

WIADOMOŚCI *chemiczne*

A 1263 II

DI. 3



1998

(52)

3-4

(609 - 610)



CZASOPISMO POLSKIEGO TOWARZYSTWA CHEMICZNEGO

Publikacja dotowana przez KBN

RADA REDAKCYJNA

**JERZY BŁAŻEJOWSKI, RYSZARD BODALSKI, HENRYK BUCHOWSKI,
HENRYK GÓRECKI, ZDZISŁAW HIPPE, ZBIGNIEW HUBICKI, JERZY KONARSKI,
JANUSZ LIPKOWSKI, MARIA NOWAKOWSKA, STANISŁAW PENCZEK,
ZOFIA STASICKA, MIROŚLAW SZAFRAN**

Z REDAKCJĄ STAŁE WSPÓŁPRACUJĄ

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

KOMITET REDAKCYJNY

**BOGDAN BURCZYK, JERZY P. HAWRANEK, ANDRZEJ JASIŃSKI, ADAM JEZIECKI,
ADOLF KISZA, ZDZISŁAW LATAJKA, PRZEMYSŁAW MASTALERZ,
IGNACY Z. SIEMION, MIROŚLAW SOROKA, MARIA SUSZYŃSKA**

REDAKTOR NACZELNY

JÓZEF J. ZIÓŁKOWSKI

SEKRETARZ REDAKCJI

KRYSTYNA MARKSOWA

Korespondencję należy kierować pod adresem:

Redakcja „Wiadomości Chemicznych”
ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław
tel. 20 43 89, tel./fax 22 14 06

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

© Copyright by Wydawnictwo Uniwersytetu Wrocławskiego Sp. z o.o., Wrocław 1998

**REDAKTOR WYDAWNICTWA
AGNIESZKA FLASIŃSKA**

**REDAKTOR TECHNICZNY
BOŻENA SOBOTA**

ISSN 0043-5104

ISBN 83-229-1755-4

Maszynopis niniejszego numeru przekazano Wydawcy w lutym 1998

Skład, druk i oprawa: Wrocławska Drukarnia Naukowa Polskiej Akademii Nauk

**DZIAŁALNOŚĆ NAUKOWA I DYDAKTYCZNA
ZAKŁADU FOTOTECHNIKI INSTYTUTU CHEMII
FIZYCZNEJ I TEORETYCZNEJ
POLITECHNIKI WROCŁAWSKIEJ***

**THE RESEARCH AND THE TEACHING ACTIVITY
OF THE CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
OF PHOTOGRAPHIC PROCESSES GROUP
OF THE INSTITUTE OF PHYSICAL
AND THEORETICAL CHEMISTRY**

Piotr Nowak

*Zakład Fototechniki, Instytut Chemii Fizycznej i Teoretycznej,
Politechnika Wroclawska,
Wybrzeże S. Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław*

Abstract

Powstanie i przemiany Katedry Fototechniki
Charakterystyka działalności naukowej
Okres Politechniki Lwowskiej i II wojny światowej
Powojenna działalność wrocławskiej Katedry
i późniejszego Zakładu Fototechniki
Piśmiennictwo cytowane

* Redakcja wyjątkowo akceptuje druk tego artykułu ze względu na szczególny, jedyny w Polsce kierunek prac Zakładu Fototechniki Instytutu Chemii Fizycznej i Teoretycznej Politechniki Wrocławskiej.

ABSTRACT

The main scientific publications on chemistry and technology of light-sensitive materials, published by the Chemistry and Technology of Photographic Processes Group are listed. The main scientific and research activities performed in this unique group in Poland are presented. The technological achievements which have been applied in the Polish photochemical industry are also described. Additionally, the teaching achievements at the academic level of the Chemistry and Technology of Photographic Processes Group are described.

POWSTANIE I PRZEMIANY KATEDRY FOTOTECHNIKI

Katedra Fototechniki została powołana na wniosek Senatu połączonych wówczas uczelni Uniwersytetu i Politechniki Wrocławskiej na Wydziale Matematyczno-Przyrodniczym. Działalność swoją rozpoczęła 31 października 1946 r. w wyniku opublikowania rozporządzenia nr 319 ministra oświaty, zawartego w Dzienniku Urzędowym Ministerstwa Oświaty nr 11 [1]. Inicjatorem utworzenia tej placówki naukowo-dydaktycznej oraz jej głównym organizatorem i wieloletnim kierownikiem był Profesor Witold Romer (1900–1967), który w latach 1931–1939 kierował Katedrą Fotografii Wydziału Architektonicznego przedwojennej Politechniki Lwowskiej [2–5]. W powojennym czasie odbudowy wszystkich dziedzin życia następowała również odbudowa szkolnictwa fotograficznego na wszystkich poziomach kształcenia oraz w różnych aspektach szeroko rozumianej fotografii. Pisał o tym prof. W. Romer na łamach ówczesnej prasy fotograficznej [6], powołując się również na opinie prof. J. Bułhaka (1876–1950) w sprawie fotografii artystycznej i krajoznawczej [7] oraz prof. A. Gałęckiego (1882–1962) w sprawie fotografii użytkowej i technicznej [8]. Prof. W. Romer kierował wrocławską Katedrą Fototechniki do 19 kwietnia 1967 r., kiedy to nagła śmierć przerwała jego twórczą działalność naukową i dydaktyczną. W tym roku kierownictwo Katedry objął ówczesny doc. dr hab. inż. Władysław Markocki (1910–1993) – wychowanek prof. W. Romera i jego bliski współpracownik jeszcze z czasów Politechniki Lwowskiej. W 1979 r. kierownictwo Zakładu Fototechniki przejął prof. dr inż. Adam Zaleski – jeden z pierwszych absolwentów wrocławskiej Katedry Fototechniki, również wychowanek i bliski współpracownik prof. W. Romera.

1 kwietnia 1947 r. Katedra Fototechniki przechodzi z Wydziału Matematyczno-Przyrodniczego do Wydziału Matematyki, Fizyki i Chemii z Oddziałem Chemii Technicznej Uniwersytetu i Politechniki Wrocławskiej, gdzie pozostaje do 1 września 1951 r. [9], aby następnie po rozdzieleniu Politechniki i Uniwersytetu wejść w skład Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej. 31 sierpnia 1968 r. następuje restrukturyzacja placówek naukowych Politechniki Wrocławskiej [10]. Samodzielne katedry naukowe zostały zlikwidowane, a w ich miejsce utworzono instytuty naukowe. Katedra Fototechniki weszła wówczas do Instytutu Chemii Organicznej i Fizycznej Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej i zmieniła nazwę na Zakład Fototechniki. W 1993 r. Zakład Fototechniki przeszedł do nowo powstałego Instytutu Chemii Fizycznej i Teoretycznej Politechniki Wrocławskiej, gdzie pozostaje do dzisiaj [11].

CHARAKTERYSTYKA DZIAŁALNOŚCI NAUKOWEJ

Na przestrzeni ponad 50-letniej historii Katedry i Zakładu Fototechniki powstało ponad 400 opublikowanych prac naukowych, kilkadziesiąt opracowań przemysłowych oraz kilka kompletnych technologii zakończonych sukce-

sem wdrożeniowym. Szczególnie cenne opracowania technologiczne dotyczyły nowoczesnych metod syntezy emulsji fotograficznych, produkcji unikatowych typów materiałów poligraficznych — wprostpozytywowych¹ i infekcyjnych², materiałów defektoskopowych i radiologicznych oraz emulsji do rejestracji torów cząstek jonizujących — tzw. emulsji jądrowych. Pracownicy Zakładu Fototechniki czynnie uczestniczą w wielu krajowych i kilkudziesięciu zagranicznych kongresach i konferencjach naukowych, publikując tam oryginalne prace naukowe o fundamentalnym znaczeniu dla technologii materiałów światłoczułych.

We wrześniu 1968 r. w Zakopanem została zorganizowana przez pracowników Katedry, z udziałem przedstawicieli polskiego przemysłu fotochemicznego, międzynarodowa Konferencja Teorii i Technologii Procesu Fotograficznego [12]. Inicjatorem spotkania w Polsce większości uznanych w tej dziedzinie autorytetów z całego świata był prof. W. Romer, który niestety nie doczekał uczestnictwa w tej jedynej w Polsce, jak dotychczas, międzynarodowej konferencji naukowej z dziedziny chemii i technologii procesu fotograficznego. Przez wiele lat Zakład Fototechniki współuczestniczy w organizacji krajowych zjazdów naukowych, sympozjów i konferencji, których celem jest wymiana doświadczeń, szkolenie oraz popularyzacja wiedzy o fotografii w bardzo szerokim pojęciu. Za najbardziej owocne przedsięwzięcia należy uznać sympozja naukowe organizowane wspólnie z Warszawskimi i Bydgoskimi Zakładami Fotochemicznymi [13–18] oraz naukowe sympozja organizowane wspólnie z Sekcją Fotografii Naukowej Związku Polskich Artystów Fotografików z udziałem we Wrocławiu [19–24]. Wynikiem tych spotkań były wydawane drukiem materiały konferencyjne, które służą jako źródło oryginalnych opracowań rzadko poruszanych zagadnień praktyki fotograficznej, technologii i podstawowych zagadnień teoretycznych związanych z procesem fotograficznym. Są one ponadto dowodem szczególnego rodzaju entuzjazmu i chęci wspólnej pracy wielu ludzi, którym przyświecał cel podnoszenia kwalifikacji, popularyzacji wiedzy oraz wymiany doświadczeń na polu podstaw teoretycznych procesów fotograficznych i fotografii artystycznej i technicznej.

Działalność naukowa, badawcza i dydaktyczna Zakładu Fototechniki skupiała się głównie wokół technicznej strony procesu fotograficznego, a zwłaszcza opartego na światłoczułości kryształów halogenków srebra. Pomimo łat-

¹ Materiały wprostpozytywowe, w przeciwieństwie do powszechnie używanego dwustopniowego procesu negatyw-pozytyw, pozwalają na uzyskiwanie nie odwróconych (prostych) wartości tonalnych obrazu fotograficznego w jednostopniowej obróbce chemicznej. Szczególne zastosowanie mają w poligrafii, gdyż umożliwiają dwukrotne zmniejszenie zużycia materiałów fotograficznych.

² Materiały infekcyjne pozwalają na uzyskiwanie skrajnie wysokich kontrastowości obrazów fotograficznych przez wykorzystanie zjawiska „zarażania” słabo naświetlonych kryształów halogenków srebra, usytuowanych w sąsiedztwie silnie naświetlonych kryształów, wywołanych w wywoływaczu fotograficznym o specjalnym składzie.

wości uzyskiwania obrazów fotograficznych, zarówno z punktu widzenia teoretycznego, jak i technologii produkcji różnorodnych warstw światłoczułych, proces fotograficzny jest bardzo skomplikowany. Uzyskiwanie więc postępu technicznego oraz utrzymanie technologii produkcji na odpowiednio wysokim poziomie wymaga obszernych prac badawczych prowadzonych nie tylko w zakładach produkcyjnych, ale również w zakładach naukowych. Jednak tematyka prac prowadzonych w Zakładzie Fototechniki Politechniki Wrocławskiej obejmowała i dotychczas obejmuje zagadnienia, których charakter wynika nie tylko z potrzeb rodzimego przemysłu fotochemicznego, ale również z naukowych zainteresowań pracowników, które przeniesione zostały m.in. z przedwojennej Katedry Fotografii Wydziału Architektonicznego oraz Instytutu Fotograficznego Politechniki Lwowskiej. Obecnie profil działalności naukowej Zakładu Fototechniki uległ znacznemu rozszerzeniu, zwłaszcza w zakresie technologii uzyskiwania emulsji fotograficznych o określonych właściwościach użytkowych, metod ich sporządzania oraz metod sensytmetrycznego³ i strukturometrycznego⁴ badania właściwości obrazów fotograficznych. Obszar działalności naukowej i badawczej Zakładu Fototechniki, jaki zarysował się w ciągu ostatnich 50 lat, obejmuje następujące zagadnienia:

- ziarnistości i rozdzielczości materiałów fotograficznych,
- technologii sporządzania halogenosrebrowych emulsji przeznaczonych do rejestracji torów cząstek jonizujących i promieniowania wysokoenergetycznego,
- technologii sporządzania skal i podziałek o wysokiej dokładności dla przemysłu optycznego,
- technologii sporządzania oraz badania właściwości modelowych emulsji halogenosrebrowych zawierających kryształy o określonych formach przestrzennych,
- rozpraszania światła w warstwach fotograficznych,
- technologii sporządzania materiałów graficznych, infekcyjnych i wprostpozytywowych,
- technologii sporządzania materiałów fotograficznych do holografii,
- mechanizmów kontrolowanego zarodkowania i wzrostu kryształów halogenków srebra,
- wpływu wybranych związków organicznych na wzrost i formy przestrzenne kryształów halogenków srebra,

³ Sensytmometria fotograficzna obejmuje metody badania i oceny właściwości użytkowych materiałów światłoczułych, a zwłaszcza: czułości naświetleniowej, kontrastowości, optycznej gęstości minimalnej i maksymalnej, użytecznej rozpiętości naświetleń itp.

⁴ Strukturometria fotograficzna obejmuje metody badania i oceny nieciągłej natury obrazów fotograficznych. Najważniejsze z nich to: ziarnistość optyczna, zdolność rozdzielcza, ostrość konturowa, funkcja przenoszenia modulacji i funkcja rozpraszania światła, funkcja autokorelacji i widmo spektralnej gęstości mocy, wydajność kwantowa oraz stosunek sygnału do szumu w zapisie obrazu fotograficznego.

- dotowania kryształów halogenków srebra jonami metali,
- metod fotografii na nośnikach niesrebrowych,
- sensybilizacji chemicznej i spektralnej emulsji fotograficznych,
- efektywności sensybilizacji spektralnej i supersensybilizacji⁵,
- fotograficznych metod badania żelatyn,
- automatyzacji dwustrumieniowej metody syntezy emulsji fotograficznych,
- sensytometrycznych i strukturometrycznych właściwości materiałów fotograficznych,
- metod strukturometrycznego badania obrazów fotograficznych,
- konstrukcji i budowy aparatury przeznaczonej do badań nad procesem fotograficznym,
- hybrydowych⁶ technik zapisu informacji obrazowej.

OKRES POLITECHNIKI LWOWSKIEJ I II WOJNY ŚWIATOWEJ

Ze względu na tematykę prac badawczych oraz powiązania osobowe przedwojennej Katedry Fotografii Wydziału Architektonicznego oraz Instytutu Fotograficznego i obecnego Zakładu Fototechniki wydaje się uzasadnione krótkie omówienie ważniejszych prac wykonanych w tych placówkach jeszcze przed II wojną światową. Pierwsza publikacja W. Romera [25], która zdobyła światowy rozgłos, dotyczyła tonorozdzielczej techniki, nazwanej przez autora *izohelią*. Za jej pomocą uzyskiwać można ciekawe efekty graficzne o wyjątkowej ekspresji i plastyce obrazu, nieosiągalne w tym czasie innymi metodami. W roku 1932 W. Romer uzyskuje angielski patent na nową technikę druku map, tzw. *kartochromię* [26], a w 1934 r. doktoryzuje się uzyskując, jako pierwszy w Polsce, tytuł doktora w dziedzinie fizykochemii procesu fotograficznego [27]. Na uwagę zasługują również dwie prace z zakresu sensytometrii fotograficznej. Pierwsza dotyczyła wyboru kryteriów pomiaru światłoczułości [28], druga – sensytometrii papierów fotograficznych [29]. W. Romer publikuje również wiele artykułów popularnonaukowych z zakresu fotografii artystycznej, użytkowej i amatorskiej [30–33].

W latach 1936–1939 zostały wykonane przez W. Markockiego, w laboratorium Fabryki Materiałów Światłoczułych Alfa w Bydgoszczy, syntezy ponad 100 barwników uczulających halogenki srebra w zakresie promieniowania

⁵ Supersensybilizacja jest zjawiskiem superaddytywnego działania na kryształy halogenków srebra dwóch barwników uczulających lub jednego barwnika i innej substancji chemicznej, których wspólne oddziaływanie jest bardziej efektywne niż działanie każdego z osobna.

⁶ Hybrydowe techniki zapisu informacji obrazowej polegają na łączeniu tradycyjnych, chemicznych metod fotograficznych z komputerową techniką zapisu, przetwarzania i przechowywania informacji obrazowej.

widzialnego i podczerwieni [34]. W latach wojny W. Romer wykonał, pracując w angielskich laboratoriach firmy Kodak w Harrow, a następnie w lotniczych laboratoriach badawczych RAF-u, wiele istotnych prac, które ze względu na militarny charakter były publikowane tylko w formie specjalnych, wewnętrznych raportów [35–50] i były zastosowane w rozpoznaniu fotograficznym podczas lądowania aliantów we Francji w czerwcu 1944 r.

POWOJENNA DZIAŁALNOŚĆ WROCŁAWSKIEJ KATEDRY I PÓŹNIEJSZEGO ZAKŁADU FOTOTECHNIKI

Powojenna działalność badawcza i dydaktyczna Zakładu Fototechniki wynikała głównie z potrzeb, zniszczonego przez wojnę, polskiego przemysłu fotochemicznego. Kontynuowano również prace naukowe z zakresu badań struktury obrazów fotograficznych. W ich wyniku opublikowano kilkadziesiąt prac naukowych obejmujących gruntowną analizę zjawiska ziarnistości oraz metod jej pomiaru wraz z konstrukcją i budową unikatowego instrumentu pomiarowego [51–53] nazwanego *granulometrem porównawczym*. Przyrząd ten, a także sposób pomiaru ziarnistości subiektywnej metodą optycznego zrównywania deseni ziarnistych cytuje się do tej pory, ponieważ pozwalał uzyskiwać w tamtym czasie względnie wysokie dokładności pomiaru [54, 55]. W Katedrze Fototechniki wyprodukowano kilka sztuk tego przyrządu na potrzeby krajowego przemysłu fotochemicznego oraz na eksport. Część zagadnień dotyczących ziarnistości i rozdzielczości obrazów fotograficznych podsumowano w monografii *Ziarnistość i rozdzielczość obrazów fotograficznych* [56], będącej kompendium wykładów W. Romera na Uniwersytecie Karola w Pradze. Wspólne prace W. Romera i A. Zaleskiego pozwoliły na sformułowanie nowego pojęcia *współczynnika jakości* materiałów fotograficznych [57], wiążącego w sobie dwie najważniejsze właściwości materiałów fotograficznych: światłoczułość i ziarnistość optyczną. Również prace W. Romera i T. Morawskiego wykazały, że dotychczasowe poglądy na absorpcję światła przez ziarna srebra zawarte w warstwie fotograficznej muszą być zmienione [58, 59]. Na uwagę zasługują również prace W. Romera i A. Zaleskiego poświęcone zagadnieniom rozdzielczości materiałów fotograficznych, pomiarowi zdolności rozdzielczej, opracowaniu testów pomiarowych oraz warunków optycznych pomiaru. Prace te znalazły zastosowanie przemysłowe oraz doprowadziły do opracowania uniwersalnego testu pomiarowego znanego obecnie jako *test rozdzielczości Romera-Zaleskiego* [60–64].

Równolegle w Zakładzie Fototechniki prowadzone są przez W. Markockiego prace z zakresu syntezy tzw. emulsji jądrowych przeznaczonych do rejestracji torów cząstek jonizujących oraz promieniowania wysokoenergetycznego [65–69]. Opracowane technologie były wykorzystywane przez wiele lat w bio-

logicznych badaniach izotopowych, autoradiografii minerałów oraz produkcji błon dentystycznych i defektoskopowych.

Niezwykle cenne wyniki uzyskano w zakresie badań nad zarodkowaniem i wzrostem kryształów halogenków srebra, zwłaszcza w zakresie syntezy emulsji modelowych metodą kontrolowanego wzrostu ostwaldowskiego⁷ [70, 71]. Po wieloletnich badaniach sprecyzowano warunki uzyskiwania modelowych emulsji o określonych formach przestrzennych kryształów halogenków srebra [72]. Prace [70–73] mają obecnie fundamentalne znaczenie w technologii syntezy emulsji fotograficznych i są cytowane w najpoważniejszych opracowaniach naukowych [74]. Na podstawie uzyskanych wyników wykonano wiele prac eksperymentalnych z zakresu sensybilizacji spektralnej, desensybilizacji oraz wpływu zawartości jodków w emulsjach fotograficznych [73]. Zbadano również wpływ rodzaju żelatyny, stężenia nadmiarowych jonów halogenowych i amoniaku na morfologię i kinetykę wzrostu kryształów halogenków srebra [75–78]. Zagadnienia syntezy emulsji fotograficznych stanowią, jak dotychczas, główną problematykę działalności naukowej Zakładu Fototechniki.

Interesujące wyniki przyniosły prace nad rozpraszaniem światła w warstwach fotograficznych [79–82]. Zbadano wpływ rozpraszania światła na graniczną wartość kontrastowości warstw fotograficznych oraz kształt krzywej charakterystycznej [83]. Ciekawe rezultaty przyniosły również badania nad zagadnieniem odstępstw od fotochemicznego prawa Bunsena i Roscoe'a, zwanego również prawem odwrotnej proporcjonalności. W odniesieniu do badań podstawowych zjawisk zachodzących wskutek oddziaływania promieniowania elektromagnetycznego w kryształach halogenków srebra, w wyniku czego powstaje tzw. fotograficzny obraz utajony, badania te stanowią źródło ważnych informacji [84–86].

W Zakładzie Fototechniki wykonywane są również prace naukowe i badawcze z zakresu poligrafii [np. 87–100], inżynierii chemicznej [101] i zagadnień estetycznych [np. 102]. Niektóre z prac uzyskują ochronę patentową [np. 71, 103, 120]. Publikuje się wiele prac popularnonaukowych w krajowych i zagranicznych czasopismach fotograficznych [np. 120–131] oraz wydawanych przy okazji Międzynarodowych Targów Fotograficznych „POLFOTO” [132, 133] i innych spotkań popularyzujących wiedzę o fotografii.

Przez pewien czas w Zakładzie Fototechniki prowadzone były badania nad fotopolimerami i zastosowaniem ich do produkcji skal mikroskopowych, siatek dyfrakcyjnych oraz noniuszów optycznych stosowanych w maszynach cyfrowych [140–142]. Opracowano również technologię produkcji materiałów dwuazoniowych uruchomioną w Bydgoskich Zakładach Fotochemicznych „FOTON” [15, 142–144].

⁷ Wzrost kryształów halogenków srebra polegający na wykorzystaniu różnicy rozpuszczalności małych i dużych kryształów, prowadzony przy zachowaniu odpowiedniego stężenia reagujących jonów, pozwala na uzyskiwanie monodispersyjnej populacji kryształów halogenków srebra o założonej wielkości.

Owocem działalności naukowej Zakładu Fototechniki są cztery monografie: *Teoria procesu fotograficznego* W. Romera [134], *Ziarnistość i rozdzielczość obrazów fotograficznych* W. Romera [56], *Chemia organiczna procesu fotograficznego* W. Markockiego [135] oraz *Systemy kontroli i regulacji wysokotemperaturowych procesów obróbki chemicznej barwnych materiałów fotograficznych* P. Nowaka [132], a także opracowanie przez S. Jabłonkę i A. Zaleskiego dwóch rozdziałów w pracy zbiorowej *Informacja obrazowa* [136]. Pracownicy Zakładu Fototechniki są ponadto współautorami podręczników, książek, haseł do encyklopedii techniki, skryptów oraz wielu innych opracowań naukowych i popularnonaukowych [np. 137–138].

W Zakładzie Fototechniki wykonano wiele prac o charakterze technologicznym wynikających z konkretnych potrzeb krajowego przemysłu fotochemicznego. Opracowano nowoczesną technologię dwustrumieniowej metody syntezy emulsji fotograficznych przeznaczonych do czarno-białych papierów fotograficznych [156, 157], technologii produkcji błon graficznych konwencjonalnych, infekcyjnych, wprostpozytywowych oraz technologię produkcji materiałów do holografii. Materiały wprostpozytywowe, niezwykle poszukiwane w latach 80., stanowiły prawdziwy przełom w technologii poligraficznej. Cenne opracowanie Zakładu Fototechniki oraz udana realizacja technologii emulsji wprostpozytywowych na skalę przemysłową w Bydgoskich Zakładach Fotochemicznych „FOTON” pozwoliła na osiągnięcie rangi światowej w tej branży materiałów fotograficznych [139].

Za swoją działalność w dziedzinie opracowań technologicznych Zakład zdobył liczne nagrody, wśród których najcenniejsze to nagroda IV stopnia uzyskana w 1981 r. w konkursie Naczelnej Organizacji Technicznej „Szukamy nowych technologii na eksport” oraz nagroda zespołowa II stopnia uzyskana w 1986 r. w konkursie „Mistrz techniki” organizowanym przez Radę Stołeczną Naczelnej Organizacji Technicznej.

Do znaczących opracowań technologicznych wdrożonych w krajowym przemyśle fotochemicznym należy zaliczyć:

- dwustrumieniową metodę syntezy emulsji przeznaczonych do produkcji papierów fotograficznych, w której zastosowano prostą metodę regulacji kontrastowości przez odpowiednie dozowanie soli rodu,
- dwustrumieniową metodę syntezy emulsji przeznaczonych do produkcji konwencjonalnych oraz infekcyjnych błon graficznych,
- technologię produkcji wysokoczułych błon dentystycznych i defektoskopowych,
- dwustrumieniową metodę syntezy emulsji wprostpozytywowych do produkcji unikatowych błon graficznych stosowanych w poligrafii,
- technologię syntezy emulsji stosowanych w produkcji rentgenograficznych błon przeznaczonych do diagnostyki medycznej.

Pracownicy Zakładu Fototechniki intensywnie uczestniczą w krajowych i międzynarodowych konferencjach i kongresach naukowych [np. 145–153].

Wielokrotnie studenci tej specjalizacji zajmowali premiiowane miejsca w międzynarodowym konkursie „Fotografia Academica” w Pardubicach na najlepszą pracę dyplomową z zakresu fotografii naukowej [np. 154, 155].

Oprócz działalności naukowej i współpracy z polskim przemysłem fotochemicznym Zakład Fototechniki prowadzi nieprzerwanie od momentu jego powołania do chwili obecnej działalność dydaktyczną, specjalizując studentów w zakresie chemii i technologii procesów fotograficznych. Jest jedną z najstarszych specjalizacji w Politechnice Wrocławskiej i posiada bogate tradycje dydaktyczne i wychowawcze przekazywane z pokolenia na pokolenie przez kolejnych profesorów. W Zakładzie istnieje skrupulatnie prowadzona biblioteka, w której zgromadzono unikatowe książki i opracowania, ponadto istnieje również archiwum zawierające oryginały wszystkich prac naukowych, patentów, opracowań technologicznych i wdrożeniowych oraz prace dyplomowe – inżynierskie i magisterskie, doktorskie i habilitacyjne. Dyplomy ukończenia specjalizacji w Zakładzie Fototechniki do chwili obecnej uzyskało około 260 osób, 7 z nich obroniło prace doktorskie w tej samej dziedzinie, dwie uzyskały stopień doktora habilitowanego oraz trzy osoby uzyskały tytuł profesora zwyczajnego. Wiele z nich uzyskało stopnie i tytuły naukowe w innych dziedzinach nauki.

Obecnie Zakład Fototechniki kontynuuje swą działalność naukową i badawczą w zakresie technologii syntezy emulsji fotograficznych, kształtowania ich właściwości sensytmetrycznych oraz badań właściwości strukturometrycznych warstw fotograficznych. Ponadto, pod wpływem silnego rozwoju współczesnych, elektronicznych metod zapisu informacji obrazowej, profil działalności Zakładu Fototechniki ulega zmianom zmierzającym do unowocześnienia warsztatu dydaktyczno-naukowego i dostosowania go do wymogów przyszłości.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] Dziennik Urzędowy Ministerstwa Oświaty Nr 11 z 31 października 1946, pozycja 319, strona 447 (Nr IV SW-7522/46), paragraf 1, punkt F, podpunkt b).
- [2] W. Markocki, *Działalność naukowa prof. dra Witolda Romera*, Wiadomości Chemiczne, 1967, 21, 733–743.
- [3] J. Mierzecka, *Wspomnienie o prof. Witoldzie Romerze*, Fotografia, Vol. XV 1967, No. 7(169), 147–148.
- [4] J. Mierzecka, *Cale życie z fotografią*, Wydawnictwo Literackie Kraków 1981, s. 115 i 255.
- [5] P. Lizurek, *Działalność naukowa i dydaktyczna Katedry obecnie Zakładu Fototechniki Politechniki Wrocławskiej*, Praca magisterska Wyższej Szkoły Pedagogicznej w Częstochowie wykonana pod kierunkiem dra A. Żakowicza w Zakładzie Grafiki Artystycznej, Projektowania Graficznego i Fotografii (1986).
- [6] W. Romer, *Katedra Fototechniki we Wrocławiu*, Świat Fotografii, Vol. III (marzec 1948), No. 7, 38–39.

- [7] J. Bułhak, *Fotografia dla potrzeb krajoznawstwa i propagandy turystycznej*, Świat Fotografii, Vol. I (sierpień 1946), 4.
- [8] A. Gałęcki, *Fotografia dla potrzeb naszego kraju*, Świat Fotografii, Vol. I (grudzień 1946), 3.
- [9] Dziennik Ustaw Rzeczypospolitej Polskiej nr 61, Warszawa 30 listopada 1951, Rozporządzenie Ministra Szkół Wyższych i Nauki z 9 listopada 1951, pozycja 416.
- [10] Dziennik Urzędowy Ministerstwa Oświaty i Szkolnictwa Wyższego nr A-14/68, pozycja 116, Warszawa, 21 grudnia 1968.
- [11] L. Komorowski, *Informator Instytutu Chemii Fizycznej i Teoretycznej Politechniki Wrocławskiej*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 1996.
- [12] Materiały konferencyjne Konferencji Teorii i Technologii Procesu Fotograficznego, Zakopane, 16–21 września 1968 (części I–IV).
- [13] I Sympozjum Teoria i Technologia Procesu Fotograficznego, Karpacz, 15–17 października 1970, *Żelatyna fotograficzna*, Biuletyn Tematyczno-Informacyjny Warszawskich i Bydgoskich Zakładów Fotochemicznych, Bydgoszcz, Warszawa 1972.
- [14] II Sympozjum Teoria i Technologia Procesu Fotograficznego, *Powstawanie obrazu utajonego w kryształach halogenków srebra* (materiały nie publikowane), Warszawa 1972.
- [15] III Sympozjum Teoria i Technologia Procesu Fotograficznego, *Światłoczułe materiały bezsrebrowe*, Międzygórze, listopad 1973.
- [16] IV Sympozjum Teoria i Technologia Procesu Fotograficznego, *Stabilizacja halogenosrebrowych materiałów światłoczułych*, Szklarska Poręba, wrzesień 1975.
- [17] V Sympozjum Teoria i Technologia Procesu Fotograficznego, *Własności, powstawanie i wzrost kryształów halogenków srebra*, Michałowice, 12–15 września 1977.
- [18] VI Sympozjum Teoria i Technologia Procesu Fotograficznego, *Dojrzewanie chemiczne emulsji fotograficznych*, Charzykowy, 19–22 września 1979.
- [19] I Sympozjum, listopad 1967 (brak zwartego opracowania).
- [20] II Sympozjum, Rocznik Sekcji Fotografii Naukowej Związku Polskich Artystów Fotografików, Wrocław, 23–24 listopada 1968.
- [21] III Sympozjum, Rocznik Sekcji Fotografii Naukowej Związku Polskich Artystów Fotografików, Wrocław, 22–23 listopada 1970.
- [22] IV Sympozjum, Rocznik Sekcji Fotografii Naukowej Związku Polskich Artystów Fotografików, Wrocław, 28–29 listopada 1970.
- [23] V Sympozjum, Rocznik Sekcji Fotografii Naukowej Związku Polskich Artystów Fotografików, Wrocław, listopad 1971.
- [24] VI Sympozjum, Rocznik Sekcji Fotografii Naukowej Związku Polskich Artystów Fotografików, Jodłowy Dwór 10–12 maja 1974, wydanie Warszawa 1976.
- [25] W. Romer, *Isohelie, eine neue Technik der bildmäßigen Photographie*, Camera (Luzern), 1932, 10, 291–298.
- [26] W. Romer, Pat. Bryt., 369606 (1932).
- [27] W. Romer, *Studium wywoływania wyrównawczego* (praca doktorska), Przemysł Chemiczny, 1934, 18, 533.
- [28] W. Romer, W. Markocki, J. Biernat, *Expression numérique de la sensibilité basée sur les pentes minima relatives*. IX Congr. Intern. Phot. Paris 1935, 605–621.
- [29] W. Romer, A. Rajski, *Investigations Concerning Practical Sensitometry of Photographic Papers*, Phot. Journ. 1942, 82, 66–73 (Praca wykonana we Lwowie i przyjęta do publikacji w Akademii Technicznej, uległa zniszczeniu podczas wojny. Publikowana w Anglii z niekompletnych materiałów).
- [30] W. Romer, *Ostrość obrazu optycznego*, Fotograf Polski 1936, No. 6 i 7.
- [31] W. Romer, *Ziarnistość i ostrość powiększeń fotograficznych*, Przegląd Fotograficzny, Wilno 1938.
- [32] W. Romer, *Sur l'expression numérique de la rapidité des émulsions negatives*, Sci. et Ind. Phot., 1936, (2) 7, 117–120.

- [33] W. Romer, *Meisterung der Tonwerte im Silberbild*, Camera (Luzern), 1938, 17, 1-6.
- [34] W. Markocki, *Nowoczesne barwniki sensybilizacyjne*, Nowości Fotograficzne, Bydgoszcz 1938.
- [35] W. Romer, G. W. W. Stevens, *Experiments on the Influence of Light Scatter on the Resolution of Photographic Materials*, Harrow 27 XI 1941 (12 s., 10 wykr.).
- [36] W. Romer, *Some Experiments on the Combined Effect of Film and Lens Resolution*. Harrow, 16 XII 1941 (5 s. 1 wykr.).
- [37] W. Romer, *Diffusion of Light by Photographic Emulsion*, Harrow, 18 XII 1941, 16 s.
- [38] W. Romer, *Emulsion with Reduced Light Scatter for Airgraph Service*, Rep. No. H. 1028 13 Jan. 1943 (zalecane w tym raporcie modyfikacje zostały wprowadzone w materiale Rekordak po wojnie).
- [39] W. Romer, E. W. H. Selwyn, *An Instrument for Measurement of Graininess*, Rep. No. H. 890. Phot. Journ., 1943, 83, 17-20.
- [40] W. Romer, E. F. Teal, *The Effect of Light Scatter of Photographic Emulsion on Resolution*, Rep. No. H. 1077, 23 VIII 1943 (8 s., 2 tabl., 3 wykr.).
- [41] W. Romer, *Resolution of Test Objects of Low Contrast*, A. P. R. C. No. 102, Kodak rep. H. 1006 5 XI 1942 (12 s., 3 tabl.).
- [42] W. Romer, *Note on the Present Position of Image Movement Compensation*, A. P. R. C. No. 152, R. A. E. Techn. Note Ph. 254.
- [43] W. Romer, J. C. Duncan, *Camera Stabilisation - Night Photography With Bombing*, A.P.R.C. No. 169, R.A.E. Techn. Note Ph. 219.
- [44] W. Romer, *Compensation for Image Movement in Night Photography*, A.P.R.C. No. 171, R.A.E. Techn. Note Ph. 216, Jan 1943.
- [45] W. Romer, *Image Movement Compensation, Aircraft Stability Measurements*, A.P.R.C. No. 178, R.A.E. Techn. Note Ph. 236, July 1943.
- [46] W. Romer, *Progress Report on Investigation of Camera Mountings*, A.P.R.C. No. 178, R.A.E. Techn. Note Ph. 270, April 1944.
- [47] W. Romer, *Design and Testing of Moving Film Magazine for Night Photography*, A.P.R.C. No. 183, R.A.E. Techn. Note Ph. 269, April 1944.
- [48] W. Romer, *Service Trial of Night Cameras: F 52 Open Plate with Type 44/52 Moving Film Magazine Versus K 19 B*, A.P.R.C. No. 226, R.A.E. Techn. Note Ph. 312, Dec. 1944.
- [49] W. Romer, *Factors Affecting Quality in Night Photography with Pyrotechnic Flashes*, A.P.R.C., R.A.E. Techn. Note Ph. 333, Aug. 1945.
- [50] W. Romer, *Suppression of Image Movement in Air Photography*, R.A.E. Report Ph. 10 April 1946 (jedyne raport wydany przez dział fotografii R.A.E.).
- [51] W. Romer, *Investigations on the Measurement of Graininess I. The Influence of the Lens on the Grainy Pattern of the Enlarged Photographic Images*, Internationalen Konferenz für Wissenschaftliche Photographie. Sektion C, 2: Schärfe und Körnigkeit C2-2. Ergebnisse der internationalen Konferenz für wissenschaftliche Photographie. Köln (1956), O. Helwich Verlag, Darmstadt und Wien 1958, s. 550-554.
- [52] W. Romer, *A Suggestion for Classification of Aspects of Granularity and for Standardisation of Conditions for its Measurement*, Internationalen Konferenz für Wissenschaftliche Photographie. Sektion C, 2: Schärfe und Körnigkeit C2-1. Ergebnisse der internationalen Konferenz für wissenschaftliche Photographie. Köln (1956), O. Helwich Verlag, Darmstadt und Wien 1958, s. 547-549.
- [53] W. Romer, A. Zaleski, *Investigations on the Measurement of Graininess II. A New Visual Method of Graininess Estimation*, Internationalen Konferenz für Wissenschaftliche Photographie Sektion C, 2: Schärfe und Körnigkeit C2-3. Ergebnisse der internationalen Konferenz für wissenschaftliche Photographie. Köln (1956), O. Helwich Verlag, Darmstadt und Wien 1958, s. 555-560.
- [54] P. Glafkides, *Chimie et Physique Photographiques*, C.E.P. Édition (Éditions de l'Usine Nouvelle) Paris, 1987.

- [55] A. Zaleski, *Pomiar ziarnistości obrazów fotograficznych oparty na zasadzie zrównywania deseni ziarnistych* (praca doktorska), Politechnika Wrocławska, Wrocław, czerwiec 1960.
- [56] W. Romer, *Ziarnistość i rozdzielczość obrazów fotograficznych*, Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa 1953, s. 112, cykl wykładów wygłoszonych na Uniwersytecie Karola w Pradze, w listopadzie 1951, w ramach wymiany kulturalnej polsko-czechosłowackiej.
- [57] W. Romer, A. Zaleski, *Gütekoeffizient der fotografischen Schichten*, III Wissenschaftliche und Angewandte Fotografische Konferenz, Budapest, 1961. Augustus 28. — Szeptember I., s. 2/1–2/3.
- [58] W. Romer, T. Morawski, *The Absorption Cross Section for Light of the Silver Grains in Photographic Deposits*, The Journal of Photographic Science, 1963, 11, No. 3, 132–135.
- [59] W. Romer, T. Morawski, *The Absorption Cross Section for Light of the Silver Grains in Photographic Deposits, II. Further Experimental Results*, The Journal of Photographic Science, 1966, 14, 278–281.
- [60] W. Romer, *Influence du Contraste de la Mire sur le Pouvoir Résolvant des Systèmes «Objectif, Couche Sensible»*, Science et Industries Photographiques, 1947, 18, No. 7, Série 2, 193–200.
- [61] W. Romer, *Studium doświadczalne rozdzielczości negatywu fotograficznego*, Roczniki Chemii, 1948, 22, 112–126, praca habilitacyjna.
- [62] W. Romer, B. Nawrot, *Auflösungsvermögen einiger Farbfilme im Negativ-Positiv und Umkehrprozeß*, V Conference on Scientific and Applied Photography, Budapest marcius 1966, s. 35.
- [63] A. Zaleski, *Detailwiedergabe von Modellemulsionen mit verschiedenen Silberhalogenid — Gelatine — Verhältnissen*, Zeitschrift für wissenschaftliche Photographie, Photophysik und Photochemie, 1967, 61, No. 7–9, 119–123.
- [64] A. Zaleski, W. Browiński, M. Biątek, *Die Messung der MÜF von farbigen photographischen Bildern und photographischen Schwarz-Weiß-Filmaufnahmekamera-Bildern nach der Methode Deprez-Pollet*, Międzynarodowa Konferencja Teorii i Technologii Procesu Fotograficznego, Zakopane 1968, część 3, s. 66/1–66/8.
- [65] W. Markocki, *Emulsje fotograficzne do rejestracji torów cząstek elektrycznie naładowanych*, Wiadomości Chemiczne, 1952, 6, 2–27.
- [66] W. Markocki, *Un Procédé Comparatif pour la Mésure de la Sensibilité des Émulsions Photographiques Nucléaires*, Premier Colloque International de Photographie Corpusculaire, Strasbourg, 1^{er} au 6 Juillet 1957. Centre National de la Recherche scientifique. 13 Quai Anatole France Paris (VII^e) 1958, s. 107–113.
- [67] W. Markocki, *Production d'Émulsions à Haute Concentration en Halogénures d'Argent*, Science et Industries Photographiques, 1959, 30, No. 5, Série 2, 177–180.
- [68] W. Markocki, *Neue Herstellungsmethode von Kernemulsionen*, Korpuskularphotographie IV, Vorträge und Diskussionen auf dem IV Internationalen Kolloquium über Korpuskularphotographie, München 1962, s. 162–168.
- [69] W. Markocki, *Применение метода контролируемого остwaldовского созревания к изготовлению ядерных эмульсий*, ДУБНА, 10–12 декабря 1963, СССР, Сборник сообщений на рабочем совещании по химико-технологическим вопросам эмульсионной методики, ДУБНА 1964, с. 9–12.
- [70] W. Markocki, W. Romer, *Kontrollierte Ostwaldreifung photographischer Emulsionen*, Korpuskularphotographie IV, Vorträge und Diskussionen auf dem IV Internationalen Kolloquium über Korpuskularphotographie, München 1962, s. 149–161.
- [71] W. Romer, W. Markocki, *Sposób otrzymywania emulsji fotograficznej o równomiernej wielkości kryształów*, opis patentowy nr 46975, Warszawa 1961.
- [72] W. Markocki, A. Zaleski, *Investigations on the Influence of Br⁻ and NH₃ on the Shape of AgBrI Crystals in Gelatine Solutions*, The Physics and Chemistry of the Silver Halide Crystal, 1972 Montreal Science Symposium, August 23–25, 1972, Society of Photographic Scientists and Engineers, s. 47–55.
- [73] W. Markocki, *The Spectral Sensitization on Different Crystallographic Planes*, Collo-

- quo Internazionale sulla Scienza della Fotografia, Torino 23–28 Settembre 1963, Session Ia, No. 12.
- [74] *Perspective World Report 1966–1969 of the Photographic Industries, Technologies and Science*, Focal Press, New York-London.
- [75] W. Romer, A. Sidorowicz, *Investigations on the Influence of Gelatin on the Recrystallization of Silver Bromide Suspensions*, The Journal of Photographic Science, 1967, 15, No. 3, 115–123.
- [76] W. Romer, A. Sidorowicz, *Wpływ stężenia amoniaku i bromków na morfologię mikrokryształów bromku srebra*, Roczniki Chemii, 1965, 39, No. 7–8, 1145–1147.
- [77] W. Romer, A. Sidorowicz, *Influence of the Ammonia and Bromide Concentrations on the Morphology of Silver-Bromide Microcrystals*, Congrès International de Science Photographique, Paris, September 1965, The Focal Press London and New York 1967, red. J. Pouradier, s. 243–246.
- [78] W. Romer, A. Sidorowicz, *The Effect of Gelatin on the Growth of Silver Bromide Microcrystals*, Colloquio Internazionale sulla Scienza della Fotografia, Torino 23–28 Settembre 1963, Session Ia, No. 11.
- [79] W. Markocki, *Zależność młeczności warstw światłoczułych od stężenia powierzchniowego halogenku srebra*, Zeszyty Naukowe Politechniki Wrocławskiej, 1954, nr 4, Chemia, zeszyt 1, 21–41.
- [80] W. Markocki, *Zależność rozpraszania i absorpcji światła w warstwach fotograficznych od przestrzennego stężenia halogenków srebra*, Część II, Zeszyty Naukowe Politechniki Wrocławskiej, 1959, No. 31, Chemia VI, 113–129.
- [81] W. Markocki, *Die experimentale Untersuchung der Gleichung der Schwarzungskurve Fotografischer Schichten*. III. Wissenschaftliche und Angewandte Fotografische Konferenz, Budapest, 1961. Augustus 28. — Szeptember 1., s. 46/1–46/6.
- [82] W. Markocki, *Doświadczalne badanie równania krzywej charakterystycznej warstw fotograficznych*, Chemia Stosowana, 1962, 6, No. 2, 217–253.
- [83] W. Markocki, S. Jabłonka, *Der maximale Kontrast von Bromsilberschichten als Funktion mittleren Kristallgröße der Emulsion*, 6th Conference on Scientific and Applied Photography, Budapeszt, 20–24 marca 1972, s. 10.
- [84] W. Markocki, M. Borzych, *Odstępstwa papierów fotograficznych do powiększeń od prawa odwrotnej proporcjonalności*, Chemia Stosowana, 1965, 9, No. 4A, 363–370.
- [85] W. Markocki, M. Borzych, *Odstępstwa od prawa odwrotnej proporcjonalności wielowarstwowych papierów do fotografii barwnej*, Chemia Stosowana, 1966, 10, No. 2A, 159–169.
- [86] W. Markocki, W. Zajączkowski, *Wpływ rodu na odstępstwa od prawa odwrotnej proporcjonalności bromojodosrebranych emulsji fotograficznych*, Chemia Stosowana, 1966, 10, No. 3A, 281–286.
- [87] W. Romer, *Odbitki fotograficzne dla celów reprodukcji graficznej*, Poligrafika, 1957, 9, No. 11, 1–3.
- [88] W. Romer, M. Gredka, Z. Jackiewicz, H. Pasek, W. Plebańczyk, *Estimation of Certain Quality Characteristics of Plates for Process Work*, The Journal of Photographic Science, 1958, 6, 144–152.
- [89] W. Romer, E. Zaleska, *Zastosowanie pektyny buraczanej w reprodukcji poligraficznej*, Zeszyty Naukowe Politechniki Wrocławskiej, 1959, No. 31, Chemia VI, 131–138.
- [90] W. Romer, M. Luczak, B. Starostka, *The Effect of Humidity on Photochemical Hardening of Bichromated Coatings*, The Journal of Photographic Science, 1961, 9, 274–276.
- [91] A. Zaleski, *Kontrolowane wywoływanie infekcyjne*, Poligrafika, 1970, 22, Część I: No. 4, 92–94, Część II: No. 5, 108–109.
- [92] A. Zaleski, *Fotograficzne materiały infekcyjne w polskim przemyśle poligraficznym*, Poligrafika, 1982, 34, No. 1, 25–28.
- [93] A. Zaleski, *Fotograficzne materiały infekcyjne w polskim przemyśle poligraficznym*, Poligrafika, 1982, 34, No. 2, 63–64.

- [94] A. Zaleski, C. Mora, *Nowy polski wprostpozytywowy fotograficzny materiał reprodukcyjny*, Poligrafika, 1989, 41, No. 6, 129–132.
- [95] A. Zaleski, C. Mora, *Sensytometryczna kontrola jakości obrazu w druku sitowym*, Poligrafika, 1989, 41, No. 3, 59–62.
- [96] C. Mora, *Odwracalna obróbka chemiczna czarno-białych materiałów fotograficznych*, Poligrafika, 1990, 42, No. 9, 186–188, 194.
- [97] C. Mora, *Zastosowanie procesu odwracalnego do obróbki wysokokontrastowych błon graficznych*, Poligrafika, 42, 1990, No. 10, 208–210.
- [98] P. Nowak, *Ocena handlowych wprostpozytywowych błon graficznych produkcji polskiej typu Foton FWP*, Poligrafika, 1994, 46, No. 5, 28–30.
- [99] P. Nowak, *Właściwości sensytometryczne krajowych, czarno-białych papierów fotograficznych*, Poligrafika, 1994, 46, część I: No. 8, 44–46, część II: No. 9, 48–51.
- [100] P. Nowak, *Ostrość obrazów fotograficznych*, Poligrafika, 1995, 47, część I: No. 2, 46–48, część II: No. 5, 32–34.
- [101] W. Romer, J. Dziegłowski, S. Jabłonka, *Pomiar efektywności mieszania cieczy*, Chemia Stosowana, 1965, 9, No. 1B, 81–92.
- [102] W. Markocki, M. Borzych, *Prüfung der farbigen Photopapiere nach der Methode von A. Marriage*, Międzynarodowa Konferencja Teorii i Technologii Procesu Fotograficznego, Zakopane 1968, część 4, s. 57/1–57/5.
- [103] W. Romer, A. Zaleski, *Sposób korygowania barw za pomocą kompensatorów przy użyciu materiałów trójwarstwowych integralnych*, Opis patentowy nr 38887, Świadcstwo autorskie nr 3419, Warszawa 30 czerwca 1955.
- [104] W. Romer, W. Markocki, *Sposób wytwarzania materiału fotograficznego światłoczułego*, Opis patentowy nr 49756, Warszawa 1961.
- [105] W. Markocki, A. Zaleski, *Urządzenie do obróbki chemicznej sensytometrycznych próbek materiałów fotograficznych*, Zgłoszenie patentowe nr 144.318 – 1974, Patent Polski 83077, Świadcstwo autorskie nr 81365, Warszawa 15 lipca 1977.
- [106] W. Markocki, S. Jabłonka, R. Puciul, *Sposób zapobiegania obniżaniu się efektywności uczulenia spektralnego halogenosrebrowych emulsji fotograficznych do fotografii barwnej, powodowanego oddziaływaniem składowych sprzęgających*, Patent Polski nr 85.427 (1978).
- [107] W. Markocki, M. Borzych, S. Jabłonka, A. Stefańska, A. Zaleski, *Sposób wytwarzania chlorobromosrebrowych i chlorobromojodosrebrowych emulsji fotograficznych*, Patent Polski nr 97.490.
- [108] W. Markocki, A. Zaleski, L. Engel, *Termostatyczne urządzenie do wytwarzania emulsji fotograficznych*, Patent Polski nr 97.394.
- [109] A. Zaleski, *Kaseta do prób korekcji w barwnym fotograficznym procesie pozytywowym*, Prawo ochronne nr 36325, Świadcstwo autorskie nr 51342, 31 marca 1983.
- [110] S. Jabłonka, *Sposób wytwarzania chlorobromosrebrowych i chlorobromojodosrebrowych emulsji fotograficznych*, Zgłoszenie patentowe nr P 225.422-1985, Patent Polski nr 129774, patent dodatkowy do patentu nr 97490.
- [111] W. Markocki, Z. Zakrzewski, *Sposób wytwarzania halogenosrebrowych emulsji radiofotograficznych, zwłaszcza bromosrebrowych i bromojodosrebrowych*, Zgłoszenie patentowe nr 237028-1982, Patent Polski (tymczasowy) nr 131500.
- [112] W. Markocki, *Sposób usuwania zadymienia bromo- lub jodobromosrebrowych emulsji fotograficznych, powstającego w toku procesu dojrzewania fizycznego oraz zmniejszenia skłonności emulsji do powstawania zadymienia w procesie dojrzewania chemicznego*, Zgłoszenie patentowe nr 250719, Patent Polski (tymczasowy) nr 13701.
- [113] A. Zaleski, J. Węglińska-Flis, *Sposób wytwarzania halogenosrebrowych emulsji fotograficznych wprostpozytywowych*, Zgłoszenie patentowe nr P 246997 – 1984, Patent Polski nr 141741.
- [114] L. Biliński, J. Szczypior, S. Chudy, W. Markocki, M. Borzych, R. Chodyna,

- H. Szews, *Zawór do bezstopniowego regulowania przepływu cieczy*, Zgłoszenie nr W 81098-1983, Wzór użytkowy. Polska nr 44235.
- [115] A. Zaleski, C. Mora, J. Węglińska-Flis, *Sposób wytwarzania halogenosrebrowych emulsji fotograficznych*, Zgłoszenie patentowe nr 269099-1987, Patent Polski nr 155782.
- [116] A. Zaleski, C. Mora, J. Węglińska-Flis, *Sposób wytwarzania halogenosrebrowych emulsji fotograficznych*, Zgłoszenie patentowe nr 279590 — 1987, Patent Polski nr 156251.
- [117] A. Zaleski, A. Piasecka, C. Mora, J. Węglińska-Flis i inni, *Sposób wytwarzania fotograficznej emulsji wprostpozytywowej*, Zgłoszenie patentowe nr 278328-1989, Patent Polski nr 159899.
- [118] A. Zaleski, A. Piasecka, C. Mora, J. Węglińska-Flis i inni, *Sposób stabilizacji światłoczułych emulsji halogenosrebrowych*, Zgłoszenie patentowe nr 281137-1989, Patent Polski nr 160890.
- [119] A. Zaleski, C. Mora, J. Węglińska-Flis, *Sposób wytwarzania halogenosrebrowych emulsji fotograficznych o kryształach w formie płytek*, Zgłoszenie patentowe nr 279578-1987, Patent Polski nr 160903.
- [120] A. Piasecka, J. Kajzer, L. Biliński, R. Jurkowski, A. Zaleski, C. Mora, J. Węglińska-Flis, *Sposób wytwarzania materiałów fotograficznych wprostpozytywowanych do reprodukcji*, Patent Polski nr 160655.
- [121] P. Nowak, *Obróbka negatywów Foto 65 w wywoływaczu A 49*, Foto 1994, No. 6, s. 40.
- [122] P. Nowak, B. Rajkowski, *Czy wywoływacz FX19 jest wywoływaczem drobnociarnistym*, Foto 1994, No. 7, s. 46.
- [123] P. Nowak, E. Skolimowska, *Właściwości materiałów negatywowych Fotopan FL obrabianych w wywoływaczu W 17*, Foto 1994, No. 8, s. 45.
- [124] P. Nowak, *Ciepła nowość Fuji*, Foto 1994, No. 9, s. 27–29.
- [125] P. Nowak, *Fujichrome Provia 400 Professional (RHP) kontra Fujichrome 400 D Professional*, Foto 1994, No. 12, s. 27–29.
- [126] P. Nowak, *Kodak T-MAX 3200 Professional Film For Black-and-White Prints — najwyższa czułość*, Foto 1995, No. 2, s. 44–45.
- [127] P. Nowak, *Agfacolor HDC*, Foto 1995, No. 3, s. 23–25.
- [128] P. Nowak, *Astrość obrazów fotograficznych*, Foto 1995, No. 3, s. 38–39.
- [129] P. Nowak, *Jaki jest naprawdę Kodak Ektachrome 100 HC*, Foto 1995, No. 4, s. 24–25.
- [130] P. Nowak, P. Serwatyński, *Ilford Delta Professional — czarno-biały rarytas*, Foto 1995, No. 4, s. 48–50.
- [131] A. Zaleski, *O problemie szkolnictwa fotograficznego w Polsce*, Foto 1995, No. 4, s. 55.
- [132] P. Nowak, *Systemy kontroli i regulacji wysokotemperaturowych procesów obróbki chemicznej barwnych materiałów fotograficznych*, VI Międzynarodowe Targi Fotograficzne, X Ogólnopolski Zjazd Fotografów, POL-FOTO'97, Międzyzdroje, 12–16 marca 1997, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 1997, s. 132.
- [133] *Materiały Sesji Naukowo-Technicznej VI Międzynarodowych Targów Fotograficznych i X Ogólnopolskiego Zjazdu Fotografów*, Międzyzdroje, 12–16 marca 1997, pod redakcją P. Nowaka, Agencja Promocyjna MONADA, Wrocław 1997, s. 138.
- [134] W. Romer, *Teoria procesu fotograficznego*, Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa 1955, s. 290.
- [135] W. Markocki, *Chemia organiczna procesu fotograficznego*, Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa 1958, s. 252.
- [136] *Informacja obrazowa*, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 1992, praca pod redakcją M. Ostrowskiego, rozdziały 5 i 6.
- [137] W. Markocki, *Przepisy fotograficzne*, Rozdział nr 15.7 w: *Kalendarz Chemiczny*, tom 2, część 2, Dział Towaroznawstwa, 1955, s. 1239–1250.
- [138] W. Romer, *Pomiary barwy (Kolorymetria)*, *Mechanik*, poradnik techniczny, tom 1, część 2, 1053–1085, wyd. I 1951, wyd. IV przerobione i uzupełnione, Państwowe Wydawnictwo Techniczne 1960, tom 1, część 3, rozdział XXXVIII, s. 966–1002.

- [139] A. Zaleski, *Directly Positive Photographic Materials*, Pol. Tech. Rev., No. 5 1989, 20–21.
- [140] J. Rabek, A. Zaleski, *Fotopolimery w fototechnice i poligrafii*, Polimery, część I: 1970, 15, No. 9, 437–442, *Polimery promienioczułe w fototechnice i poligrafii*, część II: 1970, 15, No. 10, 499–504, część III: 1970, 15, No. 11–12, 555–560, A. Zaleski, J. Rabek, część IV: 1971, 16, No. 1, 1–5, część V: 1971, 16, No. 2, 59–63.
- [141] A. Zaleski, *Problemy zastąpienia halogenków srebra w układach fotograficznych związkami niesrebowymi*, Wiadomości Chemiczne, 1970, 24, 211–213.
- [142] A. Zaleski, W. Chabros, *Sposób nanoszenia emulsji fotograficznych na małe podkłady optyczne oraz przyrząd do noszenia emulsji fotograficznych na małe podkłady optyczne*, Patent Polski 122598 (15.12.1983).
- [143] W. Markocki, *Wytyczne do badań nad opracowaniem technologii produkcji światłoczułych materiałów dwuazoniowych*, Raport Instytutu Chemii Fizycznej i Teoretycznej Politechniki Wrocławskiej nr 102, lipiec 1977 (praca nie publikowana).
- [144] A. Zaleski, J. Zięba, *Badania wstępne nad opracowaniem w skali laboratoryjnej technologii mikrofilmu dwuazoniowego*, Raport Instytutu Chemii Fizycznej i Teoretycznej Politechniki Wrocławskiej nr I-4/S008/90 (praca nie publikowana).
- [145] W. Markocki, S. Jabłonka, *Der Einfluß einer auf den Chlorbromsilberkristallen erzeugten AgJ – Schicht auf die spectrale Sensibilisierung der Farbkupplerhaltigen Emulsionen*, International Congress on Photographic Science, Dresden 1974, oraz w: Journal für Signalaufzeichnungsmaterialien, 1977, 5, No. 3, 169–176.
- [146] W. Markocki, A. Sidorowicz, *Der Einfluß mancher Polyaminosäuren auf die Ostwaldreifung wasseriger Silberhalogenidesuspensionen*, International Congress on Photographic Science, Dresden 1974, Journal für Signalaufzeichnungsmaterialien, 1977, 5, No. 2, 119–124.
- [147] J. Zięba, W. Pflögel, *Simultaneous Photolysis of Directly Linked Porphyrin-diazonium Salt Molecule*, Proceedings of the Conference on Lasers in Chemistry, Trieste June 1990, Proc. Indian. Acad. Sci. – Chem. Sci., 1991, 103, 487–497.
- [148] S. Jabłonka, C. Mora, P. Nowak, A. Zaleski, *The influence of some organic compounds on the recrystallization of fine grain AgBr emulsions*, IS&T's 47th Annual Conference ICPS'94: The Physics and Chemistry of Imaging Systems, Rochester USA, May 1994, s. 230–233.
- [149] S. Jabłonka, C. Mora, P. Nowak, A. Zaleski, *Photographic Testing Method of Reducing Properties of Gelatins*, IS&T's 47th Annual Conference ICPS'94: The Physics and Chemistry of Imaging Systems, Rochester USA, May 1994, s. 233–253.
- [150] S. Jabłonka, C. Mora, P. Nowak, A. Zaleski, *Some Aspects of Tetrazainden Derivative in the Photographic Process with AgBr(I) Twin Crystals*, IS&T's 47th Annual Conference ICPS'94: The Physics and Chemistry of Imaging Systems, Rochester USA, May 1994, s. 301–302.
- [151] P. Nowak, C. Mora, *The Computer Technique in the Photographic Image Quality Evaluation*, IS&T's 47th Annual Conference ICPS'94: The Physics and Chemistry of Imaging Systems, Rochester USA, May 1994, s. 569–571.
- [152] P. Nowak, *Application of Fourier Transformation in the Data Smoothing Process During the Computation of Modulation Transfer Function of Photographic Materials by Spread Function Methods*, IS&T's 47th Annual Conference ICPS'94: The Physics and Chemistry of Imaging Systems Rochester USA, May 1994, s. 571–573.
- [153] M. Kaźmierczak, W. Markocki, *Experiments Concerning the Influence of [100] and [111] Faces of Silver Bromide Crystals on the Aggregation of Sensitizing Dyes*, Conf. on Sci. and Applied Photogr., Budapest 1975, Proceedings, s. 87–93.
- [154] A. Zaleski, J. Węglińska, *Исследование влияния качества желатны на сенситометрические свойства фотографических эмульсий применяемых в голографии*, VII Symposium o fotochemii, fotofizyce a vedecke fotografii, Fotografia Academica, Československo, Pardubice XI 1978, Materiały konferencyjne, s. 41–48.

- [155] J. Stasiak, *Супераддитивность в цветном проявлении черно-белых рентгеновских материалов*, IX Sympozjum o fotochemii, fotofizyce a vedecke fotografii, Fotografia Academica, Československo, Pardubice XI 1980, Materiały konferencyjne, s. 97–108.
- [156] A. Zaleski, *Some Aspects of Crystal Growth the Double-jet Method of Photographic Emulsion Preparation*, The Journal of Photographic Science, 1979, 27, 43–46.
- [157] W. Markocki, A. Zaleski, *Über die Empfindlichkeitssiteigerung der Brom- und Bromiodsilberemulsionen durch Aufkristallisieren einer Chlorsilberhülle auf die Kristalle*, Photophysikalische Symposium mit Internationaler Beteiligung Elementar und Verstärkungsprozesse und Wiedergabeigenschaften, Hohenstein-Ernstthal, DDR, November 1978, Journal für Signallaufzeichnungsmaterialien, 1979, 7, No. 6, 405–410.

Praca wpłynęła do Redakcji 30 października 1997

**WSPÓŁCZESNY PRZEMYSŁ CHEMICZNY
W ŚWIETLE WYMAGAŃ OCHRONY
ŚRODOWISKA NATURALNEGO***

**THE CHEMICAL INDUSTRY OF TODAY
IN THE LIGHT OF ENVIRONMENTAL
PROTECTION REQUIREMENTS**

Bogdan Burczyk

*Institut Technologii Organicznej i Tworzyw Sztucznych Politechniki Wrocławskiej,
Wybrzeże S. Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław*

Abstract

Wprowadzenie

1. Analiza cyklu życia produktu
2. Ocena ryzyka
3. Produkty o małej uciążliwości dla środowiska naturalnego:
surfaktanty chemodegradowalne
 - 3.1. Surfaktanty zawierające ugrupowanie estrowe
 - 3.2. Surfaktanty zawierające ugrupowanie acetalowe
4. Uwagi końcowe

Piśmiennictwo cytowane

* Artykuł jest poszerzoną wersją wykładu plenarnego wygłoszonego na II Kongresie Technologii Chemicznej we Wrocławiu we wrześniu 1997 r.

ABSTRACT

The consumption of manufactured chemical (product) has a manifold effect on resources and the environment. The chemical industry undertakes many activities to meet the requirements of environmental protection. Two environmental management techniques, i.e., Life Cycle Assessment (LCA) [10] and Risk Assessment [13–15] are described and discussed in this paper. LCA studies the environmental aspects and potential impacts throughout the product's life from raw material acquisition through production, use, and disposal. Risk assessment is a formalized analysis of the adverse impact of some specific material, chemical, or procedure on humans and/or the environment. Examples of life cycle inventory (LCI which is part of LCA) for detergent alcohols production [12] and risk assessment for detergent surfactants use [21] are given.

Finally, some new types of *chemodegradable surfactants* are described. This term has been used since 1988 [22, 23] to describe "hydrolyzable" [24, 25], "cleavable" [26, 27], and "destructible" [27] surfactants that contain in their molecules at least one functional group susceptible to chemical reactions in aqueous environment (Scheme 1). In such reactions, surface-active substances lose their chemical identity and, in many cases, surface properties as well. In this respect, *chemodegradability* is similar to *primary biodegradability* because a surface active substance is degraded in these processes to an extent that is environmentally acceptable [28]. This paper reports the synthesis of chemodegradable surfactants bearing in their molecules an ester or an acetal function, the latter being represented by cyclic 1,3-dioxolane or 1,3-dioxane structure (Scheme 3).

WPROWADZENIE

Świadomość, że konsumpcja dóbr powoduje z jednej strony wyczerpywanie się nieodtwarzalnych zasobów surowcowych, a z drugiej — zanieczyszczanie środowiska naturalnego różnego rodzaju ksenobiotykami, jest dziś bardzo mocno ugruntowana. Toteż najważniejsze organizacje międzynarodowe: ONZ, OECD, UE i inne, podjęły działania owocujące powołaniem wyspecjalizowanych agend oraz przyjęciem wielu międzynarodowych programów, służących ochronie środowiska naturalnego. Czytelnik polski ma możliwość zapoznania się z tymi działaniami w najnowszych publikacjach krajowych [1–3]. Do zawartych tam informacji pragnę dorzucić jeszcze jedną: w 1995 r. powołano Międzynarodową Organizację Zarządzania Chemikaliami (ang. International Organization for Management of Chemicals: IOMC) [4], która opracowała „Program Rozsądnego Zarządzania Chemikaliami”; jego celem jest dostarczanie międzynarodowym agendum mechanizmów koordynujących działalność obejmującą ocenę zagrożenia związkami chemicznymi.

W wielu wypadkach działania tych instytucji oraz wygenerowanych przez nie programów są mało skuteczne; stanowią one często, niestety, spektakularne gesty i są obliczone na uspokojenie opinii społeczeństw, doświadczających skutków rabunkowej gospodarki zasobami oraz dewastacji środowiska naturalnego. Obok tego nurtu działalności trzeba jednak dostrzec wysiłki szerokich gremiów naukowców, którzy wspólnie z czynnikami zarządzającymi przemysłem oraz z jego kadrą inżynierską opracowują podstawy procedur, wskazujących sposoby osiągania bezpieczeństwa ekologicznego produkcji. Procedury te uwzględniają aktualny stan wiedzy z zakresu nauk ścisłych i szeroko pojętej technologii oraz nauk o zarządzaniu i posługują się modelami, wymagającymi stosowania skwantyfikowanych parametrów, opisujących rzeczywisty stan środowiska naturalnego. Są one w wielu wypadkach podstawą norm, opracowanych i wdrażanych przez Międzynarodową Organizację Normalizacji (ISO). Jedną z ostatnio opublikowanych norm jest poświęcona systemom zarządzania środowiskiem [5]. Norma ta wymienia narzędzia oceny środowiska:

- analizę cyklu życia produktu,
- ocenę ryzyka dla środowiska,
- ocenę produktywności środowiska,
- ocenę różnorodnych oddziaływań na środowisko,
- sprawdzanie zgodności dokumentacji stanu środowiska z obowiązującymi regulacjami prawnymi (tzw. audyt środowiska).

W niniejszej prezentacji pragnę się ograniczyć do omówienia pierwszych dwóch procedur, gdyż pozwalają one ocenić działalność przemysłu chemicznego z punktu widzenia zarówno jakości ekologicznej produktów, jak i procesów technologicznych, stosowanych do ich wytwarzania. Konkretnie przykłady, obrazujące znaczenie tych procedur, zaczerpnąłem z sektora surfaktantów (związków powierzchniowo czynnych) z następujących powodów:

(i) surfaktanty są powszechnie stosowane – jako składniki detergentów, różnorodnych środków czystości oraz wielu kosmetyków – w gospodarstwach domowych, skąd ze ściekami komunalnymi trafiają – poprzez biologiczne oczyszczalnie ścieków – do naturalnych zbiorników wód;

(ii) jest to sektor, który może się poszczycić konkretnymi osiągnięciami w dziedzinie wdrażania produktów oraz procesów technologicznych o coraz mniejszej szkodliwości dla środowiska naturalnego. Dla przedstawicieli tej grupy związków, tzw. surfaktantów detergentowych, dokonano inwentaryzacji cyklu życia – najpierw w USA [6], a następnie w Europie Zachodniej [7] – oraz oceny ryzyka, jakie te związki stanowią dla naturalnych wód [8].

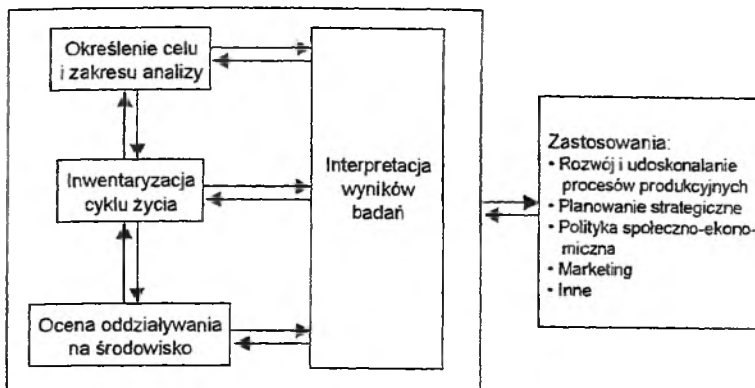
1. ANALIZA CYKLU ŻYCIA PRODUKTU

Wytwarzanie i konsumpcja określonego produktu wywiera bezpośredni wpływ na środowisko naturalne poprzez:

- zużycie surowców niezbędnych do jego wytwarzania (surowce energochemiczne, odnawialne [biomasa], nieorganiczne),
- wydobycie, przeróbkę i utylizację surowców do wytwarzania energii, potrzebnej do realizacji procesów produkcyjnych oraz zużywanej w środkach transportu,
- emisję gazów, pyłów, ścieków i odpadów stałych,
- bezpośrednie oddziaływanie – w trakcie i po wykorzystaniu – na poszczególne ekosystemy, złożone z określonej biocenozy i jej biotopu.

Ponadto każdy proces technologiczny czy jednostka świadcząca określone usługi wywiera na środowisko wpływ, objawiający się występowaniem efektu cieplarnianego, kwaśnych deszczów, dewastacją gleby polegającą na utracie jej biologicznej aktywności itp.; wszystko to oddziałuje szkodliwie na człowieka, zwierzęta, rośliny i ich otoczenie.

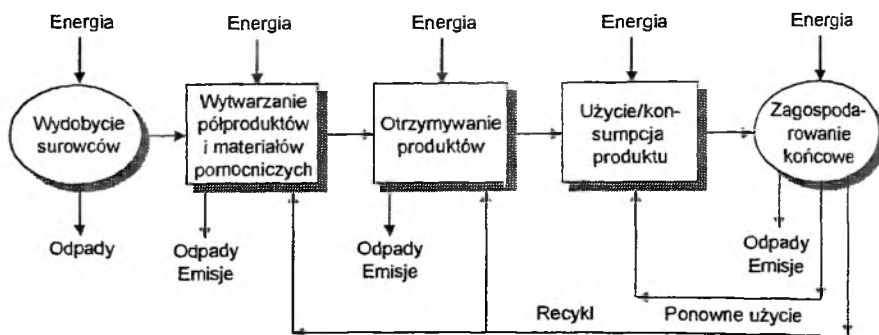
Poczynając od końca lat 60. zaczęto rozwijać procedury, starające się uchwycić ilościowo wpływ wymienionych czynników na środowisko naturalne. Zapoczątkowały je Midwest Research Institute (Kansas City, USA) oraz Franklin Associates Ltd., które dokonały w 1969 r. pierwszej analizy cyklu życia opakowań, stosowanych przez Coca-Cola Comp. [9]. Metodyka ta, nosząca stosowaną dotąd w USA nazwę *Resource and Environmental Profile Analysis* (akronim – REPA), była następnie rozwijana zarówno w USA, jak i – nieco później – w Europie Zachodniej, gdzie jest znana jako analiza (ocena) cyklu życia produktu (ang. *Life Cycle Assessment* – LCA). ISO wydała ostatnio normę, definiującą strukturę LCA, tj. poszczególne jej fazy i ich wzajemne powiązania [10]. Jak widać z rys. 1, LCA obejmuje 3 fazy. Zaczyna się ona od zdefiniowania celu i zakresu badanego procesu (lub usługi) oraz funkcji, jakie założony cel ma spełnić. Kolejny etap obejmuje inwentaryzację cyklu życia produktu (ang. *Life Cycle Inventory* – LCI), polegającą na ilościowym ze-



Rys. 1. Struktura i fazy analizy cyklu życia produktu [10]

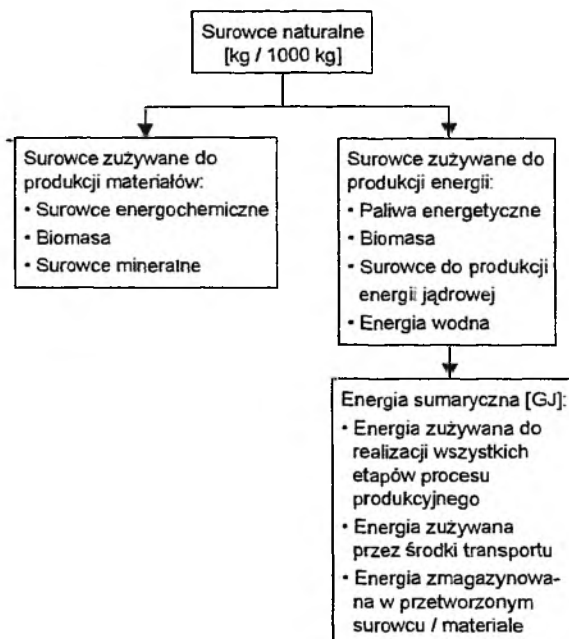
stawieniu materiałów i energii, zużywanych i wytwarzanych w danym procesie produkcyjnym poprzez wszystkie jego fazy, poczynając od wydobycia surowców, ich transportu, zamiany na energię, materiały, produkty pośrednie, produkt finalny, aż do jego zużycia, zawrotu do powtórnego wykorzystania (recykł) lub innego sposobu zagospodarowania (usuwania), łącznie z zagospodarowaniem i/lub unieszkodliwieniem emisji do atmosfery i zbiorników wód oraz odpadów stałych; obiektem inwentaryzacji cyklu życia może być także „produkt” jednostek usługowych. Obydwie te fazy są dostatecznie jasno sprecyzowane; istnieją też wiarygodne dane ilościowe, niezbędne do przeprowadzenia inwentaryzacji cyklu życia produktu. Trzeci etap: analiza oddziaływań na środowisko (ang. *Life Cycle Impact Assessment* – LCIA), stawiająca sobie za cel skorelowanie danych uzyskanych z inwentaryzacji z rzeczywistym oddziaływaniem badanego procesu na środowisko (poprzez tzw. kategorie oddziaływania i ich indykatory), znajduje się w trakcie ustaleń i dopracowania, gdyż brak jest zgodności w gronach ekspertów co do obiektywnych wskaźników ilościowych, mogących służyć do przeprowadzania takiej analizy. Wyniki każdego etapu, a zwłaszcza dwóch pierwszych, poddawane są procedurom interpretacyjnym celem identyfikacji rozwiązań (lub możliwości), prowadzących do ulepszenia analizowanych procesów z punktu widzenia ochrony środowiska.

Typowa metodyka przeprowadzania inwentaryzacji cyklu życia produktu wymaga zdefiniowania, na wstępie, schematu ideowego procesu, obejmującego wszystkie jego stadia. Ogólny schemat, ukazujący cały cykl życia produktu „od kołyski do grobu” (ang. *cradle-to-grave*), przedstawia rys. 2 [9]. Surowce naturalne, niezbędne do wytworzenia określonego produktu, zwykle się w LCI dzielić na dwie kategorie: na surowce zużywane do produkcji niezbędnych półproduktów i materiałów i, w końcu, do produktu finalnego oraz na surowce, zużywane do produkcji energii, przy czym ich zapotrzebowanie (zużycie) odnosi się zazwyczaj do 1000 kg produktu; podział ten przedstawiono schematycznie na rys. 3 [7]. Energię całkowitą, tzw. sumaryczną, niezbędną do wytwor-



Rys. 2. Ogólny schemat ideowy dystrybucji produktu (według [9])

zenia 1000 kg produktu i wyrażoną w GJ, dzieli się na 3 składowe: energię zmagazynowaną w przetwarzanym surowcu, energię zużywaną do realizacji wszystkich etapów procesu produkcyjnego (energia procesowa) oraz energię, zużywaną przez środki transportu [7, 11]. Energiom tym przyporządkowuje się tzw. profile energetyczne, tj. podaje zapotrzebowanie na poszczególne surowce energochemiczne (gaz ziemny, ropa naftowa, węgiel, biomasa itp.). Przedstawiony na rys. 2 ogólny schemat ideowy jest znacznie bardziej rozbudowany w każdym konkretnym wypadku; staje się wtedy swoistą „mapą”, która służy



Rys. 3. Podział surowców i energii używanych w procesach wytwarzania produktów chemicznych (według [7])

komputerowi do przeprowadzenia odpowiednich obliczeń. Uzyskane dane ilościowe gromadzi się w postaci zestawień – najczęściej tabelarycznych – zawierających wszystkie elementy badanego procesu.

Znaczenie LCI ilustruje przykład, dotyczący otrzymywania tzw. alkoholi detergentowych. Przemysł syntezy surfaktantów ma do dyspozycji kilka rodzajów alkoholi alifatycznych, otrzymywanych z tłuszczów roślinnych: oleju kokosowego, oleju palmowego, oleju z ziaren palmy, o długości łańcuchów węglowodorowych, odpowiednio, C_{12}/C_{14} , C_{16}/C_{18} i C_{12}/C_{14} , a ponadto alkohole syntetyczne, otrzymywane w procesie okso (tzw. alkohole okso) lub metodą Zieglera (tzw. alfole). Alkohole te stanowią surowiec – również w Europie – do otrzymywania cennych surfaktantów: oksyetylenowanych alkoholi, siarczanów alkilowych oraz siarczanów eteroalkoholi, a ostatnio także alkilopoli-glukozydów, powszechnie stosowanych w detergentach i kosmetykach. W tab. 1

Tabela 1. Zużycie energii do produkcji długołańcuchowych alkoholi [GJ/1000 kg alkoholi] (opracowano na podstawie danych zawartych w [12])

Źródło alkoholi	Energia procesowa		Energia transportu		Energia surowców		Energia sumaryczna [GJ]
	[GJ]	[%]	[GJ]	[%]	[GJ]	[%]	
Olej kokosowy*	16,8	20,6	2,30	2,81	62,5	76,6	81,6
Olej palmowy	14,0	23,1	1,86	3,06	44,9	73,8	60,8
Olej z nasion palmowych	22,0	30,6	1,93	2,69	48,0	66,7	72,0
Alkohole syntetyczne**	34,6	38,0	1,21	1,33	55,3	60,7	99,1

* Łącznie do produkcji estrów metylowych kwasów tłuszczowych i alkoholi.

** 82% alkoholi okso, 18% alfoli.

zestawiono energię zużywaną do produkcji omawianych alkoholi [12]. Zebrane dane wskazują, że najbardziej energochłonna jest produkcja syntetycznych alkoholi z surowców petrochemicznych; dotyczy to zarówno energii procesowej, jak i sumarycznej. Na drugim miejscu, pod względem zapotrzebowania na energię sumaryczną, plasują się alkohole, otrzymywane z oleju kokosowego, przy czym trzy czwarte tej energii stanowi energia zmagazynowana w surowcu. Energia zużywana w środkach transportu stanowi niewielki ułamek energii całkowitej; jej zużycie jest jednak co najmniej dwukrotnie większe w wypadku alkoholi tłuszczowych niż alkoholi syntetycznych, co jest związane z lokalizacją plantacji drzew palmowych (Malezja, Filipiny, USA).

Interesujących informacji dostarcza również zestawienie emisji zanieczyszczeń do środowiska naturalnego, związanych z produkcją omawianych alkoholi (tab. 2). Największe ilości substancji zanieczyszczających atmosferę powstają przy produkcji długołańcuchowych alkoholi syntetycznych, przy czym gros tych za-

Tabela 2. Emisje do atmosfery i zbiorników wód oraz odpady stałe [kg/1000 kg alkoholu] (opracowano na podstawie danych zawartych w [12])

Źródło alkoholu	Emisje do atmosfery		Emisje do wód		Odpady stałe	
	procesowe	ze spalania paliw	procesowe	ze spalania paliw	procesowe	ze spalania paliw
Olej kokosowy	247,41*	866,99*	15,32*	1,15*	19,8**	31,9**
Olej palmowy	686,39	981,98	9,88	2,55	25,1	24,4
Olej z nasion palmowych	733,34	50,52	10,85	1,53	43,8	35,7
Alkohole syntetyczne***	445,46	2041,64	33,14	3,03	10,6	61,0

* Produkcja estrów metylowych kwasów oleju kokosowego.

** Łącznie: produkcja estrów metylowych i alkoholi.

*** 82% alkoholi okso, 18% alfoli.

nieczyszczeń pochodzi ze spalania paliw. Procesy te charakteryzują się ponadto stosunkowo dużą ilością odpadów stałych, pochodzących również ze spalania paliw. Kolejne miejsce pod względem emisji do atmosfery zajmuje produkcja alkoholu z oleju palmowego. Emisje związków do zbiorników wód naturalnych są największe przy produkcji alkoholu z oleju kokosowego: są to emisje związane z procesem technologicznym; udział zanieczyszczeń wód związanych ze spalaniem paliw jest we wszystkich procesach niewielki. Warto podkreślić jest też fakt, iż największa, łączna ilość odpadów stałych, powstaje przy produkcji alkoholu z oleju z nasion palmowych, przy czym udział odpadów procesowych jest tu największy spośród rozpatrywanych procesów.

Omówiona w dużym skrócie metodyka przeprowadzania inwentaryzacji cyklu życia produktu oraz wyniki tej inwentaryzacji, przedstawione na jednym zaledwie przykładzie, pozwalają dostrzec zalety tej procedury w kategoriach ilościowych; ukazuje ona:

- oddziaływanie danego produktu na środowisko naturalne, pokazując wielkości zużycia różnego rodzaju surowców jako materiałów/reagentów i nośników energii oraz emisje szkodliwych i bezużytecznych substancji i odpadów;

- pozwala zidentyfikować krytyczne węzły procesu technologicznego i ukazuje możliwości wprowadzenia usprawnień i/lub nowych rozwiązań;

- umożliwia ocenę perspektyw rozwoju produkcji danego wyrobu (albo usługi) na tle innych, realizowanych procesów;

- daje materiał do racjonalnej i obiektywnej dyskusji na temat skutków dla środowiska naturalnego, wynikających z konsumpcji określonych dóbr.

2. OCENA RYZYKA

Analiza cyklu życia nie jest oceną ryzyka dla środowiska naturalnego, związanego ze stosowaniem danego produktu. LCA dostarcza wprawdzie ilościowych informacji dotyczących emisji substancji do atmosfery i wód naturalnych, jednakże nie wystarczają one do wyznaczenia stężeń poszczególnych zanieczyszczeń; wymaga to zebrania danych, odnoszących się do zdefiniowanego obszaru geograficznego oraz do określonego przedziału czasu. Ocena ryzyka przedstawia sformalizowaną analizę niekorzystnego oddziaływania określonego związku, materiału lub procesu technologicznego na człowieka oraz na poszczególne składniki rozpatrywanego ekosystemu. Stawia sobie za cel oznaczenie występującego lub przewidywanego – w danej części ekosystemu – stężenia i porównanie uzyskanych wartości ze stężeniami, nie wywołującymi ujemnego wpływu na przedstawicieli badanej biocenozy.

Znaczenie oceny ryzyka dla ochrony środowiska naturalnego jest powszechnie rozumiane, toteż stanowi ona ważny element procesu zarządzania środowiskiem. Odzwierciedleniem tego było powołanie do życia w 1994 r. Międzypaństwowego Forum Bezpieczeństwa Chemicznego (ang. Intergovernmental Forum on Chemical Safety – IFCS), którego zadaniem jest inicjowanie i popieranie prac – na różnych szczeblach – dotyczących oceny ryzyka i bezpieczeństwa chemicznego [4]. W EWG (obecnie Unii Europejskiej) opracowano dyrektywy i wytyczne, określające tryb i metody oceny progów ryzyka [13–15] w odniesieniu do wszystkich składników biosfery: powietrza, wód i gleb, oraz różnych skal przestrzennych: lokalnych lub regionalnych, a wyspecjalizowane agendy (np. European Inventory of Existing Chemical Substances oraz International Uniform Chemicals Information Database) gromadzą dostępne dane ekotoksikologiczne, toksykologiczne i fizykochemiczne stosowanych substancji (aktualnie dla około 100 000). Ze względu na dostępność udokumentowanych danych liczbowych, obecnie oceny ryzyka dotyczą ekosystemów wody i powietrza, w mniejszym stopniu gleb.

W procedurach wyznaczania ryzyka wyróżnia się kilka etapów. Są one podobne przy określaniu niebezpieczeństwa zarówno dla ludzi, jak i dla biocenz, zasiedlających określone ekosystemy [16]. Jednakże zestawy danych, niezbędnych do wyznaczenia progów ryzyka są – w obydwu porównywanych wypadkach – różne. W wypadku ekosystemów, celem postępowania jest wyznaczenie ilościowej zależności między stężeniem nie wywołującym negatywnego działania na daną biocenozę a przewidywanym stężeniem tejże substancji w badanym ekosystemie. Wyznaczenie przewidywanego stężenia substancji w środowisku, nie wywołującego ujemnych skutków w odniesieniu do głównych przedstawicieli biocenozy (ang. *Predicted No Effect Concentration* – PNEC) wymaga dysponowania danymi dotyczącymi ekotoksyczności, tj. toksyczności ostrej i chronicznej tej substancji. Obecnie dysponujemy zbiorami

takich danych dla wielu związków, w tym dla związków powierzchniowo czynnych, dla których wyznaczono parametry toksyczności ostrej i chronicznej względem najważniejszych przedstawicieli biocenozy wód: bakterii, glonów, skorupiaków i ryb, wyrażone stężeniem wywołującym określony skutek [17], oraz tzw. współczynniki bezpieczeństwa [18]. Na podstawie tych danych wyznacza się metodami ekstrapolacyjnymi wartości PNEC [19].

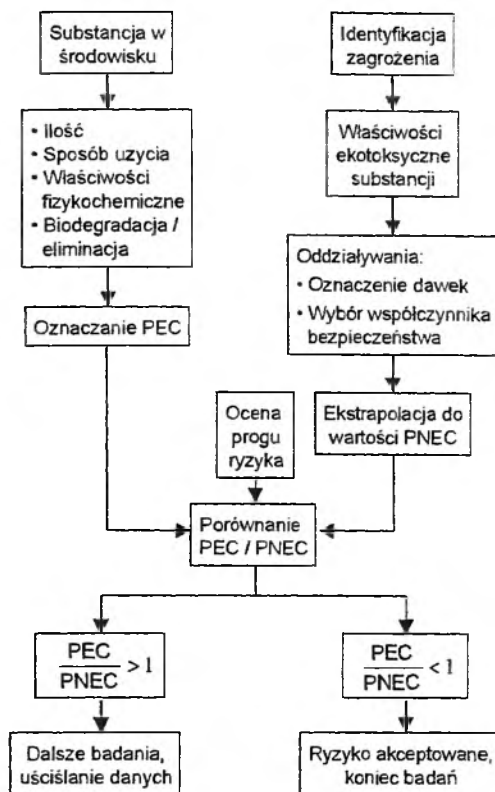
Drugą wielkość niezbędną do oceny ryzyka, tj. przewidywane stężenie badanej substancji w środowisku (ang. *Predicted Environmental Concentration* – PEC), można albo oznaczyć eksperymentalnie, prowadząc monitoring tej substancji w badanym obszarze, albo wyliczyć na drodze komputerowych symulacji, stosując odpowiednie modele teoretyczne. Eksperymentalne wyznaczenie stężeń w określonym ekosystemie nie zawsze jest jednak możliwe, głównie z braku odpowiednich czułych i dokładnych metod analitycznych. Z tego względu, a także w wypadku nowych związków chemicznych wprowadzanych do środowiska korzysta się często z modeli teoretycznych, pozwalających na symulację losu badanej substancji w środowisku (w powietrzu, wodzie i glebie) i według opracowanych algorytmów wylicza się przewidywane stężenie PEC. Jednym z takich modeli, służących do teoretycznego wyznaczania wartości PEC dla związków powierzchniowo czynnych w wodach, jest program HAZ-CHEM [20].

Z wartości PEC oraz PNEC określa się progi ryzyka według zależności

$$\frac{PEC}{PNEC} < 1 \text{ (?)}$$

Stopniowe dochodzenie do pożądanej wartości tego ilorazu przedstawia schemat na rys. 4 [21]. Śledząc losy substancji trafiającej do badanego ekosystemu, wyznacza się wartości PEC, wyniki badań ekotoksyczności i ich dalsze statystyczne opracowanie prowadzą natomiast do wartości PNEC. Ocena ryzyka jest – jak wynika z przedstawionego schematu – procesem iteracyjnym. Jeśli iloraz PEC/PNEC jest mniejszy od jedności, to substancja (produkt) nie stanowi zagrożenia dla środowiska; jeśli jest większy od jedności, to przedstawione na schemacie postępowanie trzeba powtórzyć, dobierając bardziej realistyczne dane. Może to dotyczyć zarówno wartości PNEC (np. posłużenie się stężeniami toksyczności chronicznej zamiast ostrej z jednoczesnym zastosowaniem łagodniejszych współczynników bezpieczeństwa), jak i wartości PEC – w tym wypadku w procedurach symulacyjnych dobiera się coraz ostrzejsze parametry, charakteryzujące obecność substancji w środowisku.

Wyniki oceny ryzyka związanego z obecnością związku chemicznego (produktu, wyrobu) w określonym ekosystemie stanowią ważny element zarządzania środowiskiem. Są one podstawą podejmowania decyzji o dopuszczeniu nowych chemikaliów do stosowania, a także stanowią narzędzie selekcji i wycofywania już stosowanych związków (produktów); dają wreszcie impuls do poszukiwania nowych związków o mniejszym stopniu ryzyka.



Rys. 4. Schemat procedury oceny ryzyka (według [21])

3. PRODUKTY O MAŁEJ UCIAŹLIWOŚCI DLA ŚRODOWISKA NATURALNEGO: SURFAKTANTY CHEMODEGRADOWALNE

W każdym sektorze przemysłu chemicznego, produkującym chemikalia znajdujące praktyczne zastosowania, a także w placówkach badawczych pracujących na rzecz przemysłu, prowadzi się prace poszukiwawcze mające na celu wdrożenie do praktyki nowych produktów o coraz mniejszej uciążliwości dla środowiska naturalnego. Pozostając na gruncie związków powierzchniowo czynnych należy wymienić nową grupę surfaktantów, spełniających wymóg małego ryzyka dla ekosystemów wodnych. Pojawiły się ostatnio liczne doniesienia, opisujące syntezę i właściwości tzw. *surfaktantów chemodegradowalnych*. Termin ten, wprowadzony do międzynarodowego obiegu w 1988 r. [22, 23], obejmuje związki, określane dotąd angielskimi terminami: „hydrolyzable” [24, 25], „cleavable” [26, 27] i „destructible surfactants” [27]. Są to związki zawierające w swej cząsteczce celowo wbudowane ugrupowanie, podatne na reakcje chemiczne (schemat 1).

nie stanowią zagrożenia do biocenozy wód: kwasy karboksylowe podlegają łatwo biochemicznej β -oksydacji, aminoalkohol zaś ulega biodegradacji całkowitej powodującej jego szybką eliminację ze środowiska (schemat 2), [35]. Dokonano też syntez IV-rzędowych soli amoniowych (III), zawierających – obok ugrupowania estrowego – grupę amidową [36], oraz betain (IV), zawierających dwa lub trzy ugrupowania estrowe [37]. Związki te mają dobre właściwości zmiękczenia tkanin.

Istnieje wiele innych grup surfaktantów o charakterze estrów – należą do nich np. siarczany alkilowe, siarczany eteroalkoholi, fosforany alkilowe, estry kwasów karboksylowych i polioli, oksyetylenowane kwasy karboksylowe i inne. Nie są one jednak syntezowane i stosowane w tym celu, aby je po użyciu poddawać rozkładowi chemicznemu i dlatego nie zalicza się ich do omawianej, nowej generacji surfaktantów.

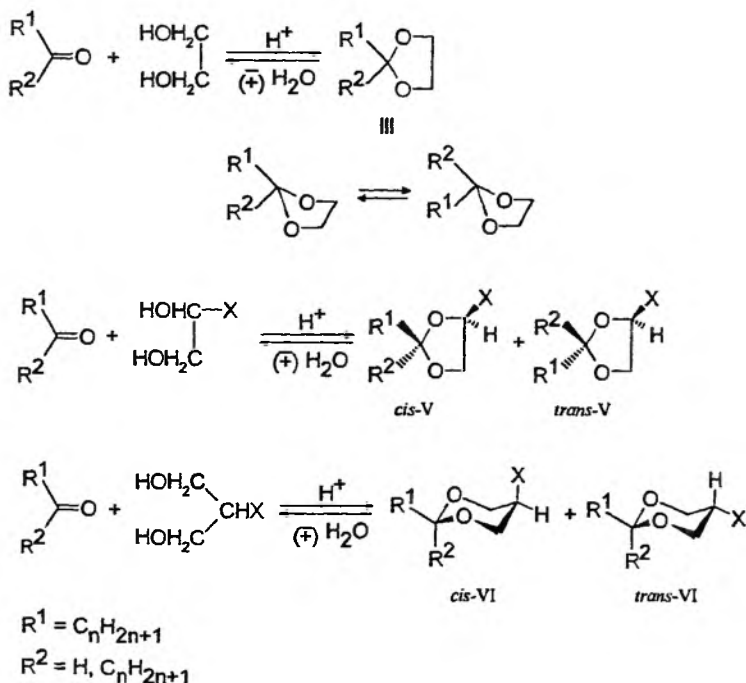
3.2. SURFAKTANTY ZAWIERAJĄCE UGRUPOWANIE ACETALOWE

Ugrupowaniem chętnie wprowadzanym do cząsteczki związku powierzchniowo czynnego jest ugrupowanie acetalowe. Jest ono obecne w alkilopoli-glikozydach – nowej grupie niejonowych surfaktantów, wprowadzonych na rynek światowy z początkiem lat 90. przez firmę Henkel (Niemcy). Ich wdrożenie do praktyki wynikało jednak z tendencji do oparcia syntez związków chemicznych – tam, gdzie to jest ekonomicznie i ekologicznie uzasadnione – na tzw. surowcach odnawialnych (w tym wypadku są to glukoza lub jej małowczątkowe oligomery oraz alkohole tłuszczowe); odznaczają się one łatwą biodegradowalnością i mają właściwości, predestynujące je do stosowania w środkach do pielęgnacji ciała. Nie są one jednak produkowane z myślą o ich chemicznej degradacji i dlatego nie będą tu omawiane.

Ugrupowanie acetalowe tworzy się głównie w reakcji związków karbonylowych: aldehydów i ketonów z alkoholami mono- i wielowodorotlenowymi. Grupa acetalowa jest trwała w środowisku obojętnym i alkalicznym, łatwo zaś ulega hydrolizie w środowisku kwaśnym, odtwarzając wyjściowe reagenty: aldehydy (ketony) oraz alkohole mono- i/lub wielowodorotlenowe. Długołańcuchowe aldehydy alifatyczne stanowią produkty pośrednie w biochemicznych procesach ω -oksydacji końcowych grup metylowych łańcuchów węglowodorowych i są dalej enzymatycznie utleniane do kwasów karboksylowych [38], a te – jak zaznaczono (schemat 2) – ulegają β -oksydacji, przebiegającej w każdej żywej komórce [39]. Tak więc surfaktanty te są produktami mało uciążliwymi dla środowiska naturalnego; ostatnio doniesiono, że związki zawierające ugrupowanie 1,3-dioksolanowe w cząsteczce ulegają biodegradacji równie szybko co laurynian sodu (mydło) [40], znacznie szybciej

zaś aniżeli dodecylobenzenosulfonian sodu, powszechnie stosowany w detergentach.

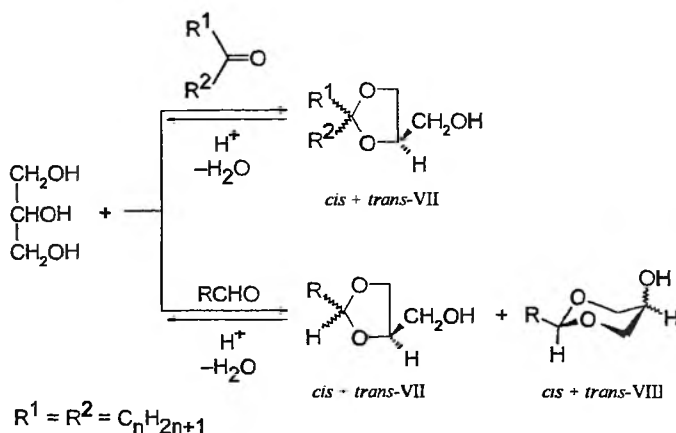
Acetale mają zbyt słaby charakter hydrofilowy i nie są dostatecznie dobrze rozpuszczalne w wodzie [41]. Z tego względu acetale mogą stanowić jedynie półprodukty hydrofobowe do syntez surfaktantów i to tylko wówczas, gdy zawierają dodatkowo reaktywne ugrupowanie, pozwalające na wprowadzenie odpowiednio silnej grupy hydrofilowej do ich cząsteczek. Wymóg ten spełniają głównie acetale cykliczne — pochodne 1,3-dioksacyklanów. Związki te uzyskuje się najłatwiej w reakcji długołańcuchowych aldehydów — rzadziej ketonów — z odpowiednimi poliolami; w reakcji 1,2-dioli powstają diastereomeryczne *cis*- i *trans*-dwupodstawione-1,3-dioksolany (V), 1,3-diole zaś tworzą *cis*- i *trans*-1,3-dioksany (VI) (schemat 3). Zarówno długołańcuchowe aldehydy, jak i poliole są obecnie dostępne na rynku: aldehydy uzyskuje się w reakcjach hydroformylowania olefin (proces okso), poliole zaś są bądź pochodzenia naturalnego (gliceryna z rozszczepiania olejów roślinnych, cukry proste), bądź są otrzymywane syntetycznie w procesach kondensacji aldolowej małowcząstkowych aldehydów (1,1,1-tris(hydroksymetylo)propan(etan), 2,2-bis(hydroksymetylo)propanodiol-1,3). Pochodne 1,3-dioksacyklanów można ponadto uzyskać w kilku innych reakcjach.



Schemat 3

3.2.1. Pochodne 1,3-dioksolanów

W pierwszych próbach otrzymywania surfaktantów, pochodnych 1,3-dioksacyklanów, zwrócono uwagę na glicerynę – najprostszy, dostępny triol. W zależności od zastosowanego związku karbonyłowego tworzy ona różne produkty: w reakcji z ketonami powstają 2,2-dialkilo-4-hydroksymetylo-1,3-dioksolany (VII), użycie aldehydów zaś prowadzi do powstania mieszaniny *cis*- i *trans*-2-alkilo-4-hydroksymetylo-1,3-dioksolanów (VII) oraz *cis*- i *trans*-2-alkilo-5-hydroksy-1,3-dioksolanów (VIII), (schemat 4).

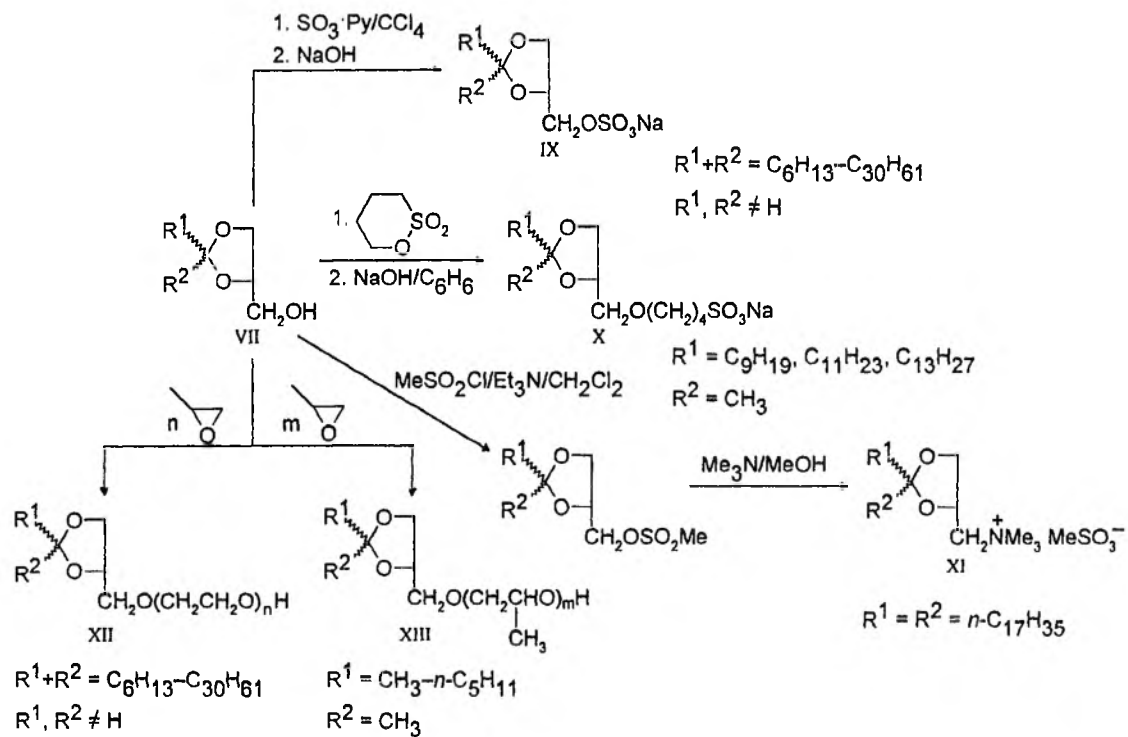


Schemat 4

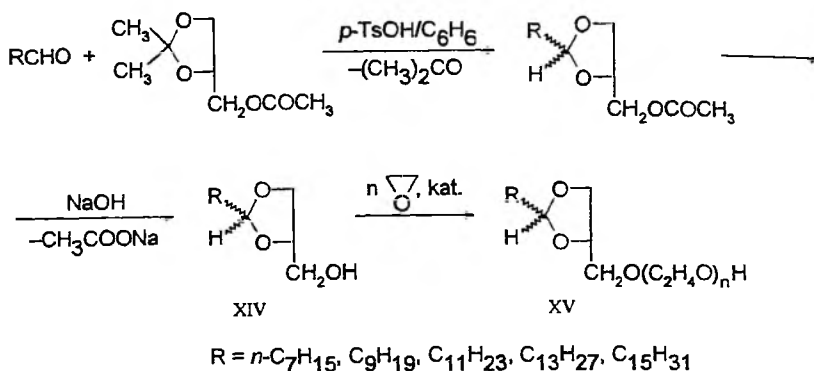
Pochodne 1,3-dioksolanów (VII) znalazły zastosowanie do syntez odpowiednich siarczanów (IX) [43], sulfonianów (X) [44], IV-rzędowych soli amonowych (XI) [45] oraz niejonowych surfaktantów (XII) [43] i (XIII) [46], (schemat 5).

Gliceryna może być też użyta do konstrukcji pierścienia 1,3-dioksolanowego, zawierającego jeden podstawnik alkilowy przy węglu C2 pierścienia. Dokonano syntez niejonowych surfaktantów, poddając 2,2-dimetylo-4-acetoksymetylo-1,3-dioksolan reakcji transacetalizacji długołańcuchowymi aldehydami, a następnie hydrolizie grupy octanowej; uzyskane 2-alkilo-4-hydroksymetylo-1,3-dioksolany (XIV), zanieczyszczone jednak pochodnymi 1,3-dioksanu, poddano reakcji z oksiranem, otrzymując odpowiednie pochodne oligooksyetylenowe (XV) [47, 48] (schemat 6). Wspomnieć też wypada o patencie niemieckim [24], w którym doniesiono o addycji oksiranu do 4-składnikowego produktu, powstałego w reakcji długołańcuchowych aldehydów z gliceryną (schemat 4); jest to odosobniony przykład stosowania takiej mieszaniny do syntez surfaktantów.

Surfaktanty zawierające pierścień 1,3-dioksolanowy w cząsteczce syntezuje się częściej z ketonów aniżeli z aldehydów, przy czym stosuje się dwie strategie

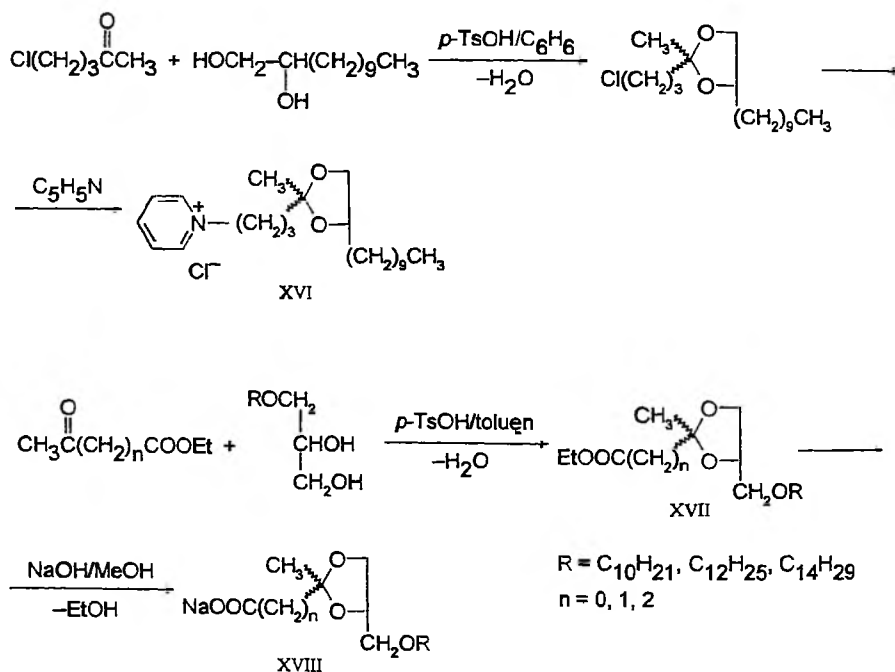


Schemat 5



Schemat 6

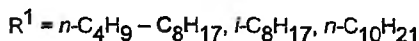
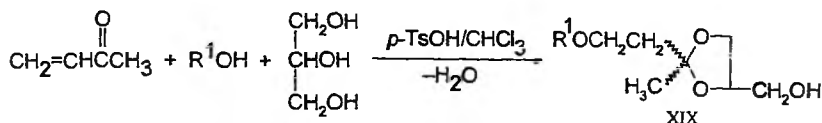
syntez. Jeden sposób polega na stosowaniu chlorowcoetonów, które w reakcji z długołańcuchowymi 1,2-diolami tworzą 2-(chlorowcoalkilo)-2-metylo-4-alkilo-1,3-dioksolany; w reakcji z szeregiem amin uzyskano z nich liczne IV-rzędowe sole amoniowe, w tym np. sole pirydyniowe (XVI) [27, 49], (schemat 7). W reakcji 1-O-alkilgliceryny z ketoestrami tworzą się natomiast pochodne (XVII) [50], które po hydrolizie dają odpowiednie karboksylany (XVIII), tj. mydła, zawierające ugrupowanie dioksolanowe w cząsteczce (schemat 7). W obydwu przykładach długi łańcuch węglowodorowy, odpowiedzialny



Schemat 7

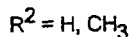
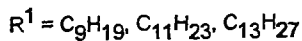
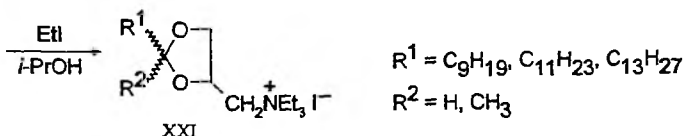
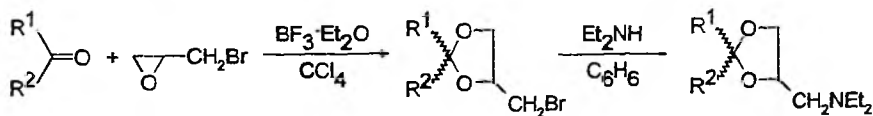
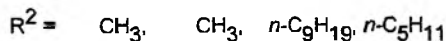
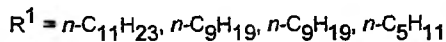
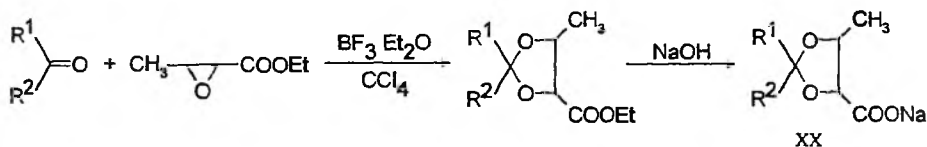
ny za aktywność powierzchniową związku, jest wprowadzony do cząsteczki nie przez keton, lecz przez diol.

Próbowano też zastosować do syntez pochodnych 1,3-dioksolanu małych cząsteczkowe, α,β -nienasycone związki karbonylowe, które poddano reakcji z mieszaniną gliceryny i długołańcuchowego alkoholu monowodorotlenowego. Tak np., wychodząc z metylowinyloketonu, uzyskiwano w jednoetapowym procesie mieszaninę *cis*- i *trans*-2(2-alkoksyetylo)-2-metylo-4-hydroksymetylo-1,3-dioksolanów (XIX) [51], (schemat 8). W tej reakcji długołańcuchowe alkohole monowodorotlenowe – a takie są technicznie dostępne – wnoszą do cząsteczki (XIX) fragment hydrofobowy.



Schemat 8

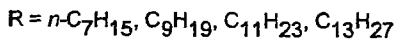
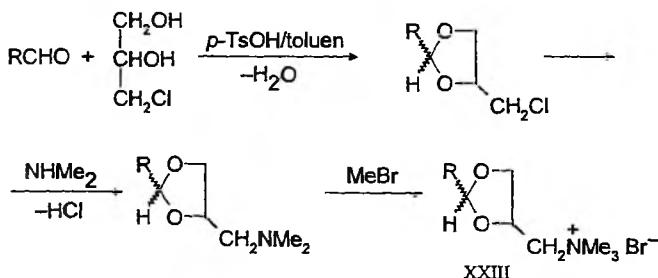
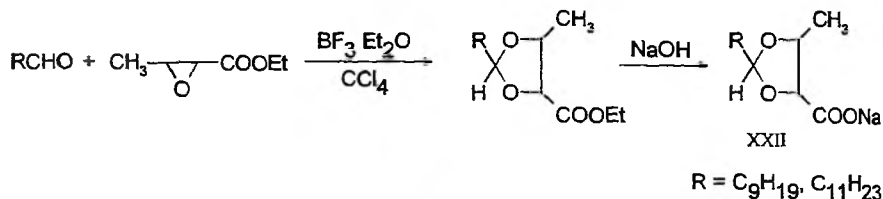
Druga strategia polega na reakcji ketonów, zawierających jeden lub dwa długie łańcuchy węglowodorowe, ze związkami epoksydowymi. W reakcji z 2,3-epoksyksyałanem etylu powstają 2,2-dialkilo-4-etoksykarbonylo-5-metylo-1,3-dioksolany, które po hydrolizie dają sole odpowiednich kwasów (XX) [52] (schemat 9). Podobnie w reakcji z 1-bromo-2,3-epoksypropanem powstają



Schemat 9

2,2-dialkilo-4-bromometylo-1,3-dioksolany, stanowiące półprodukty do syntez kationowych surfaktantów: IV-rzędowych jodków amoniowych (XXI) [53].

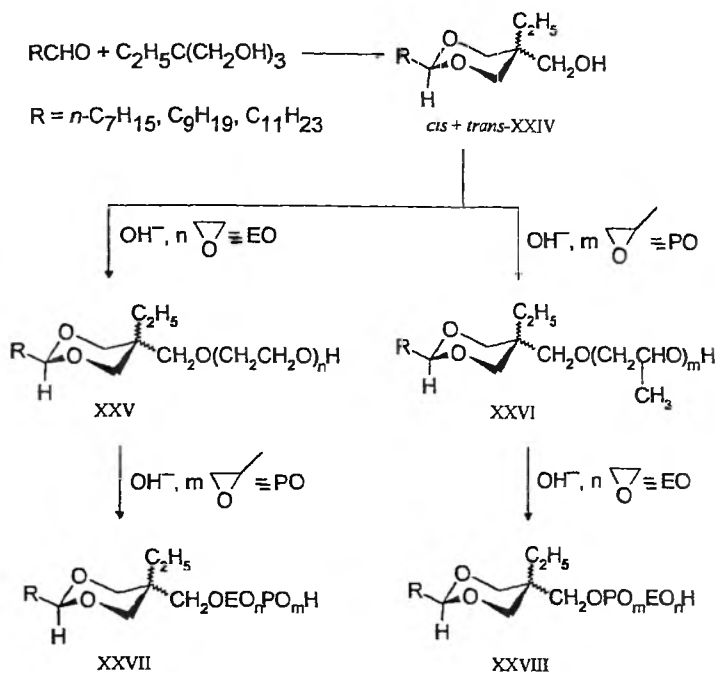
Długołańcuchowe aldehydy alifatyczne były znacznie rzadziej stosowane do syntez powierzchniowo czynnych pochodnych 1,3-dioksolanu. Odnotować trzeba w tym miejscu badania chemików japońskich, którzy zsyntezowali karboksylany (XXII) (schemat 10), zawierające jeden łańcuch węglowodorowy przy atomie węgla C2 pierścienia dioksolanowego [54]. Właściwości powierzchniowe tych związków różnią się od właściwości karboksylanów (XX) (schemat 9) zawierających dwa łańcuchy alkilowe przy C2. Odrębną grupę stanowią też IV-rzędowe bromki amoniowe (XXIII) [55] (schemat 10), do których otrzymania użyto aldehydów i 3-chloropropanodiolu-1,2. Związki te różnią się wyraźnie podatnością na hydrolizę od pochodnych typu ketali (tj. pochodnych 2,2-dialkilo-1,3-dioksolanu), stanowiących przeważający typ wcześniej omówionych surfaktantów.



Schemat 10

3.2.2. Pochodne 1,3-dioksanów

Ze względu na wspomniany skład produktów reakcji gliceryny z aldehydami (schemat 4), do otrzymywania pochodnych 1,3-dioksanu bardziej celowe okazało się użycie 1,1,1-tris(hydroksymetylo)propanu, technicznie dostępnego triolu. W reakcji z długołańcuchowymi aldehydami tworzy on mieszaninę *cis*- i *trans*-2-alkilo-5-hydroksymetylo-5-etylo-1,3-dioksanów (XXIV); zostały one wykorzystane do syntez kilku grup niejonowych surfaktantów: pochodnych oksyetylenowych (XXV) [56] oraz kopolimerów blokowych typu REP (XXVII) [57] i RPE (XXVIII) [58] (schemat 11).

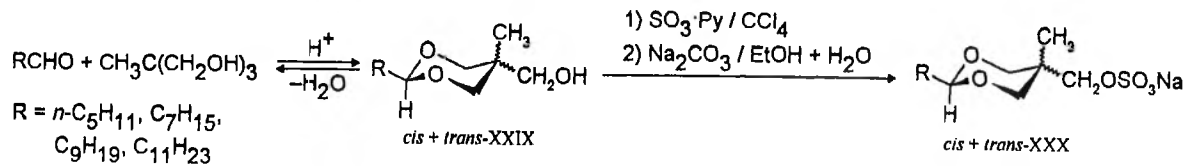


Schemat 11

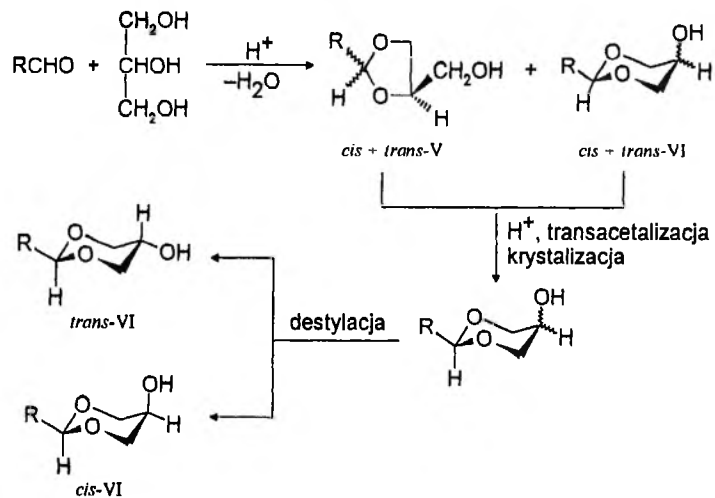
Produkowany w skali przemysłowej 1,1,1-tris(hydroksymetylo)etan posłużył do syntezy *cis*- i *trans*-2-alkilo-5-hydroksymetylo-5-metylo-1,3-dioksanów (XXIX) (schemat 12), które poddawano reakcji siarczanowania uzyskując odpowiednie wodorosiarczany, a po ich neutralizacji – sole sodowe (XXX) [28, 59]. Cechą charakterystyczną tych związków jest to, że z punktu widzenia właściwości powierzchniowych odpowiadają one cennym siarczanom eteroalkoholi, zawierającym w cząsteczce 2–3 ugrupowania oksyetylenowe [28]. Udało się ponadto otrzymać czyste *cis*-[(2-*n*-alkilo-5-metylo-1,3-dioksan-5-yl)metyl]siarczany sodu (*cis*-XXX) i oznaczyć ich aktywność powierzchniową na granicy faz: woda-powietrze [60].

Ostatnio opracowano sposób otrzymywania wyłącznie *cis*- i *trans*-2-alkilo-5-hydroksy-1,3-dioksanów z gliceryny i długołańcuchowych aldehydów. Polega on na prowadzeniu procesu w typowych dla reakcji acetalizacji warunkach [61], produkt reakcji natomiast poddaje się wewnątrzcząsteczkowej transacetalizacji (ulegają jej pochodne 1,3-dioksolanu) i jednoczesnej, powolnej krystalizacji, w wyniku czego uzyskuje się mieszaninę izomerycznych pochodnych 1,3-dioksanu (schemat 13), którą można rozdzielić na czyste diastereoizomery [62].

Omówiony sposób pozwala na wykorzystanie zarówno mieszaniny, jak i czystych diastereoizomerów, do syntez nowych, chemodegradowalnych surfa-

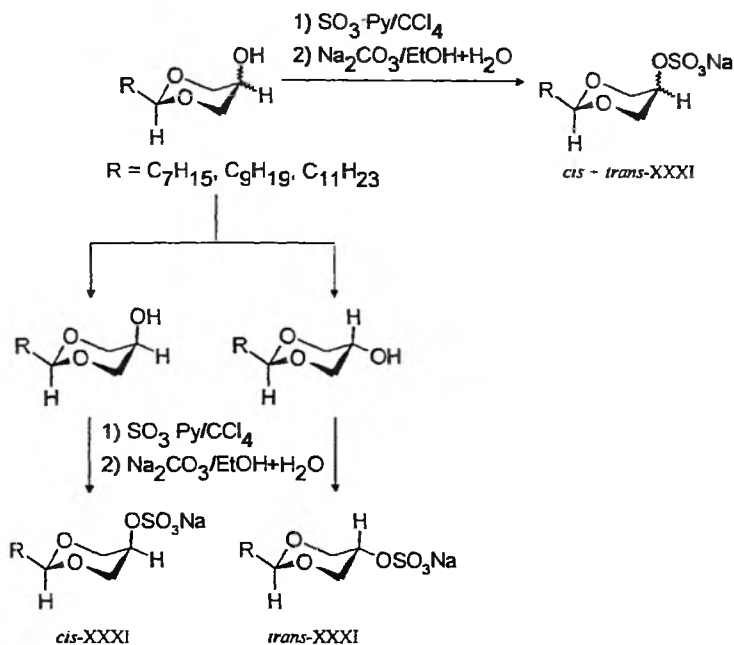


Schemat 12



Schemat 13

ktantów acetalowych. Jak dotąd dokonano syntezy II-rzędowych siarczanów sodowych, uzyskując zarówno mieszaninę *cis*- i *trans*-siarczanów (XXXI) [63], jak i czyste diastereoizomery [64], (schemat 14).

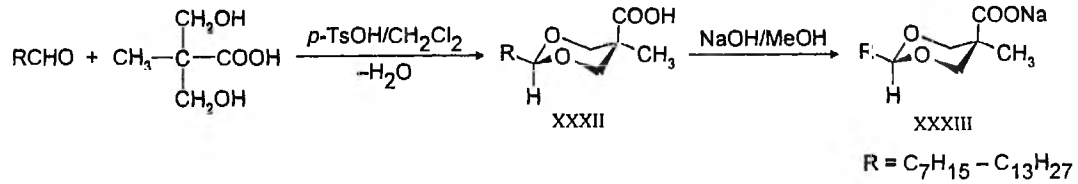


Schemat 14

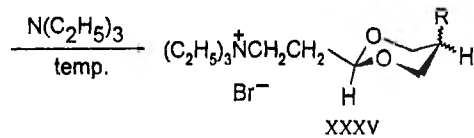
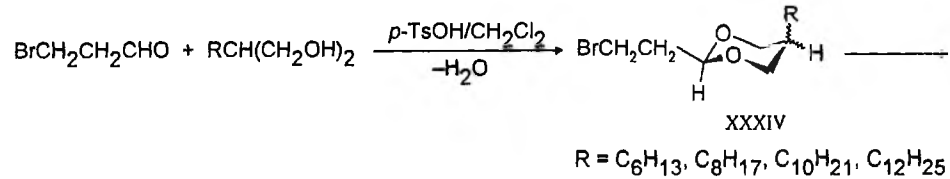
Podobnie jak w wypadku 1,3-dioksoalanów, do cząsteczki alkilowych pochodnych 1,3-dioksanu można wprowadzić grupę karboksylową, co pozwala uzyskać modyfikowane mydła. Poddając długołańcuchowe aldehydy reakcji z kwasem 2,2-bis(hydroksymetylo)propionowym uzyskano kwasy *cis*-(2-alkilo-5-metylo-1,3-dioksan-5-ylo)karboksylowe (XXXII), które przeprowadzono w sole sodowe (XXXIII) [65], (schemat 15).

W odróżnieniu od licznych powierzchniowo aktywnych pochodnych 1,3-dioksoalanów o charakterze IV-rzędowych soli amoniowych, w wypadku pochodnych 1,3-dioksanu natrafiono dotąd na jedno doniesienie, opisujące kationowe surfaktanty zawierające w cząsteczce pierścień 1,3-dioksanu. W reakcji 3-bromopropanalu z 2-alkilo-1,3-propanodiolem otrzymano mieszaninę *cis*- i *trans*-2(2-bromoetylo)-5-alkilo-1,3-dioksanów (XXXIV), które w reakcji z trietyloaminą dały bromki amoniowe (XXXV) [66], (schemat 16).

Opisane dotąd pochodne 1,3-dioksanu zawierały jedną grupę polarną w cząsteczce. Dostępność na rynku 2,2-bis(hydroksymetylo)propanodiolu-1,3 (tzw. pentaerytrytu) pozwala na uzyskanie pochodnych 1,3-dioksanu, zawierających przy atomie węgla C5 pierścienia dioksanowego dwie grupy hydroksy-

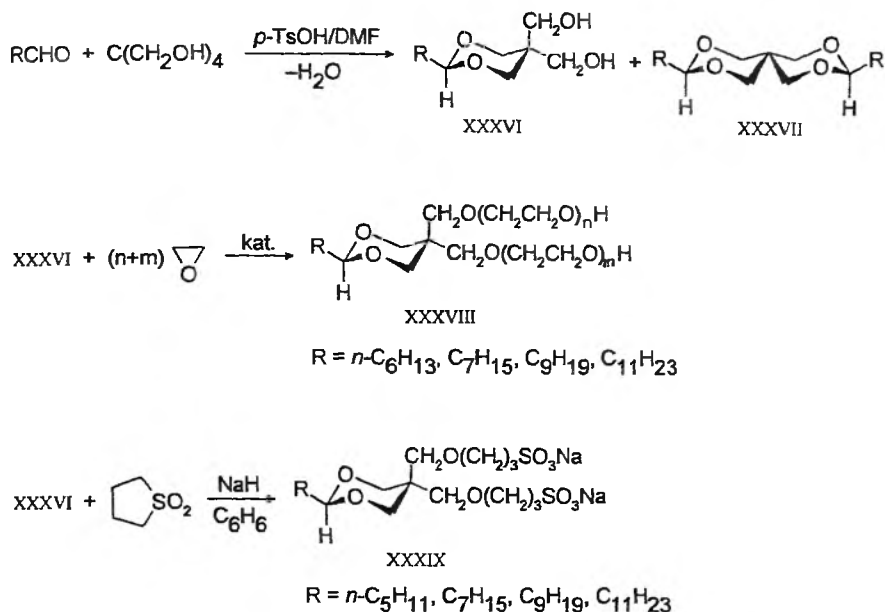


Schemat 15



Schemat 16

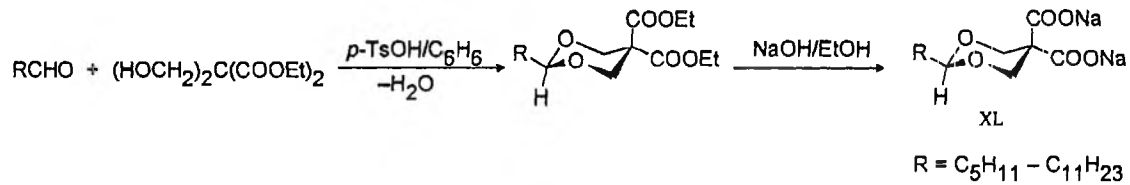
metylowe, co ogranicza występowanie diastereoizomerów. W reakcji aldehydów z tym tetroletem powstaje – oprócz 2-alkilo-5,5-bis(hydroksymetylo)-1,3-dioksanów (XXXVI) – także diacetal (3,9-dialkilo-2,4,8,10-tetraokspiro[5,5]-undekan, XXXVII), powodując zmniejszenie wydajności związku (XXXVI). Monoacetale (XXXVI) zostały wykorzystane do syntez niejonowych surfaktantów (XXXVIII) [68] oraz do anionowych pochodnych o charakterze sulfonianów (XXXIX) [69], (schemat 17).



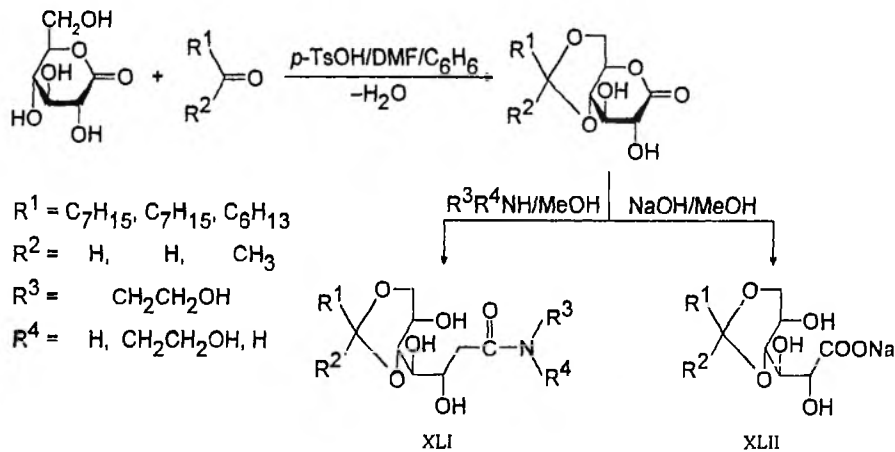
Schemat 17

Dokonano również syntezy podwójnych karboksylanów sodu, pochodnych 1,3-dioksanu. Aldehydy alifatyczne poddano reakcji z bis(hydroksymetylo)malonianem dietylowym, a uzyskany dietylan zmydlono ługiem sodowym, uzyskując oczekiwane mydła (XL) [70], (schemat 18).

Coraz silniejsza w chemii związków powierzchniowo czynnych tendencja do wykorzystywania cukrów prostych jako fragmentów hydrofilowych części, znalazła również oddźwięk w syntezie chemodegradowalnych surfaktantów. Podobnie jak w syntezach innych typów tzw. „surfaktantów cukrowych”, i w tym wypadku sięgnięto do 1,5-glukonolaktonu jako surowca cukrowego. Poddano go reakcji zarówno z aldehydami, jak i ketonami, a z uzyskanych 4,6-O-alkilideno-glukono-1,5-laktonów otrzymano odpowiednie amidy (XLI) bądź karboksylany (XLII) [71], (schemat 19). Innym przykładem jest synteza anionowych (karboksylany) i kationowych (IV-rzędowe jodki amoniowe) surfaktantów, pochodnych 4,6-O-alkilideno-D-glukoaminy [72].

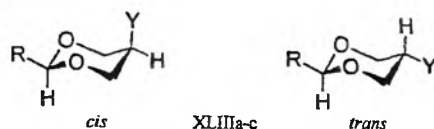


Schemat 18



Schemat 19

Zainteresowanie surfaktantami zawierającymi ugrupowanie acetalowe w cząsteczce wynika z możliwości ich rozkładu w reakcjach hydrolizy kwasowej. Przeprowadzono wiele badań dotyczących kinetyki hydrolizy powierzchniowo aktywnych pochodnych 1,3-dioksolanu [55, 73] i 1,3-dioksanu [64, 69, 70, 74]. Interesujące wydają się wyniki hydrolizy związków, stanowiących pary diastereoizomerów (*cis*- i *trans*-XLIIIa-c) (schemat 20), [74]. Jak wynika z zawartych w tab. 3 wartości stałych szybkości hydrolizy II rzędu, we wszystkich trzech grupach związków izomery *trans* ulegają szybciej hydrolizie aniżeli izomery *cis*, co autorzy badań wiążą z nieco większą odległością grup polarnych,



a: R = $n\text{-C}_{11}\text{H}_{23}$; Y = $\text{CH}_2\text{OSO}_3\text{Na}$

b: R = $n\text{-C}_9\text{H}_{19}$; Y = OSO_3Na

c: R = $n\text{-C}_{11}\text{H}_{23}$; Y = $\text{O}(\text{CH}_2)_3\text{SO}_3\text{Na}$

Schemat 20

Tabela 3. Kinetyka hydrolizy 2,5-dwupodstawionych-1,3-dioksanów. Temp.: 27 °C; DCl: 0,2 M [74]

Grupa hydrofilowa	Izomer	$10^4 \times k_{II}$ [dm ³ ·mol ⁻¹ ·s ⁻¹]
—CH ₂ OSO ₃ Na	<i>cis</i> -XLIIIa	32,5
	<i>trans</i> -XLIIIa	150,0
—OSO ₃ Na	<i>cis</i> -XLIIIb	1,1
	<i>trans</i> -XLIIIb	4,0
—O(CH ₂) ₃ SO ₃ Na	<i>cis</i> -XLIIIc	2,1
	<i>trans</i> -XLIIIc	6,0

zajmujących konfigurację ekwatorialną (w izomerach *trans*), od „acetalowych” atomów tlenu pierścienia 1,3-dioksanu [64, 74]. Uderza ponadto znacznie większa podatność na hydrolizę I-rzędowych siarczanów (XLIIIa) aniżeli siarczanów II-rzędowych (XLIIIb) i sulfonianów (XLIIIc). Efekt ten tłumaczono osłanianiem „acetalowych” atomów tlenu przez atomy tlenu grup polarnych, związanych bezpośrednio z atomem węgla C5 pierścienia, co utrudnia atak protonu na ugrupowanie acetalowe.

Badania kinetyki omawianych surfaktantów, nazywanych niekiedy surfaktantami o kontrolowanych czasach połowicznej przemiany [75], pozwalają na ustalenie zależności między ich budową a trwałością i – w konsekwencji – na planowanie struktur związków o pożądanej trwałości. Otwiera to obiecujące perspektywy syntez oraz zastosowań nowych związków chemicznych w wielu dziedzinach.

4. UWAGI KOŃCOWE

Analiza cyklu życia produktu, stosująca procedury ilościowe oparte na naukowych podstawach, wyodrębnia się jako oddzielna, interdyscyplinarna gałąź wiedzy, której rozwojem są zainteresowani zarówno przedstawiciele przemysłu (gospodarki), jak i ekolodzy. Ciągłe rosnąca liczba publikacji poświęconych tej problematyce stała się impulsem do powołania (w 1966 r.) odrębnego czasopisma: „The International Journal of Life Cycle Assessment” (Int. J. LCA) i towarzystwa Society for the Promotion of LCA Development (SPOLD). Podobnie wiele zrobiono dotąd w celu opracowania sformalizowanych procedur oceny ryzyka dla człowieka i środowiska naturalnego, jakie pociąga za sobą stosowanie określonych substancji (produktów).

Przemysł chemiczny korzysta nie tylko z opisanych narzędzi, mających na celu zwiększenie bezpieczeństwa ekologicznego procesów produkcyjnych oraz produktów. Wdraża program *Odpowiedzialnej Troski* (ang. *Responsible Care*) (w Polsce inicjatywie tej patronuje Polska Izba Przemysłu Chemicznego), zmierza do wprowadzania – w miejsce starych, zazwyczaj uciążliwych dla środowiska naturalnego – tzw. czystych technologii (ang. *clean technologies*) oraz zrównoważonych technologii (ang. *sustainable technologies*). Te i inne inicjatywy [1–3] stanowią wkład do wymogu *zrównoważonego rozwoju* (ang. *sustainable development*) naszej cywilizacji. Coraz częściej można się też spotkać z opiniami, że to przemysł chemiczny będzie pomocny w przywróceniu poszczególnym ekosystemom ich nie skażonego stanu i naturalnych funkcji. Tak np. realizacja postanowień Protokołu Montrealskiego w sprawie substancji zubożających warstwę ozonową [76] spowodowała zmniejszenie, w ciągu lat 1986–1991, produkcji i zużycia freonów (CFC) o ok. 40% oraz wprowadzenie pierwszej generacji ich zamienników [77]. Przykład ten – nie jedyny zresztą – wydaje się potwierdzać zasadność tych opinii.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] M. Taniewski, *Sprawy Nauki*, 1996, Nr 5 (31), 3.
- [2] W. Lubiewa-Wieleżyński, *Przem. Chem.*, 1996, 75, 148.
- [3] J. A. Haber, *Chemik*, 1997, 50, Nr 7–8, 190.
- [4] T. Feijtel, *Proc. A.I.S.E./CESIO III Workshop*, Limelette, 1995, s. 35–43.
- [5] ISO/14000, *Environmental Management Systems*, 1996.
- [6] C. A. Pittinger, J. S. Sellers, D. C. Janzen, D. G. Koch, T. M. Rothgeb, M. L. Hunnicutt, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1993, 70, 1.
- [7] M. Stalmans, M. Berenbold, J. L. Berna, L. Cavalli, A. Dillarstone, M. Franke, F. Hirsinger, D. Janzen, K. Kosswig, D. Postlethwaite, Th. Rappert, C. Renta, D. Schare, K.-P. Schick, W. Schul, H. Thomas, R. Van Sloten, *Tenside Surf. Det.*, 1995, 32, 84.
- [8] J. Rosenblom, *Proc. 4th World Surfactants Congress*, Barcelona 3–7.06.1996, Vol. 1, s. 13–17.
- [9] R. G. Hunt, J. D. Sellers, W. E. Franklin, *Environ. Impact Assess. Rev.*, 1992, 12, 245.

- [10] ISO/14040, *Environmental Management – Life Cycle Assessment – Principles and Framework*, 1997.
- [11] D. C. Janzen, *Tenside Surf. Det.*, 1995, **32**, 110.
- [12] F. Hirsinger, K.-P. Schick, W. Schul, M. Stalmans, *ibid.*, 1995, **32**, 398.
- [13] Commission Regulation of laying down the principles for the assessment of risks to man and the environment of existing substances in accordance with Council Regulation No 793/93/EEC, wg: T. Feijt, Proc. A.I.S.E./CESIO III Workshop, Limelette, 1995, s. 35–43.
- [14] Technical guidance documents in support of the Commission Regulation 1488/94/EC on risks assessment for existing substances in accordance with Council Regulation 793/93, *Official Journal of the European Union*, 1994, No 161.
- [15] Technical guidance documents in support of the risk assessment Directive 93/67/EC for substances notified in accordance with the requirements of Council Directive 67/548/EEC, Brussels, 1993; wg: R. J. Van Wijk, et al, Proc. 4th World Surfactants Congress, Barcelona, 3–7.06.1996, Vol. 3, s. 143–154.
- [16] C. E. Cowan, P. H. Masscheleyn, World Conf. Exhib. Environmental Challenges in Oilseeds Processing, Surfactants and Detergents, and Oleochemicals, Brussels, 4–7.03.1997, Abstr. s. 22.
- [17] P. Schöberl, N. Scholz, [w:] *Die Tenside*, K. Kosswig, H. Stache (red.), München–Wien, C. Hanser Verlag, 1993, s. 465–482.
- [18] Report of the OECD workshop on the extrapolation of laboratory aquatic toxicity data to the real environment, OECD Monograph No. 59, 1992; wg: E. V. D. Plassche, T. Feijt, Proc. 4th World Surfactants Congress, Barcelona, 3–7.06.1996, Vol. 3, s. 246–260.
- [19] E. K. D. Plassche, T. Feijt, *ibid.*, Vol. 3, s. 251–252.
- [20] HAZCHEM – *A mathematical model for use in risk assessment of substances*, ECETOC Special Report No 8, European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, Brussels, 1994; wg: F. R. Schröder, *ibid.*, Vol. 3, s. 136–142.
- [21] P. Schöberl, *Tenside Surf. Det.*, 1997, **34**, 28.
- [22] B. Burczyk, VIIth Intern. Conf. Surface Active Substances, Bad Stuer (G.D.R.), April 22–30, 1988, Central Institute of Organic Chemistry of the Academy of Sciences of the GDR, Berlin (GDR), 1988, Preprints Abs., s. 4.
- [23] A. Piasecki, A. Sokołowski, B. Burczyk, Proc. 2nd World Surfactants Congress, Paris, 24–27.05.1988, Vol. II, s. 296–304.
- [24] H. Rutzen, E. Götte, Patent RFN 1542671 (1969).
- [25] T. Kuwamura, H. Takahashi, *Bull. Chem. Soc. Japan*, 1972, **45**, 617.
- [26] J. Cuomo, J. H. Marrifield, F. W. Keana, *J. Org. Chem.*, 1980, **45**, 2216.
- [27] D. A. Jaeger, M. R. Frey, *ibid.*, 1982, **47**, 311.
- [28] A. Sokołowski, A. Piasecki, B. Burczyk, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1992, **69**, 633.
- [29] A. Bieniecki, B. Matuszewska, K. A. Wilk, *Pol. J. Chem.*, 1995, **69**, 1174 i piśmiennictwo tam cytowane.
- [30] J. R. Brotherus, P. C. Jost, O. H. Griffith, L. E. Hokin, *Biochemistry*, 1979, **18**, 5043.
- [31] A. Pinazo, M. Piz, C. Solans, M. A. Pes, P. Erra, M. R. Infante, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1993, **70**, 37.
- [32] D. A. Jaeger, D. M. Ward, *J. Org. Chem.*, 1982, **47**, 2221.
- [33] D. A. Jaeger, C. T. Finley, M. R. Walter, C. A. Martin, *ibid.*, 1986, **51**, 3956.
- [34] R. B. Mc Connell, *Inform.*, 1994, **5**, No 1, 76.
- [35] R. Puchta, P. Krings, P. Sandköhler, *Tenside Surf. Det.*, 1993, **30**, 186.
- [36] R. Lagerman, S. Clany, D. Tanner, N. Johnston, B. Callian, F. Friedli, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1994, **71**, 97.
- [37] L. M. Ilardi, S. A. Madson, Patent USA 5429755 (1995).
- [38] R. D. Swisher, *Surfactant Biodegradation*, M. Dekker, Inc., New York, 1970, s. 258–261.
- [39] L. Stryer, *Biochemia*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1997, s. 642–669.

- [40] D. Ono, S. Yamamura, N. Nakamura, T. Takeda, A. Masuyama, Y. Nakatsuji, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1995, **72**, 853.
- [41] A. Sokołowski, B. Burczyk, J. Oleś, *J. Phys. Chem.*, 1984, **88**, 807.
- [42] A. J. Showler, P. A. Darley, *Chem. Rev.*, 1967, **67**, 427.
- [43] D. R. McCoy, Patent USA 3948953 (1976).
- [44] S. Yamamura, M. Nakamura, K. Kasai, H. Sato, T. Takeda, *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, 1991, **40**, 1002.
- [45] D. A. Jaeger, J. Jamrozik, T. G. Golich, M. Węgrzyn Clennan, J. Mohebalian, *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, **111**, 3001.
- [46] A. Piasecki, *Tenside Detergents*, 1985, **22**, 239.
- [47] B. Burczyk, L. Węślaś, *ibid.*, 1980, **17**, 21.
- [48] L. Węślaś, B. Burczyk, *ibid.*, 1981, **18**, 19.
- [49] D. A. Jaeger, *Supramol. Chem.*, 1995, **5**, 27 i piśmiennictwo tam cytowane.
- [50] D. Ono, A. Masuyama, Y. Nakatsuji, M. Okahara, S. Yamamura, T. Takeda, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1993, **70**, 29.
- [51] (a) A. Piasecki, *ibid.*, 1992, **69**, 639; (b) A. Piasecki, B. Burczyk, Patent polski PL 163515 (1994); A. Piasecki, B. Burczyk, Patent polski PL 163516 (1994).
- [52] S. Yamamura, M. Nakamura, T. Takeda, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1989, **66**, 1165.
- [53] S. Yamamura, K. Shimaki, T. Nakajima, T. Takeda, I. Ikeda, M. Okahara, *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, 1991, **40**, 16.
- [54] T. Takeda, S. Yamamura, K. Tanaka, M. Nakamura, *Yukagaku*, 1991, **65**, 389.
- [55] (a) K. A. Wilk, A. Bieniecki, B. Burczyk, A. Sokołowski, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1994, **71**, 81; (b) A. Sokołowski, A. Bieniecki, K. A. Wilk, B. Burczyk, *Colloids Surfaces A*, 1995, **98**, 73.
- [56] (a) B. Burczyk, M. Banaszczyk, A. Sokołowski, A. Piasecki, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1988, **65**, 1204; (b) B. Burczyk, M. Banaszczyk, Patent polski PL 139977 (1989); (c) K. Pyżalski, A. Piasecki, B. Burczyk, G. Bekierz, *Przem. Chem.*, 1992, **71**, 348; (d) A. Piasecki, B. Burczyk, K. Pyżalski, G. Bekierz, *Proc. 4th World Surfactants Congress, Barcelona 3-7.06.1966*, Vol. 4, s. 15-23.
- [57] (a) A. Sokołowski, A. Piasecki, B. Burczyk, *Tenside Surf. Det.*, 1993, **30**, 417; (b) A. Sokołowski, B. Burczyk, Patent polski PL 163371 (1990); (c) A. Piasecki, i in. *Zgłoszenie patentowe P-298844* (1993).
- [58] (a) A. Sokołowski, B. Burczyk, Patent polski PL 163495 (1990); (b) A. Piasecki, B. Burczyk, K. Pyżalski, G. Bekierz, *Zgłoszenie patentowe P-313991*.
- [59] (a) A. Piasecki, *Synth. Commun.*, 1992, **22**, 445; (b) A. Piasecki, B. Burczyk, Patent polski PL 162441 (1993).
- [60] A. Piasecki, B. Burczyk, A. Sokołowski, A. Mayhew, K. A. Wilk, *Bull. Pol. Ac. Sci. Chem.*, 1997, **45**, 329.
- [61] A. Piasecki, B. Burczyk, *Pol. J. Chem.*, 1980, **54**, 367.
- [62] (a) A. Piasecki, A. Sokołowski, B. Burczyk, U. Kotlewska, *Synth. Commun.*, 1996, **26**, 4145; (b) *ibidem*, *Zgłoszenie patentowe P-306515* (1994).
- [63] (a) A. Piasecki, A. Sokołowski, B. Burczyk, U. Kotlewska, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1997, **74**, 33; (b) *ibidem*, *Zgłoszenie patentowe P-306516* (1994); (c) *ibidem*, *Zgłoszenie patentowe P-308929* (1995).
- [64] A. Piasecki, A. Sokołowski, B. Burczyk, R. Gancarz, U. Kotlewska, *Langmuir*, 1997, **13**, 1434.
- [65] (a) A. Piasecki, B. Burczyk, P. Ruchała, *J. Surf. Det.* 1998, **1**, 29; (b) *ibidem*, *Zgłoszenie patentowe P-311492* (1995); (c) *ibidem*, *Zgłoszenie patentowe P-311493* (1995).
- [66] G.-W. Wang, X.-Y. Yuan, Y.-C. Liu, X.-G. Lei, Q.-X. Guo, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1995, **72**, 83.
- [67] E. Berlow, R. H. Barth, J. E. Snow, *The Pentaerithritols*, Reinhold Publ., New York, 1958.

- [68] (a) B. Burczyk, W. Foltynska, Proc. I World Surfactants Congress, Kuerle u. Verlag, Gelnhausen (Germany), 1984, Vol. II, s. 132–140; (b) W. Foltynska, B. Burczyk, Patent polski 115527 (1982).
- [69] G.-W. Wang, X.-Y. Yuan, Y.-C. Liu, X.-G. Lei, J. Am. Oil Chem. Soc., 1994, 71, 727.
- [70] G.-W. Wang, X.-G. Lei, Y.-C. Liu, *ibid.*, 1993, 70, 731.
- [71] T. Kida, N. Morishima, A. Masuyama, Y. Nakatsuji, *ibid.*, 1994, 71, 705.
- [72] T. Kida, K. Yurugi, A. Masuyama, Y. Nakatsuji, D. Ono, T. Takeda, *ibid.*, 1995, 72, 773.
- [73] D. A. Jaeger, J. Mohebalian, P. L. Rose, Langmuir, 1990, 6, 547.
- [74] A. Piasecki, A. Sokołowski, B. Burczyk, R. Gancarz, U. Kotlewska, J. Colloid Interface Sci., 1997, 192, 74.
- [75] K. Holmberg, Current Opinion Colloid Interface Sci., 1996, 1, 572.
- [76] Dziennik Ustaw RP Nr 98, poz. 490, Warszawa, 23.12.1992.
- [77] I. R. Shakland, [w]: *The Chemistry of the Atmosphere: Its Impact on Global Change*, J. G. Calvert (red.), Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1994, s. 71–83.

Praca wpłynęła do Redakcji 22 grudnia 1997

ENZYMY NIKLOWE NICKEL ENZYMES

Marek Wasielewski

*Instytut Chemii Uniwersytetu Opolskiego, ul. Oleska 48, 45-951 Opole,
e-mail: marwas@sparc-1.uni.opole.pl*

Abstract

Rozpowszechnienie i występowanie niklu

Znaczenie biologiczne niklu

Właściwości chemiczne niklu

Ogólna charakterystyka biochemiczna niklu

Ureaza

Hydrogenazy

Reduktaza metylokoenzymu M

Dehydrogenaza tlenku węgla/Syntaza acetylo-CoA

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

ABSTRACT

Nickel is now well recognized as an essential ultra trace element for bacteria and plants, where five distinct types of Ni-containing enzymes have been identified. It is also considered to be essential for animals and humans, however, its role in animal biochemistry is not well defined.

The article, containing 10 figures and 201 bibliographic positions, provides a current summary of the properties of known nickel enzymes, with emphasis on structure-function relations. In the beginning the paper reviews occurrence of Ni in environment, and its biological importance. The relevant chemistry of nickel complexes has been shortly reviewed.

Nickel enzymes are particularly prominent in the metabolism of anaerobic bacteria. For example, the metabolism of methanogens involves methyl-CoM reductase, nickel hydrogenase, acetyl-CoA synthase, and carbon monoxide dehydrogenase. Important enzyme for many bacteria, fungi, and plants is urease.

Urease catalyzes the hydrolysis of urea, to form ammonia and carbamate. It was the first enzyme ever to be crystallized (Sumner J. B., *J. Biol. Chem.*, 1926, **69**, 435; *ibid.*, 1926, **70**, 97). In 1975 Dixon and co-workers discovered that urease contains nickel at the active site (Dixon N. F. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1975, **97**, 4131). Twenty years later the X-ray crystal structure of the urease from *Klebsiella aerogenes* has been determined (Jabri E. et al., *Science*, 1995, **268**, 998). The enzyme is an $(\alpha\beta\gamma)_3$ trimer with each α -subunit having an $(\alpha\beta)_8$ -barrel domain containing a binickel active site. A carbamylated lysine provides an oxygen ligand to each nickel, explaining why carbon dioxide is required for the activation of urease apoenzyme (Park I. S., Hausinger R. P., *Science*, 1995, **267**, 1156). In the paper the coordination geometry of nickel ions and the structure of active site, together with possible catalytic mechanism, are presented.

[NiFe]-hydrogenases catalyze the two electron redox chemistry of H_2 . Crystallographic data on the hydrogenase from *Desulfovibrio gigas* were presented (Volbeda et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 12989), giving new information on the structure and mode of action of its H_2 activating place. The active centre was found to contain a heterodinuclear active site composed of a Ni centre bridged to an Fe centre by cysteinate ligands, and by oxygen species, which is proposed to be signature of the inactive form of the enzyme. The iron atom binds three diatomic ligands which are nonexchangeable triply bonded molecules (probably CO, CN^- or NO). Based on the new structure possible modes of hydrogen binding and catalytic action of the active site are discussed.

Methyl-coenzyme M reductase (MCR) catalyzes the final stage of the reduction of carbon dioxide to methane in methanogenic bacteria. The terminal step involves prosthetic group, Factor 430 (F-430), which in the resting state is a nickel(II) tetrapyrrole. Studies of F-430 in the enzyme complex suggest

a hexacoordinate, octahedral Ni(II) environment, with two oxygen axial ligands. The spectral data of the active form of MCR are characteristic for F-430 in the Ni(I) oxidation state (Goubeaud M. et al., *Eur. J. Biochem.*, 1997, **243**, 110), indicating that methyl-CoM reductase is activated when the enzyme-bound coenzyme F-430 is reduced to the Ni(I) state. The macrocycle can readily accommodate the structural changes that accompany reduction Ni(II) to Ni(I).

Carbon monoxide dehydrogenase (CODH) catalyzes the reversible oxidation of CO to CO₂, at an active site, called the cluster C, composed of an [4Fe-4S] cube with pentacoordinate Fe (called FCII), linked to a Ni (Hu Z. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 830). Besides the enzymes that contain only CODH activity, there are the bifunctional enzymes that contain both CODH and acetyl-CoA synthase (ACS) activity (Ragsdale S. W., Kumar M., *Chem. Rev.*, 1996, **96**, 2515). This enzyme catalyzes reaction of CO at two separate Ni-FeS clusters. Oxidation of CO to CO₂ is catalyzed by cluster C, while incorporation of CO into acetyl-CoA occurs at cluster A. A model of catalysis is proposed.

ROZPOWSZECHNIENIE I WYSTĘPOWANIE NIKLU

Średnia zawartość niklu w skorupie ziemskiej wynosi 86 ppm, co daje mu 22 miejsce wśród pierwiastków [1]. Występuje on głównie w rudach siarczonych i tlenkowych. Najwięcej znajduje się go w skałach ultrazasadowych (do 2000 ppm) i zasadowych (130–160 ppm), a najmniej w kwaśnych (5–15 ppm) [2]. Nikiel łatwo ulega mobilizacji w procesach wietrzenia.

Gleby piaszczyste zawierają do 10 ppm Ni, czarnoziemy i rędziny – do 30 ppm. Zanieczyszczenia przemysłowe mogą zwiększyć zawartość Ni w glebach do kilkudziesięciu tysięcy ppm, przy dopuszczalnej dla gleb uprawnych wartości 100 ppm [2]. Nikiel występuje w nich głównie w formach związanych z materią organiczną. Jego ruchliwość nie ogranicza się więc do gleb kwaśnych, ale jest też duża w glebach obojętnych i alkalicznych. Mobilność ta maleje w wyniku sorpcji przez wodorotlenki Fe i Mn, rosnącej ze zmniejszaniem się kwasowości gleb.

W wodach nikiel występuje głównie jako zawiesina koloidalna, szybko sorbowana przez minerały ilaste. Wskutek tego jego stężenie jest małe: $0,3\text{--}1\ \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ w rzekach i $0,1\text{--}0,6\ \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ w wodach mórz i oceanów (przy brzegach $> 1\ \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$), [2, 3]. W wodach gruntowych niklu jest średnio $2,5\ \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Dopuszczalne jego stężenie w wodach gruntowych wynosi w Polsce $20\ \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$, w wodach powierzchniowych $1\ \text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$, a w wodzie do picia $30\ \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ [4].

Zawartość niklu w powietrzu atmosferycznym wynosi na Spitzbergenie poniżej $0,2\ \text{ng}\cdot\text{m}^{-3}$, $2\text{--}6\ \text{ng}\cdot\text{m}^{-3}$ na obszarach zamiejskich, $17\text{--}25\ \text{ng}\cdot\text{m}^{-3}$ w miastach i do $150\ \text{ng}\cdot\text{m}^{-3}$ w metropoliach [2]. W zakładach przemysłowych stosujących Ni jego ilość w $1\ \text{m}^3$ powietrza zmienia się od mikro- do miligramów. Każdy papieros zawiera ok. $2,2\ \mu\text{g}$ Ni, który przy paleniu przechodzi do fazy gazowej, głównie w formie toksycznego, łatwo wchłanianego przez płuca $\text{Ni}(\text{CO})_4$ [3].

ZNACZENIE BIOLOGICZNE NIKLU

Już w 1915 r. zauważono, że nikiel przyspiesza wschodzenie pszenicy i wpływa na rozwój niektórych innych roślin, a w 1948 r. stwierdzono jego akumulację w *Alyssum bertolonii* [1]. Dopiero jednak w 1965 r. ustalono jednoznacznie, iż wzrost bakterii w mieszaninie H_2 i O_2 zależy od obecności Ni w środowisku [5]. Wskazywało to, że przynajmniej dla niektórych organizmów jest to pierwiastek podstawowy. Pod koniec lat sześćdziesiątych zaczęto uważać nikiel za składnik niezbędny do rozwoju niektórych bakterii beztlenowych, a w 1967 r. wykazano, iż jest on konieczny do wzrostu roślin (*Chlorella vulgaris*). W trzy lata później stwierdzono korzystny wpływ obecności niklu w pokarmie dla rozwoju kurczaków [1].

Mobilne formy niklu są łatwo przyswajane przez rośliny, w ilościach zależnych od jego zawartości w glebie, rodzaju gleby i jej właściwości (zwłaszcza odczynu; fitoprzyswajalność Ni gwałtownie spada przy $\text{pH} > 6$). Zawartość niklu w roślinach wynosi 0,04–4 ppm, choć w rejonach hutniczych może sięgać kilku tysięcy ppm [2]. Ze względu na rozpowszechnienie tego metalu objawów jego niedoboru właściwie nie obserwuje się. Nadmiar niklu (> 10 –100 ppm) jest szkodliwy: powoduje chlorozę, zaburzenia w przyswajaniu innych pierwiastków i zaburzenia ogólnego metabolizmu [2, 3]. Rośliny hiperakumulujące (*Alyssum bertolonii*, *Psychotria douarrei*, *Sebertia accuminata*), które wytworzyły specyficzne, wydajne układy szybkiego transportu i zatrzymywania tego pierwiastka, mogą gromadzić do kilkuset ppm niklu.

Tkanki zwierząt morskich zawierają 0,1–40 ppm Ni, ryb rzecznych – do 10 ppm, a ssaków lądowych – 1–3 ppm [2]. Kręgowce przyswajają go głównie poprzez układ pokarmowy i oddechowy. Niezbędność niklu dla zwierząt stwierdzono niedawno, hodując je na diecie pozbawionej tego pierwiastka [3].

Niedobór niklu obserwuje się przy stężeniach poniżej 40 ppb. Objawia się on zmianami skórnymi (dermatozy, rogowacenie), zniekształceniami kości kończyn, niewłaściwym upierzeniem, obniżeniem poziomu hemoglobiny i upośledzeniem działania wątroby wskutek gromadzenia się w niej tłuszczów. Deficyt niklu w diecie powoduje u szczurów zahamowanie wzrostu, anemię, mniejszą aktywność wielu układów enzymatycznych i zmniejszoną zawartość niektórych metali śladowych w wątrobie [6–8]. Dotychczas nie ustalono jednak żadnej szczególnej funkcji Ni w organizmach zwierzęcych, choć objawy związane z jego deficytem wydają się wskazywać na ich istnienie. Niektóre z nich mogą być jednak wywołane za pośrednictwem bakterii beztlenowych żyjących w przewodzie pokarmowym [1, 3, 9].

Toksyczność niklu zależy od charakteru chemicznego, postaci fizycznej i sposobu wchłonięcia zawierających go substancji. Wnikanie tego metalu do komórek kręgowców zależy od jego formy biochemicznej i rodzaju tkanki, w której one występują. Nadmiar niklu w diecie zwierząt zaburza metabolizm magnezu i cynku [3]. U szczurów, które piły wodę zawierającą sole niklu, rosła śmiertelność nowo narodzonych i liczba karłowatych osobników, częściej też rodziły się samice.

Ciało człowieka o wadze 70 kg zawiera 10 mg Ni. Dzielne zapotrzebowanie na nikiel jest nieduże i wynosi 25–35 μg [3], wobec przeciętnie przyjmowanej dawki 165 μg , a przy diecie bogatej w kakao lub orzechy – przekraczającej 1 mg. Szczególnie dużo Ni występuje w różnych przyprawach: goździkach (3200 ppm), pieprzu (2000 ppm), papryce (1550 ppm) [2], ale ich udział w pożywieniu jest niewielki.

W tkankach ciała ludzkiego znajduje się 0,02–2 ppm niklu. Gromadzi się on w nerkach (0,5–2 ppm), wątrobie (0,02–2 ppm), mięśniach (1–2 ppm), kościach (1 ppm) i płucach; jego stężenie we krwi wynosi 1,3–3,3 $\mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$ [3]. Nikiel słabo wchłania się w przewodzie pokarmowym ($< 10\%$ dla związków

nieorganicznych Ni, co odpowiada 1–2% niklu dostarczanego w pożywieniu [1, 3]. Pierwiastek ten jest szybko wydalany z organizmu — głównie z moczem, ale także z potem, śliną i wypadającymi włosami.

Nadmiar niklu jest szkodliwy, ale dopuszczalnych zawartości dotychczas nie ustalono. Uszkadza on szpik kostny i błony śluzowe (zwłaszcza Ni w pyłach atmosferycznych). U ludzi coraz częściej występuje specyficzna alergia na nikiel, objawiająca się zapaleniem skóry. Cierpi na nią 5–13% populacji: ok. 1% mężczyzn i 14% kobiet [3, 10]. Osoby te nie mogą używać naczyń kuchennych i sztućców ze stali nierdzewnej, zawierających nikiel monet lub biżuterii.

Najbardziej toksycznym związkiem niklu (bardziej niż np. cyjanowodor) jest gazowy karbonyl niklu $\text{Ni}(\text{CO})_4$, bardzo łatwo wchłaniany przez płuca i ze względu na swą lipofilowość przenikający przez błony komórkowe do większości narządów [11]. W organizmie jest on metabolizowany do wiązanego przez hemoglobinę tlenku węgla oraz wolnego niklu, ulegającego następnie utlenieniu do $\text{Ni}(\text{II})$. Zatrucia karbonylkami niklu, występujące najczęściej w przemyśle przy oczyszczaniu tego metalu, mają początkowo łagodny przebieg. Występują mdłości, bóle głowy, duszności i bóle w klatce piersiowej, które zwykle szybko ustępują. Po pewnym czasie — od 12 godzin do 5 dni — wracają duszności i kaszel oraz następują zmiany w mózgu i innych narządach, mogące doprowadzić do śmierci. Przy zatruciach karbonylkami niklu stosuje się diety loditiokarbaminian sodu; inne czynniki chelatujące są mniej skuteczne [5].

Największe zagrożenie dla ludzi ekspozowanych na działanie niklu wynika z jego kancerogenności [12]. Przyczyną nowotworów mogą być $\text{Ni}(\text{CO})_4$ lub słabo rozpuszczalne w wodzie związki Ni, takie jak Ni_3S_2 lub NiO . Granulki tych ostatnich dostają się do komórek przez fagocytę. W niektórych tkankach wnikaniu niklu do komórek zapobiega obecność w środowisku pozakomórkowym potencjalnych ligandów chelatujących. Wdychanie rozpuszczalnych w wodzie soli niklu przypuszczalnie nie jest rakotwórcze, zaś przypadkowe spożycie ich roztworów przejawia się tylko przejściową nefrotoksycznością [12]. Głównym mechanizmem kancerogennego działania niklu jest oksydacyjne uszkodzenie DNA [12], ale nie wyjaśnia ono wszystkich obserwacji, dlatego sformułowane są i inne hipotezy [12–17].

WŁAŚCIWOŚCI CHEMICZNE NIKLU

Nikiel, $[\text{Ar}] 3d^8 4s^2$, występuje w związkach na kolejnych stopniach utlenienia od -1 do $+4$. Najtrwalszy, najczęściej spotykany i najlepiej zbadany jest nikiel(II). Ze względu na próby opracowania modeli centrów katalitycznych enzymów niklowych dużo uwagi poświęcono w ostatnich latach kompleksom $\text{Ni}(\text{I})$ i $\text{Ni}(\text{III})$ [18].

Nikiel(-1) występuje w anionie $[\text{Ni}_2(\text{CO})_6]^{2-}$, ale ani struktura, ani liczba koordynacyjna jonu metalu w tym kompleksie nie są znane. Nikiel na

0 oraz +1 stopniu utlenienia występuje najczęściej w związkach metaloorganicznych. Nikiel(0), (d^{10}) jest stabilizowany przez ligandy silnie π -akceptorowe, takie jak CO, PR_3 lub $P(OR)_3$. Jego kompleksy mają zwykle budowę tetraedryczną [19].

Nikiel(I), (d^9) jest mocnym reduktorem. Jest on izoelektronowy z Cu(II), ale ma większy promień jonowy i preferuje miękkie atomy donorowe ligandów. Tworzy on przede wszystkim kompleksy tetraedryczne, ale także diamagnetyczne kompleksy dwurdzeniowe z wiązaniami metal—metal. Niektóre monordzeniowe kompleksy Ni(I), np. z ligandami makrocyklicznymi koordynowanymi przez azot, o rozmiarach luki w pierścieniu pozwalających przyjąć duży jon Ni^+ , mają budowę bipiramidy tetragonalnej. Stabilizacja Ni(I) przez ligandy wodorkowe i ditiolenowe może być istotna dla zawierających ten metal enzymów [18].

Nikiel(II), (d^8) przyjmuje w kompleksach liczby koordynacyjne od 3 do 6 oraz wszystkie ważniejsze typy struktur: oktaedryczną, bipiramidy trygonalnej, piramidy kwadratowej, tetraedryczną i kwadratową. Zwykle jednak występuje — w zależności od pola ligandów — jako jon paramagnetyczny w koordynacji oktaedrycznej albo diamagnetyczny, w otoczeniu o symetrii kwadratowej. Kompleksy z ligandami zawierającymi donorowe atomy tlenu są wysokospinowe. W silnym polu ligandów (np. z donatorami S), powstają kompleksy niskospinowe. Nieduże zmiany właściwości elektronowych lub rozmieszczenia przestrzennego donorów mogą powodować zmianę stanu spinowego. Wiązania w kompleksach z donatorami azotowymi są na ogół mocniejsze niż w zawierających ligandy wytwarzające słabsze pole, ale $[Ni(NH_3)_6]^{2+}$ łatwo dysocjuje w wodzie, co potwierdza labilność wysokospinowych kompleksów Ni(II). Reakcje podstawienia dla tych ostatnich zachodzą znacznie szybciej niż dla kompleksów niskospinowych. W wyniku utleniania kompleksów oktaedrycznych Ni(II) zwykle powstają oktaedryczne połączenia Ni(IV), a płaskich, kwadratowych — tetragonalne kompleksy Ni(III) [12, 18]. Kompleksy pięciokoordynacyjne bywają dia- lub paramagnetyczne [12, 18, 19].

Z ligandami wyłącznie monodentatnymi Ni(II) tworzy tylko kilka kompleksów o budowie kwadratowej — np. $[Ni(CN)_4]^{2-}$. Znacznie ich więcej zawiera ligandy dwukleszczowe: siarkowe (S_4^{2-}), dimetyloglioksym, ditiokarbaminian. Kompleksy płaskie, kwadratowe Ni(II) mogą przechodzić w paramagnetyczne związki tetraedryczne. Możliwe są też koordynacje bipiramidy trygonalnej (kompleksy na ogół niskospinowe) i piramidy kwadratowej (kompleksy zwykle wysokospinowe). Pomiędzy tymi strukturami występują skomplikowane stany równowagi, zależnie od temperatury i od stężeń reagentów. Nikiel(II) tworzy też kompleksy dwu- i wielordzeniowe. Występują w nich wiązania metal—metal lub ligandy mostkowe łączące ze sobą jony metalu występujące w otoczeniu pięcio- lub sześciokoordynacyjnym.

Stopień utlenienia +3 był dla niklu uważany do niedawna za bardzo rzadki. Zainteresowanie takimi związkami wzrosło po zaobserwowaniu Ni(III)

w układach biologicznych i stwierdzeniu samorzutnego ich tworzenia z płaskich, kwadratowych kompleksów niklu(II) w obecności O_2 . Uważa się, że nikiel na tym stopniu utlenienia jest produktem pośrednim w reakcjach redoks katalizowanych przez Ni(II) [20].

Nikiel(III), (d^7) stabilizują niektóre ligandy: aminy makrocycliczne, porfiryny, chelatowe amidy, oksymy, 1,1-ditiolany [21]. Kompleksy te mają na ogół budowę odkształconego oktaedru, kwadratową lub bipiramidy trygonalnej. Związki jednordzeniowe są paramagnetyczne (zwykle jeden elektron niesparowany). Właściwości kinetyczne kompleksów Ni(III) i ich zachowanie w reakcjach utleniania-redukcji zależą od skoordynowanych ligandów [21, 22].

Monopeptydowe połączenia Ni(III) można otrzymać przez utlenienie kwadratowych kompleksów di-, tri-, tetra- i pentapeptydowych Ni(II). Mają one budowę wydłużonej bipiramidy kwadratowej, z cząsteczkami wody w pozycjach aksjalnych. Kompleksy bis(dipeptydowe) Ni(II) utleniają się do związków Ni(III) o strukturze skróconej bipiramidy tetragonalnej. W przeciwieństwie do trwałych kompleksów mono(tripeptydowych) Ni(II), kompleksy Ni(III) łatwo przyłączają drugi tripeptyd, dając związki bis(tripeptydowe) o budowie wydłużonej bipiramidy tetragonalnej. Znane są kompleksy Ni(III) z ligandami mieszanymi, gdzie obok peptydu skoordynowane są inne jony lub cząsteczki [21–24].

Nikiel(IV), (d^6) jest mało trwały i znanych jest niewiele jego związków. Większość z nich zawiera twarde ligandy z donorowymi atomami tlenu lub azotu. Mają one budowę oktaedryczną lub odkształconego oktaedru, zwykle sparowane spiny i są diamagnetyczne lub wykazują słaby paramagnetyzm niezależny od temperatury [18].

OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA BIOCHEMICZNA NIKLU

Dotychczas poznano kilka enzymów zawierających nikiel. Przełomowe znaczenie dla rozwoju chemii bionieorganicznej tego metalu miało odkrycie, że znana już od dawna ureaza jest enzymem niklowym. Ponieważ występuje ona nie tylko w wielu bakteriach, ale i w większości roślin, wyjaśniałoby to choć częściowo korzystny wpływ Ni na ich rozwój. Według obecnego stanu wiedzy ureaza jest jedynym enzymem niklowym w roślinach wyższych. Stwierdzono też, że nikiel jest niezbędny dla alg, choć nie zawierają one ureazy [25].

Obecność niklu wykryto także w enzymach bakteryjnych: hydrogenazach z większości (choć nie wszystkich) bakterii, dehydrogenazie tlenu węgla z bakterii beztlenowych oraz w reduktazie metylokoenzymu M z bakterii metanogennych [25, 26]. W przeciwieństwie do ureazy, która jest enzymem hydrolytycznym, wszystkie pozostałe enzymy niklowe uczestniczą w reakcjach utleniania-redukcji. Żadnego z nich nie znaleziono w organizmach zwierzęcych i znaczenie fizjologiczne niklu nie jest w ich wypadku jasne. Wiadomo jednak,

że metal ten może być bezpośrednio koordynowany z białkiem, zwłaszcza przez fragmenty o dużym udziale reszt histydynowych [27, 28].

Niedawno wyizolowano ze *Streptomyces* sp. i *Streptomyces coelicolor* niklową dysmutazę ponadtlenkową (SOD), [29]. Oba enzymy są zbudowane z czterech identycznych podjednostek ($M_r = 13,4$ tys. u), różniących się od Fe-SOD, Mn-SOD oraz Cu,Zn-SOD strukturą pierwszorzędową i N-końcową sekwencją aminokwasów. Ich widma EPR były podobne do widm tetragonalnych kompleksów oligopeptydowych Ni(III), zwłaszcza zawierających histydynę. O podstawowym znaczeniu niklu dla funkcjonowania enzymu świadczy fakt, że pozbawione go apobiałko nie wpływa na przemianę O_2^- w H_2O_2 .

Enzymy niklowe badano różnymi metodami fizykochemicznymi, zwłaszcza spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego, EPR [30], i spektroskopii absorpcyjnej promieniowania rentgenowskiego, XAS [31–33]. Badania te uzupełniane były syntezami kompleksów modelowych niklu, naśladujących właściwości spektroskopowe i katalityczne centrów metalicznych w enzymach [26]. Dopiero w ostatnich latach rozwiązano strukturę krystaliczną ureazy i poczyniono znaczne postępy na drodze do określenia struktury hydrogenazy, co pozwala lepiej zrozumieć budowę i funkcje centrów niklowych.

Otoczenia koordynacyjne niklu w enzymach są znacząco odmienne, pełni on też różne funkcje. Celowe jest więc oddzielne rozważenie poszczególnych enzymów, z uwzględnieniem budowy miejsca aktywnego i funkcji jonów metalu.

UREAZA

Ureaza, czyli amidohydrolaza mocznika, E.C.3.5.1.5, była pierwszym enzymem wyodrębnionym w postaci krystalicznej (J. B. Sumner, 1926 r. — z nasion fasoli „Jaś”, *Canavalia ensiformis*) [34]. Występuje ona w wielu bakteriach, w tym patogennych (*Klebsiella aerogenes*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter pylori*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus pasteurii* i in.) oraz w grzybach i roślinach wyższych, uczestnicząc w obiegu biochemicznym azotu w przyrodzie [11, 35–45]. Ureaza katalizuje hydrolizę mocznika do karbaminianu, który rozkłada się samorzutnie do amoniaku i wodorowęglanu:



Pięćdziesiąt lat po wykrystalizowaniu tego enzymu wykazano obecność niklu w jego miejscu aktywnym [46]. Ureaza z fasoli jest heksamerem (podjednostki o ciężarach cząsteczkowych $M_r = 90,4 \cdot 10^3$ u), natomiast enzym z *K. aerogenes* — trimerem. Homologia sekwencyjna obu tych białek przekracza 50% [47, 48], a ich właściwości spektroskopowe i katalityczne są niemal iden-

tyczne [26]. Podjednostka katalityczna wszystkich poznanych ureaz zawiera dwa znajdujące się blisko siebie jony metalu [49–53], enzymy te są więc dwuzdzeniowymi metalohydrolazami [26, 54, 55].

W tworzeniu centrum metalicznego najlepiej scharakteryzowanej ureazy z *K. aerogenes* [56–60] uczestniczą *in vivo* białka UreD, UreE, UreF i UreG [61]. Postuluje się stabilizację konformacji apoproteiny ureazy przez UreD i rolę źródła jonów niklu dla UreE; znaczenia UreF i UreG dotychczas nie wyjaśniono [61–64]. Wiązanie niklu przez apoureazę wymaga obecności CO₂ [62].

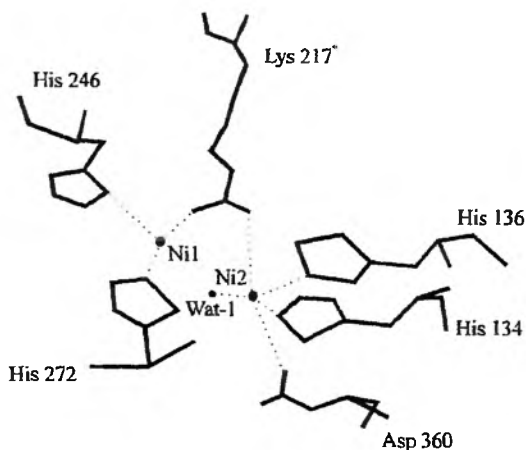
Strukturę krystaliczną ureazy z *K. aerogenes* ustalono rentgenograficznie w 1995 r. [65]. Jest ona trimerem ($\alpha\beta\gamma$)₃, zbudowanym z T-kształtnych jednostek $\alpha\beta\gamma$ o ciężarach cząsteczkowych 60304 u (α , UreC), 11695 u (β , UreB) i 11086 u (γ , UreA). Każda z nich zawiera cztery domeny strukturalne: po dwie w łańcuchach α i po jednej w łańcuchach β oraz γ . Miejsce aktywne enzymu znajduje się w C-końcowej części domeny 1 (reszty α 130– α 141), tj. domeny ($\alpha\beta$)₈ podjednostki α [65], niemal identycznej z odpowiednimi fragmentami dwóch monozdzeniowych enzymów cynkowych: deaminazy adenozykowej [66, 67] i fosfotriesterazy [68].

W miejscu aktywnym ureazy dwa mocno związane jony Ni(II), odległe o 350 pm od siebie, są połączone ze sobą mostkiem karboksylanowym zmodyfikowanej lizyny Lys- α 217*. Z jej grupy ϵ -aminowej w reakcji z CO₂ tworzy się karbaminian, który może uczestniczyć w koordynowaniu metalu [62, 69]. Wyjaśnia to niezbędność dwutlenku węgla do wiązania niklu i aktywacji apoenzymu. Podobny mechanizm aktywacji znano wcześniej dla fosfotriesterazy [68] i magnezowej karboksylazy/oksygenazy rybulozo-1,5-difosforanu (*Rubisco*) [70, 71]; jest on też prawdopodobny dla zawierającej żelazo oksydazy 1-aminocyklopropano-1-karboksylanu (ACC) [72]. Długi łańcuch węglowy i obecność grupy NH₂COO⁻ zamiast ϵ -NH₃ w H₂N(CH₂)₄CH(NH₂)COOH umożliwia w ureazie równoczesne skoordynowanie Lys- α 217* do dwóch jonów Ni(II); grupa karboksylanowa jest dla nich ligandem mostkowym. W deaminazie adenozykowej występuje fragment łańcucha niemal identyczny z domeną ($\alpha\beta$)₈ podjednostki α , zawierającą miejsce wiązania niklu. Zamiast Lys znajduje się tam jednak Asp-181, H₂NCOCH₂CH₂(NH₂)COOH, o krótszym łańcuchu, co pozwala na wiązanie się z jednym tylko jonem metalu [73].

Rubisco i fosfotriesteraza, także koordynujące jony metalu przez karbamylowaną lizynę, ulegają łatwo deaktywacji pod działaniem związków chelatujących. Ureaza jest natomiast bardzo odporna na działanie czynników denaturujących [47, 48, 74], co wynika z jej struktury czwartorzędowej, prowadzącej do schowania niezwykle dużej części reszt aminokwasowych wewnątrz białka (60% w podjednostce α , 30% w β i 50% w γ) [75]. Stosunek powierzchni do objętości jest w niej unikatowo mały; mniejszy nawet niż w hipertermostabilnym enzymie, ferredoksynowej oksydoreduktazie aldehydowej, AOR [76]. Znaczący udział w mocnym wiązaniu niklu ma preorganizacja apoenzymu. Jego struktura — z wyjątkiem miejsca aktywnego, w którym cząsteczka wody

zajmuje miejsce brakujących jonów niklu i karbaminianu – jest prawie identyczna jak holoenzymu [75].

W sferze koordynacyjnej Ni₂ (rys. 1) są dwa atomy azotu, Ne His- α 134 i Ne His- α 136, oraz trzy atomy tlenu: z Asp- α 360, mostkowej Lys- α 217* i cząsteczki Wat-1 (H₂O lub OH⁻; przeprowadzone badania nie pozwalają ich rozróż-



Rys. 1. Otoczenie koordynacyjne jonów niklu w miejscu aktywnym ureazy z *Klebsiella aerogenes* [65]

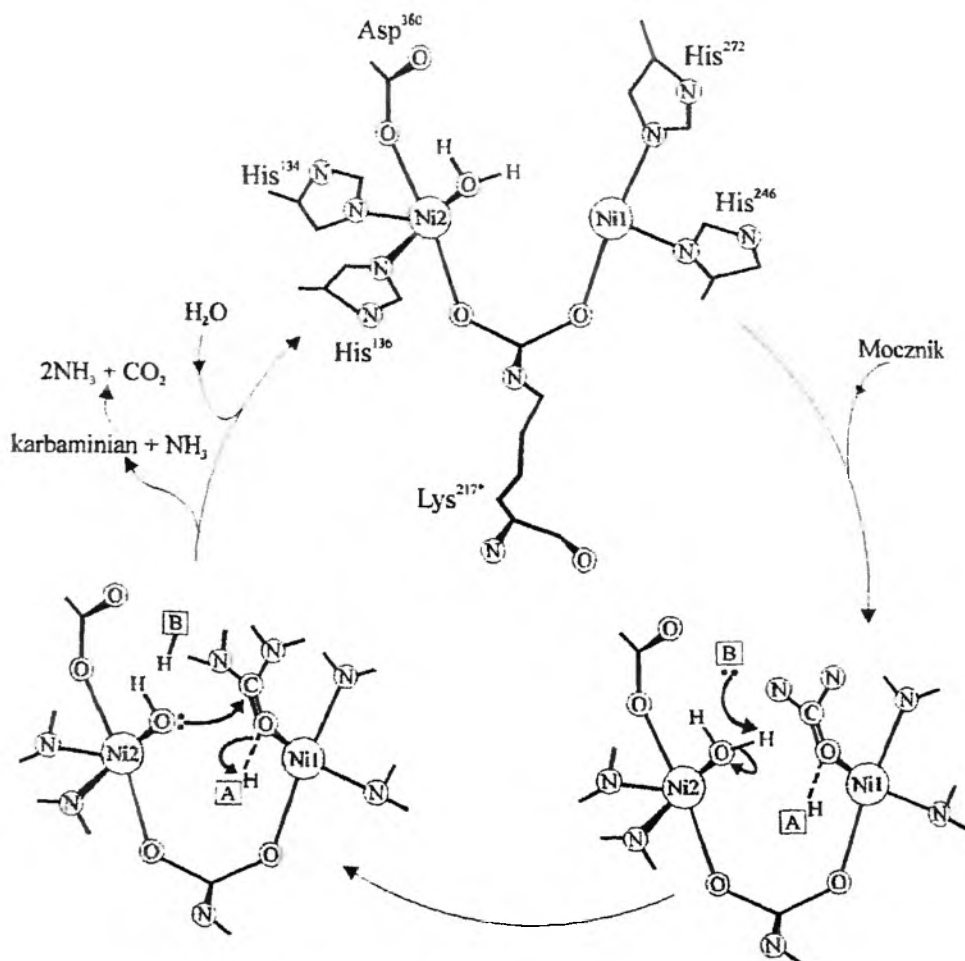
nić). Jon Ni₂ ma koordynację pośrednią między bipiramidą trygonalną a piramidą kwadratową. Drugi jon metalu w miejscu aktywnym, Ni₁, ma nietypową, pseudotetraedryczną geometrię koordynacyjną [65, 77]. Jest on związany z drugim atomem tlenu Lys- α 217* oraz atomami azotu N δ His- α 246 i Ne His- α 272. Czwarte miejsce koordynacyjne uzupełnia słabo oddziałujący ligand Wat-1. Porównania z modelowymi dwurdzeniowymi kompleksami Ni(II) [78–82] wskazują na unikatowy charakter koordynacji jonów metalu w ureazie, wynikający z silnej stabilizacji położenia ligandów wokół centrów koordynacji przez oddziaływania hydrofobowe i wiązania wodorowe [75].

Mutant H134A, w którym His- α 134 zastąpiono resztą Ala, jest nieaktywny katalitycznie. Zamiast dwóch jonów niklu zawiera on tylko Ni₁, o koordynacji nie pseudotetraedrycznej, ale oktaedrycznej. Wskazuje to na istotne znaczenie jonu Ni₂ w ustalaniu odpowiedniej geometrii koordynacyjnej Ni₁ i tworzeniu aktywnej ureazy. Jon niklu w mutancie jest także wiązany przez His-246, His-272 i Lys-217* (co świadczy, że karbamylowanie grupy aminowej Lys-217 może zachodzić również w nieobecności jonu Ni₂), a ponadto przez trzy cząsteczki wody. Poza różnicami wokół centrum metalicznego (reszty 314–331) struktura białka pozostaje w zasadzie nie zmieniona [75].

Dwa centra metaliczne połączone ze sobą mostkami karboksylanowymi lub fosfodiestrowymi występują w licznych hydrolazach [73]. Dla wielu z nich szczególnie mechanizmy katalityczne nie są znane, ale uważa się, iż jeden jon

metalu jest kwasem Lewisa, polaryzującym i stabilizującym grupę odchodzącą, a drugi deprotonuje cząsteczkę wody, służąc za lokalne źródło jonów OH^- do nukleofilowego ataku na substrat. Postuluje się, że podobnie jest i w ureazie.

Badania mutagenetyczne świadczą o kluczowej roli His- α 219 i His- α 320 w katalizie enzymatycznej [75, 83]. Reszta His- α 219 wpływa na wiązanie substratu, prawdopodobnie przez tworzenie wiązania wodorowego z mocznikiem. Znajduje się ona w „kieszni” białkowej w miejscu aktywnym, w odległości 310 pm od Ni1, 370 pm od Ni2 oraz 300 pm od wolnego miejsca koordynacyjnego Ni1. Reszta ta występuje w formie protonowanej przy atomie N ϵ , co pozwala wytworzyć wiązanie wodorowe z atomem tlenu mocznika, umożliwiając odpowiednie ułożenie substratu i jego polaryzację [75].



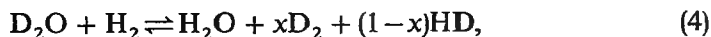
Rys. 2. Możliwy mechanizm funkcjonowania miejsca aktywnego ureazy: A^H – reszta His α 219 polaryzująca grupę karbonylową skoordynowanej cząsteczki mocznika i ułatwiająca atak nukleofilowy grupy OH^- , B: – zasada Lewisa (przypuszczalnie atom azotu His α 320) [73]

Przypuszcza się, że His- α 320 pełni w procesie katalizy rolę zasady. Odległość protonowanego atomu Ne od hipotetycznego nukleofila, Wat-1 (H_2O lub OH^-), wynosi co prawda aż 430 pm, czyli reszta ta jest zbyt daleko, by mogła aktywować Wat-1. W wyniku zmian konformacyjnych po związaniu cząsteczki mocznika His- α 320 może jednak znaleźć się w odpowiednim położeniu. W enzymie nie zmodyfikowanym Wat-1 oddziałuje z tą resztą za pośrednictwem Wat-170. W strukturze H320A poza brakiem His- α 320 w łańcuchu bocznym jedyną zmianą jest utrata Wat-170 i przesunięcie Wat-1 ze sfery koordynacyjnej Ni2 na pozycję liganda mostkowego, 240 pm od Ni1 i 230 pm od Ni2. Jon Ni2 zachowuje swoją koordynację, natomiast koordynacja Ni1 przestaje być tak unikatową, bowiem wiązane są teraz cztery ligandy (dwa N i dwa O) w geometrii tetraedrycznej. Możliwą dodatkowo poza rolą zasady katalitycznej, albo nawet alternatywną funkcją reszty His- α 320, może być zapewnienie odpowiedniej geometrii miejsca aktywnego, umożliwiającej związanie mocznika [75].

Proponowany mechanizm funkcjonowania miejsca aktywnego ureazy przedstawiono na rys. 2 [73, 84]. Oprócz Ni1, Ni2 i grup pokazanych na rysunku w katalizie uczestniczą także kwasowe i zasadowe reszty aminokwasowe obecne w miejscu aktywnym wokół „kieszeni” białkowej wiążącej mocznik w pobliżu skoordynowanej cząsteczki wody. Model ten jest bardzo prawdopodobny, ale nie można zupełnie wykluczyć wiązania się substratu z obydwoma jonami Ni(II). W prowadzonych obecnie badaniach najistotniejsze wydaje się określenie struktury krystalicznej ureazy zawierającej związany inhibitor.

HYDROGENAZY

Hydrogenazy (E.C.1.12.1.2, 1.2.2.1, 1.8.99.1) to enzymy uczestniczące w metabolizmie wodoru cząsteczkowego. Katalizują one tworzenie i utlenianie H_2 (3), w czym biorą też udział odpowiednie donory lub akceptory elektronów: NAD, ferredoksyny, cytochrom *c* itp. Hydrogenazy mogą również katalizować wymianę izotopową wodoru (np. 4) i wzajemną przemianę *orto*- i *para*-wodoru (5), [25].



Reakcje te wskazują, że hydrogenaza katalizuje heterolityczne rozrywanie wiązania w cząsteczce H_2 . Powstały proton łączy się przy udziale enzymu z zasadą, a jon wodorkowy jest przypuszczalnie wiązany przez centrum metaliczne. Beztlenowce wytwarzają ponad 200 mln ton H_2 rocznie, a tlenowce 10 mln ton [85]. Wodór ten jest zużywany przez inne organizmy, przede wszystkim archebakterie metanogenne, bakterie acetogenne, redukujące siarczyn lub

azotany, a także przez niektóre grzyby i algi. Kodują one w swych genach różne hydrogenazy [86], które występują m.in. w cytoplazmie (np. *C. pasteurianum*, *Nocardia opaca* Ib [87]) i w przestrzeni periplazmatycznej (*Desulfovibrio gigas*). Najpowszechniejsze są jednak związane z błonami hydrogenazy łańcucha oddechowego. Spotyka się je w bakteriach utleniających wodór gazowy (*E. coli*, *Alcaligenes*), wbudowujących N_2 (*Azotobacter*) i w bakteriach fotosyntezujących (*Rhodobacter capsulatus*, *Thiocapsa roseopersicina*, *C. vinosum*) [25, 88–92].

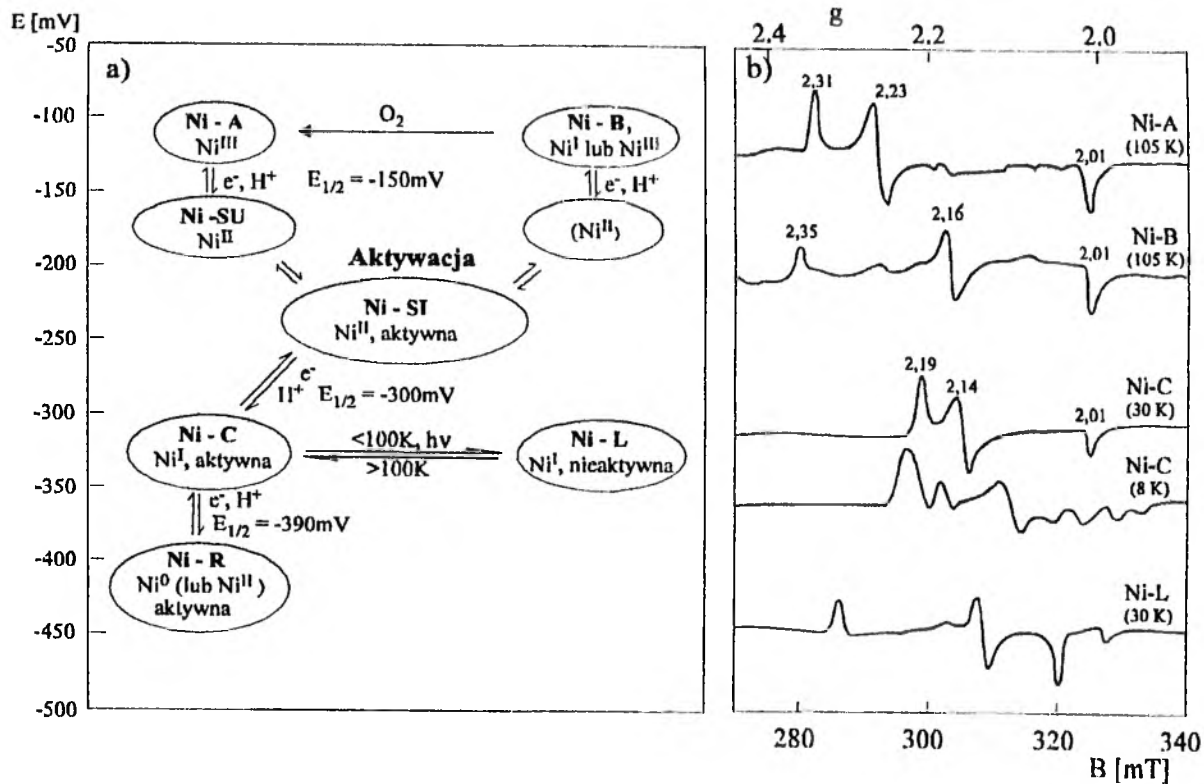
Niemal wszystkie hydrogenazy zawierają centra żelazo-siarkowe. W 1990 r. wyodrębniono z bakterii metanogennych nowy typ enzymu, hydrogenazę N^5, N^{10} -metenylotetrahydrometanopteryny, w której nie ma centrów metalicznych [85, 93, 94]. W hydrogenazach z ponad dwudziestu różnych organizmów występuje nikiel [95, 96]. Enzymy te dzieli się więc ogólnie na żelazowe (hydrogenazy [Fe]) i niklowe (hydrogenazy [NiFe]). Te pierwsze, bardzo wrażliwe na działanie powietrza i trudne do wyodrębnienia, stanowią stosunkowo małą grupę i na ogół uczestniczą w wytwarzaniu H_2 . W miejscu aktywnym mają one specyficzny, zawierający sześć atomów żelaza klaster Fe-S, tzw. klaster H.

Hydrogenazy niklowe występują we wszystkich grupach taksonomicznych bakterii. Większość z nich (poza enzymem hipertermofilowej archebakterii *Pyrococcus furiosus* [25]) katalizuje utlenianie H_2 z szybkościami większymi niż jego wytwarzanie, zatem uczestniczą one w jego konsumpcji. Hydrogenazy [NiFe] cechuje duża różnorodność składu chemicznego, ciężarów cząsteczkowych, potencjałów redukcji i zachowania katalitycznego. Niektóre, zawierające związany z niklem selen w formie selenocysteiny, wyróżnia się jako podklase hydrogenaz [NiFeSe]. Jeszcze inne zawierają flawinę (FMN albo FAD), a we wszystkich występują centra Fe-S (4–14 atomów Fe na jeden atom Ni).

Hydrogenazy niklowe wykazują znacznie większą niż hydrogenazy [Fe] (choć zróżnicowaną) odporność na działanie O_2 i innych inhibitorów: CO, NO, CN^- , C_2H_2 . Często obserwuje się odwracalne działanie inhibitorów przy krótkiej ekspozycji, a nieodwracalną inaktywację po dłuższym czasie. Sugeruje to, że niektóre inhibitory mogą być wiązane w kilku różnych miejscach enzymu. Tlenek węgla w obecności światła jest inhibitorem współzawodniczącym z H_2 ; aktywacja przy naświetlaniu wskazuje na centrum metaliczne jako miejsce wiążące [85].

Hydrogenazy niklowe mogą występować w różnych formach, dających odmienne widma EPR (rys. 3), [25, 26, 97]. Sygnały EPR pochodzące od niklu obserwuje się wraz z sygnałami klasterów żelazo-siarkowych wchodzących w skład łańcuchów transportu elektronów do oraz z miejsca aktywnego [25].

Przy wyodrębnianiu enzymu w warunkach aerobowych powstaje mieszanina Ni-A i Ni-B, które mają różne [98] lub jednakowe [99] widma IR. Pierwsza z tych form może być aktywowana dopiero po długotrwałej inkubacji w H_2 . Forma Ni-B, trwała na powietrzu, w temperaturach fizjologicznych



Rys. 3. a) Formy występowania hydrogenaz niklowych, b) widma EPR różnych form hydrogenazy [NiFe] z *Desulfovibrio gigas* [26, 88]

w obecności H_2 i niskopotencjałowych akceptorów elektronów ulega aktywacji natychmiast [100]. Tworzy się przy tym najbardziej aktywna forma Ni-C [97, 101]. Przy częściowej redukcji Ni-B powstaje forma pośrednia, nie dająca sygnału EPR, Ni-SI [98]. Przy szybkim utlenianiu przechodzi ona w Ni-A, powolne utlenianie zaś prowadzi do Ni-B. W wyniku częściowej, jednoelektronowej redukcji Ni-A można otrzymać nieaktywną formę Ni-SU [98]. Całkowita redukcja aktywowanego enzymu daje formę Ni-R, znów nie wykazującą sygnałów EPR, które można by przypisać niklowi. Formy Ni-SI, Ni-C i Ni-R są aktywne względem utleniania H_2 lub redukcji protonów.

Hydrogenazy niklowe składają się z co najmniej dwóch podjednostek, dużej ($M_r = 46-72$ tys. u) i małej ($M_r = 23-38$ tys. u) [102]. W większej znajduje się zawierające nikiel miejsce aktywne, a w mniejszej klaster [4Fe-4S]. Ten ostatni nie jest częścią miejsca aktywnego, a jedynie przenosi ładunek między H_2 a jednoelektronowymi donorami lub akceptorami. Powszechne w hydrogenazach są także klaster [3Fe-4S], o wyższych potencjałach redukcji. Ich roli dotychczas nie ustalono. Hydrogenazy redukujące NAD (np. z *Azotobacter entrophus*) i z hipertermofilowych archebakterii *Thermococcus stetteri* zawierają też podjednostki z klasterem [2Fe-2S] i FAD [103], a w hydrogenazach redukujących F-420 w komórkach metanogenów znajduje się jeszcze trzecia podjednostka [25].

Przy rozważaniu budowy miejsca aktywnego proponowano różne sposoby koordynacji izolowanego jonu niklu [11, 26, 104, 105, 106]. Analiza rentgenowska formy Ni-A hydrogenazy niklowej z *D. gigas* ujawniła w miejscu aktywnym obecność heterodwurdzeniowego centrum metalicznego [107, 108]. W mniejszej podjednostce są trzy klaster [3Fe-4S] pomiędzy dwoma klasterami [4Fe-4S].

Miejsce aktywne enzymu występuje w większej podjednostce i zawiera atom niklu związany mostkowo z odległym o 290 pm atomem żelaza (rys. 4). Atomy donorowe tworzą wokół Ni(II) silnie odkształconą piramidę kwadratową; szóste miejsce koordynacyjne jest nie obsadzone. Żelazo w miejscu aktywnym koordynuje trzy ligandy mostkowe i trzy dwuatomowe ligandy białkowe, które razem tworzą odkształconą strukturę oktaedryczną [98, 99, 109, 110].

Ligand X jest przypuszczalnie jednoatomowym produktem redukcji O_2 . Jego obecność świadczy o występowaniu enzymu w stanie nieaktywnym [98]. Przy redukcji utlenionej formy enzymu do formy pośredniej możliwa jest zmiana liczby koordynacyjnej niklu z 5 na 6. Wyjątkiem jest hydrogenaza z *Thiocapsa roseopersicina*, w której nikiel jest zawsze sześciokoordynacyjny [111].

Trzy dotąd nie zidentyfikowane ligandy, L1, L2, L3, związane bardzo mocno z Fe, zawierają przypuszczalnie wiązania potrójne. Mogą nimi być CO lub CN^- , żelazo w miejscu aktywnym jest, być może, skoordynowane z różnymi takimi ligandami [98]. Każdy z nich występuje w innym otoczeniu białkowym. Ligandy L1 i L2, koplanarne z dwoma skoordynowanymi z Fe cys-

reakcjach redoks [26, 116]. Badania związków modelowych pokazują, że nikiel(III), w przeciwieństwie do Ni(I), nie wiąże jonów H^- ani CO [117].

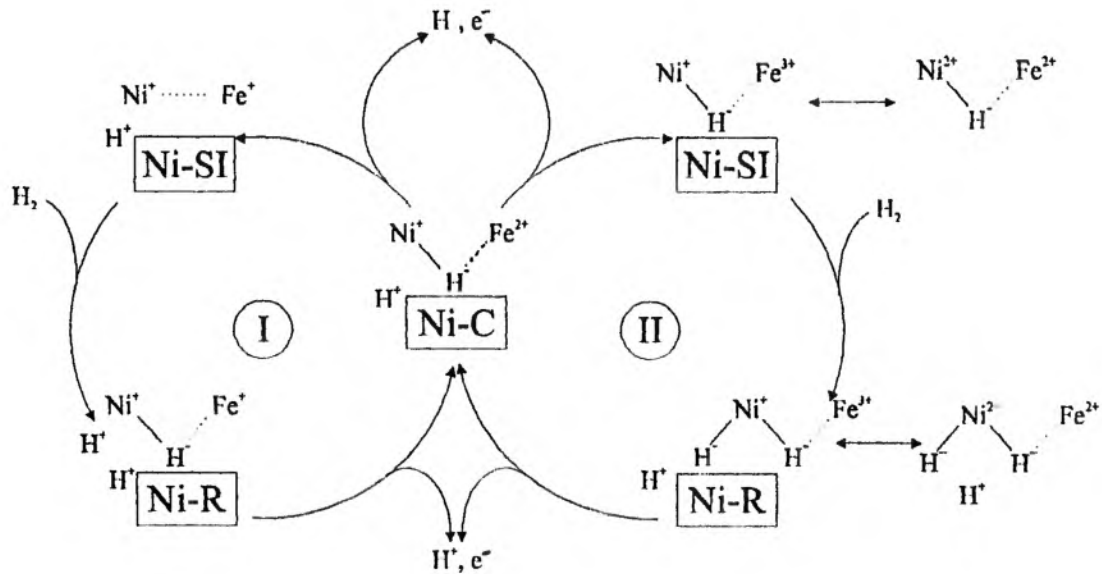
Forma Ni-C hydrogenazy, w której z niklem wiązane są przypuszczalnie jony H^- [118] i która może przyłączać odwracalnie inhibitor kompetycyjny CO [119], zawiera więc Ni(I). Forma ta jest prawdopodobnie zredukowana o dwie jednostki ładunku w stosunku do Ni-B [120–122]. Ta ostatnia mogłaby więc zawierać Ni(III) [123], jeżeli jednak występuje w niej ligand wodorkowy (lub H_2), to dwa elektrony byłyby związane z tym ligandem i stopnie utlenienia jonów metali w miejscu aktywnym nie ulegałyby zmianie przy redukcji Ni-B do Ni-C [98]. W wypadku Fe potwierdzają to widma IR, a niklu, który nie zmieniałyby stopnia utlenienia i występowałby jako Ni(I) – spektroskopia XAS [124].

Nikiel skoordynowany przez cztery ligandy cysteinowe ma dwa wolne miejsca koordynacyjne, w których może wiązać jon wodorkowy. Wydaje się, że jest on przyłączany w położeniu zajmowanym w strukturze krystalicznej przez mostkowy ligand tlenowy (zbadano strukturę białka nieaktywnego, otrzymanego w warunkach tlenowych; centrum niklowe w aktywnym enzymie może wyglądać odmiennie), [101, 122]. Ligand H^- byłby stabilizowany przez oba jony metali i Arg-463. Obserwowane słabsze oddziaływanie Ni- H^- wynikałoby z wiązania tego liganda także przez jon żelaza, który w Ni-A/B/C występuje przypuszczalnie w stanie diamagnetycznym, odpowiadającym niskospinowemu Fe(II). Zgadzałoby się to z silnym, oktaedrycznym polem ligandów, wytwarzanym m.in. przez występujące w jego sferze koordynacyjnej ligandy dwuatomowe, CO lub CN^- .

Próby sformułowania mechanizmu działania katalitycznego hydrogenaz [NiFe] są podejmowane od dawna (np. [125, 126]). Otrzymane ostatnio wyniki badań podtrzymują model, w którym miejsce aktywne enzymu przyjmuje dwa elektrony, przenoszone następnie przez znajdujące się w mniejszej podjednostce dwa klastry [4Fe-4S] do cytochromu c_3 . Jon niklu przy udziale zasady Lewisa umożliwia rozerwanie wiązania w H_2 , po czym przyłącza powstały jon H^- , skoordynowany także przez Fe (rys. 5). Żelazo stabilizuje +1 stopień utlenienia, który nikiel musi przyjąć, by wypełniać swą funkcję [127, 128].

Mechanizm działania katalitycznego hydrogenaz niklowych nie został jednak całkowicie wyjaśniony. Niektóre badania wskazują, że nikiel nie jest miejscem wiązania wodoru w miejscu aktywnym. Wyniki niedawnych analiz EPR prowadzonych w temperaturach kriogenicznych sugerują, iż dla Ni-C substrat wodorkowy nie znajduje się w pierwszej sferze koordynacyjnej niklu, ale jest związany z atomem siarki jego terminalnego liganda cysteinowego [129]. Nie wyklucza się udziału związanej z niklem siarki cysteinowej w procesach redoks zachodzących w miejscu aktywnym [130]. Badana jest rola ligandów tiolanych w tworzeniu miejsca aktywnego i ewentualnym wiązaniu H^+ [131].

Konieczne są dalsze prace zmierzające do określenia stopnia utlenienia metali w miejscu aktywnym i ich zmian oraz zidentyfikowania skoordynowanych z żelazem ligandów dwuatomowych. Prowadzone obecnie badania hydro-

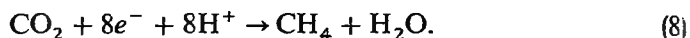
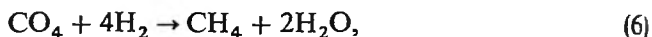


Rys. 5. Proponowany mechanizm utleniania H₂ z udziałem hydrogenazy z *Desulfovibrio gigas* [98]

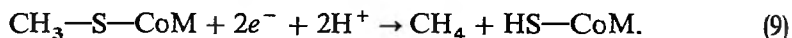
genazy utlenionej Ni-B, zredukowanej Ni-R i związanej z CO mają scharakteryzować zmiany strukturalne zachodzące w miejscu aktywnym przy aktywacji enzymu i w procesie katalizy oraz pośrednio określić miejsce przyłączenia substratu.

REDUKTAZA METYLOKOENZYMU M

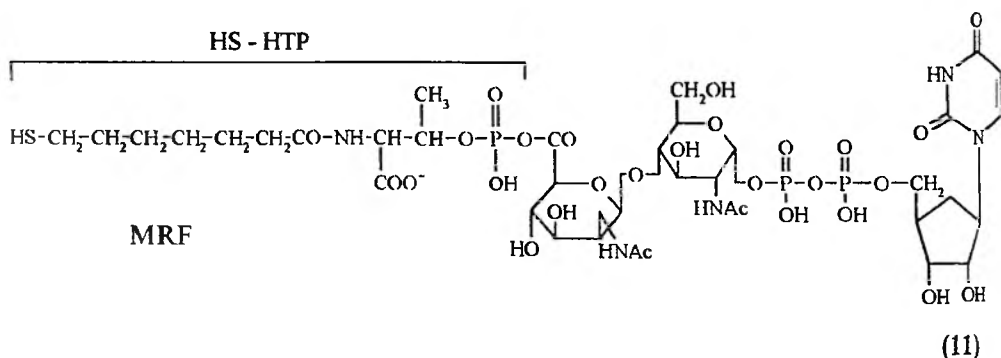
Bakterie metanogenne są organizmami ściśle beztlenowymi. Cechuje je wysoce wyspecjalizowany metabolizm energetyczny, zwany metanogenezą [132, 133]. Źródłem energii jest dla nich reakcja (6), w której od H_2 do CO_2 w etapach dwuelektronowych przenoszone jest osiem elektronów ((7), (8)).



W końcowym etapie wytwarzania metanu przez chemolitoautotrofowe bakterie metanogenne uczestniczy reduktaza metylokoenzymu M, MCR (E.C.1.8.-.-). Katalizuje ona redukcję CoM, $CH_3S(CH_2)SO_3^-$, który jest produktem pośrednim przy tworzeniu metanu ze wszystkich substratów metanogennych:



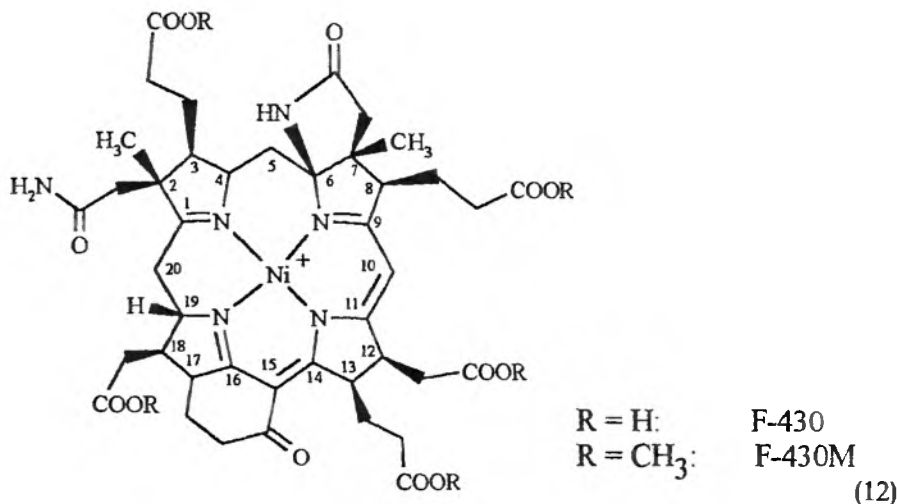
Uwalnianie metanu można rozważać jako wynik desulfuryzacji grupy $-S-CH_3$ metylokoenzymu M, polegającej na przeniesieniu siarczku i utworzeniu mieszanego disiarczku z tiolowym kofaktorem $HS-HTP$ (10), wchodzącym w skład kofaktora redukującego metyl, MRF (11), [134]. Ostatnim etapem pozyskiwania energii jest powtórna redukcja $CoM-SS-HTP$ podczas przenoszenia elektronu w błonie komórkowej, zachodzącego z udziałem hydrogenazy.



Reduktaza metylo-CoM jest białkiem dimerycznym, składającym się z trzech podjednostek ($\alpha_2\beta_2\gamma_2$) [135]. Jego działanie wymaga obecności szeregu aktywujących go białek, określanych łącznie jako „składnik A”, a w więk-

szości przypadków także udziału ATP [26]. W części białkowej MCR znajdują się ponadto dwie cząsteczki zawierającego nikiel kofaktora F-430. Wyodrębniony w wolnej postaci wykazuje on maksimum absorpcji przy 430 nm, natomiast dla kofaktora w enzymie $\lambda_{\max} = 420$ nm. Zarówno wolny koenzym, jak i występujący w stanie spoczynkowym MCR, zawiera wysokospinowy jon Ni(II), [136]. Ester pentametylowy F-430 można zredukować do formy zawierającej Ni(I) ($\lambda_{\max} = 382$ nm), albo utlenić do stanu z Ni(III) ($\lambda_{\max} = 368$ nm), [137].

Pierścień makrocykliczny F-430 jest zredukowanym układem tetrapirolowym (12), pofałdowanym i podatnym na odkształcenia od idealnie płaskiej struktury [138]. Możliwość przyjmowania geometrii koordynacyjnej płaskiej, kwadratowej lub bipiramidy trygonalnej ułatwia redukcję Ni(II) do Ni(I) [25]. Struktury krystalicznej miejsca aktywnego i sposobu wiązania F-430 w enzymie nie ustalono. Widma ramanowskie, EXAFS i badania magnetyczne Ni(II) w enzymie nieaktywnym wskazują, że nikiel jest sześciokoordynacyjny, a w położeniach aksjalnych nie ma donorów siarkowych [139], ale azotowe lub, co bardziej prawdopodobne, tlenowe. Analizy XAS świeżo wyodrębnionego MCR pokazują 5–6 donorów N/O w odległości 209 pm od Ni [140].

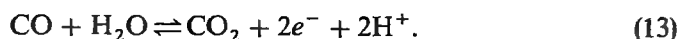


Reduktaza metylokoenzymu M jest bardzo wrażliwa na działanie O₂. Izoluje się ją z zachowaniem 30% aktywności fizjologicznej, obserwowanej tylko w warunkach redukujących. Widmo EPR natywnego F-430 pokazano na rys. 6a. Dla formy aktywnej występują dwa zestawy sygnałów EPR, MCR-red1 i MCR-red2, wynikające z obecności centrum Ni^IF₄₃₀, zawierające słabo związane ligandy aksjalne. Nieaktywna forma enzymu albo nie wykazuje sygnału EPR, albo daje sygnał odmienny, MCR-ox1 [141]. Redukcja MCR-ox1 *in vitro* prowadzi do MCR-red1, przy czym aktywność enzymu stopniowo rośnie. Reduktaza metylo-CoM ulega aktywacji, gdy związany z białkiem koenzym F-430 jest redukowany do stanu odpowiadającego Ni(I), o czym

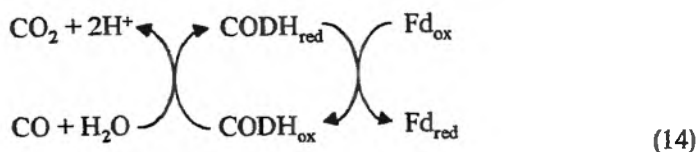
wskazuje, iż sulfonian nie uczestniczy bezpośrednio w reakcji. Zaproponowano dwupunktowe przyłączenie substratu, z siarczkiem wiązonym przez nikiel, a sulfonianem przez białko [25]. Możliwy mechanizm uwalniania metanu badano analizując właściwości koenzymu F-430 [25, 137] i związków modelowych [26, 139, 144–147]. Sformułowano wiele propozycji funkcjonowania F-430 w cyklu katalitycznym. Wyniki badań EPR wskazują, że nikiel zmienia przy tym stopień utlenienia z +2 na +1 i odwrotnie. W wyniku koordynacji HS—HTP do Ni(I) powstaje forma MCR-red2 [148]. Mechanizm działania tego enzymu nie jest jednak dokładnie znany. Jedną z możliwości przedstawiono na rys. 7.

DEHYDROGENAZA TLENKU WĘGLA/SYNTAZA ACETYLO-CoA

Wiele bakterii metanogennych i acetogennych zawiera enzym katalizujący odwracalne utlenianie tlenku węgla do dwutlenku (13), [25, 149, 150]. Nazywa się go dehydrogenazą tlenku węgla, CODH, mimo że CO nie zawiera wodoru (właściwie jest to oksydoreduktaza CO:akceptor; E.C.1.2.99.2).

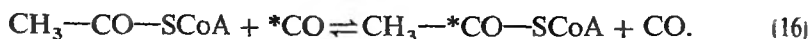


Akceptorem elektronów dla tej reakcji jest często ferredoksyna (14), choć mogą nimi być też FMN, FAD, rubredoksyna, flawodoksyna, cytochrom *c*. Enzymami pełniącymi wyłącznie tę jedną funkcję są aerobowe dehydrogenazy molibdenowe [151] i niklowe CODH bakterii fototrofowych. W tych ostatnich, bardzo wrażliwych na działanie O_2 , występują dwa rodzaje klastrów metali, B i C, przy czym klaster B jest typowym układem $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+/1+}$, uczestniczącym w przenoszeniu elektronów [152].



W większości, choć nie we wszystkich bakteriach acetogennych i autotrofowych metanogenach, enzym ten pełni podwójną funkcję [153], co stwierdzono izolując go przy braku CO_2 . Nie tylko katalizuje on redukcję dwutlenku węgla do CO, ale i pośredniczy w tworzeniu acetylokoenzymu A z tlenku węgla, koenzymu A i źródła grup metylowych – jest więc syntazą acetylo-CoA, ACS (15; CFeSP oznacza korynoidowe białko żelazo-siarkowe) [154]. ACS katalizuje też reakcje wymiany między CO a grupą karbonylową acetylo-CoA (16) oraz między wolnym koenzymem A a grupą CoA wchodzą w skład acetylo-CoA (17). Wskazują one, że enzym zawiera specyficzne miejsca wiążące grupy metylową, karbonylową i CoA. Dotychczas nie zaobserwowano enzymu

wykazującego wyłącznie aktywność ACS, choć może on zostać wykryty, obie funkcje bowiem są związane z udziałem różnych miejsc aktywnych enzymu [155].



Pełniące podwójną rolę CODH/ACS enzymy bakterii metanogennych oraz acetogennych wykazują na ogół dużą wrażliwość na działanie ditlenu. Są one zbudowane z podjednostek o podobnej wielkości i wszystkie zawierają trzy klaster metali: A, B i C. Utlenianie CO zachodzi w miejscu zawierającym klaster C, klaster A natomiast jest miejscem syntezy acetylo-CoA. Mimo wypełniania różnych funkcji w każdym z nich jon niklu jest połączony przez ligand mostkowy z klasterem $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$.

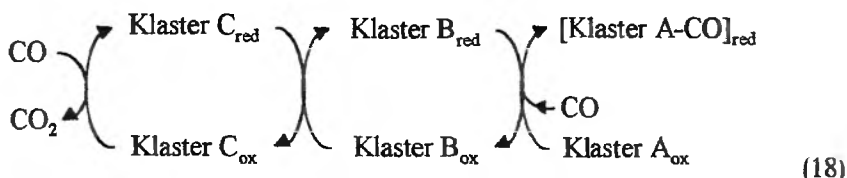
Do najlepiej zbadanych należy CODH/ACS z acetogennych bakterii *C. thermoacetikum*. Analizy chromatograficzne enzymu wskazywały na strukturę heksameryczną [153, 156, 157], ale ostatnie jego badania [158], a także białka z *Methanosarcina frisia* [159] świadczą, iż jest to tetramer $\alpha_2\beta_2$. Dwie podjednostki β (71 tys. u) stanowią podłużny rdzeń, na którego końcach znajdują się podjednostki α (81 tys. u) [155]. Zbliżoną budowę ma wykazujący podobne właściwości [160] enzym z *Acetobacterium woodii*. W każdym dimerze $\alpha\beta$ są dwa jony Ni, 11–12 Fe, 1 Zn i 14 atomów labilnej w kwasach siarki nieorganicznej. Wchodzą one w skład klastrów A, B i C [161]. Działanie CODH acetogennych związane jest z podjednostką β [158, 162], zawierającą klaster B i C konieczne do utlenienia CO. Wyzolowana podjednostka α nie wykazuje aktywności ACS. Zawiera ona jednak jeden jon Ni i cztery atomy Fe oraz ma właściwości spektroskopowe podobne jak klaster A [163], będący miejscem aktywnym, w którym odbywa się synteza acetylo-CoA [164]. Aktywność ACS może być więc związana albo z podjednostką α , albo wymagać udziału α oraz β .

W skład enzymu CODH/ACS metanogennych wchodzi kompleks składający się z podjednostek α (90 tys. u), β (60–70 tys. u), γ (60 tys. u), δ (58 tys. u) i ϵ (20 tys. u) [165]. Dysocjuje on na białko dimeryczne (podjednostki o M_r ok. 89 tys. u i 19 tys. u), dimeryczną formę CFeSP (60 i 58 tys. u), [166–168] i składnik o $M_r = 52$ tys. u [169]. Aktywność CODH związana jest z kompleksem podjednostek α oraz ϵ (232 tys. u) [170, 171]; możliwe, że miejsce aktywne znajduje się w podjednostce α [172]. Nie wiadomo, jakie składniki enzymu zapewniają aktywność ACS; być może podjednostka β [171], kompleks $\alpha\epsilon$ lub $\alpha\epsilon\beta$ [155].

Dehydrogenaza CO wyodrębniona z purpurowych bakterii fototrofowych *R. rubrum* umożliwia im wykorzystanie tlenku węgla jako jedynego źródła węgla i energii [173]. Jest ona pojedynczym łańcuchem polipeptydowym, zawierającym 1 Ni, 7–9 Fe, 8 S i Zn [25]. W enzymie nie ma klastrów A i nie

katalizuje on syntezy acetylokoenzymu A [174, 175]. Można go wyizolować w formie pozbawionej niklu, hodując bakterie w środowisku wolnym od tego metalu. Występuje w nim wtedy zwykła zawartość Fe i S, ale jest on bardziej wrażliwy na działanie O_2 , niż enzym natywny. Jego aktywność można przywrócić po inkubacji w roztworze Ni(II). Jest to jedyny enzym niklowy, dla którego odnotowano dotychczas łatwą insercję jonów Ni(II) [176]. Utlenianie CO jest tu odwrotnością pierwszego etapu w cyklu syntezy acetylo-CoA, co dowodzi, że w enzymie z *R. rubrum* centrum zawierające nikiel jest miejscem reakcji z CO.

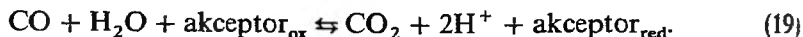
Miejscem aktywnym CODH, w którym zachodzi utlenianie tlenku węgla, jest klaster C, występujący jako C-red1 ($S = 1/2$) [177–179]. Po przyłączeniu CO ulega on redukcji, przypuszczalnie dwuelektronowej [180], do C-red2 (także $S = 1/2$). Ponadto ma on jeszcze co najmniej dwie trwałe formy: diamagnetyczną C-ox i C-red3 (dawniej C*), powstającą w reakcji enzymu z tiocyjanianem, izocyjankiem lub azydkiem. Sugeruje się też istnienie formy C-int zredukowanej o jednostkę ładunku względem C-red1 [180]. W procesie katalizy elektrony są przenoszone z klastra C do B (18), diamagnetycznego w stanie $[Fe_4S_4]^{2+}$ (B-ox), a paramagnetycznego ($S = 1/2$) jako $[Fe_4S_4]^{1+}$, tj. B-red [175].



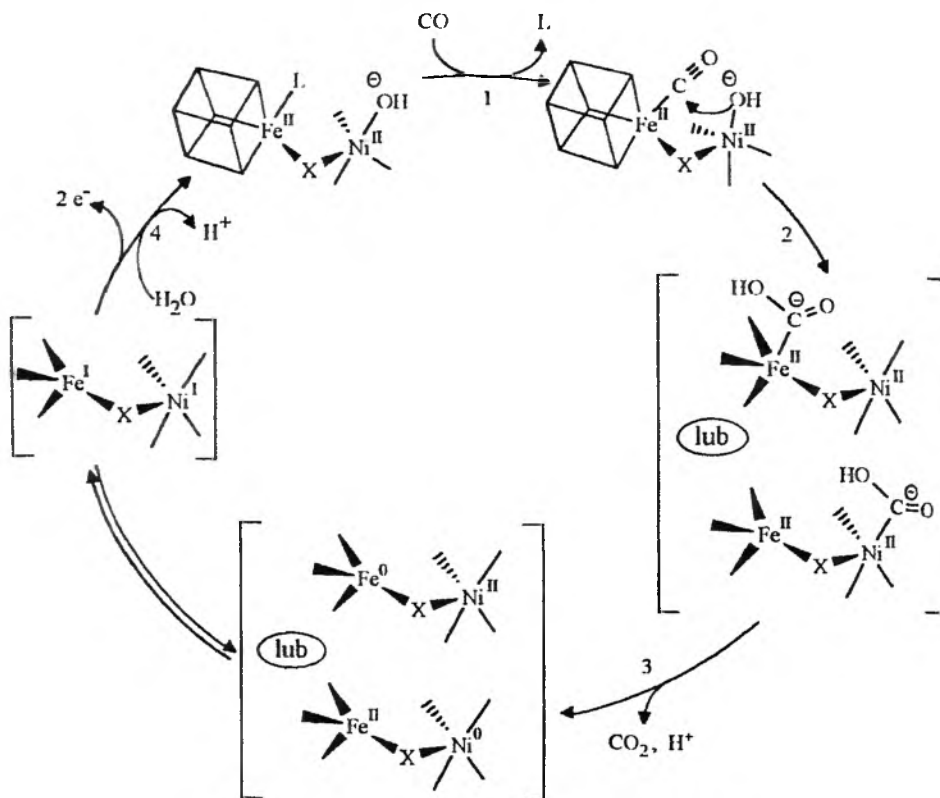
W skład klastra C wchodzi klaster żelazo-siarkowy oraz nikiel. Badania EXAFS CODH z *R. rubrum* wskazują, że jon niklu występuje jako pięciokoordynacyjny, wysokospinowy Ni(II), połączony z trzema donorami N/O i dwoma ligandami siarkowymi. Jeżeli Ni i Fe wchodzi w skład tego samego klastra, to na pewno nie występują jako $[NiFe_3S_4]$, [181]. Widma EPR i Mössbauera świadczą, że Ni(II) jest połączony z żelazem przez ligand mostkowy, wykazując słabe sprzężenie z klasterem $[Fe_4S_4]^{2+/1+}$ ($S = 1/2$), w którym jeden z atomów żelaza (tzw. FCII) jest przypuszczalnie pięciokoordynacyjny i przypomina Fe_2 klastra $[Fe_4S_4]$ akonitazy [175, 182]. Dla inhibitowanej cyjankiem CODH z *C. thermoacetikum* jony CN^- wiążą się równocześnie z Ni i Fe, przy czym żelazo koordynuje atom C. Nie jest jednak jasne, czy jony te zastępują wcześniej istniejący ligand mostkowy, czy tworzą dodatkowy mostek. Układ Fe—C—N jest liniowy, natomiast kąt C—N—Ni wynosi 140° . Taką budowę adduktu sugeruje, że w utlenianiu CO uczestniczą dwa jony metali [183].

Na podstawie wyników badań CODH proponuje się mechanizm, zakładający, że na sumaryczną reakcję utleniania CO (19) składają się dwa procesy. W pierwszym, w wyniku utleniania CO do CO_2 , tworzy się dwuelektronowo

zredukowany enzym, a w drugim następuje powtórne utlenienie enzymu przez akceptor elektronów [155].



Najpierw do klastru Ni—X—Fe₄S₄ przyłącza się CO (rys. 8), a jeden z ligandów prawdopodobnie oddysocjuje. W centrum niklowym koordynowana jest cząsteczka wody, dająca po deprotonacji związany nukleofil OH⁻

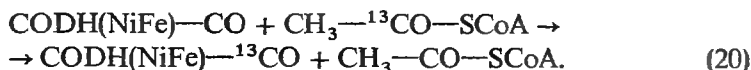


Rys. 8. Mechanizm utleniania CO przez CODH [155]

W miejscu zawierającym żelazo (FCII) przyłącza się cząsteczka tlenu węgla (jak CN⁻, ale CO jako słabszy π-akceptor raczej nie tworzy mostka między dwoma jonami metali). W drugim etapie, dla którego duże znaczenie ma preorganizacja jonów metali w enzymie, związana z Ni(II) grupa hydroksylowa atakuje skoordynowany z żelazem CO, tworząc połączoną z enzymem grupę karboksylową. Nikiel pełni rolę kwasu Lewisa, polaryzując wiązanie w CO i nadając przez to atomowi węgla charakter bardziej elektrofilowy. W trzecim etapie grupa —COOH ulega deprotonacji i dekarboksylacji z utworzeniem CO₂, przy czym klaster C (Ni—FeS) przechodzi w formę zredukowaną. Przej-

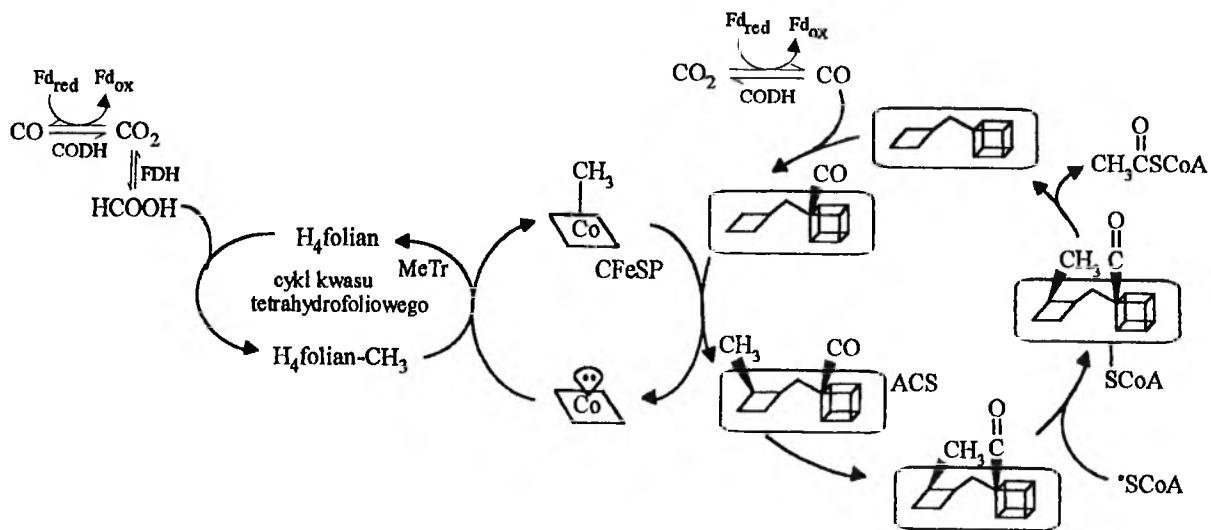
ściowo tworzyłyby się tu Ni(0) lub Fe(0), oddający szybko elektrony innym klastronom metali w białku. Na miejsce oddysocjującej grupy karboksylowej przyłącza się przypuszczalnie ligand oderwany w pierwszym etapie, przy wiązaniu CO. Ostatni etap dotyczy drugiego procesu: zredukowany enzym jest ponownie utleniany przez akceptor elektronów, którym dla enzymu z *C. thermoaceticum* jest przypuszczalnie ferredoksyna.

Miejscem syntezy acetylo-CoA jest klaster A, o charakterystyce spektroskopowej odmiennej niż klaster C [157, 184–187]. Wyizolowana podjednostka α , o właściwościach spektroskopowych podobnych do właściwości enzymu natywnego, zawiera cztery atomy żelaza w klastrze $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+/1+}$ ($S = 3/2$) oraz nikiel. Ten ostatni koordynuje dwa odległe o 219 pm donory siarkowe i dwa donory azotowe lub tlenowe oddalone o 189 pm, w odkształconej geometrii płaskiej, kwadratowej [163]. W enzymie nikiel jest połączony mostkowo przez nieznaną ligand X z klastrzem Fe-S: $[\text{Ni}(\mu\text{-X})\text{-Fe}_4\text{S}_4]$, [26]. Częsteczką CO jest ligandem terminalnym, koordynowanym nie przez Ni, jak wcześniej sądzono, ale przez Fe [188–190], służąc za prekursor grupy karbonylowej acetylo-CoA [155]:

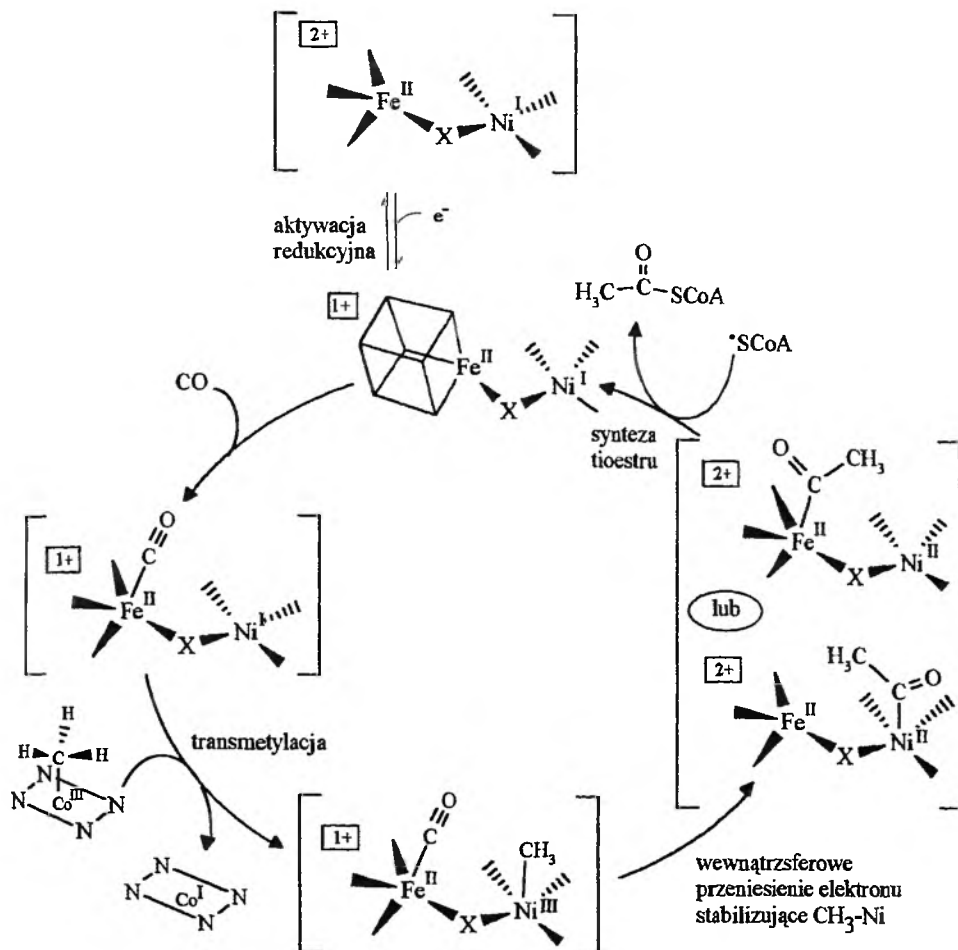


Proponowany mechanizm funkcjonowania ACS/CODH przedstawiono na rys. 9. Pod działaniem oksydoreduktazy pirogronian:ferredoksyna kwas ulega dekarboksylacji i powstaje CO_2 , redukowany w miejscu aktywnym CODH do CO. Tlenek węgla, wytwarzany jako metabolit pośredni, jest od razu zużywany przez związanie go w miejscu aktywnym ACS i utworzenie paramagnetycznego adduktu NiFeC. Skoordynowana grupa karbonylowa łączy się z grupą metylową i CoA, tworząc acetylo-CoA [191]. Na przenoszenie węgla w metanogenach wpływają potencjał redukcji wewnątrz komórki i dostępność wodoru [192].

Ponieważ tlenek węgla wiąże się z żelazem, a dla syntezy acetylo-CoA niezbędny jest nikiel [193], dlatego postuluje się tworzenie jako produktów pośrednich układu żelazo-karbonyl i pochodnej metylowej niklu [189]. Istnienie układu metyl-ACS, prekursora grupy metylowej acetylo-CoA, potwierdzono eksperymentalnie; był to pierwszy przykład występowania wiązania nikiel—węgiel w przyrodzie [194, 195]. Zidentyfikowanie najważniejszych produktów pośrednich w cyklu katalitycznym ACS (rys. 10) pozwoliło zaproponować mechanizm, w którym po procesach karbonylowania i transmetylacji następuje insercja grupy karbonylowej i tworzy się kolejny produkt pośredni, acetylo-ACS [196]. Koenzym A jest wiązany w pobliżu klastera A lub przez ten klaster (może nawet jako jego ligand [197]), przy czym w utrzymaniu go w miejscu aktywnym pomagają reszty argininowa i tryptofanowa [198, 199]. Ostatni etap obejmuje syntezę wiązania tioestrowego acetylo-CoA [155].



Rys. 9. Schemat ogólny mechanizmu tworzenia acetylo-CoA [155]



Rys. 10. Związane z ACS produkty pośrednie w cyklu katalitycznym tworzenia acetylo-CoA [155]

W celu lepszego zrozumienia działania CODH i ACS prowadzone są próby otrzymania ich struktury krystalograficznej i scharakteryzowania wiązania metal-węgiel w kompleksie acetylo-ACS [155]. Ważną w tym rolę pełnią badania układów modelowych, w tym kompleksów dwurdzeniowych, zawierających nikiel i żelazo połączone ligandami mostkowymi [26, 197, 200, 201].

PODSUMOWANIE

W ciągu ponad dwudziestu lat, jakie upłynęły od wykrycia niklu w miejscu aktywnym ureazy, znaleziono jeszcze kilka zawierających go enzymów. W znacznym stopniu poznano otoczenie koordynacyjne niklu, do czego szczególnie przyczyniły się wyniki badań rentgenograficznych w ostatnich 2-3 latach (urea-

za, hydrogenaza). Poczyniono duże postępy na drodze do zrozumienia roli nikiel w mechanizmach katalizy enzymatycznej. Wciąż jednak pozostały pewne wątpliwości, nie rozstrzygnięte problemy i sprzeczności w interpretacji wyników doświadczalnych. Brakuje przy tym nadal pełnej odpowiedzi, dlaczego to właśnie nikiel, a nie inny metal, został wybrany w toku ewolucji do wypełniania tych specyficznych funkcji w enzymach.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] D. Ankel-Fuchs, R. K. Thauer, „Nickel in Biology: Nickel as an Essential Trace Element”, [w:] J. R. Lancaster, Jr. (red.), *The Bioinorganic Chemistry of Nickel*, s. 93–110, VCH, New York 1988.
- [2] A. Kabata-Pendias, H. Pendias, *Biogeochemia pierwiastków śladowych*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1993.
- [3] M. Anke, L. Angelow, M. Glej, M. Müller, H. Illing, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1995, **352**, 92.
- [4] J. R. Dojlido, *Chemia wód powierzchniowych*, Wyd. Ekon. i Środ., Białystok 1995.
- [5] W. Kaim, B. Schwederski, *Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life*, Wiley, New York 1994.
- [6] T. Norseth, *Nickel*, [w:] *Handbook on the Toxicology of Metals*, 2nd ed., s. 462–481, Elsevier, Amsterdam 1986.
- [7] G. Stangl, M. Kirchgessner, *J. Nutrit.*, 1996, **126**, 2466.
- [8] G. Stangl, M. Kirchgessner, *J. Animal Physiol. Animal Nutrit.*, 1996, **75**, 164.
- [9] S. R. Starnes, J. W. Spears, R. W. Harvey, *Biol. Trace Elem. Res.*, 1984, **6**, 403.
- [10] T. Norseth, „Clinical Effects of Nickel”, [w:] F. W. Sunderman (red.), *Nickel in the Human Environment*, s. 395–401, IARC Sci. Publ., No. 53, 1984.
- [11] R. P. Hausinger, *Biochemistry of Nickel*, Plenum, New York 1993.
- [12] H. Kozłowski, J. Świątek, W. Bał, „Chemical Bases of Metal Induced Mutagenesis and Carcinogenesis”, [w:] *Educ. Adv. Chem.*, vol. 3, s. 41–60, Wrocław 1996.
- [13] K. S. Kasprzak, „Effects of Calcium, Magnesium, Zinc, and Iron on Nickel Carcinogenesis: Inhibition versus Enhancement”, [w:] N. D. Hadjiiladis (red.), *Cytotoxic, Mutagenic and Carcinogenic Potential of Heavy Metals Related to Human Environment*, s. 93–106, Kluwer, Dordrecht 1997.
- [14] W. Bał, S. Kasprzak, „Modeling the Metal Binding Sites in Core Histones: Interactions of Carcinogenic Ni(II) with the -CAIH- Motif of Histone H3”, *ibid.*, s. 107–121.
- [15] N. T. Christie, *Toxicol. Environ. Chem.*, 1989, **22**, 51.
- [16] N. T. Christie, D. M. Tummolo, N. W. Biggart, E. C. Murphy, Jr., *Cell Biol. Toxicol.*, 1988, **4**, 427.
- [17] Y. W. Lee, C. B. Klein, B. Kargacin, K. Salnikow, J. Kitahara, K. Dowjat, A. Zhitkovich, N. T. Christie, M. Costa, *Mol. Cell. Biol.*, 1995, **15**, 2547.
- [18] C. L. Coyle, E. I. Stiefel, „The Coordination Chemistry of Nickel: An Introducing Survey” [w:] J. R. Lancaster, Jr. (red.), *The Bioinorganic Chemistry of Nickel*, s. 1–28.
- [19] F. A. Cotton, G. Wilkinson, P. L. Gaus, *Chemia nieorganiczna. Podstawy*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1995.
- [20] W. Bał, M. I. Djuran, D. W. Margerum, E. T. Gray, Jr., M. A. Mazid, R. T. Tom, E. Nieboer, P. J. Saddler, *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, 1994, 1889.
- [21] D. W. Margerum, S. L. Anliker, „Nickel(III) Chemistry and Properties of the Peptide Complexes of Ni(II) and Ni(III)”, [w:] J. R. Lancaster, Jr., *The Bioinorganic Chemistry of Nickel*, s. 29–52.

- [22] L. D. Pettit, J. E. Gregor, H. Kozłowski, „Complex Formation Between Metal Ions and Peptides”, [w:] *Perspectives on Bioinorganic Chemistry*, vol. 1, s. 1–41, JAI 1991.
- [23] T. Gajda, B. Henry, J.-J. Delpuech, *Inorg. Chem.*, 1995, **34**, 2455.
- [24] H. Siegel, R. B. Martin, *Chem. Rev.*, 1992, **82**, 385.
- [25] R. Cammack, „Catalysis by Nickel in Biological Systems”, [w:], J. Reedijk (red.), *Bioinorganic Catalysis*, s. 189–226, Dekker, New York 1993.
- [26] M. A. Halcrow, G. Christou, *Chem. Rev.*, 1994, **94**, 2421.
- [27] J. Dolovich, S. L. Evans, E. Nieboer, *Br. J. Ind. Med.*, 1984, **41**, 51.
- [28] C. L. Fu, J. W. Olson, R. J. Maier, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1995, **92**, 2333.
- [29] H. D. Youn, E. J. Kim, J. H. Roe, Y. C. Hah, S. O. Kang, *Biochem. J.*, 1996, **318**, 889.
- [30] C. Salerno, „The EPR Spectra of Odd-Electron Nickel Ions in Biological Systems: Theory for d^7 and d^9 Ions”, [w:] J. R. Lancaster, Jr. (red.), *The Bioinorganic Chemistry of Nickel*, s. 53–72.
- [31] M. K. Eidsness, R. J. Sullivan, R. A. Scott, „Electronic and Molecular Structure of Biological Nickel as Studied by X-ray Absorption Spectroscopy”, *ibid.*, s. 73–92.
- [32] P. J. Riggs-Gelasco, T. L. Stemmler, J. E. Penner-Hahn, *Coord. Chem. Rev.*, 1995, **144**, 245.
- [33] S. Benini, S. Ciurli, H. F. Nolting, S. Mangani, *Eur. J. Biochem.*, 1996, **239**, 61.
- [34] J. B. Summer, *J. Biol. Chem.*, 1926, **69**, 435.
- [35] R. K. Andrews, R. L. Blakely, B. Zerner, *Adv. Inorg. Biochem.*, 1984, **6**, 245.
- [36] H. L. T. Mobley, R. P. Hausinger, *Microbiol. Rev.*, 1989, **53**, 85.
- [37] H. L. T. Mobley, M. D. Island, R. P. Hausinger, *ibid.*, 1995, **59**, 451.
- [38] M. B. C. Moncrief, L. G. Hom, E. Jabri, P. A. Karplus, R. P. Hausinger, *Protein Sci.*, 1995, **4**, 2234.
- [39] T. Jahns, U. Schafer, H. Kaltwasser, *Microbiol. U. K.*, 1995, **141**, 737.
- [40] R. M. Stark, J. Greenman, M. R. Millar, *Br. J. Biomed. Sci.*, 1995, **52**, 282.
- [41] C. L. Williams, T. Preston, M. Hossack, C. Slater, K. McColl, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 1996, **13**, 87.
- [42] I. Kansau, F. Guillain, J. M. Thiberge, A. Labigne, *Mol. Microbiol.*, 1996, **22**, 1013.
- [43] H. L. T. Mobley, *Aliment. Pharmacol. Therapeut.*, 1996, **10**, 57.
- [44] M. J. Blaser, *ibid.*, 1996, **10**, 73.
- [45] M. W. Lubbers, S. B. Rodriguez, N. K. Honey, R. J. Thornton, *Can. J. Microbiol.*, 1996, **42**, 132.
- [46] N. E. Dixon, C. Gazzola, R. L. Blakely, B. Zerner, *J. Am. Chem. Soc.*, 1975, **97**, 4731.
- [47] K. Takishima, T. Suga, G. Mamiya, *Eur. J. Biochem.*, 1988, **175**, 151.
- [48] S. B. Modrooney, R. P. Hausinger, *J. Bacteriol.*, 1990, **172**, 5837.
- [49] N. E. Dixon, C. Gazzola, J. J. Waters, R. L. Blakely, B. Zerner, *ibid.*, 1975, **97**, 4730.
- [50] P. A. Clark, D. E. Wilcox, *Inorg. Chem.*, 1989, **28**, 1326.
- [51] P. A. Clark, D. E. Wilcox, R. A. Scott, *ibid.*, 1990, **29**, 579.
- [52] M. G. Finnegan, A. T. Kowal, M. T. Werth, P. A. Clark, D. E. Wilcox, M. K. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, **113**, 4030.
- [53] S. Wang, M. H. Lee, R. P. Hausinger, P. A. Clark, D. E. Wilcox, P. A. Scott, *Inorg. Chem.*, 1994, **33**, 1589.
- [54] D. E. Wilcox, *Chem. Rev.*, 1996, **96**, 2435.
- [55] N. Strater, N. Lipscomb, T. Klabunde, B. Krebs, *Angew. Chemie Int. Ed. Engl.*, 1996, **35**, 2024.
- [56] M. J. Todd, R. P. Hausinger, *J. Biol. Chem.*, 1987, **262**, 5963.
- [57] M. J. Todd, R. P. Hausinger, *ibid.*, 1989, **264**, 15835.
- [58] M. J. Todd, R. P. Hausinger, *ibid.*, 1991, **266**, 10260.
- [59] M. J. Todd, R. P. Hausinger, *ibid.*, 1991, **266**, 24327.
- [60] M. J. Todd, R. P. Hausinger, *ibid.*, 1992, **267**, 20024.

- [61] M. H. Lee, S. B. Moolroney, M. J. Renner, Y. Markowicz, R. P. Hausinger, *J. Bacteriol.*, 1992, **174**, 4324.
- [62] I.-S. Park, R. P. Hausinger, *Science*, 1995, **267**, 1156.
- [63] I.-S. Park, M. B. Carr, R. P. Hausinger, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1994, **91**, 3233.
- [64] I.-S. Park, R. P. Hausinger, *J. Bacteriol.*, 1995, **177**, 1947.
- [65] E. Jabri, M. B. Carr, R. P. Hausinger, P. A. Karplus, *Science*, 1995, **268**, 998.
- [66] D. K. Wilson, F. B. Rudolph, F. A. Quioco, *ibid.*, 1991, **252**, 1278.
- [67] D. K. Wilson, F. A. Quioco, *Biochemistry*, 1993, **32**, 1689.
- [68] M. M. Benning, J. M. Kuo, F. M. Raushel, H. M. Holden, *ibid.*, 1995, **34**, 7973.
- [69] M. B. C. Moncrief, R. P. Hausinger, *Adv. Inorg. Biochem.*, 1996, **18**, 151.
- [70] G. H. Lorimer, M. R. Badger, T. J. Andrews, *Biochemistry*, 1976, **15**, 529.
- [71] F. C. Hartman, M. R. Harpel, *Annu. Rev. Biochem.*, 1994, **63**, 197.
- [72] J. G. Dong, J. C. Fernandez-Maculet, S. F. Yang, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1992, **89**, 9789.
- [73] S. J. Lippard, *Science*, 1995, **268**, 996.
- [74] P. R. Martin, R. P. Hausinger, *J. Biol. Chem.*, 1992, **267**, 20024.
- [75] E. Jabri, P. A. Karplus, *Biochemistry*, 1996, **35**, 10616.
- [76] M. K. Chan, S. Muklund, A. Kletzin, M. W. W. Adams, D. C. Rees, *Science*, 1995, **267**, 1463.
- [77] A. Volbeda, J. C. Fontecillacamps, M. Frey, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 1996, **6**, 804.
- [78] A. J. Stemmler, J. W. Kampf, M. L. Kirk, V. L. Pecoraro, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 6368.
- [79] S. M. Mukhopadhyay, D. Ray, *Ind. J. Chem.-Sec. A*, 1995, **34**, 466.
- [80] D. Volkmer, A. Horstman, K. Griesar, W. Haase, B. Krebs, *Inorg. Chem.*, 1996, **35**, 1132.
- [81] D. Volkmer, B. Hommerich, K. Griesar, W. Haase, B. Krebs, *ibid.*, 1996, **35**, 3792.
- [82] Y. Nakao, C. Mori, W. Mori, T. Sakurai, K. Matsumoto, H. Kimoto, *Chem. Lett.*, 1996, **8**, 641.
- [83] I.-S. Park, L. O. Michel, M. A. Pearson, E. Jabri, P. A. Karplus, S. K. Wang, J. Dong, R. A. Scott, B. P. Koehler, M. K. Johnson, R. P. Hausinger, *J. Biol. Chem.*, 1996, **271**, 18632.
- [84] N. E. Dixon, P. W. Riddles, C. Gazzola, R. L. Blakely, B. Zerner, *Can. J. Biochem.*, 1980, **58**, 1335.
- [85] R. K. Thauer, A. R. Klein, G. C. Hartmann, *Chem. Rev.*, 1996, **96**, 3031.
- [86] S. P. J. Albracht, *Biochem. Biophys. Acta*, 1994, **1188**, 167.
- [87] C. Zaborosch, M. Koster, E. Bill, K. Schneider, H. G. Schlegel, A. X. Trautwein, *Biometals*, 1995, **8**, 149.
- [88] R. Cammack, V. M. Fernandez, K. Schneider, „Nickel in Hydrogenases from Sulfate-Reducing, Photosynthetic, and Hydrogen-Oxidizing Bacteria”, [w:] J. R. Lancaster, Jr. (red.), *The Bioinorganic Chemistry of Nickel*, s. 167–190.
- [89] N. R. Bastian, D. A. Wink, L. P. Wackett, D. J. Livingston, L. M. Jordan, J. Fox, W. H. Orme-Johnson, Ch. T. Walsh, „Hydrogenases of *Methanobacterium thermoautotrophicum* strain AH”, *ibid.*, s. 167–190.
- [90] T. Maier, A. Bock, *Adv. Inorg. Biochem.*, 1996, **18**, 173.
- [91] T. Maier, A. Bock, *Biochemistry*, 1996, **35**, 10089.
- [92] U. Binder, T. Maier, A. Bock, *Arch. Microbiol.*, 1996, **165**, 69.
- [93] D. Zirnigbl, R. Hedderich, R. K. Thauer, *FEBS Lett.*, 1990, **261**, 112.
- [94] K. Ma, D. Zirnigbl, D. Linder, K. O. Stetter, R. K. Thauer, *Arch. Microbiol.*, 1991, **156**, 43.
- [95] E. G. Graf, R. Thauer, *FEBS Lett.*, 1981, **136**, 165.
- [96] I. Bertini, H. B. Gray, S. J. Lippard, J. S. Valentine, *Bioinorganic Chemistry*, Univ. Sci. Books, Mill Valley 1994.

- [97] R. Cammack, D. S. Patil, E. C. Hatchikian, V. M. Fernandez, *Biochim. Biophys. Acta*, 1987, **912**, 98.
- [98] A. Volbeda, E. Garcin, C. Piras, A. L. de Lacey, V. M. Fernandez, E. C. Hatchikian, M. Frey, J. C. Fontecilla-Camps, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 12989.
- [99] K. A. Bagley, E. C. Duin, W. Roseboom, S. P. J. Albracht, W. H. Woodruff, *Biochemistry*, 1995, **34**, 5527.
- [100] V. M. Hernandez, E. C. Hatchikian, R. Cammack, *Biochim. Biophys. Acta*, 1985, **832**, 69.
- [101] B. Guigliarelli, C. More, A. Fournel, M. Asso, E. C. Hatchikian, R. Williams, R. Cammack, P. Bertrand, *Biochemistry*, 1995, **34**, 4781.
- [102] T. Kamachi, S. Uno, T. Hirashi, I. Okura, *J. Mol. Cat. A - Chem.*, 1995, **95**, 93.
- [103] N. A. Zorin, M. Medina, M. A. Pusheva, I. N. Gogotov, R. Cammack, *FEMS Microbiol. Lett.*, 1996, **142**, 71.
- [104] J. A. Kovacs, *Inorg. Biochem.*, 1994, **9**, 173.
- [105] A. F. Kolodziej, *Prog. Inorg. Chem.*, 1994, **41**, 493.
- [106] M. J. Maroney, G. J. Colpas, C. Bagyinka, N. Baidya, P. K. Mascharak, *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, **113**, 3692.
- [107] A. Volbeda, M. H. Charon, C. Piras, E. C. Hatchikian, M. Frey, J. C. Fontecilla-Camps, *Nature*, 1995, **373**, 580.
- [108] J. C. Fontecilla-Camps, A. Volbeda, M. Frey, *Trends Biotechnol.*, 1996, **14**, 417.
- [109] K. K. Surerus, M. Chen, J. W. Van der Zwaan, F. M. Rusnak, M. Kolk, E. C. Duin, S. P. J. Albracht, E. Munck, *Biochemistry*, 1994, **33**, 4980.
- [110] T. M. Van der Spek, A. F. Arendsen, R. P. Happe, S. Y. Yun, K. A. Bagley, D. J. Stufkens, W. R. Hagen, S. P. J. Albracht, *Eur. J. Biochem.*, 1996, **237**, 629.
- [111] Z. J. Gu, J. Dong, C. B. Allan, S. B. Choudhury, R. Franco, J. J. G. Moura, J. Legall, A. E. Przybyla, W. Roseboom, S. P. J. Albracht, M. J. Axley, R. A. Scott, M. J. Maroney, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 11155.
- [112] D. K. Mills, Y. M. Hsiao, P. J. Farmer, E. V. Atnip, J. H. Reibenspies, M. Y. Darensborough, *ibid.*, 1991, **113**, 1421.
- [113] G. J. Colpas, R. O. Day, M. J. Maroney, *Inorg. Chem.*, 1992, **31**, 5053.
- [114] G. Musie, P. J. Farmer, T. Tuntulani, J. H. Reibenspies, M. Y. Darensborough, *ibid.*, 1996, **35**, 2176.
- [115] A. Berkessel, J. W. Bats, M. Huber, W. Haase, T. Neumann, L. Seidel, *Chem. Berichte*, 1995, **128**, 125.
- [116] M. A. Halcrow, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1995, **34**, 1193.
- [117] C. A. Marganian, H. Vazir, N. Baidya, M. M. Olmstead, P. K. Mascharak, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 1584.
- [118] J. W. Van der Zwaan, S. P. J. Albracht, R. D. Fontijn, C. E. Slater, *FEBS Lett.*, 1985, **179**, 271.
- [119] S. P. J. Albracht, *Biochim. Biophys. Acta*, 1994, **1188**, 167.
- [120] M. Teixeira, I. Moura, A. V. Xavier, J. J. G. Moura, J. LeGall, D. V. Dervartanian, H. D. Peck, Jr., B.-H. Huynh, *J. Biol. Chem.*, 1989, **264**, 16435.
- [121] L. M. Roberts, P. Lindahl, *Biochemistry*, 1994, **33**, 14339.
- [122] L. M. Roberts, P. Lindahl, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 2565.
- [123] M. E. Dervartanian, N. K. Menon, A. E. Przybyla, H. D. Peck, D. V. Dervartanian, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1996, **227**, 211.
- [124] M. J. Maroney, M. A. Pressler, S. A. Mirza, J. P. Whitehead, R. J. Gurbiel, B. M. Hoffman, *Adv. Chem. Ser.*, 1995, **246**, 21.
- [125] J. J. G. Moura, M. Teixeira, I. Moura, J. LeGall, „(Ni, Fe) Hydrogenases from Sulfate-Reducing Bacteria: Nickel Catalytic and Regulatory Roles”, [w:] J. R. Lancaster, Jr. (red.), *The Bioinorganic Chemistry of Nickel*, s. 167–190.

- [126] R. Cammack, *Nature*, 1995, **373**, 556.
- [127] R. T. Hembre, J. S. McQueen, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 798.
- [128] A. Coghlan, *New Sci.*, 1996, **2011**, 14.
- [129] F. Dole, M. Medina, C. Moe, R. Cammack, P. Bertrand, B. Guigliarelli, *Biochemistry*, 1996, **35**, 16399.
- [130] S. Hati, D. Datta, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1995, 1177.
- [131] M. J. Maroney, C. B. Allan, B. S. Chohan, S. B. Choudhury, Z. J. Gu, *ACS Symp. Ser.*, 1966, **653**, 74.
- [132] L. P. Wackett, J. F. Honek, T. P. Begley, S. L. Shames, E. C. Niederhoffer, R. P. Hausinger, W. H. Orme-Johnson, Ch. T. Walsh, „Methyl-S-Coenzyme-M Reductase: A Nickel-Dependent Enzyme Catalyzing the Terminal Redox Step in Methane Biogenesis”, [w:] J. R. Lancaster, Jr. (red.), *The Bioinorganic Chemistry of Nickel*, s. 249–274.
- [133] U. Deppenmeier, V. Muller, G. Gottschalk, *Arch. Microbiol.*, 1996, **165**, 149.
- [134] F. D. Sauer, B. A. Blackwell, J. K. G. Kramer, B. J. Marsden, *Biochemistry*, 1990, **29**, 7593.
- [135] S. Rospert, D. Linder, J. Ellermann, R. K. Thauer, *Eur. J. Biochem.*, 1990, **194**, 871.
- [136] J. Telser, Y. C. Fann, M. W. Renner, J. Fajer, S. K. Wang, H. Zhang, R. A. Scott, B. M. Hoffmann, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 733.
- [137] A. Pfalz, „Structure and Properties of Coenzyme F₄₃₀”, [w:] J. R. Lancaster, Jr. (red.), *The Bioinorganic Chemistry of Nickel*, s. 249–274.
- [138] M. W. Renner, L. R. Furenlid, K. M. Barkigia, A. Forman, H.-K. Shim, D. J. Simpson, K. M. Smith, J. Fajer, *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, **113**, 6891.
- [139] A. K. Shiemke, R. A. Scott, J. A. Shelnutz, *ibid.*, 1988, **110**, 1645.
- [140] M. K. Eidsness, R. J. Sullivan, J. R. Schwartz, P. L. Hartzell, R. S. Wolfe, A.-M. Flank, S. P. Cramer, R. A. Scott, *ibid.*, 1986, **108**, 3120.
- [141] H. C. Friedmann, A. Klein, R. K. Thauer, *FEMS Microbiol. Rev.*, 1990, **87**, 339.
- [142] Ch. Hollinger, A. J. Pierik, E. J. Reijerse, W. R. Hagen, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 5651.
- [143] M. Goubeaud, G. Schreiner, R. K. Thauer, *Eur. J. Biochem.*, 1997, **243**, 110.
- [144] C. M. Drain, D. B. Sable, B. B. Corden, *Inorg. Chem.*, 1990, **29**, 1428.
- [145] A. Berkessel, *Bioorg. Chem.*, 1991, **19**, 101.
- [146] Z. Zhang, J. L. Petersen, A. M. Stolzenberg, *Inorg. Chem.*, 1996, **35**, 4649.
- [147] A. Berkessel, M. Bolte, T. Neumann, L. Seidel, *Chem. Berichte*, 1996, **129**, 1183.
- [148] S. P. J. Albracht, D. Ankel-Fuchs, R. Boecher, J. Ellermann, J. Moll, J. W. Van der Zwaan, R. K. Thauer, *Biochim. Biophys. Acta*, 1988, **86**, 955.
- [149] P. A. Lindahl, E. Münck, S. W. Ragsdale, *J. Biol. Chem.*, 1990, **265**, 3873.
- [150] M. Blaut, *A van Leeuwenhoek Int. J. Gen. Mol. Microbiol.*, 1994, **66**, 187.
- [151] B. Santiago, R. Meyer, *FEMS Microbiol. Lett.*, 1996, **136**, 157.
- [152] J. G. Ferry, *Annu. Rev. Microbiol.*, 1995, **49**, 305.
- [153] G. Diekert, „Carbon Monoxide Dehydrogenase of Acetogens”, [w:] J. R. Lancaster, Jr. (red.), *The Bioinorganic Chemistry of Nickel*, s. 299–310.
- [154] M. Kumar, S. W. Ragsdale, *J. Inorg. Biochem.*, 1993, **51**, 233.
- [155] S. W. Ragsdale, M. Kumar, *Chem. Rev.*, 1996, **96**, 2515.
- [156] S. W. Ragsdale, H. G. Wood, T. A. Morton, L. G. Ljungdahl, D. V. DerVartanian, „Nickel in CO Dehydrogenase”, [w:] J. R. Lancaster, Jr. (red.), *The Bioinorganic Chemistry of Nickel*, s. 299–310.
- [157] W. Shin, M. E. Anderson, P. A. Lindahl, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 5522.
- [158] J. Q. Xia, J. F. Sinclair, T. O. Baldwin, P. A. Lindahl, *Biochemistry*, 1996, **35**, 1965.
- [159] R. I. L. Eggen, R. Vankranenburg, A. J. M. Vriesema, A. C. M. Geerling, *J. Biol. Chem.*, 1996, **271**, 14256.
- [160] S. W. Ragsdale, L. G. Ljungdahl, D. V. DerVartanian, *J. Bacteriol.*, 1983, **155**, 1224.

- [161] S. W. Ragsdale, J. E. Clark, L. G. Ljungdahl, L. L. Lundie, H. L. Drake, *J. Biol. Chem.*, 1983, **258**, 2364.
- [162] J. Q. Xia, P. A. Lindahl, *Biochemistry*, 1995, **34**, 6037.
- [163] J. Q. Xia, J. Dong, S. K. Wang, R. A. Scott, P. A. Lindahl, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 7065.
- [164] J. Q. Xia, P. A. Lindahl, *ibid.*, 1996, **118**, 483.
- [165] K. C. Terlesky, M. J. K. Nelson, J. G. Ferry, *J. Bacteriol.*, 1986, **168**, 1053.
- [166] J. A. Krzycki, L. E. Mortenson, R. C. Prince, *J. Biol. Chem.*, 1989, **264**, 7217.
- [167] D. R. Abbanat, J. G. Ferry, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1991, **88**, 3272.
- [168] M. S. M. Jetten, W. R. Hagen, A. J. Pierik, A. J. M. Stams, A. J. B. Zehnder, *Eur. J. Biochem.*, 1991, **195**, 385.
- [169] J. A. Maupin-Furlow, J. G. Ferry, *J. Bacteriol.*, 1996, **178**, 340.
- [170] J. A. Krzycki, J. G. Zeikus, *ibid.*, 1984, **158**, 231.
- [171] D. A. Graham, E. Demoll, *J. Biol. Chem.*, 1996, **271**, 8352.
- [172] R. I. L. Eggen, A. C. M. Geerling, M. S. M. Jetten, W. M. de Vos, *ibid.*, 1991, **266**, 6883.
- [173] R. L. Kerby, P. W. Ludden, G. P. Roberts, *J. Bacteriol.*, 1995, **177**, 2241.
- [174] D. Bonam, P. W. Ludden, *J. Biol. Chem.*, 1987, **262**, 2980.
- [175] Z. Hu, N. J. Spangler, M. E. Anderson, J. Xia, P. W. Ludden, P. A. Lindahl, E. Munck, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 830.
- [176] S. A. Ensign, M. J. Campbell, P. W. Ludden, *Biochemistry*, 1990, **29**, 2162.
- [177] M. Kumar, W.-P. Lu, L. Liu, S. W. Ragsdale, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 11646.
- [178] M. E. Anderson, V. J. DeRose, B. M. Hoffman, P. A. Lindahl, *J. Inorg. Biochem.*, 1993, **51**, Abstr. B149.
- [179] W. P. Lu, P. E. Jablonski, M. Rasche, J. G. Ferry, S. W. Ragsdale, *J. Biol. Chem.*, 1994, **269**, 9736.
- [180] M. E. Anderson, P. A. Lindahl, *Biochemistry*, 1996, **35**, 8371.
- [181] G. O. Tan, S. A. Ensign, S. Ciurli, M. J. Scott, B. Hedman, R. H. Holm, P. W. Ludden, Z. R. Korszun, P. J. Stephens, K. O. Hodgson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1992, **89**, 4427.
- [182] Z. G. Hu, N. J. Spangler, M. E. Anderson, J. Q. Xia, P. W. Ludden, P. A. Lindahl, E. Munck, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 830.
- [183] D. Qui, M. Kumar, S. W. Ragsdale, T. G. Spiro, *ibid.*, 1996, **118**, 10429.
- [184] S. W. Ragsdale, H. G. Wood, W. E. Antholine, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1985, **82**, 6811.
- [185] K. C. Terlesky, M. J. Barber, D. J. Aceti, J. G. Ferry, *J. Biol. Chem.*, 1987, **262**, 15392.
- [186] C. Fan, C. M. Gorst, S. W. Ragsdale, B. M. Hoffman, *Biochemistry*, 1991, **30**, 431.
- [187] C. M. Gorst, S. W. Ragsdale, *J. Biol. Chem.*, 1991, **266**, 20687.
- [188] M. Kumar, S. W. Ragsdale, *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, **114**, 8713.
- [189] D. Qui, M. Kumar, S. W. Ragsdale, T. G. Spiro, *Science*, 1994, **264**, 817.
- [190] D. Qiu, M. Kumar, S. W. Ragsdale, T. G. Spiro, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 2653.
- [191] S. Menon, S. W. Ragsdale, *Biochemistry*, 1996, **35**, 12119.
- [192] D. A. Graham, E. Demoll *ibid.*, 1995, **34**, 4617.
- [193] W. Shin, P. A. Lindahl, *ibid.*, 1992, **31**, 12870.
- [194] M. Kumar, D. Qiu, T. G. Spiro, S. W. Ragsdale, *Science*, 1995, **270**, 628.
- [195] J. A. Kovacs, S. C. Shoner, J. J. Ellison, *ibid.*, 1995, **270**, 587.
- [196] W. P. Lu, S. W. Ragsdale, *J. Biol. Chem.*, 1991, **266**, 3554.
- [197] G. C. Tucci, R. H. Holm, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 6489.
- [198] S. W. Ragsdale, H. G. Wood, *J. Biol. Chem.*, 1985, **260**, 3970.
- [199] T. Shanmugasundaram, G. K. Kumar, H. G. Wood, *Biochemistry*, 1988, **27**, 6499.
- [200] F. Osterloh, W. Saak, D. Haase, S. Pohl, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1996, 777.
- [201] Z. Lu, R. H. Crabtree, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 3994.

**ZASTOSOWANIA REAKCJI MITSUNOBU
W CHEMII AMINOKWASÓW**
**APPLICATIONS OF THE MITSUNOBU
REACTION IN CHEMISTRY OF AMINO ACIDS**

**Kazimierz Wiśniewski¹, Aleksandra S. Kołodziejczyk¹,
Bogdan Falkiewicz^{1,2}**

¹ *Zakład Chemii Peptydów, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański,
ul. J. Sobieskiego 18, 80-952 Gdańsk*

² *Katedra Biotechnologii, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii
Uniwersytetu Gdańskiego i Akademii Medycznej
w Gdańsku, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk*

Abstract

Wstęp

Synteza α -aminokwasów i ich pochodnych

Synteza aminokwasów niekodowanych i modyfikowanych

N-alkilowanie aminokwasów

Zastosowanie reakcji Mitsunobu do zmiany konfiguracji aminokwasów
i ich pochodnych

Estryfikacja aminokwasów i ich pochodnych za pomocą reakcji Mitsunobu

Synteza związków cyklicznych z pochodnych aminokwasów

Reakcja Mitsunobu w syntezie monomerów peptydowych analogów
kwasów nukleinowych

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

ABSTRACT

The Mitsunobu reaction has been known since the late sixties. It is mediated by the redox system: triaryl- or trialkylphosphine dialkyl azodicarboxylate and brings about the nucleophilic substitution of an alcoholic hydroxyl group by the conjugate base of an acidic reactant, with inversion of configuration at the alcohol carbon. The Mitsunobu reaction is widely used in organic chemistry and its mechanism (Scheme 1) has been intensively studied (for review — see [2–5]). This article deals with the application of the reaction in the chemistry of amino acids.

The reaction was proposed as an effective method of α -amino acid synthesis using hydroxy acids as substrates. As the amino group synthons phthalimide [10, 11], (Scheme 2), hydrazoic acid [14], (Scheme 5) or *t*-butyl-2(trimethylsilyl)ethylsulphonylcarbamate [18], (Scheme 7) were used. The procedure using HN_3 was profoundly improved by the introduction of a stable bis-pyridine complex of zinc oxide [16]. The use of phthalimide as an amino group precursor in Mitsunobu-type reaction was successfully applied to the synthesis of 2- ^2H -labelled chiral glycine [13], (Scheme 4). In the model studies on the synthesis of ^{15}N -labelled N-protected chiral amino acids Degerbeck et al. [17] found that the yield of the Mitsunobu conversion (Scheme 6) depends on the acidity of the NH function in the imidocarbonate or sulphonylcarbamate used.

The Mitsunobu reaction has also been applied to the synthesis of many unnatural or modified amino acids such as protected 2,3-diamino butyric acid [19], 3- or 4- mercaptoproline derivatives [20, 21], (Scheme 8), N^5 -acetyl- N^5 -hydroxy-L-ornithine [22], (Scheme 9) and α -N-hydroxyamino acids [23], (Scheme 10). Wojciechowska et al. [24] have reported the preparation of dehydroamino acids from protected serine and threonine derivatives under the intramolecular Mitsunobu dehydration condition (Scheme 11).

A general approach to the preparation of N-monoalkylated amino acids based on the Mitsunobu reaction has been developed [30] using N-tosylamino acid esters as acidic components of the reaction (Scheme 15). Since the removal of tosyl group is difficult, a modification of the N-alkylation procedure has recently been devised [32, 33].

The Mitsunobu reaction is also an excellent procedure for transforming hydroxy acids or hydroxy amino acids into esters whose subsequent hydrolysis leads to a stereoisomer of the initial compound with the inverted configuration at the carbinol centre and was very often used in this way [37, 38], (Schemes 8 and 17).

The Mitsunobu reaction provides also an interesting method of esterification in which an alcohol, not a carboxylic component, is activated. It was used to the synthesis of diphenylmethyl esters of N-trityl amino acids [43], to the attachment of a first amino acid to the polymer support [44] or to active ester synthesis [45], (Scheme 18).

The applications of the Mitsunobu reaction include also the preparation of many cyclic derivatives of amino acids such as β -lactams [51], (Scheme 20), aziridines [49, 54], (Schemes 19, 21) or β -lactons [60]. The last cyclic derivatives are valuable intermediates for the synthesis of β -substituted alanines (Scheme 22). β -Lactonization proceeds easily in case of serine derivatives whereas in threonine derivatives β -elimination is the dominant reaction [61], (Scheme 23).

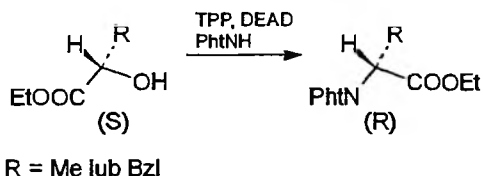
The review deals also with the application of the title reaction to the synthesis of peptide (polyamide) nucleic acids (PNA) [31, 39, 40, 68-70].

nie [8]. Zagadnienia związane z mechanizmem zostały szczegółowo omówione w artykułach przeglądowych Mitsunobu [2], Jenkinsa i Mitsunobu [3] oraz Hughesa [4, 5].

Niniejszy artykuł jest poświęcony zastosowaniom reakcji Mitsunobu w chemii aminokwasów. Pominęliśmy w nim dużą grupę publikacji dotyczących fosfonowych analogów aminokwasów, które zasługują na odrębne potraktowanie. W pokrewnych dziedzinach reakcja Mitsunobu stała się już przedmiotem doskonałych opracowań rodzimych [np. 9].

SYNTEZA α -AMINOKWASÓW I ICH POCHODNYCH

W swoich pionierskich pracach nad syntezą amin w łagodnych warunkach Mitsunobu i wsp. [10] opisali przekształcenie estru etylowego kwasu mlekowego w racemiczną N-ftaloiloalaninę przy użyciu równomolowych ilości TPP, DEAD i ftalimidu (schemat 2).



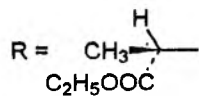
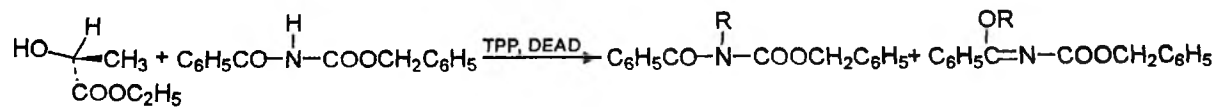
Schemat 2

W analogiczny sposób otrzymano [11] optycznie czynne N-ftaloiloalaninę i N-ftaloilofenyloalaninę wychodząc z odpowiedniego chiralnego hydroksykwasu, ftalimidu i typowych komponentów reakcji Mitsunobu. W pracy tej wykazano, że wydajność reakcji może być w znaczny sposób podwyższona przez dodatek nadmiaru TPP i DEAD oraz że zachodzi ona z inwersją konfiguracji na karbinolowym atomie węgla.

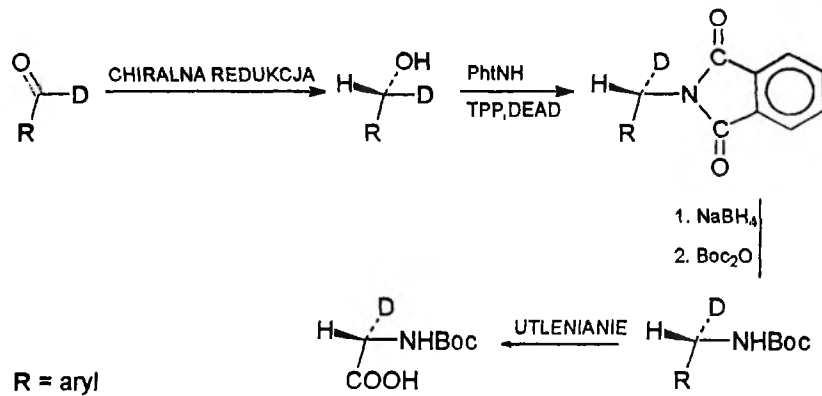
Opisano także stereospecyficzną syntezę pochodnej aminokwasu w wyniku alkilowania N-benzylksykarbonyloimidu kwasu benzoowego przez ester etylowy kwasu S-mlekowego w warunkach reakcji Mitsunobu, prowadzącą do otrzymania mieszaniny produktów N- i O-alkilowania [12], (schemat 3).

W wyniku acydolizy produktu w 33% HBr w AcOH uzyskano ester etylowy (R)-alaniny. Jednak zarówno benzoilowa, jak i ftaloilowa osłona grupy aminowej usuwana jest w warunkach zbyt drastycznych, przez co nie nadaje się do stosowania w syntezach bazujących na substratach zawierających grupy labilne.

Ftalimid, jako „źródło” grupy aminowej syntezowanego aminokwasu, został także wykorzystany w syntezie stereospecyficznie znaczonej glicyny [13]. (R)- i (S)-[2- ^2H]-glicyna o wysokiej czystości optycznej została zsyntezowana w dużej skali na drodze czysto chemicznej zgodnie ze schematem 4.



Schemat 3



Schemat 4

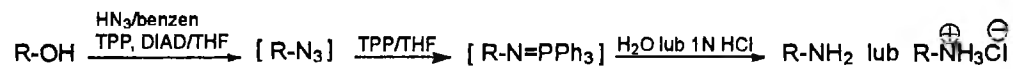
Otrzymane klasycznie deuterowane aldehydy aromatyczne zredukowano za pomocą chiralnego czynnika redukującego (*R*- lub *S*-*B*-izopinokamferyl-9-borabicyklo-[3.3.1]-nonan) do chiralnych deuterowanych arylometryloalkoholi, które na drodze reakcji Mitsunobu przekształcano w pochodne arylometryloftalimidowe o przeciwnej konfiguracji na węglu arylometrylenowym. Po usunięciu osłony ftaloilowej grupę karboksylową chiralnej glicyny tworząco przez utlenienie podstawnika arylometrylenowego wobec soli rutenu.

Fabiano i wsp. [14] wykorzystali reakcję Mitsunobu do syntezy wolnych aminokwasów bądź ich estrów z odpowiednich hydroksykwasów poprzez pośrednio powstający azydek, ulegający *in situ* reakcji Staudingera [15] prowadzącej do przejściowo powstającego iminofosforanu, który następnie hydrolizowano (schemat 5).

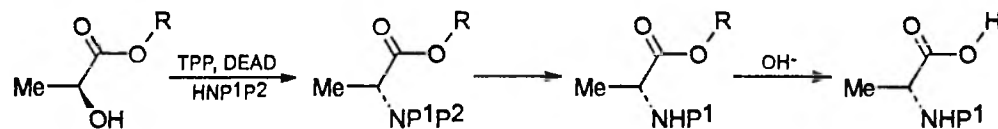
W zależności od warunków reakcji hydrolizy otrzymać można tą metodą wolną aminę bądź jej chlorowoderek. Zgodnie z tym schematem (*S*)-mleczan metylu został przekształcony w optycznie czystą (*R*)-alaninę, a benzyloksykarbonylo-*L*-seryna i jej ester w optycznie czynne pochodne kwasu diaminopropionowego. Jednak ester metylowy kwasu (*S*)-migdałowego uległ w tych warunkach przemianie w racemiczny azydek, a następnie – w racemiczny chlorowoderek estru metylowego fenyloglicyny. Racemizacja była w tym wypadku prawdopodobnie spowodowana szczególną stabilnością karboanionu tworzącego się przez utratę α -protonu. Synteza aminokwasów przez azydki została znacznie ułatwiona przez zastosowanie wprowadzonego przez Viauda i wsp. [16] stabilnego kompleksu azydku cynku z pirydyną jako źródła jonów azydkowych w podstawieniu typu Mitsunobu. Reakcja ta, podobnie jak analogiczna reakcja z kwasem azotowodorowym, zachodzi z pełną inwersją konfiguracji na chiralnym centrum karbinolowym.

W modelowych badaniach mających na celu opracowanie optymalnych metod syntezy ^{15}N -znaczonych, *N*-chronionych chiralnych aminokwasów Decker i wsp. [17] otrzymali estry *N,N*-dichronionej-*(R)*-alaniny z szeregu imidowęglań lub tosylokarbaminianów i niewielkiego nadmiaru (*S*)-mleczanu etylu w konwencjonalnych warunkach reakcji Mitsunobu (schemat 6).

Wydajność przekształcenia w zasadniczy sposób uzależniona była od struktury użytego imidowęglań (lub tosylokarbaminianu) i wahała się od < 5% (kombinacja Boc i Boc) do 93% (kombinacje Tos i Boc oraz Tos i $\text{Z}(\text{NO}_2)$). Wyższe wydajności związane były z zastosowaniem Tos lub BzlSCO jako grup ochronnych, co jest zrozumiałe przy założeniu, że wydajność reakcji Mitsunobu ściśle związana jest z kwasowością protonu NH w stosowanym imidowęglań czy tosylokarbaminianie, a steryczne zależności wydają się grać mniejszą rolę. Jako bardziej kwasowe niż amidy, sulfonamidy były alkilowane z dużymi wydajnościami, a czystość uzyskiwanych pochodnych *D*-alaniny przekraczała 95%. Grupa 9-fluorenylometoksy-karbonylowa (Fmoc) okazała się niestabilna w reakcji Mitsunobu i w reakcji *Z*-NH-Fmoc z (*S*)-mleczanem etylu



Schemat 5

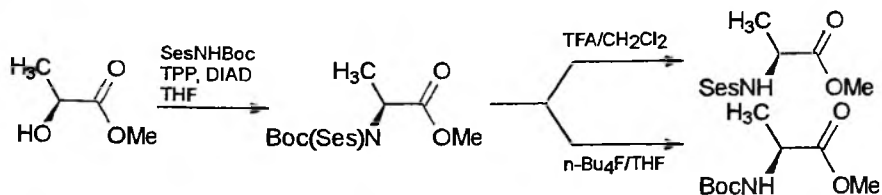


P1, P2 = Z, Boc, Adoc, Alloc, TCBoc, Troc, Z(OMe), Z(NO₂), Z(Cl), Z(o-Cl), Poc, BzIS-CO lub Tos
R = Et lub Bzl

Schemat 6

nie stwierdzono śladu Z(Fmoc)-D-AlaOEt, a jedynie produkty rozkładu: ZNH_2 i dibenzofulwen.

Campbell i Hart [18] zaproponowali inny reagent jako prekursor grupy aminowej w aminokwasach otrzymywanych poprzez reakcję Mitsunobu. Do przekształcania alkoholi/hydroksoykwasów w aminy/aminokwasy używali oni karbaminianu *tert*-butylo-2-(trimetylosililo)etylosulfonowego (Boc-NH-Ses). Po selektywnym zdjęciu jednej z grup ochronnych otrzymywano aminokwasy z osłoną typu uretanowego lub sulfonamidowego (schemat 7).



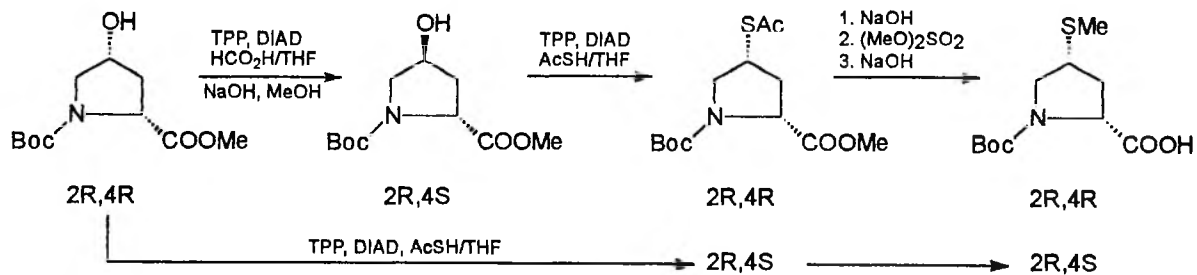
Schemat 7

W ten sposób, w reakcji (*S*)-mleczanu metylu, SesNH-Boc, TPP i DEAD otrzymano ester N-Boc-N-Ses-D-alaniny jako związek modelowy, z którego przy użyciu fluorku tetra-*n*-butyloamoniowego zdjęto grupę Ses i otrzymano czysty enancjomerycznie ester metylowy N-*tert*-butyloksykarbonylo-D-alaniny.

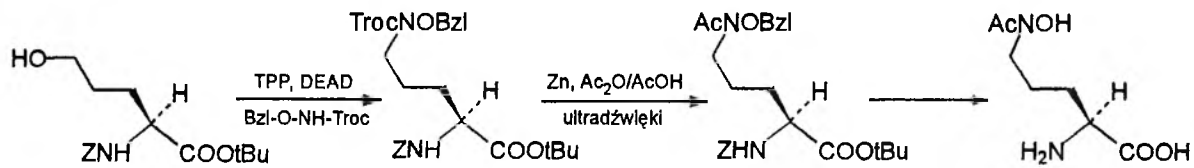
SYNTEZA AMINOKWASÓW NIEKODOWANYCH I MODYFIKOWANYCH

Schmidt i wsp. [19] opisali wysoce stereoselektywną syntezę 2-Fmoc-3-Boc-chronionego kwasu diaminomasłowego (DABA), nienaturalnego aminokwasu, będącego składnikiem wyizolowanych z materiału biologicznego peptydów o działaniu antybiotycznym i immunomodulującym. Oba diastereoizomery tego aminokwasu otrzymano z odpowiednich pochodnych treoniny bądź *allo*-treoniny przez zamianę grupy hydroksylowej na azydkową w reakcji Mitsunobu z kwasem azotowodorowym, a następnie redukcję grupy azydkowej do aminowej.

Na reakcji Mitsunobu oparto także syntezę czystych izomerów pochodnych zarówno 4-merkaptoproliny [20], jak i 3-merkaptoproliny [21], które stanowią cenne substraty do budowania usztywnionych analogów biologicznie czynnych peptydów. Strategia syntezy *cis*- i *trans*-N-Boc-4-metylotioprolin (schemat 8) bazowała na reakcji estru metylowego (2*R*,4*R*)-N-Boc-4-hydroksyproliny bądź jej izomeru 2*R*,4*S* z kwasem tioloctowym w warunkach reakcji Mitsunobu, po czym otrzymany ester (2*R*,4*S*)- lub (2*R*,4*R*)-N-Boc-4-acetylotioproliny hydrolizowano do tiolu, który alkilowano, hydrolizując jednocześnie grupę estrową.



Schemat 8

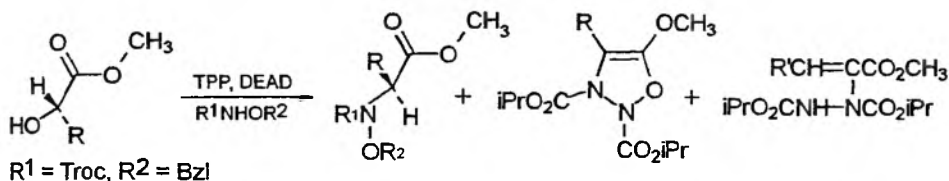


Schemat 9

W syntezie tej reakcję Mitsunobu wykorzystano dodatkowo do otrzymania trudniej osiągalnego substratu, tj. estru Boc-(2*R*,4*S*)-4-hydroksyproliny na drodze epimeryzacji na węglu 4 przez utworzenie mrówczanu (reakcja Mitsunobu z kwasem mrówkowym – inwersja konfiguracji), a następnie jego hydrolizę.

Dolence i wsp. opisali [22] syntezę N⁵-acetylo-N⁵-hydroksy-L-ornityny, kluczowego składnika wielu sideroforów – niskocząsteczkowych związków transportujących Fe(III). W syntezie tej (schemat 9) ester *tert*-butylowy N-Z-5-hydroksy-L-norwaliny poddawano reakcji Mitsunobu z N-Troc-O-benzylhydroksyloaminą, otrzymując ester N²-Z-N⁵-benzyloksi-N⁵-Troc-L-ornityny, z którego usuwano grupę Troc i zastępowano ją grupą acetylową. Usunięcie pozostałych grup ochronnych prowadziło do otrzymania składnika sideroforów mającego zarówno ugrupowanie aminowe, jak i kwasu hydroksamowego.

Generalną drogę do otrzymywania chiralnych α-N-hydroksyaminokwasów przedstawili Kolasa i wsp. [23]. Opiera się ona na chiralnych α-hydroksyestrach jako komponentach reakcji Mitsunobu. Związki te, łatwo dostępne przez deaminowanie i hydroksylowanie aminokwasów, poddawano reakcji Mitsunobu z O-benzyl-N-Troc-hydroksyloaminą, otrzymując estry N-benzyloksi-N-Troc-α-aminokwasów z wydajnością 20–82% (schemat 10).



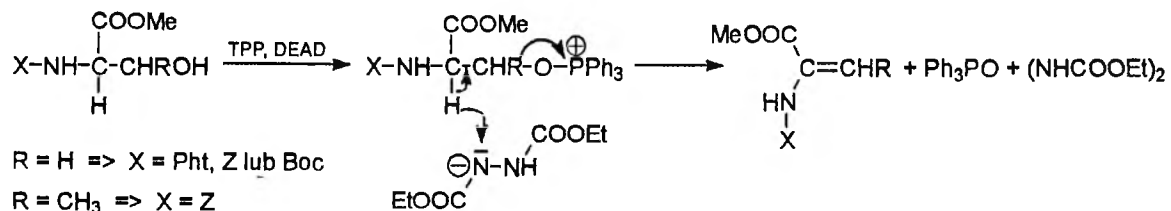
Schemat 10

W żadnej z przeprowadzonych reakcji pożądany związek nie był jedynym produktem, a wydajność otrzymywanych N-hydroksyaminokwasów wydawała się zależeć głównie od podstawnika alkilowego (R) w estrze hydroksykwasu.

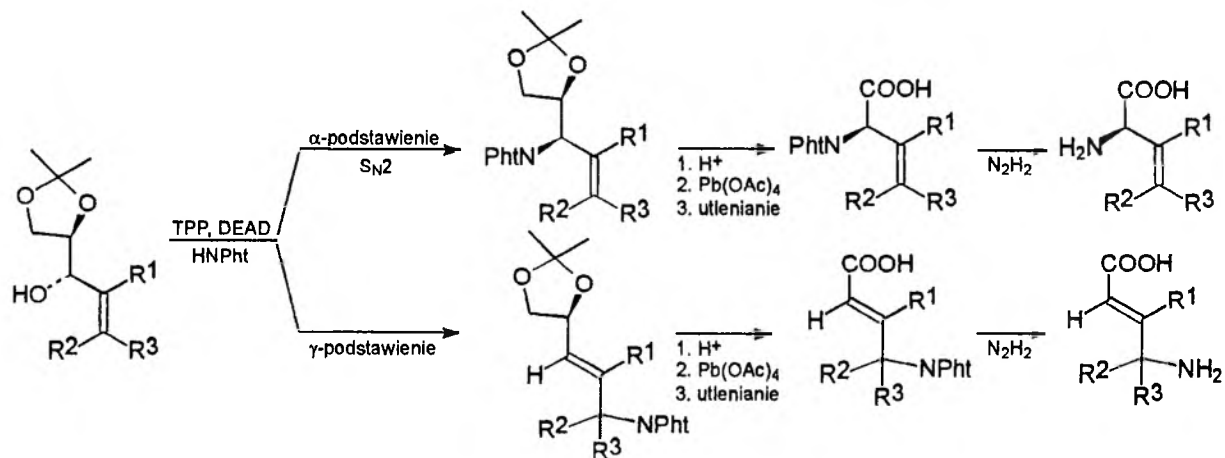
Wewnątrzcząsteczkowa reakcja dehydratacji w warunkach reakcji Mitsunobu posłużyła Wojciechowskiej i wsp. [24] do otrzymania dehydroaminokwasów z estrów N-chronionej (Z-Pht-, Boc-) seryny lub treoniny (schemat 11).

Reakcję prowadzono przy użyciu równomolowej ilości TPP, DEAD i odpowiedniego hydroksykwasu, otrzymując oczekiwany α,β-dehydroaminokwas z wydajnością 55–69%. W wypadku reakcji z pochodną treoniny otrzymano mieszaninę izomerów E:Z w stosunku 1:1.

Optycznie czyste β,γ-nienasycone α-aminokwasy i α,β-nienasycone γ-aminokwasy otrzymano na drodze aminowania alkoholi allilowych [25], wychodząc z aldehydu (*R*)-izopropylidenoglicerynowego lub (*S*)-mleczanu etylu (schemat 12).

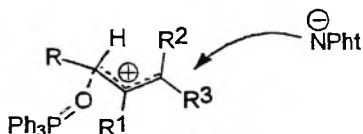


Schemat 11



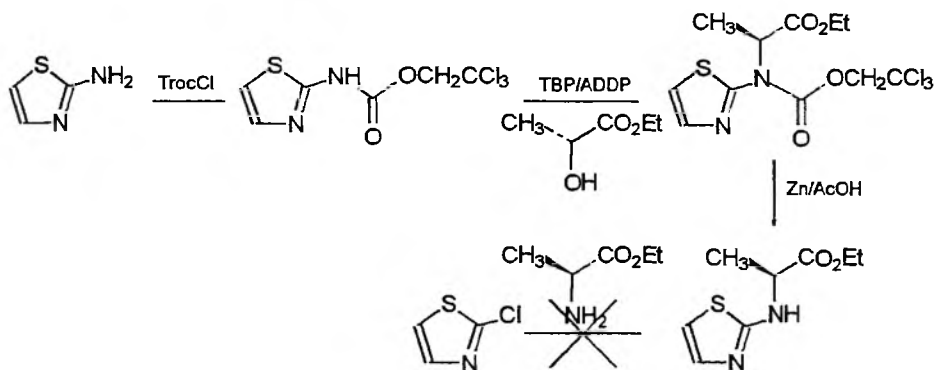
Schemat 12

Kluczowym etapem syntezy była reakcja Mitsunobu drugorzędowych alkoholi allylowych i ftalimidu, podczas której zaobserwowano przegrupowanie allylowe. Badanie stereochemii tej reakcji pozwoliło stwierdzić, że α -substytucja zachodzi z pełną inwersją, γ -podstawieniu natomiast odpowiada atak (*E*)-*anti* (w stosunku do grupy odchodzącej $-\text{OPPh}_3$) z selektywnością zależną od struktury substratów. Wyniki wskazują, że atak γ zachodzi z częściowym udziałem mechanizmu $\text{S}_{\text{N}}1$, w którym grupa odchodząca przesłania stronę *syn* kationu allylowego i kieruje atak w stronę *anti* (schemat 13).



Schemat 13

Podczas systematycznych badań nad alkilowaniem heterocyklicznych amidyn (pochodnych pirydyn i tiazoli) w warunkach reakcji Mitsunobu, Abarghaz i wsp. [26] dowiedli, że następuje ono regioselektywnie, na egzocyklicznym atomie azotu i może być cenną drogą syntezy różnego typu analogów aminokwasów, często niedostępnych na innej drodze (schemat 14).



Schemat 14

Potwierdzili też znacznie większą skuteczność wprowadzonego niedawno układu tributylfosfina/1,1'-azodikarbonylodiperydyna (TBP/ADPP) w stosunku do tradycyjnego układu redoksyjnego TPP/DEAD [6].

N-ALKILOWANIE AMINOKWASÓW

N-alkilowane aminokwasy są ważnymi substratami, służącymi głównie do otrzymywania alkilowanych peptydów. Są one składnikami licznych biologicznie czynnych peptydów o właściwościach immunosupresyjnych, antybiotycznych

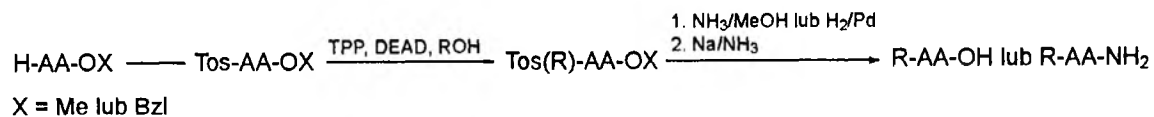
nych, przeciwnowotworowych, ponadto mają liczne zastosowania jako elementy strukturalne w badaniach konformacyjnych. Zarówno w wypadku aminokwasów, jak i peptydów, ich otrzymanie do dnia dzisiejszego stwarza wiele trudności (szczegółowy przegląd zagadnienia syntezy i zastosowań N-alkilowanych aminokwasów przedstawiono ostatnio na łamach „Wiadomości Chemicznych” [27]).

Reakcja Mitsunobu stwarza warunki do przebiegającego w łagodnych warunkach monoalkilowania aminokwasów grupą alkilową pochodzącą z alkoholu dodanego do układu reakcyjnego. Zasadniczym problemem jest uzyskanie dostatecznej kwasowości protonu aminowego, gdyż to grupa aminowa musi zostać przekształcona w ugrupowanie dostarczające w reakcji Mitsunobu anionowego składnika wymieniającego grupę hydroksylową drugiego substratu. Opracowano dotychczas jeden rodzaj takiego przekształcenia, który zastosowano w alkilowaniu aminokwasów. Henry i wsp. jako pierwsi zaproponowali zastosowanie sulfonamidów jako kwasowego składnika reakcji Mitsunobu [28]. Papaioannou i wsp. wykorzystali ten pomysł do N-alkilowania aminokwasów i ich estrów oraz peptydów N-chronionych grupą *p*-toluenosulfonylową (Tos), [29, 30], (schemat 15).

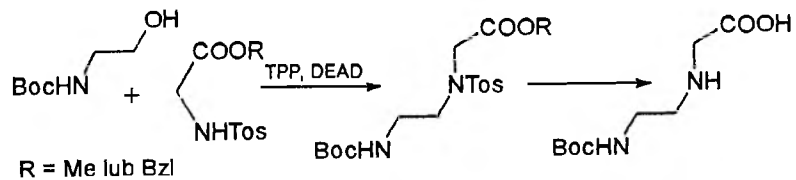
Grupa sulfonamidowa powstająca w wyniku zastosowania takiej osłony podlega alkilowaniu za pomocą alkoholu będącego drugim substratem. Jeżeli do reakcji użyjemy chronionego aminokwasu zamiast jego estru, przed N-alkilowaniem dochodzi do estryfikacji grupy karboksylowej przez ten sam alkohol. Wydajności zarówno monoalkilowanych, jak i alkilowanych i estryfikowanych równocześnie N-Tos-aminokwasów wynoszą około 85–95%. Warto zauważyć, że w reakcji tej nawet poważne przeszkody steryczne, jak w wypadku alkilowania Tos-Ile-OMe lub Tos-Val-OBzI za pomocą izopropanolu, tylko nieznacznie obniżają wydajność alkilowania (80–84%). Reakcję Mitsunobu można też zastosować do selektywnego alkilowania jednej z grup aminowych aminokwasów diaminowych. W odróżnieniu od N^α-alkilowania, w wypadku N^ω-alkilowania N^α-Boc-N^ω-Tos-aminokwasów lub N^α-Z-N^ω-Tos-aminokwasów, peptydów czy ich estrów, wydajność reakcji jest umiarkowana, nawet przy użyciu dwukrotnego nadmiaru odczynników [29]. Reakcja alkilowania biegnie w sposób bezracemizacyjny [30]. Ponieważ jednak hydroliza estru metylowego prowadzi do częściowej racemizacji, w wypadku potrzeby otrzymania chiralnie czystych N-alkiloaminokwasów lepszą ochroną grupy karboksylowej jest ester benzyłowy, możliwy do usunięcia w sposób bezracemizacyjny.

Reakcję alkilowania estrów metylowych lub benzyłowych N-Tos-aminokwasów zaproponowaliśmy do syntezy szkieletu monomerów peptydowych kwasów nukleinowych (PNA), [31]. W tym wypadku reakcja Mitsunobu służy do alkilowania odpowiednich Tos-aminokwasów za pomocą Boc-aminoetanolu (schemat 16).

Możliwe jest usunięcie grupy Tos za pomocą redukcji sodem w ciekłym amoniaku. W wyniku działania warunków redukujących ester benzyłowy pod-



Schemat 15



Schemat 16

lega usunięciu, jednak w wypadku estru metylowego dochodzi wówczas do powstawania amidu, dlatego konieczna jest wcześniejsza hydroliza estru i poddanie redukcji produktu z wolną grupą karboksylową. Produktem redukcji, po acylowaniu karboksymetylową pochodną zasady azotowej, jest N-Boc-chroniony monomer PNA.

Problemy z deprotekcją, związane ze stosowaniem grupy Tos do otrzymywania sulfonamidu podatnego na alkilowanie w reakcji Mitsunobu, udało się nam ostatnio pokonać dzięki wykorzystaniu grupy ochronnej Pmc (2,2,5,7,8-pentametylochromano-6-sulfonowej) [32, 33]. Jest to osłona ugrupowania guanidynowego argininy stosowana w chemii aminokwasów. Jej usuwanie jest możliwe przez działanie roztworem bromowodoru w kwasie octowym, co w wielu wypadkach czyni z niej korzystną alternatywę do grupy Tos. Również w wypadku stosowania grupy Pmc alkilowanie grupy ω -aminowej będzie trudniej niż α -aminowej [33].

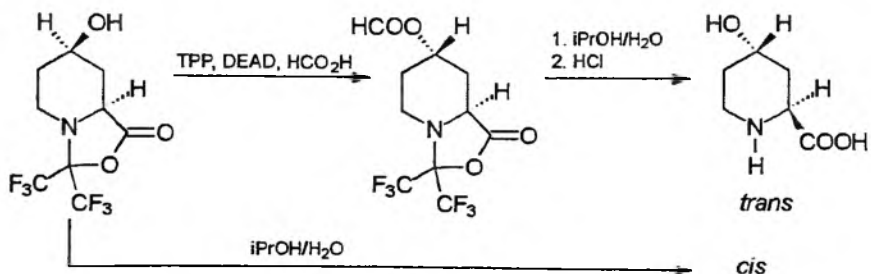
W reakcji Mitsunobu możliwe jest także alkilowanie indolowego atomu azotu w wolny od racemizacji sposób, w wypadku podstawienia pierścienia indolowego przez dwie grupy elektroujemne [34]. Daje to podstawę do przewidywania, że możliwe będzie otrzymywanie w ten sposób chiralnie czystych N-alkilowanych pochodnych tryptofanu.

Wydajność N-alkilowania za pomocą reakcji Mitsunobu rośnie wyraźnie wraz ze wzrostem kwasowości protonu związanego z ulegającym alkilowaniu atomem azotu [35].

ZASTOSOWANIE REAKCJI MITSUNOBU DO ZMIANY KONFIGURACJI AMINOKWASÓW I ICH POCHODNYCH

Wewnątrzcząsteczkowa laktonizacja w obrębie hydroksyproliny była niejednokrotnie wykorzystywana do zmiany konfiguracji tego aminokwasu. Zastosowanie w stosunku do aminokwasu lub peptydu wewnątrzcząsteczkowej laktonizacji w warunkach Mitsunobu w obrębie C-końcowej reszty hydroksyproliny umożliwia (po dodaniu nadmiaru alkoholu) otwarcie laktonu i estryfikację grupy karboksylowej hydroksyproliny z równoczesną inwersją konfiguracji na węglu C-4 tej reszty. Zastosowanie do otwierania laktonu amoniaku w roztworze izopropanolowym umożliwia uzyskanie amidu w miejsce estru. Jest to wygodny sposób otrzymywania różnych, trudnych do zsyntezowania na innej drodze, pochodnych *cis*-hydroksyproliny [36, 37].

Reakcja Mitsunobu została w nieco inny sposób zastosowana do zmiany konfiguracji pochodnych kwasu *cis*-4-hydroksypipekolinowego. W pierwszym etapie, w obecności kwasu mrówkowego, reakcja Mitsunobu prowadzi do estryfikacji grupy hydroksylowej hydroksykwasu wraz z inwersją jego konfiguracji na atomie węgla 4, a kwaśna hydroliza estru przywraca grupę hydroksylową w zmienionej konfiguracji [38], (schemat 17).



Schemat 17

W identyczny sposób dokonano zmiany konfiguracji na karbinolowym atomie węgla pochodnej 4-hydroksyproliny. Zmiana konfiguracji pochodnych L-4-*trans*-hydroksyproliny została także dokonana przez przejściową estryfikację za pomocą kwasu octowego [39] i *p*-nitrobenzoesowego [40].

Z kolei Pasto i wsp. opisali syntezę *syn*- α -hydroksy- β -aminokwasów z *anti*-N-Boc-1-*tert*-butylo-dimetylosilylo-3-amino-1,2-dioli. Kluczowy etap, inwersja grupy 2-hydroksylowej, możliwy był dzięki estryfikacji tej grupy przez kwas benzoesowy w warunkach Mitsunobu, a następnie hydrolizie otrzymanego estru [41]. Metodę tę, z wykorzystaniem estryfikacji kwasem *p*-nitrobenzoesowym, z powodzeniem zastosowano do otrzymania enancjomerycznie czystej formy docetakselu (Taxotere), jednego z bardzo obiecujących leków przeciwnowotworowych z grupy taksanów [41].

ESTRYFIKACJA AMINOKWASÓW I ICH POCHODNYCH ZA POMOCĄ REAKCJI MITSUNOBU

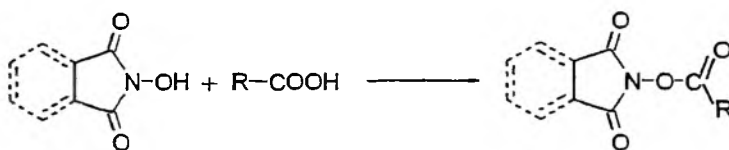
Estryfikacja za pomocą reakcji Mitsunobu jest bardzo przydatną i szeroko stosowaną procedurą. Ma ona niewątpliwie zalety w stosunku do innych metod estryfikacji, przebiega w łagodnych warunkach, obojętnym środowisku i daje wysokie wydajności. Równocześnie jest reakcją ciekawą chociażby dlatego, że w wypadku estryfikacji Mitsunobu w toku reakcji dochodzi do aktywacji grupy hydroksylowej alkoholu, a nie ugrupowania karboksylowego [42]. W czasie estryfikacji dochodzi do typowej dla reakcji Mitsunobu inwersji konfiguracji alkoholu, o ile grupa hydroksylowa związana była z chiralnym atomem węgla.

Reakcja N-trityloaminokwasów z difenylometanolem w obecności TPP i DEAD prowadzi do syntezy odpowiednich estrów difenylometylowych [43]. Synteza takich estrów umożliwia usuwanie grupy Trt poprzez działanie HOBt i trifluoroetanolu.

Estryfikacja w warunkach Mitsunobu może być zastosowana do estryfikacji zawierających grupę hydroksylową żywic, służących do syntezy peptydów

na nośniku. Barlos i wsp. z powodzeniem wykorzystali tę strategię do mocowania na żywicy *sec*-alkoholowej N-chronionych trytylo- i Fmoc-aminokwasów [44].

Grochowski i Jurczak zastosowali reakcję Mitsunobu do syntezy tzw. estrów aktywnych [45], czyli pochodnych kwasów karboksylowych z aktywowaną grupą karboksylową, które łatwo mogą być użyte do acylowania i są szeroko wykorzystywane w syntezie peptydów. Reakcja Mitsunobu N-chronionych aminokwasów z N-hydroksyfталimidem lub N-hydroksysukcynimidem, w obecności 10% nadmiaru TPP i DEAD, daje po oczyszczeniu oczekiwany N-acyloksyfталimid lub N-acyloksysukcynimid z wydajnością 72–96% (schemat 18).

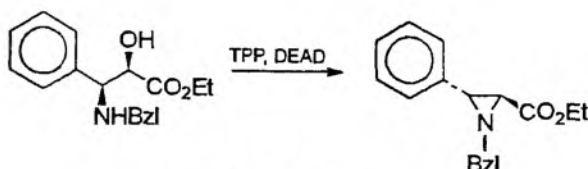


Schemat 18

Wydajność estryfikacji przeprowadzanej za pomocą reakcji Mitsunobu rośnie wyraźnie wraz ze wzrostem stałej dysocjacji kwasu [46]. Wpływ ten zależy m.in. od konkurencyjnego tworzenia bezwodnika kwasowego, który jest produktem ubocznym [47]. Reakcja Mitsunobu może więc służyć także do syntezy bezwodników kwasowych słabych stosunkowo kwasów [48].

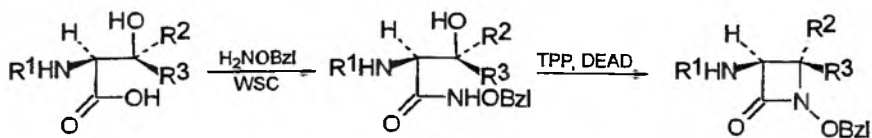
SYNTEZA ZWIĄZKÓW CYKLICZNYCH Z POCHODNYCH AMINOKWASÓW

Jednym z ważnych zastosowań reakcji Mitsunobu jest przekształcanie pochodnych aminokwasów w związki zawierające pierścienie heterocykliczne o różnych rozmiarach, w tym naprężony pierścień azirydyny. Wattanasiu i Kathawala przeprowadzili ester etylowy kwasu 3-benzyloamino-3-fenyl-2-hydroksypropionowego w 1-benzylo-2-etoksykarbonylo-3-fenylazirydynę w wewnątrzcząsteczkowej reakcji Mitsunobu (schemat 19). Proces jest stereospecyficzny i prowadzi do izomeru *trans*, niedostępnego innymi metodami [49].



Schemat 19

Pochodne β -hydroksyaminokwasów mogą zostać przekształcone w związki zawierające pierścienie czteroczłonowe. Najważniejszą grupę stanowią tutaj 2-azetydynony (β -laktamy). Substratami w omawianej syntezie są kwasy O-alkilo- lub O-acylohydroksamowe będące pochodnymi N-chronionych aminokwasów [50, 51]. Cyklizacja taka zachodzi stereospecyficznie i w wypadku pochodnych treoniny prowadzi do *trans*- β -laktamów (schemat 20).



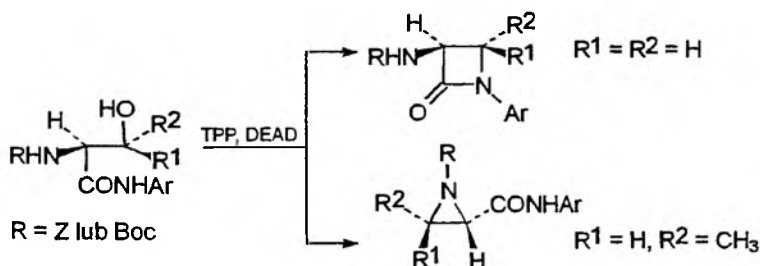
$R^1 = Z$ lub Boc; $R^2, R^3 = H$ lub CH_3

Schemat 20

Cyklizację tego typu zastosowano m.in. do otrzymania nowej klasy antybiotyków β -laktamowych – monobaktamów – zawierających pierścień azetydynowy sulfonowany w pozycji 1 [52]. W syntezie wykorzystano N'-metoksyamid Boc-seryny, który poddano cyklizacji w warunkach reakcji Mitsunobu [53]. Oczekiwany związek otrzymano po usunięciu grupy metoksylowej przez redukcję sodem w ciekłym amoniaku, sulfonowanie i usuwanie grupy Boc.

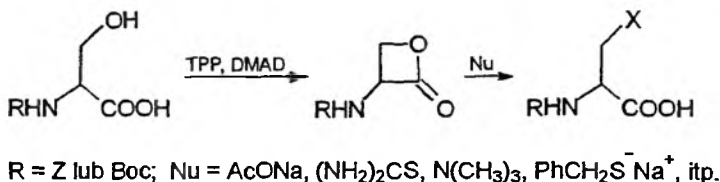
Stereospecyficzną cyklizację aryloamidów N-chronionych β -hydroksyaminokwasów do odpowiednich β -laktamów studiował Bose ze wsp. [54, 55]. Podczas gdy w wypadku pochodnych seryny stwierdzono powstawanie pochodnych β -laktamowych, głównym produktem wewnątrzcząsteczkowej reakcji Mitsunobu pochodnych treoniny były pochodne azirydyny (schemat 21). Aby zapobiec reakcjom ubocznym tworzenia pierścienia azirydynowego, stosowano pełną ochronę grupy aminowej, np. w postaci 4,5-difenylo-2-oksazolinonu [56].

W warunkach reakcji Mitsunobu dokonano cyklizacji N-chronionej seryny do 2-oksoetanonu (β -laktonu). Pierwotnie, stosując standardowe warunki



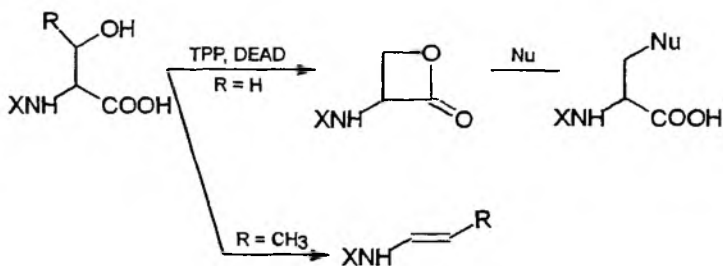
Schemat 21

reakcji, uzyskano żądany produkt w śladowych ilościach [57]. Modyfikacja tej syntezy zaproponowana przez Arnolda i wsp. [58], polegająca na obniżeniu temperatury i tworzeniu adduktu TPP/DMAD przed dodaniem pochodnej seryny przyniosła znaczne ograniczenie produktów β -eliminacji (α,β -nienasyconych aminokwasów). W ten sposób wyeliminowano także niebezpieczeństwo otwierania naprężonego pierścienia β -laktonowego przez nukleofilowy atak cząsteczki TPP. Otrzymane w ten sposób β -laktony posłużyły do syntezy β -podstawionych analogów alaniny [59, 60], (schemat 22).



Schemat 22

Otwieranie pierścienia β -laktonu związkami metaloorganicznymi [59] i innymi nukleofilami [60] prowadzi do aminokwasów trudno dostępnych innymi metodami, jak np. kwas 2-aminoheptanowy [59]. Podobne podejście do cyklizacji diastereoizomerów N-chronionej treoniny zakończyło się niepowodzeniem [61]. Rozgałęzienie na węglu β powoduje zwiększenie zawady sterycznej i utrudnia wewnątrzcząsteczkowy atak nukleofilowy anionu karboksylanowego. Wg Pansare i Vederasa zachodzi tutaj głównie β -eliminacja połączona z dekarboksylacją, w wyniku której powstają N-chronione enaminy [61], (schemat 23).

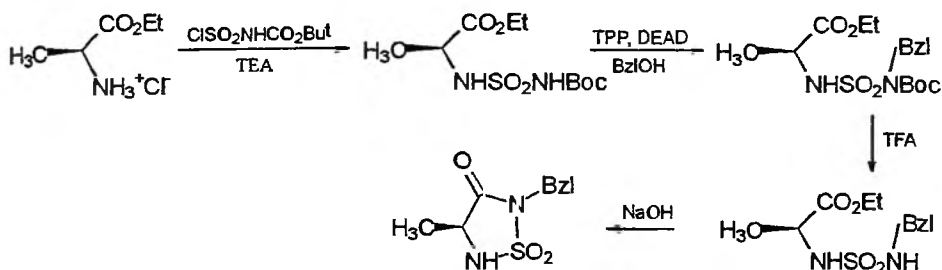


Schemat 23

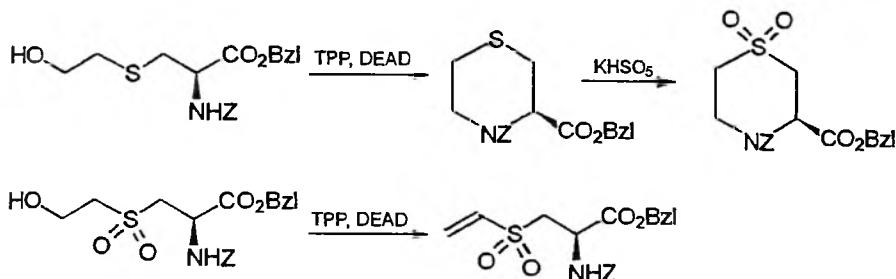
Reakcja Mitsunobu stanowiła jeden z etapów syntezy pięcioczłonowych, sulfonowych analogów hydantoin. Związki te zastosowano jako analogi zasad pirymidynowych w syntezie pseudonukleozydów [62–64]. W omawianym procesie wykorzystano dużą różnicę kwasowości protonów NH N-alkilosulfonamidowych i N-alkoksykarbonylosulfonamidowych w produkcie przejściowym

pozwalającą na selektywne alkirowanie atomu azotu podstawionego grupą *t*-butoksykarbonylową (schemat 24).

Cyklizacja pochodnej uzyskanej w wyniku reakcji Z-Cys-OBzl i 1,2-epoksyetanu prowadzi do związku zawierającego sześcioczłonowy pierścień perhydrotiazynowy (schemat 25), [65].



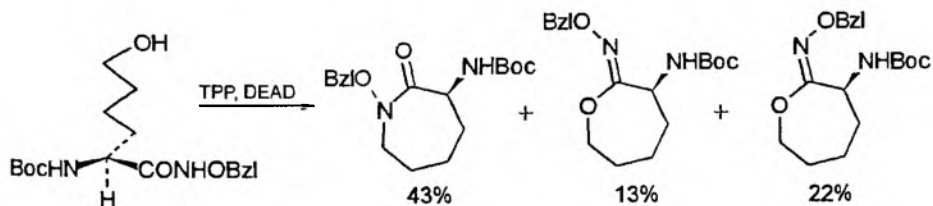
Schemat 24



Schemat 25

W wyniku utleniania produktu cyklizacji za pomocą KHSO_5 otrzymano pochodną sulfonową tego cyklicznego aminokwasu. Interesujące, że próba syntezy tego związku w odwrotnej sekwencji reakcji (najpierw utlenianie później cyklizacja) doprowadziła do produktu β -eliminacji. Związane jest to niewątpliwie ze znaczną kwasowością protonów α w stosunku do grupy sulfonowej.

W syntezie mykobaktyn, najbardziej złożonych ze znanych sideroforów [66], Maurer i Müller [67] zastosowali reakcję Mitsunobu do utworzenia pierścienia 7-członowego. Substratem w syntezie był N-benzyluksamid Boc- ϵ -hydroksynorleucyny (schemat 26).



Schemat 26

REAKCJA MITSUNOBU W SYNTEZIE MONOMERÓW PEPTYDOWYCH ANALOGÓW KWASÓW NUKLEINOWYCH

Peptydowe (poliamidowe) kwasy nukleinowe (PNA) są grupą analogów kwasów nukleinowych, w których cały szkielet fosfocukrowy został zastąpiony przez łańcuch poliamidowy z elementami szkieletu peptydowego lub wręcz przez szkielet peptydowy. Zasady azotowe kwasów nukleinowych przyłączone są bezpośrednio do łańcuchów bocznych aminokwasów tworzących taki łańcuch lub do szkieletu poprzez łączniki alkiloacylowe [68]. Ze względu na rosnące znaczenie tej grupy pochodnych aminokwasowych i szerokie zastosowanie reakcji Mitsunobu w ich syntezie uznaliśmy, że warto na koniec krótko podsumować pozycje piśmiennictwa, które dotyczą tego problemu.

Oprócz zastosowania reakcji Mitsunobu do syntezy szkieletu PNA, przedstawionego w rozdziale o otrzymywaniu alkilowanych aminokwasów, a także do zmiany konfiguracji hydroksyaminokwasów, opisanego w odpowiednim miejscu, reakcja ta wykorzystywana była również do podstawiania grupy hydroksylowej hydroksyaminokwasów przez heterocykliczny atom azotu zasad azotowych. W warunkach Mitsunobu dokonywano podstawienia C,N-dichrotonionych pochodnych 4-hydroksyproliny przez chronione pochodne zasad azotowych [39, 40, 69]. Za pomocą reakcji Mitsunobu można także otrzymywać połączenia innych acyklicznych elementów szkieletu monomerów PNA, np. estru metylowego N-Boc-N-(2-hydroksyetylo)glicyny lub estru benzylowego N-Boc-L-homoseryny, z zasadami azotowymi i ich pochodnymi [39, 70].

PODSUMOWANIE

Ze względu na wiele cech, a przede wszystkim prostotę protokołu eksperymentalnego, kompatybilność warunków reakcji z szerokim wachlarzem grup funkcyjnych oraz stereochemicznie czysty przebieg reakcji w absolutnej większości wypadków, reakcja Mitsunobu znalazła różnorodne zastosowania także w chemii aminokwasów.

Możliwość prostej zamiany grupy hydroksylowej na grupę aminową bądź inny nukleofil daje podstawy do syntezy amino- i diaminokwasów różnego typu oraz tworzenia nietypowych aminokwasów, często trudno osiągalnych innymi drogami. Wewnątrzcząsteczkowa reakcja Mitsunobu może prowadzić do pochodnych cyklicznych, zawierających pierścień azirydynowy, oksazolino- czy β -laktonowy, lub do produktów dehydratacji.

Wprowadzenie nowych reagentów redokso-owych poszerzyło zakres zastosowań reakcji o nowe, nie reaktywne wcześniej substraty, dlatego aplikacje tej niezwykle wszechstronnej reakcji wydają się nie mieć końca.

PODZIĘKOWANIA

Chcielibyśmy podziękować Panu Prof. Januszowi Rachoniowi z PG za „zarażenie” nas zainteresowaniem reakcją Mitsunobu i dostarczenie nam części materiałów źródłowych na jej temat. Nasze badania eksperymentalne nad wykorzystaniem tej reakcji były finansowane m.in. z grantów BW Uniwersytetu Gdańskiego nr 8000-5-0171-7 i Akademii Medycznej w Gdańsku nr W-51.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] M. Wada, O. Mitsunobu, *Tetrahedron Lett.*, 1972, 1279.
- [2] O. Mitsunobu, *Synthesis*, 1981, 1.
- [3] D. Jenkins, O. Mitsunobu, [w:] *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*, vol. 8, red. L. A. Paquette, Wiley, 1995, s. 5379.
- [4] D. L. Hughes, *Org. React.*, 1992, 42, 337.
- [5] D. L. Hughes, *Org. Prep. Proced. Int.*, 1996, 23, 127.
- [6] T. Tsunoda, Y. Yamamiya, S. Ito, *Tetrahedron Lett.*, 1993, 34, 1639.
- [7] T. Tsunoda, J. Otsuka, Y. Yamamiya, S. Ito, *Chem. Lett.*, 1994, 539.
- [8] T. Tsunoda, Y. Yamamiya, Y. Kawamura, S. Ito, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36, 2529.
- [9] T. M. Gajda, *Badania nad wykorzystaniem reakcji Mitsunobu i przemian pokrewnych w syntezie α -heteropodstawionych fosfonianów i ich analogów fosfinowych oraz 1,3-aminoalkoholi (rozprawa habilitacyjna)*, Politechnika Łódzka, Łódź 1995.
- [10] O. Mitsunobu, M. Wada, T. Sano, *J. Am. Chem. Soc.*, 1972, 94, 679.
- [11] M. Wada, T. Sano, O. Mitsunobu, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1973, 46, 2833.
- [12] H. Morimoto, T. Furokawa, K. Mijazima, O. Mitsunobu, *Chem. Lett.*, 1973, 821.
- [13] K. Ramalingam, P. Nanjappan, D. M. Kalvin, R. W. Woodard, *Tetrahedron*, 1988, 44, 5597.
- [14] E. Fabiano, B. T. Golding, M. M. Sadeghi, *Synthesis*, 1987, 190.
- [15] J. March, *Advanced Organic Chemistry. Reactions, mechanisms and Structure*, Wiley-Interscience Publication, John Wiley and Sons, New York 1992, s. 1220.
- [16] M. C. Viaud, P. Rollin, *Synthesis*, 1990, 130.
- [17] F. Degerbeck, B. Fransson, L. Grehn, U. Ragnarson, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1992, 245.
- [18] J. A. Campbell, D. J. Hart, *J. Org. Chem.*, 1993, 58, 2900.
- [19] U. Schmidt, K. Munding, B. Riedl, G. Haas, R. Lau, *Synthesis*, 1992, 1201.
- [20] S. A. Kołodziej, G. V. Nikiforovich, R. Skeeane, M.-F. Lignon, J. Martinez, G. R. Marshall, *J. Med. Chem.*, 1995, 38, 137.
- [21] S. A. Kołodziej, G. R. Marshall, [w:] *Peptides: Chemistry, Structure and Biology*, red. P. T. P. Kaumaya, R. S. Hodges, Mayflower Scientific Ltd., 1996, s. 833.
- [22] E. K. Dolence, C.-E. Lin, M. J. Miller, *J. Med. Chem.*, 1991, 34, 956.
- [23] T. Kolasa, M. J. Miller, *J. Org. Chem.*, 1987, 52, 4978.
- [24] H. Wojciechowska, R. Pawłowicz, R. Andruszkiewicz, J. Grzybowska, *Tetrahedron Lett.*, 1978, 19, 4063.
- [25] J. Mulzer, G. Funk, *Synthesis*, 1995, 101.
- [26] M. Abarghaz, A. Kerbal, J.-J. Bourguignon, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36, 6463.
- [27] K. Wiśniewski, *Wiad. Chem.*, 1997, 51, 63.
- [28] J. R. Henry, L. R. Marcin, M. H. McIntosh, P. M. Scola, G. D. Harris Jr., S. M. Weinreb, *Tetrahedron Lett.*, 1989, 30, 5709.

- [29] G. Stavropoulos, C. Athanassopoulos, V. Magafa, D. Papaioannou, [w:] *Peptides 1992, Proceedings of the 22nd Symposium of European Peptide Society*, red. C. H. Schneider, A. N. Eberle, Interlaken, ESCOM Science Publishers 1993, s. 173.
- [30] D. Papaioannou, C. Athanassopoulos, V. Magafa, N. Karamanos, G. Stavropoulos, A. Napoli, G. Sindona, D. W. Aksnes, G. W. Francis, *Acta Chem. Scand.*, 1994, **48**, 324.
- [31] B. Falkiewicz, L. Łankiewicz, K. Wiśniewski, N. Liberek, [w:] *Peptides 1996, Proceedings of the 24th Symposium of European Peptide Society*, Edinburgh, Mayflower Scientific, 1998.
- [32] K. Wiśniewski, A. S. Kołodziejczyk [w:] *Peptides 1996, Proceedings of the 24th Symposium of European Peptide Society*, Edinburgh, Mayflower Scientific, 1998.
- [33] K. Wiśniewski, A. S. Kołodziejczyk, *Tetrahedron Lett.*, 1997, **38**, 483.
- [34] S. S. Bhagwat, C. Gude, *ibid.*, 1994, **35**, 1847.
- [35] J. Koppel, F. Degerbeck, L. Grehn, U. Ragnarsson, *J. Org. Chem.*, 1991, **56**, 7172.
- [36] D. Papaioannou, G. Stavropoulos, K. Karagiannis, G. W. Francis, T. Brekke, D. W. Aksnes, *Acta Chem. Scand.*, 1990, **44**, 243.
- [37] D. Papaioannou, C. Athanassopoulos, V. Magafa, K. Karagiannis, N. Karamanos, G. Stavropoulos, A. Napoli, G. Sindona, D. W. Aksnes, G. W. Francis, A. Aaberg, *ibid.*, 1995, **49**, 103.
- [38] A. Golubev, N. Sewald, K. Burger, *Tetrahedron Lett.*, 1995, **36**, 2037.
- [39] G. Lowe, T. Vilaivan, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1997, 539.
- [40] S. Jordan, C. Schwemler, W. Kosch, A. Kretschmer, E. Schwenner, U. Stropp, B. Mielke, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1997, **7**, 681.
- [41] M. Pasto, A. Moyano, M. A. Pericas, A. Riera, *Tetrahedron Asymm.*, 1996, **7**, 243.
- [42] T. Kurihara, Y. Nakajima, O. Mitsunobu, *Tetrahedron Lett.*, 1976, 2455.
- [43] K. Barlos, J. Kallitsis, P. Mamos, S. Patrianakou, G. Stavropoulos, *Liebigs Ann. Chem.*, 1987, 633.
- [44] K. Barlos, D. Gatos, J. Hondrelis, J. Matsoukas, G. J. Moore, W. Schafer, P. Sotiriou, *ibid.*, 1989, 951.
- [45] E. Grochowski, J. Jurczak, *Synthesis*, 1977, 277.
- [46] J. A. Dodge, J. I. Trujillo, M. Presnel, *J. Org. Chem.*, 1994, **59**, 234.
- [47] R. Hulst, A. van Basten, K. Fitzpatrick, R. Kellog, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1995, 2961.
- [48] P. J. Harvey, M. von Itzstein, I. D. Jenkins, *Tetrahedron*, 1997, **53**, 3933.
- [49] S. Wattanasu, F. G. Kathawa, *Synth. Commun.*, 1992, **22**, 1487.
- [50] P. G. Mattingly, J. F. Kerwin, Jr., M. J. Miller, *J. Am. Chem. Soc.*, 1979, **101**, 3983.
- [51] M. J. Miller, P. G. Mattingly, M. A. Morrison, J. F. Kerwin Jr., *ibid.*, 1980, **102**, 7026.
- [52] R. B. Sykes, C. M. Cimarusti, D. P. Bonner, K. Bush, D. M. Floyd, N. H. Georgopapadakou, W. M. Koster, W. C. Liu, W. L. Parker, P. A. Principe, M. L. Rathnum, W. A. Slusarchyk, W. H. Trejo, J. S. Wells, *Nature (London)*, 1981, **291**, 489.
- [53] D. M. Floyd, A. W. Fritz, J. Plusec, E. R. Weaver, C. M. Cimarusti, *J. Org. Chem.*, 1982, **47**, 5160.
- [54] A. K. Bose, M. S. Manhas, D. P. Sahu, V. R. Hedge, *Can. J. Chem.*, 1984, **62**, 2498.
- [55] A. K. Bose, D. P. Sahu, M. S. Manhas, *J. Org. Chem.*, 1981, **46**, 1229.
- [56] J. C. Sheehan, F. J. Guziec, *ibid.*, 1973, **38**, 3034.
- [57] W. L. Parker, M. L. Rathnum, W. Liu, *J. Antibiot.*, 1982, **35**, 900.
- [58] L. D. Arnold, T. H. Kalantar, J. C. Vederas, *J. Am. Chem. Soc.*, 1985, **107**, 7105.
- [59] L. D. Arnold, J. C. Drover, J. C. Vederas, *ibid.*, 1987, **109**, 4649.
- [60] L. D. Arnold, R. G. May, J. C. Vederas, *ibid.*, 1988, **110**, 2237.
- [61] S. V. Pansare, J. C. Vederas, *J. Org. Chem.*, 1989, **54**, 2311.
- [62] G. Dewynter, N. Aouf, M. Criton, J.-L. Montero, *Tetrahedron*, 1993, **49**, 65.
- [63] G. Dewynter, N. Aouf, Z. Regaina, J. L. Montero, *ibid.*, 1996, **52**, 993.

- [64] G. Dewynter, J.-L. Montero, C. R. Acad. Sci. Paris serie II, 1992, **315**, 1675.
[65] U. Larsson, R. Carlson, Acta Chem. Scand., 1994, **48**, 517.
[66] G. A. Snow, Bacteriol. Rev., 1970, **34**, 99.
[67] P. J. Maurer, M. J. Miller. J. Am. Chem. Soc., 1983, **105**, 240.
[68] B. Hyrup, P. E. Nielsen, Bioorg. Med. Chem., 1996, **4**, 5.
[69] G. Lowe, T. Vilaivan, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 1997, 547.
[70] G. Ceulemans, K. Khan, A. Van Schepdael, P. Herdewijn, Nucleos. Nucleot., 1995, **14**, 813.

Praca wpłynęła do Redakcji 5 października 1997

**WSPÓŁCZESNE POSTĘPY
W WYBRANYCH ASPEKTACH
CHEMII SPIRANÓW**

**RECENT ADVANCES IN SELECTED ASPECTS
OF SPIRAN CHEMISTRY**

Janusz Jamrozik, Szymon Schab

*Zakład Chemii Organicznej, Wydział Chemii, Uniwersytet Jagielloński,
ul. Ingardena 3, 30-060 Kraków*

Abstract

Wstęp

Spirokoniugacja

Helikalność spiranów

Transmisja konformacyjna w spiranach

Fotochromizm spiranów

Spirany aktywne biologicznie

Piśmiennictwo cytowane

ABSTRACT

The chemistry of spiranes has been studied extensively from many points of view and has already been the subject of many papers. Generally the spiranes are not a new class of compounds in the chemical sense, but they retain the chemical properties of their parent moieties. Much interest has been focused on the bonding character of the central *spiro-atom*. This review describes all aspects of spirane chemistry that have been developed in the last few years: spiroconjugation, helical structure, conformational transmission, photochromism and biologically active spiranes.

When two perpendicular π systems are joined by a common tetrahedral atom, it is postulated that electronic delocalization will produce important and characteristic effects in the electronic spectrum [10, 11] and in chemical reactivity [14, 15]. This special case of homoconjugation has been called spiroconjugation (Schemes 1, 2). The presence of hypochromism suggests that the dominant conformation of spiranes is helical (Schemes 4, 5), [20–23]. The effect of conformational transmission in the series of new spirane systems was studied with the aid of $^1\text{H-NMR}$ spectra (Schemes 7, 8), [36–38].

The photochromic behaviour of spiropyrans is based on the reversibility between the colourless “closed” spiropyran form and the coloured “open” merocyanine dye *via* heterolytic cleavage of the spiro oxygen-carbon bond (Scheme 9), [47, 48]. The spiropyrans and related compounds (spirooxazines) continue to arise a strong interest in various fields such as: non-silver high resolution photography [45], optical devices and holographic systems [46].

Many representatives of spiranes have a useful biological activity (Schemes 10, 11), [49–55]. For example, 1,7-dioxaspiro[5.5]undecane is the major component of the sex pheromone of the olive fruit fly [56].

The purpose of this article is to show a “phenomenon” of the spiro-atom and to present the most representative examples.

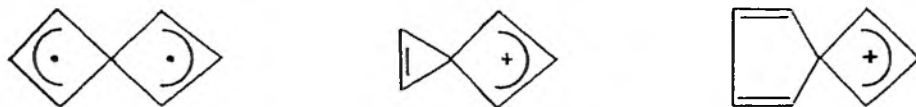
WSTĘP

Spirany należą do dość rzadko badanych dwu- lub policyklicznych związków organicznych połączonych ze sobą za pomocą jednego, wspólnego atomu o konfiguracji tetraedrycznej (tzw. *spiro-atom*). Układy takie, zwłaszcza zawierające podstawniki, pierścienie heterocykliczne lub wiązania wielokrotne są interesującymi obiektami badań stereochemicznych ze względu na możliwość występowania w nich różnego rodzaju izomerii, np. związanej z obecnością centrum chiralności, chiralnością osiową, izomerią konformacyjną, a także geometryczną. Enancjomeria wynikająca wyłącznie z budowy spiranowej opisana została po raz pierwszy przez Millsa i Noddera [1] już w 1920 r. i od tego czasu chiralne spirany cytowane są często w podręcznikach akademickich. Wiele układów spiranowych występuje w przyrodzie, a ponieważ funkcje biologiczne tych połączeń są ściśle związane z ich budową przestrzenną, tym większe więc znaczenie ma stereochemia związków spiranowych. W ostatnich latach podejmowane są próby odpowiedzi na pytanie, czy *spiro-atom* jest tylko jednym z elementów konstytucji tego typu połączeń organicznych, czy też umożliwia on przekazywanie niektórych oddziaływań i efektów, wpływając zarazem na właściwości badanych związków. Pytanie to wydaje się szczególnie aktualne obecnie, ponieważ ostatnie badania doprowadziły do odkrycia nowych zastosowań spiranów [2–6].

SPIROKONIUGACJA

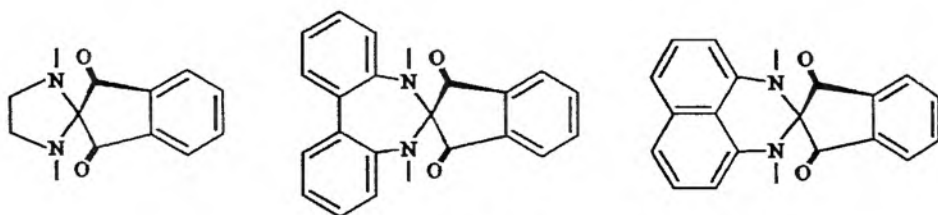
Spirokoniugacja jest szczególnym przypadkiem homokoniugacji polegającej na przenikaniu się orbitali p atomów oddzielonych od siebie przez atom izolujący. W wypadku spiranów, w których cztery orbitale p rozmieszczone są wokół węzłowego atomu węgla o geometrii tetraedrycznej, nakładanie się dwóch orbitali leżących w różnych płaszczyznach sięga zaledwie 20% wartości wyznaczonej dla dwóch sąsiadujących ze sobą orbitali w planarnym układzie π -elektronowym. Spirokoniugacja odgrywa ważną rolę w wysokoenergetycznych stanach cząsteczki. W widmie UV/VIS spiranów, w których występuje zjawisko spirokoniugacji, obserwuje się charakterystyczne przesunięcie maksimum absorpcji spiranu konstytucyjnie symetrycznego w stosunku do jednostki „monomerycznej” [7–9]. Zmienia się również rozkład gęstości elektronicznej w cząsteczce w ten sposób, że jeden z pierścieni zyskuje charakter donora, a drugi akceptora elektronów. Delokalizacja elektronów spowodowana spirokoniugacją jest także przyczyną dużej trwałości następujących jonów i dwu-rodników [10, 11], (schemat 1).

Mimo że zjawisko spirokoniugacji obserwowane było w wielu różnych układach [12, 13], to dopiero Maslak na początku lat dziewięćdziesiątych doniósł o praktycznym znaczeniu tego efektu [14, 15]. Odkrył on mianowicie



Schemat 1

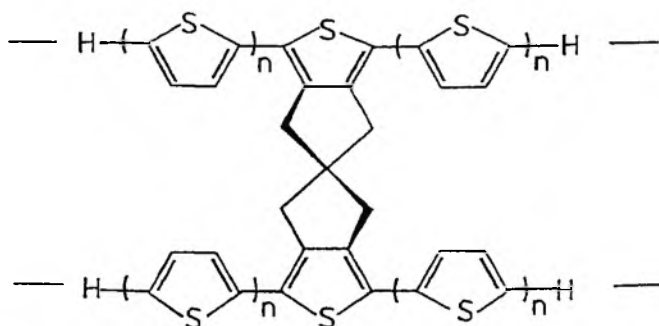
nową klasę farb organicznych typu *charge-transfer*, w których akceptor i donor są ze sobą spirokoniugowane. Stosunkowo słaba „trójwymiarowa” koniugacja pozwala na niezależne sterowanie donorem i akceptorem, co umożliwiła uzyskiwanie materiałów o zaplanowanych wcześniej właściwościach. W przedstawionym przykładzie akceptorem jest indanodionowa część związku, donorem natomiast podstawiona diamina (schemat 2). Połączenie *spiro* pozwala na



Schemat 2

oddziaływanie przez przestrzeń wolnej pary elektronowej atomu azotu i orbitalu p atomu węgla grupy karbonylowej. Jeśli symetria LUMO akceptora jest taka sama jak symetria HOMO donora, to nakładanie się orbitali prowadzi do spirokoniugacji. W tym wypadku energia HOMO jest obniżona, a LUMO podwyższona w porównaniu do separowanych części połączenia spiranowego. Dodatkowo, charakter orbitali ulega „wymieszaniu”, tzn. HOMO ma pewną gęstość elektronową na części indanodionowej, a LUMO ma niezerowy współczynnik orbitalu p na aminie. Przejście HOMO-LUMO typu *charge-transfer* powinno być dozwolone we wszystkich wypadkach [16].

Na szczególną uwagę zasługują spirany wykorzystywane w elektronice do otrzymywania przewodników komórkowych, w których jednostką przewodzącą jest cała cząsteczka [17], (schemat 3).

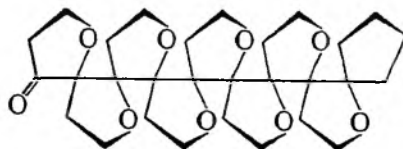


Schemat 3

Od roku 1992 na znaczną skalę stosuje się spirobis(2,4-benzodioxepinę) jako środek polepszający parametry sprężystości polimerów, bez wpływu na ich właściwości termiczne [18].

HELIKALNOŚĆ SPIRANÓW

Helikalność jest własnością strukturalną, dzięki której ułożenie atomów może być opisane jako złożenie translacji i rotacji [19]. Cząsteczka taka charakteryzuje się helikalną, śrubową osią i skokiem śrubowym (stosunek cech osiowo-liniowych do kątowych). Jeżeli promień helisy jest stały, to mamy do czynienia z helisą cylindryczną, gdy się zmienia – ze stożkową. Również spiranowe połączenia mogą być rozumiane jako związki o budowie helikalnej, przy czym fakt ten jest konsekwencją ich chiralności [20].

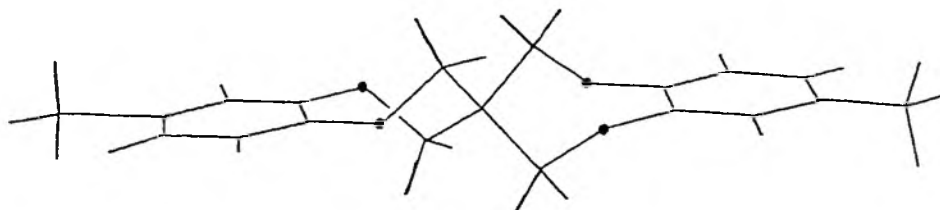


Schemat 4

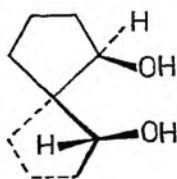
Przedstawiony system (schemat 4) składa się głównie z pierścieni tetrahydrofuranowych, ułożonych helikalnie wzdłuż osi cząsteczki, co ustalono na podstawie badań rentgenowskich. Niektórzy autorzy łączą występowanie hipochromizmu z helikalnością pewnych układów spiranowych, przypisując im konformację helikalną jako dominującą przy pojawieniu się znacznych odstępstw od addytywności absorpcji w zakresie promieniowania UV/VIS. Potwierdzenie tej tezy dla spiranów przedstawiono w 1992 r. [21] na podstawie badań krystalograficznych oraz dichroizmu kołowego.

Zjawisko hipochromizmu zaobserwowano w wypadku 3,3'-spirobis(3,4-dihydro-2H-1,5-[3''-metylo]benzodioxepenu), dla którego zsyntetyzowano odpowiedni „monomer”. Porównując współczynniki ekstynkcji „dimeru” (spiranu) i „monomeru” stwierdzono występowanie hipochromizmu, co wskazuje wyraźnie na helikalną konformację wspomnianego układu spiranowego, w której pierścienie benzenowe ułożone są względem siebie koplarnie [22], (schemat 5).

Syntezy chiralnych układów o wysokiej czystości enancjomerycznej mają ogromne znaczenie ze względu na dużą liczbę chiralnych leków [23]. Otrzymano wiele *chiral auxiliaries* pochodzenia naturalnego i syntetycznych, ale pierwszy związek spiranowy przebadano pod tym kątem dopiero w 1992 r. [24]. Autorzy odnotowali wysoką enancjoselektywność *cis,cis(+)*spiro[4,4]nonan-1,6-diolu w reakcji redukcji fenyloalkilowych ketonów (schemat 6).



Schemat 5



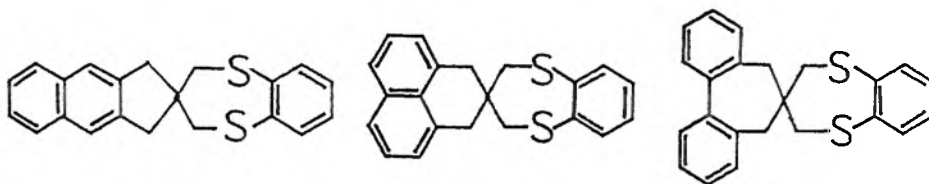
Schemat 6

TRANSMISJA KONFORMACYJNA W SPIRANACH

Określenie „transmisja konformacyjna”, opisujące przekazywanie napięć sterycznych do dalekich obszarów tej samej cząsteczki, zostało wprowadzone przez Bartona [25]. Dowodząc istnienia tego typu oddziaływań dalekiego zasięgu, Barton przeprowadził wiele doświadczeń ze steroidami. Wykazał on, że szybkość tworzenia się ich benzylidenowych pochodnych zmienia się w zależności od lokalizacji podstawnika lub podwójnego wiązania, odległych od centrum reakcji [26]. Wyniki badań różnych autorów [27] potwierdzają słuszność koncepcji Bartona, nieliczni natomiast tłumaczą to zjawisko prostymi oddziaływaniami indukcyjnymi [28]. W związku z tym, że zasięg efektu indukcyjnego poprzez więcej niż dwa wiązania jest mało prawdopodobny, część autorów posługuje się efektem pola elektrostatycznego. I tak np. Kollman [29], na podstawie metody CNDO/2 oraz danych z analizy widm rentgenowskich, obliczył rozkład gęstości elektronowej w kilku steroidach i stwierdził, że oddziaływanie dalekiego zasięgu determinowane są przede wszystkim przez transmisję konformacyjną. Model transmisji konformacyjnej został także użyty w wypadku systemów naturalnych: DNA i RNA [30], fosfolipidów [31], antytrombiny [32], a także fosforylowanych cukrów [33].

W ostatnich latach laboratorium Koole'a potwierdziło także istnienie transmisji konformacyjnej w różnych połączeniach zawierających trygonalnie bipiramidalny atom fosforu [34, 35]. Zjawisko transmisji konformacyjnej obserwowano także w spiranach, dowodząc jego istnienia na podstawie widm UV/VIS oraz NMR [36, 37]. Transmisja konformacyjna w tych związkach rozumiana jest jako przekazywanie napięcia pierścieni karbocyklicznych

znajdujących się po jednej stronie spiro-atomu do pierścienia heterocyklicznego drugiej części spiro-połączenia, który na skutek tego ulega deformacji, co powoduje w efekcie zmianę jego geometrii. Jeżeli obecne są tam chromofory, to mogą one w konsekwencji transmisji konformacyjnej zmienić położenie względem siebie. Efekt transmisji konformacyjnej obserwowany jest w serii konstytucyjnie niesymetrycznych spiranów, z których każdy zawiera siedmioczłonowy pierścień 1,5-benzoditiepiny [38], (schemat 7). Zmiana sytuacji sterycznej



Schemat 7

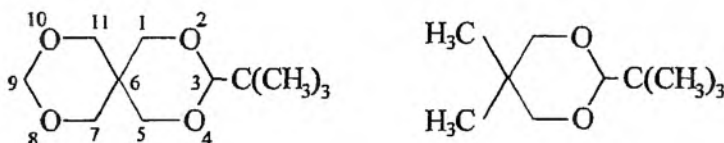
w części karbocyklicznej spiranów jest transmitowana poprzez spiro-atom do pierścienia 1,5-benzoditiepiny. Znajduje to swoje odzwierciedlenie w położeniu sygnałów grup metylenowych pierścienia heterocyklicznego w widmach $^1\text{H-NMR}$. Na podstawie analizy widm DNMR ustalono ponadto, że pierścień heterocykliczny w ostatnim połączeniu przyjmuje konformację *krzesłową* i *skręconej łodzi*. Stosunek populacji tych konformerów w temp. -90°C określono odpowiednio jako 2:1, a bariera interkonwersji wynosi 12,8 kcal/mol.

Wcześniejsze próby analizy konformacyjnej pierścieni oparte były na intuicji chemików, popartej modelami Dreidinga, i na obliczeniach mechaniki molekularnej. Intuicja nie zawsze jednak prowadzi do prawidłowych wniosków. Całkowicie niezależną metodykę analizy konformacyjnej oparto na bardzo udanej koncepcji hyperpowierzchni energii potencjalnej [39]. Hyperpowierzchnię energii potencjalnej oblicza się dla wszystkich symetrycznych i asymetrycznych minimów energii konformerów i stanów przejściowych. Minimum energii konformeru odpowiada minimom lokalnym, stany przejściowe natomiast „punktom siodłowym” na hyperpowierzchni energii potencjalnej. Przemiany konformacyjne mogą być zdefiniowane w sposób ściśle matematyczny na podstawie prac Tachibana i Fukui [40], co skierowało analizę konformacyjną na zupełnie nowe tory – szukania punktów siodłowych na hyperpowierzchniach energii potencjalnej, a nie tylko minimów lokalnych [41].

Saunders przedstawił metodę *random kick*, która może służyć do identyfikowania par minimów energii konformerów, które ulegają wzajemnej konwersji, nie identyfikując przy tym łączących je punktów siodłowych [42]. Kolosovary i Guida uważają, że pełne zrozumienie przestrzeni konformacyjnej (w której może zachodzić transmisja konformacyjna) wymaga identyfikacji całej sieci konformacyjnych przekształceń (NCI) w pewnym zakresie energii.

Zaproponowali oni jako podstawowe jednostki „NCI” bezpośrednio powiązane triady minimum – punkt siodłowy – minimum, które reprezentują pojedyncze przekształcenie konformacyjne. Autorzy lokalizowali punkty siodłowe na hyperpowierzchniach energii potencjalnej (MM2), używając różnych metod wyszukiwania konformacji (systematycznych i statystycznych) w połączeniu z minimalizacją energii newtonowskich [43].

Zjawisko transmisji konformacyjnej zaobserwowano także wcześniej w 3-*t*-butylo-2,4,8,10-tetraoksapiro[5,5]undekanie. W widmie $^1\text{H-NMR}$ w temperaturze -100°C występuje znaczne poszerzenie sygnału rezonansowego grupy *t*-butylowej w stosunku do sygnału identycznej grupy, ale w połączeniu nie zawierającym spiro-atomu [44]. Takie poszerzenie sygnału rezonansowego grupy *t*-butylowej autorzy przypisali zwolnionej rotacji tej grupy, spowodowanej transmisją konformacyjną (schemat 8).



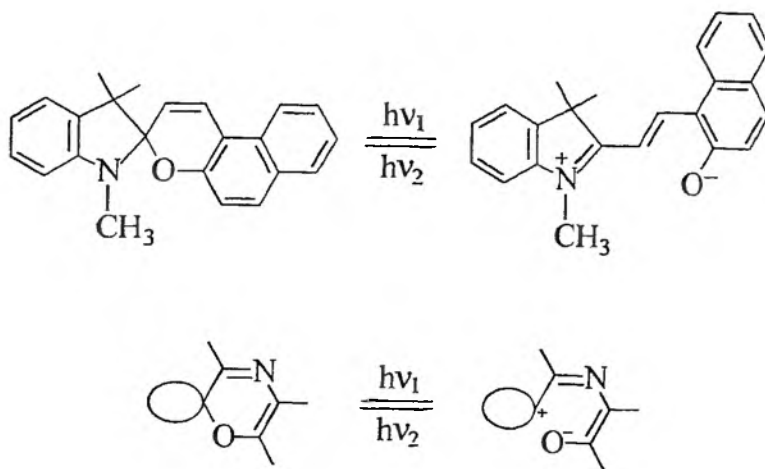
Schemat 8

Efekt transmisji konformacyjnej jest jednym z subtelnych oddziaływań sterycznych, często trudnym do zaobserwowania ze względu na nakładanie się z nim różnorodnych innych efektów elektronowych bądź sterycznych.

FOTOCROMIZM SPIRANÓW

Zjawisko fotochromii polega na odwracalnej zmianie barwy substancji chemicznej pod wpływem napromieniowania światłem o różnej długości fali. Od prawdziwej fotochromii należy odróżnić zmiany barwy niektórych związków organicznych dostrzegane wizualnie po napromieniowaniu, związków nie związanych z przejściem cząsteczki w nową odmianę o innych właściwościach spektralnych.

Spiropirany bądź spirooksazyny wzbudzają duże zainteresowanie w takich dziedzinach, jak: niesrebrna fotografia wysokorozdzielcza [45] oraz w różnych systemach optycznych i holograficznych [46]. Fotochromowe zachowanie spiropiranów jest oparte na odwracalności między bezbarwną, „zamkniętą” formą układu spiropiranu a barwną, „otwartą” strukturą merocyjaniny. Przez napromieniowanie spiranu światłem ultrafioletowym [$h\nu_1$] następuje rozerwanie wiązania między spiro-atomem węgla a atomem tlenu z utworzeniem merocyjaniny, która w świetle widzialnym [$h\nu_2$] tworzy znów formę „zamkniętą”. Podobny cykl przemian występuje dla układu spirooksazyny [47], (schemat 9).



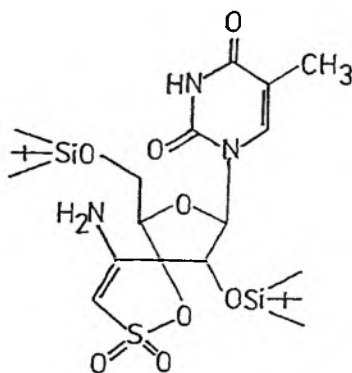
Schemat 9

Spirany wykazujące właściwości fotochemiczne stosowane są jako nieliniowe materiały optyczne, a badania nad fotochemią tego typu spiranów prowadzone są przez grupę badaczy włoskich [48].

SPIRANY AKTYWNE BIOLOGICZNIE

Mechanizm działania środków leczniczych jest zagadnieniem ogromnie złożonym. Pewną próbą uogólnienia tego problemu jest teoria receptorów, według której działanie farmakologiczne danego związku jest spowodowane połączeniem z odpowiednim receptorem. W takim ujęciu istotną rolę odgrywa przestrzenna struktura cząsteczki leku, niekiedy obecność spirokonfiguracji może ułatwić „dopasowanie się” tego leku do struktury receptora. Właśnie badania analogów 2'-metylo-spiro[1-aza-bicyklo[2.2.2]oktano-3,4'-[1,3]-dioksolanu] prowadzone były pod kątem ich przydatności w leczeniu choroby Alzheimera i choć nie wykazały one spodziewanej aktywności, to jednak wniosły wiele nowego do wyjaśnienia mechanizmów działania leków [49]. W ostatnich latach uzyskano nową klasę połączeń spiranowych TSAO, które wykazały działanie spowalniające rozwój wirusa HIV-1. Jeden z tych związków nazwany w skrócie (*R*)(*ribo*) TSAO-T przedstawiono na schemacie 10.

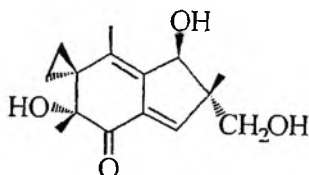
Należy dodać, że jedynie spirany o konfiguracji *ribo* wykazują aktywność antywirusową. Działanie tego inhibitora jest wysoce selektywne i obecność ugrupowania spiranowego odgrywa w nim znaczącą rolę [50, 51]. TSAO nie zmieniają ponadto aktywności innych inhibitorów HIV-1 i dlatego mogą z nimi działać jednocześnie [52].



(R)(ribe) TSAO-T

Schemat 10

Na uwagę zasługuje także duża grupa antybiotyków spiranowych. Najbardziej znana jest gryzeofulwina, wyodrębniona z grzybnia *Penicillium griseofulvum*, a także szereg jej pochodnych [53]. Większość antybiotyków tego typu zawiera pierścień oksiranyowy, rzadziej cyklopentanowy bądź furanowy lub cyklopropanowy. Niektóre z nich, jak np. iludyna S, wykazują działanie cytostatyczne [54], (schemat 11). Ważną rolę w medycynie odgrywają „spiranowe



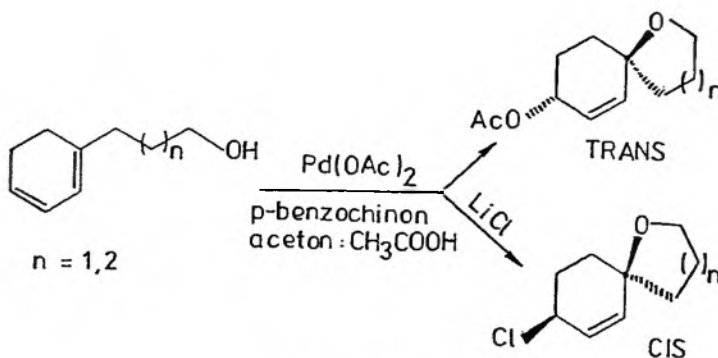
Schemat 11

steroidy”, które znalazły zastosowanie w kardiologii przy leczeniu hipertropii [55]. Interesujące badania Moriego [56] nad feromonami seksualnymi owadów (muszek owocowych, zwanych *olive fruit fly*) dotyczą chiralnych spiranów wywodzących się z 1,7-dioksaspiro[5.5]undekanu. Biosyntezowane przez te owady enancjomery (-)-(R) oraz (+)-(S)-oleanu mają różną aktywność biologiczną; pierwszy wabi osobniki męskie, a drugi – osobniki żeńskie.

W przedstawionym opracowaniu celowo pominięto zagadnienie syntezy połączeń spiranowych w formie osobnego rozdziału. Można przecież wyróżnić wiele interesujących, często wieloetapowych przemian prowadzących do układów spiranowych. Wspomnimy tylko o addycji karbenu do egzocyklicznych olefin, wykorzystaniu różnych reakcji cykloaddycji, kondensacji Dieckmanna czy też reakcji odpowiednich *bis-* lub *tetrakis-*bromometylopo pochodnych węglowodorów [57–60] z różnymi diolami i ditiolami. Omówienie więk-

szości wspomnianych procesów znaleźć można w cytowanym piśmiennictwie.

Sądzymy, że na szczególną uwagę zasługuje opracowana w 1992 r. [61] metoda otrzymywania układów spiranowych w wyniku 1,4-cykloaddycji na katalizatorze palladowym z zachowaniem pełnej kontroli stereochemicznej (schemat 12). Łatwo zauważyć, że izomer *cis* powstaje w obecności chlorku litu, układ *trans* natomiast tworzy się w identycznych warunkach bez dodatku tej soli.



Schemat 12

W zakończeniu pozwolimy sobie zauważyć, że choć do dzisiaj nie wyjaśniono w pełni „fenomenu” spiro-atomu, to jednak stan naszej wiedzy o roli tego atomu w spiranach został poszerzony.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] W. H. Mills, C. K. Nodder, *J. Chem. Soc.*, 1920, 7, 1410.
- [2] M. A. Manzhen, *Int. J. Polym. Mat.*, 1992, 18, 1.
- [3] M. J. Perez, A. San-Felix, M. J. Camarasa, J. Balzarini, E. De Clercq, *Tetrahedron Lett.*, 1992, 33, 3029.
- [4] D. Ginsburg, *Top. Curr. Chem.*, 1987, 137, 1.
- [5] M. Jamrozik, J. Jamrozik, *J. prakt. Chem.*, 1986, 328, 327.
- [6] K. Ogawa, M. Kaji, H. Kagawa, M. Sagawa, A. Kakuta, *Acta Cryst. C.*, 1994, 50, 95.
- [7] S. Smoliński, J. Nowicka, J. Mokrosz, M. Jamrozik, M. Jaworski, E. Wiekiera, *Tetrahedron*, 1977, 33, 1219.
- [8] S. Smoliński, *Spirochromans, Chromans and Tocopherols*, Wiley, 1981.
- [9] S. Smoliński, J. Jamrozik, M. Jamrozik, *Monatsh. Chem.*, 1977, 108, 1145.
- [10] H. Durr, R. Gleiter, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1978, 17, 559.
- [11] M. F. Semmelhack, R. J. De Franco, *J. Am. Chem. Soc.*, 1972, 94, 22.
- [12] A. Riemann, R. W. Hoffmann, J. S. Larsen, R. Gleiter, *Chem. Ber.*, 1985, 118, 1000.
- [13] S. Smoliński, M. Bałazy, H. Iwamura, T. Sugawara, Y. Kawada, M. Iwamura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1982, 55, 1106.
- [14] P. Maslak, A. Chopra, *J. Am. Chem. Soc.* 1993, 115, 9331.
- [15] P. Maslak, M. P. Augustine, J. D. Burkey, *ibid.*, 1990, 112, 5359.

- [16] S. Nagagura, *Excited States*, Academic Press, New York 1975, 2, 321.
- [17] J. M. Tour, R. Wu, J. S. Schumm, *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, 112, 5662.
- [18] F. Sanda, T. Takata, T. Endo, *Makromol.*, 1993, 26, 737.
- [19] R. S. Cahn, C. Ingold, V. Prelog, *Angew. Chem.*, 1966, 78, 413.
- [20] H. Dodziuk, *J. Chem. Soc., Perkin Trans 2*, 1986, 249.
- [21] J. Grochowski, M. Rutkowska, B. Rys, P. Serda, G. Snatzke, *Chem. Ber.*, 1992, 125, 1837.
- [22] J. Jamrozik, S. Schab, K. Nagraba, *Monatsh. Chem.* 1994, 125, 451.
- [23] A. Danysz, Z. Kleinrok, *Podstawy farmakologii*, Wydawnictwo Volumed, Wrocław 1996.
- [24] N. Srivastava, A. Mital, A. Kumar, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1992, 493.
- [25] D. H. K. Barton, *J. Chem. Soc.*, 1957, 935.
- [26] D. H. K. Barton, *ibid.*, 1960, 1297.
- [27] N. L. Allinger, G. A. Lane, *J. Am. Chem. Soc.*, 1974, 96, 2937.
- [28] P. E. Petersen, *Tetrahedron Lett.*, 1963, 181.
- [29] P. Kollman, D. D. Gianini, W. L. Duax, S. Rothenberg, M. E. Wolff, *J. Am. Chem. Soc.*, 1973, 95, 2869.
- [30] L. H. Koole, M. H. P. van Genderen, H. M. Buck, *J. Org. Chem.*, 1988, 53, 5266.
- [31] G. H. Meulendijck, J. W. de Haan, M. H. van Genderen, H. M. Buck, *Eur. J. Biochem.*, 1989, 182, 531.
- [32] P. G. Gettings, B. Fan, B. C. Crews, J. V. Turko, *Biochemistry* 1993, 32, 8385.
- [33] N. K. De Vries, H. M. Buck, *Rect. Trav. Chim. Pays-Bas*, 1986, 105, 150.
- [34] N. L. Broeders, L. H. Koole, H. M. Buck, *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, 112, 7475.
- [35] L. H. Koole, E. A. Olders, M. Opresnik, H. M. Buck, *Rect. Trav. Chim. Pays-Bas*, 1990, 109, 55.
- [36] S. Smoliński, G. Kinyua, *Tetrahedron*, 1971, 27, 265.
- [37] S. Smoliński, M. Paluchowska, *Monatsh. Chem.*, 1980, 111, 413.
- [38] J. Jamrozik, S. Schab, *ibid.*, 1994, 125, 1145.
- [39] D. Heidrich, W. Kliesch, W. Quapp, *Properties of Chemically Interesting Potential Energy Hypersurfaces*, Berlin 1991.
- [40] K. Fukui, *Acc. Chem. Res.*, 1981, 14, 363.
- [41] F. A. L. Anet, *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, 112, 7172.
- [42] M. Saunders, *J. Comput. Chem.*, 1991, 12, 645.
- [43] I. Kolosvary, W. C. Guida, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, 115, 2107.
- [44] A. Greenberg, P. Laszalo, *Tetrahedron Lett.*, 1974, 2355.
- [45] A. S. Kholmanskii, V. M. Dynmaev, *Russ. Chem. Rev.* 1987, 56, 136.
- [46] D. G. Milles, P. D. Lamb, K. W. Rhee, C. S. Johnson, *J. Phys. Chem.*, 1983, 87, 4815.
- [47] S. Tamura, N. Asai, J. Seto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1989, 62, 358.
- [48] G. Favaro, F. Masetti, U. Mazzucato, G. Ottavi, P. Allergini, V. Malatesta, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 1994, 90, 33.
- [49] G. Nordvall, S. Sundquist, G. Glas, A. Gogoll, L. Nilvebrant, U. Hacksell, *J. Med. Chem.*, 1992, 35, 1541.
- [50] M. J. Camarasa, M. J. Perez, A. San-Felix, J. Balzarini, E. De Clercq, *J. Med. Chem.*, 1992, 35, 2988.
- [51] J. Balzarini, L. Naesens, C. Bohman, M. J. Perez, A. San-Felix, M. J. Camarasa, E. De Clercq, *Biochemical Pharmacology*, 1993, 46, 69.
- [52] R. Pauwels, K. Andries, J. Desmyter, D. Schols, M. J. Kukla, H. J. Breslin, A. Raeymaeckers, J. Van Gelder, R. Woestenborghs, J. Heykants, K. Schellekens, M. A. C. Janssen, E. De Clercq, P. A. J. Janssen, *Nature*, 1990, 343, 746.
- [53] L. Hegeman, S. Toso, K. Lahijani, *J. Invest. Dermat.* 1993, 100, 343.
- [54] T. C. McMorris, M. J. Keiner, W. Wang, L. A. Estes, M. A. Mantoya, R. Taetle, *J. Org. Chem.*, 1992, 57, 6876.

- [55] C. G. Brilla, L. S. Matsubara, K. T. Weber, *Am. J. Cardiol.* 1993, **71**, 124.
[56] K. Mori, T. Uematsu, K. Yanagi, M. Minobe, *Tetrahedron*, 1985, **41**, 2751.
[57] S. Smoliński, J. Jamrozik, *Tetrahedron*, 1975, **31**, 1237.
[58] S. Smoliński, J. Jamrozik, M. Jamrozik, *Monatsh. Chem.*, 1977, **108**, 1145.
[59] J. Jamrozik, *J. prakt. Chem.*, 1985, **327**, 1033.
[60] M. Jamrozik, J. Jamrozik, *J. prakt. Chem.* 1986, **328**, 1986.
[61] J. E. Baeckvall, P. G. Anderson, *Pure Appl. Chem.*, 1992, **64**, 429.

Praca wpłynęła do Redakcji 2 września 1997

**METODY IMMUNOENZYMATYCZNE
W ANALIZIE ANTYBIOTYKÓW
W PRODUKTACH ŻYWNOŚCIOWYCH**

**IMMUNOENZYMATIC METHODS
FOR ANALYSIS OF ANTIBIOTICS
IN FOOD PRODUCTS**

Urszula Kucharska, Joanna Maślowska

*Instytut Podstaw Chemii Żywności, Politechnika Łódzka,
ul. B. Stefanowskiego 4/10, 90-924 Łódź*

Abstract

Wstęp

1. Teoretyczne podstawy metod immunochemicznych
2. Metody immunometryczne
3. Metody immunologiczne w ocenie żywności
4. Antybiotyki w żywności a ustawodawstwo zdrowotne dotyczące żywności
5. Oznaczanie antybiotyków w żywności
6. Potencjał i korzyści użycia metod immunoenzymatycznych

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

ABSTRACT

Antibiotics constitute a group of chemical compounds which arouse extreme excitement — in some cases great expectations and in others fear, anxiety and dismay. Such a situation is due to the observed effects of their action within the sphere of human life. Dosages of these chemicals may be regarded as indispensable and advantageous during medical treatment or as hazardous when overdosed. Antibiotics and antimicrobiological compounds constitute often toxic residuals in food. Due to a wide use of antibiotics as prophylactic measures in the breeding of animals which are the raw material base for the manufacture of food products, and the use of these compounds as food additives to prolong food stability and its life, there is a search going on to find out methods for determination and analysis of speciation of their trace quantities.

A valuable and large group of diagnostic methods with potential possibilities and significance in such analyses consists of immunometric methods [1–7]. Generally, these methods are based on selective reactions of complex formation between antibodies and antigens or haptens which have developed a specific antibody in vertebrates organisms [1–4, 6]. The results of immunochemical reactions depend on many factors such as the type of sorbent, size of active surface, kind of marker, specificity of the formed bonds directly or indirectly affecting the kinetics and physico-chemistry of the serologic process (precipitation or agglutination), [2–7, 16–18]. The use of immunodiagnosis as a method of food analysis results in a considerable lowering of detection and determination thresholds of many substances [8–15].

Known immunological methods can be successfully used not only for the evaluation of antibodies [2–4, 13–18], hormones [19–23], autoantigens [24], but also for the determination of the nutritious components of food [25–28], proteins [29–43], vitamins [44, 45] as well as toxic bacterial, mycotic and mould residues [48–54], antibiotics [55–61], alkaloids [62, 63] and pesticides [64–70]. These methods can be utilized for analyses of final products as well as intermediates and raw materials, including the assessment of specified technological processes [71–79]. Their use makes it possible to lower the detection and determination thresholds of the compound under analysis [80–84, 134–136].

Stored food products give rise to the formation of antibiotics under the influence of present or developing microflora [91–103]. The hitherto used methods for the determination of antibiotics include mainly various chromatographic procedures such as HPLC [101–110], GC [106, 111–115], P & TLC [116, 117], MS [118–123], or enzymatic methods. All these methods have been recognized as sensitive and satisfying the requirements of analysts [124–127]. However, their general utilization is relatively low due to expensive apparatus and equipment required. Therefore, in order to improve the sensitivity of deter-

mination and to reduce the costs of analyses, in the seventies analysts started to use thin-layer or column chromatography in combination with enzymatic or immunochemical reactions [128–133]. At present, penetrating research is going on in analytics to use widely proteins and not only enzymatic ones [1–7, 13, 16–18].

The properties of specific proteins can be used in analytics as agents which either directly or indirectly form selective complexes with the component of the compound under analysis. To provide good and effective monitoring of such reactions, one of the serologic reaction components is marked with isotopic tracer (^{115}J , ^3H , ^{57}Co , ^{14}C), fluorochromes (fluorescein isothiocyanate, rhodamine B isothiocyanate), enzymes (peroxidase, alkaline phosphatase, glucose oxidase, urease) or colloidal gold [1–7, 134–136]. In addition, there is used an avidin-biotin system, with antibodies being marked with biotin and enzymes with avidin. Such an extension of biomolecule application increases the sensitivity of the antibody-antigen reaction by increasing the number of addition sites on biotinylated antibodies.

Among the immunometric methods, the highest effectiveness is shown by immunoenzymatic methods which may have a wide application due to the simplicity of their use. The effectiveness of such an analysis depends on the stage of sample preparation being dependent, in turn, on the immunometric method selected. Then, the processes of sample preparation for analysis are different accordingly. In most cases the sample preparation is based on extraction with organic solvents to remove homogenates of samples under analysis [61]. It is a significant point of any analysis to consider the procedures of speciation examination [137–140]. Thus, the choice of immunometric methods, as those with a high specificity, to that end seems to deserve recommendation.

The present paper reports the results of comparison of methods for the determination of antibiotics in food products of animal origin. The multidirectional comparison of properties, characteristics and values of various chromatographic methods: HPLC, GC, P & TLC and GC-MS with various immunometric methods has clearly resulted in the benefit of immunoenzymatic methods. The best results in terms of technical development are obtained by the immunoenzymatic method ELISA [2–4, 7, 15–17, 71–74, 83, 84, 138–140]. This is due not only to its high specificity, detectability, sensitivity, but also to the short time of analysis, possibility of multiple repetitions under the same testing conditions, simple equipment and personnel requirements as well as low costs of determination.

WSTĘP

Jednym z istotnych elementów analizy wszystkich artykułów żywnościowych jest szybkie i prawidłowe postawienie diagnozy. W praktyce w większości wypadków proces diagnostyczny w dużym stopniu opiera się na ocenie wyników badań laboratoryjnych. Wśród nich coraz więcej miejsca zajmują metody badawcze oparte na reakcjach enzymatycznych oraz immunochemicznych. Zamiana jednych metod diagnostycznych na inne zawsze prowadzi do pytania, jakie korzyści i walory mają nowe metody w stosunku do metod dotychczasowych. Aby w pełni odpowiedzieć na tak postawione pytanie, należy w pierwszej kolejności poznać potencjał i możliwości nowych metod, w tym wypadku metod immunometrycznych.

W analizie antybiotyków w żywności spotyka się wiele rozmaitych problemów wynikających z niewielkich, śladowych ich ilości, najczęściej jako pozostałości. Ponadto problemy analityczne związane są z efektami zmian metabolicznych antybiotyków, jakim one już uległy w organizmach zwierząt rzeźnych. Inne dodatkowe problemy związane są bezpośrednio z samym procesem ekstrakcji antybiotyków z próbek rzeczywistych poddanych analizie.

1. TEORETYCZNE PODSTAWY METOD IMMUNOCHEMICZNYCH

Nazwa immunologia pochodzi od słowa *immunitas* i oznacza odporność na zakażenia nabyte w wyniku kontaktu z zarazkami. Należy jednak odróżnić ten rodzaj odporności wrodzonej na infekcje lub czynniki szkodliwe, która ściśle jest związana ze słowem *resistentio*. Odporność rozwija się w organizmie kręgowców, w szczególności stałocieplnych, jako odpowiedź na wniknięcie do ustroju antygeny. Słowo *antygen* nie ma nic wspólnego z popularnym dziś *genem*, a zostało stworzone jako skrót dwóch słów *anticorporis generator*, co oznacza coś, co rodzi (tworzy) przeciwciała [1–5].

Odpowiedź organizmu jest bardzo swoista, dotyczy wyłącznie tego antygeny, który ją wywołał. Przeciwciała (immunoglobulina), białko wytworzone przez organizm w tej odpowiedzi, reaguje też tylko z antygenem, jaki spowodował jego powstanie; immunogenami są więc wszelkie substancje, które wprowadzone do organizmu, zasadniczo drogą pozajelitową, wywołują w nim odpowiedź odpornościową w postaci tworzenia swoistych przeciwciał [4–7]. Właściwości antygenowe mają białka, węglowodany, a nawet, choć słabo wyrażoną, kwasy nukleinowe. Antygeny mogą występować w postaci rozpuszczonej lub jako część struktur wirusów, bakterii, pierwotniaków, grzybów oraz komórek tkankowców [1, 5, 6].

Swoistość biologiczna enzymów nie zależy od całej sekwencji aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym, a od rodzaju i przestrzennego układu kilku aminokwasów w aktywnym centrum enzymu. Podobnie swoistość antygeny

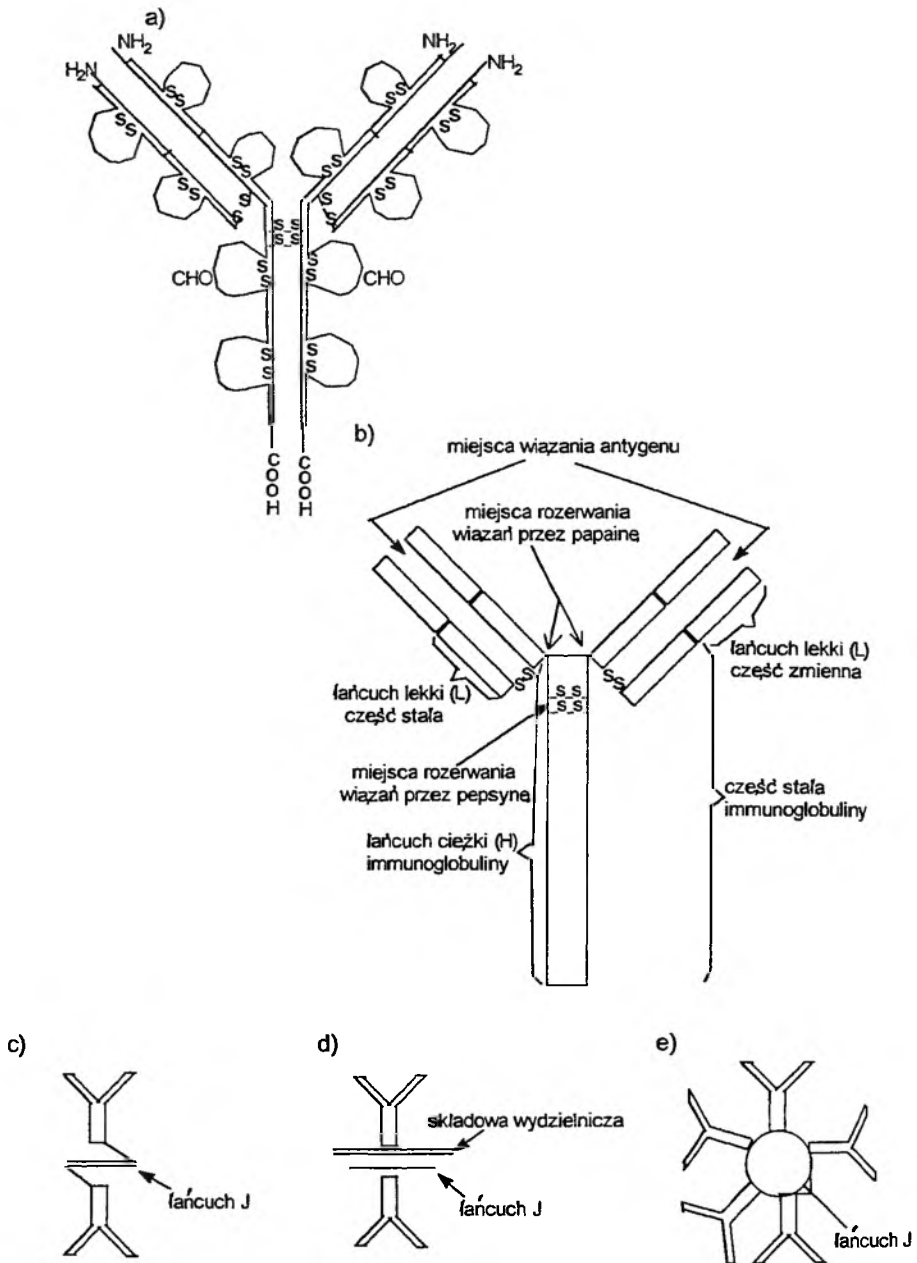
związana jest tylko z małą częścią cząsteczki, nazywaną determinantą antygenową. W białkach determinantami (liniowe lub konformacyjne) antygenowymi są grupy aminokwasów bądź to określone sekwencjami, bądź też odpowiednio ułożone wzajemnie na powierzchni cząsteczki białka.

W wielocukrach są to określone cukry proste, a w kwasach nukleinowych są to przestrzenne układy zasad azotowych. Znane są też determinanty sztuczne, wprowadzone do cząsteczki białka przez eksperymentatora, np. przyłączenie atomów jodu lub kwasu diazobenzosulfonowego do tyrozyny, wytwarza nową determinantę [1, 4–6]. Determinanta i cząsteczka z nią związana często wykazują zdolność do reagowania ze swoistym przeciwciałem, ale sama nie połączona uprzednio z białkiem nie jest zdolna do pobudzenia organizmu do wytworzenia przeciwciała. Takie substancje o częściowo wyrażonych cechach antygenowych, reagujące z przeciwciałami, nie indukujące ich wytworzenia, nazywane są *haptenami*. Haptenami są nie tylko sztuczne determinanty. Wiele antygenów węglowodanowych i kwasów nukleinowych to w istocie hapteny, które kojarzyć się mogą z białkami już po wprowadzeniu do organizmu. Dopiero po takim związaniu z białkami stają się pełnymi antygenami [1, 5, 6].

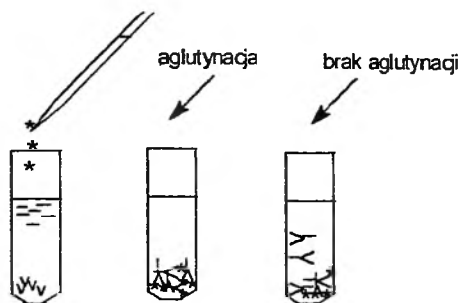
Przeciwciała są białkami złożonymi z kilku łańcuchów polipeptydowych, białkami o charakterze globulin, występującymi w osoczu krwi. Ich właściwością charakterystyczną jest łączenie się ze swoistym dla nich antygenem. Wyróżniono szereg przeciwciał, które różnią się budową. Wszystkie zawierają łańcuch lekki i łańcuch ciężki połączone wiązaniami disulfidowymi (rys. 1). Na skutek takiej odmienności przeciwciała reaguje wyłącznie ze swoistym dla siebie antygenem. Reakcje antygen-przeciwciała wykorzystywane są w immunometrii [1–4].

Jeśli rozporządzamy znanym (określonym) przeciwciałem, możemy rozpoznać swoisty dlań antygen, nawet gdy występuje w śladowych ilościach w mieszaninie z innymi substancjami. Odwrotnie, gdy rozporządzamy określonym antygenem, możemy stwierdzić obecność swoistego przeciwciała w próbie badanej [1–4, 6]. Znanych jest wiele typów reakcji antygen-przeciwciała, jednakże najczęściej wykorzystywane są: aglutynacja, precypitacja i wiązanie dopełniacza (komplementu). Charakter tych reakcji zależy od stanu fizykochemicznego używanego antygeny.

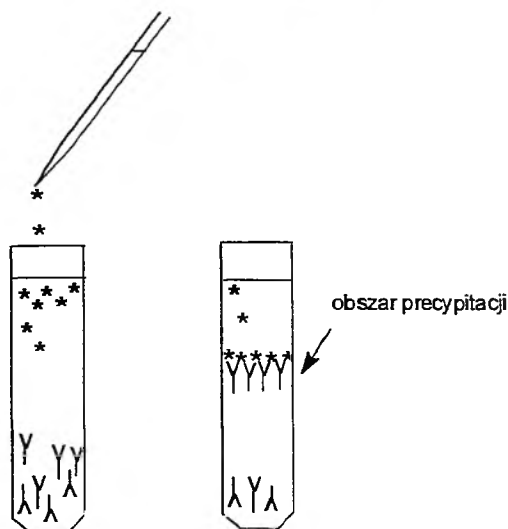
Zmieszanie z surowicą antygeny prowadzi do zlepiania, czyli *aglutynacji* (rys. 2). Reakcja ta przebiega dwufazowo. W pierwszej fazie następuje wiązanie aglutynogenu z przeciwciałem, a w drugiej, która zachodzi w obecności elektrolitów, następuje wypadanie z roztworu powstałych kompleksów w postaci dobrze widocznych agregatów (aglutynatów). Czynniki niezwykle istotnymi w tej reakcji są własności samego antygeny: wielkość cząsteczki, rodzaj determinant antygenowych, ich liczba i umiejscowienie, gęstość ładunku powierzchniowego, który ma duży wpływ na przebieg drugiej fazy reakcji.



Rys. 1. Schemat ilustrujący budowę globulin: a) aktywne ugrupowania wiążące w immunoglobulinach, b) układ łańcucha ciężkiego (H) i lekkiego (L) oraz miejsc hydrolizowanych przez papainę i pepsynę, c) dimer surowiczej immunoglobuliny IgG, d) dimer wydzielniczej immunoglobuliny IgA, e) pentamer immunoglobuliny IgM



Rys. 2. Schemat reakcji aglutynacji



Rys. 3. Schemat reakcji precipitacji

Surowica nawarstwiona na rozpuszczony antygen tworzy strąć przeciwciała z antygenem, zwany precipitatem, a reakcję oznacza się wtedy terminem *precypitacja* (rys. 3). Reakcja precypitacji również przebiega w dwóch etapach. W pierwszym etapie powstaje hydrofobowy kompleks antygen-przeciwciało. Proces ten jest wynikiem interakcji różnych determinant antygenowych danego antygeny z przeciwciałem o różnej swoistości. W drugim etapie utworzony kompleks antygen-przeciwciało pod wpływem elektrolitów obecnych w środowisku reakcji zostaje wytrącony w postaci strątu widocznego jako zmętnienie środowiska. Aby powstały precipitat stał się widoczny, musi utworzyć się bardzo duża sieć przestrzenna złożona z dużej liczby cząsteczek antygeny i przeciwciała, czyli występuje konieczność stosowania wysokich stężeń obu reagentów.

W surowicach kręgowców znajduje się zespół białek zwany *dopełniaczem*, czyli komplemtem. Komplemtem składa się z 20 białek, z których dwa są

ciepłochwiejne i ulegają inaktywacji przy podgrzaniu. Dopełniacz nie jest swoisty i sam nie wykazuje zdolności do reagowania z antygenem. Łączy się natomiast z uprzednio wytworzonym kompleksem antygeny ze swoistym przeciwciałem. Po takim połączeniu dopełniacz wywiera określony wpływ na antygen. Jeśli kompleks przeciwciało-antygen został utworzony przez antygen, np. komórkę bakteryjną lub krwinkę czerwoną (erytrocyt), dochodzi do rozpuszczenia, czyli lizy komórki. Zjawisko hemolizy immunologicznej jest podstawą odczynu wiązania dopełniacza. Odczyn wiązania dopełniacza ma szerokie zastosowanie praktyczne. Efekty zależą jednakże od temperatury reakcji, czasu inkubacji, obecności elektrolitów, zastosowanych stężeń reagentów oraz od wielkości powstałego kompleksu.

Siły wiążące kompleks przeciwciało-antygen są zupełnie takie same, jak między enzymem a jego substratem. Antygen bardzo precyzyjnie pasuje do miejsca wiążącego przeciwciała, tak że po związaniu pozostaje solidnie unieruchomiony na swoim miejscu bez żadnej swobody ruchów. Reakcja między przeciwciałem a antygenem jest, jak już wspomniano, bardzo swoista. Przeciwciało reaguje tylko z antygenem, pod którego wpływem zostało wytworzone przez zwierzę. Nawet mała różnica w budowie dwóch antygenów, nieraz bardzo trudna do wykrycia lub wręcz niewykrywalna, wystarcza, aby antygeny te powodowały powstanie dwóch różnych przeciwciał, reagujących tylko z sobie swoistym antygenem [1, 3, 4].

W tak bardzo swoistych reakcjach immunologicznych analitycy znaleźli narzędzie odróżniania i identyfikacji drobnoustrojów lub związków chemicznych, nawet wówczas, gdy badania morfologiczne i chemiczne nie pozwoliły na wykrycie różnic między drobnoustrojami czy obecnością substancji analizowanej [1-7].

2. METODY IMMUNOMETRYCZNE

Immunodiagnostyka jako jeden z najnowszych działów nauki, zajmujący się opracowywaniem i stosowaniem metod opartych na reakcjach immunologicznych, zyskuje obecnie powszechne zastosowanie nie tylko w praktyce klinicznej [2, 3, 6] do:

- oceny stanu czynnościowego układu immunologicznego i układów wtórnych włączonych w odpowiedź immunologiczną,
- diagnostyki chorób zakaźnych i inwazyjnych,
- określenia antygenów zgodności tkankowej (HLA) w transplantologii i transfuzjologii,
- ustalania grup krwi, co jest istotne w hematologii, transfuzjologii i transplantologii,
- oznaczania poziomu wielu białek w płynach ustrojowych.

Stosuje się te metody również w w badaniach naukowych i aplikacyjnych, w tym m.in. do oceny jakości żywności w testach określających zawartość:

- a) białka obcego (niezgodnego z recepturą w zafalszowaniach żywności);
- b) białka niepożądanego (żywność dietetyczna);
- c) środków alergicznych naturalnych i obcych;
- d) antybiotyków i innych związków antymikrobiologicznych;
- e) pestycydów i insektycydów;
- f) substancji toksycznych (fenoli, kancerogennych amin i węglowodorów aromatycznych) itp.

Obecnie nauka ta dysponuje całą gamą różnorodnych metod immunometrycznych. Zdecydowana większość poznanych testów oparta jest na reakcji antygenu ze swoistym przeciwciałem (skierowanym przeciwko danemu antygenowi). Do tej grupy testów należą:

- odczyny precypitacji pierścieniowej, szkiełkowej, flokulacyjnej;
- odczyny immunodyszufji: pojedyncza i podwójna próbówkowa, płyt-kowa (PDA) oraz nefelometria;
- techniki immunoelektroforezy: wg metody Schneideggera, wg metody Laurella, przeciwprądowa, krzyżowa i *western blotting*;
- odczyny aglutynacyjne: aglutynacja bezpośrednia (czynna) szkiełkowa i próbówkowa (typu H, O lub V), aglutynacja pośrednia (bierna);
- odczyn lateksowy, odczyn hemaglutynacji, odczyn hamowania hema-glutynacji, odczyn antyglobulinowy bezpośredni i pośredni (RF, test Wader-go-Rosego);
- odczyn wiązania dopełniacza (OWD);
- odczyn antystreptolizynowy (ASO);
- metody immunometryczne z zastosowaniem znaczników.

Metody immunometryczne z użyciem znaczników ze względu na rodzaj użytego znacznika dzielą się na:

- immunofluorymetryczne (FIA — *Fluorescent Immunoassay*):
 - a) kompetycyjne,
 - b) pośrednie,
 - c) kanapkowe;
- radioimmunologiczne (RIA — *Radioimmunoassay*):
 - a) kompetycyjne,
 - b) bezpośrednie (Farra);
- immunoradiometryczne (IRMA):
 - a) test RAST (*Radioallergosorbent*),
 - b) test RIST (*Radioimmunosorbent*);
- immunoenzymatyczne (EIA — *Enzyme Immunoassay*):
 - a) bezpośrednia reakcja immunoenzymatyczna,
 - b) pośrednia reakcja immunoenzymatyczna,
 - c) test ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*),

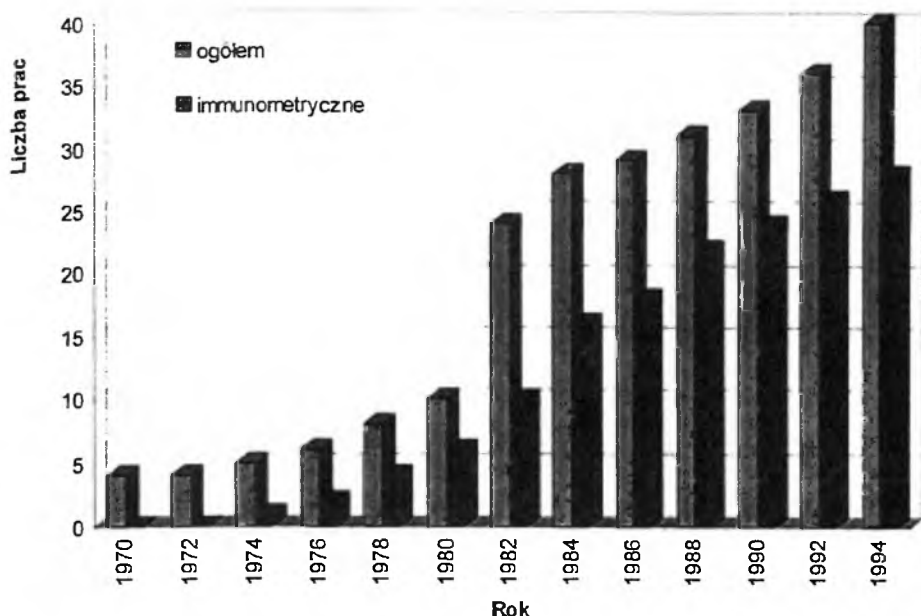
- d) test EMIT (*Enzyme-Multiplied Immunoassay Technique*);
- immunochemiluminescencyjne:
 - a) chemiluminescencyjne (lucyferyna, ester akrydyny),
 - b) bioluminescencyjne (lucyferaza).

3. METODY IMMUNOLOGICZNE W OCENIE ŻYWNOŚCI

Dotychczasowe klasyczne metody analityczne stosowane do oznaczania zanieczyszczeń, dodatków lub pozostałości środków agrotechnicznych w żywności generalnie związane są z ekstrakcją rozpuszczalnikami organicznymi, a następnie detekcją metodami: chromatograficznymi (kolumnowa, cieczowa, gazowa, planarna), spektrofotometrycznymi, fluorometrycznymi, radiometrycznymi lub elektrochemicznymi [8]. Dane literaturowe wskazują, że użycie po raz pierwszy metod immunoanalitycznych nastąpiło w roku 1959, kiedy to Yelow i Berson [9] zastosowali radioimmunoanalityczną metodę do oznaczania insuliny (10–40 pg) jako hormonu. Od tego roku metody immunoanalityczne stały się dość często używane, ale głównie w medycynie klinicznej.

Pierwsze doniesienia o użyciu metod radioimmunoanalitycznych w analizie środków spożywczych spotykamy w 1970 r. Porath [10] przedstawił wyniki prac prezentowanych na Międzynarodowym Zjeździe Biologicznym, który odbył się w 1968 r. w Sztokholmie. Prace tam prezentowane głównie dotyczyły detekcji (1 pg) specyficznych białek ekstrahowanych z żywności. Upowszechnianie stosowania metod immunoanalitycznych w początkowym okresie (1970–1974) następowało bardzo powoli i ostrożnie, dopiero od 1982 r. datuje się ich intensywny rozwój, tak pod względem częstości użycia (rys. 4), jak i pod względem różnorodności technik wykonania [11, 12]. Wielokierunkowy rozwój metod immunoanalitycznych doprowadził do opracowania rozmaitych technik oznaczania takich samych bądź różnych związków chemicznych w próbkach o różnorodnym pochodzeniu (mikroorganizmy, rośliny, ssaki). Najwięcej uwagi jednakże poświęcono metodom immunoenzymatycznym i możliwościom ich wykorzystania. Obserwuje się wyraźny postęp w dopracowywaniu do perfekcji szczegółów technicznych manualnego wykonania oraz technik monitorowania aż po komputerową obróbkę wyników uzyskanych podczas immunoanalizy.

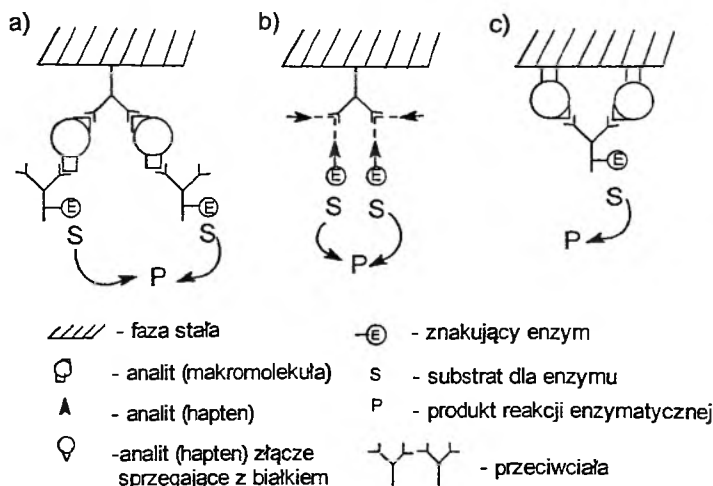
Spośród wszystkich dotychczas stosowanych wyróżniają się metody immunometryczne jako grupa specyficznych metod analitycznych o dużej czułości i wielorakim zastosowaniu. Największe uznanie za swoją prostotę i różnorodność stosowania zyskała sobie metoda ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), metoda immunologiczna oparta na wykorzystaniu immunosorpcji przeciwciał lub antygenów na fazie stałej w kompozycji z odpowiednimi koniugatami przeciwciał znakowanych enzymem. Metoda ta została opracowana w 1971 r. przez Engvalle'a i Perlmana [13] oraz Van Weemena i Schuurasa



Rys. 4. Udział metod immunometrycznych wśród wszystkich metod analizy żywności stosowanych do oznaczenia zawartości tego samego składnika [11]

[14]. Obecnie metoda ELISA znana jest w trzech wariantach (rys. 5): a) kanapkowa (sandwicz); b) kompetycyjna, ze znakowanym antygenem; c) niekompetycyjna, ze znakowanym przeciwciałem [2–4, 7, 15–17].

Pod względem rozwiązania technicznego metoda ELISA została starannie dopracowana w postaci testu płytkowego i zautomatyzowanych odczytów przy użyciu odpowiednich czytników spektrofotometrycznych lub fluorometrycznych). Obecnie w tej postaci ma ona zastosowanie do ilościowej oceny antygenów lub przeciwciał [16–18], wielu hormonów [19–23], autoantygenów, [24], składników żywności [25–28], monitorowania i kontroli pozostałości nie tylko chemicznych zanieczyszczeń [29–32] w żywności pochodzenia zwierzęcego [33–35] lub roślinnego [36–38], ale także do stwierdzenia obecności enzymów [39–43], witamin [44, 45], obcych czynników wzrostu [46, 47], toksyn bakteryjnych i grzybiczych [48–54], antybiotyków [55–61], alkaloidów [62, 63], pestycydów [64–70] itp. Ponadto metoda ELISA znalazła zastosowanie w diagnozowaniu i ocenie procesów technologicznych głównie w przemyśle spożywczym. Jest ona wykorzystywana zwłaszcza do oceny poziomu stopnia denaturacji białek mleka i mięsa [71–74]. Kontrola ta związana jest przede wszystkim z nadzorem procesu, który ma na celu uzyskanie w procesie technologicznym specyficznego składu produktu o różnorodnych, zmodyfikowanych białkach, które nie wywołują alergii u osób z nietolerancją mleka krowiego czy określonych gatunków mięsa.



Rys. 5. Schemat prezentujący różne wersje użycia metody ELISA w analizie żywności: a) kanapkowa (sandwicz), b) kompetycyjna – ze znakowanym antygenem, c) niekompetycyjna – ze znakowanym przeciwciałem

Dzięki możliwości diagnozowania metodami immunoenzymatycznymi można wpływać na proces technologiczny związany z obniżeniem zawartości np. α - i β -laktoglobulin w mleku i produktach fermentacji mlekowej [75–77]. Metoda ta umożliwiła ponadto zbadanie różnic w składzie mleka czy mięsa wynikających z uwarunkowań genetycznych zwierząt [78]. W wypadku produktów mięsnych pozwala ona zidentyfikować różne gatunki mięsa w produktach nie poddanych obróbce termicznej, zawartości białek dodawanych w procesie technologicznym bądź zawartości innych białek, np. roślinnych [79], czy też zafałszowania niektórych gatunków mięsa i jego produktów przez dodawanie tańszych surowców [80–82].

Użycie tej metody przez wiele wyspecjalizowanych laboratoriów na całym świecie pozwoliło wykazać, że metody immunoanalityczne, a zwłaszcza metoda ELISA są zdecydowanie lepsze, szybsze i bardziej czułe w porównaniu z klasycznymi metodami analitycznymi [83, 84].

4. ANTYBIOTYKI W ŻYWNOSCI

A USTAWODAWSTWO ZDROWOTNE DOTYCZĄCE ŻYWNOSCI

Powszechne stosowanie w weterynarii antybiotyków, zwłaszcza w leczeniu i profilaktyce chorób bakteryjnych gruczołu mlekowego u krów oraz w profilaktyce hodowlanej drobiu, trzody chlewnej i bydła, wiąże się z ryzykiem występowania pozostałości preparatów antybakteryjnych w produktach mlecz-

nych, jajach i mięsie oraz w ich przetworach [61, 85, 86]. Ponadto moda na produkty żywnościowe o przedłużonej trwałości (lecz często o niskiej wartości), sprzyja skracaniu procesów technologicznych poprzez stosowanie dodatków antybakteryjnych, m.in. sulfonamidów czy fosfonopeptydów, które dość często u konsumentów wywołują różne alergię i patologie wchłaniania jelitowego. Niezależnie od celowego, niskiego dawkowania wymienionych związków stwierdza się przypadki naturalnego występowania w żywności ich pozostałości [87–90].

Obserwując dużą konkurencyjność na rynku żywnościowym, zauważa się, że niektóre produkty żywnościowe (najmniej atrakcyjne i najmniej trwałe) skazane są na długotrwałe przechowywanie. To zaś jest przyczyną naturalnego wytwarzania substancji szkodliwych, nie tylko antybiotyków, w gotowym, przechowywanym produkcie spożywczym pod wpływem obecnej i rozwijającej się tam mikroflory (drożdże, bakterie i pleśnie), [91–103].

Wyniki badań prowadzonych w ostatnich latach świadczą o tym, że niektóre związki organiczne i nieorganiczne okazują się szkodliwe i są powodem wielu stanów alergicznych, nawet w dużo mniejszych dawkach niż te, które ustalono wcześniej. W takiej sytuacji bardzo ważnym problemem staje się analiza żywności dla ochrony całości społeczeństwa przed groźnymi następstwami chorobowymi, wynikającymi z powszechnego ich dawkowania z żywnością. Należy zatem dążyć do stosowania niezawodnych, bardziej czułych i specyficznych metod analitycznych umożliwiających wykrywanie i oznaczanie tych związków. Stosowane metody muszą być także ekonomiczne i proste w wykonaniu, aby można je było wykorzystywać powszechnie do bieżących, seryjnych analiz, a nie tylko w pracach typowo badawczych.

Spśród wielu związków występujących w żywności szczególną uwagę zwracają antybiotyki, które w dobie konkurencji i wolnego rynku stały się modne. Według postanowień polskiego ustawodawstwa używanie antybiotyków do konserwowania żywności jest niedozwolone. Polskie ustawodawstwo nie dopuszcza obecności antybiotyków w środkach spożywczych pochodzenia zwierzęcego [96, 97]. Wyniki badań nad higieną żywności wskazują jednakże, iż produkty ogólnie dostępne (mleko, jaja, mięso i ich przetwory) obarczone są pozostałościami antybiotyków lub związków o działaniu antymikrobiologicznym [55–61].

W tab. 1 przedstawiono listę używanych antybiotyków i innych związków antymikrobiologicznych, identyfikowanych w żywności pochodzenia zwierzęcego. Lista ta jest świadectwem obfitego występowania antybiotyków w produktach codziennego spożycia. Przerażające jest i to, że tak szeroka gama medykamentów serwowana jest wraz z żywnością. W tym miejscu należy postawić pytanie: czy występujące u ludzi i zwierząt niedobory pierwiastków śladowych, mikro- i makroelementów o ważnych funkcjach biologicznych mogą być spowodowane właśnie chętnie chelatującymi i kompleksującymi antybiotykami? A może właśnie dzięki obecnym w nich pierwiastkom ludzkie

Tabela 1. Lista używanych antybiotyków i związków antimikrobiologicznych identyfikowanych w żywności pochodzenia zwierzęcego [15, 55–61, 87, 87–103]

Antybiotyk	Rodzaj żywności pochodzenia zwierzęcego				
	kurczaki	indyki	wieprzowina	wołowina	baranina
Bacylomycyna	+	+	+	+	—
Bacytracyna	+	+	+	+	—
Chlorotetracyklina	+	+	+	+	+
Erytromycyna	+	+	—	—	—
Hygromycyna	+	—	+	—	—
Linkomycyna	+	—	+	—	—
Monezyna	+	—	+	+	+
Neomycyna	+	+	+	+	+
Nystatyna	+	+	—	—	—
Oleandomycyna	+	+	+	—	—
Oksyteracyna	+	+	+	+	+
Penicylina	+	+	+	—	—
Salinomycyna	+	+	+	—	—
Streptomycyna	+	+	+	—	—
Sulfonoamidy	+	+	+	—	—
Tylozyna	+	+	+	—	+
Wirginiamycyna	+	+	+	—	—

„+” — obecność antybiotyku oznaczana i stwierdzona w badanym produkcie mięsny,

„—” — obecność antybiotyku oznaczana i nie stwierdzona w badanym produkcie mięsny.

organizmy łatwiej znoszą toksyczne działanie antybiotyków? Należy przypuszczać, że pod ich wpływem zmieniona zostaje struktura kostna, która z natury jest bogata w pierwiastki chemiczne. Zjawisko takich zmian daje się zaobserwować na przykładzie kości kurczaków hodowanych na dużych fermach. Kurczaki hodowane w dużych stadach wraz z paszą pokarmową pobierają antybiotyki w tzw. „dawkach profilaktycznych”. Kości tych kurczaków są łatwo rozsypujące się, miękkie, często poprzerastane tkanką chrzęstną, a kości długie najczęściej są zniekształcone, powyginane. Prawdopodobnie struktura tych kości została osłabiona i nie jest w stanie utrzymać masy ciała. Czy niedobory innych związków ważnych dla życia ludzi i zwierząt zawdzięczamy także obecnym w żywności nadmiarom medykamentów (hormony, czynniki wzrostu itp.)?

Szerokie użycie antybiotyków wymusza konieczność opracowywania coraz bardziej czułych metod wykrywania i oznaczania ich pozostałości w żywności oraz sugeruje zakres prac mający na celu określenie poziomów tolerancji lub ustalania poziomów określanych jako „dopuszczalne lub nieszkodliwe”. Według ustawodawstwa holenderskiego problem kontroli i nadzoru przedstawia się inaczej niż w Polsce i kilku innych krajach Europy, ale z pewnością jest on bardziej racjonalny, jeśli weźmiemy pod uwagę wyniki sporadycznych analiz, wykonanych na próbkach żywności ogólnego obrotu i sprzedaży. Ze względu na zawartość antybiotyków w żywności ustawodawstwo holenderskie

zakłada trzy klasy toksyczności: a) dopuszczalna, b) warunkowo dopuszczalna, c) niedopuszczalna. Aby można było ustalić określone klasy czystości żywności, należy stosować w badaniach niezawodne metody wykrywania i oznaczania ultraśladowych ilości tych i innych (pestycydy, aflatoksyny) zanieczyszczeń.

Antybiotyki i związki o działaniu antymikrobiologicznym są stosowane od ponad 35 lat na całym świecie. Znajdują się one w żywności, ale przez cały czas dąży się do zabezpieczenia ludności przed ich toksycznym działaniem. Ustalone normy dawek dopuszczalnych dają prawo do roszczeń i ekwiwalentnych wynagrodzeń od producentów z tytułu ich przekraczania. Ustawodawstwo USA ustaliło dawki dopuszczalne określonych klas (grup) antybiotyków i związków antymikrobiologicznych w żywności (tab. 2).

Tabela 2. Dopuszczalne ilości antybiotyków i związków antymikrobiologicznych w jajach, mleku, mięsie i rybach wg ustawodawstwa USA [61, 124-133]

Antybiotyki	W przeliczeniu na związek	Dopuszczalne ilości w ppb			
		jaja	mleko	mięso	ryby
Aminoglikozydowe	Streptomycyna	0	150	500	150
Beta-laktamowe	Penicylina G	0	5	50	20
Tetracykliny	Chlorotetracyklina	0	30	100	100
	Oksytetracyklina	0	30	100	50
Sulfonoamidy	Sulfadimetoksyna	100	10	100	10
	Sulfametazyna	100	10	100	25
	Sulfachinoksalina	100	10	10	20
Makrolidy	Erytromycyna	25	50	300	150
	Tylozyna	200	50	200	500
Chloramfenikol	Chloramfenikol	5	5	10	5

Metody immunometryczne należy traktować jako potencjalne źródło dobrych, specyficznych, czułych, szybkich i wygodnych metod oznaczania antybiotyków. Należy rozpropagować i upowszechnić ich zastosowanie w laboratoriach zajmujących się analizą żywności. Po przeprowadzeniu badań międzylaboratoryjnych należałoby podjąć, wzorem krajów zachodnich (Niemcy, Holandia), działania legislacyjne związane z adaptacją metod immunometrycznych, zwłaszcza immunoenzymatycznych, jako metod analitycznych dających szansę ustalenia nowych, lepszych norm jakościowych odpowiadających wymagom Unii Europejskiej.

5. OZNACZANIE ANTYBIOTYKÓW W ŻYWNOCI

Za historyczne można dziś uznać metody kolorymetryczne Brattona i Marshalla [99, 100], które z pewnymi poprawkami bywają stosowane jeszcze do dzisiaj. W fachowej literaturze spotkać można wiele propozycji identyfiko-

wania i oznaczania różnych substancji przeciwbakteryjnych technikami chromatografii cieczowej (HPLC) [101–110], gazowej (GC) [106, 111–115], cienkowarstwowej (P&TLC) [116, 117] lub najbardziej miarodajną techniką spektrometrii masowej (MS) [118–123]. Metody te jednak nie znalazły szerszego zastosowania w rutynowych, masowych oznaczeniach ze względu na wysoką cenę specjalistycznego sprzętu, dostępnego tylko w dużych, wyspecjalizowanych laboratoriach. Bez wątplenia metody te mogą być stosowane w charakterze metod potwierdzających lub odwoławczych wtedy, kiedy badania skrininowe dałyby wyniki wymagające potwierdzenia.

Metody immunoenzymatyczne w swoim klasycznym wydaniu jeszcze nie są na tyle rozpracowane, aby mogły stanowić metody powszechnego stosowania. W doniesieniach literaturowych jednakże można spotkać dane o możliwości stosowania testów (test-kit, Quik-card) immunoenzymatycznych do wykrywania w ilościach kilku ppt (ng/kg) tylozyny, sulfodimetoksyny i chloramfenikolu oraz innych związków antybakteryjnych [124–127]. W testach tych należy wykonać nieco pracochłonne, choć nieskomplikowane operacje przygotowania ekstraktów do reakcji immunoenzymatycznych, ale tylko ten etap wydłuża czas analizy. Być może jednak pojawiające się od paru lat publikacje [128–133], dotyczące możliwości wykorzystania testów immunoenzymatycznych do wykrywania pozostałości leków o charakterze przeciwbakteryjnym w tkankach zwierząt, w płynach ustrojowych czy w mleku, są zwiastunami upowszechniania i stosowania tych metod w rutynowej diagnostyce laboratoryjnej.

Ważną rolę metod immunoenzymatycznych w analizie antybiotyków należy wiązać z faktem ich występowania w zmienionej formie jako produkty metabolicznych przemian. Uzyskiwanie specyficznych przeciwciał dla takich związków może dać szansę określenia absolutnych poziomów ich występowania oraz toksyczności, a także możliwość ustalenia specjacji w materiałach biologicznych. Większość indywidualów chemicznych będących obiektem zainteresowania toksykologii tych związków to cząsteczki małe, łatwo przenikające i łatwo ulegające wiązaniu przez inne obecne w układach aktywne grupy związków. Poprzez takie reakcje w efekcie dają całą grupę związków o podobnych właściwościach chemicznych i fizycznych, co następcza istotne trudności w analizie, zwłaszcza w analizie specjacyjnej. Niewątpliwy wpływ na wynik analizy ma specyfika doboru warunków przygotowania próbek do analizy. W analizie specjacyjnej ma zastosowanie wiele złożonych procedur analitycznych, których istotnymi elementami są procedury rozdzielania czy wydzielenia i oznaczania. Metody immunoenzymatyczne jako wysoce specyficzne mogą zapewnić bardzo dobrą wykrywalność w połączeniu z detekcją spektrometryczną lub ostatnio wprowadzaną detekcją elektrochemiczną. Konieczność łączenia procesów rozdzielania i oznaczania doprowadziła do konstrukcji aparatów realizujących obie te funkcje. Są to przyrządy lub techniki sprzężone (*hyphenated techniques, coupled techniques*), a możliwości jest tu bardzo wiele. Takie układy wykorzystuje się do oznaczania nie tylko antybiotyków, ale także czynników wzrostu,

hormonów, pestycydów i innych substancji toksycznych znajdujących się w żywności.

Wiarygodność oznaczania w próbkach naturalnych wymaga potwierdzenia jakości oznaczania, a więc określenia jego dokładności. W ostatniej dekadzie zagadnienia jakości oznaczania nabrały specjalnego znaczenia celem określenia dopuszczalnych poziomów referencyjnych, opracowywania międzynarodowych standardów. Podstawowym sposobem określenia jakości tych oznaczeń w analizie chemicznej jest używanie certyfikowanych materiałów odniesienia o dobrze znanej zawartości analitu. Problemem jest jednak dobór właściwych matryc o odpowiednio niskim poziomie analitu. Sam analit zaś powinien być w takiej postaci, w jakiej występuje w badanym materiale. Takich materiałów do badania specjacji jest bardzo mało i są to materiały specjalne [134–137].

W zasadzie sprawdzenie wyników oznaczania poszczególnych form jest możliwe przez porównanie sumy stężeń wszystkich składników z całkowitym stężeniem oznaczanego składnika niezależnie. W praktyce nie jest to takie proste, gdyż stężenie składnika najtrudniejszego do oznaczenia często uzyskuje się, wyznaczając różnicę między całkowitym stężeniem a sumą stężeń pozostałych jego form. Wnioskowanie o toksyczności substancji, w tym wypadku metabolicznych pochodnych antybiotyków, jest niewątpliwie trudne. Dzięki metodom immunometrycznym będzie można choć częściowo rozwiązać przedstawione tu problemy.

6. POTENCJAŁ I KORZYŚCI UŻYCIA METOD IMMUNOENZYMATYCZNYCH

Użycie metod immunoenzymatycznych w analizie antybiotyków jako pozostałości w żywności może odbywać się w kilku wariantach technicznych. Każdy z tych wariantów ma swoje zalety i wady. Zalety i wady poszczególnych systemów analitycznych metod immunoenzymatycznych zależą od rodzaju metody (homogeniczna, heterogeniczna) i rozwiązań technicznych. Podstawą wykonania reakcji w efektywnych metodach heterogenicznych jest zaadsorbowanie antygenów lub przeciwciał do podłoża (faza stała), na którym może zachodzić reakcja immunochemiczna. W praktyce stosowane są różne rodzaje faz stałych (tab. 3). Efekty procesu sorpcji zależą bezpośrednio od własności materiałów, a przede wszystkim od rodzaju występujących wiązań antygenu (przeciwciała) z podłożem oraz pojemności antygenów (przeciwciał) na jednostce powierzchni adsorpcyjnej. Powierzchnia i kształt fazy stałej oraz siła wiązań mają swój bezpośredni wpływ na termodynamikę i kinetykę reakcji immunochemicznej. Dla wszystkich powszechnie używanych materiałów stosuje się formy kuleczek, wałeczków, kóleczek, pierścieni, ale najczęściej używa się mikrostudzienek na płytce [138–140].

Tabela 3. Różne fazy stałe stosowane w metodach immunoenzymatycznych (EIA)

Typ materiału	Forma	Rodzaj wiązania	Pojemność
Polistyren	mikrostudzienki na płytce, kuleczki, wałeczki	niekowalencyjne	300 ng/cm ²
Poliwinył	mikrostudzienki na płytce	niekowalencyjne	300 ng/cm ²
Poliwęglan	kuleczki	niekowalencyjne	300 ng/cm ²
Kopolimer	kuleczki	niekowalencyjne	zmienna
Nitroceluloza	mikrostudzienki na płytce, membrany	niekowalencyjne	100 µg/cm ²
Białka	mikrostudzienki na płytce, kuleczki	niekowalencyjne	20 mg/cm ² (tylko dla przeciwciała)
Różne	mikrostudzienki na płytce, kuleczki	kowalencyjne	zmienna
Kulki magnetyczne	opłaszczane różnymi materiałami	zależą od materiału opłaszczanego	zmienna

Wybrany typ reakcji immunochemicznej decyduje też o niezbędnej wielkości wykorzystywanej powierzchni, a to bezpośrednio wpływa na wybór rodzaju materiału płytek. Rodzaj użytego materiału związany jest ściśle z ilością przeciwciał adsorbowanych na jego powierzchni. W wypadku oznaczeń antybiotyków czynnikiem decydującym o wyborze odpowiedniego materiału jest przede wszystkim rodzaj grupy reaktywnej badanego antybiotyku oraz typ wiązania z fazą stałą (tab. 3 i 4). W molekułach antybiotyków centrami aktywnymi najczęściej są ugrupowania aminowe, hydroksylowe, karboksylowe oraz β -lak-

Tabela 4. Wykrywalne minimum w kompetycyjnej metodzie immunoenzymatycznej EIA (z peroksydazą) przy użyciu przeciwciał poli- oraz monoklonalnych [138–140]

Antybiotyki	Reaktywne grupy	Przeciwciała poliklonalne ng/cm ³	Przeciwciała monoklonalne ng/cm ³
Ampicylina	—NH ₂	10	—
Penicylina G	β -laktamowe	—	2,0
Kloksacylina	—COOH	4,0	0,7
Chloramfenikol (podstawa)	—COOH	0,1	6,2
(pocho dna bursztynianowa)	—NH ₂	—	—
Streptomycyna (oksym)	—COOH	2,2	1,1
(hydrazon)	—NH ₂	—	—
Sulfadiazyna	—NH ₂	—	9,0
Sulfametazyna	—NH ₂	1,8	15,0
Sulfametoksypirydazyna	—NH ₂	1,8	—
Tetracyklina	—NH ₂	0,5	75
Trimetoprym	—NH ₂	6,0	—

tamowe (tab. 5). W oznaczaniu antybiotyków metodami immunometrycznymi wykorzystywane są wiązania właśnie przez te reaktywne grupy. Modyfikacji metod celem uzyskania wysokiej efektywności lub specyficzności reakcji dokonuje się przez użycie kofaktorów stabilizujących wiązanie lub użycie znaczników (izotopy, fluorochromy, enzymy) wzmacniających odpowiedź reakcji immunochemicznej [15, 16, 61, 139].

Tabela 5. Rodzaje wiązań tworzących się w reakcjach immunochemicznych oraz typy grup funkcyjnych biorących udział w ich powstawaniu [138-140]

Grupy funkcyjne na haptenach	Powstające wiązania	Grupa funkcyjna na immunoglobulinie
Hydroksylowe	hemibursztynianowe chlorokarboksylowe cykloheksanowe	ugrupowanie N-amino- we lizyny
Karbonyłowe	oksym O-metylokarboksylowy	ugrupowanie N-amino- we lizyny
Sulfhydryłowe	połączenia disulfidowe	ugrupowanie siarkowe cysteiny
Karboksylowe	bezwodnik karboimidowy	ugrupowanie N-amino- we cysteiny
Aminy aromatyczne	sole diazoniowe	ugrupowanie N-amino- we histydyny, tyrozyny
Aminy alifatyczne	aldehyd glutarowy, bifunkcyjne X-połączenia	ugrupowanie N-amino- we lizyny

W metodach immunoenzymatycznych do znakowania reagentów stosuje się białka enzymatyczne. Do najczęściej wykorzystywanych tu enzymów należą: fosfataza alkaliczna, peroksydaza, ureaza i β -galaktozydaza. Środowisko wykonania reakcji na płytce najczęściej jest obojętne lub lekko alkaliczne. Do przeprowadzenia reakcji enzymatycznej zwykle stosuje się substraty przechodzące w produkty barwne (detekcja spektrofotometryczna) lub wykazujące fluorescencję (detekcja fluorymetryczna), (tab. 6). O efektywności metod immunochemicznych w analizie decyduje także rodzaj użytego przeciwciała – poliklonalne bądź monoklonalne (tab. 4). W wypadku antybiotyków tetracyklinowych, a także substancji antybakteryjnych, takich jak chloramfenikol czy związki sulfonoamidowe, użycie przeciwciał poliklonalnych w metodzie immunometrycznej obniża próg wykrywalności 5–100-krotnie w porównaniu do metod z użyciem przeciwciał monoklonalnych. Wzrost efektywności w tym wypadku najprawdopodobniej związany jest z utworzeniem, oprócz wiązania głównego, dodatkowych wiązań, które stabilizują powstały sztywny układ kompleksowy. Użycie przeciwciał monoklonalnych do oznaczenia antybiotyków β -laktamowych pozwala obniżyć próg wykrywalności 2–10-krotnie w porównaniu do metod z zastosowaniem przeciwciał poliklonalnych. Ogólnie

Tabela 6. Enzymy powszechnie używane w metodach systemu EIA [1-7, 138-140]

Enzym	Źródło enzymu	Optimum pH	Kolorymetryczny substrat dla enzymu	Fluorymetryczny substrat dla enzymu
Fosfataza alkaliczna	wnętrzości cielęce	9-10	<i>p</i> -nitrofenylofosforan	fosforan 4-metylo-umbelferylu
β -galaktozydaza	<i>Escherichia coli</i>	6-8	ONPG ^a CPRG ^b	β -d-galaktopiranozyd 4-metyloumbelferylu
Peroksydaza	korzeń chrzanu	5-7	ABTS ^c TMB ^d OPD ^e	kwas <i>p</i> -hydroksy-fenylooctowy
Ureaza	fasola „jas”	6,5-7,5	mocznik/purpura bromokrezolowa	—

^a — β -d-galaktopiranozyd *o*-nitrofenylu; ^b — β -d-galaktopiranozyd czerwieni chlorofenolowej; ^c — kwas 2,2'-azino-bis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowy)/H₂O₂; ^d — 3,3',5,5'-tetrametylobenzidyna/H₂O₂; ^e — *o*-fenylenodiamina/H₂O₂.

stwierdza się, że w wybranych reakcjach immunoenzymatycznych przeciwciała monoklonalne swoją specyficznością efektywnie przewyższają wyniki analizy metodami z przeciwciałami poliklonalnymi. Rodzaj stosowanego antygeny (hapteny) lub przeciwciała i jego ugrupowań aktywnych (tab. 4), w zależności od budowy i składu determinant (epitopów) na przeciwciałach, również ma wyraźny wpływ na kinetykę i termodynamikę tych reakcji.

Tabela 7. Porównanie trzech metod immunoanalitycznych: RIA (*radioimmunoassay*), FIA (*fluorescent immunoassay*) i EIA (*enzyme immunoassay*) [2-4, 16-18, 138-140]

Charakterystyka	RIA	FIA	EIA
Wykrywalność	wysoka ng-pg	wysoka ng-pg	bardzo wysoka ng-pg-ppt
Specyficzność	wysoka	wysoka	bardzo wysoka
Czas analizy	dni	dni	godziny
Okres przechowywania odczynników	krótki	umiarkowany	dość długi
Wymagane wyposażenie	scyntylator lub licznik promieniowania	UV monitor	spektrofotometr
Kwalifikacje personelu	wykwalifikowany z licencją Radio	wykwalifikowany i wprawny	minimalne przeszkolenie
Koszt analizy	7\$	5\$	2\$

Analiza immunochemiczna opiera się na pomiarze sygnału jako natężenia radiolitycznego (RIA), fluorymetrycznego (FIA) oraz spektrofotometrycznego będącego końcowym wynikiem reakcji enzymatycznej (EIA) bądź chemicznej. Porównując wyniki oznaczania antybiotyków metodami immunometrycznymi na podstawie specyficzności, wykrywalności, czułości, czasu analizy, wymaganego wyposażenia, kosztów i kwalifikacji personelu, zauważa się zdecydowaną przewagę w efektywności metod immunoenzymatycznych (EIA) nad metodami immunofluorymetrycznymi (FIA) i radioimmunologicznymi (RIA) (tab. 7).

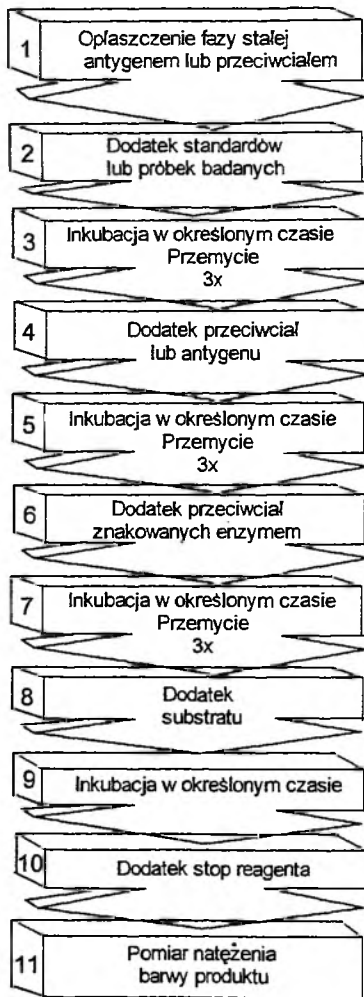
Wśród metod immunoenzymatycznych (EIA) największą popularnością pod względem najlepszej efektywności cieszą się dwie metody: ELISA i EMIT. Metoda ELISA należy do metod heterogenicznych analizy makromolekuł na fazie stałej i służy diagnostyce immunoglobulin, leków, hormonów i metabolitów. Jest ona metodą nieco powolniejszą od metody EMIT, ale cechuje ją wyższa czułość (tab. 8). Etapy wykonania badań metodą ELISA przedstawiono

Tabela 8. Charakterystyka i porównanie dwóch najbardziej efektywnych metod immunoenzymatycznych [2-4, 8, 15-18, 138-140]

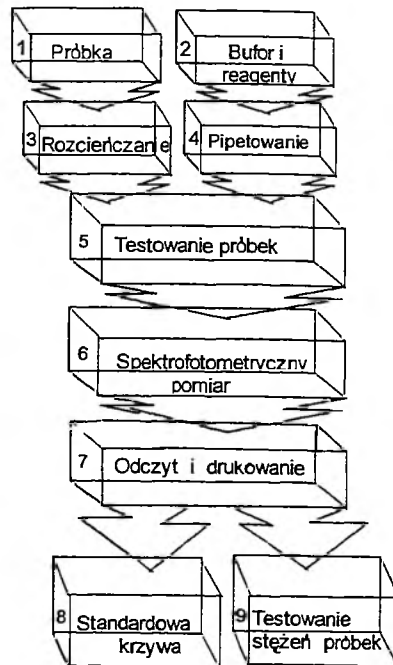
Metoda ELISA	Metoda EMIT
Analiza heterogeniczna	analiza homogeniczna
Wymaga separowania reagentów	nie wymaga separowania reagentów
Wymaga przemycia reagentów	nie wymaga przemywania reagentów
Wolniejsza niż metoda EMIT	szybsza niż metoda ELISA
Wyższa czułość niż w metodzie EMIT	niższa czułość niż w metodzie ELISA
Pomiar makromolekuł (antygen, przeciwciało)	pomiar małych molekuł (hapteny)
Służy diagnostyce immunoglobulin, zakażeń, leków, hormonów, metabolitów	służy diagnozowaniu leków, hormonów, metabolitów
Stała faza analizy	wodne fazy analizy

schematycznie na rys. 6, analogiczne etapy dla metody EMIT – na rys. 7. Do zagłębień stanowiących mikrostudzienki na płycie w zależności od typu metody ELISA (rys. 5) w odpowiedniej kolejności (rys. 6) dodawane są etapami (1-11) właściwe reagenty oraz wykonywane są odpowiednie operacje analityczne. W instrumentalnej metodzie EMIT liczba wykonywanych operacji jest odpowiednio mniejsza (1-9), a całość analizy w obydwu metodach można wyraźnie podzielić na trzy charakterystyczne etapy: a) przygotowanie próbki, b) test doświadczalny, c) pomiar i odczyt wyników.

Porównując wyniki oznaczania antybiotyków w żywności różnymi metodami analitycznymi (tab. 9), stwierdza się wyraźną przewagę metod immuno-



Rys. 6. Kolejne etapy wykonania analizy metodą ELISA



Rys. 7. Kolejne etapy wykonania analizy metodą EMIT

enzymatycznych (EIA i ELISA) nad metodami enzymatycznymi (testy: CITE, Charm Form), a także nad różnymi odmianami chromatografii (GC, HPLC, P&TLC). Czulość metod immunoenzymatycznych jest na poziomie kilku ppb lub ppm, pozostałych metod natomiast – kilka tysięcy lub kilkaset ppm. Wprowadzenie do metody ELISA modyfikacji biotynowo-awidynowej, poprawiającej zdecydowanie czulość metody, zdaje się przesądzać o jej przydatności do oznaczania nie tylko antybiotyków, ale i innych związków w żywności. Uniwersalność metody ELISA, możliwość wielokrotnych powtórzeń, bardzo duża czulość i specyficzność, a jednocześnie stosunkowo krótki czas uzyskania wyników sprawiły, że metoda ta ma coraz to szersze zastosowanie w analizie

Tabela 9. Wykrywalne minimalne ilości antybiotyków oraz związków antimikrobiologicznych przy użyciu różnych technik analitycznych i testów mikrobiologicznych oraz immunoanalitycznych [55–61, 85, 86, 91, 101–133]

Klasa antybiotyków	Ilości przeliczane na związek	HPLC	TLC	GC	Test CITE	Test Charm Form	EIA	ELISA
Aminoglikozydowe	streptomycyna	2–20 µg/g			> 1000	> 1000	10 ng/ml	1–2 ng/ml
β-laktamowe	penicylina G	30 ng/ml	0,03 µg/g	1–10 µg/ml			10 ng/ml	1–4 ng/ml
Makrolidy	erytromycyna	0,05 mg/kg			–	1000		1 ppm
	tylozyna	0,05 mg/kg			–	50		
Sulfonoamidy	sulfadimetoksyna	60 µg/kg	20 µg/kg	100 µg/kg	10	10	7 ppm	5 ppm
	sulfametazyna	50 ng/ml	10 µg/kg	50 µg/kg	–	15	5 ppm	2 ppm
	sulfachinoksalina	30 µg/kg	50 µg/kg	50 µg/kg	100	10	25 ppm	20 ppm
Tetracykliny	chlorotetracyklina	0,1–5 mg/kg	0,1 µg/g		30	150	50 ppm	1–10 ng/ml
	oksytetracyklina	50 µg/kg	15 ng/g		30	80	100 ppm	20 ng/ml
Chloramfenikol	chloramfenikol	1–10 µg/kg		1–10 ng/g		1	10 ppb	0,1 ppb

żywności. Modyfikacje techniczne tej metody doprowadziły do pojawienia się na rynku szybkich testów, tzw. bioindykatorów, na bezpośrednie, szybkie stwierdzenie oznaczanego składnika ze zdecydowanie niższą czułością niż w wypadku testów mikropłytkowych. W świetle przedstawionych danych, uzyskanych w trakcie badań, metody immunoenzymatyczne cechują się dużą przydatnością, wysokim potencjałem analitycznym, przynoszącym wielorakie korzyści w analizie żywności. Wyniki uzyskane dotychczas w naszym Instytucie są opisane w pracach [141–150].

PODSUMOWANIE

Wnioski płynące z tych rozważań wskazują, że oznaczanie pozostałości antybiotyków w żywności można przeprowadzać za pomocą analizy immunometrycznej, a potencjał metod immunoenzymatycznych w oznaczaniu antybiotyków w żywności może być w pełni wykorzystany. Należy jednak pamiętać, że immunoanaliza nie ma specyfiki metod fizykochemicznych, jak GC lub LC, i obecność substancji interferujących w próbce nie ogranicza metody. Immunoanaliza może być wykorzystana jako analiza skринingowa w procesie badawczym dużej liczby prób czy też prób przed statystycznym selekcjonowaniem. Wiarygodność wyników oznaczenia przy użyciu tych metod jest zawsze potwierdzona przez stosowane standardy. Ograniczona jest zapewne weryfikacja poprawności rezultatów tych metod, gdyż mało jest ogólnie dostępnych metod, za których pomocą można wykonać oznaczenia na poziomie ppb–ppt. Należy jednak zauważyć, że wynik otrzymany nawet ze 100% błędem na poziomie ppt–ppb jest z punktu widzenia praktycznego wynikiem lepszym niż brak oznaczenia w ogóle z powodu braku sygnału analitycznego, np. w P&TLC, spektrometrii lub fluorymetrii, które są metodami zalecanymi w wypadku analiz żywności na zawartość różnych medykamentów.

Podstawowe korzyści płynące z użycia metod immunoenzymatycznych to przede wszystkim prostota, czas, koszt i efekt analizy. Podstawa analiz immunoenzymatycznych jest niezwykle prosta, a do wykonania nie wymaga wysokiej klasy specjalistów ani też drogiego sprzętu. Niezbędne jest sprawdzenie metod, ocena i realizacja adaptacyjna oraz wdrożeniowa metod immunochemicznych w placówkach analitycznych.

W przygotowaniu pracy wykorzystano pomoc finansową KBN — grant Nr 5 PO6 G 008 09.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] S. Ślopek (red.), *Immunologia praktyczna*, PZWL, Warszawa 1970.
- [2] L. C. Javois, *Immunocytochemical methods and protocols*, [w:] *Methods in Molecular Biology*, Vol. 34, Humana Press, Totowa, NJ. 1994.

- [3] M. Zabla (red.), *Immunocytochemia*, PWN, Warszawa 1990.
- [4] D. Wild, *The Immunoassay Handbook*, Macmillan Press LTD, London 1994.
- [5] S. Ślopek, *Ilustrowany słownik immunologiczny*, PZWL, Warszawa 1983.
- [6] L. Stryer, *Biochemia*, PWN, Warszawa 1997.
- [7] E. Brzezińska-Błaszczuk, *Zarys immunodiagnostyki*, Wyd. Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź 1994.
- [8] Y. Pomeranz, C. E. Meloan, *Food Analysis, Theory and Practice*, Chapman&Hall, New York 1994.
- [9] R. S. Yellow, S. A. Berson, *Nature*, 1959, **184**, 1643.
- [10] J. Porath, *Evaluation of Novel Protein Products*, Pergamon Press, Oxford 1970.
- [11] M. N. Clifford, *Proceedings of a Symposium, Immunoassays in Food Analysis*, Guildford, 15-16.08.1983.
- [12] J. M. Emon, V. Lopez-Avila, *Anal. Chem.*, 1992, **64**, 79A.
- [13] E. Engvalle, P. Perlmann, *Immunochemistry*, 1971, **8**, 871.
- [14] B. K. Van Weemen, A. H. M. W. Schuurs, *FEBS Letters*, 1971, **15**, 232.
- [15] N. Haagsma, C. Van de Water, *Proceedings of an American Chemical Society, Agriculture and Food Chemistry Division, Symposium on Antibiotic/Drug Residues in Food of Animal Origin*, 25-30.08.1981, New York.
- [16] P. Tijssen, *The nature of immunogens, antigens and haptens*, rozdz. 4, [w:] *Practice and Theory of Enzyme Immunoassays*, R. H. Burdon, P. H. Knippenberg (red.), Elsevier Applied Science Publishers, Amsterdam 1985.
- [17] A. P. Johnstone, R. Thorpe, *Immunochemistry in Practice*, Blackwell Scientific Publ., Oxford 1982.
- [18] C. A. Williams, M. W. Chase (red.), *Methods in Immunology and Immunochemistry*, Academic Press 1987.
- [19] M. L. Rodriguez, I. McConnell, J. Lamont, J. Campbell, S. P. FitzGerald, *Analyst*, 1994, **119**, 2631.
- [20] S. A. Wring, R. M. O'Neill, J. L. Williams, H. L. Birch, C. P. Goddard, P. D. Andrew, W. N. Jenner, *ibid.*, 1994, **119**, 2395.
- [21] M. P. Oriundi, R. Angeletti, E. Bastini, C. Nachtmann, K. E. Vanoosthnyze, C. Van Petheghem, *ibid.*, **120**, 577.
- [22] N. Haasnoot, G. D'Van Bruchem, R. J. A. Paulussen, R. Schilt, J. Arts, G. Dijkstra, J. C. Meijer, *Archiv. Lebensmittelhyg.* 1990, **41**, 131.
- [23] Ch. T. Elliott, K. S. Francis, H. D. Shortt, W. J. McCaughey, *Analyst*, 1995, **120**, 1827.
- [24] M. Oellerich, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 1984, **22**, 895.
- [25] E. Rodriguez, R. Martin, T. Garcia, I. Gonzalez, P. Morales, B. Sanz, E. P. Hernandez, *J. Sci. Food Agric.*, 1993, **61**, 175.
- [26] Y. Sone, Y. Fujikawa, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 1993, **39**, 597.
- [27] S. P. D. Lalljie, J. Vindevogel, P. Sandra, *J. Chromatogr.*, 1993, **652**, 563.
- [28] C. Delgado, T. Talon, A. Gaset, *Analysis*, 1993, **21**, 281.
- [29] M. Vanderlaan, L. H. Stanker, B. E. Watkins, *Environ. Toxicol. Chem.*, 1988, **7**, 859.
- [30] P. W. Albro, M. I. Luster, K. Chae, S. K. Chandhary, G. Clark, L. D. Lawson, J. T. Corbett, J. D. McKinney, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1979, **50**, 137.
- [31] W. H. Newsome, B. J. Shields, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 1981, **10**, 295.
- [32] B. Wróblewska, L. Jędrychowski, M. Bielecka, *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 1995, **4/45** (3), 21.
- [33] R. L. S. Petterson, *Biochemical Identification of Meat Species*, Elsevier Applied Science Publishers, New York 1985.
- [34] W. J. Slattery, A. J. Sinclair, *Food Technol. Aust.*, 1987, **39**, 105.
- [35] M. E. Cutrufelli, R. P. Magean, B. Schwab, R. W. Johnston, *J. Assn. Offic. Anal. Chem. Intl.*, 1989, **72**, 60; *ibid.*, 1991, **74** 410; *ibid.*, 1992, **75**, 74.
- [36] J. A. Berezofsky, *Science*, 1995, **229**, 932.

- [37] H. Windemann, F. Fritschy, E. Baumgartner, *Biochim. Biophys. Acta*, 1982, **709**, 110.
- [38] A. S. Tatham, B. J. Milfin, *J. Immunol. Methods*, 1985, **92**, 21.
- [39] L. Stefaniak, *Przegl. Mleczarski*, 1986, **11**, 19.
- [40] S. S. Collins, J. T. Keeton, S. B. Smith, *J. Agric. Food Chem.*, 1991, **39**, 1291 i 1294.
- [41] C. H. Wang, J. J. Pestka, A. M. Booren, D. M. Smith, *J. Agric. Food Chem.*, 1994, **42**, 1829.
- [42] W. E. Townsend, C. E. Davies, *J. Food Sci.*, 1992, **57**, 555.
- [43] M. Y. Khokhar, J. N. Miller, N. J. Seare, *Anal. Chim. Acta* 1994, **290**, 154.
- [44] F. Tsumura, Y. Ohsako, Y. Haraguchi, H. Kumagai, H. Sakurai, K. Ishii, *J. Food Sci.*, 1993, **58**, 619 i 687.
- [45] B. W. Hollis, B. A. Roos, H. H. Draper, P. W. Lambert, *J. Nutr.*, 1981, **111**, 1240.
- [46] A. Reggin, J. R. Sportsman, F. E. Regnier, *J. Chromatogr.*, 1993, **632**, 37.
- [47] L. Van Look, E. H. J. Jansen, R. H. van den Berg, B. Zomer, K. E. Vanoosthuyze, C. H. Peteghem, *ibid.*, 1991, **564**, 451.
- [48] M. R. A. Morgan, R. McNerney, H. W.-S. Chan, *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.*, 1983, **66**, 1481.
- [49] O. Olsvik, S. Myhre, B. P. Berdal, K. Fossum, *Acta Veterin. Scandin.*, 1982, **23**, 204.
- [50] M. S. Bergdoll, R. Reiser, *J. Food Protect.*, 1980, **43**, 68.
- [51] A. Biermann, G. Terplan, *Archiv. Lebensmittelhyg.*, 1980, **31**, 51; *ibid.*, 1982, **33**, 17.
- [52] M. W. Truëksess, M. E. Stack, *J. AOAC Int.* 1994, **77**, 655.
- [53] E. Usleber, M. Straka, G. Terplan, *J. Agric. Food Chem.*, 1994, **42**, 1392.
- [54] K. Nam, J. W. King, *J. Agric. Food Chem.*, 1994, **42**, 1469.
- [55] P. Hammer, H. Kirchhoff, G. Hahn, *Anal. Chim. Acta*, 1993, **275**, 313.
- [56] P. Schnappinger, E. Usleber, E. Marlbauer, G. Terplan, *Food&Agricul. Immunology*, 1993, **5**, 67.
- [57] E. Märtlbauer, E. Usleber, E. Schnaider, R. Dietrich, *Analyst*, 1994, **119**, 2543.
- [58] B. Sheth, P. Sporns, *J. Agric. Food Chem.*, 1991, **39**, 1696.
- [59] S. A. Barker, C. C. Walker, *J. Chromatogr.*, 1992, **624**, 195.
- [60] B. Lang, E. Märtlbauer, G. Terplan, *Archiv. Lebensmittelhyg.*, 1992, **43**, 77.
- [61] V. K. Agarwal (red.). *Analysis of Antibiotic/Drug Residues in Food Products of Animal Origin*, Plenum Press, New York&London 1992.
- [62] D. T. Coxon, *American Potato J.*, 1984, **61**, 169.
- [63] M. R. A. Morgan, R. McNerney, J. A. Mattew, D. T. Coxon, H. W.-S. Chan, *J. Scien. Food Agricult.*, 1983, **34**, 593.
- [64] J. M. Van Emon, V. Lopez-Avila, *Anal. Chem.*, 1992, **64**, 79A.
- [65] Q. X. Li, B. D. Hammock, J. N. Seiber, *J. Agric. Food Chem.*, 1991, **39**, 1537.
- [66] C. Wittmann, B. Hock, *ibid.*, 1991, **39**, 1194.
- [67] H. Newsome, P. G. Collins, *Food Agric. Immunol.*, 1990, **2**, 75.
- [68] J. Sherma, *Anal. Chem.*, 1995, **67**, 1R.
- [69] K.-S. Nam, J. W. King, *J. Agric. Food Chem.*, 1994, **42**, 1469.
- [70] T. Giersch, B. Hock, *Food Agric. Immunol.*, 1990, **2**, 85.
- [71] P. J. Kilshaw, L. M. Heppel, J. E. Ford, *Archive of Diseases in Childhood*, 1982, **57**, 842.
- [72] J. A. Lovegrove, *Biochem. Soc. Trans.* 1986, **6**, 1059.
- [73] L. M. J. Heppeli, A. J. Cant, P. J. Kilshaw, *British J. Nutr.*, 1984, **51**, 29.
- [74] E. Bogin, B. M. Israeli, I. Klinger, *J. Food Protect.*, 1992, **55**, 787.
- [75] U. Samarajeewa, C. I. Wei, I. S. Huang, M. R. Marshall, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1991, **29**, 403.
- [76] B. Wróblewska, L. Jędrychowski, *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 1994, **3/44** (1), 45.
- [77] R. G. Whittaker, T. L. Copland, *Austr. Veterin. J.*, 1982, **59**, 125.
- [78] L. M. J. Heppell, A. J. Cant, P. J. Kilshaw, *British. J. Nutrition*, 1984, **51**, 29.
- [79] C. H. S. Hitchcock, *Sci. Food and Agric.*, 1981, **2**, 157.

- [80] R. L. S. Petterson, S. J. Jones, *Els. App. Sci. Publ. London*, 1985, 87.
- [81] E. K. Kang'ethe, S. J. Jones, R. L. S. Petterson, *Meat Sci.*, 1982, 7, 229.
- [82] R. Martin, R. J. Wardale, S. J. Jones, P. E. Hernandez, R. L. S. Petterson, *ibid.*, 1991, 30, 23.
- [83] B. A. Morris, M. N. Clifford, R. Jackman, *Els. Appl. Sci. Publ. London*, 1985, 5.
- [84] R. Wood, *ibid.*, 1985, 113.
- [85] Krajowa Konferencja Naukowa *Substancje chemiczne w mleku działające hamująco* – 12–13 X 1992 w Olsztynie.
- [86] K. Rybińska, I. Karkocha, *Rocz. PZH*, 1992, 43, 241.
- [87] R. F. Bevil, J. Vetern. Pharmac. and Therap., 1989, 12, 241.
- [88] F. W. Ezzedenn, S. H. Majeed, F. A. Shihab, M. J. Mahmoud, D. H. Robinson, Y. M. Tahseen, S. J. Stohs, *Intern. J. Pharmac.*, 1990, 59, 255.
- [89] S. E. Charm, R. Chi, *Assoc. Offic. Analyt. Chemist's J.*, 1988, 71, 1137.
- [90] J. F. M. Nouws, T. B. Vree, R. Aerts, J. Grondel, *Arch. Lebensmittelhyg.*, 1986, 37, 57.
- [91] A. R. Fraser, S. M. Ridley, *Planta*, 1984, 161, 470.
- [92] S. Omura, M. Murata, H. Hanaki, R. Hinotozawa, R. Oiwa, H. Tanaka, *J. Antibiot.*, 1984, 37, 829.
- [93] R. Manderscheid, A. Wild, *J. Plant. Physiol.*, 1986, 123, 135.
- [94] PN-81/86002, Mleko surowe do skupu.
- [95] Ustawa o warunkach zdrowotnych żywności i żywienia z dn. 25 XI 1970 r. Dz. U. nr 29 poz. 245 oraz Dz. U. nr 91 poz. 456.
- [96] M. S. Brady, N. White, S. F. Katz, *J. Food Protection*, 1993, 56, 229.
- [97] Commission Regulation (EC) No 2377/94; OJEC No 287, 7, 8.11.1994.
- [98] 38th Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, World Health Organization, Geneva, 1991.
- [99] A. C. Bratton, E. K. Marshall, *J. Biol. Chem.*, 1939, 128, 537.
- [100] A. C. Bratton, E. K. Marshall, *Staatliches Veterinärmedizinische Prüfungsinstitut*, Berlin, 1987.
- [101] K. Rybińska, *Rocz. PZH*, 1981, 32, 113.
- [102] E. M. Ruczyńska-Skonieczna, *ibid.*, 1981, 32, 117.
- [103] I. Karkocha, *Rocz. PZH*, 1977, 28, 65.
- [104] C. M. Moore, K. Sato, Y. Katsumata, *J. Chromatogr.*, 1991, 539, 215.
- [105] B. Shaikh, W. A. Moats, *ibid.*, 1993, 643, 369.
- [106] E. H. Allen, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1985, 68, 990.
- [107] V. K. Agarwal, *J. Chromatogr.*, 1992, 624, 411; *ibid.*, 1991, 614, 699.
- [108] P. Sanders, P. Guillot, M. Dagorn, J. M. Delmas, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1991, 74, 483.
- [109] T. Galeano, A. Diaz, G. Cabanillas, F. Salinas, *Anal. Lett.*, 1990, 23, 607.
- [110] M. C. Rouan, *J. Chromatogr.*, 1985, 340, 361.
- [111] W. A. Moats, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1985, 68, 980.
- [112] W. A. Moats, *J. Chromatogr.*, 1984, 317, 311; *ibid.*, 1986, 358, 253; *ibid.*, 1990, 507, 177.
- [113] W. A. Moats, *J. Agric. Food Chem.*, 1983, 31, 880 i 1348.
- [114] B. Shaikh, E. H. Allen, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1985, 68, 1007.
- [115] F. Kondo, S. Morikawa, S. Tatayama, *J. Food Chem.*, 1988, 52, 41.
- [116] C. D. C. Salibury, C. E. Rigby, W. Chan, *J. Agric. Food Chem.*, 1989, 37, 105.
- [117] H. Oka, Y. Ikai, N. Kawamura, K. Uno, M. Yamada, *J. Chromatogr.* 1987, 393, 285.
- [118] V. K. Agarwal, *J. Liq. Chromatogr.*, 1989, 12, 613 i 3265; *ibid.*, 1991, 614, 699.
- [119] M. H. Thomas, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1989, 72, 564.
- [120] D. J. Fletouris, J. E. Psomas, N. A. Botsoglou, *J. Agric. Food Chem.*, 1990, 38, 1913.
- [121] S. Pleasance, P. Blay, M. A. Quilliam, G. O'Hara, *J. Chromatogr.*, 1991, 558, 155.
- [122] T. A. Getek, M. L. Vestal, T. G. Alexander, *ibid.*, 1991, 554, 191.

- [123] L. A. Van Ginkel, H. J. Van Rossum, P. W. Zoontjes, H. Van Blitterswijk, *Anal. Chim. Acta*, 1990, **237**, 501.
- [124] J. F. M. Nouws, J. Laurensen M. M. L. Aerts, *Archiv. Lebensmittelhyg.*, 1987, **38**, 7.
- [125] J. F. M. Nouws, F. Reek, M. M. L. Aerts, M. Baakman, *ibid.*, 1987, **38**, 9.
- [126] P. Rohner, M. Schällibum, J. Nicolet, *J. Food Protect.*, 1985, **48**, 59.
- [128] Ch. T. Elliott, K. S. Francis, H. D. Shortt, W. J. McCanghey, *Analyst*, 1995, **120**, 1827.
- [129] A. L. Wicker, M. P. Turberg, M. R. Coleman, *ibid.*, 1994, **119**, 2879.
- [130] Ch. T. Elliott, K. S. Francis, W. J. McCanghey, *ibid.*, 1994, **119**, 2565.
- [131] M. A. Baciggalupo, A. Ius, G. Meroni, M. Dovis, E. Petruzzelli, *ibid.*, 1995, **120**, 2269.
- [132] C. Williams, I. Patel, C. J. Willer, N. T. Crosby, *ibid.*, 1994, **119**, 427.
- [133] J. J. Silverlight, R. Jackmman, *ibid.*, 1994, **119**, 2705.
- [134] L. Campanella, K. Purzyńska, M. Trojanowicz, *Talanta*, 1996, **43**, 825.
- [135] M. Balcerzak, *Wiad. Chem.*, 1995, **49**, 137.
- [136] B. Godlewska, A. Hulaniccki, *Chem. Anal.*, 1993, **38**, 267.
- [137] A. Hulaniccki, *Wiad. Chem.*, 1997, **51**, 189.
- [138] S. L. Hefle, *Food Technol.*, 1995, 102.
- [139] W. H. Newsome, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1986, **69**, 919.
- [140] D. Monre, *Anal. Chem.*, 1984, **56**, 920A.
- [141] J. Leszczyńska, J. Masłowska, A. Owczarek, U. Pytasz, *Chem. Anal. (Warsaw)*, 1997, **42**, 715.
- [142] J. Masłowska, A. Owczarek, *Chem. Anal. (Warsaw)*, 1997, **42**, w druku.
- [143] U. Kucharska, A. Owczarek, J. Leszczyńska, J. Masłowska, *Chem. Anal. (Warsaw)*, praca przedstawiona do druku.
- [144] M. Więdocha, J. Masłowska, *Zeszyty Naukowe Politechniki Łódzkiej, Chemia Spożywcza i Biotechnologia*, 1997, **58**, w druku.
- [145] J. Leszczyńska, A. Owczarek, U. Kucharska, J. Masłowska, *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 1997, praca przyjęta do druku.
- [146] U. Kucharska, J. Leszczyńska, *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 1997, praca przyjęta do druku.
- [147] J. Masłowska, J. Leszczyńska, *Roczn. PZH*, 1992, **43**, 61.
- [148] J. Masłowska, *Chemia Spożywcza i Biotechnologia*, 1997, **58**, 5.
- [149] J. Masłowska, *Chemia a żywność, X Szkoła Problemów Dydaktyki Chemii, 6–10 VI 1997, Materiały Szkoły*, s. 182–192.
- [150] J. Masłowska, A. Owczarek, J. Leszczyńska, *Wiad. Chem.* 1997, **51**, 827.

Praca wpłynęła do Redakcji 4 sierpnia 1997

FELIETON NAUKOWY



NOTATKI CHAOTYCZNE
XVIII. O CHEMII KOMBINATORYCZNEJ

Ignacy Z. Siemion

*Wydział Chemii, Uniwersytet Wrocławski,
ul. F. Joliot-Curie 14, 50-385 Wrocław*

I oto znów, na naszych oczach, powstał nowy dział nauk chemicznych – chemia kombinatoryczna. Przynajmniej na razie jest to część chemii organicznej, dotycząca syntezy związków organicznych. Ale implikuje ona zupełnie nową, używając bardzo modnego teraz słownictwa, „filozofię” syntezy. Syntetykom chodziło zawsze i nadal chodzi o uzyskiwanie konkretnych, indywidualnych związków chemicznych. Celem prowadzonej pracy była zawsze synteza indywidualnego połączenia chemicznego, które następnie należało właściwie scharakteryzować, ustalając jego cechy strukturalne. Chemikowi „kombinatorycznemu” chodzi zaś o coś innego. Chodzi o wyselekcjonowanie z tysięcy związków, stanowiących razem ich „bibliotekę”, jednego konkretnego połączenia o pożądanych właściwościach. Jest to więc sztuka szukania igły w stogu siana i aż dziwne, że się udaje. Niektórzy charakteryzują ten stan rzeczy w następujący sposób: „nie chodzi już nam dzisiaj o pomnażanie zasobu istniejących (otrzymanych na drodze syntezy) związków organicznych, ale o syntezę określonych własności”. Wypowiedź ta jest pewnym uproszczeniem sprawy. Bo dokładniej mówiąc, chodzi tu o otrzymanie ogromnej biblioteki związków, z których badacz wyselekcjonowuje ten jeden o potrzebnych mu własnościach.

Podejście takie jest zdecydowanie odmienne od podejścia pracującego na sposób tradycyjny organika-syntetyka, ale i od podejścia chemika pracującego w chemii polimerów. Temu ostatniemu zależy wprawdzie na otrzymaniu preparatu o pożądanych własnościach, ale własności te są cechą mieszaniny chemicznie zbliżonych indywidualów chemicznych, a nie pojedynczego związku chemicznego.

Historia chemii kombinatorycznej liczy zaledwie dziesięć lat. Oprócz licznych artykułów przeglądowych doczekała się jednak już i poważnego opracowania książkowego, budzącego respekt nawet swoimi rozmiarami [1]. Kombinatoryka to według encyklopedii PWN „elementarny dział teorii mnogości, którego przedmiotem jest badanie różnych możliwych zestawień i ugrupowań, jakie można tworzyć z elementów pewnego zbioru skończonego”. Ta definicja bardzo jasno mówi nam, o co też w chemii kombinatorycznej może chodzić. Oto mamy np. skończony zbiór 20 elementów – aminokwasów białkowych. Można zeń utworzyć rodzinę 20^5 pentapeptydów, różniących się sekwencją aminokwasową. Konkretnie mówiąc, rodzina taka będzie zawierała 3 200 000 związków. I wśród tej masy szukamy pojedynczego pentapeptydu o interesujących nas własnościach.

Chemia kombinatoryczna zrodziła się na gruncie chemii peptydów, ale szybko podbiła tereny objęte przez pokrewne działy chemii – jak chemia polinukleotydów – i włączyła się w obręb chemii leków. W gruncie rzeczy jest ona konsekwencją, dostrzeżeniem możliwości tkwiących w znacznie starszym od niej podejściu – w syntezie na nośnikach stałych. Na podstawie technik syntezy na podłożu stałym uzyskuje się bardzo szybko obszerne biblioteki związków, np. biblioteki peptydów o określonych rozmiarach i składzie aminokwasowym. Albo biblioteki nukleotydowe. (O ich otrzymaniu pisał niedaw-

no na naszych łamach W. Markiewicz [2].) Otrzymano również szereg bibliotek potencjalnych leków: benzodiazepin, hydantoin i tiazolidyn. Umożliwiają one szybką selekcję najbardziej obiecujących indywidualnych połączeń, ukrytych wśród setek czy tysięcy innych.

Jak powiedzieliśmy, chemia kombinatoryczna jest konsekwencją rozwoju metod syntezy na nośniku stałych. Wymyślona przez R. Merrifielda synteza peptydów na nośniku stałym pojawiła się w latach 1963–1964. Umożliwiła ona ogromne przyspieszenie tempa prac, ale nie pozwalała jeszcze syntez skutecznie zmnożyć, tak by było można równocześnie syntezować wiele peptydów. I dopiero dwadzieścia lat później umożliwiła to metoda „torebek herbacianych” R. A. Houghtena [3]. Jego pomysł uderza swoją prostotą. Ziarna polimeru, będącego stałym nośnikiem narastającego peptydu, dzieli się na porcje 50–100-miligramowe. Każdą porcję umieszcza się w oddzielnej perforowanej torebce z polipropylenu, o wymiarach 15 × 20 mm. Rozmiary otworków w ściankach torebek muszą oczywiście być mniejsze od rozmiarów ziaren nośnika. Dysponując oddzielnymi naczyniami zawierającymi roztwory aktywowanych pochodnych N-blokowanych aminokwasów, można te torebki w dowolny sposób kombinować ze sobą, prowadząc równoczesną syntezę znacznej liczby peptydów, różniących się sekwencją, a nawet rozmiarami łańcucha. Takie etapy syntezy, jak zdjęcie osłon i przygotowanie narastających peptydów do następnego jej etapu, można przy tym prowadzić dla wszystkich torebek łącznie, zbierając je razem. Autor pomysłu pokazał, że w opisany sposób można np. równocześnie zsyntezować 248 13-peptydów, homologów fragmentu 98–110 hemoaglutyniny grypy. Cała synteza zajęła badaczowi mniej niż 4 tygodnie, a ilości produktów w poszczególnych torebkach sięgnęły 10–20 mg. Cała ta praca była nakierowana na jasno określony cel. Chodziło o zbadanie, jak wymiana właściwych wymienionemu fragmentowi hemoaglutyniny aminokwasów na inne reszty aminokwasowe wpłynie na wiązanie się uzyskanych peptydów ze specyficznym przeciwciałem białkowym, reagującym z tym fragmentem. Houghten pokazał więc, w jaki sposób można szybko otrzymać bibliotekę peptydów o kontrolowanych sekwencjach aminokwasowych. Bo prowadząc syntezę dobrze przecież wiemy, jakie reszty aminokwasowe wprowadzamy do poszczególnych pozycji każdego z równocześnie syntezowanych peptydów.

Późniejsze modyfikacje tego podejścia polegały na propozycjach automatyzacji operacji i miniaturyzacji całego procesu. Czeski chemik, M. Lebl, zaproponował, aby jako podłoża użyć wstęg bawełnianych. C-końcowy aminokwas jest w tym podejściu estrowo wiązany z celulozą. Wstęgę, według zadanego programu, przewija się przez szereg naczyń zawierających aktywowane aminokwasy i odczynniki odblokowujące grupy funkcyjne oraz rozpuszczalniki potrzebne do przemywania taśmy na poszczególnych etapach syntezy. Podłoże celulozowe umożliwiło w następstwie miniaturyzację procesu. Na arkuszu bibuły o rozmiarach 55 × 105 mm lokuje się obok siebie 50 równoległych syntez

peptydowych. Zautomatyzowane baterie pipet laboratoryjnych pozwalają precyzyjnie nakraplać na poszczególne pola potrzebne do realizacji kolejnych etapów syntezy odczynniki.

Jeszcze większe możliwości miniaturyzacji syntezy stworzyło podłoże aminoalkilowanego szkła [4]. Związane z tym podłożem C-terminalne aminokwasy chronione są osłonami fotolabilnymi. Napromieniowanie układu (przy użyciu odpowiednich szablonów) odsłania grupy aminowe narastającego łańcucha peptydowego przed kolejnymi etapami syntezy. Przy użyciu tej metody (*light-directed, spatially addressable*) można na polu o powierzchni 1 cm^2 zmieścić 10 tysięcy równolegle biegnących syntez peptydowych. Syntezy są tu w pełni kontrolowane pod względem sekwencyjnym; prowadzący je chemik wie, jaki peptyd jest syntezowany w konkretnym wycinku pola operacyjnego. Oczywiście nie ma przy tym mowy o izolacji produktów. Technika taka może jednak być użyta np. do badania epitopów (fragmentów immunogennych) białek. Łańcuch polipeptydowy badanego białka można podzielić na szereg krótkich fragmentów o określonej sekwencji aminokwasowej. Wszystkie te fragmenty można zsyntezować w opisany sposób, a następnie można zobaczyć, z jakimi (osadzonymi na podłożu) peptydami wiążą się specyficzne dla badanego białka przeciwciała. Jeśli dysponujemy przeciwciałami tak zmodyfikowanymi chemicznie, aby dawały widzialną fluorescencję, bez trudu zidentyfikujemy epitopy peptydowe, uwidaczniające się wśród wszystkich innych, ułożonych obok siebie na użytym do syntezy podłożu, peptydów. W tak zmultiplikowanej syntezie chemik rezygnuje z izolacji, oczyszczenia i analitycznej kontroli produktów. Sekwencję określonego i osadzonego w danym wycinku pola operacyjnego peptydu dobrze jednak zna. Określa ją historia syntezy, kolejność wprowadzania odczynników, czy lepiej — reagentów.

Te wydarzenia przygotowały grunt dla kolejnego kroku. Jego autorem był węgierski chemik, Arpad Furka. Zaproponował on, by w ogóle zrezygnować z kontroli sekwencji syntezowanych peptydów. Jego metoda to metoda porcjonowania-mieszania. Powiedzmy, że chcemy zsyntezować bibliotekę wszystkich możliwych trójpeptydów, zbudowanych z leucyny (L), alaniny (A) i glicyny (G). Będzie to nieduża biblioteka, wszystkiego 27 związków. Każdy z wymienionych aminokwasów oddzielnie osadzamy na podłożu polimerowym. Otrzymane układy wyjściowe to A — P, L — P i G — P (P — nośnik stały). Mieszymy je ze sobą dokładnie i po odblokowaniu N-końcowych grup aminowych dzielimy na trzy równe porcje. Pierwszą porcję łączymy z leucyną. Powstanie wtedy mieszanina produktów: L-A — P, L-L — P i L-G — P. Druga porcja posłuży nam do reakcji z alaniną. Powstaną wtedy produkty: A-A — P, A-L — P i A-G — P. Z trzeciej porcji otrzymamy odpowiednio G-G — P, G-A — P oraz G-L — P. Teraz ponownie mieszamy wszystkie trzy porcje, odblokowujemy N-końcowe grupy aminowe wszystkich peptydów i całość dzielimy znów na trzy porcje, by każdą poddać reakcji sprzęgania — pierwszą z alaniną, drugą z leucyną i trzecią z glicyną. W wyniku tej operacji

powstanie 27 trójpeptydów. Oczywiście, nie wiemy, na jakich ziarenkach polimeru-nośnika znajduje się konkretny peptyd. Wiemy tylko, że każde pojedyncze ziarenko polimeru niesie na sobie tylko jeden rodzaj trójpeptydu. W każdym razie, w kolejnych cyklach syntezy, tzn. przedłużając syntezywane łańcuchy peptydowe, możemy szybko namnażać liczbę uzyskanych peptydów. Na etapie pentapeptydu, tj. przeprowadzając pięć kolejnych cykli syntezy, będziemy już dysponowali 243 peptydami, zbudowanymi z alaniny, glicyny i leucyny w różnych proporcjach. Metoda porcjonowania-mieszania umożliwia rzeczy zgoła niezwykle. Gdybyśmy chcieli (używając wyłącznie aminokwasów białkowych) przeprowadzić syntezę wszystkich możliwych heksapeptydów, musielibyśmy wykonać 384 miliony pojedynczych operacji. Metoda porcjonowania-mieszania ogranicza tę liczbę do zaledwie 120, co mieści się jeszcze dość łatwo w możliwościach syntetyka.

Metoda Furki pozwala bardzo szybko wyprodukować obszerne biblioteki peptydowe. Wymieniony już Houghten otrzymał np. biblioteki wolnych (tj. zdjętych z nośnika) heksapeptydów, zawierające ponad 50 milionów indywidualnych związków [5]. Liczba ta jest kilkakrotnie wyższa od liczby wszystkich otrzymanych dotychczas indywidualnych i opisanych w piśmiennictwie chemicznym związków organicznych.

Na pomysł metody porcjonowania-mieszania wpadł Furka w 1988 roku. Pomysł ten zaprezentował na dwóch dużych kongresach naukowych [6], a niedługo potem w postaci rozwiniętej publikacji [7]. Trudno opisać, jaki ścisk powstał na polu odkrytym przez Furkę – na polu niesterowanej syntezy bibliotek peptydowych. Na 22. Europejskim Sympozjum Peptydowym w Interlaken, w roku 1992, przedstawiono już cały szereg referatów plenarnych na ten właśnie temat.

Na sympozjum tym poznałem Furkę. W pewnym momencie uroczystego bankietu, kończącego sympozjum (odbywało się to w ogromnej hali, która mogła zmieścić blisko tysiąc uczestników spotkania), przysiadłem się na moment do stolika, który zajmowała m.in. para moich niedawnych jeszcze współpracowników. Wieloosobowy stół nie miał już niemal załogi, większość dokądeś pobiegła. Siedziała tam ta moja para i koło nich ponury, może 50-letni osobnik z taką jakby obwisłą i obrzękłą twarzą. „Oni wszyscy – mówił mi nerwowo – nawet się nie zająkną, że ja to wymyśliłem. To jest przecież moje. A żaden z nich nawet o tym nie wspomniał”. Dłuższy czas słuchałem wtedy wyrzekań zapoznanego odkrywcy. Takiemu przemilczeniu na pewno sprzyjał zbyt długi czas, jaki upłynął między zjazdowymi komunikatami a pełną publikacją Furki. Ale przecież sytuacja na 26. sympozjum, które odbyło się w Edynburgu w 1996 roku, była już zupełnie inna. Furka był już uznany i doceniony. Może zresztą i dlatego, że występował wtedy nie tak jak przedtem, z ramienia Eötvös Lorand University w Budapeszcie, ale Advanced ChemTech Inc. w Louisville. Jeśli kiedyś, co jest przecież możliwe, przyjdzie komuś do głowy odznaczyć metodę porcjonowania-mieszania Nagrodą Nobla, nie sposób już będzie pominąć Arpada Furki.

W dotychczasowych rozważaniach nie powiedzieliśmy nic jeszcze o rzeczy chyba najważniejszej. O tym, jak znaleźć igłę w stogu siana, czyli odszukać potrzebny nam peptyd wśród tysięcy innych, stanowiących razem bibliotekę peptydową. Do tego celu służą w najwyższym stopniu selektywne oddziaływania, jakie istnieją w układach bipolimerów, nieomylnie rozpoznających właściwe bioligandy. Właściwy receptor białkowy zwiąże się z powierzchnią tylko tego ziarenka użytego do syntezy biblioteki nośnika, na którym osadzony jest właściwy peptydowy bioligand. Jeśli takie testujące bibliotekę białko zaopatrzymy w znacznik fluoryzujący, bez trudu odnajdziemy wśród tysięcy innych ziarenek nośnika te niosące na sobie potrzebny nam peptyd. Możemy te ziarenka odseparować od pozostałych. Możemy następnie, po zdjęciu peptydu z nośnika, określić jego sekwencję. Współczesne metody, a zwłaszcza nadzwyczaj czułe techniki spektrometrii mas, umożliwiają już takie działania.

Można zresztą działać w odwrotny sposób. Przygotować bibliotekę wolnych, tzn. zdjętych z nośnika, peptydów i roztwór takiej mieszaniny przepuszczać przez kolumnę zawierającą immobilizowany białkowy receptor, selektywnie wiążący właściwy ligand peptydowy. Taki układ „przeczyta” nam w mgnieniu oka całą naszą bibliotekę i wybierze z niej właściwą inskrypcję.

Biblioteki peptydowe pozwalają nam więc bardzo szybko zidentyfikować epitopy białek antygenowych czy też wskazać, jakie peptydy mają zdolność łączenia się z określonymi receptorami komórek żywych i błon cytoplazmatycznych. I to jest ta najbardziej istotna zaleta „filozofii” chemii kombinatorycznej.

Na pierwszy rzut oka chemia kombinatoryczna pozostawia niewiele miejsca dla intelektualnego wysiłku badacza. Ale takie wrażenie, to tylko pierwsze wrażenie. Biblioteki związków chemicznych, takie jak biblioteki peptydów, nigdy nie są kompletne. Nie zawierają one wszystkich możliwych połączeń danej grupy. Chemik już na wstępie dokonuje wyboru. Określa, jaka biblioteka będzie mu potrzebna do rozwiązania konkretnego problemu, nad którym pracuje. Wybór może być trafny, ale może też być błędny. Chemia kombinatoryczna pozostawia więc pole dla błędu, nieodłącznej cechy każdej pracy badawczej. Chemia kombinatoryczna wymaga zatem od swoich adeptów zmiany sposobu myślenia, ale nie zwalnia ich od myślenia w ogóle.

Wiele ciekawych przykładów umiejętnego zastosowania bibliotek peptydowych do rozwiązywania konkretnych problemów badawczych dostarczyły prace zespołu R. A. Houghtena. Przytoczę tylko jeden. Od dość już dawna znane są peptydy o działaniu morfinopodobnym, a wśród nich enkefalin leucynowa i metioninowa o sekwencjach: Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu i Tyr-Gly-Gly-Phe-Met. Zamiarem Houghtena było zoptymalizowanie sekwencji peptydu łączącego się z receptorem „mi” błon komórkowych mózgu. W tym celu homogenaty mózgu szczura były traktowane specyficznym ligandem receptorów „mi”, peptydem o sekwencji [^3H]-[D-Ala², MePhe⁴, Gly-ol⁵]-enkefalina, a następnie szeregiem roztworów bibliotek peptydowych. Kontrolowano, jak

poszczególne biblioteki wpływają na proces oddziaływania wskazanego uprzednio liganda z receptorami. Początkowo ustalono, że najsilniej hamują wiązanie tego liganda z receptorami białkowymi biblioteki typu Tyr-Gly-Xxx-Xxx-Xxx, gdzie w miejscach Xxx był dowolny z 19 (poza cysteiną) aminokwasów białkowych. Zostawiając fragment Tyr-Gly w pentapeptydzie jako element stały, sporządzano dalsze biblioteki ze zdefiniowanym aminokwasem w pozycji trzeciej. Najaktywniejsze były teraz biblioteki o sekwencjach Tyr-Gly-Gly-Xxx-Xxx. Teraz należało więc określić optymalną sekwencję dla pozycji czwartej w peptydzie i sporządzić biblioteki, w których pozycja ta byłaby zdefiniowana, a tylko piąta obsadzona chaotycznie.

Można powiedzieć: „no i cóż to za wyczyn, wyraźnie tu dążymy do stwierdzenia, że optymalnym ligandem receptora jest naturalna enkefalina”. Ale po drodze zdarzają się przecież niespodzianki. Dokonując przeglądu kilku setek bibliotek wolnych peptydów, Houghten znalazł nową grupę antagonistów enkefalin o sekwencji: Ac-Arg-Phe-Met-Trp-Met-Xxx-NH₂. Żadne dotychczas zaprezentowane w piśmiennictwie chemicznym wyniki nie mogły podpowiedzieć, że warto pracować w takim właśnie kierunku. Nową grupę antagonistów enkefalin nazwano acetalinami [8].

Przykład ten pokazuje, że i w chemii kombinatorycznej można liczyć na szczęśliwy traf, na zaskakującą niespodziankę. Że jest ona również polem nieodłącznego od działalności badawczej hazardu poznawczego.

Trzeba tu powiedzieć, że Przyroda już bez porównania dawniej niż chemicy wymyśliła biblioteki związków organicznych. Liczne np. antybiotyki peptydowe produkowane są w organizmach żywych w postaci naborów strukturalnie do siebie podobnych, a przecież nie identycznych związków. Jako przykłady można wymienić lantiobiotyki bakteryjne, czy też związki peptaibolowe. I w końcu – czyż nie ogromną biblioteką białek są przeciwciała, zbudowane wedle jednolitego planu i różniące się budową obszarów wiązania antygenów?

W moich czasach studenckich synteza nowych, indywidualnych połączeń chemicznych była bodaj najważniejszym celem pracy organika. Pamiętam, jak do naszej pracowni magisterskiej trafił Koreańczyk, chłopak, któremu wojna, w której zresztą musiał wziąć czynny udział, przerwała studia. Teraz doganiał stracony czas i pracował nad swoją rozprawą doktorską. Egzaminował mnie z moich dokonań, pytając dociekliwie łamaną ruszczyzną: „Skolki nowyja sojedinenija sdiełał?” Uważał – i w tym przekonaniu nie był osamotniony – że naszym powołaniem jest synteza nowych związków. No, ale wtedy znano tylko 2–3 miliony związków organicznych. Dlatego nie może dziwić, że w recenzjach rozpraw doktorskich tamtych lat padały często takie sformułowania: „doktorant potrafił otrzymać 30 (40, 50) nowych związków chemicznych”. I był to powód do dumy i chwały doktoranta. Dziś unikamy takich sformułowań, aby doktorantowi nie psuć dobrej opinii. Dziś wiemy, że wyścig o liczbę nowych związków jest z samego założenia przegrany. Chyba że posłużymy się technikami chemii kombinatorycznej.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] *Combinatorial Peptide and Nonpeptide Libraries*, G. Jung (wyd.), Verlag Chemie, Weinheim 1996, s. XXVIII + 544.
- [2] W. Markiewicz, *Wiad. Chem.*, 1995, **49**, 729.
- [3] R. A. Houghten, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 1985, **82**, 5131.
- [4] S. P. A. Fodor, J. L. Read, M. C. Pirrung, L. Stryer, A. T. Lu, D. Solas, *Science*, 1991, **252**, 767.
- [5] R. A. Houghten et al., *Nature*, 1991, **354**, 84.
- [6] A. Furka, F. Sebastyén, G. Dibo, *Abstr. 14th Int. Congr. Biochem.*, Prague 1988, vol. 5, s. 47; *Abstr. 10th Symp. Med. Chem.*, Budapest 1988, s. 288.
- [7] A. Furka, F. Sebastyén, M. Asgedom, G. Dibo, *Int. J. Peptide a. Protein Res.*, 1991, **37**, 487.
- [8] C. T. Dooley, N. N. Chung, P. W. Schiller, R. A. Houghten, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 1993, **90**, 10811.

KRONIKA



DOKTORAT *HONORIS CAUSA* RUMUŃSKIEGO UNIWERSYTETU DLA POLSKIEGO NAUKOWCA

Profesor Zbigniew Jedliński – wybitny polski uczony, wykładowca Politechniki Gdańskiej, Politechniki Śląskiej, Uniwersytetu Jagiellońskiego, a także uniwersytetów amerykańskich i niemieckich, pracujący obecnie w Centrum Chemii Polimerów Polskiej Akademii Nauk w Zabrze, otrzymał doktorat *honoris causa* Uniwersytetu Technicznego w Jassach – Rumunia. Najwyższą godność akademicką przyznał Z. Jedlińskiemu Senat tej utworzonej w roku 1912, jednej z najstarszych wyższych uczelni technicznych w Europie, w uznaniu jego wybitnych osiągnięć naukowych w dziedzinie chemii.

Dotychczas doktoraty *honoris causa* tego uniwersytetu otrzymało tylko niewielu sławnych chemików, jak profesorowie H. Mark, O. Vogel, R. West ze Stanów Zjednoczonych, profesor H. A. Schneider z Niemiec i profesor J. Schurz z Austrii.

Uroczystości związane z wręczeniem dyplomu doktora *honoris causa* odbyły się na ogólnym zebraniu Senatu, profesorów, zaproszonych gości i młodzieży akademickiej 7 kwietnia br.

Jest to już drugie w ostatnich latach prestiżowe wyróżnienie zagraniczne dla Profesora Jedlińskiego, który w roku 1996 jako jedyny Polak został laureatem nagrody im. Hermana F. Marka, przyznawanej przez Międzynarodowy Komitet tej nagrody w Wiedniu.

*

Do najbardziej znaczących osiągnięć Profesora Jedlińskiego należy wykrycie kilku nowych reakcji chemicznych, które weszły jako oryginalne odkrycia do literatury światowej i zostały odnotowane zarówno w monografiach, jak

i encyklopediach międzynarodowych. Są to np. nowe metody generowania karbanionów, nowe reakcje transformacji związków oksiranowych w laktony oraz rozerwania wiązań C—C w laktonach, odkrycie nowych katalizatorów – typu metalicznych kompleksów supramolekularnych, zastosowanych w syntezie polimerów biokompatybilnych. Odkrycia te rozświetliły polską naukę na świecie, a nazwisko Profesora Jedlińskiego pojawiło się w licznych monografiach oraz encyklopediach zagranicznych.

W ostatnich latach twórczo rozwinął nowoczesną gałąź chemii – chemię supramolekularną kompleksów metali alkalicznych (litowców) oraz zjawisk przeniesienia elektronów w układach reakcyjnych z udziałem tych kompleksów, która to dziedzina okazała się niesłychanie interesująca i pożyteczna z punktu widzenia aspektów teoretycznych i zastosowań praktycznych.

Profesor Jedliński opublikował około 300 prac, m.in. w takich czasopismach, jak: „Journal of American Chemical Society”, „Journal of Physical Chemistry”, „Journal of Organic Chemistry”, „Macromolecules”, „Synlett”, „Pure and Applied Chemistry”, „Tetrahedron”, „Journal of Chemical Society – Chemical Communications” oraz „Accounts of Chemical Research”.

*Krystyna Brandt
Rzecznik prasowy
Centrum Chemii Polimerów PAN*

NOWE WYDAWNICTWA



W. Ufnalski, **Obliczenia fizykochemiczne na Twoim PC**, WNT Warszawa 1997

Jest to podręcznik do obliczeń z zakresu termodynamiki chemicznej uzupełniony o programy komputerowe ułatwiające obliczenia, wraz z konieczną bazą danych.

Książka składa się z pięciu rozdziałów:

1. Elementarne zastosowanie zasad termodynamiki: Jednostki i pojęcia podstawowe. Temperatura, energia i ciepło. Przemiany gazu doskonałego i faz skondensowanych. Druga zasada termodynamiki i maszyny cieplne.

2. Przemiany fizyczne substancji czystych i mieszanin: Efekty cieplne przemian fizycznych. Obliczenia funkcji termodynamicznych na podstawie danych kalorymetrycznych. Obliczenia funkcji termodynamicznych gazów i ciał stałych metodami statystycznymi. Bilanse cieplne z przemianami fizycznymi, elementy kalorymetrii.

3. Elementy metod numerycznych.

4. Dodatki (stałe fizyczne i relacje między nimi, funkcje Debye'a i Einsteina).

5. Piśmiennictwo i źródła danych fizykochemicznych.

Materiał przekracza podstawowy zakres termodynamiki chemicznej o zagadnienia z termodynamiki technicznej. Podręcznik zawiera zadania z rozwiązaniami o różnym stopniu trudności oraz zadania do rozwiązania na podstawie podanych wskazówek.

Programy komputerowe wraz z bazą danych ułatwiają wykonanie obliczeń:

DTMS – program obsługi bazy danych.

DEBYE – prezentuje dane termochemiczne i molekularne substancji czystych i wspomaga obliczenia funkcji termodynamicznych oraz bilansów cieplnych.

INFO – do czytania dokumentacji programów.

Podręcznik opracowany jest bardzo starannie i wyczerpująco. Zagadnienia przedstawione są jasno. Sposób rozwiązywania danego programu podany jest przejrzysto z uwzględnieniem etapów przejściowych. Uważam, że jest bardzo pomocny do poznania i zrozumienia termodynamiki chemicznej. Również pomocny jest zbiór literatury dotyczący istniejących podręczników i źródeł danych fizykochemicznych.

Uwagi dyskusyjne:

1. Tytuł jest zbyt ogólny, chyba że jest zapowiedzią dalszych części.

2. Moim zdaniem rozdział „Elementy metod numerycznych” nie jest konieczny, dotyczy oddzielnego przedmiotu wykładu.

3. Programy byłyby jeszcze bardziej użyteczne, gdyby napisano je jako aplikacje Windows, co ułatwiłoby edycję. Posługiwanie się nowym programem wymaga czasu na jego opanowanie. Równie skutecznie można by dokonywać obliczeń i prezentować wyniki korzystając np. z Excela,

ogólnie znanego i dostępnego, gdyby udostępnić bazę danych pod Windows oraz wskazówki w postaci makroinstrukcji.

4. Czy zabezpieczenia programu są konieczne? Utrudniają korzystanie z programów.

W sumie uważam prezentowany podręcznik za najlepszy z dostępnych na rynku z zakresu obliczeń z termodynamiki chemicznej.

Kazimierz Gatner

Zbigniew Szydło, Woda, która nie moczy rąk. Alchemia Michała Sędziwoja. Z angielskiego przełożył Roman Mierzecki, WNT, Warszawa 1997, 300 s. okładka kartonowa, cena 26 zł

Autor książki, Zbigniew Szydło, nauczyciel chemii i historyk nauki pracujący w Anglii, urodził się tam w rodzinie polskich emigrantów. Takie koleje życia pozwoliły mu z równą łatwością korzystać z dorobku zarówno polskich, jak i angielskich badaczy wczesnych okresów historii nauk chemicznych. Budzące uznanie pełne wykorzystanie tego dorobku, pomnożone o docieklive własne studia Autora, dały w wyniku książkę wielce ciekawą. Książka poświęcona jest postaci największego bodaj, a w każdym razie najbardziej przez współczesnych mu znanego i cenionego polskiego alchemika, Michała Sędziwoja. Losy życia i omówienie treści dzieł Sędziwoja zostały jednak w książce zarysowane na szerokim tle dokonań jego poprzedników i następców, wyraziście odzwierciedlając miejsce Sędziwoja w tradycji wiekowych prac alchemików europejskich.

Alchemia i tradycje alchemiczne były w XIX w. wyraźnie negliżowane. Uwypuklano raczej zdecydowaną odmienność tej „starej” chemii od chemii postlavoisierowskiej. Kiedy np. nasz wybitny chemik minionego wieku, Bronisław Radziszewski, wygłaszał (było to w roku 1898) wykład na otwarciu trzeciej serii kursów akademickich dla kobiet, to, jak możemy przeczytać w „Kronice Uniwersytetu Lwowskiego” za ten okres, „szczególnie zatrzymał się przy badaniach średniowiecznych chemików nad wynalezieniem kamienia filozoficznego [...] Wspomniał o kilku głośniejszych szarlatanach, a szczególnie zatrzymał się przy Michale Sędziwoju [...] Dziwił się, dlaczego właśnie tego szarlatana Matejko wziął do swego obrazu, jako reprezentanta nauki”.

Dzisiaj usiłujemy raczej z zagmatwanych treściowo i napisanych zawitym, symbolicznym językiem ksiąg alchemicznych wydobyć te elementy wartościowe, które w jakiejś mierze oddziaływały na późniejszy rozwój chemii. Takiemu właśnie spojrzeniu na twórczość Sędziwoja sprzyjały w naszym kraju wieloletnie badania Romana Bugaja. Bugaj zwrócił szczególną uwagę na „teorię nitry” Sędziwoja, w której dopatrywał się przecucia roli tlenu w procesach życiowych i chemicznych. Wyszukał też Bugaj przypuszczenie, że późniejsze na ten temat domysły Johna Mayowa (1641–1679) pozostawały pod wpływem pism Sędziwoja. Prezentowane w recenzowanej książce wyniki badań Szydły w pełni potwierdzają ten domysł Bugaja.

Jeden z rozdziałów swojej książki Szydło poświęca opinii dzisiejszych historyków nauki o naszym alchemiku. Wskazuje, że o zależności Mayowa (a także Hooke’a) od Sędziwoja pisali m.in. H. Guerlac (1953), A. G. Debus (1964) i R. Frank Jr (1980), wykazując, że sprawa ta stała się przedmiotem poważnej, międzynarodowej dyskusji naukowej.

Ważnym wynikiem osobistych poszukiwań Szydły jest też pomnożenie listy publikacji Sędziwoja. Wcześniej Bugaj ustalił listę sześciu tytułów dzieł naszego alchemika. Szydło rozszerzył ją o cztery dalsze. Zestawił też listy wydań tych dzieł. Było ich niemało i to w różnych europejskich językach. Istnienie tych wydań starał się Szydło sprawdzić osobiście. O większości pisze, że miał je w rękę. Wśród tych nowych, przepisanych Sędziwojowi tytułów szczególną uwagę zwracają *Statuty nieznanych filozofów* (*Statuts des Philosophes Inconnus*). Rzucając one nieoczekiwane światło na przypuszczalną rolę Sędziwoja we wczesnym okresie historii międzynarodowego bractwa różokrzyżowców. Potwierdzałoby to, zdaniem Szydły, przypuszczenie R. Prinksa, że to Sędziwój był wzorem dla legendarnej postaci Christiana Rosenkreutza, domniemanego założyciela bractwa.

Jak już powiedziałem, Szydło omawia dokonania Sędziwoja na tle historii dokonań alchemików europejskich w ogóle. Swoje tezy obficie ilustruje wyborem tekstów oryginalnych dzieł Sędziwoja. Stara się dociec realnych znaczeń chemicznych tych tekstów i znaczenia te wyrazić w postaci współczesnych równań reakcji chemicznych. W tych pożytecznych interpretacjach zdarzają się niekiedy zbytnie jednak uproszczenia. I tak np. przedstawiona na s. 191 interpretacja procesu kwaśnienia wina całkowicie ignoruje rolę mikroorganizmów w tym *par excellence* biotechnologicznym procesie. W równaniu zaś reakcji termicznego rozkładu azotynu potasu (s. 175) winien figurować tlenek potasu, a nie potas metaliczny.

Książkę na język polski przetłumaczył Roman Mierzecki. Było to trudne zadanie. W tekście oryginału współczesna angielszczyzna jest przepleciona starymi tekstami i cytatami z dzieł alchemików, pełnych przecież zagadek, również językowych. Z tego zadania tłumacz wywiązał się bardzo dobrze. Książkę czyta się gładko, język jest giętki i wyrazisty. Może tylko na s. 92 użyłbym zwrotu „ziemna błyskawica”, zamiast „ziemska błyskawica”. Lepiej by to, być może, oddawało upatrywany przez alchemików związek soli (a więc i saletry, która jest tą „błyskawicą”) z arystotelesowskim pierwiastkiem „ziemi”.

Redakcyjna strona książki stoi na dobrym poziomie. Jakość papieru, druku, ilustracji itp. jest dobra. Mały błąd zauważyłem tylko w dacie śmierci Jana Zamoyskiego, podanej na s. 47.

Książkę wydały Wydawnictwa Naukowo-Techniczne. Jest to kolejny już dowód dbałości Wydawnictwa o upowszechnienie historii nauk chemicznych, dbałości rzadkiej przecież w naszych czasach. Nie tak przecież dawno to samo Wydawnictwo wydało tom *Z dziejów chemii i alchemii* Włodzimierza Hubickiego (1991), a nieco wcześniej książkę R. Sołoniewicza *Rozwój podstawowych pojęć chemicznych* (1986).

Ignacy Z. Siemion

REGULAMIN DLA AUTORÓW

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

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

Pod tytułem polskim należy umieścić tytuł w języku angielskim, adres autora oraz obszernie streszczenie w języku angielskim (do 2 stron maszynopisu z cytowaniem piśmiennictwa i odsyłaczami do tabel i rysunków w tekście).

Artykuły należy opracowywać zwięźle i nie zamieszczać szczegółów, odsyłając czytelnika do piśmiennictwa oryginalnego. Maszynopis nie powinien przekraczać 25 stron wraz z tabelami i wykazem piśmiennictwa lub 100 stron, jeśli jest monografią przeznaczoną do druku w „Bibliotece Wiadomości Chemicznych”. W wypadku prac wykonywanych za pomocą komputera, proszę zwrócić szczególną uwagę na jakość wydruku i czytelność wzorów. Jeśli nie będą wyraźne, to artykuł **nie będzie przyjęty do Wydawnictwa**. Redakcja prosi – jeżeli to możliwe – o dołączenie dyskietki z tekstem pracy wraz z informacją o używanym edytorze (i jego wersji). Redakcja zapewnia zwrot dyskietki.

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

Tabele należy ponumerować cyframi arabskimi oraz podać ich tytuł.

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

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

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

DO CZYTELNIKÓW „WIADOMOŚCI CHEMICZNYCH”

Redakcja miesięcznika PTCh „Wiadomości Chemiczne” zawiadamia, że wysokość prenumeraty rocznej „Wiadomości Chemicznych” za 1998 r. ustaliliśmy na 48 zł dla instytucji i nie zrzeszonych prenumeratorów indywidualnych oraz 24 zł dla bibliotek szkół średnich i podstawowych. Należność za prenumeratę prosimy przekazywać na konto:

Bank Przemysłowo-Handlowy S.A.
I Oddział we Wrocławiu
pl. Powstańców Śl. 9, 53-316 Wrocław
Redakcja „Wiadomości Chemicznych”
Nr 10601679-060280-27000-520101

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

- prenumerata „Wiadomości Chemicznych” na rok 1998 wraz ze składką członkowską, w ramach której dostarczany jest „Orbital”, wynosi 37 zł (składka – 30 zł, prenumerata – 7 zł);
 - emeryci oraz nauczyciele szkół średnich i podstawowych płać 22 zł (składka – 15 zł, prenumerata – 7 zł);
 - dla studentów, członków PTCh, składka wraz z prenumeratą „Wiadomości Chemicznych” wynosi 15 zł (składka – 8 zł, prenumerata – 7 zł).
- Członkowie PTCh, którzy zechcą zaprenumerować „Wiadomości Chemiczne” na podanych tu warunkach, proszeni są o wnoszenie opłat na konto:

PTCh Warszawa, ul. Freta 16
BG IV O/Warszawa, Nr 10401019-6594-132

Redakcja „Wiadomości Chemicznych”



SPIS TREŚCI

Piotr NOWAK: Działalność naukowa i dydaktyczna Zakładu Fototechniki Instytutu Chemii Fizycznej i Teoretycznej Politechniki Wrocławskiej	157
Bogdan BURCZYK: Współczesny przemysł chemiczny w świetle wymagań ochrony środowiska	175
Marek WASIELEWSKI: Enzymy niklowe	207
Kazimierz WIŚNIEWSKI, Aleksandra S. KOŁODZIEJCZYK, Bogdan FALKIEWICZ: Zastosowania reakcji Mitsunobu w chemii aminokwasów	243
Janusz JAMROZIK, Szymon SCHAB: Współczesne postępy w wybranych aspektach chemii spiranów	269
Urszula KUCHARSKA, Joanna MASŁOWSKA: Metody immunoenzymatyczne w analizie antybiotyków w produktach żywnościowych	283
Felieton naukowy	
Ignacy Z. SIEMION: Notatki chaotyczne. XVIII. O chemii kombinatorycznej	311
Kronika	319
Nowe wydawnictwa	321

W NASTĘPNYM ZESZYCIE UKAŻĄ SIĘ:

- Zdzisław RUZIEWICZ**: Fotochemia w pracach dawnych badaczy polskich. Część II. Lata 1900–1918
- Karel DUŠEK: Nauka, chemia, polimery, sieci polimerowe
- Józef HURWIC: Teoria kwantykuł Kazimierza Fajansa
- Jan S. JAWORSKI: Kinetyka rozrywania wiązania w aromatycznych anionorodnikach oraz ich tworzenia
- Ewa Daniela RACZYŃSKA: Zastosowanie spektrometrii masowej cyklotronowego rezonansu jonowego do badania reakcji przeniesienia protonu w fazie gazowej
- Krzysztof WOJCIECHOWSKI: Mechanizm i kinetyka procesów tworzenia oraz zaniku eks-cymerów XeCl⁺ w układach XeRCl
- Jerzy CIARKOWSKI, Cezary CZAPLEWSKI, Rajmund KAŻMIERKIEWICZ, Ewa POLITOWSKA: Receptory sprzężone z białkami G (GPCR): struktura i oddziaływania z bioligandami
- Zdzisława NOWAKOWSKA, Elżbieta WYRZYKIEWICZ: Metody syntezy siarkowych pochodnych zasad pirymidynowych
- Andrzej SOBKOWIAK: Wspomnienie o profesorze D.H.R. Bartonie