

WIADOMOŚCI *chemiczne*

A 1263 II

DI. 3

2002

(56)

5-6

(659-660)



CZASOPISMO POLSKIEGO TOWARZYSTWA CHEMICZNEGO

Publikacja dotowana przez KBN

RADA REDAKCYJNA

RYSZARD ADAMIAK, JERZY BŁAŻEJOWSKI, RYSZARD BODALSKI,
JACEK GAWROŃSKI, ZBIGNIEW HUBICKI, JERZY KONARSKI,
TADEUSZ M. KRYGOWSKI, JANUSZ LIPKOWSKI, JACEK MŁOCHOWSKI,
PIOTR PANETH, STANISŁAW SŁOMKOWSKI, ZOFIA STASICKA

Z REDAKCJĄ STALE WSPÓŁPRACUJĄ

HENRYK GALINA (Rzeszów), MAREK K. KALINOWSKI (Warszawa),
BENIAMIN LENARCIK (Bydgoszcz), ZOFIA LIBUŚ (Gdańsk), JAN MAŁYSZKO (Kielce),
BOGDAN MARCINIEC (Poznań), ZOFIA MICHALSKA (Łódź),
ROMAN MIERZECKI (Warszawa), WŁADYSŁAW RUDZIŃSKI (Lublin),
ZOFIA STASICKA (Kraków), JAN SZYMANOWSKI (Poznań), JÓZEF ŚLIWIOK (Katowice)

KOMITET REDAKCYJNY

BOGDAN BURCZYK, JERZY P. HAWRANEK, ADAM JEZERSKI, ADOLF KISZA,
LUDWIK KOMOROWSKI, ZDZISŁAW LATAJKA, PRZEMYSŁAW MASTALERZ,
IGNACY Z. SIEMION, MIROSLAW SOROKA, MARIA SUSZYŃSKA

REDAKTOR NACZELNY

JÓZEF J. ZIÓLKOWSKI

SEKRETARZ REDAKCJI

KRYSTYNA MARKSOWA

Korespondencję należy kierować pod adresem:

Redakcja „Wiadomości Chemicznych”
ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław
tel. 375 73 89, tel./fax 322 14 06

INTERNET (English abstracts) <http://www.chem.uni.wroc.pl/wiadchem.htm>

© Copyright by Redakcja „Wiadomości Chemicznych”, Wrocław 2002

REDAKTOR WYDAWNICTWA
AGNIESZKA FLASIŃSKA

ISSN 0043-5104

Maszynopis niniejszego numeru przekazano Wydawcy w kwietniu 2002

Opracowanie edytorskie i typograficzne: Wydawnictwo Uniwersytetu Wrocławskiego Sp. z o.o.

Druk i oprawa: Drukarnia Uniwersytetu Wrocławskiego



**DeNO_x NA SITACH MOLEKULARNYCH
ZAWIERAJĄCYCH MIEDŹ**

**CZ. III. SELEKTYWNA KATALITYCZNA REDUKCJA
NO (SKR NO) WĘGLOWODORAMI.
WPLYW O₂, H₂O I SO₂***

**DeNO_x ON COPPER-CONTAINING
MOLECULAR SIEVES**

**PART III. SELECTIVE CATALYTIC REDUCTION OF NO.
EFFECT OF O₂, H₂O I SO₂**

Izabela Sobczak, Maria Ziółek

*Uniwersytet im. A. Mickiewicza, Wydział Chemii,
ul. Grunwaldzka 6, 60-780 Poznań*

Abstract

Spis akronimów

1. Selektywna katalityczna redukcja NO (SKR NO) węglowodorami
2. Wpływ O₂, H₂O i SO₂ na aktywność katalizatorów w procesach usuwania NO
 - 2.1. Wpływ tlenu
 - 2.2. Wpływ wody
 - 2.3. Wpływ SO₂

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

* *DeNO_x na sitach molekularnych zawierających miedź. Cz. I. Fizykochemiczna charakterystyka katalizatorów, Wiad. Chem., 2002, 56, (1-2), 83.*

DeNO_x na sitach molekularnych zawierających miedź. Cz. II. Katalityczny rozkład NO, Wiad. Chem., 2002, 56, (3-4), 177.



Izabela Sobczak jest doktorem i wykładowcą w Zakładzie Katalizy Heterogenicznej na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Stopień magistra uzyskała w 1997 r., a stopień doktora w 2001 r. na Wydziale Chemii UAM.

Jej tematyka badawcza koncentruje się wokół sit molekularnych modyfikowanych miedzią (zeolity i mezoporowate materiały MCM-41), charakterystyki ich właściwości fizykochemicznych oraz katalitycznego zastosowania w procesach DeNO_x .

Jest współautorką 12 publikacji w czasopismach o zasięgu międzynarodowym i 24 prezentacji na konferencjach krajowych i zagranicznych.



Maria Ziólek jest profesorem i kierownikiem Zakładu Katalizy Heterogenicznej na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Stopień magistra uzyskała w 1971 r., doktora – 1976, dr hab. – w 1985, prof. UAM – 1991, a tytuł profesora – 1996 na Wydziale Chemii UAM.

Jej zainteresowania naukowe obejmują zagadnienia katalizy heterogenicznej na zeolitach, tlenkach metali i mezoporowatych sitach molekularnych, syntezę katalizatorów, ich modyfikację, charakterystykę i zastosowanie (m.in. w ochronie środowiska i procesach utleniania).

Współpracuje z takimi ośrodkami zagranicznymi, jak: Fritz Haber Institut der Max Planck Gesellschaft, Berlin, Niemcy; URA CNRS 0414 – ISMRA, Caen, Francja; RHODIA, Francja.

Jest autorką i współautorką 91 publikacji w czasopismach o zasięgu międzynarodowym, 5 patentów i zgłoszeń patentowych oraz 144 prezentacji na konferencjach krajowych i zagranicznych.

ABSTRACT

Part I of this series exhibited the physico-chemical properties of Cu-containing molecular sieves, whereas, Part II was devoted to the DeNO_x carried out *via* the decomposition of NO.

Cu-containing molecular sieves are applied not only in the decomposition of NO but also in the selective catalytic reduction of NO with hydrocarbons (HC-SCR). The latter is the subject of this paper. The selective reduction of NO with hydrocarbons is a new alternative for the removal of NO from the exhausts gases. It is addressed, among others, to the reduction of NO in the presence of a large amount of oxygen.

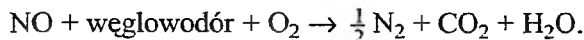
Part III considers also the influence of O₂, H₂O and SO₂ on the activity of Cu-catalysts in both NO reduction with hydrocarbons and NO decomposition.

SPIS AKRONIMÓW

AIMCM-41	Mezoporowate glinokrzemianowe sito molekularne należące do M41S – struktura heksagonalna
Cu-NbZSM-5	Niobokrzemianowa forma zeolitu ZSM-5 jonowo wymienionego miedzią
Cu-ZSM-5	Glinokrzemianowa forma zeolitu ZSM-5 jonowo wymienionego miedzią
DeNO _x	Usuwanie tlenków azotu
DFT	Teoria funkcjonału gęstości
ELO	<i>Extra Lattice Oxygen</i> – tlen sieciowy w pozycji pozaszkieletowej zeolitu
EPR	Spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego
FTIR	Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera
IR	Spektroskopia w podczerwieni
MCM-41	Mezoporowate krzemianowe sito molekularne należące do M41S – struktura heksagonalna
NbMCM-41	Mezoporowate niobokrzemianowe sito molekularne należące do M41S – struktura heksagonalna
NMR	Spektroskopia jądrowego rezonansu magnetycznego
PILC	Gliny warstwowe (<i>Pillared clays</i>)
SEM	Skaningowa mikroskopia elektronowa
SKR	Selektywna katalityczna redukcja
SKR-WW	Selektywna katalityczna redukcja węglowodorami
STEM	Skaningowa mikroskopia transmisyjna elektronowa
TPD	Termoprogramowana desorpcja
TPR	Termoprogramowana redukcja
XPS	Spektroskopia fotoelektronów wybijanych promieniowaniem rentgenowskim
XRD	Dyfrakcja promieniowania rentgenowskiego
ZSM-5	<i>Zeolite Socony Mobil</i> – typ zeolitu – ma średnie kanały otoczone 10-członowymi pierścieniami tlenowymi, należy do MFI

1. SELEKTYWNA KATALITYCZNA REDUKCJA NO (SKR NO) WĘGLOWODORAMI

Selektywna katalityczna redukcja NO węglowodorami przebiega w obecności nadmiaru tlenu wg schematu [1]:



W ostatniej dekadzie przebadano wiele katalizatorów, które okazały się aktywne w tym procesie. Była to cała gama zeolitów modyfikowanych różnymi metalami, np.: Cu [2–8], Co [9–14], Fe [15–18], Pt [19–24], Pd [25], Ga [26, 27], a także tlenki metali: La₂O₃, CeO₂, Sm₂O₃, Tm₂O₃ lub CaO [28–30], metale naniesione na tlenki metali [31–34]. Spośród tych katalizatorów najdokładniej przebadano zeolity Cu-ZSM-5, wykazujące niemal 100% konwersję NO w temperaturze ~673 K z wysoką selektywnością do N₂.

Możliwość wykorzystania zeolitu Cu-ZSM-5 w procesie selektywnej redukcji NO w obecności tlenu, przy użyciu takich węglowodorów, jak: C₂H₄, C₃H₆ i C₃H₈, jako pierwsi, niezależnie od siebie, przedstawili Iwamoto [35] oraz Held i wsp. [36]. Stwierdzili, że obecność tlenu podwyższa konwersję NO, która osiąga maksimum w określonej temperaturze, a następnie spada. Temperatura, w której redukcja osiąga maksimum, zależy od rodzaju węglowodoru i wynosi, odpowiednio, 523, 598 i 573 K w przypadku zastosowania C₂H₄, C₃H₈ i C₄H₈. CH₄ i C₂H₆ okazały się reduktorami nieselektywnymi, tzn. łatwo reagującymi z tlenem.

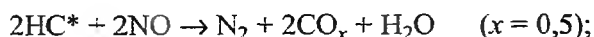
Iwamoto i wsp. [37, 38] zbadali wpływ temperatury reakcji, stężenia tlenu i węglowodorów w mieszaninie gazów oraz stopnia wymiany miedzi w zeolicie Cu-ZSM-5 na aktywność w SKR-WW. Badania wykazały, że bez udziału węglowodorów i tlenu konwersja tlenku azotu (1000 ppm) wynosi 25% w 673 K, a reakcja jest całkowicie hamowana w obecności 1% obj. tlenu. Dopiero wprowadzenie propenu (166 ppm) powoduje 100% redukcję NO w 873 K. Wzrost stężenia propenu (1000 ppm) sprzyja przesunięciu maksimum aktywności do niższej temperatury (573 K). Dodatek ok. 1–2% tlenu zwiększa aktywność katalizatora Cu-ZSM-5 (przy większych stężeniach tlenu aktywność spada), podczas gdy zależność konwersji NO od stężenia propenu w danej temperaturze jest liniowa.

Inną interesującą obserwacją był fakt, iż aktywność katalizatora Cu-ZSM-5 zwiększa się ze wzrostem zawartości miedzi, osiągając maksimum, w przeciwieństwie do reakcji rozkładu NO, w zakresie 80–100% wymiany jonowej. Potwierdziły to badania Torre-Abreu i wsp. [39] oparte na analizie próbek katalizatora technikami H₂-TPR i TPD-NO. Wykazały one, że w zeolicie Cu-ZSM-5 o stosunku Cu/Al < 0,5 dominują jony Cu²⁺, co sugeruje, że jony te są centrami aktywnymi w SKR NO propenem. Z kolei spadek aktywności katalizatora ze wzrostem stosunku Si/Al, a co z tym związane ze spadkiem stężenia centrów kwasowych Brønsteda, dowodzi ważności również tych ostatnich jako centrów aktywnych zdolnych do adsorpcji NO. O tym, że obecność zarówno jonów Cu²⁺,

jak i centrów kwasowych Brønsteda w próbce jest istotna dla uzyskania wysokiej konwersji NO świadczy też fakt, że tylko zeolity jonowo wymienione miedzią z roztworu wodnego soli cechują się znaczną aktywnością w SKR-WW. Aktywność spada w następującym porządku: Cu-ZSM-5 (wymiana jonowa w roztworze) > Cu-ZSM-5 (wymiana w ciele stałym) > Cu-ZSM-5 (mieszanina fizyczna Cu/NaZSM-5 + HZSM-5) > Cu/ZSM-5 (impregnacja) [5].

Mechanizm redukcji NO przy użyciu węglowodorów (SKR-WW) zależy od rodzaju katalizatora, reduktora i warunków reakcji, ale zawsze składa się z kilku etapów. Generalnie rozróżnia się trzy możliwe ścieżki reakcji [40, 41]:

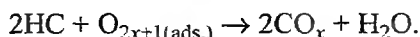
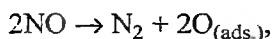
1. Częściowe utlenienie węglowodorów i następnie reakcja z NO



2. Utlenienie NO do NO₂, który jako silny czynnik utleniający reaguje z węglowodorami



3. Rozkład NO i regeneracja miejsc aktywnych przez węglowodory



Charakterystyczne cechy procesu SKR-WW są następujące:

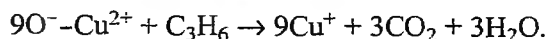
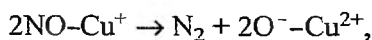
1. Redukcja NO do N₂ i utlenianie HC do CO_x rozpoczynają się w zbliżonej temperaturze (~ 453–473 K).

2. Maksimum redukcji NO jest osiągane w temperaturze 673 K, a powyżej tej temperatury redukcja spada, ponieważ zaczyna dominować utlenianie węglowodorów przez tlen.

3. Wyższa szybkość objętościowa, użycie mniej reaktywnych węglowodorów i obecność związków hamujących reakcję, np. wody, prowadzi do przesunięcia maksimum redukcji do wyższych temperatur.

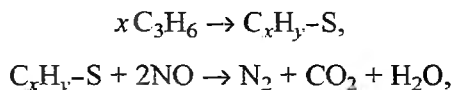
Mechanizm SKR-HC na Cu-ZSM-5 nie jest jeszcze do końca zrozumiały. Proponowane są różne formy wiązania substratów i produktów przejściowych z powierzchnią katalizatora. Podsumowania różnych propozycji mechanizmu reakcji dokonali Fritz i Pitchon [42]:

1. Rozkład NO jako główny etap procesu, tzn. NO adsorbuje się na jonach Cu⁺, a następnie rozkłada do N₂ i tlenu skoordynowanego z Cu²⁺. Węglowódor występuje jako czynnik regenerujący centra aktywne.



Zdaniem Burcha i Millingtona [43] tlen zabezpiecza redukcję miedzi do Cu⁰. Z kolei Cho sugeruje [44], że węglowodory adsorbują się na zeolicie w niskich temperaturach, co uniemożliwia adsorpcję i redukcję NO, dlatego katalizator Cu-ZSM-5 jest aktywny tylko wówczas, kiedy zarówno węglowodory, jak i NO oraz tlen mają dostęp do miejsc aktywnych. Poza tym, kiedy spalanie węglowodorów jest całkowite, nie następuje odnowa centrów aktywnych i konwersja NO spada.

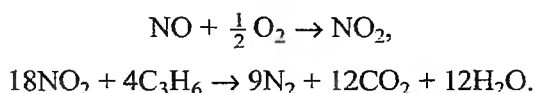
2. Tworzenie depozytu węglowego na powierzchni katalizatora, który wykazuje zdolność do redukcji NO [45]:



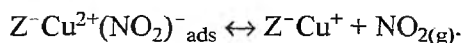
gdzie S oznacza powierzchnię katalizatora.

Rola tlenu polega na zwiększeniu stężenia zaadsorbowanych form NO na powierzchni katalizatora, co przyczynia się do zwiększenia stopnia przereagowania NO.

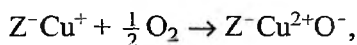
3. Utlenianie NO do NO₂, który jako bardziej aktywny od NO reaguje bezpośrednio z węglowodorami:



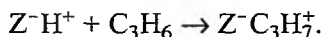
Dokładny mechanizm tego typu, składający się z 10 etapów, zaproponował Shelef [46]. Zgodnie z wynikami badań XPS zeolitu Cu-ZSM-5 w obecności O₂, NO i C₃H₆ [47], wskazującymi, że jony Cu²⁺ w próbce skoordynowane są z pozaszkieletowym tlenem (sygnał 937 eV wrażliwy na działanie tlenu), autor proponuje udział Cu²⁺O⁻ wraz z centrami kwasowymi Brønsteda w roli centrów aktywnych reakcji. Mechanizm rozpoczyna się tworzeniem zaadsorbowanych form azotanowych:



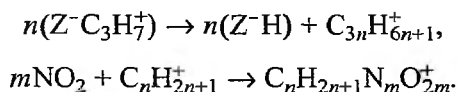
W dalszym etapie tlen regeneruje centra aktywne Cu²⁺O⁻:



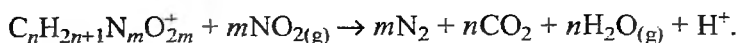
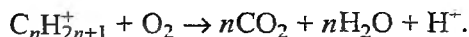
a propen aktywowany jest na centrach kwasowych Brønsteda:



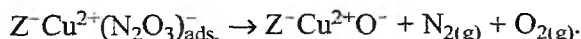
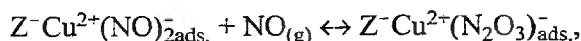
Utworzone kationy organiczne ulegają oligomeryzacji, a następnie reagują z NO₂:



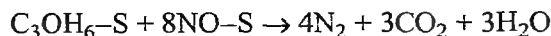
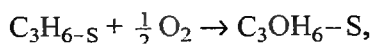
Formy oligomeryczne reagują dalej z gazowym tlenem i gazowym NO₂:



Utworzone wcześniej formy azotanowe mogą także reagować z NO w fazie gazowej, a produkt rozkłada się do N₂ i O₂:



4. Częściowe utlenianie zaadsorbowanych węglowodorów do alkoholi, aldehydów lub ketonów, które cechują się wyższą zdolnością do redukcji NO niż węglowodory:



(S – powierzchnia katalizatora).

Nowa rodzina mezoporowatych sit molekularnych MCM-41 również stała się obiektem zainteresowań badaczy w odniesieniu do jej zastosowania w procesie usuwania NO. Valange i wsp. [48] podjęli się porównania aktywności katalizatorów typu Cu,Zn-ZSM-5 i Cu,Zn-MCM-41, zawierających zmieszane fazy tlenkowe miedzi i cynku, w procesie SKR NO propenem. Niestety, aktywność materiału mezoporowatego była znacznie niższa w całym przedziale badanych temperatur (473–773 K). Konwersja NO wyniosła 17% w 673 K, w porównaniu z 40% w 723 K na Cu,Zn-ZSM-5 (800 ppm NO, 800 ppm C₃H₆, 4% obj. O₂, przepływ 15 l/h). To sugeruje, że otwarta struktura sita MCM-41 trudniej generuje aktywne jony miedzi niż bardziej ograniczona objętość porów zeolitu ZSM-5. Innym powodem niższej aktywności sit MCM-41 może też być prawdopodobnie wbudowanie jonów Cu²⁺ w krzemianowe ściany materiału z utworzeniem mniej aktywnej fazy krzemianu miedzi. Wyższą aktywność sit typu MCM-41 w tym samym procesie uzyskali autorzy pracy [49] w przypadku katalizatora Cu-AlMCM-41, przygotowanego przez mechaniczne zmieszanie CuCl z AlMCM-41 i kalcynację – 40% konwersji NO w 873 K (0,16% NO, 0,14% C₃H₆, 2% obj. O₂, przepływ 6 l/h). Z kolei aktywność katalizatora Cu-SiMCM-41 była znikoma (8% konwersji NO w 873 K). Uzyskane wyniki sugerują, że matryca glinokrzemianowa jest lepszym nośnikiem dla aktywnej fazy miedzi w tej reakcji, a jony miedzi Cu²⁺ i Cu⁺ skoordynowane z tlenem z tetraedru glinowotlenowego są głównymi centrami aktywnymi w SKR NO na Cu-AlMCM-41.

SKR NO węglowodorami jest metodą bardzo obiecującą, ale wymaga wciąż dalszych badań, zanim zostanie zastosowana w praktyce. Poważnym problemem jest rozwiązanie negatywnego wpływu wody i SO₂ na aktywność katalizatorów zeolitowych (rozdz. 2).

Drugim celem prowadzonych obecnie badań jest ciągle polepszanie aktywności i trwałości katalizatorów. Obiecującą drogą, biorąc pod uwagę fakt, że mechanizm SKR-WW jest wieloetapowy, jest skierowanie uwagi badaczy na katalizatory bifunkcyjne, czyli zawierające dwa składniki aktywne, pełniące różne funkcje katalityczne [40]. Wpływ kokationu na aktywność zeolitu Cu-ZSM-5 w SKR NO etenem badali Teraoka i wsp. [50]. Stwierdzili, że obecność Ca, Sr, Fe, Co lub Ni podwyższa aktywność oraz poszerza okno temperaturowe, w którym katalizator uzyskiwał wysoką aktywność, nie wywiera jednak wpływu na temperaturę najwyższej redukcji NO (673 K dla wszystkich katalizatorów). Największy wzrost aktywności zaobserwowano dla CaCu-ZSM-5. Autorzy sugerują, że obecność drugiego kationu tłumy spalanie etenu przez zmianę lokalizacji, formy i/lub stanu elektronowego miedzi.

2. WPLYW O₂, H₂O i SO₂ NA AKTYWNOŚĆ KATALIZATORÓW W PROCESACH USUWANIA NO

Znaczne ilości tlenu, pary wodnej oraz niewielkie ilości związków siarki (przede wszystkim dwutlenku siarki) towarzyszą emisji tlenków azotu, których głównym źródłem jest spalanie różnego rodzaju paliw kopalnych. Bardzo ważne jest zatem, aby obecność tych związków w mieszaninach gazowych nie wpływała ujemnie na skuteczność pracy katalizatora usuwania NO. Problem wpływu tlenu, wody i związków siarki na aktywność katalizatora Cu-ZSM-5, najskuteczniejszego spośród katalizatorów zeolitowych w procesie rozkładu NO i SKR NO, stał się przedmiotem licznych badań.

2.1. WPLYW TLENU

W przypadku SKR, zarówno za pomocą amoniaku, jak i węglowodorów, tlen jest konieczny do uzyskania wysokiej konwersji NO, ponieważ promuje utlenianie NO do NO₂ lub przyczynia się do regeneracji miejsc aktywnych katalizatora Cu-ZSM-5 [42, 51]. Bardzo ważne jest jednak stężenie tlenu. Stwierdzono, że przy braku tlenu w mieszaninie gazów katalizator nie wykazuje aktywności w procesie SKR, ale już dodatek tlenu w ilości ok. 1% obj. prowadzi do natychmiastowego wzrostu konwersji NO do ok. 90% (773 K, 500 ppmv NO, 900 ppmv C₃H₆, SV ~10000 h⁻¹) [38]. Konwersja NO pozostaje stabilna do ok. 1,5% obj. tlenu, natomiast dalszy wzrost zawartości O₂ prowadzi do stopniowego spadku aktywności katalizatora [38, 52].

Odmiennej wpływ obecności tlenu obserwuje się w przypadku katalitycznego rozkładu NO. Jak wykazało wielu autorów [53–55] dodanie tlenu do mieszaniny reakcyjnej zmniejsza aktywność katalizatora Cu-ZSM-5. Spadek konwersji NO zależy od ilości wprowadzonego tlenu, a także temperatury reakcji, czasu kontaktu i zawartości miedzi w próbce. Li i Hall [55] zaobserwowali spadek kon-

wersji NO ze wzrostem stężenia O_2 , przy czym dla najaktywniejszego spośród badanych przez nich katalizatorów, Cu-ZSM-5-12-140, stwierdzili spadek prze-reagowania NO w 773 K z 97 do 80%, przy 10% obj. tlenu. Konwersja NO powracała do wcześniejszego poziomu po 30 minutach od usunięcia tlenu z układu. Z kolei Pirone i wsp. [54] wykazali, że podobnie jak w przypadku reakcji bez udziału tlenu, aktywność wzrasta ze wzrostem czasu kontaktu W/F, temperatury i zawartości miedzi w próbce. Katalizator osiągał maksymalną konwersję NO w wyższej temperaturze niż w nieobecności tlenu. Dodatkowo zaobserwowano [53], że dla nadmiarowo wymienionych zeolitów negatywny wpływ tlenu jest znacznie mniejszy niż dla próbek o stosunku Cu/Al < 0,5. Z tego wynika, że nadmiar miedzi w Cu-ZSM-5 przyczynia się nie tylko do wzrostu katalitycznej aktywności materiału, ale także do zwiększenia odporności na negatywne działanie tlenu.

Obserwuje się wyraźny wzrost konwersji NO do NO_2 [54, 55] ze wzrostem zawartości tlenu. Pirone i wsp. [54] zaobserwowali, że dodanie 1% O_2 powoduje zmniejszenie selektywności do N_2 z 91 do 25%, przy czym zwiększenie czasu kontaktu W/F hamuje nieco ten proces. Zdaniem Li i Halla [55] utlenianie NO do NO_2 ma miejsce w zimnej części układu reakcyjnego, bez udziału katalizatora. Autorzy potwierdzili to, przepuszczając mieszaninę NO + O_2 (4% NO w He i 4% O_2 w He) przez pusty reaktor w temperaturze pokojowej. Natomiast Pirone i wsp. [54] wykluczają taką możliwość. W przeprowadzonym przez nich podobnym eksperymencie (mieszanina 0,5% NO, 1% O_2 , He) konwersja NO do NO_2 nie przekraczała 4% w przedziale temperatur od pokojowej do 790 K. Stąd też ich zdaniem niekatalityczne utlenianie NO do NO_2 jest nieznaczne. Tym bardziej, że badania metodą spektroskopii w podczerwieni wyraźnie wskazują na zdolność katalizatora Cu-ZSM-5 do utleniania NO do NO_2 [9, 56–59].

Przyczynę spadku aktywności katalizatora Cu-ZSM-5 w rozkładzie NO w obecności tlenu próbowano wyjaśnić za pomocą techniki TPD NO i O_2 oraz obliczeń teoretycznych [9, 61–62]. Gervasini [62] przeprowadził procesy wysycania katalizatora Cu-ZSM-5 tlenkiem azotu, a następnie tlenem, i odwrotnie, w temperaturach 298–623 K w celu wyjaśnienia, czy NO i O_2 adsorbują się na tych samych centrach aktywnych. Pomiary TPD po procesach wysycania wykazały, że adsorpcja NO i O_2 następuje na tych samych centrach aktywnych (stąd hamowanie adsorpcji NO przez tlen) oraz że konkurencja w zajmowaniu centrów adsorpcji przez NO i O_2 zależy od temperatury. W 298 K NO usuwa zaadsorbowany tlen, co przejawia się odnowieniem kształtu krzywej TPD odpowiadającej świeżej próbce Cu-ZSM-5 po wysyceniu NO, podczas gdy w temperaturze 623 K nie następuje całkowite usunięcie O_2 przez NO. To sugeruje, że cząsteczka NO nie jest zdolna efektywnie konkurować z zaadsorbowanym tlenem w tej temperaturze. Przyczyną spadku aktywności katalizatora w rozkładzie NO w 623 K jest więc silniejsza adsorpcja tlenu niż NO na centrach aktywnych. Ponadto stwierdzono, że w 623 K tlen usuwa zaadsorbowane formy NO typu $Cu^{2+}(NO)(NO_2^-)$, uważane za aktywne związki pośrednie w reakcji rozkładu NO

[9, 56, 57, 62, 63]. Obliczenia teoretyczne przy użyciu metody DFT [61] potwierdzają, że energia adsorpcji O₂ na Cu⁺ jest wyższa niż energia adsorpcji NO (773 K). Ponadto sugerują, że mniejszy negatywny wpływ tlenu obserwowany w nadmiarowo wymienionych zeolitach Cu-ZSM-5 związany jest z obecnością w tych katalizatorach form [Cu-O-Cu]²⁺, gdyż najprawdopodobniej wyższa energia adsorpcji O₂ na Cu⁺ niż na [Cu-O-Cu]²⁺ jest przyczyną dezaktywacji katalizatora zawierającego izolowane jony miedzi. Zwiększeniu odporności katalizatora Cu-ZSM-5 na działanie tlenu sprzyja wzrost temperatury reakcji. Powyżej 673 K, szczególnie dla zeolitów o wysokim poziomie wymiany miedzi (Cu/Al > 0,5), szybkość desorpcji tlenu znacznie wzrasta (od 3,7×10⁵ w 673 K do 15×10⁵ O/Cu w 823 K dla Cu-ZSM-5-26-166), dzięki czemu nie następuje zatrucie centrów aktywnych [64].

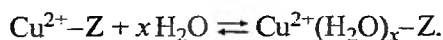
2.2. WPŁYW WODY

Spadek konwersji NO w reakcji rozkładu tego tlenku w obecności wody zależy od stopnia wymiany miedzi w zeolicie oraz od zawartości wody w mieszaninie reakcyjnej [65]. Dezaktywacja katalizatora jest tym większa, im większe jest stężenie dodanej wody (ok. 60% dezaktywacji dla 2% obj. wody i 90% dla 20% obj. wody na katalizatorze z 142% wymiany na Cu, w reakcji prowadzonej w 773 K). Iwamoto i wsp. [53] oraz Hall i wsp. [55] zaobserwowali, że efekt działania wody jest całkowicie odwracalny, ale wymagany czas regeneracji jest dłuższy niż w przypadku zatrucia tlenem. Z kolei Zhang i Flytzani-Stephanopoulos [65] wskazali jedynie na możliwość częściowego odnowienia aktywności katalizatora po usunięciu wody i tylko dla zeolitów nadmiarowo wymienionych miedzią.

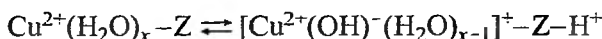
Podobny wpływ wody na aktywność Cu-ZSM-5 stwierdzono w przypadku SKR NO węglowodorami [3, 15]. Nadmiarowo wymienione zeolity wykazywały spadek konwersji NO o ok. 2/3 przy 10% obj. wody [3]. Wzrost zawartości pary wodnej do 20% obj. powodował niemal całkowity spadek aktywności katalizatora [15], przy czym usunięcie H₂O z układu prowadziło do przywrócenia początkowej aktywności zeolitu. Autorzy pracy [66] porównali hydrotermalną odporność katalizatora Cu-ZSM-5 i Cu-Ti-PILC (*Pillared clays*) w procesie SKR NO przy użyciu etenu. Oba typy katalizatorów cechował spadek konwersji NO w obecności wody, jednakże stopień dezaktywacji w przypadku materiału typu PILC był dużo mniejszy (odpowiednio o ok. 20 i 5%).

W celu wyjaśnienia negatywnego wpływu wody na aktywność katalizatora Cu-ZSM-5 dokonano charakterystyki próbek po procesach rozkładu NO i SKR NO z udziałem pary wodnej [3, 4, 65]. W pierwszym przypadku (po rozkładzie NO) badania STEM i XRD zeolitu Cu-ZSM-5-20-141 wskazały na agregację jonów miedzi z utworzeniem fazy CuO (refleks XRD – 2θ = 38,8°) o rozmiarach ok. 20 nm oraz spadek krystaliczności materiału pod wpływem działania wody. Jednakże analiza XPS nie wykazała zgromadzenia form tlenkowych miedzi na

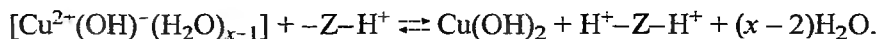
powierzchni materiału, z czego wynika, że tworzenie CuO musi zachodzić wewnątrz kanałów zeolitu. Duży rozmiar cząsteczek CuO przyczynia się do blokowania porów, a także do zniszczenia struktury wokół tych cząsteczek. Poza tym zdjęcia STEM wykazały obecność agregatów glinu pozaszkieletowego, co sugeruje częściową dealuminację zeolitu pod wpływem H₂O. Powyższe informacje pozwalają wnioskować, że główną przyczyną spadku aktywności katalizatora Cu-ZSM-5 w reakcji rozkładu NO pod wpływem działania pary wodnej jest tworzenie nieaktywnych form tlenku miedzi CuO oraz proces dealuminacji. Zhang i Flytzani-Stephanopoulos [65] zaproponowali mechanizm dezaktywacji zeolitu w podwyższonej temperaturze. Według nich w wyniku działania pary wodnej następuje tworzenie uwodnionych i zhydrolizowanych kompleksów miedzi, które mają zdolność migracji w kanałach ZSM-5:



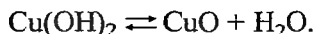
Jednocześnie zachodzi protonacja zeolitu w wyniku dysocjacji H₂O pod wpływem pola elektrostatycznego kationów Cu²⁺ wg reakcji:



oraz utworzenie Cu(OH)₂:

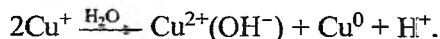


Tlenek miedzi, nieaktywny w rozkładzie NO, tworzony jest w wyniku rozkładu Cu(OH)₂:



Protonacja zeolitu powoduje, że jest on mniej stabilny niż pierwotna forma miedziowa i przez to bardziej skłonny do dealuminacji działaniem pary wodnej. Częściowy wzrost aktywności katalizatora Cu-ZSM-5 po usunięciu H₂O wskazuje, że niektóre z zachodzących procesów są odwracalne, co umożliwia odbudowanie aktywnych form miedzi (najprawdopodobniej procesy hydratacji).

Autorzy pracy [67] wyjaśnili zatrucie wodą mordenitu, wymienionego miedzią w reakcji rozkładu NO, tworzeniem klasterów miedzi. Klaster te, lokalizując się w porach zeolitu, powodują ich blokadę oraz powstawanie miedzi metalicznej pod wpływem wody:



Dokładna charakterystyka materiałów Cu-ZSM-5 po procesie SKR węglodorami w obecności wody pozwoliła autorom prac [3, 4] określić możliwe przyczyny dezaktywacji katalizatora działaniem H₂O. Dyfraktogramy XRD nie wykazały tworzenia fazy CuO ani też spadku krystaliczności materiału. Jednakże z krzywych H₂-TPR wyraźnie wynikało, że pod działaniem pary wodnej tworzą się pewne nowe formy miedzi, których nie obserwowano w świeżej próbce

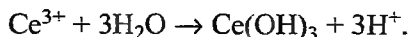
(szerokie maksima ok. 523 K i 723 K). Przez porównanie krzywych TPR katalizatora zdezaktywowanego pod wpływem H₂O i krzywych CuAl₂O₄/Al₂O₃ oraz zeolitu H-ZSM-5 poddanego procesowi dealuminacji parą wodną przed wymianą na miedź, maksimum powyżej 673 K przypisano CuAl₂O₄, natomiast szerokie maksimum ok. 523 K jonom miedzi rozproszonym w Al₂O₃. Nie zaobserwowano natomiast maksimum przy 298 K, wcześniej zarejestrowanego dla próbki przed dezaktywacją, co wykluczyło obecność jonu [Cu–O–Cu]²⁺ w katalizatorze po działaniu H₂O. Badania EPR potwierdzają obecność nowej fazy miedzi w zdezaktywowanym zeolicie, wskazując na istnienie przynajmniej dwóch form izolowanych jonów miedzi. Wzrost intensywności sygnału świadczy o tym, że diamagnetyczny kation [Cu–O–Cu]²⁺ uległ przekształceniu w inne formy, rejestrowane w widmie EPR, którymi mogą być jony Cu²⁺ zdyspergowane na Al₂O₃. Zdaniem Yana i wsp. [3] główną przyczyną dezaktywacji katalizatora Cu-ZSM-5 parą wodną w procesie SKR NO jest dealuminacja (łatwo zachodząca w obecności protonów tworzących się w zeolicie), która prowadzi do wytworzenia pozaszkieletowych form glinu w postaci Al₂O₃. Jednocześnie ma miejsce tworzenie małych krystalitów CuO (*d* < 4 nm, niewykrywalnych na dyfraktogramach), głównie w krzemianowej części zeolitu. Z czasem, gdy dealuminacja staje się głębsza, powstaje coraz większa liczba cząstek Al₂O₃, dzięki czemu wzrasta liczba jonów Cu²⁺ zdyspergowanych na Al₂O₃ oraz klastrów Cu/Al₂O₃, a nawet związków typu CuAl₂O₄. Procent aktywnych, izolowanych jonów Cu²⁺ maleje ze wzrostem stopnia dezaktywacji. Tymczasem Gomez i wsp. [68] nie stwierdzili zachodzenia dealuminacji w próbkach Cu-ZSM-5 po reakcji redukcji NO z użyciem C₃H₈ w obecności 10% H₂O. W widmach ²⁷Al MAS NMR nie zaobserwowano sygnałów świadczących o istnieniu glinu pozaszkieletowego, a badania metodą XRD potwierdziły zachowanie niezmienionego stosunku Si/Al. Zdaniem autorów dezaktywacja katalizatora Cu-ZSM-5 parą wodną wywołana jest jedynie przez zmianę lokalizacji i koordynacji jonów Cu²⁺. Z przeprowadzonych badań EPR wynika, że w próbce po dezaktywacji ok. 30% wszystkich paramagnetycznych jonów Cu²⁺ zmienia swoją koordynację, lokując się na przecięciach kanałów, tzn. w otwartych przestrzeniach struktury zeolitu. Wg autorów wyznaczone wartości *g*_{||} = 2,31 i *A*_{||} = 150 G odpowiadają koordynacji zniekształconej piramidy kwadratowej.

Problem zatrucia katalizatora Cu-ZSM-5 w obecności wody próbowano wyjaśnić także za pomocą obliczeń teoretycznych (DFT) [61, 69, 70]. Stwierdzono, że adsorpcja H₂O na zeolicie Cu-ZSM-5 zachodzi przez tworzenie wiązania między atomem O cząsteczki H₂O a kationem metalu oraz wiązania wodorowego między jednym z dwóch atomów wodoru cząsteczki H₂O a atomem tlenu w szkielecie zeolitu. Adsorpcja wody wydłuża wiązania między kationem metalu a tlenem w szkielecie, z którym jest związany. Wydłużenie wiązania M–O jest tym większe, im więcej cząsteczek H₂O ulega zaadsorbowaniu, co osłabia oddziaływanie kationu ze szkieletem. Ponadto wykazano [70], że energia adsorpcji H₂O na Cu⁺/zeolicie jest większa niż cząsteczki NO, a więc adsorpcja NO na

Cu⁺/zeolicie, na którym zaszła preadsorpcja H₂O, nie będzie korzystna pod względem energetycznym i nie doprowadzi do wytworzenia stabilnych kompleksów NO z miedzią.

Bell i wsp. [69] próbowali także określić łatwość tworzenia form tlenkowych miedzi w zeolicie Cu-ZSM-5 i Co-ZSM-5 z punktu widzenia termodynamiki. Ich badania wskazują, że powstawanie wodorotlenku metalu (stan gazowy) jest termodynamicznie niekorzystne, ale może zachodzić spontanicznie, jeżeli końcowym produktem będzie tlenek metalu. Według nich proces ten jest znacznie łatwiejszy w przypadku Cu-ZSM-5 niż Co-ZSM-5, co może sugerować większą stabilność hydrotermalną zeolitów zawierających kobalt.

W grupach badawczych Yana i Zhanga [4, 65] przeprowadzono próby modyfikacji katalizatora Cu-ZSM-5 w celu polepszenia jego odporności hydrotermalnej. Przedmiotem zainteresowania Zhanga i Flytzani-Stephanopoulos [65] były zeolity Cu-ZSM-5 modyfikowane cerem (oba metale wprowadzano przez wymianę jonową z roztworu). Badania katalitycznej aktywności materiału Ce(60)Cu(180)-ZSM-5 w rozkładzie NO z udziałem wody (2–20% obj.) wykazały, że katalizator z dodatkiem ceru cechuje się dwukrotnie wyższą aktywnością od katalizatora Cu(141)-ZSM-5, w tych samych warunkach. Na dyfraktogramach rentgenowskich nie zaobserwowano sygnału świadczącego o istnieniu w próbce fazy CuO, a na zdjęciach STEM obecności agregatów pozaszkieletowego glinu. Z tego wynika, że cer powstrzymuje zachodzenie procesu dealuminacji przez stabilizację aktywnych jonów miedzi w sąsiedztwie AlO₂⁻. Yan i wsp. [4] sprawdzali wpływ wody na aktywność katalizatora Cu-ZSM-5 modyfikowanego Na, La i Ce przez impregnację (M/Al = 0,5). W procesie SKR NO węglowodorami z udziałem pary wodnej tylko próbki modyfikowane La dezaktywowały się wolniej w porównaniu z wyjściowym Cu-ZSM-5. Badania metodami XRD i H₂-TPR wykazały, że wyższa odporność katalizatora La/Cu-ZSM-5 związana jest z faktem, że nie ulega on procesowi dealuminacji. Lantan dobrze rozproszony w zeolicie w postaci kationów La(OH)₂⁺ lub LaO⁺ powoduje zmniejszenie stężenia protonów w zeolicie i w konsekwencji zapobiega dealuminacji. Obecność Ce nie powoduje wzrostu hydrotermalnej odporności katalizatora. Materiał Ce/Cu-ZSM-5 zachowuje się podobnie jak Cu-ZSM-5. Cer w wyniku hydrolizy tworzy Ce(OH)₃, a więc protony zastąpione przez Ce³⁺ podczas modyfikacji generowane są ponownie podczas hydrolizy zgodnie z równaniem



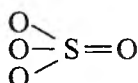
Wprowadzenie sodu do zeolitu Cu-ZSM-5 wywiera negatywny wpływ na odporność katalizatora na działanie pary wodnej, ponieważ jony Na⁺ promują hydrolizę jonów Cu²⁺ z utworzeniem nieaktywnych cząsteczek CuO.

Ostatnio Corma i wsp. [71] stwierdzili wyższą, w porównaniu z Cu-ZSM-5, hydrotermalną stabilność nowej rodziny zeolitów Cu-IM5 w reakcji SKR NO propanem. Autorzy wiążą ten fakt z większą stabilnością centrów aktywnych (Cu²⁺ i Cu⁺) w strukturze IM5. Jednak z powodu braku dokładnej identyfikacji

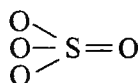
struktury IM5 (sugeruje się podobieństwo struktury do ZSM-5) nie można jednoznacznie wyjaśnić powodów obserwowanej aktywności i stabilności formy modyfikowanej miedzią.

2.3. WPLYW SO₂

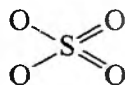
Ważną częścią badań dotyczących katalizatorów aktywnych w procesach usuwania NO jest sprawdzenie ich odporności na działanie SO₂. Iwamoto [53] wykazał, że SO₂ całkowicie zatrzuwa katalizator Cu-ZSM-5 w reakcji rozkładu NO w zakresie temperatur 673–973 K. Przyczyny znacznego spadku aktywności katalizatora Cu-ZSM-5 w reakcji rozkładu NO pod wpływem działania SO₂ wyjaśniają badania FTIR i H₂-TPR przeprowadzone przez Ziółek i wsp. [72]. Wynika z nich, że adsorpcja SO₂ blokuje aktywne w rozkładzie NO jony miedzi Cu²⁺ w koordynacji płaskiej kwadratowej, a pod wpływem temperatury następuje wytworzenie form siarczanowych na powierzchni katalizatora, co powoduje jego trwałą dezaktywację. Stwierdzono, że jest to typ siarczanów w postaci



(oznaczany jako typ I), który w widmie IR daje pasma przy 1365 i 1385 cm⁻¹ [73–76], a w profilu TPR maksimum w zakresie 580–600 K [72]. W przypadku glinokrzemianowych sit mezoporowatych Cu-*Al*MCM-41 adsorpcja dwutlenku siarki prowadzi również do blokowania jonów Cu²⁺, a w wyniku procesu grzania następuje utlenienie zaadsorbowanego SO₂ do siarczanów. Jednakże na powierzchni sit Cu-*Al*MCM-41 zidentyfikowano dwa typy siarczanów:



(typ I – pasmo przy 1385 cm⁻¹ w widmie IR i maksimum przy 580 K na krzywej TPR) i

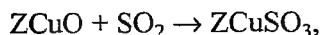


(typ II – pasmo przy ok. 1430 cm⁻¹ w widmie IR i maksimum przy ok. 630 K na krzywej TPR) [72].

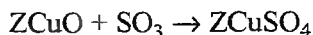
Według autorów pracy [72] możliwe drogi generowania siarczanów odpowiedzialnych za utratę aktywności miedziowych katalizatorów typu ZSM-5 i MCM-41 o matrycy glinokrzemianowej w reakcji rozkładu NO są następujące: utlenianie SO₂ tlenem z reakcji rozkładu NO (1), utlenianie SO₂ przez sieciowy tlen pozaszkieletowy (ELO) (2) lub też reakcja SO₂ z NO z utworzeniem SO₃ i N₂, a następnie chemisorpcja SO₃ z udziałem tlenu szkieletowego (3).

Tworzenie się siarczanów po działaniu SO_2 jest także przyczyną dezaktywacji miedziowych katalizatorów zeolitowych w procesie SKR węglowodorami. Zdaniem Arakawy i wsp. [76] SO_2 adsorbuje się na jonach Cu^+ w zeolicie Cu-ZSM-5, co prowadzi do utlenienia tych jonów do Cu^{2+} w obecności tlenu i wytworzenia siarczanów.

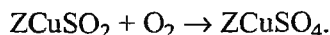
Mechanizm dezaktywacji katalizatora Cu-ZSM-5 pod wpływem działania SO_2 próbowano wyjaśnić za pomocą obliczeń teoretycznych metodą DFT [77]. Ich wyniki wykazały, że SO_2 wiąże się silnie z miedzią w zeolicie, przy czym preferowane jest wiązanie SO_2 z Cu przez atom siarki (energia wiązania = 34,5 kcal/mol dla modelu ZCuSO_2 , gdzie Z – szkielet zeolitu). Wg autorów termodynamicznie korzystna jest reakcja utleniania SO_2 do SO_3 z udziałem ELO ($\text{ZCuO} = \text{ZCu}^{2+}\text{O}^-$):



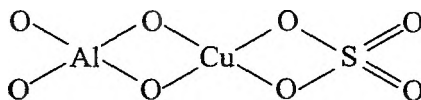
a także dalsza reakcja SO_3 do siarczanów(VI):



lub utlenianie SO_2 do siarczanów(VI):



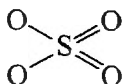
Najbardziej stabilną formą siarczanów jest ta, w której miedź uzyskuje koordynację płaską kwadratową:



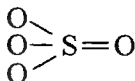
Zdaniem autorów właśnie ta forma jest odpowiedzialna za blokowanie aktywnych centrów miedziowych.

Spośród katalizatorów zeolitowych innych niż Cu-ZSM-5 naturalny mordenit wymieniony miedzią również okazał się wrażliwy na zatrucie SO_2 (1000 ppm) w procesie SKR C_3H_6 [78]. Przyczyną spadku aktywności katalizatora, jak wykazały badania XPS, było, podobnie jak w przypadku Cu-ZSM-5, tworzenie siarczanów [7]. Stwierdzono, że powstawaniu tych form na mordenicie sprzyja obecność miedzi w próbce, która przyspiesza utlenianie SO_2 do SO_3 . Ważną informacją było także wykazanie, że formy siarczanowe obecne na powierzchni katalizatora miedziowego nie odpowiadają pentaakwa siarczanowi(VI) miedzi(II) – $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$. Ponieważ jony Cu^{2+} na powierzchni zeolitu znajdują się w izolowanym środowisku, a atomy tlenu grupy SO_4 zawierają wolne pary elektronowe, autorzy sugerują, że formy siarczanowe oddziałują z jonami miedzi katalizatora.

Ostatnio doniesiono o wysokiej odporności na działanie dwutlenku siarki w reakcji rozkładu NO mezoporowatych sit MCM-41 o matrycy niobokrzemianowej modyfikowanych miedzią [72]. Badania FTIR wykazały, że SO_2 nie adsorbuje się na kationach miedzi na powierzchni katalizatora, a więc nie blokuje powstawania aktywnych kompleksów NO z miedzią. Zaobserwowano, że grzanie prowadzi do wytworzenia jedynie II typu siarczanów

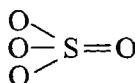


(pasmo przy ok. 1430 cm^{-1} w widmie IR i maksimum przy ok. 630 K na krzywej TPR). Z tego wynika, że niob zlokalizowany w szkielecie sita MCM-41 przeciwdziała powstawaniu siarczanów typu I



Forma II siarczanów nie ma istotnego znaczenia dla adsorpcji i rozkładu NO na Cu-NbMCM-41.

Wprowadzenie niobu do szkieletu ZSM-5 modyfikowanego następnie miedzią nie zabezpiecza przed zatruciem katalizatora przez SO₂ [79]. W wyniku procesu grzania następowało przekształcenie zaadsorbowanego na powierzchni sita SO₂ w formy siarczanowe typu I



(pasmo przy 1364 cm^{-1} w widmie IR), które blokują jony Cu²⁺, Cu^{δ+} i Cu^{2+O}-. To sugeruje, że odporność sita molekularnego zawierającego miedź na zatrucie przez SO₂ zależy nie tylko od obecności niobu w szkielecie sita, ale także od struktury materiału.

Pojawiły się doniesienia o katalizatorach typu Cu-Ti-PILC, Ce-Cu-PILC [66] oraz Co/Al₂O₃ [80], aktywnych i odpornych na zatrucie SO₂ w procesie SKR węglowodorami. Katalizatory typu PILC [66] cechował nieznaczny (ok. 5%) spadek aktywności po wprowadzeniu SO₂ (500 ppm), podobnie jak katalizatory typu Co/Al₂O₃ (30 ppm SO₂) [80].

Interesującego spostrzeżenia, dotyczącego poprawy aktywności katalizatora w obecności SO₂, dokonali Perez-Ramirez i wsp. [81]. Na podstawie badań rozkładu N₂O z zastosowaniem zeolitów typu hydrotalcytu modyfikowanych Co lub Ni wykazali, że odporność katalizatora na działanie SO₂ jest podwyższona przez dodatek Mg. Zasadowy charakter tego metalu powoduje, że SO₂ i SO₃ jako cząsteczki o słabej kwasowości Lewisa adsorbują się głównie na MgO, dzięki czemu wolne są centra aktywne reakcji.

PODSUMOWANIE

Selektywna katalityczna redukcja NO węglowodorami jest procesem wciąż intensywnie badanym. Chociaż miedziowe formy sit molekularnych prawdopodobnie nie znajdują praktycznego zastosowania w reakcji selektywnej katalitycznej redukcji NO węglowodorami, to informacje o oddziaływaniu O₂, H₂O czy SO₂

z katalizatorami miedziowymi, opisane w niniejszym artykule, mogą być przydatne w wypadku wielu innych procesów utleniania i redukcji, w których stosuje się materiały zawierające miedź.

Ostatnio uwaga badaczy skupia się na katalizatorach zawierających żelazo, które okazują się atrakcyjniejsze od katalizatorów miedziowych dla selektywnej katalitycznej redukcji NO węglowodorami. Niektóre badania wskazują na wyższą odporność katalizatorów żelazowych na zatrucie O₂, H₂O czy SO₂.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] M.D. Amiridis, T. Zhang, R.J. Farrauto, *Appl. Catal. B: Environmental*, 1996, **10**, 203.
- [2] C. Henriques, M.F. Ribeiro, C. Abreu, D.M. Murphy, F. Poignant, J. Saussey, J.C. Lavalley, *ibid.*, 1998, **16**, 79.
- [3] I.Y. Yan, G.D. Lei, W.M.H. Sachtler, H.H. Kung, *J. Catal.*, 1996, **161**, 43.
- [4] J.Y. Yan, W.M.H. Sachtler, H.H. Kung, *Catal. Today*, 1997, **33**, 279.
- [5] W. Grünert, N.W. Hayes, R.W. Joyner, E.S. Shapiro, M.R.H. Siddiqui, G.N. Baeva, *J. Phys. Chem.*, 1994, **98**, 10 832.
- [6] V.A. Matyshak, A.N. Il'ichev, A.A. Ukharsky, V.N. Korchak, *J. Catal.*, 1997, **171**, 245.
- [7] M.H. Kim, I.S. Nam, Y.G. Kim, *ibid.*, 1998, **179**, 350.
- [8] D.J. Liu, H.J. Robota, *J. Phys. Chem. B*, 1999, **103**, 2755.
- [9] A.T. Bell, *Catal. Today*, 1997, **38**, 151.
- [10] Y. Li, P.J. Battavio, J.N. Armor, *J. Catal.*, 1993, **142**, 561.
- [11] Y. Li, J.N. Armor, *ibid.*, 1994, **150**, 376.
- [12] Y. Li, T.L. Slager, J.N. Armor, *ibid.*, 1994, **150**, 388.
- [13] F. Witzel, G.A. Sill, W.K. Hall, *ibid.*, 1994, **149**, 229.
- [14] D. Pietrogiamomi, S. Tuti, M.C. Campa, V. Indovina, *Appl. Catal. B: Environmental*, 2000, **28**, 43.
- [15] X. Feng, W.K. Hall, *J. Catal.*, 1997, **166**, 368.
- [16] H.Y. Chen, W.M.H. Sachtler, *Catal. Today*, 1998, **42**, 73.
- [17] H.Y. Chen, T. Voskoboinikov, W.M.H. Sachtler, *J. Catal.*, 1998, **180**, 171.
- [18] H.Y. Chen, El-M. El-Malki, X. Wang, R.A. van Santen, W.M.H. Sachtler, *J. Mol. Catal. A: Chemical*, 2000, **162**, 159.
- [19] M.D. Amiridis, K.L. Roberts, C.J. Pereira, *ibid.*, 1997, **14**, 203.
- [20] M. Iwamoto, T. Zengyo, *Chem. Lett.*, 1997, 1283.
- [21] C. Rottländer, R. Andorf, C. Plog, B. Krutzsch, M. Baerns, *J. Catal.*, 1997, **169**, 400.
- [22] M. Iwamoto, T. Zengyo, A.M. Hernandez, H. Araki, *Appl. Catal. B: Environmental*, 1998, **17**, 259.
- [23] M. Debba, J. Feeley, R. Farrauto, *Appl. Catal. A: General*, 1999, **188**, 219.
- [24] A. Jentys, W. Schießer, H. Vinek, *Chem. Commun*, 1999, 335.
- [25] K. Shimizu, F. Okada, Y. Nakamura, A. Satsuma, T. Hattori, *J. Catal.*, 2000, **195**, 151.
- [26] Y. Li, J.N. Armor, *ibid.*, 1994, **145**, 1.
- [27] E. Kikuchi, M. Ogura, I. Teresaki, Y. Goto, *ibid.*, 1996, **161**, 465.
- [28] X. Zhang, A.B. Walters, M.A. Vannice, *Catal. Today*, 1996, **27**, 41.
- [29] A.J. Colussi, V.T. Amorebieta, *J. Phys. Chem. A*, 1998, **102**, 8486.
- [30] K.D. Fliatoura, X.E. Verykios, C.N. Costa, A.M. Efstathiou, *J. Catal.*, 1999, **183**, 323.
- [31] H.H. Kung, M.C. Kung, *Catal. Today*, 1996, **30**, 5.
- [32] H. Hamada, Y. Kintaichi, M. Inaba, M. Tabata, T. Yoshinari, H. Tsuchida, *ibid.*, 1996, **29**, 53.

- [33] G. Delahay, E. Ensuque, B. Coq, F. Figueras, *J. Catal.*, 1998, **175**, 7.
- [34] A. Auroux, D. Sprinceana, A. Gervasini, *ibid.*, 2000, **195**, 140.
- [35] M. Iwamoto, *Proceedings of the Meeting on Catalytic Technology for the Removal on Nitrogen Monoxide*, Tokyo, styczeń 1990, s. 17.
- [36] W. Held, A. König, T. Richev, L. Puppe, SAE Paper 900496, 1990.
- [37] M. Iwamoto, N. Mizuno, H. Yahiro, *Stud. Surf. Sci. Catal.*, 1992, **75**, 1285.
- [38] S. Sato, H. Yuu, H. Yahiro, N. Mizuno, M. Iwamoto, *Appl. Catal.*, 1991, **70**, L1.
- [39] C. Torre-Abreu, M.F. Ribeiro, C. Henriques, G. Delahay, *Appl. Catal. B: Environmental*, 1997, **12**, 249.
- [40] M. Misono, *Cattech*, 1998, **3**, 53.
- [41] Y. Traa, B. Burger, J. Weitkamp, *Microporous and Mesoporous Mat.*, 1999, **30**, 3.
- [42] A. Fritz, V. Pitchon, *Appl. Catal. B: Environmental*, 1997, **13**, 1.
- [43] R. Burch, P.J. Millington, *ibid.*, 1993, **2**, 101.
- [44] B.K. Cho, *J. Catal.*, 1995, **155**, 184.
- [45] C.J. Bennett, P.S. Bennett, S.E. Golunski, J.W. Hayes, A.P. Walker, *Appl. Catal. A: General*, 1992, **86**, L1.
- [46] M. Shelef, *Chem. Rev.*, 1995, **95**, 209.
- [47] I.C. Hwang, S.I. Woo, *J. Phys. Chem. B*, 1997, **101**, 4055.
- [48] S. Valange, Z. Gabelica, C. Torre-Abreu, M.F. Ribeiro, *Proc. 11 Intern. Zeolite Conference*, RP 104, Seoul, Korea, 1996.
- [49] M.J. Jia, W.Y. Lin, W.X. Zhang, F.S. Xiao, W.Q. Pang, T.H. Wu, *React. Kinet. Catal. Lett.*, 1999, **67**, 353.
- [50] Y. Teraoka, H. Ogawa, H. Furukawa, S. Kagawa, *Catal. Lett.*, 1992, **12**, 361.
- [51] G. Centi, S. Perathoner, *Appl. Catal. A: General*, 1995, **132**, 179.
- [52] P. Gilot, M. Guyon, B.R. Stanmore, *Fuel*, 1997, **76**, 507.
- [53] M. Iwamoto, H. Yahiro, K. Tanda, N. Mizuno, Y. Mine, S. Kagawa, *J. Phys. Chem.*, 1991, **95**, 3727.
- [54] R. Pirone, P. Ciambelli, G. Moretti, G. Russo, *Appl. Catal. B: Environmental*, 1996, **8**, 197.
- [55] Y. Li, W.K. Hall, *J. Phys. Chem.*, 1990, **94**, 6145.
- [56] T. Cheung, S.K. Bhargava, M. Hobday, K. Foger, *J. Catal.*, 1996, **158**, 301.
- [57] J. Vaylon, W.K. Hall, *J. Phys. Chem.*, 1993, **97**, 1204.
- [58] V.I. Parvulescu, P. Grange, B. Delmon, *J. Phys. Chem. B*, 1997, **101**, 6933.
- [59] S.K. Park, V. Kurshev, Z. Luan, C.W. Lee, L. Kevan, *Microporous and Mesoporous Mat.*, 2000, **38**, 255.
- [60] Y. Yokomichi, T. Yamabe, H. Ohtsuka, T. Kakumato, *J. Phys. Chem.*, 1996, **100**, 14 424.
- [61] L.B. Trout, A.K. Chakraborty, A.T. Bell, *ibid.*, 1996, **100**, 17 582.
- [62] A. Gervasini, *Appl. Catal. B: Environmental*, 1997, **14**, 147.
- [63] Y. Li, W.K. Hall, *J. Catal.*, 1993, **143**, 520.
- [64] Y. Li, W.K. Hall, *ibid.*, 1991, **129**, 202.
- [65] Y. Zhang, M. Flytzani-Stephanopoulos, *J. Catal.*, 1996, **164**, 131.
- [66] R.T. Yang, N. Tharappiwattananon, R.Q. Long, *Appl. Catal. B: Environmental*, 1998, **19**, 289.
- [67] Y. Kuroda, S. Konno, Y. Yoshikawa, H. Maeda, Y. Kubozono, H. Hamano, R. Kumashiro, M. Nagao, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, 1997, **93**, 2125.
- [68] S.A. Gomez, A. Campero, A. Martinez-Hernandez, G.A. Fuentes, *Appl. Catal. A: General*, 2000, **197**, 157.
- [69] M.J. Rice, A.K. Chakraborty, A.T. Bell, *J. Phys. Chem. A*, 1998, **102**, 7498.
- [70] N.U. Zhanpeisov, M. Matsuoka, H. Mishima, Y. Yamashita, M. Anpo, *J. Mol. Structure (Techoem)*, 1998, **454**, 201.
- [71] A.E. Palomares, F. Marquez, S. Valencia, A. Corma, *J. Mol. Catal. A: Chemical*, 2000, **162**, 175.

- [72] M. Ziólek, I. Sobczak, I. Nowak, M. Daturi, J.C. Lavalley, *Topics in Catalysis*, 2000, **11**, 343.
- [73] F. Geobaldo, C. Lamberti, G. Ricchiardi, S. Bordiga, A. Zecchina, *J. Phys. Chem.*, 1995, **99**, 11 167.
- [74] M. Waqif, O. Saur, J.C. Lavalley, S. Perathoner, G. Centi, *ibid.*, 1991, **95**, 4051.
- [75] M. Waqif, M. Lakhdar, O. Saur, J.C. Lavalley, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, 1994, **90**, 2815.
- [76] K. Arakawa, S. Matsuda, H. Kinoshita, *Appl. Surf. Sci.*, 1997, **121/122**, 382.
- [77] K.C. Hass, W.F. Schneider, *PCCP*, 1999, **1**, 639.
- [78] M.H. Kim, I.S. Nam, Y.G. Kim, *Appl. Catal. B: Environmental*, 1995, **6**, 297.
- [79] I. Sobczak, P. Decyk, M. Ziólek, M. Daturi, J.C. Lavalley, L. Kevan, A.M. Prakash, *J. Catal.*, 2002, **207**, 101.
- [80] J.Y. Yan, M.C. Kung, W.M.H. Sachtler, H.H. Kung, *J. Catal.*, 1997, **172**, 178.
- [81] J. Perez-Ramirez, J. Overijnder, F. Kapteijn, J.A. Maulijn, *Appl. Catal. B: Environmental*, 1999, **23**, 59.

Praca wpłynęła do Redakcji 27 listopada 2001

**PRODUKTY POŚREDNIE
WIELOETAPOWEJ KONWERSJI $\text{NADH} \rightleftharpoons \text{NAD}^+$**

**TRANSIENT SPECIES
IN MULTISTEP $\text{NADH} \rightleftharpoons \text{NAD}^+$ CONVERSION**

Jerzy Gębicki, Andrzej Marcinek, Jan Adamus

*Instytut Techniki Radiacyjnej, Politechnika Łódzka
90-924 Łódź, ul. Żeromskiego 116*

Abstract

Wstęp

1. Przeniesienie anionu wodorkowego – proces jednoetapowy

2. Proces wieloetapowy

2.1. Reaktywne produkty pośrednie reakcji wieloetapowej – charakterystyka

2.1.1. Rodnikokation

2.1.2. Forma enolowa rodnikokationu

2.1.3. Rodnik

2.1.4. Mechanizm etapowej transformacji $\text{NADH} \rightleftharpoons \text{NAD}^+$ i ich modelowych odpowiedników

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane



Prof. dr hab. Jerzy Gębicki ukończył studia na Wydziale Chemicznym Politechniki Łódzkiej w 1969 r. Tam też uzyskał kolejne stopnie naukowe: doktora (1976, pod kierunkiem prof. W. Reimschuessela), doktora habilitowanego (1985) i tytuł profesora (1993). Początkowo był związany z Katedrą Chemii Fizycznej, a po reorganizacji z Instytutem Techniki Radiacyjnej, gdzie obecnie zajmuje stanowisko profesora zwyczajnego.

W latach 1979–1982 odbył staże podoktorskie w State University of New York, Stony Brook (prof. A. Krantz), i w University of Utah (prof. J. Michl). Kilkakrotnie wyjeżdżał za granicę jako „visiting professor” (University of Texas – Austin, Ohio State University i University of Fribourg). Jest autorem ponad 80 artykułów. Początkowe zainteresowania naukowe prof. Gębickiego obejmowały problematykę radiometrii, następnie fotochemię i spektroskopię, a obecnie różne aspekty chemii medycznej i biofizyki.



Dr hab. Andrzej Marcinek ukończył w 1983 r. studia na Wydziale Fizyki Technicznej i Matematyki Stosowanej Politechniki Łódzkiej. Od tego czasu pracuje w Instytucie Techniki Radiacyjnej PŁ, obecnie na stanowisku adiunkta. W 1991 r. uzyskał stopień doktora, a w 2001 r. doktora hab. nauk chemicznych. W latach 1991–1993 odbył staż naukowy w Ohio State University (USA). Zainteresowania naukowe autora koncentrują się na badaniach jonów molekularnych w fazach skondensowanych z wykorzystaniem rozdzielczych w czasie technik pomiarowych, takich jak radioliza impulsowa czy laserowa fotoliza błyskowa.

Jest autorem lub współautorem 30 artykułów naukowych oraz 60 referatów i komunikatów prezentowanych na konferencjach naukowych.



Dr inż. Jan Adamus ukończył studia na Wydziale Chemii Politechniki Łódzkiej w 1973 r. Stopień doktora uzyskał w 1990 r. Obecnie jest adiunktem w Instytucie Techniki Radiacyjnej Politechniki Łódzkiej. Głównymi zainteresowaniami Jana Adamusa są badania nad syntezą i elektrochemią pochodnych 1,4-dihydropirydiny oraz soli pirydyniowych. Jest współautorem 20 artykułów naukowych opublikowanych w czasopiśmie o cyrkulacji międzynarodowej.

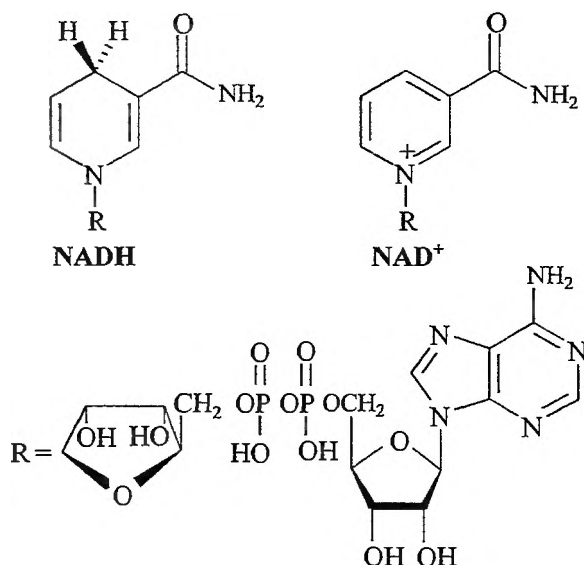
ABSTRACT

The conversion of NADH to NAD^+ and of the reverse reaction, in the coenzyme as well as in its synthetic analogues, 1,4-dihydropyridines and 9,10-dihydroanthracenes are discussed. Two mechanisms of the $\text{NADH} \rightleftharpoons \text{NAD}^+$ conversion are compared: one-step hydride transfer and stepwise electron-proton-electron transfer.

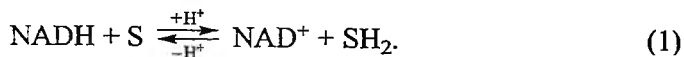
Direct characterization of transient species in the stepwise process, namely radical cations and radicals, is based on the pulse radiolysis and laser flash photolysis studies both in solution and low-temperature matrices. On ionization of NADH and 1,4-dihydropyridines the stability order of the keto and enol tautomers is inverted as compared to their neutral precursors. Both types of radical cations are characterized and their role in the stepwise process are discussed.

WSTĘP

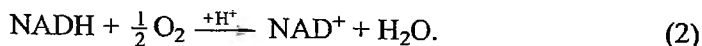
Kluczową rolę w biologicznych reakcjach utleniania i redukcji oraz, co za tym idzie, gromadzenia energii i siły redukcyjnej w procesach biosyntezy odgrywają nukleotydy pirydyniowe, pełniące w reakcjach enzymatycznych funkcję koenzymów: dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (NAD⁺) i jego zredukowana forma dinukleotyd 1,4-dihydronikotynoamidoadeninowy (NADH). W procesach komórkowych NADH jest używany głównie do tworzenia ATP (adenozyno-5'-trifosforan), podczas gdy w reakcjach biosyntezy wykorzystywana jest zredukowana forma fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADPH), w której grupa 2'-hydroksylowa adenozyliny połączona jest wiązaniem estrowym z fosforanem [1, 2].



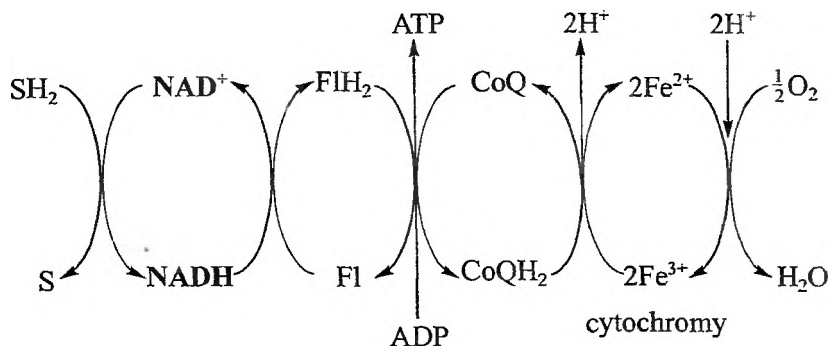
W reakcjach z udziałem koenzymów pirydyniowych utlenieniu i redukcji ulega głównie fragment 1,4-dihydropirydiniowy. Pierścień nikotynoamidowy w reakcjach utlenienia NAD(P)H oddaje cząsteczce substratu dwa elektrony i proton, które są ekwiwalentem anionu wodorkowego.



Ponad 250 enzymatycznych reakcji utleniania i redukcji jest zależnych od konwersji $\text{NADH} \rightleftharpoons \text{NAD}^+$ i ponad 150 od konwersji $\text{NADPH} \rightleftharpoons \text{NADP}^+$. NADH jest głównym źródłem elektronów w redukcji tlenu komórkowego. Procesowi temu towarzyszy olbrzymia zmiana energii swobodnej ($\Delta G^\circ = -220 \text{ kJ/mol}$, $\text{pH} = 7$) [1, 2].



W nieobecności katalizatorów NADH jest cząsteczką względnie stabilną wobec reakcji z tlenem cząsteczkowym, co umożliwia niezakłócony przebieg reakcji enzymatycznych. W organizmach tlenowych redukcja tlenu odbywa się za pośrednictwem łańcucha transportu elektronów umiejscowionego w mitochondriach (schemat 1).



Schemat 1

W reakcjach z różnymi organicznymi utleniaczami przeniesienie anionu wodorkowego może być obserwowane nie tylko w reakcjach enzymatycznych, ale również w reakcjach termicznych, fotochemicznych lub reakcjach katalizowanych przez kwasy czy jony metali, co w konsekwencji może być wykorzystane np. w syntezie organicznej [3].

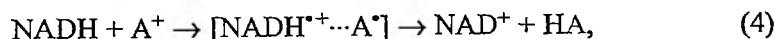
Wyróżniającą się cechą reakcji enzymatycznych z udziałem koenzymów pirydyniowych jest przeniesienie protonu bezpośrednio na substrat bez wymiany z innym protonem, np. protonem rozpuszczalnika. Przykładem może być redukcja aldehydu octowego do etanolu [4]. Podobnie, dominująca liczba reakcji termicznych również charakteryzuje się bezpośrednim przeniesieniem protonu (w konsekwencji anionu wodorkowego) ze zredukowanego NADH na substrat, np. tiobenzofenon [5] czy chinony [6]. Na rzecz jednoetapowego przeniesienia anionu wodorkowego wskazują w tych reakcjach efekty podstawnikowe, rozpuszczalnikowe, kinetyczne efekty izotopowe, brak wpływu na szybkość reakcji pH roztworu, stężenia tlenu czy innych zmiataczy wolnych rodników [7].

Jednakże oprócz jednoetapowego mechanizmu konwersji $\text{NADH} \rightleftharpoons \text{NAD}^+$ w wyniku przeniesienia anionu wodorkowego do akceptora



możliwe jest rozważenie dwóch alternatywnych mechanizmów, w których etap przeniesienia atomu wodoru lub protonu poprzedzony jest przeniesieniem elektronu i powstaniem kompleksu odpowiedniego rodnikokationu donora i rodnika akceptora elektronu:

– proces dwuetapowy ($e^- - \text{H}^*$)



– proces trójetapowy ($e^- - H^+ - e^-$):

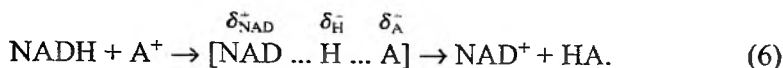


Reakcje, w których powstające kompleksy rodnikowe mogłyby ulegać separacji, powinny wyraźnie różnić się od reakcji jednoetapowej obecnością produktów reakcji rodnikowych, wymianą protonu z rozpuszczalnikiem, inhibicją reakcji przez zmiatacze wolnych rodników czy tlen oraz kinetycznymi efektami izotopowymi. Z drugiej zaś strony procesy, w których kolejne etapy przeniesienia elektronów i protonu z utworzeniem kompleksów typu *charge transfer* następują szybciej niż dysocjacja pary rodnikowej, stają się niemal nierozróżnialne od procesu jednoetapowego. Ta trudność rozróżnienia obu mechanizmów stała się początkiem trwającej do dziś debaty nad mechanizmem konwersji $\text{NADH} \rightleftharpoons \text{NAD}^+$.

1. PRZENIESIENIE ANIONU WODORKOWEGO – PROCES JEDNOETAPOWY

Bezpośrednie przeniesienie anionu wodorkowego z NADH na substrat badane jest zazwyczaj z wykorzystaniem związków modelujących reaktywność koenzymu, takich jak pochodne 1,4-dihydropirydydy czy 9,10-dihydroakrydydy oraz ich podstawionych analogów. Związki te zawierają w swojej budowie fragment 1,4-dihydropirydynowy, kluczowy w procesach utleniania i redukcji koenzymu NADH. Reaktywność związków modelowych z solami pirydyniowymi czy akrydyniowymi, flawinami, chinonami czy całą gamą innych substancji organicznych służy wyjaśnieniu mechanizmu konwersji $\text{NADH} \rightleftharpoons \text{NAD}^+$. Stałe szybkości tych reakcji i ich korelacja ze stałą Hammetta, potencjałem redukcji akceptora, stałą równowagi reakcji czy wreszcie pierwszo- i drugorzędowy efekt izotopowy pozwalają wnioskować na temat mechanizmu reakcji. Na podstawie badań takich modelowych związków Kreevoy i wsp. [8–11] na podstawie modelu Marcusa i zależności stałej szybkości reakcji od stałej równowagi wykazują, że mechanizm jednoetapowy jest znacznie bardziej prawdopodobny niż mechanizm wieloetapowy z udziałem rodnikowych produktów pośrednich. Również szeroko rozwinięte badania Buntinga i wsp. [12, 13] reakcji 1,4-dihydranikotynoamidów z pochodnymi soli pirydyniowych i zależność tych reakcji od efektu podstawnikowego jasno wskazują na mechanizm przeniesienia anionu wodorkowego. Bunting i in. wskazują na korelację stałych szybkości tych reakcji ze stałą szybkości reakcji addycji ^-OH do badanych kationowych akceptorów anionu wodorkowego, ich potencjałów redukcji i powinowactwa elektronowego. Zależności tych korelacji od efektu podstawnikowego interpretowane są przez autorów jako obraz stanu przejściowego, w którym anion wodorkowy ulegający przeniesieniu obciążony jest niepełnym ładunkiem ujemnym ($\delta_{\text{H}^-} < 1$). W efekcie reakcja uzyskuje częściowy charakter reakcji o mechanizmie mieszanym, łączącym proces jed-

no- (przeniesienie anionu wodorkowego) i wieloetapowy (osobno proton i elektron) w stanie przejściowym [12]:



Najczęstszym jednakże argumentem na rzecz mechanizmu jednoetapowego jest brak dowodów występowania mechanizmu wieloetapowego. Przede wszystkim jest to brak obserwacji produktów reakcji rodnikowych, które powinny powstawać, gdyby para rodnikokation i rodnik powstająca w procesie wieloetapowym uległa separacji [7]. Co więcej, nie obserwuje się wymiany przenoszonego protonu z rozpuszczalnikiem, co powinno nastąpić ze względu na silnie kwasowy charakter powstającego rodnikokationu i zasadowy charakter rodnika akceptora [14, 15]. Te eksperymentalne fakty, choć wskazują co najmniej na „nierozzerwalność” powstającej pary rodnikowej, były wielokrotnie konfrontowane z obserwowaną rozbieżnością między kinetycznym efektem izotopowym a znacznie większym efektem izotopowym w rozkładzie produktów [7, 16–19]. Jednak w przypadku związków zawierających grupy karbonylowe tego typu porównania stają się całkowicie bezużyteczne na skutek efektu mieszania (*scrambling*) [20]. Sam pierwszorzędowy efekt izotopowy nie jest wystarczającym argumentem na rzecz odróżnienia przeniesienia anionu wodorkowego w procesie jednoetapowym, a procesem wieloetapowym, gdy przeniesienie protonu jest procesem określającym całkowitą szybkość reakcji.

2. PROCES WIELOETAPOWY

Na niekorzyść wieloetapowego przeniesienia anionu wodorkowego przemawia przede wszystkim argument, że pierwotny proces przeniesienia elektronu jest procesem silnie endotermicznym, podczas gdy cały proces jest egzotermiczny. Co więcej, stałe szybkości reakcji przeniesienia elektronu przewidywane dla tak endotermicznych procesów musiałyby być w wielu przypadkach wielokrotnie niższe niż obserwowane doświadczalnie. Na przykład redukcja chinonów przez NADH następuje 10^4 – 10^6 razy szybciej niż gdyby proces był wynikiem przeniesienia etapowego anionu wodorkowego, w którym reakcją limitującą szybkość jest przeniesienie elektronu. W przypadku kationu 10-metyloakrydyniowego ta różnica stałych szybkości sięgnęłaby już 7 rzędów [12, 21]. Przyjmuje się, że proces wieloetapowy może mieć miejsce wówczas, gdy zmiana energii swobodnej w procesie przeniesienia elektronu jest nie większa niż 1 eV [22]. I rzeczywiście, w reakcjach NADH lub jego analogów, pochodnych 1,4-dihydropirydyny czy 9,10-dihydroakrydyny, z mocnymi, jednoelektronowymi utleniaczami, takimi jak np. jony żelazicyjankowe czy kationy ferrocenowe lub rodniki i rodnikokationy organiczne, bezsprzecznie obserwuje się przeniesienie elektronu i utworzenie odpowiednich rodnikokationów [6, 19, 21, 27–32].

Co więcej, część energii niezbędnej do zainicjowania procesu wieloetapowego może być uzyskana w wyniku oddziaływań powstających produktów rodnikowych, procesów tautomerii rodnikokationów czy wreszcie w procesach katalizujących przeniesienie elektronu np. przez stabilizację akceptora elektronów. Do ostatniego typu reakcji zaliczyć można reakcje katalizowane przez kwasy, zachodzące przez protonowanie rodnikoanionów, które są produktami przeniesienia elektronu, a jednocześnie silnymi zasadami. Podobnego efektu można oczekiwać również w przypadku katalizy jonami metali tworzącymi podobnie silne kompleksy z rodnikoanionami [23, 24].

Ponieważ fotowzbudzenie cząsteczek aktywuje ich reaktywność związaną z przeniesieniem elektronu również w procesach fotochemicznych, proces wieloetapowego przeniesienia anionu wodorkowego może być dominujący. Obserwacja produktów reakcji rodnikowych, jak i samych rodników i rodnikokationów w tych procesach jest bezpośrednim tego dowodem [24–26].

Reaktywność rodnikokationów NADH czy jego analogów może być również badana w wyniku ich generowania w procesach elektrochemicznych (utlenianie anodowe) lub radiacyjnych [33–48].

2.1. REAKTYWNE PRODUKTY POŚREDNIE REAKCJI WIELOETAPOWEJ – CHARAKTERYSTYKA

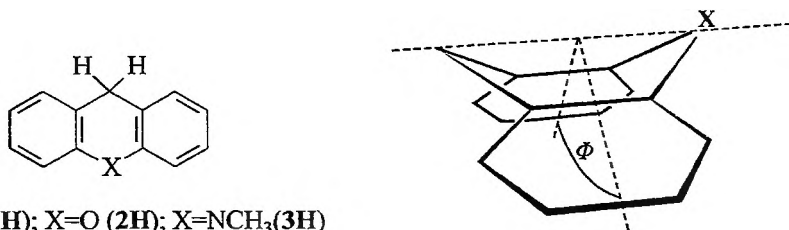
Badanie produktów pośrednich jest trudne eksperymentalnie, tym bardziej gdy są to produkty o charakterze rodnikowym czy rodnikojonowym. Szczególnie przydatną techniką jest metoda radiolizy impulsowej, która w połączeniu z techniką matryc niskotemperaturowych stwarza unikatowe możliwości spektroskopowej identyfikacji jonów molekularnych i śledzenia ich szybkich reakcji [49–53]. Przedstawiona dalej spektroskopowa charakterystyka rodników i rodnikokationów pochodzi z takich właśnie badań przeprowadzonych w laboratorium autorów niniejszej publikacji.

2.1.1. Rodnikokation

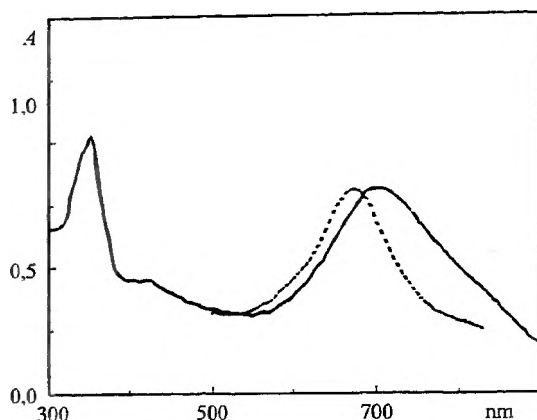
Usunięcie jednego elektronu z cząsteczki wydaje się najmniejszą możliwą jej modyfikacją, pomijając, być może, wzbudzenie elektronowe cząsteczki, i w związku z tym zasadne wydaje się pytanie: jeden elektron więcej, jeden elektron mniej, czy czyni to jakkolwiek różnicę? Naturalnie, podobnie do fotowzbudzenia, usunięcie jednego elektronu zwiększa powinowactwo elektronowe cząsteczki i, co za tym idzie, dominująca liczba znanych reakcji rodnikokationów dotyczy powrotnego przeniesienia elektronu i ich neutralizacji. Usunięcie elektronu zmienia strukturę elektronową cząsteczki, powodując, iż rodnikokationy mogą ulegać wzbudzeniu, absorbując światło o energii znacznie niższej niż charakterystyczna dla cząsteczek neutralnych absorpcja HOMO → LUMO (przejście elektronowe z najbogatszego

energetycznie zajętego na najuboższy energetycznie niezajęty orbital cząsteczkowy), mianowicie odpowiadającej separacji poziomów energetycznych w ramach powłok częściowo zajętych, np. HOMO-1 \rightarrow HOMO [52]. W efekcie rodnikokationy NADH i pochodnych 1,4-dihydropirydyny absorbują już w zakresie widzialnym widma przy 550 nm, podczas gdy ich neutralne odpowiedniki mają pasmo absorpcji zlokalizowane przy 340–360 nm [38].

Reorganizacja struktury elektronowej pociąga za sobą relaksację strukturalną cząsteczki, co prowadzi do nieznacznych przesunięć i zawężania obserwowanych pasm absorpcji. Zmiany te dla pochodnych 1,4-dihydropirydyny są jednakże niewielkie i trudne do jednoznacznej interpretacji. Proces ten jest dobrze widoczny na przykładzie tioksantenu (**1H**) i ksantenu (**2H**), analogów 10-metyloakrydanu (**3H**), jednego z najczęściej badanych związków modelujących reaktywność NADH. Podobnie jak 10-metyloakrydan, także cząsteczki **1H** i **2H** nie są płaskie. Ich wygięcie można wyrazić kątem dwuściennym Φ , jaki tworzą ze sobą płaszczyzny bocznych pierścieni. Został on eksperymentalnie określony na $135 \pm 8^\circ$ dla **1H** [54–56], $160 \pm 6^\circ$ dla **2H** [54], a obliczenia B3LYP/6-31G* (metoda oparta na teorii funkcjonału gęstości wykorzystująca funkcjonały Beckego [trójparametrowy] oraz Lee, Yanga i Parra) wskazują, że w **3H** wynosi on 149° [48].



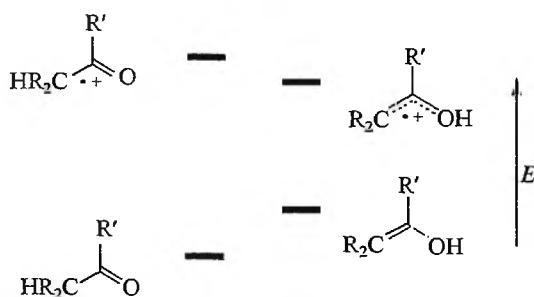
W wyniku jonizacji obserwuje się spłaszczenie cząsteczek pochodnych 10-metyloakrydanu (wg obliczeń dla **3H**, aż do 165°), choć prawdopodobnie cząsteczka staje się całkowicie płaska dopiero w wyniku odszczepienia protonu i utworzenia rodnika [48]. Te zmiany konformacji cząsteczki mogą być obserwowane m.in. na podstawie zmian widma elektronowego z wykorzystaniem metod rozdzielczych w czasie, np. radiolizy impulsowej. Mogą one być również obserwowane metodami stacjonarnymi w środowisku matrycowym, ze względu na fakt, że procesy relaksacji w sztywnym środowisku matryc organicznych lub gazów szlachetnych mogą być znacznie spowolnione lub całkowicie zahamowane. Rys. 1 przedstawia właśnie taką zmianę widma rodnikokationu **1H**^{•+} w wyniku jego relaksacji strukturalnej. W tym wypadku widmo końcowe (linia przerywana) jest znacznie węższe, przesunięte w stronę krótszych długości fal i jest identyczne z widmem obserwowanym dla tego rodnikokationu w ciekłym acetonitrylu.



Rys. 1. Widmo absorpcji rodnikokationu tioksantenu ($1\text{H}^{+\cdot}$) w matrycy metylocykloheksanowej (z dodatkiem 1M 2-chlorobutanu) w 77 K. Linia przerywana pokazuje zmiany wywołane relaksacją matrycy

2.1.2. Forma enolowa rodnikokationu

Opisane uprzednio zmiany strukturalne związane z relaksacją cząsteczki prowadzą do niewielkiej stabilizacji powstającego rodnikokationu (wg obliczeń B3LYP/6-31G* dla $3\text{H}^{+\cdot}$ jest to ok. 15 kJ/mol). Jednak znacznie większa stabilizacja może zostać osiągnięta dla pochodnych 1,4-dihydronikotynoamidu w wyniku przeniesienia atomu wodoru i utworzenia enolowego tautomeru. O ile przeniesienie atomu wodoru w cząsteczce neutralnej jest procesem endotermicznym, o tyle w przypadku rodnikokationów sytuacja może ulec odwróceniu (schemat 2).

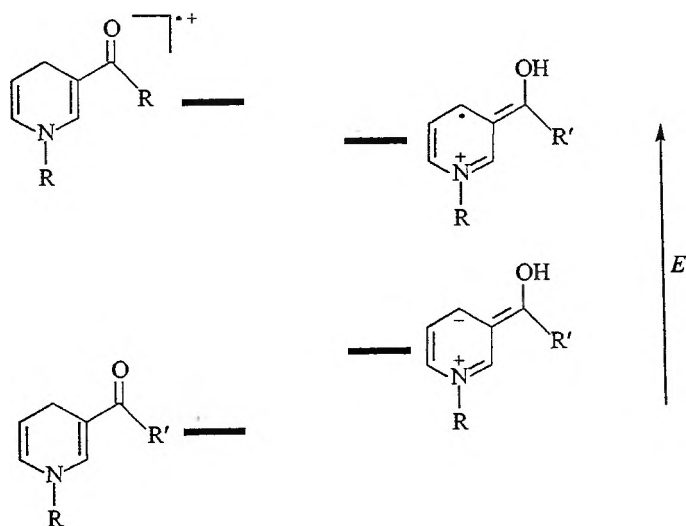


Schemat 2

Jedną z najbardziej intrygujących cech rodnikokationów jest bowiem przejawiająca się w licznych przypadkach inwersja stabilności tautomerów w odniesieniu do ich neutralnych odpowiedników. Dobrze poznane i udokumentowane jest spontaniczne przeniesienie atomu wodoru w zjonizowanych *orto* podstawionych

ketonach arylowych, dla których proces ten jest egzotermiczny w przypadku rodnikokationów, lecz endotermiczny dla ich neutralnych odpowiedników [57–59]. Niska energia aktywacji procesu powoduje, że zachodzi on efektywnie już w temperaturach kriogenicznych i może być obserwowany jedynie za pomocą szybkich metod rozdzielczych w czasie. Podstawienie izotopowe przenoszonego atomu wodoru przez atom deuteru znacznie spowalnia proces. Spontaniczne przeniesienie atomu wodoru nie ogranicza się jedynie do ketonów arylowych z podstawnikami alkilowymi w pozycji *orto*. Donorem atomu wodoru może być zjonizowana grupa hydroksylowa czy formylowa, podczas gdy grupy nitrowa i nitrozowa mogą działać jako akceptory [57–61]. Ta różnorodność związków, dla których w wyniku usunięcia jednego elektronu obserwuje się inwersję stabilności, uzasadnia pytanie, czy NADH również należy do tej grupy.

Obliczenia kwantowomechaniczne B3LYP/6-31G* dla prostych modeli NADH, będących pochodnymi 1,4-dihydropirydyny z podstawnikiem C(O)-R' w pozycji 3, gdzie R' = H, CH₃, NH₂, potwierdzają tę hipotezę (schemat 3). Przeniesienie atomu wodoru w neutralnych cząsteczkach jest procesem endotermicznym (80–120 kJ/mol), podczas gdy dla cząsteczek zjonizowanych proces jest egzotermiczny (40–60 kJ/mol). Jednakże można oczekiwać istotnie różnej energii aktywacji procesu przeniesienia atomu wodoru w rodnikokationach pochodnych 1,4-dihydropirydyny w porównaniu do ketonów *orto*-alkiloarylowych ze względu na mniej korzystną geometrię pięcioczłonowego stanu przejściowego. I rzeczywiście, mimo inwersji stabilności tworzenie bardziej stabilnego tautomeru w wyniku wewnątrzcząsteczkowego przeniesienia atomu wodoru nie jest obserwowane dla prostych analogów NADH. Aby proces mógł przebiegać spontanicznie, muszą być spełnione odpowiednie wymagania konformacyjne. Jakież? Odpo-



Schemat 3

wiedzą na to pytanie można uzyskać, porównując struktury dwóch związków mających grupę karbonylową usytuowaną korzystnie dla wewnątrzcząsteczkowego przeniesienia atomu wodoru, 1-metylo-1,4-dihydro-6,7,8,9-tetrahydro-5*H*-cyklohepta[b]pirydino-5-onu (**4H**) i 1-metylo-1,4,7,8-tetrahydro-5(6*H*)-chinolino-5-onu (**5H**) ze strukturą 1-metylo-3-formylo-1,4-dihydropirydiny (**6H**). Krystaliczną strukturę pierwszych dwóch związków określono rentgenograficznie [45]. Również obliczenia metodą B3LYP/6-31G* przewidują struktury cząsteczek zgodne ze strukturą krystaliczną (drobne różnice mogą być skutkiem oddziaływań w kryształach – zob. tab. 1). W obu cząsteczkach atomy azotu i węgla C-4 wychylone są nieznacznie poza płaszczyznę pierścienia pirydynowego. Jednakże boczne pierścienie są pofałdowane, co nieznacznie wpływa na pierścień pirydynowy, ale zmienia orientację grupy karbonylowej. Grupa karbonylowa wychylona jest poza płaszczyznę pierścienia pirydynowego o kąt $1,1^\circ$ w kryształach **5H** i $7,5^\circ$ w kryształach **4H**. Dla tych związków minimalna odległość O...H w kryształach wynosi 2,60–2,64 Å (2,55–2,56 Å według obliczeń) i jest znacznie mniejsza niż odległość 2,87 Å przewidywana dla płaskiej struktury **6H**.

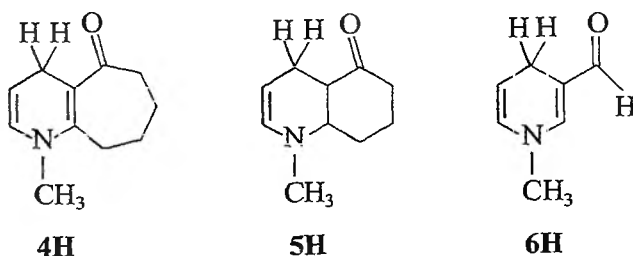
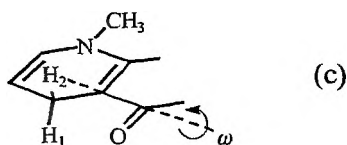


Tabela 1. Wybrane parametry struktury wyznaczone krystalograficznie i z obliczeń

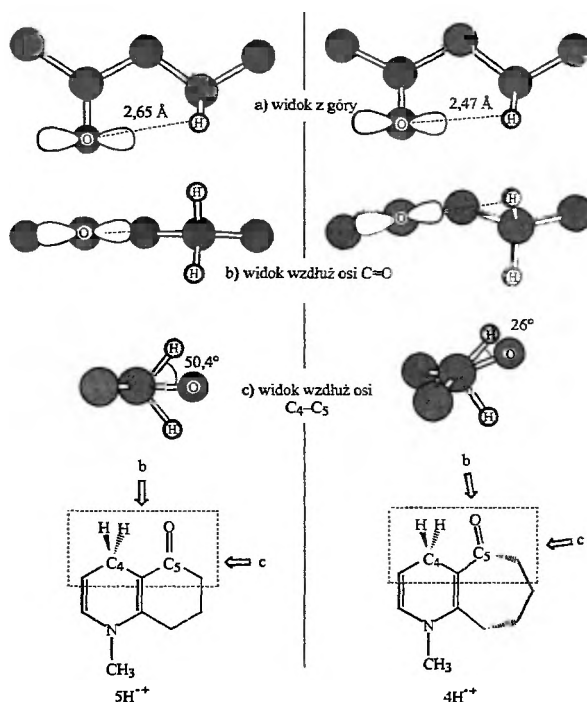


	ω	R(O...H ₁)	R(O...H ₂)
4H (wyznaczone dośw.)	$7,5^\circ$	2,60 Å	2,64 Å
4H (obliczenia)	$11,7^\circ$	2,71 Å	2,55 Å
4H⁺ (obliczenia)	$25,9^\circ$	2,47 Å	2,86 Å
5H (wyznaczone dośw.)	$1,1^\circ$	2,64 Å	2,77 Å
5H (obliczenia)	$1,9^\circ$	2,56 Å	2,76 Å
5H⁺ (obliczenia)	$2,0^\circ$	2,65 Å	2,68 Å
6H (obliczenia)	$0,0^\circ$	2,87 Å	2,87 Å
6H⁺ (obliczenia)	$0,0^\circ$	2,78 Å	2,78 Å

(c)

Co więcej, w wyniku jonizacji pojawiają się również istotne różnice między cząsteczkami **4H** i **5H**. W rodnikokationie **5H⁺** orientacja grupy karbonylowej

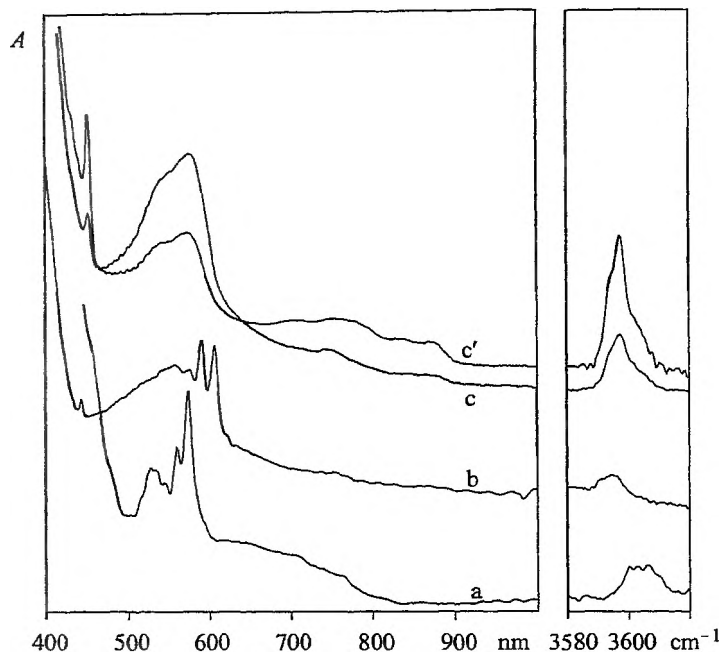
prawie nie ulega zmianie, natomiast w 4H^{*+} wychylenie wzrasta do $25,9^\circ$. Skutkiem tego jest znaczne skrócenie odległości O...H, do $2,47 \text{ \AA}$, i zmiana orientacji orbitalu p atomu tlenu, który przyjmuje ustawienie skierowane w stronę najbliższego atomu wodoru przy węglu C-4 (rys. 2). W efekcie rodnikokation 4H^{*+} ma geometrię bardzo korzystną dla wewnątrzcząsteczkowego przeniesienia atomu wodoru.



Rys. 2. Porównanie struktur cząsteczek 4H^{*+} i 5H^{*+} zoptymalizowanych metodą B3LYP/6-31G*

Widma otrzymane po jonizacji omawianych związków w matrycy argonowej pokazane są na rys. 3. We wszystkich przypadkach w widmie dominuje absorpcja rodnikokationów odmiany ketonowej (z wyraźnie zarysowaną strukturą oscylacyjną dla 5H^{*+} i 6H^{*+}). Jednak oprócz dominującego pasma absorpcji tych rodnikokationów w widmach widać dodatkową absorpcję charakteryzującą się słabym szerokim pasmem w zakresie $700\text{--}900 \text{ nm}$ i ostrym pasmem przy 450 nm . Świadczy to o pojawieniu się drugiego produktu w zjonizowanej próbce, któremu towarzyszy również absorpcja przy 3600 cm^{-1} w widmie w podczerwieni, a którą można przypisać drganiu rozciągającemu OH w rodnikokationie odmiany enolowej [58]. Przypisanie wymienionych pasm absorpcji rodnikokationom odmiany enolowej potwierdzają wyniki obliczeń metodą CASSCF/CASPT2 (CASSCF – metoda samouzgodnionego pola związana z pełnym mieszaniami

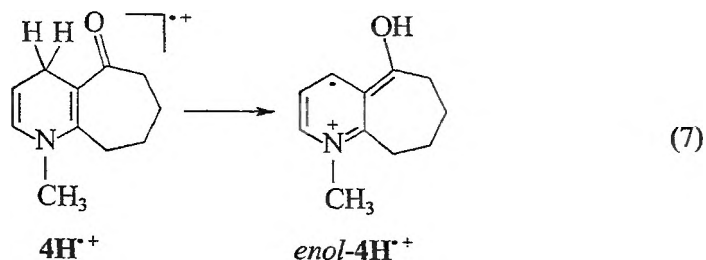
konfiguracji w ramach ograniczonego zbioru aktywnych orbitali cząsteczkowych; CASPT2 – metoda zaburzeń drugiego rzędu oparta na funkcjach falowych uzyskiwanych w metodzie CASSCF). Przewidują one pierwsze przejście elektronowe przy 720 nm, co jest zgodne z eksperymentalnie obserwowanym szerokim pasmem absorpcji w zakresie 700–900 nm. Drugie przejście elektronowe, któremu odpowiada wąskie pasmo absorpcji przy 450 nm (niestety pasmo to nie jest widoczne dla 6H^+) jest przewidziane również dokładnie (435 nm).



Rys. 3. Widma produktów radiolizy 6H (a), 5H (b) i 4H (c) zamrożonych w matrycy argonowej w 12 K. Widmo (c') pokazuje zmianę widma (c) z upływem czasu

Widma uzyskane w wyniku jonizacji 5H i 6H nie ulegają dalszym zmianom. Powolne zmiany obserwuje się jednak w widmie otrzymanym po jonizacji 4H . Pasma absorpcji rodnikokationu odmiany ketonowej (500–600 nm) bardzo wolno zanika z jednoczesnym wzrostem pasm absorpcji odmiany enolowej. Zmianom widma elektronowego towarzyszą odpowiednie zmiany w widmie w podczerwieni. Zmiany te można efektywnie przyspieszyć przez naświetlanie próbki (500–600 nm). Obserwacje te są bezpośrednim dowodem spontanicznego, wewnątrzcząsteczkowego przeniesienia atomu wodoru. Rodnikokation 4H^{*+} ma strukturę szczególnie sprzyjającą temu procesowi, dzięki czemu zachodzi on spontanicznie. Konfiguracja tego rodnikokationu jest zbliżona do konformacji *trans* (grupa amidowa skrzywiona jest o kąt 20–30° poza płaszczyznę pierścienia), jaką przyjmuje dihydronikotynoamidowy fragment cząsteczki NADH w większości

enzymatycznie aktywnych miejsc [62–64]. A zysk energetyczny stabilizacji rodnikokationu powstającego w formie enolowej mógłby być kolejnym czynnikiem ułatwiającym zajście reakcji wieloetapowej w procesie przenoszenia anionu wodorkowego.

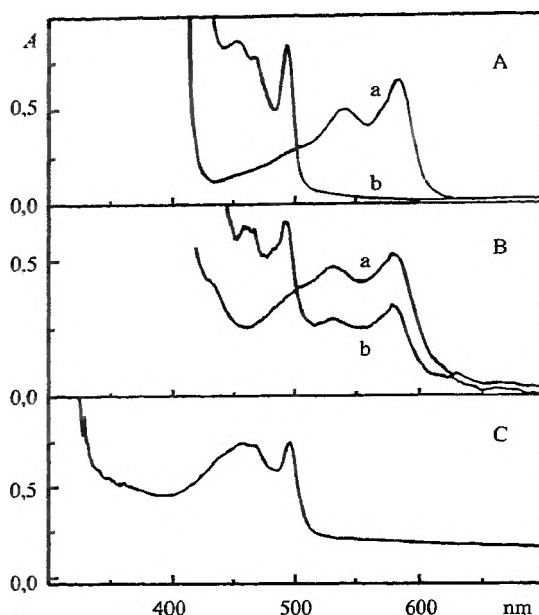


2.1.3. Rodnik

Usunięcie jednego elektronu i wynikające stąd obniżenie gęstości elektronowej cząsteczki powoduje istotne zwiększenie jej kwasowości. Rodnikokationy są więc bardziej kwasowe niż ich neutralne cząsteczki macierzyste [65–70] i rozpad wiązania C–H może być dominującą reakcją rodnikokationów w obecności odpowiednich zasad [71]. Tym bardziej, że rolę akceptora protonu mogą odgrywać odpowiednie rodnikoaniony (wykazujące charakter zasadowy), szczególnie że są one generowane w bliskim sąsiedztwie rodnikokationów. W wielu przypadkach bezpośrednie przeniesienie protonu zachodzi w parach jonowych jeszcze przed ich dysocjacją [72–74]. Również cząsteczka macierzysta może być akceptorem protonu od swojego zjonizowanego odpowiednika [75].

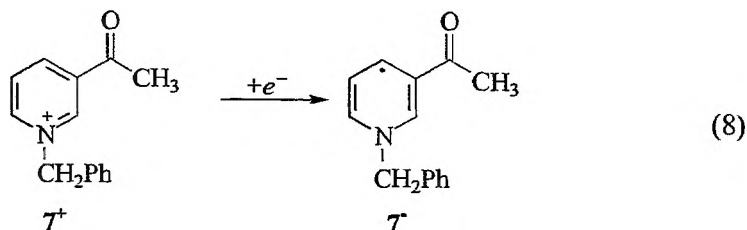
Powstanie rodnikokationu NADH lub związków modelujących jego reaktywność prowadzi więc do szybkiego odszczepienia protonu i utworzenia rodnika [25, 39–42, 76–86]. Powstający w ten sposób rodnik może podlegać reakcjom rodnikowym, np. dimeryzacji, chyba że szybciej utraci kolejny elektron, kończąc w ten sposób cykl przeniesienia anionu wodorkowego. Trzeci etap reakcji wieloetapowej jest bowiem niezwykle egzotermiczny, a akceptorem elektronu mogą być rodnikokationy o silnym powinowactwie elektronowym.

Pochodne 1,4-dihydropirydyny również łatwo odszczepiają proton po jonizacji cząsteczki. Eksperymenty wykonane metodą radiolizy impulsowej pokazały, że czas życia rodnikokationu w roztworze wodnym maleje ze wzrostem stężenia neutralnego związku, który działa jako akceptor protonu. Zanik pierwotnego rodnikokationu i związany z nim wzrost pasm absorpcji charakteryzujących rodnik i sprotonowaną cząsteczkę macierzystą wyraźnie widać w pomiarach matrycowych (rys. 4). Widmo elektronowe rodnika, składające się z wąskiego pasma przy 500 nm i szerszego bocznego pasma od strony fal krótkich, jest charakterystyczne dla wszystkich badanych związków i przypomina absorpcję rodnika akrydylowego 3^{\bullet} .



Rys. 4. Widma produktów radiolizy **6H** (A) i 1-benzyl-3-acetylo-1,4-dihydropirydyny (**7H**) (B) w 2-chlorobutanie w 77 K (a) i po relaksacji próbki (b) oraz radiolizy **7⁺** w 2-propanolu w 77 K (C)

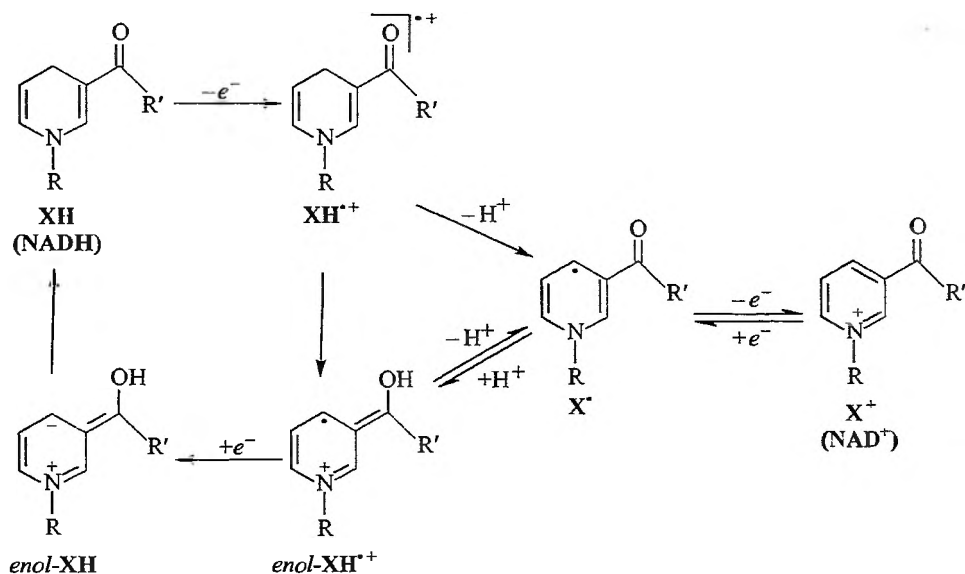
Spektroskopowa identyfikacja rodnika jest możliwa również przez redukcję odpowiedniego kationu w matrycach alkoholowych (reakcja (8)). Przykładowe widmo tak otrzymanego rodnika ilustruje rys. 4C. Oprócz długofalowego pasma absorpcji rodnik ma w widmie silniejsze pasmo poniżej 320 nm. Wyniki obliczeń metodą CASSCF/CASPT2 przypisują absorpcję w zakresie widzialnym widma przejściu elektronowemu HOMO → LUMO + 1, podczas gdy wzbudzenie HOMO → LUMO jest zbyt słabe, by mogło być zaobserwowane.



W kwaśnym środowisku rodniki powstające w reakcji (8), czyli reakcji początkującej powrotną, etapową konwersję $\text{NAD}^+ \rightarrow \text{NADH}$, mogą ulegać protonowaniu, tworząc bardziej stabilną formę enolową rodnikokationu. Nie obserwuje się natomiast tworzenia rodnikokationów formy ketonowej w wyniku protonowania rodnika (w analogach nie mających grupy karbonylowej, jak np. pochodne 10-metyloakrydanu, nie obserwuje się procesu protonowania).

2.1.4. Mechanizm etapowej transformacji $\text{NADH} \rightleftharpoons \text{NAD}^+$ i ich modelowych odpowiedników

Wyniki badań związków modelowych jednoznacznie sugerują udział dwóch tautomerycznych form rodnikokationów w etapowej (elektron–proton–elektron) transformacji $\text{NADH} \rightleftharpoons \text{NAD}^+$. W reakcji utleniania udział obu form jest możliwy, gdy wewnątrzcząsteczkowe przeniesienie atomu wodoru jest procesem szybszym niż dysocjacja rodnikokationu. Reakcja odwrotna przebiega wyłącznie z udziałem bardziej stabilnej formy enolowej, a proces reketonizacji może mieć miejsce dopiero w neutralnej cząsteczce, zamykając w ten sposób cykl reakcji przedstawionych ogólnie na schemacie 4.



Schemat 4

PODSUMOWANIE

Przedstawione mechanizmy konwersji $\text{NADH} \rightleftharpoons \text{NAD}^+$, jednoetapowego przeniesienia anionu wodorowego lub wieloetapowego przeniesienia elektron–proton–elektron występują w reakcjach termicznych z udziałem koenzymów pirydyniowych. Z punktu widzenia wydajności tych reakcji, reakcji ubocznych i z punktu widzenia „bezpieczeństwa” organizmów żywych mechanizm jednoetapowy jest znacznie korzystniejszy. Powstające w reakcji wieloetapowej rodnikowe produkty pośrednie mogą bowiem prowadzić do reakcji ubocznych, w tym tak niebezpiecznych dla komórki, jak tworzenie rodnikoanionu ponadtlenkowego. Jednakże i w przypadku reakcji wieloetapowej powstające produkty pośrednie mogą być dość silnie powiązane, nie ulegając separacji przed zakończeniem

kolejnych etapów reakcji. Zastosowanie silnych jednoelektronowych utleniaczy może prowadzić do zmiany mechanizmu jednoetapowego w wieloetapowy. Inwersja stabilności formy enolowej i ketonowej rodnikokationów NADH i jego pochodnych czyni mechanizm wieloetapowy bardziej skomplikowanym, ale energetycznie mniej wymagającym.

Pracę wykonano w ramach grantu KBN nr 3T09A/122/18.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] L. Stryer, *Biochemia*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1997.
- [2] P. Kafarski, B. Lejczak, *Chemia bioorganiczna*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1994.
- [3] K.E. Taylor, J.B. Jones, *J. Am. Chem. Soc.*, 1976, **98**, 5689.
- [4] D. Mauzerall, F.H. Westheimer, *J. Am. Chem. Soc.*, 1955, **77**, 2261.
- [5] R.H. Abeles, R.F. Hutton, F.H. Westheimer, *J. Am. Chem. Soc.*, 1957, **79**, 712.
- [6] B.W. Carlson, L.L. Miller, *J. Am. Chem. Soc.*, 1985, **107**, 479.
- [7] M.F. Powell, T.C. Bruice, *J. Am. Chem. Soc.*, 1983, **105**, 1014.
- [8] M.M. Kreevoy, I.-S.H. Lee, *J. Am. Chem. Soc.*, 1984, **106**, 2550.
- [9] D. Ostović, I.-S.H. Lee, R.M.G. Roberts, M.M. Kreevoy, *J. Org. Chem.*, 1985, **50**, 4206.
- [10] M.M. Kreevoy, D. Ostović, I.-S. H. Lee, D.A. Binder, G.W. King, *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, **110**, 524.
- [11] I.-S.H. Lee, E.H. Jeoung, M.M. Kreevoy, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 2722.
- [12] J. Bunting, *Bioorg. Chem.*, 1991, **19**, 456.
- [13] J.W. Bunting, J.L. Bolton, *Tetrahedron*, 1986, **42**, 1007.
- [14] P. van Eikeren, P. Kenney, R. Tokmakian, *J. Am. Chem. Soc.*, 1979, **101**, 1402.
- [15] W. van Gerresheim, C. Kruk, J.W. Verhoeven, *Tetrahedron Lett.*, 1982, **23**, 565.
- [16] J.J. Steffens, D.M. Chipman, *J. Am. Chem. Soc.*, 1971, **93**, 6694.
- [17] D.M. Chipman, R. Yaniv, P. van Eikeren, *J. Am. Chem. Soc.*, 1980, **102**, 3244.
- [18] M. Goto, Y. Mikata, A. Ohno, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1997, **70**, 1.
- [19] S. Yasui, A. Ohno, *Bioorg. Chem.*, 1986, **14**, 70.
- [20] M.F. Powell, T.C. Bruice, *J. Am. Chem. Soc.*, 1983, **105**, 7139.
- [21] B.W. Carlson, L.L. Miller, P. Neta, J. Grodkowski, *J. Am. Chem. Soc.*, 1984, **106**, 7233.
- [22] J.-P. Cheng, Y. Lu, X. Zhu, L. Mu, *J. Org. Chem.*, 1998, **63**, 6108.
- [23] S. Fukuzumi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1997, **70**, 1.
- [24] S. Fukuzumi, M. Ishikawa, T. Tanaka, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, 1989, 1037.
- [25] S. Fukuzumi, T. Tanaka, *NAD(P)H, NAD⁺, and analogues*, [w:] M.A. Fox, M. Chanon (red.), *Photoinduced Electron Transfer*, Elsevier, Amsterdam 1988, Part C, s. 578-635.
- [26] A. Czochralska, L. Lindqvist, *Chem. Phys. Lett.*, 1983, **101**, 297.
- [27] J. Moiroux, P.J. Elving, *J. Am. Chem. Soc.*, 1980, **102**, 6533.
- [28] T. Okamoto, A. Ohno, S. Oka, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1977, 181.
- [29] M.E. Brewster, J.J. Kaminski, Z. Gabanyi, K. Czako, A. Simay, N. Bodor, *Tetrahedron*, 1990, **46**, 319.
- [30] L.L. Miller, J.R. Valentine, *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, **110**, 3982.
- [31] M.F. Powell, J.C. Wu, T.C. Bruice, *J. Am. Chem. Soc.*, 1984, **106**, 3850.
- [32] O. Almarsson, A. Sinha, E. Gopinath, T.C. Bruice, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 7093.
- [33] A. Anne, J. Moiroux, *J. Org. Chem.*, 1990, **55**, 4608.
- [34] A. Anne, J. Moiroux, J.-M. Savéant, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 10224.

- [35] A. Anne, P. Hapiot, J. Moiroux, P. Neta, J.-M. Savéant, *J. Phys. Chem.*, 1991, **95**, 2370.
- [36] P. Hapiot, J. Moiroux, J.-M. Savéant, *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, **112**, 1337.
- [37] S. Fukuzumi, S. Mochizuki, T. Tanaka, *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, **111**, 1497.
- [38] M. Ishikawa, S. Fukuzumi, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, 1990, **86**, 3531.
- [39] U. Brühlmann, E. Hayon, *J. Am. Chem. Soc.*, 1974, **96**, 6169.
- [40] E.J. Land, A.J. Swallow, *Biochim. Biophys. Acta*, 1968, **162**, 327.
- [41] P. Neta, L.K. Patterson, *J. Phys. Chem.*, 1974, **78**, 2211.
- [42] E.M. Kosower, A. Teuerstein, H.D. Burrows, A.J. Swallow, *J. Am. Chem. Soc.*, 1978, **100**, 5185.
- [43] A. Marcinek, J. Rogowski, J. Adamus, J. Gębicki, M.S. Platz, *J. Phys. Chem.*, 1996, **100**, 13539.
- [44] J. Gębicki, A. Marcinek, J. Adamus, P. Paneth, J. Rogowski, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 691.
- [45] A. Marcinek, J. Adamus, K. Huben, J. Gębicki, T.J. Bartczak, P. Bednarek, T. Bally, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 437.
- [46] A. Marcinek, J. Rogowski, J. Adamus, J. Gębicki, P. Bednarek, T. Bally, *J. Phys. Chem. A*, 2000, **104**, 718.
- [47] A. Marcinek, J. Adamus, J. Gębicki, M.S. Platz, P. Bednarek, *J. Phys. Chem. A*, 2000, **104**, 724.
- [48] A. Marcinek, J. Zielonka, J. Adamus, J. Gębicki, M.S. Platz, *J. Phys. Chem. A*, 2001, **105**, 875.
- [49] J. Gębicki, A. Marcinek, J. Rogowski, *Radiat. Phys. Chem.*, 1992, **39**, 41.
- [50] S. Karolczak, K. Hodyr, R. Łubis, J. Kroh, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 1986, **101**, 177.
- [51] J. Gębicki, A. Marcinek, *Low-temperature pulse radiolytic studies of fast isomerization processes in radical cations*, [w:] J. Mayer (red.), *Properties and Reactions of Radiation Induced Transients. Selected Topics*, Polish Scientific Publishers PWN, Warszawa 1999, s. 129–150.
- [52] J. Gębicki, A. Marcinek, *Radical ions: Generation, characterization and reactions*, [w:] Z.B. Alfassi (red.), *General Aspects of Free Radical Chemistry*, Wiley, Chichester 1999, s. 175–208.
- [53] T. Shida, *Electronic Absorption Spectra of Radical Ions*, Elsevier, Amsterdam 1988, s. 260–261.
- [54] M.J. Aroney, G.M. Hoskins, R.J.W. Le Fevre, *J. Chem. Soc., Part B*, 1969, 980.
- [55] J.A. Gillean, D.W. Phelps, A.W. Cordes, *Acta Crystallogr.*, 1973, **B29**, 2296.
- [56] T. Schaefer, R. Sebastian, C. Beaulieu, *Can. J. Chem.*, 1991, **69**, 927.
- [57] J. Gębicki, A. Marcinek, J. Michalak, J. Rogowski, T. Bally, W. Tang, *J. Mol. Struct.*, 1992, **275**, 249.
- [58] A. Marcinek, J. Michalak, J. Rogowski, W. Tang, T. Bally, J. Gębicki, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1992, 1353.
- [59] J. Gębicki, T. Bally, *Acc. Chem. Res.*, 1997, **30**, 477.
- [60] J. Michalak, J. Gębicki, T. Bally, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1993, 1321.
- [61] J. Michalak, T. Bally, J. Gębicki, *Radiat. Phys. Chem.*, 1995, **45**, 749.
- [62] N. J. Oppenheimer, A.L. Handlon, *Mechanism of NAD-dependent enzymes*, [w:] D.S. Sigman (red.), *The Enzymes*, Academic Press, San Diego 1992, Vol. 20, s. 453–505.
- [63] Y.-D. Wu, K.N. Houk, *J. Org. Chem.*, 1993, **58**, 2043.
- [64] M. E. Brewster, E. Pop, M.-J. Huang, N. Bodor, *Heterocycles*, 1994, **37**, 1373.
- [65] A. M. P. Nicholas, D. R. Arnold, *Can. J. Chem.*, 1982, **60**, 2165.
- [66] F.G. Bordwell, M.J. Bausch, *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 2473, 1986.
- [67] F.G. Bordwell, J.-P. Cheng, M.J. Bausch, *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, **110**, 2867.
- [68] F.G. Bordwell, J.-P. Cheng, M.J. Bausch, *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, **110**, 2872.
- [69] X. Du, D.R. Arnold, R.J. Boyd, Z. Shi, *Can. J. Chem.*, 1991, **69**, 1365.
- [70] X. Zhang, F.G. Bordwell, *J. Org. Chem.*, 1992, **57**, 4163.

- [71] A. Albini, E. Fasani, N. d'Alessandro, *Coord. Chem. Rev.*, 1993, **125**, 269.
- [72] A. Albini, E. Fasani, A. Sulpizio, *J. Am. Chem. Soc.*, 1984, **106**, 3562.
- [73] F.D. Lewis, *Acc. Chem. Res.*, 1986, **19**, 401.
- [74] F.D. Lewis, J.R. Petisce, *Tetrahedron*, 1986, **42**, 6207.
- [75] A. Anne, P. Hapiot, J. Moiroux, P. Neta, J.-M. Savéant, *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, **114**, 4694.
- [76] J. Adamus, J. Rogowski, J. Michalak, P. Paneth, J. Gębicki, A. Marcinek, M. Platz, *J. Phys. Org. Chem.*, 1993, **6**, 254.
- [77] L.J. Johnston, D.F. Wong, *J. Phys. Chem.*, 1993, **97**, 1589.
- [78] M.F. Clifton, D.J. Fenic, S.M. Gasper, D.E. Falvey, M.K. Boyd, *J. Org. Chem.*, 1994, **59**, 8023.
- [79] R.E. Minto, P.K. Das, *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, **111**, 8858.
- [80] A. Samanta, K.R. Gopidas, P.K. Das, *J. Phys. Chem.*, 1993, **97**, 1583.
- [81] D. Shukla, F. de Rege, P. Wan, L.J. Johnston, *J. Phys. Chem.*, 1991, **95**, 10240.
- [82] S. Fukuzumi, Y. Tokuda, T. Kitano, T. Okamoto, J. Otera, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 8960.
- [83] A. Anne, S. Fraoua, P. Hapiot, J. Moiroux, J.-M. Savéant, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 7412.
- [84] P. Neta, *J. Phys. Chem.*, 1979, **83**, 3096.
- [85] A.T. Poulos, G.S. Hammond, M.E. Burton, *Photochem. Photobiol.*, 1981, **34**, 169.
- [86] E. M. Kosower, *Top. Curr. Chem.*, 1983, **112**, 117.

Praca wpłynęła do Redakcji 12 października 2001

ROZPOZNAWANIE ANIONÓW

ANION RECOGNITION

Kamil Wojciechowski, Zbigniew Brzózka

*Katedra Chemii Analitycznej,
Wydział Chemiczny Politechniki Warszawskiej
ul. Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa*

Abstract

Wstęp

1. Właściwości anionów
2. Rozpoznawanie anionów w układach biologicznych
 - 2.1. Błony biologiczne
 - 2.2. Transport przez błony biologiczne
3. Receptory syntetyczne
 - 3.1. Wybrane przykłady syntetycznych receptorów anionów
 - 3.2. Receptory syntetyczne wzorowane na naturalnych

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

Prof. dr hab. Zbigniew Brzózka ukończył studia chemiczne w 1977 r. na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej. Doktorat z wyróżnieniem uzyskał w 1982 r., dr hab. od 1990 r., tytuł naukowy profesora – 1998 r. Od 1977 r. jest zatrudniony w Katedrze Chemii Analitycznej Wydziału Chemicznego PW, od 1998 r. na stanowisku profesora nadzwyczajnego, od 2002 – profesor zwyczajny.

Główne zainteresowania badawcze: rozpoznawanie jonów z wykorzystaniem chemii i technologii supramolekularnej oraz zastosowanie badań podstawowych do projektowania chemicznych sensorów i miniaturowych urządzeń analitycznych oraz ich zastosowania w monitorowaniu jonów w chemii klinicznej i ochronie środowiska.

Autor ponad 100 prac oryginalnych i kilku monografii.

Dr Kamil Wojciechowski ukończył studia chemiczne w 1999 r. na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej, a w 2001 r. uzyskał doktorat z wyróżnieniem. Obecnie przebywa na długoterminowym stażu naukowym w Uniwersytecie w Genewie.

Zainteresowania naukowe: rozpoznawanie anionów, receptory i jonofory hydrofilowych anionów (fosforany, azotyny, fluorki, wodorowęglany) oraz zastosowania do monitorowania tych anionów w środowisku naturalnym i analitycznej kontroli procesowej.

Autor 11 prac oryginalnych.

ABSTRACT

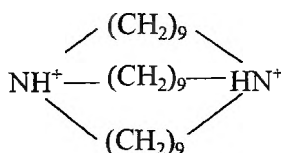
The article deals with the anion recognition. The aim of this review was to stress that the anion recognition is becoming more and more rapidly expanding field of the ion recognition and modern chemistry in general.

First, the general characteristics of the anions were given, including the size, shape, pH dependence and hydration (see Tab. 1). These parameters were compared with the respective ones for cations. The importance of the anions for the biological processes was shown on some most representative examples, like inorganic phosphate ions. The biological mechanisms of the "arginine fork" [18], and phosphate/sulfate recognition selectivity were used to show the importance of hydrogen bonding [11-17]. The synthetic cycle of the ATP exemplified the uniqueness of the rotary synthesis based on anion recognition [24]. The discovery of the mechanism of the rotary synthesis was awarded the Nobel Prize in chemistry in 1997. The biological membranes and their role in the ion recognition (binding and transportation) were briefly introduced.

The most spectacular examples of the molecular recognition were compared with the current achievements of supramolecular chemists. Starting from the pioneering work of Park and Simmons [1] to the very recent dendrimeric structures [65, 66], the anion receptors were reviewed. The authors were not trying to introduce any artificial classification of receptors, because in most of the cases at least two types of non-covalent interactions participate in the recognition process. The usefulness of this approach was discussed on the example of polyammonium receptors recognizing the anions by inseparable electrostatic and H-bonding interactions. The following groups of receptors were described: guanidinium, polyamines/polyammonium, metalloorganic (tin, boron, mercury, ferrocenium, cobaltocenium), metal complexes, porphyrines, expanded porphyrines (saphyrines), calix[n]arenes, catenane, cyclodextrine, and gold nanoparticles.

WSTĘP

W układach biologicznych rozpoznawanie anionów odgrywa co najmniej tak samo ważną rolę jak rozpoznawanie kationów, jednak liczba dostępnych syntetycznych receptorów anionów jest znacznie mniejsza niż receptorów kationów. Mimo że pierwsza publikacja dotycząca rozpoznawania anionów halogenkowych za pomocą katapinandów (ang. *catapinands*) (rys. 1) autorstwa Parka i Simmonsa [1] ukazała się zaledwie rok po pionierskiej pracy C.J. Pedersena dotyczącej eterów koronowych [2], dalszy rozwój chemii supramolekularnej anionów i kationów był nierównomierny. Z przyczyn opisanych dalej rzadko udaje się wykorzystać doświadczenia zdobyte przy badaniach rozpoznawania kationów do konstruowania receptorów anionów.



Rys. 1. Struktura pierwszego syntetycznego „receptora” anionów, katapinandu (1,11-diazabicyklo[9.9.9]nonakosanu). W kompleksie utworzonym z udziałem jonów halogenkowych anion znajduje się pomiędzy atomami wodoru

Do badania rozpoznawania molekularnego mogą być stosowane wszelkie metody analityczne pozwalające na uzyskanie informacji o strukturze badanego indywiduum, takie jak spektroskopie: IR, NMR, MS, fluorescencja, potencjometria oraz wiele innych technik. Wyniki badań rozpoznawania molekularnego znajdują coraz więcej zastosowań o rosnącym znaczeniu praktycznym. Wykraczają one znacznie poza wspomaganie syntezy organicznej, będące początkowym obszarem zastosowań chemii supramolekularnej [2].

1. WŁAŚCIWOŚCI ANIONÓW

Atwood i wsp. wypunktowali cztery najważniejsze różnice między kationami a anionami, decydujące o trudnościach w konstrukcji receptorów anionów [3]:

1. Aniony mają w porównaniu z kationami zazwyczaj większe rozmiary [4], np. promień jonu fluorkowego, jednego z najmniejszych anionów, jest porównywalny z promieniem kationu potasowego mającego cztery powłoki *s*. Miejsca wiążące w receptorach anionów muszą mieć zatem odpowiednio większe rozmiary niż w receptorach kationów.

2. W przypadku anionów notuje się wielką różnorodność kształtów, rozmiarów i ładunków. Zwiększa to wymagania geometryczne co do miejsca wiążącego receptora, ale jednocześnie może być źródłem wysokiej selektywności. Najczęściej spotykane wśród anionów kształty to: liniowy (N_3^- , CN^- , SCN^-), płaski

(CO_3^{2-} , NO_3^-), kulisty (Cl^- , F^- , Br^-), tetraedryczny (PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , ClO_4^-), a nawet oktaedryczny ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$, $\text{Co}(\text{CN})_6^{3-}$) [5].

3. W porównaniu z kationami aniony są silniej hydratowane. Wynika to głównie z możliwości tworzenia przez aniony silnych wiązań wodorowych z wodą. Wpływa to, po pierwsze, na rzeczywiste rozmiary anionów, a po drugie na utrudnione przenoszenie przez wodno-organiczną granicę faz. Model opisujący selektywność rozpoznawania w układach dwufazowych zakłada, że jest ona funkcją dwóch składowych: rozpoznawania w układzie jednofazowym i transportu przez granicę faz [6]. W tab. 1 porównano entalpie hydratacji dla wybranych anionów.

4. Wiele jonów o dużym znaczeniu biologicznym może występować w różnych formach, o stopniu protonowania zależnym od pH. Taka zależność ma często ogromne znaczenie dla ich poprawnego fizjologicznego funkcjonowania, ale może być przyczyną wielu trudności przy konstrukcji receptorów syntetycznych. Jednym z najważniejszych problemów jest protonowanie i deprotonowanie miejsc wiążących receptora. Należy zatem pamiętać o takim zaprojektowaniu receptora, aby $\text{p}K_a$ grup odpowiedzialnych za kompleksowanie anionu mieściło się w zakresie pH odpowiadającym istnieniu rozpoznawanego anionu, centra wiążące receptora znajdowały się w formie aktywnej. Jedynym ograniczeniem dla pH w przypadku kationów jest zazwyczaj ich hydroliza.

Określenie „rozpoznawanie anionów” zawiera w sobie zawsze określony cel, któremu służy utworzenie kompleksu receptor-substrat. Może być nim rozdzielanie składników mieszaniny, zmiana reaktywności chemicznej [8], stabilizowanie nietrwałych struktur (reakcje katalityczne), synteza niekowalencyjna [9] czy wreszcie generowanie informacji o utworzeniu kompleksu [10]. Ta ostatnia funkcja stanowi podstawę wykorzystania rozpoznawania anionów w chemii analitycznej. Należy jednak zwrócić uwagę na to, że pojęcie receptor jest dość szerokie. W zależności od metody analitycznej receptor musi spełniać wiele wymogów dodatkowych, dotyczących np. wartości stałych trwałości tworzonych z substratem kompleksów czy kinetyki reakcji kompleksowania. Dalej przedstawiono wybrane przykłady receptorów wykorzystujących różne rodzaje oddziaływań niekowalencyjnych. Liczba możliwych klasyfikacji receptorów jest bardzo duża, więc wybór najciekawszych receptorów z konieczności musi być subiektywny. Dlatego przedstawiony tu podział nie jest ani obiektywny, ani wyczerpujący, ma na celu jedynie porównanie dotychczasowych, najciekawszych zdaniem autorów, dokonań chemików supramolekularnych ze znanymi dotąd przykładami rozpoznawania w układach biologicznych.

2. ROZPOZNAWANIE ANIONÓW W UKŁADACH BIOLOGICZNYCH

Na wstępie części poświęconej rozpoznawaniu anionów w układach biologicznych warto podkreślić kilka najważniejszych faktów świadczących o znaczeniu tego procesu w biologii i medycynie:

- większość substratów i kofaktorów enzymatycznych to aniony,
- choroba Alzheimera może być skutkiem złego funkcjonowania białek wiążących aniony,
 - choroba genetyczna mukowiscydoza (*cystic fibrosis*) polega na rozregulowaniu tzw. kanałów chlorkowych,
 - trifosforan adenozy (ATP) i kwas dezoksyrybonukleinowy (DNA), najważniejsze przenośniki energii i informacji w przyrodzie, są polianionami,
 - nowotwory związane są z niekontrolowanymi zmianami w DNA.

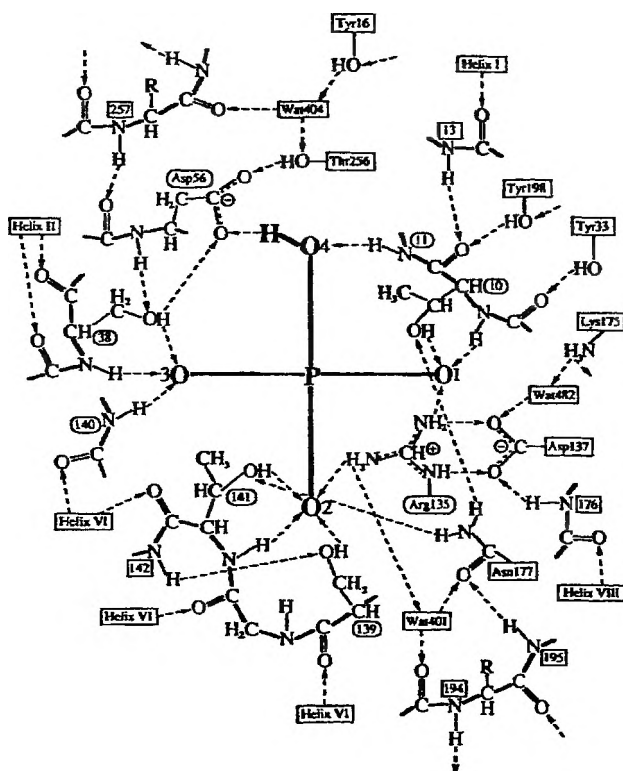
Niezwykle istotna rola, jaką odgrywają w naturze cząstki zawierające grupy fosforanowe, skłoniła wielu badaczy do zainteresowania się naturalnymi mechanizmami rozpoznawania tych jonów. Intensywnym badaniom mechanistycznym poddano szczególnie procesy selektywnego rozpoznawania jonów fosforanowych(V) i siarczanowych(VI) w układach biologicznych. Mimo takiej samej, tetraedrycznej konfiguracji i bardzo zbliżonej hydrofilowości tych jonów (tab. 1) w naturze błędy w rozpoznawaniu zdarzają się rzadko. Zespół Christiansona przeanalizował dane krystalograficzne z *Cambridge Structural Database (CSD)* dla znanych kompleksów jonów fosforanowych(V), karboksylanowych i siarczanowych(VI). Stwierdzono, że selektywność rozpoznawania jonów może po części wynikać z kierunkowości wiązań typu donor–akceptor pary elektronowej (ang. *electron pair acceptor–electron pair donor*, EPA–EPD). Donorem pary elektronów w jonie fosforanowym jest wiązanie P=O, w którym atomowi tlenu przypisuje się hybrydyzację *sp* lub pośrednią *sp-sp²*. Wobec tego wspomniana wolna para elektronowa musi znajdować się pod kątem 120–180° względem wiązania P=O. Wydawać by się mogło, że usytuowanie wolnej pary elektronowej w grupie S=O powinno być zbliżone do usytuowania takiej pary w grupie P=O. Jednak na podstawie badań zarówno teoretycznych [11], jak i praktycznych [12] stwierdzono różnice w geometrii wiązania jonu fosforanowego(V) i siarczanowego(VI) przez takie same ligandy. Obserwowano je zarówno w kompleksach stabilizowanych głównie przez wiązania typu EPA–EPD, jak i przez wiązania wodorowe.

Tabela 1. Wartości entalpii hydratacji wybranych anionów [7]

Anion	F ⁻	Cl ⁻	Br ⁻	NO ₃ ⁻	ClO ₄ ⁻	SO ₄ ²⁻	PO ₄ ³⁻
Entalpia hydratacji [kJ·mol ⁻¹]	-510	-367	-336	-312	-246	-1035	-2879

Białko wiążące jony siarczanowe(VI) (ang. *sulfate-binding protein*, SBP) z bakterii *Salmonella typhimurium* [13] kompleksuje substrat przez sieć 7 wiązań wodorowych. Miejsce wiążące białka znajduje się 0,7 nm pod jego „powierzchnią” i jest dobrze odizolowane od wpływu otoczenia, a skompleksowany jon jest całkowicie zdehydratowany. Dodatkową stabilizację ze strony oddziaływań jon–dipol przypisuje się obecności czterech α -helis z N-końcami zwróconymi w kie-

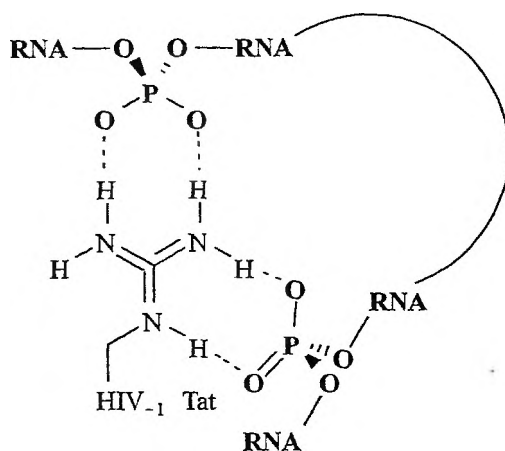
runku miejsca wiążącego. Zbliżone strukturalnie do SBP białko wiążące jony fosforanowe(V) (ang. *phosphate-binding protein*, PBP) wiąże substrat za pomocą 12 wiązań wodorowych [14]. Białko PBP składa się z pojedynczego łańcucha polipeptydowego o masie 34 400 D. W jednej cząsteczce białka znajduje się jedno miejsce wiążące jony fosforanowe, dzięki któremu białko tworzy z jonem fosforanowym kompleks o stałej trwałości około $10^6 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Głównym źródłem selektywności rozpoznawania H_2PO_4^- i HPO_4^{2-} względem SO_4^{2-} jest możliwość tworzenia dodatkowego wiązania między atomem tlenu z grupy karboksylowej białka, pochodzącej od reszty kwasu asparaginowego (Asp56 na rys. 2), a atomem wodoru anionu fosforanowego(V). W jonie siarczanowym(VI) nie ma donora wodoru, dlatego w miejscu wiążącym białka SBP nie ma aminokwasu zawierającego grupy, które są akceptorami wiązania wodorowego. Obecność wspomnianej grupy karboksylowej powoduje ponadto elektrostatyczne odpychanie jonów całkowicie zdeprotonowanych, takich jak SO_4^{2-} [15]. Kwas siarkowy(VI) jest znacznie silniejszym kwasem Brønsteda niż fosforowy(VI) i dlatego w warunkach fizjologicznych jon HSO_4^- praktycznie nie występuje. Jony monowodor- lub diwodorofosforanowe(V) są kompleksowane ok. 10^5 razy silniej niż siarczanowe(VI).



Rys. 2. Schematyczne przedstawienie struktury centrum wiążącego białka PBP z uwidocznionymi wiązaniami wodorowymi [15]

Według Chakrabartiego [16] ogólną regułą w przyrodzie jest, że oksoaniony są wiązane średnio za pomocą 7 (± 3) wiązań wodorowych, z których 5 (± 3) pochodzi od cząsteczek białek, a reszta od cząsteczek wody. Tak częste występowanie wiązań wodorowych w naturze wynika prawdopodobnie z faktu posiadania przez większość aminokwasów fragmentów mogących być zarówno donorami, jak i akceptorami wiązań wodorowych. Kim i wsp. [17] wykonali serię obliczeń *ab initio* w celu zbadania możliwości rozpoznawania kationów i anionów przez cykliczne tetra- i heksapeptydy. Stwierdzono, że grupy karboksylowe i aminowe w zależności od ładunku substratu orientują się do środka lub na zewnątrz wnętrza oligopeptydów.

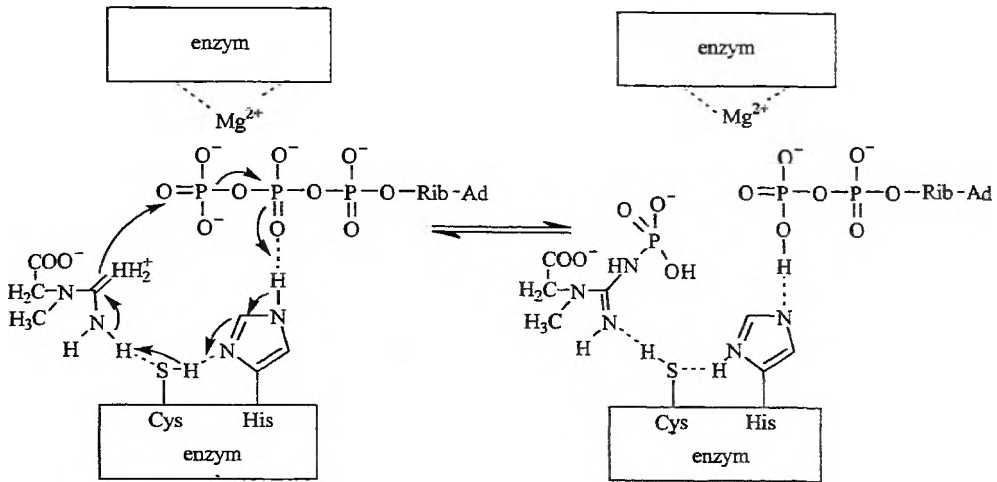
Ciekawy mechanizm zwany „widelcem argininowym” (ang. *arginine fork*) [18] wykorzystywany jest w białku *HIV-1 Tat*, które dzięki obecności grupy guanidynowej aminokwasu arginy rozpozna pętlę w strukturze RNA (rys. 3).



Rys. 3. Schematyczne przedstawienie mechanizmu rozpoznawania pętli RNA przez „widelec argininowy” (ang. *arginine fork*) białka *HIV-1 Tat*

Równie interesujące są wyniki badań nad reakcjami enzymatycznymi. Na rys. 4 przedstawiono schematycznie mechanizm reakcji przeniesienia grupy fosforanowej między difosforanem(V) adenozy (ADP) a kreatyną za pomocą kinazy kreatynowej. Jak w każdej reakcji enzymatycznej kluczowym etapem jest skompleksowanie obu substratów w najkorzystniejszym dla reakcji wzajemnym ustawieniu. Fosforan(V) adenozy jest utrzymywany w centrum wiążącym enzymu dzięki koordynacji z jonem magnezu w tym enzymie oraz wiązaniu wodorowemu między resztą imidazolową histydyny a protonem β grupy fosforanowej(V). Natomiast grupa guanidynowa kreatyny tworzy wiązanie wodorowe z grupą tiolową cysteiny.

W układach biologicznych niezwykle ważną rolę w rozpoznawaniu anionów odgrywają jony metali grup głównych, np. Ca^{2+} , Mg^{2+} . Na przykład difosfo-



Rys. 4. Schematyczne przedstawienie mechanizmu działania kinazy kreatynowej. Cys – cysteina, His – histydyna, Rib – ryboza, Ad – adenina

ran(V) guanozyny (GDP) wiązany jest przez białko *Ran* w jądrach komórek eukariotycznych dzięki sprzężeniu wiązań wodorowych oraz koordynacyjnych z jodem magnezu. Ponadto geometria koordynacyjna jonu magnezu nadaje receptorowi odpowiedni do kompleksowania kształt centrum wiążącego. Dzięki temu donory i akceptory wiązań wodorowych stają się komplementarne i tworzą wysoce selektywną sieć wiązań. W trakcie konstruowania receptorów syntetycznych rzadko jednak wykorzystuje się właściwości metali grup głównych, częściej sięgając po metale przejściowe [19].

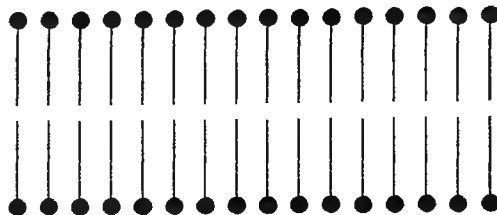
Dobrze opisano również wiele mechanizmów kooperatywnego wiązania kationów i anionów. Jednym z lepiej znanych przykładów jest rozpoznawanie jonów żelaza i węglanowych przez białko laktoferynę. Skompleksowanie jonu węglanowego znacznie poprawia trwałość powstałego kompleksu z jodem żelaza(III), dzięki wiązaniom wodorowym, ale także oddziaływaniom elektrostatycznym i EPA-EPD.

2.1. BŁONY BIOLOGICZNE

Bardzo ważnym procesem związanym z rozpoznawaniem jonów jest ich transport przez błony biologiczne. Mimo że struktura takich membran stabilizowana jest tylko przez oddziaływania niekowalencyjne, jest ona niezwykle trwałą. Błony biologiczne pełnią funkcję ochronną, a także uczestniczą w transporcie zarówno masy, jak i informacji chemicznej. Budowę błony biologicznej przedstawia schematycznie rys. 5.

Błona biologiczna składa się z podwójnej warstwy fosfolipidów, których grupy hydrofilowe zwrócone są w kierunku faz wodnych po obu stronach mem-

brany, tj. do wnętrza i na zewnątrz komórki. Struktura membrany utrzymywana jest dzięki oddziaływaniom hydrofobowym pomiędzy stykającymi się ze sobą grupami lipofilowymi. Grubość warstwy wynosi ok. 4 nm. Części hydrofilowe membrany pokryte są dodatkową warstwą białkową o grubości ok. 2 nm z każdej strony.



Rys. 5. Schematyczne przedstawienie struktury bilipidowej błony biologicznej. Fragmenty hydrofilowe („główki”) zwrócone są na zewnątrz, a lipofilowe („ogony”) do środka błony

2.2. TRANSPORT PRZEZ BŁONY BIOLOGICZNE

Dokładniejsze badania struktury błon biologicznych ujawniły ich tzw. nieciągłą i dynamiczną strukturę opisywaną modelem Singera i Nicolsona [20]. Dzięki takiej strukturze transport substratów przez błony może się odbywać według jednego z czterech głównych mechanizmów:

1. Transport pasywny, dzięki dyfuzji niewymuszonej, zgodny z gradientem aktywności substratu po obu stronach membrany. Mechanizm ten ma w praktyce znikome znaczenie.

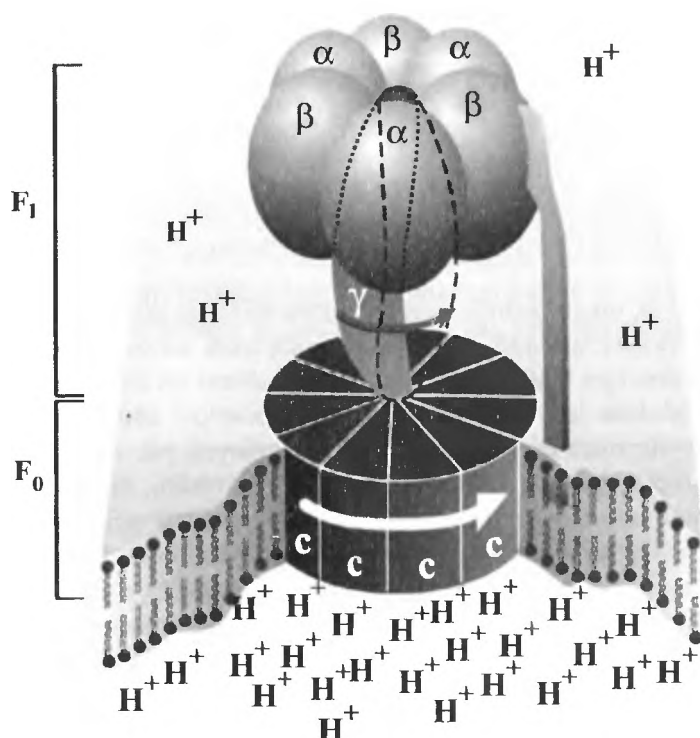
2. Przenikanie przez pory w strukturze błony. Pory powstają w miejscach nagromadzenia się polienowych związków makrocyclicznych o budowie amfifilowej. Fragmenty polienowe jako hydrofobowe skierowane są do hydrofobowej części błony, a poliolenowe – hydrofilowej. Dzięki temu pory tworzą się w kierunku prostopadłym do płaszczyzny membrany, umożliwiając transport substratów. Pory tworzyć mogą np. alametycyna [21] czy amfoterycyna [22].

3. Transport przez kanały jonowe (ang. *ion channels*). Tworzą je helisy oligopeptydów ustawione w ten sposób, by części hydrofobowe znalazły się na zewnątrz kanału, tzn. w kierunku warstwy lipidowej. Do środka kanału skierowane są natomiast grupy karbonylowe (np. β -helisa gramycydyny [23]). Transport przez kanały jonowe może być sterowany chemicznie lub elektrycznie. Przykładem transportu sterowanego elektrycznie (ang. *voltage-regulated*) jest tzw. pompa sodowo-potasowa, czyli mechanizm odpowiedzialny za utrzymywanie gradientu stężeń jonów sodu i potasu w celu spolaryzowania membrany. Dzięki takiej polaryzacji możliwe jest przekazywanie sygnałów przez neurony.

4. Transport aktywny za pomocą nośników (jonoforów, ang. *carrier* lub *ionophore*). Mogą to być zarówno peptydy lub białka transportujące – zdolne do przemieszczania się wzdłuż błony, jak i związane z powierzchnią błony. Najbar-

dziej znanym przykładem naturalnego jonoforu jest walinomycyna, nośnik jonów potasowych.

Kanały jonowe pośredniczą w większości procesów życiowych, tj. przechowywaniu i transporcie energii, przenoszeniu i przetwarzaniu informacji. Najlepszym przykładem może być tu trifosforan adenozy (ATP), który z chemicznego punktu widzenia jest jonem o ładunku 4^- . Również inne formy fosforanu(V) adenozy, które uczestniczą w procesach wymiany energii, są anionami. Z punktu widzenia rozpoznawania anionów szczególnie interesujący jest mechanizm działania enzymu syntazy ATP wspomagającego syntezę ATP^{4-} z ADP^{3-} (diwodorofosforanu(V) adenozy) i fosforanu(V) nieorganicznego, tj. fosforylację oksydacyjną (ang. *oxidative phosphorylation*). Po związaniu ADP i grupy fosforanowej(V) następuje obrót (ang. *rotary catalysis*) części receptora pod wpływem przepływu protonów (rys. 6), a następnie uwolnienie jonu ATP^{4-} . Za badanie mechanizmów syntezy i transportu ATP trzech badaczy: P.D. Boyer, J.E. Walker, J.C. Skou uhonorowano Nagrodą Nobla w 1997 r. [24].



Rys. 6. Schematyczne przedstawienie mechanizmu działania syntazy ATP. Fragment F_0 jest unieruchomiony w membranie, a fragment F_1 , w którym syntezowany jest ATP^{4-} , umieszczony jest na zewnątrz membrany i obraca się pod wpływem przepływu protonów. Obrót części γ następuje wewnątrz cylindra utworzonego przez podjednostki α i β , różniące się powinowactwem do obu form: ATP^{4-} i ADP^{3-} [25]

3. RECEPTORY SYNTETYCZNE

Poniżej wymieniono trzy, najważniejsze z punktu widzenia rozpoznawania, cechy anionów, które powinny być brane pod uwagę podczas projektowania receptorów:

a) zwykle większe rozmiary anionów w porównaniu z kationami są przyczyną większej podatności anionów na oddziaływania polaryzacyjne (szczególnie dyspersyjne). Za to ich oddziaływanie na drodze elektrostatycznej jest mniejsze niż dla kationów, ponieważ ładunek elektryczny jest zdelokalizowany na większym obszarze.

b) aniony są zwykle zasadami z punktu widzenia teorii Lewisa, choć znane są też cząstki o ładunku ujemnym pozbawione wolnej pary elektronowej, które z formalnego punktu widzenia nie są klasyfikowane jako zasady Lewisa, jak np. anion tetrafenyloboranowy, $B(C_6H_5)_4^-$ [7]. Aby receptor zawierający w swej strukturze jon metalu mógł kompleksować aniony dzięki oddziaływaniom EPA-EPD, jon ten musi mieć co najmniej jeden niezapełniony orbital zdolny do przyjęcia pary elektronowej od anionu. Określa się to mianem koordynacyjnego niewysycenia. Wolne jony metalu nie mogą być jednak stosowane jako receptory, mimo znacznego niewysycenia koordynacyjnego, ze względu na zbyt dużą liczbę miejsc wiążących i brak możliwości kontroli stechiometrii i geometrii kompleksów. Oddziaływania EPA-EPD metal-anion dla metali bloku *d* są silniejsze niż oddziaływanie elektrostatyczne.

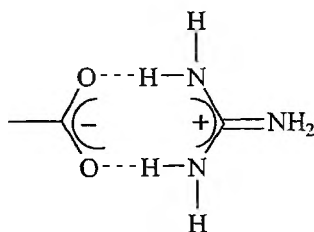
c) aniony proste mogą być jedynie akceptorami wiązania wodorowego, a aniony złożone w postaci częściowo sprotonowanej – również donorami takich wiązań.

Nie udało się dotąd zsyntezować receptora zdolnego do rozpoznawania anionów w środowisku wodnym tylko za pomocą sieci wiązań wodorowych, jak w opisanych powyżej białkach SBP czy PBP. Problem ten mógłby być rozwiązany prawdopodobnie jedynie przez stworzenie receptora zdolnego do tworzenia wnęki o specyficznych właściwościach solwatacyjnych, jak ma to miejsce w centrach wiążących enzymów czy białek. W takim wypadku, mimo że cały proces rozpoznawania następuje w wodzie, lokalna (w miejscu wiążącym) polarność środowiska jest niska. Na przykład we wspomnianych białkach SBP i PBP anion kompleksowany jest całkowicie zdehydratowany i znajduje się ok. 0,8 nm pod „powierzchnią” białka. Wiązania wodorowe są osłabiane przez obecność substancji polarnych, np. wody. Problem lokalnego otoczenia był bardzo intensywnie badany na pokrewnym przykładzie odwracalnego wiązania tlenu przez hemoglobinę i mioglobinę. Podobnie jak w przypadku wiązania anionów, nie udało się stworzyć dotąd receptora tak selektywnego i trwałego jak białka naturalne, głównie ze względu na trudności w odtworzeniu lokalnego środowiska centrum wiążącego [26]. Taki efekt osiągnąć można najlepiej poprzez tworzenie struktur wyższego rzędu, których przykłady opisano w końcowej części przeglądu.

3.1. WYBRANE PRZYKŁADY SYNTETYCZNYCH RECEPTORÓW ANIONÓW

Tylko w przypadku nielicznych par receptor–substrat udział jednego typu oddziaływania w procesie rozpoznawania jest dominujący. Istnienie określonych grup funkcyjnych może być źródłem występowania wielu różnych typów oddziaływań, np. obecność pierścieni aromatycznych powoduje zarówno oddziaływanie π - π *stacking*, jak i hydrofobowe, a dodatkowo, jeśli obecne są jony, również elektrostatyczne. Już w przypadku wspomnianego na początku tego rozdziału pierwszego poliamoniowego syntetycznego receptora anionów – katapinandu, kompleks z anionem jest stabilizowany zarówno przez oddziaływanie elektrostatyczne z ładunkiem dodatnim na protonowanym atomie azotu, jak i przez wiązanie wodorowe z tym protonem. Warto zaznaczyć, że żadne z tych oddziaływań nie może występować samodzielnie: ładunek elektryczny pojawia się dopiero po sprotonowaniu, co jest równoznaczne z wprowadzeniem donora wiązania wodorowego. Wspólną wadą receptorów poliamoniowych jest zależność selektywności rozpoznawania anionów od pH, ponieważ tylko forma protonowana może kompleksować aniony. Zwykle zakres pH protonowania grup aminowych w związkach tej klasy pokrywa się z zakresem protonowania anionów, szczególnie fosforanowych(V) i węglanowych.

Tak silnej zależności od pH środowiska nie wykazują receptory zawierające grupy guanidynowe, których pK_a wynosi znacznie powyżej 7⁽¹⁾. Ugrupowanie guanidynowe dość często występuje w związkach pochodzenia biologicznego. Wchodzi ono w skład aminokwasu argininy, pełniąc tam funkcję zarówno receptorową, jak i strukturalną (stabilizuje trzeciorzędową strukturę białek przez tworzenie wiązań z grupami karboksylowymi). Ze względu na obecność atomów wodoru rozpoznawanie może opierać się na kombinacji dwóch równoległych wiązań wodorowych i oddziaływania kulombowskiego, jak przedstawiono to na rys. 7.

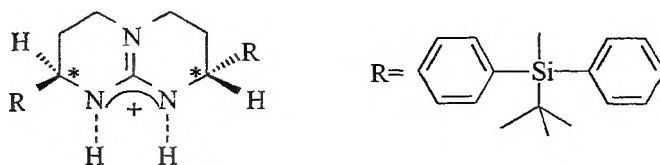


Rys. 7. Schematyczna reprezentacja równoległego wiązania między jonem guanidyniowym a karboksylanowym

Jednak oddziaływania kulombowskie nie mogą już tak silnie stabilizować kompleksu receptor–substrat, jak w kompleksach receptorów poliamoniowych, ze względu na znaczną delokalizację ładunku dodatniego w jonie guanidyniowym. Podobne donorowo-akceptorowe właściwości mają też grupy mocznikowe i tio-

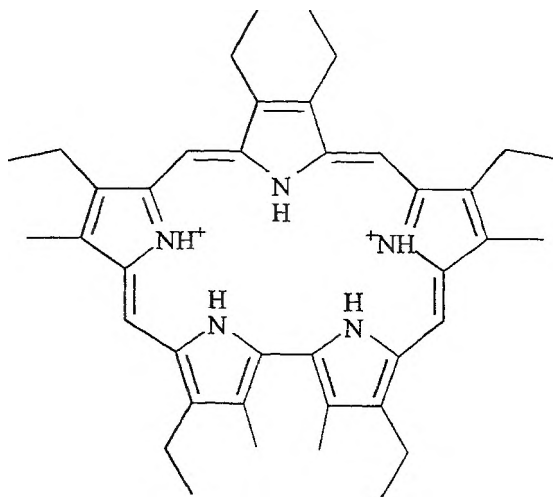
⁽¹⁾ Np. pK_a dla jonu guanidyniowego przedstawionego na rys. 7 wynosi 13,5.

mocznikowe, nie mają jednak formalnego ładunku elektrycznego. Interesujący przykład receptora guanidynowego zmodyfikowanego podstawnikami zapewniającymi dodatkową stabilizację kompleksu z anionem przedstawił Schmidtchen i wsp. [27]. Receptor przedstawiony na rys. 8 tworzy z substratem parę jonową i wiązanie wodorowe z udziałem kationu guanidyniowego. Dzięki obecności dwóch centrów asymetrii w cząsteczce receptora można go było zastosować do rozdzielania mieszanin racemicznych kwasów karboksylowych [28].



Rys. 8. Struktura „receptora” guanidynowego zawierającego dwa centra asymetrii

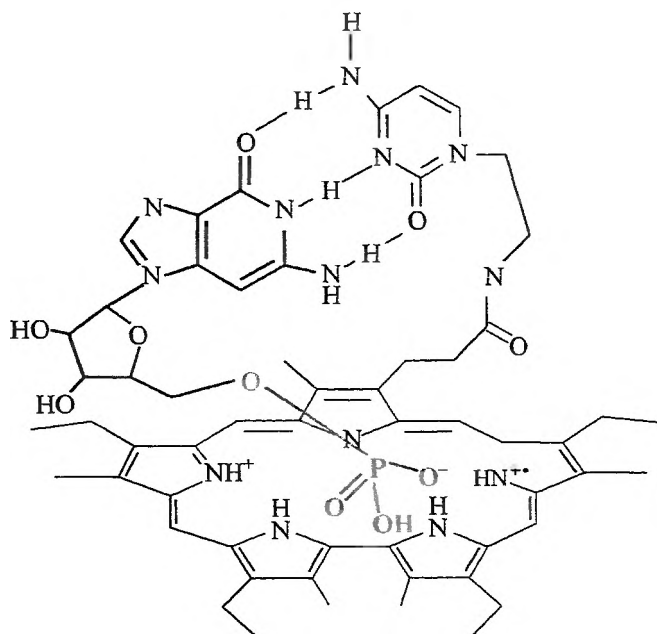
Aby otrzymać receptor naładowany dodatnio, można również poddać protonowaniu atomy azotu w pierścieniach aromatycznych, jak w przypadku „rozszerzonych” porfiryn (ang. *expanded porphyrins*), zwanych safirynami. Sessler i wsp. [29] zsyntezowali safirynę przedstawioną na rys. 9, w której wewnątrz po sprotonowaniu dwóch pirolowych atomów azotu może zostać skompleksowany anion fluorkowy.



Rys. 9. Struktura safiryny w formie dwuprotonowanej

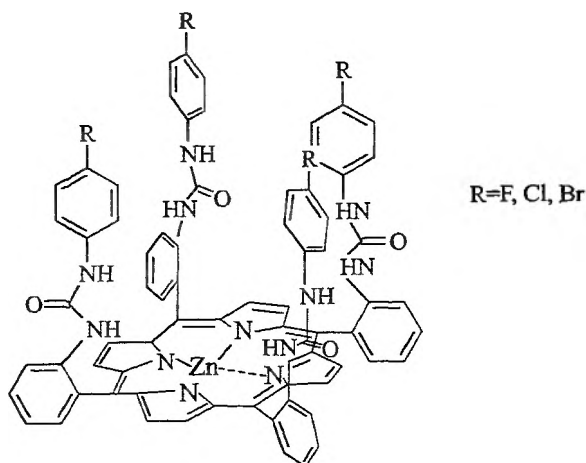
Podobnie jak poprzednio, oddziaływaniom elektrostatycznym towarzyszy tu tworzenie wiązań wodorowych, ponieważ wszystkie atomy wodoru skierowane są do środka wnęki. W wyniku modyfikacji cząsteczki safiryny Sessler i wsp.

otrzymali receptor zdolny do rozpoznawania monofosforanu(V) guanozyny (GMP) [30]. Po sprotonowaniu jednego atomu azotu receptor przyjmuje ładunek +1, który kompensowany jest przez ładunek grupy fosforanowej(V). Kompleksowanie tej grupy jest dodatkowo stabilizowane przez wiązania wodorowe z atomami wodoru protonowanych grup pirolowych. Modyfikacja polegała na kowalencyjnym (poprzez grupę amidową) dowiązaniu cytozyny, jak przedstawiono na rys. 10. W ten sposób wprowadzono do struktury receptora zarówno donory, jak i akceptory dla wiązań wodorowych, które tworzą się z purynową częścią GMP. Po kowalencyjnym dołączeniu safiryry do matrycy polimerowej Sessler i wsp. wykorzystali jej zdolności kompleksotwórcze w stosunku do nukleotydów do celów chromatograficznych [31].



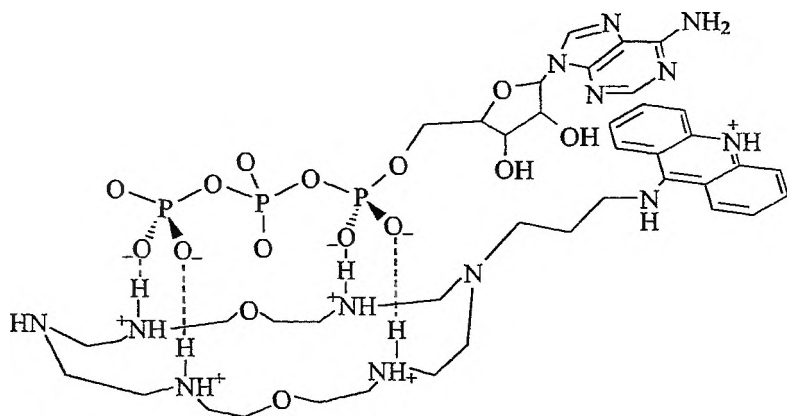
Rys. 10. Struktura kompleksu utworzonego między safiryną a monofosforanem(V) guanozyny (GMP)

Klasyczne porfiryny nawet po sprotonowaniu nie wykazują żadnych właściwości kompleksujących w stosunku do anionów, prawdopodobnie ze względu na zbyt małe rozmiary wnęki wiążącej [7]. Jednak po skompleksowaniu kationu metalu przez porfiryne może ona służyć jako receptor anionów dzięki oddziaływaniom kulombowskim i EPA-EPD z jonem metalu. Jagessar i wsp. [32] rozbudowali szkielet porfiryny cynkowej o podstawniki zawierające grupy difenylomocznikowe, zyskując w ten sposób dodatkową stabilizację kompleksu z anionami przez wiązania wodorowe (rys. 11). W ostatnich latach rośnie również zainteresowanie związkami z grupy kaliks[4]piroli. Mimo znacznego podobieństwa do porfiryn mają one zdolność kompleksowania anionów [33].



Rys. 11. Struktura porfiryny cynkowej z podstawnikami mocznikowymi w pozycjach *mezo*-

Lehn i wsp. [34] zaproponowali receptor zdolny do rozpoznawania jonów ATP^{4-} za pomocą wiązań kulombowskich oraz oddziaływań π - π *stacking*. Oddziaływania kulombowskie zachodzą między ładunkami ujemnymi grup fosforanowych(V) a protonowanymi atomami azotu, oddziaływania typu π - π *stacking* zaś są odpowiedzialne za strukturę kompleksu, prowadząc do równoległego ustawienia reszty adeninowej ATP^{4-} i grupy akrydynowej receptora (rys. 12). Kompleksowaniu towarzyszy zmiana właściwości luminescencyjnych receptora, czego prawdopodobną przyczyną jest oddziaływanie π - π *stacking*.

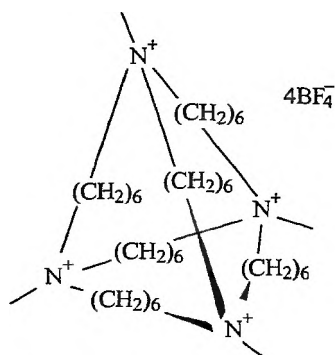


Rys. 12. Struktura kompleksu utworzonego między „receptorem” poliamoniowym a jonem ATP^{4-}

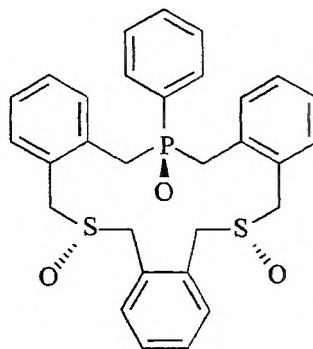
Schmidtchen [35] zsyntezował receptor zawierający czwartorzędowe atomy azotu, którego strukturę przedstawiono na rys. 13. Ładunek dodatni zlokalizowany jest na atomach azotu, choć nie są one protonowane. Skutkiem takiego rozwią-

zania jest brak możliwości tworzenia wiązań wodorowych, ale dzięki tetraedrycznej konfiguracji czwartorzędowych atomów azotu receptor ma postać zamkniętej klatki. Aniony we wnętrzu receptora mogą być stabilizowane przez kombinację oddziaływań kulombowskich, jon-dipol i hydrofobowych. Zbadano możliwości wspomagania reakcji katalitycznych przez receptory tej grupy i udowodniono, że przy dostatecznie dużych rozmiarach receptora możliwe jest jednoczesne skompleksowanie we wnętrzu klatki dwóch reagentów i przeprowadzenie reakcji podstawienia nukleofilowego [36].

Oddziaływania dipolowe mogą również decydować o selektywności względem anionów. Gellman i wsp. [37] opisali receptor przedstawiony na rys. 14, zdolny do tworzenia trzech wiązań jon-dipol między grupami S=O i P=O a anionem, np. chlorowca. Możliwe jest również wzmocnienie siły oddziaływania między receptorem a anionem przez skompleksowanie kationu amoniowego w obrębie tej samej cząsteczki. Zapewnia to dodatkową kulombowską stabilizację wiązania.



Rys. 13. Struktura „receptora” tetraalkilamoniowego

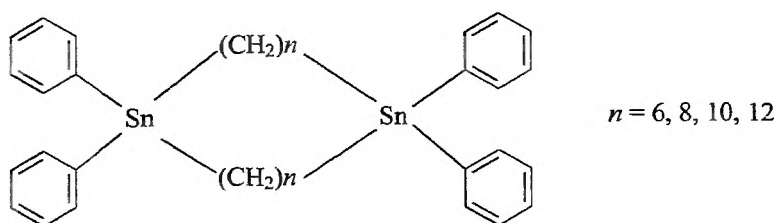


Rys. 14. Struktura „receptora” kompleksującego aniony dzięki oddziaływaniom jon-dipol

Bardzo liczną grupą receptorów są związki zawierające kowalencyjnie związany atom metalu lub skompleksowany kation tego metalu o ładunku skompensowanym przez ładunek liganda organicznego. W przypadku rozpoznawania substratów przez takie receptory dominujący jest udział oddziaływań związanych z przeniesieniem elektronu, tj. EPA-EPD. Jednak rola atomu lub jonu metalu rzadko ogranicza się tylko do tworzenia wiązań niekowalencyjnych. Atomy i jony metalu obecne w receptorach często decydują o ich strukturze geometrycznej, co ma istotne znaczenie dla trwałości kompleksu.

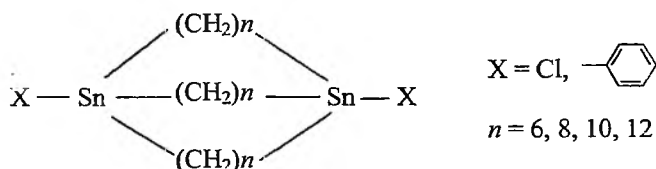
Atom metalu w związkach metaloorganicznych ma formalny ładunek elektryczny równy zero. Wynika to z kowalencyjnego charakteru wiązania z atomem węgla pochodzącym z części organicznej. Mimo istnienia takiego wiązania σ w atomie metalu pozostają niezapełnione orbitale, dzięki którym receptor tworzyć może z anionami kompleksy EPA-EPD. Metaloorganiczne analogi zwią-

ków makrocyklicznych nazywane są często „antykoronami” (ang. *anticrown*), ze względu na umiejscowienie akceptorów par elektronowych w pozycjach zajmowanych przez donory par elektronowych w eterach koronowych. Najlepiej zbadaną pod tym względem grupą receptorów są związki cynoorganiczne. Newcomb i wsp. [38] zsyntezowali cynoorganiczny analog związku makrocyklicznego przedstawiony na rys. 15.



Rys. 15. Struktura makrocyklicznego „receptora” cynoorganicznego

Dzięki obecności dwóch akceptorów par elektronowych możliwe było skompleksowanie dwóch anionów we wnętrzu struktury makrocyklicznej receptora. W tej samej grupie badawczej zsyntezowano również cynoorganiczne analogi pierwszego katapinandu [39], których struktury przedstawia rys. 16.

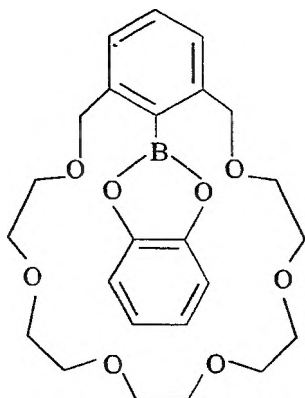


Rys. 16. Struktura makrobicyklicznego „receptora” cynoorganicznego

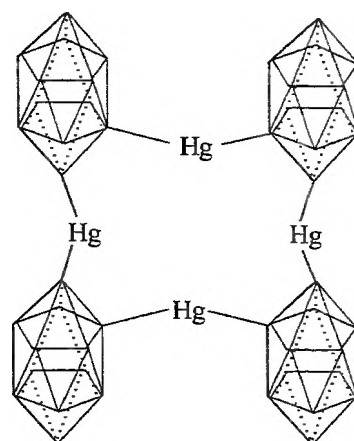
W przeciwieństwie do katapinandu otrzymany analog nie oddziałuje z anionami ani elektrostatycznie, ani poprzez wiązania wodorowe, ale dzięki wiązaniu typu EPA–EPD. Dowiedziono, że skompleksowany anion fluorkowy znajduje się we wnętrzu struktury receptora, między dwoma atomami cyny [40].

Podobnym zainteresowaniem chemików projektujących receptory anionów cieszą się związki boroorganiczne. Bor, mimo że nie jest metalem, ma korzystne własności kwasowe w ujęciu teorii Lewisa i może służyć jako akceptor pary elektronowej. Interesujący przykład połączenia oddziaływań EPA–EPD z elektrostatycznymi przedstawili Reetz i wsp. [41]. Opisany przez nich receptor składa się z eteru koronowego i części boroorganicznej (rys. 17). Po skompleksowaniu jonu K^+ przez część eterową oddziaływanie jonu F^- z pustym orbitalem boru jest wzmacniane o składową kulombowską oddziaływania jonów K^+ oraz F^- .

Szczególnie duże nadzieje wiąże się ze związkami rtęcioorganicznymi, ze względu na unikatowe właściwości atomu rtęci. Ma on w takich związkach aż dwa puste orbitale p (ustawione prostopadle do siebie i do osi wiązania), zdolne do przyjęcia dwóch par elektronowych. Interesujący dowód rozpoznawania anionów przez związki tej klasy przedstawili Hawthorne i wsp. Stwierdzili, że obecność anionów chlorkowych w trakcie syntezy merkuropkarboranu (rys. 18) jest konieczna, aby zapobiec powstawaniu produktów oligomerycznych [42]. W jednym ze stanów przejściowych reakcji muszą się zatem tworzyć kompleksy z anionami, dzięki którym cykliczny produkt tetrameryczny jest stabilny.



Rys. 17. Struktura ditopowego „receptora” boroorganicznego

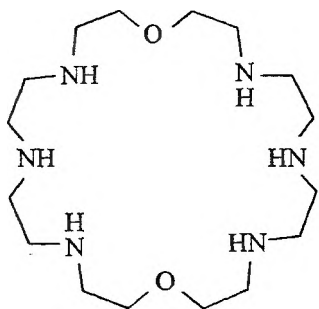


Rys. 18. Struktura „receptora” rtęcioorganicznego, [12]merkuropkarboranu-4

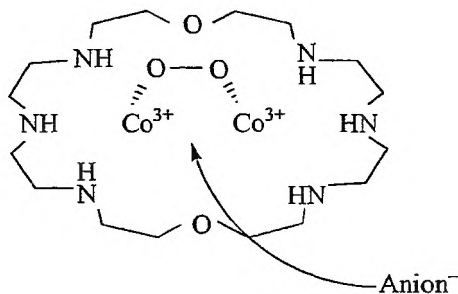
Opisane związki metaloorganiczne rzadko mają zastosowanie praktyczne ze względu na ich dużą wrażliwość na obecność tlenu i wody. W wielu przypadkach zarówno syntezy, jak i badania właściwości związków metaloorganicznych muszą być prowadzone w bardzo specyficznych warunkach. Często znacznie łatwiejszym sposobem wprowadzenia metalu do struktury receptora jest niekowalencyjne wiązanie jonu metalu z heteroatomami, głównie O, N, S. W trakcie wiązania anionów tworzą się wtedy tzw. kompleksy kaskadowe (ang. *cascade complexes*): zasada Lewisa–kwas Lewisa–zasada Lewisa. Niekowalencyjnie immobilizowany jon metalu może pełnić taką samą funkcję jak metal związany kowalencyjnie, tzn. decydować o geometrii receptora i być akceptorem pary elektronowej. Dodatkowo, ze względu na częściowo jonowy charakter wiązań z heteroatomami, metal ma zawsze częściowy ładunek dodatni. Dzięki niemu energia oddziaływania takich receptorów z anionami jest sumą składowej elektrostatycznej i typu kwas–zasada Lewisa. Podstawowym warunkiem decydującym o przydatności kompleksów kaskadowych jako receptorów jest jednak duża szybkość reakcji kompleksowania anionu.

Do konstrukcji takich receptorów mogą być użyte związki poliamoniowe, zdolne do kompleksowania kationów. W takim wypadku związanie jonu metalu ma na celu stworzenie nowego receptora, można więc traktować taki proces jako podwójne rozpoznawanie. Lehn i wsp. [43] wykorzystali w tym celu kompleks miedzi(II) z azaeterem koronowym, OBISDIEN-em. Pokazali, że taki receptor może rozpoznawać aniony imidazolanowe, które tworzą łącznik między dwoma jonami miedzi. OBISDIEN (rys. 19) w późniejszych pracach zespołu Lehna [44] stosowano jako receptor anionów również w postaci protonowanej, wykorzystując oddziaływania elektrostatyczne i wodorowe. Po sprotonowaniu wzrastał udział wiązań wodorowych w rozpoznawaniu anionów, ale jednocześnie zanikała stabilizacja wynikająca z oddziaływań EPA-EPD.

Właściwości receptorowe OBISDIEN-u wykorzystano w reakcjach utleniania skoordynowanego anionu [45]. Po skompleksowaniu dwóch jonów Co(III) powstały receptor może wiązać np. jony fosforanowe(III). Jednocześnie dzięki właściwościom kwasowym (wg Lewisa) jony kobaltu mogą przyjmować parę elektronową od cząsteczki tlenu [46]. Konsekwencją utworzenia takiego kompleksu (rys. 20) było katalityczne utlenienie anionu fosforanowego(III) do fosforanowego(V).



Rys. 19. Struktura OBISDIEN-u

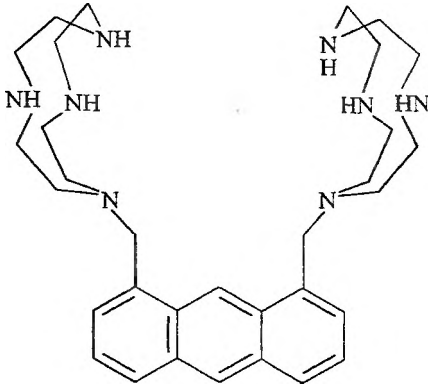


Rys. 20. Schematyczne przedstawienie mechanizmu utleniania jonów fosforanowych(III) do fosforanowych(V) przez kompleks $\text{Co}_2\text{-OBISDIEN-O}_2$

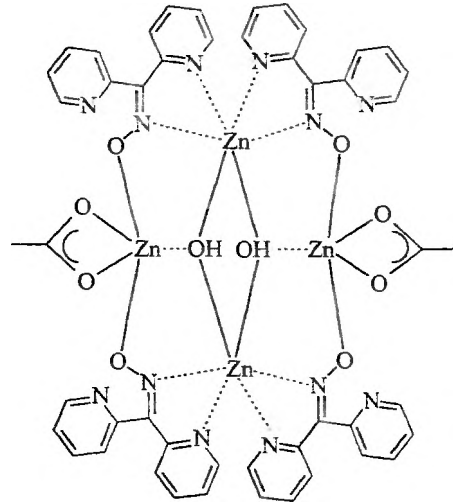
Inny przykład zastosowania receptora anionów do celów katalitycznych pokazano na rys. 21. Po skompleksowaniu dwóch jonów Co(III) receptor może kaskadowo wiązać estry fosforanowe i wspomagać ich hydrolizę [47].

W grupie Pecoraro zsyntezowano oraz zbadano właściwości receptorowe związku stanowiącego analog eteru koronowego (ang. *metallocrown*). Cztery identyczne jednostki oksymowe połączone zostały przez jony cynku(II), by stworzyć odpowiednik eteru 12-korona-4 przedstawiony na rys. 22. We wnętrzu receptora udało się skompleksować dwa jony OH^- dzięki oddziaływaniom EPA-EPD [48]. Heteroatomy znajdujące się w pobliżu centrów metalicznych mogą także tworzyć wiązania wodorowe.

Tabushi i wsp. [49] umiejętnie połączyli oddziaływania elektrostatyczne, EPA-EPD i hydrofobowe, modyfikując cząsteczkę β -cyklodekstryny za pomocą



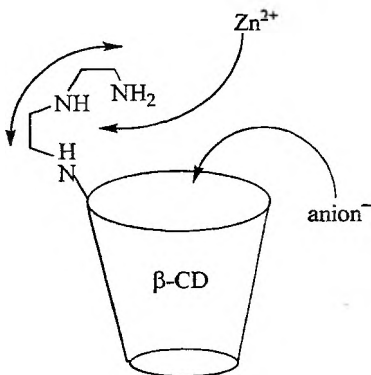
Rys. 21. Struktura „receptora” katalizującego hydrolizę estrów fosforanowych po skompleksowaniu jonów Co(III)



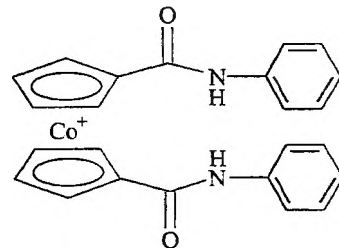
Rys. 22. Struktura „receptora” Zn-12-korona-4

triaminy. Z jej udziałem receptor mógł kompleksować jon cynku(II), który z kolei zapewniał elektrostatyczną stabilizację rozpoznawania lipofilowych anionów karboksylanowych znajdujących się w hydrofobowej wnęce cyklodekstryny. Schematycznie przebieg reakcji kompleksowania anionu przedstawiono na rys. 23.

Podobnie jak protonowane aminy, również kationy metali w kompleksach cyklopentadienylowych, np. kobaltocenie i ferrocenie, mogą oddziaływać elektrostatycznie. Beer i wsp. [50] opisali receptor zawierający grupy amidowe (zdolne do tworzenia wiązań wodorowych) oraz reszty kobaltocenowe (dzięki którym anion może być stabilizowany elektrostatycznie we wnęce receptora) (rys. 24).



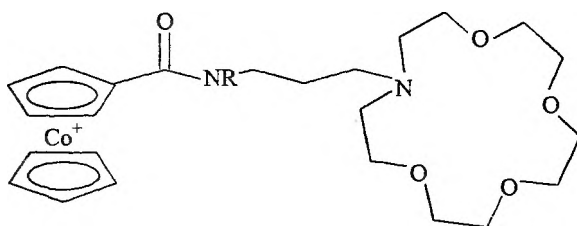
Rys. 23. Schematyczne przedstawienie mechanizmu kompleksowania anionu przez β-cyklodekstrynę modyfikowaną triaminą



Rys. 24. Struktura „receptora” kobaltocenowego z grupami amidowymi

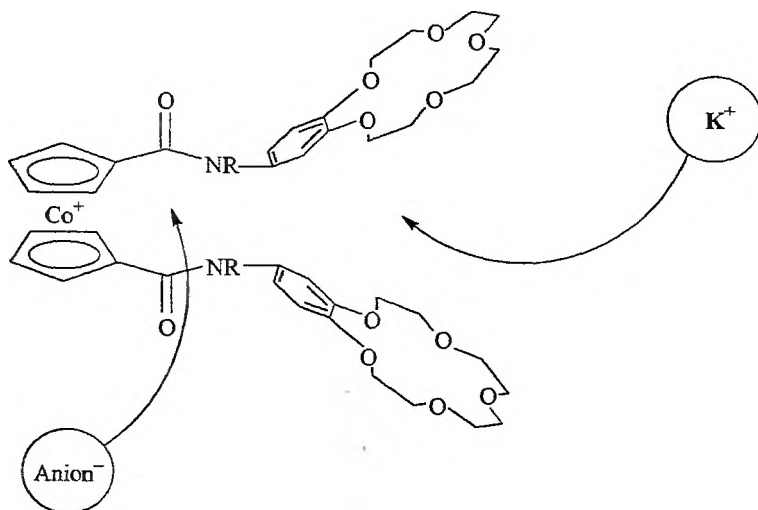
Na podstawie badań krystalograficznych autorzy sugerują również istnienie wiązań wodorowych między anionem a protonami grup cyklopentadienyłowych. Prawdopodobnie zdolność tworzenia takich wiązań jest cechą wspólną receptorów zawierających grupy metalocenowe. Stwierdzono jednak, że obecność samej grupy metalocenowej nie wystarcza do osiągnięcia zadowalającej selektywności wiązania anionów, potrzebna jest dodatkowa stabilizacja wiązania, np. ze strony grup amidowych [51].

W tej samej grupie badawczej [52] zsyntezowano receptor, w którym oprócz wspomnianych już grup amidowej i kobaltocenowej znalazł się eter azakoronowy (rys. 25). Dzięki jego obecności cząsteczka może skompleksować kation, zyskując dodatkową kulombowską stabilizację energii wiązania anionu.



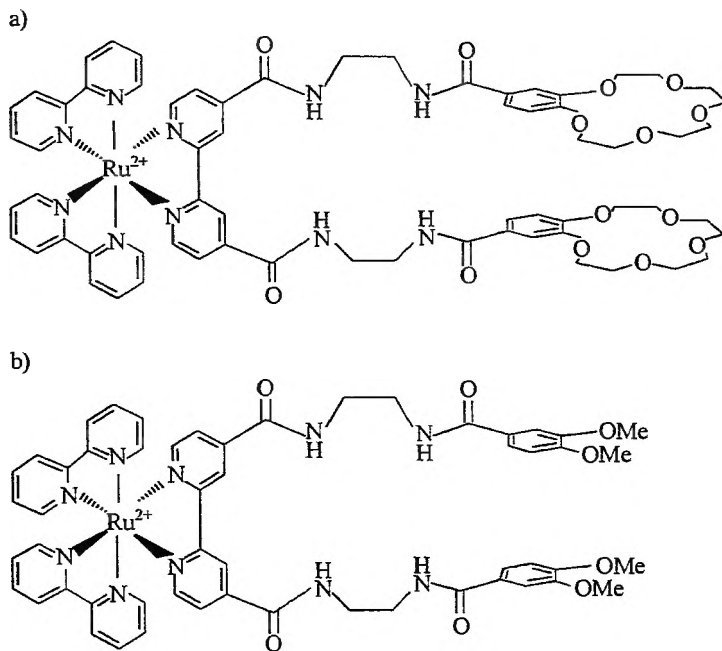
Rys. 25. Struktura „receptora” kobaltocenowego z grupami amidowymi i eterem azakoronowym

W rezultacie innego połączenia tych samych grup funkcyjnych skonstruowano przełączalny (ang. *switchable*) receptor dla anionów chlorkowych [53], którego strukturę pokazano na rys. 26.



Rys. 26. Schemat kompleksowania soli potasowej przez „receptor” kobaltocenowy z podstawnikami eterowymi

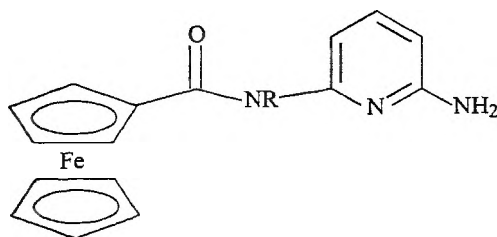
W tym przypadku jednak kation metalu kompleksowanego przez część eterową nie stabilizuje elektrostatycznie anionu, a raczej „włącza/wyłącza” możliwość jego kompleksowania. Wykorzystano tu zdolność jonów potasu do tworzenia kompleksów typu „sandwicz” (ang. *sandwich complexes*) z niektórymi eterami koronowymi. Skompleksowanie jonu potasu powoduje zbliżenie dwóch podstawników eterowych do siebie, co wprowadza przeszkody steryczne dla kompleksowania anionu w obszarze między kobaltoceniem a grupą amidową. Wyniki dalszych badań potwierdziły, że efekt ten nie występuje w przypadku użycia pochodnej pozbawionej podstawnika koronowego, której strukturę pokazano na rys. 27b. Anion w tym przypadku jest stabilizowany przez oddziaływania kulombowskie z częścią tris(bipirydylo)rutenową, a nie przez kation K^+ jak poprzednio. Stwierdzono, że dla receptora bez eteru koronowego obecność jonów potasu nie wpływa na selektywność rozpoznawania anionów. Analogiczny receptor przedstawiony na rys. 27a wykazuje zależność selektywności rozpoznawania anionów od obecności jonów potasu [54].



Rys. 27. Struktury związków tris(bipirydylo)rutenowych wykorzystanych do badania zjawiska przełączania zdolności receptorowych w stosunku do anionów: a) „receptor” z fragmentem kompleksującym K^+ , b) „receptor” niekompleksujący K^+

Beer i wsp. [55] pokazali również inny przykład sterowania właściwościami receptorowymi, oparty na reakcji redoks ferrocenu. Budowę receptora przedstawiono na rys. 28. Po utlenieniu jonu $Fe(II)$ do $Fe(III)$ cząsteczka uzyskuje ładunek dodatni i, oprócz tworzenia wiązania wodorowego przez grupę amidową, re-

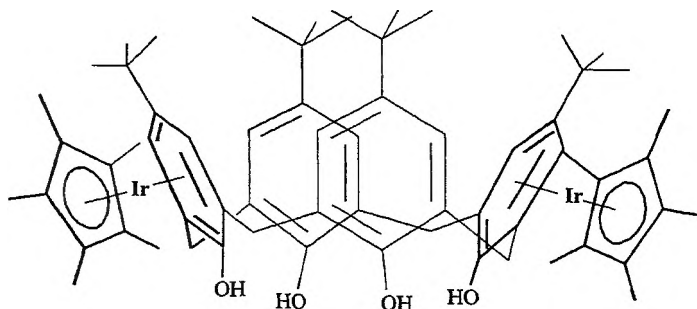
ceptor oddziałuje z substratem elektrostatycznie. Udział tej ostatniej składowej jest na tyle duży, że może zmieniać selektywność rozpoznawania anionów.



Rys. 28. Struktura przełączalnego „receptora” ferrocenowego sterowanego reakcjami redoks

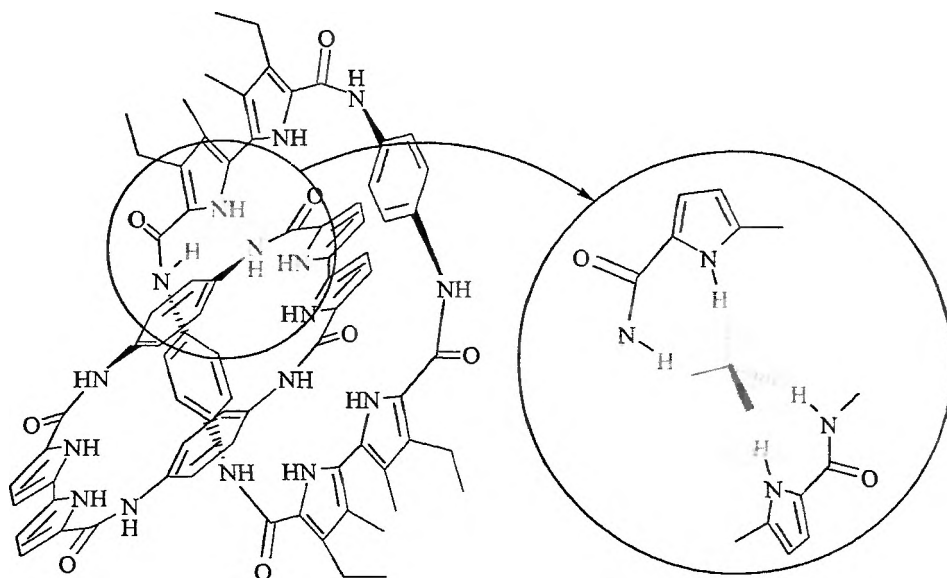
Opisano również wiele receptorów, w których jony metali, oprócz możliwości oddziaływania z anionami w drodze oddziaływań EPA–EPD lub kulombowskich, wymuszają określoną strukturę receptorów. Hydrofobowa wnęka utworzona z jednostek heteroaromatycznych połączonych w narożach jonem metalu o koordynacji płaskiej kwadratowej zapewnia stabilizację struktury kompleksu z anionem: kulombowską (zmniejszona gęstość elektronowa w części aromatycznej), hydrofobową i ewentualnie π - π *stacking* (w przypadku anionów aromatycznych). Wiele spośród takich receptorów zastosowano do budowy skomplikowanych struktur geometrycznych, które zostały przedstawione w wizjonerskich artykułach przeglądowych [np. 56]. Ich opis wykracza jednak poza ramy niniejszego przeglądu.

W grupie Atwooda i Steeda [57] zsyntezowano metalizowany (ang. *metallated*) kaliks[4]aren zdolny do kompleksowania anionów tetrafluoroboranowych we wnęce kaliksarenu dzięki umiejscowieniu punktowych ładunków dodatnich w postaci kompleksów η jon–dipol (π -*cation*) rodu i irydu. Strukturę receptora irydowego pokazano na rys. 29. Skompleksowany przez niego anion znajduje się w polu elektrycznym czterech jonów, a ponieważ znajduje się przy tym we wnęce kaliksarenu, może także oddziaływać hydrofobowo z atomami wnęki. Puddephatt i wsp. [58] stwierdzili, że właściwości nukleofilowe tak skompleksowanych anionów zmieniły się znacząco w porównaniu z wolnymi anionami.



Rys. 29. Struktury „receptorów” powstałych przez metalizowanie η jonami irydu kaliksarenów [59]

Sessler, Vögtle i wsp. [60] zaproponowali jako receptor anionów [2]katenan, w którym tetraedryczna geometria centrum wiążącego została wymuszona przez oddziaływania π - π *stacking* (rys. 30) pomiędzy ogniwami katenanu. Dzięki umiejętnemu połączeniu grup donorowych i akceptorowych uzyskano wysokie stałe trwałości tworzonych przez receptor kompleksów z anionami. Niestety, dotąd nie udało się uzyskać wydajności syntezy katenanu wyższej niż 4%.

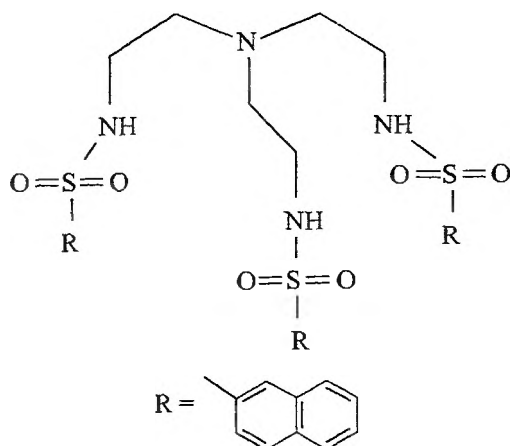


Rys. 30. Struktura [2]katenanu rozpoznającego aniony (po lewej) z uwidocznioną tetraedryczną geometrią centrum wiążącego powstającego kompleksu (po prawej)

3.2. RECEPTORY SYNTETYCZNE WZOROWANE NA NATURALNYCH

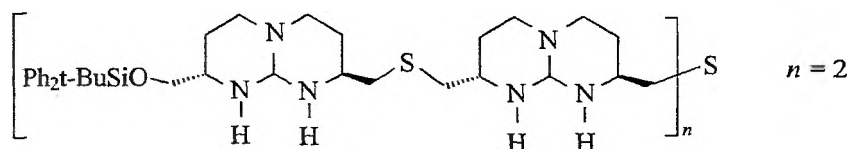
W końcowej części przeglądu przedstawione zostały najciekawsze przykłady receptorów wzorowanych na receptorach naturalnych bądź wykorzystujących motywy strukturalne znane z biomimetyki. Z przykładów tych wynika, że naśladowanie natury nie zawsze musi być bardzo pracochłonne, czasami najistotniejsza jest umiejętność obserwacji naturalnych mechanizmów rozpoznawania i właściwe wykorzystanie zgromadzonej wiedzy.

Z punktu widzenia rozpoznawania anionów szczególnie obiecujące jest zastosowanie ugrupowań sulfonamidowych [61]. Reinhoudt i wsp. [62] wykorzystali właściwości donorowo-akceptorowe receptora przedstawionego na rys. 31 do rozpoznawania anionów. Dzięki obecności pierścieni aromatycznych i oddziaływaniom typu π - π *stacking* receptor nawet w nieobecności substratu tworzy wnękę z umiejscowionymi w niej zarówno donorami, jak i akceptorami wiązań wodorowych.



Rys. 31. Struktura „receptora” sulfonamidowego

De Mendoza i wsp. zsyntezowali tetraguanidynowy receptor (rys. 32) zdolny do tworzenia podwójnej helisy wokół anionów siarczanowych(VI) [63]. Struktura helisy utrzymywana jest dzięki sieci wiązań wodorowych.

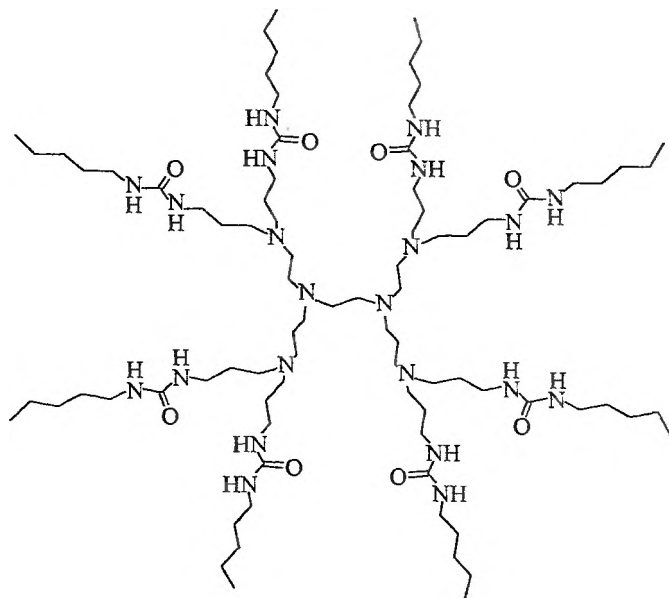


Rys. 32. Struktura „receptora” tetraguanidynowego tworzącego podwójną helisę wokół jonów siarczanowych(VI)

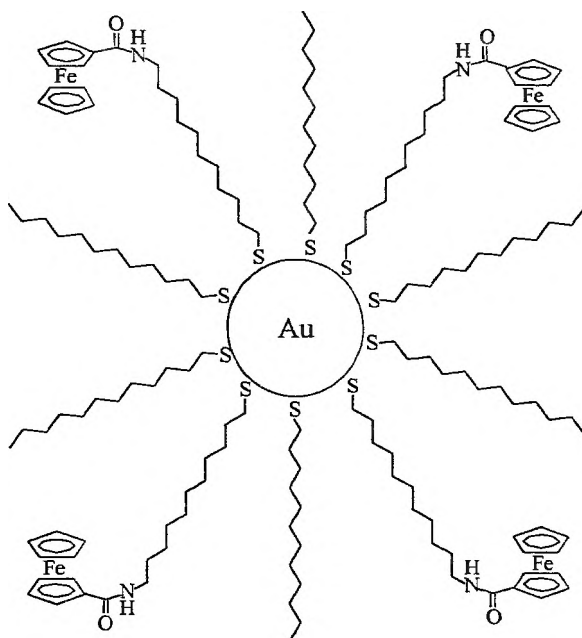
W wielu grupach prowadzone są prace nad wykorzystaniem specyficznych właściwości dendrymerów. W pobliżu środka dendrymeru, gdzie gęstość upakowania grup funkcyjnych jest największa, lokalna polarność środowiska jest inna niż w objętości roztworu. Z tego względu często dendrymery wymienia się jako potencjalne narzędzia badań biomimetycznych [64]. Vögtle, Stephan i wsp. zaproponowali lipofilowy dendrymer przedstawiony na rys. 33, zawierający grupy mocznikowe jako receptory anionów dla celów ekstrakcyjnych [65].

W zespole Astruca również prowadzone są badania nad dendrymerycznymi receptorami anionów. W gałęziach dendrymerów umieszczono grupy amido-ferrocenowe, które odgrywały rolę centrów wiążących. Selektywność rozpoznawania poszczególnych jonów zmieniała się dla kolejnych generacji dendrymeru [66]. Podobny efekt uzyskano zastępując jądro dendrymeru przez nanocząstkę złota (ang. *gold nanoparticle*). Reszty amidoferrocenowe umieszczono na końcu cząsteczki alkiloliolu tak, że na skutek samoorganizacji (ang. *self-assembly*) tworzy

się struktura pokazana na rys. 34. Podobnie jak opisany wcześniej dendrymer, agregat taki ma zdolność rozpoznawania anionów [67].

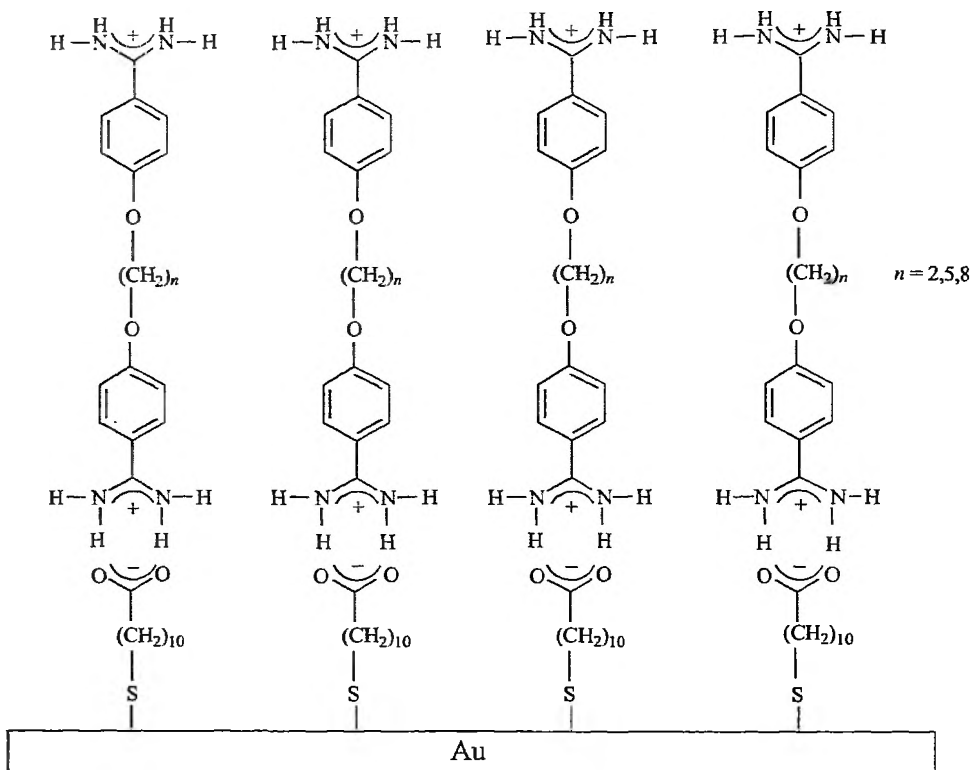


Rys. 33. Struktura „receptora” dendrymerycznego z grupami mocznikowymi



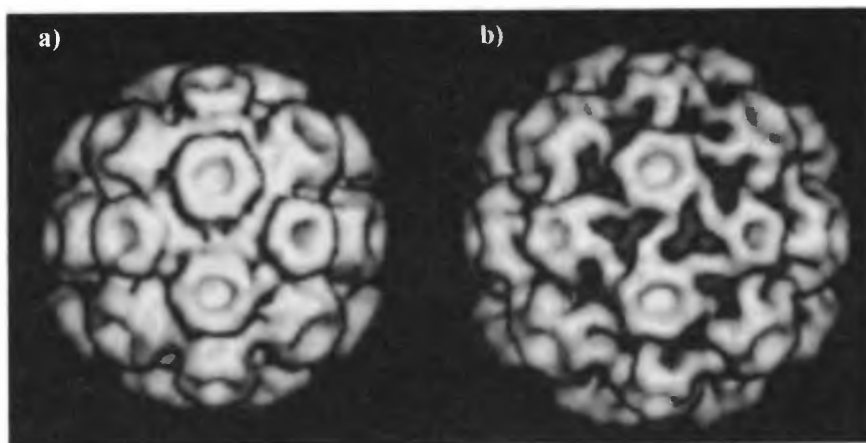
Rys. 34. Schematyczne przedstawienie struktury „receptora” zawierającego grupy amidoferrocenowe, powstałego dzięki samoorganizacji

Sellergren i wsp. [68] zastosowali samoorganizujące się monowarstwy (ang. *self-assembling monolayers*) na podłożu złotym jako receptory oligonukleotydów. Zalety stosowania monowarstw wynikają z ich podobieństwa strukturalnego do opisanych wcześniej kanałów jonowych (ang. *ion-channels*), których rola w rozpoznawaniu i transporcie anionów jest bardzo duża. Źródłem selektywności kompleksowania w proponowanych przez autorów receptorach są głównie oddziaływania kulombowskie i wodorowe (od grupy guanidynowej) oraz π - π *stacking* (rys. 35).



Rys. 35. Struktura monowarstwy bis(benzamidynowej) na złocie zastosowanej do rozpoznawania oligonukleotydów

Douglas i Young przedstawili niezwykle ciekawy przykład wykorzystania właściwości receptorowych naturalnego płaszczka białkowego wirusa fasolnika chińskiego, *cowpea chlorotic mottle virus* (CCMV), złożonego ze 180 jednostek białkowych [69]. Ma on zdolność samoorganizacji, tworząc „kapsułę” o średnicy 15 nm. W zależności od pH pory w strukturze „kapsuły” mogą się otwierać lub zamykać. Autorzy wykorzystali tę właściwość do sterowania procesem kompleksowania anionów polioksometalanowych [70]. Rys. 36 przedstawia zdjęcia mikroskopowe „kapsuły”.



Rys. 36. Zdjęcie z mikroskopu elektronowego przedstawiające płaszcz białkowy wirusa CCMV: a) w niskim pH, b) w podwyższonym pH, po otwarciu porów w strukturze [70]

PODSUMOWANIE

W niniejszym przeglądzie przedstawiono wybrane najnowsze osiągnięcia chemików supramolekularnych w coraz szybciej rozwijającej się dziedzinie rozpoznawania anionów. Porównanie finezji działania przedstawionych wybranych receptorów naturalnych i syntetycznych wciąż wypada zdecydowanie na korzyść tych pierwszych. Spore nadzieje budzi jednak fakt, że coraz częściej badacze sięgają po rozwiązania, jakie stosuje Natura, a nawet zaczynają się posługiwać jej narzędziami.

Praca była finansowana przez Komitet Badań Naukowych w ramach grantów Nr 3T09A 114 19 oraz 7 T09A 041 21.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] C.H. Park, H. Simmons, *J. Am. Chem. Soc.*, 1968, **90**, 2431.
- [2] C.J. Pedersen, *J. Am. Chem. Soc.*, 1967, **89**, 7017.
- [3] K.T. Holman, J.L. Atwood, J.W. Steed, *Advances in Supramolecular Chemistry*, Vol. 4, 287, JAI Press Inc. 1997.
- [4] H.K. Roobottom, H.B. Jenkins, J. Passmore, L. Glasser, *J. Chem. Ed.*, 1999, **76**, 1570.
- [5] B. Dietrich, *Pure Appl. Chem.*, 1993, **65**, 1457.
- [6] U.E. Spichiger-Keller, *Chemical Sensors and Biosensors for Medical and Biological Applications*, Wiley-Vch, 1998.
- [7] F.P. Schmidtchen, M. Berger, *Chem. Rev.*, 1997, **97**, 1609.
- [8] B. Dietrich, *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, Vol. 10, Ch. 12. Ed. D.N. Reinhoudt, Pergamon 1996.
- [9] L. Prins, P. Timmerman, D.N. Reinhoudt, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2001, **40**, 2382.

- [10] Np. L. Fabrizzi, M. Lichelli, G. Rabaioli, A. Taglietti, *Coord. Chem. Rev.*, 2000, **205**, 85.
- [11] G.R. Thatcher, D.R. Cameron, R. Nagelkerke, J. Schmitke, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1992, 386.
- [12] a) R.S. Alexander, Z.F. Kanyo, L.E. Chirlian, D.W. Christianson, *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, **112**, 933; b) Z.F. Kanyo, D.W. Christianson, *J. Biol. Chem.*, 1991, **266**, 4264.
- [13] J.W. Pflugrath, F.A. Quioco, *Nature*, 1985, **314**, 256.
- [14] J.W. Pflugrath, F.A. Quioco, *J. Mol. Biol.*, 1988, **200**, 163.
- [15] H. Luecke, F.A. Quioco, *Nature*, 1990, **347**, 402.
- [16] P. Chakrabarti, *J. Mol. Biol.*, 1993, **234**, 463.
- [17] K.S. Kim, C.Z. Cui, S.J. Cho, *J. Phys. Chem. B*, 1998, **102**, 461.
- [18] B.J. Calnan, B. Tidor, S. Biancalana, D. Hudson, A.D. Frankel, *Science*, 1991, **252**, 1167.
- [19] C.B. Black, H.W. Huong, J.A. Cowan, *Coord. Chem. Rev.*, 1994, **134-135**, 165.
- [20] J. Kączkowski, *Podstawy biochemii*, WNT, Warszawa 1999.
- [21] G.A. Woolley, B.A. Wallace, *J. Membr. Biol.*, 1992, **241**, 109.
- [22] J. Bolard, P. Legrand, F. Heitz, B. Cybulska, *Biochemistry*, 1991, **30**, 5707.
- [23] D.W. Urry, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1971, **16**, 41.
- [24] P.D. Boyer, J.E. Walker, J.C. Skou, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1998, **37**, 2296.
- [25] źródło: <http://www.nobel.se/chemistry/laureates/1997/press.html>
- [26] M. Momenteau, C.A. Reed, *Chem. Rev.*, 1994, **94**, 659.
- [27] G. Müller, J. Riede, F.P. Schmidtchen, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1988, **27**, 1516.
- [28] Gleich, F.P. Schmidtchen, P. Mikulcik, G. Müller, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1990, 55.
- [29] J.L. Sessler, M.J. Cyr, V. Lynch, E. McGhee, J.A. Ibers, *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, **112**, 2810.
- [30] J.L. Sessler, V. Kral, H. Furuta, *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, **114**, 8704.
- [31] J.L. Sessler, V. Kral, J.W. Genge, R.E. Thomas, B.L. Iverson, *Anal. Chem.*, 1998, **70**, 2516.
- [32] R.C. Jagessar, M.Y. Shang, W.R. Scheidt, D.H. Burns, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 11684.
- [33] np. S. Carniolo, P.A. Gale, *Chem. Commun.*, 2000, 1129.
- [34] H. Fenniri, M.W. Hosseini, J.-M. Lehn, *Helv. Chim. Acta*, 1997, **80**, 786.
- [35] F.P. Schmidtchen, *Chem. Ber.*, 1981, **114**, 597.
- [36] F.P. Schmidtchen, *J. Mol. Catal.*, 1986, **37**, 141.
- [37] P.B. Savage, S.K. Holmgren, S.H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, **116**, 4069.
- [38] M. Newcomb, A.M. Madonik, M.T. Blanda, J.K. Judice, *Organometallics*, 1987, **6**, 145.
- [39] M. Newcomb, M.T. Blanda, Y. Azuma, T.J. Delord, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1984, 1159.
- [40] M. Newcomb, J.H. Horner, M.T. Blanda, P.J. Squattrito, *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, **111**, 6294.
- [41] M.T. Reetz, C.M. Niemeyer, K. Harms, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1991, **30**, 1472.
- [42] X. Yang, C.B. Knobler, M.F. Hawthorne, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1991, **30**, 1507.
- [43] P.K. Coughlin, J.C. Dewar, S.J. Lippard, E. Watanabe, J.-M. Lehn, *J. Am. Chem. Soc.*, 1979, **101**, 265.
- [44] Dietrich, M.W. Hosseini, J.-M. Lehn, R.B. Sessions, *Helv. Chim. Acta*, 1983, **66**, 1262.
- [45] A.E. Martell, R.J. Motekaitis, *Inorg. Chem.*, 1994, **33**, 1032.
- [46] M. Momenteau, C.A. Reed, *Chem. Rev.*, 1994, **94**, 659.
- [47] D.H. Vance, A.W. Czarnik, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 12165.
- [48] A.J. Stemmler, J.W. Kampf, V.L. Pecoraro, *Inorg. Chem.*, 1995, **34**, 2271.
- [49] I. Tabushi, N. Shimizu, T. Sugimoto, M. Shiozuk, K. Yamamura, *J. Am. Chem. Soc.*, 1977, **99**, 7100.
- [50] P.D. Beer, D. Heseck, J. Hodacova, S.E. Stokes, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1992, 270.
- [51] P.D. Beer, C. Hazlewood, D. Heseck, J. Hodacova, S.E. Stokes, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1993, 1327.
- [52] P.D. Beer, A.R. Graydon, *J. Organomet. Chem.*, 1994, **466**, 241.
- [53] P.D. Beer, S.E. Stokes, *Polyhedron*, 1995, **14**, 2631.

- [54] P.D. Beer, S.W. Dent, *Chem. Commun.*, 1998, 825.
- [55] P.D. Beer, Z. Chan, A.J. Goulden, A.R. Graydon, S.E. Stokes, T. Wear, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1993, 183.
- [56] M.C. Jiménez, C. Dietrich-Buchecker, J.-P. Sauvage, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2000, **39**, 3284.
- [57] M. Staffilani, K.S.B. Hancock, J.W. Steed, K.T. Holman, J.L. Atwood, R.K. Juneja, R.S. Burkhalter, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 6324.
- [58] W. Xu, J.J. Vittal, R.J. Puddephatt, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 8362.
- [59] P.A. Gale, *Coord. Chem. Rev.*, 2000, **199**, 181.
- [60] A. Andrievsky, F. Ahuis, J.L. Sessler, F. Vögtle, D. Gudat, M. Moini, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 9712.
- [61] E. Fan, S.A. van Arman, S. Kincaid, A.D. Hamilton, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 369.
- [62] S. Valiyaveetil, J.J.F. Engbersen, W. Verboom, D.N. Reinhoudt, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1993, **32**, 900.
- [63] J. Sanchez-Quesada, C. Seel, P. Prados, J. de Mendoza, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 277.
- [64] P.J. Dandliker, F. Diederich, A. Zingg, J.-P. Gisselbrecht, M. Gross, A. Lonati, E. Sanford, *Helv. Chim. Acta*, 1997, **80**, 1773.
- [65] H. Stephan, H. Spies, B. Johannsen, L. Klein, F. Vögtle, *Chem. Commun.*, 1999, 1875.
- [66] C. Valerio, J.-L. Fillaut, J. Ruiz, J. Guittard, J.-C. Blais, D. Astruc, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 2588.
- [67] A. Labande, D. Astruc, *Chem. Commun.*, 2000, 1007.
- [68] B. Sellergren, F. Auer, T. Arnebrant, *Chem. Commun.*, 1999, 2001.
- [69] więcej informacji o wirusie CCMV można znaleźć pod internetowymi adresami:
<http://gcg.tran.wau.nl/ccmv-overview/CCMV.html>
<http://image.fs.uidaho.edu/vide/descr249.htm>
- [70] T. Douglas, M. Young, *Nature*, 1998, **393**, 152.

Praca wpłynęła do Redakcji 16 października 2001

**HYDROKSYLACJE ENZYMATYCZNE.
ZASTOSOWANIE PREPARATYWNE
I MECHANIZM REAKCJI
Z UDZIAŁEM MONOOKSYGENAZ
CYTOCHROMOWYCH P450**

ENZYMATIC HYDROXYLATIONS,
THEIR APPLICATIONS AND MECHANISM
OF THE REACTION PERFORMED
BY CYTOCHROME P450 MONOOXYGENASES

Teresa Kołek

*Katedra Chemii, Akademia Rolnicza we Wrocławiu
ul. Norwida 25, 50-375 Wrocław*

Abstract

Wstęp

Znaczenie praktyczne hydroksylacji enzymatycznych

Monooksygenazy cytochromowe P450

Budowa substratu a regioselektywność hydroksylacji

Mechanizm hydroksylacji z udziałem hydroksylaz cytochromowych P450

Piśmiennictwo cytowane

Dr hab. Teresa Kołek ukończyła studia na Wydziale Chemii Politechniki Wrocławskiej w 1967 r. Pracę doktorską obroniła w Instytucie Chemii Organicznej i Fizycznej tej Uczelni w 1975 r., a w 2000 r. uzyskała stopień doktora habilitowanego w zakresie biotechnologii. Od ukończenia studiów pracuje w Katedrze Chemii Akademii Rolniczej we Wrocławiu.

Prowadziła badania, których celem było określenie zależności między stereochemią cząsteczki substratu a przebiegiem reakcji chemicznej. Od dwudziestu lat jej zainteresowania badawcze koncentrują się na przebiegu przekształceń mikrobiologicznych substratów izoprenoidowych.

ABSTRACT

Enzymatic conversion of a carbon–hydrogen to a carbon–hydroxyl bond is a key part of the biosynthesis and oxidative metabolism in living organisms from bacteria to humans. Biocatalytic hydroxylations are also widely used in organic synthesis, especially to introduce the desired function to the site of the molecule, which is difficult to obtain by chemical methods.

Biocatalytic hydroxylations are most often performed by cytochrome P450-dependent monooxygenases. In a catalytic cycle, one oxygen atom from oxygen molecule is incorporated into water and the other is incorporated into the substrate.

Cytochrome P450 is known to catalyze hydroxylations, epoxidations, N-, S-, and O-oxidations, dealkylation, and dehalogenations.

The mechanism of the hydroxylation reaction has been explored in the context of synthetic applications, selection of the substrate, and enzyme–substrate interaction.

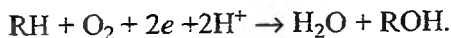
Models involving defined spatial relationships between the mode of substrate–enzyme binding and hydroxylation sites have rationalized the regio- and stereochemistry of hydroxylation.

Many of the steps in sequence of the oxidation reactions are well characterized, but the identity of the final oxidant and the reaction mechanism are still not well understood.

Recent developments in the area of biohydroxylation have been focused on the use of new biocatalysts and substrates for C–H activation, the use of recombinant strains of yeast and bacteria expressing desired hydroxylase enzymes.

WSTĘP

Hydroksylacja enzymatyczna jest wieloetapową reakcją, którą schematycznie przedstawia równanie



W wyniku działania enzymów z grupy monoooksygenaz, katalizujących tę reakcję, jeden atom dwuatomowej cząsteczki tlenu jest wiązany w cząsteczkę wody, a drugi wbudowywany do hydroksylovanego substratu. Z monoooksygenazą współdziała zazwyczaj drugi enzym dostarczający równoważników redukujących.

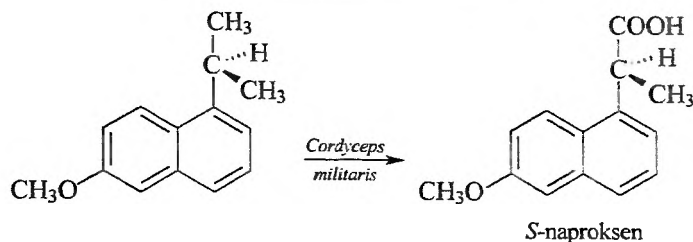
Reakcje enzymatycznej hydroksylacji odgrywają ważną rolę w organizmach żywych w procesach biosyntezy (np. podczas przekształcenia cholesterolu do glukokortykoidów i hormonów płciowych [1]), w procesach biodegradacji oraz są jedną z głównych dróg metabolizmu ksenobiotyków. Wiele z nich usuwanych jest z organizmu w postaci bardziej polarnych hydroksypochodnych bądź ich koniugatów [2]. Enzymy hydroksylujące biorą więc udział w procesach detoksykacji, chociaż niekiedy produkty hydroksylacji wykazują wyższą toksyczność niż odpowiednie substraty.

Właściwości katalityczne enzymów hydroksylujących są od dawna wykorzystywane w biotransformacjach. *Biotransformacje to katalizowane przez enzymy reakcje chemiczne, w wyniku których następuje przekształcenie określonego fragmentu substratu.* Jako źródła biokatalizatorów stosowane są drobnoustroje, rośliny wyższe, bardzo rzadko ssaki.

Znaczenie syntetyczne enzymatycznych hydroksylacji polega głównie na tym, że umożliwiają one otrzymanie produktów niedostępnych lub trudno dostępnych w klasycznej syntezie chemicznej. Najważniejsze jest tu regio- i stereospecyficzne (w tym enancjosecypiczne) działanie biokatalizatorów, ich zdolność wprowadzenia grupy funkcyjnej w nieaktywowaną pozycję substratu, a także łagodne warunki, w których przebiegają te reakcje. Wykorzystywane początkowo głównie do otrzymania leków reakcje tego typu są obecnie coraz powszechniej stosowane, m.in. do otrzymywania związków stosowanych w agrotechnice. Poniżej podano przykłady przekształceń ilustrujące praktyczne znaczenie enzymatycznych hydroksylacji.

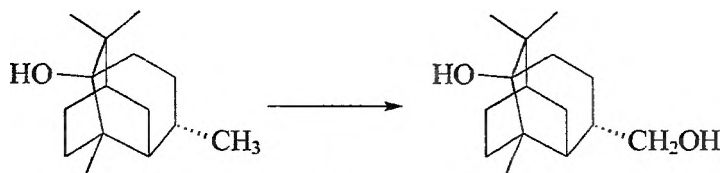
ZNACZENIE PRAKTYCZNE HYDROKSYLACJI ENZYMATYCZNYCH

Znany niesteroidowy lek o działaniu przeciwzapalnym (*S*)-naproksen może być uzyskany z prochiralnego substratu, w wyniku enancjoselektywnego utlenienia (*S*)-enancjotopowej grupy metylowej przez szczep *Cordyceps militaris* (schemat 1). Czystość optyczna otrzymanego produktu wynosi 99,5% [3].



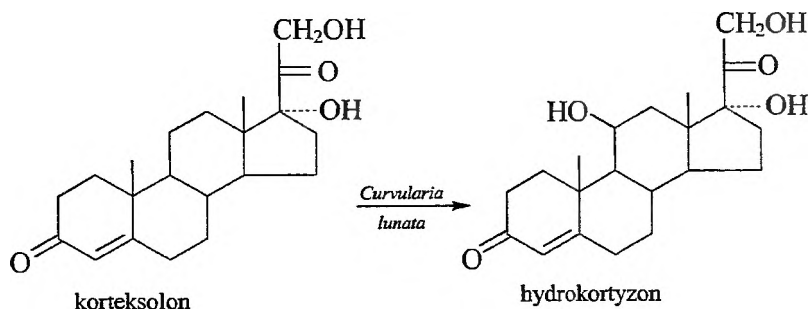
Schemat 1

Hydroksylacja grupy metylowej pacyzolułu przez enzymy wątrobowe psa lub królika prowadzi do otrzymania z 70% wydajnością cennego półproduktu dla przemysłu perfumeryjnego (schemat 2), podczas gdy w opracowanych syntezach chemicznych nie udało się uzyskać wydajności przekraczającej 6% [4].



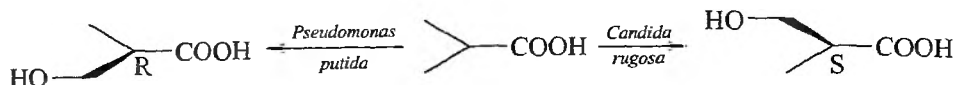
Schemat 2

Najważniejsza ze względu na znaczenie terapeutyczne i ekonomiczne jest nadal mikrobiologiczna hydroksylacja steroidów, która chronologicznie była jedną z pierwszych reakcji biotransformacji zastosowanych w praktyce [5]. Zachodzące w kulturze *Curvularia lunata* przekształcenie korteksolonu do hydrokortyzonu jest przykładem selektywnego wprowadzenia grupy funkcyjnej w nieaktywowaną pozycję substratu (schemat 3). Dzięki zastosowaniu biokatalizatora (zamiast 37-etapowej syntezy) kilkudziesięciokrotnie zmniejszyły się koszty produkcji hydrokortyzonu i w podobnym stopniu zwiększyła się ilość związku otrzymywanego z dostępnej bazy surowcowej, co pozwoliło na powszechne terapeutyczne zastosowanie hydrokortyzonu.



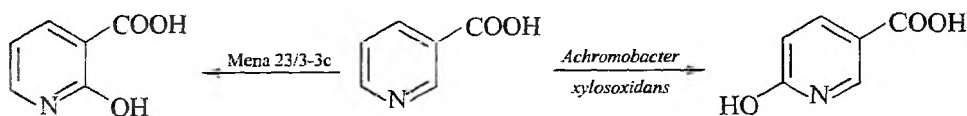
Schemat 3

Utlenianie kwasu izomasłowego przedstawione na schemacie 4 ilustruje znaczenie enancjoselektywnego działania enzymu. Oba enancjomery kwasu β -hydroksyizomasłowego mają zastosowanie jako „chiralne bloczki” w syntezie witamin (α -tokoferol), związków zapachowych i leków [6, 7].



Schemat 4

Regioselektywność hydroksylacji enzymatycznych wykorzystywana jest do otrzymywania 2- i 6-hydroksypochodnych kwasu nikotynowego. Reakcje te zachodzą z tak dobrą wydajnością, że możliwe jest wykorzystanie otrzymanych związków jako półproduktów nie tylko w farmacji, lecz również w agrotechnice [8, 9] (schemat 5).



Schemat 5

Otrzymywanie z dobrą wydajnością kwasu β -hydroksy- β -metylomasłowego (schemat 6), w wyniku przekształcenia kwasu β -metylomasłowego przez szczep *Galactomyces reessii* (w roztworach o stężeniu substratu 20g/l) [10], jest konkurencyjne wobec metody chemicznej wymagającej stosowania podchlorynu. Kwas β -hydroksy- β -metylomasłowy syntezowany jest w organizmach ssaków i roślin z leucyny. Jego działanie biologiczne ma pewne podobieństwa do witamin, m.in. łagodzi skutki stresu związanego z wysiłkiem fizycznym, urazami, powoduje u osób uprawiających ćwiczenia fizyczne szybszy wzrost masy mięśni i wspomaga układ odpornościowy.

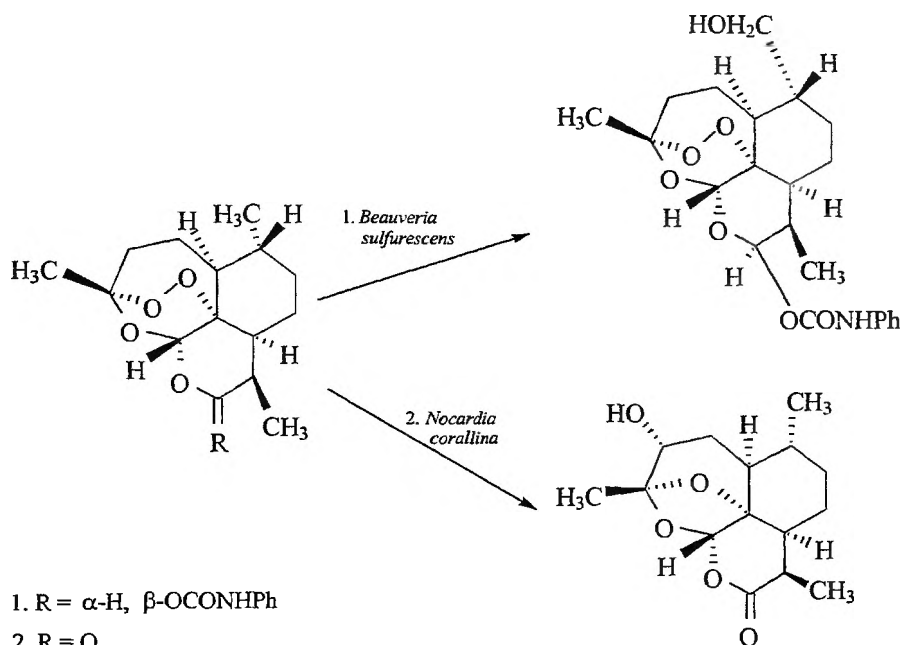


Schemat 6

Otrzymywanie hydroksypochodnych kwasu nikotynowego czy β -metylomasłowego w procesie biotransformacji jest konkurencyjne wobec klasycznych syntez, nie tylko ze względu na wyższą wydajność produktów, lecz również ze

względu na ochronę środowiska. Niekorzystny wpływ na środowisko mają zarówno stosowane w chemicznej syntezie odczynniki, jak i powstające z nich odpady oraz produkty uboczne.

Po inkubacji w kulturze szczepu *Beauveria sulfurescens* artemisininu (składnika rośliny leczniczej *Artemisia annua* o aktywności antymalarycznej) otrzymano hydroksypochodną, w której zachowane zostało nietrwałe ugrupowanie nadtlenkowe (schemat 7) [11]. Jednakże nawet w warunkach procesu biotransformacji ugrupowanie to często ulega dekompozycji [12].

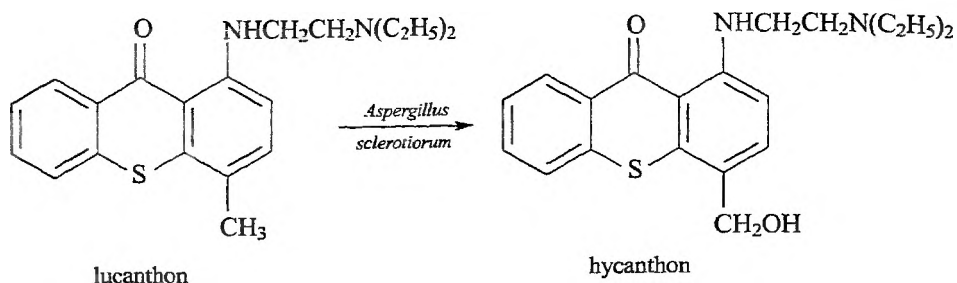


Schemat 7

Zainteresowanie reakcjami biohydroksylacji wynika również z ich udziału w metabolizmie prowadzącym do dezaktywacji, a niekiedy wzrostu aktywności leku.

Badania nad działaniem lucanthonu, leku stosowanego w terapii motylicy wątrobowej, wskazywały, że za aktywność terapeutyczną odpowiedzialny jest jego metabolit. Nie izolowano jednak aktywnego metabolitu z moczu zwierząt, którym wcześniej podawano lek. W wyniku transformacji przez szczep *Aspergillus sclerotiorum* (schemat 8) otrzymano hycanthon – metabolit wykazujący 10-krotnie wyższą aktywność terapeutyczną niż lucanthon [13] (schemat 8).

Hycanthonu nie identyfikowano u ssaków, ponieważ jest nietrwały w środowisku kwaśnym. Kolejne, prowadzone w odpowiednich warunkach doświadczenia wykazały obecność tego związku w moczu ssaków, którym uprzednio podano lek.

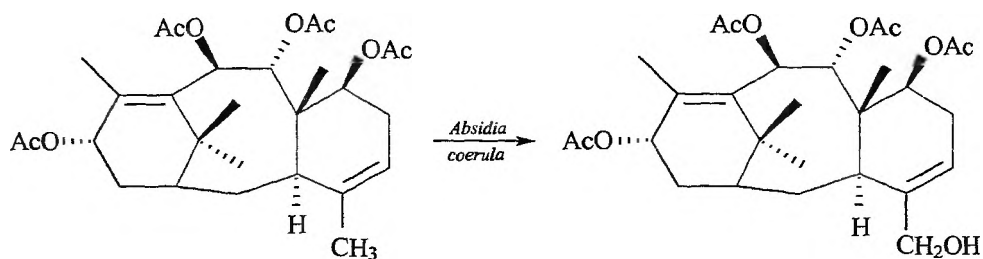


Schemat 8

Ustalenie struktury i oznaczenie aktywności biologicznej hycanthonu pozwoliło również na wyjaśnienie, dlaczego strukturalnie podobne do lucanthonu związki bez grupy metylowej przy C-4 nie wykazywały aktywności biologicznej.

W wyniku wprowadzenia grupy hydroksylowej do cząsteczki naturalnego produktu otrzymuje się niekiedy pochodne o wyższej bądź zmienionej aktywności terapeutycznej. W tym celu prowadzone są badania nad przekształceniami taksanu w kulturach grzybów strzępkowych charakteryzujących się zdolnością hydroksylującą [14].

Mikrobiologiczne hydroksylacje wykorzystywane są również w badaniach nad określeniem szlaku biosyntezy leków pochodzenia naturalnego, co ma znaczenie dla opracowania wydajnych metod pozyskania tych związków. Schemat 9 przedstawia wynik doświadczeń transformacji prekursora taksolu w kulturze szczepu *Absidia coerulea* [15].

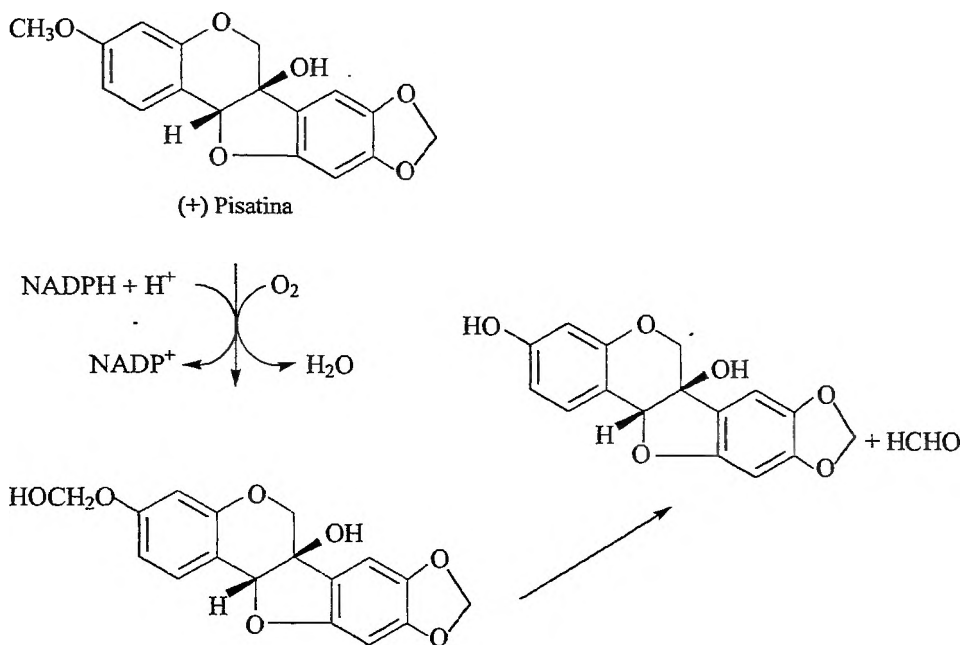


Schemat 9

Reakcje enzymatycznej hydroksylacji odgrywają ważną rolę w oddziaływaniach ekosystemowych. Wyjaśnienie, dlaczego niektóre szczepy tego samego gatunku różnią się patogennością wobec tego samego gospodarza wykazały znaczenie aktywności monoooksygenazy P450 dla rozwoju mikroorganizmu w środowisku naturalnym [16] (schemat 10). *Nectria haematococca* (płciowa forma grzyba *Fusarium solani*) jest patogenem m.in. groszku ogrodowego. Stwierdzono, że w przeciwieństwie do innych niepatogennych szczepów tego gatunku fitoaleksy-

na-pisatina indukuje u *N. haematococca* syntezę cytochromowej oksygenazy, zdolnej do hydroksylacji CH_3O -metylowej grupy pisatiny (schemat 10).

Powstająca hydroksypochodna ulega kolejnej przemianie do fenolu, który jest stosunkowo mało toksyczny wobec grzybów.



Schemat 10

MONOOKSYGENAZY CYTOCHROMOWE P450

Enzymatyczne hydroksylacje najczęściej katalizowane są przez monooksygenazy cytochromowe P450. Systematyczne badania enzymów tej grupy rozpoczęły się pod koniec lat 50, kiedy zidentyfikowano w mikrosomach wątrobowych szczura i świni pigment, którego zredukowana forma w obecności tlenu węgla charakteryzowała się maksimum absorpcji przy 450 nm [17].

Stwierdzono obecność enzymów z maksimum absorpcji przy 450 nm we wszystkich tkankach ssaków (najwięcej w wątrobie, nerkach, płucach, gruczołach dokrewnych), w owadach, grzybach, bakteriach i w roślinach. Oprócz hydroksylacji katalizują one epoksydację, S-, N-, O-utlenienie i są odpowiedzialne za liczne procesy dealkilacji i dehalogenacji [18]. Równoległe z rozpoznaniem reakcji katalizowanych przez monooksygenazy cytochromowe P450 prowadzono badania nad określeniem ich budowy, poznaniem mechanizmu działania i specyficzności substratowej enzymu.

Chociaż monoooksygenazy cytochromowe P450 są powszechnie spotykane, a ich zdolności katalityczne od dawna wykorzystywano w biotransformacjach na skalę przemysłową, wciąż nie są do końca poznane. Ustalenie mechanizmu reakcji hydroksylacji i struktury katalizujących je enzymów jest trudne, ponieważ przeważająca część enzymów związana jest z błonami komórkowymi, co utrudnia ich izolowanie w warunkach, które pozwalają równocześnie na zachowanie aktywności enzymatycznej [19].

Najwięcej informacji o monoooksygenazach P450 zgromadzono w badaniach nad rozpuszczalną bakteryjną hydroksylazą P450_{cam} z *Pseudomonas putida*. Katalizuje ona selektywną 5-egzo hydroksylację D-kamfory – swoistego dla niej substratu. Reakcja ta jest pierwszym etapem asymilacji D-kamfory jako źródła węgla przez wymieniony szczep.

Rozpuszczalność jest ważną właściwością hydroksylazy P450_{cam}, ponieważ umożliwia uzyskanie krystalicznej formy enzymu, a to pozwala na zastosowanie metod rentgenograficznych do określenia jego budowy przestrzennej [20].

Poznanie struktur przestrzennych: enzymu, jego kieszeni substratowej, naturalnego kompleksu enzym–substrat (D-kamfora), kompleksu enzym–substrat z pochodnymi kamfory, a także wyniki badań przekształceń kamfory i jej pochodnych dostarczyły informacji o „zasadach działania” tej hydroksylazy [21].

Dla regio- i stereoselektywności hydroksylacji D-kamfory istotne znaczenie ma wiązanie substratu wiązaniem wodorowym, które tworzy grupa karbonylowa substratu z grupą hydroksylową tyrozyny 96, a także oddziaływania hydrofobowe cząsteczki substratu z resztami aminokwasów w otoczeniu centrum aktywności enzymu. Wymienione czynniki utrzymują cząsteczkę substratu w takim położeniu, że 5-egzo atom wodoru znajduje się najbliżej tlenu $[Fe=O]^{+3}$. Rolę wiązania wodorowego, między substratem a grupą hydroksylową w łańcuchu aminokwasu obecnego w kieszeni substratowej, dla selektywności hydroksylacji wykazały wyniki przekształceń D-kamfory przez mutant P450_{cam}, w którym tyrozyna 96 została zastąpiona przez fenyloalaninę. W transformacji D-kamfory przez zmutowany enzym obok 5-egzo-hydroksy-D-kamfory jako głównego produktu powstawały również C₃-, C₆- i C₉-hydroksypochodne [22].

Cytochromy P450 ssaków, najwcześniej rozpoznana grupa tych enzymów, były intensywnie badane ze względu na ich rolę w biosyntezie [23] oraz w metabolizmie naturalnych i ksenobiotycznych związków [24]. Z powodu trudności, jakie napotykają próby izolowania i otrzymania krystalicznej postaci hydroksylaz P450 ssaków, nie jest dotychczas znana budowa przestrzenna żadnego enzymu tej grupy.

Na podstawie sekwencji kodujących je nukleotydów została określona pierwszorzędowa struktura wielu hydroksylaz P450 ssaków [25]. Zauważono, że prawdopodobne, drugorzędowe struktury cytochromów P450 ssaków (opracowane na podstawie znanej sekwencji aminokwasów) wykazują duże podobieństwa do bakteryjnego cytochromu z *P. putida* pod względem liczby helis α i procentowego udziału aminokwasów w tych strukturach, jak i zawartości struktur β -harmonijkowych [26].

Chociaż nie jest znana budowa przestrzenna cytochromów P450 ssaków, sporo informacji o zależnościach między selektywnością substratową, regiospecyficznością działania enzymu i wykazywaną aktywnością enzymatyczną uzyskano na podstawie wyników przekształceń substratów steroidowych przez naturalne i mutowane enzymy tej grupy [27]. Wykorzystanie przestrzennej budowy P450_{cam} jako modelu dla cytochromowych hydroksylaz P450 ssaków pozwoliło na wyjaśnienie niektórych różnic właściwości katalitycznych naturalnych enzymów i ich mutantów.

Zgromadzone dotychczas informacje o właściwościach katalitycznych naturalnych i zmutowanych hydroksylaz ssaków wskazują, że aminokwasy o kluczowym znaczeniu dla katalitycznych właściwości enzymu występują w różnych cytochromach P450 ssaków w podobnych położeniach.

Stwierdzenie obecności, a zwłaszcza izolowanie i oczyszczanie mikrobiologicznych monooksygenaz cytochromowych nastęrczało wiele trudności związanych z małą zawartością enzymu w komórce i skłonnością do odszczepiania komponentu hemowego podczas oczyszczania. W pierwszych doświadczeniach, których celem była identyfikacja obecności cytochromu P450 w grzybach zdolnych do hydroksylacji steroidów, nie uzyskiwano pozytywnych wyników [28].

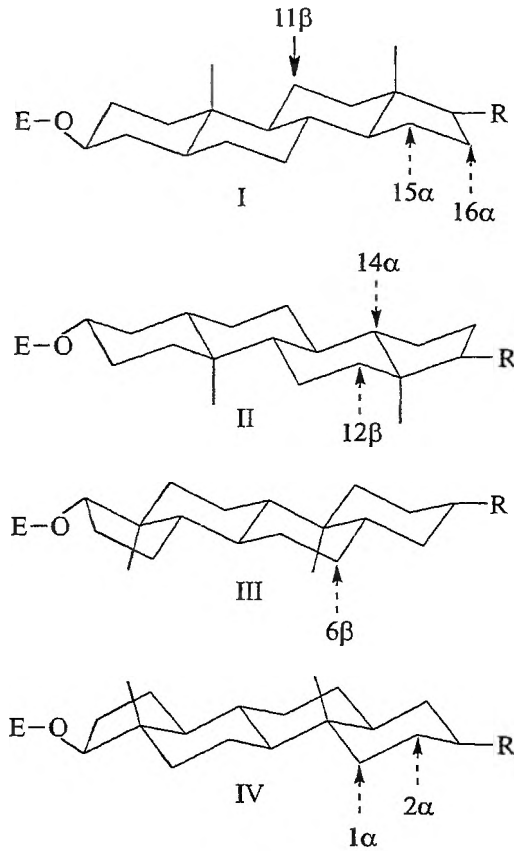
Udział cytochromów P450 w mikrobiologicznych hydroksylacjach ksenobiotycznych steroidów wykazały kolejne badania, w których na obecność cytochromu P450 wskazywało maksimum absorpcji (w obecności tlenu węgla) przy 450 nm po zredukowaniu ditionianem oraz zmiana aktywności hydroksylazy w obecności specyficznych inhibitorów: tlenu węgla, miconasolu, ketoconasolu, metylraponu, *p*-chlorortęciobenzoesu (P-CMB). Dzięki opracowaniu nowych metod i warunków izolowania, oczyszczania i rozdzielania mikrobiologicznych hydroksylaz oznaczono masy molekularne kilku enzymów tej grupy i rozdzielono układ hydroksylujący na poszczególne komponenty. W nielicznych doświadczeniach po połączeniu rozdzielonych frakcji uzyskano układ wykazujący aktywność hydroksylującą [29, 30].

BUDOWA SUBSTRATU A REGIOSELEKTYWNOŚĆ HYDROKSYLACJI

Badania nad przebiegiem hydroksylacji przez nienaruszone kultury mikroorganizmów dostarczyły wielu informacji o warunkach prowadzenia reakcji i rodzaju enzymów (konstytutywne czy indukowane) odpowiedzialnych za przekształcenia. Transformacje mikrobiologiczne steroidów, ze względu na ich budowę (duża, sztywna cząsteczka) oraz stabilność zarówno substratów, jak i ich metabolitów, pozwoliły na zgromadzenie informacji o czynnikach wpływających na selektywność substratową enzymu i regioselektywność hydroksylacji [19].

Stwierdzono, że zdolności hydroksylujące wykazują przede wszystkim grzyby strzępkowe, a różnorodność ich enzymów pozwala na znalezienie szczepów zdolnych do hydroksylacji dowolnej pozycji szkieletu steroidowego.

Porównanie przebiegu transformacji substratów steroidowych w kulturze szczepu *Calonectria decora* wskazuje, jak budowa substratu wpływa na regioselektywność hydroksylacji szkieletu steroidowego [31]. Między innymi z substratów z funkcją tlenową przy C-3 otrzymywano $12\beta,15\beta$ -dihydroksypochodne, a $1\beta,6\alpha$ -dihydroksypochodne były głównymi produktami substratów zawierających podstawniki tlenowe na C-17 (schemat 11). Taki przebieg hydroksylacji substratów z funkcją tlenową na C-3 i C-17 świadczy o skierującym wpływie obecnej w substracie funkcji tlenowej na pozycję wprowadzanej grupy hydroksylowej.



Schemat 11

Różnice w regioselektywności hydroksylacji w kulturze *C. decora* można wyjaśnić, przyjmując następujące założenia:

- obecne w substracie funkcje tlenowe biorą udział w tworzeniu kompleksu enzym-substrat,
- możliwe jest różne ułożenie cząsteczki substratu w kieszeni substratowej i w kompleksie enzym-substrat,

- hydroksylacja różnych pozycji w substracie steroidowym może być prowadzona przez ten sam układ enzymatyczny.

Jeżeli w kompleksie z udziałem funkcji tlenowej przy C-3 hydroksylowane są pozycje 12 β - i 15 α -, to w odpowiednich kompleksach 17-okso-substratów prawdopodobna jest hydroksylacja 1 α - i/lub 6 β -. Hydroksylacja pozycji 1 β - i 6 α -, zamiast przewidywanych 1 α - i 6 β -, może być związana z ich ekwatorialną konfiguracją. Z wyjątkiem 6 β - wszystkie pozycje hydroksylowane przez *C. decora* były ekwatorialne; 6 β -aksjalny alkohol powstawał tylko w transformacji 4-estren-3-onu, w którym pozycja ta miała allilowe położenie.

Wpływ czynników stereoelektronowych na regioselektywność hydroksylacji widoczny jest, gdy porównuje się przekształcenia 4-en-3-okso i 5-en steroidów w kulturze szczepu *Fusarium culmorum*. Androstendion hydroksylowany był do mieszaniny 6 β - i 15 α -hydroksypochodnych, 4-metoksy-androstendion ulegał selektywnej 6 β -hydroksylacji, a DHEA selektywnej 7 α -hydroksylacji [32-34].

Wniosek, że ten sam układ enzymatyczny może hydroksylować różne pozycje szkieletu steroidowego w wyniku różnego ułożenia cząsteczki substratu w kompleksie enzym-substrat, sformułowany na podstawie analizy przebiegu transformacji przez kultury mikroorganizmów, znalazł potwierdzenie w badaniach przekształceń przez preparaty enzymatyczne i/lub wyizolowane enzymy.

Progesteron transformowany był do analogicznej mieszaniny 11 β - i 14 α -hydroksypochodnych, zarówno przez nienaruszone kultury *Cochliobolus lunatus*, jak i wyizolowany z tego mikroorganizmu enzym [35].

Po transformacji korteksolonu przez hydroksylazę izolowaną z *C. lunata* otrzymywano mieszaninę 11 β - i 14 α -monohydroksypochodnych; frakcje enzymatyczne otrzymane w kolejnych etapach oczyszczania enzymu i czysty enzym dawały mieszaniny o stałej proporcji 11 β - : 14 α - alkoholi wynoszącej 2 : 1 [36].

Atomy wodoru 11 β - i 14 α - w kompleksach I i II (schemat 11) znajdują się w analogicznym położeniu wobec centrum aktywnego enzymu.

Schenkman proponuje analogiczną interpretację dla hydroksylacji prowadzonej przez wyizolowany cytochrom P450 ssaka. Cytochrom P450 2C11 – wątrobowy, konstytutywny enzym szczura [37], hydroksyluje testosteron w pozycjach 2 α - i 16 α -; atomy wodoru 2 α - i 16 α - w kompleksach I i IV (schemat 11) mogą znajdować się w ekwiwalentnych położeniach wobec centrum aktywnego enzymu.

Wyniki wielu badań wskazują na znaczne podobieństwa budowy przestrzennej centrum aktywnego hydroksylaz cytochromowych P450, niezależnie od tego, że ich struktury pierwszorzędowe wykazują znaczne różnice [38].

Znana budowa centrum aktywnego P450_{cam} jest wykorzystywana jako modelowa dla innych hydroksylaz cytochromowych P450. Przykładem jest hydroksylacja insektycydu – karbofuranu. Metoda modelowania molekularnego w oparciu o przestrzenną budowę centrum aktywnego P450_{cam} wykazała, że najbardziej prawdopodobna jest hydroksylacja karbofuranu przy C-3. Stwierdzono doświadczalnie, że nie wykazująca aktywności C₃-hydroksypochodna jest głów-

nym metabolitem powstającym z karbofuranu w wyniku działania systemu enzymatycznego muchy [39]. Odporność owada na obecność karbofuranu wynikała z dezaktywacji tego insektycydu w wyniku hydroksylacji. Postuluje się, aby przyjmując jako wzorzec budowę przestrzenną cytochromu P450_{cam}, wykorzystać metodę modelowania molekularnego do zaprogramowania struktury insektycydu, który nie będzie dezaktywowany przez system enzymatyczny muchy.

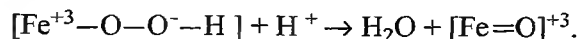
MECHANIZM HYDROKSYLACJI Z UDZIAŁEM HYDROKSYLAZ CYTOCHROMOWYCH P450

Monooksygenazy cytochromowe P450 zawierają hem jako grupę prostetyczną i współdziałają z NAD(P)H-reduktazami. Izolowane z różnych źródeł układy transportujące elektrony do hydroksylaz tej grupy wykazują znaczne różnice, ale mechanizm ich działania jest analogiczny [40].

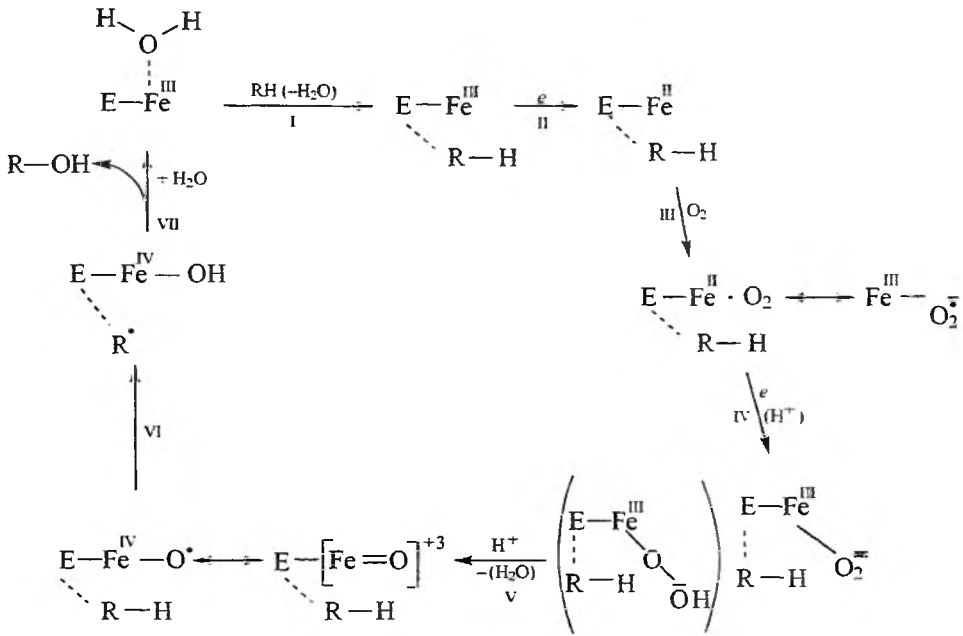
Pierwszym etapem reakcji jest utworzenie kompleksu enzym-substrat, co związane jest z równoczesnym przesunięciem cząsteczki wody – szóstego aksjalnego liganda hemowego żelaza (schemat 12). W wyniku zmiany dielektryczności środowiska hemu po odejściu cząsteczki wody, żelazo w utworzonym kompleksie enzym-substrat znajduje się w wysoko spinowym stanie, którego potencjał oksydacyjno-redukcyjny pozwala na pobranie elektronu od donora. Po przyjęciu elektronu cząsteczkowy tlen wiąże się z kationem żelaza(II) jako szósty, aksjalny ligand. Następnie kompleks enzym-substrat-tlen przyjmuje drugi elektron, po czym powstaje cząsteczka wody i produkt hydroksylacji. Szybkość przemiany po przyjęciu drugiego elektronu jest bardzo duża i nie udało się zarejestrować poszczególnych jej etapów. Schemat 12 przedstawia cykl katalityczny reakcji, który może być postulowany na podstawie wyników wielu badań [41 i cytowane tam pozycje literaturowe].

Stwierdzono, że cytochromy P450 katalizują reakcje hydroksylacji w obecności utleniaczy, m.in. jodozobenzenu (bez udziału zarówno NADPH, jak i O₂), z taką samą regio- i stereoselektywnością, jaka jest obserwowana w naturalnym procesie (schemat 13).

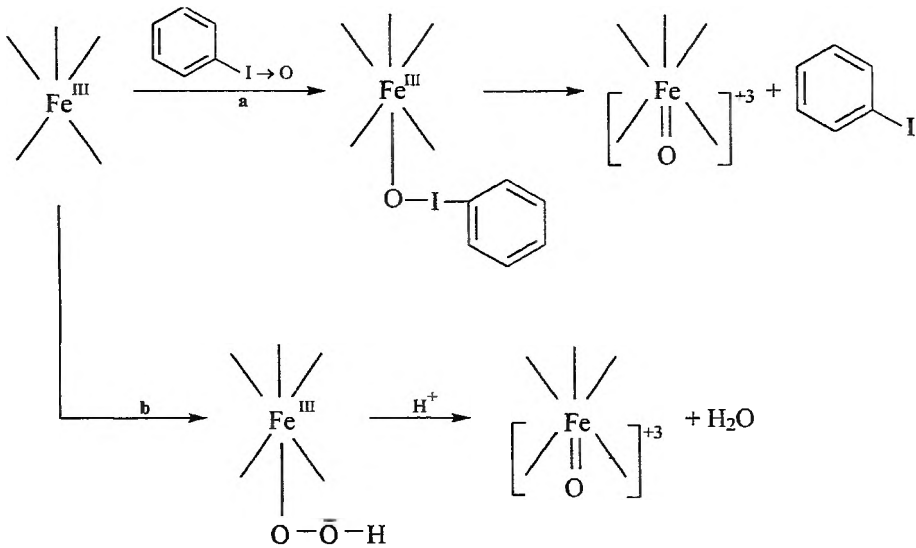
Na tej podstawie zakłada się, że czynniki hydroksylujące w obu przemianach są takie same. Utleniająca forma enzymu w obecności jodozobenzenu ma jeden atom tlenu [Fe=O]⁺³, a taka sama forma w normalnym procesie hydroksylacji może powstawać jako wynik reakcji



Na udział [Fe⁺³-O-O-H] w omawianym cyklu katalitycznym wskazuje otrzymywanie stechiometrycznych ilości H₂O₂ w doświadczeniach z wątrobowymi, mikrosomalnymi cytochromami P450, do których dodano NADPH w obecności O₂, a w środowisku brak było odpowiedniego substratu.



Schemat 12

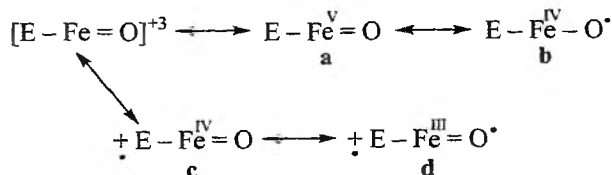


Schemat 13

Poszukiwanie odpowiedzi na pytania, która z podanych na schemacie 14 mezo-merycznych struktur utleniającego stanu $[Fe=O]^{+3}$ jest odpowiedzialna za przekształcenie wiązania C-H w C-O-H i jaki jest mechanizm tego procesu, trwa od ponad dwudziestu lat.

Problem, czy obecna w układach biologicznych porfiryra dostarcza tylko czterech koordynacyjnych ligandów, czy też ma udział w regulowaniu utleniającego stanu żelaza przez dostarczenie elektronu, jest wciąż nierozstrzygnięty. Skoniugowany układ wiązań π porfiryry jest odpowiedni do stabilizacji powstającego kationorodnika.

Jest prawdopodobne, że faktycznym utleniaczem jest znacznie korzystniejsza energetycznie forma $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ (schemat 14: **c**, **d**), powstająca w wyniku dostarczenia elektronu przez układ porfiryrowy.



Schemat 14

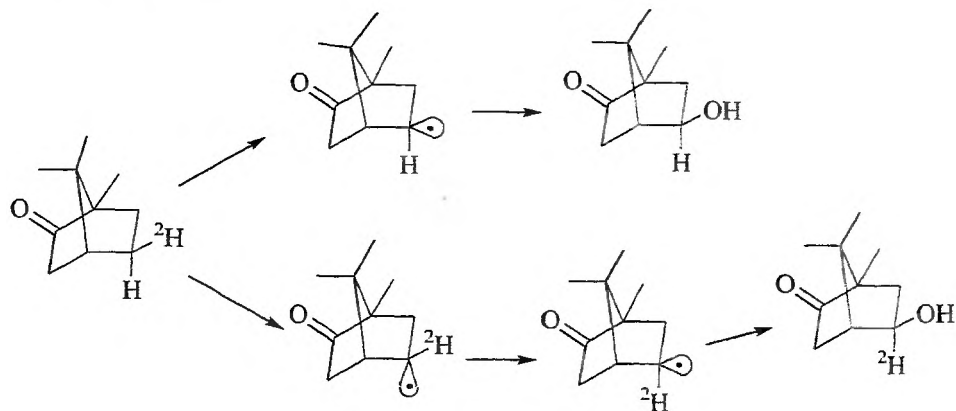
Utlenienie wiązania C—H do C—O—H może zachodzić z udziałem karboanionu, karbokationu lub rodnika. Rodnikowy charakter tej reakcji, szczególnie gdy hydroksylacja zachodzi w nieaktywowanej pozycji, jest najbardziej prawdopodobny. Jednak przebieg reakcji enzymatycznych, w których utlenienie wiązania C—H zachodziło z zachowaniem stereochemii hydroksylowanej pozycji, przemawia za innym niż rodnikowy mechanizmem reakcji.

Na podstawie znanych reakcji, w których reaktywne karbeny CH_2 były wstawiane do wiązań C—H, bez produktów izomeryzacji, postulowano analogiczny udział aktywnej formy oksenowej w reakcjach hydroksylacji i wbudowywanie atomu tlenu do wiązania C—H. Dopiero wyniki badań deuterowanych substratów wykazały, że chociaż reakcje enzymatycznej hydroksylacji zachodzą zazwyczaj z zachowaniem konfiguracji, towarzyszy im również niekiedy izomeryzacja w pozycji hydroksylowanej. I tak po transformacji D-kamfory deuterowanej w pozycji 5-*egzo*, przez izolowany z *P. putida* cytochrom P450_{cam}, otrzymywano również produkt hydroksylacji z deuterem w położeniu 5-*endo* (schemat 15).

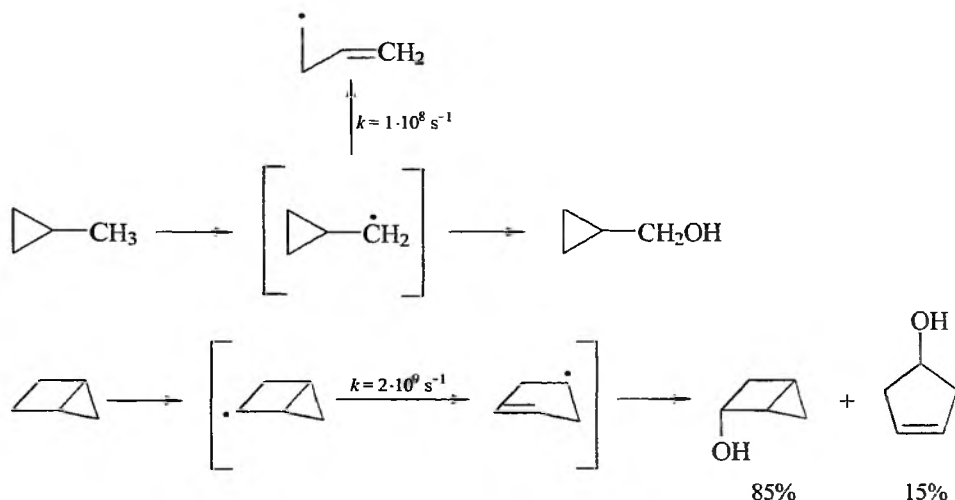
Na rodnikowy mechanizm enzymatycznej hydroksylacji wskazywały wyniki prac z wątrobowymi, mikrosomalnymi cytochromami P450 [42 i cytowane tam piśmiennictwo].

Z metylocyklopropanu izolowano jedną hydroksypochodną, podczas gdy z dwupierścieniowego substratu otrzymywano mieszaninę dwóch alkoholi, z których jeden (15%) może powstawać w wyniku rodnikowego przegrupowania (schemat 16).

Stała szybkości przegrupowania rodnika metylocyklopropanowego ma wartość $1 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$, a odpowiedni rodnik z drugiego substratu (bicykliczny, naprężony) jest mniej trwały i stała szybkości przegrupowania tego rodnika wynosi $2 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$. Z metylocyklopropanu otrzymywano jeden produkt, a z dicyklicznej-



Schemat 15



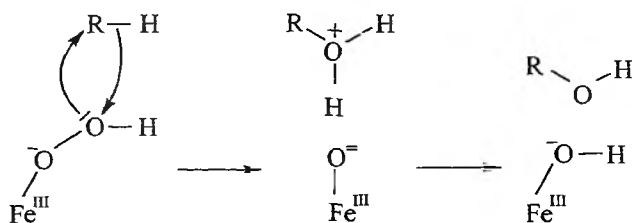
Schemat 16

go substratu mieszaninę hydroksypochnych. Różnice w przebiegu transformacji obu substratów można uzasadnić założeniem, że szybkość rekombinacji karbo-rodników w procesie hydroksylacji (VII, schemat 12) jest większa niż $1 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$. Na podstawie procentowego udziału produktu przegrupowania w mieszaninie powstałej z dicyklicznego substratu można szacować wartość szybkości rekombinacji rodników w enzymatycznej hydroksylacji na $2 \times 10^{10} \text{ s}^{-1}$ [41].

W reakcjach katalizowanych przez hydroksylazy cytochromowe P450 szczura i królika obserwowano podobne do opisanych uprzednio różnice w przebiegu przekształceń substratów cyklopropanowych i bicyklopentanowych, co przemawia za rodnikowym mechanizmem reakcji hydroksylacji enzymatycznych [42].

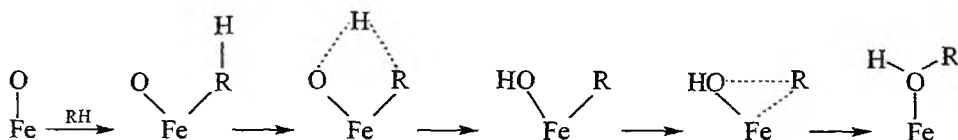
Ponieważ stałe szybkości reakcji uzyskano pośrednio (porównując skład produktów reakcji i trwałość odpowiednich rodników), a dla niektórych substratów oszacowane na tej podstawie stałe szybkości są znacznie wyższe niż przeciętne, wciąż proponowane są inne, możliwe mechanizmy reakcji hydroksylacji enzymatycznej [43].

Na podstawie wyników ostatnio prowadzonych badań, w których dokładnej analizie poddano ilościowy udział produktów z zachowaną strukturą i przegrupowanych, powstających w transformacjach prowadzonych przez kilka różnych hydroksylaz P450 ssaków, postulowany jest mechanizm hydroksylacji z udziałem kationu ^+O-H (schemat 17). Zgodnie z tym mechanizmem utlenienie wiązania C-H następuje w wyniku elektrofilowego ataku kationu ^+O-H [44].



Schemat 17

Rozważany jest również dwustopniowy proces, w którym zachodzi równoczesna migracja atomu wodoru i grupy alkilowej, a utworzona grupa hydroksylowa staje się szóstym ligandem kationu hemowego żelaza (schemat 18) [45].



Schemat 18

Prowadzone obecnie badania dotyczące biohydroksylacji mają na celu jednoznaczne ustalenie mechanizmu reakcji oraz otrzymanie biokatalizatorów zdolnych do prowadzenia pożądanej reakcji lub o wyższej aktywności dzięki możliwościom, jakie stwarza rozwój biologii molekularnej. Obiecujące są wyniki prac nad konstruowaniem rekombinacyjnych szczepów drożdży i bakterii w drodze ekspresji pożądanej hydroksylazy, np. ssaka [46].

Reakcje enzymatycznej hydroksylacji są wciąż postrzegane jako atrakcyjna, skuteczna metoda funkcjonalizacji nieaktywowanej pozycji substratu oraz dealkylacji i dehalogenacji. Ostatnia z wymienionych reakcja ma kluczowe znaczenie dla neutralizacji zanieczyszczeń środowiska [47].

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] F.J. Zeelen, *Medicinal Chemistry of Steroids*, Elsevier, Oxford 1990.
- [2] P.J. Davis, *Develop Industrial Microbiology*, 1988, **29**, 197.
- [3] G.T. Philips, G.W. Maugham, M.A. Bertola, A.F. Marx, H.S. Koger, Eur. Pat. Appl. EP 205215, 1987, December 17.
- [4] T.S. Santhanaskrishnan, *Tetrahedron*, 1984, **40**, 3597.
- [5] L. Sedlaczek, *CRC. Crit. Rev. Biotechnol.*, 1988, **7**, 187.
- [6] T. Hasegawa, S. Hamaguchi, M. Ogura, K. Watanase, *J. Ferm. Technol.*, 1981, **59**, 257.
- [7] C. Goodhue, J. Schaeffler, *Biotechnol. Bioeng.*, 1971, **13**, 203.
- [8] T. Yoshida, T. Nagasawa, *J. Biosci. Bioeng.*, 2000, **89**, 111.
- [9] A. Tinschert, K. Ker, A. Heinzmann, *Tschech. Arch. Microbiol.*, 1997, **168**, 355.
- [10] I.Y. Lee, S.L. Nissen, J.P.N. Rosazza, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, 4191.
- [11] Y. Hu, R.J. Highed, D. Marion, H. Ziffer, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1991, 1176.
- [12] I.S. Lee, H.N. ElSohly, E.M. Croom, C.D. Hufford, *J. Nat. Prod.*, 1989, **52**, 337.
- [13] D. Rosi, G. Peruzzotti, E.W. Dennis, D.A. Berberian, H. Freele, S. Archer, *Nature*, 1965, **208**, 1005.
- [14] S. Hu, D. Sun, X. Tan, O. Fang, *Tetrahedron Lett.*, 1997, **38**, 2721.
- [15] S. Hu, D. Sun, A.I. Scott, *Tetrahedron Lett.*, 2000, **41**, 1703.
- [16] H.L. George, K.D. Hirschi, H.D. Van Etten, *Arch. Microbiol.*, 1998, **170**, 147.
- [17] T. Omura, R. Sato, *J. Biol. Chem.*, 1964, **239**, 2370.
- [18] K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer-Verlag, Berlin 2000.
- [19] H.L. Holland, *Organic Synthesis with Oxidative Enzymes*, VCH Publishers, New York 1992.
- [20] T.L. Poulos, B.C. Finzel, A.J. Howard, *J. Biol. Mol.*, 1987, **195**, 687.
- [21] P.R. Ortiz de Montellano, *Cytochrome P450*, 2nd ed., Plenum Press, New York and London 1995.
- [22] J.K. Atkinson, S.G. Sligar, *J. Biol. Chem.*, 1988, **263**, 18842.
- [23] R. Hobkirk, *Steroid Biochemistry*, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1979, Vol. 2.
- [24] F.J. Gonzales, *Pharm. Rev.*, 1989, **40**, 243.
- [25] T. Aoyama, K. Korzekwa, K. Nagata, M. Adesnik, A. Reiss, D. Lapenson, J. Gillette, H.V. Gelboin, D.J. Waxman, F. Gonzalez, *J. Biol. Chem.*, 1989, **264**, 21327.
- [26] D.R. Nelson, H.W. Strobel, *Biochemistry*, 1989, **28**, 656.
- [27] R.L.P. Lindberg, M. Negishi, *Nature*, 1989, **339**, 632.
- [28] M.H. Zuidweg, *Biophys. Acta*, 1967, **152**, 144.
- [29] F. Ahmed, R.A.D. William, K.E. Smith, *J. Steroid Biochem Mol. Biol.*, 1995, **52**, 203.
- [30] H.L. Holland, *Steroids*, 1999, **64**, 178.
- [31] E.R.H. Jones, *Pure Appl. Chem.*, 1973, **32**, 39.
- [32] T. Kołek, A. Świzdor, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 1998, **67**, 3.
- [33] T. Kołek, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 1999, **71**, 83.
- [34] T. Kołek, A. Świzdor, wyniki niepublikowane.
- [35] G.R. Jänig, D. Pfeil, M. Müller-Frohne, H. Riemer, M. Henning, W. Schwarze, K. Ruckpaul, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 1992, **43**, 1117.
- [36] K. Suzuki, K.I. Sanga, Y. Chkaoka, E. Itagaki, *Biochim. Biophys. Acta*, 1993, **1203**, 215.
- [37] J.B. Schenkman, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 1992, **43**, 1032.
- [38] H.M. van den Brink, R.F.M. Van Gorcom, C.A.M.J.J. Van den Hondel, P.J. Punt, *Fungal Genetics and Biology*, 1998, **23**, 1.
- [39] G.M. Keserii, I. Kolossovary, B. Bertók, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 5126.
- [40] R. Sato, T. Omura, *Cytochrome P450*, Academic Press, New York 1978.
- [41] M. Akhtar, J.N. Wright, *Natural Product Reports*, 1991, 327.
- [42] J.K. Atkinson, K.U. Ingold, *Biochemistry*, 1995, **32**, 9209.
- [43] R.D. Bach, I. Mintcheva, C.M. Estéva, H.B. Schlegel, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 10121.

- [44] M. Newcomb, R. Shen, S.Y. Choi, P.H. Toy, P.F. Hollenberg, A.D.N. Vaz, M.J. Coon, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 2677.
- [45] K. Yoshizawa, T. Ohta, M. Eda, T. Yambe, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 2000, **73**, 401.
- [46] H.L. Holland, H.K. Weber, *Current Opinion in Biotechnology*, 2000, **11**, 547.
- [47] R.G. Chaudry, S. Chapalamadugu, *Microbiol. Rev.*, 1991, **55**, 59.

Praca wpłynęła do Redakcji 27 listopada 2001

**AMLODYPINA,
NOWOCZESNY ANTAGONISTA WAPNIA
– METODY SYNTEZY**

**AMLODYPINE,
MODERN CALCIUM ANTAGONIST
– METHODS OF SYNTHESIS**

**Halina Hajmowicz, Dominik Jańczewski,
Ludwik Synoradzki**

*Laboratorium Procesów Technologicznych,
Wydział Chemiczny Politechniki Warszawskiej
ul. Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa*

Abstract

Wprowadzenie

1. Otrzymywanie amlodypiny
 - 1.1. Warianty syntezy amlodypiny
 - 1.2. Zabezpieczanie i odbezpieczanie grupy aminowej
 - 1.3. Zastosowanie prekursora grupy aminowej
 2. Porównanie opłacalności wybranych metod otrzymywania amlodypiny
 3. Sytuacja patentowa w Polsce
- Piśmiennictwo cytowane



Mgr inż. Halina Hajmowicz po ukończeniu studiów (1969) na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej pracowała w Przedsiębiorstwie Doświadczalnym Przemysłu Farmaceutycznego „Polfa”, a następnie w Laboratorium Badawczo-Wdrożeniowym WZF „Polfa”. Od 1985 r. jest starszym specjalistą w Laboratorium Procesów Technologicznych. Kierownik tematów, autorka oryginalnych metod wytwarzania substancji biologicznie czynnych, patentów i wdrożeń. Zainteresowania naukowe: synteza, technologia oraz wdrażanie procesów chemicznych, szczególnie dla przemysłu farmaceutycznego.



Mgr inż. Dominik Jańczewski ukończył studia w 1998 r. i został słuchaczem studiów doktoranckich na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej. Prowadzi badania w Laboratorium Procesów Technologicznych. Zainteresowania naukowe: synteza i technologia biologicznie czynnych dihydropirydyn i ich półproduktów, metody optymalizacji procesu.



Dr inż. Ludwik Synoradzki ukończył studia (1971) i obronił pracę doktorską (1980) na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej, a następnie odbył dwuletni staż w Max-Planck Institut für Kohlenforschung w Mülheim/Ruhr (Niemcy). Od 1985 r. jest kierownikiem Laboratorium Procesów Technologicznych. Specjalność: technologia chemiczna. Zainteresowania naukowe: projektowanie, optymalizacja i wdrażanie procesów technologicznych, optycznie czynne kwasy karboksylowe i ich pochodne.

ABSTRACT

The paper is a review of the methods of synthesis of amlodipine (**1**), 3-ethyl-5-methyl-2-(2-aminoethoxymethyl)-4-(2-chlorophenyl)-1,4-dihydro-6-methylpyridino-3,5-dicarboxylate, a modern drug belonging to the calcium antagonists group. The synthesis of amlodipine is a multistep process. A Williamson reaction with the formation of a compound with an ether bond (**5**) is usually the first step. This reaction is followed by a Hantzsch reaction with the formation of a correspondingly substituted dihydropyridine ring. Two routes of the realization of this step, which limits the overall process yield, are described. Chlorobenzoic aldehyde (**8**) and 4-(2-R_N-ethoxy) ethyl acetylacetate (**5**) are substrates in both routes. Nitrogen in the dihydropyridine ring originates either from methyl aminocrotonate (**7**) (route I) or from ammonium acetate (**11**) (by amination of **5**) (route II). Amlodipine (**1**) is formed in the third step after deprotecting the amino group or introducing the amino group into the molecule. The formation of amlodipine benzenesulfonate (**2**) can follow or it can be combined with the third step.

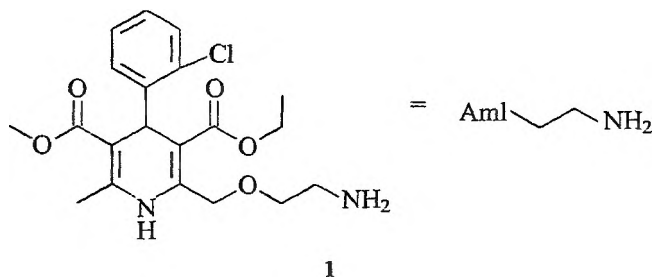
There are two valid patents in Poland concerning the preparation of amlodipine benzenesulfonate (**2**) of Pfizer and of Lek Polska. A patent application of Adamed is under consideration of the Patent Office.

WPROWADZENIE

Związki z grupy 1,4-dihydropirydyn do leczenia wprowadzono w połowie lat 70. Jest to szczególnie dynamicznie rozwijająca się grupa antagonistów wapnia [1], których działanie polega na blokowaniu tzw. wolnego kanału wapniowego błony komórkowej, co utrudnia przepływ jonów Ca^{2+} do wnętrza komórki i ma zasadniczy wpływ na funkcjonowanie komórek mięśnia sercowego oraz mięśni gładkich.

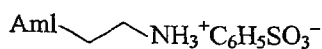
Do najbardziej znanych leków z tej grupy należą: Nifedypina, Nitredypina, Nimodypina, Nikardypina, Felodypina czy Nilwadyypina oraz od roku 1994 Amlodypina. Ich farmakologiczne spektrum działania jest szerokie. Stosuje się je w leczeniu: choroby wieńcowej, wad serca, wtórnych skurczów naczyń mózgowych, zaburzeń neurologicznych oraz pierwotnego i wtórnego nadciśnienia tętniczego.

Amlodypina, 2-(2-aminoetoksymetylo)-4-(2-chlorofenylo)-1,4-dihydro-6-metylo-pirydino-3,5-dikarboksylan-3-etylu-5-metylu (**1**), najnowocześniejszy obecnie lek przeciwko nadciśnieniu tętniczemu oraz chorobie niedokrwiennej serca, zajmuje jedno z czołowych miejsc na liście klasyfikującej leki pod względem wartości sprzedaży (czwarta pozycja w 1998 r. – 2,575 mln USD, wzrost sprzedaży o 16,7% względem roku poprzedniego).



W porównaniu z pozostałymi związkami grupy dihydropirydyn amlodypina rzadziej powoduje działania niepożądane oraz interakcje z innymi lekami. Jeżeli interakcje występują – mają łagodniejszy przebieg.

Amlodypinę stosuje się jako składnik leków w postaci soli z kwasami zawierającymi farmaceutycznie dopuszczalne aniony: chlorek, bromek, siarczan, fosforan, octan, maleinian, fumaran, mleczan, winian, cytrynian, glukonian i benzenosulfonian [2].



Stwierdzono, że benzenosulfonian amlodypiny (**2**) wykazuje wiele cech korzystniejszych od pozostałych znanych jej soli, a ponadto dobrze łączy się z in-

nymi składnikami receptur, dlatego jest szczególnie odpowiedni do sporządzania preparatów farmaceutycznych [3–5].

Celem niniejszego opracowania jest przegląd stosowanych metod syntezy amlodypiny oraz porównanie ich opłacalności i czystości patentowej w Polsce.

1. OTRZYMYWANIE AMLODYPINY

1.1. WARIANTY SYNTEZY AMLODYPINY

Kilkuetapowy proces syntezy amlodypiny (rys. 1) przeważnie zaczyna się od otrzymania związku z wiązaniem eterowym, często mającym już także zabezpieczoną grupę aminową. Odpowiednio podstawiony R_N -etanol (3) poddaje się reakcji Williamsona z 4-chloroacetylooctanem etylu (4), otrzymując 4-(2- R_N -etoksy)-acetylooctan etylu (5) [6].

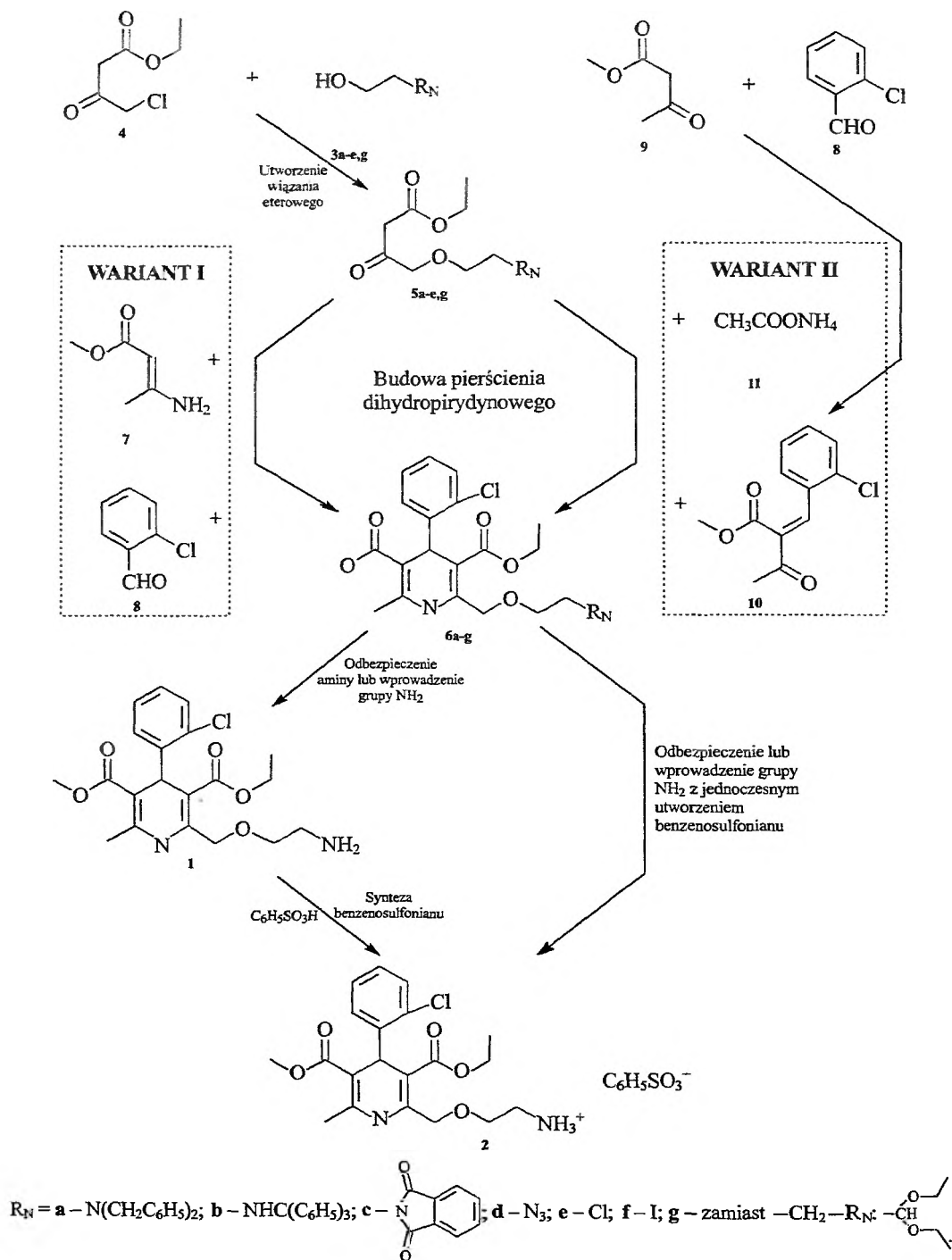
Drugi etap to, realizowana w dwóch wariantach, reakcja Hantzsch [7]. Według wariantu I synteza pochodnej amlodypiny (6) polega na kondensacji 4-[2- R_N -etoksy]acetylooctanem etylu (5) z 3-aminokrotonianem metylu (7) i aldehydem 2-chlorobenzoesowym (8). Według wariantu II przed syntezą związku (6) przeprowadza się reakcję acetylooctanu metylu (9) z aldehydem chlorobenzoesowym (8) w celu otrzymania 2-(2-chlorobenzylideno)acetylooctanu metylu (10). W tym przypadku synteza związku zawierającego podstawiony pierścień dihydropirydynowy (6) polega na aminowaniu 4-(2- R_N -etoksy)-acetylooctanu etylu (5) octanem amonu (11) i następnie reakcji z otrzymanym wcześniej 2-(2-chlorobenzylideno)acetylooctanem metylu (10).

W trzecim etapie odbezpiecza się lub wprowadza do cząsteczki grupę aminową [2–5, 8–12]. Etap ostatni, łączony często z trzecim [8, 9], to utworzenie soli, np. benzenosulfonianu [5, 8, 9, 13].

Grupę aminową można wprowadzić już na samym początku tworzenia cząsteczki amlodypiny (przed utworzeniem wiązania eterowego) lub w końcowej fazie procesu. W pierwszym przypadku musi być ona odpowiednio zabezpieczona, a następnie odbezpieczona. Druga możliwość wymaga wcześniejszego wprowadzenia do cząsteczki prekursora grupy aminowej, a następnie przekształcenia go w grupę aminową.

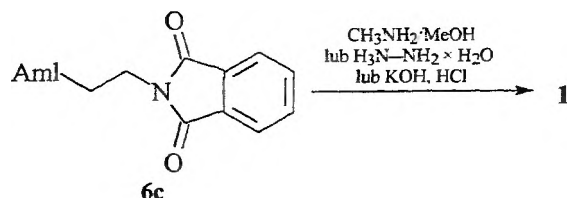
1.2. ZABEZPIECZANIE I ODBEZPIECZANIE GRUPY AMINOWEJ

Jeśli podstawowym surowcem do syntezy amlodypiny jest tani i łatwo dostępny 2-aminoetanol (12), to grupę aminową należy przed syntezą zabezpieczyć, a w końcowej fazie syntezy odbezpieczyć. Jednym ze sposobów zabezpieczania grupy aminowej jest przeprowadzenie jej w ugrupowanie aminowe wyższego rzędu -NHR lub -NR₂. W patencie firmy Pfizer [2] opisano sposób otrzymywa-



Rys. 1. Warianty syntezy benzenosulfonianu amlodypinu

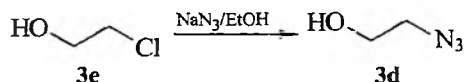
nym z trzech sposobów [4, 12]: w reakcji z metyloaminą w etanolu, w reakcji z wodzianem hydrazyny lub przez hydrolizę z użyciem wodorotlenku potasu, a następnie kwasu solnego:



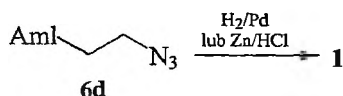
1.3. ZASTOSOWANIE PREKURSORA GRUPY AMINOWEJ

Jako substrat do syntezy amlodypiny można wykorzystać pochodną etanolu podstawioną w pozycji 2 grupą, którą w końcowej fazie syntezy można łatwo wymienić na grupę aminową.

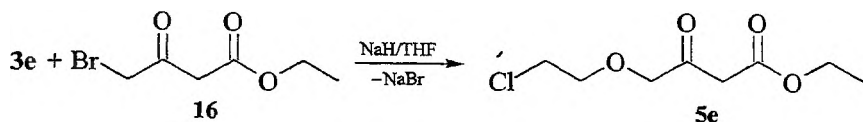
Wygodnym prekursorem grupy aminowej może być mniej reaktywna grupa azydkowa. Substratem do syntezy związku z ugrupowaniem eterowym (5d) jest wtedy 2-azydoetanol (3d) otrzymywany np. z 2-chloroetanolu (3e) [16]:



Pochodną amlodypiny z grupą azydkową w miejsce aminowej (6d) otrzymano w etanolu zarówno według wariantu I, jak i II, z wydajnością odpowiednio 30% oraz ok. 20%. Grupę azydkową w 6d redukuje się wodorem na katalizatorze palladowym bądź też cynkiem i kwasem solnym [3]:

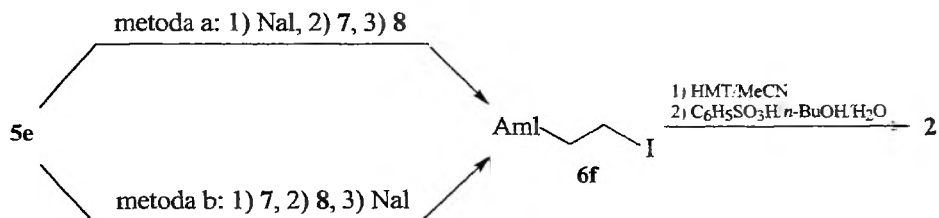


Prekursorem grupy aminowej może być też atom fluorowca [8]. W tym przypadku wyjściowym substratem jest również 2-chloroetanol (3e), który poddaje się reakcji z 4-bromoacetylooctanem etylu (16), wobec wodorunku sodu w tetrahydrofuranie, w celu otrzymania 4[2-chloroetoksy]acetylooctanu etylu (5e):

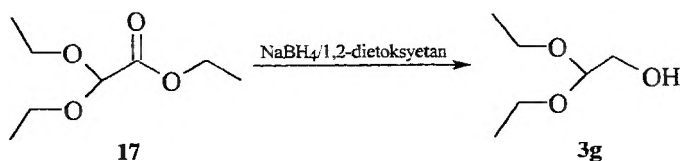


Jest to jedyna metoda, w której stosuje się pochodną 4-bromową acetylooctanu etylu (**16**) w miejsce 4-chlorowej (**4**). Związek **5e** przekształca się następnie w reakcji Hantzsch (wariant I) w jodopochodną amlodypiny (**6f**).

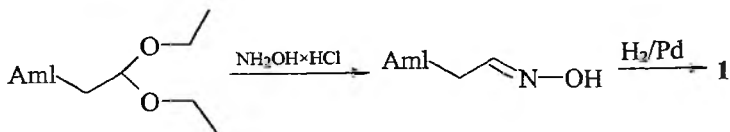
Na związek (**6f**) działa się heksametylenotetraminą (HMT) w acetonitrylu, a następnie kwasem benzenosulfonowym, w środowisku butanolowo-wodnym, uzyskując bezpośrednio benzenosulfonian amlodypiny (**2**):



Kolejnym sposobem na wprowadzenie grupy aminowej do cząsteczki amlodypiny jest zastosowanie pochodnych acetalowych [10]. Substrat do syntezy związku z wiązaniem eterowym – dietoksyetanol (**3g**) – otrzymuje się, redukując dietoksyoctan etylu (**17**) borowodorkiem sodu w 1,2-dietoksyetanie:



Pochodną amlodypiny z grupą acetalową w miejscu aminowej (**6g**) otrzymano zarówno według I, jak i II wariantu syntezy Hantzsch. Proces prowadzono w toluenie, uzyskując odpowiednio 37% i 67% wydajności. Zamianę grupy acetalowej na aminową przeprowadza się w dwóch etapach. Pod działaniem chłorowodoru hydroksyloaminy związek (**6g**) przekształca się w oksym (**18**), który następnie katalitycznie redukuje się wodorem wobec palladu do amlodypiny (**1**):



2. PORÓWNANIE OPLACALNOŚCI WYBRANYCH METOD OTRZYMYWANIA AMLODYPINY

Poszczególne warianty metod otrzymywania amlodypiny różnią się pod wieloma względami. Różne są surowce, różnymi sposobami przeprowadza się poszczególne etapy procesu. Ma to w dużej mierze znaczenie patentowe, z drugiej

jednak strony wpływa na koszt wytwarzania produktu, opłacalność procesu chemicznego zależy bowiem w zasadniczy sposób od jego wydajności i od cen surowców. W odniesieniu do procesów mających istotne znaczenie handlowe, a do takich niewątpliwie należy produkcja amlodypiny, zdobycie wiarygodnych informacji o wydajnościach, potrzebnych do przeprowadzenia analizy ekonomicznej, jest trudne. Na podstawie dostępnych danych literaturowych zestawiono wydajności poszczególnych etapów procesu i obliczono całkowite wydajności otrzymywania benzenosulfonianu amlodypiny różnymi metodami. Mimo że wyniki te są tylko przybliżone, to ich zestawienie jest dla technologa analizującego proces niewątpliwie pożyteczne. Wyraźnie widać, że etapem limitującym proces jest utworzenie pierścienia dihydropirydynowego (reakcja Hantzscha) (tab. 1).

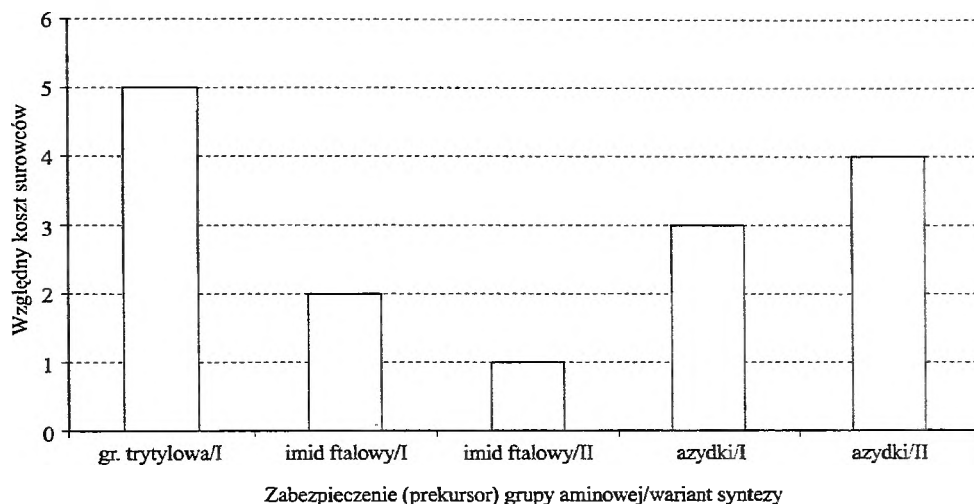
Tabela 1. Porównanie wydajności poszczególnych etapów syntezy benzenosulfonianu amlodypiny w zależności od sposobu zabezpieczenia grupy aminowej lub rodzaju prekursora

Produkt	Etap syntezy benzenosulfonianu amlodypiny	Grupa zabezpieczająca lub prekursor		Trytylowa	Imid ftalowy, war. I	Imid ftalowy, war. II	Azydki, wariant I	Azydki, wariant II	Fluorowiec, met. a	Fluorowiec, met. b	Dietoksy, wariant I	Dietoksy, wariant II
		Reakcja	Wydajność [%] [2-5, 7-11, 14-16]									
3	Zabezpieczenie aminoetanolu			97	88	88						
5	Synteza Williamsona – utworzenie wiązania eterowego			74	97	97	66	66	67	67	71	71
6	Synteza Hantzscha – utworzenie pierścienia dihydropirydynowego					54	30		12	39	37	66
1	Synteza amlodypiny – odbezpieczenie lub wprowadzenie grupy aminowej				20		80	16			61	61
2	Synteza benzenosulfonianu amlodypiny			6	83	60	83	83	50	50	83	83
	Sumaryczna wydajność 2			4	14	28	13	9	4	13	16	29

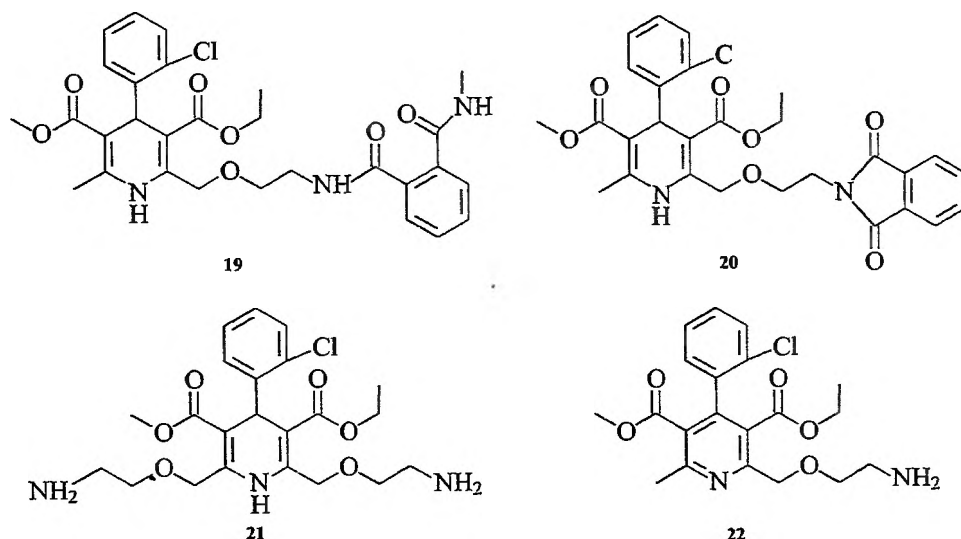
Dla pięciu metod, odznaczających się łatwo dostępnymi i względnie tanimi surowcami, porównano koszty substratów na podstawie ich cen hurtowych (rys. 2). Najniższy „koszt surowców” charakteryzuje metody, w których grupę aminową zabezpiecza się w formie imidu ftalowego. Wynika to ze stosunkowo wysokich wydajności procesu oraz odpowiednio niskich cen surowców. Zabezpieczenie grupą azydową wydaje się droższe, co wynika z wysokiego kosztu katalizatora używanego do redukcji grupy azydowej, może jednak okazać się atrakcyjne w przypadku rozwiązania problemu regeneracji i wielokrotnego użycia palladu.

W *Farmakopei europejskiej* [17] wśród czterech możliwych zanieczyszczeń zasady amlodypiny (1) wymienione są związki (19) i (20) (rys. 3) mogące po-

wstawać jedynie w procesie, w którym do zabezpieczenia grupy aminowej używa się bezwodnika ftalowego. Pozostałe dwa związki (21) i (22) (rys. 3) mogą powstawać niezależnie od zastosowanej metody syntezy 1. Biorąc pod uwagę również najniższy koszt surowców, wydaje się bardzo prawdopodobne, że właśnie bezwodnik ftalowy stosuje się do zabezpieczania grupy aminowej w przemysłowym procesie otrzymywania amlodypiny.



Rys. 2. Porównanie kosztów surowców w syntezie amlodypiny różnymi metodami



Rys. 3. Zanieczyszczenia benzenosulfonianu amlodypiny wymienione w *Farmakopei europejskiej*

3. SYTUACJA PATENTOWA W POLSCE

W kraju amlodypina w formie zasady (1) nie jest dotychczas produkowana. Wytwarzanie benzenosulfonianu amlodypiny (2), będącego składnikiem aktywnym leków z amlodypiną, chronione jest na terenie Polski na rzecz dwóch producentów, firmy Pfizer PL 149532 i firmy Lek PL 173645 (ochrona patentowa może być przedłużona odpowiednio do 3.04.2002 i do 17.11.2013). W toku postępowania patentowego jest zgłoszenie firmy Adamed P325757 (1998).

Według firmy Pfizer [5], która jako pierwsza opatentowała otrzymywanie benzenosulfonianu amlodypiny (2), amlodypinę w postaci zasady (1) poddaje się reakcji z roztworem kwasu benzenosulfonowego lub jego soli amonowej w obojętnym rozpuszczalniku, a następnie wyodrębnia się produkt finalny (2).

Wytwarzanie benzenosulfonianu amlodypiny (2) metodą firmy Lek [9] polega na bezpośredniej reakcji amlodypiny zabezpieczonej grupą trytylową (6b) z kwasem benzenosulfonowym w metanolu.

Według opublikowanego zgłoszenia firmy Adamed [13] benzenosulfonian amlodypiny (2) można otrzymać z soli amlodypiny, takich jak: chlorki, bromki, octany, chlorooctany i azotany, poddając je reakcji wymiany z benzenosulfonianem metalu alkalicznego.

Firma Pfizer, właściciel pierwszego patentu na wytwarzanie benzenosulfonianu amlodypiny, jest producentem leku „oryginalnego” sprzedawanego pod nazwą „Norvasc”. Wprowadzenie na polski rynek dwóch pozostałych leków generycznych zawierających amlodypinę: „Amlopinu” firmy Lek oraz „Amlozeku” firmy Adamed, stało się możliwe dzięki późniejszym wynalazkom [9, 13], omijającym konieczność stosowania w procesie produkcyjnym amlodypiny w formie wolnej zasady.

Wartość polskiego rynku amlodypiny to 105 mln złotych (IV kw. 2000 – III kw. 2001). Dominującą pozycję zajmuje „Amlozek” polskiej firmy Adamed – 78% udziału w całości sprzedaży, za nim „Novarsc” – 14%, oraz „Amlopin” – 8%.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] J. Mielcarek, *Farmacja Polska*, 1999, **55** (10), 471.
- [2] S.F. Campbell, P.E. Cross, J.K. Stubbs, PL 140278, 1983, CA: 105:42661.
- [3] S.F. Campbell, P.E. Cross, J.K. Stubbs, PL 140575, 1983, CA: 105:42661.
- [4] S.F. Campbell, P.E. Cross, J.K. Stubbs, PL 141830, 1983, CA: 105:42661.
- [5] E. Davison, J.I. Wells, PL 149532, 1987, CA: 110:121408.
- [6] C.B. Troostwijk, R.M. Kellogg, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1977, 932.
- [7] A. Hantzsch, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, 1882, **215**, 1.
- [8] D. Bozsing, L.G. Kovanyi, G. Simig, EP 0902016, 1999, CA 130:P252247v.
- [9] B. Furlan, A. Copar, A. Jeriha, PL 173645, 1993, CA: 122:81125.
- [10] G.L. Karup, H.F. Preikscha, S.B. Padersen, WO 99/25688, 1999, CA 131:5189b.
- [11] J.E. Arrowsmith, S.F. Campbell, P.E. Cross, *J. Med. Chem.*, 1986, **29**, 1696.

-
- [12] L. Coppi, Y. Gansaz Gulien, J. Campon Prado. WO 00 24714, 2000, CA 132:308245d.
[13] M. Włostowski, M. Wieczorek. WO 99 52873, 1999, CA 131:291315f.
[14] D.J. Dupre, J. Elks, B.A. Hems, J. Chem. Soc., 1949, 500.
[15] J. Wenker, J. Am. Chem. Soc., 1937, **59**, 422.
[16] B. Carboni, M. Vaultier, Tetrahedron, 1987, **43** (8), 1789.
[17] *European Pharmacopeia*, Supplement 2001.

Praca wpłynęła do Redakcji 31 lipca 2001

**NIE MA PROBLEMU
ŚRODOWISKOWYCH ESTROGENÓW**

**ENVIRONMENTAL ESTROGENS
ARE NOT A PROBLEM**

Przemysław Mastalerz

50-525 Wrocław, ul. Gliniana 23/17

Abstract

Wprowadzenie

1. Czy należy się bać roślinnych i syntetycznych estrogenów?
2. Problem zmniejszającej się płodności mężczyzn
3. Efekt synergistyczny
4. Syntetyczne estrogeny i rak sutka u kobiet

Piśmiennictwo cytowane



Przemysław Mastalerz urodził się w 1925 r., w latach 1947–1951 studiował chemię na Uniwersytecie Wrocławskim. Doktorat z biochemii uzyskał w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN w 1959 r. Habilitował się w zakresie chemii na Politechnice Wrocławskiej w 1967 r. Tytuł profesora nauk chemicznych otrzymał w 1977 r., a od 1991 r. jest na emeryturze.

Zainteresowania naukowe: chemia i biochemia kwasów aminoalkanofosfonowych oraz biogenne związki halogenoorganiczne, propagowanie wiedzy ekologicznej.

Wypromował 10 doktorów, z których 3 się habilitowało. Jest autorem 5 podręczników akademickich z dziedziny chemii, 2 monografii książkowych i 5 artykułów przeglądowych oraz ok. 100 oryginalnych prac naukowych. W roku akademickim 1980/81 był wykładowcą chemii organicznej na Southern Illinois University w Carbondale w USA.

ABSTRACT

In ecological literature the term “environmental estrogens” refers to industrial compounds which contaminate the environment and have estrogen-like biological activity. In a strict sense the term should include also estrogens produced by plants (phytoestrogens) but these are scarcely mentioned by environmentalists who all their attention concentrate on man-made chemicals.

The first observation of hormonal activity of an industrial chemical dates back to 1950 when Burlington et al. reported that DDT affects the secondary sex characteristics of male birds [3]. Similar observations multiplied in later years but the observed effects were always weak or very weak and did not attract much interest. The situation changed when environmentalists became aware of the huge propaganda potential of estrogenic activity of pesticides such as DDT and begun using that activity as one of the tools helping their efforts to bring about a ban of man-made pesticidal compounds. In many ecological publications the hormonal activity of industrial compounds was suitably enlarged and horrifying scenarios were developed, some of them predicting even the end of mankind due to cancer and catastrophic reduction of fertility [4–7]. As usual, the mass media are happily helping to ring the alarm bells.

Fortunately there are several reasons to dismiss the environmental estrogens scare. First of all, plants such as rice, wheat, cabbage, potatoes and many other contain substantial amounts of compounds with estrogenic activity but are eaten daily without harm. And there are no scientific grounds to believe that industrial estrogens are more harmful than phytohormones.

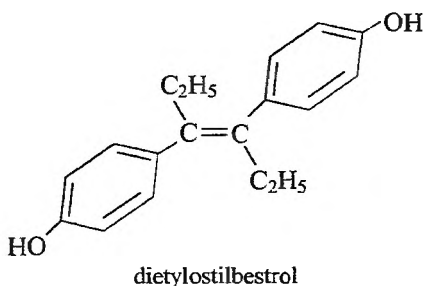
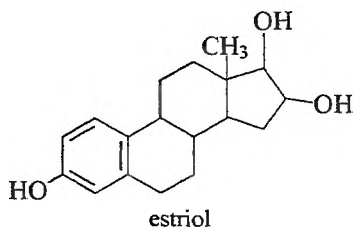
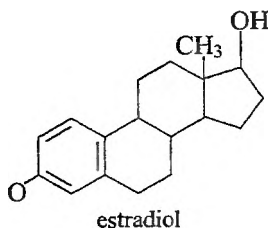
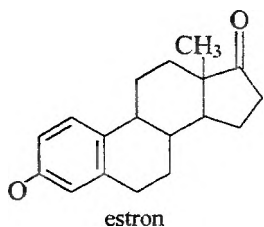
Some specific and very recent developments in the field of environmental estrogens include the fertility of males, the alleged synergistic potentiation of weak estrogens and the problem of their cancerogenic activity. The problem of fertility emerged with a publication by Danish scientists [13] who claimed that the sperm counts in otherwise healthy men are very rapidly decreasing. For obvious reasons the problem received much attention and the Danish publication was followed by several papers on sperm counts, e.g. [14, 15]. However, no one was able to confirm the claims of Danish scientists.

The problem of synergism ended with a scandal. The paper claiming a thousandfold increase of estrogenic activity when mixtures are applied instead of single compounds [16] was retracted [21] and one of the authors admitted cheating (Science, 2001, 294, 763).

Finally, the accusation that DDE (one of the metabolites of DDT) is responsible for breast cancer in women [22] was convincingly disproved [23–25]. And so ended the environmental estrogens scare.

WPROWADZENIE

Estrogenami nazywamy żeńskie hormony płciowe: estron, estradiol i estriol, wydzielane przez jajniki i nadnercza. Naturalne estrogeny zawierają szkielet steroidowy. Estrogenną aktywność wykazują liczne niesterydowe związki naturalne i syntetyczne. Jednym z estrogenów syntetycznych jest dietylostilbestrol.



Estron, estradiol i estriol są używane w leczeniu. Do niedawna lekiem stosowanym w leczeniu hormonalnych zaburzeń u kobiet był również dietylostilbestrol, ale został wycofany z powodu podejrzenia o działanie rakotwórcze [1]. Z tego samego powodu zakazano również stosowania dietylostilbestrolu w hodowli bydła, nierogacizny i drobiu, gdzie przez wiele lat był używany jako bardzo skuteczny przyspieszacz przyrostu wagi zwierząt [2].

W ekologicznej literaturze termin „środowiskowe estrogeny” odnosi się do zanieczyszczających środowisko związków pochodzenia przemysłowego, które mają aktywność estrogeną. W ścisłym znaczeniu termin ten obejmuje także estrogenne substancje wytwarzane przez rośliny (fitoestrogeny). Roślinne estrogeny jednak rzadko są wspomniane przez ekologów, którzy całą swoją uwagę koncentrują na związkach wytwarzanych w fabrykach chemicznych.

Do 1950 r. estrogeny pozostawały w sferze zainteresowań tylko fizjologów, lekarzy i hodowców zwierząt. Sytuacja ta zmieniła się, gdy zaobserwowano śladowe działanie hormonalne chlorowanych insektycydów, a przede wszystkim DDT [3]. Od tego momentu jeszcze bardziej nasiliła się propagandowa kampania przeciwko DDT, a hormonalne działanie tego insektycydu stało się jednym z najważniejszych argumentów w walce organizacji ekologicznych o zakaz

produkcji i stosowania DDT i innych środków ochrony roślin. Paul Ehrlich, znany autor przepowiedni, które nigdy się nie sprawdziły, w jednej ze swoich książek pisze dosłownie:

Wzrastająca liczba dowodów świadczy o tym, że niektóre syntetyczne związki wykazują strukturalne podobieństwo do naturalnych hormonów i w subtelny, podstępny sposób mogą zaburzać normalny rozwój zwierząt i ludzi. Związki te mogą stanowić **potencjalnie gigantyczne zagrożenie** całej ludzkości [4].

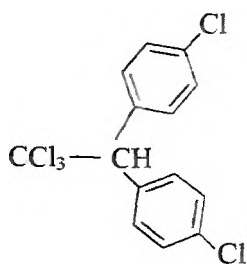
Podobne stanowisko zajmują autorzy innych książek propagujących zagrożenia ludzkości przez syntetyczne związki naśladujące naturalne hormony estrogenne [5, 6]. Szczególnie duży wpływ na opinię publiczną wywarła książka pod wymownym tytułem *Our Stolen Future (Nasza skradziona przyszłość)* [5]. Jej autorzy przewidują rozmaite nieszczęścia, m.in. to, że hormonalnie aktywne insektycydy i inne produkty przemysłu chemicznego spowodują bezpłodność mężczyzn i doprowadzą do wymarcia całej ludzkości.

Książka J. Thorntona [6] jest szczególnie niebezpieczna, ponieważ jest frontalnym atakiem nie tylko na syntetyczne związki o działaniu hormonalnym, ale także na wszystkie związki chloru, bez żadnego wyjątku. Autor, ni mniej ni więcej, domaga się całkowitego zakazu produkcji chloru i wszystkich jego związków organicznych. Organizacje ekologiczne, zachęczone sukcesami w postaci wprowadzenia zakazu produkcji i używania DDT w 1972 r. [8], freonów w 1987 r. [9] i tzw. POP⁽¹⁾ [10] w maju 2001 r., żądają coraz więcej, a ich dotychczasowe sukcesy każą się obawiać nowych rygorystycznych zakazów o coraz poważniejszych konsekwencjach ekonomicznych. Można temu zapobiec tylko przez lepsze poinformowanie społeczeństwa o zagrożeniach przez syntetyczne związki chloru.

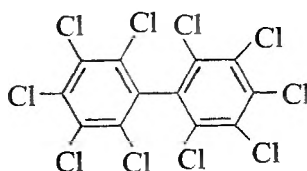
1. CZY NALEŻY SIĘ BAĆ ROŚLINNYCH I SYNTETYCZNYCH ESTROGENÓW?

Niektóre produkty przemysłowe, m.in. DDT i PCB, działają podobnie do hormonów estrogennych. Według alarmistycznych publikacji objawia się to np. tym, że samice narażone na działanie niektórych związków chloroorganicznych wydają na świat więcej osobników płci żeńskiej niż męskiej, a u męskich osobników występuje zanik organów płciowych [9] i zmniejszenie zdolności do reprodukcji. DDT i PCB zostały uznane za zakazane w latach 70. i od tego czasu ich stężenie w środowisku systematycznie maleje. Powstają zatem pytania, dlaczego dopiero teraz organizacje ekologiczne podnoszą alarm i każą nam się bać tych związków i czy szerzone przez ekologów obawy rzeczywiście są uzasadnione?

(¹) Persistent Organic Pollutants (organiczne zanieczyszczenia długo przebywające w środowisku).



DDT

Dekachlorobifenyl
(jeden z PCB)

Okazuje się, że ekologiczne alarmy nie znajdują najmniejszego nawet uzasadnienia. Między innymi dowodzą tego fakty i niepodważalne obserwacje, przedstawione dalej. Jednym z poważnych argumentów przeciwko szerzeniu strachu przed syntetycznymi estrogenami jest obecność znacznych ilości naturalnych substancji estrogennych w licznych roślinach jadalnych, które spożywamy w dużych ilościach [7, 9], (tabl. 1). Ekolodzy jednak nie ostrzegają nas przed spożywaniem chleba, kapusty, ziemniaków i innych produktów rolnych. Według ekologów substancje naturalne nie stwarzają zagrożenia, nawet gdy mają podobne działanie do rzekomo groźnych substancji syntetycznych, i dlatego całą swoją uwagę zwrócili w stronę związków chemicznych wytwarzanych przez przemysł. Takie stanowisko jest wynikiem przeświadczeń, które nie mają żadnych podstaw naukowych.

Tabela 1. Przykłady roślin zawierających substancje estrogenne [9]

Zboża	Jarzyzny	Owoce	Używki
jęczmień	kapusta	jabłka	kawa
pszenica	szpinak	czereśnie	whisky
ryż	soja	śliwki	
żyto	ziemniaki		
	marchew		

Spożywamy wielokrotnie więcej estrogenów roślinnych niż produkowanych przez przemysł, ponieważ stężenia przemysłowych zanieczyszczeń naszej diety są znikomo małe w porównaniu ze stężeniami estrogenów w roślinach. Mimo dużego spożycia tylko w wyjątkowych przypadkach obserwuje się skutki działania roślinnych estrogenów. Na przykład z powodu dużej zawartości estrogenów nadmierne spożycie soi może powodować zaburzenia cyklu miesiączkowego u kobiet [9]. Nikt jednak z tego powodu nie przestrzega przed spożywaniem soi. Wręcz przeciwnie, zwolennicy jarskiej kuchni prześcigają się w kulinarnych propozycjach wykorzystujących różne produkty sojowe.

Skoro fitoestrogeny nie są szkodliwe, to zanieczyszczające środowisko estrogeny pochodzenia przemysłowego nie mogą być powodem do obaw, ponieważ

ich estrogenne działanie jest bardzo słabe, a ponadto występują one w bardzo niskich stężeniach. Z naszą dietą wchłaniamy kilkadziesiąt milionów razy mniej estrogennych substancji pochodzenia przemysłowego niż naturalnych estrogenów roślinnych [11].

Jeszcze bardziej uderzające jest porównanie z pigułkami zapobiegającymi ciąży. Każda taka pigułka zawiera ładunek estrogenów sześć miliardów razy większy od ładunku codziennie wchłanianego z pożywieniem z powodu zanieczyszczeń estrogenami przemysłowymi. Jak wobec tego uzasadnić szerzenie strachu przed syntetycznymi estrogenami, które rzekomo mają tak potężne działanie, że zagrażają samemu istnieniu ludzkości?

Niełatwo jednak dyskutuje się z ekowojownikami, ponieważ oni nigdy nie rezygnują ze swoich poglądów. Colborn, Dumanoski i Myers odpierają zarzuty przez ucieczkę w nieznanne [5]. Piszą po prostu, że na temat syntetycznych estrogenów wiemy jeszcze zbyt mało, żeby wyciągać ostateczne wnioski. Niedostateczna wiedza nie przeszkadza im jednak w historycznym szerzeniu strachu, aż do przewidywania rychłej zagłady ludzkości przez zawarte w pożywieniu syntetyczne estrogeny.

2. PROBLEM ZMNIEJSZAJĄCEJ SIĘ PŁODNOŚCI MĘŻCZYZN

Propagatorów strachu przed syntetycznymi estrogenami zanieczyszczającymi środowisko spotkały trzy bardzo oczywiste i wielkie kompromitacje. Najpierw zdemaskowane zostały ich kłamstwa w sprawie zmniejszającej się liczby plemników, następnie okazało się, że w rzeczywistości nie ma synergistycznego działania mieszanin estrogenów, a potem udowodniono, że nie są prawdziwe twierdzenia o rakotwórczym działaniu estrogennych środków ochrony roślin. Zaczniemy od liczby plemników. W osławionej książce [5] znajdujemy taki akapit:

Najbardziej dramatycznym i zatrważającym sygnałem, świadczącym, że syntetyczne estrogeny już wyrządziły wielką szkodę, jest duże zmniejszenie się liczby plemników w ludzkiej spermie w ciągu ostatnich 50 lat.

Twierdzenie to jest oparte na publikacji duńskich uczonych [13]. Zawarta w tej publikacji informacja o dramatycznie zmniejszonej liczbie plemników obiegnęła natychmiast cały świat, nagłośniona przez czekające na takie sensacje środki masowego przekazu. Nie trzeba dodawać, że wiadomość ta została też entuzjastycznie przyjęta przez organizacje ekologiczne, które skwapliwie wykorzystały ją do własnych propagandowych celów. Greenpeace, który nie cofa się przed niczym w pogoni za popularnością i składkami napływającymi od otumanionych ludzi, zamieścił w gazetach ogłoszenie, przedstawiające młodego mężczyznę z bardzo małym penisem. Podpis głosił: „Nawet w połowie nie jesteś takim mężczyzną, jakim był twój ojciec” [9]. Walcząc z ekowojownikami, dobrze jest wiedzieć, na jakim poziomie intelektualnym jest przeciwnik.

Zanim obalona została publikacja [13], ukazały się jeszcze trzy następne, w tym samym duchu. Potem jednak nastąpiła reakcja uczonych. Zebrano dużo informacji z różnych krajów o ilości plemników w spermie i przeanalizowano dane z publikacji [13]. Efekt był druzgocący: autorom publikacji [13] udowodniono duże błędy w statystycznej analizie wyników, a ponadto stwierdzono, że od 1970 r. (odkąd istnieją godne zaufania dane statystyczne na ten temat), nie nastąpiło na świecie zmniejszenie się liczby plemników w spermie [14, 15]. To wyjaśnia sprawę i nie wymaga dalszych dyskusji. Przy okazji jednak znów ujawniła się znana skądinąd brzydka cecha ekowojowników: gdy spotykają się z krytyką, której nie mogą obalić przez przytoczenie argumentów naukowych, to krytykującym autorom zarzucają, że piszą nieprawdę, ponieważ pozostają na żołdzie przemysłowych sponsorów [9].

3. EFEKT SYNERGISTYCZNY

Jak już wspomniano, nie musimy się obawiać syntetycznych estrogenów, ponieważ działają one tysiące razy słabiej od estronu i dietylostilbestrolu, a ponadto ich stężenie w naszym pożywieniu jest bardzo niewielkie. Jednak w 1996 r., ku wielkiej, choć krótkotrwałej radości ekowojowników, ukazał się artykuł o synergistycznym powiększaniu aktywności syntetycznych estrogenów [16]. Według tej pracy estrogeny, które mają słabe działanie, gdy są podawane pojedynczo, stają się tysiące razy silniejsze, gdy działają w mieszaninie z innymi, równie słabymi estrogenami. Wynikało stąd, że nawet słabe, nieszkodliwe estrogeny w sprzyjających okolicznościach mogą mieć działanie bardzo silne i mogą zagrozić normalnemu funkcjonowaniu organizmów zwierzęcych.

Już samo opublikowanie artykułu [16] w „Science”, naukowym tygodniku o ogromnym prestiżu, wystarczyło, by publikacji tej zapewnić światowy rozgłos. W trwającej w tamtych latach dyskusji na temat zakazu produkcji i stosowania związków z grupy POP⁽²⁾ publikacja [16] odegrała dużą rolę, ponieważ w bardzo istotnym stopniu wspomogła zwolenników zakazu.

⁽²⁾ Skrót POP oficjalnie zaistniał w ostatniej dekadzie XX w., gdy pojawił się w dokumentach ONZ. Znajdujemy go np. w dokumencie UNEP (*United Nations Environmental Programme*) dotyczącym przygotowań do zakazu produkcji i używania związków zaliczonych do grupy POP [17]. Prace przygotowawcze, polegające głównie na organizowaniu licznych i kosztownych konferencji międzynarodowych, zakończyły się konferencją w Sztokholmie w maju 2001 r., na której przedstawiciele 127 krajów uroczyście podpisali dokument nazywany *Konwencją sztokholmską w sprawie POP* [18]. Konwencja ta zakazuje lub drastycznie ogranicza produkcję, stosowanie lub emisję do środowiska 12 związków chloroorganicznych. Są to insektycydy (DDT i polichlorowane węglowodory cykloalifatyczne – aldryna, dieldryna, endryna, chlordan, heptachlor, mireks, toksafen i gameksan) oraz polichlorowane pochodne bifenyli (PCB), dioksyny i dibenzofuranu. W angielskim piśmiennictwie ekologicznym związki te są określane jako „the dirty dozen” [19], a polscy ekolodzy nazywają je „parszywą dwunastką” [20]. *Konwencja sztokholmska* właściwie tylko zatwierdziła i nadała wysoką rangę urzędową postanowieniom uchwalonym wcześniej na konferencji w Johannesburgu.

Radość ekologów, przekonanych, że nareszcie znaleźli mocny, naukowy argument potwierdzający postulowane przez nich wielkie zagrożenie ludzkości syntetycznymi estrogenami, szybko jednak ustąpiła ogromnemu rozczarowaniu. Publikacja [16] ukazała się w 1966 r., a już rok później zaczęły pojawiać się liczne głosy uczonych, którzy twierdzili, że nie mogą powtórzyć opisanych tam doświadczeń. Innymi słowy, jest to publikacja fałszywa. Fałszywość w sposób ostateczny potwierdziło odwołanie tej publikacji przez jej autorów [21]. Finał tej sprawy nastąpił jesienią 2001 r., kiedy to amerykańska agencja U.S. Public Health Service, która sfinansowała publikację [16], po oficjalnych dochodzeniach uznała, że jeden z jej autorów, Stephen F. Arnold, dopuścił się naukowego fałszerstwa (Science, 2001, 294, 763). Arnold przyznał się do winy i przez pięć lat nie będzie finansowany przez Public Health Service.

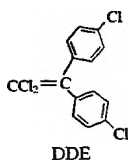
Jest rzeczą znamioną i bardzo smutną, że w literaturze dotyczącej różnych zagadnień ekologicznych wiele jest nieprawdziwych publikacji, ale ich autorzy najczęściej nie przyznają się do błędów.

W kwestiach ekologicznych bywa często tak, że tezy uznane za fałszywe długo pokutują w piśmiennictwie i znajdują posłuch w politycznych organach odpowiedzialnych za ochronę środowiska. Tak było i w przypadku synergistycznego działania estrogenów. Amerykańska Agencja Ochrony Środowiska (EPA, Environment Protection Agency) uznała, że brak doświadczalnych dowodów estrogennego efektu synergistycznego bynajmniej nie oznacza, że efekt taki nie może istnieć, może tylko nie został jeszcze odkryty. Zgodnie z takim przekonaniem EPA oświadczyła, że nie zmienia swego stanowiska w sprawie szkodliwości środowiskowych estrogenów [9]. Trudno jednak nie zauważyć, że jest to przekonanie co najmniej dziwne. Nie pierwszy to jednak raz EPA dała świadectwo lekceważenia opinii naukowych.

4. SYNTETYCZNE ESTROGENY I RAK SUTKA U KOBIET

Jednym z najbardziej istotnych elementów kampanii strachu przed estrogenami jest twierdzenie, że obecne w naszym pożywieniu pozostałości po syntetycznych środkach ochrony roślin spowodowały wzrost zachorowań kobiet na raka sutka. Sprawa miała swój początek w 1993 r., gdy grupa uczonych opublikowała pracę, według której istnieje związek między zawartością DDE we krwi kobiet i zachorowalnością na raka piersi [22]⁽³⁾.

⁽³⁾ DDE jest metabolitem DDT o wzorze



Autorzy tej publikacji zaalarmowali opinię publiczną, zwracając uwagę, że z powodu występowania estrogennych pestycydów w ludzkim pożywieniu ich rakotwórcze działanie może mieć dalekosiężne skutki. Wyrazili też pogląd, że wyniki ich badań powinny zmobilizować władze do działań zapobiegawczych. Organizacjom ekologicznym nie trzeba było silniejszych bodźców do podniesienia alarmu. Do szerzenia strachu wnet przyłączyły się wszystkie środki przekazu, nie wyłączając solidnego na ogół i rozsądnego miesięcznika „Scientific American” [23].

Przy powierzchniowej analizie może się wydawać, że wywoływanie nowotworów przez środowiskowe estrogeny ma silne podstawy teoretyczne, wiadomo bowiem, że ilość estrogenów wytwarzanych przez organizm kobiety pozostaje w związku z zachorowaniami na nowotwory. Rozsądne mogłoby się zatem wydawać twierdzenie, że obecne w pożywieniu syntetyczne substancje o estrogennym działaniu zwiększają całkowity ładunek estrogenów w kobiecym organizmie i mogą przyczyniać się do zachorowań na raka. Rzeczywistość jest jednak inna i o wiele bardziej skomplikowana [24].

Istnieje kilka ważkich argumentów, które nie pozwalają na przyjęcie twierdzenia, że środowiskowe estrogeny zwiększają liczbę zachorowań na raka. Są to następujące argumenty:

1. DDT i produkty jego degradacji są słabymi estrogenami, a jeśli chodzi o ich związek z nowotworami, to w doświadczeniach na zwierzętach zaobserwowano tylko tyle, że hamują rozwój guzów rakowych [25].

2. Rośliny zawierają estrogeny, ale nigdy nie zauważono, żeby jarska dieta sprzyjała rozwojowi nowotworów sutka.

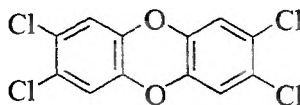
3. Nie zaobserwowano zwiększonej zachorowalności na nowotwory u kobiet, które w pracy zawodowej były narażone w ciągu wielu lat na działanie dużych dawek DDT i innych związków chloroorganicznych [25].

4. Liczba nowych przypadków raka sutka zwiększa się, podczas gdy już od kilkunastu lat zmniejsza się stężenie DDT i jego metabolitów w środowisku i w żywności [26]. Spadek stężenia jest oczywistą konsekwencją zakazu stosowania DDT do zwalczania owadów, obowiązującego w większości krajów na świecie mniej więcej od połowy lat 70. Nie wydaje się rozsądne przypuszczenie, że zmniejszające się stężenie szkodliwego czynnika powoduje zwiększone skutki.

Już w 1994 r., czyli wkrótce po ukazaniu się publikacji [22], która spowodowała tyle niepotrzebnego zamętu, ukazała się ważna praca, której autorzy wyraźnie stwierdzają, że istniejące obserwacje nie pozwalają na wyciąganie wniosków o rakotwórczym działaniu DDE [27]. Taką samą opinię znajdujemy w cytowanym już raporcie National Research Council [25]. Do 2000 r. ukazało się ok. dziesięć publikacji, które zgodnie stwierdzają, że nie ma związku między zachorowaniami na raka sutka a stężeniem DDE albo DDT.

Oprócz DDT, DDE i PCB także inne chloroorganiczne insektycydy były podejrzewane o wywoływanie nowotworów sutka, ale w szeroko zakrojonych badaniach

nie stwierdzono rakotwórczego działania dieldryny, hexachlorocykloheksanu i lindanu [28]. W publikacji [25] czytamy: „Analiza przeprowadzonych dotąd badań dowodzi, że DDT, DDE, TCDD i PCB nie wywołują nowotworów sutka”.



TCDD
(tetrachlorodibenzodioxyna)

Okazuje się zatem, że obawy o wywoływanie nowotworów przez pestycydy o słabym działaniu estrogennym są bezpodstawne. Podobnie bezpodstawne są obawy o zmniejszanie się płodności mężczyzn i o zwiększanie estrogennego działania przez efekt synergistyczny. Mimo niezaprzeczalnych dowodów nieistnienia tych zjawisk są one treścią książek i licznych mniejszych publikacji, a zwłaszcza tych, które są rozpowszechniane przez środki masowego przekazu i przez Internet [29].

Straszenie rakiem łatwo znajduje posłuch u ludzi i dlatego bez skrpułów jest wykorzystywane przez ekologiczne organizacje, które w ten niegodziwy sposób zdobywają popularność. Trudno jest jednak z tym walczyć, bo środki masowego przekazu odmawiają publikowania wypowiedzi obalających fałszywe przekonania ekologiczne. Prawdy można doszukać się tylko w czasopiśmie naukowych, ale kto czyta te czasopisma, oprócz garstki zainteresowanych uczonych?

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] J. Wickenden, *Our Daily Poison*, Bartholomew House, Inc., New York 1955.
- [2] E.M. Whelan, *Toxic Terror. The Truth behind the Cancer Scares*, Prometheus Books, New York 1993.
- [3] H. Burlington, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1950, 74, 48.
- [4] P.E. Ehrlich, A.H. Ehrlich, *Betrayal of Science and Reason. How Anti-Environmental Rhetoric Threatens Our Future*, Island Press/Shearwater Books, Washington D.C. 1998.
- [5] T. Colborn, D. Dumanoski, J. Myers, *Our Stolen Future: Are We Threatening Our Fertility, Intelligence, and Survival?*, Dutton, New York 1996.
- [6] J. Thornton, *Pandora's Poison. Chlorine, Health and a New Environmental Strategy*, MIT Press, London 2000.
- [7] R.K. Naz (red.), *Endocrine Disruptors. Effects on Male and Female Reproductive Systems*, CRC Press, London 1999.
- [8] A. Wildavsky, *But Is It True? A Citizen's Guide to Environmental Health and Safety Issues*, Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, 1995.
- [9] B. Lomborg, *The Skeptical Environmentalist. Measuring the Real State of the World*, Cambridge University Press, 2001.
- [10] UN conference approves POP convention in Stockholm, <http://www.ourstolenfuture.org>

- [11] S.H. Safe, *Environmental Health Perspectives*, 1995, **103**, 346.
- [12] R.J. Golden, K.L. Noller, L. Titus-Ernstoff, R.H. Kaufman, R. Mittendorf, R. Stillman, E.A. Reese, *Critical Reviews in Toxicology*, 1998, **28**, 109.
- [13] E. Carlsen, A. Giwercman, N. Keiding, N.E. Skakkebaek, *Br. Med. J.*, 1992, **305**, 609.
- [14] J.A. Saidi, D.T. Chang, E.T. Goluboff, E. Bagiella, G. Olsen, H. Fish, *The Journal of Urology*, 1999, **161**, 460.
- [15] G.W. Olsen, K.M. Bodner, J.M. Romlow, C.E. Ross, L.I. Lipschultz, *Fertility and Sterility*, 1995, **63**, 887.
- [16] S.F. Arnold, D.M. Klotz, B.M. Collins, P.M. Vonier, L.J. Guillette Jr., J. McLachlan, *Science*, 1996, **272**, 489.
- [17] Decision 18/32 of the UNEP Governing Council: Persistent Organic Pollutants (POPs), May 1995; chem.unep.ch/pops/indxhtmls/gcl1832en.html
- [18] <http://www.ourstolenfuture.org/.../2001-0522popsconvention.ht>
- [19] <http://www.commondreams.org/headlines01/0520-01.htm>
- [20] M. Pecul, *Wiedza i Życie*, 1999, październik, s. 27.
- [21] J.A. McLachlan, *Science*, 1997, **227**, 462.
- [22] M.S. Wolff, P.G. Toniolo, E.W. Lee, M. Rivera, N. Dubin, *J. Internat. Cancer Inst.*, 1993, **85**, 648.
- [23] D.L. Davis, H.L. Bradlow, *Sci. Amer.*, 1995, **273** (4), 166.
- [24] S.H. Safe, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1998, **38**, 121.
- [25] National Research Council, *Hormonally active agents in the environment*, 1999. http://books.nap.edu/html/hormonal_agents/
- [26] T.M. Crisp, E.C. Clegg, R.L. Cooper, W.P. Wood, D.G. Anderson, K.P. Baetcke, J.L. Hoffmann, M.S. Morrow, D.J. Rodier, J.E. Schaeffer, L.W. Touart, M.G. Zeeman, Y.M. Patel, *Environmental Health Perspectives Supplement*, 1998, **106** (1), 11.
- [27] N. Krieger, M.S. Wolff, R.A. Hiatt, M. Rivera, J. Vogelman, N. Orentlich, *J. Int. Cancer Inst.*, 1994, **86** (8), 589.
- [28] Advisory Committee of the UK Department of Health, *Breast cancer risk and exposure to organochlorine insecticides: consideration of the epidemiology data on dieldrin, DDT and some hexachlorocyclohexane isomers*, <http://www.doh.uk/pub/docs/doh/ocbreast.pdf>.
- [29] *Poisoning the Future. Impacts of Endocrine-Disrupting Chemicals on Wildlife and Human Health*, October 1997. <http://www.greenpeace.org/~toxics/reports/ptf.html>

Praca wpłynęła do Redakcji 16 listopada 2001

**NOWOCZESNE TECHNIKI ANALITYCZNE
WYKORZYSTUJĄCE PLAZMĘ
INDUKCYJNIE SPRZEŻONĄ
JAKO ŹRÓDŁO WZBUDZENIA I JONIZACJI**

**INDUCTIVELY COUPLED PLASMA AS A SOURCE
OF EXCITATION AND IONIZATION
FOR MODERN ANALYTICAL TECHNIQUES**

**Elżbieta Skrzydlewska¹, Maria Balcerzak¹,
Piotr Paślawski²**

¹*Katedra Chemii Analitycznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska
ul. Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa*

²*Centralne Laboratorium Chemiczne, Państwowy Instytut Geologiczny
ul. Rakowiecka 4, 00-975 Warszawa*

Abstract

1. Ogólna charakterystyka technik ICP-AES i ICP-MS
2. Technika ICP-AES
 - 2.1. Aparatura stosowana w technice ICP-AES
 - 2.2. Optymalizacja warunków pomiaru
3. Technika ICP-MS
 - 3.1. Aparatura stosowana w technice ICP-MS
 - 3.2. Optymalizacja warunków pomiaru
4. Czynniki zakłócające oraz sposoby ich korekcji
 - 4.1. Interferencje fizyczne
 - 4.2. Efekty matrycowe
 - 4.3. Interferencje chemiczne
 - 4.4. Interferencje spektralne

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane



Mgr inż. Elżbieta Skrzydlewska jest absolwentką Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej. W ramach pracy magisterskiej prowadziła badania nad wykorzystaniem technik plazmowych sprzężonych z atomową emisyjną spektrometrią (ICP-AES) i spektrometrią mas (ICP-MS) do oznaczania śladowych ilości chromu i wanadu w glebach. Badania prowadzone były w Centralnym Laboratorium Chemicznym Państwowego Instytutu Geologicznego w Warszawie oraz na Uniwersytecie w Pau we Francji w zespole badawczym prof. R. Łobińskiego, gdzie mgr Skrzydlewska przebywała na 6-miesięcznym stypendium w ramach programu „Sokrates”.

Mgr Skrzydlewska jest słuchaczką Studium Doktoranckiego na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej i pracuje nad oznaczaniem metali ciężkich w różnych materiałach środowiskowych z zastosowaniem do detekcji plazmy indukcyjnie sprzężonej w połączeniu ze spektrometrią mas.



Dr hab. Maria Balcerzak jest adiunktem w Katedrze Chemii Analitycznej Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej. Specjalność – analityka metali szlachetnych i analiza specjacyjna metali i metaloidów. Techniki instrumentalne wykorzystujące plazmę indukcyjnie sprzężoną dr Balcerzak stosowała w badaniach prowadzonych w zagranicznych ośrodkach uniwersyteckich.



Dr inż. Piotr Pasławski jest kierownikiem Centralnego Laboratorium Chemicznego w Państwowym Instytucie Geologicznym (Warszawa). Specjalność – analityka metali w wodach, glebach, osadach i próbkach geologicznych. Stosowane techniki instrumentalne: atomowa spektrometria absorpcyjna, atomowa spektrometria emisyjna ze wzbudzeniem w łuku prądu stałego i w plazmie indukcyjnie sprzężonej oraz fluorescencyjna spektrometria rentgenowska.

ABSTRACT

Plasma spectrometric techniques: inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry (ICP-AES) and inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) are rapidly becoming the most important analytical tools for the determination of trace amounts of elements. High speed, excellent detection limits, wide dynamic range and possibility of accurate multi-element analysis make the techniques particularly suited to the determination of ppb and sub-ppb levels of the analytes in complex matrices. Mass spectrometric methods offer unique capability of rapid isotopic ratios measurements.

Plasma techniques have found wide applications in analysis of geological, environmental and clinical samples. They have proved to be very useful in speciation studies due to extremely low sensitivities offered and the ease of on-line combination with separation techniques, in particular with chromatography.

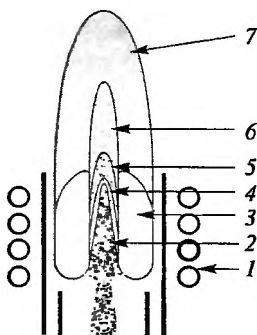
A brief review of ICP-AES and ICP-MS techniques is presented in the paper. The possibility and limitations of the techniques as analytical tools are discussed. The most important analytical parameters are collected in Table 1. Detailed characteristics of equipment used (Figs 2, 5): sample introduction systems, analyzers (Figs 4a, b and Figs 7-9) and detectors [18, 30, 43] are given. The discussion of experimental parameters, including the choice of analytical wavelengths (ICP-AES) and isotopes (ICP-MS), is presented. The main physical, matrix, chemical and spectral interferences occurring in analysis of real samples are characterized.

1. OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA TECHNIK ICP-AES I ICP-MS

Wprowadzone w ostatnich dekadach techniki analityczne wykorzystujące plazmę indukcyjnie sprzężoną (ICP – ang. *inductively coupled plasma*) jako źródło wzbudzenia i jonizacji szybko zdobyły wiodącą rolę w analizie instrumentalnej głównie dzięki niskim granicom detekcji (rzędu ppb), mniejszym w porównaniu z innymi technikami interferencjami, oraz dużej szybkości wykonywania analiz.

Mianem plazmy określa się zjonizowany gaz o odpowiednio dużej koncentracji cząstek naładowanych, *quasi*-obojętny elektrycznie, tzn. o jednakowej liczbie ładunków dodatnich i ujemnych. Plazmę można rozpatrywać jako zbiór cząstek obojętnych, jonów dodatnich i elektronów. Stosunek ilościowy poszczególnych postaci zależy od warunków wzbudzenia i temperatury plazmy. Plazma jest układem nie będącym w stanie równowagi [1]. To, gdzie kończy się gaz, a zaczyna plazma, jest sprawą umowną. Jako granicę między nimi można uznać stan, w którym liczba cząstek obdarzonych ładunkiem jest na tyle duża, że zaczyna zmieniać właściwości materii [2].

Plazma indukcyjnie sprzężona okazała się doskonałym źródłem wzbudzenia oraz jonów dla czułych i selektywnych analitycznych technik detekcji: atomowej emisyjnej spektrometrii (AES – ang. *atomic emission spectrometry*) [3–6] i spektrometrii mas (MS – ang. *mass spectrometry*) [4, 7–12]. We wstępnie zjonizowanym środowisku (najczęściej argonu), zapoczątkowanym przez wyładowanie iskrowe z transformatora Tesli, zmienne w czasie pole magnetyczne (27,56 MHz lub 40,68 MHz) indukuje przepływ prądu. Towarzyszy temu wytwarzanie dużych ilości ciepła. Drgające elektrony wywołują intensywną jonizację gazu i powstawanie plazmy. Aby wywołać efekt samopodtrzymywania się plazmy, potrzebne jest ciągle dostarczanie energii z cewki indukcyjnej. Nazwa ICP wywodzi się właśnie stąd, że plazma jest podtrzymywana przez indukcyjne ogrzewanie przepływającego gazu. Plazma sprzężona indukcyjnie jest widoczna jako intensywnie świecące wyładowanie o charakterystycznym kształcie (rys. 1). W plazmie



Rys. 1. Schemat plazmy indukcyjnie wzbudzonej: 1 – cewka indukcyjna, 2 – strefa wstępnego ogrzewania, 3 – strefa głównego wzbudzenia, 4 – kanał analityczny, 5 – wstępny obszar promieniowania, 6 – strefa analityczna, 7 – pióropusz plazmowy (zimny stożek plazmy); 5 i 6 tworzą razem tzw. kanał centralny

wyróżniamy kilka stref, które są łatwo rozróżnialne po wprowadzeniu do niej próbki zawierającej itr, dzięki różnicom w zabarwieniu.

Pierwszą publikację na temat możliwości wykorzystania plazmy do celów analitycznych opublikował Greenfield z Birmingham (Anglia) w 1964 r. [13]. Praca dotyczyła połączenia plazmy indukcyjnie sprzężonej z detekcją optyczną (ICP-AES). Równoległe z pracami Greenfielda, Dickinson i Fassel zajmowali się metodami doprowadzania próbek do plazmy w postaci rozpylonych roztworów [14]. Początkowo technika ICP-AES nie dawała lepszych wyników niż znana i powszechnie stosowana płomieniowa atomowa absorpcyjna spektrometria (FAAS). Prowadzono jednak dalsze badania nad udoskonaleniem techniki. Badania dotyczyły m.in. obniżenia poziomu szumów, bardziej ekonomicznego wykorzystania strumieni Ar, zastosowania innych rodzajów gazów, optymalizacji kształtu palnika oraz różnych metod doprowadzania próbki do plazmy. Intensywne prace nad rozwojem aparatury umożliwiły wprowadzenie w latach 70. pierwszych handlowo dostępnych aparatów wykorzystujących technikę ICP-AES. W aparatach tych stosowano pionowe ustawienie plazmy, w okresie późniejszym wprowadzono także aparaty z poziomym ustawieniem palnika plazmowego.

Połączenie plazmy indukcyjnie sprzężonej ze spektrometrem masowym po raz pierwszy zastosował Gray w 1978 r. [15]. Pierwsze komercyjne instrumenty wykorzystujące technikę ICP-MS pojawiły się w 1983 r.

Za pomocą technik ICP-AES i ICP-MS można oznaczać prawie wszystkie pierwiastki układu okresowego. Technikami tymi nie oznacza się: gazów szlachetnych, pierwiastków zbyt radioaktywnych lub o krótkim czasie półtrwania oraz atomów H, C, O, N, F. W obu omawianych technikach istnieje możliwość analizowania próbek stałych, ciekłych, gazowych, organicznych i nieorganicznych. Wysokie temperatury (do 10 000 K) zapewniają dużą wydajność wzbudzenia i jonizacji oraz niewielkie interferencje chemiczne. W temperaturze ok. 6000 K większość pierwiastków jest w 90% zjonizowana. Są to głównie jony dodatnie, pojedynczo naładowane. W mniejszym stopniu jonizacji ulegają takie pierwiastki, jak: As (52%), Se (33%), S (14%) i F ($9 \cdot 10^{-4}\%$).

Techniki ICP-AES i ICP-MS są technikami wielopierwiastkowymi. Liczba oznaczanych jednocześnie pierwiastków zależy od możliwości technicznych aparatury, rodzaju analizowanych próbek, stosowanych metod ich przygotowania oraz wymaganej jakości otrzymywanych wyników. Czas potrzebny do rejestracji sygnału pojedynczej próbki zależy głównie od: liczby oznaczanych pierwiastków, stosowanego czasu integracji i rodzaju analizatora. W technice ICP-AES pomiar może trwać od 30 s do kilkunastu minut. Przy pomiarze równoczesnym czas potrzebny do detekcji ok. 30 pierwiastków (liczba pierwiastków zależy od liczby dostępnych szczelin wyjściowych) wynosi ok. 1–2 min, podczas gdy do oznaczenia tej samej liczby pierwiastków za pomocą spektrometru sekwencyjnego ok. 15 min. Średnio na taki pomiar w technice ICP-AES (analiza równoczesna) zużywa się ok. 2–3 mL roztworu, natomiast przy analizie sekwencyjnej ok. 30 mL. W technice ICP-MS pomiar sygnału wszystkich pierwiastków zajmuje ok. 2–3 min i zużywa się ok. 3–4 mL roztworu.

Techniki ICP-AES i ICP-MS cechują się szerokim zakresem prostoliniowości krzywej kalibracyjnej (3–6 rzędów wartości stężenia). W technice ICP-AES analityczny zakres stężeń [16] obejmuje zwykle stężenia od ng/g (ppb) do kilku procent, natomiast w technice ICP-MS od pg/g (ppt) do µg/g (ppm). Obniżenie czułości w stosunku do optymalnej jest najczęściej spowodowane efektami matrycowymi lub źle dobranymi warunkami pomiaru.

W celu scharakteryzowania metody analitycznej często podaje się tylko dolną granicę, tzw. granicę wykrywalności (DL – ang. *detection limit*). Granica wykrywalności jest często definiowana jako minimalne stężenie analitu (pierwiastka oznaczanego) w próbce, dla którego uzyskiwany sygnał (y) równy jest wartości sygnału tła (y_B) zwiększonego zwykle o trzy odchylenia standardowe (SD_B) tła [17]:

$$y = y_B + 3SD_B \quad \text{lub, po odpowiednim przekształceniu,} \quad DL = 3SD_B/a,$$

gdzie a oznacza współczynnik kierunkowy krzywej kalibracyjnej.

Rzeczywista granica wykrywalności zależy od wielu czynników, m.in. od rodzaju i stężenia matrycy, rodzaju używanych kwasów, czystości stosowanych odczynników, sposobu doprowadzania próbki do plazmy oraz stanu technicznego aparatury. Parametry te mogą mieć również wpływ na stabilność warunków panujących w plazmie, a tym samym na precyzję pomiarów.

Precyzja odzwierciedla stopień rozrzutu poszczególnych wyników (x_i) od wyniku średniego (x_{SR}) obliczonego z n pomiarów. Jest ona określana przez względne odchylenie standardowe (RSD) [17]. Precyzja może być krótko- lub długoterminowa. Pierwsza wyznaczana jest przez kilkakrotny pomiar tej samej wartości w krótkim odstępie czasu (zwykle jeden pomiar za drugim). Precyzja krótkoterminowa waha się na ogół w przedziale 0,1–3% (ICP-MS), 0,3–2% (ICP-AES). Precyzja długoterminowa kontrolowana jest przy użyciu standardów wewnętrznych lub przez pomiar sygnału tej samej próbki w dłuższym okresie (kilku godzin). Dla obydwu technik plazmowych precyzja długoterminowa jest zwykle < 5%.

W tab. 1 przedstawiono podstawowe parametry analityczne obu omawianych technik.

Tabela 1. Porównanie wybranych parametrów analitycznych technik ICP-AES i ICP-MS

Parametr	ICP-AES	ICP-MS
Granica wykrywalności ng · g ⁻¹	~0,5–100	~7 · 10 ⁻⁴ – 5 · 10 ⁻¹
Zakres prostoliniowości	10 ⁵	10 ⁵
Precyzja (RSD)	0,3–2%	1–3%
Interferencje		
– spektralne	średnie	średnie
– matrycowe	średnie	średnie
Stężenie soli w roztworze	2-kilkanaście%*	0,1–0,4%
Czas pomiaru	jednocz. 5–30 pierw./min sekwen. 1–2 pierw. / min	jednocz. 2–6 min

cd. tab. 1

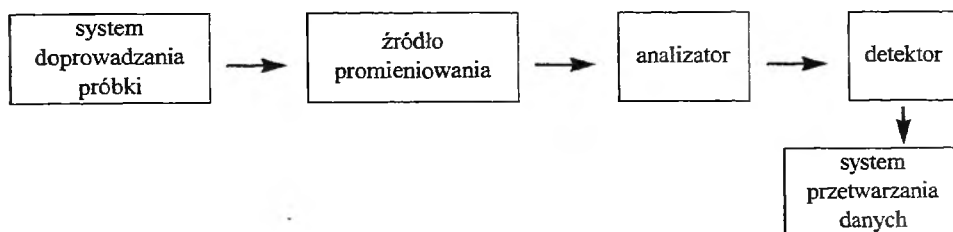
Zużycie próbki	2–7 mL w zależności od rodzaju analizatora	1–3 mL
Analiza wielopierwiastkowa	sekwencyjna lub jednoczesna	sekwencyjna lub jednoczesna
Relatywny koszt instrumentu	wysoki	bardzo wysoki
Koszty eksploatacyjne	wysokie, głównie koszt argonu, regularna wymiana palnika	bardzo wysokie, głównie koszt argonu, regularna wymiana palnika i stożków

* Przy stężeniu przekraczającym kilkanaście % plazma z reguły gaśnie lub jej stabilność jest bardzo mała. Mogą się również pojawić silne efekty pamięciowe układu.

2. TECHNIKA ICP-AES

2.1. APARATURA STOSOWANA W TECHNICIE ICP-AES

Przyrząd do pomiaru techniką ICP-AES składa się z następujących elementów: systemu doprowadzania próbki, źródła promieniowania, analizatora, detektora, komputerowego systemu zbierania i przetwarzania danych (rys. 2).



Rys. 2. Schemat blokowy instrumentu wykorzystywanego w technice ICP-AES

2.1.1. Sposoby doprowadzania próbki do plazmy

2.1.1.1. Nebulizacja. Próbką jest najczęściej doprowadzana do plazmy w postaci aerozolu ciecz–gaz otrzymywanego w procesie nebulizacji pneumatycznej [18]. Roztwór próbki podawany jest do nebulizera przez pompę perystaltyczną. W nebulizerach pneumatycznych aerozol może być wytwarzany w wyniku gwałtownego rozprężania gazu (nebulizer koncentryczny), zderzenia się roztworu z płynącym prostopadle do niego gazem (nebulizer krzyżowy) lub w inny sposób (np. nebulizer Babingtona, rowkowy). Aby zapewnić stabilność plazmy, większe krople powinny ulec kondensacji w komorach mgielnych. Wydajność nebulizacji pneumatycznej wynosi ok. 1–2%. W wyniku wprowadzania do plazmy większych ilości rozpuszczalnika w postaci aerozolu następuje schładzanie plazmy, co z kolei obniża wydajność atomizacji i jonizacji.

Wadę tę usuwają nebulizery ultradźwiękowe, w których aerozol powstaje w wyniku drgań membrany. Przez ogrzewaną rurę jest on kierowany do kondensera rozpuszczalnika. W ten sposób do plazmy wprowadzany jest suchy aerozol

(ciało stałe–gaz) i nie traci się energii na proces desolvatacji. Nebulizery te cechuje większa wydajność nebulizacji. Nebulizer ultradźwiękowy jest jednak bardzo wrażliwy na rodzaj i stężenie matrycy oraz charakteryzuje się silniejszym efektem pamięciowym [19, 20].

2.1.1.2. Generowanie lotnych wodorków. W metodzie tej do zakwaszonej próbki dodawany jest czynnik redukujący, najczęściej NaBH_4 [21]. W wyniku reakcji między kwasem a odczynnikiem redukującym powstaje atomowy wodór, tworzący z wieloma pierwiastkami lotne w temperaturze pokojowej wodorki. Są one przenoszone do plazmy przez gaz nośny. Wykorzystując lotność poszczególnych wodorków, można je oddzielić od matrycy, a przez to zmniejszyć efekty matrycowe. Szybkość doprowadzania próbki tą metodą jest ok. 10 razy większa niż przy stosowaniu rozpylaczy pneumatycznych; efektywność dochodzi do 100%. Technika można stosować do oznaczania pierwiastków tworzących lotne wodorki, np. Sb, As, Bi, Ge, Pb, Se, Te, Sn [22]. Podstawową wadą tej metody jest niestabilność plazmy, kiedy razem z wodorkami do plazmy wprowadzany jest nieprzereagowany kwas. Ostatnio szczegółowo badano proces transportu do plazmy wielu metali (Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, Ti, Zn) w ciągłym układzie generowania wodorków [23].

2.1.1.3. Odparowanie elektrotermiczne. Innym sposobem doprowadzania próbki do plazmy jest zastosowanie połączenia z piecem grafitowym [24] lub innym elektrochemicznym układem stosowanym do odparowywania niewielkich ilości cieczy lub próbek stałych. Próbkę umieszcza się na podłożu, np. grafitowym, które jest ogrzewane oporowo. Odparowywana próbka jest wprowadzana do plazmy razem z gazem nośnym. Zaletą metody są niskie granice detekcji, rzędu kilku ppb, wadą – mniejsza precyzja [25]. Ilość próbki potrzebna do analizy może być bardzo mała. Utrudnienie stanowi konieczność dostosowania warunków temperaturowych przy odparowywaniu do rodzaju analizowanej próbki oraz w przypadku analizy ciał stałych niejednorodność analizowanego materiału.

2.1.1.4. Metody bezpośrednie. Próbki stałe i ciekłe można wprowadzać do plazmy metodami bezpośrednimi. Stosuje się dwie techniki [18]: wprowadzanie próbki na nośniku (elektrodzie grafitowej) – w przypadku doprowadzania próbek stałych do obszaru wyładowania, oraz bezpośrednie wstrzykiwanie próbki w obszar wyładowania za pomocą umieszczonej wewnątrz palnika kapilary – w przypadku doprowadzania próbek ciekłych.

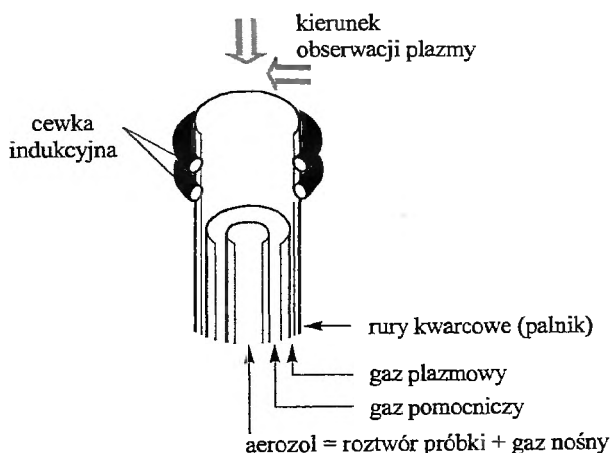
W metodach tych podstawowym problemem, podobnie jak przy wyładowaniu iskrowym czy łukowym, jest odparowywanie materiału elektrody oraz tworzenie związków trudno wzbudzających się ze składnikami powietrza otaczającego plazmę. Podstawowe zalety obu technik to blisko 100% efektywność transportu próbki do plazmy oraz jej małe zużycie.

2.1.1.5. Ablacja. Ablacja (albo inaczej proces erozji) polega na odparowaniu (sublimacji) materiału z powierzchni próbki w wyniku wyładowania łukowego lub iskrowego. Odparowana część jest transportowana do plazmy w strumieniu argonu. Aby uniknąć oddziaływania próbki z powietrzem, wyładowanie przeprowadza się w atmosferze czystego argonu.

Ablacja laserowa jest nowoczesną techniką, w której próbka ulega odparowaniu pod wpływem oddziaływania wiązki laserowej. Jest stosowana przede wszystkim do bezpośredniego doprowadzania próbek stałych do plazmy [26, 27]. Podstawowa przewaga ablacji laserowej nad klasyczną to możliwość bardzo precyzyjnego odparowania materiału badanego z możliwością regulacji głębokości, z której następuje odparowanie. Metoda ta doskonale nadaje się do mikroanaliz, przy czym próbka nie musi mieć właściwości przewodzących.

2.1.2. Palniki

Typowy palnik stosowany w technikach plazmowych składa się z trzech koncentrycznie ustawionych rurek – jedna wewnątrz drugiej (rys. 3). Pierwsze dwie rurki są kwarcowe, środkowa część może być wykonana z materiału ceramicznego. Jest ona nazywana iniektorem. Wokół górnej części palnika zamontowana jest miedziana cewka indukcyjna chłodzona od wewnątrz wodą. Najczęściej wykorzystuje się moc cewki z zakresu 0,8–1,5 kW. Wewnątrz każdej z rurek przepływa gaz. Schemat palnika z wyszczególnieniem stosowanych w ICP-AES strumieni gazowych pokazano na rys. 3. Ułożenie palnika może być pionowe lub poziome. Plazmę można „obserwować” na dwa sposoby: wzdłuż jej osi (obserwacja kanału centralnego) lub prostopadłe do niej (obserwacja określonego fragmentu plazmy). Pierwszy sposób obserwacji wykorzystuje się, gdy palnik ustawiony jest poziomo, drugi przy ustawieniu pionowym. Dostępne są również spektrometry umożliwiające obserwację plazmy obydwiema metodami równocześnie.

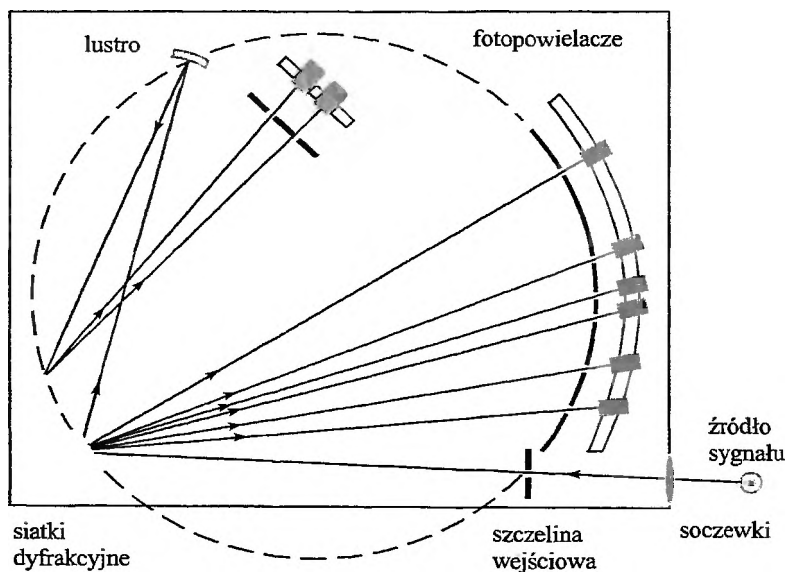


Rys. 3. Budowa palnika stosowanego w technikach plazmowych

2.1.3. Analizator

Zadaniem analizatora jest rozdzielenie złożonego widma emitowanego przez pierwiastki ze strefy wzbudzenia na składowe o różnych długościach fal. Dwa najczęściej wykorzystywane w spektrometrach ICP-AES analizatory to: poli- i monochromator [28]. Spektrometr ICP-AES może zawierać obydwaj analizatory równocześnie. Polichromator umożliwia rozdzielenie fal z zakresu 170–850 nm, monochromator z zakresu 160–500 nm. Promieniowanie dociera do analizatora przez światłowody lub szklaną tubę przemywaną w przeciwnym kierunku azotem (zapobiega to pochłanianiu promieniowania przez tlen w zakresie 190–200 nm). Światłowody nie mogą być stosowane przy długościach fal poniżej 200 nm.

2.1.3.1. Polichromator. Najczęściej wykorzystywany w ICP-AES polichromator składa się z układu Paschen-Rünge umieszczonego na kole Rowlanda (rys. 4a). Polichromator umożliwia pomiar wielu sygnałów w tym samym czasie, dlatego urządzenie mające tego typu analizator nazywa się spektrometrem równoczesnym. W polichromatorze wyizolowana wiązka światła skupiana jest przez soczewkę znajdującą się przed szczeliną wejściową i kierowana na nieruchomą siatkę dyfrakcyjną, na której następuje rozszczepienie wiązki promieniowania. Siatka dyfrakcyjna składa się z określonej liczby rowków wykonanych na materiale odbijającym (np. Al) naniesionym na podłożu szklane lub kwarcowe. Uzyskane wiązki promieniowania przechodzą następnie przez szczeliny wyjściowe rozmieszczone na kole Rowlanda. Ich rozmieszczenie zależy od rodzaju oznaczanych pierwiastków i wybranych linii analitycznych. Szczelin wyjściowych jest na ogół 20–40.

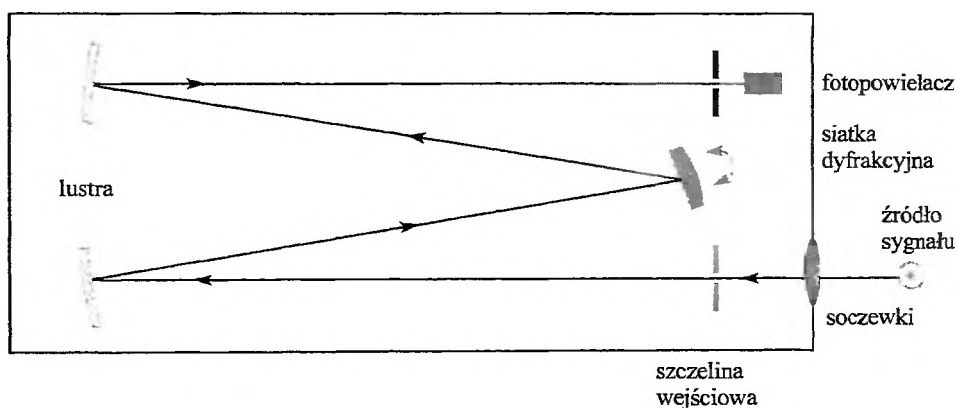


Rys. 4a. Schemat polichromatora typu Paschen-Rünge stosowanego w technice ICP-AES

Pomiar promieniowania o długościach fal poniżej 200 nm (np. Al, P) wymaga, aby spektrometr znajdował się w komorze próżniowej lub w komorze przepływającej argonem albo azotem. Promieniowanie o długościach fal powyżej 500 nm (np. Na, K) kierowane jest na specjalne lustro, które odbija je w kierunku dodatkowej siatki dyfrakcyjnej. Jest to tzw. układ *flat-field* [29] lub inaczej mały polichromator. Rozszczerzone promieniowanie przechodzi przez szczeliny wyjściowe do detektorów. Układ ten znajduje się wewnątrz koła Rowlanda i jest wyposażeniem dodatkowym.

Wadą polichromatorów jest to, że linie analityczne muszą być wybrane przed montażem spektrometru. Istnieje możliwość analizowania również innych linii niż podane przez producenta, jednak w bardzo ograniczonym zakresie. Wadą jest także koszt aparatu związany z koniecznością instalowania fotopowielacza dla każdej wybranej linii. Niedogodności te rekompensuje możliwość pomiaru wielu pierwiastków w krótkim przedziale czasowym, a co za tym idzie – niższy koszt analizy oraz możliwość stosowania standardów wewnętrznych.

2.1.3.2. Monochromator. Monochromator umożliwia pomiar promieniowania o dowolnej długości fali z zakresu 160–500 nm. Stanowi to podstawową zaletę w stosunku do polichromatora. Każda wydzielona wiązka promieniowania jest kolejno kierowana do detektora, dlatego spektrometry zawierające monochromator nazywa się spektrometrami sekwencyjnymi. Najczęściej spotykanym typem monochromatora jest monochromator Czerny–Turner (rys. 4b). Skupione na soczewce wejściowej promieniowanie kierowane jest w monochromatorze na lustro, które odbija je w kierunku siatki dyfrakcyjnej. W tym przypadku siatka jest elementem ruchomym. Jest ona ustawiana komputerowo pod odpowiednim kątem, tak że do drugiego lustra dociera tylko promieniowanie o odpowiedniej długości fali. Po odbiciu jest ono kierowane ku szczelinie wyjściowej, za którą znajduje się detektor. Możliwa jest też opcja, w której siatka jest nieruchoma, a de-



Rys. 4b. Schemat monochromatora typu Czerny–Turner stosowanego w technice ICP-AES

tektor porusza się bardzo szybko i precyzyjnie ustawia przy wybranej szczelinie wyjściowej. Pierwszy system nazywa się poszukiwaniem pików, szczytu (ang. *peak search*), drugi bezpośredniego odczytu (ang. *direct reading*). Wadą monochromatorów jest mniejsza szybkość detekcji. Czas analizy wydłuża się wraz z liczbą analizowanych pierwiastków i wymaga większej ilości roztworu niż przy analogicznym pomiarze za pomocą polichromatora. Koszt analizy jest większy, ale za to możliwa jest detekcja dowolnej linii z podanego wcześniej zakresu widma. Układ pomiarowy jest prostszy i tańszy.

2.1.4. Detektor

Zadaniem detektora jest przetworzenie uzyskanego sygnału na sygnał elektryczny. Najczęściej spotykanym detektorem w technice ICP-AES jest fotopowielacz [18]. Składa się on z fotoczułej katody i anody rozdzielonych przez kilka lub kilkanaście elektrod zwanych dynodami. Padający foton wybija z fotokatody fotoelektron, który uderzając w pierwszą dynodę, wybija dwa do pięciu elektronów wtórnych, te z kolei uderzają w następną dynodę i efekt wybijania elektronów powtarza się. Ilość elektronów wtórnych rośnie lawinowo, tak że końcowy współczynnik wzmocnienia wynosi 10^6 – 10^8 . Wytworzony sygnał elektryczny jest proporcjonalny do natężenia promieniowania docierającego do detektora, a więc proporcjonalny do stężenia pierwiastka w plazmie.

Stosuje się także detektor CID (ang. *Charge Injection Device*) [30]. Jest to tablica fotodiodowa składająca się z 10 000 lub więcej elementów światłoczułych ułożonych obok siebie na pojedynczym „chipie” krzemowym. Jedna lub dwie takie tablice pozwalają monitorować jednocześnie wszystkie interesujące długości fal. Analiza jakościowa odbywa się przez nakładanie „map” pierwiastków na uzyskane widmo spektralne.

2.2. OPTYMALIZACJA WARUNKÓW POMIARU

W celu uzyskania jak najdokładniejszych wyników analiz należy zoptymalizować warunki pomiaru daną techniką analityczną. Optymalizacja sprowadza się do takiego dobrania warunków oznaczania analitu, aby intensywność mierzonego sygnału była jak największa. Ważna jest nie tylko bezwzględna wielkość sygnału, ale również stosunek intensywności sygnału do intensywności tła. Im większa jest intensywność tła, tym bardziej jego fluktuacje wpływają na uzyskiwany sygnał analityczny, powodując większe jego wahania.

W analizie wielopierwiastkowej optymalizacja jest kompromisem. Nie optymalizuje się warunków dla każdego pierwiastka osobno, gdyż taka analiza wymagałaby każdorazowej zmiany parametrów, co z kolei znacznie wydłużałoby czas i koszt analizy. W przypadku analizy pierwiastków trudno wykrywalnych lub występujących w małych ilościach warunki dobiera się głównie pod kątem ich detekcji. Dla tych samych pierwiastków można uzyskać różne warunki

optymalne w zależności od tego, jaki rodzaj próbki będzie mierzony (np. gleby, wody). Jest to wynikiem różnic w poziomie zawartości oznaczanych pierwiastków, rodzaju matrycy, sposobu przygotowania próbki itp.

Znalezienie warunków optymalnych nie jest prostym zadaniem, ze względu na to, że jeden parametr jest ściśle powiązany z drugim. Najprostszym sposobem, ale i najmniej dokładnym, jest przyjęcie pewnego uproszczenia, mianowicie że optymalizuje się kolejne parametry według ich ważności (wywieranego wpływu na intensywność uzyskiwanego sygnału) przy standardowych ustawieniach innych parametrów. Za standardowe należy rozumieć wartości zalecane przez producenta lub najczęściej przytaczane w literaturze [31–33]. Po znalezieniu optimum dla pierwszego parametru ustala się jego wartość, po czym wyznacza się optymalną wartość dla następnego parametru. Decyzja, w jakiej kolejności optymalizować parametry, jest dość istotna.

2.2.1. Parametry pomiaru techniką ICP-AES

Przed przystąpieniem do pomiarów techniką ICP-AES należy zdecydować się, przy jakiej długości fali chcemy oznaczać dany pierwiastek, określić miejsce pomiaru tła, a następnie zoptymalizować parametry instrumentalne, takie jak: wysokość obserwacji, szybkość przepływu gazów, moc generatora częstotliwości radiowej oraz ilość podawanej próbki w czasie.

2.2.1.1. Wybór linii analitycznych. Wybór linii analitycznych jest jednym z ważniejszych etapów przed przystąpieniem do pomiarów. Z dużej liczby uzyskiwanych linii widmowych zwykle tylko kilka nadaje się do wykorzystania jako linie analityczne. Podstawowe kryteria, którymi należy się kierować przy wyborze linii analitycznych, to:

- promieniowanie o wybranej długości fali musi być możliwe do zmierzenia za pomocą posiadanego aparatu,
- linia analityczna powinna być wybierana spośród najbardziej intensywnych; szczególnie dotyczy to oznaczania pierwiastków występujących w próbkach w ilościach śladowych,
- tło występujące przy danej długości fali i w miejscu jego pomiaru (okolicy wybranej linii) powinno być stabilne; jeżeli tło ma kształt wypukły lub wklęsły, to podczas pomiarów niewielki dryf sygnału w czasie może powodować znaczne różnice w mierzonych wartościach,
- przed wyborem linii analitycznej dobrze jest znać przybliżony skład analizowanej próbki, tak aby móc przewidzieć możliwe interferencje; wybierane linie analityczne powinny być od nich wolne. Jeżeli interferencji tych nie da się uniknąć, to stosunek intensywności wybranej linii do intensywności linii interferenta powinien być jak największy, ponieważ wtedy błąd pomiaru będzie najmniejszy,
- linia analityczna powinna być tak wybrana, aby oznaczane stężenie analitu mieściło się w zakresie prostoliniowym krzywej kalibracji dla danej długości fali.

2.2.1.2. Dobór warunków obserwacji plazmy. Przy poziomym ustawieniu plazmy sygnał zbierany jest z kanału centralnego plazmy. Aby uzyskać najbardziej intensywny sygnał, wykonuje się tzw. centrowanie xy palnika (wzdłuż osi x i y), polegające na takim ustawieniu palnika, a właściwie osi plazmy, aby znajdowała się idealnie na wprost szczeliny wejściowej analizatora. Wtedy sygnał docierający do detektora jest najsilniejszy. Natomiast gdy plazma obserwowana jest z boku, przeprowadza się tzw. optymalizację wysokości obserwacji plazmy. Wysokość obserwacji określa się jako odległość w mm ponad górnym zwojem cewki indukcyjnej. Przy pionowym ustawieniu palnika plazmę „obserwuje” się na wysokości 10–20 mm. W obszarze tym można mierzyć zarówno linie atomowe, jak i jonowe. W strefie poniżej 10 mm występuje silne promieniowanie pochodzące od „otoczki” argonowej. W obszarze powyżej 20 mm obniża się temperatura plazmy i zaczyna dochodzić do procesów rekombinacji. W tej strefie mierzy się wyłącznie linie atomowe pierwiastków o niskich potencjałach wzbudzenia.

Nie zawsze wysokość obserwacji dobiera się tak, aby otrzymać najbardziej intensywny sygnał. Związane jest to z rozkładem temperatur panujących w plazmie [34]. Czasami bardziej opłaca się wybrać taką wysokość obserwacji, przy której intensywność sygnału nie jest maksymalna, ale za to mierzony sygnał jest bardziej stabilny.

2.2.1.3. Optymalizacja szybkości przepływów gazów. Gaz nośny jest gazem, który ma największe znaczenie spośród wszystkich stosowanych gazów w technice ICP. Gaz ten przepływa przez środkową część palnika z szybkością 0,3–2 L/min. Przepływ gazu nośnego zależy od rodzaju stosowanego nebulizera. Za jego pomocą próbka transportowana jest do plazmy. Szybkość przepływu wpływa na czas, w którym analit przebywa w obszarze wyładowania plazmowego. Przez zmniejszenie szybkości przepływu gazu nośnego można zwiększyć czułość oznaczania. Przepływ można regulować tylko w granicach stabilności pracy nebulizera. Nie zawsze stosowanie długiego czasu przebywania analitu w plazmie jest korzystne. W przypadku dużej zawartości pierwiastków łatwo ulegających jonizacji (np. Al, Ca), które obniżają temperaturę plazmy, korzystne jest stosowanie większych przepływów gazu nośnego, tak aby zmniejszyć możliwość jonizacji. Przepływ gazu nośnego związany jest także z położeniem palnika [34] oraz mocą generatora częstotliwości radiowej [35].

W palniku plazmowym wykorzystuje się jeszcze kilka gazów, w tym gaz chłodzący i gaz pomocniczy. Przepływ tych gazów nie ma już tak dużego wpływu na intensywność sygnału, jak gaz nośny, jednak one również mogą podlegać optymalizacji.

Gaz chłodzący (przepływ 5–20 L/min) jest wykorzystywany do chłodzenia ścianek palnika oraz zasilania plazmy. Dostarcza on atomów Ar, które, ulegając jonizacji, podtrzymują jej istnienie. Mały przepływ jest stosowany, gdy wymagany jest długi czas przebywania analitu w plazmie, natomiast duży, gdy stosujemy np. sprzężenie techniki ICP-AES z chromatografią gazową.

Gaz pomocniczy nie musi być stosowany w każdej analizie. Jego zadaniem jest utrzymanie plazmy z daleka od iniektora. Wykorzystuje się go np. przy analizie próbek organicznych, aby zapobiec osadzeniu się sadzy na ściankach palnika.

W niektórych aparatach stosowane są również inne gazy, które zwykle mają za zadanie chronić iniektor przed bezpośrednim kontaktem z próbką.

2.2.1.4. Moc generatora częstotliwości radiowej. Zmiana mocy generatora powoduje zmianę temperatur panujących w plazmie. Im wyższa jest moc przyłożona do cewki, tym wyższa temperatura panuje w strefie wyładowania plazmowego. Powoduje to wzrost efektywności procesu wzbudzenia i jonizacji. Najczęściej moc waha się w zakresie 0,8–1,5 kW. Niskie wartości stosuje się przy pomiarach pierwiastków łatwo wzbudzanych lub gdy chcemy np. osłabić wpływ interferentów przez ich słabsze wzbudzenie. Moc ok. 1,5 kW jest wykorzystywana w analizie próbek zawierających dużą ilość substancji organicznych, które powodują silne ochłodzenie plazmy. W analizie materiałów nieorganicznych moc generatora wynosi na ogół 1,0–1,2 kW.

2.2.1.5. Inne parametry. Istnieją jeszcze inne parametry mogące wpływać na jakość otrzymywanych wyników. Są to: napięcie fotopowielacza, czas integracji oraz ilość pobieranej do pomiaru próbki.

Wybór napięcia fotopowielacza zależy od wielkości mierzonego sygnału. Przy pomiarach próbek, w których pierwiastki występują w bardzo małych ilościach i/lub intensywność sygnału jest mała, stosuje się wysokie napięcia. Niskie napięcia stosuje się w badaniach próbek z dużą zawartością oznaczanego pierwiastka lub w przypadku analitów o intensywnych liniach analitycznych.

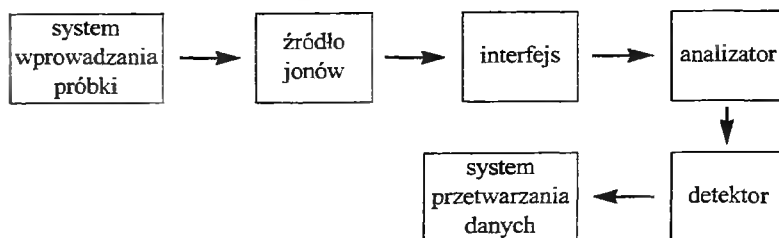
Czas integracji, czyli czas pomiaru intensywności promieniowania przy danej długości fali, ma wpływ na precyzję pomiaru. Im jest on dłuższy, tym precyzja jest większa, jednak wiąże się to równocześnie z wydłużeniem czasu analizy, a tym samym zwiększa jej koszty. Zwiększenie liczby powtórzeń danego pomiaru także powoduje wydłużenie czasu analizy, ale również poprawia precyzję oznaczeń.

Ilość podawanej próbki nie ma większego wpływu na mierzony sygnał. Wraz ze zmniejszaniem się szybkości przepływu obserwuje się stopniowy spadek intensywności sygnału. Zwykle przy stosowaniu standardowej wielkości palników przepływ próbki ustala się na poziomie 1–1,5 mL/min.

3. TECHNIKA ICP-MS

3.1. APARATURA STOSOWANA W TECHNICIE ICP-MS

Schemat blokowy przyrządu do pomiaru techniką ICP-MS jest przedstawiony na rys. 5 i składa się z następujących elementów: systemu doprowadzania próbki, źródła jonów, interfejsu oraz soczewek elektrostatycznych, analizatora, detektora, komputerowego systemu zbierania i przetwarzania danych.



Rys. 5. Schemat blokowy instrumentu wykorzystywanego w technice ICP-MS

3.1.1. Metody doprowadzania próbki do plazmy

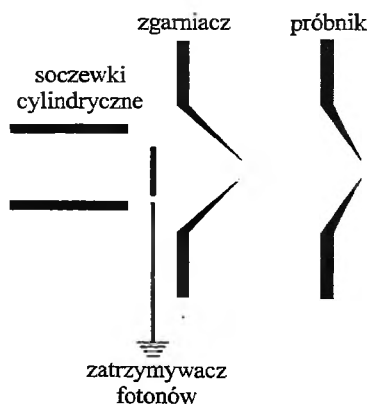
Z wyjątkiem wprowadzania bezpośredniego, wszystkie wymienione w rozdziale 2.1.1 sposoby doprowadzania próbki do plazmy są stosowane również w technice ICP-MS [36–40]. W większości przypadków próbka doprowadzana jest do plazmy w wyniku nebulizacji pneumatycznej przy użyciu tych samych typów nebulizatorów co w technice ICP-AES. Coraz częściej wykorzystuje się mikronebulizery, które zwiększają wydajność nebulizacji oraz zmniejszają zużycie próbki [41, 42].

3.1.2. Palniki

W technice ICP-MS palnik ma taką samą budowę jak opisywany w rozdziale 2.1.2 dla techniki ICP-AES, jest tylko mniejszy. Stosowane gazy to: gaz nośny, plazmowy i pomocniczy. Ustawienie palnika jest wyłącznie poziome.

3.1.3. Interfejs i soczewki

W skład interfejsu wchodzi dwa stożki: pierwszy zwany próbnikiem, drugi zgarniaczem (rys. 6). Są one wykonane najczęściej z niklu, ponieważ jest on sto-



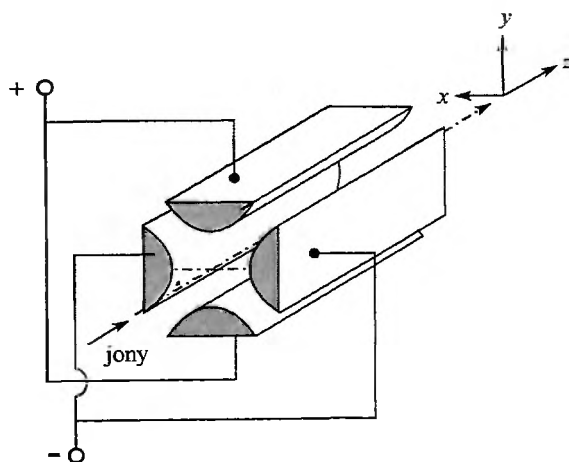
Rys. 6. Schemat interfejsu oraz soczewek elektrostacyjnych

sunkowo odporny na korozję chemiczną i ma dobre przewodnictwo cieplne. Przy pracy z substancjami organicznymi stosuje się stożki platynowe. Stożki stanowią rodzaj kontrolowanej „nieszczelności”, przez którą jony z plazmy są transportowane (zasysane) ze strefy o ciśnieniu atmosferycznym do strefy o ciśnieniu ok. 10^{-5} bar, wymaganej do prawidłowej pracy analizatora. Średnica otworów nie przekracza 1 mm. Za stożkami znajduje się jedna lub kilka soczewek elektrostatycznych, które mają za zadanie ukierunkować otrzymaną wiązkę jonów równoległe do osi analizatora. W niektórych analizatorach są one poprzedzone metalowym dyskiem, tzw. foton stop, którego rolą jest zatrzymywanie fotonów i cząstek obojętnych.

3.1.4. Analizator

Zadaniem analizatora jest rozdzielić docierające do niego jony tak, aby możliwa była jakościowa i ilościowa analiza badanej próbki. Stosowane są: analizator kwadrupolowy, analizator czasu przelotu oraz sektorowy analizator magnetyczno-elektrostatyczny. Pierwszy jest filtrem mas i rozdziela jony w zależności od stosunku masy do ładunku (m/z), drugi rozdziela jony w czasie, trzeci w przestrzeni.

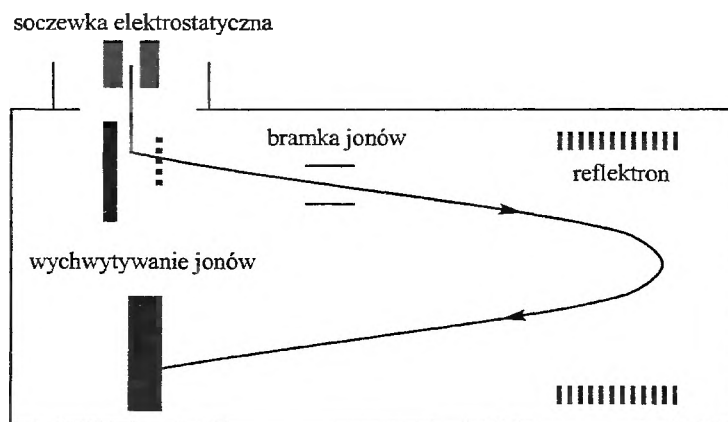
3.1.4.1. Analizator kwadrupolowy. Analizator kwadrupolowy stosowany jest w większości dostępnych na rynku instrumentów, jeżeli nie jest wymagana wysoka rozdzielczość i duża dokładność [8]. Jony rozdzielane są z dokładnością do 1 Da, zakres pomiaru mas – do 4000 Da [43]. Mała rozdzielczość i dokładność są rekompensowane przez niewielki rozmiar (20–30 cm) analizatora, niewielką masę w porównaniu z innymi analizatorami, prostą budowę i oczywiście niższą cenę. Skanowanie widma jest w pełni elektryczne, bardzo szybkie, zwykle 100 ms na cały zakres mas.



Rys. 7. Schemat analizatora kwadrupolowego

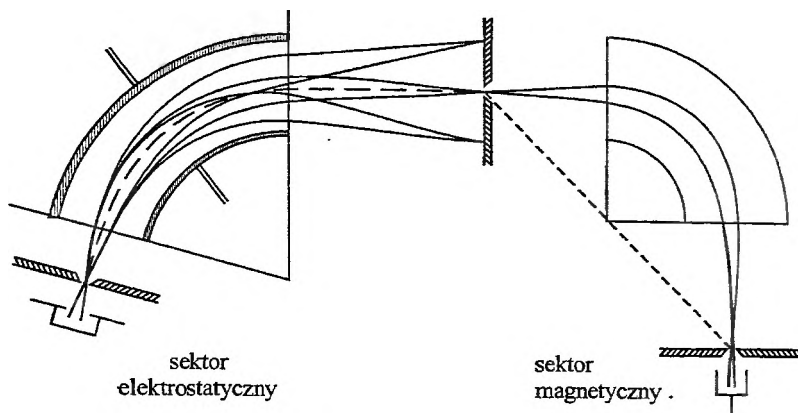
Analizator kwadrupolowy zbudowany jest z czterech równoległych prętów, tworzących w idealnym przekroju hiperbole, do których przyłożone jest odpowiednie napięcie (rys. 7), przy którym tylko jony o odpowiednim stosunku m/z mają stabilną trajektorię wzdłuż prętów, pozostałe ulegają rozładowaniu na elektrodach i nie docierają do detektora.

3.1.4.2. Analizator czasu przelotu. Analizator czasu przelotu wykorzystuje właściwość, że jony o tej samej energii kinetycznej, ale o różnej masie poruszają się z różną prędkością [44, 45]. Cząstki o mniejszych masach docierają do detektora w krótszym czasie, dzięki czemu następuje rozdział jonów w czasie (rys. 8). Konieczne jest impulsowe wprowadzanie jonów, aby uniknąć sytuacji, w której jony o różnych wartościach m/z dotarłyby równocześnie do detektora.



Rys. 8. Schemat analizatora czasu przelotu

3.1.4.3. Analizator elektromagnetyczny. Analizator elektromagnetyczny jest kombinacją dwóch analizatorów, z których każdy rozdziela jony w inny sposób (rys. 9). W sektorze elektrostatycznym jony rozdzielane są w zależności od ich energii kinetycznej, niwelując w ten sposób dyspersję energii jonów. Sektor magnetyczny rozdziela jony o tej samej energii kinetycznej względem ich mas. Eliminuje on rozbieżność wiązki jonów (kierunków, w których poruszają się jony). Dzięki połączeniu obu analizatorów w jeden układ można uzyskać bardzo dużą rozdzielczość. Analizator elektromagnetyczny jest stosowany w wysoko rozdzielczych spektrometrach masowych (HR ICP-MS – ang. *high resolution inductively coupled plasma mass spectrometry*) [38, 46]. Interesujące porównanie możliwości detekcji przy użyciu analizatora kwadrupolowego i analizatora wysoko rozdzielczego na przykładzie oznaczania ołowiu w różnych matrycach przedstawili ostatnio Encinar i in. [47].



Rys. 9. Schemat analizatora elektromagnetycznego

3.1.5. Detektor

Najczęściej spotykanym detektorem w technice ICP-MS jest powielacz elektronowy. Jego zasada działania jest zbliżona do działania fotopowielacza. Swoim kształtem przypomina rurę w postaci rogu [43]. Napięcie przyłożone między dwoma końcami rury spada stopniowo wzdłuż całej jej długości. Jony docierające przed detektor są bardzo silnie przyciągane przez odpowiednią dynodę wysokonapięciową i powodują wybijanie z niej elektronów. Te z kolei uderzając w dynodę ciągłą, wybijają z niej X elektronów wtórnych, których ilość rośnie lawinowo. Współczynnik wzmocnienia osiąga wartość 10^6 – 10^8 .

3.2. OPTIMALIZACJA WARUNKÓW POMIARU

W technice ICP-MS źródłem informacji są jony powstające w plazmie. W większości przypadków podstawą analizy jakościowej jest występowanie sygnału przy określonym stosunku masy do ładunku (m/z), natomiast w analizie ilościowej wykorzystywane jest natężenie wiązki jonów analitu. Celem optymalizacji warunków pomiaru jest uzyskanie jak największej liczby jonów analitu w plazmie, a tym samym uzyskanie jak najbardziej intensywnego sygnału.

3.2.1. Parametry pomiaru techniką ICP-MS

3.2.1.1. Wybór izotopu do pomiaru. Sposób pomiaru jest powiązany pośrednio lub bezpośrednio z masą atomową analitu. Większość pierwiastków ma więcej niż jeden stabilny izotop. Przed przystąpieniem do pomiarów należy więc zdecydować, który izotop będzie stanowił podstawę oznaczania analitu. Podczas wyboru izotopu należy zwrócić uwagę na następujące parametry:

– jaka jest zawartość procentowa danego izotopu w przyrodzie (wybiera się na ogół izotop o największym rozpowszechnieniu w środowisku naturalnym),

– jak silnie i czy w ogóle sygnał danego izotopu może być zakłócony. Ważna jest nie tylko liczba interferentów, ale także ich rodzaj. W przypadku występowania interferencji izobarycznych można bowiem zastosować korekcję międzyizotopową, podczas gdy interferencje pochodzące od argonu lub rozpuszczalnika mogą być trudne do wyeliminowania (zob. rozdział 4.4.2),

– przewidywane stężenie oznaczanego pierwiastka powinno mieścić się w zakresie prostoliniowości krzywej kalibracji dla danego izotopu.

3.2.1.2. Optymalizacja parametrów pomiarowych. Podobnie jak w technice ICP-AES, przed pomiarami techniką ICP-MS przeprowadza się optymalizację warunków pomiarowych. W technice ICP-MS najczęściej optymalizuje się następujące parametry: szybkość przepływu gazu nośnego, moc generatora częstotliwości radiowej, napięcie przyłożone do „soczewek” oraz czas integracji.

W technice ICP-MS decydującą rolę odgrywa gaz nośny. Jego rola i stosowane przepływy są podobne jak w ICP-AES, jednak w ICP-MS szybkość przepływu gazu nośnego nie zależy od wysokości obserwacji, ponieważ ułożenie palnika jest poziome. Przepływ gazu nośnego nie może być zbyt mały, ponieważ sprzyja to powstawaniu interferencji spektralnych, wynikających z tworzenia się jonów podwójnie naładowanych. Zbyt szybki przepływ osłabia efektywność zachodzenia procesu jonizacji oraz sprzyja tworzeniu się tlenków. Interferencje te zostaną opisane w rozdziale 4.3.

Moc generatora zasilającego cewkę ma takie samo oddziaływanie na procesy zachodzące w plazmie jak w przypadku techniki ICP-AES (zob. rozdział 2.2.1.4).

W technice ICP-MS jony po przejściu przez stożki z obszaru o ciśnieniu atmosferycznym do obszaru o obniżonym ciśnieniu muszą zostać zogniskowane na osi analizatora. Służą do tego soczewki elektrostatyczne. Soczewka elektrostatyczna jest to pole elektryczne wytworzone pomiędzy odpowiednio ukształtowanymi elektrodami [48]. Elektrody mają kształt współosiowych walców. W niektórych rozwiązaniach konstrukcyjnych stosowana jest tylko jedna elektroda. Przez regulację napięcia przykładanego do elektrod można wpływać na intensywność sygnału pochodzącego od analitu. Wielkość napięcia jest różna w zależności od masy mierzonych izotopów. Z upływem czasu „soczewki” ulegają zabrudzeniu i optima przesuwają się ku wyższym wartościom.

4. CZYNNIKI ZAKŁÓCAJĄCE ORAZ SPOSOBY ICH KOREKCJI

Początkowo sądzono, że ze względu na wysokie temperatury panujące w plazmie techniki wykorzystujące plazmę indukcyjnie sprzężoną powinny być wolne od zakłóceń. Okazało się jednak, że rzeczywiście zmniejszyły się wpływy chemiczne, ale nadal dużym problemem są interferencje spektralne. Oprócz interfe-

rencji spektralnych występują także inne czynniki przeszkadzające: interferencje fizyczne, efekty matrycowe i interferencje chemiczne [49–51].

4.1. INTERFERENCJE FIZYCZNE

Interferencje fizyczne związane są z właściwościami fizycznymi roztworu. Podczas analizy próbek o dużej gęstości, lepkości, zawierających duże ilości rozpuszczonych soli, ze zróżnicowaną wielkością cząstek (lub zmianą tych parametrów w czasie) może dochodzić do nierównomiernej pracy nebulizera. Do plazmy może być wprowadzana niejednakowa ilość badanej substancji, co z kolei może powodować wahania sygnału. Duża ilość soli może krystalizować na ściankach palnika lub powodować zatykanie stożków. Przy pomiarze techniką ICP-AES maksymalne dopuszczalne stężenie soli w roztworze jest na poziomie 20%, ale tylko w przypadku bardzo prostych soli (zob. tab. 1). W przypadku ICP-MS wartość ta jest dużo mniejsza i wynosi ok. 0,4%. Podobnie duża ilość węgla (np. przy pracy z substancjami organicznymi) powoduje szybkie zanieczyszczenie palnika oraz stożków. Od stanu, w którym się one znajdują, zależy jakość uzyskiwanych wyników. Aby zmniejszyć ilość tworzącej się sadzy, często do gazu nośnego dodaje się tlen.

Interferencje fizyczne można zmniejszyć przez: rozcieńczenie próbki, zbliżenie właściwości fizycznych wzorców do właściwości analizowanych próbek, zastosowanie pompy perystaltycznej (nie niweluje ona zmian związanych z lepkością, ale ułatwia równomierne podawanie próbki) oraz użycie odpowiedniego typu nebulizera.

4.2. EFEKTY MATRYCOWE

Interferencje matrycowe związane są z wpływem pierwiastków matrycy na intensywność mierzonego sygnału. Wielkość tego wpływu zależy od potencjałów jonizacji poszczególnych pierwiastków. Dużą rolę odgrywa tu stężenie pierwiastków o niskich potencjałach jonizacji, np. Mg, Ca, które obecne w próbce w dużych ilościach powodują obniżanie temperatury plazmy, przez co zmniejsza się prawdopodobieństwo wzbudzenia pierwiastków o wyższych potencjałach wzbudzenia [35]. Zbyt duże stężenie soli może prowadzić do zgaszenia plazmy. Efekt związany z wpływami matrycowymi to najczęściej podwyższenie poziomu obserwowanego tła.

Istotny wpływ na uzyskiwane wyniki może mieć rodzaj i ilość obecnych w próbce kwasów. Wpływ ten jest powiązany z gęstością kwasu oraz z potencjałami jonizacji pierwiastków kwasotwórczych, np. S (10,42 eV), P (10,43 eV), Cl (13,01 eV) i N (14,51 eV) [52]. Kwas siarkowy i fosforowy powodują bardzo silne ochładzanie plazmy [35]. Kwasy te mają dużą gęstość, co dodatkowo wywołuje interferencje fizyczne. W przypadku analizy metodą ICP-MS stężenie kwa-

sów w próbce nie powinno przekraczać 10%, natomiast w ICP-AES nie powinno być większe od 20%. Niekiedy nawet małe stężenia kwasów mogą powodować duże zmiany intensywności sygnału.

Rozpuszczalniki organiczne generalnie powodują drastyczne ochładzanie plazmy, jednak efekt ten w dużym stopniu zależy od stosunku C/O.

Negatywny wpływ matrycy można minimalizować przez: rozcieńczenie próbki, optymalizację warunków pomiaru, zastosowanie wzorca wewnętrznego – pozwala on uniknąć wpływu wahań plazmy na intensywność sygnału, ponieważ w takim samym stopniu wpływają one na analit, co i na standard wewnętrzny, dopasowanie matrycy, tzn. sporządzenie roztworów kalibracyjnych o składzie takim samym jak matryca w próbce lub bardzo zbliżonym, zastosowanie metody dodatku wzorca (analiza ilościowa tą metodą jest czasochłonna), zastosowanie korekcji tła stałego, użycie interferenta buforującego [16] lub przez zastosowanie metody rozcieńczeń izotopowych, która jest możliwa tylko wtedy, gdy pierwiastek ma co najmniej dwa stabilne izotopy.

4.3. INTERFERENCJE CHEMICZNE

Interferencje chemiczne związane są z oddziaływaniami chemicznymi analitu z innymi składnikami próbki oraz postacią, w jakiej analit występuje w badanej próbce.

4.3.1. Interferencje chemiczne w technice ICP-AES

Procesem niepożądanym z analitycznego punktu widzenia jest rekombinacja oraz tworzenie się związków między różnymi pierwiastkami obecnymi w plazmie a otaczającym plazmę powietrzem. Procesy te powodują zmniejszanie się liczby jonów i atomów, przez co spada intensywność mierzonego sygnału. Powstające związki mogą pochłaniać część promieniowania oraz emitować własny sygnał. Wymienione procesy zachodzą głównie w pióropuszu plazmowym. Przy pionowym ustawieniu palnika interferencji tych częściowo unika się przez optymalizację wysokości obserwacji. W przypadku poziomego ustawienia palnika problem tłumienia promieniowania przez zimny stożek plazmy rozwiązano dzięki zastosowaniu strumienia sprężonego powietrza, przepływającego prostopadle do pióropusza, powodującego jego „ściananie”. Stosowane są również przedłużone palniki plazmowe, które izolują plazmę od niekorzystnego wpływu powietrza.

4.3.2. Interferencje chemiczne w technice ICP-MS

W technice ICP-MS problemem są nie tylko związki powstające na skutek kontaktu plazmy z powietrzem (głównie tlenki), ale również tworzenie się jonów podwójnie naładowanych. Tlenki powstają przede wszystkim w obszarze między plazmą a stożkami, podczas gdy jony podwójnie naładowane tworzone są w pla-

zmie. Ilość każdego z osobna zwykle nie przekracza 3–6% i w decydującym stopniu zależy od mocy generatora częstotliwości radiowej (zbyt niska moc powoduje, że temperatura plazmy jest niższa i sprzyja tworzeniu się tlenków; za wysoka zwiększa wydajność procesu jonizacji, przez co rośnie liczba jonów M^{++}) oraz przepływu gazu nośnego (zbyt mały przepływ gazu nośnego prowadzi do wzrostu ilości jonów M^{++} , zbyt duży do zwiększenia ilości jonów MO^+) [53].

Interferencje chemiczne można zminimalizować przez optymalizację obydwu parametrów. Parametry te dobiera się tak, aby uzyskać maksymalną intensywność sygnału dla jonów pojedynczo naładowanych.

4.4. INTERFERENCJE SPEKTRALNE

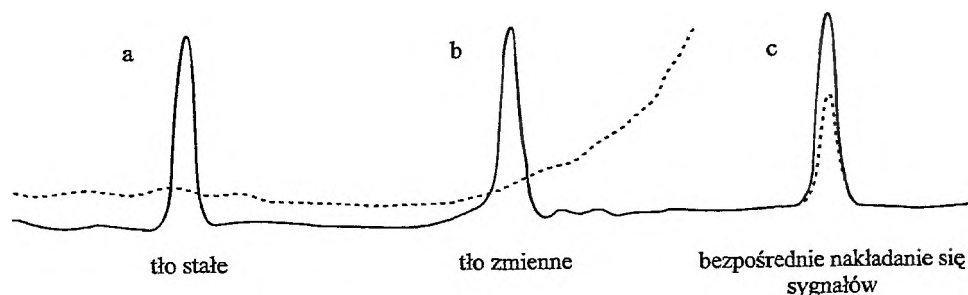
4.4.1. Interferencje spektralne w technice ICP-AES

W technice ICP-AES występują różnego typu interferencje spektralne. Są to najczęściej:

– tło stałe (rys. 10a), które polega na zmianie intensywności tła w obecności interferenta. Może ono ulegać podwyższeniu i obniżeniu. Korekcja polega na pomiarze sygnału tła po jednej ze stron pików i odjęciu uzyskanej wartości od całkowitej intensywności sygnału zmierzonej dla wybranej linii.

– tło zmienne (rys. 10b), które jest najczęściej wynikiem obecności w okolicy analizowanej linii silnej linii innego pierwiastka. Efekt nakładania się sygnałów nazywa się często „ogonowaniem”. Gdy interferencja nie jest duża, stosuje się korekcję polegającą na pomiarze intensywności tła po obu stronach pików, wyznaczeniu prostej przechodzącej przez te punkty i odjęciu od całkowitej uzyskanej intensywności tła wyznaczonego z tej prostej. Im bardziej wybrana linia analityczna leży na zboczu innego pików, tym większy błąd popełnia się przy założeniu prostoliniowych zmian tła. Stosuje się przybliżenia krzywymi wyższego rzędu, ale najczęściej do pomiarów wybiera się po prostu inną linię.

– bezpośrednie nakładanie się linii przedstawione jest na rys. 10c. Możliwe jest, że teoretycznie w tym samym miejscu obserwuje się sygnały kilku pierwia-



Rys. 10a-c. Typy interferencji spektralnych w technice ICP-AES

stków równocześnie, szczególnie przy użyciu aparatów o niedużej rozdzielczości. Korekcja polega na pomiarze „fikcyjnego” stężenia analitu wywoływanego przez określone stężenie innego pierwiastka i wyznaczeniu krzywych korekcji będących funkcją tych dwóch stężeń, po czym od uzyskanego stężenia analitu odejmuje się (dodaje) stężenie wyznaczone z krzywej korekcji. Jest to tzw. korekcja międzypierwiastkowa. Można ją stosować tylko wtedy, gdy istnieje możliwość równoczesnego pomiaru stężeń obydwu pierwiastków.

4.4.2. Interferencje spektralne w technice ICP-MS

W technice ICP-MS występują dwa podstawowe typy interferencji spektralnych: interferencje izobaryczne i interferencje poliatomowe.

Większość pierwiastków ma więcej niż jeden stabilny izotop. Ponieważ współczesne instrumenty ICP-MS nie mają możliwości rozróżnienia dwóch izotopów z dokładnością przekraczającą 10^{-4} Da, możliwe jest więc, że w tym samym miejscu widma masowego obserwuje się sygnały pochodzące od różnych izotopów. Takie interferencje nazywa się izobarycznymi. Do ich niwelowania stosuje się korekcję międzypierwiastkową.

W technice ICP-MS występują również tzw. interferencje poliatomowe. Gdy jony rozdzielane są na podstawie stosunku masy do ładunku (m/z), pojawia się problem z rozróżnieniem struktur o tym samym m/z , a o różnym składzie. Teoretycznie każdy izotop pierwiastka ma swoją własną masę, więc i stosunek m/z jest niepowtarzalny. Żeby rozróżnić np. sygnały ^{56}Fe i ^{56}ArO , wymagana jest rozdzielczość $R = 2500$, a do rozróżnienia ^{80}Se i $^{80}\text{Ar}_2$: $R = 9700$ [8]. Rozdzielczość (R) jest ilorazem masy m i szerokości piku Δm mierzonej na wysokości 5% lub 10% jego maksymalnej amplitudy [8].

Głównym źródłem interferencji poliatomowych są: woda, argon oraz kwasy stosowane do przygotowania próbki, w mniejszym stopniu otaczające plazmę powietrze. W przypadku roztworów wodnych często tworzą się takie połączenia, jak: ^{17}OH , $^{18}\text{OH}_2$, $^{80}\text{Ar}_2$, $^{32}\text{O}_2$, ^{41}ArH , ^{80}ArO . Rozpuszczalniki organiczne są bogatym źródłem węgla – ^{28}CO , ^{52}ArC ; kwasy mineralne zaś dostarczają dużej ilości N, Cl, S, P – ^{52}SO , $^{52}\text{ClOH}$, ^{52}ClN .

Teoretycznie stałe interferencje poliatomowe powstające między składnikami zawartymi zarówno w ślepej próbce, jak i w mierzonym roztworze mogą zostać skorygowane przez odjęcie sygnału tła od sygnału analitu. Metoda ta sprawdza się przy założeniu, że np. wszystkie atomy chloru znajdujące się w próbce pochodzą wyłącznie od kwasu solnego zastosowanego do rozkładu próbki, a nie są naturalnym składnikiem próbki. Wtedy bowiem ilość interferenta w odnośniku i w mierzonym roztworze jest inna, a więc korekcja nie jest dokładna. Innym sposobem korekcji jest, podobnie jak dla interferencji izobarycznych, korekcja międzypierwiastkowa. Również zastosowanie komory zderzeniowej pozwala minimalizować interferencje poliatomowe [54]. Szczegółową dyskusję interferencji

spektralnych i niespektralnych przy zastosowaniu analizatora kwadrupolowego i wysokorozdzielczego przedstawiono w publikacjach [46, 49, 50].

PODSUMOWANIE

Wprowadzenie indukcyjnie sprzężonej plazmy do analizy instrumentalnej było dużym przełomem. Techniki wykorzystujące ją stwarzają ogromne możliwości i są powszechnie stosowane przez analityków. Umożliwiają jednoczesne oznaczanie kilkudziesięciu pierwiastków z dużą dokładnością i precyzją. Uniwersalność technik polega na tym, że można badać próbki stałe, ciekłe i gazowe, organiczne i nieorganiczne. Poza tym bardzo często można oznaczać analit w obecności kilkunastu innych pierwiastków w próbce bez konieczności jego wydzielenia. Sprzężenie technik detekcji z etapami wstępnego rozdzielania próbki, np. z metodami chromatograficznymi, jest z powodzeniem stosowane do oznaczania ultraśladowych ilości pierwiastków w analizie specjacyjnej.

W technikach plazmowych dużym problemem podczas analizy są interferencje spektralne. Interferencje te występują zarówno w technice ICP-AES, jak i w ICP-MS, ale w przypadku tej ostatniej są bardziej uciążliwe (interferencje poliatomowe). Interpretacja wyników wymaga doświadczenia, zwłaszcza przy pracy z bardzo złożonymi próbkami (o bogatej matrycy). Nieuwzględnienie wpływów matrycy i interferencji spektralnych może prowadzić do tego, że uzyskiwane wyniki będą obciążone dużym błędem.

Czas potrzebny na przygotowanie próbki do pomiaru jest „wąskim gardłem” technik plazmowych. Jest to najdłuższy etap podczas całej analizy. Bez względu na sposób doprowadzania próbki do plazmy ulega ona zawsze całkowitemu zniszczeniu.

Zaletą omawianych technik plazmowych jest stosunkowo niewielka ilość potrzebnej do pomiaru próbki. Do wykonania pojedynczego pomiaru wystarcza ok. 2 mL w technice ICP-MS i ok. 3 mL w ICP-AES. W krótkim czasie możliwy jest pomiar sygnału kilkunastu pierwiastków. Zastosowanie mikronebulizatorów w ICP-AES(MS) pozwala zredukować objętość roztworów do kilkudziesięciu μL oraz zwiększyć wydajność procesu nebulizacji.

Techniki ICP-AES i ICP-MS wzajemnie się uzupełniają pod względem możliwości do oznaczeń stężeń. Za pomocą ICP-MS mierzy się stężenia od kilkunastu pg/g (ppt) do kilkudziesięciu ng/g (ppb) [55]. Zastosowanie mniej czułego instrumentu – ICP-AES z pionowym ustawieniem palnika – pozwala mierzyć stężenia od $\mu\text{g/g}$ (ppm) do kilkunastu %. Jeżeli natomiast chcemy mierzyć z dużą dokładnością zakres stężeń ng/g (ppb) – $\mu\text{g/g}$ (ppm), to najbardziej przydatna będzie technika ICP-AES z poziomym ustawieniem palnika. Szeroki zakres prostoliniowości krzywych kalibracji daje możliwość oznaczania różnych wielkości stężeń w jednej próbce bez konieczności jej rozcieńczenia.

Wszechstronność i inne wymienione wcześniej zalety technik ICP-AES i ICP-MS sprawiają, że są one chętnie wykorzystywane w laboratoriach badawczych. Techniki te nie są jednak panaceum na wszystkie problemy analityczne i nie zawsze ich stosowanie jest uzasadnione [56]. Trzeba się również liczyć z wysoką ceną instrumentu i oprzyrządowania niezbędnego do wykonywania pomiaru. Jest ona odczuwalna zarówno przy kupnie aparatury, jak i przy jej eksploatacji [8].

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] J.W. Olesik, *Anal. Chem.*, 1996, **68**, 469A.
- [2] A. Kordus, *Plazma. Właściwości i zastosowania w technice*, WNT, Warszawa 1985.
- [3] A. Sanz-Medel, *Microchim. Acta*, 1991III, 265.
- [4] J.A.C. Broekaert, *Microchim. Acta*, 1995, **120**, 21.
- [5] J. Marshall, S. Chenery, E.H. Evans, A. Fisher, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1998, **13**, 107R.
- [6] E.H. Evans, S. Chenery, A. Fisher, J. Marshall, K. Sutton, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1999, **14**, 977.
- [7] A.L. Burlingame, R.K. Boyd, S.J. Gaskell, *Anal. Chem.*, 1998, **70**, 647R.
- [8] Praca zbiorowa (red. E. Bulska i K. Pyrżyńska), *Zastosowanie metod spektrometrii atomowej w przemyśle i ochronie środowiska*, Komisja Analitycznej Spektrometrii Atomowej, Komitet Chemii Analitycznej PAN, Warszawa 1999.
- [9] F. Vanhaecke, L. Moens, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 1999, **364**, 440.
- [10] J.R. Bacon, J. Crain, L. van Vaeck, J. G. Williams, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1999, **14**, 1633.
- [11] C. Moor, W. Devos, M. Guecheva, J. Kobler, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 2000, **366**, 159.
- [12] J.A.C. Broekaert, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 2000, **368**, 15.
- [13] S. Greenfield, I.L. Jones, C.T. Berry, *Analyst*, 1964, **89**, 713.
- [14] G.W. Dickinson, V.A. Fassel, *Anal. Chem.*, 1969, **41**, 1021.
- [15] A.L. Gray, *Dyn. Mass Spectrom.*, 1978, **5**, 106.
- [16] Praca zbiorowa (red. A. Kabata-Pendias i B. Szeke), *Problemy jakości analizy śladowej w badaniach środowiska przyrodniczego*, PIOŚ, Warszawa 1998.
- [17] J.C. Miller, J.N. Miller, *Statistics for Analytical Chemistry*, Ellis Horwood, Chichester 1993.
- [18] C.B. Boss, K.J. Fredeen, *Podstawy, aparatura i metodyka atomowej spektrometrii emisyjnej z plazmą wzbudzoną indukcyjnie*, tłum. E. Bulska, Perkin Elmer, 1989.
- [19] L.B. Allen, P.H. Siitonen, H.C. Thompson, Jr., *J. Anal. At. Spectrom.*, 1998, **13**, 735.
- [20] B. Budič, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1998, **13**, 869.
- [21] X.-D. Tian, Z.-X. Zhuang, B. Chen, X.-R. Wang, *Analyst*, 1998, **123**, 627.
- [22] Y.-L. Feng, H.-W. Chen, H.-Y. Chen, L.-C. Tian, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 1998, **361**, 155.
- [23] P. Pohl, W. Żyrnicki, *Anal. Chim. Acta*, 2001, **429**, 135.
- [24] U. Schäffer, V. Krivan, *Anal. Chem.*, 1998, **70**, 482.
- [25] K. Ohls, B. Hustch, *Inf. News.*, 1986, **12**, 170.
- [26] Y.S. Choi, S.C. Lee, H.S. Im, C.J. Park, *Microchem. J.*, 1999, **63**, 24.
- [27] T. Ishizuka, Y. Uwamino, *Spectrochim. Acta, Part B*, 1983, **38**, 519.
- [28] T. Kozłowski, A. Ramsza, *Analityka*, 2000, **4**, 8.
- [29] Jobin Yvon, *Instrukcja obsługi „JY70 Plus Geoplasma”*, 1990.
- [30] G. de Loos, L. Gras presented at 25th FACSS, Austin, TX, USA, 1998.
- [31] G.E.M. Hall, J.C. Pelchat, J. Loop, *J. Anal. Atom. Spectrom.*, 1990, **5**, 339.
- [32] I. Rodushkin, T. Ruth, A. Huhtasaari, *Anal. Chim. Acta*, 1999, **378**, 191.
- [33] L. Perring, M. Alonso, D. Andrey, B. Bourqui, P. Zbinden, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 2001, **370**, 76.

- [34] P.J. Potts, *A Handbook of Silicate Rock Analysis*, Blackie& Son, Glasgow 1987.
- [35] A. Montaser, D.W. Golightly, *Inductively Coupled Plasmas in Analytical Atomic Spectrometry*, VCH, New York 1992.
- [36] M. Ødegård, S.H. Dundas, B. Flem, A. Grimstvedt, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 1998, **362**, 477.
- [37] V. Majidi, N.J. Miller-Ihli, *Spectrochim. Acta, Part B*, 1998, **53B**, 965.
- [38] Y.-L. Feng, H.-Y. Chen, L.-C. Tian, H. Narasaki, *Anal. Chim. Acta*, 1998, **375**, 167.
- [39] J.A. McLean, M.G. Minnich, L.A. Iacone, H. Liu, A. Montaser, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1998, **13**, 829.
- [40] S.F. Durrant, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1999, **14**, 1385.
- [41] M. de Wit, R. Blust, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1998, **13**, 515.
- [42] K.A. Taylor, B.L. Sharp, D.J. Lewis, H.M. Crews, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1998, **13**, 1095.
- [43] E. de Hoffmann, J. Charette, V. Stroobant, *Spektrometria mas*, WNT, Warszawa 1998.
- [44] X. Tian, H. Emteborg, F.C. Adams, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1999, **14**, 1807.
- [45] M. Barbaste, L. Halicz, A. Galy, B. Medina, H. Emteborg, F.C. Adams, R. Łobiński, *Talanta*, 2001, **54**, 307.
- [46] N. Nonose, M. Kubota, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2001, **16**, 551, 560.
- [47] J.R. Encinar, J.I.G. Alonso, A. Sanz-Medel, S. Main, P.J. Turner, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2001, **16**, 315, 322.
- [48] S. Szczeniowski, *Fizyka doświadczalna, część 3*, PWN, Warszawa 1973.
- [49] E.H. Evans, J.J. Giglio, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1993, **8**, 1.
- [50] R.F.J. Dams, J. Goossens, L. Moens, *Mikrochim. Acta*, 1995, **119**, 277.
- [51] I. Jarvis, K.E. Jarvis, *Chem. Geol.*, 1992, **95**, 1.
- [52] L. Kolditz, *Chemia nieorganiczna, część 1*, tłum. J. Kuryłowicz, PWN, Warszawa 1994.
- [53] R. Falciani, E. Novaro, M. Marchesini, M. Gucciardi, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2000, **15**, 561.
- [54] S.D. Tanner, V.I. Baranov, *Atom. Spectrom.*, 1999, **20**, 45.
- [55] E.D. Prudnikov, R.M. Barnes, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 1998, **362**, 465.
- [56] R. Thomas, *Today's Chemist at Work*, 1999, **10**, 42.

Praca wpłynęła do Redakcji 6 kwietnia 2001

Redakcja „Wiadomości Chemicznych” informuje, że są u nas do nabycia następujące pozycje „Biblioteki Wiadomości Chemicznych”:

Nomenklatura steroidów (Zalecenia 1989), tłum. J.W. Morzycki i W.J. Szczepek, cena 3 zł

J. Połtowicz, T. Młodnicka, *Metaloporfiryny jako katalizatory procesów utleniania*, cena 3 zł

Nomenklatura chemii nieorganicznej. Zalecenia 1990, red. Z. Stasicka, cena 25 zł

Z. Kluz, M. Późniczek, *Nomenklatura związków chemicznych. Poradnik dla nauczycieli*, cena 10 zł

Podstawowa terminologia stereochemii oraz Słownik podstawowych terminów w nauce o polimerach. Zalecenia 1996, red. O. Achmatowicz, B. Szechner i P. Kubisa, cena 12 zł

Nomenklatura węglowodanów. Zalecenia 1996, tłum. i red. T. Sokołowska i A. Wiśniewski, cena 18 zł

I.Z. Siemion, *Bronisław Radziszewski i lwowska szkoła chemii organicznej*, cena 18 zł

K. Maruszewski, *Fizykochemia molekuł zamkniętych w zeolitach i zol-żelach*, cena 18 zł

Praca zbiorowa, *Uporządkowane materiały mezoporowate*, red. B. Burczyk, cena 18 zł

Skorygowana nomenklatura rodników, jonów, jonorodników i podobnych indywidualności chemicznych. Zalecenia 1993, red. T. Sokołowska i A. Wiśniewski, cena 15 zł

Bibliografia „Wiadomości Chemicznych” za lata 1988–1997, cena 3 zł

Książki wysyłamy na koszt zamawiającego. Zamówienia prosimy kierować pod adresem: Redakcja „Wiadomości Chemicznych”, ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław. Opłaty należy wnosić na konto: BHP SA I O/Wrocław, Redakcja „Wiadomości Chemicznych”, Nr 10601679-320000400597.

Do nabycia jest również książka Z. Ruzewicza *Ludzie i dzieła. Studia nad historią chemii na ziemiach polskich*, wyd. Instytut Chemii Fizycznej i Teoretycznej Politechniki Wrocławskiej, cena 10 zł.

FELIETON NAUKOWY



NOTATKI CHAOTYCZNE

XL. CZYTAJĄC *FAUSTA*

Ignacy Z. Siemion

*Wydział Chemii, Uniwersytet Wrocławski
ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław*



Ignacy Z. Siemion, urodzony w 1932 r., ukończył studia chemiczne na Uniwersytecie Moskiewskim w 1955 r. Doktorat nauk technicznych na Politechnice Wrocławskiej – 1964. Doktor habilitowany nauk chemicznych – 1968. Profesor nadzwyczajny – 1974, profesor zwyczajny – 1981. Jest kierownikiem Zakładu Chemii Organicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Własne zainteresowania badawcze: chemia i stereochemia peptydów i białek. Wypromował 22 doktorów chemii, z których trzech się habilitowało. Autor 6 książek, ponad 250 prac oryginalnych i ponad 80 artykułów przeglądowych oraz dotyczących historii nauki. W latach 1983–1994 Redaktor Naczelny „Wiadomości Chemicznych”.

Wspomnienia, wspomnienia. Im bardziej się starzejemy, tym mocniej opresjonują nasze wolne godziny. Było to chyba wiosną 1957 r.? Przechodząc przez dzikie targowisko rozlokowane za dzisiejszą Halą Targową przy ul. Piaskowej, znalazłem u samozwańczego bukinisty stare niemieckie wydanie *Fausta* Goethego. Zbliżała się Wielkanoc i właśnie zapadłem na jakąś ciężką grypę. Nasza kolonia młodych asystentów zajmowała kilka pokoi w porzuconym przez administrację Uniwersytetu budynku, gdzie był niedawno jeszcze dom studencki prawników. Ten dom zdewastowała zima 1955/56 – mieścił się w oficynie budynku, który dziś zajmuje Wrocławski Oddział PAN. Więc teraz zostałem zupełnie sam w tym budynku, bo moi koledzy wyjechali, gdzie kto mógł. Leżąc w lekkiej gorączce, wziąłem się za *Fausta*. Klarowny wiersz Goethego czyta się dobrze, nawet przy średniej znajomości języka. Szybko więc doszedłem do tego miejsca, w którym wiosenne wielkanocne powietrze wypędza z miasta na łąki i do pobliskich lasów barwny tłum mieszczan. I wtedy właśnie za moim oknem odezwały się naraz wszystkie dzwony Wrocławia. Bo we Wrocławiu też była wtedy Niedziela Wielkanocna. Ten tekst Goethego i te dzwony stanowiły razem niezwykle ciekawą grę. Silne poruszenie, któremu wówczas uległem, jeszcze dziś wraca do mnie odległym echem, kiedy wspominam tę chwilę. Ale niedługo potem utknąłem w tekście na dobre. Nieco dalej opowiada bowiem Faust o swoim ojcu, lekarzu. Mówi, jak to on wraz ze swymi uczniami preparował jakieś lekarstwo, którym, chcąc leczyć, uśmiercał niechący swoich ufnych pacjentów. Goethe dokładnie opisuje przebieg preparacji tajemniczego leku, ale spróbujcie to zrozumieć! Bo Goethe, przeciwnie do współczesnego czytelnika, dobrze znał symboliczny język alchemii i właśnie w tym języku całą sprawę opisał. Dla współczesnych mu rzecz była zrozumialsza. Wykształcony czytelnik XVIII w. miał jakieś takie pojęcie o alchemicznych symbolach. Ale jakakolwiek powszechniejsza znajomość tego pełnego tajnych znaków języka całkowicie przecież zanikła. Spójrzmy zresztą sami na tekst oryginału:

Mein Vater war ein dunkler Ehreman,
Der über die Natur und ihre heil'gen Kreise,
In Redlichkeit, jedoch auf seine Weise,
Mit grillenhafter Mühe sann;
Der, in Gesellschaft von Adepten,
Sich in die schwarze Küche schloss
Und, nach unendlichen Rezepten,
Das Widrige zusammengoss.
Da ward ein rother Leu, ein kühner Freier,
Im lauen Bad der Lilie vermählt,
Und beide dann mit offnem Flammenfeuer
Aus einem Brautgemach ins andere gequelt.
Erschien darauf mit bunten Farben
Die junge Königin im Glas.
Hier war die Arznei, die Patienten starben,
Und niemand fragte: wer genas?
So haben wir mit höllischen Latwergen

In diesen Tälern, diesen Bergen,
Weit schlimmer als die Pest getobt.
Ich habe selbst den Gift in Tausende gegeben;
Sie welkten hin, ich muss erleben,
Dass man die frechen Mörder lobt.

A oto polski przekład tego fragmentu, pióra samego Emila Zegadłowicza:

Ogółem biorąc był to człowiek sprawiedliwy,
który wierzył w te swoje obłąkańcze dziwy,
Wierzył – więc był spokojny i czysty w sumieniu.
Owe lwy i lilije, żenione w płomieniu,
Na łożu madejowym rozciągał i smażył,
Aż królową rumianą w retorcie uwarzył.
Lecz gorzej, kiedy chorych tym wywarem leczył,
Boć, rzecz jasna, nikogo tym nie zabezpieczył
Przed śmiercią, wprost przeciwnie, dużo zdziałał złego.
Umierali, nie wiedząc przez kogo i z czego...

To bardzo ładny przekład. Cóż, kiedy trudno go nazwać wiernym. Z 22 wersów oryginału pozostało tylko dziesięć, a i tak trudna do wyrozumienia preparacja została przez tłumacza całkowicie zamazana. A przecież Goethe zapewne dobrze wiedział, o czym pisał.

Szwajcarski historyk chemii H.E. Fierz-Dawid był zdania, że cały ten fragment odnosi się do alchemicznej alegorii Arisleusa, która w symboliczny sposób przedstawia syntezę cynobru. Na tę alegorię można się natknąć w licznych alchemicznych tekstach. Cynobrem jest według Fierz-Dawida „rumiana królowa” poematu. Produkt ten otrzymywano w reakcji rtęci z siarką. Najpierw powstawał czarny siarczek rtęci (ten etap procesu nazywano „nigredo”), który, sublimowany w retorcie, przekształcał się w czerwony cynober (etap „rubedo”). Taka interpretacja tekstu Goethego nie wydaje się jednak zasadna. Przecież poeta wyraźnie pisze, że chodzi mu o preparację leku, a takim cynober nie był. Aby lepiej zrozumieć, o co poecie mogło chodzić, wykorzystać warto dwie książki: starą historię chemii Koppa [1] i współczesny leksykon terminów i symboli alchemicznych Schneidera [2].

Dwa składniki operacji chemicznej prowadzonej w „czarnej kuchni” („schwarze Küche”) przez doktora Fausta zostały dokładnie przez poetę określone. Jednym jest „czerwony lew”, będący „dzielny zalotnikiem” („ein roter Leu, ein kühner Freier”). Ten poddawany jest na letniej łąznie („im lauen Bad”; mogła to być łąznia wodna albo słabo ogrzana łąznia piaskowa) „zaślubinom” z „lilią”. A potem z mieszaniny reakcyjnej wydobywany jest ostrym płomieniem produkt reakcji, „die junge Königin”. Pojawia się ona w retorcie (im Glas) w otoczeniu barwnych kolorów.

„Czerwony lew Paracelsusa” to jedna z wielu nazw alchemicznych siarczku antymonu. Substancja ta była zaś substancją wyjściową w syntezie leków antymonowych. W szczególności służyła do otrzymywania tzw. *antimonium diaphoreticum*, ulubionego i nadużywanego leku epoki jatrochemii. Lek ten był stoso-

wany od początków XVII w. Wytwarzano go, kilkakrotnie stapiając siarczek antymonu z saletrą. Prawie na pewno preparację tego właśnie leku przedstawił Goethe w *Fauście*. Taka interpretacja sugeruje, że pod kryptonimem „lilia” ukrył poeta nic innego, jak saletrę. Pewnie urzekł go kontrast „czerwonego lwa” i białej „lili”. Na tę cechę saletry zwraca uwagę przynajmniej kilka jej nazw alchemicznych, jak „sapo alba” (białe mydło), „sulphur album” (biała siarka) i wreszcie niemiecki „Weisser Drache” (biały smok). W reakcji siarczku antymonu z saletrą powstawał antymonian potasu. On właśnie był lekiem jatrochemików. Działając na ten produkt kwasami, siarkowym i octowym, otrzymywano kwas antymonowy, inny wzięty lek.

A teraz o zaślubinach w retorcii. To też bardzo stara alchemiczna alegoria. Reakcję chemiczną wyobrażano sobie jako miłosne połączenie pierwiastka męskiego z żeńskim. W akcie miłosnym partnerzy reakcji ponosić mieli śmierć, a z ich martwych ciał rodziła się „młoda królowa”. Taka antropomorfizacja w myśleniu o przekształceniu chemicznym właściwa jest alchemii. Wydaje się nawet, że alegorię aktu miłosnego brali oni dosłownie, przypisując jej realne znaczenie. Zdają się to potwierdzać liczne ryciny w manuskryptach alchemicznych. Dla przykładu podaję tu jedną z takich rycin. Na wielu podobnych rysunkach złączona w uścisku para to król i królowa. Dobitnie o tym świadczą korony, jakie mają na głowach. Ich śmierć prowadzi do narodzin młodej królowy.

Podobne rozumienie reakcji chemicznej napotkać można jeszcze i w tekstach XIX-wiecznych. Oto np. opis reakcji cynku z kwasem siarkowym wzięty z *Zarysu filozofii natury* warszawskiego lekarza i filozofa Henryka Levittoux:

Każda cząsteczka powierzchni cynku [...] połączy się z atomem kwasorodu wody, który też w drogę ku sile w tej chwili się podniósł i zespolą się razem, dając początek nowego związku, ciała niedokwasem cynku zwanego. Zadziwiający fenomen, który, przy początku istot organicznych zwierzęcych przypomina coïtus, a który przy całej fizyczności tego aktu u człowieka w chwili jego poczęcia jest i uczuciem, jest sercem [3].

Wróćmy jednak do tekstu Goethego. Powstający w reakcji „czerwonego lwa” z „lilią” produkt jest, jak widzieliśmy, ostrym ogniem „przepędzany” z jednej narzędzińskiej komory do drugiej („beide dann mit offnem Flammenfeuer aus einem Brautgemach in andere gequelt”). I wtedy właśnie pojawia się owa „młoda królowa” w otoczeniu barwnych kolorów („mit bunten Farben”). Tak też musiało być; podczas tej operacji w gardle retorty osadzały się w postaci barwnych, białych przechodzących w żółte i czerwone pasów, „kwiaty antymonowe” (*Flores antimonii*). Były to tlenki i siarczki antymonu, sublimujące z mieszaniny reakcyjnej.

W swoim poemacie Goethe dość dokładnie opisał więc preparację *antimonium diaphoreticum*.

Taka interpretacja tekstu Goethego wydaje mi się najbardziej prawdopodobna. Trzeba jednak powiedzieć, że nazwy „czerwony lew” używano nie tylko dla siarczku antymonu, ale – niekiedy – również dla kwasu azotowego. Znana była inna od tutaj opisanej metoda otrzymywania *antimonium diaphoreticum*, polega-

jąca na kilkakrotnym oddestylowywaniu kwasu azotowego z nad zadanego nim „masła antymonowego”, tj. trichlorku antymonu. Doktor Faust mógł, wśród innych „niezliczonych recept” użyć i takiej recepty, by otrzymać swój lek antymonowy. Tyle, że przy takim postępowaniu nie tworzyłyby się w gardle retorty nalot „kwiatów antymonowych”. Tekst Goethego opisuje więc raczej tę starszą metodę syntezy leku.



Alegoria reakcji chemicznej. Z rękopisu: *Pretiosissimum Donum Dei (per) Georgium Anrach*, XVII w., Biblioteka Arsenau, Paryż (S. Klossowski de Rola, *Alchemy*, New York 1973)

W tym miejscu pojawić się może u Czytelnika pytanie, czy rzeczywiście wiadomości chemiczne poety były tak gruntowne, by jego wierszom przypisywać jakąś chemiczną realność? Otóż Goethe niewątpliwie dobrze znał język dzieł alchemicznych. We wczesnym okresie życia urzekła go *ars magna* alchemików. Przebywając na studiach w Lipsku poeta ciężko zaniemógł i w 1768 r. powrócił do ro-

dzinnego domu we Frankfurcie nad Menem. Tam zaprzyjaźnił się z panią Zuzaną von Klettenberg, również cierpiącą na przewlekłą chorobę. Obydwoje leczył ten sam lekarz, J.F. Metz, cichy wyznawca alchemii. Goethego ujął sobie przepisaniem skutecznego leku, własnej produkcji. Obydwoje zaś chorych zachęcał, by samodzielnie zabrali się do pracy nad esencjami leczniczymi. Przyjaciółka Goethego miała już pewne w takich pracach doświadczenie. Eksperymentowała z solami żelaza. Razem z Goethem zaczęła studiować wydaną w 1760 r. księgę G. von Wellinga *Opus mago-cabalisticum et theosophicum*. Niezauważalnie dla siebie Goethe utonął w alchemiczno-kabalistycznej literaturze. Czytał więc, jak wspomina, dzieła Paracelsusa, Bazylego Valentinusa, van Helmonta, Starckeya i innych alchemików. Specjalnie zaś urzekła go wydana bezimiennie księga *Aura catena Homeri*, prawdziwa biblia ruchu Różokrzyżowców. W ślad za tym poszły własne próby eksperymentalne. „Najbardziej – wspominał potem poeta – zajął mnie tzw. *Liquor Silicum* (szkło wodne), który powstaje jako przejrzyste szkło, gdy stapia się piasek kwarcowy z odpowiednią ilością ługu, a który rozplywa się na powietrzu, przechodząc w klarowną ciecz. Ten, kto sam to choć raz wytworzył i oglądał własnymi oczyma, ten nie będzie potępiać kogoś, kto wierzy w ziemię dziewiczą i możliwość działania na niej i przez nią” [4]. Wyjaśnić tu trzeba, że „ziemia dziewicza” (*terra virginea*) oznaczała „pierwszą materię” (*materia prima*) alchemików. Tak więc Goethe musiał dokładnie wiedzieć, co też preparował doktor Faust.

Jak już wspomnieliśmy, leki antymonowe były w powszechnym użyciu od początku XVII w. Uchodząca za pierwszą, gazeta polska „Merkuriusz Polski” donosiła np. z Paryża pod datą „18 februari 1661”: „Król i królowa sprowadzili się do Vincennes do kardynała Mazariniego, który tam niebezpiecznie chory leży. Dano mu po dwa razy wina antymonialnym proszkiem przyprawionego, po którym począł się lepiej mieć” [5].

W naszym kraju też wtedy leczono takimi specjami. Weźmy np. do ręki tom wydawanego w połowie XVIII wieku w Warszawie, przez lekarza i wydawcę Mitzlera de Kolofa, czasopisma naukowego „Acta Litteraria Regni Poloniae et Magni Ducatus Lithuaniae”. Mitzler znany jest z gorliwego propagowania na łamach swoich wydawnictw własnej produkcji „cudownego balsamu” na niemal wszystkie choroby. W „Acta Litteraria” donosił, że udało mu się wyleczyć z ukąszenia przez węża lekiem sporządzonym z „siarki antymonialnej ekstrahowanej octem winnym z jej szkła” i tynktury „aurum volatile”. „Szkło siarki antymonialnej”, *vitrum antimonii*, było mieszaniną tlenków i siarczków antymonu. Tę brązowożółtą, szklistą masę otrzymywano, szybko stapiając wilgotny siarczek antymonu. *Aurum* zaś *potabile*, inaczej *aurum fulminans* lub *aurum scolopetans* – to złoto piorunujące, amoniakalny kompleks złota [6].

W tym samym tomie „Acta Litteraria” znajduje się artykuł lekarza z Leszna, Jeremiasza Neifelda (1721–1773), o leczeniu 15-letniej dziewczynki z „gorączki kataralnej”. Lekarz aplikował jej mieszaninę sproszkowanego piżma i „antymonu diaforetycznego”, a więc tego leku, którego preparację opisał Goethe [7]. Był to bowiem straszny dla chorych czas leków mineralnych. Cytowany już wyżej

Mitzler de Kolof pisał wtedy: „Cóż doprawdy lepiej może posłużyć do korygowania właściwych gruczołów i limfy, jak merkuriusz słodki?” [8] („słodki merkuriusz” to kalomel, Hg_2Cl_2). Używanie w leczeniu preparatów antymonowych utrzymało się w jakiejś mierze do końca XIX w. Zwłaszcza emetyku, wianu potasowo-antymonowego, leku o bardzo starej historii. O nim tak pisał w 1840 r. krakowski lekarz i biolog, Józef Majer:

Skuteczność tego środka w zapaleniach, zwłaszcza błon surowiczych i śluzowych, dawno znana jest lekarzom [...] Jakimby sposobem środek ten skutkował w zapaleniach, Śniadecki nie odważa się tłumaczyć, przekonany jest tylko, iż władza ta nie zawisła od zadrażnienia żołądka i sprawionego przez to odciągnięcia; bo jakże wielkim musiałoby być to zadrażnienie, ażeby zdołało stłumić, jak to czasem bywa, nawet najgwałtowniejsze zapalenie płuc? [...] Mniej upowszechnione, chociaż już od Barkhausena i wielu lekarzy angielskich usilnie zalecone, jest użycie emetyku w obłędzie pijaków [9].

Jak więc stwierdziliśmy, Goethe dobrze musiał wiedzieć, o czym pisał, opowiadając o pracach Fausta-seniora. Współcześni mu czytelnicy dzieła nie mieli też zapewne trudności w zrozumieniu tekstu poematu. Oświecony czytelnik XVIII w. był w jakiejś mierze obyty z językiem pism alchemicznych. Takie samo stwierdzenie można odnieść i do tekstów polskich. W ciekawej rozprawce pt. *O chemii w Polsce*, opublikowanej w 1826 r., F.X. Kurowski przytacza np. następujący passus z wiersza księdza Krasickiego:

Franciszek, przed tem piniacz, teraz alchemista,
Dmucha co raz na węgle, przy piecyku siedzi:
Zagęszcza i rozwilża, przerzedza i cedzi:
Pełne proszków chemicznych szafy i stoliki,
Wszędzie torty, retorty, banie, alembiki.
Już postrzegł w ogniu gwiazdę – a kto gwiazdę zoczy,
Albo głowę Meduzy, albo ogon smoczy,
Już ten wygrał. Winszuję, ale nie zazdroszczę.

(I. Krasicki, *Złość ukryta i jawna*)

Kurowski nie zaopatrzył tego tekstu w żadne objaśnienia [10]. Tekst był wtedy zrozumiały. Dziś nie ujedziemy tu bez komentarza. „Zobaczyć gwiazdę” – to przecież coś wprost z laboratorium alchemicznego. W postaci srebrzystej gwiazdy krystalizował metaliczny antymon. Siarczek antymonu ogrzewano z potażem i opiłkami żelaza, a następnie kilkakrotnie przetapiano zredukowany, metaliczny produkt z potażem. Czysty metal krystalizował po oziębieniu w postaci gwiazdy. Śniadecki w swoim podręczniku chemii radził, by do reakcji brać mieszaninę 8 części siarczku antymonu, 6 – kamienia winnego i 3 – saletry albo też prażyć siarczek z „połową co do wagi opiłków żelaznych, a potem dodać czwartą część saletry”. „Po ostudzeniu – pisał – znajdziemy metal na spód zebrany, wskazujący na powierzchni sieć lub plecionkę do gwiazdy podobną” [11]. Tę „gwiazdę antymonową” nazywali alchemicy *regulus antimonii stellatus*.

Z kolei figurujący w wierszu Krasickiego „ogon smoczy” to jedna z bardzo wielu nazw rtęci. To *cauda draconis* alchemików. Gorzej natomiast wygląda

sprawa „głowy Meduzy”. W leksykonie terminów alchemicznych nie znalazłem czegoś takiego w dosłownym brzmieniu. Wprawdzie nazwa „głowa” występuje dość często w różnych kontekstach, zwłaszcza jako *caput mortuum*, a więc „trupia głowa” czy też „głowa śmiertelnych”, ale przecież nie jako „głowa Meduzy”. Wydaje się, że Krasicki potraktował tę głowę Meduzy jako rodzaj poetyckiej opozycji do „ogona smoka”. Termin zaś *caput mortuum* mógł odegrać jakąś rolę w tworzeniu tej opozycji, bo przecież Meduza swoim spojrzeniem zadawała śmierć. Jeśli zaś chodzi o termin *caput mortuum*, to oznaczał on pozostałość w re-torcie, jaką uzyskiwano wydestylowując kwas siarkowy z „zielonego witiolu” (siarczan żelaza). Były nią oczywiście tlenki żelaza. Do wyszydzenia praktyk adeptów alchemii użył więc poeta języka alchemików. Dziś jego wersy zdają się czystą poetycką fantazją, ale tylko dlatego, że znajomość użytego w wierszu języka zaginęła i zrozumiałe dla współczesnych treści musimy odcyfrowywać, niczym tajemnicze rebusy.

PIŚMIENICTWO CYTOWANE

- [1] H. Kopp, *Geschichte der Chemie*, Th. 4, Braunschweig 1847.
- [2] W. Schneider, *Lexicon alchemistisch-pharmazeutischer Symbole*, Vrlg. Chemie, Weinheim 1962.
- [3] H. Levittoux, *Zarys filozofii natury*, Warszawa 1869, s. 47.
- [4] J.W. Goethe, *Aus meinem Leben. Wahrheit und Dichtung. Goethes Werke*, Bd. 5, Dritte Auflage, Stuttgart, s.192.
- [5] *Merkuriusz Polski*, oprac. A. Przyboś, PWN, Kraków 1960, s. 227.
- [6] Laur. Mizleri, medici Varsaviensis, *Observationes binas ex medicina practica selectae, altera de ulcere super Vesicam puerperae creato, altera de morsu serpentis in se ipso intra viginti quatuor hores sanato*, Acta Litteraria Regni Poloniae et Magni Ducatus Lithuaniae, 1755, Trim. II, s. 152.
- [7] *Observatio de efficatia moschi cum antimonio diaforetico in febre a catarrhali petachizante, autore D. Ernesto Jerem. Neifeld Medico Lesnensi*, Acta Litt., 1755, Trim. III, s. 218.
- [8] Laur. Mizleri de Kolof, Med. Varsaviensis, *Observatio ex medicina practica selecta, de phtisi confirmata, in virginum XV annorum curata*, Acta Litt., 1755, Trim. III, s. 215.
- [9] J. Majer, *Obraz postępu nauki lekarskiej*, Krabów 1840, s. 90–91.
- [10] F.X. Kurowski, *O chemii w Polsce*, [w:] *Popis publiczny uczniów Konwiktu Warszawskiego Księży Piitarów*, Warszawa 1826, s.16.
- [11] J. Śniadecki, *Początki chemii*, T. 1, Wilno 1816, s. 276.

REGULAMIN DLA AUTORÓW

„Wiadomości Chemiczne” publikują artykuły referatowe, nie oryginalne prace doświadczalne, dotyczące wszystkich dziedzin chemii i nie drukowane przedtem w innych czasopismach. Artykuły publikowane w „Wiadomościach Chemicznych” nie mogą być bez zgody Redakcji drukowane w innych czasopismach. Treść artykułów powinna odpowiadać stanowi wiedzy w chwili pisanania artykułu. Piśmiennictwo cytowane powinno uwzględniać najnowsze prace krajowe i zagraniczne z dziedziny, której dotyczy artykuł.

Maszynopisy (wydruki komputerowe) należy nadsyłać do Redakcji w **dwóch egzemplarzach**: oryginał i kopia lub kserokopia pisana jednostronnie, z zachowaniem podwójnej interlinii i marginesu szerokości 5 cm z **prawej** strony; pierwszy wiersz akapitu należy zaznaczyć wcięciem na 5 uderzeń w klawisz.

Na pierwszej stronie pod tytułem polskim należy umieścić tytuł w języku angielskim, adres autora oraz spis rozdziałów. Praca powinna zawierać obszernie streszczenie w języku angielskim (do 1,5 strony maszynopisu z cytowaniem piśmiennictwa i odsyłaczami do tabel i rysunków w tekście). Na osobnej kartce prosimy o krótką (do 150 wyrazów) notkę z informacją o uprawianej przez Autora tematyce naukowej i przebiegu pracy. Prosimy o podanie tytułu naukowego i miejsca pracy oraz o dołączenie aktualnego zdjęcia. Przesłanie tych informacji będziemy traktować jako zgodę na ich publikację.

Artykuły należy opracowywać zwięźle i nie zamieszczać szczegółów, odsyłając czytelnika do piśmiennictwa oryginalnego. Maszynopis nie powinien przekraczać 25 stron wraz z tabelami i wykazem piśmiennictwa lub 100 stron, jeśli jest monografią przeznaczoną do druku w „Bibliotece Wiadomości Chemicznych”. Artykuły powinny być napisane za pomocą komputera. Redakcja prosi o dołączenie dyskietki z tekstem pracy i ilustracjami wraz z wyczerpującą informacją o używanym edytorze. Pożyczony edytor Word (co najmniej wersja 6).

Rysunki (mogą być kolorowe) należy nadsyłać w dwóch egzemplarzach (oryginały i kopie lub kserokopie). Oryginały rysunków muszą mieć taką formę graficzną, by nadawały się do reprodukcji. Na odwrotnej stronie należy podać ołówkiem nazwisko autora i numer rysunku i ten sam numer zaznaczyć w odpowiednim miejscu maszynopisu. Na osobnym arkuszu dołączyć podpisy pod rysunki. **Wzory chemiczne i schematy reakcji chemicznych, których nie można w prosty sposób napisać na maszynie lub komputerze**, powinny być wpisane ręcznie, w odpowiednich miejscach tekstu. Niezależnie od tego **do pracy należy dołączyć jeden komplet wzorów i schematów narysowanych oddzielnie w formie nadającej się do reprodukcji**.

Tabele należy ponumerować cyframi arabskimi oraz podać ich tytuły.

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

O przyjęciu pracy do druku decyduje Komitet Redakcyjny. **Maszynopisy nie odpowiadające podanym warunkom nie będą przez Komitet rozpatrywane**. Artykuły nie zakwalifikowane do druku Redakcja zwraca, zachowując kopię maszynopisu. Autorzy przeprowadzają jedną korektę tekstu. Po zakwalifikowaniu pracy do druku nie będą uwzględniane żadne poprawki rysunków.

Honoraria za wydrukowane prace są wypłacane wyłącznie tym Autorom, których artykuły zostały zamówione przez Redakcję. Autorzy wydrukowanych prac otrzymują bezpłatnie 20 nadbittek.

DO CZYTELNIKÓW „WIADOMOŚCI CHEMICZNYCH”

Redakcja miesięcznika PTCh „Wiadomości Chemiczne” zawiadamia, że wysokość prenumeraty rocznej „Wiadomości Chemicznych” za 2002 r. ustaliliśmy na 60 zł dla instytucji i nie zrzeszonych prenumeratorów indywidualnych oraz 30 zł dla bibliotek szkół średnich i podstawowych. Należność za prenumeratę prosimy przekazywać na konto:

Bank Przemysłowo-Handlowy S.A.
I Oddział we Wrocławiu
pl. Powstańców Śl. 9, 53-316 Wrocław
Redakcja „Wiadomości Chemicznych”
Nr 10601679-320000400597

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

– prenumerata „Wiadomości Chemicznych” na rok 2002 wraz ze składką członkowską, w ramach której dostarczany jest „Orbital”, wynosi 85 zł (składka – 75 zł, prenumerata – 10 zł);

– emeryci oraz nauczyciele szkół średnich i podstawowych płacą 35 zł (składka – 25 zł, prenumerata – 10 zł);

– dla studentów, członków PTCh, składka wraz z prenumeratą „Wiadomości Chemicznych” wynosi 18 zł (składka – 8 zł, prenumerata – 10 zł).

Członkowie PTCh, którzy zechcą zaprenumerować „Wiadomości Chemiczne” na podanych tu warunkach, proszeni są o wnoszenie opłat na konto:

PTCh Warszawa, ul. Freta 16
Millennium BIG BG SA, Nr 5711602202-0000000027202458

Redakcja „Wiadomości Chemicznych”



SPIS TREŚCI

Izabela SOBCZAK, Maria ZIOŁEK: DeNO _x na sitach molekularnych zawierających miedź. Cz. III. Selektywna katalityczna redukcja NO (SKR NO) węglowodorami. Wpływ O ₂ , H ₂ O i SO ₂	377
Jerzy GĘBICKI, Andrzej MARCINEK, Jan ADAMUS: Produkty pośrednie wieloetapowej konwersji NADH ⇌ NAD ⁺	397
Kamil WOJCIECHOWSKI, Zbigniew BRZÓZKA: Rozpoznawanie anionów	417
Teresa KOLEK: Hydroksylacje enzymatyczne. Zastosowanie preparatywne i mechanizm reakcji z udziałem monooksygenaz cytochromowych P450	449
Halina HAJMOWICZ, Dominik JAŃCZEWSKI, Ludwik SYNORADZKI: Amlodypina, nowo- czesny antagonistą wapnia – metody syntezy	469
Przemysław MASTALERZ: Nie ma problemu środowiskowych estrogenów	483
Elżbieta SKRZYDLEWSKA, Maria BALCERZAK, Piotr PASŁAWSKI: Nowoczesne techniki analityczne wykorzystujące plazmę indukcyjnie sprzężoną jako źródło wzbudzenia i jonizacji	495
Felieton naukowy	
Ignacy Z. SIEMION: Notatki chaotyczne. XL. Czytając <i>Fausta</i>	523

W NASTĘPNYM ZESZYCIE UKAZĄ SIĘ:

Grzegorz GRYNKIEWICZ, Osman ACHMATOWICZ, Iza FOKT, Waldemar PRIEBE, Jan RAMZA, Barbara SZECHNER, Wiesław SZEJA: Syntezy naturalnych i modyfikowanych antybiotyków antracykli- nowych ze wspólnego prekursora: 3,4-di-O-acetylo-L-ramnału	
Joanna RABICZKO, Dariusz SOCHA, Margarita JURCZAK, Marek CHMIELEWSKI: Synteza hydroksy- indolizydy z α,β-nienasyconych δ-laktonów	
Antoni RÓŻAŁSKI, Agnieszka TORZEWSKA, Beata BARTODZIEJSKA, Dorota BABICKA, Iwona KWIL, Andrei V. PEREPELOV, Anna N. KONDAKOVA, Sof'ya N. SENCHENKOVA, Yuriy A. KNIREL, Evgeny V. VINOGRADOV: Struktura chemiczna, swoistość antygenowa i znaczenie w choro- botwórczości lipopolisacharydu (LPS, endotoksyna) – na przykładzie bakterii <i>Proteus vulgaris</i>	
Wiesław SZEJA, Joanna BUGŁA, Aleksandra NIEMIEC, Gabriela PASTUCH, Anna KASPRZYCKA, Anna ŚLUSARCZYK, Ilona WANDZIK, Tadeusz BIEG, Bogdan PRZYBYSZ, Jadwiga BOGUSIAK: Glikozylacja z zastosowaniem pochodnych 1-tiocukrów jako substratów	
Bogusław KRYCZKA, Stanisław PORWAŃSKI: Synteza glikozydów, disacharydów i pseudodisachary- dów w reakcjach z udziałem związków palladu	
Sławomir JAROSZ, Stanisław SKÓRA, Katarzyna SZEWCZYK: Allilocynowe pochodne cukrów pro- stych w syntezie układów karbocyklicznych	
Barbara DMOCHOWSKA, Eugenia SKORUPOWA, Andrzej WIŚNIEWSKI: O czwartorzędowych solach N-glikopiranozyloamoniowych	

Felieton naukowy

Ignacy Z. SIEMION: Notatki chaotyczne. XLI. W stronę gastronomii molekularnej

Kronika

Nowe wydawnictwa