Boltzmanna:

$$\rho_e = \sum_i z_i e n_{0i} \exp(-z_i e \varphi(r)/kT) \quad (3)$$

Połączenie obu równań daje równanie Poissona-Boltzmann (PB), które dla elektrolitu typu z:z przyjmuje postać:

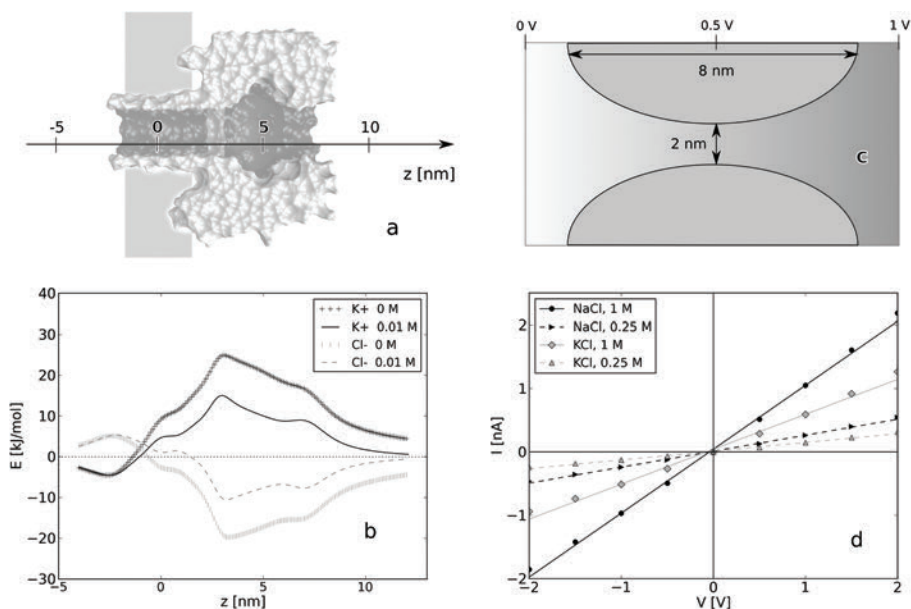
$$\epsilon_0 \nabla \cdot (\epsilon(r) \nabla \varphi(r)) = 2ezn_0 \sinh[ze\varphi(r)/kT] - \rho_e \quad (4)$$

gdzie  $n_0$  oznacza gęstość liczbową jonów, a  $z$  ich ładunek,  $k$  to stała Boltzmanna, a  $T$  – temperatura.

Równanie PB opisuje rozkład potencjału  $\varphi$  w stanie równowagi. Jeśli interesuje nas przepływ jonów (Rys. 6c,d) to równanie Nernsta-Plancka:

$$J_i = -D_i \left( \nabla n_i + \frac{z_i e n_i}{kT} \nabla \varphi \right) \quad (5)$$

wiąże strumień  $J_i$  dla jonu  $i$  z gradientem stężenia  $n_i$  oraz z gradientem potencjału  $\varphi$ .  $D_i$  jest współczynnikiem dyfuzji jonu  $i$ . Połączenie równania Poissona z równaniem Nernsta-Plancka daje równanie Poissona-Nernsta-Plancka (PNP).



Rysunek 6. Przykłady symulacji typu PB/PNP. (a) Model alfa-hemolizyny umieszczonej w membranie lipidowej używany w symulacjach PNP. (b) Obliczona energia oddziaływań elektrostatycznych różnych jonów w alfa-hemolizynie. (c) Model symetrycznego nanoporu używany w symulacjach PNP przepływu jonów. (d) Zależność natężenia prądu jonowego od napięcia dla różnych stężeń i różnych elektrolitów

Figure 6. Examples of PB/PNP simulations. (a) A model of alpha-hemolysin in a lipid membrane used in PNP simulations. (b) The calculated electrostatic energy for different ions in alpha-hemolysin. (c) A model of symmetric nanopore used in PNP simulations of ion flow. (d) An ionic current as a function of an applied voltage for different concentrations and electrolytes

Równania BP i PNP sprawdzają się tylko dla szerokich nanoporów [48]. Dla nanoporów o małych średnicach znacznie zawyżony jest wpływ ekranowania kationów przez aniony i anionów przez kationy, który w rzeczywistości z powodów sterycznych jest znacznie ograniczony. Dla szerokich nanoporów i niskich stężeń oddziaływania jonów ze ściankami nanoporu i między sobą są na tyle niewielkie, że nie wpływają znacząco na wynik. Zaletą metody jest prostota i co za tym idzie krótki czas trwania obliczeń. Wśród programów typu *freeware* służących do symulacji PB/ PNP można wymienić m.in.: 3DPNPSolver [51], APBS [52] oraz PBPNP [53].

### 3.1.3. Dynamika molekularna

Symulacje komputerowe metodą dynamiki molekularnej wykorzystują opis nanoporów, który uwzględnia istnienie dyskretnych atomów, jonów i cząsteczek. W przypadku dużych układów stosowane są uproszczenia np. tzw. modele ziarniste (ang. *coarse-grained*), w których grupy atomów modelowane są jako jedna cząstka.

W symulacji dynamiki molekularnej trajektorie ruchu poszczególnych atomów oblicza się na podstawie równania Newtona:

$$m_i \ddot{r}_i = -\nabla_i U(\{r_i\}) \quad (6)$$

w którym  $i$  to numer cząstki,  $m$  jej masa,  $r$  położenie. Prawa strona równania (6) przedstawia całkowitą siłę działającą na atom  $i$ . W każdym kroku czasowym na podstawie położenia atomów obliczany jest potencjał układu, a z niego, poprzez rozwiązanie równań Newtona (6), nowe położenia atomów. W symulacjach dynamiki molekularnej korzysta się z pól siłowych definiujących ładunki cząstkowe, odległości, kąty i energię wiązań. Oddziaływania niewiążące definiowane są jako suma oddziaływań Coulombowskich i Lennarda-Jonesa. Istnieje szereg programów służących do symulacji dynamiki molekularnej, komercyjnych i typu *freeware*. Z tej ostatniej grupy najpopularniejsze są NAMD [54] i GROMACS [55].

Dynamika brownowska stanowi opis pośredni między modelami ciągłymi a pełną dynamiką molekularną. Jony, ścianki nanoporu i ewentualne inne cząstki znajdujące się wewnątrz nanoporu opisane są jako indywidua o określonej masie, ładunku i położeniu w przestrzeni, natomiast rozpuszczalnik zdefiniowany jest modelem ciągłym. Ruch jonu o masie  $m$ , prędkości  $v$  i ładunku  $q$  jest opisany równaniem Langevina:

$$m \frac{dv}{dt} = -\gamma v + qE + R \quad (7)$$

gdzie  $\gamma$  oznacza współczynnik tarcia,  $E$  jest sumą oddziaływań elektrostatycznych działających na jon pochodzących od innych jonów, ścianek nanoporu i przyłożonego napięcia,  $R$  opisuje losowe siły działające na jon, przede wszystkim w wyniku zderzeń z rozpuszczalnikiem. Czas trwania obliczeń jest znacznie krótszy niż w pełnej dynamice molekularnej. Do wad metody należą trudności ze zdefiniowaniem oddziaływań w układach o małej średnicy i wysokim ładunku. Ponadto nie są uwzględnione fluktuacje położenia atomów tworzących ścianki nanoporu. Wyniki uzyskane z symulacji metodą dynamiki brownowskiej, w których duże cząsteczki o złożonej strukturze drugorzędowej nie są nieruchome, mogą odbiegać od spodziewanych [56].

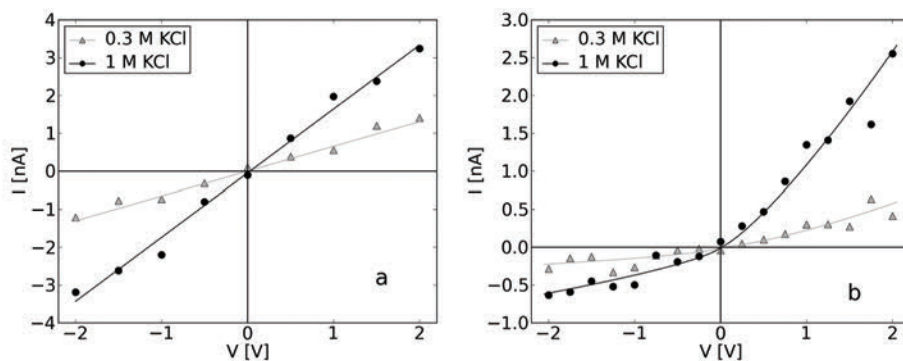
Symulacje dynamiki brownowskiej można przeprowadzać zarówno przy użyciu pakietów do dynamiki molekularnej, np. GROMACS, NAMD, jak i za pomocą programów specjalnie do tego typu symulacji przeznaczonych, np. BD\_BOX [57] i GCMC/BD [58].

### 3.2. PRĄD JONOWY

W celu lepszego wyjaśnienia zjawiska selektywności nanoporów oraz zmian natężenia strumienia jonów dla układów o różnej geometrii przeprowadzane są symulacje różnych typów. Obliczenia oparte na równaniach PNP pozwalają na opis

asymetrycznej zależności prądu jonowego od napięcia w nanoporach o kształcie stożka [59] a także wpływu długości nanoporu i napięcia na selektywność jonów [60]. Symulacje Monte Carlo dostarczają więcej szczegółów na temat mechanizmów obu zjawisk. Za ich pomocą pokazano m.in. w jaki sposób selektywność nanoporu zależy od jego średnicy i stałej dielektrycznej [61]. Symulacje dynamiki Browna przepływu jonów przez alfa-hemolizynę dają wyniki porównywalne z wartościami eksperymentalnymi, wartości przewodności uzyskane z modelu PNP są jednak zawyżone [62].

Symulacje dynamiki molekularnej dostarczają najwięcej informacji o przepływie elektrolitu przez nanopory, trajektoriach jonów i ich oddziaływaniach z innymi jonami, rozpuszczalnikiem i ściankami nanoporu. Symulacje dynamiki molekularnej posłużyły np. do opisu właściwości nanoporu – alfa-hemolizyny umieszczonej w dwuwarstwie lipidowej [63]. Zbadana została selektywność w zależności od przyłożonego napięcia, opracowane zostały także mapy potencjału elektrostatycznego. W innej pracy wykazano, że uproszczenie układu, poprzez pozostawienie jedynie trzonu alfa-hemolizyny i zastąpienie błony lipidowej unieruchomioną warstwą metanu umożliwia uzyskanie wyników zbliżonych do wartości eksperymentalnych przy jednoczesnym znacznym skróceniu czasu obliczeń [64].



Rysunek 7. Przykładowe wykresy zależności natężenia prądu jonowego od napięcia dla nanoporu (a) symetrycznego (średnica 2,2 nm) (b) asymetrycznego (1,3 nm) wydrążonego w azotku krzemu, uzyskane w symulacjach dynamiki molekularnej w programie NAMD

Figure 7. Examples of an ionic current as a function of an applied voltage for (a) a symmetric (2,2 nm diameter) and (b) an asymmetric (1,3 nm) nanopore cut in silicon nitride, obtained from MD simulations in AMD

W przypadku nanoporów wykonanych z substancji nieorganicznych kształt krzywych natężenie – napięcie zależy nie tylko od geometrii układu (Rys. 7) i materiału, w którym nanopory zostały utworzone, lecz także struktury materiału. W symulacjach dynamiki molekularnej, zarówno podczas przepływu jonów przez cylindryczne kanały wytworzone z krzemionce krystalicznej jak i amorficznej, zaobserwowano asymetrię wykresu zależności prądu jonowego od przyłożonego napię-

cia, malejącą wraz ze wzrostem szerokości nanoporu. Dla stopionej krzemionki, ponieważ ścianki nanoporu są gładkie, asymetria nie występuje [65].

Model nanoporu utworzonego w materiale polimerowym stał stosunkowo niedawno [66], ponieważ trudnym zagadnieniem było odtworzenie struktury ścianek nanoporu, będącej istotnym czynnikiem określającym właściwości transportowe. Model ten został opracowany w celu wyjaśnienia zjawisk zachodzących w nanoporach asymetrycznych, na przykładzie politereftalanu etylenu. Symulacje dynamiki molekularnej wykazały, że pH, a co za tym idzie, stopień sprotonowania grup karboksylowych polimeru wpływa na selektywność nanoporu. Selektywność występuje tylko wtedy, gdy pH jest na tyle wysokie, że następuje dysocjacja protonów z grup karboksylowych. Zaobserwowano także, że w przypadku obecności w układzie kationów wapnia, ich powinowactwo do ścianek nanoporu jest wyższe niż kationów potasu, co pomaga w wyjaśnieniu mechanizmu zjawiska inwersji ładunku [66].

### 3.3. TRANSLOKACJA BIOPOLIMERÓW

Aby dokładniej zrozumieć mechanizmy procesów, którym podlegają biomolekuły w nanoporach, konieczne jest opracowanie modeli teoretycznych, opisujących w szczególności oddziaływania pomiędzy poszczególnymi składnikami układu. Dzięki takim modelom możliwe jest też opracowanie lepszych metod detekcji cząsteczek i manipulacji nimi.

Jeden z modeli, oparty o równania Poissona-Nernsta-Plancka, zakłada, że w obecności cząsteczki polimeru, np. glikolu polietylenowego w nanoporze następuje spadek prądu jonowego poprzez zmniejszenie ilości jonów w nanoporze z przyczyn sterycznych oraz w wyniku oddziaływań z analitem – ujemnie naładowana biocząsteczka powoduje zmniejszenie ruchliwości kationów. Model ten pozwala na wyznaczenie wartości spadku prądu jonowego oraz czasu blokady w zależności od przyłożonego napięcia oraz stężenia elektrolitu. Możliwe jest także obliczenie energii oddziaływania jonu z cząsteczką polimeru [67].

Symulacje przeprowadzone dla polipeptydów, opisujące ich translokację na poziomie ruchu po powierzchni potencjału, wykazały, że bariera energetyczna w przypadku molekuł pozbawionych struktury drugorzędowej jest bardzo niska, odpowiadająca sile 2–6 pN. Możliwe jest także wyznaczenie zależności oddziaływań analitu z nanoporem w zależności od jego średnicy. Symulacje pozwoliły również na zbadanie mechanizmu rozplatania w nanoporze bardziej złożonych struktur [68].

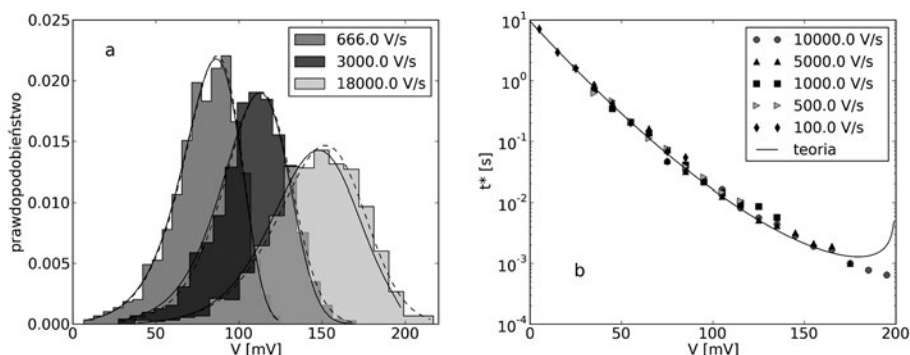
Do najczęściej badanych struktur należą polinukleotydy. Porównane zostały np. wyniki symulacji dynamiki molekularnej według modelu uwzględniającego wszystkie atomy, w tym rozpuszczalnika, oraz symulacji dynamiki Browna, w których rozpuszczalnik jest obecny jedynie jako uproszczony model, co pozwala na znaczne skrócenie czasu obliczeń. Badanym układem była para zasad wewnątrz nanoporu, poddana działaniu pola elektrycznego. Stwierdzono, że rozkład jonów

wokół nukleotydów oraz prąd jonowy wyznaczone obiema metodami są zbliżone i zgodne z wartościami eksperymentalnymi, a uzyskane wyniki mogą ułatwić interpretację danych doświadczalnych [69].

W celu obliczenia pól elektrostatycznych powstałych w membranie półprzewodnikowej zanurzonej w roztworze elektrolitu, następnie zbadania ich wpływu na translokację polimeru, użyto dwóch modeli. W równań Poissona wyznaczono charakterystykę pól elektrostatycznych i rozkład jonów w układzie, a następnie za pomocą dynamiki Browna modelowano translokację polimeru. Wykazano, że membrana złożona z naprzemiennie naładowanych warstw półprzewodnika umożliwia kontrolę ruchu polinukleotydu, co może znaleźć potencjalne zastosowanie w sekwencjonowaniu DNA [70].

### 3.4. NANOPOROWA SPEKTROSKOPIA SIŁ

Nanoporowa spektroskopia sił (NFS) dostarcza informacje o strukturze, dynamice i oddziaływaniach na poziomie pojedynczych cząsteczek.



Rysunek 8. Przykład analizy danych uzyskanych z symulacji rozplatania spinki DNA w nanoporze. (a) Histogramy napięć rozplecenia, krzywe teoretyczne (linie ciągłe) i dopasowania (linie przerywane). (b) Histogramy napięć rozplecenia przekształcone do histogramów czasów rozplecenia

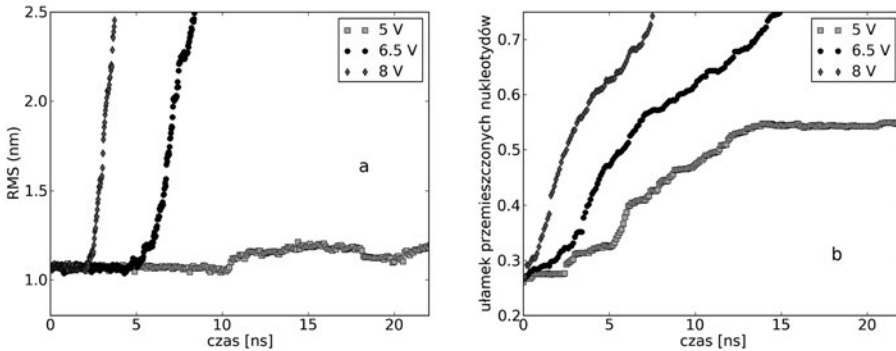
Figure 8. An exemplary analysis of data obtained from hairpin DNA unzipping in a nanopore. (a) Unzipping voltage histograms, theoretical curves (solid lines) and fits (dotted lines). (b) Unzipping voltage histograms transformed to unzipping time histograms

Do wyznaczania parametrów kinetycznych z eksperymentów spektroskopii sił stosowano modele stochastyczne. Jeżeli eksperyment prowadzony jest przy stałym napięciu, otrzymuje się zestaw czasów potrzebnych na dysocjację kompleksu lub rozplecenie spinki. W przypadku eksperymentów przy rosnącym liniowo napięciu, uzyskiwane są wartości napięcia rozplecenia (Rys. 8). Opracowany został model umożliwiający uzyskanie parametrów kinetycznych (czas życia układu, położenie maksimum bariery energetycznej oraz jej wysokość) z obu typów eksperymentów [42]. Model ten zakłada, że pod wpływem przyłożonego napięcia następuje nie-



odwracalna przemiana w układzie, polegająca na przekroczeniu przez cząsteczkę bariery energetycznej w maksimum powierzchni energii średniej siły. Im większe jest przyłożone napięcie, tym bariera jest niższa.

Inny model pozwala na oszacowanie czasów translokacji spinek DNA o różnej strukturze. Na podstawie wyników eksperymentalnych skonstruowany został model powierzchni potencjału, zależny od sekwencji par zasad, opisany dwoma parametrami: ładunkiem efektywnym przypadającym na jedną parę nukleotydów, oraz stałą szybkości określającą szybkość translokacji cząsteczki. Wyznaczone czasy translokacji są zbieżne z wartościami eksperymentalnymi, możliwe jest także obliczenie czasów dla nowych struktur [49]. Symulacje z zastosowaniem algorytmu błędzenia losowego traktują rozplatanie DNA jako ruch po powierzchni potencjału zależny od siły zmieniającej się w czasie, w trakcie którego dysocjacji ulegają kolejne pary zasad. Wykazano w ten sposób, że na rozplatanie wpływają fluktuacje termiczne. Stwierdzono także, że czas translokacji nie zawsze wzrasta wraz ze stabilnością podwójnej helisy [50].



Rysunek 9. Wyniki przykładowych symulacji dynamiki molekularnej rozplatania spinki DNA w nanoporze o średnicy 1,3 nm. (a) Zmiana średniej odległości (RMS) między atomami C1' sparowanych zasad w czasie. (b) Zależność liczby nukleotydów znajdujących się poniżej przewężenia nanoporu od czasu. Dla 8 V i 6,5 V następuje całkowite rozplecenie spinki. Napięcie 5 V jest zbyt niskie, aby rozplecenie można było zaobserwować w czasie 25 ns

Figure 9. Results of sample MD simulations of hairpin DNA unzipping in 1,3-diameter nanopore. (a) An average distance (RMS) between C1' atoms of paired bases as a function of time. (b) The number of nucleotides below nanopore constriction as a function of time. For 8 V and 6,5 V hairpin unzips completely. The 5 V voltage is too low to observe unzipping during 25 ns

Symulacje dynamiki molekularnej dostarczają informacji niemożliwych do uzyskania eksperymentalnie. Pozwalają oszacować, w jaki sposób analit oddziałuje z nanoporem, jaką przyjmie konformację, a także w jakiej kolejności mogą nastąpić poszczególne przemiany (Rys. 9). Symulacje takie pozwoliły na odtworzenie wyników eksperymentu dysocjacji kompleksu enzym-DNA w nanoporze. Stwierdzono także, że enzym znajduje się na zewnątrz nanoporu, a geometria układu znacznie odbiega od równowagowej. Zidentyfikowane także zostały pary zasad najmocniej wiążące się z cząsteczką enzymu [4]. Przeprowadzone zostały również symulacje

rozplatania spinki DNA. Potwierdziły one hipotezy dotyczące konfiguracji analitu w zależności od szerokości nanoporu. Im średnica nanoporu większa, tym większe prawdopodobieństwo, że spinka zamiast rozpleceniu ulegnie tylko zniekształceniu i obie nici jednocześnie ulegną translokacji. Podczas symulacji rozplatania, pary zasad ulegają kolejno dysocjacji, zaczynając od znajdujących się najbliżej pojedynczej nici [47].

#### 4. PERSPEKTYWY: SEKWENCJONOWANIE DNA

Eksperymenty z wykorzystaniem nanoporów, w tym przede wszystkim translokacja polinukleotydów, cieszą się dużym zainteresowaniem ze względu na możliwość zastosowania nanoporów do sekwencjonowania DNA [5]. Zastosowanie nanoporów w sekwencjonowaniu wydaje się możliwe, ponieważ wartość mierzonego prądu jonowego przyjmuje wartości nie tylko zależne od średnicy nanoporu, stężenia elektrolitu i przyłożonego napięcia, lecz co najważniejsze od rodzaju nukleotydu.

Badane są zarówno nanopory białkowe jak i syntetyczne. Modyfikacja alfa-hemolizyny poprzez umieszczenie w jej trzonie cyklodekstryny umożliwia utrzymywanie nukleotydu w miejscu przez czas na tyle długi, aby zmierzyć prąd jonowy. Najpierw egzonukleaza powoduje hydrolizę nici na poszczególne nukleotydy, a następnie trafiają one do nanoporu [71]. Metoda ta ma jednak zasadniczą wadę, ponieważ nukleotydy mogą przechodzić przez nanopor w innej kolejności, niż występowały w nici DNA. Kolejne ograniczenia to niewielki zakres modyfikacji, którym można poddawać alfa-hemolizynę, nie zmieniając jednocześnie jej właściwości oraz mała wytrzymałość mechaniczna i chemiczna układu.

W przeciwieństwie do nanoporów białkowych, nanopory syntetyczne mogą mieć dowolną geometrię, są także dużo bardziej wytrzymałe. Ich wadą z kolei jest szybkie przemieszczanie się DNA, powyżej jednej pary nukleotydów w ciągu 10 nanosekund, nawet dla niskich napięć (200 mV) [72], co bardzo utrudnia zarejestrowanie prądu jonowego z wystarczającą rozdzielczością. Zaproponowano wiele rozwiązań tego problemu [73–76]. Niektóre polegają na zastosowaniu elektronicznych czujników, inne – na modyfikacji struktury badanej cząsteczki.

Metody oparte na modyfikacji cząsteczki wymagają jej wcześniejszego przygotowania do eksperymentu. W jednej z metod [73] badana cząsteczka DNA najpierw jest przetwarzana za pomocą enzymu na polimer, każdy nukleotyd jest kodowany fragmentem składającym się z dwóch jednostek po 10 par zasad każda, należących do dwóch typów. W ten sposób powstają cztery możliwe kombinacje jednostek, każda koduje inny nukleotyd. Na utworzony w ten sposób polimer nakładane są komplementarne fragmenty oznakowane fluorescencyjnie, które oddzielają się kolejno podczas translokacji przez nanopor, emitując promieniowanie o dwóch barwach, których rejestracja pozwala na identyfikację kolejnych nukleotydów wyjściowego DNA [73]. Inna metoda [74] polega na nałożeniu na nić DNA jednakowych,

krótkich oligonukleotydów o znanej sekwencji. Ponieważ prąd jonowy przyjmuje inną wartość dla struktury jedno- i dwuniciowej, jego pomiar umożliwia określenie, do którego odcinka nici przyłączony jest dany fragment, a tym samym jaką ma on sekwencję. Poprzez zastosowanie kolejno różnych oligonukleotydów możliwa jest identyfikacja całej sekwencji [74].

Dzięki zastosowaniu czujnika elektronicznego możliwe jest badanie cząsteczki bez poddawania jej modyfikacjom. W metodzie poprzecznego transportu elektronowego stosuje się drugą parę elektrod, prostopadłą do osi DNA. Identyfikacja nukleotydów następuje na podstawie zmian mierzonego prądu tunelowego następujących w miarę przesuwania się nici [75]. Innym rozwiązaniem jest użycie półprzewodnikowego kondensatora nanoporowego. Ruch naładowanej elektrycznie cząsteczki DNA powoduje zmiany rejestrowanego napięcia na kondensatorze [76]. Obie metody mają jednak wadę – wymagają kontroli nad ruchem cząsteczki w nanoporze, gdyż ma on duży wpływ na wynik pomiaru.

Ruch cząsteczki może być kontrolowany na kilka sposobów. Szybkość translokacji może zostać zmniejszona przez zwiększenie lepkości roztworu, przyłożenie słabszego pola elektrycznego, rozcieńczenie elektrolitu i obniżenie temperatury [77]. Powoduje to jednak osłabienie rejestrowanego sygnału. Możliwe jest także użycie pęsety optycznej. Do jednego końca DNA przyłączana jest kulka, której ruch kontroluje się za pomocą promienia laserowego. Na podstawie pomiarów położenia kulki wyliczana jest siła działająca na DNA. Kontrola położenia kulki pozwala na regulowanie szybkości ruchu DNA [78]. W podobny sposób działa pęseta magnetyczna. Kulka przyłączana do jednego z końców polinukleotydu ma właściwości magnetyczne. Poprzez zastosowanie pola magnetycznego kontrolowany jest ruch kulki, a co za tym idzie ruch cząsteczki DNA [79]. Ponieważ gradient pola magnetycznego można zastosować względem określonej powierzchni, technikę tę można zastosować nie tylko do pojedynczych nanoporów, ale też do całych matryc. Metoda „tranzystora DNA” polega na użyciu membrany złożonej z pięciu warstw kolejno metalu i dielektryka (m/d/m/d/m). Poprzez odpowiednie zmiany napięcia przykładanego do środkowej warstwy metalu, możliwe jest wymuszenie ruchu DNA w sposób skokowy, o wartość równą odległości dwóch zasad [80].

## PODZIĘKOWANIA

Praca powstała przy wsparciu grantu NN204 166736 Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

## PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] J. Kasianowicz, E. Brandin, D. Branton, D. Deamer, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1996, **93**, 13770.
- [2] S. Bezrukov, I. Vodyanoy, V. Parsegian, Nature, 1994, **370**, 279.
- [3] W. Coulter, United States Patent 2656508, 1953.
- [4] S. Iqbal, R. Bashir, *Nanopores: sensing and fundamental biological interactions*, Springer, 2011.
- [5] B. Venkatesan, R. Bashir, Nat. Nanotechnol., 2011, **6**, 615.
- [6] C. Dekker, Nat. Nanotechnol., 2007, **2**, 209.
- [7] O. Hayden, K. Nielsch, *Molecular- and Nano-Tubes*, Springer, 2011.
- [8] P. Hinterdorfer, A. van Oijen, Handbook of Single-Molecule Biophysics, Springer, 2009
- [9] N. Modi, M. Winterhalter, U. Kleinekathofer, Nanoscale, 2012, **4**, 6166.
- [10] C. Maffeo, S. Bhattacharya, J. Yoo, D. Wells, A. Aksimentiev, Chem. Rev., 2012, **112**, 6250.
- [11] D. Wendell, P. Jing, J. Geng, V. Subramaniam, T. Lee, C. Montemagno, P. Guo, Nat. Nano, 2009, **4**, 765.
- [12] D. Jonas, I. Walev, T. Berger, M. Liebetrau, M. Palmer, S. Bhakdi, Infect. Immun., 1994, **62**, 1304.
- [13] S. Winters-Hilt, BMC Bioinformatics, 2007, **8**, S9.
- [14] V. Rao, M. Feiss, Annu. Rev. Genet., 2008, **42**, 647.
- [15] A. Simpson, P. Leiman, Y. Tao, Y. He, M. Badasso, P. Jardine, D. Anderson, M. Rossmann, Acta Cryst. D, 2001, **57**, 1260.
- [16] Z. Siwy, A. Fulinski, Am. J. Phys., 2004, **72**, 567.
- [17] C. Harrell, Z. Siwy, C. Martin, Small, 2006, **2**, 194.
- [18] Z. Siwy, D. Dobrev, R. Neumann, C. Trautmann, K. Voss, Appl. Phys. A Mater. Sci. Process., 2003, **76**, 781.
- [19] J. Li, D. Stein, C. McMullan, D. Branton, M. Aziz, J. Golovchenko, Nature, 2001, **412**, 166.
- [20] J. Heng, C. Ho, T. Kim, R. Timp, A. Aksimentiev, Y. Grinkova, S. Sligar, K. Schulten, G. Timp, Biophys. J., 2004, **87**, 2905.
- [21] S. Park, H. Peng, X. Ling, Small, 2007, **3**, 116.
- [22] M. Fischbein, M. Drndic, Appl. Phys. Lett., 2008, **93**, 113107.
- [23] C. Merchant, K. Healy, M. Wanunu, V. Ray, N. Peterman, J. Bartel, M. Fischbein, K. Venta, Z. Luo, A. Johnson, M. Drndic, Nano Lett., 2010, **10**, 2915.
- [24] G. Schneider, S. Kowalczyk, V. Calado, G. Pandraud, H. Zandbergen, L. Vandersypen, C. Dekker, Nano Lett., 2010, **10**, 3163.
- [25] S. Garaj, W. Hubbard, A. Reina, J. Kong, D. Branton, J. Golovchenko, Nature, 2010, **467**, 190.
- [26] B. Venkatesan, B. Dorvel, S. Yemenicioglu, N. Watkins, I. Petrov, R. Bashir, Adv. Mater., 2009, **21**, 2771.
- [27] R. Smeets, U. Keyser, D. Krapf, M. Wu, N. Dekker, C. Dekker, Nano Lett., 2006, **6**, 89.
- [28] C. Ho, R. Qiao, J. Heng, A. Chatterjee, R. Timp, N. Aluru, G. Timp, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2005, **102**, 10445.
- [29] B. Venkatesan, A. Shah, J. Zuo, R. Bashir, Adv. Funct. Mater., 2010, **20**, 1266.
- [30] Y. He, D. Gillespie, D. Boda, I. Vlassiouk, R. Eisenberg, Z. Siwy, J. Am. Chem. Soc., 2009, **131**, 5194.
- [31] B. Hornblower, A. Coombs, R. Whitaker, A. Kolomeisky, S. Picone, A. Meller, M. Akeson, Nature Mater., 2007, **4**, 315.
- [32] A. Han, G. Schurmann, G. Mondin, R. Bitterli, N. Hegelbach, N. de Rooij, U. Staufer, Appl. Phys. Lett., 2006, **88**, 093901.
- [33] M. Wanunu, J. Sutin, B. McNally, A. Chow, A. Meller, Biophys. J., 2008, **108**, 140475.
- [34] M. Wanunu, W. Morrison, Y. Rabin, A. Grosberg, A. Meller, Nat. Nanotechnol., 2010, **5**, 160.
- [35] L. Movileanu, H. Bayley, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001, **98**, 10137.

- [36] O. Krasilnikov, C. Rodrigues, S. Bezrukov, *Phys. Rev. Lett.*, 2006, **97**, 018301.
- [37] A. Han, M. Creus, G. Schurmann, V. Linder, T. Ward, N. de Rooij, U. Staufer, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 4651.
- [38] D. Fologea, B. Ledden, D. McNabb, J. Li, *Appl. Phys. Lett.*, 2007, **91**, 053901-1.
- [39] D. Talaga, J. Li, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 9287.
- [40] J. Uram, M. Mayer, *Biosens. Bioelectron.*, 2007, **22**, 1556.
- [41] J. Li, M. Gershow, D. Stein, E. Brandin, J. Golovchenko, *Nat. Mater.*, 2003, **2**, 611.
- [42] O. Dudko, J. Mathe, A. Meller, *Methods in enzymology*, 2010, **475**, 565.
- [43] A. Sauer-Budge, J. Nyamwanda, D. Lubensky, D. Branton, *Phys. Rev. Lett.*, 2003, **90**, 238101.
- [44] Q. Zhao, G. Sigalov, V. Dimitrov, B. Dorvel, U. Mirsaidov, S. Sligar, A. Aksimentiev, *G. Timp, Nano Lett.*, 2007, **7**, 1680.
- [45] B. Dorvel, G. Sigalov, Q. Zhao, J. Comer, V. Dimitrov, U. Mirsaidov, A. Aksimentiev, *G. Timp, Nucl. Acids Res.*, 2009, **37**, 4170.
- [46] J. Mathe, A. Arinstein, Y. Rabin, A. Meller, *Europhys. Lett.*, 2006, **73**, 130.
- [47] J. Comer, V. Dimitrov, Q. Zhao, G. Timp, A. Aksimentiev, *Biophys. J.*, 2009, **96**, 593.
- [48] S. Chung, B. Corry, *Soft Matter*, 2005, **1**, 417.
- [49] S. Schink, S. Renner, K. Alim, V. Arnaut, F. Simmel, U. Gerland, *Biophys. J.*, 2012, **102**, 85.
- [50] V. Viasnoff, N. Chiaruttini, J. Muzard, U. Bockelmann, *J. Phys.: Condens. Matter*, 2010, **22**, 454122.
- [51] W. Dyrka, A. Augousti, M. Kotulska, *J. Comput. Chem.*, 2008, **29**, 1876.
- [52] N. Baker, D. Sept, S. Joseph, M. Holst, J. McCammon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, **98**, 10037.
- [53] W. Im, B. Roux, *J. Mol. Biol.*, 2002, **322**, 851.
- [54] J. Phillips, R. Braun, W. Wang, J. Gumbart, E. Tajkhorshid, E. Villa, C. Chipot, R. Skeel, L. Kale, K. Schulten, *J. Comput. Chem.*, 2005, **26**, 1781.
- [55] H. Berendsen, D. van der Spoel, R. van Drunen, *Comput. Phys. Commun.*, 1995, **91**, 43.
- [56] R. Zhou, B. Berne, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, **99**, 12777.
- [57] M. Długosz, P. Zieliński, J. Trylska, *J. Comput. Chem.*, 2011, **32**, 2734.
- [58] W. Im, S. Seefeld, B. Roux, *Biophys. J.*, 2000, **79**, 788.
- [59] H. White, A. Bund, *Langmuir*, 2008, **24**, 2212.
- [60] I. Vlassioug, S. Smirnov, Z. Siwy, *Nano Lett.*, 2008, **8**, 1978.
- [61] D. Boda, M. Valisko, B. Eisenberg, W. Nonner, D. Henderson, D. Gillespie, *Phys. Rev. Lett.*, 2007, **98**, 168102.
- [62] S. Noskov, W. Im, B. Roux, *Biophys. J.*, 2004, **87**, 2299.
- [63] A. Aksimentiev, K. Schulten, *Biophys. J.*, 2005, **88**, 3745.
- [64] P. Bond, A. Guy, A. Heron, H. Bayley, S. Khalid, *Biochemistry*, 2011, **50**, 3777.
- [65] E. Cruz-Chu, A. Aksimentiev, K. Schulten, *J. Phys. Chem. C*, 2009, **113**, 1850.
- [66] E. Cruz-Chu, T. Ritz, Z. Siwy, K. Schulten, *Faraday Discuss.*, 2009, **143**, 47.
- [67] J. Reiner, J. Kasianowicz, B. Nablo, J. Robertson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010, **107**, 12080.
- [68] D. Makarov, *Acc. Chem. Res.*, 2009, **42**, 281.
- [69] J. Comer, A. Aksimentiev, *J. Phys. Chem. C*, 2012, **116**, 3376.
- [70] D. Melnikov, A. Nikolaev, J. Leburton, M. Gracheva, *Methods Mol. Biol.*, 2012, **870**, 187.
- [71] J. Clarke, H. Wu, L. Jayasinghe, A. Patel, S. Reid, H. Bayley, *Nat. Nanotechnol.*, 2009, **4**, 265.
- [72] A. Storm, C. Storm, J. Chen, H. Zandbergen, J. Joanny, C. Dekker, *Nano Lett.*, 2005, **5**, 1193.
- [73] G. Soni, A. Meller, *Clin. Chem.*, 2007, **53**, 1996.
- [74] X. Ling, B. Bready, A. Pertsinidis, *USPTO Patent Application No. 20070190542*, 2006.
- [75] J. Lagerqvist, M. Zwolak, M. Di Ventra, *Nano Lett.*, 2006, **6**, 779.
- [76] M. Gracheva, A. Xiong, A. Aksimentiev, K. Schulten, G. Timp, J. Leburton, *Nanotechnology*, 2006, **17**, 622.
- [77] D. Fologea, J. Uplinger, B. Thomas, D. McNabb, J. Li, *Nano Lett.*, 2005, **5**, 1734.

- [78] U. Keyser, B. Koeleman, S. van Dorp, *Nat. Phys.*, 2006, **2**, 473.
- [79] H. Peng, X. Ling, *Nanotechnology*, 2009, **20**, 185101.
- [80] S. Polonsky, S. Rossnagel, G. Stolovitzky, *Appl. Phys. Lett.*, 2007, **91**, 153103.

Praca wpłynęła do Redakcji 26 listopada 2012

# WYBRANE WTÓRNE METABOLITY ROŚLINNE JAKO ŚRODKI PRZECIWDROBNOUSTROJOWE

## SECONDARY PLANT METABOLITES AS ANTIMICROBIAL AGENTS

**Michalina Adaszyńska\*, Maria Swarczewicz**

*Zakład Syntezy Organicznej i Technologii Leków, Instytut Technologii Chemicznej  
Organicznej, Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej, Zachodniopomorski  
Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie  
Al. Piastów 42, 71-065 Szczecin  
\*e-mail: madaszynska@zut.edu.pl*

---

Abstract

Wstęp

1. Grupy metabolitów roślinnych o działaniu przeciwdrobnoustrojowym
  - 1.1. Alkaloidy
  - 1.2. Kumaryny
  - 1.3. Flawonoidy
  - 1.4. Terpenoidy i olejki eteryczne
  - 1.5. Fitosterole
  - 1.6. Garbniki i związki fenolowe

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

---

**mgr inż. Michalina Adaszyńska**, absolwentka kierunku technologia chemiczna na Wydziale Technologii i Inżynierii Chemicznej Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. W 2010 roku uzyskała tytuł magistra inżyniera, pracę dyplomową wykonywała w Zakładzie Syntezy Organicznej i Technologii Leków. Obecnie jest słuchaczką Studium Doktoranckiego przy Wydziale Technologii i Inżynierii Chemicznej ZUT w Szczecinie, gdzie wykonuje pracę doktorską pod kierunkiem dr hab. inż. Marii Swarcewicz. Prowadzone przez nią badania dotyczą związków naturalnych występujących w roślinach i ich wykorzystanie w kosmetykach i lekach.

**dr hab. inż. Maria Swarcewicz**, kierownik Zakładu Syntezy Organicznej i Technologii Leków w Instytucie Technologii Chemicznej Organicznej Wydziału Technologii i Inżynierii Chemicznej Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie od 2005. Zainteresowania naukowe: ocena zagrożeń środowiska i metody ich ograniczania w wodzie i glebie ze szczególnym uwzględnieniem pestycydów; analiza jakościowa kosmetyków. Nowy kierunek badań zespołu to: związki naturalne w kosmetykach i lekach, ich synteza i wyodrębnianie; analiza składu chemicznego; opracowanie receptur kosmetycznych oraz badania aktywności przeciwutleniających i mikrobiologicznych ekstraktów roślinnych i olejków eterycznych; izolacja oraz identyfikacja allelozwiązków wybranych roślin.



## ABSTRACT

One of the oldest achievements of the human thought is the use of plants and plant extracts in therapeutics. Drugs of a plant origin are characterized by multi-effects. In recent years, much interest was directed at medicinal plants containing a mixture of biologically active substances with antimicrobial properties. In medicine, for many years have been used substances extracted from plants and their secondary metabolites and plant extracts, but now due to the development of organic chemistry, pharmacology and medicine, we can determine which biologically active substances produced by these plants are useful. Antimicrobial activity were described for selected groups of plant secondary metabolites, which potentially would allow their use as antimicrobial substances in medicines. These substances can be complementary to basic medical treatment, because their main advantage is a lower incidence of side effects. This paper presents an overview of research on antimicrobial properties of alkaloids, coumarins, flavonoids, terpenoids and essential oils, phytosterols, and tannins and phenolic compounds. Examples of alkaloids active against strains of *S. aureus*, *E. faecalis* and *E. coli* are quindoline (1) and cryptolepine (2) which are components of an extract of *Sida acuta* [7]. Saal et al. described the effect of 7-amino-4-methylcoumarin (8) and daphnetin (9) isolated from *Gingo biloba*. These compounds are characterized by activity against strains of the genus *S. aureus*, *E. coli* and *Salmonella enteritidis* [5]. Apigenin (15) and amentoflavone (16) have a strong activity against pathogenic fungi *Candida albicans*, *S. cerevisiae*, and *T. beigellii*. Terpenoids are potent phorbol esters (21-26), dustanine (27), 15-acetoxycustaine (28), cycloartenole (29) [14]. Several phytosterols has antibacterial activity [2, 5, 48]. The examples might be: stigmasterol (36),  $\beta$ -sitosterol (37), epidoxysterol (38) isolated from *Morinda citrifolia* (*Rubiaceae*), which were characterized by strong activity against *Mycobacterium intracellulare* [5]. Many authors reported that the tannins and phenolic compounds were characterized by antimicrobial activity [49-53]. Natural substances that inhibit the growth of microorganisms are becoming an alternative to synthetic compounds, as this literature review confirms it.

**Keywords:** antimicrobial properties, secondary metabolites of plants, herbal medicines

**Słowa kluczowe:** właściwości przeciwdrobnoustrojowe, wtórne metabolity roślinne, medycyna naturalna

---

## WSTĘP

Roślinne metabolity wtórne charakteryzują się biogenetyczną różnorodnością oraz zróżnicowanymi strukturami. Determinuje to ich wielokierunkowe działanie biologicznie. Piśmiennictwo donosi o ich szerokich właściwościach: przeciwbakteryjnych, grzybiczych, wirusowych, hamujących enzymy, a także przeciwnowotworowych [1–12]. W ostatnich latach obserwuje się wyraźny wzrost zainteresowania lekami pochodzenia roślinnego zwłaszcza w krajach europejskich, Japonii i USA. Dzięki rozwojowi chemii organicznej, metod analitycznych, farmakognozji możemy obecnie określić, które metabolity wtórne mogą być skutecznymi środkami przeciwdrobnoustrojowymi. W obecnych czasach, gdy oporność mikroorganizmów na antybiotyki syntetyczne jest już poważnym problemem zarówno medycznym, jak i ekonomicznym, poszukuje się substancji naturalnych zawartych w roślinach, mogących zastąpić leki syntetyczne. Interesujące rezultaty naszych badań zachęciły do zebrania danych na temat właściwości przeciwdrobnoustrojowych roślinnych metabolitów wtórnych. Wiele roślin posiada w swym składzie kompleksy substancji biologicznie czynnych o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych, antyoksydacyjnych i terapeutycznych [1, 2]. Należy podkreślić, iż mieszaniny związków naturalnych, które są w roślinach, działają łagodniej, bardziej skutecznie i kompleksowo w porównaniu do niektórych składników syntetycznych.

Do substancji wtórnych zalicza się, między innymi: glikozydy, flawonoidy, lignany, kumaryny, fenole, garbniki, saponiny, chinony, terpeny, steroidy, alkaloidy, olejki eteryczne. Znajomość dróg biosyntezy substancji naturalnych, szczególnie zaś metabolitów wtórnych jest istotnym czynnikiem optymalizacji procesów biosyntezy w hodowlach tkankowych i mikroorganizmach produkujących antybiotyki.

ESCOP 2003 i ESCOP 2009 supplement (European Scientific Cooperative on Phytotherapy), zawierają informację na temat surowców roślinnych, stosowanych głównie w Europie, między innymi: przedstawiają zastosowanie, interakcje, dawkowanie, długość stosowania, przeciwwskazania i ostrożność leczenia poszczególnymi lekami roślinnymi. W monografii European Medicines Agency (EMA) przedstawiono opinie naukowe dotyczące leków roślinnych wyrażone przez Wspólnotę Europejską na podstawie oceny dostępnych badań naukowych i/lub tradycji stosowania.

### 1. GRUPY ROŚLINNYCH METABOLITÓW WTÓRNYCH O DZIAŁANIU PRZECIWDROBNOUSTROJOWYM

Coraz częściej podejmowane są badania mające na celu poszukiwanie nowych surowców roślinnych o właściwościach mogących mieć zastosowanie w profilaktyce dolegliwości andropauzy i menopauzy, chemoprewencji procesu kancerogenezy gruczolę krokowego, łagodnych postaci metastazy, wyjaśnienie molekularnego podłoża fitoterapii i mechanizmu działania fitoterapeutyków. Dzięki ogromnemu

postępowi w metodach analitycznych możemy obecnie zbadać złożone wyciągi, bądź poszczególne frakcje i izolowane substancje biologicznie czynne, które decydują o właściwościach leczniczych. Leki pochodzenia naturalnego zostały szczegółowo omówione w książce Gerarda Nowaka z 2012 r. [3].

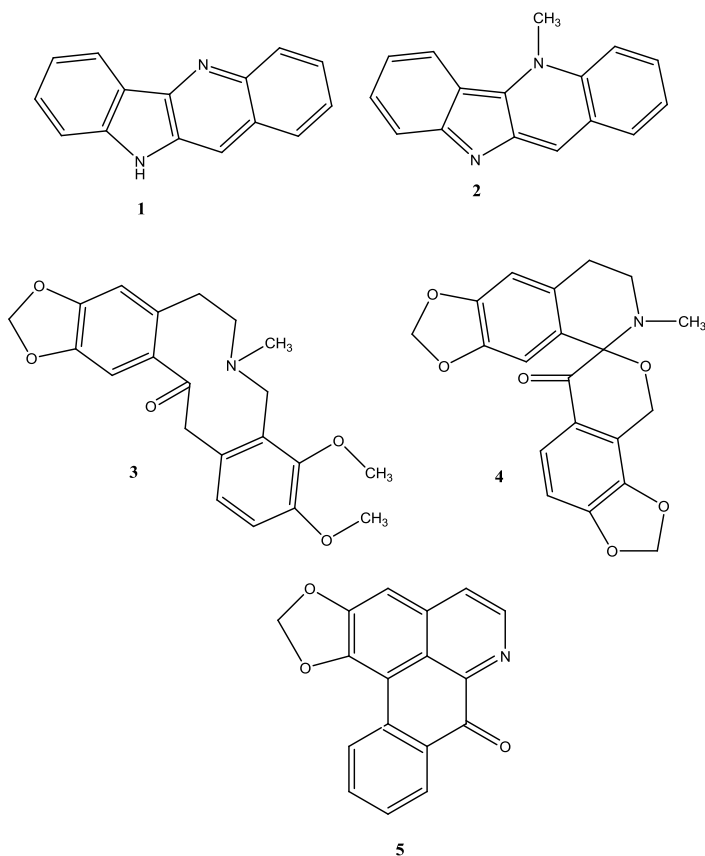
Z roślin wyizolowano wiele substancji chemicznych, które mają być odpowiedzialne za wielokierunkowe działanie fitoterapeutyków. Przykładowo, dotychczas wyizolowano trzy rodzaje substancji należących do dużej grupy fitoestrogenów. Są to flawony, izoflawony i kumestany. Od nich w głównej mierze zależy efekt leczniczy preparatów roślinnych. Genisteina – najbardziej aktywny izoflawon – wykazuje największe powinowactwo do receptorów estrogennych. Kumesterol jest silnym estrogenem, flawonoidy – oprócz powinowactwa do receptorów estrogenowych – mają duży wpływ na metabolizm kwasu arachidynowego, prekursora prostaglandyn. Wszystkie te substancje wywierają silne działanie antyoksydacyjne i przeciwrodnikowe. Dzięki tym właściwościom flawony i flawonoidy oddziałują hamująco na cyklooksygenezę i lipooksygenezę, biorąc udział w powstawaniu prostaglandyn z kwasu arachidynowego. Proces ten powoduje rozluźnienie mięśniówki pęcherza i cewki oraz ma działanie przeciwzapalne i przeciwobrzękowe. Stwierdzono, że fitoterapeutyki nie zmieniają morfologii krwi, aktywności enzymów, ani nie upośledzają czynności nerek. Są bezpieczną grupą leków nie wywołujących objawów niepożądanych [4]. W celu spotęgowania skutku leczniczego produkuje się preparaty wieloskładnikowe.

Dużym zainteresowaniem cieszą się rośliny lecznicze zawierające mieszaniny substancji biologicznie aktywnych o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych. Do ważniejszych grup substancji biologicznie aktywnych o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych należą: alkaloidy, kumaryny, flawonoidy i izoflawonoidy, olejki eteryczne i terpenoidy, fitosterole, garbniki i związki fenolowe, poliacytleny, irydoidy, lignany, ksantony [2–4].

### 1.1. ALKALOIDY

Substancjami naturalnymi o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych mogą być alkaloidy, czyli różnorodne związki organiczne pochodzenia roślinnego o charakterze zasadowym, zawierające przeważnie azot. W roślinie pełnią funkcje ochronne. Alkaloidy występują w całym świecie roślinnym, w mikroorganizmach, grzybach oraz u niektórych zwierząt. Znanych jest ponad 12 tysięcy różnych alkaloidów. W medycynie alkaloidy wykorzystuje się jako leki przeciwbakteryjne, przeciwbólowe, pobudzające ośrodkowy układ nerwowy (OUN), nasenne, a także jako środki psychotropowe, odurzające, miejscowo znieczulające lub zwężające naczynia krwionośne. Wiele alkaloidów wykazuje działanie przeciwbakteryjne [3–6]. Przykładami alkaloidów działających wobec szczepów *S. aureus*, *E. coli* oraz *E. faecalis* są kuindolina (1) oraz kryptolepina (2) będące składnikami ekstraktu z *Sida acuta* (MIC = 16–400 mg/ml) [7]. Su i współpracownicy potwierdzili działanie prze-

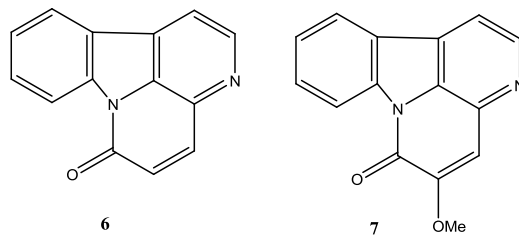
ciwbakteryjne siedmiu alkaloidów z kręciszka (*Hypecoum erectum*). W badaniach wykazano, że allokryptolepina (**3**) oraz hiperkorinina (**4**) charakteryzowały się działaniem wobec bakterii *P. aeruginosa* oraz *E. coli* (MIC = 125 mg/ml) [13]. Okunade opisał roślinne alkaloidy działające na mykobakterie, a były to, między innymi: klauzolina, echinulina, kleistofolina, sampangina (MIC = 0,78–100,0 µg/ml) [14]. Wykazano doświadczalnie, że niektóre alkaloidy charakteryzują się działaniem na wieloantybiotykooporne gronkowce złociste, wśród nich szczep MRSA [15–18]. Zhang i współpracownicy udowodnili, że szczep *Staphylococcus aureus* oporny na metycylinę (MRSA) jest wrażliwy na aporfinę (**5**) wyizolowaną z *Guatteria multivenia* (MIC wynosiło 2,0 µg/ml) [15].



Rysunek 1. Alkaloidy o działaniu przeciwbakteryjnym  
Figure 1. Antibacterial alkaloids

Godna uwagi jest stosunkowo wysoka aktywność przeciwgrzybicza alkaloidów wyizolowanych z czosnku neapolitańskiego (*Allium neapolitanum*) wobec grzybów z rodzaju *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *A. terreus*, *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *Trichosporon beigelii*, *Trichosporon cutaneum* oraz *Trichophyton men-*

*tagrophytes var. interdigitale*. Wyizolowane alkaloidy kantyn-6-on (**6**) oraz jego pochodna (**7**) hamowały rozwój grzybów w stężeniu 1,66–10,12 µg/ml [5].



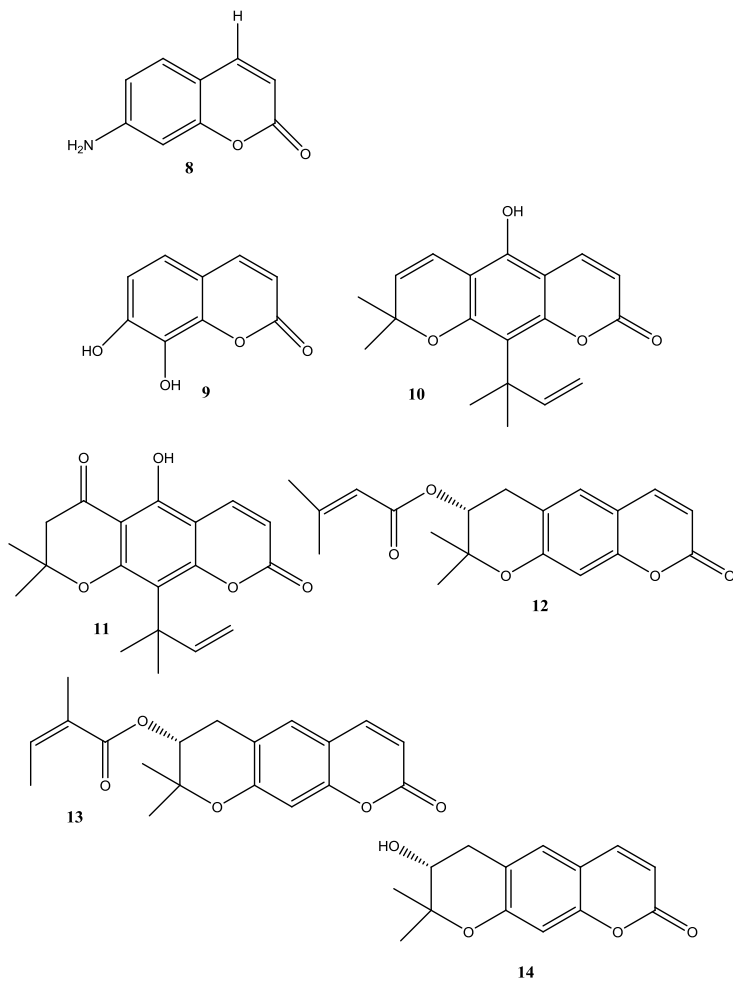
Rysunek 2. Alkaloidy o działaniu przeciwgrzybiczym  
Figure 2. Alkaloids of antifungal activity

W cebuli czosnku (*Allium sativum bulbosum*) występują dwa inne ważne składniki: allicyna i jej produkt rozpadu ajoen, które wykazują właściwości, pośrednio lub bezpośrednio, wpływające na serce i układ krążenia. Czosnek hamuje agregację płytek krwi, jest skuteczny w usuwaniu wolnych rodników, hamowaniu peroksydacji tłuszczów, wykazuje działanie przeciwzapalne. Badania kliniczne niektórych preparatów z czosnku w formie bezzapachowych tabletek lub olejku destylowanego z cebuli czosnku nie dały znaczących efektów obniżania poziomu cholesterolu i trójglicerydów [3].

## 1.2. KUMARYNY

Kumaryny są dwupierścieniowymi pochodnymi benzo- $\alpha$ -pironu. Związki kumarynowe najczęściej występują w roślinach jako glikozydy oraz składniki olejków eterycznych i ekstraktów roślinnych. Dotychczas poznano ogółem ponad 300 kumaryn. Najczęściej występują one w nasionach, owocach i korzeniach. Działanie kumaryn zawartych w surowcach, stosowanych w postaci mieszanek ziołowych zależy od stopnia ich rozpuszczalności w środowisku wodnym. Badania ostatnich lat dostarczyły nowych interesujących danych o właściwościach farmakologicznych kumaryn, a do nich zaliczamy: działanie uspokajające, przeciwskurczowe i rozszerzające naczynia krwionośne oraz przeciwnowotworowe [5]. W badaniach *in vivo* przeprowadzonych przez Imaida, 1% eskulina hamowała promocję rozwoju guza nowotworowego szczura, indukowanego przez podskórne podanie 1,2-dimetylohydrazyny (40 mg/kg m.c., przez tydzień), a następnie 1-metylo-1-nitrozomocznika (20 mg/kg m.c., dwa razy na tydzień, przez dwa tygodnie) [19]. Substancje kumarynowe wykazują także znaczną aktywność przeciwdrobnoustrojową [20–23]. Saalem i współpracownicy opisali działanie 7-amino-4-metylokumaryny (**8**), oraz dapnetyny (**9**), wyizolowanych z *Gingo biloba*. Związki te charakteryzowały się aktywnością wobec szczepów z rodzaju *S. aureus*, *E. coli* oraz *Salmonella enteritidis* w granicach MIC od 8,5 do 15,0 µg/ml [5]. Okunade i Arbab wykazali aktywność kumaryn

wobec mykobakterii. Najwyższą aktywnością charakteryzowały się dentatina (**10**) oraz nordentatina (**11**), wyizolowane z *Clausena excavata* (MIC = 50,0–200,0 mg/ml) [14, 21]. Basile opisał działanie przeciwbakteryjne grandiwiny (**12**), agasyliny (**13**), aegelinolu (**14**), wyizolowanych z *Ferulago campestris*. Związki te działały wobec szczepów *S. aureus*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *E. cloacae* (MIC = 16–250 mg/ml) [20].



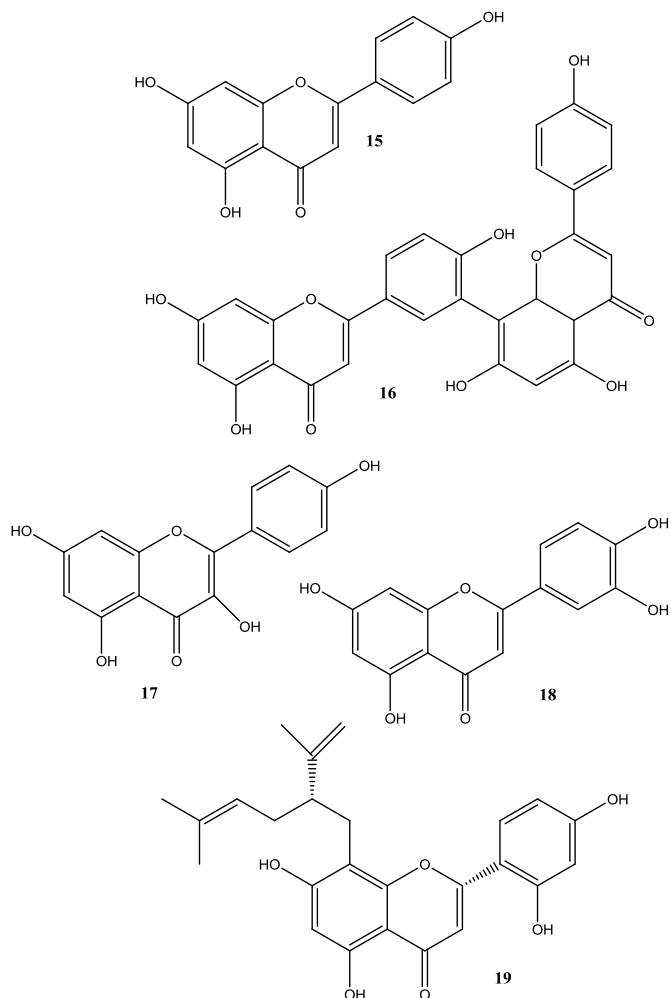
Rysunek 3. Kumaryny o działaniu przeciwbakteryjnym  
Figure 3. Coumarin antibacterial

### 1.3. FLAWONOIDY

Flawonoidy są bardzo rozpowszechnionymi roślinnymi metabolitami wtórnymi. Są to związki o charakterze barwników. W roślinach, jako składniki aktywne biochemicznie, nadają zabarwienie kwiatom i owocom, są kopigmentami antocyjanidyn, stanowią filtr chroniący roślinę przed promieniowaniem UV, działają jako antyoksydanty, chroniąc roślinę przed działaniem wolnych rodników, powstających w trakcie fotosyntezy. Związki flawonoidowe charakteryzuje wielokierunkowa aktywność biologiczna, która jest wykorzystywana w celach leczniczych, terapeutycznych i kosmetycznych. Niektóre flawonoidy działają uszczelniająco na naczynia krwionośne i mają wpływ na krążenie w mięśniu sercowym. Działają: przeciwzapalnie, przeciwwrzodowo, przeciwalergicznie, antyagregacyjnie na płytki krwi, spazmolitycznie, diuretycznie oraz chronią wątrobę. Właściwości te stwierdzono dla różnych indywidualnych związków flawonoidowych, zależnie od ich budowy chemicznej. Stwierdzono, że flawonoidy z grupy flawonów, flawonoli i ich glikozydów charakteryzują się aktywnością przeciwbakteryjną, przeciwgrzybiczą i przeciwwirusową oraz hamującym działaniem niektórych enzymów [5, 24–30]. Mechanizm oraz siła ich działania zależy od budowy chemicznej oraz obecności lub braku różnych grup funkcyjnych [24, 26]. Apigenina (**15**) i amentofalwon (**16**) charakteryzują się aktywnością przeciwgrzybiczą. Wrażliwe na ich działanie są grzyby chorobotwórcze *C. albicans*, *S. cerevisiae* oraz *T. beigeli* (MIC = 5 mg/ml) [5]. Przykładem wszechstronnego działania jest kemferol (**17**). Występuje, między innymi, w liściach herbaty *Camelia sinensis* (*Theaceae*) w ilości 8%, w kwiatach tarniny *Prunus spinosa* (*Rosaceae*), kwiatach ostróżeczki polnej *Consolida regalis* (*Ranunculaceae*). Ponadto występuje w postaci licznych glikozydów. Kemferol działa na bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne (MIC = 2,4–10,1 mg/ml), oraz na grzyby z rodzaju *Candida glabrata* (MIC = 4,8–9,7 mg/ml) [5, 26].

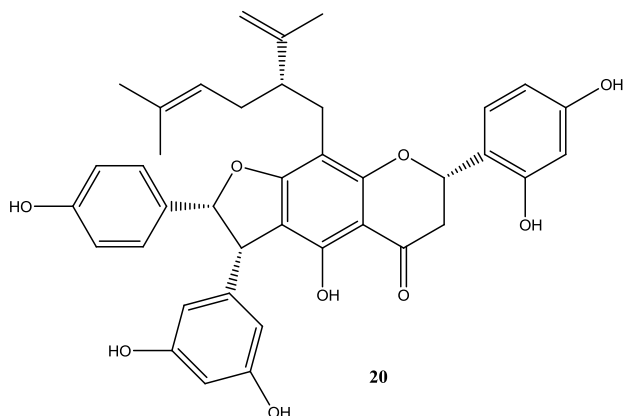
Flawonoidy są aktywne wobec szczepów antybiotykoopornych. Badania udowadniają, że wielohydroksylowe pochodne flawonoidów wykazują aktywność przeciwko metycyliny opornym szczepom *S. aureus* (MRSA) [5, 17, 31]. Saleem opisuje silne działanie apigeniny (**15**), wyodrębnionej z *Scutellaria barbata* (*Lamiaceae*), wobec 20 szczepów MRSA (MIC = 3,9–15,6 mg/ml) [5]. Sato i współpracownicy [31] zbadali apigeninę (**15**), i luteolinę (**18**), zarówno wobec zwykłych szczepów *S. aureus* oraz szczepów MRSA. Okazało się, że testowane flawonoidy wykazują zdolność hamowania wzrostu szczepów przy wartości MIC zawierającej się w granicach 3,9–62,5 mg/ml. Stwierdzono, że wzrost szczepów MRSA hamowały: kemferol, datiscetyna, kwercetyna, luteolina, mirycetyna (w kolejności malejącej). Podstawienie aglikonów resztą cukrową znosi aktywność, np. glikozydy mirycetyny i kwercetyny były nieaktywne [27]. Wyniki badań innych autorów wskazują na działanie synergistyczne kombinacji wankomycyny z soforaflawonem G (**19**), (FIC indeks = 0,16) [32]. Innym metabolitem wtórnym z grupy flawonoidów charakteryzującym się działaniem wobec 21 szczepów MRSA w granicach MIC 3,31–6,25 mg/ml jest alopekuron (**20**). Związek ten działa silniej niż syntetyczne antybiotyki, gentame-

cyna i erytromycyna (MIC = 1,56–100,0 mg/ml) [33]. Niektóre flawonoidy hamują aktywność *Helicobacter pylori*, która odpowiada za 80% przypadków choroby wrzodowej żołądka i 90% przypadków choroby wrzodowej dwunastnicy. Zakażenie tą bakterią może mieć też wpływ na rozwój nowotworów żołądka. Cechą właściwą tej bakterii jest odporność na działanie kwasu żołądkowego. Wytwarza ona w dużych ilościach ureazę, enzym katalizujący rozkład mocznika do dwutlenku węgla i amoniaku. Amoniak powoduje neutralizację kwasu solnego (obecnego w soku żołądkowym) w bezpośrednim otoczeniu *H. pylori*, co ma podstawowe znaczenie dla jej przeżycia [26].



Rysunek 4. Flawonoidy o aktywności biologicznej  
Figure 4. Flavonoids



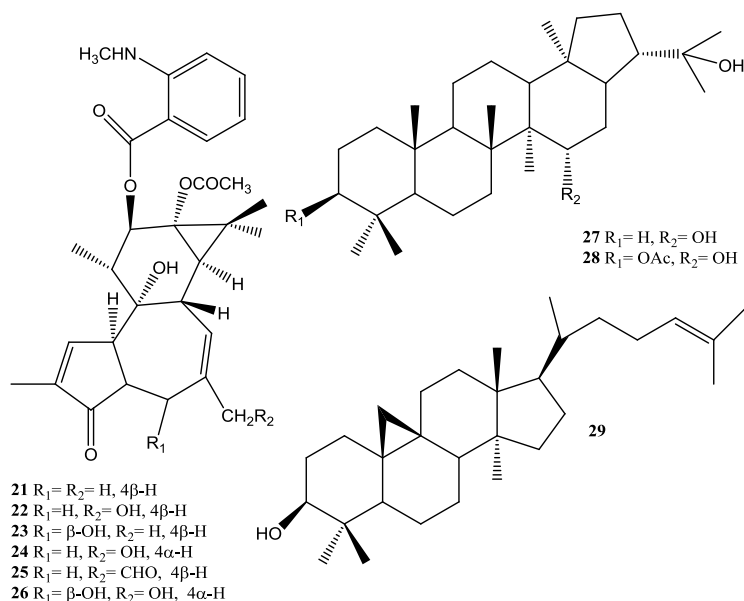


Rysunek 4. Ciąg dalszy  
Figure 4. Continuation

Niektóre aglikony flawonoidowe mają zdolność hamowania ureazy (glikozydy działają zdecydowanie słabiej). Aktywnością hamującą ureazy charakteryzują się flawonoidy, posiadające grupę metoksyłową w C-4', natomiast obecność grupy hydroksylowej lub dodatkowej OH w pierścieniu B redukuje to działanie. Działanie takie wykazują, np. poncyretyna (MIC = 10 mg/ml), hesperetyna (MIC = 20 mg/ml), naryngenina (MIC = 40 mg/ml), diosmetyna (MIC = 80 mg/ml), ampicylina (MIC = 1 mg/ml) [27].

#### 1.4. TERPENOIDY I OLEJKI ETERYCZNE

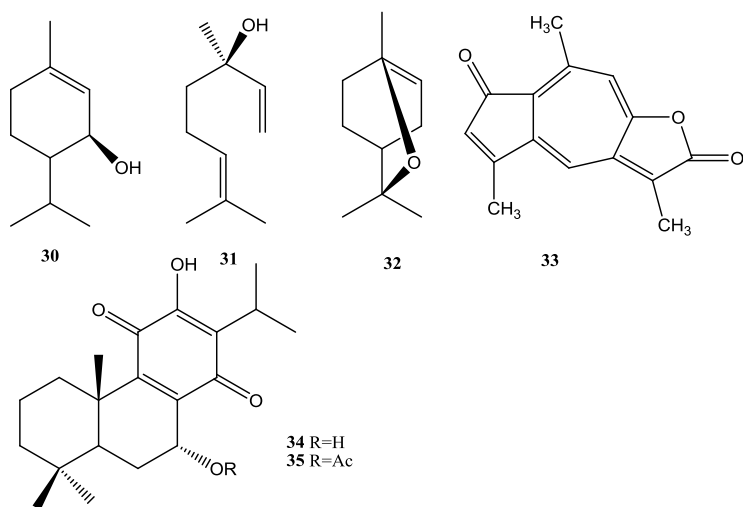
Terpenoidy i substancje olejkowe należą do najobszerniejszej grupy wtórnych metabolitów roślinnych. Badania dotyczące ich właściwości przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybiczych prowadzone są od dawna. Udowodniona została aktywność przeciwbakteryjna (2–5, 15, 33–43) oraz przeciwgrzybicza (5, 39, 41). W pracy Cantrella i współpracowników opisano 118 związków terpenoidowych pochodzenia naturalnego i syntetycznego, o udowodnionym działaniu antymikrobiologicznym przeciwko mykobakteriom [42]. Najlepsze efekty działania terpenoidów w niszczeniu pałeczek gruźlicy zebrał i opisał zespół pod kierownictwem Okunade. Silnie działającymi terpenoidami były estry forbolu (**21–26**), dustanina (**27**), 15-acetooksydustaina (**28**), cykloartenol (**29**) (MIC = 3,12–25,0 mg/ml) [14].



Rysunek 5. Terpenoidy o działaniu antymykobakteryjnym  
 Figure 5. Terpenoids antimycobacterial

Wiele roślin zawiera w swym składzie terpenoidy o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, przykładem może być drzewo herbaciane (*Melaleuca alternifolia*) [34]. W olejku eterycznym (*Melaleuca aetheroleum*) zawarte są przede wszystkim monoterpény: terpinen-4-ol (30),  $\gamma$ -terpinen, 1,8-cyneol oraz  $\alpha$ -terpinen,  $\alpha$ -terpineol i inne. Olejek w badaniach *in vitro* i *in vivo* wykazywał aktywność przeciwdrobnoustrojową obejmującą szerokie spektrum bakterii, drożdżaków i grzybów w tym *Escherichia coli*, *Staphylococcus ureus*, *Candida albicans*. Najbardziej aktywnymi *in vitro* komponentami olejku wobec powyższych drobnoustrojów były 1,8-cyneol, terpinen-4-ol (30) i  $\alpha$ -terpineol [3]. Przebadano terpinen-4-ol (30) oraz linalol (31) pod kątem aktywności przeciwbakteryjnej wobec szczepów *S. aureus*. Związki te charakteryzowały się silnym działaniem przeciwbakteryjnym (MIC = 0,125–0,25% v/v) [15, 32, 33]. Z kolei Kalemba i Kusewicz [35] przebadali – 1,8-cineol (32) wyizolowany z bylicy (*Artemisia asiatica*), który charakteryzował się działaniem przeciwbakteryjnym wobec szczepu *S. aureus* (MIC = 2,0 mg/ml), *E. coli* i *P. aeruginosa* (MIC = 3,0 mg/ml). Kawazoe i współpracownicy opublikowali wyniki badań nad gujanolidem (33), otrzymanego z innej odmiany bylicy (*Artemisia gilvescenes*), które wskazują na silne działanie przeciwbakteryjne wobec szczepu MRSA tego seskwiterpenoidu (MIC = 1,95) [43]. Ważne wydają się być wyniki prac Ulubelena i współpracowników [44–46], ukazujące działanie przeciwbakteryjne związków diterpenowych z szałwi (*Salvia blepharochlena* i *Salvia virdis*). Związki horminon (34), oraz 7-acetylhorminon (35), charakteryzowały się aktywnością wobec szczepów *S. aureus* i *S. epidermidis* w zakresie MIC od 1,5 do 10 mg/ml.

Liście szalwi lekarskiej (*Salvia officinalis* L.), posiadają właściwości przeciwbakteryjne (bakterie Gram + i Gram -) i przeciwgrzybiczne [3]. Dwuterpeny izolowane z liści szalwi lekarskiej wykazują aktywność przeciwko niektórym gatunkom wirusów. Stwierdzono w badaniach *in vivo*, że związki fenolowe redukują zapalenie dziąseł, jamy ustnej błon śluzowych gardła [3]. Związki terpenoidowe i ich mieszaniny wykazują także działanie przeciwgrzybiczne. Hammer i współpracownicy stwierdzili aktywność monoterpenu wobec drożdżaków i grzybów nitkowatych [47]. Podczas badań okazało się, że grzyby z rodzaju *Candida* (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*) charakteryzują się wrażliwością na mieszaniny monoterpenu. Wysoką aktywność przeciwgrzybiczną wykazują: terpinen-4-ol,  $\alpha$ -pinen,  $\beta$ -pinen, 1,8-cyneol (**32**), linalol (**31**) i 4-terpineol (**30**). Ta mieszanina metabolitów terpenoidowych hamuje także rozwój dermatofitów, w tym *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum* czy *Microsporum gypseum*. Podobnie, wzrost *Aspergillus niger* i *A. flavus* również jest hamowany przez te monotereny [47].

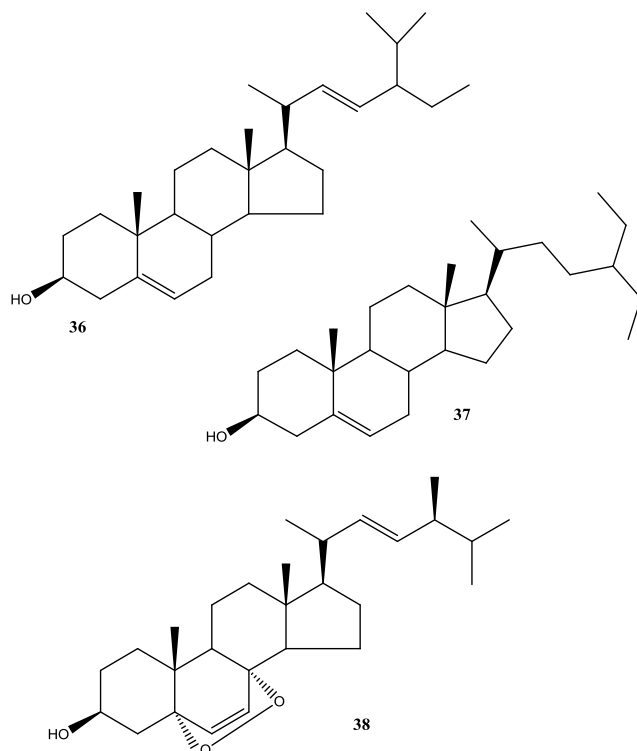


Rysunek 6. Monoterpeny, seskwiterpeny i diterpeny o działaniu przeciwbakteryjnym i przeciwgrzybicznym  
Figure 6. Monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes with antibacterial and antifungal

### 1.5. FITOSTEROLE

Sterole roślinne (fitosterole) charakteryzują się czterema pierścieniami skondensowanymi kątowno i obecnością grupy hydroksylowej w pozycji 3, ewentualnie podwójnym wiązaniem i obecnością alifatycznego łańcucha w pozycji 17. Liczne badania wykazały, że fitosterole posiadają właściwości przeciwwzkrzepowe, przez co zmniejszają ryzyko wystąpienia zawału serca oraz udaru mózgu. Ponadto zaobserwowano, że wysoka zawartość fitosteroli w diecie zapobiega rozwojowi wielu nowotworów, zwłaszcza jelita grubego, prostaty czy piersi. W medycynie sterole

roślinne wspomagają leczenie rozrostu prostaty, a także pomagają podczas trudności z oddawaniem moczu. Wskazaniem do spożywania fitosteroli są również zabiegi operacyjne na gruczole krokowym. Spożywanie w dużych ilościach fitosteroli nie powoduje skutków ubocznych. Wysokie dawki fitosteroli wykazują działanie estrogenne, przez co zmniejszają u kobiet objawy menopauzy. Ponadto sterole roślinne hamują produkcję wolnych rodników, których nadmiar przyspiesza starzenie się organizmu oraz jest przyczyną wielu chorób. Wiele fitosteroli wykazuje działanie przeciwbakteryjne [2, 5, 48]. Przykładem mogą być: stigmasterol (36),  $\beta$ -sitosterol (37), epidoksysterol (38), wyizolowane z *Morinda citrifolia* (Rubiaceae), które charakteryzowały się silnym działaniem przeciwko *Mycobacterium intracellulare* (MIC = 2,5–128 mg/ml) [5]. Stigmasterol (36), występuje obficie w oleju sojowym z *Glycine soja* (Fabaceae) i innych olejach roślinnych, burakach, selerach i innych jarzynach. Odgrywa rolę w metabolizmie fosforanów.  $\beta$ -sitosterol (37), występuje obficie w olejkach kielkujących zbóż i w wielu innych roślinach. Zastosowano go w lekach zmniejszających stężenie cholesterolu we krwi. Wykazuje działanie przeciwzapalne, i przeciwgorączkowe.



Rysunek 7. Fitosterole o działaniu przeciwbakteryjnym

Figure 7. Phytosterols antibacterial

## 1.6. GARBNIKI I ZWIĄZKI FENOLOWE

Garbniki są to bezazotowe substancje naturalne o dużej masie molowej, rozpuszczalne w wodzie, zawierające liczne grupy hydroksylowe, mające charakter polifenoli i właściwości tworzenia trwałych połączeń z białkami i innymi makrocząsteczkami. Związki fenolowe są bardzo rozpowszechnione, szczególnie wśród roślin kwiatowych. Związki roślinne o charakterze fenolowym mogą powstawać na drodze aromatyzacji poprzez kwas szikimowy, kwas cynamonowy, fenyloalaninę i tyrozynę. Na tej drodze powstają fenolokwasy, a także odpowiednie alkohole i aldehydy. Druga droga biosyntezy to powstanie pierścienia benzenowego (albo kilku pierścieni) poprzez kondensację aktywnego octanu. Garbniki oraz związki fenolowe syntetyzowane w roślinach pełnią funkcję ochronną, zabezpieczając rośliny przed infekcjami bakteryjnymi oraz chorobami wywoływanymi przez grzyby [49, 50]. Ogólną właściwością garbników jest działanie ściągające koagulujące białko. Wielu autorów podaje, iż garbniki i związki fenolowe charakteryzują się działaniem przeciwbakteryjnym [49–53]. Działanie to może być związane z tworzeniem kompleksów z enzymami i substratami bakteryjnymi. W badaniach *in vitro* wykazano, że wiele enzymów bakteryjnych takich jak: celulaza, pektynaza, ksylanaza, peroksydaza, transferaza glukozylowa, traci swoją aktywność po dodaniu garbników i kwasów fenolowych [49]. Garbniki i związki fenolowe wykazują aktywność wobec gronkowców (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*) [49–54]. Przykładowym związkiem o działaniu przeciwbakteryjnym jest gibbilimbol B, wyizolowany z liści *Piper gibblimum* (*Piperaceae*). Związek ten charakteryzował się aktywnością wobec szczepu *S. epidermidis* na poziomie MIC = 2,0 mg/ml [55]. Bansa i Adeyemo [51] podjęli próbę określenia aktywności biologicznej mieszaniny garbników wyizolowanych z *Dichrostachys cinerea* wobec *Staphylococcus aureus*, *Shigella boydii*, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli* oraz *Pseudomonas aeruginosa*. Uzyskane rezultaty świadczyły o hamującym wpływie mieszaniny garbników na poziomie MIC 4,0–6,0 mg/ml. Działanie przeciwbakteryjne potwierdzono także dla kwasów fenolowych: kawowego, wanilinowego, *p*-kumarowego, *p*-hydroksybenzoesowego [52, 53]. Znalezione w *Scrophularia Jrutescens* i *Scrophularia sambucifolia* fenolokwasy: ferulowy, izowanilinowy, *p*-hydroksycynamonowy, syringowy, kawowy, gentyzowy i protokatechowy wykazują właściwości przeciwbakteryjne, szczególnie przeciwko bakteriom Gram+ (*Bacillus sp.*). Surowce te są wykorzystywane w medycynie tradycyjnej jako środek przeciwzapalny i zwalczający różne dermatozy, a także przeciw pasożytniczy (świerzb) [54].

Fenolowe składniki wielu olejków eterycznych (np. tymol, eugenol, karakol i inne) działają dezynfekująco i są stosowane w różnych preparatach zawierających te olejki lub odpowiednie wyciągi roślinne.

## PODSUMOWANIE

Przegląd literatury dowodzi, jak dużym zainteresowaniem cieszy się ta tematyka. W obliczu coraz częściej występującej odporności bakterii na stosowane syntetyczne antybiotyki ważne jest poszukiwanie nowych, skutecznych alternatyw, skutecznych w zakażeniach drobnoustrojami chorobotwórczymi. W niniejszym opracowaniu przedstawiono dane literaturowe, wskazujące na przeciwdrobnoustrojowe działanie roślinnych metabolitów wtórnych. Związki te są wartościowym materiałem do badań. Potencjalna aktywność biologiczna stwarza nadzieję na wykorzystanie substancji produkowanych przez rośliny w terapii trudnych do zwalczania zakażeń, natomiast znajomość ich struktury umożliwia podjęcie prób otrzymania danego związku na drodze syntezy chemicznej. Dotychczas poznano właściwości wielu ekstraktów roślinnych, ale istnieje zapewne jeszcze bardzo wiele niezidentyfikowanych. Te, które częściowo zostały przebadane wymagają kolejnych analiz, w celu potwierdzenia ich właściwości, w warunkach *in vivo* i w badaniach klinicznych. Szczególne nadzieje związane są z właściwościami przeciwbakteryjnymi. Istotne jest także poznanie szlaków biosyntezy oraz ich modyfikacja w celu jeszcze wydajniejszej produkcji substancji biologicznie aktywnych w różnych systemach, np. roślinnych kulturach bioreaktorowych. Ważne jest zbadanie działania synergizmu wtórnych metabolitów roślinnych z lekami syntetycznymi.

## PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] A.M. Clark, *Pharm. Res.*, 1996, **13**, 1996.
- [2] J. Okpuzor, O. Adebiesia, H. Ogbunuga, *Internat. Biomed. Health Sci.*, 2008, **4**, 47.
- [3] G. Nowak, *Leki pochodzenia naturalnego*. 2012. Wyd. Univ. Medycznego, Poznań.
- [4] W. Ejchman. *Przegląd Urologiczny*, 2004, **5**, 1.
- [5] M. Saleem, M. Nazir, M. Shaig, H. Hussain, *Nat. Prod. Rep.*, 2010, **27**, 238.
- [6] A. Sher, Gomal. *J. Med. Sci.*, 2009, **7**, 72.
- [7] P.M. Pauletti, A.R. Araujo, M.C. Young, A.M. Giesbrecht, V.D. Bolzani, *Phytochemistry*, 2000, **55**, 597.
- [8] K. Winkelmann, J. Heilmann, O. Zerbe, T. Rali, O. Sticher, *J. Nat. Prod.*, 2000, **63**, 104.
- [9] A.T. Hübner, *Phytomedicine*, 2003, **10**, 206.
- [10] A. Ulubelen, S. Oksuz, G. Topcu, A.C. Goren, C. Bozok-Johansson, C. Celik, G. Kokdil, W. Voelter, *Nat. Prod. Lett.*, 2001, **15**, 307.
- [11] V. Vajs, S. Vugdelija, S. Trifunovic, I. Karadzic, N. Juranic, S. Macura, S. Milosavljevic, *Fitoterapia*, 2003, **74**, 439.
- [12] K. Hayashi, M. Kamiya, T. Hayashi, *Planta Med.*, 1995, **61**, 237.
- [13] Y. Su, S. Li, N. Li, L. Chen, Z. Zhang, *J. Med. Plants Res.*, 2011, **5**, 5428.
- [14] A.L. Okunade, P.F. Elvin-Lewis, W.H. Lewis, *Phytochemistry*, 2004, **65**, 1017.
- [15] Z. Zhang, H.N. ElSohly, M.R. Jacob, D.S. Pasco, L.A. Walker, *J. Nat. Prod.*, 2002, **65**, 856.
- [16] R. Zaraghi, L. Worrall, R.H. See, W. Strangman, W.L. Poppelwell, H. Gong, *J. Biol. Chem.*, 2011, **52**, 716.
- [17] S. Gibbons, *Nat. Prod. Rep.*, 2004, **21**, 272.
- [18] D. Karou, D. Savadogo, A. Canini, S. Yameogo S. Afri, *J. Biotech.*, 2006, **5**, 197.

- [19] K. Imaida, M. Hirose, S. Yamaguchi, S. Tanahashi, *Cancer Lett.*, 1990, **5**, 53.
- [20] A. Basile, S. Sorbo, V. Spadaro, B. Maurizio, *Molecules*, 2009, **14**, 939.
- [21] I.A. Arbab, A.B. Abdul, M. Aspollah, R. Abdullah, *J. Med. Plants Res.*, 2011, **5**, 7177.
- [22] F. Cottiglia, G. Loy, D. Garau, C. FloriS, *Phytomedicine*, 2001, **8**, 302.
- [23] J. Wideliski, M. Popova, K. Graikou, K. Glowniak, K. Chinou, *Molecules*, 2009, **14**, 2729.
- [24] B.M. Tincusi, I.A. Jimenez, I.L. Bazzocchi, L.M. Moujir, Z.A. Mamani, J.P. Barroso, A.G. Ravelo, B.V. Hernandez, *Planta Med.*, 2002, **68**, 808.
- [25] A. Braca, I. Morelli, J. Mendez, L. Battinelli, L. Braghiroli and G. Mazzanti, *Planta Med.*, 2000, **66**, 768.
- [26] T.P. Cushnie, A.J. Lamb, *Internat. J. Antimic. Agents*, 2005, **26**, 343.
- [27] W. Byłka, I. Matławska, N.A. Pilewski, *JANA*, 2004, **7**, 9.
- [28] F. Bakkali, S. Averbeck, D.I. Averbeck, *Food Chem. Toxicol.*, 2008, **46**, 446.
- [29] B.M. Tincusi, I.A. Jimenez, I.L. Bazzocchi, L.M. Moujir, Z.A. Mamani, J.P. Barroso, A.G. Ravelo, B.V. Hernandez, *Planta Med.*, 2002, **68**, 808.
- [30] A. Braca, I. Morelli, J. Mendez, L. Battinelli, L. Braghiroli, G. Mazzanti, *Planta Med.*, 2000, **66**, 768.
- [31] Y. Sato, S. Suzaki, T. Nishikawa, M. Kihara, H. Shibata, T. Higuti, *J. Ethnopharmacol.*, 2000, **72**, 483.
- [32] S.G. Dastidar, S.K. Mahapatra, K. Ganguly, A.N. Chakrabarty, Y. Shirataki, N. Motohashi, *In Vivo*, 2001, **15**, 519.
- [33] M. Sato, H. Tsuchiya, T. Miyazaki, M. Ohyama, T. Tanaka, M. Iinuma, *Lett. Appl. Microbiol.*, 1995, **21**, 219.
- [34] I.B. Bassett, D.L. Pannowitz, R.S. Barnetson, *Med. J. Aust.*, 1990, **153**, 455.
- [35] A. Raman, U. Weir, S.F. Bloomfield, *Lett. Appl. Microbiol.*, 1995, **21**, 242.
- [36] C.F. Carson, T.V. Riley, *J. Appl. Bacteriol.*, 1995, **78**, 264.
- [37] D. Kalemba, D. Kusewicz, K. Swiader, *Phytother. Res.*, 2002, **16**, 288.
- [38] T. Nagappan, P. Ramasamy, M. Effendy, A. Wahid, *Molecules*, 2011, **16**, 9651.
- [39] A. Kędzia, B. Kochańska, B. Molęda-Ciszewska, A. Wojtaszek-Słowińska, *Dent. Med. Probl.*, 2010, **47**, 328.
- [40] T. Malik, P. Singh, *Asian J. Biol. Sci.*, 2010, **3**, 92.
- [41] M.D. Saković, J. Vukojevic, P.D. Marin, D.D. Brkic, *Molecules*, 2009, **14**, 238.
- [42] C.L. Cantrell, S.G. Franzblau, N.H. Fischer, *Planta Med.*, 2001, **67**, 685.
- [43] K. Kawazoe, Y. Tsubouchi, N. Abdullah, Y. Takaishi, H. Shibata, T. Higuti, H. Hori, M. Ogawa, *J. Nat. Prod.*, 2003, **66**, 538.
- [44] A. Ulubelen, S. Oksuz, G. Topcu, A.C. Goren, W. Voelter, *J. Nat. Prod.*, 2001, **64**, 549.
- [45] A. Ulubelen, S. Oksuz, U. Kolak, C. Bozok-Johansson, C. Celik, W. Voelter, *Planta Med.*, 2000, **66**, 458.
- [46] A. Ulubelen, *Phytochemistry*, 2003, **64**, 395.
- [47] K.A. Hammer, C.F. Carson, T.V. Riley, *J. Applied Microbiol.*, 2003, **95**, 853.
- [48] A.R. Mehtiev, A. Misharim, *Biomedical chemistry*, 2008, **2**, 12.
- [49] K.T. Chung, C.I. Wei, *Trends in Food Science & Technology*, 1998, **9**, 168.
- [50] A. Scalbert, *Phytochemistry*, 1991, **30**, 3875.
- [51] A. Bansa, S.O. Adeyemo, *Afr. J. Biotech.*, 2007, **6**, 1785.
- [52] H. Akiyama, K. Fujii, O. Yamasaki, T. Oono, K. Iwatsuki, *J. Antimic. Chem.*, 2001, **48**, 487.
- [53] Borkowski, A. Biesiadecka, B. Litwińska, *Herba Polonica* 1996, **4**, 318.
- [54] B. Borkowski, *Herba Polonica*, 1993, **3**, 77.
- [55] J. Orjala, P. Mian, T. Rali, O. Sticher, *J. Nat. Prod.*, 1998, **61**, 939.





# TRANSPORT PRZEZNASKÓRKOWY AKTYWNYCH SKŁADNIKÓW KOSMETYCZNYCH

## PERCUTANEOUS PENETRATION OF ACTIVE COSMETICS INGREDIENTS

**Magdalena Malinowska, Elżbieta Sikora\*,  
Jan Ogonowski**

*Instytut Chemii i Technologii Organicznej  
Wydział Inżynierii i Technologii Chemicznej, Politechnika Krakowska  
ul. Warszawska 24, 31-155 Kraków  
\*e-mail: esikora@pk.edu.pl*

---

Abstract

Wstęp

1. Naskórek – budowa i funkcje
2. Transport przeznaskórkowy
3. Penetracja substancji aktywnej przez skórę
4. Czynniki wpływające na efektywność przenikania związków
  - 4.1. Lipofilowość
    - 4.1.1. Metody wyznaczania lipofilowości
  - 4.2. Baza kosmetyku
  - 4.3. Promotory przenikania
5. Metody badania przenikalności przez skórę
  - 5.1. Komora Franza
  - 5.2. Dyfuzyjna komora przepływowa
  - 5.3. Model Saarbruckena
  - 5.4. Metoda ATR-FTIR

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

---

**mgr inż. Magdalena Malinowska** – absolwentka Wydziału Inżynierii i Technologii Chemicznej Politechniki Krakowskiej. Jest doktorantką w Instytucie Chemii i Technologii Organicznej.

**dr inż. Elżbieta Sikora** – ukończyła studia i doktoryzowała się na Wydziale Inżynierii i Technologii Chemicznej Politechniki Krakowskiej. Jest adiunktem w Katedrze Technologii Organicznej i Procesów Rafineryjnych. Zainteresowania naukowe dr inż. E. Sikory dotyczą technologii organicznej małotonazowej, obejmują zagadnienia związane z pozyskiwaniem, badaniem właściwości oraz zastosowaniem surowców pochodzenia naturalnego w produktach kosmetycznych i produktach chemii gospodarczej.

**prof. dr hab. inż. Jan Ogonowski** – jest kierownikiem Katedry Technologii Organicznej i Procesów Rafineryjnych na Wydziale Inżynierii i Technologii Chemicznej Politechniki Krakowskiej. Zainteresowania naukowe Profesora dotyczą katalizy, technologii chemicznej, technologii produktów małotonazowych oraz chemii i technologii kosmetyków.

## ABSTRACT

This article presents the science output regarding percutaneous transport mechanisms, penetration promoters and the methods of active substances skin absorption enhancement. The interaction between cosmetic ingredient and skin cells determines efficiency of the product. The study presents the most important functions of the skin outlayer (*stratum corneum*), its structure (Fig. 1) and permeability [1–7]. Due to the compact structure, *stratum corneum* prevents skin water loss. Moreover, it protects human body from outer substances influence [8–12]. Relationship between compound properties and its ability to skin absorption was also described. Physicochemical properties like lipophilicity, compound structure and particle size have a significant influence on intensity of the compounds skin penetration [4, 16–25]. Lipophilicity of a molecule is defined using many theoretical and experimental methods which allow to predict cosmetic ingredients assimilation [26–42]. Moreover, cosmetic base composition [43–47] and the presence of the penetration enhancers (promoters) also affect active ingredients absorption through the skin [48–49].

The most popular equipment used for testing the absorption and the penetration of active substances through the human skin are described in the last part of the manuscript. Compounds permeability through the skin could be tested using various experimental methods [50–58] including the diffusion cells equipped with membranes or prepared skin fragments [37, 55, 64–67]. The most common used are Franz diffusion cells (Fig. 4) and flow diffusion cell (Fig. 5). The measurement of permeation through *stratum corneum* using ATR-FTIR method is quite reliable and simple (Fig. 8), although measuring skin penetration is made by Saarbrücken penetration model (Fig. 6) and by application of Tape Stripping technique (Fig. 7). The study of skin absorption mechanisms and factors influencing this process is a great opportunity to design efficient cosmetic recipes and a possibility to make more effective, active cosmetic ingredients.

Keywords: percutaneous permeation, percutaneous absorption, diffusion cells

Słowa kluczowe: przenikanie przezskórne, absorpcja przezskórna, komory dyfuzyjne

---

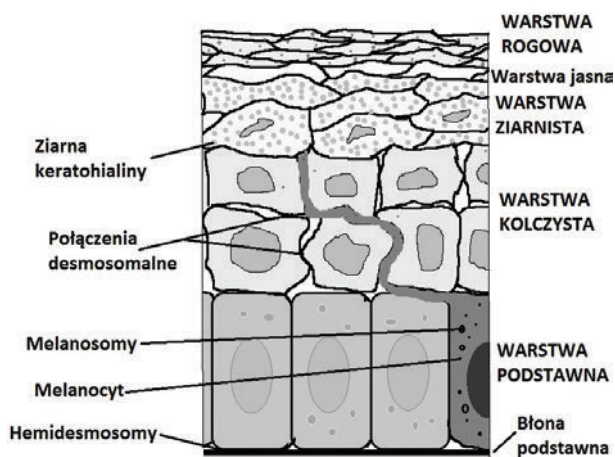
## WSTĘP

Badania nad nowymi substancjami czynnymi o optymalnej aktywności biologicznej oraz wysokiej skuteczności stanowią wyzwanie dla współczesnych naukowców [1]. Zagadnienie transportu substancji aktywnych przez skórę oraz błony to bardzo istotny element w badaniach nad efektywnością działania związków stosowanych w farmacji i kosmetyce.

Jednym z głównych problemów przemysłu kosmetycznego jest uzyskanie odpowiedniego stopnia penetracji składników aktywnych przez skórę, a także potwierdzenie ich klinicznej skuteczności [2]. Oddziaływanie preparatu na lipidy cementu międzykomórkowego warstwy rogowej naskórka oraz na błony komórkowe determinuje skuteczność działania kosmetyku, a także ewentualne efekty niepożądane [3]. Dlatego umiejętność przewidywania zdolności substancji do przenikania przez skórę jest pomocna przy tworzeniu nowych receptur [4]. Poznanie mechanizmów absorpcji substancji czynnych oraz czynników na nie wpływających daje większe możliwości w projektowaniu receptur, a co za tym idzie, zwiększeniu efektywności działania i skuteczności preparatów kosmetycznych [2].

### 1. NASKÓREK – BUDOWA I FUNKCJE

Najbardziej zewnętrzną warstwą skóry ludzkiej jest naskórek. Naskórek zbudowany jest z pięciu warstw komórek znajdujących się w różnych stadiach różnicowania: warstwa podstawna, kolczysta, ziarnista i rogowa. Na styku warstwy rogowej i ziarnistej znajduje się cienka, widoczna jedynie w zrogowaciałym naskórku dłoni i stóp warstwa jasna (Rys. 1). Tworzenie się i rozrost głębszych warstw wymusza na warstwach zewnętrznych proces różnicowania. W głębszych warstwach, komórki naskórka są duże, walcowate i łączą się z przylegającymi komórkami za pomocą desmosomów. W miarę zbliżania się do powierzchni skóry, komórki stają się bardziej zwarte, a ich kształt ulega wysmukleniu. Najbardziej spłaszczone komórki (tzw. *stratum corneum*) stanowiące zewnętrzną, ostatnią warstwę skóry noszą nazwę korneocytów [2, 5, 6]. Grubość naskórka to tylko 10–20 mm, przy 10–25 warstwach korneocytów, a bariera, którą tworzy okazuje się być nie do pokonania dla wielu związków [7].



Rysunek 1. Schemat budowy naskórka  
Figure 1. Epidermis structure scheme

Przestrzeń międzykomórkową warstwy rogowej wypełnia spoiwo wodno-lipidowe nazywane „cementem międzykomórkowym”. Dzięki zwartej budowie, naskórek zapobiega utracie wody ze skóry. Chroni również organizm przed przedostaniem się obcych substancji z zewnątrz. Funkcja ta jest oczywista ze względu na ochronę organizmu przed wnikaniem związków toksycznych, jednak odnosi się także do składników zawartych we wszelkich preparatach nanoszonych na skórę [8, 9]. Głębsze poznanie mechanizmu funkcji barierowej naskórka stanowi bardzo istotny element w projektowaniu receptur kosmetycznych i farmaceutycznych, gdyż ma ona ścisły związek z dostarczaniem do skóry szerokiej gamy substancji leczniczych, pielęgnacyjnych, a także z polepszeniem funkcjonowania skóry [10, 11]. Najbardziej przekonującym dowodem na to, że główną barierą ograniczającą przenikanie związków czynnych jest warstwa rogowa naskórka jest fakt, że fizyczne usunięcie tej warstwy powoduje nagły wzrost intensywności przenikania wody i innych związków w głąb organizmu [4, 12].

Skład lipidów warstwy rogowej jest nieco inny niż głębszych warstw naskórka, m.in. charakteryzuje się mniejszą zawartością fosfolipidów, zawiera za to więcej ceramidów, kwasów tłuszczowych oraz cholesterolu i jego estrów [6]. Obecność amfifilowych fosfolipidów (o charakterze hydrofilowo-hydrofobowym) umożliwia związkom hydrofilowym wnikanie przez membrany oraz zachodzenie wodno-lipidowych procesów biochemicznych. Dlatego właśnie fosfolipidy stanowią 50% lipidów warstwy podstawnej i kolczystej naskórka oraz około 25% warstwy ziarnistej [2]. Glikolipidy, glikoproteiny i cholesterol, które również wchodzi w skład *stratum corneum* to podstawowe komponenty niezbędne do prawidłowego zachodzenia procesów transportu substancji przez błony [2]. Szacuje się, że proteiny stanowią 75–80% *stratum corneum*, lipidy 5–15%, natomiast reszta składników to 5–10% [13]. Wiadomo, że błony komórkowe są przepuszczalne dla substancji hydrofilowych

dzięki obecności protein i glikoprotein, podczas gdy związki lipofilowe przenikają przez podwójną warstwę fosfolipidową i utworzone w niej „pory” [2]. Płynność błony komórkowej oraz jej przepuszczalność są ściśle powiązane z rodzajem lipidów wchodzących w jej skład. Błona jest bardziej elastyczna (bardziej przepuszczalna i płynna) jeśli zawiera więcej nienasyconych kwasów tłuszczowych, natomiast bardziej sztywna (mniej przepuszczalna i o strukturze bardziej usieciowanej) gdy przeważają nasycone kwasy tłuszczowe oraz cholesterol. Dlatego warstwa ziarnista oraz warstwa rogowa naskórka, które zawierają sporo glukozyloceramidów, ceramidów i cholesterolu mają równocześnie, zauważalnie większą sztywność niż głębsze warstwy naskórka. Każda, nawet najmniejsza zmiana proporcji kwasów tłuszczowych w naskórku powoduje wyraźne zmiany w wyglądzie i funkcjonowaniu skóry, wpływa m.in. na spójność warstwy rogowej naskórka (gładkość lub szorstkość skóry) [2].

## 2. TRANSPORT PRZEZNASKÓRKOWY

Substancje aktywne zawarte w recepturach kosmetyków i leków mogą wnikać przez naskórek na dwa sposoby – poprzez warstwę rogową naskórka oraz przez przydatki skórne, tj. gruczoły potowe, łojowe oraz mieszki włosowe. Transport substancji aktywnych przez warstwę rogową do jej głębszych warstw może odbywać się drogą intercelularną (pomiędzy komórkami naskórka, przez lipidy cementu międzykomórkowego) oraz drogą transcelularną (poprzez komórki naskórka – korneocyty). Całkowity przepływ substancji przez skórę jest sumą poszczególnych przepływów, a zrozumienie mechanizmów sterujących przenikaniem związków przez *stratum corneum* jest dość istotne dla projektowania efektywnie działających substancji czynnych w recepturach kosmetycznych [13–15]. Wyniki badań wskazują, że lipidowe obszary warstwy rogowej stanowią ekwiwalent bariery naskórkowej dla większości cząsteczek. Wynika z tego, że droga intercelularna (międzykomórkowa) jest dla związków efektywniejsza niż droga transcelularna (przez komórkowa) [4].

Podstawowa droga dyfuzji substancji prowadzi przez cement międzykomórkowy, który składa się głównie z obszarów lipofilowych. Niżej położone warstwy są zdecydowanie bardziej hydrofilowe. Dlatego charakter związku ma duży wpływ na to, czy związek ulegnie absorpcji. Składniki cementu międzykomórkowego odgrywają znaczącą rolę w kohezji korneocytów, wpływając na przepuszczalność bariery skórnej [1]. Mechanizmy transportu substancji aktywnych mogą przebiegać w różny sposób. Wyróżniono kilka rodzajów przenikania związków przez błony biologiczne. Najbardziej powszechny i najczęściej występujący mechanizm przenikania cząsteczek przez skórę to dyfuzja bierna [4, 16–21]. Jest to proces nie wymagający dostarczenia energii, zachodzący na zasadzie wyrównywania stężeń. Cząsteczki przechodzą zgodnie z gradientem stężeń, co jest uzależnione jedynie od sił fizycznych – dyfuzji, osmozy i ich energii kinetycznej. Cząsteczki z roztworu po jednej stronie błony wnika do jej wnętrza, a następnie przechodzą do fazy wewnętrznej po dru-

giej stronie błony. Substancje tym szybciej przechodzą przez błony, im są lepiej rozpuszczalne w tłuszczach [16, 22].

Transport cząsteczek przez błonę niezgodnie z prawami dyfuzji to transport czynny i wymaga on dostarczenia energii. Stosowane są tu nośniki, które mają powinowactwo do przenoszonej substancji. Energia potrzebna do aktywacji nośnika wytwarzana może być w procesach utleniania lub rozpadu ATP. Jeśli jednak transport z udziałem nośnika odbywa się zgodnie z gradientem stężeń, to nie wymaga wówczas nakładu energii i nazywany jest transportem ułatwionym.

W przypadku małych cząsteczek rozpuszczonych w medium przenikającym przez pory znajdujące się w błonie, mamy do czynienia z transportem konwekcyjnym. Im większa różnica stężeń po obu stronach błony oraz im większa średnica porów, tym szybkość transportu konwekcyjnego jest większa. Ten rodzaj transportu dotyczy jedynie cząsteczek o rozmiarach nieprzekraczających 400 Da.

Transport przez pary jonowe to szczególny przypadek dyfuzji biernej, w którym cząstki dyfundujące są silnie zdysocjowane i łączą się z jonami organicznymi rozpuszczalnymi w lipidach błony.

Kolejny mechanizm transportu cząstek przez błony to pinocytoza. Polega ona na wchłanianiu przez błonę kropelek tłuszczu lub cząstek stałych. Błona ulega w tym miejscu wklęsnięciu i tworzą się drobne pęcherzyki z zamkniętą wewnątrz substancją. Zawartość pęcherzyków przenika przez błonę, natomiast pęcherzyki stopniowo zanikają [4, 16–24].

### 3. PENETRACJA SUBSTACJI AKTYWNEJ PRZEZ SKÓRĘ

Surowce stosowane w kosmetykach jako substancje czynne wykazują odpowiednio wysoką efektywność nie tylko wtedy gdy mają odpowiednie powinowactwo do receptora, czyli aktywność wewnętrzną, ale także gdy cechuje je zdolność do wnikięcia w warstwę rogową naskórka, a następnie w głąb żywych warstw skóry. Zdolność substancji do przenikania skóry jest decydującym czynnikiem umożliwiającym dotarcie związku do odpowiedniego miejsca w obrębie skóry. Proces efektywnej penetracji cząsteczki przez warstwy *stratum corneum* do skóry właściwej można podzielić na kilka etapów [1, 23]:

- partycja związku pomiędzy *vehiculum* o różnej lipofilowości oraz warstwę rogową naskórka,
- dyfuzja związku przez warstwę rogową naskórka,
- partycja związku pomiędzy lipofilową warstwę rogową naskórka a hydrofilowe głębsze warstwy naskórka,
- dyfuzja związku przez kolejne warstwy naskórka oraz skóry właściwej,
- przenikanie związku do krwi przez ściany naczyń włosowatych.

Na Rysunku 2 przedstawiono schematycznie drogę dyfuzji substancji przez skórę.



Rysunek 2. Droga substancji przez struktury skóry  
 Figure 2. Compounds transport through the skin layers

W przybliżeniu proces wchłaniania substancji przez warstwy naskórka można opisać pierwszym prawem dyfuzji Ficka (równanie 1).

$$dq = -DS \frac{dC}{dx} dt \quad (1)$$

gdzie:

$dq$  – masa substancji dyfundującej w czasie  $dt$  przez powierzchnię  $S$ . Masa ta jest proporcjonalna do zmiany stężenia  $dC$  na odcinku  $dx$ ,

$D$  – współczynnik dyfuzji, czyli masa substancji dyfundującej w jednostce czasu przez jednostkę powierzchni ( $1\text{cm}^2$ ), przy gradiencie stężenia  $dC/dx = 1$ , odwrotnie proporcjonalny do masy cząsteczkowej substancji,

$S$  – powierzchnia, na której zachodzi dyfuzja,

$dC/dx$  – tzw. gradient stężenia, czyli zmiana stężenia odniesiona do jednostki długości.

#### 4. CZYNNIKI WPŁYWAJĄCE NA EFEKTYWNOŚĆ PRZENIKANIA

Efektywność przenikania substancji przez skórę determinuje wiele czynników, które można podzielić na 4 grupy [4, 16, 17, 19, 20, 22, 23, 25]:

a) właściwości substancji dyfundującej:

- rozpuszczalność w lipidach i w wodzie,
- współczynnik podziału olej/woda,
- wielkość i kształt cząsteczki – szybciej dyfundują cząsteczki mniejsze (o masie cząsteczkowej mniejszej niż 3 kDa),



- polarność, ładunek i stopień dysocjacji – cząsteczki obojętne, niezdysoncjowane i niepolarne przenikają szybciej,
- lotność związku – gazy przenikają łatwo przez skórę,
- b) właściwości bazy:
  - właściwości penetracyjne,
  - obecność substancji pomocniczych (promotorów przenikania),
  - obecność związków powierzchniowo-czynnych,
  - tworzenie okluzji,
  - pH,
- c) czynniki biologiczne:
  - stan zdrowia skóry i jej grubość – przez skórę uszkodzoną substancja szybciej dyfunduje,
  - wiek, metabolizm,
  - przepływ krwi,
- d) czynniki fizyczne:
  - temperatura (w tym ogrzanie skóry, masaż – wpływają korzystnie na przenikanie),
  - pora dnia,
  - klimat.

Dzisiejsza wiedza na temat związku pomiędzy budową cząsteczki oraz jej zdolnościami przenikania przez skórę pozwala na sformułowanie kilku ogólnych reguł [4]:

- dla niejonowych związków o małej bądź średniej masie cząsteczkowej ich zdolność przenikania zależy przede wszystkim od ich lipofilowości – możliwość penetracji rośnie wraz ze wzrostem lipofilowości,
- małowcząsteczkowe substancje o właściwościach higroskopijnych mogą przenikać do obszarów wodnych warstwy rogowej naskórka i tam zwiększać masę związanej wody, w tym przypadku nie można też wykluczyć przezkomórkowej (transcelularnej) drogi penetracji,
- dla substancji o budowie jonowej, *stratum corneum* stanowi bardzo trudno przepuszczalną barierę i dyfuzja związku następuje głównie za pośrednictwem przydatków skórnych.

#### 4.1. LIPOFILOWOŚĆ

Współczynnik podziału oraz rozpuszczalność związku w tłuszczach i w wodzie to czynniki, które mają największe znaczenie dla zdolności penetracji związku. Określa się je mianem lipofilowości, która determinuje zachowanie się substancji chemicznej w warunkach *in vivo*. Od lipofilowości związku zależy jego zachowanie w obrębie struktur biologicznych (np. wiązanie z proteinami plazmy krwi) czy przenikanie przez błony komórkowe, barierę krew–mózg, a także struktury skóry [1]. Znajomość lipofilowości związku jest szeroko stosowana do przewidywania farma-

kokinytyki i farmakodynamiki działania leków oraz toksyczności związków egzogennych. Określenie lipofilowości substancji polega na wyznaczeniu jej **współczynnika podziału** pomiędzy dwie niemieszające się cieczce – *n*-oktanol i wodę (które dobrze modelują własności struktur komórkowych) [4, 19, 20, 25–27]. Współczynnik podziału wyrażony jest stosunkiem stężeń substancji w obu fazach (równanie 2).

$$P_{ow} = \frac{C_{oktanol}}{C_{woda}} \quad (2)$$

gdzie:

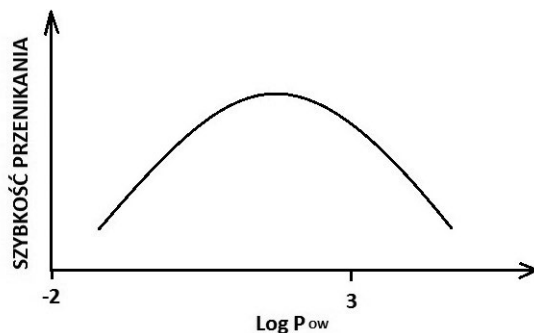
$P_{ow}$  – współczynnik podziału,

$C_{oktanol}$  – stężenie związku w fazie oktanolowej,

$C_{woda}$  – stężenia związku w fazie wodnej.

Lipofilowość związku przedstawia się w postaci logarytmu dziesiętnego ze współczynnika podziału  $\log P_{ow}$  [19, 20, 25–29].

Substancje o wysokiej wartości  $\log P_{ow}$  (czyli substancje o dużej lipofilowości) wnikać bardzo łatwo do warstwy rogowej naskórka, ale ich przenikanie do żywych warstw naskórka jest już zahamowane ze względu na hydrofilowy charakter tych warstw. Odwrotnie jest z substancjami hydrofilowymi (o niskim  $\log P_{ow}$ ). Mogą one łatwo dyfundować przez żywe warstwy naskórka i skórę właściwą, jednak nie są w stanie pokonać lipofilowej bariery *stratum corneum*. Reasumując, optymalną zdolnością do penetracji będą charakteryzować się substancje o średniej lipofilowości, wykazujące znaczącą rozpuszczalność zarówno w wodzie jak i w lipidach, z maksimum dla wartości  $\log P_{ow}$  1,0–3,0 (Rys. 3) [4, 19, 20, 25, 69].



Rysunek 3. Zależność przenikania substancji przez skórę od ich lipofilowości

Figure 3. Dependence of a compound skin permeation on its lipophilic properties

Ponieważ lipofilowość w znacznym stopniu determinuje przenikanie substancji przez skórę, w celu poprawy przenikalności można modyfikować strukturę danego związku. Przez wprowadzenie łańcuchów alkilowych i arylowych do wyjściowego związku możemy zwiększyć lipofilowość substancji natomiast podstawniki zdolne do dysocjacji, czy zawierające elektroujemne atomy (jak azot czy tlen) będą obniżać lipofilowość. Takie zmiany lipofilowości, zwłaszcza w przypadku związków hydrofi-

lowych sprawiają, że dana substancja może w prosty sposób przeniknąć barierę *stratum corneum* i następnie przekształcić się do swojej pierwotnej postaci (np. przez zhydrolizowanie lipofilowego prekursora) [17, 19, 20, 23, 25].

Powyższe sposoby zwiększania lipofilowości związku są określone mianem lipofilizacji. Najprostszymi jej metodami mogą być estryfikacja, alkoksylacja, amidowanie, tworzenie par jonowych. Czasami związek wyjściowy zamyka się w lipofilowych nośnikach, takich jak liposomy czy niosomy, co ułatwia jego penetrację przez warstwę rogową naskórka [17, 19, 20, 23, 25]. Dobrym przykładem takiej modyfikacji jest zwiększenie lipofilowości, stosowanych jako antyutleniacze, witaminy C – przekształcając ją w palmitynian askorbylu czy kwasu galusowego – w jego estry, np. gallusan oktylu.

#### 4.1.1. Metody wyznaczania lipofilowości

Wśród metod określania lipofilowości substancji wyróżniamy: metody teoretyczne (rachunkowe i programy komputerowe) [28, 30–34], metody eksperymentalne – metoda „shake-flask” (wytrząsanie w kolbie) [19, 26, 27], metoda Slow-Stirring [29], metoda SPME (ang. *Solid-Phase Microextraction*) [30], oraz metody pośrednie – chromatograficzne, tj. MLC (ang. *Micellar Liquid Chromatography*) – cieczowa chromatografia micelarna, czy HPLC (ang. *High Performance Liquid Chromatography*) – wysokosprawna chromatografia cieczowa, także w układzie odwróconych faz – RPHPLC (ang. *Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography*), RPTLC (ang. *Reversed Phase Thin Layer Chromatography*) [28, 35].

#### Metody teoretyczne

Metody teoretyczne wyznaczania współczynnika podziału oktanol/woda pozwalają na wstępne oszacowanie wartości  $\log P_{ow}$ .

Stosując szeroko dostępne programy komputerowe [31–34], można na podstawie znajomości budowy strukturalnej danego związku obliczyć wartości  $\log P_{ow}$ . Do odpowiedniego programu wprowadza się strukturę substancji, najlepiej w postaci kodu SMILES (ang. *Simplified Molecular Input Line Entry System*), który wyróżnia poszczególne grupy funkcyjne w cząsteczce i ich wzajemne powiązania. Można też narysować wzór strukturalny cząsteczki lub podać jej numer CAS. Program automatycznie dzieli cząsteczkę na grupy atomów (np.  $-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{C}=\text{O}$ ,  $-\text{OH}$ ), którym przypisana jest odpowiednia wartość współczynnika hydrofilowego bądź lipofilowego (zależna od charakteru danej grupy). Dodatkowo wprowadzana jest wartość współczynników korygujących (uwzględniających np. fakt cykliczności czy aromatyczności cząsteczki). Po zsumowaniu wszystkich wartości współczynników obliczana jest wartość  $\log P_{ow}$  dla całej cząsteczki substancji.

Ponadto, do oszacowania wartości  $\log P_{ow}$  stosowane są metody rachunkowe, między innymi: metoda  $\pi$  – Fujita-Hansch (stosowana głównie dla substancji zawierających fragmenty aromatyczne) [28, 36, 37], metoda Rekker [28, 38–40] czy metoda Hansch-Leo [28, 36, 41, 42].

### Metody eksperymentalne

Metody eksperymentalne polegają na oznaczeniu dystrybucji związku pomiędzy wodę a rozpuszczalnik niepolarny, jakim jest *n*-oktanol.

Metodę „shake-flask” stosuje się dla czystych substancji o  $\log P_{ow}$  zawartym w przedziale od  $-2$  do  $4$  (czasem do  $5$ , co jest uwarunkowane granicami wykrywalności zastosowanej metody analitycznej). Metoda nie ma zastosowania dla badania związków powierzchniowo czynnych. W przypadku substancji dysocjujących stosowane są zamiast wody roztwory buforowe [26, 27].

Metoda Slow-Stirring (powolnego mieszania) pozwala na wyznaczenie współczynnika podziału oktanol/woda dla substancji silnie lipofilowych (od wartości  $\log P_{ow}$   $5$  do  $8,2$ ). W metodzie tej, przez powolne mieszanie w termostatowanym reaktorze mieszaniny wody, oktanolu i badanej substancji, zapobiega się tworzeniu mikrokropel, które pojawiają się często w przypadku stosowania metody shake flask. Wymiana pomiędzy fazami jest przyspieszana przez mieszanie [29].

### Metody pośrednie

Metoda SPME pozwala oznaczać  $\log P_{ow}$  substancji, których wartość lipofilowości nie można już badać metodą shake flask. W metodzie tej wyznacza się współczynnik podziału olej/woda stosując mikroekstrakcję do fazy stałej. Do oznaczenia stężenia substancji stosuje się metody chromatograficzne, np. GC-MS [35].

Innym przykładem jest zastosowanie wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) do wyznaczenia liofilowości substancji o współczynnikach podziału w granicach od  $0$  do  $6$ . Metoda ta nie jest odpowiednia dla mocnych kwasów i zasad, związków kompleksowych, substancji powierzchniowo czynnych, a także substancji reagujących z eluentem. Aby skorelować zmierzone wartości metodą HPLC, dla danej substancji należy wykonać wykres kalibracyjny  $\log P_{ow}$  na podstawie wyników otrzymanych metodą chromatograficzną dla co najmniej  $6$  punktów kontrolnych. Najlepiej wykonać pomiar dla substancji o wyższym i niższym  $\log P_{ow}$  w porównaniu z badanym związkiem oraz o podobnej strukturze (wykres zależności logarytmu współczynników pojemnościowych  $\log k$  od  $\log P_{ow}$ ). W badaniach stosuje się kolumnę, w której fazę stacjonarną stanowią związki o długich łańcuchach węglowodorowych (np.  $C_8$ ,  $C_{18}$ ) z minimalną zawartością grup polarnych naniesione na krzemionkę. Jako eluent stosuje się mieszaninę metanolu z minimum  $25\%$  wody. Pomiar zwykle prowadzony jest w czasie  $1$  godziny, przy prędkości przepływu

1 ml/min. Dla substancji hydrofilowych zmniejsza się prędkość przepływu przez kolumnę oraz podwyższa udział wody w mieszaninie z metanolem. Dla substancji bardziej lipofilowych konieczne jest czasem skrócenie czasu retencji. Wszystkie badane substancje powinny być w odpowiednim stężeniu rozpuszczalne w fazie ruchomej, aby można je było wykryć. W niektórych przypadkach stosuje się zamiennie rozpuszczalnik organiczny lub oddzielną kolumnę [27, 28, 35].

Na podstawie wyników wyznaczana jest zależność pomiędzy czasem retencji na danej kolumnie (w fazie odwracalnej) a współczynnikiem podziału o/w. O wartości współczynnika podziału mówi współczynnik pojemnościowy  $k$  (równanie 3):

$$k = \frac{tR - t_0}{t_0} \quad (3)$$

gdzie:

$t_R$  – czas retencji substancji,

$t_0$  – czas martwy (średni czas, jaki potrzebuje cząsteczka rozpuszczalnika na przejście przez kolumnę).

#### 4.2. BAZA KOSMETYKU

Oprócz właściwości fizykochemicznych związku, istotny wpływ na zdolność przenikania przez *stratum corneum* wywiera rodzaj bazy kosmetycznej [43]. Składniki, które towarzyszą substancji czynnej, nadają kosmetykom odpowiednie właściwości fizykochemiczne, mają również istotny wpływ na zdolność penetracyjną danej substancji. Baza kosmetyku powinna zawierać takie surowce, które będą wspomagać przenikanie substancji aktywnych, będą odpowiednio rozluźniać strukturę cementu międzykomórkowego oraz w odpowiednim stopniu uwadniać warstwę rogową. Istotne jest powinowactwo bazy zarówno do substancji czynnej jak i *stratum corneum*. Również powinowactwo składnika aktywnego do bazy kosmetyku oraz do struktur lipidowych warstwy rogowej naskórka spełnia kluczową rolę w zdolności substancji do przenikania przez skórę. Jeśli powinowactwo bazy kosmetyku i substancji czynnej jest większe niż substancji czynnej i lipidów cementu, wówczas związek aktywny nie będzie dyfundował do warstwy rogowej [4, 44]. Podział substancji aktywnej pomiędzy cząsteczki bazy a cząsteczki cementu międzykomórkowego może być wyrażona równaniem (4) [45]:

$$K_m = \frac{C_{sc}}{C_v} \quad (4)$$

gdzie:

$K_m$  – współczynnik podziału cząsteczki penetrującej,

$C_{sc}$  – stężenie substancji aktywnej w *stratum corneum*,

$C_v$  – stężenie substancji aktywnej w bazie kosmetyku.

Zdecydowana większość kosmetyków aplikowanych na skórę ma postać emulsji. Przeprowadzone badania wskazują, że istotne znaczenie ma zarówno typ emulsji jak i stopień rozdrobnienia fazy wewnętrznej. Mikroemulsje i nanoemulsje (układy, w których krople fazy zdyspergowanej mają średnice  $d < 500$  nm) poprawiają przenikanie cząsteczek przez skórę w porównaniu do żelu lub makroemulsji [43, 46, 47].

#### 4.3. PROMOTORY PRZENIKANIA

Do zwiększenia szybkości transportu związków aktywnych przez skórę bardzo skuteczne jest wprowadzenie do receptury związków wspomagających przenikanie i penetrację substancji czynnych przez skórę, tzw. promotorów transportu (penetration enhancers), które w sposób odwracalny zaburzają strukturę lipidową *stratum corneum*, czyniąc warstwę rogową bardziej przepuszczalną. Promotory transportu transdermalnego powinny być nietoksyczne, nieaktywne farmakologicznie, a także działać w sposób odwracalny. Oznacza to, że po wnikięciu związku przez warstwę rogową struktura skóry powinna wrócić do pierwotnego stanu [48].

Do najpopularniejszych promotorów penetracji przez naskórkowej zaliczamy: sulfotlenki (np. DMSO), piroolidony, alkohole i kwasy tłuszczowe oraz ich estry, alkohole małowcząsteczkowe, tenzydy, niektóre amidy i terpeny oraz ich pochodne, N-dodecylokaprolaktam (Azon) i jego pochodne [48-49]. Mechanizm ich działania polega na zmniejszeniu funkcji barierowej skóry. Związki te mogą oddziaływać na wiele sposobów [4]:

- małowcząsteczkowe alkohole powodują wymywanie lipidów cementu międzykomórkowego, zwiększanie rozpuszczalności bazy kosmetyku oraz zmianę stopnia uwodnienia keratyny,
- działanie różnego rodzaju rozpuszczalników organicznych, np. DMSO powoduje zmianę struktury ciekłokrystalicznej cementu międzykomórkowego, wymywanie lipidów, usunięcie z danego obszaru wody, a także rozluźnienie struktury zrogowaciałych komórek,
- alkohole wielowodorotlenowe, jak np. gliceryna, zwiększają płynność struktur ciekłokrystalicznych, dyfundują do wodnych obszarów cementu międzykomórkowego i dzięki swoim właściwościom higroskopijnym zwiększają wodne przestrzenie między lipidowymi warstwami cementu, co wpływa na zwiększenie przenikania małowcząsteczkowych substancji hydrofilowych przez warstwę rogową,
- związki powierzchniowo-czynne oddziałują z proteinami, w wyniku czego *stratum corneum* „pęcznieje”, zwiększając płynność obszarów lipidowych.

## 5. METODY BADANIA PRZENIKALNOŚCI PRZEZ SKÓRĘ

Modelowanie procesu przenikalności związków aktywnych przez skórę wymaga wzięcia pod uwagę wielu czynników, łącznie z dobraniem odpowiedniej formulacji, a także wykonaniem oceny ryzyka mającego miejsce podczas przeprowadzania testów. Dane pozwalające przewidzieć zdolność substancji do penetracji przez warstwy *stratum corneum* są również kluczowe, należy bowiem pamiętać, że nawet najlepiej przygotowany eksperyment nie zastąpi informacji, na podstawie której został on zaprojektowany.

Zostało opracowanych wiele modeli matematycznych mających na celu oznaczenie przenikalności substancji przez skórę, niestety niewiele z nich odzwierciedla wyniki uzyskane podczas badań *in vivo* [50]. Metody przewidywania penetracji substancji czynnych przez naskórek, w większości są metodami empirycznymi, opartymi na wcześniejszych doświadczeniach, wiele z nich to metody bardzo dokładne [72]. Najbardziej popularne modele to model QSPR Potts & Guy oraz model Mitra-gotri [51, 76, 77].

Metoda opisana przez Potts'a i Guy'a pozwala na przewidywanie współczynnika przenikalności związków, które mają kontakt ze skórą w postaci wodnych roztworów, ponadto stosowana w niej dawka badanej substancji jest nieograniczona. Wspomniana metoda określa zdolność substancji do przenikania przez *stratum corneum*, nie określa jednak ilościowo tego procesu [51].

Alternatywny model do badania przenikalności związków uwzględnia względny współczynnik polarności (ang. *Relative Polarity Index*, RPI). Metoda umożliwia dobór odpowiedniego emolienta, tak aby substancja uległa łatwiejszemu transportowi przez barierę *stratum corneum*. Podobnie jak wyżej opisana metoda, zdolność substancji do przenikania określana jest jakościowo, natomiast nie można oszacować ilości zaabsorbowanej substancji. Ponadto fakt, że względny współczynnik polarności trudno określić w sposób jednoznaczny sprawia, że metoda jest trudna do stosowania w ogólnych badaniach [52].

Kolejna metoda opiera się na informacjach o właściwościach fizykochemicznych substancji (wyznaczane są współczynnik załamania światła, polarność, logP) oraz oddziaływaniach pomiędzy komponentami formulacji a skórą. Metoda ta może być z powodzeniem stosowana w przypadku układów o małej liczbie składników (max. 5) [53, 54]. Najczęściej jednak preparaty kosmetyczne to układy bardziej złożone, zawierające wiele składników aktywnych, substancje o charakterze kompleksów lub związki polimerowe, dlatego uzyskane wyniki pomiarów należy interpretować, biorąc pod uwagę wszystkie możliwe kombinacje i wzajemne interakcje związków [50, 74].

Dla związków aktywnych zawartych w kosmetykach można wskazać trzy główne miejsca działania: powierzchnię skóry, warstwę rogową naskórka oraz głębsze, żywe tkanki naskórka i skóry właściwej. W większości preparatów kosmetycznych, składniki aktywne mają działać na powierzchni skóry bądź w obrębie warstwy rogowej naskórka. Dlatego związki te nie powinny penetrować głębiej niż do poziomu *stra-*

*tum corneum*. W przeciwnym wypadku substancja przeniknie do głębszych warstw skóry tracąc aktywność dla warstwy rogowej naskórka. Skóra powinna spełniać rolę pewnego rodzaju rezerwuaru umożliwiając składnikom aktywnym pozostanie w jej obrębie przez jakiś czas i zapewniając dłuższe działanie [4, 71].

W celu dokładniejszego zbadania możliwości penetracyjnych związków aktywnych do skóry, stworzono modele imitujące skórę ludzką, służące do badań eksperymentalnych *in vivo* oraz *in vitro* [4].

Aby zmierzyć absorpcję substancji przez skórę metodami *in vitro*, wykonuje się pomiary w różnych warunkach oraz stosuje różnego rodzaju modele (membrany, skóry, błony), a także modyfikuje sposoby ich przygotowania. Główną metodą w badaniach *in vitro* jest wyznaczanie współczynnika przenikania przez modelowe membrany, hodowle tkankowe imitujące skórę ludzką, a także wypreparowaną skórę ludzką [58].

Skóra ludzka stanowi najlepszy model, doskonale odwzorowujący warunki, w jakich kosmetyk ma potencjalnie działać, zastosowanie znajduje też skóra zwierzęca lub substytuty skóry rekonstruowane biotechnologicznie [55–57]. Stosowane są membrany o różnej grubości: grubsze  $1620 \pm 580 \mu\text{m}$  i cieńsze  $390 \pm 80 \mu\text{m}$ . Membrany cieńsze sprawdzają się lepiej w przypadku pomiarów absorpcji związków lipofilowych, gdyż grubsze membrany mogą w tym przypadku stanowić dla tych związków zbyt dużą barierę. Grubość membrany nie ma jednak znaczącego wpływu na wyniki pomiaru [75].

Badania przepuszczalności *stratum corneum* metodą *in vitro* stały się przedmiotem zainteresowań już w latach 60-tych. Przez te lata doświadczeń stworzona została ogromna baza danych pozwalająca na sprawdzenie przenikalności setek związków w przemyśle farmaceutycznym, kosmetycznym oraz do oceny ryzyka i toksyczności substancji [59, 60, 71, 74]. Prowadzenie eksperymentów w warunkach *in vitro* ma wiele zalet, eksperymenty takie między innymi wymagają mniejszego nakładu finansowego, znacznie łatwiej jest utrzymać określone warunki badań, przeprowadzane testy są łatwiejsze w przygotowaniu, a ponadto, dużo prościej jest zidentyfikować substancje toksyczne lub radioaktywne bez szkody dla żywych organizmów. Istnieje możliwość prowadzenia większej liczby eksperymentów jednocześnie, łatwiej jest określić jeden konkretny parametr (uwalnianie substancji z określonego nośnika, wpływ wilgotności, temperatury, wcześniejszej obróbki). Ponadto, masa wnikażącej substancji może być określana bezpośrednio wewnątrz skóry, bądź tuż poniżej w medium akceptorowym. Z drugiej strony, istnieje też pewne ryzyko związane z metodą *in vitro*. Medium akceptorowe może mieć wpływ na transport substancji przez skórę, a także na samą kondycję skóry, natomiast brak krwi może zmieniać właściwości poszczególnych warstw skóry. Dodatkowo, stosowanie spreparowanej skóry nie może trwać zbyt długo ze względu na jej szybkie zużywanie w warunkach badań. Wiadomo, że w warunkach *in vitro* nie jesteśmy w stanie osiągnąć dokładnie tych samych parametrów co w warunkach *in vivo* (praca mięśni, łuszczenie naskórka), trudne do określenia są też efekty metabolizmu [55, 61, 73].



W badaniach przenikalności związków stosowane są specjalistyczne komory dyfuzyjne – najpopularniejsze i najczęściej stosowane to dyfuzyjna komora statyczna (komora Franza) oraz dyfuzyjna komora przepływowa (komora Bronaugh'a). Oba rodzaje dyfuzji, zarówno statyczna jak i dynamiczna (przepływowa) są oficjalnie uznane za metody, którymi można z powodzeniem zastąpić metodę *in vivo*. Istota działania komór dyfuzyjnych polega na badaniu dyfuzji związku poprzez błonę półprzepuszczalną (skórę czy innego rodzaju membranę). Membrana znajduje się pomiędzy częścią donorową i akceptorową. Próbkę pobierane są w sposób ciągły lub w określonych odstępach czasu z części akceptorowej, wypełnionej płynem akceptorowym, który stanowi najczęściej bufor o fizjologicznym pH = 7,4. Dozowanie związku może odbywać się w sposób ograniczony (< 10 ml/cm<sup>3</sup> lub 10 mg/cm<sup>3</sup>) lub w sposób nieograniczony (>10 µl/cm<sup>3</sup> lub 10 mg/cm<sup>3</sup>). Przy dozowaniu nieograniczonym, na skórę aplikowana jest maksymalna dawka substancji. Takie warunki zapewniają powtarzalność otrzymanych wyników.

Przenikalność może być obliczona w oparciu o równanie 5 [55, 62]:

$$J_{ss} = \frac{K_{mv} D}{l} \Delta C \quad (5)$$

gdzie [48]:

$J_{ss}$  – współczynnik przepływu stałego (Steady State Flux),

$l$  – grubość membrany,

$\Delta C$  – różnica stężeń substancji w roztworach donorowym i akceptorowym,

$D$  – współczynnik dyfuzji, który zależy od mobilności chemicznej związku w obrębie membrany,

$K_{mv}$  – współczynnik podziału membrana/nośnik.

Przy obliczeniach przenikalności związków w metodach *in vitro* stosujemy współczynnik przenikalności  $k_p$  (równanie 6) [62]:

$$k_p = \frac{K_{mv} D}{l} \quad (6)$$

gdzie:

$l$  – grubość membrany,

$D$  – współczynnik dyfuzji, który zależy od mobilności chemicznej związku w obrębie membrany,

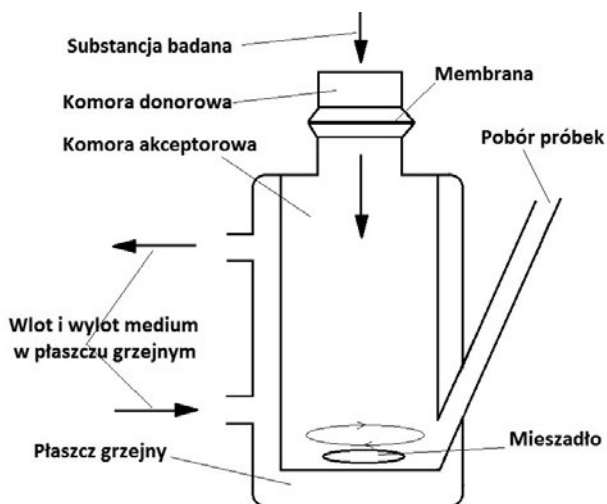
$K_{mv}$  – współczynnik podziału membrana/nośnik.

Przenikalność jest łatwo obliczana przez dzielenie współczynnika stałego przepływu (*Steady State Flux*) przez  $\Delta C$  [62].

W przypadku gdy na membranę aplikowana jest ograniczona dawka związku, możemy obserwować wpływ parowania czynnika akceptorowego [55]. Eksperymenty powinny być prowadzone w temperaturze 32°C, odpowiadającej temperaturze w warunkach *in vivo* [55, 63, 70]. Kontrola temperatury zapewniona jest poprzez użycie płaszcza wodnego wokół każdej z komór, często stosowana jest też komora z ciepłym powietrzem.

### 5.1. KOMORA FRANZA

Komora Franza jest dziś najpowszechniej stosowaną aparaturą do określania przenikania substancji aktywnych przez skórę. Składa się ona z dwóch części: donorowej i akceptorowej przedzielonych membraną (Rys. 4). Jako membrana stosowane są: skóra ludzka (np. pobrana śródoperacyjnie), skóra zwierzęca (np. skóra z ucha świńskiego) lub skóra sztuczna [18, 55, 64].

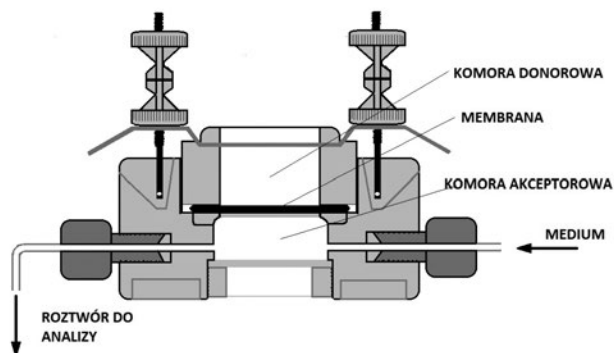


Rysunek 4. Budowa komory Franza  
Figure 4. The construction of Franz diffusion cell

Część donorowa zawiera rozpuszczoną substancję badaną natomiast komora akceptorowa poniżej membrany wypełniona jest płynem mieszanym w sposób ciągły przez mieszadło magnetyczne. Pomiar prowadzi się najwyżej do momentu gdy nie więcej niż 10% związku przeniknie przez membranę lub gdy więcej niż 90% związku jest wciąż obecne w roztworze donorowym. Komora Franza ma bardzo wiele zalet, jest dokładna, łatwa w użyciu, próbki pobiera się w sposób szybki i precyzyjny. Nie jest problemem utrzymywanie pożądanej temperatury układu czy odmierzanie dokładnie wyznaczonych objętości medium. Pobieranie próbek odbywa się poprzez boczne ramię komory, a ubytek pobranego buforu od razu uzupełnia się jego świeżą porcją. Często pojawiającym się problemem jest słaba rozpuszczalność niektórych związków w wodnym środowisku. Stosuje się wówczas dodatek organicznych związków poprawiających rozpuszczalność tych substancji, np. niejonowe związki powierzchniowo czynne, białka, cyklodekstryny. Należy jednak wziąć pod uwagę fakt, że dodatek tych związków może wpływać na właściwości membrany i jej przepuszczalność.

## 5.2. DYFUZYJNA KOMORA PRZEPLYWOWA

W dyfuzyjnej komorze przepływowej, bufor jest w sposób ciągły pompowany przez komorę akceptorową (Rys. 5) [6, 18, 55, 64–67].



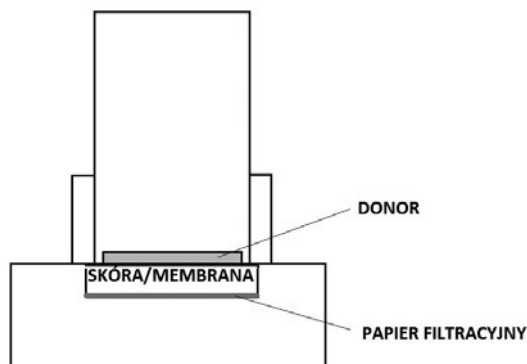
Rysunek 5. Budowa dyfuzyjnej komory przepływowej  
Figure 5. The construction of flow diffusion cell

Komorę przepływową znajduje zastosowanie, gdy absorpcja substancji jest wysoka, a jej rozpuszczalność w fazie akceptorowej niska. Ważne jest, aby ustalić określoną minimalną szybkość przepływu fazy i zapewnić w ten sposób dobre mieszanie oraz ciągle usuwanie z komory zaabsorbowanego związku, a także aby zminimalizować obecność niedostatecznie zmieszanych warstw. Dla większości substancji zwiększenie szybkości przepływu nie ma większego wpływu na absorpcję, wyjątek stanowią związki o bardzo słabej rozpuszczalności. Co ważne, przydatność skóry do użycia jest w tym przypadku znacznie dłuższa ze względu na ciągłą wymianę fizjologicznego roztworu akceptorowego. Z drugiej strony, nieustanny przepływ płynu zawierającego donor prowadzi do wymywania ze skóry substancji hydrofobowych przez fazę akceptorową. W rezultacie skóra staje się znacznie bardziej przepuszczalna ze względu na zmianę swoich właściwości. Dyfuzja przepływowa pozwala na użycie znacznie większej ilości związków, jednak wymaga przeprowadzenia wstępnych eksperymentów przed rozpoczęciem badań w celu ustalenia optymalnej szybkości przepływu [18, 55, 64–67].

## 5.3. MODEL SAARBRUCKENA

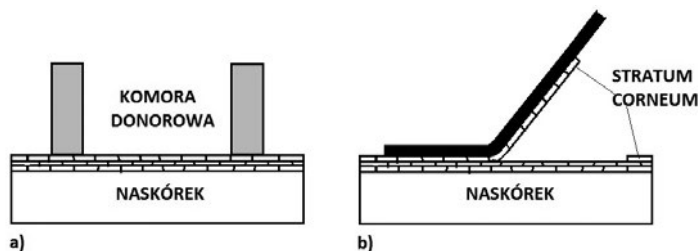
Dyfuzyjne komory statyczne i przepływowe znalazły zastosowanie do określania przenikalności związków przez skórę. Istnieje jeszcze jeden model, który określa zdolność związku do penetracji (w odróżnieniu od przenikania, penetracja odbywa się przez kolejne warstwy skóry, związek niekoniecznie przebywa cały jej przekrój, może pozostać na pewnym określonym poziomie). Badanie penetracji substancji przez skórę zasadniczo różni się więc od określania jej przenikania. Na potrzeby

badania penetracji związków przez skórę zaprojektowany został model penetracji Saarbruckena, którego schemat przedstawiono na Rysunku 6 [37].



Rysunek 6. Schemat modelu penetracji Saarbruckena  
Figure 6. Saarbrucken penetration model scheme

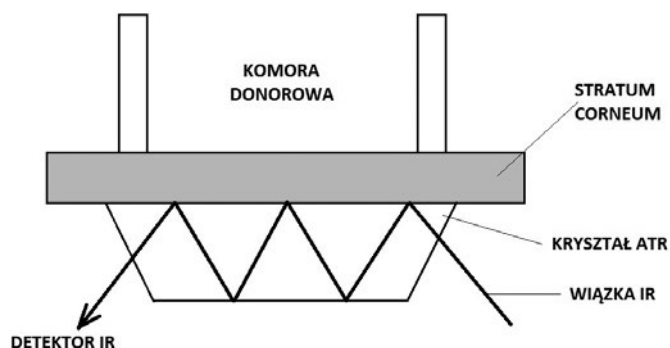
Stosując to urządzenie można określić skalę i intensywność penetracji związku do poszczególnych warstw skóry. W odróżnieniu od opisanych wcześniej komór dyfuzyjnych, w tym przypadku skóra pełni rolę akceptora dla penetrującego związku. Zaletą omawianej metody jest wyeliminowanie możliwości nadmiernego nawodnienia skóry. Znika także obawa przed zmianą jakości skóry przez przepływające medium akceptorowe. W zależności od substancji, badanie jest zakańczane w momencie, gdy substancja dociera do najgłębszej warstwy skóry. W metodzie tej fragment skóry umieszcza się na papierze filtracyjnym nasączonym roztworem Ringera (izotoniczny w stosunku do krwi człowieka wodny roztwór: chlorku sodu, chlorku potasu i chlorku wapnia). Stężenie zabsorbowanej substancji oznaczane jest tzw. techniką „tape stripping” (zdrarcie powłoki). Schemat działania techniki „tape stripping” jest przedstawiony na Rysunku 7 [55, 64]. Kolejne warstwy skóry są oddzielane, a po odpowiedniej obróbce, ilość badanej substancji zaabsorbowana w każdej z warstw określana jest wybraną metodą analityczną (np. HPLC).



Rysunek 7. Schemat działania metody Tape Stripping  
Figure 7. Tape stripping method scheme

#### 5.4. METODA ATR-FTIR

Oprócz modelowych układów pozwalających badać przenikanie substancji przez struktury skóry, istnieją również inne rozwiązania. Jednym z nich jest zastosowanie metody ATR-FTIR (ang. *Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infra Red*), pozwalającej bezpośrednio obserwować przenikanie substancji przez *stratum corneum*. Warstwa rogowa jest tu umieszczona pomiędzy kryształem a roztworem donorowym zawierającym badaną substancję (Rys. 8). Kryształy ATR mogą być wykonane z selenku cynku, germanu, siarczku cynku, krzemu lub diamentu. Rodzaj zastosowanego kryształu zależy od właściwości badanej substancji. Dyfuzja substancji do głębszych warstw naskórka jest monitorowana przez pomiar absorbancji w funkcji czasu. Absorbancja przeliczana jest na stężenie. Substancja z podłoża umieszczonego w komorze donorowej przechodzi do głębszych warstw naskórka i jest mierzona przez wiązkę promieni IR [64, 68].



Rysunek 8. Schematyczny sposób pomiaru przenikalności przez *stratum corneum* metodą ATR-FTIR  
Figure 8. Measurement of permeation through *stratum corneum* using ATR-FTIR method

#### PODSUMOWANIE

Główną i podstawową barierą dla związków aktywnych przenikających przez skórę jest warstwa rogowa naskórka, która dzięki swojemu lipofilowemu charakterowi oraz zwartej strukturze ogranicza penetrację cząsteczek w głąb skóry. Właściwości fizykochemiczne *stratum corneum* można modyfikować poprzez zastosowanie promotorów transportu przeznaskórkowego, które odwracalnie zmieniają strukturę cementu międzykomórkowego, poprawiając jego przenikalność. Istotny wpływ na zdolność substancji do przenikania mają również jej właściwości fizykochemiczne, takie jak lipofilowość czy budowa i wielkość cząsteczki. Badania prowadzone w ostatnich latach pozwoliły na zwiększenie efektywności działania kosmetyków i lepszą przyswajalność związków aktywnych przez skórę. Przenikalność związków przez skórę można badać stosując z powodzeniem dyfuzyjne komory wyposażone w syntetyczne membrany lub fragment skóry ludzkiej lub zwierzęcej.

Na skórę nanosi się substancję w postaci roztworu, natomiast rolę akceptora pełni medium o fizjologicznym pH. Stopień penetracji związków określa się natomiast za pomocą modelu penetracji Saarbruckena, który pozwala na określenie ilości substancji zaabsorbowanej w poszczególnych warstwach skóry. Powstało wiele modeli pozwalających przewidywać zdolność związków do przenikania przez skórę opartych na obliczeniach oraz bazach wyników doświadczalnych. Modele matematyczne opierają się na właściwościach fizykochemicznych substancji aktywnych i ich związku z lipofilowością i powinowactwem do komórek *stratum corneum*. Metody te zyskały w ostatnich latach dużą popularność ze względu na łatwość wykonania, oszczędność czasu, aparatury i odczynników chemicznych, niskie koszty oraz dużą dokładność.

#### PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] E. Starzyk, J. Arct, Wiad. PTK, 2003, **6**, 12.
- [2] P. Morganti, E. Ruocco, R. Wolf, V. Ruocco, Clin. Dermatol., 2001, **19**, 489.
- [3] D. Parasrampur, J. Parasrampur, J. Clin. Pharm. Ther., 1991, **16**, 7.
- [4] J. Arct, M. Chełkowska, Wiad. PTK, 2001, **4**, 37.
- [5] R.H. Muller, G.E. Hildebrand, *Technologia nowoczesnych postaci leków*, PZWL, Warszawa 1998.
- [6] M. Sznitowska, *Polarna droga dyfuzji leku przez skórę – dowody na istnienie i próba charakterystyki*, Gdańsk 1996.
- [7] P. Tarleja, N. Kleene, W. Pickens, T. Wang, G. Kasting, AAPS PharmSci., 2001, **3**, 1.
- [8] J. Arct, K. Pytkowska, Wiad. PTK, 2002, **5**, 3.
- [9] P. Grasso, A.B.G. Lansdown, J. Soc. Chem., 1972, **23**, 481.
- [10] R. Prausnitz, S. Mitragotri, R. Langer, Nat. Rev. Drug Discov., 2004, **3**, 115.
- [11] J. Thiele, S. Hsieh, S. Ekanayake-Mudiyanselage, Dermatol. Surg., 2005, **31**, 805.
- [12] E. Estrada, E. Uriarte, Y. Gutierrez, H. Gonzalez, SAR QSAR Environ. Res., 2003, **14**, 145.
- [13] M. Johnson, D. Blankschtein, R. Langer, J. Pharm. Sci., 1997, **86**, 1162.
- [14] A. Wilschut, W. Berge, P. Robinson, T. McCone, Chemosphere, 1995, **30**, 1275.
- [15] C. Cullander, R. Guy, Solid State Ionics, 1992, **53**, 197.
- [16] E. Szyszko, Biblioteka farmaceuty, tom 5, Zarys Biofarmacji, PZWL, Warszawa 1984.
- [17] W.S. Brud, R. Glinka, *Technologia kosmetyków*, MA O.W., Łódź 2001.
- [18] J. Arct, Wiad. PTK, 2003, **6**, 2.
- [19] K. Moser, K. Kriwet, A. Naik, Y.N. Kalia, R.H. Guy, Eur. J. Pharm. Biopharm., 2001, **52**, 103.
- [20] E. Starzyk, J. Arct, A. Jończyk, P. Jaworski, Wiad. PTK, 2005, **8**, 1.
- [21] F. Yamashita, M. Hashida, Adv. Drug Deliver. Rev., 2003, **55**, 1185.
- [22] K. Orzechowska-Juzwenko, *Podstawy Farmakologii klinicznej*, Volumed s.c., Wrocław 1997.
- [23] L. Krówczyński, A. Danek, *Zarys farmacji klinicznej*, PZWL, Warszawa 1988.
- [24] E.P. Solomon, L.R. Berg, D.W. Martin, C.A. Vilee, *Biologia*, MULTICO O.W., Warszawa 1998.
- [25] A. Langner (red.), *Współczesne leczenie wybranych chorób skóry*, PZWL, Warszawa 2002.
- [26] W. Klein, W. Kordel, M. Weiss, H.J. Poremski, Chemosphere, 1988, **17**, 361.
- [27] Wytyczne OECD dotyczące metod wyznaczania współczynnika podziału, [dostęp: 2013-01-08], Dostępny w Internecie: <http://www.ppr.pl/semadmin/zasoby/pliki/pdf/metody%20A%206-14.pdf>
- [28] OECD Guideline for the testing of chemicals, test no. 117 – Partition Coefficient (noctanol/water), High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Method, [dostęp: 2013-01-08], Dostępny

- w Internecie: [http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-117-partition-coefficient-n-octanol-water-hplc-method\\_9789264069824-en;jsessionid=487dc7aene0ab.x-oecd-live-0](http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-117-partition-coefficient-n-octanol-water-hplc-method_9789264069824-en;jsessionid=487dc7aene0ab.x-oecd-live-0).
- [29] OECD Guideline for the testing of chemicals, test no. 123 – Partition Coefficient (1-octanol/water): Slow-Stirring Method, [dostęp: 2013-01-08], Dostępny w Internecie: [http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-123-partition-coefficient-1-octanol-water-slow-stirring-method\\_9789264015845-en;jsessionid=487dc7aene0ab.x-oecd-live-01](http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-123-partition-coefficient-1-octanol-water-slow-stirring-method_9789264015845-en;jsessionid=487dc7aene0ab.x-oecd-live-01).
- [30] CLOGP Reference Manual Daylight Version 4.9 [dostęp: 2013-01-07], Dostępny w Internecie: <http://www.daylight.com/dayhtml/doc/clogp/index.html>.
- [31] HyperChem Version 7.5, [dostęp: 2013-01-07], Dostępny w Internecie: <http://www.computationalchemistry.com/products/Professional/index.htm>.
- [32] ALOGPS Version 2.1, [dostęp: 2013-01-07], Dostępny w Internecie: <http://www.vcclab.org/lab/alogps/start.html>.
- [33] Cosmoquick Version 1.0, [dostęp: 2013-01-07], Dostępny w Internecie: <http://www.cosmologic.de/index.php?cosId=2101&crId=2>.
- [34] Molinspiration Cheminformatics 2012, Calculation of Molecular Properties and Bioactivity Score, [dostęp: 2013-01-08], Dostępny w Internecie: <http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>.
- [35] P. Pollien, D. Roberts, J. Chromatogr. A, 1999, **864**, 183.
- [36] C. Hansch, A.J. Leo, *Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology*, John Wiley, New York, 1979.
- [37] A.J. Leo, C. Hansch, D. Elkins, Chem. Rev., 1979, **71**, 525.
- [38] R.F. Rekker, H.M. de Kort, Eur. J. Med. Chem., 1979, **14**, 479.
- [39] R.F. Rekker, *The hydrophobic fragmental constant*, Elsevier Scientific Pub. Co., New York 1977.
- [40] C.V. Eadsforth, P. Moser, Chemosphere, 1983, **12**, 1459.
- [41] W.J. Lyman, W.F. Reehl, D.H. Rosenblatt (ed.), *Handbook of Chemical Property Estimation Methods*, McGraw-Hill, New York 1982.
- [42] ClogP User Guide, [dostęp: 2013-01-08], Dostępny w internecie: <http://www.biobyte.com/bb/prod/40manual.pdf>.
- [43] M. Jaworska, E. Sikora, J. Ogonowski, Wiad. Chem., 2001, **3/4**, 301.
- [44] N. Dayan, Cosmet. Toiletries, 2005, **120**, 67.
- [45] E.B. Souto, J.W. Wiechers, Cosmet. Toiletries, 2012, **127**, 344.
- [46] J. Ziegenmeyer, C. Fuehrer, Acta Pharm. Technol., 1980, **26**, 273.
- [47] E. Ramon, C. Alonso, L. Coderch, Drug Deliv., 2005, **12**, 83.
- [48] L. Zaprutko, D. Partyka, B. Bednarczyk-Cwynar, Wiad. PTK, 2003, **6**, 20.
- [49] A. Otto, J. du Plessis, J.W. Wiecherst, Int. J. Cosmetic Sci., 2009, **31**, 1.
- [50] S. Gregoire, C. Ribaud, F. Benech, J.R. Meunier, A. Garrigues-Mazert, R.H. Guy, Brit. J. Dermatol., 2009, **160**, 80.
- [51] R.O. Potts, R.H. Guy, Pharm. Res., 1992, **9**, 497.
- [52] J.W. Wiechers, C.L. Kelly, T.G. Blease, Int. J. Cosmet. Sci., 2004, **26**, 173.
- [53] H. Kouzuki, F. Yamashita, H. Itagaki, M. Hashida, Prediction of human skin permeability of chemicals In various vehicles using artificial neural network, Abstracts of the 5<sup>th</sup> World Congress on Alternative and Animal Use in the Life Sciences, Berlin, Germany, Altex 2005; **22**, 276.
- [54] J.E. Riviere, J. Brooks, Toxicol. Appl. Pharm., 2005, **208**, 99.
- [55] T. Hahn, U.F. Schaefer, C.M. Lehr, SOFW-Journal, 2010, **136**, 28.
- [56] A. Verniory, R.Du Bois, P. Decoodt, J.P. Gasee, P.P. Lambert, J. Gen. Physiol., 1972, **62**, 489.
- [57] T. Koike, N. Nakashima, C. Urata, M. Arashima, H. Okumura, A. Takada, Percutaneous absorption test – A case of effectiveness evaluation of skin – whitening cosmetics, Proc. 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Tokyo, Japan, 2007, **14**, 407.
- [58] H. Clowes, R. Scott, J. Heylings, Toxicol. in Vitro, 1994, **8**, 827.

- [59] R. Scheuplein, I. Blank, *Physiol. Rev.*, 1971, **51**, 702.
- [60] R. Scheuplein, *J. Invest. Dermatol.*, 1965, **45**, 334.
- [61] D. Howes, R. Guy, J. Hadgraft, J. Heylings, U. Hoeck, F. Kemper, H. Maibach, J.P. Marty, H. Merck, J. Parra, D. Rekkas, I. Rondelli, H. Schaefer, U. Tauber, N. Verbiere, *Methods for Assessing Percutaneous Absorption*, ATLA, 1996, **24**, 81.
- [62] H.F. Frash, *Risk Anal.*, 2002, **22**, 265.
- [63] J. Arct, K. Pytkowska, *Wiad. PTK*, 2002, **5**, 3.
- [64] J. Hadgraft, *Int. J. Pharm.*, 2001, **224**, 1.
- [65] J. Arct, A. Oborska, E. Jareńko, M. Mojski, *Wiad. PTK*, 2004, **7**, 16.
- [66] M. Chełkowska, J. Arct, K. Kasiura, A. Kozłowska, *Wiad. PTK*, 2005, **8**, 22.
- [67] N. Kanikkannan, M. Singh, *Int. J. Pharm.*, 2002, **248**, 219.
- [68] K.R. Feingold, *J. Lipid. Res.*, 2009, **50**, S417.
- [69] M. Miszczyk, *Prog. Plant. Prot.*, 2001, **51** 3.
- [70] M. Gamal, El. Marghraby, *Int. J. Pharm.*, 2008, **355**, 285.
- [71] M. Forster, M.A. Bolzinger, H. Fessi, S. Briancon, *Eur. J. Dermatol.*, 2009, **4**, 309.
- [72] G. Lian, L. Chen, L. Han, *J. Pharm. Sci.*, 2008, **97**, 584.
- [73] L. Norlen, I. Plasencia, L. Bagatolli, *Int. J. Cosmetic. Sci.*, 2008, **30**, 391.
- [74] R.B. Silverman, *Chemia organiczna w projektowaniu leków*, WNT, Warszawa 2004.
- [75] S. Wilkinson, W. Maas, J. Nielsen, *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 2006, **79**, 405.
- [76] L. Chen, G. Lian, L. Han, *AICHe J.*, 2010, **56**, 1136.
- [77] S. Mitragotri, *J. Pharm. Sci.*, 2002, **91**, 744.

Praca wpłynęła do Redakcji 26 listopada 2012



**SUBSTANCJE AKTYWNE PREPARATÓW  
DO USUWANIA POWŁOK LAKIERNICZYCH**  
ACTIVE INGREDIENTS OF PAINT REMOVER

**Grzegorz Kurowski, Otmar Vogt\*, Jan Ogonowski**

*Politechnika Krakowska, Wydział Inżynierii i Technologii Chemicznej,  
Instytut Chemii i Technologii Organicznej,  
Katedra Technologii Organicznej i Procesów Rafineryjnych,  
ul. Warszawska 24, 31-155 Kraków  
\*e-mail: ozvogt@chemia.pk.edu.pl*

---

Abstract

Wprowadzenie

1. Preparaty do usuwania powłok lakierniczych:

2. Chlorek metylenu

3. *N*-metylopirolidon

4. Inne substancje aktywne

5. Biopreparaty

Uwagi końcowe

Piśmiennictwo cytowane

---



technologii produktów małotonazowych oraz technologii kosmetyków.

**prof. dr hab. inż. Jan Ogonowski** absolwent Wydziału Chemicznego Politechniki Śląskiej. Doktorat z nauk technicznych uzyskał na Wydziale Inżynierii i Technologii Chemicznej Politechniki Krakowskiej, habilitację w dziedzinie nauk technicznych uzyskał na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej. Od 2006 roku profesor nauk technicznych. Obecnie jest kierownikiem Katedry Technologii Organicznej i Procesów Rafineryjnych w Instytucie Chemii i Technologii Organicznej Politechniki Krakowskiej. Prowadzi badania w zakresie technologii organicznej, w tym badania procesów katalitycznych,



**mgr inż. Grzegorz Kurowski** – absolwent Wydziału Inżynierii i Technologii Chemicznej Politechniki Krakowskiej, obecnie rozpoczął studia doktoranckie na Wydziale Inżynierii i Technologii Chemicznej Politechniki Krakowskiej. Prowadzi badania w zakresie syntezy nowoczesnych, przyjaznych środowisku preparatów do usuwania powłok lakierniczych.



**dr inż. Otmar Z. Vogt** – absolwent Wydziału Inżynierii i Technologii Chemicznej Politechniki Krakowskiej, doktoryzował się na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Jest adiunktem w Zakładzie Technologii Organicznej i Procesów Rafineryjnych PK. Prowadzi prace badawcze z zakresu katalizy, proekologicznych technologii oraz zastosowania substancji pochodzenia naturalnego w kosmetykach i środkach ochrony roślin.

---

**ABSTRACT**

In most of paint removers organic solvent are used as active ingredients. The analysis of the literature on modern manufacture preparations allowed to identify the most commonly used solvent for this purpose i.e. methylene chloride. Characterization of the advantages and risks associated with its use and the legal aspect of the use of this compound was described. Also the advantages and potential risks associated with the use of N-methylpyrrolidone were described. Substances from the group of alcohols, carbonates, carboxylic acid esters and derivatives of amides were also discussed. Compositions based on substances of natural origin and the solution involving biotechnological methods were presented. Developments in the production of such preparations were outlined.

Keywords: paint stripper

Słowa kluczowe: preparaty do usuwania powłok lakierniczych

---

---

## WPROWADZENIE

Preparaty do usuwania powłok lakierniczych stanowią ważny element w procesach renowacji i przygotowania powierzchni do nakładania nowych warstw ochronnych oraz przy usuwaniu graffiti.

W skład preparatów do usuwania powłok lakierniczych najczęściej wchodzi rozpuszczalniki organiczne (rozpuszczalniki aktywne i współrozpuszczalniki), środki zagęszczające lub emulgujące, aktywatory, inhibitory korozji. W kompozycjach spotykane są również opóźniacze parowania, związki powierzchniowo czynne, pigmenty i związki zapachowe. Spośród tych składników najważniejsze znaczenie mają aktywne rozpuszczalniki, które powodują odpajanie farby od podłoża pozwalając na jej łatwe usunięcie.

### 1. PREPARATY DO USUWANIA POWŁOK LAKIERNICZYCH

#### 1.1. CHLOREK METYLENU

Dotychczas najczęściej stosowanym rozpuszczalnikiem był chlorek metylenu (DCM). Preparaty oparte na DCM wykazują wysoką skuteczność w usuwaniu większości powłok, co jest spowodowane zbliżoną rozpuszczalnością DCM i żywic organicznych [1]. Zaletą DCM jest również szybki czas działania oraz stosunkowo niska cena. Porównanie czasu skuteczności działania różnych rozpuszczalników w stosunku do typowych powłok lakierniczych znaleźć można w pracy Błachowicz [2]. Pomimo wszystkich zalet chlorku metylenu i stwierdzenia braku wpływu tej substancji na warstwę ozonową [2] jest on wycofany z użycia [3] z uwagi na ochronę zdrowia osób mających z nim kontakt.

Jak wiadomo chlorek metylenu jest środkiem łatwo lotnym, a jego opary są szkodliwe dla zdrowia [1]. Oddziałuje na układ nerwowy, skórę, błony śluzowe. Krótkotrwała ekspozycja na pary chlorku metylenu może powodować bóle i zawroty głowy, nudności, senność, natomiast częstsze narażenie na kontakt z DCM może wpłynąć na układ nerwowy, powodując zmęczenie, bezsenność, słabą koordynację, utratę pamięci krótkotrwałej oraz zmiany osobowości, takie jak depresja, lęki i drażliwość [4]. Wielokrotny kontakt DCM ze skórą może powodować, zapalenie skóry, objawiające się zaczerwienieniem, pękaniem i łuszczeniem się. Ponadto stwierdzono, że DCM powoduje zmiany nowotworowe u zwierząt i może być przyczyną analogicznych schorzeń u ludzi [4].

Mając na uwadze powyższe zagrożenia oraz na podstawie przeprowadzonych niezależnych badań oceny szkodliwości chlorku metylenu Rada Unii Europejskiej zakazała stosowania tej substancji w preparatach do usuwania powłok lakierniczych. Zgodnie z decyzją Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 455/2009/WE z dnia 6 maja 2009 r. zabrania się wprowadzania preparatów zawierających chlorek

metylenu do obrotu po dniu 6 grudnia 2011 r. oraz ich stosowania przez użytkowników profesjonalnych po dniu 6 czerwca 2012 roku [3].

### 1.2. N-METYLOPIROLIDON

Aktywnym rozpuszczalnikiem wykazującym porównywalne efekty działania z chlorkiem metylenu w usuwaniu powłok lakierniczych jest *N*-metylopirolidon (NMP). NMP jest polarnym rozpuszczalnikiem, mieszającym się zarówno z wodą jak i z większością rozpuszczalników organicznych [5]. Działanie NMP jest wolniejsze niż chlorku metylenu, jednak usuwa on wiele warstw farby oraz wykazuje mniejszą lotność, co zmniejsza ryzyko narażenia na wdychanie par rozpuszczalnika. Cena NMP jest wyższa niż DCM, jednak do usunięcia powłoki malarskiej potrzeba mniej tego związku [6].

NMP jako substancja aktywna występuje w kompozycjach opisanych w wielu patentach [7–11]. W patencie Shiremana [7] zawartość NMP wynosi od 60 do 70%. Dodatkowo kompozycja zawiera od 10 do 25% D-limonenu, jako współrozpuszczalnika. Radu i Maruyama opisuje kompozycję zawierającą 5 do 55% NMP oraz 6 do 45% estrów kwasów dikarboksylowych, takich jak estry metylowe kwasów bursztynowego, glutarowego i adypinowego [8]. Patent Hawesa i Shiremana [9] zawiera recepturę, w której NMP stosowano w ilości od 20 do 60% w połączeniu z estrami kwasów dikarboksylowych w ilości od 20 do 60%. W patentach Pageau, Marcu i Aston [10, 11] opisana jest kompozycja zawierająca od 15 do 25% NMP, 30 do 50 % dimetyloformamidu oraz od 1 do 20% alkoholu benzylowego.

Skutki toksycznego działania NMP na organizm człowieka nie zostały dokładnie zbadane. NMP jest obecnie substancją dozwoloną do stosowania jako dodatek w tworzywach sztucznych [12]. Na mocy rozporządzenia CLP (Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r) [13] NMP został sklasyfikowany jako CMR kat. 1B (dawna kategoria 2) ze szczególnym limitem stężenia (5%) [14]. W marcu 2011 Komitet Naukowy ds. Bezpieczeństwa Konsumentów SCCS opublikował opinię na temat zastosowania NMP w produktach kosmetycznych w stężeniach poniżej 5%, w której uznaje, że stosowanie NMP w kosmetykach w stężeniach do 5% nie jest bezpieczne dla konsumentów. Istnieje więc duże prawdopodobieństwo, że w niezbyt odległej przyszłości zostanie wprowadzony całkowity zakaz stosowania *N*-metylopirolidonu w kosmetykach [14].

Dotychczasowe badania wskazują, że NMP powoduje opóźnienie wzrostu u potomstwa zwierząt narażonych na kontakt z tą substancją [15]. W badaniach tych autorzy stwierdzili, że NMP spowodował również zmniejszenie płodności u szczurów. Wpływ NMP na płodność ludzi nie został zbadany. Jednak na podstawie badań na zwierzętach można traktować NMP jako potencjalne zagrożenie dla ludzkiego układu rozrodczego [15]. Ponadto NMP podobnie jak inne rozpuszczalniki organiczne może mieć wpływ na układ nerwowy. Krótkotrwała ekspozycja na NMP może wywoływać bóle i zawroty głowy, nudności, oraz senność. Długotrwała ekspozycja

zycja może wywoływać zmęczenie, bezsenność, słabą koordynację, utratę pamięci krótkotrwałej oraz zmiany osobowości, takie jak depresja, lęki i drażliwość [15].

Potwierdzenie powyższych zagrożeń może spowodować, iż NMP również zostanie wycofany z obrotu w preparatach do usuwania powłok lakierniczych. Mając to na uwadze producenci starają się opracować preparaty zawierające inne substancje aktywne wykazujące zdolność do odspajania powłoki malarskiej.

### 1.3. INNE SUBSTANCJE AKTYWNE PREPARATÓW DO USUWANIA POWŁOK LAKIERNICZYCH

#### Alkohol benzyłowy

Substancją aktywną znajdującą szerokie zastosowanie w preparatach do usuwania powłok lakierniczych jest alkohol benzyłowy lub jego metyłowe pochodne [16–30]. Alkohol benzyłowy może występować jako pojedyncza substancja aktywna lub w połączeniu z innymi substancjami aktywnymi. Często alkohol benzyłowy występuje w połączeniu z aktywatorem, którym jest nadtlenek wodoru [16, 17]. Sam nadtlenek wodoru nie powoduje usunięcia powłoki, jednak dodany do alkoholu benzyłowego zwiększa jego skuteczność w porównaniu z użyciem samego alkoholu benzyłowego. Innymi aktywatorami mogą być hydroksyminy [18].

Zgodnie z danymi podanymi w patentach, alkohol benzyłowy może być stosowany w różnych ilościach tak: Summerfield i in. [16] oraz Vitomir [18] podają, że alkohol benzyłowy powinien być użyty w ilości od 20 do 50%, natomiast Belt i in. w patencie [17] podają, że powinien być użyty w ilości od 5 do 25%. Distaso [19] podaje, że alkohol benzyłowy powinien być użyty w ilości 40%. Najszerzy zakres udziału tego związku w kompozycjach podają Brailsford [20, 21] oraz Detar i in. [22, 23]. Brailsford [20, 21] określa, że alkohol benzyłowy powinien być użyty w ilości od 10 do 90% natomiast Detar i in. [22, 23] przesuwiają ten zakres do niższych stężeń zawierających się w przedziale od 5 do 85%. Vitomir [24] proponuje stosować alkohol benzyłowy łącznie z kwasem jabłkowym. Stwierdza ponadto, że taka kompozycja może zawierać także etery aromatyczne, np. eter dibenzyłowy oraz hydroksykwasy, np. kwas glikolowy. Przeprowadzone przez autora badania wykazały, że kwas jabłkowy szczególnie sprawdza się w przypadku usuwaniu farb przeciwporostowych oraz przyspiesza czas usuwania tej powłoki [24].

Inny skład preparatów proponuje Marquis i in. [25], stosując dodatek węglału propylenu do alkoholu benzyłowego. W tym przypadku alkohol benzyłowy zastosowany jest w ilości od 40 do 80%.

Lallier [26] opisuje preparat zawierający alkohol benzyłowy razem z dimetylo-sulfotlenkiem lub NMP. Zgodnie z danymi zamieszczonymi w patencie zawartość alkoholu benzyłowego wynosi w tym przypadku od 2 do 47,5%. Wadą stosowania

tego dodatku jest znacząco dłuższy czas usuwania powłok, w porównaniu z DCM czy NMP.

### **Węgłany alkilenowe**

Kolejną substancją często stosowaną jako substancja aktywna preparatów do usuwania powłok lakierniczych jest węgiel propylenowy lub węgiel etylenowy [31–36]. Machac, Jr. i in. [31] jako substancje aktywne opisują węglany alkilenowe zawierające od 3 do 10 atomów węgla, z których najlepsze rezultaty uzyskuje się stosując węgiel propylenowy. Ponadto mogą zostać użyte węglany dialkylowe, takie jak węgiel dimetylowy lub węgiel dietylowy. W omawianym patencie [31] węgiel propylenowy stosuje się razem z alkoholem benzylowym, w ilości od 1 do 10%. Marquis i in. [32] proponują dodatkowo wprowadzić do kompozycji nadtlenek wodoru jako aktywator.

### **Estry metylowe kwasów karboksylowych**

Wojcik [37] jako substancję aktywną opisuje ester metylowy kwasu benzoowego w połączeniu z kwasem mrówkowym. W patencie tym zastosowano od 60 do 80% estru metylowego kwasu benzoowego oraz od 15 do 30% kwasu mrówkowego.

Substancją aktywną preparatów są również estry metylowe kwasów dikarboksylowych [38–40]. Można użyć estry kwasów bursztynowego, glutarowego lub adypinowego. W skład kompozycji przygotowanych według tych patentów wchodzi estry w ilości od 10 do 99% wagowych.

Machac, Jr. i in. [41, 42] opisują kompozycję zawierającą węglany alkilenowe lub węglany dialkylowe, estry kwasów mono- i dikarboksylowych oraz związki zawierające siarkę, np. dimetylosulfotlenek. Jako estry zastosowano octan etylu, octan butylu, 3-etoksypropionian etylu lub octan 1-metoksy-2-propylu. Najlepsze wyniki autorzy uzyskali stosując 3-etoksypropionian etylu. Tego rodzaju kompozycje powinny zawierać od 20 do 45% estrów kwasów dikarboksylowych, 20 do 40% 3-etoksypropionianu etylu oraz 10 do 30% dimetylosulfotlenku [41, 42].

### **Dimetylosulfotlenek**

Zastosowanie dimetylosulfotlenku w połączeniu z D-limonenem opisuje Adams [43]. W wymienionym patencie dimetylosulfotlenek użyty jest w ilości od 85 do 90% natomiast D-limonen w ilości od 5 do 10%.

Dimetylosulfotlenek w połączeniu z innymi substancjami zaproponowali również McKim i in. [44]. Stwierdzili oni, że substancjami użytymi z dimetylosulfotlen-

kiem mogą być: octan *tert*-butylu, octan amylu, octan *n*-heksylu, octan 2-butoksyetylu oraz octan 2-etoksyetylu. Można również zastosować estry hydroksykwasów, takie jak mleczan metylu, mleczan etylu, mleczan *n*-propylu, mleczan *izo*-propylu, mleczan *tert*-propylu, winian dietylu, cytrynian trietylu i cytrynian tributylu. Kompozycja powinna zawierać od 5 do 30% dimetylosulfotlenku oraz 70 do 95% estrów [44].

Lallier [45] opisuje mieszaninę dimetylosulfotlenku z estrami kwasów dikarboksylowych (estry metylowe kwasów bursztynowego, glutarowego i adypinowego). Kompozycja powinna zawierać od 15 do 25% dimetylosulfotlenku oraz od 25 do 45% estrów [45]. Preparaty oparte na dietylosulfotlenku opisane są również w patentach [46, 47].

### Estry kwasu mlekowego

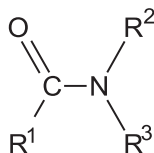
Kolejną grupą związków stanowiących substancję aktywną omawianych preparatów są estry kwasu mlekowego w połączeniu z D-limonenem [48]. W patencie opisane są kompozycje zawierające estry C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> kwasu mlekowego w ilości od 20 do 80% oraz D-limonen w ilości od 20 do 80%. Według autorów preferowanym estrem jest ester etylowy kwasu mlekowego [48].

### Izomaślan izobutylu

Jako substancja aktywna preparatów do usuwania farb lateksowych według Pearl [49, 50] może zostać użyty izomaślan izobutylu. Kompozycja powinna zawierać ten związek w ilości od 25 do 75%.

### Alkilowe pochodne amidów kwasów karboksylowych, dikarboksylowych i hydroksykarboksylowych

Substancjami aktywnymi są również alkilowe pochodne amidów kwasów karboksylowych [51] o ogólnym wzorze:

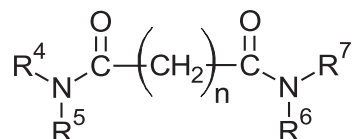


Rysunek 1. Struktura ogólna amidu  
Figure 1. General structure of the amide



W związkach o tej budowie  $R^1$  to kwas alifatyczny lub aromatyczny zawierający od 8 do 12 atomów węgla i do 3 nienasyconych wiązań w cząsteczce. Podstawnikami  $R^2$  i  $R^3$  mogą być grupy alkilowe zawierające od 1 do 4 atomów węgla. W cytowanym patencie zastosowano kwas kapronowy, laurynowy, mirystynowy, palmitynowy, oleinowy, linolowy, linolenowy i arachidowy, natomiast podstawnikami alkilowymi były grupy metylowa, etylowa, propylowa, *izo*-propylowa, *n*-butylowa, *izo*-butylowa oraz *tert*-butylowa.

Kolejną grupą związków wykazujących pożądane właściwości są podstawione amidy kwasów dikarboksylowych o wzorze ogólnym:



Rysunek 2. Struktura ogólna amidu kwasu di karboksylowego  
Figure 2. General structure of the di carboxylic acid amide

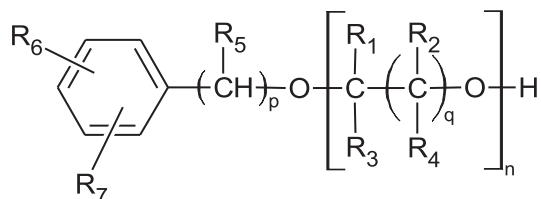
Przykładowymi kwasami stosowanymi do syntezy amidów mogą być kwasy zawierające od 1 do 12 atomów węgla, takie jak kwas maleinowy, kwas fumarowy czy kwas adypinowy.  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $R^7$  to grupy alkilowe zawierające od 1 do 4 atomów węgla.

W patencie Valls i in. [51] opisane są również amidy kwasów hydroksykarboksylowych. Do syntezy tych amidów można zastosować takie kwasy jak kwas mlekowy, kwas cytrynowy lub winowy. Podstawnikami przy azocie mogą być grupy alkilowe zawierające od 1 do 4 atomów węgla [51].

### Cykliczne etery

Kolejnymi substancjami znajdującymi zastosowanie jako substancje aktywne są cykliczne etery zawierające jeden lub dwa atomy tlenu w pierścieniu [52]. Przykładem takiego związku może być dioksolan. Dodatkowo, w skład kompozycji wchodzi alkohol benzylowy [52].

Wilson i in. [53, 54] opisują alkoksylované alkohole aromatyczne o strukturze przedstawionej na rysunku (Rys. 3):



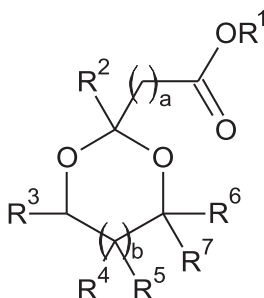
Rysunek 3. Struktura ogólna alkoksylowanego alkoholu aromatycznego  
Figure 3. General structure of the alkoxyated aromatic alcohol

gdzie:  $R_1, R_2, R_3, R_4$  to grupa metylowa, wodór lub atom halogenu,  $R_5, R_6, R_7$  to grupa alkilowa zawierająca od 1 do 4 atomów węgla, wodór lub atom halogenu,  $q$  przyjmuje wartość 1 lub 2,  $p$  przyjmuje wartość 0 lub 1,  $n$  przyjmuje wartości od 1 do 10.

### Alkoksylowane alkohole alifatyczne

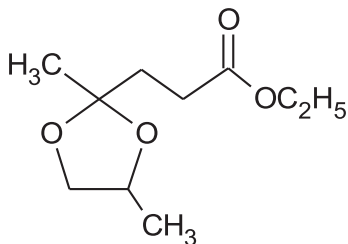
Rehm i Spei [55], jako substancje aktywne opisują alkoksylowane alkohole alifatyczne zawierające od 8 do 12 atomów węgla i od 2 do 12 grup oksyetylenowych lub metyloksyetylenowych.

Rieth [56] jako substancje aktywne opisuje związki o następującej strukturze (Rys. 4)



Rysunek 4. Struktura ogólna związku stosowanego jako substancja aktywna przez Rieth [56]  
Figure 4. General structure of a compound used as an active substance by Rieth [56]

gdzie:  $R^1$  to grupa alkilowa zawierająca od 1 do 6 atomów węgla,  $R^2$  to wodór lub grupa alkilowa zawierająca od 1 do 3 atomów węgla,  $R^3, R^4, R^5, R^6, R^7$  jest to wodór lub grupa alkilowa zawierająca od 1 do 6 atomów węgla,  $a$  przyjmuje wartości od 0 do 3,  $b$  przyjmuje wartości od 0 do 1. Najlepsze wyniki otrzymano stosując związek powstały w wyniku reakcji 1,2-propanodiolu z estrem etylowym kwasu lewulinowego o następującej strukturze (Rys. 5).



Rysunek 5. Struktura związku zastosowanego jako substancja aktywna w patencie Rietha [56]  
Figure 5. Structure of a compound used as active substance in Rieth patent [56]

#### 1.4. BIOPREPARATY

##### **Preparaty zawierające składniki aktywne otrzymywane z biosurowców.**

Ze względu na ochronę środowiska i zdrowia ludzkiego opracowano preparaty mniej toksyczne. Preparaty te nie zawierają substancji ropopochodnych oraz innych niebezpiecznych substancji stosowanych w innych preparatach tego typu. Obecnie dużym zainteresowaniem cieszą się preparaty oparte na składnikach pochodzących z przerobu soi. Preparaty te są w pełni biodegradowalne oraz nietoksyczne.

Substancjami aktywnymi stosowanymi w tych preparatach są estry kwasu mlekowego, i estry kwasów tłuszczowych. Preferowane są estry metylowe powstałe w wyniku reakcji transestryfikacji oleju sojowego oraz ester etylowy kwasu mlekowego [57, 58].

Gross [59] jako substancję aktywną opisuje estry alkilowe  $C_{1-4}$  nasyconych lub nie nasyconych kwasów tłuszczowych  $C_{6-22}$  w połączeniu z cyklicznymi ketonami, w stosunku od 10:1 do 1:10. Preferowane są estry metylowe kwasów zawierających od 6 do 14 atomów węgla, użyte w ilości od 3 do 96%. Cyklicznym ketonem jest cykloheksanon użyty w ilości od 1 do 35% [59, 61, 62].

##### **Biopreparaty do usuwania powłok lakierniczych**

Ciekawą propozycję przedstawia firma Atotech [63]. Proponuje ona biochemiczny proces Master Remover przeznaczony do usuwania starych powłok lakierniczych. Proponowana technologia polega na zmieszaniu dwóch składników tworzących emulsję wodno-organiczną, która ma zdolność do usuwania powłok. Obecne w roztworze kultury bakterii rozkładają odspojone organiczne komponenty powłoki, co powoduje znaczne wydłużenie żywotności kompozycji. W procesie Master Remover nie stosuje się chlorowcopochodnych rozpuszczalników, a pomimo tego cechuje go duża szybkość działania oraz duża wydajność [63–65].

Firma Atotech proponuje również inne realizacje biotechnologicznego procesu odseparowania farby. W zaproponowanym rozwiązaniu obecne w roztworze mikroorganizmy powodują degradację składników farby, natomiast zastosowane koagulanty i flokulanty powodują kumulację rozłożonych komponentów w większe konglomeraty łatwe do usunięcia z roztworu [66, 67]. Po odseparowaniu fazy stałej, można ją poddać niezależnym procesom utylizacji.

##### **Preparaty wytwarzane w oparciu o produkty uboczne przemysłu chemicznego**

Większość z omawianych rozwiązań zawierających rozpuszczalniki organiczne wykorzystuje jako substancje aktywne związki droższe niż stosowany wcześniej

chlerek metylenu. Celowym jest zatem szukanie źródeł tanich surowców do przygotowania kompozycji odspajającej stare powłoki. Mając dodatkowo na względzie aktualne dążenie do opracowywania technologii bezodpadowych i zagospodarowania wytwarzanych produktów ubocznych należy poszukiwać surowców do syntezy składników preparatów do usuwania powłok lakierniczych między innymi w tej grupie produktów. Niewątpliwą korzyścią takiego rozwiązania jest zagospodarowanie produktów ubocznych oraz obniżenie kosztów wytwarzania samego preparatu.

Przykładem takiego rozwiązania jest próba skomponowania preparatów do usuwania powłok lakierniczych opartych na produktach ubocznych powstałych podczas utleniania cykloheksanu w technologii Cyklopol w Zakładach Azotowych w Tarnowie-Mościcach S.A. [68].

### UWAGI KOŃCOWE

Na podstawie przeprowadzonego przeglądu można zauważyć dominującą obecnie tendencję do zastępowania niebezpiecznych dla zdrowia oraz środowiska aktywnych rozpuszczalników substancjami o mniejszej szkodliwości lub wręcz substancjami nietoksycznymi. Do 2009 roku powszechnie stosowanym środkiem był chlorek metylenu, jednak przeprowadzone badania odnośnie jego szkodliwości doprowadziły do wycofania tego związku ze składu preparatów do usuwania powłok lakierniczych. Podobna sytuacja może wystąpić w przypadku powszechnie stosowanego obecnie N-metylopirolidonu.

W związku z tym producenci starają się wprowadzić preparaty oparte o związki mniej lotne oraz bezpieczne dla zdrowia człowieka. Często stosowanym nietoksycznym środkiem używanym w wielu kompozycjach jest alkohol benzylowy. Ponadto, jako środki aktywne można użyć takie związki jak dimetylosulfotlenek, estry kwasów dikarboksylowych, estry hydroksykwasów czy węglany alkenowe. W trosce o środowisko wprowadzane zostają preparaty oparte na składnikach w pełni biodegradowalnych oraz nietoksycznych, powstałe z odnawialnych surowców naturalnych. Przykładem są preparaty oparte na produktach powstałych z przerobu soi. Na rynku krajowym alternatywą może być produkcja preparatów do usuwania powłok lakierniczych w oparciu o tanie surowce, stanowiące produkty uboczne krajowego przemysłu chemicznego.

Na uwagę zasługuje również fakt, że firmy oferujące tego rodzaju preparaty starają się opracować metody, równoczesnej z odspajaniem powłok, bioutylizacji powstających odpadów.

### PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] A. Kozłowska, *Ochrona przed korozją*, 2005, 4, 137.
- [2] E. Błachowicz, *Ryn. chem.*, 2000, 2, 18.

- [3] Decyzja Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) NR 455/2009/WE.
- [4] Biuletyn informacyjny Departamentu Zdrowia Publicznego Stanu California (The California Department of Public Health), [online], [dostęp: 2012-10-31]. Dostępny w Internecie: <http://www.cdph.ca.gov/programs/hesis/Documents/methylenechloride.pdf>.
- [5] Patent nr WO91/00893, E. Stevens, Paint stripper and varnish remover compositions and related methods, 24.01.1991.
- [6] NMP in Paint Strippers, Andrianos chemicals, [online], [dostęp: 2012-01-24]. Dostępny w Internecie: <http://www.andrianos.com/nmp.pdf>.
- [7] Patent nr US7087566, D.E. Shireman, Paint removing composition, 08.08.2006.
- [8] Patent nr US5932530, G. Radu, S. Maruyama, *N*-methylpyrrolidone, dimethyl ester and terpene-containing, paint removing composition, 03.08.1999.
- [9] Patent nr US20060229220, C.L. Hawes, D.E. Shireman, Color changing paint removing composition, 12.10.2006.
- [10] Patent nr US6923873, D. Pageau, E. Marcu, D. Aston, Paint stripping composition and method of using the same, 02.08.2005.
- [11] Patent nr CA 2331439, D. Pageau, E. Marcu, D. Aston, Paint stripping composition and method of using the same, 19.01.2001.
- [12] Rozporządzenie komisji (UE) Nr 1282/2001 z dnia 28 listopada 2011 (<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:328:0022:0029:PL:PDF>).
- [13] Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r ([http://www.chemikalia.gov.pl/informacje\\_ogolne4.html](http://www.chemikalia.gov.pl/informacje_ogolne4.html)).
- [14] Biuletyn informacyjny Polskiego Związku Przemysłu Kosmetycznego, planowany zakaz stosowania *N*-metylo-2-pirolidonu, [online], [dostęp 2012-10-31]. Dostępny w Internecie: <http://www.kosmetyczni.pl/aktualnosc.php?f=386>.
- [15] Biuletyn informacyjny Departamentu Zdrowia Publicznego Stanu California (The California Department of Public Health), [online], [dostęp 2012-10-31]. Dostępny w Internecie: <http://www.cdph.ca.gov/programs/hesis/Documents/nmp.pdf>.
- [16] Patent nr US5990062, S.R. Summerfield, M.W. Clark, N.R. Wilson, M.E. Moore, T.A. Vivian, S.A. Hofacker, Low toxicity paint stripper, 23.11.1999.
- [17] Patent nr WO9729158 (European Patent EP0879267B1, Paint Remover, J.L. Belt, A.T. Zieleniewski, 2001).
- [18] Patent nr US6358907, S. Vitomir, Aerosol formulations, 19.03.2002
- [19] Patent nr EP0860482B1, J. Distaso, A.G. DeGuzman, Paint-stripping formulations, their preparation and use, 25.02.1998.
- [20] Patent nr WO2008/142562 (European Patent EP2152816A1, Biodegradable ecological paint remover, M. Brailsford, 27.11.2008).
- [21] Patent nr US2010326479, M. Brailsford, S.M. Dormon, Paint remover, 30.12.2010.
- [22] Patent nr US20070244019, M. Detar, F. Connelly, Water-based paint stripper, 18.10.2007.
- [23] Patent nr US20050026799, M. Detar, F. Connelly, Water-based paint stripper, 03.02.2005.
- [24] Patent nr US6465405, S. Vitomir, Paint stripper compositions, 15.10.2002.
- [25] Patent nr US6586380, E.T. Marquis, R.E. Baldwin, Paint and coating remover, 01.07.2003.
- [26] Patent nr US6174847, J.-P. Lallier, Composition for stripping paints varnishes or lacquers, 16.01.2001.
- [27] Patent nr US2010/0326479, M. Brailsford, S.M. Dormon, Paint remover, 30.12.2010.
- [28] Patent nr WO99/32564 (European Patent EP1040170A1, Low toxicity paint stripper, S. Summerfield, M. Clark, N.R. Wilson, M.E. Moore, T.A. Vivian, S. Hofacker, 01.07.1999).
- [29] Australian Patent Application 2007902248, M. Brailsford, Biodegradable ecological paint remover, 30.04.2007.

- [30] Patent nr WO2006/071194, A. Samuelsson, Agent to remove paint, lacquer, glue, plastic or similar from objects and use of it, 06.07.2006.
- [31] Patent nr US6548464, J.R. Machac, Jr., E. Chung-Yit Nieh, S.A. Woodrum, E.T. Marquis, Pains stripper for aircraft and other multicoat systems, 15.04.2003.
- [32] Patent nr US6040284, E.T. Marquis, R.E. Baldwin, Paint coating remover comprising propylene carbonate and hydrogen peroxide, 21.03.2000.
- [33] Patent nr US7485608, D. Perlman, pH-buffered alkylene carbonate nail polish and paint remover, 03.03.2009.
- [34] Patent nr US20060058208, M. Ventura, S. Bolkan, R.F. Ashley, Paint & Ink remover two-phase system, 16.03.2006.
- [35] Patent nr WO0142376A1, E.T. Marquis, R.E. Baldwin, J.R. Machac, Jr., K. Darragas, S.A. Woodrum, Thickened paint and coating remover, 14.06.2001.
- [36] Patent nr US616906, J.R. Machac, Jr., E.T. Marquis, S.A. Woodrum, Paint and coating remover, 02.01.2001.
- [37] Patent nr US6417149, G. Wojcik, Paint stripping composition and process containing methyl benzoate and formic acid, 09.07.2002.
- [38] Patent nr US6624222, P.E. Kestyn, A.T. Chen, H. Zhao, Environmentally safe paint stripper emulsion, 23.08.2003.
- [39] Patent nr US6790891, P.E. Kestyn, A.T. Chen, H. Zhao, Environmentally safe paint stripper, 14.08.2004.
- [40] Patent nr WO2010/084159 (European Patent EP2384359A1, Stripping composition, A. Bourdette, J.-E. Zanetto, P. Lasnet de Lanty, 29.07.2010).
- [41] Patent nr US6159915, J.R. Machac, Jr, E.T. Marquis, S.A. Woodrum, Katty Darragas, Paint and coating remover, 12.12.2000.
- [42] Patent nr US6395103, J.R. Machac, Jr, E.T. Marquis, S.A. Woodrum, Degreasing compositions, 28.05.2002.
- [43] Patent nr WO2010/122515 (European Patent EP2421922A1, Paint stripping composition and device for application thereof for paint stripping by pell-off, G. Adami, 28.10.2010).
- [44] Patent nr US6673157, A.S. McKim, G. Kvakovszky, J.E. Schmidheiser, Methods for stripping paint with DMSO containing compositions, 06.01.2004.
- [45] Patent nr US6534461, J.-P. Lallier, Stripping composition which can be used in particular in the construction and yachting field, 18.03.2003.
- [46] Patent nr WO2008/107611 (European Patent EP2115079A2, Dimethylsulfoxide formulation in mixture with additive lowering the crystallization point of same, and applications of said mixture, J.-P. Lallier, F. Le Vilain, 12.09.2008).
- [47] Israel Patent nr 12087, Thickened paint stripping composition, 23.11.2003.
- [48] Patent nr US6797684, M. Henneberry, J.A. Snively, G.J. Vasek, R. Datta, Biosolvent composition of lactate ester and D-limonene with improved cleaning and solvating properties, 28.09.2004.
- [49] Patent nr US6235694, R.E. Pearl, Latex paint remover, 22.05.2001.
- [50] Patent nr US6797077, R.E. Pearl, Latex paint remover, 28.09.2004.
- [51] Patent nr EP2345702, R. Valls, J. Bigorra Llosas, E. Graupera, J. Raya, Paint and coating remover compositions, 20.07.2011.
- [52] Patent nr WO03052004, Ch.H. Hensley, Cyclic ether based paint remover, 26.06.2003.
- [53] Patent nr US7482316, N.R. Wilson, M.A. Murphy, Jr., Water-based flushing solution for paint and other coatings, 27.01.2009.
- [54] Patent nr EP1918322A1, K.E. Foster, M.S. Ciemiega, Paint stripper with corrosion inhibitor for aluminum, 31.10.2007.
- [55] Patent nr US20030119688, H.-J. Rehm, B. Spei, Organic paint stripper, 26.06.2003.

- [56] Patent nr US2012/0040880, L. R. Rieth, M. J. Tjosass, D. J. Yontz, Carboxy ester ketal removal compositions, method of manufacture, and uses thereof, 16.02.2012.
- [57] Patent nr US6096699, E.P. Bergemann, J.E. Opre, M. Henneberry, Environmentally friendly solvent, 01.08.2000.
- [58] Materiały informacyjne firmy Elements, BioGel Graffiti Remover, Dostępny w internecie: <http://www.parish-supply.com/msds/0042401.pdf>.
- [59] Patent nr US6824623, S.F. Gross, M.J. Barabash, J.F. Hessel, Graffiti remover, paint stripper, degreaser, 30.11.2004.
- [60] Patent nr US7449437, S.F. Gross, M.J. Barabash, J.F. Hessel, Graffiti remover, paint stripper, degreaser, 11.11.2008.
- [61] Patent nr WO0121719A1, S.F. Gross, M.J. Barabash, J.F. Hessel, Graffiti remover, paint stripper, degreaser, 29.03.2001.
- [62] Patent nr EP1772496A1, Graffiti remover, paint stripper, degreaser, 11.09.2000.
- [63] Broszura reklamowa firmy Atotech, Master Remover – Technologia Usuwania Lakieru, [online], [dostęp: 2012-10-13]. Dostępny w internecie: [http://www.atotech.com/data/Atotech%20Poland/Master%20Remover-Broszurka\\_PL.pdf](http://www.atotech.com/data/Atotech%20Poland/Master%20Remover-Broszurka_PL.pdf).
- [64] Materiały informacyjne firmy Atotech, Master Remover – Sustainable Paint Removal Technology, [online], [dostęp: 2012-10-13]. Dostępny w Internecie: <http://www.atotech.com/products/general-metal-finishing/paint-supporttechnologies/master-remover.html>.
- [65] M. Kulczyński, Lak. przem., 2007, **6**(50), 52.
- [66] Materiały informacyjne firmy Atotech, KleerAid Biotechnologiczny proces odseparowania farby ekonomiczny u przyjazny dla środowiska, [online], [dostęp: 2012-10-13]. Dostępny w Internecie: [http://www.atotech.com/data/Atotech%20Poland/KleerAid\\_Broszura\\_PL.pdf](http://www.atotech.com/data/Atotech%20Poland/KleerAid_Broszura_PL.pdf).
- [67] Patent nr US8202424, A. Almadidy, N. Lavyssierre, Microbial degradation of water-borne paint containing high levels of organic solvent, 19.06.2012.
- [68] O. Vogt, J. Ogonowski, P. Michorczyk, J. Chem. Tech., **14**(4), 2012, 7.

Praca wpłynęła do Redakcji 26 listopada 2012





**O EKSPERYMENTACH MICHAŁA  
JANA BORCHA (1753–1811) DOTYCZĄCYCH  
CHEMILUMINESCENCJI**

THE EXPERIMENTS OF MICHAŁ JAN BORCH  
(1753–1811) CONCERNING CHEMILUMINESCENCE

**Ignacy Z. Siemion<sup>1</sup>, Alicja Szastyńska-Siemion<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *Wydział Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego  
ul. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław*

<sup>2</sup> *Instytut Studiów Klasycznych, Orientalnych i Śródziemnomorskich  
Uniwersytetu Wrocławskiego  
ul. Szewska 49, 50-139 Wrocław*

---

**Ignacy Z. Siemion**, urodzony w roku 1932, ukończył studia chemiczne na Uniwersytecie Moskiewskim w 1955. Doktorat na Politechnice Wrocławskiej – 1964. Doktor habilitowany nauk chemicznych – 1968. Profesor nadzwyczajny – 1974, zwyczajny – 1981. Był kierownikiem Zakładu Chemii Organicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Własne zainteresowania badawcze: chemia i stereochemia peptydów i białek. Wypromował 23 doktorów chemii, z których pięcioro się habilitowało. Autor 9 książek, 275 prac oryginalnych i około 150 artykułów przeglądowych i dotyczących historii nauki. W latach 1983–1994 redaktor naczelny „Wiadomości Chemicznych”. Obecnie zaangażowany w pracy Gabinetu Historii Chemii Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego.

**Alicja Szastyńska-Siemion**, profesor zwyczajny w Instytucie Studiów Klasycznych, Orientalnych i Śródziemnomorskich Uniwersytetu Wrocławskiego. Autorka licznych prac z zakresu literatury starogreckiej oraz jej recepcji w Polsce i nowożytnej Europie, zwłaszcza różnych gatunków liryki i epigramatu, m.in. książki o poetce greckiej, Safonie (Ossolineum, Wrocław 1994), Współautorka pracy o lwowskim chemiku, Ignacym Martinowicsu i tłumaczka z języka łacińskiego obszernych partii jego podręcznika chemii.

**ABSTRACT**

In the paper, the scientific activities of Polish scientist Michał Jan Borch (1753–1811) are briefly discussed, The Polish translation of Borch's article (published in "Atti dell' Academia della Scienza di Siena" in 1781) on the luminescence of the sea and different ideas on what could cause the phenomenon is presented. The attempts of Borch to isolate the luminescence – generating substance from decaying swordfish are discussed in the light of some later data on the chemiluminescence of organic compounds, Connected to bioluminescence experiments of our other scientists of that time (G. Forster and K. Kortum) are also quoted.

Keywords: M. Borch's scientific activity, sea luminescence, luminescence of decaying swordfish

Słowa kluczowe: działalność naukowa Borch, luminescencja morza, luminescencja zepsutych mieczników

---

---

Michał Jan Borch (1753–1811) wywodził się od wieków ze spolszczonej, rodziny inflanckiej, osiadłej w Polskich Inflantach, na pograniczu obecnej Łotwy i Litwy, Rodzina, której początki sięgały czasów Zakonu Kawalerów Mieczowych, uległa w ciągu wieków całkowitemu spolszczeniu. Ojciec Michała był nawet kanclerzem wielkim koronnym Królestwa Polskiego. Michał Jan uczył się w warszawskim Collegium Nobilium. Za młodu myślał o karierze wojskowej. Służył w gwardii królewskiej i był nawet ranny podczas słynnego zamachu konfederatów barskich na króla. Wcześniej jednak ujawniły się u niego pasje naukowe, które szczególnie były mocne w czasie kilkuletniej podróży do Zachodniej Europy. Jej trasa biegła przez Niemcy, Szwajcarię (gdzie zatrzymał się dłużej), Francję i Włochy. W Genewie pozostawał pod wyraźnym wpływem wybitnego przyrodnika tego kraju, Ch. Bonneta (1720–1793). Naukowe pasje Borchy dotyczyły głównie mineralogii i chemii. W chemii był wyznawcą teorii flogistonowej. Jego dzieło o mineralogii Sycylii obarczone jest mocno takimi poglądami i dziś nie może być uważane za progresywne dla ówczesnej nauki, chociaż dokumentuje gorliwość badawczą.

Rozwiniętą biografię Borchy skreślił nie tak dawno łotewski historyk nauki, Stradins [1]. Obszerna twórczość naukowa Borchy nie była, jak dotąd, szerzej traktowana w naszym kraju. Szerszego omówienia doczekał się jedynie memoriał Borchy, w którym przedstawił swoje nowatorskie idee na temat, jak ją dziś się nazywa, biogeochemicznej metody poszukiwania złóż rud metali. Polegała ona na wykorzystaniu znajomości roślin rosnących w określonej okolicy. I tak np. obecność różneczników miała według Borchy świadczyć o obecności rud żelaza. Kierując się tą wskazówką, odkrył Borch we Francji dwa źródła wód żelazistych. Memoriał ten przedstawił Borch w 1776 roku, w Akademii w Dijon. Pozostawało to w związku z procedurą przyjęcia Borchy do tego gremium. Niezależnie, przekazał później ten memoriał królowi Stanisławowi Augustowi. Materiały te opublikował Gaweł [2] w „Pracach Muzeum Ziemi” a wysoką ocenę dał im Maślankiewicz [3]. Uwagę chemika zwracają tam analizy jakościowe wód żelazistych, przeprowadzone przez Borchy. Opierały się one na wykorzystaniu reakcji charakterystycznych, między innymi obecność żelaza stwierdzał Borch przy pomocy reakcji próbki wody z „alkali flogistonowym”, to jest z cyjankiem.

W ostatnim czasie Siemion i Latko przeszali do druku [4] polskie tłumaczenie pracy Borchy o truflach piemonckich. Jest to wysoce odkrywcza praca, dotycząca sposobu rozmnażania się trufli i aktualnego jeszcze podówczas mniemania o ich samoródtwie. Ta praca nie znalazła, jak dotąd oddźwięku w polskim piśmiennictwie, choć jest, bez wątpienia, bardzo istotna dla oceny miejsca Borchy w polskiej tradycji naukowej. Jej ostatnią część stanowi rozdział o chemicznym badaniu trufli. Narzędziem badania jest sucha destylacja trufli. Zabieg suchej destylacji materiałów biologicznych był typowym zabiegiem tamtych lat. Przeprowadzano dziesiątki takich prób, izolując kolejne frakcje destylatu: najbardziej lotny „spirytus”, potem „flegmę” i „olej”. Nie wychodzono poza taką ogólną charakterystykę destylatu. O izolacji konkretnych związków organicznych nie było jeszcze mowy. Pozostałość podestylacyjną, zwaną „caput mortuum” (martwa głowa) spopieliano i badano na

zawartość węglanów (burzenie się po zadaniu kwasem). Borch w swoim dziełku dokładnie opisał przebieg destylacji trufl i użytych w kontroli grzybów. Podejmuje też polemikę z wynikami współczesnego mu badacza, Severina, wyznawcy poglądu o powstawaniu trufl pod wpływem „siły fermentacyjnej”. Severin stwierdził, że destylacja trufl przebiega podobnie jak innych grzybów, a spopielona pozostałość jest zasadowa i burzy się z kwasami. Borch uzyskał inny wynik. U niego sucha pozostałość była kwaśna i burzyła się po zadaniu zasadą. Nie jesteśmy dziś w stanie orzec, jak było na prawdę. Jesteśmy raczej skłonni powiedzieć, że ten wynik Borch był prawdopodobnie błędny, co nie zmienia zresztą zasadności jego polemiki z poglądami Severina na temat rozmnażania się trufl. Trudno jednak nie odnotować, rzadkiego przecież wtedy u nas przykładu zastosowania przezeń techniki pracy chemicznej do badania materiału biologicznego.

W niniejszej publikacji omawiamy inną pracę Borch, pracę o „fosforze morza”. Podczas swojej podróży na Sycylię i Maltę, jaką podjął pod koniec roku 1776, zaobserwował on intensywną poświatę morza, której przyczyny nie znano. Dopiero znacznie później ustalono, że przyczyną zjawiska są żyjące w morzu bakterie. Borch opisał swoją podróż w solidnym tomie „Listów o Sycylii i Malcie” [5]. Książkę tę napisał po francusku. Miała one też dwa osiemnastowieczne wydania niemieckie. Była więc dziełem bardzo poczytnym. Pisał ją przyrodnik z zamiłowania, pełno więc tam różnorodnych wiadomości przyrodniczych. Pisał tam Borch co następuje: „Jeszcze dwa słowa o zwyczajnym, a mimo to wyjątkowym fenomenie, który miałem okazję zaobserwować na morzu. Jest to składające się z nieskończenie wielu iskier ognista krecha, widoczna na morzu. Na pierwszy rzut oka można ją uważać za odbicie gwiazd, ale widzi się wyskakujące z morza małe, ogniste cząstki, które, gdy ster, albo żerdź zanurzyć w morzu, wyrzucane są na schodki statku i świecą jeszcze przez jedną, dwie minuty, utrzymując się tam” [6].

Pobyt na Sycylii pozwolił Borchowi zaobserwować również świecenie rozkładających się ryb morskich. Było to podczas przepływu ławic miecznika (*Xiphias gladius*). Jest to potężna ryba, o długości około trzech metrów, przy czym trzecią część jej długości stanowi łeb z potężnym mieczem (przerośnięta górna szczeka). Obydwa zjawiska zaobserwował Borch w tym samym czasie, musiały więc mu się ze sobą skojarzyć. Korzystając z tych okoliczności zabrał się Borch do izolacji świecącej substancji rozkładających się mieczników. Swoje doświadczenia opisał w rozprawie, przedstawionej na posiedzeniu Akademii Nauk w Sjenie, 30 listopada 1778. Pozostawało to w związku z przyjęciem Borch na członka tej akademii. Rozprawa została zamieszczona w Aktach Akademii (*Atti dell' Accademia della Scienza di Siena*, t. VI, Siena 1781). Rozprawę tę napisał po włosku. Jej tłumaczenie na język polski przedstawiamy w aneksie do tej publikacji. Niezależnie od jej rzeczywistej wartości, jest ona godna uwagi jako przejaw wczesnej naszej twórczości naukowo-badawczej.

Opis doświadczeń Borch jest klarowny i w zasadzie nie wymaga komentarzy. Zebrany z trzydziestu łbów rozkładających się ryb wyciek poddał Borch destylacji (był to wariant destylacji z parą wodną). Generujący światło substrat przechodził do destylatu, do jego fazy organicznej. Oddzieloną fazę organiczną postanowił Borch

„zestalić”. Do tego celu użył czerwonej glinki (*bolus*). Była to, jak można sądzić, glinka lekarska, typu czerwonej glinki z Armenii (*bolus Armenus* średniowiecza), glinokrzemianowy preparat montmorillonitowy, o znakomitych własnościach sorpcyjnych. Na Śląsku słynęła lecznicza glinka strzegomska. Pisaliśmy o niej stosunkowo niedawno [7]. Użycie takiego podłoża do „zestalania” świecącej substancji ryb była ciekawym i sensownym pomysłem Borchy. W ten sposób otrzymał on stały „fosfor morski”.

Końcowe fragmenty rozprawy Borchy zawierają jego rozważania dotyczące przyczyn luminescencji zwierząt, morza i niektórych minerałów (jak kamień boloński). Borch uważał, że wszystkie takie zjawiska powinny mieć tę samą przyczynę i upatrywał jej w działaniu „lotnej morskiej soli alkalicznej”. W ten sposób oddawał dań epoce, która zjawiska nieznaną zwykła była ciągle jeszcze objaśniać czystej wody spekulacjami.

Borch nie łączył bezpośrednio świecenia morza ze swoim „fosforem zwierzęcym”. W sprawie świecenia morza wypowiadał się ostrożnie. „Poglądy na to zjawisko – pisze – są różne, ponieważ jedni uważają, że jest to efekt obecności świecących skolopendr, a drudzy przypisują je wyłącznie emanacji światła bitumu morskiego, który zapala się i świeci, kiedy się połączy z flogistonem, albo rozsiewa się w otaczającym powietrzu atmosfery, albo pochodzi z odkładanych w głębi morza części rozkładanych zwierząt morskich”. Wyraźniejsze w tej sprawie stanowisko, zawarł Borch w jednym z rozdziałów swoich „Listów o Sycylii”. „Można to – pisał – sensownie objaśnić, kiedy się zauważy, że na wodę morską składają się dwie natury, nie biorąc pod uwagę właściwej jej ciepłości, która jest cechą każdej innej wody; jedną z nich stanowi rozpuszczona sól, która od pierwszego rzutu oka może się ujawnić i jak udowodniła użyta przez pana Bogainvilla maszyna pana Poissoniera, łatwo daje się od tego fluidu odciągnąć, druga jest również rozpuszczona, ale tak ciągliwa i, rzekłbym, tak mocno do tego fluidu przyklejona smoła, że wydaje się tworzyć z nim jedno ciało i wszelkie chemiczne operacje i zabiegi przyrodników nie przyniosły jej oddzielenia, a wodzie morskiej przydaje ona goryczy i żywicznego smaku. Stąd można wnioskować, że właśnie ta smoła jest przyczyną omawianego zjawiska” [8].

Jeśli dziś spojrzeć na doświadczenia Borchy i dać wiarę jego wynikom, to można je odnieść do wczesnych prac nad chemiluminescencją. Zjawisko chemiluminescencji związków organicznych wnikliwie badał w latach 70. i 80. XIX wieku lwowski profesor chemii, Bronisław Radziszewski (1838–1914). Swoje w tym temacie prace podsumował w obszernym artykule w „Liebigs Annalen” [9]. W 75 rocznicę ukazania się tego artykułu poświęcił pracom Radziszewskiego specjalne omówienie J. Kroh [10].

Badania Radziszewskiego dotyczyły roztworów ciekłych wielu substancji organicznych. Stwierdził on, że świecenie można zaobserwować w przypadku olejków eterycznych, niektórych węglowodorów aromatycznych, kwasów tłuszczowych, ich estrów i soli, alkoholi (począwszy od zawierających cztery atomy węgla w łańcuchu), fosfatydów (jak lecytyna), i kwasów żółciowych. Świecenie polega, jak dowiódł Radziszewski, na powolnym spalaniu substancji organicznej. Proces stymulowała

obecność zasady. Jak stwierdził Radziszewski, świecenie stymulowały nie tylko zasady nieorganiczne, ale liczne zasadowe związki o charakterze organicznym, jak np cholina. Takie związki, nie mówiąc już o amoniaku, łatwo mogły się znaleźć w destylatach Borch. Świecenie tego destylatu mogło więc być przejawem tego ogólnego procesu. Borch nie był oczywiście w stanie cokolwiek powiedzieć o charakterze związków organicznych, obecnych w jego destylacie. Chemia organiczna praktycznie jeszcze nie istniała. Tym niemniej, jego usiłowania, aby świecącą substancję rozkładających się ryb wydzielić, i dodatkowo ją „zestalić”, jest na pewno godne odnotowania.

Współcześnie o omówionych tutaj doświadczeniach Borch, nad zjawiskiem luminescencji, a dokładniej bioluminescencji, pracowało przynajmniej dwóch przyrodników związanych z naszym krajem. Najciekawszym i wartym omówienia, jest chyba wynik Jerzego Forstera (1754–1794), który, urodzony w Prusach Królewskich, a więc obywatel polski, przez kilka lat był profesorem historii naturalnej Głównej Szkoły Litewskiej (uniwersytetu w Wilnie). Zdobył on sobie wielką sławę udziałem w drugiej podróży kapitana Cooka, którą opisał w bardzo poczytnej książce. Po powrocie z dwuletniego rejsu dookoła świata przebywał w Londynie, a potem w Kassel, gdzie był profesorem w Collegium Carolinum. Tam zaprzyjaźnił się z pochodzącym z Torunia fizjologiem i anatomem, Tomaszem Sömmeringiem (1766–1838). Razem wykonali bardzo ciekawe doświadczenie nad wpływem „powietrza zdeflostonowanego” (tj. tlenu) na świecenie „robaczek świętojańskich”. Do doświadczenia, wykonanego w czerwcu 1782 roku, użyli męskich osobników z rodzaju *Lampyrus splendidula*. Rezultaty eksperymentu ogłosił Forster w wydawanym przez siebie i Lichtenberga w Getyndze czasopiśmie naukowym [11]. Badacze stwierdzili, że w czystym tlenie świecenie owadów jest bez porównania bardziej intensywne, niż w zwykłym powietrzu atmosferycznym. Osobniki przeniesione ze zwykłego powietrza do tlenu też zaczynały znacznie intensywniej świecić. Świecenie jednego owada przebywającego w atmosferze tlenowej wystarczało, by móc przy jego świetle czytać „Göttingische gelehrten Anzeigen”. Taką zaś samą czynność umożliwiało dopiero użycie czterech owadów, pozostających w zwykłej atmosferze.

Forster przypuszczał, że świecenie umożliwia obecność jakiegoś „fosforu zwierzęcego”. Świadczyła o tym jego obserwacja, że po zmiżdżeniu owada jakiś czas świeci substancja jego tkanek, przyklejona do palców. W gruncie rzeczy doświadczenie Forstera dowodziło, że świecenie towarzyszy utlenieniu jakiejś substancji obecnej w organizmie owada, ale będąc wyznawcą teorii flogistonowej, Forster nie mógł badanego zjawiska w ten sposób zinterpretować. Ciekawym też spostrzeżeniem Forstera było stwierdzenie, że tlen nie wpływa w podobny sposób na świecenie butwiejącego drewna dębowego. O chemicznych i alchemicznych zainteresowaniach uczonego jedno z nas pisało szerzej gdzie indziej [12].

W nieco późniejszym czasie interesujące spostrzeżenie, dotyczące bioluminescencji, zrobił Karol Kortum (1749–1808). Ten bankier warszawski z zamiłowania zajmował się fizyką i chemią. Szczególnie ciekawa wydaje się jego praca nad elektrolizą – jedna z pierwszych w piśmiennictwie naukowym. O tym wielce ciekawym

uczonym – amatorze, świetną pracę napisał Ruziewicz [13]. Wśród wymienionych tam publikacji Kortuma, znajduje się doniesienie o bioluminescencji przechowywanych w ciemności korzeni kozłka lekarskiego [14]. Świecenie występowało w miejscach przecięcia korzeni. Kortum odnotował, że świecenie wymaga dostępu powietrza. „Bez dostępu powietrza – pisał – nie zachodzi żadne świecenie”. Podkreślał też, że ma ono miejsce tylko wtedy, gdy korzenie są wilgotne i stwierdzał, że towarzyszy mu zapewne „chemiczny rozkład i nowe połączenie”.

Wraz z przedstawionymi tu eksperymentami Borchy, prace Forstera i Kortuma stanowią ciekawy wkład do wczesnych badań nad chemiluminescencją,

#### PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] J. Stradins, *Michał Borch – polski przyrodnik XVIII wieku*, Kwart. Historii Nauki i Techn., 1980, **28**, 482.
- [2] A. Gaweł, *Memoriał Michała Borchy z roku 1780 – pierwsza w Polsce próba geobiochemicznych poszukiwań kruszcowych*, Prace Muzeum Ziemi, 1966, Nr 8, 311.
- [3] K. Maślankiewicz, *Michał Jan Borch and his activity in mineralogy and geochemistry*, Acta de XI Congres Int. d’Histoire des Sciences, Varsovie-Cracovie 1965, Wrocław, 1968, 284.
- [4] I.Z. Siemion, B. Latko, *Michała Jana Borchy rozprawa o truflach piemonckich*, Analecta, Przesłane do druku.
- [5] *Lettres sur la Sicile et sur L’ile de Malthe de Monsieur le Comte de Borch de plusieurs Academies a M. le C. de N.*, T.1, Turyn 1782.
- [6] Dz. cyt. wyżej, t. I, s. 45.
- [7] I.Z. Siemion, A. Szastyńska-Siemion, *Wiad. Chem.*, 2010, **64**, 155.
- [8] M. Borch, *Lettres...*, t. I, s. 46.
- [9] B. Radziszewski, *Ueber die Phosphorescenz der organischen und organisierten Körper*, *Ann.*, 1880, **203**, 305.
- [10] J. Kroh, *Chemiluminescencja roztworów ciekłych*, *Wiad. Chem.*, 1955, **9**, 580.
- [11] G. Forster, *Ein Versuch mit der dephlogosirten Luft*, *Göttingisches Magazin der Wissenschaften und Literatur*, 1782, **3**, 281.
- [12] I.Z. Siemion, *Chemiczne i alchemiczne próby Jerzego Forstera*, *Analecta*, 1995, **4**, 73.
- [13] Z. Ruziewicz, *Karol Kortum i jego zapomniane prace naukowe*, *Wiad. Chem.*, 1990, **44**, 1.
- [14] K. Kortum, *Ueber die phosphorescenz vegetabilischen, in Faulniss gehender Körper*, *Magazin fuer den neuesten Zustand d. Naturkunde*, 1800, **2**, 67.



## ANEKS

**ROZPRAWA (MEMORIAL) PANA HRABIEGO BORCHA,  
DOWÓDCY PIERWSZEGO PUŁKU KAWALERI I SZLACHTY (CHORĄGWI HUSARII)  
WIELKIEGO KSIĘSTWA LITEWSKIEGO NA TEMAT FOSFORU MORSKIEGO  
PRZEDSTAWIONĄ W AKADEMII I ODCZYTANĄ PODCZAS PUBLICZNEGO  
ZEBRANIA 30 LISTOPADA 1778 ROKU**

Od roku 1677, w którym przesławny chemik Kunkel tak zdumiewająco odkrył głośny fosfor – który wprawdzie już od kilku lat był znany sławnemu Hamburgczykowi Brandowi, ale był przez niego zazdrośnie utrzymywany w tajemnicy – w ciągu następnych kilku lat wszyscy najdzielniejsi chemicy w Europie starali się na wyścigi odkryć i upowszechnić, znaną tylko niewielu, tajemnicę, tak interesującą ze względu na cudowne zjawiska, które powodowała. Są aż zbyt dobrze znane prace sławnego Margrafa i znakomitych Boile’a, Hellota, Geoffroi Duffaya, Bechera, Sthala, i wreszcie panów Macquera i Baume’go, żeby sądzić, że należy opisywać ich działalność. Wszyscy oni mieli na względzie fosfor wymienionego Kunkela, i chociaż są pewne różnice w ich badaniach nad ołowiem rogowym (*saturnus corneus* – chlorek ołowiu), lotnym alkali, a przede wszystkim nad spirytusami pochodzącymi z resztek roślinnych i moczu ludzkiego doprowadzonego do konsystencji miodu, wszyscy oni uzyskali te same wyniki z małymi tylko różnicami. Ale, kiedy duch ludzki, podobny w tym do iskry elektrycznej, nabierze większej mocy, i większego blasku wobec tych samych przeszkód, które napotyka na swojej drodze, to za wysiłkami tych znakomitych profesorów pójdą tysiąckrotne najdonioślejsze odkrycia. W ten sposób został znaleziony kamień boloński, w ten sposób odgadnięto lub co najmniej przeczuwano istotę żywego piorunu, dzięki któremu rozbłyska tak wiele świecących owadów, spróchniałe drewno i gnijące ryby, pewne spaty oraz inne wapienne fluory. Także w ten sposób umysł wypełniony odkrytymi prawdami i zasadami nabytymi w trakcie tych prac, ustępuje wobec żywego pragnienia nowych odkryć, które dał mi przypadek, a który okazał się tak cudowny, o czym zaraz opowiem. Pod koniec roku 1776, w czasie przeprawy z Neapolu na Sycylię, zaobserwowałem mnóstwo świecących cząstek które ze wszystkich stron pokrywały powierzchnię morza. Znane mi już były badania prowadzone nad nimi od wielu lat przez licznych poważnych fizyków, przede wszystkim te prowadzone przez panów Rigault i Fougereux w 1763 i 1764 roku. W ich wyniku poznano istotę tego zjawiska u niektórych polipów czy też u skolopendr jednookich, dwuokich i innych świecących. Tak też, zadawalając się tymi wynikami, chwilowo nie zgłębiałem problemu. W kilka miesięcy później, kiedy znalazłem się w Palermo w czasie, gdy tak nasila się przepływ ławic miecznika, że nie ma znacniejszego domu, który by nie uczynił z nich – żeby tak powiedzieć – ekstrawaganckiego użytku. Zauważyłem, że kilka porzuconych bezużytecznie łbów tychże ryb, pozostających w stanie lekkiego gnicia, wydziela jasne i bardzo przyjemne dla oka światło. Ponieważ zjawisko świecenia ryb w trakcie rozkładu było

zbyt pospolite, w pierwszej chwili nie poświęciłem tej obserwacji należytej uwagi. Później jednak wróciłem do niej z większym zainteresowaniem, sądząc, że to jest właśnie okazja i najbardziej dogodna sytuacja, by poświęcić się naświetleniu tej sprawy, i ostatecznemu wyjaśnieniu tego zjawiska, tak niezwykłego, którego przyczyna aż do tej pory nie jest znana. Przystąpiłem do tych badań stosując wszystkie operacje, jakie zna sztuka chemiczna, i po wykonaniu tej, nie tak znowu małej pracy, otrzymałem wynik tak bardzo interesujący nie tylko dla ludzkości, ale i dla horyzontów naszego poznania, że nie należy trzymać go dłużej w ukryciu.

Zanim jednak odsłonię tę tajemnicę, nie wydaje mi się rzeczą niegodną zainteresowania chemika, a także człowieka wykształconego, przeprowadzenie go, krok po kroku, od moich pierwszych prac, aż do ostatniego etapu mojego odkrycia.

Już na początku, mając na uwadze wątpliwości, jakie mieli niektórzy chemicy na temat istoty tego świecenia ciał w stanie rozkładu, położyłem nacisk na rygorystyczne zbadanie samego zjawiska, i na izolację oleju fosforycznego, który ich zdaniem był w tych ciałach uwięziony. Hierne w swoim dziele „*Prodomos historiae naturalis Sveciae*”, opisując niezwykle właściwości pewnej ziemi tego kraju, z okolic Jeziora Bahus, która świeciła pod wpływem rozcierania, opowiada o wydobytym z niej oleju i podaje, że jest on ciemnożółty, pełen zanieczyszczeń i cuchnący, a także zapalny w zetknięciu z otaczającym powietrzem, i całkowicie fosforyczny.

Aż dotąd wszyscy, którzy zajmowali się tym przedmiotem, otrzymali – o ile ja wiem – podobne lub niewiele różniące się wyniki, jak te które osiągnął rzeczony chemik szwedzki.

Pouczony przez ich prace doszedłem do wniosku, że muszę pójść inną drogą, bo dopóki całkowicie nie zaniecham wygniatania fluidu fosforycznego, to zawsze nie otrzymam nic innego, jak tylko olej mętny, taki jaki uzyskało wielu wcześniej przede mną: Hjerne, Becher oraz inni sławni chemicy.

Wziąłem zatem trzydzieści łbów miecznika (Brałem tylko głowy, ponieważ zaobserwowałem, że ta część ciała jest najbogatsza w płyny oleiste, w co nikt nie będzie wątpił, ponieważ głowa jest siedzibą najcenniejszych części naszego organizmu, i – żeby tak powiedzieć – centrum nerwów, mięśni i żył itd.), zawiesiłem je na ścianie, i pod każdą umieściłem czystą miskę. W ten sposób pozwoliłem działać samej naturze i w trakcie rozkładu, jaki zachodzi pod wpływem gnicia, zebrałem w tych naczyniach, kropla po kropli, olej tłusty, mętny, ciemnożółty i bardzo mocno cuchnący. Po siedmiu dniach olej stał się jaśniejszy, ponieważ cząstki, które go otaczały, i – żeby tak powiedzieć – ukrywały jego naturalną płynność, jakkolwiek niedoskonałą, pod wpływem spokoju i siły ciężenia opadły na dno naczyń. W tym okresie, który będę przedstawiał, w drugim stadium badań nad substancją otrzymywałem zawsze olej żółty, ale jaśniejszy, mniej tłusty, i wydający zapach mniej przykry.

Kiedy sądziłem, że ten olej oczyści się sam przy staniu, i wystarczy sama ręka czasu, żeby stał się przezroczysty jak inne tego typu fluidy, to się myliłem, i po bezowocnym wielodniowym oczekiwaniu, nie zauważyłem najmniejszej nawet na moją korzyść różnicy. Przywołałem wtedy na pomoc wodę, żeby przemyć ten olej

i usunąć części obce, które mogły powodować zbytnią gęstość, ale ta próba nie dała żadnego innego skutku, jak tylko ten, iż przekonałem się, że kiedy olej fosforyczny znajduje się w stadium niedoskonałym, wydaje się zmieniać własności i przyjmować ciężar olejów pochodzących z roślin krajów tropikalnych – mógłby to być *sasofras* (wawrzynowate), drzewo cynamonowe itd. – i opada na dno naczynia, a odwrotnie, kiedy jest oczyszczony, staje się tak lekki, że najmniejsza warstwa wody utrzymuje go na powierzchni, podobnie jak oleje cedrowe, cytrynowe i temu podobne. Kiedy jednak w tej mieszaninie oleju z wodą jego istota palna nie uniosła go w całości do góry, uznałem, że trzeba go destylować, tak, jak się to czyni podczas rektyfikacji olejów esencjonalnych. Do tego celu zastosowałem zwykły alembik i użyłem bardzo łagodnej łaźni wodnej. Destylowałem tak przez piętnaście kolejnych dni, utrzymując tę samą temperaturę i otrzymałem najbardziej przezroczystą wodę, na powierzchni której unosił się biały, lekko żółtawy, olej. Oddzieliłem olej od wody za pomocą lejka, tak jak się to czyni z olejami esencjonalnymi, i umieściłem go w kilku kryształowych kolbkach dobrze wyszlifowanych i zaopatrzonych w wyszlifowane korki z tego samego materiału. I już od ponad roku, kiedy używam go w razie potrzeby, ma on zawsze tę samą jasność i przejrzystość i wydziela takie miłe światło, jakie może wydawać fosfor Kunkela lub co najmniej te, które są sprzedawane pod tą nazwą. Ponadto mogę się pochwalić, że ten fosfor, który ma wszystkie właściwości wyżej wymienionego fosforu, odznacza się taką jasnością, jakiej dotąd nie widziałem w żadnym fosforze.

Kiedy już zapewniłem sobie pewność posiadania nowego morskiego ciekłego fosforu, łatwego do uzyskania, nabrałem przekonania, że nie będzie zbyt trudno nadać mu stałą konsystencję przez skupienie w masę i otrzymać to, co wszyscy nazywają *fosforo in pietra* (fosfor skamieniały). Chociaż ten stan miał już wcześniej fosfor Kunkela, na próżno starałem się przez kilka dni to osiągnąć; wreszcie przyszło mi do głowy, że to właśnie lotność może być przyczyną trudności w tego rodzaju kondensacji. By temu przeciwdziałać, postanowiłem posłużyć się metodą stosowaną przez chemików i fosforowi, który już osiągnął konsystencję łoju, nadać formę laseczki, właściwszą do tego celu. Przez mały szklany lejek napełniłem moim płynnym fosforem, zmieszany z czerwoną gliną (*bolus*), kilka szklanych rurek o różnej średnicy. Rurki te zawiesiłem pionowo nad łagodnym ogniem, który stopniowo wzmacniałem. Praca ta przyniosła mi wielki, pożądaný sukces, ponieważ zobaczyłem, jak stopniowo najtłustsze części fosforu spływają na dno rurki i łączą się ze sobą, pomimo wrzenia, które powodowało rozpryskiwanie się mieszaniny. Zadowolony z efektu, z wielką ostrożnością usunąłem rurki z sąsiedztwa ognia, i zostawiłem, aż do ochłodzenia. Kiedy zauważyłem, że można je wziąć już do gołej ręki, zająłem się obserwacją wyników. Zauważyłem, że w głębi rurek fosfor był najsilniej skondensowany na wysokość dwóch cali i czterech linii francuskich. Powyżej znajdował się olej bardzo gęsty, ale jednak ciekły, aż do wysokości pięciu cali lub nawet ponad. Najwyższa warstwa pozostała w stanie niezmienionym płynnego fosforu, tak jak kiedy nalewałem ją do rurek. Wyjąłem korki i odwracając rurki wylałem po kolei

oleje, które pozostały przejrzyste, odpowiednio do ich gęstości, ale nie udawało mi się wyjąć fosforu skondensowanego, bo trzymały go ścianki rurki. Wreszcie musiałem zgnieść naczynie i w ten sposób otrzymałem łaskę skondensowanego fosforu, o rozmiarach dwóch cali i czterech linii, jak to zauważyłem już powyżej. Poddałem go wszystkim wymaganym próbom i stwierdziłem, że nie jest gorszy od fosforów Kunkela, Margrafa i innych.

Jest zatem rzeczą słuszną i oczywistą, że to moje doniesienie nie wydawałoby się mi wystarczające, gdybym do metody otrzymywania tego fosforu nie dodał kilku spostrzeżeń na temat jego natury. Żyjemy w wieku pozbawionym przesądów albo co najmniej trudniejszym dla tych wszystkich, którzy by chcieli wszystko w naturze uporządkować, jednocześnie na podstawie obserwacji przyrody musimy podzielić przekonanie, że panuje w niej jedność praw, które dają i ruch ogromnej liczbie obiektów i które ją upiększają. Jeśli zatem, wychodząc od tej generalnej zasady, przyjmiemy tę uniwersalną jedność, to po co szukać we wszystkich zjawiskach przyrody jakiejś innej zasady, po co przyznawać tym kwasom i tym ziemiom *sui generis* najmniejsze różnice, które widzimy w ich wytworach?

Spróchniałe drewno, ryby w stanie gnicia stają się świecące, i nikt nie wątpi, że jest to wynik działania maleńkich, świecących stworzonek, które się tam zagnieździły.

Morze o zachodzie słońca wygląda jak pokryte świecącymi punktami, które sprawiają wrażenie różnorodnego iskrzenia na powierzchni. Poglądy na to zjawisko są różne, ponieważ jedni uważają, że jest to efekt obecności świecących skolopendr, a drudzy przypisują je wyłącznie zwykłej emanacji światła bitumu morskiego, który zapala się i świeci, kiedy się połączy z flogistonem albo rozsiewa się w otaczającym powietrzu atmosfery, albo pochodzi z, odkładanych w głębi morza części rozkładanych zwierząt morskich.

Kamień boloński po swojej kalcynacji (w wyniku ogrzania) wydziela żywy blask, rtęć w rurce (wstrząsana) świeci, fosfor Kunkela, Margrafa, Newtona i innych, czy to płynny czy też stały, rozsiewa żywe i miłe oku światło. Wszystkie te zjawiska, ze względu na pewne ich podobieństwo zostały nazwane fosforycznymi, chociaż każdy stara się znaleźć dla nich wspólną przyczynę, ale większość przyjmuje różną ich podstawę.

Nie takie są prawa rządzące przyrodą, jeśli się już uzna za pewne, że fluid elektryczny, magnetyzm, grawitacja i flogiston, są niczym innym jak siłami sprawczymi początku, choć różnie zmodyfikowanymi, to różnic należy szukać w obrębie tego podziału.

Żeby jednak nie przedłużać niepotrzebnie tego dyskursu, zanim nastąpi podsumowanie, oto wstępna analiza wszystkich tych różnic.

Spróchniałe drzewo i ryby w stanie gnicia świecą z powodu obecności w nich świecących żyjątek, jak to zauważono już przed wieloma laty. Nie miałyby one takiej własności, gdyby nad ich ciałami, grzbietami, a zwłaszcza skrzydłami nie został rozproszony humor fosforyczny, podobny do tego, który zwykle pojawia się na ciele ludzkim, kiedy w wyniku bardzo gwałtownej wysokiej gorączki, ktoś szybko wyjdzie

na powietrze. Zdarza się to powszechnie kiedy się zmienia koszulę, spodnie, albo jeszcze, kiedy się gładzi ręką koci grzbiet pod włos, lub kawałek tkaniny. W pierwszej chwili wszystkie te zjawiska wydają się mieć przyczyny różne, ale po zastanowieniu, łączą się w jedność i wszystkie wpadają w łono tej samego źródła.

Tu przypominam sobie anegdotę przytoczoną w *Academia Curiosorum Naturae*, zwaną przez poważnego chemika Henckela w dysertacji na temat potu fosforycznego – przy końcu jego *Flora Saturnisans*. Oto jego słowa w moim tłumaczeniu:

„Pewien mój przyjaciel, dziś już nieżyjący, o temperamencie sangwinicznym, człowiek nauki, który używał w potrawach bardzo dużo soli, co stało się przyczyną ataku podagry, pewnego dnia tańczył tak zawzięcie, że poczuł się bardzo słabo, i myślał, że umiera z racji gwałtowne wzburzenia humorów i obfitego potu, który one spowodowały. Obecni, którzy go oglądali w ciemności, zauważyli, że cała jego koszula świeciła, i – żeby tak powiedzieć – wydawała się cała płonąć. Kiedy odzyskał on przytomność, był mocno zaskoczony i zaczął domagać się od przyjaciół, żeby wszyscy potwierdzili prawdziwość tego wydarzenia, bo byli mniej od niego przestraszeni. Zażądano świecy, i – jak to łatwo każdy może sobie wyobrazić – silniejsze światło zgasiło słabsze, tylko na koszuli odsłoniły się czerwone plamki, takie, jakie się widzi na języku chłopców, kiedy gorączkują. Jednocześnie dał się odczuć zapach, który jeden z obecnych lekarzy określił jako urynowy. Ten zapach był nie tyle zapachem lotnego alkali, co raczej silnego kwasu solnego, ostrego, podobnego do tych które wydziela marynowana w occie kapusta, kiedy się zaczyna psuć i następuje fermentacja. Kiedy usunięto ponownie świecę, koszula znowu zaczęła świecić, ale już słabiej. Nie wiadomo, jak długo to trwało, ponieważ wszyscy stamtąd wyszli”.

Po opowiedzeniu tej historii, ten chemik tak objaśnił przyczynę tego zjawiska. Humory podagryków – mówi on – cierpią często od nadmiaru kwasu solnego, wina, octu, piwa, wódki, mleka i innych, które powodują wydzielenie w naszym żołądku ogromnego nadmiaru kwaśnych humorów, o zapachu zbliżonym do tego, który wydziela kiszona przez Niemców kapusta. Ten zapach nie pochodzi wprost tylko z tych pokarmów, ale także jeszcze z soli morskiej, której używamy do naszych potraw. Soli zawdzięcza się istnienie lotnego alkali, a teraz możemy też ją uznać za źródło fosforu. Nie można wątpić, że stąd się biorą humory gęste, słone, ziemiste i bardziej stężone, i że to one produkują fosforyzujący, bądź temu podobny, pot.

Piękna i głęboka jest dysertacja panów Rigault i Fougeroux i nie można w najmniejszym stopniu przeczyć ich próbom dowodzącym, że przyczyną żywego światła iskier, które rozbłyskują na powierzchni morza, nie są owady, lub – żeby użyć ich słów – liczne świecące skolopendry, jednookie czy dwuokie, które niekiedy są identyczne z tymi, które się zagnieżdżają w próchni i martwych rybach zagrożonych rozkładem, i chociaż one w trakcie rozkładu przybierają różną postać, to przecież ich własności nie zmieniają się. Nie mogłyby one jednak mieć tych właściwości świecenia, gdyby same nie były wypełnione lotną alkaliczną solą morską, która wytwarza w nich ten pot fosforyczny, jedyną przyczynę ich świecenia.

Królestwo minerałów jest nie mniej bogate w produkty fosforyczne: kamień boloński, oczyszczona rteć, wreszcie same fosfory, które produkują takie cudowne zjawiska, nie przyciągałyby naszej ciekawości, gdyby nie zawierały, mniej lub więcej, tych samych pryncypiów lotnej morskiej soli alkalicznej, która, jak się uważa w chwili obecnej, jest bazą fosforu.

My sami, jeśli spostrzeżemy podobne zjawisko na naszej odzieży, nie budujemy beżużytecznych konstrukcji, dla wyjaśnienia tych emanacji, bo sprawia je obfitość tegoż właśnie principium, które objawia się w nas, zauważalnie, w mniejszym lub większym stopniu, w zależności od większego lub mniejszego nadmiaru lotnej morskiej soli alkalicznej, którą spożyte przez nas pokarmy wydzieliły, sprawiając wzburzenie w naszym żołądku.

Ferment, menstruum, czy też kwas żołądkowy, który ma trawić przyjęte przez nas pokarmy nie są jeszcze dziś traktowane poważnie, jest jednak rzeczą pewną, że ten kwas tworzy tysiące soli obojętnych, łącząc się z ciałami różnej natury, które składają się na nasz pokarm i on musi być silniejszy od wszystkich innych, pozostając z nimi we właściwej proporcji, ponieważ on nasycza i podporządkowuje sobie wszystko, co podlega strawieniu.

Dołączmy do tego naszą drobną obserwację na temat sposobu w jaki pojawiają się owe iskry fosforyczne.

Kiedy krzesanie krzemienia albo skałki zapalającej powoduje zapalenie paproci, to nie prawda, że iskry wyskakują z krzemienia albo skałki. Ani jedno ani drugie nie zawiera w sobie jakichś cząsteczek palnych, które się właśnie pojawiły. To twar- dość dwóch ciał, które zbliżone do siebie, stawiają niemal równy opór gwałtownym wstrząsom, zagęszczając powietrze między nimi, a ten opór, wzajemnie wywierany, łączy cząsteczki saletrzane i zapalne rozproszone w powietrzu, i zapala je dzięki ciepłu, które wytwarza pocieranie gwałtownie uderzanych o siebie dwóch ciał.

To samo zachodzi w zjawiskach fosforycznych, ale z mniejszą siłą, ponieważ w naturze efekt jest zawsze proporcjonalny do przyczyny. Gwałtowne wzburzenie, wytworzone w naszym żołądku poprzez wzajemne działania kwasu żołądkowego z przyrodą mu przeciwstawną, przejawia się w całej objętości krwi, w rdzeniu i we wszystkich wydzielinach, a kiedy to ciepło trafi na świeże powietrze, to nie tyle atakuje cząstki zapalne, co natychmiast powstaje równowaga, i aż do chwili, kiedy osiągnie stan doskonały, widać, jak ze wszystkich części ciała wychodzą iskiere podobne do elektrycznych. A więc, przebiega to tak, w jak kuleczkach fosforycznych, kiedy powietrze atmosferyczne zostaje zużyte – jak się to mówi – światło ginie i zjawisko zanika. Ta tematyka jest tak bogata, że można by przytoczyć tysiące argumentów dla poparcia tego systemu. Przedstawię to w innej rozprawie, która będzie poświęcona wyłącznie tej tematyce. To, co powiedziałem tutaj, wystarczy dla znawców. Spodziewam się zatem, że jeśli w rozumowaniu moim błędę, znakomita Akademia, której to przedstawiam, wybaczy moją słabość ze względu na moje nowe odkrycie, a zwłaszcza na moje żywe w nie zaangażowanie.

## NOWE WYDAWNICTWA



Bogdan Burczyk, *Biomasa surowiec do syntez chemicznych i produkcji* Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 2011, Wyd. 1, str. 255, oprawa miękka, cena około 35 zł.

Biomasa roślinna i zwierzęca była dla człowieka jedynym źródłem pożywienia, odzienia i energii cieplnej do połowy XVIII w., tj. do ery paliw kopalnych, ropy naftowej i gazu ziemnego. Kryzys energetyczny z początkiem lat 70. ubiegłego wieku uświadomił nam, że surowce kopalne w tym gaz ziemny i ropa naftowa ulegną w niedalekiej przyszłości wyczerpaniu i należy zwrócić większą uwagę na surowce odnawialne. Znalazło to odzwierciedlenie w paradygmacie zrównoważonego rozwoju cywilizacji w tzw. Raporcie Brundtland – zgodnie, z którym „ludzkość jest podmiotem zrównoważonego rozwoju, który powinien jej zapewnić zdrowe i twórcze życie w harmonii z naturą”.

Kierując się w dużej mierze zasadami zielonej chemii, podjęto intensywne, wielokierunkowe badania nad możliwością otrzymywania z różnych rodzajów biomasy poszukiwanych na rynku związków chemicznych, w tym biopaliw otrzymywanych dotychczas z ropy naftowej. Rosła liczba publikacji poświęconych tematyce biomasy jako surowca do syntez chemicznych i produkcji paliw. Skłoniło to znanych wydawców czasopism chemicznych do powołania nowych tytułów: *Green Chemistry*, *Biofuels*, *Bioproducts*, *Biorefining*, *Chem. Sus. Chem.*, *Energy*, *Environmental Science*, *Biomass Conversion and Biorefinery*.

Wielokierunkowe badania otwierały ogromne możliwości opracowania nowych innowacyjnych procesów przetwarzania biomasy. Surowce odnawialne zastępują powoli surowce petrochemiczne w produkcji tworzyw sztucznych i paliw płynnych. Tempo zastępowania surowców petrochemicznych uzależnione jest mocno od poziomu rozwoju metod biotechnologicznych. Dobrze się stało, że do rąk polskiego czytelnika trafiła bardzo dobra książka prof. Bogdana Burczyka, który jest od dawna gorliwym i wytrwałym propagatorem zielonej chemii i zarazem innowacyjnego przetwórstwa biomasy. Jestem głęboko przekonany, że ta świetnie napisana książka dostarczy czytelnikowi obszerny materiał dotyczący biomasy i innowacyjnych procesów jej przetwórstwa. Recenzowana książka składa się z ośmiu rozdziałów, w których przedstawiono najnowszą literaturę dotyczącą przetwórstwa różnych rodzajów biomasy z możliwościami otrzymywania z niej prekursorów do syntez chemikaliów i paliw.

Scharakteryzowano polimery naturalne jako zamienniki trudno biodegradowalnych polimerów syntetycznych oraz opisano ich nowe reakcje i zastosowania. W monografii uwypuklono rosnącą rolę cukrów i otrzymywanych z nich surowców służących do syntez związków otrzymywanych dotychczas z surowców petrochemicznych.

Szeroko opisano nowe reakcje triacylogliceroli (oleje roślinne, tłuszcze zwierzęce) ze szczególnym podkreśleniem ważnych z praktycznego punktu widzenia reakcji grupy karboksylowej.

---

Znaczną uwagę poświęcono estrom kwasów tłuszczowych (transestryfikacje tłuszczów małowcząsteczkowymi alkoholami, gliceroliza tłuszczów, estry cukrowe kwasów tłuszczowych).

Wiele miejsca poświęcono utylizacji gliceryny – nowego „surowca odnawialnego” będącego produktem ubocznych syntezy biodiesla estrowego.

W jednym z rozdziałów czytelnik zapozna się z głębokimi przemianami niektórych związków monoterpenowych, które są ważnymi środkami zapachowymi i smakowymi. Autor podkreśla, że dokonano tego wielkiego postępu dzięki rozwojowi katalizy homogenicznej i heterogenicznej, które umożliwiły uzyskiwanie dużych stopni konwersji i selektywności. Dużo miejsca Autor poświęcił glonom. Glony uważane są za odnawialny biologiczny magazyn energii słonecznej. Opisano ich charakterystykę, produkty i związki chemiczne, które można otrzymać z glonów (białka, węglowodany, lipidy, węglowodory, pigmenty, związki biologicznie czynne, żywność, paszę, dodatki do pasz, nawozy oraz paliwa: metan, wodór, etanol, biodiesel). Autor przedstawił też warunki hodowli glonów.

Z założenia książki, najobszerniejszy rozdział dotyczy biopaliw, dla których biomasa jest głównym surowcem odnawialnym mającym zastąpić kopalne surowce energetyczne. Największe perspektywy wdrożenia do praktyki mają biorafinerie ligninocelulozowe. Ich rozwojowi sprzyja dostępność surowca odnawialnego różnego pochodzenia, jego niska cena oraz rozstrzygnięcie wątpliwości i zastrzeżeń dotyczących zastosowania zbóż i tłuszczów jako surowców przemysłowych przy braku żywności w świecie.

Coraz większe zastosowanie znajdują biopaliwa ciekłe i gazowe otrzymane z biomasy ligninocelulozowej, glonów i wodorostów. Każdy z rozdziałów książki, dotyczący wybranego problemu zaopatrzonej jest w przypisany mu wykaz literatury, co ułatwia czytelnikowi dotarcie do materiału źródłowego.

Książka wydana została bardzo starannie i z przyjemnością bierze się ją do ręki. Tematyka dotycząca przyszłościowych odnawialnych surowców chemicznych jest przedmiotem szerokiego zainteresowania wśród chemików wszystkich specjalności, a w szczególności inżynierów przemysłu chemicznego i studentów kierunków chemicznych w tym studiów doktoranckich.

Mam nadzieję, że książka trafi do szerokiego kręgu odbiorców, a zwłaszcza pedagogów, a także młodzieży szkół średnich oraz biznesmenów i liderów przemysłu. Wierzę, że pobudzi ona czytelnika do dłuższego, aktywnego poznawania problemów dotyczących biomasy, ważnego odnawialnego surowca dla chemii w przyszłość.

*Tadeusz Paryjczak*



## INFORMACJE

### INFORMACJE REDAKCJI „WIADOMOŚCI CHEMICZNYCH”

#### CENY PRENUMERATY NA ROK 2013

Redakcja miesięcznika PTCh „Wiadomości Chemiczne” zawiadamia, że wysokość prenumeraty rocznej „Wiadomości Chemicznych” za 2013 r. będzie wynosiła **200 zł** dla instytucji i niezrzeszonych prenumeratorów indywidualnych. Dla członków PTChem **20 zł**. Należność za prenumeratę prosimy przekazywać na konto:

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

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

- prenumerata „Wiadomości Chemicznych” na rok 2013 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

---

### **Wyróżnione prace doktorskie lub habilitacyjne**

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

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

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

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



Instytut Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych  
im. Włodzimierza Trzebiatowskiego  
Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu  
zaprasza na

# STUDIA DOKTORANCKIE

FIZYKA I CHEMIA CIAŁA STAŁEGO

Nowa specjalność "Nanotechnologia w procesach przemysłowych"  
finansowana z programu PO KL z wysokimi stypendiami

Stypendium im. W. Trzebiatowskiego  
dla najlepszych doktorantów

Program praktyk i staży dla studentów wszystkich lat studiów

Termin naboru: **czerwiec 2013 r.**

Pełna informacja: [www.intibs.pl](http://www.intibs.pl)





# Politechnika Wrocławska

---

## Studia Doktoranckie na Wydziale Chemicznym

Wydział Chemiczny Politechniki Wrocławskiej ogłasza nabór na czteroletnie stacjonarne **STUDIA DOKTORANCKIE** w roku akademickim 2013/2014, w następujących dyscyplinach:

- **BIOTECHNOLOGIA**
- **CHEMIA**
- **INŻYNIERIA CHEMICZNA**
- **TECHNOLOGIA CHEMICZNA**

Warunkami przyjęcia na studia są ukończone studia wyższe II stopnia i pozytywny wynik postępowania kwalifikacyjnego.

Zgłoszenia wraz z wymaganymi dokumentami należy składać w Dziale Nauczania Politechniki Wrocławskiej (Wybrzeże Wyspiańskiego 27, budynek A-1, pokój 153) w dniach od 7 do 28 maja bieżącego roku.

Przewidywany termin rozmów kwalifikacyjnych: 20–21 czerwca 2013.

Kandydaci zakwalifikowani na studia, którzy uzyskają wysoką lokatę w postępowaniu rekrutacyjnym, mogą otrzymać stypendium doktoranckie. Ponadto, zgodnie z Regulaminem Studiów Doktoranckich, doktoranci mogą ubiegać się o stypendia socjalne i naukowe.

Dodatkowe informacje, w tym o potencjalnych promotorach, można uzyskać na stronach internetowych Studium Doktoranckiego Politechniki Wrocławskiej (<http://www.doktoranci.pwr.wroc.pl>) i Wydziału Chemicznego (<http://www.ch.pwr.wroc.pl>).

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 indywiduali chemicznych. Zalecenia 1993*, red. T. Sokołowska i A. Wiśniewski, cena 15 zł

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

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

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

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

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

*Od substancji prostych do życia. Świat RNA – początki życia na Ziemi*, Zdzisław Chilmonczyk – NAKŁAD WYCZERpany.

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

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

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

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

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

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



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

### 1. Informacje ogólne

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

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

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

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

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

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

- Prace nie były wcześniej publikowane, ani nie są złożone w redakcji innego czasopisma.
- Autorzy prac stosują się do wymagań praw autorskich tzn. w przypadku zamieszczania rysunków, tabel itp., pochodzących z opracowań opublikowanych w innych czasopismach lub publikacjach zwartych, posiadają pisemną zgodę na ich przedruk.
- Opublikowana raz praca bez zgody Redakcji, nie może być wydawana gdzie indziej.
- Autorzy przysyłający prace po raz pierwszy powinni podać swój numer telefonu oraz adresy poczty tradycyjnej i elektronicznej. Jest to niezbędny warunek sprawnego przebiegu opracowania redakcyjnego tekstu.
- Autorzy zobowiązani są do wykonania korekty tekstu. W pracach przyjętych do druku Redakcja ma prawo dokonywania niezbędnej korekty.
- Jeżeli autorzy nie zastrzegą inaczej w momencie zgłoszenia pracy, wydawca nabywa ogólnych praw autorskich do wydrukowanych prac (w tym prawo wydawania na nośnikach elektronicznych oraz w Internecie). Tytułem powyższego wykorzystania utworów autorom nie są wypłacane honoraria.
- Wszystkie nadsyłane prace są poddawane wstępnej ocenie, która określa czy odpowiadają randze i profilowi „Wiadomości Chemicznych” oraz czy zostały przygotowane zgodnie z formalnymi wymogami MNiSW oraz Redakcji.
- Po uzyskaniu pozytywnej wstępnej oceny wszystkie prace są recenzowane przez co najmniej dwóch niezależnych recenzentów, zgodnie ze wskazówkami zawartymi w broszurze informacyjnej Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, [http://www.nauka.gov.pl/fileadmin/user\\_upload/ministerstwo/Publikacje/201110216\\_MNISW\\_broszura\\_210x210.pdf](http://www.nauka.gov.pl/fileadmin/user_upload/ministerstwo/Publikacje/201110216_MNISW_broszura_210x210.pdf).
- O przyjęciu pracy do druku decyduje Komitet Redakcyjny.
- Prace, które Komitet Redakcyjny na podstawie uzyskanych recenzji stwierdził, że nie należy przyjąć do druku w czasopiśmie, po uwzględnieniu sugestii recenzentów mogą być powtórnie przesłane do czaso-

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

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

### 3. Koszty

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

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

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

### 4. Informacje szczegółowe dotyczące przygotowania maszynopisu do druku

#### 4.1. Wymagania merytoryczne

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

#### 4.2. Wymagania techniczne składu tekstu

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



Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Tytuł rozdziału

1.1. Tytuł podrozdziału itp.

Uwagi końcowe

Podziękowanie

Piśmiennictwo cytowane

• **Kolejne strony pracy powinny zawierać:**

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

• **Tabele, rysunki, fotografie**

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

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

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

• **Piśmiennictwo cytowane**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

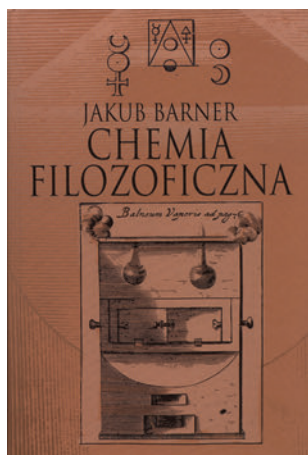
Autor wskazany w liście przewodnim jako osoba kontaktowa otrzymuje drogą elektroniczną plik opublikowanej pracy w formacie pdf.

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

*Redakcja „Wiadomości Chemicznych”*



## Zachęcamy do lektury znakomitej książki „Chemia filozoficzna” Jakuba Barnera



Najnowszym osiągnięciem Gabinetu Historii Chemii, Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego jest książka Jakuba Barnera „Chemia filozoficzna”. Publikacja została wydana przez Instytut Historii Nauki PAN im. L. i A. Birkenmajerów PAN w Warszawie w ramach serii „Fontes Rerum ad Historiam Scientiae Spectantium”.

Ten doskonały przekład jest efektem wspólnej pracy prof. Kazimierza Ignacego Orzechowskiego, historyka prawa i jego syna prof. Kazimierza Władysława Orzechowskiego, fizykochemika. W pracach nad przygotowaniem książki do druku uczestniczyli też prof. Alicja Szastyńska-Siemion, filolog klasyczny i prof. Ignacy Z. Siemion, który opatrzył książkę obszernym wstępem zawierającym koleje życia i prac Jakuba Barnera.

Oryginał łaciński został zamieszczony w Internecie, natomiast nigdy to XVII-wieczne dzieło, nie miało polskiego tłumaczenia.

Jakub Barner, urodzony w polskim wtedy Elblągu, należał do elity europejskich chemików XVII wieku, studiował medycynę w Lipsku, odbył szereg wędrowek naukowych po Europie, celem odwiedzania znanych pracowni alchemików, poznawania ich tajemnic, sposobów leczenia ludzi, przygotowywania lekarstw, preparowania rozmaitych eliksirów. Był nadwornym lekarzem króla Michała Korybuta Wiśniowieckiego, potem Jana III Sobieskiego.

Przypuszczać można, że bohaterowie trylogii Henryka Sienkiewicza widywali Jakuba Barnera wśród królewskich dworzan.

Książka, cytując Panią prof. dr hab. Halinę Lichocką jest „znakomitą lekturą i źródłem autentycznych informacji, dotyczących historii kultury, nauki i medycyny. Obecnie dzieło to jest białym krukiem”.

W wydaniu dzieła partycypowały: Instytut Historii Nauki PAN, Towarzystwo Naukowe Warszawskie, Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz Kasa im. Józefa Mianowskiego – Fundacja Popierania Nauki.

*K. Lukjan*

## SPIS TREŚCI

Anna NOWICKA, Wanda Paulina NAWROCKA: Syntezy wybranych, nowych pochodnych 2-amino-1 <i>H</i> -benzimidazolu i ich mechanizmy działania biologicznego . . . . .	203
Hanna LISZKIEWICZ, Anna NOWICKA, Wanda Paulina NAWROCKA: 2,2'- Syntezy, struktury i aktywność biologiczna pochodnych imidazo[4,5- <i>b</i> ]pirydyny. Część II . . . . .	227
Anna WÓJCICKA: Synteza i aktywność biologiczna pochodnych pirolo[3,4- <i>c</i> ]pirydyny . . . . .	251
Anna STACHIEWICZ, Andrzej MOŁSKI: Nanopory: budowa, właściwości, modele, zastosowania . . . . .	277
Michalina ADASZYŃSKA, Maria SWARCEWICZ: Wybrane wtórne metabolity roślinne jako środki przeciwdrobnoustrojowe . . . . .	303
Magdalena MALINOWSKA, Elżbieta SIKORA, Jan OGOŃSKI: Transport przeznaskórkowy aktywnych składników kosmetycznych . . . . .	321
Grzegorz KUROWSKI, Otmar VOGT, Jan OGOŃSKI: Substancje aktywne preparatów do usuwania powłok lakierniczych . . . . .	345
Ignacy Z. SIEMION, Alicja SZASTYŃSKA-SIEMION: O eksperymentach Michała Jana Borchy (1753–1811) dotyczących chemiluminescencji . . . . .	361
<b>Nowe wydawnictwa</b> . . . . .	375
<b>Informacje</b> . . . . .	377

## W NASTĘPNYCH ZESZYTACH UKAŻĄ SIĘ:

Piotr WOSZCZYŃSKI: Metody badań niejednorodności energetycznej powierzchni katalizatorów i adsorbentów  
Anna NOWICKA, Wanda Paulina NAWROCKA: Syntezy wybranych leków pochodnych 2-amino-1*H*-benzimidazolu  
Anna NOWICKA, Wanda Paulina NAWROCKA: Wybrane Metody syntezy 2-amino-1*H*-benzimidazolu

## ZESZYT POŚWIĘCONY PROFESOROWI JACKOWI GAWROŃSKIEMU

Małgorzata PETRYK, Marcin KWIT: *Trans*-1,2-diaminocykloheksan – kariera outsidera  
Karol KACPRZAK, Paweł CZARNECKI: Alkaloidy kory chinowej – małe cząsteczki, które wiele mogą  
Jakub GRAJEWSKI: Kwas winowy i jego pochodne we współczesnej chemii organicznej  
Jadwiga GAJEWY: Katalizowane cynkiem asymetryczne hydrosylilowanie ketonów i imin  
Paweł SKOWRONEK: Piękne cząsteczki  
Natalia PRUSINOWSKA: Reakcje asymetrycznego otwierania pierścienia azyrydyn