



Jacek Rutkowski

**Badania spektroskopowe, strukturalne i aktywność
przeciwdrobnoustrojowa nowych soli kwasu lasalowego
z aminami**

Praca przedstawiona Radzie Wydziału Chemii
Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
w celu uzyskania stopnia naukowego
doktora nauk chemicznych

Promotor: Prof. dr hab. Bogumił Brzezinski

Promotor pomocniczy: Dr Adam Huczyński

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Wydział Chemii, Zakład Biochemii

Poznań 2013

PODZIĘKOWANIA

Panu Profesorowi Bogumiłowi Brzezinskiemu składam serdeczne podziękowania za życzliwość i wszelką pomoc jaką otrzymałem przez cztery lata pracy nad doktoratem. Dziękuję za wszystkie naukowe dyskusje i wiedzę jaką mi przekazał, a także za swobodę prowadzenia badań oraz zaufanie jakim mnie obdarzał.

Promotorowi pomocniczemu, doktorowi Adamowi Huczyńskiemu, dziękuję za wiele cennych wskazówek naukowych, pomoc, współpracę i mobilizowanie mnie do pracy, oraz za wiele dyskusji na tematy naukowe i nie tylko.

Słowa ogromnej wdzięczności kieruję do moich rodziców, dzięki którym mogłem zrealizować to marzenie. Dziękuję im za wyrozumiałość i życzliwość, za trud i poświęcenie jakie włożyli w moje wychowanie.

Pragnę również podziękować wszystkim, z którymi miałem okazję naukowo współpracować podczas realizacji tego doktoratu: dr Piotrowi Przybylskiemu, dr Franzowi Bartłowi, dr Małgorzacie Ratajczak-Sitarz, Prof. Andrzejowi Katrusiakowi, dr Joannie Stefańskiej, prof. Joannie Wietrzyk, dr Krystianowi Pycie i mgr Halinie Thiel-Pawlickiej. Współpraca z tymi osobami była dla mnie inspirująca i pozwoliła mi nauczyć się wielu nowych rzeczy.

Dziękuję przyjaciołom i bliskim, którzy dzielnie wspierali mnie przez te cztery lata wyczerpanej, ale bardzo przyjemnej pracy.

Spis treści

1. Cel pracy	1
2. Część teoretyczna	3
2.1 Jonofory	4
2.2 Klasyfikacja jonoforów	5
2.3 Jonofory syntetyczne	6
2.4 Cykliczne jonofory neutralne	8
2.5 Jonofory tworzące kanał	9
2.6 Niecykliczne jonofory karboksylowe	11
2.7 Charakterystyka obiektu badań – kwas lasalowy	23
2.7.1 Struktura i homologi kwasu lasalowego	25
2.7.2 Biosynteza kwasu lasalowego	25
2.7.3 Synteza totalna kwasu lasalowego	27
2.7.4 Struktura kompleksów kwasu lasalowego	31
2.7.5 Pochodne kwasu lasalowego	38
3. Badania własne	40
3.1 Stechiometria kompleksów kwasu lasalowego z aminami	41
3.2 Badania krystalograficzne kompleksów kwasu lasalowego z aminami	44
3.3 Badania NMR kompleksów kwasu lasalowego z aminami	51
3.4 Badania FT-IR kompleksów kwasu lasalowego z aminami	62
3.5 Określenie konkurencji w kompleksowaniu amin i kationów	73
3.5.1 Badania ESI MS	73
3.5.2 Badania NMR	74
3.5.3 Badania TF-IR	75
3.6 Aktywność przeciwdrobnoustrojowa kwasu lasalowego i jego kompleksów	77
3.7 Aktywność cytotoksyczna kwasu lasalowego i jego kompleksów	82
4. Część eksperymentalna	85
4.1 Odczynniki i rozpuszczalniki	86
4.1.1 Izolacja soli sodowej kwasu lasalowego z preparatu avatec	86
4.1.2 Pozyskiwanie kwasu lasalowego z jego soli	86
4.1.3 Rozpuszczalniki	87
4.1.4 Preparatyka kompleksów kwasu lasalowego	87
4.2. Stosowane metody badawcze	87
4.2.1 Dyfrakcja promieni Rentgenowskich	87
4.2.2 Spektroskopia FT-IR	90
4.2.3 Spektroskopia NMR	91
4.2.4 Spektrometria mas	91
4.2.5 Analiza elementarna	91

4.2.6 Temperatura topnienia	92
4.2.7 Wyznaczanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej	92
4.2.8 Wyznaczanie aktywności cytotoksycznej	94
5. Podsumowanie i wnioski	95
6. Literatura	100

1. Cel pracy

Kwas lasalowy jest związkiem chemicznym pochodzenia naturalnego, który został po raz pierwszy wyizolowany w 1951 roku z kultury promieniowców *Streptomyces lasaliensis*. Jest on antybiotykiem jonoforowym i wykazuje wiele istotnych właściwości biologicznych, takich jak aktywność przeciwbakteryjną, przeciwgrzybiczą, przeciwwirusową oraz kokcydiostatyczną. Szerokie spektrum wyżej wymienionych właściwości sprawia, że kwas lasalowy znalazł powszechne zastosowanie w weterynarii. Stosowany jest w zwalczaniu kokcydiozy u ptactwa hodowlanego, a także jako niehormonalny stymulator wzrostu, dzięki czemu zwiększa się efektywność wykorzystania pokarmu w hodowli bydła. Kwas lasalowy jest jednym z zaledwie kilku antybiotyków jonoforowych dopuszczonych do komercyjnego stosowania w krajach Unii Europejskiej, w Stanach Zjednoczonych Ameryki oraz w Kanadzie. Sól sodowa kwasu lasalowego jest handlowo dostępna w postaci preparatu Avatec i jest jednym z najpowszechniej stosowanych antybiotyków jonoforowych.

W skład cząsteczki kwasu lasalowego wchodzi między innymi: fragment pochodnej kwasu salicylowego, pierścień tetrahydrofuranowy, pierścień tetrahydropirany, dwie grupy hydroksylowe oraz grupa karbonylowa. Dzięki obecności wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych wytworzonych pomiędzy grupą karboksylową na jednym końcu i grupami hydroksylowymi na drugim końcu cząsteczki, kwas lasalowy tworzy pseudocykliczną strukturę, wewnątrz której znajduje się hydrofilowa wnęka, zdolna do kompleksowania kationu. Jednocześnie grupy alkilowe skierowane są na zewnątrz, co powoduje że cała cząsteczka ma charakter hydrofobowy, w związku z czym kwas lasalowy i jego kompleksy mogą przechodzić przez błony komórkowe. Po przejściu do wnętrza komórki kwas lasalowy wymienia transportowany kation metalu na proton, co prowadzi do zmiany pH oraz do wzrostu ciśnienia osmotycznego, a co za tym idzie do śmierci komórki.

Modyfikacje chemiczne kwasu lasalowego są przedmiotem zainteresowania w szeregu ośrodków naukowych. Wśród otrzymanych dotychczas pochodnych kwasu lasalowego największą grupę stanowią estry, syntezowane w grupie badawczej profesora B. Brzezinskiego. Brak było natomiast w literaturze doniesień dotyczących soli kwasu lasalowego z aminami, ich struktury i właściwości biologicznych.

Cel pracy

Aminy to związki organiczne szeroko występujące w przyrodzie. Grupa aminowa jest obecna w aminokwasach i niektórych witaminach. Ponadto wiele leków zawiera w swojej strukturze grupę aminową, a aminy biogenne (serotonina, histamina) oraz katecholaminy (adrenalina, noradrenalina, dopamina) pełnią rolę neuroprzekaźników w centralnym układzie nerwowym. W związku z tym otrzymanie nowych kompleksów kwasu lasalowego z aminami i badania struktury otrzymanych związków uznałem za szczególnie ciekawy temat badań, który uzupełniłby stan wiedzy na temat właściwości takich związków w układach biologicznych.

W ramach niniejszej pracy doktorskiej postanowiłem otrzymać serię kompleksów kwasu lasalowego z aminami i określić ich strukturę. W tym celu wybrałem różne aminy, zarówno alifatyczne, aromatyczne, jak również zasady azotowe oraz kation amonowy, aby zweryfikować wpływ podstawnika na proces kompleksowania oraz porównać struktury poszczególnych kompleksów między sobą w kontekście tworzonych wiązań wodorowych pomiędzy kwasem lasalowym i aminą. Ponadto postanowiłem określić konkurencję amin i kationów metali w kompleksowaniu przez kwas lasalowy.

Określenie struktur otrzymanych kompleksów miało być prowadzone przy użyciu metod spektroskopowych i spektrometrycznych, takich jak: spektroskopia w podczerwieni FT-IR (zarówno w ciele stałym i w roztworze), magnetyczny rezonans jądrowy NMR (^1H NMR, ^{13}C NMR, techniki dwuwymiarowe HETCOR, COSY, NOESY, HMBC) a także spektrometria masowa z jonizacją przez elektrorozpylanie ESI-MS. Ta ostatnia metoda miała dostarczyć informacji na temat stosunku stechiometrycznego utworzonych kompleksów, a także pomóc w określeniu konkurencji w kompleksowaniu przez kwas lasalowy amin i kationów metali.

W literaturze brakowało również doniesień odnośnie aktywności przeciwdrobnoustrojowej kompleksów kwasu lasalowego z aminami, dlatego postanowiłem w ramach niniejszej pracy sprawdzić aktywność przeciwdrobnoustrojową otrzymanych kompleksów. Ponadto postanowiłem porównać ewentualną aktywność kompleksów z aktywnością niemodyfikowanego kwasu lasalowego i innych jego pochodnych oraz ustalić zależność pomiędzy aktywnością, a kompleksowaną przez kwas lasalowy aminą.

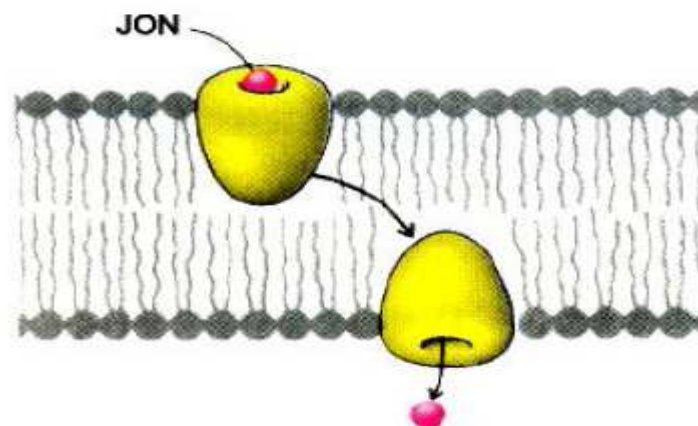
2. Część teoretyczna

2.1 Jonofory

Jonofory to hydrofobowe związki, które poprzez selektywne wiązanie się z jonami umożliwiają ich transportowanie przez błony komórkowe. Związki powstające po skompleksowaniu kationu przez jonofor noszą nazwę kompleksów typu gość-gospodarz. Kation metalu jest traktowany jako gość przyjmowany we wnęce utworzonej przez gospodarza (jonofor) [1, 2]

Obecność elektronodonorowych atomów tlenu lub azotu w cząsteczce jonoforu ułatwia kompleksowanie kationów ze względu na posiadanie przez te atomy wolnych par elektronowych. Polarna „wnęka” utworzona z atomów tlenu, w której znajduje się kation otoczona jest przez zewnętrzną hydrofobową część cząsteczki, co sprawia, że cały kompleks staje się lipofilowy. Tak utworzony kompleks może przenikać przez błony biologiczne.

Jonofory kompleksują kation po zewnętrznej stronie błony w procesie polegającym na zamianie solwatujących go cząsteczek wody polarnymi grupami antybiotyku. Później kompleks przesuwa się w poprzek błony, aby po wewnętrznej stronie uwolnić jon. **(Rys. 1)** Wysoka selektywność poszczególnych jonoforów w stosunku do kationów metali wynika ze specyficznej budowy polarnej „wnęki”, która ma ściśle określone wymiary tak, iż tylko kation o odpowiednim promieniu może zostać skompleksowany. Jony o nieodpowiednich rozmiarach (zarówno za duże jak i za małe) nie będą kompleksowane.



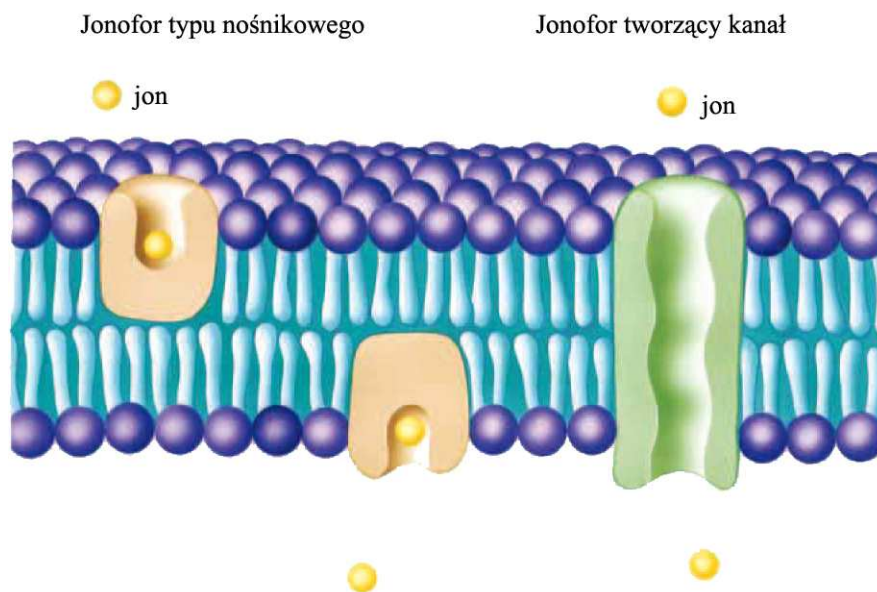
Rys.1 Transport kationów przez jonofory. Antybiotyk kompleksuje kation po jednej stronie błony, transportuje go w poprzek dwuwarstwy i uwalnia po drugiej stronie. [3]

2.2 Klasyfikacja jonoforów

Jonofory klasyfikuje się według różnych kryteriów. Wśród nich najczęściej stosowane to:

- pochodzenie związku
- sposób transportowania kationów
- budowa chemiczna
- wartościowość kompleksowanych jonów

Biorąc pod uwagę kryterium pochodzenia, można wyróżnić jonofory syntetyczne, do których zaliczane są m. in. etery koronowe oraz naturalne, w skład, których wchodzi związek wyizolowane np. z różnych szczepów bakterii. Ze względu na sposób transportowania kationów przez błony można podzielić te związki na jonofory nośnikowe oraz jonofory tworzące kanał (**Rys.2**).

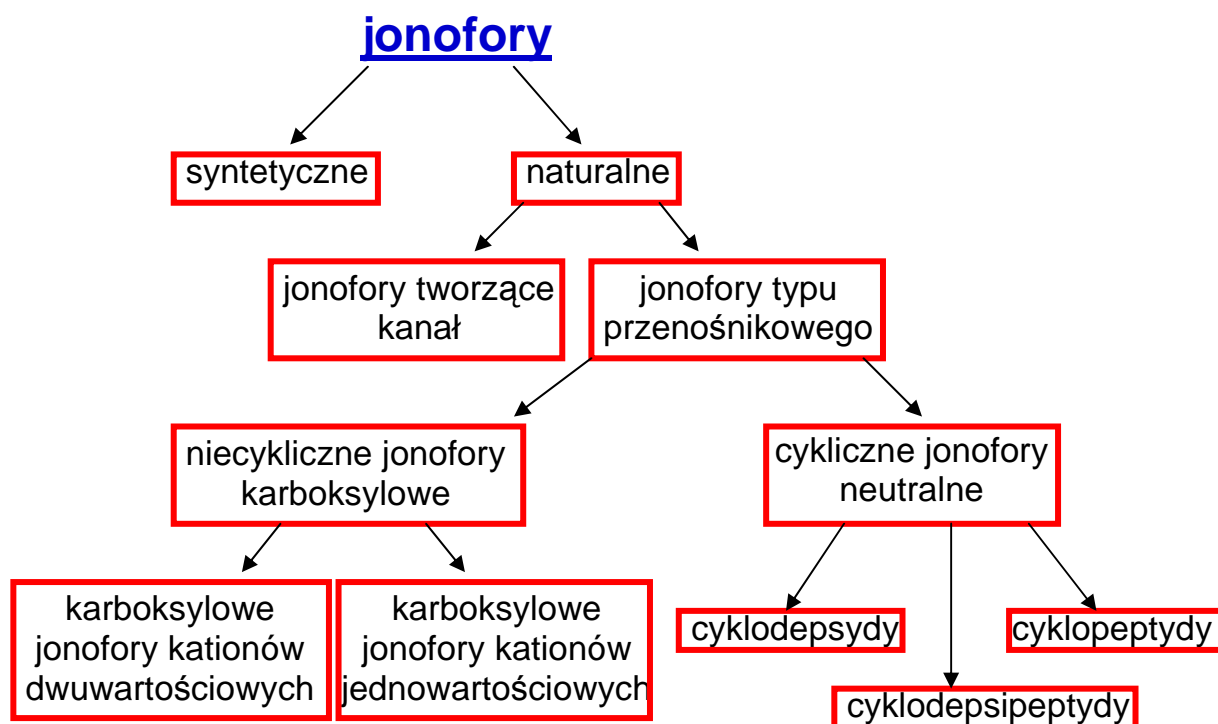


Rys. 2 Transportowanie jonów przez jonofory typu nośnikowego oraz jonofory tworzące kanał. [4]

Uwzględniając budowę chemiczną jonofory podzielić można na cykliczne jonofory neutralne i niecykliczne jonofory karboksylowe. Wśród tych pierwszych – w zależności od występujących w nich wiązań – wyróżnić można cyklopeptydy (zbudowane tylko z

aminokwasów), cyklopepsydy (zbudowane wyłącznie z hydroksykwasów) oraz cyklopepsipeptydy (zbudowane z występujących przemiennie aminokwasów i hydroksykwasów). Ze względu na różnice w budowie chemicznej, inny jest także sposób kompleksowania jonów przez wyżej wymienione związki. W przypadku cyklicznych jonoforów neutralnych oddziaływanie z jonem zachodzi tylko poprzez wiązania koordynacyjne, natomiast przy niecyklicznych jonoforach karboksylowych mogą dodatkowo występować oddziaływania jonowe z anionem karboksylanowym.

Biorąc pod uwagę wartościowość kompleksowanych kationów jonofory dzielą się na: jonofory kompleksujące kationy jednowartościowe i jonofory kompleksujące kationy dwuwartościowe. Schematyczny podział jonoforów przedstawiono na **Rysunku 3**.

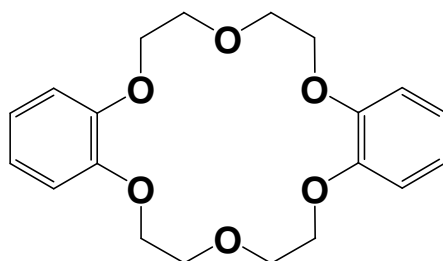


Rys. 3 Schemat podziału jonoforów.

2.3 Jonofory syntetyczne

W 1967 r. Charles Pedersen, poszukując nowych zdolnych do kompleksowania kationów opublikował pracę w której doniósł o otrzymaniu nowej grupy cyklicznych eterów które nazwał „eterami koronowymi” [5]. Otrzymany przez niego związek – dibenzo-18-

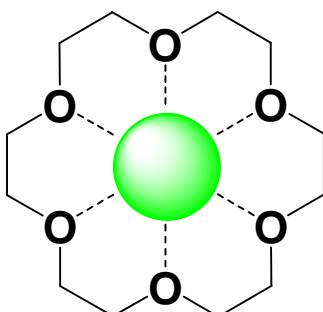
korona-6 (**Rys. 4**) – wykazywał niespotykane dotychczas właściwości chemiczne. Odkrycie Pedersena zapoczątkowało badania nad syntezą i ustaleniem właściwości wielu nowych klas związków, które wykazują zdolności do kompleksowania kationów. Odkrycie to dało początek nowej dziedzinie – chemii supramolekularnej. Za swoje odkrycie Pedersen został uhonorowany w 1985 r. Nagrodą Nobla [6].



Rys. 4 Struktura dibenzo-18-korony-6.

Najważniejszą właściwością eterów koronowych jest ich zdolność do kompleksowania kationów (**Rys. 5**) metali alkalicznych, lantanowców, jak również kationu amonowego (NH_4^+). Selektywność kompleksowania zależy od rozmiaru wnęki utworzonej przez atomy tlenu oraz od promienia jonowego kationu. Kompleksy takie są rozpuszczalne w rozpuszczalnikach organicznych.

Dzięki swym właściwościom etery koronowe znalazły szerokie zastosowanie m. in. jako czynniki kompleksujące w katalizie przeniesienia fazowego, w analizie chemicznej oraz jako receptory jonowe [7-13].



Rys. 5 Schemat kompleksowania kationu przez eter koronowy.

2.4 Cykliczne jonofory neutralne

Badania przeprowadzone na neutralnych jonoforach wykazały, że ich właściwości kompleksujące wynikają z możliwości cyklizacji cząsteczki. Po przyjęciu takiej struktury karbonylowe atomy tlenu zawarte w cząsteczce mogą kompleksować kation. W konsekwencji neutralne jonofory, po skompleksowaniu kationu przyjmują jego ładunek [14].

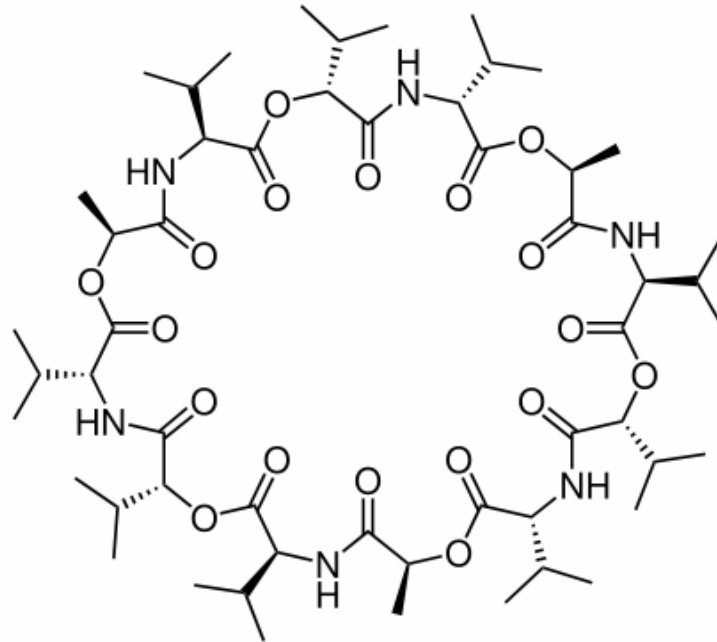
Transport kationów przez neutralne jonofory odbywa się według następującego schematu: jonofor znajdujący się wewnątrz błony dyfunduje do granicy faz, gdzie wchodzi w kontakt z kompleksowanym jonem. Kation występuje w postaci solwatowanej i gdy znajdzie się w odpowiednim położeniu, aby oddziaływać z jonoforem, solwatujące go cząsteczki wody są sukcesywnie wypierane i zastępowane przez polarne grupy jonoforu. Tak utworzony kompleks M^+ odrywa się od granicy faz i przechodzi przez przestrzeń międzybłonową na drugą stronę, gdzie uwalnia transportowany kation. Ostatecznie „pusty” jonofor dyfunduje z powrotem do przestrzeni międzykomórkowej przywracając warunki początkowe cyklu [14, 15].

Jednym z najlepiej poznanych cyklicznych jonoforów neutralnych jest walinomycyna (**Rys. 6**), która po raz pierwszy została wyizolowana ze szczepów *Streptomyces fulvissimus* w 1955 roku [16]. Jej cząsteczka jest cykliczna i zbudowana z trzech powtarzających się elementów, a każdy element zbudowany jest z przemiennie występujących aminokwasów i hydroksykwasów, mianowicie *D*-waliny, *L*-mleczanu, *L*-waliny i *D*-hydroksyzowalerianianu, które połączone są ze sobą na przemian wiązaniami estrowymi i peptydowymi, dając w sumie strukturę o przemiennej chiralności *DDLLDDLLDDLL* [17].

Pierwszej syntezy walinomycyny dokonano w 1963 r. w grupie Shemyakina [18] i w następnych latach podjęto wiele prób modyfikacji tej cząsteczki m.in. modyfikowano łańcuchy boczne aminokwasów, zmieniano chiralność oraz tworzono mniejsze pierścienie, aby zbadać wpływ modyfikacji na właściwości kompleksujące i selektywność antybiotyku [17]. Obecnie znanych jest ponad 85 pochodnych walinomycyny [19].

Biologiczna aktywność walinomycyny związana jest ze zdolnością do transportowania kationów potasu przez błony do wnętrza mitochondrium. Jednocześnie w przeciwnym kierunku odbywa się transport protonów dlatego pełni ona funkcję inhibitora fosforylacji

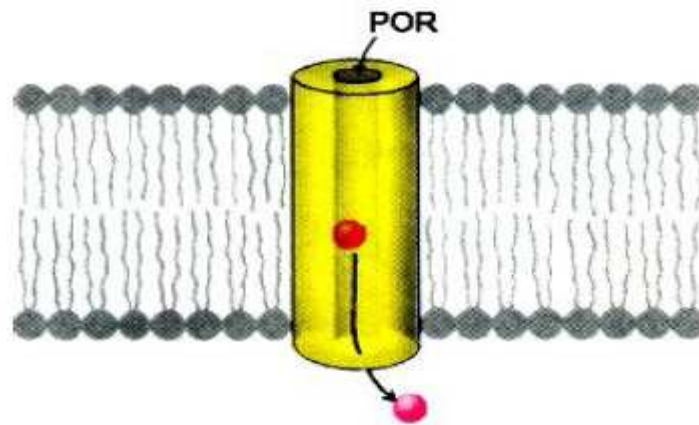
oksydacyjnej, ponieważ jej obecność sprawia, że błony komórkowe są nieprzepuszczalne dla protonów. [20-22].



Rys. 6 Wzór strukturalny walinomycyny

2.5 Jonofory tworzące kanał

Antybiotyki jonoforowe tworzące kanał (**Rys. 7**) często nazywa się pseudo-jonoforami. Mechanizm kanałowy jest mniej poznany niż mechanizm przenoszenia jonów. Polega on jednak na tym, że jonofory tworzące kanał wbudowują się w lipidowy rdzeń błony tworząc często wypełniony wodą por, przez który mogą przechodzić jony. Jonofory takie są mniej selektywne od jonoforów nośnikowych ze względu na to, że przez kanały mogą przechodzić składniki niepożądane [14].

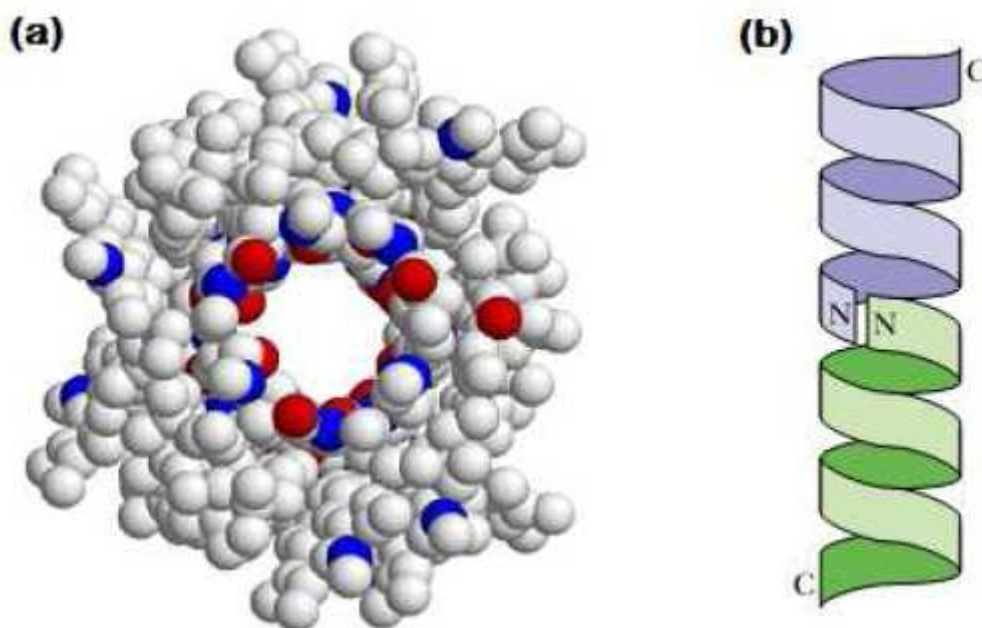


Rys. 7 Transport jonów za pomocą antybiotyku tworzącego kanał [3].

Jednymi z najlepiej poznanych i opisanych związków tworzących kanał są gramicydyny, które wyizolowano ze szczepów *Bacillus brevis*. Gramicydyny składają się z połączonych liniowo reszt L i D aminokwasowych. Struktura gramicydyny zależna jest od środowiska, w którym się znajduje, jednak jej podstawową jednostką strukturalną jest struktura helisy β . Przedstawicielem tej grupy związków jest gramicydyna A zbudowana z aminokwasów o naprzemiennej konfiguracji D i L oraz grupy formylowej na jednym i etanoloaminy na drugim końcu cząsteczki. Istnieją też jej homologi, nazwane gramicydyną B i C, w której jedenasta reszta L-tryptofanu została zastąpiona odpowiednio przez L-fenylalaninę i L-tyrozinę [23-25].

Łańcuch polipeptydowy gramicydyny ma tendencję do tworzenia dimeru. Dimer taki tworzy kanał o długości 25-30 Å i średnicy 4 Å. Kanał taki tworzą dwie prawoskrętne helisy, które układają się względem siebie jak „głowa do głowy” N-końcami peptydu (Rys. 8). Struktura ta jest na tyle duża, aby wnikać w błonę i wprowadzić kanał przewodzący jon.

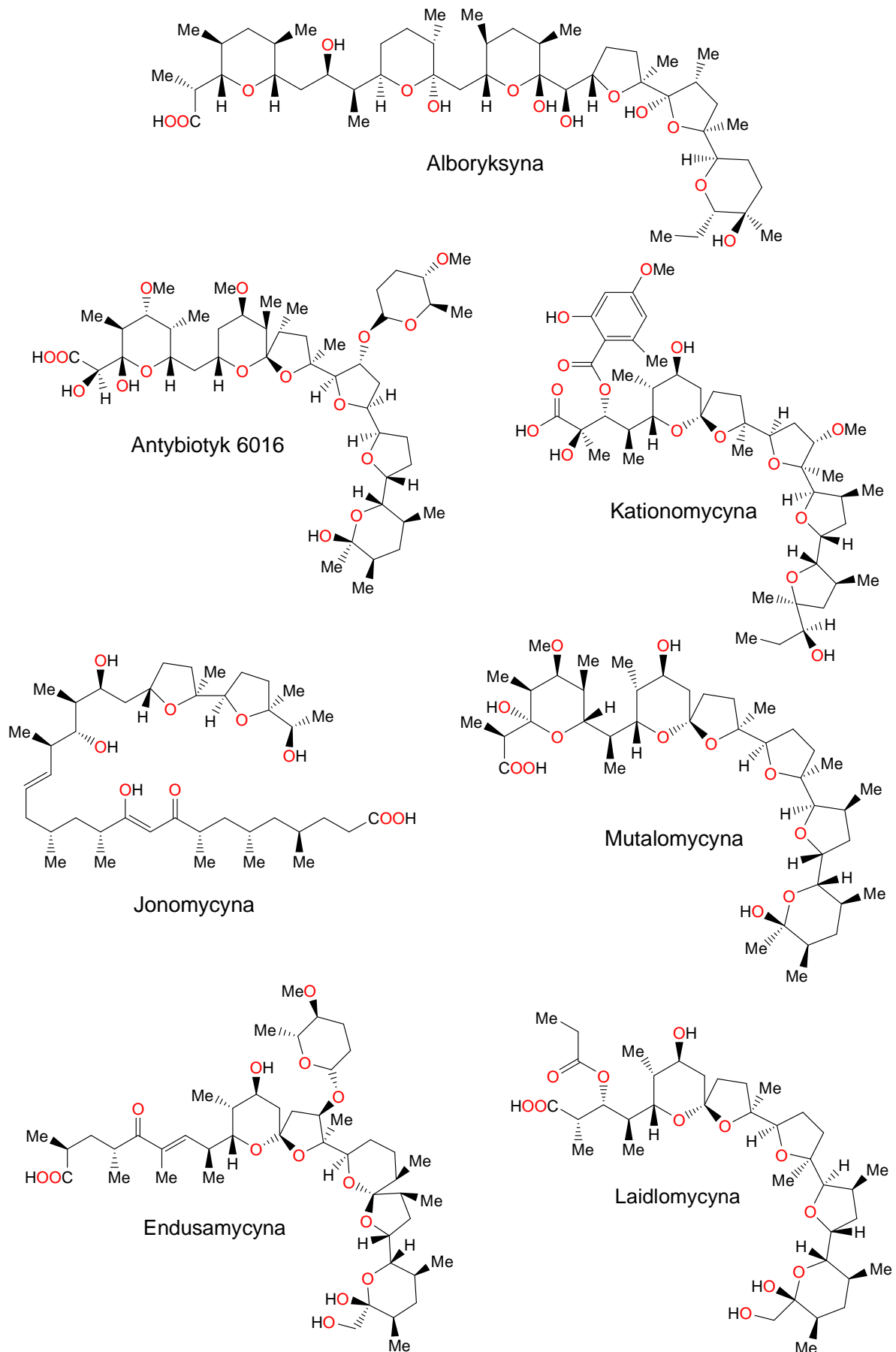
Podczas tworzenia dimeru łańcuchy boczne aminokwasów kierowane są na zewnątrz, dzięki czemu zewnętrzna powierzchnia kanału jest hydrofobowa i bez problemu oddziałuje z błoną. Gramicydyna wykazuje selektywność wobec kationów jednowartościowych (wobec większych cząstek jest nieprzepuszczalna) a preferencja oddziaływania jest następująca: $Cs^+ > Rb^+ > K^+ > Na^+ > Li^+$ [25-32].



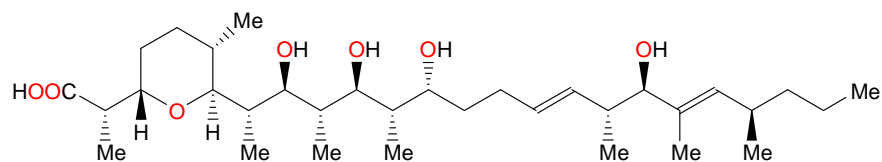
Rys. 8 Struktura kanału gramicydyny (a) widok z góry, (b) widok z boku. [4, 70]

2.6 Niecykliczne jonofory karboksylowe

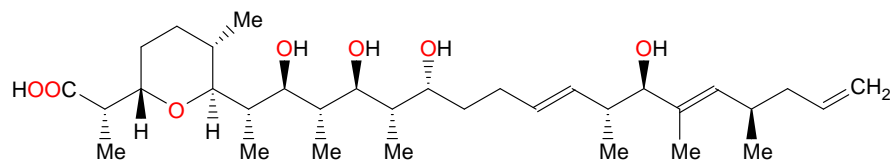
Naturalne jonofory karboksylowe (**Rys. 9-11**) określane są też jako antybiotyki polieteryowe lub antybiotyki nigerycynowe. Stanowią one liczną grupę związków składających się z podobnych jednostek strukturalnych. Częsteczki jonoforów karboksylowych mają budowę liniową, jednakże tworzenie się wiązań wodorowych typu „głowa do ogona” pomiędzy grupą karboksylową na jednym końcu cząsteczki, a grupami hydroksylowymi na drugim końcu cząsteczki umożliwia powstanie pseudo-cyklicznej struktury. Konformacja pseudo-cykliczna obserwowana jest zarówno w przypadku cząsteczek nieskompleksowanych jak i kompleksów z kationami metali [2, 14, 17]. Struktury jonoforów karboksylowych najczęściej określane były dzięki badaniom krystalograficznym ich soli z kationami metali [33-58].



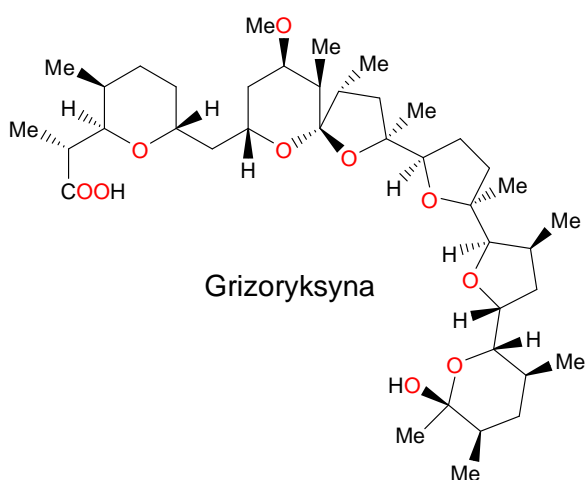
Rys. 9 Struktury karboksylowych antybiotyków jonoforowych



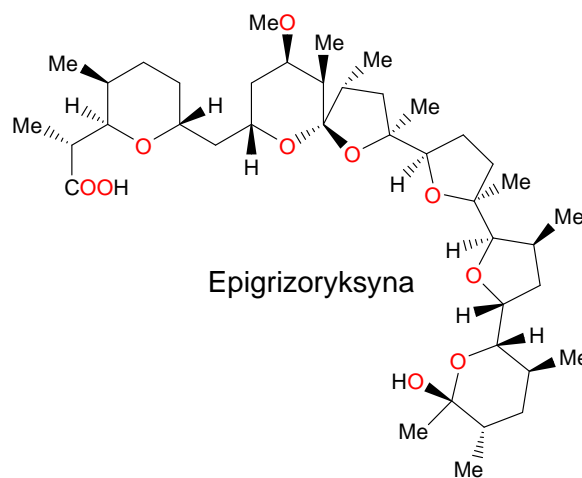
Cynkoforyna



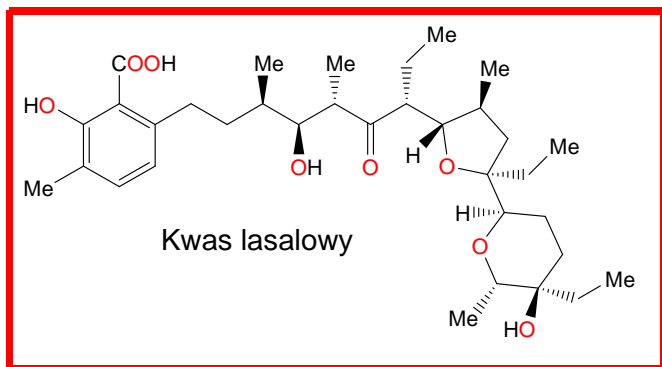
CP-78545



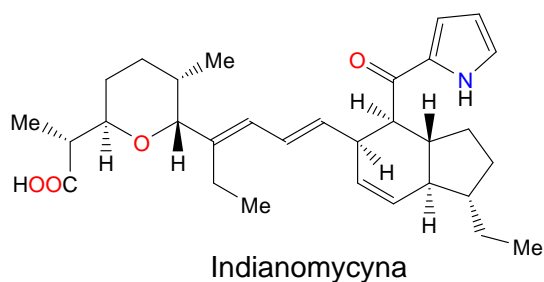
Grizoryksyna



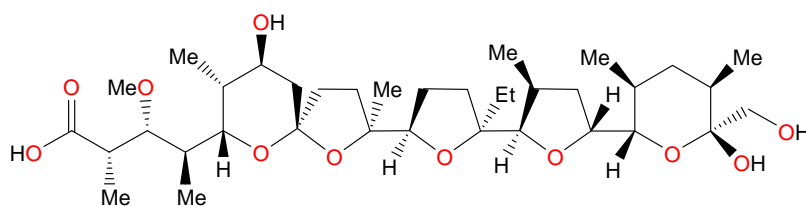
Epigrizoryksyna



Kwas lasalowy

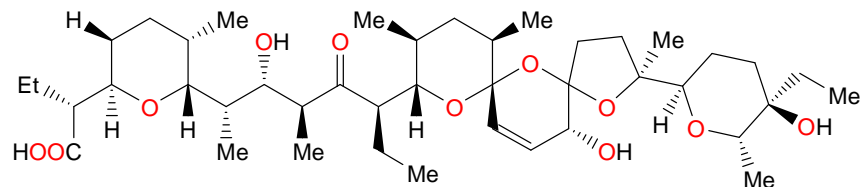


Indianomycyna

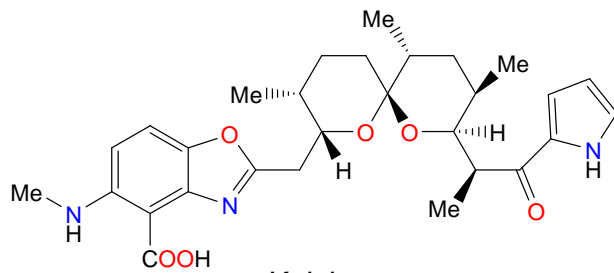


Monenzyna A

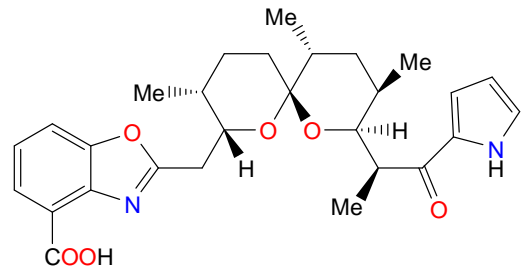
Rys. 10 Struktury karboksylowych antybiotyków jonoforowych.



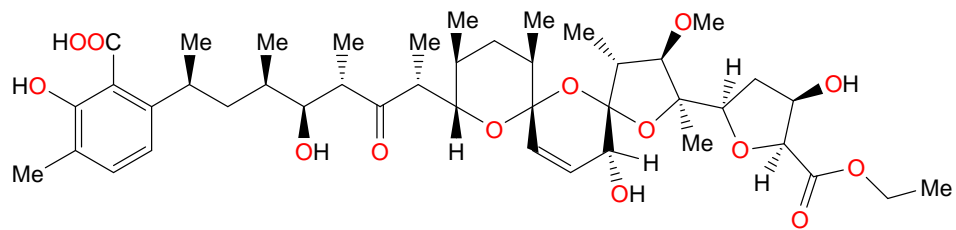
Salinomycyna



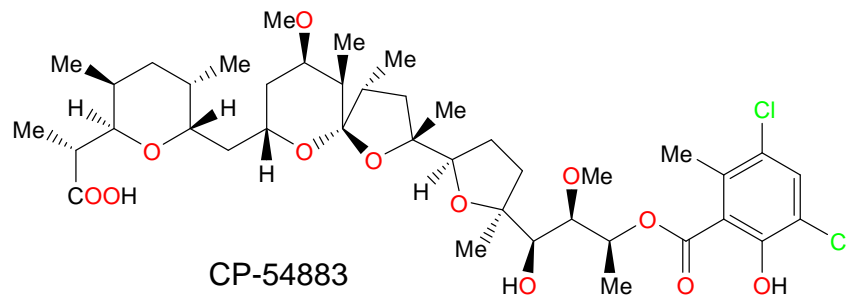
Kalcimycyna



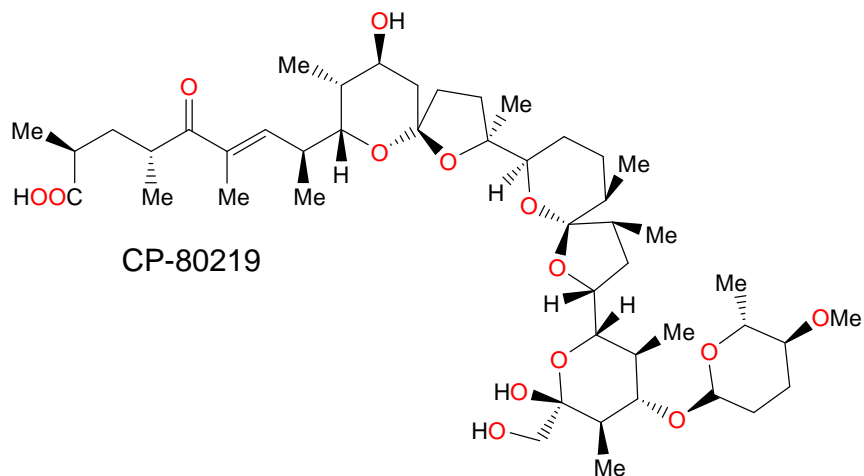
Cezomycyna



Norobitomycyna



CP-54883



CP-80219

Rys. 11 Struktury karboksylowych antybiotyków jonoforowych.

Historycznie pierwszym odkrytym antybiotykiem polieterykowym była w 1951 roku nigerycyna, a wyizolowano ją ze szczepów *Streptomyces hygroscopicus* [59]. Od tego czasu zaczęto badać różne szczepy bakterii *Streptomyces*, uzyskując kolejne antybiotyki. Dzisiaj znanych jest ponad 120 takich związków izolowanych głównie ze szczepów bakterii *Streptomyces* i *Actinomadura* [60]. W Tabeli 1 zestawiono niektóre antybiotyki oraz organizmy, z których są one izolowane.

Tabela 1. Organizmy produkujące poszczególne antybiotyki jonoforowe

Antybiotyk	Organizm produkujący
Alboryksyna	<i>Streptomyces hygroscopicus</i> [61]
Kalcimycyna	<i>Streptomyces chartreuse</i> [62]
Cezomycyna	<i>Streptomyces chartreuse</i> [38]
X-14885A	<i>Streptomyces chartreuse</i> [63]
Antybiotyk 6016	<i>Streptomyces albus</i> [64]
Kationomycyna	<i>Actinomadura azurea</i> [65]
Jonomycyna	<i>Streptomyces conglobatus</i> [66]
Endusamycyna	<i>Streptomyces Indus</i> [42]
Mutalomycyna	<i>Streptomyces mutabilis</i> [67]
Cynkoforyna	<i>Streptomyces griseus</i> [44]
CP-78545	<i>Streptomyces griseus</i> [45]
Grizoryksyna	<i>Streptomyces griseus</i> [68]
Epigrizoryksyna	<i>Streptomyces hygroscopicus</i> [69]
CP-54883	<i>Actinomadura routieni</i> [70]
Indianomycyna	<i>Streptomyces antibioticus</i> [71]
Salinomycyna	<i>Streptomyces albus</i> [50]
Monenzyna	<i>Streptomyces cinamonensis</i> [54]
Kwas lasalowy	<i>Streptomyces lasaliensis</i> [72]
Laidlomycyna	<i>Streptomyces eurocidicus</i> [56]
norobitomycyna	<i>Streptomyces noboritoensis</i> [57]
CP-80219	<i>Streptomyces hygroscopicus</i> [58]

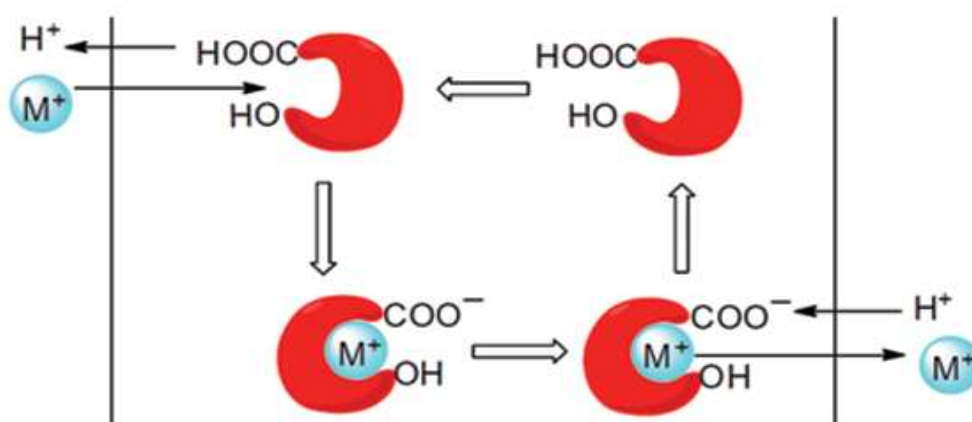
Wszystkie jonofory karboksylowe zbudowane są z pierścieni tetrahydrofuranowych i tetrahydropiranowych, czasami połączonych za pomocą spiro atomu węgla. Eterowe atomy tlenu oraz atomy tlenu grup hydroksylowych biorą udział w kompleksowaniu kationu. Grupa karboksylowa tej rodziny związków w fizjologicznym pH ulega deprotonacji, co prowadzi do powstania neutralnych kompleksów z kationami $[L^-M^+]$, jednakże obdarzone ładunkiem kompleksy typu $[LHM]^+$ również są znane jak np. kompleks monenzyny z NaBr [14, 17, 73].

Aktywność biologiczna wykazywana przez karboksylowe antybiotyki jonoforowe związana jest z ich zdolnością do kompleksowania kationów i transportowania ich przez błony komórkowe. Transport kationów odbywa się na drodze dwóch mechanizmów: elektroneutralnego (ang. *electroneutral*) i elektrogenicznego (ang. *electrogenic*) [15].

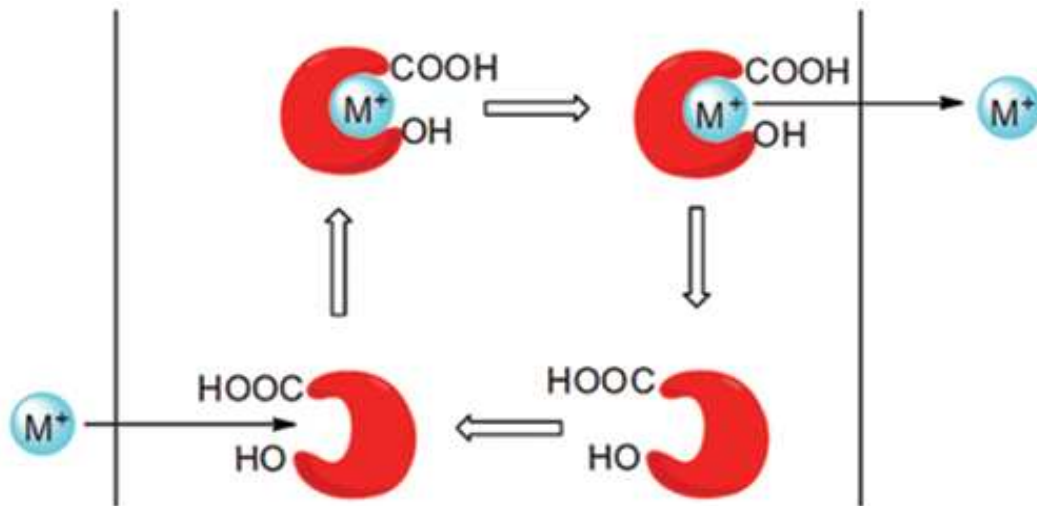
W procesie elektroneutralnym anion antybiotyku jonoforowego (I^-) tworzy kompleks z kationem metalu, w którym koordynacja kationu jest zawsze związana z tworzeniem pseudo-cyklicznej struktury, która stabilizowana jest przez tworzenie wiązań wodorowych typu głowa do ogona pomiędzy grupą karboksylową i grupami hydroksylowymi, obecnymi w strukturze antybiotyku. W procesie elektroneutralnym anion jonoforu wiąże kation lub proton dając odpowiednio neutralną sól, bądź neutralny jonofor w postaci kwasu (**Rys. 12**) i tylko w takiej neutralnej formie przechodzi przez błony komórkowe. Ten mechanizm jest możliwy tylko w neutralnym, bądź lekko zasadowym pH, ze względu na kluczowy etap deprotonacji grupy karboksylowej jonoforu [15].

Wykazana niedawno aktywność przeciwnowotworowa antybiotyków jonoforowych, w połączeniu z wiedzą, iż w środowisku komórek rakowych panuje niskie pH zainspirowało Huczyńskiego i współpracowników do znalezienia strukturalnych i spektroskopowych dowodów na istnienie alternatywnego mechanizmu transportu jonów przez błony biologiczne [15].

Ich badania wykazały, że proces kompleksowania kationów zachodzi w środowisku innym od zasadowego. Jonofor w formie kwasowej kompleksuje kation, w związku, z czym kompleks obdarzony jest ładunkiem i w takiej formie przechodzi przez błony (**Rys. 13**) na drodze mechanizmu elektrogenicznego [15].



Rys. 12 Mechanizm transportu elektroneutralnego z udziałem jonoforów karboksylowych [15].



Rys. 13 Mechanizm transportu elektrogenicznego z udziałem jonoforów karboksylowych [15].

W zależności od wartościowości transportowanych przez jonofor kationów dokonano podziału jonoforów karboksylowych na: jednowartościowe polietery – zdolne do transportowania wyłącznie kationów jednowartościowych (np. mutalomycyna, jonomycyna) oraz dwuwartościowe polietery, które są zdolne do transportowania zarówno kationów jednowartościowych jak i dwuwartościowych (kwas lasalowy) [17, 74].

Pomimo dużej liczby wyizolowanych karboksylowych antybiotyków jonoforowych, nie znalazły one zastosowania klinicznego, ze względu na dość znaczną toksyczność. Są one jednakże szeroko stosowane, jako kokcydiostatyki w hodowli drobiu. Ze względu na swoją selektywność w stosunku do kationów jonofory mogą być wykorzystane przy produkcji elektrod jonoselektywnych [75-84].

Proponowanych jest kilka mechanizmów toksycznego działania antybiotyków jonoforowych [85]. Według jednego z nich jonofory powodują wymianę kationów K^+ z mitochondrium komórek mięśnia sercowego na kationy Ca^{2+} i Na^+ z przestrzeni międzykomórkowej. Powoduje to nadmierny wzrost stężenia kationów Ca^{2+} w mitochondriach i uszkadza je. Ostatecznie prowadzi to zmniejszenia energii w komórce i martwicy mięśnia [82, 85]. Według innego mechanizmu jonofory powodują śmierć komórek mięśnia sercowego indukując apoptozę [86]. Trzeci mechanizm zakłada, że w wyniku zwiększonego przepływu kationów Ca^{2+} jonofory powodują niszczenie komórek nerwowych [87].

Jonofory karboksylowe wykazują wysoką aktywność przeciwko bakteriom Gram-dodatnim, kokcydiom oraz mykobakteriom. Dlatego znalazły zastosowanie jako leki przeciwko kokcydiozie wywoływanej u ptaków przez pasożyty z rodzaju *Eimeria*. Ponadto niektóre jonofory karboksylowe są aktywne przeciwko krętkom *Treponema hyodysenteriae*, wywołującym dyzenterię u świń. Działanie jonoforów względem bakterii Gram-dodatnich pozytywnie wpływa na mikroflorę przewodu pokarmowego u bydła. Zmniejszenie ilości bakterii Gram-dodatnich pozwala na zwiększenie liczności bakterii Gram-ujemnych, których działanie powoduje zwiększenie stężenia kwasu propionowego w przewodzie pokarmowym w miejsce kwasu octowego i masłowego, co ostatecznie prowadzi do lepszego wchłaniania pokarmu, dlatego też antybiotyki jonoforowe znalazły zastosowanie jako niehormonalne stymulatory wzrostu oraz kokcydiostatyki w przemysłowej hodowli drobiu i bydła [88-100].

Ostatnie doniesienia wskazują na możliwość selektywnego niszczenia komórek raka piersi przy użyciu salinomycyny. Zdolność do niszczenia komórek macierzystych raka oraz komórek rakowych odpornych na apoptozę czyni z salinomycyny związek potencjalnie wykorzystywany w terapii antynowotworowej [101-104].

Budowę oraz właściwości biologiczne antybiotyków polieterowych omówiłem szczegółowo w pracy przeglądowej [105], do której odsyłam czytelnika w celu uzyskania dalszych informacji.

W Tabeli 2 zestawiono aktywność biologiczną poszczególnych antybiotyków jonoforowych przeciwko różnym mikroorganizmom.

Tabela 2. Aktywność biologiczna poszczególnych antybiotyków jonoforowych [88-104]

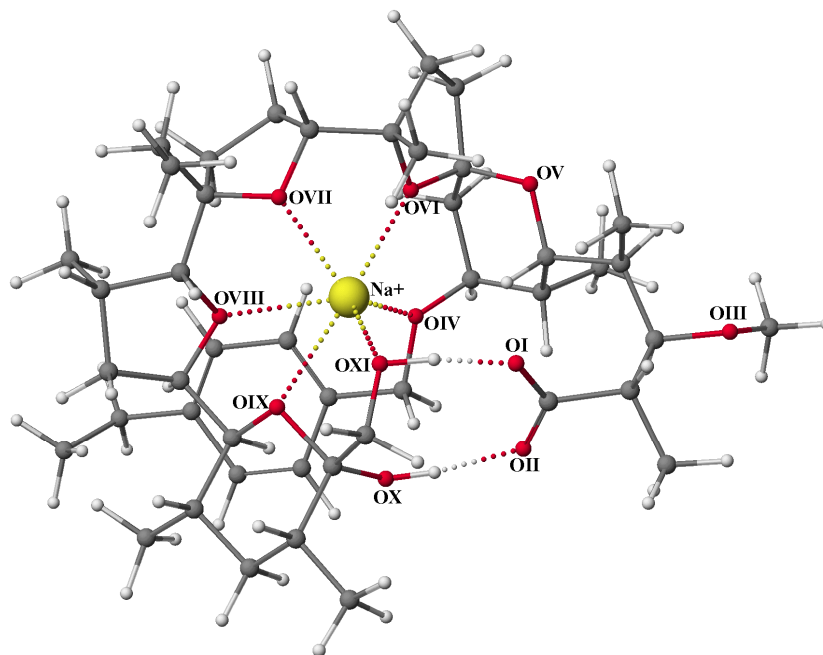
Antybiotyk	Aktywność przeciwbakteryjna
Alboryksyna	bakterie Gram-dodatnie
Kalcimycyna	bakterie Gram-dodatnie
Cezomycyna	bakterie Gram-dodatnie
X-14885A	bakterie Gram-dodatnie
	krętki <i>Treponema hyodesenteriae</i>
Antybiotyk 6016	bakterie Gram-dodatnie
	mykobakterie
	pasożyty <i>Eimeria tenella</i>
Kationomycyna	bakterie Gram-dodatnie
Jonomycyna	bakterie Gram-dodatnie
Endusamycyna	bakterie Gram-dodatnie
	krętki <i>Treponema hyodesenteriae</i>
	pasożyty <i>Eimeria tenella</i> i <i>Eimeria acervulina</i>

Antybiotyki	Aktywność przeciwbakteryjna
Mutalomycyna	bakterie Gram-dodatnie pasożyty <i>Eimeria tenella</i>
Cynkoforyna	bakterie Gram-dodatnie pasożyty <i>Eimeria tenella</i>
CP-78545	bakterie Gram-dodatnie krętki <i>Treponema hyodesenteriae</i>
Grizoryksyna	bakterie Gram-dodatnie
Epigrizoryksyna	bakterie Gram-dodatnie
CP-54883	bakterie Gram-dodatnie pasożyty <i>Eimeria tenella</i> , <i>Eimeria acervulina</i> oraz <i>Eimeria maxima</i>
Indianomycyna	bakterie Gram-dodatnie
Salinomycyna	bakterie Gram-dodatnie pasożyty <i>Eimeria tenella</i> zdolność selektywnego niszczenia komórek nowotworowych
Monenzyna	bakterie Gram-dodatnie
Kwas lasalowy	bakterie Gram-dodatnie
Laidlomycyna	bakterie Gram-dodatnie
norobitomycyna	bakterie Gram-dodatnie pasożyty <i>Eimeria tenella</i>
CP-80219	bakterie Gram-dodatnie krętki <i>Treponema hyodesenteriae</i>

Monenzyna jest jednym z najlepiej poznanych i opisanych antybiotyków jonoforowych. Ponadto, wiele jonoforów kompleksujących kationy jednowartościowe jest strukturalnie podobnych do monenzyny, dlatego przyglądając się właściwościom monenzyny, można w dużym przybliżeniu scharakteryzować całą grupę jonoforów kompleksujących kationy jednowartościowe.

Obecność w cząsteczce monenzyny (jak i innych jonoforów) pierścieni eterowych, połączonych niekiedy atomami węgla „spiro” wymusza sztywność konformacyjną i określony kształt wnęki kompleksującej kation. Sztywność ta jednocześnie jest przyczyną wysokiej selektywności poszczególnych jonoforów względem konkretnych jonów. W przypadku monenzyny preferencja kompleksowania kationów jednowartościowych układa się w szereg $\text{Na}^+ \gg \text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Li}^+ > \text{Cs}^+$ [106].

W kompleksach monenzyny kation metalu koordynowany jest przez 4 eterowe atomy tlenu i atomy tlenu grup hydroksylowych (**Rys. 14**).

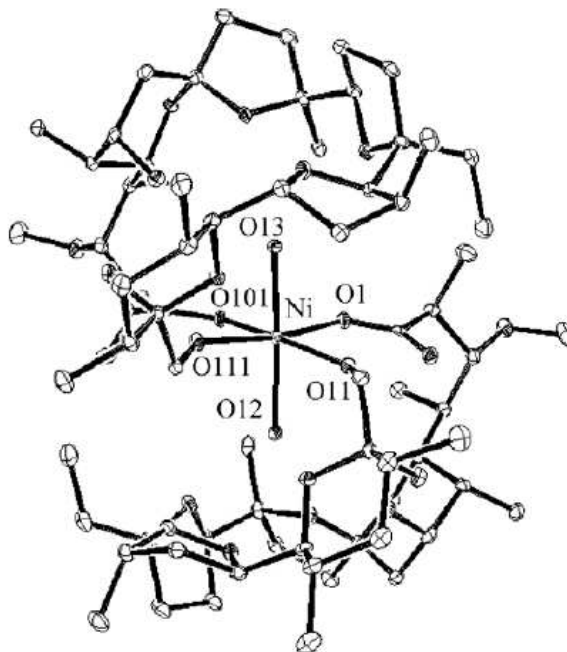


Rys. 14 Struktura kompleksu monenzyny z kationem sodu [106]

Konformacja soli sodowej monenzyny nie różni się zbyt wiele od konformacji kwasu monenzynowego, ponieważ w procesie kompleksowania cząsteczki wody ze strefy solwatacyjnej kationu są zastępowane przez atomy tlenu monenzyny [107].

Początkowo sądzono, że monenzyna nie tworzy kompleksów z kationami metali dwuwartościowych, jednak niedawno grupa bułgarskich naukowców opublikowała struktury krystalograficzne kompleksów monenzyny z kationami metali dwuwartościowych, takimi, jak Co^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} . Kompleksy monenzyny z kationami dwuwartościowymi mogą występować w dwóch formach. W jednym przypadku sól sodowa monenzyny tworzy kompleks z dichlorkiem metalu o stechiometrii $[\text{M}(\text{MON}-\text{Na})_2]\text{Cl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, gdzie $\text{M} = \text{Co}^{2+}$, Mn^{2+} i Cu^{2+} . W tej formie kation dwuwartościowy jest koordynowany przez atomy tlenu pochodzące z grup karboksylowych dwóch cząsteczek monenzyny oraz dwa aniony chlorkowe. Kation sodu pozostaje w hydrofilowej wnęce cząsteczki liganda i nie może być zastąpiony przez kation metalu przejściowego. W drugim przypadku monenzyna tworzy kompleks z kationami dwuwartościowymi o stechiometrii $[\text{M}(\text{MON})_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_2]$, gdzie $\text{M} = \text{Mg}^{2+}$, Ca^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} . W tej formie kation koordynowany jest przez atomy tlenu pochodzące z grup karboksylowych dwóch cząsteczek monenzyny oraz dwie cząsteczki wody. Obie formy kompleksów monenzyny z kationami dwuwartościowymi są nietypowe, ponieważ eterowe atomy tlenu nie odgrywają roli w kompleksowaniu, odwrotnie niż w

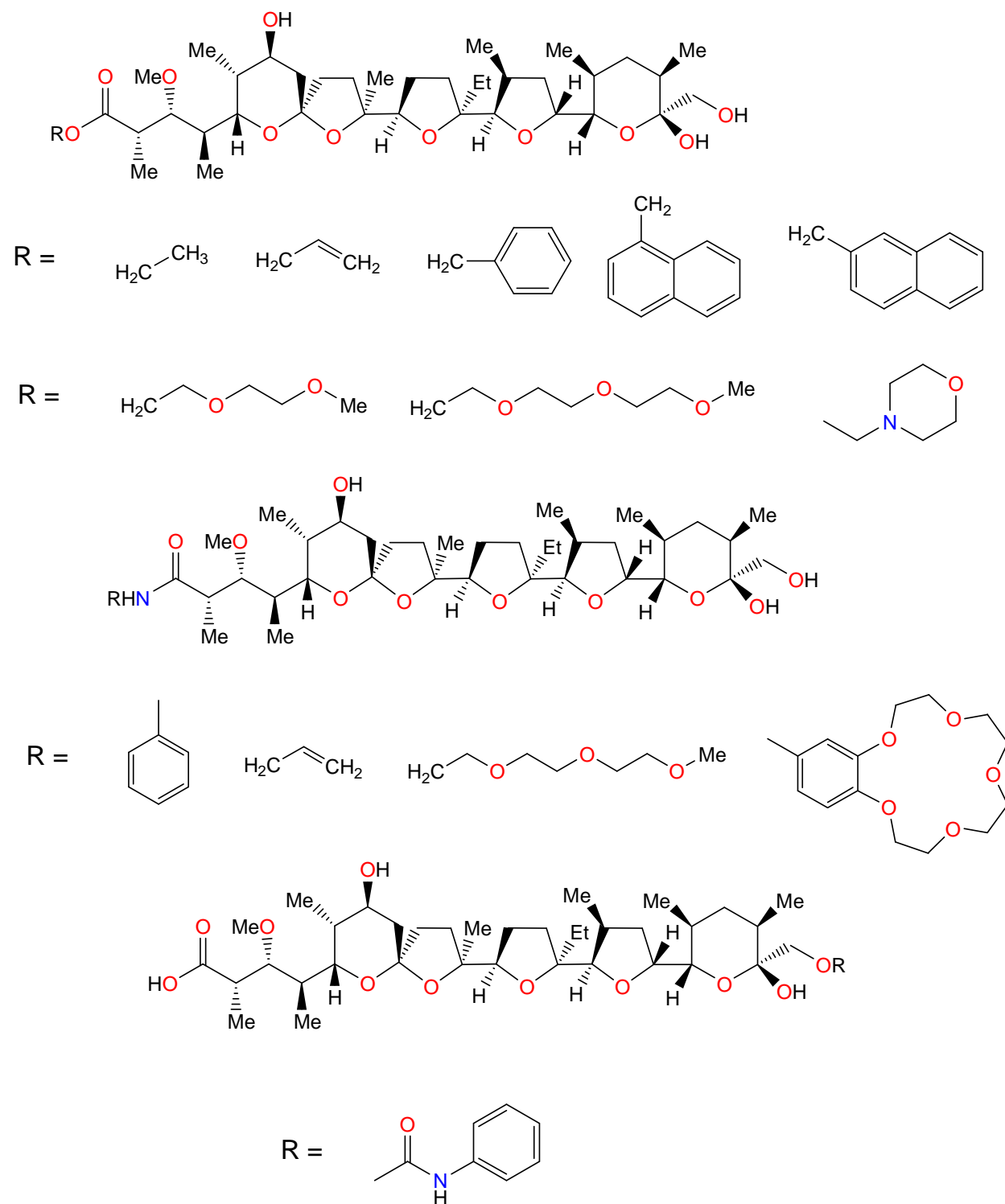
przypadku kompleksów z kationami jednowartościowymi, gdzie owe atomy tlenu zawsze są zaangażowane w proces kompleksowania [108-113]. Strukturę kompleksu monenzyny z kationem niklu pokazano na **Rysunku 15**.



Rys. 15 Struktura dimerycznego kompleksu monenzyny z kationem niklu [108].

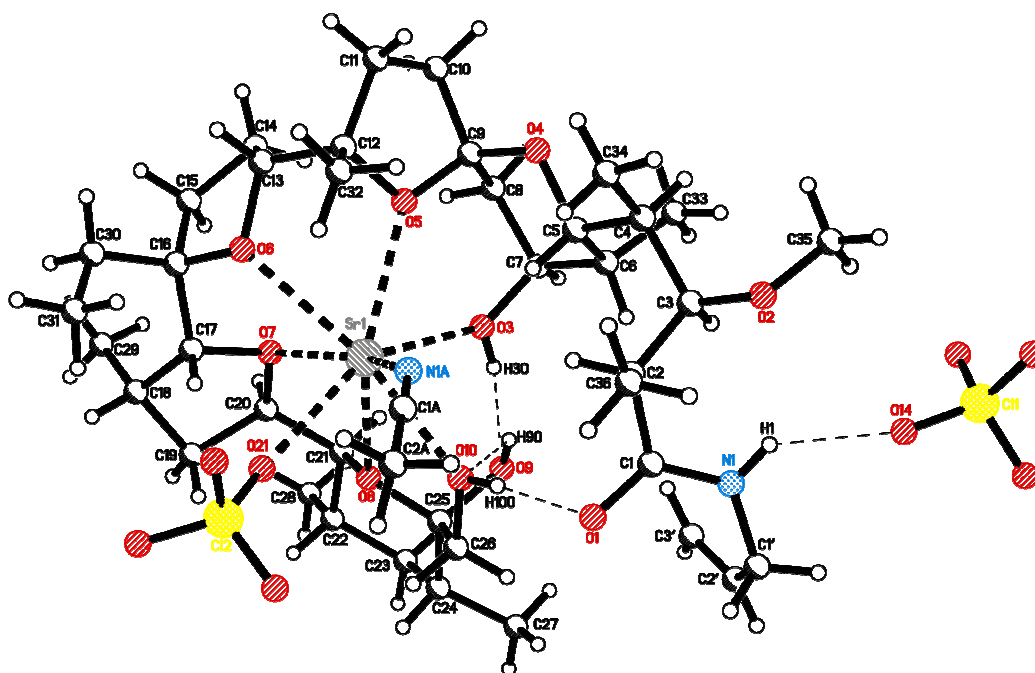
Znanych jest wiele syntetycznych pochodnych monenzyny, takich jak pochodne eterowe i estrowe otrzymane przez modyfikację grupy O(4)H [114, 115], a także pochodne estrowe otrzymane przez modyfikację grupy O(11)H [116, 117].

W ostatnim czasie w grupie badawczej profesora B. Brzezinskiego zsyntezowano szereg nowych estrów [118-130] i amidów monenzyny [131-136] otrzymanych w wyniku modyfikacji grupy karboksylowej, oraz uretanów [137, 138] otrzymanych poprzez modyfikację pierwszorzędowej grupy hydroksylowej. Strukturę niektórych z wyżej wymienionych pochodnych monenzyny przedstawiono na **Rysunku 17**.



Rys. 16 Struktury pochodnych monensyny

Pierwszym eksperymentalnym dowodem na możliwość tworzenia kompleksów przez pochodne monensyny z kationami dwuwartościowymi [136] było otrzymanie kompleksu amidu allilowego monensyny z kationem strontu w postaci krystalicznej (Rys. 17).



Rys. 17 Struktura krystalograficzna kompleksu amidu allilowego monenzyny z kationem strontu [136].

2.7 Charakterystyka obiektu badań – kwas lasalowy

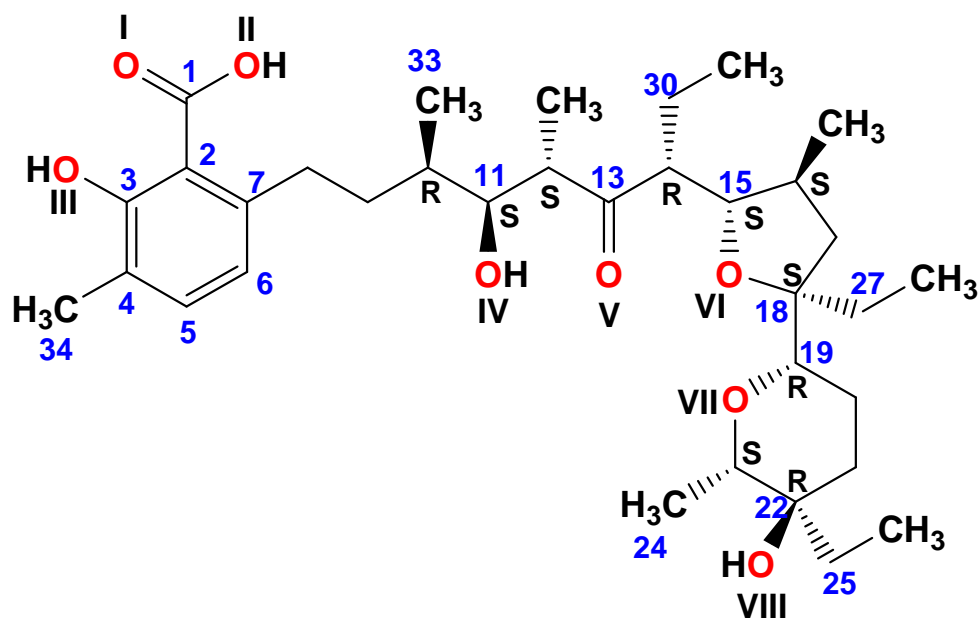
Kwas lasalowy jest antybiotykiem jonoforowym wytwarzanym przez *Streptomyces lasaliensis*. Po raz pierwszy został wyizolowany przez Bergera w 1951 roku [72].

Pomimo wielu pozytywnych cech, toksyczność kwasu lasalowego jest dużym problemem. Dlatego też prowadzone są prace nad modyfikacjami kwasu lasalowego, aby zmniejszyć, lub całkowicie wyeliminować jego toksyczność i w związku z tym zwiększyć jego chemiczne i biologiczne zastosowanie w weterynarii [139].

Dokładna struktura kwasu lasalowego (Rys. 18) została określona dopiero w 1970 roku przez Westleya i współpracowników. Konfiguracja absolutna na wszystkich dziesięciu centrach asymetrii została wyznaczona dzięki rentgenografii strukturalnej kryształu uwodnionej soli barowej kwasu lasalowego [140].

Zdolność kompleksowania przez kwas lasalowy kationów metali alkalicznych oraz możliwość transportowania ich przez błony biologiczne sprawia, iż związek ten wykazuje

właściwości antybiotyczne, dzięki którym znalazł zastosowanie jako niehormonalny stymulator wzrostu oraz kokcydiostatyk w przemysłowej hodowli drobiu i bydła [141-168].



Rys. 18 Struktura kwasu lasalowego.

Tabela 3. Krótka charakterystyka kwasu lasalowego

Nazwa polska:	Kwas lasalowy
Nazwa angielska:	Lasalocid acid
Nazwa według CAS (Chemical Abstracts Service):	[2R-[2α[2S*(3R*,4S*,5S*,7R*),3S*,5S*],5α,6β]]-6-[7-[5-Ethyl-5-(5-ethyltetrahydro-5-hydroxy-6-methyl-2H-pyran-2-yl)tetrahydro-3-methyl-2-furanyl]-4-hydroxy-3,5-dimethyl-6-oxonyl]-2-hydroxy-3-methylbenzoic acid
Inne nazwy:	<ul style="list-style-type: none"> • 3-methyl-6-[7-ethyl-4-hydroxy-3,5-dimethyl-6-oxo-7-[5-ethyl-3-methyl-5-(5-ethyl-5-hydroxy-6-methyl-2-tetrahydropyran-2-yl)-2-tetrahydrofuryl]heptyl]salicylic acid • antybiotyk X-537A • jonofor X-4537A
Wzór sumaryczny:	C ₃₄ H ₅₄ O ₈
Masa cząsteczkowa:	590.79 g/mol
Skład procentowy:	C 69.12%, H 9.21%, O 21.67%
Temperatura topnienia:	110 - 114°C
Skręcalność właściwa:	[α] _D ²⁵ - 7.55° (w metanolu)
Źródło izolacji:	<i>Streptomyces lasaliensis</i>

Rozpuszczalność:	Słabo w wodzie, dobrze w rozpuszczalnikach organicznych
Toksyczność:	
Mysz	LD ₅₀ = 145 mg/kg
Kurczak	LD ₅₀ = 71,5 mg/kg
Szczur	LD ₅₀ = 122 mg/kg
Świnia	LD ₅₀ = 58 mg/kg
Królik	LD ₅₀ = 40 mg/kg
Pies	LD ₅₀ = 15 mg/kg
Koń	LD ₅₀ = 21,5 mg/kg

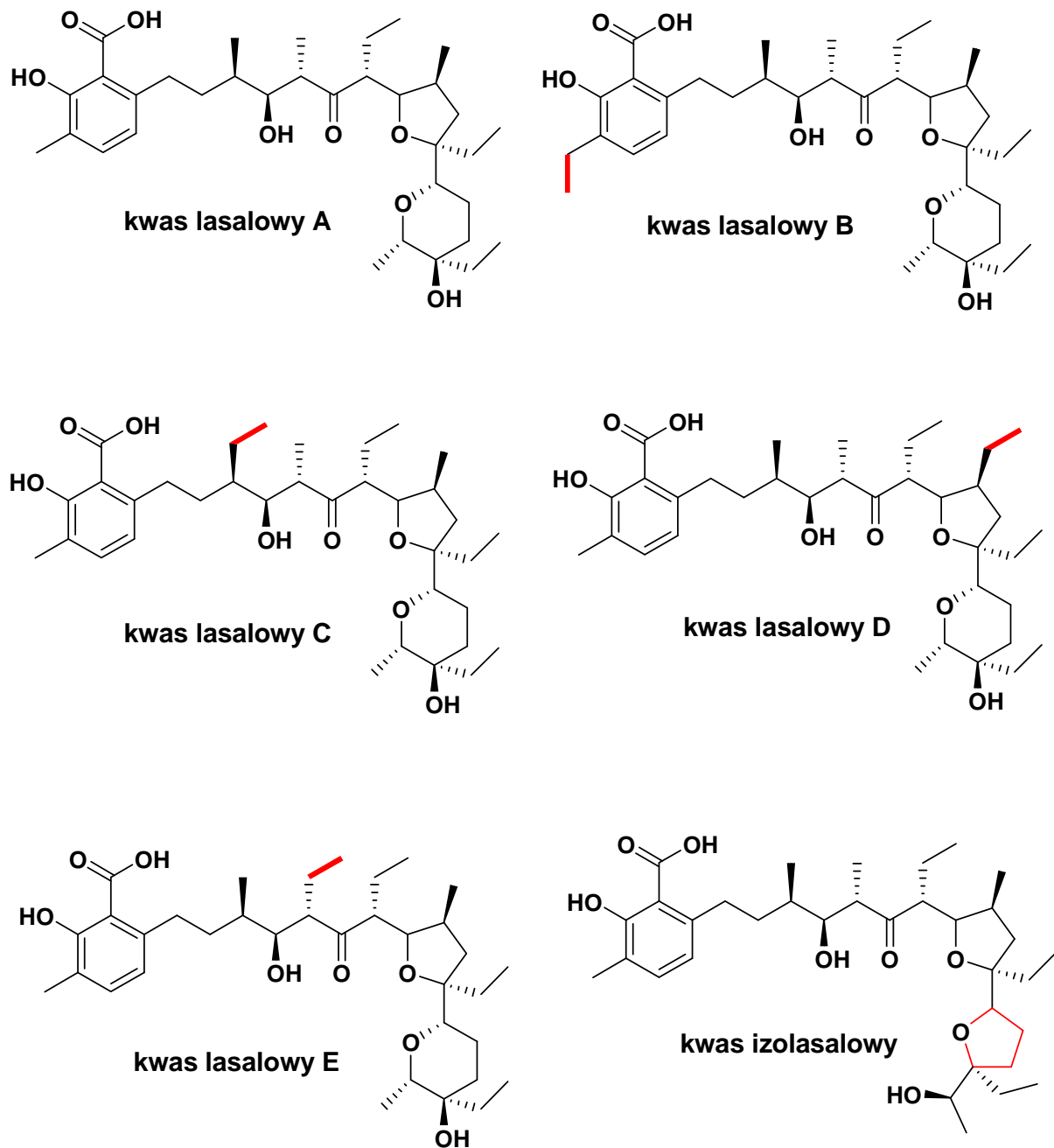
2.7.1 Struktura i homologi kwasu lasalowego

Kwas lasalowy jest cząsteczką o budowie liniowej i zawiera w swej budowie pierścień aromatyczny, będący pochodną kwasu salicylowego, pierścień tetrahydrofuranowy oraz pierścień tetrahydropiranyowy. Ponadto cząsteczka kwasu lasalowego „posiada” dwie grupy hydroksylowe oraz dodatkowa grupa karbonylowa.

W 1974 roku podczas badań nad biosyntezą kwasu lasalowego w grupie Westleya odkryto i zidentyfikowano pięć homologów [169, 170] tego związku, oznaczonych jako kwas lasalowy B, C, D i E, w których jedna z grup metylowych jest zamieniona na grupę etylową oraz kwas izolasalowy, w którym końcowy pierścień tetrahydropiranyowy jest zamieniony na pierścień tetrahydrofuranowy, oraz zmieniona jest konfiguracja absolutna przy węglach C-22 i C-23. Strukturę kwasu lasalowego i jego homologów pokazano na **Rysunku 19**.

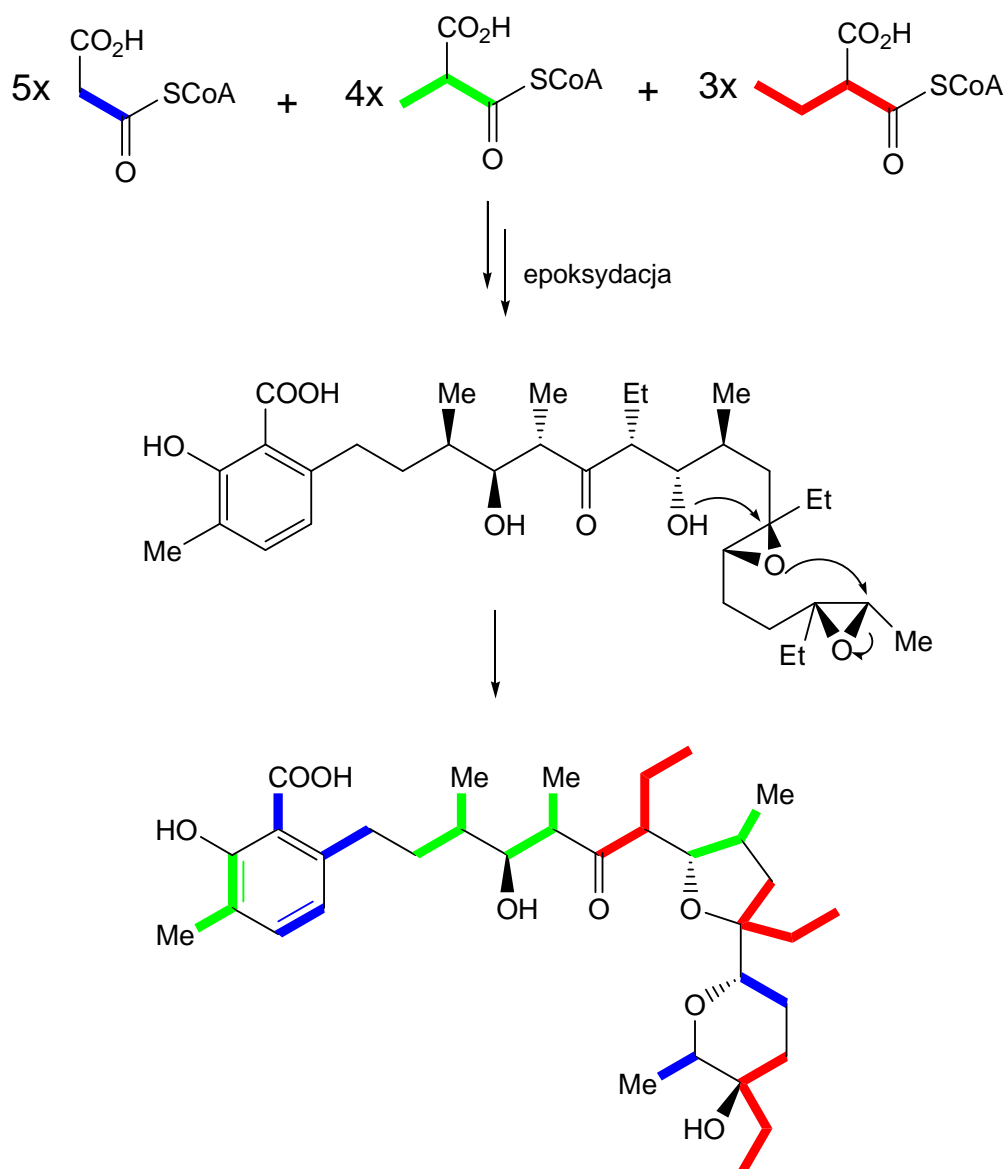
2.7.2 Biosynteza kwasu lasalowego

Kwas lasalowy jest otrzymywany w procesie biosyntezy prowadzonym w hodowli *Streptomyces lasaliensis*. Podłoże fermentacyjne użyte do tego procesu zawiera glukozę, glutaminian sodu, olej z tłuszczu, oraz wodorofosforan potasu (K₂HPO₄). Cały proces prowadzony jest przez 7 dni w temperaturze 28° C, przy jednoczesnym napowietrzaniu i mieszaniu [169-172].



Rys. 19 Struktura kwasu lasalowego i jego homologów

Prekursorami w biosyntezie kwasu lasalowego (podobnie jak w biosyntezie kwasów tłuszczowych) są malonylo-CoA, metylomalonylo-CoA oraz etylomalonylo-CoA, które są przekształcane w odpowiednie jednostki octanowe, propionianowe oraz maślanowe. Kwas lasalowy zawiera pięć reszt octanowych (kolor niebieski), cztery propionianowe (kolor zielony) oraz 3 reszty kwasu masłowego (kolor czerwony, **Rys. 20**).



Rys. 20 Biosynteza kwasu lasalowego.

Po tygodniowym okresie biosyntezy otrzymany pochodowlany zacier oczyszcza się przez odsączenie oraz ekstrakcję octanem etylu otrzymanego przesączu. Ekstrakt zatęża się, a otrzymany olej oczyszcza się poprzez krystalizację [169-172].

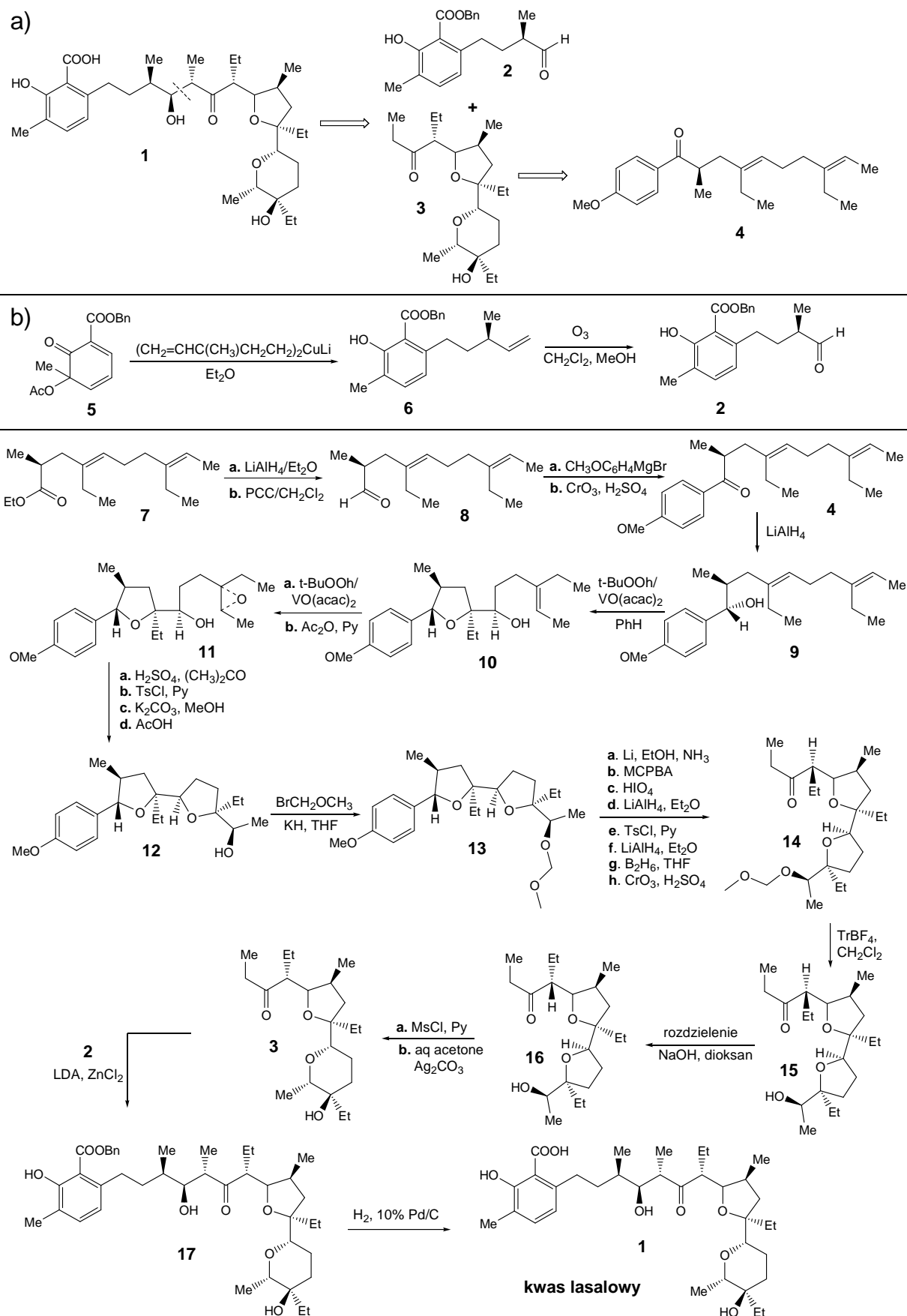
2.7.3 Synteza totalna kwasu lasalowego

Ze względu na stopień skomplikowania cząsteczki kwasu lasalowego, otrzymywanie tego związku w laboratorium okazuje się zbyt drogie w porównaniu z kosztami, jakie są ponoszone przy jego izolacji ze źródeł naturalnych, jednak opracowanie metody syntezy

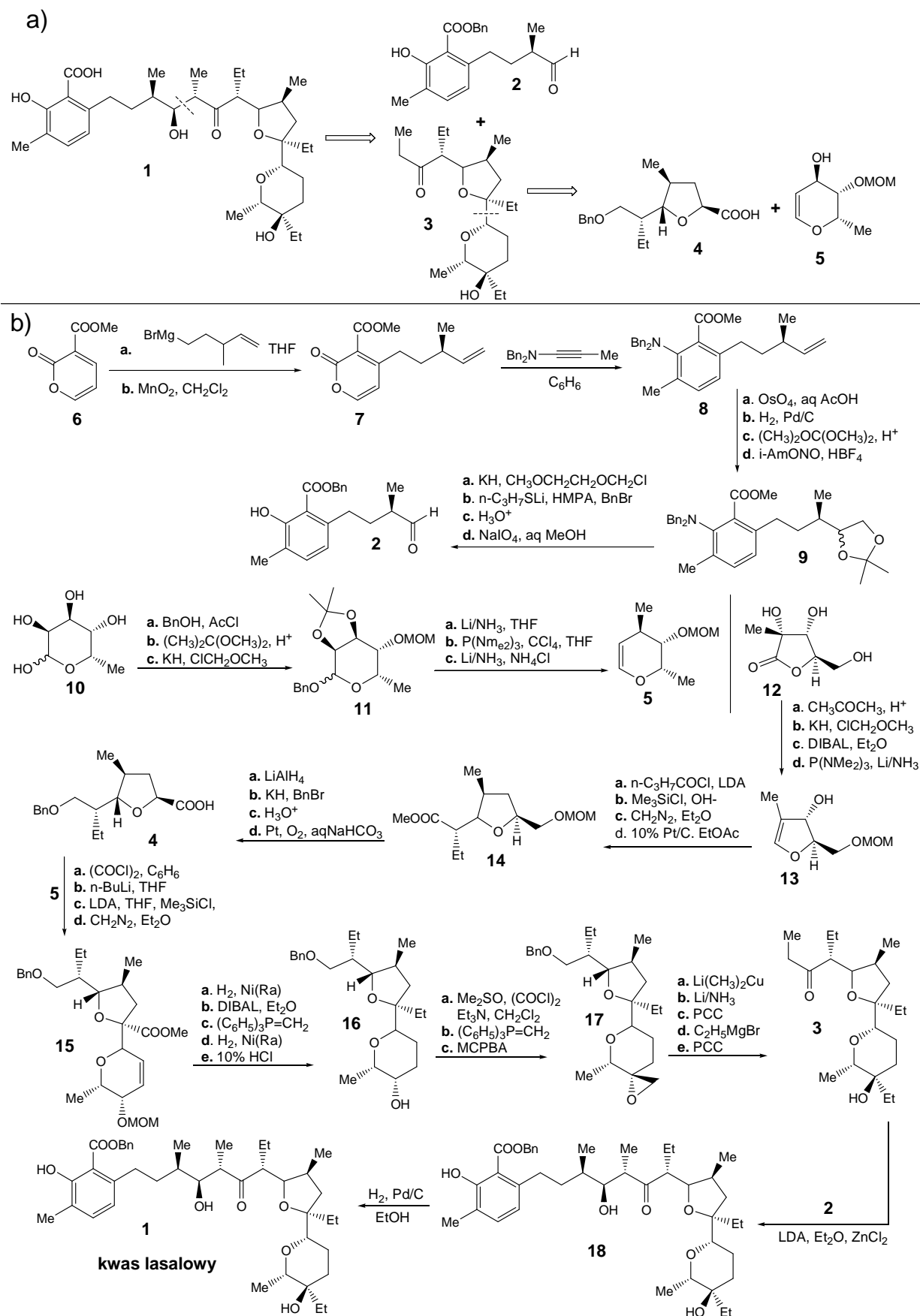
totalnej kwasu lasalowego stanowiło wyzwanie dla wielu grup chemików zajmujących się syntezą organiczną, Do tej pory opracowano dwie metody syntezy totalnej kwasu lasalowego.

Pierwsza metoda (**Rys. 21**), opracowana przez grupę Kishi'ego w 1978 r. [173] była jedną z pierwszych syntez totalnych opracowanych dla antybiotyków polieterowych. W metodzie tej wykorzystano strategię reakcji retro-aldolowej, w celu otrzymania dwóch fragmentów („prawa” i „lewa” strona kwasu lasalowego), które były syntezowane z wykorzystaniem m. in. wysoko regio- i stereokontrolowanej addycji alkoholi do epoksydów [174, 175]. W ostatnim etapie wykorzystano reakcję addycji Crama pomiędzy anionem enolanowym i aldehydem, co pozwoliło na otrzymanie odpowiedniej stereochemii produktu końcowego [176].

Drugą metodę syntezy totalnej kwasu lasalowego (**Rys. 22**) opracowano w grupie Irealnd'a w 1980 r. W tym przypadku podobnie jak w przypadku syntezy totalnej Kishi'ego zastosowano reakcję retro-aldolową, aby otrzymać dwa fragmenty kwasu lasalowego, jednakże w syntezie tych fragmentów po raz pierwszy zastosowano w kontekście syntezy antybiotyków polieterowych estrowo – enolanowe przegrupowanie Claisena [177-179]. Wykorzystanie tej reakcji pozwoliło na efektywne przekształcenie węglowodanów w jednostki tetrahydrofuranowe i tetrahydropirany potrzebne do dalszej syntezy kwasu lasalowego [180-182]. W końcowym etapie, podobnie jak w przypadku syntezy prowadzonej przez Kishi'ego zastosowano reakcję pomiędzy aldehydem, a anionem enolanowym, co pozwoliło na otrzymanie końcowego produktu o odpowiedniej stereochemii.



Rys. 21 Synteza totalna kwasu lasalowego według Kishi'ego. a) retrosynteza, b) synteza totalna

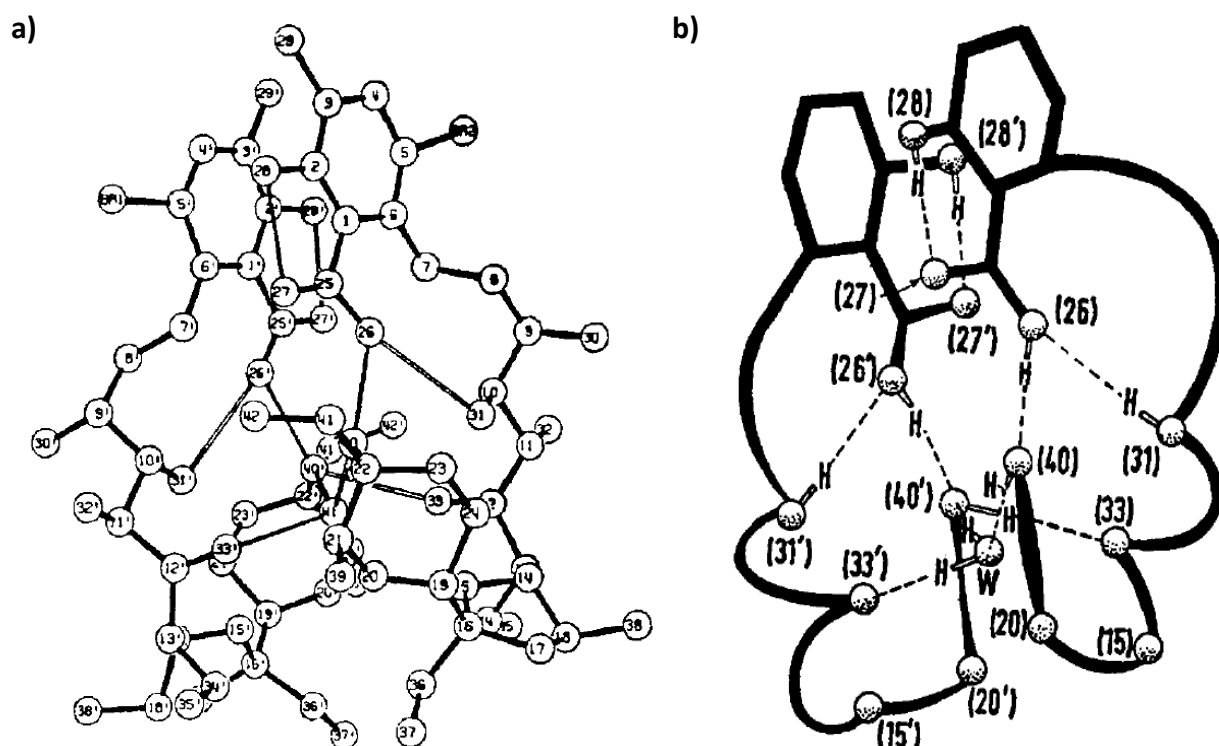


Rys. 22 Synteza totalna kwasu lasalowego według Ireland'a. a) retrosynteza, b) synteza totalna

2.7.4 Struktura kompleksów kwasu lasalowego

Kwas lasalowy tworzy kompleksy zarówno z kationami jedno- i dwuwartościowymi. Z procesem kompleksowania kationu związane jest utworzenie przez cząsteczkę kwasu lasalowego pseudo-cyklicznej struktury, która stabilizowana jest za pomocą wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych tworzonych pomiędzy grupą karboksylową na jednym końcu, oraz grupą hydroksylową na drugim końcu cząsteczki. Kompleksowany kation koordynowany jest za pomocą atomów tlenu, w związku, z czym wewnętrzna wnęka, w której znajduje się kation jest hydrofilowa. Zewnętrzna strefa kompleksu ma charakter hydrofobowy, co ułatwia przenoszenie jonów przez błony biologiczne [183].

Pomimo, że struktura soli barowej kwasu lasalowego, była historycznie pierwszą wyznaczoną przy pomocy metod krystalograficznych, to struktura nieskompleksowanego kwasu (w postaci 5-bromopochodnej) opublikowana została 2 lata później [184] (Rys. 23a).

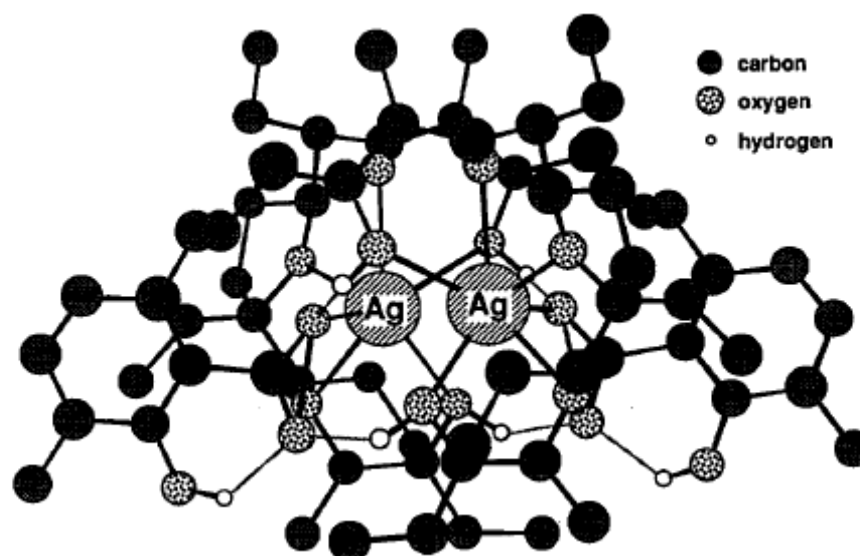


Rys. 23 a) Struktura krystalograficzna dimeru hydratu kwasu lasalowego, b) schematyczny układ wiązań wodorowych [184]

Kwas lasalowy występuje jako monohydrat, tworząc dimeryczną strukturę, w której cząsteczka wody umieszczona jest we wnęce utworzonej pomiędzy dwiema cząsteczkami kwasu lasalowego.

W tym przypadku, odwrotnie jak w przypadku soli, dimeryczna struktura tworzy się poprzez połączenie dwóch cząsteczek kwasu lasalowego w sposób „głowa do głowy”. Zaobserwowano także odmienne zachowanie protonów z terminalnej grupy hydroksylowej, ponieważ proton z jednej cząsteczki dimeru zaangażowany jest w tworzenie wewnątrzcząsteczkowego wiązania wodorowego z grupą karboksylową, podczas gdy proton z drugiej cząsteczki tworzy wiązanie wodorowe z cząsteczką wody. Schematyczny układ wiązań wodorowych pokazano na **Rysunku 23b**.

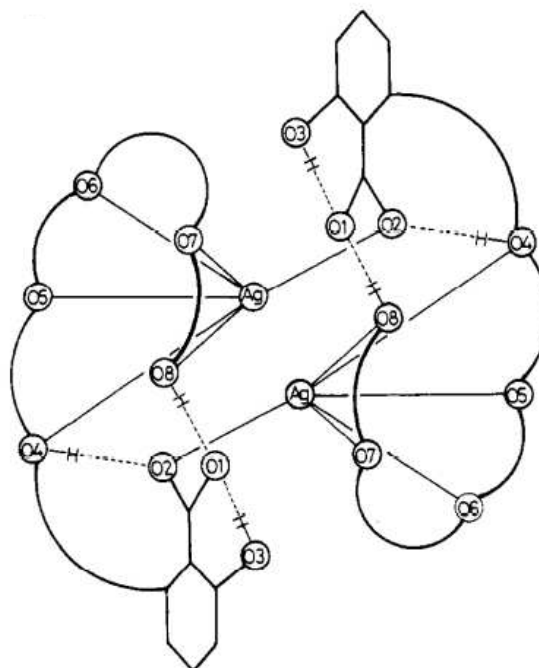
Kompleksy kwasu lasalowego z kationami jednowartościowymi wykazują tendencję do tworzenia dimerycznych struktur o stechiometrii 2:2, czyli dwie cząsteczki liganda na dwa kationy metalu. Przykładem takiej stechiometrii jest kompleks kwasu lasalowego z kationem srebra [185], którego strukturę krystalograficzną pokazano na **Rysunku 24**.



Rys. 24 Struktura krystalograficzna kompleksu kwasu lasalowego z kationem Ag^+ [183]

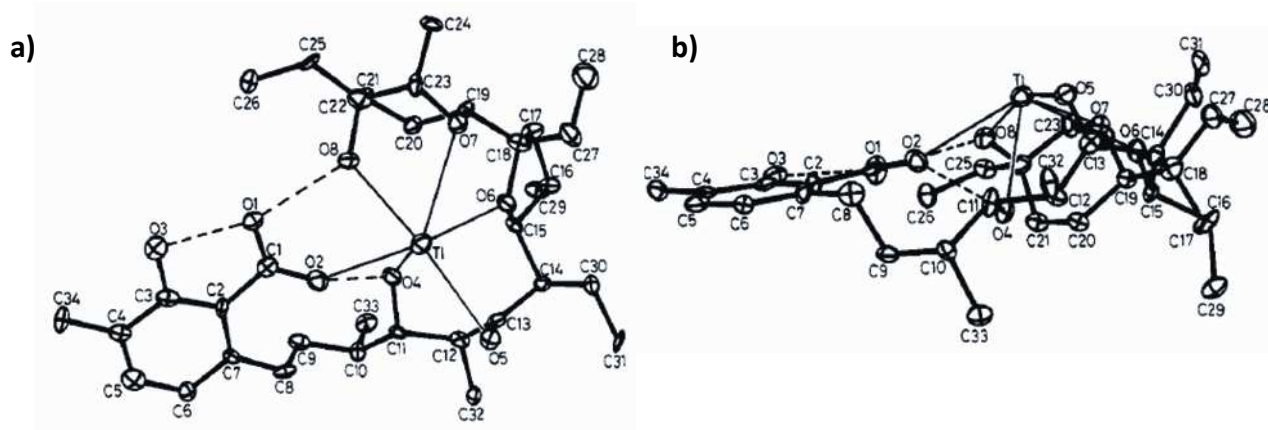
W kompleksie tym dimeryczna struktura tworzy się poprzez połączenie dwóch cząsteczek kwasu lasalowego w sposób „głowa do ogona”, a każdy z kompleksowanych kationów srebra koordynowany jest przez pięć atomów tlenu pochodzących z anionu kwasu lasalowego oraz przez karbonylowy atom tlenu sąsiedniego anionu kwasu lasalowego. Wiązanie to spełnia dwojaką funkcję, po pierwsze „spina” dwie cząsteczki kwasu lasalowego z kationem srebra, po drugie powoduje stabilizację całego kompleksu, który wykazuje

dwukrotną symetrię [185]. Schematyczny układ wiązań wodorowych w dimerycznym kompleksie przedstawia **Rysunek 25**.

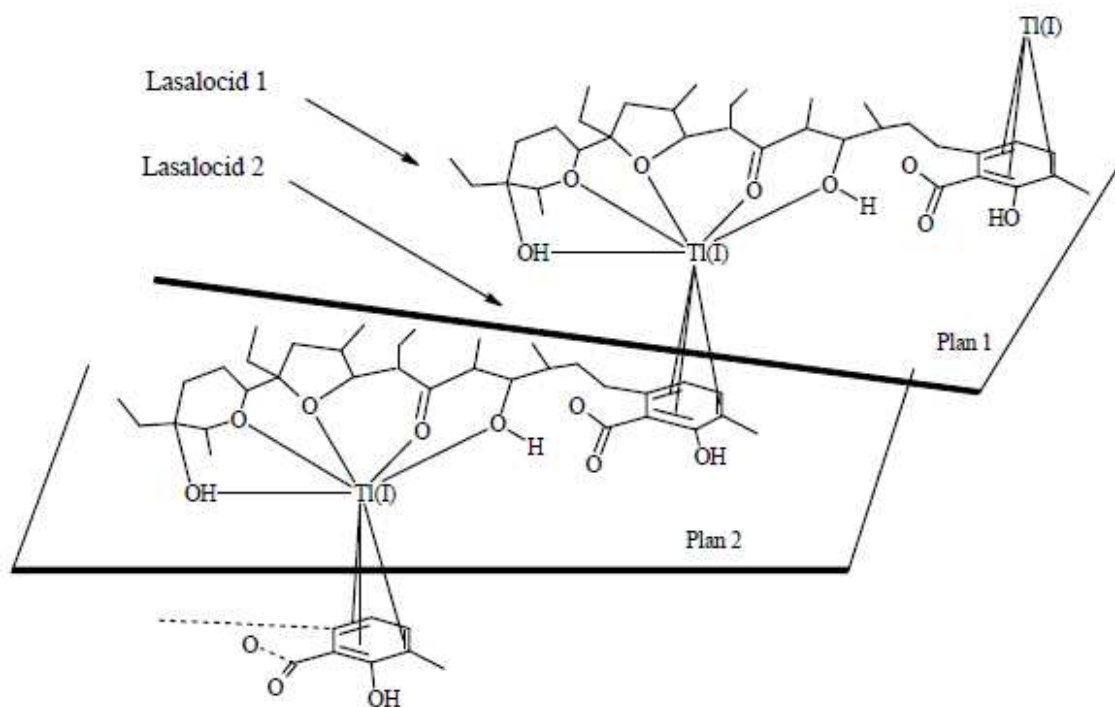


Rys. 25 Schematyczny układ wiązań wodorowych w dimerycznym kompleksie kwasu lasalowego z kationem Ag⁺ [185]

Nieco inna sytuacja obserwowana jest dla kompleksu kwasu lasalowego z kationem talu, ponieważ obserwowana jest tu zależność struktury krystalograficznej kompleksu od rozpuszczalnika użytego do krystalizacji. W przypadku użycia metanolu z dodatkiem glikolu etylenowego, tworzy się struktura monomeryczna [186], w której kation talu koordynowany jest przez sześć atomów tlenu pochodzących od anionu kwasu lasalowego, a grupa karboksylanowa jest zaangażowana w proces kompleksowania (**Rys.26**). Gdy jednak do krystalizacji użyto samego metanolu, otrzymano inną strukturę, w której kation talu jest koordynowany przez pięć atomów tlenu cząsteczki anionu kwasu lasalowego. Szóste wiązanie koordynacyjne pochodzi od pierścienia fenylowego sąsiedniej cząsteczki anionu kwasu lasalowego (**Rys. 27**). Powstaje w ten sposób dimeryczna struktura, w której – podobnie jak w przypadku kompleksu z kationem srebra – aniony kwasu lasalowego ułożone są w sposób „głowa do ogona” [187].



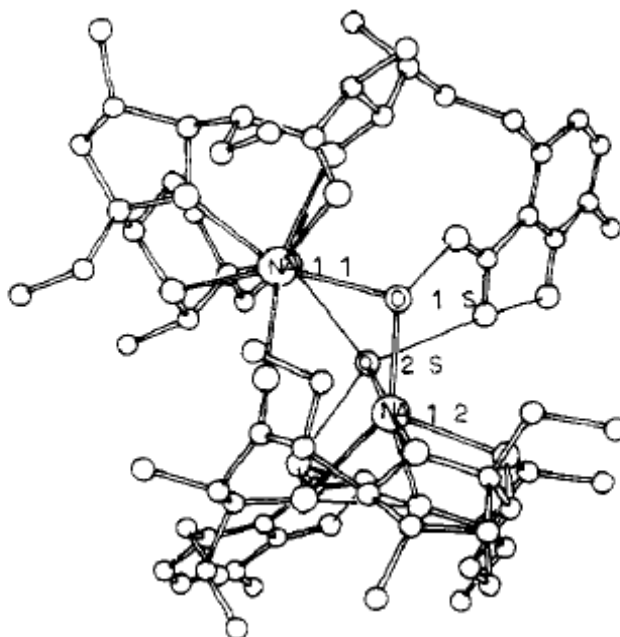
Rys. 26 Forma monomeru kompleksu kwasu lasalowego z kationem talu. a) widok z góry, b) widok z boku [186]



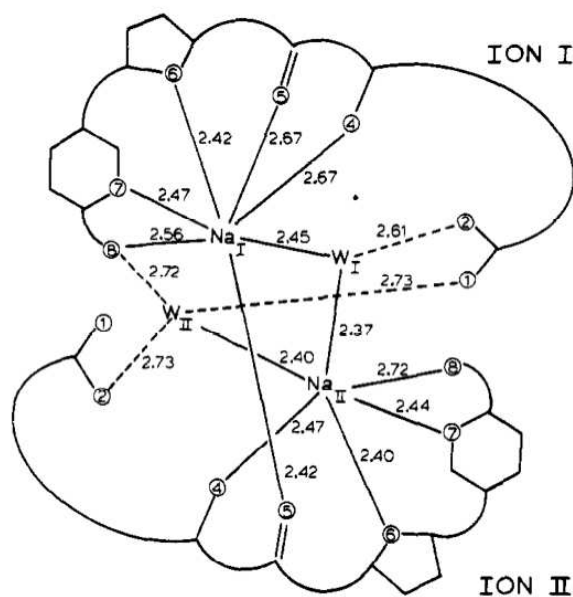
Rys. 27 oddziaływanie kationu talu – pierścienia fenyloвого stabilizujące dimer [187]

Kompleks kwasu lasalowego z kationem sodu tworzy nietypową strukturę o stechiometrii kation : kwas lasalowy : woda 2 : 2 : 2. Struktura ta rozważana jest jako stan przejściowy w procesie transformacji monomeru w dimer. Dwa kationy sodu oraz dwie cząsteczki wody ulokowane są we wnęce utworzonej przez oba aniony kwasu lasalowego. **(Rys. 28)**. Jeden kation sodu koordynowany jest przez 6 atomów tlenu pochodzących z obu anionów kwasu lasalowego oraz przez cząsteczkę wody, drugi natomiast jest koordynowany

przez cztery atomy tlenu pochodzące tylko od jednego anionu kwasu lasalowego oraz przez dwie cząsteczki wody. Widać, zatem, że jedna z dwóch cząsteczek wody związana jest równocześnie z obydwoma kationami sodu. Przymuszczalnie w kompleksie tym tylko jeden z anionów kwasu lasalowego występuje w cyklicznej formie stabilizowanej wiązaniami wodorowymi [188]. Schematyczny układ wiązań wodorowych w tym kompleksie pokazany jest na **Rysunku 29**.

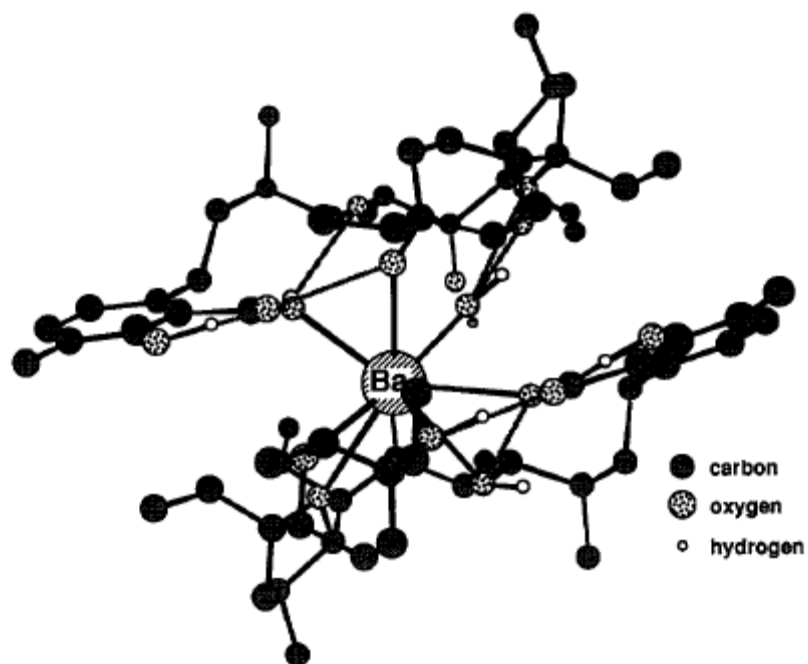


Rys. 28 Struktura krystalograficzna dimeru kompleksu kwasu lasalowego z kationem Na^+ . Atomy tlenu cząsteczek wody zaznaczone są jako O1 i O2 [188]



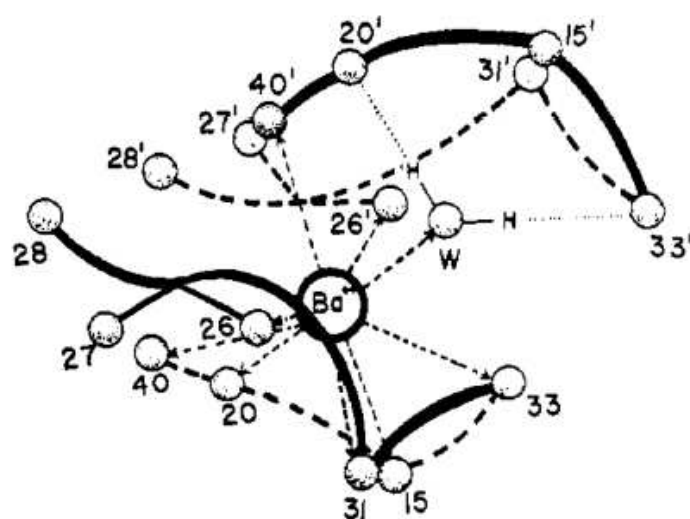
Rys. 29 Schematyczny układ wiązań wodorowych w kompleksie kwasu lasalowego z kationem Na^+ . Atomy tlenu cząsteczek wody są oznaczone jako W1 i W2 [188]

Kompleksy kwasu lasalowego z kationami dwuwartościowymi wykazują tendencję do tworzenia dimerycznych struktur o stechiometrii 2:1, czyli dwie cząsteczki liganda na jeden kation metalu. Przykładem takiej stechiometrii jest struktura kompleksu kwasu lasalowego z kationem baru [189] pokazana na **Rysunku 30**.



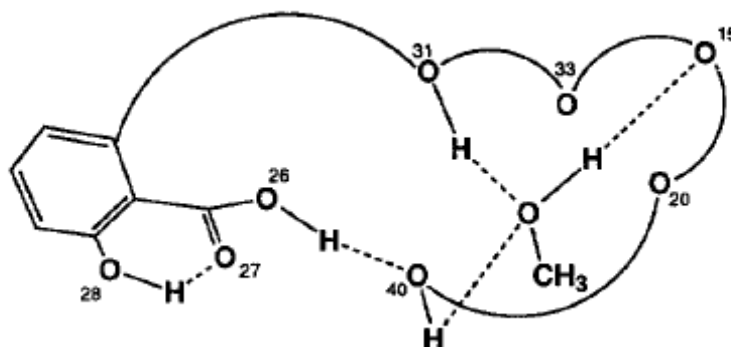
Rys. 30 Struktura krystalograficzna kompleksu kwasu lasalowego z kationem Ba²⁺ [183].

Kompleks ten występuje w postaci hydratu i wykazuje pseudo-dwukrotną symetrię. Kation baru koordynowany jest przez 8 atomów tlenu pochodzących od dwóch cząsteczek anionów kwasu lasalowego, przy czym 6 atomów pochodzi od jednej cząsteczki, a dwa pozostałe od drugiej [189]. Co istotne, także cząsteczka wody bierze udział w koordynowaniu kationu, zatem można uważać, że kation baru ma w tym przypadku liczbę koordynacyjną LK = 9 [189, 190]. Cząsteczka wody spełnia jeszcze jedną rolę w tym kompleksie, mianowicie stabilizuje jego strukturę poprzez tworzenie wiązań wodorowych z jedną cząsteczką anionu kwasu lasalowego uczestniczącą w koordynacji kationu [189]. Schematyczny układ wiązań wodorowych w tym kompleksie pokazany jest na **Rysunku 31**.



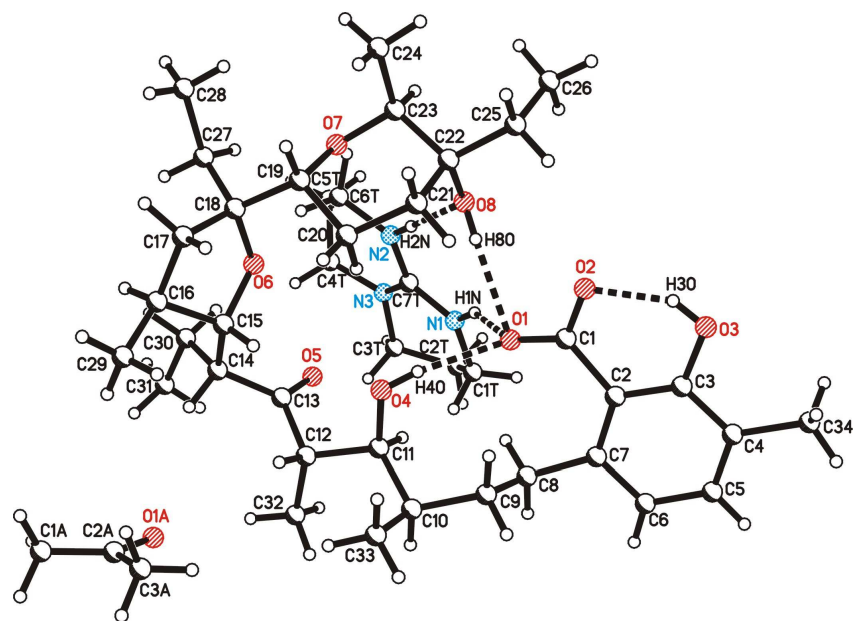
Rys. 31 Schematyczny układ wiązań wodorowych w kompleksie kwasu lasalowego z kationem Ba^{2+} .
Atom tlenu cząsteczki wody oznaczono jako W. [189]

Oprócz kationów, kwas lasalowy może tworzyć kompleksy z różnymi małymi cząsteczkami. Znany jest jego kompleks z metanolem (**Rys. 32**) [183].



Rys. 32 Kompleks kwasu lasalowego z metanolem [183]

Znana jest struktura kompleksu kwasu lasalowego z silną zasadą guanidynową TBD (1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-ene) otrzymanego w grupie badawczej profesora Brzezinskiego w postaci krystalicznej (**Rys. 33**). Kompleks ten występuje również w roztworze acetonitrylowym, jednak jego struktura jest inna niż w przypadku kompleksu w formie ciała stałego. W roztworze ketonowy atom tlenu kwasu lasalowego zaangażowany jest w tworzenie wewnątrzcząsteczkowego wiązania wodorowego, czego nie obserwuje się dla kompleksu w formie ciała stałego [191].



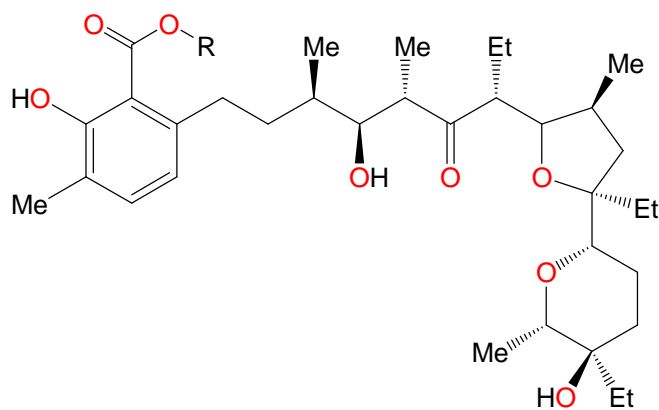
Rys. 33 Struktura krystalograficzna kompleksu kwasu lasalowego z TBD z zainkludowaną cząsteczką acetonu [191].

2.7.5 Pochodne kwasu lasalowego

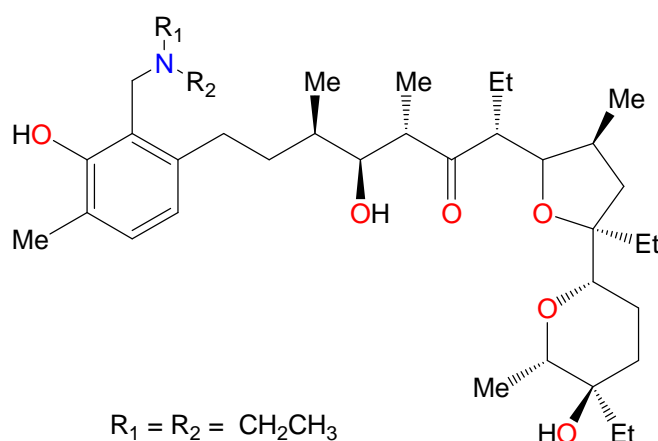
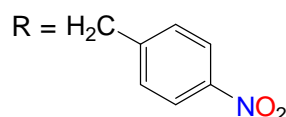
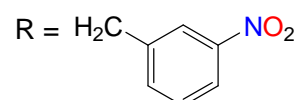
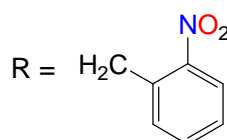
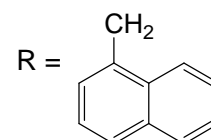
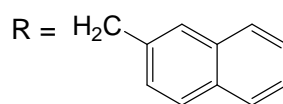
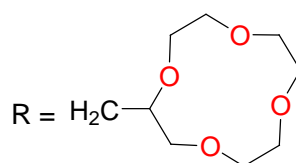
Praktycznie wszystkie poznane dotychczas pochodne kwasu lasalowego zostały otrzymane w wyniku przekształcenia grupy karboksylowej. Większość z tych pochodnych to estry [192-207], pojawiają się też doniesienia na temat zasad Mannicha otrzymanych z kwasu lasalowego [208, 209]. Struktury pochodnych pokazano na **Rysunku 34**

Dla większości otrzymanych estrów kwasu lasalowego zbadano preferencję kompleksowania kationów i w każdym przypadku powinowactwo do kationu Li^+ było największe. Podobną zależność zaobserwowano dla zmodyfikowanego kwasu lasalowego zawierającego zasadę Mannicha [209].

Otrzymane pochodne były także badane pod kątem aktywności biologicznej, jednak wykazywały niższą aktywność w porównaniu do niemodyfikowanego kwasu.



$R = \text{CH}_3$
 $R = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$
 $R = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$
 $R = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$
 $R = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$
 $R = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$
 $R = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{S-SCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$
 $R = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$
 $R = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$
 $R = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$
 $R = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$



$R_1 = R_2 = \text{CH}_2\text{CH}_3$

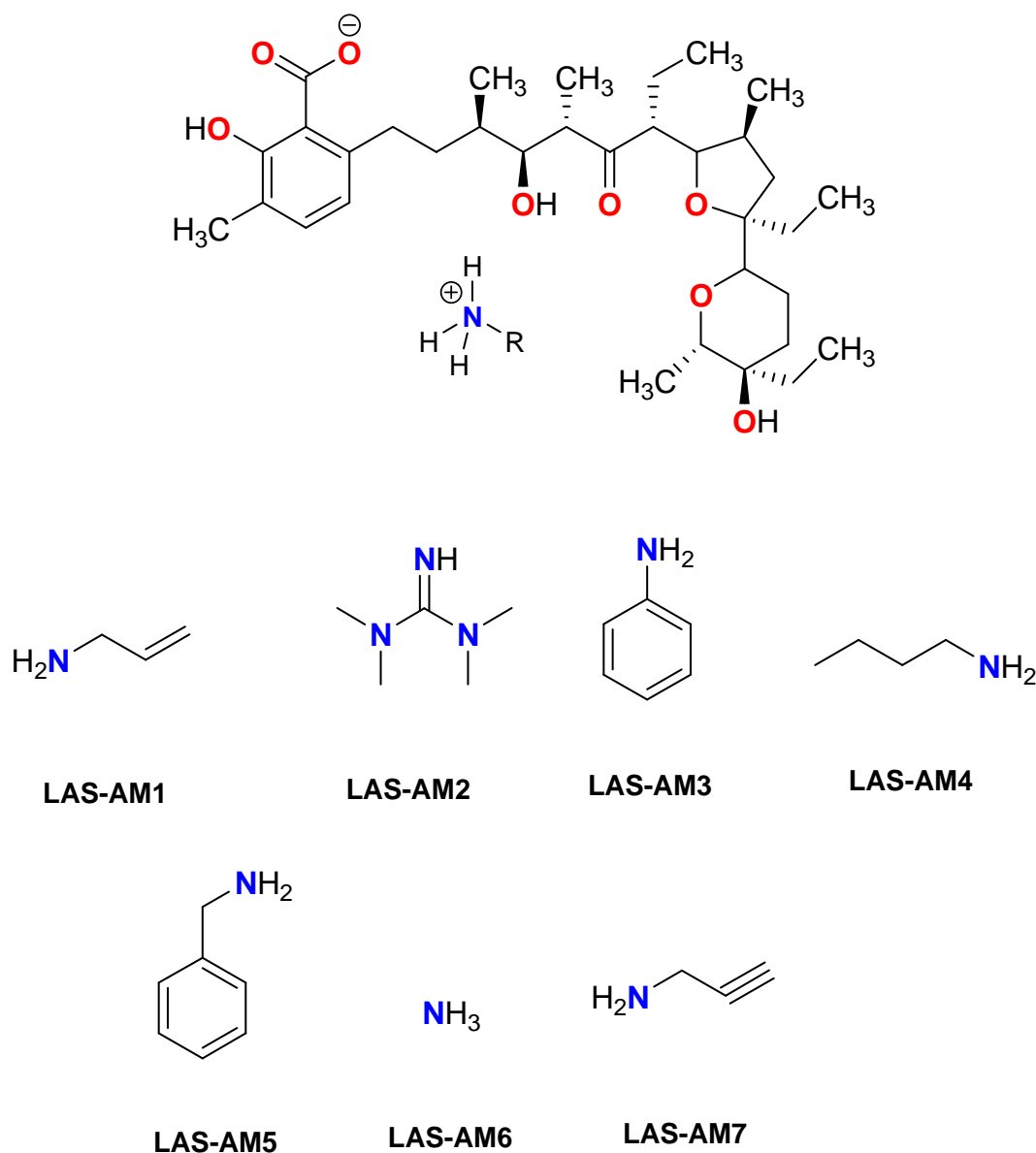
$R_1 = R_2 =$

Rys. 34 Struktury pochodnych kwasu lasalowego

3. Badania własne

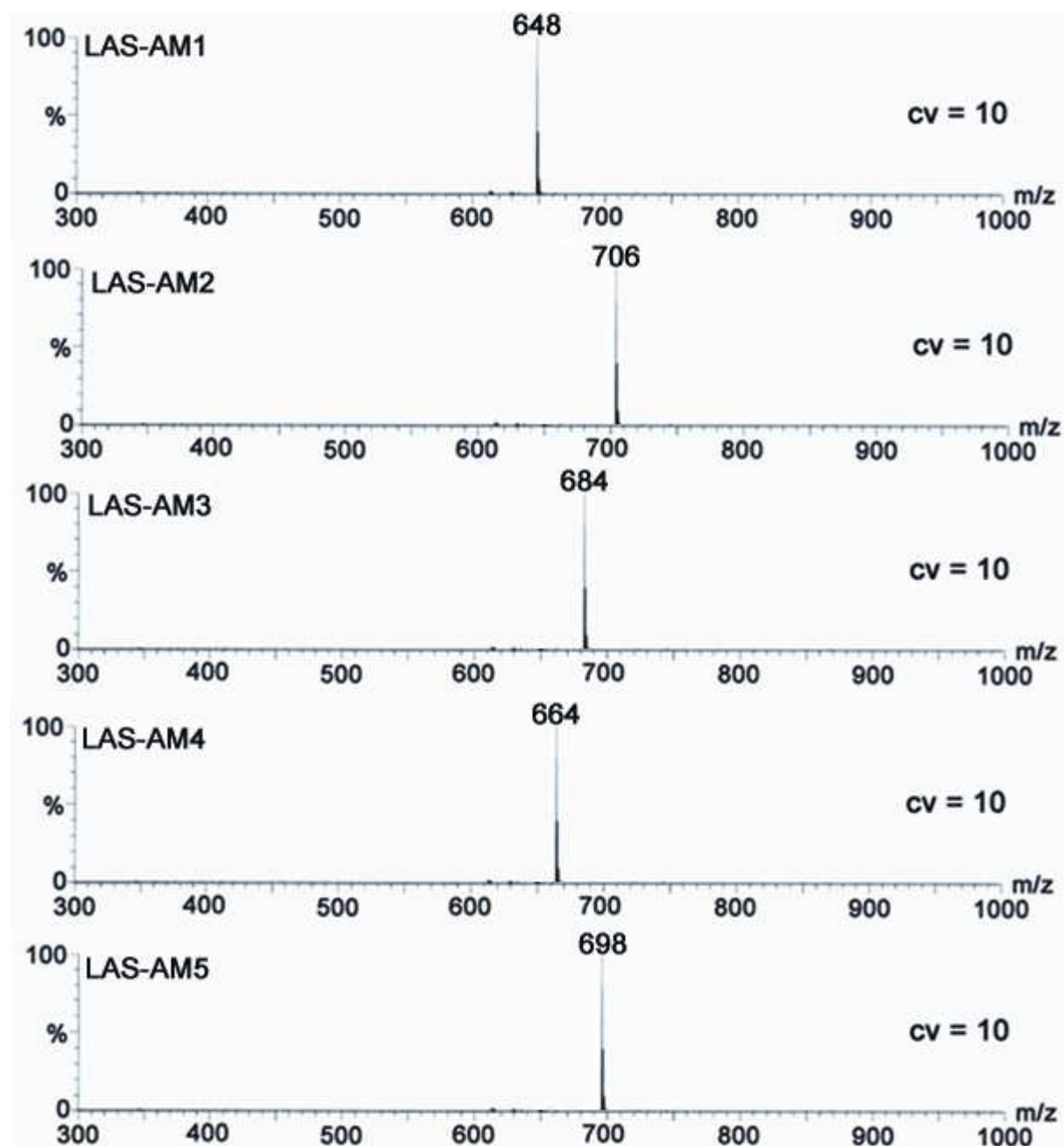
3.1 Stechiometria kompleksów kwasu lasalowego z aminami

Aminy wybrane do tworzenia kompleksów z kwasem lasalowym (**Rys. 35**) zawierały w swojej strukturze różne ugrupowania. Były to: amina alifatyczna (*N*-butyloamina), aminy zawierające wiązania nienasycone (aliloamina, propargiloamina), aminy aromatyczne i alifatyczno-aromatyczne (anilina, benzyloamina), których dodatek mógłby zwiększyć rozpuszczalność otrzymanych kompleksów w błonach biologicznych oraz amoniak i zasadę azotową 1,1,3,3-tetrametyloguanidynę, która jako silna zasada łatwiej deprotonowałaby kwas lasalowy niż pozostałe aminy.

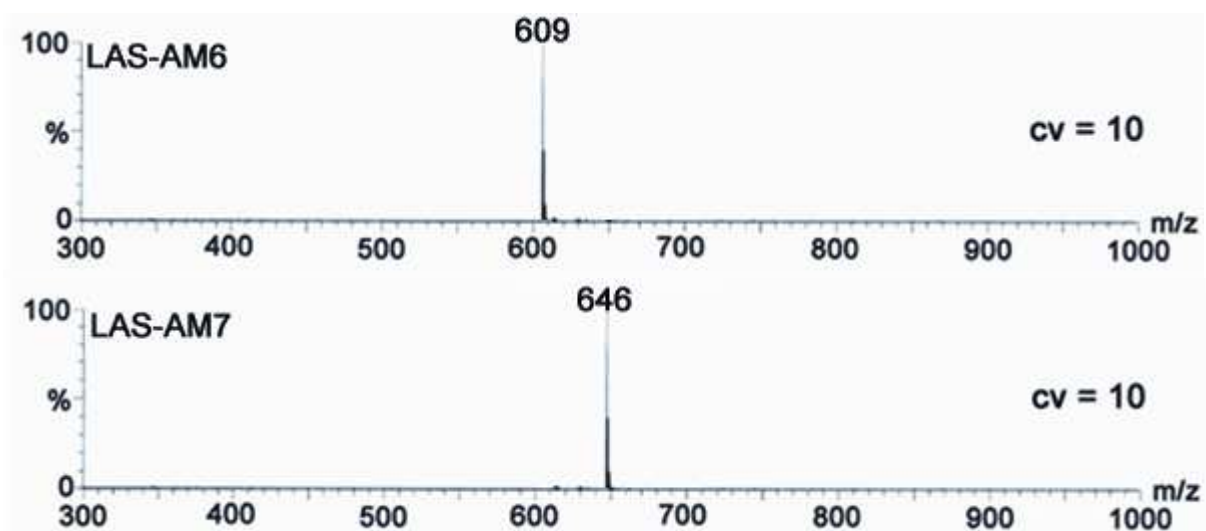


Rys. 35 Wzory otrzymanych kompleksów kwasu lasalowego.

Otrzymane przez mnie kompleksy tworzą się w wyniku transferu protonu z grupy karboksylowej kwasu lasalowego do grupy aminowej odpowiedniej aminy. Tworzenie się kompleksów kwasu lasalowego z aminami w stosunku stechiometrycznym 1:1 potwierdzają widma spektrometrii mas ESI-MS, pokazane na **rysunkach 36 i 37**, w których obserwowany jest tylko jeden pik pochodzący od odpowiedniego proponowanego kompleksu.



Rys. 36 Widma ESI-MS kompleksów LAS-AM1 – LAS-AM5 zarejestrowane przy napięciu stożka 10 V



Rys. 37 Widma ESI-MS kompleksów LAS-AM6 – LAS-AM7 zarejestrowane przy napięciu stożka 10 V

3.2 Badania krystalograficzne kompleksów kwasu lasalowego z aminami

Podczas syntezy kompleksów kwasu lasalowego z aminami zauważyłem słabą rozpuszczalność otrzymywanych związków w niektórych rozpuszczalnikach. Właściwość tę postanowiłem wykorzystać do uzyskania kompleksów w postaci krystalicznej, co pozwoliłoby jednoznacznie określić ich struktury. W sześciu przypadkach udało mi się otrzymać kryształy poprzez krystalizację z acetonitrylu. Wyjątek stanowi tutaj kompleks LAS-AM2 (z 1,1,3,3, - tetrametyloguanidyną), który otrzymałem w postaci krystalicznej poprzez krystalizację z acetonu.

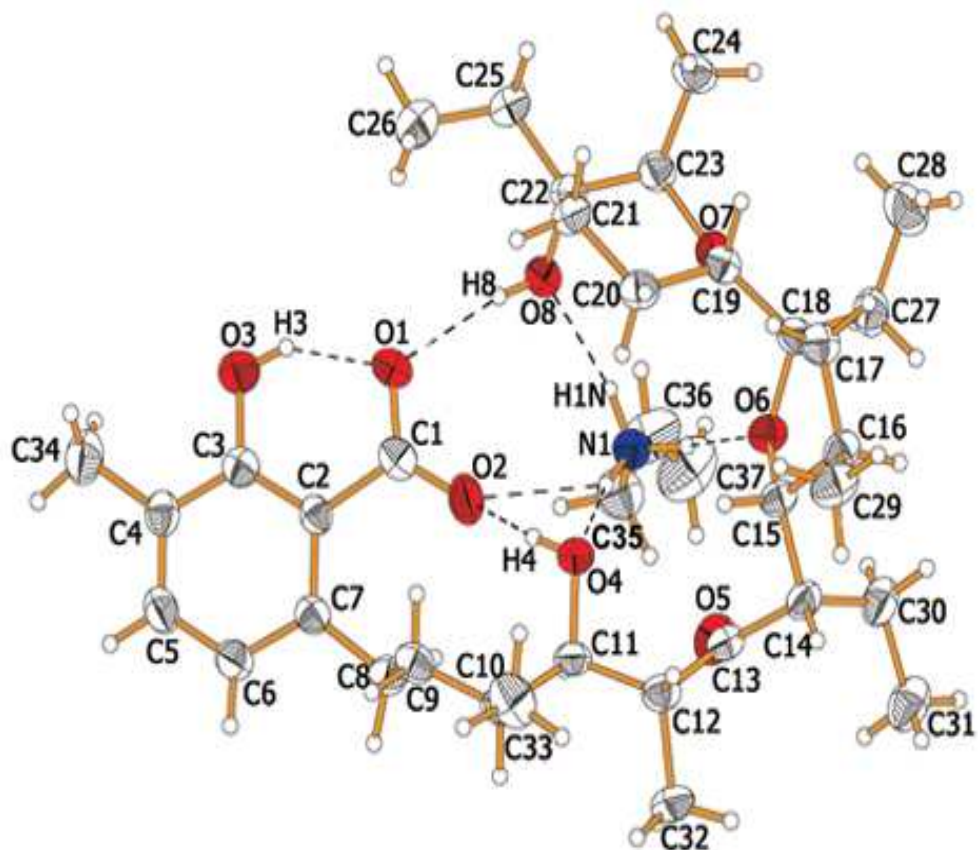
Badania krystalograficzne otrzymanych kompleksów zostały przeprowadzone przy współpracy z prof. Janem Janczakiem z Instytutu Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych PAN we Wrocławiu oraz przy współpracy z dr Małgorzatą Ratajczak-Sitarz i prof. Andrzejem Katrusiakiem z Zakładu Chemii Materiałów Wydziału Chemii UAM. Struktury krystalograficzne otrzymanych kompleksów przedstawione są na **Rysunkach 38-44**.

W wyniku badań krystalograficznych wykazano, że grupa karboksylowa kwasu lasalowego we wszystkich otrzymanych kompleksach jest zdeprotonowana, a grupa aminowa odpowiedniej aminy jest sprotonowana i cząsteczka aminy jest kompleksowana we wnęce utworzonej przez anion kwasu lasalowego. Ustalono także, że pseudo-cykliczna struktura anionu kwasu lasalowego stabilizowana jest za pomocą wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych tworzonych pomiędzy zdeprotonowaną grupą karboksylową, a grupami hydroksylowymi O(3)H, O(4)H i O(8)H. Wiązanie wodorowe tworzone pomiędzy grupą hydroksylową O(3)H, a grupą karboksylanową okazało się być wiązaniem najkrótszym we wszystkich kompleksach. Jego długość wynosząca od 2.421 Å dla kompleksu LAS-AM6 do 2.461 Å dla kompleksu LAS-AM7, klasyfikowałaby to wiązanie w grupie bardzo silnych wiązań wodorowych, jednakże kąt tworzony przez te wiązania, którego wartość kształtuje się w granicach od 146 do 165° pozwala uzasadnia zaliczenie go do jedynie średnio-silnych wiązań wodorowych. Długości pozostałych wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych wynoszą od 2.636 Å do 2.812 Å dla wiązania tworzonych pomiędzy grupą hydroksylową O(4)H, a grupą karboksylanową oraz od 2.674 Å do 2.916 Å dla wiązania tworzonych pomiędzy grupą hydroksylową O(8)H, a grupą karboksylanową. Długości tych wiązań

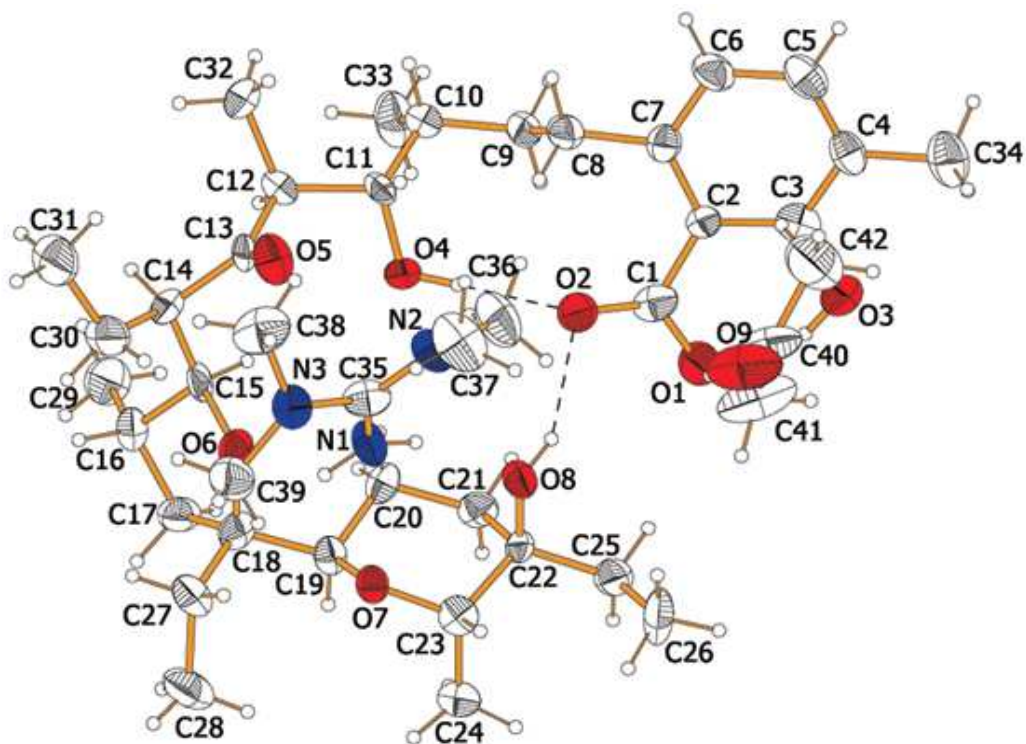
wskazują na to, że są one względnie słabe. Parametry wiązań wodorowych w badanych kompleksach zestawione są w **Tabeli 4**.

Międzycząsteczkowe wiązania wodorowe, stabilizujące strukturę kompleksu tworzone są pomiędzy atomami wodoru sprotonowanej grupy aminowej, a atomami tlenu grup eterowych, hydroksylowych i karboksylanowych atomami tlenu obecnymi w cząsteczce anionu kwasu lasalowego. Ilość i parametry tych wiązań zależne są mocno od struktury kompleksowanej aminy. W strukturze kompleksu LAS-AM2 występują tylko dwa międzycząsteczkowe wodorowe (tworzone z eterowymi atomami tlenu O6 i O8) ze względu na obecność dwóch atomów wodoru przy sprotonowanym atomie azotu. Dla kompleksów LAS-AM3, LAS-AM4 i LAS-AM7 możliwe jest utworzenie trzech, a dla kompleksów LAS-AM1 i LAS-AM5 czterech międzycząsteczkowych wiązań wodorowych. W strukturze kompleksu LAS-AM6 możliwe jest utworzenie pięciu wiązań wodorowych, ze względu na obecność czterech atomów wodoru przy sprotonowanym atomie azotu.

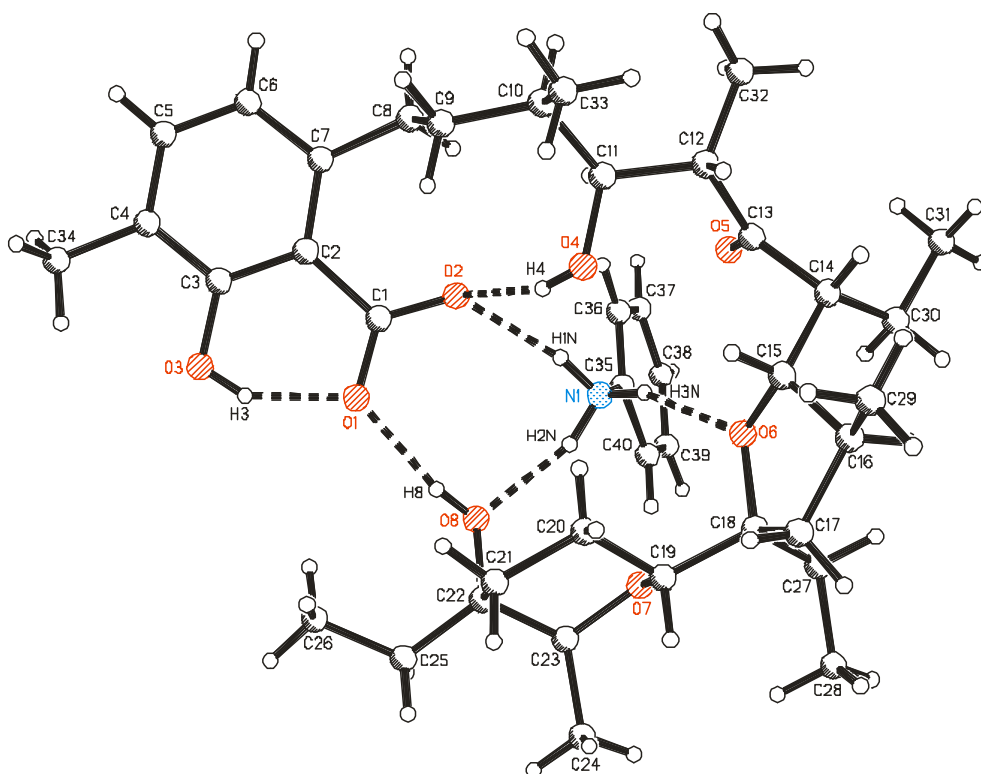
Długość międzycząsteczkowych wiązań wodorowych tworzonych pomiędzy anionem kwasu lasalowego a sprotonowaną cząsteczką aminy przyjmuje wartości w przedziale 2,745 – 3,225 Å a więc są to wiązania należące do grupy słabych wiązań wodorowych, co potwierdzają także kąty tworzone przez te wiązania, których wartość kształtująca się w zakresie 130 - 168° jest charakterystyczna dla słabych wiązań wodorowych.



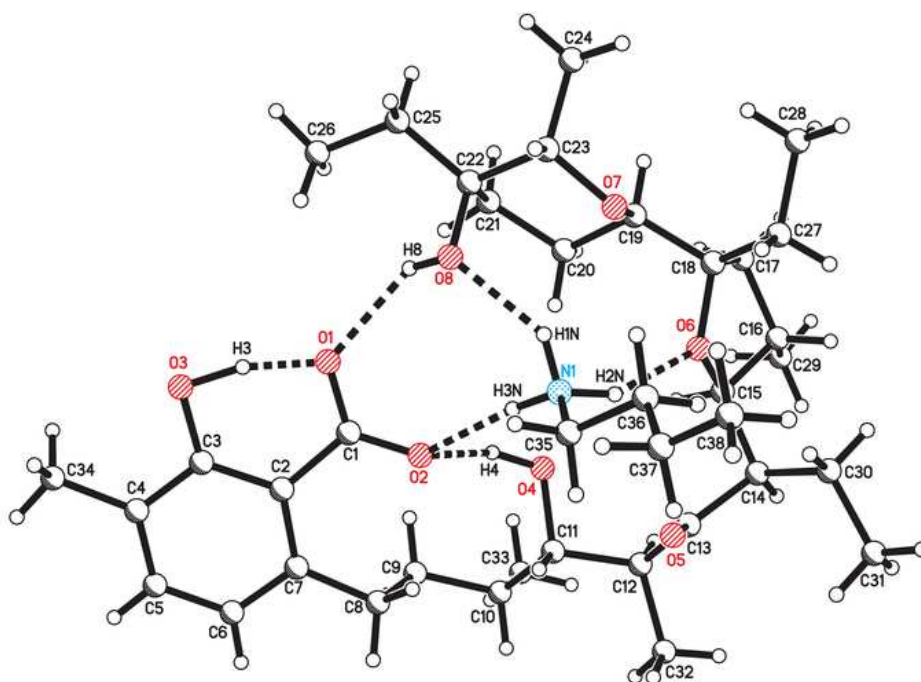
Rys. 38 Struktura krystalograficzna kompleksu LAS-AM1.



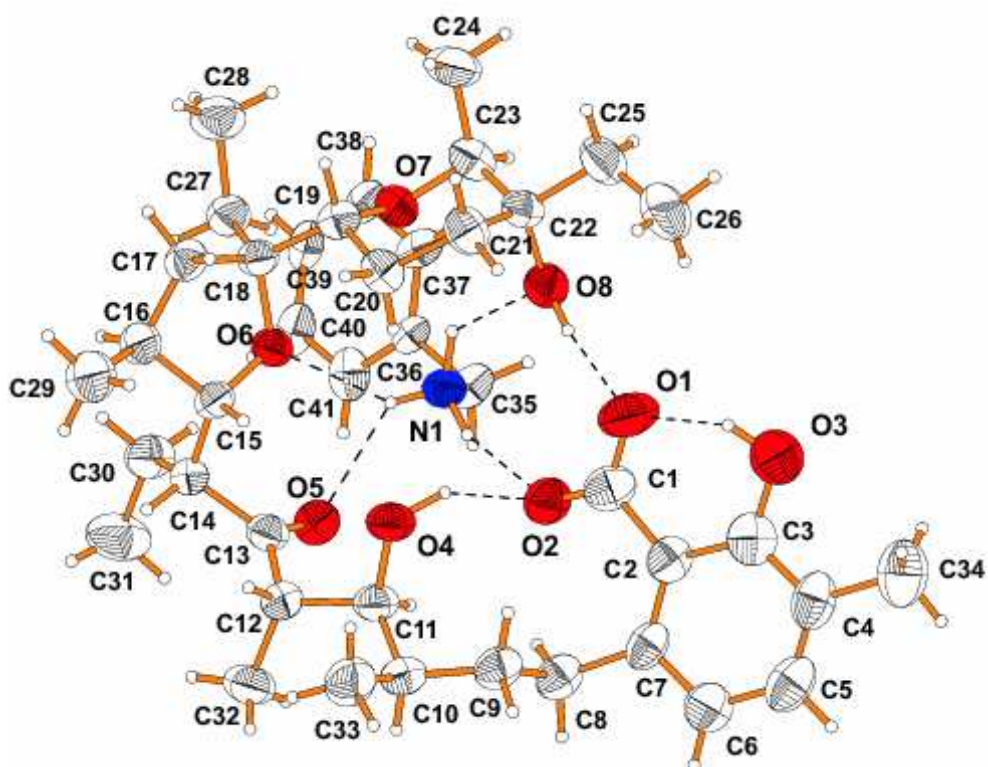
Rys. 39 Struktura krystalograficzna kompleksu LAS-AM2 z zainkludowaną cząsteczką acetonu.



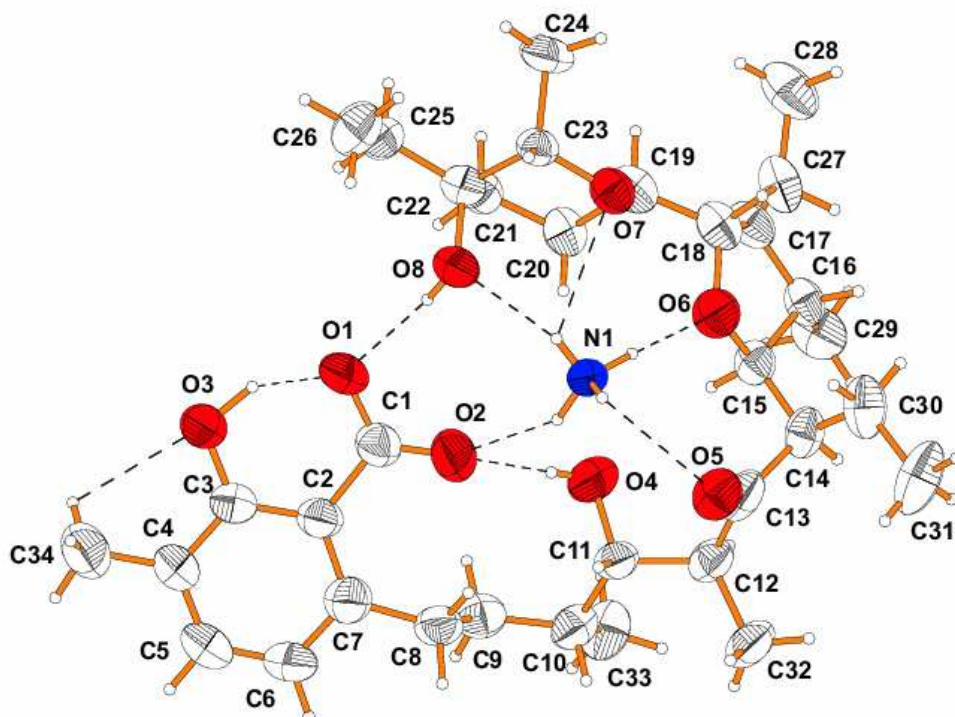
Rys. 40 Struktura krystalograficzna kompleksu LAS-AM3.



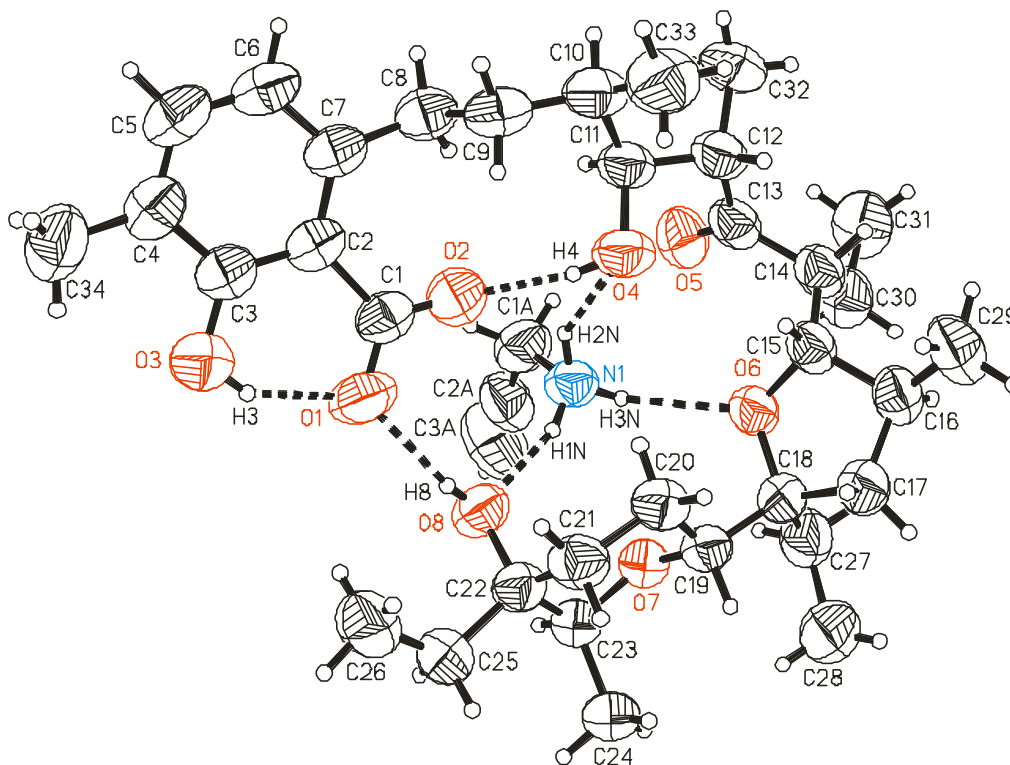
Rys. 41 Struktura krystalograficzna kompleksu Las-AM4.



Rys. 42 Struktura krystalograficzna kompleksu LAS-AM5.



Rys. 43 Struktura krystalograficzna kompleksu Las-AM6.



Rys. 44 Struktura krystalograficzna kompleksu LAS-AM7.

Tabela 4 Parametry wiązań wodorowych (Å, °) kompleksów kwau lasalowego

Wiązanie	Odległość donor-proton (D—H)	Odległość proton-akceptor (H···A)	Długość wiązania (D···A)	Kąt wiązania <(D—H···A)
LAS-AM1				
O3—H3···O1	0.82(2)	1.73(2)	2.452(3)	146(4)
O4—H4···O2	0.82(2)	1.89(1)	2.664(3)	158(3)
O8—H8···O1	0.82(2)	1.95(1)	2.712(3)	155(3)
N1—H1A···O8	0.89	1.88	2.757(3)	167
N1—H1C···O2	0.89	2.23	2.845(3)	126
N1—H1B···O6	0.89	2.24	2.958(3)	137
N1—H1C···O4	0.89	2.37	3.225(3)	160
LAS-AM2				
O3—H3···O1	0.82	1.69	2.428(4)	149
O4—H4···O2	0.88	1.93	2.803(4)	177
O8—H8···O2	0.82	2.05	2.805(4)	154
N1—H1N···O8	0.86	2.07	2.903(4)	162
N1—H2N···O6	0.86	2.36	2.933(4)	125

Wiązanie	Odległość donor-proton (D—H)	Odległość proton-akceptor (H…A)	Długość wiązania (D…A)	Kąt wiązania <(D—H…A)
LAS-AM3				
O3—H3…O1	0.82	1.72	2.448(2)	148
O4—H4…O2	0.82	1.96	2.740(2)	159
O8—H8…O1	0.82	1.88	2.674(2)	163
N1—H2N…O8	0.91(2)	1.88(2)	2.745(2)	160(2)
N1—H1N…O2	0.90(2)	1.94(2)	2.820(2)	168(2)
N1—H3N…O6	0.85(2)	2.13(2)	2.935(2)	159(2)
LAS-AM4				
O3—H3…O1	1.08(4)	1.39(4)	2.460(2)	165
O4—H4…O2	1.00(3)	1.78(3)	2.707(2)	153
O8—H8…O1	0.90(3)	2.03(3)	2.717(2)	132
N1—H1N…O8	0.95(3)	1.96(2)	2.784(2)	144
N1—H2N…O6	0.97(3)	2.08(3)	2.954(2)	150
N1—H3N…O2	0.96(4)	1.86(4)	2.813(2)	168
LAS-AM5				
O1—H1…O2	0.92(5)	1.68(5)	2.484(4)	145(5)
O4—H4…O3	0.98(3)	1.92(4)	2.762(4)	142(3)
O8—H8…O2	0.98(4)	1.74(4)	2.686(4)	162(3)
N1—H1N…O3	0.95(3)	1.98(3)	2.888(4)	160(3)
N1—H2N…O8	0.97(3)	2.05(3)	2.766(4)	129(3)
N1—H3N…O6	0.89(3)	2.22(3)	2.972(4)	141(3)
N1—H3N…O5	0.89(3)	2.23(3)	2.904(4)	132(3)
LAS-AM6				
O3—H3…O1	1.01(5)	1.50(5)	2.421(4)	149(4)
O8—H8…O1	0.86(4)	1.96(4)	2.812(4)	167(4)
N1—H1A…O3	1.05(5)	1.89(5)	2.916(5)	166(4)
N1—H1B…O8	0.81(4)	2.02(4)	2.795(5)	162(3)
N1—H1B…O7	0.81(4)	2.61(4)	3.085(5)	119(3)
N1—H1C…O2	0.95(6)	2.13(6)	2.979(5)	148(4)
N1—H3D…O6	0.96(7)	1.96(8)	2.908(5)	171(6)
LAS-AM7				
O3—H3…O1	0.82	1.73	2.461(2)	148(4)
O4—H4…O2	0.82	1.83	2.636(2)	168(4)
O8—H8…O1	0.82	1.94	2.721(2)	160(4)
N1—H1N…O8	0.83(3)	1.99(3)	2.766(2)	155(2)
N1—H2N…O4	0.97(4)	2.29(4)	3.137(2)	145(3)
N1—H3N…O6	0.84(3)	2.21(3)	2.934(2)	143(3)

3.3 Badania NMR kompleksów kwasu lasalowego z aminami

Jednym z celów mojej pracy było określenie struktury otrzymanych kompleksów kwasu lasalowego z aminami w roztworze na podstawie analizy widm magnetycznego rezonansu jądrowego). Rozpuszczalnikiem używanym w badaniach był deuterowany chloroform (CDCl_3). Przykładowe widmo ^1H NMR kwasu lasalowego i jego kompleksów z aminami zostało pokazane na **Rysunku 45**, a widmo ^{13}C NMR kwasu lasalowego i jego kompleksów z aminami na **Rysunku 46**. W celu jednoznacznego przypisania położenia poszczególnych sygnałów w widmach ^1H NMR i ^{13}C NMR kwasu lasalowego i jego kompleksów z aminami wykorzystałem dwuwymiarowe techniki korelacyjne COSY, HETCOR i HMBC. Przykładowe widma HETCOR oraz COSY kwasu lasalowego i jego kompleksów zostały pokazane na Rysunkach **47-52**. Wartości przesunięć chemicznych sygnałów pochodzących od wybranych atomów węgla oraz wodoru w widmach kompleksów LAS-AM1 do LAS-AM7 podane zostały w **Tabelach 5-11**.

W widmie kwasu lasalowego protony grup O(4)H i O(8)H obserwowane są w postaci jednego sygnału, natomiast w widmach wszystkich badanych kompleksów protony grup hydroksylowych występują w postaci oddzielnych sygnałów. Wartość przesunięcia chemicznego wyżej wymienionych protonów w dużym stopniu zależy od rodzaju kompleksowanej aminy, co zostało pokazane na **Rysunku 45**. Wartości przesunięć chemicznych protonów grup hydroksylowych dostarczają informacji na temat struktury tworzonych kompleksów, a także na temat wiązań wodorowych, w których tworzenie zaangażowane są te grupy.

Analiza przesunięć sygnałów ^1H NMR pozwala sformułować następujące wnioski:

- 1) W widmie kwasu lasalowego sygnały pochodzące od protonów grup hydroksylowych O(4)H i O(8)H występują w postaci jednego szerokiego sygnału przy 6.14 ppm, natomiast sygnał od grupy O(3)H obserwowany jest przy 11.84 ppm ze względu na tworzenie silnego wewnątrzcząsteczkowego wiązania wodorowego z grupą karboksylową
- 2) Wartości przesunięć chemicznych grup hydroksylowych kwasu lasalowego ulegały zmianie po utworzeniu kompleksów z poszczególnymi aminami, a charakter tych

zmian wskazuje na zależność pomiędzy strukturą kompleksu a rodzajem kompleksowanej aminy.

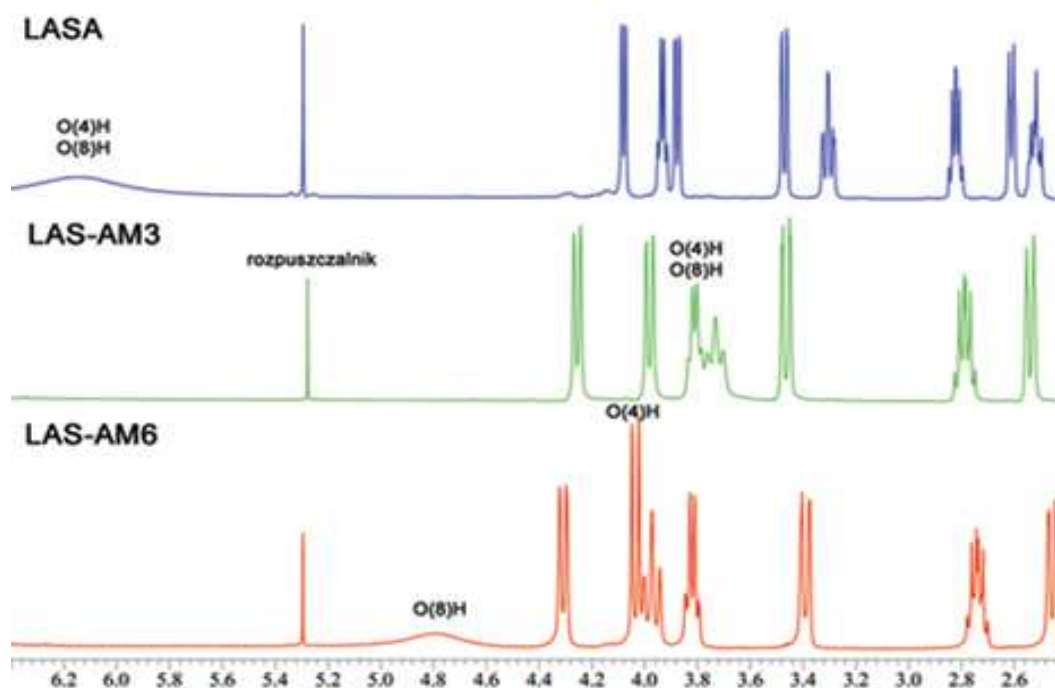
- 3) W widmach ^1H NMR badanych kompleksów sygnał od protonu grupy O(3)H obserwowany był w zakresie od 11.95 ppm dla kompleksu LAS-AM3 do 16.35 ppm dla kompleksu LAS-AM2
- 4) Sygnał protonu grupy hydroksylowej O(4)H dla badanych kompleksów obserwowany był w zakresie od 3.80 ppm dla kompleksu LAS-AM3 do 4.94 ppm dla kompleksu LAS-AM1
- 5) Sygnał protonu grupy hydroksylowej O(8)H w badanych kompleksach pojawiał się w zakresie od 2.76 ppm dla kompleksu LAS-AM1 do 4.80 ppm dla LAS-AM6
- 6) Sygnał protonów sprotonowanej grupy aminowej obserwowany był w zakresie od 6.94 ppm dla kompleksu LAS-AM6 do 9.34 ppm dla LAS-AM3.

Różnice przesunięć chemicznych sygnałów pochodzących od grup OH w widmach ^1H NMR kwasu lasalowego i w widmach kompleksów z aminami mogą być określone parametrem Δ ($\Delta = \delta_{\text{kompleks}} - \delta_{\text{kwas lasalowy}}$). Wartości parametru Δ zestawiono w **Tabeli 12**. Dodatnia wartość parametru Δ sugeruje, że jądro atomu wodoru silniej oddziałuje z grupą protonoakceptorową, a co za tym idzie wiązanie wodorowe tworzone przez grupę OH jest silniejsze w strukturze kompleksu niż w przypadku kwasu lasalowego. Ujemna wartość parametru Δ mówi o osłabieniu siły wiązania wodorowego tworzonego przez grupę hydroksylową.

Ustalono, że powstałe różnice w położeniach sygnałów pochodzących od grup hydroksylowych zależne są od natury kompleksowanej aminy. Dla grupy O(3)H największą różnicę przesunięć chemicznych, wynoszącą 4.51 ppm obserwuje się dla kompleksu LAS-AM2. Taka zmiana przesunięcia chemicznego tłumaczona może być znaczącym wzmocnieniem siły wiązania wodorowego tworzonego przez tę grupę w kompleksie LAS-AM2. Najmniejszą różnicę natomiast obserwuje się dla kompleksu LAS-AM3. Wynosi ona 0.11 ppm, co sugeruje, że siła wiązania wodorowego tworzonego przez tę grupę jest podobna zarówno w kwasie lasalowym jak i w kompleksie.

W przypadku grupy O(4)H wartość parametru Δ ma znak ujemny i wynosi od -1.20 ppm do -2.34 ppm, co oznacza, że w kompleksach kwasu lasalowego z aminami wiązanie wodorowe tworzone przez tę grupę ulega osłabieniu. Podobny kierunek zmian obserwuje się

dla parametru Δ dla grupy O(8)H lecz rozpiętość zakresu jest nieco większa niż w przypadku grupy O(4)H i kształtuje się w granicach -1.21 ppm do -3.38 ppm, wskazując, że wiązanie wodorowe tworzone przez grupę O(8)H ulegać może większemu osłabieniu niż to tworzone przez grupę O(4)H.



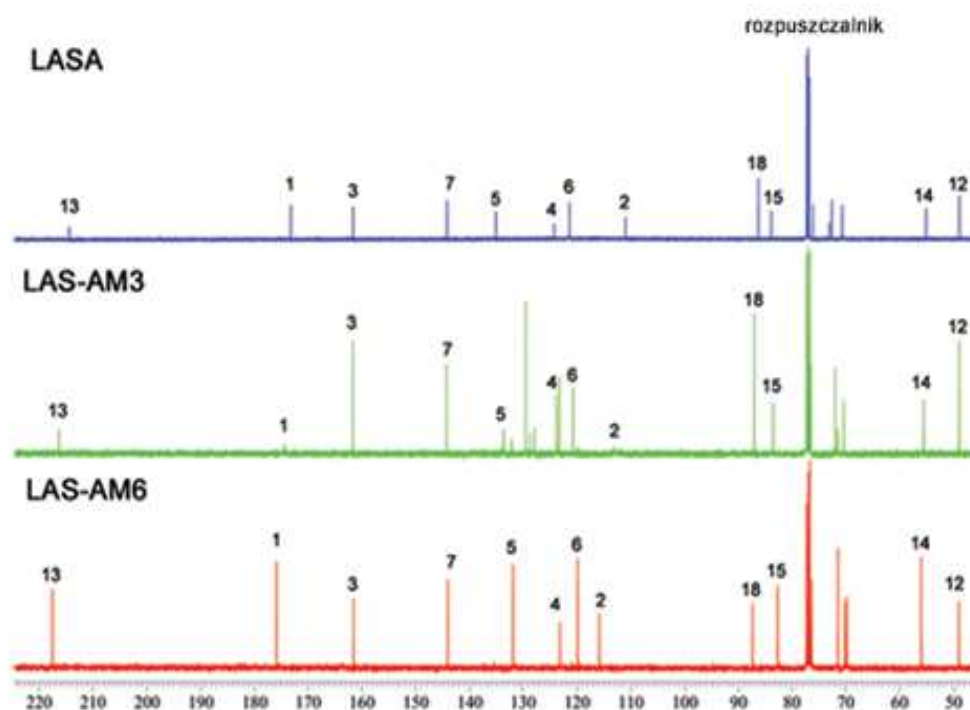
Rys. 45 Widmo ^1H NMR kwasu lasalowego i kompleksów LAS-AM3 i LAS-AM6 w CDCl_3 z zakresie 6.4 -2.4 ppm

Widma ^1H NMR dostarczyły informacji na temat siły wiązań wodorowych tworzonych przez grupy hydroksylowe. Pomocna przy określeniu struktur kompleksów kwasu lasalowego z aminami jest także technika węglowego rezonansu magnetycznego ^{13}C NMR, którą można zastosować do określenia zaangażowania atomów tlenu w proces kompleksowania. Metoda ta została wcześniej zastosowana do badania eterów koronowych i ich kompleksów z kationami metali [210]. Zaangażowanie atomu tlenu w proces kompleksowania kationu obserwowany jest poprzez zmiany położenia sygnałów pochodzących od atomów węgla sąsiadujących z danym atomem tlenu. Kompleksowanie kationu przez atom tlenu powoduje zmniejszenie gęstości elektronowej na tym atomie, przy jednoczesnym zwiększeniu ekranowania sąsiadujących atomów węgla. W związku z tym sygnały pochodzące od tych atomów węgla obserwowane są przy niższych wartościach ppm niż sygnały pochodzące od tych samych atomów węgla w przypadku nieskompleksowanej cząsteczki. Różnica w

położeniu sygnałów pochodzących od tego samego atomu w widmie kompleksu i w widmie kwasu może być określona parametrem $\Delta = \delta_{\text{kompleks}} - \delta_{\text{kwas lasalowy}}$.

Porównanie zmian przesunięć chemicznych najważniejszych sygnałów ^{13}C NMR w widmach kompleksów kwasu lasalowego z aminami pozwala na sformułowanie następujących wniosków:

- 1) Sygnały ^{13}C NMR pochodzące od atomów węgla C(11), C(15), C(19) oraz C(22) w widmach kompleksów obserwowane są przy niższych wartościach ppm, niż w widmie kwasu lasalowego, co dowodzi, że połączone z nimi bezpośrednio atomy tlenu O(4), O(6) i O(8) biorą udział w kompleksowaniu aminy.
- 2) Dodatnia wartość parametru Δ obserwowana dla sygnałów ^{13}C NMR pochodzących od atomu węgla C(13) jest wynikiem zmian konformacyjnych następujących w czasteczce kwasu lasalowego po skompleksowaniu aminy
- 3) Obserwowane dla atomów węgla C(1) i C(2) dodatnia wartość parametru Δ związana jest raczej z przeważającym efektem zwiększenia gęstości elektronowej na atomach tlenu grupy karboksylowej w wyniku jej deprotonacji, niż z brakiem jej zaangażowania w kompleksowanie aminy.



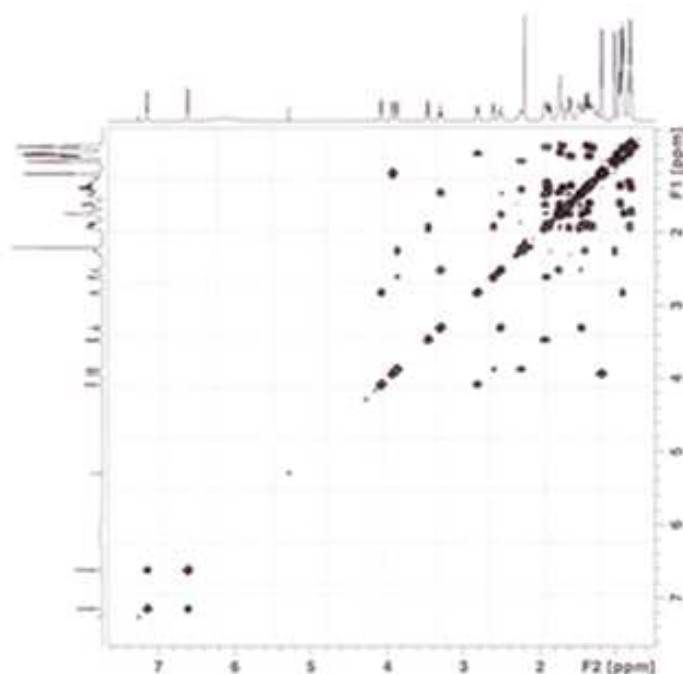
Rys. 46 Przykładowe widma ^{13}C NMR kwasu lasalowego (—), kompleksu LAS-AM3 (—) i kompleksu LAS-AM6 (—) w zakresie 225-45 ppm

Tabela 5 Przesunięcia chemiczne sygnałów ^1H i ^{13}C NMR (ppm) kompleksu LAS-AM1

Nr atomu	LASA		LAS-AM1		różnice (Δ) między przesunięciami chemicznymi (ppm)	
	przesunięcie chemiczne (ppm)		przesunięcie chemiczne (ppm)		$\Delta ^1\text{H}$	$\Delta ^{13}\text{C}$
	^1H NMR	^{13}C NMR	^1H NMR	^{13}C NMR		
1	-	173.2	-	175.3	-	2.1
2	-	111.0	-	115.5	-	4.5
3	-	161.6	-	161.7	-	0.1
4	-	124.2	-	123.4	-	-0.8
5	7.17	134.5	7.02	130.4	-0.15	-4.1
6	6.63	121.4	6.50	119.7	-0.13	-1.7
7	-	144.1	-	144.2	-	0.1
11	4.08	73.0	4.31	71.1	0.23	-1.9
12	2.84	48.8	2.75	49.0	-0.09	0.2
13	-	214.4	-	217.9	-	3.5
14	2.62	55.0	2.48	56.1	-0.14	1.1
15	3.88	83.8	4.10	82.9	0.22	-0.9
18	-	86.2	-	87.5	-	1.3
19	3.50	70.7	3.46	70.3	-0.04	-0.4
22	-	72.6	-	71.1	-	-1.5
23	3.93	76.0	3.79	76.6	-0.14	0.6
35	-	-	3.67	41.6	-	-
O(1)H	6.14 _{sz}	-	-	-	-	-
O(3)H	11.84	-	14.84	-	3	-
O(4)H	6.14 _{sz}	-	4.94	-	-1.2	-
O(8)H	6.14 _{sz}	-	2.76	-	-3.38	-
NH ₃ ⁺	-	-	7.61	-	-	-

$$\Delta ^1\text{H} = \delta_{\text{LAS-AM1}} - \delta_{\text{LASA}}; \Delta ^{13}\text{C} = \delta_{\text{LAS-AM1}} - \delta_{\text{LASA}}$$

sz. – szeroki sygnał



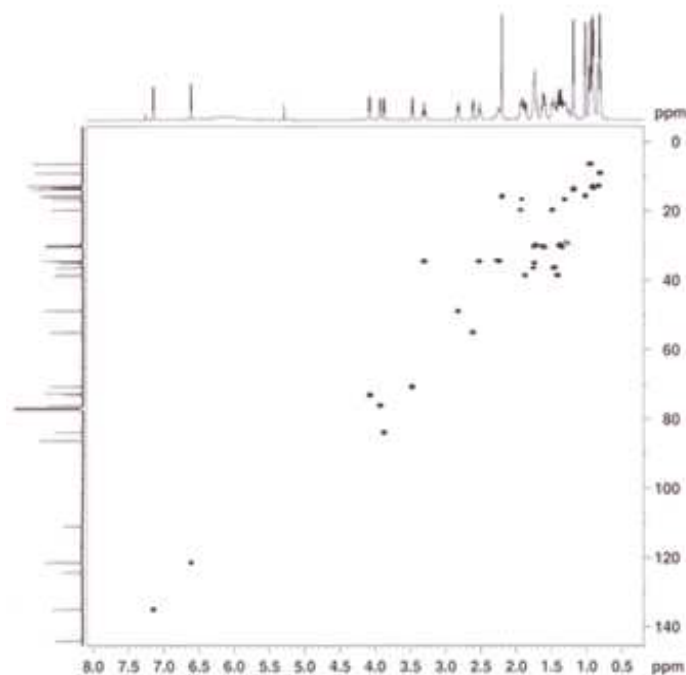
Rys. 47 Przykładowe widmo korelacyjne COSY kwasu laktowego

Tabela 6 Przesunięcia chemiczne sygnałów ^1H i ^{13}C NMR (ppm) kompleksu LAS-AM2

Nr atomu	LASA		LAS-AM2		różnice (Δ) między przesunięciami chemicznymi (ppm)	
	przesunięcie chemiczne (ppm)		przesunięcie chemiczne (ppm)		$\Delta ^1\text{H}$	$\Delta ^{13}\text{C}$
	^1H NMR	^{13}C NMR	^1H NMR	^{13}C NMR		
1	-	173.2	-	174.6	-	1.4
2	-	111.0	-	119.3	-	8.3
3	-	161.6	-	162.1	-	0.5
4	-	124.2	-	127.8	-	3.6
5	7.17	134.5	7.00	131.7	-0.17	-2.8
6	6.63	121.4	6.46	119.3	-0.17	-2.1
7	-	144.1	-	143.9	-	-0.2
11	4.08	73.0	4.15	71.1	0.07	-1.9
12	2.84	48.8	2.71	49.1	-0.13	0.3
13	-	214.4	-	214.7	-	0.3
14	2.62	55.0	2.42	55.7	-0.2	0.7
15	3.88	83.8	4.15	81.8	0.27	-2
18	-	86.2	-	86.0	-	-0.2
19	3.50	70.7	3.76	70.3	0.26	-0.4
22	-	72.6	-	71.2	-	-1.4
23	3.93	76.0	3.83	75.7	-0.1	-0.3
35	-	-	-	162.3	-	-
O(1)H	6.14 _{sz}	-	-	-	-	-
O(3)H	11.84	-	16.35	-	4.51	-
O(4)H	6.14 _{sz}	-	4.12	-	-2.02	-
O(8)H	6.14 _{sz}	-	3.76	-	-2.38	-
NH ₃ ⁺	-	-	8.07	-	-	-

$$\Delta ^1\text{H} = \delta_{\text{LAS-AM2}} - \delta_{\text{LASA}}; \Delta ^{13}\text{C} = \delta_{\text{LAS-AM2}} - \delta_{\text{LASA}}$$

sz. – szeroki sygnał;



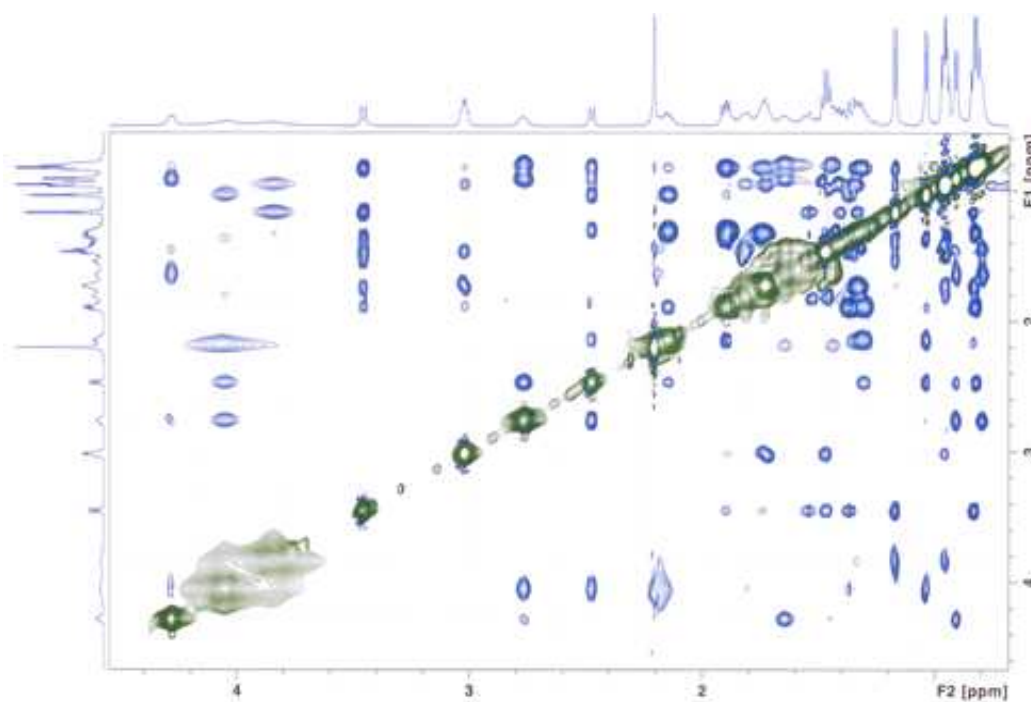
Rys. 48 Przykładowe widmo korelacyjne HETCOR kwasu lasalowego

Tabela 7 Przesunięcia chemiczne sygnałów ^1H i ^{13}C NMR (ppm) kompleksu LAS-AM3

Nr atomu	LASA		LAS-AM3		różnice (Δ) między przesunięciami chemicznymi (ppm)	
	przesunięcie chemiczne (ppm)		przesunięcie chemiczne (ppm)		Δ ^1H	Δ ^{13}C
	^1H NMR	^{13}C NMR	^1H NMR	^{13}C NMR		
1	-	173.2	-	174.4	-	1.2
2	-	111.0	-	113.1	-	2.1
3	-	161.6	-	161.6	-	0
4	-	124.2	-	123.8	-	-0.4
5	7.17	134.5	7.15	132.1	-0.02	-2.4
6	6.63	121.4	6.61	119.7	-0.02	-1.7
7	-	144.1	-	144.2	-	0.1
11	4.08	73.0	4.26	71.9	0.18	-1.1
12	2.84	48.8	2.79	48.8	-0.05	0
13	-	214.4	-	216.3	-	1.9
14	2.62	55.0	2.53	55.4	-0.09	0.4
15	3.88	83.8	3.81	83.4	-0.07	-0.4
18	-	86.2	-	86.9	-	0.7
19	3.50	70.7	3.45	70.3	-0.05	-0.4
22	-	72.6	-	71.4	-	-1.2
23	3.93	76.0	3.95	76.4	0.02	0.4
35	-	-	-	133.6	-	-
O(1)H	6.14 _{sz}	-	-	-	-	-
O(3)H	11.84	-	11.95	-	0.11	-
O(4)H	6.14 _{sz}	-	3.80 _{b.sz.}	-	-2.34	-
O(8)H	6.14 _{sz}	-	3.80 _{b.sz.}	-	-2.34	-
NH ₃ ⁺	-	-	9.34	-	-	-
NH ₂	-	-	3.80 _{b.sz.}	-	-	-

$$\Delta ^1\text{H} = \delta_{\text{LAS-AM3}} - \delta_{\text{LASA}}; \Delta ^{13}\text{C} = \delta_{\text{LAS-AM3}} - \delta_{\text{LASA}}$$

sz. – szeroki sygnał; b.sz. – bardzo szeroki sygnał



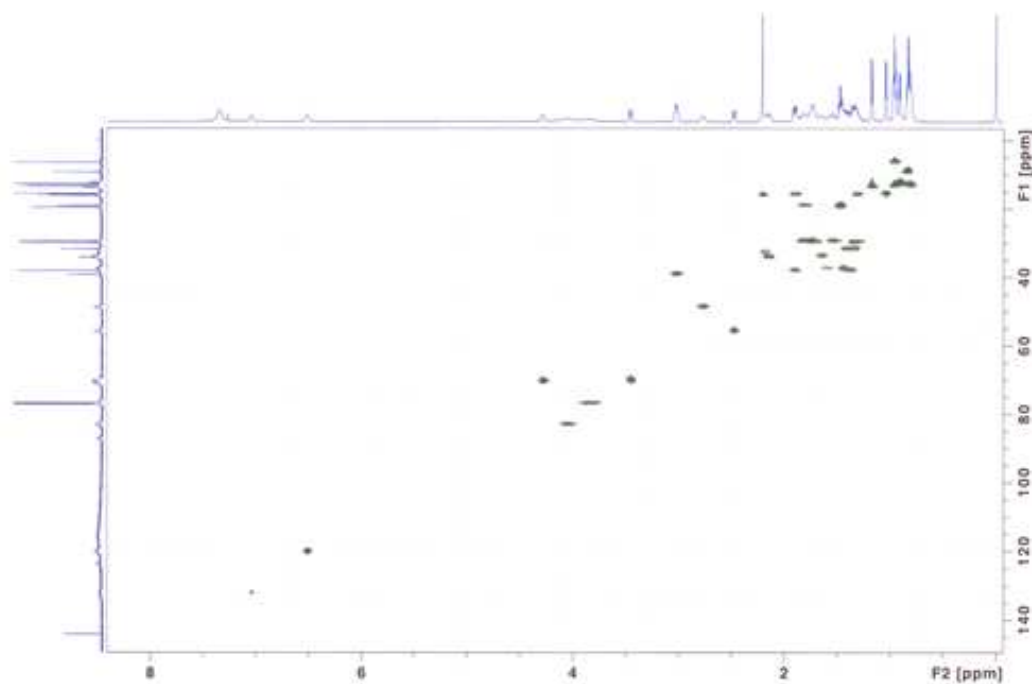
Rys. 49 Przykładowe widmo korelacyjne COSY kompleksu LAS-AM4

Tabela 8 Przesunięcia chemiczne sygnałów ^1H i ^{13}C NMR (ppm) kompleksu LAS-AM4

Nr atomu	LASA		LAS-AM4		różnice (Δ) między przesunięciami chemicznymi (ppm)	
	przesunięcie chemiczne (ppm)		przesunięcie chemiczne (ppm)		$\Delta ^1\text{H}$	$\Delta ^{13}\text{C}$
	^1H NMR	^{13}C NMR	^1H NMR	^{13}C NMR		
1	-	173.2	-	175.4	-	2.2
2	-	111.0	-	115.5	-	4.5
3	-	161.6	-	161.6	-	0
4	-	124.2	-	123.6	-	-0.6
5	7.17	134.5	7.05	132.0	-0.12	-2.5
6	6.63	121.4	6.51	120.7	-0.12	-0.7
7	-	144.1	-	144.2	-	0.1
11	4.08	73.0	4.30	71.7	0.22	-1.3
12	2.84	48.8	2.76	48.7	-0.08	-0.1
13	-	214.4	-	217.8	-	3.4
14	2.62	55.0	2.48	55.9	-0.14	0.9
15	3.88	83.8	4.05	83.1	0.17	-0.7
18	-	86.2	-	87.2	-	1
19	3.50	70.7	3.43	70.2	-0.07	-0.5
22	-	72.6	-	71.1	-	-1.5
23	3.93	76.0	3.82	76.8	-0.11	0.8
35	-	-	3.02	39.3	-	-
O(1)H	6.14 _{sz}	-	-	-	-	-
O(3)H	11.84	-	14.90	-	3.06	-
O(4)H	6.14 _{sz}	-	4.87 _{sz.}	-	-1.27	-
O(8)H	6.14 _{sz}	-	4.07	-	-2.07	-
NH ₃ ⁺	-	-	7.35	-	-	-

$$\Delta ^1\text{H} = \delta_{\text{LAS-AM4}} - \delta_{\text{LASA}}; \Delta ^{13}\text{C} = \delta_{\text{LAS-AM4}} - \delta_{\text{LASA}}$$

sz. – szeroki sygnał; b.sz. – bardzo szeroki sygnał



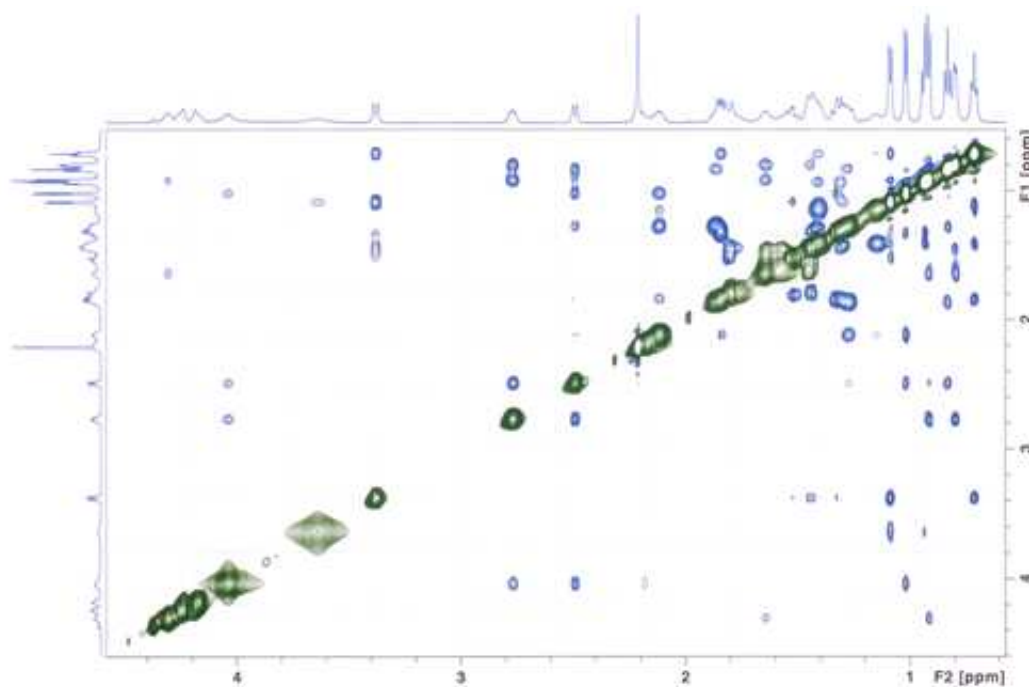
Rys. 50 Przykładowe widmo korelacyjne HETCOR kompleksu LAS-AM4

Tabela 9 Przesunięcia chemiczne sygnałów ^1H i ^{13}C NMR (ppm) kompleksu LAS-AM5

Nr atomu	LASA		LAS-AM5		różnice (Δ) między przesunięciami chemicznymi (ppm)	
	przesunięcie chemiczne (ppm)		przesunięcie chemiczne (ppm)		$\Delta ^1\text{H}$	$\Delta ^{13}\text{C}$
	^1H NMR	^{13}C NMR	^1H NMR	^{13}C NMR		
1	-	173.2	-	175.5	-	2.3
2	-	111.0	-	115.6	-	4.6
3	-	161.6	-	161.7	-	0.1
4	-	124.2	-	123.6	-	-0.6
5	7.17	134.5	7.07	133.6	-0.1	-0.9
6	6.63	121.4	6.51	120.2	-0.12	-1.2
7	-	144.1	-	144.2	-	0.1
11	4.08	73.0	4.31	71.2	0.23	-1.8
12	2.84	48.8	2.80	48.9	-0.04	0.1
13	-	214.4	-	218.2	-	3.8
14	2.62	55.0	2.49	56.0	-0.13	1
15	3.88	83.8	4.04	83.1	0.16	-0.7
18	-	86.2	-	87.3	-	1.1
19	3.50	70.7	3.38	70.1	-0.12	-0.6
22	-	72.6	-	70.6	-	-2
23	3.93	76.0	3.64	76.1	-0.29	0.1
35	-	-	4.21	43.4	-	-
O(1)H	6.14 _{sz}	-	-	-	-	-
O(3)H	11.84	-	14.43 _{b.sz.}	-	2.59	-
O(4)H	6.14 _{sz}	-	4.04	-	-2.1	-
O(8)H	6.14 _{sz}	-	4.93	-	-1.21	-
NH ₃ ⁺	-	-	7.80	-	-	-

$$\Delta ^1\text{H} = \delta_{\text{LAS-AM5}} - \delta_{\text{LASA}}; \Delta ^{13}\text{C} = \delta_{\text{LAS-AM5}} - \delta_{\text{LASA}}$$

sz. – szeroki sygnał; b.sz. – bardzo szeroki sygnał



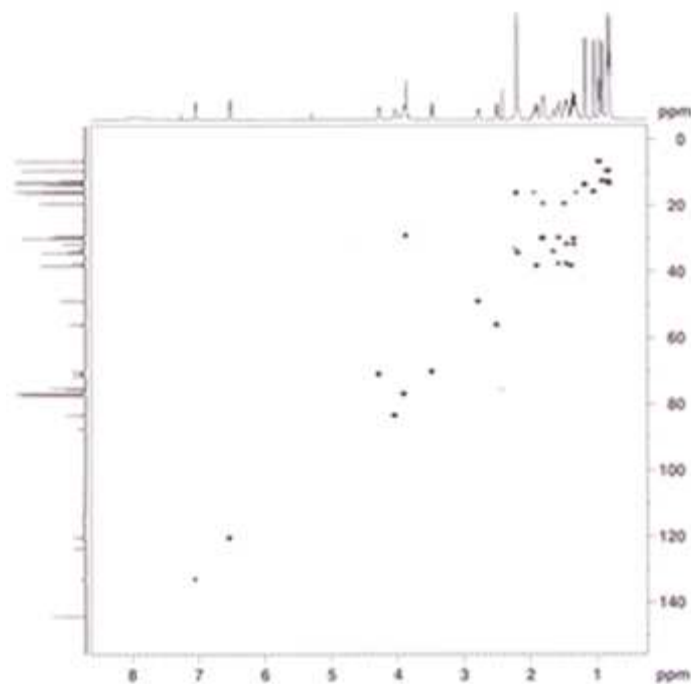
Rys. 51 Przykładowe widmo korelacyjne COSY kompleksu LAS-AM5

Tabela 10 Przesunięcia chemiczne sygnałów ^1H i ^{13}C NMR (ppm) kompleksu LAS-AM6

Nr atomu	LASA		LAS-AM6		różnice (Δ) między przesunięciami chemicznymi (ppm)	
	przesunięcie chemiczne (ppm)		przesunięcie chemiczne (ppm)		$\Delta ^1\text{H}$	$\Delta ^{13}\text{C}$
	^1H NMR	^{13}C NMR	^1H NMR	^{13}C NMR		
1	-	173.2	-	175.7	-	2.5
2	-	111.0	-	115.8	-	4.8
3	-	161.6	-	161.5	-	-0.1
4	-	124.2	-	123.1	-	-1.1
5	7.17	134.5	6.99	131.9	-0.18	-2.6
6	6.63	121.4	6.46	123.1	-0.17	1.7
7	-	144.1	-	144.0	-	-0.1
11	4.08	73.0	4.31	71.4	0.23	-1.6
12	2.84	48.8	2.74	49.0	-0.1	0.2
13	-	214.4	-	217.5	-	3.1
14	2.62	55.0	2.45	55.9	-0.17	0.9
15	3.88	83.8	3.97	82.7	0.09	-1.1
18	-	86.2	-	87.3	-	1.1
19	3.50	70.7	3.39	69.8	-0.11	-0.9
22	-	72.6	-	71.4	-	-1.2
23	3.93	76.0	3.82	76.3	-0.11	0.3
35	-	-	-	-	-	-
O(1)H	6.14 _{sz}	-	-	-	-	-
O(3)H	11.84	-	14.50 _{b.sz.}	-	-	-
O(4)H	6.14 _{sz}	-	4.03	-	2.66	-
O(8)H	6.14 _{sz}	-	4.80	-	-2.11	-
NH ₄ ⁺	-	-	6.94	-	-1.34	-

$$\Delta ^1\text{H} = \delta_{\text{LAS-AM6}} - \delta_{\text{LASA}}; \Delta ^{13}\text{C} = \delta_{\text{LAS-AM6}} - \delta_{\text{LASA}}$$

sz. – szeroki sygnał; b.sz. – bardzo szeroki sygnał



Rys. 52 Przykładowe widmo korelacyjne HETCOR kompleksu LAS-AM7.

Tabela 11 Przesunięcia chemiczne sygnałów ^1H i ^{13}C NMR (ppm) kompleksu LAS-AM7

Nr atomu	LASA		LAS-AM7		różnice (Δ) między przesunięciami chemicznymi (ppm)	
	przesunięcie chemiczne (ppm)		przesunięcie chemiczne (ppm)		$\Delta ^1\text{H}$	$\Delta ^{13}\text{C}$
	^1H NMR	^{13}C NMR	^1H NMR	^{13}C NMR		
1	-	173.2	-	174.7	-	1.5
2	-	111.0	-	116.6	-	5.6
3	-	161.6	-	161.5	-	-0.1
4	-	124.2	-	123.6	-	-0.6
5	7.17	134.5	7.04	132.7	-0.13	-1.8
6	6.63	121.4	6.52	120.2	-0.11	-1.2
7	-	144.1	-	144.1	-	0
11	4.08	73.0	4.28	70.9	0.2	-2.1
12	2.84	48.8	2.78	48.7	-0.06	-0.1
13	-	214.4	-	217.5	-	3.1
14	2.62	55.0	2.50	55.9	-0.12	0.9
15	3.88	83.8	4.03	83.3	0.15	-0.5
18	-	86.2	-	87.4	-	1.2
19	3.50	70.7	3.48	70.0	-0.02	-0.7
22	-	72.6	-	71.4	-	-1.2
23	3.93	76.0	3.90	76.8	-0.03	0.8
35	-	-	3.83	29.9	-	-
O(1)H	6.14 _{sz}	-	-	-	-	-
O(3)H	11.84	-	14.88	-	3.04	-
O(4)H	6.14 _{sz}	-	4.72 _{b.sz.}	-	-1.42	-
O(8)H	6.14 _{sz}	-	3.96	-	-2.18	-
NH ₃ ⁺	-	-	7.92	-	-	-

$$\Delta ^1\text{H} = \delta_{\text{LAS-AM7}} - \delta_{\text{LASA}}; \Delta ^{13}\text{C} = \delta_{\text{LAS-AM7}} - \delta_{\text{LASA}}$$

sz. – szeroki sygnał; b.sz. – bardzo szeroki sygnał

Tabela 12 Przesunięcia chemiczne protonów grup hydroksylowych kwasu lasalowego i jego kompleksów z aminami

związek	Wartość przesunięcia chemicznego δ (ppm)			Różnica przesunięć chemicznych Δ (ppm)		
	O(3)H	O(4)H	O(8)H	$\Delta = \delta_{\text{kompleks}} - \delta_{\text{kwas lasalowy}}$		
				$\Delta 1$	$\Delta 2$	$\Delta 3$
LASA	11.84	6.14	6.14	---	---	---
LAS-AM1	14.84	4.94	2.76	3.00	-1.20	-3.38
LAS-AM2	16.35	4.12	3.76	4.51	-2.02	-2.38
LAS-AM3	11.95	3.80	3.80	0.11	-2.34	-2.34
LAS-AM4	14.90	4.87	4.07	3.06	-1.27	-2.07
LAS-AM5	14.43	4.04	4.93	2.59	-2.10	-1.21
LAS-AM6	14.50	4.03	4.80	2.66	-2.11	-1.34
LAS-AM7	14.88	4.72	3.96	3.04	-1.42	-2.18

$$\Delta 1 = \delta_{\text{KOMPLEKS O(3)H}} - \delta_{\text{LASA O(3)H}}, \Delta 2 = \delta_{\text{KOMPLEKS O(4)H}} - \delta_{\text{LASA O(4)H}}, \Delta 3 = \delta_{\text{KOMPLEKS O(8)H}} - \delta_{\text{LASAO(8)H}}$$

3.4 Badania FT-IR kompleksów kwasu lasalowego z aminami

Spektroskopia w podczerwieni to doskonała technika spektroskopowa, dzięki której można stwierdzić obecność różnych grup funkcyjnych w strukturze cząsteczki. Dzieje się tak, ponieważ grupy atomów absorbują promieniowanie o podobnej częstotliwości, w wyniku czego obserwowane jest pojawienie się pasma absorpcyjnego w określonym zakresie widma. Pomiar widm FT-IR kwasu lasalowego i jego kompleksów z aminami prowadzone były w zakresie 4000 cm^{-1} – 400 cm^{-1}

Zastosowanie metody spektroskopii w podczerwieni pozwala na porównanie struktur otrzymanych związków zarówno w postaci ciała stałego (w postaci tabletki z KBr, jak również w postaci zawiesiny w nujolu/fluorolubie) i w roztworze, dając informację o zmianach zachodzących w strukturze związku po przejściu z jednego stanu skupienia do drugiego.

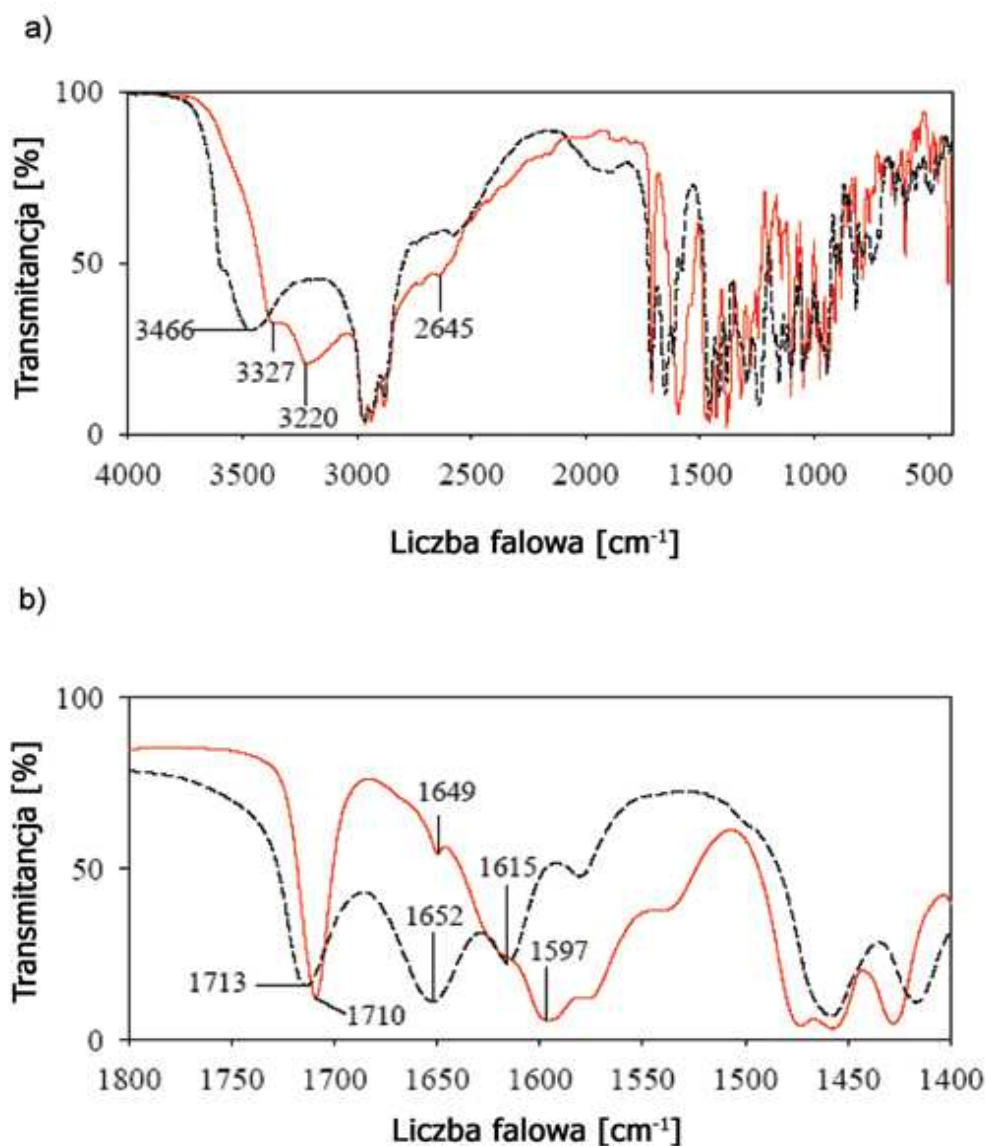
Na **Rysunkach 53-56** zestawione są widma kwasu lasalowego i jego kompleksów wykonane w postaci zawiesin w nujolu/fluorolubie. Dodatkowo widma te zostały pokazane w rozszerzonej skali, która pozwala obserwować zmiany położenia pasm $\nu(\text{O-H})$ oraz $\nu(\text{C=O})$, ponieważ wyniki badań NMR wskazały, że największe zmiany przesunięć chemicznych przy tworzeniu kompleksów kwasu lasalowego z aminami związane były z tworzeniem wiązań wodorowych.

W widmie kwasu lasalowego w ciele stałym pasma przypisane drganiom $\nu(\text{O-H})$ wykazują maksima przy 3558 cm^{-1} oraz 3462 cm^{-1} . Ponadto w widmie kwasu lasalowego występuje pasmo drgań $\nu(\text{C=O})$ grupy karboksylowej przy 1652 cm^{-1} oraz pasmo drgań $\nu(\text{C=O})$ grupy karbonylowej przy 1713 cm^{-1}

W widmach FT-IR kompleksów kwasu lasalowego z aminami położenie pasm drgań rozciągających $\nu(\text{O-H})$ ulega zmianie, wskazując na zmianę siły wiązań wodorowych tworzonych przez grupy OH. Pasma przy 3558 cm^{-1} oraz 3462 cm^{-1} obecne w widmie kwasu zanikają, w zamian za to pojawiają się nowe pasma wykazujące maksima w zakresie $3400\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$ pochodzące od między- i wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych o różnej sile powstałych w strukturze kompleksów

W widmach FT-IR kompleksów kwasu lasalowego z aminami pasmo drgań $\nu(\text{C=O})$ grupy karboksylowej obserwowane na widmie nieskompleksowanego kwasu przy 1652 cm^{-1} znika, pojawia się natomiast nowe pasmo obserwowane w przedziale 1585 cm^{-1} – 1598 cm^{-1}

pochodzące od drgań rozciągających anionu karboksylanowego $\nu_{as}(\text{COO}^-)$, co dowodzi, że w kompleksach z aminami kwas lasalowy występuje w formie zdeprotonowanej. Taka interpretacja jest zgodna z wynikami badań krystalograficznych.

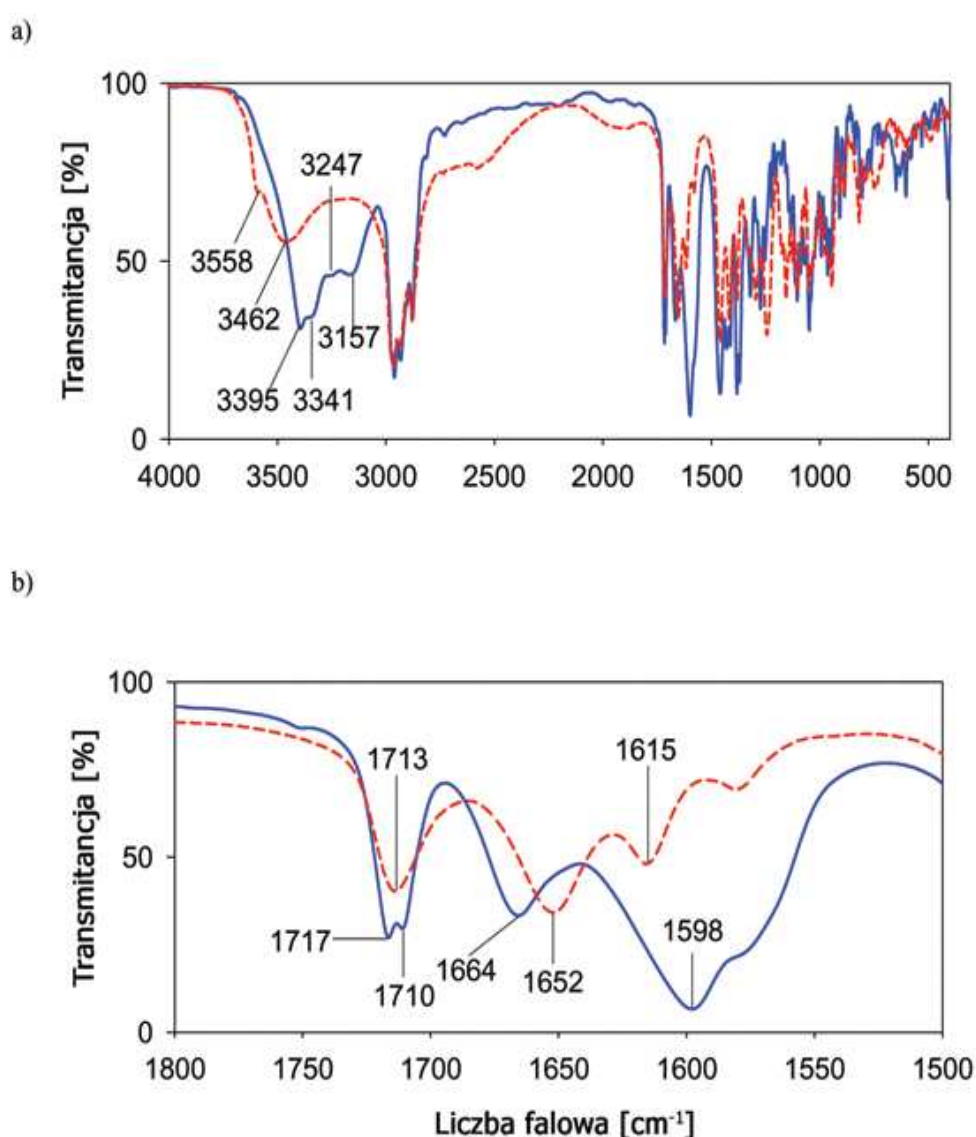


Rys. 53 Zestawienie widm FT-IR w ciele stałym: kwas lasalowy (- -), LAS-AM1 (—), w zakresie:

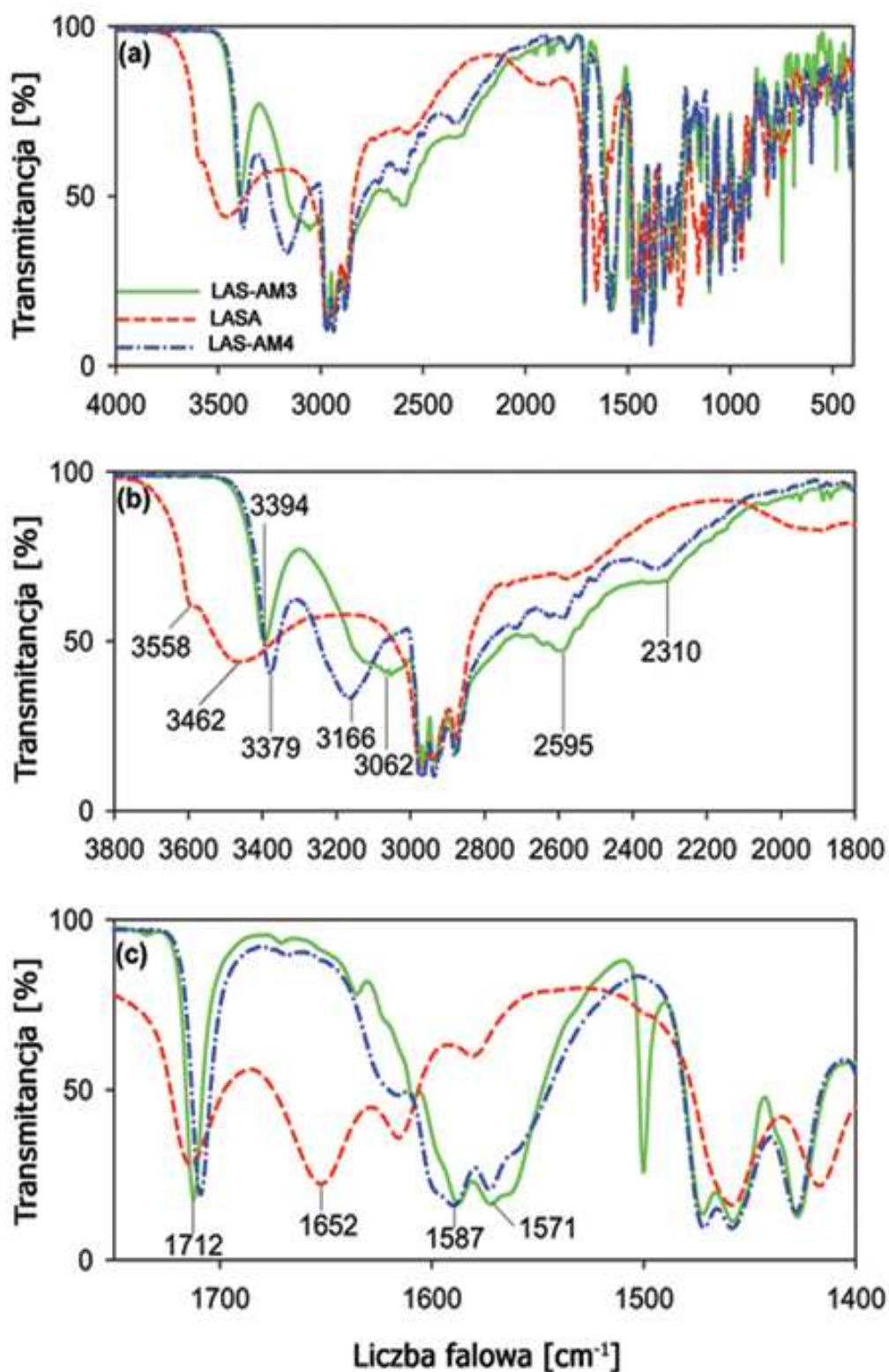
a) $4000 - 500 \text{ cm}^{-1}$, b) $1800 - 1500 \text{ cm}^{-1}$

W widmach FT-IR kompleksów kwasu lasalowego z aminami położenie pasma pochodzącego od drgań rozciągających $\nu(\text{C}=\text{O})$ grupy ketonowej obserwowane jest w

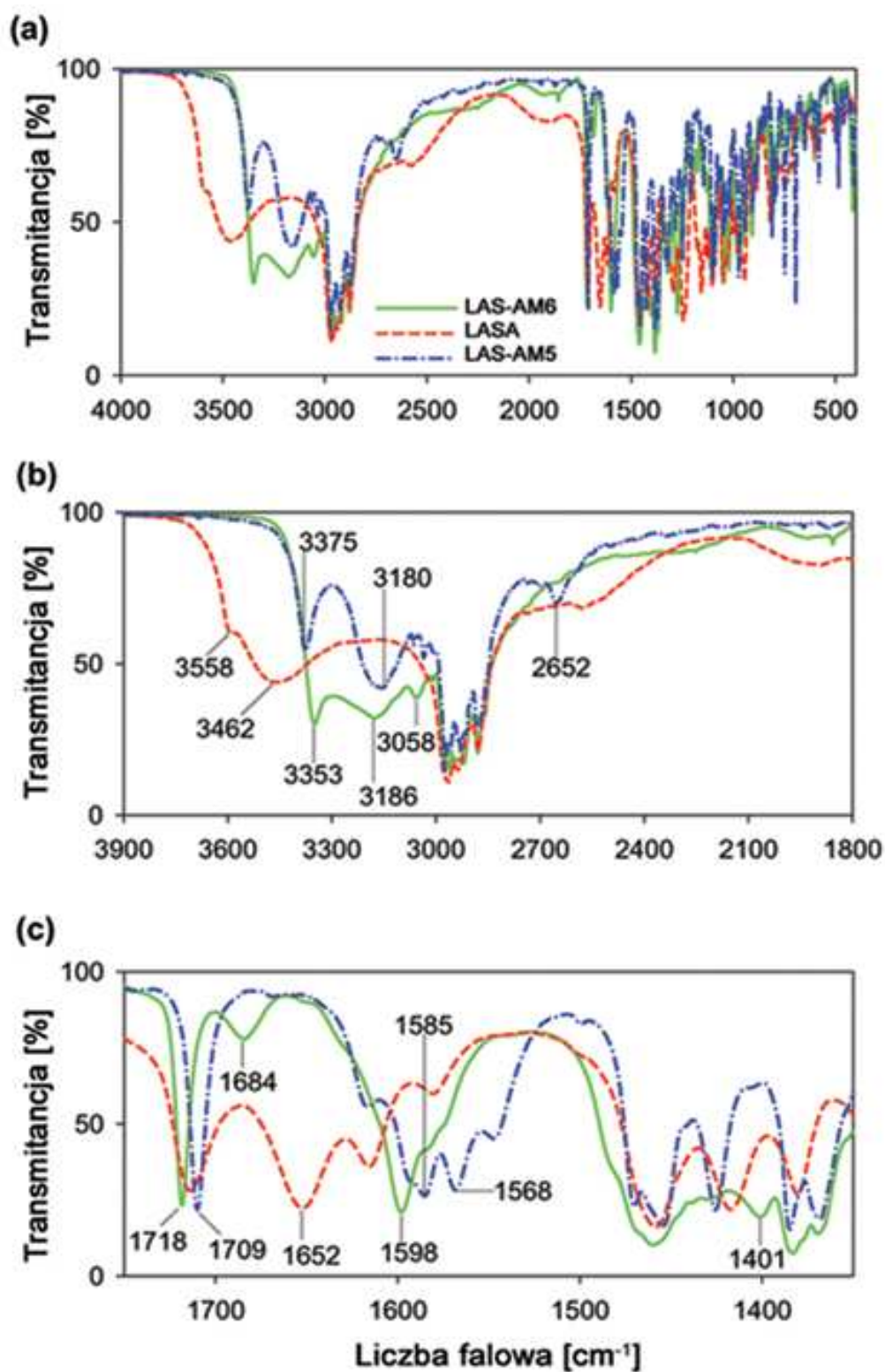
przedziale 1710 cm^{-1} – 1717 cm^{-1} i nie ulega zasadniczym zmianom w stosunku do położenia tego pasma w widmie nieskompleksowanego kwasu. Jedynie w kompleksie LAS-AM2 w omawianym zakresie widoczne są dwa pasma przy 1717 cm^{-1} i 1710 cm^{-1} pochodzące od drgań $\nu(\text{C}=\text{O})$ odpowiednio grupy ketonowej anionu kwasu lasalowego oraz grupy ketonowej zainkludowanej cząsteczki acetonu. Brak zasadniczych zmian położenia pasma drgań $\nu(\text{C}=\text{O})$ grupy karbonylowej w widmach kompleksów kwasu lasalowego z aminami wskazuje na brak zaangażowania tej grupy w tworzenie wiązań wodorowych. Taka interpretacja jest zgodna z wynikami badań ^{13}C NMR (Tabele 5-11).



Rys. 54 Zestawienie widm FT-IR w ciele stałym: kwas lasalowy (---), LAS-AM2 (—), w zakresie:
a) $4000 - 500\text{ cm}^{-1}$, b) $1800 - 1500\text{ cm}^{-1}$

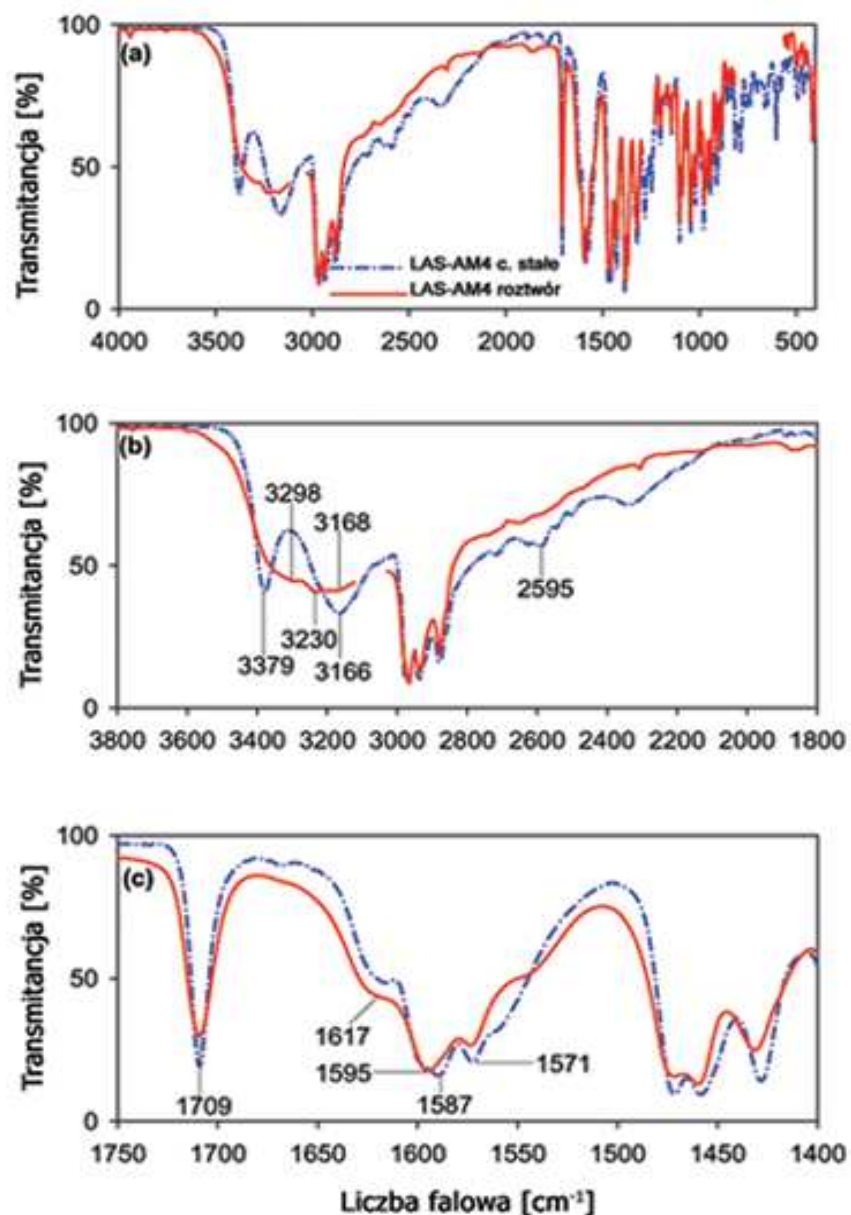


Rys. 55 Zestawienie widm FT-IR w ciele stałym: kwas lasalowy (- -), LAS-AM3 (—), LAS-AM4 (· · ·), w zakresie: a) 4000 – 500 cm⁻¹, b) 3800 – 1800 cm⁻¹, c) 1750 – 1400 cm⁻¹

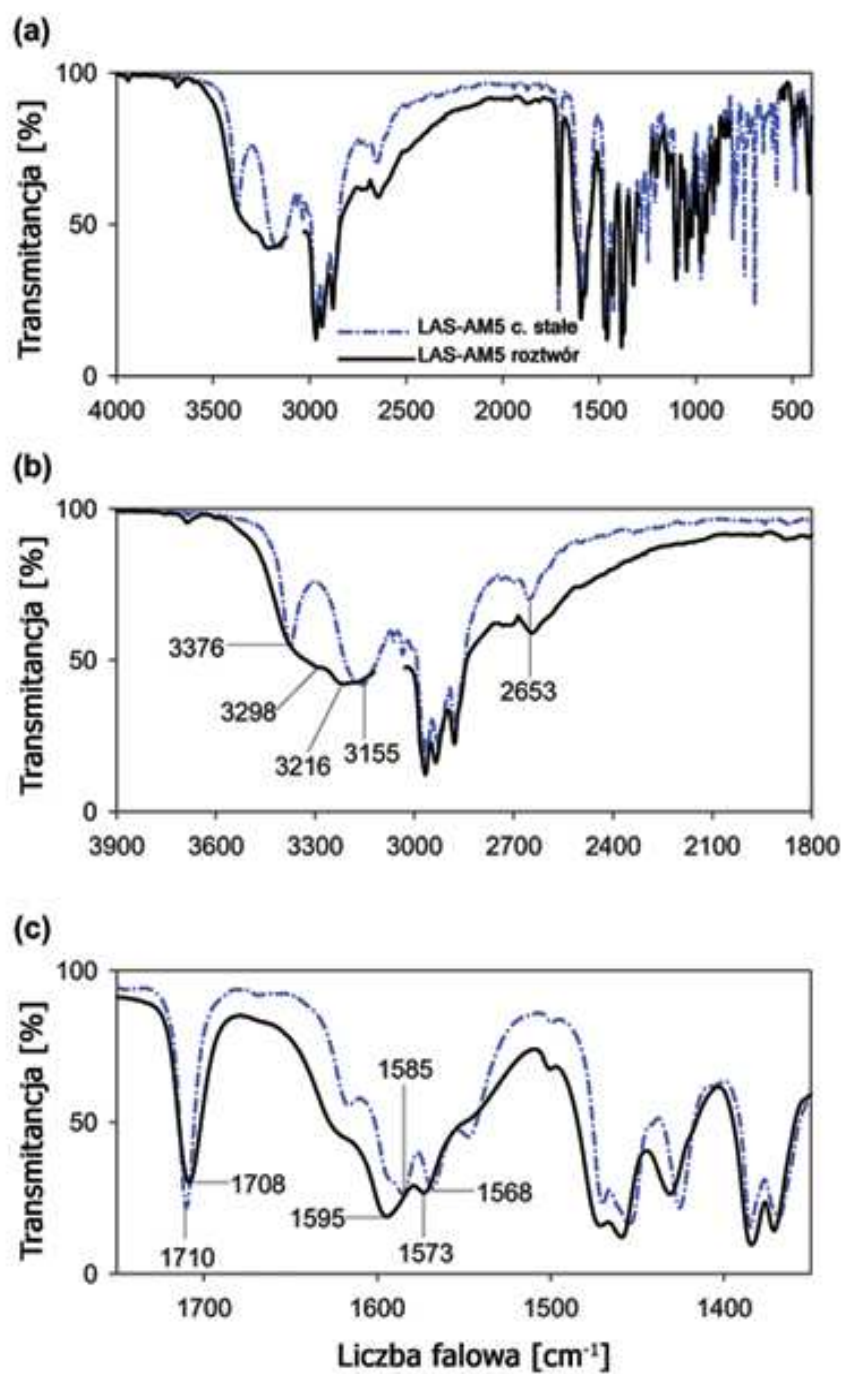


Rys. 56 Zestawienie widm FT-IR w nujolu/fluorolubie: kwas lasalowy (- -), LAS-AM5 (- · -), LAS-AM6 (—), w zakresie: a) 4000 – 500 cm⁻¹, b) 3800 – 1800 cm⁻¹, c) 1750 – 1350 cm⁻¹

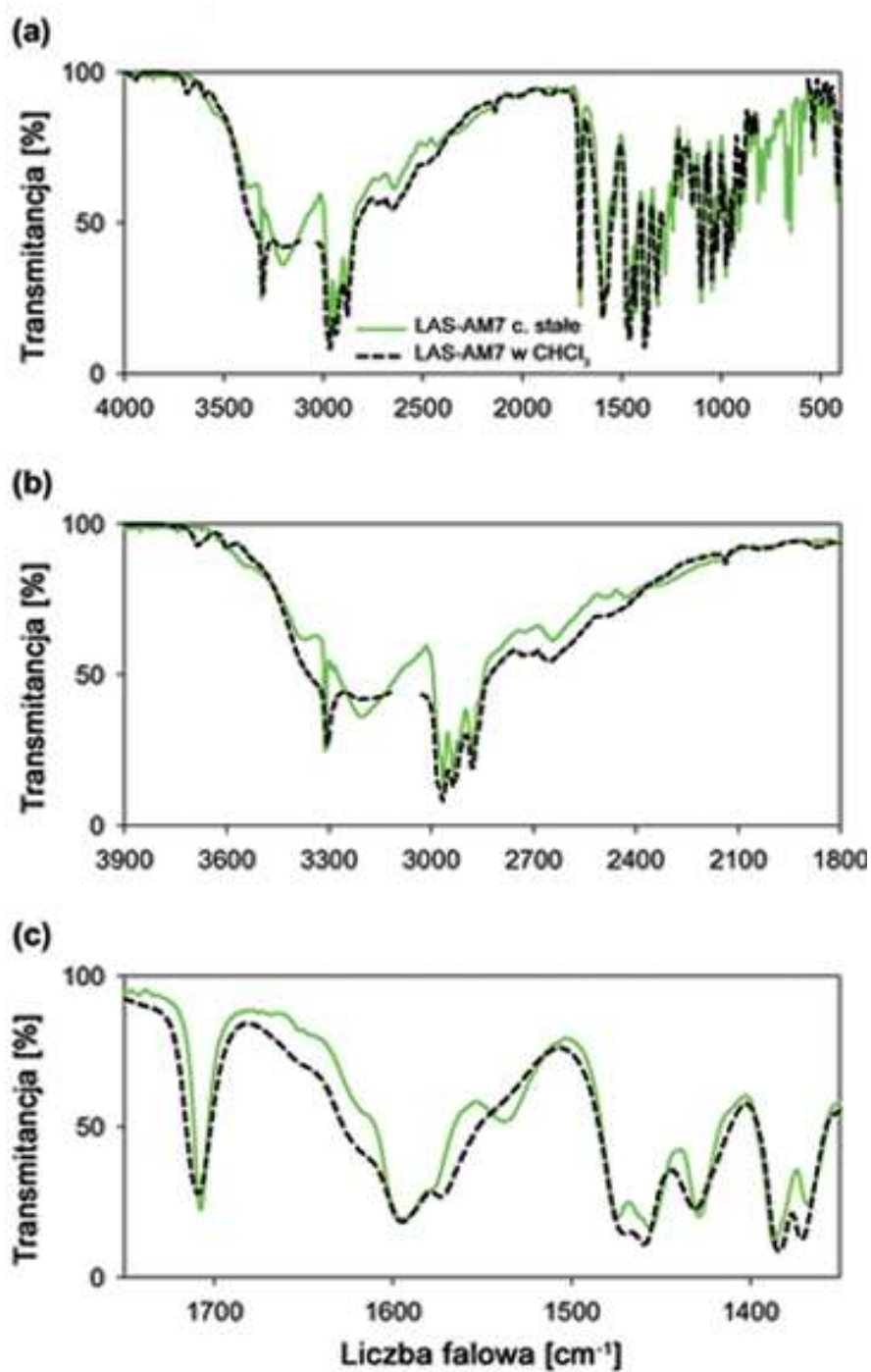
Porównanie widm FT-IR kompleksów w ciele stałym i w roztworze chloroformowym w pięciu przypadkach: LAS-AM1, LAS-AM2, LAS-AM4 (Rys. 57), LAS-AM5 (Rys. 58) i LAS-AM7 (Rys. 59) wykazało niewielkie zmiany w położeniu pasm absorpcyjnych, związane z niewielką różnicą w sile tworzonych wiązań wodorowych. Drgania rozciągające grup hydroksylowych objawiają się w postaci szerokiego pasma w tym samym regionie, w którym są one obecne na widmach kompleksów w ciele stałym, co dowodzi, że struktura tych kompleksów w roztworze jest zachowana.



Rys. 57 Zestawienie widm FT-IR kompleksu LAS-AM4 w nujolu/fluorolubie (---) oraz w roztworze chloroformowym (—), w zakresie: a) 4000 – 500 cm⁻¹, b) 3800 – 1800 cm⁻¹, c) 1750 – 1400 cm⁻¹



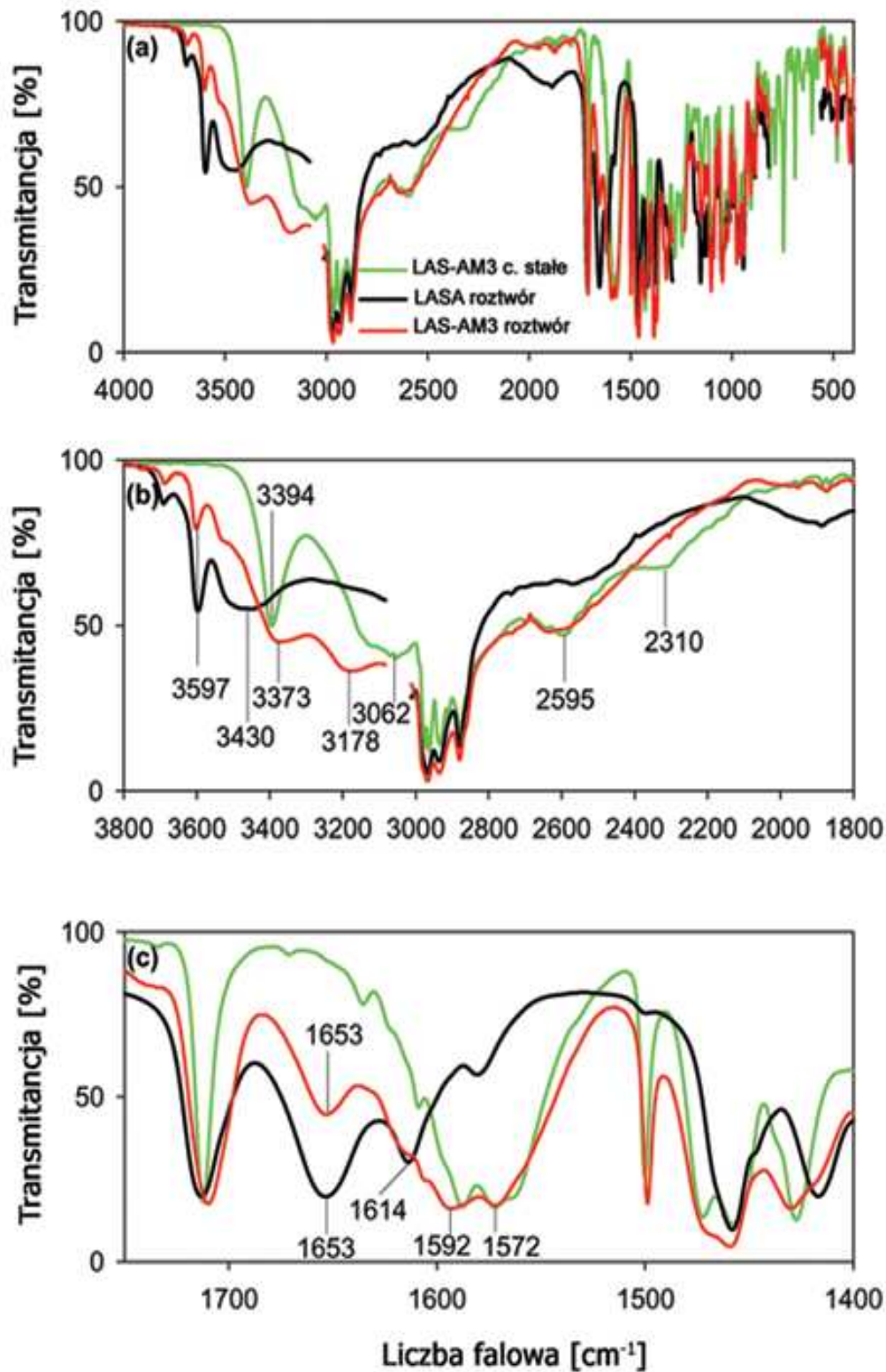
Rys. 58 Zestawienie widm FT-IR kompleksu LAS-AM5 w nujolu/fluorolubie (- -) oraz w roztworze chloroformowym (—), w zakresie: a) 4000 – 500 cm⁻¹, b) 3800 – 1800 cm⁻¹, b) 1750 – 1350 cm⁻¹



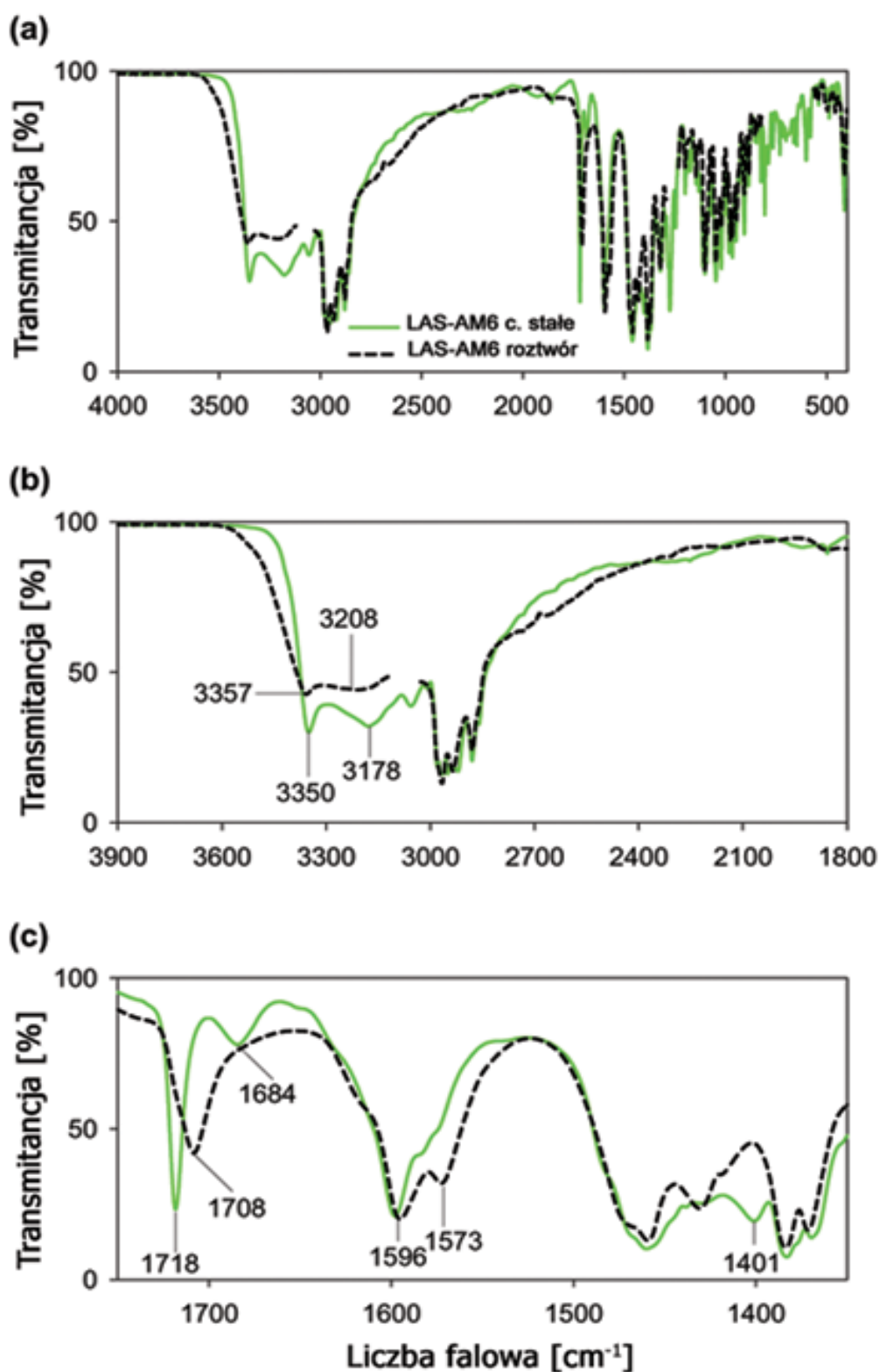
Rys. 59 Zestawienie widm FT-IR kompleksu LAS-AM7 w KBr (—) oraz roztworze chloroformowym (---) w zakresie: a) 4000 – 500 cm⁻¹, b) 3900 – 1800 cm⁻¹, c) 1750 – 1350 cm⁻¹

Porównanie widm FT-IR kompleksu LAS-AM3 w ciele stałym i w roztworze (**Rys. 60**) okazało się interesujące, ponieważ w przypadku tego kompleksu widoczne są duże zmiany strukturalne w zależności od stanu skupienia. W widmie kompleksu w roztworze chloroformowym obserwowane jest pojawienie się nowych pasm przy 1653 cm^{-1} , 3597 cm^{-1} oraz 3430 cm^{-1} , co wskazuje na częściową dysocjację kompleksu z utworzeniem nieskompleksowanego kwasu lasalowego. Interpretacja taka jest zgodna z wynikami analizy ^{13}C NMR, na co wskazują małe różnice przesunięć chemicznych pomiędzy sygnałami pochodzącymi od atomów C(1) i C(2) kwasu lasalowego i kompleksu LAS-AM3. Różnice te – mniejsze niż w przypadku pozostałych kompleksów – wskazują na niecałkowity proces przeniesienia protonu od kwasu lasalowego do aminy. Fakt dysocjacji kompleksu LAS-AM3 potwierdzają także wyniki analizy ^1H NMR. Sygnał rezonansowy pochodzący od protonu O(3)H na widmie kompleksu LAS-AM3 obserwowany jest przy 11.95 ppm, a więc przy znacznie niższej wartości ppm niż w przypadku innych kompleksów. Jednocześnie różnica pomiędzy przesunięciem chemicznym tego sygnału i sygnału pochodzącego od grupy O(3)H nieskompleksowanego kwasu wynosi tylko 0.11 ppm. Ponadto w widmie ^1H NMR kompleksu LAS-AM3 obserwowany jest sygnał pochodzący od protonów sprotonowanej grupy aminowej NH_3^+ aniliny przy 9.34 ppm, jak również sygnał pochodzący od nie związanych wodorowo protonów grupy NH_2 wolnej aniliny przy 3.80 ppm.

W przypadku kompleksu LAS-AM6 również obserwowane są zmiany w strukturze kompleksu w ciele stałym i w roztworze, jednakże nie są one tak drastyczne jak w przypadku wyżej omawianego kompleksu LAS-AM3. W widmie kompleksu LAS-AM6 w roztworze chloroformowym (**Rys. 61**) obserwowany jest zanik dwóch pasm widocznych w widmie kompleksu w postaci ciała stałego przy 1684 cm^{-1} i 1401 cm^{-1} , co spowodowane jest częściowym zerwaniem międzycząsteczkowych wiązań wodorowych oraz zmianami w koordynacji jonu amonowego, po przejściu do roztworu.



Rys. 60 Zestawienie widm FT-IR kompleksu LAS-AM3 w nujolu/fluorolubie (—) oraz w roztworze chloroformowym (—), a także kwasu lasalowego w roztworze chloroformowym (—) w zakresie: a) 4000 – 500 cm^{-1} , b) 3800 – 1800 cm^{-1} , b) 1750 – 1400 cm^{-1}



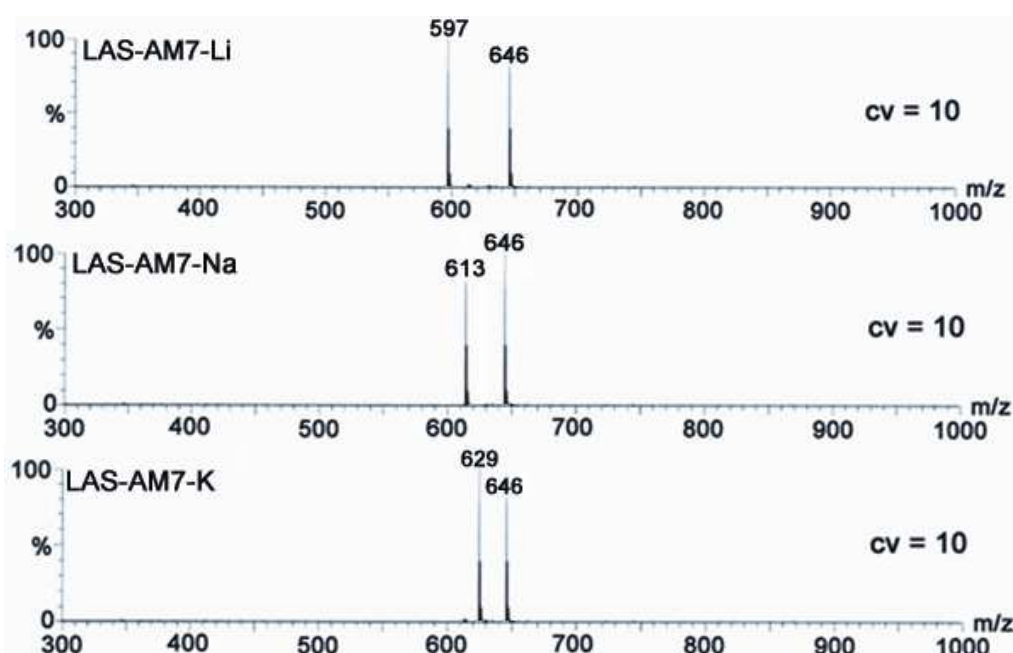
Rys. 61 Zestawienie widm FT-IR kompleksu LAS-AM6 w nujolu/fluorolubie (—) oraz w roztworze chloroformowym (- -), w zakresie: a) 4000 – 500 cm⁻¹, b) 3900 – 1800 cm⁻¹, b) 1750 – 1350 cm⁻¹

3.5 Określenie konkurencji w kompleksowaniu amin i kationów

Kwas lasalowy ukierunkowany jest na kompleksowanie kationów. Ponieważ w pracy doktorskiej zajmowałem się kompleksami kwasu lasalowego z aminami, uznałem za uzasadnione zbadanie konkurencji w kompleksowaniu przez kwas lasalowy amin i kationów metali. W tym celu przygotowałem roztwory poszczególnych kompleksów kwasu lasalowego z aminami z dodatkiem kationów Li^+ , Na^+ i K^+ o różnych stosunkach stechiometrycznych i poddałem je analizie spektroskopowej i spektrometrycznej.

3.5.1 Badania ESI-MS

Na widmach ESI-MS kompleksu LAS-AM7 z dodatkiem kationu Li^+ , Na^+ i K^+ w stosunku stechiometrycznym 1:1 (**Rys. 62**) obserwowane są w każdym przypadku dwa piki. Jeden przy $m/z = 646$, pochodzący od protonowanego kompleksu LAS-AM7 i drugi pik przy wartości m/z równej 597, 613 i 629 pochodzący od odpowiednich kompleksów kwasu lasalowego z kationami Li^+ , Na^+ i K^+ . Fakt ten dowodzi, że przy stosunku stechiometrycznym 1:1 jest możliwe tworzenie kompleksu kwasu lasalowego z kationami metali nawet w obecności aminy, i że kompleksy te istnieją ze sobą w równowadze. Taka sama sytuacja obserwowana była przy zastosowanym nadmiarze kationu.



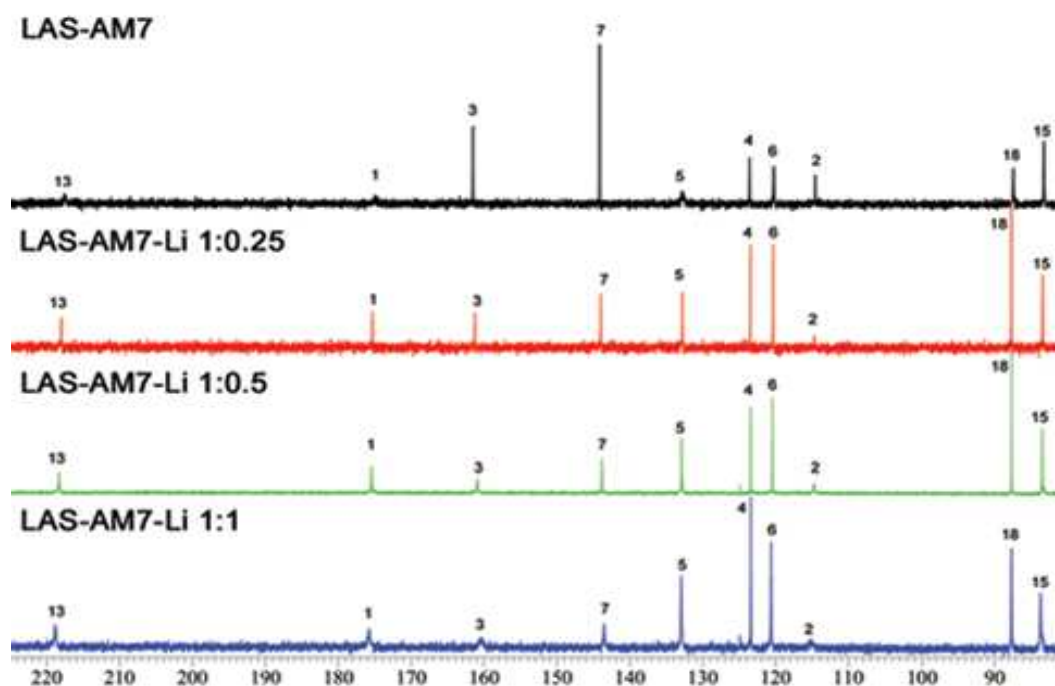
Rys. 62 Widma ESI-MS kompleksów kwasu lasalowego z dodatkiem kationów Li^+ , Na^+ i K^+ w stosunku stechiometrycznym 1:1 zarejestrowane przy napięciu stożka 10 V

3.5.2 Badania NMR

Porównanie widm ^{13}C NMR kompleksów kwasu lasalowego z aminami, do których dodano kationów w różnych stosunkach stechiometrycznych z widmem wyjściowego kompleksu wykazało różnicę przesunięć chemicznych sygnałów pochodzących od atomów węgla bezpośrednio sąsiadujących z atomami tlenu, co wskazuje na proces kompleksowania kationu w obecności aminy. Porównane widma dla kompleksu LAS-AM7 i kompleksu z dodatkiem kationu Li^+ w stosunkach stechiometrycznych 1:0.25; 1:0.5; i 1:1 przedstawiono na (Rys. 63).

Wartości przesunięć chemicznych sygnałów pochodzących od wybranych atomów węgla oraz wodoru związków LAS-AM1, LAS-AM7-Li 1:0.25, LAS-AM7-Li 1: 0.5 i LAS-AM7-Li 1:1 zestawiono w Tabeli 13.

Obserwowane różnice przesunięć chemicznych, zwłaszcza dla atomu C(13) potwierdzają utworzenie kompleksu kwasu lasalowego z kationem Li^+ w obecności aminy oraz fakt, że kompleksy te istnieją w równowadze. Taka interpretacja jest zgodna z przedstawionymi wyżej wynikami badań ESI-MS.



Rys. 63 Przykładowe widma ^{13}C NMR kompleksu LAS-AM7 (—) i jego roztworów z dodatkiem kationu Li^+ w stosunkach stechiometrycznych 1:0.25 (—), 1:0.5 (—) i 1:1 (—)

Tabela 13 Przesunięcia chemiczne sygnałów ^1H i ^{13}C NMR (ppm) kompleksu LAS-AM7 i jego roztworów z kationem Li^+ o różnych stężeniach stechiometrycznych

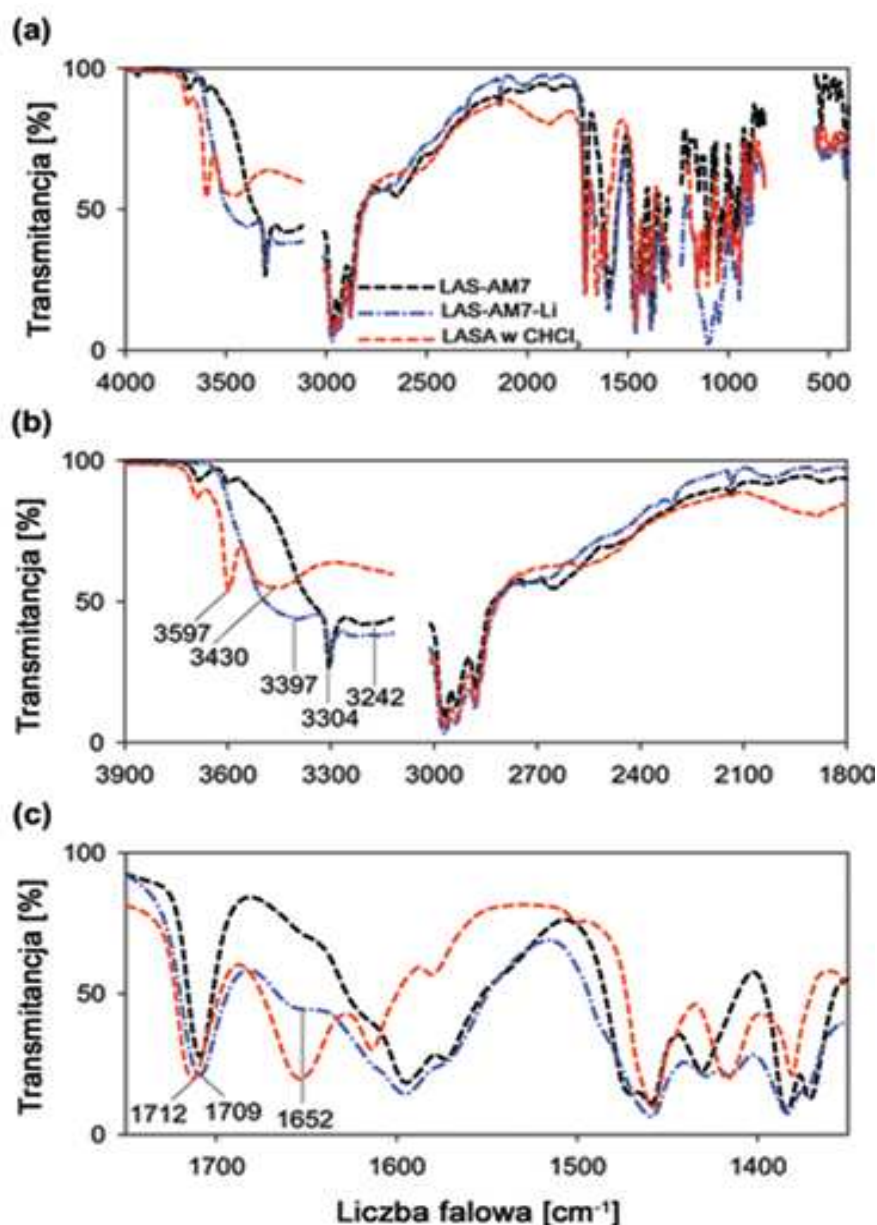
Nr atomu	Przesunięcie chemiczne (ppm)				Różnice (Δ) między przesunięciami chemicznymi (ppm)		
	LAS-AM7	LAS-AM7-Li 1:0.25 eq	LAS-AM7-Li 1: 0.5 eq	LAS-AM7-Li 1:1 eq	$\Delta 1$	$\Delta 2$	$\Delta 3$
1	174.7	175.4	175.4	175.7	0.7	0.7	1
2	116.6	114.7	114.7	115.1	-1.9	-1.9	-1.5
3	161.5	161.3	160.9	160.4	-0.2	-0.6	-1.1
4	123.6	123.5	123.4	123.3	-0.1	-0.2	-0.3
5	132.7	132.8	132.9	132.9	0.1	0.2	0.2
6	120.2	120.3	120.4	120.6	0.1	0.2	0.4
7	144.1	144.0	143.8	143.5	-0.1	-0.3	-0.6
11	70.9	71.3	71.1	71.2	0.4	0.2	0.3
12	48.7	48.9	48.8	48.7	0.2	0.1	0
13	217.5	217.9	218.3	218.8	0.4	0.8	1.3
14	55.9	55.7	55.7	55.3	-0.2	-0.2	-0.6
15	83.3	83.3	83.3	83.7	0	0	0.4
18	87.4	87.6	87.6	87.6	0.2	0.2	0.2
19	70.0	69.7	69.6	69.5	-0.3	-0.4	-0.5
22	71.4	71.6	71.6	71.7	0.2	0.2	0.3
23	76.8	77.2	77.2	77.2	0.4	0.4	0.4

$$\Delta 1 = \delta_{\text{LAS-AM7-Li 1:0.25 eq}} - \delta_{\text{LAS-AM7}}, \Delta 2 = \delta_{\text{LAS-AM7-Li 1:0,5 eq}} - \delta_{\text{LAS-AM7}}, \Delta 3 = \delta_{\text{LAS-AM7-Li 1:1 eq}} - \delta_{\text{LAS-AM7}}$$

3.5.3 Badania FT-IR

Porównanie widm FT-IR kompleksu LAS-AM7 przed i po dodaniu nadchloranu litu (**Rys. 64**) wykazało zmiany w położeniach pasm absorpcyjnych związane z pojawieniem się kationu. W widmie FT-IR kompleksu LAS-AM7 zmianie ulega położenie pasm pochodzących od drgań $\nu(\text{OH})$ po dodaniu kationu Li^+ , co wskazuje na zmniejszenie siły wiązań wodorowych związane z pojawieniem się kationu. Ponadto obserwuje się pojawienie nowego pasma – nieobecnego w widmie kompleksu LAS-AM7 przed dodaniem nadchloranu – z maksimum przy 1652 cm^{-1} (**Rys. 64c**) Pasma takie obserwowane jest również w widmie kwasu lasalowego w roztworze chloroformowym i przypisywane jest drganiom $\nu(\text{C}=\text{O})$ związanej wodorowo grupy karboksylowej. Fakt pojawienia się tego pasma w widmie kompleksu LAS-AM7-Li dowodzi, że następuje częściowa dysocjacja kompleksu kwasu lasalowego, a miejsce kompleksowanej aminy zajmuje dodany kation litowca. Fakt ten potwierdza również przesunięcie pasma pochodzącego od drgań $\nu(\text{C}=\text{O})$ grupy ketonowej po dodaniu kationu Li^+

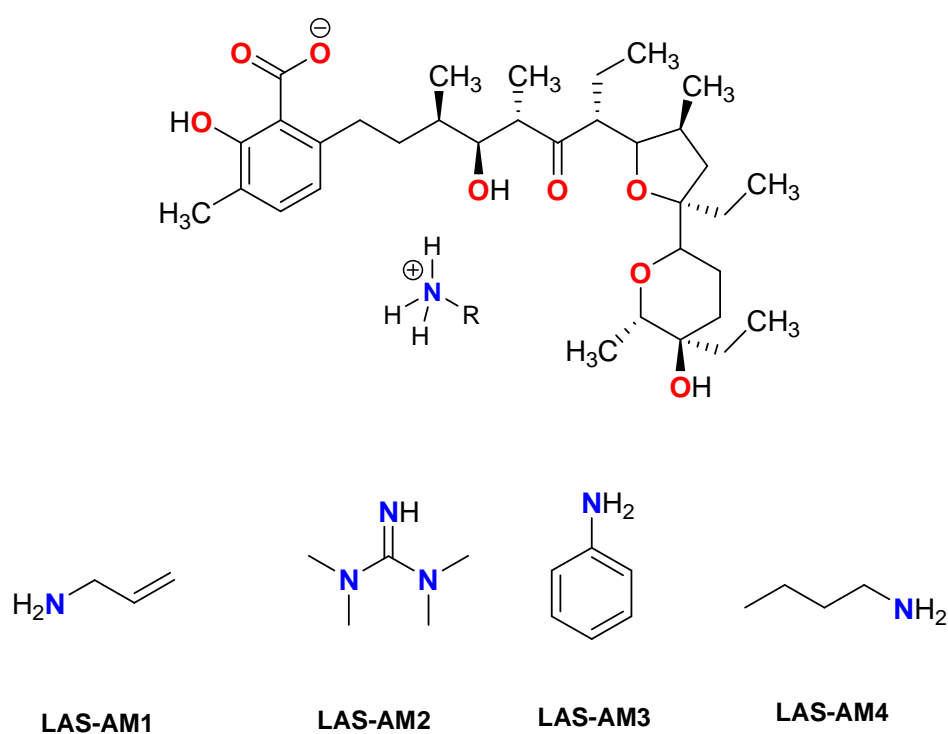
(Rys. 64c), co obserwowane było w kompleksach kwasu lasalowego z kationem Li^+ [211]. Wszystkie powyższe obserwacje wskazują na obecność w roztworze równowagi pomiędzy dwoma kompleksami - pierwszym, w którym kwas lasalowy kompleksuje aminę i drugim, w której kwas lasalowy kompleksuje kation. Taka interpretacja jest zgodna z omówionymi wcześniej wynikami badań ESI-MS i NMR, pokazując, że kwas lasalowy jest zdolny do kompleksowania aminy nawet w obecności konkurującego o miejsce kompleksujące kationu.



Rys. 64 Zestawienie widm FT-IR w roztworze chloroformowym: kompleksu LAS-AM7 (- -) kompleksu LAS-AM7 z dodatkiem kationu Li^+ (- -) oraz kwasu lasalowego (- -) w zakresie: a) 4000 – 500 cm^{-1} , b) 3900 – 1800 cm^{-1} , c) 1750 – 1350 cm^{-1}

3.6 Aktywność przeciwdrobnoustrojowa kwasu lasalowego i jego kompleksów z aminami

Kwas lasalowy jest związkiem wykazującym aktywność biologiczną wobec bakterii Gram-dodatnich, dlatego postanowiłem określić aktywność biologiczną otrzymanych kompleksów kwasu lasalowego. Badanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej kwasu lasalowego oraz kilku jego kompleksów z aminami (**Rys. 65**) przeprowadzono we współpracy z dr Joanną Stefańską w Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Warszawie.



Rys. 65 Struktury związków, dla których badano aktywność biologiczną

Do badań aktywności przeciwdrobnoustrojowej użyto szczepów ziarenkowców Gram-dodatnich: *Staphylococcus aureus* NCTC 4163, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Enterococcus hirae* ATCC 10541, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Micrococcus luteus* ATCC

10240; **pałeczek Gram-ujemnych**: *Escherichia coli* ATCC 10538, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* NCTC 8196, *Proteus vulgaris* NCTC 4635, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27863, *Bordetella bronchiseptica* ATCC 4617; **oraz drożdżaków**: *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida parapsilosis* ATCC 22019.

Szczepy te są standardowo używane w oznaczeniach aktywności i/lub środków dezynfekcyjnych. Szczepy pochodzą z kolekcji Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

Ponadto przebadano aktywność kwasu lasalowego i jego kompleksu z alliloaminą (LAS-AM1) przeciwko szpitalnym szczepom gronkowca złocistego (*Staphylococcus aureus*), które uzyskano z różnych próbek biologicznych od pacjentów Szpitala Uniwersytetu Medycznego w Warszawie. W badaniach użyto 10 szczepów wrażliwych na metycylinę (*S. aureus* MSSA) oraz 10 szczepów opornych na metycylinę (*S. aureus* MRSA)

Badania prowadzono metodą krążkowo-dyfuzyjną oraz oznaczając wartość minimalnego stężenia hamującego (MIC) zgodnie z zaleceniami CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) [212, 213]

W metodzie krążkowo-dyfuzyjnej na podłożu Mueller-Hinton II agar (*Becton Dickinson*) lub dla *Candida albicans* na podłożu RPMI (*Sigma*) obsiane zawiesiną drobnoustroju o gęstości 0.5 w skali Mc Farlanda nanoszono krążki bibułowe (Whatman 3) o średnicy 9 mm nasączone roztworami badanych związków w DMSO w stężeniu 400 µg/krążek. Po okresie inkubacji (18 h w temperaturze 35 °C) mierzono średnicę stref zahamowania wzrostu (GIZ) drobnoustrojów wokół krążków z badanym związkiem.

Minimalne stężenie hamujące (MIC) oznaczano metodą rozcieńczeń badanego związku w podłożu stałym w zakresie stężeń 3.125 µg/ml – 400 µg/ml. Na płytce MH II agar zawierające odpowiednie stężenie związku nanoszono po 2µl rozcieńzonego szczepu w ilości końcowej 10⁴ cfu/ml,¹ a w przypadku szczepu *E. hirae* w ilości 10⁵ cfu/ml. Wyniki odczytywano po 18-godzinnej inkubacji w temperaturze 35 °C.

Wyniki badan aktywności przeciwdrobnoustrojowej kwasu lasalowego i jego kompleksów z aminami zestawiono w **Tabelach 14-15**

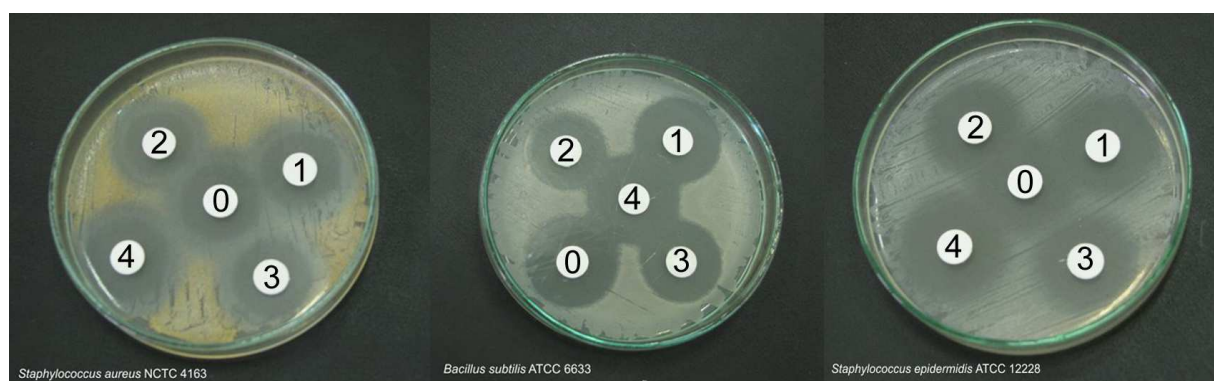
¹ **CFU** (ang. *colony forming unit* - jednostka tworząca kolonię) - skrót oznaczający pojedyncze komórki, z których w wyniku podziałów powstaną kolonie komórek. W związku z tą właściwością, liczba kolonii może służyć do określenia stężenia komórek, (CFU) w roztworze.

Tabela 14. Wartości średnicy zahamowania wzrostu GIZ [mm] oraz wartości minimalnego stężenia hamującego MIC [$\mu\text{g/ml}$] wzrost mikroorganizmów, wyznaczone dla kwasu lasalowego i jego kompleksów

	(GIZ) [mm] oraz (MIC) [$\mu\text{g/ml}$]									
	LASA		LAS-AM1		LAS-AM2		LAS-AM3		LAS-AM4	
	GIZ	MIC	GIZ	MIC	GIZ	MIC	GIZ	MIC	GIZ	MIC
<i>S. aureus</i> NCTC 4163	30	4	22	6.25	25	16	28	4	25	4
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	29	4	25	3.125	25	16	29	2	27	4
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	24	4	24	6.25	23	16	23	2	21	4
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	24	4	26	6.25	26	16	23	2	22	4
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	28	4	28	6.25	25	8	26	4	26	8
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	31	2	26	3.125	26	16	28	2	26	2
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	29	2	30	3.125	27	8	30	2	30	4
<i>E. hirae</i> ATCC 10541	20	8	22	6.25	23	32	21	4	20	8
<i>M. luteus</i> ATCC 9341	28	4	29	3.125	28	16	27	2	26	4
<i>M. luteus</i> ATCC 10240	31	4	33	3.125	28	8	31	2	29	4

Przeprowadzone badania mikrobiologiczne wykazały, że wszystkie badane kompleksy kwasu lasalowego wykazują aktywność przeciwko bakteriom gram dodatnim.

Kwas lasalowy wykazuje silną aktywność przeciwko bakteriom Gram-dodatnim, nie jest aktywny natomiast w stosunku do bakterii Gram-ujemnych oraz drożdżaków z rodzaju *Candida* (Tabela 14). Aktywność kompleksów LAS-AM1 i LAS-AM2 jest nieco niższa niż w przypadku niemodyfikowanego kwasu, a kompleks LAS-AM4 wykazał podobną do kwasu lasalowego aktywność względem bakterii Gram-dodatnich. Kompleks LAS-AM3 wykazał się wyższą aktywnością niż niemodyfikowany kwas lasalowy, dlatego iż hamuje on wzrost mikroorganizmów przy niższych stężeniach niż niemodyfikowany kwas (Tabela 14). Na Rysunku 66 pokazano badań GIZ wykonanych metodą krążków dyfuzyjnych kwasu lasalowego (oznaczonego jako 0) oraz jego kompleksów względem szczepów *Staphylococcus aureus* NCTC 4163, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 oraz *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228



Rys. 66 zdjęcia próbek wykonanych metodą krążków dyfuzyjnych względem szczepów *S. aureus* NCTC 4163, *B. subtilis* ATCC 6633 oraz *S. epidermidis* ATCC 122. Kwas lasalowy oznaczony jako 0, kompleks LAS-AM1 jako 1, kompleks LAS-AM2 jako 2, kompleks LAS-AM3 jako 3, a kompleks LAS-AM4 oznaczono cyfrą 4

Zarówno kwas lasalowy jak i jego kompleksy nie wykazywały aktywności biologicznej względem testowanych szczepów bakterii Gram-ujemnych oraz grzybów *Candida*. Tłumaczyć to można różnicą w budowie struktur otaczających komórki bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. Bakterie Gram-dodatnie posiadają grubszą ścianę komórkową, jednakże bakterie Gram-ujemne posiadają dodatkowo błonę komórkową, co nie pozwala na przechodzenie przez nie hydrofobowych cząsteczek o dużej masie cząsteczkowej, takich jak kwas lasalowy.

Kwas lasalowy i jego kompleks z alliloaminą (LAS-AM1), zostały poddane dodatkowym testom aktywności biologicznej wobec szczepów *gronkowców złocistych* pobranych od pacjentów warszawskich szpitali.

Bakterie gronkowca złocistego (*Staphylococcus aureus*) występują głównie w jamie nosowo-gardłowej oraz na skórze ludzi i zwierząt. Bakterie te dzieli się na dwie grupy: wykazujące odporność na metycylinę - MRSA (ang. *methicillin resistant Staphylococcus aureus*) oraz wrażliwe na działanie metycyliny - MSSA (ang. *methicillin susceptible Staphylococcus aureus*). Bakterie obecne na skórze lub jamie nosowo-gardłowej nie są groźne, jednak przedostając się do wnętrza organizmu np. w wyniku odniesionych ran mogą wywołać zakażenie. Zakażenia wywołane przez MRSA stanowią duży problem, gdyż bakterie te wykazują odporność wobec antybiotyków β -laktamowych, takich jak penicylina czy cefalosporyna. Jedyne skuteczne leki stosowane w leczeniu zakażeń wywołanych szczepami MRSA to antybiotyki glikopeptydowe, takie jak wankomycyna [214-216].

Wyniki badań mikrobiologicznych kwasu lasalowego prowadzone wobec szczepów szpitalnych gronkowców złocistych opornych na metycylinę (MRSA) i wrażliwych na

matycylinę (MSSA) zestawiono w **Tabeli 15**. Badania te wykazały po raz pierwszy, że kwas lasalowy i jego kompleks z alliloaminą wykazują dużą aktywność przeciwko szczepom *S. aureus* MSSA jak, i przeciwko szczepom *S. aureus* MRSA.

Tabela 15. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa kwasu lasalowego i jego kompleksu LAS-AM1 przeciwko wybranym szpitalnym szczepom gronkowca złocistego (*Staphylococcus aureus*) wrażliwych na metycylinę (*S. aureus* MSSA), oraz opornych na metycylinę (*S. aureus* MRSA) (wartości minimalnego stężenia hamującego (MIC) [$\mu\text{g/ml}$] wzrost drobnoustrojów testowych).

	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	
	LAS	LAS-AM1
<i>S. aureus</i> MSSA	3.125	3.125
319/08	3.125	6.25
320/08	6.25	6.25
321/08	3.125	6.25
322/08	3.125	6.25
323/08	3.125	3.125
324/08	3.125	6.25
325/08	3.125	6.25
336/08	3.125	6.25
337/08	3.125	3.125
338/08	6.25	
<i>S. aureus</i> MRSA		
307/08	6.25	6.25
308/08	6.25	6.25
309/08	6.25	3.125
329/08	6.25	6.25
330/08	3.125	3.125
331/08	3.125	3.125
332/08	3.125	6.25
333/08	3.125	6.25
334/08	3.125	3.125
335/08	3.125	3.125

Wyniki badań aktywności przeciwdrobnoustrojowej kwasu lasalowego i jego kompleksów z aminami pokazały, że wszystkie poddane testom związki wykazywały aktywność przeciwbakteryjną wobec bakterii Gram-dodatnich. Najwyższą aktywność wykazał kompleks LAS-AM3, który pod tym względem okazał się bardziej aktywny niż niemodyfikowany kwas lasalowy. Wszystkie badane związki nie wykazały aktywności wobec bakterii Gram-ujemnych oraz grzybów z rodzaju *Candida*.

3.7 Aktywność cytotoksyczna kwasu lasalowego i jego kompleksów

Naturalne polieteryne antybiotyki jonoforowe mogą być istotnymi czynnikami w terapii antynowotworowej, ponieważ większość z nich wykazuje silną aktywność przeciw proliferacji (namnażaniu) wielu komórek nowotworowych, m. in. przeciw komórkom wykazującym oporność na różne leki – MDR (ang. *Multidrug Resistance*), a także przeciwko komórkom macierzystym raka – CSC (ang. *Cancer Stem Cells*). Aktywność przeciwnowotworowa antybiotyków jonoforowych może być związana z ich zdolnością do kompleksowania kationów i transportowania ich przez błony biologiczne. Coraz więcej dowodów wskazuje, że aktywność przeciwnowotworowa antybiotyków jonoforowych może być wynikiem zdolności do indukcji apoptozy, powodującej śmierć komórki [15]. Dlatego też tak ważne jest określenie aktywności cytotoksycznej antybiotyków jonoforowych i poznanie dokładnego mechanizmu ich działania.

Pojawiające się ostatnio doniesienia na temat aktywności cytotoksycznej antybiotyków jonoforowych, a także zastosowania jednego z nich – salinomycyny w terapii antynowotworowej (między innymi regresja nowotworu u pacjentek z rakiem piersi oraz mniejsze niż w przypadku konwencjonalnych chemioterapeutyków skutki uboczne terapii) [102] zainspirowały mnie do określenia po raz pierwszy aktywności cytotoksycznej kwasu lasalowego oraz dwóch jego kompleksów.

Badanie aktywności cytotoksycznej kwasu lasalowego oraz jego kompleksów z aniliną (LAS-AM3) oraz *N*-butyloaminą (LAS-AM4) przeprowadzono we współpracy z prof. dr hab. Joanną Wietrzyk w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu.

Do badań aktywności cytotoksycznej użyto 6 różnych linii komórkowych: A-549 (ludzki rak płuc), MCF-7 (ludzki rak piersi), HT-29 (ludzki rak okrężnicy), P-388 (komórki mysiej białaczki), HLMEC (ludzki śródbłonek pochodzenia płucnego) oraz BALB/3T3 (komórki mysich fibroblastów). Wszystkie linie komórkowe znajdują się w kolekcji linii komórkowych Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu. Komórki hodowane były w następujący sposób:

- Komórki linii MCF-7 hodowano w medium Eagle z dodatkiem 10% FBS (bydlęca surowica płodowa), L-glutaminy (2mM), aminokwasów oraz insuliny.
- Komórki linii A549 hodowano w medium OptiMEM+RPMI1640 (1:1) z dodatkiem 5% FBS (bydlęca surowica płodowa) oraz L-glutaminy (2mM).
- Komórki linii HT-29 hodowano w medium OptiMEM+RPMI1640 (1:1) z dodatkiem 5% FBS (bydlęca surowica płodowa) oraz glutaminy (2mM) i pirogronianu sodu (1mM).
- Komórki linii HLMEC hodowano w medium RPMI1640 z dodatkiem 10% FBS (bydlęca surowica płodowa) oraz L-glutaminy (2mM).
- Komórki linii BALB 3T3 hodowano w medium Dulbecco z dodatkiem 10% FBS (bydlęca surowica płodowa), glutaminy (4mM) oraz glukozy (4,5g/L).
- Komórki linii P388 hodowano w medium RPMI1640 z dodatkiem 10% FBS (bydlęca surowica płodowa), L-glutaminy (2mM) oraz pirogronianu sodu (1mM).

Wszystkie media zawierały antybiotyki: 100 µg/ml streptomycyny i 100 U/ml penicyliny. Komórki hodowano w wilgotnej atmosferze, 5% CO₂ w 37°C.

Jako związku referencyjnego użyto cisplatyny oraz zbadano kontrolę rozpuszczalnika, tj. DMSO, w takim samym stężeniu jak w próbkach z badanymi związkami. Roztwory wyjściowe (*stock solutions*) testowanych związków o stężeniu 10mg/ml przygotowywano do każdego doświadczenia *ex tempore*, rozpuszczając 1 mg preparatu w 100 µl DMSO. Rozpuszczalnikiem dla dalszych rozcieńczeń było medium hodowlane. Związki przetestowano w przedziałach stężeń od 100 do 0,1 µg/ml. Cisplatyna była badana w stężeniach od 100 do 0,1 µg/ml.

Oznaczenie działania cytotoksycznego badanych związków wykonywano w 96-godzinnych hodowlach *in vitro*. Wobec linii komórek adherentnych zastosowano test kolorymetryczny SRB (za pomocą sulforodaminy B), mierzący zahamowanie proliferacji docelowych komórek na podstawie pomiaru ilości białka komórkowego. Dla komórek mysiej białaczki P388 wykonano test redukcji soli tetrazolowej MTT, jako ocenę aktywności metabolicznej komórek. W każdym doświadczeniu próbki zawierające określone stężenia preparatu nanoszono na płytki 96-dołkowe w trzech powtórzeniach. Doświadczenia powtarzano od trzech do pięciu razy. Wyniki badań zestawione są w **Tabeli 16**.

Tabela 16. Stężenie IC50 badanych związków w µg/ml (średnia + odchylenie standardowe) dla wszystkich badanych linii

Badany związek	Linia komórkowa / IC ₅₀ µg/ml				
	A549	MCF-7	HT-29	HLMEC	P388
LASA	1,35±0,25	4,51±1,83	2,99±1,07	0,45±0,20	2,13±0,90
LAS-AM3	1,36±0,12	4,08±0,64	3,12±0,54	0,39±0,06	2,72±0,46
LAS-AM4	1,32±0,10	4,17±0,61	3,06±0,55	0,37±0,02	2,14±0,86
Cisplatyna	3,35±0,30	3,71±0,62	11,18±1,98	1,95±0,13	2,98±0,08

Wszystkie badane związki, bez względu na linie komórkowe, na których były testowane, są aktywne w badanym zakresie stężeń. Kwas lasalowy oraz jego kompleksy LAS-AM3 i LAS-AM4 hamowały proliferację komórek mysiej białaczki P388 (IC₅₀ w zakresie 2,13-2,72 µg/ml). Najwyższą aktywność związki wykazały wobec komórek ludzkiego śródbłonka pochodzenia płucnego HLMEC (IC₅₀ w zakresie 0,37-0,45 µg/ml) oraz raka niedrobnokomórkowego płuca A549 (1,32-1,36 µg/ml). Warty podkreślenia jest fakt, że aktywność kwasu lasalowego i jego kompleksów jest wyższa od cis-platyny – standardowo stosowanego leku przeciwnowotworowego. Interesujące wyniki badań aktywności przeciwnowotworowej kwasu lasalowego powodują, że może być on traktowany jako potencjalny kandydat w dalszych poszukiwaniach nowych leków w terapii antynowotworowej.

4. Część eksperymentalna

4.1 Odczynniki i rozpuszczalniki

4.1.1 Izolacja soli sodowej kwasu lasalowego z preparatu „Avatec”

Ze względu na brak komercyjnie dostępnego kwasu lasalowego jego sól sodową kwasu lasalowego otrzymałem z preparatu Avatec z firmy Spezialfutter Neuruppin GmbH&Co. K.G. , który znajduje zastosowanie jako dodatek do pasz dla zwierząt. 500g tego preparatu poddałem ekstrakcji 2 l chloroformu w aparacie Soxhleta przez 24 godziny.. Po zakończeniu procesu pozostawiłem kolbę do ostygnięcia. Następnie roztwór chloroformowy soli sodowej kwasu lasalowego przesączyłem, aby otrzymać klarowny roztwór. Przesączę podzieliłem na dwie części i oddestylowałem rozpuszczalnik na wyparce obrotowej. Otrzymałem brązowy osad, który przemywałem eterem naftowym oraz heksanem, aż zmienił barwę na jaśniejszą. Otrzymałem 68 g soli sodowej kwasu lasalowego. Według specyfikacji w 1 kg preparatu Avatec znajduje się 150 g soli sodowej kwasu lasalowego. Wynika z tego, że otrzymano czysty produkt z wydajnością 91%

Czystość produktu została potwierdzona przez wykonanie widm FT-IR, a także NMR oraz porównanie ich z widmami wzorca.

4.1.2 Pozyskiwanie kwasu lasalowego z jego soli

Sól sodowa kwasu lasalowego (3g) rozpuściłem w 25 ml chlorku metylenu i przenieśliem do rozdzielacza zawierającego 50 ml wodnego roztworu kwasu siarkowego o pH = 1.5 Po intensywnym wytrząsaniu rozdzielacz pozostawiłem i po rozwarstwieniu usunąłem fazę wodną. Fazę organiczną wytrząsałem ponownie z kolejnymi porcjami roztworu H₂SO₄, aż odczyn fazy wodnej pozostał kwaśny. Oddzieloną warstwę organiczną, zawierającą kwas lasalowy przepłukałem kilkakrotnie wodą destylowaną w celu usunięcia resztek kwasu siarkowego. Ostatecznie rozpuszczalnik organiczny został oddestylowany aż do uzyskania suchej pozostałości pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymałem 2.6 g kwasu lasalowego. Czystość produktu została potwierdzona za pomocą widm FT-IR oraz NMR

4.1.3 Rozpuszczalniki

Wszystkie rozpuszczalniki do pomiarów spektroskopowych (chloroform, deuterowany chloroform i acetonitryl) zostały zakupione w firmach korporacji Sigma-Aldrich-Fluka. Rozpuszczalniki stosowane w pomiarach spektroskopowych suszone były sitami molekularnymi 3 A (Aldrich), przez kilkanaście dni przed pomiarem. Rozpuszczalniki używane jako medium reakcyjne (chlorek metylenu) zakupiono w firmie Aldrich lub PPH „POCh” S.A. Gliwice.

4.1.4 Preparatyka kompleksów kwasu lasalowego

Równomolowe ilości kwasu lasalowego i odpowiedniej aminy rozpuściłem w chlorku metylenu, zmieszałem ze sobą i odparowałem douzyskania suchej pozostałości. Czynność tę powtórzyłem jeszcze 5 razy. Suchą pozostałość rozpuściłem następnie w gorącym acetonitrylu lub acetonie i pozostawiłem do powolnej krystalizacji. Przeprowadziłem liczne próby krystalizacji m. in z aminami biogennymi (tryptamina, histamina) i poliamidami (spermina, spermidyna) ale tylko w 7 przypadkach otrzymałem kompleksy w fazie krystalicznej z możliwością ich wykorzystania w badaniach krystalograficznych.

4.2 Stosowane metody badawcze.

4.2.1 Dyfrakcja promieni Rentgenowskich

Pomiary dyfrakcji promieni Rentgenowskich wykonano w temperaturze 293 K przy użyciu dyfraktometru KUM4A-CCD. Analiza rentgenograficzna została przeprowadzona w Zakładzie Chemii Materiałów Wydziału Chemii UAM przez dr Małgorzatę Ratajczak-Sitarz i Prof. dr hab. Andrzeja Katrusiaka, oraz w Instytucie Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych Pan we Wrocławiu przez prof. Jana Janczaka. Przykładowe dane kryształów i parametry pomiarów zebrano w **Tabelach 17-19**.

Tabela 17. Dane kryształu i pomiary rentgenowskiego dla kryształu LAS-AM3

Wzór empiryczny	$C_{34}H_{54}O_8 \cdot C_6H_7N$
Masa molowa	683.90
Temperatura (K)	293(2)
Długość fali	0.71073 Å
Układ krystalograficzny ,grupa przestrzenna	ortorombowy, $P2_12_12_1$
Wymiary kom. elementarnej (Å)	$a = 10.6585(1)$ $b = 18.9220(2)$ $c = 19.3361(2)$
Objętość (Å ³)	3899.71(7)
Z	4
Obliczona gęstość	1.165 gcm ⁻³
Współczynnik absorpcji	0.087 mm ⁻¹
$F(000)$	1488
Rozmiar kryształu	0.25 x 0.20 x 0.10 mm
ϑ zakres kąta	1.51-26.63°
Ograniczenia dla hkl	$-13 \leq h \leq 13, -23 \leq k \leq 22, -24 \leq l \leq 24$
Liczba refleksów / refleksy jednostkowe	61008 / 8122 $R_{int} = 0.0178$
Zgodność do $\vartheta = 30.10$	99.5 %
Metoda zagęszczenia	Pełna macierz najmniejszych kwadratów dla F^2
Dane/ ograniczenia / parametry	8122 / 0 / 454
Poprawność dopasowania F^2	1.090
Końcowe R i [$l > 2\sigma(l)$]	$R_1 = 0.0344, wR_2 = 0.1044$
R (całość danych)	$R_1 = 0.0365, wR_2 = 0.1061$
Największy i najmniejszy pik na mapie różnicowej	0.173 and -0.120 eÅ^{-3}

Tabela 18 Dane kryształu i pomiary rentgenowskiego dla kryształu LAS-AM4

Wzór empiryczny	$C_{38}H_{65}NO_8$
Masa molowa	663.91
Temperatura (K)	293(2)
Długość fali	1.54178 Å
Układ krystalograficzny ,grupa przestrzenna	ortorombowy, $P2_12_12_1$
Wymiary kom. elementarnej (Å)	$a = 10.1671(1)$ $b = 18.7745(1)$ $c = 20.4549(1)$
Objętość (Å ³)	3904.48(3)
Z	4
Obliczona gęstość	1.129 gcm ⁻³
Współczynnik absorpcji	0.621 mm ⁻¹
$F(000)$	1456
Rozmiar kryształu	0.25 x 0.20 x 0.15 mm
ϑ zakres kąta	3.19-73.82°
Ograniczenia dla hkl	$-12 \leq h \leq 9, -23 \leq k \leq 23, -25 \leq l \leq 25$
Liczba refleksów / refleksy jednostkowe	30662 / 7816 $R_{int} = 0.0121$
Zgodność do $\vartheta = 30.10$	99.3 %
Metoda zagęszczenia	Pełna macierz najmniejszych kwadratów dla F^2
Dane/ ograniczenia / parametry	7816 / 0 / 447
Poprawność dopasowania F^2	1.005
Końcowe R i [$I > 2\sigma(I)$]	$R_1 = 0.0421, wR_2 = 0.1375$
R (całość danych)	$R_1 = 0.0433, wR_2 = 0.1406$
Największy i najmniejszy pik na mapie różnicowej	0.431 and -0.213 eÅ^{-3}

Tabela 19 Dane kryształu i pomiary rentgenowskiego dla kryształu LAS-AM7

Wzór empiryczny	$C_{37}H_{59}NO_8$
Masa molowa	645.85
Temperatura (K)	293(2)
Długość fali	1.54178 Å
Układ krystalograficzny ,grupa przestrzenna	ortorombowy, $P2_12_12_1$
Wymiary kom. elementarnej (Å)	$a = 10.0590(1)$ $b = 18.5610(1)$ $c = 19.7388(1)$
Objętość (Å ³)	3685.15(3)
Z	4
Obliczona gęstość	1.164 gcm ⁻³
Współczynnik absorpcji	0.648 mm ⁻¹
$F(000)$	1408
Rozmiar kryształu	0.25 x 0.20 x 0.15 mm
ϑ zakres kąta	3.27-73.81°
Ograniczenia dla hkl	$-8 \leq h \leq 12, -23 \leq k \leq 22, -24 \leq l \leq 24$
Liczba refleksów / refleksy jednostkowe	30193 / 7320 $R_{int} = 0.0127$
Zgodność do $\vartheta = 30.10$	99.2 %
Metoda zagęszczenia	Pełna macierz najmniejszych kwadratów dla F^2
Dane/ ograniczenia / parametry	7320 / 0 / 427
Poprawność dopasowania F^2	1.038
Końcowe R i [$>2\sigma(I)$]	$R_1 = 0.0401, wR_2 = 0.1202$
R (całość danych)	$R_1 = 0.0412, wR_2 = 0.1219$
Największy i najmniejszy pik na mapie różnicowej	0.260 and -0.139 eÅ^{-3}

4.2.2 Spektroskopia FT-IR

Widma związków o stężeniu 0.07 mol/dm³ w bezwodnym chloroformie wykonałem w kuwecie wyposażonej w okna z monokrystalicznego krzemu. Grubość warstwy roztworu wynosiła 0.176 mm. Pomiary wykonano przy użyciu aparatu FTIR Bruker IFS 113v z detektorem DTGS z rozdzielczością 2 cm⁻¹ w temperaturze 300 K. Użyto funkcję apodyzacyjną Happa-Genzela. Standardowo wykonywano pomiar, na który składały się 64 skany.

4.2.3 Spektroskopia NMR

Widma ^1H , ^{13}C NMR badanych związków w roztworach wykonałem w stężeniu 0.07 mol/dm^3 w chloroformie-d stosując jako wzorzec wewnątrz TMS. Pomiarów wykonano przy użyciu aparatu Varian Gemini 300VT w $T=293 \text{ K}$ i częstotliwości 300.075 Hz . Dokładność oznaczenia wynosiła 0.01 ppm dla pomiarów ^1H NMR i 0.1 ppm dla pomiarów ^{13}C NMR. Poprawność przypisania sygnałów w widmach ^1H i ^{13}C NMR została zweryfikowana na podstawie dwuwymiarowych widm korelacyjnych (COSY, HETCOR). Parametry akwizycji dla widm protonowych: impuls 30° , rozdzielczość 0.64 Hz , liczba skanów 64. Parametry akwizycji dla widm węglowych: impuls 30° z impulsowym rozprężaniem protonów, rozdzielczość 0.97 Hz , liczba skanów: 2000-8000.

4.2.4 Spektrometria mas

Widma masowe z techniką jonizacji ESI (*Electrospray Ionization*) zostały wykonane na aparacie Waters/Micromass (Manchester, UK) ZQ dla związków w postaci roztworów w acetonitrylu o stężeniu rzędu 10^{-5} - 10^{-4} mol/dm^3 . Próbki były dozowane do źródła ESI przy użyciu pomp Harvarda z prędkością przepływu wynoszącą $20 \mu\text{l/min}$. Potencjały źródła ESI wynosiły: kapilara 3 kV , soczewki 0.5 kV , ekstraktor 4V . Standardowe widmo ESI wykonywano przy napięciu stożka $cv = 10\text{V}$. Temperatura źródła wynosiła $120 \text{ }^\circ\text{C}$, a temperatura desolwatacji $300 \text{ }^\circ\text{C}$. Do nebulizacji stosowano azot, którego prędkość przepływu wynosiła od 100 do $300 \text{ dm}^3/\text{h}$. Widma masowe były wykonywane w trybie jonów dodatnich z rozdzielczością wynoszącą $m/z = 1$.

4.2.5 Analiza elementarna

Analizę elementarną otrzymanych związków wykonano na aparacie Elementar Analyser CHN 240 firmy Perkin Elmer, a uzyskane wyniki zebrałem w **Tabeli 20**.

4.2.6 Temperatura topnienia

Temperaturę topnienia otrzymanych kryształów zmierzono na aparacie SMP10 firmy Stuart (Tabela 20)

Tabela 20. Analiza elementarna i temperatura topnienia otrzymanych kompleksów kwasu lasalowego.

związek	Wzór sumaryczny i masa molowa [g/mol]	Analiza elementarna [%]		Temperatura topnienia
		Obliczona	Wyznaczona	
LAS-AM1	C ₃₇ H ₆₁ NO ₈ 684.4	C, 68.59	C, 68.61	199–200 °C
		H, 9.49	H, 9.59	
		N, 2.16	N, 2.01	
LAS-AM2	C ₃₉ H ₆₇ N ₃ O ₈ * C ₃ H ₆ O 746.03	C, 62.73	C, 62.77	139-141 °C
		H, 8.98	H, 9.04	
		N, 5.62	N, 5.51	
LAS-AM3	C ₃₄ H ₅₄ O ₈ * C ₆ H ₇ N 683.90	C, 70.18	C, 70.21	208-210°C
		H, 8.91	H, 8.88	
		N, 2.04	N, 2.07	
LAS-AM4	C ₃₈ H ₆₅ NO ₈ 663.91	C, 68.68	C, 68.72	180-182°C
		H, 9.79	H, 9.75	
		N, 2.10	N, 2.13	
LAS-AM5	C ₄₁ H ₆₃ NO ₈ 697.90	C, 70.58	C, 70.;62	179-181°C
		H, 9.02	H, 9.04	
		N, 2.01	N, 2.03	
LAS-AM6	C ₃₄ H ₅₈ NO ₈ 608.80	C, 67.01	C, 67.07	183-186°C
		H, 9.52	H, 9.48	
		N, 2.29	N, 2.27	
LAS-AM7	C ₃₇ H ₅₉ NO ₈ 645.85	C, 68.83	C, 68.88	190-192°C
		H, 9.13	H, 9.10	
		N, 2,16	N, 2.17	

4.2.7 Wyznaczanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej

Do badań aktywności przeciwdrobnoustrojowej użyto szczepów ziarenkowców Gram-dodatnich: *Staphylococcus aureus* NCTC 4163, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus*

epidermidis ATCC 12228, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Enterococcus hirae* ATCC 10541, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Micrococcus luteus* ATCC 10240; **pałeczek Gram-ujemnych**: *Escherichia coli* ATCC 10538, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* NCTC 8196, *Proteus vulgaris* NCTC 4635, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27863, *Bordetella bronchiseptica* ATCC 4617; **oraz drożdżaków**: *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida parapsilosis* ATCC 22019.

Szczepy te są standardowo używane w oznaczeniach aktywności i/lub środków dezynfekcyjnych. Szczepy pochodziły z kolekcji Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

Ponadto przebadano aktywność kwasu lasalowego i jego kompleksu z alliloaminą (LAS-AM1) przeciwko szpitalnym szczepom gronkowca złocistego (*Staphylococcus aureus*), które uzyskano z różnych próbek biologicznych od pacjentów Szpitala Uniwersytetu Medycznego w Warszawie. W badaniach użyto 10 szczepów wrażliwych na metycylinę (*S. aureus* MSSA) oraz 10 szczepów opornych na metycylinę (*S. aureus* MRSA)

Badania prowadzono metodą krążkowo-dyfuzyjną oraz oznaczając wartość minimalnego stężenia hamującego (MIC) zgodnie z zaleceniami CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*)

W metodzie krążkowo-dyfuzyjnej na podłoże Mueller-Hinton II agar (*Becton Dickinson*) lub dla *Candida albicans* na podłoże RPMI (*Sigma*) obsiane zawiesiną drobnoustroju o gęstości 0.5 w skali Mc Farlanda nanoszono krążki bibułowe (Whatman 3) o średnicy 9 mm nasączone roztworami badanych związków w DMSO w stężeniu 400 µg/krążek. Po okresie inkubacji (18 h w temperaturze 35 °C) mierzono średnicę stref zahamowania wzrostu drobnoustrojów wokół krążków z badanym związkiem.

Minimalne stężenie hamujące (MIC) oznaczano metodą rozcieńczeń badanego związku w podłożu stałym w zakresie stężeń 3.125 µg/ml – 400 µg/ml. Na płytce MH II agar zawierające odpowiednie stężenie związku nanoszono po 2µl rozcieńczonego szczepu w ilości końcowej 10⁴ cfu/ml,¹ a w przypadku szczepu *E. hirae* w ilości 10⁵ cfu/ml. Wyniki odczytywano po 18-godzinnej inkubacji w temperaturze 35 °C.

4.2.8 Wyznaczanie aktywności cytotoksycznej

Do badań aktywności cytotoksycznej użyto 6 różnych linii komórkowych: A-549 (ludzki rak płuc), MCF-7 (ludzki rak piersi), HT-29 (ludzki rak okrężnicy), P-388 (komórki mysiej białaczki), HLMEC (ludzki śródbłonek pochodzenia płucnego) oraz BALB/3T3 (komórki mysich fibroblastów). Wszystkie linie komórkowe znajdują się w kolekcji linii komórkowych Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu. Komórki hodowane były w następujący sposób:

- Komórki linii MCF-7 hodowano w medium Eagle z dodatkiem 10% FBS (bydlęca surowica płodowa), L-glutaminy (2mM), aminokwasów oraz insuliny.
- Komórki linii A549 hodowano w medium OptiMEM+RPMI1640 (1:1) z dodatkiem 5% FBS (bydlęca surowica płodowa) oraz L-glutaminy (2mM).
- Komórki linii HT-29 hodowano w medium OptiMEM+RPMI1640 (1:1) z dodatkiem 5% FBS (bydlęca surowica płodowa) oraz glutaminy (2mM) i pirogronianu sodu (1mM).
- Komórki linii HLMEC hodowano w medium RPMI1640 z dodatkiem 10% FBS (bydlęca surowica płodowa) oraz L-glutaminy (2mM).
- Komórki linii BALB 3T3 hodowano w medium Dulbecco z dodatkiem 10% FBS (bydlęca surowica płodowa), glutaminy (4mM) oraz glukozy (4,5g/L).
- Komórki linii P388 hodowano w medium RPMI1640 z dodatkiem 10% FBS (bydlęca surowica płodowa), L-glutaminy (2mM) oraz pirogronianu sodu (1mM).

Wszystkie media zawierały antybiotyki: 100 µg/ml streptomycyny i 100 U/ml penicyliny. Komórki hodowano w wilgotnej atmosferze, 5% CO₂ w 37°C.

Jako związku referencyjnego użyto cisplatyny oraz zbadano kontrolę rozpuszczalnika, tj. DMSO, w takim samym stężeniu jak w próbkach z badanymi związkami. Roztwory wyjściowe (*stock solutions*) testowanych związków o stężeniu 10mg/ml przygotowywano do każdego doświadczenia *ex tempore*, rozpuszczając 1 mg preparatu w 100 µl DMSO. Rozpuszczalnikiem dla dalszych rozcieńczeń było medium hodowlane. Związki przetestowano w przedziałach stężeń od 100 do 0,1 µg/ml. Cisplatyna była badana w stężeniach od 100 do 0,1 µg/ml.

Oznaczenie działania cytotoksycznego badanych związków wykonywano w 96-godzinnych hodowlach *in vitro*. Wobec linii komórek adherentnych zastosowano test kolorymetryczny SRB (za pomocą sulforodaminy B), mierzący zahamowanie proliferacji docelowych komórek na podstawie pomiaru ilości białka komórkowego. Dla komórek mysiej białaczki P388 wykonano test redukcji soli tetrazolowej MTT, jako ocenę aktywności metabolicznej komórek. W każdym doświadczeniu próbki zawierające określone stężenia preparatu nanoszono na płytki 96-dołkowe w trzech powtórzeniach. Doświadczenia powtarzano od trzech do pięciu razy

Kontrola rozpuszczalnika wykazała brak działania samego DMSO na komórki linii A549, HT-29, BALB 3T3, natomiast w przypadku linii MCF-7 stwierdzono nieznaczne zahamowanie proliferacji (rzędu kilkunastu procent) przy najwyższym testowanym stężeniu DMSO wynoszącym 1%. Podobnie dla linii HLMEC, przy stężeniu DMSO 1%, zaobserwowano zahamowanie wzrostu komórek w zakresie 20-49%.

5. Podsumowanie i wnioski

W trakcie realizacji pracy doktorskiej otrzymałem siedem nowych kompleksów kwasu lasalowego z aminami o różnej strukturze: z alliloaminą (LAS-AM1), z 1,1,3,3-tetrametyloguanidyną (LAS-AM2), z aniliną (LAS-AM3), z *N*-butyloaminą (LAS-AM4), z benzyloaminą (LAS-AM5), z amoniakiem (LAS-AM6) oraz z propargiloaminą (LAS-AM7), wszystkie w stanie krystalicznym.

Przeprowadzone badania ESI-MS wykazały, że kwas lasalowy tworzy kompleksy z aminami w stosunku stechiometrycznym 1:1. Analiza krystalograficzna pozwoliła na jednoznaczne ustalenie struktury tych kompleksów. Stwierdzono, że cząsteczka kwasu lasalowego w kompleksach jest zawsze zdeprotonowana, a sprotonowana amina jest kompleksowana w pseudo-cyklicznej strukturze anionu kwasu lasalowego. Ta pseudo-cykliczna struktura stabilizowana jest za pomocą wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych pomiędzy zdeprotonowaną grupą karboksylową a grupami hydroksylowymi O(3)H, O(4)H i O(8)H. We wszystkich kompleksach najkrótsze jest wewnątrzcząsteczkowe wiązanie wodorowe pomiędzy grupą hydroksylową O(3)H a grupą karboksylanową. Długość tego wiązania, waha się od 2.421 Å dla kompleksu LAS-AM6 do 2.461 Å dla kompleksu LAS-AM7, co klasyfikowało by je do grupy bardzo silnych wiązań wodorowych. Jednakże kąt tego wiązania wodorowego, o wartości w granicach między 146°a 165°, uzasadnia zaliczenie go do jedynie średnio-silnych wiązań wodorowych. Analiza parametrów pozostałych wiązań wodorowych pozwala zakwalifikować je do wiązań słabych.

Szeregu istotnych informacji o strukturze kompleksów kwasu lasalowego z aminami w ciele stałym i szczególnie w roztworze dostarczyły szeroko przeprowadzone badania spektroskopowe. Spektroskopię ^1H NMR wykorzystałem do określenia zmian siły wiązań wodorowych towarzyszących procesowi kompleksowania. Największe zmiany przesunięcia chemicznego protonów grup hydroksylowych obserwowane były dla grupy O(3)H, zaangażowanej w wewnątrzcząsteczkowym wiązaniu wodorowym O(3)—H \cdots O(1). Analiza widm ^1H NMR wykazała, że wiązanie to ulega wzmocnieniu po skompleksowaniu cząsteczki aminy przez kwas lasalowy. Odwrotny kierunek zmian obserwowany był w przypadku wiązań wodorowych tworzących się przy udziale grup hydroksylowych O(4)H i O(8)H. Stwierdziłem, że wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe tworzone przez te grupy ulegają osłabieniu po skompleksowaniu aminy przez kwas lasalowy.

Podsumowanie i wnioski

Analiza widm ^{13}C NMR dostarczyła informacji o zaangażowaniu atomów tlenu O(4), O(6) i O(8) cząsteczki kwasu lasalowego w kompleksowaniu amin. Wykluczono natomiast możliwość tworzenia wiązania wodorowego między atomem tlenu O(5) a grupami aminowymi. Dodatnią wartość parametru Δ obserwowaną dla tego atomu przypisano zmianom konformacyjnym występującym w cząsteczce anionu kwasu lasalowego w wyniku skompleksowania aminy.

Na podstawie widm w podczerwieni wykonanych w ciele stałym i w roztworze chloroformowym możliwe stało się porównanie struktur otrzymanych kompleksów w dwóch stanach skupienia. Różnice w położeniu pasm absorpcji drgań rozciągających grup hydroksylowych $\nu(\text{O-H})$ pozwoliły na stwierdzenie różnego ich zaangażowania w tworzenie wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych między proponowaną aminą a anionem kwasu lasalowego.

Pojawienie się na widmach FT-IR kompleksów kwasu lasalowego z aminami pasma w przedziale $1585\text{ cm}^{-1} - 1598\text{ cm}^{-1}$ przypisanego drganiom rozciągającym anionu karboksylanowego $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ i jednoczesny brak pasma przy około 1652 cm^{-1} , charakterystycznego dla $\nu(\text{C=O})$ grupy karboksylowej kwasu lasalowego, dowodzi jednoznacznie, że kwas ten w badanych kompleksach występuje w formie zdeprotonowanej.

Brak zasadniczych zmian w położeniu pasma pochodzącego od drgań rozciągających $\nu(\text{C=O})$ grupy ketonowej w widmach kompleksów kwasu lasalowego w porównaniu z widmem kwasu wykazał brak zaangażowania tej grupy w kompleksowaniu aminy.

Porównanie widm FT-IR w ciele stałym i w roztworze chloroformowym w przypadku pięciu kompleksów (LAS-AM1, LAS-AM2, LAS-AM4, LAS-AM5 i LAS-AM7) wykazało jedynie niewielkie zmiany w położeniu pasm absorpcyjnych związane z pewnymi różnicami w sile wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych obecnych w badanych związkach. Obserwacja ta stanowi podstawę wniosku o podobieństwie struktury badanych kompleksów w ciele stałym i w roztworze. Natomiast istotne różnice w widmach FT-IR w przypadku kompleksu kwasu lasalowego z aniliną (LAS-AM3) wskazują, że w roztworze chloroformowym kompleks ulega częściowej dysocjacji do kwasu lasalowego i aniliny. O procesie tym świadczy pojawienie się pasma przy 1653 cm^{-1} charakterystycznego dla drgań $\nu(\text{C=O})$ grupy karboksylowej kwasu lasalowego. Interpretacja taka jest zgodna z wynikami analizy widm ^1H NMR i ^{13}C NMR.

Także w przypadku kompleksu LAS-AM6 obserwowane są pewne różnice w strukturze kompleksu w cieple stałym i w roztworze związane głównie ze zmianą w koordynacji jonu amonowego po rozpuszczeniu kompleksu.

Szeroko przeprowadzona analiza spektroskopowa pozwoliła także na stwierdzenie konkurencji w tworzeniu kompleksów kwasu lasalowego z aminami i kationami metali jednowartościowych (Li^+ , Na^+ i K^+). Na podstawie analizy wyników badań ESI-MS, NMR i FT-IR ustaliłem, że kwas lasalowy zdolny jest do kompleksowania amin w obecności kationów metali jednowartościowych, przy czym kompleksy kwasu lasalowego z kationami i z aminą współistnieją w równowadze.

Kwas lasalowy oraz 4 jego kompleksy zostały poddane szczegółowej analizie aktywności przeciwdrobnoustrojowej w stosunku do szczepów ziarniaków Gram-dodatnich, pałeczek Gram-ujemnych oraz drożdżaków. Ponadto określono aktywność kwasu lasalowego i jego kompleksu z alliloaminą (LAS-AM1) przeciwko szpitalnym szczepom gronkowca złocistego (*Staphylococcus aureus*), które uzyskano z różnych próbek biologicznych od pacjentów Szpitala Uniwersyteckiego Medycznego w Warszawie. Użyto przy tym 10 szczepów wrażliwych na metycylinę – (*S. aureus* MSSA) oraz 10 szczepów opornych na metycylinę (*S. aureus* MRSA). Stwierdzono, że poza kwasem lasalowym 4 jego kompleksy z aminami wykazały aktywność przeciwko bakteriom Gram-dodatnim, przy czym kompleks z aniliną (LAS-AM3) wykazywał nieco wyższą aktywność niż kwas lasalowy a kompleksy z alliloaminą i *N*-butyloaminą cechują się podobną aktywnością do niemodyfikowanego kwasu. Ważnym rezultatem badań mikrobiologicznych było wykazanie, że kwas lasalowy i jego kompleks z alliloaminą (LAS-AM1) wykazują aktywność przeciwko antybiotykoopornym szczepom gronkowca złocistego (*Staphylococcus aureus*). Bakterie te są niezwykle groźnym źródłem zakażeń szpitalnych i często prowadzą do śmierci pacjentów.

Pojawiające się ostatnio doniesienia na temat aktywności przeciwnowotworowej antybiotyków jonoforowych zainspirowały mnie do określenia aktywności cytotoksycznej kwasu lasalowego i jego kompleksów. Na podstawie badań stwierdzono, że zarówno kwas lasalowy jak i jego kompleksy wykazują aktywność wobec linii komórkowych ludzkiego raka płuc, raka okrężnicy oraz raka piersi. Co warto podkreślić, aktywność kwasu lasalowego i jego kompleksów jest wyższa od cis-platyny – standardowo stosowanego leku przeciwnowotworowego. Zatem kwas lasalowy może być traktowany jako potencjalny kandydat w dalszych poszukiwaniach nowych leków w terapii antynowotworowej.

Podsumowanie i wnioski

Wyniki badań związanych z tematem niniejszej pracy doktorskiej zostały opublikowane w czterech pracach, które ukazały się w czasopismach o zasięgu międzynarodowym: *Journal of Molecular Structure* [217-219], *BioMed Research International* [105] oraz zostały przedstawione w postaci trzech komunikatów na międzynarodowych konferencjach naukowych [220-222]. Ponadto jestem współautorem dwóch innych prac, które ukazały się w czasopismach z listy filadelfijskiej [209, 223].

Najważniejsze rezultaty niniejszej pracy to:

- opracowanie wydajnej metody pozyskiwania soli sodowej kwasu lasalowego z preparatu Avatec
- otrzymanie siedmiu nowych kompleksów kwasu lasalowego z aminami w stanie krystalicznym
- szczegółowe określenie struktur otrzymanych kompleksów przy wykorzystaniu metod krystalograficznych, spektroskopii ^1H NMR, ^{13}C NMR, FT-IR oraz spektrometrii masowej ESI.
- wykazanie możliwości tworzenia kompleksów kwasu lasalowego z aminami nawet w obecności konkurujących kationów metali jednowartościowych (Li^+ , Na^+ i K^+) oraz wykazanie istnienia równowagi między takimi kompleksami
- wykazanie przeciwdrobnoustrojowej aktywności nowych kompleksów kwasu lasalowego z aminami przeciwko bakteriom Gram-dodatnim, a w szczególności przeciwko antybiotykoopornym szczepom gronkowca złocistego (*Staphylococcus aureus* MRSA).
- wykazanie wyższej aktywności kwasu lasalowego i dwóch jego kompleksów z aniliną i *N*-butyloaminą (LAS-AM3 i LAS-AM4) przeciw komórkom nowotworowym niż w przypadku cisplatyny - standardowo stosowanego leku przeciwnowotworowego.

6. Literatura

Literatura

- [1] M. Dobler, "Ionophores and Their Structures" Wiley, New York, **1981**, ISBN: 04-71-05-270-1.
- [2] R. Fedrani, G. W. Gokel, "Encyclopedia of supramolecular chemistry: Ionophores" edited by: J.L. Atwood, J.W. Steed, **2004**, ISBN: 0-8247-4723-2, 760-766
- [3] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, „Biochemia" wyd. 3, Wydawnictwo Naukowe PWN, **2005**, ISBN: 978-83-01-14379-4
- [4] R. H. Garret, C. M. Grisham, "Biochemistry" Second Edition, Sanders College Publishing **1999**, ISBN:0-030022318-0
- [5] C. J. Pedersen, „Cyclic polyethers and their complexes with metal salts" *J. Am. Chem. Soc.*, **1967**, *89*, 7017-7036
- [6] C. J. Pedersen, „The discovery of crown ether (Noble Lecture)" *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.*, **1988**, *27*, 1021-1027
- [7] E. Weber, F. Vögtle, „ Host Guest Complex Chemistry I: *Crown-type compounds — An introductory overview*" *Top. Cur. Chem.*, **1981**, *98*, 1-41.
- [8] G. W. Gokel, E. Weber, „Phase Transfer Catalysis in Organic Synthesis", Springer Verlag, Berlin–Heidelberg–New York **1977**
- [9] "Macrocyclic Compounds in Analytical Chemistry" edited by: Yu. A. Zolotov; John Wiley & Sons, New York **1997**.
- [10] A. Spath, B. König, "Molecular recognition of organic ammonium ions in solution using synthetic receptors", *Beilstein J. Org. Chem*, **2010**, *6*, 1-111
- [11] V. Rudiger, H. J. Schneider, V. P. Solovev, V. P. Kazachenko, O. A. Raevski, "Crown ether-ammonium complexes: Binding mechanisms and solvent effects" *Eur. J. Org. Chem*, **1999**, *8*, 1847-1856
- [12] D. J. Cram, „The design of molecular hosts, guests, and their complexes (Nobel `Lecture)" *Angew. Chem. Int. Ed.* **1988**, *27*, 1009-1020
- [13] J. T. Minko, S. S. Moore, D. M. Walba, P. C. Hiberty, D. J. Cram, "Host-guest complexation 2. Structural units that control association constants between polyethers and tert-butylammonium salts", *J. Am. Chem. Soc.*, **1977**, *99*, 4207-4217
- [14] B. C. Pressman "Biological applications of ionophores" *Annual Review of Biochemistry*, **1976**, *45*, 501 – 530
- [15] A. Huczyński, "Polyether ionophores—promising bioactive molecules for cancer therapy", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2012**, *22*, 7002-7010
- [16] H. Brockmann, G. Schmidt-Kastner, „Valinomycin I, XXVII. Mitteil. über antibiotica aus actinomyceten" *Chem. Ber.*, **1955**, *88*, 57-61.
- [17] M. Dobler „Natural cation binding agents", *Compr. Supramol. Chem.* Pergamon, **1996**, *vol.1*, 267 – 313

- [18] M. M. Shemyakin, N. A. Aldanova, E. I. Vinogradova, M. Feigina, "The structure and total synthesis of valinomycin", *Tetrahedron Lett.* **1963**, 4, (28), 1921-1925
- [19] Y. A. Ovchinnikov, V. T. Ivanov, A. M. Skrob, „Membrane-Active Complexones”, *BBA Library* 12, Elsevier, Amsterdam **1974**
- [20] M. A. Verity, M. K. Cheung, W. J. Brown "Studies on valinomycin inhibition of synaptosome-fraction protein synthesis" *Biochem J.*, **1981**, 196, 25 – 32
- [21] O. Shirai, H. Yamana, T. Ohunki, Y. Yoshida, S. Kihara „Ion transport cross a bilayer lipid membrane facilitated by valinomycin”, *J. Electroanal. Chem.*, **2004**, 570, 219 – 226
- [22] C. Steinem, A. Janshoff, K. Bruch, K. Rehis, J. Goosens, H. J. Galla "Valinomycin-mediated transport of alkali cations through solid supported membranes" *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **1998**, 45, p. 17 – 26
- [23] R. Sagres, B. Witkop, "Gramicidin A. V. The structure of valine- and isoleucine-gramicidin A" *J. Am. Chem. Soc.*, **1965**, 87, 2011-2020
- [24] R. Sagres, B. Witkop, "Gramicidin A. VI. The structure of valine- and isoleucine-gramicidin A" *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, 87, 2020-2027
- [25] D. A. Kelkar, A. Chattopadhyay, "The gramicidin ion channel: A model membrane protein", *Biochim. Biophys. Acta*, **2007**, 1758, 2011-2025
- [26] D. A. Kelkar, A. Chattopadhyay, "Modulation of gramicidin channel conformation and organization by hydrophobic mismatch in saturated phosphatidylcholine bilayers" *Biochim. Biophys. Acta*, **2007**, 1768, 1103 – 1113
- [27] B. Roux, M. Karplus, "The normal modes of the gramicidin A dimer channel" *Biophys. J.*, **1988**, 53, 297 – 309
- [28] B. Roux, M. Karplus, "Ion transport in a model gramicidin channel. Structure and thermodynamics" *Biophys. J.*, **1991**, 59, 961 – 981
- [29] R. Pankiewicz, G. Wojciechowski, G. Schroeder, B. Brzezinski, F. Bartl, G. Zundel, „FT-IR study of the nature of K^+ , Rb^+ and Cs^+ cation motions in gramicidin A", *J. Mol. Struct.*, **2001**, 565, 213 – 217
- [30] B. A. Wallace, "Structure of gramicidin A", *Biophys J.*, **1986**, 49, 295-306
- [31] D.W. Urry, M.C. Goodall, J.D. Glickson, D.F. Mayers, „The gramicidin A transmembrane channel: Characteristics of Head-to-Head dimerized $\pi_{(L,D)}$ helices" *PNAS*, **1971**, 68, 1907-1911.
- [32] O.S. Smart, J.M. Goodfellow, B.A. Wallace, „The pore dimensions of gramicidin A" *Biophys. J.*, **1993**, 65, 2455-2460.
- [33] M. Alleaume, B. Busetta, C. Farges, P. Gachon, A. Kergomard, T. Staron, "X-Ray structure of alborixin, a new antibiotic ionophore" *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, **1975**, 11, 411-412
- [34] G.D. Smith, W.L. Daux, "Crystal and molecular structure of the calcium ion complex of A23187", *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, 6, 1578-1580
- [35] M. Alleaume, Y. Barrans, "Crystal structure of the magnesium complex of calcimycin" *Can. J. Chemistry*, **1985**, 63, 3482-3485

Literatura

- [36] M. Akkurt, A. Melhaoui, T.B. Hadda, M. Mimouni, S.O. Yildirim, V. McKeec, "Synthesis and crystal structure of the bis-calcimycin anion-Ni²⁺ complex" *Arkivoc* **2008**, *11*, 154-164,
- [37] S. Vila, I. Canet, J. Guyot, G. Jeminet, L. Toupet, "Unusual structure of the dimeric 4-bromocalcimycin-Zn²⁺ complex" *Chem. Commun.*, **2003**, *9*, 516-517
- [38] K.D. Klika, J.P. Haansuu, V.V. Ovcharenko, K.K. Haahtela, P.M. Vuorela, R. Sillanpaa, K. Pihlaja, "Frankiamide: A Structural Revision to Demethyl (C-11) Cezomycin" *Z. Naturforsch. - Section B Journal of Chemical Sciences*, **2003**, *58*, 1210-1215
- [39] N. Otake, T. Ogita, H. Nakayama, H. Miyame, S. Sato, Y. Saito, "X-Ray crystal structure of the thallium salt of antibiotic-6016, a new polyether ionophore" *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, **1978**, *20*, 875-876
- [40] T. Sakurai, K. Kobayashi, G. Nakamura, K. Isono, "Structure of the thallium salt of cationomycin" *Acta Cryst. Sect. B*, **1982**, *38*, 2471-2473
- [41] Z. Gao, Y. Li, J.P. Cooksey, T.N. Snaddon, S. Schunk, E.M.E. Viseux, S.M. McAteer, P.J. Kocienski, "A synthesis of an ionomycin calcium complex" *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*, 5022-5025.
- [42] J.R. Oscarson, J. Bordner, W.D. Celmer, W.P. Cullen, L.H. Huang, H. Maeda, P.M. Moshier, S. Nishiyama, L. Presseau, R. Shibakawa, J. Tone, "Endusamycin, a novel polycyclic ether antibiotic produced by a strain of *Streptomyces endus* subsp. *aureus*" *J. Antibiotics*, **1989**, *42*, 37-48.
- [43] T. Fehr, M. Kuhn, H.-R. Loosil. M. Ponelle, J.J. Boelsterli, M.D. Walkinshaw, "2-Epimutalomycin and 28-epimutalomycin, two new polyether antibiotics from *Streptomyces mutabilis*. Derivatization of mutalomycin and the structure elucidation of two minor metabolites" *J. Antibiot.*, **1989**, *42*, 897-902
- [44] H.A. Brooks, D. Gardner, J.P. Poyser, T.J. King, "The structure and absolute stereochemistry of zincophorin (antibiotic M144255): a monobasic carboxylic acid ionophore having a remarkable specificity for divalent cations" *J. Antibiot.*, **1984**, *37*, 1501-1504.
- [45] J.P. Dirlam, A.M. Belton, S.P. Chang, W.P. Cullen, L.H. Huang, Y. Kojima, H. Maeda, S. Nishiyama, J.R. Oscarson, T. Sakakibara, J. Tone, M. Yamada "CP-78,545, a new monocarboxylic acid ionophore antibiotic related to zincophorin and produced by a *Streptomyces*" *J. Antibiot.*, **1989**, *42*, 1213-1220
- [46] M. Alleaume, D. Hickel, "The crystal structure of grisorixin silver salt" *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, **1970**, *21*, 1422-1423
- [47] M. Alleaume, D. Hickel, "Crystal structure of the thallium salt of the antibiotic grisorixin" *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, **1972**, *3*, 175-176
- [48] J. Bordner, P.C. Watts, E.B. Whipple, "Structure of the natural antibiotic ionophore CP-54,883", *J. Antibiot.*, **1987**, *40*, 1496-1505
- [49] J.W. Westley, R.H. Evans Jr, L.H. Sello, N. Troupe, C.M. Liu, J.F. Blount, "Isolation and characterization of antibiotic X-14547A, a novel monocarboxylic acid ionophore produced by *Streptomyces antibioticus* NRRL 8167", *J. Antibiot.*, **1979**, *32*, 100-107
- [50] H. Kinashi, N. Otake, H. Yonehara, S. Sato, Y. Saito, "The structure of salinomycin, a new member of the polyether antibiotics" *Tetrahedron Lett.*, **1973**, *49*, 4955-4958

- [51] J.W. Westley, J.F. Blount, R.H. Evans, C.M. Liu, "C-17 epimers of deoxy-(O-8)-salinomycin from *Streptomyces albus* (ATCC 21838)", *J. Antibiot.*, **1977**, *30*, 610-612
- [52] E.F. Paulus, L. Vertesy, "Crystal structure of the antibiotic SY-1 (20-deoxy-salinomycin): Sodium 2-(6-[2-(5-ethyl-5-hydroxy-6-methyl-tetrahydro-pyran-2-yl)-2,10,12-trimethyl-1,6,8-trioxa-dispiro[4.1.5.3]pentadec-13-en-9-yl]-2-hydroxy-1,3-dimethyl-4-oxo-heptyl-5-methyl-tetrahydro-pyran-2-yl)-butyrate - Methanol solvate (1:0.69), $C_{42}H_{69}NaO_{10} \cdot 0.69CH_3OH$ " *Z. Kristallogr. - New Cryst. Struct.*, **2003**, *218*, 575-577
- [53] E.F. Paulus, L. Vertesy, "Crystal structure of 2-(6-[2-(5-ethyl-5-hydroxy-6-methyl-tetrahydro-pyran-2-yl)-15-oxo-2,10,12-trimethyl-1,6,8-trioxa-dispiro[4.1.5.3]pentadec-13-en-9-yl]-2-hydroxy-1,3-dimethyl-4-oxo-heptyl-5-methyl-tetrahydro-pyran-2-yl)-butyrate sodium, $Na(C_{42}H_{67}O_{11})$, SY-9 - Antibiotic 20-oxo-salinomycin" *Z. Kristallogr. - New Cryst. Struct.*, **2004**, *219*, 184-186
- [54] A. Agtarap, J.W. Chamberlin, M. Pinkerton, L. Steinrauf, "The structure of monensic acid. A new biologically active compound" *J. Am. Chem. Soc.*, **1967**, *89*, 5737-5739
- [55] W.K. Lutz, F.K. Winkler, J.D. Dunitz, "Crystal Structure of the Antibiotic Monensin Similarities and Differences between Free Acid and Metal Complex" *Helv. Chim. Acta*, **1971**, *54*, 1103-1108.
- [56] F. Kitame, K. Utsushikawa, T. Kohama, T. Saito, M. Kikuchi, N. Ishida, "Laidlomycin, a new antimycoplasmal polyether antibiotic", *J. Antibiot.*, **1974**, *27*, 884-888
- [57] J.P. Dirlam, L. Pousseau-Linabury, D.A. Koss, "The structure of CP-80,219, a new polyether antibiotic related to dianemycin" *J. Antibiot.*, **1990**, *43*, 727-730
- [58] C. Keller-Juslen, H.D. King, M. Kuhn, H.R. Loosli, A. von Wartburg, "Noboritomycins A and B, new polyether antibiotics" *J. Antibiot.*, **1978**, *31*, 820-828
- [59] R.L. Harned, P.H. Hidy, C.J. Corum, K.L. Jones, "Nigericin, a new crystalline antibiotic from an unidentified *Streptomyces*" *Antibiot. Chemotherapy*, **1951**, *vol. 1*, s. 594-604.
- [60] C.J. Dutton, B.J. Banks, C.B. Cooper, "Polyether ionophores" *NPS*, **1995**, *vol. 12*, s. 165-181.
- [61] P. Gachon, C. Farges, A. Kergomard, "Alborixin, a new antibiotic ionophore: isolation, structure, physical and chemical properties" *J. Antibiot.*, **1976**, *29*, 603-610.
- [62] G. Grenier, J. Van Sande, D. Glick, J.E. Dumont, "Effect of ionophore A23187 on thyroid secretion" *FEBS Letters*, **1974**, *49*, 96-99
- [63] J.W. Westley, C.-M. Liu, J.F. Blount, L.H. Sello, N. Troupe, P.A. Miller, "Isolation and characterization of a novel polyether antibiotic of the pyrroloether class, antibiotic X-14885A" *J. Antibiot.*, **1983**, *36*, 1275-1278
- [64] Y. Kusakabe, S. Mitsuoka, Y. Omuro, A. Seino, "Antibiotic No. 6016, a polyether antibiotic" *J. Antibiot.*, **1980**, *33*, 1437-1442
- [65] M. Ubukata, Y. Hamazaki, K. Isono, "Chemical modification of cationomycin and its structure-activity relationship" *Agr. Biol. Chem. (Tokyo)*, **1986**, *50*, 1153-1160
- [66] C.M. Liu, T.E. Hermann, "Characterization of ionomycin as a calcium ionophore" *J. Biol. Chem.*, **1978**, *253*, 5892-5894.

Literatura

- [67] T. Fehr, H.D. King, M. Kuhn, "Mutalomycin, a new polyether antibiotic. Taxonomy, fermentation, isolation and characterization" *J. Antibiot.*, **1977**, *30*, 903-907.
- [68] P. Gachon, A. Kergomard, "Grisorixin, an ionophorous antibiotic of the nigericin group I. Fermentation, isolation, biological properties and structure", *J. Antibiot.*, **1975**, *28*, 345-350
- [69] J. Mouslim, A. Cuer, L. David, J.C. Tabet, "Epigrisorixin, a new polyether carboxylic antibiotic", *J. Antibiot.*, **1993**, *46*, 201-203
- [70] W.P. Cullen, W.D. Celmer, L.R. Chappel, L.H. Huang, H. Maeda, S. Nishiyama, R. Shibakawa, J. Tone, P.C. Watts, "CP-54,883 a novel chlorine-containing polyether antibiotic produced by a new species of Actinomadura: Taxonomy of the producing culture, fermentation, physico-chemical and biological properties of the antibiotic", *J. Antibiot.*, **1987**, *40*, 1490-1495
- [71] C.M. Liu, T.E. Hermann, M. Liu, D.N. Bull, N.J. Palleroni, T. Prosser, J.W. Westley, P.A. Miller, "X-14547A, a new ionophorous antibiotic produced by Streptomyces antibioticus NRRL 8167. Discovery, fermentation, biological properties and taxonomy of the producing culture", *J. Antibiot.*, **1979**, *32*, 95-99
- [72] J. Berger, A. I. Rachlin, W. E. Scott, L. H. Sternbach, M. W. Goldberg "The isolation of three new crystalline antibiotics from Streptoyces", *J. Am. Chem. Soc.*, **1951**, *73*, 5295-5298
- [73] D. L. Ward, K. T. Wei, J. G. Hoogerheide, A. I. Popov, "The crystal and molecular structure of the sodium bromide complex of monensin, $C_{36}H_{62}O_{11} \cdot Na^+Br^-$ ", *Acta Cryst. Sect. B*, **1978**, *34*, 110-115
- [74] J. W. Westley, "Chapter 25. The Polyether Antibiotics: Monocarboxylic acid ionophores", *Ann. Rep. Med. Chem.* **1975**, *10*, 246-256
- [75] W. G. Bergen, D. B. Bates, "Ionophores: their effect on production efficiency and mode of action", *J. Anim. Sci.*, **1984**, *58*, 1465-1483
- [76] S. M. Dennis, T. G. Nagaraja, E. E. Bartley, "Effects of lasalocid or monensin on lactate-producing or -using rumen bacteria", *J. Anim Sci.*, **1981**, *52*, 418-426.
- [77] D. A. Dinius., M. E. Simpson, P. B. Marsh, "Effect of monensin fed with forage on digestion and the ruminal ecosystem of steers. *J. Anim. Sci.*, **1976**, *42*, 229-234.
- [78] T. G. Nagaraja, M. M. Chengappa, „Liver abscesses in feedlot cattle: A review. *J. Anim. Sci.*, **1998**, *76*, 287-298
- [79] J. B. Russell, H. J. Strobel, "Effect of ionophores on ruminal fermentation", *Appl. Environ. Microbiol.* **1989**, *55*, 1-6
- [80] T.R. Callaway, T.S. Edrington, J.L. Rychlik, T.L. Genovese, T.L. Poole, Y.S. Jung, K.M. Bischoff, R.C. Anderson, D.J. Nisbet, "Ionophores: Their use as ruminant growth promotants and impact on food safety", *Curr Issues Intest. Microbiol.*, **2003**, *4*, 43-51
- [81] B. C. Pressman, M. Fahim, "Pharmacology and toxicology of the monovalent carboxylic ionophores" *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **1982**, *22*, 465-490
- [82] M. N. Novilla, "The veterinary importance of the toxic syndrome induced by ionophores" *Vet. Hum. Toxicol.*, **1992**, *34*, 66-70

- [83] S. Rochefeuille, C. Jimenez, S. Tingry, P. Seta, J.P. Desfours, "Mixed Langmuir–Blodgett monolayers containing carboxylic ionophores. Application to Na⁺ and Ca²⁺ ISFET-based sensors" *Mat. Sci. Eng. B*, **2002**, *21*, 43-46
- [84] C. Gabrielli, P. Hemery, P. Letellier, M. Masure, H. Perrot, M.I. Rahmi, M. Turmine, "Investigation of ion-selective electrodes with neutral ionophores and ionic sites by EIS. II Application to K⁺ detection" *J. Electroanal. Chem.*, **2004**, *570*, 291-304
- [85] A. Kart, A. Bilgili, "Ionophore antibiotics: Toxicity, mode of action and neurotoxic aspect of carboxylic ionophores" *J. Anim. Vet. Adv.*, **2008**, *7*, 748-751.
- [86] D.M. Ojcius, A. Zychlinsky, L.M. Zheng, J.D. E Young, "Ionophore-induced apoptosis: Role of DNA fragmentation and calcium fluxes", *Exp. Cell Res.*, **1991**, *197*, 43-49.
- [87] N. Safran, R. Haring, D. Gurwitz, "Selective neurotoxicity induced by the ionophores lasalocid in rat dissociated cerebral cultures, involvement of the NMDA receptor/Channel", *Neurotoxicol.*, **1996**, *17*, 833-896.
- [88] P. Butaye, L.A. Devriese, F. Haesebrouck, "Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well known antibiotics on Gram-positive bacteria" *Clin. Microbiol. Rev.*, **2003**, *16*, 175-188
- [89] J.B. Russel, A.J. Houlihan, "Ionophore resistance of ruminal bacteria and its potential impact on human health" *FEMS Microbiol. Rev.*, **2003**, *27*, 65-74
- [90] B.C. Karl, W.S. Zawalich, J.A. Ferrendelli, F.M. Matochinsky, "The role of Ca²⁺ and cyclic adenosine 3':5'-monophosphate in insulin release induced in vitro by the divalent cation ionophore A23187" *J. Biol. Chem.*, **1975**, *250*, 4575-4579
- [91] G.D. Case, J.M. Vanderkooi, A. Scarpa, "Physical properties of biological membranes determined by the fluorescence of the calcium ionophore A23187" *Arch. Biochem. Biophys.*, **1974**, *162*, 174-185
- [92] J. Guoyt, G. Jeminet, M. Prudhomme, M. Sancelme, R. Meiniel, "Interaction of the calcium ionophore A.23187 (calcimycin) with *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*" *Let. Appl. Microbiol.*, **1993**, *16*, 192-195
- [93] M. Ubukata, Y. Hamazaki, K. Isono, "Aromatic side chain analogs of cationomycin and their biological activities" *Agr. Biol. Chem. (Tokyo)*, **1988**, *52*, 1637-1641
- [94] A.M. Delort, G. Jeminet, S. Sareth, F.G. Riddle, "Ionophore properties of cationomycin in large unilamellar vesicles studied by ²³Na- and ³⁹K-NMR" *Chem. Pharm. Bull.*, **1988**, *46*, 1618-1620
- [95] W.C. Liu, D. Smith-Slusarczyk, G. Astle, W.H. Trejo, W.E. Brown, E. Meyers, "Ionomycin, a new polyether antibiotic" *J. Antibiot.*, **1978**, *31*, 815-819
- [96] M. Mitani, T. Yamanishi, Y. Miyazaki "Salinomycin: a new monovalent cation ionophore", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1975**, *66*, 1231-1235
- [97] Y. Miyazaki, M. Shibuya, H. Sugawara, O. Kawaguchi, C. Hirose, J. Nagatsu, S. Esumi, "Salinomycin, a new polyether antibiotic" *J. Antibiot.*, **1974**, *27*, 814-821
- [98] A. Iacoangelli, G. Melucci-Vigo, G. Risuleo, "The ionophore monensin inhibits mouse polyomavirus DNA replication and destabilizes viral early mRNAs", *Biochimie*, **2000**, *82*, 35-39

Literatura

- [99] A. Huczyński, J. Janczak, M. Antoszczak, J. Stefanska, B. Brzezinski, „X-ray, FT-IR, NMR and PM5 structural studies and antibacterial activity of unexpectedly stable salinomycin-benzotriazole intermediate ester” *J. Mol. Struct.*, **2012**, *1022*, 197-203
- [100] A. Huczyński, J. Janczak, J. Stefanska, M. Antoszczak, B. Brzezinski, „Synthesis and antimicrobial activity of amide derivatives of polyether antibiotic - Salinomycin” *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2012**, *22*, 4697-4702
- [101] P. B. Gupta, T. T. Onder, G. Jiang, K. Tao, C. Kuperwasser, R. A. Weinberg, E. S. Lander, “Identification of Selective Inhibitors of Cancer Stem Cells by High-Throughput Screening”, *Cell*, **2009**, *138*, 645-659
- [102] C. Naujokat, R. Steinhart, “Salinomycin as a drug for targeting human cancer stem cells”, *J. Biomed. Biotechnol.*, **2012**, Art. no. 950658
- [103] A. Huczyński, “Salinomycin - A New Cancer Drug Candidate” *Chem. Biol. Drug Des.*, **2012**, *79*, 235-238
- [104] A. Huczyński, J. Janczak, M. Antoszczak, J. wietrzyk, E. Maj, B. Brzezinski, „Antiproliferative activity of salinomycin and its derivatives”, *Bioorg. Med. Chem. Lett*, **2012**, *22*, 7146-7150
- [105] **J. Rutkowski**, B. Brzezinski, “Structures and properties of naturally occurring polyether antibiotics” *BioMed Res. International*, **2013**, Article ID 162513, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/162513>
- [106] W.K. Lutz, F.K. Winkler, J.D. Dunitz, „Crystal Structure of the Antibiotic Monensin Similarities and Differences between Free Acid and Metal Complex” *Helv. Chim. Acta*, **1971**, *54*, 1103-1108.
- [107] P. Przybylski, A. Huczyński, B. Brzezinski, “The structures of Monensin A derivatives and its complexes with some monovalent cations studied by the AM1d, PM3 as well as PM5 semiempirical methods”, *J. Mol. Struct.* **2007**, *826*, 156-164.
- [108] I. N. Pantcheva, R. Zhorova, M. Mitewa, S. Simova, H. Mayer-Figge, W. S. Sheldrick, “First solid state alkaline-earth complexes of monensic acid A (MonH): crystal structure of $[M(\text{Mon})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ (M = Mg, Ca), spectral properties and cytotoxicity against aerobic Gram-positive bacteria”, *Biometals*, **2010**, *23*, 59-70
- [109] I. N. Pantcheva, J. Ivanova, R. Zhorova, M. Mitewa, S. Simova, H. Mayer-Figge, W. S. Sheldrick, “Nickel(II) and zinc(II) dimonensinates: Single crystal X-ray structure, spectral properties and antibacterial activity”, *Inorg. Chim. Acta*, **2010**, *363*, 1879-1886
- [110] P. Dorkov, I. N. Pantcheva, W. S. Sheldrick, H. Mayer-Figge, R. Petrova, M. Mitewa, “Synthesis, structure and antimicrobial activity of manganese(II) and cobalt(II) complexes of the polyether ionophore antibiotic Sodium Monensin A” *J. Inorg. Biochem.*, **2008**, *102*, 26-32
- [111] I. N. Pantcheva, P. Dorkov, V. N. Atanasov, M. Mitewa, B. L. Shivachev, R. P. Nikolova, H. Mayer-Figge, W. S. Sheldrick, “Crystal structure and properties of the copper(II) complex of sodium monensin A” *J. Inorg Biochem.*, **2009**, *103*, 1419-1424.
- [112] J. Ivanova, I.N. Pantcheva, M. Mitewa, S. Simova, H. Mayer-Figge, W. S. Sheldrick, “Crystal structures and spectral properties of new Cd(II) and Hg(II) complexes of monensic acid with different coordination modes of the ligand” *Cent. Eur. J. Chem.*, **2010**, *8*, 852-860

- [113] J. Ivanova, I.N. Pantcheva, M. Mitewa, S. Simova, H. Mayer-Figge, W.S. Sheldrick, "First divalent metal complexes of the polyether ionophore monensin A: X-ray structures of $[\text{Co}(\text{Mon})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ and $[\text{Mn}(\text{Mon})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ and their bactericidal properties" *Curr. Drug Discovery Technol.*, **2008**, *5*, 154-161
- [114] A. Nakamura, S. Nagai, T. Takahashi, R. Malhan, N. Murakami, T. Ueda, J. Sakakibara, M. Asano, „Studies on chemical modification of monensin. IV. Synthesis, sodium ion permeability and biological activity of 7-*O*-acyl- and 7-*O*-alkylmonensins." *Chem. Pharm. Bull.*, **1992**, *40*, 2331-2337.
- [115] A. Nagatsu, T. Takahashi, M. Isomura, S. Nagai, T. Ueda, N. Murakami, J. Sakakibara, K. Hatano, „Studies on chemical modification of monensin. V. Synthesis, sodium ion permeability, antibacterial activity, and crystal structure of 7-*O*-(4-substituted benzyl)monensins." *Chem. Pharm. Bull.*, **1994**, *42*, 2269-2275.
- [116] R. Tanaka, A. Nagatsu, H. Mizukami, Y. Ogihara, J. Sakakibara, „Studies on chemical modification of monensin VIII. Synthesis of 7-*O*-substituted-25-carboxymonensins and their Ca^{2+} ion transport activity" *Tetrahedron*, **2001**, *57*, 3005-3012.
- [117] R. Tanaka, A. Nagatsu, H. Mizukami, Y. Ogihara, J. Sakakibara, „Studies on Chemical Modification of Monensin IX. Synthesis of 26-Substituted Monensins and Their Na^+ Ion Transport Activity" *Chem. Pharm. Bull.*, **2001**, *49*, 711-715.
- [118] A. Huczyński, P. Przybylski, B. Brzezinski, F. Bartl, „Spectroscopic and semiempirical studies of a proton channel formed by the methyl ester of monensin A" *J. Phys. Chem. B*, **2006**, *110*, 15615 – 15623
- [119] A. Huczyński, P. Przybylski, B. Brzezinski, F. Bartl, „Monensin A methyl ester complexes with Li^+ , Na^+ , and K^+ cations studied by ESI-MS, ^1H - and ^{13}C -NMR, FTIR, as well as PM5 semiempirical method" *Biopolymers*, **2006**, *81*, 282 – 294
- [120] A. Huczyński, P. Przybylski, B. Brzezinski, „Complexes of monensin A methyl ester with Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} cations studied by electrospray ionization mass spectrometry and PM5 semiempirical method" *J. Mol. Struct.*, **2006**, *788*, 176-183
- [121] A. Huczyński, P. Przybylski, B. Brzezinski, F. Bartl, „Spectroscopic, mass spectrometry, and semiempirical investigation of a new ester of Monensin A with ethylene glycol and its complexes with monovalent metal cations" *Biopolymers*, **2006**, *82*, 491-503
- [122] A. Huczyński, D. Michalak, P. Przybylski, B. Brzezinski, F. Bartl „Monensin A benzyl ester and its complexes with monovalent metal cations studied by spectroscopic, mass spectrometry and semiempirical methods" *J. Mol. Struct.*, **2006**, *797*, 99-110
- [123] A. Huczyński, P. Przybylski, B. Brzezinski „The structures of monensin A derivatives and its complexes with some monovalent cations studied by the AM1d, PM3 as well as PM5 semiempirical methods" *J. Mol. Struct.*, **2007**, *826*, 156-164
- [124] A. Huczyński, D. Michalak, P. Przybylski, B. Brzezinski, F. Bartl „Spectroscopic, mass spectrometry and semiempirical investigation of a new Monensin A allyl ester and its complexes with Li^+ , Na^+ and K^+ cations" *J. Mol. Struct.*, **2007**, *828*, 130-141
- [125] A. Huczyński, P. Przybylski, G. Schroeder, B. Brzezinski „Investigation of complex structures of a new 2-hydroxyethyl ester of Monensin A with Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} cations using electrospray ionization mass spectrometry and semiempirical PM5 methods" *J. Mol. Struct.*, **2007**, *829*, 111-119

Literatura

- [126] A. Huczyński, P. Przybylski, B. Brzezinski „NMR, FTIR, ESI-MS and semiempirical study of a new 2-(2-hydroxyethoxy)ethyl ester of monensin A and its complexes with alkali metal cations” *Tetrahedron*, **2007**, *63*, 8831-8839
- [127] A. Huczyński, D. Łowicki, B. Brzezinski, F. Bartl „Spectroscopic, mass spectrometry and semiempirical investigation of a new 2-methoxyethyl ester of monensin A and its complexes with Li⁺, Na⁺ and K⁺ cations” *J. Mol. Struct.*, **2008**, *874*, 89 – 100
- [128] A. Huczyński, D. Łowicki, B. Brzezinski, F. Bartl „Spectroscopic, mass spectrometry, and semiempirical investigations of a new 2-(2-methoxyethoxy)ethyl ester of Monensin A and its complexes with monovalent cations” *J. Mol. Struct.*, **2008**, *879*, 14 – 24
- [129] A. Huczyński, J. Stefańska, P. Przybylski, B. Brzezinski, F. Bartl „Synthesis and antimicrobial properties of Monensin A esters” *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2008**, *18*, 2585-2589
- [130] A. Huczyński, B. Brzezinski, F. Bartl „Structures of complexes of benzyl and allyl esters of monensin A with Mg²⁺, Ca²⁺, Sr²⁺, Ba²⁺ cations studied by ESI-MS and PM5 methods” *J. Mol. Struct.*, **2008**, *886*, 9 – 16
- [131] D. Łowicki, A. Huczyński, M. Ratajczak-Sitarz, A. Katrusiak, J. Stefańska, B. Brzezinski, „Structural and antimicrobial studies of a new *N*-phenylamide of Monensin A complex with sodium chloride” *J. Mol. Struct.*, **2009**, *923*, 53-59.
- [132] D. Łowicki, A. Huczyński, J. Stefańska, B. Brzezinski, „Structural characterization and antibacterial activity against clinical isolates of Staphylococcus of *N*-phenylamide of monensin A and its 1:1 complexes with monovalent cations” *Eur. J. Med. Chem.*, **2010**, *45*, 4050-4057.
- [133] D. Łowicki, A. Huczyński, J. Stefańska, B. Brzezinski, F. Bartl, „Syntheses, structural and antimicrobial studies of a new *N*-allylamide of Monensin A and its complexes with monovalent metal cations” *Tetrahedron*, **2009**, *65*, 7730–7740.
- [134] D. Łowicki, A. Huczyński, B. Brzezinski, „¹H, ¹³C NMR, FT-IR, ESI MS as well as PM5 studies of a new 3,6,9-trioxadecylamide of monensin A and its complexes with Li⁺, Na⁺ and K⁺ cations” *J. Mol. Struct.*, **2011**, *990*, 121-131.
- [135] D. Łowicki, A. Huczyński, J. Stefańska, B. Brzezinski, „Spectroscopic, semiempirical and antimicrobial studies of a new amide of monensin A with 4-aminobenzo-15-crown-5 and its complexes with Na⁺ cation in 1:1 and 1:2 ratios” *Tetrahedron*, **2011**, *67*, 1468-1478
- [136] A. Huczyński, D. Łowicki, M. Ratajczak-Sitarz, A. Katrusiak, B. Brzezinski, „Structural investigation of a new complex of *N*-allylamide of Monensin A with strontium perchlorate using X-ray, FT-IR, ESI MS and semiempirical methods”, *J. Mol. Struct.*, **2011**, *995*, 20-28
- [137] A. Huczyński, M. Ratajczak-Sitarz, J. Stefańska, A. Katrusiak, B. Brzezinski, F. Bartl, „Reinvestigation of the structure of monensin A phenylurethane sodium salt based on X-ray crystallographic and spectroscopic studies, and its activity against hospital strains of methicillin-resistant *S. epidermidis* and *S. aureus*”, *J. Antibiot.*, **2011**, *64*, 249-256
- [138] A. Huczyński, M. Stefańska, M. Piśmienny, B. Brzezinski, „Spectroscopic, semiempirical studies and antibacterial activity of new urethane derivatives of natural polyether antibiotic - Monensin A”, *J. Mol. Struct.*, **2013**, *1034*, 198-206

- [139] A. Huczyński, R. Wawrzyn, B. Brzezinski, F. Bartl, "Structure of complexes of lasalocid m-nitrobenzyl ester with monovalent metal cations", *J. Mol. Struct.*, **2008**, 889 72–80
- [140] J. W. Westley, R. H. Evans, J. T. Williams, A. Stempel, "Structure of antibiotic X-537A", *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, **1970**, 2, 71-72
- [141] J. W. Spears, R. W. Harley, "Lasalocid and dietary sodium and potassium effects on mineral metabolism, ruminal volatile fatty acids and performance of finishing steers." *J. Anim. Sci.*, **1987**, 65, 830-840
- [142] J. Gilka, P. Jelínek, B. Janková, P. Knesel, J. Mašek, H. Dočekalová, „Amino acid composition of meat, fatty acid composition of fat and content of some chemical elements in the tissues of male lambs fed monensin or lasalocid”, *Meat Sci.*, **1989**, 25, 273-280
- [143] R. H. Wessels, E. C. Titgemeyer, C. K. Armendariz, G. S. Jean, „Lasalocid Effects on Ruminal Degradation of Protein and Postruminal Supply of Amino Acids in Holstein Steers”, *J. Dairy Sci.*, **1996**, 79, 1802-1808
- [144] M. Mitrovic, E. G. Schildknecht, „Anticoccidial activity of Lasalocid (X-537A) in chicks”, *Poultry Sci.*, **1974**, 53, 1448-1455
- [145] M. Mitrovic, E.G. Schildknecht, „Lasalocid: resistance and cross-resistance studies in *Eimeria tenella*-infected chicks”, *Poultry Sci.*, **1975**, 54, 750-756
- [146] W.M. Reid, J. Johnson, J. Dick, „Anticoccidial activity of lasalocid in control of moderate and severe coccidiosis”, *Avian Dis.*, **1975**, 19, 12-18
- [147] H. D. Chapman, "Eimeria tenella in chickens: Studies on resistance to the anticoccidial drugs monensin and lasalocid", *Vet. Parasitol.*, **1976**, 2, 178-196
- [148] R.M. Weppelman, G. Olson, D. A. Smith, T. Tamas, A. Van Iderstine, "Comparison of anticoccidial efficacy, resistance and tolerance of narasin, monensin and lasalocid in chicken battery trials", *Poultry Sci.*, **1977**, 55, 1550-1559
- [149] W. J. Foreyt, N. L. Gates, R. B. Wescott, "Effects of lasalocid and monensin against experimentally induced coccidiosis in confinement-reared lambs from weaning to market weight", *Am. J. Vet. Res.*, **1979**, 40, 97-100
- [150] M. Mitrovic, , E. G. Schildknecht, , W.L. Marusich, "Lasalocid in prevention of turkey coccidiosis", *Poultry Sci.*, **1979**, 58, 1154-1159
- [151] P. R. Fitzgerald, M. E. Mansfield, "Efficacy of lasalocid against coccidia in cattle", *J. Parasitol.*, **1979**, 65, 824-825
- [152] M. Chen, , M. J. Wolin, "Effect of monensin and lasalocid-sodium on the growth of methanogenic and rumen saccharolytic bacteria", *Appl. Environ. Microb.*, **1979**, 28, 72-77
- [153] G. M. Horton, P. H. Stockdale, "Lasalocid and monensin in finishing diets for early weaned lambs with naturally occurring coccidiosis", *Am. J. Vet. Res.*, **1981**, 42, 433-436
- [154] W.J. Foreyt, S.M. Parish, K.M. Foreyt, "Lasalocid for improved weight gains and control of *Coccidia* in lambs" *Am. J. Vet. Res.*, **1981**, 42, 57-60

Literatura

- [155] T. G. Nagaraja, T. B Avery, E. E. Bartley, S. J. Galitzer, A. D. Dayton, „Prevention of lactic acidosis in cattle by lasalocid or monensin”, *J. Anim. Sci.*, **1981**, *53*, 201-216
- [156] B. E. Stromberg, J. C. Schlotthauer, B. D. Armstrong, W. E. Brandt, C. Liss, “Efficacy of lasalocid sodium against coccidiosis (*Eimeria zuernii* and *Eimeria bovis*) in calves”, *Am. J. Vet. Res.*, **1982**, *43*, 583-585
- [157] C. P. Robinson, “Drug for veterinary use: Lasalocid/roxarsone/lincomycin”, *Drugs of Today*, **1983**, *19*, 491-494
- [158] J.A Paterson, B.M. Anderson, D.K Bowman, R.L. Morrison, J.E. Williams, “Effect of protein source and lasalocid on nitrogen digestibility and growth by ruminants”, *J. Anim. Sci.*, **1983**, *57*, 1537-1544
- [159] N.K Sasmal, P.K Sinha, P.K. Senapati, M.K Bhowmik, “Acquired immunity to *Eimeria tenella* in lasalocid-treated chickens”, *Vet. Parasitol.*, **1984**, *15*, 1-9
- [160] D.A. Neuendorff, L.M Rutter, L.A. Peterson, R.D. Randel, “Effect of lasalocid on growth and puberal development in Brahman bulls”, *J. Anim. Sci.*, **1985**, *61*, 1049-1057
- [161] L. Fuller, R. Griffeth, L. R. McDougald, “Efficacy of lasalocid against coccidiosis in Chinese ring-necked pheasants”, *Avian Dis.*, **2008**, *52*, 632-634
- [162] R. Martineau, C. Benchaar, H. V. Petit, H. Lapierre, D. R. Ouellet, D. Pellerin, R. Berthiaume, “Effects of lasalocid or monensin supplementation on digestion, ruminal fermentation, blood metabolites, and milk production of lactating dairy cows”, *J. Dairy Sci.*, **2007**, *90*, 5714-5725
- [163] C.R. Stockdale, “Efficacy of a lasalocid supplement in the diet of dairy cows in early lactation in a pasture-based dairy system” *Aust. J. Exp. Agr.*, **2007**, *47*, 658-663
- [164] C. M. J. Yang, C.-T Chang, S.-C Huang, T. Chang, “Effect of lasalocid on growth, blood gases, and nutrient utilization in dairy goats fed a high forage, low protein diet”, *J. Dairy Sci.*, **2003**, *86*, 3967-3971
- [165] J.A Castro Hermida, F. Freire Santos, A. M. Oteiza López, C. A. Vergara Castiblanco, M. E. Ares-Mazás, “In vitro and in vivo efficacy of lasalocid for treatment of experimental cryptosporidiosis”, *Vet. Parasitol.*, **2000**, *90*, 265-270
- [166] L.J. Erasmus, I. Smith, A. Muller, D. O'Hagan, “Effects of lasalocid on performance of lactating dairy cows”, *J. Dairy Sci.*, **1999**, *82*, 1817-1823
- [167] J. D Quigley III, J. J. Drewry, L. M. Murray, S.J. Ivey, “Effects of Lasalocid in Milk Replacer or Calf Starter on Health and Performance of Calves Challenged with *Eimeria* Species”, *J. Dairy Sci.*, **1997**, *80*, 2972-2976
- [168] D.J. Kirk, J.P. Fontenot, S. Rahnema, “Effects of feeding lasalocid and monensin on digestive tract flow and partial absorption of minerals in sheep”, *J. Anim. Sci.*, **1994**, *72*, 1029-1037
- [169] J. W. Westley, W. Benz, J. Donahue, R. H. Evans, C. G. Scott, A. Stempel, J. Berger, “Biosynthesis of lasalocid III. Isolation and structure determination of four homologs of lasalocid A”, *J. Antibiot.*, **1974**, *27*, 744-753
- [170] J. W. Westley, J. F. Blount, R. H. Evans, A. Stempel, J. Berger, “Biosynthesis of lasalocid II. X-ray analysis of a naturally occurring isomer of lasalocid A”, *J. Antibiot.*, **1974**, *27*, 597-604

- [171] J. W. Westley, R. H. Evans, G. Harvey, R. G. Pitcher, D. L. Pruess, A. Stempel, J. Berger, "Biosynthesis of lasalocid I. Incorporation of ^{13}C and ^{14}C labeled substrates into lasalocid A", *J. Antibiot.*, **1974**, *27*, 288-296
- [172] J. W. Westley, R.H. Evans, D. L. Pruess, A. Stempel, "Biosynthesis of Antibiotic X-537A", *J.Chem. Soc. Chem. Comm.*, **1970**, *21*, 1467-1468
- [173] T. Nakata, G. Schmid, B. Vranesic, M. Okinawa, T. Smith-Palmer, Y. Kishi, "A total synthesis of Lasalocid A", *J. Am. Chem. Soc.*, **1978**, *100*, 2933-2935
- [174] T. Fukuyama, B. Vranesic, D. P. Negri, Y. Kishi, "Synthetic studies on polyether antibiotics II. Stereocontrolled syntheses of epoxides of bishomoallylic alcohols", *Tetrahedron Lett.*, **1978**, *31*, 2741-2744
- [175] T. Nakata, Y. Kishi, "Synthetic studies on polyether antibiotics. III. A stereocontrolled synthesis of isolasalocid ketone from acyclic precursors", *Tetrahedron Lett.*, **1978**, *31*, 2745-2748
- [176] M. M. Faul, B. E. Huff, "Strategy and methodology development for the total synthesis of polyether ionophore antibiotics", *Chem. Rev.*, **2000**, *100*, 2407-2473
- [177] F. E. Ziegler, "Stereo- and regiochemistry of the claisen rearrangement: Applications to natural products synthesis", *Accounts Chem. Res.*, **1977**, *10*, 227-232
- [178] R. E. Ireland, S. Thaisrivongs, C. S. Wilcox, "Total synthesis of Lasalocid A (X537 A)", *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, *102*, 1155-1157
- [179] R. E. Ireland, R. H. Mueller, A. K. Willard, "The ester enolate Claisen rearrangement -Stereochemical control through stereoselective enolate formation", *J. Am. Chem. Soc.*, **1976**, *98*, 2868-2877
- [180] R. E. Ireland, G. J. McGarvey, R. C. Anderson, R. Badoud, B. Fitzsimmons, S. Thaisrivongs, "A chiral synthesis of the left-side aldehyde for lasalocid A synthesis", *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, *102*, 6178-6180
- [181] R. E. Ireland, R. C. Anderson, R. Badoud, B. J. Fitzsimmons, G. J. McGarvey, S. Thaisrivongs, C. S. Wilcox, "The total synthesis of ionophore antibiotics. A convergent synthesis of lasalocid A (X537 A)", *J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, *105*, 1988-2006
- [182] R. E. Ireland, L. Courtney, B. J. Fitzsimmons, "Total synthesis of polyether antibiotics. Synthesis of the enantiomer of lasalocid A (X537 A)", *J. Org. Chem.*, **1983**, *48*, 5186-5198
- [183] L. F. Lindoy, "Outer-sphere and inner-sphere complexation of cations by the natural ionophore lasalocid A", *Coordin. Chem. Rev.*, **1996**, *148*, 349-368
- [184] E. C. Bissell, I. C. Paul, "Crystal and molecular structure of a derivative of the free acid of the antibiotic X-537A", *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, **1972**, *16*, 967-968
- [185] I. H. Suh, K. Aoki, H. Yamazaki, "Crystal structure of a silver salt of the antibiotic Lasalocid A: A dimer having an exact 2-fold symmetry", *Inorg. Chem.*, **1989**, *28*, 358-362
- [186] K. Aoki, I. H. Suh, H. Nagashima, J. Uzawa, H. Yamazaki, "Crystal structures of two polymorphic thallium(I) salts of the antibiotic lasalocid A: A polymeric form involving metal-phenyl π -bonding and a monomeric form involving the "half-naked" metal ion", *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, *114*, 5722-5729

Literatura

- [187] M. Akkurt, S. Ozturk-Yildirim, F. Z. Khardli, M. Mimouni, V. McKee, T. Ben Hadda, "Crystal structure of a new polymeric thallium-lasalocid complex: Lasalocide anion-thallium(I) containing aryl-Tl interactions", *Arkivoc*, **2008**, 15, 121-132
- [188] G. D. Smith, W. L. Daux, S. Fortier, "Structure of a hydrated sodium-lasalocid A (X-537A) dimer: an intermediate in complex formation", *J. Am. Chem. Soc.*, **1978**, 100, 6725-6727
- [189] S. M. Johnson, J. Herrin, S. J. Liu, I. C. Paul, "The crystal and molecular structure of the barium salt of antibiotic containing a high proportion of oxygen", *J. Am. Chem. Soc.*, **1970**, 92, 4428-4435
- [190] S. M. Johnson, J. Herrin, S. J. Liu, I. C. Paul, "Crystal structure of a barium complex of antibiotic X-537A, $Ba(C_{34}H_{53}O_8)_2 \cdot H_2O$ ", *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, **1970**, 2, 72-73
- [191] A. Huczyński, T. Pospieszny, M. Ratajczak-Sitarz, A. Katrusiak, B. Brzezinski, „Structural and spectroscopic studies of the 1:1 complex of lasalocid acid with 1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-ene", *J. Mol. Struct.*, **2008**, 875, 501-508
- [192] R. Pankiewicz, G. Schroeder, B. Gierczyk, B. Brzezinski, F. Bartl „Multinuclear NMR and FTIR studies of new polyoxaalkyl esters of lasalocid and their complexes with lithium and sodium cations", *Biopolymers*, **2002**, 65, 95-110
- [193] R. Pankiewicz, G. Schroeder, P. Przybylski, B. Brzezinski, F. Bartl „Lasalocid polyoxaalkyl esters complexes with Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+ and Cs^+ cations studied by ESI MS and semiempirical methods", *J. Mol. Struct.*, **2004**, 688, 171–176
- [194] R. Pankiewicz, A. Pawłowska, G. Schroeder, P. Przybylski, B. Brzezinski, F. Bartl „Multinuclear NMR, FT-IR, ESI MS studies and PM5 semiempirical calculations of new ethylene glycol ester of lasalocid acid and their complexes with K^+ cation", *J. Mol. Struct.*, **2004**, 694, 53–61
- [195] R. Pankiewicz, A. Pawłowska, G. Schroeder, P. Przybylski, B. Brzezinski, F. Bartl „NMR, FT-IR, ESI MS studies and PM5 semiempirical calculations of lasalocid ethylene glycol ester complexes with Li^+ and Na^+ cations", *J. Mol. Struct.*, **2004**, 694, 155–163
- [196] R. Pankiewicz, G. Schroeder, B. Brzezinski, F. Bartl " Spectroscopic and PM5 semiempirical study of new lasalocid 5-hydroxypentyl ester and its complexes with monovalent cations", *J. Mol. Struct.*, **2004**, 699, 53–64
- [197] R. Pankiewicz, G. Schroeder, B. Brzezinski "NMR, FT-IR, ESI MS and PM5 semiempirical study of new lasalocid 5-hydroxy-3-oxapentyl ester and its complexes with monovalent cations", *J. Mol. Struct.*, **2005**, 733, 155–165
- [198] R. Pankiewicz, G. Schroeder, B. Brzezinski „Spectroscopic, spectrometric and PM5 semiempirical investigation of new lasalocid 8-hydroxy-3,6-dioxaoctyl ester and its complexes with monovalent cations", *J. Mol. Struct.*, **2005**, 733, 217–229
- [199] R. Pankiewicz, G. Schroeder, B. Brzezinski, F. Bartl " NMR, FT-IR and ESI-MS study of new lasalocid ester with 2-(hydroxymethyl)-12-crown-4 and its complexes with monovalent cations" *J. Mol. Struct.*, **2005**, 749, 128–137
- [200] R. Pankiewicz, J. Kira, G. Schroeder, T. Ossowski, B. Brzezinski „Potentiometric, ESI MS and AM1d studies of lasalocid esters-silver(I) complexes", *J. Mol. Struct.*, **2006**, 782, 63–70

- [201] R. Pankiewicz, D. Remlein-Starosta, G. Schroeder, B. Brzezinski „Biological activity and ESI MS study of oxaalkyl and hydroksyoalkyl lasalocid esters”, *J. Mol. Struct.*, **2006**, *783*, 136 – 144
- [202] R. Pankiewicz, G. Schoeder, B. Brzezinski „Spectroscopic and PM5 semiempirical study of a new lasalocid ester with 2-allyloxyethanol and its complexes with monovalent cations”, *J. Mol. Struct.*, **2006**, *789*, 1–7
- [203] R. Pankiewicz, G. Schoeder, B. Brzezinski „¹H, ¹³C NMR, FT-IR, ESI-MS and PM5 semiempirical study of new lasalocid ester with 3-(methylthio)-1-propanol and its complexes with monovalent cations” *J. Mol. Struct.*, **2007**, *829*, 120–127
- [204] A. Huczyński, T. Pospieszny, R. Wawrzyn, M. Ratajczak-Sitarz, A. Katrusiak, B. Brzezinski, F. Bartl „Structural and spectroscopic studies of new o-, m- and p-nitrobenzyl esters of lasalocid acid”, *J. Mol. Struct.*, **2008**, *877*, 105–114
- [205] A. Huczyński, R. Wawrzyn, B. Brzezinski, F. Bartl “Structure of complexes of lasalocid m-nitrobenzyl ester with monovalent metal cations”, *J. Mol. Struct.*, **2008**, *889*, 72–80
- [206] A. Huczyński, I. Paluch, M. Ratajczak-Sitarz, A. Katrusiak, J. Stefańska, B. Brzezinski, F. Bartl „Spectroscopic studies, crystal structures and antimicrobial activities of a new lasalocid 1-naphthylmethyl ester”, *J. Mol. Struct.*, **2008**, *891*, 481–490
- [207] A. Huczyński, I. Paluch, M. Ratajczak-Sitarz, A. Katrusiak, B. Brzezinski, F. Bartl „Structural and spectroscopic studies of a new 2-naphthylmethyl ester of lasalocid acid” *J. Mol. Struct.*, **2009**, *918*, 108–115
- [208] D. L. Coffen, D. A. Katonak, “Chemical degradation of lasalocid: (A) The Mannich reaction, (B) Baeyer-Villiger oxidation of the retro-aldol ketone”, *Helv. Chim. Acta*, **1981**, *64*, 1645-1652
- [209] A. Huczyński, **J. Rutkowski**, B. Brzezinski, F. Bartl, „Synthesis, FT-IR, ¹H, ¹³C NMR, ESI MS and PM5 studies of a new Mannich base of polyether antibiotic - Lasalocid acid and its complexes with Li⁺, Na⁺ and K⁺ cations”, *Spectrochim. Acta A-M.*, **2013**, *104*, 497-504
- [210] A. M. Alstanei, C. Bendic, M. Carles, J. P. Aycard, “Crown ethers analogues and their complexes with NaSCN: Stoichiometry and stability constants determined by ¹³C NMR spectroscopy”, *J. Inclusion Phenom.*, **2000**, *37*, 423-440
- [211] R. Pankiewicz, G. Schroeder, B. Gierczyk, G. Wojciechowski, B. Brzezinski, F. Bartl, G. Kundel, „⁷Li-NMR and FT-IR studies of lithium, potassium, rubidium, and cesium complexed with ionophor lasalocid acid”, *Biopolymers*, **2001**, *62*, 173-182
- [212] National Committee for Clinical Laboratory Standards – Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disc Susceptibility Tests; Approved Standard M2-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa, USA (2006).
- [213] Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard M7-A7. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa. USA (2006).
- [214] M. Bednarek, E. Majda-Stanisławska, „Incidence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains (MRSA) and difficulties in treatment. Own experience” *Przegl. Epidemiol.*, **2006**, *60*, 49-52.

Literatura

- [215] M. A. Gardam, „Is methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* an emerging community pathogen? A review of the literature” *Can. J. Infect. Dis.*, **2000**, *11*, 202-211.
- [216] B. Murthy, A. Schmitt-Hoffmann, „Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Ceftobiprole, an Anti-MRSA Cephalosporin with Broad-Spectrum Activity” *Clin. Pharmacokinet.*, **2008**, *47*, 21-33.
- [217] A. Huczyński, J. Janczak, **J. Rutkowski**, D. Łowicki, A. Pietruczuk, J. Stefańska, B. Brzezinski, F. Bartl, „Lasalocid acid as a lipophilic carrier ionophore for allylamine: Spectroscopic, crystallographic and microbiological investigation.”, *J. Mol. Struct.* **2009**, *936*, 92-98
- [218] A. Huczyński, J. Janczak, J. Stefańska, **J. Rutkowski**, B. Brzezinski, „X-ray, spectroscopic and antibacterial activity studies of the 1:1 complex of lasalocid acid with 1,1,3,3-tetramethylguanidine” *J. Mol. Struct.*, **2010**, *977*, 51-55
- [219] A. Huczyński, **J. Rutkowski**, J. Wietrzyk, J. Stefańska, E. Maj, M. Ratajczak-Sitarz, A. Katrusiak, B. Brzezinski, F. Bartl, „X-ray crystallographic, FT-IR and NMR studies as well as anticancer and antibacterial activity of the salt formed between ionophore antibiotic Lasalocid acid and amines” *J. Mol. Struct.*, 2013, *1032*, 69-77
- [220] A. Huczyński, **J. Rutkowski**, J. Janczak, J. Stefańska, B. Brzezinski, D. Łowicki „X-ray, spectroscopic and antibacterial activity studies of 1:1 complex of lasalocid acid with 1,1,3,3-tetra methylguanidine” **Central European School on Physical Organic Chemistry, Przesieka, 08-12.06.2010**
- [221] A. Huczyński, **J. Rutkowski**, J. Janczak, M. Ratajczak-Sitarz, A. Katrusiak, B. Brzezinski, „Interactions between lasalocid acid and amines” **Central European School on Physical Organic Chemistry, Przesieka, 07-11.06.2011**
- [222] A. Huczyński, **J. Rutkowski**, J. Wietrzyk, J. Stefańska, E. Maj, M. Ratajczak-Sitarz, A. Katrusiak, B. Brzezinski, F. Bartl, „Hydrogen bond-mediated self-assembly structures of lasalocid acid complexes with amines” **Central European School on Physical Organic Chemistry, Przesieka, 07-11.05.2012**
- [223] A. Huczyński, **J. Rutkowski**, B. Brzezinski, „Complexes of lasalocid 2-naphthylmethyl ester with monovalent metal cations studied by mass spectrometry, spectroscopic and semiempirical methods”, *Struct. Chem.*, **2011**, *22*, 627-634

Spectroscopic, structural and antimicrobial investigation of new salts of lasalocid acid with amines

Summary in English

The main objective of this dissertation was to determine the structure and biological activity of new salts of lasalocid acid with amines and also to evaluate the competition between amines and metal cations for complexation by lasalocid acid.

Seven new complexes of lasalocid acid with amines were obtained in the crystal state and in solution. Mass spectrometry studies revealed that lasalocid acid forms complexes with amines of 1:1 stoichiometry. Spectroscopic and X-ray studies showed that in complexes with amines lasalocid acid is deprotonated and protonated amine molecule is complexed in the hydrophilic pocket formed by lasalocid acid anion. Analysis of spectroscopic data have shown that after complexation of amine molecule, intramolecular hydrogen bond formed by O(3)H hydroxyl group gets stronger, and two other intramolecular bonds, formed by O(4)H and O(8)H hydroxyl groups get weaker. Intermolecular hydrogen bonds formed between lasalocid acid anion and protonated amine molecule were generally weak. X-ray and spectroscopic studies showed that in 5 cases the structure of lasalocid acid complexes were comparable in solid state and in solution. In two cases the structures of lasalocid acid complexes observed in solid state were different in solution due to the partial dissociation connected with formation of lasalocid acid and free amine molecule and due to changes in coordination of amine molecule. Spectroscopic analysis also showed that lasalocid acid was able to complex amine molecule even in the presence of monovalent cations (Li^+ , Na^+ , K^+) and an equilibrium between the two types of lasalocid acid complexes with amine and with cation was observed.

Antimicrobial activity of lasalocid acid and its four complexes was tested. Biological studies showed that lasalocid acid and its complexes were active against Gram-positive bacteria. The activity of lasalocid acid complex with phenylamine was higher than that of pure lasalocid acid and the activities of complexes with allylamine and *N*-butylamine were comparable with that of uncomplexed acid. Lasalocid acid and its complex with allylamine (LAS-AM1) was additionally tested against clinically isolated *Staphylococcus* and showed good activity towards some strains of methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA), methicillin-

resistant *S. aureus* (MRSA). Lasalocid acid and its two complexes with phenylamine and *N*-butylamine were tested for cytotoxic activity and showed activity against human lung, breast and colon cancer cell lines. The cytostatic activity of lasalocid acid and its complexes was greater than that of cisplatin, indicating that lasalocid and its complexes could be promising candidates for new anticancer drugs.