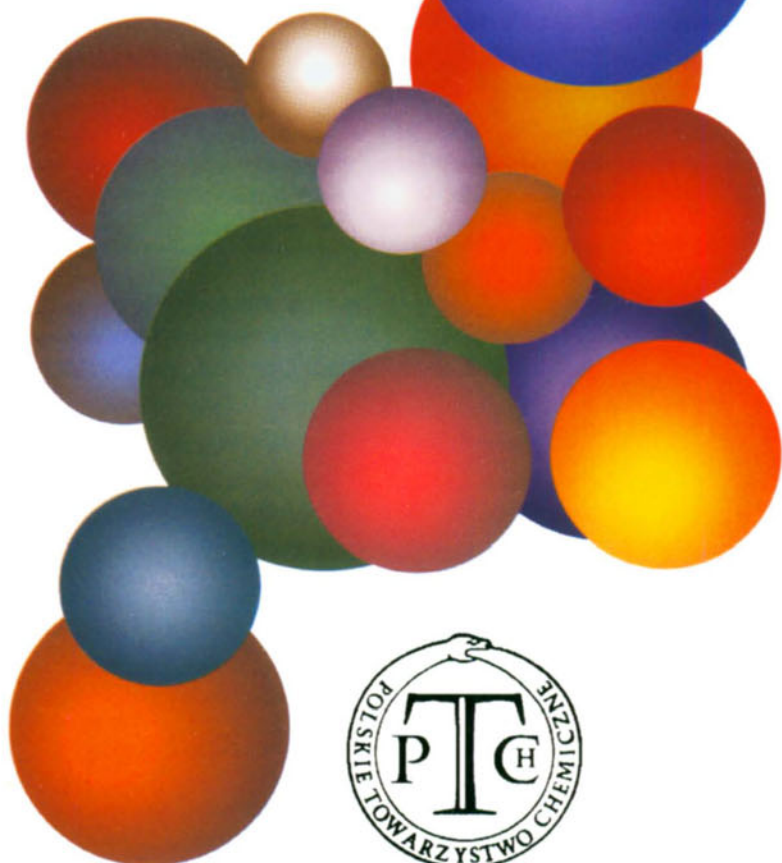


WIADOMOŚCI *chemiczne*



**SYNTEZA CHEMICZNA OLIGONUKLEOTYDÓW
NA FAZIE STAŁEJ.
MOŻLIWOŚCI I OGRANICZENIA
NOŚNIKÓW STAŁYCH**

**CHEMICAL SOLID-PHASE SYNTHESIS
OF OLIGONUCLEOTIDES.
POSSIBILITIES AND LIMITATIONS
OF SOLID-PHASE SUPPORTS**

Izabela Burzyńska-Pędziwiatr*, Lucyna Woźniak

*Zakład Biologii Strukturalnej, Katedra Endokrynologii Ogólnej
Uniwersytet Medyczny w Łodzi
ul. Żeligowskiego 7/9, 90-752 Łódź
e-mail: iza_burzynska@yahoo.com*

Abstract

Wstęp

1. Charakterystyka metody, zalety i ograniczenia
2. Stałe nośniki, linkery; 2.1. Funkcjonalizacja fazy stałej. Przyłączanie linkera i nukleotydu; 2.2. Linkery usuwane po syntezie; 2.3. Linkery labilne; 2.4. Linkery uniwersalne; 2.5. Linkery umożliwiające deprotekcję immobilizowanych produktów
3. Podstawy chemiczne; 3.1. Metoda amidofosforynowa; 3.2. Metoda H-fosfonianowa; 3.2.1. Wpływ poszczególnych parametrów na wydajność reakcji kondensacji w metodzie H-fosfonianowej

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane



Mgr Izabela Burzyńska-Pędziwiatr ukończyła chemię na Uniwersytecie Łódzkim w Katedrze Chemii Organicznej i Stosowanej. Pracę magisterską wykonała w pracowni Wirusologii Molekularnej i Chemii Biologicznej CBM PAN, w ramach umowy o współpracy naukowej i dydaktycznej pomiędzy UŁ i CBM PAN. Obecnie jest doktorantką w Zakładzie Biologii Strukturalnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Zainteresowania naukowe wiąże z chemią biologiczną i biologią molekularną.

Dr hab. Lucyna Woźniak, prof. UM, ukończyła Wydz. Chemiczny Politechniki Łódzkiej i podjęła pracę w Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi, gdzie uzyskała tytuł doktora n. chem. i dr. hab. Po stażu podoktorskim w Kings College London, w zespole prof. Colina B. Reesa, kontynuowała pracę w Zakładzie Chemii Bioorganicznej CBMM PAN. Obecnie jest Kierownikiem Zakładu Biologii Strukturalnej w Katedrze Endokrynologii Ogólnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

ABSTRACT

Synthesis of biopolymers (peptides, proteins and nucleic acids) has long been in the range of interest of numerous chemists. The primary structure of biomolecules consists of linear and repeating sequences of monomeric units (aminoacids, nucleic bases, sugars) in a specifically determined orientation. Therefore, chemical synthesis of biopolymers comprises a lot of identical, repetitive steps (condensation, chain elongation and purification).

Solid phase method is currently used also for the oligonucleotide [2, 3] (Figure 1) and oligosaccharide synthesis. There exist interesting applications of analogous approach to combinatorial synthesis of small molecules (Solid Phase Organic Chemistry – SPOC) [4, 5].

Automation of the phosphoramidite method of oligonucleotide synthesis process proposed by Caruthers [6] made an enormous impact on biological, medical and biotechnological sciences. It is beyond any doubt that this is the fastest and the most convenient method of oligonucleotide synthesis aimed at biological research. Solid phase synthesis has many advantages, however, it is not free of drawbacks either.

Depending on the synthesis method, various types of supports are used. An ideal support should have an appropriate and reactive chemical group on its surface, e.g. $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$, $-\text{COOH}$, by means of which it is connected to the linker and the first unit of the monomer. Surface functionalization of the solid phase determines the number of available reactive groups and characterizes support loading expressed in micromoles per gram.

Nucleosides are attached to the support by a linker, the choice of which depends on the reaction conditions. The linker arm must be designed in such a way that it is adjusted to the cleavage conditions and deprotection procedures.

Depending on the synthesis purpose and the type of a oligonucleotide, various linker arms are used. They include: linker arms cleaved after synthesis, labile linker arms, universal linkers [21, 22], and the linker arms for deprotection of the immobilized products [26, 27].

Among numerous methods of oligonucleotide synthesis, the phosphoramidite method is the most common. The phosphoramidite approach (Figure 10) allows for obtaining both natural DNA/RNA and plenty of modified analogs (phosphorothioates, phosphoroselenoates, triesters and others). Its alternative is the H-phosphonate method (Figure 11) [40–42]. Particular advantage of this method is that it can be used in the synthesis without protection of nucleobases.

Depending on its destination, the synthesis must be very carefully designed considering the strategy of group protection to make them stable under reaction conditions. A decision must be also made whether to use the phosphoramidite method or the H-phosphonate method taking also into account whether the product is to be immobilized on the support or not, which depends on expected results.

Keywords: oligonucleotide synthesis, phosphoramidite method, H-phosphonate method, supports, linkers

Słowa kluczowe: synteza oligonukleotydów, metoda amidofosforynowa, metoda H-fosfonianowa, złoża, linkery

WSTĘP

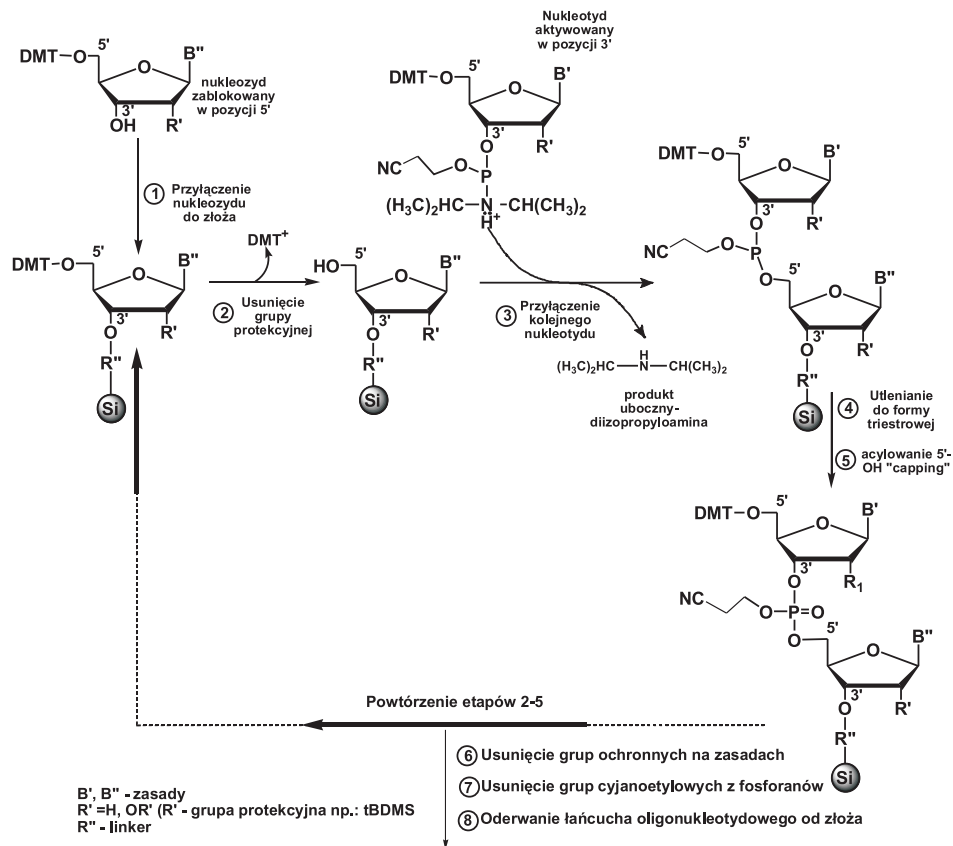
Synteza biopolimerów (peptydów, białek, kwasów nukleinowych) od dawna budziła zainteresowanie chemików. Pierwszorzędowa struktura tych biomolekuł składa się z liniowo ułożonych, powtarzających się sekwencji zasad nukleinowych w ściśle określonej orientacji. Chemiczna synteza biopolimerów obejmuje więc wiele powtarzających się etapów (kondensacja, wydłużanie łańcucha, oczyszczanie).

Przełomem w tej dziedzinie była synteza polipeptydów na stałym złożu polistyrenowym, opracowana przez Merrifielda [1], uhonorowana Nagrodą Nobla w 1984, w dziedzinie chemii.

Synteza na fazie stałej jest obecnie wykorzystywana również do syntezy oligonukleotydów [2, 3] (Schemat 1) i oligosacharydów. Ponadto, istnieją interesujące zastosowania tej metody do syntezy małych cząsteczek organicznych (ang. *Solid Phase Organic Chemistry*, SPOC) [4, 5].

Automatyzacja procesu syntezy oligonukleotydów metodą amidofosforynową, zaproponowana przez Caruthersa [6, 7], wywarła ogromny wpływ na postęp w naukach biologicznych, medycynie i biotechnologii. Jest to obecnie najszybszy sposób syntezy krótkich oligonukleotydów (od kilku do kilkudziesięciu nukleotydów), wykorzystywanych jako startery do amplifikacji i sekwencjonowania DNA oraz jako sondy hybrydazyjne [8]. Ponadto możliwość uzyskania znacznych ilości oligonukleotydów wskutek automatyzacji procesu ich syntezy sprawiła, że krótkie fragmenty DNA i RNA zaczęto z powodzeniem wykorzystywać w celu zahamowania syntezy niepożądanych białek (tzw. oligonukleotydy antysensowe i antygenowe oraz oligonukleotydy o właściwościach katalitycznych – rybozomy i deoksyrybozomy) [9] lub zmiany ich działania (tzw. oligonukleotydy o właściwościach aptamerów).

W prezentowanym opracowaniu pokazano aktualny stan wiedzy na temat możliwości i ograniczeń syntezy oligonukleotydów na fazie stałej, z uwzględnieniem specyfiki różnych złóż.



Schemat 1. Uproszczony schemat syntezy oligonukleotydów na fazie stałej.

Etapy 2–5 powtarzane są n razy, w celu otrzymania oligonukleotydu o zaplanowanej sekwencji

Figure 1. Simplified scheme of solid-phase oligonucleotide synthesis.

Steps 2–5 are repeated n -times to assemble oligonucleotide with a designed sequence

1. CHARAKTERYSTYKA METODY, ZALETY I OGRANICZENIA

W metodzie syntezy oligonukleotydów na stałym nośniku nierozpuszczalne podłoże jest kowalencyjnie połączone z jednym z końców syntetyzowanego łańcucha oligonukleotydowego, który jest dostępny dla reagentów znajdujących się w jego otoczeniu, w roztworze. Wydłużany produkt pozostaje kowalencyjnie związany z podłożem przez cały czas trwania syntezy. Aby zakończyć cykl syntezy (reakcja wydłużania łańcucha o jeden nukleotydy) i oddzielić produkt, nieprzereagowane reagenty należy usunąć (filtracja, a następnie przemyć złoże rozpuszczalnikiem) i wówczas podłoże z przyłączonym do niego produktem jest gotowe do następnego etapu. Końcowy produkt jest uwalniany w wyniku rozerwania wiązania kowalencyjnego z łącznikiem (linkerem).

W praktyce aby zminimalizować wpływ warunków zewnętrznych i zachować w pełni bezwodne środowisko reakcji taką syntezę przeprowadza się w szczelnie zamkniętych reaktorach lub kolumnach.

Istotnymi zaletami metody syntezy na stałym nośniku są:

- **łatwość oddzielania produktów** związanych ze złożem (immobilizowanych na złożu) od innych reagentów i produktów ubocznych,
- **automatyzacja metody** pozwalająca na duże zróżnicowanie skali syntezy (od 40 nmoli do 1 μ mola) [10], jak również na zastosowanie analogicznych reguł w stosunku do skali wielokilogramowej,
- **uniwersalność metody** umożliwiająca syntezę modyfikowanych oligonukleotydów, poprzez wprowadzanie różnych niestandardowych lub modyfikowanych zasad w monomerach lub modyfikację wiązań internukleotydowych [11, 12],
- **możliwość syntezy bibliotek oligonukleotydowych** [13, 14].

Jednak, oprócz wyżej wymienionych zalet, proces syntezy na podłożu stałym związany jest z szeregiem ograniczeń.

- Końcowa wydajność produktu spada wraz ze wzrostem liczby etapów. Dla pentanukleotydu – przy założeniu, że wydajność pojedynczego etapu przyłączenia wynosi 90% (0,9), obliczona sumaryczna wydajność wynosi: $0,9^4 \times 100\% = 66\%$, zgodnie z poniższym wzorem:

$$W_k = W^{n-1} \times 100\%,$$

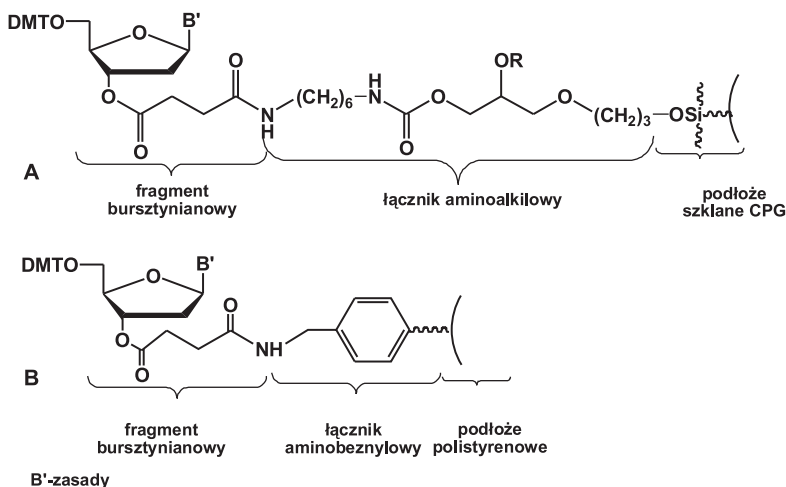
gdzie: W_k – wydajność końcowa syntezy, W – średnia wydajność pojedynczego przyłączenia, $(n-1)$ – liczba etapów, n – długość oligonukleotydu.

Warunkiem powodzenia syntezy jest zatem uzyskanie na wszystkich jej etapach wydajności bliskich 100%.

- Tworzenie nieprawidłowych (krótszych) sekwencji również wpływa na obniżenie wydajności całkowitej i zanieczyszczenie oczekiwanego produktu. Ich ilość można zminimalizować poprzez wprowadzenie etapu acylowania nieprzereagowanych funkcji hydroksylowych po każdym etapie wydłużania łańcucha (ang. *capping*).
- Niecałkowite odblokowanie oligonukleotydu oraz jego właściwości fizykochemiczne (tworzenie form ustrukturyzowanych, niska rozpuszczalność itp.) determinują wyizolowanie oligonukleotydu o pełnej długości (n).
- Trudne jest analizowanie produktów przyłączonych do złoża na każdym etapie reakcji, z wyjątkiem kontroli reakcji detrytylowania (metoda UV).

2. STAŁE NOŚNIKI

W zależności od metody syntezy, stosuje się różnego rodzaju złoza posiadające odpowiednią, reaktywną grupę chemiczną na powierzchni, np. $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$, $-\text{COOH}$, za pomocą której łączą się z linkerem (łącznikiem) i z pierwszą jednostką monomeru. Dostępność powierzchni nośnika (fazy stałej) dla reagentów jest czynnikiem decydującym o wyborze fazy stałej. Dodatkowymi czynnikami mającymi istotny wpływ na właściwości fazy stałej są: rozwinięta powierzchnia warunkująca dużą powierzchnię nośną, czynniki steryczne oraz prędkość dyfuzji przez pory.



Schemat 2. Struktura dwóch najczęściej stosowanych złoź wykorzystywanych w syntezie oligonukleotydów.

(A) LCAA-CPG. (B) Aminometylo-polistyren (niepęczniejący, wysoce usieciowany).

W obydwóch przypadkach nukleozyd jest połączony z grupą $-\text{NH}_2$ złoza za pomocą reszt bursztyninowych (Figure 2). The structure of the two most commonly used phases utilized in oligonucleotide synthesis.

(A) LCAA-CPG. (B) Aminomethyl polystyrene (nonswelling, highly cross-linked).

In both cases, a nucleoside is attached to the amino group $-\text{NH}_2$ of the support through the succinic acid linker

W syntezie niemodyfikowanych oligonukleotydów wykorzystuje się przeważnie fazy stałe o upakowaniu $\sim 40\text{--}300 \mu\text{mol/g}$ [15].

Łącznik zbudowany jest z dwóch oddzielnych fragmentów. Pierwszy stanowi reszta łącząca aktywne grupy ($-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$) z rdzeniem fazy stałej. Łącznikami są najczęściej kwasy dikarboxylowe (np. kwas bursztynowy) [16], które łączą nukleozyd z podłożem poprzez wiązanie estrowe i amidowe [17]. Drugi fragment stanowi dłuższy łańcuch alkilowy, alkiloaminowy (ang. *long-chain alkylamine CPG*, LCAA-CPG). Preferowane są dłuższe łańcuchy, które oddzielają terminalne grupy od powierzchni złoza (Schemat 2).

Większość linkerów wykazuje stabilność w warunkach kwasowych i ulega hydrolizie w warunkach silnie zasadowych, co umożliwia zastosowanie kombinacji

najbardziej popularnych grup ochronnych – kwasolabilnej 5'-dimetoksytrytylowej (DMT) do protekcji grupy 5'-OH, zasadolabilnych grup acylowych do protekcji grup egzoaminowych nukleozad i grupy β -cyjanoetylowej do protekcji funkcji fosforanowej.

Linkery powinny charakteryzować się szczególnie wysoką stabilnością w przypadku, kiedy usuwanie grup ochronnych oligonukleotydu ma miejsce przed ich oderwaniem od złoza, np. synteza immobilizowanych bibliotek oligonukleotydowych.

Poniżej scharakteryzowano podstawowe klasy faz stałych.

- **Złoza makroporowate** oparte są na żelach krzemionkowych, CPG (ang. *controlled pore glass*) lub wysoko usieciowanych polimerach (polistyren, polimetakrylany) i są handlowo dostępne w wielu różnych odmianach. Porowata struktura tych złozy pozostaje niezmienną i, dzięki rozwiniętej powierzchni, upakowanie złozy jest wysokie (40–100 $\mu\text{mol/g}$). Trwałość właściwości fizyko-chemicznych i mechanicznych przypomina złoza wykorzystywane w kolumnach HPLC i umożliwiają ich zastosowanie w kolumnach reakcyjnych o ciągłym przepływie. Jednak maksymalne upakowanie takich nośników jest znacznie mniejsze niż pęczniących faz stałych. Najpopularniejsze są obecnie złoza CPG funkcjonalizowane za pomocą różnych grup, ponieważ łatwo jest nimi operować, ze względu na jednorodną granulację i dużą trwałość mechaniczną. Powierzchnia i upakowanie zależy od rozmiarów porów, a złoza CPG o największej granulacji charakteryzują się najniższym upakowaniem. Najczęściej stosowane są złoza sfunkcjonalizowane LCAA-CPG, z porami o średnicy 500 Å i upakowaniu ok. 30–40 $\mu\text{mol/g}$, które umożliwiają syntezę oligonukleotydów o maksymalnej długości 50–60 nukleotydów.
- **Złoza w stanie ciekłym** są polimerami o wysokiej masie cząsteczkowej, które zawierają PEG (glikol polietylenowy) lub poli(*N*-akrylomorfolinę), są całkowicie rozpuszczalne w niektórych rozpuszczalnikach stosowanych podczas syntezy (dichlorometan, pirydyna, acetonitryl) i mogą być wytrącane w innych rozpuszczalnikach niż wyżej wymienione. W tym przypadku, reakcja wydłużania łańcucha oligonukleotydowego zachodzi w roztworze, a po jej zakończeniu złoze wraz z produktem jest wytrącane poprzez dodanie odpowiedniego rozpuszczalnika (alkohole, etery). Zaletą reakcji kondensacji w roztworze homogenicznym jest możliwość użycia mniejszych nadmiarów reagentów, co skutkuje obniżeniem kosztów syntezy, możliwością skalowania reakcji w dużym zakresie oraz możliwością wykorzystywania metod spektroskopowych (UV/VIS, NMR, IR) do monitorowania przebiegu reakcji. Takie rozwiązanie nie wymaga użycia skomplikowanej aparatury, ponieważ reakcje przeprowadza się w naczyniach szklanych. Wadą tej metody jest stosunkowo długi czas każdego cyklu. Niemniej jednak, jest ona odpowiednia do syntezy oligonukleotydów na większą skalę [18]. Z danych literaturowych wynika, że w praktyce stosuje się złoza PEG o stopniu upakowania dochodzącym do ok. 400 $\mu\text{mol/g}$ [18].

- **Złoże nieporowate** są sztywnymi nieporowatymi kulkami o upakowaniu ok. trzy razy mniejszym niż złoże porowate. Nieporowate CPG umożliwiają syntezę dłuższych oligonukleotydów z wysokimi wydajnościami. Te nośniki znalazły zastosowanie w syntezie oligonukleotydów immobilizowanych trwale na złożu, np. do tworzenia bibliotek kombinatorycznych. W tym przypadku, wymagana jest obecność stabilnych linkerów, które pozostają nienaruszone w warunkach usuwania wszystkich grup ochronnych po zakończeniu syntezy. Odblokowane oligonukleotydy immobilizowane na złożu są wykorzystywane jako sensory DNA.
- **Złoże szczepione** należą do hybrydowych faz stałych, których struktura zawiera: PS-PTFE (polistyren-politetrafluoroetylen) i PEG-PS (glikol polietylenowy-polistyren o zawartości około 70% PEG; nazwa handlowa tego złoża – TentaGel® [19]). Złoże te łączą zalety złożeń żelowych i złożeń sztywnych porowatych. Powierzchnia złoża jest łatwo „rozpuszczalna” i nie jest usieciowana, podczas gdy sztywny rdzeń pozostaje nierozpuszczalny. Złoże te mogą być stosowane w kolumnach przepływowych, ponieważ są sztywne i nie wykazują właściwości pęcznienia. Często są wykorzystywane w syntezie oligonukleotydów na skalę przemysłową, szczególnie w połączeniu z uniwersalnymi łącznikami, umożliwiającymi syntezę od pierwszej zasady, która każdorazowo jest wprowadzana na złoże w trakcie syntezy. **Eliminuje to konieczność przygotowywania złożeń sfunkcjonalizowanych różnymi nukleozydami.**
- **Polimerowe złoże o konsystencji żelu** zawierają polistyren – diwinylobenzen, poliakrylamid i są usieciowane tylko w 1–5%. Posiadają zdolność wielokrotnego zwiększania swej objętości w rozpuszczalnikach niepolarnych (np. dichlorometan). Tego typu fazy stałe nie znalazły szerokiego zastosowania w syntezie oligonukleotydów (nie pęcznieją w rozpuszczalnikach polarnych wykorzystywanych w tych reakcjach), natomiast są wykorzystywane z powodzeniem w syntezie peptydów.

2.1. FUNKCJONALIZACJA FAZY STAŁEJ. PRZYŁĄCZANIE LINKERA I NUKLEOZYDU

Nukleozydy są połączone ze złożem linkerem, którego dobór jest uzależniony od warunków reakcji. Łącznik powinien być tak zaprojektowany, aby był dostosowany do warunków odcięcia i usuwania grup ochronnych, z możliwością zastosowania kilku kombinacji:

- 1) odcięcia od złoża z następującą deprotekcją,
- 2) deprotekcji immobilizowanych produktów i ewentualnego odcięcia od złoża,
- 3) deprotekcji immobilizowanych produktów bez następującego odcięcia
- 4) odcinania łączników od złoża w innym miejscu niż 3'-końcowa grupa hydroksylowa i wprowadzanie modyfikacji na 3' końcu otrzymanego oligonukleotydu.

2.2. LINKERY USUWANE PO SYNTEZIE

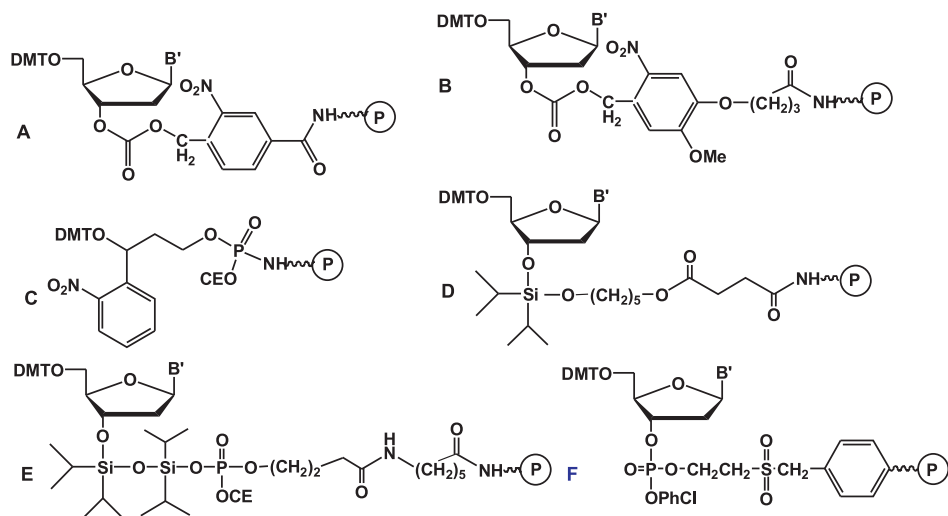
Obecnie najczęściej stosowanym łącznikiem jest kwas bursztynowy. Jest on wykorzystywany już od ponad 30 lat, ze względu na niskie koszty, łatwość wprowadzania i wysoką wydajność usuwania w warunkach zasadowych. Odpowiednio zablokowany nukleozyd może być poddawany reakcji bursztynylowania zarówno na końcu 3', jak i 5', a otrzymany 3'- lub 5'-*O*-hemibursztynian reaguje z grupą aminową lub hydroksylową złoza. Reakcje kondensacji nukleozydu z bursztynianem lub ze złoziem są aktywowane za pomocą dicykloheksylokarbodiimidu (DCC), 1-(3-dimetyloaminopropyl)etylokarbodiimidu (DEC), lub diizopropylkarbodiimidu (DIPCC) [20].

Po zakończeniu syntezy oligonukleotydów na nośniku z łącznikiem bursztynylowym, zablokowane produkty są odcinane od złoza, w wyniku zasadowej hydrolizy wiązania estrowego, z użyciem stężonego wodnego roztworu amoniaku. Zastosowanie metyloaminy lub wodorotlenku sodu z amoniakiem skraca czas przebiegu hydrolizy, ale powoduje wzrost niebezpieczeństwa pojawienia się reakcji ubocznych, w tym głównie modyfikacji cytozyny i, w konsekwencji, może zachodzić alkilaminowanie lub deaminacja.

2.3. LINKERY LABILNE

Linkery labilne są usuwane w łagodniejszych warunkach niż linker bursztynylowy. Szczególną grupę stanowią linkery fotolabilne z grupą nitrobenzylową [21] (Schemat 3 A–C), wykorzystywane w syntezie oligonukleotydów z końcowymi grupami 3'-hydroksylowymi (Schemat 3A i B), 3'-fosforanowymi (Schemat 3C) lub innymi 3'-terminalnymi modyfikacjami. Reakcją uboczną fotolitycznego odcięcia oligonukleotydu od złoza jest dimeryzacja tyminy (< 3%). W kolejnym etapie konieczne jest usunięcie grup ochronnych funkcji egzoaminowych w warunkach alkalicznych.

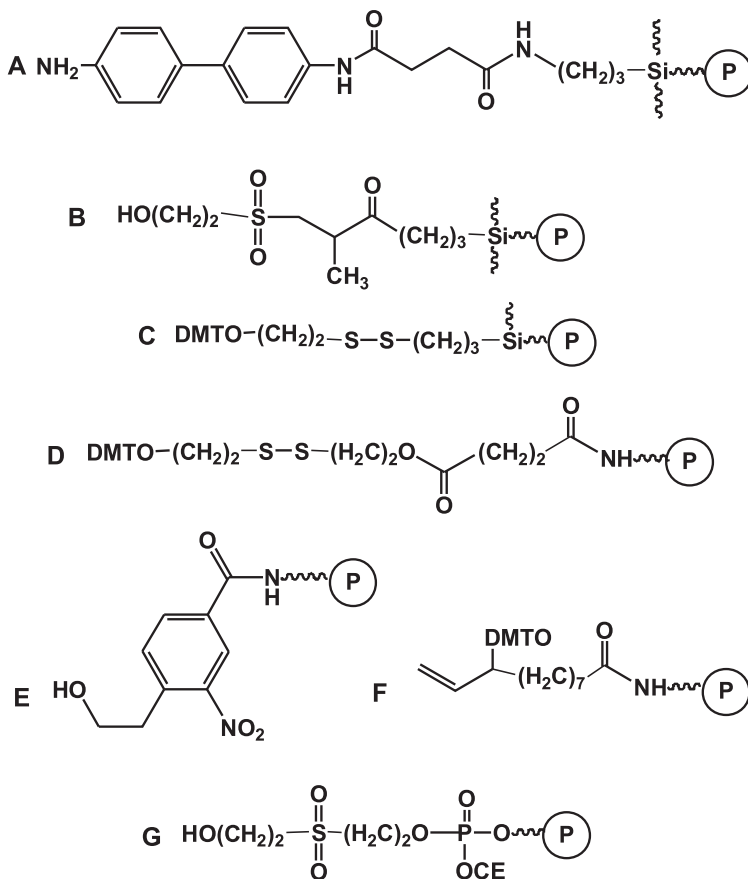
Na uwagę zasługują łączniki labilne, usuwane w łagodnych, nienukleofilowych warunkach i w środowisku obojętnym za pomocą jonu fluorkowego. Linkery te zawierają grupę silylową lub disiloksanową (Schemat 3D i E). Do syntezy oligonukleotydów z 3'-fosforylowanym końcem najczęściej stosowany jest linker benzylosulfonyloetanolowy (Schemat 3F), który ulega hydrolizie w obecności trietyloaminy [15, 22].



Schemat 3. Struktura wybranych labilnych linkerów
Figure 3. The structure of selected labile linkers

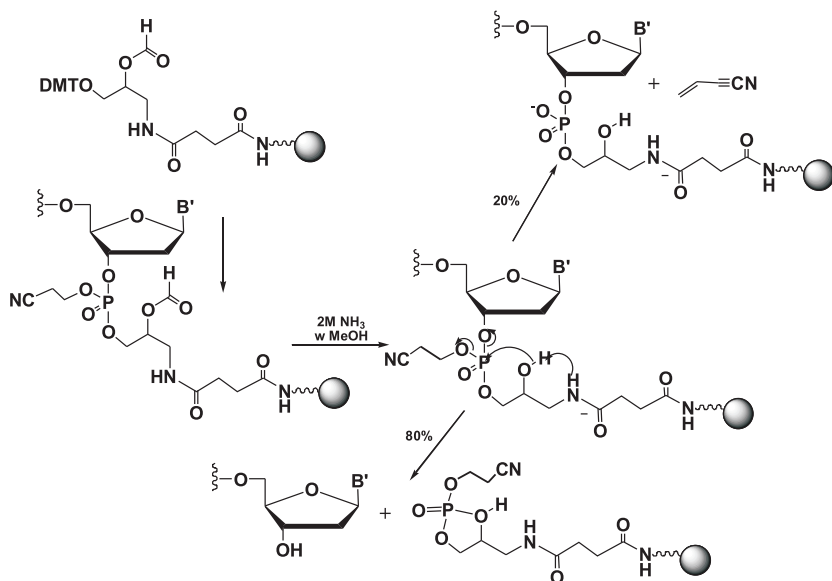
2.4. LINKERY UNIWERSALNE

Łączniki omówione powyżej są wykorzystywane do syntezy oligonukleotydów, w której przyłączenie pierwszego monomeru stanowi oddzielny etap przygotowania złoza (ze względu na zastosowane reakcje chemiczne i długie czasy kondensacji). Dostępne są również złoza uniwersalne, w których przyłączenie pierwszego nukleotydu stanowi etap protokołu zautomatyzowanej syntezy. Uniwersalne linkery (Schemat 4) stosuje się przede wszystkim w syntezie oligonukleotydów, które w swojej sekwencji zawierają modyfikowane zasady. Zaprojektowano łączniki uniwersalne, umożliwiające syntezę oligonukleotydów z końcami 3'-fosforanowymi, z wykorzystaniem zarówno funkcji hydroksylowych, jak i aminowych (Schemat 4A-F). Amido-fosforyn sulfonylodietylowy, zazwyczaj stosowany do 5'-fosforylacji, może być również użyty w syntezie 3'-fosforylowanych sekwencji oligonukleotydów na złożu sfunkcjonalizowanym grupami hydroksylowymi lub aminowymi (Schemat 4G).



Schemat 4. Struktury wybranych linkerów uniwersalnych
 Figure 4. The structure of selected universal linkers

Interesującą alternatywą są złoza uniwersalne, zaproponowane przez Azhayaeva [23, 24] (Schemat 5), a oparte na wykorzystaniu różnic kinetycznych reakcji solwolizy wewnątrzcząsteczkowej i międzycząsteczkowej, prowadzące do powstania cyklicznego fosforanu P(V), w rezultacie wewnątrzcząsteczkowego ataku sąsiadującej grupy hydroksylowej na atom fosforu wiązania internukleotydogo.

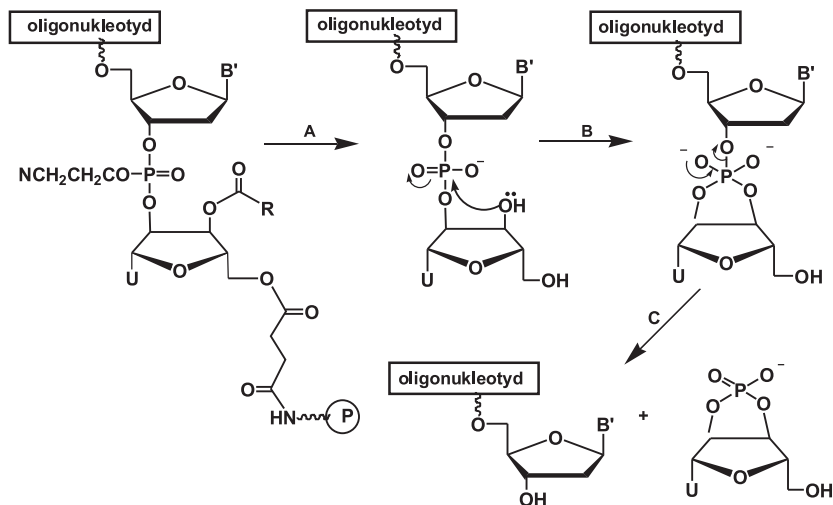


Schemat 5. Złoże uniwersalne zaproponowane przez Azhayeve

Figure 5. Universal support proposed by Azhayeve

Wprowadzenie pojedynczego rybonukleozydu z inwersją orientacji pierścienia cukrowego (związanego z podłożem poprzez grupę 5'-OH) pozwala również na wykorzystanie zróżnicowanej trwałości hydrolytycznej internukleotydydowych wiązań fosfodiesterowych w 2'-deoksynukleotydach i 2'-rybonukleotydach i umożliwia selektywne odcięcie od złoża w pozycji zawierającej rybonukleozyd.

Mechanizm odcięcia od złoża uniwersalnego (Schemat 6) opiera się na sekwencji reakcji deacylacji grupy 2'-OH rybonukleozydu (urydyny) oraz jednoczesnej β -eliminacji akrylonitrylu (odblokowanie grupy fosfodiesterowej). Atak grupy 2'-OH na atom fosforu grupy fosfodiesterowej prowadzi do utworzenia cyklicznego pentakoordynacyjnego 2',3'-fosforanu P(V), który ulega hydrolizie z rozerwaniem wiązania fosfor-tlen i utworzeniem oligonukleotydu z wolnym końcem 3'-OH, oraz cyklicznego 2',3'-fosforanu. W ten sposób wydłużanie łańcucha zachodzi od końca 2' (lub 3'), a nie od końca 5', co umożliwi usunięcie terminalnej grupy fosforanowej na drodze mechanizmu wewnątrzcząsteczkowej substytucji nukleofilowej (Schemat 6) [25–27].



Schemat 6. Mechanizm odszczepienia terminalnego fosforanu w złożach uniwersalnych.

- (A) Odblokowanie grupy 2'-hydroksylowej (hydroliza) i funkcji fosfodiesterowej (β -eliminacja).
 (B) Atak grupy 2'-hydroksylowej na fosfor grupy fosfodiesterowej z utworzeniem pentakoordynacyjnego cyklicznego 2',3'-fosforanu. (C) Hydroliza pentakoordynacyjnego fosforanu z utworzeniem 3'-OH oligonukleotydu i cyklicznego 2',3'-fosforanu urydyny

Figure 6. Mechanism of terminal phosphate cleavage in universal supports.

- (A) Deprotection of 2'-hydroxyl group (hydrolysis) and phosphodiester group (β -elimination).
 (B) Attack of the 2'-hydroxyl group at phosphorus atom of phosphodiester group with a formation of pentacoordinate 2',3'-cyclic phosphodiester. (C) Hydrolysis of pentacoordinate phosphorus atom with formation of 3'-OH oligonucleotide and 2',3'-cyclic uridine phosphate

Opisaną powyżej koncepcję zastosowano z powodzeniem dla monomerów urydyny, związanych z CPG poprzez linker 5'-bursztynylowy (Schemat 6). Synteza oligonukleotydów z wykorzystaniem 3'-amidofosforynów przebiega standardowo od końca 2' lub 3' grupy hydroksylowej linkera urydynowego. Odcięcie oligonukleotydu od złoża obejmuje dwa etapy: etap hydrolizy linkera bursztynylowego (w celu odcięcia produktu od złoża) i etap tworzenia terminalnego cyklicznego 2',3'-fosforanu urydyny, który jest etapem limitującym szybkość reakcji i może przebiegać jednocześnie z usuwaniem grup ochronnych. Reakcje hydrolizy i odblokowania zachodzą w standardowych warunkach.

Ustalono, że szybkość odblokowania zależy od nukleozydu połączonego z 3'-urydyną i maleje w następującej kolejności: rybonukleozydy > dA, dG > T > dC [25].

Istnieje szereg wariantów złożów z łącznikiem uniwersalnym, w tym również wykorzystujących połączenie rybonukleozydu poprzez pozycję N^4 cytozyny z następującym wydłużaniem łańcucha od grupy 3'-fosforanowej lub połączenie ze złożem dinukleotydu.

Linkerami uniwersalnymi nie muszą być wyłącznie rybonukleozydy o odwrotnym ułożeniu pierścienia cukrowego. Mogą nimi być również inne ugrupowania (np. amidowe, peptydowe). Warunkiem koniecznym jest obecność zablokowanej

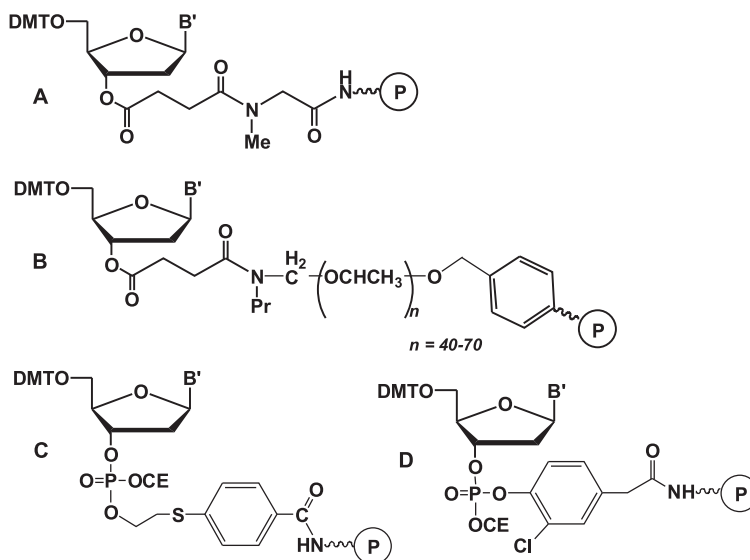
grupy funkcyjnej, która po odblokowaniu stanowi wewnątrzcząsteczkową asystę nukleofilową, umożliwiającą odcięcie od złoża w łagodnych warunkach.

2.5. LINKERY UMOŻLIWIĄCE DEPROTEKCJĘ IMMOBILIZOWANYCH PRODUKTÓW

Na uwagę zasługują złoża z linkerem trwałym w warunkach zasadowej hydrolyzy, pozwalającym na usuwanie grup ochronnych bez odcinania produktów od złoża. Do tej grupy łączników należą linkery tiofosforanowe i tioeterowe.

Złoża z łącznikiem bursztynianowym połączonym przez *N*-metyloglicynę (sarkozyna), *bis*-1,6-dimetyloaminoheksan lub glikol *N*-propylopolietylenowy (Schemat 7A–D), odporne na działanie silnych zasad, w tym DBU, znalazły zastosowanie m.in. w syntezie modyfikowanych oligonukleotydów, a także P-chiralnych analogów tiofosforanowych metodą oksatiafosfolanową [28, 29].

W przypadku tego typu złożeń, wykorzystuje się często grupy ochronne umożliwiające deprotekcję na kolumnie, w tym: 9-fluorenylometoksykarbonylową (Fmoc) oraz 2-(4-nitrofenylo)etoksykarbonylową (NPE) [30, 31].



Schemat 7. Linkery odporne na silnie zasadowe warunki reakcji kondensacji lub umożliwiające deprotekcję produktów bez ich odcięcie od złoża
Figure 7. Linkers resistant to strong base conditions of condensation and enabling deprotection of products without cleavage from a support

Interesującym rozwiązaniem są złoża z łącznikami fosfodiesterowymi lub amidofosforanowymi, które powstają poprzez bezpośrednią kondensację amidofosforanów z odpowiednimi grupami hydroksylowymi lub aminowymi, znajdującymi się na powierzchni złoża [32–34].

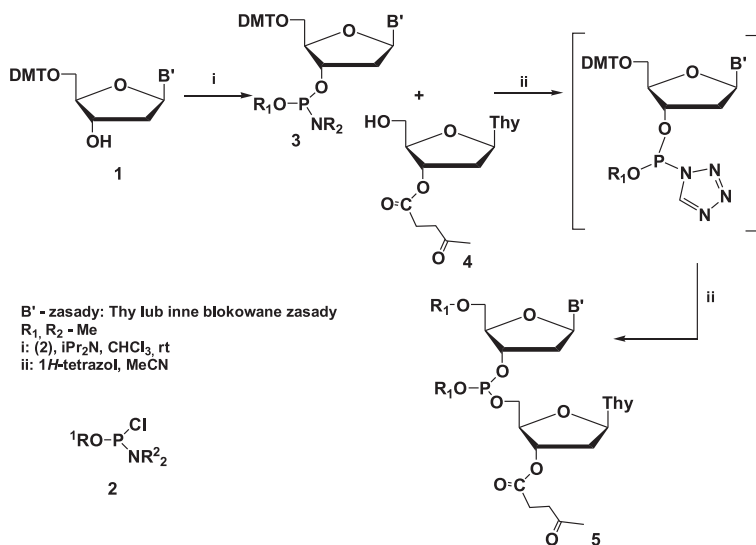
Ostatnie doniesienia literaturowe wskazują na możliwość bezpośredniego połączenia amidofosforanów z grupami silanolowymi na powierzchni płytek szklanych [35].

Synteza oligonukleotydów immobilizowanych na złożu znalazła zastosowanie w tworzeniu bibliotek oligonukleotydów, które otrzymuje się w sposób synchronizowany na filtrach lub membranach, lub płytkach szklanych [36].

3. PODSTAWY CHEMICZNE

3.1. METODA AMIDOFOSFORYNOWA

Caruthers i współpracownicy opisali reakcję fosfitylacji 5'-*O*-DMT-tymidyny **1** lub 5'-*O*-DMT-*N*-acylowanych pochodnych innych 2'-deoksynukleozydów za pomocą chloro-*N,N*-diizopropylamidofosforynu **2**, w wyniku której powstawały odpowiednie amidofosforyny nukleozydów **3** (Schemat 8). Fosfitylacja 3'-lewulinylotymidyny **4** za pomocą amidofosforynu **3**, w obecności 1*H*-tetrazolu (kwasowy katalizator), prowadziła do powstania zablokowanego dinukleozydo(3',5')-amidofosforynu **5** z bardzo dobrą wydajnością (> 90%) i dała początek metodzie amidofosforynowej [6, 7, 37].

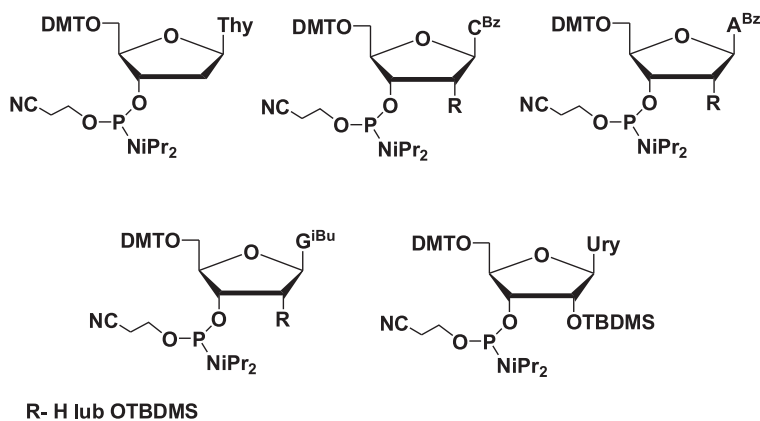


Schemat 8. Synteza dinukleozydo (3',5') fosforynu β-cyanoetylowego metodą Caruthersa [37]

Figure 8. Formation of dinucleoside (3',5') phosphite by Caruthers [37]

Intensywne badania nad doбором odpowiednich grup ochronnych oraz optymalizacją warunków reakcji doprowadziły do wykorzystania tej metody w zautomatyzowanej syntezie oligonukleotydów na fazie stałej.

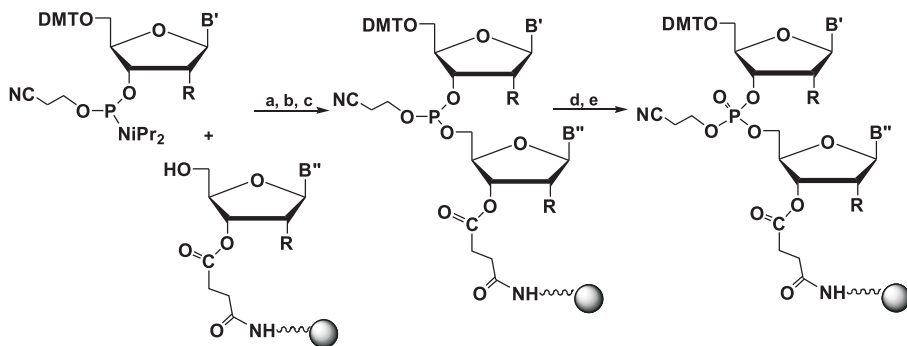
Standardowe 3'-O-amidofosforyny nukleozydów są obecnie dostępne handlowo (Schemat 9), a opracowane szczegółowe protokoły mogą być wykorzystane zarówno do syntez standardowych, jak i do syntezy oligonukleotydów modyfikowanych [15].



Schemat 9. Handlowo dostępne standardowe amidofosforyny 2'-deoksy- i 2'-rybonukleozydów
Figure 9. Commercially available standard phosphoramidites of 2'-deoxy- and 2'-ribonucleosides

Synteza oligonukleotydów metodą amidofosforynową obejmuje wiele powtarzających się etapów (Schemat 10):

- (a) detytlację, prowadzoną w roztworze 3% kwasu dichlorooctowego (DCA) w chlorku metylenu,
- (b) kondensację: reakcja pomiędzy amidofosforynami nukleozydów a nukleozydem (lub nukleotydam) immobilizowanym na fazie stałej w obecności aktywatora kwasowego, np. 1*H*-tetrazolu. W przypadku syntezy RNA, najczęściej stosowany jest 5-etylotio-1*H*-tetrazol lub 1-(3-nitro-fenilo)-1*H*-tetrazol.
- (c) zablokowanie nieprzereagowanych funkcji 5'-hydroksylowych poprzez acylowanie (ang. *capping*), za pomocą bezwodnika kwasu octowego, prowadzone po każdym etapie kondensacji,
- (d) utlenianie, prowadzone po każdym etapie wydłużania łańcucha, w układzie I₂/H₂O/Py, w THF. W warunkach niestandardowych, jako odczynnik utleniający może być zastosowany wodoronadtlenek *t*-butylowy.
- (e) odcięcie od złoża i usunięcie zasadolabilnych grup ochronnych, w stężonym wodnym roztworze amoniaku lub w bezwodnym nasyconym roztworze amoniaku w metanolu.



Schemat 10. Synteza oligonukleotydów metodą amidofosforyną
 Figure 10. Synthesis of oligonucleotides by the phosphoramidite method

W przypadku syntezy RNA, istnieje konieczność zablokowania funkcji 2'-hydroksylowych [38], ze względu na możliwość migracji wiązania internukleotydo-owego między pozycjami 2' i 3' pierścienia cukrowego oraz rozerwania wiązania internukleotydo-owego, w wyniku ataku grupy 2'-OH na fosfor wiązania fosfodiestrowego i fosfortriestrowego. Bardzo istotny jest dobór odpowiedniej grupy blokującej pozycję 2'-OH tak, aby grupa ochronna pozycji 2'-OH była stabilna podczas trwania syntezy i podczas deprotekcji wiązania internukleotydo-owego i mogła być usunięta jako ostatnia. W przeciwnym razie, istnieje niebezpieczeństwo powstawania krótszych fragmentów oligonukleotydowych, w wyniku rozerwania wiązania internukleotydo-owego, które nastąpiło wskutek aktywności nukleofilowej grupy 2'-OH w reakcji podstawienia na centrum fosforowym i hydrolizie utworzonego produktu przejściowego. Najczęściej stosowaną grupą blokującą jest grupa *t*-butylo-dimetylo-sililowa (TBDMS), którą usuwa się za pomocą jonów fluorkowych (np. stosując trifluorowodorek trietyloamoniowy, $\text{Et}_3\text{N}\cdot 3\text{HF}$). Znane są również inne grupy protekcyjne pozycji 2'-OH, np. grupa 1-(2-fluorofenyl)-4-metoksypiperidyn-4-ylowa (Fmp) lub tetrahydropiranylowa (Thp), które są usuwane w warunkach kwasowych.

Pozycja 5'-OH jest najczęściej blokowana grupą dimetoksytrytylową (DMT), której istotną zaletą jest łatwość usuwania w warunkach kwasowych. Kolejną korzyścią użycia grupy DMT jest możliwość monitorowania reakcji detrytylacji spektrofotometrycznie i, w konsekwencji, kontrolowania wydajności kondensacji. Analogiczne właściwości posiada grupa 9-fenyl-ksanten-9-ylowa (Px) [39].

Grupy zasadowolabilne są usuwane podczas odcinania otrzymanego oligonukleotydu od złoża. W tym samym czasie jest usuwana również grupa 2-cyanoetylowa z wiązania internukleotydo-owego.

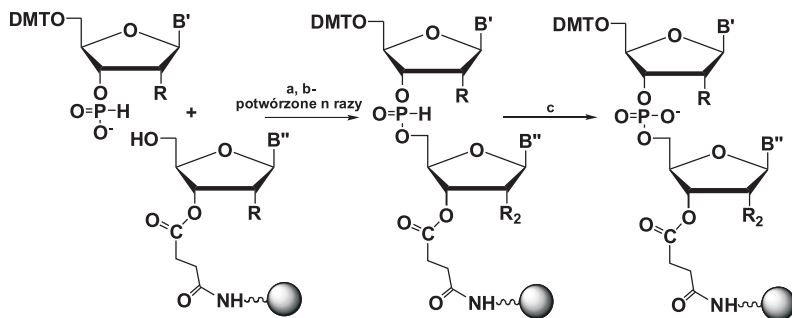
3.2. METODA H-FOSFONIANOWA W SYNTEZIE OLIGONUKLEOTYDÓW NA FAZIE STAŁEJ

Metoda amidofosforynowa jest najczęściej stosowana w syntezie oligonukleotydów na fazie stałej. Jej alternatywę stanowi metoda H-fosfonianowa, która została po raz pierwszy zastosowana do syntezy dinukleotydów przez Todda i in., którzy w 1952 r. opisali reakcję tworzenia diestrów H-fosfonianowych w wyniku kondensacji monoestrów H-fosfonianowych z zablokowanymi nukleozydami w obecności chlorofosforynu difenylowego [40].

Trzydzieści lat później metoda H-fosfonianowa została udoskonalona i wykorzystana w syntezie oligonukleotydów na fazie stałej [41–43]. Istotną zaletą metody H-fosfonianowej jest możliwość syntezy oligonukleotydów bez konieczności blokowania funkcji egzoaminowych zasad [44, 45].

Przebieg etapów syntezy, przedstawiony na Schemacie 11, obejmuje:

- (a) **detrytylację**, za pomocą 3,5% kwasu dichlorooctowego (DCA) w 1,2-dichloroetanie (DCE) w przypadku syntezy DNA; w syntezie RNA przeprowadza się ją za pomocą 1% kwasu trifluorooctowego (TFA) w DCE,
- (b) **kondensację** monoestru H-fosfonianowego z nukleozydem, w obecności odczynnika kondensującego, najczęściej w mieszaninie pirydyny i acetonitrylu (1:3, v/v). Spośród wielu odczynników kondensujących, powszechnie stosowany jest chlorek piwaloilu (Pv-Cl), chlorek adamantoilu [46] lub, rzadziej inne odczynniki, np. *bis*(pentafluorofenyl)węglan [47]. Z uwagi na fakt, że chlorek adamantoilu jest ciałem stałym, wykazuje mniejszą podatność na hydrolizę niż chlorek piwaloilu, który powinien być destylowany bezpośrednio przed każdą syntezą,
- (c) **utlenianie** prowadzone w celu przekształcenia internukleotydowych wiązań H-fosfonianowych (P III) w fosfodiestrowe lub w wiązania modyfikowane innymi atomami, np. atomami siarki - tiofosforany lub atomami selenu – selenofosforany (Schemat 11). Utlenianie zachodzi w ostatnim, pojedynczym etapie, po zakończeniu syntezy pożądanego sekwencji oligonukleotydu. Odczynnikiem utleniającym jest najczęściej roztwór jodu (2%) w wodnym roztworze pirydyny (2% wody) [48, 49] lub w wodnym roztworze innej zasady (np. trietyloamina, *N*-metyloimidazol) [50]. W przypadku gdy utlenianie nie przebiegnie do końca, podczas odcinania produktu (oligonukleotydu) od złoza następuje degradacja łańcucha w miejscach internukleotydowych wiązań H-fosfonianowych. W rezultacie tworzą się krótsze łańcuchy oligonukleotydowe, których obecność obniża wydajność całkowitą syntezy.



Schemat 11. Synteza oligonukleotydów metodą H-fosfonianową.

Etapy a, b są powtarzane n razy w zależności od zaplanowanej długości

Figure 11. Synthesis of oligonucleotides according to the H-phosphonate method.

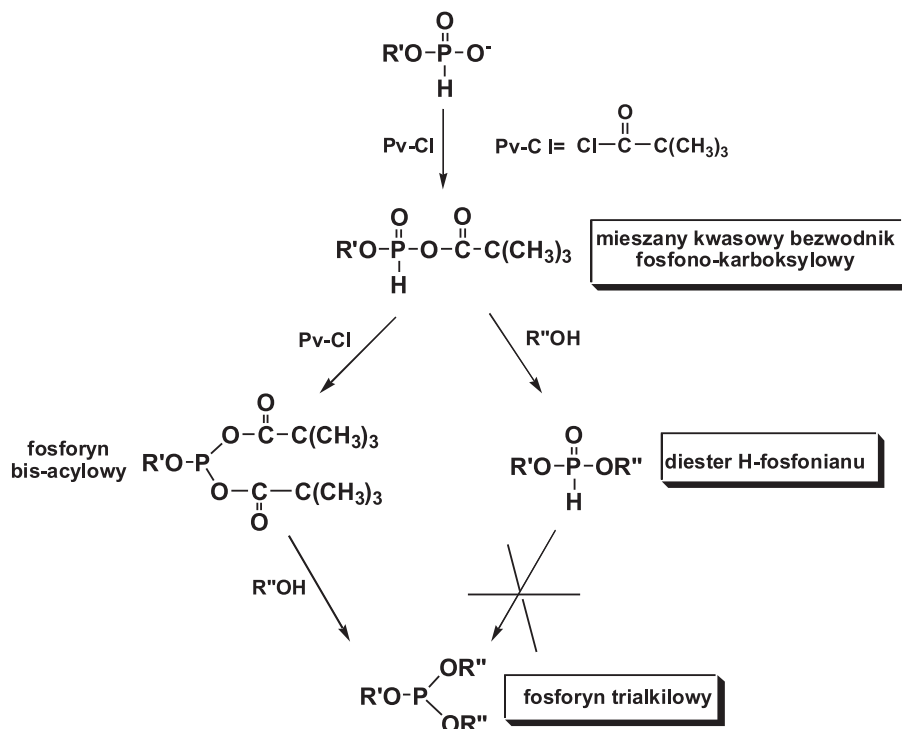
Steps a and b are repeated n times depending on the designed length of oligonucleotide

- (d) Odcięcie otrzymanego oligonukleotydu od złoża w warunkach zasadowych (steżony roztwór amoniaku), które zachodzi z równoczesnym odblokowaniem grup zasadolabilnych, jeśli użyte były monomery z zablokowanymi grupami egzaminowymi.

Metodę H-fosfonianową wykorzystano z powodzeniem do tworzenia bibliotek oligonukleotydów [51] oraz do syntezy analogów oligonukleotydów m.in. amidofosforanów [52], tiofosforanów [53].

3.2.1. Wpływ poszczególnych parametrów na wydajność reakcji kondensacji w metodzie H-fosfonianowej

W reakcji kondensacji zachodzi aktywacja H-fosfonianu pod wpływem odczynnika kondensującego (Schemat 12) i tworzy się mieszany bezwodnik fosfonokarboksylowy, który reaguje z grupą 5'-OH nukleozydu (oligonukleotydu) z utworzeniem diestru H-fosfonianowego [54, 55]. Kolejność dodawania reagentów jest istotna dla wydajnego powstawania diestru H-fosfonianu. Szczegółowe badania mechanizmu wykazały, że odczynnik kondensujący musi być dodawany do roztworu zawierającego zarówno nukleozyd, jak i H-fosfonian. Jeżeli H-fosfonian jest aktywowany przed dodaniem alkoholu, zachodzą reakcje uboczne, m.in. tworzenie bezwodników *bis*-acylowych, *P*-acylowanie i *O*-acylowanie. Ważne jest również zachowanie odpowiedniej stechiometrii, co pozwala na zminimalizowanie ilości powstałych produktów ubocznych.



Schemat 12. Mechanizm aktywacji monoestru H-fosfonianu.

R' – zablokowany nukleozyd w pozycji 3', R'' – zablokowany nukleozyd w pozycji 5' [53]

Figure 12. Activation mechanism of H-phosphonate monoesters. R' – protected nucleoside-3'-yl;

R'' – protected nucleoside-5'-yl [53]

Kolejnym istotnym czynnikiem wpływającym na przebieg reakcji kondensacji jest rozpuszczalnik. W wyniku aktywacji monoestru H-fosfonianu bez obecności zasady (np. pirydyna), uzyskuje się monoaktywowane pochodne, mieszane bezwodniki fosfonokarboksyłowe (Schemat 12) [53]. Zamiana pirydyny na inne, mniej zasadowe rozpuszczalniki, np. chinolinę [56] lub podstawione pochodne pirydyny [55] minimalizuje w znacznym stopniu obecność reakcji konkurencyjnych (powstawanie bezwodników *bis*-acylowych).

Metoda H-fosfonianowa znalazła również zastosowanie w syntezie RNA. Etapy syntezy dla RNA są analogiczne jak dla DNA, z tą różnicą, że w przypadku RNA należy blokować funkcję 2'-OH. Najczęściej stosowaną grupą protekcyjną jest grupa TBDBS – *t*-butylo-dimetylosililowa (podobnie jak w metodzie amidofosforynowej). Mogą być stosowane także inne grupy ochronne, jak: fotolabilna – *o*-nitrobenzylowa, kwasolabilna (np. 4-metoksytetrahydropiran-4-yłowa) (Mthp) lub zasadolabilna: benzoilowa. Problemy związane z występowaniem reakcji konkurencyjnych są znacznie zminimalizowane w przypadku syntezy RNA. Wykazano m.in., że obecność wicynalnej w stosunku do wiązania internukleotydowego, zablokowanej grupy

2'-OH minimalizuje ryzyko zajęcia *P*-acylowania. Reakcje zachodzą z podobną szybkością jak w przypadku DNA, pomimo zawady przestrzennej, którą stanowi zablokowana grupa 2'-OH.

Metoda H-fosfonianowa posiada wiele zalet. Zakończeniem syntezy w metodzie H-fosfonianowej jest utlenienie nietrwałych H-fosfonianów. Uzyskane oligonukleotydy w postaci diestrów charakteryzują się znaczną trwałością i, immobilizowane na złożu, mogą być przechowywane w temperaturze -20°C przez dłuższy okres przed odcięciem od złoża i usunięciem grup zasadolabilnych *N*-acylowych. W metodzie tej wykorzystuje się stosunkowo tanie odczynniki kondensujące.

PODSUMOWANIE

Od końca lat 90. trwa bardzo dynamiczny rozwój metod syntezy prowadzonych na stałych nośnikach. Istniejące obecnie metody umożliwiają syntezę w zależności od oczekiwań stawianych danej metodzie preparatywnej (skala procesu, wprowadzane modyfikacje itp.) oraz pozwalają za pomocą handlowo dostępnych odczynników otrzymać oligonukleotydy lub ich analogi w postaci wolnej lub immobilizowane na złożach, w skali zróżnicowanej od submikromolowej (PCR) do skali wielokilogramowej (badania kliniczne). Celem niniejszego przeglądu była charakterystyka różnorodnych złożów, stosowanych w syntezie na fazie stałej. W zależności od wykorzystania tych złożów, syntezę należy bardzo szczegółowo zaplanować, uwzględniając strategię grup ochronnych tak, aby były one trwałe w warunkach reakcji. Należy również podjąć decyzję, czy zastosować metodę amidofosforynową, czy H-fosfonianową. Ponadto należy wziąć pod uwagę to, czy produkt syntezy na fazie stałej powinien być immobilizowany na złożu. Dostępne obecnie metody syntezy oraz dostępne typy linkerów pozwalają na precyzyjne uwzględnienie wymogów modyfikacji, różnorodnych zastosowań produktów oraz skali preparatyki.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] R.B. Merrifield, *Science*, 1965, **150**, 178.
- [2] S. Sun, A. Yoshida, J.A. Piccirilli, *RNA*, 1997, **3**, 1352.
- [3] S.A. Scaringe, *Methods*, 2001, **23**, 206.
- [4] J.S. Fruchtel, G. Jung, *Angew. Chem. Intl. Ed. Engl.*, 1996, **35**, 17.
- [5] J.A. Porco, T. Deegan, W. Devonport, O.W. Gooding, K. Heisler, J.W. Labadine, B. Newcomb, C. Nguyen, P. van Eikeren, J. Wong, P. Wright, *Mol. Divers.*, 1997, **2**, 197.
- [6] M.D. Matteucci, M.H. Caruthers, *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, **103**, 3185.
- [7] S.L. Beaucage, M.H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.*, 1981, **22**, 1859.
- [8] L. Stryer, *Biochemia*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2005, Wydanie III zmienione.
- [9] E. Wickstrom (ed.), *Clinical trials of genetic therapy with antisense DNA and RNA vectors*, New York, Marcel Dekker, Inc. 1998.

- [10] W.E. Rapp, [w:] *Combinatorial Chemistry: Synthesis and Application*, (S.R. Wilson and A.W. Czarnik, eds.), str. 65–93, John Wiley & Sons, New York.
- [11] W.J. Stec, *Stereocontrolled synthesis of P-chiral oligoribonucleotides, Antisense Research and applications*, S.T. Crooke, B. Lebleu (ed.) CRC Press, 1993, 251.
- [12] L.A. Woźniak, M. Janicka, M. Bukowiecka-Matusiak, *Europ. J. Org. Chem.*, 2005, **12**, 5189.
- [13] R. Frank, W. Heikens, Heisterberg – G. Moutsis, H. Bloker, *Nucleic Acids Res.*, 1983, **13**, 4365.
- [14] J. Ott, F. Eckstein, *Nucl. Acids Res.*, 1984, **12**, 9137.
- [15] S.L. Beaucage, D.E. Bergstrom, P. Herdewijn, A. Matsuda, *Current Protocols*, [w:] *Nucleic Acid Chemistry*, Wiley & Sons, Inc. N. York, 2005
- [16] R.T. Pon, N. Usman, K.K. Ogilvie, *Biotechniques*, 1988, **6**, 768.
- [17] M.J. Damha, P.A. Giannaris, S.V. Zabarylo, *Nucleic Acids Res.*, 1990, **18**, 3813.
- [18] G.M. Bonora, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1995, **54**, 17.
- [19] W.E. Rapp, 1996, [w:] *Combinatorial Peptide and Non-Peptide Libraries: A Handbook*, (G. Jung, ed.), ss. 425–464. VCH, Weinheim.
- [20] F.X. Montserrat, A. Grandas, E. Pedroso, *Nucleos. Nucleot.*, 1994, **12**, 967.
- [21] M.M. Greenberg, J.L. Gilmore, *J. Org. Chem.*, 1994, **59**, 746.
- [22] R. Schwyzler, E. Felder, P. Failli, *Helv. Chim. Acta*, 1984, **67**, 1316.
- [23] A.V. Azhayev, *Tetrahedron*, 1999, **55**, 787.
- [24] A.V. Azhayev, M.L. Antopolsky, *Tetrahedron*, 2001, **57**, 4977.
- [25] G.R. Gough, M. J. Brunden, P. T. Gilham, *Tetrahedron Lett.*, 1983, **24**, 5321.
- [26] R. Cosstick, F. Eckstein, *Biochemistry*, 1985, **24**, 3630.
- [27] J.S. Debear, J. A. Hayes, M. P. Koleck, G. R. Gough, *Nucleos. Nucleot.*, 1987, **6**, 821.
- [28] W.J. Stec, A. Grajkowski, M. Koziolkiewicz, B. Uznański, *Nucleic Acid Res.*, 1991, **19**, 5883.
- [29] W.J. Stec, A. Grajkowski, A. Kobyłańska, B. Karwowski, M. Koziolkiewicz, K. Misiura, A. Okruszek, A. Wilk, P. Guga, M. Boczkowska, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 12019.
- [30] K.P. Stengle, W. Pfeleiderer, *Tetrahedron. Lett.*, 1990, **31**, 2549.
- [31] J. Weiler, W. Pfeleiderer, *Nucleos. Nucleot.*, 1995, **14**, 917.
- [32] R.S. Matson, J.B. Rampa, P.J. Coassin, *Anal. Biochem.*, 1994, **217**, 306.
- [33] R.S. Matson, J.B. Rampa, S.L. Jr. Pentoney, P.D. Anderson, P.J. Coassin, *Anal. Biochem.*, 1995, **224**, 110.
- [34] M.S. Weinert, R.S. Matson, J.B. Rampa, P.J. Coassin, C.T. Caskey, *Nucleic Acids Res.*, 1994, **22**, 1701.
- [35] G. Cohen, J. Deutsch, J. Fineberg, A. Levine, *Nucleic Acids Res.*, 1997, **25**, 911.
- [36] W.T. Markiewicz, K. Adrych-Rozek, K. Markiewicz, A. Zebrowska, A. Astriab, [w:] *Innovation and Perspectives In Solid Phase Synthesis: peptides, proteins and nucleic acids: biological and biomedical applications*, (R. Epton, ed.), 1994, ss. 339–346. Mayflower Worldwide, Birmingham.
- [37] L. McBride, M.H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.*, 1983, **24**, 5843.
- [38] C.B. Reese, *Org. Biomol. Chem.*, 2005, **3**, 3851.
- [39] J.B. Chattopadhyaya, C.B. Reese, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1978, 639.
- [40] N.S. Corby, G.W. Kelner, A.R. Todd, *J. Chem. Soc.*, 1952, 3669.
- [41] P.J. Garegg, T. Regberg, J. Stawiński, R. Strömberg, *Chem. Scr.*, 1985, **25**, 280.
- [42] P.J. Garegg, T. Regberg, J. Stawiński, R. Strömberg, *Chem. Scr.*, 1986, **26**, 59.
- [43] J. Stawiński, R. Strömberg, *Meth. Mol. Biol.*, 2005, **288**, 81.
- [44] T. Wada, Y. Sato, F. Honda, S. Kawahara, M. Sekine, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 12710.
- [45] P.P. Kung, R.A. Jones, *Tetrahedron Lett.*, 1992, **33**, 5869.
- [46] A. Andrus, J.W. Efcavitch, L.J. McBride, B. Giusti, *Tetrahedron Lett.*, 1988, **29**, 861.
- [47] V.A. Effimov, A.L. Kalinkina, O.G. Chakhmakhcheva, *Nucleic Acids Res.*, 1993, **21**, 5337.

- [48] P.J. Garegg, I. Lindh, T. Regberg, J. Stawiński, R. Strömberg, C. Henrichson, *Tetrahedron Lett.*, 1986, **27**, 4051.
- [49] P.J. Garegg, I. Lindh, T. Regberg, J. Stawiński, R. Strömberg, C. Henrichson, *Tetrahedron Lett.*, 1986, **27**, 4055.
- [50] B.C. Froehler, M.D. Matteucci, *Tetrahedron Lett.*, 1986, **27**, 469.
- [51] H. Seliger, R. Rösch, *DNA Cell Biol.*, 1990, **9**, 691.
- [52] B.C. Froehler, *Tetrahedron Lett.*, 1986, **27**, 5575.
- [53] S. Agrawal, J.Y. Tang, *Tetrahedron Lett.*, 1990, **31**, 7541.
- [54] P.J. Garegg, T., Regberg, T. Stawiński, R. Strömberg, *Nucleos. Nucleot.*, 1987, **6**, 655.
- [55] S. Sigurdsson, R. Strömberg, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 2002, **2**, 1682.
- [56] V.A. Effimov, I.Y. Dubey, *Bioorg. Khim.*, 1990, **16**, 211.

Praca wpłynęła do Redakcji 16 kwietnia 2008

**CHARAKTERYSTYKA STATERYNY –
BIAŁKA ŚLINY ZAANGAŻOWANEGO
W UTRZYMYWANIE HOMEOSTAZY JAMY USTNEJ**

PROFILE OF STATHERIN – SALIVARY PROTEIN
INVOLVED IN HOMEOSTASIS IN ORAL CAVITY

**Dominika Jackiewicz-Barańska, Elżbieta Kamysz,
Zbigniew Maćkiewicz**

*Wydział Chemii, Zakład Chemii Polipeptydów, Uniwersytet Gdański
ul. J. Sobieskiego 18/19, 80-952 Gdańsk*

Abstract

Wprowadzenie

1. Budowa stateryny i jej właściwości
2. Powstawanie stateryny. Gen dla stateryny
3. Pochodne stateryny
4. Funkcje białka

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

Mgr inż. Dominika Jackiewicz-Barańska – urodziła się w 1977 roku w Gdańsku. W latach 1996–2001 studiowała chemię na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. W 2001 roku uzyskała tytuł magistra chemii. W 1999 roku rozpoczęła dodatkowe studia inżynierskie na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej. W roku 2002 uzyskała tytuł inżyniera na kierunku Biotechnologia. Obecnie jest słuchaczką Studium Doktoranckiego na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, w Zakładzie Chemii Polipeptydów, gdzie pod kierunkiem prof. dr hab. Zbigniewa Maćkiewicza pracuje nad badaniem trwałości i syntezą wybranych białek śliny.

Dr Elżbieta Kamysz – urodziła się w 1971 roku w Szczuczynie. W latach 1990–1995 studiowała na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego na kierunku Chemia. W roku 1995 obroniła pracę magisterską pt. „Synteza analogów fragmentu 144-152 proteiny p24^(gag) wirusa HIV-1 wiążących się z białkami głównego układu zgodności tkankowej MHC”. W tym samym roku rozpoczęła naukę na Studium Doktoranckim na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. W 2000 roku obroniła pracę doktorską pt. „Wpływ wybranych modyfikacji cząsteczek hormonów neuroprzysadkowych na ich czynność biologiczną”. W roku 1999 podjęła pracę w Zakładzie Chemii Polipeptydów Uniwersytetu Gdańskiego, gdzie pracuje do chwili obecnej. Zajmuje się syntezą oraz badaniem trwałości wybranych peptydów oraz polipeptydów wchodzących w skład śliny: stateryn, histatyn, białek bogatych w prolinę. Ponadto prowadzi prace dotyczące syntezy i badania właściwości przeciwdrobnoustrojowych peptydów.

Prof. dr hab. Zbigniew Maćkiewicz – kierownik Zakładu Chemii Polipeptydów w Katedrze Syntezy Organicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego – zajmuje się syntezą w roztworze i na nośniku stałym polipeptydów stosowanych w badaniach immunologicznych. Główne kierunki pracy zespołu to: syntezy, badania immunogenności fragmentów antygenów wirusa zapalenia wątroby typu B (HBV) oraz C (HCV) i wykorzystanie ich do opracowywania testów diagnostycznych na wykrywanie WZW typu B i C. W ostatnich latach zespół prof. Maćkiewicza zajmuje się otrzymywaniem peptydów biologicznie czynnych i ich oddziaływaniem z kationami metali ciężkich (Cu^{2+} , Zn^{2+}) oraz chemiczną syntezą fragmentów parathormonu (PTH) i wybranych fragmentów ludzkich białek szoku termicznego (Hsp). Nowe kierunki badań to białka śliny m.in. stateryna, jej analogi, krótsze warianty i wybrane fragmenty, histatyny i inne. Synteza stateryny, jej fragmentów i wybranych analogów posłużyła do opracowania testu na ilościowe oznaczenie macierzystego polipeptydu w ślinie. Prof. dr hab. Zbigniew Maćkiewicz jest autorem i współautorem 99 publikacji oraz ponad 200 komunikatów, wypromował 7 doktorów, 4 następne prace doktorskie w przygotowaniu.

ABSTRACT

Saliva is a gel resembling liquid, that acts almost as an organic tissue [1]. Saliva influences oral health through its non-specific physico-chemical properties [2]. It is composed of secretions from parotid, submandibular and sublingual glands, and smaller contributions come from minor salivary glands (e.g. palatal and labial). Saliva contains a number of proteins and polypeptides [2]. One of them is statherin a multi-functional 43-amino acid residue phosphominioprotein, containing vicinal phosphoserines at 2 and 3 positions and seven residues of tyrosine (Fig. 1) [7]. The relevant structural feature of statherin is N-terminal helix segment connected to a long poly-L-proline type II segment, which is followed by a short extended structure [14]. The gene for statherin is believed to be a single-copy gene and has been mapped to human chromosome 4q11-13 [20].

The statherin variants are SV1, SV2 and SV3 which comprise approx. 30% of the statherin family (Fig. 6). The ratios of statherin : SV1 and SV2 : SV3 are in both cases approx. 3 : 1. Statherin and SV2 are products of two different transcripts found in each of the major salivary gland. The variants SV1 and SV3 are derived by post-translational processing of statherin and SV2 [22].

Statherin is a multifunctional molecule that shows a high affinity for calcium phosphate minerals such as hydroxyapatite. It takes part in the calcium and phosphate transport during secretion in the salivary glands, is responsible for the protection and recalcification of tooth enamel, promotes selective initial bacterial colonization of enamel, and functions as a boundary lubricant on the enamel surface [38, 39]. Statherin levels of concentration in saliva could be in relation with the precancerous and cancerous lesions of the oral cavity [38].

The understanding of a profile and role of statherin has become important in medicine as the peptide could play a protective effect in oral cavity. However, the role and the functions of this peptide are still not well-know [38].

Keywords: saliva, salivary proteins, statherin, oral cavity

Słowa kluczowe: ślina, białka ślinowe, stateryna, jama ustna

WPROWADZENIE

Ślina jest złożonym płynem, podobnym do żelu, który działa niemal jak tkanka organizmu [1]. Dzięki swoim właściwościom fizycznym i chemicznym, wpływa na środowisko jamy ustnej, odgrywając istotną rolę w utrzymaniu i ochronie jej zdrowia [2].

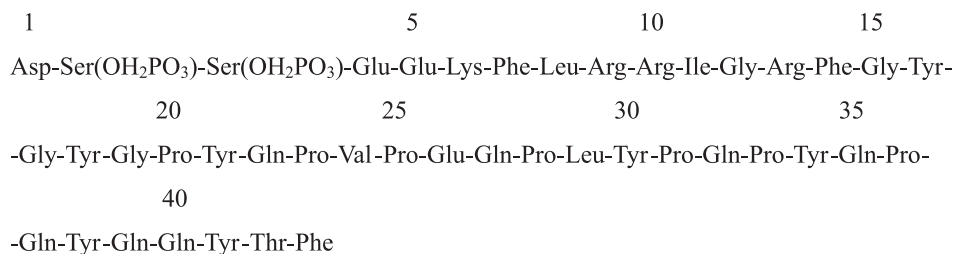
Głównymi komponentami śliny są: woda, elektrolity, lipidy oraz proteiny. Ślina ludzka zawiera białka ślinowe i peptydy składające się z ponad 1000 różnych składników. Obecnie żadna nowoczesna, analityczna technika użyta pojedynczo nie jest w stanie wykryć i zanalizować wszystkich komponentów białek ludzkiej śliny.

Biorąc pod uwagę właściwości fizyko-chemiczne białek występujących w ślinie ludzkiej, można je pogrupować w następujące rodziny. Są to białka bogate w prolinę (ang. *proline-rich proteins*, PRPs), które dzielą się na grupę białek kwasowych (aPRPs), zasadowych (bPRPs) oraz zasadowych glikozylowanych (G-PRPs). Kolejną rodziną są cystatyny, histatyny oraz stateryny. Wymienione peptydy wraz z małymi peptydami, o specyficznej sekwencji, zajmują wagowo 75% ogólnej liczby białek ślinowych. Resztę stanowi amylaza ślinowa (ok. 20%), mucyny, enzymy oraz proteiny wiążące wapń [3].

Jednym z ważniejszych białek śliny jest stateryna. Stateryna jest biologicznie czynną fosfoproteiną, wytwarzaną przez gruczoły ślinowe i wydzielaną wraz ze śliną do jamy ustnej. Jest białkiem, które wykazuje wysokie powinowactwo do hydroksyapatytu (HAP), wchodzi w reakcję z niektórymi bakteriami i grzybami, a także silnie hamuje pierwotną i wtórną precypitację (wytrącanie) soli wapniowo-fosforanowych. Ponadto może funkcjonować jako smar graniczny na powierzchni szkliwa zębów, zmniejszając ich obciążenie podczas aktu żucia, ułatwiając w ten sposób poślizg powierzchniom zębowym [4–6]. Stateryna wraz z innymi proteinami obecnymi w ślinie ludzkiej bierze udział w tworzeniu środowiska przyjaznego jamie ustnej, niezbędnego do utrzymania prawidłowej homeostazy.

1. BUDOWA STATERYNY I JEJ WŁAŚCIWOŚCI

Stateryna jest 43-aminokwasowym polipeptydem o masie cząsteczkowej 5380 Da i następującej strukturze pierwszorzędowej (Rys. 1) [7]:

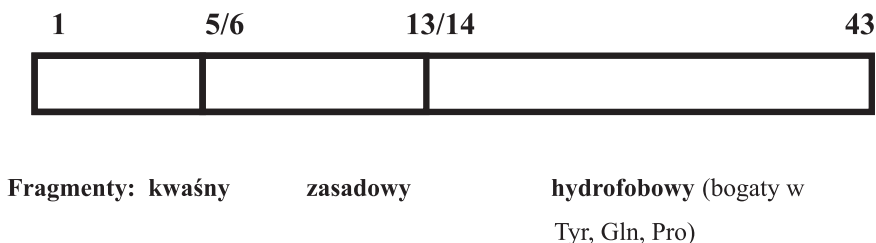


Rysunek 1. Struktura pierwszorzędowa stateryny [7]

Figure 1. Primary structure of statherin [7]

Sekwencja aminokwasowa stateryny została w pełni określona przez Schlesinger i Haya w roku 1977 [7], przy czym natywną staterynę Hay wyizolował ze śliny ludzkiej i częściowo scharakteryzował wcześniej, tj. w roku 1970 [8]. Skład aminokwasowy N-końcowej części natywnej cząsteczki stateryny określono za pomocą techniki automatycznej degradacji Edmana. Poli-peptyd był również poddany trawieniu chymotrypsyną, trypsyną, i proteazą *Staphylococcus aureus*. Otrzymane w ten sposób krótkie fragmenty peptydowe, po oczyszczeniu, poddano manualnej degradacji Edmana. Dzięki temu ustalono sekwencję aminokwasową aż do przedostatniej, C-końcowej reszty aminokwasowej. Te analizy, łącznie z trawieniem karboksypeptydazą natywnej stateryny i jej fragmentów peptydowych, zakończyły się ustaleniem kompletnej sekwencji cząsteczki. Ustalono m. in., iż dwie reszty seryny (w pozycji 2 i 3) poprzez grupy hydroksylowe są związane kowalencyjnie (wiązanie estrowe) z resztami kwasu fosforowego(V) [7]. Zdaniem niektórych autorów, za fosforylację stateryny w strukturze ślinianek odpowiedzialne są kinazy białkowe [9, 10]. Nam i in. [11] scharakteryzowali i wyizolowali kinazę białkową ślinianki podjęzykowej, która zdolna jest fosforylować kwaśne białka śliny bogate w prolinę. Ponadto w strukturze cząsteczki stateryny można zauważyć dużą zawartość reszt L-proliny, L-glutaminy i L-tyrozyny, które stanowią ponad 50% wszystkich reszt aminokwasowych. Inną cechą jest duża powtarzalność sekwencji w C-końcowej części stateryny (dwie trzecie cząsteczki). Są to następujące sekwencje: czterokrotnie powtórzona -Gln-Pro-, dwukrotnie powtórzona, przylegające do siebie -Gly-Tyr- oraz trzykrotnie -Tyr-Gln- i dwukrotnie powtórzona sekwencja tetrapeptydowa -Pro-Tyr-Gln-Pro-. Kontrastują one silnie z sekwencjami dipeptydowymi, ulokowanymi w N-końcowej części cząsteczki stateryny, które są złożone z dwóch takich samych, naładowanych reszt aminokwasowych: -Glu-Glu-, -Arg-Arg-, -Ser(P)-Ser(P)- [7]. Natywna stateryna ma charakter kwaśny, a jej punkt izoelektryczny znajduje się w pH równym 4,2. Analizując budowę cząsteczki stateryny można zauważyć, iż wysoko polarny charakter ma 1/3 cząsteczki od jej N-końca (reszty od 1 do 15). Znajdujące się w tym obszarze dziesięć polarnych reszt aminokwasowych wykazuje ładunek ujemny (5 reszt) oraz dodatni (4 reszty). Pozostałe 2/3 cząsteczki ma właściwości hydrofobowe, gdyż zawiera większość obojętnych reszt aminokwasowych. Dodatkowo

w C-końcowej części cząsteczki znajdują się wszystkie L-tyrozyny, L-proliny i L-glutaminy (Rys. 2) [7, 12, 13].



Rysunek 2. Fragmenty stateriny według Schlesingera i Haya [7], Lamkina i in. [12], Schwartzta i in. [13]
Figure 2. Statherin fragments by Schlesinger & Haya [7], Lamkina et al. [12], Schwartzta et al. [13]

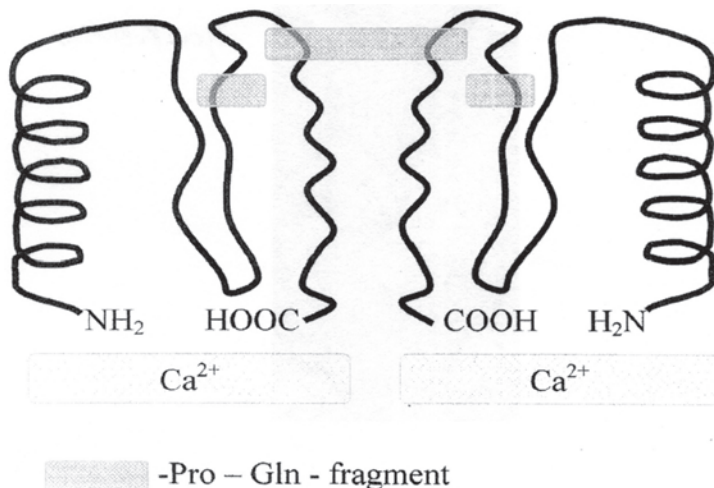
W cząsteczce stateriny można wyodrębnić różne motywy strukturalne. Raj i in. [6] badając staterynę metodą dichroizmu kołowego (CD) stwierdzili, że N-końcowy fragment cząsteczki tj. (Asp¹-Gly¹⁵-) tworzy amfipatyczną α -helisę z resztami hydrofobowymi i hydrofilowymi, znajdującymi się po przeciwnych stronach helisy. Uzyskane wyniki zostały również potwierdzone metodą spektroskopii NMR [14].

C-końcowy fragment cząsteczki (-Pro³⁶-Phe⁴³-) przyjmuje strukturę helisy typu 3_{10} [15], natomiast środkowy (-Pro²⁰-Pro³⁶-) strukturę helikalną typu poli-L-proliny. W rezultacie amfipatyczna α -helisa oddziałuje z częścią helisy poli-L-proliny, powodując, iż reszty hydrofobowe w pozycjach 7, 8, 11 i 14 są oddzielone od środowiska wodnego [14]. Analiza widm dichroizmu kołowego wykazała, że zawartość struktury helikalnej w natywnej cząsteczce wynosi zaledwie 15%, podobnie jak w przypadku syntetycznej stateriny ok. 18–20%. Natomiast w 50% roztworze trifluoroetanolu (TFE) zawartość struktury helikalnej wzrasta do ok. 25%, co wskazuje na istnienie fragmentów amfipatycznych w cząsteczce. Na podkreślenie zasługuje również fakt, iż zawartość struktury helikalnej ulega bardzo nieznacznym zmianom przy różnym stężeniu jonów wodorowych (pH) oraz jonów wapnia [14]. Ponadto jakakolwiek zmiana ujemnego ładunku w N-końcowym fragmencie (1-15) cząsteczki stateriny powoduje obniżenie jej tendencji do przyjmowania ustalonej struktury helikalnej, a w rezultacie spadek stabilności konformacyjnej. Natomiast usunięcie czterech pierwszych (1-4) ujemnie naładowanych reszt aminokwasowych powoduje całkowity zanik stabilności konformacyjnej i ustalonej struktury helikalnej [14].

Konformacja stateriny ulega również zmianom w zależności od tego, czy znajduje się w roztworze czy też jest zaadsorbowana na powierzchni szkliva zęba (Rys. 3, 4) [14]. W modelu ludzkiej, natywnej stateriny w roztworze wszystkie ujemnie naładowane reszty z N-końcowego fragmentu stateriny oraz Glu²⁶ i C-końcowa Phe⁴³ zgromadzone są razem w przestrzeni [14].

Natomiast atomy tlenu grup fosforanowych i hydroksylowych są tak usytuowane w przestrzeni, iż mogą maksymalnie oddziaływać z jonami wapnia, które na powierzchni hydroksyapatytu są oddalone od siebie o 5,4 Å. Biorąc pod uwagę gromadze-

nie się ujemnych ładunków w przestrzeni, a także zdolność dwóch cząsteczek stateryny do formowania dimerów w poprzek wydłużonej struktury na C-końcu, można wyjaśnić proces hamowania pierwotnej precypitacji (wytrącania) soli wapniowo fosforanowych. Dimer dwóch cząsteczek stateryny, połączony z powierzchnią szklivią zęba (Rys. 3) zawiera skupione N-końcowe ujemnie naładowane grupy, które są całkowicie wyeksponowane dla wiązania się z jądrem wapniowym, ale miejsca potencjalnej adhezji bakterii są zamaskowane [14].

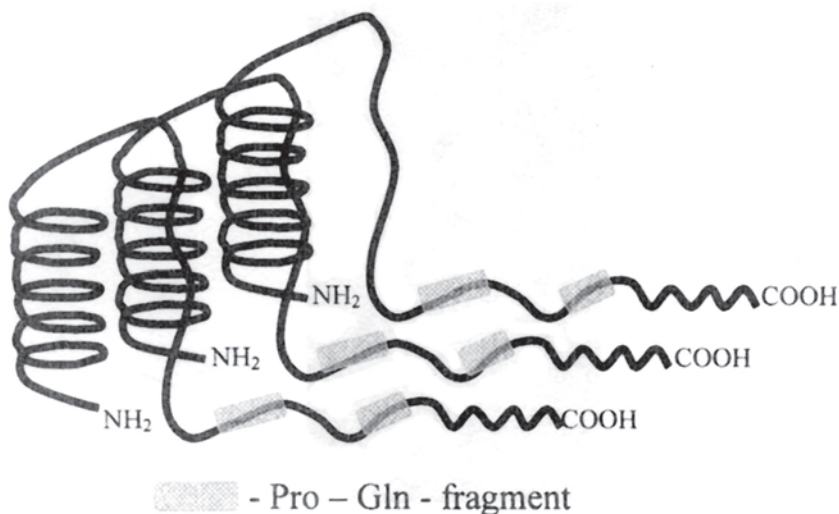


Rysunek 3. Model cząsteczki stateryny w roztworze [14]

Figure 3. Model of statherin molecule in solution [14]

W przedstawionym modelu kotwicą trzymającą jony wapnia narastających zarodków krystalizacji w roztworze lub na powierzchni szklivią jest reszta Glu²⁶ oddalona od polarnego N-końca stateryny, która przy udziale C-końcowego fragmentu Tyr³⁸-Phe⁴³ może odpowiadać za funkcję mineralizacyjną stateryny w jamie ustnej [14].

Cząsteczki stateryny charakteryzują się wysokim powinowactwem do hydroksyapatytu. W momencie, gdy następuje adsorpcja cząsteczek stateryny z roztworu na powierzchnię hydroksyapatytu, ulegają one częściowemu rozfałdowaniu. Taka zmiana konformacji jest korzystna termodynamicznie, gdyż między C-końcowymi resztami L-tyrozyny i/lub L-glutminy tworzą się wiązania wodorowe. W wyniku rozfałdowania wyeksponowane zostają potencjalne miejsca wiążące dla bakterii (kryptoty), które w przypadku występującej konformacji w roztworze, są zamaskowane. Najczęściej są to C-końcowe segmenty -Pro-Gln-, które są rozpoznawane przez adhezyny bakteryjne [16]. N-końcowy fragment stateryny (Asp¹-Glu²⁶) służy do zakotwiczenia cząsteczki na HAP, podczas gdy C-końcowy segment może być dość elastyczny, zwiększając stabilność cząsteczki przez oddziaływanie z powierzchnią HAP (Rys. 4).



Rysunek 4. Model cząsteczki stateryny na powierzchni szkliwa [14]

Figure 4. Model of statherin molecule on enamel surface [14]

Przedstawione modele struktury stateryny w roztworze i na powierzchni hydroksyapatytu (Rys. 3, 4) wyjaśniają funkcjonowanie jej jako smaru granicznego i jako czynnika promującego adhezję bakterii.

Model przedstawiony na Rysunku 3 jest konformacją dimerów cząsteczek stateryny w roztworze, w której miejsca bakteryjnego rozpoznawania są maskowane przez pofałdowanie struktury. Podczas wiązania się stateryny z roztworu do powierzchni szkliwa, może nastąpić jej częściowe rozfałdowanie, co pokazuje Rysunek 4. Na tym modelu stateryna jest częściowo rozwinięta, ale zachowuje swój indywidualny, strukturalny porządek. Badania na syntetycznych fragmentach białek bogatych w prolinę pokazały, że bakteryjne adhezyny (miejsca przylegania) mogą rozróżniać C-terminalne segmenty -Pro-Gln-. W C-kończym odcinku cząsteczki stateryny występują dwie takie sekwencje dipeptydowe (reszty 31-32 oraz 36-37). W przedstawionym modelu (Rys. 3) te dwa dipeptydowe segmenty są częściowo zakryte, w wyniku formowania dimerów stateryny, i dlatego są niedostępne dla bakteryjnej adhezji. Częściowe rozwinięcie cząsteczki na powierzchni szkliwa udostępnia fragmenty -Pro-Gln- dla właściwego oddziaływania z adhezynami bakteryjnymi [14].

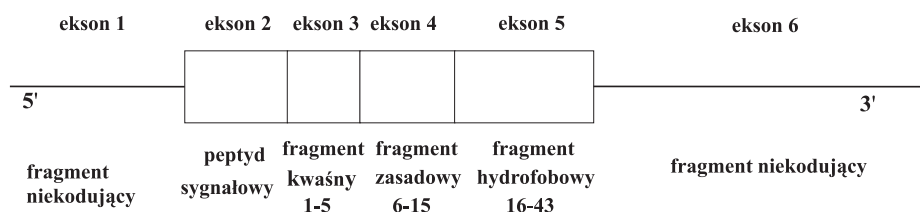
2. POWSTAWANIE STATERYNY. GEN DLA STATERYNY

Stateryna jest proteiną, która nie powstaje w procesie proteolizy większego białka prekursorowego, lecz jest syntetyzowana poprzez transkrypcję i translację zakodowanej sekwencji nukleotydu w małym genie stateryny. Oppenheim i in. [16] jako pierwsi pokazali translację *in vitro* ludzkiego staterynowego mRNA, w wyniku któ-

rej stwierdzono, że prekursor stateryny zawiera 19-aminokwasowy peptyd sygnałowy o następującej sekwencji aminokwasowej [17]:

Met-Lys-Phe-Leu-Val-Phe-Ala-Phe-Ile-Leu-Ala-Leu-Met-Val-Ser-Met-Ile-Gly-Ala

Mogłoby się wydawać, iż gen dla stateryny znajdzie się na chromosomie 12, tam gdzie kompleks genów białek śliny (ang. *salivary-protein gene complex*, SPC), w tym niektórych białek wykazujących powinowactwo do hydroksypatytytu [18, 19]. Jednak, pomimo funkcjonalnego podobieństwa stateryny do innych białek śliny, takich jak PRPs czy histatyn, badania Sabatini i in. [20] wskazują, iż pojedyncza kopia genu kodująca ludzką staterynę jest zlokalizowana na chromosomie 4q11-13. Strukturę genu kodującego staterynę przedstawia poniższy Rysunek 5 [21].



Rysunek 5. Struktura fragmentów kodujących i niekodujących staterynowego cDNA [21]

Figure 5. Structure of coding and noncoding fragments of statherin cDNA [21]

Ekson 1 koduje wstępny 5'-końcowy region niekodujący mRNA, nie ulegający translacji. Ekson 2 obejmuje kodon startowy ATG i koduje 19-aminokwasowy peptyd sygnałowy. Ekson 3 koduje jeszcze dwie reszty aminokwasowe peptydu sygnałowego oraz N-końcowy, pięcioaminokwasowy fragment stateryny. Ekson 4 koduje fragment zasadowy, złożony z dziesięciu reszt (6-15) naładowany dodatnio. Ekson 5 zawiera kodon kończący TAA oraz koduje C-terminalny hydrofobowy fragment obejmujący reszty 16-43. Ostatni ekson 6 obejmuje sekwencję 3'-końcowego fragmentu mRNA, nie ulegającego translacji. Natomiast pomiędzy wszystkimi eksonami znajduje się 5 intronów.

3. POCHODNE STATERYNY

W ślinie ludzkiej, oprócz stateryny właściwej, znajdują się również jej trzy krótsze pochodne SV1, SV2 oraz SV3 [22]. Jensen i in. [22] stosując metodę degradacji Edmana oraz trawienie karboksypeptydazą otrzymanych frakcji białkowych określili ich struktury pierwszorzędowe (Rys. 6).

Stateryna	DS(P)S(P)EEKFLRRIGRFGYGYGPYQPVPEQPLYQPYPYQPQYQQYTF
SV1	DS(P)S(P)EEKFLRRIGRFGYGYGPYQPVPEQPLYQPYPYQPQYQQYT
SV2	DS(P)S(P)EE.....YGYGPYQPVPEQPLYQPYPYQPQYQQYTF
SV3	DS(P)S(P)EE.....YGYGPYQPVPEQPLYQPYPYQPQYQQYT

Rysunek 6. Struktura pierwszorzędowa stateryny i jej pochodnych [22].

(P) – oznacza resztę fosforanową ($-\text{OH}_2\text{PO}_3$)

Figure 6. Primary structure of statherin and its derivatives [22].

(P) – phosphoric acid residue ($-\text{OH}_2\text{PO}_3$)

Ponadto w trakcie badań odkryli, iż SV1 powstaje w wyniku potranslacyjnej modyfikacji stateryny, polegającej na odszczepieniu C-końcowej reszty L-feniloalaniny. Kolejne warianty SV2 i SV3 składają się z 33 reszt aminokwasowych wskutek wystąpienia delecji reszt 6-15. SV2 jest skróconym analogiem, który nie posiada reszt aminokwasowych 6-15 (KFLRRIGRFG), obecnych w staterynie, i prawdopodobnie mógł powstać w trakcie składania RNA, czyli usuwania intronów. Natomiast SV3 ma taką samą sekwencję jak SV2, z wyjątkiem C-końcowego aminokwasu – L-feniloalaniny, i mógł powstać przez potranslacyjne przetworzenie SV2 [22].

Pochodne stateryny SV1, SV2 oraz SV3 stanowią około 30% całkowitej ilości stateryn, a stosunek ilości stateryn: SV1 oraz SV2 : SV3 wynosi w obu przypadkach 3 : 1 [22].

4. FUNKCJE BIAŁKA

Nazwa stateryna pochodzi od greckiego słowa, ‘*statheropio*’ co oznacza stabilizować. Stateryna jest białkiem śliny zdolnym do hamowania w roztworze pierwotnej (spontanicznej) precypitacji soli wapniowo-fosforanowych oraz zapobiegania wtórnej precypitacji związanej z nawarstwianiem kryształu hydroksyapatytu [7, 8, 23]. Pełni również ważną rolę w utrzymaniu stanu przesylenia śliny. W rezultacie, stateryna jest białkiem wielofunkcyjnym, w pełnionej roli w jamie ustnej wykraczającym poza znaczenie oryginalnej nazwy [23]. Stateryna selektywnie adsorbuje ze śliny na powierzchnię hydroksyapatytu, co sugeruje, iż jest prekursorem powstawania nabytej ochronnej błonki powierzchniowej na szkliwie zębów, a także determinuje początkową kolonizację mikrobiologiczną na powierzchni zębów [23–25]. Stateryna jest białkiem śliny, które w środowisku jamy ustnej zarządza jonami wapnia. Pełni również istotną rolę w ochronie zębów, będąc podstawowym białkiem wchodzącym w skład biofilmu pokrywającego zęby [4].

Badania przeprowadzone przez Douglasa i in. [5] potwierdziły zdolność stateryny do funkcjonowania w roli smaru granicznego na powierzchni szkliwa. Jest to funkcja, która chroni zęby przed wysokim obciążeniem zgryzu i wolnym ślizganiem, które pojawiają się podczas żucia, a zależy od utrzymania na szkliwie zaadsorbowanego, amfipatycznego filmu [4]. Z badań CD oraz obliczeń momentu hydrofobo-

wego wyniku, że stateryna może przyjmować amfipatyczną, helikalną strukturę na N-końcu. Jednak nie tylko N-końcowe reszty Asp¹-Gly¹⁵ stateryny odpowiadają za jej właściwości smarujące. Polarny N-koniec odpowiada za adsorpcję cząsteczki stateryny do powierzchni hydroksyapatytu, natomiast niepolarny C-koniec jest niezbędny do utworzenia zorientowanej warstewki na szkliwie. W rezultacie, reszty hydrofobowe stabilizują powstający amfipatyczny film i redukują opór w poziomym ślizganiu powierzchni zębowych [5].

Stateryna jest również jedną z najbardziej skutecznych ślinowych protein, gdy chodzi o hamowanie pierwotnego oraz wtórnego wytrącania soli wapniowo-fosforanowych. Tamaki i in. [26] wykazali, iż jest ona aż o 66-razy silniejszym inhibitorem precypitacji niż histatyna-1. W procesie hamowania pierwotnej precypitacji soli fosforanowo-wapniowych ważną rolę pełni N-końcowy fragment Asp¹-Lys⁶, którego wszystkie reszty wykazują ładunek ujemny. Usunięcie sześciu C-końcowych reszt aminokwasowych Tyr³⁸-Phe⁴³ powodowało spadek aktywności antyprecypitacyjnej o 50% [14]. Natomiast aktywność stateryny, polegającą na hamowaniu narastania kryształów na hydroksyapatycie (wtórnej precypitacji soli fosforanowo-wapniowych), znajduje się na 1-15 N-końcowym, ujemnie naładowanym fragmencie. Usunięcie pierwszych czterech reszt powoduje zmniejszenie ujemnego ładunku na N-końcu, wskutek czego następuje spadek aktywności inhibitorowej fragmentu w stosunku do odcinka 1-15. Także zastąpienie w pozycjach 2 i 3 fosfo-L-seryn, L-serynami powodowało mniejszą tendencję do przylegania i hamowania formowania hydroksyapatytu (HAP), w porównaniu do całego fragmentu 1-15 N-końca stateryny. Oznacza to, że ufosforylowane L-seryny mają istotny wpływ na hamowanie wzrostu kryształów hydroksyapatytu [6]. Obie te funkcje: hamowanie pierwotnej oraz wtórnej precypitacji soli fosforanowo-wapniowych, umożliwiają zachowanie stanu przesylenia śliny w stosunku do tych soli, co m.in. umożliwia remineralizację zębów.

Inną cechą stateryny jest zdolność łączenia różnego rodzaju bakterii ze szkliwem zęba w momencie, gdy jej cząsteczka zaadsorbuje się na hydroksyapatycie. Dzięki temu, eksponowane są miejsca odpowiedzialne za przyłączenie komórek bakteryjnych [27].

Badania Amano i in. [28, 29] dowodzą, że 29-43 C-końcowy fragment stateryny, a szczególnie sekwencje aminokwasowe 29-30 oraz 41-43, odpowiadają za wysoką zdolność wiązania niektórych drobnoustrojów do cząsteczki stateryny. Drobnoustroje, które wykazywały cechy adhezji do cząsteczki stateryny zaadsorbowanej na powierzchni hydroksyapatytu, to bakterie: *Fusobacterium nucleatum* [30], *Porphyromonas gingivalis* [28, 29], *Actinomyces viscosus* [27, 31, 32], oraz grzyby drożdżopodobne – *Candida albicans* [33]. Wszystkie wymienione drobnoustroje w dużej mierze są odpowiedzialne za procesy patologiczne toczące się na powierzchni korzenia zęba oraz w przyzębiu [34]. W odróżnieniu od białek bogatych w prolinę (PRPs), stateryna nie posiada miejsc wiążących dla bakterii uważanych za próchnicotwórcze [35, 36]. Nie można natomiast jednoznacznie odpowiedzieć na pytanie, czy stateryna wykazuje działanie przeciwdrobnoustrojowe [37].

Inną ważną rolą, choć nie do końca poznaną, jaką może pełnić stateryna jest używanie jej stężenia w ślinie jako wskaźnika zmian przednowotworowych i nowotworowych w jamie ustnej. Contucci i in. [38] przeprowadzili badania naukowe mierząc stężenie stateryny w ślinie za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) na dwóch grupach pacjentów. Pierwszą grupę stanowili ochotnicy zdrowi, natomiast do drugiej należeli pacjenci z chorobami jamy ustnej i ślinianek. Przeprowadzone wstępne badania wykazały, iż poziom stężenia stateryny nie ulegał znaczącej redukcji w ślinie pacjentów chorych ze stanami zapalnymi jamy ustnej lub z guzami ślinianek, w porównaniu do śliny pacjentów zdrowych. Natomiast zauważono wyraźny spadek poziomu stężenia stateryny u pacjentów ze zmianami przednowotworowymi i nowotworowymi jamy ustnej, co sugeruje, iż poziom stężenia stateryny zależy od rodzaju patologii. Znaczna redukcja poziomu stężenia stateryny u tej grupy pacjentów nasuwa pytanie, czy widoczne zmniejszenie poziomu stężenia stateryny w ślinie jest przyczyną albo skutkiem nowotworów jamy ustnej [38].

PODSUMOWANIE

Wśród białek ślinowych stateryna jest jedyną proteiną, która jest odpowiedzialną za hamowanie pierwotnej precypitacji soli wapniowo-fosforanowych (spontanicznej) oraz wtórnej precypitacji soli wapniowo-fosforanowych (wzrostu kryształów). Pełni również wiodącą rolę w utrzymaniu stanu przesylenia śliny jonami wapniowymi i fosforanowymi, w stosunku do soli wapniowo-fosforanowych [39]. Ponadto wpływa na prawidłowy stan zębów, selektywnie promuje pierwotną kolonizację bakterii na nabytej ochronnej błonie powierzchniowej na szkliwie zębów oraz bierze udział w transporcie jonów wapniowych i fosforanowych podczas wydzielania śliny [6, 38]. Wszystkie te funkcje są niezbędne, aby ślina ludzka zachowała zdolności remineralizacyjne i zapewniała homeostazę jamy ustnej [39]. Ponadto istnieje możliwość wykorzystania oznaczenia poziomu stężenia stateryny w ślinie do określenia zmian przednowotworowych i nowotworowych w jamie ustnej.

Podsumowując można powiedzieć, iż zarówno rola, jaką pełni stateryna w jamie ustnej, jak i jej wszystkie funkcje, nie są nadal do końca poznane. Niemniej jednak zrozumienie obecności i działania stateryny w ślinie jest ważnym krokiem do poznania środowiska jamy ustnej.

PODZIĘKOWANIE

Praca finansowana z BW 8000-5-0034-8 oraz DS 8362-4-0135-8 Uniwersytetu Gdańskiego.

Rysunki nr 3 i 4 zamieszczone w niniejszej pracy zostały wykonane przez studenta Zakładu Chemii Polipeptydów, Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego p. Krzysztofa Lidzbarskiego.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] Komitet Edukacyjny Międzynarodowego Towarzystwa Dentystyki Pediatrycznej (USA), Nowa Stom., 1999, **11(4)**, 3.
- [2] M.W.J. Dodds, D.A. Johnson, C.K. Yeh, J. Dent., 2005, **33**, 223.
- [3] R. Inzitari, T. Cabras, D.V. Rossetti, C. Fanali, A. Vitali, M. Pellegrini, G. Paludetti, A. Manni, B. Giardina, I. Messina, M. Castagnola, Proteomics, 2006, **6**, 6370.
- [4] J. Kosoric, R.A.D. Williams, M.P. Hector, P. Anderson, Internat. J. Pept. Res. and Therap., 2007, **13**, 497.
- [5] W.H. Douglas, E.S. Reeh, N. Ramassubu, P.A. Raj, K.K. Bhandary, M.J. Levine, Bioch. Bioph. Res. Comm., 1991, **180**, 91.
- [6] A.P. Raj, M. Johnsson, M.J. Levine, G.H. Nancollas, J. Biol. Chem., 1992, **267**, 5968.
- [7] D.H. Schlesinger, D.I. Hay, J. Biol. Chem., 1977, **252**, 1689.
- [8] D.J. Hay, Arch. Oral. Biol., 1973, **18**, 1517.
- [9] M.S. Lamkin, F.G. Oppenheim, J. Dent. Res., 1994, **73**, 191.
- [10] G. Madapallimattam, A. Bennick, J. Dent. Res., 1986, **65**, 405.
- [11] Y. Nam, G. Madapallimattam, L. Drzymala, A. Bennick, Arch. Oral. Biol., 1997, **42**, 527.
- [12] M.S. Lamkin, F.G. Oppenheim, Rev. Oral. Biol. Med., 1993, **4**, 251.
- [13] S.S. Schwartz, D.J. Hay, S.K. Schluckebier, Calcif. Tissue. Int., 1992, **50**, 511.
- [14] N. Ramasubbu, L.M. Thomas, K.K. Bhandary, M.J. Levine, Crit. Rev. Oral. Biol. Med., 1993, **4**, 363.
- [15] G.A. Naganagowa, T.L. Guruaja, M.J. Levine, J. Biomol. Structure & Dynamics., 1998, **16**, 91.
- [16] F.G. Oppenheim, D.I. Hay, D.J. Smith, G.D. Offner, R.F. Troxler, J. Dent. Res., 1987, **66**, 464.
- [17] D.P. Dickinson, A.L. Ridall, M.J. Levine, Biochem. Biophys. Res. Commun., 1987, **149**, 784.
- [18] E.A. Azen, P.A. Goodman, P.A. Lalley, Am. J. Hum. Genet., 1985, **37**, 418.
- [19] P.W. Mamula, N.A. Heerema, C.G. Palmer, K.M. Lyons, R.C. Karn, Cytogenet. Cell. Genet., 1985, **39**, 279.
- [20] L.M. Sabatini, L.R. Carlock, G.W. Johnson, E.A. Azen, Am. J. Hum. Genet., 1987, **41**, 1048.
- [21] L.M. Sabatini, Y.-Z. He, E.A. Azen, Gene, 1990, **89**, 245.
- [22] J.L. Jensen, M.S. Lamkin, R.F. Troxler, F.G. Oppenheim, Arch. Oral. Biol., 1991, **36**, 529.
- [23] J. Li, E.J. Helmerhorst, Y. Yao, M.E. Nunn, R.F. Troxler, F.G. Oppenheim, Arch. Oral Biol., 2004, **49**, 379.
- [24] D.J. Hay, Arch Oral Biol, 1973, **18**, 1531.
- [25] J. Li, E.J. Helmerhorst, R.B. Corlej, L.E. Luus, R.F. Troxler, F.G. Oppenheim, Oral Microbiol. Immunol, 2003, **18**, 183.
- [26] N. Tamaki, T. Tada, M. Morita, T. Watanabe, Calcif Tissue Int., 2002, **71**, 59.
- [27] R.J. Gibbons, D.I. Hay, Infect Immun. 1988, **56**, 439.
- [28] A. Amano, K. Kataoka, P.A. Raj, R.J. Genco, S. Shizukuishi, Infect Immun., 1996, **64**, 4249.
- [29] A. Amano, H.T. Sojar, J.Y. Lee, A. Sharma, M.J. Levine, R.J. Genco, Infect Immun., 1994, **62**, 3372.
- [30] H. Xie, R.J. Gibbons, D.I. Hay, Oral. Microbiol. Immunol., 1991, **6**, 257.
- [31] R.J. Gibbons, D.I. Hay, J.O. Cisar, W.B. Clark, Infect Immun., 1988, **56**, 2990.
- [32] T. Li, I. Johansson, D.I. Hay, N. Strömberg, Infect. Immun., 1999, **67**, 2053.
- [33] R.D. Cannon, A.K. Nand, H.F. Jenkinson, Microbiology, 1995, **141**, 213.
- [34] P. Marsh, M. Martin, *Mikrobiologia jamy ustnej*, Warszawa, PWN, 1994.
- [35] R.J. Gibbons, D.I. Hay, J. Dent. Res., 1989, **68**, 1303.
- [36] R.J. Gibbons, D.I. Hay, D.H. Schlesinger, Immun. 1991, **59**, 2948.

- [37] B. Kochańska, Stężenie stateryny w ślinie a występowanie próchnicy zębów i ubytków niepróchnicowego pochodzenia. 2000, XXX, supl 7, 1-130, rozprawa habilitacyjna, Akademia Medyczna w Gdańsku.
- [38] A.M. Contucci, R. Inzitari, S. Agostino, A. Vitali, A. Fiorita, T. Cabras, E. Scarano, I. Messina, Oral Diseases, 2005, **11**, 95.
- [39] F.G. Oppenheim, E. Salih, W.L. Siqueira, W. Zhang, E.J. Helmerhorst, N Y Acad. Sci, 2007, **1098**, 22.

Praca wpłynęła do Redakcji 13 lutego 2008

**MAKROCYKLICZNE KOMPLEKSY
RADIONUKLIDÓW W MEDYCYNIE NUKLEARNEJ**
MACROCYCLIC COMPLEXES OF RADIONUCLIDES
IN NUCLEAR MEDICINE

Agnieszka Majkowska, Aleksander Bilewicz

*Zakład Radiochemii, Instytut Chemii i Techniki Jądrowej,
ul. Dorodna 16, 03-195 Warszawa*

Abstract

Wstęp

1. Metaliczne radionuklidy stosowane w radiofarmacji
2. Synteza i charakterystyka makrocyklicznych ligandów
3. Linkery
4. Makrocykliczne kompleksy radionuklidów, będące prekursorami radiofarmaceutyków
 - 4.1. Kompleksy Y^{3+} i lantanowców
 - 4.2. Kompleksy Ga^{3+} i In^{3+}
 - 4.3. Kompleksy Rh^{3+} , Cu^{2+} i Ag^{+}
 - 4.4. Makrocykliczne kompleksy α emiterów bizmutu i astatu

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane



Prof. dr hab. Aleksander Bilewicz ukończył studia na Wydziale Chemicznym Uniwersytetu Warszawskiego w 1976 r. Po studiach rozpoczął pracę w Instytucie Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie, gdzie obecnie jest zatrudniony na stanowisku profesora. W 1986 roku obronił pracę doktorską, której tematyka dotyczyła wymiany jonowej na nieorganicznych sorbentach. W 1998 uzyskał stopień dr habilitowanego, broniąc pracę o wpływie efektów relatywistycznych na własności transaktynowców. W 2007 roku otrzymał tytuł profesora.

Aktualnie jego zainteresowania naukowe koncentrują się głównie na otrzymywaniu i badaniu nowych radiofarmaceutyków dla medycyny nuklearnej.



Mgr inż. Agnieszka Majkowska ukończyła Wydział Chemiczny Politechniki Warszawskiej na kierunku Technologii i Przetwórstwa Tworzyw Sztucznych. Od stycznia 2005 roku jest doktorantką w Instytucie Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie i aktualnie pracuje na stanowisku asystenta w Zakładzie Radiochemii. Tematyka jej pracy doktorskiej jest związana z badaniem własności chemicznych kompleksów Sc z ligandami makrocyclicznymi oraz ich potencjalnym zastosowaniem w medycynie nuklearnej.

ABSTRACT

The use of radiometal-labeled small complexes and biomolecules as diagnostic and therapeutic agents is a relatively new area of medical research. Radiopharmaceuticals are radiolabeled molecules designed to deliver ionizing radiation doses to specific disease sites. Between the targeting biomolecule and a radionuclide a bifunctional ligand is inserted, one end of which is covalently attached to the targeting molecule either directly or through a linker whereas the other strongly coordinates a metallic radionuclide. Selection of a bifunctional ligand is largely determined by the nature and oxidation state of a metal ion. The metal chelate can significantly affect the tumor uptake and biodistribution of radiopharmaceuticals based on small biomolecules. This is because in many cases the metal chelate contributes greatly to the overall size and lipophilicity of the radiopharmaceutical. Therefore, the design and selection of the ligand is very important for the development of a clinically useful therapeutic agent. The requirement for high thermodynamic and kinetic stability of the metal complex is often achieved through the use of macrocyclic ligands with a functionalized arm for covalent bonding to the biomolecule.

In this review synthesis of bifunctional macrocyclic ligands and properties of radionuclide macrocyclic complexes used in nuclear medicine are presented. We describe results in two areas: substituted macrocyclic aza ligands for chelation of hard metal cations, and macrocycles containing sulphur for complexation of soft metal cations. Special attention was paid to stability of the complexes as well as to their lipophilicity, which affect biological properties of the formed radiopharmaceuticals. We also include a forecast of the near-term opportunities that are likely to determine practice in the next few years.

Keywords: nuclear medicine, radiopharmacy, macrocyclic ligands

Słowa kluczowe: medycyna nuklearna, radiofarmacja, ligandy makrocykliczne

WSTĘP

W ciągu ostatnich kilkunastu lat znacznie udoskonalono zarówno metody detekcji promieniowania jak i komputerowego przetwarzania uzyskanych danych. Dzięki temu, diagnostyczne metody medycyny nuklearnej, szczególnie pozytonowa tomografia emisyjna (PET), są dziś niezastąpionym narzędziem lekarza zarówno diagnosty, jak i terapeuty, który łatwo może kontrolować przebieg procesu leczenia.

Toksyczny efekt promieniowania jonizującego, znany od wielu lat, jest wykorzystywany do leczenia zmian patologicznych, głównie w onkologii. Rutynową metodą leczenia nowotworów jest naświetlanie chorych tkanek zewnętrznymi źródłami promieniowania. Metoda ta ma jednak wiele ograniczeń, takich jak konieczność dokładnej lokalizacji guzów, niemożność leczenia bardzo drobnych i rozsianych przerzutów oraz duże deponowanie dawki promieniowania na sąsiednich zdrowych tkankach. Aby uniknąć tych ograniczeń, opracowano w ostatnich latach alternatywną metodę „celowanej” radioterapii, w której naświetlanie chorej tkanki następuje poprzez nakierowany na nią radionuklid.

Celowana radioterapia wykorzystuje radionuklidy, będące emiterami promieniowania korpuskularnego, które przyłączone do cząsteczek biologicznie aktywnych selektywnie akumulują się w chorej tkance. Wyjątkową zaletą celowanej radioterapii jest możliwość niszczenia chorych tkanek bez uszkodzania zdrowych. Ma to szczególne znaczenie w przypadku małych guzów nowotworowych we wczesnym stadium rozwoju oraz drobnych przerzutów nowotworowych. Ograniczeniem zastosowania celowanej radioterapii jest konieczność znalezienia odpowiednich receptorów na komórkach nowotworowych oraz cząstek biologicznie aktywnych, wykazujących powinowactwo do tych receptorów. Jednakże, według ostatnich danych literaturowych [1], można się spodziewać znalezienia dla około połowy rodzajów nowotworów odpowiednich cząsteczek biologicznie aktywnych przydatnych w celowanej radioterapii.

Podczas projektowania nowych radiofarmaceutyków głównym zadaniem chemika jest otrzymanie odpowiedniego radionuklidu oraz znalezienie metody trwałego związania radionuklidu z biomolekułą, która na zasadzie rozpoznania molekularnego naprowadza radionuklid na chorą tkankę. Pracujący w radiofarmacji chemik powinien więc łączyć wiedzę w zakresie chemii jądrowej, organicznej i koordynacyjnej. Celem jego pracy powinno być otrzymywanie na prostej drodze kompleksu odpowiedniego radionuklidu wykazującego bardzo wysoką trwałość. Ponadto, taki kompleks powinien mieć możliwość przyłączenia się trwałym wiązaniem (zazwyczaj peptydowym) do biomolekuły. Zagadnienia związane z otrzymywaniem i badaniem nowych radiofarmaceutyków zarówno diagnostycznych, jak i terapeutycznych, zostały opisane w wielu pracach przeglądowych, w większości opublikowanych w czasopismach chemicznych [2–6].

W naszej pracy przeglądowej zajęliśmy się niedużym fragmentem radiofarmacji, jakim są kompleksy makrocykliczne, które samodzielnie lub przyłączone do

biomolekuły tworzą radiofarmaceutyk. Ligandy makrocykliczne spełniają dwa podstawowe warunki konieczne do ich zastosowania w radiofarmacji:

1. Otrzymane kompleksy muszą być na tyle mocne, tak aby ich synteza w warunkach, gdy stosunek ligandu do radionuklidu jest bliski 1:1 była możliwa. Ponieważ stężenie radionuklidów nie przekracza zazwyczaj 10^{-7} M, ilość liganda stosowana do syntezy nie powinna przekraczać paru nmoli. Aby w tych warunkach mógł powstać kompleks z dużą wydajnością, stałe trwałości kompleksów muszą przekraczać wartość 10^{10} .
2. Wytworzone kompleksy muszą być na tyle trwale kinetycznie, aby radionuklid nie mógł się uwolnić z radiofarmaceutyku. Uwolnione kationy metali mają bowiem zdolność gromadzenia się w tkankach, np. lantanowce w kościach, sprawiając tym samym duże zagrożenie dla szpiku kostnego. Ponieważ w płynach biologicznych nie ma wolnego liganda, zawsze, nawet z najbardziej trwałego kompleksu, następuje uwolnienie kationu metalu. Największą przydatność wykazują inertne kompleksy, dla których proces dysocjacji jest na tyle długi, że w trakcie terapii nie obserwuje się uwolnienia radionuklidu. Takie warunki spełniają makrocykliczne kompleksy niektórych kationów, np. niskospinowe kompleksy Rh^{3+} czy Ir^{3+} o konfiguracji d^6 . Kompleksy makrocykliczne tworzą się powoli, dlatego też do ich syntezy stosuje się podwyższoną temperaturę, ale po wytworzeniu są bardzo trwałe, nawet w obecności konkurencyjnego liganda.

1. METALICZNE RADIONUKLIDY STOSOWANE W RADIOFARMACJI

Ogromna większość stosowanych w radiofarmacji radionuklidów zarówno diagnostycznych, jak i terapeutycznych to metale. Najważniejsze z nich przedstawiono w Tabelach 1, 2 i 3.

Tabela 1. Najważniejsze metaliczne radionuklidy znajdujące zastosowanie w terapii
Table 1. The most important radionuclides to be used for therapy

Radionuklid	$T_{1/2}$	Sposób otrzymywania*	Rodzaj promieniowania (MeV)	Maksymalny zasięg w organizmie
^{67}Ga	3,26 d	C	Auger, γ (0,09)	10 nm
^{99m}Tc	6 h	G	Auger, γ (141)	
^{103m}Rh	55 min	G	Auger,	
^{211}At	7,2 h	C	α (6,8)	65 μm
$^{212}Pb/^{212}Bi$	1,0 h	G	α (7,8), γ (0,72)	70 μm
^{213}Bi	46 min	G	α (5,9), γ (0,72)	
^{169}Er	9,5 d	C	β (0,34)	1,0 mm

Tabela 1. Ciąg dalszy
Table 1. Continuation

Radionuklid	$T_{1/2}$	Sposób otrzymywania*	Rodzaj promieniowania (MeV)	Maksymalny zasięg w organizmie
^{177}Lu	6,7 d	R	β (0,497), γ (0,21)	1,5 mm
^{161}Tb	6,91 d	C	β (0,51), γ (0,025)	1,7 mm
^{67}Cu	2,58 d	C	β (0,54), γ (0,185)	1,8 mm
^{105}Rh	1,48 d	R	β (0,57), γ (0,320)	1,9 mm
^{47}Sc	3,35 d	R	β (0,600, 0,438), γ (0,159)	2,0 mm
^{153}Sm	1,95 d	R	β (0,8), γ (0,103)	3,0 mm
^{111}Ag	7,47 d	C	β (1,05), γ (0,34)	4,8 mm
^{149}Pm	2,21 d	C	β (1,07), γ (0,289)	5,0 mm
^{186}Re	3,77 d	R	β (1,08), γ (0,131)	5,0 mm
^{188}Re	16,95 h	G	β (2,13), γ (0,155)	11,0 mm
^{142}Pr	19,1 h	C	β (2,16), γ (1,6)	11,3 mm
^{90}Y	2,67 d	G	β (2,28)	12,0 mm

*C – otrzymywane w cyklotronie.

G – otrzymywane z generatora.

R – otrzymywane w reaktorze.

Tabela 2. Najważniejsze radionuklidy metaliczne stosowane w emisyjnej tomografii pojedynczego fotonu (SPECT)

Table 2. Main metallic radionuclides used for single photon emission computer tomography (SPECT)

Radionuklid	$T_{1/2}$ (godz.)	Sposób otrzymywania	Typ rozpadu	Energia promieniowania γ (keV)
^{67}Ga	78,26	C	EC (100%)	91, 93, 185, 296, 388
^{111}In	67,9	C	EC (100%)	245, 172
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	6,0	G	IT (100%)	141
^{201}Tl	72	C	EC (100%)	135, 167

Tabela 3. Metaliczne radionuklidy stosowane w pozytonowej tomografii emisyjnej (PET)
 Table 3. Metallic radionuclides used in positron emission tomography (PET)

Radionuklid	$T_{1/2}$ (godz.)	Sposób otrzymywania	E_{β^+} (keV)
^{55}Co	17,5	C	1513, 1037
^{60}Cu	0,4	C	3920, 3000
^{61}Cu	3,3	C	1220, 1150, 940, 560
^{62}Cu	0,16	G	2910
^{64}Cu	12,7	C, R	656
^{66}Ga	9,5	C	4150, 935
^{68}Ga	1,1	G	1880, 770
^{82}Rb	0,022	G	3150
^{44}Sc	3,9	G	1430
^{86}Y	14,7	C	2335, 2019
^{89}Zr	78,4	C	900

Większość przedstawionych w Tabelach kationów radionuklidów to twarde kwasy Lewisa, jak np. Ln^{3+} , Sc^{3+} , Y^{3+} i Zr^{4+} . W związku z tym, drogą do ich trwałego związania z biomolekułą jest zastosowanie ligandów będących twardymi zasadami Lewisa, a więc zawierających donorowe atomy tlenu i azotu, jak np. karboksylowe pochodne tetraazamakrocycli.

Drugą grupę radionuklidów tworzą kationy będące miękkimi kwasami Lewisa, takie jak At^+ , Ag^+ , Cu^{2+} , Rh^{3+} , $\text{Re}(\text{I})$, (III) , (V) i $\text{Tc}(\text{I})$, (III) , (V) . Radionuklidy tych kationów są trwale wiązane ligandami zawierającymi donorowe atomy siarki (grupy tiolowe, tioeterowe) lub azotu w pirydynie lub imidazolu.

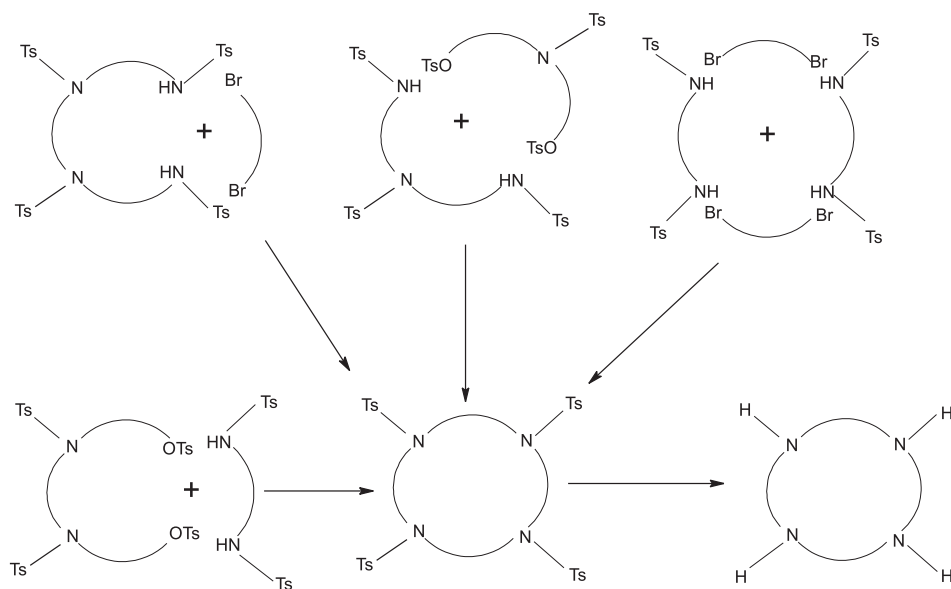
Radionuklidy kationów Ga^{3+} , In^{3+} i Bi^{3+} tworzą silne kompleksy zarówno z ligandami będącymi twardymi, jak i miękkimi zasadami.

2. SYNTEZA I CHARAKTERYSTYKA MAKROCYKLICZNYCH LIGANDÓW

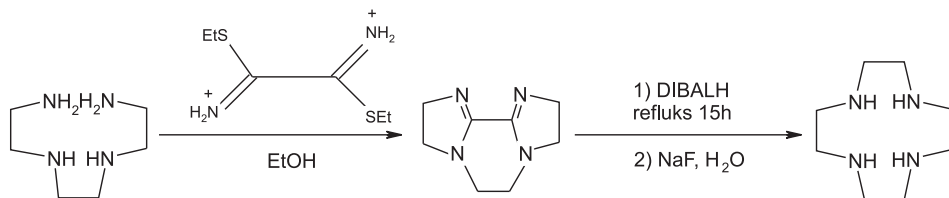
Syntetyczne związki makrocykliczne są znane od 1967 roku, gdy Pedersen [7–8] opracował syntezę eterów koronowych. Od tego momentu rośnie liczba otrzymanych makrocyklicznych ligandów z różnymi atomami donorowymi, a także są syntezowane i badane ich kompleksy z metalami. Spośród różnorodnych chelatów, azamakrocycyle i ich N- lub C-podstawione pochodne zasługują na szczególną uwagę, gdyż charakteryzują się wysoką trwałością termodynamiczną, a także inertynością kinetyczną w połączeniach z wieloma metalami.

Kluczowym etapem syntezy azamakrocycli bazującym na prekursorach liniowych jest reakcja cyklizacji. Jedną z najbardziej znanych tego typu syntez jest reakcja Richmana-Atkinsa [9]. Na Rys. 1 przedstawiono schemat syntezy cyklenu tą metodą. Do syntezy użyto tosylowanych poliamin z dihalogenkami lub ditosylami w obecności wodorunku sodu. Wydajność syntezy była stosunkowo duża i wynosiła 40–90%, w zależności od wielkości stosowanych poliamin makrocyclicznych. Metoda ta jest również stosowana do syntezy tri-, penta- i heksaazamakrocycli.

W 1996 r. Weisman i Reed opracowali inną dwuetapową metodę syntezy [10], znacznie tańszą, łatwiejszą do przeprowadzenia i niewymagającą użycia dużych ilości rozpuszczalnika DMF (Rys. 2).

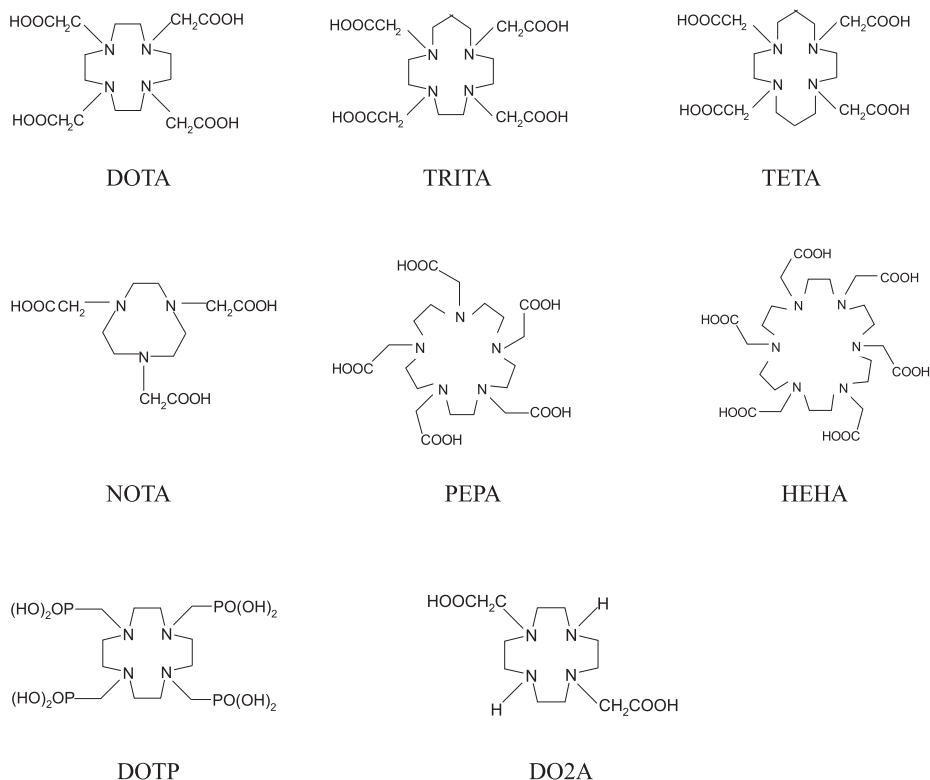


Rysunek 1. Reakcja Richmana-Atkinsa syntezy tetraazamakrocycli
Figure 1. Richman - Atkins method for synthesis of tetraazamacrocycles



Rysunek 2. Reakcja otrzymywania cyklenu-metodą Weismana i Reeda
Figure 2. Weisman's and Reed's method for the synthesis of cyclen

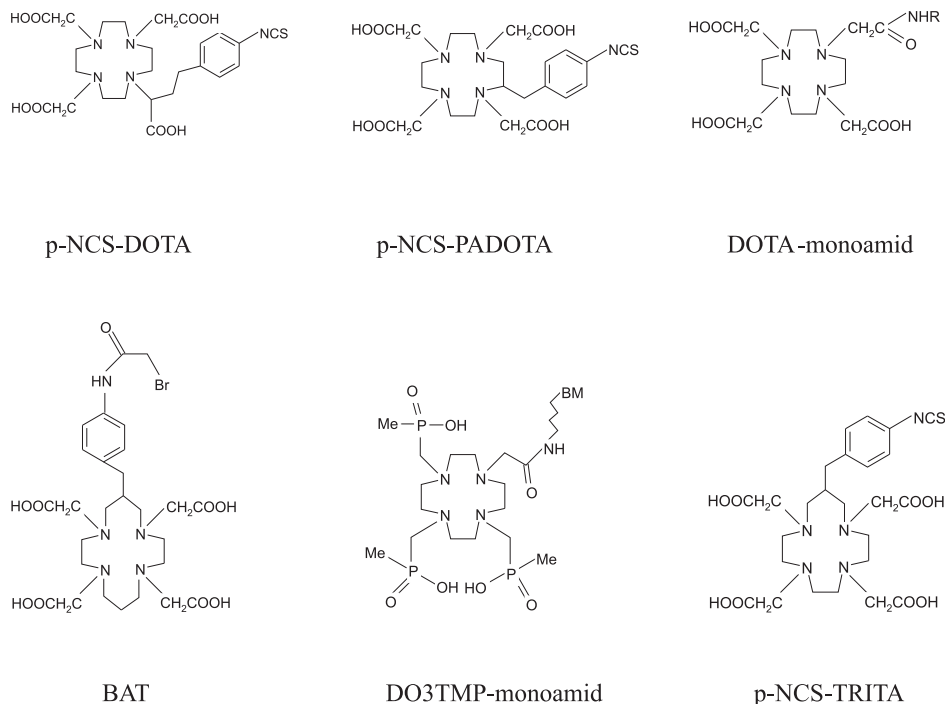
Tetraazamacrocykle, takie jak np. cyklam, znalazły zastosowanie do kompleksowania kationów metali tworzących płaskie kompleksy, np. Cu^{2+} . Jednakże w przypadku większości kationów, wykazujących wyższe liczby koordynacyjne, konieczne było przyłączenie do atomów azotu grup funkcyjnych zawierających atomy donorowe. Zazwyczaj były to grupy karboksylowe, fosforanowe, aminowe i tiolowe. Otrzymano w ten sposób takie powszechnie stosowane w radiofarmacji ligandy jak: 1,4,7-triaza-cyclononane-1,4,7 triacetic acid (NOTA), 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid (DOTA), 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,7-bis(acetic acid) (DO2A), 1,5,8,12-tetraazacyclotetradecane-1,5,8,12-tetraacetic acid (TETA) i 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetrakis(methylenephosphonic acid) (DOTP) (Rys. 3).



Rysunek 3. . Ligandy azamacrocycliczne stosowane w radiofarmacji
Figure 3. Azamacrocyclic ligands used in radiopharmacy

Aby jednak można było przyłączyć do makrocyklu, bezpośrednio lub pośrednio (przez tzw. linker), cząsteczkę biologicznie czynną, należy wprowadzić do niego odpowiednią grupę funkcyjną, która wytworzy z linkerem lub biomolekułą dostatecznie silne wiązanie. Funkcjonalizacja związków makrocyklicznych jest jednak

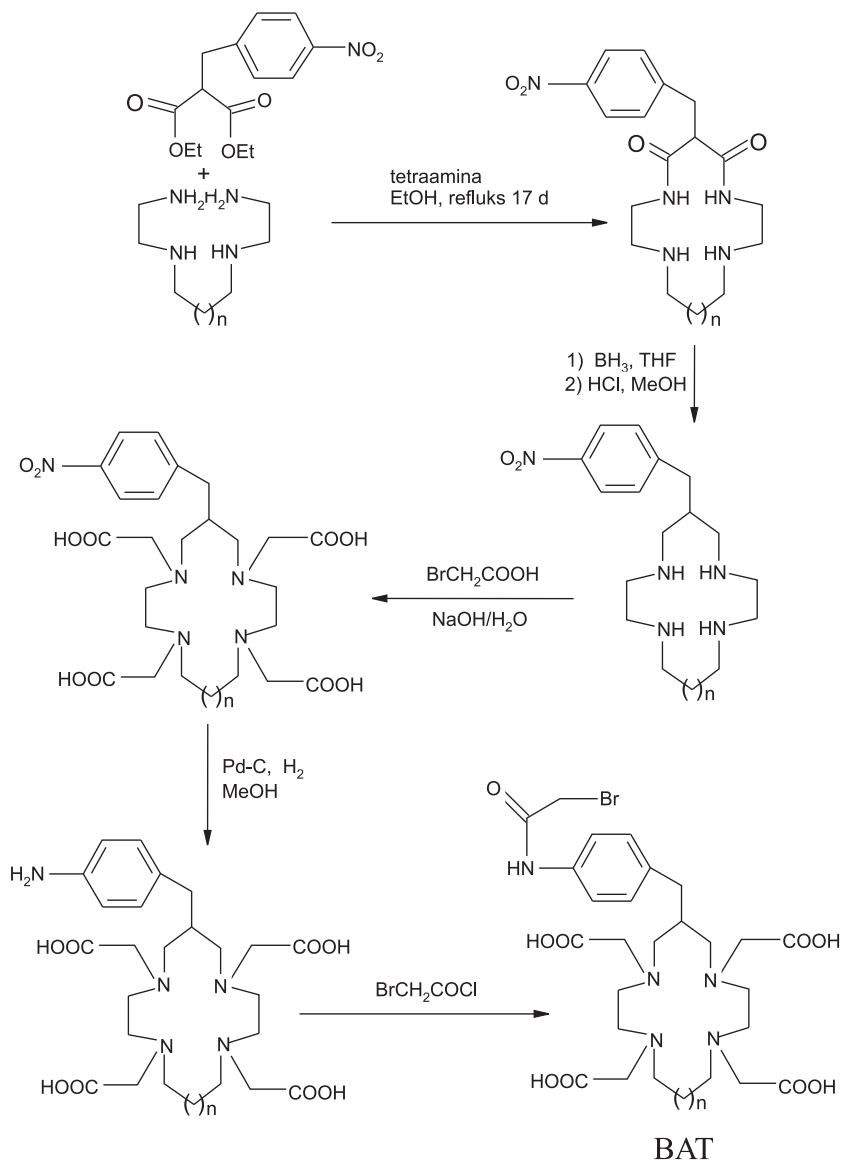
dość skomplikowanym procesem. Niektóre sfunkcjonalizowane ligandy azamakrocykliczne zostały przedstawione na Rys. 4.



Rysunek 4. Wzory strukturalne niektórych sfunkcjonalizowanych tetraazamakrocykli
Figure 4. Structures of selected functionalized tetraazamacrocycles

Najbardziej rozpowszechnioną metodą funkcjonalizacji jest dołączenie dodatkowej grupy funkcyjnej poprzez alkilację atomu N w drugorzędowej aminie [11–18]. W zależności od warunków reakcji (rodzaj rozpuszczalnika, pH, czas reakcji, temperatura) i stosunku molowego reagentów, otrzymany produkt był często mieszaniną różnie podstawionych makrocykli.

Kolejnym przykładem reakcji funkcjonalizacji jest „metoda peptydowa”. Polega ona na wytworzeniu co najmniej jednego wiązania peptydowego przed reakcją cyklizacji lub w jej trakcie. Literatura podaje przykłady zawierające kondensację podstawionych estrów z liniowymi tetraaminami, addycję Michaela, czyli reakcję tetraamin z α lub β nienasyconymi związkami karbonylowymi. Tworzenie sfunkcjonalizowanych makrocykli może przebiegać także w reakcji diamin z imidem kwasu bursztynowego. Wiązanie peptydowe jest zazwyczaj redukowane wodorkiem boru lub LiAlH₄. Meares, Moi i in. [19–21], jako pierwsi, zaproponowali syntezę liganda makrocyklicznego poprzez reakcję podstawionego estru malonowego z łańcuchową aminą. Schemat reakcji przedstawiono na Rys. 5.



Rysunek 5. Metoda peptydowa opracowana przez Mearesa
 Figure 5. Meares' peptide method for the synthesis of BAT

3. LINKERY

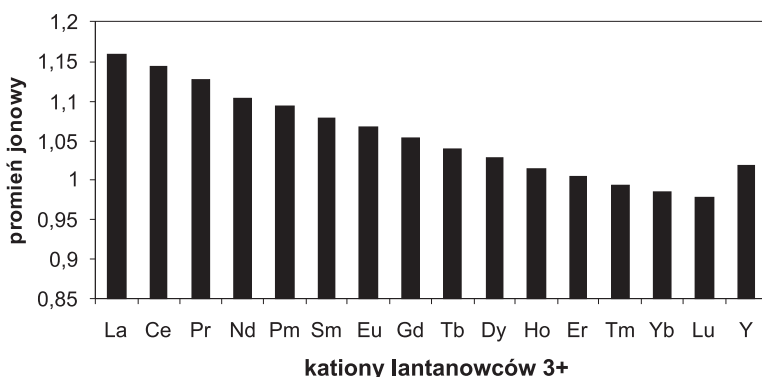
Ponieważ bezpośrednie przyłączenie kompleksu do biomolekuły może powodować zmniejszenie lub zanik jej aktywności biologicznej, aby oddalić kompleks od biomolekuły, stosuje się tzw. linkery (łączniki). Innym zadaniem linkerów może być

również modyfikacja właściwości radiofarmaceutyku, np. jego lipofilowości. Linkerem może być prosty łańcuch węglowodorowy, zwiększający lipofilowość lub łańcuch polipeptydowy (np. poliglicyna, poliseryna), zwiększający hydrofilowość radiofarmaceutyku, a tym samym ułatwiający jego wydalanie przez system nerkowo-moczowy. W wielu pracach wykazano, że niektóre grupy linkerów mają decydujący wpływ na biodystrybucję przeciwciała monoklonalnego znakowanego ^{111}In i $^{99\text{m}}\text{Tc}$ [22–23]. Także łącznik tetrapeptydowy Gly-Gly-Gly-L-(p-NO₂)-Phe-CONH₂ znacząco modyfikował własności farmakokinetyczne przeciwciała znakowanego ^{90}Y [24–25].

4. MAKROCYKLICZNE KOMPLEKSY RADIONUKLIDÓW, BĘDĄCE PREKURSORAMI RADIOFARMACEUTYKÓW

4.1. KOMPLEKSY Y^{3+} I LANTANOWCÓW

Jak przedstawiono w Tabeli 1, radionuklidy wielu lantanowców mogą być stosowane w diagnostyce i terapii. Także ^{90}Y , otrzymywany z generatora $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$, jest jednym z podstawowych radionuklidów terapeutycznych. Y^{3+} , jest kationem trzeciej grupy, ale ze względu na wielkość promienia jonowego, zbliżonego do promienia ciężkich lantanowców, jest traktowany jako pseudolantanowiec (Rys. 6).



Rysunek 6. Porównanie promienia jonowego Y^{3+} z promieniami Ln^{3+} , LK = 8
Figure 6. A comparison of ionic radii (Å) for trivalent yttrium and lanthanide metal ions

Trójładunkowe kationy itru i lantanowców tworzą kompleksy o liczbach koordynacyjnych od 7 do 10. Jednym z najbardziej popularnych ligandów makrocyklicznych stosowanych w radiofarmacji, który silnie wiąże Y^{3+} i trójładunkowe jony lantanowców (Ln^{3+}), jest DOTA (Rys. 3). DOTA jest ligandem dostępnym handlowo, co dodatkowo ułatwia jej zastosowanie.

DOTA z itrem i niektórymi lantanowcami na stopniu utlenienia +3 tworzy kompleksy wykazujące w cieple stałym $LK = 9$. W narożach antypryzmatu kwadratowego znajdują się cztery atomy azotu i cztery atomy tlenu, a dodatkowo jedna ściana jest centrowana cząsteczką wody [26–32]. Kompleksy lantanowców z DOTA mogą występować w postaci czterech możliwych izomerów. Izomery A i B są względem siebie enancjomerami nierozróżnialnymi metodą NMR. Tworzą one antypryzmat kwadratowy o różnym położeniu przestrzennym grup karboksylowych. Taka sama konformacja pierścienia występuje w przypadku izomerów C i D, które są również parą enancjomerów. Konwersja każdej pary enancjomerów następuje poprzez inwersję grup etylenowych i jednoczesną lub stopniową rotację grup octanowych [33]. Kinetyka tworzenia się kompleksów DOTA z radionuklidami lantanowców jest powolna i zależy głównie od warunków znakowania, czyli od stężenia ligandu, temperatury, pH, rodzaju buforu, a także od stężenia substancji zanieczyszczających – głównie kationów innych metali, np. Fe^{3+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} .

W zależności od pH roztworu, DOTA i jej pochodne mają tendencję do występowania w jednej z dwóch form [34–41]. Dominującą formą w zakresie $pH = 3,6–5,0$ jest $H_3(DOTA)^-$, podczas gdy w zakresie $pH = 6,0–7,0$ występuje $H_2(DOTA)^{2-}$. W przejściowym, podwójnie protonowanym kompleksie $YH_2(DOTA)^+$, kation Y^{3+} znajduje się na zewnątrz makrocyklu i jest koordynowany jedynie poprzez cztery atomy tlenu grup karboksylowych. Usunięcie protonu z pierścienia azotowego powoduje wytworzenie kompleksu $YH(DOTA)$, w którym Y przemieszcza się w kierunku pierścienia i tworzy wiązanie z czterema tlenami grup karboksylowych oraz z jednym atomem azotu. Tak więc tworzenie się kompleksu $Y(DOTA)^-$ zachodzi poprzez powstawanie dwóch pośrednich struktur: $YH_2(DOTA)^+$ i $YH(DOTA)$. Czynnikiem limitującym szybkość reakcji jest powolne odszczepienie protonu z kompleksu $YH(DOTA)$ i utworzenie ośmiokoordynacyjnego kompleksu $Y(DOTA)^-$. W trakcie tej reakcji następuje przegrupowanie pierścienia makrocyklicznego z rotacją wiązań C-C, C-N i inwersją atomu N. Kiedy proton zostaje usunięty, tworzenie wiązań koordynacyjnych przez pozostałe trzy atomy N jest szybsze.

Jak więc widać, wadą ligandów tetraazamakrocyklicznych jest powolna kinetyka tworzenia kompleksów z kationami lantanowców. Aby przezwyciężyć ten problem, pojawił się pomysł zastosowania ligandów o większym pierścieniu zawierającym 5 lub 6 atomów azotu, takich jak PEPA czy HEHA (Rys. 3). Ligandy te wykazują szybszą kinetykę kompleksowania lantanowców, ale ciągle jeszcze wolniejszą niż ligandy acykliczne. Stałe szybkości tworzenia kompleksów (Tab. 4) rosną wraz ze wzrostem wielkości pierścienia makrocyklu. Dla przykładu HEHA tworzy kompleks z Lu i Y 100 razy szybciej niż DOTA, ale reaguje 10 razy wolniej niż jej liniowy analog DTPA [42]. Nie zaobserwowano prostej korelacji między ilością atomów azotu w pierścieniu a trwałością utworzonych kompleksów (Tab. 5). Dane przedstawione (Tab. 4 i 5) pokazują, że na szybkość tworzenia kompleksów z Lu^{3+} i Y^{3+} ma wpływ elastyczność ligandu, rosnąca z wielkością pierścienia makrocyklicznego, a więc z liczbą atomów N, a nie termodynamiczna trwałość powstających

kompleksów. Wydaje się, że perspektywnym ligandem jest HEHA, tworząca znacznie szybciej równie silne kompleksy z lantanowcami jak DOTA.

Tabela 4. Pseudo-pierwszego rzędu stałe szybkości tworzenia kompleksów, pH = 7,8 i t = 25°C [42]
Table 4. Pseudo-first-order rate constants of complexes formation at pH = 7,8 and t = 25°C

Metal	k [min ⁻¹]			
	DOTA	PEPA	HEHA	DTPA
Lu ³⁺	6,3 × 10 ⁻³	9,6 × 10 ⁻²	5,8 × 10 ⁻¹	4,6
Y ³⁺	4,6 × 10 ⁻³	2,0 × 10 ⁻¹	6,8 × 10 ⁻¹	7,3

Tabela 5. Stałe trwałości kompleksów lantanowców z niektórymi ligandami makrocyclicznymi i DTPA
Table 5. Stability constants of lanthanide complexes with selected macrocyclic ligands and DTPA

Kation	log K			
	DOTA	PEPA [42]	HEHA [42]	DTPA [42]
Lu ³⁺	23,5 [43]	16,71	24,26	22,4
Y ³⁺	24,9 [44]	16,07	24,04	22,1
Sm ³⁺	23,5 [43]	15,35	21,24	22,3
Ho ³⁺	23,3 [43]	16,48	23,88	22,8

4.2. KOMPLEKSY Ga³⁺ I In³⁺

Radionuklidy ^{67,68}Ga i ¹¹¹In znalazły szerokie zastosowanie w diagnostyce, ⁶⁷Ga i ¹¹¹In w technice SPECT, a ⁶⁸Ga w PET. Dodatkową zaletą ⁶⁸Ga jest możliwość otrzymania tego radionuklidu z generatora ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga.

Kationy Ga³⁺ i In³⁺, mimo że należą do bloku *p*, wykazują duże podobieństwo chemiczne do kationów grupy 3, Sc³⁺ i Y³⁺ oraz lantanowców. Dlatego ligandy opracowane dla tych kationów znalazły także zastosowanie do koordynacji Ga³⁺ i In³⁺. Jednak, w odróżnieniu od kationów lantanowców, kationy Ga³⁺ i In³⁺ wykazują niższe liczby koordynacyjne w tworzonych kompleksach, od 4 do 6. W rzadkich przypadkach In³⁺ może także tworzyć kompleksy o LK = 7 i 8 [43].

Od dłuższego czasu ⁶⁷Ga w postaci cytrynianu znajduje zastosowanie w diagnostyce nowotworów [44–46]. Wykorzystuje się tu duże podobieństwo Ga³⁺ i Fe³⁺. W płynach biologicznych cytryniany zostają wyparte ze sfery koordynacyjnej przez transferynę i kompleksy ⁶⁷Ga³⁺, podobnie jak kompleksy Fe³⁺ z transferyną, kumulują się w komórkach nowotworowych.

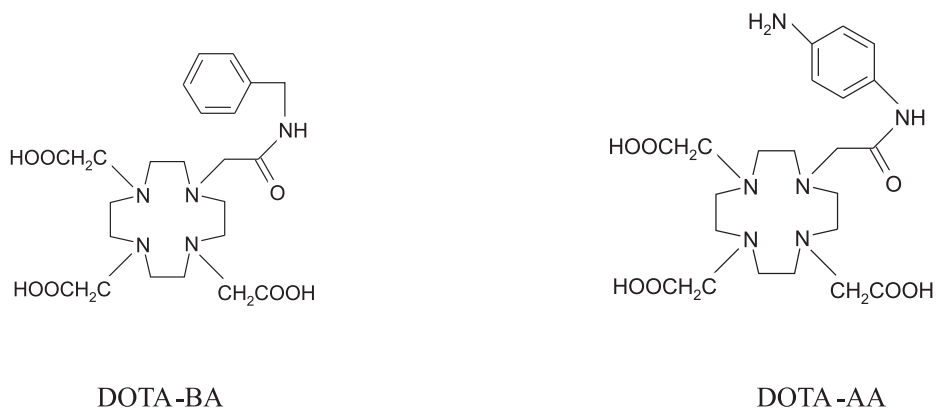
Ostatnio coraz częściej wykorzystuje się radionuklidy Ga i In do diagnostyki receptorowej. Radionuklidy te, przyłączone do różnych peptydów, znajdują zastosowanie zarówno w diagnostyce SPECT, jak i PET [47–48]. Początkowo kationy te były kompleksowane acyklicznymi ligandami, takimi jak DTPA lub desferoksamina. Jednak ze względu na możliwą transchelatację Ga^{3+} i In^{3+} do transferyny, ligandy stosowane do wiązania Ga^{3+} i In^{3+} muszą tworzyć wiązania silniejsze niż transferyna (Ga(III)-transferyna, $\log K = 20,3$ [49], In(III)-transferyna $\log K = 18,74$ [50]). W przypadku wielu ligandów acyklicznych stwierdzono oddysocjowanie radionuklidów Ga^{3+} i In^{3+} , dlatego też w dalszych pracach skupiono się na ligandach makrocyklicznych. Stałe trwałości tych kompleksów z DOTA nie są co prawda dużo większe niż kompleksów z DTPA, ale ze względu na ich inertność uwalnianie radionuklidów Ga i In było znacznie mniejsze.

Porównując powinowactwo do receptorów na komórkach nowotworowych radiofarmaceutyku DOTA-[Tyr]³-okterotydu (DOTATOC) zawierającego nuklidy Y i Ga stwierdzono bardzo duże różnice (Tab. 6). W Tabeli tej przedstawiono powinowactwo (IC_{50}) jako stężenie radiofarmaceutyku potrzebnego do wyparcia z receptora sstr2 połowy somatostatyny znakowanej ¹²⁵I.

Tabela 6. Powinowactwo DOTATOC znakowanego różnymi kationami metali do receptora sstr2 [51]
Table 6. Affinity of DOTATOC labeled with various metal cations for sstr2 receptor

Znakowany DOTATOC	IC_{50} [nM]
somatostatyna	2,7 +/- 0,3
Ga(III) DOTATOC	2,5 +/- 0,5
Y(III) DOTATOC	11 +/- 1,7

W podobnych badaniach stwierdzono znacznie większe powinowactwo radiofarmaceutyku DOTA-1-Nal3-octreotide (DOTA-NOC) znakowanego ¹¹¹In niż znakowanego ⁹⁰Y [52]. Pomimo dużego podobieństwa chemicznego kationów Ga^{3+} , In^{3+} i Y^{3+} , zaobserwowano niespodziewane różnice w powinowactwie radiofarmaceutyków do receptorów komórkowych, w zależności od kationu. W rezultacie poszerzono badania tych kompleksów o ich strukturę w ciele stałym i w roztworze. Liu i in. [53] zsyntezowali modelowe kompleksy In^{3+} i Y^{3+} z pochodnymi DOTA 1,4,7,10-tetraaza-4,7,10-tris-(carboxymethyl)-1-cyclododecylacetylbenzylamine (DOTABA) oraz 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid mono(*p*-aminoanilide) (DOTA-AA) (Rys. 7).



Rysunek 7. Wzory strukturalne modelowych ligandów DOTA-BA i DOTA-AA
 Figure 7. Structures of two model compounds: DOTA-BA and DOTA-AA

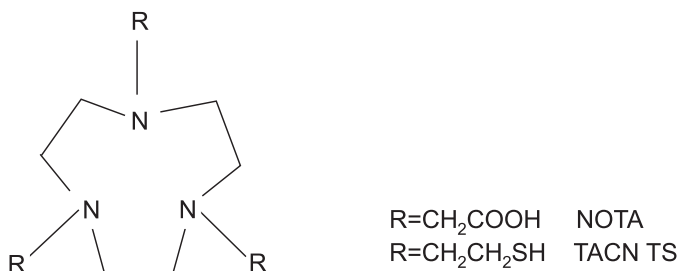
Badania rentgenograficzne wykazały, że Y^{3+} i In^{3+} z DOTA-BA i z DOTA-AA tworzą kompleksy ośmiokoordynacyjne, natomiast Ga^{3+} sześciokoordynacyjne [54–55]. Jednak w roztworze, jak to wykazano metodą NMR, grupa karbonylowa ligandu nie uczestniczy w koordynacji In^{3+} i wykazuje on $LK = 7$, natomiast kompleksy Y^{3+} mają w roztworze taką samą strukturę jak w ciele stałym. Otrzymane wyniki zostały potwierdzone chromatograficznie. Stwierdzono bowiem, że czas retencji In-DOTA-AA jest znacznie mniejszy od czasu retencji Y-DOTA-AA [57]. Podobne wyniki otrzymano także dla kompleksów DOTA-BA [56]. Różnice w retencji kompleksów wynikały z większej hydrofilowości siedmiokoordynacyjnych kompleksów In^{3+} z nieskoordynowaną grupą amidową. Oczywiście, najbardziej hydrofilowe były sześciokoordynacyjne kompleksy Ga^{3+} z wolną grupą amidową i karboksylową. Bardziej otwarta i giętka struktura kompleksów Ga^{3+} i In^{3+} pozwala na lepsze dopasowanie peptydów do receptorów komórkowych niż w przypadku kompleksów Y^{3+} , w których wykorzystanie grupy amidowej do koordynacji zbliża kompleks do peptydu i usztywnia radiofarmaceutyk. Większa hydrofilowość kompleksów Ga^{3+} i In^{3+} , w porównaniu z kompleksami Y^{3+} , wpływa także na lepsze wydalanie z moczem radiofarmaceutyków nie związanych z receptorami [57].

Badania te miały fundamentalne znaczenie, ze względu na możliwość zastosowania znakowanych $^{67,68}Ga$ i ^{111}In , pochodnych oktreotydu, jako wskaźników dozymetrycznych w radioterapii oktreotydem znakowanym ^{90}Y . W przypadku podobnych własności farmakokinetycznych oraz zbliżonego powinowactwa do receptorów komórkowych, radiofarmaceutyki znakowane $^{67,68}Ga$ i ^{111}In można zastosować do badania wrażliwości komórek nowotworowych na radiofarmaceutyki terapeutyczne.

Obserwując doniesienia literaturowe dotyczące użycia $^{67,68}Ga$ i ^{111}In w diagnostyce receptorowej, można stwierdzić, że większość prac dotyczy biomolekuł sprzężonych z ligandem DOTA. Jest to spowodowane dużą dostępnością DOTA i jej

dwufunkcyjnych pochodnych, a także dostępnością gotowego oktreatydu sprzężonego z DOTA. Wcześniej już dobrze opracowano procedury znakowania biomolekuł zawierających DOTA radionuklidami ^{90}Y i ^{177}Lu [58–60].

Ga^{3+} ($r_i = 76$ pm) jest kationem mniejszym niż kationy lantanowców, dlatego DOTA, której wielkość luki jest dobrze dopasowana do kationów Y^{3+} i Ln^{3+} , nie jest optymalnym ligandem dla Ga^{3+} . Lepsze dopasowanie Ga^{3+} uzyskano dla karboksylowych i tiolowych pochodnych triazacyklononanu (Rys. 8) [61].



Rysunek 8. Wzór strukturalny ligandów, pochodnych triazacyklononanu
 Figure 8. Chemical structures of triazacyclononane derivatives

Ligandy te tworzą z Ga^{3+} jak i z In^{3+} silniejsze kompleksy niż DOTA. Szczególną trwałość wykazują kompleksy z ligandami zawierającymi grupy etylenotiolowe, jak np. z TACN TS. Stałe trwałości tych kompleksów przedstawiono w Tabeli 7.

Tabela 7. Stałe trwałości kompleksów Ga^{3+} , In^{3+} i Y^{3+} z DOTA, NOTA i TACN TS, ($\mu = 0,1$) 25°C
 Table 7. Stability constants of Ga^{3+} , In^{3+} i Y^{3+} complexes with DOTA, NOTA and TACN TS, ($\mu = 0,1$) 25°C

Ligand	log K		
	Ga^{3+}	In^{3+}	Y^{3+}
DOTA	21,33 [62]	23,9 [64]	24,9 [44]
NOTA	30,98 [63]	26,2 [65]	–
TACN TS	34,2 [63]	36,1 [63]	–

Dane w Tabeli 7 jednoznacznie pokazują, że zarówno w przypadku Ga^{3+} jak i In^{3+} kompleksy z NOTA, a szczególnie z TACN TS, są znacznie silniejsze niż z DOTA, przy czym trwałość kompleksu Ga^{3+} -DOTA jest zbliżona do trwałości kompleksu Ga^{3+} -transferyna, co może powodować transchelatacje radionuklidów galu, szczególnie dłużej żyjącego ^{67}Ga . Kompleks Ga^{3+} z NOTA został zidentyfikowany jako sześciokoordynacyjny, ze strukturą pseudo oktaedru. Kation Ga^{3+} bardzo dobrze pasuje do luki w NOTA utworzonej przez trzy atomy tlenu z trzech grup karboksylowych w jednej płaszczyźnie i trzy atomy azotu w drugiej. Dla kompleksu In^{3+} z TACN TS

stwierdzono istnienie struktury pośredniej pomiędzy oktaedrem a antypryzmatem trygonalnym [64]. Stwierdzono też, że ligand ten jest bardziej plastyczny niż DOTA i lepiej dopasowuje się do kompleksowanego kationu. Tak więc, zarówno dobre dopasowanie, jak i powinowactwo Ga^{3+} i In^{3+} do donorowych atomów siarki odpowiada za dużą trwałość kompleksów tych kationów z TACN TS.

4.3. KOMPLEKSY Rh^{3+} , Cu^{2+} I Ag^+

W odróżnieniu od opisanych w punktach 4.1 i 4.2 radionuklidów, których kationy były twardymi kwasami, kationy miedzi, rodu i srebra są typowymi miękkimi kwasami Lewisa. Dlatego ligandy zaprojektowane dla radionuklidów Ln^{3+} , Y^{3+} , Ga^{3+} czy In^{3+} nie tworzyły silnych kompleksów z Rh^{3+} , Cu^{2+} i Ag^+ . Wspólną cechą miękkich kwasów Lewisa jest tworzenie trwałych połączeń z ligandami zawierającymi donorowe atomy siarki (tioetery, tiole), azotu (aminy, grupa imidazolowa) lub fosforu, dlatego też takie ligandy wybrano do kompleksowania tych kationów.

Rod ma dwa bardzo atrakcyjne radionuklidy, które mogą być zastosowane w radiofarmacji. Radionuklid ^{105}Rh jest niskoenergetycznym emiterym promieniowania β^- o charakterystyce promieniowania podobnej do ^{177}Lu , a $^{103\text{m}}\text{Rh}$ został zakwalifikowany jako najlepszy radioizotop w terapii elektronami Augera [65]. Bezośnikowy ^{105}Rh otrzymuje się przez naświetlenie w reaktorze metalicznej tarczy rutenowej. Powstały w wyniku rozpadu β^- ^{105}Ru radionuklid ^{105}Rh może być bardzo łatwo oddzielony przez odparowanie tarczy rutenowej po jej utlenieniu do RuO_4 lub przez ekstrakcję RuO_4 do CCl_4 [66]. Radionuklid $^{103\text{m}}\text{Rh}$ można otrzymać bezpośrednio w szpitalu z generatora $^{103}\text{Ru}/^{103\text{m}}\text{Rh}$ [67].

Dodatkową zaletą radionuklidów rodu jest fakt, że kation Rh^{3+} ma w kompleksach niskospinowych konfigurację d^6 , charakterystyczną dla bardzo trwałych kinetycznie kompleksów. Niestety, z powodu trwałości kinetycznej tych kompleksów, ich synteza jest bardzo powolna. Aby ją przyspieszyć, zastosowano roztwory wodno-etanolowe. W tych roztworach etanol redukuje Rh^{3+} do Rh^+ , który szybko był kompleksowany i następnie utleniany tlenem powietrza do Rh^{3+} [68].

W celu związania kationów ^{105}Rh z biomolekułą, zaproponowano tetradentne cykliczne i acykliczne ligandy zawierające donorowe atomy siarki i azotu. Kompleksowanie wszystkimi badanymi ligandami było bardzo wydajne. Zauważono jednak, że w makrocyclicznych ligandach [14]ane NS_3 , [14]ane N_2S_2 i [14]ane N_4 zastępowanie donorowych atomów siarki atomami azotu powodowało duży spadek wydajności znakowania [69].

Miedź posiada kilka radionuklidów, które znalazły zastosowanie zarówno w diagnostyce, jak i w terapii. Najważniejsze z nich to: krótkożyciowy ^{62}Cu , otrzymywany z generatora $^{62}\text{Ni}/^{62}\text{Cu}$ i wykorzystywany w badaniach perfuzyjnych techniką PET, terapeutyczny emitery β^- ^{67}Cu oraz radionuklid ^{64}Cu , będący jednocześnie emiterym β^+ jak i β^- i również zastosowany zarówno w terapii, jak i diagnostyce PET. W celu przyłączenia radionuklidów miedzi do biomolekuł stosowano powszechnie

ligandy tetraazamakrocykliczne, takie jak cyklam, cyklen i ich pochodne. Welch, Anderson i in. w szeregu pracach pokazali, że formalny ładunek tych kompleksów silnie wpływa na ich zachowanie biologiczne. Dodatnio naładowane kompleksy akumulowały się silnie w nerkach i wątrobie, natomiast obojętne i ujemnie naładowane były łatwo usuwane z organizmu przez nerki [69–72].

Obecnie do wiązania radionuklidów miedzi powszechnie stosuje się karboksylowe pochodne tetraazamakrocykli. W kompleksach z DOTA i TETA (Rys. 3) kation Cu^{2+} wchodzi do pierścienia teraazamakrocyklicznego, a dwie grupy karboksylowe tworzą słabe wiązania z miedzią w pozycjach aksjalnych. Stwierdzono także, że Cu^{2+} tworzy trwalsze termodynamicznie i kinetycznie kompleksy z ligandami tetraazamakrocyklicznymi, zawierającymi poprzecznie mostkowane atomy azotu [73].

4.4. Makrocykliczne kompleksy α emiterów bizmutu i astatu

Dwa radionuklidy bizmutu ^{212}Bi i ^{213}Bi , będące emiterami cząstek α , mogą znaleźć zastosowanie w terapii radionuklidowej. Emisja cząstek α o małym zasięgu predestynuje $^{212,213}\text{Bi}$ głównie do zwalczania przerzutów nowotworowych występujących w postaci małych guzków o średnicy kilku komórek, rozsianych na dużej powierzchni tkanki lub nowotworów we wczesnym stadium rozwoju. W ten sposób radiofarmaceutyki znakowane $^{212,213}\text{Bi}$ byłyby uzupełnieniem dla istniejących już radiofarmaceutyków na bazie emiterów β^- , wykorzystywanych w radioterapii dużych guzów nowotworowych. Dużą zaletą ^{212}Bi i ^{213}Bi jest możliwość otrzymywania obu radionuklidów z generatorów, odpowiednio $^{228}\text{Th}/^{212}\text{Bi}$ i $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$. Wadą ograniczającą możliwość zastosowania obu radionuklidów bizmutu w radiofarmacji jest ich stosunkowo krótki czas połowicznego rozpadu, wynoszący 46 min. dla ^{213}Bi i 1,0 godz. dla ^{212}Bi .

Bi^{3+} został sklasyfikowany przez Pearsona [74] jako kation leżący na granicy twardych i miękkich kwasów Lewisa. Podobnie jak lantanowce, tworzy on bardzo trwałe kompleksy z ligandami zawierającymi twarde donorowe atomy O i N. Tak więc ligandy zaprojektowane dla Y^{3+} i Ln^{3+} tworzą również silne kompleksy z Bi^{3+} . Jednakże znakowane ^{212}Bi radiofarmaceutyki, zawierające acykliczne ligandy, takie jak EDTA i DTPA, uwalniały w organizmie radiotoksyczny ^{212}Bi , który gromadził się w nerkach. Dalsze badania wykazały jednak, że kompleksy radionuklidów bizmutu z izomerem *trans* kwasu cyclohexyldietylenetriaminepentowego (CyDTPA) są znacznie bardziej inertne [75–77].

Równoległe prowadzono badania trwałości kompleksów radionuklidów bizmutu z makrocyklicznymi ligandami, takimi jak DOTA i NOTA, które jak pokazano w punktach 4.1 i 4.2, tworzą z trójwartościowymi metalami bardzo trwałe kompleksy zarówno termodynamicznie, jak i kinetycznie. W ciele stałym kompleks $\text{Bi}(\text{DOTA})^-$ ma strukturę zdeformowanego antypryzmatu kwadratowego, w którym płaszczyzna wyznaczona przez 4 tleny jest względem płaszczyzny wyznaczonej przez 4 azoty obrócona o 30° . Struktura $\text{Bi}(\text{DOTA})^-$ bardzo przypomina strukturę $\text{Lu}(\text{DOTA})^-$.

Jednakże, ze względu na występowanie stereochemicznie czynnej wolnej pary $6s^2$, odległości Bi-N są znacznie krótsze niż odległości Lu-N, mimo że kation Bi^{3+} ma znacznie większy promień jonowy. W związku z tym, struktura kompleksu Bi^{3+} jest bardziej zwarta i kompleksy bizmutu są silniejsze ($\log K_{\text{Bi(DOTA)}} = 30,3$) niż lantanowców [78].

Trwałość i inertność kompleksów bizmutu z DOTA została potwierdzona w szeregu badań zarówno *in vitro* [79], jak i *in vivo* [80]. Niestety duża inertność kompleksów trójwartościowych metali z DOTA powoduje, że ich synteza jest powolna. W przypadku radionuklidów $^{212,213}\text{Bi}$ o czasach połowicznego rozpadu 46 min. i 1 godz. długi czas syntezy kompleksów uniemożliwiał efektywne znakowanie. Skierowano więc uwagę na inne makrocycliczne ligandy, tworzące bardziej labilne kompleksy. Garmestani i in. [81] zbadali możliwość zastosowania makrocyklu zawierającego 5 atomów azotu w pierścieniu i 5 grup karboksylowych, kwas 1,4,7,10,13-pentaazacyklopentadecane $\text{N,N',N'',N''',N''''}$ -pentaoctowy (PEPA) (Rys. 3). Niestety, badania biodystrybucji i trwałości koniugatu (przeciwciało monoklonalne-PEPA- ^{206}Bi) wykazały, że otrzymany koniugat miał gorszą trwałość niż znakowane przeciwciało, skoniugowane z DTPA. Także kinetyka znakowania była w dalszym ciągu powolna.

Inną możliwością zastosowania ^{212}Bi w radiofarmacji jest wykorzystanie koncepcji tzw. „generatora *in vivo*” [82]. Polega ona na związaniu macierzystego, dłużej żyjącego radionuklidu, który w wyniku rozpadu tworzy krócej żyjący radionuklid o właściwościach terapeutycznych. W przypadku ^{212}Bi , macierzystym radionuklidem jest ^{212}Pb ($t_{1/2} = 10$ godz.), który ulega rozpadowi w reakcji:

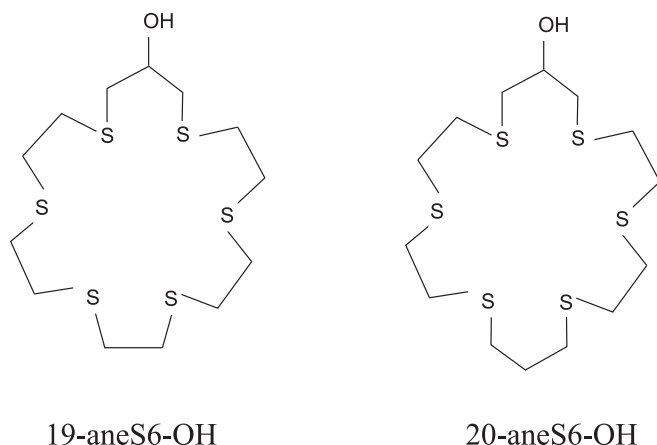


Takie podejście pozwala na znaczne wydłużenie procesu terapeutycznego. W przypadku dłużej żyjącego radionuklidu ^{212}Pb , możliwe jest, w odróżnieniu od ^{212}Bi , zastosowanie makrocyclicznych ligandów. Jednogodzinna synteza kompleksu przy czasie połowicznego rozpadu 10 godz. nie stanowi istotnego ograniczenia. Głównym wymaganiami w stosunku do liganda jest utworzenie trwałych kompleksów zarówno z nuklidem macierzystym ^{212}Pb , jak i produktem rozpadu ^{212}Bi . Jeśli uwzględnia się tylko energię odrzutu, to rozpad β^- radionuklidu ^{212}Pb nie powinien niszczyć wiązań metalu z ligandem, ponieważ oszacowana energia odrzutu powstającego ^{212}Bi wynosi tylko 0,5 eV. Nie jest to energia wystarczająca, ponieważ zerwanie wiązań wymaga ok. 10 eV. Jednakże w czasie rozpadu ^{212}Pb powstaje wzbudzone jądro ^{212}Bi , które w wyniku oddziaływania z powłokami elektronowymi powoduje emisję średnio trzech elektronów konwersji. Tak więc, w wyniku rozpadu ^{212}Pb , powstaje ^{212}Bi w postaci Bi^{5+} , który łatwo uwalnia się z kompleksu. Eksperymentalnie stwierdzono, że w czasie przemiany $^{212}\text{Pb} \xrightarrow{\beta^-} ^{212}\text{Bi}$ w kompleksie Pb(DOTA)^{2-} uwalnia się 36% atomów ^{212}Bi . Uwolniony ^{212}Bi , mający zdolność gromadzenia się w wielu organach, szczególnie nerkach, stanowiłby duże zagrożenie dla organizmu i ograniczałby możliwość zastosowania koniugatów z ^{212}Pb jedynie w procesach,

w których radiofarmaceutyk ulega szybko internalizacji. Lepsze wyniki, jeśli chodzi o wiązanie ^{212}Pb , uzyskał Chappell i in. stosując analog DOTA, w którym grupy karboksylowe zostały zastąpione grupami amidowymi [83]. Przeprowadzone ostatnio badania na zwierzętach z koniugatem ^{212}Pb -biotyna [84] wskazują na dużą kumulację ^{212}Bi w wszczepionych guzach, a stosunkowo niedużą w innych organach, również w nerkach. Autorzy proponują, aby uwalniany ^{212}Bi wiązać podawanym dodatkowo pacjentom chelatem selektywnym na kationy Bi^{3+} .

Innym obiecującym emiterym promieniowania α , mogącym znaleźć zastosowanie w celowanej radioterapii, jest izotop astatu ^{211}At [85]. Badania kliniczne z zastosowaniem przeciwciał znakowanych ^{211}At są bardzo zaawansowane. Znakowanie biomolekuł prowadzi się zazwyczaj przez astatowanie pierścienia benzenowego. Jednak połączenia astatu z węglem są znacznie słabsze niż innych chlorowców, przez co astatowane biomolekuły nie wykazują dużej trwałości. Astat jest najcięższym chlorowcem o własnościach chemicznych różniących go od lżejszych homologów. Występuje na stopniach utlenienia od -1 do $+7$, przy czym najbardziej trwałe jest jako At^- i At^+ . Kation astatu na stopniu $+1$, jako miękki kwas Lewisa, wykazuje duże powinowactwo do chelatujących ligandów zawierających donorowe atomy siarki, selenu i fosforu [86]. Autorzy tej pracy stosowali acykliczne ligandy, jednak nie przeprowadzili badań trwałości tych kompleksów. Yordanov i in. [87] próbowali zastosować makrocykliczne ligandy do kompleksowania ^{211}At . Zsyntezowany przez tych autorów 25,26,27,28-tetrakis(2-tioacetatoethoxy)calix[4]arene efektywnie kompleksował ^{211}At , jednakże wykazywał bardzo małą stabilność w badaniach *in vivo*. Autorzy stwierdzili więc bardzo małą przydatność tego kompleksu w radiofarmacji.

Innym radionuklidem jednowartościowego kationu mogącym mieć zastosowanie w radiofarmacji jest ^{111}Ag . Radionuklid ten jest emiterym promieniowania β^- o stosunkowo długim czasie połowicznego rozpadu $t_{1/2} = 7,45$ d. Jego zastosowanie w radiofarmacji wymaga silnego związania z ligandami. Srebro w kompleksach jest bardzo labilnym centrum metalicznym, w którym proces wymiany ligandów zachodzi bardzo szybko. Alberto i in. [88] stwierdzili, że jedynie ligandy makrocykliczne mogą wytworzyć z kationami Ag^+ odpowiednio inertne kompleksy. Autorzy zsyntezowali dwie hydroksy pochodne cyklicznych tioeterów 3,6,9,12,15,18-Hexathianonadecanol i 3,6,9,13,16,19-Hexathiaicosanol (Rys. 9) oraz ich kompleksy z Ag^+ .



Rysunek 9. Hydroksylowe pochodne cyklicznych ligandów tioeterowych
 Figure 9. Structures of hydroxylic derivatives of crown thioether ligands

Otrzymane kompleksy miały strukturę tetraedryczną w stanie stałym i oktaedryczną w roztworze. Kompleksy te wykazują rzadko spotykaną dla Ag^+ liczbę koordynacyjną 6, dzięki czemu powinny wykazywać dużą trwałość. Niestety, pomimo zapowiedzi, autorzy nie przeprowadzili badań trwałości w warunkach *in vitro* i *in vivo*.

PODSUMOWANIE

Rosnąca w ostatnich latach rola radioizotopowych metod diagnostyki i terapii medycznej była w dużym stopniu możliwa dzięki rozwojowi chemii koordynacyjnej. Zsyntezowane makrocykliczne ligandy idealnie nadawały się do trwałego związania radionuklidów. Duża trwałość tych kompleksów, związana z tzw. efektem makrocyklicznym, powodowała, że obecnie znaczny procent stosowanych radiofarmaceutyków jest oparty na makrocyklicznych kompleksach radionuklidów. Szczególną zaletą kompleksów makrocyklicznych jest ich inertność. Skompleksowany w radiofarmaceutyku kation metalu znajduje się w płynach biologicznych, w otoczeniu, w którym nie ma wolnego liganda, jest natomiast dużo związków mogących go wyprzeć z kompleksu. W tych warunkach trwałość kinetyczna kompleksu umożliwia utrzymanie radionuklidu w biomolekule przez wystarczająco długi okres czasu, potrzebny dla diagnozy lub terapii. Obecnie, prace są szczególnie ukierunkowane na otrzymywanie nowych, jeszcze trwalszych kompleksów, które jednocześnie tak modyfikowałyby radiofarmaceutyk, aby miał optymalne własności, związane zarówno z internalizacją, jak i z właściwościami farmakokinetycznymi.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] V. Tolmachev, J. Carlsson, H. Lundqvist, *Acta Oncologica*, 2004, **43**, 264.
- [2] P.A. Schubiger, R. Alberto, A. Smith, *Bioconjugate Chem.*, 1996, **7**, 165.
- [3] C.J. Anderson, M.J. Welch, *Chem. Rev.*, 1999, **99**, 2219.
- [4] M.J. Heeg, S.S. Jurisson, *Acc. Chem. Res.*, 1999, **32**, 1053.
- [5] D.E. Milenic, E.D. Brady, M.W. Brechbie, *Nature Rev.*, 2004, **3**, 488.
- [6] S. Liu, D.S. Edwards, *Bioconjugate Chem.*, 2001, **12**, 7.
- [7] C.J. Pedersen, *J. Am. Chem. Soc.*, 1967, **89**, 2495.
- [8] C.J. Pedersen, *J. Am. Chem. Soc.*, 1967, **89**, 7017.
- [9] J.E. Richman, T. Atkins, *J. Am. Chem. Soc.*, 1974, **96**, 2268.
- [10] G.R. Weisman, P. Reed, *J. Org. Chem.*, 1996, **61**, 5186.
- [11] I.M. Helps, D. Parker, J.R. Morphy, J. Chapman, *Tetrahedron*, 1989, **45**, 219.
- [12] D.D. Dischino, E.J. Delaney, J.E. Emswiler, G.T. Gaughan, J.S. Prasad, S.K. Srivasrava, M.F. Tweedle, *Inorg. Chem.*, 1991, **30**, 1265.
- [13] W.J. Kruper, P.R. Rudofl, C.A. Langhoff, *J. Org. Chem.*, 1993, **58**, 3869.
- [14] C. Traubaud, J. Dessolin, M. Camplo, J.L. Kraus, *Synth. Commun.*, 1998, **28**, 311.
- [15] A.K. Mishra, K. Draillard, A. Five-Chauvet, J.F. Gustin, C. Curtet, J.F. Chatal, *Tetrahedron Lett.*, 1996, **37**, 7515.
- [16] M. Mailet, C.S. Kwok, A.A. Noujaim, V. Snieckus, *Tetrahedron Lett.*, 1998, **39**, 2659.
- [17] S.J. Kline, D.A. Betebenner, D.K. Johnson, *Bioconjugate Chem.* 1990, **2**, 26.
- [18] G. Ruser, W. Ritter, H.R. Maecke, *Bioconjugate Chem.* 1990, **1**, 345.
- [19] C.F. Meares, T.G. Wensel, *Acc. Chem. Res.*, 1984, **17**, 202.
- [20] C.F. Meares, *Nucl. Med. Biol.* 1986, **13**, 311.
- [21] M.K. Moi, C.F. Meares, M.J. McCall, W.C. Cole, S.J. DeNardo, *Anal. Chem.*, 1985, **148**, 249.
- [22] S.M. Quardi, H.M. Vriesendorp, Q.J. Nuc. Med., 1998, **42**, 250.
- [23] L.E. Williams, M.R. Lewis, G.G. Bebb, K.G. Clarke, T.L. Odom-Maryon, J.E. Shively, A.A. Raubitschek, *Bioconjugate Chem.*, 1998, **9**, 87.
- [24] J.J. Peterson, C.F. Meares, *Bioconjugate Chem.* 1999, **10**, 553.
- [25] S. Jurisson, C.F. Meares, *Bioconjugate Chem.* 1998, **9**, 618.
- [26] J.A.K. Howard, A.M. Kenwright, J.M. Moloney, D. Parker, M. Port, M. Navet, O. Rousseau, M. Woods, *Chem. Commun.*, 1998, 1381.
- [27] S.I. Kang, R.S. Ranganathan, J.E. Emswiler, K. Kumar, J.Z. Gougoutas, M.F. Malley, M.F. Tweedle, *Inorg. Chem.*, 1993, **32**, 2912.
- [28] M.R. Spirlet, J. Rebizant, J.F. Desreux, M.F. Loncin, *Inorg. Chem.*, 1984, **23**, 359.
- [29] C.A. Chang, L.C. Francesconi, M.F. Malley, K. Kumar, J.Z. Cougoutas, M.F. Tweedle, *Inorg. Chem.*, 1993, **32**, 3501.
- [30] J.F. Desreux, *Inorg. Chem.* 1980, **19**, 1319.
- [31] S. Aime, M. Botta, G. Ermodi, *Inorg. Chem.* 1992, **31**, 4291.
- [32] S. Aime, P.L. Anelli, M. Botta, F. Fedeli, G. Ermondi, M. Grandi, P. Paoli, F. Uggeri, *Inorg. Chem.* 1992, **31**, 2422.
- [33] J.F. Desreux, *Inorg. Chem.* 1980, **19**, 1319.
- [34] D.A. Keire, M. Kobayashi, *Bioconjugate Chem.*, 1999, **10**, 454.
- [35] R. Delgado, J.J.R. Frausto da Siliva, *Talanta*, 1982, **29**, 815.
- [36] K. Kumar, C.A. Chang, L.C. Francesconi, D.D. Dischino, M.F. Malley, J.Z. Cougoutas, M.F. Tweedle, *Inorg. Chem.*, 1994, **33**, 3567.
- [37] K. Kumar, C.A. Chang, M.F. Tweedle, *Inorg. Chem.* 1993, **32**, 587.
- [38] E.T. Clarke, A.E. Martell, *Inorg. Chim. Acta*, 1991, **190**, 27.

- [39] E.T. Clarke, A.E. Martell, *Inorg. Chim. Acta*, 1991, **190**, 37.
- [40] D.L. Kukis, S.J. DeNardo, G.L. DeNardo, R.T. O'Donnell, C.F. Meares, *J. Nucl. Med.*, 1998, **39**, 2105.
- [41] D.D. Dischino, J.J. Delaney, J.E. Emswiler, G.T. Gaughan, J.S. Prasad, S.K. Srivasrava, M.F. Tweedle, *Inorg. Chem.*, 1991, **30**, 1265.
- [42] M. Kodama, T. Koike, A.B. Mahatma, E. Kiura, *Inorg. Chem.*, 1991, **30**, 1270.
- [43] G. Wilkinson, *Comprehensive Coordination Chemistry*, ed. Pergamon Press 1987, **3**, 129, 154.
- [44] R.E. Weiner, M.L. Thakur, *Radiochim. Acta*, 1995, **70/71**, 273.
- [45] A.E. Jones, G.S. Johnston, M. Koslow, *J. Nucl. Med.*, 1972, **13**, 439.
- [46] G.L. Denardo, K. A Drohn, S.J. Denardo, *Cancer*, 1977, **40**, 2923.
- [47] P. Antunes, M. Ginj, H. Zhang, B. Waser, R.P. Baum, J.C. Reubi, H. Maecke, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. I.*, 2007, **34**, 982.
- [48] K.-P. Eisenwiener, M.I.M. Prata, I. Buschmann, H.-W. Zhang, A.C. Santos, S. Wenger, J.C. Reubi, H.R. Mäcke, *Bioconjugate Chem.*, 2002, **13**, 530.
- [49] W.R. Harris, V.L. Pecoraro, *Biochemistry*, 1983, **22**, 292.
- [50] W.R. Harris, Y. Chen, K. Wein, *Inorg. Chem.*, 1994, **33**, 4991.
- [51] J.B. Stimmel, F.C. Kuhl, *Nucl. Med. Biol.*, 1998, **25**, 117.
- [52] D. Wild, J.S. Schmitt, M. Ginj, H.R. Mäcke, B.F. Bernard, E. Krenning, M.de Jong, S. Wenger, J.-C. Reubi, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. I.*, 2003, **30**, 1338.
- [53] S. Liu, Z. He, W.-Y. Hsieh, P.E. Fanwick, *Inorg. Chem.*, 2003, **42**, 8831.
- [54] A. Heppeler, S. Froidevaux, H.R. Mäcke, E. Jermann, M. Behe, P. Powell, M. Hennig, *Chem. Eur. J.*, 1999, **5**, 1974.
- [55] S. Liu, Z. He, W.-Y. Hsieh, P.E. Fanwick, *Inorg. Chem.*, 2003, **42**, 8831.
- [56] S. Liu, J. Pietryka, C.E. Ellars, D.S. Edwards, *Bioconjugate Chem.*, 2002, **13**, 902.
- [57] A. Heppeler, S. Froidevaux, H.R. Mäcke, E. Jermann, M. Behe, P. Powell, M. Hennig, *Chem. Eur. J.*, 1999, **5**, 1974.
- [58] B. Stolz, G. Weckbecker, P.M. Smith-Jones, R. Albert, F. Raulf, C. Bruns, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. I.*, 1998, **25**, 668.
- [59] A. Otte, J. Mueller-Brand, S. Dellas, E. Nitzsche, R. Herrmann, H. Maecke, *Lancet*, 1998, **351**, 417.
- [60] C. Waldherr, M. Pless, H. Maecke, A. Haldemann, J. Mueller-Brand, *Ann. Oncol.*, 2001, **12**, 942.
- [61] R. Ma, M.J. Welch, J. Reibenspies, A.E. Martell, *Inorg. Chim. Acta* 1995, **236**, 75.
- [62] E.T. Clarke, A.E. Martell, *Inorg. Chim. Acta*, 1991, **190**, 37.
- [63] E.T. Clarke, A.E. Martell, *Inorg. Chim. Acta*, 1991, **181**, 273.
- [64] U. Bossek, D. Hanke, K. Wieghardt, *Polyhedron*, 1993, **12**, 1.
- [65] P. Bernhardt, E. Forsell-Aronsson, L. Jacobsson, G. Skarnemark, *Acta Oncol.*, 2001, **40**, 602.
- [66] P.R. Unni, M.R.A. Pillai, *Radiochim. Acta*, 2002, **90**, 363.
- [67] B. Bartoś, E. Kowalska, A. Bilewicz, G. Skarnemark, *J. Labelled Cpd. Radiopharm.*, 2007, **50s1**, 94.
- [68] S.S. Jurisson, A.R. Ketring, W.A. Volkert, *Transition Met. Chem.*, 1997, **22**, 315.
- [69] C.J. Anderson, T.S. Pajean, W.B. Edwards, E.L. Sherman, B.E. Rogers, M.J. Welch, *J. Nucl. Med.*, 1995, **36**, 2315.
- [70] T.M. Jones-Wilson, K.A. Deal, C.J. Anderson, D.W. McCarthy, Z. Kovacs, R.J. Motekaitis, A.D. Sherry, A.E. Martell, M.J. Welch, *Nucl. Med. Biol.*, 1998, **25**, 523.
- [71] B.E. Rogers, C.J. Anderson, J.M. Connett, W.G. Li, W.B. Edwards, E.L.C. Sherman, K.R. Zinn, M.J. Welch, *Bioconjugate Chem.* 1996, **7**, 511.
- [72] X. Sun, J. Kim, A.E. Martell, M.J. Welch, C.J. Anderson, *Nucl. Med. Biol.* 2004, **31**, 1051.

- [73] C.A. Boswell, X. Sun, W. Niu, G.R. Weisman, E.H. Wong, A.L. Rheingold, C.J. Anderson, *J. Med. Chem.*, 2004, **47**, 1465.
- [74] R.G. Pearson, *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, **85**, 3533.
- [75] R.B. Huneke, C.G. Pippin, R.A. Squire, M.W. Brechbiel, O.A. Gansow, M. Strand, *Cancer Res.*, 1992, **52**, 5818.
- [76] T.K. Nikula, M.R. McDevitt, R.D. Finn, C. Wu, R.W. Kozak, K. Garmestani, M.W. Brechbiel, M.J. Curcio, C.G. Pippin, L. Tiffany-Jones, Sr.M.W. Geerlings, C. Apostolidos, R. Molinet, Jr. M. W. Geerlings, O.A. Gansow, D.A. Scheinberg, *J. Nucl. Med.*, 1999, **40**, 166.
- [77] J.P. Norenberg, B.J. Krenning, I.R.H.M. Konings, D.F. Kusewitt, T.K. Nayak, T.L. Anderson, M. de Jong, K. Garmestani, M.W. Brechbiel, L.K. Kvols, *Clin. Canc. Res.*, 2006, **12**, 897.
- [78] E. Csajbok, Z. Baranyai, I. Banyai, E. Brucher, R. Kiraly, A. Muller-Fahrnow, J. Platzek, B. Raduchel, M. Schafer, *Inorg. Chem.*, 2003, **42**, 2342.
- [79] K. Kumar, M. Magerstadt, O.A. Gansow, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1989, **2**, 145.
- [80] C.L. Ruegg, W.T. Anderson-Berg, M.W. Brechbiel, S. Mirzadeh, O.A. Gansow, M. Strand, *Cancer Res.*, 1990, **50**, 4221.
- [81] K. Garmestani, Z. Yao, M. Zhang, K. Wong, C.W. Park, I. Pastan, J.A. Carrasquillo, M.W. Brechbiel, *Nucl. Med. Biol.*, 2001, **28**, 409.
- [82] S. Mirzadeh, K. Kumar, O. Gansow, *Radiochim Acta*, 1993, **60**, 1.
- [83] L.L. Chappell, E. Dadachova, D.E. Milenic, K. Garmestani, Ch. Wu, M.W. Brechbiel, *Nucl. Med. Biol.*, 2000, **27**, 93.
- [84] F. Su, P. Beaumier, D. Axworthy, R. Atcher, A. Fritzberg, *Nucl. Med. Biol.*, 2005, **32**, 741.
- [85] M. Pruszyński, A. Bilewicz, *Wiad. Chem.*, 2004, **58**, 403.
- [86] R. Ludwig, S. Fischer, R. Dreyer, R. Jacobi, J. Beger, *Polyhedron*, 1991, **10**, 11.
- [87] A.T. Yordanov, K. Deal, K. Garmestani, K. Kobayashi, B. Herring, T. Waldmann, W. Brechbiel, *J. Labelled Cpd. Radiopharm.*, 2000, **43**, 1219.
- [87] R. Alberto, W. Nef, A. Smith, T.A. Kaden, M. Neuburger, M. Zehnder, A. Frey, U. Abram, P.A. Schubiger, *Inorg. Chem.*, 1996, **35**, 3420.

Praca wpłynęła do Redakcji 28 marca 2008

AKTYWNOŚĆ KATALITYCZNA POJEDYNCZYCH CZĄSTECZEK ENZYMÓW

CATALYTIC ACTIVITY OF SINGLE ENZYME MOLECULES

Jolanta Jakubaszek, Andrzej Molski

*Pracownia Dynamiki Procesów Fizykochemicznych,
Wydział Chemii UAM,
ul. Grunwaldzka 6, 60-780 Poznań*

Abstract

Wprowadzenie

1. Układy eksperymentalne

1.1. Migotanie fluorescencji pochodzi od cząsteczek enzymu

1.2. Rozbłyski fluorescencji pochodzą od cząsteczek produktów

2. Modelowanie i symulacje kinetyki pojedynczych enzymów

Podsumowanie i perspektywy

Piśmiennictwo cytowane



Mgr. Jolanta Jakubaszek ukończyła studia na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Od 2002 roku jest doktorantką w Pracowni Dynamiki Procesów Fizykochemicznych. Prowadzi badania dotyczące teorii kinetyki reakcji enzymatycznych dla pojedynczych cząsteczek enzymów. Celem jej pracy jest określenie możliwości rozróżniania reakcji enzymatycznych i wyznaczania ich parametrów kinetycznych z rozkładu czasu obrotu.



Prof. dr hab. Andrzej Molski jest absolwentem Wydziału Matematyki, Fizyki i Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Od roku 2002 kieruje Pracownią Dynamiki Procesów Fizykochemicznych. Obecnie prowadzi badania dotyczące teorii spektroskopii fluorescencyjnej pojedynczych cząsteczek. Jest członkiem Polskiego Towarzystwa Chemicznego.

ABSTRACT

As early as in 1961, it has been demonstrated that turnovers of individual enzyme molecules can be detected [1]. In the nineties, advances in single-molecule methods, in particular in confocal microscopy (Fig. 1), made it possible to monitor more closely enzymatic turnovers at a single-molecule level [2–5]. This led to the discoveries of static disorder and dynamic disorder, and closely related memory effects in enzymatic turnovers [6–8]. Differences in activity of individual molecules of the same enzyme are called static disorder. Time-dependent fluctuations of enzymatic activity are called dynamic disorder. One manifestation of dynamic disorder is the fact that consecutive enzymatic turnovers are not statistically independent, which is called „memory effect”. It is believed that static disorder and dynamic disorder are related to conformational dynamics of enzyme molecules.

In this review we discuss current issues of single-molecule enzymology, in particular kinetic effects that are specific to single-enzyme measurements. First we review the conceptual basis of single-enzyme kinetics and the initial work on single enzymes. We focus on the *ping-pong* mechanism of bisubstrate enzyme reactions (Eqs. (1) and (2)), and consider fluorescence trajectories (Figs. 2 and 3) associated with enzymatic turnovers. Two cases are distinguished. In the first, fluorescence comes from an enzyme molecule and fluorescence intensity jumps called blinking carry information on enzymatic activity. Jumps between a fluorescent (*on*) and non-fluorescent (*off*) states (Eqs. (4), (5), and Fig. 2) indicate the moments when the photophysical state of an enzyme changes during enzymatic turnovers. In the second case, fluorescence comes from product molecules whereas enzyme and substrate are non-fluorescent. Fluorescence bursts on a trajectory indicate the moments when non-fluorescent substrate molecules are converted into fluorescent product molecules that subsequently diffuse away from the detection volume (Eqs. (8), (9) and Fig. 3).

In Section 1 we present selected experiments implying the effect of conformational dynamics on enzymatic kinetics. In Section 1.1, we discuss cholesterol oxydase and dihydroorotate dihydrogenase as examples of enzymes whose *on-off* fluorescence blinking is caused by chemical reactions at the enzyme active site. In Section 1.2 we discuss β -galactosidase and lipase B as enzymes which turnovers can generate fluorescent products from suitably chosen non-fluorescent substrates.

In Section 2, we review modeling and simulations of single-enzyme data. The aim of data modeling is to gain insight into single-enzyme activity through analysis of models of increasing complexity. Phenomenological models attempt to capture the essence of single-enzyme kinetics without going into molecular details. If a model is simple enough it may allow analytical solutions. For instance, a simple model of on-off blinking is given in Scheme (25). This scheme is capable of reproducing memory effect that can be visualized by a two-dimensional histogram of consecutive on and off times (Figs. 5a and 5b).

Finally, in the last section we present an outlook for single-molecule enzymology.

Keywords: enzymatic kinetics, single molecules, fluorescence spectroscopy

Słowa kluczowe: kinetyka enzymatyczna, pojedyncze cząsteczki, spektroskopia fluorescencyjna

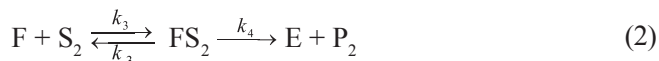
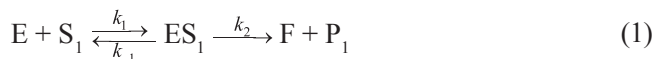
WPROWADZENIE

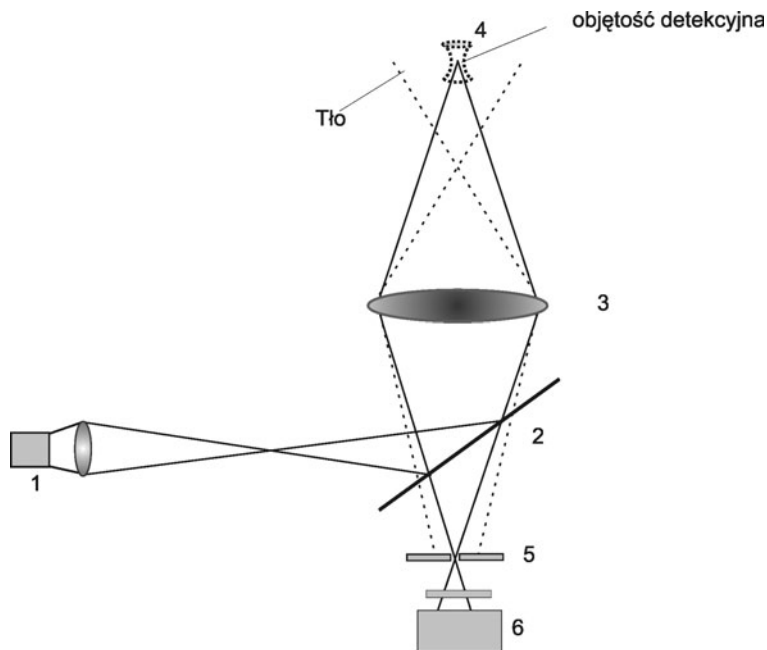
Niniejszy artykuł omawia wyniki oraz analizę eksperymentów, w których obserwowano aktywność katalityczną pojedynczych cząsteczek enzymów. We wprowadzeniu omówiono podstawy koncepcyjne kinetyki pojedynczych cząsteczek enzymów oraz pierwsze prace eksperymentalne w tej dziedzinie.

Pierwsze doświadczenie, w którym obserwowano aktywność enzymatyczną z dokładnością do pojedynczych cząsteczek enzymu przeprowadził Rotman w 1961 roku [1]. Mikrokropelki wody zawierające pojedyncze cząsteczki β -galaktozydazy oraz cząsteczki substratu 6HFG (ang. *6-hydroxyfluoran- β -D-galactopyranoside*) zostały rozproszone w oleju silikonowym. W wyniku reakcji katalitycznej powstawały fluoryzujące cząsteczki produktu, które gromadziły się wewnątrz kropli. Fluorescencje produktu rejestrowano na mikrofotografiach w postaci jasnych kół. Stwierdzono proporcjonalną zależność intensywności fluorescencji od stężenia substratu i odkryto, że dla danego stężenia substratu intensywność fluorescencji rośnie wraz ze wzrostem objętości kropli. Z zależności wzrastającej intensywności fluorescencji od czasu wyznaczono stałą hydrolizy substratu, a na podstawie liczby powstających cząsteczek produktów ustalono liczbę obrotów reakcji.

Rozwój mikroskopii fluorescencyjnej dał nowe możliwości badania kinetyki reakcji pojedynczych cząsteczek enzymów. Do obserwacji pracy pojedynczych cząsteczek enzymu używa się m.in. mikroskopu współogniskowego (konfokalnego), którego schemat budowy przedstawia Rys. 1.

Rozważmy aktywność katalityczną pojedynczych cząsteczek na przykładzie mechanizmu *ping-pong*, który jest często spotykanym mechanizmem aktywności katalitycznej enzymów dwusubstratowych. W pierwszym etapie reakcji do enzymu E przyłącza się substrat S_1 , tworząc kompleks ES_1 , a następnie zachodzi reakcja katalityczna, w wyniku której powstaje produkt P_1 i zmieniona forma enzymu F. Cząsteczka enzymu wraca do formy katalitycznie aktywnej reagując z drugim substratem S_2 . W wyniku reakcji powstaje „zregenerowany” enzym E i drugi produkt P_2 :





Rysunek 1. Schemat budowy mikroskopu współniskowego (konfokalnego).

Laser 1 wysyła wiązkę wzbudzącą w kierunku lustra dwubarwnego 2, które odbija promieniowanie wzbudzące, a przepuszcza promieniowanie o większej długości fali (fluorescencję). Układ soczewek 3 (obiektyw) skupia wiązkę wzbudzącą w objętości detekcyjnej 4, w której znajduje się np. pojedyncza unieruchomiona cząsteczka enzymu. Ten sam zestaw soczewek 3 skierowuje promieniowanie fluorescencji, pochodzące od cząsteczki enzymu lub cząsteczek produktów, na bardzo mały otwór (ang. *pinhole*) w przesłonie 5, a następnie na detektor 6. Linie przerywane przedstawiają fluorescencję pochodzącą spoza objętości detekcyjnej. Dzięki sprzężeniu układu soczewek 3 i otworu 5, mierzona fluorescencja pochodzi głównie z objętości detekcyjnej 4

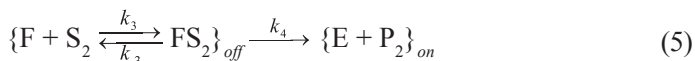
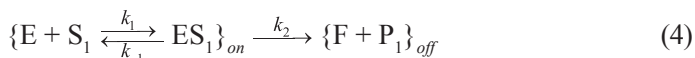
Figure 1. Diagram of a confocal microscope. Laser 1 sends an excitation beam at a dichromic mirror 2 that reflects the excitation light but passes longer wavelengths (fluorescence). A system of lenses 3 (objective) focuses the excitation light onto detection volume 4, where, for example, a single immobilized enzyme molecule is present. The same lenses 3 direct fluorescence from the single enzyme or products molecules into pinhole 5 and then onto detector 6. Dashed lines represent fluorescence generated away from the detection volume. Due to the coupling between lenses 3 and the pinhole the measured fluorescence comes mostly from the detection volume

Mechanizm *ping-pong* ma złożoną kinetykę, która upraszcza się w szczególnych przypadkach. Na przykład, jeśli etap (2) jest szybki w stosunku do etapu (1), to kinetyka tworzenia się cząsteczek produktu P_1 redukuje się do kinetyki Michaelisa-Menten dla etapu (1). Inny szczególny przypadek dotyczy układów, dla których etapy katalityczne kontrolują szybkość reakcji, a równania (1) i (2) upraszczają się do mechanizmu:



gdzie $k_f = k_2$, $k_b = k_4$ są stałymi szybkości pierwszego rzędu dla reakcji prostej (ang. *forward*) i odwrotnej (ang. *backward*), wyznaczonymi przez szybkości etapów katalitycznych.

Jeśli właściwości fluorescencyjne form E i F enzymu różnią się między sobą, mechanizm *ping-pong* (1) i (2) można śledzić w mikroskopie konfokalnym obserwując migotania *on-off* fluorescencji. Zmiany właściwości fotofizycznych cząsteczki enzymu mogą następować pod wpływem cyklicznych zmian chemicznych (np. utleniania i redukcji w miejscu aktywnym, jak to ma miejsce dla flawoenzymów) lub zmian konformacyjnych zachodzących podczas obrotów enzymatycznych. Mechanizm *ping-pong* (1) i (2), dla którego forma E enzymu fluoryzuje, a forma F jest „ciemna”, można zapisać w postaci:



W równaniach (4) i (5) indeksem *on* oznaczono etapy reakcji, dla których obserwuje się intensywną fluorescencję (stan jasny) oraz indeksem *off* te etapy, które odpowiadają małej intensywności fluorescencji (stan ciemny). Długości okresów *on* i *off* są zmiennymi losowymi, których właściwości statystyczne zależą od stałych kinetycznych mechanizmu *ping-pong* (4) i (5). Przy dużym stężeniu substratów S_1 i S_2 , etapy reakcji, w których substraty przyłączają się do enzymu, przebiegają szybciej niż reakcja uwolnienia produktu. W takim przypadku, równania (4) i (5) opisujące migotanie fluorescencji upraszczają się do równania:

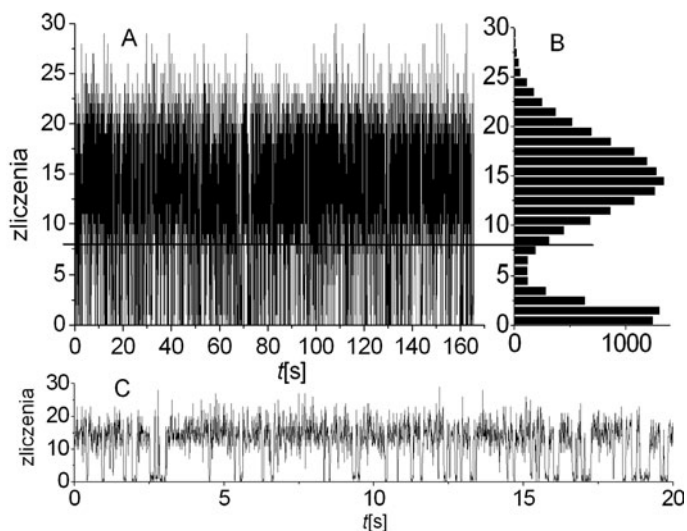


gdzie $k_{on} = k_2$ – stała szybkości ucieczki ze stanu jasnego *on* w stan ciemny, a $k_{off} = k_4$ to stała ucieczki ze stanu ciemnego *off*. Dla migotania fluorescencji opisanego równaniem (6), czasy *on* i *off* są zmiennymi losowymi o rozkładzie wykładniczym:

$$p_{on}(t) = k_{on} e^{-k_{on}t}, \quad p_{off}(t) = k_{off} e^{-k_{off}t} \quad (7)$$

gdzie p_{on} i p_{off} są gęstościami prawdopodobieństwa długości trwania czasu *on* i czasu *off*.

Wynikiem obserwacji aktywnej cząsteczki enzymu w mikroskopie konfokalnym jest trajektoria intensywności fluorescencji, tj. szereg czasowy przedstawiający liczbę zliczeń fotonów w następujących po sobie przedziałach czasu (Rys. 2, panele A i C). Trajektoria fluorescencji niesie w sobie informację o dynamice enzymu.



Rysunek 2. A) Trajektoria fluorescencji modelu dwustanowego (6) dla wartości parametrów nawiązujących do pracy [10]. B) Histogram zliczeń fotonów dla trajektorii z panelu A. C) Fragment (pierwsze 20 sekund) trajektorii fluorescencji pokazanej na panelu A. Na panelach A i B linią poziomą zaznaczono intensywność rozdzielającą stan jasny *on* od stanu ciemnego *off*

Figure 2. A) Fluorescence trajectory for the two-state model (6) and parameters from [10]. B) Histogram of photon counts for trajectory from panel A. C) An initial portion of fluorescence trajectory (first 20 seconds) from panel A. In panels A and B the horizontal line separates the *on* state from the *off* state

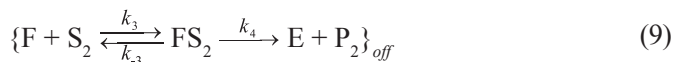
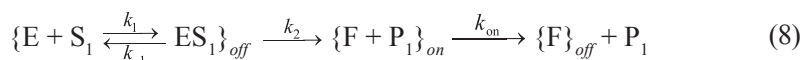
Podstawową korzyścią z badania pojedynczych cząsteczek enzymów jest możliwość poznania rozkładów aktywności enzymatycznej, a nie tylko wartości średnich mierzonych w klasycznej enzymologii. Wymaga to pokonania trudności eksperymentalnych wynikających z faktu, że niska intensywność fluorescencji pojedynczej cząsteczki enzymu musi być odróżniona od sygnału tła, np. od rozpraszania Ramana, pochodzącego od rozpuszczalnika. Problem ten można pokonać dobierając odpowiednio długości fal wzbudzenia i emisji, a także mierząc inne charakterystyki fluorescencji, takie jak czas życia czy polaryzację. Inna trudność wynika z faktu, że sygnał fluorescencji aktywnego enzymu ma charakter losowy i dlatego do wydobycia informacji o dynamice enzymu stosowane być muszą zaawansowane metody statystyczne.

Ważne jest pytanie, jakie nowe informacje uzyskuje się badając pojedyncze cząsteczki. Dzięki zastosowaniu spektroskopowych metod pojedynczych cząsteczek, odkryto zjawiska, które były trudne lub wręcz niemożliwe do zaobserwowania dla zespołu cząsteczek. Są to nieporządek statyczny i nieporządek dynamiczny oraz efekt pamięci obrotów enzymatycznych. Zjawisko polegające na tym, że różne cząsteczki tego samego enzymu wykazują różną aktywność katalityczną, nazwano nieporządkiem statycznym (ang. *static disorder*). Fluktuacje aktywności enzymatycznej w czasie nazywa się nieporządkiem dynamicznym (ang. *dynamic disorder*). Obydwa zjawiska łączy się z różnicami aktywności enzymatycznej dla różnych konformacji

enzymów. Statystyczne korelacje aktywności enzymatycznej w czasie nazwane zostały efektem pamięci (ang. *memory effect*).

Pierwszym eksperymentalnym układem, dla którego badano aktywność katalityczną pojedynczych cząsteczek enzymów poprzez obserwację migotania fluorescencji pochodzącej od cząsteczek enzymów, była oksydaza cholesterolowa [2–4]. Stwierdzono obecność statycznego nieporządku, ponieważ pojedyncze cząsteczki oksydazy miały różne stałe szybkości katalitycznej. Stwierdzono także obecność dynamicznego nieporządku, ponieważ wykazano istnienie korelacji między kolejnymi czasami *on*.

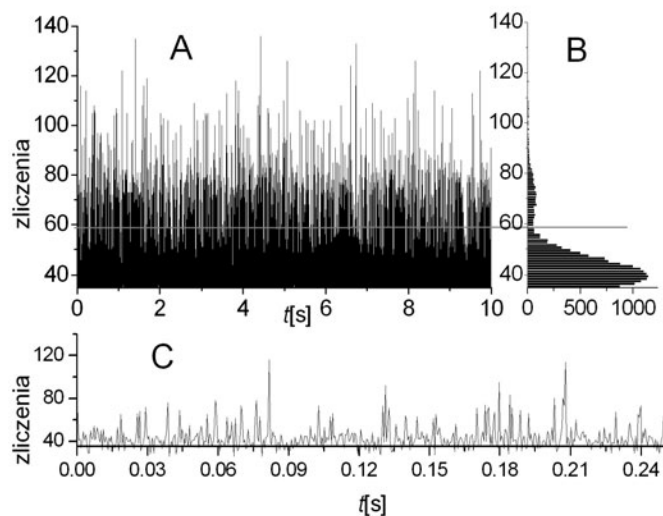
Reakcje enzymatyczne typu *ping-pong* można również śledzić poprzez obserwację powstawania fluoryzującego produktu P_1 z niefluoryzującego substratu S_1 :



gdzie $\{E + P_1\}_{on}$ oznacza fluoryzującą cząsteczkę produktu P_1 , znajdującą się w pobliżu cząsteczki enzymu, a $\{E\}_{off} + P_1$ oznacza, że w polu obserwacyjnym, w którego centrum znajduje się cząsteczka enzymu, nie ma już cząsteczki produktu. Mechanizmem przejścia *off* \rightarrow *on* jest powstanie fluoryzującego produktu P_1 , a mechanizm przejścia *on* \rightarrow *off* to dyfuzja produktu poza pole widzenia. Rysunek 3 przedstawia przykład trajektorii fluorescencji dla mechanizmu (8) i (9).

Pierwszym układem, w którym obserwowano rozbłyski (ang. *bursts*) fluorescencji, pochodzące od powstających cząsteczek produktów, była peroksydaza chrzanowa [5]. Enzym ten katalizuje reakcję rozkładu nadtlenu wodoru w obecności donora wodoru. Jako niefluoryzującego substratu użyto dihydrorodaminy 6G, która po utlenieniu do rodaminy 6G staje się produktem fluoryzującym. Ze zmierzonych trajektorii intensywności fluorescencji obliczano funkcję korelacji intensywności i dopasowywano model uwzględniający dynamiczny nieporządek. Przyjęto, że jest to dowód na obecność dynamicznego nieporządku, powodowanego zmianami konformacyjnymi enzymu.

Niedawno ukazały się prace przeglądowe omawiające różne aspekty badań nad aktywnością katalityczną pojedynczych cząsteczek enzymów [6–8]. Niniejszy artykuł skupia się na pracach eksperymentalnych i teoretycznych wskazujących na efekty wynikające z dynamiki konformacyjnej enzymu. Rysunki 2–6 zamieszczone w pracy są wynikiem symulacji komputerowych, wykonanych w Pracowni Dynamiki Procesów Fizykochemicznych Wydziału Chemii UAM dla modeli aktywności enzymatycznej pojedynczych cząsteczek odpowiadających układom eksperymentalnym.



Rysunek 3. A) Trajektoria fluorescencji dla wartości parametrów modelu (8), (9) nawiązujących do pracy [15].

B) Histogram zliczeń fotonów dla trajektorii pokazanej na panelu A. Linia poziomą zaznaczono granicę intensywności rozdzielającą fluorescencję pochodzącą od tła od fluorescencji pochodzącej od powstających cząsteczek produktów. C) Początkowy fragment trajektorii fluorescencji pokazanej na panelu A

Figure 3. A) Fluorescence trajectory for model (8), (9) and parameters from [15]. B) Histogram of photon counts for trajectory from panel A). The horizontal line separates the background fluorescence from fluorescence of products molecules. C) Initial portion of fluorescence from panel A

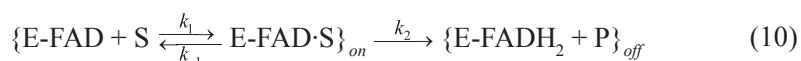
1. UKŁADY EKSPERYMENTALNE

W tej części pracy omówiono przykłady układów eksperymentalnych, wskazujących na obecność statycznego i dynamicznego nieporządku w aktywności katalitycznej enzymów. W pierwszej części rozdziału omówiono układy, w których migotanie fluorescencji pochodzi od cząsteczek enzymu, a w części drugiej układy, w których rozbłyski fluorescencji pochodzą od tworzących się od cząsteczek produktów.

1.1. MIGOTANIE FLUORESCENCJI POCHODZI OD CZĄSTECZEK ENZYMU

Oksydaza cholesterolowa

Oksydaza cholesterolowa katalizuje reakcje utleniania cholesterolu (Tab. 1) według mechanizmu *ping-pong* [2]:



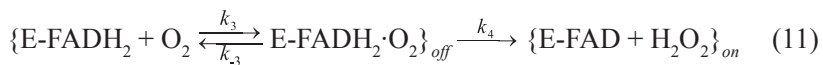


Tabela 1. Enzymy i ich substraty w reakcjach enzymatycznych badanych metodami pojedynczych cząsteczek

Table 1. Enzymes and substrates in single-molecule enzyme reactions

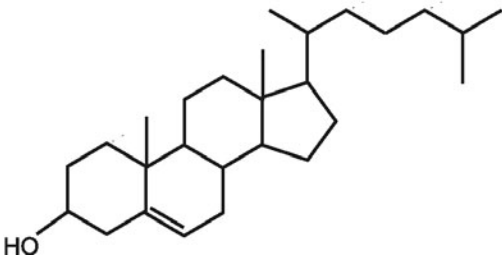
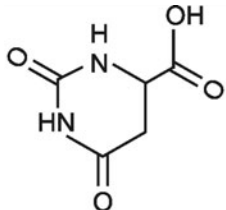
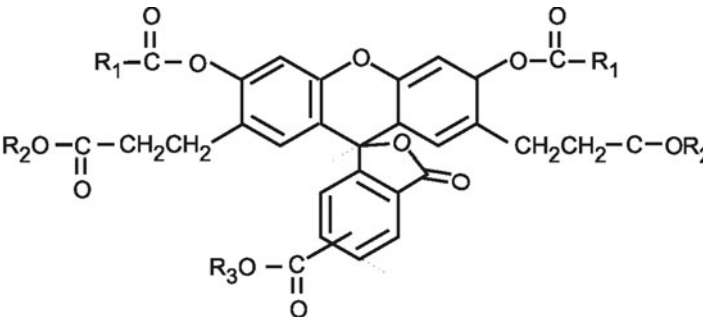
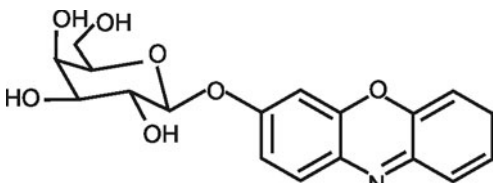
Enzym (E)	Substrat (S)
Oksydaza cholesterolowa	<p style="text-align: center;">Cholesterol</p> 
Dehydrogenaza dihydroorotowa	<p style="text-align: center;">Kwas dihydroorotowy</p> 
Lipaza	<p style="text-align: center;">BCEF-AM</p> 

Tabela 1. Ciąg dalszy
Table 1. Continuation

Enzym (E)	Substrat (S)
β-galaktozydaza	<p style="text-align: center;">RGP</p> 

Częścią aktywną enzymu odpowiadającą za reakcje utleniania jest dinukleotyd flawinoadeninowy FAD (ang. *flavin adenine dinucleotide*), który jest naturalnym fluoroforem. Fluoryzujący enzym E-FAD przyłącza cząsteczkę cholesterolu, która w reakcji (10) jest oznaczona jako S, i tworzy się kompleks E-FAD·S. Kompleks E-FAD·S fluoryzuje aż do momentu, gdy substrat zostanie utleniony, a enzym przyjmie formę zredukowaną E-FADH₂. Zredukowana postać enzymu E-FADH₂ nie fluoryzuje. W obecności tlenu E-FADH₂ ulega szybkiej regeneracji do formy utlenionej. Otrzymuje się ponownie fluoryzującą formę enzymu E-FAD, która jest zdolna do utlenienia następnej cząsteczki cholesterolu.

Aktywność pojedynczych cząsteczek oksydazy cholesterolowej obserwowano za pomocą mikroskopu konfokalnego. Cząsteczki enzymu o stężeniu 10⁻⁹ M były unieruchomione w 1% żelu agarowym, w którym rozpuszczono cząsteczki substratów. Cząsteczki cholesterolu i tlenu mogły swobodnie dyfundować. Obserwowano migotanie fluorescencji dla stężenia cholesterolu 0,2 mM i tlenu 0,25 mM (roztwór nasycony), lecz w tych warunkach stała k₂ nie była stałą limitującą szybkość całkowitą. Stosując pochodną cholesterolu (ang. *5-pregene-3β-20α-diol*), która reaguje wolniej z enzymem, zastosowano stężenie substratu 2 mM, przy którym stała k₂ określała całkowitą szybkość. Do zmierzonych histogramów czasów *on* dla „powolnej” pochodnej cholesterolu dopasowano krzywą jednowykładniczą wyznaczając wartości parametru k₂. Procedurę tą powtórzono dla 33 różnych cząsteczek oksydazy. Dla każdej cząsteczki wyznaczona wartość parametru k₂ była inna (od 3 s⁻¹ do 14 s⁻¹), co oznacza, że cząsteczki enzymu mają różne aktywności katalityczne. Różnice właściwości cząsteczek enzymu są niewidoczne w zespole cząsteczek, gdyż indywidualne właściwości uśredniają się.

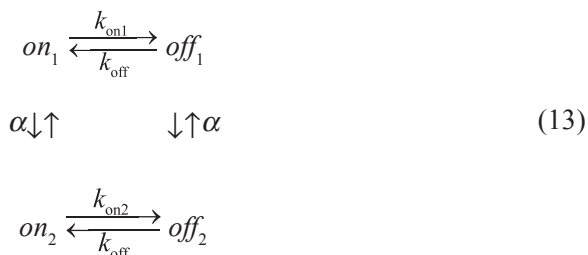
W warunkach, gdy etapy E-FAD·S → E-FADH₂ + P, oraz E-FADH₂·O₂ → E-FAD + H₂O₂ określają szybkości tworzenia produktu P i regeneracji miejsca aktywnego E-FAD, reakcje (10) i (11) redukują się, równanie (6), z którego wynika, że czasy *on* i *off* są niezależnymi zmiennymi losowymi o rozkładzie wykładniczym. W eksperymencie zbadano korelacje kolejnych czasów *on*, stosując znormalizowaną funkcję korelacji

$$r(m) = \frac{\langle \Delta\tau(0)\Delta\tau(m) \rangle}{\langle \Delta\tau(0)^2 \rangle} \quad (12)$$

gdzie $m = 0, 1, \dots$ jest odległością pomiędzy kolejnymi czasami on , a $\Delta\tau = \tau - \langle \tau \rangle$ jest odchyleniem czasu on od wartości średniej. Jeśli kolejne czasy on są niezależnymi zmiennymi losowymi to funkcja korelacji $r(m) = 1$. Odchylenia od jedności wskazują na obecność efektu pamięci. Zmierzona funkcja korelacji świadczy o istnieniu korelacji pomiędzy następującymi po sobie czasami on : po długim czasie on częściej następował długi czas on , a po krótkim czasie on częściej następuje krótki czas on .

Istnienie korelacji czasów on sprawdzono także poprzez obliczenie dwuwymiarowych histogramów par czasów on dla kolejnych czasów on oraz dla par czasów on przesuniętych o dziesięć obrotów. Charakterystyczny kształt diagonalnej histogramu otrzymano, gdy czasy on następowały po sobie. Korelacje zanikały dla par czasów on odległych od siebie.

Istnienie pamięci czasów on wskazuje na obecność dynamicznego nieporządku. Prosty model dynamicznego nieporządku jest dany schematem:



Stan on_1 jest stanem jasnym o konformacji 1, a stan on_2 jest stanem jasnym o konformacji 2. Podobnie stany off_1 i off_2 to stany ciemne o konformacjach, odpowiednio: 1 i 2. Występują dwie stałe ucieczki ze stanu on , k_{on1} , k_{on2} , które są różne dla każdej z dwóch konformacji. Dla prostoty zakłada się, że stałe ucieczki k_{off} dla obydwu konformacji off są takie same, oraz że jedna stała szybkości α opisuje przejścia między konformacjami. Warto podkreślić, że dla modelu (13) trajektoria fluorescencji wykazuje dwie intensywności I_{on} i I_{off} lecz czasy trwania czasów on i off nie są już opisane rozkładem wykładniczym (7), gdyż występują przejścia między konformacjami $1 \leftrightarrow 2$. Model (13) był analizowany teoretycznie w pracy [9], zaś w pracy [4] był symulowany komputerowo, w celu określenia warunków, w których możliwe jest wykrycie zmian konformacyjnych $1 \leftrightarrow 2$.

Dehydrogenaza dihydroorotowa

Dehydrogenaza dihydroorotowa katalizuje reakcję utleniania kwasu dihydroorotowego [10] (Tab. 1) do kwasu orotowego. Mononukleotyd flawinowy FMN (ang. *flavin mononucleotide*), wchodzący w skład części aktywnej enzymu, fluoryzuje w formie utlenionej i jest niefluoryzujący w formie zredukowanej. Mechanizm reakcji przebiega, podobnie jak dla oksydazy cholesterolowej, według schematu *ping-pong*. Reakcję można podzielić na dwie połowy. W pierwszej połowie, zwanej reakcją redukującą, enzym w formie utlenionej E-FMN przyłącza cząsteczkę substratu. Tworzy się kompleks, po czym następuje reakcja utleniania substratu, w wyniku której powstaje kwas orotowy i enzym w formie zredukowanej E-FMNH₂. W obecności utleniacza, w drugiej połowie reakcji, enzym utlenia się z powrotem do formy E-FMN.

W celu unieruchomienia, cząsteczki enzymu zostały umieszczone w żelu agarowym, do którego dodawano kwas dihydroorotowy. Długości obserwowanych trajektorii były małe, około 2,5–3 sekund. Przy tak krótkich trajektoriach liczba obserwowanych cykli *on-off* wynosiła ok. 10. Przyczyną krótkiego czasu trajektorii była dysocjacja cząsteczki FMN, która odpowiada za fluorescencję.

Z trajektorii intensywności fluorescencji obliczono histogramy długości czasów w stanie ciemnym *off* i jasnym *on*. Ze względu na krótkie trajektorie, histogramy zostały obliczone dla zespołu 50 cząsteczek enzymu. Do histogramu czasów *on* dopasowano krzywą dwuwykładniczą, a do histogramu czasów *off* jednowykładniczą. Wyznaczenie dwóch wartości stałej szybkości k_{on} ucieczki ze stanu jasnego sugeruje obecność dwóch populacji dehydrogenazy, różniących się aktywnością enzymatyczną. Dla stwierdzenia, czy występuje efekt pamięci, obliczono znormalizowaną funkcję korelacji czasów *on* oraz sporządzono dwuwymiarowe histogramy par czasów *on* oraz dwuwymiarowy histogram par czasów *on* i *off*. Wyniki sugerowały brak obecności dynamicznego nieporządku. Wykres znormalizowanej funkcji korelacji przedstawiał losowo rozłożone punkty, natomiast dwuwymiarowe histogramy par czasów *on* oraz par czasów *on* i *off* nie miały charakterystycznego kształtu na diagonalnej. Ze względu na krótkie trajektorie, histogramy czasów stanów jasnych i ciemnych mogły być za mało czułe, by na ich podstawie stwierdzić obecność dynamicznego nieporządku. Przypuszczenie to zostało potwierdzone symulacjami dla modeli (6) i (13), opisanymi w Rozdziale 3 [11].

Inne układy

W przeciwieństwie do oksydazy cholesterolowej i dehydrogenazy dihydroorotowej, cząsteczki reduktazy dihydrofolianowej nie fluoryzują i dlatego do obserwacji aktywności tego enzymu zastosowano znakowanie fluoroforem [12–14]. Trudność interpretacji migotania fluorescencji znakowanej reduktazy dihydrofolianowej

wynika ze skomplikowanego mechanizmu reakcji oraz niejasnego związku migotania fluorescencji z aktywnością katalityczną.

1.2. ROZBŁYSKI FLUORESCENCJI POCHODZĄ OD CZĄSTECZEK PRODUKTÓW

β -galaktozydaza

β -galaktozydaza katalizuje reakcje hydrolizy laktozy oraz innych β -D-galaktopyranozydów [15]. Reakcje katalizowane przez β -galaktozydazę zachodzą według mechanizmu *ping-pong*. W eksperymencie cząsteczki enzymu były unieruchomione na powierzchni szkła (stężenie powierzchniowe rzędu jednej cząsteczki enzymu na mm^2) i zanurzone w buforowym roztworze substratów o odpowiednich stężeniach (10–380 μM). Jako substrat zastosowano niefluoryzujący związek RGP (ang. *resorufin- β -D-galactopyranoside*) (Tab. 1), z którego w wyniku hydrolizy powstawały fluoryzujące cząsteczki produktu. Fluorescencję mierzono za pomocą mikroskopu konfokalnego. W celu uniknięcia niepożądanych efektów związanych z fluorescencją tła, zastosowano promieniowanie laserowe o odpowiedniej długości do fotowysbielenia gromadzących się cząsteczek produktów.

Obserwowana trajektoria intensywności wykazywała rozbłyski fluorescencji sygnalizujące powstanie cząsteczek produktów, które szybko oddyfundowały z objętości detekcyjnej. Przy nadmiarowym stężeniu substratu S_2 , wpływ reakcji regeneracji na kinetykę całego mechanizmu był zanedbywalnie mały. W takim układzie rozkład czasów oczekiwania tj. czasów pomiędzy rozbłyskami, jest dwuwymiarowy [15, 16]:

$$p(t) = \frac{k_1[S]k_2}{X} (e^{z_1 t} - e^{z_2 t}) \quad (14)$$

gdzie:

$$z_{1,2} = -\frac{1}{2} (k_1[S] + k_{-1} + k_2 \mp X) \quad (15)$$

$$X = \sqrt{k_1^2[S]^2 + 2k_1[S]k_{-1} - 2k_1[S]k_2 + k_{-1}^2 + 2k_{-1}k_2 + k_2^2} \quad (16)$$

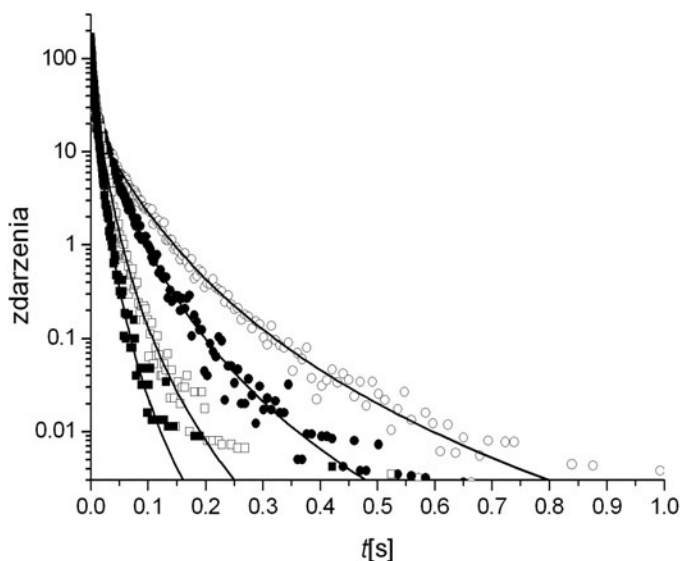
Kształt histogramów czasów oczekiwania na kolejną cząsteczkę produktu zmienił się wraz ze stężeniem substratów. Dla dużych stężeń substratu o szybkości reakcji decydowała stała szybkości k_2 . Wyniki eksperymentalne wskazywały, że wartość k_2 fluktuuje w czasie reakcji. Zgodność z doświadczeniem uzyskano przyjmując, że stała szybkości k_2 jest zmienną losową o rozkładzie gamma:

$$w(k_2) = \frac{1}{b^a \cdot \Gamma(a)} \cdot k_2^{1-a} \cdot \exp\left(\frac{-k_2}{b}\right) \quad (17)$$

gdzie: a – parametr kształtu i b – parametr skali. W obecności dynamicznego nieporządku, tj. fluktuacji stałej k_2 , rozkład czasów oczekiwania $p(t)$ przyjmuje postać [15, 16]:

$$p(t) = \int_0^{\infty} dk_2 w(k_2) \frac{k_1[S]k_2}{X} \left(e^{z_1 t} - e^{z_2 t} \right) \quad (18)$$

Na Rys. 4 przedstawiono przykładowe histogramy czasów oczekiwania dla czterech stężeń substratu otrzymane w wyniku symulacji komputerowych. Wraz ze wzrostem stężenia czasy oczekiwania skracają się. Linie ciągłe są obliczone zgodnie z równaniem (18).



Rysunek 4. Histogramy czasów oczekiwania obliczone z trajektorii fluorescencji pokazanej na Rys. 2 dla wartości parametrów nawiązujących do publikacji [15] wraz z krzywymi teoretycznymi obliczonymi według równania (18)

Figure 4. Histograms of waiting times calculated from the fluorescence trajectory shown in Fig. 2 for parameters from [15] with theoretical lines calculated according to (18).

Dynamiczny nieporządek, powodujący niewykładniczą postać histogramów czasów oczekiwania (18), został potwierdzony obecnością efektu pamięci. W celu wykrycia korelacji pomiędzy kolejnymi czasami oczekiwania, obliczono dwuwy-

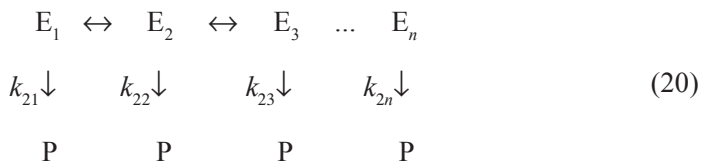
miarowe histogramy par czasów oczekiwania kolejno następujących po sobie, $h(t_1, t_2)$, par znacznie odległych od siebie, $h(t_1)h(t_2)$, oraz wykres przedstawiający różnicę $\delta(t_1, t_2) = h(t_1, t_2) - h(t_1)h(t_2)$. Wykres różnic $\delta(t_1, t_2)$ miał charakterystyczny kształt na diagonalnej $t_1 = t_2$, co świadczy o efekcie pamięci czasów oczekiwania. W Rozdziale 3 podany jest przykład wykresu $\delta(t_1, t_2)$ dla prostego modelu dynamiki konformacyjnej.

Lipaza

Lipaza katalizuje hydrolizę estrów w roztworze wodnym [17, 18]. Do cząsteczek enzymu unieruchomionych na powierzchni szkła dodawano różne stężenia estru BCEF-AM (ang. *2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein acetoxymethyl ester*) (Tab. 1), który pod wpływem reakcji hydrolizy przekształcał się w fluoryzujący produkt. Z czasem trwania reakcji liczba fluoryzujących cząsteczek produktu zwiększała się, co powodowało powstawanie tła fluorescencji. W przypadku lipazy, histogramy czasów oczekiwania dla różnych stężeń substratów miały kształt wykładniczo-potęgowy:

$$p_{\text{off}}(t) \propto e^{-(t/\tau)^\alpha} \quad (19)$$

z parametrem skali $\tau = 1,15 \mu\text{s}$ oraz parametrem kształtu $\alpha = 0,15$. Proponowana interpretacja zakłada istnienie wielu konformacji enzymu $E_1, E_2, E_3, \dots, E_n$ różniących się szybkością tworzenia produktu k_2 :



Inne układy

W pracy [19] badano chymotrypsynę, która katalizuje reakcje hydrolizy wiązań peptydowych. Idea doświadczenia była podobna do eksperymentu [1]. Wytwarzano emulsję typu *woda-w-oleju*, w której mikrokropelki wody zawierały pojedyncze cząsteczki enzymu i cząsteczki substratu. Niefluoryzujący substrat przekształcał się we fluoryzujący produkt. Dla chymotrypsyny obserwowano fluorescencję pochodzącą od powstających cząsteczek produktów jednocześnie dla kilkuset pojedynczych cząsteczek enzymu. Umożliwiło to porównanie aktywności pojedynczych cząsteczek ze średnią aktywnością zespołu cząsteczek. W pracy [19] przedstawiono zależność intensywności fluorescencji od czasu dla 96 cząsteczek enzymu. Na tym samym wykresie zaznaczono krzywą, będącą średnią intensywności dla tych wszystkich cząste-

czek, w celu pokazania jak duże są odchylenia fluorescencji pojedynczych cząsteczek od wartości średniej. Ponadto przedstawiono krzywą średniej fluorescencji z około 1124 cząsteczek enzymu, w porównaniu z krzywą fluorescencji zmierzoną dla zespołu cząsteczek. Wykresy fluorescencji odpowiadające średniej aktywności pojedynczych cząsteczek chymotrypsyny były zgodne z wykresami aktywności dla zespołu cząsteczek.

2. MODELOWANIE I SYMULACJE KINETYKI POJEDYNCZYCH ENZYMÓW

Modelowanie

Celem modelowania jest pogłębienie zrozumienia przebiegu zjawisk poprzez tworzenie i analizę modeli o różnym stopniu idealizacji. Modele fenomenologiczne starają się uchwycić istotę zjawiska, nie wnikając w szczegóły molekularne. Prostota modelu pozwala niekiedy na uzyskanie wyników analitycznych.

Dla przykładu rozważmy rozkład czasów *on* dla mechanizmu *ping-pong*. Zapiszmy równanie (1) w postaci:



gdzie $k_1^0 = k_1[S_1]$ jest stałą szybkości pseudopierwszego rzędu. W kinetyce pojedynczych cząsteczek rozpatruje się nie stężenia, a prawdopodobieństwa występowania w danym stanie. Dla równania (21) należy rozpatrzyć prawdopodobieństwa $P_E(t)$, $P_{ES_1}(t)$, $P_F(t)$, że enzym znajduje się w momencie t w stanie wolnym E, w stanie związanym ES_1 i w stanie wolnym F. Prawdopodobieństwa te spełniają równania kinetyczne, analogiczne do chemicznych równań kinetycznych, np.:

$$dP_{ES_1}/dt = k_1^0 P_E - (k_{-1} + k_2) P_{ES_1} \quad (22)$$

Załóżmy, że obrót enzymatyczny zaczyna się w momencie $t=0$, tzn. w momencie $t=0$ enzym z postaci F przekształcił się w postać E. Niech $P(\tau \leq t)$ oznacza prawdopodobieństwo, że obrót nastąpił do momentu czasu $t > 0$, to jest, że $\tau \leq t$ gdzie τ jest losowym czasem obrotu. Zdarzenie losowe $\tau \leq t$ jest równoważne zdarzeniu, że enzym jest w postaci F w momencie t i dlatego zachodzi równość $P(\tau \leq t) = P_F(t)$. Ponieważ $P(\tau \leq t)$ jest dystrybuantą losowego czasu obrotu τ , $dP_F/dt = p(t)$ jest gęstością prawdopodobieństwa τ , która może być oszacowana za pomocą histogramu zmierzonych czasów obrotu τ_1, \dots, τ_N . Zgodnie z równaniem (21) prawdopodobieństwo $P_F(t)$ spełnia następujące równania kinetyczne (22)–(24):

$$dP_E/dt = -k_1^0 P_E + k_{-1} P_{ES1} \quad (23)$$

$$dP_F/dt = k_2 P_{ES1} \quad (24)$$

wraz z warunkami początkowymi $P_E(0) = 1$, $P_{ES1}(0) = 0$, $P_F(0) = 0$. Rozwiązanie tych równań prowadzi do wzorów (14)–(16).

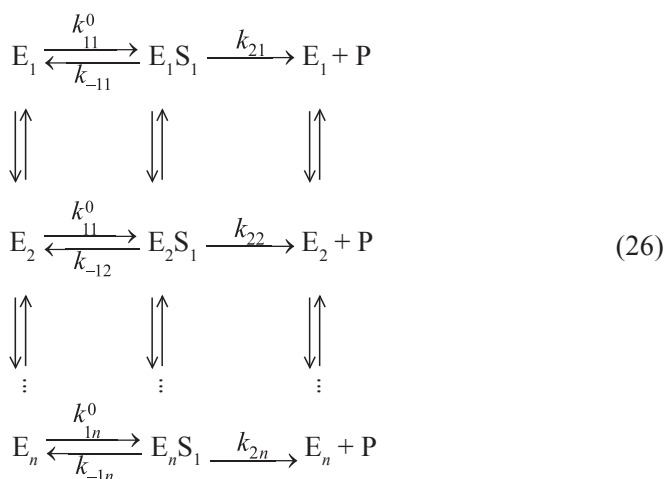
Model dynamiki konformacyjnej (13) posługuje się czterema stałymi szybkości. Jeszcze prostszy model zmian konformacyjnych dany jest schematem:



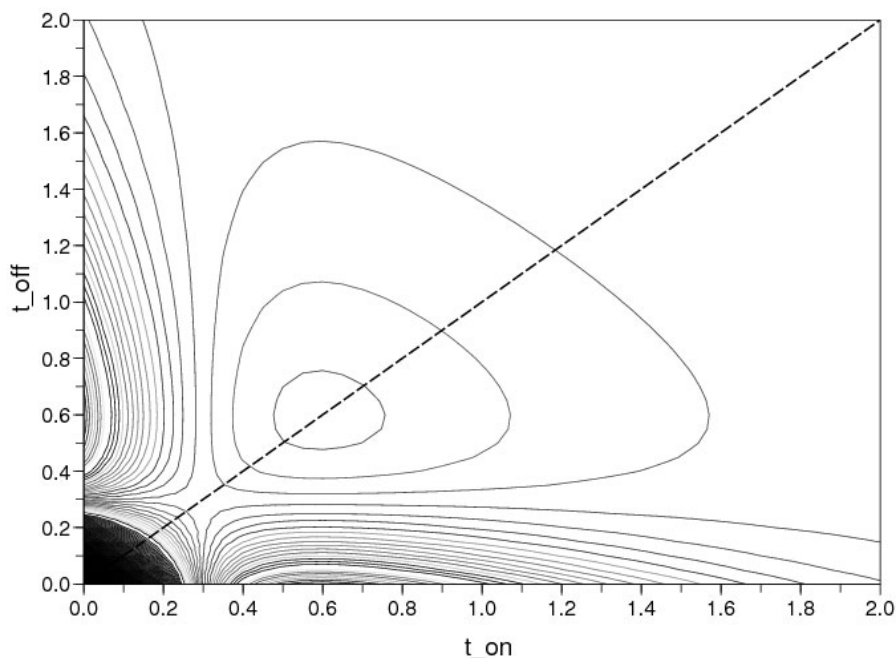
w którym szybkości ucieczki ze stanów on i off są takie same dla danej konformacji. Schemat (25) posługuje się jedynie trzema wartościami stałych szybkości k_1 , k_2 , α . Różne charakterystyki statystyczne modeli (13) i (25) były analizowane w celu określenia możliwości wykrycia zmian konformacyjnych [9], [20].

Niech dwuwymiarowy histogram $h(t_{on}, t_{off})$ przedstawia łączny rozkład prawdopodobieństwa kolejnych czasów on i off , a jednowymiarowe histogramy $h_{on}(t)$ i $h_{off}(t)$ przedstawiają rozkłady czasów on i off dla modelu (25). Jeśli następujące po sobie czasy on i off są niezależne, to $h(t_{on}, t_{off}) = h_{on}(t_{on})h_{off}(t_{off})$, a stąd różnica $\delta(t_{on}, t_{off}) = h(t_{on}, t_{off}) - h_{on}(t_{on})h_{off}(t_{off})$ jest równa zero. Odchylenie $\delta(t_{on}, t_{off})$ od zera jest miarą zależności pomiędzy czasami on i off i oznacza obecność dynamicznego nieporządku. Na Rys. 5a pokazano dwuwymiarowe poziomicę różnicy histogramów $\delta(t_{on}, t_{off}) = h(t_{on}, t_{off}) - h_{on}(t_{on})h_{off}(t_{off})$ kolejnych czasów on i off , a na Rys. 5b profil $\delta(t_{on}, t_{off})$ wzdłuż przekątnej $t_{on} = t_{off} = t$ [20].

W pracy [16] wyprowadzono rozkład czasów off z uwzględnieniem dynamiki konformacyjnej. Założono, że stała k_2 fluktuuje według rozkładu gamma (18). Jeśli uwzględni się przejścia konformacyjne to równanie (21) można przedstawić w postaci:

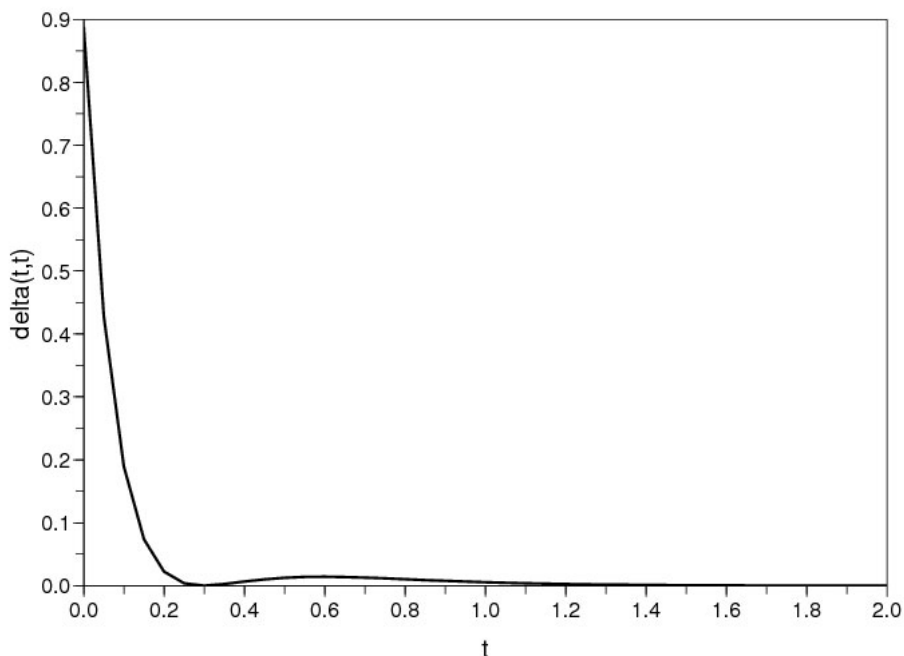


gdzie indeks $i = 1, \dots, n$ przy symbolu enzymu E_i oraz drugi indeks przy stałych szybkości k_{1i} , k_{-1i} , k_{2i} opisuje numer konformacji, w której występuje enzym.



Rysunek 5a. Poziomice różnic histogramów $\delta(t_{on}, t_{off}) = h(t_{on}, t_{off}) - h_{on}(t_{on}) h_{off}(t_{off})$ kolejnych czasów *on* i *off* dla schematu (25). Linia przerywana zaznacza przekątną histogramu.

Figure 5a. 2D contour plot of a difference $\delta(t_{on}, t_{off}) = h(t_{on}, t_{off}) - h_{on}(t_{on}) h_{off}(t_{off})$ for consecutive *on* and *off* times according to model (25). The histogram diagonal is marked by a dashed line



Rysunek 5b. Profil różnicy histogramów $\delta(t_{on}, t_{off})$ z Rys. 5a wzdłuż przekątnej. Charakterystyczne maksimum, pojawiające się dla $t > 0$, może być niewidoczne na histogramach eksperymentalnych ze względu na błędy statystyczne histogramów eksperymentalnych dla krótkich trajektorii.

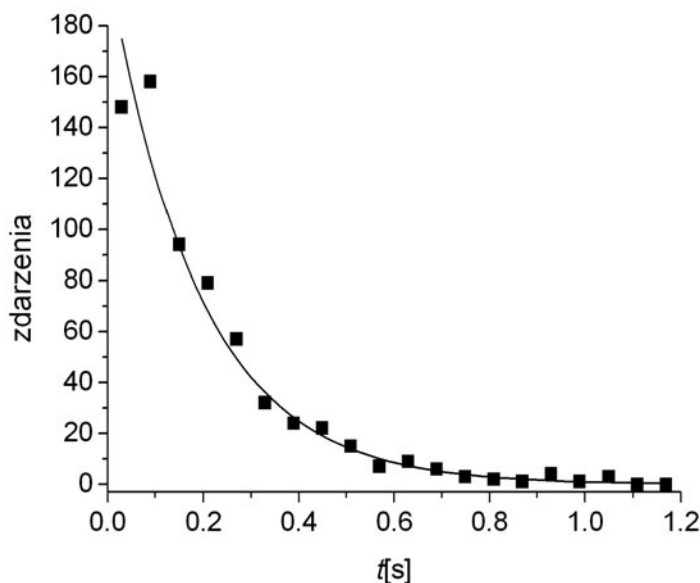
Figure 5b. The profile of the histogram difference $\delta(t_{on}, t_{off})$ from Fig. 5a along the diagonal. A characteristic maximum at $t > 0$ can be invisible on experimental histograms due to statistical errors of experimental histograms for short trajectories

W publikacji [21] prezentowane są formalizmy dla obliczenia statystyk z trajektorii zdarzeń, dla różnych schematów kinetycznych reakcji enzymatycznych. Celem pracy [22] było pokazanie, w jakich warunkach kinetyka Michaelisa-Menten pozostaje prawdziwa pomimo fluktuacji stałej katalitycznej k_2 . W pracy [23] zaproponowano model dynamicznego nieporządku, nawiązujący do aktywności oksydazy cholesterolowej. W modelu uwzględniono założenie, że enzym w formie E-FADH₂ przechodzi szereg zmian konformacyjnych umożliwiających reakcję regeneracji z tlenem. Uwzględnienie takich zmian konformacyjnych wzmacnia korelację między stanami fluorescencji *on* i *off*. Do pokazania tych korelacji autorzy użyli dwuwymiarowych histogramów par czasów *on*. Histogramy otrzymane z symulacji stanów dla parametrów nawiązujących do publikacji [2] miały charakterystyczny kształt na diagonalnej, co jest zgodne z eksperymentem.

Symulacje

Symulacje stosuje się w sytuacjach, w których nie jest możliwe uzyskanie wyników analitycznych. Symulacje umożliwiają testowanie modeli oraz eksperymenty na modelach, a przez to weryfikację zgodności modeli z doświadczeniem.

W pracy [10] przeprowadzono symulacje modelu dwustanowego (6) dla wartości parametrów otrzymanych z eksperymentu. W wyniku symulacji otrzymano trajektorię stanów, z której obliczono histogramy czasów *on* i *off*. Do histogramów czasów *on* dopasowano krzywą jednowykładniczą wyznaczając wartość stałej k_{on} bliską wartości rzeczywistej (Rys. 6).



Rysunek 6. Histogram czasów *on* obliczony z trajektorii intensywności fluorescencji pokazanej na Rys. 1 wraz z dopasowaną krzywą jednowykładniczą

Figure 6. Histogram of *on* times calculated from the fluorescence trajectory shown in Fig. 1 with a one-exponential fit

Rozwinięcie tych symulacji przedstawiono w pracy [11]. Model dwustanowy (6) został rozbudowany do modelu czterostanowego (13). Jeśli stała szybkości przejść między konformacjami α będzie znacznie większa od stałych przejścia między stanami jasnymi a ciemnymi, k_{on1} , k_{on2} , k_{off} , to wówczas model (13) redukuje się do modelu (6) i nie będzie możliwe wykrycie dynamicznego nieporządku. Z trajektorii stanów obliczono histogramy czasów *on*, do których dopasowano krzywe wykładnicze. Dla największej wartości α udało się dopasować krzywą jednowykładniczą, a dla wartości α porównywalnej lub mniejszej od stałych przejścia k_{on1} , k_{on2} , k_{off} dopasowano krzywe dwuwykładnicze. Symulacje te potwierdziły, że w przypadku szybkich przejść konformacyjnych, właściwości modelu czterostanowego zbliżają

się do właściwości modelu dwustanowego, i że w takiej sytuacji histogramy czasów *on* i *off* mogą okazać się niewystarczające do badania dynamiki konformacyjnej.

W pracy [15] zastosowano symulacje komputerowe w celu potwierdzenia obecności dynamicznego nieporządku. Symulacje przeprowadzono dla modeli o rosnącym stopniu złożoności. Najprostszy model odpowiadał równaniu (21), gdzie limitującą stałą szybkości jest k_2 . Model ten przedstawia układ bez dynamicznego nieporządku, a zatem nie wykazuje efektu pamięci. Bardziej złożone modele uwzględniły rosnącą liczbę konformacji enzymu $n = 2, 5, 10$. Nawet dla złożonych modeli z $n = 5$ i 10 , symulowane trajektorie intensywności i odpowiednie funkcje korelacji intensywności różniły się od wielkości obserwowanych w eksperymencie. Przyjęto, że jest to dowód na złożony charakter zmian konformacyjnych.

POSUMOWANIE I PERSPEKTYWY

Rozwój spektroskopii fluorescencyjnej umożliwił obserwowanie aktywności pojedynczych cząsteczek enzymów. Odkryto przy tym zjawiska, które były trudne lub wręcz niemożliwe do zaobserwowania w badaniach zespołów cząsteczek. Jednym z nich było stwierdzenie, że różne cząsteczki danego enzymu wykazują różną aktywność katalityczną. Innym zjawiskiem były fluktuacje parametrów kinetycznych w czasie aktywności katalitycznej oraz ściśle związany efekt pamięci, polegający na korelacji aktywności enzymatycznej w czasie. Odkrycie tych efektów rodzi pytanie, czy ich obecność jest ograniczona do badanych układów, czy też jest powszechna dla szerokiej klasy układów enzymatycznych.

Kolejnym znakiem zapytania jest rola biologiczna, jaką pełni dynamiczny nieporządek. Na przykład, rozkład wykładniczo-potęgowy (19) czasów oczekiwania na kolejną cząsteczkę produktu wyznaczony dla lipazy w pracach [17, 18] oznacza, że aktywność katalityczna enzymu jest nierównomierna. Okresy intensywnej aktywności są przedzielane długimi okresami spowolnionej aktywności. Czy w komórce istnieje mechanizm synchronizujący aktywność enzymów, usuwający tę nierównomierność? Czy przerwy w aktywności pełnią jakąś pożyteczną rolę biologiczną? Odpowiedzi na te pytania przyniosą dalsze badania nad kinetyką enzymatyczną pojedynczych cząsteczek.

Od momentu, gdy 10 lat temu obserwowano po raz pierwszy migotanie fluorescencji pojedynczych cząsteczek oksydazy cholesterolowej [2], nastąpił znaczący rozwój technik badań pojedynczych cząsteczek enzymów. Interesujące jest zastosowanie spektroskopii czasowo rozdzielczej, która może być stosowana do identyfikacji konformerów pojedynczych cząsteczek enzymów [24, 25]. W metodzie tej stosuje się laser impulsowy i mierzy się odstępy pomiędzy impulsami wzbudzającymi i rejestracją fotonu fluorescencji (tj. czas życia stanu wzbudzonego). Jeśli zmiany konformacyjne zmieniają właściwości fotofizyczne cząsteczki, to odpowiadające im zmiany czasu życia dostarczają informacji o dynamice konformacyjnej.

Inny kierunek rozwoju to zastosowanie mikroreaktorów. Na przykład, w pracy [26] przedstawiono technologię umożliwiającą tworzenie mikrokomór reakcyjnych o objętości 45 fl na końcach włókien optycznych wiązki złożonej 50000 włókien. Fluorescencja pochodząca od cząsteczek produktów gromadzących się w mikroreaktorach obserwowano w mikroskopie fluorescencyjnym sprzężonym z wiązką. Badano wpływ inhibitora D-galaktau na aktywność β -galaktozydazy, w obecności substratu RGP. Stwierdzono zgodność średniej z danych dla pojedynczych cząsteczek z pomiarami dla zespołu cząsteczek. Innym przykładem rozwoju technologii mikroreaktorów jest praca [27], gdzie zademonstrowano kontrolowane inicjowanie obrotów enzymatycznych β -galaktozydazy w objętościach rzędu femtolitrów.

Tego typu osiągnięcia pozwalają przypuszczać, że badania aktywności pojedynczych cząsteczek enzymów dostarczą nie tylko wyników o znaczeniu poznawczym, lecz także doprowadzą do powstania biochemicznych procedur analitycznych o ekstremalnie wysokiej rozdzielczości.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] B. Rotman, PNAS, 1961, **47**, 1981.
- [2] H.P. Lu, L. Xun, X.S. Xie, Science, 1998, **282**, 1877.
- [3] X.S. Xie, Single Mol., 2001, **4**, 229.
- [4] G.K. Schenter, H.P. Lu, X.S. Xie, J. Phys. Chem. A, 1999, **103**, 10477.
- [5] L. Edman, Z.FZ. Földes-Papp, S. Wennmalm, R. Rigler, Chem. Phys., 1999, **247**, 11.
- [6] A.I. Lee, J.P. Brody, Curr. Pharm. Biotech., 2005, **6**, 41.
- [7] W. Min, B.P. English, G. Luo, B.J. Cherrayil, S.C. Kou, X.S. Xie, Acc. Chem. Res., 2005, **38**, 923.
- [8] R.D. Smiley, G.G. Hammes, Chem. Rev., 2006, **106**, 3080.
- [9] J. Cao, Chem. Phys. Lett., 2000, **327**, 38.
- [10] J. Shi, B.A. Palfey, J. Dertouzos, K.F. Jensen, A. Gafni, D. Steel, J. Am. Chem. Soc., 2004, **126**, 6914.
- [11] J. Shi, A. Gafni, D. Steel, Eur. Biophys. J., 2006, **35**, 633.
- [12] P.T.R. Rajagopalan, Z. Zhang, L. McCourt, M. Dwyer, S.J. Benkovic, G.G. Hammes, PNAS, 2002, **99**, 13481.
- [13] P.T.R. Rajagopalan, Z. Zhang, T. Selzer, S.J. Benkovic, G.G. Hammes, PNAS, 2004, **101**, 2764.
- [14] N.M. Antikainen, R.D. Smiley, S.J. Benkovic, G.G. Hammes, Biochemistry, 2005, **44**, 16835.
- [15] B.P. English, W. Min, A.M. van Oijen, K.T. Lee, G. Luo, H. Sun, B.J. Cherrayil, S.C. Kou, X.S. Xie, Nature Chem. Biol., 2006, **2**, 87.
- [16] S.C. Kou, B.J. Cherrayil, W. Min, B.P. English, X.S. Xie, J. Phys. Chem. B, 2005, **109**, 19068.
- [17] K. Velonia, O. Flomenbom, D. Loos, S. Masuo, M. Cotlet, Y. Engelborghs, J. Hofkens, A.E. Rowan, J. Klafter, R.J.M. Nolte, F.C. de Schryver, Angew. Chem. Int. Ed., 2005, **44**, 560.
- [18] O. Flomenbom, K. Velonia, D. Loos, S. Masuo, M. Cotlet, Y. Engelborghs, A. E. Rowan, R.J.M. Nolte, M. Van der Auweraer, F.C. de Schryver, J. Klafter, PNAS, 2005, **102**, 2368.
- [19] A.I. Lee, J.P. Brody, Biophys. J., 2005, **88**, 4303.
- [20] S. Yang, J. Cao, J. Phys. Chem. B, 2001, **105**, 6536.
- [21] I.V. Gopich, A. Szabo, J. Chem. Phys., 2006, **124**, 1.
- [22] W. Min, I.V. Gopich, B.P. English, S.C. Kou, X.S. Xie, A. Szabo, J. Phys. Chem. B Lett., 2006, **110**, 20093.

- [23] H.P. Lerch, R. Rigler, A.S.Mikhailov, PNAS, 2005, **102**, 10807.
- [24] H. Yang, X.S. Xie, J. Chem. Phys. 2002, **117**, 10965.
- [25] I. Gopich, A. Szabo, J. Chem. Phys. B, 2005, **109**, 6845.
- [26] H.H. Gorris, D.M. Rissin, D.R. Walt, PNAS, 2007, **104**, 17680.
- [27] S.-Y. Jung, Y. Liu, C. P. Collier, Langmuir, 2008, **24**, 4439.

Praca wpłynęła do Redakcji 26 maja 2008

NOWE METODY SYNTEZY PIGMENTÓW ULTRAMARYNOWYCH Z UŻYCIEM ZEOLITÓW

NEW METHODS OF ULTRAMARINE PIGMENTS SYNTHESIS FROM ZEOLITES

Aldona Jankowska, Stanisław Kowalak

*Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Chemii,
ul. Grunwaldzka 6, 60-780 Poznań
aljan@amu.edu.pl*

Abstract

Wstęp

1. Użycie matryc zeolitowych do syntezy pigmentów siarkowych
 - 1.1. Sposoby enkapsulacji rodników siarkowych w matrycach zeolitowych
 - 1.1.1. Próby wprowadzenia do zeolitów rodników siarkowych z roztworów aprotycznych
 - 1.1.2. Wprowadzenie prekursorów rodników siarkowych podczas syntezy zeolitów
 - 1.1.3. Generowanie w zeolitach rodników siarkowych za pomocą promieniowania
 - 1.1.4. Termiczna obróbka mieszanin zeolitów z prekursorami rodników siarkowych
 - 1.2. Próby syntez analogów ultramaryny przy użyciu zeolitów zawierających w swej strukturze jednostki sodalitowe
 - 1.2.1. Syntezy bazujące na zeolitach A (LTA)
 - 1.2.2. Syntezy oparte na zeolitach typu fozazytu
 - 1.2.3. Syntezy przy użyciu sodalitu
 - 1.3. Syntezy w oparciu o zeolity nie zawierające jednostek sodalitowych
 - 1.3.1. Syntezy w oparciu o zeolity typu kankrynit
 - 1.3.2. Syntezy z użyciem erionitu
 - 1.3.3. Syntezy z użyciem losodu
 2. Użycie zeolitów naturalnych
 3. Wpływ rodzaju kationów alkalicznych na wyniki syntez pigmentów siarkowych z zeolitów
 4. Pigmenty ultramarynowe w matrycach nieglinokrzemianowych
- Podsumowanie
Piśmiennictwo cytowane
-



Dr Aldona Jankowska ukończyła studia na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu, w roku 1997. W 2004 roku uzyskała tytuł doktora. Obecnie jest adiunktem w Pracowni Sit Molekularnych. Prowadzone przez nią badania dotyczą głównie syntezy i modyfikacji sit molekularnych, a szczególnie enkapsulacji wybranych związków chemicznych w przestrzeniach wewnątrzkrystalicznych. Jest członkiem Polskiego Towarzystwa Zeolitowego (PTZ) oraz International Zeolite Association. Jest współautorką blisko 30 publikacji (15 znajduje się na Liście Filadelfijskiej) oraz 23 komunikatów prezentowanych zarówno na konferencjach krajowych, jak i międzynarodowych oraz współautorem kilku patentów.

nikatów prezentowanych zarówno na konferencjach krajowych, jak i międzynarodowych oraz współautorem kilku patentów.



Prof. dr hab. Stanisław Kowalak ukończył studia chemiczne na Wydziale Mat.-Fiz.-Chem. Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu, w 1968 roku. W tej samej uczelni uzyskał kolejne stopnie naukowe. Obecnie jest profesorem zwyczajnym.

Zajmuje się głównie syntezą, modyfikacją i zastosowaniami (przede wszystkim katalitycznymi) zeolitów oraz innych sit molekularnych. Odbył szereg staży naukowych w uniwersytetach europejskich i amerykańskich i prowadzi szeroką współpracę z licznymi ośrodkami naukowymi w kraju i zagranicą, a także z firmami przemysłowymi.

Jest autorem około 150 publikacji i kilkunastu patentów. Należał do założycieli Polskiego Towarzystwa Zeolitowego i pełnił funkcję prezesa. Obecnie jest członkiem PTZ oraz International Zeolite Association.

ABSTRACT

The natural ultramarine (*lazurite*, *lapis lazuli*) has been known and valued since the ancient times as semiprecious gem applied for jewelry, artistic works, decoration and painting. In Middle Ages it was used as excellent, but very expensive pigment. At the beginning of the nineteenth century a method of synthesis of artificial ultramarine has been discovered and it soon became a common inexpensive commercial product applied mostly for production of paints and as an optical brightener. The procedure included heating of the substrate mixtures (kaolin, sulfur, sodium carbonate, reducing agent) in kilns at high temperature (800°C). The technology of ultramarine production has not been substantially changed up to now, whereas the law regulations concerning environment protection imposed in the twentieth century could not accept a serious air pollution (SO₂, H₂S) always accompanying the production process. Therefore, searching for novel, environmentally friendly procedures becomes challenging.

Ultramarine is an aluminosilicate with sodalite structure that contains sulfur anion-radicals (mostly S_3^-) combined with Na⁺ cations embedded inside β -cages. The sulfur radicals play a role of chromophores (S_3^- blue, S_3^- yellow). Sodalite is a zeolite and the sodalite units (β -cages) are constituents of structure of several zeolites (LTA, FAU, LTN, EMT).

The use of zeolitic structures for encapsulation of sulfur anion radicals appeared very promising. The direct introduction of sulfur radicals from aprotic solutions of oligosulfides [27] was not successful but the thermal treatment of zeolites mixed with sulfur radical precursors (NaS_n, S + alkalis) resulted in colored products analogous to ultramarine [24–26, 30, 31]. Zeolites A seem the most useful for preparation of sulfur pigments but other zeolites can be applied as well. The products of various colors (yellow, green blue and sometimes pinky) and shades can be obtained by choosing appropriate zeolite, radical precursor, kind and content of alkaline cation in the initial mixture, temperature (400–800°C) and time of treatment. It was found that zeolite structure can be maintained upon the thermal treatment or it can be transformed (mostly towards SOD) under highly alkaline thermal treatment. The sulfur radicals can also be embedded inside smaller than β -cages (e.g. CAN) which favors a generation of smaller radicals (i.e. S_2^-) [39–42]. It is also possible to incorporate the sulfur compounds into zeolites during their crystallization and then a generation of radical upon heating. The sulfur pigments based on non aluminosilicate matrices (e.g. AlPO₄-20) can be also obtained [38, 53].

Generally use of zeolites allows to obtain ultramarine-like pigments with broad range of colors under much milder than conventional conditions and with much lower emission of polluting agents.

Keywords: ultramarine, zeolites, molecular sieves, sulfur radicals, encapsulation

Słowa kluczowe: ultramaryna, zeolity, sita molekularne, rodniki siarkowe, enkapsulacja

WSTĘP

Naturalny lazuryt (*lapis lazuli*) o głęboko niebieskim zabarwieniu znany był i ceniony jako kamień półszlachetny już kilka tysięcy lat temu. W rozwiniętych cywilizacjach tego okresu (Mezopotamia, Egipt) stosowany był w zdobnictwie i w jubilerstwie, a od średniowiecza zaczęto go przerabiać na cenny pigment używany do malarstwa artystycznego. Stało się to po wyprawach Marco Polo, który przywiózł lazuryt do Europy z Afganistanu, gdzie do dziś występują największe złoża tego minerału. Wtedy też utrzymała się jego nazwa ultramaryna, nawiązująca (w języku włoskim) do zamorskiego pochodzenia. Wieloetapowa przeróbka lazurytu na pigment była bardzo pracochłonna i mało efektywna (końcowy produkt stanowił zaledwie ~3% masy początkowego surowca), co poza wysokimi kosztami egzotycznego w Europie minerału, dodatkowo podnosiło cenę błękitu ultramarynowego. Zapotrzebowanie na pigmenty i barwniki zdecydowanie wzrosło na początku XIX wieku, po Rewolucji Przemysłowej, która spowodowała gwałtowny rozwój technologii przemysłowych i postęp cywilizacji. W roku 1824 Société d'Encouragement pour l'Industrie Nationale w Paryżu ogłosiło konkurs na opracowanie metody otrzymywania syntetycznego pigmentu o właściwościach ultramaryny uzyskiwanej z lazurytu, którego cena nie przekraczałaby 300 franków za funt. Nagrodę otrzymał Jean Baptiste Guimet, który w 1828 roku przedstawił produkt uzyskany przez prażenie kaolinu, siarki, sody i węgla drzewnego, jako reduktora. Szacowana cena uzyskanego produktu była wprawdzie dwukrotnie wyższa niż w założeniach konkursu, ale jakość i prosty sposób otrzymywania z tanich surowców zyskały uznanie komisji. Niemal równocześnie podobną metodę przedstawił niemiecki chemik Christian Gottlieb Gmelin, który również pretendował do nagrody.

Opracowanie metody syntezy ultramaryny stało się realne w 1806 po określeniu składu chemicznego lazurytu przez Clementa i Desormesa [1], którzy wykazali, że jest on glinokrzemianem zawierającym siarkę. Pierwsza przemysłowa wytwórnia ultramaryny według metody Gmelina rozpoczęła działalność w Niemczech, w 1834 roku, a wkrótce potem pojawiły się kolejne. Pod koniec XIX wieku na terenie Europy było ich blisko 100. Ultramaryna, z produktu luksusowego, stała się pospolitym pigmentem, powszechnie używanym do farb, lakierów, jako wybielacz optyczny do środków piorących, papieru, a nawet produktów spożywczych (np. cukru). To ostatnie zastosowanie wynika z jej całkowitej nietoksyczności. Obecnie znaczna część produkowanej ultramaryny przeznaczona jest do barwienia tworzyw sztucznych.

Poza podstawowym typem ultramaryny niebieskiej, możliwe jest również uzyskiwanie odcieni zielonych lub fioletowych, a także ultramaryny różowej, poprzez termiczne traktowanie podstawowego produktu chlorem lub chlorkiem amonu [2].

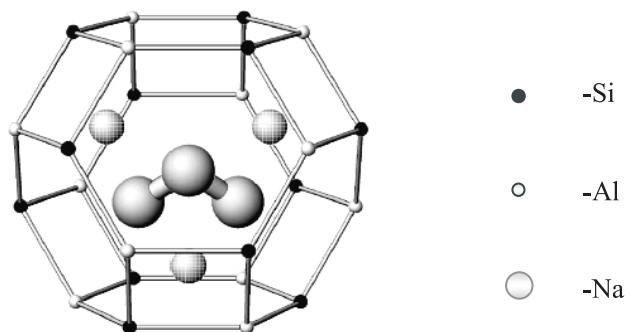
Poważnym mankamentem tradycyjnej syntezy ultramaryny jest zagrożenie środowiska wynikające z emisji do atmosfery lotnych związków siarki (SO_2 , H_2S). Zwiększona troska o ochronę środowiska w XX wieku oraz idące za tym, zaostrzające się przepisy prawne spowodowały, że wiele małych wytwórni ultramaryny nie

mogło sprostać postawionym wymogom i zostały zamknięte. Światowa produkcja nie ulega jednak zmniejszeniu i zbliża się do poziomu 50 000 ton rocznie. Największymi producentami ultramaryny są Holliday Pigments (oddział Yule Cato), który jest kontynuatorem firmy Reckitt's Colours, działającej nieprzerwanie od połowy XIX wieku, a także Nubiola (Hiszpania). Znaczne ilości ultramaryny produkuje się w Indiach i w Chinach.

Problem ochrony środowiska jest poważnym wyzwaniem dla producentów, a neutralizacja toksycznych gazów stanowi poważny składnik kosztów produkcji. Innym problemem, który jest jednocześnie szansą dla producentów pigmentów siarkowych, jest zwiększenie palety osiągalnych barw.

Ponieważ tradycyjne pigmenty nieorganiczne, zawierające metale ciężkie, są wycofywane z rynku ze względu na ich toksyczność, nietoksyczne odpowiedniki ultramarynowe mogłyby zająć ich miejsce.

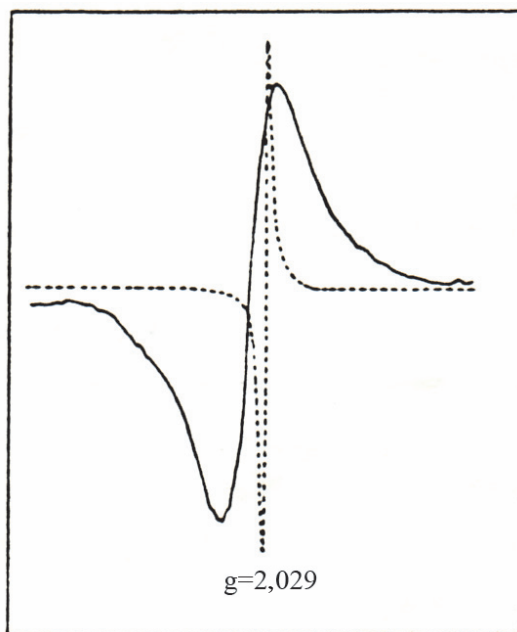
Mimo że produkcja ultramaryny syntetycznej trwa od blisko 200 lat, struktura krystaliczna, a tym bardziej natura chromoforów przez długi czas pozostawała nieznaną. W latach 30. ubiegłego wieku Jaeger [3] wykazała, że ultramaryna syntetyczna, podobnie jak naturalny lazuryt, ma strukturę sodalitu (SOD). Ciasne klatki sodali-towe pełnią rolę matryc goszczących centra barwne (Rys. 1).



Rysunek 1. Budowa ultramaryny (jednostka sodalitowa z enkapsulowanym rodnikiem S_3)

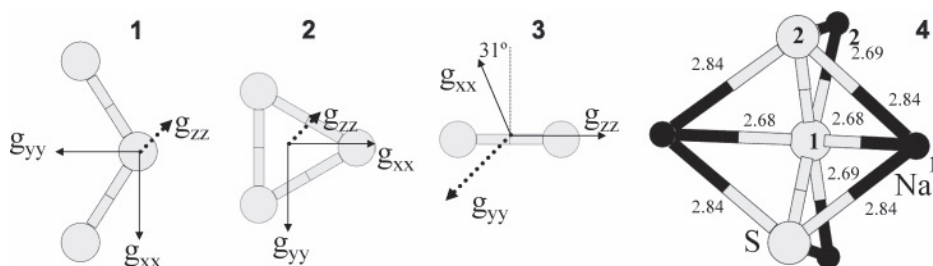
Figure 1. Structure of ultramarine (model of sodalite cages with entrapped radical S_3)

Udział siarki w tworzeniu centrów barwnych od dawna nie budził wątpliwości, jednak skład i struktura chromoforów siarkowych pozostawały w sferze spekulacji. Obserwowano, że traktowanie ultramaryny kwasami powoduje wydzielanie siarkowodoru, jednak ani siarczki, ani oligosiarczki sodu nie są błękitne. Dopiero za pomocą spektroskopii EPR wykazano, że w ultramarynie obecne są rodniki siarkowe [4]. Badania nad oligosiarczkami alkalicznymi, rozpuszczonymi w aprotycznych rozpuszczalnikach, takich jak aceton, DMF, DMSO, aminy, triamid kwasu heksametylofosforowego (HMPT), wykazały intensywne ich zabarwienie (żółte, zielone niebieskie, czerwone, brązowe), zależne od długości łańcucha polisulfidowego.



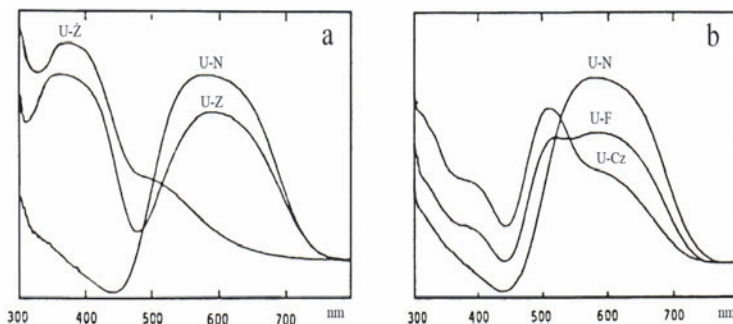
Rysunek 2. Widmo EPR ultramaryny (wąski sygnał) oraz anionorodnika S_3^- w roztworze triamidu kwasu heksametylofosforowego (HMPT) [14]
 Figure 2. EPR spectra of ultramarine (narrow signal) and of anion-radical S_3^- in hexamethylphosphoric acid triamide (HMPT) solution [14]

Widma EPR roztworów oligosiarczku Na_2S_6 w rozpuszczalnikach aprotycznych, bez udziału powietrza, o intensywnie błękitnym zabarwieniu okazały się prawie identyczne jak widma ultramaryny [5–7]. Był to decydujący argument wykazujący, że aniono-rodnik S_3^- jest chromoforem odpowiedzialnym za niebieskie zabarwienie ultramaryny (Rys. 2). Obecnie, na podstawie obliczeń teoretycznych, uważa się [8, 9], że z dwóch izomerów S_3^- trwalsza jest forma otwarta (Rys. 3).



Rysunek 3. Modele rodników siarkowych: 1 – S_3^- forma otwarta (C_{2v}), 2 – S_3^- forma zamknięta (D_{3h}), 3 – S_2^- (C_1), 4 – $[\text{Na}_4\text{S}_3]^{3+}$ (C_{2v}). Obliczone kierunki tensora g oraz długości wiązań S-Na (Å) [28]

Figure 3. The radical sulphur models: 1 – S_3^- open form (C_{2v}), 2 – S_3^- closed form (D_{3h}), 3 – S_2^- (C_1), 4 – $[\text{Na}_4\text{S}_3]^{3+}$ (C_{2v}). The calculated g -tensor orientations and the S-Na bond lengths (Å) in the cluster [28]



Rysunek 4. Widma UV-vis ultramaryn o różnym zabarwieniu.

U-Ż – ultramaryna żółta, U-N – ultramaryna niebieska, U-Z – ultramaryna zielona (wykres a).

U-F – ultramaryna fioletowa, U-Cz – ultramaryna czerwona (wykres b) [14]

Figure 4. UV-vis spectra of differently coloured types of ultramarine.

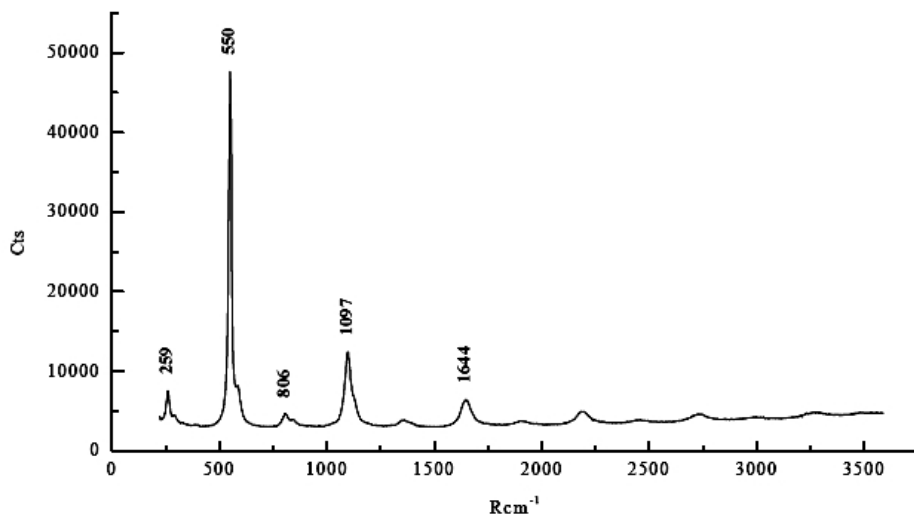
U-Ż – yellow, U-N – blue, U-Z – green (Fig. a).

U-F – violet, U-Cz – red (Fig. b) [14]

Widma elektronowe (Rys. 4) ultramaryny, poza dominującym pasmem w rejonie 600 nm, charakterystycznym dla barwy niebieskiej, niekiedy wykazuje również obecność pasma absorpcji przy długości ~ 400 nm, które odpowiada barwie żółtej. Za żółty chromofor powszechnie uważa się anionorodnik S_2^- . Jego identyfikacja za pomocą spektroskopii EPR nie jest jednak jednoznaczna. W starszych pracach przypisywano mu sygnał o wartości $g = 1,99\text{--}2,018$ [4], który jednak przez niektórych autorów jest uważany za świadectwo obecności zanieczyszczeń (np. żelaza) [10]. Obecnie przeważa pogląd, że rodnik ten nie jest wykrywalny przez EPR [10, 11]. Rodniki siarkowe nie są również łatwe do obserwacji za pomocą spektroskopii w podczerwieni, gdyż ich pasmo ($550\text{--}580\text{ cm}^{-1}$) często występuje w tym samym zakresie drgań, co pasma występujące w matrycach zeolitowych.

Dużą przydatność w identyfikacji połączeń siarkowych w preparatach ultramarynowych wykazuje spektroskopia Ramana. Pozwala ona na rozróżnienie zarówno rodników S_3^- (pasmo przy ok. 550 cm^{-1}) od S_2^- ($\sim 590\text{ cm}^{-1}$), jak również od siarki elementarnej (pasma przy ok. $153, 218, 470\text{ cm}^{-1}$) (Rys. 5).

W niektórych modyfikacjach ultramaryny (za pomocą chloru lub chlorku amonu) widoczny jest także udział czerwonego chromofora, za który uważano rodnik S_4^- . Odmianę taką otrzymano już w XIX wieku i pierwszy patent Cesarskiego Urzędu Patentowego w Niemczech [2] poświęcony był temu odkryciu. Identyfikacja czerwonego chromoforu za pomocą spektroskopii EPR budziła również poważne kontrowersje [12–14] i obecnie przeważa pogląd, że czerwonym komponentem barwy jest raczej obojętna cząsteczka S_4 (Rys. 6) [8–9].



Rysunek 5. Widmo Ramana ultramaryny niebieskiej
Figure 5. Raman spectrum of ultramarine blue

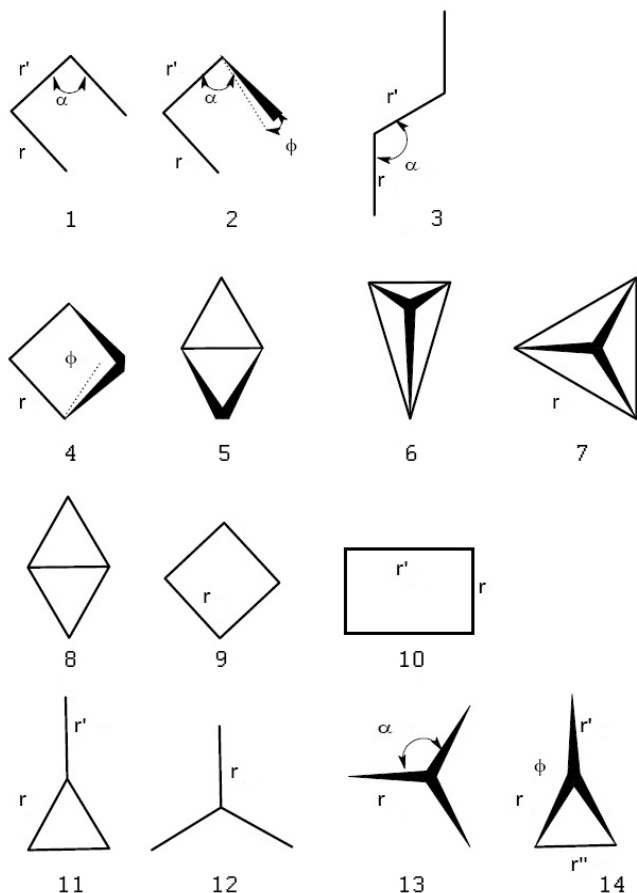
Czerwoną barwę ultramaryny można uzyskać także przez zastąpienie siarki selenem. Stwierdzono, że za czerwoną barwę w ultramarynie selenowej odpowiedzialne są rodniki $\cdot\text{Se}_2$ oraz cząsteczki Se_2 [15–18]. Możliwe jest również uzyskanie zielononiebieskich, tellurowych analogów ultramarynowych [19]. Produkcja przemysłowa powyższych modyfikacji jest jednak mało prawdopodobna, nie tylko ze względu na wysoką cenę selenu i telluru, ale głównie na wysoką toksyczność ich związków.

Tradycyjna synteza ultramaryny z kaolinu obejmuje kilka etapów. Polega ona na prażeniu w wysokich temperaturach mieszaniny kaolinu, krzemionki, węgla lub siarczanu sodowego, a czasami także niewielkiej ilości sody kaustycznej oraz siarki z dodatkiem środków redukujących siarkę, tj. węgla, kalafonii, paku. Prażenie przeprowadza się w tyglach szamotowych o pojemności kilku kilogramów (metoda tyglowa) lub bezpośrednio w muflach pieca (metoda muflowa). Obie metody stosowane są w przemyśle. Metoda tyglowa jest jednak bardziej rozpowszechniona, ponieważ regulacja temperatury i dostępu powietrza jest łatwiejsza.

Oprócz w/w metod periodycznych, syntezę przeprowadza się również metodą ciągłą. W metodzie tej proces przebiega w pochylonym piecu obrotowym. W górnej części pieca utrzymuje się temperaturę powyżej 750°C , natomiast w dolnej około 200°C . Mieszanina przesuwana jest z górnej części pieca, gdzie panują warunki beztlenowe, do dolnej. Po dotlenieniu w niższych partiach pieca, produkt opuszcza go w postaci błękitu ultramarynowego [20].

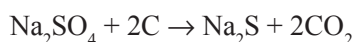
Ze względu na rodzaj stosowanego surowca, wyróżnia się następujące metody syntezy ultramaryny:

- *metoda siarczanowa* – polega na wypalaniu w tyglach mieszaniny kaolinu, siarczanu sodu oraz węgla, jako czynnika redukującego.

Rysunek 6. Przykładowe izomery chromoforu S_4 :

- 1 – łańcuchowy *cis* (C_{2v}), 2 – łańcuchowa skośna (C_2), 3 – łańcuchowy *trans* (C_{2h}),
 4 – wygięty pierścieniowy (D_{2d}), 5 – motylkowy (D_{2d}), 6 – tetraedyczny (D_{2d}), 7 – tetraedyczny (T_d),
 8 – podwójny trójkątny (D_{4h}), 9 – płaski kwadratowy (D_{4h}), 10 – prostokątny (D_{2h}), 11 – egzocykliczny (C_{2v}),
 12 – rozgałęziony łańcuchowy (D_{2h}), 13 – piramidalny (C_3), 14 – zgięty egzocykliczny (C_3) [8]
 Figure 6. Typical isomers of S_4 : 1 – *cis* chain (C_{2v}), 2 – *gauche* chain (C_2), 3 – *trans* chain (C_{2h}),
 4 – puckered ring (D_{2d}), 5 – butterfly (D_{2d}), 6 – tetrahedral (D_{2d}), 7 – tetrahedral (T_d),
 8 – double triangle (D_{4h}), 9 – square planar (D_{4h}), 10 – rectangle (D_{2h}), 11 – exocyclic (C_{2v}),
 12 – branched chain (D_{2h}), 13 – pyramidal (C_3), 14 – bent exocyclic (C_3) [8]

W początkowej fazie procesu, zachodzącej w około 900°C , następuje redukcja siarcznanu sodu węglem:

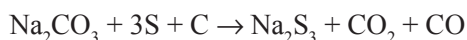
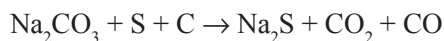


Następnie, w wyniku reakcji pomiędzy siarczkiem sodu i kaolinem, powstaje ultramaryna o kolorze zielonym (tzw. błękit pierwotny). Produkt ten poddaje się dalszemu wypalaniu, w celu przemiany w ultramarynę niebieską. Wadą tej metody

jest konieczność dwukrotnego wypalania, duża zawartość wolnej siarki w produkcie oraz mała intensywność barwy.

- *metoda siarkowo-sodowa* – polega na prażeniu mieszaniny kaolinu, sody, siarki, kwarcu lub ziemi okrzemkowej, paku lub kalafonii. W metodzie tej wyróżnić możemy trzy etapy:

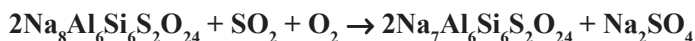
- 1) w pierwszym, w wyniku reakcji sody amoniakalnej z siarką elementarną powstają siarczki i wielosiarczki. Reakcje te zachodzą w atmosferze redukującej. Proces zachodzi w zakresie temperatur od 25–700°C, zgodnie z podanym zapisem reakcji:



- 2) w drugim etapie, w temperaturach od 700–830°C, zachodzi reakcja między kaolinem i krzemionką oraz wytworzonymi w pierwszym etapie siarczkami. Powstaje ultramaryna pierwotna, zielononiebieska



- 3) w trzecim etapie procesu, w zakresie temperatur od 500–700°C, zachodzi proces utleniania ultramaryny pierwotnej mieszaniną tlenu i dwutlenku siarki. Powstaje właściwa ultramaryna niebieska oraz produkt uboczny – siarczan sodu



Zaletą tej metody jest możliwość otrzymania ultramaryny o różnym stopniu zawartości krzemu do siarki, bez dwukrotnego wypalania. Wadą natomiast jest emisja znacznych ilości szkodliwych gazów.

1. UŻYCIE MATRYC ZEOLITOWYCH DO SYNTEZY PIGMENTÓW SIARKOWYCH

Jednostki sodalitowe, w których uwięzione są anionorodniki siarkowe w ultramarynie, to podstawowe segmenty struktury SOD. Jednostki te występują również jako elementy strukturalne kilku innych typów zeolitów (np. LTA, FAU, EMT, LTN) [21].

Użycie istniejących już struktur zeolitowych (szczególnie zawierających klatki sodalitowe) do enkapsulacji rodników siarkowych wydawało się obiecujące, w porównaniu z długotrwałym procesem konwencjonalnym, w którym struktura sodalitowa powstaje w procesie wysokotemperaturowym z kaolinu, a syntezie towarzyszy emisja znacznej ilości toksycznych gazów siarkowych.

Pierwsze, niezbyt udane próby, zastosowania zeolitów do syntezy ultramaryny prezentowano już w latach 30. ubiegłego wieku [22]. Syntetyczne zeolity stosowali Kummins i in. [23, 24]. Mieszaninę zeolitu, wielosiarczku sodu bądź siarki elementarnej i octanu sodu poddawano prażeniu w 800°C, w atmosferze azotu, a następnie łagodnie utleniano w 500°C, w atmosferze powietrza. Podobne próby prowadził Ishida i in. [25–27], którzy stosowali syntetyczne zeolity 4A lub 5A, impregnowane siarczkiem sodu i traktowane termicznie w obecności par siarki. Intensywność zabarwienia otrzymanych produktów była jednak niższa, w porównaniu z produktami otrzymanymi z kaolinu.

Mimo niezbyt obiecujących początków, badania nad stosowaniem zeolitów i innych sit molekularnych do syntezy pigmentów siarkowych rozwinęły się w szeregu ośrodków i wzbudzają zainteresowanie producentów.

W badaniach tych można wyróżnić różne kierunki i różne aspekty, omówione w kolejnych paragrafach.

1.1. SPOSOBY ENKAPSULACJI RODNIKÓW SIARKOWYCH W MATRYCACH ZEOLITOWYCH

1.1.1. Próby wprowadzenia do zeolitów rodników siarkowych z roztworów aprotycznych

Roztwory wielosiarczkwów alkalicznych w rozpuszczalnikach aprotycznych zawierają rodniki siarkowe, powstające przez dysocjację łańcuchów wielosiarczkowych. Wydawało się, że traktowanie aktywowanych zeolitów solwatowanymi rodnikami może doprowadzić do ich penetracji do wnętrza klatek, a następnie stabilizowania ich w zamkniętych przestrzeniach wewnątrzkrystalicznych. Próby traktowania zeolitów A i X [28] kolorowymi roztworami wielosiarczkwów w DMSO prowadziły początkowo do barwnych zawiesin zeolitów, jednak usuwanie rozpuszczalnika przez odparowywanie przy zmniejszonym ciśnieniu prowadziło do natychmiastowego odbarwienia zeolitów. Również eksperymenty prowadzone w wyższych temperaturach (w autoklawach) nie prowadziły do zakotwiczenia rodników w małych kłatkach (sodalitowych). Wydaje się oczywiste, że usuwanie rozpuszczalnika powoduje natychmiastową rekombinację rodników z utworzeniem prawie bezbarwnych wielosiarczkwów.

1.1.2. Wprowadzenie prekursorów rodników siarkowych podczas syntezy zeolitów

Tradycyjna, wysokotemperaturowa metoda syntezy ultramaryny obejmuje krystalizację struktury sodalitu bez udziału fazy ciekłej. Powszechnie stosowana krysta-

lizacja hydrotermalna zeolitów jest prowadzona w znacznie łagodniejszych warunkach. Niektóre typy zeolitów (sodalit, kankrynit) zawierają w swoich przestrzeniach wewnątrzkrystalicznych okludowane cząsteczki soli obecnych w mieszaninie krystalizacyjnej. Cząsteczkami takimi mogą być prekursorzy rodników siarkowych (np. cząsteczki siarczków, oligosiarczków, rodanków, siarczanów). Weller [29] uzyskiwał strukturę sodalitu z enkapsulowanymi cząsteczkami tiocyjanianów. Podczas prażenia tiocyjaniany ulegały utlenieniu i powstawały aniono-rodniki oligosiarczkowe $\cdot S_3^-$ i $\cdot S_2^-$, co było widoczne w zabarwieniu (niebieskim, zielonym). Voughan [11] syntetyzował sodalit w obecności kationów tetrametyloamoniowych oraz anionów siarczanowych, które pozostawały w klatkach β po krystalizacji. Podczas obróbki termicznej siarczany ulegały redukcji za pośrednictwem rozkładającego się kationu organicznego i powstawał niebieski produkt podobny do ultramaryny. Próby analogicznych syntez, przy użyciu innych niż Al i Si pierwiastków szkieletowych (takich jak gal i german) oraz selenianu zamiast siarczanu, nie prowadziły natomiast do utworzenia barwnych produktów [30].

Krystalizacja sodalitu [31] lub kankrynit [32] w obecności siarczków lub wielosiarczków sodu prowadziła do uzyskania blade zielonkawych produktów, w których pomiary EPR wykazywały sygnały świadczące o obecności rodników. Ogrzewanie tych produktów w wyższych temperaturach zdecydowanie zwiększało intensywność zabarwienia. Wprowadzanie prekursorów rodników siarkowych do wnętrza struktur zeolitowych prowadzono również poprzez rekrystalizację zeolitów (głównie zeolitów A) w obecności siarczków lub wielosiarczków sodu. W zależności od stężenia związków siarkowych oraz temperatury obróbki hydrotermalnej, uzyskiwano strukturę sodalitu [31] lub kankrynit [32]. Ogrzewanie powstałych produktów prowadziło do powstawania rodników, a co za tym idzie – do intensywnego zabarwienia preparatów. Preparaty prażone w $500^\circ C$ zachowywały strukturę macierzystego zeolitu, natomiast prażone w $800^\circ C$ (w przypadku mieszanin wysoko alkalicznych) rekrystalizowały do sodalitu.

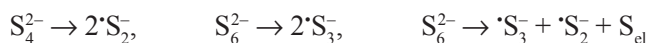
1.1.3. Generowanie w zeolitach rodników siarkowych za pomocą promieniowania

Powszechną metodą wytwarzania rodników siarkowych w matrycach zeolitowych jest termiczne działanie na wprowadzone prekursorzy (np. oligosiarczki). Podejmowano również próby rozerwania łańcuchów wielosiarczkowych za pomocą promieniowania.

Preparaty otrzymane z zeolitów A i X impregnowanych wielosiarczkami sodu poddawane były działaniu wiązki przyspieszonych elektronów lub promieni γ . W przypadku impregnowanych zeolitów A, pojawiało się zabarwienie preparatów, które było jednak znacznie mniej intensywne od obserwowanego w ultramarynie, a widma EPR nie przypominały widm ultramaryny [33].

1.1.4. Termiczna obróbka mieszanin zeolitów z prekursorami rodników siarkowych

W tradycyjnej syntezie ultramaryny z kaolinu, związki siarkowe prawdopodobnie są wprowadzane w trakcie tworzenia się komór sodalitowych. W podobny sposób wprowadzane są prekursory rodników siarkowych podczas hydrotermalnej syntezy zeolitów (sodalitu, kankrynitu) w obecności związków siarkowych. Wczesne prace [29, 34, 35] wskazują, że penetracja małych cząsteczek zawierających siarkę do wnętrza klatek jest jednak możliwa, szczególnie w wysokiej temperaturze. Również cykliczna cząsteczka siarki S_8 może ulegać termicznej dysocjacji na mniejsze segmenty, które mogą dyfundować do małych klatek strukturalnych (np. do klatki sodalitowej). Jak wykazały badania termiczne, traktowanie zeolitów odpowiednimi związkami siarki może prowadzić do lokalizowania prekursorów rodników w ograniczonych przestrzeniach (klatkach), a następnie do generowania rodników. Mechanizm tych procesów nie jest jednak całkowicie jasny. Łańcuchy oligosiarczków mogą ulegać homolitycznemu przerwaniu, w wyniku czego mogą powstawać następujące aniono-rodniki:



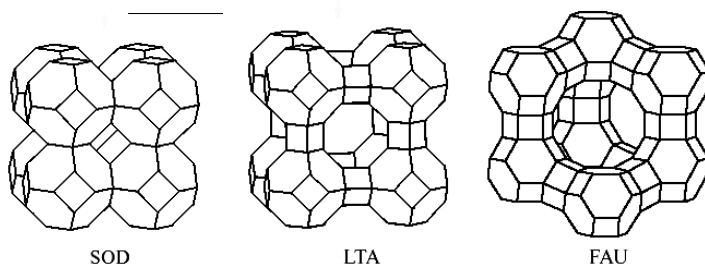
Rodniki mogą również powstawać w wyniku łagodnego utleniania siarczków lub oligosiarczków za pomocą tlenu lub siarki:



Jako prekursorów siarkowych używano zarówno siarczków i oligosiarczków alkalicznych (głównie sodowych), jak i siarki elementarnej z dodatkiem związków alkalicznych (przede wszystkim Na_2CO_3 lub NaOH).

1.2. PRÓBY SYNTEZ ANALOGÓW ULTRAMARYNY PRZY UŻYCIU ZEOLITÓW ZAWIERAJACYCH W SWEJ STRUKTURZE JEDNOSTKI SODALITOWE

Przeprowadzając syntezy pigmentów siarkowych badano wpływ oraz możliwości wykorzystania różnych struktur zeolitywych. Ponieważ ultramaryna naturalna posiada strukturę sodalitu (SOD), szczególny nacisk kładziono na zeolity zawierające w swej strukturze jednostki sodalitowe, m.in. zeolit A, X, Y (Rys. 7).



Rysunek 7. Struktura sodalitu (SOD), zeolitu A (LTA) oraz fojazytu (FAU)
 Figure 7. Models of selected zeolite structures (SOD – sodalite, LTA– zeolite A, FAU – faujasite)

1.2.1. SYNTEZY BAZUJĄCE NA ZEOLITACH A (LTA)

Zeolity typu A (4A i 5A) wykorzystywane były przez Ishidę i współpracowników [25–27] do syntezy analogów ultramarynowych. Zgodnie z procedurą podaną przez autorów, zeolity impregnowane siarczkiem sodu poddawano obróbce termicznej (820°C) w strumieniu azotu z udziałem par siarki, a następnie utlenieniu w 500°C. Autorzy nie przewidywali potencjalnych zastosowań przemysłowych stosowanej metody, ze względu na stosunkowo niską intensywność barwy uzyskanych produktów i wysoką wówczas cenę zeolitów syntetycznych.

Obecnie zeolity A są produkowane na dużą skalę (ponad milion ton rocznie) i ich cena zdecydowanie się obniżyła, i jest porównywalna z ceną kaolinu. Sprawia to, że otrzymywane z nich pigmenty mają szanse wejścia do produkcji przemysłowej.

Poza impregnacją zeolitów A, stosowano także zwykle mieszanie z siarczkami lub oligosiarczkami sodu i następnie prażenie w szerokim zakresie temperatur (300–900°C) [36, 37]. Właściwości produktów (przede wszystkim zabarwienie i struktura) zdecydowanie zależały od długości łańcucha oligosiarczkowego (a więc stosunku Na_2/S) w prekursorze siarkowym, jak również od temperatury i czasu obróbki termicznej. Zwykle eksperymenty prowadzono w małej skali laboratoryjnej (kilka gramów zeolitu), a sumaryczna zawartość siarki nie przekraczała 40% masy zeolitu. Obróbkę termiczną prowadzono w zamkniętych tyglach ceramicznych, w atmosferze powietrza, bez udziału czynnika redukującego. Tabela 1 prezentuje zabarwienie i strukturę produktów uzyskanych przy użyciu różnych oligosiarczków sodu (przy różnej alkaliczności mieszaniny wyrażonej jako stosunek Na_2/S). Jak można zauważyć, preparaty otrzymywane przy użyciu najdłuższych oligosiarczków (a więc o najniższej alkaliczności) zachowują strukturę macierzystych zeolitów (LTA). Przy średniej alkaliczności mieszaniny reakcyjnej ($\text{Na}_2/\text{S} \sim 0,3$) następują zmiany strukturalne zeolitu widoczne w dyfraktogramach rentgenowskich jako zanik refleksów niskokątowych, sugerujące powstanie nowej fazy krystalicznej, przypominającej opisywany przez Barrera [38] hydrat nefelinu II. Próbkę powstającą z mieszanin o najwyższej alkaliczności wykazują strukturę sodalitu. Produkty otrzymane z mieszanin o średniej alkaliczności wykazują zmniejszoną intensywność refleksów dyfrak-

cyjnych, jednak nigdy nie obserwowano całkowitej amorfizacji preparatów. Zabarwienie preparatów w serii otrzymanej w temperaturze 500°C zmienia się od niebieskiego, poprzez turkusowy, do zielonego wraz z rosnącą alkalicznością mieszanin, natomiast w serii uzyskanej w 800°C obserwuje się odwrotną zależność. Otrzymane wyniki mogą sugerować, że w 500°C rodniki siarkowe powstają głównie dzięki *krakingowi* oligosiarczków, natomiast w wyższej temperaturze dominuje proces ich utleniania.

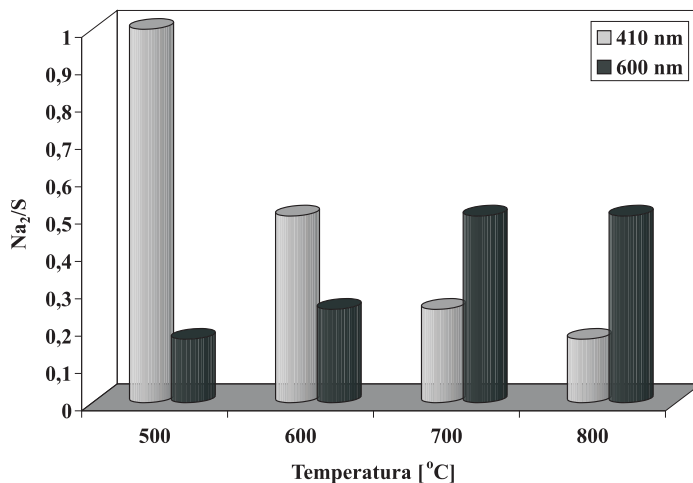
Tabela 1. Warunki oraz rezultaty serii syntez otrzymanych z zeolitu A przy użyciu wielosiarczków sodu [38]

Table 1. Preparation conditions and properties of the products obtained from zeolite A and sodium oligosulfides [38]

Temp. \ Źródło siarki	Na ₂ S Na ₂ /S = 1	Na ₂ S ₂ Na ₂ /S = 0,5	Na ₂ S ₃ Na ₂ /S = 0,33	Na ₂ S ₄ Na ₂ /S = 0,25	Na ₂ S ₆ Na ₂ /S = 0,17	Na ₂ S ₈ Na ₂ /S = 0,12
500°C	j. seledynowa	j. zielona	zielona	turkusowa	niebieska	niebieska
Struktura	SOD	SOD+CAN	NEF	NEF	LTA	LTA
600°C	seledynowa	j. zielona	zielona	turkusowa	niebieska	niebieska
Struktura	SOD	SOD+CAN	NEF	NEF	LTA	LTA
700°C	błękitna	niebieska	zielona	zielona	seledynowa	seledynowa
Struktura	SOD	SOD+CAN	NEF	NEF	LTA	LTA
800°C	błękitna	niebieska	zielona	j. zielona	seledynowa	seledynowa
Struktura	SOD	SOD+CAN	NEF	NEF	LTA	LTA

SOD – sodalit, LTA – zeolit A, NEF – hydrat nefelinu II, CAN – kankrynit.

Widma elektronowe (Rys. 8) ilustrują zmienny udział chromoforu niebieskiego (pasmo ~600 nm) i żółtego (~400 nm) w preparatach. Porównując udział poszczególnych pasm w widmie elektronowym, możemy zauważyć, że pasmo przypisane rodnikowi $\cdot S_2$ w niskich temperaturach wykazuje największą intensywność przy wysokim stosunku Na₂/S, natomiast w wyższych temperaturach jego maksymalna intensywność występuje przy niższej alkaliczności. Dla próbek prażonych w niskich temperaturach pasmo o długości fali ~600 nm (rodnik $\cdot S_3$) osiąga maksimum przy niskim stosunku Na₂/S. W przypadku próbek otrzymanych w wyższych temperaturach, pasmo to wykazuje maksimum przy wyższym stosunku Na₂/S. Otrzymane wyniki nasuwają przypuszczenie, że oprócz generowania rodników siarkowych na drodze utleniania wielosiarczków, homolityczne rozerwanie wiązań S-S w łańcuchu poli-siarkowym może stanowić istotny element tworzenia rodników siarkowych.



Rysunek 8. Wpływ alkaliczności (Na_2/S) mieszaniny na maksymalny udział chromoforów (600 nm – S_3^- , 410 nm – S_2^-) w produktach uzyskanych w różnych temperaturach [38]
 Figure 8. Influence of initial mixture alkalinity (Na_2/S) on maximum contribution of chromophores (600 nm – S_3^- , 410 nm – S_2^-) in the products prepared at various temperatures [38]

Podobne rezultaty uzyskuje się z mieszanin zeolitów A, siarki elementarnej i alkaliów (głównie Na_2CO_3) [37]. Zależności zmian strukturalnych oraz zabarwienia od alkaliczności mieszanin początkowych (Tab. 2) są podobne jak w przypadku użycia oligosiarczków, przy czym struktura sodalitu podczas prażenia w wysokich temperaturach pojawia się już przy niższych stosunkach Na_2/S (0,4).

Tabela 2. Warunki oraz rezultaty serii syntez otrzymanych z zeolitu A przy użyciu siarki elementarnej oraz sody [38]

Table. 2. Preparation conditions and properties of the products obtained from zeolite A and elemental sulfur mixed with sodium carbonate [38]

Temp. / Źródło siarki	Na_2/S					
	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0
500°C	zielona	j. turkusowa	turkusowa	turkusowa	niebieska	biała
Struktura	SOD	NEF	NEF	NEF	LTA	LTA
600°C	zielona	zielona	turkusowa	turkusowa	niebieska	niebieska
Struktura	SOD	SOD	NEF	NEF	LTA	LTA
700°C	błękitna	niebieska	niebieska	turkusowa	seledynowa	seledynowa
Struktura	SOD	SOD	SOD	NEF	LTA	LTA
800°C	błękitna	niebieska	zielona	j. zielona	seledynowa	seledynowa
Struktura	SOD	SOD	SOD	SOD	LTA	LTA

1.2.2. Syntezy oparte na zeolitach typu fojazytu

Zeolity typu X i Y mogą być użyte do syntez analogów ultramaryny w podobny sposób jak zeolity typu A, jednak przy podobnych parametrach syntezy termicznej, uzyskane preparaty wykazują niższą intensywność zabarwienia. W niskich temperaturach obróbki, a szczególnie przy użyciu mieszanin o niskiej alkaliczności, produkty zachowują pierwotną strukturę (FAU), ale intensywność ich zabarwienia jest bardzo niska lub wcale nie wykazują zabarwienia. Produkty uzyskiwane w wysokich temperaturach z mieszanin o wysokiej alkaliczności wykazują znacznie intensywniejsze zabarwienie, ponadto obserwuje się rekryształizację do struktury sodalitu [28, 31, 39]. Produkty otrzymane z zeolitów Y są zwykle mniej intensywnie zabarwione, w porównaniu z materiałami uzyskanymi z zeolitów X.

1.2.3. Syntezy przy użyciu sodalitu

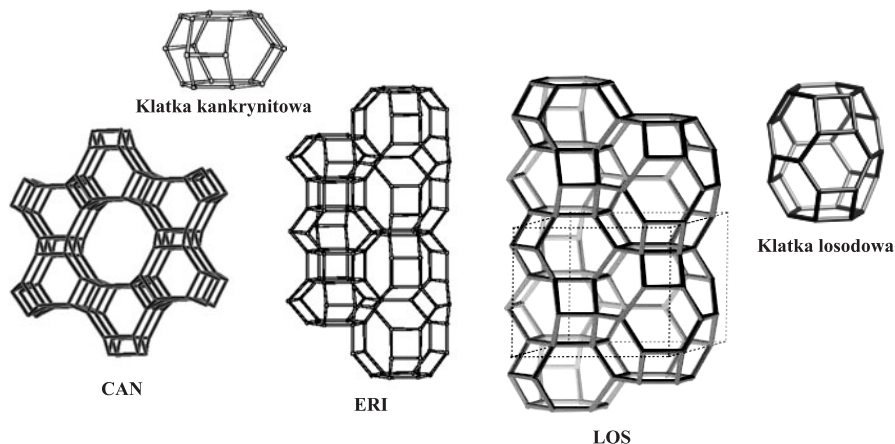
Użycie syntetycznego sodalitu do otrzymywania pigmentów siarkowych z badawczego punktu widzenia było interesującym wyzwaniem. Ponieważ zarówno ultramaryna naturalna, jak i syntetyczna wykazują strukturę SOD, badania te mogły rozstrzygnąć problem, czy rodniki siarkowe lub ich prekursory mogą dyfundować do klatek sodalitowych [31].

Syntezy prowadzone w sposób analogiczny do stosowanych dla zeolitów A prowadziły do uzyskania barwnych produktów (błękitnych, turkusowych) o niższej intensywności zabarwienia, w porównaniu z preparatami otrzymanymi z zeolitów A. Niższa intensywność zabarwienia może wynikać z mniejszej ilości enkapsulowanych rodników. Prawdopodobnie w przypadku struktury sodalitu dyfuzja związków siarkowych do jednostek sodalitowych przebiega znacznie trudniej, w porównaniu z zeolitem A, w którym prekursory rodników siarkowych mogą gromadzić się początkowo w dużych komorach α , a następnie dyfundować do klatek sodalitowych poprzez otwory sześcioczołowe. Struktura sodalitu nie ulegała wyraźnym transformacjom podczas obróbki termicznej, jednak w niektórych przypadkach w dyfraktogramach widoczne są refleksy świadczące o domieszkach karnegeitu.

1.3. SYNTEZY W OPARCIU O ZEOLITY NIE ZAWIERAJĄCE JEDNOSTEK SODALITOWYCH

Interesującym problemem było sprawdzenie, czy poza klatkami sodalitowymi rodniki siarkowe mogą być enkapsulowane i stabilizowane w innych klatkach strukturalnych, mniejszych bądź większych od sodalitowych (β). Przez klatki (*cages*) rozumie się przestrzenie wewnątrzkrystaliczne ograniczone pierścieniami tetraedrów nie większymi niż sześcioczołowe. Pierścienie te mają średnicę $\sim 0,3$ nm, co w normalnych warunkach zapewnia izolację enkapsulowanych cząsteczek. Klatki

o różnych rozmiarach mogą faworyzować powstawanie i stabilizowanie różnych rodników siarkowych (np. $^{\circ}\text{S}_2^-$, $^{\circ}\text{S}_4^-$). Spośród klatek mniejszych od sodalitowej na uwagę zasługuje klatka kankrynitowa (ϵ), występująca m.in. w kankrynicie, erionicie, losodzie oraz ofretycie. Interesująca jest również klatka losodowa, blisko dwukrotnie większa od klatki β (Rys. 9).



Rysunek 9. Przykładowe typy struktur zeolitowych (CAN – kankrynit, ERI – erionit, LOS – losod)
Figure 9. Models of the selected zeolite structures (CAN – cancrinite, ERI – erionite, LOS – losod)

1.3.1. Syntezy w oparciu o zeolity typu kankrynit

Związki siarkowe były wprowadzane do kankrynitru podczas jego syntezy, a następnie, po obróbce wysokotemperaturowej (500–800°C), generowano rodniki siarkowe. Barwne produkty otrzymane w wyniku prażenia wykazywały jednak niską intensywność zabarwienia [31, 40, 41]. Intensywnie zabarwione preparaty otrzymano wprowadzając związki siarkowe (oligosiarczki, siarka elementarna z alkaliami) do syntetycznych kankrynitów przez zmieszanie, a następnie ogrzewanie w podwyższonych temperaturach (500–800°C). Preparaty otrzymane w 500°C zachowywały macierzystą strukturę, a w ich zabarwieniu (żółtym, zielonym) widoczny był znaczący udział rodników $^{\circ}\text{S}_2^-$ (chromoforu żółtego). Powyższe obserwacje dotyczą również preparatów otrzymywanych w 800°C z mieszanin o niskiej alkalicyzności. Próbkę otrzymywaną z mieszanin bardziej alkalicznych posiadały barwę błękitną, a struktura kankrynitowa uległa transformacji do sodalitu. Powyższe rezultaty mogą sugerować wpływ geometrii matrycy zeolitowych na rodzaj tworzących się rodników siarkowych. Ponieważ, w przypadku materiałów posiadających strukturę kankrynitru, otrzymano preparaty, w których udział chromoforu $^{\circ}\text{S}_2^-$ był dominujący, można przypuszczać, że mniejsze klatki ϵ wyraźnie faworyzują powstawanie mniejszych rodników $^{\circ}\text{S}_2^-$, natomiast większe klatki sodalitu umożliwiają enkapsulację większych rodników $^{\circ}\text{S}_3^-$.

Preparaty otrzymane z kankrynytu (szczególnie zachowujące pierwotną strukturę) wykazują interesujące widma EPR. Widma lazurytu lub konwencjonalnie otrzymywanej ultramaryny wykonywane w temperaturze pokojowej prezentują zwykle sygnał izotropowy o współczynniku rozszczepienia $g = 2,029$ odpowiadającym rodnikowi $^{\circ}S_3$. Prowadzenie pomiaru w niskich temperaturach (w ciekłym azocie lub helu) znacznie ogranicza rotację rodników, wynikiem czego jest pojawienie się sygnału anizotropowego. W przypadku preparatów posiadających zachowaną strukturę CAN anizotropia sygnałów EPR widoczna jest już podczas pomiarów prowadzonych w temperaturze pokojowej [42, 43]. Badanie te wskazują na istotny wpływ geometrii matryc zeolitowych na otoczenie rodników siarkowych oraz na ich ruchliwość.

1.3.2. Syntezy z użyciem erionitu

Syntezy termiczne prowadzone z użyciem erionitu zmieszanego z siarką i różnymi ilościami węgla sodu prowadziły w temperaturze $500^{\circ}C$ do produktów o zachowanej strukturze ERI, natomiast w $800^{\circ}C$ następowała rekryształizacja do sodalitu [42, 44]. Zabarwienie uzyskanych preparatów ustępowało intensywności analogicznych próbek otrzymywanych z kankrynytu, a udział chromoforu żółtego nie był tak wyrazisty.

1.3.3. Syntezy z użyciem losodu

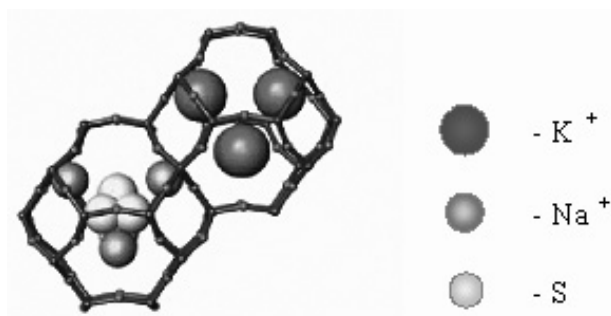
Użycie klatek kankrynitowych do syntezy pigmentów siarkowych wykazuje zauważalny wpływ ich rozmiaru (szczególnie w przypadku kankrynytu) na zwiększony udział mniejszych rodników $^{\circ}S_2$, w porównaniu z preparatami bazującymi na matrycach sodalitowych. Można było zatem oczekiwać, że większe klatki losodowe będą sprzyjać powstawaniu większych chromoforów siarkowych (np. $^{\circ}S_4$ lub S_4) i, w rezultacie, tworzyć nowe (np. czerwone) zabarwienie. Przeprowadzone eksperymenty [45, 46] przy użyciu różnych prekursorów siarkowych (siarki z alkaliami, oligosiarczków alkalicznych) nie doprowadziły jednak do uzyskania czerwonych produktów. Podobnie jak w poprzednich przypadkach, łagodne warunki obróbki termicznej pozwalały zachować strukturę LOS, ale zabarwienie produktów (zielone, błękitne) było zwykle mniej intensywne, niż przy użyciu innych zeolitów. Najprawdopodobniej rodniki siarkowe lokują się wyłącznie w klatkach kankrynitowych, natomiast w obszernych klatkach losodowych może zachodzić ich rekombinacja, prowadząca do bezbarwnych anionów oligosiarczkowych. Próby pewnego ograniczenia objętości klatek losodowych przez wprowadzenie większych kationów (K^+ , Cs^+) prowadziły jednak do degradacji struktury LOS [45, 46].

2. UŻYCIE ZEOLITÓW NATURALNYCH

Do syntez pigmentów siarkowych próbowano stosować również zeolity naturalne, takie jak chabazyt, stylbit, klinoptylolit, mordenit, przez ogrzewanie mieszanin zeolitów z oligosiarczkiem sodu i pakiem, jako czynnikiem redukującym [47]. Jedynie mieszaniny zawierające stylbit i chabazyt tworzyły błękitne produkty, a ich struktura rekrytalizowała do sodalitu. Zeolity wysokokrzemowe (mordenit i klinoptylolit) nie tworzyły produktów barwnych. Ich struktura ulegała transformacji do nieznanych form krystalicznych.

3. WPŁYW RODZAJU KATIONÓW ALKALICZNYCH NA WYNIKI SYNTEZ PIGMENTÓW SIARKOWYCH Z ZEOLITÓW

Jak wspomniano we wstępie, ultramaryna jest glinokrzemianem o strukturze sodalitu. We wnętrzu jednostek sodalitowych, tzw. β -cages, znajdują się rodniki $\cdot S_3^-$ tetraedrycznie, skoordynowane z czterema kationami sodu. Ujemny ładunek rodnika jest kompensowany przez jeden z tych kationów, natomiast pozostałe neutralizują ładunki sieci zlokalizowane na atomach glinu szkieletowego (Rys. 10) [48, 49]. Zaobserwowano, że zastąpienie kationów Na^+ innymi kationami prowadzi do zmiany zabarwienia preparatów [5, 36, 50, 51]. Istotny wpływ na jakość produktu ma nie tylko rodzaj kationów, ale również sposób ich wprowadzenia do matrycy. Kationy mogą być wprowadzane zarówno na drodze wymiany jonowej gotowego produktu [2, 5, 50], jak i podczas syntezy [36, 51].



Rysunek 10. Model przedstawiający lokalizacje kationów alkalicznych (Na^+ , K^+) oraz rodnika siarkowego w jednostce sodalitowej

Figure 10. Model of sodalite with alkaline cations (Na^+ , K^+) and the entrapped radical $\cdot S_3^-$

Najbardziej wyraziste efekty wpływu rodzaju użytego kationu na barwę oraz strukturę otrzymanych pigmentów zaobserwowano, gdy kationy wprowadzano do mieszaniny już podczas syntezy, jako źródło alkaliów w postaci odpowiednich węglanów lub tlenku [36]. Kationowa modyfikacja gotowej ultramaryny (na drodze wymiany jonowej) dawała zwykle mniej wyraziste efekty.

Zastąpienie kationów Na^+ kationami K^+ (wprowadzanymi podczas syntezy w postaci K_2CO_3) prowadziło do otrzymania produktów zawierających głównie chromofor żółty (S_2^-). Wynika to prawdopodobnie z większego (niż Na^+) rozmiaru kationów potasu, które zmniejszają objętość klatek sodalitowych i faworyzują powstawanie mniejszych rodników S_2^- . W przypadku użycia Li_2CO_3 , otrzymano produkty niebieskie, zawierające głównie rodniki S_3^- . Mniejsze kationy litu pozostawiają wolną większą część przestrzeni komór i pozwalają na tworzenie się większych anion-rodników S_3^- . Użycie CaO , jako źródła alkaliów, prowadzi do bezbarwnych produktów.

Interesujące właściwości wykazują preparaty uzyskane z zeolitu A po traktowaniu termicznym oligosiarczkiem amonowym w 800°C [52]. Próbki te zachowywały strukturę LTA i były niemal bezbarwne w temperaturze pokojowej, natomiast po ogrzaniu powyżej 500°C wykazywały niebieskie zabarwienie. Obserwowany efekt termochromowy miał charakter odwracalny i był tłumaczony termiczną dysocjacją anionów S_6^{2-} na rodniki i ich rekombinacją po ochłodzeniu.

4. PIGMENTY ULTRAMARYNOWE W MATRYCACH NIEGLINOKRZEMIANOWYCH

Ultramaryna naturalna i syntetyczna są glinokrzemianami o strukturze sodalitu, zawierającymi w klatkach β enkapsulowane rodnikowe chromofory siarkowe. Rodniki te mogą być uwięzione również w innych strukturach krystalicznych (np. w halogenkach [4]), a także w materiałach warstwowych [53], choć w tym przypadku, ich izolacja nie jest w pełni zapewniona i po pewnym czasie ulegają one rozkładowi.

Interesujące jest, czy rodniki siarkowe mogą być izolowane w klatkach nieglinokrzemianowych, a szczególnie pozbawionych mobilnych kationów. Próby ich enkapsulacji w materiale AlPO-20 o strukturze SOD potwierdziły taką możliwość [31, 39, 54]. Uzyskane preparaty wykazywały błękitne zabarwienie i dużą trwałość.

Jak już wspomniano, Weller [55] otrzymał gallokrzemiany i glinogermaniany o strukturze sodalitu lub kankrynit, z enkapsulowanymi anionami SCN lub SeCN . Obróbka termiczna tych materiałów prowadziła do otrzymania barwnych analogów ultramaryny.

Próby otrzymania barwnych produktów zawierających kombinacje szkieletowych pierwiastków, takich jak Ga/Si , Ge/Si , Al/Ge , Al/Ga , zawierających seleniany i siarczany w jednostkach sodalitowych, zakończyły się niepowodzeniem [56]. Nie skuteczne okazały się również próby umieszczenia rodników siarkowych w sodalitatych cynkofosforanowych, otrzymywanych spontanicznie w niskich temperaturach [57]. Wynikało to głównie z dużego powinowactwa jonów cynkowych do siarki, prowadzącego do degradacji struktury krystalicznej.

PODSUMOWANIE

Przedstawione dane wskazują, że zastosowanie zeolitów, a niekiedy także innych sit molekularnych, pozwala na uzyskanie materiałów analogicznych do ultramaryny. Związki siarki (prekursory rodników) mogą być wprowadzone do zeolitów zarówno podczas ich krystalizacji, jak i poprzez impregnacje lub zmieszanie mechaniczne. Rodniki siarkowe powstają poprzez obróbkę termiczną, podczas której może dochodzić do termicznej dysocjacji anionów oligosiarczkowych lub łagodnego utlenienia. Próby wprowadzania do zeolitów rodników siarkowych z roztworów aprotycznych nie sprawdziły się, gdyż podczas usuwania rozpuszczalników rodniki ulegały rekombinacji przed osiągnięciem miejsc w izolujących klatkach strukturalnych. Spośród badanych zeolitów najbardziej obiecujące wydają się zeolity typu A. Uzyskiwane produkty wykazywały wysoką intensywność i trwałość. Dobór warunków syntezy (alkaliczności mieszaniny, rodzaju kationów alkalicznych, temperatury i czasu obróbki termicznej, udziału czynnika redukującego) pozwala na uzyskanie produktów o bardzo szerokim zakresie barw i odcieni. Mieszaniny zawierają zwykle znacznie mniej siarki niż w przypadku syntezy z kaolinu i wymagają krótszego czasu syntezy, nie jest konieczne używanie reduktorów. Emisja lotnych związków siarki podczas ogrzewania jest również zdecydowanie niższa. Dodatkową zaletą zeolitów A jest ich stosunkowo niska cena, porównywalna z ceną kaolinu. Poza zeolitem A, barwne pigmenty siarkowe można otrzymać przy użyciu wielu innych zeolitów, szczególnie niskokrzemowych, a nawet z materiałów zeolitopodobnych (np. AlPO-20) [39, 54]. Stosowane zeolity mogą zachowywać oryginalną strukturę krystaliczną podczas obróbki termicznej ze związkami siarki, albo ulegać rekrystalizacji, najczęściej do sodalitu (jeśli zapewnione jest duże stężenie kationów sodowych). Poza strukturami zawierającymi jednostki sodalitowe możliwe jest użycie zeolitów zawierających inne klatki (kankrynitowa, losodowa), co w znaczący sposób wpływa na dystrybucję odpowiednich rodników siarkowych i, w konsekwencji, na barwę produktów.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] F. Clement, J.B. Desormes, *Annales de Chimie*, 1806, **57**, 317.
- [2] J. Zeltner, Patent nr 1 Cesarskiego Niemieckiego Biura Patentowego (1877).
- [3] F.M. Jaeger, *Trans. Faraday Soc.*, 1929, **25**, 320.
- [4] J.R. Morton, 150 Collège Ampère, Grenoble Sept. 1968, Amsterdam 1969, 299.
- [5] Y. Matsunaga, *Can. J. Chem.*, 1959, **37**, 994.
- [6] D.M. Gardner, G.K. Frankel, *J. Am. Chem. Soc.*, 1955, **77**, 6399.
- [7] A.B. Więckowski, D. Mechandzjiew, *Prace Kom. Mat. Przyr.*, 1968, **9**, 3.
- [8] A.A. Landman, D. de Waal, *S. Afr. J. Chem.*, 2005, **58**, 46.
- [9] W. Koch, J. Natterer, C. Henemann, *J. Chem. Phys.*, 1995, **102**, 6159.
- [10] N. Gobeltz, A. Demortier, J.P. Lelieur, A. Lorriaux, C. Duhayon, *New J. Chem.*, 1996, **20**, 19.
- [11] A. Arieli, D.E.W. Vaughan, and D. Goldfarb, *J. Am. Chem. Soc.* 2004, **126**, 5776.
- [12] F. Seel, H.J. Güttler, *Angew. Chem.*, 1973, **85**, 416.

- [13] F. Seel, H.J. Güttler, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1973, **12**, 420.
- [14] F. Seel, *Stud. Inorg. Chem.*, 1984, **5**, 67.
- [15] J. Plique, *Bl. Soc. Chim., Paris N.S.*, 1877, **28**, 522.
- [16] D. Reinen, G.G. Lindner, *Chem. Soc. Rev.*, 1999, **28**, 75.
- [17] R.J.H. Clark, T.J. Dines, M. Kurmoo, *Inorg. Chem.*, 1983, **22**, 2766.
- [18] H. Schlaich, G.G. Lindner, J. Feldmann, E.O. Göbel, and D. Reinen, *Inorg. Chem.*, 2000, **39**, 2740.
- [19] G.G. Lindner, K. Witke, D. Schlaich, D. Reinen, *D. Inorg. Chim. Acta*, 1966, **252**, 39.
- [20] E.F. Beleński, J.W. Ryskin, *Chemia i Technologia pigmentów*, Goschimizda, Moskwa (1949).
- [21] Ch. Baerlocher, W.M. Meier, D.H. Olson, *Atlas of zeolite framework types*, Elsevier (2001).
- [22] J. Singer, *Z. Anorg. Chem.*, 1932, **204**, 232.
- [23] C.A. Kumins, A.E. Gessler, *Ind. Eng. Chem.*, 1953, **45**, 567.
- [24] C.A. Kumins, Patent U.S. 2 544 695 (1951).
- [25] I. Ishida, Y. Fujimura, K. Fujiyoshi, M. Wakamatsu, *The Ceramic Society of Japan*, 1983, **91**, 53.
- [26] I. Ishida, Y. Fujimura, K. Fujiyoshi, M. Wakamatsu, *The Ceramic Society of Japan*, 1982, **90**, 326.
- [27] I. Ishida, Y. Fujimura, K. Fujiyoshi, Y. Satoh, M. Wakamatsu, *The Ceramic Society of Japan*, 1984, **92**, 579.
- [28] S. Kowalak, M. Stróżyk, M. Pawłowska, M. Miluška, W. Przystajko, J. Kania, *Colloids and Surface A*, 1995, **101**, 179.
- [29] M.T. Weller, G. Wong, C.L. Adamson, S.M. Dodd, J.J. Roe, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1990, 593.
- [30] D.E.W. Vaughan, *Stud. Surf. Sci. Catal.*, 2007, **170A**, 193.
- [31] S. Kowalak, M. Stróżyk, M. Pawłowska, M. Miluška, J. Kania, *Stud. Surf. Sci. Catal.*, 1997, **105A**, 237.
- [32] A. Jankowska, S. Zeidler, S. Kowalak, *Proc. of XII Zeolite Forum, Polańczyk, Polish Zeolite Association, Kraków, Poland, 2006*.
- [33] A.B. Więckowski, Z. Stuglik, Z. Stróżyk, S. Kowalak, *Mol. Phys. Rep.*, 2000, **28**, 25.
- [34] S.E. Tarling, P. Barnes, L.A. Mackay, *J. Appl. Crystallogr.* 1984, **17**, 96.
- [35] N. Gobeltz, A. Demortier, J.P. Lelieur, C. Duhayon, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 1998, **94**, 2257.
- [36] S. Kowalak, A. Jankowska, and S. Łączkowska, *Stud. Surf. Sci. Catal.*, 2005, **158A**, 215.
- [37] S. Kowalak, A. Jankowska, S. Łączkowska, *Catal. Today*, 2004, **90**, 167.
- [38] R.M. Barrer, E.A.D. White, *J. Chem. Soc.*, 1952, **2**, 1561.
- [39] A. Jankowska, *Rozprawa doktorska, Wydział Chemii UAM, Poznań (2004)*.
- [40] F. Hund, *Z. Anorg. Allg. Chem.*, 1984, **509**, 153.
- [41] G.G. Lindner, W. Massa, D. Reinen, *J. Solid State. Chem.*, 1995, **117**, 386.
- [42] S. Kowalak, A. Jankowska, S. Zeidler, A.B. Więckowski, *J. Solid State Chem.*, 2007, **180**, 1119.
- [43] S. Kowalak, A. Jankowska, *Polish J. Chem.*, 2008, **82**, 131.
- [44] S. Kowalak, A. Jankowska, *Micropor. Mesopor. Mater.*, 2008, **110**, 570.
- [45] A. Jankowska, E. Mikołajska, S. Kowalak, *Proc. of XIV Zeolite Forum, Kocierz, Polish Zeolite Association, Kraków, Poland, 2007*.
- [46] S. Kowalak, A. Jankowska, E. Mikołajska, *Proc. of Second International Symposium, Varna, Bulgaria 2007*.
- [47] S. Kowalak, A. Jankowska, *Micropor. Mesopor. Mater.*, 2003, **61**, 213.
- [48] D.W. Breck, *Zeolite Molecular Sieves*, J. Wiley, Int. Publ., New York (1974).
- [49] G. Pergo, G. Bellusi, C. Cormo, M. Taramoss, F. Buonomo, A. Esposito, *Stud. Surf. Sci. Catal.*, 1986, **28**, 129.
- [50] R.M. Barrer and J.S. Raitt, *J. Chem. Soc.*, 1954, 4641.
- [51] D.G. Booth, S.E. Dann, M.T. Weller, *Dyes and Pigments*, 2003, **58**, 73.
- [52] S. Kowalak, M. Stróżyk, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 1996, **92**, 1639.

- [53] M. Ogawa, F. Saito, *Chem. Lett.*, 2004, **33**, 1030.
- [54] S. Kowalak, A. Jankowska, N. Pietrzak, M. Stróżyk, *Stud. Surf. Sci. Catal.*, 2001, 363.
- [55] G.M. Johnson, P.J. Mead, M.T. Weller, *Micropor. Mesopor. Mater.*, 2000, **38**, 445.
- [56] D.E.W. Vaughan, *Stud. Surf. Sci. Catal.*, 2007, **170A**, 193.
- [57] S. Kowalak, A. Jankowska, E. Baran, *Chem. Commun.*, 2001, 575.

Praca wpłynęła do Redakcji 7 marca 2008

**UKŁADY BIMETALICZNE Pd-Ag, Pd-Pt, Pd-Au, Pt-Ag
I Pt-Au JAKO KATALIZATORY HETEROGENICZNE
REAKCJI Z UDZIAŁEM WODORU**

Pd-Ag, Pd-Pt, Pd-Au, Pt-Ag, AND Pt-Au BIMETALLIC
SYSTEMS AS HETEROGENEOUS CATALYSTS OF
REACTIONS WITH HYDROGEN

Piotr Matczak

*Katedra Chemii Teoretycznej, Uniwersytet Łódzki
ul. Pomorska 149/153, 90-236 Łódź
E-mail: pmatczak@chemul.uni.lodz.pl*

Abstract

Wprowadzenie

1. Klasyfikacja układów bimetalicznych
2. Metody otrzymywania i podstawowe właściwości
3. Właściwości katalityczne względem reakcji z wodorem

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane



Dr Piotr Matczak – ukończył Wydział Fizyki i Chemii Uniwersytetu Łódzkiego w 2002 roku, tam również otrzymał stopień doktora (2007). Obecnie jest pracownikiem Katedry Chemii Teoretycznej Wydziału Chemii UŁ. Jego zainteresowania naukowe dotyczą własności katalitycznych metali przejściowych.

ABSTRACT

Heterogeneous catalysts play an important role in the manufacture of various chemical substances in large-scale processes, e.g. crude oil processing and organic synthesis [1]. Heterogeneous catalyst most often consists of a transition metal arranged on an oxide support [2]. The transition metal employed is usually one from Group 10 of the Periodic Table (Ni, Pd or Pt). The Group 10 metals are efficient catalysts of reactions with hydrogen. Such reactions occur in the above-mentioned crude oil processing and organic synthesis.

In large-scale applications some modifications of the catalyst properties are often necessary to increase the rate of an appropriate stage of catalyzed reaction and to avoid by-products. The change of the catalytic properties can be obtained by incorporating another metal into the catalyst. Heterogeneous catalysts in which the active part contains two metals are called bimetallic catalysts or, more generally, bimetallic systems [3, 4]. Research on bimetallic catalysts was initiated in the 1960s and since then these catalysts have become an object of increasingly in-depth investigations [5].

The aim of this review is to summarize the available knowledge on heterogeneous bimetallic catalysts. The review has been narrowed only to a few combinations of metals, i.e. Pd-Ag, Pd-Pt, Pd-Au, Pt-Ag, and Pt-Au.

In the first part of the review some general information on the forms of the bimetallic systems is presented. The term bimetallic system itself is quite broad and includes, among other, the following representatives (Fig. 1): alloys, surface alloys, monometallic monolayer or pseudomorphic overlayers arranged on the surface of the other metal, monometallic nanoparticles and clusters arranged on the surface of the other metal, alloyed nanoparticles and clusters, core/shell nanoparticles and clusters, and heteroaggregates. Recently, the last three of these representatives have been in the centre of interest [5, 6]. They offer properties very different from those characteristic of bulk materials [15].

Later, the methods of synthesis and structural characterization of the bimetallic systems are described. At present, the preparation of the bimetallic catalysts that exhibit an appropriate structure is difficult and expensive. Hence, further progress in this field is still required. Some new methods of preparation [7, 16–41], as well as many experimental [42–45, 48–67] and theoretical papers [69–77] on structural, energetic and electronic properties of the bimetallic systems are reviewed.

In the last part of the review the catalytic behaviour of the Pd-Ag, Pd-Pt, Pd-Au, Pt-Ag and Pt-Au systems is discussed in detail. The discussion concentrates on the catalytic reactions with hydrogen, e.g. hydrogenation, dehydrogenation, hydrogenolysis, etc. [106–137]. In such reactions the bimetallic catalysts exhibit higher selectivity than the monometallic ones. They also have better resistance to deactivation. At the very end of this review the theoretical investigations on H_2 dissociation and H adsorption on the bimetallic systems have been mentioned [138–155].

Keywords: heterogeneous catalysis, bimetallic catalyst, hydrogen

Słowa kluczowe: kataliza heterogeniczna, katalizator bimetaliczny, wodór

WPROWADZENIE

Katalizatory heterogeniczne odgrywają wyjątkowo ważną rolę w otrzymywaniu na masową skalę różnych produktów z przeróbki ropy naftowej i syntezy organicznej [1]. Katalizator heterogeniczny najczęściej ma postać metalu przejściowego, osadzonego na nośniku tlenkowym [2]. Spośród metali przejściowych, niemal od momentu powstania katalizy heterogenicznej, szczególnie często wykorzystywano przedstawicieli grupy 10 układu okresowego pierwiastków (Ni, Pd oraz Pt). Metale tej grupy bardzo dobrze sprawdzają się jako katalizatory reakcji chemicznych z udziałem wodoru. Reakcje takie następują powszechnie właśnie podczas przeróbki ropy naftowej i w syntezie organicznej.

W zastosowaniach przemysłowych często zachodzi konieczność modyfikacji własności katalizatora, w celu przyspieszenia w odpowiednim stopniu właściwych etapów reakcji i spowolnienia niepożądanych reakcji ubocznych. Zmiana właściwości metalicznego katalizatora heterogenicznego może odbywać się między innymi poprzez wprowadzenie drugiego metalu, dając tzw. katalizatory bimetaliczne lub uogólniając: układy bimetaliczne [3, 4]. Katalizatory bimetaliczne na nośniku stały się obiektem intensywnych badań począwszy od lat 60. ubiegłego wieku [5]. W chwili obecnej znajdują się w kręgu zainteresowania nie tylko katalizy heterogenicznej, ale również nauki o powierzchni [5] i nanochemii [6]. Jednak, pomimo rosnącego zainteresowania i nieustannego poszerzania wiedzy o układach bimetalicznych, nadal brakuje całościowej, w pełni spójnej teorii obejmującej aktywność katalityczną takich układów [7].

W niniejszym artykule podjęto próbę zebrania dostępnej wiedzy o bimetalicznych katalizatorach heterogenicznych, w których częścią aktywną jest połączenie metali: Pd-Ag, Pd-Pt, Pd-Au, Pt-Ag lub Pt-Au. Dokonano przeglądu prac dotyczących własności tego rodzaju układów bimetalicznych, ze szczególnym uwzględnieniem ich katalitycznej aktywności, selektywności i stabilności w reakcjach z udziałem wodoru.

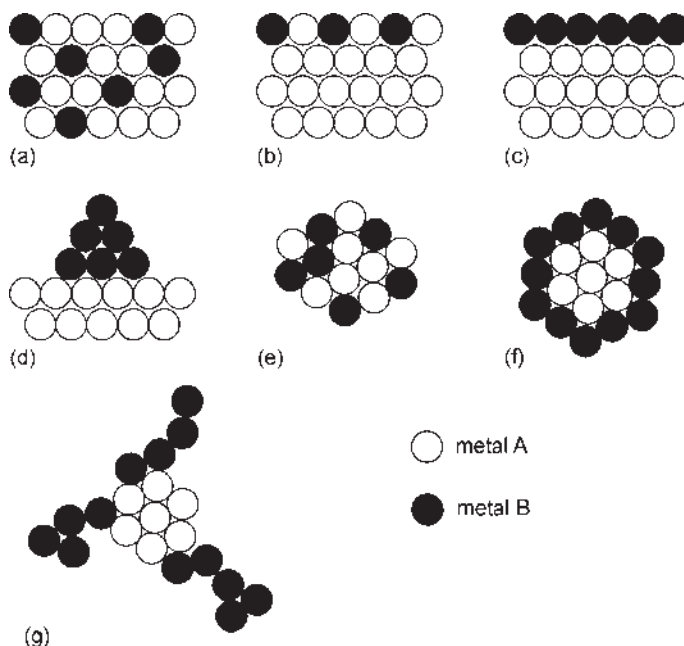
1. KLASYFIKACJA UKŁADÓW BIMETALICZNYCH

Układ bimetaliczny A-B powstaje w wyniku łączenia dwu metali (A i B) ze sobą. Pojęcie układu bimetalicznego jest bardzo szerokie i mieści, między innymi, następujące kategorie, ważne z punktu widzenia katalizy heterogenicznej i odzwierciedlające różne postacie strukturalne takiego układu:

- stopy,
- stopy powierzchniowe,
- monowarstwa lub pseudomorficzne warstwy metalu B nałożone na powierzchnię metalu A,
- nanocząstki i klastery metalu B osadzone na podłożu z metalu A,
- nanocząstki i klastery o charakterze stopu,

- nanocząstki i klastery o strukturze rdzeń/płaszcz,
- nanocząstki i klastery w postaci heteroagregatów.

Bimetaliczny stop AB, w przypadku idealnym, charakteryzuje się prawdopodobieństwem znalezienia atomu A niezależnym od konkretnego miejsca sieci krystalicznej lub jego otoczenia (Rys. 1a). Prawdopodobieństwo to jest równe średniemu stężeniu A w stopie [8]. Taki całkowicie nieuporządkowany stan może istnieć wtedy, gdy siły kierujące segregacją i uporządkowaniem (wskutek oddziaływań międzyatomowych) są bardzo słabe, w porównaniu z energią termiczną. W niższych temperaturach, w stopie może wystąpić zjawisko segregacji, czyli tendencja do separacji faz na skutek gromadzenia się atomów jednego rodzaju wokół siebie. Zdarza się, że segregacja zachodzi tylko w warstwie powierzchniowej. Jeśli na powierzchni metalu A osadzany jest metal B i, wskutek wzajemnej rozpuszczalności następuje mieszanie, ale tylko w warstwie powierzchniowej, to tworzy się stop powierzchniowy (Rys. 1b). Natomiast warstwy pseudomorficzne dwu metali powstają wtedy, gdy jedna lub więcej warstw metalu B jest osadzana na podłożu z metalu A i metale te mają małą wzajemną rozpuszczalność oraz nie zachodzi dyfuzja między podłożem A a warstwą lub warstwami B (Rys. 1c).



Rysunek 1. Postacie układów bimetalicznych: (a) stop, (b) stop powierzchniowy, (c) monowarstwa osadzona na powierzchni, (d) klastery osadzony na powierzchni, (e) klastery stopowy, (f) klastery rdzeń/płaszcz oraz (g) heteroagregat. Dla uproszczenia kółka symbolizujące metale A i B mają taką samą średnicę
Figure 1. Forms of bimetallic systems: (a) alloy, (b) surface alloy, (c) monolayer arranged on the surface, (d) cluster arranged on the surface, (e) alloyed cluster, (f) core/shell cluster, and (g) heteroaggregate. For simplicity the circles, which denote metals A and B, have the same diameter

W ostatnim czasie bardzo dużego znaczenia nabrały nanocząstki i klaster bimetaliczne osadzone na podłożach [5, 6]. Zainteresowanie takimi układami, obrazującymi stan materii o niezwykle wysokim stopniu rozdrobnienia (dyspersji), wzrosło wraz z powstaniem i rozwojem takich technik eksperymentalnych jak: wysokorozdzielcza mikroskopia elektronowa, mikroskopia skaningowa i spektrometria masowa o wysokiej rozdzielczości.

Pojęcia nanocząstki i klastera bimetalicznego definiowane były przez badaczy jako naturalne rozwinięcie klastera i nanocząstki monometalicznej [3–6]. W polskiej literaturze najpełniejsze określenie tych pojęć pojawiło się w pracach Romanowskiego [9, 10]. Nanocząstka bimetaliczna to obiekt złożony z atomów dwu metali o rozmiarach od 1 do kilkudziesięciu nm, o niezbyt dokładnie określonym kształcie i bliżej nieznanym liczbie atomów. Natomiast klaster bimetaliczny to krańcowo mała nanocząstka, czyli zespół liczący od kilku do kilkudziesięciu atomów dwu metali i o znanym kształcie. Definicje te dobrze oddają podstawowe różnice między tymi pojęciami, choć dokładna ilościowa granica między klasterem a nanocząstką jest kwestią w znacznym stopniu umowną [11–14].

Właściwości fizyczne i chemiczne nanocząstek i klasterów różnią się znacznie od analogicznych właściwości czystych metali i stopów w postaci makrokryształicznej, czyli masywnej (ang. *bulk*) [9, 10, 15]. Nanocząstki i klaster charakteryzują się bowiem pewną nadwyżką energii, związaną z wolnymi wartościami atomów powierzchniowych. Konsekwencją tego jest ich ogromna reaktywność. W szczególności kilkuatomowe klaster, które jako takie są tworam powierzchniowymi i nie mają objętości, są ekstremalnie aktywne w reakcjach chemicznych i mogą być efektywnymi katalizatorami.

W najprostszym przypadku układy bimetaliczne o dużym stopniu rozdrobnienia można otrzymać poprzez osadzenie nanocząstek lub klasterów metalu B na powierzchni metalu A (Rys. 1d). Ta klasa układów bimetalicznych łączy cechy typowe dla powierzchni (metal A) z cechami tworów o wysokiej dyspersji (metal B). Na nośniku można również osadzać nanocząstki i klaster o charakterze stopu, co oznacza, że składniki A i B są wzajemnie wymieszane (Rys. 1e). Osobną kategorią nanocząstek i klasterów bimetalicznych są układy o rdzeniu z atomów metalu A i zewnętrznej powłoce, tzw. płaszczu, z atomów metalu B (Rys. 1f). W układach tego typu nie zachodzi wzajemne mieszanie składników ani na skutek samych Właściwości metali A i B, ani w wyniku odpowiedniej metody syntezy. W ostatnich latach zainteresowano się też bimetalicznymi heteroagregatami (agregatami kontaktowymi). Składają się one z rdzenia z metalu A, na powierzchni którego formowane są dendrytyczne „wąsy” metalu B (Rys. 1g).

2. METODY OTRZYMYWANIA I PODSTAWOWE WŁAŚCIWOŚCI

Obecnie większość wysiłków podejmowanych przez badaczy zmierza ku opracowaniu nowych metod syntezy nanocząstek i klastrów bimetalicznych o pożądanym składzie i strukturze [7, 16]. Otrzymanie nanocząstki lub klastra o precyzyjnie określonym składzie ilościowym i odpowiedniej strukturze stanowi bowiem przez cały czas poważne wyzwanie.

Układy bimetaliczne o wysokiej dyspersji można otrzymać tradycyjnymi metodami „impregnowania” i następującej później chemicznej redukcji albo fizyczną techniką wiązki molekularnej z osadzeniem na nośniku [16]. Stosunkowo niedawno w centrum zainteresowania znalazły się metody przekształcania koloidalnych klastrów bimetalicznych w typowy katalizator heterogeniczny na nośniku [16, 17]. Koloidalne klaster bimetaliczne dają dosyć duże możliwości, jeśli chodzi o projektowanie ich struktury, która następnie musi być stabilizowana różnymi ligandami, organicznymi polimerami lub dendrymerami. Takie koloidalne klaster umieszcza się na matrycy nieorganicznego nośnika lub w niej zanurza (matryca pełni wtedy rolę ośrodka dyspergującego).

Scott i współpracownicy otrzymali nanocząstki PdAu metodą zamknięcia (enkapsulacji) w dendrymerze [18]. Nanocząstki te po osadzeniu na proszku TiO_2 miały wielkość od 1,8 do 3,2 nm i zawierały $48 \pm 3\%$ Pd oraz $52 \pm 3\%$ Au. W tym przypadku dendrymer, poliamidoamina (PAMAM), służy jako swoistego rodzaju nanoreaktor, który zamyka w swoim wnętrzu bimetaliczną nanocząstkę lub klastr i staje się prekursorem, który może być osadzony na podłożu. Pobieżny przegląd metod otrzymywania koloidalnych nanocząstek PdAu i przekształcania ich w katalizator heterogeniczny zamieścił Pârulescu wraz z współpracownikami w pracy [17]. Tworzenie nanocząstek PdAu w wodnych roztworach stwarza znaczne możliwości uzyskiwania pożądanej struktury, np. rdzeń Au/płaszcz Pd techniką sonochemiczną [19–21], radiolityczną [22, 23] lub szybkim ogrzewaniem mikrofalowym [24]. Tak zsyntezowane nanocząstki i klaster można następnie osadzać w porowatej matrycy SiO_2 [19, 23]. Podobne techniki stosuje się do otrzymywania nanocząstek PdAg o strukturze stopu [25, 26], rdzeniu Ag/płaszczu Pd [27] i rdzeniu Pd/płaszczu Ag [28].

Z prekursora w postaci klastra molekularnego Chandler i współpracownicy otrzymali metodą chemicznej redukcji katalizator PtAu położony na SiO_2 [29]. Ten sam katalizator, ale osadzony na graficie, uzyskuje się przez redukcję AuCl_4^- na monometalicznym katalizatorze platynowym na graficie, Pt/C [30]. Redukcję AuCl_4^- można prowadzić na dwa sposoby. Pierwszy polega na bezpośrednim użyciu platyny jako czynnika redukującego. Otrzymuje się w ten sposób bardzo małe klaster PtAu: dimery, trimery itd. Po redukcji H_2 w 573 K przeważająca większość atomów Au opuszcza klaster bimetaliczne i tworzy osobne krystality. W drugim sposobie czynnikiem redukującym jest wodór zaadsorbowany wcześniej na Pt/C. Uzyskane tym sposobem klaster są bardziej odporne na ucieczkę Au po redukcji H_2 w 573 K. Metodę otrzymywania, podobną do tej z [30], przedstawiono również dla PtAu/ SiO_2 [31]. To samo podłoże zastosowano do osadzenia nanocząstek PtAu o średnicy

do 3 nm zamkniętych w dendrymerze [32]. Heteroagregaty o rdzeniu Au i „wąsach” Pt zsyntezował niedawno Zhou wraz z współpracownikami [33]. Nanocząstki heteroagregatu PtAu zostały przygotowane jako zawiesina w toluenie, a następnie osadzone na $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$. Synteza w roztworze daje dużą możliwość regulacji struktury nanocząstki, np. rdzeń Ag/płaszcz Pt [34], rdzeń Pt/płaszcz PtAu [35] lub stop PtAu [36]. Tak zsyntezowane nanocząstki mogą być osadzone na nośniku [36].

W celu otrzymania nanocząstek i klastrów bimetalicznych można stosować metodę elektrochemiczną. Metodą tą otrzymano układ PdPt [37]. Osadzenie nanocząstek i klastrów PdPt przeprowadzono dotychczas na podłożach: Al_2O_3 [38], SiO_2 [39], graficie i amorficznym węglu [40]. Cho i Kang pokazali, że nanocząstki PdPt posiadają strukturę rdzeń Pd/płaszcz Pt [38]. Taką strukturę nanocząstki uzyskuje się również za pomocą matrycy krzemianowej modyfikowanej związkami organicznymi [41].

Bimetaliczne stopy palladu i platyny ze srebrem i złotem tworzą stopy substytucyjne o regularnym typie sieci krystalicznej ściennie centrowanej fcc [2, 3]. Oznacza to, że atomy jednego metalu obsadzają pozycje zajmowane przez atomy drugiego metalu, zamieniając się wzajemnie. Stała sieciowa takich stopów substytucyjnych leży wtedy pomiędzy wartościami charakterystycznymi dla sieci metali składowych (prawo Vegarda).

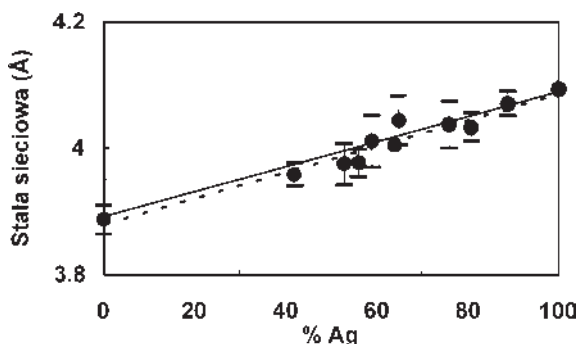
W przypadku stopów PtAg i PtAu, obserwuje się dużą przerwę we wzajemnej rozpuszczalności. Przykładowo dla PtAu przerwa w rozpuszczalności występuje między 15 a 98% wagowych Pt i termodynamiczna trwałość tego stopu o składzie 1:1 pojawia się dopiero powyżej 1473K [42]. Jednak, pomimo braku rozpuszczalności masywnych metali, na powierzchni mogą tworzyć się bimetaliczne cząstki, o ile tylko są dostatecznie małe. Tak więc, cechy charakterystyczne dla masywnego stopu, takie jak wzajemna rozpuszczalność, nie są właściwe dla nanocząstek i klastrów [43, 44]. Wskazuje się nawet, że nieodpowiednie różnice rozmiarów atomowych, które zapobiegają mieszaniu się składników w masie, mogą faworyzować mieszanie przy powierzchni i prowadzić do tworzenia stopów w nanocząstkach.

Stopy PdAg, PdPt i PdAu nie wykazują żadnego obszaru braku wzajemnej rozpuszczalności. PdPt, podobnie jak pozostałe stopy, przybiera strukturę fcc [45] i otrzymać go można, dla zawartości Pd od 11 do 94%, za pomocą redukcji mieszaniny chlorków palladu i platyny roztworem borowodorku sodu, suszenia i dodatkowej redukcji H_2 [46]. PdPt w postaci czerni uzyskano stosując metodę Adamsa [47].

Eksperymentalne badania stopu PdAg wskazują, że w próżni na powierzchni stopu dominują atomy Ag. I tak, dla stopu $\text{Pd}_{67}\text{Ag}_{33}$ powierzchnia o symetrii płaszczystej sieciowej (111) zawiera pomiędzy 5 a 11% Pd, a powierzchnia (100) praktycznie nie wykazuje obecności Pd – 0,05% [48]. Jednakże, pod wysokim ciśnieniem wodoru w membranie $\text{Pd}_{75}\text{Ag}_{25}$, kiedy to pallad gromadzi się na powierzchni – następuje odwrotna segregacja powierzchniowa [49]. Takie zachowanie wynika z tendencji do wzbogacania powierzchni w ten składnik, który ma większe powinowactwo chemiczne do gazów będących w kontakcie z tą powierzchnią. Ponieważ pallad ma większe powinowactwo względem wodoru niż srebro, to on dominuje na

powierzchni w obecności atmosfery wodoru. Natomiast w próżni lub inertej atmosferze na powierzchni stopu gromadzi się srebro, gdyż ono bardziej obniża energię powierzchniową. Efekt wzbogacania powierzchni w jeden ze składników jest charakterystyczny dla masywnych bimetalicznych stopów. Jednak, wraz ze wzrostem dyspersji, efekt ten zanika, ponieważ maleje udział fazy objętościowej.

Ciekawe zachowanie układu Pd-Ag zaobserwował Persson wraz z współpracownikami [50]. Podczas dodawania Ag do Pd, srebro tworzyło bowiem osobne nanocząstki. Dla atomów Ag, po osadzeniu na Pd(110) zauważyć można przesunięcie poziomu energii wiązania elektronów rdzeniowych 3d, a wielkość tego przesunięcia jest funkcją stopnia pokrycia palladu srebrem [51]. Zależność wartości stałej sieciowej klastrow PdAg od ich składu została pokazana na Rys. 2.



Rysunek 2. Wykres zależności wartości stałej sieciowej klastrow PdAg od zawartości Ag w tych klastrow [26]. Linia ciągłą oznaczono zależność wyznaczoną z prawa Vegarda, natomiast linią przerywaną zależność dopasowaną do danych eksperymentalnych. Zmierzone techniką dyfrakcji elektronów wartości stałych sieciowych klastrow są reprezentowane na wykresie za pomocą czarnych kółek z dołączonymi słupkami błędów (za zgodą American Chemical Society. Copyright 2002 American Chemical Society)

Figure 2. Graph of the dependence of the lattice constant of PdAg clusters on the Ag concentration in the clusters [26]. The solid line is the theoretical value (Vegard's law) and the dashed line is a linear fit to the experimental data. The lattice constant values, measured with the electron diffraction technique, are represented by black circles together with the corresponding error bars (Copyright 2002 American Chemical Society. Reproduced with permission)

W przypadku dodawania Au do Pd zwykle natychmiast tworzy się stop [50], choć dla składu PdAu₃ znany jest fakt wykształcania się powierzchniowej warstwy czystego złota [52]. Wyniki badań właściwości filmu (bardzo cienkiej warstwy) Au na Pd metodami spektroskopii promieniami Roentgena i mikroskopii sił atomowych zaprezentował Maluf z współpracownikami w artykule [53]. Dla warstwy PdAu o grubości od 46 do 250 Å położonej na SiO₂ Yalcin oraz Avcı wyznaczyli stałą sieciową równą 4,004 ± 0,014 Å [54]. Parametry strukturalne dla nanocząstek PdAu o różnych składach podał Tsen wraz z współpracownikami [55]. Z kolei klaster o rdzeniu Au/płaszczy Pd osadzone na SiO₂ wykazują odległość Pd-Pd taką samą jak w masywnym Pd, podczas gdy odległość Au-Au jest krótsza o 3% niż w masyw-

nym Au [56]. Duże podobieństwo własności geometrycznych i elektronowych obserwuje się pomiędzy anionowymi klastrami: bimetalicznym $Au_{n-1}Pd^-$ i monometalicznym Au_n^- ($n \leq 4$) [57].

Proces osadzania klastrów Ag na powierzchni Pt(111) opisali Röder i współpracownicy [58, 59]. W temperaturze 50 K, w wyniku zarodkowania dimerów Ag_2 , pojawiają się niewielkie ugrupowania atomów Ag w postaci wysp. W 80 K wyspy te liczą po 19 atomów Ag i mają kształt odzwierciedlający trygonalną symetrię nośnika Pt(111). Po ogrzaniu do 230 K na nośniku występują wyspy o średniej ilości atomów równej 230. Dalsze zwiększanie temperatury do 280 K powoduje wzrost tych wysp do 1000 atomów Ag. W 350 K wyspy współlistnieją z dwuwymiarową (2-W) warstwą adatomów Ag, podczas gdy w 400 K wszystkie duże wyspy zaczynają znikać. Oprócz tworzenia się klastrów srebrowych na Pt, możliwe jest też powstanie powierzchniowego stopu PtAg. W temperaturach powyżej 620 K formuje się właśnie 2-W stop PtAg na powierzchni nośnika platynowego [44].

Monowarstwa atomów Ag na Pt(111) wykazuje chemiczne podobieństwo do powierzchni (111) masywnego srebra [60]. Dla tego układu obserwuje się wzrost orbitalnej populacji elektronowej Ag(4d), w porównaniu do czystego srebra [61, 62]. Szczegółową analizę oddziaływań pomiędzy Pt a Ag osadzonym na nośniku grafitowym zaprezentowali Casalis i współpracownicy w pracy [63]. Według tych autorów, wydajne powstawanie stopu PtAg następowało na powierzchniach dużych 3-W struktur srebrowych. Tworzenie się stopu na mniejszych nanowyspach Ag nie było już tak wydajne. Nośnik SiO_2 wykorzystywany był do osadzania niewielkich klastrów PtAu [29, 64–66].

Powierzchnia stopu PdPt wykazuje wzbogacenie w pallad zarówno dla składu ilościowego $Pd_{80}Pt_{20}$, jak i $Pd_{20}Pt_{80}$ [67]. Zjawisko segregacji powierzchniowej Pd wzmaga się podczas wygrzewania stopu w wodorze. Jednak dla katalizatorów PdPt o wysokiej dyspersji (bliskiej jedności) segregacja powierzchniowa zostaje całkowicie powstrzymana przy wygrzewaniu w wodorze, co wynika z ograniczonego przechodzenia atomów Pd ze stopu do tworzących się nanocząstek. Bimetaliczne klaster PdPt osadzano też na Al_2O_3 i węgla [67].

Oprócz badań prowadzonych technikami eksperymentalnymi, własności układów bimetalicznych próbuje się również przewidywać metodami teoretycznymi. Wśród różnych postaci układów bimetalicznych, klaster są zdecydowanie najczęściej spotykanym obiektem obliczeń wykonywanych metodami teoretycznymi. Wynika to z faktu, że klaster są najmniejszymi możliwymi przedstawicielami układów bimetalicznych, a niewielka liczba atomów wchodzących w skład takich obiektów przekłada się bezpośrednio na krótszy czas wykonywania obliczeń. W przeważającej większości obliczenia teoretyczne wykonywane są w ramach teorii funkcjonalów gęstości DFT (ang. *density functional theory*), która charakteryzuje się bardzo korzystnym stosunkiem dokładności uzyskiwanych wyników do kosztu obliczeniowego (szczególnie w porównaniu do zaawansowanych metod *ab initio*, uwzględniających korelację elektronową) [68].

Prace teoretyczne, w których zajmowano się geometrią i energetyczną stabilnością niewielkich klastrów bimetalicznych, zostały wyszczególnione w Tab. 1. Dla zdecydowanej większości badanych klastrów PdAg_n [69], PdAu_n [70–72] i PtAu_n [72, 73] preferowana energetycznie jest geometria planarna. Zupełnie inaczej jest dla klastrów Pt₃Au [74] oraz Pt₆Au [75], wykazujących największą stabilność dla 3-W trygonalnych struktur piramidy oraz bipiramidy. Uwzględnienie nośnika MgO w obliczeniach powoduje dla PdAg_n (5 ≤ n ≤ 8) strukturalne przejście od geometrii planarnej do 3-W ułożenia o pięciokrotnej symetrii [69]. Za stabilność płaskich klastrów PtAu_n odpowiedzialne być mogą silne efekty relatywistyczne [72], choć znacząca rola sprzężenia spin-orbita jest również widoczna w piramidalnym Pt₃Au [74]. W przypadku PdAu_n, planarne geometrie tych klastrów wykazują duże podobieństwo do monometalicznych klastrów złota o tej samej liczbie atomów [70].

Tabela 1. Klasyfikacja bimetalicznych, będące obiektem badań teoretycznych
Table 1. Bimetallic clusters investigated theoretically

Klaster	Wielkość	Metoda obliczeniowa	Odnosnik
PdAg _n	n ≤ 8	DFT (BH)	[69]
PdAu _n	n ≤ 4	DFT (GGA) DFT (B3LYP)	[70] [71]
	n ≤ 7	DFT (PW91PW91)	[72]
PtAu _n	n ≤ 7	DFT (PW91PW91)	[72]
	n = 6	DFT (BPW91)	[73]
Pt _n Au	n = 3	<i>ab initio</i> (CAS-MCSCF/MRSDCI)	[74]
	n = 6	DFT (BPW91)	[75]
Pd _n Pt _n	n = 12, 19	algorytm genetyczny z potencjałem Gupty	[76]

Wśród klastrów PdAg_n wyjątkowe własności zaobserwowano dla PdAg₆, który po osadzeniu na nośniku, charakteryzuje się bardzo dużą różnicą energii między najwyższym obsadzonym orbitalem molekularnym HOMO (ang. *highest occupied molecular orbital*), a najniższym nieobsadzonym orbitalem molekularnym LUMO (ang. *lowest unoccupied molecular orbital*) oraz największą stabilnością energetyczną [69]. Może go zatem określić, tak jak to czyni się dla klastrów monometalicznych, mianem „magicznego”. Na reaktywność chemiczną klastrów PdAu_n wpływają silne oddziaływania elektronowe d-d i s-d domieszki Pd i atomów Au [72]. W przypadku Pt₆Au, domieszkowanie złotem obniża chemiczną aktywność klastera platynowego i zwiększa jego katalityczną selektywność [75]. Domieszkowanie klastrów złota platyną również podwyższa selektywność w porównaniu do monometalicznych klastrów Au [73]. Jednakże elektronowy wpływ domieszki Au w klasterze Pt₆Au jest zdecydowanie mniej zauważalny, w stosunku do wpływu Pt w PtAu₆.

Fuks i Dorfman wyszli poza typowe układy klasterowe i teoretycznie wyznaczyli energetyczne parametry charakterystyczne dla procesu porządkowania w stopie PdAu [77].

3. WŁAŚCIWOŚCI KATALITYCZNE WZGLĘDEM REAKCJI Z WODOREM

Uzyskanie pożądanej aktywności, selektywności i stabilności katalizatora możliwe jest, oprócz zastosowania odpowiedniego nośnika lub regulacji kształtu i rozmiaru nanocząstek bądź klasterów, także poprzez zmianę składu jakościowego metalicznej części aktywnej. Odbywać się to może drogą wprowadzenia drugiego metalu i utworzenia układu bimetalicznego, np. stopu [78–82]. Generalnie, właściwości katalityczne wykazywane przez układ bimetaliczny, odniesione do właściwości metali składowych, obejmują dwa przypadki [83]:

- właściwości układu bimetalicznego leżą poza zakresem wartości tych samych właściwości, charakterystycznych dla poszczególnych składników układu,
- właściwości układu bimetalicznego leżą pomiędzy wartościami tych właściwości dla czystych składników.

Na wyższym poziomie szczegółowości aktywność i selektywność katalizatora bimetalicznego jest zwykle dyskutowana w kontekście trzech efektów:

- efektu zespołowego [83–85] – odnosi się do liczby miejsc (centrów) aktywnych, potrzebnych do zajęcia katalizowanej reakcji. Reakcje, które wymagają dużego zespołu lub grupy miejsc aktywnych, mogą być selektywnie powstrzymane przez blokowanie części tych miejsc. Polepsza się w ten sposób selektywność, w stosunku do reakcji, które wymagają małego zespołu miejsc aktywnych,
- efektu elektronowego (liganda) [85–87] – jeden ze składników układu zmienia właściwości elektronowe drugiego składnika tak, że prowadzi to do modyfikacji aktywności i selektywności,
- efektu geometrycznego (strukturalnego) [83] – modyfikacja odległości międzyatomowych w układzie bimetalicznym spowodowana różnicą wartości stałych sieciowych składników. Prowadzi to do unikalnego rozkładu atomów w centrum aktywnym.

Czasami efekty zespołowy i geometryczny łączy się w jedną ogólną kategorię, nazywaną efektem bifunkcyjnym (synergicznym) [86, 88]. Pod pojęciem efektu bifunkcyjnego rozumie się wtedy połączenie specyficznych właściwości poszczególnych składników w układ, który ma lepsze właściwości katalityczne niż każdy ze składników osobno.

Wymienione powyżej efekty stanowią pewną koncepcję próbującą wytłumaczyć zachowanie katalizatora bimetalicznego. Jednak, zarówno takie podejście, jak i wcześniej wysunięty model sztywnego pasma RBM (ang. *rigid band model*) [89] i przybliżenie koherentnego potencjału CPA (ang. *coherent potential approximation*) [3], nie są w pełni całościowe.

Oddziaływanie pomiędzy wodorem a układami bimetalicznymi to istotny aspekt katalizy heterogenicznej. Szczególna ranga tego oddziaływania wynika przede wszystkim z dużego znaczenia technologicznego [90]. Z punktu widzenia zastosowania w procesach przemysłowych, wodór może pełnić następujące funkcje:

- reagenta – reakcje hydrogenacji, dehydrogenacji, hydrogenolizy itp.,
- czynnika redukującego – otrzymywanie nanocząstek i klastrów bimetalicznych oraz regeneracja katalizatorów,
- cząsteczki sondującej – zbieranie informacji o właściwościach układów bimetalicznych.

Atomy H i cząsteczki H_2 to chemicznie najprostsze możliwe adsorbaty, odpowiednio atomowe i molekularne. Adsorpcja atomów H na powierzchni katalizatora jest koniecznym warunkiem zachodzenia heterogenicznych reakcji katalitycznych, w których reagentem jest wodór. Oddziaływania pomiędzy atomami wodoru a powierzchnią i dalszą reaktywność zaadsorbowanych atomów H próbuje tłumaczyć się w ramach koncepcji gorącego atomu (ang. *hot atom*) [91–93]. Pomimo chemicznej prostoty budowy wodoru, jego oddziaływanie z powierzchniami bimetalicznymi jest bardzo złożone, ze względu na małe rozmiary atomowe wodoru i relatywnie silne wiązanie. Złożoność ta objawia się istnieniem takich zjawisk, jak: absorpcja, strukturalna rekonstrukcja i relaksacja powierzchni, *spillover*, dyfuzja powierzchniowa itd. Z drugiej strony, prostota budowy wodoru umożliwia wygodne przeprowadzenie badań eksperymentalnych z użyciem izotopów. Izotopy wodoru mają bowiem unikalny stosunek mas (D_2 jest dwukrotnie cięższy od H_2), co jest bardzo korzystne, jeśli chodzi o uwidocznienie różnych efektów izotopowych.

Na mono- i bimetalicznej powierzchni adsorpcja wodoru może zachodzić na trzy sposoby [94]:

- molekularna chemisorpcja H_2 ,
- atomowa chemisorpcja H,
- molekularna fizysorpcja H_2 .

Podczas chemisorpcji cząsteczek H_2 i atomów H, na powierzchni tworzą się w zasadzie typowe, silne wiązania chemiczne między adsorbatem a tą powierzchnią. Tymczasem fizysorpcja cząsteczek H_2 charakteryzuje się słabymi oddziaływaniami o naturze sił van der Waalsa lub dyspersyjnych. Chemisorpcja atomowa jest najczęściej poprzedzona dysocjacją H_2 na atomy nad powierzchnią – mówi się wtedy o dysocjatywnej chemisorpcji (adsorpcji), jak to ma miejsce dla metali grupy 10. Może się jednak zdarzyć, że H_2 nie ulega dysocjacji nad danym metalem (np. Ag), ale sam atom H jest przez powierzchnię tego metalu wiązany, czyli następuje chemisorpcja atomowa. Zachodzi wtedy konieczność przeprowadzenia samej dysocjacji na innym zewnętrznym układzie (np. wolframie) i dostarczenia nad badaną powierzchnię tylko pojedynczych atomów. W temperaturze pomiędzy 73 a 673 K (w zależności od metalu) wodór cząsteczkowy dysocjuje na powierzchni, dając postać atomową, która następnie może ulec rekombinacji (jak dla każdej reakcji chemicznej, ustala się tu pewien stan równowagi) [2]. W wyższych temperaturach zaadsorbo-

wane atomy H mogą opuszczać powierzchnię, przechodząc w postaci atomowej do fazy gazowej. W ostatnim czasie rozwinięto technikę niskotemperaturowej adsorpcji wodoru [95]. W temperaturze 30 K i niższej wodór może być utrzymywany przez dłuższy czas w stanie molekularnej fizysorpcji na powierzchni. Fizysorbowana cząsteczka H_2 może odgrywać rolę stanu prekursorowego dla dysocjatywnej chemisorpcji.

Z punktu widzenia reakcji z wodorem, najciekawsze jest tworzenie stopów palladu i platyny ze srebrem i złotem. Jak to już zostało powiedziane, metale grupy 10 dysocjatywnie adsorbują H_2 (bezaktywacyjnie), natomiast w grupie 11 ani dla Ag [96, 97], ani dla Au [98, 99] taki proces nie zachodzi. Stąd połączenie metali z tych dwu grup pozwoliłoby na swobodną regulację aktywności i selektywności katalitycznej. Jednakże stopy PdAg i PdAu wykazują, często niepożądaną, znaczną i zmienną absorpcję wodoru, a stopy PtAg i PtAu charakteryzują się dużym obszarem braku wzajemnej rozpuszczalności. Wady te dotyczą zasadniczo stopów masywnych, a nanocząstki oraz klastery bimetaliczne mogą być od nich wolne.

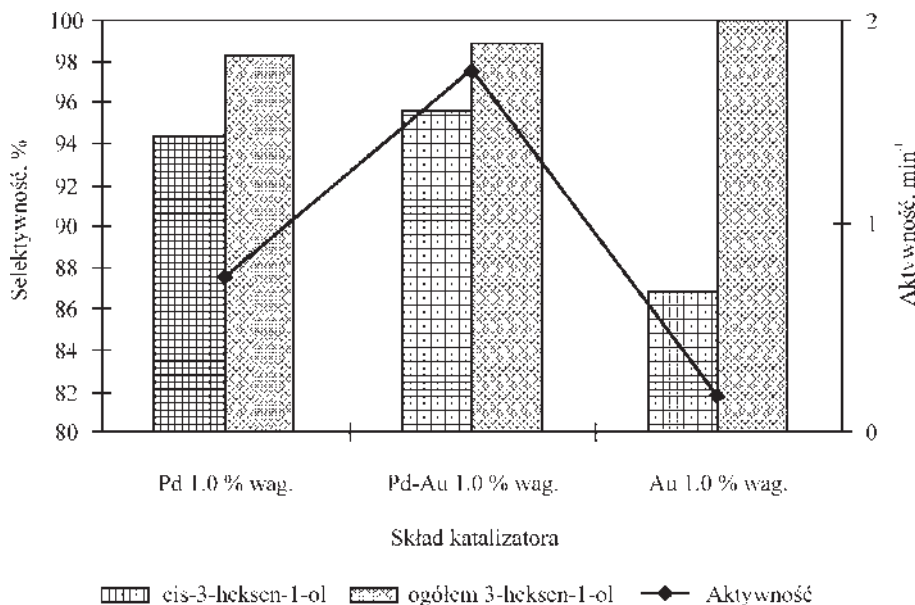
Nanocząstki i klastery bimetaliczne, oparte o Pd lub Pt, zazwyczaj adsorbują wodór z podobnym lub mniejszym efektem egzoenergetycznym w porównaniu do monometalicznych katalizatorów Pd i Pt. Z kinetycznego punktu widzenia, a więc aktywności katalitycznej względem reakcji z udziałem wodoru, zachowanie takich katalizatorów bimetalicznych bywa różne. Domieszka metaliczna może obniżać aktywność katalizatora, ale może też jej nie zmieniać. Brak zmiany aktywności względem wiązania wodoru bierze się z faktu, że stany przejściowe reakcji hydrogenacji oraz dehydrogenacji na układach bimetalicznych często są podobne do stanów znanych z układów monometalicznych. To z kolei wynika z tego, że takie reakcje wymagają miejsc aktywnych w postaci tylko jednego lub dwu atomów metalu – strukturalna niewrażliwość [100]. Są wreszcie reakcje katalityczne z udziałem wodoru, w których układy bimetaliczne wykazują wyższą aktywność w odniesieniu do katalizatorów monometalicznych.

PdAg jest chyba najlepiej zbadanym stopem palladu, pod względem oddziaływania z wodorem, gdyż pierwsza praca na jego temat ukazała się już w 1868 roku [101]. Ponieważ wodór jest praktycznie nierozpuszczalny w srebrze, to można byłoby oczekiwać, że stop PdAg będzie gorzej absorbował wodór w porównaniu z czystym palladem. Tymczasem rozpuszczalność tego gazu w PdAg o pewnym szczególnym składzie jest większa niż w Pd. Pod ciśnieniem 0,1 MPa i w temperaturze 400 K rozpuszczalność wodoru jest największa dla stopu o zawartości Ag pomiędzy 20 a 40% [102]. Optymalne własności otrzymuje się dla składu 77% Pd i 23% Ag [103]. Dalsze zwiększanie zawartości srebra w stopie obniża absorpcję. Rozpuszczalność wodoru w stopie $Pd_{77}Ag_{23}$, miejsca, gdzie związany zostaje wodór, i wędrówkę wodoru między tymi miejscami szczegółowo zbadali Cao i współpracownicy [104]. Zdecydowanie szybszą absorpcję wodoru, w porównaniu do czystego Pd, zaobserwowano dla ultracienkiego filmu $Pd_{77}Ag_{23}$ [105]. Jednak, w tym przypadku, ilość pochłoniętego wodoru okazała się mniejsza niż w Pd.

Stop PdAg stosuje się do hydrogenacji acetyleny [106, 107]. Proces polimeryzacji etylenu w produkcji polietylenu wymaga, aby zanieczyszczenie etylenu acetylenem było mniejsze niż 5 ppm, co zapobiega deaktywacji katalizatora. Nawet oczyszczony etylen może wciąż zawierać do 2% objętościowych acetyleny, który musi być selektywnie uwodorniony do etylenu. Ten proces można przeprowadzać na Pd/Al₂O₃, jednak przy niskim ciśnieniu H₂ na tym katalizatorze odkładają się substancje, które są prekursorami związków blokujących miejsca aktywne (depozyt węglowy) i tym samym obniżają aktywność katalityczną. Takie zjawiska ograniczają stosowanie katalizatorów opartych o czysty pallad. Tymczasem stop PdAg wykazuje przede wszystkim lepszą od Pd stabilność, jak również selektywność dla tworzenia etylenu. Minimalizuje on tworzenie się depozytu węglowego, jest też bardziej stabilny przy zmianach stężenia reagentów w strumieniu przepływającym przez reaktor i ma dłuższy czas życia. Na poziomie mikroskopowym dodanie Ag powoduje zmniejszenie się powierzchniowych grup (zespołów) blisko siebie leżących atomów Pd. Inhibuje to rozkład węglowodorów i reakcję polimeryzacji, które wymagają większych zespołów atomów Pd. W wyniku tego następuje wzrost selektywności względem tworzenia etylenu. W stopie PdAg następuje również transfer ładunku z Ag na Pd, który osłabia adsorpcję produktów pośrednich oraz zmienia kinetykę hydrogenacji i jej selektywność. Energia wiązania adsorbentu z powierzchnią wpływa na energetykę całej reakcji złożonej z elementarnych etapów tak z tworzeniem, jak i zrywaniem wiązań. Słabsza energia wiązania adsorbentu z powierzchnią faworyzuje etapy z tworzeniem wiązań (np. hydrogenacja), podnosząc ich egzoenergetyczność. Atomy wodoru słabo związane na powierzchni PdAg wykazuje bowiem większą skłonność do reagowania niż silnie związane produkty pośrednie na powierzchni czystego palladu. Wzrost zawartości Ag na powierzchni prowadzi także do słabszego wiązania etylenu, w związku z tym jest bardziej prawdopodobne, że oderwie się on od powierzchni, zanim nastąpi hydrogenacja do etanu. Dodatkowo utworzenie stopu PdAg obniża egzoenergetyczność etapów z pękaniem wiązań. Eksperymentalnie potwierdzono to w wielu pracach obserwując spadek liczby produktów rozkładu węglowodorów przy przejściu od czystego Pd do PdAg [108–110]. Oprócz hydrogenacji acetyleny, stop PdAg znajduje również zastosowanie w częściowym uwodornieniu dienów [111] oraz hydrodehalogenacji chlorobenzenów i 1,2-dichloroetanu [112, 113]. W obydwu tych przypadkach, stop wykazuje lepszą selektywność, w porównaniu z Pd. Bimetaliczne nanocząstki o rdzeniu Ag/płaszczu Pd, umieszczone w ultracienkim filmie żelaznym TiO₂, katalizują reakcję hydrogenacji akrylanu metylu [114]. Aktywność takich nanocząstek w wymienionej reakcji okazuje się 367 razy większa niż czerni palladowej i 1,6 razy większa niż monometalicznych nanocząstek Pd.

Zastosowanie katalityczne stopów PdAu jest nieco gorzej poznane niż PdAg, co spowodowane jest faktem, że dopiero niedawno nastąpiła intensyfikacja badań nad złotem, jako domieszką [115]. Stop PdAu, podobnie jak PdAg, bywa używany w hydrogenacji acetyleny do etylenu [116], gdyż również zmniejsza efekt zatrucia

katalizatora depozytem węglowym i ma wysoką selektywność. PdAu pozostaje też odporny na zatrucie siarką [117]. Jest to bardzo istotne w procesie aromatycznej hydrogenacji, która jest często prowadzona równolegle z hydroodsiarczaniem [115]. Do takich procesów katalizator z czystego Pd jest nieprzydatny, gdyż jest wrażliwy na zatrucie już małymi ilościami siarki. Katalityczna hydrogenacja etylenu jest natomiast niewrażliwa na dodatki Au do Pd. Złoto redukuje liczbę powierzchniowych miejsc aktywujących wodór, co obniża szybkość reakcji. Z drugiej strony Au obniża energię wiązania etylenu, co podwyższa szybkość reakcji. Te dwa czynniki działają przeciwstawnie i ostatecznie aktywność PdAu pozostaje na poziomie podobnym do Pd [118]. Obniżenie aktywności katalizatora PdAu w reakcji hydrogenacji cykloheksenu zaobserwowano doświadczalnie przy przejściu od nanocząstek rdzeń Au/płaszcz Pd do stopu o przypadkowej strukturze [19]. Ta sama reakcja, ale w porównaniu z Pd na nośniku, charakteryzuje się liczbą przekształceń TON (ang. *turnover number*) cztery razy większą dla PdAu [118]. Mizukoshi i współpracownicy [20] zmierzili wyższą aktywność nanocząstek rdzeń Au/płaszcz Pd niż mieszaniny monometalicznych nanocząstek o tym samym stosunku złota do palladu podczas hydrogenacji kwasu 4-pentenowego. Nanocząstki PdAu o strukturze stopowej, osadzone w matrycy SiO_2 , bardzo dobrze katalizują selektywną hydrogenację 3-heksyn-1-olu [17, 119], aldehydu cynamonowego [17] i styrenu [17].



Rysunek 3. Aktywność oraz selektywność katalizatorów Pd, PdAu oraz Au w reakcji hydrogenacji 3-heksyn-1-olu do 3-heksen-1-olu [119]

(za zgodą Wiley-VCH. Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA)

Figure 3. Activity and selectivity of the Pd, PdAu, and Au catalysts in the hydrogenation of 3-hexen-1-ol to 3-hexen-1-ol [119] (Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission)

W odniesieniu do Pd bimetaliczny katalizator posiada wyższą aktywność i selektywność, w szczególności *cis*-selektywność w reakcji hydrogenacji 3-heksyn-1-olu do *cis*-3-heksen-1-olu (Rys. 3). PdAu jest też bardziej odporny na zatrucie, co widać w reakcji hydrogenacji styrenu w obecności tiofenu [17]. PdAu na nośniku charakteryzuje się wyższą aktywnością (niż Pd) w hydrodehalogenacji chlorofluorowęglowodorów (CFC) [120], hydroodsiarczaniu [121] i tworzeniu wody z H_2 i O_2 [122]. Warstwa Pd osadzona na Au(111) może katalizować cyklotrimeryzację C_2H_2 do C_6H_6 [123].

PtAg jest najsłabiej poznanym układem katalitycznym względem wodoru ze wszystkich opisywanych w tym rozdziale. Przebadana została jedynie monowarstwa Ag osadzona na Pt(111), która jednak nie wykazuje bezaktywacyjnej dysocjatywnej adsorpcji H_2 [60].

Dla PtAu, wykazującego jako masywny stop dużą przerwę we wzajemnej rozpuszczalności składników, możliwe jest uzyskanie metastabilnej fazy powierzchniowego stopu w postaci filmu [42]. Najczęściej jednak katalizator PtAu spotyka się jako nanocząstki lub klastery osadzone na nośniku. Sterując składem i wielkością nanocząstek można otrzymać żadaną selektywność w reakcjach hydrogenacji [124, 125] i wymiany izotopowej H na D [126]. Chemisorpcja wodoru na PtAu maleje wraz ze wzrostem zawartości złota. Za efekt ten odpowiedzialne jest blokowanie miejsc aktywnych (atomów Pt) poprzez osadzenie na tych miejscach atomów Au. Tak więc, złoto wpływa na rozmiar zespołów katalitycznych i tym samym reguluje selektywność [127, 128]. Adsorpcję H_2 potwierdzono dla katalizatorów złożonych z nanocząstek PtAu osadzonych na różnych nośnikach: SiO_2 [98, 129], TiO_2 [129] i Al_2O_3 [129]. Co ciekawe, dla bardzo niskiej zawartości PtAu w katalizatorze, adsorpcja H_2 okazuje się w znacznej mierze niezależna od ilości złota [130].

Katalizator PtAu/ SiO_2 wykorzystano do selektywnej hydrogenacji karwonu w pracy [124]. Selektywność tego katalizatora zależała od wielkości nanocząstek. Jedynie małe nanocząstki PtAu były w stanie dokonać częściowej hydrogenacji karwonu, tj. addycji wodoru wyłącznie do jednego wiązania podwójnego. W porównaniu z monometalicznym katalizatorem platynowym, PtAu wykazywał obniżoną aktywność w tej reakcji. Obniżoną aktywność posiadał również wysoce zdyspergowany PtAu w reakcji hydrogenacji toluenu. PtAu/ SiO_2 otrzymany z klastera molekularnego, jako prekursora był mianowicie 6 do 30 razy mniej aktywny niż Pt/ SiO_2 [29]. PtAu charakteryzuje się mniejszą liczbą przekształceń TON niż Pt podczas dehydrogenacji propanu [131]. Zwiększenie szybkości reakcji na stopie PtAu wykazuje natomiast dehydrogenacja cykloheksanu do benzenu [132]. Produkcja benzenu osiąga maksimum przy składzie 50% Au. Złoto redukuje liczbę atomów Pt oddziałujących z zaadsorbowanym benzenem. Zapobiega to dalszej dehydrogenacji i tworzeniu się depozytu węglowego, zatruwającego katalizator.

Obecność złota w katalizatorze PtAu/ SiO_2 nie oddziałuje istotnie na katalityczną aktywność w reakcji hydrogenolizy *n*-heksanu do propanu [65]. Selektywność w tej reakcji przesunięta jest w kierunku rozerwania wewnętrznego wiązania węgiel-wę-

giel (tworzenie propanu), a nie na rozszczepienie terminalnego wiązania węgiel-węgiel (tworzenie metanu), co jest charakterystyczne dla Pt/SiO₂. PtAu/SiO₂ wykazuje bardzo dobrą odporność na deaktywację. Hydrogenoliza *n*-heksanu była również badana w pracach [133, 134]. Złoto osadzono na powierzchniach Pt(111) i Pt(100), tak że tworzyła się epitaksjalna warstwa Au lub stop PtAu. Tak w przypadku Au/Pt(111), jak i PtAu/Pt(111) obserwuje się redukcję aktywności względem hydrogenolizy i znaczące przyspieszenie szybkości izomeryzacji (tworzenie 2- i 3-metylopentanu). Au/Pt(100) nie wykazuje dużej inhibicji hydrogenolizy *n*-heksanu, co wskazuje na mniejszą zależność tego układu od efektu zespołowego.

Szczególne znaczenie technologiczne wśród stopów palladu ma stop PdPt. Wykazuje on wysoką odporność na zatrucie siarką i azotem oraz jest łatwo redukowalny w atmosferze wodoru [40]. Połączenie palladu i platyny może być dla dobrze dobranego składu bardziej reaktywne niż dla każdego z metali osobno. Aktywność wzrasta trzykrotnie, w porównaniu do czystego palladu, w reakcji hydrogenacji cyklooktadienu do cyklooktenu dla klastrów Pd₈₀Pt₂₀ [135]. W klastrach tych Pd tworzy zewnętrzny płaszcz, a platynowy rdzeń jest niedostępny dla reagentów. Stąd ulepszona aktywność katalityczna płaszcza palladowego spowodowana jest efektem elektronowym atomów Pt leżących pod płaszczem. W pracy [40] zbadano selektywne uwodornienie butadienu do butenu na klastrach PdPt, jako funkcję temperatury. Selektywność była bliska 100%, czyli zbliżona do tej charakterystycznej dla czystego palladu. Aktywność wzrastała z temperaturą, czego przyczyną prawdopodobnie było obniżenie poziomu zanieczyszczeń, towarzyszące podwyższaniu temperatury.

Katalizator PdPt jest czasami używany do hydrogenacji aromatycznych węglowodorów, takich jak naftalen [136] czy toluen [137]. Stop PdPt, wystawiony na działanie wodoru pod ciśnieniem 5,5 MPa i w temperaturze 448 K, wykazuje częściowy rozdział faz na obszary bogatsze i uboższe w Pd [45]. Zaburzenie jednorodności stopu nie wpływa jednak na jego zdolność absorpcji H₂, która jest zawsze niższa niż w czystym Pd.

Właściwości katalityczne układów bimetalicznych w reakcjach z udziałem wodoru badano również metodami teoretycznymi. Jednak, w porównaniu do badań układów monometalicznych, obliczenia dla katalizatorów złożonych z dwu metali są zdecydowanie rzadsze.

Adsorpcji i absorpcji H na powierzchni PdAg poświęcone są prace [138–142]. Løvvik i Olsen [138, 139] założyli, że oddziaływanie atom H-stop składa się z wkładu geometrycznego oraz elektronowego i w oparciu o tak wprowadzony podział stwierdzili, że wkład geometryczny dominuje w tego typu oddziaływaniach. Efekt elektronowy jest widoczny przy porównywaniu pozycji adsorpcyjnych, będących atomami metali o takim samym otoczeniu. Wodór wiąże się znacznie silniej z Pd niż z Ag i w stopach siła wiązania wodoru słabnie ze wzrostem zawartości Ag. Autorzy wysunęli przypuszczenie, że w przypadku powierzchni stopów energia adsorpcji H może zostać w przybliżeniu wyznaczona poprzez interpolację między wartościami energii adsorpcji na czystych Pd i Ag. Potwierdzenie na gruncie teoretycznym wyższej rozpuszczal-

ności H w PdAg niż w Pd przedstawili Sonwane i współpracownicy [142]. Maksimum rozpuszczalności przypadło w temperaturze 456 K dla stopu z około 30% Ag.

Zmianą struktury powierzchniowej stopu PdAg pod wpływem wodoru zajmowali się González i współpracownicy, wykorzystując metodę DFT [143]. W próżni na powierzchni stopu następuje segregacja atomów Ag. W stanie równowagi powierzchnia stopu składa się wtedy głównie z Ag oraz odosobnionych atomów Pd lub dimerów Pd₂. Gdy na powierzchni adsorbuje się wodór, to segregacja atomów Ag zostaje powstrzymana i, przy pokryciu powierzchni wodorem równym 0,25 monowarstwy H, preferowana staje się migracja powierzchniowych atomów Ag do warstwy podpowierzchniowej stopu. W wyniku tej odwrotnej segregacji, warstwa powierzchniowa stopu zawiera głównie atomy Pd. Autorzy sugerują, że w obecności wodoru podpowierzchniowe atomy Ag powstrzymują tworzenie się podpowierzchniowego wodoru i, co za tym idzie, ewentualnej pełnej hydrogenacji nienasyconych węglowodorów. Na powierzchni PdAg atom H oddziałuje z tymi centrami aktywnymi, które złożone są z możliwie największej ilości atomów Pd. Periodyczne obliczenia DFT wskazują na egzoenergetyczną adsorpcję atomów H na pseudomorficznej warstwie Pd położonej na nośniku Au [144].

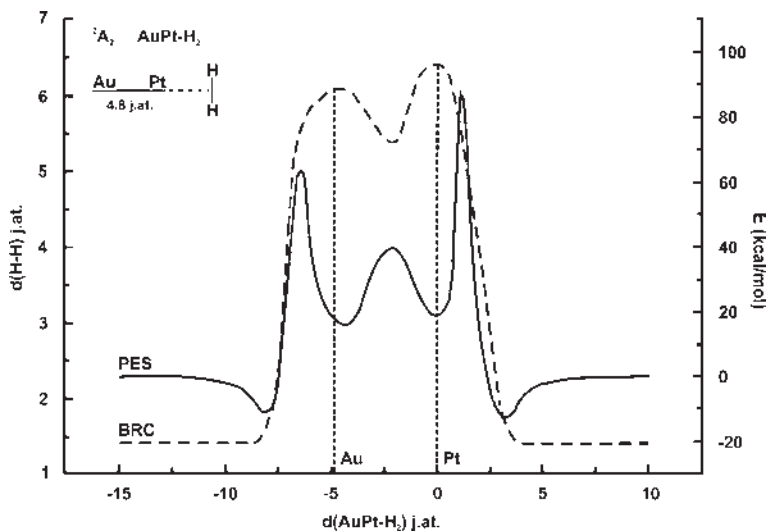
Sheth i współpracownicy przeanalizowali w artykule [145] adsorpcję atomowego wodoru na stopie PdAg (o składach: 25 i 50% Ag), w kontekście szczegółowych badań nad katalityczną hydrogenacją mieszaniny etylenu i acetyleny. Periodyczne obliczenia DFT z użyciem fal płaskich pozwoliły otrzymać energię adsorpcji wodoru, która okazuje się korzystniejsza (bardziej egzoenergetyczna) o 0,04 eV dla stopu o 50% Ag, w porównaniu ze stopem o 25% Ag. Teoretyczne badania metodą DFT i Monte Carlo reakcji hydrogenacji etylenu na stopie PdAu (o zawartości 6,25 i 12,5% Au) zaprezentowali Mei i współpracownicy [146]. Wzrost zawartości Au w stopie obniża siłę wiązania metal-wodór, co podnosi aktywność katalizatora bimetalicznego względem hydrogenacji. Z drugiej strony wzrost zawartości Au w warstwie powierzchniowej blokuje miejsca adsorpcji i aktywacji H₂, co wywołuje efekt kompensacyjny. Szybkość reakcji hydrogenacji pozostaje właściwie taka sama dla stopu o 6,25 i 12,5% Au.

Wiązanie atomu H na stopach PdAg i PtAu w dosyć szerokim zakresie składów było badane przez Romanowskiego i współpracowników w [147, 148]. W pracach tych obliczenia DFT przeprowadzono w ramach modelu klasterowego. Na podstawie uzyskanych wyników Autorzy [148] doszli do wniosku, że stop PtAu wykazuje nawet czterokrotnie bardziej egzoenergetyczną wartość energii wiązania z atomami H niż PdAg. Najkorzystniejsza energia wiązania atomów wodoru odpowiada też różnej zawartości domieszki w przypadku PtAu i PdAg (odpowiednio 37,5% Au i 81,25% Ag).

Teoretyczne badania reakcji dysocjacji H₂ na niewielkich klastrach bimetalicznych, zawierających Pd lub Pt i domieszkowanych Ag lub Au, zaprezentowano do tej pory jedynie w kilku publikacjach [147, 149–154].

W artykułach [147, 149] zbadano dysocjację H_2 na dimerze PdAg o długości wiązania równej 2,58 Å, za pomocą metody DFT. Zaobserwowano redystrybucję gęstości elektronowej w H_2 w kierunku atomu wodoru bliższemu krańcowi palladowemu dimeru. Autorzy wysnuli na tej podstawie wniosek, że rozerwanie wiązania w molekule H_2 prowadzi do utworzenia jonów H^+ i H^- , przy czym ten drugi jon zostaje zdecydowanie silniej związany przez atom Pd dimeru. Na szereg wad właściwych dla obliczeń z ustaloną geometrią dimeru bimetalicznego wskazują Wang i współpracownicy [150]. W celu wyznaczenia mechanizmu dysocjacji H_2 na PdAg i PdAu, wykonali oni pełne optymalizacje geometrii takich układów przy użyciu hybrydowego funkcjonału gęstości B3LYP. Istnieje kilka możliwych ścieżek reakcji dysocjacji (zwykle geometria układu H_2 -dimer jest 3-W), ale preferowana jest ta ścieżka, w której H_2 zbliża się od strony atomu Pd. Przejście cząsteczki H_2 przez dimery jest trudne na skutek obecności wysokich barier energetycznych na atomie Ag i Au.

Mechanizm oddziaływania H_2 z dimerem PtAu wyznaczyli Cruz i współpracownicy [151]. Prowadzili obliczenia za pomocą szeregu następujących po sobie, coraz dokładniejszych zaawansowanych metod *ab initio*. Podczas zbliżania cząsteczki H_2 osią wiązania prostopadle do osi dimeru następowało wiązanie H_2 bez jakiegokolwiek bariery aktywacji (Rys. 4).



Rysunek 4. Powierzchnia energii potencjalnej PES oraz krzywa relaksacji BRC długości wiązania wodór-wodór $d(H-H)$ jako funkcje odległości $d(AuPt-H_2)$ między dimerem PtAu a środkiem wiązania w cząsteczce H_2 [151]. Zero na osi energii odpowiada sumie energii izolowanych PtAu i H_2 , (za zgodą Wiley-VCH. Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA)

Figure 4. Potential energy surface PES and bond relaxation curve BRC of the H-H bond length, $d(H-H)$, as functions of the distance between the PtAu dimer and the bond centre of the H_2 molecule, $d(AuPt-H_2)$ [151]. Zero on the energy axis corresponds to the sum of the energies of separated PtAu and H_2 . (Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission)

Długość wiązania w dimerze cały czas była ustalona na 2,54 Å. Obydwa atomy dimeru mają taką samą zdolność do molekularnego wychwytu H_2 (związania H_2 w postaci cząsteczkowej). Porównanie z układem H_2Pt_2 pokazuje, że złoto inhibituje aktywność platyny – energia adsorpcji oraz relaksacja długości wiązania H-H spadają prawie o 50%. Badania dysocjacji H_2 na większym, piramidalnym klasterze Pt_3Au wykonali Olvera-Neria i współpracownicy [152], wykorzystując metodę obliczeniową podobną do tej z [151]. Spontaniczny wychwyt i dysocjacja H_2 zachodzi zarówno w pobliżu wierzchołka Pt, jak i Au klastra Pt_3Au . Zamiana jednego atomu platyny w Pt_4 na złoto pozwala na osiągnięcie dwu ścieżek dysocjatywnej adsorpcji H_2 o mniejszych barierach aktywacji niż te w Pt_4 . Oddziaływania między H_2 i O_2 a klastrami PdAu, Pd_2Au i $PdAu_2$ w kontekście tworzenia H_2O_2 zbadali Joshi i współpracownicy [153] za pomocą hybrydowego funkcjonału gęstości B3LYP. Przy użyciu tego samego funkcjonału Bartczak i Stawowska analizowali dysocjację H_2 na klastrach Pd_4Ag i $PdAg_4$ o planarnej strukturze (100) [154]. Stwierdzili oni, że dodanie Ag do katalizatora palladowego o czterech atomach Pd obniżało jego aktywność względem dysocjacji cząsteczkowego wodoru i wprowadzało barierę aktywacji. Natomiast dodanie Pd do klastra srebrowego pozwalało rozerwać wiązanie H-H, co nie było możliwe dla czystego srebra.

Oddziaływaniom pomiędzy H_2 a katalizatorem bimetalicznym PdPt poświęcono do tej pory tylko jeden artykuł teoretyczny. Jiang i współpracownicy [155] zbadali za pomocą DFT adsorpcję H_2 i H_2S na powierzchni PdPt. Dodanie niewielkiej ilości Pd do powierzchni platynowej znacząco zmienia właściwości katalityczne, tak w stosunku do czystej Pt, jak i do czystego Pd. Katalizator bimetaliczny sprzyja bowiem bardziej adsorpcji H_2 niż H_2S , stąd większa odporność PdPt na zatrucie siarką, w porównaniu z monometalicznymi katalizatorami.

PODSUMOWANIE

W świetle przedstawionego materiału wyraźnie widać interesujące właściwości katalityczne wykazywane przez układy bimetaliczne w reakcjach z udziałem wodoru. Właściwości te ulegają znacznej modyfikacji w stosunku do aktywności, selektywności i stabilności monometalicznych katalizatorów. Tworzenie układów bimetalicznych może też prowadzić do zupełnie nowych, nieoczekiwanych cech, np. wyjątkowej odporności na zatrucie, co jest niezwykle istotne w zastosowaniach przemysłowych.

Badania eksperymentalne i teoretyczne katalizatorów bimetalicznych są nadal w stosunkowo wczesnej fazie i daleko jeszcze do pełnego zrozumienia zachowania się takich układów w reakcjach katalitycznych. Obecnie większość wysiłków podejmowanych przez badaczy zmierza ku opracowaniu odpowiednich metod syntezy i regeneracji katalizatorów bimetalicznych. Trudna i kosztowna synteza oraz problem braku zachowania struktury podczas regeneracji wydają się kluczowymi czynnikami ograniczającymi zastosowanie takich katalizatorów.

W najbliższej przyszłości należy spodziewać się nowych odkryć w omawianej tematyce, które z pewnością spowodują ewolucję aktualnych poglądów i, być może, doprowadzą do powstania jednolitej teorii tłumaczącej własności katalizatorów bimetalicznych.

Notka dodana przy okazji korekty: Od momentu ukończenia manuskryptu ukazały się drukiem dwa ważne opracowania przeglądowe poświęcone własnościom katalitycznym omawianych układów bimetalicznych (R. Ferrando, J. Jellinek, R.L. Johnston, *Chem. Rev.*, 2008, **108**, 845 oraz I. Witońska, M. Frajtek, N. Krawczyk, A. Królak, S. Karski, *Przem. Chem.*, 2008, **87**, 55).

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] J.M. Thomas, W.J. Thomas, *Principles and Practice of Heterogeneous Catalysis*, VCH-Wiley, Weinheim, 1997.
- [2] G.C. Bond, *Catalysis by Metals*, Academic Press, London & New York, 1962.
- [3] V. Ponec, G.C. Bond, *Catalysis by Metals and Alloys*, Elsevier, Amsterdam, 1995.
- [4] J.H. Sinfelt, *Bimetallic Catalysis: Discoveries, Concepts and Applications*, Wiley, New York, 1982.
- [5] J.H. Sinfelt, *Surf. Sci.*, 2002, **500**, 923.
- [6] G.B. Sergeev, *Nanochemistry*, Elsevier B.V., Amsterdam, 2006.
- [7] L. Guzzi, *Catal. Today*, 2005, **101**, 53.
- [8] M. Polak, L. Rubinovich, *Surf. Sci. Rep.*, 2000, **38**, 127.
- [9] W. Romanowski, *Metale w stanie wysokiej dyspersji*, PWN, Warszawa, 1979.
- [10] W. Romanowski, *Mikrocząstki i klustery metaliczne w katalizie*, PWN, Warszawa, 1983.
- [11] U. Kreibitz, *Z. Phys. D*, 1986, **3**, 239.
- [12] K.J. Klabunde, *Free Atoms, Clusters and Nanosized Particles*, Academic Press, New York, 1994.
- [13] N. Takeo, *Disperse Systems*, Wiley-VCH, Weinheim, 1999.
- [14] G.B. Sergeev, V.E. Bochenkov, *Physical Chemistry of Ultradispersed Systems: Conference Proceedings*, Moscow, 2003, s. 24.
- [15] W. Eberhardt, *Surf. Sci.*, 2002, **500**, 242.
- [16] O.S. Alexeev, B.C. Gates, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2003, **42**, 1571.
- [17] V.I. Pârvulescu, V. Pârvulescu, U. Endruschat, G. Filoti, F.E. Wagner, C. Kübel, R. Richards, *Chem. – Eur. J.*, 2006, **12**, 2343.
- [18] R.W.J. Scott, C. Sivadinarayana, O.M. Wilson, Z. Yan, D.W. Goodman, R.M. Crooks, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 1380.
- [19] T. Nakagawa, H. Nitani, S. Tanabe, K. Okitsu, S. Seino, Y. Mizukoshi, T.A. Yamamoto, *Ultrason. Sonochem.*, 2005, **12**, 249.
- [20] Y. Mizukoshi, T. Fujimoto, Y. Nagata, R. Oshima, Y. Maeda, *J. Phys. Chem. B*, 2000, **104**, 6028.
- [21] F. Hori, T. Kojima, S. Tanaka, T. Akita, T. Iwai, T. Onitsuka, N. Taguchi, A. Iwase, *Phys. Status Solidi C*, 2007, **4**, 3895.
- [22] H. Remita, A. Etcheberry, J. Belloni, *J. Phys. Chem. B*, 2003, **107**, 31.
- [23] A. Sárkány, P. Hargittai, A. Horvath, *Top. Catal.*, 2007, **46**, 121.
- [24] M. Tsuji, M. Hashimoto, Y. Nishizawa, M. Kubokawa, T. Tsuji, *Chem. – Eur. J.*, 2005, **11**, 440.

- [25] D. Lahiri, B. Bunker, B. Mishra, Z. Zhenyuan, D. Meisel, C.M. Doudna, M.F. Bertino, F.D. Blum, A.T. Tokuhira, S. Chattopadhyay, T. Shibata, J. Terry, *J. Appl. Phys.*, 2005, **97**, 094304.
- [26] C.M. Doudna, M.F. Bertino, A.T. Tokuhira, *Langmuir*, 2002, **18**, 2434.
- [27] C. Damle, A. Kumar, M. Sastry, *J. Phys. Chem. B*, 2002, **106**, 297.
- [28] N. Toshima, *Macromol. Symp.*, 2003, **204**, 219.
- [29] B.D. Chandler, A.B. Schabel, L.H. Pignolet, *J. Phys. Chem. B*, 2001, **105**, 149.
- [30] P. Del Angel, J.M. Dominguez, G. Del Angel, J.A. Montoya, E. Lamy-Pitara, S. Labruquere, J. Barbier, *Langmuir*, 2000, **16**, 7210.
- [31] J. Barbier, P. Marécot, G. Del Angel, P. Bosch, J.P. Boitiaux, B. Didillon, J.M. Dominguez, I. Schiftef, G. Espinoza, *Appl. Catal. A: Gen.*, 1994, **116**, 179.
- [32] H. Lang, S. Maldonado, K.J. Stevenson, B.D. Chandler, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 12949.
- [33] S. Zhou, K. McIlwrath, G. Jackson, B. Eichhorn, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 1780.
- [34] C.M. Doudna, M.F. Bertino, F.D. Blum, A.T. Tokuhira, D. Lahiri-Dey, S. Chattopadhyay, J. Terry, *J. Phys. Chem. B*, 2003, **107**, 2966.
- [35] D. Jingtao, Y. Pingping, H. Nanping, Y. Ping, D. Yukou, *J. Dispersion Sci. Technol.*, 2007, **28**, 872.
- [36] P.N. Njoki, J. Luo, L. Wang, M.M. Maye, H. Quaizar, C.-J. Zhong, *Langmuir*, 2005, **21**, 1623.
- [37] M.T. Reetz, M. Winter, R. Breinbauer, T. Thurn-Albrecht, W. Vogel, *Chem. – Eur. J.*, 2001, **7**, 1084.
- [38] S.J. Cho, S.K. Kang, *Catal. Today*, 2004, **93–95**, 561.
- [39] A. Vázquez, F. Pedraza, *Appl. Surf. Sci.*, 1996, **99**, 213.
- [40] J.L. Rousset, A.M. Cadrot, F.J. Cadete Santos Aires, A. Renouprez, P. Melinon, A. Perez, M. Pellarin, J.L. Vialle, M. Broyer, *J. Chem. Phys.*, 1995, **102**, 8574.
- [41] L. D'Souza, S. Sampath, *Langmuir*, 2000, **16**, 8510.
- [42] H. Okamoto, T.B. Massalski, *Binary Alloy Phase Diagrams*, pod red. T.B. Massalski, American Society of Metals, New York, 1986.
- [43] J. Tersoff, *Phys. Rev. Lett.*, 1995, **74**, 434.
- [44] H. Röder, R. Schuster, H. Brune, K. Kern, *Phys. Rev. Lett.*, 1993, **71**, 2086.
- [45] T.B. Flanagan, J.D. Clewley, H. Noh, J. Barker, Y. Sakamoto, *Acta Mater.*, 1998, **46**, 2173.
- [46] D.W. MacKee, F.J. Norton, *J. Catal.*, 1964, **3**, 252.
- [47] G.C. Bond, D.E. Webster, *Ann. New York Acad. Sci.*, 1969, **158**, 540.
- [48] P.T. Wouda, M. Schmid, B.E. Nieuwenhuys, P. Varga, *Surf. Sci.*, 1998, **417**, 292.
- [49] J. Shu, B.E.W. Bongondo, B.P.A. Grandjean, A. Adnot, S. Kaliaguine, *Surf. Sci.*, 1993, **291**, 129.
- [50] K. Persson, A. Ersson, K. Jansson, N. Iverlund, S. Järås, *J. Catal.*, 2005, **231**, 139.
- [51] P. Pervan, M. Milun, *Surf. Sci.*, 1992, **264**, 135.
- [52] M. Aschoff, S. Speller, J. Kuntze, W. Heiland, E. Platzgummer, M. Schmid, P. Varga, B. Baretzky, *Surf. Sci.*, 1998, **415**, L1051.
- [53] S.S. Maluf, A.L. Gobbi, P.I. Paulin-Filho, P.A.P. Nascente, *Surf. Interface Anal.*, 2004, **36**, 931.
- [54] S. Yalcin, R. Avci, *Appl. Surf. Sci.*, 2003, **214**, 319.
- [55] S.-C.Y. Tsen, P.A. Crozier, J. Liu, *Ultramicroscopy*, 2003, **98**, 63.
- [56] R.J. Davis, M. Boudart, *J. Phys. Chem.*, 1994, **98**, 5471.
- [57] K. Koyasu, M. Mitsui, A. Nakajima, K. Kaya, *Chem. Phys. Lett.*, 2002, **358**, 224.
- [58] H. Röder, H. Brune, K. Kern, *Phys. Rev. Lett.*, 1994, **73**, 2143.
- [59] H. Röder, H. Brune, J.-P. Bucher, K. Kern, *Surf. Sci.*, 1993, **298**, 121.
- [60] S. Ogura, K. Fukutani, M. Wilde, M. Matsumoto, T. Okano, M. Okada, T. Kasai, W.A. Dino, *Surf. Sci.*, 2004, **566–568**, 755.
- [61] J.A. Rodriguez, M. Kuhn, *J. Phys. Chem.*, 1994, **98**, 11251.
- [62] P.J. Feibelman, *Surf. Sci.*, 1994, **313**, L801.
- [63] L. Casalis, S. Günther, J. Kovač, M. Marsi, M. Kiskinova, A. Bifone, *Chem. Phys. Lett.*, 1998, **290**, 245.

- [64] B.D. Chandler, A.B. Schabel, C.F. Blanford, L.H. Pignolet, *J. Catal.*, 2000, **187**, 367.
- [65] B.D. Chandler, A.B. Schabel, L.H. Pignolet, *J. Catal.*, 2000, **193**, 186.
- [66] B.D. Chandler, L.H. Pignolet, *Catal. Today*, 2001, **65**, 39.
- [67] L.C.A. van den Oetelaar, O.W. Nooij, S. Oerlemans, A.W. Denier van der Gon, H.H. Brongersma, L. Lefferts, A.G. Roosenbrand, J.A.R. van Veen, *J. Phys. Chem. B*, 1998, **102**, 3445.
- [68] F. Jensen, *Introduction to Computational Chemistry*, John Wiley & Sons, Chichester, 2007.
- [69] G. Barcaro, A. Fortunelli, *J. Phys. Chem. C*, 2007, **111**, 11384.
- [70] B.R. Sahu, G. Maofa, L. Kleinman, *Phys. Rev. B*, 2003, **67**, 115420.
- [71] Z.J. Wu, S.H. Zhou, J.S. Shi, S.Y. Zhang, *Chem. Phys. Lett.*, 2003, **368**, 153.
- [72] D.W. Yuan, Y. Wang, Z. Zeng, *J. Chem. Phys.*, 2005, **122**, 114310.
- [73] W.Q. Tian, M. Ge, F. Gu, T. Yamada, Y. Aoki, *J. Phys. Chem. A*, 2006, **110**, 6285.
- [74] D. Dai, K. Balasubramanian, *J. Chem. Phys.*, 1994, **100**, 4401.
- [75] W.Q. Tian, M. Ge, F. Gu, Y. Aoki, *J. Phys. Chem. A*, 2005, **109**, 9860.
- [76] L.D. Lloyd, R.L. Johnston, S. Salhi, *J. Comput. Chem.*, 2005, **26**, 1069.
- [77] D. Fuks, S. Dorfman, *Int. J. Quantum Chem.*, 1996, **57**, 897.
- [78] J.H. Sinfelt, *J. Catal.*, 1973, **29**, 308.
- [79] J.H. Sinfelt, *Acc. Chem. Res.*, 1977, **10**, 15.
- [80] J.H. Sinfelt, *Sci. Am.*, 1985, **253**, 90.
- [81] J.H. Sinfelt, *Acc. Chem. Res.*, 1987, **20**, 134.
- [82] G.H. Via, K.F. Drake Jr., G. Meitzner, F.W. Lytle, *Catal. Lett.*, 1990, **5**, 25.
- [83] A. Groß, *Top. Catal.*, 2006, **37**, 29.
- [84] J.A. Rodriguez, *Surf. Sci. Rep.*, 1996, **24**, 223.
- [85] W.H.M. Sachtler, *Faraday Discuss.*, 1981, **72**, 7.
- [86] I. Efremenko, M. Sheintuch, *Chem. Phys. Lett.*, 2005, **401**, 232.
- [87] W.H.M. Sachtler, *Appl. Surf. Sci.*, 1984, **19**, 167.
- [88] M.T.M. Koper, *Surf. Sci.*, 2004, **548**, 1.
- [89] D.A. Dowden, P.W. Reynolds, *Discuss. Faraday Soc.*, 1950, **8**, 184.
- [90] S. Holloway, *Surf. Sci.*, 2003, **540**, 1.
- [91] J. Harris, B. Kasemo, *Surf. Sci.*, 1981, **105**, L281.
- [92] T. Kammler, S. Wehner, J. Küppers, *J. Chem. Phys.*, 1998, **109**, 4071.
- [93] S. Caratzoulas, B. Jackson, M. Persson, *J. Chem. Phys.*, 1997, **107**, 6420.
- [94] M.K. Oudenhuijzen, *Support Effects in Heterogeneous Catalysis. PhD Thesis*, Universiteit Utrecht, 2002.
- [95] Y.G. Ptushinskii, *Low Temp. Phys.*, 2004, **30**, 1.
- [96] G. Lee, E.W. Plummer, *Phys. Rev. B*, 1995, **51**, 7250.
- [97] P.T. Sprunger, E.W. Plummer, *Phys. Rev. B*, 1993, **48**, 14436.
- [98] K. Balakrishnan, A. Sachdev, J. Schwank, *J. Catal.*, 1990, **121**, 441.
- [99] V.F. Kiselev, O.V. Krylow, *Adsorption and Catalysis on Transition Metals and Their Oxides*, Springer, Berlin Heidelberg, 1989, rozdz. 6.
- [100] M. Boudart, *Proc. 6th Int. Cong. Catal.*, Vol. 2, London, 1977, 1.
- [101] T. Graham, *Proc. Royal Soc.*, 1868, **16**, 422.
- [102] F.A. Lewis, *The Palladium Hydrogen System*, Academic Press, London, 1967.
- [103] A.G. Naptan, *Platin. Met. Rev.*, 1977, **21**, 44.
- [104] Y. Cao, H.L. Li, J.A. Szpunar, W. Shmayda, *Mater. Sci. Eng. A*, 2004, **379**, 173.
- [105] S.-Y. Liu, Y.-H. Kao, Y. Oliver Su, T.-P. Perng, *J. Alloys Compd.*, 1999, **293–295**, 468.
- [106] Á. Molnár, A. Sárkány, M. Varga, *J. Mol. Catal. A: Chem.*, 2001, **173**, 185.
- [107] M.M. Johnson, D.W. Walker, G.P. Nowack, *Selective Hydrogenation Catalyst*, U.S. Patent, 1983.
- [108] B. Coq, F. Figueras, *J. Mol. Catal. A: Chem.*, 2001, **173**, 117.

- [109] A. Sárkány, *Appl. Catal. A: Gen.*, 1997, **165**, 87.
- [110] D.C. Huang, K.H. Chang, W.F. Pong, P.K. Tseng, K.J. Hung, W.F. Huang, *Catal. Lett.*, 1998, **53**, 155.
- [111] J. Phillips, A. Auroux, G. Bergeret, J. Massardier, A. Renouprez, *J. Phys. Chem.*, 1993, **97**, 3565.
- [112] E.N. Balko, E. Przybylski, F. Von Trentini, *Appl. Catal. B: Environ.*, 1993, **2**, 1.
- [113] J.-P. Schoebrechts, F. Janssens, U.S. Patent 5821394, 1998.
- [114] J. He, I. Ichinose, T. Kunitake, A. Nakao, Y. Shiraishi, N. Toshima, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 11034.
- [115] B. Pawelec, A.M. Venezia, V. La Parola, E. Cano-Serrano, J.M. Campos-Martin, J.L.G. Fierro, *Appl. Surf. Sci.*, 2005, **242**, 380.
- [116] A. Sárkány, A. Horváth, A. Beck, *Appl. Catal. A: Gen.*, 2002, **229**, 117.
- [117] A.M. Venezia, V. La Parola, G. Deganello, B. Pawelec, J.L.G. Fierro, *J. Catal.*, 2003, **215**, 317.
- [118] R.J. Davis, M. Boudart, *Catal. Sci. Technol.*, 1991, **1**, 129.
- [119] H. Bönnemann, U. Endruschat, B. Tesche, A. Rufinska, C.W. Lehmann, F.E. Wagner, G. Filoti, V. Pârvulescu, V.I. Pârvulescu, *Eur. J. Inorg. Chem.* 2000, 819.
- [120] M. Bonarowska, J. Pielaszek, W. Juszczyk, Z. Karpiński, *J. Catal.*, 2000, **195**, 304.
- [121] A.M. Venezia, V. La Parola, V. Nicoli, G. Deganello, *J. Catal.*, 2002, **212**, 56.
- [122] Y.L. Lam, J. Criado, M. Boudart, *Nouv. J. Chim.*, 1977, **1**, 461.
- [123] R.M. Ormerod, C.J. Baddeley, R.M. Lambert, *Surf. Sci.*, 1991, **259**, L709.
- [124] G. Del Angel, R. Meléndrez, V. Bertin, J.M. Dominguez, P. Marecot, J. Barbier, *Stud. Surf. Sci. Catal.*, 1993, **78**, 171.
- [125] J. Schwank, K. Balakrishnan, A. Sachdev, *Proc. 10th Int. Cong. Catal.*, Budapest, 1992, 905.
- [126] M.A. Aubart, B.D. Chandler, R.A.T. Gould, D.A. Krogstad, M.F.J. Schoondergang, L.H. Pignolet, *Inorg. Chem.*, 1994, **33**, 3724.
- [127] J.W.A. Sachtler, G.A. Somorjai, *Prepr. - Am. Chem. Soc., Div. Pet. Chem.*, 1983, **28**, 491.
- [128] S. Galvagno, G. Parravano, *J. Catal.*, 1979, **57**, 272.
- [129] A. Vázquez-Zavala, J. Garcia-Gómez, A. Gómez-Cortés, *Appl. Surf. Sci.*, 2000, **167**, 177.
- [130] J.R. Anderson, K. Foger, R.J. Breakspere, *J. Catal.*, 1979, **57**, 458.
- [131] P. Biloen, F.M. Dautzenberg, W.M.H. Sachtler, *J. Catal.*, 1977, **56**, 77.
- [132] J.W.A. Sachtler, G.A. Somorjai, *J. Catal.*, 1984, **89**, 35.
- [133] J.W.A. Sachtler, G.A. Somorjai, *J. Catal.*, 1983, **81**, 77.
- [134] R.C. Yeates, G.A. Somorjai, *J. Catal.*, 1987, **103**, 208.
- [135] N. Toshima, K. Kushihashi, T. Yonezawa, H. Hiarai, *Chem. Lett.*, 1989, **10**, 1769.
- [136] S. Murcia-Mascarós, B. Pawelec, J.L.G. Fierro, *Catal. Commun.*, 2002, **3**, 305.
- [137] K. Thomas, C. Binet, T. Chevreau, D. Cornet, J.-P. Gilson, *J. Catal.*, 2002, **212**, 63.
- [138] O.M. Løvvik, R.A. Olsen, *J. Alloys Compd.*, 2002, **330–332**, 332.
- [139] O.M. Løvvik, R.A. Olsen, *J. Chem. Phys.*, 2003, **118**, 3268.
- [140] X. Ke, G.J. Kramer, *Phys. Rev. B*, 2002, **66**, 184304.
- [141] X. Ke, G.J. Kramer, O.M. Løvvik, *J. Phys.: Condens. Matter*, 2004, **16**, 6267.
- [142] C.G. Sonwane, J. Wilcox, Y.H. Ma, *J. Phys. Chem. B*, 2006, **110**, 24549.
- [143] S. González, K.M. Neyman, S. Shaikhutdinov, H.-J. Freund, F. Illas, *J. Phys. Chem. C*, 2007, **111**, 6852.
- [144] J. Greeley, J.K. Nørskov, L.A. Kibler, A.M. El-Aziz, D.M. Kolb, *ChemPhysChem*, 2006, **7**, 1032.
- [145] P.A. Sheth, M. Neurock, C.M. Smith, *J. Phys. Chem. B*, 2005, **109**, 12449.
- [146] D. Mei, E.W. Hansen, M. Neurock, *J. Phys. Chem. B*, 2003, **107**, 798.
- [147] S. Romanowski, W.M. Bartczak, R. Wesółkowski, *Langmuir*, 1999, **15**, 5773.
- [148] S. Romanowski, T.M. Pietrzak, W.M. Bartczak, *Bull. Acad. Pol. Sci. Ser. Sci. Chim.*, 1999, **47**, 143.

- [149] W.M. Bartczak, S. Romanowski, M. Landwijt, *Wiad. Chem.*, 2001, **55**, 629.
- [150] M.Y. Wang, X.J. Liu, J. Meng, Z.J. Wu, *J. Mol. Struct. (Theochem)*, 2007, **804**, 47.
- [151] A. Cruz, E. Poulain, G. Del Angel, S. Castillo, V. Bertin, *Int. J. Quantum Chem.*, 1998, **67**, 399.
- [152] O. Olvera-Neria, A. Cruz, H. Luna-Garcia, A. Anguiano-Garcia, E. Poulain, S. Castillo, *J. Chem. Phys.*, 2005, **123**, 164302.
- [153] A.M. Joshi, W.N. Delgass, K.T. Thomson, *J. Phys. Chem. C*, 2007, **111**, 7384.
- [154] W.M. Bartczak, J. Stawowska, *Struct. Chem.*, 2004, **15**, 447.
- [155] H. Jiang, H. Yang, R. Hawkins, *Z. Ring, Catal. Today*, 2007, **125**, 282.

Praca wpłynęła do Redakcji 3 kwietnia 2008

OKREŚLANIE KONFIGURACJI ABSOLUTNEJ ZA POMOCĄ MAGNETYCZNEGO REZONANSU JĄDROWEGO

DETERMINATION OF THE ABSOLUTE CONFIGURATION BY NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE

**Renata Kołodziejska, Lidia Jasińska,
Aleksandra Karczmarzka, Marcin Dramiński**

*Katedra i Zakład Chemii Ogólnej, Collegium Medicum w Bydgoszczy
UMK Toruń
ul. Dębowa 3, 85-626 Bydgoszcz*

Abstract

Wstęp

1. Określenie konfiguracji absolutnej chiralnych związków organicznych za pomocą NMR
 - 1.1. Podwójna derywatacja
 - A. Alkohole
 - B. Aminy
 - C. Kwasy karboksylowe
 - 1.2. Pojedyncza derywatacja
 2. Chiralne czynniki pomocnicze CLSRs i CSAs
 3. Nowe kierunki w określeniu konfiguracji absolutnej
- Piśmiennictwo cytowane
-



Dr Renata Kołodziejska, pracownik Katedry i Zakładu Chemii Ogólnej Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Zainteresowania naukowe Autorki związane są z badaniami nad regio- i stereoselektywnymi właściwościami biokatalizatorów oraz modyfikacją analogów nukleozydów pirymidynowych.



Dr Lidia Jasińska, starszy wykładowca w Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu w Katedrze i Zakładzie Chemii Ogólnej. Jej zainteresowania naukowe dotyczą oceny interakcji frakcji białkowych mleka i krótkich peptydów pochodzących z trawienia białek mleka z witaminą D oraz badanie pochodnych *N*-chronionych aminokwasów.



Mgr Aleksandra Karczmarzka, ukończyła chemię na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu. Pracę magisterską wykonała w Zakładzie Chemii Organicznej. Obecnie pracuje w Katedrze i Zakładzie Chemii Ogólnej Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. W ramach pracy doktorskiej zajmuje się enancjoselektywną redukcją analogów nukleozydowych.



Prof. dr hab. Marcin Dramiński, kieruje pracą w Zakładzie Chemii Ogólnej Collegium Medicum. Interesuje się chemią i stereochemią syntez związanych z analogami nukleozydów pirymidynowych i dydaktyką przedkliniczną dla studentów medycyny i kierunków pokrewnych.

ABSTRACT

In relation to a very limited scale of tolerance of organisms to different geometrical isomers it has been imperative to invent a method which would enable a precise and fast evaluation of a spatial structure of optically active compounds. Using a spectroscopic method of nuclear magnetic resonance (NMR) proved to be an excellent solution. In order to define an absolute configuration by means of NMR, the enantiomeric mixture must be transformed into diastereoisomeric one by adding chiral auxiliary substituents.

We distinguish three types of chiral auxiliary reagents: CDAs (chiral derivatizing agents), CSAs (chiral solvating agents), CLSRs (chiral lanthanide shift reagents). Chiral derivatizing agents are the most frequently used in analyses. The condensation reaction of an auxiliary compound with enantiomer may be single or double derivatization.

In case of a double derivatization, ^1H NMR spectra of two diastereoisomers obtained as a result of condensation of (R)- and (S)-CDAs with the substrates are compared. The changes in the chemical shifts of the substituents L_1 (the most bulky substituent) and L_2 (the least bulky substituent) asymmetric carbon of the substrate in the two derivatives (R)- and (S)-CDAs is defined as $\Delta\delta^{\text{RS}}$. The $\Delta\delta^{\text{RS}}$ value is the difference between the chemical shift in the (R)-CDAs derivative ($\delta(\text{R})$) and (S)-CDAs derivative ($\delta(\text{S})$) for the substituents L_1 ($\Delta\delta^{\text{RS}}L_1$) and L_2 ($\Delta\delta^{\text{RS}}L_2$) (Figure 2).

In case of a single derivatization, the tested enantiomer is combined with only one enantiomer ((R)- or (S)-CDA). In the single derivatization $\Delta\delta^{\text{AR}}$ ($\Delta\delta^{\text{AR}} = \delta(\text{A}) - \delta(\text{R})$) is the difference in the chemical shifts of the substituents L_1 and L_2 of a derivative and a free substrate (Figure 3) [1].

Among these auxiliary reagents are MPA (methoxyphenylacetic acid), MTPA (methoxytrifluoromethylphenylacetic acid), 9-AMA (9-anthrylmethoxyacetic acid), BPG (boc-phenylglycine), 9-AHA (ethyl 2-(9-anthryl)-2-hydroxyacetate), PGME (phenylglycine methyl ester), and PGDA (phenylglycine dimethyl amide). These reagents are currently being used to determine the absolute configuration of primary alcohols (Figure 4), secondary alcohols (Figure 5), tertiary alcohols, diols [2–5], triols [6], primary amines (Figure 6, 7), secondary amines (Figure 8), and carboxylic acids (Figure 9).

Other methods of determining absolute configuration such as HPLC-NMR or „mix and shake” method are currently investigated – HPLC-NMR method allows determining the absolute configuration of enantiomeric mixture as well as a pure enantiomer, the use of semipreparative column allows to precisely distinguish the obtained derivatives, which undergo the spectroscopic analysis (Figure 11) [1].

The „mix and shake” method allows determining the absolute configuration in a few minutes and without any additional separation methods. The derivative/s is/are prepared by simply mixing a solid matrix-bond auxiliary reagent with a chiral substrate and NMR spectra of the resulting derivatives are obtained without any further manipulation (Figure 12) [7].

Keywords: absolute configuration, nuclear magnetic resonance, auxiliary reagent, single and double derivatization.

Słowa kluczowe: konfiguracja absolutna, magnetyczny rezonans jądrowy, czynnik pomocniczy, pojedyncza i podwójna derywatywacja

WSTĘP

Aktywność oraz toksyczność enancjomerów chiralnych leków przejawia się w odmiennym sposobie reagowania z innymi związkami posiadającymi centrum asymetrii. Znany, bardzo dramatycznym, przykładem było stosowanie w latach 60. racemicznego Thalidomidu (Conterganu), podawanego kobietom ciężarnym, którego stereoizomer R był środkiem uspokajającym, natomiast enancjomer S wywoływał deformacje płodu (działanie teratogenne).

Leki otrzymywane syntetycznie stanowią najczęściej mieszaninę enancjomerów. Synteza asymetryczna, prowadząca do jednego enancjomeru jest obecnie coraz częściej stosowana. Projektowanie syntezy leków chiralnych wymaga określenia konfiguracji enancjomeru wykazującego właściwości terapeutyczne. Kontrola takich syntez oraz badania biologiczne enancjomerów wymagają oznaczeń chiralności związków. Stosowanie polarymetrii tylko w niewielkim stopniu nadaje się do takiej kontroli, szczególnie przy prowadzeniu syntez w skali milimolowej.

Istnieją dwie bezpośrednie metody oznaczania konfiguracji absolutnej:

- metoda dyfrakcji promieni rentgenowskich,
- analiza właściwości chiralno-optycznych (dyspersja skręcalności optycznej i dichroizm kołowy) [1].

Ograniczenia chiralno-optycznych metod narzuciły konieczność znalezienia innego sposobu analizy związków chiralnych. Doskonałym rozwiązaniem okazało się zastosowanie techniki magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR), jako pośredniej metody w wyznaczaniu konfiguracji absolutnej.

1. OKREŚLANIE KONFIGURACJI ABSOLUTNEJ CHIRALNYCH ZWIĄZKÓW ORGANICZNYCH ZA POMOCĄ NMR

W celu określenia konfiguracji absolutnej za pomocą NMR, należy przekształcić mieszaninę enancjomeryczną w diastereoizomeryczną, poprzez dodanie chiralnych pomocników (Rys. 1) [1, 8].

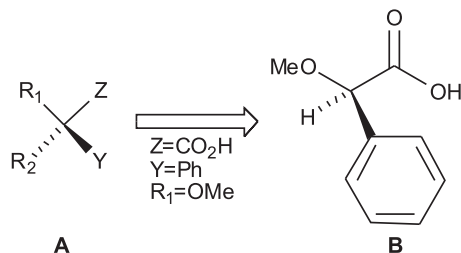
Wyróżniamy trzy rodzaje tego typu związków:

- CDAs (ang. *chiral derivatizing agents*) – chiralne czynniki derywatyzujące,
- CSAs (ang. *chiral solvating agents*) – chiralne czynniki solwujące,
- CLSRs (ang. *chiral lanthanide shift reagents*) – chiralne zmieniające przesunięcie chemiczne związki lantanowe [8].

Chiralne pomocniki powinny zawierać w swej strukturze:

- polarną lub ciężką grupę R_1 , która wymusza określoną konformację,
- grupę funkcyjną Z (np. grupę karboksylową), która zapewnia kowalencyjne lub koordynacyjne związanie pomocnika z substratem,
- specyficzną grupę Y (np. grupę fenyłową czy grupę karbonylową), która zapewnia powstanie efektu anizotropowego w badanej mieszaninie, poprzez

selektywny wpływ na podstawniki L_1 (grupa większa objętościowo) i L_2 (grupa mniejsza objętościowo) substratu [1].



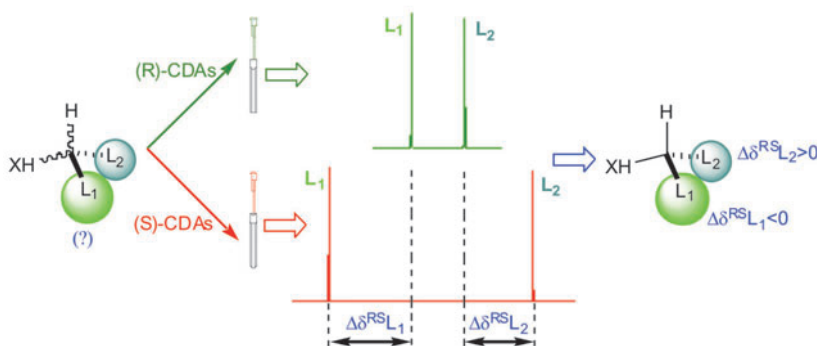
Rysunek 1. Budowa chiralnego czynnika pomocniczego na przykładzie kwasu α -fenylometoksyoctowego (MPA)

Figure 1. Structure of the chiral auxiliary reagent of methoxyphenylacetic acid (MPA)

W celu określenia konfiguracji absolutnej, najczęściej wykorzystuje się chiralne czynniki derywatywizujące (CDAs), ponieważ w odróżnieniu od dwóch pozostałych klas, nie tworzą wiązania koordynacyjnego ze związkami organicznymi, ale bardziej trwale wiązanie kowalencyjne [1, 2].

Istnieją dwie drogi analizy konfiguracji za pomocą CDAs [1]:

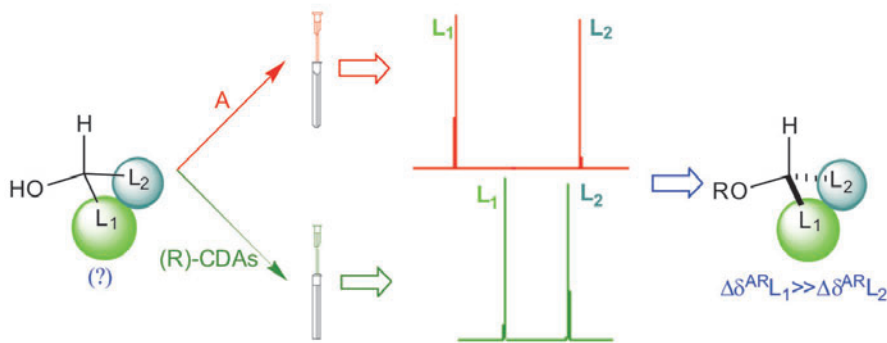
- podwójna derywatywizacja (Rys. 2) – substrat A o nieznannej konfiguracji absolutnej zostaje sprzężony z czynnikiem derywatywizującym (R)-CDAs oraz osobno z (S)-CDAs i, w efekcie, uzyskuje się dwa diastereoizomery A-(R)-CDAs i A-(S)-CDAs. Analiza ^1H NMR uzyskanych diastereoizomerycznych pochodnych umożliwia wyznaczenie różnicy wartości przesunięć chemicznych podstawników L_1 i L_2 przy asymetrycznym atomie węgla substratu w kondensacie R i S – $\Delta\delta^{\text{RS}}$ ($\Delta\delta^{\text{RS}} = \delta\text{R} - \delta\text{S}$), odpowiednio dla podstawnika $L_1 - \Delta\delta^{\text{RS}}(L_1)$ i $L_2 - \Delta\delta^{\text{RS}}(L_2)$. Wyznaczone wartości $\Delta\delta$ pochodnych oraz ich znak (dodatni lub ujemny) zawierają informację o konfiguracji absolutnej.



Rysunek 2. Podwójna derywatywizacja

Figure 2. Double derivatization

- pojedyncza derywatywacja (Rys. 3) – substrat ulega kondensacji z jednym spośród dwóch czynników pomocniczych ((R)-CDAs lub (S)-CDAs). W pojedynczej derywatywacji wyznacza się różnicę wartości przesunięć chemicznych podstawników L_1 i L_2 otrzymanej pochodnej i wolnego substratu (A) – $\Delta\delta^{AR}$ lub $\Delta\delta^{AS}$ ($\Delta\delta^{AR} = \delta A - \delta R$ lub $\Delta\delta^{AS} = \delta A - \delta S$), odpowiednio dla podstawnika L_1 wyznacza się $\Delta\delta^{AR}(L_1)$, dla L_2 $\Delta\delta^{AR}(L_2)$ lub $\Delta\delta^{AS}(L_1)$, $\Delta\delta^{AS}(L_2)$.



Rysunek 3. Pojedyncza derywatywacja
Figure 3. Single derivatization

Określenie konfiguracji absolutnej związków organicznych za pomocą NMR jest tylko wtedy wiarygodne, jeśli zostaną spełnione trzy podstawowe kryteria:

- wartości $\Delta\delta$ muszą być na tyle duże, by przekroczyć poziom błędów pojawiających się podczas doświadczenia,
- przydzielenie znaku $\Delta\delta$ (dodatniego lub ujemnego) musi być zawsze jednoznaczne dla danego podstawnika,
- jeżeli $\Delta\delta$ przyjmuje wartość ujemną dla jednego podstawnika (np. L_1) związku, którego konfigurację określamy, to wówczas dla drugiego podstawnika (L_2) musi przyjąć wartość dodatnią [9].

1.1. PODWÓJNA DERYWATYZACJA

Podczas wyznaczania konfiguracji absolutnej związków chiralnych pośrednią metodą NMR najczęściej stosuje się podwójną derywatyzację.

Metoda podwójnej derywatywacji obarczona jest mniejszym błędem, ponieważ podczas analizy konfiguracyjnej uzyskuje się dwa kondensaty powstałe w wyniku połączenia substratu z enancjomerami czynnika pomocniczego.

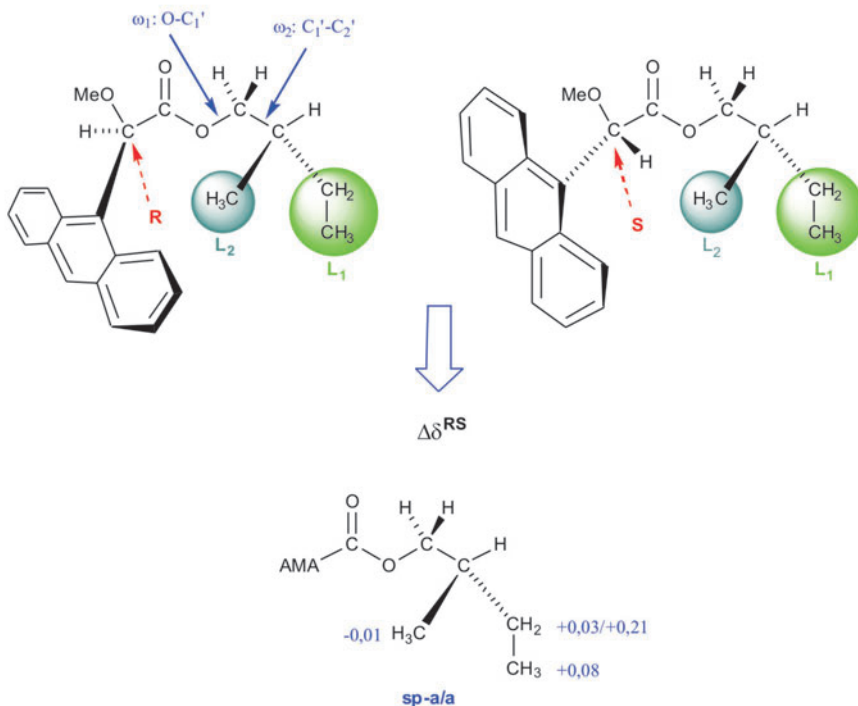
Poniżej przedstawiono konkretne przykłady wyznaczania konfiguracji absolutnej za pomocą NMR jednofunkcyjnych związków organicznych (alkoholi, amin, kwasów karboksylowych).

A. Alkohole

W celu określenia konfiguracji absolutnej pierwszorzędowych alkoholi z centrum stereogenicznym na atomie węgla w pozycji β , stosuje się głównie kwas 9-antrylometoksyoctowy (9-AMA). W standardowej procedurze uzyskane pochodne (R)-9-AMA i (S)-9-AMA poddawane są analizie ^1H NMR. Wyznaczenie różnic wartości przesunięć chemicznych, a tym samym określenie usytuowania w przestrzeni podstawników L_1 i L_2 wokół asymetrycznego atomu węgla związku, dla którego określa się konfigurację absolutną, zależne jest od bezpośredniego sąsiedztwa pierścienia antracenu [1, 10, 11].

Obecność pierścienia antracenowego w 9-AMA wymusza określoną konformację uzyskanych estrów – konformację *syn*-periplanarną (*sp*). Dodatkowo obrót wokół wiązań ω_1 (O-C1') i ω_2 (C1'-C2') generuje trzy główne konformery (*syn*-periplanarna-*gauche*(+)/*anti* (*sp-g*(+)/*a*), *syn*-periplanarna-*anti*/*anti* (*sp-a*/*a*), *syn*-periplanarna-*gauche*(-)/*anti* (*sp-g*(-)/*a*)), spośród których konformacja *sp-a/a* jest preferowana.

Określenie konfiguracji absolutnej, np. 2-metylobutanolu, sprowadza się do wyznaczenia $\Delta\delta^{\text{RS}}$ dla podstawników L_1 i L_2 pochodnych z (R)- i (S)-9-AMA (Rys. 4).



Rysunek 4. Określenie konfiguracji absolutnej metodą podwójnej derywatyzacji alkoholu I-rzędowego na przykładzie 2-(S)-metylobutanolu

Figure 4. The assignment of an absolute configuration of 2-(S)-methylbutanol by double derivatization

Jeśli wyjściowy alkohol ma konfigurację S, w kondensacie z (R)-9-AMA ekranowany jest podstawnik L_2 (grupa metylowa), podczas gdy w estrze z (S)-9-AMA podstawnik większy objętościowo L_1 (grupa etylowa) znajduje się w bliskim sąsiedztwie pierścienia antracenowego. W wyniku porównania widm $^1\text{H NMR}$ dwóch uzyskanych pochodnych, wyznacza się $\Delta\delta^{\text{RS}}$, w tym przypadku $\Delta\delta^{\text{RS}}L_1 > 0$ (+0,03/+0,21; +0,08), a $\Delta\delta^{\text{RS}}L_2 < 0$ (-0,01) [1].

Dla pierwszorzędowych alkoholi, gdy jedna z grup, np. L_2 , ma charakter polarny (-OH, -OR, -Cl, -NHC(O)R, -NHC(O)OR, -C(O)OR, -CH₂Br), w celu wyznaczenia konfiguracji absolutnej wystarczy określić wartość i znak $\Delta\delta^{\text{RS}}$ dla C β -H i podstawnika niepolarnego, ponieważ w określonej konformacji pochodnej zarówno podstawnik o charakterze polarnym, jak również proton w pozycji β względem grupy -OH będzie znajdował się w takim samym położeniu, w stosunku do pierścienia antracenu (identyczny efekt anizotropowy) [12].

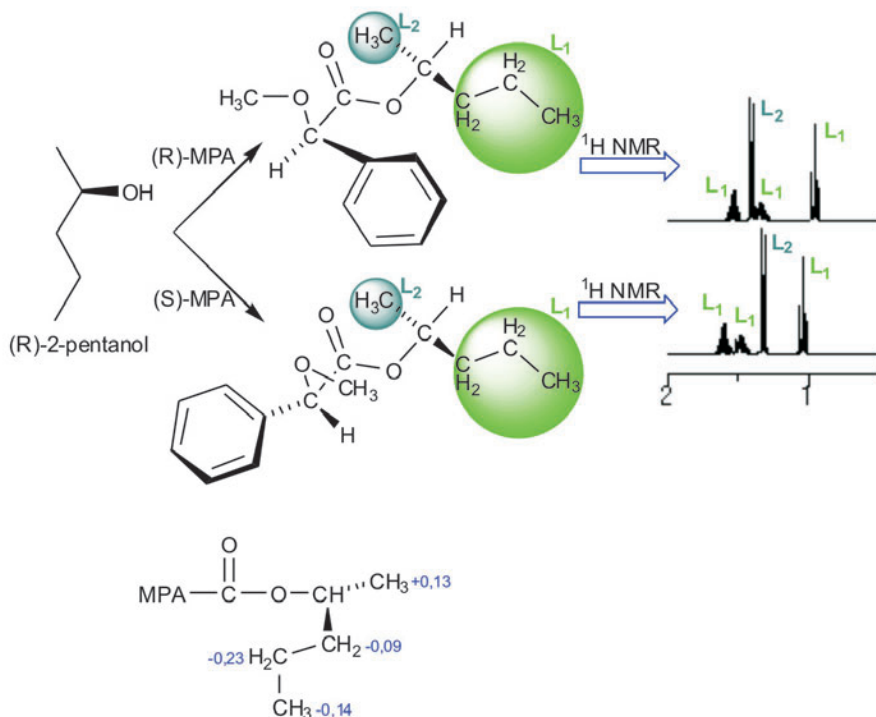
Do określenia konfiguracji pierwszorzędowych alkoholi nie stosuje się MTPA (kwas metoksytrifluorometylofenylooctowy) i MPA, ponieważ, często, obserwuje się niewielkie wartości i nierównomierny rozkład znaków $\Delta\delta^{\text{RS}}$.

W odróżnieniu od alkoholi I-rzędowych, wyznaczenie konfiguracji absolutnej II-rzędowych alkoholi z chiralnym atomem węgla w pozycji α , jest możliwe poprzez zastosowanie szerszej gamy związków pomocniczych, z których najczęściej używa się enancjomery 9-AMA, MTPA i MPA.

Chcąc określić konfigurację, np. 2-pentanolu, w pierwszej kolejności przeprowadzamy alkohol w dwa diastereoizomery, np. z (R)-MPA i (S)-MPA (Rys. 5). W kwasie α -fenylometoksyoctowym atom tlenu grupy metoksylowej, atom węgla grupy karbonylowej i proton C(1')H znajdują się w jednej płaszczyźnie. W estrze ze związkiem pomocniczym o konfiguracji R, grupa fenylowa 2-(R)-pentanolu oddziałuje z podstawnikiem większym objętościowo L_1 (-CH₂-CH₂-CH₃), powodując ekranowanie protonów tej grupy. Jeśli zastosujemy (S)-MPA, w otrzymanej pochodnej grupa fenylowa znajduje się bliżej podstawnika metylowego (L_2), sygnał odpowiadający protonowi grupy L_2 zostaje przesunięty w kierunku wyższego pola [1].

Wartości uzyskanych różnic przesunięć chemicznych, dla alkoholu o konfiguracji R, przedstawiają się następująco: $\Delta\delta^{\text{RS}}L_1 < 0$ (-0,09; -0,14; -0,23) i $\Delta\delta^{\text{RS}}L_2 > 0$ (+0,13). Dla alkoholu o konfiguracji przeciwnej: $\Delta\delta^{\text{RS}}L_1 > 0$ i $\Delta\delta^{\text{RS}}L_2 < 0$.

Uzyskane wartości $\Delta\delta^{\text{RS}}$ dla pochodnej z MPA są wysokie, ponieważ spośród dwóch konformerów (sp i ap) tylko jedna z konformacji jest preferowana (sp).



Rysunek 5. Określenie konfiguracji absolutnej metodą podwójnej derywatyzacji alkoholu II-rzędowego na przykładzie 2-(R)-pentanolu

Figure 5. The assignment of an absolute configuration of 2-(R)-pentanol by double derivatization

Estry MTPA występują w trzech różnych konformacjach, bez wyraźnej preferencji i często z tego powodu wartości różnic przesunięć chemicznych są małe, na granicy błędu.

Zdecydowanie najlepszym czynnikiem derywatyzującym jest kwas 9-antrylometoksyoctowy. Podobnie jak w przypadku wyznaczania konfiguracji alkoholi pierwszorzędowych, decydujące znaczenie ma pierścień antracenu, który wymuszając określoną konformację wpływa na zwiększenie wartości $\Delta\delta^{\text{RS}}$ [1].

Pozostałe reagenty, stosowane jako związki CDAs podczas wyznaczania konfiguracji alkoholi, zostały przedstawione w Tabeli 1.

Tabela 1. Inne czynniki derywatyzujące stosowane podczas wyznaczania konfiguracji absolutnej chiralnych alkoholi metodą NMR [13–19]

Tabelle 1. Other derivatizing reagents for the assignment of an absolute configuration of chiral alcohols by NMR [13–19]

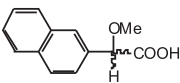
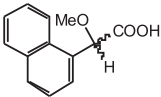
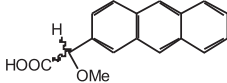
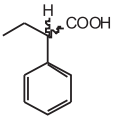
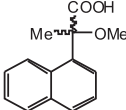
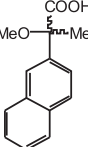
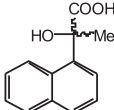
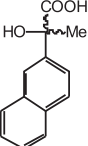
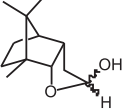
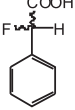
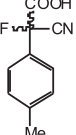
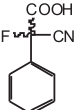
Nazwa	Wzór strukturalny	Nazwa	Wzór strukturalny
kwasy 2-metoksy-2-(2-naftylo)octowy (1-NMA)		kwasy 2-metoksy-2-(1-naftylo)octowy (2-NMA)	
kwasy 2-(2-antrylo)-2-metoksyoctowy (2-ATMA)		kwasy 2-fenylbutanowy (PBA)	
kwasy 2-metoksy-2-(1-naftylo)propionowy (M α NP)		kwasy 2-metoksy-2-(2-naftylo)propionowy (M β NP)	
kwasy 2-hydrokso-2-(1-naftylo)propionowy (H α NP)		kwasy 2-hydrokso-2-(2-naftylo)propionowy (H β NP)	
<i>endo</i> -oktahydro-7,8,8-trimetylo-4,7-metanobenzofuran-2-ol (<i>endo</i> -MBF-OH)		kwasy 2-fluoro-2-fenyloctowy (AFPA)	
kwasy 2-cyjano-2-fluorotoluenooctowy (CFTA)		kwasy 2-cyjano-2-fluoro-2-fenyloctowy (CFPA)	

Tabela 1. Ciąg dalszy
Table 1. Continuation

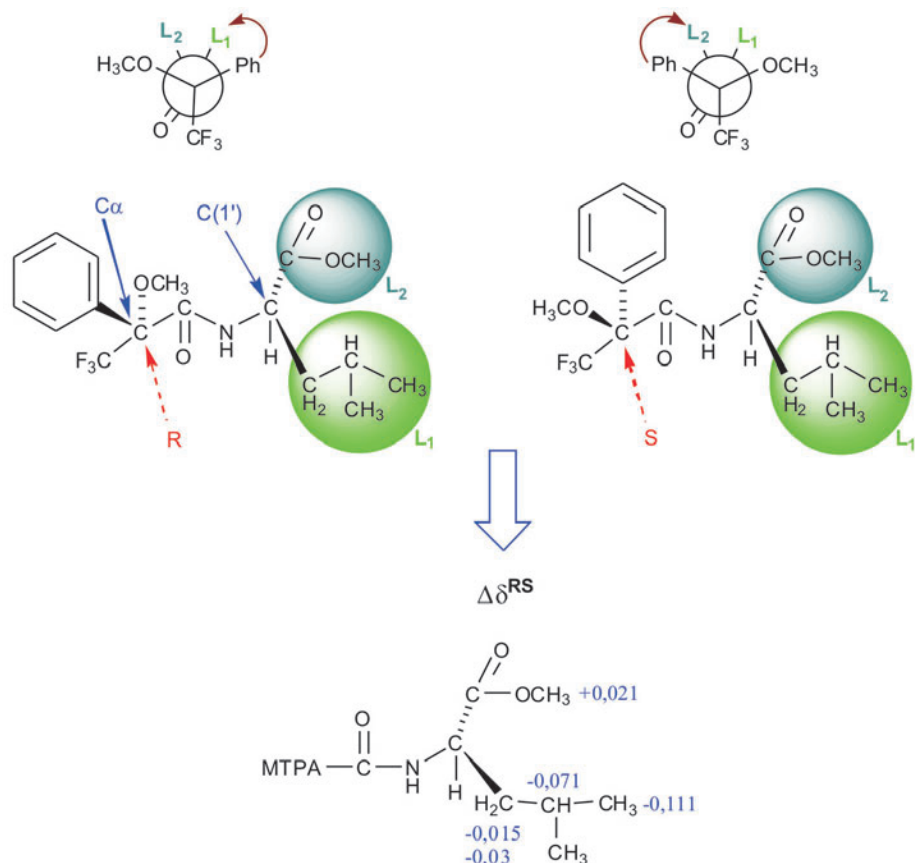
Nazwa	Wzór strukturalny	Nazwa	Wzór strukturalny
1,2,3,4-tetra- <i>O</i> -benzylo- β -D-glukopiranoza		1,2,3,4-tetra- <i>O</i> -acetylo- β -D-glukopiranoza	
kwas 2'-metoksy-1,1'-binaftylo-2-karboksylowy (MBNC)		kwas 3,5-dichloro-2-(1-(2-metoksy-1-naftylo))benzoesowy (MNCB)	
kwas (1-(9-bromoantrylo))2-naftylo-karboksylowy (BANA)		chlorek diazacyklofosfamidu	

B. Aminy

Kwas MTPA znalazł zastosowanie do określania konfiguracji absolutnej pierwszorzędowych amin z centrum asymetrii w położeniu α , w stosunku do grupy NH_2 . Kondensacja enancjomerów MTPA i aminy o nieznannej konfiguracji prowadzi do uzyskania dwóch diastereoizomerycznych pochodnych. W celu oznaczenia konfiguracji absolutnej, analizuje się wartości $\Delta\delta^{\text{RS}}$ pochodnych. Otrzymane wartości $\Delta\delta^{\text{RS}}$ zawierają precyzyjną informację o konfiguracji absolutnej badanej aminy, jeśli otrzymane kondensaty mają ściśle określoną konformację. W badaniach nad konformacją amidów ważne są wiązania: CO-NH , $\text{C}\alpha\text{-CO}$ oraz $\text{C}\alpha\text{-Ph}$. Częściowy charakter podwójny wiązania amidowego prowadzi do powstania dwóch izomerów – Z i E. Konfiguracja Z jest preferowana. Obrót wokół wiązania $\text{C}\alpha\text{-CO}$ daje dwa konformery: *sp* oraz *ap* (grupa $-\text{CF}_3$ w położeniu *syn*- lub *anti*-periplanarnym, w stosunku do wiązania $-\text{CO}$). Rezultatem rotacji wokół wiązania $\text{C}\alpha\text{-Ph}$ jest możliwość uzyskania jednej spośród trzech możliwych orientacji grupy fenylovej, leżącej w jednej płaszczyźnie z wiązaniem $\text{C}\alpha\text{-OMe}$, $\text{C}\alpha\text{-CO}$ lub $\text{C}\alpha\text{-CF}_3$. Otrzymany amid występuje preferencyjnie w jednym spośród sześciu izomerów – w konformerze *syn*-periplanarnym, w którym grupa fenylovej leży w jednej płaszczyźnie z wiązaniem $\text{C}\alpha\text{-OMe}$ [1,20].

W amidzie (R)-MTPA, powstałym w wyniku derywatywacji z odpowiednią aminą pierwszorzędową o konfiguracji S, np. z estrem metylowym leucyny (Rys. 6), pod-

stawnik L_1 ($-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_3$) jest ekranowany przez grupę fenylową, natomiast w pochodnej z (S)-MTPA ma miejsce sytuacja odwrotna – podstawnik L_2 ($-\text{CO}-\text{OCH}_3$) jest osłonięty przez grupę fenylową i dlatego sygnały protonów grupy L_1 są przesunięte w kierunku wyższego pola [1]. Różnice wartości przesunięć chemicznych dla pochodnej L-leucyny wynoszą: $\Delta\delta^{\text{RS}}L_1 < 0$ ($-0,15$; $-0,03$; $-0,071$; $-0,111$), $\Delta\delta^{\text{RS}}L_2 > 0$ ($+0,021$).

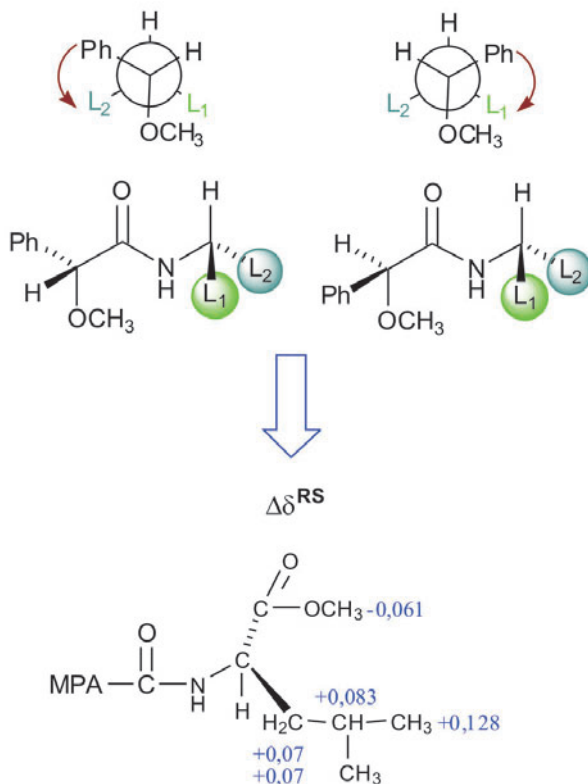


Rysunek 6. Określenie konfiguracji absolutnej metodą podwójnej derywatywacji aminy I-rzędowej, na przykładzie estru metylowego L-leucyny z MTPA

Figure 6. The assignment of an absolute configuration of L-leucine methyl ester with MTPA by double derivatization

Do wyznaczenia konfiguracji α -chiralnych amin znalazł również zastosowanie kwas MPA. Podobnie jak podczas analiz z wykorzystaniem kwasu MTPA, przeprowadza się reakcję podwójnej derywatywacji, prowadzącą do uzyskania diastereoizomerów z (R)-MPA i (S)-MPA. W uzyskanej pochodnej bardziej preferowana jest konformacja ap-Z (grupa $-\text{OCH}_3$ w położeniu ap, w stosunku do grupy karbonylo-

wej), w której grupa fenylowa wykazuje współpłaszczyznowość z wiązaniem C α -H. W amidzie (R)-MPA z estrem metylowym L-leucyny (Rys. 7) podstawnik L₂ jest ekranowany, podczas gdy w diastereoizomerze z (S)-MPA podstawnik L₁ znajduje się w bliskim sąsiedztwie pierścienia fenylowego (odwrotnie niż z MTPA). Wartości wyznaczonych różnic przesunięć chemicznych, w tym konkretnym przypadku, przedstawiają się następująco: $\Delta\delta^{\text{RS}}L_1 > 0$ (+0,07; +0,07; +0,083; +0,128), $\Delta\delta^{\text{RS}}L_2 < 0$ (-0,061) [1].

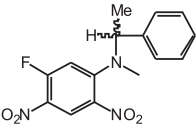
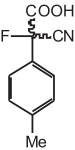
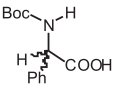


Rysunek 7. Określanie konfiguracji absolutnej metodą podwójnej derywatyzacji aminy I-rzędowej, na przykładzie estru metylowego L-leucyny z MPA

Figure 7. The assignment of an absolute configuration of L-leucine methyl ester with MPA by double derivatization

Inne reagenty pomocnicze, stosowane w oznaczaniu konfiguracji amin pierwszorzędowych, zostały zebrane w Tabeli 2.

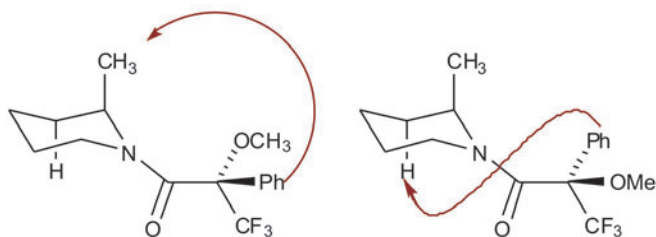
Tabela 2. Inne chiralne czynniki derywatyzujące stosowane podczas wyznaczania konfiguracji absolutnej chiralnych amin metodą NMR [1, 20–23]
 Tabela 2. Other chiral derivatizing reagents for the assignment of an absolute configuration of chiral amines by NMR [1, 20–23]

Nazwa	Wzór strukturalny
1-fluoro-2,4-dinitrofenylo-5-feniloetyloaminy (FDPEA)	
kwasy 2-cyano-2-fluoro-2-p-toluenooctowy (CFTA)	
Boc-fenylglicyna (BPG)	

Konfiguracja absolutna drugorzędowych amin z centrum stereogenicznym w pozycji α lub β , w stosunku do podstawionej grupy aminowej, jest wyznaczana najczęściej przy użyciu MTPA [9].

Zamrożenie konformacji poprzez usztywnienie wiązań w otrzymanym diastereoizomerze (efekt steryczny) prowadzi do przesunięcia równowagi konformacyjnej w kierunku jednego z rotametrów. Diastereoizomery, np. (R)-2-metylopiperydyny, występują preferencyjnie w konformacji sp (Rys. 8). Aksjalna grupa metylowa (C-2) w pochodnej 2-metylopiperydyny z (S)-MTPA jest bardziej ekranowana niż z (R)-MTPA, podczas gdy sygnały protonów przy trzecim atomie węgla przesunięte są w kierunku wyższego pola w diastereoizomerze z (R)-MTPA.

W rezultacie, wartość $\Delta\delta^{\text{RS}}$ dla drugorzędowej aminy o konfiguracji R jest ujemna dla grupy C-2-CH₃ i dodatnia dla protonu przy C-3 [1].



Rysunek 8. Diastereoizomer MTPA z (R)-2-metylopiperydyną
Figure 8. Diastereoisomer MTPA with (R)-2-methylpiperidine

C. Kwasy karboksylowe

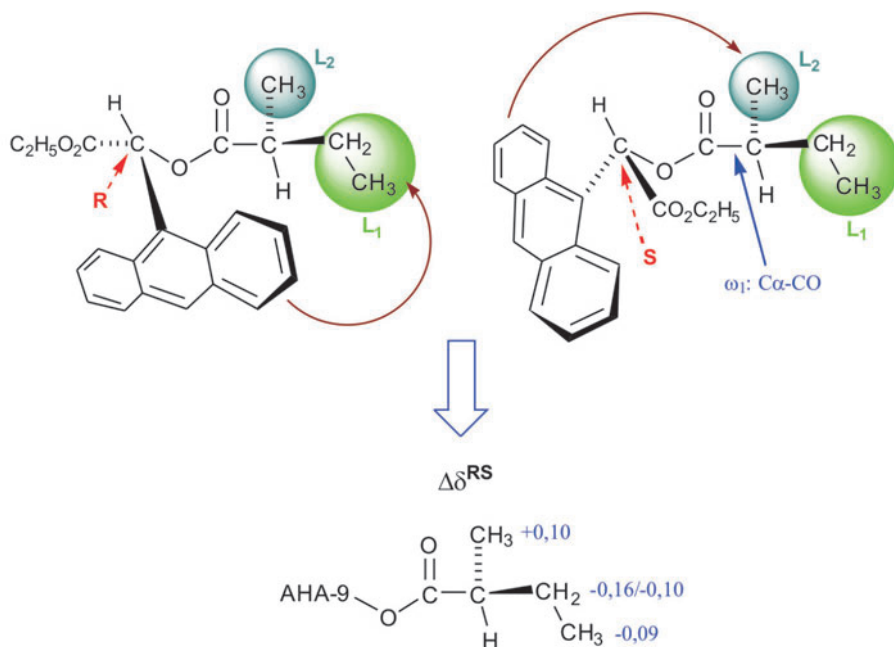
Kwasy karboksylowe, dla których określano konfigurację absolutną, to głównie związki z centrum stereogenicznym w pozycji α .

Podczas analizy konformacyjnej kwasów karboksylowych istotny wpływ na konformację otrzymanej pochodnej ma wiązanie ω_1 ($C\alpha$ -CO), wokół którego rotacja generuje dwa główne konformery *ap* i *sp*. Równowaga konformacyjna przesunięta jest wyraźnie w kierunku jednego z rotametrów wówczas, gdy uzyskana pochodna jest estrem. W przypadku gdy diastereoizomer jest amidem, nie ma jednoznacznie określonej preferencji.

Jednym z najczęściej stosowanych czynników derywatyzujących w badaniach nad określeniem konfiguracji kwasów karboksylowych jest 2-hydrokso-2-(9-antrylo)octan etylu (9-AHA) [24].

α -Chiralne kwasy, np. kwas (S)-2-metylobutanowy, dają w połączeniu z 9-AHA stabilny estrowy konformer – *ap* (Rys. 9). W pochodnej kwasu o konfiguracji S z (R)-9-AHA podstawnik L_1 ($-\text{CH}_2\text{CH}_3$) jest osłonięty. W przypadku estru powstałego z (S)-9-AHA, ekranowany przez pierścień antracenu jest podstawnik L_2 ($-\text{CH}_3$). Wartości różnic przesunięć chemicznych dla podstawnika większego objętościowo są ujemne ($-0,16$; $-0,10$; $-0,09$), natomiast dla grupy metylowej $\Delta\delta^{\text{RS}}$ jest dodatnie ($+0,10$) [1].

Kondensacja chiralnych kwasów karboksylowych z amidem dimetylofenyloglicyny (PDGA) i estrem metylowym fenylglicyny (PGME) jako czynników pomocniczych, daje diastereoizomeryczne amidy. Dla S izomeru kwasu 2-metylobutanowego, podobnie jak w pochodnej z 9-AHA, podstawnik L_2 jest w większym stopniu ekranowany w amidzie (S)-PDGA (lub (S)-PGME), niż w amidzie z (R)-PDGA ((R)-PGMA), dlatego wartości $\Delta\delta^{\text{RSL}_2} > 0$, a $\Delta\delta^{\text{RSL}_1} < 0$ [1].

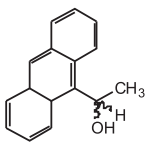
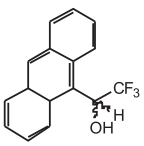
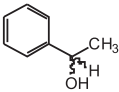
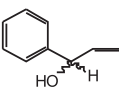
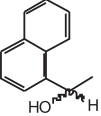
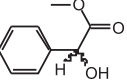
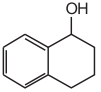
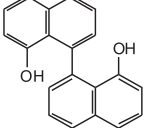


Rysunek 9. Określanie konfiguracji absolutnej metodą podwójnej derywatyzacji α -chiralnego kwasu karboksylowego, na przykładzie kwasu 2-(S)-metylobutanowego

Figure 9. The assignment of an absolute configuration of 2-(S)-methylbutane acid by double derivatization

Inne chiralne związki derywatyzujące, wykorzystywane w celu określenia konfiguracji absolutnej kwasów karboksylowych, zostały przedstawione w Tabeli 3.

Tabela 3. Inne czynniki derywatyzujące stosowane podczas wyznaczania konfiguracji absolutnej α -chiralnych kwasów karboksylowych metodą NMR [1, 24–27]Tabele 3. Other derivatizing reagents for the assignment of an absolute configuration of α -chiral carboxylic acids by NMR [1, 24–27]

Nazwa	Wzór strukturalny	Nazwa	Wzór strukturalny
1-(9-(8a,10a-dihydroantrylo))etanol		2,2,2-trifluoro-1-(9-(8a,10a-dihydroantrylo))etanol	
1-fenyloctanol		1-fenyloprop-2-en-1-ol	
1-(naftylo)etanol		ester metylowy kwasu migdałowego	
1,2,3,4-tetrahyronaftalen-1-ol		1,1'-binaftylo-8,8'-diol (BNDO)	

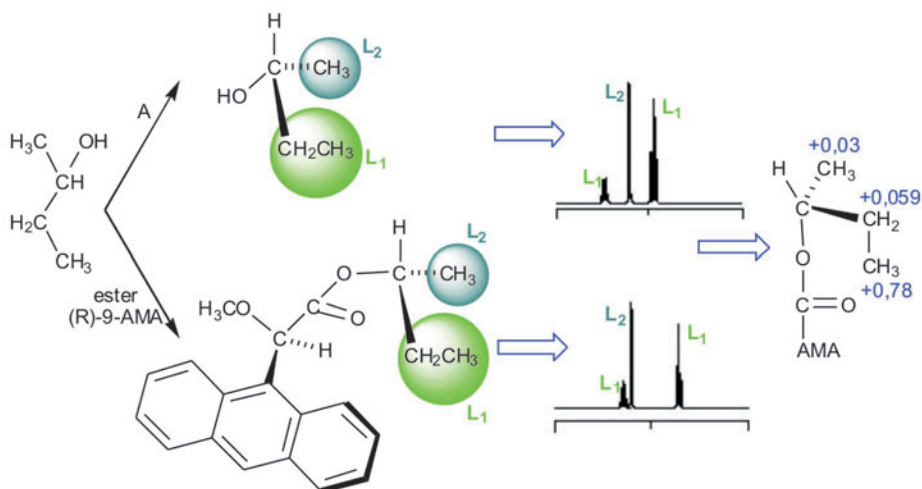
1.2 POJEDYNCZA DERYWATYZACJA

Dotychczas opisywane metody, zmierzające do wyznaczenia konfiguracji absolutnej za pomocą NMR, wymagały zastosowania dwóch chiralnych czynników, podczas gdy zastosowanie pojedynczej derywatyzacji wymaga użycia tylko jednego chiralnego czynnika [1].

Metoda pojedynczej derywatyzacji w badaniach stereochemicznych ma ograniczony zakres, stosuje się ją głównie do wyznaczania konfiguracji absolutnej alkoholi drugorzędowych, z udziałem 9-AMA jako czynnika derywatyzującego. Duży objętościowo podstawnik antracenu w chiralnym związku pomocniczym umożliwia występowanie otrzymanego diastereoizomeru w ściśle określonej konformacji [10].

W przypadku gdy wyjściowy alkohol drugorzędowy posiada konfigurację R, np. (R)-*sec*-butanol (Rys. 10), w estrze powstałym w wyniku syntezy z (R)-9-AMA

protony grupy L_1 ($-\text{CH}_2\text{CH}_3$) są ekranowane przez pierścień antracenu. Sygnały protonów podstawnika L_1 zostają przesunięte w kierunku wyższego pola, natomiast protony grupy L_2 ($-\text{CH}_3$) zostają przesunięte w kierunku pola o niższym natężeniu. Dlatego wartość $\Delta\delta^{\text{AR}} L_1$ jest dużo większa od $\Delta\delta^{\text{AR}} L_2$ ($\Delta\delta^{\text{AR}} L_1 = 0,59; 0,78, \Delta\delta^{\text{AR}} L_2 = 0,03$). Sytuację przeciwną można zaobserwować, gdy alkohol skondensuje się z (S)-9-AMA; wówczas $\Delta\delta^{\text{AS}} L_1 \ll \Delta\delta^{\text{AS}} L_2$ ($\Delta\delta^{\text{AR}} L_1 = 0,04; 0,12, \Delta\delta^{\text{AR}} L_2 = 0,50$) [1].



Rysunek 10. Określenie konfiguracji absolutnej metodą pojedynczej derywatyzacji na przykładzie (R)-*sec*-butanolu

Figure 10. The assignment of an absolute configuration of (R)-*sec*-butanol by single derivatization

MPA w procesie pojedynczej derywatyzacji stosuje się rzadziej, ponieważ uzyskane pochodne z MPA nie wykazują wyraźnej preferencji konformacyjnej [1, 9]. W celu uzyskania znacznej przewagi w kierunku jednego z rotamerów, można obniżyć temperaturę próbki (metoda stosowana podczas badania konfiguracji alkoholi II-rzędowych) lub selektywnie chelatować jeden z konformerów (metoda stosowana podczas badania konfiguracji alkoholi i amin I-rzędowych).

Obniżenie temperatury próbki przesuną równowagę w kierunku konformeru *sp*. Badania spektroskopowe pojedynczego diastereoizomeru MPA przeprowadza się w dwóch różnych temperaturach. Określenie konfiguracji sprowadza się do wyznaczenia $\Delta\delta T_1 T_2$, które definiuje się jako różnicę przesunięć chemicznych uzyskanych w temperaturze T_1 i T_2 ($T_1 > T_2$) ($\Delta\delta T_1 T_2 =$ przesunięcie chemiczne uzyskane w wyższej temperaturze T_1 minus przesunięcie chemiczne wyznaczone w temperaturze niższej T_2) [1].

Drugim sposobem umożliwiającym kontrolę równowagi konformacyjnej w roztworze jest dodanie do uzyskanej pochodnej soli baru (II).

Dwuwartościowy jon baru pełni rolę czynnika chelatującego, stabilizuje jeden z konformerów estru MPA (preferowany konformer *sp*) poprzez koordynacyjne wią-

zanie z atomami tlenu (grupa karboksylowa i metoksylova). W trakcie badania otrzymuje się dwa widma NMR: widmo czystej pochodnej oraz widmo pochodnej skompleksowanej z jonem baru. W celu określenia konfiguracji, wyznacza się różnicę pomiędzy wartością przesunięcia chemicznego danej grupy wolnej pochodnej, a wartością przesunięcia chemicznego poderywatyzyjnego związku, połączonego z dwuwartościowym jonem baru $\Delta\delta^{\text{Ba}}$ ($\delta(\text{MPA-ester}) - \delta(\text{MPA-ester} + \text{Ba}^{2+})$). Określenie konfiguracji absolutnej nie jest możliwe, jeśli podstawnik L_1 i (lub) L_2 wyjściowego związku wchodzi w interakcję z jonami baru [28, 29].

2. CHIRALNE CZYNNIKI POMOCNICZE CLSRs I CSAs

Chiralne czynniki pomocnicze CLSRs i CSAs tworzą z analitem wiązania koordynacyjne, dodanie ich do związku organicznego powoduje, analogicznie jak w procesie derywatyzyacji, przesunięcie sygnałów protonów grup donorowych w kierunku wyższego lub niższego pola. Chiralne czynniki CLSRs to związki metaloorganiczne zawierające sześciokoordynacyjny lantanowiec [8].

W Tabeli 4 zostały przedstawione najważniejsze, przykładowe związki typu CLSRs stosowane w metodzie NMR.

Tabela 4. Przykłady chiralnych czynników lantanowych [8]
Tabele 4. Chiral lanthanide shift reagents [8]

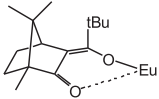
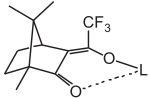
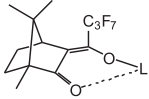
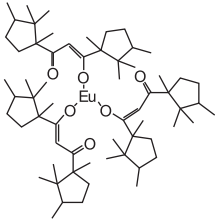
Nazwa	Skrót	Wzór strukturalny
<i>tert</i> -butylohydroksymetyleno- <i>d</i> -kamforan europu	Eu(pvc) ₃	
trifluorohydroksymetyleno- <i>d</i> -kamforan europu/ prazeodymu/ iterbu	Eu(tfc) ₃ / Pr(tfc) ₃ / Yb(tfc) ₃	 L = Eu, Pr, Yb
heptafluorohydroksymetyleno- <i>d</i> -kamforan europu/ prazeodymu/ iterbu	Eu(hfc) ₃ / Pr(hfc) ₃ / Yb(hfc) ₃	 L = Eu, Pr, Yb

Tabela 4. Ciąg dalszy
Table 4. Continuation

Nazwa	Skrót	Wzór strukturalny
1-hydroksy-1,3-bis-(1,4,5,5-tetrametylocyklopentyl)-3-oksopropenylan europu	Eu(dcm) ₃	

Chiralne czynniki lantanowe znalazły zastosowanie podczas badań nad czystością enancjomeryczną chiralnych kwasów karboksylowych, amin, alkenów i arenów. W przypadku niektórych analiz, obok CLSRs, do roztworu dodaje się także achiralne czynniki kompleksujące, np. sole srebra.

Chiralne czynniki solwujące tworzą z enancjomerami koordynacyjne diastereoizomery. Istotne znaczenie w określaniu konfiguracji absolutnej i czystości enancjomerycznej, podobnie jak w przypadku CLSRs, ma trwałość utworzonego kompleksu. Wartości $\Delta\delta$ diastereoizomerów z CSAs, w porównaniu z trwałymi kowalencyjnymi kondensatami, są niewielkie, dlatego w celu zwiększenia tych wartości, stosuje się aparaty NMR o wysokiej rozdzielczości. Dodatkowo, zastosowanie niepolarnych rozpuszczalników (CDCl_3 , CCl_4 , C_6H_6) wpływa na zwiększenie efektu anizotropowego (efekt silnego ekranowania protonów), a tym samym wartości $\Delta\delta$. W rozpuszczalnikach polarnych solwatacja powoduje, że różnice w wartościach przesunięć chemicznych są na granicy błędu [8,30].

Niektóre związki CSAs, wykorzystywane w badaniach nad konfiguracją związków chiralnych i ich czystością enancjomeryczną, zostały przedstawione w Tabeli 5.

Tabela 5. Przykłady czynników solwujących [1, 8]
 Tabela 5. Chiral solvating agents [1, 8]

Nazwa	Wzór strukturalny	Nazwa	Wzór strukturalny
1-(9-antrylo)-2,2,2-trifluoroetanol		ester metylowy kwasu fenylo-(3,5-dinitrobenzoilo)aminoctowego	
kwas acetyloamidowy		3,5-dinitrobenzoilo-fenyletyloamina	
1,2-difenylo-diaminoetan		2-naftylo-etyloamina	

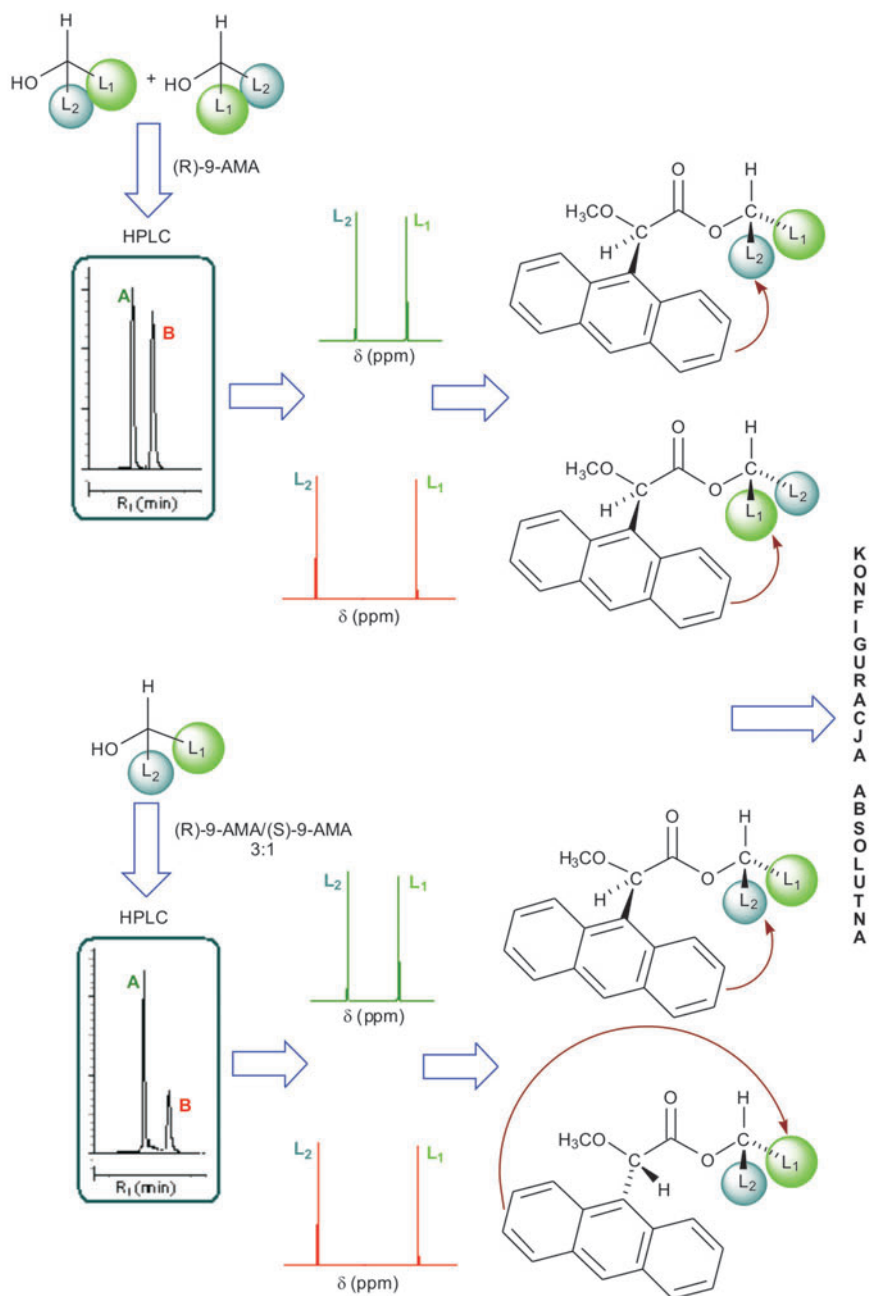
3. NOWE KIERUNKI W OKREŚLENIU KONFIGURACJI ABSOLUTNEJ

Podczas określania konfiguracji chiralnych atomów węgla często wykorzystuje się sprzężone metody analityczne, np. HPLC-NMR (Rys. 11). Zastosowanie HPLC umożliwia rozdzielenie enancjomerów. Jeżeli aparatura pozwala na bezpośrednie oznaczenie widma NMR otrzymanych pików (np. A i B), można liczyć na nowe, szybkie metody znalezienia konfiguracji chiralnego atomu węgla.

Metoda ta umożliwia wyznaczenie konfiguracji absolutnej:

- mieszaniny enancjomerów (racemat), przez dodanie czynnika derywatyzującego R lub S (np. (S) lub (R)-9-AMA), a następnie rozdział uzyskanych pochodnych (przy użyciu HPLC) i analizę spektroskopową uzyskanych pików,
- pojedynczych enancjomerów, przez uzyskanie diastereoizomerycznych pochodnych z chiralnymi czynnikami pomocniczymi zmieszanyymi w stosunku molarowym 3:1, rozdział na semipreparatywnej kolumnie i analizę ^1H NMR.

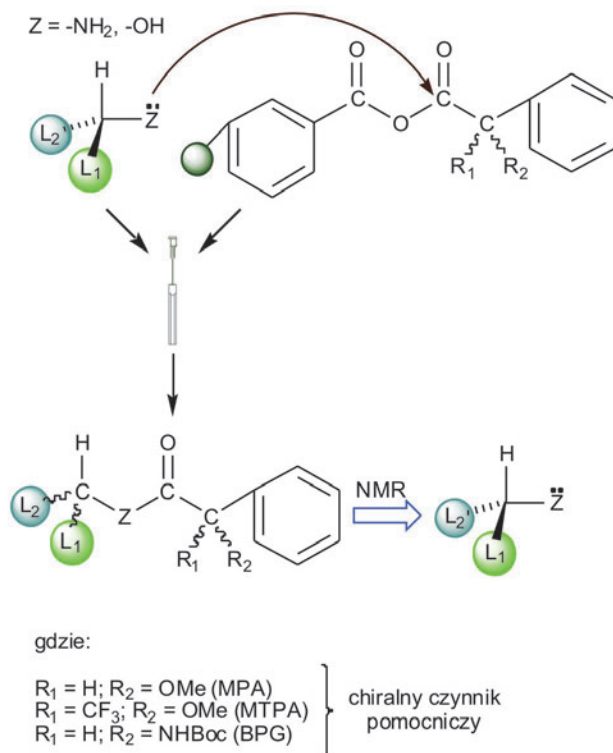
Najczęściej w metodzie HPLC-NMR stosuje się 9-AMA [1, 31].



Rysunek 11. Określenie konfiguracji absolutnej metodą HPLC-NMR
 Figure 11. The assignment of an absolute configuration by HPLC-NMR

Inną metodą, umożliwiającą szybkie i precyzyjne określenie konfiguracji absolutnej jest metoda „mix and shake” (Rys. 12). W ciągu kilku minut można uzyskać

informację o właściwościach stereogenicznych atomu węgla, nie wykonując przy tym żadnych dodatkowych metod separacyjnych [1, 7].



Rysunek 12. Określenie konfiguracji absolutnej metodą „mix and shake”

Figure 12. The assignment of an absolute configuration by „mix and shake” method

Do niewielkiego układu reakcyjnego, w którym znajduje się przytwierdzony do stałego podłoża chiralny czynnik derywatyzujący, wprowadza się substrat, dla którego określa się konfigurację absolutną. Całość miesza się i wstrząsa. Uzyskuje się trwałe połączenie substrat – chiralny czynnik pomocniczy. Następnie otrzymany kondensat zostaje uwolniony ze stałego podłoża do roztworu. Otrzymana pochodna jest analizowana za pomocą techniki NMR i, na podstawie wyznaczonych wartości $\Delta\delta^{RS}$, uzyskuje się informację o konfiguracji absolutnej.

Metodą „mix and shake” określa się konfigurację absolutną czystych optycznie enancjomerów poprzez zastosowanie:

- pojedynczych chiralnych czynników derywatyzujących o określonej konfiguracji (R lub S),
- mieszaniny dwóch optycznie czynnych izomerów chiralnych czynników derywatyzujących, zmieszanych w stosunku 1:2.

Analiza konfiguracyjna chiralnego atomu węgla w aminach pierwszorzędowych trwa około 5 minut, natomiast do wyznaczenia konfiguracji alkoholi drugorzędowych potrzeba kilka godzin. Niezaprzeczalnym atutem tej metody jest użycie niewielkiej ilości substratu do analizy (< 0,5 mg substratu).

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] J.M. Seco, E. Quinoa, R. Riguera, *Chem. Rev.*, 2004, **104**, 17.
- [2] F. Freire, J.M. Seco, E. Quinoa, R. Riguera, *J. Org. Chem.*, 2005, **70**, 3778.
- [3] F. Freire, J.M. Seco, E. Quinoa, R. Riguera, *Org. Lett.*, 2005, **7**, 4855.
- [4] F. Freire, F. Calderon, J. M. Seco, A. Fernandez-Mayoralas, E. Quinoa, R. Riguera, *J. Org. Chem.*, 2006, **72**, 2297.
- [5] J.M. Seco, M. Martino, E. Quinoa, R. Riguera, *Org. Lett.*, 2000, **2**, 3261.
- [6] E. Allana, F. Freire, J.M. Seco, E. Quinoa, R. Riguera, *Org. Lett.*, 2006, **8**, 4449.
- [7] S. Porto, J. Duran, J.M. Seco, E. Quinoa, R. Riguera, *Org. Lett.*, 2003, **5**, 2979.
- [8] D. Parker, *Chem. Rev.*, 1991, **91**, 1441.
- [9] J.M. Seco, E. Quinoa, R. Riguera, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2001, **12**, 2915.
- [10] S.K. Latypov, J.M. Seco, E. Quinoa, R. Riguera, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 877.
- [11] M.J. Ferreira, S.K. Latypov, E. Quinoa, R. Riguera, *Tetrahedron: Asymmetry*, 1996, **7**, 2195.
- [12] F. Freire, J.M. Seco, E. Quinoa, R. Riguera, *Chem. Commun.*, 2007, 1456.
- [13] A. Ichikawa, S. Hiradate, A. Sugio, S. Kuwahara, M. Watanabe, N. Harada, *Tetrahedron: Asymmetry*, 1999, **10**, 4075.
- [14] A. Ichikawa, H. Ono, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2005, **16**, 2559.
- [15] A. Ichikawa, H. Ono, S. Hiradate, M. Watanabe, N. Harada, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2002, **13**, 1167.
- [16] M. Kobayashi, *Tetrahedron*, 2000, **56**, 1661.
- [17] M. Trujillo, E.Q. Morales, J. Vazquez, *J. Org. Chem.*, 1994, **59**, 6637.
- [18] Y. Takeuchi, N. Itoh, T. Satoh, T. Koizumi, K. Yamaguchi, *J. Org. Chem.*, 1993, **58**, 1812.
- [19] M. Apparu, Y.B. Tiba, P.M. Leo, S. Hamman, C. Coulombeau, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2000, **11**, 2885.
- [20] J.M. Seco, E. Quinoa, R. Riguera, *J. Org. Chem.*, 1999, **64**, 4669.
- [21] D.B. Weibel, T.R. Walker, F.C. Schroeder, J. Meinwald, *Org. Lett.*, 2000, **2**, 2381.
- [22] K. Harada, Y. Shimizu, K. Fujii, *Tetrahedron Lett.*, 1998, **39**, 6245.
- [23] T. Fujiwara, K. Omata, K. Kabuto, C. Kabuto, T. Takahashi, M. Segawa, Y. Takeuchi, *Chem. Commun.*, 2001, 2694.
- [24] M.J. Ferreira, S.K. Latypov, E. Quinoa, R. Riguera, *J. Org. Chem.* 2000, **65**, 2658.
- [25] M.J. Ferreira, S.K. Latypov, E. Quinoa, R. Riguera, *Tetrahedron: Asymmetry*, 1997, **8**, 1015.
- [26] E. Tyrrell, M.W.H. Tsang, G.A. Skinner, J. Fawcett, *Tetrahedron*, 1996, **52**, 9841.
- [27] Y. Fukushi, K. Shigematsu, J. Mizutani, S. Tahara, *Tetrahedron Lett.*, 1996, **37**, 4737.
- [28] R. Garcia, J.M. Seco, S.A. Vazquez, E. Quinoa, R. Riguera, *J. Org. Chem.*, 2002, **67**, 4579.
- [29] R. Garcia, J.M. Seco, S.A. Vazquez, E. Quinoa, R. Riguera, *J. Org. Chem.*, 2006, **71**, 1119.
- [30] J. Omelańczuk, M. Mikołajczyk, *Tetrahedron: Asymmetry*, 1996, **7**, 2687.
- [31] J.M. Seco, L.-H. Tseng, M. Godejohann, E. Quinoa, R. Riguera, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2002, **13**, 2149.

**CHROMATOGRAFICZNE METODY BADAŃ
ZANIECZYSZCZEŃ POWIETRZA W OBIEKTACH
GOSPODARKI KOMUNALNEJ**

**CHROMATOGRAPHIC METHODS OF AIR POLLUTION
ANALYSIS AT THE COMMUNAL MANAGEMENT
FACILITIES**

Anna Sadowska-Rociek¹, Magdalena Kurdziel²

*¹ Małopolskie Centrum Monitoringu i Atestacji Żywności,
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kollątaja w Krakowie
ul. Balicka 122, 30-149 Kraków*

*² Wydział Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego
ul. Ingardena 3, 30-060 Kraków*

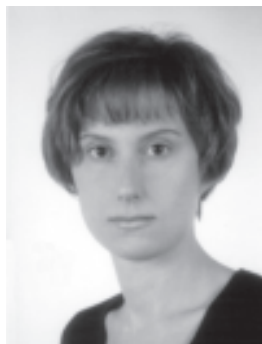
Abstract

Wstęp

1. Techniki pobierania próbek powietrza
2. Stosowane adsorbenty i uwalnianie zatrzymanych analitów
3. Kolumny chromatograficzne i detektory
4. Warianty chromatografii gazowej
 - 4.1. Sprzężenie chromatografii gazowej ze spektrometrią mas (GC-MS)
 - 4.2. Mikrochromatografia gazowa (μ GC)
 - 4.3. Sprzężenie chromatografii gazowej z olfaktometrią (GC-ODP)

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane



Dr Anna Sadowska-Rociek ukończyła studia magisterskie z chemii na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego, gdzie następnie, w latach 2003–2007, odbywała stacjonarne studia doktoranckie z chemii. Rozprawę doktorską poświęciła problematyce oznaczeń metodą chromatografii gazowej (GC-FID, GC-MS oraz μ GC-MS) lotnych związków organicznych, emitowanych ze składowisk odpadów komunalnych, odpowiedzialnych za uciążliwość zapachową. Stopień doktora nauk chemicznych w zakresie chemii analitycznej i ochrony środowiska uzyskała w czerwcu 2007 r.

Obecnie pracuje w Małopolskim Centrum Monitoringu i Atestacji Żywności Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie. Jej badania dotyczą m.in. opracowania metod oznaczeń związków zapachowych a także zanieczyszczeń w żywności, z wykorzystaniem chromatografii gazowej (GG/MS, GC \times GC/TOF-MS).



Dr Magdalena Kurdziel jest asystentem na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego. W dotychczasowej pracy naukowej zajmowała się problematyką oznaczeń lotnych związków organicznych, głównie lekkich niematanowych węglowodorów, w powietrzu atmosferycznym oraz metodami pobierania i dynamicznego wzbogacania próbek powietrza. Prowadziła również oznaczania rozpuszczalności węglowodorów C_5 – C_6 w ciekłym azocie i ciekłym argonie w temperaturach wrzenia.

Obecnie pracuje w Zespole Kriogeniki i Chemii Spożywczej na Wydziale Chemii UJ. Kontynuuje badania nad oznaczaniem lotnych związków organicznych metodą GC i pracuje nad badaniem wpływu niskich temperatur na strukturę ziarna skrobi modyfikowanych.

ABSTRACT

Communal management facilities like composting plants or landfills are found to be significant sources of air pollution in the environment. Air pollution is caused by chemical compounds that are naturally generated during biological decomposition of organic waste. Most of these substances belong to the volatile organic compounds (VOC). They can be classified into the groups: aliphatic and aromatic hydrocarbons, alcohols, aldehydes, ketones, acids, esters, chlorinated hydrocarbons and sulphur and nitrogen containing compounds. Their emissions to the atmosphere cause serious environmental concerns like potential health hazards, global warming, ozone layer damage and finally unpleasant odours that are the most important nuisance to citizens living in the vicinity of communal management objects. In the recent years the growing public concern about living conditions and the state of environment has resulted in the development of new analytical approaches suitable for monitoring and examining the volatile organic compounds in the air.

This article provides a review of the most frequently employed gas chromatographic methods used for determination of air pollutants emitted from communal management facilities. Gas chromatographs equipped with various types of columns and detectors (FID, PID) and coupled with mass spectrometers (GC/MS), olfactory detection port (GC/ODP) remain nowadays the most widely used and very suitable devices to investigate the presence and concentration of landfill odorants in the air [1–3].

In the article the above-mentioned methods are summarized and discussed.

The sampling technique in the analysis of gases is often the crucial point of the whole procedure. The most popular techniques of sample preparation including dynamic and passive enrichment on sorbents, followed by thermal desorption or extraction, solid-phase microextraction (SPME) or the modern approaches like use of the flux chamber [4, 5] are also described.

Finally, the review covers the topic of miniaturization of gas-chromatographic instruments. Micro gas chromatographs (μ GC) and portable gas chromatographs provide the possibility of on-site analysis without the risk of sample contamination or destruction. They are easy to operate and work on-line, giving immediate results, which permit to monitor the level of pollution in the real time and follow the time evolution of landfill emissions [6].

In the Table 1 some examples of volatile organic compounds determination recently carried out in different places of the world are presented.

Keywords: communal management facilities, gas chromatography, air sampling, microchromatography, air pollution

Słowa kluczowe: obiekty gospodarki komunalnej, chromatografia gazowa, pobieranie próbek powietrza, mikrochromatografia, zanieczyszczenia powietrza

WSTĘP

Obiekty gospodarki komunalnej, takie jak składowiska odpadów komunalnych, oczyszczalnie ścieków, kompostownie, ze względu na rodzaj prowadzonej w nich działalności, należą do istotnych źródeł zanieczyszczeń powietrza. Zanieczyszczenia powstają podczas rozkładu materii organicznej, obecnej w odpadach, ściekach oraz w kompoście. Do gazowych produktów rozkładu należą przede wszystkim: węglowodory alifatyczne i aromatyczne oraz ich fluorowcopochodne, alkohole, aldehydy i ketony, kwasy organiczne, organiczne związki azotu i siarki oraz związki nieorganiczne (np. amoniak).

Emisje tych związków są bardzo uciążliwe dla środowiska – wiele z nich to gazy cieplarniane lub przyczyniające się do niszczenia warstwy ozonowej. Mają negatywny wpływ na organizmy żywe – część z nich jest toksyczna, a niektóre charakteryzują się również nieprzyjemnym zapachem, co pogarsza jakość powietrza w otoczeniu tego typu obiektów.

W praktyce badawczej do oznaczania w powietrzu związków emitowanych ze składowisk odpadów i kompostowni najczęściej wykorzystywane są metody fizykochemiczne [7], oparte na pomiarach właściwości fizycznych i chemicznych związków, głównie chromatografia gazowa, rzadziej metody spektralne.

Do badań zapachowych zanieczyszczeń powietrza stosuje się również metody olfaktometryczne, które pozwalają na pomiar stężenia zapachowego mieszanin odorantów (związków odoroczynnych) oraz ocenę jakościowych cech wrażenia: intensywności i rodzaju zapachu oraz jego jakości hedonicznej [1–3, 8–12]. Inną, mniej rozpowszechnioną techniką jest tzw. nos elektroniczny – złożony z specjalnie przygotowanych zestawów czujników, naśladujących działanie ludzkiego nosa [13–15].

Ponieważ większość substancji emitowanych z obiektów gospodarki komunalnej należy do grupy lotnych związków organicznych, ich pełną analizę jakościową i ilościową w różnych zakresach stężeń można wykonać metodą chromatografii gazowej. W połączeniu z odpowiednimi technikami pobierania próbek i wzbogacania analitów oraz warunkami analizy, chromatografia gazowa pozostaje obecnie najpopularniejszą metodą badań lotnych zanieczyszczeń powietrza.

W artykule omówiono poszczególne etapy oznaczania gazowych zanieczyszczeń powietrza pochodzących z obiektów gospodarki komunalnej. Całość zilustrowano wybranymi przykładami badań na składowiskach odpadów i w kompostowniach (Tab. 1).

Tabela 1. Przegląd zastosowań chromatografii gazowej do badań lotnych związków organicznych w powietrzu na składowiskach odpadów komunalnych i w kompostowniach
 i w kompostowniach
 Table 1. The review of the applications of gas chromatography in analysis of volatile organic compounds in the air at municipal landfill sites and composting plants

Metoda i cel badań	Technika pobierania i wzbogacania próbek	Stosowana kolumna	Oznaczone związki	Lit.
GC-MS (składniki śladowe biogazu)	pobieranie do worków Tedlar; wzbogacanie na adsorbencie: węgiel aktywny; objętość próbki powietrza: 0,3 l; desorpcja rozpuszczalnikiem (C ₂ H ₂ Cl ₂)	DB-5 MS	węglowodory i ich chlorowcopochodne, ketony, estry	[1]
GC-MS (składniki śladowe biogazu)	pobieranie do worków Nalophan; wzbogacanie na adsorbencie: Tenax TA; objętość próbki powietrza: 0,05-0,1 l; desorpcja termiczna	HP-5 MS	węglowodory i ich chlorowcopochodne, alkohole, ketony, terpeny, furany, organiczne związki siarki	[1]
SPME-GC-MS (składniki śladowe biogazu)	pobieranie do worków Nalophan; wzbogacanie metodą SPME; adsorbent: Carboxen/PDMS; desorpcja termiczna	HP-5 MS	węglowodory i ich chlorowcopochodne, alkohole, aldehydy, ketony, terpeny, furany, organiczne związki siarki	[1]
SPME-GC-FID SPME-GC-ODP (składniki śladowe biogazu)	pobieranie do worków Nalophan; wzbogacanie metodą SPME; adsorbent: Carboxen/PDMS; desorpcja termiczna	DB-5	węglowodory i ich chlorowcopochodne, alkohole, ketony, kwasy organiczne, terpeny, furany	[1]
GC-MS (zanieczyszczenia powietrza na składowisku)	pobieranie do worków Nalophan; wzbogacanie na adsorbencie: Tenax TA/ Carboxen 1000; objętość próbki powietrza 5l; desorpcja termiczna	HP-5 MS	węglowodory aromatyczne, chlorowcopochodne węglowodorów, aldehydy, ketony, kwasy karboksylowe, estry, disiarczki węgla, akrylonitryl	[2,3]
SPME-GC-MS (zanieczyszczenia powietrza na składowisku)	pobieranie do worków Nalophan objętość próbki powietrza 9 l; wzbogacanie metodą SPME; adsorbenty: PDMS, Carboxen, DVB; desorpcja termiczna	HP-5	węglowodory i ich chlorowcopochodne, ketony, kwasy organiczne, estry, terpeny, disiarczki dimetylu	[4]
μGC-TCD (zanieczyszczenia powietrza na składowisku)	dynamiczna; badania <i>in situ</i> , pobieranie z jednoczesnym wzbogacaniem na przystawce SRA CONVOY (SRA Instruments); desorpcja termiczna	Pora PLOT Q, OV-1	toluen, p-cymen, limonen	[4]

Tabela 1. Ciąg dalszy
Table 1. Continuation

Metoda i cel badań	Technika pobierania i wzbogacania próbek	Stosowana kolumna	Oznaczone związki	Lit.
GC-FPD-S GC-FID (zanieczyszczenia powietrza na składowisku)	komora przepływowa; wzbogacanie na adsorbencie: włókna szklane impregnowane octanem rtęci; objętość próbki powietrza 20 l; desorpcja rozpuszczalnikiem (C ₂ H ₂ Cl ₂)	brak danych	organiczne związki siarki (siarczki, merkaptany, tiofen), siarkowodor	[5]
μGC-TCD μGC-MS (zanieczyszczenia powietrza na składowisku)	pobieranie do worków Tedlar; wzbogacanie na przystawce AIRSENSE EDU (Analytics), czas pobierania próbki: 30 s–30 min; desorpcja termiczna	OV-1	weglowodory i ich chlorowcopochodne	[6]
GC-MS (zanieczyszczenia powietrza w kompostowni)	dynamiczna; adsorbent: węgiel aktywny; desorpcja termiczna	HP-5 MS	toluen, ksyleny, alkohole, aldehydy, ketony, kwas octowy, estry, terpeny	[10]
GC-MS GC-FID (zanieczyszczenia powietrza w kompostowni)	komora przepływowa; wzbogacanie na adsorbencie: Tenax TA; objętość próbki powietrza: 5–10 l; desorpcja termiczna	wypełnienie: dimetylopolisiloksan	weglowodory i ich chlorowcopochodne, alkohole, aldehydy, ketony, eter, kwasy organiczne, estry, furany, terpeny, organiczne związki siarki	[11]
GC-MS (zanieczyszczenia powietrza w kompostowni)	dynamiczna; adsorbent: Tenax TM /SpheroCarb TM ; objętość próbki powietrza: 0,2 l; desorpcja termiczna	CP-Sil 8 CB MS	weglowodory i ich chlorowcopochodne, alkohole, dioksan, aldehydy, ketony, eter, kwasy organiczne, estry, furany, terpeny, amoniak, organiczne związki siarki i azotu	[15]
GC-MS (zanieczyszczenia powietrza na składowisku)	dynamiczna; adsorbent: Chromosorb 106; objętość próbki powietrza: 55–130 l; desorpcja termiczna	HP-1	weglowodory i ich chlorowcopochodne, benzaldehyd	[17]
GC-FID GC-MS (zanieczyszczenia powietrza na składowisku)	1. pasywna; próbniiki pasywne ATD 400TM, adsorbent: Chromosorb 106; czas ekspozycji: 1 miesiąc 2. dynamiczna; adsorbent: CarbotrapC/CarbotrapB/CarbosieveSIII; objętość próbki powietrza: 14,5 l; desorpcja termiczna	BP-1	weglowodory i ich chlorowcopochodne, aldehydy, kwasy organiczne, estry, związki poliaromatyczne i heterocykliczne, organiczne związki siarki	[18]

Tabela 1. Ciąg dalszy
Table 1. Continuation

Metoda i cel badań	Technika pobierania i wzbogacania próbek	Stosowana kolumna	Oznaczone związki	Lit.
GC-MS (zanieczyszczenia powietrza na składowisku)	dynamiczna; adsorbent: Tenax TA/ Carbotrap; objętość próbki powietrza: 20 l; desorpcja termiczna	DB-502	węglowodory i ich chlorowcopochodne, aldehydy, ketony, estry, terpeny	[19]
GC-MS (śladowe składniki biogazu)	pobieranie do worków Tedlar, objętość próbki powietrza 15 l; wzbogacanie na Tenaxie TA; desorpcja termiczna	DB-502	węglowodory i ich chlorowcopochodne, alkohole, ketony, estry, terpeny, organiczne związki siarki	[19]
GC-PID (zanieczyszczenia powietrza na składowisku)	dynamiczna; badania <i>in situ</i> ; adsorbent Microtrap (Tenax GR), objętość próbki powietrza: 0,1 l; desorpcja termiczna	wypełnienie: metylopolisiloksan	limonen, p-cymen	[19]
GC-MS (zanieczyszczenia powietrza na składowisku)	dynamiczna; adsorbent Tenax TA, objętość próbki powietrza: 1,5 l; desorpcja termiczna	wypełnienie: fenylometylosilikon	węglowodory i ich chlorowcopochodne, związki poliaromatyczne	[20]
GC-FID (zanieczyszczenia powietrza na składowisku)	dynamiczna; adsorbent: CarbotrapCTM /Carbotrap B/CarbosieveSIII, objętość próbki powietrza: 3 l; desorpcja termiczna	BP-1	benzen, toluen, ksyleny, etylobenzen	[21]
GC-MS (zanieczyszczenia powietrza na składowisku)	1. pasywna; próbniiki pasywne GRADKO 2. pasywna; próbniiki pasywne RADIELLO; adsorbent: węgiel aktywny, czas ekspozycji: 2-15 dni 3. dynamiczna; adsorbent: węgiel aktywny, objętość próbki powietrza: 37-57 l; desorpcja rozpuszczalnikiem (CS ₂)	brak danych	benzen, toluen, ksyleny, etylobenzen, α-pinen, nonan	[22]
μGC-MS (zanieczyszczenia powietrza na składowisku)	dynamiczna; badania <i>in situ</i> : czas pobierania próbki 0,2 s	OV-1	benzen, toluen, ksyleny, etylobenzen, nonan, tetrachloroeten	[22]
μGC-PID (zanieczyszczenia powietrza na składowisku)	dynamiczna; badania <i>in situ</i> : czas pobierania próbki 20 s	Supelcowax 10™	benzen, toluen, ksyleny, etylobenzen, nonan, tetrachloroeten	[22]

Tabela 1. Ciąg dalszy
Table 1. Continuation

Metoda i cel badań	Technika pobierania i wzbogacania próbek	Stosowana kolumna	Oznaczone związki	Lit.
GC-MS (zanieczyszczenia powietrza na składowisku)	Technika pobierania i wzbogacania próbek dynamiczna; adsorbent: Carbotrap™ 300 - Tenax/CarbonisieveSIII/ Żel krzemionkowy; objętość próbki powietrza 10 l; desorpcja termiczna	HP-VOC	Oznaczone związki węglowodory i ich chlorowcopochodne, aldehydy, terpeny, związki poliaromatyczne	Lit. [23]

1. TECHNIKI POBIERANIA PRÓBEK POWIETRZA

Do pobierania próbek powietrza najczęściej stosuje się techniki połączone z równoczesnym wzbogacaniem analitów na odpowiednim sorbencie, co jest konieczne ze względu na ich niskie stężenia w powietrzu (zazwyczaj poniżej granicy wykrywalności stosowanych urządzeń analitycznych). Do takich technik należą:

- **metody dynamiczne** – polegają na przepuszczaniu strumienia badanej próbki powietrza przez rurkę z sorbentem, na którym zatrzymywane są anality, przy czym ruch powietrza jest wymuszony poprzez zastosowanie pompy aspiracyjnej [16]. Metody dynamiczne były dotychczas najczęściej stosowane do pobierania próbek powietrza z nadkładów [4, 5, 10, 15, 17–23];
- **metody pasywne** – zanieczyszczenia gazowe docierają do wnętrza próbniaka, dzięki samorzutnej dyfuzji lub permeacji, przez półprzepuszczalną membranę i tam ulegają zatrzymaniu na odpowiednim sorbencie [24]. Próbniki pasywne wykorzystane były w badaniach na nadkładach w Wielkiej Brytanii [18] i we Francji [22];
- **zastosowanie komory przepływowej** (ang. *flux chamber*). Do komory o ustalonej pojemności, ustawionej w miejscu pobierania próbki, doprowadzany jest strumień oczyszczonego na filtrze powietrza. Powoduje to wymuszenie ruchów powietrza w komorze i wymieszanie doprowadzonego gazu z gazami emitowanymi z badanej powierzchni. Mieszanka gazów jest następnie zasysana przez pompę, a anality są adsorbowane na odpowiednim typie adsorbentu [7]. Komorę przepływową wykorzystano do pobierania próbek powietrza z kompostowni w Belgii [11] i z nadkładu odpadów komunalnych w Izmirze w Turcji [5].
- **inne metody** pobierania próbek powietrza – jeżeli proces wzbogacania odbywa się w laboratorium, próbki powietrza pobiera się w terenie do worków o odpowiedniej pojemności, wykonanych z tworzyw sztucznych (np. Tedlar, Nalophan). Tak pobrane próbki przetransportowane do laboratorium mogą być następnie wzbogacane np. techniką mikroekstrakcji do fazy stałej (SPME). W technice tej anality obecne w ciekłej próbce lub w parach nad jej powierzchnią są adsorbowane na włóknie pokrytym odpowiednią fazą stacjonarną i zamkniętym w mikrostrzykawce. Zaadsorbowany analit jest przenoszony do dozownika chromatografu gazowego, gdzie następuje jego desorpcja termiczna [25]. Technika tę wykorzystano do wzbogacania analitów obecnych w powietrzu nad nadkładem we Włoszech [4].

2. STOSOWANE ADSORBENTY I UWALNIANIE ZATRZYMANEYCH ANALITÓW

Dobór odpowiedniego adsorbenta umożliwia proces zatrzymywania analitów oraz ich desorpcję z uzyskaniem wysokiego stopnia selektywności pobieranej próbki. Przy wyborze adsorbenta uwzględnia się jego pojemność sorpcyjną, stosowaną metodę desorpcji oraz możliwość zachodzenia zmian chemicznych zaadsorbowanych związków w czasie przechowywania próbki. Do wzbogacania związków organicznych obecnych w powietrzu nad składowiskami najczęściej stosuje się węgiel aktywny [1, 10, 22], węgiel grafityzowany (Carbotrap B i C) [18, 21, 23], sita węglowe (Carbosieve) [18, 21, 23], polimery porowate (Chromosorby, Tenaxy: TA, GC, GR) [1–3, 11, 17–20, 23], ditlenek krzemu w postaci żelu [26].

Zatrzymane na sorbencie związki uwalnia się następnie poprzez ekstrakcję rozpuszczalnikiem (z węgla aktywnego) lub poprzez desorpcję termiczną (z sorbentów: Carbosieve, Tenax, Chromosorb). Desorpcja z użyciem rozpuszczalnika, którym jest najczęściej disiareczek węgla, jest techniką prostą, dającą możliwość powtórzeń oznaczeń, jednak jej wadą jest konieczność stosowania niektórych toksycznych rozpuszczalników oraz ryzyko straty analitów podczas desorpcji i rozcieńczeń. W badaniach lotnych związków organicznych częściej korzysta się z desorpcji termicznej, gdzie próbka nie jest rozcieńczana, a cały proces odbywa się automatycznie w desorberze [27].

3. KOLUMNY CHROMATOGRAFICZNE I DETEKTORY

Do analizy lotnych związków organicznych stosuje się głównie kolumny kapilarnie z wypełnieniem niepolarnym lub słabo polarnym. Są to najczęściej fazy ciekłe: metylosilikony (polisiloksany) (OV-1, HP-1, BP-1) [6, 11, 17–19, 21, 22], fenylometylosilikony (CP-Sil-8 CB, DB-5, HP-5) [1–4, 10, 15, 20], fazy przeznaczone do oznaczeń związków lotnych (HP-VOC, DB-502) [19, 23], glikol polietylenowy (Supelcowax-10) [22] oraz adsorbenty organiczne: polistyren-diwinilobenzen (PORA Plot Q) [4]. W celu lepszego rozdzielenia chromatografowanych substancji, analizę prowadzi się przy programowanej temperaturze termostatu kolumny (przeważnie od 35°C do 240°C).

Do detekcji wykorzystuje się następujące detektory: płomieniowo-jonizacyjny (FID) [1, 5, 11, 18, 21], foto-jonizacyjny (PID) [19, 22] oraz płomieniowo-fotometryczny do analizy związków siarki (FPD-S) [5]. Identyfikacja związków rozdzielonych na kolumnie i trafiających do danego detektora odbywa się zazwyczaj przez porównanie ich czasów retencji z czasami retencji odpowiednich wzorców.

4. WARIANTY CHROMATOGRAFII GAZOWEJ

4.1. SPRZEŻENIE CHROMATOGRAFII GAZOWEJ ZE SPEKTROMETRIĄ MAS (GC-MS)

Sprzeżenie GC-MS pozwala na pełną analizę jakościową i ilościową powietrza zanieczyszczonego lotnymi związkami organicznymi: związki rozdzielone na kolumnie chromatograficznej trafiają do spektrometru mas, który dokonuje ich identyfikacji na podstawie widm masowych, czyli zapisu intensywności występowania poszczególnych jonów w funkcji ich masy. Identyfikację tą ułatwiają biblioteki widm masowych związków (Wiley, NIST), dostępne wraz z odpowiednim oprogramowaniem komputerowym. Wykres całkowitego prądu jonowego (ang. *Total Ion Current*), w funkcji czasu retencji, jest chromatogramem masowym (TIC, ang. *Total Ion Chromatogram*), podobnym do klasycznego chromatogramu i stanowi podstawę analizy ilościowej.

W sprzeżeniu GC-MS wykorzystuje się odpowiednio przystosowane chromatografy gazowe. Modyfikacja dotyczy głównie kolumn – do analizy metodą GC-MS stosuje się specjalne kolumny, na przykład HP-5 MS, które zazwyczaj zawierają usieciowane fazy ciekłe. Najważniejszym urządzeniem w sprzeżeniu GC-MS jest interfejs – element łączący chromatograf gazowy ze spektrometrem mas. Jego zadaniem jest redukcja ciśnienia gazu nośnego (w chromatografii gazowym rzędu 100 kPa, w spektrometrze mas – 0,01 Pa), przez jego częściowe usunięcie, przy jak najmniejszych stratach analitu. W sprzeżeniu GC-MS jonizacja cząsteczek odbywa się najczęściej za pomocą strumienia elektronów (EI), zaś jako analizator jonów przeważnie jest stosowany analizator kwadrupolowy [28].

Obecnie tę technikę głównie używa się do oznaczeń gazowych zanieczyszczeń powietrza w obiektach gospodarki komunalnej [1–4, 6, 10, 11, 15, 17–20, 22, 23].

4.2. MIKROCHROMATOGRAFIA GAZOWA (μ GC)

Do analiz zanieczyszczeń powietrza *in situ* służą także przenośne miniaturowe chromatografy i mikrochromatografy gazowe [29, 30]. Urządzenia te umożliwiają pomiar stężeń analizowanych substancji w bardzo małych próbkach analitycznych, dzięki znacznemu zmniejszeniu rozmiarów układu przepływowego. W mikrochromatografach gazowych stosowane są odpowiednio przystosowane kolumny kapilarne o długości zazwyczaj do 10 m i małej średnicy wewnętrznej. Zaletą metody jest krótki czas analizy (rzędu kilku minut), niewielkie zużycie odczynników i samej próbki oraz brak konieczności transportu pobranych próbek do laboratorium, co pozwala uniknąć ryzyka ich zanieczyszczenia lub rozkładu. Dzięki niewielkiemu czasowi trwania całej procedury analitycznej, rezultaty otrzymuje się w czasie rzeczywistym, co jest szczególnie przydatne przy obserwacji zmian stężeń wybranych związków w pomiarach ciągłych [30].

Miniaturyzacja układu pomiarowego wprowadza jednak pewne ograniczenia, przede wszystkim brak możliwości zastosowania niektórych detektorów oraz programowanej temperatury termostatu kolumny. Jako detektory wykorzystywane są najczęściej FID, PID i TCD. Powoduje to, iż granica wykrywalności związków uzyskiwana w μ GC jest zazwyczaj wyższa, w porównaniu z klasyczną chromatografią gazową. Z reguły więc tego typu urządzenia używane są do analizy ograniczonej ilości związków, np. wybranych zanieczyszczeń powietrza. W skład zestawu do analizy *in situ* metodą μ GC może wchodzić również specjalna przystawka do wzbogacania – przenośny desorber termiczny. Umożliwia on pobranie próbki powietrza z równoczesną adsorpcją analitów na adsorbencie, następnie ich desorpcję termiczną i dozowanie próbki do chromatografu. Całkowity cykl pracy tego typu urządzeń jest zwykle nie dłuższy niż 10 minut [6, 22].

Przenośne chromatografy i mikrochromatografy gazowe używane były do analizy *in situ* na składowiskach w Belgii [19], Francji, [6, 22] i Włoszech [4]. W tym ostatnim przypadku, do wzbogacania analitów zastosowano przystawkę SRA CONVOY. W badaniach tych oznaczenia odorantów prowadzono zarówno metodą klasycznej chromatografii gazowej, jak i metodą μ GC *in situ* na składowisku. Otrzymane wyniki stężeń związków były porównywalne. Zaobserwowano natomiast znaczne różnice rezultatów pochodzących z analiz z użyciem różnego typu mikrochromatografów (μ GC AGILENT i PHOTOVAC VOYAGER), wynikające przede wszystkim z różnic w czasie pobierania próbek powietrza (0,2 s i 20 s) i czułości stosowanych przyrządów [22].

4.3. SPRZĘŻENIE CHROMATOGRAFII GAZOWEJ Z OLFAKTOMETRIĄ (GC-ODP)

Detektorem w chromatografii gazowej może być także specjalny port olfaktometryczny (ang. *olfactometry detection port*, ODP), który dostarcza informacji o natężeniu zapachu pochodzącego od konkretnego związku. Technika ta jest szczególnie przydatna do analizy związków organicznych odpowiedzialnych za powstawanie nieprzyjemnych zapachów. Podczas analizy, próbka mieszaniny zawierającej odoranty dozowana jest do chromatografu gazowego, gdzie następuje jej rozdzielanie na poszczególne substancje. Eluat z kolumny, po jej opuszczeniu, jest dzielony na dwa strumienie: pierwszy trafia do tradycyjnego detektora (np. MS lub FID), drugi kierowany jest do portu ODP, gdzie następuje analiza sensoryczna próbki. Grupa oceniających ma za zadanie ocenić rodzaj zapachu, jego jakość hedoniczną oraz oszacować jego intensywność. Wszystkie wskazania grupy oceniających są rejestrowane (tworzony jest tzw. aromagram) i następnie porównywane z wynikami analizy GC-MS lub GC-FID. Porównanie sygnałów z detektora MS lub FID (zidentyfikowany związek chemiczny) z informacją dostarczoną na podstawie analizy sensorycznej (rodzaj i intensywność zapachu) pozwala na ustalenie, które ze związków charakteryzują się zapachem, jaki jest jego typ i natężenie [31]. Technika GC-ODP służy do badań mieszanin gazowych posiadających zapach [32] i znalazła zastoso-

wanie w analizie żywności, środków zapachowych, w tym także próbek środowiskowych z hodowli zwierząt, oczyszczalni ścieków, składowisk odpadów komunalnych i zakładów przemysłowych [33]. Metoda ta jest wykorzystywana do badań odorantów obecnych w próbkach gazu wysypiskowego na francuskim składowisku odpadów komunalnych [1]. W przeprowadzonych badaniach rezultaty analizy olfaktometrycznej uzupełniły identyfikację związków przeprowadzoną za pomocą detektora FID. Grupa oceniających zapachy z użyciem olfaktometru dodatkowo wskazała związki, które nie zostały zidentyfikowane metodą GC-FID, a zostały rozdzielone na kolumnie chromatograficznej. Były to substancje, które mają niskie progi wyczuwalności węchowej, niższe niż granica wykrywalności stosowanego detektora FID.

PODSUMOWANIE

Monitorowanie zanieczyszczeń powietrza powodowanych przez działalność obiektów gospodarki komunalnej jest szczególnie ważne ze względu na zagrożenie, jakie niesie ze sobą obecność tych substancji w powietrzu. W tym celu stosuje się szereg metod badawczych, umożliwiających skuteczne kontrolowanie poziomu gazowych zanieczyszczeń w powietrzu. Jedną z takich metod jest chromatografia gazowa, która – w połączeniu z odpowiednimi technikami pobierania i wzbogacania próbek – okazała się szczególnie przydatnym narzędziem do analizy lotnych związków organicznych. Na szczególną uwagę zasługują również techniki łączone, jak np. GC-ODP, które nie tylko pozwalają oznaczyć wybrane związki organiczne w powietrzu, ale także zebrać informacje na temat ich profilu zapachowego.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] R. Lornage, K.K. Kleeberg, R. Stegmann, T. Lagier, J. Carre, *Investigation on volatile organic compounds (VOC) and odorous emissions during solid waste treatment: implementation of different analytical methods*, [w:] Proceedings of 10th International Waste Management & Landfill Symposium, Sardinia, 2005.
- [2] F. Dincer, M. Odabasi, A. Muezzinoglu, *J. Chromatogr. A*, 2006, **1122**, 222.
- [3] F. Dincer, A. Muezzinoglu, *Atmos. Environ.*, 2006, **40**, 4210.
- [4] E. Davoli, M.L. Gangai, L. Morselli, D. Tonelli, *Chemosphere*, 2003, **51**, 357.
- [5] A. Muezzinoglu, *Chemosphere*, 2003, **51**, 245.
- [6] R.E. Chiriac, R. Lornage, L. Fine, J. Carre, J.L. Gass, T. Lagier, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 2007, **87**, 43.
- [7] C. Rognon, L. Pourtier, *Techniques de l'Ingénieur. Traité Environnement*, 2001, G 2940, 1.
- [8] J. Kośmider, B. Mazur-Chrzanowska, B. Wyszyński, *Odory*, PWN, Warszawa 2002.
- [9] F. Biasioli, F. Gasperi, G. Odorizzi, E. Aprea, D. Mott, F. Marini, G. Autiero, G. Rotondo, T.D. Märk, *Int. J. Mass Spectrom.*, 2004, **239**, 103.
- [10] M. Schlegelmilch, J. Streese, W. Biedermann, T. Herold, R. Stegmann, *Waste Manag.*, 2005, **25**, 917.

- [11] N. Defoer, I. De Bo, H. van Langenhove, J. Dewulf, T. van Elst, J. Chromatogr. A, 2002, **970**, 259.
- [12] F.-B. Frechen, [w:] *Landfilling of Waste: Biogas*, T.H. Christensen., R. Cossu, R. Stegmann, E&FN Spon, London 1996, 200.
- [13] P. Ciosek, W. Wróblewski, [w:] *Nowoczesne techniki analityczne*, red. M. Jarosz. Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 2006, 351.
- [14] A.S. Yuwono, P. Boeker, P. Schulze Lammers, Anal. Bioanal. Chem., 2003, **375**, 1045.
- [15] A.-C. Romain, D. Godefroid, J. Nicolas, Sens. and Actuators B Chem., 2005, **106**, 317.
- [16] W. Wardencki, J. Namieśnik, [w:] *Nowe horyzonty i wyzwania w analityce i monitoringu środowiskowym*, red. J. Namieśnik, W. Chrzanowski, P. Szpinek, Centrum Doskonałości Analityki i Monitoringu Środowiskowego, Gdańsk 2003, 526.
- [17] K.J. James, M.A. Stack, Chemosphere, 1997, **34**, 1713.
- [18] J. Leach, A. Blanch, A.C. Bianchi, Atmos. Environ., 1999, **33**, 4309.
- [19] A. Termonia, M. Termonia, Int. J. of Environ. Anal. Chem., 1999, **73**, 43.
- [20] G. Fernández-Martínez, G. López-Mahía, S. Muniategui-Lorenzo, D. Prada-Rodríguez, E. Fernández-Fernández, Water Air Soil Pollut., 2001, **129**, 267.
- [21] K.-H. Kim, M.-Y. Kim, Atmos. Environ., 2002, **36**, 2433.
- [22] J.M. Baldasano, J. Carre, R. Chiriac, S. Gasso, D. Juc Lambelet, A. Loga, Y. Perrodin, Pollution Atmosphérique, 2002, **176**, 541.
- [23] S.C. Zou, S.C. Lee, C.Y. Chan, K.F. Ho, X.M. Wang, L.Y. Chan, Z.X. Zhang, Chemosphere, 2003, **51**, 1015.
- [24] J. Namieśnik, [w:] *Nowe horyzonty i wyzwania w analityce i monitoringu środowiskowym*, red. J. Namieśnik, W. Chrzanowski, P. Szpinek, Centrum Doskonałości Analityki i Monitoringu Środowiskowego, Gdańsk 2003, 1.
- [25] B. Buszewski, M. Ligor, T. Ligor, [w:] *Miniaturyzacja w analityce*, red. Z. Brzózka, Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 2005, 13.
- [26] P.V. Doskey, [w:] *Chromatographic analysis of the environment*, ed. L.M.L. Nollet, 3rd Edition, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton 2006, 617.
- [27] N.M. García, L.M.L. Nollet, [w:] *Chromatographic analysis of the environment*, ed. L.M.L. Nollet, 3rd Edition, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton 2006, 513.
- [28] A. Kraj, [w:] *Spektrometria mas*, red. P. Suder, J. Sillberring, Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków 2006, 161.
- [29] A. Hulanicki, *Współczesna chemia analityczna. Wybrane zagadnienia*. PWN, Warszawa 2001.
- [30] Ya.I. Yashin, A. Ya. Yashin, J. Anal. Chem., 2001, **56**, 794.
- [31] G. Reineccius, *Flavor Chemistry and Technology*, 2nd edition, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton 2006.
- [32] A.-M. Siouffi, [w:] *Chromatographic analysis of the environment*, ed. L.M.L. Nollet, 3rd Edition, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton 2006, 177.
- [33] K.K. Kleeberg, Y. Liu, M. Jans, M. Schlegelmilch, J. Streese, R. Stegmann, Waste Manag., 2005, **25**, 872.

FELIETON NAUKOWY



**OKRUCHY. VI.
WYNAŁAZCY Z NIEPOSPOLITEJ RODZINY**

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 trzech się habilitowało. Autor 8 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.

Mieszkającą w Krzywiczach, w powiecie wilejskim, rodzinę Chodzków trudno nie nazwać rodziną niepospolitą. Ojciec, Jan Chodźko, (1777–1851), był cenionym w swoim czasie pisarzem i działaczem społecznym. Dwanaście tomów jego „Dzieł” wydano w Wilnie w roku 1837. Był patriotą polskim. W roku 1826 władze carskie kazały go wywieźć w głąb Rosji i dopiero „po długiej niewoli” powrócił do kraju. Ponownie wywieziono go po wybuchu Powstania Listopadowego [1]. Miał on sześciu synów. Trzech spośród nich wymieniają liczne encyklopedie. O dwóch zapomniano. A przecież dawniej byli oni bardzo cenionymi wynalazcami, wyróżnionymi licznymi patentami i odznaczeniami. Dodajmy, że Uruski [2] obydwu wymienił jako chemików. Zaczniemy więc od krótkiego przypomnienia kolei życia braci Chodzków.

Najstarszy z nich, Józef (1800–1881), ukończył ze stopniem magistra (w 1820 roku) Wydział Matematyczno-Fizyczny Uniwersytetu Wileńskiego. W czasie studiów należał do takich organizacji studenckich, jak „Towarzystwo Sześciu” – „Związek Przyjaciół”, a od grudnia 1820 r. – Towarzystwo Filomatów. W roku 1821 wstąpił do wojskowej służby topograficznej. Brał udział w pomiarach triangulacyjnych w guberniach wileńskiej, grodzieńskiej, mińskiej i kurlandzkiej. Uczestniczył w działaniach przygotowujących powstanie. Przewidywano go na dowódcę powstania w Wilnie. Ale musiały o tym wiedzieć i władze wojskowe, bo w marcu 1831 roku, rozkazem szefa sztabu generalnego generała Czernyszewa został odwołany ze Żmudzi i oddany pod ścisły nadzór. Dalsze lata służby wojskowej spędził daleko od stron rodzinnych. Prowadził pomiary triangulacyjne w Mołdawii, na Wołoszczyźnie, w okolicach Bosforu i, wreszcie, na Kaukazie. Karierę wojskową zakończył jako generał-porucznik służby topograficznej. Za zasługi naukowe Cesarskie Rosyjskie Towarzystwo Geograficzne obdarzyło go (w r. 1860) wielkim medalem, a w roku 1871 nadało mu godność członka honorowego. Był też jednym z pierwszych polskich alpinistów. W roku 1850 zdobył szczyt Araratu [3]. Zdobył też szczyty Ałagez (4005 m) i Ziłga-Choch (3857 m). Club Alpin Français nadał mu godność członka honorowego. (Por. pozycja [5] piśmiennictwa).

Drugim z kolei synem Jana Chodźki był, jak się wydaje, Stanisław. Piszemy tu „jak się wydaje”, bo dokładnej daty urodzenia Stanisława nie udało się ustalić (zmarł w Paryżu, 1880). W każdym razie on też studiował na Uniwersytecie Wileńskim. Przyjaciół Aleksandra Chodźki, Antoni Edward Odyniec (1804–1885), wspominał bowiem, że „mieszkał on osobno, wraz dwoma starszymi braćmi” [4]. Aleksander Chodźko urodził się w 1804 roku. Stanisław to jeden z dwóch zapomnianych wynalazców, wspomnianych na wstępie. Więcej opowiemy o nim później, a teraz kilka słów o Aleksandrze. Aleksander Chodźko (1804–1891) kształcił się w Wilnie, a potem w Instytucie Wschodnim, w Petersburgu. W Wilnie był ulubionym uczniem Tomasza Zana, niekwestionowanego przywódcy studentów wileńskich. Szereg lat pracował w dyplomatycznej służbie rosyjskiej w Persji, był znawcą języka i piśmiennictwa perskiego, potem został profesorem literatur słowiańskich w Collège de France w Paryżu. Był autorem licznych prac z iranistyki, pisanych po francusku i tłumaczonych na inne obce języki. Działacz emigracji polskiej, był m.in. członkiem rady

szkoły polskiej w Batignolles. Na kilka lat przed śmiercią prowadził w Paryżu szkołę dla studiującej we Francji młodzieży perskiej. Kawaler Legii Honorowej [5, 6].

Najmłodszy, jak się wydaje, z braci, Michał (1807–1879), poeta i publicysta, odznaczał się wielką aktywnością, jako działacz emigracyjny. Był zwolennikiem demokratycznej części Wielkiej Emigracji, współpracownikiem i przyjacielem Adama Mickiewicza. Uczestnik (w 1833 roku) wyprawy Zaliwskiego, której zadaniem było ponowne rozpalenie powstania na ziemiach polskich, jej niepowodzenie przypisywał knowaniom Czartoryszczyków [7]. „Poznaje lud polski – pisał w swoim sprawozdaniu z wyprawy – te prawdę, poznał już w większej części stan szlachecki, że przywileje, z którymi rodzi się człowiek, ustąpić muszą świętym, dawniejszym prawom, to jest wszechwładztwu Ludu, które żadnych stanów nie cierpi” [8]. W czasie Wiosny Ludów współorganizował Legion Polski we Włoszech. Działania te opisał w oddzielnym druku [9].

Piąty z braci, Napoleon Feliks, to drugi z Chodźków – wynalazców. Tak jak Stanisław i Michał, znalazł się po powstaniu na emigracji. Mieszkał w Paryżu, a opisy swoich wynalazków sygnował jako inżynier prywatny (*ingénieur civil*). Nie znamy okoliczności, w jakich uzyskał prawo używania takiego tytułu. Z wykształcenia był prawdopodobnie prawnikiem, bo przed Powstaniem Listopadowym pracował jako sędzia. Nie są też znane daty jego urodzenia i śmierci. Interesujący ślad jego działań emigracyjnych zanotował Domeyko. W czasie obchodu rocznicy powstania, w roku 1833, wywołał on skandal, wygwizdując przemówienie Niemcewicza [10].

Trzeba tu teraz pokrótce opisać drogi, jakie prowadziły braci na emigrację. Trzej z nich, Stanisław, Napoleon Feliks i Michał, wzięli udział w powstaniu na Litwie, w 1831 roku. Pewne szczegóły o ich powstańczej służbie znaleźć można w „Zbiorze pamiętników o powstaniu Litwy”, wydanym w 1875 roku [11]. Powstanie zaczęło się na Żmudzi w dniu 25 marca. W pierwszych dniach kwietnia objęło powiaty leżące między Wilnem a Grodnem. W dniu 4 kwietnia powstała Oszmiana. Stąd wysłano do sąsiedniego powiatu wilejskiego mały oddział konny pod dowództwem Michała Chodźki. Byli w nim także dwaj inni bracia-powstańcy. Oddział ten 14 kwietnia zajął Wilejkę, rozbrajając miejscowy garnizon rosyjski. Utworzoną tam siłą zbrojną dowodził były pułkownik, St. Radziszewski. Bracia Chodźkowie znaleźli się w oddziale konnym, pod komendą Aleksandra Wołodkiewicza. Pod naciskiem wojsk rosyjskich powstańcy 24 kwietnia opuścili Wilejkę. Radziszewski poprowadził ich, wśród ciągłych utarczek, w kierunku na Wiłkomierz. 21 maja doszło do boju pod Koczergiszkami, w którym jazda Wołodkiewicza szarżowała na kawalerię rosyjską. Niedługo potem, w Czebiszkach, doszło do połączenia się powstańców z wydzielonym korpusem generała Chłapowskiego, który ruszył z Królestwa na pomoc powstaniu. Chłapowski utworzył z piechoty Radziszewskiego 26 pułk piechoty liniowej, a konnicę przeorganizował w 12 pułk ułanów. Chodźkowie uzyskali tam szarże oficerskie: Michał kapitana, Feliks porucznika, a Stanisław podporucznika. Pułkiem dowodził major Jan Giedroyć. W bitwie o Wilno (19 czerwca) pułk

stał w rezerwie [12]. Potem, z całym wojskiem, pod dowództwem gen. Giełguda, ruszył w składzie brygady jazdy litewsko-żmudzkiej na Żmudź. Kiedy wojsko podzielono na trzy kolumny, pułk znalazł się w najdłuższej walczącej kolumnie gen. Rohlanda. 14 lipca wziął udział w bitwie pod Powendeniami, a 13 lipca w bitwie pod Nowym Miastem Żmudzkiem. Tam zginął w boju dowódca pułku, a jego następcą mianowano awansowanego do stopnia majora Karola hr. Załuskiego. I to był już koniec wojaczki braci Chodzków. Wojsko złożyło w Prusach broń. Michał przeszedł do Prus z Giełgudem 13 lipca, Stanisław (a zapewne i Feliks) z Rohlandem – 15 lipca. Drogę do kraju mieli zamkniętą. Komisja śledcza zaliczyła Michała i Stanisława do grupy przestępców drugiej kategorii [13]. Cała trójka braci znalazła się początkowo (w grudniu 1831 roku) w 6 kompanii obozu polskich wojskowych w Besançon. W roku 1832 Stanisław i Feliks uzyskali prawo pobytu w Paryżu i przebywali tam i w roku 1833 [14]. Feliks wyjechał potem na krótko do Brukseli. Później przebywał w Limoges (lata 1841–1846) i znów w Paryżu. Ożenił się z Francuzką. Nie miał dzieci. Stanisław mieszkał w Paryżu, gdzie był członkiem Komitetu Narodowego Polskiego i Zjednoczenia Emigracji Polskiej. W roku 1842 wyjechał do Limoges, później do szwajcarskiego Fryburga, gdzie był nauczycielem chemii i fizyki.

Jak powiedzieliśmy na wstępie, Stanisław i Napoleon Feliks Chodźkowie byli cenionymi wynalazcami. Stanisław przebywał we Fryburgu, jako nauczyciel chemii i fizyki tamtejszego liceum kantonalnego. Fryburg był wtedy niewielkim miastem, liczącym około 10 tys. mieszkańców. Ludność była francuskojęzyczna i w większości rzymsko-katolicka. Trwały tam zawzięte spory pomiędzy partią jezuicko-konserwatywną i partią liberalną. W roku 1848 przyjęto konstytucję liberalną i w latach 1848, 1850 i 1851 organizowano przeciwko niej powstania. Nie wiemy, czy Chodźko brał udział w tych wydarzeniach. Dopiero w 1857 roku odwołano dekret o zniesieniu klasztorów, a w roku 1889 utworzono we Fryburgu katolicki uniwersytet, gdzie pracowało wielu Polaków. Liceum kantonalne było kontynuacją Jezuickiego Kolegium, istniejącego od 1580 roku [15]. Chodźko pracował więc w szkole o bogatych tradycjach, aczkolwiek nie mającej statusu szkoły wyższej. W poznańskim czasopiśmie pt. „Goniec polski” z roku 1851 ukazał się artykuł o „wynalazku chemicznym” Chodźki [16]. Doniesienie poznańskie oparte było na artykule z miejscowego dziennika „Confédéré de Fribourg”, z dnia 24 maja tego roku. Czytamy tam, że 18 marca licznie zgromadzeni widzowie, w obecności władz municypalnych, byli świadkami zastosowania nowego rodzaju oświetlenia wynalezionego przez Stanisława Chodźkę. W płomieniu wodoru umieszczał on „knot z drutu platynowego, co dawało światło jasno-białe, przewyższające światło, jakie gaz wodorodno-węglisty daje”. „Pan Chodźko – czytamy dalej w tym artykule – jasnym płomieniem tego gazu dostatecznie oświecał przedsionek gmachu licealnego”. „Szczególny entuzjazm zebranych wywołały próby barwienia płomienia za pomocą pewnych ciał chemicznych na zielono, żółto, czarno, etc.”. „Powszechne zadowolenie doszło swego szczytu wtedy, kiedy pan Chodźko włożywszy w płomień purpurowy krzyż biały, przedstawił (...) nasz herb federalny” [16].

W artykule rozważano możliwości oświetlenia w ten sposób całego miasta. Zdaniem autora, w tym celu wystarczyłoby zbudować trzy stacje wytwarzania wodoru, umieszczone w piwnicach liceum i szkoły żeńskiej. Informował też autor artykułu, że podobne do czynionych przez Chodźkę próby prowadzi się aktualnie w Paryżu i Londynie, ale wynalazek Chodźki jest w pełni oryginalny.

Dodajmy, że podobne oświetleniowe pomysły sprawdzano podówczas w Europie dość szeroko. Jeszcze Davy obserwował świecenie blaszki platynowej w strumieniu płonącego wodoru. W roku 1829 Berzelius odkrył, że tlenki toru i cyrkonu świecą jasnym światłem w płomieniu wodorowo-tlenowym. Na rok 1826 przypadło odkrycie „światła Drummonda” (Thomas Drummond, 1797–1840) – Drummond użył do tego celu płomienia wodorowo-tlenowego, przechodzącego przez rozżarzony walec kredowy. Te pomysły były jednak za drogie, by je powszechnie zastosować, zresztą, jak zapewne i pomysł Chodźki.

Opisane tu wydarzenie przypadło na rok 1851. Jak stąd wynika, Chodźko przebywał wówczas we Fryburgu. Tam też prawdopodobnie rozpoczął prace nad swoim wynalazkiem życia – sposobem na utylizację ścieków komunalnych, połączonym z produkcją nawozu mineralnego, który Chodźko nazwał „nawozem atmosferycznym”. Zachowało się sporo materiałów dotyczących tego wynalazku. Przede wszystkim – wydana w roku 1858 w Paryżu rozprawa pt. „*Mémoire sur la production de l’engrais atmosphérique et de la désinfection des habitations*” (Rozprawa o wytwarzaniu nawozu atmosferycznego i o dezynfekcji mieszkań) [17]. Prócz tego, w „Materiałach dotyczących sfinansowania wynalazku nawozu atmosferycznego”, przechowywanych w Bibliotece Kórnickiej, zachował się raport, pisany dla generała Wł. Zamoyskiego, na temat kosztów produkcji nawozu (*Rapport à Mr. le Gen. l Comte Zamoyski sur l’engrais complet, dit atmosphérique, obtenu avec les eaux vannes ou la matière première pour l’extraction des sels ammoniacaux et du phosphore*), a także dwa druki ulotne, najwidoczniej reklamowego charakteru. Dla nas szczególnie ważny był druk pt. „*Désinfection des fosses d’aisance. Systeme Chodźko*” [18].

Jak pisał Chodźko w cytowanej wyżej rozprawie, prace nad wynalazkiem zabrały mu 14 lat. Stąd wynika, że rozpoczął je w roku 1844, a więc podczas pobytu we Fryburgu. Istotą wynalazku było przetwarzanie zawartych w ściekach soli na fosforan amonowo-magnezowy, sprzedawany jako nawóz. Do wydzielenia tego związku zastosował Chodźko technikę zateżnienia ścieków w tężniach, którą wypróbował na dużą skalę w doświadczalnej fabryce, zbudowanej przy obozie wojskowym w Châlon-sur-Marne. Opracowaną procedurę rozszerzył Chodźko na sprawę dezynfekcji rowów asenizacyjnych, co, zgodnie z przytaczanymi w cytowanych materiałach oświadczeniami użytkowników, w pełni się udało. Swoją metodą próbował Chodźko zainteresować takich uczonych, jak J.B. Dumas (1800–1884) i J.B. Boussingault (1802–1882). Ten ostatni, znany jako jeden z twórców agrochemii, w istotny sposób pomógł Chodźce. W roku 1860 spowodował wykonanie chemicznych analiz nawozu Chodźki. Przeprowadzili je, niezależnie od siebie, Lhote ze Szkoły Sztuk i Rzemiosł oraz Magnon-Hervé z Cesarskiej Szkoły Dróg i Mostów. Profesor Mag-

non określił zawartość azotu w nawozie na 4,2%, a kwasu fosforowego na 4,48%. Wyniki p. Lhote były bardzo podobne. Analizę Magnon-Hervé opublikowano, w „Annales de Chimie et Physique” (1860, T. 9, seria 3).

Boussingault wszedł również w skład komisji, która w maju 1860 roku oceniała wynik doświadczeń Chodźki nad dezynfekcją rowów kanalizacyjnych w Pentin.

Koleje swoich starań o poparcie swoich badań przez władze municypalne przedstawił Chodźko w cytowanej wyżej ulotce. Ten krótki tekst warto tu zaprezentować w całości:

„Dezynfekcja rowów asenizacyjnych.

System Chodźko – 6 rue Oudinot

W styczniu 1857 r. p. Stanisław Chodźko, profesor chemii w Paryżu, ul. Oudinot 6, miał zaszczyt przedłożyć Panu Prefektowi departamentu Seine pracę opisową odkrytego przez siebie procesu, który umożliwi dezynfekcję rowów asenizacyjnych i zmianę płynnych ścieków w nawóz atmosferyczny przedniej jakości.

Przesławszy rozprawę p. Prefektowi, po jednej kopii przesłał panu Belgrand, głównemu inżynierowi Miejskich Służb Wodociągów i Ścieków Paryża i panu Dumas, profesorowi chemii. Kilka dni później (27 stycznia) p. Belgrand odpowiedział panu Chodźko, że jego pomysł ocenia jako nowatorski, praktyczny i nadający się do wdrożenia na masową skalę, ale zważywszy, że pod tym względem nie został wypróbowany, istnieje obawa, iż cena uzyskiwanego nawozu będzie dla rolników zbyt wysoka.

Pan Prefekt odpowiedział 31 marca, że rozprawę p. Chodźko przekazał inżynierom służb miejskich, aby sprawdzili, czy używane do dezynfekcji gazy chlorowodorowe i siarkowe nie są szkodliwe dla, jakby nie było, gęsto zaludnionej strefy miasta i dla wymagających konserwacji brzegów samych rowów. Jednym słowem: konieczne są badania na dużą skalę, a miasto Paryż nie jest w stanie ich wesprzeć finansowo, ani jako projektu, który wciąż wymaga potwierdzenia praktycznego, ani jako budowy fabryki doświadczalnej.

P. Chodźko wystąpił zatem o powołanie komisji, która oceniłaby jego odkrycie i ustosunkowała się do obaw p. Prefekta. Oczekując na mianowanie komisji, p. Chodźko podjął się na prośbę władz lokalnych Fribourga dezynfekcji rowów asenizacyjnych i odstożników miejskiego liceum. Następnie wrócił do Paryża i zajął się dezynfekcją rowu ściekowego na terenie posiadłości p. Teste przy ul. Honoré-Chevalier 4. Dezynfekcje przeprowadzono w środku lata, a jednym z jej celów było sprawdzenie w praktyce, czy obawy wyrażone w piśmie p. Prefekta z 31 marca są słuszne. Świadczenia mieszkańców okolicznych domów i ich właściciele potwierdzają, że nie tylko zniknęły brzydkie zapachy, ale też, że nie stwierdzają żadnych szkód ani w rowach, ani w domach.

Powodzenie wszystkich dotychczasowych prób zachęciło p. Chodźkę do wystąpienia z prośbą do Prefektury Paryża o wyznaczenie do dezynfekcji jednego z rowów publicznych. Oczekując na decyzję, p. Chodźko rozpoczął budowę fabryki w Orleanie. Fabryka funkcjonuje i jak potwierdzają kompetentne urzędy lokalne, nie roz-

siewa żadnych uciążliwych zapachów, nie powoduje uszkodzenia rowów lub zbiorników, a więc rozprasza zasadnicze obawy p. Prefekta.

Wreszcie, 17 stycznia 1859 r. p. Chodźko otrzymał odpowiedź p. Grosjean, że zarząd oczyszczania miasta oddaje mu do dyspozycji rów ściekowy z latryn publicznych przy nabrzeżu Megisserie. Rów opróżniono, a począwszy od 12 kwietnia do 12 lipca p. Chodźko stosował tam swoją metodę dezynfekcji. Wynik był taki, że mieszkańcy dzielnicy i osoby ich odwiedzające nie kryły zdziwienia i zadowolenia. Powszechna aprobata nie ucieszyła p. Chodźkę, który nie doczekawszy się powołania żadnej komisji specjalnej, napisał do uznawanego za autorytet naukowy p. Bous-singault, prosząc go, aby zechciał przybyć na miejsce i wyrazić swoją opinię. P. Boussingault był uprzejmy przyjęć zaproszenie i przybył w towarzystwie p. Fourneyron, głównego inżyniera zarządu dróg i członka komitetu oczyszczania miasta Paryża. W pisemnym raporcie z tej wizyty nie ukrywa zdziwienia, że w środku wyjątkowo upalnego lata rów publiczny, choć wypełniony fekaliami, nie wydziela żadnego nieprzyjemnego zapachu.

Wszystkie te fakty jednoznacznie potwierdzają, że system dezynfekcji autorstwa p. Chodźko działa i daje zadawalające pod każdym względem rezultaty, osią-gane przy niewielkich, moim skromnym zdaniem, nakładach. Bez żadnych obaw władze lokalne mogą wybrać metodę dezynfekcji najlepiej służącą i mieszkańcom i właścicielom miejsc wymagających asenizacji”.

Jak każda poważna inicjatywa, metoda Chodźki wymagała na początku dużych nakładów. Wobec niechęci władz municypalnych, usiłował więc Chodźko uzyskać pomoc od rodaków, a zwłaszcza generała Władysława Zamoyskiego. W nawiązaniu kontaktu z generałem pomagał mu rodak, Leonard Niedźwiecki. W cytowanym zbiorze Biblioteki Kórnickiej zachowało się kilka listów Chodźki do Niedźwieckiego, z lat 1860–1867. W liście z 14 października 1860 roku pisał więc Chodźko: „Teraz, szanowny Panie Leonardzie, dobrze byłoby, żebyś sam się przekonał, że pożyczka tysiąca franków, do której dołożyłeś nie mało Twego wpływu, wydała niesłychane owoce...” List ten pisał Chodźko z Chalons, gdzie właśnie uruchomił doświadczalną fabrykę swojego nawozu. Ale pieniędzy musiało ciągle brakować. Bo kilka lat później (24 grudnia 1864 r.) znów zabiegał o pomoc. „Błagam także szanownego Pana Leonarda – pisał – wstawić się za mną do P. Hrabiego Jana (? I.S.) Zamoyskiego, żeby raczył pozwolić przysłać mu drugi bilet na 1000 F.” W tym samym liście donosił, że „nowy i pewny wynalazek, jak wypróbowany, pozwala ulepszyć i powiększyć urodzaj winnicy”. To, zapewne, był kolejny wynik zastosowania nawozu Chodźki w produkcji rolniczej. 24 czerwca 1867 roku konstatował Chodźko: „Raz już trzeci Waszą pomocą wyszedłem z nader trudnego położenia...” Kłopoty Chodźki nie kończyły się więc łatwo. Jego losy nie różniły się od typowych losów wynalazców. Trudno musiało być nieraz jego rodzinie, którą założył. „Bardzo dziękuję – pisał Chodźko do Niedźwieckiego (24.07.1867) Szanownemu Panu za łaskawą pomoc, którą dałeś mojej żonie...”

Korespondencja z Niedźwieckim, dokumentując niemałe, jak widać, kłopoty wynalazcy, wskazuje, że działania Chodźki, rozpoczęte w latach 50. XIX wieku, trwały przez lata 60. Nie wiemy jednak, kiedy się zakończyły i w jaki konkretnie sposób.

Chodźko zadbał o zabezpieczenie swoich praw patentowych. Według gruntownego opracowania B. Orłowskiego [19], na liście angielskich patentów, wydanych w latach 1832–1870, pod datą 15.IX.1856 znajduje się patent Nr 2159 na ulepszoną produkcję nawozów i służące do niej urządzenia. Dodajmy za Orłowskim, że wynalazek ten opatentowano w tym samym czasie także we Francji (11.IX. 1856 oraz, dodatkowo, 26. IX tegoż roku) i jeszcze w Austrii (28. III. 1857).

Przegląd materiałów dotyczących wynalazku Stanisława Chodźki pozwala dość dokładnie odtworzyć opracowany przez niego proces produkcyjny. Do wytwarzania nawozu zastosował on technikę koncentrowania produktu w tęźniach. W swojej doświadczalnej fabryce w Châlon-sur-Marne zbudował trzy kolumny z gałęzi. Miały one 8 metrów wysokości, 3 metry długości i 2,75 szerokości, co dawało 198 m³ objętości faszyny. Kolumny zraszano przez 15 dni ściekami, spływającymi z umieszczonych nad nimi zbiorników. Do przepompowywanych do tych zbiorników ścieków dodawano wstępnie wyprażony siarczan magnezu. (Dawkowanie tej soli nie jest w analizowanych materiałach dokładnie określone. Jako źródło siarczanu magnezu materiały wymieniają rosoły wody morskiej i bagna solankowe). Powstający w ściekach fosforan amonowo-magnezowy, jako dość trudno rozpuszczalny, osadzał się na faszynie. Aby zapobiec rozsiewaniu przykrych zapachów, pochodzących od zawartego w ściekach siarkowodoru, zraszano gałęzie faszyny mieszaniną kwasów solnego i siarkowego. W tych warunkach zawarta w siarkowodorze siarka utleniała się do siarki elementarnej. Po zakończeniu procesu zateżnienia faszynę pozostawiano do suszenia na powietrzu przez dalsze 5 dni, po czym osadzony na niej produkt strzepywano z gałęzi. W ten sposób, w ciągu 20 dni przerabiano 35 m³ ścieków, uzyskując 94 hektolitry (4136 kg) nawozu. Jego cennym składnikiem był fosforan amonowo-magnezowy. Nawóz zawierał też znaczne ilości humusu.

W analizowanych materiałach znajdują się dokładne kosztorysy produkcji i ocena jej opłacalności. Nawóz kupował m.in., Zarząd Majątków Ziemijskich Korony. Cesarz arbitralnie wyznaczył dla obozu wojskowego w Châlon, 20 sierpnia 1862 roku, cenę 15 franków za kwintal nawozu. Zdaniem Chodźki, była to cena zaniżona. Jak widzimy, cesarz chciał jak najszybciej zarobić na wynalazcy.

Jak powiedzieliśmy, działalnością wynalazczą zasłynął też brat Stanisława Chodźki, Napoleon Feliks. Mimo iż Uruski nazywa go, nie wiemy dlaczego, chemikiem, jego myśl wynalazcza dotyczyła głównie techniki cieplnej i mało odnosiła się do chemii. Uzyskane przez Napoleona Feliksa patenty zestawił w cytowanym opracowaniu B. Orłowski. I tak, 21 XI 1857 roku uzyskał patent angielski Nr 2924 na piece do podgrzewania kotłów parowych. Urządzenie opatentowano także 22 V 1856 roku we Francji. 23 listopada 1858 roku opatentował on w Anglii urządzenie chroniące przed dymem (patent Nr 2658). I to urządzenie miało także, wydany

20 lipca 1858 roku, patent francuski. 13 marca 1862 roku otrzymał Chodźko angielski patent Nr 689 na ulepszenie pieców pochłaniających dym. Jak podaje Orłowski, St. Januszewski odnalazł jeszcze jeden francuski patent Napoleona Feliksa, noszący tytuł: *Nouveau procédé relatif à la gravure de tous genres d'impressions*. Orłowski przypuszcza, że może on dotyczyć nowej chemicznej metody wytrawiania sztychów.

W Bibliotece Kórnickiej znajduje się jeszcze jeden druk, opisujący nie wymieniony przez Orłowskiego wynalazek Napoleona Feliksa. W katalogu Biblioteki jest on mylnie przypisany Stanisławowi Chodźce. Treść broszury niedwuznacznie każe przypisać ten druk Napoleonowi Feliksowi. Nosi on tytuł *Fumivore Chodźko...*, a więc „Wędzarnia Chodźki” [20]. Zamieszczono tam szereg pozytywnych opinii użytkowników wynalazku. Na stronie tytułowej umieścił autor reprodukcje dwóch medali I klasy, jakie uzyskało urządzenie. W roku 1861 otrzymało ono mianowicie Złoty Medal Akademii Przemysłu, Rolnictwa, Manufaktur i Komercji, a w roku 1863 także medal Akademii Sztuk i Rzemiosł.

Tak więc, obydwaj zapomniani przez encyklopedie bracia Chodźkowie, Stanisław i Napoleon Feliks, godnie przyczynili się do sławy rodziny. Tyle, że ich sława została zapomniana, bo sława wynalazców nie jest tak trwała, jak sława literatów.

PODZIĘKOWANIE

Pawłowi i Barbarze Latko dziękuję za tłumaczenia wykorzystanych w tym szkicu francuskojęzycznych materiałów.

PIŚMIENICTWO CYTOWANE

- [1] *Zbiór pamiętników o powstaniu Litwy w roku 1831*, ułożony przez F. Wrotnowskiego, Lipsk 1875, s. 195.
- [2] S. Uruski, *Rodzina, herbarz szlachty polskiej*, Warszawa 1905, s. 221.
- [3] B. Zwolski, *Chodźko Józef*, PSB, T. 3, Kraków 1937, s. 285–286.
- [4] A.E. Odyniec, *Wspomnienia z przeszłości*, Warszawa 1884, s. 102.
- [5] W. Kietlicz-Wojnacki, *Polskie osiągnięcia naukowe na obczyźnie*, Lublin 1980, s. 256.
- [6] J. Skowronek, A. Bochenek, M. Cichowski, K. Filipow, *Cmentarz polski w Montmorency*, PIW, Warszawa 1986, s. 132.
- [7] M. Chodźko, *Wyprawa do Polski w r. 1833* (przez jednego z emisariuszy), Paryż 1835.
- [8] M. Chodźko, *Wyprawa do Polski w r. 1833* (przez jednego z emisariuszy), Paryż 1835, s. 15.
- [9] M. Chodźko, *Adam Mickiewicz i Legion Polski we Włoszech. Czterdziestego ósmego lata wspomnienie*, Paryż 1862.
- [10] *Pamiętniki Ignacego Domeyki (1831–1838)*, Kraków 1908.
- [11] *Zbiór pamiętników...* (patrz poz. 1).
- [12] D. Chłapowski, *Pamiętniki: Cz. 2, Wojna 1830–1831*, Poznań 1899, s. 78.
- [13] R. Bielecki, *Słownik Biograficzny Oficerów Powstania Listopadowego*, T. 1, A-D, Warszawa 1995, s. 296.

- [14] R. Bielecki, *Zarys rozproszenia Wielkiej Emigracji we Francji (1831-1837)*, PWN, Warszawa 1986, s. 95, 202, 204.
- [15] *Encyklopedia powszechna Orgelbranda*, T. 4, Warszawa 1883, s. 289.
- [16] *Wynalazek chemiczny Stanisława Chodźki*, *Goniec Polski*, 1851, Nr 146, s. 588.
- [17] *Engrais atmosphérique. Mémoire sur la production de l'engrais atmosphérique et de la désinfection des habitations, égouts, rivières, cours d'eau, etc*; par M. Stanislas Chodźko, Professeur de Chimie, Paris 1858.
- [18] Patrz: Biblioteka Kórnicka, Materiały dotyczące sfinansowania wynalazku nawozu „atmosferycznego” przez Stanisława Chodźkę. Rkp. 02528 (MF 2000).
- [19] B. Orłowski, *Brytyjskie patenty Polaków w okresie Wielkiej Emigracji (1832–1870)*, *KHNT*, 29, 526-528 (1989).
- [20] *Fumivore Chodźko breveté S.G.D.G. en France et à l'Etranger*, Paris (bez daty).

Praca wpłynęła do Redakcji 11 czerwca 2008

KRONIKA



SPRAWOZDANIE KOMITETU GŁÓWNEGO OLIMPIADY CHEMICZNEJ Z LIV OLIMPIADY CHEMICZNEJ W ROKU SZKOLNYM 2007/08

W roku szkolnym 2007/08 odbyła się LIV Olimpiada Chemiczna.

Zawody, jak w latach poprzednich, rozpoczęły się etapem wstępnym, w trakcie którego uczniowie, indywidualnie, w dowolnym miejscu i czasie, rozwiązyali zadania z folderu (korzystając z potrzebnych im materiałów). Na podstawie rozwiązanych zadań nauczyciele do etapu pierwszego zakwalifikowali 942 uczniów, czyli o 93 mniej niż w roku ubiegłym, ale o 117 więcej niż w roku szkolnym 2002/2003 (Tab. 1).

Etap I odbył się 17.11.2007 r. w kilkunastu większych miastach Polski, pod nadzorem komisji powołanych przez Komitety Okręgowe. Zawodnicy rozwiązali 5 zadań teoretycznych. Na podstawie uzyskanych wyników, Komitet Główny zakwalifikował do następnego etapu 334 zawodników, którzy osiągnęli co najmniej 2/3 średniej arytmetycznej łącznych wyników trzech najlepszych prac w tych zawodach.

Etap II odbył się 25 i 26 stycznia 2008 r. w trzynastu punktach, będących siedzibami Komitetów Okręgowych. Uczniowie mieli do rozwiązania 5 zadań teoretycznych oraz jedno zadanie laboratoryjne. Wzięło w nich udział 334 zawodników, do finału (III etapu) Komitet Główny zakwalifikował 98 uczniów.

Zaraz po zakończeniu zawodów laboratoryjnych w Okręgu Kieleckim i Wrocławskim odbyły się uroczystości zakończenia Olimpiady Chemicznej na szczeblu Okręgowym, gdzie zostały wręczone zawodnikom zaświadczenia uczestnictwa w II etapie LIV Olimpiady Chemicznej.

Tabela 1. Uczestnictwo uczniów w LIV Olimpiadzie Chemicznej w poszczególnych okręgach

Okręg	Liczba szkół	Liczba uczniów			Liczba uczniów	
	w I etapie	w I etapie	w II etapie	w III etapie	wyróżnionych	laureatów
Białostocki	13	31	10	3	0	0
Gdański	16	65	16	3	0	1
Katowicki	35	76	27	3	0	0
Kielecki	13	36	18	3	0	0
Krakowski	24	124	46	13	1	5
Lubelski	23	57	8	3	0	1
Łódzki	19	104	37	14	1	7
Poznański	20	57	12	3	0	2
Rzeszowski	18	43	13	5	1	0
Szczeciński	16	85	32	9	0	3
Toruński	13	72	21	4	0	0
Warszawski	31	106	51	20	4	10
Wrocławski	25	81	35	8	1	1
Łącznie	266	942	334	98	8	30

W Kielcach – nagrody książkowe dla wszystkich uczestników ufundowali – Kurator woj. świętokrzyskiego, które wręczył mgr Waldemar Majchrzykiewicz – wizytator, J. Betnarski (V-ce Prezydent Częstochowy), J. Borowski (burmistrz Sandomierza), Starosta pow. ostrowieckiego, Starosta pow. skarżyńskiego. Pani Barbara Tęgiewicz (dyrektor Collegium Gostomianum w Sandomierzu wręczyła wszystkim kalendarze na 2008 rok, a od Z.Ch. „Organika-Sarzyna” wszyscy dostali upominki w postaci koszulek i polarów.

We Wrocławiu darczyńcami dla zawodników byli: prof. dr hab. L. Komorowski (dziekan Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej), prof. dr hab. J. Sołducho (pełnomocnik dziekana ds. promocji Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej), prof. dr hab. Florian Pruchnik (przewodniczący Oddziału Wrocławskiego PTCH), Burmistrz Szczawna Zdroju – ufundowali dla wszystkich nagrody książkowe, a firma „Vitrosilicon z Iłowy ufundowała dla wszystkich kubeczki, skarbonki, smycze i długopisy.

W dniu 5 kwietnia uroczystość na szczeblu okręgowym obchodzili zawodnicy okręgu Poznańskiego, gdzie pięciu najlepszych zawodników i ich nauczyciele zostali nagrodzeni książkami ufundowanymi przez prof. dr hab. Grzegorza Schroedera (dziekana Wydziału Chemicznego Uniwersytetu Adama Mickiewicza) i prof. dr hab.

Bohdana Skalskiego (prezesa Oddziału Poznańskiego PTCH). Podczas II etapu wszyscy zawodnicy, podobnie jak we Wrocławiu, zostali obdarowani przez firmę „Vitre-silicon”.

18 kwietnia zawodnicy ze Szczecina zostali zaproszeni na uroczystość, gdzie nagrodami w postaci książek PWN obdarował ich prof. dr hab. Eugeniusz Milchert (dziekan Wydziału Technologii i Inżynierii Chemicznej Politechniki Szczecińskiej, a Artur Gałęski (Kurator Zachodniopomorski) ufundował zawodnikom piłki, żeby podczas nauki nie zapominali o wypoczynku.

9 maja w Lublinie, w uroczystości zakończenia II etapu wzięło udział 8 zawodników i ich nauczyciele, ale obecni byli także prof. dr hab. Władysław Janusz i prof. dr hab. Janusz Ryczkowski (prodziekani Wydziału Chemii UMCS), przedstawiciele Oddziału Lubelskiego PTCH oraz osoby współpracujące przy organizacji kółka Olimpijskiego w Lublinie. Był także obecny p. Czesław Kościug – dyrektor ds. sprzedaży SODA POLSKA. Tu po wysłuchaniu wykładu prof. dr hab. Zofii Rzączyńskiej też nastąpiło wręczenie nagród zawodnikom i ich nauczycielom, a później spotkanie przy degustacji tortu z logo zakładów SODA POLSKA SA. Fundatorami nagród, poza „Sodą Polska”, były także CEMEX, Wytwórnia Surowic i Szczepionek BIOMED, Instytut Nawozów Sztucznych w Puławach oraz Dziekan Wydziału Chemii UMCS.

28 marca b.r. w trzech pracowniach Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej odbyły się finałowe zawody laboratoryjne. Zawodnicy mieli do rozwiązania dwa zadania – jedno jakościowe oraz drugie ilościowe. Podczas oznaczenia próbki musieli nie tylko miareczkować, ale również zinterpretować widmo. Następnego dnia w sobotę w salach Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego odbyły się zawody teoretyczne. Zawodnicy mieli do rozwiązania 5 zadań teoretycznych. Treść wszystkich zadań wraz z modelowymi rozwiązaniami zamieszczona jest na stronie Olimpiady w Internecie. Po dwukrotnym sprawdzeniu każdego zadania, Komitet Główny wyłonił 30 laureatów i 8 wyróżnionych oraz 4 reprezentantów Polski na Olimpiadę Międzynarodową.

Zadania finałowe LIV Olimpiady Chemicznej nie były łatwe. Zwycięzca – Łukasz Krawiec uzyskał 126,5 pkt., wyprzedzając następnego laureata, którym został drugoklasista Mateusz Snamina, o 20 pkt. Laureatem można było zostać dopiero po uzyskaniu 72,75 pkt. a wyróżnionym – 64,75 pkt.

Lista Laureatów i Wyróżnionych została zamieszczona w Tabeli 2 i 3. Na podkreślenie zasługuje fakt, że na 30 laureatów 10 jest z V LO im. Księcia Józefa Poniatowskiego w Warszawie.

Tabela 2. Lista laureatów LIV Olimpiady Chemicznej rok 2007/2008

Nr	Nazwisko i imię	Klasa	Miejscowość	Szkoła	Opiekunowie nauki i Laureatów
1	Krawiec Lukasz	3	Radom	ZSO nr 6 im. J. Kochanowskiego	mgr Ewa Serafin dr Stanisław Banaszkiewicz
2	Snamina Mateusz	2	Kraków	V LO im. A. Witkowskiego	dr Anna Reizer Przybylski
3	Teterycz Paweł	3	Zamość	I Społ. LO im. Unii Europejskiej	mgr Włodzimierz Kuśmierczuk
4	Biczek Tomasz	3	Warszawa	V LO im. Ks. J. Poniatowskiego	mgr Krzysztof Kuśmierczyk mgr Joanna Bąk
5	Seweryn Jakub	3	Łódź	XXXII LO im. H. Poświatowskiej	mgr Jan Antoniak mgr Emilia Objajska
6	Beker Wiktor	3	Opole	II LO im. M. Konopnickiej	mgr Tomasz Klimkiewicz
7	Kowalczuk Kamil	2	Gdynia	III LO im. Marynarki Wojennej RP	mgr Justyna Raulin
8	Miróz Jakub	3	Radom	ZSO nr 6 im. J. Kochanowskiego	mgr Ewa Serafin mgr Stanisław Banaszkiewicz
9	Korzyński Maciej	3	Warszawa	V LO im. Ks. J. Poniatowskiego	mgr Krzysztof Kuśmierczyk mgr Joanna Bąk
10	Sala Oskar	3	Oświęcim	Pow. Z. Sz. Nr 2 Sz. Og. Mistrzostwa Sp. i Techn.	mgr Zofia Klys
11	Borys Krzysztof	3	Warszawa	V LO im. Ks. J. Poniatowskiego	mgr Krzysztof Kuśmierczyk mgr Joanna Bąk
12	Wenz Konrad	3	Szczecin	II LO im. Mieszka I	mgr Teresa Kologrecka-Bajek
13	Malinowski Marcin	1	Warszawa	V LO im. Ks. J. Poniatowskiego	mgr Krzysztof Kuśmierczyk
14	Żak Emil	3	Kraków	II LO im. Króla Jana III Sobieskiego	dr Barbara Pac mgr Agata Zegar
15	Sienkiewicz Maciej	2	Łódź	I LO im. M. Kopernika	mgr Stanisława Hejwowska dr Justyna Staluszka
16	Hoffmann Witold	1	Poznań	VIII LO im. A. Mickiewicza	mgr Katarzyna Chraplewska
17	Ciechanowski Bartosz	3	Szczecin	II LO im. Mieszka I	mgr Teresa Kologrecka-Bajek

Tabela 2. Ciąg dalszy

Nr	Nazwisko i imię	Klasa	Miejscowość	Szkoła	Opiekunowie naukowci Laureatów
18	Andrzej Witold	3	Poznań	I LO im. K. Marcinkowskiego	mgr Halina Szymańska
19	Lesiuk Michał	3	Warszawa	V LO im. Ks. J. Poniatowskiego	mgr Krzysztof Kuśmierczyk mgr Joanna Bąk
20	Gług Maciej	3	Kraków	V LO im. A. Witkowskiego	dr Wojciech Przybylski mgr Wojciech Gług
21	Sadowski Bartłomiej	2	Warszawa	V LO im. Ks. J. Poniatowskiego	mgr Krzysztof Kuśmierczyk prof. Michał Fedoryński mgr Joanna Bąk
22	Kwiatkowski Damian	1	Szczecin	II LO im. Mieszka I	mgr Teresa Kologrecka-Bajek
23	Warمیński Marcin	2	Warszawa	V LO im. Ks. J. Poniatowskiego	prof. Michał Fedoryński mgr Krzysztof Kuśmierczyk
24	Bolewski Przemek	2	Warszawa	V LO im. Ks. J. Poniatowskiego	prof. Michał Fedoryński mgr Krzysztof Kuśmierczyk
25	Bara Angelika	3	Łódź	I LO im. M. Kopernika	mgr Stanisława Hejwowska dr Justyna Staluszka
26	Bartoszek Cezary	3	Warszawa	V LO im. Ks. J. Poniatowskiego	mgr Joanna Bąk prof. M. Fedoryński
27	Boczek Dawid	2	Radom	ZSO nr 6 im. J. Kochanowskiego	dr Stanisław Banaszkiewicz
28	Bończak Bartłomiej	3	Warszawa	V LO im. Ks. J. Poniatowskiego	prof. Michał Fedoryński mgr Joanna Bąk
29	Izydorczyk Grzegorz	3	Łódź	I LO im. M. Kopernika	mgr Stanisława Hejwowska
30	Biedroń Grzegorz	2	Kraków	V LO im. A. Witkowskiego	dr Joanna Klich-Kafel

Tabela 3. Wyróżnieni Finaliści LIV Olimpiady Chemicznej

Nr	Nazwisko i imię	Klasa	Miejscowość	Szkoła	Opiekunowie naukowci wyróżnionych	
1	Michałek Stanisław	3	Warszawa	V LO im. Ks. J. Poniatowskiego	mgr Krzysztof Kuśmierczyk	
2	Kubiński Dominik	3	Oświęcim	I LO im. S. Konarskiego	mgr Lucyna Drabezyk	
3	Kutyłowski Michał	2	Warszawa	V LO im. Ks. J. Poniatowskiego	mgr Krzysztof Kuśmierczyk	prof.dr hab. Michał Fedoryński
4	Gołębek Hubert	3	Warszawa	V LO im. Ks. J. Poniatowskiego	mgr Krzysztof Kuśmierczyk	mgr Joanna Bąk
5	Lisik Maciej	2	Wrocław	III LO im. A. Mickiewicza	mgr Teresa Pikuta-Byrka	
6	Skrzypecki Janusz	3	Warszawa	II LO im. St. Batorego	mgr Krystyna Zapędowska	mgr Krzysztof Kuśmierczyk
7	Popielarska Katarzyna	3	Radom	ZSO nr 6 im. J. Kochanowskiego	dr Stanisław Banaszkiewicz	mgr Ewa Serafin
8	Grzyb Agnieszka	3	Sanok	I LO im. KEN	mgr Jan Bukład	

Na XL Olimpiadzie Międzynarodowej w Budapeszcie Polskę będą reprezentowali: **Lukasz Krawiec**, **Tomasz Biczel**, **Jakub Mróz** i **Oskar Sala** (który w tym roku po raz czwarty został laureatem). Zawodnikiem rezerwowym jest **Jakub Seweryn**.

W dniach 5 czerwca w Radomiu odbyła się sesja naukowa poświęcona rocznicy 55 lat pracy koła Olimpijskiego przy VI LO w Radomiu, którego twórcą był początkowo samodzielnie dr Stanisław Banaszkiewicz, następnie w pracy z młodzieżą pomagała Mu małżonka Anna Banaszkiewicz, a obecnie była uczennica Ewa Serafin. Koło to wykształciło już 119 Laureatów Olimpiady Chemicznej.

Laureaci, wyróżnieni i ich opiekunowie zostali zaproszeni na zakończenie Olimpiady w sobotę 7 czerwca do Auli Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego.

W tym uroczystym dniu odwiedzili nas goście, którzy wspierali Komitet Główny zarówno w pracy, jak i finansowo w nagradzaniu laureatów, byli nimi prof. dr hab. Janusz Jurczak, Przewodniczący III Wydziału PAN, prof. dr hab. Marek Chmielewski, dyrektor Instytutu Chemii Organicznej PAN, dr hab. Inż. Jacek Gregorowicz, który reprezentował dyrektora Instytutu Chemii Fizycznej PAN – prof. dr hab. Aleksandra Jabłońskiego, prof. dr hab. Władysław Wieczorek, dziekan Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej, dr hab. Rafał Siciński, który reprezentował prof. dr hab. Grzegorza Chałasińskiego, dziekana Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego, prof. dr hab. Marek Krygowski, laureat pierwszych dwóch Olimpiad Chemicznych oraz były prezes PTCH, mgr Małgorzata Żuber-Zielicz przedstawicielka władz samorządowych Warszawy, a jednocześnie przewodnicząca Stowarzyszenia na Rzecz Uzdolnionych. Na podkreślenie zasługuje obecność Pana Waldemara Grzegorzcyka, reprezentanta Grupy Chemicznej CIECH S.A., która w ramach sponsoringu objęła patronatem II etap LIV Olimpiady Chemicznej. Dzięki temu wszyscy zawodnicy już w pierwszym i drugim etapie zostali obdarowani drobnymi upominkami przez przedstawicieli zakładów chemicznych wchodzących w skład grupy. Wszyscy finaliści otrzymali Antologię Komiksu Powstania Warszawskiego, a Nauczyciele Opiekunowie Laureatów także piękne teczki na zbieranie dokumentacji swoich podopiecznych. Komitet Główny został w swoich działaniach wsparty finansowo.

Prof. dr hab. Jerzy Szydłowski wręczył Laureatom, Wyróżnionym oraz ich Nauczycielom dyplomy i nagrody od Komitetu Głównego Olimpiady Chemicznej; były to komputer przenośny dla zwycięzcy, mini komputery przenośne dla trzech następnych zawodników, palmtopy dla 9 następnym i odtwarzacze dla pozostałych laureatów a bezprzewodowe telefony dla wyróżnionych oraz książki подарowane przez PWN i WNT, akcesoria do komputerów подарowane przez POLFEĘ – Warszawa, torby podróżne, kubeczki, koszulki, smycze i długopisy od ADAMEDU.

Nauczyciele otrzymali skromne nagrody pieniężne.

Jak zwykle od kilku lat, były też nagrody specjalne.

Zwycięzca LIV Olimpiady Chemicznej, Łukasz Krawiec, otrzymał nagrodę pieniężną ufundowaną przez Komitet Chemii PAN.

Mateusz Snamina – od Dziekana Wydziału Chemii U.W. a Paweł Teterycz – od Dziekana Wydziału Chemicznego P.W., – kamery cyfrowe.

Nagrody za najlepiej rozwiązane zadania z chemii organicznej, od Dyrektora Instytutu Chemii Organicznej PAN, otrzymali Łukasz Krawiec i Oskar Sala.

Nagrody za najlepiej rozwiązane zadania z chemii fizycznej, od Dyrektora Instytutu Chemii Fizycznej PAN, otrzymali Tomasz Biczel i Mateusz Snamina.

Tradycyjnie Prezes spółki ADAMED ufundował nagrody, w postaci złotych bransoletek Laureatce i Wyróżnionym Dziewczętom, a trzem pierwszoklasistom zegarki.

Wszyscy Finaliści otrzymali zaświadczenia, które wystawia Komitet Główny, a które stanowią podstawę przyznania odpowiednich uprawnień przy przyjmowaniu na I rok studiów wyższych oraz zwalniają z notą najwyższą z egzaminu maturalnego.

W tym roku, dzięki sponsorom, wszystkich przyjeżdżających poczęstowaliśmy kanapkami przed uroczystością, a po części oficjalnej był indyk z warzywami, kanapki, ciasta, sałatka owocowa i oczywiście napoje. Pozwoliło to na dłuższą przyjacielską rozmowę wszystkich gości.

Zakończenie jednej Olimpiady to już czas przygotowań do następnej. Kolejna LV Olimpiada Chemiczna odbędzie się w następujących terminach:

31.10.2008 r. – ostateczny termin przesyłania zgłoszeń i prac etapu wstępnego do Komitetów Okręgowych.

22.11.2008 r. – I etap zawodów

30 i 31.01. 2009 r. – II etap zawodów

27 i 28.03.2009 r. – III etap zawodów.

Sponsorzy LIV Olimpiady Chemicznej:

1. Ministerstwo Edukacji Narodowej i Sportu
2. Prezes Polskiego Towarzystwa Chemicznego
3. Komitet Chemii Polskiej Akademii Nauk
4. Dyrektor Instytutu Chemii Organicznej PAN
5. Dyrektor Instytutu Chemii Fizycznej PAN
6. Dyrektor Instytutu Chemii Przemysłowej
7. Dziekan Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej
8. Dziekan Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego
9. Rektor Wyższej Szkoły Kosmetyki i Pielęgnacji Zdrowia
10. Prezes Grupy Chemicznej CIECH S.A.
11. Prezes Zakładów Chemicznych „ORLEN”
11. Prezes „ADAMED” Sp. z o.o.
12. Prezes Zarządu Warszawskich Z.F. „POLFA”
13. Prezes Zarządu Spółki CEMEX
14. Dyrektor Wydawnictw Naukowo-Technicznych

15. Redaktor Działu Matematyki i Nauk Przyrodniczych PWN

16. Prezes SIGMA–ALDRICH Sp. z o.o.

Patroni Medialni: Chemia w Szkole, Przemysł Chemiczny, Rynek Chemiczny, Laboratorium i Wiadomości Chemiczne.

mgr Wanda Szelałowska



Fot. 1. Goście oficjalni, którzy wspierają olimpiadę
(od lewej strony siedzą: Teresa Kowalczyk – *Przemysł Chemiczny*, prof. Paweł Kulesza (od września 2008 r. – Dziekan Wydz. Chemii U.W.), prof. Marek Krygowski, mgr Małgorzata Zuber-Zielicz, dyrektor Waldemar Grzegorzczak, mgr Ewa i prof. Marek Chmielewscy, prof. Janusz Jurczak



Fot. 2. Zwycięzca Łukasz Krawiec otrzymuje nagrodę Komitetu Chemii od prof. J. Jurczaka



Fot. 3. Drużyna na 40 ICHO
(od lewej Jakub Mróz, Łukasz Krawiec, Oskar Sala, Tomasz Biczel i Jakub Seweryn (rezerwowi))

Wpłynęło do Redakcji 14 lipca 2008

NOWE WYDAWNICTWA



K.H. Lautenschlager, W. Schröter, A. Wanninger, *Nowoczesne Kompendium Chemii*. tłumaczenie zbiorowe z języka niemieckiego (tytuł oryginału: „Taschenbuch der Chemie”) pod redakcją naukową Profesora G. Mlostonia, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2007, str. 877, oprawa twarda.

Uczniowie, studenci wielu wydziałów stykający się z chemią na zróżnicowanym poziomie, pracownicy naukowcy, dla których wiedza chemiczna w stopniu co najmniej podstawowym jest niezbędna, otrzymali bardzo pomocne, dość nowoczesne źródło informacji i wiedzy, jakim jest polskie wydanie znanego w Niemczech „Taschenbuch der Chemie”, które tam ukazało się aż 20 razy.

Ostatnie wydanie, poprawione i uzupełnione, wyszło w 2005 roku w Wissenschaftlicher Verlag Harri Deutsch GmbH i zostało przez grupę wytrawnych tłumaczy pod redakcją naukową Profesora Grzegorza Mlostonia doskonale przetłumaczone i zredagowane pod kątem potrzeb polskiego czytelnika, w różnym stopniu znającego chemię.

Wydanie polskie ukazało się w ubiegłym roku pod tytułem „Nowoczesne Kompendium Chemii”. Układ treści *Kompendium* przypomina klasyczny podręcznik chemii. Zgadzam się z Autorami oryginału i tłumaczami polskimi, że dzięki temu *Kompendium* będzie rzeczywiście spełniać rolę podręcznika Chemii dla czytelników, którzy w różnym stopniu opanowali wcześniej wiedzę chemiczną, oraz dla tych, którzy nieco od chemii odeszli, ale chcieliby ją sobie przypomnieć.

W takiej roli *Kompendium* prawdopodobnie sprawdzi się dobrze. Pewnym niedostatkiem jego zawartości jest brak niektórych nowoczesnych gałęzi chemii, które powstały i rozwinęły się w ostatnim półwieczu. Do takich dziedzin chemii należą m.in. chemia koordynacyjna, kataliza (homo- i heterogeniczna) w syntezie organicznej, chemia materiałów.

Można mieć zastrzeżenia co do nowoczesności ujęcia niektórych tematów, np. dotyczących chemii koordynacyjnej, oraz brak niektórych pojęć, takich jak np.: związki metaloorganiczne, ciecze jonowe, stopione sole itp.

Wprawdzie niemieccy autorzy *Kompendium* piszą w przedmowie do wydania 20, że w celu unowocześnienia treści korzystali z uwag wielu specjalistów, ale nie wynika to z zestawu „Literatury uzupełniającej”, która – jak na rok wydania 2005 jest nieco „podstarzała”.

Redaktor wydania polskiego znacznie wzbogacił i unowocześnił wykaz literatury dodatkowej i przez to czytelnik polski ma szansę sięgnąć do bardziej nowoczesnych źródeł.

Reasumując uważam, że wydane przez PWN „Kompendium Chemii”, raczej przesadnie w tytule nazwane „Nowoczesnym”, było celowym przedsięwzięciem i będzie bardzo użyteczną pomocą dla szerokiej rzeszy czytelników, ale nie będzie skróconym podręcznikiem do nauczania chemii.

INFORMACJE

INFORMACJA REDAKCJI „WIADOMOŚCI CHEMICZNYCH”

Redakcja „Wiadomości Chemicznych” w porozumieniu z Radą Redakcyjną kontynuuje inicjatywę podjętą na konferencji Dziekanów Wydziałów Chemicznych „CHEMIA08”, która odbyła się w czerwcu 2008 roku w Krynicy-Zdrój.

Zgodnie z tą inicjatywą poszczególne ośrodki chemiczne (przede wszystkim uczelniane) w Polsce mogą publikować w „Wiadomościach Chemicznych” informacje o swojej działalności.

Uwaga, zmiana numeru konta Redakcji „Wiadomości Chemiczne”

Bank PEKAO SA
Oddział we Wrocławiu
pl. Powstańców Śląskich
50-950 Wrocław
NRB 48 1240 6670 1111 0000 5649 8781

Uwaga, zmiana w Regulaminie!

Od numeru 1-2/2008 Wiad. Chem. podpisy pod rysunkami, schematami, fotografiami, tabelami itp. należy przysyłać także w języku angielskim.



XVIth
International Winter School
on Coordination Chemistry
Karpacz, Poland
December 8-12 2008



<http://www.wchuwr.pl/iwsc16>

organized by:
Faculty of Chemistry, University of Wrocław
Section of Coordination and Inorganic Chemistry,
Polish Chemical Society

INVITATION

The Organizing Committee of "International Winter School on Coordination Chemistry" is honoured to invite you for the XVIth Conference. The Conference will be held from Monday December 8 till Friday December 12, 2008 in Karpacz, a well known lovely Polish resort in the Karkonosze Mountains, south-west part of Poland, about 120 km far from Wrocław.

ACCOMMODATION

All participants will be placed in an attractive hotel "Karolinka" (<http://www.karolinka.karpacz.pl>)

CONTACT – CHAIRMAN

PROF. DR HAB. JERZY MROZIŃSKI
Faculty of Chemistry, University of Wrocław
14 F. Joliot –Curie str., 50-383 Wrocław, POLAND
tel/fax: (071) 3757-307,
e-mail: jmroz@wchuwr.chem.uni.wroc.pl

SCIENTIFIC PROGRAMME

The program will consist of session lectures, lectures, short lectures and posters. The purpose of the Conference, like in the previous years, is the meeting of scientists who work in Coordination Chemistry and the discussion of current achievements in this field. The XVIth International Winter School 2008 will be devoted to the problems of structure, spectroscopy and magnetism of coordination compounds, in the aspect of new molecular materials. During the Conference there will be a special session organized devoted to the European Commission's Six Framework Program "Molecular Approach to Nanomagnets and Multifunctional Materials" MAGMANet (Network of Excellence). The Programme of the Conference will be distributed among Participants upon arrival.

Abstracts should be submitted before
October 31, 2008 (deadline !)

INTERNATIONAL ADVISORY BOARD

Prof. Marius Andruh (Romania)	Prof. Adonis Michaelides (Greece)
Prof. Evangelos Bakalbasis (Greece)	Prof. Masahiro Mikuriya (Japan)
Prof. Phalguni Chaudhuri (Germany)	Prof. Wasuke Mori (Japan)
Prof. Peter Day (Great Britain)	Prof. Hisashi Okawa (Japan)
Prof. Etienne Goovaerts (Belgium)	Prof. Spyros Perlepes (Greece)
Prof. Hans Hartl (Germany)	Prof. Annie Powel (Germany)
Prof. Tasuku Ito (Japan)	Prof. Claus Schäffer (Denmark)
Prof. Lothar Jäger (Germany)	Prof. Dirk Steinborn (Germany)
Prof. Miguel Julve (Spain)	Prof. Peter Strauch (Germany)
Prof. Masaaki Kojima (Japan)	Prof. Markku Sundberg (Finland)
Prof. Vladimir Kokozay (Ukraine)	Prof. Michel Verdager (France)
Prof. Marian Koman (Slovakia)	Prof. Yurii Yablokov (Russia)
Prof. Milan Melnik (Slovakia)	Prof. Masahiro Yamashita (Japan)

ORGANIZING COMMITTEE:

Jerzy Mroziński – chair
Romuald Grobelny – secretary
Alina Bieńko – secretary

Bożena Kalińska, Julia Klak,
Maria Korabik, Monika Nahorska,
Katarzyna Nalewajczyk, Andrzej Pochaba,
Mirosław Wrzeczion, Bogumiła Żurowska

