

WIADOMOSCI *chemiczne*



2011

(65)

7-8

(769-770)

JUBILEUSZE

ADAM BARTECKI (1920–2010)
– SZKIC O ŻYCIU I TWÓRCZOŚCI

ADAM BARTECKI (1920–2010)
– AN ESSAY ON HIS LIFE AND WORK

Maria Cieślak-Golonka, Jan Starosta

*Zakład Chemii Nieorganicznej i Strukturalnej,
Wydział Chemiczny Politechniki Wrocławskiej,
ul. Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław
e-mail: maria.golonka@pwr.wroc.pl*



prof. zw. dr hab. Maria Cieślak-Golonka, profesor Politechniki Wrocławskiej. Absolwentka Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. W 1974 roku doktorat z chemii koordynacyjnej wolframu który wykonywała pod kierunkiem prof. Adama Barteckiego. Habilitowała się w roku 1993 na podstawie publikacji dotyczących syntezy i spektroskopii elektronowej związków chromu(VI) W ostatnich latach Jej zainteresowania poszerzone zostały o badania nad farmaceutykami nieorganicznymi. Jest autorką i współautorką ponad stu prac w czasopismach o zasięgu i międzynarodowym. Pełni funkcje wiceprezesa

Oddziału Wrocławskiego PTChem.



dr Jan Starosta, urodził się w 1936 roku w Gostyniu Poznańskim. W latach 1954–1959 studiował chemię na Uniwersytecie Wrocławskim. Po jej ukończeniu podjął pracę naukowo-dydaktyczną w II Katedrze Chemii Nieorganicznej Politechniki a od roku 1968 w Instytucie Chemii Nieorganicznej i Metalurgii Pierwiastków Rządowych tej Uczelni. Prowadził badania dotyczące problematyki równowag w roztworach związków kompleksowych, a także biometalurgii. W roku 1967 obronił pracę doktorską, której promotorką była Profesor Bogusława Jeżowska-Trzebiatowska. Jest aktywnym członkiem Polskiego

Towarzystwa Chemicznego. Wielokrotnie był wybierany do Zarządu Wrocławskiego PTChem oraz do Centralnej Komisji Rewizyjnej tej organizacji. Był organizatorem i kierownikiem Studium Podyplomowego dla Nauczycieli. Jest współautorem podręcznika akademickiego pt. *Wstęp do chemii koordynacyjnej*, autorstwa Marii Cieślak-Golonki, Jan Starosty, Marka Wasielewskiego, wydane w roku 2010 przez Wydawnictwo Naukowe PWN.



Scientia nihil est quam veritatis imago
Sir Francis Bacon

Sentencja powyższa, najkrócej ujmując to, czemu Profesor Bardecki służył całym swoim życiem czyli wytrwałemu poszukiwaniu prawdy poprzez ponad 60-letnią działalność naukową. Każda praca jest nierozzerwalnie związana z historią człowieka a zatem należy zacząć od początku, od miejsca, gdzie wszystko się zaczęło.

Stanisławów-Lwów-Złotniki

Adam Bardecki urodził się 17 marca 1920 roku w Stanisławowie w rodzinie urzędniczej Myny i Maksymiliana. Region, w którym leżał Stanisławów, to były Polskie Kresy. *Kresy... bogate, stare, piękne słowo. Jest w nim obszar i przestrzenność, bezkres równin falujących, oddalenie od świata i wicher stepowy* – pisała Zofia Kossak-Szczucka. Stanisławów to były kresy Kresów. Miasto usytuowane na przedgórzu Karpat, które liczyło w okresie międzywojennym 60 tys. mieszkańców założył w 1663 roku Jędrzej Potocki – imię Stanisław nosił zarówno syn jak również ojciec Jędrzeja, słynny Rewera Potocki. D’Alerach, francuski kupiec tak pisał w roku 1684: *Największym, najpiękniejszym miastem na Pokuciu jest Stanisławów. Rynek, budynki, mieszkańcy jak i arsenał przewyższa wszystkie inne. Mieszkańcy bardzo bogaci. Sprawiedliwie, Stanisławów jest sercem Królestwa (...).*

Tu właśnie w stanisławowskiej farze Henryk Sienkiewicz umieścił scenę pogrzebu Michała Wołodyjowskiego. Wydaje się, że w murach kościoła jeszcze słychać echo głosu księdza Kamińskiego: *Dlaboga, panie Wołodyjowski! Larum grają!*

Wybitni stanisławowianie to m.in. Franciszek Karpiński (1741–1825), poeta, autor m.in. słynnej kolędy *Bóg się rodzi*; Mieczysław Romanowski (1834–63), poeta, patron szkoły do której uczęszczał Adam Bardecki – Mieczysław Romanowski zginął w powstaniu styczniowym; Albin Dunajewski (1814–94), kardynał krakowski; Bogusława Jeżowska-Trzebiatowska (1908–1991), założycielka wrocławskiej szkoły chemii koordynacyjnej. W Stanisławowie urodzony był również oraz spędził dzieciństwo i młodość Stanisław Sosabowski (1892–1967), jeden z najwybitniejszych generałów polskich XX wieku.

Jak wszystkie miasta kresowe, Stanisławów był mozaiką narodowościową w której dominowali Polacy i Rusini (Ukraińcy), było tam też wielu Ormian, Niemców, Łemków i Żydów.

Ojciec przyszłego profesora Adama Bardeckiego był urzędnikiem w firmie ubezpieczeniowej, matka zaś zajmowała się wychowywaniem dzieci. Adam był

najmłodszym spośród trójki rodzeństwa. Jego rodzice przed I-szą wojną światową mieszkali w rdzennej Austrii, stąd matka znała bardzo dobrze język niemiecki i mogła tego języka od najmłodszych lat nauczać swoje dzieci. Ponadto, Adam uczył się dwóch kolejnych języków obcych tj. ukraińskiego (ruskiego) i łaciny, w szkole podstawowej.

Słynne I Gimnazjum i Liceum im. Mieczysława Romanowskiego w Stanisławowie do którego uczęszczał Adam Bartecki stało się tematem wspomnieniowego artykułu Profesora, który napisał z okazji swojego 85-lecia urodzin [1]. Szkoła ta, zwana Collegio Stanislapolitano była założona w XVII w. na wzór Akademii Zamoyskiej przez Jędrzeja Potockiego i była najstarszą w mieście, stanowiła tak jak chciał jej Założyciel, ognisko promieniujące na całe Zadniestrze [2] – uczyli w niej m.in. doktorzy Wszechnicy Jagiellońskiej. W roku 1722 powstało z niej Kolegium Jezuickie nawiązujące do tradycji Akademii, które przeżywa rozkwit w latach 1730–1760. Po I-szym rozbiórce Polski i rozwiązaniu Zakonu w roku 1773, szkoła przeszła pod zarząd państwa austriackiego, z niemieckim językiem wykładowym. Dopiero w połowie XIX wieku wprowadzono polski i ruski jako języki wykładowe. W okresie II-giej Rzeczypospolitej, I Gimnazjum i Liceum im. M. Romanowskiego należało do najlepszych szkół w mieście. Miała ona wspaniałą bibliotekę liczącą kilka tysięcy książek i jak pisał dr Józef Zieliński, historyk: (...) *Biblioteka naszego gimnazjum pod względem swojej wartości naukowej stoi na pierwszym miejscu wśród reszty bibliotek stanisławowskich* [2]. W szkole istniała również czytelnia czasopism zagranicznych.

Szkoła miała profil humanistyczny, ale Adam Bartecki szczególnie upodobał sobie matematykę. Kazimierz Waligóra, wychowawca klasy, do której uczęszczał Adam potrafił zainteresować młodzież tym przedmiotem poprzez m.in. organizację dodatkowych zajęć samokształceniowych. Doceniając zdolności językowe ucznia, profesor Maksymilian Freszel, germanista powierzył młodemu Adamowi opiekę nad zbiorem niemieckojęzycznym szkolnej biblioteki. Niestety, prawie cała inteligencja stanisławowska (ponad 250 osób), w tym wyżej wymienieni nauczyciele, zginęła z rąk niemieckich w czasie II wojny światowej, w większości w sierpniu 1941 roku. Adamowi wojna zabrała zarówno rodziców, których widział ostatni raz w kwietniu 1941 roku, jak i wielu innych członków rodziny.

17 września 1939 roku do Stanisławowa wkroczyła Armia Czerwona. Zmieniło się wszystko, między innymi szkoła, która na wzór sowiecki stała się dziesięciolatką. Adam został uczniem ostatniej klasy licealnej z ukraińskim językiem wykładowym – dlatego dopiero po wojnie już w polskim Wrocławiu, w liceum przy ul Parkowej jako uzupełnienie świadectwa maturalnego, Adam Bartecki zdawał egzamin z języka polskiego, historii i geografii.

W ostatniej klasie licealnej zainteresował się chemią, która zafascynowała Go do tego stopnia, że postanowił rozpocząć studia chemiczne w Lwowskim Instytucie Politechnicznym, podległym wówczas bezpośrednio Moskwie – przedwojennej Politechnice Lwowskiej.

Po ukończeniu dziesięciolatki w roku 1940 Adam Bartecki wyjechał do Lwowa, gdzie zdawał egzamin wstępny na Wydział Chemiczny. Egzamin ten obejmował matematykę, chemię i język ukraiński. Jak wspomina: *Miałem opanowanego całego Tołłoczkę* – chodziło najpewniej o książkę autorstwa L. Brunera i S. Tołłoczki, *Chemia nieorganiczna*, W-wa 1921, wyd. Gebethner i Wolff. Po przyjęciu na studia mieszkał w akademiku przy ul. Abrahamowiczów niedaleko Wzgórz Wuleckich. Wykładowcami i studentami uczelni na której pobierał studia byli Polacy, stąd w większości wykłady prowadzone były w języku polskim. Kierownikami katedr Wydziału Chemicznego byli tacy wybitni uczeni jak Wiktor Jakób, Stanisław Pilat, Edward Sucharda i Adolf Koszt [3].



Fotografia 1. Fasada Gmachu Chemii Politechniki Lwowskiej, gdzie studiował Adam Bartecki w roku akademickim 1940/1941

Z tego pamiętnego roku akademickiego 1940/1941, profesor Adam Bartecki wspominał wielu nauczycieli. Uważał za swoich mistrzów m.in. Wiktora Jakóba, wykładowcę chemii nieorganicznej; Kazimierza Bartla, wykładowcę geometrii wykreślnej; Stanisławę Witekową prowadzącą laboratorium chemiczne; Jana Weyssenhofa, wykładowcę fizyki, czy też Adama Maksymowicza, wykładowcę matematyki. Po II wojnie światowej, niektórzy profesorowie pozostali we Lwowie, z innymi, m.in. Edwardem Suchardą i Wiktorem Jakóbem, Adam Bartecki spotykał się po przesiedleniu na Ziemię Zachodnie. Chemik Stanisław Pilat i matematyk Kazimierz Bartel zostali zamordowani przez hitlerowców wraz z innymi profesorami na Wzgórzach Wuleckich, w lipcu 1941 roku.

Jak przedstawiał w swoich wspomnieniach profesor Bartecki [4], najbardziej frapowały go analizy chemiczne. Często prof. Wiktor Jakób w otoczeniu asystentów

wizytował laboratoria i zwracał uwagę oraz udzielał rad pracującym w nich młodym adeptom chemii. Adam Bartecki pisał:

(...) W moich wspomnieniach nie może zabraknąć także paru słów o matematyce, chyba najważniejszym niechemicznym przedmiocie naszych studiów. Wykład i (liczne) kolokwia prowadził docent (czy profesor?) A. Maksymowicz. Niski, mocno pochylony, po wejściu na salę wykładową zwykł wyciągać z kieszeni jakiś karteluszek i po spojrzeniu nań i schowaniu do ubrania „ruszał do ataku”. Musiał mieć wspaniałą pamięć, bo wykład toczył się gładko, już bez powtórnego zaglądania do kartki (...). Profesor Maksymowicz był niezwykle wymagający, co dowodnie okazało się podczas kolokwiów i co nawet stawało się tematem (bolesnych) żartów. I tak, na przykład, kolokwia z geometrii analitycznej miały taki przebieg: Student stoi przy tablicy i biedzi się nad zadaniem, które podyktował mu Profesor (odwrócony tyłem). (...) delikwent coś mówi ale często mówi źle, Profesor czeka, student wreszcie odpowiada dobrze. Profesor stwierdza: „Zaliczam panu geometrię analityczną w zakresie prostej i koła (!), materiał w zakresie następnych krzywych (np. elipsy, paraboli itd.) będzie Pan zdawał za tydzień (lub dwa) [4].

Do całkowitego zaliczenia letniej sesji egzaminacyjnej roku akademickiego 1940/1941 Adamowi Barteckiemu zabrakło zdanego egzaminu z chemii nieorganicznej wyznaczonego na 23 (lub 24) czerwca. Jednak 22 czerwca 1941 roku rozpoczyna się wojna sowiecko-niemiecka i 30 czerwca armia niemiecka zajmuje Lwów. Za wyjątkiem paru szkół zawodowych zamykane są szkoły, w tym także wyższe uczelnie – zamknięty został Lwowski Instytut Politechniczny. W przeddzień ataku niemieckiego do Lwowa przyjechał ojciec aby cieszyć się wraz z nim pomyślnie zdanymi egzaminami i perspektywą otrzymania stypendium na rok następny. Niestety, Adam Bartecki zmuszony był powrócić najpierw do rodzinnego Stanisławowa a potem do Złotnik koło Podhajec gdzie pracował jako laborant u swojej siostry, która była kierowniczką apteki. Praca ta, w pewnym sensie spowodowała, że utrwalił swoje wiadomości z chemii oraz nauczył się podstawowych czynności dotyczących technik laboratoryjnych.

W Złotnikach również spotkał swoją przyszłą żonę Krystynę Radnicką, córkę lekarza i jednocześnie późniejszego dowódcy jednego z oddziałów Armii Krajowej. Krystyna była sanitariuszką tego oddziału – po wojnie często wspominała operacje przeprowadzane w lesie u boku swojego ojca. W roku 1944 nastąpiło drugie wejście Sowieców i ojciec Krystyny, dr Bogumił Radnicki za swoją działalność został wywieziony na Syberię, gdzie przebywał 10 lat.

W połowie 1945 roku Adam Bartecki opuścił Kresy i został przesiedlony do Mirska k/Jeleniej Góry, gdzie osiedliła się jego siostra, która ponownie rozpoczęła prowadzenie apteki. Toteż, w latach 1945–1946, już jako siła fachowa – wprawdzie po jednym roku studiów chemicznych lecz dwuletniej praktyce w Złotnikach – kontynuował on pracę w aptece.

Okres wrocławski

Po wojnie w zrujnowanym Wrocławiu, organizowała się Politechnika, która w tym okresie wraz z Uniwersytetem stanowiła jedną uczelnię: Ze względu na fakt, że prof. Jakób w owym czasie przebywający w Gliwicach, przywiózł ze Lwowa podstawową dokumentację dotyczącą studentów tamtejszej Politechniki i dzięki Jego życzliwości Adam Bartecki otrzymał dokument potwierdzający ukończenie pierwszego roku studiów we Lwowie. Na jego podstawie i pod pewnymi warunkami, m.in. uzupełnienia przedmiotów maturalnych, mógł rozpocząć rok akademicki 1946/47, jako student drugiego roku Oddziału Chemii Technicznej Wydziału Matematyki, Fizyki i Chemii Uniwersytetu i Politechniki we Wrocławiu. Jednakże kolejnym warunkiem, który należało spełnić, było zaliczenie ćwiczeń z analizy jakościowej i ilościowej. Profesor Trzebiatowski swoim charakterystycznym nosowym brzmieniem głosu stwierdził: *No nie, Panie Kolego, Pan już zapomniał, była wojna. Owszem, zaliczę Panu ćwiczenia, ale tylko wstępne*. Tak więc rok akademicki 1946/1947 – drugi rok studiów chemicznych – był bardzo pracowity bo należało zdać dodatkowo kilka przedmiotów maturalnych oraz uzupełnić laboratorium z analizy jakościowej i ilościowej. Dzięki wielkiej pracowitości i ambicji Adama, następny rok akademicki (1947/1948) rozpoczął już bez zaległości. W kolejnym roku akademickim 1948/1949, Adam Bartecki student IV roku chemii po wyborze specjalizacji został zastępcą asystenta w Katedrze Chemii i Technologii Węgla, którą kierował prof. Błażej Roga (1895–1977), wybitny chemik o światowej sławie [5–7]. Wobec tego Adam Bartecki od 1 stycznia 1949 roku stał się formalnie pracownikiem Politechniki Wrocławskiej. Temat pracy magisterskiej zaproponowany przez Profesora Rogę związany był z zagadnieniami ekstrakcji węgla brunatnego mieszaniną alkoholi. Tytuł pracy brzmiał „Wpływ składu mieszanki benzolu i alkoholu etylowego oraz suszenia węgla brunatnego na wydajność bituminów”. Po uzyskaniu dyplomu w roku 1950 Adam telegrafował do swojej narzeczonej: *Operacja udana-pacjent żyje*. Prof. Roga zaproponował młodemu asystentowi badanie procesów spalania paliw stałych – na ten temat powstała w latach następnych trzyczęściowa publikacja [8]. Adam Bartecki przeszedł na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej wszystkie stopnie naukowej kariery akademickiej: doktorat (1960), habilitacja (1965), profesura (profesor nadzwyczajny 1973 i profesor zwyczajny 1979). Od roku 1968 do przejścia na emeryturę w roku 1990 Profesor Bartecki pełnił funkcję kierownika Zakładu Chemii Pierwiastków Rzadkich im. W. Trzebiatowskiego w Instytucie Chemii Nieorganicznej i Metalurgii Pierwiastków Rzadkich Wydziału Chemicznego PWr. W latach 1982–87 był dyrektorem tego Instytutu. W latach 1984–87 Profesor Bartecki pełnił również funkcję Prezesa Oddziału Wrocławskiego Polskiego Towarzystwa Chemicznego (dwie kadencje).

Adam Bartecki w roku 1950 poślubił Krystynę Radnicką z którą miał troje dzieci: Janusza, Małgorzatę i Ewę, doczekał się czworga wnucząt: Karola, Agnieszki, Marcina i Barnaby.

Twórczość

Rzeczywistość i działalność naukową Adama Barteckiego można podzielić na trzy główne okresy:

1. badania pod kierunkiem mistrzów (1949–1965),
2. realizacja własnych zainteresowań i nauczanie młodych (1965–1990) oraz
3. badania nad barwą (1990–2010).

Czas nauczycieli (1949–1965)

Czas nauczycieli rozpoczął się od objęcia stanowiska asystenta u prof. Rogi i trwał do usamodzielnienia się poprzez habilitację, w roku 1965. Jak wspomniano wcześniej, będąc studentem IV roku (1949) Adam Bartecki i jego bliski kolega Stefan Jasieńko zostali zastępcami asystentów na Oddziale Chemii Technicznej Wydziału Mat.-Fiz.-Chem. Uniwersytetu i Politechniki we Wrocławiu [5,6]. Pierwszym wrocławskim mistrzem Adama Barteckiego był wspomniany wcześniej Błażej Roga (1895–1977), absolwent Politechniki Lwowskiej, specjalista z zakresu fizykochemii i technologii węgla, kierownik Zakładu Chemicznej Przeróbki Węgla w Głównym Instytucie Górnictwa w Katowicach, późniejszy członek PAN. Profesor Roga zachęcił młodego adepta nauki do badań z zakresu zagadnień związanych ze spalaniem węgla. Z tego okresu pochodzą pierwsze publikacje Adama Barteckiego dotyczące analizy składu węgla brunatnych oraz sposobu oznaczania przebiegu spalania paliw stałych. W latach 1952–1954 powstały trzy publikacje związane z pracą Adama Barteckiego w Katedrze Chemii i Technologii Węgla, z której artykuł *O fotoelektrycznej metodzie oznaczania przebiegu spalania paliw stałych*, opublikowany w 1952 roku wydaje się być pierwszą pracą młodego uczonego [9–11]. Znacznie później, bo w 1961 roku, została opublikowana ostatnia z tego cyklu trzyczęściowa praca dotycząca zjawiska świecenia naturalnych paliw stałych [8]. Chociaż okres ten był owocny pod względem dorobku naukowego oraz przyniósł pierwsze doświadczenia w pracy badawczej, to jednak tematyka związana z chemią koordynacyjną stała się dla młodego uczonego bardziej interesująca. W związku z tym w 1954 roku podjął decyzję o przeniesieniu do katedry Chemii Nieorganicznej II, kierowanej przez Bogusławę Jeżowską-Trzebiatowską. Zespół jakim kierowała wówczas prof. Jeżowska-Trzebiatowska, obejmował pracowników katedr Chemii Nieorganicznej Uniwersytetu i Chemii Nieorganicznej II Politechniki. Pani Profesor na początek zaproponowała młodemu uczonemu badania nad rolą rozpuszczalników niewodnych w układach redoksowych, a konkretnie nad przebiegiem reakcji KMnO_4 z SnCl_2 w acetonie. Okazało się, że aceton nawet tzw. bardzo czysty zawierał domieszki, które redukowały manganian(VII) potasu. Zatem należało oczyścić ten rozpuszczalnik, co zabrało badaczowi około roku. Była to benedyktyńska praca. Ostatni etap oczyszczania przebiegał na kolumnie destylacyjnej o siedemdziesięciu półkach teoretycznych. Doświadczenie pracy z rozpuszczalnikami niewodnymi było kontynuowane właściwie przez cały ponad 60-letni okres pracy Uczonego. Wkrótce potem otrzymał kolejne zadanie od prof. Jeżowskiej-Trzebiatowskiej, dotyczące oznaczenia wpływu rozpuszczalników na widma elektronowe metali, przede wszystkim związków uranu(VI).

Z tej tematyki w 1960 roku obronił pracę doktorską pt. *Widma absorpcyjne azotanu uranylu i ich struktura w rozpuszczalnikach organicznych*. W swoim doktoracie zwrócił szczególną uwagę na strukturę oscylacyjną widm elektronowych U(VI) i informacje w nich zawarte, co pozwoliło m.in. na wyznaczenie odległości międzyatomowej uran-tlen w jonie UO_2^{2+} , stałych siłowych wiązania i wartości energii dysocjacji w stanie podstawowym. Recenzentem pracy był m.in. światowej klasy fizyk z Torunia, prof. Aleksander Jabłoński (1898–1980). Praca doktorska na temat związków uranu(VI) mieściła się w nurcie badań zespołu prof. Jeżowskiej-Trzebiatowskiej, gdyż w tym okresie istniało duże zainteresowanie chemią i fizykochemią tych połączeń. Wyniki badań prezentowano na konferencji poświęconej pokojowemu wykorzystaniu energii jądrowej, która odbywała się w 1959 roku w Genewie oraz zostały opublikowane w 1962 roku w czasopiśmie *Spectrochimica Acta* [12]. Praca ta była wielokrotnie cytowana w literaturze. Doświadczenie uzyskane w badaniach związków uranu(VI) stało się podstawą do rozszerzenia tej tematyki na inne formy oksyjonów metali, np. CrO_2^{2+} .

Jeszcze przed doktoratem autor wyjechał do Szeged (Węgry) na dwumiesięczne stypendium. Po kilku latach przyjechał ponownie na Węgry, tym razem do Budapesztu i Pecs, na zaproszenie do wygłoszenia wykładów. Wtedy spotkał dr L. Langa, redaktora atlasu widm absorpcyjnych wydawanego przez Węgierską Akademię Nauk [13]. Dr Lang zaproponował dr Barteckiemu członkostwo w Komitecie redakcyjnym Atlasu. Od tego czasu regularnie w Bibliotece Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej zaczęły pojawiać się ciemnogrnatowe zeszyty atlasu widm elektronowych Langa. Był on obok atlasu Hershensona, ważnym źródłem informacji z tej dziedziny spektroskopii. Tak oto spektroskopia elektronowa związków koordynacyjnych, która w omawianym okresie przeżywała swój burzliwy rozwój, stała się głównym narzędziem badawczym Uczonego. Chemicy węgierscy pozostali szczególnie bliscy Adamowi Barteckiemu – z niektórymi korespondował do końca życia – echem tej przyjaźni był list do redaktora naczelnego *Structural Chemistry*, Istvana Hargittai, napisany przez prof. Barteckiego w roku 2010. Profesor dziękując za numer okolicznościowy czasopisma, który został wydany z okazji jego 90-tych urodzin, powoływał się na ponad półwieczną przyjaźń z chemikami węgierskimi.

Również w tym okresie Adam Barteki odbywał dwumiesięczny staż w Rzymie w grupie naukowej profesora Claudio Furlanigo, wybitnego fizykochemika przedstawiciela tzw. rzymskiej szkoły chemii koordynacyjnej. Brał udział w licznych konferencjach i sympozjach zagranicznych m.in. Sztokholmie (1962), Tihany na Węgrzech (1965) oraz St. Moritz w Szwajcarii (1966).

Po Marii Wrońskiej (1958) i Lechu Pajdowskim (1959), Adam Barteki był trzecim doktorantem pani Profesor Jeżowskiej-Trzebiatowskiej – dzięki zakrojonej na szeroką skalę jej współpracy z wieloma ośrodkami na świecie, możliwy był dostęp do najnowszych osiągnięć w dziedzinie chemii koordynacyjnej. W sytuacji, gdy ze względów politycznych trudne były kontakty uczonych Wschodu i Zachodu, pani prof. Jeżowska-Trzebiatowska organizowała międzynarodowe konferencje poświę-

cone problematyce związków kompleksowych. Na przykład, w 1962 roku Adam Bartecki był uczestnikiem a także sekretarzem konferencji: „Theory and Structure of Complex Compounds”, która odbywała się we Wrocławiu czy też konferencji organizowanej w roku 1970 w Krakowie i Zakopanem - „XIII International Conference on Coordination Chemistry” (ICCC).



Fotografia 2. Przygotowywanie kolejnej konferencji. Od lewej siedzą: L. Pajdowski, T. Mikulski, A. Bartecki, prof. Jeżowska-Trzebiatowska, J. Ziółkowski

W latach sześćdziesiątych i siedemdziesiątych ubiegłego wieku brał również czynny udział w Letnich Szkołach Chemii Koordynacyjnej w Karpaczu. Uczestnictwo w tych konferencjach było znaczące dla rozwoju kadry naukowej i integracji polskich oraz zagranicznych ośrodków akademickich. Dodatkowym efektem powyższych działań były wspomniane wcześniej staże i udział w prestiżowych konferencjach i sympozjach zagranicznych. Adam Bartecki w pełni wykorzystywał możliwości kontaktów z nauką światową poprzez udział w konferencjach, publikowaniu swoich wyników w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym a także we współpracy z wybitnymi uczonymi, na przykład V. Gutmannem z Austrii i S.P. Sinhą ze Szwajcarii [15]. Jak wspominał, szczególnie utkwiło w Jego pamięci spotkanie z Christianem C. Jörgensenem, w owym czasie największym specjalistą od spektroskopii elektronowej. ‘Guru’ chemii koordynacyjnej był także amerykański uczone Fred Basolo, z którym jak pisze, „spędzili wiele czasu dyskutując na tematy naukowe lub po prostu gawędząc” [4].

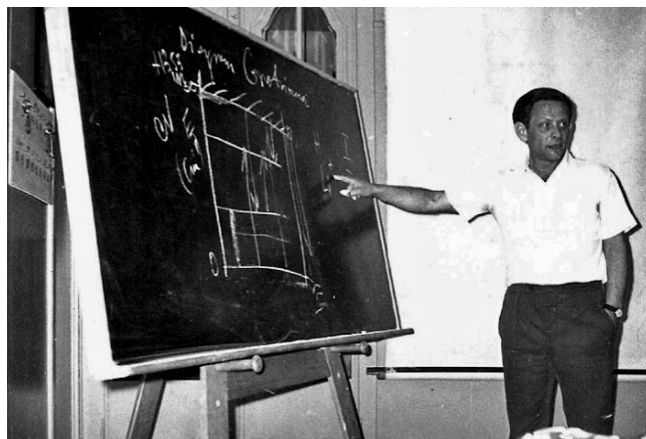
Spektroskopia elektronowa była dla niego najważniejszym instrumentem poznawczym w badaniu związków kompleksowych metali przejściowych ze szczególnym uwzględnieniem ugrupowań UO_2^{2+} , MoO_4^{4+} i CrO_2Cl_2 . Problemy spektro-

skopii elektronowej związków chromu stały się przedmiotem pracy habilitacyjnej (1965). W swoim wykładzie habilitacyjnym Adam Bartecki przedstawił aktualne w tamtym okresie teorie widm elektronowych pierwiastków przejściowych, a kilka lat później (1971) ukazała się pierwsza jego książka zatytułowana *Spektroskopia elektronowa związków nieorganicznych i kompleksowych* [16]. Wydana została przez PWN, liczyła trzysta czterdzieści stron i zawierała imponującą liczbę siedemset siedemdziesięciu pięciu pozycji literaturowych – publikacja ta posiada charakter podręcznikowy; składała się z pięciu dużych rozdziałów omawiających takie zagadnienia jak widma atomów i cząsteczek dwu- oraz wieloatomowych, a także teorie widm elektronowych. Ostatni rozdział tej książki przedstawia problemy symetrii i teorię grup.

Czas nauczycieli (określenie A.B.) był dla Adama Barteckiego bardzo owocny i w pełni przez niego wykorzystany.

Czas uczniów (1965–1990)

Habilitacja otworzyła nowy etap działalności Adama Barteckiego; zarówno naukowej, dydaktycznej jak i organizacyjnej. Był to najdłuższy (1965–1990) i najbardziej owocny okres pracy tego Uczzonego. Główny przedmiot badań, to znaczy spektroskopia elektronowa związków koordynacyjnych zyskał swoje zastosowanie w interpretacji wielu procesów hydrometalurgicznych oraz został poszerzony o zastosowanie metod numerycznych w analizie widm elektronowych.



Fotografia 3. Wykład ze spektroskopii

Te najważniejsze kierunki badań przełożyły się na tematy prac doktorskich, których był promotorem (Tabele A–C).

Profesor Adam Bartecki był promotorem osiemnastu prac doktorskich. Ośmioro jego doktorantów uzyskało stopień naukowy doktora habilitowanego (E. Ingier-Stocka, L. Rycerz, J. Myrczek, W. Apostołuk, W. Walkowiak, K. Kurzak,

A. Szejnberg, M. Cieślak-Golonka) a troje z nich zostało profesorami tytularnymi (W. Apostoluk, M. Cieślak-Golonka i W. Walkowiak). Dwoje doktorantów pracuje naukowo zagranicą: M. Sowińska (Strasburg, Francja) i J. Masełko (Anchorage, USA).

W oparciu o główne kierunki zainteresowań naukowych Adama Barteckiego tj. związki kompleksowe w badaniach podstawowych i stosowanych oraz analizę komputerową widm elektronowych, tematy proponowanych przez niego prac doktorskich w sposób bardzo ogólny można podzielić na trzy grupy. Należy podkreślić, że podział ten ma charakter umowny, o czym świadczy m.in. praca doktorska Małgorzaty Sowińskiej dotycząca spektroskopii elektronowej kompleksów Ga(III) i In(III), w której stosowano analizę matematyczną widm elektronowych tych związków (Tab. 1A, poz. 5).

W Tabeli 1A podano informacje dotyczące doktoratów wykonanych w zakresie badań podstawowych to znaczy obejmujących syntezę, właściwości fizykochemiczne, w tym spektroskopię kompleksów wybranych jonów metali przejściowych.

Tabela 1A. Autorzy oraz tytuły prac doktorskich dotyczących badań podstawowych w zakresie spektroskopii elektronowej związków kompleksowych
Table 1A. Authors and titles of the PhD theses related to basic research in electronic spectroscopy of complex compounds

| Lp. | Doktorant | Tytuł pracy | Rok obrony |
|-----|---------------------|---|------------|
| 1. | Danuta Dembicka | Struktura i własności związków kompleksowych Mo(VI). Wrocław (1971) | 1971 |
| 2. | Maria Cieślak | Badania nad związkami koordynacyjnymi W(IV) i W(VI) | 1974 |
| 3. | Jan Kamiński | Spektroskopowe badania właściwości i struktury oksykationowych związków kompleksowych wanadu(V) | 1975 |
| 4. | Teresa Tłaczała | Reakcje oscylacyjne w układzie: kwas organiczny–bromian potasu kwas siarkowy–siarczan manganu” | 1977 |
| 5. | Małgorzata Sowińska | Widma przeniesienia ładunku (CT) w związkach Ga(III) i In(III) | 1977 |

Druga grupa tematów prac doktorskich dotyczyła zastosowania komputerów w chemii. Doktoranci tej grupy w większości byli absolwentami kierunków matematycznych bądź informatycznych. Wykaz tych tematów podaje Tabela 1B. Trzecią, ostatnią grupę stanowią prace z zakresu zastosowań chemii koordynacyjnej w hydrometalurgii (Tab. 1C).

Jeszcze raz należy podkreślić, że jest to jedynie podział formalny, niechronologiczny, w którym tematyka nie była jednorodna. We wszystkich grupach podstawą były związki koordynacyjne. Świat tych związków był najczęściej widziany metodą spektroskopii elektronowej, której analiza dokonana w oparciu o programy komputerowe dostarczała wielu interesujących i ważnych informacji, również w zakresie zastosowań w hydrometalurgii. Jak widać, w jednej osobie krzyżowały się nici pro-

blemów z pozoru oddalonych od siebie, ale tak naprawdę tworzących jedną, spójną całość. Każdy z uczniów „prządł swoją nić”.

Szczególną atencją Profesor darzył swoją pierwszą asystentkę, Danutę Dembicką (1940–2009), która była twórczą realizatorką Jego naukowych zainteresowań w latach 60. i 70. Oksykationowa grupa uranylowa była tak atrakcyjnym obiektem badawczym, że Profesor poszerzył ten temat o inne formy oksyjonów. Jak się okazało, poprzez ich szczegółową analizę znaleziono indywidualne, charakterystyczne cechy danej grupy oksymetalu i skorelowano je z takimi wartościami, jak na przykład, promień jonowy [17]. Korelacja promieni oksykationów z przejściami CT O→M dokonana przez Adama Bardeckiego i Jego zespół, była obok analogicznej korelacji promieni oksyanionów opracowanej przez M.C.R. Symmons, ważnym dowodem na to, że forma $\{MO\}_n$ zachowuje swoją tożsamość w widmach różnych związków i należy ją traktować jako trwałe indywiduum chemiczne.

Dr Dembicka odznaczała się ogromną pracowitością i rzetelnością swoich badań. Po obronie doktoratu jeszcze kilka lat pracowała w Instytucie lecz ze względów rodzinnych przeniosła się do Legnicy, gdzie pracowała w laboratorium środowiskowym afiliowanym przy Urzędzie Miasta. Ostatnia wspólna ich praca dotyczyła kompleksów jonów metali o strukturze d^0 elektronowej z błękitem molibdenowym [18].

W badaniach podstawowych ważnym zagadnieniem była preparatyka związków koordynacyjnych metali, głównie przejściowych [19]. Na szczególne wyróżnienie zasługuje synteza kompleksu $[VO_2acac]$ (gdzie acac oznacza anion acetyloacetonianowy) po raz pierwszy otrzymanego przez doktoranta Jana Kamińskiego [20]. Związek ten stał się prekursorem w syntezie wielu alkoholatów V(V), które mają znaczenie katalityczne [21]. Inne spojrzenie na rolę kompleksów metali przejściowych przyniosły badania reakcji oscylacyjnych stanowiące treść pracy doktorskiej Teresy Tłaczały. Przedmiotem badań Doktorantki były reakcje oscylacyjne w układach: [kwas organiczny (malonowy, jabłkowy)–bromian(V) potasu–kwas siarkowy(VI)–siarczany(VI) manganu(II)], w których pojawia się periodycznie utleniona barwna forma katalizatora Mn^{3+} (d^4). Metodą spektroskopową wykazano, że w takich układach jony katalizatora mogą występować w formie kompleksów z kwasem organicznym. Badano warunki występowania oscylacji oraz zależności pomiędzy stężeniami początkowymi reagentów a czasem indukcji i okresem oscylacji [22].

Nagromadzony materiał doświadczalny w zakresie spektroskopii elektronowej stał się podstawą wprowadzenia metod matematycznych do analizy widm. Metody te pozwalały uzyskiwać z widm, nowe, interesujące informacje. Pierwsza praca doktorska w której wykorzystane zostały metody rozkładu widm elektronowych wykonana została przez Małgorzatę Sowińską, chociaż pewne elementy analizy krzywych spektralnych zawarte były już we wcześniejszych doktoratach prowadzonych przez Profesora. Doktorantka analizowała widma elektronowe absorpcyjne i emisyjne kompleksów Ga(III) i In(III) z bipyrydylem i fenantroliną [23].

Nowy kierunek badawczy związany z zastosowaniem komputerów do analizy widm elektronowych został zainicjowany i rozwijany przez Profesora w latach 70. i 80. XX w. Jego realizacja miała swoje odbicie podczas kierowaniu pięcioma pracami doktorskimi (Tab. 1B). Do tego celu Profesor stworzył zespół, który realizował obszerny, przemyślany i spójny program badań. Powstała interdyscyplinarna grupa, w skład której wchodziła: chemicy, w większość składający się z pracowników Zakładu; matematycy, Z. Staszak i J. Myrczek; fizycy, L. Stelmaszek, J. Sołtowski oraz informatyk K. Waško. Zespół ten rozpoczął w Polsce rozwijać problematykę zaawansowanego interpretowania widm elektronowych kompleksów metali przejściowych. Badania te stanowiły nie tylko poznawczy lecz również rozwijały metodologię badawczą w tym zakresie.

Tabela 1B. Autorzy oraz wykaz prac doktorskich realizowanych w zakresie zastosowań komputerów w spektroskopii elektronowej

Table 1B. The authors and the list of PhD theses realized in the frame of computer applications in the electronic spectroscopy

| Lp. | Doktorant | Temat | Rok |
|-----|----------------------|---|------|
| 1. | Aleksander Szejnberg | Określenie parametrów widm absorpcyjnych kompleksów oktaedrycznych pierwiastków d-elektronowych | 1977 |
| 2. | Krzysztof Kurzak | Interpretacja elektronowych widm absorpcyjnych tetragonalnych kompleksów metali przejściowych (d^2 , d^3 , d^7 , d^8) z zastosowaniem rozkładu złożonych krzywych | 1983 |
| 3. | Józef Myrczek | Komputerowa analiza elektronowych widm absorpcyjnych związków kompleksowych z uwzględnieniem przejść d-d i struktury wibronowej | 1984 |
| 4. | Zbigniew Staszak | Analiza komputerowa i interpretacja elektronowych widm absorpcyjnych mieszanin kompleksów następczych | 1985 |
| 5. | Krzysztof Waško | Organizacja systemu bazy danych spektralnych: ESTE-DBS | 1986 |

Oprócz wyżej wymienionych doktoratów (Tab. 1B), efektem zainteresowania Profesora Barteckiego, dotyczącego matematycznego podejścia do zagadnień spektroskopowych była monografia oraz pięć konferencji (w tym jedna międzynarodowa) poświęconych zastosowaniu komputerów w chemii (rok 1987). Pierwsza konferencja na ten temat „Mini- i mikrokomputery w chemii” odbyła się w 1986 roku we Wrocławiu. Konferencje te miały na celu zarówno zapoznanie uczestników z tą niezwykle szybko rozwijającą się dziedziną wiedzy ale też integracją różnych środowisk uniwersyteckich i przemysłowych zainteresowanych zastosowaniem informatyki w chemii.

Badania nad szerokim zastosowaniem metod komputerowych w zakładzie prof. Barteckiego zostały zapoczątkowane współpracą z Aleksandrem Szejnbergiem i Krzysztofem Kurzakiem. Głównym celem tych rozpraw była próba opisu struktury geometrycznej i elektronowej związków kompleksowych o symetrii oktaedrycznej [24] (A. Szejnberg) oraz tetragonalnej [25] (K. Kurzak). Dokonano tego na podstawie pogłębionej analizy widm elektronowych kompleksów jonów metali przejści-

ciowych. W opracowaniu metody ogólnej zarówno rozkładu pasm jak i obliczeń parametrów pola krystalicznego można wyróżnić dwa etapy:

1. Numeryczny rozkład widm elektronowych na krzywe Gaussa.
2. Obliczenia parametrów pola krystalicznego i oddziaływań międzyelektronowych w kompleksach.

W pracy doktorskiej Józefa Myrczka (Tab. 1B, poz. 3) rozszerzono analizę widm elektronowych o widma wibronowe (elektronowo-oscyłacyjne). Badania te były ważne gdyż Adam Bartecki w swoich wcześniejszych pracach wykazał wpływ rozpuszczalnika na stopień wykształcenia struktury oscylacyjnej drgania ν (U-O) sprzężonego z przejściem elektronowym CT (O \rightarrow U). W pracy doktorskiej J. Myrczek zastosował zmodyfikowaną metodę komputerowego rozkładu widm elektronowych w taki sposób, aby możliwe było uwzględnienie struktury oscylacyjnej (z zastosowaniem parametryzacji pasm składowych progresji). Przedmiotem badań były zarówno oksyjony uranu(VI), jak i związki Cr(IV), a także w okresie późniejszym Cr(VI) [26].

Praca doktorska Zbigniewa Staszaka dotyczyła analizy widm roztworów kompleksów następczych Ni(II) z etylenodiaminą. Zaproponowano w niej odpowiedni algorytm, który w pierwszym etapie wyznaczał liczbę składników mieszaniny kompleksów a w kolejnym etapie ich charakterystyki spektralne (widma). W ramach analizowanych układów udało się otrzymać i zanalizować widma wszystkich kompleksów następczych [27].

Krzysztof Waśko, pracownik Instytutu Organizacji i Zarządzania Politechniki Wrocławskiej, w swojej pracy doktorskiej skonstruował bazę danych widm elektronowych związków kompleksowych. Baza EST-DBS (ang. *Electronic Spectra of Transition Elements – Data Base System*) zawierała charakterystykę widm np. kontury pasm oraz ich przypisanie odpowiednim przejściom elektronowym. Opis widma obejmował nazwę badanego związku, jego strukturę (symetrię), parametry pola krystalicznego, zakres pomiarowy, położenie i intensywność pasm oraz rodzaj stosowanego rozpuszczalnika [28]. Tak szczegółowy opis widma pozwalał nie tylko na gromadzenie danych, ale ich interpretację.

Efektorem intensywnych badań przedstawionego zespołu była monografia pt. *Widma elektronowe związków kompleksowych. Metody analizy przetwarzania i gromadzenia danych przy użyciu mikrokomputera (1987)* [29] autorstwa grupy zajmującej się zastosowaniem komputerów w chemii.

Trzecią grupę problemów rozwijanych pod kierunkiem Adama Barteckiego były badania w zakresie chemii stosowanej. Na Wydziale Chemicznym zainicjował je profesor Włodzimierz Trzebiatowski (1906–1982) i realizował przy współudziale swoich wychowanków: Aleksandra Bogacza, Jana Niemca, Franciszka Łętowskiego, Władysławy Mulak i Witolda Charewicza. Sprzyjającą okolicznością rozwoju metalurgii chemicznej i hydrometalurgii była eksploatacja pobliskich złóż miedzi w rejonie Głogowa i Lubinia. W efekcie nawiązała się współpraca pomiędzy Kombinatem Górniczo-Hutniczym Miedzi w Lubinie, Instytutem „Cuprum” we Wrocławiu,

Instytutem Metali Nieżelaznych w Gliwicach a Politechniką Wrocławską. Przeróbka rud miedzi dostarczała wielu tematów do opracowania, a w szczególności dotyczyła możliwości zastosowania metod „nieogniowych” w uzyskiwaniu miedzi oraz innych cennych metali jej towarzyszących (np. Ag) zawartych w rudach i odpadach poflotacyjnych. Równie ważnym źródłem tych pierwiastków były szlamy anodowe powstałe w procesie elektrorafinacji miedzi. Wydział Chemiczny Politechniki stał się znaczącym ośrodkiem naukowym i dydaktycznym metalurgii miedzi oraz pierwiastków jej towarzyszących w złożach. Wiedza Adama Barteckiego w zakresie chemii koordynacyjnej, którą posiadał i rozwijał początkowo w ramach współpracy z profesorem Jeżowską-Trzebiatowską a następnie wspólnie ze swoimi doktorantami, pozwoliły zrozumieć i zinterpretować procesy technologiczne zachodzące podczas przeróbki rud miedzi. Szczególnie współpraca Profesora Barteckiego z Władysławą Mulak pozwoliła na wyjaśnienie metodami spektroskopowymi wielu procesów towarzyszących ługowaniu miedzi i innych metali z ich siarczków [30]. Wykaz prac doktorskich prowadzonych w tym zakresie podano w Tabeli 1C. W każdym z realizowanych doktoratów ważna była znajomość procesów kompleksowania, w szczególności w ekstrakcji i flotacji, a także w wyjaśnieniu kinetyki i mechanizmów roztwarzania minerałów będących naturalnymi składnikami rud metali.

Władysław Walkowiak, który w swojej pracy zajął się badaniem flotacji jonów wybranych pierwiastków grup 8–10 (dawna VIII podgrupa) [31], wykazał, że o flotowalności jonów metalu decyduje głównie powstawanie w roztworze wodnym tzw. sublatu, czyli nierozpuszczalnego połączenia: jon metalu-kolektor flotacji. Dzięki zastosowaniu unikalnej metody wskaźników promieniotwórczych ustalono kinetykę i mechanizm flotacji jonów metali. Badania spektroskopowe – widma elektronowe i oscylacyjne sublatów jonów Pt(IV) oraz Co(III) – pozwoliły określić charakter wiązań w tych kompleksach.

Do ważnych badań podstawowych w zakresie hydrometalurgii należy zaliczyć wyniki zawarte w pracach doktorskich Jerzego Masełki i Barbary Kozłowskiej-Kołodziej.

W celu rozdzielania jonów metali obecnych w niskim stężeniu w rudach i odpadach flotacyjnych Jerzy Masełko stosował metody wymiany jonowej. Wzorował się przy tym na metodach używanych do rozdzielania związków kompleksowych. Efektem tych badań było opracowanie tak zwanych portretów fazowych w kinetyce wymiany izotopowej [32].

Barbara Kozłowska-Kołodziej pracowała nad możliwością roztwarzania Ag_2O w obecności amoniaku i soli amonowych a także rozpuszczalników organicznych w warunkach podwyższonej temperatury [33]. Doktorantka wyznaczyła ilościową charakterystykę procesu kompleksowania zachodzącego w układzie $\{Ag(I)-H_2O-NH_3\}$ – powstał model odzysku srebra, które występowało w postaci tlenku srebra w szlamach anodowych po elektrorafinacji miedzi.

Tematyka pracy doktorskiej Romany Wojciechowskiej dotyczyła problemów geochemicznych również związanych z rudami Legnicko-Głogowskiego Okręgu

Miedziowego (LGOM). Oparta była na badaniach termochemicznych (analiza TG/DTG/DTA) próbek rud, na podstawie których wyznaczono kinetykę ich rozkładu.

Kinetyce ługowania siarczków metali poświęcone były prace doktorskie Lucjusza Dudy i Leszka Rycerza. Lucjusz Duda zajmował się badaniem mechanizmu roztwarzania siarczków miedzi w układzie: Cu_2S -związek organiczny, gdzie związek organiczny oznacza używany rozpuszczalnik np. EDTA. Kinetyka tego heterogenicznego procesu zależy od ciśnienia parcjalnego tlenu i od pH roztworu. Zaproponowano dwa etapy roztwarzania Cu_2S w środowisku obojętnym i kwaśnym: w pierwszym jako produkt przejściowy tworzy się CuS , w drugim zaś powstaje kompleks miedzi z EDTA i elementarna siarka. W środowisku alkalicznym zamiast siarki powstaje SO_4^{2-} . Z porównania energii aktywacji tych procesów wynika, że pierwszy etap ma charakter dyfuzyjny a drugi przebiega w obszarze kinetycznym [34].

Praca doktorska Leszka Rycerza mieściła się w temacie ogólnym dotyczącym oceny technologicznej przydatności krajowych rud zawierających molibden. Doktorant zajmował się badaniem kinetyki i mechanizmem roztwarzania syntetycznego MoS_2 w roztworach zawierających bromiany. Mechanizm ten okazał się wieloetapowy, a jego produktami pośrednimi były jony Mo(V) i Mo(VI) przy czym ten ostatni występował w formie oksykationu MoO_2^{2+} i oksyanionu MoO_4^{2-} [35].

Badania nad rolą rozpuszczalników niewodnych w procesie kompleksowania jonów metali, interesowały Adama Barteckiego od początku jego pracy naukowej w zespole Profesor Bogusławy Jeżowskiej-Trzebiatowskiej. Badania te nie tylko miały charakter podstawowy (obszerna praca doktorska Adama Barteckiego), ale także technologiczny, w szczególności w poszukiwaniach metod otrzymywania cennych metali. Dla przykładu, jako rozpuszczalnik o znaczeniu strategicznym, w technologii przeróbki rud uranu, stosowany był fosforan trójbutylowy (TBP). Adam Bartek wraz z Stanisławem Kopaczem pracowali nad mechanizmami ekstrakcji różnych metali przy użyciu TBP w układzie ciecz–ciecz [36].

Badaniem wpływu rozpuszczalników amidowych na widma elektronowe w układach: chlorek kobaltu(II)-formamid, dimetyloformamid- H_2O ; zajmowała się w latach sześćdziesiątych Felicja Golińska, stażystka z Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Badała widma elektronowe bezwodnego i uwodnionego chlorku kobaltu(II) w rozpuszczalnikach amidowych [37].

Tematyką związaną z rozpuszczalnikami niewodnymi zajmował się Wiesław Apostoluk, kolejny doktorant profesora Adama Barteckiego (Tab. 1C). Badał on ekstrakcję jonów Cu(II) i Fe(III) z roztworów zawierających kwas kaprynowy (dekanowy), związek organiczny z grupy kwasów karboksylowych zawierający łańcuch alkilowy ($\text{C}_9\text{H}_{19}\text{COOH}$). Na uwagę zasługuje wykazanie metodami spektroskopową i przewodnictwa elektrycznego obecności w fazie organicznej formy kompleksowej Fe(III) zawierającej rdzeń Fe_3O . Do interpretacji mechanizmów ekstrakcji zastosowano metodę analizy regresyjnej, która pozwoliła uzyskać pogłębiony obraz równowag ekstrakcyjnych w tych układach [38]. Ekstrakcja przy użyciu kwasów karboksylowych była twórczo kontynuowana także po doktoracie.

W tematyce rozpuszczalników organicznych bardzo owocną była współpraca oraz częste kontakty z profesorem Wiktoorem Gutmannem z Wiednia. Był to wybitny chemik austriacki, autor poczytnych monografii, który m.in. zaproponował w latach 70. XX wieku donorowo-akceptorową teorię rozpuszczalników [39].

Kolejna praca doktorska poświęcona była kinetyce i mechanizmom roztwarzania metali w rozpuszczalnikach organicznych i wodno-organicznych. Ewa Ingier-Stocka w swojej pracy badała rozpuszczalność siarczanu kobaltu(II) w takich rozpuszczalnikach jak formamid, DMF i glikol etylenowy oraz wyznaczyła ilościową kinetyczną charakterystykę tych procesów (stałe szybkości reakcji, rzędy reakcji oraz energie aktywacji). Identyfikację produktów w fazie stałej i ciekłej przeprowadziła metodami spektroskopową i konduktometryczną. W oparciu o wyznaczone parametry kinetyczne procesu rozpuszczania CoSO_4 określiła mechanizm tych reakcji. Zbadano także wpływ zawartości wody w polarnych rozpuszczalnikach na mechanizm rozpuszczania CoSO_4 [40].

Wyniesione doświadczenia związane z przygotowywaniem swoich prac doktorskich stały się podstawą dalszego rozwoju naukowego doktorantów Profesora Barteckiego.

Tabela 1C. Autorzy oraz tytuły prac doktorskich dotyczących badań podstawowych w zakresie zastosowań badań podstawowych w hydrometalurgii
Table 1C. Authors and titles of the PhD theses related to application of fundamental research to hydrometallurgy

| Lp. | Doktorant | Tytuł pracy | Rok obrony |
|-----|-----------------------------|--|------------|
| 1. | Władysław Walkowiak | Flotacja jonów niektórych pierwiastków VIII podgrupy | 1973 |
| 2. | Barbara Kozłowska-Kolodziej | Równowagi chemiczne i elektrochemiczne w układzie $\text{Ag-H}_2\text{O-NH}_3$ w temperaturach podwyższonych | 1974 |
| 3. | Jerzy Masełko | Model kinetyki wymiany jonowej związków kompleksowych | 1974 |
| 4. | Romana Wojciechowska | Fizykochemiczne badania występowania węgla w złożach miedzi Dolnego Śląska | 1975 |
| 5. | Wiesław Apostoluk | Ekstrakcja niektórych metali 3d elektronowych kwasami karboksylowymi | 1977 |
| 6. | Ewa Ingier-Stocka | Kinetyka i mechanizm rozpuszczania siarczanu kobaltu(II) w polarnych rozpuszczalnikach organicznych | 1977 |
| 7. | Lucjusz Duda | Mechanizm rozpuszczania siarczków miedzi w układzie: siarczek miedzi-ligand organiczny-rozpuszczalnik | 1978 |
| 8. | Leszek Rycerz | Kinetyka i mechanizm roztwarzania syntetycznego dwusiarczku molibdenu w roztworach bromianowych | 1985 |

Opiece Adama Barteckiego nad swoimi doktorantami nieodłącznie towarzyszyła praca związana z bieżącym przygotowywaniem seminariów, konferencji i wykładów. Rezultatem dwudziestoletniego okresu prowadzenia wykładu na temat chemii pierwiastków przejściowych było napisanie przez Profesora książki o tym

samym tytule (*Chemia pierwiastków przejściowych*), której pierwsze wydanie ukazało się w 1987 roku, a następne w 1996 [36]. Książka ta, a właściwie doskonały podręcznik akademicki natychmiast zdobył popularność wśród polskich studentów i pracowników specjalizujących się w dziedzinie chemii metali przejściowych. Plany dotyczące trzeciego wydania, Profesor konsultował z najbliższymi współpracownikami, niestety nie zdążył ich zrealizować.

Ostatnie dwudziestolecie (1990–2010). Badania nad barwą.

Był to okres w działalności Profesora, nie mający nic wspólnego z tradycyjnym myśleniem o emeryturze. Od połowy lat osiemdziesiątych, czyli pod koniec kariery zawodowej Profesor zajął się problemem barwy związków chemicznych. Jak się okazało, była to Jego wielka i ostatnia w życiu pasja naukowa. Inspiracją dla podjęcia badań nad tym problemem było obserwowane wielokrotnie oraz znane z literatury zjawisko solwatochromizmu [3, 42] a także szerokie zastosowanie związków barwnych w analizie chemicznej. Wraz z T. Tłaczałą, J. Myrczkiem i K. Kurzakiem [43, 50] rozpoczął badania nad zależnością ilościową zjawiska barwy od charakterystyki spektralnej danego związku oraz parametru rozszczepienia pola krystalicznego. W roku 1989 na konferencji w Jerozolimie wygłosił referat pt. *An Approach to Quantitative Estimation of Solvatochromism*. W referacie tym zaproponował trzy wielkości ważne w nauce o barwie: a) energia i intensywność pasm odpowiadających przejściom elektronowym w widmie, b) parametry pola ligandów oraz c) parametry chromatyczności w różnych rozpuszczalnikach. Publikacje poświęcone barwie zostały napisane już po przejściu Profesora na emeryturę – w tym też okresie, również organizował konferencje na temat barwy. W roku 1993 ukazała się Jego pierwsza książka z tej dziedziny pt *Barwa związków metali* [44]. Według autora, na szczególną uwagę zasługuje rozdział omawiający barwę i kolorymetrię trójkromatyczną związków metali *d*-elektronowych. W książce opisano zarówno problemy pierwiastków *d*- jak i *f*-elektronowych (lanthanowców). Dużo miejsca poświęcono zastosowaniu i znaczeniu barwy w analizie chemicznej a także szczegółowo przedstawiono problemy barwy w obiektach makroskopowych, takich jak: minerały, pigmenty, kamienie szlachetne oraz szkła zawierające metale przejściowe. Ostatni rozdział książki dotyczył barwy i jej znaczenia w nauczaniu chemii.

Powyzsza monografia stała się podstawą do opracowania wraz z wybitnym chemikiem brytyjskim Johnem Burgessem poszerzonej wersji anglojęzycznej zatytułowanej *The colour of metal compounds*, która ukazała się w roku 2000 nakładem wydawnictwa Gordon & Breach Science Publishers [45].

W drugim wydaniu tej książki, które ma się ukazać w roku 2012 współautorem jest profesor Krzysztof Kurzak z Uniwersytetu Opolskiego. W omawianej edycji zostaną dołączone wyniki badań nad barwą oparte przede wszystkim na dwóch dużych pracach przeglądowych autorstwa Profesora i Krzysztofa Kurzaka opublikowanych w czasopiśmie *Reviews in Inorganic Chemistry* [46]. Dodatkowo, zain-

teresowania Profesora nanomateriałami, a w szczególności ich barwą, spowodowały że temu problemowi poświęcił jeden z rozdziałów kolejnego wydania książki – w pierwszej edycji nie było na ten temat nawet wzmianki – te nowe informacje sprawiły, że Wydawnictwo szybko zdecydowało się na wznowienie książki.

Profesor Barteccki zmarł nagle 30 sierpnia 2010 roku. Kilka dni przed śmiercią przesłał Johnowi Burgessowi finalną wersję książki [49].

Mistrz, Nauczyciel, Człowiek

Cechą charakterystyczną metodyki naukowej Profesora był częsty powrót do wyników wcześniejszych badań i twórcze ich pogłębianie poprzez stosowanie nowych metod. Tak było w przypadku badań nad związkami chromu, strukturą oscylacyjną widm elektronowych czy badaniem roli rozpuszczalników niewodnych. Inną cechą było ściśle połączenie eksperymentu z teorią przy czym pierwszeństwo dawał eksperymentowi. Profesor był autorem ponad trzystu publikacji.

Nie był On łatwym szefem. Wymagał pracy właściwie bez ograniczeń czasowych. Cotygodniowe rozmowy indywidualne, co dwa tygodnie sprawozdania pisemne i regularne seminaria nauczyły nas jednak systematyczności wg zasady Michała Anioła: „codziennie jedna kreska”. Często po takiej spowiedzi delikwent wychodził z gabinetu Profesora z przyspieszonym tętnem i zaciśniętymi pięściami. Znow ktoś otrzymał zadanie ponad siły. Wielu odeszło. Trzeba jednak przyznać, że na ogół doskonale wyczuwał stan ducha penitenta w danym momencie i dostosowywał do tego swoje wymagania.

Gdy działo się coś interesującego na stole laboratoryjnym, potrafił pytać nawet trzy razy na godzinę: *No i co? Wytrąciło się? A gdyby tak? A może tą metodą.* Czasem było to denerwujące, bo reakcje zachodziły wolniej niż chciałyby tego ciekawość Profesora. W ten sposób zaszczepił w nas niespokojnego ducha.

Do ostatnich swoich dni nie opuszczała Go pasja naukowa. Przynosił swoim uczniom wydruki z komputera dotyczące najnowszych prac z dziedziny nanochemii i gorąco zachęcał do prowadzenia badań w tym kierunku.

Kiedyś przyniósł artykuł dotyczący nowej koncepcji układu okresowego opartej na paradygmacie nanonauki, dotyczącym właściwości materii jako funkcji wielkości badanych obiektów. W tym konkretnym przypadku była to możliwość przedstawienia właściwości jednego pierwiastka za pomocą klastra innych pierwiastków – zdarzenie to stało się przedmiotem długiej dyskusji w zespole.

Rozmowy z Profesorem były zawsze bardzo inspirujące. Zarówno, gdy omawiany był jakiś poważny naukowy problem, jak i te z gatunku „lekkich”. Nie było jednak tematów banalnych. Szczególnie w ostatnim dwudziestolecu Jego życia, gdy zwolnił tempo pracy i złagodniał widać było, jak piękna może być starość człowieka, któremu zdrowie i siły pozwalały na dzielenie się mądrością i uśmiechem z innymi.

Osiągnięcia naukowe Profesora zostały docenione przez władze Wydziału i Uczelni. Uhonorowano go kilkoma odznaczeniami i nagrodami m.in. Krzyżem Kawalerskim Orderu Odrodzenia Polski, Złotym Krzyżem Zasługi, Złotą Odznaką

Politechniki Wrocławskiej, Medalem z Okazji Pierwszego Wykładu na Politechnice Wrocławskiej.

W uznaniu zasług dla Adama Barteckiego, władze Uczelni oraz macierzystego Instytutu/później Wydziału, uroczystie obchodziły zarówno przejście na emeryturę (Fot. 4), jak i jego znaczące rocznice urodzin (Fot. 6). [47, 48].



Fotografia 4. Profesor Jezowska-Trzebiatowska z uczniami (1990). Od lewej: Adam Barteccki, Bogusław Kędzia i Walter Wojciechowski

Jak wspomniano wcześniej, w związku z 90-tą rocznicą ukazał się specjalny numer czasopisma *Structural Chemistry* (Springer), złożony z dwudziestu jeden oryginalnych prac polskich i zagranicznych autorów, dedykowanych Jego osobie [14].

Profesor miał w sobie pewną szarmanckość i delikatność, co często podkreślały kobiety. Być może były to cechy kresowe. Jak wspominała prof. Zofia Gregorczyk „Nigdy mnie nie spotkała z Jego strony jakaś zniewaga”. Być może dlatego w Jego otoczeniu wiele było kobiet. Do wiernych i oddanych pracowników należy zaliczyć m.in. inż. Marię Zieniewicz-Raczko (Fot. 5), która z wielką starannością wykonywała pomiary elektronowych widm absorpcyjnych a także uczestniczyła w niektórych programach badawczych.



Fotografia 5. Z inż. Marią Zieniewicz-Raczko przy spektrofotometrze (lata 60. XX w.)

Do końca życia Profesor aktywnie uczestniczył w życiu społeczności naukowej poprzez udział w seminariach i uroczystych wydarzeniach Uczelni.

Zainteresowania Profesora nie ograniczały się wyłącznie do zagadnień badawczych. Do ostatnich chwil swojego życia nieobce były Mu sprawy związane z życiem społecznym i politycznym, które śledził w prasie, radiu, telewizji a także w internecie, a które chętnie komentował na spotkaniach towarzyskich.

Obok nauki największą pasją Profesora była muzyka. Był wielkim wielbicielem muzyki klasycznej, w szczególności takich kompozytorów jak Mozart i Beethoven. Najchętniej słuchał koncertów skrzypcowych tych mistrzów. Często można było Go spotkać na koncertach w Filharmonii Wrocławskiej, gdzie miał stałe miejsce.



Fotografia 6. Vivat Maestro! Profesor ze swoimi doktorantami na uroczystości Jubileuszu 85-lecia Jego urodzin (2005). Od lewej stoją: Leszek Rycerz, Grażyna Tłaczała, Profesor Adam Bartecki, Ewa Ingier-Stocka, Maria Cieślak-Golonka, Zbigniew Staszak i Wiesław Apostoluk. Drugi rząd od lewej: Józef Myrczek, Krzysztof Kurzak, Aleksander Szejnberg, Władysław Walkowiak, Jan Kamiński, Krzysztof Waško

Uroczystość 90-lecia jego urodzin, otworzył fragment ulubionej przez Profesora symfonii Nr 40 g-mol W.A. Mozarta. Na tej uroczystości Profesor wygłosił swój ostatni wykład pt. *O meandrach rozwoju wiedzy o barwie*. Szczególnym prezentem urodzinowym był utwór muzyczny dedykowany Profesorowi napisany przez chemika i muzyka prof. Piotra Drożdżewskiego. Jego tytuł brzmiał *Cztery barwne wariacje na temat stałej Plancka*. Uroczystość ta, która miała miejsce 27 marca 2010 roku w Starej Sali Senatu Politechniki Wrocławskiej, w sposób symboliczny wyraziła najważniejsze pasje życiowe Jubilata [47, 48].

Jak napisał we wspomnieniu John Burgess, współautor książki o barwie (...) *Profesor Bartecki należał niewątpliwie do ludzi szczęśliwych gdyż udało mu się zrealizować dziewięćdziesiąt dziewięć procent zamierzeń. Być może ten jeden procent stanowiłoby ujrzenie drugiego, poszerzonego i uzupełnionego wydania książki „The Colour of Metal Compounds”* [49].

Należy żywić nadzieję, że Jego wychowankowie, ich uczniowie i kolejne pokolenia w swoich poszukiwaniach prawdy, będą kontynuowały idee i pasje Mistrza.

PODZIĘKOWANIA

Autorzy składają serdeczne podziękowania Dzieciom Profesora za udostępnienie zarówno fragmentów autobiografii jak i owocną współpracę w trakcie pisania tej pracy. Również Doktoranci Profesora pomogli nam bardzo poprzez dostarczenie materiałów dotyczących swoich prac doktorskich, za co jesteśmy im bardzo wdzięczni. Dziękujemy również pani prof. Marii Kopacz, długoletniej pracownicy Instytutu Chemii Nieorganicznej i Metalurgii Pierwiastków Rzadkich PWr i współpracownicy prof. A. Barteckiego, która również podzieliła się z nami wspomnieniem o Profesorze. Szczególne podziękowania składamy pani doc. Teresie Tłaczale, która uważnie przeczytała pracę i wprowadziła cenne uwagi.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] A. Bartecki, *Pryzmat*, 2005, **195**; http://pryzmat.pwr.wroc.pl/Pryzmat_195.
- [2] M. Pawłowiczowa, *Księga pamiątkowa I Gimnazjum Państwowego im. M. Romanowskiego w Stanisławowie*, <http://stanislawow.net>.
- [3] K. Kabzińska, R. Mierzecki „Chemicy polscy w latach II-iej wojny światowej”, Wydawnictwo PTChem, Warszawa, 2011.
- [3] A. Bartecki, *Chemia Koordynacyjna w Polsce*, J.J. Ziółkowski (red.). Biblioteka Wiadomości Chemicznych, Wrocław 2008, 445.
- [4] A. Bartecki, fragmenty Autobiografii, materiał niepublikowany.
- [5] B. Karabon, *Z Wilna do Wrocławia* OW PWr, Wrocław 2009.
- [6] I. Gaweł, J. Trawczyński, *XXX lat Instytutu Chemii i Technologii Nafty i Węgla. Księga Jubileuszowa*. OW PWr, Wrocław 1999.
- [7] J.Cz. Dobrowolski, *Orbital*, 2011, **3**, 169.
- [8] A. Bartecki, *Zeszyty Naukowe Politechniki Wrocławskiej. Chemia*, 1961, **1–3**, 87.
- [9] A. Bartecki, *Materiały Konferencyjne*, Wrocław, 1952, 101.
- [10] A. Bartecki, *Zesz. Nauk. Pol. Wrocł.*, 1954, **1**, 73.
- [11] B. Karabon, A. Bartecki, *Wiad. Chem.*, 1955, **9**, 65.
- [12] B. Jeżowska-Trzebiatowska, A. Bartecki, *Spectrochim. Acta*, 1962, **18**, 799.
- [13] L. Lang (red.), *Absorption Spectra in the Visible and UV Region*, Vol. 1–10, Budapest 1959–1975.
- [14] I. Hargittai, *Struc. Chem.*, 2011, **21(2)**, wydanie specjalne.
- [15] S.P. Sinha, A. Bartecki, *Inorg. Chim. Acta*, 1978, **31**, 77.

- [16] A. Bartecki *Spektroskopia elektronowa związków nieorganicznych i kompleksowych*, PWN, Warszawa 1971.
- [17] A. Bartecki, Section Lectures of the XIII ICCO, Kraków-Zakopane, Wyd. Wrocław 1974.
- [18] D. Dembicka, A. Bartecki, *Pol. J. Chem.*, 1978, **52**, 457.
- [19] A. Bartecki, M. Cieślak-Golonka, *Rocz. Chem.*, 1975, **49**, 1219.
- [20] A. Bartecki, J. Kamiński, *Rocz. Chem.*, 1973, **47**, 217.
- [21] F. Jiang, O.P. Anderson, S.M. Miller, J. Chen, M. Mahroof-Tahir, D.C. Crans, *Inorg. Chem.*, 1998, **37**, 5439.
- [22] T. Tłaczała, A. Bartecki, *Z. Phys. Chem.*, 1983, **274**, 507.
- [23] A. Bartecki, M. Sowińska, *Pol. J. Chem.*, 1980, **54**, 2103.
- [24] A. Bartecki, A. Szejnberg, *Bull. Acad. Pol. Sci.*, 1979, **27**, 281.
- [25] A. Bartecki, K. Kurzak, *Bull. Acad. Pol. Sci.*, 1979, **27**, 973.
- [26] A. Bartecki, J. Myrczek, *Mat. Science (New York)*, 1983, **9**, 81.
- [27] A. Bartecki, Z. Staszak, *Comp. Enh. Spectry*, 1984, **2**, 129.
- [28] A. Bartecki, K. Waśko, *J. Mol. Struct.*, 1986, **141**, 293.
- [29] A. Bartecki, J. Myrczek, Z. Staszak, K. Waśko, M. Sowińska, K. Kurzak, *Widma Elektronowe związków analizy: metody analizy, przetwarzania i gromadzenia przy użyciu mikrokomputera*, WNT, Warszawa 1987.
- [30] W. Mulak, A. Bartecki, *Fizykochem. Prob. Mineral.*, 1989, **21**, 97.
- [31] W. Walkowiak, A. Bartecki, *Nukleonika*, 1973, **18**, 209.
- [32] J. Maselko, A. Bartecki, *Rocz. Chem.*, 1972, **46**, 1109.
- [33] B. Kozłowska-Kołodziej, A. Bartecki, *Pol. J. Chem.*, 1978, **52**, 1847.
- [34] A. Bartecki, L. Duda, *Mat. Sci. (New York)*, 1979, **5**, 165.
- [35] A. Bartecki, L. Rycerz, *Hydrometallurgy*, 1988, **20**, 249.
- [36] B. Jeżowska-Trzebiatowska, A. Bartecki, S. Kopacz, *Zh. Nieorg. Kchim.*, 1968, **13**, 864.
- [37] A. Bartecki, F. Golińska, *Rocz. Chem.*, 1968, **42**, 575.
- [38] W. Apostoluk, A. Bartecki, *Mat. Sci (New York)*, 1980, **6**, 113.
- [39] V. Gutmann, *Coordination Chemistry in Non-aqueous solutions*, Springer 1968.
- [40] E. Ingier-Stocka, A. Bartecki, *Pol. J. Chem.*, 1982, **56**, 903.
- [41] A. Bartecki, *Chemia Pierwiastków Przejściowych*, OW PWR, I-wydanie 1987, II wydanie 1996.
- [42] M. Cieślak-Golonka, J. Starosta, M. Wasielewski, *Wstęp do chemii koordynacyjnej*, PWN, Warszawa 2010.
- [43] T. Tłaczała, A. Bartecki, *Dyes and Pigments*, 1995, **28**, 47.
- [44] A. Bartecki, *Barwa związków metali*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 1983.
- [45] A. Bartecki, J. Burgess, *The colour of metal compounds*, Gordon & Breach Science Pub, Australia, Canada 2000.
- [46] A. Bartecki, K. Kurzak, *Rev. Inorg. Chem. (London)*, 2006, **26**, 389; *ibid.* 2007, **27**, 319.
- [47] J. Starosta, *Pryzmat*, 2010, **238**, 16.
- [48] J. Starosta, *Orbital*, 2010, **6**, 277.
- [49] J. Burgess, doniesienie prywatne.
- [50] A. Bartecki, *Rev. Inorg. Chem.*, 1992, **12**, 35.

ZASTOSOWANIA ENZYMÓW Z TKANEK ZWIERZĘCYCH W SYNTEZIE ORGANICZNEJ I BIOKATALIZIE. CZĘŚĆ I. HYDROLAZY

APPLICATIONS OF HYDROLASES FROM ANIMAL TISSUES IN ORGANIC SYNTHESIS

Hanna Hibner¹, Ryszard Ostaszewski^{*2}

¹ *Wydział Chemiczny Politechniki Warszawskiej
ul. Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa*

² *Instytut Chemii Organicznej Polskiej Akademii Nauk
ul. Kasprzaka 44/52, 01-224 Warszawa
e-mail: rysza@icho.edu.pl*

Abstract

Wstęp

- 1.1. Enzymy; 1.2. Ogólna metoda izolacji enzymów z tkanek zwierzęcych
2. Wybrane zastosowania hydrolaz; 2.1. Lipazy; 2.1.1. Zastosowania PPL w biokatalizie; 2.1.2. Inne lipazy; 2.2. Esterazy; 2.2.1. Zastosowanie esteraz zwierzęcych jako katalizatorów reakcji chemicznych; 2.3. *L*-aminoacylaza z nerek ssaków; 2.4. Imidazy; 2.5. Pepsyna; 2.6. Trypsyna; 2.7. Hydrolazy aldoheksoz; 2.7.1. β -Glukuronidaza; 2.7.2. α -*L*-Fukozydaza; 2.7.3. β -Galaktozydaza; 2.7.4. α -Glukozydaza; 2.8. Pirofosfatazy nukleotydów (NPP)

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane



Hanna Hibner w 2011 r. ukończyła studia inżynierskie, Biotechnologię na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej. Obecnie kontynuuje naukę na studiach magisterskich na tym samym kierunku. Od 2010 r. bierze udział w projekcie Innowacyjna Gospodarka „Biotransformacje użyteczne w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym” realizowanym w Instytucie Chemii Organicznej PAN w Warszawie.



Prof. dr hab. inż. Ryszard Ostaszewski w roku 1984 ukończył studia magisterskie na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej; specjalność Chemia i Technologia Ciała Stałego. W tym roku rozpoczął staż w Instytucie Chemii Organicznej (IChO) PAN w Warszawie i po roku obowiązkowej służby wojskowej (1985) rozpoczął studia doktoranckie (1986). Pracę doktorską z zakresu chemii supramolekularnej wykonywał w zespole prof. Janusza Jurczaka, którą obronił z wyróżnieniem w 1989 roku. Zaraz po zakończeniu doktoratu został zatrudniony na stanowisku adiunkta w IChO PAN

gdzie pracuje do chwili obecnej. Odbił dwumiesięczny staż naukowy w zespole prof. D.N. Reinhoudta, Uniwersytet Twente, Holandia, oraz roczny staż w tym samym ośrodku (1989/1990). Kolejny roczny staż naukowy już, jako stypendysta ETH odbył u profesora H.J. Hansena, Uniwersytet Zurych, Szwajcaria (1994/1995). W roku 1999 obronił pracę habilitacyjną, którą także wykonał w IChO PAN. W roku 2009 otrzymał tytuł profesora. Pracował na Wydziale Chemicznym, Międzywydziałowym Centrum Biotechnologii oraz Wydziale Inżynierii Chemicznej i Procesowej PW w latach 2000–2009. Jest autorem bądź współautorem 65 publikacji naukowych z listy filadelfijskiej, jednego rozdziału z książki Wiley „Novel Concepts in Catalysis and Chemical Reactors: Improving the Efficiency for the Future”, pięciu patentów oraz 25 innych publikacji. Wypromował czterech doktorów nauk chemicznych i jest promotorem kolejnych czterech doktoratów. Jego zainteresowania naukowe związane są ze stereokontrolowaną syntezą organiczną, chemią reakcji multikomponentowych, biokatalizą, biotechnologią oraz chemią medyczną.

ABSTRACT

This work presents systematically enzymes which can be obtained from animal tissue and their applications in synthesis of pharmaceuticals and nonracemic organic compounds. It lays out similarities in procedures of isolation and purification of particular enzymes. Such procedures usually are so simple that they can be used in every industrial or research laboratory.

Most animal enzymes are well-investigated and their structures and substrate specificity are known. They are used as biocatalysts in many chemical processes. Others were used in one or a few reactions but their natural substrates and biochemical properties are described. Trials of predicting potential applications of such enzymes and other substrates for them were done.

In this part typical applications of hydrolases: lipases (porcine pancreatic lipase [8–17], lamb pregastric lipase [22]), esterases (porcine, horse liver esterase, liver acetone powders [34–43, 46]), *L*-aminoacylase [48, 49], pepsin [56], trypsin [58, 59], imidase [52, 53], aldohexose hydrolases [60, 62–64], nucleotide pyrophosphatase [65]; were described.

Also examples of immobilized [10, 32] or recombined [49] enzymes are given in the text. These modifications enhance catalytic properties or reduce costs of using enzymes.

In practical applications a biocatalytic effect of enzymes from animal sources is often compared with microbial ones. This text is focused on processes where animal enzymes gave much better results (yield and enantioselectivity) than microorganisms. They are also proper, unlike whole microorganisms, to investigate and computer analysis of mechanism of the reaction. Enzymes isolated from animal tissues usually have well-defined structure of active site which is a key to predict mechanisms.

Keywords: animal enzymes, biocatalysis, organic synthesis, applications of hydrolases

Słowa kluczowe: enzymy zwierzęce, biokataliza, synteza organiczna, zastosowania hydrolaz

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

| | |
|------------------|---|
| ACE | – acetylocholinoesteraza |
| AcOH | – kwas octowy |
| ee | – nadmiar enancjomeryczny |
| Fuc | – fukoza |
| Gal | – galaktoza |
| GDP | – guanozynodifosforan |
| HCV | – wirus zapalenia wątroby typu C |
| HLAP | – proszek acetonowy z wątroby końskiej |
| KAP | – proszek acetonowy z nerek (ang. <i>kidney acetone powder</i>) |
| LAP | – proszek acetonowy z wątroby (ang. <i>liver acetone powder</i>) |
| LPGL | – lipaza owcza (ang. <i>lamb pregastric lipase</i>) |
| NPP | – pirofosfataza nukleotydów |
| PLAP | – proszek acetonowy z wątroby wieprzowej |
| PLE | – esteraza z wątroby wieprzowej |
| PPL | – lipaza z trzustki wieprzowej |
| <i>rac</i> | – racemat |
| <i>t</i> Bu-O-Me | – eter <i>tert</i> -butylowo-metylowy |

WSTĘP

Współczesna chemia organiczna jest dynamicznie rozwijającą się dziedziną wiedzy, w której coraz powszechniej stosuje się reakcje katalizowane przez proste i złożone układy katalityczne. Niewątpliwie enzymy są biokatalizatorami o złożonej strukturze, które katalizują różnego typu reakcje chemiczne. Wysoka selektywność substratowa enzymów, jako biokatalizatorów reakcji chemicznych umożliwia uzyskanie odpowiednich produktów z wysoką chemo-, regio- i stereo- selektywnością. Dlatego też we współczesnych laboratoriach chemicznych enzymy są już stosowane w rutynowych eksperymentach, co nie budzi żadnych zastrzeżeń. Ponadto reakcje katalizowane przez enzymy spełniają wszystkie wymagania zielonej chemii, których spełnienie jest niezwykle ważne w eksperymentach laboratoryjnych i procesach przemysłowych. Zalecenia organizacji międzynarodowych idą w kierunku wprowadzania nowych metod wytwarzania związków chemicznych dla których uciążliwość środowiskowa jest niewielka. Ponieważ większość reakcji katalizowanych przez enzymy przebiega w łagodnych warunkach pod ciśnieniem atmosferycznym i w temperaturze pokojowej lub niewiele wyższej zainteresowanie procesami biokatalitycznymi rośnie. Niestety, wysoka selektywność substratowa enzymów wymusza stosowanie szerokiej gamy biokatalizatorów, które są trudno dostępne komercyjnie. Wydaje się, więc, że należy szerzej korzystać ze źródeł naturalnych, w których występują enzymy w dużych ilościach. Barię trudną do pokonania jest jednak brak wiedzy i umiejętności korzystania z tych zasobów, co jest bardzo istotnym ograniczeniem. Dlatego wydaje się celowe przedstawienie ogólnej metody wydziałania i izolowania enzymów z tkanek zwierzęcych, które są powszechnie dostępnym źródłem tych biokatalizatorów, wskazując przy tym na ich prostotę i uniwersalność. Ponieważ omówienie wszystkich klas enzymów nie jest możliwa w ramach tylko jednej publikacji w niniejszej części zostanie przedstawiona ogólna metoda izolowania enzymów z komórek zwierzęcych oraz zastosowanie hydrolaz w syntezie organicznej i biokatalizie.

W pracy przedstawiono również wybrane przykłady zastosowania enzymów rekombinowanych i immobilizowanych, które pierwotnie były wydziałone z tkanek zwierzęcych. Szczególnie immobilizacja enzymów umożliwia obniżenie kosztów procesów poprzez zwiększenie wydajności a także wielokrotne zastosowanie tego samego biokatalizatora. Ten bardzo ważny aspekt biokatalizy był omówiony uprzednio [1] i nie jest przedmiotem niniejszej pracy

1.1. ENZYMY

Enzymy są to białka o aktywności katalitycznej (oprócz rybozymów, ale nie są one przedmiotem tej pracy i zostaną pominięte), które nie zmieniają równowagi reakcji, ale przyspieszają ich przebieg dzięki obniżeniu energii aktywacji. Ogólnie akceptowany mechanizm reakcji katalizowanej przez enzym polega na

dopasowaniu substratu w miejsce aktywne enzymu, co prowadzi do powstania kompleksu enzym–substrat, który jest przekształcany w kompleks enzym–produkt i w kolejnym etapie reakcji powstały kompleks rozpada się uwalniając enzym i produkt do środowiska reakcji [2]. W obecności enzymu, będącego cząsteczką chiralną, stałe szybkości reakcji poszczególnych enancjomerów substratu różnią się. Stosunek tych stałych definiuje się, jako enancjoselektywność reakcji.

Ich aktywność, jako biokatalizatorów reakcji jest silnie regulowana. Czynniki, które najbardziej wpływają na ich aktywność katalityczną są rodzaj rozpuszczalnika, pH, temperatura oraz obecność inhibitorów i/lub aktywatorów. Najczęściej używanym rozpuszczalnikiem w reakcjach katalizowanych przez enzymy jest woda lub mieszaniny woda rozpuszczalnik organiczny. Obecnie coraz więcej reakcji tego typu przeprowadza się tylko w rozpuszczalnikach organicznych lub też w mieszaninach rozpuszczalników zawierających niewielkie ilości wody.

W zależności od typu reakcji katalizowanej przez enzym dzielimy enzymy się na sześć klas, czyli: oksydoreduktazy, transferazy, hydrolazy, liazy, izomerazy, ligazy. Najczęściej w syntezie organicznej wykorzystywane są hydrolazy. Enzymy te katalizują reakcje rozrywania wiązań chemicznych, w których bierze udział cząsteczka wody. Dlatego też do ich efektywnego działania niezbędne jest środowisko wodne. Ostatnie dane literaturowe wskazują wyraźnie, że szereg z dotychczas opracowanych procesów biegnących w roztworach wodnych można przeprowadzić w rozpuszczalnikach organicznych, co ma ogromne znaczenie dla procesów przemysłowych [3].

1.2. OGÓLNA METODA IZOLACJI ENZYMÓW Z TKANEK ZWIERZĘCYCH

Przygotowanie surowego preparatu enzymatycznego jest proste i nie wymaga żadnego specjalistycznego sprzętu. Jest to możliwe do wykonania w każdym laboratorium. Ponadto ten sam preparat, np. proszek acetonowy z wątroby końskiej, jest źródłem wielu enzymów należących do różnych klas. Można go zastosować, jako katalizator reakcji zarówno utleniania bądź redukcji, jak i hydrolizy czy transestryfikacji.

Typowe procedury przygotowania różnych enzymów są bardzo podobne. Różnią się najczęściej rodzajem użytego rozpuszczalnika organicznego (aceton, chloroform, chlorek metylenu, metanol), pH stosowanego buforu oraz stężeniem siarczanu amonu najczęściej używanego do wysalania białka, jeżeli ten etap jest konieczny do wykonania.

Opracowano kilka metod izolowania enzymów. Ponieważ można je w dogodny sposób modyfikować warto zawsze zastosować ogólną procedurę przygotowania preparatu enzymatycznego. Dogodną metodą przygotowania takiego biokatalizatora jest procedura opracowana przez Garnera i Smitha [4]. Autorzy zaproponowali następujący sposób uzyskania surowego preparatu zawierającego lipazę z trzustki wieprzowej (PPL). Zamrożoną trzustkę wieprzową pocięto na kawałki i homogenizowano z acetonem. Następnie homogenat był wirowany, a uzyskany osad przemyto

dwukrotnie zimnym acetonem, ponownie wirowano i suszono w eksykatorze pod zmniejszonym ciśnieniem. Tak otrzymany proszek acetonowy może być bezpośrednio zastosowany, jako biokatalizator do reakcji. Kolejne etapy oczyszczania polegały na dwukrotnym ługowaniu proszku acetonowego układem chloroform/metanol (2:1) i wirowaniu. Tak uzyskany osad przemyto acetonem oraz eterem i następnie suszono pod zmniejszonym ciśnieniem. Tak uzyskany proszek acetonowy można poddać kolejnym etapom oczyszczania. Każdy z nich jest charakterystyczny dla określonego enzymu, ale należy zauważyć, że nie gwarantuje to uzyskania biokatalizatora bardziej aktywnego. Co więcej, znane są przypadki tracenia aktywności przez enzym po jego dokładnym oczyszczeniu. Dlatego też do katalizowania reakcji używa się często właśnie proszków acetonowych, gdyż są one dużo tańsze niż oczyszczone enzymy, a ich własności katalityczne są znakomite i często przewyższają komercyjnie dostępne biokatalizatory. Wynika to, między innymi, z obecności w surowych ekstraktach różnych związków, które pełnią rolę kofaktorów, np. jony metali, aktywatorów bądź związków stabilizujących strukturę enzymów.

2. WYBRANE ZASTOSOWANIA HYDROLAZ

Hydrolazy są enzymami katalizującymi rozpad wiązań chemicznych w cząsteczkach związków chemicznych z udziałem cząsteczek wody i co jest niezmiernie ważne, nie wymagają stosowania kofaktorów. Ponadto hydrolazy zachowują wysoką aktywność katalityczną nie tylko w wodzie a także w układach woda/rozpuszczalnik organiczny lub tylko w rozpuszczalnikach organicznych. Dlatego też są najczęściej używanymi biokatalizatorami w syntezie organicznej. Każda klasa enzymów dzieli się na podklasy. Dla hydrolaz podział zależy od rodzaju hydrolizowanego wiązania. Najważniejsze dla syntezy organicznej podklasy hydrolaz to: esterazy, lipazy, glikozydazy, proteazy.

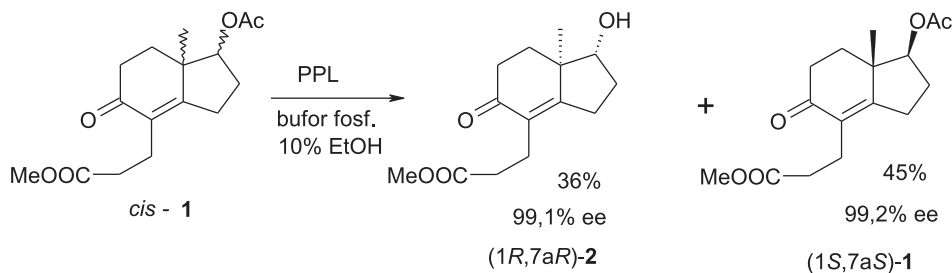
2.1. LIPAZY

Lipazy są często stosowane w syntezie z uwagi na ich wysoką enancjoselektywność i szeroką specyficzność substratową. Mają różnorodne zastosowania [5]. Dużo biologicznie czynnych związków (jak antybiotyki, nukleotydy, pestycydy) było syntetyzowanych z użyciem lipaz, jako biokatalizatorów [6]. Wśród zwierzęcych lipaz lipaza z trzustki wieprzowej (PPL) jest najbardziej użyteczną i łatwą do przygotowania [4]. Aktywność biochemiczna lipazy trzustkowej w organizmie jest dobrze znana [7].

2.1.1. Zastosowania PPL w biokatalizie

a) a) Lipaza z trzustki jest szeroko stosowana w reakcjach hydrolizy estrów alkoholi pierwszo- i drugorzędowych:

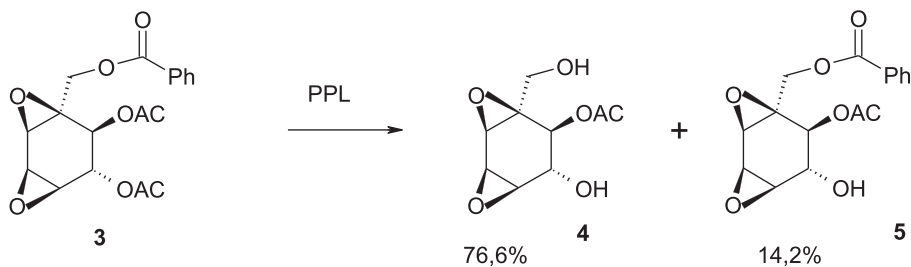
Hydroliza estrów alkoholi drugorzędowych z zastosowaniem PPL jako biokatalizatora przebiega często bez naruszania ugrupowania estrowego alkoholu pierwszorzędowego [8], czyli jest chemoselektywna. Na Schemacie 1 przedstawiono chemoselektywną reakcję hydrolizy tylko jednego z dwóch obecnych w cząsteczce substratu **1** wiązań estrowych. Produkt **2** jest ważnym substratem do syntezy steroidów jak estradiol, oesteron [8].



Schemat 1
Scheme 1

Enancjoselektywność tej reakcji była bardzo wysoka, większa niż 1000. Kilka bakteryjnych i grzybowych lipaz było również badanych, ale odpowiednie produkty otrzymano z niską wydajnością i bardzo niskimi nadmiarami enancjomerycznymi.

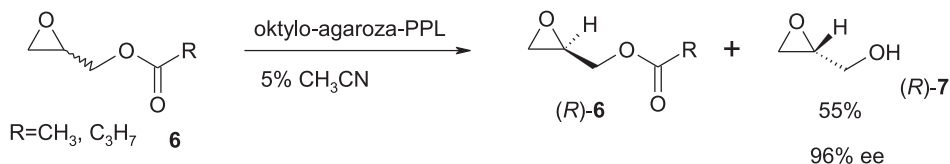
Krotepoksyd (**3**) jest związkiem naturalnym, bardzo trudnym do uzyskania w syntezie organicznej, ponieważ posiada trzy grupy estrowe i dwa pierścienie epoksydowe o zdefiniowanej konfiguracji. Cykloheksanole uzyskane z hydrolizy tego związku są ważnymi związkami biologicznie czynnymi oraz prekursorami leków. Zastosowanie PPL do hydrolizy wiązań estrowych w związku **3** umożliwiło uzyskanie tylko dwóch produktów, których pierwszy posiadający strukturę **4** otrzymano z wydajnością 76,6% a drugi związku **5** z wydajnością 14,2% [9]. Reakcja była regio- i chemoselektywna.



Schemat 2
Scheme 2

Po przeanalizowaniu składu uzyskanych produktów można sądzić, że PPL najpierw hydrolizuje grupę 3-OAc, a następnie grupę 7-OBz. Kolejne badania pokazały, że lipazy mikrobiologiczne z *Mucor miehei* i *Pseudomonas cepacia* katalizują hydrolizę tych samych wiązań estrowych związku **3**. Próby zastosowania lipaz z innych mikroorganizmów nie powiodły się, gdyż okazało się, że hydrolizowane są wszystkie trzy wiązania estrowe substratu **3** lub też reakcje nie przebiegają.

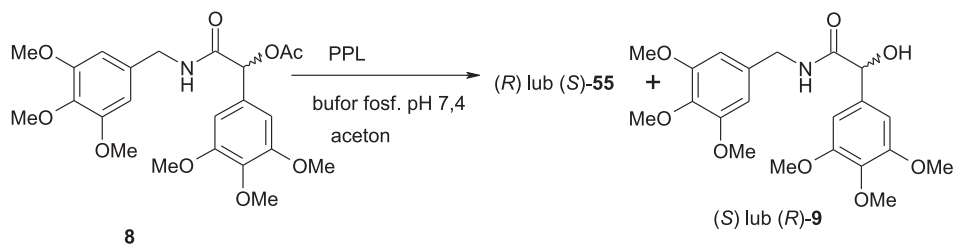
Istotnym problemem w syntezie organicznej jest uzyskanie enancjomerycznie czystych estrów zawierających pierścień epoksydowy. Hydroliza takich estrów bez rozrywania pierścienia epoksydowego jest możliwa z zastosowaniem lipazy z trzustki wieprzowej. Otrzymano w ten sposób enancjomer (*R*)-glicydołu (**7**) z wydajnością 55% i nadmiarem enancjomerycznym wynoszącym 96% [10]. Ten związek jest używany do syntezy enancjomerycznie czystych 3-aryloksy-1,2-propanodiolu, ważnych dla przemysłu farmaceutycznego [11]. Ponadto jest on substratem do syntezy kwasu 3-(4-metoksyfenylo)glicydowego z którego produkuje się diltiazem – lek będący antagonistą receptorów wapnia.



Schemat 3
Scheme 3

Zastosowano różne procedury immobilizacji tego enzymu takie jak: immobilizacja na żelu oktylo-agarozą, fenylo-agarozą oraz oktadecylo-polimetakrylat. W przypadku użycia biokatalizatora na żelu oktylo-agarozowym konwersja była największa, a enancjoselektywność dla estru butylowego wynosiła około 30.

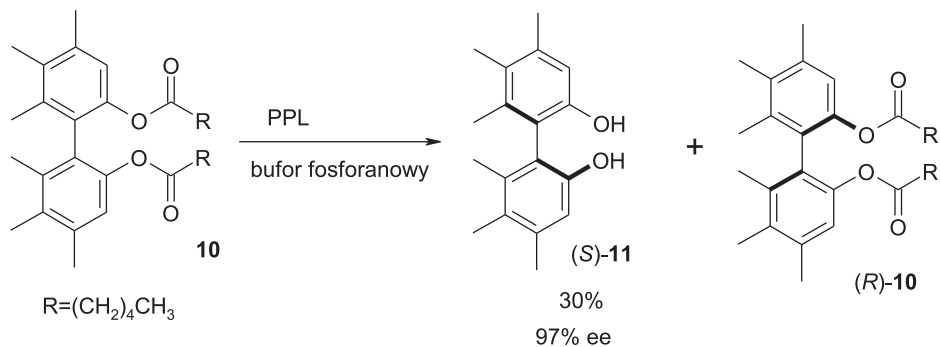
PPL zastosowano również, jako katalizator reakcji hydrolizy α -acetoksyamidów [12], przykład takiego procesu przedstawiono na Schemacie 4. Związek **9** jest analogiem podofilotoksyny, która ma własności antynowotworowe.



Schemat 4
Scheme 4

W przypadku stosowania natywnego enzymu reakcja trwała 7 godzin, konwersja wyniosła 48% a enancjoselektywność $E = 3,5$. Gdy zastosowano enzym immobilizowany w alginianie wapnia czas reakcji wydłużył się do 20 godzin, a konwersja obniżyła się do 41%, ale enancjoselektywność reakcji wzrosła do 5,1.

b) Również estry fenoli i bifenoli (takich jak związek **10**) są hydrolizowane z wysoką enancjoselektywnością dzięki zastosowaniu PPL [13].

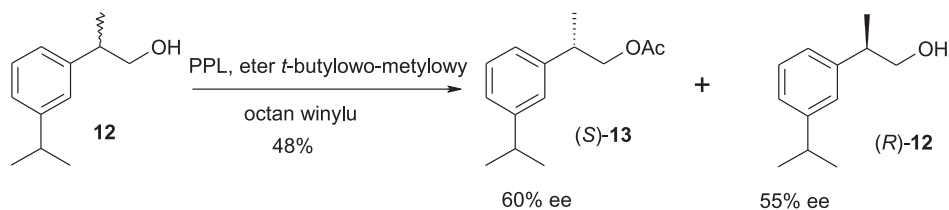


Schemat 5
Scheme 5

Związek **11** otrzymano z dobrą wydajnością i nadmiarem enancjomerycznym wynoszącym 97%. Enancjoselektywność tej reakcji była wysoka, powyżej 100. Inne lipazy również były badane, ale otrzymywano produkt **11** ze znacznie mniejszą wydajnością. Drugi enancjomer był otrzymany z podobną enancjoselektywnością przez chemiczną hydrolizę pozostałego po reakcji enzymatycznej nieprzereagowanego diestru o konfiguracji *R*.

c) Lipaza z trzustki wieprzowej jest bardzo często stosowanym biokatalizatorem w reakcjach transestryfikacji. Reakcje takie przeprowadza się w rozpuszczalnikach organicznych, gdyż w środowisku wodnym przebiegają reakcje hydrolityczne. Pierwszorzędowe i drugorzędowe alkohole są acetylowane z dobrą enancjoselektywnością.

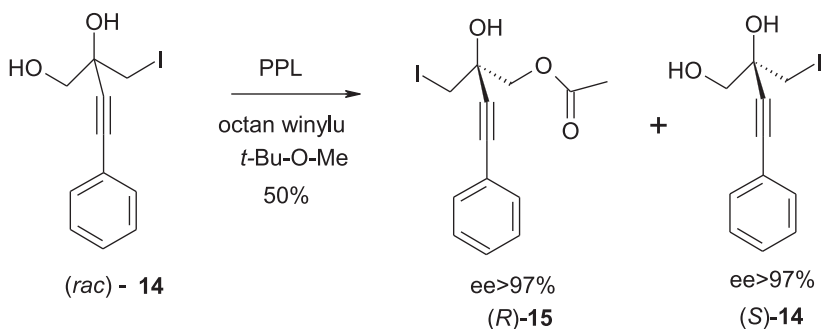
PPL zastosowano do syntezy enancjomerycznie wzbogaconych oraz enancjomerycznie czystych związków zapachowych (Schemat 6) [14].



Schemat 6
Scheme 6

Produkty otrzymano z bardzo dobrą wydajnością i nadmiarami enancjomerycznymi wynoszącymi 60% dla estru **13** i 55% dla alkoholu (*R*)-**12**. Aby uzyskać wyższe nadmiary enancjomeryczne nieprzereagowany alkohol był ponownie poddany reakcji transestryfikacji, w wyniku czego jego nadmiar enancjomeryczny wzrósł do 99%. Ester octowy był chemicznie hydrolizowany (wodorotlenek potasu w metanolu) do alkoholu, który poddano kolejnej reakcji transestryfikacji z PPL jako katalizatorem. Nadmiar enancjomeryczny octanu wyniósł 99%. Alkohol (*R*)-**12** i octan **13** były następnie przekształcane w stereoizomery florhydralu, które mają różne zapachy (znacznie silniejsze niż zapach racemicznego florhydralu) i są stosowane w przemyśle kosmetycznym.

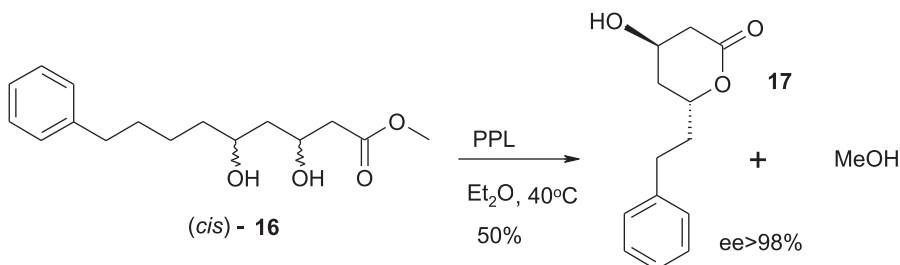
W przypadku dioli z pierwszorzędowymi i trzeciorzędowymi grupami hydroksylowymi, acetylowane są tylko grupy pierwszorzędowe [15]. Jest to typowe dla katalizowanych enzymatycznie reakcji acetylowania. Metodę tę zastosowano do otrzymywania chiralnych trzeciorzędowych alkoholi (*S*)-**14**, co pokazano na Schemacie 7. Produkty tej reakcji są stosowane w syntezie metabolitów ze ścieżki biosyntezy witaminy D₃ lub analogów prostaglandyny.



Schemat 7
Scheme 7

Produkt **15** i nieprzereagowany substrat (*S*)-**14** uzyskano z wysokimi nadmiarami enancjomerycznymi, powyżej 97%. Enancjoselektywność tej reakcji jest bardzo wysoka, powyżej 1000.

PPL zastosowano również jako biokatalizator transestryfikacji wewnątrzcząsteczkowej [16], w wyniku której powstają laktony. Lakton statyny (**17**) jest używany w produkcji leków, takich jak lowastatyna i simwastatyna, które obniżają poziom cholesterolu we krwi.

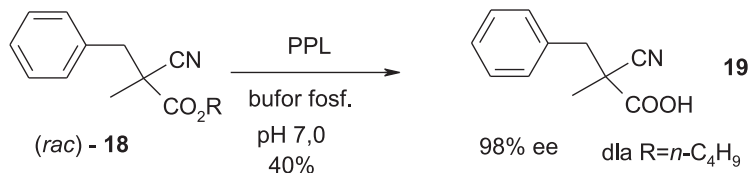


Schemat 8
Scheme 8

Zastosowanie enzymu zwierzęcego umożliwiło otrzymanie produktu **17** z wysoką wydajnością i nadmiarem enancjomerycznym przewyższającym 98%. Wydajność zwiększono z 25% do 50% stosując stałą matrycę – sita molekularne usuwające wodę z natywnego enzymu. W przypadku stosowania lipaz z mikroorganizmów odpowiedni produkt otrzymano z niższą wydajnością.

d) Typowym zastosowaniem PPL jest użycie tego enzymu, jako biokatalizatora hydrolizy estrów prowadzącej do chiralnych kwasów:

Kwasy 2-cyano-2-metylo-podstawione (**19**) otrzymano z wysoką enancjoselektywnością (większą niż 150) stosując PPL, jako biokatalizator [17]. Obecność dwóch grup funkcyjnych w bezpośrednim sąsiedztwie grupy karboksylowej powoduje, że są to związki bardzo użyteczne w syntezie organicznej.



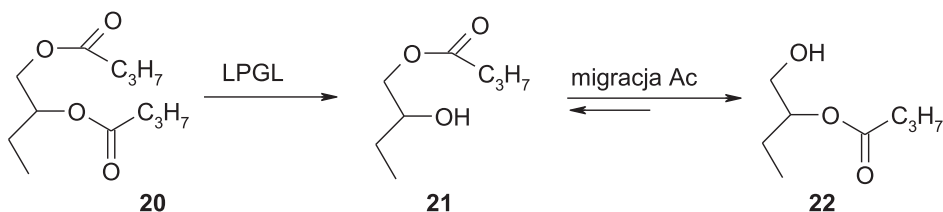
Schemat 9
Scheme 9

Autorzy nie określili konfiguracji absolutnej hydrolizowanego enancjomeru. Enancjoselektywność zależy od rodzaju grupy alkoksylowej R estrze będącym substratem reakcji (**18**). Odpowiednie produkty otrzymano z wydajnościami od 13 do 51% oraz nadmiarami enancjomerycznymi zmieniającymi się w zakresie 79–98%. Reakcję, w której otrzymano najlepszą enancjoselektywność przedstawiono na Schemacie 9. Enzymy mikrobiologiczne nie były przydatne w tej reakcji, gdyż produkty otrzymano ze znacznie niższymi nadmiarami enancjomerycznymi.

2.1.2. Inne lipazy

Również lipazy z różnych gatunków ryb [18], owczych organów [19], brązowego tłuszczu szczura [20] oraz psiej trzustki [21] były izolowane i oczyszczane. W większości przypadków do homogenizacji używano acetonu. Aktywności enzymatyczne były mierzone odpowiednio dla palmitynianu *p*-nitrofenyłu, triacylogliceroli, trioleiny i tributyriny jako substratów, zatem prawdopodobnie reakcje związków podobnych do tych mogą być katalizowane przez wymienione lipazy. Zwłaszcza surowy ekstrakt lipazy z psiej trzustki wykazywał dużą aktywność i jest potencjalnie użyteczny w biotransformacjach.

Lipazę z narządów owczego przewodu pokarmowego zastosowano do katalizowania hydrolizy 1,2-propanodiolu (**20**) [22].



Schemat 10
Scheme 10

W stanie równowagi 1-monoester (**21**):2-monoester (**22**) występują w stosunku 33,2:66,8. Przeniesienie reszty acylowej w drugim etapie jest obserwowane również bez obecności enzymu. Pozycja 2 jest preferowana przez lipazę prawdopodobnie dlatego, że jest bardziej hydrofobowa.

2.2. ESTERAZY

Mechanizm katalizowania reakcji przez esterazy jest dobrze znany [23], a ich bardzo liczne zastosowania zostały opisane [24]. Znanych jest bardzo wiele esteraż pochodzenia mikrobiologicznego, jednak niewiele z nich ma zastosowanie w syntezie. Natomiast esterazy zwierzęce są szeroko wykorzystywane. Własności oraz zastosowania najbardziej popularnej z nich, esterazy z wątroby wieprzowej, zostały zestawione i opisane [25].

Esterazy izolowano z wątroby różnych zwierząt, najczęściej świni i konia. Są używane głównie jako proszki acetonowe. Procedury przygotowania proszków acetonowych z wątroby różnych zwierząt są podobne [26]. Są również podobne do standardowej procedury podanej w rozdziale 2.2., ale prostsze od niej. Do homogenizacji tkanki używa się zimnego acetonu, po wirowaniu osad suszy się i rozciera, nie ma kolejnych etapów ekstrakcji.

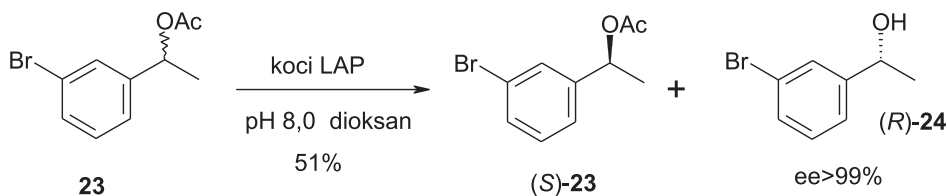
Esteraza z wątroby wieprzowej (PLE) jest enzymem występującym w postaci kilku izoenzymów. Wszystkie one mają aktywność esterazy, zatem nie ma sensu oczyszczanie ich do pojedynczych białek i następnie łączenie. Lepiej zastosować surowy proszek acetonowy, który zawiera wszystkie izoenzymy obecne w danej tkance, ma taką samą specyficzność substratową, a jest go o wiele łatwiej otrzymać.

PLE została sklonowana i eksprymowana w drożdżach *Pichia pastoris* [27]. Uzyskano rekombinowane izoenzymy inne niż γ -PLE które posiadały wyższą aktywność specyficzną w reakcji hydrolizy (*R*)-metylo-(4*E*)-5-chloro-2-izopropyl-4-pentenianu (enantjoselektywność powyżej 200), niż surowe PLE. Mutanty PLE również były eksprymowane [28]. Dają one lepszą enantjoselektywność podczas hydrolizy 1-fenyl-1-etylooctanu i preferują inny enancjomer 1-fenyl-3-butylooctanu niż enzym natywny.

2.2.1. Zastosowanie esteraz zwierzęcych, jako katalizatorów reakcji chemicznych

a) Esterazy są bardzo popularnymi katalizatorami hydrolizy estrów, w wyniku, której otrzymuje się chiralne alkohole drugorzędowe:

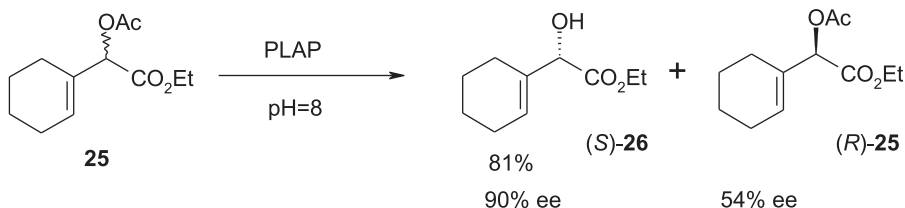
Pochodne 1-fenyletanolu i 1-fenylpropanolu były rozdzielane z użyciem proszków acetonowych z krowy, kota, kurczaka, indyka, owcy, świni i szczura [29]. Przykład takiej reakcji przedstawiono na Schemacie 11. Powstające w ten sposób chiralne alkohole (np. związek **24**) są jednostkami budulcowymi w syntezie leków oraz chemikaliów stosowanych w rolnictwie.



Schemat 11
Scheme 11

1-(3-Bromofenyl)etanol (**24**) otrzymano z wydajnością 51% i świetnym nadmiarem enancjomerycznym, powyżej 99%. Reakcje prowadzono z dodatkiem różnych rozpuszczalników organicznych. W zależności od źródła enzymu, zastosowanie innych rozpuszczalników dawało optymalne rezultaty. W większości przypadków produkty otrzymano z dobrą wydajnością i nadmiarami enancjomerycznymi powyżej 80%. We wszystkich przypadkach otrzymano alkohol o konfiguracji *R*, niezależnie od gatunku, z którego pochodził enzym.

Synteza α -hydroksy- β,γ -nienasyconych estrów (**26**) z zastosowaniem proszku acetonowego z wątroby wieprzowej została opisana przez Vankara i współpracowników [30]. Produkty były używane do syntezy chiralnych epoksydów winylowych.

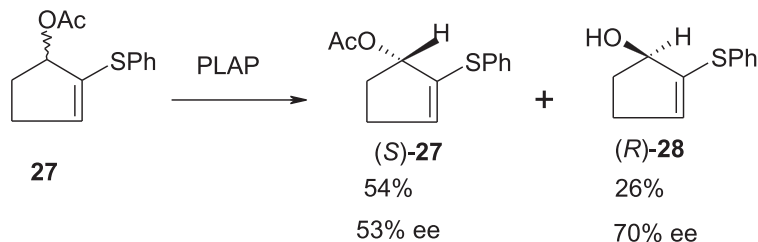


Schemat 12
Scheme 12

W tej reakcji enzym hydrolizuje wiązanie estrowe, w którym bierze udział alkohol drugorzędowy, a pozostawia nienaruszone wiązanie z alkoholem pierwszorzędowym. Jest to powszechne zjawisko w przypadku hydrolizy enzymatycznej. Produkt **26** otrzymano z wydajnością 81% i nadmiarem enancjomerycznym wynoszącym 90%. Odzyskano również wzbogacony enancjomerycznie substrat (*R*)-**25**.

LAPy zastosowano również do rozdziału estrów z innymi grupami funkcyjnymi:

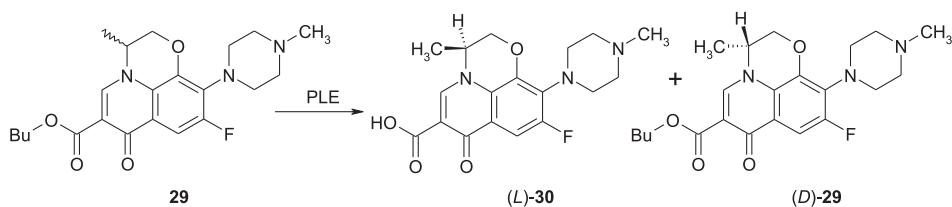
Reakcje octanów fenylotycykloalkenylów (**27**) [31] przebiegają z niewielką enancjoselektywnością (około 10), jednak było to wystarczające, aby wykorzystać otrzymane produkty do dalszej syntezy użytecznych związków chemicznych.



Schemat 13
Scheme 13

Produkt **28** otrzymano z umiarkowaną wydajnością i nadmiarem enancjomerycznym wynoszącym 70%. Po przeprowadzeniu reakcji z analogami substratu **27** stwierdzono, że wpływ grupy fenylsulfidowej na przebieg hydrolizy zmniejsza się, gdy znajduje się ona dalej od centrum stereogenicznego.

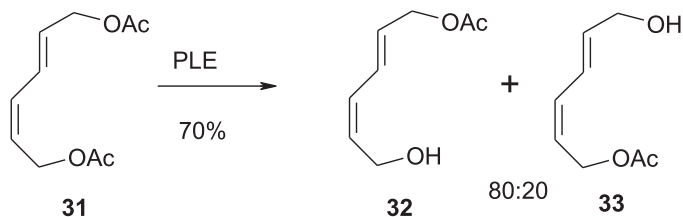
Immobilizowana PLE była zastosowana w reakcji hydrolizy estru butyloвого ofloksacyny (**29**) do chiralnej lewofloksacyny (**30**) [32]. Jest to antybiotyk z grupy leków fluorochinolonowych. Lewofloksacyna jest znacznie aktywniejsza biologicznie niż forma *D*, ponadto *D*-ofloksacyna może być toksyczna przy dłuższym stosowaniu, dlatego ważne jest otrzymanie izomeru *L*.



Schemat 14
Scheme 14

Produkt otrzymano z nadmiarem enancjomerycznym ok. 60%. Centrum stereogeniczne znajduje się daleko od centrum reakcji, mimo to wykazano, że ma wpływ na enancjoselektywność reakcji. W kolejnym etapie badań enzym był immobilizowany w alginianie, żelu poliakrylamidowym i przez adsorpcję. Dwie pierwsze metody umożliwiły uzyskanie biokatalizatorów, które zastosowane w powyższej reakcji katalizowały powstawanie produktu z podobnym nadmiarem enancjomerycznym, co w przypadku stosowania natywnego enzymu (53–60%). Adsorpcja okazała się tym razem metodą zmieniającą własności enzymu tak, iż stał się nieprzydatny jako biokatalizator.

b) Zastosowano PLE do regioselektywnej hydrolizy octanów dioli (**31**) [33].

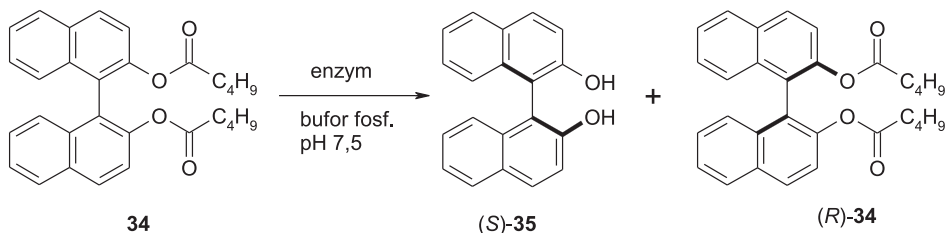


Schemat 15
Scheme 15

Badania wykazały, że wiązanie estrowe w pobliżu wiązania podwójnego o konfiguracji *Z* było łatwiej hydrolizowane przez enzym pochodzenia zwierzęcego, powstaje głównie związek **32** (*Z:E* 80:20). Lipaza z grzyba *Mucor miehei* preferuje hydrolizę drugiego wiązania estrowego, głównie otrzymano związek **33** (*Z:E* 20:80). Mikrobiologiczne lipazy były używane do acetylowania dioli, a PLE była najlepszym enzymem do przeprowadzenia selektywnej hydrolizy.

c) Zastosowanie proszków acetonowych do enancjoselektywnej hydrolizy estrów fenoli:

Proszek acetonowy z trzustki wieprzowej katalizuje hydrolizę dipentanianu 1,1'-bi-2-naftyłu (**34**) [34]. Enancjomery binaftolu w kompleksie z tytanem znalazły zastosowanie, jako katalizatory np. w reakcji Friedela-Craftsa z fluoranem [35] lub w reakcji utleniania sulfidów [36].



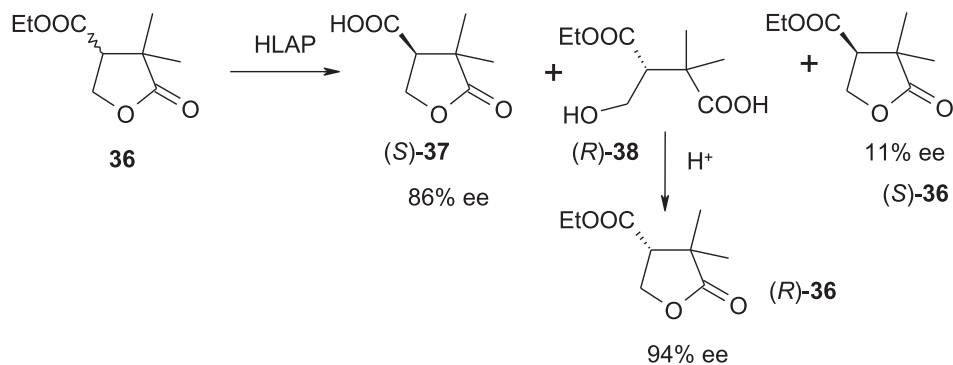
Schemat 16
Scheme 16

W wyniku reakcji enzymatycznej otrzymano (*S*)-bi-2-naftol (**35**) z wydajnością 64–67%. (*R*)-Bi-2-naftol otrzymano stosując chemiczną hydrolizę nieprzereagowanego estru **34** (metanol i wodorotlenek sodu). Po krystalizacji z toluenu czystość chemiczna i optyczna były większe niż 99%.

d) Enancjoselektywna hydroliza estrów z użyciem proszków acetonowych z wątroby jako biokatalizatorów, w wyniku której otrzymuje się optycznie czynne kwasy i estry:

Hydroliza może przebiegać bez otwierania pierścienia laktonu [37]. Powstający (4*R*,5*R*)-4-karboksy-5-pentyl- γ -butyrolakton jest prekursorem związku naturalnego; kwasu (-)-fazeolinowego. Używano tu proszku acetonowego z wątroby wieprzowej, gdyż esterazy mikrobiologiczne bądź z innych zwierząt nie katalizują tej reakcji lub produkt powstaje z bardzo małym nadmiarem enancjomerycznym.

HLAP zastosowano także do syntezy pochodnych kwasu parakonowego [38], co przedstawiono na Schemacie 17.



Schemat 17
Scheme 17

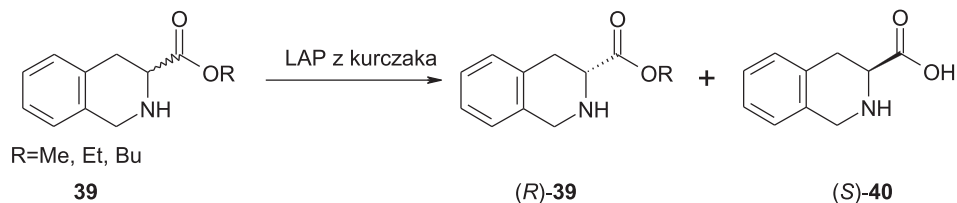
Produkt hydrolizy, czyli lakton z wolną grupą karboksylową (**37**) otrzymano z nadmiarem enancjomerycznym wynoszącym 86%. (*S*)-lakton **36** był obecny w mieszaninie reakcyjnej, ale jego nadmiar enancjomeryczny był niewielki. Natomiast (*R*)-lakton **36** wyizolowano po dodaniu kwasu do uzyskania pH = 2, z nadmiarem enancjomerycznym wynoszącym 94%. Lipazy mikrobiologiczne nie wykazywały regioselektywności i hydrolizowały pierścień laktonowy, natomiast zastosowanie proszku acetonowego z wątroby końskiej (HLAP) umożliwiło otrzymanie optycznie czynnego laktonu.

Hydroliza laktonu bez rozrywania innych wiązań estrowych również jest możliwa dzięki zastosowaniu HLAP:

Kiedy γ -butyrolakton jest podstawiony grupą alkilową w pozycji 5, wiązanie laktonowe jest tworzone przez alkohol drugorzędowy i zachodzi jego enzymatyczna hydroliza [39]. HLAP hydrolizuje substraty o konfiguracji *cis*, mimo że tego typu związki nie są dobrymi substratami do enzymatycznej hydrolizy. Enzymy z innych źródeł katalizowały nieenancjoselektywną hydrolizę.

W przypadku 5-arylopodstawionych parakonianów PPL i α -chymotrypsyna nie są selektywne. Natomiast gdy zastosowano HLAP nieprzereagowane estry wyizolowano z wysokimi nadmiarami enancjomerycznymi [40]. Hydroliza laktonów o konfiguracji *trans* jest szybsza, ale nie regioselektywna, otrzymuje się mieszaninę kwasów.

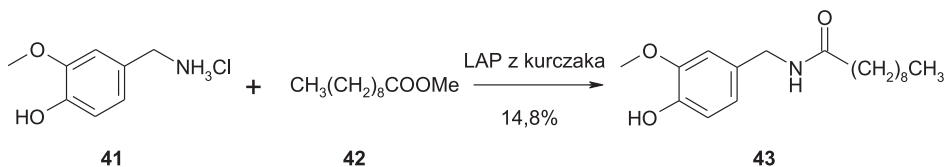
Zastosowanie krurzego LAPu do rozdziału estrów kwasu 1,2,3,4-tetrahydroizochinolino-3-karboksylowego (**40**) [41] przedstawiono na Schemacie 18. Kwas **40** jest jednostką budulcową biologicznie czynnych peptydów oraz inhibitorów enzymów, np. proteazy HCV [42] lub metaloproteinazy występującej w matrix [43].



Schemat 18
Scheme 18

Autorzy twierdzą, że produkty (*R*)-**39** i **40** otrzymali z wysoką wydajnością i świetnymi nadmiarami enancjomerycznymi, niezależnie od reszty alkoholu w substracie **39**, ale nie podają konkretnych wartości. Inne proszki acetonowe, PPL i lipaza z *Candida cylindracea* prowadziły do powstania produktów z mniejszymi nadmiarami enancjomerycznymi. Wydajność nie zależy od rodzaju alkoholu w hydrolizowanym estrze.

Proszki acetonowe zastosowano też do syntezy amidów z chlorowodorków amin i estrów (Schemat 19).

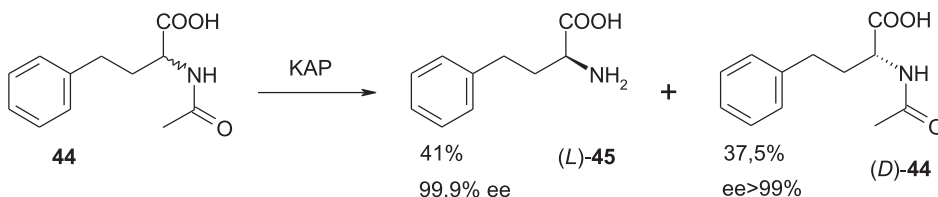
Schemat 19
Scheme 19

Bez dodatku enzymu do środowiska reakcji nie powstawał żaden produkt. Zastosowanie LAP pozwoliło otrzymać amidy **43** będące analogami kapsaicyny, które mają własności przeciwbólowe [44] i wpływają na przewodzenie bodźców nocycyptywnych [45]. Były otrzymywane z chlorowodoru wanilylaminu (**41**) oraz estrów metylowych różnych kwasów tłuszczowych (**42**) [46]. Enzym katalizuje formowanie nowego wiązania amidowego, co jest zupełnie różne od innych reakcji, w których był stosowany i pokazuje jak szerokie jest spektrum możliwych zastosowań. Produkt otrzymano z niską wydajnością, ale reakcja przebiegała w łagodnych warunkach i nie trzeba było stosować żadnych toksycznych reagentów.

2.3. L-AMINOACYLAZA Z NEREK SSAKÓW

Przygotowanie proszków acetonowych z nerek (KAP) zostało opisane przez Regła i współpracowników [47]. Jest to ta sama metoda, co do przygotowania proszków z wątroby. Tę procedurę zaadaptowano do przygotowania proszków z nerek wołowych, psich, wieprzowych, szczurzych i owczych.

Proszki acetonowe z nerek są wykorzystywane głównie do otrzymywania optycznie czynnych aminokwasów, np. *L*-homofenyloalaniny (**45**). Ester etylowy *L*-homofenyloalaniny jest stosowany do syntezy Benazeprilu, inhibitora ACE (acetylocholinoesterazy) [48].

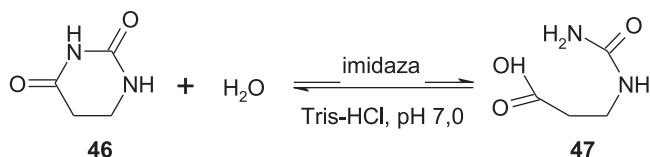
Schemat 20
Scheme 20

Stwierdzono, że KAP wołowy ma największą aktywność specyficzną i przy jego zastosowaniu uzyskano najlepsze rezultaty w powyższej reakcji. Produkty **45** i (*D*)-**44** otrzymano z wysokimi wydajnościami i nadmiarami enancjomerycznymi bliskimi 100%.

Wieprzowa aminoacylaza 1 była ekspresjonowana w *Escherichia coli*, konstruowano też różne mutanty tego enzymu [49]. Pozwoliło to odkryć mechanizm katalityczny i budowę miejsca aktywnego tej metaloproteiny. Dzięki temu nowe substraty dla tego enzymu mogą być projektowane *in silico*.

2.4. IMIDAZY

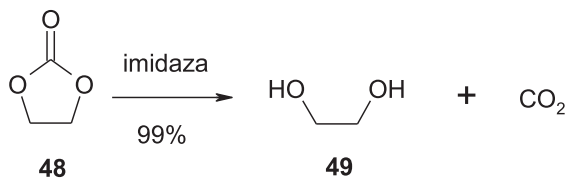
Imidazy to enzymy katalizujące reakcję hydrolizy wiązania imidowego, głównie w związkach cyklicznych, np. dihydrouracylu (**46**). Były izolowane z wątroby szczurzej [50], wieprzowej [51] i wołowej [52]. Procedury były podobne, polegały na ekstrakcji enzymu z proszku acetonowego za pomocą buforu (w odróżnieniu od podanej ogólnej procedury, gdzie ekstrahowano proszki rozpuszczalnikami organicznymi). Enzym (nazywany również dihydropirymidynazą) katalizuje reakcje hydrolizy 5-, 6- i 7-członowych pierścieni imidów oraz diacetamidu. Amidy, estry i *N*-podstawione imidy nie są hydrolizowane przez imidazy.



Schemat 21
Scheme 21

Stwierdzono, że produkt hydrolizy dihydrouracylu (**46**) – *N*-karbamyl- β -alanina (**47**) jest inhibitorem tego enzymu.

Imidaza ze szczurzej wątroby ma również zdolność katalizowania reakcji hydrolizy cyklicznych organicznych węglanów jak węglan etylenowy (**48**), który jest hydrolizowany do glikolu etylenowego (**49**) [53]. Jest to reakcja nietypowa dla tego enzymu, gdyż hydrolizowane jest wiązanie estrowe, a nie imidowe.



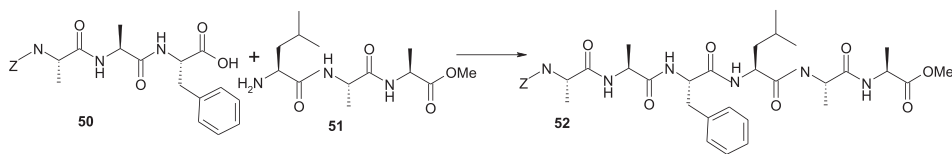
Schemat 22
Scheme 22

2.5. PEPSYNA

Pepsyna i trypsina to proteazy, czyli enzymy hydrolizujące wiązania peptydowe.

Surowe ekstrakty pepsyny były przygotowywane z żołądków różnych zwierząt, np. ryb [54] (homogenizacja z acetonem, zawieszenie w buforze o pH 6 i liofilizacja) i indyka [55] (ekstrakcja z użyciem HCl).

Enzym ten zastosowano jako katalizator syntezy peptydów [56]. Pepsyna immobilizowana na Celicie wykazywała aktywność syntazy w rozpuszczalnikach organicznych, jak acetonitryl, chlorek metylenu, etanol. Przykład syntezy peptydu z zastosowaniem pepsyny podano poniżej:



Schemat 23
Scheme 23

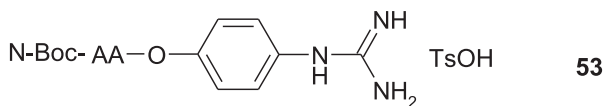
Wydajność wyniosła 90%. Metoda była efektywna w syntezie hydrofobowych peptydów, które nie mogą być syntetyzowane w rozpuszczalnikach wodnych.

2.6. TRYPSYNA

Ekstrakty trypsyny były izolowane z wnętrzości różnych gatunków ryb [57]. Wszystkie procedury były podobne (homogenizacja śledziona z acetonem, wirowanie, zawieszenie w buforze Tris-HCl i liofilizacja oraz czasem frakcjonowanie siarczanem amonu).

Trypsyna zwykle katalizuje hydrolizę wiązań peptydowych i jest często używana do dzielenia białek na mniejsze peptydy przed ich analizą w spektrometrze masowym. Jednak enzym ten ma również inne własności katalityczne. Trypsyna była użyta do badania kinetyki hydrolizy pochodnych aminokwasów: estrów metyloowych chlorowodorów *L*-argininy, *L*-homoargininy i *L*-ornityny [58]. Stwierdzono, że acylowanie enzymu jest szybkie, a deacylowanie kompleksu enzym-substrat jest etapem limitującym. Ester argininy był najlepszym substratem, zaś ester ornityny był hydrolizowany najwolniej i z najmniejszą stereoselektywnością.

Również hydroliza *p*-guanidynofenylowych estrów aminokwasów (53) i peptydów była przeprowadzana z użyciem trypsyny [59] (na Rysunku 1 skrót AA oznacza resztę aminokwasową).



Rysunek 1
Figure 1

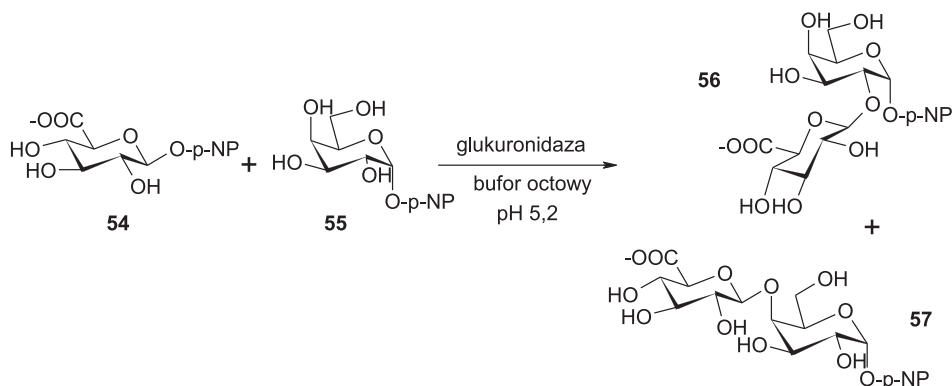
Badania wykazały, iż takie pochodne *D*- i *L*-aminokwasów mają duże powinowactwo do trypsyny, podobne do powinowactwa dla typowych substratów (*L*-lizyny i *L*-argininy). Natomiast *D* aminokwasy są wolniej acylowane niż enancjomery *L*.

2.7. HYDROLAZY ALDOHEKSOZ

Są to enzymy hydrolizujące wiązania glikozydowe pomiędzy resztami cukrowymi. Można je również stosować do reakcji syntezy oligosacharydów. Przykłady takich zastosowań przedstawiono poniżej.

2.7.1. β -Glukuronidaza

β -Glukuronidaza z wątroby wołowej była biokatalizatorem użytym w syntezie disacharydów zawierających β -*D*-glukuronian [60].



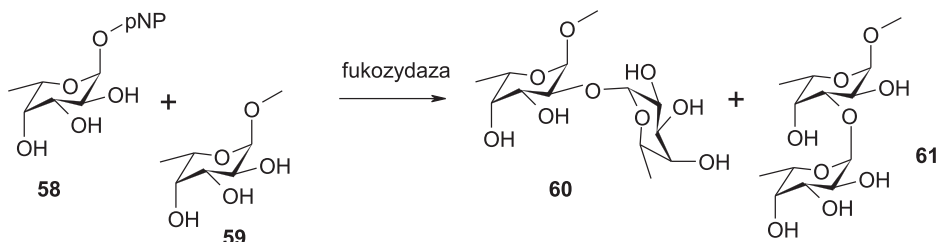
Schemat 24
Scheme 24

p-Nitrofenylo- β -*D*-glukuronian (54) był użyty jako donator, a *p*-nitrofenylo-galaktopiranoza (55) jako akceptor. Produkty 1 \rightarrow 2 (56) i 1 \rightarrow 4 (57) otrzymano z wydajnością 21% i 16%. Substraty zawierają po kilka grup hydroksylowych, zatem jest dużo teoretycznie możliwych produktów. Powstawanie tylko dwóch z nich świadczy o bardzo dużej selektywności enzymu. Powstało 40% produktów transglikozylacji, co jak na enzym hydrolityczny jest dobrym wynikiem.

2.7.2. α -L-Fukozydaza

α -L-Fukozydaza była izolowana z kilkunastu zwierząt (gadów, płazów, ptaków i ssaków) [61]. U różnych gatunków różne tkanki były bogate w ten enzym, głównie wątroba, nerki, śledziona. Stężenie tego enzymu w organizmie jest niewielkie i uzyskanie dostatecznie czystego do przeprowadzenia reakcji enzymu wymagało dokładnego oczyszczenia metodami chromatograficznymi.

α -L-Fukozydaza z mięczaków i psa ma aktywność trans glikozydazy [62]. Donorem fukozy był *p*-nitrofenylo- α -L-fukopiranozyd (58). Jako akceptory stosowano różne zmetylowane cukry. Typową reakcję przedstawiono na Schemacie 25.

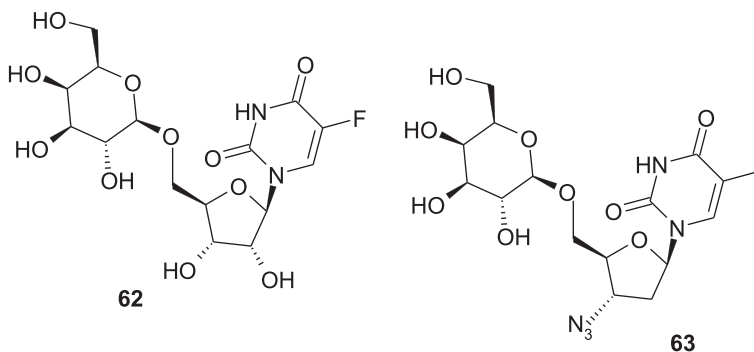


Schemat 25
Scheme 25

Najlepszymi akceptorami były zmetylowana α -L-fukoza (α -L-Fuc-O-Me, 59) i zmetylowana β -D-galaktoza (β -D-Gal-O-Me). Regioselektywność zależy od akceptora: w przypadku α -L-Fuc-O-Me produkty 1 \rightarrow 2 (60) i 1 \rightarrow 3 (61) powstawały w proporcji 45/55, w przypadku β -D-Gal-O-Me produkty 1 \rightarrow 2, 1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6 otrzymano w proporcji 45/42/13. W drugim przypadku izolowano nie tylko di-, ale też tri- i tetrasacharydy. Posiadały one resztę fukozy w różnych pozycjach.

2.7.3. β -Galaktozydaza

β -Galaktozydazę zastosowano do syntezy β -galaktozylowanych pochodnych nukleozydów (Rys. 2), które mają aktywność antynowotworową i anty HIV [63]. Mimo że grupa 5'-hydroksylowa w nukleozydach jest nieaktywna, β -galaktozydaza z mięczaka pozwoliła otrzymać 5'- β -galaktozylonukleozydy ze świetną regioselektywnością.



Rysunek 2
Figure 2

5'-O- β -Galaktozylo-5-fluorourydyna (**62**) (pochodna leku przeciwnowotworowego) była otrzymana z wydajnością 60%, a 5'-O- β -galaktozylo-3'-azydo-3'-deoksytymidyna (**63**) (pochodna leku anty HIV) z wydajnością 43%. Analogi nukleozydów innych zasad otrzymano z niską wydajnością, ponieważ posiadają one grupy aminowe bardziej reaktywne niż hydroksylowe i glikozylacja zachodziła głównie na grupie aminowej.

2.7.4. α -Glukozydaza

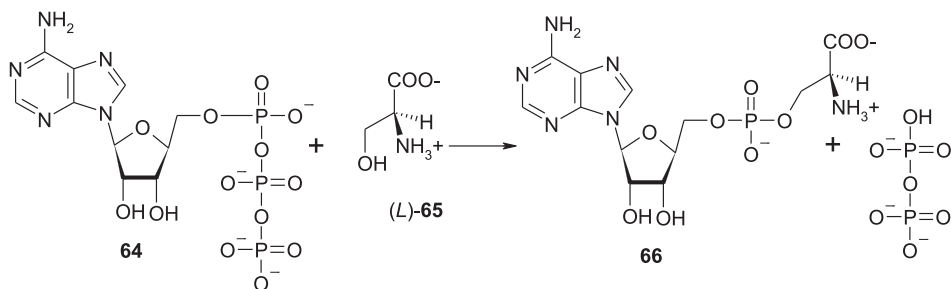
α -Glukozydaza również wykazuje aktywność transferazy. W pH 5,8 z użyciem p-nitrofenylo- α -D-glukozy jako substratu, katalizuje przeniesienie α -D-glukozy na celobiozę, sacharozę i izomaltozę. Na początku tworzy się głównie wiązanie 1 \rightarrow 4, ale później kumuluje się produkt 1 \rightarrow 6. Enzym ten katalizuje również glikozylację pirydoksyny [64].

2.8. PIROFOSFATAZY NUKLEOTYDÓW (NPP)

NPP katalizują reakcje:



gdzie X jest oligofosforanem lub resztą alkoholu, a NMP jest dowolnym 5'-nukleotydem. Pirofosfatazy nukleotydydów zastosowano również, jako katalizator reakcji alkoholizy [65]. Badano takie reakcje pirofosfataz pochodzących z wnętrza wołowych, wątroby szczurzej i ludzkiego serum. Stwierdzono, że NPP mają w tych reakcjach aktywność transferazy.



W przypadku wołowej i ludzkiej NPP tworzyły się estry (**66**) tylko w przypadku zastosowania alkoholu metylowego bądź etylowego. Natomiast pirofosfataza ze szczurzej wątroby katalizuje reakcje z glicerolem, seryną (**65**), glikolem polietylenowym, glicerolo-2-fosforanem.

PODSUMOWANIE

Na podstawie przytoczonego piśmiennictwa stwierdzono, iż tkanki zwierzęce są źródłem bardzo wielu hydrolaz, używanych jako biokatalizatory różnorodnych reakcji. Widać, że największe zastosowanie znalazły lipaza z trzustki wieprzowej i esteraza z wątroby wieprzowej.

Znane są przykłady stosowania enzymów immobilizowanych, pokazano to dla PPL (otrzymywanie (*R*)-glicydołu) i PLE (otrzymywanie lewofloksacyny).

W pracy zostały pokazane reakcje, w których enzymy pochodzenia zwierzęcego nierzadko okazywały się wydajniejszymi biokatalizatorami niż te z mikroorganizmów. Wskazano również zastosowania produktów reakcji enzymatycznych do dalszej syntezy, np. leków.

PODZIĘKOWANIA

Praca wykonana w ramach projektu „Biotransformacje użyteczne w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym” No. POIG.01.03.01-00-158/09-01 częściowo finansowana przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] J. Bryjak, *Wiad. Chem.*, 2004, **58**, 691.
- [2] R.K. Murray, D.K. Granner, P.A. Mayes, V. Rodwell, *Harper's Illustrated Biochemistry*, McGraw-Hill, 2003, 49.
- [3] P. Kielbasiński, R. Ostaszewski, W. Szymański, *Enzymatic Catalysis Today and tomorrow*, [w:] *Novel Concepts in Catalysis and Chemical Reactors*, pod redakcją A. Cybulski, J.A. Moulijn, A. Stankiewicz, WILEY-VCH, 2010, 95.
- [4] Ch.-W. Garner, L.C. Smith, *J. Biol. Chem.*, 1972, **247**, 561.
- [5] N.N. Ghandi, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1997, **74**, 621.
- [6] F. Theil, *Chem. Rev.*, 1995, **95**, 2203.
- [7] C. Chapus, M. Rovey, L. Sarda, R. Verger, *Biochimie*, 1988, **70**, 1223.
- [8] U.R. Kalkote, A.N. Purude, V.G. Puranik, M.K. Gurjar, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 2006, **40**, 38.
- [9] N. Nazir, S. Koul, M.A. Qurishi, S.C. Taneja, G.N. Qazi, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 2009, **59**, 121.
- [10] M. Pregnotato, M. Terreni, I.E. de Fuentes, A.R. Alcantara Leon, P. Sabuquillo, R. Fernandez-Lafuente, J.M. Guisan, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 2001, **11**, 757.
- [11] J. Chen, W. Shum, *Tetrahedron Lett.*, 1995, **36**, 2379.
- [12] D. Koszelewski, A. Redzej, R. Ostaszewski, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 2007, **47**, 51.
- [13] T. Takemura, G. Emoto, J. Satoh, Y. Kobayashi, C. Yaginuma, Y. Takahashi, T. Utsukihara, C.A. Horiuchi, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 2008, **55**, 104.
- [14] A. Abate, E. Brenna, C. Fuganti, F.G. Gatti, S. Serra, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 2004, **32**, 33.
- [15] S.-T. Chen, J.-M. Fang, *J. Org. Chem.*, 1997, **62**, 4349.
- [16] C. Bonini, C. Cazzato, E. Cernia, C. Palocci, S. Soro, L. Viggiani, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 2001, **16**, 1.
- [17] T. Miyazawa, M. Shimaoka, T. Yamada, *Biotechnol. Lett.*, 1991, **21**, 309.
- [18] A.N.A. Aryee, B.K. Simpson, R. Villalonga, *Enzyme Microb. Tech.*, 2007, **40**, 394.
- [19] J. De Caro, F. Ferrato, R. Verger, A. De Caro, *BBA Gen. Subjects*, 1995, **1252**, 321.
- [20] D. Guerrier, H. Pellet, *FEBS Lett.*, 1979, **106**, 115.
- [21] J.M. Steiner, D.A. Williams, *Biochimie*, 2002, **84**, 1243.
- [22] C.J. O'Connor, R.H. Barton, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 1998, **4**, 161.
- [23] J. Bryan Jones, *Pure & Appl. Chem.*, 1990, **62**, 1445.
- [24] T. Panda, B.S. Gowrishankar, *Appl. Microbiol. Biot.*, 2005, **67**, 160.
- [25] M. Mroczkiewicz, A. Fryszkowska, R. Ostaszewski, *Biotechnologia*, 2005, **2**, 32.
- [26] a) W.M. Connors, A. Pihl, A.L. Dounce, E. Stotz, *J. Biol. Chem.*, 1950, **184**, 29; b) K. Adachi, S. Kobayashi, M. Ohno, *Chimia*, 1986, **40**, 311.
- [27] M. Hermann, M.U. Kietzmann, M. Ivancić, C. Zenzmaier, R.G.M. Luiten, W. Skranc, M. Wubolts, M. Winkler, R. Birner-Gruenberger, H. Pichler, H. Schwab, *J. Biotech.*, 2008, **133**, 301.
- [28] A. Musidłowska-Persson, U.T. Bornscheuer, *Tetrahedron-Asymmetr.*, 2003, **14**, 1341.
- [29] A. Solis, S. Garcia, H.I. Perez, N. Manjarrez, H. Luna, *Tetrahedron-Asymmetr.*, 2008, **19**, 549.
- [30] P.S. Vankar, I. Bhattacharya, Y.D. Vankar, *Tetrahedron-Asymmetr.*, 1996, **7**, 1683.
- [31] Y.D. Vankar, G. Kumaravel, I. Bhattacharya, P.S. Vankar, K. Kaur, *Tetrahedron*, 1995, **51**, 4829.
- [32] S.-Y. Lee, B.-H. Min, S.-H. Hwang, Y.-M. Koo, C.-K. Lee, S.-W. Song, S.-Y. Oh, S.-M. Lim, S.-L. Kim, D.-I. Kim, *Biotechnol. Lett.*, 2001, **23**, 1033.
- [33] C. Pichon, M.-E. Martin-Gourdel, D. Chauvat, C. Alexandre, F. Huet, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 2004, **27**, 65.
- [34] R.J. Kazlauskas, *Organic Syntheses*, 1992, **70**, 60.
- [35] A. Ishii, V.A. Soloshonok, K. Mikami, *J. Org. Chem.*, 2000, **65**, 1597.
- [36] N. Komatsu, M. Hashizume, T. Sugita, S. Uemura, *J. Org. Chem.*, 1993, **58**, 4529.

- [37] S. Drioli, F. Felluga, C. Forzato, P. Nitti, G. Pitacco, E. Valentin, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 1997, **3**, 203.
- [38] S. Coriani, C. Forzato, G. Furlan, P. Nitti, G. Pitacco, M. Ringholm, K. Ruud, *Tetrahedron-Asymmetr.*, 2009, **20**, 1459.
- [39] A. Comini, C. Forzato, P. Nitti, G. Pitacco, E. Valentin, *Tetrahedron-Asymmetr.*, 2004, **15**, 617.
- [40] C. Forzato, G. Furlan, P. Nitti, G. Pitacco, E. Valentin, E. Zangrando, P. Buzzini, M. Goretti, B. Turchetti, *Tetrahedron-Asymmetr.*, 2008, **19**, 2026.
- [41] R. Sanchez, H. Luna, H.I. Perez, N. Manjarrez, A. Solis, *Tetrahedron-Asymmetr.*, 2001, **12**, 1399.
- [42] K.X. Chen, F.G. Njoroge, J. Pichardo, A. Prongay, N. Butkiewicz, N. Yao, V. Madison, V. Girijavallabhan, *J. Med. Chem.*, 2006, **49**, 567.
- [43] H. Matter, M. Schudok, W. Schwab, W. Thorwart, D. Barbier, G. Billen, B. Haase, B. Neises, K.-U. Weithmann, T. Wollmann, *Bioorgan. Med. Chem.*, 2002, **10**, 3529.
- [44] R. Wrigglesworth, C.S.J. Walpol, S. Bevan, E.A. Campbell, A. Dray, G.A. Hughes, I. James, K.J. Masdin, J. Winter, *J. Med. Chem.*, 1996, **39**, 4942.
- [45] A. Dray, *Biochem. Pharmacol.*, 1992, **44**, 611.
- [46] K. Kobata, K. Yoshikawa, M. Kohashi, T. Watanabe, *Tetrahedron-Lett.*, 1996, **37**, 2789.
- [47] I. Regla, H. Luna, H.I. Perez, P. Demare, I. Bustos-Jaimes, V. Zaldivar, M.L. Calcagno, *Tetrahedron-Asymmetr.*, 2004, **15**, 1285.
- [48] C.-Y. Chang, T.-K. Yang, *Tetrahedron-Asymmetr.*, 2003, **14**, 2239.
- [49] Z. Liu, Z. Zhen, Z. Zuo, Y. Wu, A. Liu, Q. Yi, W. Li, *J. Biochem.*, 2006, **139**, 421.
- [50] Y.-S. Yang, S. Ramaswamy, W.B. Jakoby, *J. Biol. Chem.*, 1993, **268**, 10870.
- [51] T.-M. Su, Y.-S. Yang, *Protein Expres. Purif.*, 2000, **19**, 289.
- [52] J. Kautz, K.D. Schnackerz, *Eur. J. Biochem.*, 1989, **181**, 431.
- [53] Y.-L. Yang, S.G. Ramaswamy, W.B. Jacoby, *J. Biol. Chem.*, 1998, **273**, 7814.
- [54] S. Klomklao, H. Kishimura, M. Yabe, S. Benjakul, *Comp. Biochem. Phys. B*, 2007, **147**, 682.
- [55] H. Temiz, U. Aykut, E. Okumus, S. Turhan, *Biotechnol. Bioproc. E.*, 2007, **12**, 450.
- [56] I.Y. Filippova, E.N. Lysogorskaya, *Russ. J. Bioorg. Chem.*, 2003, **29**, 496.
- [57] a) R. Balti, A. Barkia, A. Bougatef, N. Ktari, M. Nasri, *Food Chem.*, 2009, **113**, 146; b) I. Kurtovic, S.N. Marshall, B.K. Simpson, *Comp. Biochem. Phys. B*, 2006, **143**, 432; c) H. Kishimura, K. Hayashi, *Comp. Biochem. Phys. B*, 2002, **132**, 485; d) S. Klomklao, S. Benjakul, W. Visessanguan, K. Kishimura, B.K. Simpson, H. Saeki, *Comp. Biochem. Phys. B*, 2006, **144**, 47; e) S. Klomklao, H. Kishimura, Y. Nonami, S. Benjakul, *Food Chem.*, 2009, **115**, 155.
- [58] N.J. Baines, J.B. Baird, D.T. Elmore, *Biochem. J.*, 1964, **90**, 470.
- [59] H. Sekizaki, K. Itoh, E. Toyota, K. Tanizawa, *Chem. Pharm. Bull.*, 1996, **44**, 1577.
- [60] V. Langlois, J. Parisot, V. Bonnet, C. Rabiller, *Tetrahedron-Asymmetr.*, 2002, **13**, 2369.
- [61] B.J. Honas, U.M. Glassman, T.J. Wiese, *Comp. Biochem. Phys. B*, 2009, **153**, 359.
- [62] O. Berteau, J. Bielicki, A. Kilonda, D. Machy, D.S. Anson, L. Kenne, *Biochem.*, 2004, **43**, 7881.
- [63] G. Andreotti, A. Trincone, A. Giordano, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 2007, **47**, 28.
- [64] G. Andreotti, A. Giordano, A. Tramice, E. Mollo, A. Trincone, *J. Biotech.*, 2006, **122**, 274.
- [65] J.C. Cameselle, A. Agudo, J. Canales, M.J. Costas, A. Fernandez, A. Flores, M. Garcia-Diaz, S. Gonzalez-Santiago, J. Lopez-Gomez, J.M. Ribeiro, J.M. Vergeles, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 2001, **11**, 469.

**ZASTOSOWANIA WYBRANYCH ENZYMÓW
Z TKANEK ZWIERZĘCYCH W SYNTEZIE
ORGANICZNEJ I BIOKATALIZIE, CZĘŚĆ II.
OKSYDOREDUKTAZY, TRANSFERAZY, LIAZY,
IZOMERAZY**

**APPLICATIONS OF ENZYMES FROM ANIMAL TISSUES
IN ORGANIC SYNTHESIS, PART 2**

Hanna Hibner¹, Ryszard Ostaszewski^{*2}

¹ *Wydział Chemiczny Politechniki Warszawskiej
ul. Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa*

² *Instytut Chemii Organicznej Polskiej Akademii Nauk
ul. Kasprzaka 44/52, 01-224 Warszawa
e-mail: rysza@icho.edu.pl*

Abstract

Wprowadzenie

1. Kofaktory

2. Zastosowania enzymów; 2.1. Wybrane zastosowania oksydoreduktaz w syntezie organicznej; 2.1.1. Dehydrogenaza alkoholowa z wątroby końskiej (HLADH); 2.1.1.1. Reakcje utleniania; 2.1.1.2. Reakcje redukcji; 2.1.2. Dehydrogenaza mleczanowa; 2.1.3. Dehydrogenaza glutaminianowa; 2.1.4. Reduktaza karbonylowa; 2.1.5. Katalaza; 2.2. Wybrane zastosowania transferaz w syntezie organicznej; 2.2.1. Transaldolaza; 2.2.2. Galaktozylotransferaza; 2.2.3. Transferaza UDP-glukozy; 2.2.4. Fukozylotransferaza; 2.2.5. Syntaza difosforanu farnezyli; 2.3. Zastosowania liaz w syntezie organicznej; 2.3.1. Dekarboksylaza DOPA (3,4-dihydroksyfenyloalaniny); 2.3.2. Aldolazy; 2.4. Zastosowania izomeraz w syntezie organicznej; 2.4.1. *N*-acylo-*D*-glukozamino-2-epimeraza (GlcNAc-2-epimeraza); 2.5. Ligazy

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane



Hanna Hibner w 2011 r. ukończyła studia inżynierskie, Biotechnologię na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej. Obecnie kontynuuje naukę na studiach magisterskich na tym samym kierunku. Od 2010 r. bierze udział w projekcie Innowacyjna Gospodarka „Biotransformacje użyteczne w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym” realizowanym w Instytucie Chemii Organicznej PAN w Warszawie.



Prof. dr hab. inż. Ryszard Ostaszewski w roku 1984 ukończył studia magisterskie na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej; specjalność Chemia i Technologia Ciała Stałego. W tym roku rozpoczął staż w Instytucie Chemii Organicznej (IChO) PAN w Warszawie i po roku obowiązkowej służby wojskowej (1985) rozpoczął studia doktoranckie (1986). Pracę doktorską z zakresu chemii supramolekularnej wykonywał w zespole prof. Janusza Jurczaka, którą obronił z wyróżnieniem w 1989 roku. Zaraz po zakończeniu doktoratu został zatrudniony na stanowisku adiunkta w IChO PAN

gdzie pracuje do chwili obecnej. Odbił dwumiesięczny staż naukowy w zespole prof. D.N. Reinhoudta, Uniwersytet Twente, Holandia, oraz roczny staż w tym samym ośrodku (1989/1990). Kolejny roczny staż naukowy już, jako stypendysta ETH odbył u profesora H.J. Hansena, Uniwersytet Zurych, Szwajcaria (1994/1995). W roku 1999 obronił pracę habilitacyjną, którą także wykonał w IChO PAN. W roku 2009 otrzymał tytuł profesora. Pracował na Wydziale Chemicznym, Międzywydziałowym Centrum Biotechnologii oraz Wydziale Inżynierii Chemicznej i Procesowej PW w latach 2000–2009. Jest autorem bądź współautorem 65 publikacji naukowych z listy filadelfijskiej, jednego rozdziału z książki Wiley „Novel Concepts in Catalysis and Chemical Reactors: Improving the Efficiency for the Future”, pięciu patentów oraz 25 innych publikacji. Wypromował czterech doktorów nauk chemicznych i jest promotorem kolejnych czterech doktoratów. Jego zainteresowania naukowe związane są ze stereokontrolowaną syntezą organiczną, chemią reakcji multikomponentowych, biokatalizą, biotechnologią oraz chemią medyczną.

ABSTRACT

This work shows systematically known types of animal enzymes and their applications in synthesis of pharmaceuticals and nonracemic organic compounds. It lays out similarities in procedures of isolation and purification of particular enzymes. Such procedures usually are so simple that they can be used in every industrial or research laboratory.

Most animal enzymes are well-investigated and their structures and substrate specificity are known. They are used as biocatalysts in many chemical processes. Others were used in one or a few reactions but their natural substrates and biochemical properties are described. Trials of predicting potential applications of such enzymes and other substrates for them were performed.

Typical applications of:

- Oxidoreductases: horse liver alcohol dehydrogenase [3–13], lactate dehydrogenase [16–18], glutamate dehydrogenase [19, 20], carbonyl reductase [24], catalase [27];
- Transferases: transaldolase [29], galactosyltransferase [30], UDP-glucuronosyltransferase [31], fucosyltransferase [34], farnesyl diphosphate synthase [35];
- Lyases: DOPA decarboxylase [38, 39], aldolase [42];
- Isomerases: *N*-acyl-*D*-glucosamine 2-epimerase [44]

were described.

Also examples of or recombined [24, 39, 44] enzymes are given in the text. These modifications enhance catalytic properties or reduce costs of using enzymes.

In practical applications a biocatalytic effect of enzymes from animal sources is often compared with microbial ones. This text is focused on processes where animal enzymes gave much better results (yield and enantioselectivity) than microorganisms. They are also proper, unlike whole microorganisms, to investigate and computer analysis of mechanism of the reaction. Enzymes isolated from animal tissues usually have well-defined structure of active site which is a key to predict mechanisms.

A quantitative analysis of applications of these enzymes was performed. Among animal enzymes hydrolases and oxidoreductases have found the most applications in synthesis. Transferases are also often used. Other classes of enzymes seldom act as biocatalysts. It is general tendency, true also in relation to microbial and plant enzymes.

Key words: animal enzymes, biocatalysis, organic synthesis, applications of enzymes

Słowa kluczowe: enzymy zwierzęce, biokataliza, synteza organiczna, zastosowania enzymów

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

| | |
|--------------|---|
| AcOH | – kwas octowy |
| AldDH | – dehydrogenaza aldehydowa |
| DOPA | – 3,4-dihydroksyfenyloalanina |
| ee | – nadmiar enancjomeryczny |
| FMN | – mononukleotyd flawinowo adeninowy |
| Fuc | – fukoza |
| GDH | – dehydrogenaza glutaminianowa |
| GDP | – guanozynodifosforan |
| GlcNAc | – N-acetyloglukozamina |
| HLADH | – dehydrogenaza alkoholowa z wątroby końskiej |
| LDH | – dehydrogenaza mleczanowa |
| NADH | – dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy |
| NE | – norepinefryna |
| Neu5Ac | – kwas N-acetyloneuraminowy |
| Ni (Ra) | – nikiel Raney'a |
| <i>p</i> -NP | – <i>para</i> -nitrofenol |
| PLP | – pirydoksyno-5'-fosforan |
| <i>rac</i> | – racemat |
| rPHCR | – rekombinowana reduktaza karbonylowa z serca świni |
| UDP | – urydynodifosforan |

WPROWADZENIE

Ważnym wyzwaniem w syntezie organicznej jest uzyskanie odpowiednich produktów w reakcjach o wysokiej chemo-, regio- i stereoselektywności.

Ponieważ katalizatory chemiczne nie zawsze umożliwiają przeprowadzenie odpowiednich reakcji w zadowalający sposób, warto zwrócić uwagę na reakcje, które są katalizowane przez enzymy. W pierwszej części tego opracowania przedstawiono zastosowania hydrolaz w syntezie organicznej. Wynika to z tego, iż ta klasa enzymów znalazła zdecydowanie najszersze zastosowanie w syntezie. W niniejszej części zostały przedstawione zastosowania oksydoreduktaz, transferaz, liaz i izomeraz. Enzymy należące do tych klas nie znalazły, aż tak szerokiego zastosowania, ale zdecydowanie powinno się to szybko zmieniać. Niestety odpowiednie dane literaturowe zostały opublikowane nie tylko w czasopismach chemicznych, co bardzo utrudnia zapoznanie się z tym zagadnieniem. Dlatego w tej części opracowania przedstawiono znane zastosowania enzymów należących do odpowiednich klas tak, aby w możliwie przejrzysty sposób usystematyzować dane literaturowe. Szczególnie hydrolazy i oksydoreduktazy znalazły szerokie zastosowanie w syntezie złożonych produktów końcowych, które zwykle posiadają wysoką cenę jednostkową [1].

1. KOFAKTORY

Często do prawidłowego działania enzymy wymagają obecności kofaktorów, czyli związków chemicznych o małej masie cząsteczkowej, nieorganicznych (takich jak jony metali) bądź organicznych, (dla których dinukleotyd nikotynoamidoadeniny – NADH jest dobrym przedstawicielem). Ten fakt jest często pomijany w literaturze. Należy jednak podkreślić, że bez kofaktorów aktywność szeregu enzymów jest niewielka, co rzutuje na uzyskiwane wyniki i prowadzi do błędnych wniosków. Zastosowanie nieoczyszczonych preparatów biologicznych, które jak może się wydawać nie są zbyt atrakcyjnymi biokatalizatorami, zapewnia obecność kofaktorów, co przekłada się na ich wysoką aktywność katalityczną. Warto więc w przesiewowych badaniach laboratoryjnych, których celem jest tylko znalezienie dogodnego biokatalizatora stosować takie preparaty.

2. WYBRANE ZASTOSOWANIA ENZYMÓW

2.1. WYBRANE ZASTOSOWANIA OKSYDOREDUKTAZ W SYNTEZIE ORGANICZNEJ

Oksydoreduktazy są to enzymy, które katalizują reakcje utleniania i redukcji. Utleniają np. grupy hydroksylowe, aminowe, jony metali, wiązania pojedyncze

węgiel-węgiel do wiązań podwójnych. Redukują np. grupy karbonylowe. Kofaktory takie jak NAD(P)H, mononukleotyd flawinowo adeninowy (FMN), są niezbędne do prawidłowego działania tych enzymów ponieważ umożliwiają regenerację biokatalizatora.

2.1.1. Dehydrogenaza alkoholowa z wątroby końskiej (HLADH)

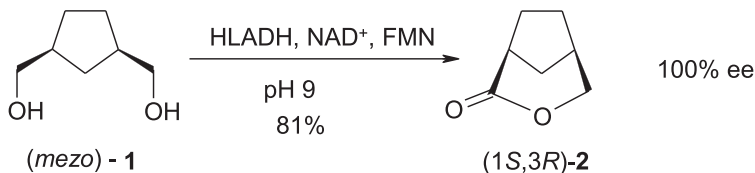
Dehydrogenazy to podklasa oksydoreduktaz katalizująca reakcje odszczepienia wodoru od cząsteczki. Dehydrogenaza alkoholowa znalazła zastosowanie, jako biokatalizator zarówno w reakcjach utleniania jak i redukcji.

Typowa, szeroko stosowana procedura izolacji tego enzymu została opisana przez Dalziela [2].

2.1.1.1. Reakcje utleniania

HLADH znalazł szerokie zastosowanie w reakcjach utleniania dioli:

a) Dzięki zastosowaniu tego enzymu w reakcji utleniania 1,3-mezo-dioli [3] (takich jak związek **1**) do laktonów otrzymano enancjomerycznie czyste bicykliczne [3.2.1] laktony o strukturze związku **2** oraz jego analogi i [3.3.1] laktony, które są cennymi intermediami w syntezie organicznej.



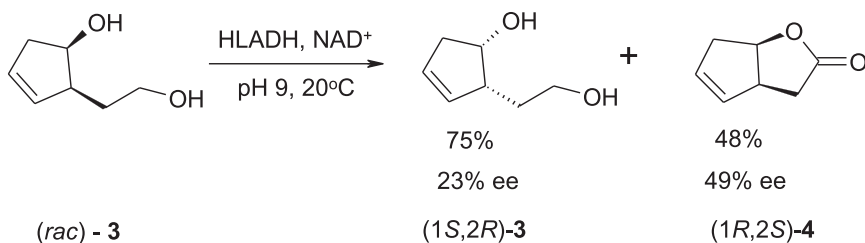
Schemat 1
Scheme 1

Jak pokazano na Schemacie 1, lakton **2** otrzymano z wysoką wydajnością oraz nadmiarem enancjomerycznym wynoszącym 100%. Analogiczne związki otrzymano z podobną wydajnością. Aby umożliwić regenerację dinukleotydu nikotynoamido-adeninowego (NAD⁺), do reakcji dodano mononukleotyd flawinowo adeninowy (FMN). Dodatek FMN znacznie zwiększa koszty syntezy, ale jest to dużo tańsze niż dodawanie NAD⁺ w większej ilości i nie regenerowanie go. Przeprowadzone badania wykazały, że diole z pierścieniem cyklopentanowym bądź cykloheksanowym są akceptowane przez enzym. Wykazano ponadto, że *cis*-1,3-bis(hydroksymetylo)cycloheksan i (1*R*,3*S*,5*R*)-*syn-anti*-1,3-bis(hydroksymetylo)-5-(metoksymetylo)cycloheksan były doskonałymi substratami dla tego enzymu.

b) Również utlenianie 1,2-mezo-dioli w warunkach analogicznych do przedstawionych na Schemacie 1, jest katalizowane przez ten enzym [4]. Takie lak-

tony są ważnymi substratami do syntezy leków i biocydów, np. lakton cyklobutanowy był dalej przekształcany do grandizolu – feromonu używanego do ochrony upraw bawełny przed wołkiem zbożowym. Utlenianie *cis-mezo* dioli dało bardzo dobre rezultaty. Natomiast utlenianie racemicznych *trans* dioli przebiegało z niską wydajnością i uzyskiwano produkty racemiczne. Aby to wyjaśnić zaproponowano model sześciennych przestrzeni w miejscu aktywnym, w którym oba izomery *trans* wpasowują się dobrze w te przestrzenie, co wyjaśnia tworzenie racemicznych produktów.

c) HLADH katalizuje również utlenianie hydroksycyklopentenów [5] takich jak związek **3** do laktonów, co pokazano na Schemacie 2.



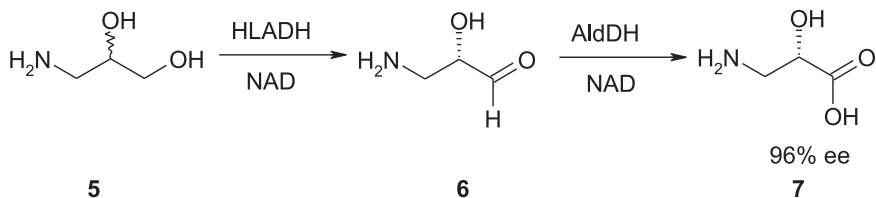
Schemat 2
Scheme 2

Wydajność liczona jest względem odpowiedniego enancjomeru substratu. Dzięki zastosowaniu tego enzymu reakcja jest regio- i enancjoselektywna. Regioselektywność reakcji jest zgodna z przewidywaniami, tzn. utleniana jest pierwszorzędowa, a nie drugorzędowa grupa hydroksylowa, co prowadzi do powstania laktonu **4** i odzyskiwany jest wzbogacony enancjomerycznie substrat (1S,2R)-**3**. Produkty otrzymywane są z umiarkowanymi nadmiarami enancjomerycznymi.

Otrzymywanie optycznie czynnych laktonów z wykorzystaniem różnych biotransformacji zostało opisane [6]. W niniejszej pracy przedstawiono kilka przykładów otrzymywania laktonów z zastosowaniem enzymów zwierzęcych.

d) Zastosowanie HLADH oraz dehydrogenazy aldehydowej immobilizowanych razem w żelu poliakrylamidowym umożliwiło utlenianie dioli (np. związku **5**) do L- α -hydroksykwasów [7]. Kwas 3-amino-2-hydroksypropionowy (**7**) otrzymany w ten sposób może być wykorzystany do syntezy blokerów receptorów β -adrenergicznych, które są stosowane jako leki.

Jest to interesujący przykład współdziałania dwóch różnych enzymów. Zgodnie z ideą przedstawioną na Schemacie 3, najpierw dehydrogenaza alkoholowa utlenia pierwszorzędową grupę hydroksylową diolu do aldehydu **6**, a następnie dehydrogenaza aldehydowa utlenia powstałą grupę związku **6** do grupy karboksylowej kwasu **7**. Konwersja aldehydu do kwasu przesunęła równowagę pierwszej reakcji w stronę produktu, co zwiększa wydajność całej przemiany.



Schemat 3

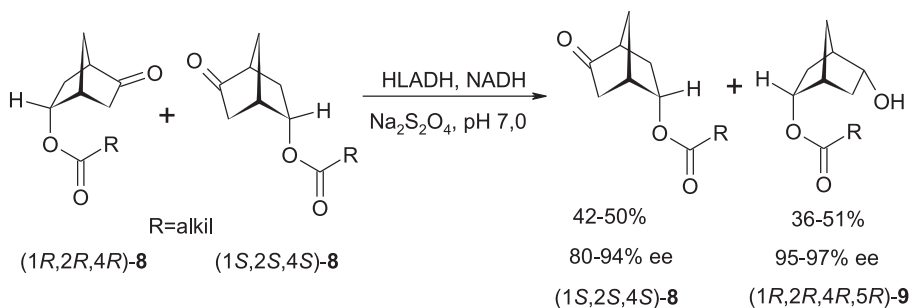
Scheme 3

Zastosowanie drożdżowej dehydrogenazy alkoholowej pokazało, że enzym ten był niestabilny i mniej aktywny w przypadku utleniania dioli i α -aminoalkoholi.

2.1.1.2. Reakcje redukcji

Dehydrogenaza alkoholowa jest również szeroko stosowana w reakcjach redukcji aldehydów i ketonów. Enancjoselektywne redukcje katalizowane odczynnikami organicznymi są zwykle bardzo trudne do przeprowadzenia szczególnie, gdy odpowiednie reakcje mają być enacjo- i diastereoselektywne.

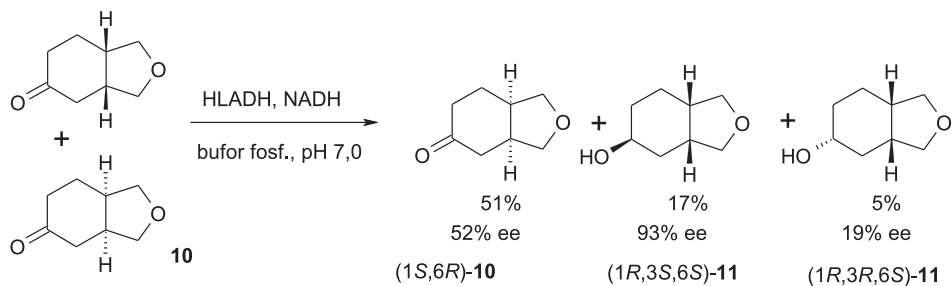
- a) Typowe zastosowanie tego enzymu do redukcji bicyklicznych ketonów [8] przedstawione jest na Schemacie 4. Alkohole **9** otrzymano z dobrymi wydajnościami i nadmiarami enancjomerycznymi wynoszącymi 95–97%. Najlepsze rezultaty otrzymano, gdy jako grupę karboksylową w substracie **8** zastosowano resztę kwasu propionowego. Hydrofobowe łańcuchy boczne ketonów (**8**) oddziałują z hydrofobową strefą miejsca aktywnego enzymu, co zwiększa stabilizację kompleksu enzym–substrat. Reakcja była enancjoselektywna (tylko jeden z enancjomerów substratu jest redukowany) i diastereoselektywna (tworzy się drugie centrum stereogeniczne i powstaje tylko jeden z możliwych diastereoizomerów).



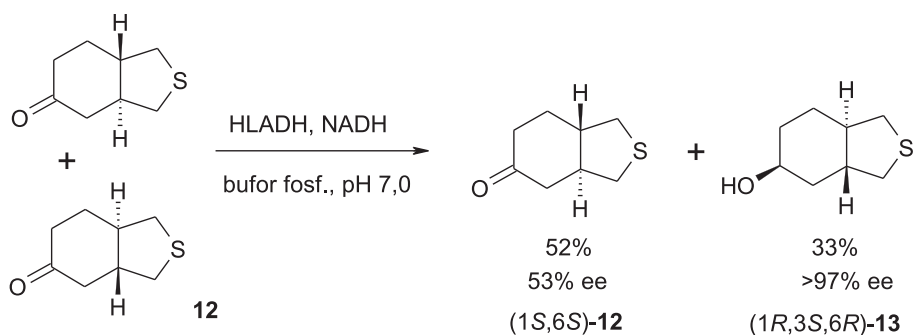
Schemat 4

Scheme 4

b) Zastosowano HLADH również do redukcji heterocyklicznych ketonów [9], co przedstawiono na Schematach 5 i 6.



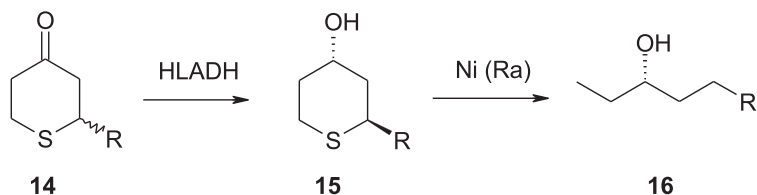
Schemat 5
Scheme 5



Schemat 6
Scheme 6

Stwierdzono, że substraty zawierające tlen (**10**) lub siarkę (**12**) są dobrze akceptowane przez HLADH, a ich redukcja przebiega tak jak dla węglowych analogów. Zauważono również, iż małe znaczenie ma czy substrat zawiera tlen czy siarkę. Znaczące jest natomiast jaką substrat ma konfigurację. Jeżeli ma konfigurację *trans* reakcja jest enacjo- i diastereoselektywna. W przypadku substratu o konfiguracji *cis* diastereoselektywność jest niższa.

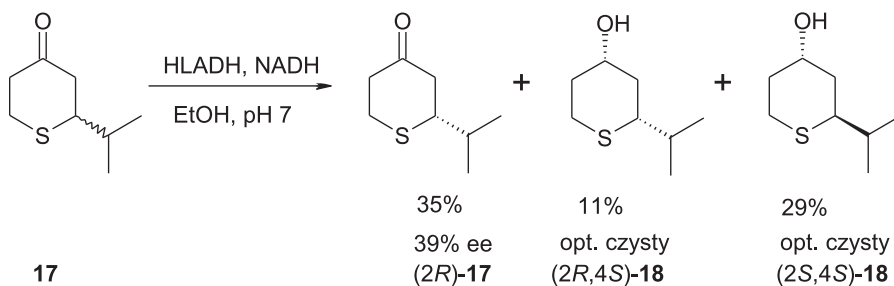
c) Optycznie czystych acyklicznych alkoholi drugorzędowych nie da się otrzymać przez bezpośrednią redukcję biokatalityczną, gdyż acykliczne ketony nie są dobrymi substratami dla dehydrogenazy alkoholowej. Dlatego zaproponowano koncepcję przedstawioną na Schemacie 7 [10].



Schemat 7
Scheme 7

Polega ona na redukcji heterocyklicznych ketonów zawierających siarkę (**16**) do alkoholi, a następnie ich desulfuryzacji metodami chemicznymi (z zastosowaniem niklu Raney'a). W ten sposób powstają acykliczne, optycznie czyste alkohole drugorzędowe (**18**), które są bardzo trudne do otrzymania metodami chemicznymi.

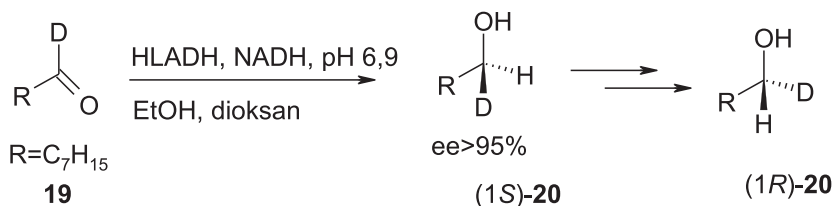
Na Schemacie 8 przedstawiono warunki etapu enzymatycznego (redukcji 2-podstawionych tetrahydrotiopiran-4-onów do cyklicznych alkoholi).



Schemat 8
Scheme 8

Enancjoselektywność tej reakcji jest niewielka, redukcji ulegają oba enancjomery związku **17**. Natomiast nowo powstające centrum stereogeniczne ma tylko jedną konfigurację, zatem reakcja jest diastereoselektywna. Produkty otrzymano z umiarkowaną wydajnością, ale są one optycznie czyste. Związki (*2R,4S*)-**18** i (*2S,4S*)-**18** są diastereoizomerami, więc można je rozdzielić metodami fizycznymi.

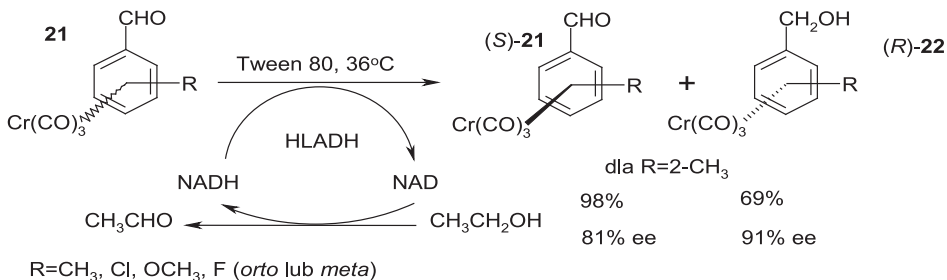
- d) Redukcja 3-podstawionych tetrahydrotiopiran-4-onów [11] była przeprowadzana w takich samych warunkach jak podane na Schemacie 8. W tym przypadku produkty otrzymano z wyższą wydajnością (do 49% izomeru *trans*), ale z niższymi nadmiarami enancjomerycznymi (78–90%).
- e) Dehydrogenazę alkoholową zastosowano również do katalizowania redukcji [$1\text{-}^2\text{H}$] oktanalu (**19**) [12].



Schemat 9
Scheme 9

Enzym odróżnia wodór od deuteru. Tak małe różnice są niezauważalne w przypadku metod chemicznych, zatem zastosowanie biokatalizy jest bardzo trudne do zastąpienia. Produkt otrzymano z nadmiarem enancjomerycznym większym niż 95%. Enancjomer (*S*) (związek **20**) otrzymany w ten sposób był chemicznie przekształcony w mniej dostępny enancjomer (*R*), zatem możliwe jest otrzymanie tą metodą obydwu enancjomerów.

f) HLADH akceptuje również związki organometaliczne jako substraty. Dzięki temu z powodzeniem zastosowano ten enzym do redukcji trikarbonylo- (η^6 -benzaldehydo) kompleksów chromu [13].



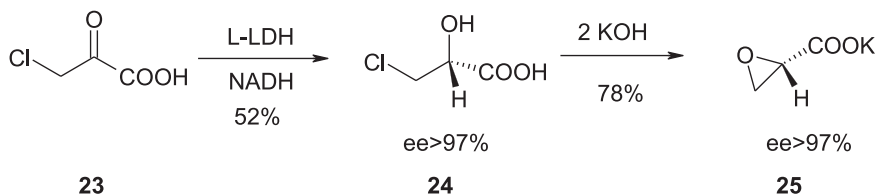
Schemat 10
Scheme 10

Na Schemacie 10 przedstawiono przebieg reakcji oraz rolę, jaką spełnia dodatek etanolu (umożliwia regenerację kofaktora). W zależności od reszty R produkty otrzymano z wydajnością od 60 do prawie 100% oraz nadmiarami enancjomerycznymi od kilku do ok. 91%. W przypadku izomeru *meta* otrzymywano zawsze alkohol o konfiguracji *R*, ale w przypadku izomeru *orto* produkty 2-metoksy i 2-fluoro powstawały z przewagą enancjomeru *S*. Aby to wyjaśnić zastosowano komputerowe modelowanie dopasowania substratów do miejsca aktywnego enzymu. Okazało się, że układ oddziaływań hydrofobowych i wiązań wodorowych enzym-substrat zmienia się w zależności od podstawnika i stąd różnice w enancjopreferencji.

2.1.2. Dehydrogenaza mleczanowa

Dehydrogenaza mleczanowa (LDH) była izolowana np. z osocza i leukocytów krów i koni [14]. Jednak otrzymanie LDH z tkanki mięśniowej świni jest wydajniejsze i tańsze [15]. Zastosowano nietypową procedurę wydzielenia tego enzymu. Tkankę mięśniową homogenizowano z buforem Tris-HCl, a następnie mieszano z pianą wytworzoną z surfaktanta, NaOH i barwnika. Po wirowaniu w fazie wodnej znajdował się oczyszczony enzym. LDH akceptuje duże spektrum kwasów jako substratów, zatem jest uniwersalnym katalizatorem.

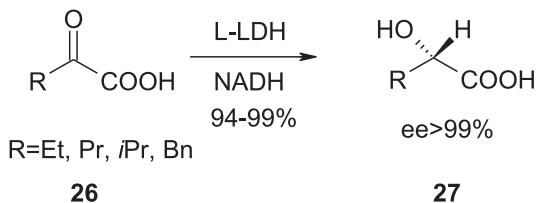
Dehydrogenazę mleczanową zastosowano, jako biokatalizator reakcji syntezy kwasu β -chloromlekowego (**24**) oraz glicydolanu potasu (**25**) [16].



Schemat 11
Scheme 11

Na Schemacie 11 przedstawiono etap enzymatyczny i chemiczny reakcji. Produkt otrzymano z nadmiarem enancjomerycznym powyżej 97% i umiarkowaną wydajnością. Enzym był używany w formie immobilizowanej (zamykany w żelu). NADH był regenerowany za pomocą glukozo-6-fosforanu oraz dehydrogenazy glukozo-6-fosforanu. Stosując zwierzęcą LDH otrzymywano kwas *L*- β -chloromlekowy oraz *L*-glicydol. Izomery *D* uzyskiwano w ten sam sposób z podobnymi nadmiarami enancjomerycznymi używając *D*-LDH z *Lactobacillus leichmannii*.

Opisano również zastosowanie LDH do syntezy innych 2-hydroksykwasów (**27**) [17], które są ważnymi substratami zastosowanymi w syntezie epoksydów, glikoli i haloestrów.

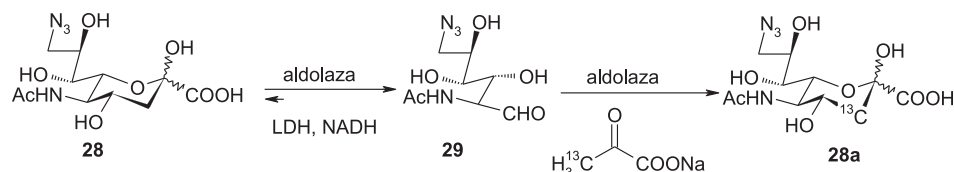


Schemat 12
Scheme 12

Na Schemacie 12 pokazano ogólnie reakcję tego typu. Wydajność i nadmiary enancjomeryczne produktów były bardzo wysokie. NADH regenerowano za pomocą

mrówczanu i dehydrogenazy mrówczanowej. Enzym był immobilizowany w żelu poliakrylamidowym. Dehydrogenaza mleczanowa ma grupę tiolową łatwo ulegającą utlenieniu na powietrzu, co jest dużym utrudnieniem w zastosowaniu tego enzymu. Immobilizacja enzymu daje trwały biokatalizator, który jest zabezpieczony przed utlenianiem.

Dehydrogenaza mleczanowa była również wykorzystana podczas syntezy glikoproteiny, której fragmentem był związek **28a** [18].



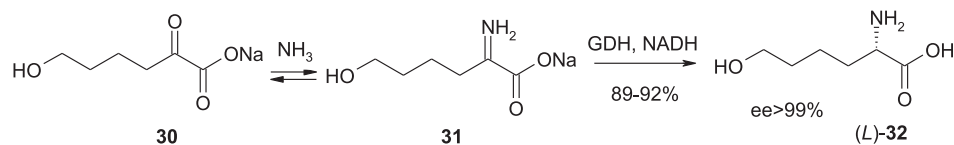
Schemat 13

Scheme 13

Sacharyd z izotopem węgla ^{13}C był syntetyzowany w celu zbadania mechanizmu formowania oligosacharydów w organizmie. Etapy enzymatyczne tej wielostopniowej syntezy przedstawiono na Schemacie 13. Jest to przykład współpracy dwóch enzymów w tym samym etapie syntezy. Aldolaza katalizuje tutaj zarówno reakcję retroaldolową (pierwszy etap), jak i aldolową (drugi etap). Gdy nie używano LDH jako dodatkowego katalizatora, pierwsza reakcja była odwracalna, a jej wydajność wynosiła 60%. Po dodaniu LDH, stwierdzono, że wydajność zwiększyła się do 98%, a w drugim etapie analog [3- ^{13}C] kwasu *N*-acetylneuraminowego (**28a**) otrzymano z wydajnością 93%.

2.1.3. Dehydrogenaza glutaminianowa

Dehydrogenaza glutaminianowa (GDH) z wątroby wołowej była użyta do syntezy *L*-6-hydroksynorleucyny (**32**) [19], która jest kluczowym substratem do syntezy omapatrilatu, leku przeciwko nadciśnieniu [20].

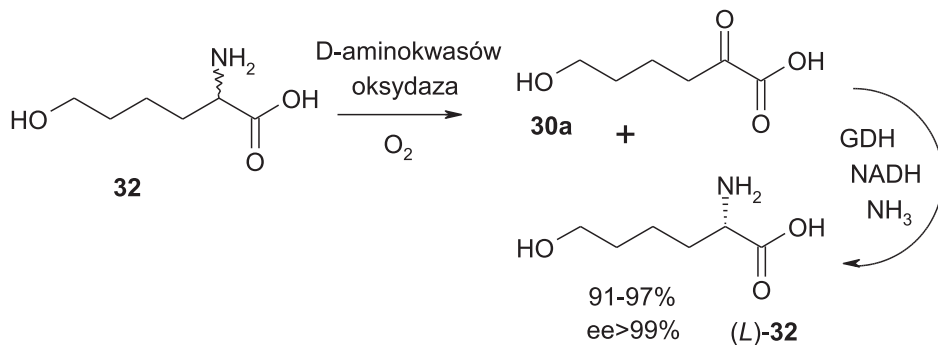


Schemat 14

Scheme 14

Produkt otrzymano z wysoką wydajnością i nadmiarem enancjomerycznym powyżej 99%. Zaobserwowano, że enzym katalizuje enancjoselektywną redukcję wiązania iminowego tworzącego się *in situ*, co pokazano na Schemacie 14.

L-6-hydroksynorleucyna była również otrzymana w reakcji deracemizacji, w dwóch etapach, z zastosowaniem dwóch enzymów (Schemat 15). Oksydaza *D*-aminokwasów z nerki wieprzowej katalizuje utleniające deaminowanie *D*-6-hydroksynorleucyny (czyli zbędnego enancjomeru), a GDH katalizuje redukujące aminowanie ketokwasu do *L*-enancjomeru, potrzebnego do produkcji leku.



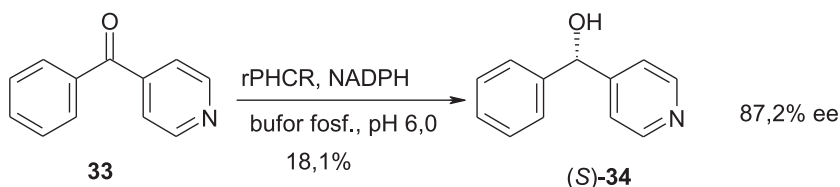
Produkt otrzymano z tak samo wysokim nadmiarem enancjomerycznym, ale z wyższą wydajnością niż powyżej. Tworzący się, jako produkt uboczny pierwszego etapu reakcji nadtlenek wodoru był rozkładany przez dodanie katalazy (enzym opisany w rozdziale 3.1.5.). Po przeprowadzeniu badań stwierdzono, że ekstrakty dehydrogenazy fenyloalaniny z mikroorganizmów *Sporosarcina sp.* i *Thermoactinomyces intermedius* były również efektywnymi biokatalizatorami. GDH z mikroorganizmów były aktywne przy użyciu NADPH, a nie NADH. Bakteryjne dehydrogenaza leucyny i dehydrogenaza alaniny były nieaktywne.

2.1.4. Reduktaza karbonylowa

Reduktazy karbonylowe są obecne we wszystkich tkankach i odgrywają ważną rolę w metabolizmie wielu leków. Ich biochemiczna aktywność została opisana przez Forresta i Gonzaleza [21]. Reduktaza karbonylowa była wyizolowana między innymi z serca królika [22]. Reduktazę karbonylową z serca świni sklonowano przez rekombinację plazmidu i transformację do *E. coli* [23].

Rekombinowana reduktaza karbonylowa z serca świni (rPHCR) została zastosowana do redukcji 4-benzoilopirydiny (**33**) [24]. α -Pirydylo alkohole są substratami w syntezie wielu leków. Mają aktywność analgetyczną i antykonwulsyjną [25]. Stosując chemiczne katalizatory trudno byłoby uzyskać alkohole podobne do związku **34** z dobrym nadmiarem enancjomerycznym, gdyż różnica pomiędzy pierścieniami benzenu i pirydyny jest mała.

Jak pokazano na Schemacie 16, po zastosowaniu tego enzymu otrzymano produkt z nadmiarem enancjomerycznym wynoszącym 87,2%. α -Fenyl-pirydylo-metanole były wcześniej syntetyzowane z użyciem drożdży piekarnianych, ale uzyskano produkty z nadmiarami enancjomerycznymi od 3 do 86%, dlatego postanowiono zastosować rekombinowany enzym, by uzyskać produkty z większymi nadmiarami enancjomerycznymi. Niestety, uzyskano produkty z analogicznymi nadmiarami enancjomerycznym.

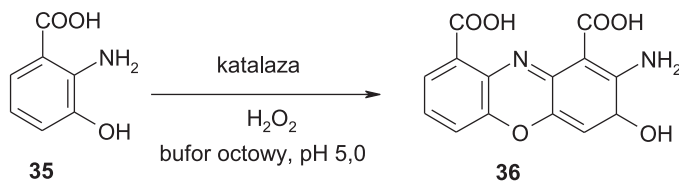


Schemat 16
Scheme 16

2.1.5. Katalaza

Enzym wyizolowano i oczyszczono z wątroby wołowej [26]. W odróżnieniu od najczęściej stosowanych procedur wątrobę homogenizowano z kwasem cytrynowym, a nie rozpuszczalnikiem organicznym. Po odwirowaniu osad rozpuszczono w buforze fosforanowym i wysalano enzym stałym siarczanem amonu.

Katalaza katalizuje reakcję rozkładu nadtlenku wodoru do wody i tlenu. Znalazła zastosowanie do katalizowania innych reakcji, np. utleniania kwasu 3-hydroksyantranilowego (35) [27].



Schemat 17
Scheme 17

Nadtlenek wodoru był stale dostarczany przez układ glukoza/oksydaza glukozy. Pokazany na Schemacie 17 związek **36** wykazuje aktywność antybakteryjną.

2.2. WYBRANE ZASTOSOWANIA TRANSFERAZ W SYNTEZIE ORGANICZNEJ

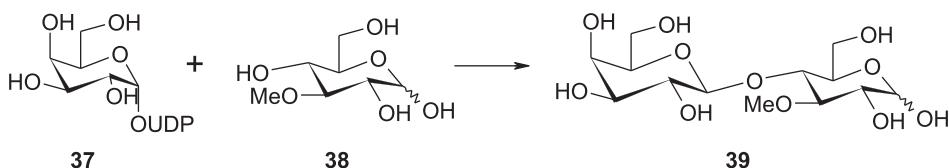
Transferazy są enzymami, które katalizują przenoszenie różnych grup pomiędzy cząsteczkami związków chemicznych. Najwięcej transferaz używanych w biokatalizie to te katalizujące przenoszenie grup cukrowych. Stosując je można otrzymać produkty z wysoką regio- i stereoselektywnością. Nie jest to możliwe przy użyciu metod chemicznych, gdyż cukry mają kilka chemicznie równocennych grup hydroksylowych nierozróżnialnych dla klasycznych katalizatorów.

2.2.1. Transaldolaza

Transaldolaza była otrzymana np. z wołowego gruczołu sutkowego [28]. Tkanka była homogenizowana z buforem o pH 4, a następnie supernatant frakcjonowano siarczanem amonu. Enzym ten był zastosowany do produkcji 2,5-*D*-treodiketoheksozy [29]. Wszystkie wcześniej znane akceptory reszt przenoszonych przez transaldolazę miały grupę hydroksylową przy węglu sąsiadującym z grupą aldehydową. W przytoczonym tu eksperymencie okazało się, iż pomimo że aldehyd hydroksypirogronowy nie spełnia tego warunku, jest on również dobrym akceptorem w tej reakcji. Stąd wniosek, że transaldolaza jest bardziej uniwersalnym katalizatorem, niż wcześniej uważano.

2.2.2. Galaktozylotransferaza

Galaktozylotransferaza z mleka krowiego znalazła zastosowanie w syntezie 3-*O*-metylolaktozy (39) [30], co pokazano na Schemacie 18.

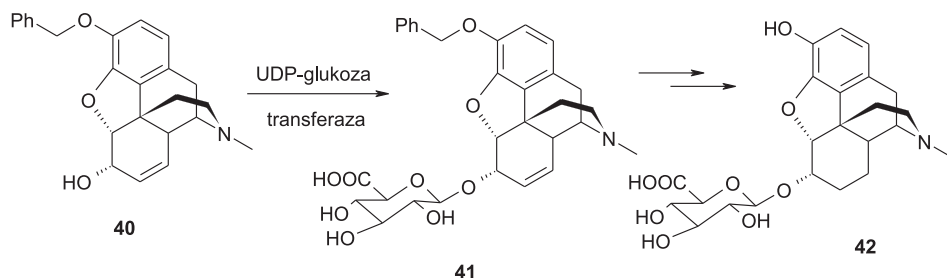


Schemat 18
Scheme 18

Ten β -1 \rightarrow 4 disacharyd był otrzymany z wydajnością 15%, co w przypadku syntezy sacharydów mających wiele tak samo reaktywnych grup hydroksylowych jest dobrym wynikiem. 3-*O*-metylolaktozy użyto w diagnostyce medycznej do sprawdzania aktywności laktazy w jelitach. β -galaktozydazy w analogicznej reakcji katalizują tworzenie wiązania 1 \rightarrow 6-glikozydowego.

2.2.3. Transferaza UDP-glukozy

Ten enzym (obecny w wątrobach ssaków) był zastosowany w reakcji glukuronidacji 3-O-benzylowej pochodnej morfiny (**40**) [31]. Na Schemacie 19 przedstawiono reakcję glukuronidacji oraz końcowy efekt przemian chemicznych.



Schemat 19
Scheme 19

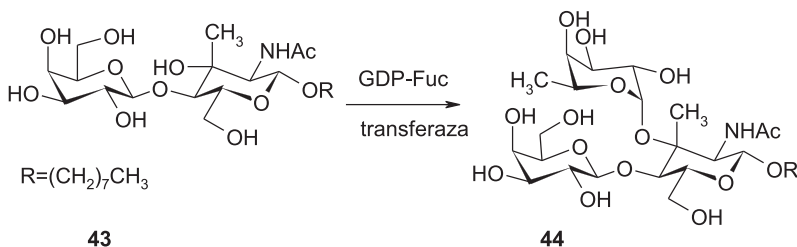
Stwierdzono, że mimo dość znacznego rozbudowania sterycznego, cząsteczka zmodyfikowanej morfiny jest akceptowana jako substrat dla tej transferazy. Hydroliza produktu przy użyciu wodorotlenku sodu w izopropanolu oraz uwodornienie (Pd/C, H₂O/MeOH/AcOH) dała 7,8-dihydromorfino-6-glukuronid (**42**), który ma lepsze właściwości przeciwbólowe niż morfina. Zabezpieczenie grupy OH w fenolu w pozycji 3 jest interesującym przykładem jak można chemicznie kierować reakcją katalizowaną przez enzym. Dla substratu z wolną grupą 3-OH enzym preferuje glukuronidację tej pozycji i nie jest możliwe uzyskanie produktu funkcjonalizowania w pozycji 6.

2.2.4. Fukozylotransferaza

Glikany biorą udział w procesach takich jak adhezja podczas zapalenia i metastazy lub rozpoznawanie komórek. Ta transferaza może być użyteczna w produkcji glikomimetyków będących inhibitorami powyższych procesów.

Enzym został wyizolowany z mleka ludzkiego [32], ale mleko innych ssaków może być również dobrym źródłem fukozylotransferazy. W natywnych tkankach stężenie tego enzymu jest niskie, dlatego ludzka fukozylotransferaza III była ekspresjonowana w komórkach *Spodoptera frugiperda* Sf9 [33], co umożliwiło zwiększenie produkcji enzymu.

Fukozylotransferaza jest enzymem przenoszącym resztę fukozy, również na trzeciorzędowy alkohol, co jest unikalną właściwością, zastosowaną do otrzymania analogu czynnika grupowego krwi – LeX trisacharydu (**44**) [34].



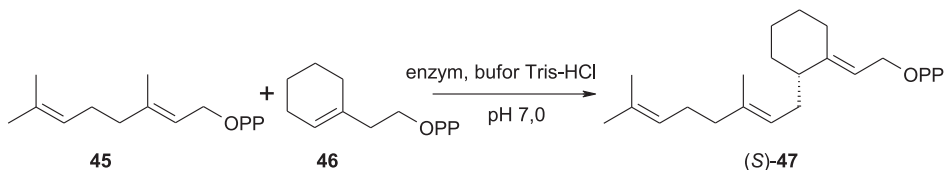
Schemat 20
Scheme 20

Stwierdzono, że reakcja przebiega równie dobrze, jak dla akceptora z drugorzędową grupą OH (bez grupy CH_3).

2.2.5. Syntaza difosforanu farnezylu

Ten enzym, nazywany również transferazą prenylu, był izolowany z wątroby wieprzowej [35] i kurczącej [36] (homogenizacja z buforem fosforanowym o pH 7 i frakcjonowanie siarczanem amonu). Syntazy mają zdolność katalizowania tworzenia wiązania C–C. Metody chemiczne tworzenia takich wiązań są trudne, wymagają dobrania specyficznych warunków reakcji i zastosowania drogiego katalizatorów. Syntazy powinny być przedmiotem zainteresowań naukowców i szczegółowych badań, gdyż ich zastosowanie może zdecydowanie rozwinąć znane metody syntezy nawet bardzo złożonych związków.

Enzym syntaza difosforanu farnezylu wydzielony z wątroby wieprzowej oraz z *Bacillus stearothermophilus* były używane w syntezie difosforanów (47).



Schemat 21
Scheme 21

Reakcje z cyklicznym analogiem substratu (przykład pokazano na Schemacie 21) przebiegają z wydajnością 42,2% w przypadku enzymu pochodzenia zwierzęcego, a tylko 13,6% z enzymem bakteryjnym. Produkt zawiera resztę difosforanową i może służyć do tworzenia bardziej rozbudowanych cząsteczek.

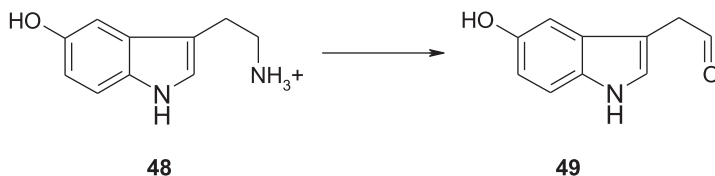
2.3. ZASTOSOWANIA LIAZ W SYNTEZIE ORGANICZNEJ

Liazy to enzymy, które katalizują rozszczepienie wiązań związków chemicznych bez udziału wody. Większość liaz z wyższych eukariotów używanych w syntezie organicznej pochodzi z roślin, ale te znajdujące się w organizmach zwierzęcych charakteryzują się cennymi właściwościami biokatalitycznymi.

2.3.1. Dekarboksylaza DOPA (3,4-dihydroksyfenyloalaniny)

Enzym ten był izolowany z nerek wieprzowych [37] poprzez homogenizację z buforem fosforanowym o pH 6,8 oraz frakcjonowanie supernatantu siarczanem amonu.

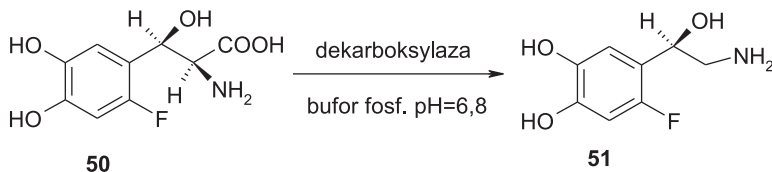
Główne działanie tego enzymu to dekarboksylacja aromatycznych *L*-aminokwasów, ale katalizuje on również pół-transaminację aromatycznych *D*-aminokwasów (w niskim pH i w warunkach beztlenowych) oraz utleniające deaminowanie aromatycznych amin (w wysokim pH, w warunkach tlenowych) [38]. W przypadku, gdy substratem jest serotonina (**48**) obydwa te mechanizmy są obserwowane i prowadzą do tego samego produktu (**49**).



Schemat 22
Scheme 22

Enzym jest związany z pirydoksyno-5'-fosforanem (PLP), do którego wiąże się substrat. PLP jest przekształcany podczas reakcji do pirydoksamino-5'-fosforanu.

Rekombinowaną w *E. coli* dekarboksylazę DOPA zastosowano w reakcji dekarboksylacji *L-treo*-(3,4-dihydroksyfenylo)seryny do norepinefryny (NE) [39]. 6-Fluoro-*L-treo*-(3,4-dihydroksyfenylo)seryna (**50**) była dekarboksylowana do 6-fluoro-NE (**51**), która jest agonistą α -adrenergicznym. Stwierdzono, że reakcje z 2-fluorowanym analogiem związku **50** nie zachodzą.

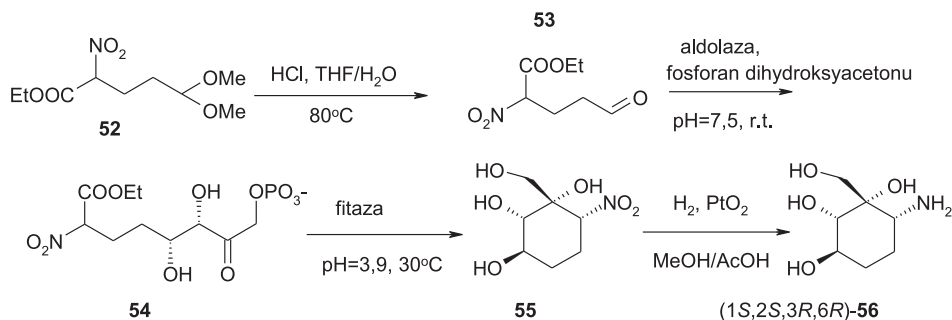


Schemat 23
Scheme 23

Związek **50** jest dekarboksylowany z taką samą szybkością jak jego niefluorowany analog.

2.3.2. Aldolazy

Aldolazy izolowano np. z wątroby wołowej [40] (zawieszenie w KCl, dodatek metanolu, filtracja) lub mięśni królika. Katalizują one reakcje kondensacji aldolowej, które prowadzą do formowania nowego wiązania C–C [41]. Fruktozo-1,6-difosforo aldolaza z mięśni królika była zastosowana w syntezie aminocykloheksitolu (**56**), który jest analogiem aminocyklitolowalioaminy, inhibitora glikozydaz [42]. Inhibitory takie są używane w leczeniu różnorodnych infekcji.



Kondensacja katalizowana przez aldolazę była wysoce stereoselektywna. Enzym kontroluje konfigurację na obu atomach węgla tworzącego się wiązania C–C. Produkt **56** otrzymano ze związku **55** poprzez chemiczną redukcję grupy nitrowej do aminowej. Wydajność całkowita wynosiła około 60%.

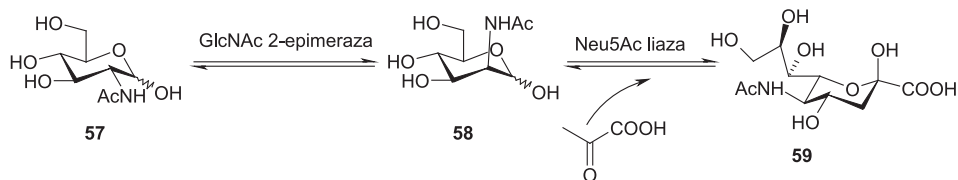
2.4. ZASTOSOWANIA IZOMERAZ W SYNTEZIE ORGANICZNEJ

Izomerazy są enzymami, które katalizują zmianę wzajemnego ułożenia atomów lub grup atomów w cząsteczce związku chemicznego, bez zmiany ich ilości. Są one rzadko używane w biotransformacjach i produkowane raczej przez mikroorganizmy. Jednak epimerazy można otrzymać również z tkanek zwierzęcych.

2.4.1. *N*-acylo-*D*-glukozamino-2-epimeraza (GlcNAc-2-epimeraza)

Ten enzym izolowano z nerek wieprzowych i eksprymowano w *E.coli* [43]. W nerkach wieprzowych ma on aktywność białka wiążącego reninę.

GlcNAc-2-epimeraza z liazą *N*-acetylneuraminianu pochodzącą z *E.coli* były zastosowane do produkcji kwasu *N*-acetylneuraminowego (59) z *N*-acetylo-*D*-glukozaminy (57) i kwasu pirogronowego [44]. Oba enzymy dodano jednocześnie do mieszaniny reakcyjnej.



Pierwszy etap jest enzymatyczną epimeryzacją do *N*-acetylo-*D*-mannozoaminy (58), a drugi to kondensacja aldolowa. Równowagę reakcji przesunięto w stronę kwasu Neu5Ac dzięki użyciu nadmiaru kwasu pirogronowego. Konwersja GlcNAc wyniosła 77%.

2.5. LIGAZY

Ligazy to enzymy katalizujące tworzenie nowych wiązań chemicznych, łączenie cząsteczek w większe związki. Znajdują zastosowanie w biologii molekularnej i inżynierii genetycznej, na razie brak doniesień o ich wykorzystaniu w syntezie organicznej. Są to enzymy pozyskiwane z mikroorganizmów, a nie z tkanek zwierzęcych, choć oczywiście występują w organizmach zwierząt.

PODSUMOWANIE

Na podstawie przytoczonego piśmiennictwa można stwierdzić, iż tkanki zwierzęce są źródłem bardzo wielu enzymów, używanych jako biokatalizatory różnorodnych reakcji. Zdecydowanie widać, że największe zastosowanie znalazły hydrolazy ponadto dużo jest też zastosowań oksydoreduktaz. W znacznie mniejszym stopniu wykorzystuje się transferazy, liazы i izomerazy, natomiast ligazy jak dotąd nie znalazły zastosowań w syntezie organicznej.

Znane są przykłady stosowania enzymów immobilizowanych, pokazano to dla dekarboksylazy DOPA (otrzymywanie 6-fluoronorepinefryny). Przytoczono również przykłady zastosowań enzymów rekombinowanych – reduktazy karbonylowej

z serca świni (redukcja 4-benzoilopirydyny) oraz GlcNAc-2-epimerazy (otrzymywanie kwasu *N*-acetyloneuraminowego).

W pracy zostały pokazane reakcje, w których enzymy pochodzenia zwierzęcego nierzadko okazywały się wydajniejszymi biokatalizatorami niż te z mikroorganizmów. Wskazano również zastosowania produktów reakcji enzymatycznych do dalszej syntezy, np. leków.

Z przytoczonych faktów wynika, iż biokataliza z użyciem enzymów zwierzęcych jest dynamicznie rozwijającą się dziedziną i w przyszłości będzie coraz szerzej wykorzystywana.

PODZIĘKOWANIA

Praca wykonana w ramach projektu „Biotransformacje użyteczne w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym” No. POIG.01.03.01-00-158/09-01 częściowo finansowana przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] J.E. Leresche, H.-P. Meyer, *Org. Process. Res. Dev.*, 2006, **10**, 572.
- [2] K. Dalziel, *Biochem. J.*, 1960, **80**, 440.
- [3] A.J. Bridges, P. Sundara Raman, G.S.Y. Ng, J. Bryan Jones, *J. Am. Chem. Soc.*, 1984, **106**, 1461.
- [4] I.J. Jakovac, H.B. Goodbrand, K.P. Lok, J. Bryan Jones, *J. Am. Chem. Soc.*, 1982, **104**, 4659.
- [5] A.J. Irwin, J. Bryan Jones, *J. Am. Chem. Soc.*, 1977, **99**, 1625.
- [6] W. Gładkowski, *Wiad. Chem.*, 2009, **63**, 361.
- [7] Ch.H. Wong, J.R. Matos, *J. Org. Chem.*, 1985, **50**, 1992.
- [8] H. Shigematsu, T. Matsumoto, G. Kawachi, Y. Hirose, K. Naemura, *Tetrahedron-Asymmetr.*, 1995, **6**, 3001.
- [9] L.K.P. Lam, I.A. Gair, J. Bryan Jones, *J. Org. Chem.*, 1988, **53**, 1611.
- [10] J. Davies, J. Bryan Jones, *J. Am. Chem. Soc.*, 1979, **101**, 5405.
- [11] T. Takemura, J. Bryan Jones, *J. Org. Chem.*, 1983, **48**, 791.
- [12] E. Caspi, Ch.R. Eck, *J. Org. Chem.*, 1977, **42**, 767.
- [13] C. Baldoli, P. Del Buttero, S. Maiorana, G. Ottolina, S. Riva, *Tetrahedron-Asymmetr.*, 1998, **9**, 1497.
- [14] T. Arai, A. Inoue, Y. Uematsu, T. Sako, N. Kimura, *Res. Vet. Sci.*, 2003, **75**, 15.
- [15] S. Fernandes, R. Hatti-Kaul, B. Mattiasson, *Biotechnol. Bioeng.*, 2002, **79**, 472.
- [16] B.L. Hirschbain, G.M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.*, 1982, **104**, 4458.
- [17] M.-J. Kim, G.M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, **110**, 2959.
- [18] . Miyazaki, T. Sakakibara, H. Sato, Y. Kajihara, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 1411.
- [19] R.L. Hanson, M.D. Schwinden, A. Banerjee, D.B. Brzozowski, B.-Ch. Chen, B.P. Patel, C.G. McNamee, G.A. Kodersha, D.R. Kronenthal, R.N. Patel, L.J. Szarka, *Bioorgan. Med. Chem.*, 1999, **7**, 2247.
- [20] R.N. Patel, *Biomol. Eng.*, 2001, **17**, 167.
- [21] G.L. Forrest, B. Gonzalez, *Chem.-Biol. Interact.*, 2000, **129**, 21.

- [22] Y. Imamura, T. Migita, M. Otagiri, T. Choshi, S. Hibino, *J. Biochem.* (Tokyo), 1999, **125**, 41.
- [23] N. Usami, S. Ishikura, H. Abe, M. Nagano, M. Uebuchi, A. Kuniyasu, M. Otagiri, H. Nakayama, Y. Imamura, A. Hara, *Chem.-Biol. Interact.*, 2003, **143**, 353.
- [24] H. Shimada, S. Fujiki, M. Oginuma, M. Asakawa, T. Okawara, K. Kato, S. Yamamura, H. Akita, A. Hara, Y. Imamura, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 2003, **23**, 29.
- [25] N.A. Salvi, S.R. Udupa, A. Banerji, *Biotech. Lett.*, 1998, **20**, 201.
- [26] Z. Yassen, S. Jadallah, *The Islamic Univ. J.*, 2009, **17**, 37.
- [27] S. Christen, P.T. Southwell-Keely, R. Stocker, *Biochem.*, 1992, **31**, 8090.
- [28] E. Kuhn, K. Brand, *Biochem.*, 1972, **11**, 1767.
- [29] E. Graci, M. Mangiarotti, S. Pontremoli, *Biochem.*, 1962, **1**, 628.
- [30] J.H. Yoon, G.H. Ryu, P. Finch, J.S. Rhee, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 2001, **15**, 191.
- [31] G.N. Jenkins, A.V. Stachulski, F. Scheinmann, N.J. Turner, *Tetrahedron-Asymmetr.*, 2000, **11**, 413.
- [32] M.M. Palcic, *Methods Enzymol.*, 1994, **230**, 300.
- [33] V.A. Morais, J. Costa, *J. Biotech.*, 2003, **106**, 69.
- [34] X. Qian, O. Hindsgaul, H. Li, M.M. Palcic, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 2184.
- [35] J.K. Dorsey, J.A. Dorsey, J.W. Porter, *J. Biol. Chem.*, 1966, **241**, 5353.
- [36] B.C. Reed, H.C. Rilling, *Biochem.*, 1975, **14**, 50.
- [37] C. Borri Voltattorni, A. Minelli, P. Vecchini, A. Fiori, C. Turano, *Eur. J. Biochem.*, 1979, **93**, 181.
- [38] M. Bertoldi, C. Borri Voltattorni, *Protein Science*, 2001, **10**, 1178.
- [39] C. Borri Voltattorni, M. Bertoldi, S. Bianconi, W.-P. Deng, K. Wong, I.H. Kim, B. Herbert, K.L. Kirk, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2002, **295**, 107.
- [40] R.J. Peanasky, H.A. Lardy, *J. Biol. Chem.*, 1958, **233**, 365.
- [41] a) G. Seoane, *Curr. Org. Chem.*, 2000, **4**, 283; b) J. Sukumaran, U. Hanefeld, *Chem. Soc. Rev.*, 2005, **34**, 530.
- [42] L. El Blidi, D. Crestia, E. Gallienne, C. Demuynck, J. Bolte, M. Lemaire, *Tetrahedron-Asymmetr.*, 2004, **15**, 2951.
- [43] I. Maru, Y. Ohta, K. Murata, Y. Tsukada, *J. Biol. Chem.*, 1996, **271**, 16294.
- [44] Z. Liu, R. Weis, A. Glieder, *Food Technol. Biotech.*, 2004, **42**, 248.

Praca wpłynęła do Redakcji 1 września 2011

SPEKTROMETRIA MAS W ROZRÓŻNIANIU ZWIĄZKÓW CHIRALNYCH

CHIRAL RECOGNITION BY MASS SPECTROMETRY

Ewelina Drabik

*Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych
Polskiej Akademii Nauk,
Środowiskowe Laboratorium Badań Fizykochemicznych,
ul. Sienkiewicza 112, 90-363 Łódź
e-mail: ewdrabik@wp.pl*

Abstract

Wstęp

1. Techniki jonizacji i typy analizatorów mas stosowane w analizie związków chiralnych
2. Metody analizy związków chiralnych
 - 2.1. Tworzenie kompleksów typu *gość-gospodarz* lub układów analit-selektor
 - 2.2. Enancjoselektywne reakcje kompleksów inkluzyjnych jon-cząsteczka w fazie gazowej
 - 2.3. Metoda kinetyczna
 - 2.4. Analiza ilościowa związków chiralnych oparta na metodzie kinetycznej
 - 2.5. Wyznaczenie współczynnika CR w oparciu o widma jonów produktów dla określonych kompleksów
3. „Ruchliwość jonów” w analizie związków chiralnych

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

mgr Ewelina Drabik ukończyła studia na Wydziale Chemii Uniwersytetu Łódzkiego w 2005 roku. Pracę magisterską wykonała w Katedrze Chemii Fizycznej. W roku 2006 rozpoczęła pracę w Środowiskowym Laboratorium Badań Fizykochemicznych w Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi, gdzie obecnie pracuje jako asystent. Obszarem jej zainteresowań jest zastosowanie spektrometrii mas w badaniach stereochemii związków organicznych.

ABSTRACT

The phenomenon of *optical activity* was discovered by Louis Pasteur in 1848. Since this time, chirality of organic compounds observed in biological systems has become a central theme in scientific research. Synthesis and quantitation of enantiomerically pure compounds is important for a wide range of applications. Chirally pure compounds are required not only by pharmacology, but they are also of interest in cosmetic and food industry and many other applications.

Similarity of enantiomers in their chemical and physical properties, except for optical rotation, makes their separation and detection very difficult. Until now, many methods have been used for the enantioselective discrimination of organic compounds, including nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR), circular dichroism (CD), capillary electrophoresis (CE) and chromatography (GC, HPLC), where an interference of a solvent cannot be excluded.

Recent studies have shown that mass spectrometry (MS) is an alternative approach to traditional method for chiral recognition and determination of enantiomeric composition. Although, mass spectrometry has been considered as insensitive to chirality because enantiomers have the same mass and show identical mass spectra, it is now accepted as important tool for differentiating of enantiomeric compounds through their interactions with chiral reference molecules (Fig. 1). The ability to transfer diastereomeric non-covalent complexes between chiral selectors and analyte enantiomers, which differ in stability, into the gas-phase and measure such differences through mass spectrometric ion abundances, has appeared with development of soft ionization techniques such electrospray ionization (ESI), fast atom bombardment (FAB) and matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI). Mass spectrometry-based methods for chiral recognition and quantitative determination of enantiomeric purity are attractive due to their speed, high sensitivity, low sample consumption, tolerance to impurities and ability to probe the analyte in a solvent free environment.

Currently, there are four well-defined approaches for determining a measure of enantiomer discrimination, using either single-stage or tandem mass spectrometry. They can be classified into the following categories: (1) measurement of the relative abundance of diastereomeric complexes between chiral reference compound and the enantiomers (usually one isotopically labeled [10]), (2) enantioselective ion/molecule reaction between diastereomeric complexes and chiral or achiral reactants [11], (3) kinetic method [12] and (4) collision-induced dissociation (CID) of diastereomeric adducts in a tandem mass spectrometry (MS/MS) experiment [61, 62].

Over the past decade, new approaches to chiral separation and analysis of enantiomers have been introduced, where molecules are separated based on their mobility (ion mobility spectrometry) [66].

Keywords: mass spectrometry, chiral recognition, *host-guest* (analyte-selector) interaction, kinetic method, ion-molecule reaction, ion mobility spectrometry

Słowa kluczowe: spektrometria mas, rozróżnianie związków chiralnych, oddziaływania typu *gość-gospodarz* (analit-selektor), metoda kinetyczna, reakcje kompleksów jon-cząsteczka, spektrometria „ruchliwości jonów”

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

| | |
|---------------------|--|
| CD | – dichroizm kołowy |
| CID | – dysocjacja indukowana zderzeniami |
| CE | – elektroforeza kapilarna |
| CIF | – ułamek intensywności pików kompleksu (ang. <i>complex intensity fraction</i>) |
| CR | – „rozpoznanie chiralne” (ang. <i>chiral recognition</i>) |
| CSP | – chiralne fazy stacjonarne |
| <i>e.e.</i> | – nadmiar enancjomeryczny (czystość enancjomeryczna) |
| ESI | – elektrosprej |
| FAB | – bombardowanie szybkimi atomami |
| FTICR | – cyklotronowy rezonans jonów z transformacją Fouriera |
| GC | – chromatografia gazowa |
| HPLC | – wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa |
| LSIMS | – spektrometria mas jonów wtórnych w ciekłej matrycy (ang. <i>liquid secondary ion mass spectrometry</i>) |
| MALDI | – desorpcja/ionizacja laserowa wspomagana matrycą |
| MS | – spektrometria mas |
| MS/MS | – tandemowa spektrometria mas |
| NMR | – spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego |
| PA | – powinowactwo względem protonu (ang. <i>proton affinity</i>) |
| Q | – kwadрупol |
| QIT | – kwadрупolowa pułapka jonów |
| QR | – metoda QR (ang. <i>quotient ratio method</i>) |
| QR ^{fixed} | – metoda QR ^{fixed} (ang. <i>fixed-ligand quotient ratio method</i>) |
| RPI | – względna intensywność pików (ang. <i>relative peak intensity</i>) |
| SA | – selektand |
| SO | – selektor |
| SR | – metoda SR (ang. <i>single ratio method</i>) |
| TOF | – analizator czasu przelotu |

WSTĘP

Zjawisko czynności optycznej związków organicznych zostało po raz pierwszy zaobserwowane w roku 1848 przez Louisa Pasteura. Różnice w skręcalności płaszczyzny polaryzacji światła, jakie zaobserwował dla roztworów dwóch form krystalicznych kwasu winowego zostały szeroko opisane w pracy zatytułowanej *Researches on the Molecular Asymmetry of Natural Organic Products* [1], a fakt ten powszechnie uznany za początek rozwoju stereochemii.

Zaproponowana przez Kelvina w roku 1893 definicja chiralności, zgodnie z którą „figurę geometryczną lub grupę punktów określamy jako chiralną wtedy, jeśli posiada ona odbicie lustrzane, które nie może być na nią nałożone” [2], funkcjonuje do dziś i przyjęta została również w terminologii chemicznej. Częsteczki względem siebie chiralne występują w formie dwóch stereoisomerów, tzw. enancjomerów. Enancjomery tego samego związku, zwane również izomerami optycznymi wykazują identyczne właściwości fizykochemiczne. Wyjątkiem jest jedynie kierunek skręcania płaszczyzny światła spolaryzowanego, przechodzącego przez substancję lub jej roztwór. Zgodnie z przyjętą konwencją enancjomer, który skręca płaszczyznę światła spolaryzowanego kołowo w prawo oznaczany jest symbolem (+) i nazywany prawoskrętnym, natomiast skręcający płaszczyznę takiego światła w lewo – lewoskrętnym i ma symbol (–).

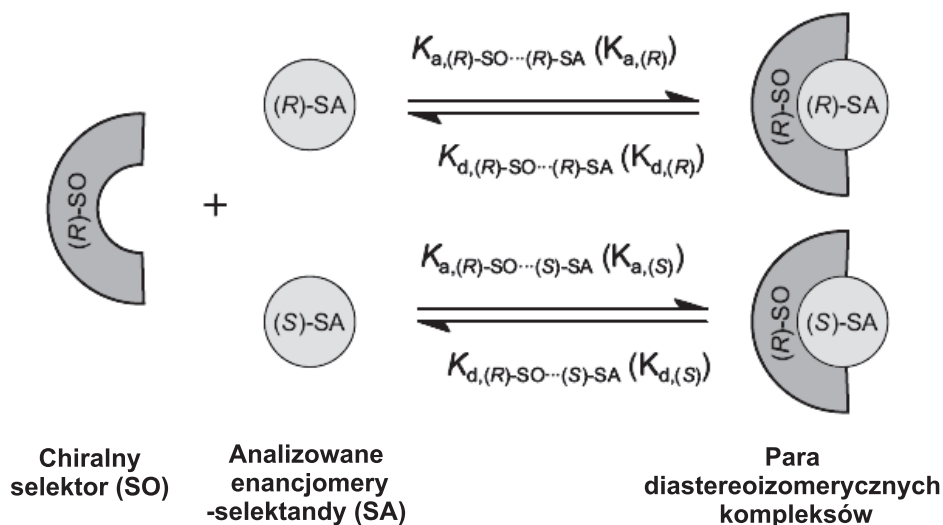
Pełne scharakteryzowanie substancji optycznie czynnej wymaga określenia nadmiaru enancjomerycznego i/lub diastereoizomerycznego oraz oznaczenia absolutnej konfiguracji wokół elementu chiralności odpowiedzialnego za pojawienie się takiego rodzaju aktywności.

Zjawisko występowania izomerii optycznej ma szczególne znaczenie dla organizmów żywych. Ścisłe określone enancjomery są monomerami większości naturalnych białek, węglowodanów, kwasów nukleinowych, terpenów i szeregu innych składników żywej materii. Ponadto w przypadku związków biologicznie czynnych takich jak leki i inne farmaceutyki, często tylko jeden z enancjomerów posiada właściwości terapeutyczne, podczas gdy drugi stanowi zbędny balast lub wywołuje niepożądane skutki. Możliwość otrzymywania i stosowania czystych enancjomerów jest również istotna z punktu widzenia przemysłu spożywczego, kosmetycznego czy chemii polimerów.

Skutkiem coraz większego zapotrzebowania na pojedyncze enancjomery jest nie tylko poszukiwanie nowych sposobów pozyskiwania związków homochiralnych (np. synteza asymetryczna), ale również rozwój metod analitycznych określających ich czystość optyczną lub nadmiar enancjomeryczny *e.e.* (ang. *enantiomeric excess*).

Ze względu na brak istotnych różnic we właściwościach fizykochemicznych enancjomerów określenie ich zawartości przy użyciu klasycznych metod analitycznych jest bardzo trudne. Obecnie wśród metod wykorzystywanych w kontroli czystości optycznej związków chemicznych najczęściej stosowanymi są: spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) [3], dichroizm kołowy (CD) [4], elek-

troforeza kapilarna (CE) [5] oraz metody chromatograficzne: wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa (HPLC) [6] i chromatografia gazowa (GC) [7]. Wszystkie z wymienionych metod, z wyjątkiem dichroizmu kołowego, wymagają obecności chiralnego środowiska, w którym optycznie czynny selektor (SO) oddziałując z danym enancjomerem analitu, zwanym selektandem (SA), tworzy przejściowy diastereoizomeryczny kompleks. Kompleksy utworzone przez poszczególne enancjomery danego związku często różnią się stabilnością. Uzyskany w ten sposób efekt różnicowania właściwości fizycznych badanych enancjomerów umożliwia ich rozróżnienie z zastosowaniem wymienionych technik analitycznych (Rys. 1). W praktyce jednak podczas stosowania opisanej strategii często pojawia się wiele problemów wynikających ze skomplikowanej i czasochłonnej procedury przygotowania analizy czy potrzeby użycia relatywnie dużej ilości próbki. Alternatywne podejście w analizie jakościowej, jak również ilościowej związków chiralnych, pozbawione takich ograniczeń stwarza spektrometria mas (MS), mimo iż enancjomery dają identyczne widma, a sama technika nazywana jest potocznie „chiralnie ślepą”. Wykorzystanie spektrometrii mas jako użytecznego narzędzia w analizie związków chiralnych możliwe jest poprzez tworzenie diastereoizomerycznych kompleksów w obecności związków chiralnych, w których słabe oddziaływania niekowalencyjne są przenoszone do fazy gazowej podczas wykonywanego eksperymentu.



Jeżeli $K_{a,(R)} \neq K_{a,(S)}$ i/lub $K_{d,(R)} \neq K_{d,(S)}$, selektor (R)-SO jest enancjoselektywny względem enancjomerów SA.

Rysunek 1. Powstawanie i/lub dysocjacja diastereoizomerycznych kompleksów pomiędzy chiralną cząsteczką selektora ((R)-SO) i enancjomerycznymi cząsteczkami analitu ((R)-SA i (S)-SA) [9]

Figure 1. Generalized description of a formation and/or dissociation of diastereomeric complexes between a chiral selector molecule ((R)-SO) and enantiomeric selectands ((R)-SA and (S)-SA) [9]

Podstawowe cechy, stanowiące o użyteczności spektrometrii mas w analizie związków chiralnych to szybkość analizy (jakościowej i ilościowej), wysoka czułość pomiarów, tolerancja na zanieczyszczenia oraz znacznie mniejsza ilość wymaganego analitu. Pełną optymalizację parametrów pomiaru wraz z rejestracją widma można wykonać już dla kilku mikrogramów substancji. Dodatkowo spektrometria mas eliminuje możliwy wpływ rozpuszczalnika lub fazy stacjonarnej na wynik przeprowadzonej analizy, co ma miejsce np. w przypadku metod chromatograficznych.

Pierwsza praca omawiająca eksperymenty nad rozróżnianiem enancjomerów z wykorzystaniem MS pochodzi z roku 1977 [8]. False i Wright opisali w niej wpływ „chiralności” estrów kwasu winowego na względną intensywność wybranych sygnałów, które odpowiadały powstającym w warunkach jonizacji chemicznej dimerom.

W późniejszym okresie, do znacznego rozwoju w dziedzinie MS, przyczyniło się wprowadzenie tzw. „łagodnych” technik jonizacji, wśród których na szczególną uwagę zasługują: elektrosprej (ang. *Electrospray Ionisation*, ESI), jonizacja za pomocą bombardowania szybkimi atomami (ang. *Fast Atom Bombardment*, FAB) czy desorpcja/jonizacja wspomagana matrycą (ang. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation*, MALDI). Istotny postęp nastąpił również wyniku zastosowania nowych, opartych na innych zasadach działania, analizatorów mas.

Możliwości, jakimi dysponuje współczesna spektrometria mas pozwoliły na wprowadzenie szeregu metod, które sklasyfikowano w czterech grupach i opisano w wielu pracach przeglądowych [9]. Wykonanie oznaczeń w poszczególnych grupach metod jest możliwe dzięki:

- tworzeniu przez analizowane enancjomery diastereoizomerycznych kompleksów typu gość-gospodarz (ang. *host-guest method*) w obecności chiralnych związków, które zdolne są inkludować mniejsze cząsteczki, lub układów analit-selektor. Przy rozróżnianiu enancjomerów wykorzystuje się pomiar względnych intensywności pików, odpowiadających poszczególnym dynamicznym diastereoizomerom, które z założenia różnią się stabilnością w warunkach eksperymentu. Zwykle jeden z analizowanych enancjomerów jest znaczony trwałym izotopem, dzięki czemu piki odpowiadające utworzonym diastereoizomerycznym kompleksom są przesunięte względem siebie o określoną wartość m/z [10],
- monitorowaniu stałych równowagi lub stałych szybkości reakcji wymiany cząsteczki analitu w diastereoizomerycznym kompleksie typu gość-gospodarz (analit-selektor) przez chiralną lub optycznie nieczynną cząsteczkę reagenta wprowadzoną w warunkach analizy [11],
- utworzeniu trimerycznego kompleksu analitu i enancjomerycznie czystego odnośnika w obecności dwuwartościowych jonów metali $[M^{2+}(\text{ref})_2(\text{A})\text{-H}]^+$ (zwykle metali grup przejściowych) i monitorowaniu szybkości konkurencyjnych procesów dysocjacji indukowanych zderzeniami (ang. *Collision-Induced Dissociation*, CID) [12],
- wyznaczeniu współczynnika CR (ang. *chiral recognition ratio*), jako stosunku względnej intensywności tylko jednego jonu fragmentacyjnego do

jonu podlegającego fragmentacji lub stosunku dwóch jonów fragmentacyjnych powstałych w wyniku dysocjacji indukowanej zderzeniami.

Stosując inne kryteria, wymienione metody podzielić można na te, które wymagają rejestracji jedynie podstawowego widma mas (pierwsza grupa) i takie (grupa druga) gdzie konieczne jest zastosowanie tandemowej spektrometrii mas (ang. *tandem mass spectrometry*, MS/MS). W pierwszej grupie metod rejestruje się widma, w których piki odpowiadające utworzonym diastereoizomerom przesunięte są o określoną wartość m/z w wyniku zastosowania znaczonego izotopowo jednego z enancjomerów. Znacznie szerzej wykorzystywane są metody grupy drugiej, gdzie jony o wybranej wartości m/z pod wpływem niskoenergetycznych zderzeń ulegają określonym procesom fragmentacji (widma CID).

W praktyce metoda MS/MS polega na tym, że z wiązki jonów selekcjonuje się wybrany jon, nazywany jonem prekursorem (ang. *precursor ion*), który poddawany jest kolizjom, zwykle z cząsteczkami wprowadzonego gazu obojętnego, na skutek czego rozpada się na jony fragmentacyjne (ang. *product ions*). Dzięki tej metodzie możliwe jest rejestrowanie widm jonów powstałych w wyniku fragmentacji wybranego jonu prekursora (ang. *product ion mass spectra*), widm jonów, które ulegając fragmentacji wytwarzają jon o wybranej masie (ang. *precursor ion mass spectra*) oraz widm jonów, które ulegają fragmentacji tracąc obojętną cząsteczkę o wybranej masie (ang. *neutral loss mass spectra*).

1. TECHNIKI JONIZACJI I TYPY ANALIZATORÓW MAS STOSOWANE W ANALIZIE ZWIĄZKÓW CHIRALNYCH

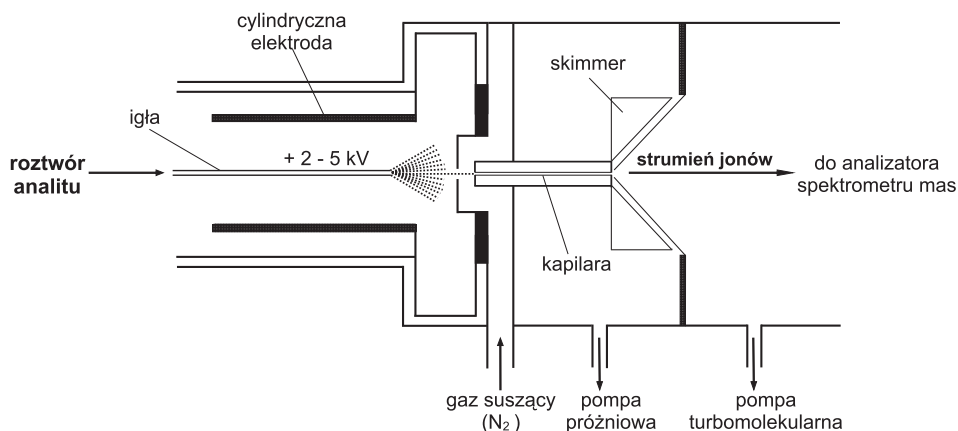
Rozróżnianie enancjomerów w spektrometrii mas stało się możliwe w momencie wprowadzenia odpowiednich technik jonizacji, podczas których słabe oddziaływania tworzone pomiędzy analitem a chiralną cząsteczką odnośnika lub jonem metalu mogły być zachowane i przeniesione do fazy gazowej w trakcie wykonywania eksperymentu.

W roku 2001 ukazała się praca przeglądowa na temat niekowalencyjnych oddziaływań w układach typu *gość-gospodarz* w fazie gazowej opisująca możliwości ich obserwacji przy zastosowaniu spektrometrii mas [13].

W ostatniej dekadzie najpowszechniej stosowaną techniką jonizacji w spektrometrii mas jest elektrosprej (ESI). Pionierskie prace dotyczące tej techniki należą do Fenna i pochodzą już z połowy lat osiemdziesiątych [14]. Podstawową zaletą ESI jest szerokie spektrum zastosowań w analizie różnych grup związków, od małych cząsteczek począwszy, przez wielkocząsteczkowe biopolimery, takie jak białka czy oligonukleotydy, po złożone układy kompleksowe.

Jonizując badany związek techniką ESI, analit rozpuszcza się w odpowiednim rozpuszczalniku, zwykle z niewielkim dodatkiem kwasu, ułatwiającym jego protonowanie. Następnie roztwór zostaje wprowadzany do komory, w której utrzymywane jest ciśnienie atmosferyczne. Przepływ cieczy odbywa się przez kapilarę

o stosunkowo małej średnicy, dzięki czemu zachowana jest niewielka szybkości przepływu roztworu (2–100 $\mu\text{l}/\text{min}$). Przyłożone do kapilary napięcie rzędu 2–5 kV powoduje akumulację ładunku na jej końcu, czego efektem jest utworzenie przez przepływającą ciecz tzw. dynamicznego stożka Taylor'a [15]. Odpowiednio wysokie napięcie powoduje, że gęstość ładunku jest na końcu stożka na tyle wysoka, że napięcie powierzchniowe nie może utrzymać cieczy w całości i ulega ona rozproszeniu tworząc strumień drobnych, równomiernie naładowanych kropli. Wytworzone krople zmniejszają objętość pod wpływem gazu suszącego (następuje odparowywanie rozpuszczalnika) oraz odpychania pomiędzy równoimiennymi ładunkami zgromadzonymi na ich powierzchni. Proces ten w konsekwencji prowadzi do powstania wiązki jonów, która wprowadzana jest do analizatora spektrometru mas (Rys. 2).



Rysunek 2. Schemat źródła jonów do ESI.
Figure 2. Schematic depiction of an ESI source

Jony powstałe przy użyciu techniki ESI charakteryzują się niewielkim nadmiarem energii wewnętrznej, co sprawia, że elektrosprej jest jedną z najłagodniejszych metod jonizacji spośród obecnie znanych.

Inne metody jonizacji, też zaliczane do tzw. „metod miękkich”, to jonizacja w wyniku bombardowania szybkimi atomami FAB i desorpcja/jonizacja wspomagana matrycą MALDI. Techniki te również pozwalają na obserwację „połączeń niekowalencyjnych” w warunkach wykonywanego eksperymentu. Ich wykorzystanie do badań związków chiralnych nie jest jednak obecnie tak duże jak techniki ESI.

Jonizacja techniką FAB następuje na skutek bombardowania roztworu analitu w odpowiednio dobranej ciekłej matrycy za pomocą strumienia atomów argonu lub ksenonu o energii rzędu 3–8 keV. Stosowana matryca ułatwia desorpcję jonów substancji badanej. Ulegając jonizacji w pierwszej kolejności pośredniczy w przekazywaniu energii niesionej przez wiązkę „rozpędzonych” atomów, wspomagając proces jonizacji analitu. Ponadto zapewnia równomierne stężenie badanej substancji w całym obszarze podlegającym działaniu wiązki energetycznie wzbudzonych atomów.

Jonizacja próbki może również odbywać się przy wykorzystaniu strumienia jonów cezu (Cs^+). Modyfikacja ta znana jest pod nazwą spektrometrii mas jonów wtórnych w ciekłej matrycy (ang. *Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry*, LSIMS). Z uwagi na to, że w praktyce techniki FAB i LSIMS, jak również widma rejestrowane przy ich zastosowaniu są bardzo do siebie podobne, akronim „FAB” jest często używany w stosunku do obu metod.

MALDI jako technika jonizacji, rozwijana w spektrometrii mas od połowy lat 80., wykorzystuje ideę znaną z technik FAB i LSIMS. Podstawowym założeniem MALDI jest użycie odpowiednio dobranej matrycy pośredniczącej w przekazywaniu energii umożliwiającej jonizację badanej substancji. W tym przypadku źródłem energii jest promieniowanie laserowe. Jonizacja cząsteczek analitu następuje po naświetleniu wiązką lasera o energii, która nie doprowadza do ich fragmentacji. Po zjonizowaniu próbki, strumień jonów kierowany jest do analizatora, gdzie następuje ich rozdział w zależności od wartości m/z .

Obecnie spektrometry mas wyposażone są w analizatory różnych typów. Na szczególną uwagę, z punktu widzenia badania związków chiralnych, zasługują analizatory kwadrupolowe (ang. *Quadrupole*, Q), różnego rodzaju pułapki jonów (ang. *Ion Trap*, IT), analizatory cyklotronowego rezonansu jonów z transformacją Fouriera (ang. *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*, FTICR) oraz analizatory czasu przelotu (ang. *Time-of-Flight*, TOF). Spektrometry, w których analizatory łączone są szeregowo umożliwiają stosowanie tzw. tandemowej spektrometrii mas (MS/MS). W takim systemie, pierwsze urządzenie służy do wyizolowania jonu o określonej wartości m/z , po czym wybrany jon zostaje poddany dalszej fragmentacji, a powstałe jony fragmentacyjne są analizowane w drugim z analizatorów.

Najpowszechniej używanym analizatorem mas jest analizator kwadrupolowy Q. Zbudowany jest on z czterech równoległych prętów ułożonych symetrycznie, do których przykładana jest napięcie prądu stałego oraz nakładana potencjał zmieniający się z częstością radiową. Dzięki temu działa on jako filtr masy, czyli w danym momencie przepuszcza tylko jony o określonej wartości m/z . Spektrometry z analizatorem kwadrupolowym są aparatami o relatywnie niskiej zdolności rozdzielczej, zaś ich podstawową zaletą jest proste połączenie z szeregiem układów służących do wprowadzania próbek np. z chromatografem.

Wśród pułapek jonowych najczęściej wykorzystywaną jest kwadrupolowa pułapka jonów (ang. *Quadrupole Ion Trap*, QIT). Jej działanie podobne jest do zwykłego analizatora kwadrupolowego. Pomiaru masy dokonuje się tu przez zatrzymanie w specjalnej komorze (pułapce) jonów o szerokim zakresie wartości m/z , dzięki zastosowaniu odpowiedniego pola elektrycznego. Następnie, jony te są selektywnie wyrzucane do detektora, na skutek przykładanego, zmieniającego się sinusoidalnie potencjału o częstości radiowej. Analizator taki pozwala stosować tandemową spektrometrię mas bez konieczności sprzęgania go z kolejnym analizatorem. Wyselekcjonowane jony są zatrzymywane w pułapce, a następnie wskutek przyłożonego dodatkowego impulsu o odpowiedniej częstości ulegają procesom fragmentacji.

Jony fragmentacyjne są dalej „wypychane” do detektora w kolejności zgodnej ze zmianą wartości m/z .

Analizator cyklotronowego rezonansu jonów z transformacją Fouriera (FTICR), podobnie jak pułapka jonów, zatrzymuje jony wewnątrz odpowiednio zbudowanej komory. Jony znajdujące się pod wpływem pola magnetycznego i elektrycznego poruszają się w jej wnętrzu po orbitach kołowych, gdzie dodatkowo przykładane napięcie o częstotliwości radiowej powoduje zmianę ich toru.

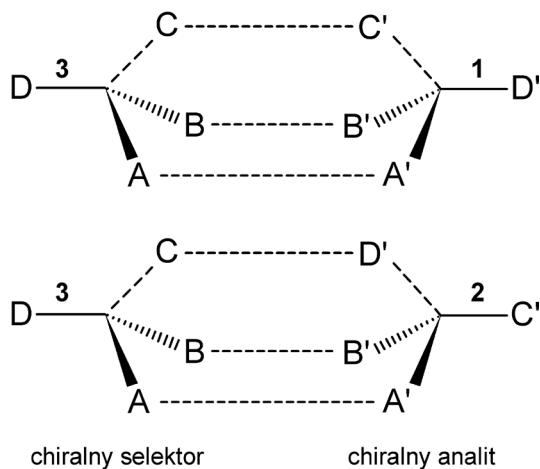
Główną zaletą spektrometru mas wyposażonego w analizator typu FTICR, podobnie jak w pułapkę jonów QIT jest fakt, iż jony mogą przebywać w nich do kilkudziesięciu minut. Tak „długi” okres umożliwia badanie składu mieszaniny powstających jonów w określonych odstępach czasu. Pozwala to na prowadzenie precyzyjnych badań kinetycznych, które z uwagi na wysoką próżnię w komorze analizatora (10^{-5} – 10^{-8} milibara), nie są narażone na błędy wynikające z zakłóceń spowodowanych dodatkowymi oddziaływaniami między jonami.

Zasada działania analizatora czasu przelotu TOF jest zupełnie inna. Jony przyspieszane przy pomocy impulsu elektrycznego dryfują przez komorę analizatora, w której nie poddawane są działaniu żadnego pola. Wskutek tego jony o różnym stosunku masy do ładunku poruszają się z różną prędkością i w różnym czasie docierają do detektora.

2. METODY ANALIZY ZWIĄZKÓW CHIRALNYCH

2.1. TWORZENIE KOMPLEKSÓW TYPU GOŚĆ-GOSPODARZ (ANG. *HOST-GUEST METHOD*) LUB UKŁADÓW ANALIT-SELEKTOR

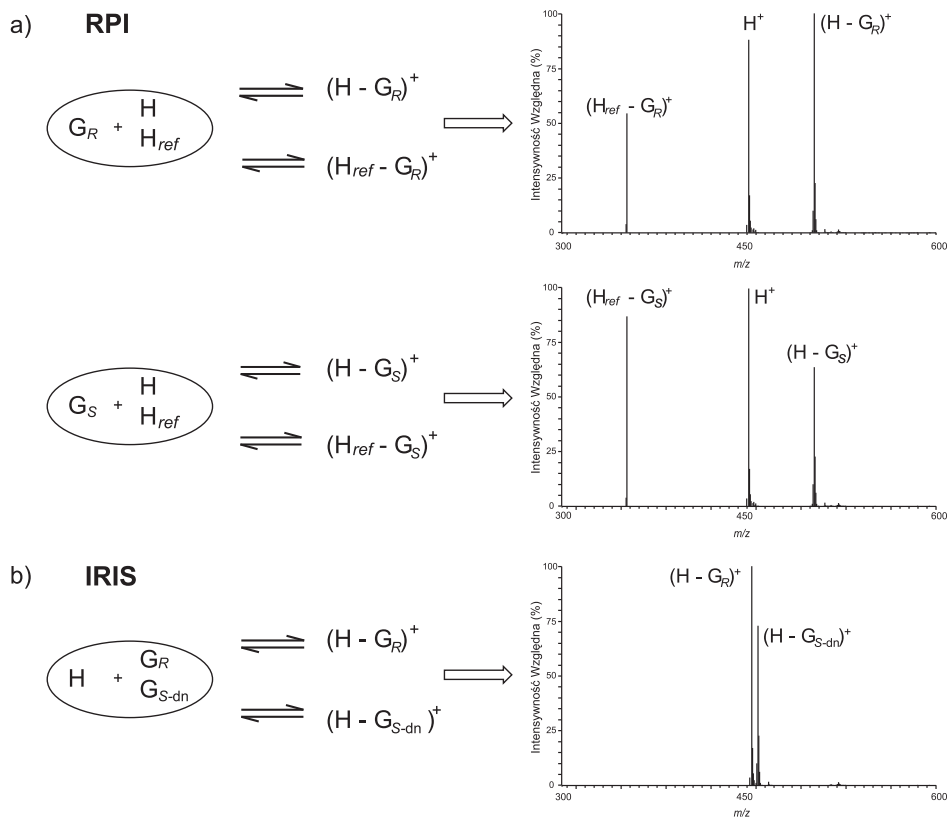
Zgodnie z powszechnie przyjętym poglądem, różnicowanie związków chiralnych przy użyciu metod chromatograficznych wymaga utworzenia przez cząsteczkę analitu stabilnego w warunkach analizy kompleksu z drugą enancjomerycznie czystą cząsteczką. Są to kompleksy typu analit–selektor lub *gość–gospodarz*. Układy te tworzą się dzięki obecności słabych oddziaływań, takich jak oddziaływanie dipol–dipol, hydrofobowe, elektrostatyczne, van der Waals’a czy wiązania wodorowe (Rys. 3) w przynajmniej trzech miejscach. Taki model oddziaływań oparty na trzech punktach zwany regułą trzech punktów lub regułą Pirkle’a, zakłada, że jedno z oddziaływań występujących pomiędzy enancjomerem a chiralnym selektorem powinno być stereochemicznie zależne tzn. zależeć od konfiguracji centrum stereogenicznego danego enancjomeru. W przypadku spektrometrii mas, jako techniki analitycznej, oczywistym wymogiem jest występowanie podobnych oddziaływań pomiędzy wyjściową cząsteczką a powstałym jonem w fazie gazowej, w warunkach wykonywanego eksperymentu.



Rysunek 3. Reguła trzech punktów (reguła Pirkle'a) stosowana w rozróżnianiu enancjomerów (1 i 2) przez chiralny selektor (3)

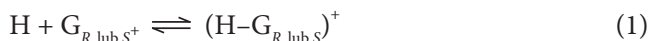
Figure 3. Schematic illustration of the three-point "Pirkle Rule" required for chiral recognition of enantiomers (1 and 2) by chiral selector (3)

Istotny wkład w rozwój badań nad trwałością kompleksów związków chiralnych typu *gość-gospodarz* mają prace Sawady, w których do jonizacji analizowanych cząstek wykorzystywano głównie bombardowanie szybkimi atomami (FAB) [10]. Rozróżnienia enancjomerów dokonywano na podstawie stosunku względnych intensywności pików (ang. *Relative Peak Intensity*, RPI) odpowiadających kompleksom, jakie optycznie czysta cząsteczka analitu (G_R lub G_S) utworzyła z chiralną cząsteczką *gospodarza* (H) wobec kompleksów utworzonych przez dany enancjomer z cząsteczką odnośnika (H_{ref}) (równania 1–3) [16]. Użyty odnośnik, oprócz właściwości kompleksujących powinien wykazywać podobieństwo chemiczne i strukturalne z chiralnym *gospodarzem*. Z uwagi na to, iż eksperyment wymaga wykonania dwóch oddzielnych widm, bo osobno dla poszczególnych enancjomerów, zachowanie identycznych warunków pomiaru jest często trudne do osiągnięcia i może prowadzić do dość dużego błędu (Rys. 4a).



Rysunek 4. Rozróżnianie związków chiralnych w oparciu o trwałość kompleksów typu gość-gospodarz: a) RPI, b) IRIS

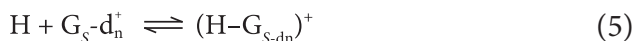
Figure 4. Recognition of chiral compounds based on stability of host-guest complexes: a) RPI, b) IRIS



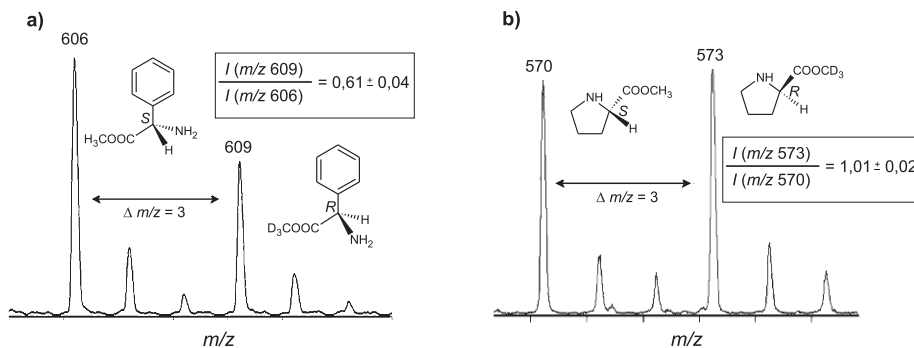
$$\text{RPI} = \frac{\text{RPI}_{(R)}}{\text{RPI}_{(S)}} = \frac{I[(\text{H} - \text{G}_R)^+]/I[(\text{H}_{\text{ref}} - \text{G}_R)^+]}{I[(\text{H} - \text{G}_S)^+]/I[(\text{H}_{\text{ref}} - \text{G}_S)^+]} \quad (3)$$

Zastosowanie znaczonych izotopowo cząsteczek gościa (ang. *enantiomer-labeled guest method*) lub gospodarza (ang. *enantiomer-labeled host method*) umożliwiło nie tylko rozróżnianie związków chiralnych, ale także analizę ilościową poszczególnych enancjomerów, już podczas rejestracji pojedynczego widma mas. Obecnie metoda ta jest dość powszechnie wykorzystywana w eksperymentach, w których jako technikę jonizacji stosuje się elektrosprej (ESI) [17], zaś znacznie rzadziej jonizację przez bombardowanie szybkimi atomami [18].

Metoda znaczonej trwałym izotopem cząsteczki *gościa* wymaga przygotowania równomolowej mieszaniny analizowanych enancjomerów, z których jeden jest znaczony izotopowo (G_R i $G_{S\text{-dn}}$), w obecności znacznie mniejszej ilości związku pełniącego rolę *gospodarza* (H) (równanie 4 i 5, Rys. 4b). Dzięki temu sygnały, które odpowiadają utworzonym kompleksom ($H-G_R$) i ($H-G_{S\text{-dn}}$) są przesunięte względem siebie o określoną wartość m/z . Miarą zróżnicowania enancjomerów jest stosunek względnej intensywności tych pików w widmie mas (zgodnie z przyjętą terminologią IRIS - równanie 6).



$$\text{IRIS} = \frac{I_R}{I_{S\text{-dn}}} = \frac{I[(H-G_R)^+]}{I[(H-G_{S\text{-dn}})^+]} \quad (6)$$

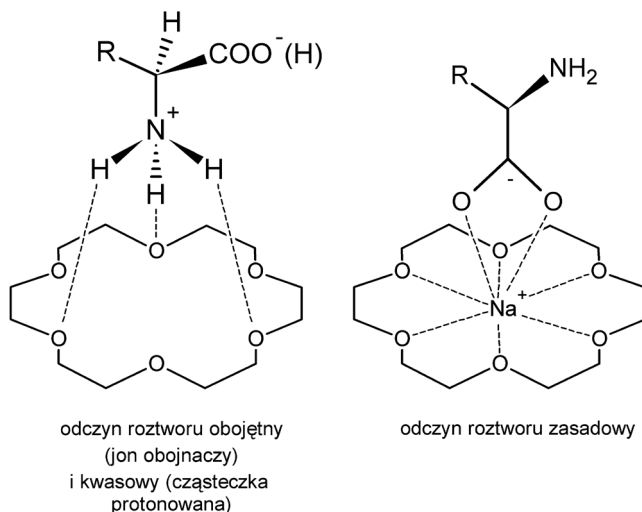


Rysunek 5. Widma ESI-TOF trójskładnikowych roztworów zawierających a) kwas eter 18-korona-6-2,3,11,12-tetrakarboksylowy ((-)-18C6TA) i enancjomery estrów metylowych fenyloglicyny (*L*-PG-CH₃ i *D*-PG-CD₃), b) (-)-18C6TA i enancjomery estrów metylowych proliny (*L*-Pro-CH₃ i *D*-Pro-CD₃) w metanolu w stosunku 1:10:10 [19]

Figure 5. ESI-TOF analysis of 1:10:10 ternary solutions in methanol containing a) ([18]crown-6)-2,3,11,12-tetracarboxylic acid ((-)-18C6TA), enantiomers of phenylglycine methyl ester (*L*-PG-CH₃ and *D*-PG-CD₃) and b) (-)-18C6TA, enantiomers of proline methyl ester (*L*-Pro-CH₃ and *D*-Pro-CD₃) [19]

Metodę opartą na wprowadzeniu izotopowoznaczonych cząsteczek jednego z enancjomerów analizowanego związku wykorzystali m.in. Gerbaux i współpracownicy w badaniach chiralnych aminokwasów i ich estrów metylowych, używając jako związków różnicujących eterów koronowych podstawionych czterema grupami karboksylowymi [19]. Wybór tej grupy związków nie jest przypadkowy, lecz był efektem ich szerokiego zastosowania w rozdziale optycznie czynnych aminokwasów

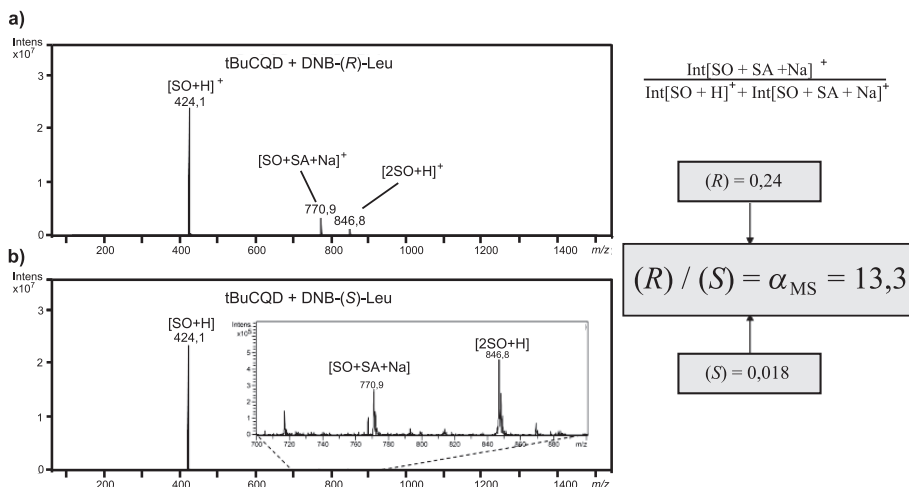
przy użyciu technik chromatograficznych. Funkcjonalizowane resztami karboksylowymi etery koronowe stosuje się w chromatografii jako chiralne fazy stacjonarne (ang. *Chiral Stationary Phases*, CSP). Możliwości rozróżniania aminokwasów przez etery koronowe wynikają bezpośrednio z ich struktury oraz ewentualnych oddziaływań z grupami funkcyjnymi i łańcuchem bocznym aminokwasów, zależnie od stereochemii badanych układów (Rys. 6). Z wybranej grupy aminokwasów, jedynie dla estrów metylowych proliny metoda ta nie dała satysfakcjonujących wyników (Rys. 5b) (IRIS = 1,01). Może to wskazywać na brak specyficznych oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy proliną a cząsteczkami eterów koronowych.



Rysunek 6. Podstawowe oddziaływania pomiędzy cząsteczką aminokwasu a eterem koronowym w zależności od odczynu roztworu [19]

Figure 6. Fundamental binding interactions between an amino acid and a crown ether in relation to pH [19]

Inną grupą związków powszechnie stosowaną jako chiralne fazy stacjonarne w chromatograficznym i elektroforetycznym rozdziale enancjomerów są pochodne chininy i chinidyny, do których zalicza się alkaloidy chinowcowe. Stosując spektrometrię mas, obiekty te zostały użyte jako związki różnicujące – selektory (SO) m.in. w analizie chiralnych *N*-(3,5-dinitrobenzoilo)aminokwasów [20] i dipeptydów [21] (selektandy, SA). Wykonano dwa oddzielne widma mas rejestrowane dla mieszanin selektora i czystych enancjomerów. Liczbowo miarą rozróżnienia enancjomerów był współczynnik enancjoselektywności (α_{MS}). Jego wartość, wyznaczona jako stosunek względnej intensywności sygnału odpowiadającego kompleksowi analit–selektor dla enancjomeru *S* i *R* lub na podstawie stosunków intensywności sygnału kompleksu analit–selektor do sumy intensywności wszystkich pików (wolny selektor + kompleks) (Rys. 7), bardzo dobrze korelował z danymi uzyskanymi w oparciu o metody chromatograficzne (α_{HPLC}).



Rysunek 7. Widma mas dla równomolowych mieszanin a) *tert*-butylokarbamoilochiny, *t*BuCQD (SO) i (*R*)-*N*-(3,5-dinitrobenzoilo)leucyny, DNB-(*R*)-Leu (SA) oraz b) *t*BuCQD i DNB-(*S*)-Leu w układzie woda/metanol w stosunku 50:50 z dodatkiem 10 μM octanu sodu [20]

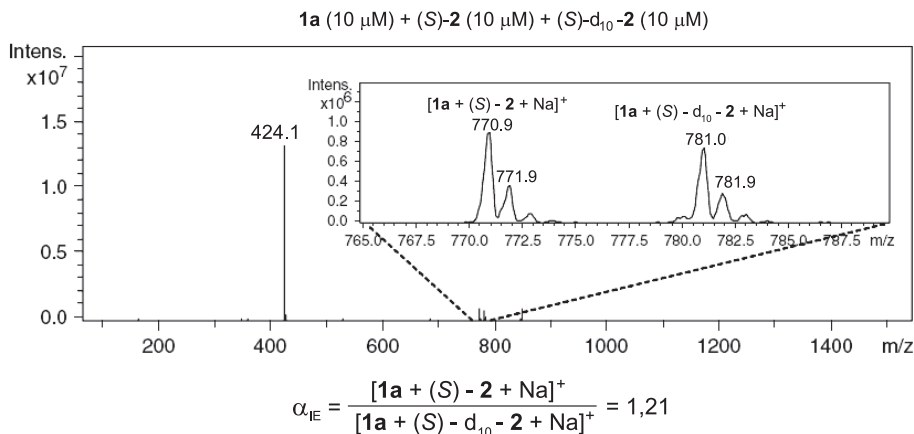
Figure 7. Mass spectra generated from equimolar mixtures of a) *tert*-butylcarbamoylquinine, *t*BuCQD (SO) and (*R*)-*N*-(3,5-dinitrobenzoyl)leucine, DNB-(*R*)-Leu (SA) and b) *t*BuCQD and DNB-(*S*)-Leu in 50:50 water/methanol with 10 μM sodium acetate [20]

Pochodnych chinowcowych użyto również jako związków różnicujących w analizie enancjomerów *N*-podstawionych aminokwasów wykorzystując opisaną wcześniej metodologię, w której jeden z analizowanych enancjomerów był znaczone trwałym izotopem [22]. Z przeprowadzonych badań wynikało, iż w przypadku tej klasy związków metoda obarczona była błędem wynikającym z kinetycznego efektu izotopowego. Analizując równomolową mieszaninę (*S*)-*N*-(3,5-dinitrobenzoilo)leucyny i jej deuterowanego analogu o tej samej konfiguracji, w obecności pochodnej chininowej zaobserwowano różnice w intensywności pików, odpowiadającym poszczególnym kompleksom analit–selektor (Rys. 8) [23].

Z uwagi na taką samą konfigurację absolutną analizowanych związków, prawdopodobnym powodem zaobserwowanych różnic jest modyfikacja właściwości fizykochemicznych związku deuterowanego względem nieznaczonego. Przypuszczenia odnośnie osłabienia oddziaływań typu van der Waals'a pomiędzy grupą *tert*-butylową selektora i deuterowanego aminokwasu, nie znalazły potwierdzenia. Wydeuterowanie grupy *tert*-butylowej w cząsteczce selektora nie spowodowało istotnych zmian w intensywności pików, odpowiadającym diastereoizomerycznym kompleksom w stosunku do eksperymentów, w których jako selektora użyto związku z niedeuterowaną grupą *tert*-butylową.

Wpływ kinetycznego efektu izotopowego w rozróżnianiu związków chiralnych został wyeliminowany w metodzie zaproponowanej przez Koschoë, w której jako związków różnicujących (selektorów) zastosowano pary „pseudoenancjomerów”. Pseudoenancjomerami nazywamy pary związków, które oprócz przeciwnej konfi-

guracji różnią się masą cząsteczkową. Różnicę tę powoduje zwykle podstawnik alkilowy o różnej długości łańcucha w odpowiadających sobie enancjomerach. Grupy te nie oddziałują w istotny sposób z cząsteczkami analitu, przez co nie mają wpływu na stopień zróżnicowania związków chiralnych.

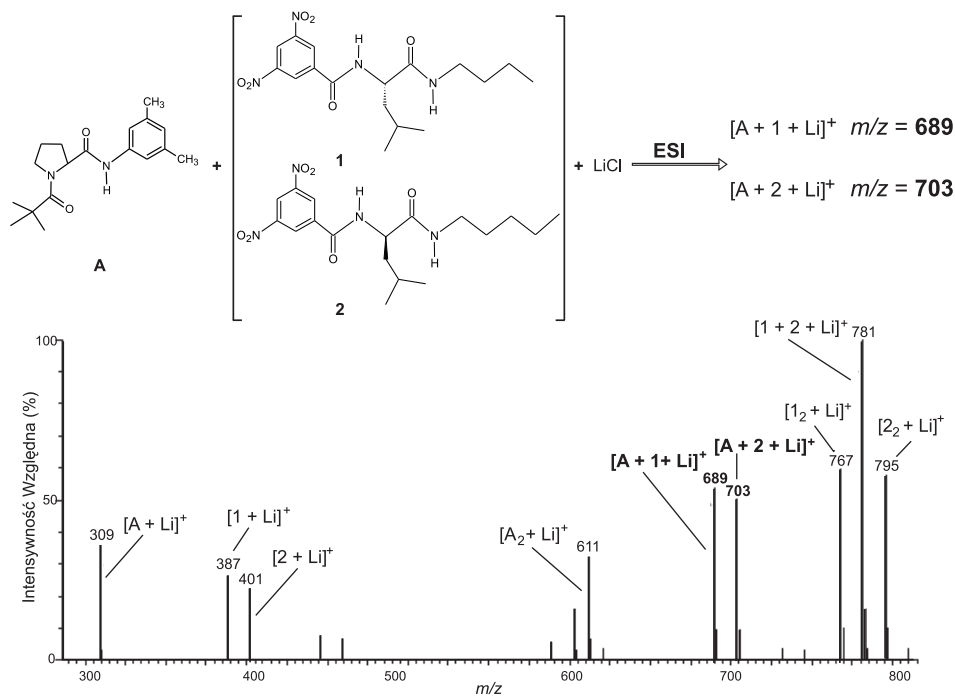


Rysunek 8. Widmo mas kompleksów *tert*-butylokarbamoilochininy **1a** z (*S*)-*N*-(3,5-dinitrobenzoilo)-leucyną (*S*)-2 i jej deuterowanym analogiem o tej samej konfiguracji (*S*)-d₁₀-2). Wyższa intensywność pików odpowiadającego diastereoizomerycznemu kompleksowi z cząsteczką niedeuterowaną świadczy o kinetycznym efekcie izotopowym. Potwierdzeniem jest wartość α_{IE} różna od jedności [23]

Figure 8. Mass spectrum of **1a** (*tert*-butylcarbamoylquinine) binding enantiomeric isotopologues of **2** ((*S*)-*N*-(3,5-dinitrobenzoyl)leucine) with the same configuration. A deuterium isotopic effect is apparent from the higher ion abundance of the diastereomeric complex incorporating the non-deuterated SA. The difference is manifested in a non unity α_{IE} value [23]

W pierwszych doniesieniach wykorzystujących opisane podejście, jako selektorów, użyto rozpuszczalne analogi chiralnych faz stacjonarnych typu Pirkle'a. Były to odpowiednie amidy *N*-(3,5-dinitrobenzoilo)leucyny stosowane w analizie pochodnych proliny (Rys. 9), których rozdział metodami chromatograficznymi przy użyciu tychże faz był już znany [24, 25].

W widmach wykonanych techniką ESI dla równomolowej mieszaniny związków będących parą „pseudoenancjomerów”, tj. amidu butylowego (*S*)-*N*-(3,5-dinitrobenzoilo)leucyny i amidu pentylowego (*R*)-*N*-(3,5-dinitrobenzoilo)leucyny, pełniących rolę selektorów wobec chiralnej pochodnej proliny, zaobserwowano piki, które odpowiadały obu kompleksom analit–selektor. Względna intensywność tych sygnałów zależała od składu enancjometrycznego badanego analitu. Z różnicy intensywności wynikało, że enancjomer *R* proliny tworzył kompleks o większej trwałości z amidem pentylowym (*R*)-*N*-(3,5-dinitrobenzoilo)leucyny, podczas gdy enancjomer *S* bardziej trwale łączył się z jego „pseudoenancjomerem” (Rys. 10a).

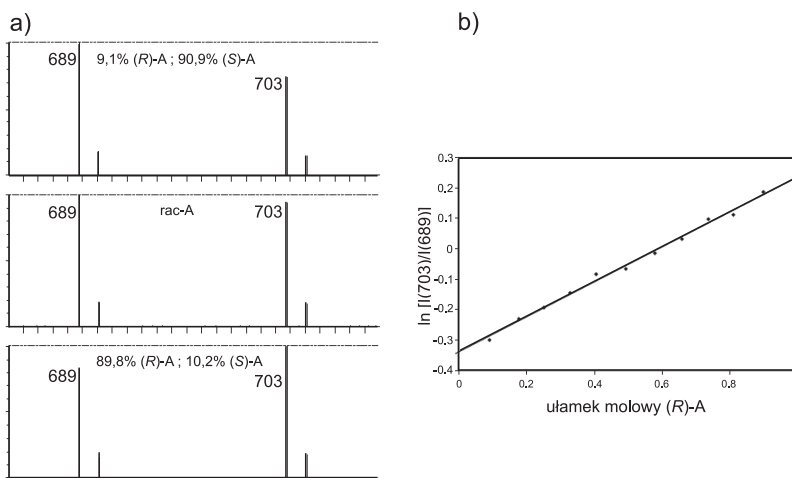


Rysunek 9. Widmo mas mieszaniny pary „pseudoenantjomerycznych” selektorów **1** (amid butylowy (S)-N-(3,5-dinitrobenzoilo)leucyny), **2** (amid pentylowy (R)-N-(3,5-dinitrobenzoilo)leucyny) (2,5 mM) i analitu **A** (0,25 mM) z dodatkiem chlorku litu (25 mM) w układzie metanol/woda/acetone (1:1:2) [24]

Figure 9. Mass spectrum of a solution of pseudo-enantiomeric selectors **1** (butyl amide of (S)-DNB-leucine) and **2** (pentyl amide of (R)-DNB-leucine) (2.5 mM) and analyte **A** (0.25 mM) with added lithium chloride (25 mM) in methanol/water/acetone (1:1:2) [24]

Podjęto również próbę, gdzie rolę selektora pełniły pochodne proliny [26] oraz *trans*-4-hydroksyproliny [27]. Związków tych użyto z powodzeniem w analizie *N*-(3,5-dinitrobenzoilo)aminokwasów. W zależności od charakteru użytego selektora, widma ESI (dla tych układów) rejestrowane były zarówno w trybie jonów dodatnich jak i ujemnych.

We wszystkich przypadkach zależność logarytmu naturalnego ilorazu względnych intensywności pików odpowiadających kompleksom analit–selektor, gdzie pary selektorów są „pseudoenantjomerycznymi”, względem ułamka molowego jednego z enancjomerów jest funkcją liniową (Rys. 10b). Powinowactwo poszczególnych enancjomerów badanego analitu wobec selektorów określa współczynnik enancjoselektywności α_{MS} . Wyznaczyć go można w prosty sposób na podstawie nachylenia prostej, które równe jest podwojonej wartości logarytmu naturalnego współczynnika enancjoselektywności ($2\ln\alpha_{MS}$).



Rysunek 10. a) Widma mas pary „pseudoenancjomerycznych” selektorów: amid butylowy (S)-*N*-(3,5-dinitrobenzoilo)leucyny, (S)-1 i amid pentyłowy (R)-*N*-(3,5-dinitrobenzoilo)leucyny, (R)-2 (2,5 mM) z analitem A (0,25 mM) z dodatkiem chlorku litu (25 mM) w układzie metanol/woda/aceton (1:1:2) dla roztworów o różnym składzie enancjomerycznym analitu A, b) zależność logarytmu naturalnego stosunku intensywności pików o *m/z* 703 i 689 w widmach mas ESI względem ułamka molowego (R)-A ($r^2 = 0,997$) [24]

Figure 10. a) Partial mass spectra of pseudo-enantiomeric selectors (S)-1 and (R)-2 (2.5 mM) and analyte A (0.25 mM) with added lithium chloride (25 mM) in methanol/water/acetone (1:1:2), b) Plot of the natural log of the ratio of peaks at *m/z* 703 and 689 in the ESI-MS versus the mole fraction of (R)-A in the solution ($r^2 = 0.997$) [24]

Istotnym zabiegiem prowadzącym do poprawienia dokładności wyznaczonej na podstawie powyższej zależności wartości współczynnika α_{MS} okazało się wprowadzenie w cząsteczkach selektorów dodatkowej grupy, która łatwo ulegała protonowaniu (grupa aminowa). Umożliwiło to odseparowanie miejsca lokalizacji ładunku od miejsc oddziałujących z analitem i jednocześnie odpowiedzialnych za zróżnicowanie enancjomerów [28].

W oparciu o podstawowe widma ESI, dzięki tej metodzie, wyznaczyć można również tzw. ułamek intensywności pików kompleksu (ang. *Complex Intensity Fraction*, CIF). Liczbowo jest on określany jako stosunek intensywności sygnału pochodzącego od jednego z kompleksów analit-selektor do sumy intensywności pików pochodzących od obu kompleksów jakie dany analit tworzy z parą „pseudoenancjomerów”. Jego wartość zmienia się liniowo względem enancjomerycznego składu badanego analitu ($r^2=0,999$). Liniowy charakter tej zależności umożliwia z dużą dokładnością określenie udziału poszczególnych enancjomerów w próbkach o nieznanym składzie (analiza ilościowa). Pozwala również wyznaczyć współczynnik enancjoselektywności α_{MS} chiralnej pary „pseudoenancjomerycznej” względem analizowanych układów na podstawie równania łączącego CIF z ułamkiem molowym jednego z enancjomerów $X_{R \text{ lub } S}$ analitu:

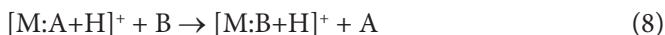
$$\text{CIF} = \left(\frac{\alpha_{\text{MS}} - 1}{\alpha_{\text{MS}} + 1} \right) X_{R \text{ lub } S} + \left(\frac{1}{\alpha_{\text{MS}} + 1} \right) \quad (7)$$

2.2. ENANCJOSELEKTYWNE REAKCJE KOMPLEKSÓW INKLUZYJNYCH JON-CZĄSTECZKA W FAZIE GAZOWEJ

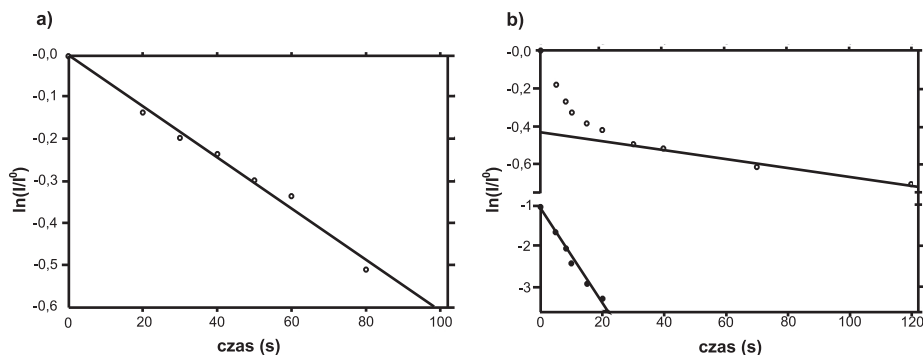
Znanym i powszechnie używanym terminem w chemii supramolekularnej jest tzw. „rozpoznanie molekularne” (ang. *molecular recognition*). Pod pojęciem tym rozumie się proces specyficznego wiązania ligandu przez większą cząsteczkę, w wyniku którego dochodzi do powstania kompleksu typu *gość-gospodarz*. Związkami, które najczęściej pełnią rolę molekuly kompleksującej są układy makrocykliczne, takie jak: cyklodekstryny, etery koronowe, kaliksareny, wśród których szeroką grupę stanowią rezorcynoareny, czy cykliczne poliamidy. Skuteczność wymienionych związków w otrzymywaniu połączeń inkluzyjnych, które często tworzą się w sposób stereoselektywny, wynika z ich specyficznej budowy. Natomiast taka zdolność rozpoznawania związków chiralnych (ang. *Chiral Recognition*, CR) stwarza możliwość ich wykorzystania w spektrometrii mas, do określania czystości optycznej związków optycznie czynnych.

Metoda rozróżniania związków chiralnych, z wykorzystaniem enancjoselektywnych reakcji kompleksów jon-cząsteczka w fazie gazowej (ang. *ion/molecule reaction*) polega na utworzeniu kompleksu opartego na słabych oddziaływaniach niekowalencyjnych, takich jak: siły van der Waalsa, słabe wiązania wodorowe, oddziaływania π - π (nazywane także π - π *stackingiem*) oraz oddziaływania elektrostatyczne, w którym związek optycznie czynny jest zainkludowany przez molekułę kompleksującą. Powstały w ten sposób kompleks typu *gość-gospodarz* ulega następnie reakcji wymiany ligandu przez obojętną cząsteczkę innego związku. Związkami, które najczęściej pełnią funkcję reagenta zastępującego badany analit w kompleksie inkluzyjnym są chiralne bądź nieczynne optycznie aminy lub aminokwasy. Sama metoda dostarcza oprócz cennych informacji na temat trwałości diastereoizomerycznego kompleksu jon-cząsteczka również dane opisujące szybkość reakcji wymiany cząsteczki gościa w tymże kompleksie.

Ogólnie, pomiar taki wykonuje się generując z roztworu zawierającego makrocykl M oraz analizowany enancjomer A odpowiedni diastereoizomeryczny kompleks $[M:A+H]^+$, stosując jako technikę jonizacji elektrosprej ESI. Po wprowadzeniu utworzonego jonu do analizatora cyklotronowego rezonansu jonów z transformacją Fourier’a FTICR w obecności wprowadzonego z zewnątrz chiralnego bądź achiralnego reagenta B monitoruje się szybkość reakcji wymiany, opisanej równaniem (8).



W oparciu o względne intensywności pików, które odpowiadają kompleksom: wyjściowemu $[M:A+H]^+$ oraz powstałemu w reakcji wymiany $[M:B+H]^+$, mierzo- nym w zależności od czasu, wyznaczyć można stałą szybkości przebiegającej reak- cji wymiany. Jeżeli I opowiada względnej intensywności kompleksu wyjściowego $[M:A+H]^+$ w czasie t , podczas gdy I_0 jest sumą intensywności kompleksu pierwot- nego oraz uzyskanego w reakcji wymiany, zależność logarytmu naturalnego (I/I_0) od czasu t jest zwykle zależnością liniową, a nachylenie prostej odpowiada stałej szybkości reakcji wymiany pseudo-pierwszego rzędu (k') (Rys. 11a). Odpowied- nio stałą szybkości drugiego rzędu opisuje stosunek nachylenia prostej pierwszego rzędu względem stężenia reagenta B ($k=k'/[B]$).



Rysunek 11. Zależność opisująca kinetykę reakcji kompleksów jon–cząsteczka w fazie gazowej pomiędzy a) S-(+)-2-butyloaminą a kompleksem $[M:L-DOPA^{OEt} + H]^+$, b) S-(+)-2-butyloaminą a kompleksem $[M:L-DOPA^{OMe} + H]^+$ [31].

Figure 11. Kinetic plot for the gas-phase reaction between a) S-(+)-2-butylamine and $[M:L-DOPA^{OEt} + H]^+$, b) between S-(+)-2-butylamine and $[M:L-DOPA^{OMe} + H]^+$ [31]

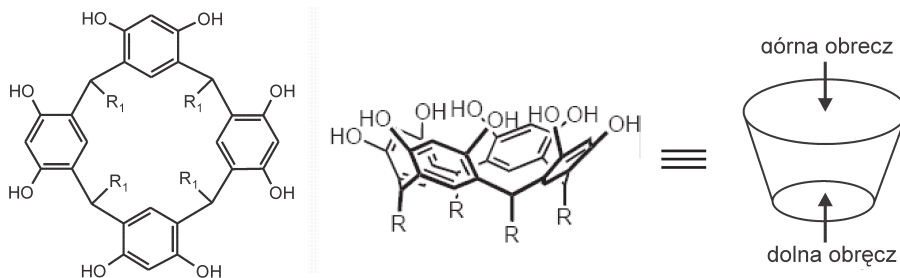
Istnieją przypadki, w których $\ln(I/I_0)$ w funkcji czasu nie jest zależnością liniową i obserwujemy się swego rodzaju załamanie prostej (Rys. 11b). Jest to wynikiem współistnienia co najmniej dwóch trwałych izomerycznych struktur kompleksu wyjściowego $[M:A+H]^+$, które różnią się reaktywnością względem wprowadzonego związku B. Mniej reaktywny określany jest jako $[M:A+H]_{slow}^+$ oraz podlegający reakcji wymiany szybciej, jako $[M:A+H]_{fast}^+$. Zależność $\ln(I/I_0)$ względem czasu t dla kompleksu bardziej reaktywnego $[M:A+H]_{fast}^+$ (zapełnione kółka na Rys. 11b) można wykreślić odejmując od zależności opisującej cały proces wymiany (puste kółka na Rysunku 11b), punkty odpowiadające szybkości reakcji pierwszego rzędu rozpadu kompleksu, dla którego reakcja wymiany zachodzi wolniej $[M:A+H]_{slow}^+$ (górną prostą na Rysunku 11b). Punkty przecięcia prostych opisujących kinetykę reakcji z osią rzędnych dla kompleksów $[M:A+H]_{slow}^+$ i $[M:A+H]_{fast}^+$ pozwala oszacować ich względny rozkład.

Kinetyczną enancjoselektywność reakcji wymiany ligandu wyznaczyć można porównując stałe szybkości reakcji drugiego rzędu dla dwóch identycznych reakcji

wymiany w diastereoizomerycznych kompleksach $[M:A_R+H]^+$ i $[M:A_S+H]^+$ przeprowadzonych w tych samych warunkach. Zatem, k_{homo} odnosi się do kompleksu, w którym związki A i M posiadają tę samą konfigurację, zaś k_{hetero} do pary o konfiguracji przeciwnej. W zależności od konfiguracji związku B stała szybkości reakcji opisywana jest jako $k_{(R)}$ lub $k_{(S)}$.

Wartość enancjoselektywności określana jest dwoma parametrami ρ i ξ . Współczynnik ρ zdefiniowany jako $k_{\text{homo}}/k_{\text{hetero}}$ dotyczy konfiguracji pary M/A natomiast $\xi = k_{(R)}/k_{(S)}$, odnosi się do konfiguracji substancji B (obojętnej aminy lub aminokwasu). Jeżeli $\rho > 1$, reakcja wymiany ligandu A przez B zachodzi szybciej dla kompleksu homochiralnego i odwrotnie, dla kompleksu heterochiralnego gdy $\rho < 1$. Wartość $\rho = 1$ wskazuje na jednakową szybkość wymiany dla obu reakcji. Analogicznie, $\xi > 1$ wskazuje na szybszą reakcję wymiany cząsteczki gościa A w danym kompleksie przez związek B o konfiguracji R, podczas gdy związek o konfiguracji S zastępuje cząsteczkę A szybciej, jeżeli spełniona jest zależność $\xi < 1$. Identyczną szybkość reakcji wymiany niezależnie od konfiguracji reagenta B obserwujemy w przypadku, gdy współczynnik enancjoselektywności $\xi = 1$.

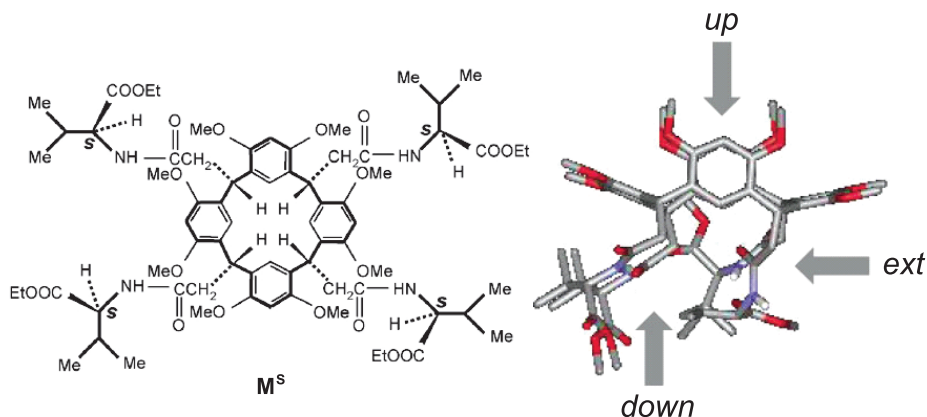
Śród makrocyklicznych związków, które łatwo tworzą kompleksy inkluzyjne, grupą obecnie najczęściej wykorzystywaną są kaliksareny i ich pochodne zwane rezorcynoarenami. Z uwagi na ich wnątkową (stożkową) budowę (Rys. 12) mają one zdolność do kompleksowania szerokiej gamy analitów. Dodatkowo istotną cechą tej grupy połączeń jest możliwość ich łatwej modyfikacji poprzez funkcjonalizację grup hydroksylowych. Wprowadzenie optycznie czynnych podstawników powoduje, że stają się chiralne i wykazują stereoselektywny charakter w oddziaływaniach typu gość-gospodarz wobec związków optycznie czynnych.



Rysunek 12. Struktura rezorcynoarenów
Figure 12. Structure of resorcinarenes

W przeprowadzonych dotychczas badaniach za pomocą spektrometrii mas, wykazano użyteczność metody polegającej na reakcji wymiany jon-cząsteczka w rozróżnianiu szeregu chiralnych aminokwasów i ich pochodnych [29–33], a także dipeptydów [34]. Jako molekuł kompleksujących użyto tu chiralnych pochodnych rezorcyno[4]arenów, których asymetryczną budowę uzyskano dzięki wprowadzeniu czterech aksjalnie położonych grup L-waliny (Rys. 13). Związkami uczestniczącymi

w reakcji wymiany zainkludowanego aminokwasu były enancjomery [(*S*)- lub (*R*)]-2-butyloaminy.



Rysunek 13. Wzór pochodnej 2,8,14,20-tetrakis(*L*-walinamido)rezorcyno[4]arenu (M^S) oraz możliwe miejsca lokalizacji cząsteczki aminokwasu (cząsteczki gościa) [33]

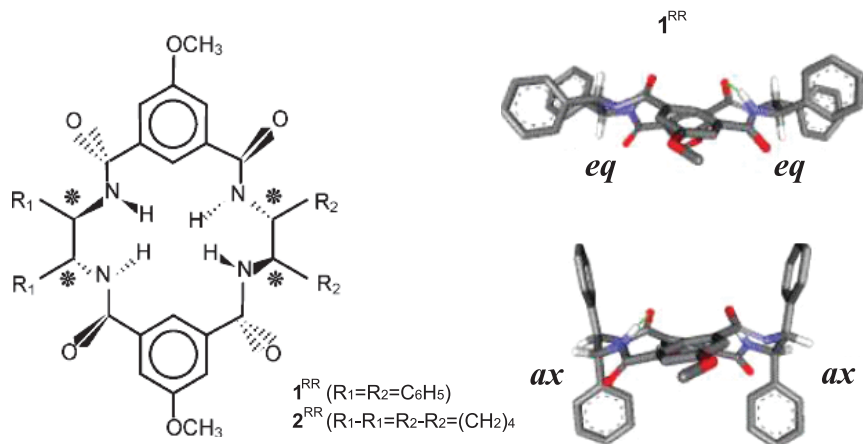
Figure 13. Formula of the flattened-cone 2,8,14,20-tetrakis(*L*-valinamido)resorcin[4]arene (M^S) and regions of attachment of amino acidic guest on flattened-cone 2,8,14,20-tetrakis(*L*-valinamido)resorcin[4]arene [33]

Szybkość reakcji wymiany we wszystkich analizowanych układach zależała zarówno od konfiguracji badanych aminokwasów ($\rho \neq 1$) jak i od konfiguracji użytej aminy ($\xi \neq 1$). W wielu przypadkach zaobserwowano również obecność więcej niż jednej trwałej struktury kompleksu $[M:A+H]^+$.

Użytecznym narzędziem, które pomaga zrozumieć zaistniałe różnice są metody obliczeniowe oparte na założeniach mechaniki i dynamiki molekularnej. Zgodnie z nimi w badanych pochodnych rezorcyno[4]arenów istnieją trzy pozycje, gdzie cząsteczka gościa może zostać zainkludowana. Cząsteczka kompleksowana może znajdować się wewnątrz achiralnej górnej obręczy (pozycja *up*), pomiędzy chiralnymi podstawnikami (pozycja *down*) oraz na zewnątrz cząsteczki w otoczeniu dwóch sąsiednich chiralnych podstawników (pozycja *ext*) (Rys. 13). Dodatkowo istotnym elementem jest konformacja cząsteczki gospodarza. Żadna z tych pozycji nie jest uprzywilejowana dla całej grupy badanych analitów i zależy od charakteru łańcucha bocznego i konfiguracji aminokwasów.

Grupą związków równie często wykorzystywaną w opisaney metodzie badań związków chiralnych są cykliczne poliamidy [35]. Na szczególną uwagę zasługuje amfifilowy charakter grup amidowych w oddziaływaniach dipolowych oraz wiązaniach wodorowych. Grupa karbonylowa może spełniać funkcję donorową w oddziaływaniu dipolowym i być akceptorem wodoru w wiązaniu wodorowym, zaś grupa N–H działać jako akceptor dipolowy, a zarazem donor wodoru w wiązaniu wodorowym.

Kompleksy cyklicznych poliamidów z pochodnymi aminokwasów $[M:A+H]^+$ mogą przyjmować w fazie gazowej trzy różne konformacje, zależne od położenia podstawników alkilowych lub fenylowych przy dwóch sąsiednich stereogenicznych atomach węgla (Rys. 14).



Rysunek 14. Wzór cyklicznych tetramidów i odpowiadające mu struktury o najniższej energii [36]
 Figure 14. Formula and relevant minimum energy structures of tetra-amide macrocycles [36]

Wśród nich położenia *eq-eq* i *ax-ax* wykazują największą trwałość, dając zwykle mieszaninę dwóch konformerów dla danego diastereoizomerycznego kompleksu $[M:A:H]^+$, których stosunek zależy od konfiguracji cząsteczek A i M i charakteryzujących się różną reaktywnością względem stosowanej aminy. W odróżnieniu od rezorcynoarenów szybkość reakcji wymiany zainkludowanej cząsteczki przez reagent B nie zależy w znacznym stopniu od jego konfiguracji ($\xi \approx 1$) [36].

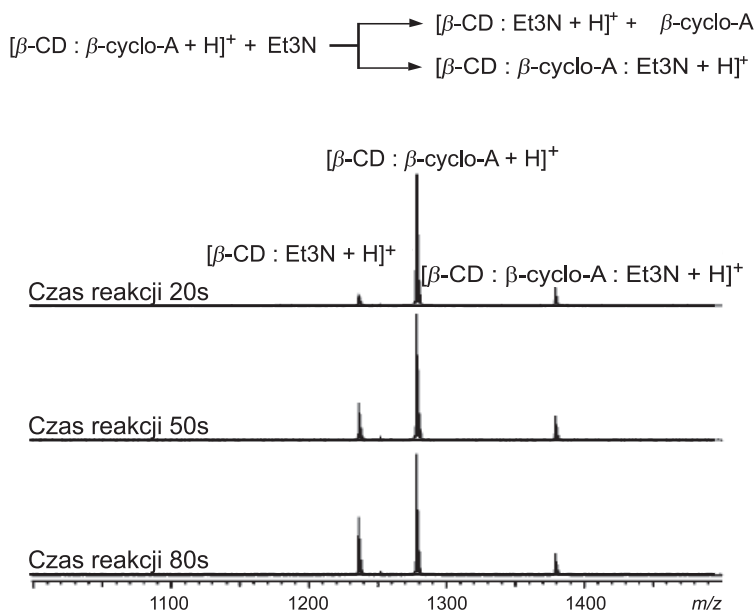
Szeroką analizę osiągnięć w badaniach związków chiralnych, z wykorzystaniem enancjoselektywnych reakcji w fazie gazowej kompleksów jon–cząsteczka przedstawił w pracy przeglądowej Speranza [37].

Kolejną szeroko stosowaną grupą makrocykli wykorzystywaną w analizie związków chiralnych, również metodami chromatograficznymi są cyklodekstryny. Są to cykliczne układy zbudowane z jednostek cukrowych α -1,4-glukozy, z których najbardziej rozpowszechnione formy to α , β i γ składające się odpowiednio z 6, 7 lub 8 merów. Z uwagi na toroidalny kształt cząsteczki z chiralną wnęką oraz grupami hydroksylowymi obecnymi na krawędzi toroidalnej struktury, cyklodekstryny posiadają zdolność stereoselektywnego inkludowania mniejszych cząsteczek. We wcześniejszych latach fakt ten wykorzystywany był w rozróżnianiu związków chiralnych opisaną w poprzednim rozdziale metodą opartą na tworzeniu kompleksów typu *gość–gospodarz* [38], a obecnie dodatkowo wykorzystującą reakcję wymiany zainkludowanego w cząsteczce cyklodekstryny gościa. Stosowany w eksperymencie reagent B, w przypadku użycia cyklodekstryn jako związków kompleksujących musi charakteryzować się odpowiednio wysokim powinowactwem względem

protonu (ang. *Proton Affinity*, PA), aby reakcja wymiany ligandu mogła nastąpić. W przypadku analizy chiralnych cyklicznych β -aminokwasów w kompleksie z β -cyklodekstryną konieczne było zastosowanie trietyloaminy (PA = 982 kJ mol⁻¹), podczas gdy w obecności eterów koronowych wystarczyła *n*-propyloamina, której powinowactwo względem protonu wynosi 918 kJ mol⁻¹ [39].

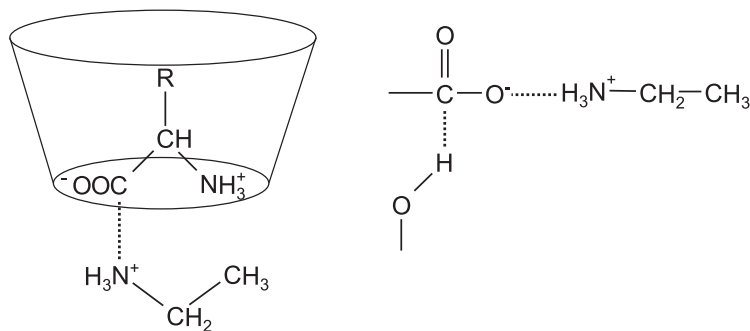
Interesującą obserwacją w przypadku stosowania cyklodekstryn jako cząsteczek kompleksujących względem chiralnych aminokwasów, oprócz typowej reakcji wymiany ligandu przez wprowadzony reagent, jest obecność trimerycznych kompleksów [M:A:B+H]⁺, które nie występują w przypadku opisanych poprzednio klas związków kompleksujących (Rys. 15).

Aby uniknąć tworzenia kompleksów trimerycznych w analizie chiralnych aminokwasów w obecności β -cyklodekstryn, które mogą zakłócać ich rozróżnianie, w wielu przypadkach stosuje się modyfikację cyklodekstryn poprzez częściowe metylowanie grup hydroksylowych [40]. Za przyczynę powstawania kompleksów trimerycznych uznaje się występowanie aminokwasów w postaci jonów obojnaczych (*zwitterion*), które oddziałują jednocześnie z cząsteczką β -cyklodekstryny i protonowaną cząsteczką aminy.



Rysunek 15. Widma mas ESI kompleksu β -cyklodekstryny (β -CD) z β -aminokwasem 1R,2S-cykloheksanowym (β -cyclo-A) w obecności trietyloaminy (Et₃N) w różnych odstępach czasu opisujące reakcję wymiany ligandu w kompleksie [39]

Figure 15. a) ESI mass spectra of ion/molecule reaction of *host-guest* complex of β -cyclodextrin (β -CD) and 1R,2S-cyclohexane β -amino acid (β -cyclo-A) with triethylamine (Et₃N) [39]



Rysunek 16. Proponowana struktura aminokwasu w postaci jonu obojnaczego zainkludowanego we wnęce cyklodekstryny [41]

Figure 16. Proposed structure of gas-phase zwitterionic amino acid in the cavity of cyclodextrin (represented as a toroidal cavity) [41]

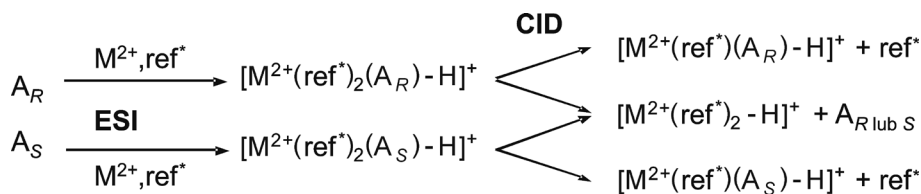
Szczegółowa analiza kompleksowania chiralnych aminokwasów przez α -, β -, γ -cyklodekstryny oraz reakcje wymiany ligandów przez obojętne aminy wskazała, że aminokwasy, które preferencyjnie występują w postaci jonu obojnaczego w fazie gazowej charakteryzują się wysoką zasadowością. Zgodnie z proponowaną strukturą kompleksu inkluzyjnego, aminokwas w postaci jonu obojnaczego jest stabilizowany przez wiązania wodorowe, jakie tworzy z grupami hydroksylowymi w obszarze wąskiej obręczy cyklodekstryny. Ponadto ładunek dodatni protonowanej cząsteczki aminy, będącej reagentem biorącym udział w reakcji wymiany jest skoordynowany z grupą karboksylową aminokwasu (Rys. 16). Kluczowymi w tworzeniu kompleksów cyklodekstryn z aminokwasami jest geometria i wielkość wnęki, jakimi charakteryzuje się dana molekula kompleksująca oraz rodzaj grupy w łańcuchu bocznym zainkludowanego ligandu. Im wnęka ta jest większa, a co za tym idzie cząsteczka posiada więcej grup hydroksylowych w obszarze wąskiej obręczy (ang. *narrow rim*), tym łatwiej stabilizuje ona aminokwas w formie jonu obojnaczego [41]. Rozróżnienie związków chiralnych w oparciu o reakcję wymiany ligandu w kompleksie typu *gość-gosodarz* zastosowano również w analizie ilościowej. Krzywą kalibracyjną wyznacza się w oparciu o intensywność pików, które odpowiadają kompleksom wyjściowemu $[M:A+H]^+$ i powstałemu w reakcji wymiany $[M:B+H]^+$ w ściśle określonym czasie t dla mieszanin o znanej zawartości poszczególnych enancjomerów [42]. Zależność I/I_0 względem ułamka molowego jednego z enancjomerów ma charakter liniowy, co pozwala z dość dużą dokładnością wyznaczyć stosunek poszczególnych enancjomerów dla mieszanin o nieznannej ich zawartości.

2.3. METODA KINETYCZNA (ANG. KINETIC METHOD)

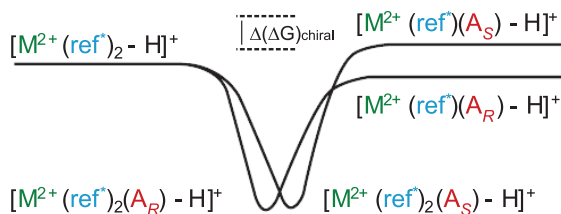
Metoda kinetyczna (ang. *kinetic method*) została po raz pierwszy wprowadzona przez Cooks'a i początkowo szeroko stosowana w wyznaczaniu wielkości termodynamicznych [43, 44]. Z czasem znalazła również zastosowanie w oznaczaniu i kontroli

czystości enancjomerycznej związków chiralnych. W ciągu ostatnich dziesięciu lat metodę tę zastosowano w oznaczaniu wielu grup związków chiralnych jak aminokwasy [45], α -hydroksykwasy [46], dipeptydy [47], β -blokery [48], cukry [49] czy nukleozydy stosowane jako leki antywirusowe [50]. Prowadzone do chwili obecnej badania mają na celu jej udoskonalenie i określenie wpływu różnych czynników na jej użyteczność.

Stosując metodę kinetyczną w analizie enancjomerów w pierwszym etapie pomiaru wymagane jest wygenerowanie odpowiedniego trimerycznego kompleksu $[M^{2+}(\text{ref}^*)_2(\text{A}_R \text{ lub } \text{A}_S)\text{-H}]^+$. Kompleks taki można otrzymać z mieszaniny wodnych roztworów metanolu zawierających odpowiednio: interesujący izomer optyczny A_R lub A_S , chiralny odnośnik ref^* i sól dwuwartościowego metalu M^{2+} , stosując jako technikę jonizacji elektrosprej. Następnie wyizolowany jon poddaje się dysocjacji indukowanej zderzeniami (CID), w wyniku której ulega on dwóm konkurencyjnym procesom eliminacji ligandów. W efekcie odejścia cząsteczki będącej odnośnikiem lub cząsteczki analizowanego enancjomeru powstają odpowiednio dimeryczne jony: $[M^{2+}(\text{ref}^*)(\text{A}_R \text{ lub } \text{A}_S)\text{-H}]^+$ i $[M^{2+}(\text{ref}^*)_2\text{-H}]^+$.



Z uwagi na różnice energii wewnętrznej jonów $[M^{2+}(\text{ref}^*)(\text{A})\text{-H}]^+$ dla poszczególnych enancjomerów A_R i A_S , stałe szybkości reakcji eliminacji prowadzące do ich powstawania są odpowiednio różne. Rysunek 17 przedstawia diagram zmian energetycznych dla dwóch konkurencyjnych procesów fragmentacji trimerycznych kompleksów $[M^{2+}(\text{ref}^*)_2(\text{A}_R)\text{-H}]^+$ i $[M^{2+}(\text{ref}^*)_2(\text{A}_S)\text{-H}]^+$ prowadzących do odpowiednich jonów fragmentacyjnych.



Rysunek 17. Diagram zmian energii wewnętrznej jonów powstałych w konkurencyjnych procesach fragmentacji dwóch trimerycznych kompleksów różniących się chiralnością jednego z ligandów.

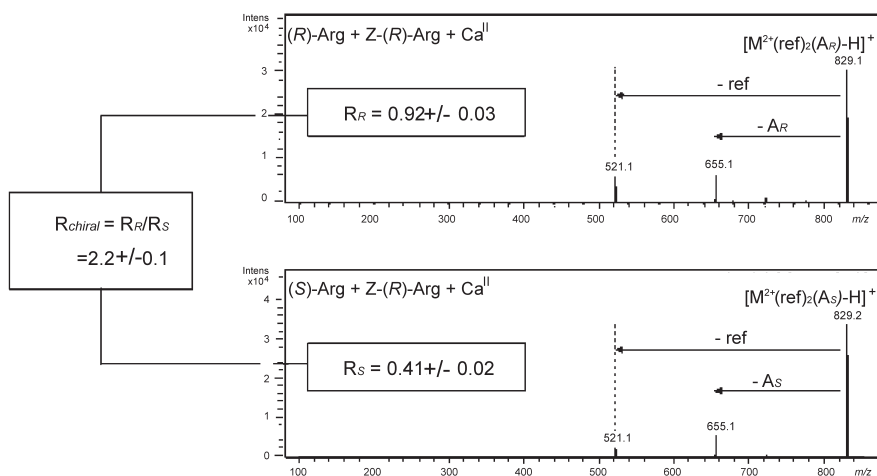
Figure 17. Energy diagram for competitive dissociations of metal-ion bound cluster ions of two deprotonated trimeric cluster ions that differ in the chirality of one ligand

Efektem różnicy w energii wewnętrznej oraz szybkości reakcji eliminacji, prowadzących do powstawania dimerycznych kompleksów $[M^{2+}(\text{ref}^*)(\text{A}_R)\text{-H}]^+$

i $[M^{2+}(\text{ref})(A_S)-H]^+$ jest różnica względnych intensywności odpowiadających im pików w rejestrowanych widmach jonów produktów dla odpowiedniego diastereoizomerycznego kompleksu $[M^{2+}(\text{ref})_2(A_R \text{ lub } A_S)-H]^+$ (Rys. 17), oraz wielkości R_R i R_S opisane odpowiednio równaniami (9) i (10):

$$R_R = \frac{[M^{2+}(\text{ref}^*)(A_R) - H]^+}{[M^{2+}(\text{ref}^*)_2 - H]^+} \quad (9)$$

$$R_S = \frac{[M^{2+}(\text{ref}^*)(A_S) - H]^+}{[M^{2+}(\text{ref}^*)_2 - H]^+} \quad (10)$$



Rysunek 18. Rozróżnienie enancjomerów argininy (A_R i A_S) metodą kinetyczną przy użyciu *N*-benzyloksykarbonylo-*(R)*-argininy (*Z*-*(R)*-Arg) jako odnośnika i Ca^{II} jako jonu metalu; (a) i (b) widma jonów produktów dla trimerycznych jonów (m/z 829) [55]

Figure 18. Example of chiral discrimination of Arg by *Z*-*(R)*-Arg using the kinetic method: (a) and (b) show the dissociation of the trimer ion (m/z 829) formed from *(R)*-Arg and *(S)*-Arg, respectively, with *Z*-*(R)*-Arg and Ca^{II} metal mediation [55]

Stosunek R_R do R_S określony jako R_{chiral} (równanie 11) liczbowo opisuje stopień zróżnicowania dwóch enancjomerów w określonym eksperymencie i zależy od rodzaju jonu centralnego oraz użytego odnośnika.

$$R_{\text{chiral}} = \frac{R_R}{R_S} = \frac{[M^{2+}(\text{ref}^*)(A_R) - H]^+ / [M^{2+}(\text{ref}^*)_2 - H]^+}{[M^{2+}(\text{ref}^*)(A_S) - H]^+ / [M^{2+}(\text{ref}^*)_2 - H]^+} \quad (11)$$

Aby uznać, że przeprowadzony pomiar umożliwił rozróżnienie enancjomerów R_{chiral} powinna mieć wartość jak najbardziej różną od 1. W przypadku, gdy $R_{\text{chiral}} = 1$ wybór określonego kationu M^{2+} oraz odnośnika jest błędny i wskazuje na brak

w diastereoizomerycznych kompleksach oddziaływań zależnych od konfiguracji analizowanych enancjomerów A_R i A_S .

Istotą doboru odpowiedniego związku jako odnośnika jest jego powinowactwo wobec użytego w eksperymencie jonu metalu, które powinno być porównywalne z powinowactwem substancji analizowanej. Znaczna różnica w powinowactwie powoduje eliminację tylko jednego z ligandów (analitu lub odnośnika) lub znaczną przewagą jednego z dwóch konkurencyjnych procesów fragmentacji. Cechą równie pożądaną jest podobieństwo w strukturze analitu i odnośnika, co ułatwia tworzenie się układów kompleksowych wokół jonu centralnego.

Większość obecnie prowadzonych prac ma na celu optymalizację metody kinetycznej w rozróżnianiu związków chiralnych, głównie aminokwasów i ich pochodnych, poprzez stosowanie różnego rodzaju odnośników oraz jonów metali. Bazując na szeregu wcześniejszych doniesień najlepsze wyniki rozróżniania chiralnych aminokwasów uzyskano w przypadku stosowania jako odnośników aminokwasów zawierających pierścień aromatyczny w łańcuchu bocznym (np. *L*-fenyloalanina). Zgodnie z hipotezą Cooksa jest to wynikiem oddziaływań π - π typu *stacking*, czyli nakładaniem się orbitali π pierścienia aromatycznego w łańcuchu bocznym tej części i grupy karboksylowej analizowanego aminokwasu [51].

Vairamani wraz ze współpracownikami opublikowali szereg danych dotyczących halogenowych pochodnych aromatycznych aminokwasów, użytych jako cząsteczek odnośnika w metodzie kinetycznej i wpływu obecnego podstawnika na wartość enancjoselektywności. Pochodne tyrozyny, posiadające różną liczbę podstawionych atomów jodu w pierścieniu aromatycznym użyto w analizie wszystkich naturalnie występujących aminokwasów [52]. Wraz ze wzrostem liczby atomów jodu zaobserwowano wzrost enancjoselektywności dla wszystkich alifatycznych i aromatycznych aminokwasów. Jest to prawdopodobnie wynikiem oddziaływań sterycznych wynikających z bliskiego położenia atomów jodu i łańcucha bocznego analizowanych *L*-aminokwasów, które obniżają trwałość powstałych kompleksów w stosunku do powstałych z enancjomerami *D*. Stosując szereg halogenowych *para*-podstawionych pochodnych *L*-fenyloalaniny jako odnośników, zaobserwowano dla analizowanych układów wzrost enancjoselektywności w szeregu $I > Br > Cl > F$ [53]. Wysoka elektroujemność atomu fluoru, która powoduje zmniejszenie gęstości elektronowej w pierścieniu aromatycznym fenyloalaniny może mieć ujemny wpływ na siłę oddziaływań π - π typu *stacking* i obniżenie efektywności w rozróżnieniu związków chiralnych. Wzrost enancjoselektywności w przypadku pozostałych pochodnych jest wynikiem oddziaływań sterycznych w kompleksach powstałych z *L*-aminokwasami i jest zależne od wielkości atomu podstawionego w pierścieniu fenyloalaniny.

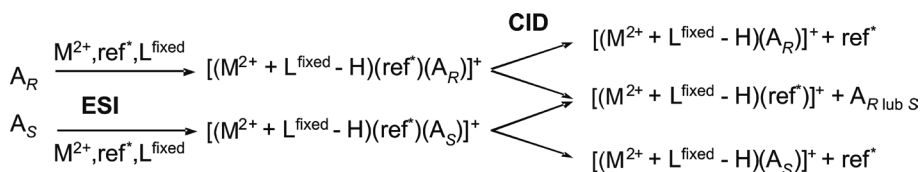
Szczegółową optymalizację doboru odpowiedniego jonu metalu i odnośnika przeprowadził wraz ze współpracownikami Ramagiri, wykorzystując metodę kinetyczną w analizie enancjomerów *L* i *D* kwasu *N*-ftaliloglutaminowego [54]. Dzięki acetylowaniu grupy aminowej *L*-fenyloalaniny, użytej jako odnośnik, uzyskano bardziej satysfakcjonujące wyniki od prezentowanych wcześniej. Jest to prawdopodob-

nie wynikiem obecności dodatkowej grupy karbonylowej uczestniczącej w oddziaływaniach ligand–ligand lub ligand–metal.

Najczęściej stosowanymi jonami metali do rozróżniania enancjomerów metodą kinetyczną są jony metali grup przejściowych, które posiadają zdolność tworzenia kompleksów z większością związków organicznych, wykorzystując elektronowe orbitale *d*. Znane są również prace gdzie w analizie związków chiralnych metodą kinetyczną jako jonu centralnego użyto jonów wapnia [55].

Udoskonaleniem klasycznej metody kinetycznej w analizie związków chiralnych jest wprowadzona przez Cooksa w roku 2003 tzw. metoda kinetyczna z „nieruchomym” ligandem (ang. *kinetic method with fixed ligand*).

Ogólną procedurą tej metody jest zastąpienie w wygenerowanym w warunkach jonizacji trimerycznym kompleksie, jednej z dwóch cząsteczek chiralnego odnośnika ligandem, który nie ulega odejściu w wyniku fragmentacji indukowanej zdezonowaniem (ang. *fixed ligand*) [56]. Istotną cechą, którą musi posiadać związek użyty jako dodatkowy ligand jest wysokie powinowactwo względem stosowanego jonu metalu, zaś fragmentacja diastereoizomerycznego kompleksu powinna przebiegać zgodnie z obserwowaną w metodzie klasycznej. W przypadku przedstawionej przez Cooksa analizy aminokwasów jako ligandy stosowane były krótkie peptydy (od 2 do 5 aminokwasów), których powinowactwo do jonu metalu jest wyższe niż pojedynczych aminokwasów. Dwie konkurencyjne ścieżki fragmentacji, w których eliminacji ulegają cząsteczka chiralnego odnośnika lub analizowanego związku, prowadzą do posiadających różną energię odpowiednich jonów $[(M^{2+} + L^{\text{fixed}} - H)(A)]^+$ i $[(M^{2+} + L^{\text{fixed}} - H)(\text{ref})]^+$ zgodnie z przedstawionymi równaniami:



W przeciwieństwie do klasycznej metody, gdzie trudno dokładnie wskazać miejsce oderwania protonu i strukturę powstałych kompleksów, wprowadzenie ligandu, który nie ulega eliminacji jednoznacznie wskazuje cząsteczkę tego ligandu jako miejsce deprotonacji. Dzięki temu struktura wygenerowanych kompleksów może być ściśle określona. Dodatkowo, porównując fragmentację kompleksów z dwoma identycznymi ligandami odnośnika, oddziaływania ligand–metal oraz ligand–ligand są łatwiejsze do zoptymalizowania w przypadku zastosowania odnośnika, który nie podlega eliminacji, co usprawnia i poprawia efektywność rozróżnienia związków optycznie czynnych.

Metodę kinetyczną z zastosowaniem „nieruchomego” ligandu wykorzystano w ostatnim czasie w analizie pochodnych fenyloalaniny [57], z których tylko jeden z enancjomerów, *L*-3,4-dihydroksyfenyloalanina (*L*-DOPA) wykazuje właściwości terapeutyczne. Pochodne pirydyli, które posiadają dwa aromatyczne atomy azotu

o hybrydyzacji sp^2 położone w jednej płaszczyźnie, użyto jako ligandów nie ulegających eliminacji. Wolne pary elektronowe atomów azotu uczestniczą w wiązaniach koordynacyjnych z centralnym jonem metalu, prowadząc do stabilnych połączeń w diastereoizomerycznych kompleksach. Vainiotalo i współpracownicy wykorzystali natomiast opisaną metodę w analizie chiralnych cyklicznych β -aminokwasów posiadających dwa asymetryczne atomy węgla, wykorzystując jako „nieruchome” ligandy dipeptydy [58]. Zgodnie z wcześniejszymi obserwacjami dipeptyd, w którym jeden z aminokwasów posiada w łańcuchu bocznym układ aromatyczny, powoduje znaczny wzrost enancjoselektywności, wskutek oddziaływań z grupą karboksylową analizowanych aminokwasów.

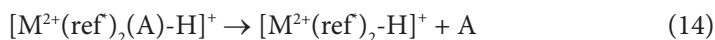
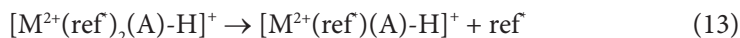
2.4. ANALIZA ILOŚCIOWA ZWIĄZKÓW CHIRALNYCH OPARTA NA METODZIE KINETYCZNEJ

Różnice w energii wewnętrznej dimerycznych kompleksów $[M^{2+}(\text{ref}^*)(A_R)-H]^+$ i $[M^{2+}(\text{ref}^*)(A_S)-H]^+$ i co się z tym wiąże różnice w szybkości ich tworzenia, skutkują różną względną intensywnością odpowiadających im pikom w widmach jonów produktów dla wybranych diastereoizomerycznych kompleksów $[M^{2+}(\text{ref}^*)_2(A_R \text{ lub } A_S)-H]^+$. W analizie ilościowej związków optycznie czynnych opierającej się na metodzie kinetycznej wykorzystuje się logarytmiczną zależność pomiędzy R_{chiral} a nadmiarem enancjomerycznym (*e.e.*) jednego z enancjomerów.

Logarytm naturalny stosunku stałych szybkości reakcji (*R*) jest proporcjonalny do różnicy pomiędzy zmianami entalpii swobodnej dla dwóch konkurencyjnych dróg fragmentacji prowadzących do utworzenia dwóch dimerycznych produktów:

$$\ln R = \frac{\Delta(\Delta G)}{RT_{\text{eff}}} \quad (12)$$

gdzie *R* w mianowniku jest stałą gazową, T_{eff} temperatura efektywna kompleksu aktywnego układu trimerycznego (średnia temperatura kompleksów aktywnych dla dwóch konkurencyjnych procesów fragmentacji), $\Delta(\Delta G)$ różnice energii swobodnej reakcji opisanych równaniami (13) i (14)



W przypadku analizy czystych enancjomerów A_R i A_S , $\Delta(\Delta G)$ w równaniu (12) opisane jest odpowiednio przez $\Delta(\Delta G)_R$ i $\Delta(\Delta G)_S$. Dla mieszaniny enancjomerów z nadmiarem enancjomeru *R* o określonej wartości *e.e.* $\Delta(\Delta G)$ wyraża się jako:

$$\Delta(\Delta G) = \Delta(\Delta G)_R \frac{1+ee}{2} + \Delta(\Delta G)_S \frac{1-ee}{2} = \frac{[\Delta(\Delta G)_R + \Delta(\Delta G)_S]}{2} + \frac{[\Delta(\Delta G)_R - \Delta(\Delta G)_S]}{2} ee \quad (15)$$

Zależność łączącą R z nadmiarem enancjomerycznym $e.e.$ opisuje więc równanie (16):

$$\ln R = \left[\frac{\ln(R_R) + \ln(R_S)}{2} \right] + \left[\frac{\ln(R_{\text{chiral}})}{2} \right] ee \quad (16)$$

Przeprowadzenie pomiaru ilościowego wymaga wyznaczenia w pierwszym etapie krzywej kalibracyjnej. Stosując klasyczne podejście krzywą tą w metodzie kinetycznej wykonuje się wykorzystując liniową zależność pomiędzy $\ln R$ a nadmiarem enancjomerycznym $e.e.$ jednego z analizowanych enancjomerów. W metodzie SR (ang. *Single Ratio method*, SR) wyznaczenie takiej krzywej wymaga przynajmniej dwóch punktów kalibracyjnych (racemat i próbka o znanej czystości enancjomerycznej, dwóch czystych enancjomerów R i S lub dwóch próbek o znanej czystości enancjomerycznej).

Rejestrując jedno widmo jonów produktów dla diastereoizomerycznego kompleksu $[M^{2+}(\text{ref}^*)_2(\text{A})-\text{H}]^+$ dla mieszaniny o nieznannej zawartości poszczególnych enancjomerów i określając R jako stosunek względnych intensywności dimerycznych jonów fragmentacyjnych, możliwe jest określenie na podstawie krzywej kalibracyjnej jej składu enancjomerycznego.

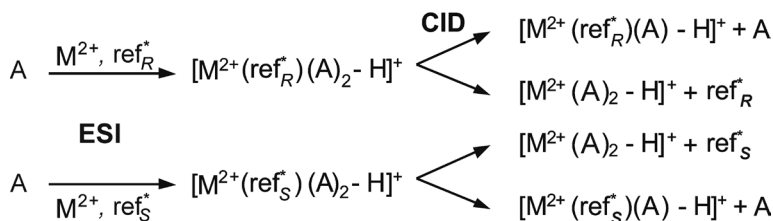
Metoda ta posiada pewne ograniczenia i nie może być stosowana w przypadku, gdy dostępna jest tylko jedna próbka optycznie czystej substancji lub o znanej czystości enancjomerycznej (potrzebne dwa punkty kalibracyjne). Problem ten jest szczególnie często spotykany w przypadku chiralnych leków otrzymywanych z naturalnych chiralnych produktów, gdzie tylko jeden z enancjomerów występuje w postaci czystej, a uzyskanie nawet mieszaniny racemicznej jest skomplikowane.

Problem ten został wyeliminowany przez wprowadzenie bardziej rozbudowanej metody QR (ang. *Quotient Ratio method*, QR) [59]. Metoda ta wymaga tylko jednej próbki o znanej czystości enancjomerycznej w celu uzyskania krzywej kalibracyjnej.

W odróżnieniu od metody *single ratio* widma jonów produktów wykonuje się dla trimerycznego kompleksu $[M^{2+}(\text{ref}^*)(\text{A})_2-\text{H}]^+$ (zamiast $[M^{2+}(\text{ref}^*)_2(\text{A})-\text{H}]^+$), dla którego monitoruje się dwa konkurencyjne procesy eliminacji ligandów: cząsteczki chiralnego odnośnika ref^* i analitu A , prowadzące do powstania odpowiednio dimerycznych jonów $[M^{2+}(\text{A})_2-\text{H}]^+$ i $[M^{2+}(\text{ref}^*)(\text{A})-\text{H}]^+$. Tworzenie krzywej kalibracyjnej, jak również analiza próbki o nieznannej zawartości poszczególnych enancjomerów, wymaga zarejestrowania dwóch oddzielnych widm jonów produktów dla kompleksu $[M^{2+}(\text{ref}^*)(\text{A})_2-\text{H}]^+$, stosując optycznie czyste lub o znanej czystości enancjomerycznej cząsteczki odnośnika ref^*_R i ref^*_S .

Wynikiem różnicy w energii potrzebnej do powstania dimerycznych jonów fragmentacyjnych $[M^{2+}(\text{ref}^*_R)(\text{A})-\text{H}]^+$ i $[M^{2+}(\text{ref}^*_S)(\text{A})-\text{H}]^+$ jest różna intensywność względna odpowiadających im pików w widmach jonów produktów oraz stosunek

względem $[M^{2+}(A)_2-H]^+$. Ogólny schemat metody QR oraz zależności matematyczne opisujące stopień rozróżnienia enancjomerów RR_{chiral} w tej metodzie przedstawiono poniżej:



$$RR = \frac{[M^{2+}(\text{ref}_R^*)(A)-H]^+ / [M^{2+}(A)_2-H]^+}{[M^{2+}(\text{ref}_S^*)(A)-H]^+ / [M^{2+}(A)_2-H]^+} \quad (17)$$

W przypadku gdy analit jest enancjomerycznie czysty tzn. $A = A_R$, to $RR = RR_R$, lub gdy $A = A_S$, to $RR = RR_S$, zaś stopień ich rozróżnienia określa RR_{chiral} zdefiniowany jako:

$$RR_{\text{chiral}} = RR_R / RR_S \quad (18)$$

Podobnie jak w metodzie *single ratio* $\ln RR$ wykazuje zależność liniową względem czystości enancjomerycznej *e.e.* jednego z enancjomerów. Zgodnie z zależnościami opisanymi w cytowanej pracy $\ln RR$ dla mieszaniny racemicznej wynosi zero, co umożliwia uzyskanie krzywej kalibracyjnej w oparciu o dane eksperymentalne dla jednej próbki o znanej czystości enancjomerycznej. Porównując dane eksperymentalne z rzeczywistymi dla szeregu próbek *L*-3,4-dihydroksyfenyloalaniny (*L*-DOPA), średni błąd pomiaru nadmiaru enancjomerycznego (różnica pomiędzy wartościami zmierzonymi a rzeczywistymi) wyniósł 2,4%.

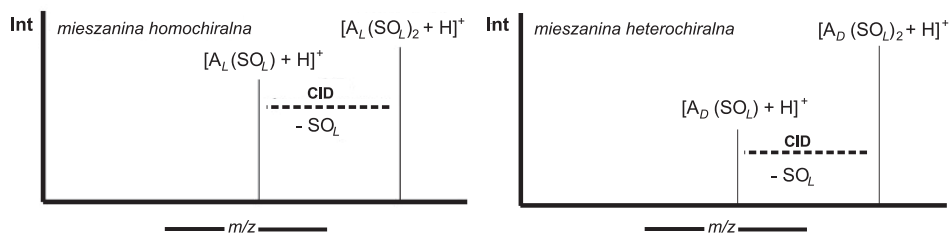
Połączenie metody kinetycznej opartej na wprowadzeniu „nieruchomego” ligandu z opisaną wyżej metodą QR pozwoliło na wprowadzenie kolejnej modyfikacji w analizie ilościowej związków chiralnych. Jest to tzw. *fixed-ligand quotient ratio method* QR^{fixed} . Jej główną zaletą jest szybka konstrukcja krzywej kalibracyjnej przez zmianę chiralności „nieruchomego” ligandu i cząsteczki odnośnika oraz jeszcze większa dokładność pomiaru [60]. Średni błąd pomiaru nadmiaru enancjomerycznego dla szeregu próbek wspomnianej wcześniej pochodnej alaniny (*L*-DOPA) wyznaczony tą metodą wynosi mniej niż 1,2%.

Praktycznie we wszystkich podjętych próbach analizy ilościowej związków chiralnych metodą kinetyczną stosowaną techniką jonizacji jest elektrosprej. Dotychczas opublikowano tylko jedną pracę, gdzie w analizie ilościowej kwasu *N*-ftaliloglutaminowego metodą kinetyczną wykorzystano desorpcję/ionizację laserową wspomaganą matrycą MALDI [54]. Uzyskane wyniki m.in. wysoki współczynnik korelacji dla linowej zależności R_{chiral} w funkcji czystości enancjomerycznej enancjomeru *L* ($r^2 = 0,9843$) sugeruje, iż MALDI może być uznawana jako technika

komplementarna do ESI w określaniu zawartości poszczególnych enancjomerów w próbkach o nieznanym składzie.

2.5. WYZNACZENIE WSPÓŁCZYNNIKA CR (ANG. *CHIRAL RECOGNITION RATIO*) W OPARCIU O WIDMA JONÓW PRODUKTÓW DLA OKREŚLONYCH KOMPLEKSÓW

Drugą opartą na tandemowej spektrometrii mas jest metoda, w której rozróżnienie enancjomerów polega na wyznaczeniu współczynnika nazywanego *chiral recognition ratio* CR. Kinetyczna metoda opisana powyżej wymaga doboru odpowiedniego metalu i odnośnika, aby jony powstałe w dwóch konkurencyjnych procesach fragmentacji miały odpowiednio wysoką intensywność. W wielu przypadkach dobór tych reagentów jest dość problematyczny. Alternatywną metodą okazała się metoda oparta na wyznaczeniu współczynnika CR. Metoda ta wymaga wygenerowania odpowiedniego trimerycznego układu analit-selektor lub diastereoizomerycznego kompleksu, zawierającego analogicznie jak w metodzie kinetycznej cząsteczkę analitu i enancjomerycznie czystego odnośnika w obecności jonu metalu. Wartość CR określa się na podstawie stosunku względnej intensywności tylko jednego jonu fragmentacyjnego do intensywności jonu prekursora lub stosunku intensywności dwóch jonów fragmentacyjnych (Rys. 19, równanie 19). Logarytm naturalny tego stosunku względem nadmiaru enancjomerycznego jednego z enancjomerów jest zależnością liniową, co pozwala na zastosowanie tej metody w analizie ilościowej.



Rysunek 19. Fragmentacja trimerycznych diastereoizomerycznych kompleksów homochiralnych (wszystkie cząsteczki o konfiguracji *L*) i heterochiralnych (układy o konfiguracji *D, D, L* i *L, L, D*) wskazujące na enancjoselektywne wiązanie jednego ze składników w kompleksie wyjściowym [9]

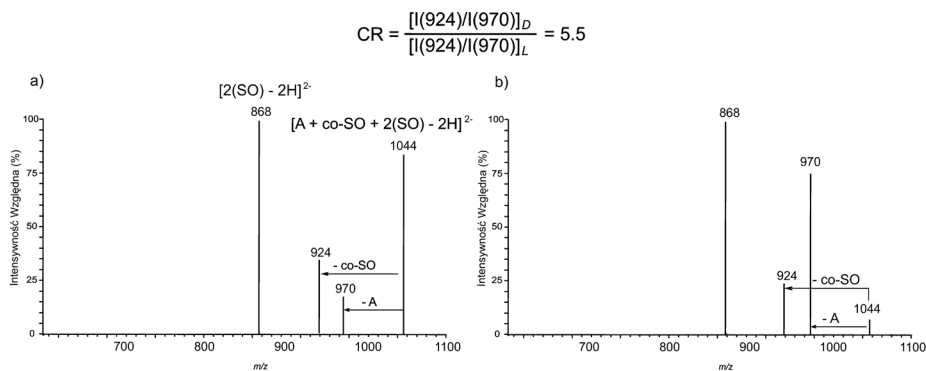
Figure 19. Dissociation of homochiral (all *L*) and heterochiral (*D, D, L*; *L, L, D*) trimeric diastereomeric complexes for the purpose of measuring a branching ratio indicative of enantioselective binding in one component of the parent trimeric complex [9]

$$CR = \frac{[A_L(SO_L) + H]^+ / [A_L(SO_L)_2 + H]^+}{[A_D(SO_L) + H]^+ / [A_D(SO_L)_2 + H]^+} \quad (19)$$

Pionierskie prace oparte na tej metodzie badań związków optycznie czynnych należą do Yao, który wykorzystał ją zarówno w analizie jakościowej jak i ilościowej dziewiętnastu aminokwasów (A), stosując jako selektory chiralne *N-tert*-butoxycarbonyłowe pochodne seryny, fenyloalaniny i proliny (SO) [61, 62].

Dotychczasowe badania różnych klas związków chiralnych wykorzystywały możliwość ich stereoselektywnego kompleksowania przez związki powszechnie używane w metodach chromatograficznych (cyklodekstryny, etery koronowe) oraz modyfikowane aminokwasy czy peptydy. W ostatnich latach do potencjalnych selektorów wykorzystywanych w analizie związków optycznie czynnych, głównie aminokwasów w oparciu o tandemową spektrometrię mas, dołączyły krótkie oligonukleotydy [63]. Analiza szeregu połączeń nukleotydowych, zbudowanych z trzech deoksyrybonukleotydów, wskazała trimer GCA jako najkorzystniejsze połączenie w analizie chiralnych α -aminokwasów, wykazujące stereoselektywność kompleksowania wobec enancjomerów *D*. Interesujący jest fakt, iż kompleksy chiralnych aminokwasów z trinukleotydem ACG, który posiada identyczny skład, ale odwrotną sekwencję w ogóle nie wykazują charakteru stereoselektywnego. Istotnym elementem w prawidłowym określeniu współczynnika CR okazał się wybór odpowiedniego jonu, który poddawany jest reakcji fragmentacji. W przypadku użycia trinukleotydów jako selektorów zaobserwowano nakładanie pików, które odpowiadały różnym jonom, co w istotny sposób zakłóca wyznaczoną wartość enancjoselektywności.

Problem ten wyeliminowano wprowadzając dodatkową cząsteczkę aminokwasu jako ko-selektora (co-SO), który charakteryzuje się podobnym powinowactwem względem oligonukleotydu. Wartość CR wyznaczono w tym przypadku na podstawie widma CID dla jonu $[A+co-SO+2(SO)-2H]^{2-}$, jako stosunek intensywności dwóch pików fragmentacyjnych $[A+2(SO)-2H]^{2-}$ i $[co-SO+2(SO)-2H]^{2-}$ (Rys. 20) [64].



Rysunek 20. Widma jonów produktów dla jonu $[A+co-SO+2(SO)-2H]^{2-}$, gdzie $A = D$ -Glu (a) i L -Glu (b), $co-SO = D$ -Trp i $SO = GCA$ [64]

Figure 20. CID spectra of $[A+co-SO+2(SO)-2H]^{2-}$ ion, $A = D$ -Glu (a) and L -Glu (b), $co-SO = D$ -Trp and $SO = GCA$ [64]

W przeprowadzonych badaniach jako cząsteczek ko-selektorów użyto szeregu *L*- i *D*-aminokwasów. Nie dla wszystkich badanych układów możliwe było wyznaczenie współczynnika CR, jednak w większości z nich jego wartość okazała się wyższa niż w badaniach przeprowadzonych wcześniej.

Użycie tetranukleotydów jako związków kompleksujących w rozróżnieniu chiralnych aminokwasów nie wymaga wprowadzenia cząsteczki ko-selektora, z uwagi na wybór innego rodzaju jonu, który podlega procesom fragmentacji [65]. Spośród analizowanych połączeń nukleotydowych GCAA i GGCA wykazały najwyższą stereoselektywność względem α -aminokwasów; odpowiednio GCAA względem enancjomerów *D*, zaś GGCA enancjomerów *L*.

Jednym z nielicznych chiralnych aminokwasów, dla którego rozróżnienie enancjomerów metodą kinetyczną okazało się trudne jest arginina i jej *N*-blokowane pochodne. Wynika to z jej wysokiego powinowactwa względem większości metali. Problem ten próbowano rozwiązać stosując jako chiralne odnośniki pochodne argininy o podobnym powinowactwie względem użytego kationu. W wielu przypadkach nie uzyskano jednak pożądanego efektu i wartość enancjoselektywności określono opierając się na wyznaczeniu współczynnika *chiral recognition ratio* [55]. Porównywalna wartość współczynnika korelacji dla krzywych kalibracyjnych uzyskanych obiema metodami (KM i CR) dla układów, kiedy względne intensywności odpowiednich pików umożliwiły zastosowanie obu z nich, pozwalają twierdzić, że metody te mogą być stosowane zamiennie w oznaczeniu zawartości czystości enancjomerycznej *e.e.* z odpowiednio dużą dokładnością.

3. „RUCHLIWOŚĆ JONÓW” W ANALIZIE ZWIĄZKÓW CHIRALNYCH

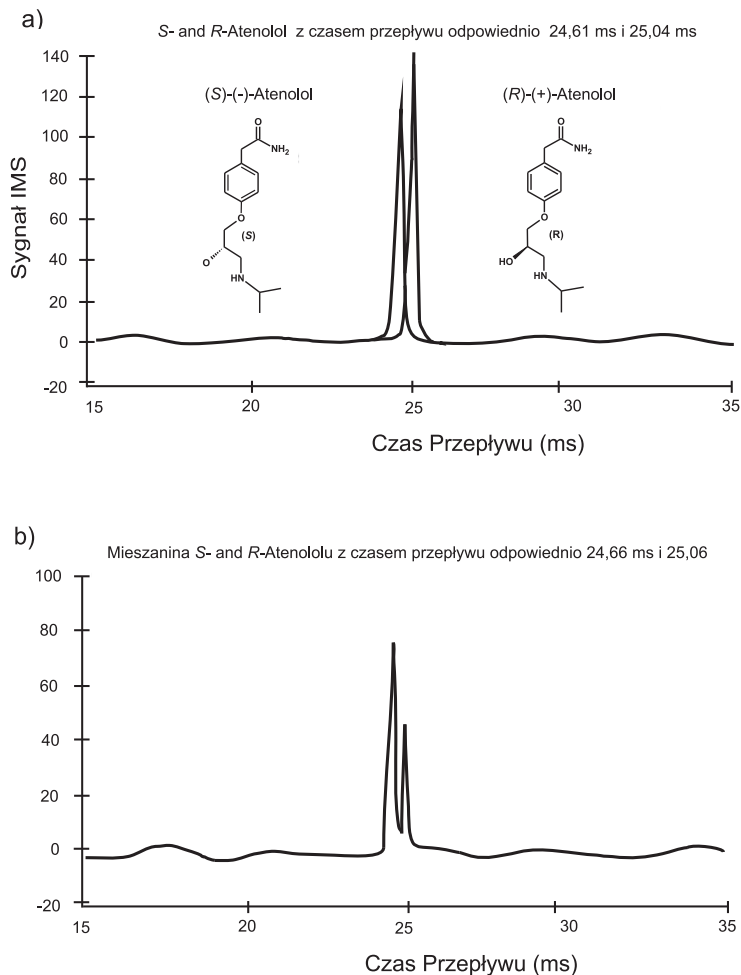
W ciągu ostatniej dekady zjawisko ruchliwości jonów, zwane również mobilnością w połączeniu ze spektrometrią mas znalazło swoje zastosowanie również w odróżnianiu związków optycznie czynnych [66]. Typowy spektrometr wykorzystywany w tej metodzie, oprócz tradycyjnych elementów, wyposażony jest w odpowiednio skonstruowaną komorę, w której następuje separacja analizowanych związków. Proces ten jest analogiczny do rozdziału elektroforetycznego w fazie gazowej, który odbywa się w oparciu o wielkość cząsteczek analitu i wzajemne oddziaływanie podczas ich zderzeń z cząsteczkami gazu obojętnego. Z uwagi na różne konstrukcje stosowanych komór, rozdział molekuł może odbywać się zarówno w czasie, jaki i przestrzeni. Generalnie, powstałe w wyniku jonizacji jony zostają wprowadzone do komory separacyjnej wraz z cząsteczkami gazu obojętnego i poddawane działaniu pola elektrycznego. Szybkość przepływu (v_d) jonów przez komorę jest proporcjonalna do napięcia elektrostatycznego (E), $v_d = KE$, gdzie współczynnik proporcjonalności K określa ruchliwość jonów w danym gazie nośnym.

Podobnie jak tradycyjna spektrometria mas, *ion mobility spectrometry* jest metodą, która nie posiada możliwości rozdziału związków chiralnych bez wprowadzenia dodatkowych reagentów, które wpływają na zmianę ich ruchliwości.

Jednym z zaproponowanych podejść jest wygenerowanie diastereoizomerycznych kompleksów, analogicznych do wykorzystywanych w metodzie kinetycznej, gdzie jon dwuwartościowego metalu (M^{2+}) połączony jest z cząsteczką analitu (A_X) i dwiema cząsteczkami odnośnika (ref^+) $[M^{2+}(ref^+)_2(A_X)-H]^+$. Następnie kompleksy

rozdzielane są w komorze separacyjnej pod wpływem zmiennego pola elektrycznego, które przyłożone jest do dwóch równoległe ułożonych elektrod. Uzyskuje się to na skutek cyklicznie powtarzających się impulsów wysokiego pola elektrycznego o danej polarności w krótkim okresie czasu i niskiego pola o polarności przeciwnej w okresie dłuższym. Rozdział jonów następuje więc w przestrzeni, w oparciu o stosunek ruchliwości jonów w obszarze wysokiego i niskiego pola. Dzięki dodatkowo użytemu napięciu stałemu, którego wartość można regulować, określanemu jako napięcie kompensujące, tylko interesujące jony mogą przechodzić przez komorę. Pozostała część podlega zderzeniom z elektrodami i zostaje utracona. Opisaną metodę określa się jako *high-field asymmetric waveform ion mobility*. Dotychczas zastosowano ją w rozróżnianiu wielu związków chiralnych m.in. aminokwasów [67], enancjomerów terbutaliny [68], enancjomerów kwasu mlekowego [69] oraz diastereoizomerów efedryny i pseudoefedryny [70]. W wielu przypadkach określenie warunków eksperymentu, a szczególnie wartości napięcia kompensującego jest dość problematyczne i wymaga optymalizacji na enancjomerycznie czystym odnośniku.

Druga z użytych metod nazywana *drift tube ion mobility*, której ogólnym założeniem jest wprowadzenie do komory separacyjnej strumienia gazu obojętnego, którego cząsteczki w efekcie zderzeń z analitem powodują zmianę ich ruchliwości. W ten sposób mniejsze cząsteczki, które ulegają mniejszej liczbie zderzeń, ze względu na niższą masę lub ściślejsze upakowanie, w krótszym czasie docierają do detektora, niż cząsteczki większe lub posiadające bardziej rozbudowaną strukturę. Rozdział związków optycznie czynnych w oparciu o tę metodę wymaga wprowadzenia niewielkiej ilości chiralnego modyfikatora, którego oddziaływanie z cząsteczkami analitu może mieć charakter selektywny. Jeden z enancjomerów analizowanego związku mieszaniny racemicznej oddziałuje z enancjomerycznie czystą formą modyfikatora dłużej lub oddziaływanie to jest bardziej korzystne, przez co dłużej pozostaje w komorze separacyjnej [71]. W eksperymencie przeprowadzonym przez Dwivediego metodą tą uzyskano rozdział wielu chiralnych związków, wśród których znalazły się min. aminokwasy, węglowodany i grupa związków zaliczanych do leków. Jako chiralnego modyfikatora dodanego do gazu nośnego użyto (S)-(+)-2-butanolu (Rys. 21). Jest to obecnie jedyna praca dotycząca analizy związków optycznie czynnych z wykorzystaniem tej metody i odnosi się do cząsteczek o niewielkich rozmiarach. Czynnikiem, który czyni ją dość obiecującą w analizie bardziej skomplikowanych związków chiralnych jest fakt, że nie wymaga wprowadzania dodatkowych cząsteczek określonego odnośnika czy związku kompleksującego.



Rysunek 21. Rozdział enancjomerów atenololu, a) nałożone widma (*S*- i (*R*)-atenololu uzyskane po wprowadzeniu 10 ppm (*S*)-(+)-2-butanolu jako chiralnego modyfikatora do strumienia gazu nośnego (azotu), b) rozdział enancjomerów w mieszaninie racemicznej [71]

Figure 21. Gas-phase separation of atenolol enantiomers, a) superimposed spectrum of (*S*- and (*R*)-atenolol obtained after introduction of (*S*)-(+)-2-butanol (10 ppm) as the chiral modifier in the inert nitrogen drift gas, b) separation of the enantiomers from their racemic mixture [71]

PODSUMOWANIE

W ciągu ostatniego dziesięciolecia nastąpił bardzo istotny postęp w zastosowaniu spektrometrii mas do analizy związków chiralnych. Czynnikiemami decydującymi o rozszerzeniu możliwości tej metody analitycznej były przede wszystkim

rozwój i udoskonalenie technik jonizacji oraz rozwój technik analizy jonów. Coraz powszechniejsze stosowanie elektrospreju pozwoliło na wykorzystanie niekowalencyjnych oddziaływań pomiędzy chiralnymi cząsteczkami (jonami) w fazie gazowej do rozróżniania enancjomerów, co uprzednio było możliwe jedynie w fazie skondensowanej i stanowiło podstawę ich rozdziałów chromatograficznych.

Omówione w niniejszej pracy doniesienia literaturowe świadczą o tym, że spektrometria mas jest użyteczną, a zarazem mającą ogromne perspektywy rozwoju metodą analityczną do analizy związków chiralnych. Dotychczas znalazła zastosowanie w rozróżnianiu enancjomerów oraz określaniu ich zawartości dla szerokiej gamy związków, wśród których najczęściej spotykane to: aminokwasy i ich pochodne, dipeptydy, cukry czy α -hydroksykwasy.

Wiele z cytowanych prac oryginalnych zawiera dane uzyskane przy jednoczesnym zastosowaniu przynajmniej dwóch z opisanych metod oznaczania nadmiaru enancjomerycznego. Otrzymane wartości enancjoselektywności, jak również przeprowadzone przy użyciu tych metod pomiary ilościowe wyrażone nadmiarem enancjomerycznym jednego z izomerów optycznych, mają zwykle zbliżone do siebie wartości. Dodatkowo w wielu przypadkach są one zgodne z danymi uzyskanymi innymi technikami analitycznymi, którymi zwykle są techniki chromatograficzne. Zgodność wyników uzyskanych różnymi metodami, jak również fakt, iż spektrometria mas jest metodą szybką i coraz bardziej dostępną, pozwala postrzegać ją jako narzędzie do poszukiwania nowych związków o wysokiej zdolności rozróżniania związków chiralnych, które w przyszłości mogą być zastosowane w chromatografii jako chiralne selektory.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] L. Pasteur, *Researches on the Molecular Asymmetry of Natural Organic Products*, Alembic Club Reprints, Edinburgh, 1897.
- [2] L. Kelvin, *Baltimore Lectures on Molecular Dynamics and the Wave Theory of Light*, C.J. Clay and Sons, London, 1904.
- [3] G. Uccello-Barretta, L. Vanni, F. Balzano, *J. Chromatogr. A*, 2010, **1217**, 928.
- [4] N. Berova, L. Di Bari, G. Pescitelli, *Chem. Soc. Rev.*, 2007, **36**, 914.
- [5] G. Gübitz, M.G. Schmid, *J. Chromatogr. A*, 2008, **1204**, 140.
- [6] Y. Okamoto, T. Ikai, *Chem. Soc. Rev.*, 2008, **37**, 2593.
- [7] G. Sicoli, F. Pertici, Z. Jiang, L. Jicsinkszy, V. Schurig, *Chirality*, 2007, **19**, 391.
- [8] H.M. Fales, G.J. Wright, *J. Am. Chem. Soc.*, 1977, **99**, 2339.
- [9] K.A. Shug, W. Lindner, *J. Sep. Sci.*, 2005, **28**, 1932.
- [10] M. Sawada, *Mass Spectrom. Rev.*, 1997, **16**, 73.
- [11] M. Speranza, *Int. J. Mass Spectrom.*, 2004, **232**, 277.
- [12] W.A. Tao, R.G. Cooks, *Anal. Chem.*, 2003, **75** (1), 5A.
- [13] C.A. Schalley, *Mass Spectrom. Rev.*, 2001, **20**, 253.
- [14] M. Yamashita, J.B. Fenn, *J. Phys. Chem.*, 1984, **88**, 4451.
- [15] M.S. Wilm, M. Mann, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, 1994, **136**, 167.

- [16] M. Sawada, M. Shizuma, Y. Takai, H. Yamada, T. Kaneda, T. Hanafusa, *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, **114**, 4405.
- [17] Y. Takai, K. Iguchi, H. Yamada, M. Shizuma, R. Arakowa, M. Sawada, *J. Mass Spectrom.*, 2006, **41**, 266.
- [18] M. Shizuma, H. Adachi, D. Ono, H. Sato, M. Nakamura, *Chirality*, 2009, **21**, 324.
- [19] P. Gerbaux, J. De Winter, D. Cornil, K. Ravicini, G. Pesesse, J. Cornil, R. Flammang, *Chem. Eur. J.*, 2008, **14**, 11039.
- [20] K.A. Schug, P. Frycak, N.M. Maier, W. Lindner, *Anal. Chem.*, 2005, **77**, 3660.
- [21] C. Czerwenka, N.M. Maier, W. Lindner, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2004, **379**, 1039.
- [22] K.A. Schug, N.M. Maier, W. Lindner, *Chem. Commun.*, 2006, 414.
- [23] K.A. Schug, N.M. Maier, W. Lindner, *J. Mass Spectrom.*, 2006, **41**, 157.
- [24] M.E. Koscho, C. Zu, B.N. Brewer, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2005, **16**, 801.
- [25] B.N. Brewer, C. Zu, M.E. Koscho, *Chirality*, 2005, **17**, 456.
- [26] C. Zu, J.A. Woolfolk, M.E. Koscho, *Int. J. Mass Spectrom.*, 2009, **288**, 44.
- [27] C. Zu, J.A. Woolfolk, M.E. Koscho, *Anal. Chim. Acta*, 2010, **661**, 60.
- [28] C. Zu, B.N. Brewer, B. Wang, M.E. Koscho, *Anal. Chem.*, 2005, **77**, 5019.
- [29] B. Botta, F. Caporuscio, D. Subissati, A. Tafi, M. Botta, A. Filippi, M. Speranza, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, **45**, 2717.
- [30] B. Botta, F. Caporuscio, I. D'Acquarica, G. D. Monache, D. Subissati, A. Tafi, M. Botta, A. Filippi, M. Speranza, *Chem. Eur. J.*, 2006, **12**, 8096.
- [31] B. Botta, G. D. Monache, C. Frasschetti, L. Nevola, D. Subissati, M. Speranza, *Int. J. Mass Spectrom.*, 2007, **267**, 24.
- [32] B. Botta, A. Tafi, F. Caporuscio, M. Botta, L. Nevola, I. D'Acquarica, C. Frasschetti, M. Speranza, *Chem. Eur. J.*, 2008, **14**, 3585.
- [33] M. Speranza, I. D'Acquarica, C. Frasschetti, B. Botta, A. Tafi, L. Bellucci, G. Zappia, *Int. J. Mass Spectrom.*, 2010, **291**, 84.
- [34] B. Botta, C. Frasschetti, I. D'Acquarica, M. Speranza, F.R. Novara, J. Mattay, M.C. Letzel, *J. Phys. Chem. A*, 2009, **113**, 14625.
- [35] A. Filippi, F. Gasparrini, M. Pierini, M. Speranza, C. Villani, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 11913.
- [36] F. Gasparrini, M. Pierini, C. Villani, A. Filippi, M. Speranza, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 522.
- [37] M. Speranza, F. Gasparrini, B. Botta, C. Villani, D. Subissati, C. Frasschetti, F. Subrizi, *Chirality*, 2009, **21**, 69.
- [38] Y. Cheng, D. M. Hercules, *J. Mass Spectrom.*, 2001, **36**, 834.
- [39] A.R.M. Hyyryläinen, J. M. H. Pakarinen, E. Forró, F. Fülöp, P. Vainitalo, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2009, **20**, 1235.
- [40] S.C.X. Ahn, C.B. Lebrilla, S. Gronert, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2005, **16**, 166.
- [41] X. Cong, G. Czerwieńiec, E. McJimpsey, S. Ahn, F.A. Troy, C.B. Lebrilla, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2006, **17**, 442.
- [42] G. Grigorean, C.B. Lebrilla, *Anal. Chem.*, 2001, **73**, 1684.
- [43] J.S. Patrik, T. Kotiaho, S.A. McLuckey, R.G. Cooks, *Mass Spectrom. Rev.*, 1994, **13**, 287.
- [44] P.H. Wong, R.G. Cooks, *Acc. Chem. Res.*, 1998, **31**, 379.
- [45] D. Zhang, W.A. Tao, R.G. Cooks, *Int. J. Mass Spectrom.*, 2001, **204**, 159.
- [46] L. Wu, W.A. Tao, R.G. Cooks, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2002, **373**, 618.
- [47] W.A. Tao, L. Wu, R.G. Cooks, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2001, **12**, 490.
- [48] W.A. Tao, F.C. Gozzo, R.G. Cooks, *Anal. Chem.*, 2001, **73**, 1692.
- [49] D.V. Augusti, F. Carazza, R. Augusti, W.A. Tao, R.G. Cooks, *Anal. Chem.*, 2002, **74**, 3458.
- [50] W.A. Tao, L. Wu, R.G. Cooks, *J. Med. Chem.*, 2001, **44**, 3541.
- [51] W.A. Tao, D. Zhang, E.N. Nikolaev, R.G. Cooks, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 10598.

- [52] S. Kumari, S. Prabhakar, M. Vairamani, C.L. Devi, G.K. Chaitanya, K. Bhanuprakash, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2007, **18**, 1516.
- [53] S. Kumari, S. Prabhakar, M. Vairamani, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2008, **22**, 1393.
- [54] S. Ramagiri, R. Gupete, I. Racov, C.R. Yates, D.D. Miller, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2008, **22**, 639.
- [55] K.A. Schug, W. Linder, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2005, **16**, 825.
- [56] L. Wu, R.G. Cooks, *Anal. Chem.*, 2003, **75**, 678.
- [57] M.K. Lee, A.P. Kumar, D. Jin, Y. Lee, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2008, **22**, 909.
- [58] A.R.M. Hyyryläinen, J.M.H. Pakarinen, E. Forró, F. Fülöp, P. Vainiotalo, *J. Mass. Spectrom.*, 2010, **54**, 198.
- [59] W.A. Tao, R.L. Clarc, R.G. Cooks, *Anal. Chem.*, 2002, **74**, 3783.
- [60] L. Wu, E.C. Meurer, R.G. Cooks, *Anal. Chem.*, 2004, **76**, 663.
- [61] Z.P. Yao, T.S.M. Wan, K.-P. Kwong, C.-T. Che, *Anal. Chem.*, 2000, **72**, 5383.
- [62] Z.P. Yao, T.S.M. Wan, K.-P. Kwong, C.-T. Che, *Anal. Chem.*, 2000, **72**, 5394.
- [63] M. Ravikumar, S. Prabhakar, M. Vairamani, *Chem. Comm.*, 2007, 392.
- [64] M.R. Kumar, S. Prabhakar, T. Sivaleela, M. Vairamani, *J. Mass Spectrom.*, 2007, **42**, 1218.
- [65] T. Sivaleea, M.R. Kumar, S. Prabhakar, G. Bhaskar, M. Vairamani, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2008, **22**, 204.
- [66] J.R. Enders, J.A. Mclean, *Chirality*, 2009, **21**, E253.
- [67] A. Mie, M. Jornten-Karlsson, B.-O. Axelsson, A. Ray, C.T. Reimann; *Anal. Chem.*, 2007, **79**, 2850.
- [68] A. Mie, A. Ray, B.-O. Axelsson, M. Jornten-Karlsson, C.T. Reimann, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 4133.
- [69] J. Sultan, W. Gabryelski, *Anal. Chem.*, 2006, **78**, 2905.
- [70] M. McCooye, L. Ding, G.J. Gardner, C.A. Fraser, J. Lam, R.E. Sturgeon, Z. Mester, *Anal. Chem.*, 2003, **75**, 2538.
- [71] P. Dwivedi, C. Wu, L.M. Matz, B.H. Clowers, W.F. Siems, H.H. Hill, *Anal. Chem.*, 2006, **78**, 8200.

Praca wpłynęła do Redakcji 28 lipca 2011

KOSMETYKI DO PIELEGNACJI SKÓRY ATOPOWEJ

COSMETICS FOR ATOPIC DERMATITIS

Karolina Śliwa, Elżbieta Sikora, Jan Ogonowski

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

Abstract

Wstęp

1. Leczenie atopowego zapalenia skóry (AZS)
2. Pielęgnacja skóry z AZS
3. Formułacja kosmetyków do skóry z AZS
 - 3.1. Niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe (NNKT)
 - 3.2. Ceramidy
 - 3.3. Humektanty
 - 3.4. Ekstrakty roślinne jako składniki kosmetyków z AZS
4. Wybrane receptury kosmetyczne

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

mgr inż. Karolina Śliwa – absolwentka Wydziału Inżynierii i Technologii Chemicznej Politechniki Krakowskiej. Jest asystentem w Instytucie Chemii i Technologii Organicznej. Prowadzi zajęcia laboratoryjne z Technologii Kosmetyków oraz Fizykochemii Form Kosmetycznych.

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

prof. dr hab. inż. Jan Ogonowski, prof. zw. PK – jest kierownikiem specjalności Chemia i Technologia Kosmetyków oraz kierownikiem Katedry Technologii Organicznej i Procesów Rafineryjnych na Wydziale Inżynierii i Technologii Chemicznej Politechniki Krakowskiej Katedry Technologii Organicznej i Procesów Rafineryjnych na Wydziale Inżynierii i Technologii Chemicznej Politechniki Krakowskiej. Zainteresowania naukowe profesora dotyczą katalizy, technologii chemicznej oraz technologii produktów małowadłowych.

ABSTRACT

Atopic dermatitis (AD) is an inflammatory chronic, skin disorder with the multifactorial etiology. The major symptom of AD is pruritic [1]. The treatment is symptomatic and is being assisted with intensive skincare at the use of cosmetics.

In the paper generally used methods of AD therapy and the skin care were discussed. Moreover the essential ingredients of products used to the atopic skin treating were described. Some examples of cosmetic formulations were also presented.

Keywords: atopic dermatitis, cosmetics, emollients

Słowa kluczowe: atopowe zapalenie skóry, kosmetyki, emolienty

WSTĘP

Atopowe zapalenie skóry (AZS) jest jedną z najczęstszych chorób skóry wieku niemowlęcego i dziecięcego. U większości pacjentów choroba ta pozostaje jednak na całe życie [1]. Chociaż przyczyny i patogeneza atopowego zapalenia skóry nie są jeszcze w pełni wyjaśnione to wydaje się, że istotne mogą być czynniki genetyczne, lecz przede wszystkim jest to choroba systemu odpornościowego [2]. W uprzemysłowionych krajach zachodnich AZS jest coraz powszechniejszą dolegliwością. Częściej występuje u dzieci ze środowiska miejskiego, pochodzących z rodzin małodzieńskich i dobrze sytuowanych materialnie, co sugeruje, że narażenie na zanieczyszczenie środowiska, brak ekspozycji na infekcje, brak kontaktu z alergenami w okresie wczesnego dzieciństwa oraz nadmierna higiena mogą odgrywać znaczącą rolę w powstawaniu alergicznego stanu zapalnego [2, 3]. Obserwuje się również zaostrzenie choroby pod wpływem stresu oraz czynników psychogennych [4].

AZS definiuje się jako przewlekłą zapalną chorobę skóry przebiegającą ze świądem. Główną cechą AZS jest suchość skóry spowodowana dysfunkcją bariery skórnej, ze zwiększeniem utraty wody przez naskórek, czemu zwykle towarzyszy intensywny świąd i stan zapalny [1]. Nadmierna suchość skóry jest związana ze zmianą aktywności enzymu Δ -6-desaturazy, który uczestniczy w metabolizmie niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych (NNKT), składowych błon komórkowych keratynocytów i międzykomórkowego spoiwa lipidowego warstwy rogowej skóry. Niedobór NNKT powoduje wzrost przepuszczalności skóry, co prowadzi do nadmiernej utraty wody oraz utraty NMF (Naturalny Czynniki Nawilżający) [4–6]. Atopowe zapalenie skóry charakteryzuje się również zmianą miejscowej odporności komórkowej i występowaniem stanu zapalnego w skórze właściwej. Charakterystycznym objawem jest także kolonizacja skóry przez bakterie *Staphylococcus aureus*, których rozwój jest ułatwiony z powodu braku kwasu oleinowego i zmiany jakościowej pokrywającego skórę płaszcz hydrolipidowego. Dodatkowo, ekspresja receptorów swoistych dla *S. aureus* (laminina, kolagen IV, fibronektyna) powoduje zwiększone przyleganie bakterii na skórę atopowej [4, 7]. AZS często wiąże się ze zwiększonym stężeniem Immunoglobuliny E w surowicy krwi oraz alergią typu I, alergicznym nieżytem nosa i astmą [8, 9]. U osób chorych na AZS stwierdza się również obecność genu atopii na chromosomie 11q [4, 6]. Podstawą zaś do klinicznego rozpoznania AZS jest stwierdzenie występowania przynajmniej trzech z czterech głównych objawów, według Hanifina i Rajki, do których należą: charakterystyczna morfologia i lokalizacja zmian, świąd, przewlekły i nawrotowy przebieg oraz osobniczy lub rodzinny wywiad atopowy [10, 11].

1. LECZENIE AZS

Leczenie atopowego zapalenia skóry obejmuje profilaktykę, leczenie miejscowe i leczenie ogólne. W pierwszym etapie należy wyeliminować czynniki wywołujące

chorobę. Jeśli można stwierdzić czynniki odczulające, leczenie polega na eliminacji ich z otoczenia lub diety chorego. Można też podejmować próby odczulania [10].

W leczeniu miejscowym zastosowanie znajdują przede wszystkim emolienty, które należy stosować nieprzerwanie, nawet jeśli na skórze nie ma wyraźnych zmian zapalnych [1]. W leczeniu ostrych zmian wypryskowych stosuje się miejscowo glikokortykosteroidy (GKS) (np. hydrokortyzon, prednizolon, klobetazol) [1, 12–15]. Inhibitory kalcyneuryny stosowane miejscowo (pimekrolimus i takrolimus) umożliwiają opanowanie stanu zapalnego skóry bez użycia GKS [1, 12, 16]. W leczeniu stosuje się również miejscowe leki przeciwdrobnoustrojowe, takie jak triklosan lub chlorheksydyna [1].

W razie rozległego, wtórnego zakażenia bakteryjnego (zwłaszcza *S. aureus*) stosuje się doustne leki przeciwdrobnoustrojowe. Zwykle skuteczne są cefalosporyny I i II generacji lub penicyliny półsyntetyczne. W przypadku alergii na penicyliny lub cefalosporyny alternatywę stanowi klindamycyna lub doustny kwas fusydowy. Zakażenie skóry wirusem *Herpes simplex* w postaci wyprysku herpetycznego stanowi ciężkie, mogące zagrażać życiu, powikłanie AZS, wymagające ogólnoustrojowego leczenia acyklowirem lub innym lekiem przeciwwirusowym (np. walacyklowirem). U wybranych chorych korzystne może być miejscowe lub ogólnoustrojowe leczenie przeciwrzybicze [1, 12]. W leczeniu zaostrzeń AZS mogą być przydatne doustne GKS, ale ze względu na działania uboczne należy unikać ich stosowania u dzieci i przez dłuższy czas u dorosłych [1, 12, 13]. Stosuje się również cyklosporynę A oraz mykofenolat mofetilu (MMF). W przypadkach ciężkich i opornych stosowana bywa azatiopryna, lek immunosupresyjny, powoduje jednak liczne skutki uboczne [1, 10, 12]. Jako leki wspomagające leczenie miejscowe zaostrzeń przebiegających z nasilonym świądem stosuje się leki przeciwhistaminowe [1, 10, 17]. Standardowym leczeniem u dorosłych jest również fototerapia [10].

2. PIELĘGNACJA SKÓRY Z AZS

U osób chorych na AZS ważne jest, aby właściwie dbać o skórę wrażliwą. Odpowiednie wydaje się być tu stosowanie produktów, które nie tylko zlikwidują podrażnienia, ale także będą im zapobiegać. W codziennej pielęgnacji ważne jest, by używać preparatów przeznaczonych specjalnie do potrzeb, tego typu skóry takich, które właściwie ją oczyszczą, odżywią i nawilżą oraz będą skutecznie chronić. Jeżeli chodzi o kosmetyki, to należy przede wszystkim stosować produkty, które mają jak najprostszy skład. Duża liczba różnych surowców zwiększa ryzyko pojawienia się odczynów alergicznych na skórze. Warto także pamiętać, by produkty były z jednej firmy bądź serii. Spośród produktów zalecanych do stosowania dla skóry wrażliwej można wymienić [18]:

- łagodnie działające mleczka, kremy lub śmietanki myjące,
- bezalkoholowe toniki,
- nawilżające i kojące maski oraz ampułki,

- kremy w postaci emulsji stałych W/O,
- płynne emulsje O/W utrzymujące fizjologiczne pH skóry,
- preparaty z filtrami mineralnymi, np. tlenkiem cynku,
- wody termalne bogate w sole mineralne i pierwiastki śladowe,
- surowce kosmetyczne najczęściej powodujące podrażnienia i alergie.

Bardzo ważne jest, by osoby mające skórę wrażliwą, szczególną uwagę zwracały na komponenty kosmetyków, bowiem istotne jest wykrycie surowca potencjalnie alergizującego. Służą temu testy płatkowe, które opierają się na substancjach najczęściej powodujących uczulenia i nietolerancje skóry na dany kosmetyk. Wśród takich związków wyróżnić należy: składniki kompozycji zapachowych, konserwanty, podłoża kremów, czy surowce naturalne pochodzenia roślinnego.

Substancje zapachowe, zarówno naturalne, jak i syntetyczne są powszechnie stosowane nie tylko do wyrobów perfumeryjnych, ale także do innych produktów kosmetycznych. Zgodnie z nowymi uregulowaniami prawnymi pewne substancje występujące w kompozycjach zapachowych są potencjalnymi alergenami. Wymienia się tutaj: alkohol benzylový, aldehyd cynamonowy, alkohol cynamonowy, cynamonian heksylu, geraniol, salicylan benzylu, eugenol, farnezoł, czy limonen [19]. Również substancje zapachowe naturalnego pochodzenia stanowią mogą naturalne alergeny (Tab. 1) [20, 21].

Tabela 1. Substancje zapachowe naturalne – potencjalnie alergizujące [20, 21]
Table 1. Natural fragrances – potentially allergenic [20, 21]

| Nazwa polska | Nazwa INCI |
|----------------------------|---|
| olejek drzewa herbacianego | tea tree oil |
| olejek sosnowy | pinus silvestris oil |
| olejek pomarańczowy | citrus dulcis oil |
| olejek mięty pieprzowej | mentha piperita oil |
| olejek bergamotowy | citrus aurantium bergamina (bergamot) fruit oil |
| balsam peruwiański | myroxylon pereirae |

Potencjalne alergeny mogą stanowić także dodawane do kosmetyków, w celu zapobiegania wzrostowi bakterii i grzybów, konserwanty. W tej grupie na szczególną uwagę zasługuje formaldehyd oraz związki go uwalniające. Przykłady substancji, które w środowisku wodnym uwalniają formaldehyd przedstawia Tabela 2.

Tabela 2. Przykład potencjalnych alergenów spośród konserwantów [22]
Table 2 Example of potential allergens in preservatives [22]

| Nazwa polska | Nazwa handlowa |
|---|----------------|
| 2-bromo-2-nitropropan-1,3-diol | bronopol® |
| pochodna hydantoiny | DMDM hydantoin |
| sól sodowa kwasu 2-etylorteciotiosalicylowego | thimerosal |
| imidazolidynylomocznik | germall 115 |
| chlorek N-(3-chloroallilo)heksamoniowy | dowicil 200 |
| heksametylenotetroamina | metenamin |

W kosmetykach do skóry wrażliwej należy również unikać ekstraktów roślinnych, które mogą być dostarczycielami alergenów wywołujących niepożądane reakcje skórne (Tab. 3) [18].

Tabela 3. Stosowane w kosmetykach ekstrakty roślinne – potencjalnie alergizujące [18]
Table 3. Plant extracts potentially allergenic, used in cosmetics [18]

| Nazwa polska | Nazwa INCI |
|--------------------------------|---------------------------------------|
| ekstrakt z dziurawca | hypericum perforatum extract |
| ekstrakt z cytryny | citrus medica limonum (lemon) extract |
| ekstrakt z melisy lekarskiej | melissa officinalis extract |
| ekstrakt z liści pokrzywy | urtica dioica (nettle leaf) extract |
| ekstrakt z mniszka lekarskiego | taraxacum officinalis extract |
| ekstrakt z rumianku | matricaria recutita extract |

U osób chorych na AZS ważne jest odpowiednie nawilżanie i natłuszczenie skóry. Odpowiednio dobierając kosmetyki można uniknąć odczynów kontaktowych typu alergicznego. Wybór odpowiednich preparatów zależeć będzie zatem od indywidualnej reaktywności skóry chorego i praktycznie nie ma idealnej, najbezpieczniejszej linii kosmetyków przeznaczonych do pielęgnacji skóry atopowej. W przypadku niezbyt rozległych i nie zainfekowanych zmian oraz umiarkowanego świądu należy nawilżać skórę przez stosowanie tłustych emulsji zawierających ceramidy, NNKT, masło karite oraz środków pozbawionych mydła. Do mycia należy stosować preparaty zawierające kwaśne i neutralne środki powierzchniowo czynne oraz dodawać olejki do kąpieli. Powinno się unikać stosowania produktów zawierających w dużym stężeniu mleczany (wyższym niż 10%), w celu uniknięcia podrażnienia. Zalecane jest stosowanie produktów hipoalergicznym nie zawierających substancji zapachowych oraz konserwantów [4, 23–25].

Pielęgnacja skóry atopowej ma na celu odbudowanie zaburzonej funkcji bariery skórnej, złagodzenie świądu i przedłużenie okresów bezobjawowych. Jednym z bardzo ważnych elementów programu pielęgnacyjnego skóry są kąpiele. Nie powinny one jednak przekraczać 10–15 minut, raz dziennie, a temperatura wody nie powinna być zbyt wysoka. Zalecane jest dodawanie do wody preparatów, które dodatkowo pomagają nawilżać i natłuszczać skórę. Drugim elementem jest smarowanie emolientami, zwłaszcza eksponowanych części ciała (ręce, twarz). Zabiegi pielęgnacyjne należy wykonywać często, nawet kilka razy dziennie [3].

3. FORMULACJA KOSMETYKÓW DO SKÓRY Z AZS

Kosmetyki zawierające substancje nawilżające znacznie poprawiają wygląd powierzchni skóry atopowej. Rodzaj stosowanych lipidów oraz stosunek olej/woda w formulacji kosmetyku decydują o właściwościach użytkowych produktu. Emulgatory, humektanty i składniki fazy olejowej wpływają również na ocenę sensoryczną kosmetyku, rozprządzenie na skórze, szybkość wchłaniania, oraz na jakość skóry po jego zastosowaniu. W AZS kosmetyk wypełnia przestrzeń między częściowo złuszczającą się skórą, dlatego powierzchnia, którą wchłaniane są substancje jest dużo większa, co oznacza również większą dawkę przyjmowanych przez skórę substancji. Kosmetyki stosowane w AZS zawierają wyższe stężenia substancji natłuszczających, nawilżających i leczniczych, dlatego klasyfikuje się je jako dermokosmetyki [22].

Właściwości użytkowe kosmetyków i łatwość aplikacji są równie istotnymi parametrami. Lepkie i kleiste produkty są uważane za mniej atrakcyjne niż szybko wchłaniające się emulsje, zwłaszcza w przypadku atopowego zapalenia skóry, gdy pacjent musi często (kilka razy dziennie) nakładać dermokosmetyk na duże powierzchnie ciała [22].

Emolienty takie jak: eter stearylowy glikolu polietylenowego, estry alkoholi C15-C17 i kwasu 2-etyloheksanowego, mirystynian izopropylu, lanolina, triglicerydy kwasu kaprylowego i kaprynowego, alkohol cetylowy, zmniejszają łuszczenie, pękanie i swędzenie skóry. Zapewniają odpowiednie natłuszczenie i wspomagają nawilżanie. Chronią również skórę przed substancjami drażniącymi, alergenami oraz bakteriami. Częste stosowanie emolientów i odpowiednia pielęgnacja skóry może zmniejszać konieczność leczenia, na przykład sterydami [26, 27].

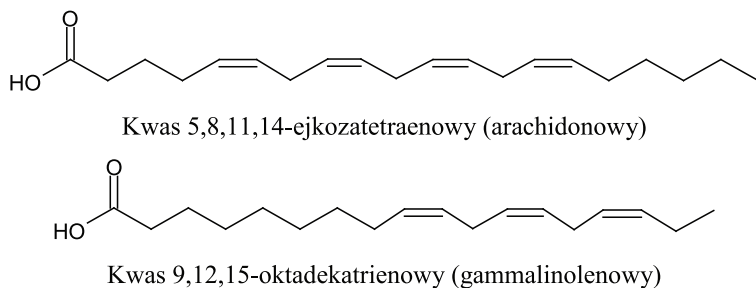
3.1. NIEZBĘDNE NIENASYCONE KWASY TŁUSZCZOWE (NNKT)

Funkcja ochronna warstwy rogowej naskórka zależy od zawartości lipidów, które wypełniają przestrzeń pomiędzy korneocytami (tzw. cement międzykomórkowy). W skład tych lipidów wchodzi przede wszystkim ceramidy (50%), cholesterol (25%) oraz długołańcuchowe kwasy tłuszczowe (15%) [28, 29]. Spoiwo międzykomórkowe stanowi układ ciekłokrystaliczny o budowie warstwowej, gdzie pomiędzy

warstwami lipidów występują bogate w hydrofilowe, małowczątkowe substancje nawilżające, warstewki wodne. Unikatowy skład lipidów warstwy rogowej naskórka cechuje szczególnie wysoka zawartość sfingolipidów (40–50%) oraz cholesterolu (25% łącznie z siarczanem cholesterolu). Dodatkową ochronę skóry stanowi zewnętrzkomórkowy płaszcz hydrolipidowy (mieszanina sebum, potu i złuszczonego się naskórka). Na powierzchni naskórka znajduje się mieszanina triglicerydów, wolnych kwasów tłuszczowych, wosków, cholesterolu, skwalenu oraz ceramidów o układzie warstwowym [30].

Suchość skóry atopowej związana jest przede wszystkim z nieprawidłowym metabolizmem lipidów naskórka. U chorych na AZS stwierdza się podwyższony poziom kwasu linolowego oraz obniżony poziom kwasu gammalinolenowego i kwasu arachidonowego w surowicy krwi [2, 3]. Przy niedoborze kwasu linolowego, w ceramidy wbudowywane zostają inne kwasy tłuszczowe. Kwas arachidonowy jest natomiast związkiem wyjściowym dla syntezy najważniejszych mediatorów zapalnych [2].

Preparaty natłuszczające stosowane zewnętrznie wspomagają tworzenie okluzyjnego filmu lipidowego i wzmacniają barierę lipidową cementu międzykomórkowego, zabezpieczając skórę przed utratą wody, zwiększają jej elastyczność i zmniejszają uczucie świądu. Na zaburzoną funkcję bariery skórnej może, przynajmniej na krótki czas, korzystnie wpływać dostarczenie lipidów. W kosmetykach do pielęgnacji skóry atopowej stosowane są kwasy gammalinolenowy (GLA) i arachidonowy (Rys. 1).



Rysunek 1. Struktura kwasu arachidonowego oraz kwasu gammalinolenowego
Figure 1. Arachidonic and gamma-linolenic acids

Spośród olejów roślinnych stosowanych jako emolienty, w NNKT szczególnie bogate są oleje z: wiesiołka, nasion ogórecznika lekarskiego, zarodków pszenicy czy lnu złocistego (Tab. 4) [2]. W Tabeli 5 przedstawiono przybliżony skład NNKT w wybranych olejach roślinnych.

Tabela 4. Zawartość oleju i kwasu gammalinolenowego w wybranych roślinach oleistych [31]
Table 4. The oil and gamma-linolenic acid content in selected plants [31]

| Nazwa rośliny | Zawartość oleju % | Zawartość GLA w oleju % |
|--|-------------------|-------------------------|
| Wiesiołek dwuletni (<i>Oenothera biennis</i> L.) | 15–20 | 7–10 |
| Wiesiołek dziwaczny (<i>Oenothera paradoxa</i> L.) | 18–22 | 8–10 |
| Czarna porzeczka (<i>Ribes nigrum</i> L.) | 20–25 | 15–20 |
| Ogórecznik lekarski (<i>Borago officinalis</i> L.) | 25–30 | 21–25 |

Tabela 5. Przybliżony skład NNKT w naturalnych olejach roślinnych [31]
Table 5. Estimated composition of essential fatty acids of natural plant oils [31]

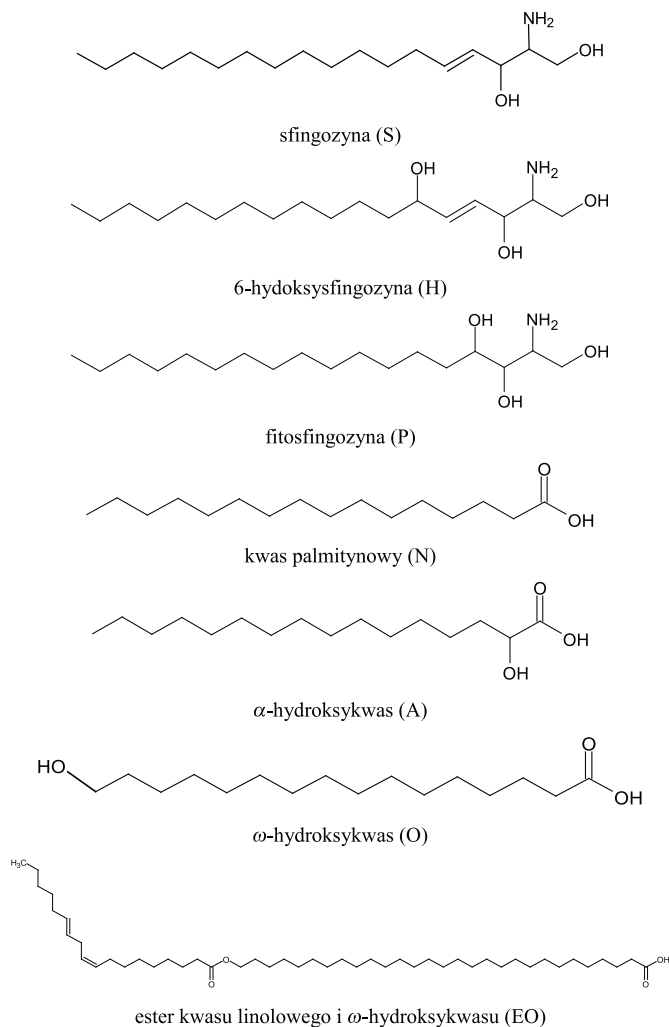
| Olej | Typ kwasu tłuszczowego | | | | |
|---------------------|------------------------|-----|-------|-------|-------|
| | C16 | C18 | C18:1 | C18:2 | C18:3 |
| z czarnej porzeczki | 7 | 2 | 10 | 49 | 30 |
| z ogórecznika | 9 | 3 | 14 | 38 | 25 |
| kukurydziany | 11 | 2 | 30 | 55 | 1 |
| wiesiołkowy | 6 | 2 | 8 | 71 | 12 |
| winogronowy | 6 | 2 | 25 | 69 | – |
| arachidowy | 10 | 2 | 48 | 40 | – |
| sezamowy | 10 | 5 | 40 | 45 | – |
| sojowy | 11 | 4 | 25 | 55 | 5 |
| słonecznikowy | 6 | 4 | 15 | 75 | – |
| z kielków pszenicy | 13 | 3 | 14 | 58 | 8 |

Termin emolienty jest często stosowany w literaturze w odniesieniu do samych NNKT. Jednak określenie to dotyczy także syntetycznych estrów kwasów tłuszczowych z alkoholami. Do najczęściej stosowanych, w kosmetykach, należą mirystynian propylu, izostearynian izopropylu oraz stearynian oktylu [30].

3.2. CERAMIDY

Ceramidy, obecne w naskórku, mają wpływ nie tylko na jego spoistość i szczelność, ale także spełniają rolę przekaźników międzykomórkowych oraz biorą udział w procesach różnicowania keratynocytów. Synteza ceramidów odbywa się w, tzw. ciałkach lamelarnych (ciałka Odlanda) z fosfolipidów, glicerolipidów, glukozyloce-

ramidów i sfingomieliny (Rys. 2, Rys. 3). Następnie ulegają one egzocytocie do przestrzeni międzykomórkowej i kolejno poddawane są działaniu enzymów. Powstająca ostatecznie mieszanina lipidów wypełnia przestrzeń międzykomórkową, wpływając na adhezję keratocytów w warstwie rogowej naskórka, dlatego też określana jest mianem cementu międzykomórkowego [30].

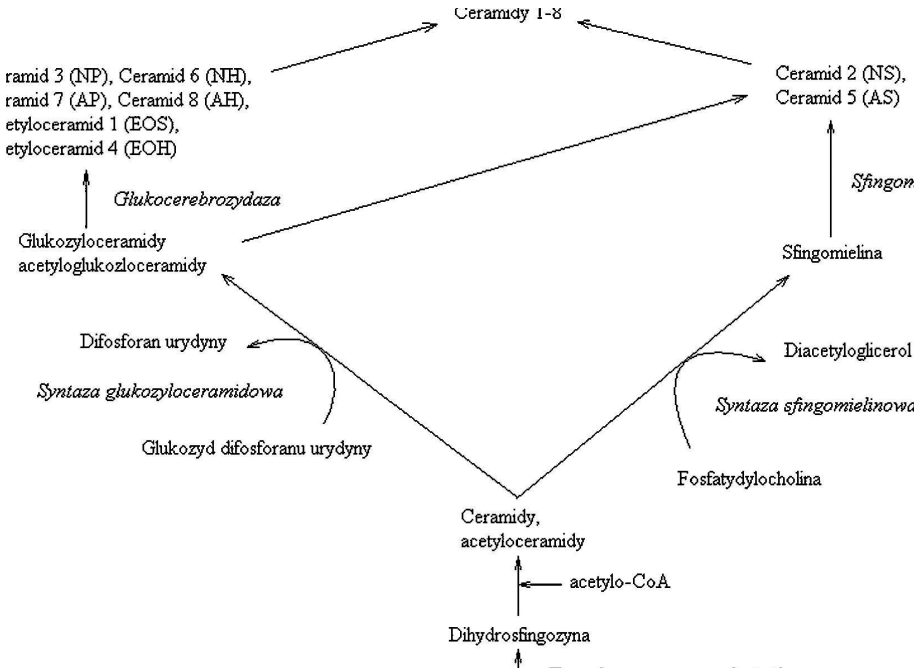


Rysunek 2. Struktury prekursorów ceramidów [32]

Figure 2. Structures of ceramides precursors [32]

Występowanie nasilonej suchości skóry u chorych z atopowym zapaleniem skóry jest wynikiem, między innymi, niedoboru ceramidów. Przyczyną niedoboru jest nadmierna produkcja deacylazy sfingomieliny (SM), co powoduje gromadzenie się w warstwie rogowej sfingozylfosforylocholino (SPC), zamiast ceramidów

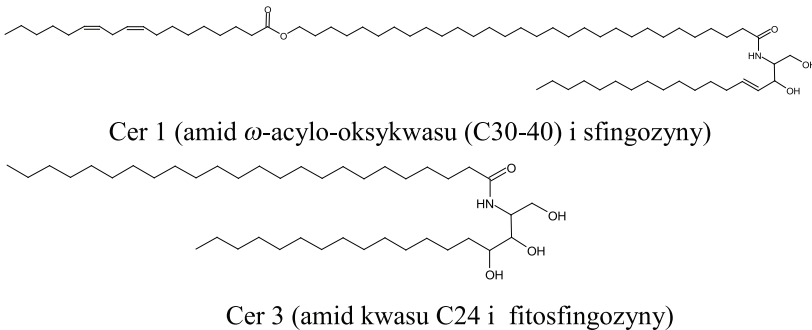
(CR) [33]. Całkowita ilość ceramidów u pacjentów z AZS, zarówno tych posiadających i nie posiadających egzemy, jest podobna i znacznie niższa niż u zdrowych ludzi w tym samym wieku. Spadek dotyczy przede wszystkim Ceramidu 1 i 3 (Rys. 4). Ilość Ceramidu 3 jest bezpośrednio związana z transepidermalną utratą wody. U pacjentów z AZS obserwuje się ponadto wzrost stężenia cholesterolu w skórze [32].



Rysunek 3. Schemat syntezy ceramidów naskórka [32]

Figure 3. The scheme for the production of stratum corneum ceramides [32]

Zastosowanie ceramidów w kosmetykach do skóry atopowej poprawia uwodnienie skóry oraz wspomaga odnowę bariery lipidowej [34].



Rysunek 4. Struktura ceramidów Cer1 i Cer3 [32]

Figure 4. Structure of Cer1 and Cer3 [32]

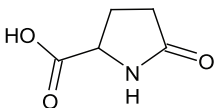
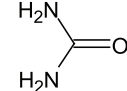
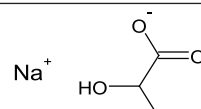
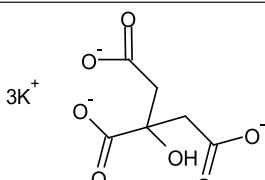
3.3 HUMEKTANTY

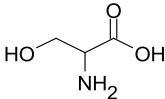
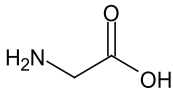
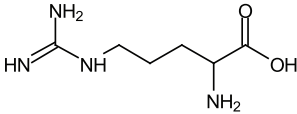
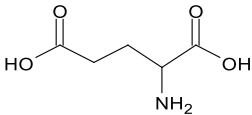
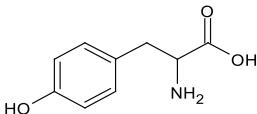
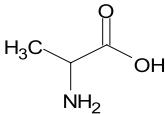
Za suchość skóry w mniejszym stopniu odpowiada upośledzenie czynności gruczołów łojowych oraz zmniejszenie ilości składników naturalnego czynnika nawilżającego (NMF) w naskórku [2, 3].

Naturalny czynnik nawilżający, stanowi 15–20% całkowitej wagi warstwy rogowej naskórka. NMF jest mieszaniną składników obecnych w warstewkach wodnych cementu międzykomórkowego warstwy rogowej, zapewniających prawidłowe nawilżenie naskórka. W jego składzie znajdują się hydrofilowe związki o małej masie cząsteczkowej, w tym aminokwasy, kwas pirolidonowy (ang. *pyrrolidone carboxylic acid*, PCA), mocznik, mleczań, kreatynina, glukozamina oraz jony sodowe, potasowe, wapniowe, magnezowe, chlorkowe i inne (Tab. 6) [29, 32, 35–37].

Prekursorem aminokwasów stanowiących podstawowy składnik NMF (48%) jest, powstające w warstwie ziarnistej naskórka, białko – filagryna [37, 38]. Uważa się, że patomechanizm uszkodzenia bariery naskórkowej w atopowym zapaleniu skóry, polega na mutacji genu zwanego naskórkowym kompleksem różnicowania, a zwłaszcza zaburzenia ekspresji genu filagryny znajdującego się na krótkim ramieniu chromosomu 1 [30]. Składniki NMF zastosowane w preparatach do pielęgnacji skóry atopowej, po wnikięciu w strukturę biochemiczną płaszczka lipidowego, przyciągają wodę do warstwy rogowej, zwiększając jej stopień uwodnienia [3, 22].

Tabela 6. Składniki NMF [39]
Table 6. Natural moisturizing formulation [39]

| Składnik | Nazwa INCI | Wzór strukturalny | Zawartość [% wag] |
|-------------------|-----------------------------|---|-------------------|
| Kwas pirolidonowy | Pyrrolidone carboxylic acid |  | 12,0 |
| Mocznik | Urea |  | 7,0 |
| Chlorek sodu | Sodium Chloride | NaCl | 5,0 |
| Mleczań sodu | Sodium Lactate |  | 5,0 |
| Cytrynian potasu | Potassium Citrate |  | 0,5 |

| Składnik | Nazwa INCI | Wzór strukturalny | Zawartość [% _{wag}] |
|------------------|---------------|---|-------------------------------|
| Seryna | Serine |  | 18,2 |
| Glicyna | Glycine |  | 9,1 |
| Arginina | Arginine |  | 3,2 |
| Kwas glutaminowy | Glutamic Acid |  | 2,3 |
| Tyrozyna | Tyrosine |  | 0,5 |
| Alanina | Alanine |  | 6,6 |
| Woda | Water | H ₂ O | do 100 |

Humektanty to związki chemiczne o silnych właściwościach higroskopijnych, mające zdolność do trwałego wiązania i zatrzymywania wody z otoczenia. Dzięki grupom hydroksylowym w swoich cząsteczkach umożliwiają powstanie naturalnego zapasu wody w skórze. Ponadto humektanty działają korzystnie na sam preparat kosmetyczny, zapobiegając jego wysychaniu [30]. W kosmetykach do pielęgnacji skóry atopowej stosowane są mocznik, glicerol (gliceryna), aminokwasy, mleczany i glikole.

Dodatek mocznika w stężeniu 3–10% powoduje uwodnienie warstwy rogowej. Najsilniejsze jego działanie zauważono w emulsjach typu w/o. Lepiej tolerowane są jednak emulsje o/w, przy stężeniu mocznika około 3%. W fazie ostrej oraz przy stosowaniu na twarz najlepiej stosować mocznik w ilości 5% [2, 22].

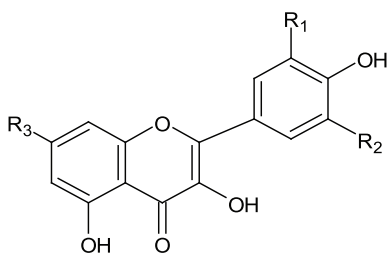
3.4. EKSTRAKTY ROŚLINNE JAKO SKŁADNIKI KOSMETYKÓW Z AZS

Wyniki badań wskazują, że ekstrakty z roślin bogatych w polifenole, jak np. *Rumex japonicus*, *Scutellaria baicalensis*, *Bambusae caulis* [40], *Scutellaria radix* oraz

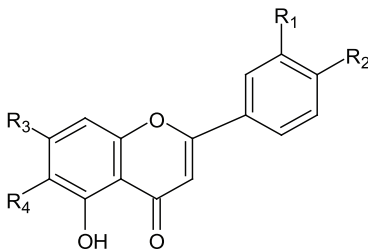
Aloe vera [41], *Cinnamomum caccia* [42] są stosowane w leczeniu atopowego zapalenia skóry. Preparaty oparte na powyższych ekstraktach mają działanie antyutleniające, antyalergiczne, antyseptyczne i przeciwzapalne [40–42]. Y-C. Nho i in. opatentowali recepturę hydrożelu zatrzymującego wodę w skórze przez dłuższy czas, działającego antybakteryjnie i chłodząco, stosowanego bezpośrednio na egzemy występujące przy AZS. Żel zawiera mieszaninę ekstraktów: *Houttuynia cordata* (tułacz sercolistny), wiązu, hebanowca, sosny, *Canavalia gladiata*, rozmarynu, lawendy, mięty, czerwonego krzewu (*Aspalathus linearis*) [26].

Powszechnie znane jest antyoksydacyjne działanie flawonoidów (polifenoli). Jako silne antyutleniacze flawonoidy mogą kontrolować stres oksydacyjny w organizmie, hamują procesy utleniania, m.in. lipidów, w tym NNKT i cementu międzykomórkowego [43].

Działanie przeciwzapalne flawonoidów (głównie kwercetyny, apigeniny, baikaliny – Rys. 5) polega na hamowaniu aktywności 5-lipooksygenazy i cyklooksygenazy. Enzymy te biorą udział w syntezie, z kwasu arachidonowego, prostaglandyn i leukotrienów, które są mediatorami odpowiedzi zapalnej. Zahamowanie tych enzymów przez flawonoidy powoduje zmniejszenie syntezy m.in. prostaglandyny PGE2, leukotrienu B4 i trombosanu A2, co w konsekwencji prowadzi do wyregulowania stanu napięcia naczyń włosowatych i zmniejszenia odczynu zapalnego [44].



kwercetyna: R₁= OH, R₂= H, R₃= OH



apigenina: R₁= H, R₂= OH, R₃= OH, R₄= H
 luteolina: R₁= OH, R₂= OH, R₃= OH, R₄= H
 baikalina: R₁= H, R₂= H, R₃= OH, R₄= OH

Rysunek 5. Struktura flawonoidów [44]

Figure 5. Structure of flavonoids [44]

Kwercetyna i luteolina dodatkowo wykazują właściwości przeciwalergiczne. Ich działanie polega na obniżaniu syntezy mediatorów zapalnych i hamowaniu uwalniania histaminy. Podobne, lecz nieco słabsze działanie wykazuje również baikaleina, która dodatkowo hamuje sekrecję eotaksyny (hemokiny wydzielanej przez fibroblasty) [45].

4. WYBRANE RECEPTURY KOSMETYCZNE

Produkty kosmetyczne do pielęgnacji skóry atopowej występują w różnych formach. Na rynku możemy spotkać: okłady, pudry, hydrożele, mleczka o/w, kremy o/w, maści chłodzące, maści w/o, maści lipożelowe czy plastry. Głównymi składnikami tych kosmetyków są substancje nawilżające, natłuszczające, środki przeciwświądowe, substancje antyseptyczne, ekstrakty roślinne oraz substancje dodatkowe, jak łagodne surfaktanty czy hipoalergiczne i niedrażniące konserwanty [2, 3].

W Tabeli 7 zamieszczono recepturę balsamu intensywnie nawilżającego do pielęgnacji skóry atopowej. Zawarta w kosmetyku lanolina uzupełnia lipidy w *stratum corneum* redukując oznaki suchej i popękanej skóry. Eter stearylowy glikolu polietylenowego, jako emolient zmiękcza skórę i nie pozostawia uczucia tłustości. Estry alkoholi C15-C17 i kwasu 2-etyloheksanowego oraz mirystynian izopropylu są emolientami, które dodatkowo poprawiają właściwości użytkowe produktu, ułatwiają rozprowadzanie kosmetyku na skórze. Gliceryna i mocznik są humektantami, które wiążą wodę w skórze, zaś воск jest składnikiem który tworzy na skórze okluzyjny film ochronny i nawilżający. Preparat jest emulsją w/o stabilizowaną monostearianem glicerolu [27].

Tabela 7. Receptura balsamu intensywnie nawilżającego z mocznikiem [27]

Table 7. Formulation of intensive moisturising balsam with urea [27]

| Nazwa polska | Nazwa handlowa | Nazwa INCI | Zawartość [%] |
|---|-----------------------|--|---------------|
| Mocznik | – | Urea | 5,0 |
| Woda destylowana | – | Distilled Water | do 100 |
| Estry alkoholi C15-C17 i kwasu 2-etyloheksanowego, Mirystynian izopropylu | Crodamol™ CAP | Cetearyl Ethylhexanoate Isopropyl Myristate | 8,0 |
| Eter stearylowy glikolu polietylenowego | Arlamol™ PS15E | PPG15 Stearyl Ether | 7,0 |
| Monostearnian glicerolu | Cithrol™ GMS 40 | Glyceryl Monostearate | 4,0 |
| Lanolina | Liquid Medilan™ Ultra | Lanolin | 2,5 |
| Wosk | Polawax™ NF | Wax | 4,0 |
| Gliceryna | Pricerine™ 9095 | Glycerin | 2,0 |

| Nazwa polska | Nazwa handlowa | Nazwa INCI | Zawartość [%] |
|--|----------------|---------------|---------------|
| Ester propylowy kwasu <i>p</i> -hydroksybenzoesowego | Propylparaben | Propylparaben | 0,15 |
| Ester metylowy kwasu <i>p</i> -hydroksybenzoesowego | Metylparaben | Methylparaben | 0,15 |

W Tabeli 8 zamieszczono recepturę kremu przeciwzapalnego z hydrokortyzonem, który ma również działanie rozjaśniające i rozświetlające skórę. Krem ma konsystencję lekkiej śmietanki. Lanolina, triglicerydy kwasu kaprylowego i kaprynowego oraz alkohol cetylowy zastosowano jako emolienty nawilżające skórę oraz zabezpieczające ją przed wysuszeniem i pękaniem, a tym samym przywracające skórze funkcję bariery. Występujący w kremie hydrokortyzon jest łagodnym kortykosteroidem, który redukuje stan zapalny. Mieszaninę estrów sorbitanu, polioksyetylenomonostearynianu sorbitanu oraz stearynianu sorbitanu zastosowano jako układ łagodnie działających, niejonowych emulgatorów [27].

Tabela 8. Receptura kremu przeciwzapalnego z hydrokortyzonem [27]

Table 8. Formulation of hydrocortisone anti-inflammatory cream [27]

| Nazwa polska | Nazwa handlowa | Nazwa INCI | Zawartość [%] |
|--|-----------------|--|---------------|
| Hydrokortyzon | – | Hydrocortisone | 1,00 |
| Woda destylowana | – | Distilled Water | do 100 |
| Triglicerydy kwasu kaprylowego i kaprynowego | Crodamol™ GTCC | Caprylic/Capric Triglyceride | 9,60 |
| Lanolina | Medilan™ Ultra | Lanolin | 5,00 |
| Polioksyetyleno-monostearynian sorbitanu | Tween™ 60 | Polyoxyethylene 60 Sorbitan Monostearate | 3,60 |
| Alkohol cetylowy | Crodacol™ CS90 | Cetearyl Alcohol | 3,60 |
| Stearynian sorbitanu | Span™ 60 | Sorbitan Stearate | 2,40 |
| Gliceryna | Pricerine™ 9095 | Glycerin | 2,40 |
| Ester propylowy kwasu <i>p</i> -hydroksybenzoesowego | Propylparaben | Propylparaben | 0,15 |
| Ester metylowy kwasu <i>p</i> -hydroksybenzoesowego | Metylparaben | Methylparaben | 0,15 |

W Tabeli 9 zamieszczono recepturę balsamu łagodzącego swędzenie, z mocznikiem. Zawarty w recepturze eter alkoholu laurylowego i glikolu polietylenowego jest łagodnym środkiem znieczulającym, który redukuje uczucie swędzenia. Lanolina jest „zbiornikiem wody *in vivo*” zwiększającym hydratację skóry, redukując trans-epidermalną utratę wody. Triglicerydy kwasu kaprylowego i kaprynowego oraz alkohol cetylowy to emolienty, które dodatkowo sprawiają, że balsam idealnie rozprowadza się po skórze. Gliceryna jest dodatkowym humektantem wiążącym wodę w naskórku, zaś emulgatorami są monooleinian polioksyetylenosorbitanu oraz monooleinian sorbitanu [27].

Tabela 9. Receptura balsamu łagodzącego swędzenie z mocznikiem [27]
 Table 9. Formulation of itch relief balsam with urea [27]

| Nazwa polska | Nazwa handlowa | Nazwa INCI | Zawartość [%] |
|--|-----------------|--|---------------|
| Mocznik | – | Urea | 5,0 |
| Eter alkoholu laurylowego i glikolu polietylenowego | Brij™ L9 | Laureth-9 | 3,0 |
| Woda destylowana | – | Distilled Water | do 100 |
| Triglicerydy kwasu kaprylowego i kaprynowego | Crodamol GTCC | Caprylic/Capric Triglyceride | 15 |
| Monooleinian polioksyetylenosorbitanu | Tween™ 80 | Polyoxyethylene 80 sorbitan monooleate | 3,6 |
| Lanolina | Medilan™ Ultra | Lanolin | 3,0 |
| Alkohol cetylowe | Crodacol™ CS90 | Cetearyl Alcohol | 3,0 |
| Monooleinian sorbitanu | Span™ 80 | Sorbitan monooleate | 2,4 |
| Gliceryna | Pricerine 9095™ | Glycerin | 2,5 |
| Ester propylowy kwasu <i>p</i> -hydroksybenzoesowego | Propylparaben | Propylparaben | 0,15 |
| Ester metylowy kwasu <i>p</i> -hydroksybenzoesowego | Methylparaben | Methylparaben | 0,15 |

W Tabeli 10 zamieszczono recepturę regenerującego kremu na dzień. Zawarta w recepturze lanolina poprawia kondycję skóry atopowej, redukuje oznaki suchości, wygładza pęknięcia. Gliceryna dodatkowo zwiększa właściwości nawilżające kremu. Witamina E jest antyoksydantem, zaś mieszaninę emulgującą stanowią alkohol cetylowy oraz oksyetylenowany alkohol cetylowy [27].

Tabela 10. Receptura regenerującego kremu [27]
 Table 10. Formulation of skin repair cream [27]

| Nazwa polska | Nazwa handlowa | Nazwa INCI | Zawartość [%] |
|--|-----------------------|-------------------------------------|---------------|
| Lanolina | Medilan™ | Lanolin | 5,00 |
| Woda dejonizowana | – | Deionised Water | do 100 |
| Parafina ciekła | Light Liquid Paraffin | Light Liquid Paraffin(25cS) at 25°C | 25,00 |
| Alkohol cetylowy, Eter alkoholu cetylowego i glikolu polietylenowego | Crodex™ N | Cetearyl Alkohol, Ceteareth-22 | 12,00 |
| Witamina E | Vitamin E | Vitamin E | 0,20 |
| Gliceryna | Pricerine™ 9095 | Glycerin | 2,40 |
| Ester propylowy kwasu <i>p</i> -hydroksybenzoesowego | Propylparaben | Propylparaben | 0,15 |
| Ester metylowy kwasu <i>p</i> -hydroksybenzoesowego | Methylparaben | Methylparaben | 0,15 |

W Tabeli 11 zamieszczono recepturę nawilżającej emulsji do mycia skóry atopowej. Nie zawiera detergentów, więc nie wysusza, ani nie drażni skóry. Mirystynian izopropylu zapewnia skuteczne i delikatne oczyszczenie, zaś lanolina przywraca barierę lipidową, nawilża i chroni skórę. Połączenie eteru hydroksystearylglicerylo glikolu polietylenowego, stearynianu sorbitanu oraz oksyetylenowany monostearynianu sorbitanu nadaje odpowiednią konsystencję oraz stabilność emulsji. Za dodatkowe zwiększenie nawilżenia naskórka odpowiada gliceryna a karbomer jest składnikiem regulującym lepkość [27].

Tabela 11. Receptura nawilżającej emulsji myjącej [27]
Table 11. Formulation of moisturizing cleansing emulsion [27]

| Nazwa polska | Nazwa handlowa | Nazwa INCI | Zawartość [%] |
|---|-----------------------|---------------------------------------|---------------|
| Parafina biała | White Soft Paraffin | White Soft Paraffin | 12,0 |
| Ciekła parafina | Light Liquid Paraffin | Light Liquid Paraffin (25cS) at 25°C | 8,0 |
| Eter hydroksystearylglicerylo glikolu polietylenowego | Croduret™ 40 | Macrogol Glycerol Hydroxystearate | 6,0 |
| Lanolina | Medilan | Lanolin | 3,0 |
| Mirystynian izopropylu | Crodamol™ IPM | Isopropyl Myristate | 3,0 |
| Stearynian sorbitanu | Span™ 60 | Sorbitan Stearate | 2,0 |
| Oksyetylenowany monostearynian sorbitanu | Tween™ 60 | Polyoxyethylene Sorbitan Monostearate | 2,0 |
| Kwas poliakrylowy (sieciowany) | Carbomer 941 (2%) | Carbomer 941 | 10,0 |
| Gliceryna | Pricerine™ 9095 | Glycerin | 3,0 |
| Woda dejonizowana | – | Deionised Water | do 100 |
| Ester propylowy kwasu p-hydroksybenzoesowego | Propylparaben | Propylparaben | 0,15 |
| Ester metylowy kwasu p-hydroksybenzoesowego | Methylparaben | Methylparaben | 0,15 |

W Tabeli 12 zamieszczono recepturę antybakteryjnego olejku do kąpieli. Zawarte w preparacie połączenie emolientów, triglicerydy kwasu kaprylowego i kaprynowego oraz mirystynian izopropylu, zapewnia odpowiednie nawilżenie oraz skuteczne oczyszczanie skóry. Ciekła lanolina zmiękcza skórę oraz uzupełnia lipidy naskórka. Olejek szafranowy jest odpowiedzialny za odbudowę funkcji barierowej skóry. Alkohol oleinowy pełni funkcję emolientu i rozpuszczalnika dla pozostałych składników. Środkiem antybakteryjnym jest chlorek benzylodimetylotridecyloamoniowy, zaś oksyetylenowany alkohol laurylowy jest dyspergatorem [27].

Tabela 12. Receptura antybakteryjnego olejku szafranowego do kąpieli [27]
Table 12. Formulation of Safflower antibacterial bath oil [27]

| Nazwa polska | Nazwa handlowa | Nazwa INCI | Zawartość [%] |
|--|---------------------------------|------------------------------|---------------|
| Olejek szafranowy rafinowany | Super Refined™ Safflower Oil | Safflower Oil | 2,5 |
| Triglicerydy kwasu kaprylowego i kaprynowego | Crodamol™ GTCC | Caprylic/Capric Triglyceride | do 100 |
| Mirystynian izopropylu | Crodamol™ IPM | Isopropyl Myristate | 15,0 |
| Oksyetylenowany alkohol laurylowy | Brij™ LT3 | C12-13 Pareth-3 | 10,0 |
| Lanolina | Liquid Medilan TM | Lanolin | 3,0 |
| Alkohol oleinowy | Novol™ | Oleyl Alcohol | 3,0 |
| Chlorek benzylodimetylotridecyloamoniowy | – | Benzalkonium Chloride | 0,5 |
| Witamina E | Vitamin E | Vitamin E | 0,5 |
| Ester propylowy kwasu <i>p</i> -hydroksybenzoesowego | Propylparaben | Propylparaben | 0,15 |

W Tabeli 13 zamieszczono recepturę emulsji oczyszczającej dla skóry atopowej, która jest propozycją połączenia właściwości myjących i leczniczych. Produkt nie zawiera detergentów. Mieszanina składników liofilowych ułatwia usunięcie hydrofobowego makijażu oraz zanieczyszczeń z powierzchni skóry, nie wysuszając skóry [27].

Tabela 13. Receptura emulsji oczyszczającej [27]
Table 13. Formulation of cleansing emulsion [27]

| Nazwa polska | Nazwa handlowa | Nazwa INCI | Zawartość [%] |
|--|-----------------------|--|---------------|
| Parafina ciekła | Light Liquid Paraffin | Light Liquid Paraffin (25cS) at 25°C | 10,0 |
| Palmitynian etyloheksylu | Crodamol TMOP | Ethylhexyl Palmitate | 1,5 |
| Stearynian sorbitanu | Span™ 60 | Sorbitan Stearate | 1,5 |
| Polioksyetylenomono-stearynian sorbitanu | Tween™ 60, | Polyoxyethylene 60 Sorbitan Monostearate | 1,5 |
| Estry alkoholu cetylowego oraz wosku | Crodamol™ SS | Cetyl Esters Wax | 0,5 |
| Stearynian glikolu polietylenowego | Cithrol™ 10MS | PEG 20 Stearate | 0,4 |
| Cyklopolidimetylo-siloksan | – | Cyclomethicone | 0,8 |
| Woda dejonizowana | – | Deionised Water | do 100 |
| Ester propylowy kwasu <i>p</i> -hydroksybenzoesowego | Propylparaben | Propylparaben | 0,15 |
| Ester metylowy kwasu <i>p</i> -hydroksybenzoesowego | Methylparaben | Methylparaben | 0,15 |

W Tabeli 14 przedstawiono recepturę nanoemulsji do skóry atopowej z ceramidami. Emulsja zawiera dwa słabo rozpuszczalne w wodzie ceramidy, ceramid 3, który najobficiej występuje w zdrowej ludzkiej skórze, a którego niedobór jest jedną z cech skóry atopowej, oraz nie występujący w skórze ceramid 3B. Według najnowszych badań oba ceramidy poprawiają funkcję barierową skóry poprzez wzmocnienie lipidów naskórka i ograniczenie TEWL. Zawarta w emulsji fitosfingozyna (PS) jest amfifilową pochodną sfingozyny występującej naturalnie, w dużym stężeniu, w *stratum corneum*. Uważa się, że sfingozyna jest częścią systemu obronnego skóry. Dodatek PS lub jej pochodnych powoduje wzrost poziomu ceramidów w naskórku. Z powodu tych właściwości PS jest bardzo atrakcyjnym surowcem w kosmetykach do pielęgnacji skóry atopowej. Emulsja zawiera również, w dużym stężeniu, łagodny emolient 2-oktylododekanol oraz glicerynę. Emulgatorami są lecytyna oraz oksyetylenowany monooleinian sorbitanu [34].

Tabela 14. Receptura nanoemulsji z ceramidami do skóry atopowej [34]
Table 14. Formulation of nanoemulsion with ceramides [34]

| Nazwa polska | Nazwa handlowa | Nazwa INCI | Zawartość [%] |
|--|-------------------|--|---------------|
| 2-Oktylododekanol | Eutanol G | Octyldodecanol | 20,00 |
| Lecytyna | Lipoid E-80* | Lecithin | 2,00 |
| Fitosfingozyna | Phytosphingosine | Phytosphingosine | 0,60 |
| Ceramid 3B | Ceramide 3B | Ceramide 3B | 0,20 |
| Ceramid 3 | Ceramide 3 | Ceramide 3 | 0,20 |
| Kwas palmitynowy | Palmitic Acid | Palmitic Acid | 0,20 |
| Cholesterol | Cholesterol | Cholesterol | 0,20 |
| Witamina E | Vitamin E | Vitamin E | 0,03 |
| Oksyetylenowany monooleinian sorbitanu | Tween 80 | Polyoxyethylene 20 sorbitan monooleate | 2,00 |
| Gliceryna | Glycerol | Glycerin | 2,50 |
| Sorbinian potasu | Potassium Sorbate | Potassium Sorbate | 0,10 |
| Cyklopolidimetylosiloksan | - | Cyclomethicone | 0,80 |
| Woda | - | Water | do 100 |

PODSUMOWANIE

W opracowaniu omówiono stosowane metody terapii oraz pielęgnacji AZS oraz opisano podstawowe składniki kosmetyków do pielęgnacji skóry atopowej.

W pielęgnacji skóry atopowej stosowane są łagodne emolienty przywracające skórze funkcję naturalnej bariery, odtwarzające płaszcz lipidowy skóry, zapobiegają

utracie wody, w efekcie powodujące wzrost jej elastyczności i zmniejszające uczucie swędzenia. Dla skóry atopowej polecane są emolienty zbudowane na bazie olejów mineralnych czy olejów roślinnych będących źródłem kwasu gammalinolenowego (GLA). Ważne jest, aby kosmetyki nie wywoływały podrażnień i alergii, dlatego w ich składzie można znaleźć typowe i znane surowce kosmetyczne o łagodnym i nie alergizującym działaniu na skórę.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] C.A. Akdis, M. Akdis, T. Bieber, C. Bindslev-Jensen, M. Boguniewicz, P. Eigenmann, Q. Hamid, A. Kapp, D.Y.M. Leung, J. Lipozencic, T.A. Luger, A. Muraro, N. Novak, T.A.E. Platts-Mills, L. Rosenwasser, A. Scheynius, F.E.R. Simons, J. Spergel, K. Turjanmaa, U. Wahn, S. Weidinger, T. Werfel, T. Zuberbier for the European Academy of Allergology and Clinical Immunology/American Academy of Allergy, Asthma and Immunology/PRACTALL Consensus Group, *Allergy*, 2006, **61**, 969.
- [2] E.S. Bender, red. wyd. pol. Elżbieta Budzisz, *Pielęgnacja ciała*, Wydawnictwo MedPharm, Warszawa 2011.
- [3] M. Wanat-Krzak, R. Kurzawa, *Terapia*, 2004, **11**, 47.
- [4] M.C. Martin, *Kosmetologia i farmakologia skóry*, Wyd. Lek. PZWL, Warszawa 2007.
- [5] A.V. Rawlings et al., *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, 2008, **5**, 127.
- [6] U.N. Das, *Nutrition*, 2010, **26**, 719.
- [7] P.Y. Ong et al., *N. Engl. J. Med.*, 2002, **347**, 1151.
- [8] J.M. Hanifin et al., *J. Amer. Acad. Dermatol.*, 2004, **50**, 391.
- [9] D. Chomiczewska, N. Kieć-Świerczyńska, B. Kręcisz, *Medycyna Pracy*, 2008, **59**, 409.
- [10] E. Waszczykowska, *Przegląd Alergologiczny*, 2004, **1**, 24.
- [11] V.S. Beltrani, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1999, **104**, 87.
- [12] C. Barzegar, A. Pradalier, *Rev. Fr. Allergol. Immunol. Clin.*, 2002, **42**, 410.
- [13] I.M. Haeck et al., *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2010, **64**, 275.
- [14] H.W. Sears et al., *Clin. Therap.*, 1997, **19**, 710.
- [15] S.R. Feldman, *Curr. Therap. Res.*, 2005, **66**, 154.
- [16] Z. Draelos et al., *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2005, **53**, 602.
- [17] S. Mommert et al., *Curr. Alerts Astma Rep.*, 2011, **11**, 21.
- [18] X. Petsitis, K. Kipper, *Kosmetyka ozdobna i pielęgnacja twarzy; Wiedza o produktach kosmetycznych i ich prawidłowym stosowaniu*, Wydawnictwo MedPharm Polska, Wrocław 2007.
- [19] M. Kaleta, *Rynek Chemiczny*, 2006, **3**, 21.
- [20] A. Kamińska, I. Złotowska, D. Orszulak-Michalak, *Polish J. Cosmetol.*, 2005, **8**, 2.
- [21] C. Saint-Martory et al., *British J. Dermatol.*, 2008, **158**, 130.
- [22] M. Loden, *Clinics in Dermatol.*, 2003, **21**, 145.
- [23] K.A. Zug et al., *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2008, **59**, 426.
- [24] www.jakowicki.pl/doc/Atopowe_zapalenie_skory.pdf
- [25] J.S.C. English, C.I. Wootton, *Clin. Dermatol.*, 2011, **29**, 273.
- [26] Y. Nho et al., US 7,799,352 B2, US Patent, 2010.
- [27] *Formulary guide, Repairing, Targeting, Nourishing, Cleansing, Moisturising, Formulating for Eczema*, <http://www.croda.com>
- [28] M. Loden, H.I. Maibach, *Dry Skin and Moisturizers, Chemistry and Function*, second edition, Taylor & Francis Group, Boca Raton 2006.

- [29] R. Darlenski et al., *Eur. J. Pharm. and Biopharm.*, 2009, **72**, 295.
- [30] A. Kacalak-Rzepka, S. Bielecka-Grzela, A. Klimowicz, J. Wesołowska, R. Maleszka, R. Pomor. Akad. Medycznej w Szczecinie, 2008, **54**, 54.
- [31] A. Dweck, *Formulating natural cosmetics*, Alluredbooks, Carol Stream 2011.
- [32] L. Coderch et al., *Am. J. Clin. Dermatol.*, 2003, **4**, 107.
- [33] J. Drukała, S. Bobis, E. Żabińska-Płazak, A. Wojas-Pelc, *Przegląd Lekarski*, 2009, **66**, 145.
- [34] E. Ylmaz, H.H. Borchert, *Internat. J. Pharm.*, 2006, **307**, 232.
- [35] M. Rousseau, et al., *Compar. Biochem. Physiol., Part B*, 2006, **145**, 1.
- [36] Y. Jukura, S. Kshikawa, H. Tokuda, G. Imokawa, *J. Invest. Dermatol.*, 1995, **104**, 806.
- [37] S. Kezic et al., *British J. Dermatol.*, 2009, **161**, 1098.
- [38] G.M. O'Regan et al., *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2008, **122**, 689.
- [39] M.O. Visscher, G. T. Tolia, R.R. Wickett, S.B. Heath, *J. Cosmet. Sci.*, 2003, **54**, 289.
- [40] X.F. Qi et al., *J. Ethnopharm.*, 2009, **123**, 195.
- [41] J. Kim et al., *J. Ethnopharm.*, 2010, **132**, 529.
- [42] Y.Y. Sung et al., *J. Ethnopharm.*, 2011, **133**, 621.
- [43] K.E. Heim, R.A. Tagliaferro, D.J. Bobilya, *Nutritional Biochem.*, 2002, **14**, 572.
- [44] L.H. Yao, Y.M. Jiang, J. Shi, *Plant Foods for Human Nutrition*, 2004, **59**, 113.
- [45] H. Czczot, *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 2000, **50**, 3.

Praca wpłynęła do Redakcji 16 czerwca 2011

PORFIRYNY ZAMKNIĘTE W ŻELU KRZEMIONKOWYM

PORPHYRINS CLOSED IN SOL-GEL MATRIX

Rafał Jakub Wigłusz

*Instytut Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych, Polska Akademia Nauk,
ul. Okólna 2, 50-422 Wrocław
e-mail: R.Wigłusz@int.pan.wroc.pl*

Abstract

Wstęp

1. Preparatyka żeli krzemionkowych
 - 1.1. Etap roztwór-żel
 - 1.2. Etap zol-żel
 - 1.3. Etap żel-ksero-żel
 - 1.4. Etap kserożel-szkło
 2. Żele modyfikowane organicznie
 3. Zastosowanie
 4. Porfiryny jako aktywne sensory
 - 4.1. Nośniki dla porfiryn
 - 4.2. Matryce polimerowe
 - 4.3. Szklą zol-żelowe
 - 4.4. Układy nieorganiczno-organiczne
 - 4.5. Biosensory
 5. Spektroskopia porfiryn w matrycach krzemionkowych
- Podsumowanie
Piśmiennictwo cytowane
-



dr Rafał Jakub Wigłusz jest adiunktem w Instytucie Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych PAN we Wrocławiu. W 1999 roku ukończył Wydziału Matematyki-Fizyki-Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego (specjalność Chemia Środowiska). Doktorat na temat syntezy i spektroskopii związków lantanowców obronił w 2004 roku. W latach 2005–2006 przebywał na stażu na Uniwersytecie w Kolonii. Obecnie prowadzi badania z zakresu spektroskopii nanokryształów domieszkowanych jonami lantanowców do zastosowań w bioobrazowaniu.

ABSTRACT

The need for new, chemically and physically stable luminescent materials operating with UV excitations has stimulated research on luminescence properties of doped sol-gel material. In this work, it has been presented a technology of production of silica gels doped with organic molecules, lanthanide compounds and organic/inorganic composites. Optical properties of these materials as functions of temperature, concentration and excitation wavelength are presented. Dynamics of excited states has been discussed based on the decay times and emission efficiencies data. Mechanisms of ligand-to-metal energy transfer as well as other processes affecting emission efficiency are considered. Silica sol-gels doped with di-aminoacid derivatives of porphyrins: PP(Ser)₂(Arg)₂, PP(Ala)₂(Arg)₂, PP(Met)₂(Arg)₂, where Met, Arg and Ser denote methionine, serine and arginine aminoacids, respectively, and H₂TTMePP {tetrakis[4-(trimethylammonio)phenyl]-21H,23H-porphine} have been obtained and spectroscopically studied. These materials can find applications as phosphors or sensors of UV irradiation.

Keywords: porphyrins, porphyrin derivatives, lanthanide(III) ions, UV-Vis spectroscopy, luminescence; sol-gel

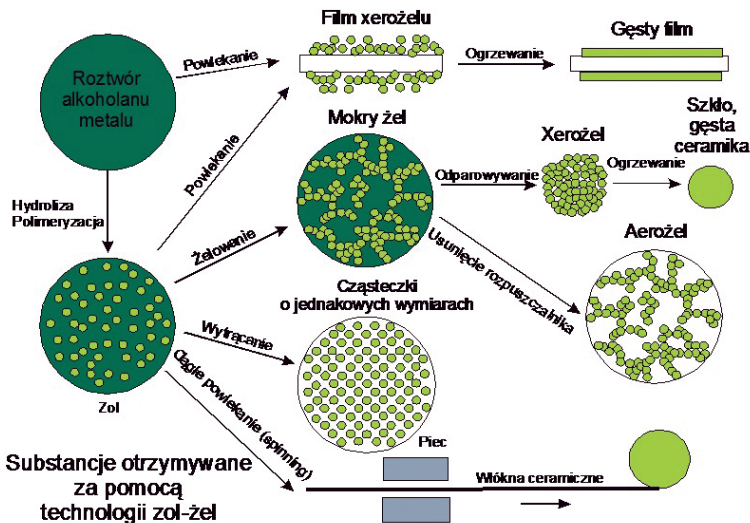
Słowa kluczowe: porfiryny, pochodne porfiryń, jony lantanowców, spektroskopia UV-Vis, luminescencja, żol-żel

WSTĘP

Produkcja szkła w sposób konwencjonalny polega na ogrzewaniu w wysokiej temperaturze (około 1000–2000°C) mieszaniny tlenków, takich jak SiO_2 , Al_2O_3 , CaO (lub węglanów). Otrzymaną w ten sposób masę szklistą poddaje się następnie procesowi szybkiego chłodzenia, co powoduje zachowanie nieuporządkowanej struktury.

Zgodnie z definicją, szkłem nazywamy każdy nieorganiczny produkt topnienia, który podczas chłodzenia przechodzi w sposób ciągły, bez krystalizacji, ze stanu ciekłego do stanu o lepkości większej niż 10^{12} Pa·s [1]. Szkło jest osobliwym stanem materii, do którego dochodzi się na drodze przemian kinetycznych. W porównaniu ze stanem krystalicznym szkło cechuje się dużym stopniem nieuporządkowania przypominające ciecz, z której powstało [2].

Nieuporządkowaną strukturę szkła można otrzymywać nie tylko na drodze wytopu w wysokiej temperaturze. W 1971 roku Dislich [3] przedstawił niezwykłą metodę otrzymywania szkła z roztworu w znacznie niższej temperaturze w porównaniu z konwencjonalnym wytopem. Wykorzystał tu proces „zol-żel”, znany już w połowie XIX wieku z powodu roli jaką pełnił w naturalnych procesach takich jak tworzenie opali [4]. Materiał uzyskany na drodze: roztwór → zol → żel → szkło, jest szkłem w myśl definicji podanej przez Secrita i Mackenzie'ego [1] (Rys. 1). Według tej definicji szkło jest ciałem stałym niekrystalicznym, gdzie termin „ciało stałe” oznacza materiał o lepkości większej niż 10^{12} Pa·s, a przymiotnik „niekrystaliczny” oznacza brak symetrii translacyjnej w odległości większej niż 2 nm od wybranego atomu, czyli wskazuje na zanik uporządkowania dalekiego zasięgu.



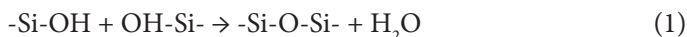
Rysunek 1. Otrzymywanie materiałów ceramicznych za pomocą metody zol-żel
Figure 1. Preparation of ceramic materials by the sol-gel method

Proces zol-żel (Rys. 1) obejmuje następujące etapy:

1. Przygotowanie jednorodnego roztworu prekursora, przeważnie w organicznym rozpuszczalniku mieszającym się z wodą lub będącym reagentem użytym w następnym etapie;
2. Przeprowadzenie roztworu w formę zolu poprzez wprowadzenie odpowiedniego reagenta, np. wody zakwaszonej HCl w przypadku ceramiki tlenkowych;
3. Przekształcenie zolu w żel przez polikondensację;
4. Nadanie żelowi (lub lepkiemu zolowi) odpowiedniego kształtu lub formy w procesie suszenia; cienkie warstwy – filmu [5–17], włókna [18–19], czy ziaren [20];
5. Wypalanie uformowanego żelu [4].

Zwykle technologia materiałów dotowanych związkami organicznymi zatrzymuje się na etapie czwartym.

Sieć krzemionki (SiO_2) może być tworzona w roztworze w reakcji polimeryzacji kwasu krzemowego $\text{Si}(\text{OH})_4$. Ogólnie wiadomo, że kwas otrzymany poprzez zakwaszenie rozpuszczalnych krzemianów lub hydrolizę SiCl_4 oraz organicznych związków krzemu typu $\text{Si}(\text{OR})_4$, gdzie R jest grupą alkilową (na przykład $-\text{CH}_3$, $-\text{C}_2\text{H}_5$), jest niestabilny i w wodnych roztworach monomery $\text{Si}(\text{OH})_4$ ulegają reakcji polimeryzacji, gdy stężenie SiO_2 przekracza 100 ppm (graniczna rozpuszczalność w wodzie w temperaturze 25°C). Reakcja polimeryzacji opiera się na kondensacji grup silanolowych:



W następstwie powyższej reakcji dochodzi do utworzenia najpierw dimerów, a potem wyższych agregatów cząsteczkowych, które kondensują tworząc pierwotne cząstki zolu, a następnie łączą się w łańcuchy i trójwymiarowe sieci żelu [21]. Najczęściej stosowanymi prekursorami w metodzie zol-żel są alkohole odpowiednich metali np. krzemu (TEOS) (Tab. 1).

Metodami otrzymywania szkła krzemionkowego oraz innych szkieł tlenkowych wykorzystującymi przejście zol-żel są: metoda zolowa, metoda alkoholowa, metoda redispersji.

Tabela 1. Alkohole stosowane do otrzymywania szkła metodą zol-żel [1]

Tabela 1. Alkoxides used to obtain a glass by the sol-gel method

| M | $\text{M}(\text{OR})_n$ | Nazwa |
|----|--|--|
| Si | $\text{Si}(\text{OCH}_3)_4$ $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$ | tetrametoksylan (TMOS) tetraetoksylan (TEOS) |
| Ti | $\text{Ti}(\text{O}-\text{C}_2\text{H}_5)_4$ $\text{Ti}(\text{O}-\text{izoC}_3\text{H}_7)_4$ $\text{Ti}(\text{O}-\text{C}_4\text{H}_9)_4$ $\text{Ti}(\text{O}-\text{C}_5\text{H}_{11})_4$ | tetraetanolan tytanu tetraizopropanolan tytanu tetrabutanolan tytanu tetrapentanolan tytanu |

| M | M(OR) _n | Nazwa |
|----|--|--|
| Al | Al(O-izoC ₃ H ₇) ₃ Al(O-secC ₄ H ₉) ₃ | triizopropanolan glinu tri-sec-butanolan glinu |
| B | B(OCH ₃) ₃ B(OC ₂ H ₅) ₃ | trimetanolan boru trietanolan boru |
| Ge | Ge(O-C ₂ H ₅) ₄ | tetraetanolan germanu |
| Zr | Zr(O-izoC ₃ H ₇) ₄ Zr(O-C ₄ H ₉) ₄ | tetraizopropanolan cyrkonu tetrabutanolan cyrkonu |
| Y | Y(O-C ₂ H ₅) ₃ | trietanolan itru |
| Ca | Ca(O-C ₂ H ₅) ₂ | dietanolan wapnia |

1. PREPARATYKA ŻELI KRZEMIONKOWYCH

1.1 ETAP ROZTWÓR-ZOL

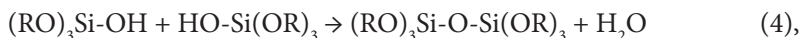
Alkoholany stosuje się w postaci roztworów, w których rozpuszczalnikami są najczęściej etanol albo metanol. Po rozpuszczeniu i dodaniu odpowiedniej ilości wody rozpoczyna się proces zol-żel. W zależności od ilości wody hydroliza może zachodzić częściowo lub całkowicie w myśl następującej reakcji:



gdzie R jest grupą alkilową. Dwie częściowo zhydrolizowane cząsteczki mogą połączyć się ze sobą w reakcji kondensacji:



lub



w których uwalniane są małe cząsteczki takie, jak woda lub alkohol [1].

Powyższe reakcje są reakcjami substytucji nukleofilowej i zachodzą według mechanizmu S_N2 [1]. Aktywność chemiczna alkoholów metali w reakcji hydrolizy i kondensacji jest zależna od wielkości ładunku, tendencji do podwyższania liczby koordynacyjnej atomu metalu oraz od długości łańcucha węglowego grupy alkilowej R. Wynika z tego, że reaktywność prekursorów wzrasta z obniżeniem elektroujemności i zwiększeniem promienia jonowego metalu oraz maleje ze wzrostem liczby atomów węgla.

Większość alkoholów metali jest zdecydowanie bardziej reaktywna niż Si(OR)₄ ze względu na elektroujemność atomów metali, która jest mniejsza niż krzemu. Ponadto, liczba koordynacyjna metali w tlenkach jest większa niż stopień utlenienia, a jak wiadomo zwiększenie liczby koordynacyjnej atomu metalu pełni istotną rolę w podwyższeniu reaktywności jego alkoholany [1]. Mimo mniejszej

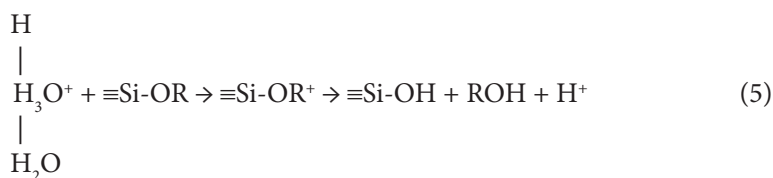
reaktywności, do produkcji szkieł i ceramiki najczęściej stosuje się alkoholany krzemu. Krzem zachowuje koordynację czterokrotną, zarówno w alkoholanie, jak i powstałym z niego tlenku. Wszystkie związki $\text{Si}(\text{OR})_4$ są monomerami o strukturze tetraedrycznej. Jednakże w roztworze w obecności silnego anionowego czynnika nukleofilowego, ulegają stabilizacji krzemiany pięciokoordynacyjne, co oczywiście podnosi reaktywność alkoholów. Z drugiej strony charakter grup alkilowych wpływa na stałą szybkości reakcji tych związków. Stała szybkości reakcji maleje ze wzrostem ilości atomów węgla w rodniku R. Jest to częściowo spowodowane niewielkim zmniejszeniem ładunku cząstkowego na atomie krzemu oraz zawadą przestrzenną hamującą tworzenie się reaktywnego kompleksu krzemu w stanie przejściowym [1].

Hydrolizę i kondensację alkoholów krzemu można przyspieszyć za pomocą katalizatorów kwasowych lub zasadowych (Tab. 2).

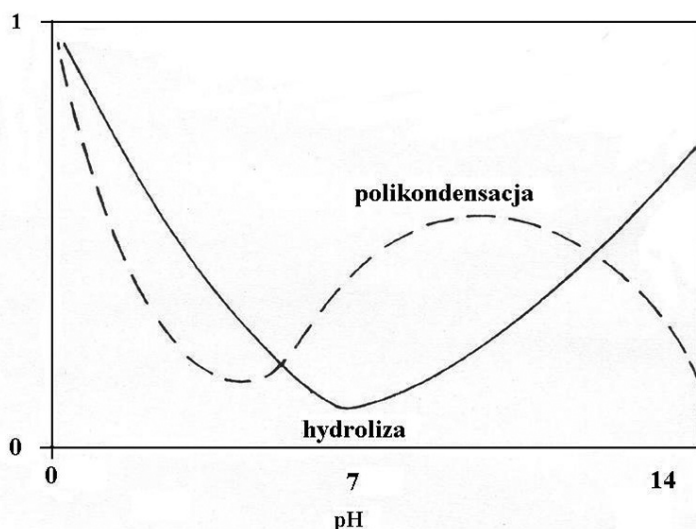
Tabela 2. Wpływ niektórych rodzajów katalizatorów na czas żelowania [21]
Tabela 2. Influence of some kinds of catalysts on the gelation time

| Katalizator | Początkowe pH roztworu | Czas żelowania [h] |
|--------------------------|------------------------|--------------------|
| HCl | 0,05 | 92 |
| CH_3COOH | 3,75 | 72 |
| NH_3 | 9,95 | 107 |

Kwasy nieorganiczne protonują odwracalnie obdarzone ładunkiem grupy alkoholowe $-\text{OR}$ w stanie przejściowym i powodują wzrost szybkości reakcji, w wyniku której grupy $-\text{OR}$ odłączają się zgodnie z poniższym równaniem:



Proton przyciągany przez atom tlenu grupy $-\text{OR}$ powoduje przesunięcie chmury elektronowej w wiązaniu $\equiv\text{Si}-\text{O}-$ w kierunku atomu tlenu. W ten sposób wzrasta ładunek dodatni na atomie krzemu, do którego przyłącza się cząsteczka wody, tworząc kompleks aktywowany krzemu w jego pięciokoordynacyjnym stanie przejściowym. Katalizatory zasadowe dostarczają silnych nukleofilowych grup OH^- , które podczas reakcji hydrolizy deprotonują grupy silanolowe, tworząc $\equiv\text{Si}-\text{O}-$, co zwiększa szybkość kondensacji. Wynika stąd, że katalizator kwasowy sprzyja hydrolizie, prowadząc do utworzenia $\text{Si}(\text{OH})_4$, w obecności nadmiaru wody. Z kolei kondensacja zachodzi szybciej, w porównaniu z hydrolizą, w obecności katalizatorów zasadowych. Reakcje hydrolizy i polikondensacji nie są rozdzielone w czasie, lecz bieżą jednocześnie obok siebie (Rys. 2).



Rysunek 2. Zależność szybkości reakcji hydrolizy i polikondensacji od pH roztworu alkoholowego tetraetoksy-sylanu (TEOS) [1]

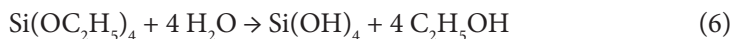
Figure 2. pH dependence of hydrolysis and polycondensation reaction rate in alcoholic solution of TEOS [1]

Względne szybkości tych reakcji mają wpływ na kształty struktur polimero-wych; np. szybko zachodząca reakcja hydrolizy i powoli biegnąca kondensacja fa-woryzują tworzenie polimerów liniowych, gdy tymczasem sytuacja odwrotna powoduje powstanie polimerów o dużych, rozbudowanych i rozgałęzionych cząsteczkach.

W wyniku postępującej polikondensacji następuje wzrost cząsteczek oksopoli-meru w roztworze. Stopniowo więc ma miejsce przejście do stanu koloidalnego, zwanego zolem, w którym zgodnie z ogólnie akceptowaną definicją rozmiary cząs-tek fazy rozproszonej zawierają się w przedziale 1–1000 nm [1].

1.2 ETAP ZOL-ŻEL

Zachowanie kwasu krzemowego otrzymanego w wyniku hydrolizy w obecności nadmiaru wody ma następujący przebieg:

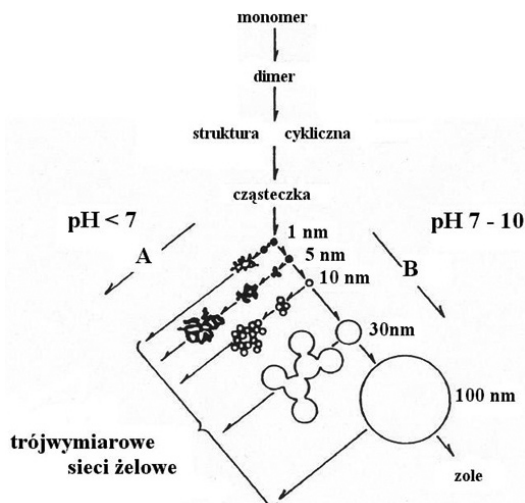


Stwierdzono, że po upływie krótkiego czasu po reakcji zachowuje on masę molową odpowiadającą monomerowi. Jednak wyniki badań uzyskane za pomocą NMR ^{29}Si wskazują, że typowa sekwencja powstawania produktów kondensacji przedstawia się następująco: monomer \rightarrow dimer \rightarrow trimer liniowy \rightarrow trimer cykliczny \rightarrow tetramer cykliczny; dalej w roztworze tworzą się już tylko cząstki koloidalne, a jego lepkość wzrasta w miarę postępu reakcji.

Po hydrolizie alkoholanu wyróżnia się trzy etapy polimeryzacji (polikondensacji):

- polimeryzacja monomeru aż do utworzenia dużych rozmiarów cząsteczki;
- dalszy wzrost cząsteczki, do rozmiarów cząstki koloidalnej (micelli);
- łączenie się cząstek koloidalnych w łańcuchy, a następnie w sieci, gdy funkcyjność monomeru wynosi $f = 3$ lub więcej (w przypadku kwasu krzemowego $f = 4$).

W trakcie polikondensacji rośnie liczba wiązań $\equiv\text{Si}-\text{O}-\text{Si}\equiv$; jednocześnie w wyniku wewnętrznej kondensacji ulega stopniowemu zmniejszeniu liczba końcowych grup $-\text{OH}$.

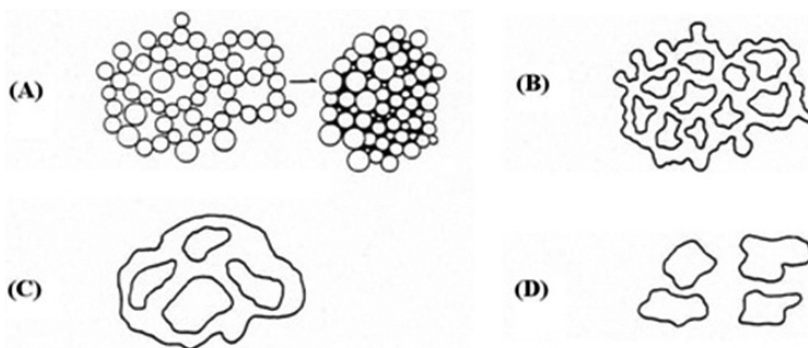


Rysunek 3. Stadia polimeryzacji kwasu krzemowego $\text{Si}(\text{OH})_4$
Figure 3. Stages of silicic acid $\text{Si}(\text{OH})_4$ polymerization

Na Rysunku 3 zilustrowano fakt odkryty przez Orcela [22], że kształt i rozmiar polimerowych jednostek strukturalnych w zolu zależy od względnych wartości stałych reakcji hydrolizy i polikondensacji. Zatem, parametry kinetyczne polimeryzacji kwasu krzemowego zależą od pH roztworu. W roztworze kwaśnym (A) cząstki w procesie agregacji tworzą sieci trójwymiarowe, które następnie tworzą żele. W roztworze zasadowym (B) cząstki zwiększają swój rozmiar z jednoczesnym zmniejszeniem liczby cząstek [18]. Tak więc szybko zachodząca hydroliza oraz wolno przebiegająca polikondensacja (kierunek A, $\text{pH} < 7$) powodują tworzenie polimerów liniowych, gdyż atak protonów pochodzących od katalizatora kwasowego skierowany jest na końce oligomerów. Natomiast odmienna sytuacja kinetyczna (droga B, $\text{pH} 7-10$) sprzyja przyłączeniu grup $\text{Si}-\text{O}$ w środku oligomerów, a więc powstawaniu dużych, zwartych i bardziej rozgałęzionych cząstek polimerowych. Cząstki te powiększają się, ulegają agregacji, dzięki reakcji kondensacji, tworząc w końcu cząstkę o rozmiarach makroskopowych, obejmujących całą objętość pierwotnego roztworu, czyli żel.

1.3. ETAP ŻEL-KSEROŻEL

W reakcji kondensacji możliwe staje się łączenie fragmentów sieci w jedną *makrocząsteczkę*, tworzącą żel mokry zwany alkożelem. W tym procesie trudno zmierzyć energię aktywacji; nie można również zdefiniować dokładnie punktu, w którym zol jako lepki roztwór przechodzi w stały żel. Dzieje się tak z powodu stopniowej rozbudowy cząstek koloidalnych i ich ciągłego wzajemnego łączenia się w coraz to większe agregaty. Po upływie pewnego charakterystycznego czasu (tak zwanego czasu żelowania t_g) proces osiąga stopień przereagowania zwany punktem żelowym, w którym tworzy się ostatecznie wiązanie kończące budowę cząsteczki-olbrzyma. Na czas żelowania ma wpływ ilość użytej wody do hydrolizy. Jeśli po osiągnięciu punktu żelowania pozostawia się płyn w porach, zmiany struktury i właściwości żelu nie ustają. Zachodzi w tym czasie kilka procesów objętych ogólną nazwą sezonowanie – nadal ma miejsce reakcja polikondensacji. W wyniku, wzrasta spójność i wymiary sieci.



Rysunek 4. Zmiany struktury żelu w trakcie poszczególnych stadiów sezonowania [1]. (A) Żel mokry bezpośrednio po otrzymaniu. Suszenie powoduje skurcz, czyli zmniejszenie objętości porów i ich średnicy; (B) Żel mokry po sezonowaniu cieplnym. Wzrasta jego zawartość. W czasie suszenia ulega niewielkiemu skurczowi, a średnica porów jest większa niż w żelu A; (C) Dalsze sezonowanie cieplne lub procesy prowadzone w autoklawie. Uzyskuje się postrzępioną strukturę o dużych porach i objętości podobnej jak w próbce B; (D) Kruszenie się żelu na fragmenty o nieregularnych kształtach [19]

Figure 4. Structural changes of silica gel during subsequent stages of seasoning [1]. (A) A wet-gel after preparation. Drying of the gel causes a shrinkage of the network and decreases the pores volume and their diameter; (B) The wet-gel after a heat treatment. A content of the gel increases. During the drying step, the gel undergoes a small shrinkage and the diameter of the pores is getting bigger than in the gel A; (C) The further heating or a preparation of the gel in an autoclave. A frayed structure of the gel is obtained with the large pores with the volume similar to the sample B; (D) The gel is crumbling into fragments with irregular shapes [19]

W tym procesie chemicznym, zilustrowanym na Rysunku 4, rośnie liczba wiązań mostkowych. W czasie dalszego wzrostu liczby wiązań mostkowych, zachodzi syneresa, czyli samorzutny skurcz żelu połączony z częściowym usunięciem płynu z porów żelu. Gdy w porach żelu obecny jest rozpuszczalnik organiczny, taki jak na przykład

alkohol, wtedy jego cząsteczki tworzą wiązania wodorowe z grupami silanolowymi, w wyniku czego zachodzi opóźnienie kondensacji i tym samym spowolnienie procesu synerезy. Z upływem czasu sieć żelowa staje się coraz sztywniejsza w miarę powstawania nowych wiązań mostkujących, co wpływa na stopniowe zmniejszenie szybkości synerезy. Następnie mokry żel ulega tzw. „dojrzywaniu Ostwalda”. Ten termin oznacza proces, w którym mostkujące fragmenty łączące cząstki żelu powiększają się i jednocześnie wzrasta średnia średnica porów, a zmniejsza się pole powierzchni właściwej żelu. Ze względu na zwiększoną rozpuszczalność żelu krzemionkowego w roztworach o wysokim pH, ten ostatni proces jest przyspieszony w roztworach zasadowych [1].

W procesie suszenia, czyli usuwania płynu zawartego w porach sieci żelowej, powstają duże naprężenia kapilarne, gdy pory mają średnicę mniejszą niż 20 nm i różnią się znacznie rozmiarami. Naprężenia tego rodzaju powodują pękanie i kruшение się żelu. Zjawisko to udaje się wyeliminować za pomocą odparowania płynu w warunkach nadkrytycznych (w autoklawie), wówczas sieć nie ulega skurczowi, powstający aerożel ma niską gęstość (80 kg/m^3), a pory zajmują 98% objętości materiału. Parametrami kontrolującymi jakość otrzymanego aerożelu są szybkość nagrzewania próbki i sposób redukcji ciśnienia. Można przyjąć, że odmianą procesu suszenia w warunkach nadkrytycznych jest proces kriogenicznego suszenia. Proces ten polega na obniżeniu temperatury alkożelu czy hydrożelu do temperatury niższej od temperatury krzepnięcia ciekłej fazy rozpraszającej i następnie sublimacji rozpuszczalnika w tej temperaturze pod zmniejszonym ciśnieniem. W odróżnieniu od alkożeli uzyskany produkt określany jest mianem kriozelu.

Jeszcze innym sposobem suszenia jest odparowanie płynu w temperaturze wyższej niż pokojowa. W trakcie tej operacji żel podlega dużemu skurczowi, a nierównomiernie wypełnione płynem pory powodują powstawanie dużych naprężeń niszczących próbkę. Aby zapobiec naprężeniom niszczącym próbkę żelu w czasie suszenia, należy uzyskać pory o rozmiarach możliwie równomiernych, stosując już na etapie hydrolizy i kondensacji dodatki chemiczne kontrolujące suszenie (ang. *Drying Control Chemical Additives*, DCCA) jako współrozpuszczalniki z alkoholem. Hench [23] kontrolował szybkość odparowywania poprzez wprowadzenie formamidu (HCONH_2) razem z metanolem do roztworu prekursora (TMOS). Formamid charakteryzuje się bardzo niskim ciśnieniem par (0,1 Tr w 40°C w porównaniu do 100 Tr w 21°C dla metanolu) oraz wysoką temperaturą wrzenia (109°C a metanol $64,5^\circ\text{C}$). Dodatek formamidu zmniejsza szybkość odparowywania podczas początkowych etapów suszenia, dzięki czemu zmniejsza naprężenia. Ponadto DCCA wpływa na szybkość hydrolizy i kondensacji, rozkład wielkości porów oraz ciśnienia par cieczy znajdującej się w porach [23]. Oprócz formamidu w charakterze chemicznego czynnika kontrolującego suszenie stosuje się dimetylosulfotlenek (DMSO) oraz dimetyloformamid (DMF) [24].

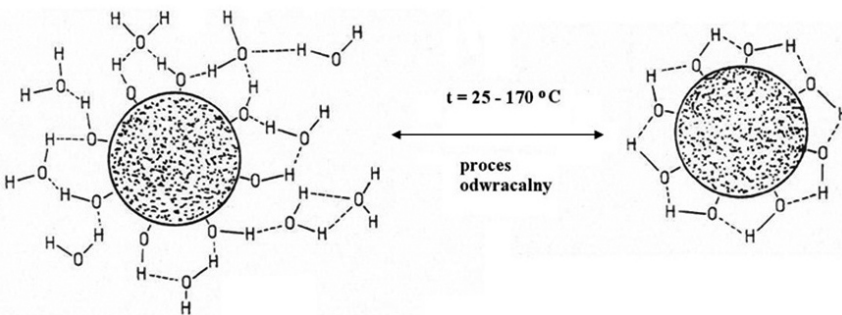
W procesie suszenia wyróżnia się trzy podstawowe etapy [1]:

1. W pierwszym etapie zmniejsza się objętość żelu o wielkość równą objętości płynu usuniętego z żelu przez odparowanie. Wtedy zachodzą największe zmiany objętości, masy, gęstości i struktury. Sieć żelowa zostaje skurczona przez duże siły kapilarne. Koniec pierwszego etapu rozpoznaje się po zaniku kurczenia.
2. Za początek drugiego etapu uważa się moment, gdy pory zaczynają opróżniać się z płynu. Ciecz wypływa na powierzchnię i odparowuje. Wypływ cieczy z porów powoduje gradient naprężeń kapilarnych.
3. Etap trzeci zachodzi wtedy, gdy pory są już opróżnione, a resztki cieczy pokrywają powierzchnię porów przerywaną warstwą. Resztki cieczy usuwa się przez odparowanie z wnętrza porów i dyfuzję par do powierzchni. Na tym etapie nie następują zmiany wymiarów próbki, a ma miejsce wolno postępujący ubytek masy aż do osiągnięcia masy równowagowej w danej temperaturze i ciśnieniu parcyjnym pary wodnej. Po tym etapie suszenia uzyskuje się żel suchy, czyli kserożel.

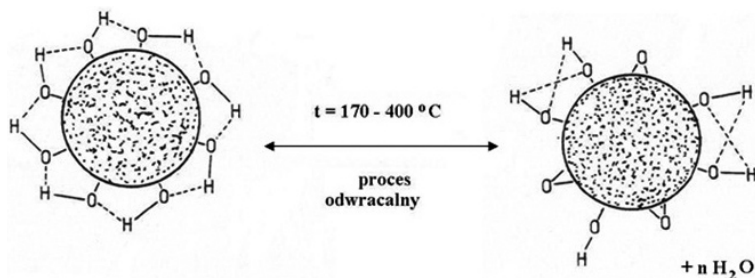
1.4. ETAP KSEROŻEL-SZKŁO

Suchy żel nie posiada wody zaadsorbowanej fizycznie dlatego należy wygrzewać żel w zakresie temperatur 100–170°C. Po takim procesie żel zawiera dużą ilość grup hydroksylowych i cząsteczek wody połączonych wiązaniem wodorowym na powierzchni porów (Rys. 5).

Dalsze ogrzewanie od 170 do 400°C eliminuje częściowo i odwracalnie grupy silanolowe (Rys. 6), a żel ustabilizowany powstaje po wygrzewaniu w przedziale temperatur 400–800°C w wyniku nieodwracalnego procesu dehydratacji.



Rysunek 5. Odwracalny proces obniżenia zawartości wody oraz kondensacji grup silanolowych na powierzchni żelu zachodzący w przedziale temperatur od temperatury pokojowej do 170°C [1, 23]
 Figure 5. Reversible process of water content removal and condensation of silica groups on the silica gel surface in the temperature range from 20 up to 170°C [1, 23]



Rysunek 6. Powierzchniowe grupy silanolowe usuwane odwracalnie w przedziale temperatur 170–400°C [1, 23]

Figure 6. Surface silica groups reversibly removed in the temperature range from 170 to 400°C [1, 23]

Jednocześnie ma miejsce stabilizacja termiczna, polegająca na zmniejszeniu pola powierzchni właściwej na tyle, by żel mógł być użyty w danej temperaturze bez wywołania odwracalnych zmian strukturalnych. Po tych operacjach maleje zwilżenie żelu i zwiększa się jego odporność na naprężenia związane z powtórą hydratacją. W taki sposób otrzymuje się nowy rodzaj trwałego, monolitycznego materiału optycznego o strukturze porowatego żelu, zwanego żelosilem. W żelach domieszkowanymi molekułami organicznymi te dwa ostatnie etapy są pomijane.

W celu usunięcia całkowicie grup hydroksylowych i wody związanej wiązaniami wodorowymi używa się chlorowane połączenia, takie jak metylowane chlorosilany: $\text{ClSi}(\text{CH}_3)_3$, $\text{Cl}_2\text{Si}(\text{CH}_3)_2$, Cl_3SiCH_3 , a poza tym tetrachlorek krzemu SiCl_4 , tetrachlorek węgla CCl_4 oraz chlor. Połączenia te całkowicie reagują z powierzchniowymi grupami hydroksylowymi tworząc chlorowodór, który desorbuje się z żelu w temperaturze z przedziału 400–800°C. W procesie spiekania żelu w jeszcze wyższych temperaturach, wyraźnie zmniejsza się liczba porów, a tym samym rośnie jego gęstość. Dopiero w temperaturze około 1000°C, w przypadku żelu krzemionkowego uzyskanego z alkoholanu, zanikają kompletnie pory i przechodzi on w lite szkło [1].

2. ŻELE MODYFIKOWANE ORGANICZNIE

Klasyczne szkła otrzymane metodą zol-żel są hydrofilowe, podczas gdy hydrofobowe materiały uzyskuje się poprzez wprowadzenie związków lub reszt organicznych [25]. Szkła modyfikowane organicznie (ang. *Organically Modified Ceramics*; *ORMOSILs*, ang. *Organically Modified Silanes*, *ORMOCERs*) wykazują mechaniczne cechy szkieł i polimerów z jednoczesnym zachowaniem właściwości optycznych. Większa elastyczność oraz mniejsza liczba powierzchniowych grup silanolowych pozwala na tworzenie powłok i monolitów nie pękających podczas suszenia.

Wśród metod otrzymywania organicznie modyfikowanych szkieł można wyróżnić impregnację oraz hydrolizę i kondensację organosilanów, czyli związków posiadających jedną lub dwie grupy alkoholowe zastąpione grupami alkilowymi,

bądź aryłowymi [26]. Pierwsza metoda polega na zanurzeniu suchego kserożelu w roztworze organicznego polimeru. Po wprowadzeniu roztworu do porów krzemionki odparowuje się rozpuszczalnik, pozostawiając cząstki polimeru uwięzione w porach kserożelu. Krzemionka impregnowana polialkoholem winylowym oraz polimetakrylanem metylu charakteryzuje się większą elastycznością i znacznie mniejszym skurczem [27]. W drugiej metodzie substancje organiczne zmieniające właściwości szkła wprowadza się w początkowym etapie tworzenia szkła. Są nimi organosilany takiego typu jak $R'-Si(OR)_3$ lub $R'_2-Si(OR)_2$, gdzie R' to nie ulegający hydrolizie podstawnik organiczny. Hydroliza i kondensacja tego typu związków prowadzi do powstania hybrydy – sieci krzemionki z wbudowanymi grupami organicznymi. Wprowadzenie podczas procesu zol-żel organosilanów zawierających epoksydowe, metakrylowe i inne grupy funkcyjne, zwiększa giętkość i zwilżalność żelu, zmniejsza skurcz w trakcie suszenia, gęstość i porowatość [28].

Szkła modyfikowane organicznie posiadają następujące zalety [1]:

- a. stosunkowo niska temperatura otrzymywania ($< 150^\circ\text{C}$);
- b. duża gęstość w porównaniu z tworzywami sztucznymi;
- c. otrzymane monolity są przezroczyste w zakresie 400–800 nm;
- d. właściwości takie jak współczynnik załamania mogą być kontrolowane składem chemicznym wyjściowego żelu;
- e. lepki żel można prosto przekształcać w użyteczne materiały o różnych kształtach, takich jak cienkie filmy i włókna.

3. ZASTOSOWANIE

Technologia zol-żel, nie pozbawiona jest wad, ale ma też sporo zalet (Tab. 3.), dlatego znajduje szerokie zastosowanie w produkcji cienkich filmów, włókien, preform, specjalistycznych urządzeń oraz w elektronice. Za pomocą metody zol-żel uzyskiwane są głównie szkła o specyficznych właściwościach, często niemożliwe do otrzymania za pomocą konwencjonalnego wytopu. Przykładem mogą być szkła zawierające jako jeden ze składników ZrO_2 , charakteryzujący się niezwykle wysoką temperaturą topnienia [29].

Z ekonomicznego punktu widzenia proces zol-żel jest bardzo atrakcyjny dla powłok i włókien. Stosuje się go do pokrywania cienkimi powłokami dużych powierzchni szkielek architektonicznych, okiennych, lusterek samochodowych oraz do produkcji filtrów do monitorów, szyb odbłaskowych, powłok ceramiczno-metalowych oraz baterii słonecznych. Możliwa jest również produkcja włókien o zróżnicowanym składzie chemicznym [4].

Szkła zol-żelowe ze względu na niską temperaturę otrzymywania, przezroczystość optyczną, mechaniczną stabilność, obojętność chemiczną, elastyczność kształtowania oraz możliwość kontrolowania parametrów fizycznych takich jak porowatość są stosowane jako nośniki wielu związków i pierwiastków chemicznych.

Postęp w domieszkowaniu matryc tlenkowych uzyskanych metodą zol-żel różnorodnymi związkami organicznymi i metaloorganicznymi, takimi jak porfiryny i metaloporfiryny, umożliwia otrzymywanie materiałów optycznych, których właściwości będą zależą od fotoaktywności, bioaktywności, czy aktywności chemicznej organicznego składnika. Żele domieszkowane odpowiednimi chromoforami, jak rodamina 6G, rodamina B, czy barwniki pirometenowe są stosowane do produkcji laserów [30, 31]. Optyczne czujniki chemiczne i biochemiczne uzyskuje się poprzez wprowadzenie odpowiednich wskaźników do nieorganicznej sieci zol-żelowej już na etapie reakcji hydrolizy. Otrzymano w ten sposób liczne czujniki pH [32] i tlenu [33].

Tabela 3. Niektóre korzyści (1) i wady (2) wynikające z procesu zol-żel [34, 35]
Tabela 3. Some advantages (1) and disadvantages (2) as a result of the sol-gel process

| (1) | (2) |
|--|---|
| <ol style="list-style-type: none"> 1. Lepsza homogeniczność uzyskana z surowców. 2. Lepsza czystość z surowców. 3. Niższa temperatura otrzymywania: <ol style="list-style-type: none"> a) oszczędność energii, b) minimalizacja strat parowania, c) minimalizacja zanieczyszczenia powietrza, d) nie ma reakcji z pojemnikiem, w którym przebiega proces – więc czystość, e) uniknięcie separacji fazowej, f) uniknięcie krystalizacji. 4. Nowe niekryształiczne ciała stałe otrzymywane poza obszarem normalnego tworzenia szkła. 5. Nowe kryształiczne fazy z nowych niekryształicznych ciał stałych. 6. Lepsze szkła otrzymywane z żeli o specjalnych właściwościach. 7. Specjalne produkty, takie jak cienkie warstwy. | <ol style="list-style-type: none"> 1. Wysoki koszt produktów. 2. Duży skurcz w czasie procesu. 3. Pozostające drobne pory. 4. Pozostające grupy hydroksylowe. 5. Pozostający węgiel. 6. Szkodliwe dla zdrowia rozpuszczalniki organiczne. 7. Długi czas trwania procesu. |

4. PORFIRYNY JAKO AKTYWNE SENSORY

Systemy oparte na chemi- i biosensorych wykorzystują reakcję chemiczną pomiędzy cząsteczką oznaczaną a substancją będącą elementem aktywnym sensora. W charakterze substancji aktywnych bardzo często stosuje się sprzężone związki makrocykliczne, na przykład porfiryny.

W metodach spektroskopowych wykorzystuje się to, że wartości molowych współczynników ekstynkcji porfiryn są bardzo duże, podnosi to czułość oznaczeń, a zatem w istotny sposób wpływa na zmiany w widmach absorpcji i luminescencji w obecności wykrywanej substancji [36].

4.1. NOŚNIKI DLA PORFIRYN

Ważnym elementem sensora jest nośnik zawierający substancję aktywną. Jest on odpowiedzialny za stworzenie obszaru, w którym może zajść żądana reakcja chemiczna. Dobrym rozwiązaniem jest zamknięcie substancji wykrywającej w stałej matrycy. Taka matryca musi odpowiadać właściwym warunkom dotyczącym: trwałości mechanicznej, bierności chemicznej, możliwość zamknięcia substancji wykrywającej bez obniżenia jej cech detekcyjnych, umożliwienia kontaktu pomiędzy reagującymi substancjami, przewodzenia sygnału będącego rezultatem reakcji analitycznej (zmiana potencjału elektrycznego, impuls świetlny itd.), nietoksyczności, czy też niskiemu kosztowi wytworzenia.

Materiały, które dobrze spełniają te warunki, to między innymi: niskotemperaturowe szkła zol-żelowe, polimery oraz zeolity. Dobór materiału nośnika zależy od: rodzaju reakcji chemicznej odpowiedzialnej za detekcję, charakteru substratów, zakresu temperatury, pH oraz fazy w której znajduje się substancja wykrywana [37].

4.2. MATRYCE POLIMEROWE

Dla porfiryn, jako matryce bardzo często stosuje się polimery. Wymagania stawiane polimerom do wyrobu matryc to przede wszystkim odporność fizyczna i chemiczna, duża rozpuszczalność substancji aktywnej, przepuszczalność gazów i cieczy, przezroczystość, amorfizm oraz niska temperatura zeszklenia. Najczęściej stosowanymi polimerami są polichlorek winylu (PCV) oraz polistyren (PS). Hartmann i in. [38] badając luminescencyjny sensor tlenu, oparty na porfirynach Pt(II)OEPK i Pd(II)OEPK rozpuszczonych w matrycach z PCV i PS stwierdzili silną zależność wygaszania luminescencji porfiryny od rodzaju polimeru oraz obecności i ilości plastyfikatora. Do budowy czujników tlenu domieszkowanych porfirynami stosowano również kopolimer oktylometakrylanu i 1-winyloimidazolu oraz kopolimery oktofluoropentylometakrylanu i 1-winyloimidazolu, PMMA i polidimetylosiloksan (GP197), polieter metakrylano-etanodioloetylenowy (pPEGMA) i kopolimer izobutylometakrylanu i trifluorometakrylanu. Papkovsky i współpr. [39] przeprowadzili badania nad możliwością zastosowania porfiryn OEP, OEPK, CP-TEE, CPK-TEE, N-MeEP i Pd(I)CP-SB unieruchomionych w membranach PCV do spektrofotometrycznych pomiarów pH. Do pomiaru stężenia gazowego HCl stosowano porfirynę TPP w membranie z gumy silikonowej oraz w matrycach złożonych z różnych kopolimerów i polimerów. Polimerowe nośniki porfirynowe zastosowano również do detekcji benzenu oraz jonów Hg^{2+} i Cd^{2+} . Matryce polimerowe są jednak mało stabilne termicznie, mało odporne mechanicznie oraz fotochemicznie [36].

4.3. SZKŁA ZOL-ŻELOWE

W ostatnich latach coraz częściej „zamyka się” porfiryny w żelach krzemionkowy, które otrzymuje się z wykorzystaniem procesu zol-żel. Wprowadzenie do zolu substancji organicznej – porfiryny – która nie ulega degradacji podczas procesu żelowania i późniejszego suszenia. Równocześnie cząsteczki porfiryny są zamykane w porach powstającego żelu, który jest materiałem przezroczystym, czyli dogodnym do badań optycznych i nie posiadającym pasm absorpcji w zakresie absorpcji porfiryn.

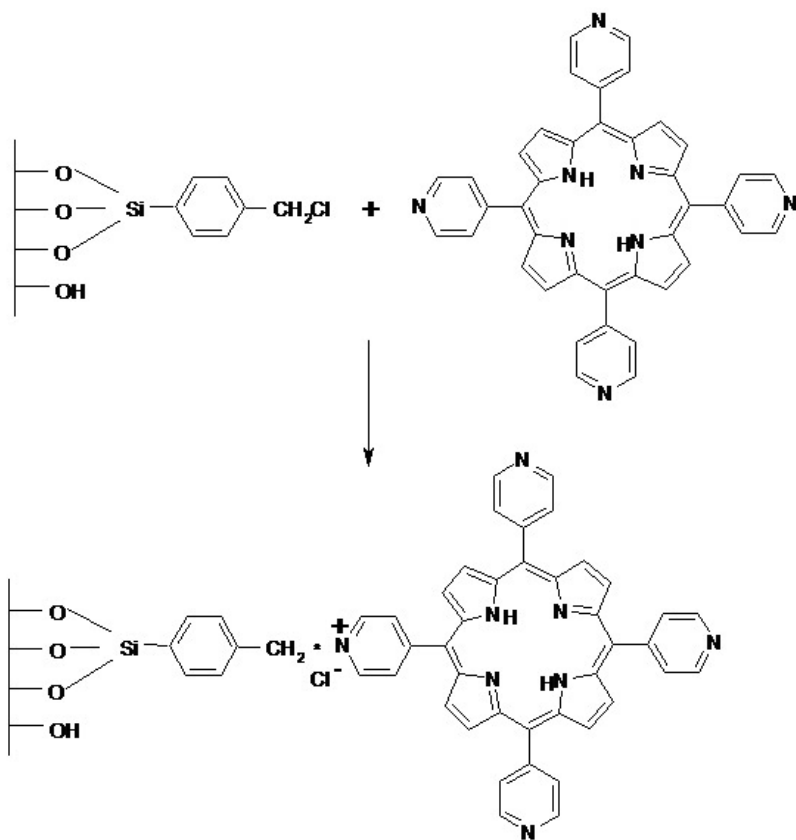
Takie zalety metody zol-żel, jak pokojowa temperatura otrzymywania żeli, ich przezroczystość, porowatość, odporność termiczna i możliwości formowania nośnika w różnych postaciach, przyczyniły się do szerokiego wykorzystania tych nośników w chemii biosensorów. Plaschke i współpr. [40] fluorymetrycznie oznaczając jony Hg(II), zastosowali film otrzymany metodą zol-żel domieszkowany porfiryńą TPPS₄. Metodę tę następnie udoskonalono, stosując porfiryńę TCPP związaną kowalencyjnie z dekstranem w celu podwyższenia stabilności czujnika. Możliwość ilościowego oznaczania zawartości jonów Hg(II), Pb(II) oraz Cd(II) w roztworach wodnych badano za pomocą matryc zol-żelowych domieszkowanych porfiryńami TMePyP i TPyP, podczas gdy ich kompleksy z jonami Sn(IV) oraz porfiryny TMePyP, TPPS₄ unieruchomione w szklach, stosowano do detekcji pH. Zol-żelowe nośniki są bardziej stabilne fotochemicznie niż matryce polimerowe, co umożliwia ich zastosowanie do budowy czujnika tlenu działającego w oparciu o zjawisko wygaszania fosforescencji porfiryny PtOEP.

Od kilku lat intensywnie studiowanym zagadnieniem jest zamykanie białek w zol-żelowych szklach krzemianowych. Nośniki zol-żelowe pozwalają na zachowanie spektroskopowych właściwości białek i aktywności biologicznej enzymów. Co więcej, unieruchomianie przez fizyczne zamykanie w poszczególnych porach matrycy, izoluje i stabilizuje (termicznie) cząstki białek bez chemicznej modyfikacji. Szklą krzemionkowe zawierające białka hemowe, takie jak: cytochrom c, mioglobinę, czy hemoglobinę, mogą być wykorzystane do spektrofotometrycznego oznaczania O₂, CO i NO, podczas gdy kompleks mioglobiny z manganem stosowano do detekcji NO.

Pomimo wielu zalet, matryce zol-żelowe posiadają również wady. Już sama metoda zol-żel jest skomplikowana, a właściwości otrzymanego szkła zależą od wielu czynników, takich jak stosunek molowy reagentów, rodzaj katalizatora, czas i temperatura reakcji itd. Porfiryny rozpuszczalne w wodzie można łatwo wprowadzić do wyjściowego zolu, podczas gdy w przypadku związków nierozpuszczalnych napotykaemy na wiele trudności. Sensory zol-żelowe często nie są stabilne z powodu wymywania substancji aktywnej. Powyższe problemy można częściowo rozwiązać wykorzystując możliwość wiązania chemicznego porfiryn z matrycą [36].

4.4. HYBRYDY NIEORGANICZNO-ORGANICZNE

Zol-żelowe nośniki porfiryn, w których substancja aktywna jest związana chemicznie z matrycą, charakteryzują się większą trwałością (porfiryra nie jest wymywana w trakcie użytkowania) oraz lepszą homogenicznością w porównaniu z nośnikami fizycznie domieszkowanymi. Delmarre i współpracownicy [41] opracowali metodę pomiaru stężenia jonów Hg(II) za pomocą porfiryry TPyP związanej chemicznie z powierzchnią szkła krzemionkowego, która w porównaniu z zol-żelowym czujnikiem domieszkowanym fizycznie porfiryry TMePyP charakteryzuje się większą szybkością detekcji i lepszą czułością. Zaproponowany przez nich mechanizm reakcji porfiryry z monowarstwą żelu przedstawiony jest na Rysunku 7.



Rysunek 7. Schemat tworzenia monowarstwy porfiryry pirydylowej na powierzchni żelu krzemionkowego [36]

Figure 7. Scheme of pyridylporphyrin monolayer formation on the silica gel surface [36]

Pessoa ze współpracownikami [42] związali chemiczne hematoporfiryne IX i protoporfiryne IX z powierzchnią SiO₂/Nb₂O₅, a następnie unieruchomione

związki poddali reakcji kompleksowania za pomocą CoCl_2 i otrzymane kompleksy zastosowali do elektrokatalitycznego oznaczania stężenia tlenu. Stwierdzili, że zaadsorbowane porfiryny bardzo łatwo ulegają reakcji metalacji, natomiast powstałe kompleksy są stabilne. Porfiryny mogą być wiązane chemicznie nie tylko z powierzchnią szkła, ale również w całej objętości. Delmarre i Bied-Charreton [41] opracowali metodę otrzymywania metaloporfiryny Co(II)TMePyP z podstawionymi jedną, dwoma i czterema grupami etoksylanowymi.

Struktura i właściwości porfiryń nie uległy zmianie po związaniu z krzemionką. Porfiryńokrzemionki są nowymi i bardzo obiecującymi materiałami do konstrukcji sensorów porfiryńowych [36].

4.5. BIOSENSORY

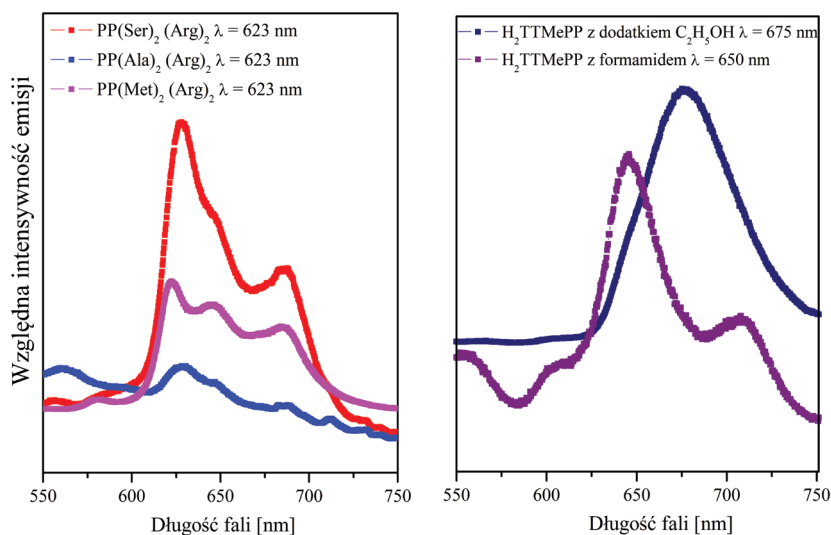
W ciągu ostatnich lat coraz większą uwagę przyciągają biosensory, które wykorzystują rozległą specyficzność reakcji biokatalitycznych oraz możliwość uzyskania sygnałów elektrochemicznych lub spektroskopowych.

Pomiar stężenia tlenu, zużywanego w czasie enzymatycznej reakcji glukozy z jej oksydazą za pomocą porfiryń PtOEPK [43] oraz CoTMePyP [44], może służyć do ilościowego oznaczania glukozy. Katalizowanie reakcji utleniania elektrochemicznego tiocholiny za pomocą CoTPP zastosowano do amperometrycznego oznaczania acetylocholin esterazy [45].

Porfiryny znajdują także zastosowanie jako związki naśladujące substancje biologicznie czynne. Niektóre żywice jonowymienne modyfikowane metaloporfirydami Co(III)TCPP oraz Mn(III)TPPS_4 wykazują aktywność katalityczną analogiczną do peroksydazy glutationu w stosunku do nadtlenu wodoru i wodorotlenku kumenu w reakcji utleniania glutationu do disiarczku [46, 47]. Pokazuje to, jak ważną rolę porfiryń i ich pochodne odgrywają w chemii analitycznej, technikach medycznych, procesach przemysłowych i pomiarach środowiskowych. Porfiryny znajdują wiele zastosowań jako ligandy do spektrofotometrycznego oznaczania kationów, spektrofluometrycznego oznaczania tlenu i wielu innych substancji. Trwałe kompleksy metali są stosowane jako modyfikatory membran elektrod jonoselektywnych w potencjometrii i woltamperometrii. Porfiryny wykorzystywane są również do budowy biosensorów.

5. SPEKTROSKOPIA PORFIRYN W MATRYCACH KRZEMIONKOWYCH

Optyczne właściwości wolnych porfiryń zamkniętych w żelach krzemionkowych otrzymanych techniką zol-żel wykazują czerwoną emisję światła, kiedy są wzbudzone w obszar pasma Soreta ($\lambda \cong 400 \text{ nm}$) (por. Rys. 8).

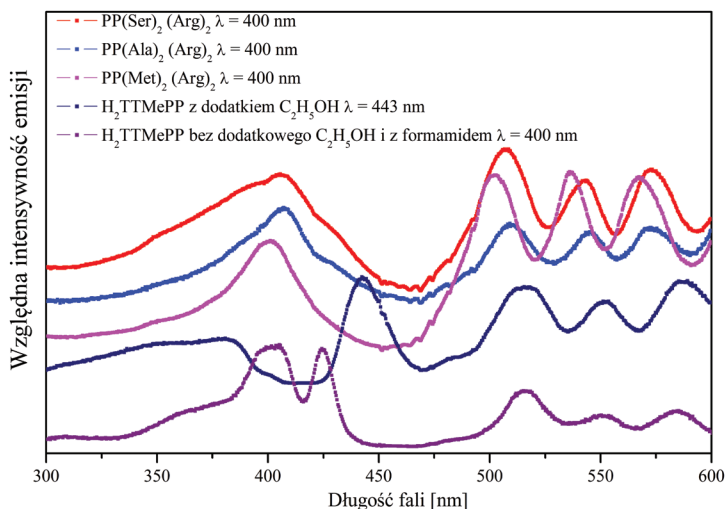


Rysunek 8. Widma emisyjne próbek zol-żelowych domieszkowanych różnymi porfirynami
 Figure 8. Emission spectra of silica sol-gel sample doped with different porphyrins

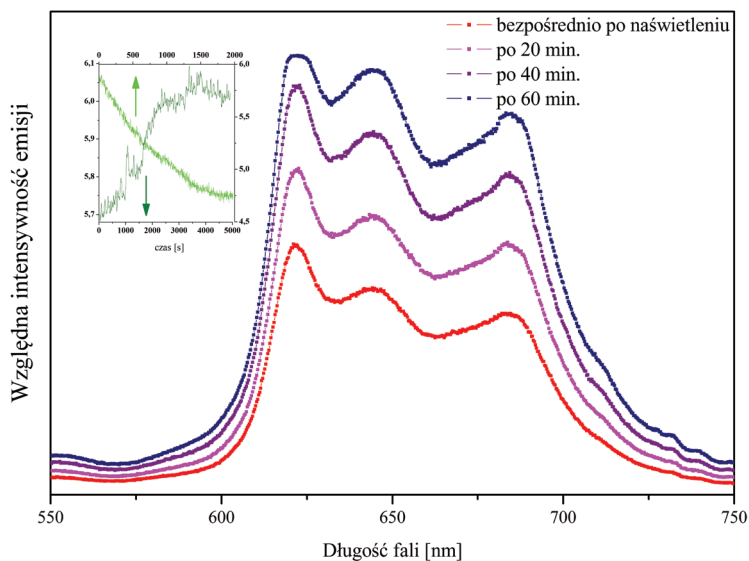
Ta emisja odpowiada przejściu $S_1 \rightarrow S_0$ porfiryny. Emisja ze stanu wzbudzonego S_2 , którą obserwowano dla porfiryn erbu [48] nie została zarejestrowana w roztworach EtOH/MeOH. Pokazuje to, że konwersja wewnętrzna $S_2 \rightsquigarrow S_1$ jest szybsza niż proces radiacyjny. Natomiast konwersja wewnętrzna $S_1 \rightsquigarrow S_0$ oraz przejście międzysystemowe $S_1 \rightsquigarrow T_1$ (ang. *Inter System Crossing, ISC*) są mniej „konkurencyjne” bowiem zaobserwowano emisje ze stanów S_1 . Warto zauważyć różny rozkład intensywności poszczególnych składowych w widmach emisji trzech typów porfiryn zamkniętych w żelu krzemionkowym oraz to, że całkowita wydajność emisji jest zależna od typu aminokwasu.

Rysunek 9 pokazuje widma wzbudzenia badanych próbek. Widma składają się z poszczególnych pasm, w których pasmo przy ~ 400 nm może być przypisywane przejściu absorpcyjnemu $S_0 \rightarrow S_2$ (pasmo Soreta), a trzy pasma z maksimami między 500 i 600 nm mogą być związane z absorpcyjnym przejściem $S_0 \rightarrow S_1$ (pasmo Q).

Pasmo Soreta dominuje w widmach wzbudzenia porfiryn zamkniętych w żelu krzemionkowym i z tej przyczyny wzbudzenie porfiryn następowało przez to pasmo. Warto podkreślić, że zastosowano te same warunki pomiarowe, aby można było porównać efektywność emisji. Wzbudzano również selektywnie używając linii 408, 510, i 545 nm lampy ksenonowej, co objawiło się zmniejszeniem intensywności emisji odpowiednio do linii wzbudzającej. Z tego punktu widzenia rolę pasma Soreta jest zasilanie emitującego poziomu Q. Ta emisja jest mniej wydajna niż można było się spodziewać dla aminokwasowych pochodnych porfiryn. Znanym jest fakt, że wydajność emisji porfiryn jest zależna od aglomeracji. Zjawisko takie jak zaobserwowane w poniższych układach, prezentowane na Rysunkach 8 i 9, spowodowane jest różnicami w aglomeracji poszczególnych porfiryn.



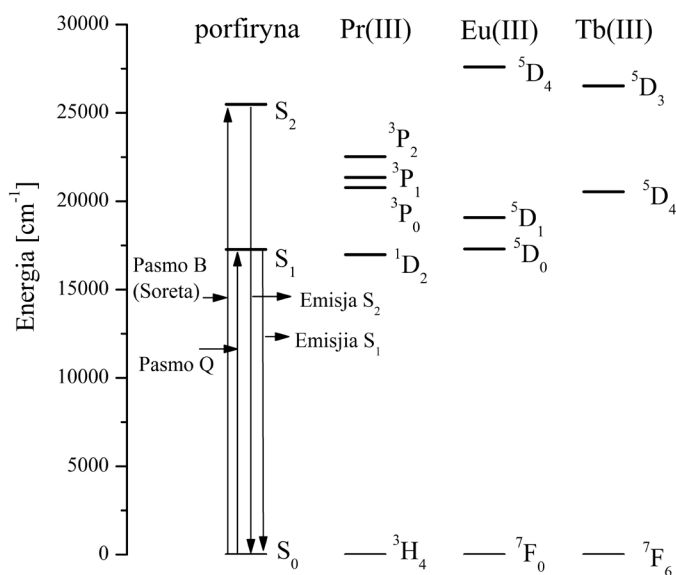
Rysunek 9. Widma wzbudzenia emisji próbek zol-żelowych domieszkowanych różnymi porfirynami
 Figure 9. Excitation spectra of silica sol-gel sample doped with different porphyrins



Rysunek 10. Czasowo zależne intensywności emisji próbki zol-żelowej domieszkowanej porfiryną PP(Met)₂(Arg)₂
 Figure 10. Time dependence of emission intensity of silica sol-gel sample doped with PP(Met)₂(Arg)₂ porphyrin

Intensywność emisji dla próbek PP(Ser)₂(Arg)₂ (1), PP(Ala)₂(Arg)₂ (2), H₂TT-MePP (4) jest stała w czasie, lecz zmienia się w przypadku próbki PP(Met)₂(Arg)₂

Wyciągnięcie wniosków, opierając się na przedstawionych widmach (które są dość złożone), może nastroczać szereg problemów. Próbką wykazuje tylko zieloną emisję jonu metalu związaną z przejściami ze wzbudzonego stanu 5D_4 jonu Tb(III). Emisja z poziomów emitujących porfiryny nie została zarejestrowana. Widmo absorpcyjne żelę pokazuje obecność zarówno jonu Tb(III), jak i porfiryny w próbce. Widmo to składa się z dwóch dobrze wykształconych pasm zlokalizowanych przy długościach fali 285 i 408 nm. Pierwsze z nich może być przypisywane przejściom absorpcyjnym do wyższych stanów wzbudzonych jonu Tb(III) (5H_4 , 5F_5 , 5H_3 , 5I_8 , 5F_4), drugie natomiast jako pasmo Soreta porfiryny. W tym obszarze widma można również znaleźć kilka bardzo słabych pasm, które są przejściami ze stanu podstawowego 7F_6 do stanów wzbudzonych 5D_3 , 5G_6 , $^5L_{10}$ i 5G_5 , 5D_2 , 5G_4 , 5L_9 jonu Tb(III). Widmo wzbudzenia, zarejestrowane przy monitorowaniu w maksimum jego emisji, składa się tylko z przejść absorpcji jonu Tb(III). Pokazuje to, że proces transferu energii z liganda do metalu nie występuje. Jeśli tak, porfiryra powinna emitować po wzbudzeniu w pasmo Soreta, co nie ma miejsca. Stan wzbudzony jonu Tb(III) 5D_3 jest zlokalizowany bardzo blisko stanu singletowego porfiryny S_2 i poziom emitujący jonu Tb(III) 5D_4 jest zlokalizowany pomiędzy stanami singletowymi porfiryn S_2 i S_1 (zobacz Schemat 1), pozwala to na możliwości złożonych procesów transferu energii z liganda do jonu metalu i tak zwany transfer odwrotny (back energy transfer) z jonu metalu do liganda [50, 51].



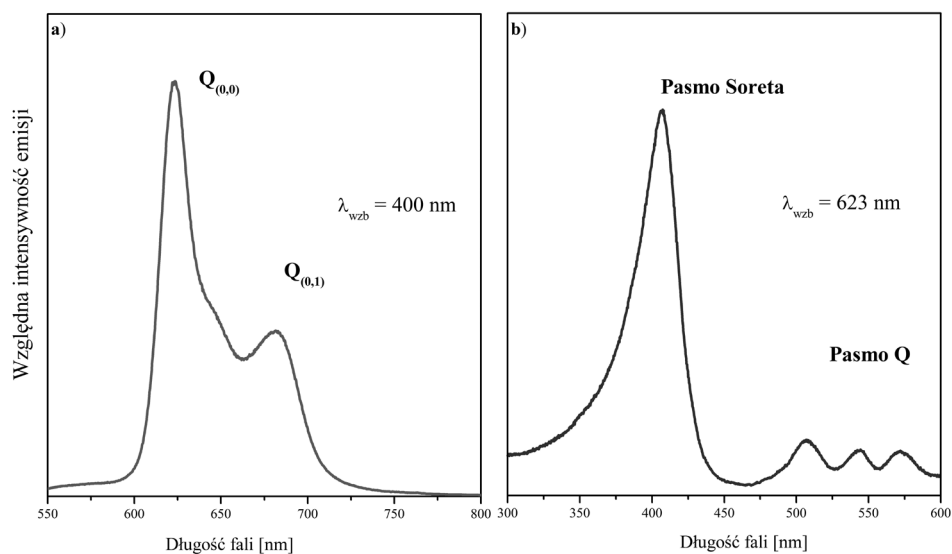
Schemat 1. Diagram poziomów energii stanów wzbudzonych porfiryny, Pr(III), Eu(III) i Tb(III)
 Scheme 1. Energy level diagram of the excited states of porphyrin, Pr(III) and Tb(III)

Transfer odwrotny energii prowadziłby do wygaszania emisji jonu Tb(III), co nie było obserwowane. To znaczy, że ligand porfirynowy, będący składową żelę, jest

niewidoczny z punktu widzenia emisji i nie uczestniczy w procesach transferu energii. Natomiast, żel krzemianowy domieszkowany wolną porfiryną wykazuje emisję, a więc rola jonów Tb(III) w wygaszaniu jej emisji jest oczywista. Można rozważyć konkurencyjne szybkości promienistej relaksacji z poziomu 5D_4 i transferu energii z tego poziomu na stany S_1 porfiryny, następnie na stan trypletowy i stany 7F_1 Tb(III), które mogą dezaktywować emitujący poziom S_1 porfiryny. Zostały zarejestrowane czasy życia dla $PP(Ser)_2(Arg)_2 : Tb(III)$, jak i dla żelu domieszkowanego wolną porfiryną $PP(Ser)_2(Arg)_2$. Chociaż błąd oznaczenia czasu życia dla pierwszej próbki jest niewielki, czasy życia dla próbek domieszkowanych wolnymi porfirynami są obciążone zbyt dużymi błędami, aby można było potwierdzić, któryś z omawianych mechanizmów (Tab. 4).

Tabela 4. Czasy życia luminescencji wybranych żeli krzemionkowych, $\lambda_{wzb} = 355$ nm
Tabela 4. Luminescence lifetimes of doped silica matrices, $\lambda_{exc} = 355$ nm

| Próbka domieszkowana w żelu krzemionkowym | RT τ (ms) |
|---|-------------------|
| $PP(Ser)_2(Arg)_2 : Tb(III)$ | 1,13 |
| $PP(Met)_2(Arg)_2$ | 0,32 |
| $PP(Ser)_2(Arg)_2$ | 0,33 |
| $PP(Ala)_2(Arg)_2$ | 0,33 |



Rysunek 12. Widma emisji (a) i wzbudzenia emisji (b) próbki zol-żelowej domieszkowanej porfiryną $PP(Ser)_2(Arg)_2 : Pr(III)$

Figure 12. Emission (a) and excitation (b) spectra of silica sol-gel sample doped with $PP(Ser)_2(Arg)_2 : Pr(III)$ porphyrin

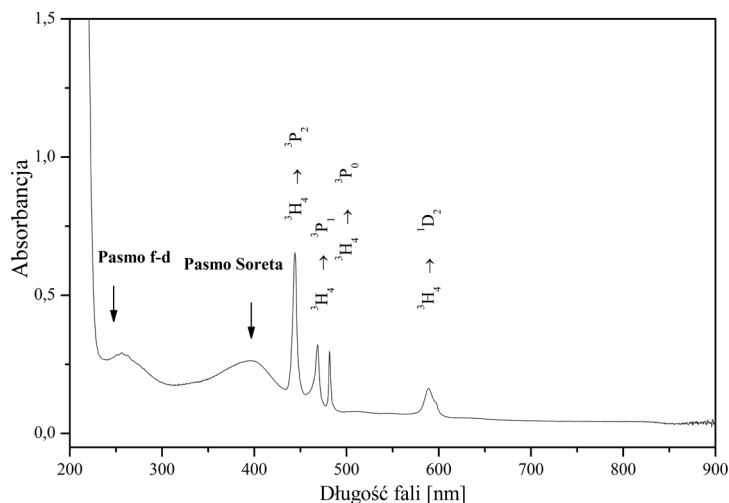
Próbka zol-żelowa domieszkowana ligandem (1) i jonem Pr(III) pokazuje odmienne optyczne zachowania w porównaniu do próbki zawierającej jon Tb(III). Rysunek 12a pokazuje widmo emisji próbki Pr(III) wzbudzonej w pasmo Soreta (~ 400 nm). Widmo jest takie samo jak w przypadku wolnego liganda porfiryнового domieszkowanego w żelu. Luminescencja jonu metalu nie została zarejestrowana, niezależnie czy wzbudzenie następowało bezpośrednio w ligand, czy też w pasma absorpcyjne metalu.

Ponieważ stany wzbudzone jonu Pr(III) 3P_1 są zlokalizowane pomiędzy stanami singletowymi porfiryны S_2 i S_1 (zobacz Schemat 1), to może być interesujące czy stany wzbudzone Pr(III) pośredniczą w konwersji wewnętrznej $S_2 \rightarrow S_1$. Na Rysunku 12b przedstawiono widmo wzbudzenia próbki z jonem Pr(III). Brak ostrych pasm jonu Pr(III) w widmie sugeruje, że nie ma transferu energii pomiędzy stanami jonu Pr(III) a wzbudzonym stanem S_1 porfiryны.

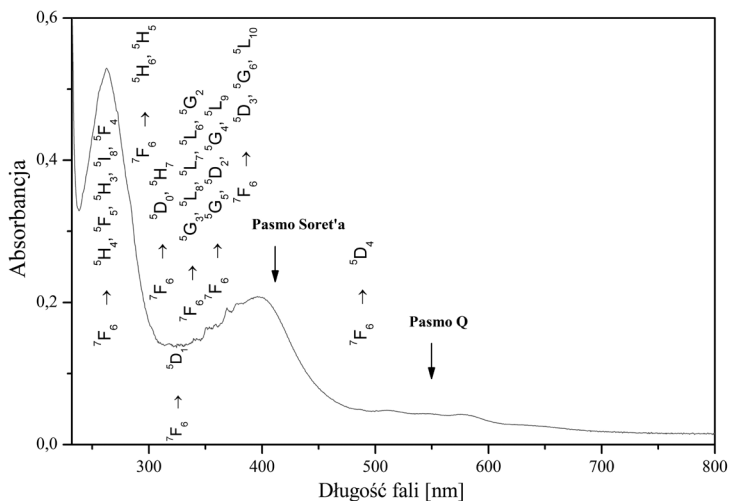
Jednakże stosunek intensywności pasm Soreta / Q, jest dużo wyższy niż dla wolnej porfiryны (porównaj Rys. 9 i 12b), co wskazuje, że stany wzbudzone jonu Pr(III) 3P_1 wpływają na proces wewnętrznej konwersji. Rola jonu Pr(III) nie jest jeszcze w pełni wyjaśniona, a intensywności przejść $f-f$ w widmach wzbudzenia jonu Pr(III) są w porównaniu z przejściami ze stanów porfiryны tak słabe, że optycznie niezauważalne w widmie wzbudzenia emisji. Ten sam układ badano w wodnym roztworze. Intensywność emisji S_1 pokazała silną zależność od koncentracji jonu Pr(III). Po dodaniu niewielkiej ilości jonu Pr(III) emisja porfiryны wzrasta do maksimum, dodanie dalszej niewielkiej ilości Pr(III) powoduje spadek emisji porfiryны (omówiono w poprzednim rozdziale). Należy również zauważyć pojawienie się dodatkowego pasma (w porównaniu do próbki zol-żelu) zlokalizowanego około 575 nm. Oznacza to, że obecność jonów Pr(III) w roztworze wpływa na intensywność emisji porfiryны ze stanu S_1 . Wyjaśnienie roli jonów lantanowca w tym procesie wymaga dalszych systematycznych badań dla próbek z różną zawartością jonów lantanowca w roztworze wodnym, jak i zol-żelu dla różnych energii wzbudzenia.

Na Rysunkach 13 i 14 pokazano widma absorpcyjne roztworów $PP(Ser)_2(Arg)_2$: Tb(III) i $PP(Ser)_2(Arg)_2$: Pr(III) użytych do syntezy szkieł metodą zol-żel.

Chiralne porfiryны zamknięte w żelach mogą wykazywać emisję wzbudzaną światłem spolaryzowanym kołowo, co wykonano metodą spektroskopii CPL (CPL – Circularly Polarized Luminescence) potwierdziło chiralność takich układów ($g_{lum} = 0,0077$, gdzie $g_{lum}(\lambda) = 2\Delta I(\lambda)/I(\lambda)$; $I(\lambda) = I_R(\lambda) + I_L(\lambda)$ i $\Delta I(\lambda) = I_L(\lambda) - I_R(\lambda)$). Stwarza to nadzieję na przyszłe zastosowanie ich jako biosensorów i sond strukturalnych.



Rysunek 13. Widmo absorpcyjne roztworu $\text{PP}(\text{Ser})_2(\text{Arg})_2:\text{Pr}(\text{III})$ (1:1000) w H_2O
 Figure 13. Absorption spectrum of $\text{PP}(\text{Ser})_2(\text{Arg})_2:\text{Pr}(\text{III})$ (1:1000) porphyrin in water



Rysunek 14. Widmo absorpcyjne roztworu $\text{PP}(\text{Ser})_2(\text{Arg})_2:\text{Tb}(\text{III})$ (1:1000) w H_2O
 Figure 14. Absorption spectrum of $\text{PP}(\text{Ser})_2(\text{Arg})_2:\text{Tb}(\text{III})$ (1:1000) porphyrin in water

PODSUMOWANIE

Konieczność poszukiwania nowych związków biologicznie aktywnych, które mogą znaleźć zastosowanie jako biosensory skłania do podjęcia badań nad fotofizyką otrzymanych układów. W obecnej dobie z jednej strony wysiłki badaczy dążą

do większej specjalizacji, zaś z drugiej do interdyscyplinarnego podejścia w odniesieniu do konkretnych zagadnień. Celem uzyskania pełnej charakterystyki spektroskopowej badanych związków, w prezentowanej pracy starano się powiązać informacje uzyskane różnymi metodami badawczymi z chemią badanych układów.

W pracy tej podjęto próbę zbadania: fotofizyki dwóch klas porfiryn i ich połączeń z jonami lantanowców(III).

Przeprowadzono obszerne badania z zastosowaniem wysoko rozdzielczej spektroskopii absorpcyjnej i emisyjnej w fazie stałej, roztworach i żelach. Badania prowadzono w różnych warunkach pH, koncentracji, odtlenienia, stosując selektywne wzbudzenie w szerokim zakresie temperatur (od 293 do 4 K).

Udało się wyjaśnić dynamikę przejść elektronowych w fazie stałej oraz sprzężenie elektron-fonon z uwzględnieniem efektów rezonansowych. Określić efektywność emisji i zaproponować prawdopodobne mechanizmy prowadzące do jej dezaktywacji bądź aktywacji. Szczególną uwagę skierowano na syntezę i właściwości optyczne zamkniętych w żelach krzemionkowych porfiryn ze względu na możliwości zastosowania ich jako biosensorów.

Zanalizowano ponadto najważniejsze zjawiska kontrolujące fotoluminescencje z udziałem porfiryn w żelach krzemionkowych, jak również wpływu jonów lantanowca na efektywność emisji w powyższych układach, efektów koncentracyjnych oraz dimeryzacji i aglomeracji porfiryn.

PODZIĘKOWANIA

Badania ujęte w tej pracy zostały wykonane na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego w zespole Fizykochemii Związków Lantanowców pod kierownictwem prof. J. Legendziewicz.

PIŚMIENICTWO CYTOWANE

- [1] A.M. Kłonkowski, *Wiad. Chem.*, 1993, **47**, 497.
- [2] A.M. Kłonkowski, *Postępy Fiz.*, 1982, **33**, 3.
- [3] H. Dislich, *Glastechn. Ber.*, 1971, **44**, 1.
- [4] R.C. Mehrotra, *Structure and Bonding*, (R. Reisfeld, C.K. Jørgensen, Red.), Vol. 77, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1992, str. 2.
- [5] M.A. Villegas, L. Pascual, *Thin Solid Films*, 1999, **351**, 103.
- [6] M.A. Garcia, S.E. Paje, M.A. Villegas, J. Llopis, *Materials Letters*, 2000, **43**, 23.
- [7] M.A. Villegas, L. Pascual, S.E. Paje, M.A. Garcia, J. Llopis, *J. European Ceramic Society*, 2000, **20**, 1621.
- [8] W.R. Birch, *Coatings: an introduction to the cleaning procedures*, The Sol-Gel Gateway, 2000.
- [9] M.A. Garcia, S.E. Paje, J. Llopis, M.A. Villegas, J.M.F. Navarro, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 1999, **32**, 975.
- [10] M.A. Villegas, M.A. Garcia, J. Llopis, J.M.F. Navarro, *J. Sol-Gel Sci. Tech.*, 1998, **11**, 251.

- [11] M.A. Villegas, M. Aparicio, A. Duran, *J. Non-Cryst. Solids*, 1997, **218**, 146.
- [12] L.L. Diaz-Flores, J.J. Perez-Bueno, Y.V. Vorobiev, J.R. Martinez, F. Ruiz, F. Perez-Robles, J. Gonzalez-Hernandez, *Mat. Lett.*, 2000, **42**, 25.
- [13] E. Gioretti, G. Margheri, S. Sottini, M. Caslboni, R. Senesi, M. Scarselli, R. Pizzoferrato, *J. Non-Cryst. Solids*, 1999, **255**, 193.
- [14] W. Dong, C. Zhu, *Mat. Lett.*, 2000, **45**, 336.
- [15] C. Malins, T.M. Butler, B.D. MacCraith, *Thin Solid Films*, 2000, **368**, 105.
- [16] T.M. Butler, B.D. MacCraith, C. McDonagh, *J. Non-Crystalline Solids*, 1998, **224**, 249.
- [17] F. De Matteis, P. Proposito, F. Sarcinelli, M. Casalboni, R. Pizzoferrato, A. Furlani, M.V. Russo, A. Vannucci, M. Varasi, *J. Non-Cryst. Solids*, 1999, **245**, 15.
- [18] K. Suza, I. Matsuyama, S. Satoh, T. Suganuma, *J. Non-Cryst. Solids*, 1990, **119**, 21.
- [19] K. Suza, I. Matsuyama, S. Satoh, *J. Non-Cryst. Solids*, 1991, **128**, 118.
- [20] R. Lindberg, J. Sjoblom, G. Sundholm, *Colloids and Surfaces A*, 1995, **99**, 79.
- [21] J. Zarzycki, *Ceramics*, 1993, **43**, 7.
- [22] G. Orcel, L.L. Hench, J. Artaki, T.W. Jonas, J. Zerda, *J. Non-Cryst. Solids*, 1988, **105**, 223.
- [23] L.L. Hench, J.K. West, *Chem. Rev.*, 1990, **90**, 33.
- [24] U. De Rossi, S. Daehne, R. Reisfeld, 1996, **251**, 259.
- [25] A. Lobnik, O.S. Wolfbeis, *Sensors and Actuators B*, 1998, **51**, 203.
- [26] D.A. Nivens, Y. Zhang, S.M. Angel, *Anal. Chim. Acta*, 1998, **376**, 235.
- [27] H. Schmidt, G. Philipp, *J. Non-Cryst. Solids*, 1984, **63**, 283.
- [28] H. Schmidt, *J. Non-Cryst. Solids*, 1989, **112**, 419.
- [29] H. Hirashima, E. Onishi, M. Nakagawa, *J. Non-Cryst. Solids*, 1990, **121**, 404.
- [30] E. Yariv, S. Schultheiss, T. Saraidarov, R. Reisfeld, *Optical Materials*, 2001, **16**, 29.
- [31] E. Yariv, R. Reisfeld, *Optical Materials*, 1999, **13**, 49.
- [32] A. Lobnik, I. Oehme, I. Murkovic, O.S. Wolfbeis, *Anal. Chim. Acta*, 1998, **367**, 159.
- [33] I. Klimant, F. Ruckruh, G. Liebsch, A. Stangelmayer, O.S. Wolfbeis, *Microchim. Acta*, 1999, **131**, 35.
- [34] J.D. Mackenzie, *Sol-Gel Optics III*, ed., J.D. Mackenzie, SPIE Proceedings Series; SPIE: Bellingham, WA, 1994, 2288.
- [35] J. Sokolnicki, *Rozprawa doktorska, Wydział Chemii, Uniwersytet Wrocławski, Wrocław 1998*.
- [36] J. Dargiewicz-Nowicka, St. Radzki, *Acta Bio-Optica et Informatica Medica*, 2002, **8**, 119.
- [37] K. Maruszewski, *Acta Bio-Optica et Informatica Medica*, 1995, **1**, 113.
- [38] P. Hartmann, W. Trettnak, *Anal. Chem.*, 1996, **68**, 2615.
- [39] D.B. Papkovsky, G.V. Ponomarev, O.S. Wolfbeis, *J. Photochem. Photobiol. A*, 1997, **104**, 151.
- [40] M. Plaschke, R. Czolk, H.J. Ache, *Anal. Chim. Acta*, 1995, **304**, 107.
- [41] D. Delmarre, R. Meallet, C. Bied-Charreton, R.B. Pansu, *J. Photochem. Photobiol. A*, 1999, **124**, 23.
- [42] C.A. Pessoa, Y. Gushikem, *J. Electroanal. Chem.*, 1999, **477**, 158.
- [43] D.B. Papkovsky, A.N. Ovchinnikov, V.I. Ogurtsov, G.V. Ponomarev, T. Korpela, *Sensors and Actuators B*, 1998, **51**, 137.
- [44] S. Dong, T. Kuwana, *Electroanalysis*, 1991, **3**, 485.
- [45] Q. Deng, S.J. Dong, *Analyst*, 1996, **121**, 1123.
- [46] M. Mifune, R. Harada, A. Iwado, N. Motohashi, Y. Saito, *Talanta*, 1998, **46**, 1583.
- [47] U. Wollenberger, B. Neumann, F.W. Scheller, *Electrochim. Acta*, 1998, **43**, 3581.
- [48] Y. Kaizu, M. Asano, H. Kobayashi, *J. Phys. Chem.*, 1986, **90**, 3906.
- [49] G. Blasse, G.J. Dirksen, N. Sabbatini, S. Perathoner, J.-M. Lehn, *B. Alpha, Phys. Chem.*, 1998, **92**, 2419.

-
- [50] R. Wigłusz, J. Legendziewicz, A. Graczyk, S. Radzki, P. Gawryszewska, J. Sokolnicki J. Alloys Compd., 2004, **380**, 396.
- [51] J. Sokolnicki, R. Wigłusz, S. Radzki, A. Graczyk and J. Legendziewicz, Optical Materials, 2004, **26**, 199.

Praca wpłynęła do Redakcji 17 lipca 2011

**RÓŻNOŚĆ CZY IDENTYCZNOŚĆ
VESTIUM/RUTENU?**

DIFFERENCE OR IDENTITY
OF VESTIUM/RUTHENIUM?

Roman Edmund Sioda

Warszawa
e-mail: rsioda@tlen.pl

Już przeszło dwieście lat ma pytanie, czy Jędrzej Śniadecki słusznie ogłosił odkrycie nowego metalu i pierwiastka, *Vestium*, który później został na nowo odkryty i nazwany rutenem [1–6]. Odpowiedź na to ważne pytanie jest nadzwyczaj trudna ze względu na złożony język chemiczny użyty przez Śniadeckiego w opisie swoich doświadczeń [7] oraz skomplikowaną chemię rutenu [8, 9]. Historyczne próby odpowiedzi na pytanie postawione w tytule były zarówno na tak, jak i nie [6]. W większości wypowiedzi zabrakło jednakże mocnego poparcia tekstem mało znanej pracy J. Śniadeckiego, a przede wszystkim na braku przeprowadzonych jeszcze doświadczeń laboratoryjnych, których celem byłoby powtórzenie doświadczeń, znalezionych w opisie samego Śniadeckiego. Wprawdzie doświadczenia Śniadeckiego znane są także z pracy opublikowanej w języku rosyjskim [10], ale ten opis jest tylko skróconą wersją pracy w języku polskim [7].

Zasadnicza trudność powtórzenia doświadczeń Śniadeckiego polega na prawidłowym zrozumieniu jego opisu, w którym Autor posługuje się terminami chemicznymi nie występującymi w użyciu współczesnym. Zrozumienie intencji Autora często wymaga dokładnej analizy pierwotnego tekstu pracy [7]. Przypuszczalnie tekst ten był napisany jako wykład wygłoszony na Uniwersytecie Wileńskim dn. 10 lipca 1808 r., według obecnego kalendarza, i następnie opracowany do druku.

Na podstawie analizy tekstu można założyć, że Autor wynalazł oryginalną metodę analizy rudy platyny surowej, dzięki której uzyskał już w jednym z pierwszych jej stadiów produkt, który okazał się solą nowego metalu. Tym produktem są *drobne kryształy pięknego czerwonego koloru*. Te kryształy Autor otrzymał po wytrawieniu rudy w gorącej wodzie królewskiej, następnie odparowaniu pozostałych kwasów *z retorty aż do suchości*, pozostawiając *masę czarniawą przyciągającą wilgoć z powietrza*. Następnie, Autor zalał tą masę tzw. *wyskokiem winnym*, który *znaczną jej część rozpuścił*, barwiąc się sam na kolor ciemno-czerwony. Kiedy dodawany porcjami *wyskok* (tj. najpewniej stężony roztwór etanolu lub *rektyfikat*) przestał się już zabarwiać, pozostały *drobne kryształy pięknego czerwonego koloru*, które *znacznie były ciężkie* [7, str. 12].

Do analizy czerwonych kryształów, Autor, przystępuje w dalszej (w przybliżeniu jednej trzeciej) części pracy [7, str. 20–27], wcześniej zaś stwierdza, że czerwone kryształy są chlorkami *Vestium*: *iak mnie długié i pracowite doświadczenia przekonały, są solaném (chlorkiem) szczególnego dotąd w platynie niepostrzeżonego metalu... Metal tén nazywam od nowo wynalezionego planety Vesta Vestium...* [7, str. 19 u dołu].

Na pozostałych stronach pracy Autor opisuje *własności*, czyli mówiąc współcześnie, właściwości nowego metalu. Zaczyna opis od właściwości fizycznych, podając, że z wyglądu i trudności topnienia podobny jest do platyny, choć wydaje się topić trudniej, kolor ma bielszy od platyny i jest mniej kruchy (ma *mocniejsze spoiénie*). Podobnie jak platyna rozpuszcza się tylko w wodzie królewskiej (*kwasiu saletro-solnym lubo cokolwiek łatwiej od platyny*). Roztwór chlorku *Vestium* ma kolor podobny do roztworu chlorku złota, czyli czerwono-fioletowy, jak czerwone

wino z Bordeaux we Francji (tj. kolor bordo), gdy roztwór chlorku platyny ma kolor czerwono-pomarańczowy [7, str. 20].

Podobnie jak chlorek platyny, chlorek *Vestium* dawał sól podwójną z chlorkami potasu i amonu, ale kolory wytworzonych osadów były różne: dla czystej platyny koloru *brudno-żółtego*, *kiedy osad Westu má piękny i świetny* (tj. błyszczący?) *kolor cytrynowy*. Nadto wspomniane sole podwójne *Vestium* łatwiej się rozpuszczały w wodzie, aniżeli analogiczne sole platyny [7, str. 20].

Wydaje się, że może tutaj występować niezgodność z wiedzą dzisiejszą. Współczesne źródła podają, że sole podwójne chlorku rutenu z chlorkami amonu czy potasu tworzą czarne kryształy, które woda rozkłada [11, 12]. Natomiast znany podręcznik podaje, że roztwór, tworzącego sól podwójną, anionu $[\text{RuCl}_6]^{2-}$ ma zabarwienie żółte, z czasem dość szybko czerniejące ze względu na rozkład związku [8, str. 1001].

Śniadecki podaje także, że chlorek *Vestium*, w odróżnieniu od platyny, nie daje soli podwójnej z chlorkiem sodu [7, str. 22 u góry]. Rzeczywiście w cytowanych wyżej encyklopedycznych źródłach nie ma informacji na temat soli podwójnej chlorku rutenu(III) z chlorkiem sodu.

Według Śniadeckiego istotną różnicą odróżniającą chlorek *Vestium* od chlorku platyny jest rozpuszczalność w alkoholu i wodzie.

Odmienne niż analogiczna sól platyny, *solan* (chlorek) *Vestium* *nie rozpuszcza się w wyskoku* (stężonym roztworze etanolu) *zwłaszcza na zimno, albo jeżeli się kiedy rozpuszcza, to w małej bardzo ilości...* [7, str. 21/22]. Dzięki tej różnicy rozpuszczalności w etanolu Śniadecki potrafił oddzielić *solan* (chlorek) *Vestium* od analogicznej soli platyny.

Czerwone kryształy chlorku Vestium ... bynajmniey nie odminiają (się) *w powietrzu...*, tj. przypuszczalnie, nie chłoną wody z powietrza, czyli nie są higroskopijne ani rozplývające się pod wpływem wilgoci w powietrzu, po angielsku, *deliquescent*. W zimnej wodzie są bardzo słabo rozpuszczalne, dając roztwór czerwono-fioletowy (koloru chlorku złota). Woda wrząca rozpuszcza znacznie więcej chlorku *Vestium*, jednakże po ostudzeniu wypadają *małe kryształy ośmioboczne lub świećące blaszki, lecz iuż nie czerwonego, ale pięknego żółtego koloru. Podobnie parując solucyą téy soli aż do suchości, otrzymuje się massa kryształów żółtych w powietrzu nieodmienny i bardzo świetnych* [7, str. 22/23].

Współczesna interpretacja opisanych przez Śniadeckiego faktów doświadczalnych nie wydaje się być łatwa. Naturalnie, należy założyć, że obserwacje były prawidłowe i zgodne ze stanem faktycznym, natomiast różnice mogą wystąpić przy próbach ich objaśnienia zgodnie z ówczesną oraz obecną wiedzą chemiczną.

Wydaje się, że kluczem do rozwiązania tej chemiczno-historycznej zagadki jest prawidłowe określenie identity wspomnianych wyżej czerwonych kryształów nierozpuszczalnych w *wyskoku* (stężonym roztworze etanolu). Nie może to być prosty chlorek rutenu, jak przypuścił Śniadecki – *solan Vestium*, gdyż zgodnie ze współczesną wiedzą, trójchlorek rutenu RuCl_3 tworzy brązowe kryształy, rozplýwa się na

powietrzu, jest nierozpuszczalny w zimnej wodzie, w gotującej wodzie rozkłada się, oraz nieznacznie rozpuszcza się w alkoholu [12].

Raczej należy przypuścić, że czerwone kryształy mogą być formą oksychlorku rutenu solwatowanego etanolem, analogicznego do tzw. amoniakalnej czerwieni rutenowej, dwucentrowego związku kompleksowego, $\text{Ru}_2(\text{OH})_2\text{Cl}_4 \cdot 7\text{NH}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, mającego postać proszku o intensywnym zabarwieniu brązowo-pomarańczowym, który rozpuszcza się w zimnej wodzie [12]. Wyższe chlorki, np. rutenu(IV) występują w formie hydroksylowanej i uwodnionej oraz mogą mieć bardzo złożone struktury [8, str. 1001–1009]. Tworzenie się żółtych kryształów po rozpuszczeniu na gorąco czerwonych kryształów w wodzie i ochłodzeniu roztworu, może wskazywać na usunięcie etanolu ze struktury soli o czerwonym zabarwieniu lub na tworzenie się w gorącym roztworze wodnym czterotlenku rutenu RuO_4 , który to jest krystalicznym ciałem stałym (romby lub igły) o żółtym zabarwieniu, niskiej temp. topnienia ($25,5^\circ\text{C}$), rozkładającym się w temp. 108°C , rozpuszczalnym w wodzie zarówno zimnej i gorącej w ilości około 2g/100 ml wody i rozpuszczalnym w alkoholu [12]. Tworzenie się RuO_4 w gorącym roztworze wodnym wskazywałoby, że w tych warunkach woda może zachowywać się jako utleniacz.

Podobne hipotezy próbujące objaśnić obserwacje opisane przez Śniadeckiego można by mnożyć. Wydaje się jednak, że właściwą drogą sprawdzenia i wyjaśnienia obserwacji staną się przeprowadzone od nowa próby laboratoryjne, mające na celu odtworzenie warunków pracy i wyników Śniadeckiego uzyskanych w latach 1806–8 na Uniwersytecie Wileńskim.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] R.E. Sioda, *Przemysł Chemiczny*, 2010, **89** (9), 1158.
- [2] R.E. Sioda, *Wiedza i Życie*, 2011, **914** (luty), 42.
- [3] R.E. Sioda, *Wiad. Chem.*, 2011, **65**, 151.
- [4] R.E. Sioda, *Chimia (Zurich)*, 2011, **65**, 429.
- [5] R.E. Sioda, *Wiad. Chem.*, 2011, **65**, 503.
- [6] R. Mierzecki, *Wiad. Chem.*, 2011, **65**, 509.
- [7] J. Śniadecki, *Rosprawa o nowym metalu w surowej platynie odkrytym*, wyd. Józefa Zawadzkiego, Wilno, 1808, 27 stron.
- [8] F.A. Cotton, G. Wilkinson, *Advanced Inorganic Chemistry*, Interscience Publishers, New York 1966, str. 992.
- [9] A. Bielański, *Podstawy Chemii*, wyd. 6-te, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2010, str. 76.
- [10] A. Snjadeckij, *Tekhnologicheskii Zhurnal*, 1809, **6**, 81.
- [11] *Chimicheskii Encyklopedicheskii Słownik*, (Red. I.L. Knunianc), Wyd. Sowetskaia Encyklopedia, Moskwa, 1983.
- [12] *Handbook of Chemistry and Physics*, 66th Edition, 1985–1986, CRC Press, Boca Raton, Florida.

FELIETON NAUKOWY



ZYGMUNT KRASIŃSKI
WOBEC ODKRYĆ PRZYRODNICZYCH

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. Był kierownikiem Zakładu Chemii Organicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Własne zainteresowania badawcze: chemia i stereochemia peptydów i białek. Wypromował 23 doktorów chemii, z których czworo się habilitowało. Autor 9 książek, 275 prac oryginalnych i ponad 120 artykułów przeglądowych oraz dotyczących historii nauki. W latach 1983–1994 Redaktor Naczelny „Wiadomości Chemicznych”. Obecnie opiekun Gabinetu Historii Chemii Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego.

„Jakże pełne – pisał Zygmunt Krasiński w liście z 13 marca 1847 roku do przyjaciela, Adama Sołtana – gazety co chwila najdziwniejszych czy odkryć, czy zdarzeń, czy przeczuciów (...). Planeta przez Leverriera wyrachowan wprzód matematycznie, że musi być koło Uranusa, a potem wnet odkryt teleskopowo. Eter ból nerwom odejmujący i o śmierci dziwne tajemnice obwieszający. Bawełna niewinna i szlamazarna przemieniona nagle w śmiertelny proch. Balonom kierunek dany w Brukseli” [1].

Rozległa korespondencja Krasińskiego zawiera niejedyn ślad jego przyrodniczo-naukowych zainteresowań. Jak widzimy, bardzo mocno oddziaływała na niego prognostyczna siła nauki, jaka przejawiała się w sprawie odkrycia Neptuna. Istnienie tej planety przewidział francuski astronom Urban-Jean-Joseph Leverrier w latach 1845–1846 i we wrześniu 1846 roku zakomunikował o tym Akademii. We wskazanym przezeń miejscu zaobserwował niebawem nową planetę J.G. Gall. Odkrycie to wstrząsnęło nie tylko uczonym światem. W liście do swojej muzy (Delfiny Potockiej), z dnia 11 października 1846 roku, pisał więc Krasiński: „Jugiel zawczoraj mówił mi, że niechybnie w tych dniach odkryto i na oczy zobaczono tego planetę tak idealnie obserwowanego, tak matematycznie przepowiedzianego, zdaje mi się przez pana de Verrier, młodego astronoma, który ze zboczeń Uranusa wyciągnął konieczność bytu takiego planety i obliczył jego wielkość i przestrzeń, gdzie go szukać, wskazał. Pamiętasz, mówiliśmy o tym. Dowiedz się, proszę Cię, czy w istocie tak logika ludzka z Bożą się zgodziła, co do joty” [2].

Siłę naukowej prognozy, tkwiącą w odkryciu Neptuna, mogli współcześni porównać chyba tylko z prognozami Mendelejewa, poczynionymi na podstawie układu okresowego pierwiastków chemicznych. Fryderyk Engels, pilny obserwator wydarzeń, jakie następowały w nauce, tak właśnie zestawiał ze sobą te dwa odkrycia.

„Mendelejew – pisał w artykule pt. „Dialektyka” w 1879 roku – wykazał, że w szeregach pokrewnych pierwiastków, uporządkowanych według ciężarów atomowych, znajdują się różne luki wskazujące na to, że w tych miejscach powinny się znajdować nie odkryte jeszcze nowe pierwiastki. Opisał on z góry ogólne własności chemiczne jednego z tych nieznanych pierwiastków – który nazwał ekaglinem, ponieważ w szeregu zaczynającym się od glinu następuje bezpośrednio po nim – w przybliżeniu podał jego ciężar właściwy i atomowy oraz objętość atomową. W kilka lat później Lecoq de Boisbaudran rzeczywiście odkrył ten pierwiastek, przy czym przewidywania Mendelejewa sprawdziły się z bardzo nieznacznymi odchyleniami. Ekaglin zrealizował się w pierwiastku galu. Odkrycie dokonane przez Mendelejewa – dzięki bezwiednemu zresztą zastosowaniu heglowskiego prawa, przechodzenia ilości w jakość – śmiało można porównać z odkryciem Leverriera, który obliczył orbitę nie znanej jeszcze planety Neptuna” [3].

Takie odkrycia, jak Leverriera, czy Mendelejewa, umocniły wiarę w potężną moc prognostyczną nauki i pełne przekonanie o jej potędze. W ten też właśnie sposób odkrycie Neptuna musiało podzielać na Krasińskiego. W trzech innych, wymienionych przez niego odkryciach, dominował natomiast aspekt utylitarny.

W pierwszym rzędzie dotyczyło to odkrycia bawełny strzelniczej. Odkrycie to miało całkowicie zmienić pole bitwy. Dawne prochy przy wystrzałach, zwłaszcza artyleryjskich, zadymiały to pole, skrywając w dymie walczące oddziały. Bawełna strzelnicza pozbawiła je tego ukrycia. Odkrył ją niemiecki chemik, Chrystian Friedrich Schönbein (1799–1868), wsławiony wcześniej (1839) odkryciem ozonu. Wstępną informację o swoim wynalazku przedstawił na sesji naukowej w Bazylei, 27 marca 1846 roku, zaś do francuskiego chemika Dumasa pisał tak: „Wiesz, że być może odkryłem bardzo prosty sposób przetwarzania bawełny w materiał posiadający wszystkie niezbędne właściwości materiału miotającego. Obok dużej siły wybuchu ta ciekawa substancja jest pod każdym względem lepsza od najlepszego prochu. Doświadczenia, jakie przeprowadziłem w kopalniach i kamieniołomach oraz z działami i moździerzami, wykazały, że jeden funt tej substancji wytwarza efekt równy użyciu od dwóch do czterech funtów zwykłego prochu czarnego. Należy dodać, że tak przyrządzona bawełna nie pozostawia żadnych stałych resztek i nie wytwarza dymu. Jej produkcja nie stwarza żadnych niebezpieczeństw i nie wymaga kosztownych instalacji. Ze względu na swoje właściwości wybuchowe bawełna bez wątpienia szybko znajdzie zastosowanie w pirotechnice, a w szczególności na okrętach wojennych” [4].

Schönbein szybko wszedł w porozumienie z angielskimi producentami prochu, a czasie swojej wizyty w Anglii osobiście zaprezentował królowej parę kuropatw ustrzelonych przy użyciu bawełny strzelniczej. Nie można wykluczyć, że wiadomości o tym wydarzeniu znajdował Krasieński w gazetach. W Faversham otwarto pierwszą wytwórnię nowego materiału wybuchowego. Niestety, w lipcu 1847 roku zniszczył ją wybuch, zabijając dwudziestu jeden ludzi. Nie powstrzymało to jednak szybkiego zaakceptowania bawełny strzelniczej przez armie świata.

Krasieński palił się, by osobiście wypróbować nowy materiał strzelecki. Już 2 grudnia 1846 roku pisał do przyjaciela, Konstantego Gaszyńskiego: „Strzelałem już bawełną; uprzejmie strzelać nią, bez huku prawie, bez dymu żadnego, z siłą potrójną od prochu, z rozświetleniem białawym, ale dymu nic a nic; niezmiernie to korzyść w bitwie; będą mogli się ludzie zabijać świetnie i przejrzysto. Przywiozę Ci próbkę”. Niestety, nie wiemy, z jakiego to źródła czerpał Krasieński próbki bawełny strzelniczej.

Inny jego korespondent, Stanisław Koźmian, tak wspominał wspólny pobyt za granicą: „Chodziliśmy co dzień do strzelnicy, gdzie go bardzo zajmowało strzelać za pomocą nowo wtedy wynalezioną kulminującą bawełną” [5]. A więc, Krasieński wykazał żywą ciekawość wobec wynalazku Schönbeina. Osobiście też sprawdził efekty działania eteru na organizm ludzki, budząc strach wśród przyjaciół, że może popaść w nałóg niebezpieczny dla zdrowia. 23 stycznia 1847 roku przeczytał Krasieński we francuskim czasopiśmie „Epoque” artykuł Bernarda Adolfa Granier de Cassanac o zażywaniu eteru, w którym ów autor twierdził, że wdychanie pary eteru „porywa do siódmego nieba”. Już nazajutrz w liście do Delfiny Potockiej pisał, że warto by było tę rzecz wypróbować. I zrobił to tego samego jeszcze dnia. Potem Krasieński jeszcze dwukrotnie przeprowadzał takie nad sobą eksperymenty: 25 lutego i 1 marca. Ich przebieg opisał w licznych listach do przyjaciół. Może naj-

bardziej rzeczowo w liście do Konstantego Gaszyńskiego z dnia 8 lutego 1847 roku, pisanym z Nicei. „Jednak mi lepiej – informował poeta – na zdrowiu i duchu od 2ch tygodni, od kiedym zażył nosem i w płuca wpakował 2 uncje eteru. Myślałem, że umieram i znieśmiertelniam, wniebowstępuję przez wszechświat do Boga! Zupełnie uczucie duszy uwolnionej od cielska; ptasiałem, wyanielałem się, ręce do lotu wyciągać i od tej chwili nerwy mi się poprawiły. Spróbuj, ale tylko 2 uncji, nosem wziwaj, a oddychaj gębą, stopniami, (w flaszczce trzeba, by otwór był szeroki) ubywać będzie płynu, a w Tobie przybywać nieśmiertelności” [6]. Dwie uncje eteru to było około 70 gramów.

Najpełniejszy natomiast opis swoich doznań psychicznych, towarzyszących zażyciu eteru, zawarł Krasiński w liście do Jerzego Lubomirskiego. „Otóż – pisał – zdarzyło się teraz pierwsze moim zdaniem chrześcijańskie odkrycie w królestwie ciał, w kręgach natury, chrześcijaństwo albowiem w naturze nie potrafi się dokładniej wyrazić jak przez eter, którego własnościami miłosiernie pozbawia nerwy wszelkiej boleściwości, a drugiej strony ducha wprowadzać ludzkiego w stan pośmiertnemu zupełnie podobny i wykazywać mu niczym niespożytą nieśmiertelność w stanie takowym. Dwomam próbował nawroty; zawszem doznał tych samych wrażeń zupełnego oddzielenia duszy od ciała, a więc śmierci. Słuchaj! Zrazu, gdy szerokoszyjny flakon, dwie uncje (więcej nie trzeba) zawierający, do nosa przytkniesz, ciągnąc nozdrzami, a powietrze wydychając usty, zrazu uczujesz niezmierną lekkość, zdaje ci się że ptasiejesz, czujesz, że mógłbyś przez wszystkie Drogi Mleczne się przedrzeć na przebój, wszechświat minąć i dojść aż do Pana Boga. Na tym uczuciu kończy się pierwszy rozdział wrażeń twoich; jeśli dalej w płuca wciągasz wonie eterowe, zwolna z nieśmiertelnej poleciałości wpadasz jakoby w pobliże śmierci wiecznej, która pod postacią niezmiernych ciemności zewsząd walić zaczyna ku tobie. Zda ci się, że twój żywot, gdyby widnokrąg z lazuru stoi przed tobą. Co chwila one ciemności szerzej się po nim rozlegają. Doskonale wiesz i rozumiesz, że to śmierć idzie, przy tym wcale przytomności nie tracisz – masz ją zupełną i do przytomnych wciąż się odzywasz, tłumacząc im co się tobie przydarza. W miarę jak owe ciemności coraz bardziej widnokrąg ten twego życia zachwytyją, tym mniej możesz obcować z ideami lub wyobrażeniami w tobie samym istniejącymi, o osobach i sprawach ziemskich, choćby ci najdroższych, najświętszych. Stopniami lud żywy, zaludniający ciebie, myśli twe, pieśni, pomysły, żądze, chęci, pojęcia, kochania, wstręty wymierają, odludniasz się, pustynniejesz, skupiasz się, ścieśniasz w coraz drobniejszy, ale za to coraz twardszy punkt środkowy jaźni twojej; z dębu stajesz się żołądźką, ale żołądźką czującą jak najdobitniej, że przetrwa wieki wieków i jeszcze drugich wieków wieki. Czy pojmujesz? – im się bardziej odpowierzchniasz, tym bardziej się głębisz – im bardziej tracisz na żywotności, tym bardziej czujesz, żeś jest, boś jest, im bardziej na możności obcowania z rojami myśli i wyobrażeń, które składają ludność ducha twego zamieszkującą w stanie żywota, tym bardziej bytowo czujesz, że ten duch w ostatecznym swym od świata i wszechświata odosobnieniu, sam w sobie niezatracałym i nieobalalnym i nieskończonym jest! Wymówisz w sobie np. imię osoby jakiej lub sprawy, lub idei, doskonale wiesz co to słowo znaczy, ale już nie

możesz z tym słowem wchodzić w żywotną społeczność. Nie zapomniałeś o nim wcale, ono jest w tobie, jest, ale nie żyje już w tobie – pojmujesz? Był tylko swój własny, oderwany, najczystszy, najprzepaścistszy, nieprzetomnym czujesz, czujesz się z granitu tego samego, z którego postawiona wieczność. Czujesz się jakby ziarnem, jakby nasieniem wypadłym z kwiatu, któremu na imię Bóg! Stąd wynika, że kiedy ciemności rosnące już zupełnie się zaległy, że kiedy czujesz, że to nie żart jednak, bo już do otaczających słowa wyrzec ci nie sposób, że kiedy znasz oczywiście i wiesz, po ludzku mówiąc, że oto umierasz. Wcale się jednak o siebie nie troszczysz – wcale a wcale – ani się odrobinę lękasz dla siebie unicestwienia lub oprzytomnienia, ale żal ci ogromny, że nie możesz już tajemnicy tego ostatecznego odchodzenia i odrywania się od życia wypowiedzieć przytomnym. Rodu ci żal niejako ludzkiego, że o tym nie będzie wiedział, że się nie dowie, czym śmierć! Dwa już tylko wtedy punkciki błękitu zostały ci przed oczyma z całego widnokregu istnienia – turkot w uszach, ba! nie w uszach tylko. Jakby prześwidrowany pał hałasu, łoskotu, brzęczenia, od mózgu sięga aż po twoje stopy – i wtedy właśnie śmierć owa rycząca i obchodząca cię jak lew, zaczyna w niemożności pokonania ciebie od ciebie się odsuwać.

Zwykle wtedy z dwóch uncji kropli jednej nie wywączanej w fiaszce już nie ma, po pięciu lub dziesięciu minutach nazad z tych otchłani powrócony jesteś na niwy żywota, znówes w swoim pokoju, wśród swoich, zupełnie tak samo jak wprzód! przez tę ostatnią tylko chwilę nie mogłeś do nich przemawiać – byłeś po trupiemu – dla nich po trupiemu, ale nie w stosunku do siebie. Zresztą przez ciąg cały doświadczenia wciąż i przytomność, i wolęś miał i mogłeś mówić, nawet z pewną wymową” [7].

W tym miejscu pominiemy fragment poświęcony rozmyśleniom poety nad wykazaniem w ten sposób nieśmiertelności duszy i przejdziemy do poczynionego przez niego podsumowania doświadczeń. „Otóż takowe – pisze dalej – („bytowe demonstracje śmierci,” I.S.) przyniosły eterowe wonie. Teraz nikomu nie radziłbym żartów tą nową potęgą – wszelkie nadużycie powiodłoby naprzód do kretynostwa, po wtóre nie do już udanej, ale rzetelnej śmierci. Spróbować warto. Gdy ból zębów lub głowy nieznośnie nęka, ustąpić zaraz musi. Raz z migrenom ponowił doświadczenie – jakby ręką odjął. Co nadzwyczajnego także to to, że nazajutrz wcale nie czujesz ospałości i ciężkości, jak zwykle po opium lub winie, owszem czujesz lekkość niezwykłą i animusz do wszystkiego. Jeśliś w melancholii był, ustąpiła i taki wywarty wpływ trwa ze dwa tygodnie. Jednak, powtarzam, nadużycia żadnego i przywykania – bo to straszna i tajemna siła. Raz ci zbawienie przyniesie, a potem zakpi i potępieniem się odwdzięczy. W rzadkich bardzo razach wolno człowiekowi przed dniem śmierci uśmiercić i przybić do wybrzeżów wieczności bez szkody i kary, z dozwolonym nazad powrotem, wolno, gdy idzie o nowe, umysłowe odkrycie, o rozszerzenie wiedzy – i wolno, po wtóre, gdy chodzi o odsunięcie piekielnych ciała boleści, o ulgę nerwom wściekłym z bólu, ale dla modnej rozkoszy nie wolno sobie chodzić jak na spacer w zaświat, w grób, do tajemnic Bożych!” [7].

W zakończeniu listu wyraźnie przebija troska, by młody przyjaciel naśladowując poetę, nie zszedł na złe drogi. Zwraca też uwagę odwołanie się Krasińskiego do, naj-

wyraźniej własnych, doświadczeń z zażywaniem opium. Podobne odwołanie znajdziemy w rozprawce „O eterze”, którą poeta napisał po francusku i przesłał swojej ukochanej. Jej polskie tłumaczenie, dokonane przez Leopolda Staffa, zamieszczono w VII tomie „Pism” Zygmunta Krasińskiego. Czytamy tam, że po zażyciu eteru „nie doznajesz żadnego przybicia, w rodzaju tych, które następują po podobnych wyprawach w zaświat, wywołanych za pomocą opium lub innego silnego narkotyku” [8].

Zainteresowania eterem, a również chloroformem, wzrosły wówczas silnie w związku z odkryciem znieczulających organizm ludzki własności tych substancji i ich zastosowaniem do operacji chirurgicznych. Obydwu tych substancji użyto do tego celu niemal równocześnie, ale wcześniejszy był tu eter. W roku natomiast 1847 udał się do Anglii, w celu poddania się operacji wydobycia z nogi odłamku granatu z czasów bitwy pod Ostrołęką, generał Józef Bem. Był tam operowany w narkozie chloroformowej. Dawka chloroformu była najwidoczniej za mała, generał obudził się w czasie operacji i zarządził, by operacji nie przerywano [9]. W tym samym czasie użyto chloroformu w Warszawie. Dokonali tego lekarze Aleksander Le Brun i Feliks Jabłonowski. W uśpieniu chloroformowym zoperowali oni wrzód na nodze mężczyzny i nowotwór piersi kobiety.

„Te słów kilka użyciu chloroformu – napisał w sprawozdaniu z tych operacji Feliks Jabłonowski – udzieliwszy kolegom, nie pozostaje mi, jak podziękować panu Peszce, zarządzającego apteką. C.K. Mości, który pierwszy ten preparat w naszym mieście, w swoim laboratorium, otrzymał. Dodać jeszcze muszę, że chloroform stosunkowo jest tańszy od eteru, albowiem każdy z wymienionych chorych wypotrzebował niecałe trzy drachmy, a jedna drachma około 40 groszy tylko kosztować będzie” [10]. Dodajmy tutaj, że drachma odpowiadała około 4,5 gramom.

Po tej małej dygresji wróćmy do naszego głównego wątku. Na liście odkryć przyrodniczych, jaką zawarł Krasiński w liście do Sołtana, cytowanym na wstępie tego tekstu, znajdujemy jeszcze wiadomość, iż w Brukseli „nadano kierunek balonom”. Nie umiem nic dokładniejszego powiedzieć na temat tej wiadomości. Wiek XIX, od swego początku do końca, przepełniony jest wiadomościami, że w końcu udało się pokierować lotem balonów. I były to wszystko próby nieudane. Tak też zapewne było z próbami brukselskimi. Szereg takich prób i usiłowań omówił Stanisław Kramsztyk w swoim artykule o balonach, napisanym w 1893 roku [11].

Pozostaje nam już tylko poczynić kilka uwag ogólnych. Zygmunt Krasiński rysuje się nam tutaj jako człowiek bardzo aktywnie reagujący na odkrycia i wydarzenia swojego wieku. Co więcej jest w stosunku do nich czynny – poeta natychmiast jest gotów osobiście sprawdzić jak się rzeczy mają. Jego obserwacje, przy okazji takich prób czynione, są wnikliwie. Kawał niezłego przyrodnika potencjalnie tkwił w naszym poecie. Można tylko żałować, że takie ogólniejsze zainteresowania nie są aktualnie ujawniane przez środowiska, przypisujące sobie miano twórczych.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] Z. Krasieński, *Listy do Adama Soltana*, PIW, Warszawa 1970, str. 514.
- [2] Z. Krasieński, *Listy do Delfiny Potockiej*, T. 3, PIW, Warszawa 1975, s. 130.
- [3] F. Engels, *Dialektyka przyrody*, KiW, Warszawa 1953, s. 58.
- [4] Cytuję za: G.I. Bron, *Historia materiałów wybuchowych*, KiW, Warszawa 2001, s. 168.
- [5] Z. Krasieński, *Listy do Koźmianów*, PIW, Warszawa 1977, s. 82.
- [6] Z. Krasieński, *Listy do Konstantego Gaszyńskiego*, PIW, Warszawa 1971, s. 440.
- [7] Z. Krasieński, *Listy do Jerzego Lubomirskiego*, PIW, Warszawa 1965, s. 450.
- [8] Z. Krasieński, *O eterze*, Pisma, T. VII, Kraków-Warszawa 1912, s. 421.
- [9] L. Śliwa, *Józef Zachariasz Bem*, [w:] *Wybitni Polacy XIX wieku. Leksykon biograficzny*, Wyd. Literackie, Kraków 1998, s. 21.
- [10] F. Jabłonowski, *O użyciu chloroformu przy operacjach chirurgicznych*, Tygodnik Lekarski, 1847, Nr 26, s. 202.
- [11] S. Kramszyk, *Balony po stuletnim rozwoju*, [w:] *Szkice przyrodnicze z dziedziny fizyki, geofizyki i astronomii*, Warszawa 1893, s. 294.

INFORMACJE

INFORMACJE REDAKCJI „WIADOMOŚCI CHEMICZNYCH”

CENY PRENUMERATY NA ROK 2011

Redakcja miesięcznika PTCh „Wiadomości Chemiczne” zawiadamia, że wysokość prenumeraty rocznej „Wiadomości Chemicznych” za 2011 r. wynosi **168 zł** dla instytucji i niezrzeszonych prenumeratorów indywidualnych oraz **78 zł** dla bibliotek szkół średnich i podstawowych. Należność za prenumeratę prosimy przekazywać na konto:

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

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

- prenumerata „Wiadomości Chemicznych” na rok 2011 wraz ze składką członkowską, w ramach której dostarczany jest „Orbital”, wynosi **70 zł** (składka – 50 zł, prenumerata – 20 zł);
- emeryci, doktoranci oraz studenci płacą **35 zł** (składka – 15 zł, prenumerata – 20 zł); a nauczyciele szkół średnich i podstawowych płacą **40 zł** (składka – 20 zł, prenumerata – 20 zł).

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

PTCh Warszawa, ul. Freta 16
Millennium BIG BG SA
NRB 57 1160 2202 0000 0000 2720 2458

Informacje bieżące

Informujemy, że od roku 2010, rezygnujemy z przesyłania do Autorów bezpłatnych odbitek manuskryptu – w zamian będziemy przysyłać elektroniczną wersję opublikowanej pracy. Decyzja ta została podjęta na prośbę wielu autorów jak również ze względu na obniżenie kosztów wydawania czasopisma.

Redakcja „Wiadomości Chemicznych”

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

Nomenklatura chemii nieorganicznej. Zalecenia 1990, red. Z. Stasicka, cena 25 zł
Podstawowa terminologia stereochemii oraz Słownik podstawowych terminów w nauce o polimerach. Zalecenia 1996, red. O. Achmatowicz, B. Szechner i P. Kubisa, cena 12 zł

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

REGULAMIN DLA AUTORÓW

„Wiadomości Chemiczne” publikują artykuły przeglądowe, dotyczące wszystkich dziedzin chemii i wcześniej niedrukowane w innych czasopismach. Prace raz opublikowane w „Wiadomościach Chemicznych”, bez zgody Redakcji, nie mogą być wydane gdzie indziej. Treść artykułów powinna odpowiadać aktualnemu stanowi wiedzy i uwzględniać najnowsze osiągnięcia z dziedziny, której artykuł dotyczy.

Ponadto w serii „Biblioteka Wiadomości Chemicznych” publikowane są prace, będące z założenia dłuższymi artykułami przeglądowymi lub monografiami poświęconymi ważnym i aktualnym problemom współczesnej chemii. Autorzy, którzy chcieliby taki artykuł napisać, powinni wcześniej skontaktować się z Redakcją.

W ramach nowej serii wydawniczej pod nazwą „Habilitatione” mogą być publikowane prace habilitacyjne z szeroko pojmowanego obszaru chemii. Zważywszy, że zgodnie z ustawą, dopuszczalne jest przedstawianie rozpraw habilitacyjnych albo w formie monografii, albo w formie pliku bliskotematycznych publikacji, poprzedzonych omówieniem w języku polskim (tzw. autoreferatem), Redakcja przewiduje drukowanie (również w kolorach) obydwu tych wariantów. W zależności od sytuacji finansowej Wydawnictwa lub w przypadku specjalnych wymagań Autorów, Redakcja zastrzega sobie prawo negocjacji kosztów druku z Autorami lub Instytucjami zlecającymi druk.

Prace należy przysyłać do Redakcji pocztą elektroniczną na adres: bstran@wchuwr.pl lub wchem@wchuwr.pl.

Tekst powinien być przygotowany w edytorze **Word** lub innym kompatybilnym z MS Office. Artykuły należy opracowywać zwięźle i nie zamieszczać nadmiaru szczegółów, odsyłając Czytelnika do piśmiennictwa oryginalnego, które powinno uwzględniać najnowsze prace z dziedziny, której dotyczy artykuł.

Plik z pracą nie powinien przekraczać 25 stron, wliczając wykaz piśmiennictwa w przypadku krótkiego przeglądu, lub 100 stron, w przypadku monografii przeznaczonej do druku w „Bibliotece Wiadomości Chemicznych”. Strona powinna zawierać **1800** znaków (razem ze spacjami), co przy interlinii 1,5 oznacza 30 wierszy po 60 znaków oraz margines z prawej strony ok. 5 cm.

Na pierwszej stronie, pod tytułem polskim, należy umieścić tytuł w języku angielskim, nazwisko(a) i adres autora(ów) oraz spis rozdziałów. Dalej powinno się znaleźć obszerne streszczenie pracy w języku angielskim (do 2700 znaków, z cytowaniem piśmiennictwa i odsyłaczami do tabel i rysunków w tekście) oraz wykaz słów kluczowych, osobno w języku polskim i osobno w angielskim. Redakcja prosi o przysyłanie tekstów angielskich adjustowanych.

W oddzielnym pliku prosimy dołączyć krótką (do 150 wyrazów) **notkę biograficzną**, zawierającą tytuły naukowe i miejsca pracy oraz inne informacje wg uznania Autora/Autorów, w tym aktualne zdjęcie. Nadesłanie tych informacji będziemy traktować jako zgodę na ich publikację.

Rysunki mogą być kolorowe, ale wówczas należy liczyć się z dopłatą do druku. Muszą mieć odpowiednią formę graficzną, by w razie potrzeby nadawały się do reprodukcji. W osobnym pliku prosimy dołączyć podpisy pod rysunki w języku polskim i angielskim. Osobno należy dołączyć ponadto jeden komplet wzorów i schematów, narysowanych oddzielnie w formie nadającej się do reprodukcji. W wersji elektronicznej rysunki czarno-białe należy zapisać w formacie .doc, .cdr, .jpg, .tif, .pdf, natomiast rysunki kolorowe – w formacie .jpg lub .tif. Rozdzielczość rysunków ≥ 300 dpi. Każdy z rysunków zapisać w oddzielnym pliku.

Tabele należy ponumerować cyframi arabskimi, a ich tytuły w języku polskim i angielskim zapisać nad tabelami.

Piśmiennictwo należy zestawiać 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, przykład: J. Kowalski, *Wiad. Chem.*, 2007, **61**, 473. 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. Przed podjęciem decyzji wszystkie prace są przysyłane recenzentom.

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