

Badania potencjometryczne, ESI-MS i NMR nad kompleksowaniem magnezu(II) i wapnia(II) wybranymi kwasami bisfosfonowymi w roztworze wodnym

Magdalena SZPAK – Wydział Chemii, Uniwersytet Opolski, Opole; Ewa MATCZAK-JON – Wydział Chemiczny, Politechnika Wrocławska, Wrocław; Barbara KURZAK* – Wydział Chemii, Uniwersytet Opolski, Opole

Prosimy cytować jako: CHEMIK 2014, **68**, 4, 321–328

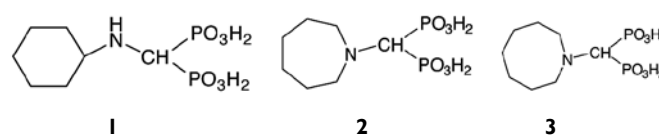
Wstęp

Bisfosfoniany (BP) to uniwersalna klasa związków o trwałych, nieulegających hydrolizie wiązaniach P–C–P. Ich wspólną cechą jest silne powinowactwo do jonów metali, zwłaszcza do Mg^{2+} i Ca^{2+} . Pierwsze związki tej klasy opracowane w XIX w. zsyntezowano jako substancje przeznaczone do celów niebiologicznych. Pierwsze zastosowania bisfosfonianów obejmowały głównie środki antykorozyjne i środki kompleksujące w przemyśle włókienniczym, nawozów i naftowym [1]. Jako leki o głębokim wpływie na metabolizm wapnia, bisfosfoniany pojawiły się w latach 70. ub.w. Pierwsze kliniczne zastosowania tych leków (klodronian i etidronian) obejmowały inhibicję kalcyfikacji, co było efektem poszukiwania trwałych analogów pirofosforanu, który jest naturalnym regulatorem mineralizacji kości [2]. Po tym sukcesie opracowano i pomyślnie wprowadzono na rynek, jako klinicznie wartościowe leki, związki skuteczniejsze – z atomem azotu w łańcuchach bocznych, najpierw z szeregu aminoalkilowego, pamidronian, alendronian, ibandronian i wreszcie rizedronian i zoledronian. W 2011 r. opublikowano specjalny numer czasopisma BONE z serią artykułów przeglądowych, podsumowujących podstawowe naukowe i kliniczne aspekty działania bisfosfonianów, napisanych przez znanych naukowców, którzy przyczynili się do zrozumienia wyjątkowych właściwości bisfosfonianów i sposobu ich funkcjonowania [3].

Obecnie bisfosfoniany zawierające azot (NBP) są najczęściej stosowanym lekiem w terapii zaburzeń metabolizmu wapnia. Powszechnie przyjmuje się, że NBP hamują resorpcję kości poprzez selektywne wychwytywanie i adsorpcję na powierzchniach mineralnych kości, gdzie zakłócają czynność resorpcyjną osteoklastów. W komórkach działają poprzez zakłócanie szlaku biosyntezy mewalonianu i hamowanie – w różnym stopniu – działania enzymów metabolizujących lipidy izoprenoidowe zawierające pirofosforan. Głównym celem enzymatycznym NBP jest zależna od magnezu syntaza pirofosforanu farnezyli (FPPS) [2, 4–15]. Kilka struktur kompleksów FPPS-bisfosfonian ustalonych rentgenoskopowo dowodzi, że dla czynności farmakologicznej leku konieczna jest obecność obu grup fosfonianowych. Ponadto wiązanie wodorowe, utworzone między atomem azotu a specyficzną resztą w centrum aktywnym FPPS, oraz oddziaływanie hydrofobowe, przyczyniają się do ogólnego powinowactwa wiązania wykazywanego przez najskuteczniejsze NBP. Pomimo ogromnego postępu w poznawaniu molekularnych podstaw działania bisfosfonianów, nadal nie jest dostatecznie jasne, dlaczego niewielkie zmiany w ich budowie mogą powodować znaczne zmiany w ich charakterystyce fizykochemicznej, biologicznej i toksykologicznej.

W niniejszej pracy przedstawiono wyniki badań Autorów nad kompleksowaniem magnezu(II) i wapnia(II) trzema aminofosfoniana-

mi różniącymi się charakterem (aminocykloheksyl lub pierścień heterocykliczny) i wielkością (pierścień 6-, 7- lub 8-członowy) podstawników przyłączonych do wspólnego szkieletu P–C–P (Schemat 1).



Schemat 1

Część doświadczalna

Materiały. Związki 1–3 (Schemat 1) otrzymano zgodnie z wcześniej opisanymi procedurami [15]. Roztwory podstawowe metali(II) do analizy potencjometrycznej sporządzono z koncentratów MCl_2 Titrisol (Merck). Dokładne stężenia jonu metalu sprawdzono za pomocą miareczkowania kompleksometrycznego etylenodiaminotetraoctanem (EDTA). Wolny od węglanów roztwór wodorotlenku potasu (titrant) sporządzono z KOH a jego miano nastawiono na roztwór wzorcowy wodoroftalanu potasowego. Roztwór HCl zakupiono w firmie Merck w postaci koncentratu Titrisol do sporządzania roztworów podstawowych. Dokładne stężenia roztworów podstawowych koncentratu Titrisol i roztworów podstawowych ligandów wyznaczono metodą Grana [16]. Wszystkie roztwory sporządzono używając wodę podwójnie destylowaną.

Jako źródło jonów metali w badaniach NMR i ESI-MS zastosowano azotany $Zn(II)$, $Mg(II)$ i $Ca(II)$ (Aldrich). Wszystkie odczynniki i rozpuszczalniki używano bez dalszego oczyszczania.

Pomiary NMR

Widma ^{31}P NMR rejestrowano za pomocą spektrometru Bruker DRX przy 121,50 MHz w temp. 300 K wobec 85% H_3PO_4 . Przesunięcia chemiczne w kierunku wyższych wartości podane są jako dodatnie. Próbkę do badań NMR sporządzono w wodzie deuterowanej o stężeniu metalu(II) równym 1×10^{-2} M i stosunku molowym $M(II)$ do liganda 1:1 i 1:2. Pomiary wykonywano wyłącznie na świeżo przygotowanych próbkach. pH mierzono za pomocą radiometru pHM83 z elektrodą Mettler Toledo INLAB 422 i wyniki podano jako odczyty z miernika bez poprawki na pD.

Pomiary potencjometryczne

Miareczkowano potencjometrycznie próbki o objętości 3 cm^3 . Stężenie ligandów wynosiło 2×10^{-3} mol dm^{-3} . Stosunek metalu do liganda był w zakresie od 1:1 do 1:3 i dla każdego badanego układu stosowano trzy lub cztery różne wartości tego stosunku. Próbkę miareczkowano w zakresie pH 2,5–11. Miareczkowanie potencjometryczne wykonywano za pomocą automatycznego systemu Titrando 809 (Metrohm) ze szklaną elektrodą złożoną

Autor do korespondencji:
Prof. dr hab. Barbara KURZAK, e-mail: bkurzak@gmail.com

Metrohm 6.0234.100 napełnioną 3M KCl w wodzie. Pomiaru wykonywano w atmosferze argonu w temp. 298 K przy stałej mocy jonowej ($0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ KCl).

Stałe protonowania liganda i stałe trwałości ($\log\beta_{pq}$) kompleksów metali obliczono za pomocą uniwersalnego programu obliczeniowego SUPERQUAD [17]. Niepewności (wartości 3SD) stałych trwałości podano w Tablicy I w nawiasach. Układ elektrod wzorcowano codziennie na stężenie jonów wodorowych z użyciem roztworu HCl ($0,02 \text{ mol dm}^{-3}$ w KCl) wobec wzorcowego roztworu KOH ($0,15 \text{ mol dm}^{-3}$). Stałą jonizacji wody ($\text{p}K_w$) wyznaczono na $13,74 \pm 0,01$. Wzorcowanie elektrody przeprowadzono w układzie $\text{pH} = -\lg[\text{H}^+]$. W obliczeniach uwzględniono stałe trwałości układów $\text{M}^{2+}\text{-OH}$, których wartości wzięto z literatury [18]. W tekście, w tablicy i na rysunkach pominięto ładunki kompleksów. Należy zauważyć, że ze względu na silną zasadowość grupy NH^+ , wartości $\text{p}K_{(\text{NH}^+)}$ nie można wyznaczyć za pomocą miareczkowania pehametrycznego i dlatego pominięto je w procesie obliczeniowym. W związku z tym w obliczeniach przyjęto, że L^{3-} stanowi w pełni deprotonowaną postać liganda.

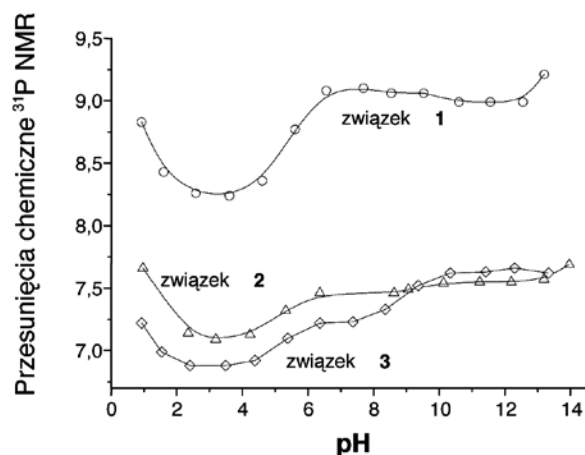
Pomiary ESI-MS

Badania ESI-MS układów M(II)-L ($\text{M} = \text{Mg, Ca}$) przeprowadzono na spektrometrze Bruker MicrOTOF-Q (Bruker Daltonic, Brema, Niemcy) wyposażonym w źródło jonów Apollo II z lejkiem jonowym. Widma uzyskiwano zarówno w trybie jonów dodatnich jak i ujemnych. Doświadczenia wykonano dla roztworów o stosunkach molowych metalu do liganda 1:1 oraz 1:2. Wodne roztwory podstawowe próbek sporządzono w stężeniach odpowiednich dla badań NMR. pH nastawiono w zakresie ok. 4,5–11 dodając odpowiednią ilość KOH lub NaOH (układy Ca(II)). Zwykle pomiary wykonywano na próbkach 50:50 (v/v) MeOH/ H_2O . Jednak zmienność składu analitu do 5% MeOH nie zmieniało kompozycji kompleksu. Próbkę wprowadzono do źródła ESI w tempie $3 \mu\text{l/min}$. Przed każdym pomiarem aparat kalibrowano wzorcem zewnętrznym stosując mieszaninę TunemixTM (Bruker Daltonic, Niemcy) w trybie regresji kwadratowej. Parametry przyrządu były następujące: zakres skanowania m/z 200–2000, potencjał płyty końcowej -500 V , suchy azot (4 l/min), temp. 473 K , napięcie kapilary 4500 V , energia jonów 5 eV . Analizę danych przeprowadzono za pomocą oprogramowania Bruker Daltonics Data Analysis v. 3.4.

Wyniki i ich omówienie

Badane związki **1–3** (Schemat 1) w postaci całkowicie sprotonowanej $[\text{H}_3\text{L}]^+$ zawierają pięć dysocjujących protonów. Pierwszy etap deprotonacji w grupach fosfoniowych (PO_3H_2) zachodzi poza mierzalnym zakresem pH ($\text{pH} \sim 1$). Następny etap deprotonacji odpowiada odszczepieniu protonu od kwaśnej grupy fosfoniowej (PO_3H) przy wartości $\text{p}K_{(\text{PO}_3\text{H})}$ dla tego procesu równej 5,14 w przypadku **1**, 4,88 w przypadku **2** i 4,91 w przypadku **3**. Uwolnienie protonu z bardziej zasadowej grupy (PO_3H^-) daje wartości $\text{p}K_{(\text{PO}_3\text{H}^-)}$ równe 8,18 dla **1**, 8,49 dla **2** i 8,44 dla **3**. Ostatni proton odszczepia się od atomu azotu przy silnie alkalicznym pH. Grupa NH^+ jest silnie zasadowa ($\text{p}K_{(\text{NH}^+)} > 13$), przez co stałej deprotonacji tego procesu nie można wyznaczyć na drodze miareczkowania pehametrycznego. Zatem ogólne zasadowości tych ligandów, określone jako $\lg K_{\text{PO}_3\text{H}^-} + \lg K_{\text{PO}_3\text{H}}$ (Tab. I), są bardzo podobne: odpowiednio 13,32, 13,37 i 13,35. Wysoką zasadowość grupy NH^+ potwierdzają badania NMR, co widać na krzywych miareczkowania ^{31}P NMR względem pH przedstawionych na Rysunku 1, wykazujących małe zmiany w przesunięciu chemicznym ($\Delta\delta \sim 2\text{--}0,5 \text{ ppm}$) w całym badanym zakresie pH.

Przyczyną tego może być wewnątrzcząsteczkowe wiązanie wodorowe $\text{N-H}\dots\text{O}$ (fosfonian) utworzone między protonowanym atomem azotu (NH^+) a atomem tlenu jednej z grup fosfoniowych [19].



Rys. 1. Krzywe miareczkowania ^{31}P NMR związków **1–3**

Tablica I

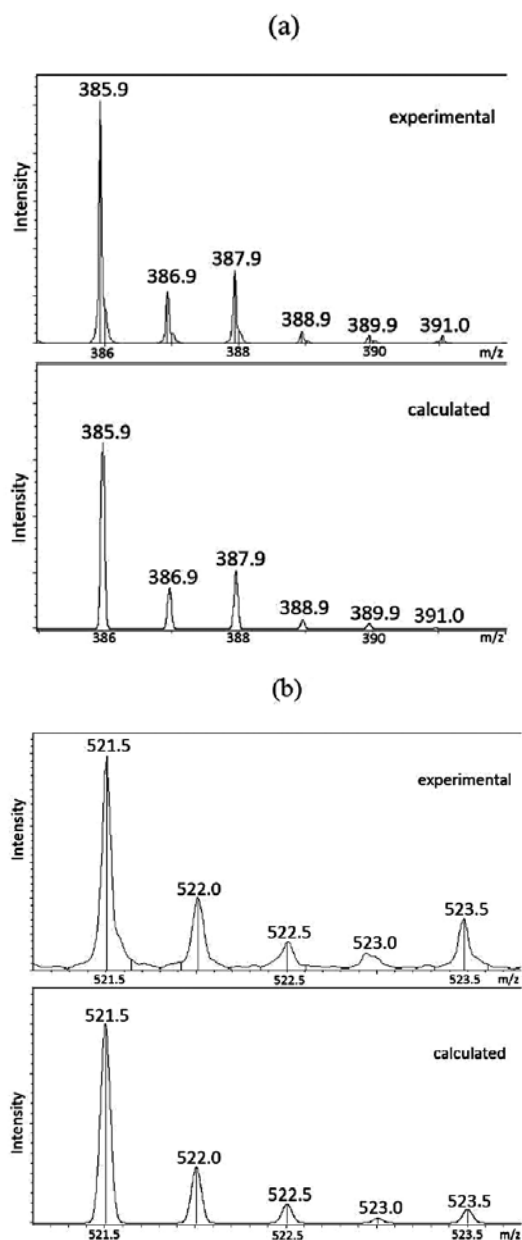
Stałe protonowania ($\lg\beta_n$), sumaryczne stałe tworzenia (wartości $\lg\beta_{pq}$) kompleksów utworzonych w układach $\text{Mg}^{II}/\text{Ca}^{II}\text{-L}$, $T=298 \text{ K}$, $I=0,2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$

Związek	a) p q r	$\lg\beta_n$ związków		
		1	2	3
Ligand (L)		1	2	3
HL	0 1 1	8,18(1)	8,49(2)	8,44(3)
H_2L	0 1 2	13,32(2)	13,37(2)	13,35(4)
$\lg K_{\text{PO}_3\text{H}^-}$		8,18	8,49	8,44
$\lg K_{\text{PO}_3\text{H}}$		5,14	4,88	4,91
Układ $\text{Mg(II)} - \text{L}$				
$[\text{Mg}(\text{H}_2\text{L})]$	1 1 1	11,63(6)	11,19(11)	11,49(4)
$[\text{Mg}(\text{HL})]$	1 1 0	6,29(6)	5,82(6)	5,32(3)
$[\text{Mg}(\text{HL})\text{H}_{-1}]$	1 1 -1	-0,37(8)		
$[\text{Mg}(\text{HL})\text{H}_{-2}]$	1 1 -2		-12,38(12)	-13,28(7)
$[\text{Mg}(\text{HL})_2]$	1 2 0		9,43(13)	
$\text{p}K_{[\text{Mg}(\text{H}_2\text{L})]}$		5,34	5,37	6,17
$\lg K[\text{M}(\text{HL})] - \sum \text{p}K_{\text{PO}_3\text{H}^-}$		-7,03	-7,55	-8,03
Układ $\text{Ca(II)} - \text{L}$				
$[\text{Ca}(\text{H}_2\text{L})]$	1 1 1	11,03(4)	11,49(2)	11,42(8)
$[\text{Ca}(\text{HL})]$	1 1 0	5,05(4)	4,98(4)	4,73(6)
$[\text{Ca}_2(\text{H}_2\text{L})_2(\text{HL})]$	2 3 2		31,28(14)	
$[\text{Ca}(\text{HL})\text{H}_{-1}]$	1 1 -1	-5,17(10)		
$[\text{Ca}(\text{HL})\text{H}_{-2}]$	1 1 -2		-15,06(6)	-13,74(8)
$[\text{Ca}(\text{HL})_2]$	1 2 0	7,80(9)	7,67(5)	7,52(5)
$\text{p}K_{[\text{Ca}(\text{H}_2\text{L})]}$		5,98	6,51	6,69
$\lg K_{[\text{Ca}(\text{HL})_2]}$		2,75	2,69	2,79
$\lg K[\text{M}(\text{HL})] - \sum \text{p}K_{\text{PO}_3\text{H}^-}$		-8,27	-8,39	-8,62

^{a)}Stale obliczone dla równowagi: $\text{pM} + \text{qHL} + \text{rH} = \text{M}_p\text{L}_q\text{H}_{r+q}$

W celu ustalenia stechiometrii kompleksów utworzonych w roztworach Mg(II) i Ca(II) z badanymi ligandami przeprowadzono badania ESI-MS. Tą metodą nie można określić liczby protonów zdolnych do jonizacji w związku. Jednak wyznaczenie masy cząsteczkowej, ładunku i rozkładu izotopowego stanowi skuteczne narzędzie do ustalania stechiometrii kompleksów metali powstających w roztworze. I faktycznie seria adduktów o takim samym stosunku $\text{M(II)}:\text{ligand}$ i zmiennej liczbie kationów alkalicznych zdaje

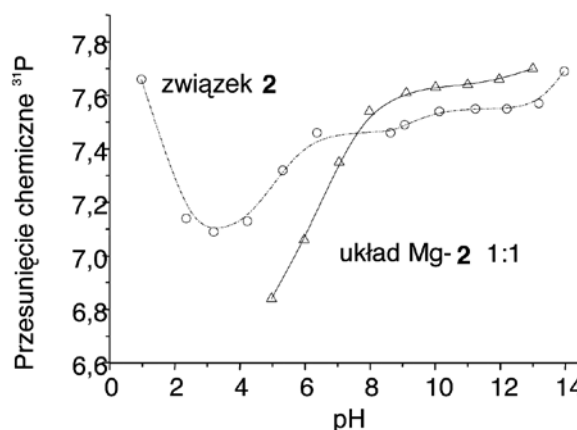
się być dobrym wskaźnikiem rzetelności rozpoznania stechiometrycznego [20 ÷ 23]. We wszystkich badanych układach widma zarejestrowane w trybie jonów dodatnich zawierają przeważnie piki odpowiadające kompleksom jednordzeniowym 1:1 M(II):L. Ponadto w przypadku **2** mniej intensywne piki można przypisać kompleksom o stosunku molowym metalu do liganda 1:2 i 2:3, które występują przeważnie jako addukty z K^+ (Na^+ w układach Ca(II)). Kompleksy te wykrywane są jako jony o podwójnym ładunku na widmach uzyskiwanych zarówno w trybie jonów dodatnich jak i ujemnych. Przykłady doświadczalnych i obliczonych rozkładów izotopowych reprezentatywnego kompleksu Mg(II) o stechiometrii metal-ligand 1:1, powszechnie występującego we wszystkich rozpatrywanych tu układach, oraz kompleksu wielordzeniowego o kompozycji metal-ligand 2:3 występującego w układach M(II) (M=Ca, Mg) z **2** przedstawiono na Rysunku 2.



Rys. 2. Doświadczalne i obliczone rozkłady izotopowe kompleksów $[Mg(HL)K_2]^+$ (a) i $[Ca_3(H_2L)_2Na_3]^{2+}$ (b) z ligandem **2**

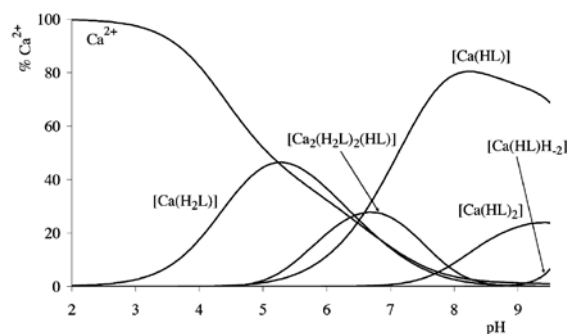
Wziąwszy pod uwagę powyższe, stałe trwałości kompleksów w badanych układach obliczono przy założeniu, że stechiometrie najważniejszych pod względem chemicznym kompleksów są zgodne z ustalonymi metodą ESI-MS. Obliczenia pehametryczne przeprowadzono stosując metodę, w której pomija się odszczepienie protonu od grupy NH^+ i traktuje postać liganda HL^- jak L^{3-} w równowadze

tworzenia $pM + qHL + rH = M_p L_q H_{r+q}$. Jest to dopuszczalne, gdy nie da się rzetelnie wyznaczyć wartości $pK_{(NH^+)}$ [24] i zostało to już wcześniej zastosowane przez Autorów przy szacowaniu stałych trwałości kompleksów Mg(II) i Ca(II) tworzonych przez bisfosfoniany zawierające łańcuchy boczne piperdylowe, morfolinylowe i tiomorfolinylowe [22, 25]. Słuszność takiego założenia potwierdzają krzywe miareczkowania ^{31}P NMR odpowiednich układów M(II)-ligand, które wskazują, że jony Mg(II) i Ca(II) nie są w stanie w całym badanym zakresie pH wyprzeć protonu związanego z azotem (NH^+) (Rys. 3).



Rys. 3. Krzywa miareczkowania ^{31}P NMR reprezentatywnego układu Mg(II)-2 o stosunku molowym 1:1 w funkcji pH w odniesieniu do liganda **2** niezwiązanego z metalem

Zweryfikowane stałe trwałości kompleksów Mg(II) i Ca(II) z **1**, **2** i **3** zestawiono w Tabelcy 1. Schematy rozkładu występowania poszczególnych postaci kompleksów dla układu Ca(II)-2, obliczone z użyciem wartości stałych trwałości z Tabelcy 1, przedstawiono na Rysunku 4.



Rys. 4. Schematy rozkładu występowania poszczególnych postaci kompleksów dla układu Ca(II)-2 w funkcji pH; stosunek molowy 1:2; $c_M = 1 \times 10^{-3} \text{ mol dcm}^{-3}$

Według tych danych, kompleksy jednordzeniowe przeważają w przedziale wartości pH do ok. 10. Kompleks dwurdzeniowy, $[Ca_2(H_2L)_2(HL)]$, tworzy się w układzie Ca(II) tylko z ligandem **2**. Kompleksy hydrokso, $[M(HL)OH]$, tworzone są w roztworach zasadowych układów M(II) z **2** i **3** (Tab. 1). Wykrywane są również kompleksy $[M(HL)_2]$ w układach Ca(II) z **1-3** i w układzie Mg(II) z **2**, nie są to jednak nigdy kompleksy przeważające. Stosunki stałych trwałości kolejnych kompleksów, $\lg(K_{[M(HL)_2]}/K_{[M(HL)_2]})$, wynoszące 2,21 dla układu Mg(II)-2 oraz odpowiednio 2,23, 2,29 i 1,94 dla układów Ca(II) z **1**, **2** i **3**, świadczą o tym, że wiązanie drugiej cząsteczki liganda nie jest preferowane.

Wartości $pK_{[M(H_2L)]}$ dla odszczepienia protonu od $[Mg(H_2L)]$ równe 5,34 dla **1**, 5,37 dla **2** i 6,17 dla **3** oraz od $[Ca(H_2L)]$ równe 5,98 dla **1**, 6,51 dla **2** i 6,69 dla **3**, są znacząco mniejsze od wartości bardziej zasadowych $\lg K_{PO_3H^-}$ dla wolnych ligandów. To wskazuje, że w tych procesach odszczepienie protonu od grup fosfonianowych zachodzi na atomie tlenu. Zatem we wszystkich związkach **1-3** preferowana jest koordynacja metalu poprzez atomy tlenu grup fosfonianowych.

Porównanie skorelowanych z zasadowością wartości stałych trwałości $\log K_{[M(HL)]} - \sum pK_{PO_3H^-}$ kompleksów Mg(II) i Ca(II) pokazuje, że kompleksy Ca(II) są o około jedną jednostkę logarytmiczną mniej trwałe od odpowiadających im kompleksów Mg(II).

Porównanie skorelowanych z zasadowością wartości stałych trwałości Mg(HL) z **1**, **2** i **3** (odpowiednio -7,03, -7,55 i -8,03) uwidacznia, że kompleks [Mg(HL)] **1** (pierścień sześcioczłonowy) jest trwalszy od **2** (pierścień siedmioczłonowy) i **3** (pierścień ośmioczłonowy), Mg(**1**) > Mg(**2**) > Mg(**3**). Taką samą prawidłowość (Ca(**1**) > Ca(**2**) > Ca(**3**)) obserwuje się w przypadku kompleksów [Ca(HL)] (Tab. 1).

Wnioski

Wyniki łączne badań NMR, potencjometrycznych i ESI-MS wykazały, że w tworzeniu kompleksów Mg(II) i Ca(II) ze związkami **1–3** preferowane jest powstawanie kompleksów protonowanych wiązanych poprzez atom tlenu. Badane ligandy wykazują silną tendencję do tworzenia kompleksów równomolowych. Znajduje to odzwierciedlenie w wartościach $\lg(K_{[M(HL)]}/K_{[M(HL)_2]})$, które wskazują, że wiązanie drugiej cząsteczki liganda nie jest preferowane.

Porównanie skorelowanych z zasadowością wartości stałych trwałości kompleksów Mg(II) i Ca(II) typu [M(HL)] pokazuje, że kompleksy [Ca(HL)] są o około jedną jednostkę logarytmiczną mniej trwałe od odpowiadających im kompleksów [Mg(HL)]. W szeregu kompleksów MHL związków **1–3** obserwuje się spadek trwałości (**1** > **2** > **3**) ze wzrostem wielkości pierścienia stanowiącego szkielet bisfosfonianu: 6-członowy (**1**) < 7-członowy (**2**) < 8-członowy (**3**).

Podziękowania

Autorzy pragną podziękować prof. Pawłowi Kafarskiemu za udostępnienie próbek badanych aminobisfosfonianów.

Literatura

- Blomen L.J.M.J., in: O.L.M. Bijvoet, H.A. Fleish, R.E. Canfield, R.G.G. Russel (Eds.), *Bisphosphonates on Bones*, Elsevier, Amsterdam, 1995, s. 111.
- Russell R.G.G., *Bisphosphonates: The first 40 years*. Bone 2011, **49**, 2–19.
- Ebetino F.H., Hogan A.-M. L., Sun S., Tsoumpra M. K., Duan X., Triffitt J. T., Kwasi A. A., Dunford J. E., Barnett B. L., Oppermann U., Lundy M. W., Boyde A., Kashemirov B. A., McKenna Ch. E., R. Russell G. G., *The relationship between the chemistry and biological activity of the bisphosphonates*, Bone 2011, **49**, 20–33
- Russell R.G.G., Croucher P.I., Rogers M.J., *Bisphosphonates: Pharmacology, mechanism of action, and clinical uses*. Osteoporosis Int 2 (Supp 12) (1999) S66–S80.
- Rogers M.J., Frith J.C., Luckman S.P., Cox F.P., Benford H.L., Mönkkönen J., Auriola S., Chilton K.M., Russell R.G.G., *Molecular mechanisms of action of bisphosphonates*. Bone 1999, **24**, 735–795.
- Russell R.G.G., Rogers M.J., *Bisphosphonates: From the laboratory to the clinic and back again*. Bone 1999, **25**, 97–106.
- Van Beek E., Pieterman E., Cohen L., Löwik C., Papapoulos S., *Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit isopentenyl pyrophosphate isomerase farnesyl pyrophosphate synthase activity with relative potencies corresponding to their antiresorptive potencies in vitro and in vivo*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1999, **255**, 491–494.
- Van Beek E., Pieterman E., Cohen L., Löwik C., Papapoulos S., *Farnesyl pyrophosphate synthase is the molecular target of nitrogen-containing bisphosphonates*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1999, **264**, 108–111.
- Keller K.R., Fliesler S.J., *Mechanism of aminobisphosphonate action: Characterization of alendronate inhibition of the isoprenoid pathway*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1999, **266**, 560–563.
- Dunford J.E., Thomson K., Coxon F.P., Luckman S.P., Hahn F.M., Poulter C.D., Ebetino F.H., Rogers M.J., *Structure-activity relationships for inhibition of farnesyl diphosphate synthase in vitro and inhibition of bone resorption in vivo by nitrogen-containing bisphosphonates*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 2001, **296**, 235–242.
- Bergstrom J.D., Bostedor R.G., Masarachia P.J., Reszka A.A., Rodan G., *Alendronate is a specific, nanomolar inhibitor of farnesyl diphosphate synthase*. Arch. Biochem. Biophys. 2000, **373**, 231–241.
- Thompson K., Dunford J.E., Ebetino F., Rogers M.J., *Identification of a bisphosphonate that inhibits isopentenyl diphosphate isomerase and farnesyl diphosphate synthase*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002, **290**, 869–873.
- Van Beek E.R., Löwik C.W.G.M., Papapoulos S.E., *Bisphosphonates suppress bone resorption by a direct effect on early osteoclast precursors without affecting the osteoclastogenic capacity of osteogenic cells: The role of protein geranylgeranylation in the action of nitrogen-containing bisphosphonates on osteoclast precursors*. Bone 2002, **30**, 64–70.
- Martin M.B., Arnold W., Heath III H.T., Urbina J.A., Oldfield E., *Nitrogen-containing bisphosphonates as carbocation transition state analogs for isoprenoid biosynthesis*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1999, **263**, 754–758.
- Sołoducho, J., Gancarz, R., Wieczorek, P., Korf, J., Hafner, J., Lejczak, B., Kafarski, P. Patent PL 172268 B1, 1997.
- Gran, G., *Determination of the equivalent point in potentiometric titrations*. Acta Chem. Scand. 1950, **4**, 559–577.
- Gans, P., Sabatini, A., Vacca, A., *SUPERQUAD: An improved general program for computation of formation constants from potentiometric data*. J. Chem. Soc., Dalton Trans. 1985, 1195–1200.
- Baes, C. F.; Mesmer, R. E., *The Hydrolysis of Cations*. Wiley-Interscience, New York 1976.
- Matczak-Jon E., Videnova-Adrańska V., Burzyńska A., Kafarski P., Lis T., *Solid-state molecular organization and solution behavior of methane-1,1-diphosphonic acid derivatives of heterocyclic amines: The role of the topochemical ring modification and the intramolecular hydrogen bonds in monosubstituted piperid-1-ylmethane-1,1-diphosphonic acids*. Chem. Eur. J. 2005, **11**, 2357–2372.
- Matczak-Jon E., Kowalik-Jankowska T., Ślepokura K., Kafarski P., Rajewska A., *Specificity of the zinc(II), magnesium(II) and calcium(II) complexation by (pyridin-2-yl)aminomethane-1,1-diphosphonic acids and related 1,3-(thiazol-2-yl) and 1,3-(benzothiazol-2-yl) derivatives*. Dalton Trans. 2010, **39**, 1207–1221.
- Di Marco V., Bombi G.G., *Electrospray mass spectrometry (ESI-MS) in the study of metal-ligand solution equilibria*. Mass Spectrom. Rev. 2006, **25**, 347–349.
- Colton R., D'Agostino A., Traeger J. C., *Electrospray mass spectrometry applied inorganic and organometallic chemistry*. Mass Spectrom. Rev. 1995, **14**, 79–106.
- Matczak-Jon E., Kurzak B., Sawka-Dobrowolska W., *NMR, potentiometric and ESI-MS combined studies on the zinc(II) magnesium(II) and calcium(II) complexation by (morpholin-1-yl)methane-1,1-diphosphonic acid and its thio-analog*. Polyhedron, 2012, **31**, 176–187.
- Di Marco V., Kilyen M., Jakusch T., Forgó P., Dombi G., Kiss T., *Complexation properties of ethylenediaminetetramethylenephosphonic acid (EDTMP) with Al-III and VO-O-IV*. Eur. J. Inorg. Chem. 2004, 2524–2532.
- Matczak-Jon E., Kurzak B., Kafarski P., Woźna A., *Coordination abilities of piperid-1-yl-methane-1,1-diphosphonic acids towards zinc(II), magnesium(II) and calcium(II): Potentiometric and NMR studies*. J. Inorg. Biochem. 2006, **100**, 1155–1166.

* Prof. dr hab. Barbara KURZAK jest absolwentką Wydziału Matematyki, Fizyki i Chemii, kierunku chemicznego Uniwersytetu Wrocławskiego (1975). Doktorat (1979) i habilitacja (1993) na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Profesor nauk chemicznych (2005). W latach 1981–2005 pracowała na Uniwersytecie Przyrodniczo-Humanistycznym w Siedlcach. Obecnie pracuje na Wydziale Chemii Uniwersytetu Opolskiego (od 2005), gdzie pełni funkcję kierownika Katedry Chemii Nieorganicznej. Zainteresowania naukowe: właściwości koordynacyjne kwasów hydroksamowych i aminohydroksamowych oraz fosfonowych i aminofosfonowych w roztworach wodnych w układach dwu- i trójskładnikowych.
e-mail: bkurzak@gmail.com

Dr hab. Ewa MATCZAK-JON jest absolwentką Wydziału Matematyki, Fizyki i Chemii, kierunku chemicznego Uniwersytetu Wrocławskiego (1975) gdzie również obroniła pracę doktorską (1979). Od 1980 zatrudniona na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej, początkowo, jako adiunkt (habilitacja 2007) a od 2012 roku na stanowisku profesora nadzwyczajnego. Zainteresowania naukowe: chemia aminofosfonianów i aminobisfosfonianów – badania strukturalne i właściwości koordynacyjne w ciele stałym i w roztworach wodnych, spektroskopia NMR, kokryształy farmaceutyczne.

Mgr Magdalena SZPAK jest absolwentką Wydziału Chemii Uniwersytetu Opolskiego (2008). Po studiach podjęła pracę na tej uczelni na stanowisku technicznym. Obecnie jest pracownikiem Katedry Chemii Nieorganicznej.