

Możliwości badawcze Laboratorium Badań Strukturalnych: teraźniejszość i przyszłość

LBS znajduje się w strukturze
Zakładu Fizycznej Chemii Organicznej
w Instytucie Chemii UJK Kielce pok. C212

Skład osobowy LBS:

- prof. dr hab. Waldemar Iwanek – kierownik laboratorium
- dr Alicja Wzorek, adiunkt;
- dr Barbara Gawdzik, adiunkt;
- dr Mariusz Urbaniak, adiunkt;
- dr Jacek Faber, adiunkt;
- mgr Agata Iwanek, pracownik naukowo-techniczny.

Wyposażenie laboratorium

2010

- spektrofotometr dichroizmu kołowego (CD);
- spektrofotometr FT-IR z mikroskopem wraz ze spektrometrem Ramana;
- spektrometr mas z systemem UPLC

2011

- spektrofotometr UV-VIS-NIR;
- spektrofluorymetr;
- przyrząd do pomiaru wielkości cząstek, potencjału zeta oraz masy cząsteczkowej;
- analizator elementarny

2012

- spektrometr magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR);
- dyfraktometr rentgenowski monokrystaliczny

Spektrometr elektronowego dichroizmu kołowego (CD)



Dostosowany do pomiarów dichroizmu kołowego oraz dichroizmu liniowego (LD) w zakresie od 180 do 900 nm z opcją pomiaru widm fluorescencji i wzbudzenia fluorescencji. Przyrząd wyposażony jest w lampę ksenonową o mocy 150 W jako źródło światła oraz układ do pomiarów temperaturowych (Peltier).

Zastosowanie

- spektrometr CD służy do badania konformacji chiralnych molekuł i makromolekuł w szczególności peptydów, białek oraz kwasów nukleinowych;
- badania CD pozwalają na określenie struktur II-rzędowych rozpuszczalnych białek, wykrywanie stabilnych kontaktów III-rzędowych oraz śledzenie przemian konformacyjnych w kwasach nukleinowych;
- analiza chiralnych związków (m.in. farmaceutyków) oraz umożliwia badania kierunku wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych;
- spektroskopia LD pozwala, z kolei, na określenie makroskopowej orientacji wydłużonych molekuł względem kierunku polaryzacji światła;
- metoda ta umożliwia również badanie wzajemnej orientacji dwóch asocjujących molekuł, o ile jedna z nich może być makroskopowo zorientowana.

Spektrofotometr FT-IR z mikroskopem

Zakres spektralny FT-IR

8,300– 350 cm^{-1} (MIR)
14,700– 2,000 cm^{-1} (NIR)
(ok. 680– 4,800 nm)

Rozdzielczość

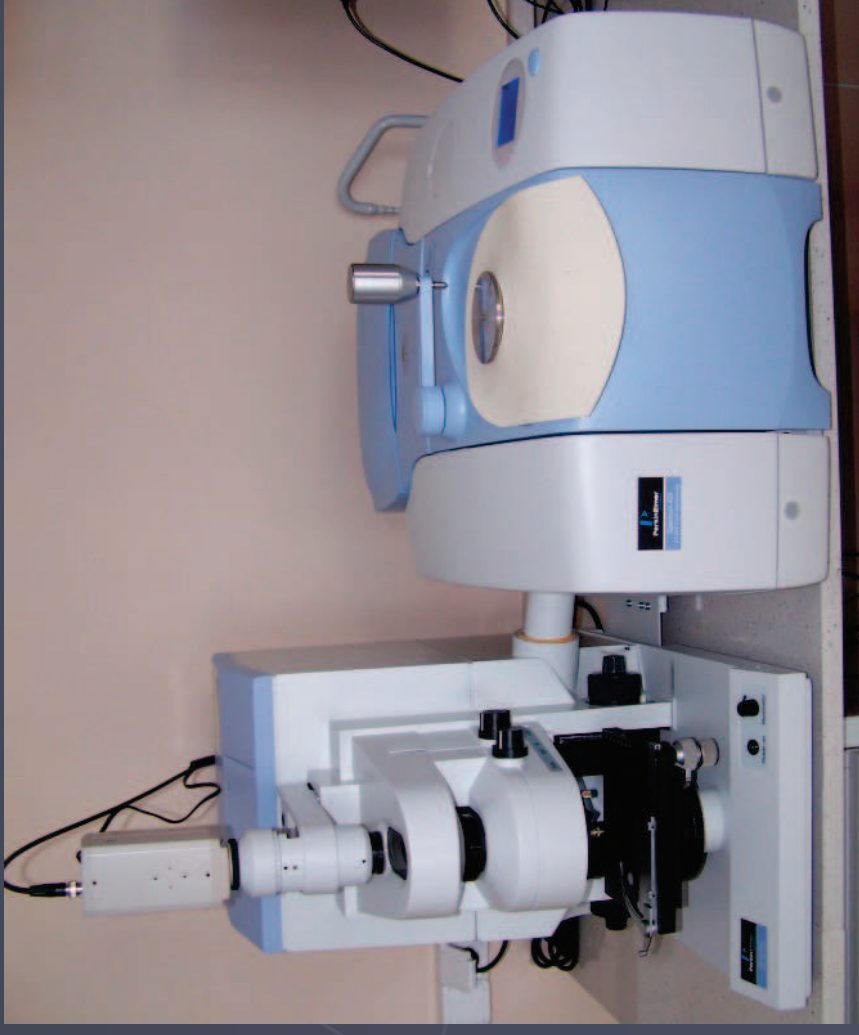
0.4-64 cm^{-1} MIR
1-64 cm^{-1} NIR

Przystawki

ATR (diamentowa); dyfuzyjna;
do pomiarów cieczy.

Metodyka pomiaru

próbki stałe, próbki ciekłe,
w tabletce KBr, w filmie



Zakres spektralny mikroskopu

5000 cm^{-1} do 550 cm^{-1} – detektor MCT

- posiada kamerę video umożliwiającą podgląd obrazu na monitorze oraz możliwość zapisywania i drukowania obrazów;
- pracuje w modzie transmitancji, refleksyjności oraz micro ATR;
- jest w stanie wyizolować obszary próbek do rozmiarów 10 x10 μm .

Porównanie zakresów MIR i NIR w spektroskopii IR

Identyfikacja substancji i ocena ilościowa oraz jakościowa próbki to podstawowe zastosowania techniki IR w zakresie MIR i NIR. Widmo IR w zakresie MIR daje nam więcej informacji o budowie chemicznej niż widmo w zakresie NIR – ma charakterystyczne miejsca dla poszczególnych grup funkcyjnych oraz tzw. „obszar daktyloskopowy”. Obie odmiany spektroskopii w podzerwieni różnią się jednak głównie analizowanym zakresem widma i sposobem przygotowania próbek.

Analiza w zakresie średniej podzerwieni ($400\text{-}7000\text{ cm}^{-1}$) wymaga dosyć kłopotliwego przygotowania próbek np. poprzez rozpuszczenie w odpowiedniej substancji, umieszczenie w kontakcie ze specjalnym kryształem itp. i jest bardzo wrażliwa na obecność wody.

Analiza NIR wykorzystuje promieniowanie w zakresie $800\text{-}2500\text{ nm}$, dostarczając informacji o budowie chemicznej oraz o stanie fizycznym badanej substancji. Analizujemy drgania wiązań chemicznych, tzw pierwsze i drugie nadtony głównie drgań rozciągających grup -OH , -NH , -CH . Analiza techniką NIR nie wymaga wstępnej obróbki badanej substancji, umożliwia zastosowanie sond światłowodowych i pomiar bezpośrednio przez opakowanie. Spektrometry NIR znakomicie sprawdzają się w pomiarach ilościowych i jakościowych w przemyśle spożywczym, chemicznym, farmaceutycznym.

Wybrane przykłady zastosowań FT-IR

Mikrobiologia

- ważnym aspektem tej metody jest to, że umożliwia ona zidentyfikowanie mikroorganizmów nawet do poziomu szczepu!;
- każdy mikroorganizm – grzyby, pleśnie, bakterie – posiada jedyne, charakterystyczne widmo, umożliwiając szybką, precyzyjną i tanią analizę;
- wynik uzyskujemy już po kilku sekundach, dokładność oznaczeń jest porównywalna z 16-sekwencyjnym RNA - tanią, bo nie potrzebujemy żadnych odczynników, a systemy zautomatyzowane mogą wykonywać nawet do 10 000 oznaczeń dziennie.

Porównanie różnych metod badawczych wykorzystywanych w badaniach i optymalizacji bioprocésów

Metoda	Wymagana objętość	Mierzony parametr	Czas analizy na jedną próbkę	Czas analizy dla 96 próbek	Możliwość automatyzacji	Zalety/wady
Dot Blot	5 µl	produkt	5 godzin	5 godzin	nle	+ metoda prosta - oznaczenia tylko jakościowe
ELISA	100 µl	produkt	4 godzin	4,5-8 godzin	tak	+ oznaczenia ilościowe - kosztowna
CEDEX	1 ml	gęstość komórek	6 minut	9,6 godzin	tak	+ możliwość automatyzacji
Analizator NOVA	500 µl	ważne metabolity pożywki	3 minuty	4,8 godzin	tak	+ prosta obsługa
FT-IR	MIR: 8 µl NIR: nie wymaga	produkty metabolity pożywki	2 minuty	31-111 minut	tak	+++ wszystko w jednym, analiza jakościowa i ilościowa dla wszystkich parametrów jednocześnie

Zalety techniki FT-IR w diagnozowaniu schorzeń

- promieniowanie podczerwone nie jest niszczące dla materiału biologicznego tak jak UV, promieniowanie X czy γ ;
- w odróżnieniu od np. magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) czy pozytonowej tomografii emisyjnej (PET) badania mogą być prowadzone na małej ilości materiału i ze zdecydowanie lepszą rozdzielczością przestrzenną;
- technika ta jest nieinwazyjną;
- jest szybką metodą oznaczania równocześnie wielu biomolekuł;
- stosunkowo tania w porównaniu ze stosowanymi metodami histochemicznymi;
- umożliwia zarówno badania *ex vivo* jak i *in vitro*.

Zastosowani FT-IR w diagnostyce medycznej

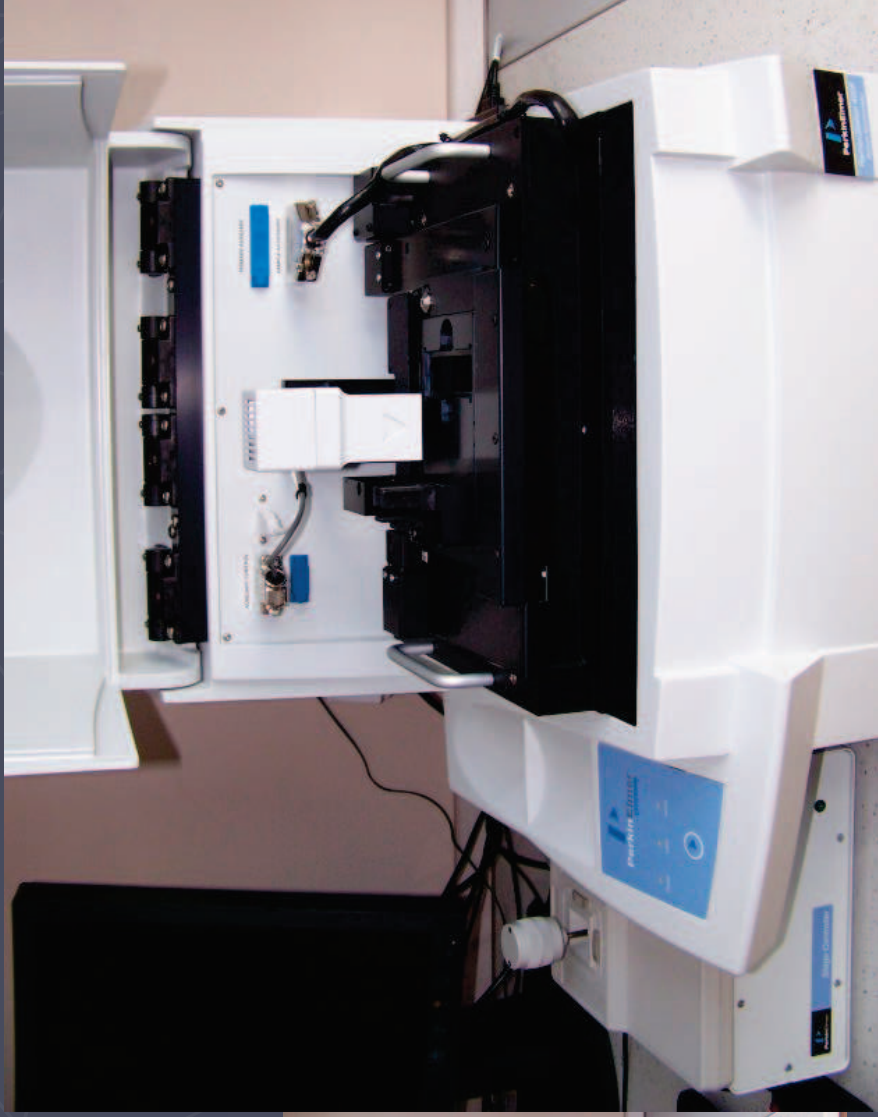
Jednym z bardziej aktywnych obszarów stosowania (mikro) spektroskopii w podcierwieni jest grupa **chorób nowotworowych**.

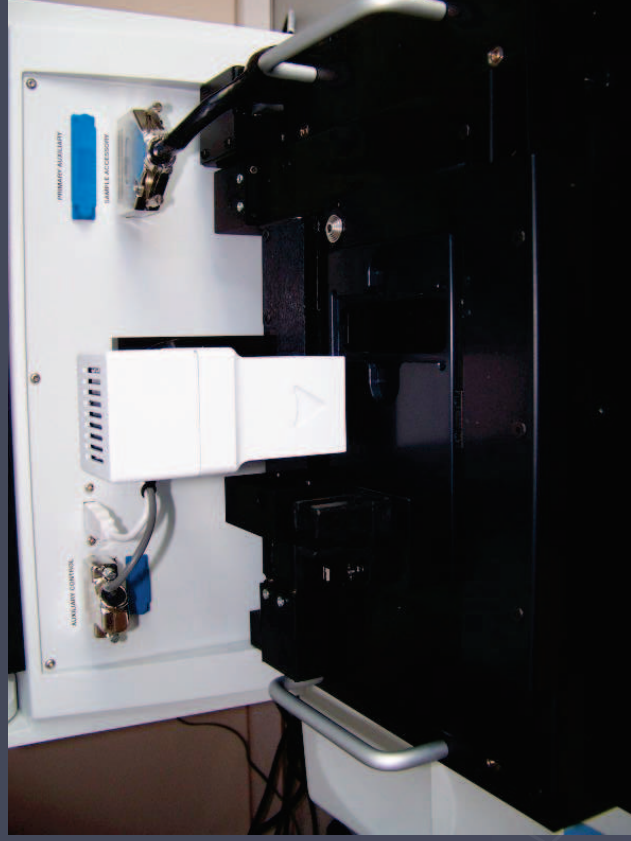
Dotychczasowe prace wskazują, że w tej grupie schorzeń spektroskopia FTIR może być stosowana w następujących zagadnieniach:

- 1) rozróżnianie pomiędzy tkankami zdrowymi a zmienionymi nowotworowo (nowotwory piersi, okrężnicy, wątroby, szyjki macicy) z uwzględnieniem wykrywania wczesnego stadium choroby, gdy standardowe metody nie dają jednoznacznej odpowiedzi;
- 2) monitorowanie nieprawidłowego wzrostu i proliferacji komórek nowotworowych tak jak w przypadku krypt jelitowych, nabłonka szyjki macicy;
- 3) rozróżnianie pomiędzy zdrowymi a nowotworowymi komórkami w biopsjach z małych organów jak prostata, tarczycza oraz płynów ustrojowych;
- 4) rozróżnianie pomiędzy stanami nowotworowymi a schorzeniami o podobnych objawach klinicznych (nowotwór okrężnicy, choroba zapalna jelit);
- 5) monitorowanie skutków terapii antynowotworowej (chemioterapii w przypadku białaczek) oraz stopnia złośliwości nowotworu;
- 6) monitorowanie stężenia metabolitów;
- 7) badania zmiany struktury drugorzędowej biomolekuł (białka, DNA) w chorobach nowotworowych.

Spektrometr Ramana

- Zakres spektralny widma ramanowskiego 95 – 3400 cm^{-1} ;
- Rozdzielczość lepsza niż 1 cm^{-1} ;
- Detektor CCD typu "Open Electrode" o 1024 x 256 pikselach;
- Wyposażony w laser 785 nm;
- Układ optyczny z siatka dyfrakcyjna typu „echelle”;
- Możliwość zebrania całego zakresu widma czasie poniżej 1 sekundy.





Przesuwany stolik na próbki

- Poruszany w układzie XYZ stolik na próbki napędzany silnikami krokowym zakresie 120 x 80 x 10mm o dokładności 1 μm ;
- Możliwość umieszczenia kuwet, fiolek, kapilar, szkiełek mikroskopowych, mikropłytek oraz funkcja programowania pozwalająca dodawać rodzaje próbek użytkownika;
- Kamera video umożliwiająca ustawienie próbki;
- Autofokus dla obrazu video i intensywności Ramana;
- Automatyczna analiza wielokrotna różnych obszarów próbki;
- Możliwość następujących typów analizy spektralnej: pojedynczy punkt, plamka, mapowanie, mapowanie liniowe, profilowanie warstwowe

Zastosowanie spektroskopii Ramana

Farmacja		Różne formy węgla		Materiałoznawstwo		Gemologia, geologia i mineralogia		Kryminalistyka	
Nanotechnologia		Sztuka i dziedzictwo historyczne		Półprzewodniki		Biologia i biomedycyna		Galeria obrazów ramanowskich	

Powierzchniowo wzmocniona spektroskopia Ramana (SERS)

Technika jest wrażliwa i selektywna; możliwe jest wykrywanie molekuł o stężeniu poniżej 10^{-9} mol/l czy detekcja monowarst adsorbatów.

Zastosowania

Badania polimerów

Możliwość badania powierzchni *in situ* została wykorzystana w chemii polimerów do charakterystyki powierzchni pod kątem objętości i geometrii grup bocznych polimerów, a także uzyskania informacji o wiązaniach w np. kompozytach polimer – metal.

Analiza śladowa

Zanotowano, że możliwa jest detekcja pojedynczej cząsteczki za pomocą echniki SERS, co sugeruje, że sygnał może być wzmocniony nawet 10^{14} – 10^{15} razy. Ponadto dzięki dobrej adsorpcji analitu do powierzchni metalu uzyskuje się wygaszenie fluorescencji, często zakłócającej obraz widm ramanowskich. Oznacza to, że używając techniki SERS można zarejestrować wysokiej jakości widma ramanowskie dla bardzo niskich stężeń substancji badanej. Metodę SERS wykorzystuje się w analizie śladowej, np. do określenia śladowych zanieczyszczeń wody.

Badania nad związkami biologicznie czynnymi i procesami biologicznymi

- Badania neurotransmiterów jak dopamina, norepinefryna, epinefryna, katechol stanowiące metodę konkurencyjną do wykorzystywanych w neurochemii pomiarów woltametrycznych;
- Analiza nukleotydów, nukleozydów i elementów składowych kwasów nukleinowych, rozwijanie sposobów detekcji w metodach chromatograficznych;
- SERS zastosowano również w połączeniu z technikami skaningowymi do uzyskania ramanowskiego obrazowania DNA z rozdzielczością 100 nm;
- Badania fotosyntetycznych membran i cytochromów;
- Struktura wirusów i patogenów w kompleksach z błoną komórkową;
- Pomiar glukozy *in vivo*;
- Oddziaływanie leków z białkami;
- Detekcja i rozróżniania pojedynczych organizmów jak np. bakterii;
- Detekcja i charakteryzacja modyfikacji posttranslacyjnych.

Spektrometr mas z systemem UPLC

Metoda jonizacji

- ESI
- APCI

Analizator mas

- hybrydowy, kwadrupol-czas przelotu (Q-TOF)

Podstawowe dane

- zakres mas: 20 – 40.000 m/z;
- dokładność 1-2 ppm (wz. wewnętrzny), 5 ppm (wz. zewnętrzny);
- rozdzielczość 17.500 (FWHM) w LBS – 23.500;
- kompensacja temperaturowa pomiarów



Chromatografia cieczowa i spektrometr mas (LC-MS):

Wysokociśnieniowe chromatografy cieczowe (HPLC, UPLC) są łączone ze spektrometrami mas. Najczęściej stosowanym w tym przypadku źródłem jonów jest elektrozpylacz (ESI). W układach tych stosuje się często spektrometry tandemowe ze względu na dużą złożoność analizowanych próbek. Systemy takie są zwykle stosowane w badaniach proteomicznych do identyfikacji białek ze złożonych mieszanin, wykrywania zanieczyszczeń środowiska oraz w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym, kosmetycznym.....

Zastosowanie:

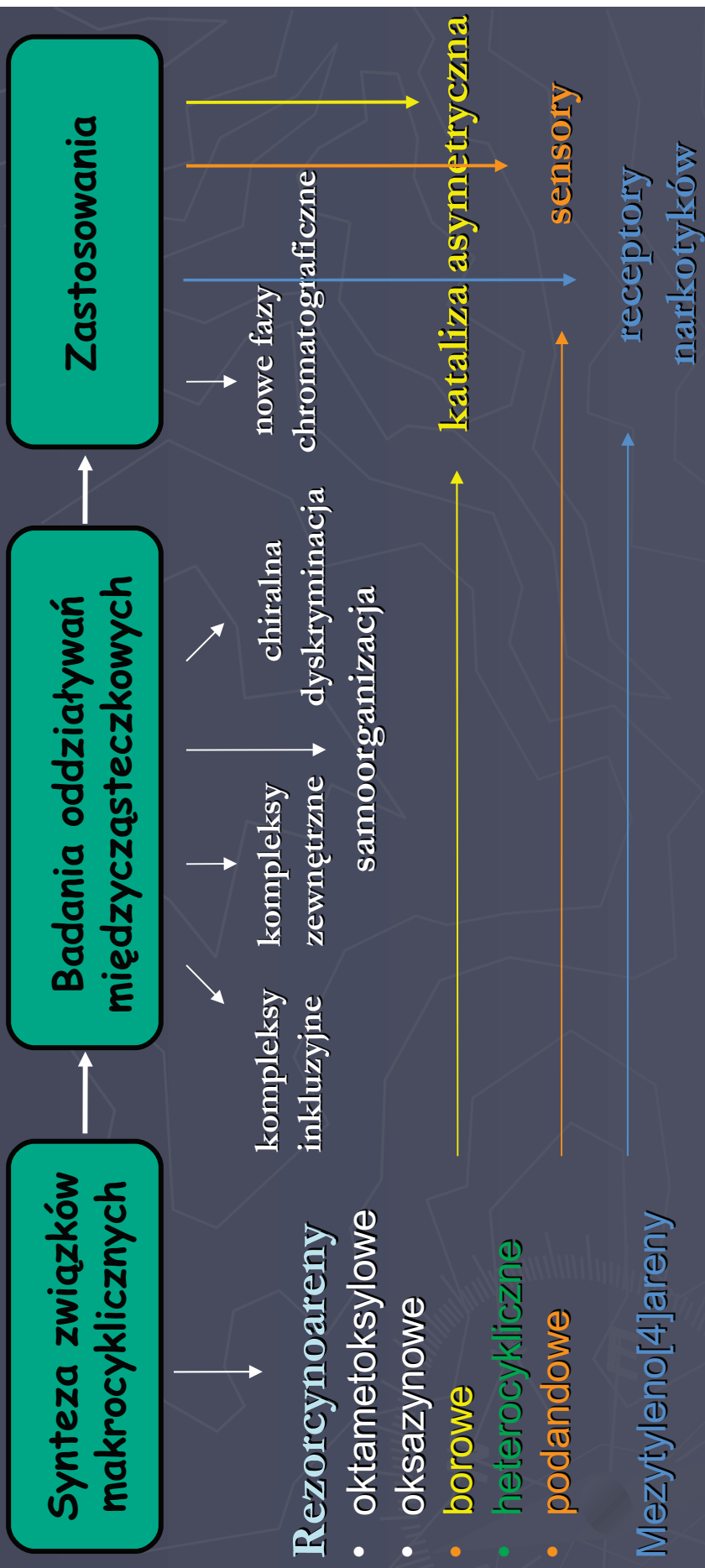
- identyfikacji związków chemicznych i ich mieszanin,
- ustalania struktury związków chemicznych,
- ustalania ich składu pierwiastkowego,
- ustalania składu izotopowego analizowanych substancji, co m.in. umożliwia określenie ich źródła pochodzenia,
- precyzyjnego ustalania składu złożonych mieszanin związków o wysokich masach molowych w proteomice, badaniach materiałowych, chemii polimerów;
- badania kompleksów molekularnych i supramolekularnych;
- badania proteomiczne i metabolomiczne.

Problematyka badawcza

Z. F. Ch. O.



Związki makrocycliczne



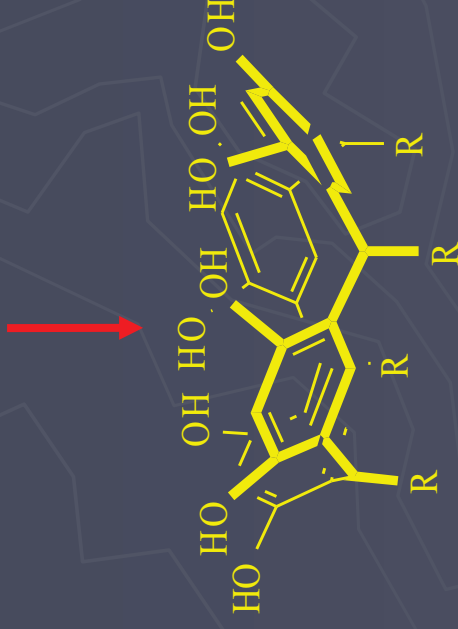
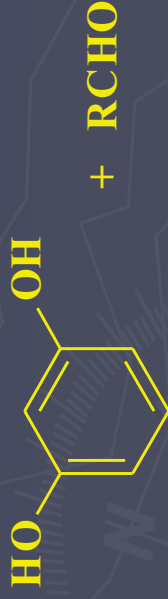
Mezityleno[4]jareny

Makrocykle borono-imidazolowe

Synteza nanocząstek

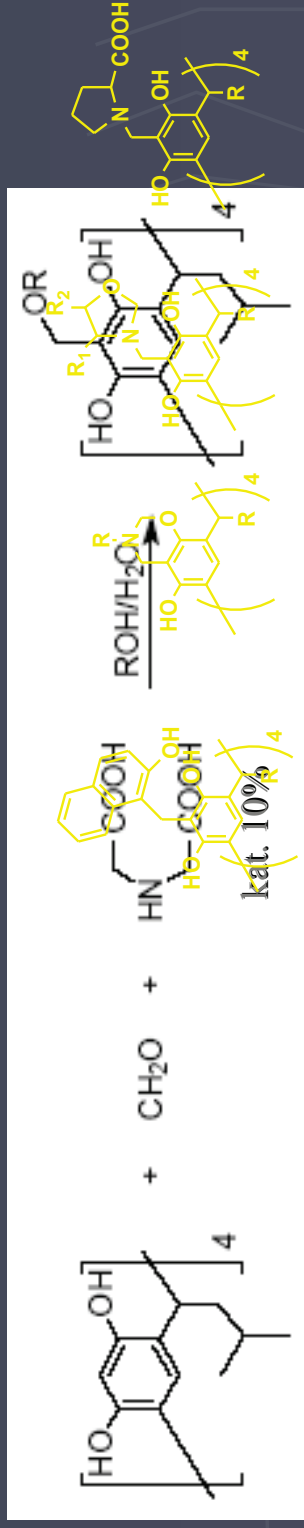
Funkcjonalizowanie rezorcynoarenów

funkcjonalizacja górnej obręczy
(grupy hydroksylowe, pozycja „orto”)



funkcjonalizacja dolnej obręczy
(modyfikacja grup pochodzące od aldehydu)

Synteza nowych pochodnych rezorcynoarenów

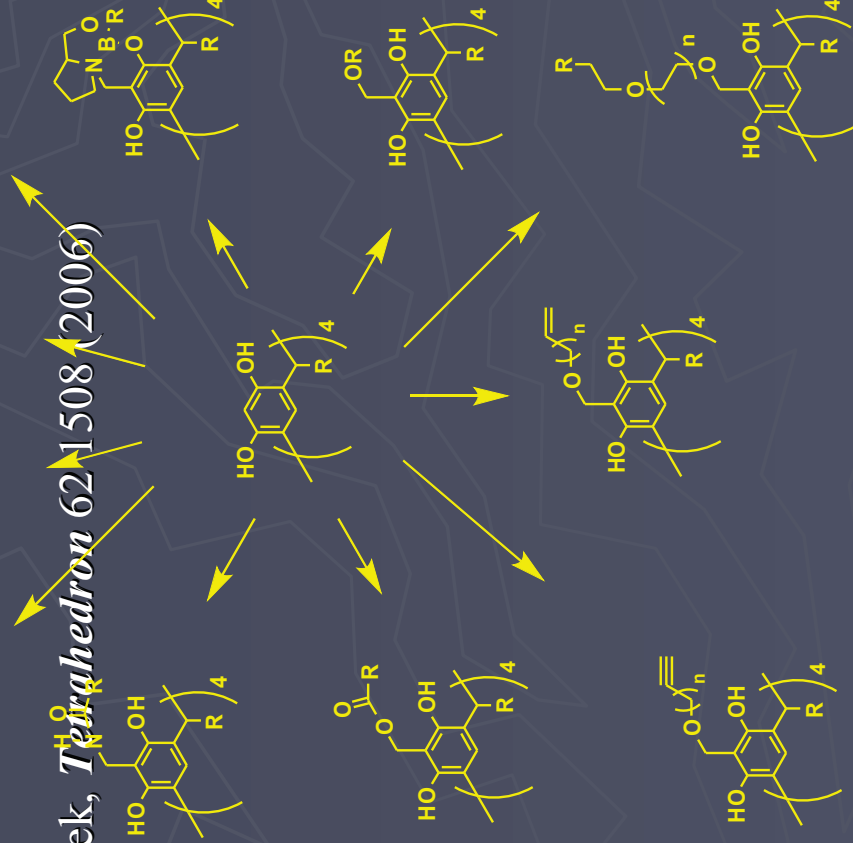


M. Urbaniak and W. Iwanek, *Tetrahedron* 62, 1508 (2006)

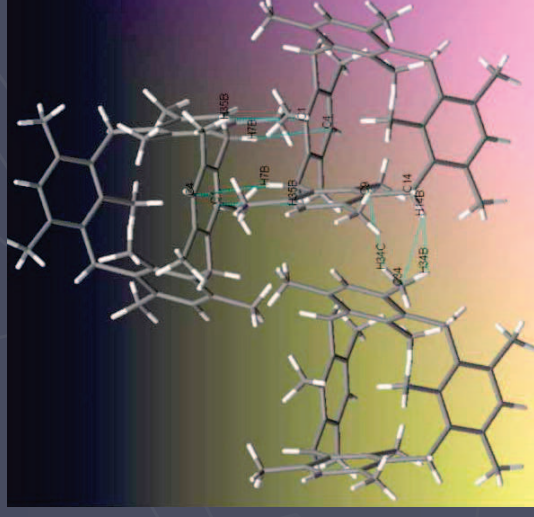
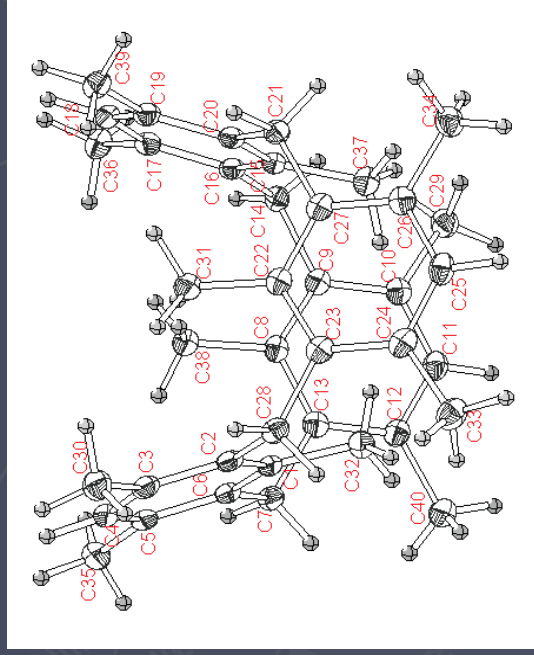
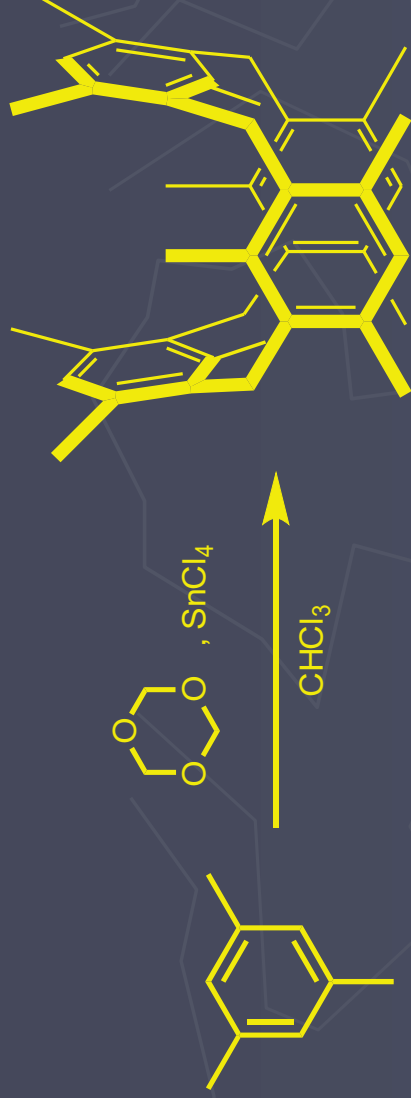
Urbaniak M., Mattay J, Iwanek W.,
Synth Commun., 2008, 38, 4345

Urbaniak M., Mattay J., Iwanek W.
Synth Commun., 2010, w druku

Iwanek W., Urbaniak M.,
Tetrahedron, 2010, przygotowana do wysłania

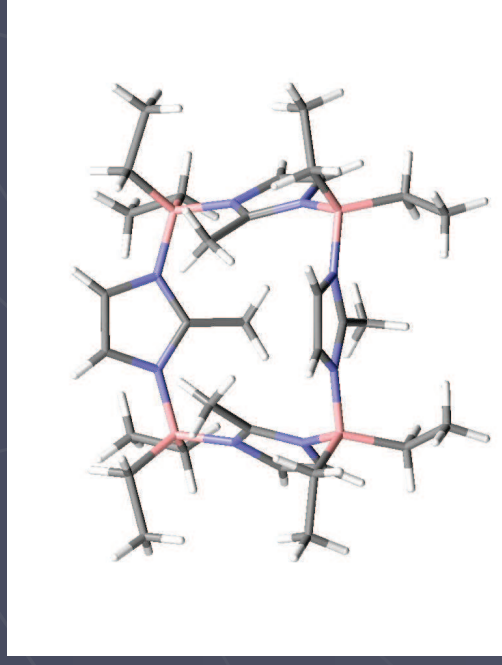
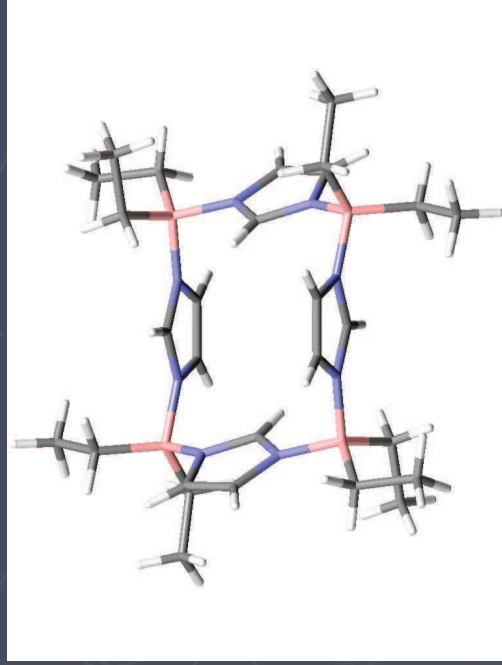
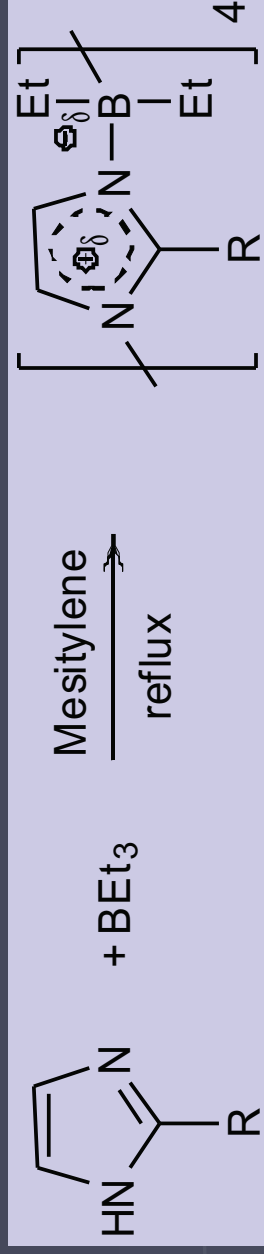


Mezytyleno[4]areny



Gawdzik B., Iwanek W., Winiarek A., Woźniak K., *Supramolecular Chemistry*, 20, 273 (2008).

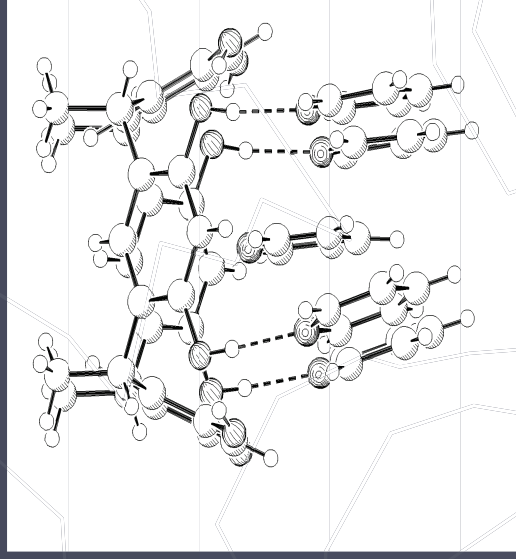
Makrocykle borono-imidazolowe



Iwanek W., Woźniak K.,..., *Supramol. Chem.*, 2010, w przygotowaniu

Badania oddziaływań międzycząsteczkowych

- kompleksowanie rezorcynoarenów z aminami oraz aminoalkoholami, w tym różnicowanie chiralne



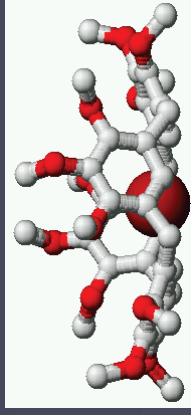
Iwanek W. and Urbaniak M., *Tetrahedron*, 57, 10377 (2001).

Iwanek W. and Urbaniak M., *Pol. J. Chem.*, 73, 2067 (1999)

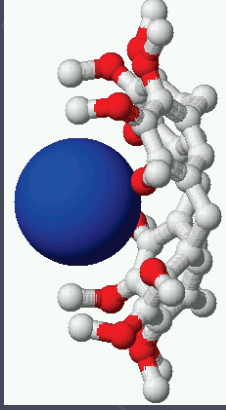
Iwanek, W., Fröhlich, R., Urbaniak, M., Mattay, J., *Tetrahedron*, 54, 14031 (1998).

Iwanek, W., Fröhlich, R., *Pol. J. Chem.*, 10, 2346 (1998)

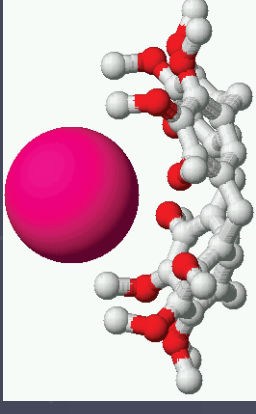
- badania kompleksotwórcze oktametoksyrezorcarenów oraz metoksyperyogalloarenów z kationami metali oraz silnymi akceptorami elektronu;



kompleks z Li^+

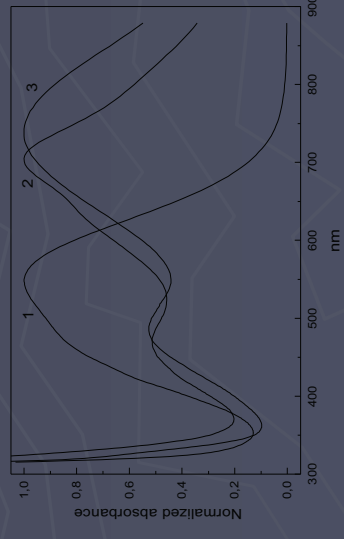
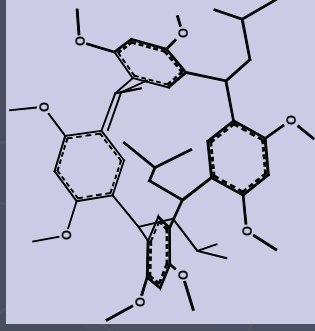
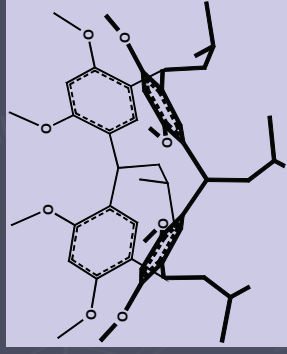


kompleks z Na^+



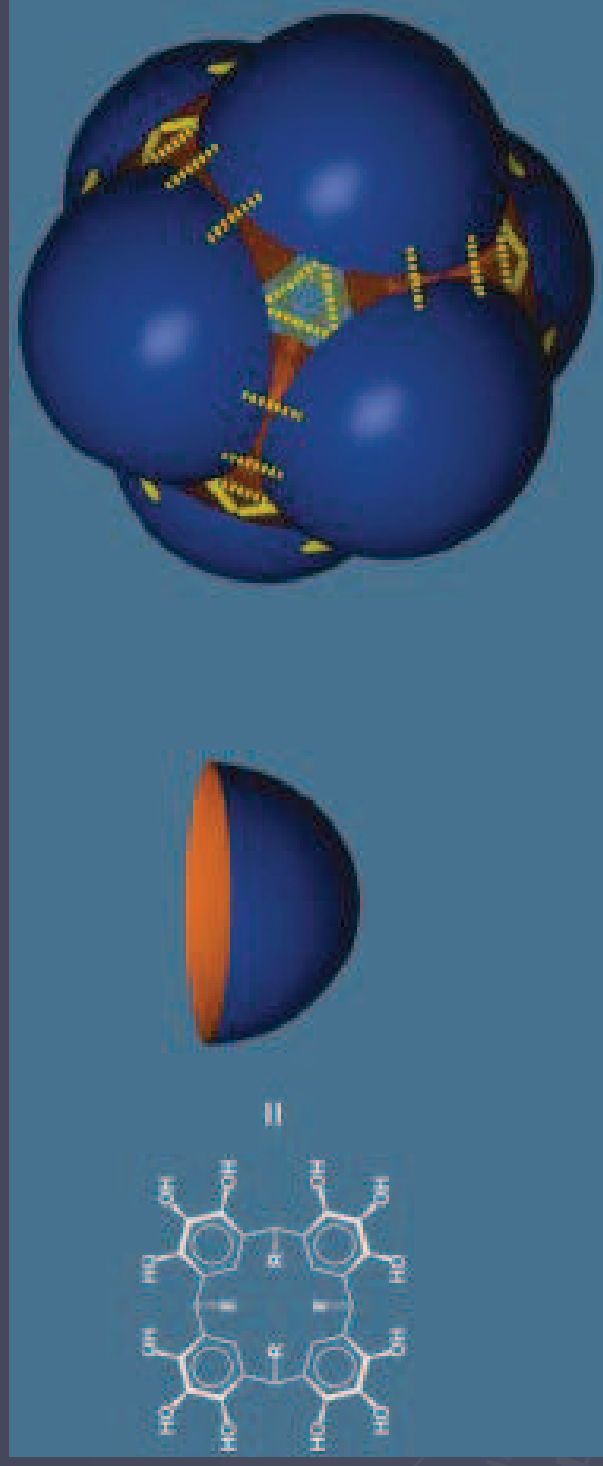
kompleks z K^+

Iwanek W. and Urbaniak M. and Bocheńska M., *Tetrahedron*, 58, 2239 (2002)



Urbaniak M. and Iwanek W., *Tetrahedron*, 55, 14459 (1999)

- badanie efektów samoasocjacji pirogaloarenów

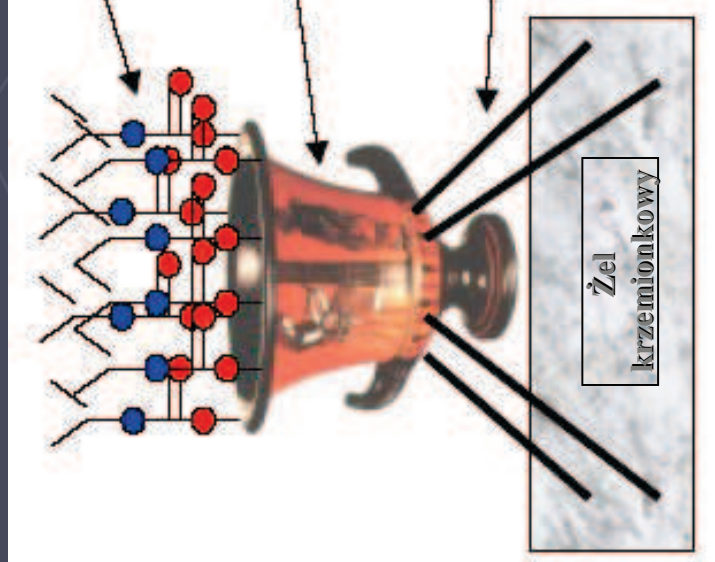
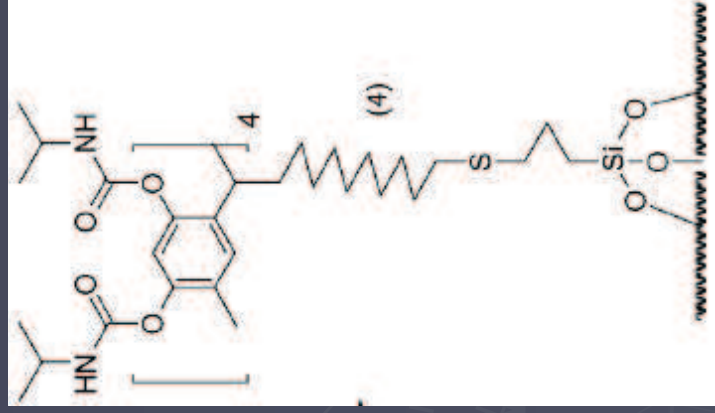


Gerkenmeier T., Iwanek W., Agena C., Fröhlich R., Kotila S., Näther Ch. and Mattay J.,
Eur. J. Org. Chem., 2257 (1999)

Gerkenmeier T., Agena C., Iwanek W., Fröhlich R., Kotila S., Näther Ch. and Mattay J.,
Z. Naturforsch., 56b, 1063 (2001)

Zastosowania

Nowe fazy chromatograficzne



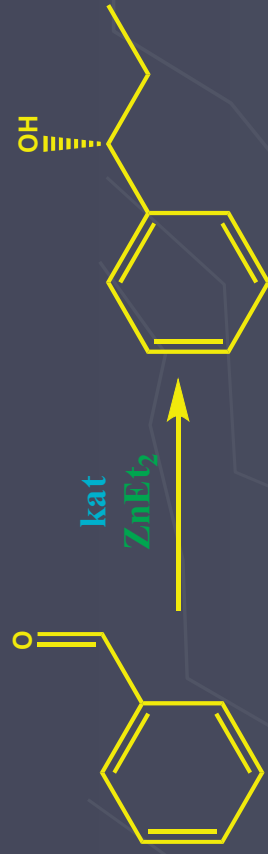
reszty karbaminianowe
oddziaływania polarne

platforma rezorcarenu
oddziaływania $\pi-\pi$

łańcuchy alkilowe
oddziaływania hydrofobowe

Ruderisch A., Iwanek W., Pfeiffer J., Fischer G., Albert K., Schurig V.,
Journal of Chromatography A, 1095, 40 (2005).

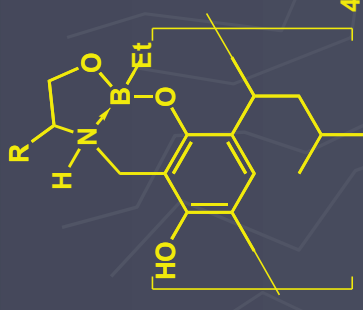
Borowe pochodne rezorcynoarenu jako katalizatory reakcji asymetrycznych



- wpływ stężenia katalizatora
- wpływ stosunku benzaldehyd/ ZnEt_2
- wpływ temperatury

Optymalne warunki reakcji:

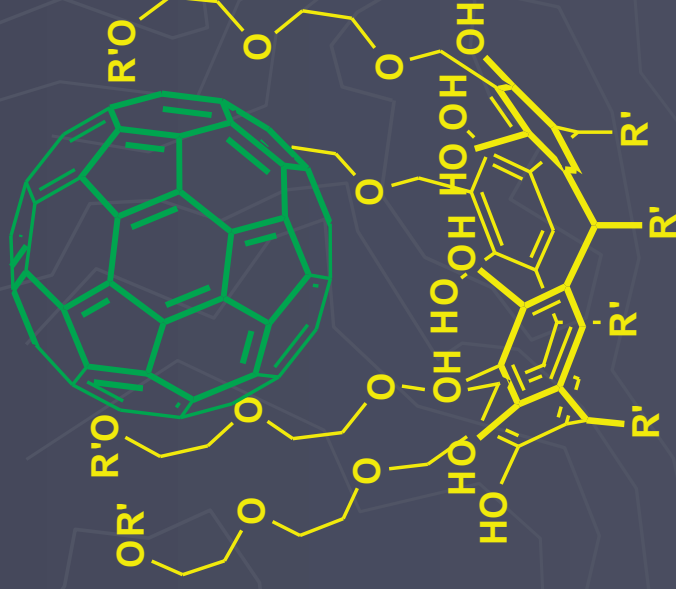
stężenie katalizatora - 5 % mol
temperatura - 0 °C
stosunek benzaldehyd/ ZnEt_2 - 1:3



	Aminoalkohol	Katalizator (kat)	Ee [%] [*]
1.	(R)-2-amino-1-butanol	<i>out</i> -(M,R,,R _N ,R _B ,R)	38.5
2.	(S)-2-amino-1-butanol	<i>out</i> -(P,S,S _N ,S _B ,S)	39.1
3.	(S)-alaninol	<i>out</i> -(P,S,S _N ,S _B ,S)	45.2
5.	(S)-walinol	<i>out</i> -(P,S,S _N ,S _B ,S)	6.4
6.	(S)-leucynol	<i>out</i> -(P,S,S _N ,S _B ,S)	9.8
7.	(S)-izo-leucynol	<i>out</i> -(P,S,S _N ,S _B ,S)	32.6
8.	(R)-fenylglycinol	<i>out</i> -(M,R,R _N ,R _B ,R)	35.9
10	(1R,2S)-1-amino-2-indanol	<i>out</i> -(M,R,R _N ,R _B ,R)	36.4

^{*} HPLC, kolumna Chiralcel OD

Podando-rezorcynoareny jako sensory



$$K = 1,77 \times 10^2 \pm 22 \text{ M}^{-1}$$

Dorobek naukowy Zakładu 2005-2010

- ilość publikacji - 17 (Σ IF ok. 40)
- patenty - 6
- naukowe doniesienia konferencyjne międzynarodowe i krajowe – 19
- wykłady na konferencjach międzynarodowych i krajowych – 4
- wykłady na seminariach międzynarodowych i krajowych – 6
- recenzje prac naukowych – 15
- recenzje grantów międzynarodowych – 2
- recenzje grantów krajowych - 8

Rozwój naukowy Zakładu

- dr Alicja Wzorek, obrona doktoratu z wyróżnieniem, 2009, Wydział Chemii UW;
- dr Mariusz Urbaniak, przewidywana obrona pracy habilitacyjnej 2013-2014;
- dr hab. Waldemar Iwanek, Wydział Chemii UW, 2010 (pozytywna ocena wniosku przez Centralną Komisję ds. Stopni i Tytułów w sprawie nadania tytułu naukowego profesora).

Wsółpraca krajowa

- Prof. Dr hab. Krzysztof Woźniak, UW Warszawa;
- Prof. Dr hab. Grzegorz Schroeder, UAM Poznań;
- Prof. Dr hab. Maria Bocheńska, Politechnika Gdańska.

Wsółpraca zagraniczna:

- Prof. Jochen Mattay, Uniwersytet w Bielefeld (Niemcy).
- Prof. Volker Schurig, Uniwersytet w Tybindze (Niemcy).
- Dr Roland Fröhlich, Uniwersytet w Münster (Niemcy).

Dotychczasowe finansowanie badań

- stypendia DFG (3 krotnie);
- stypendium Volkswagena;
- stypendia DAAD;
- grant KBN;
- projekt międzyrządowy polsko-niemiecki 2005-2006;
- badania statutowe;
- badania własne

Przewidywane finansowanie badań

- 2 złożone projekty do MNiI;
- konkurs POIG w ramach konsorcjum Uczelni;
- projekt międzyrządowy polsko-niemiecki 2011-2012;
- badania statutowe;
- badania własne;
- usługi na zewnątrz

Dziękuję za uwagę

