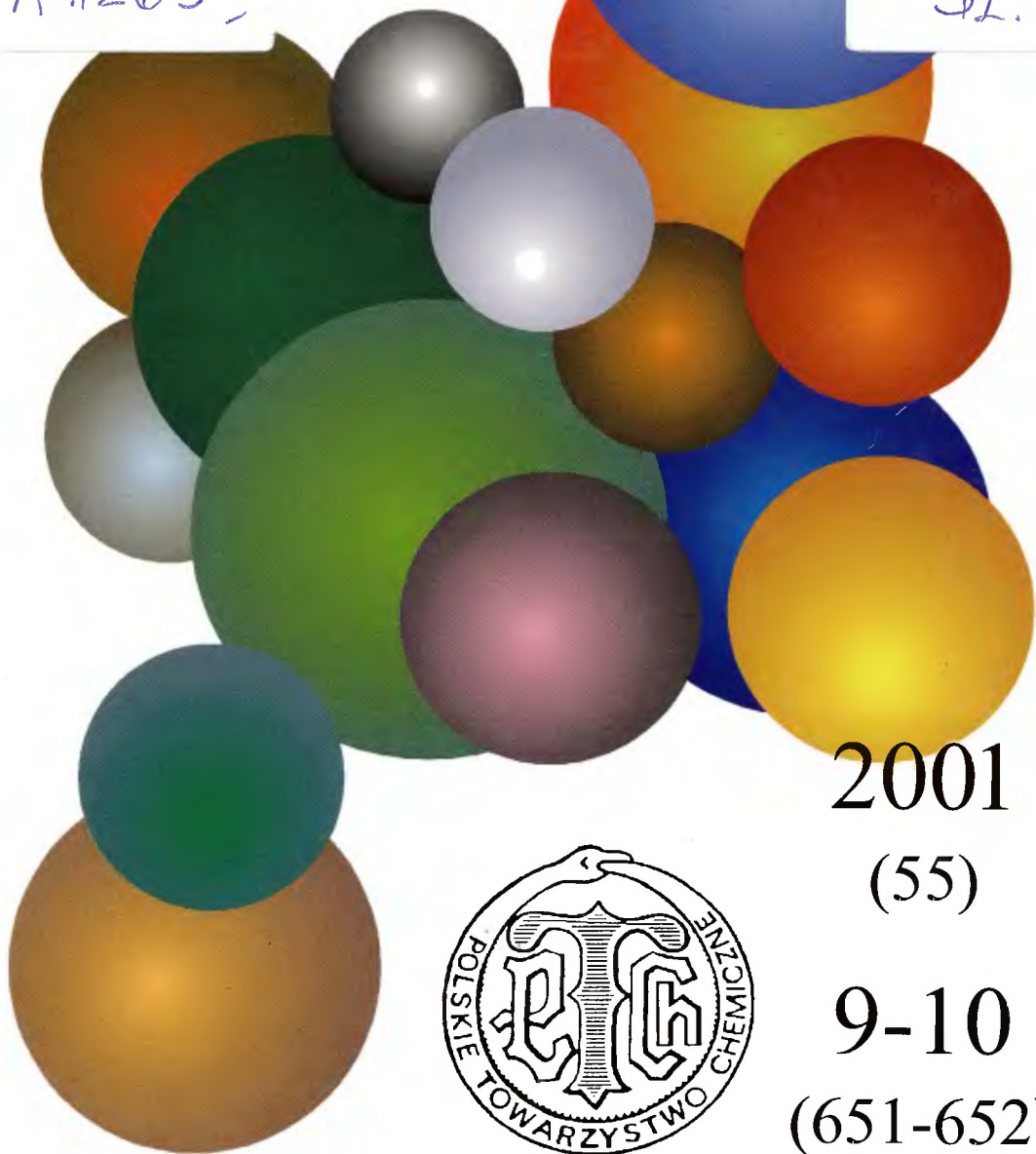


WIADOMOŚCI *chemiczne*

A 1263 II

DL. 3



2001

(55)

9-10

(651-652)





**NOWE PRODUKTY NATURALNE
O DZIAŁANIU CYTOSTATYCZNYM**

**NEW NATURAL PRODUCTS
WITH CYTOSTATIC ACTIVITY**

**Agnieszka Gryszkiewicz, Izabella Jastrzębska,
Jacek W. Morzycki**

*Instytut Chemii, Uniwersytet w Białymstoku
al. Piłsudskiego 11/4, 15-443 Białystok*

Abstract

Wprowadzenie

1. Cefalostatyny

2. Ritterazyny

3. Synteza pierścienia pirazynowego

3.1. Dimery symetryczne

3.2. Dimery niesymetryczne

4. Synteza cefalostatyny I

4.1. Synteza lewej podjednostki

4.2. Synteza prawej podjednostki

5. Ritterostatyny

6. Glikozydy cholestanowe śniedka *Ornithogalum saundersiae*

7. Syntezy saponiny OSW-1 i jej aglikonu

8. Mechanizm aktywności cytostaticznej – hipotezy

Piśmiennictwo cytowane



Agnieszka Gryszkiewicz uzyskała dyplom magistra chemii z wyróżnieniem na Wydziale Matematyczno-Przyrodniczym Filii Uniwersytetu Warszawskiego w Białymstoku w 1997 r. W tym samym roku rozpoczęła pracę w Zakładzie Chemii Produktów Naturalnych Uniwersytetu w Białymstoku. Wykonywana obecnie praca doktorska związana jest tematycznie z treścią zamieszczonego artykułu.



Izabella Jastrzębska urodziła się w 1972 r. w Siemiatyczach. Ukończyła z wyróżnieniem studia chemiczne w Białymstoku, obecnie jest doktorantką Uniwersytetu Warszawskiego. Wykonuje pracę doktorską dotyczącą przegrupowań spirostanów.



Jacek Witold Morzycki, urodził się w 1950 r. w Warszawie. Stopnie naukowe doktora (1976) i doktora habilitowanego (1986) uzyskał na Uniwersytecie Warszawskim. Od 1987 r. pracuje w Białymstoku (tytuł profesora – 1998). Zajmuje się chemią produktów naturalnych, a w szczególności chemią steroidów. Przebywał na stażach we Francji, USA i Kanadzie. Za swojego mistrza uważa profesora D.H.R. Bartona, z którym współpracował w czasie pobytu we Francji. W latach 1993–1997 był przewodniczącym oddziału białostockiego PTCh. Obecnie jest dziekanem Wydziału Biologiczno-Chemicznego Uniwersytetu w Białymstoku.

ABSTRACT

Secondary metabolites of marine invertebrates continue to attract attention of organic chemists, biochemists, and pharmacologists due to their interesting structures and potent biological activities. One such example is cephalostatin 1 (Scheme 1) isolated from the Indian Ocean hemichordate *Cephalodiscus gilchristi*, which exhibited remarkable cytotoxic activity against a broad spectrum of malignant tumor cells [5]. Similar marine alkaloids (e.g. ritterazine G: Scheme 2) were found in the lipophilic extract of the tunicate *Ritterella tokioka* collected off the coast of Japan [7]. These very potent compounds, cephalostatins and ritterazines, belong to the large family of trisdecacyclic pyrazines consisting of two steroid units. The two steroid halves of cephalostatin 1 and other highly cytotoxic members of the family are different. The biological activity of the dimeric steroid-pyrazine marine alkaloids and their limited availability coupled with the new and intriguing structure make them an attractive challenge for the synthetic organic chemists [4]. A few years ago a group of cholestane glycosides (Scheme 19) was isolated from the bulbs of *Ornithogalum saundersiae* [8], a species of the lily family without any medicinal folkloric background. The major component of the mixture of saponins, OSW-1, exhibited sub-nanomolar antineoplastic activity [35]. While OSW-1 is exceptionally cytotoxic (Table 1) against various tumor cells, it showed little toxicity to normal human pulmonary cells. The cytotoxicity profile of OSW-1 against different cancer cell lines was found to be surprisingly similar to that of the cephalostatins, which appears to imply a related mechanism of action [36]. In this review article the synthetic efforts towards these compounds are described. One of the key features of any attempted synthesis of bis-steroidal pyrazines is the central heterocyclic ring. The classical method of pyrazine synthesis (Schemes 3–7) involves the dimerization of α -amino ketones [13]. An obvious disadvantage of α -amino ketones dimerizations is their unsuitability for unsymmetrical cross-coupling. Various methods for preparation of unsymmetrical pyrazines (Schemes 9–10) were developed [21–23]. However, the preparation of suitably functionalized steroid units is still an uphill challenge, although a significant progress in this endeavor was achieved. This is exemplified among others by the synthesis of cephalostatin 1 (Schemes 14–17) [26]. The highly active “interphylal” hybrid analogues, ritterostatins and ornithostatins (Scheme 18), were also obtained [42]. Since saponin OSW-1 contains a relatively simple steroid skeleton, it is an attractive synthetic goal. The synthesis of the OSW-1 aglycone [36, 38], and later the saponin OSW-1 (Schemes 20–24) [37], was successfully accomplished. The mode of action of OSW-1 and of the cephalostatin family is not known yet, but it seems that an oxocarbenium ion (Scheme 25), which could be generated from both types of compounds, is the likely intermediate responsible for their cytotoxicity [42].

WPROWADZENIE

Jednym z kierunków poszukiwań preparatów przeciwnowotworowych [1] jest badanie substancji pochodzenia naturalnego. W latach 50. rozpoczęto w USA systematyczne testowanie [2] ekstraktów pochodzenia roślinnego i zwierzęcego na aktywność cytostatyczną. Najbardziej znanym rezultatem tych poszukiwań było odkrycie taksolu w ekstraktach z cisu [3]. Przeprowadzone w ramach programu amerykańskiego National Cancer Institute (NCI) badania wykazały również niezwykle silną aktywność cytostatyczną ekstraktów z małych (5 mm) morskich bezkręgowców *Cephalodiscus gilchristi*. Robaczki te zamieszkują produkowane przez siebie domki o rurkowatym kształcie (*coenicium*), tworząc kolonie i są często przyczepione do innych organizmów, np. gąbek. W warunkach naturalnych narażone są na ataki drapieżników i prawdopodobnie z tego powodu rozwinął się w nich mechanizm obrony chemicznej [4]. Badania nad ustaleniem struktury aktywnych związków w ekstrakcie z *C. gilchristi* trwały kilkanaście lat i w końcu doprowadziły (1988 r.) do odkrycia grupy bis-steroidowych pirazyn (cefalostatyn) przez Pettita i wsp. [5]. Badania tych związków trwają nieustannie, a zasadniczą przeszkodą, utrudniającą ich prowadzenie, jest brak dostatecznej ilości materiału. Połów *C. gilchristi* dokonywany był przez nurków amerykańskich na głębokości kilkudziesięciu metrów w wodach Oceanu Indyjskiego penetrowanych przez rekiny [6]. Ze 166 kg mokrej masy tych organizmów udało się wyodrębnić zaledwie 139 mg cefalostatyny 1.

Kilka lat temu okazało się, że związki o budowie chemicznej bardzo zbliżonej do cefalostatyn (ritterazyny) występują również w ekstraktach z osłonicy *Ritterella tokioka* złowionych u wybrzeży Japonii [7]. Przypuszczenie, że te morskie alkaloidy (cefalostatyny i ritterazyny) mogłyby być produkowane przez symbiotyczne mikroorganizmy, okazało się nieprawdziwe. Mechanizm działania cytostaticznego tych związków jest obecnie przedmiotem intensywnych badań.

W 1992 r. Sashida ze wsp. opisał grupę glikozydów cholestanowych wyizolowaną ze śniedka *Ornithogalum saundersiae* [8]. Wyciągi metanolowe z cebulek tej rośliny, chociaż nie była ona wykorzystywana w medycynie ludowej, wykazywały w testach biologicznych niezwykle silną aktywność przeciwnowotworową za sprawą zawartych w niej saponin. Głównym składnikiem mieszaniny jest saponina OSW-1, która jest aktywna już w stężeniach nanomolowych, podobnie jak cefalostatyna 1. Testy przeprowadzone na 60 liniach komórek rakowych wykazały bardzo podobny profil działania cytostaticznego, jak w przypadku bis-steroidowych pirazyn. Sugerować to może identyczny mechanizm działania biologicznego saponin cholestanowych *O. saundersiae* i morskich alkaloidów pirazynowych. Związki te nie dają się przypisać do żadnej z sześciu grup substancji przeciwnowotworowych utworzonych przez NCI na podstawie mechanizmu ich działania [9, 10]. Przypuszczalnie reprezentują one nowy typ aktywności, który jest aktualnie przedmiotem badań. Cechą wspólną tych związków jest niewątpliwie ich budowa steroidowa. Trudno jednak jest się doszukać w tych związkach

takich wspólnych cech strukturalnych, których obecność mogłaby decydować o ich aktywności cytostatycznej. W artykule zostanie przedstawiona budowa chemiczna cefalostatyn, ritterazyn i saponin *O. saundersiae*, próby syntezy tych związków, a także hipotezy na temat mechanizmu ich działania cytostatycznego.

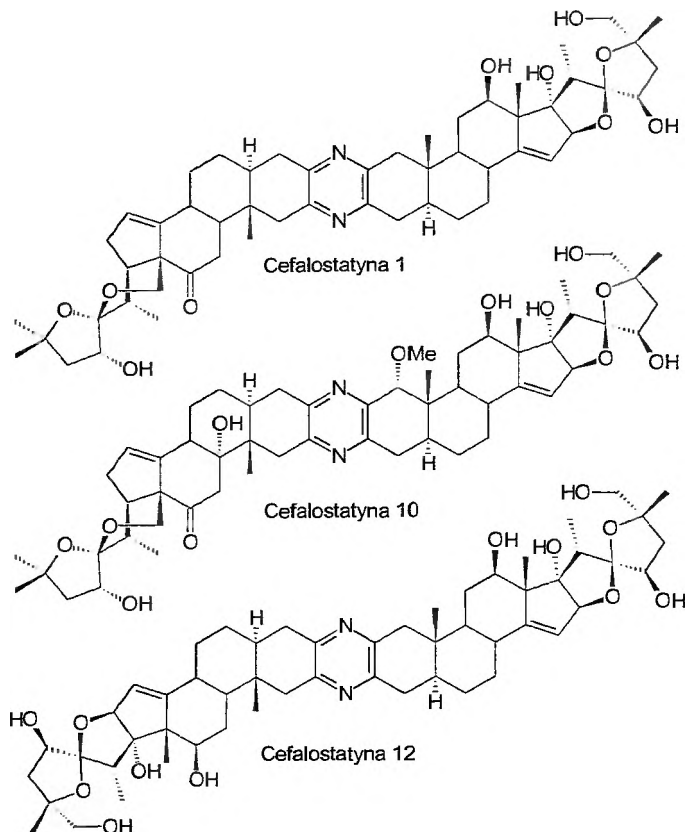
1. CEFALOSTATYNY

Pierwsza próbka *C. gilchristi* została zebrana u wybrzeży południowowschodniej Afryki przez zespół Pettita w 1972 r., a dwa lata później stwierdzono wysoką aktywność cytostatyczną sporządzonych z niej wodnych i metanolowych ekstraktów. Do identyfikacji substancji aktywnych zawartych w tych ekstraktach oraz szczegółowych badań biologicznych potrzeba było większej ilości materiału. Z powodu trudności z połowem *C. gilchristi* prace nad izolacją i identyfikacją najaktywniejszego składnika, cefalostatyny 1, trwały kilkanaście lat. Cefalostatyna 1 należąca do bis-steroidowych pirazyn w testach NCI wykazuje aktywność przeciwnowotworową wielokrotnie przewyższającą aktywność stosowanych obecnie chemoterapeutyków. W tab. 1 przedstawione zostały średnie wartości pGI_{50} (GI_{50} – ang. 50% *growth inhibition*, czyli stężenie, przy którym zahamowany jest wzrost komórek w 50%) uzyskane w tych testach.

Tabela 1. Porównanie aktywności cytostatycznej cefalostatyny 1, saponiny OSW-1 i stosowanych klinicznie chemoterapeutyków

| Nazwa związku | pGI_{50} (średnia z 60 linii komórek rakowych) |
|---------------------|---|
| Cyklofosfamid | 3,7 |
| 5-Fluorouracyl | 4,7 |
| <i>Cis</i> -platyna | 5,7 |
| Adriamycyna | 6,9 |
| Taksol | 7,9 |
| Cefalostatyna 1 | 8,3 |
| OSW-1 | 9,1 |

Do tej pory odkryto w ekstraktach *C. gilchristi* jeszcze ok. 20 innych przedstawicieli tej grupy związków [11]. Wszystkie cefalostatyny są związkami tris-dekacyklicznymi, w których dwie podjednostki steroidowe są połączone w pozycji 2,3 pierścieniem pirazynowym (schemat 1). Większość z nich to związki niesymetryczne, różniące się lewą i prawą (od strony czytającego) częścią steroidową. Elementami strukturalnymi wszystkich cefalostatyn jest układ spirostanowy, wiązanie podwójne $C_{(14)}=C_{(15)}$ oraz duża liczba grup hydroksylowych. Cefalostatyny 2–9 i 11–15 zachowują taką samą budowę części prawej jak cefalostatyna 1, zmiany w strukturze dotyczą tylko części lewej. W cefalostatynach 10, 16 i 17 inne są także podjednostki prawe. W związkach 10, 11 i 13 występuje pod-



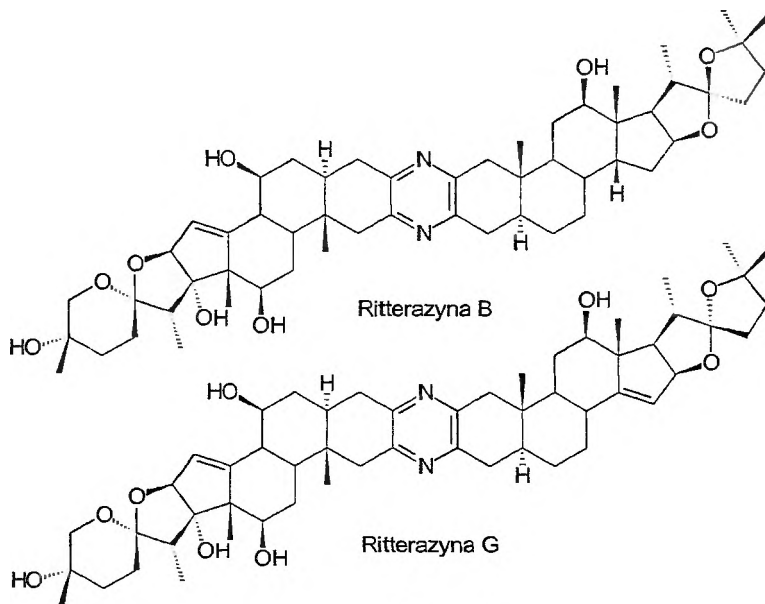
Schemat 1

stawnik tlenowy (OH lub OMe) w steroidowym pierścieniu A jednej z podjednostek. Związkiem symetrycznym jest tylko cefalostatyna 12. Wyniki badań biologicznych wskazują, że najbardziej aktywne są cefalostatyny niesymetryczne, mające w swojej budowie przynajmniej jeden układ spiroketalowy o konformacji wysokoenergetycznej oraz wolną grupę hydroksylową w pozycji 12. Związki mające w pozycji 1 α podstawnik metoksyłowy są równie aktywne jak cefalostatyna 1.

2. RITTERAZYNY

Wielkim zaskoczeniem było wyodrębnienie ritterazyn, związków o analogicznej budowie do cefalostatyn, z japońskich osłonik *Ritterela tokioka*. *R. tokioka* nie są spokrewnione z rodziną *Hemichordatae*, do której należy *Cephalodiscus*. Nie zaobserwowano też obecności tych ostatnich w zebranych próbkach. Oba gatunki *C. gilchristi* i *R. tokioka* żyją w środowiskach zamieszkałych przez morskie drapieżniki i być może wytwarzanie omawianych alkaloidów pirazykowych jest formą obrony chemicznej. Do chwili obecnej wyodrębniono 24 rittera-

zyny (ritterazyny A-Z) [12]. Ich pokrewieństwo chemiczne do cefalostatyn jest oczywiste (niektóre mają identyczną budowę jednej z podjednostek steroidowych), chociaż jak dotąd nie wyodrębniono tego samego alkaloidu z obu gatunków. Ritterazyny, podobnie jak cefalostatyny, wykazują silną aktywność cytostaticzną w testach NCI. Najwyższą aktywnością charakteryzują się ritterazyny B i G (schemat 2).



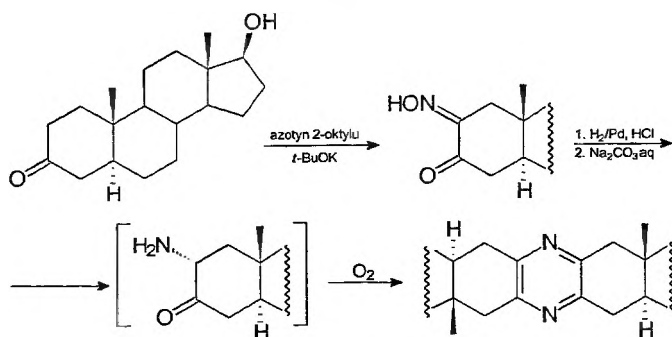
Schemat 2

3. SYNTEZA PIERŚCIENIA PIRAZYNOWEGO

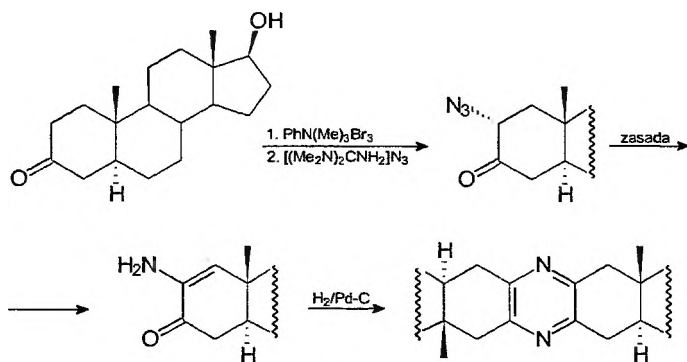
3.1. DIMERY SYMETRYCZNE

Wysoka aktywność biologiczna omawianych związków, a tym samym możliwość ich wykorzystania w medycynie oraz ograniczona dostępność ze źródeł naturalnych, skłoniły chemików organiczków do podjęcia prób ich syntezy.

Kluczowym problemem, który należało rozwiązać, była synteza centralnego pierścienia pirazynowego. Klasyczna metoda syntezy pirazyn polega na kondensacji α -aminoketonów. Proces przebiega samorzutnie z wykorzystaniem tlenu z powietrza jako utleniacza. Reakcję tę można wykorzystać do syntezy steroidowych dimerów o budowie symetrycznej [13, 14]. Steroidowe 2α -amino-3-ketony można otrzymać przez redukcję odpowiednich hydroksylimino-, azydo-, enamino- bądź nitroketonów. Pierwszą syntezę symetrycznych dimerów pirazynowych przeprowadzono przypadkowo już w 1971 r. [15]. Katalityczna redukcja 2-hydroksyliminoandrostan-17 β -ol-3-onu prowadziła do otrzymania bis-steroidowej pirazyny, chociaż nie była ona celem syntezy (schemat 3).



Po ukazaniu się w literaturze doniesień o cefalostatynach opracowano ulepszone procedury (Fuchs, Winterfeldt) otrzymywania dimerów [16, 17]. Wyściocowy 3-keton był bromowany w pozycji α , a po podstawieniu bromu jonem azydowym powstawała 2α -azydo-pochodna, która z kolei ulegała dysproporcjonowaniu pod wpływem zasady (rolę tę może odgrywać nadmiar odczynnika – azydu tetrametyloguanidyniowego) do odpowiedniej enaminy i cząsteczkowego azotu. Katalityczna redukcja tego związku prowadziła do otrzymania 2α -amino-3-ketonu, który następnie ulegał dimeryzacji (schemat 4).

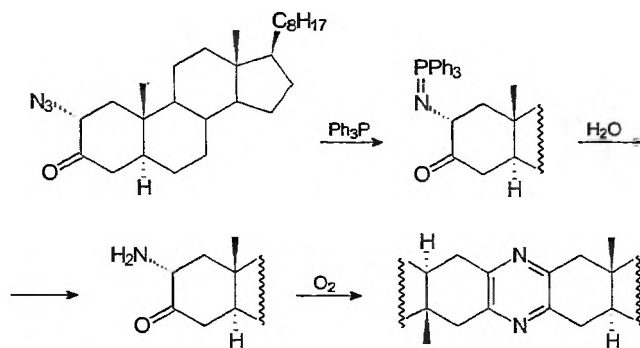


Dalszym ulepszeniem syntezy bis-steroidowych pirazyn była metoda opracowana przez Smitha i Heathcocka [13, 18], w której 2α -azydoketon, zamiast redukcji katalitycznej, poddaje się reakcji z tryfenylofosfiną w obecności wody (schemat 5).

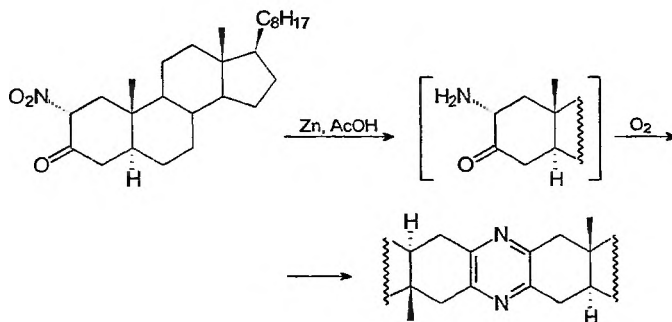
Pirazynowe dimery steroidowe można też uzyskać z wysoką wydajnością przez redukcję nitroketonów steroidowych (lub ich enoli) za pomocą cynku w kwasie octowym [19] (schemat 6). Wadą tej metody, w porównaniu do uprzednio omawianych, jest konieczność stosowania kwaśnego środowiska reakcji, na które wrażliwe są układy spiroketalowe obecne w cefalostatynach.

Wady tej pozbawiona jest następną drogą syntezy, w której żądane dimery uzyskuje się w reakcji 2α -bromoketonów z amoniakiem, po częściowej hydroli-

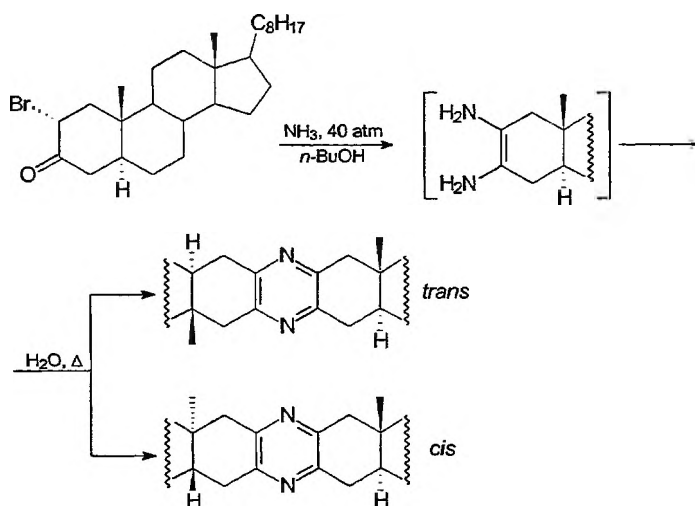
zie pierwotnego produktu reakcji [20]. W metodzie tej obok dimeru *trans* powstaje również jego izomer *cis*, jako produkt uboczny (schemat 7).



Schemat 5



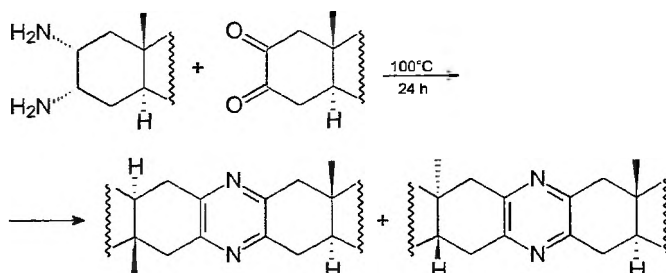
Schemat 6



Schemat 7

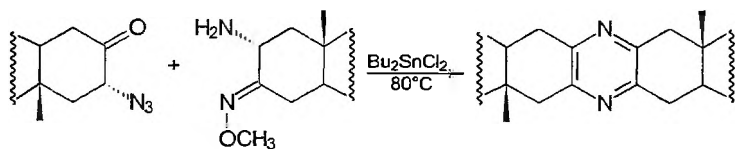
3.2. DIMERY NIESYMETRYCZNE

Występujące w przyrodzie cefalostatyny i ritterazyny są w większości związkami niesymetrycznymi, w których lewa część steroidowa różni się od prawej. To właśnie dimery niesymetryczne wykazują największą aktywność biologiczną. Z tego też względu opracowano kilka metod syntezy dimerów niesymetrycznych, w których kondensacji poddaje się dwa różne związki steroidowe. Jedną z pierwszych prób syntezy dimeru niesymetrycznego była reakcja 2,3-diketonu z 2,3-diaminą. Niestety, w tej metodzie powstają zbliżone ilości dimerów *cis* i *trans*, podczas gdy tylko izomery *trans* są aktywne biologicznie (schemat 8).



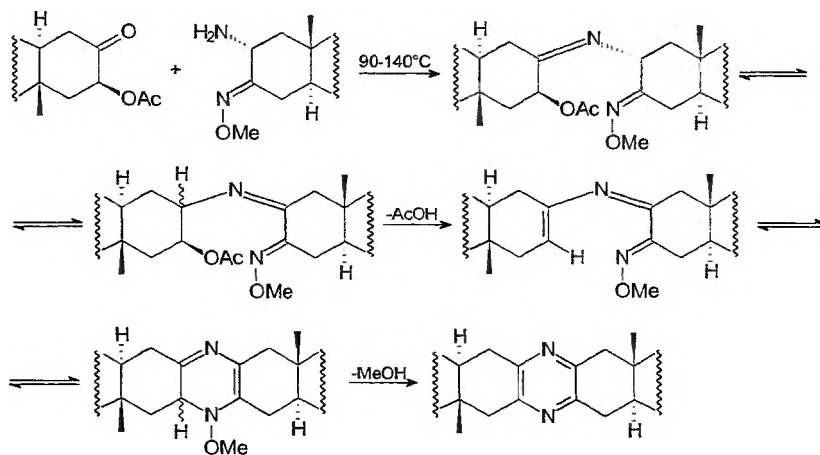
Schemat 8

Najczęściej obecnie stosowana procedura została opracowana przez zespół Fuchsa [21]. Polega ona na kondensacji 2 α -azydo-3-ketonu steroidowego z *O*-metylo-2 α -amino-3-oksymem (schemat 9). Oba związki steroidowe do syntezy Fuchsa otrzymuje się z odpowiednich 2 α -bromo-3-ketonów. 2 α -azydoketon otrzymuje się w reakcji z azydkiem tetrametyloguanidyny (TMGA). W przypadku syntezy drugiego komponentu, *O*-metylo-2 α -amino-3-oksymu, 2 α -azydoke-ton przekształca się dalej w *O*-metylo-2 α -azydo-3-oksym za pomocą chlorowodoru *O*-metylohydroksyloaminy. Otrzymany związek redukuje się trifenylofosfiną w obecności wody, uzyskując pożądany półprodukt.



Schemat 9

Reakcja Fuchsa otrzymywania niesymetrycznych pirazyn steroidowych zachodzi w łagodniejszych warunkach i z wyższą wydajnością niż podobna metoda opracowana przez Smitha i Heathcocka [13]. Polega ona na kondensacji *O*-metylo-2 α -amino-3-oksymu z 2 β -acetoksy-3-ketonem innego steroidu (schemat 10). *O*-metylo-2 α -amino-3-oksym otrzymuje się tak, jak w poprzedniej metodzie. Drugi reagent powstaje z octanu enolu wyjściowego 3-ketonu. W reakcji z dime-

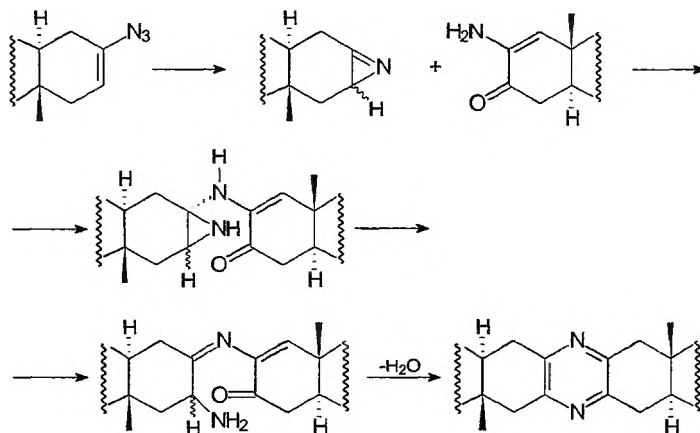


Schemat 10

tylooksyranem tworzy się 2 α ,3 α -okso-3 β -octan, który łatwo izomeryzuje do 2 β -acetoksy-3-ketonu.

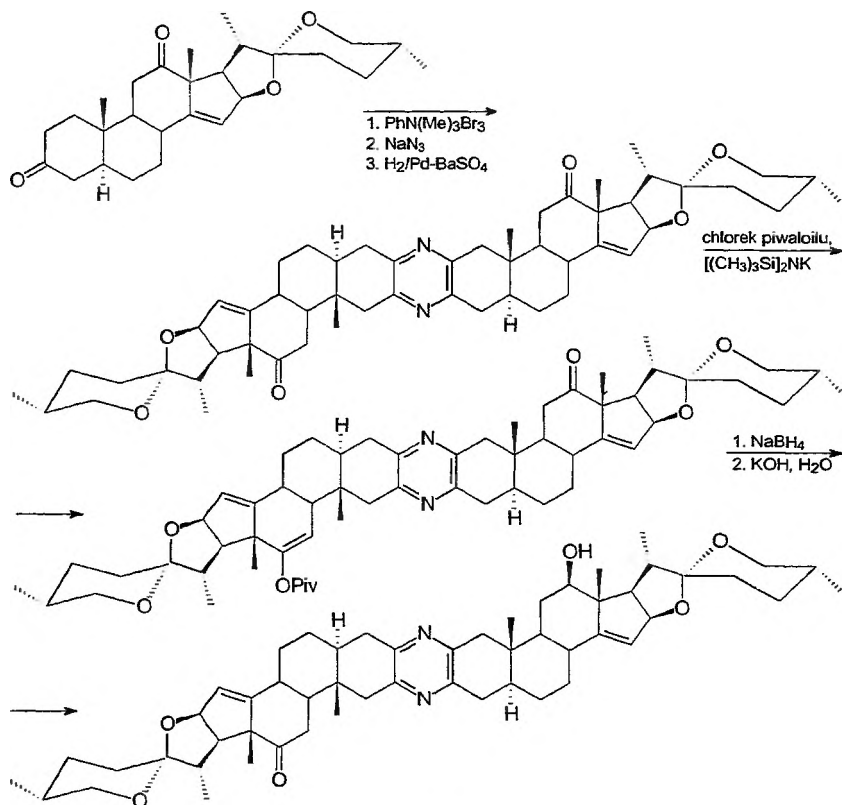
W 1996 r. Winterfeldt zaproponował jeszcze inną ścieżkę syntezy niesymetrycznych bis-steroidowych pirazyn, polegającą na reakcji steroidowego azydku winylu z enamino-3-ketonem [17, 22]. Azydek winylu w trakcie reakcji przekształca się w azirynę, która reaguje *in situ* z drugim reagentem (schemat 11). Wadą tej metody jest konieczność przeprowadzenia kilkusetapowej syntezy steroidowego azydku winylu oraz użycie do sprzęgania katalizatora o charakterze kwaśnym, który może powodować izomeryzację labilnego układu spiroketalowego.

Kolejną drogą tworzenia niesymetrycznych pirazyn jest proces asymetryzacji dimeru symetrycznego opracowany również przez Winterfeldta [23]. Ideę tej metody pokazuje schemat 12.

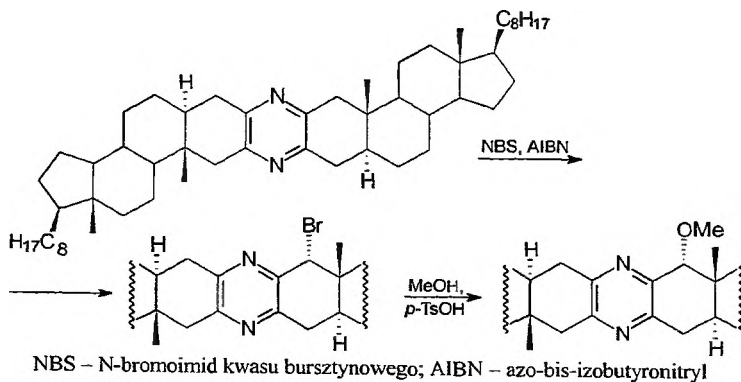


Schemat 11

Podobne założenia ma następną syntezę, w której do układu symetrycznego wprowadza się selektywnie w jedną z pozycji *quasi*-benzylowych podstawnik metoksyłowy (schemat 13) [24]. Najaktywniejsze biologicznie cefalostatyny (np. cefalostatyna 10) mają taki właśnie podstawnik. Synteza wymaga jednak stosowania kwaśnych warunków reakcji, co zmniejsza jej praktyczne znaczenie.



Schemat 12



Schemat 13

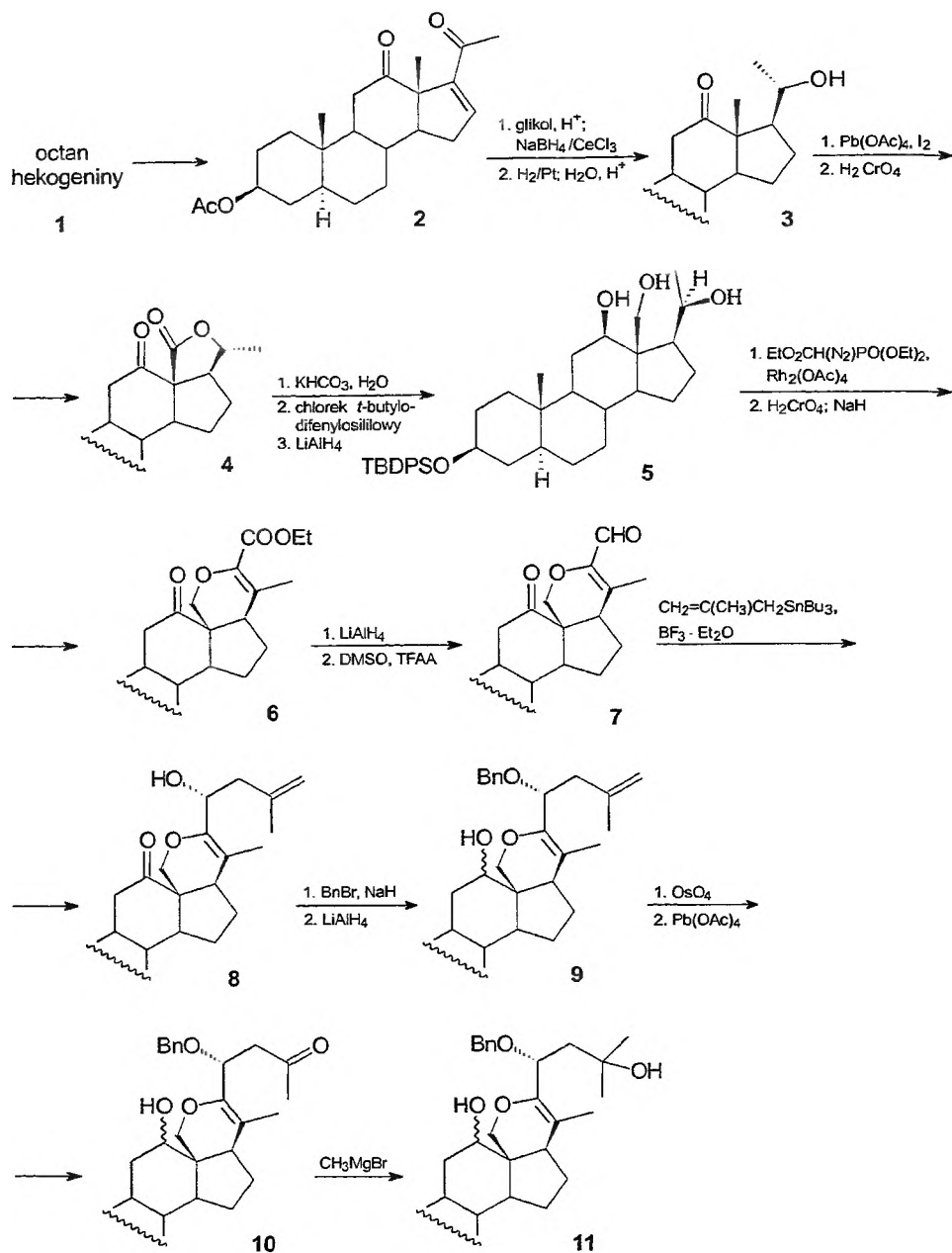
4. SYNTEZA CEFALOSTATYNY 1

Równie ambitnym i skomplikowanym zadaniem, jak opracowanie metod syntezy centralnego pierścienia pirazynowego obecnego w cefalostatynach i ritterazynach, było przygotowanie obu podjednostek steroidowych występujących w tych związkach. Prace zakończyły się sukcesem i obecnie jest już znana pełna synteza cefalostatyny 1 oraz wielu innych przedstawicieli obu rodzin bis-steroidowych pirazyn [25]. Poniżej przedstawiona zostanie przykładowo pierwsza synteza cefalostatyny 1 przeprowadzona przez LaCoura, Fuchsa i wsp. [26].

Aby otrzymać cefalostatynę 1, należało przygotować odpowiednio sfunkcjonalizowane podjednostki steroidowe. Substratem do syntezy zarówno części lewej, jak i prawej jest octan hekogeniny. Obie syntezy są wieloetapowe i bardzo skomplikowane. Jak trudne to było zadanie syntetyczne, może świadczyć fakt, że podjednostkę prawą uzyskano w 33 etapach z całkowitą wydajnością 3%, a lewą w 35 etapach z wydajnością 1% (*vide infra*).

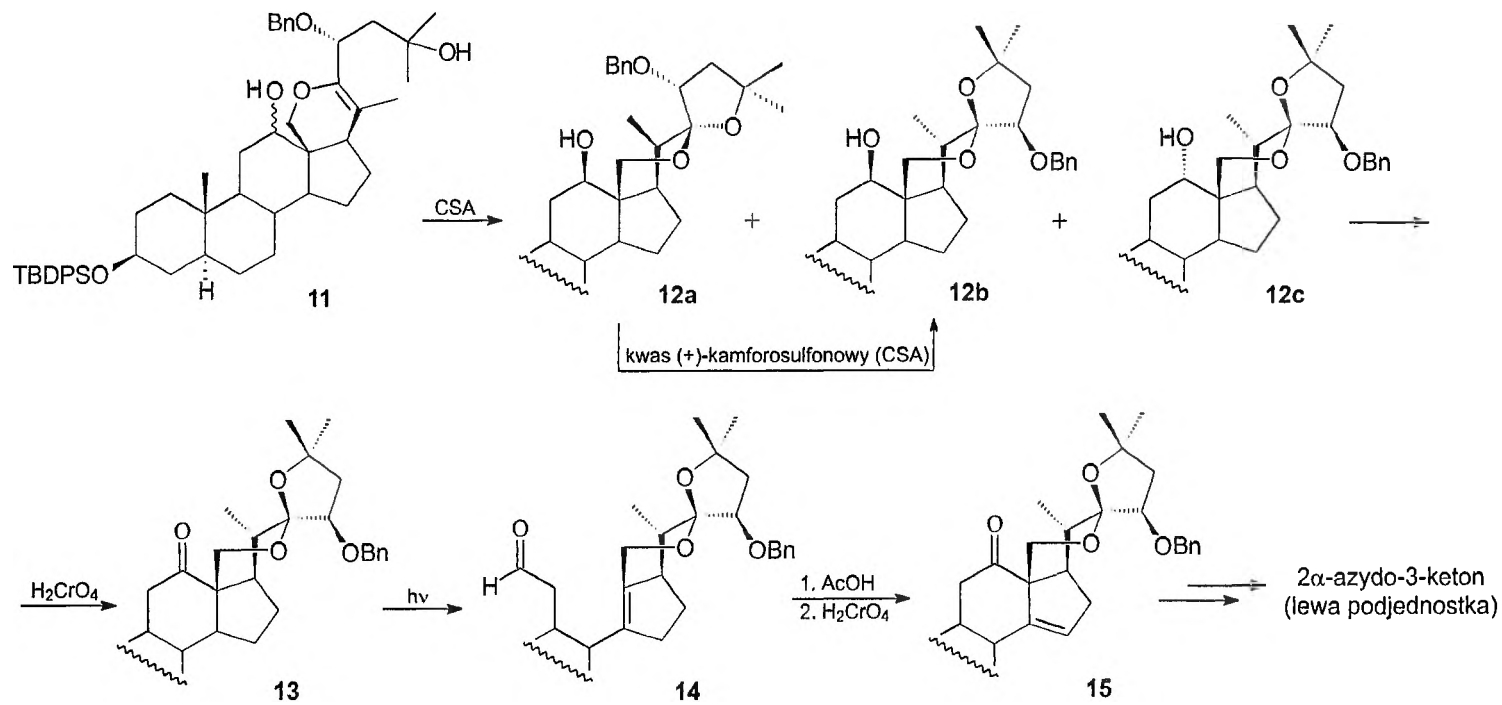
4.1. SYNTEZA LEWEJ PODJEDNOSTKI

Dwa zasadnicze problemy w syntezie części lewej cefalostatyny 1 to przebudowa pierścieni E/F z układu [5/6], występującego w związku wyjściowym, do odpowiednio sfunkcjonalizowanego układu pierścieni [6/5] oraz wprowadzenie wiązania podwójnego C₍₁₄₎–C₍₁₅₎ do pierścienia D. W pierwszej kolejności opracowano metodę otrzymywania odpowiedniego układu spiroketalowego. W syntezie lewej podjednostki substratem był octan hekogeniny **1** (schemat 14), który po degradacji Markera przekształcał się w diketon **2**. Związek ten następnie redukowano do alkoholu **3**, a grupę 18-metylową funkcjonalizowano metodą podjodynową Meystre'a. Po utlenieniu przejściowego hemiacetalu odczynnikiem Jonesa otrzymano lakton **4**. Dalszym etapem była redukcja laktonu do triolu **5**. Przed jej wykonaniem należało zmienić grupę zabezpieczającą OH w pozycji 3 z octanu na eter silylowy. W celu skonstruowania 6-członowego pierścienia E, triol **5** poddano reakcji z diazofosfonianem dietylu, który wbudowywał się selektywnie w ugrupowanie pierwszorzędowego alkoholu, a po utlenieniu drugorzędowych grup hydroksylowych ulegał wewnątrzcząsteczkowej reakcji Wadswortha-Emmonsa [27]. Powstały ester **6** w zwykły sposób przekształcony został w aldehyd **7**, który poddano reakcji z metyloallilotributylocyną, otrzymując dwa diastereoizomeryczne alkohole w proporcji 2,7:1 (przeważał potrzebny diastereoizomer **8**). Konfigurację w epimerycznym alkoholu odwrócono w reakcji Mitsunobu. W następnym etapie zabezpieczono grupę OH w postaci eteru benzylowego i zredukowano grupę karbonylową w pozycji 12 do diastereoizomerycznych alkoholi **9**. Alkohole te poddano kolejno reakcji z czterotlenkiem osmu i czteroocctanem ołowiu, otrzymując keton **10**. Związek ten reagował z bromkiem metylomagnezowym, a produkt **11** poddano spiroketalizacji w obecności kwasu



Schemat 14

(+)-kamforosulfonowego (schemat 15). Reakcja prowadziła do trzech stereoisomerów **12a**, **12b**, **12c** w proporcji 1 : 15 : 1. Związki **12b** i **12c** miały właściwą konfigurację na C-20 i C-22, różniły się tylko konfiguracją na C-12, co nie miało większego znaczenia, ponieważ w kolejnym etapie grupę OH w pozycji 12

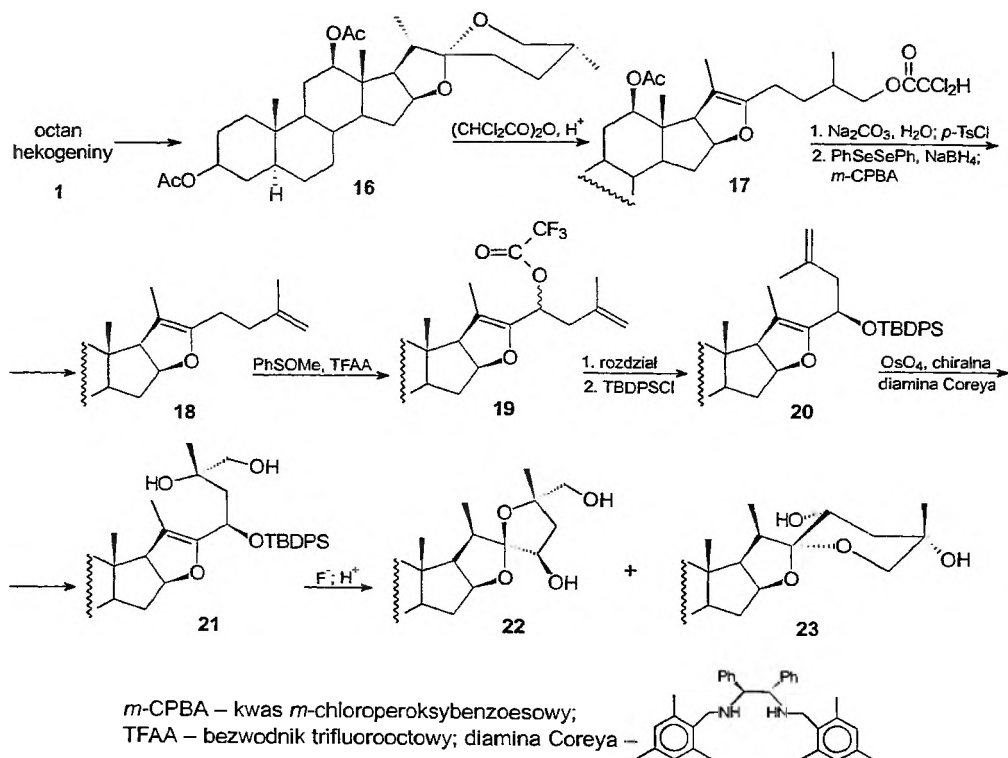


Schemat 15

utleniono do ketonu **13**. Konfigurację na C-20 i C-22 w związku **12a** można było częściowo odwrócić na właściwą pod wpływem kwasu (+)-kamforosulfonowego [28]. Związek **13** jest dihydropochodną lewej części cefalostatyny **1** i należało jeszcze do tego układu wprowadzić wiązanie podwójne C₍₁₄₎=C₍₁₅₎. W tym celu zastosowano procedurę Welzla polegającą na fotolizie [29] wiązania C₍₁₂₎-C₍₁₃₎, reakcji Prinsa z utworzonym aldehydem **14** i utlenieniu. W wyniku opisanych przekształceń uzyskano nienasycony keton **15**, a z niego metodą wcześniej przedstawioną 2 α -azydo-3-keton, który został następnie użyty do reakcji sprzęgania z odpowiednio przygotowaną prawą podjednostką steroidową.

4.2. SYNTEZA PRAWEJ PODJEDNOSTKI

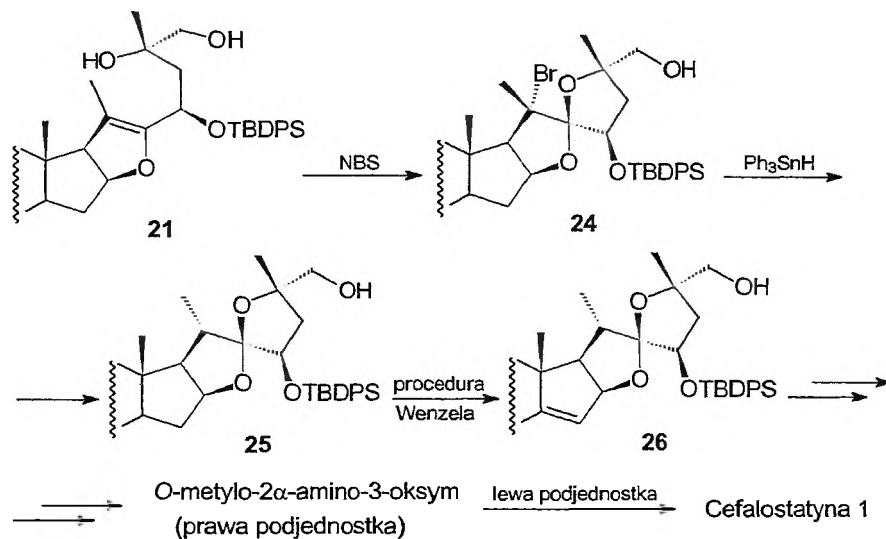
Synteza prawej części cefalostatyny **1**, podobnie jak części lewej, polegała na konstrukcji odpowiednio sfunkcjonalizowanego układu pierścieni spiroketalowych i wprowadzeniu wiązania podwójnego do pierścienia D. Przekształcenie układu pierścieni E i F z [6/5] na [5/5] przedstawiono na schemacie **16**.



Schemat **16**

Diocan **16**, otrzymany z octanu hecogeniny **1** poddano zmodyfikowanej procedurze Markera w celu otwarcia pierścienia F [30, 31]. Ester kwasu dichloro-

rooctowego **17** selektywnie zhydrolizowano, a wolny alkohol poddano dehydratacji, uzyskując olefinę **18**. Związek ten, traktowany fenylometylosulfotlenkiem aktywowanym przez bezwodnik trifluorooctowy [32, 33], przekształcał się w mieszaninę diastereoizomerycznych trifluorooctanów **19** w proporcji 2,2 : 1, które zostały rozdzielone. Właściwy diastereoizomer zhydrolizowano, a otrzymany 23-alkohol zabezpieczono w postaci eteru siliowego. W następnym etapie związek **20** poddano stereospecyficznej dihydroksylacji przy użyciu chiralnej diaminy Coreya [34]. Dalsze działania miały na celu konstrukcję układu spirostanowego [5/5]. Po usunięciu eteru TBDPS ze związku **21** powstający triol ulegał cyklizacji w środowisku kwaśnym, dając mieszaninę produktów **22** i **23** o pierścieniach E i F odpowiednio [5/5]- i [5/6]-członowych. Związek **23** przechodził w **22** po zastosowaniu bardziej drastycznych warunków. Niestety, oba te produkty miały niewłaściwą konfigurację na C-20. Przypuszczalnie elektrofilowy atak na wiązanie podwójne odbywał się z mniej zatłoczonej strony, dając 20β-metylową pochodną. W warunkach równowagowych oczekiwana epimeryzacja nie zachodziła. To niepowodzenie spowodowało, że zaistniała konieczność znalezienia innej drogi zamknięcia pierścienia. Udało się tego dokonać przez bromowanie za pomocą NBS (schemat 17). W tych warunkach tworzył się tyl-



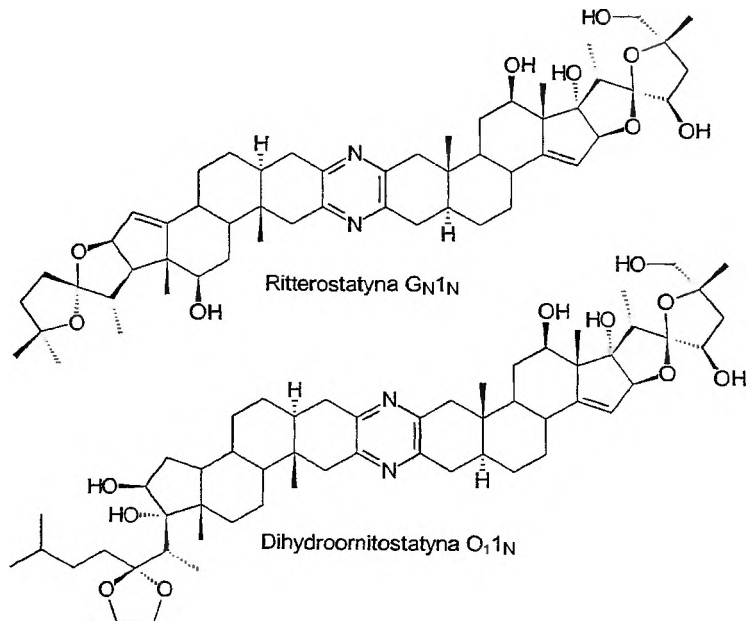
Schemat 17

ko spiroketal [5/5]. Jego redukcja wodorkiem trifenylcynowym prowadziła do związku **25** o odpowiedniej konfiguracji na C-20. W dalszych etapach syntezy prawej części cefalostatyny **1** wprowadzono wiązanie podwójne do pierścienia D. Wykonano to w analogiczny sposób jak w przypadku części lewej. Wolną grupę hydroksylową w pierścieniu F zabezpieczono eterem siliowym, a mniej zatłoczony octan w pozycji 3 selektywnie zhydrolizowano, utleniono do 3-keto-

nu 26 i przekształcono w *O*-metylo-2 α -amino-3-oksym w znany sposób. Fuchs i wsp. (1998 r.) poddali ten związek sprzęganiu z 2 α -azydo-3-ketonem lewej podjednostki otrzymując, po usunięciu grup ochronnych, cefalostatynę 1 [26].

5. RITTEROSTATYNY

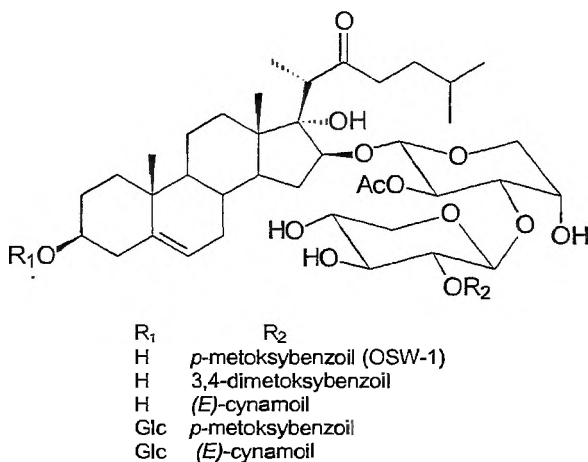
Do chwili obecnej udało się wyizolować blisko pięćdziesiąt cefalostatyn i ritterazyn. Składają się one z różnych podstawowych układów steroidowych. Najczęściej powtarzające się układy to: I_N , I_S , 7_S i G_N . Oznaczenia liczbowe odnoszą się do kolejnych cefalostatyn, literowe zaś do ritterazyn; indeksy dolne oznaczają część lewą i prawą („południową” i „północną”, ang. *South* i *North*, stąd S i N). Można z nich ułożyć 6 kombinacji niesymetrycznych dimerów, z których tylko 4 wykryto w badanych źródłach i należą one do układów najbardziej aktywnych biologicznie (np. układ $I_N I_S$, czyli cefalostatyna 1). Brakujące dwie kombinacje $G_N I_N$ i $G_N I_S$, zawierające podjednostki z różnych organizmów (tzw. ritterostatyny), otrzymano syntetycznie w celu sprawdzenia ich aktywności biologicznej. Okazało się [26], że jedna z nich, ritterostatyna $G_N I_N$, w testach NCI wykazuje bardzo wysoką aktywność cytostatyczną, a w stosunku do niektórych komórek rakowych (leukemia, rak piersi, nerek) nawet wyższą niż cefalostatyna 1 (schemat 18). Fakt ten jest ważny nie tylko ze względu na odkrycie jeszcze jednego bardzo aktywnego związku, ale także i ze względów praktycznych. Podjednostkę G_N można otrzymać znacznie krótszą drogą i z dużo większą wydajnością w porównaniu do I_S .



Schemat 18

6. GLIKOZYDY CHOLESTANOWE ŚNIEDKA *ORNITHOGALUM SAUNDERSIAE*

Bogactwo świata roślin jest od lat źródłem substancji biologicznie aktywnych i stanowi inspirację dla chemików. Szczególnie dokładnie badane są rośliny wykorzystywane w medycynie ludowej. Okazuje się jednak, że interesujące dla farmakologii związki można także znaleźć wśród roślin ozdobnych, których biologiczna aktywność nie była wcześniej znana. W 1992 r. grupa badaczy japońskich pod kierunkiem Sashidy wyekstrahowała z cebulek śniedka *Ornithogalum saundersiae* grupę glikozydów cholestanowych (schemat 19). Kilka lat później okazało się, że saponiny te wykazują niezwykle silne działanie cytostacyjne [35].



Schemat 19

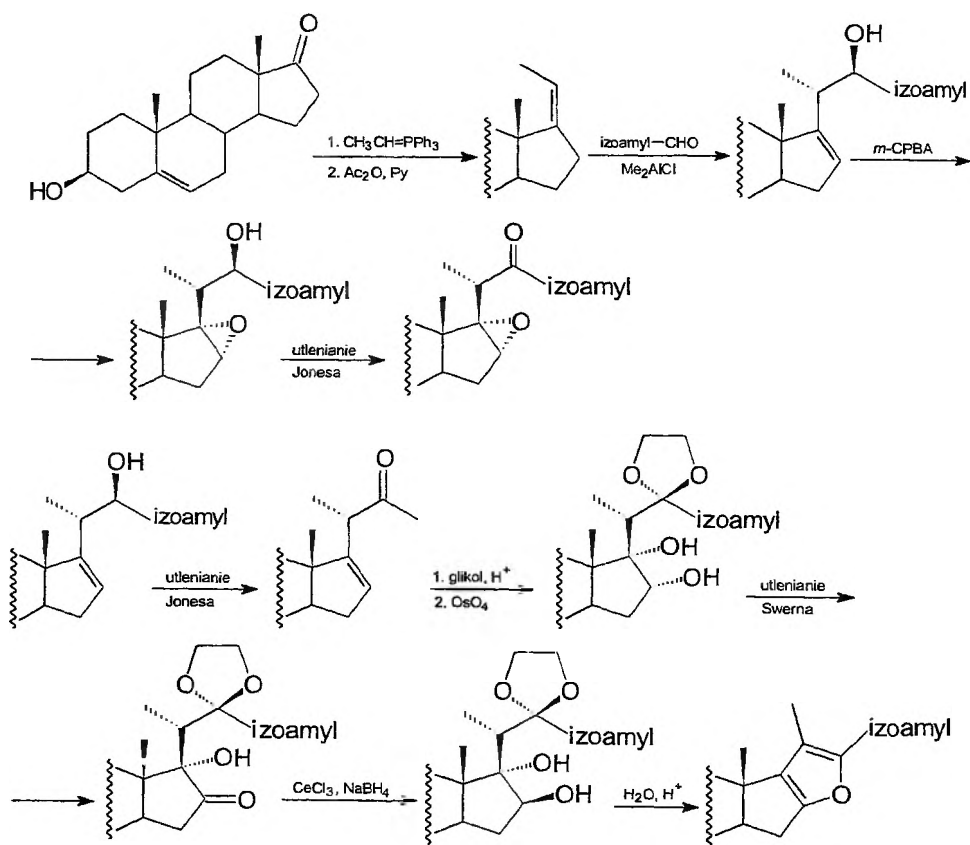
Z chemicznego punktu widzenia saponiny *O. saundersiae* są 16-*O*-β-D-ksylopiranozylo-(1 → 3)-2'-*O*-acetylo-α-L-arabinopiranozydami 3β,16β,17α-trihydroksycholest-5-en-22-onu. Różnią się one podstawnikami przy atomach tlenu w pozycji 2'' disacharydu i przy C-3 części steroidowej.

W testach NCI, przeprowadzonych na 60 liniach komórek rakowych ludzkiej leukemii, saponiny *O. saundersiae* wykazują aktywność cytostaticzną w stężeniach nanomolowych (IC₅₀ = 0,1–0,3 nM) i przewyższają pod tym względem znane chemoterapeutyki, takie jak *cis*-platyna, adriamycyna czy też taksol, co przedstawiono w tab. 1. Najaktywniejszą substancją, spośród wydzielonych z *O. saundersiae*, okazała się saponina OSW-1, która jest jednocześnie głównym składnikiem jej cebulek. Saponina OSW-1, oprócz niezwyklej właściwości cytostaticznych w stosunku do różnych złośliwych komórek nowotworowych, charakteryzuje się niewielką toksycznością względem normalnych komórek płucnych (IC₅₀ = 1500 nM). Zainteresowanie saponiną OSW-1 wyraźnie wzrosło, odkąd okazało się, że profil cytostaticznego działania przeciwko róż-

nym komórkom raka jest bardzo zbliżony do cefalostatyn. W zestawieniu z faktem, że budowa OSW-1 przypomina połowę cefalostatyny, sugerować to może identyczny mechanizm działania biologicznego. Do takiego wniosku doszli badacze z NCI, a także grupa Fuchsa, która w 1998 roku otrzymała po raz pierwszy steroidowy aglikon saponiny OSW-1 [36].

7. SYNTEZY SAPONINY OSW-1 I JEJ AGLIKONU

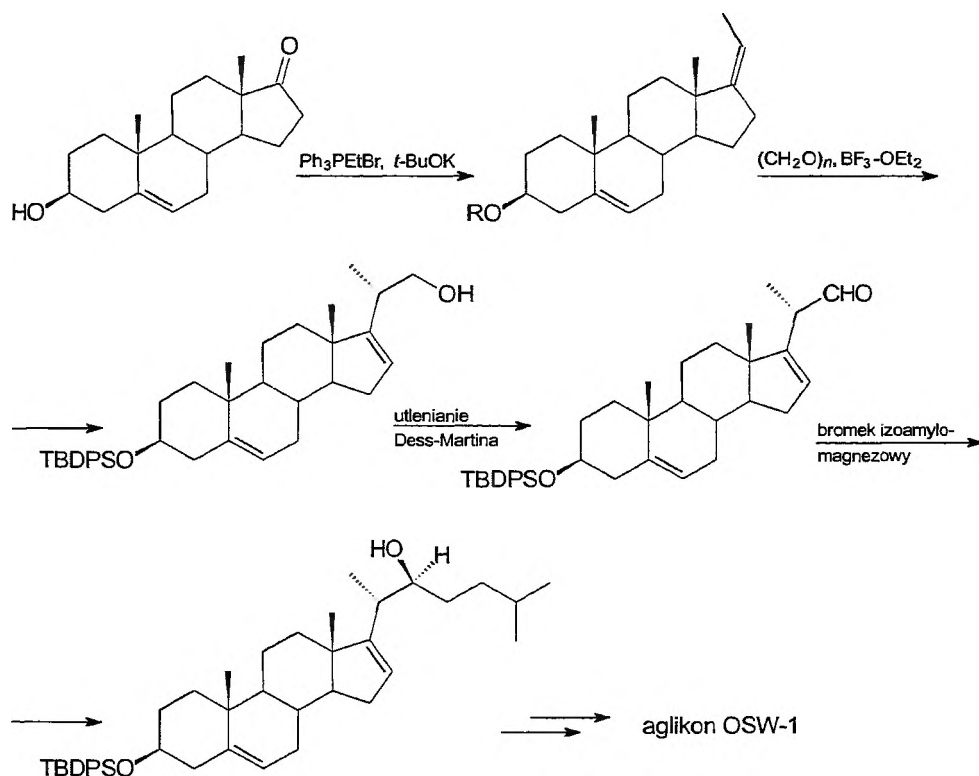
Związkami wyjściowymi w syntezie Fuchsa (schemat 20) był androst-5-en-3 β -ol-17-on, który poddano olefinacji Wittiga, a następnie diastereoselektywnej reakcji enowej. Kolejnym etapem była epoksydacja wiązania podwójnego C₍₁₆₎=C₍₁₇₎. Grupę hydroksylową przy C-22 utleniono do karbonyłu metodą Jonesa. Okazało się jednak, że otwarcie epoksydu w obecności kwaśnych lub zasadowych katalizatorów nie prowadziło do otrzymania pożądanego *trans*-diolu. Z powodu trudności z otwarciem epoksydu, w miejsce epoksydacji podjęto próby dihydroksylacji. Po utlenieniu 22-alkoholu do ketonu i jego zabezpieczeniu-



Schemat 20

niu w postaci ketalu, przeprowadzono utlenianie za pomocą OsO_4 (1 równoważnik). Reakcja zachodziła regio- i stereoselektywnie przy wiązaniu podwójnym $\text{C}_{(16)}\text{-C}_{(17)}$. W otrzymanym *trans*-diolu należało odwrócić konfigurację grupy hydroksylowej przy C-16. W tym celu grupę tę utleniono metodą Swerna, a następnie zredukowano za pomocą $\text{CeCl}_3/\text{NaBH}_4$ do produktu o właściwej konfiguracji (takiej jak w saponinie OSW-1). Otrzymany w ten sposób aglikon z zabezpieczoną grupą karbonylową można zastosować w reakcjach glikozylacji. Próby uzyskania niezabezpieczonego aglikonu prowadziły do pochodnej furanu. Wolny aglikon ma tendencję do natychmiastowej cyklizacji, a cykliczny hemiacetal w kwaśnym środowisku reakcji łatwo ulega dehydratacji.

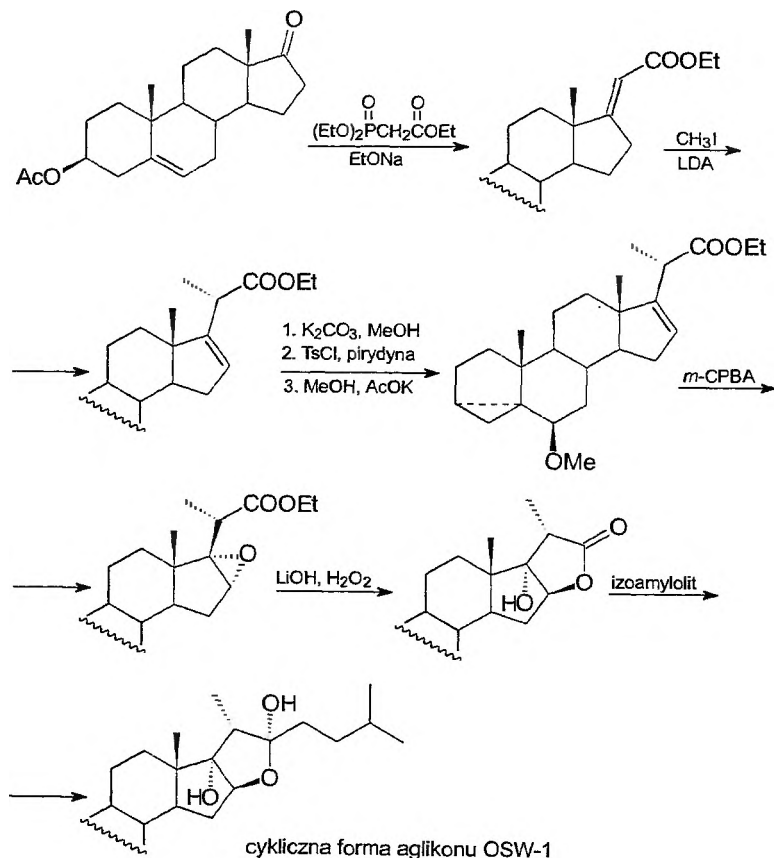
Bardzo podobną strategię syntezy aglikonu saponiny OSW-1 zastosowali rok później badacze chińscy (schemat 21) [37]. Jedyne różnica polegała na tym, że reakcja enowa została przeprowadzona z paraformaldehydem, otrzymany alkohol pierwszorzędowy został utleniony do aldehydu, który z kolei reagował z odczynnikiem Grignarda. Powstały w ten sposób drugorzędowy alkohol był dalej przekształcanym w aglikon, podobnie jak w metodzie Fuchsa.



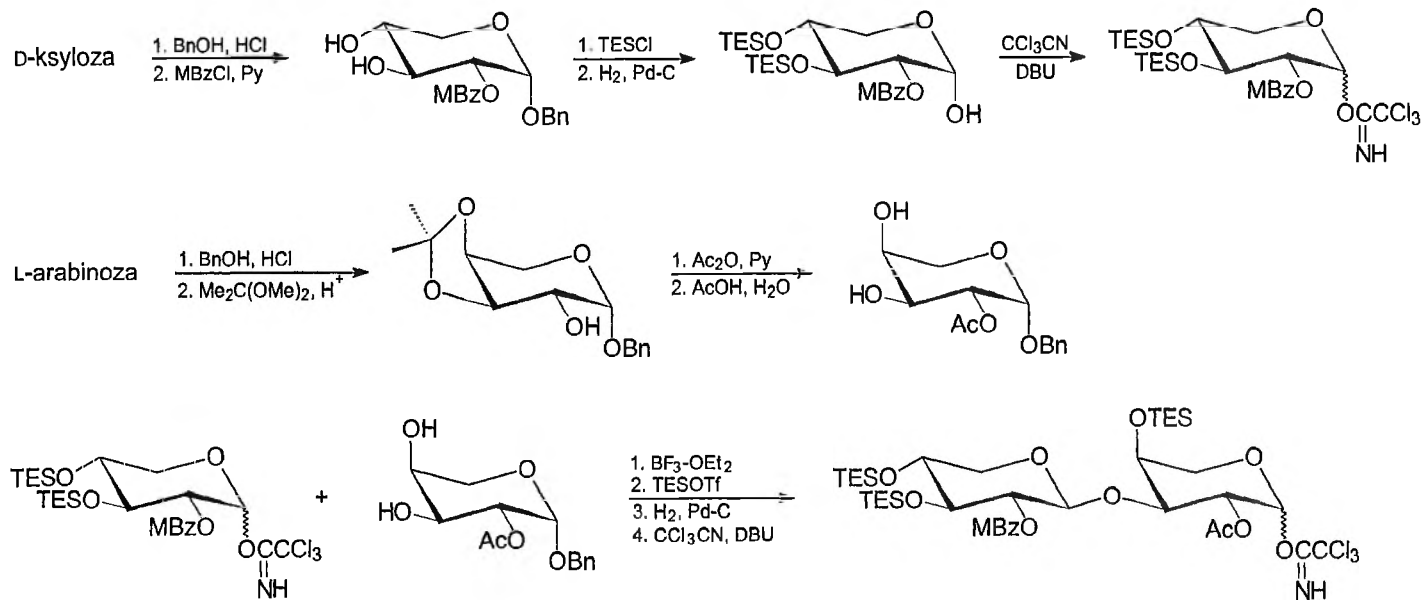
Schemat 21

Budowa aglikonu saponiny OSW-1 nie jest bardzo skomplikowana, a jedynym problemem syntetycznym jest uzyskanie odpowiedniej konfiguracji grup hydroksylowych w pierścieniu D. W obu opisanych procedurach układ *trans* diolu uzyskiwano na drodze okrężnej i bardzo kosztownej, używając ponadto toksycznej substancji, jaką jest OsO_4 . Opracowana została niedawno nowa metoda syntezy aglikonu pozbawiona tych niedogodności [38]. W metodzie tej kluczowym etapem jest otwarcie pierścienia $16\alpha,17\alpha$ -epoksydowego za pomocą $\text{H}_2\text{O}_2/\text{LiOH}$. Jak już wspomniano, epoksyd ten jest odporny na atak nukleofilowy. Nawet zastosowanie takich odczynników nukleofilowych, jak I^- , RSe^- czy HOO^- , nie prowadziło do otwarcia epoksydu. Okazało się jednak, że obecność grupy karbonylowej (zarówno ketonowej, jak i estrowej) w pozycji 22 umożliwia przeprowadzenie reakcji z wodoronadtlenkiem litu. Atak odczynnika nukleofilowego zachodzi wówczas na grupę karbonylową, a otwarcie epoksydu ma charakter reakcji wewnątrzcząsteczkowej. Syntezę aglikonu saponiny OSW-1 przy zastosowaniu tej procedury przedstawia schemat 22.

Syntezę części cukrowej, a także jej przyłączenie do steroidowego aglikonu opisano w 1999 r. [37]. α -D-Ksylolipiranozyd benzylowy (schemat 23) regioselek-

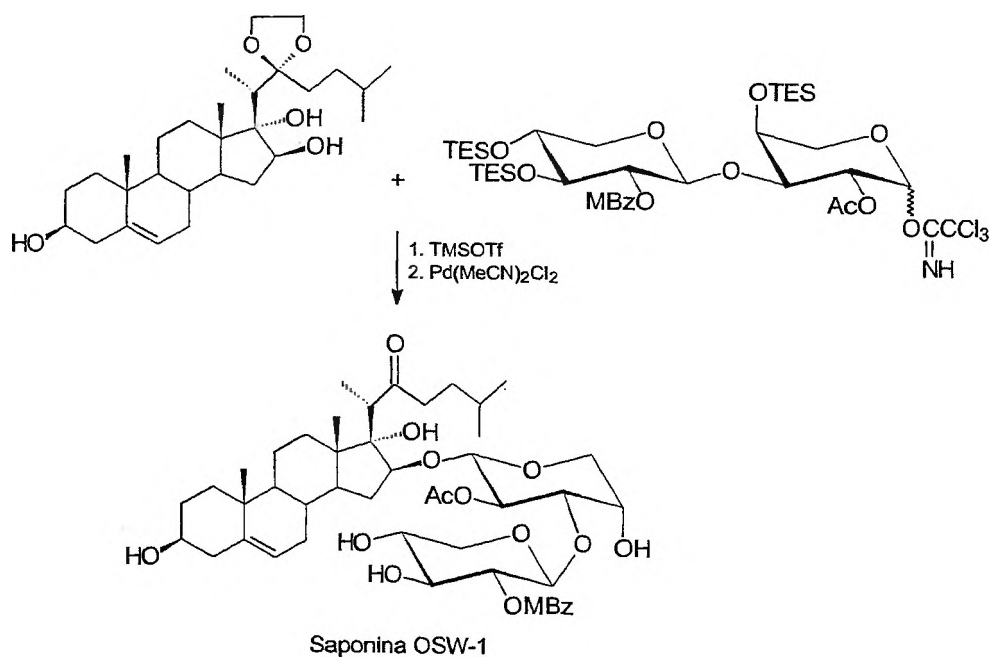


Schemat 22



Schemat 23. MBz – chlorek *p*-metoksybenzoilu; TESCl – chlorek trietylosililowy; DBU – 1,8-diazabicyklo-[5,4,0]-undec-7-en; TESOTf – trifluoro-sulfonian trietylosililowy

tywnie 4-metoksybenzoilowano w pozycji 2, a następnie grupy 3- i 4-hydroksylowe zamaskowano w postaci eteru trietylosililowego (TES). Po odbezpieczeniu grupy OH przy anomerycznym atomie węgla otrzymano pochodną trichloroacetiminylową [39], której użyto do przyłączenia do arabinozylogowego akceptora. Ten ostatni został przygotowany w czterech prostych etapach z *L*-arabinozy. Synteza akceptora obejmowała benzylowanie przy C-1, izopropylidenowanie grup 3- i 4-OH, acetylowanie przy C-2 i usunięcie grupy ochronnej 3,4-diolu. Chociaż tak przygotowany akceptor miał dwie grupy hydroksylowe, możliwa była jego selektywna glikozyłacja przy ekwatorialnej grupie 3-hydroksylowej przy użyciu donora ksylozowego. Uzyskany disacharyd zabezpieczono w postaci eteru TES, a następnie otrzymano aktywną pochodną trichloroacetiminylową. W końcowym stadium syntezy disacharyd przyłączono do steroidowego aglikonu (schemat 24) w reakcji katalizowanej trifluorosulfonianem trimetylosililowym [40], a następnie odbezpieczono wszystkie grupy ochronne w obu częściach za pomocą $\text{Pd}(\text{MeCN})_2\text{Cl}_2$ w acetonie [41].

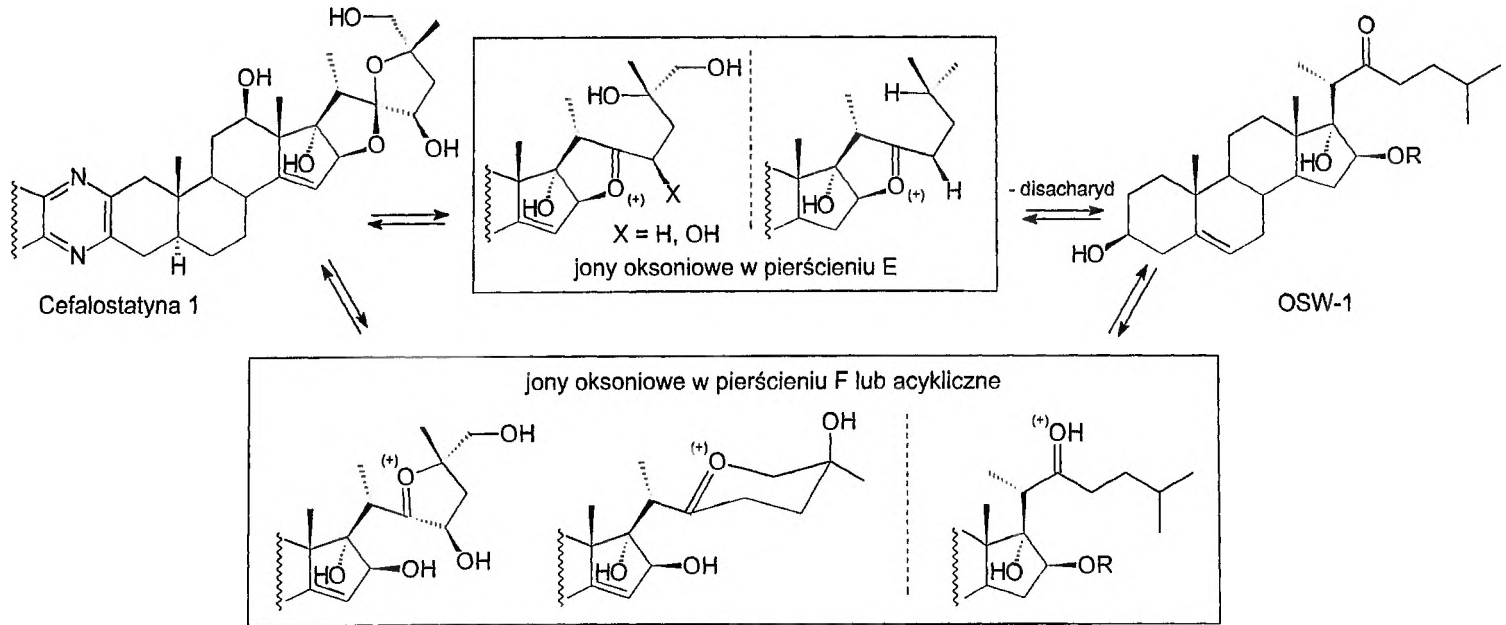


Schemat 24

Przeprowadzono również syntezy analogów cefalostatyn zawierających w jednej części dihydro aglikon saponiny OSW-1 (schemat 18). Okazało się jednak [42], że otrzymane związki (ornitostatyny) wykazywały aktywność biologiczną znacznie mniejszą niż cefalostatyna I i OSW-1.

8. MECHANIZM AKTYWNOŚCI CYTOSTATYCZNEJ – HIPOTEZY

Opisane uprzednio bis-steroidowe alkaloidy pirazynowe i saponiny *O. saundersiae* nie mają grup funkcyjnych zazwyczaj związanych z aktywnością cytostaticzną. Związki te nie mają właściwości alkilujących, interkalujących DNA, nie generują wolnych rodników, nie są akceptorami Michaela ani chinonami o wysokim potencjale oksydoredukcyjnym. Grupa badawcza J.N. Weinsteina z NCI przeprowadziła niedawno analizę wartości GI_{50} oznaczonych dla każdego ze 141 związków o znanym mechanizmie działania cytostaticznego na 60 liniach wybranych komórek rakowych [9, 10, 43–45]. Okazało się, że związki o podobnym mechanizmie działania wykazują podobne profile aktywności. Wyróżnionych zostało 6 mechanizmów działania (MOA, ang. *mechanism of action*): czynniki alkilujące, inhibitory topoizomerazy I, inhibitory topoizomerazy II, antymetabolity RNA/DNA, antymetabolity DNA i czynniki antymitotyczne. Przeprowadzona analiza pozwala przewidywać MOA z bardzo dużą dozą prawdopodobieństwa na podstawie wartości GI_{50} uzyskanych w testach NCI. Profil działania cytostaticznego omówionych w tej pracy związków nie pasuje do żadnego ze znanych MOA, a jednocześnie stwierdzono uderzające podobieństwo profilu działania cefalostatyn, ritterazyn i saponin *Ornithogalum saundersiae*. We wczesnym stadium badań alkaloidów pirazynowych zaproponowano hipotezę, że związki te łączą dwuwarstwę lipidową (cefalostatyna I ma 30 Å długości), deformując w ten sposób błony komórkowe. Hipoteza ta była o tyle uzasadniona, że aktywność biologiczną wykazywały tylko związki dimeryczne (otrzymane syntetycznie pojedyncze steroidowe nie przejawiały aktywności cytostaticznej). Jednak po odkryciu saponin *O. saundersiae*, które przypuszczalnie wykazują podobny mechanizm działania, należało odrzucić tę koncepcję. Nieco później wysunięto hipotezę, że cefalostatyny mogą być inhibitorami enzymów, tworząc wiązania wodorowe ze specyficznym układem docelowym. Sugerowano też, że *in vivo* może tworzyć się reaktywny związek przejściowy o charakterze elektrofilowym z wykorzystaniem wiązania podwójnego w pierścieniu D cefalostatyn. Kiedy jednak okazało się, że obecność tego wiązania nie jest niezbędna do aktywności cytostaticznej tej grupy związków, i ta koncepcja musiała upaść. Znamienny jest fakt, że wszystkie najbardziej aktywne pirazyny zawierają przynajmniej jeden wysokoenergetyczny układ spiroketalowy. Oznacza to, że aktywne biologicznie są izomery o niższej trwałości termodynamicznej (co wynika z obliczeń i danych doświadczalnych). Ponieważ istnieją przesłanki, że pokrewne steroidy, takie jak saponina OSW-1, która może być uważana za strukturalnie zbliżoną do spirostanów, czy azaspirostan – solasodyna, wykazują aktywność biologiczną dzięki reakcjom układu spiro, pojawiła się koncepcja „nabitego rewolweru”. Zgodnie z nią za aktywność biologiczną tych związków może odpowiadać gwałtowne wydzielenie nadmiaru energii przy konwersji spirostanów do trwałszych izomerów czy też przy cyklizacji towarzyszącej odłączeniu części cukrowej z saponiny OSW-1. Cechą charakterystyczną nowych cytostaticków jest tak-



Schemat 25

że obecność grupy 17α -hydroksylowej. Związki pozbawione tej grupy okazały się zdecydowanie mniej aktywne, a jej znaczenie dla inhibicji nowotworów zostało również udokumentowane w przypadku steroidów angiostatycznych, takich jak 17α -hydroksyprogesteron i jego analogi. Prowadzone są dalsze badania w celu określenia minimalnego farmakoforu. Wspólny mechanizm działania cytostaticznego saponin *O. saundersiae* i cefalostatyn można wytłumaczyć w oparciu o tworzenie się *in vivo* reaktywnych jonów oksoniowych (schemat 25). Takie przejściowe jony, cykliczne lub acykliczne, mogłyby powstawać z obu tych grup związków i niedawno zostały zaproponowane jako potencjalne farmakofory [42].

Praca częściowo finansowana przez Komitet Badań Naukowych w ramach projektu badawczego nr 3 T09A 054 17.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] E. Mikiciuk-Olasik, K. Błaszczak-Świątkiewicz, *Wiad. Chem.*, 2000, **54**, 705.
- [2] A. Ganesan, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1996, **35**, 611.
- [3] D.G.I. Kingston, *J. Nat. Prod.*, 2000, **63**, 726.
- [4] A. Ganesan, *Studies in Nat. Prod. Chem.*, 1996, **18**, 875.
- [5] G.R. Pettit, M. Inoue, Y. Kamano, D.L. Herald, C. Arm, C. Dufresne, N.D. Christie, J.M. Schmidt, D.L. Doubek, T.S. Krupa, *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, **110**, 2006.
- [6] F. Pietra, *A Secret World: Natural Products of Marine Life*, Birkhäuser, Basel 1990, 149 s.
- [7] S. Fukuzawa, S. Matsunaga, N. Fusetani, *J. Org. Chem.*, 1994, **59**, 6164.
- [8] S. Kubo, Y. Mimaki, M. Terao, Y. Sashida, T. Nikaido, T. Ohmoto, *Phytochemistry*, 1992, **31**, 3969.
- [9] P. Hoffman, D. Pinkney, K.A. Marx, G.G. Grinstein, artykuł dostępny tylko w internecie: http://www.anvilinformatics.com/portfolio/cancer/data_viz.htm
- [10] J.N. Weinstein, K.W. Kohn, M.R. Grever, V.N. Viswanadhan, L.V. Rubinstein, A. Monks, D.A. Scudiero, L. Welch, A. Koutsoukos, K.D. Paull, *Science*, 1992, **258**, 447.
- [11] G.R. Pettit, M. Inoue, Y. Kamano, C. Dufresne, N. Christie, M.L. Niven, D.L. Herald, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1988, 865.
- [12] S. Fukuzawa, S. Matsunaga, N. Fusetani, *J. Org. Chem.*, 1997, **62**, 4484.
- [13] C.H. Heathcock, S.C. Smith, 1994, **59**, 6828.
- [14] Y. Li, J.R. Dias, *Chem. Rev.*, 1997, **97**, 283.
- [15] H.E. Smith, A.A. Hicks, *J. Org. Chem.*, 1971, **36**, 3659.
- [16] Y. Pan, R.L. Merriman, L.R. Tanzer, P.L. Fuchs, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1992, **2**, 967.
- [17] M. Drögemüller, T. Flessner, R. Jautelat, U. Scholz, E. Winterfeldt, *Eur. J. Org. Chem.*, 1998, 2811.
- [18] S.C. Smith, C.H. Smith, *J. Org. Chem.*, 1992, **57**, 6379.
- [19] J.W. Morzycki, A. Gryszkiewicz, Z. Łotowski, W.J. Szczepek, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 1998, **63**, 1589.
- [20] Z. Łotowski, A. Gryszkiewicz, J.B. Borowiecka, A. Nikitiuk, J.W. Morzycki, *J. Chem. Research (S)*, 1999, 662.
- [21] C. Guo, S. Bhandaru, P.L. Fuchs, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 10672.
- [22] M. Drögemüller, R. Jautelat, E. Winterfeldt, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1996, **35**, 1572.
- [23] A. Kramer, U. Ullmann, E. Winterfeldt, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1993, 2865.
- [24] Z. Łotowski, E.N. Dubis, J.W. Morzycki, *Monatsh.*, 2000, **131**, 65.

- [25] J. Uk Jeong, C. Guo, P.L. Fuchs, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 2071.
- [26] T.G. LaCour, C. Guo, S. Bhandaru, M.R. Boyd, P.L. Fuchs, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 692.
- [27] S. Bhandaru, P.L. Fuchs, *Tetrahedron Lett.*, 1995, **36**, 8347.
- [28] S. Bhandaru, P.L. Fuchs, *Tetrahedron Lett.*, 1995, **36**, 8351.
- [29] R. Jautelat, E. Winterfeldt, A. Müller-Fahrnow, *J. Prakt. Chem.*, 1996, **338**, 695.
- [30] R. E. Marker, R.B. Wagner, P.R. Ulshafer, E.L. Wittbecker, D.P.J. Goldsmith, C.H. Ruof, *J. Am. Chem. Soc.*, 1947, **69**, 2167.
- [31] I.V. Micovic, M.D. Ivanovic, D.M. Piatak, *Synthesis*, 1990, 591.
- [32] S.N. Suryawanshi, P.L. Fuchs, *J. Org. Chem.*, 1986, **51**, 902.
- [33] S. Jain, K. Shukla, A. Mukhopadhyay, S.N. Suryawanshi, D.S. Bhakuni, *Synth. Commun.*, 1990, **20**, 1315.
- [34] E.J. Corey, P. Da Silva Jardine, S. Virgil, P.-W. Yuen, R.D. Connell, *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, **111**, 9243.
- [35] Y. Mimaki, M. Kuroda, A. Kameyama, Y. Sashida, T. Hirano, K. Oka, R. Maekawa, T. Wada, K. Sugita, *J.A. Beutler, Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1997, **7**, 633.
- [36] C. Guo, P.L. Fuchs, *Tetrahedron Lett.*, 1998, **39**, 1099.
- [37] S. Deng, B. Yu, Y. Lou, Y. Hui, *J. Org. Chem.*, 1999, **64**, 202.
- [38] J.W. Morzycki, A. Gryszkiewicz, I. Jastrzębska, *Tetrahedron Lett.*, 2000, **41**, 3751.
- [39] M. Numata, M. Sugimoto, K. Koike, T. Ogawa, *Carbohydr. Res.*, 1987, **163**, 209.
- [40] R.R. Schmidt, A. Toepfer, *Tetrahedron Lett.*, 1991, **32**, 3353.
- [41] B.H. Lipshutz, D. Pollart, J. Monforte, H. Kotsuki, *Tetrahedron Lett.*, 1985, **26**, 705.
- [42] C. Guo, T.G. LaCour, P.L. Fuchs, *Bioorg. Med. Lett.*, 1999, **9**, 419.
- [43] J.N. Weinstein, T.G. Myers, P.M. O'Connor, S.H. Friend, A.J. Fornace, K.W. Kohn, T. Fojo, S.E. Bates, J.N. Weinstein, N.L. Anderson, J.K. Buolamwini, W.W. van Osdol, A.P. Monks, D.A. Scudiero, E.A. Sausville, D.W. Zaharevitz, B. Bunow, V.N. Viswanadhan, G.S. Johnson, R.E. Wittes, K.D. Paull, *Science*, 1997, **275**, 343.
- [44] W.W. van Osdol, T.G. Myers, K.D. Paull, K.W. Kohn, J.N. Weinstein, *J. Natl Cancer Inst.*, 1994, **86**, 1853.
- [45] A.D. Koutsoukos, J.N. Weinstein, D. Faraggi, R.M. Simon, S. Kalyandrug, J.N. Weinstein, K.D. Paull, K.W. Kohn, *Stat. In Med.*, 1994, **13**, 719.

Praca wpłynęła do Redakcji 6 lutego 2001

CYKLITOLE CYCLITOLS

**Ryszard Frankowski, Wojciech Maszewski,
Zygfryd Smiatacz***

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

Abstract

Wstęp

1. Cyklitole

1.1. Struktura i nazewnictwo

1.2. Konfiguracja absolutna

1.3. Konformacja inozytoli

1.4. Trwałość cząsteczek inozytoli

2. Inozytyle – występowanie w przyrodzie i aktywność biologiczna

3. Inne cyklitole – występowanie w przyrodzie i aktywność biologiczna

4. Antybiotyki aminoglikozydowe

5. Wybrane metody otrzymywania cyklitolii

Piśmiennictwo cytowane

* Korespondencja



Dr Ryszard Frankowski (ur. w 1971 r. w Gdańsku). W 1995 r. otrzymał tytuł magistra chemii na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, w 1997 r. tytuł magistra ekonomii na Wydziale Ekonomii UG, a w 2000 r. stopień doktora chemii na Wydziale Chemii UG. Jego problematyka badawcza dotyczy chemii cukrów, szczególnie aminocukrów i ich transformacji w związki aminokarbocykliczne. Jest autorem 3 publikacji i 2 komunikatów.

Mgr Wojciech Maszewski (ur. 1972 r. w Ciechanowie), w 1996 r. ukończył studia na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego i otrzymał tytuł magistra. Pracę magisterską wykonał w Zakładzie Cukrów UG. Po studiach pracował kolejno w Instytucie Chemii Przemysłowej w Warszawie, w firmie Merck Sp. z o.o. w Warszawie w Dziale Laboratoryjnym, a obecnie (od 1999 r.) w Zakładach Farmaceutycznych Polfa Kutno S.A. (kierownik w dziale produkcji leków kardiologicznych).



Prof. dr hab. Zygfryd Smiatacz (ur. w 1929 r. w Belgii) jest profesorem zwyczajnym na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Mgr – 1960, WSP Gdańsk, dr – 1966, WSP Katowice, dr hab. – 1975, UG, prof. w 1992 r., kierownik Zakładu Chemii Cukrów. Zainteresowania badawcze – synteza, budowa i właściwości pochodnych cukrów: *N*-glikozydy amin aromatycznych i heterocyklicznych, *O*-, *N*- i *S*-glikozyloaminokwasy, 2-deoksy-2-hydroksyiminocukry, muranylopeptydy, karbacukry.

Wypromował 9 doktorów, jest autorem 80 prac oryginalnych. Odbił staże naukowe na uniwersytetach na Węgrzech (Debreczyn, 1968–1969, zespół prof. R. Bognara), w Kanadzie (Edmonton, 1977–1978, zespół prof. R.U. Lemieux), w Niemczech (Oldenburg i Brema 1989–1991).

ABSTRACT

Cyclitols constitute important structural elements of a variety of biologically active compounds, such as aminoglycoside antibiotics, phospholipid inositols referred to as „secondary messengers”, and coordination compounds with metals, e.g. platinum, arousing interest in many areas of natural sciences. In spite of the fact that cyclitols have been known since the 19th century, the majority of significant achievements in this field is seen during the late 90s of the 20th century.

The first section of this review deals with general information on the nomenclature, structural features ([2-6]; Schemes 1 and 2), configuration ([6, 7]; Schemes 3 and 4) and conformation ([8]; Scheme 5; Table 1) of the cyclitols.

The second section is concerned with the occurrence (Table 2) and biological properties of the inositols, in particular of myo-inositol and its derivatives (Schemes 7 and 8). A mechanism of action of myo-inositol 1,4,5-triphosphate (1,4,5-IP₃) as a secondary messenger has been outlined in Scheme 9.

The third section discusses the occurrence and biological activity of the other cyclitols of structures illustrated by the formulae in Schemes 10 through 15.

The fourth section is confined to aminoglycoside, antibiotics. Their names, occurrence, mode of action and formulae of main representatives of this class of compounds are summarized in Table 3 and in Figs. 1 through 8.

The last section describes common methods of preparation of the cyclitols. These are as follows:

- (i) syntheses using sugar precursors ([40, 48]; Schemes 16-21);
 - (ii) syntheses utilizing the Diels-Alder cycloaddition ([52]; Schemes 20 and 22);
 - (iii) hydrogenation of polyhydroxybenzenes [53, 54];
 - (iv) molecular modification of known cyclitols ([55]; Scheme 24).
-
-

WSTĘP

Cyklitole są niezmiernie ważnymi elementami strukturalnymi wielu aktywnych biologicznie związków, m.in. antybiotyków aminoglikozydowych, fosfolipidoinozytoli zwanych „drugimi posłańcami” czy też związków kompleksowych z metalami (Pt) o właściwościach cytostatycznych. Dlatego też związki te cieszą się dużym zainteresowaniem wielu dziedzin nauk przyrodniczych. I chociaż cyklitole znane są już od połowy XIX w., to większość dotyczących ich odkryć przypada na ostatnie lata XX w.

Aby zilustrować występowanie różnic w budowie i właściwościach cyklitolii, można je podzielić na wiele podgrup. Dla przejrzystości prezentowanych w tej pracy problemów proponujemy podział cyklitolii na następujące grupy:

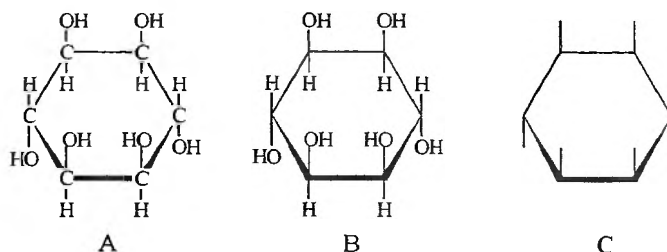
- zawierające tylko wolne grupy hydroksylowe
 - inozytole – zawierają sześć grup hydroksylowych,
 - cykloheksanopentole (kwercytyle) – zawierają pięć grup hydroksylowych;
- mające wiązanie podwójne C=C
 - konduritole – zawierają jedno wiązanie podwójne C=C,
 - konduraminy – aminowe pochodne konduritoli;
- zawierające grupę hydroksymetylową (5-C-pochodne cyklitolii)
 - pseudocukry – zawierają jedną grupę $-\text{CH}_2\text{OH}$ [1],
 - cyklofellitole – zawierają grupę $-\text{CH}_2\text{OH}$ oraz pierścień oksiranowy, które sąsiadują ze sobą [1];
- inne pochodne cyklitolii
 - cykloheksanony – inozyzy,
 - aminocyklitole – inozaminy,
 - pochodne *O*-metylowe np. kwebrachitol, sekwoitol, ononitol, pinitol,
 - pochodne fosforanowe, np. 1,4,5-tris-fosforan-*mio*-inozytolu, 1,2,3,4,5,6-heksis-fosforan-inozytolu (fitynian).

1. CYKLITOLE

1.1. STRUKTURA I NAZEWNICTWO

Cyklitole to związki karbocykliczne, które zawierają grupy wodorotlenowe połączone z atomami węgla pierścienia. Wśród nich szczególne miejsce zajmują 1,2,3,4,5,6-cykloheksanoheksole nazywane ogólnie inozytolami. Budowę przestrzenną wybranej cząsteczki inozytolu w sposób ogólny przedstawia wzór A, a w formie bardziej uproszczonej wzory B i C. Zakłada się, że we wzorach tych pierścień jest płaski i prostopadły do płaszczyzny kartki, a atomy wodoru i grupy hydroksylowe znajdują się nad lub pod jej płaszczyzną (schemat 1).

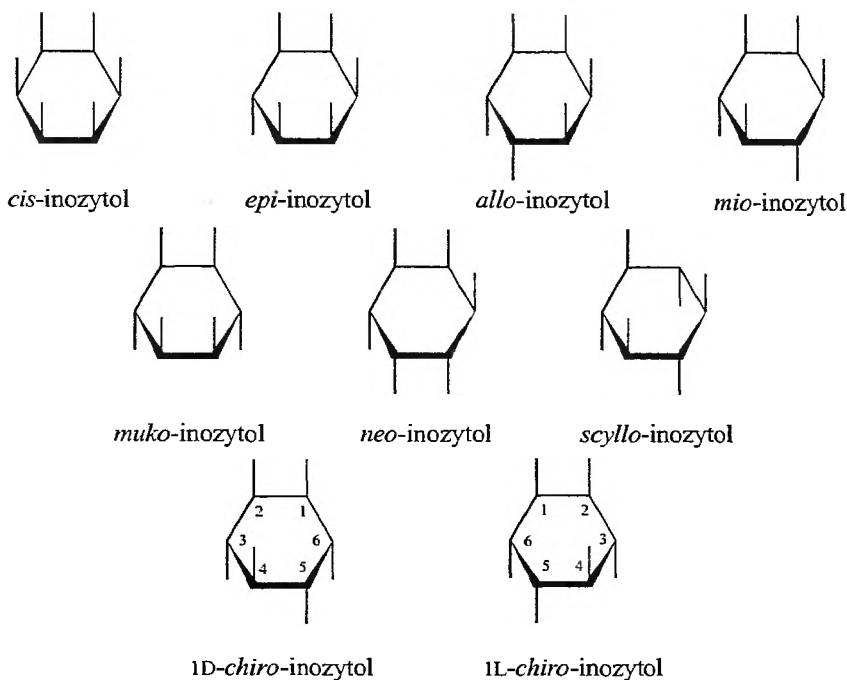
Nomenklatura tych związków jest dość złożona. W 1900 r. Maquenne [2] proponował notację wg konwencji ułamkowej, w której cyfry podane w liczniku



Schemat 1

wskazują grupy hydroksylowe lub inne grupy różne od atomów wodoru, leżące nad płaszczyzną pierścienia, a cyfry w mianowniku grupy hydroksylowe lub inne grupy będące pod płaszczyzną pierścienia. W taki sposób związek A ma stereochemiczny przedrostek 1,2,4,5/3,6. Maquenne nie podał jednak dokładnie, w jaki sposób należy przypisywać cyfry poszczególnym pozycjom i dlatego w wielu pracach dotyczących inozytoli przypisanie te były dokonywane w różny sposób.

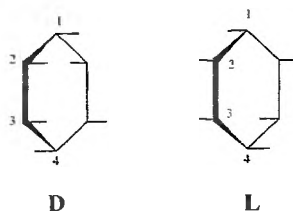
Proponowano wiele systemów nomenklatury [3, 4], jednak najbardziej logiczny i spójny jest system opracowany przez Posternaka [5]. Obecnie najczęściej poszczególne inozytoli i ich pochodne rozróżnia się, stosując pisane kursywą przedrostki z łącznikiem [6] (schemat 2).



Schemat 2

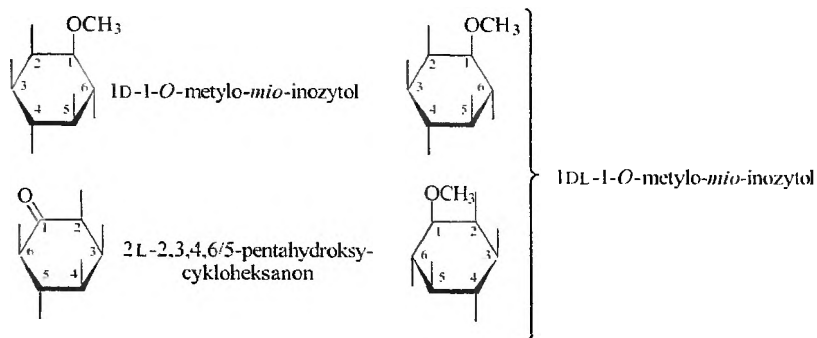
1.2. KONFIGURACJA ABSOLUTNA

W celu określenia konfiguracji absolutnej cykliczolu przedstawia się go w rysowanej pionowo projekcji Fischera-Tollensa, w której atom C-1 znajduje się u góry, a atomy C-2 i C-3 na przedniej krawędzi pierścienia. Związek ma konfigurację D, jeżeli grupa hydroksylowa związana z centrum chiralności o najniższym lokancie (lub inny podstawnik, jeżeli w tym miejscu brak grupy hydroksylowej) jest skierowana w prawo, a jako L, jeśli w lewo (schemat 3). Przedrostek



Schemat 3

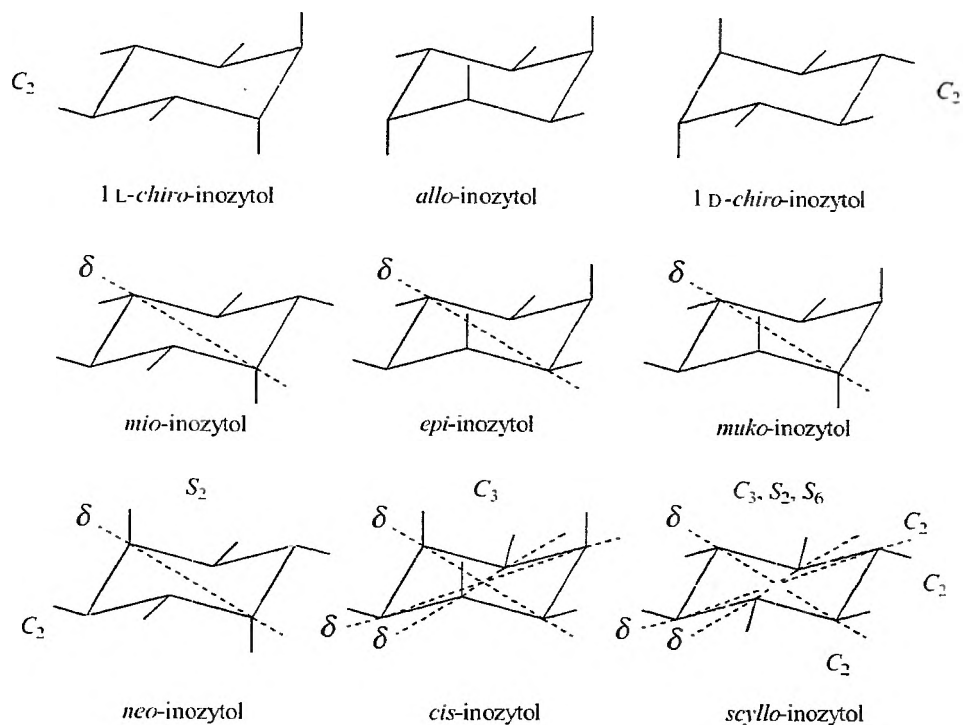
D lub L z łącznikiem umieszcza się przed nazwą związku i można go poprzedzić lokantem określonego centrum. Związki racemiczne określa się przedrostkiem DL. Brak przedrostka D, L lub DL oznacza, że związek ma konfigurację *mezo*. Konfigurację można określić prościej, postępując w następujący sposób. Wzór rysuje się tak, by podstawnik na asymetrycznym atomie węgla o najniższym lokancie leżał powyżej płaszczyzny pierścienia i jeśli numeracja biegnie w kierunku zgodnym z ruchem wskazówek zegara, to związek ma konfigurację L, a jeżeli w kierunku przeciwnym, to D (przykładowo L- i D-*chiro*-inozytyle na schemacie 2). Powyższą zasadę ilustrują wzory związków na schemacie 4.



W większości przypadków centrum chiralności o najniższym lokancie jest pozycja 1. Dlatego też przedrostki konfiguracyjne D lub L powinny być poprzedzone lokantem tylko wtedy, gdy byłby on inny niż 1. System *R, S* stosuje się do opisu uwzględniającego konfigurację centrów chiralnych [7].

1.3. KONFORMACJA INOZYTOLI

Inozytyle jako związki o pierścieniach sześciocłonowych mogą mieć wszystkie charakterystyczne dla tego typu pierścieni konformacje, tj. łódkową, krzesłową, półkrzesłową, skróconej łódki. Jednak najczęściej występują w najtrwałszej konformacji krzesłowej. Związki te ze względu na położenie grup hydroksylowych (lub innych grup) mogą mieć różne elementy symetrii, a co za tym idzie, wykazywać lub nie czynność optyczną [8]. Na schemacie 5 przedstawione są wzory wszystkich dziewięciu inozytoli oraz ich elementy symetrii [8] (schemat 5). Jedynie *allo*-inozytol jest całkowicie asymetryczny. Pozostałe inozytyle mają jeden lub więcej elementów symetrii. *D-Chiro*-inozytol oraz *L-chiro*-inozytol mają oś symetrii C_2 i są związkami chiralnymi. Cząsteczki *mio*-, *epi*- i *muko*-inozytoli charakteryzują się występowaniem płaszczyzny symetrii δ . Są to związki niechiralne, podobnie jak wszystkie pozostałe inozytyle. *Neo*-inozytol ma dwie osie symetrii S_2 i C_2 oraz płaszczyznę δ prostopadłą do osi S_2 . W cząsteczce *cis*-inozytoli występują trzy płaszczyzny δ przecinające się na osi C_3 . Najwięcej elementów symetrii znajduje się jednak w cząsteczce *scyllo*-inozytoli. Cząsteczka taka posiada trzy płaszczyzny δ przecinające się na osi C_3 przedzielające kąty utworzone pomiędzy trzema osiami C_2 .



Schemat 5

1.4. TRWAŁOŚĆ CZĄSTECZEK INOZYTOLI

Trwałość cząsteczki inozytolu w danej konformacji może być określona przez oszacowanie jej energii swobodnej. Energię swobodną cząsteczki każdego cyklitolu w danej konformacji można określić stosując następujące przybliżenia:

- sześciocząonowy pierścień analizowanej cząsteczki ma taką samą geometrię jak pierścień cykloheksanu;
- podstawniki, które znajdują się przy pierścieniu, nie mają wpływu na geometrię;

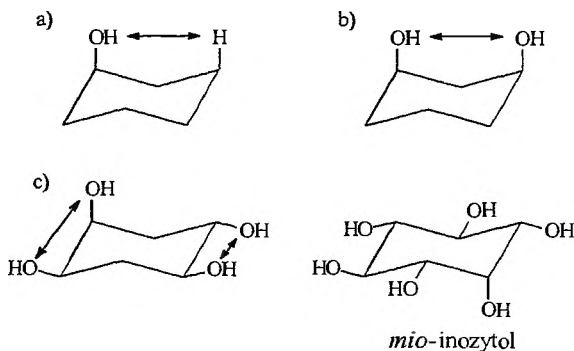
- zaniedbuje się wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe;
- jeden rodzaj oddziaływań nie wpływa na inne rodzaje oddziaływań;
- względne wartości energii swobodnej konformerów otrzymuje się przez zsumowanie oddziaływań niewiążących i oddziaływań elektronowych.

W cząsteczkach inozytoli mogą występować trzy rodzaje oddziaływań niewiążących [8] (schemat 6):

a) oddziaływanie 1,3-*syn* aksjalno-aksjalne (a : a) typu $O_a : H_a$, którego energia wynosi ok. 0,45 kcal/mol;

b) oddziaływanie 1,3-*syn* aksjalno-aksjalne (a : a) typu $O_a : O_a$, którego energia wynosi ok. 1,50 kcal/mol;

c) oddziaływanie 1,2-*gauche* aksjalno-ekwatorialne (a : e) i ekwatorialno-ekwatorialne (e : e) typu $O_1 : O_2$ o energii równej ok. 0,35 kcal/mol.



Schemat 6

Wyznaczona w ten sposób energia np. cząsteczki *mio*-inozytolu w konformacji krzesłowej wynosi:

oddziaływanie 1,2-*gauche* ($O_1 : O_2$) = 0,35 kcal/mol \times 5 = 2,10 kcal/mol

oddziaływanie 1,3-*syn* ($O_a : H_a$) = 0,45 kcal/mol \times 2 = 0,90 kcal/mol

oddziaływanie 1,3-*syn* ($O_a : O_a$) – nie występują

Suma = 3,0 kcal/mol

Obliczone w podobny sposób wartości względne energii swobodnej trwałości konformacji krzesłowej dla innych inozytoli podane są w tab. 1.

Tabela 1. Względna energia swobodna inozytoli w konformacji krzesłowej [8]

| Konfiguracja inozytoli | Energia oddziaływań (kcal/mol) | | | | | Względna energia swobodna |
|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-------|-------------------|---------------------------|
| | (O ₁ :O ₂) | (O _a :H _a) | (O _a :O _a) | RTlnσ | RTln2 dla pary DL | |
| <i>mio-</i> | 2,10 | 0,90 | – | – | – | 3,00 |
| <i>scyllo-</i> | 2,10 | – | – | 1,10 | – | 3,20 |
| <i>DL-chiro-</i> | 1,75 | 1,80 | – | 0,40 | –0,40 | 3,55 |
| <i>D-chiro</i> lub <i>L-chiro</i> | 1,75 | 1,80 | – | 0,40 | – | 3,95 |
| <i>neo-</i> | 2,10 | 1,80 | – | 0,40 | – | 4,30 |
| <i>epi-</i> | 2,10 | 0,90 | 1,50 | – | – | 4,50 |
| <i>allo-</i> | 1,75 | 1,80 | 1,50 | – | –0,40 | 4,65 |
| <i>muko-</i> | 1,40 | 1,80 | 1,50 | – | – | 4,70 |
| <i>cis-</i> | 2,10 | – | 4,50 | 0,65 | – | 7,25 |

T = 300 K

2. INOZYTOLE – WYSTĘPOWANIE W PRZYRODZIE I AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA

Niektóre z wymienionych wcześniej inozytoli (schemat 2) są dostępne w naturze, i to zarówno w postaci czystego inozytoli, jak i w postaci pochodnej inozytoli (etry metylowe inozytoli, fityniany inozytoli i fosfolipidy). I tak, *L-chiro*-inozytol stanowi 12,3% suchej masy *Cymodocea rotundata*, *muko*-inozytol – ok. 8,5% suchej masy *Thalassodendron ciliatum*, natomiast *mio*-inozytol – 3,6% suchej masy *Zostera nolbii* [9]. Szczegółowo dostępność inozytoli w naturze przedstawia tab. 2.

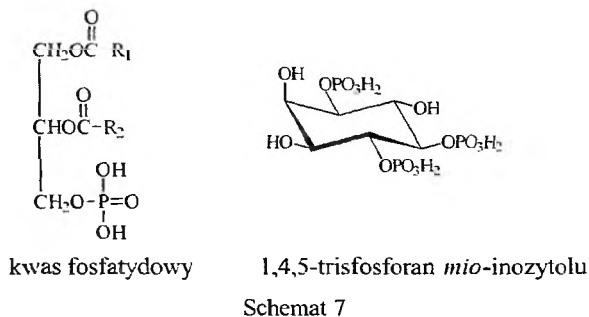
Tabela 2. Występowanie inozytoli w naturze [6, 9, 56]

| Inozytol | Źródło występowania w naturze |
|--------------------------|--|
| <i>mio</i> -inozytol | większość żywych organizmów zarówno roślinnych, jak i zwierzęcych m.in. w ziarnach kukurydzy (w postaci fitynianów), w soczewce ludzkiego oka, w mózgu szczura, u przedstawicieli szczepów <i>Zostera nolbii</i> , <i>Macrozamia riedlei</i> , <i>Sarcocephallus diderrichii</i> z rodziny <i>Rubiaceae</i> (<i>L</i> -bornezytol), <i>Liriodendron tulipifera</i> (<i>D</i> -liriodendritol), w sekwoi kalifornijskiej (<i>Sequoia sempervirens</i>), w palmie (<i>Caryota urens</i> – <i>D</i> -bornezytol), w kauczuku drzew <i>Dyera lowii</i> (<i>D</i> -bornezytol), a także u dikotyledonów (<i>D</i> -ononitol, sekwoitol, dambonitol), gymnosperm oraz rodzin <i>Magnoliaceae</i> (<i>D</i> -liriodendritol) i <i>Apocynaceae</i> (<i>L</i> -bornezytol) |
| <i>L-chiro</i> -inozytol | <i>Artemisia dracunculus</i> z rodziny <i>Compositae</i> (<i>L</i> -pinitol), <i>Cymodocea rotundata</i> , drzewo kauczukowe (<i>Hevea brasiliensis</i> – <i>L</i> -kwebrachitol) |
| <i>D-chiro</i> -inozytol | <i>Afrormosia elata</i> z rodziny <i>Leguminosae</i> , przedstawiciele rodzin, zielone algi z rodziny <i>Chlorella</i> , w syropie sosny (<i>Pinus lambertiana</i> – <i>D</i> -pinitol) |
| <i>scyllo</i> -inozytol | czerwone algi, przedstawiciele rodziny angiosperm, mocz ssaków, ryby płasztogostomiczne oraz u niektórych przedstawicieli insektów |

cd. tab. 2

| Inozytol | Źródło występowania w naturze |
|---|---|
| <i>muko</i> -inozytol | <i>Thalassodendron ciliatum</i> , przedstawiciele rodzin <i>Conifera</i> , <i>Taxopsida</i> , <i>Cistaceae</i> (1 <i>D</i> -1- <i>O</i> -metylo- <i>muko</i> -inozytol) |
| <i>neo</i> -inozytol | w ziarnach niektórych roślin (w postaci fitynianów) |
| <i>epi</i> -inozytol <i>allo</i> -inozytol <i>cis</i> -inozytol | niedostępne w naturze, otrzymywane wyłącznie syntetycznie |

Najlepiej poznanym związkiem spośród inozytoli jest *mio*-inozytol, który, jak widać z danych zawartych w tab. 1, charakteryzuje się najniższą spośród wszystkich inozytoli względną energią swobodną. *Mio*-inozytol znany jest chemikom już od 1850 r., ale zainteresowanie tym związkiem wzrosło, gdy stwierdzono, że jest on składnikiem aktywnych biologicznie fosfolipidów. W związkach tych jest on połączony wiązaniem estrowym z resztą fosforanową kwasu fosfatydowego, gdzie R_1 i R_2 – to reszty kwasów tłuszczowych (schemat 7). Dla organizmów zwierzęcych są to przeważnie: kwas arachidowy (R_2) i kwas stearynowy (R_1), a dla roślinnych kwas linoleinowy.



W trakcie badań udało się wyizolować trzy różne fosfolipido-inozytole (schemat 8):

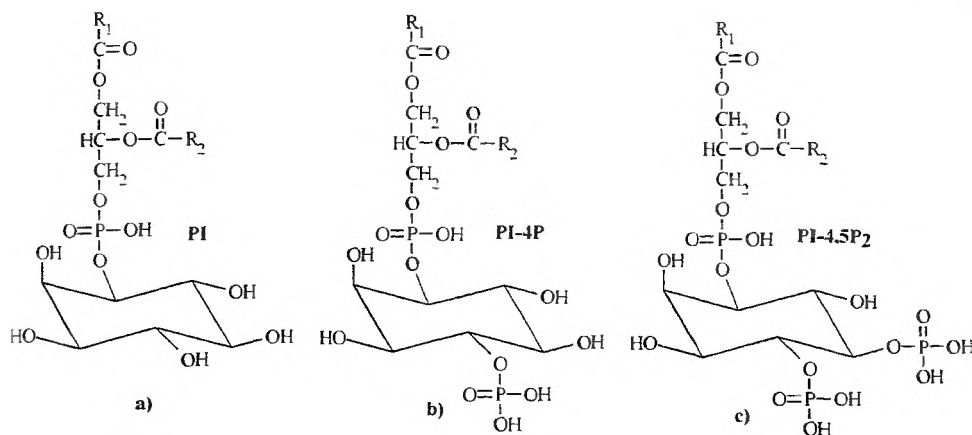
- a) fosfatydylo-*mio*-inozytol (PI),
- b) 4-fosforan fosfatydylo-*mio*-inozytolu (PI-4P),
- c) 4,5-bisfosforan fosfatydylo-*mio*-inozytolu (PI-4,5P₂).

Związki te stanowią ważny element w procesie przekazywania sygnałów i informacji w organizmie. Przekazywanie informacji do komórki może odbywać się różnymi drogami. Do najważniejszych z nich zaliczyć można [10]:

A) bezpośrednie przekazywanie informacji przy użyciu lipofilowych hormonów, które z łatwością pokonują zbudowaną z lipidów błonę komórkową,

B) przekazywanie informacji poprzez zmianę stężenia jonów wewnątrz komórki przy użyciu kanałów jonowych,

C) wykorzystanie znajdującej się w błonie komórkowej kinazy tyrozynowej, która przez fosforylację odpowiedniego białka powoduje uzyskanie odpowiedzi komórkowej,



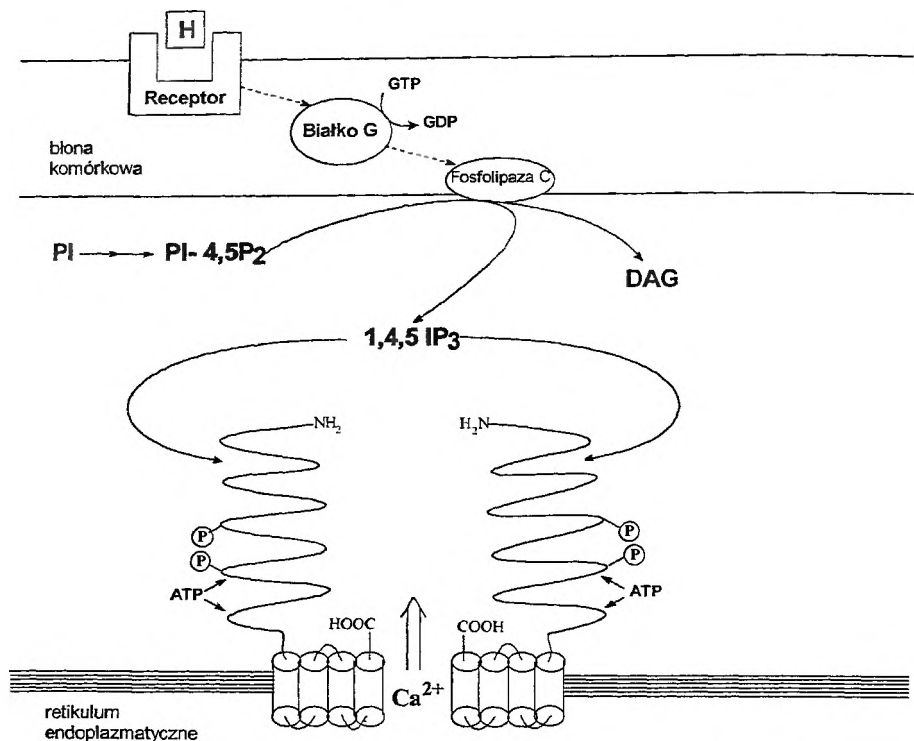
Schemat 8

D) wykorzystanie związków pośredniczących w przekazywaniu informacji – tzw. „drugich posłańców”.

W 1958 r. odkryto istnienie 3',5'-cyklicznego adenozynomonofosforanu – (3',5'-cAMP), który ze względu na swoje specyficzne właściwości biologiczne nazwano „drugim posłańcem” – „przekaznikiem drugiego rzędu” [11]. Związek ten pełni funkcję „przekaznika” informacji otrzymanej na zewnątrz komórki (od pierwszego przekaznika, np. hormonu) do retikulum endoplazmatycznego w komórce, skąd uwalniane są jony wapnia. Podobne właściwości jak cAMP wykazują również 3',5'-cykliczny guanozynomonofosforan (cGMP) oraz diacyloglicerol. Odkrycie to okazało się bardzo ważne w badaniach nad *mio*-inozytolem, gdyż niektóre jego fosforanowe pochodne także wykazują właściwości „przekazników drugiego rzędu”.

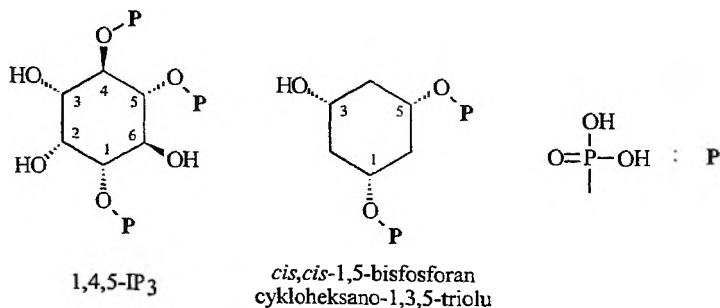
W 1975 r. Michell wysunął hipotezę, że 1,4,5-trisfosforan *mio*-inozytoli (1,4,5-IP₃) (schemat 7), powstający podczas wewnątrzkomórkowego metabolizmu fosfatydylo-inozytoli, wywołuje w komórce zmiany, podobnie jak 3',5'-cAMP, którym towarzyszy wydzielanie się dużych ilości jonów wapnia [12]. Hipoteza ta została potwierdzona w 1983 r. przez Streba, który udowodnił że 1,4,5-IP₃ uwalnia jony wapnia zmagazynowane w retikulum endoplazmatycznym, działając jako „drugi posłańiec” [13, 14]. Mechanizm tego działania został przedstawiony na schemacie 9.

W pierwszej kolejności hormon (H) albo neurotransmitter wiąże się z receptorem znajdującym się na powierzchni komórki. Ten z kolei, poprzez działające stymulująco białko G, aktywuje specyficzną fosfolipazę C (fosfodiesteraza PI-4,5P₂), która powoduje rozkład 4,5-bisfosforanu fosfatydylo-*mio*-inozytoli (PI-4,5P₂) do 1,4,5-trisfosforanu *mio*-inozytoli (1,4,5-IP₃) i diacyloglicerolu (DAG). Diacyloglicerol pozostaje w błonie komórkowej, gdzie aktywuje kinazę białkową C, 1,4,5-IP₃ zaś dyfunduje z cytozolu do retikulum endoplazmatycznego, gdzie łączy się ze znajdującym się w błonie retikularnej receptorem. Ten zaś

Schemat 9. Mechanizm działania 1,4,5-IP₃ jako „drugiego posłańca”

uwalnia jony wapnia do cytozolu. Widać tu wyraźnie, że bez udziału 1,4,5-IP₃ nie jest możliwe przesłanie informacji od hormonu do retikulum endoplazmatycznego. Dalsze przemiany 1,4,5-IP₃ oraz DAG prowadzą, w drodze wielu reakcji, do ponownego powstania PI-4,5P₂.

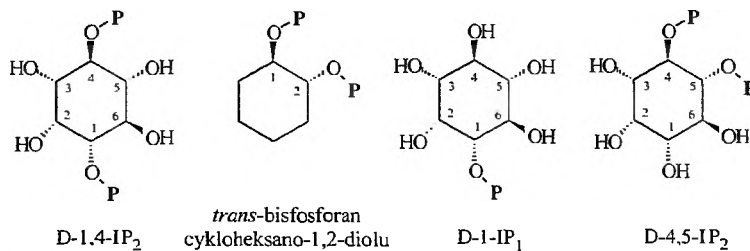
Z badań przeprowadzonych przez niemieckich naukowców wynika, że aktywność biologiczna 1,4,5-IP₃ wiąże się z obecnością grup fosforanowych w pozycjach 1 i 5 [15, 16]. Syntetycznie otrzymany przez nich *cis,cis*-1,5-bisfosforan cykloheksano-1,3,5-triolu (schemat 10) wykazywał aktywność porównywalną z 1,4,5-IP₃ (badania przeprowadzono na wakuolach mikroorganizmu *Neurospo-*



Schemat 10

ra crassa). Z kolei aktywność związków, przedstawionych na schemacie 11, w których w pozycji 1 lub 5 brak było grupy fosforanowej, była znikoma.

Warto również dodać, że podobne właściwości wykazują także monosacharydy, m.in. adenofostyna. Obecnie trwają dalsze prace nad syntezą aktywnych związków o właściwościach „drugich pośtańców” [17-20].

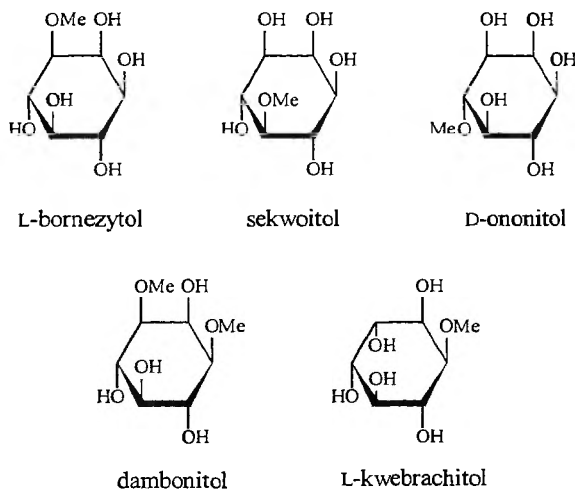


Schemat 11

3. INNE CYKLITOLE – WYSTĘPOWANIE W PRZYRODZIE I AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA

Oprócz inozytoli w środowisku naturalnym znanych jest wiele innych cyklitoli. Bogatym źródłem naturalnych cyklitoli są *O*-metylo inozytoli [21, 22]. Są to zarówno pochodne mono-*O*-metylowe, jak i poli-*O*-metylowe. Z *mio*-inozytoli można otrzymać cztery różne mono-*O*-metylowe etery: symetryczne 2- lub 5-*O*-metylowe pochodne oraz enancjomeryczne 1- lub 4-*O*-metylowe pochodne. Trzy z nich zostały znalezione w naturze:

sekwoitol (5-*O*-metylo-*mio*-inozytol) (schemat 12) po raz pierwszy znaleziony w sekwoi kalifornijskiej (*Sequoia sempervirens*), ale także w syropie sosny (*Pinus lambertiana*) oraz w *Macrozamia riedlei*,

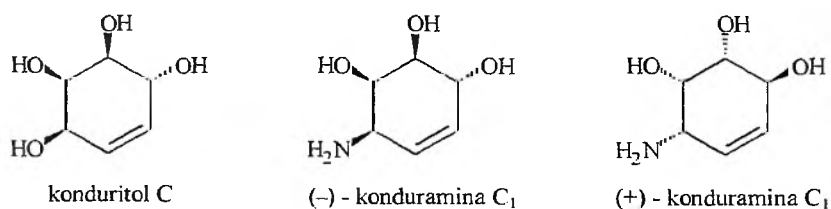


Schemat 12

prawoskrętny (+)-ononitol (1D-4-*O*-metylo-*mio*-inozytol) odkryty przez Plouviere oraz

(+)-bornezytol (1L-1-*O*-metylo-*mio*-inozytol) znaleziony w kauczuku drzew *Dyera lowii* rosnących na Borneo. Z drzew tych wyizolowano również dambonitol (1,3-di-*O*-metylo-*mio*-inozytol). We wszystkich próbkach *O*-metylowych pochodnych *mio*-inozytolu znalezionych w naturze znajdowały się śladowe ilości *mio*-inozytolu, co świadczyć może o jego udziale w biosyntezie tych związków. Charakterystyczny jest także fakt, że wszystkie etery metylowe *mio*-inozytolu uzyskane drogą naturalną mają grupę metylową jedynie w pozycji ekwatorialnej. Może to być związane z próbą wyeliminowania przez enzym odpowiedzialny za metylowanie napięć sterycznych między aksjalnymi podstawnikami. Najbardziej obfitym źródłem pochodnych cyklitolowych dostępnych w naturze jest kwebrachitol (1L-(-)-2-*O*-metylo-*chiro*-inozytol), który jest składnikiem (1–1,5%) wodnego roztworu otrzymywanego podczas koagulacji żywicy drzew kauczukowych (*Hevea brasiliensis*) [23]. W procesie produkcji kauczuku roztwór ten traktowany jest jako odpad poprodukcyjny. Tysiące ton kwebrachitolu są co roku marnowane, mimo że mógłby on być dogodnym substratem w licznych syntezach organicznych. Na przykład Paulsen wykorzystał kwebrachitol do otrzymywania optycznie czynnych cyklitoli i cyklitoli o rozgałęzionych łańcuchach (pseudocukry) [24], a Ogawa zastosował go do syntezy *O*-metylo-aminocyklitoli i diaminocyklitoli [25]. Jest on również użytecznym substratem w syntezie innych aktywnych biologicznie związków [26, 27]. W dość prosty sposób można z niego także otrzymać cukry proste szeregu D i L [23].

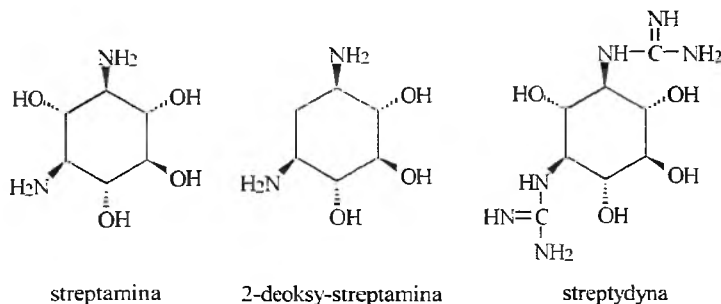
Kolejną grupą związków karbocyklicznych cennych pod względem wykorzystania w syntezach organicznych są konduritole i ich aminowe pochodne konduraminy (schemat 13) [28]. Konduritol to 1,2,3,4-tetrahydroscykloheks-5-en,



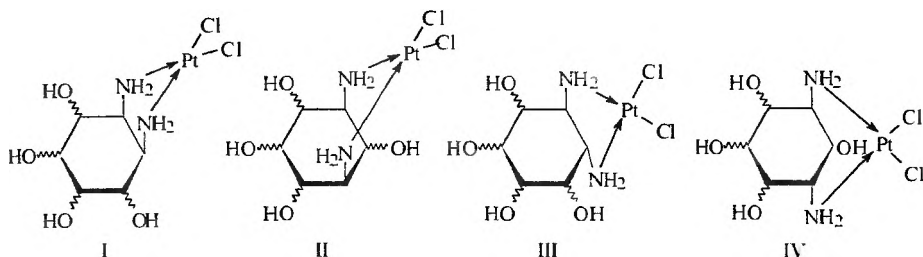
Schemat 13

w konduraminie natomiast jedna z grup hydroksylowych konduritolu jest zastąpiona przez grupę aminową. Związki te są podstawowymi substratami w syntezach monoamino- i diaminocyklitoli. Szczególną rolę odgrywa możliwość transformacji konduraminy w streptaminę (1,3-diamino-*scyllo*-inozytol), 2-deoksy-streptaminę (2-deoksy-1,3-diamino-*scyllo*-inozytol) oraz streptydynę (1,3-guandyno-*scyllo*-inozytol) (schemat 14) [29]. Związki te stanowią ważne elementy strukturalne licznej grupy antybiotyków aminoglikozydowych. Możliwość syntezy różnorodnych pochodnych konduritolu i konduramin stwarza szansę na po-

znanie mechanizmu działania tych antybiotyków, a ich modyfikacja może znacznie zwiększyć aktywność antybakteryjną. Ostatnio doniesiono również o cytostaticznych właściwościach pewnych związków kompleksowych Pt(II) z diaminocyklitolami [30]. Wzory takich połączeń (I-IV) ilustruje schemat 15.



Schemat 14



Schemat 15

4. ANTYBIOTYKI AMINOGLIKOZYDOWE

Do związków karbocyklicznych o szczególnie dużym znaczeniu należy zaliczyć wspomniane wcześniej antybiotyki aminoglikozydowe. Wśród nich istnieje liczna grupa antybiotyków charakteryzujących się obecnością w cząsteczce, oprócz części sacharydowej, także karbocyklicznego poliolu (cyklitolu) [31]. Może to być zarówno inozytol, jak i jego pochodne: aminoinozytol, diaminoinozytol, np. streptomina, 2-deoksy-streptomina lub streptydyna. Antybiotyki te, ze względu na obecność w ich strukturze cyklitolu, można by więc nazwać cyklitolowymi.

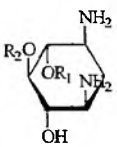
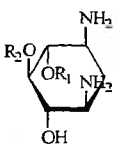
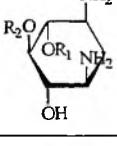
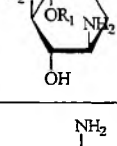
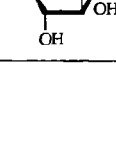
Przy opisie grupy antybiotyków aminoglikozydowych zawierających w swojej strukturze pochodną cyklitolu wydaje się uzasadniony podział na 6 podgrup, u którego podstaw leży właśnie budowa części cyklitolowej rozważanych związków. Według tych założeń antybiotyki te można podzielić na zawierające jako aglikon:

- 4,5-dwupodstawioną 2-deoksy-streptaminę,
- 4,6-dwupodstawioną 2-deoksy-streptaminę,

- jednopodstawioną 2-deoksy-streptaminę,
- aminocyklitol,
- diaminocyklitol,
- inozytol.

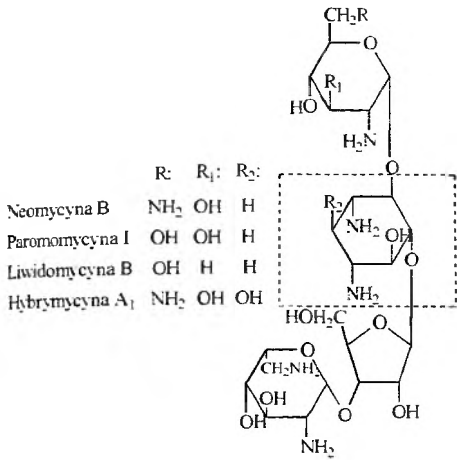
Antybiotyki te są naturalnymi związkami organicznymi wytwarzanymi przez drobnoustroje – promieniowce i bakterie. Wysoka i wybiórcza aktywność przeciwbakteryjna oraz niska toksyczność tych antybiotyków pozwoliły na wykorzystanie ich w leczeniu chorób zakaźnych o dużym znaczeniu epidemiologicznym. O wielkiej roli, jaką odgrywają antybiotyki cyklitolowe, może świadczyć tab. 3 (rys. 1–8).

Tabela 3. Antybiotyki aminoglikozydowe zawierające pochodną cyklitolu [32-39, 57]

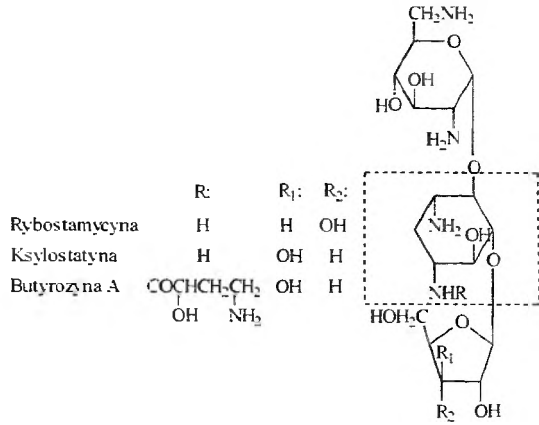
| Antybiotyk | Źródło antybiotyku | Aglikon cyklitolowy | Działanie antybiotyku na drobnoustroje |
|---|--|---|--|
| antybiotyki zawierające 4,5-dwupodstawioną 2-deoksy-streptaminę | | | |
| Neomycyna B (rys. 1) | <i>Streptomyces fradiae</i> (Waksman, Lechevalier) |  | Gram-dodatnie (<i>Staphylococcus</i> sp.) i Gram-ujemne (<i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Aerobacter</i> sp., <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Shigella</i> sp.), szczepy <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H ₃₇ R _v i H ₃₇ R _v R |
| Paromomycyna I (Monomycyna) (rys. 1) | <i>Streptomyces rimosus paramoycinus</i> (Coffey) <i>Streptomyces chrestomyceticus</i> (Canevazzi, Scotti) |  | szeroki zakres antybakteryjny (<i>Proteus vulgaris</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Micrococcus pyogenes</i> , <i>Aerobacter aerogenes</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> var. <i>hominis</i>), a także <i>Entamoeba histolytica</i> , <i>Taenia saginata</i> , <i>Hymenolepis nana</i> |
| Liwidomycyna B (rys. 1) | <i>Streptomyces lividus</i> nov. sp. ATCC-21178 (Munataka) |  | drobnoustroje Gram-dodatnie i Gram-ujemne, <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H ₃₇ R _v , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> A ₃ <i>Mycobacterium</i> 607, <i>E. coli</i> IR66/W677 |
| Rybostamycyna (rys. 2) | <i>Streptomyces ribosidifiscus</i> nov. sp. SF 733 |  | drobnoustroje Gram-dodatnie i Gram-ujemne (<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Diplococcus pneumoniae</i> , <i>Neisseria</i> sp., <i>Haemophilus</i> sp., <i>E. coli</i>) działanie podobne do kanamycyn |
| Hybrymycyna A ₁ (rys. 1) | mutant szczepu <i>Streptomyces fradiae</i> (Skier) |  | drobnoustroje Gram-dodatnie i Gram-ujemne; działanie podobne do gentamycyn i neomycyn; działa na <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . Aktywność większa niż dla neomycyny i rybostamycyny |

| Antybiotyk | Źródło antybiotyku | Aglikon cyklitolowy | Działanie antybiotyku na drobnoustroje |
|---|--|---------------------|---|
| Butyrozyna A (rys. 2) | mutant MCLR 5004 szczepu <i>Bacillus circulans</i> (Takeda) | | szerokie działanie na drobnoustroje Gram-dodatnie i Gram-ujemne |
| antybiotyki zawierające 4,6-dwupodstawioną 2-deoksy-streptaminę | | | |
| Gentamycyna A (rys. 3) | <i>Micromonospora purpurea</i> i <i>Micromonospora echinospora</i> (Weinstein, Luedeman-Brodsky) | | Gram-dodatnie (<i>Staphylococcus aureus</i>); Gram-ujemne (<i>Klebsiella</i> sp., <i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Aerobacter</i> sp., <i>Proteus</i> sp.); działanie bakteriobójcze i bakteriostatyczne; nie jest wrażliwa na inaktywujące enzymy wytwarzane przez bakterie enterokokowe |
| Kanamycyna B (rys. 3) | <i>Streptomyces kanamyceticus</i> n. sp. (Umezawa) | | Gram-dodatnie i Gram-ujemne (<i>Aerobacter aerogenes</i> , <i>Proteus</i> sp., <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Diplococcus pneumoniae</i> , <i>Micrococcus pyogenes</i> , <i>Salmonella typhi</i> i <i>paratyphi</i>); prątki gruźlicy, <i>Leptospira</i> sp. |
| Tobramycyna (rys. 3) | <i>Streptomyces tenebrarius</i> (Higgins, Kastner) (po hydrolizie w środowisku zasadowym) | | aktywne wobec Gram-dodatnich z wyjątkiem <i>Diplococcus pneumoniae</i> i paciorkowców, oraz Gram-ujemnych (<i>Pseudomonas</i> sp., <i>Aerobacter</i> sp., <i>Proteus</i> sp., <i>Klebsiella</i> sp.) |
| Sysomycyna (rys. 3) | <i>Micromonospora inyoensis</i> (Weinstein, Cooper) | | szeroki zakres działania (<i>Serratia</i> sp., indolo ujemne i dodatnie szczepy <i>Proteus</i> sp., <i>Pseudomonas aeruginosa</i>) |
| antybiotyki zawierające jednopodstawioną 2-deoksy-streptaminę | | | |
| Hygromycyna B (rys. 4) | <i>Streptomyces higroscopicus</i> (Mann, Bromer) <i>Streptoverticillum eurocidicus</i> (Shoji) | | działa na drobnoustroje Gram-dodatnie i Gram-ujemne, na wiele grzybów oraz na pasożyty jelitowe u świń (np. glisty) |
| Destomycyna A (rys. 4) | <i>Streptomyces rimofaciens</i> | | szeroki zakres działania antybakteryjnego i przeciwgrzybowego (<i>Alternaria tenuis</i> , <i>Pythium ultimum</i> , <i>Pellicularia sasakii</i> , <i>Cladosporium herbarum</i> , <i>Fusarium graminearum</i>) |
| SS-56 D (rys. 4) | <i>Streptoverticillum eurocidicus</i> No SS56 (Inoue) | | działanie bardzo podobne do destomycyn |

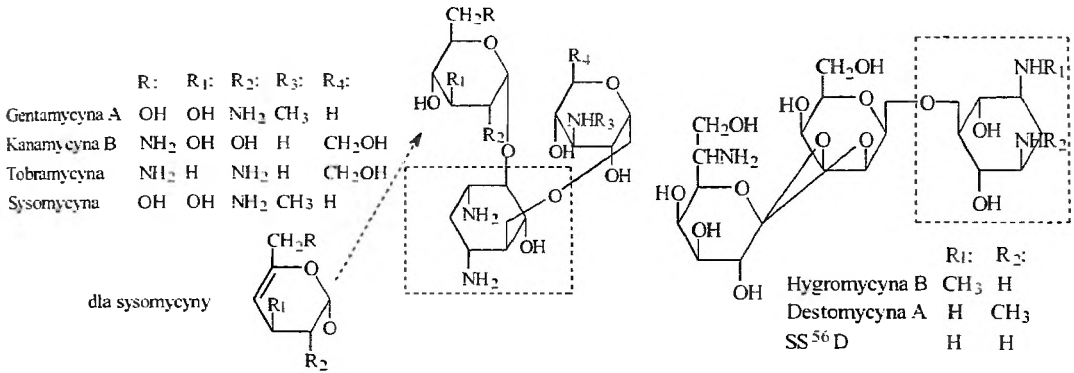
| Antybiotyk | Źródło antybiotyku | Aglikon cykliczny | Działanie antybiotyku na drobnoustroje |
|--|---|-------------------|---|
| antybiotyki zawierające aminocyklitol | | | |
| Hygromycyna A (rys. 5) | <i>Streptomyces hygroscopicus</i> (Pittenger) <i>Streptomyces noboritoensis</i> (Sumiki) | | Gram-dodatnie i Gram-ujemne, na niektóre promieniowce, prątki kwasoodporne oraz na <i>Pleuro-pneumoniae</i> sp., <i>Lep-tospira pomona</i> , <i>Entamoeba histolytica</i> , <i>Micrococcus pyogenes</i> var. <i>aureus</i> |
| Bluensomycyna (rys. 7) | <i>Streptomyces bluensis</i> | | działa na bakterie Gram-dodatnie i na niektóre Gram-ujemne |
| Minozamino-mycyna | <i>Streptomyces</i> No MA 514-A1 | | głównie działa na mykobakterie |
| antybiotyki zawierające diaminocyklitol | | | |
| Fortimycyna A (rys. 6) | <i>Micromonospora olivoasterospora</i> MK-70 | | Gram-dodatnie i Gram-ujemne (<i>Pseu-domonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Shigella sonnei</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus au-reus</i> , <i>Streptococcus faecalis</i>) |
| Sporarycyna A (rys. 6) | <i>Saccharopolyspora hirsuta</i> s. <i>kobensis</i> | | Gram-dodatnie i Gram-ujemne (<i>Kleb-siella pneumoniae</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>) oraz myko-bakterie |
| Streptomycyna A (rys. 7) | <i>Streptomyces griseus</i> (Waksman, Curtis) | | bardzo szerokie działanie na bakterie Gram-dodatnie, Gram-ujemne i prątki kwasoodporne; różnorodny mechanizm działania: hamuje syntezę białka, wpływa na przepuszczalność błony komórkowej, blokada cyklu rybosomalnego |
| Aktynospektacy-na (Spektyno-mycyna) (rys. 8) | <i>Streptomyces spectabilis</i> (Mason) <i>Streptomyces flavo-persicus</i> (Oliver) | | działa <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i> na drobnoustroje Gram-dodatnie i Gram-ujemne; hamuje selektywnie syntezę białka w komórkach <i>E. coli</i> |
| antybiotyki zawierające inozytol | | | |
| Kasugamycyna (rys. 8) | <i>Streptomyces kasugaensis</i> nor. sp. szczep M.-338 (Umezawa) | | działa na grzyby chorobotwórcze roślin (<i>Piricularia oryzae</i> , <i>Pseudomonas</i> sp.), bakterie chorobotwórcze zwierząt (<i>Proteus vulgaris</i> , <i>Shigella flexneri</i> , <i>Bacillus melitensis</i> , <i>Salmonella paratyphi</i>); działa także na rdzę ryżową |



Rys. 1

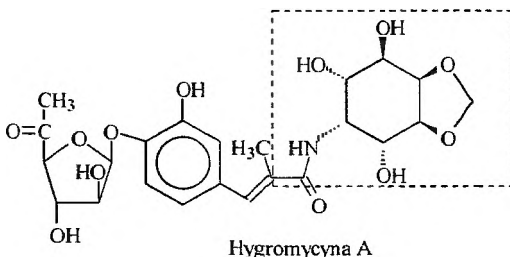


Rys. 2

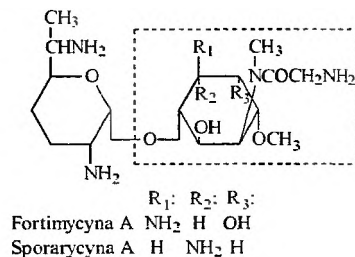


Rys. 3

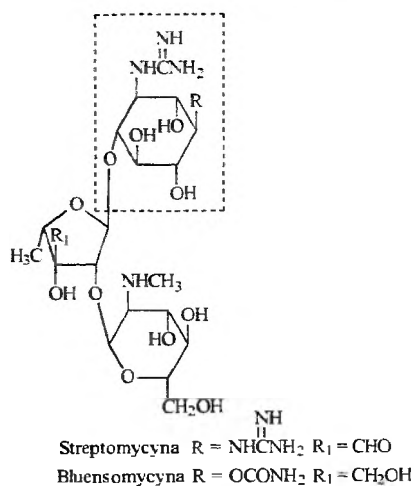
Rys. 4



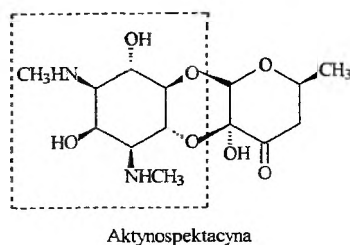
Rys. 5



Rys. 6



Rys. 7



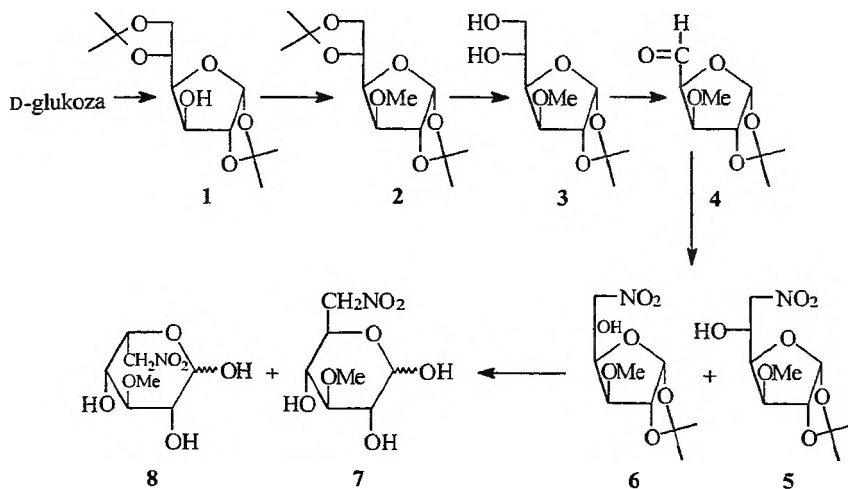
Rys. 8

5. WYBRANE METODY OTRZYMYWANIA CYKLITOLI

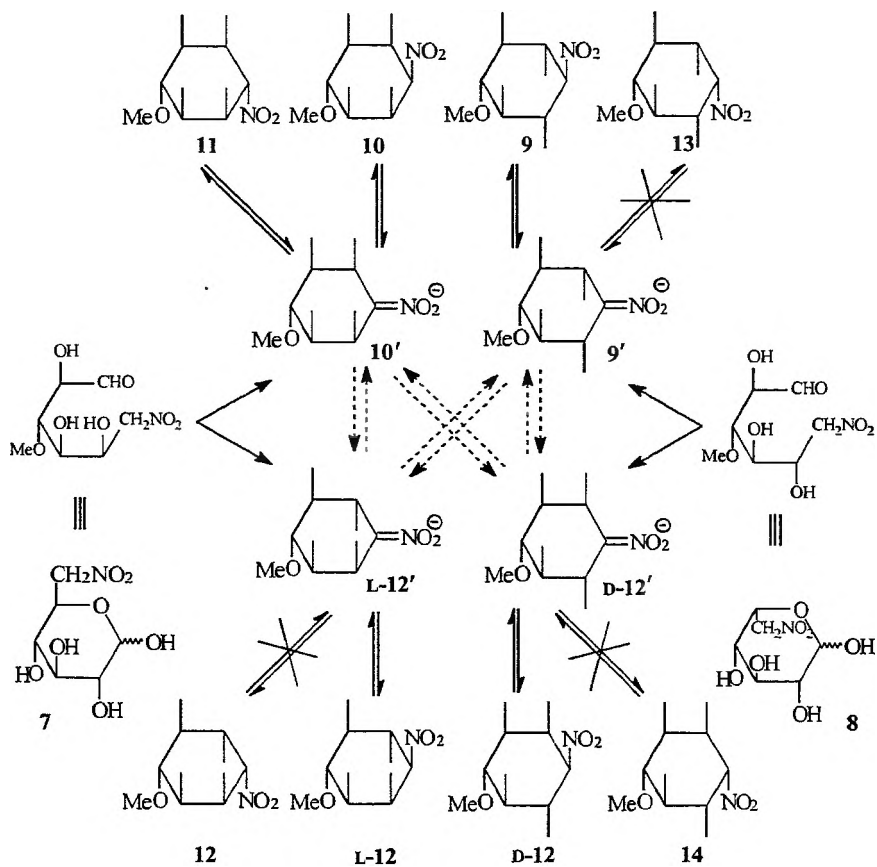
Cyklitole można otrzymać, wykorzystując ich naturalne źródła lub też w drodze chemicznej syntezy. Do najważniejszych metod syntetycznych należą:

- synteza z prekursorów cukrowych,
- synteza z wykorzystaniem cykloaddycji Dielsa–Aldera,
- wodorowanie polihydroksybenzenów,
- modyfikacja już istniejących cyklitolii.

Syntezy z prekursorów cukrowych opierają się głównie na karbocyklizacji 6-deoksy-6-nitroheksos opracowaną przez Grosheintza–Fishera oraz na karbocyklizacji heks-5-eno-piranozydów opracowanej przez Ferriera [40, 41]. Synteza deoksynitroinozytoli metodą Grosheintza–Fishera stanowiła przedmiot intensywnych badań wielu grup naukowców [42–47]. Najlepiej obrazują ją badania przeprowadzone przez Baera i Kovara [48]. Metoda ta obejmuje dwa etapy. Pierwszy polega na transformacji D-glukozy w 6-deoksy-6-nitroheksosę na drodze kolejnych reakcji (schemat 16): di-*O*-izopropylidenowanie D-glukozy ⇒ *O*-metylowanie zw. 1 ⇒ selektywne zdjęcie jednej osłony *O*-izopropylidenowej w zw. 2 na drodze kwasowej hydrolizy ⇒ oksydacyjne rozszczepienie wiązania C–C przy użyciu NaIO₄ w zw. 3 ⇒ addycja nitrometanu do aldehydu 4 ⇒ zdjęcie osłony *O*-izopropylidenowej w zw. 5 i w zw. 6 przy użyciu kwasu trifluorooctowego. W wyniku tych reakcji powstaje mieszanina 4 izomerów: 6-deoksy-3-*O*-metylo-6-nitro- α/β -D-glukopiranozy (7) oraz 6-deoksy-3-*O*-metylo-6-nitro- α/β -L-idopiranozy (8). Drugi etap badań polegał na karbocyklizacji związków 7 i 8 w środowisku wodnego roztworu Ba(OH)₂ według mechanizmu przedstawionego na schemacie 17 [45].



Schemat 16



Schemat 17

W trakcie karbocyklizacji 6-deoksy-6-nitroheksoz istnienie dwóch centrów prochiralnych (na atomie węgla C-1 i C-6) stwarza możliwość powstania czterech diastereoizomerycznych deoksynitroinozytoli. Badania udowodniły, że w warunkach kinetycznej kontroli reakcji związek **7** przekształca się w związki **10** (*epi*), **11** (*muko*) i **L-12** (*L-mio*) (produkty główne). Przedłużenie czasu trwania reakcji (kontrola termodynamiczna) powoduje, że powstają także związki **9** (*scyllo*) i **D-12** (*D-mio*) (produkty wtórne). Prawdopodobnie tworzą się one w wyniku epimeryzacji przejściowych produktów: **10'** w **D-12'**, a **L-12'** w **9'**. Z kolei karbocyklizacja związku **8** prowadzi głównie do powstania związków **9** i **D-12** (w wyniku kontroli kinetycznej), a związki **10**, **11** i **L-12** otrzymano na skutek epimeryzacji związków przejściowych **9'** i **D-12'**. Udowodniono także, że zwiększenie wartości pH układu reakcji powoduje przyspieszenie powstawania produktów głównych, a także przyspieszenie epimeryzacji, a w jej wyniku powstawanie produktów wtórnych. Nie zaobserwowano natomiast powstawania produktów o konfiguracji *D* i *L-chiro* oraz *mio* (**12**, **14** i **13**). Wszystkie otrzymane produkty miały konformację krzesłową. Konformacja ta w przypadku deoksynitroinozytoli jest korzystna energetycznie, gdyż większość podstawników w tej konformacji znajduje się w pozycji ekwatorialnej (brak niekorzystnych oddziaływań 1,3-diaksjalnych). Istotny jest też fakt, że wszystkie otrzymane produkty mają grupę *O*-metylową i nitrową w układzie *trans* (wyjątek dla *muko* **11**).

Metoda ta została z powodzeniem zastosowana do otrzymywania wielu 1,4-dwupodstawionych inozytoli o różnej konfiguracji, uzależnionej od konfiguracji wyjściowego substratu (6-deoksy-6-nitroheksozy). Różnorodność konfiguracji otrzymywanych inozytoli została przedstawiona w tab. 4.

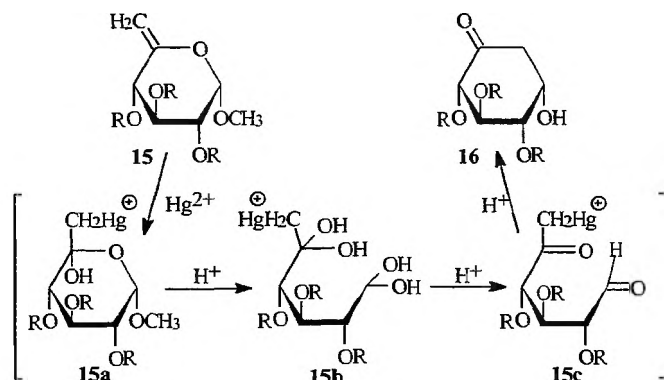
Druga z metod, opracowana przez J. Ferriera, polega na syntezie chiralnych, podstawionych cykloheksanonów przez karbocyklizację heks-5-enopiranozydów. Prawdopodobny mechanizm powstawania cykloheksanonu przedstawiony został na schemacie 18 [49]. Pierwszy etap reakcji obejmuje przyłączenie chlorku rtęci (II) do podwójnego wiązania, co prowadzi do powstania 5-hydrokso-6-deoksy-6-chlorortęciowej pochodnej **15a**. Następnie w środowisku kwaśnym następuje otwarcie pierścienia piranozowego i rozpad wiązania glikozydowego. Dehydratacja geminalnych dioli związku **15b** prowadzi do powstania łańcuchowej pochodnej **15c**. W obecności kwasu związek **15c** ulega odrtęciowaniu. Jednocześnie następuje atak węgla C-6 na karbonylowy atom węgla C-1 i powstaje cykloheksanon **16**.

Badania wykazały, że położenie grupy hydroksylowej przy C-5 w uzyskanych przez nich pochodnych cykloheksanonu zależy w głównej mierze od położenia podstawnika w pozycji C-3 5-enopiranozydu, a pośrednio od konformacji substratów – 6-deoksy-heks-5-enopiranozydów. Z pochodnych 5-enopiranozydów o konfiguracji *D-rybo* i *D-arabino*, które występują w konformacji 1C_4 i w których podstawnik przy C-3 skierowany jest „w dół”, uzyskuje się cykloheksanony z grupą hydroksylową 5-OH skierowaną „do góry” (schemat 19) [41, 49–51]. Z pochodnych 5-enopiranozydów o konfiguracji *D-ksylo*, *L-arabino*

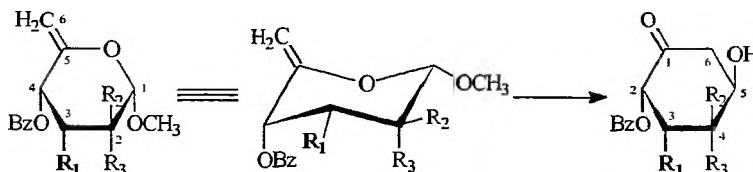
Tabela 4. Konfiguracja produktów reakcji opartych na cykloaddycji Grosheintza-Fishera [41-48]

| Konfiguracja substratu: 3-R ₁ -5-R ₂ -6-deoksy-6-nitro-heksopiranoza | R ₁ | R ₂ | Konfiguracja powstających produktów: R ₁ -nitro-inozytol |
|---|----------------------|----------------|---|
| D-gluko | -OMe | -OH | L-mio-4,1* (50%) epi-6,3 + muko-6,3 (50%) |
| L-ido | -OMe | -OH | D-mio-4,1 (80%) scyllo (20%) |
| D-gluko | -NHCOCH ₃ | -OH | L-mio-6,3 (90%) |
| L-ido | -NHCOCH ₃ | -OH | D-mio-4,1 (90%) |
| D-gluko | -OBn | -DTN** | 5-DTN-muko-6,3 (90%) |
| L-ido | -OBn | -DTN | 3-DTN-D-mio-4,1 (50%) 3-DTN-scyllo-4,1 (50%) |
| D-allo | -OMe | -OH | D-allo-5,2 (50%) epi-6,3 + L-epi-4,1 (50%) |
| L-talo | -OMe | -OH | mio-5,2 (90%) |
| D-allo | -OBn | -DTN | 5-DTN-epi-6,3 (50%) 4-DTN-D-allo-5,2 (50%) |
| L-talo | -OBn | -DTN | 4-DTN-mio-5,2 |
| D-galakto | -OBn | -DTN | 3-DTN-L-chiro-4,1 |
| L-altro | -OBn | -DTN | 3-DTN-L-neo-4,1 (60%) 3-DTN-L-mio-4,1 (40%) |

* L-mio-4,1 - 4-O-metylo-1-nitro-mio-inozytol. ** -DTN - 1,3-dithian-2-yl.

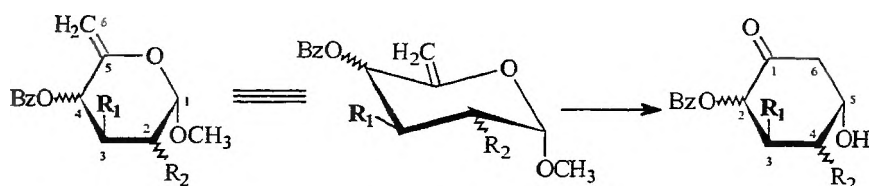


Schemat 18

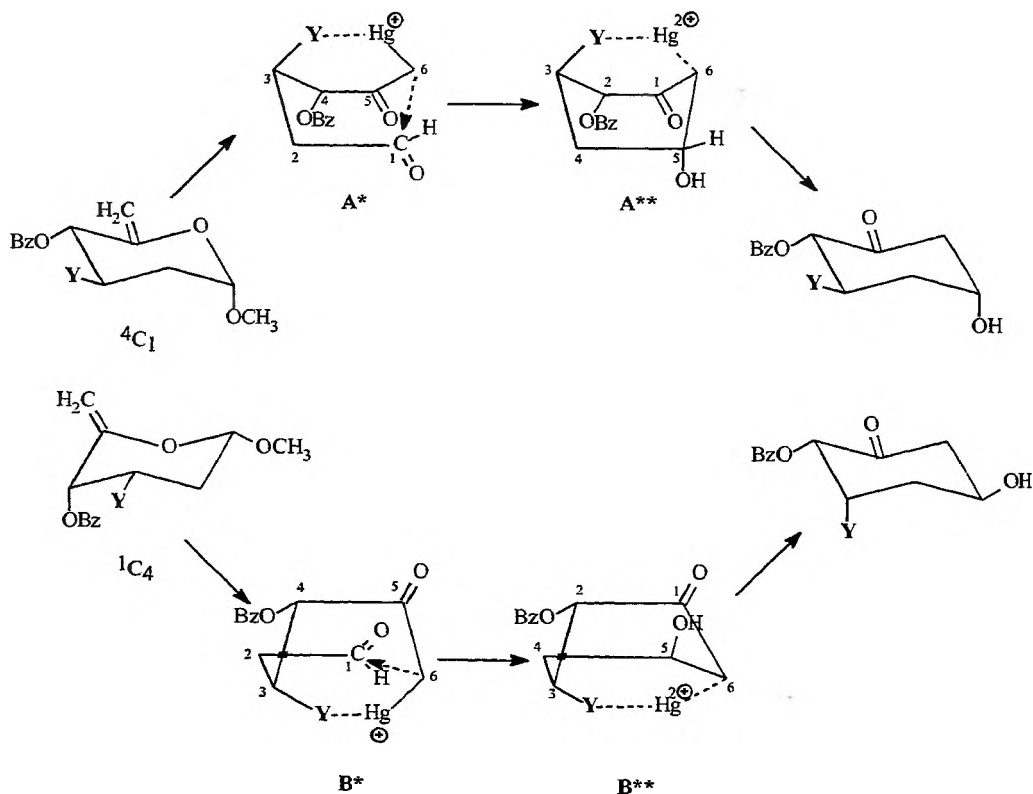


Schemat 19. R₁ = -OCH₃, -OBz, -N₃, -NHBz, -NHCOCF₃; R₂ = -OCH₃ i R₃ = -H lub R₂ = -H i R₃ = OBz lub R₂ = R₃ = -H

i *D*-likso, które występują w konformacji 4C_1 i w których podstawnik przy C-3 skierowany jest „w górę”, uzyskuje się cykloheksanony z grupą hydroksylową 5-OH skierowaną „w dół” (schemat 20). Wysoka stereoselektywność reakcji zamknięcia pierścienia może być wyjaśniona tym, że atom rtęci przyłączony do węgla C-6 może tworzyć wiązanie koordynacyjne z udziałem wolnej pary elektronowej podstawnika przy C-3 ($Y = -OR$, $-NHR$, $-NR_2$), prowadząc w ten sposób do utworzenia sześcioczłonowego pierścienia A^* (B^*). Takie ułożenie umożliwia zbliżenie nukleofilowego atomu C-6 do wiązania podwójnego w grupie karbonylowej przy C-1 od strony, z której znajduje się podstawnik przy C-3 (schemat 21) [51]. Z powodu mniejszej sterycznej przeszkody po przeciwnej stro-



Schemat 20. $R_1 = -OBz$, $-OCH_3$, $-OTs$, $-N_3$; $R_2 = -OBz$, $-OCH_3$, $-H$

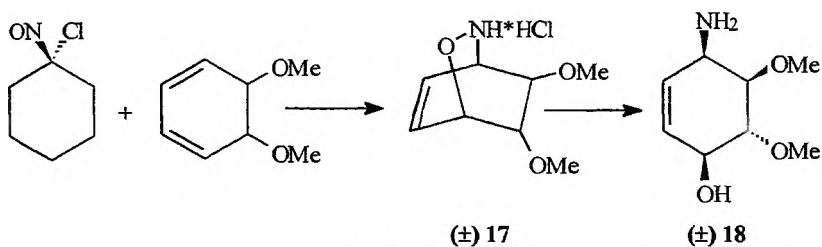


Schemat 21

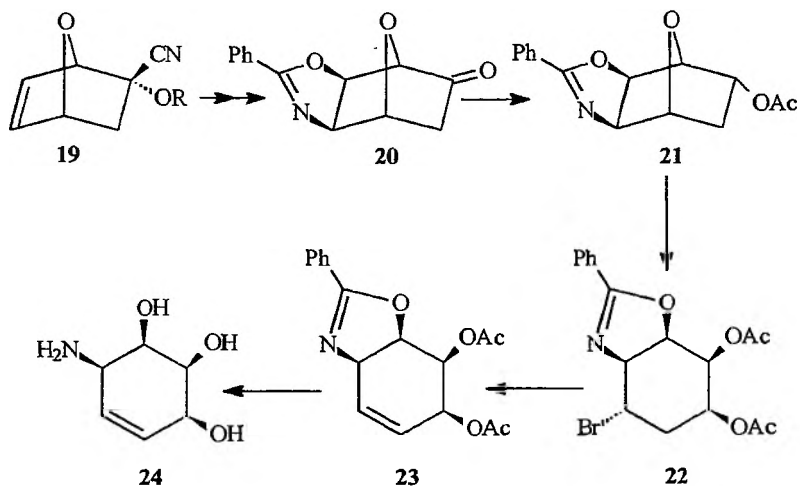
nie pierścienia grupa 5-OH (powstała w wyniku protonowania atomu tlenu grupy karbonylowej) ma orientację *trans* w stosunku do podstawnika przy C-3. Natomiast dla enopiranozydu (konformacja ⁴C₁), w którym brak było podstawnika w pozycji C-3 otrzymano mieszaninę (*2S*)-2-benzyloksi-5-hydroksycykloheksanów o konfiguracji grupy hydroksylowej 5-OH zarówno *R*, jak i *S* (3 : 4).

Ważną grupą związków z rodziny cyklitoli są opisane już wcześniej konduraminy i konduritole (schemat 13). Ich synteza oparta jest przede wszystkim na heterocykloaddycji Dielsa–Aldera, przy użyciu 1-chloro-1-nitrozocykloheksanu i 5,6-dimetoksycykloheksadienu [52].

Redukcyjne rozszczepienie wiązania N–O powstającego produktu cykloaddycji **17** prowadzi do mieszaniny racemicznej *O*-metylowych konduramin **18** (schemat 22). Wadą tej metody jest jednak brak możliwości otrzymania czystych enancjomerów. Udoskonaleniem tej metody zajęli się w latach 90. Vogel i Alleman (schemat 23), którym udało się otrzymać czystą enancjomerycznie (–)-konduraminę C₁ (**24**). Jako substratów użyto tym razem: furanu i chiralnego (1*S*)-1-kamfenoilo-1-cyjanowinylu, z których w wyniku addycji otrzymano pochodną bicykliczną **19** [29]. Następnie w wyniku sześciu kolejnych reakcji uzyskano pochodną **20**. Jej redukcja i *O*-acetylowanie prowadzi do pochodnej **21**. Stereose-



Schemat 22

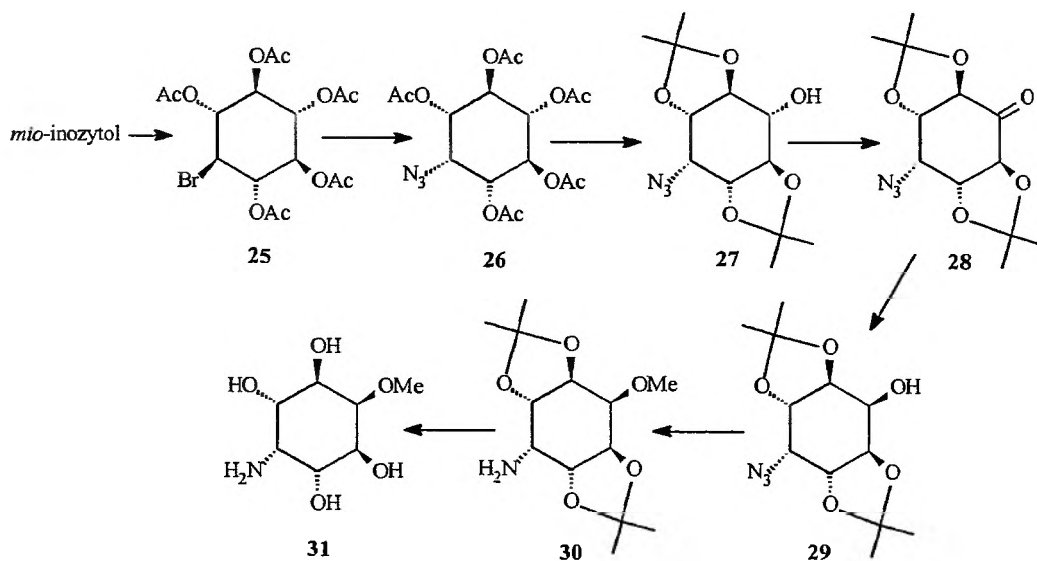


Schemat 23

lektywne rozszczepienie układu 1,4-epoksydowego przy użyciu roztworu bromowodoru w kwasie octowym pozwoliło otrzymać pochodną **22**. Dzięki eliminacji bromowodoru oraz zdjęciu osłon *O*-acetylowych oraz benzylidenowej otrzymano ostatecznie (-)-1-konduraminę (**24**).

Najstarszą metodą otrzymywania cyklitolii jest katalityczne wodorowanie polihydroksybenzenu [53]. Metodę tę jako pierwsi zastosowali już w 1914 r. Wieland i Wishart. Przy użyciu katalizatora palladowego oraz heksahydroksybenzenu otrzymali oni różne inozytoli, wśród których głównym produktem był *mio*-inozytol. Z kolei wodorowanie na katalizatorze palladowo-węglowym prowadziło do utworzenia mieszaniny inozytoli, w której dominował bardzo rzadki *cis*-inozytol. Niestety, również ta metoda nie jest pozbawiona wad. W wyniku późniejszych badań w mieszaninie po reakcji stwierdzono obecność aż 7 różnych inozytoli, 3 kwercytoli oraz kilku innych produktów, których izolacja była bardzo trudna [54].

Ostatnia z opisanych przez nas metod otrzymywania cyklitolii polega na modyfikacji już istniejących cyklitolii przez zmianę konfiguracji grupy hydroksylowej na jednym z atomów węgla (schemat 24). Metodę tę zastosowano w procesie syntezy metoksyhygromycyny, do otrzymania 2-amino-2-deoksy-5-*O*-metylo-*neo*-inozytolu (**31**), który jest elementem strukturalnym tego antybiotyku aminoglikozydowego [55]. Z *mio*-inozytolu w wyniku jednoetapowej reakcji otrzymano 1,2,3,4,5-penta-*O*-acetylo-6-bromo-6-deoksy-*scyllo*-inozytol (**25**). Azydoliza związku **25** oraz *O*-acetylowanie pozwoliły uzyskać związek **26**, ponownie o konfiguracji *mio*. *O*-deacetylowanie pochodnej **26**, a następnie *O*-izopropylidenowanie doprowadziło do powstania mieszaniny związków, z których związek **27** występował w przewadze. W wyniku utlenienia grupy hydroksylowej



Schemat 24

przy użyciu RuO_2 i NaIO_4 otrzymano keton **28**. Stereospecyficzna redukcja tego związku pozwoliła uzyskać związek **29** o konfiguracji *neo*. Następnie w wyniku kolejnych reakcji: *O*-metylowania, redukcji grupy azydkowej na niklu Raneya oraz *O*-deizopropylidenowania otrzymano 2-amino-2-deoksy-5-*O*-metylo-*neo*-inozytol (**31**).

PIŚMIENICTWO CYTOWANE

- [1] R. Frankowski, Z. Smiatacz, *Wiad. Chem.*, 2001, **55**, 221.
[2] L. Maquenne, *Les Sucres et leur Principaux Dérivés*, Gauthiers-Villars, Paris 1900.
[3] S.J. Angyal, P.T. Gilham, *J. Chem. Soc.*, 1953, 3691.
[4] H.G. Fletcher, L. Anderson Jr, H.A. Lardy, *J. Org. Chem.*, 1951, **16**, 1238.
[5] T. Posternak, *The Cyclitols*, Hermann, Paris 1965.
[6] L. Anderson, *Carbohydr. Chem., Biochem.*, 1972, vol. IA, 519; *Nomenklatura związków organicznych*, PWN, 1979; *IUPAC Information Bull.*, 1968, **32**, 51; *Eur. J. Biochem.*, 1968, **5**, 1; *J. Biol. Chem.*, 1972, **247**, 613; *Pure Appl. Chem.*, 1974, **37**, 285.
[7] R.S. Cahn, C. Ingold, V. Prelog, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1966, **5**, 385.
[8] J.F. Stodart, *Stereochemistry of Carbohydrates*, 1971.
[9] A. Wiśniewski, J. Madaj, *Podstawy chemii cukrów*, AGRA-ENVIRO Lab, Poznań-Gdańsk 2000, 178.
[10] B.V.L. Potter, D. Lampe, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1995, **34**, 1933.
[11] T.W. Rall, E.W. Sutherland, *J. Biol. Chem.*, 1958, **232**, 1065.
[12] R.H. Michell, *Biochim. Biophys. Acta*, 1975, **415**, 81.
[13] H. Streb, R.F. Irvine, M.J. Berridge, I. Schulz, *Nature*, 1983, **306**, 67.
[14] R.F. Irvine, M.J. Berridge, *Nature*, 1984, **312**, 315.
[15] C. Schultz, G. Gebauer, T. Metschies, L. Rensing, B. Jastorff, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1990, **166**, 1319.
[16] A.M. Cooke, R. Gigg, B.V.L. Potter, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1987, 1525.
[17] S. Takahashi, T. Kinoshita, M. Takahashi, *J. Antibiot.*, 1993, **47**, 95 i 1643.
[18] T. Desai, J. Gigg, R. Gigg, *Carbohydr. Res.*, 1996, **280**, 209.
[19] N. Moitessier, F. Chretien, Y. Chapleur, C. Humeau, *Tetrahedron Lett.*, 1995, **36**, 8023.
[20] F. Roussel, M. Hilly, F. Chretien, J.P. Mauger, Y. Chapleur, *J. Carb. Chem.*, 1999, **18**, 697.
[21] L. Anderson, E.S. De Luca, A. Bieder, G.G. Post, *J. Amer. Chem. Soc.*, 1957 1171.
[22] S.J. Angyal, P.T. Gilham, C.G. Mac Donald, *J. Amer. Chem. Soc.*, 1957 1417.
[23] N. Chida, M. Suzuki, M. Suwama, S. Ogawa, *J. Carb. Chem.*, 1989, **8**, 319.
[24] H. Paulsen, W. von Deyn, *Liebigs Ann. Chem.*, 1987, 141.
[25] S. Ogawa, A. Isaka, *Carbohydr. Res.*, 1991, **210**, 105.
[26] N. Chida, T. Tobe, M. Suwama, M. Ohtsuka, S. Ogawa, *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, 1990, 994.
[27] S. Angyal, L. Anderson, *Adv. Carbohydr. Chem.*, 1959, **14**, 200.
[28] M. Balci, Y. Sütbeyaz, H. Seçen, *Tetrahedron*, 1990, **46**, 3715.
[29] S. Alleman, P. Vogel, *Helv. Chim. Acta*, 1994, **77**, 1.
[30] T. Suami, Tetsuo, Shioo, Takashi, *Chem. Abstr.*, 1987, **107**, 191010p.
[31] S. Umezawa, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 1974, **30**, 111 i 183.
[32] N. Chida, M. Ohtsuka, K. Nakazawa, S. Ogawa, *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, 1989, 436.
[33] H. Fukami, K. Kitahara, M. Nakajima, *Tetrahedron Lett.*, 1976, **7**, 545.
[34] J. Cleophax, S.D. Gero, E. Jegou-Aumont, J. Leboul, D. Mercier, *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, 1975, 11.

- [35] T. Nara, M. Yamamoto, I. Kawamoto, K. Takayama, R. Okachi, S. Takasawa, T. Sato, S. Sato, *J. Antibiot.*, 1977, **30**, 533 i 551.
- [36] T. Deushi, A. Iwasaki, K. Kamiya, T. Kunieda, T. Mizoguchi, M. Nakayama, H. Itoh, T. Mori, *J. Antibiot.*, 1979, **32**, 173.
- [37] K. Takeda, K. Aihara, T. Furumai, Y. Ito, *J. Antibiot.*, 1979, **32**, 18.
- [38] K. Kanai, I. Nishigaki, T. Taki, S. Ogawa, T. Suami, *Carbohydr. Res.*, 1987, **170**, 47.
- [39] K.L. Rinehart Jr., *Pure Appl. Chem.*, 1977, **49**, 1361.
- [40] J.M. Grosheintz, H.O.L. Fisher, *J. Amer. Chem. Soc.*, 1948, **70**, 1477 i 1479.
- [41] R.J. Ferrier, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 1979, 1455.
- [42] T. Suami, K. Tadano, S. Horiuchi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1975, **48**, 2895.
- [43] M. Iwakawa, J. Yoshimura, M. Funabashi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1981, **54**, 496.
- [44] J. Kovar, H. Baer, *Carbohydr. Res.*, 1975, **45**, 161.
- [45] A.A. Othman, N.A. Al-Masudi, U.S. Al-Timari, *J. Antibiot.*, 1978, **31**, 1007.
- [46] M. Funabashi, J. Yoshimura, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 1979, 1425.
- [47] M. Funabashi, K. Kobayashi, J. Yoshimura, *J. Org. Chem.*, 1979, **44**, 1618.
- [48] J. Kovar, H. Baer, *Can. J. Chem.*, 1973, **51**, 1801, 2836 i 3373.
- [49] M. Madi-Puskas, I. Pelyvas, R. Bogner, *J. Carbohydr. Chem.*, 1985, **4**, 323.
- [50] A.S. Machado, A. Olesker, G. Lukacs, *Carbohydr. Res.*, 1985, **135**, 231.
- [51] P. Laszlo, I. Pelyvas, F. Sztaricskai, L. Szilagyi, A. Somogyi, *Carbohydr. Res.*, 1988, **175**, 227.
- [52] B. Beier, K. Schürle, O. Werbitzky, W. Piepersberg, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 1990, 2255.
- [53] Wieland, Wishart, *Ber.*, 1914, **47**, 2082.
- [54] S.J. Angyal, D.J. McHugh, *J. Amer. Chem. Soc.*, 1957, 3682.
- [55] N. Chida, K. Nakazawa, M. Ohtsuka, M. Suzuki, S. Ogawa, *Chem. Lett.*, 1990, 423.
- [56] V. Plouvier, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1963, **45**, 1079.
- [57] T. Korzybski, Z. Kowszyk-Gindifer, W. Kuryłowicz, *Antybiotyki*, PZWL, Warszawa 1977.

Praca wpłynęła do Redakcji 13 października 2000

**ALTERNATYWNE MEDIATORY
REAKCJI MITSUNOBU**

**ALTERNATIVE MEDIATORS
OF MITSUNOBU REACTION**

**Bogdan Falkiewicz¹, Kazimierz Wiśniewski²,
Aleksandra S. Kołodziejczyk³**

¹ *Katedra Biotechnologii, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii
Uniwersytetu Gdańskiego i Akademii Medycznej w Gdańsku
ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk*

Tel./fax: (58) 301-28-07; E-mail: bogdan.falkiewicz@wp.pl

² *Ferring Research Institute, San Diego, CA, USA*

³ *Katedra Chemii Organicznej, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański
ul. J. Sobieskiego 18, 80-952 Gdańsk*

Abstract

Wstęp

Nowe odczynniki zwiększające zakres stosowalności reakcji Mitsunobu

Podstawione diamidy kwasu azodikarboksylowego

Stabilizowane metylenotrialkilofosforany

Piśmiennictwo



Bogdan Falkiewicz urodził się w 1970 r. Jest absolwentem Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego oraz Wydziału Lekarskiego AMG, pracuje na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii UG-AMG. W 2001 r. obronił pracę doktorską na temat wykorzystania reakcji Mitsunobu i reduktywnej aminacji do syntezy wiązania pseudopeptydowego i monomerów PNA. Jego zainteresowania naukowe obejmują chemię peptydów i kwasów nukleinowych oraz związków krzemooorganicznych, diagnostykę molekularną chorób wirusowych i nowotworowych, hepatologię kliniczną.



Dr Kazimierz Wiśniewski tytuł magistra chemii uzyskał w 1983 r. na Wydziale Mat.-Fiz.-Chem. UG. W tym samym roku został zatrudniony w grupie peptydowej prof. Bogdana Liberka. W 1990 r. obronił pracę doktorską dotyczącą chemii peptydów kwasu homoglutaminowego i pokrewnych aminokwasów. Rok później rozpoczął staż w ośrodku badawczym szwedzkiej firmy farmaceutycznej Ferring. Po prawie trzyletnim pobycie w Malmö powrócił do Gdańska. W 1996 r. podjął pracę w powstającej grupie Ferringa w San Diego w Kalifornii, gdzie pracuje do chwili obecnej. Jego zainteresowania naukowe dotyczą poszukiwania związków biologicznie czynnych, szczególnie peptydów, jako potencjalnych nowych leków. Przykładem mogą być cykliczne peptydy z rodziny oksytocyny i wazopresyny. Drugim podstawowym tematem badawczym jest zastosowanie reakcji Mitsunobu i innych stosunkowo rzadko stosowanych reakcji chemii organicznej do modyfikacji cząsteczek aminokwasów i peptydów oraz w chemii kombinatoryjnej.



Dr inż. Aleksandra S. Kołodziejczyk, absolwentka Wydziału Chemii Politechniki Gdańskiej, od 1986 r. adiunkt w Katedrze Chemii Organicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. W latach 1988–1990 przebywała w Medical College of Ohio, w laboratorium prof. M. Manninga, zajmując się syntezą analogów wazopresyny i immunostymulujących pochodnych kwasu diaminopimelinowego. Główne zainteresowania naukowe to: stereochemia, synteza peptydów i peptydomimetyków. Od kilku lat pracuje nad różnorodnymi zastosowaniami reakcji Mitsunobu w chemii aminokwasów i peptydów.

ABSTRACT

The Mitsunobu reaction is a versatile method for the alkylation of various Brønsted-Lowry acids (HA) by alcohols, proceeding in neutral media in a presence of the redox system which traditionally consists of diethyl azodicarboxylate (DEAD, Fig. 2.1) and triphenylphosphine (TPP, Fig. 3.1). The reaction proceeds probably along the generally accepted path shown in Fig. 1. The key step of the process proceeds according to the S_N2 mechanism and results in one of the most useful attributes of the reaction, namely complete configurational inversion at the carbinol carbon (details of the mechanism and applications of the reaction can be found in reviews: [2-8]).

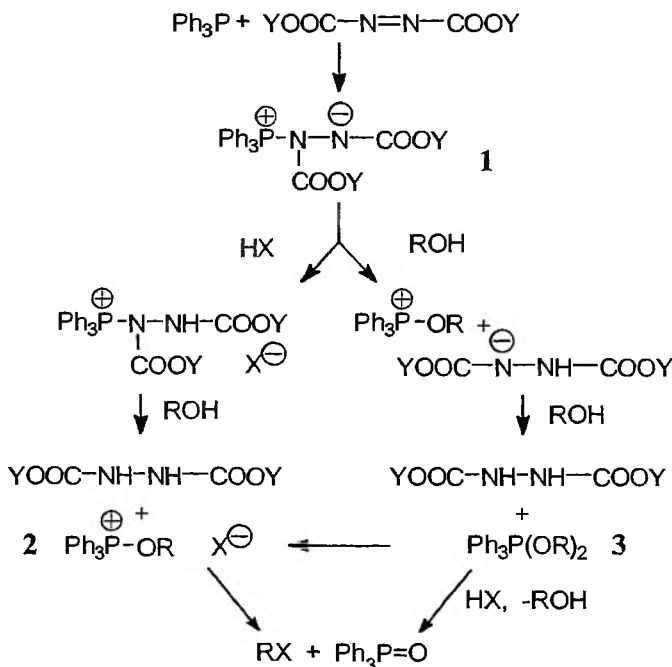
The reaction, however, has a serious limitation – the acidic component has to have pK_a smaller than 13 for the reaction to proceed smoothly. Moreover, the classical methodology of the reaction suffers from low yields when applied to secondary alcohols [32].

In recent years, in order to overcome these drawbacks and expand the versatility of the original combination of the Mitsunobu mediators, significant progress in the reaction methodology has been made, mainly due to the work of Tsunoda and Itô; we proposed to call these new procedures “Mitsunobu, Tsunoda, Itô reaction”. Two types of new mediators have been developed to replace the azodicarboxylate-TPP system. The first one is an N,N,N',N' -tetrasubstituted azodicarboxamide (Fig. 4) – tributyl phosphine (Fig. 3.2) system. All azodicarboxamide derivatives were found to be more efficient than traditional DEAD in the Mitsunobu reaction, especially for less acidic HX. N,N,N',N' -Tetramethylazodicarboxamide, TMAD, gives the best overall results among acyclic amides [20], whereas 4,7-dimethyl-3,5,7-hexahydro-1,2,4,7-tetraazocin-3,8-dion, DHTD (Fig. 4.4), in combination with TBP was found to be unique in mediating the formation of the C-C bond with *sec*-alcohols at room temperature [24, 29]. The other type of new mediators in the Mitsunobu reaction, structurally based on betaine (Fig. 5), is cyanomethylenetrialkylphosphorane (e.g. CMBP, and CMMP, Fig. 6) [26]. The phosphorane reagents are generally less active at room temperature, but in higher temperatures they are, especially CMMP, better than DHTD-TBP and afford satisfactory alkylation of secondary alcohols. Furthermore, the phosphorane reagents mediate the reaction of acids of pK_a up to 23.5 [33]. Comparative studies of the C-alkylation revealed the general reactivity of new mediators as TMAD-TBP < DHTD-TBP < CMBP < CMMP [31].

WSTĘP

Reakcja biegnąca dzięki aktywacji grupy hydroksylowej alkoholu przez układ triarylo- lub trialkilofosfiny i pochodnej kwasu azodikarboksylowego (zwykle jego diestru lub diamidu) została zastosowana i opisana po raz pierwszy przez profesora Oyo Mitsunobu i wsp. [1]. Jest to procedura o różnorodnych i ciągle rozszerzających się zastosowaniach w chemii organicznej [2–8]. Jej ostatecznym efektem jest wymiana grupy hydroksylowej na sprzężoną zasadę (X^-) pochodzącą z kwasu HX obecnego w układzie, a „siłą napędową” jest w standardowych warunkach utlenianie triarylo- lub trialkilofosfiny za pomocą diestrów kwasu azodikarboksylowego, ulegających równoczesnej redukcji do pochodnych kwasu hydrazynodikarboksylowego. Reakcja biegnie w neutralnym środowisku i można ją prowadzić w różnych rozpuszczalnikach, przy czym szybkość przebiegu procesu jest odwrotnie proporcjonalna do polarności rozpuszczalnika (np. synteza octanu benzylu biegnie ok. 30 razy szybciej w chloroformie niż w acetonitrylu) [4], ale – co jest oczywiste ze względu na istotę reakcji – jednym z kluczowych warunków jej powodzenia jest utrzymanie warunków bezwodnych [9, 10]. Najczęściej przyjmuje się, że z zastosowaniem „klasycznych” reagentów reakcja Mitsunobu zachodzić może według dwóch alternatywnych mechanizmów, przedstawionych ogólnie na rys. 1.

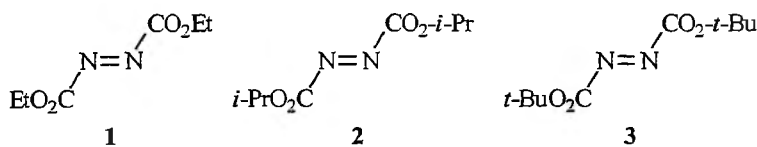
Kluczowy etap procesu polegający na nukleofilowym ataku X^- na addukt triarylo- lub trialkilofosfiny i alkoholu (rys. 1, 2) albo też triarylo- lub trialkilodial-



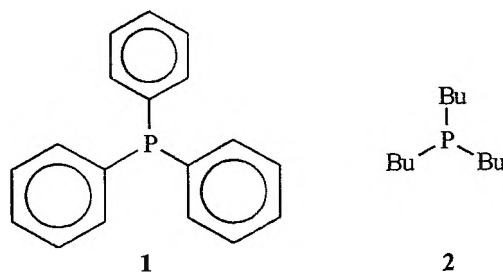
Rys. 1. Schemat ogólny przebiegu reakcji Mitsunobu z zastosowaniem tradycyjnych reagentów: diestru kwasu azodikarboksylowego i tryfenylofosfiny (TPP)

koksyfosforan (rys. 1, 3) zachodzi według mechanizmu S_N2 , co związane jest z inwersją stereochemiczną chiralnego węgla karbinolowego reagującego alkoholu. Zagadnienia związane z mechanizmem i przebiegiem stereochemicznym reakcji Mitsunobu zostały szczegółowo omówione w artykułach przeglądowych Mitsunobu [2], Jenkinsa i Mitsunobu [4] oraz Hughesa [3, 5].

Początkowo jako mediatory w reakcji Mitsunobu stosowano prawie wyłącznie trifenylofosfinę (TPP, Ph_3P , rys. 3, 1) oraz ester dietylowy (DEAD, rys. 2, 1) lub diizopropylowy (DIAD, rys. 2, 2) kwasu azodikarboksyłowego. Zdecydowanie rzadziej stosowane były: tributylfosfina (TBP, Bu_3P , rys. 3, 2) [11–13], trimetylofosfina (TMP, Me_3P) [14–16], ester dimetylowy (DMAD) lub di-*t*-butylowy kwasu azodikarboksyłowego (DBAD, TBAD, rys. 2, 3) [17] (ten ostatni jest z kolei reagentem stosowanym częściej od pozostałych azodikarboksyłanów jako dienofil w reakcji Dielsa-Aldera, ze względu na stosunkowo łatwe acydolityczne usuwanie grup ochronnych typu *t*-butylowego). W wypadku stosowania odpowiedniej kombinacji powyższych reagentów, do użytecznego syntetycznie przebiegu reakcji konieczna jest stosunkowo wysoka zasadowość anionu X^- ; reakcja



Rys. 2. Pochodne kwasu azodikarboksyłowego tradycyjnie stosowane w reakcji Mitsunobu. 1 – diester etylowy kwasu azodikarboksyłowego (DEAD); 2 – diester izopropylowy kwasu azodikarboksyłowego (DIAD); 3 – diester *t*-butylowy kwasu azodikarboksyłowego (DBAD, TBAD)



Rys. 3. Fosfiny tradycyjnie stosowane w reakcji Mitsunobu. 1 – trifenylofosfina (TPP, Ph_3P); 2 – tributylfosfina (TBP, Bu_3P)

Mitsunobu w warunkach klasycznych ma zastosowanie do kwasów HX o $pK_a < 13$ (powyżej której przestaje zachodzić, z tym że już od pK_a ok. 11 zaczyna wyraźnie spadać jej wydajność). Na przykład wydajność *N*-alkilowania za pomocą reakcji Mitsunobu rośnie wyraźnie wraz ze wzrostem kwasowości protonu związanego z ulegającym alkilowaniu atomem azotu [18]. Podobnie jest w przypadku alkilowania innych typów nukleofili. Jest to jedno z ważnych ograniczeń reakcji Mitsunobu, prowadzonej z zastosowaniem klasycznych odczynników.

W ciągu ostatnich lat dokonano znacznego postępu na polu zwiększenia możliwości zastosowania reakcji Mitsunobu w przypadku substratów o mniejszej reaktywności (w szczególności o słabszych właściwościach kwasowych i większej zawadzie sterycznej). Pokróćce opisano to w niniejszej pracy.

Drugim poważnym ograniczeniem reakcji Mitsunobu jest często występujący wysoki stopień podobieństwa właściwości fizykochemicznych substratów i produktów ubocznych tej reakcji, w stosunku do siebie i do jej produktów właściwych, co utrudnia izolację i oczyszczanie produktu finalnego [4]. W ciągu ubiegłych kilkunastu lat opracowano i zastosowano kilkanaście nowych mediatorów reakcji Mitsunobu, których budowa ułatwia usuwanie zarówno ich samych, jak i ich pochodnych z mieszaniny poreakcyjnej; temat ten wykracza jednak poza zakres niniejszego opracowania.

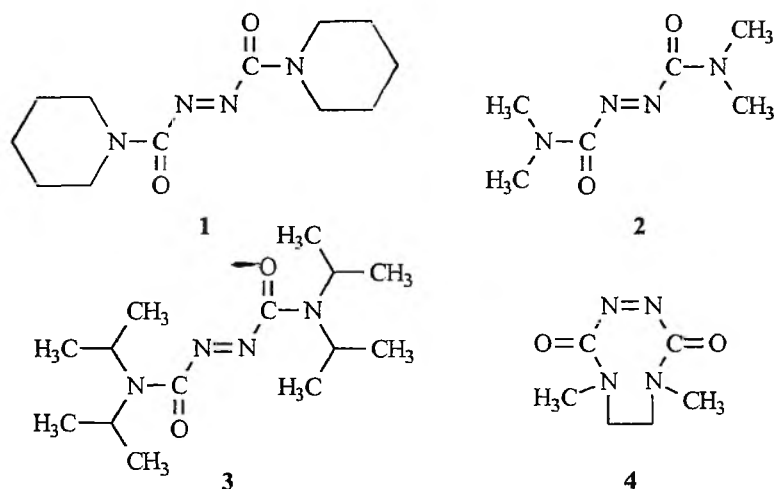
NOWE ODCZYNNIKI ZWIĘKSZAJĄCE ZAKRES STOSOWALNOŚCI REAKCJI MITSUNOBU

Stały rozwój procedury Mitsunobu zaowocował w ostatnich latach skokiem jakościowym jej możliwości, szczególnie za sprawą badań prowadzonych przez doktora Tetsuto Tsunodę i wsp. pod kierunkiem profesora Shô Itô [19–33]. Znaczenie tych badań pozwala nam zaproponować obecnie nazwę powstałych procedur jako reakcję Mitsunobu, Tsunody i Itô.

PODSTAWIONE DIAMIDY KWASU AZODIKARBOKSYLOWEGO

Zastąpienie diestrów kwasu azodikarboksyłowego podstawionymi diamidami wpływa na lepsze zlokalizowanie ładunku ujemnego na azocie azowym. Zwiększa to zasadowość produktu przejściowego reakcji Mitsunobu (1, rys. 1) i umożliwia zastosowanie w charakterze komponentów kwasowych reakcji związków o wyższej wartości pK_a , nawet do ok. 13,5. W 1993 r. Tsunoda, Yamamiya i Itô wprowadzili dipiperydyd (ADDP, rys. 4, 1) jako pierwszy z podstawionych diamidów kwasu azodikarboksyłowego w roli mediatora reakcji Mitsunobu [19]. W połączeniu z tributylfosfiną (TBP) okazał się on aktywny w przypadku związków o kwasowości sięgającej do $pK_a < 13,5$. Zastosowanie TBP zamiast TPP ma na celu zwiększenie nukleofilowości fosfiny i silniejszą lokalizację ładunku dodatniego na atomie fosforu w adduktach przejściowych reakcji (por. rys. 1), a tym samym ułatwienie ataku nukleofilowego ROH lub X^- na odpowiedni addukt [19]. Już w następnym roku Tsunoda i wsp. opublikowali wyniki badań nad kolejnymi diamidami, jeszcze aktywniejszymi w przypadku słabych kwasów: *N,N,N',N'*-tetrametylodiamidem (TMAD, rys. 4, 2) i -tetraizopropylodiamidem kwasu azodikarboksyłowego (TIPA, rys. 3, 3) [20], także reagującymi najlepiej w połączeniu z TBP. Z dwóch ostatnich pochodnych amidowych TMAD okazał się nieznacznie lepszym mediatorem; za pomocą każdej z tych pochodnych azo-

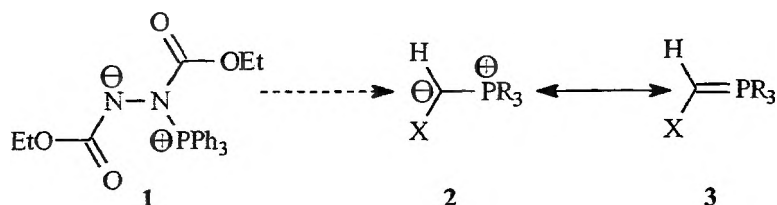
dikarboksylowych można już prowadzić efektywnie C-alkilowanie wielu odpowiednio podstawionych grup metylenowych i metinowych (o pK_a do ok. 13), jednak TMAD (a zapewne i pozostałe diamidy kwasu azodikarboksylowego) wykazuje znacznie niższą aktywność w przypadku kwasów bardzo silnych, choć toleruje (lepiej niż klasyczne odczynniki) sterycznie rozbudowane alkohole, które nie ulegały reakcji przy zastosowaniu układu redoksoowego typu ADDP/TBP [23]. W 1995 r. Lai i wsp. zaproponowali zastąpienie w reakcji Mitsunobu Bu_3P przez Me_3P , która stosowana wspólnie z ADDP ułatwia przeprowadzanie C-alkilowania [16]. Wreszcie w 1995 r. Tsunoda i wsp. otrzymali i przetestowali zastosowanie w reakcji Mitsunobu cyklicznego, N,N,N',N' -tetrapodstawionego diamidu, 4,7-dimetylo-3,5,7-heksahydro-1,2,4,7-tetrazocyno-3,8-dionu (DHTD, rys. 4, 4) [24]. Reagent ten został zaprojektowany, by uniemożliwić występowanie reakcji ubocznej, polegającej na cyklizacji acyklicznych tetrapodstawionych diamidów kwasu azodikarboksylowego do oksadiazoli (w warunkach reakcji Mitsunobu, w obecności tributylfosfiny amidy tego typu ulegają całkowitej przemianie, nawet wówczas, gdy pożądana reakcja nie zachodzi – głównym produktem są wówczas oksadiazole [20]). Stwierdzono, że DHTD cechuje wysoka aktywność redoksowa w większości analizowanych przypadków (jego zastosowanie umożliwiło przeprowadzenie C-alkilowania nawet w tak słabo kwasowych układach, jak grupy metylenowe sąsiadujące z ugrupowaniem sulfonowym charakteryzujące się pK_a ok. 23). Ponadto odczynnik ten w sposób szczególny ułatwia alkirowanie za pomocą alkoholi drugorzędowych [24]. Warto zauważyć, że wszystkie powyższe N,N,N',N' -tetrapodstawione diamidy reagują znacznie lepiej w benzenie niż w innych rozpuszczalnikach stosowanych wcześniej w reakcji Mitsunobu.



Rys. 4. Diamidy kwasu azodikarboksylowego wprowadzone jako odczynniki do reakcji Mitsunobu przez Itô i Tsunodę. **1** – dipiperidyd kwasu azodikarboksylowego (ADDP); **2** – tetrametylodiamid kwasu azodikarboksylowego (TMAD); **3** – tetraizopropylodiamid kwasu azodikarboksylowego (TIPA); **4** – 4,7-dimetylo-3,5,7-heksahydro-1,2,4,7-tetrazocyno-3,8-dion (DHTD)

STABILIZOWANE METYLENOTRIALKILOFOSFORANY

Strukturalne podobieństwo pomiędzy jednym z pośrednich produktów reakcji Mitsunobu (betainą, rys. 5, **1**) i stabilnymi ylidami fosfoniowymi (rys. 5, **2**) doprowadziło Tsunodę i wsp. do odkrycia zupełnie nowej grupy aktywnych mediatorów reakcji Mitsunobu – stabilizowanych metylenotrialkilofosforanów (rys. 5, **6**, **1**, **6**, **2**).



Rys. 5. Analogia między przejściowym aktywnym produktem reakcji Mitsunobu (**1**) i stabilizowanym metylenotrialkilofosforanem (**2**, **3**)

Zgodnie ze swoją budową, tego typu związki nie wymagają do aktywacji alkoholu innych reagentów, zastępując równocześnie fosfinę i pochodną kwasu azodikarboksylogowego. Jako pierwszy zastosowano cyjanometylenotributylofosforan (CMBP, rys. 6, **1**) [32]. Choć reakcja prowadzona z jego zastosowaniem biegnie z reguły wolniej niż odpowiednia reakcja z użyciem DEAD czy TMAD, jednak jest on znacznie efektywniejszy w przypadku rozbudowanych sterycznie alkoholi [32]. Porównanie przeprowadzonych z jego zastosowaniem syntez wskazuje, że w przypadku reagentów kwasowych o $pK_a < 13,5$ w reakcji z pierwszorzędowymi alkoholami w temperaturze pokojowej, stosowanie TMAD prowadzi do wydajności nieco wyższych niż przy zastosowaniu w tych samych warunkach CMBP. Jednak przy ok. 100 °C przewaga ta znika i CMBP okazywał się często efektywniejszy [22, 32]. CMBP był pierwszym odczynnikiem umożliwiającym efektywne przeprowadzenie reakcji Mitsunobu w przypadku komponentów kwasowych o $pK_a > 13,5$ i niektórych sterycznie rozbudowanych alkoholi drugorzędowych [22, 32].



Rys. 6. Stabilizowane metylenotrialkilofosforany zastosowane w reakcji Mitsunobu: **1** – cyjanometylenotributylofosforan (CMBP); **2** – cyjanometylenotrimetylofosforan (CMMP)

W 1996 r. Tsunoda i wsp., opierając się na wcześniejszych doświadczeniach Lai i wsp. [16], wprowadzili cyjanometylenotrimetylofosforan (CMMP, rys. 6, **2**) [26], który okazał się odczynnikiem jeszcze aktywniejszym niż CMBP w większości badanych reakcji [26, 30, 31].

Wykorzystując stabilizowane metylenotrialkilofosforany jako mediatory reakcji Mitsunobu, można z powodzeniem stosować jako komponenty kwasowe związki z grupami metylenowymi czy metinowymi o pK_a do 24, uzyskując wydajności C-alkilowania 40–95% w wypadku alkoholi pierwszorzędowych i np. 72% (120 °C) lub 88% (150 °C) w wypadku 2-oktanolu [24, 26]. Ponadto odczynniki te efektywnie pośredniczą w powstawaniu heterocyklicznych związków (zawierających atom azotu bądź tlenu) w wyniku wewnątrzcząsteczkowych dehydratacji alifatycznych dioli lub aminoalkoholi [27]. W przeciwieństwie do tradycyjnych układów redoksowych zawierających trifenylofosfinę, zastosowanie CMBP umożliwia mono- i dialkilogowanie *p*-toluenosulfonamidu, dając możliwość otrzymywania symetrycznych i niesymetrycznych *N,N*-dipodstawionych amidów [25] (wcześniejsze analogiczne syntezy dotyczyły wyłącznie amin drugorzędowych otrzymywanych z *N*-alkilowanych lub *N*-acylowanych arylosulfonoamidów dalej *N*-alkilowanych z zastosowaniem klasycznych reagentów Mitsunobu [9, 10, 34–41]).

Reakcje prowadzone z zastosowaniem stabilizowanych metylenotrialkilofosforanów z reguły biegną efektywnie dopiero w podwyższonej temperaturze (100–150 °C; dla porównania: diamidy kwasu azodikarboksylogo nie wykazują zwiększonej aktywności w podwyższonych temperaturach) i najczęściej prowadzone są w benzenie [24, 32]. Wysoka wydajność reakcji minimalizuje w pewnym stopniu powstawanie produktów ubocznych: dialkilogowanie podstawionych grup metylenowych czy formowania wiązania eterowego pomiędzy cząsteczkami zastosowanego alkoholu (np. benzylogo, krotonowego i 2-fenylotetanolu) [24].

Badania porównawcze nowych reagentów wskazują, że wszystkie są aktywniejsze od tradycyjnego układu DEAD/TPP w *N*-alkilowaniu pierwszorzędowymi alkoholami, a DHTD jest jedyną pochodną kwasu azodikarboksylogo efektywną w *N*-alkilowaniu drugorzędowymi alkoholami. CMBP i CMMP w obu przypadkach są aktywniejsze, przy czym aktywność CMBP ujawnia się dopiero w podwyższonej temperaturze, podczas gdy CMMP reaguje nawet z drugorzędowymi alkoholami już w temperaturze pokojowej [28, 33].

Aktywność badanych związków w przypadku pośredniczenia w C-alkilowaniu kształtuje się podobnie i spada w następującej kolejności: CMMP > CMBP > DHTD/ Bu_3P > TMAD/ Bu_3P [31].

Różnorodność wprowadzonych mediatorów reakcji Mitsunobu i szczególne cechy każdego z nich stwarzają możliwości znacznego rozszerzenia zasięgu stosowania tej i tak niezwykle popularnej i powszechnie stosowanej reakcji.

Praca finansowana przez KBN w ramach projektów 3TO9A08013 oraz 1245/T09/9917.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] O. Mitsunobu, M. Yamada, T. Mukaiyama, Bull. Chem. Soc. Jpn, 1967, 40, 935.
- [2] O. Mitsunobu, Synthesis, 1981, 1.

- [3] D.L. Hughes, *Org. React.*, 1992, **42**, 337.
- [4] I.D. Jenkins, O. Mitsunobu, *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*, vol. 8, L.A. Paquette (red.), Wiley, 1995, s. 5379.
- [5] D.L. Hughes, *Org. Prep. Proc. Int.*, 1996, **28**, 127.
- [6] C. Simon, S. Hosztafi, S. Makleit, *J. Heterocyclic Chem.*, 1997, **34**, 349.
- [7] K. Wiśniewski, A.S. Kołodziejczyk, B. Falkiewicz, *J. Peptide Sci.*, 1998, **4**, 1.
- [8] K. Wiśniewski, A.S. Kołodziejczyk, B. Falkiewicz, *Wiad. Chem.*, 1998, **52**, 243.
- [9] K. Wiśniewski, S. Joswig, B. Falkiewicz, A.S. Kołodziejczyk, *Pol. J. Chem.*, 1997, **71**, 1506.
- [10] A.S. Kołodziejczyk, E. Sugajska, B. Falkiewicz, K. Wiśniewski, *Synlett*, 1999, 1606.
- [11] G. Gryniewicz, J. Jurczak, A. Zamojski, *Tetrahedron*, 1975, **31**, 1411.
- [12] G. Gryniewicz, *Pol. J. Chem.*, 1979, **53**, 1571.
- [13] D. Camp, I.D. Jenkins, *Aust. J. Chem.*, 1992, **45**, 47.
- [14] J. Yu, H.-S. Cho, J.R. Falck, *J. Org. Chem.*, 1993, **58**, 5892.
- [15] J. Yu, H.-S. Cho, J.R. Falck, *Tetrahedron Lett.*, 1995, **36**, 8577.
- [16] J.-Y. Lai, J. Yu, R.D. Hawkins, J.R. Falck, *Tetrahedron Lett.*, 1995, **36**, 5691.
- [17] M. von Itzstein, I.D. Jenkins, *Aust. J. Chem.*, 1983, **36**, 557.
- [18] J. Koppel, F. Degerbeck, L. Grehn, U. Ragnarsson, *J. Org. Chem.*, 1991, **56**, 7172.
- [19] T. Tsunoda, Y. Yamamiya, S. Itô, *Tetrahedron Lett.*, 1993, **34**, 1639.
- [20] T. Tsunoda, J. Otsuka, Y. Yamamiya, S. Itô, *Chem. Lett.*, 1994, 539.
- [21] T. Tsunoda, S. Tatsuki, K. Kataoka, Y. Yamamiya, S. Itô, *Chem. Lett.*, 1994, 543.
- [22] T. Tsunoda, F. Ozaki, S. Itô, *Tetrahedron Lett.*, 1994, **35**, 5081.
- [23] T. Tsunoda, Y. Yamamiya, Y. Kawamura, S. Itô, *Tetrahedron Lett.*, 1995, **36**, 2529.
- [24] T. Tsunoda, M. Nagaku, C. Nagino, Y. Kawamura, F. Ozaki, H. Hioki, S. Itô, *Tetrahedron Lett.*, 1995, **36**, 2531.
- [25] T. Tsunoda, H. Yamamoto, K. Goda, S. Itô, *Tetrahedron Lett.*, 1996, **37**, 2457.
- [26] T. Tsunoda, C. Nagino, M. Oguri, S. Itô, *Tetrahedron Lett.*, 1996, **37**, 2459.
- [27] T. Tsunoda, F. Ozaki, N. Shirakata, Y. Tamaoka, H. Yamamoto, S. Itô, *Tetrahedron Lett.*, 1996, **37**, 2463.
- [28] T. Tsunoda, S. Itô, *J. Synth. Org. Chem. Jpn*, 1997, **55**, 631.
- [29] T. Tsunoda, Y. Kawamura, K. Uemoto, S. Itô, *Heterocycles*, 1998, **47**, 177.
- [30] T. Tsunoda, K. Uemoto, C. Nagino, M. Kawamura, H. Kaku, S. Itô, *Tetrahedron Lett.*, 1999, **40**, 7355.
- [31] T. Tsunoda, K. Uemoto, T. Ohtani, H. Kaku, S. Itô, *Tetrahedron Lett.*, 1999, **40**, 7359.
- [32] S. Itô, T. Tsunoda, *Pure Appl. Chem.*, 1994, **66**, 2071.
- [33] S. Itô, T. Tsunoda, *Pure Appl. Chem.*, 1999, **71**, 1053.
- [34] J.R. Henry, L.R. Marcin, M.H. McIntosh, P.M. Scola, G.D. Jr Harris, S.M. Weinreb, *Tetrahedron Lett.*, 1989, **30**, 5709.
- [35] M.L. Edwards, D.M. Stermerick, J.R. McCarthy, *Tetrahedron Lett.*, 1990, **31**, 3417.
- [36] 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.
- [37] T. Fukuyama, C.K. Jow, M. Cheung, *Tetrahedron Lett.*, 1995, **36**, 6373.
- [38] T. Fukuyama, M. Cheung, C.K. Jow, Y. Hidai, T. Kan, *Tetrahedron Lett.*, 1997, **38**, 5831.
- [39] K. Wiśniewski, A.S. Kołodziejczyk, *Tetrahedron Lett.*, 1997, **38**, 483.
- [40] B. Falkiewicz, L. Łankiewicz, B. Liberek, K. Wiśniewski, *Peptides 1996*. Proceedings of the 24th Eur. Peptide Symp., R. Ramage, R. Epton (red.), Mayflower Sci. Ltd., Kingswinford, 1998, s. 371.
- [41] B. Falkiewicz, A.S. Kołodziejczyk, B. Liberek, K. Wiśniewski, *Tetrahedron*, 2001, **57**, 7909.

**KRZEMOORGANICZNE POCHODNE
β-DIKETONÓW – SYNTEZA,
WŁAŚCIWOŚCI I GŁÓWNE ZASTOSOWANIA**

**ORGANOSILICON DERIVATIVES
OF β-DIKETONES – SYNTHESIS, PROPERTIES
AND MAIN APPLICATIONS**

Włodzimierz Urbaniak

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

Abstract

Wprowadzenie

1. Syntezy krzemorganicznych pochodnych diketonów
 - 1.1. Hydrosililowanie nienasyconych pochodnych acetyloacetonu
 - 1.2. Podstawienie fluorowca w związku krzemorganicznym
2. Identyfikacja krzemorganicznych pochodnych diketonów
3. Zastosowanie krzemorganicznych pochodnych diketonów
 - 3.1. Immobilizacja aminokwasów
 - 3.2. Modyfikacja napelnaczy tworzyw sztucznych
 - 3.3. Sorbent jonów metali
 - 3.4. Fazy stacjonarne dla chromatografii
 - 3.5. Katalizatory heterogenizowane
 - 3.6. Materiały zawierające zdyspergowane metale

Piśmiennictwo cytowane



Dr Włodzimierz Urbaniak jest absolwentem Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza, gdzie w 1986 r. obronił pracę doktorską z zakresu chemii związków krzemooorganicznych. Obecnie jest adiunktem w Zakładzie Chemii Analitycznej tego Wydziału.

Jest autorem lub współautorem ponad 60 prac publikowanych w wydawnictwach zagranicznych i krajowych, około 50 patentów i zgłoszeń patentowych oraz kilkudziesięciu komunikatów prezentowanych na konferencjach międzynarodowych oraz krajowych.

Główne kierunki działalności badawczej obejmują syntezę i zastosowania związków krzemooorganicznych, a także metody wykorzystania odpadów tworzyw sztucznych, głównie opakowaniowych oraz unieszkodliwiania wybranych grup odpadów niebezpiecznych.

ABSTRACT

Organosilicon derivatives of β -diketones of a general formula (1) have a wide range of possible applications, mainly because of the presence of β -diketonate moiety showing excellent properties of metal ion chelation and relatively easily undergoing conversion to other groups, as shown in Scheme 1. A particularly interesting subject of study are the compounds whose substituent R contains silyl groups (see formula (3)), capable of reacting with surface hydroxyl groups of inorganic support, e.g. silica, or of formation of polysiloxane polymers, as shown in Scheme 2.

In the paper, two most often used methods of synthesis of this group of compounds: hydrosilylation and halogen substitution are discussed on the example of derivatives of acetylacetone, the most common representative of 1,3-diketones.

Catalytic hydrosilylation of the derivatives containing unsaturated carbon-carbon bond in the substituent is usually non-selective and proceeds on both $-C=C-$ bond and carbonyl groups. More effective method is substitution of halogens in the organic group of an appropriate organosilicon compound, usually of the type described by formula (15). This reaction is also non-selective, since besides the desired products of C-alkylation a substantial amount of the products of O-alkylation appears. However, a careful choice of solvents and other reagents, e.g. a considerable amount of NaI, increases the selectivity towards the C-alkylation products and allows obtaining them in high yields.

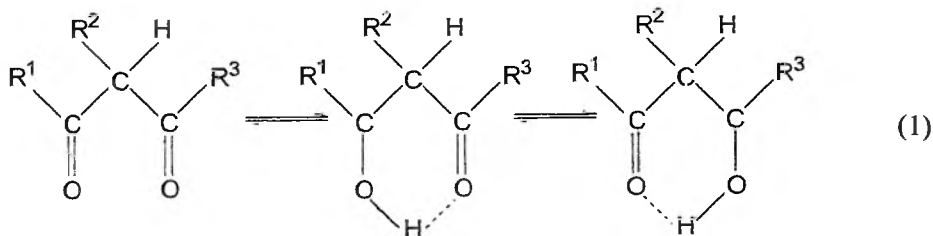
In the article the problems related to the products purification and identification by spectroscopic methods are also presented.

All the applications of organosilicon derivatives of β -diketones presented in Scheme 5 are based on the use of the support modified with β -diketonate moiety.

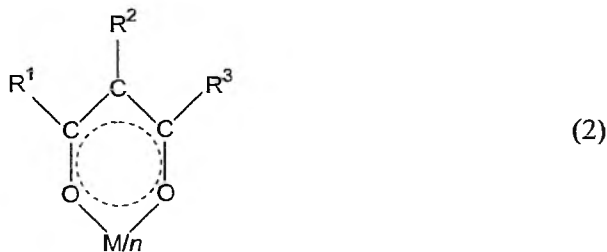
Exemplary applications of the support modified with β -diketonate moiety for immobilisation of amino acids and metal ions are discussed in detail. The immobilised metal complexes have been applied as stationary phases in gas chromatography and as the starting material for composites containing nanometer-sized metal particles of a controllable and uniform size in an inorganic matrix for magnetic and electronic applications and for use as heterogeneous catalysts or oxygen absorbers.

WPROWADZENIE

1,3-diketony lub inaczej β -diketony oraz ich kompleksy – 1,3-diketoniany metali, należą do jednych z bardziej znanych i użytecznych związków chemicznych. Charakterystyczną cechą 1,3-diketonów jest tautomeria keto-enolowa [1–4]:



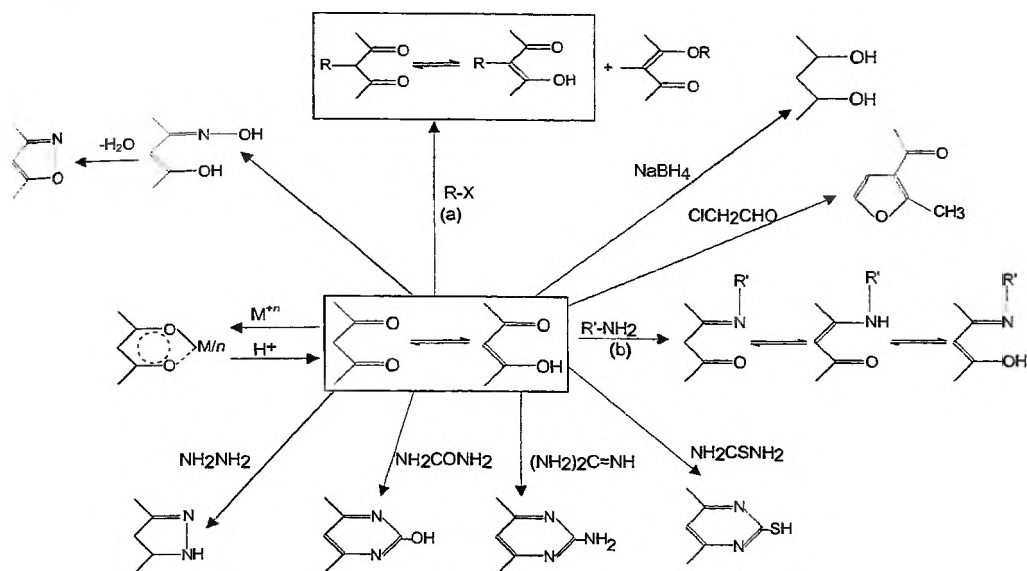
a także łatwość wymiany wodoru grupy enolowej na kationy praktycznie wszystkich metali z utworzeniem kompleksów chelatowych o strukturze sześciocząłowego pierścienia [3–5]:



gdzie n to ładunek kationu danego metalu, R^1 , R^3 to najczęściej grupy alkilowe, aryłowe lub fluoroalkilowe, R^2 to najczęściej wodór lub rzadziej podstawniki typu R^1 i R^3 .

W prezentowanym opracowaniu właściwości tej grupy związków przedstawiono na przykładzie 2,4-pentanodionu, zwyczajowo nazywanego acetyloacetonem, który jest najprostszym a zarazem najpospolitszym przedstawicielem 1,3-diketony. Związek ten charakteryzuje się stosunkowo dużą odpornością na działanie powietrza, wody oraz większości rozpuszczalników, natomiast w odpowiednich warunkach, poza tworzeniem acetyloacetonianów metali, może ulegać wielu innym reakcjom, w których bierze udział grupa metylenowa, grupy ketonowe, grupa enolowa lub końcowe grupy metylowe [5]. Reakcje te mogą przebiegać także z utworzeniem pierścienia, jeśli drugim reagentem jest związek dwufunkcyjny. Dzięki temu acetyloaceton jest niezwykle użytecznym substratem stosowanym do syntezy wielu nowych związków.

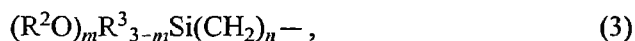
Podstawowe kierunki reakcji acetyloacetonu z różnymi reagentami przedstawiono syntetycznie na schemacie 1.



Schemat 1. Reakcje acetyloacetonu

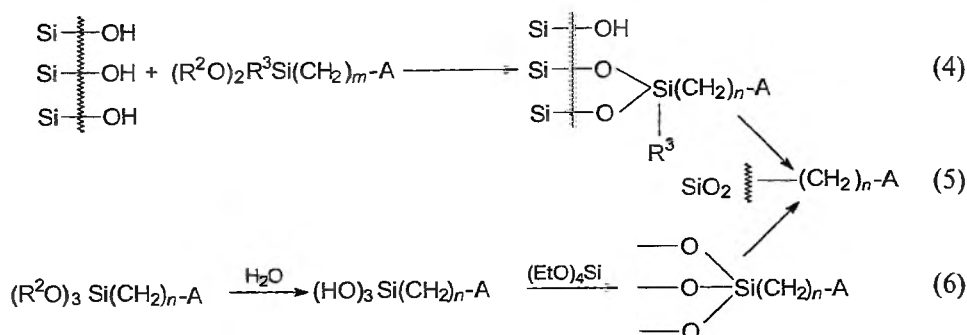
Należy podkreślić, że podstawienie jednego atomu wodoru grupy metylenowej podstawnikiem R i utworzenie 3-podstawionych pochodnych, tak jak to przedstawiono na schemacie 1 w reakcji oznaczonej (a), praktycznie nie wpływa na możliwość tworzenia dalszych związków w sposób analogiczny jak dla niepodstawionego acetyloacetonu. Tak więc dla związków opisanych na schemacie 1 w ramach, kierunki reakcji będą takie same.

Wprowadzenie w podstawniku R, a także R¹ (schemat 1) reaktywnych grup krzemooorganicznych typu



gdzie $m = 1, 2, 3$, $n = 1, 2, \dots, n$, a R² i R³ to grupy alkilowe, zwiększa dodatkowo liczbę potencjalnych zastosowań, gdyż podstawową cechą tego typu grup sililowych jest możliwość reakcji z różnymi nośnikami zawierającymi reaktywne, powierzchniowe grupy silanolowe, takimi jak np. krzemionka, szkła porowate, kaolin itp., a także kondensacji międzycząsteczkowej z utworzeniem polimerów polisiloksanowych [6–10].

Oznacza to, że gdy podstawnik R jest grupą sililową przedstawioną wzorem (3), to w wyniku reakcji z powierzchniowymi grupami hydroksylowymi powstają modyfikowane nośniki o ogólnym wzorze (4), natomiast w wyniku hydrolizy i kondensacji polimery o ogólnym wzorze (6). Produkty obu tych reakcji można przedstawić jednym ogólnym wzorem (5), co ilustruje schemat 2.



Schemat 2. Reakcje grup sililowych. A – grupa diketonowa lub jej pochodna

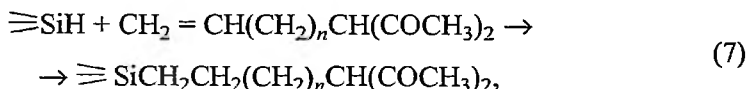
1. SYNTEZY KRZEMOORGANICZNYCH POCHODNYCH DIKETONÓW

Pochodne 2,4-pentanodionu (acetyloacetonu), w których podstawnik zawierający krzem związany jest z węglem grupy metylenowej, są podstawową grupą krzemooorganicznych pochodnych β -diketonów. Synteza 3-podstawionych pochodnych acetyloacetonu jest reakcją dość dobrze zbadaną i opisaną, jednak w przypadku pochodnych zawierających reaktywne grupy sililowe jest niezwykle trudna do przeprowadzenia z zadowalającą wydajnością i selektywnością. Jednakże ze względu na interesujące właściwości i możliwości zastosowań tego typu związków podejmowano wiele prób zwiększania efektywności metod ich syntezy. Związki te są otrzymywane zasadniczo dwoma metodami:

- przez katalityczne hydrosililowanie 3-podstawionej pochodnej acetyloacetonu, w której podstawnik zawiera nienasycone wiązanie węgiel-węgiel,
- przez podstawienie chlorowca w grupie organicznej odpowiedniego związku krzemooorganicznego.

1.1. HYDROSILILOWANIE NIENASYCONYCH POCHODNYCH ACETYLOACETONU

Część badaczy próbowała otrzymać krzemooorganiczne pochodne acetyloacetonu za pomocą katalitycznego hydrosililowania nienasyconego wiązania węgiel-węgiel w podstawniku związanym z węglem metylenowym.



gdzie $n = 0, 1, \dots, n$.

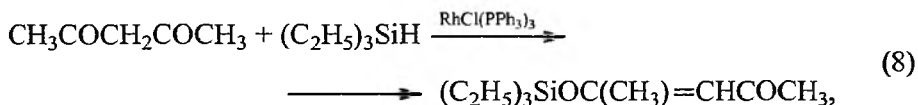
Najczęściej, ze względu na swoją aktywność, hydrosililowaniu poddawano grupę allilową. Allum i wsp. hydrosililowali 3-allilo-pentano-2,4-dion trietoksy-silanem w obecności katalizatora, którym była metaliczna platyna naniesiona na węgiel aktywny [11]. Po odfiltrowaniu katalizatora oddestylowano produkt z 60%

wydajnością i bez dodatkowej identyfikacji związano z krzemionką. Następnie na tak otrzymanym nośniku osadzono kompleks $[\text{RhCl}(\text{CO})_2]_2$. O obecności na powierzchni krzemionki grup β -dikarbonylowych świadczył fakt, że kompleks rodu został związany i nie był wymywany rozpuszczalnikiem, a w widmie IR obserwowano silny sygnał grupy karbonylowej. Wydaje się jednakże, że liczba grup β -dikarbonylowych o stosunkowo silnych właściwościach kompleksujących była znacznie niższa niż wynikałoby to z ilości naniesionego produktu hydrosililowania, gdyż otrzymany w ten sposób katalizator heterogenizowany, zastosowany w reakcji hydroformylowania, dość szybko ulegał dezaktywacji, co związane było z wypłukiwaniem się osadzonego kompleksu rodu [12].

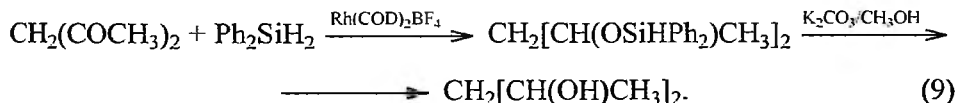
Ten sam związek wyjściowy hydrosililowano metylo dietoksylsilanem wobec kompleksu platyny [13]. Otrzymany produkt oddestylowano pod zmniejszonym ciśnieniem i bez dodatkowej identyfikacji poddano reakcji z $\text{Ti}(\text{OPr-}i)_4$. Na podstawie widma IR ustalono, że powstał kompleks acetyloacetonianowy z tytanem.

Trimetoksylsilanem w obecności kwasu chloroplatynowego jako katalizatora hydrosililowano inną pochodną acetyloacetonu z grupą alilową związaną z węglem metylenowym za pomocą wiązania estrowego, tj. $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{COOCH}(\text{COCH}_3)_2$ [14]. We wszystkich powyższych przykładach analiza produktu była niepełna. Stwierdzono obecność oczekiwanych produktów hydrosililowania, co jednak nie oznacza, że nie powstawały także inne produkty. Jest to bardzo prawdopodobne, gdyż w przypadku hydrosililowania wiązania nienasyconego węgiel-węgiel w pochodnych zawierających również grupy ketonowe, także wiązanie węgiel-tlen ulega reakcji. Wprawdzie nie prowadzono systematycznych badań tego typu związków, jednakże wiadomo, że wodorosilany bardzo łatwo przyłączają się do grupy karbonylowej ketonów w obecności większości typowych katalizatorów hydrosililowania [15, 16].

W przypadku acetyloacetonu obserwuje się zarówno przyłączenie do jednej grupy karbonylowej [17]:

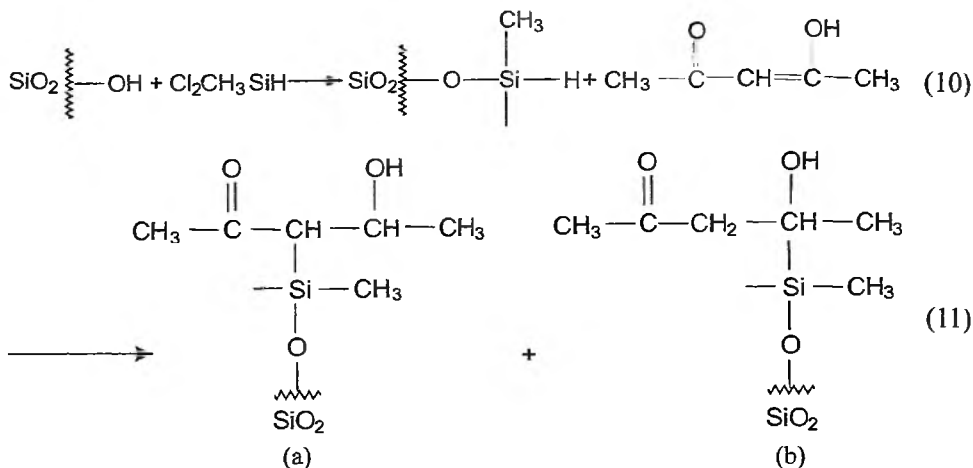


jak i hydrosililowanie obu grup prowadzące w efekcie do otrzymania nasyconego diolu [18]:



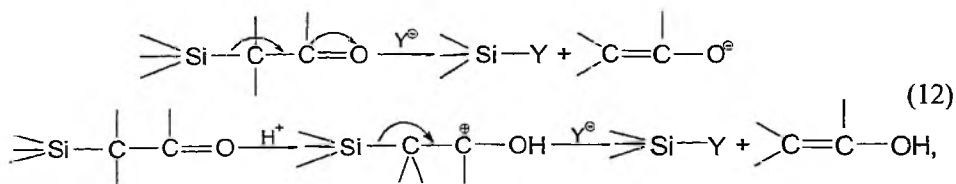
Inny kierunek reakcji hydrosililowania acetyloacetonu opisali Lyshenko i Belyakowa [19]. Czynnikiem sililującym był dichlorometylosilan, który po związaniu na powierzchni krzemionki został następnie poddany reakcji z acetyloacetone w obecności kwasu chloroplatynowego jako katalizatora. Na podstawie widm IR autorzy ustalili tworzenie się dwóch związków ((a) i (b) na schema-

cie 3), a więc produktów przyłączenia do wiązania podwójnego węgiel-węgiel formy enolowej acetyloacetonu. Jako dodatkowy argument przemawiający za takim przebiegiem reakcji autorzy wskazali wysoką stabilność hydrolytyczną otrzymanego produktu, świadcząca o tworzeniu odpornych wiązań Si-C, zamiast łatwo ulegających hydrolizie wiązań Si-O-C.



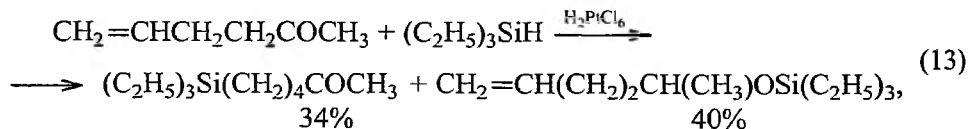
Schemat 3. Reakcja acetyloacetonu z modyfikowaną krzemionką

Biorąc jednak pod uwagę fakt, że tego typu związki są niezwykle podatne na rozszczepienie, zarówno przez czynniki elektrofilowe, jak i nukleofilowe, czyli tzw. β -eliminację [20, 21], która przebiega w następujący sposób [20]:



możliwość utworzenia trwałych produktów (a) i (b) należy uznać za kontrowersyjną.

Ketony zawierające izolowane wiązanie nienasycone węgiel-węgiel w obecności kwasu chloroplatynowego reagują zarówno z grupą karbonylową, jak i z wiązaniem podwójnym węgiel-węgiel [22]:



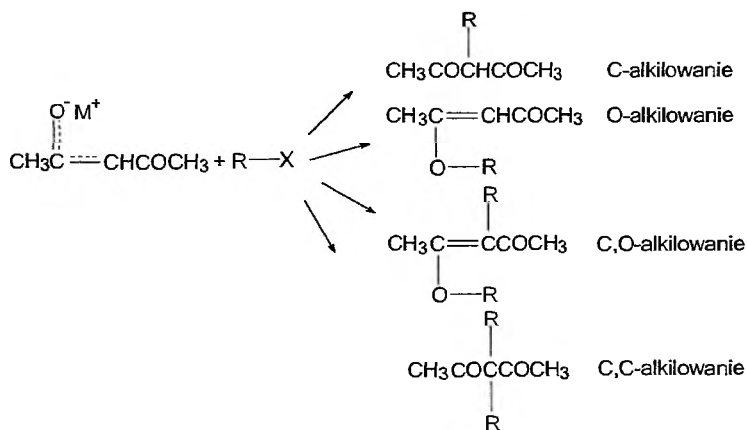
przy czym przeważa przyłączenie do grupy C=O. Dla innych katalizatorów przewaga tego kierunku reakcji jest jeszcze wyraźniejsza [15, 16].

Można przyjąć, że przebiegające konkurencyjnie reakcje praktycznie uniemożliwiają otrzymanie produktu hydrosililowania wiązań $C=C$ bez naruszenia grup karbonylowych, co powoduje, że właściwe produkty otrzymywane są z małą wydajnością.

Aby uniemożliwić reakcję grup karbonylowych, zaproponowano ich blokowanie przez wytworzenie trwałego wiązania chelatowego z jonem metalu, a następnie hydrosililowanie otrzymanego kompleksu. Do kompleksowania użyto jonów tytanu i glinu [13] lub berylu oraz glinu [23, 24]. Hydrosililowanie w obecności katalizatorów platynowych we wszystkich przypadkach prowadziło do praktycznie ilościowego przereagowania wiązania $C=C$ bez wyraźnych oznak zerwania wiązań chelatowych z metalem. Po zakończeniu reakcji nie próbowano usuwać metalu z kompleksu w celu uzyskania czystego związku. Otrzymane produkty wykorzystywano bezpośrednio, np. jako środek sieciujący w polimerach silikonowych [13], lub po hydrolizie i polikondensacji jako polisiloksanowy polimer zawierający chelatowo związane metale [23–25].

1.2. PODSTAWIENIE FLUOROWCA W ZWIĄZKU KRZEMOORGANICZNYM

Najbardziej użyteczną i najczęściej stosowaną metodą otrzymywania krzemooorganicznych pochodnych acetyloacetonu jest podstawienie fluorowca w odpowiednim związku krzemooorganicznym. Metoda ta, będąca zmodyfikowaną wersją alkilowania acetyloacetonu [26–29], jest relatywnie prosta i umożliwia wykorzystanie stosunkowo tanich i łatwo dostępnych surowców. Podstawowym problemem jest mała selektywność alkilowania, powodująca, że poza produktem alkilowania węgla grupy metylenowej (tzw. C-alkilowanie), pojawia się produkt alkilowania tlenu (tzw. O-alkilowanie). W niektórych przypadkach może także nastąpić reakcja dalszego alkilowania otrzymywanych produktów monoalkilowania [28–31], w wyniku czego powstają produkty dialkilowania, tzn. C,O-alkilowania i C,C-alkilowania jak to przedstawiono na schemacie 4.

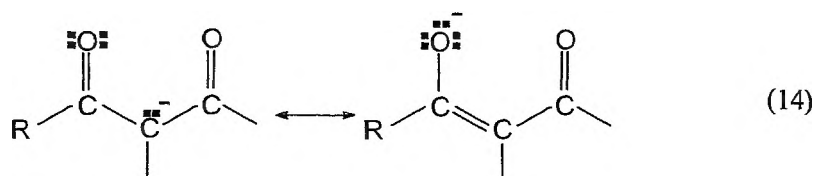


Schemat 4. Kierunki alkilowania acetyloacetonu

Taki przebieg reakcji uwarunkowany jest występowaniem tautomerii keto-enolowej. Stopień enolizacji związków 1,3-dikarbonylowych, a więc i acetyloacetonu, zależy zarówno od struktury związku, jak i od rozpuszczalnika. Rozpuszczalniki niepolarne, aprotone sprzyjają tworzeniu formy enolowej, występującej zwykle w postaci monomeru z wewnątrzcząsteczkowym wiązaniem wodorowym. W rozpuszczalnikach bardziej polarnych, a zwłaszcza w rozpuszczalnikach protonowych, ilość formy ketonowej z reguły wzrasta, ze względu na większą podatność na solwatację cząsteczkami rozpuszczalnika lub łatwiejsze tworzenie międzycząsteczkowych wiązań wodorowych. Dodatkowe podstawniki w układzie 1,3-dikarbonylowym z reguły wpływają na zmniejszenie ilości enolu obecnego w stanie równowagi [27].

Acetyloaceton, pod działaniem stosunkowo mocnych zasad w rozpuszczalnikach aprotowych, łatwo tworzy anion enolanowy, który następnie może reagować z chlorowcoalkilami lub innymi czynnikami alkilującymi, zgodnie ze schematem podstawienia nukleofilowego typu S_N2 .

W anionie enolanowym następuje delokalizacja ładunku, co ilustrują poniższe struktury rezonansowe:



W tej sytuacji możliwa jest zarówno reakcja z węglem grupy metylenowej, jak i z tlenem. Kierunek reakcji uwarunkowany jest wieloma czynnikami. Protonowe rozpuszczalniki oraz małe kationy przy anionie enolanowym powodują, że przeważa C-alkilowanie, jednakże w przypadku acetyloacetonu ilość produktów O-alkilowania jest znaczna.

W celu zwiększenia selektywności reakcji w kierunku mono C-alkilowania opracowano wiele metod wykorzystujących m.in. różne rozpuszczalniki i czynniki alkilujące [26, 29, 32–34], różnorodne układy katalityczne, zarówno homogene [35–38], jak i heterogeniczne [31, 39, 40], metody elektrochemiczne [41], a także blokowanie grupy dikarbonylowej przez utworzenie trwałego kompleksu z metalem [42].

W przypadku syntezy pochodnych krzemooorganicznych wybór metody limitowany jest dostępnością oraz reaktywnością odpowiednich związków krzemooorganicznych.

Ze względu na dostępność i niską cenę, szczególnie atrakcyjne są 3-chloropropylosilany o ogólnym wzorze:

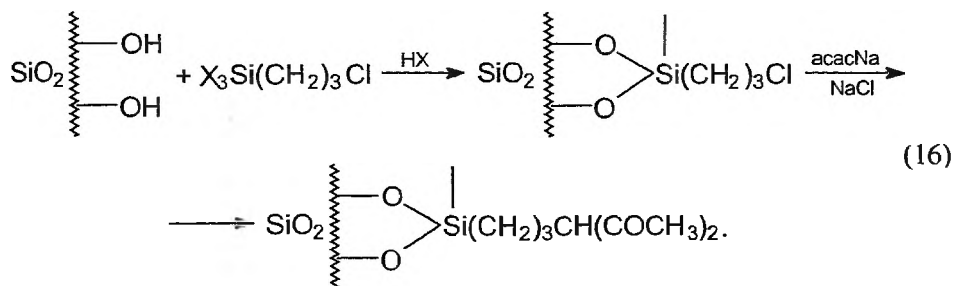


gdzie X = Cl, OR, R; R = CH₃, C₂H₅.

Związki te, produkowane w skali przemysłowej, są najważniejszymi substratami do otrzymywania dużej grupy pochodnych krzemooorganicznych, stosowanych w laboratoriach i przemyśle [8, 43, 44].

W reakcjach alkilowania acetyloacetonu związki chloroalkilowe są zasadniczo mało reaktywne i selektywne. Znacznie lepsze efekty uzyskuje się stosując jodki lub bromki alkilowe, ale w przypadku związków krzemooorganicznych pochodne takie są niezwykle drogie i stosunkowo trudno dostępne. Kolejnym ograniczeniem jest reaktywność grup związanych z krzemem. Nie powinny one reagować z anionem enolanowym, jednakże ze względu na dalsze zastosowania powinny być aktywne w innych reakcjach, np. z powierzchniowymi grupami silanolowymi krzemionki. Warunki te spełniają grupy alkoksyłowe, szczególnie etoksyłowe, jednak są one mało odporne na hydrolizę, co wyklucza stosowanie wody lub wilgotnych rozpuszczalników.

Głównym problemem w omawianej reakcji jest taki dobór warunków syntezy, aby reaktywne grupy związane z krzemem pozostały nienaruszone. Dlatego wielu badaczy, mając na uwadze dalsze zastosowania otrzymywanych związków, najczęściej wykorzystywało metodę polegającą na osadzeniu związku krzemooorganicznego na powierzchni krzemionki z wytworzeniem relatywnie stabilnych wiązań siloksanowych, a następnie podstawieniu chlorowca grupą diketonową [45-50].



Wprawdzie metoda ta pozwala na otrzymanie produktów nadających się do wielu zastosowań, jednakże bardzo trudno uzyskać powtarzalne wyniki, gdyż w reakcjach prowadzonych na powierzchni nośnika wymiana fluorowca praktycznie nigdy nie jest całkowita [11, 51]. Także jednoznaczna identyfikacja otrzymanych substancji jest niezwykle utrudniona ze względu na obecność krzemionki, stanowiącej główną część otrzymanego produktu.

Aby otrzymać czyste i ściśle zdefiniowane związki, Lisichkin i wsp. przeprowadzili reakcję 3-chloropropylotrimetoksylanu z acetyloacetonianem sodu [45]. Niestety, nie podano szczegółowej preparatyki ani identyfikacji otrzymanego związku, który, po osadzeniu na powierzchni krzemionki, wykorzystywano do sorpcji metali z roztworów. Autorzy japońscy [14] prowadzili reakcję z wykorzystaniem tych samych reagentów w mieszaninie metanolu i toluenu. Otrzymany produkt po przedestylowaniu zidentyfikowano za pomocą IR, wskazując na silne

maksima absorpcji przy 1085 cm^{-1} oraz 1715 cm^{-1} , przypisane odpowiednio grupie alkoksylowej i karbonylowej. W widmie $^1\text{H NMR}$ wskazano na sygnał protonu przy węglu grupy metylenowej w zakresie 3,8–3,9 ppm (m, 1H), jednakże nie wspominając nic o bardzo charakterystycznym sygnale protonu grupy OH formy enolowej, który dla czystego acetyloacetonu występuje przy 13,58 ppm, a w roztworach (np. w CCl_4) przesuwa się w okolice 15 ppm [60]. Na podstawie tych analiz (wraz z analizą elementarną) autorzy uznali, że otrzymany związek jest produktem C-alkilowania acetyloacetonu.

Szczegółowe badania wykazały, że otrzymany według opisanego sposobu związek jest mieszaniną produktów C-alkilowania i O-alkilowania, których praktycznie nie można rozdzielić za pomocą destylacji. O trudnościach związanych z rozdzieleniem produktów na drodze destylacji, w przypadku podobnych związków, informowali także inni autorzy [53]. Za pomocą chromatografii gazowej stwierdzono, że produktu O-alkilowania jest wyraźnie więcej niż C-alkilowania [52].

Modyfikacja opisanej przez autorów japońskich metody pozwoliła na opracowanie sposobu selektywnej syntezy nowych, wcześniej nie opisanych krzemorganicznych produktów O-alkilowania, mogących mieć zastosowanie jako np. promotory adhezji [54].

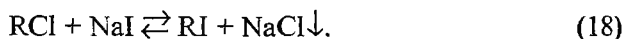
Dopiero w wyniku systematycznych badań udało się opracować efektywną i selektywną metodę syntezy 3-podstawionych pochodnych acetyloacetonu, wykorzystującą reakcję podstawienia fluorowca w pochodnej krzemorganicznej. Udało się także wyizolować i jednoznacznie zidentyfikować otrzymane produkty [52, 55].

Określono także wpływ poszczególnych czynników na przebieg reakcji.

Wiadomo, że dla określonego R stosunek produktów C- i O-alkilowania acetyloacetonu, a także szybkość reakcji zależą od typu fluorowca i zwiększają się w szeregu [26, 27, 29]:

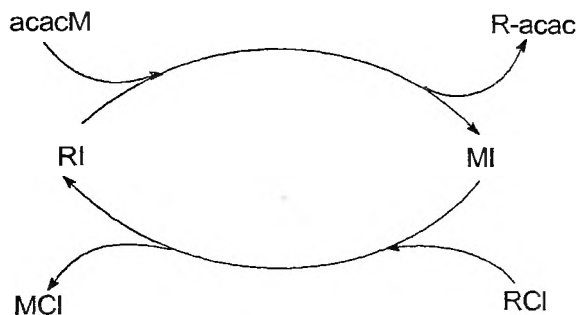


Także w przypadku podstawników krzemorganicznych najlepszą selektywność i wydajność uzyskano dla pochodnej zawierającej jod [52]. Jest to jednak związek zbyt drogi, aby go stosować w skali technicznej. Jak już wcześniej wspomniano, ze względu na dostępność i cenę najczęściej są stosowane związki zawierające chlor, które w reakcjach alkilowania β -diketonów są zdecydowanie mniej selektywne w kierunku tworzenia produktu C-alkilowania i mało aktywne. Aby rozwiązać ten problem, wytwarzano pochodną jodkową *in situ* wykorzystując reakcję Finkelsteina polegającą na wymianie fluorowca [56]:



Reakcja ta jest procesem odwracalnym. W odpowiednim rozpuszczalniku, np. acetonie, przebiega z dobrą wydajnością, co wynika z przesunięcia równowagi w prawo, gdyż NaCl w odróżnieniu od NaI jest słabo rozpuszczalny w acetonie. W badanej reakcji, po przereagowaniu z solą acetyloacetonu, odtwarza się

wyjściowy jodek, który można zawrócić do reakcji. W zasadzie już niewielka ilość soli jodkowej wystarcza, gdyż po wymianie chloru i przereagowaniu jony jodkowe powracają do roztworu, jak to przedstawiono na schemacie 5 [57].



Schemat 5. Mechanizm wymiany Finkelsteina w reakcji alkilowania acetyloacetonu

Badania wykazały jednakże znaczny wpływ stężenia soli jodkowej na wydajność i selektywność reakcji. Dopiero zawartość jodku w ilości 1:1 w stosunku do silanu pozwala na znaczne skrócenie czasu reakcji i uzyskanie z dużą wydajnością produktu C-alkilowania. W tym przypadku istotną rolę muszą odgrywać także synergiczne efekty związane z działaniem jodku i rozpuszczalnika, gdyż całkowita wymiana chloru wymaga długiego czasu reakcji. Np. w grupie chlorometylowej związanej z polisiloksanem prowadzono ją 10 dni we wrzącym acetonie. Gdy ogrzewanie prowadzono 2 dni, wymiana $\text{Cl} \rightarrow \text{I}$ zachodziła tylko w 35% [58].

Zbadano także wpływ kationu soli jodkowej i soli acetyloacetonu na stosunek produktów C- i O-alkilowania. Gdy kationem jest lit, obserwuje się zwiększenie ilości produktów C-alkilowania, jednakże przy znacznym obniżeniu wydajności. Zwiększenie selektywności w kierunku C-alkilowania w przypadku tak małego kationu jak Li(I) jest zgodne z oczekiwaniami, niska wydajność natomiast związana jest najprawdopodobniej z dobrą rozpuszczalnością LiCl , utrudniającą przesunięcie równowagi i tym samym zwiększenie stężenia jodku alkilowego. Użycie soli sodowych lub potasowych daje znacznie lepsze efekty [52, 55].

Optymalnym rozpuszczalnikiem reakcji okazał się dimetyloformamid (DMF), jakkolwiek efekty uzyskane przy zastosowaniu N-metylopirolidonu (NMP) oraz dimetylosulfotlenku (DMSO) różnią się stosunkowo niewiele [52, 55, 57]. Stwierdzono również, że aceton, typowy rozpuszczalnik dla reakcji Finkelsteina, jest w tym przypadku praktycznie nieużyteczny. Najprawdopodobniej decyduje o tym zbyt niska temperatura reakcji wynosząca ze względu na temperaturę wrzenia acetonu około $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Także dla pozostałych rozpuszczalników w temperaturze $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ w czasie do 600 min reakcja nie była zakończona [57]. Zwiększenie temperatury w zakresie $80\text{--}120\text{ }^{\circ}\text{C}$ wyraźnie skraca czas reakcji, natomiast w niewielkim stopniu wpływa na selektywność, tzn. ze wzrostem temperatury udział produktów O-alkilowania tylko minimalnie się zwiększa. W tych

warunkach przyjęto, że temperatura ok. 100 °C jest temperaturą optymalną [52, 55, 57].

Jedną z niedogodności opisaney metody jest konieczność używania stosunkowo toksycznych i trudnych do oczyszczenia oraz usunięcia po zakończeniu reakcji, higroskopijnych rozpuszczalników. Szczególnie ta ostatnia właściwość jest istotna w przypadku krzemooorganicznych substratów z reaktywnymi grupami przy krzemie, które są niezwykle wrażliwe na wilgoć. Konieczne jest także kontrolowanie temperatury reakcji. Stosowane rozpuszczalniki są wysokowrzące i ich destylację prowadzi się pod zmniejszonym ciśnieniem. Ogrzanie do temperatury bliskiej wrzenia pod ciśnieniem normalnym powoduje ich rozkład. Zastąpienie tych rozpuszczalników innymi, niepolarnymi, niżej wrzącymi i niehigroskopijnymi typu benzen, toluen czy ksylen prowadzi do całkowitej zmiany selektywności reakcji i otrzymania głównie produktów O-alkilowania [54].

Bardzo dobre efekty uzyskano wprowadzając jako rozpuszczalnik metyloizobutyloketon (MIBK), pospolity rozpuszczalnik stosowany w metodach ekstrakcyjnych. Wykorzystanie MIBK jako rozpuszczalnika pozwala na uzyskanie produktów C-alkilowania z wysoką wydajnością i selektywnością przy uniknięciu większości opisanych wcześniej niedogodności [59]. MIBK jest wystarczająco polarny dla rozpuszczenia wszystkich reagentów, co jest warunkiem wymiany atomów chloru na bardziej reaktywny jod. Rozpuszczalność reagentów w MIBK można zwiększyć zastępując go częściowo (ok. 5–10%) typowym rozpuszczalnikiem tej reakcji, tj. DMSO, DMF lub NMP. MIBK jest mało toksyczny, nie rozkłada się w temperaturze wrzenia, jest niehigroskopijny, z wodą praktycznie nie miesza się. Bardzo łatwo można go osuszyć przez destylację azeotropową, gdyż temperatura wrzenia azeotropu z wodą wynosi ok. 85 °C. Dzięki temu w przypadku gdy reagenty muszą być całkowicie bezwodne, możliwe jest ich azeotropowe osuszenie przed reakcją, bezpośrednio w reaktorze. Temperatura wrzenia MIBK wynosząca 117–118 °C jest temperaturą bliską optymalnej dla syntezy pochodnych acetyloacetonu. Ograniczone jest także niebezpieczeństwo przegrzania mieszaniny reakcyjnej.

Bardzo korzystną cechą MIBK jest jego niemieszalność z wodą, co umożliwia, w przypadku reagentów niewrażliwych na wodę, łatwe wydzielenie produktów reakcji z mieszaniny poreakcyjnej, przez dodanie wody i rozpuszczenie wydzielonych w trakcie reakcji soli. Po rozwarstwieniu się mieszaniny na dwie fazy produkty reakcji znajdują się w warstwie organicznej, a sole, stanowiące balast i utrudniające dalsze oczyszczanie, przechodzą do warstwy wodnej. Wydzieloną warstwę organiczną można następnie oczyszczać znanymi sposobami [59, 61].

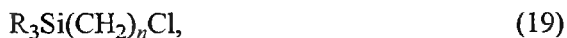
Mieszanina produktów może być rozdzielona za pomocą destylacji, jakkolwiek jest to bardzo trudne [53]. W przypadku związków krzemooorganicznych, zawierających grupy metylowe przy krzemie zamiast wrażliwych na wilgoć i łatwo ulegających rozkładowi grup alkoksylowych, możliwe jest zastosowanie innych

metod oczyszczania umożliwiających otrzymanie bardzo czystych substancji. 3-podstawione pochodne acetyloacetonu tworzą kompleksy z miedzią, co umożliwia ich oddzielenie od produktów O-alkilowania, które nie wykazują właściwości kompleksujących [61]. Po oddzieleniu kompleksu miedzi i destylacji pozostałości otrzymany produkt O-alkilowania charakteryzował się bardzo wysoką czystością [52]. Z wydzielonego kompleksu Cu(II) izolowano produkt C-alkilowania przez wytrząsanie z 3 N wodnym roztworem HCl. W tych warunkach jony miedzi(II) przechodzą do warstwy wodnej. Równocześnie pozostałości produktów O-alkilowania ulegają rozkładowi [62]. Po destylacji warstwy organicznej otrzymuje się bardzo czysty produkt C-alkilowania [61].

W celu usunięcia jonów miedzi(II) z kompleksu z 3-podstawioną pochodną acetyloacetonu, zamiast roztworu kwasu można zastosować żywicę jonowymienną – kationit [63].

Reasumując, w celu efektywnego otrzymania krzemorganicznej pochodnej acetyloacetonu z chloroalkilosilanów, należy prowadzić reakcję w polarnych rozpuszczalnikach typu DMF, DMSO, NMP lub MIBK w temp. ok. 100 °C, stosując sodowe lub potasowe sole acetyloacetonu w ilości 0,8–1,0 mola na 1 mol silanu. W zależności od rodzaju otrzymanego produktu można stosować różnorodne, bardzo efektywne metody oczyszczania.

Metoda okazała się na tyle uniwersalna, że pozwoliła na otrzymanie całej serii krzemorganicznych 3-podstawionych pochodnych acetyloacetonu [52]. Do syntez wykorzystano pochodne krzemorganiczne o ogólnym wzorze:



gdzie R = CH₃, CH₃O lub C₂H₅O, n = 1 lub 3.

Metoda umożliwia uzyskanie produktów z dobrymi wydajnościami i selektywnościami w przypadku gdy w substracie krzemorganicznym łańcuch alkilowy między chlorem a grupą sililową zawiera 3 węgle (n = 3). Przy krótszym łańcuchu (n = 1) wydajności są wyraźnie niższe, czas reakcji dłuższy, a selektywność gorsza (powstaje więcej produktu O-alkilowania). Stosunkowo duża grupa sililowa przy atomie węgla, na którym przebiega reakcja, stanowi zawadę przestrzenną, utrudniającą podstawienie, co jest typowym zjawiskiem obserwowanym w przypadku reakcji typu S_N2.

Otrzymanie produktów, gdzie n = 2, jest niemożliwe ze względu na brak odpowiednich substratów. Są one niestabilne ze względu na tzw. β -eliminację i pękanie wiązania między węglem a krzemem [21]. Z tych samych powodów nie można otrzymać 3-podstawionych pochodnych acetyloacetonu, w których krzem związany jest bezpośrednio z węglem grupy metylenowej.

W przypadku trzywęglowego łańcucha węglowodorowego (n = 3) praktycznie nie obserwuje się wpływu grup związanych z krzemem na wydajność i selektywność reakcji [52].

2. IDENTYFIKACJA KRZEMOORGANICZNYCH POCHODNYCH DIKETONÓW

Ze względu na równowagę formy ketonowej i enolowej oraz częściowe nakładanie się sygnałów występuje wiele problemów związanych z bezpośrednią interpretacją widm H^1NMR oraz widm IR. Aby jednoznacznie przypisać sygnały odpowiednim protonom w widmie H^1NMR , wykorzystano odpowiednie modele pochodne [52].

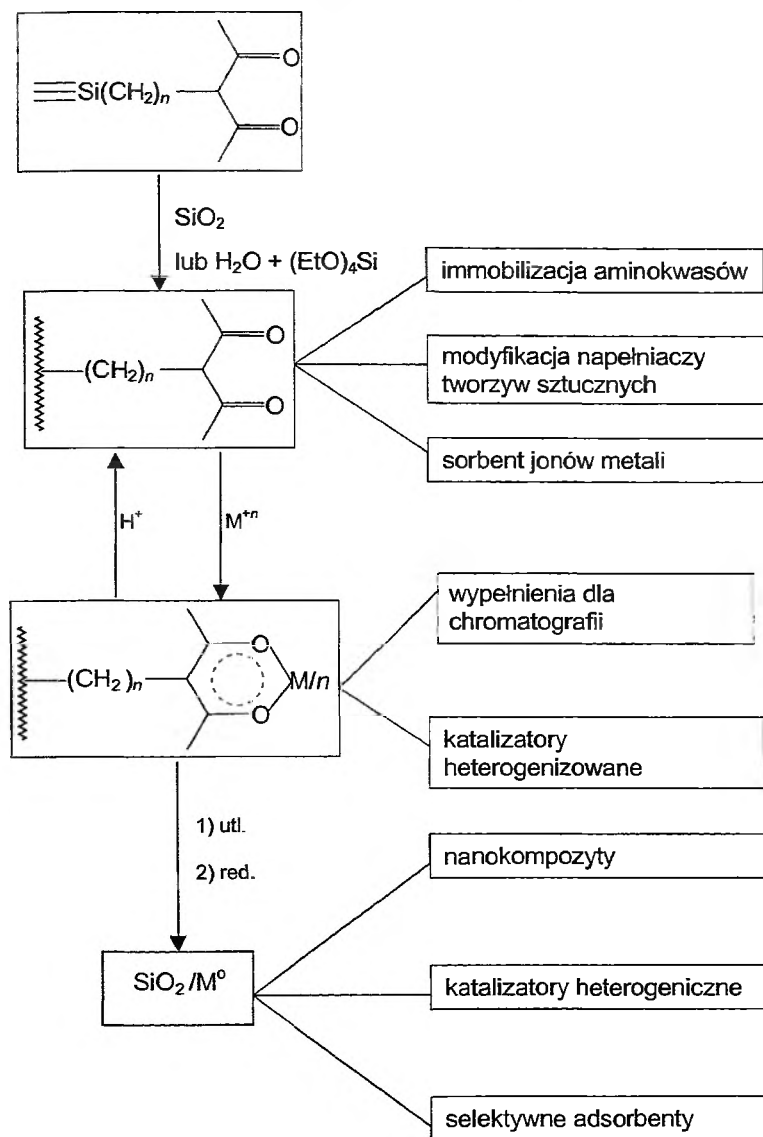
Integracja sygnału protonu przy węglu grupy metylenowej (3,3–3,7 ppm forma ketonowa) i sygnału protonu grupy OH (16,7–17,2 ppm) dla formy enolowej pochodnych trimetylosililowych wykazała, że stosunek formy ketonowej do enolowej (w CCl_4) wynosi odpowiednio 65% do 35%. W przypadku pochodnych trietoksylowych sygnał protonu przy węglu grupy metylenowej częściowo nakłada się na sygnał protonów $-CH_2-$ grupy etylowej, jednakże przez porównanie widm można przyjąć, że także w tym przypadku stosunek ten jest podobny. W widmie IR pasmami charakterystycznymi dla 3-podstawionych pochodnych acetyloacetonu są pasma przy 1625 cm^{-1} (sym.) oraz 1725 cm^{-1} (asym.) przypisane grupie karbonylowej oraz pasmo w pobliżu 1600 cm^{-1} przypisane grupie $C=C$. W tym samym zakresie występuje pasmo absorpcji dla grupy karbonylowej połączonej wiązaniem wodorowym z protonem $C=O \cdots H-$. Absorpcja grupy $C=C-O$ występuje w zakresie 1675 cm^{-1} .

Wszystkie te ugrupowania są obecne zarówno w produktach C-alkilowania, jak i O-alkilowania. Tak więc identyfikacja produktów za pomocą metody IR nigdy nie jest jednoznaczna. Wydaje się, że rozstrzygającym sposobem identyfikacji jest stwierdzenie obecności sygnału protonu grupy $-OH$ formy enolowej, który w widmie H^1NMR występuje dla β -diketonów w zakresie ok. 15–17 ppm. Należy podkreślić, że w większości prac poświęconych syntezie krzemorganicznych pochodnych acetyloacetonu nie identyfikowano w ten sposób otrzymanych produktów, opierając się głównie na wynikach analizy IR [11, 13, 14].

3. ZASTOSOWANIE KRZEMOORGANICZNYCH POCHODNYCH DIKETONÓW

Możliwości zastosowania krzemorganicznych pochodnych β -diketonów związane są przede wszystkim z obecnością w cząsteczce reaktywnych grup sililowych, mogących reagować z grupami hydroksylowymi nieorganicznych nośników lub tworzyć polimery polisiloksanowe, tak jak to przedstawiono na schemacie 2, oraz grupy diketonowej, która z kolei może reagować z różnymi czynnikami, tak jak to przedstawiono na schemacie 1.

Główne kierunki zastosowania wykorzystujące powyższe właściwości ilustruje schemat 6, w którym poszczególne grupy zastosowań są ze sobą powiązane wspólnym materiałem wyjściowym, tzn. nośnikiem modyfikowanym związanymi z powierzchnią grupami β -diketonowymi.

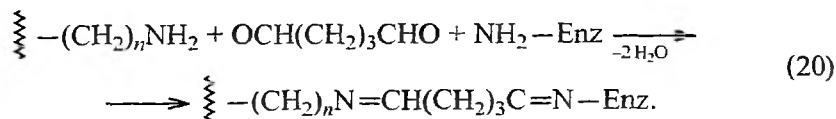


Schemat 6. Reakcje i zastosowania związków krzemooorganicznych z grupami β -diketonowymi

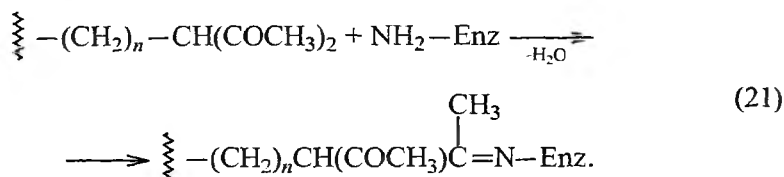
3.1. IMMOBILIZACJA AMINOKWASÓW

Wykorzystanie nierozpuszczalnych modyfikowanych matryc do immobilizacji prostych i złożonych aminokwasów, enzymów i podobnych związków, jest jednym z najdynamiczniej rozwijających się kierunków nowoczesnej biotechnologii. Jako matryce stosowane są różnego rodzaju polimery organiczne lub mate-

riały nieorganiczne modyfikowane grupami reagującymi z aminokwasami. Wśród matryc nieorganicznych preferowane są szczególnie szkła porowate lub krzemionki modyfikowane silanami, zwłaszcza aminosilanem [43]. Jednak taka modyfikacja nie jest wystarczająca do związania z matrycą aminokwasu lub enzymu za pomocą grupy aminowej. W tym celu matryca musi być dodatkowo aktywowana np. aldehydem glutarowym [64, 65].



Zastosowanie silanu z grupą β -diketonową umożliwia wiązanie aminokwasów lub enzymów w procesie jednoetapowym, gdyż grupa aminowa bardzo łatwo reaguje z grupą karbonylową diketonu [66].



3.2. MODYFIKACJA NAPEŁNIACZY TWORZYW SZTUCZNYCH

Napełniacze stosowane w kompozytach polimerowych poddaje się modyfikacji tzw. promotorami adhezji w celu poprawienia właściwości przerobowych i użytkowych [10, 67]. Podstawową grupą związków stosowaną w tym celu są różnego typu silany, głównie z grupami aminowymi i winylowymi [10, 43, 67, 68]. Ciągłe jednak poszukiwane są nowe promotory adhezji spełniające rosnące wymagania przemysłu [69–71].

Również silany z grupą diketonową zastosowano w roli promotorów adhezji, np. w celu zwiększenia przyczepności warstwy żywicy epoksydowej do powierzchni aluminium [13] lub szkła [14]. Poza bezpośrednim wykorzystaniem ogromne możliwości tkwią w przekształceniu grup β -diketonowych, tak jak to przedstawiono na schemacie 1. Można w ten sposób zmienić właściwości grupy funkcyjnej odpowiednio do potrzeb oraz charakterystyki polimeru.

3.3. SORBENT JONÓW METALI

Właściwości chelatujące grup β -diketonowych wykorzystano do rozdzielania jonów metali za pomocą chromatografii kolumnowej [72], z powodzeniem rozdzielając kationy Cu(II), Co(II) i Cd(II). Taka właściwość odwracalnego sorbowania metali z roztworów może mieć także zastosowanie do wstępnej koncentracji jonów metali w analizie śladowej [73].

3.4. FAZY STACJONARNE DLA CHROMATOGRAFII

Kompleksacyjna chromatografia gazowa jest w ostatnich latach jednym z intensywniej rozwijających się działów chromatografii. W szczególności dotyczy to syntezy wypełnień, na powierzchni których osadzone są związki organiczne z grupami funkcyjnymi zdolnymi do oddziaływań elektronowo-donorowo-akceptorowych [74–77]. Cechą charakterystyczną tego typu wypełnień, najczęściej zawierających koordynacyjnie związany jon metalu, jest ich wysoka selektywność pozwalająca na rozdział mieszanin związków wykazujących jedynie subtelne różnice w budowie, a więc wszelkiego typu izomerów, z izomerami optycznymi łącznie [76, 77].

Wypełnienia, w których metale przejściowe immobilizowano na nośniku za pomocą grup β -diketonowych, okazały się niezwykle efektywne w rozdzielach wielu grup związków organicznych [78–85]. Właściwości rozdzielcze wypełnień kształtowano osadzając na krzemionce różne metale zarówno w formie soli np. typu MCl_2 , jak i kompleksów typu $M(acac)_2$ lub $M(hfac)_2$ ($hfac$ -heksafluoroacetyloaceton), gdzie M to $Cu(II)$ [78, 79, 82], $Co(II)$ i $Ni(II)$ [80, 81, 83] oraz $Pd(II)$ [78, 79] i $Cr(III)$ [86]. Na podstawie badań fizykochemicznych i spektroskopowych stwierdzono, że jon metalu kompleksowany jest głównie za pomocą jednej grupy związanej z krzemionką [86]. Dla zastosowań w chromatografii taki sposób wiązania metalu jest korzystny ze względu na dostępność centrum metalicznego dla sorbatu [76].

3.5. KATALIZATORY HETEROGENIZOWANE

Wiele rozpuszczalnych kompleksów metali przejściowych ma zastosowanie jako katalizatory homogeniczne, wykazując niezwykle wysoką aktywność i selektywność. Jednakże ze względów technologicznych w instalacjach przemysłowych chętniej stosowane są katalizatory heterogeniczne. M.in. dlatego opracowano wiele metod przeprowadzania katalizatorów homogenicznych w formę nierozpuszczalną. W tzw. katalizatorach heterogenizowanych rozpuszczalny kompleks związany jest z nierozpuszczalnym nośnikiem za pomocą mostka węglowodorowego [87–91].

W przypadku nośników nieorganicznych wykorzystywane są różnego rodzaju silany zawierające reaktywną grupę sililową oraz grupę mającą właściwości kompleksujące. Najczęściej jest to grupa fosfinowa. Podstawową wadą ligandów fosfinowych jest ich wrażliwość na tlen prowadząca w efekcie do dezaktywacji katalizatora. Ligandy z grupą β -diketonową są znacznie bardziej odporne na utlenianie, wykazując równocześnie doskonałe właściwości chelatujące.

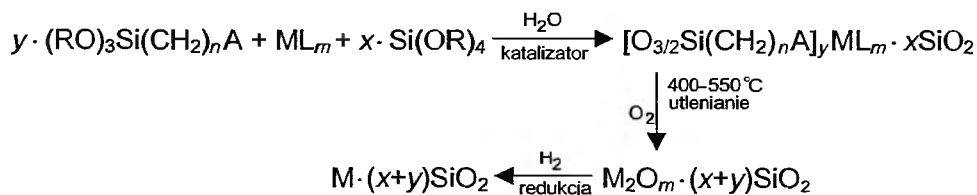
Kompleksy rodu(I) immobilizowane na powierzchni krzemionki za pomocą silanu z grupą β -diketonową z powodzeniem zastosowano w syntezie podstawowych olefin przez reakcję alkenów i diazoalkanów [92], a także w reakcji uwodornienia i hydrosililowania oktenu, gdzie heterogenizowane katalizatory rodo-

we wykazały nawet trzykrotnie wyższą aktywność niż ich homogeniczne odpowiedniki [93].

Kompleksy niklu(II) immobilizowane za pomocą grup β -diketonowych okazały się efektywnymi katalizatorami reakcji trietoksylanu z winylotrietoksylanem [86, 94]. W tym przypadku aktywność katalizatorów heterogenizowanych była niższa niż odpowiedników homogenicznych, jednakże były bardziej stabilne, co umożliwiło ich kilkakrotne użycie. Natomiast kompleksy rozpuszczalne w warunkach reakcji bardzo szybko ulegały redukcji do metalicznego niklu [95].

3.6. MATERIAŁY ZAWIERAJĄCE ZDYSPERGOWANE METALE

Materiały zawierające równomiernie rozproszone (zdyspergowane) w matrycy nieorganicznej, np. krzemionkowej, cząsteczki metalu o kontrolowanej i jednorodnej wielkości określanej w nanometrach, nazywane są często „nanokompozytami” [96, 97]. Najefektywniejszym sposobem otrzymywania nanokompozytów jest metoda zol-żel [98–100]. Aby otrzymać kompozyty zawierające bardzo małe cząstki metalu, ewentualnie jego tlenku, niezbędne jest utrzymanie praktycznie idealnej, molekularnej dyspersji związku metalu w trakcie formowania nieorganicznego szkieletu. W procesie otrzymywania żelu najczęściej stosuje się mieszaninę tetraetoksylanu oraz dwufunkcyjnych silanów typu $(\text{RO})_3\text{Si}(\text{CH}_2)_n\text{A}$. Grupa trialkoksylilowa wraz z tetraetoksylanem w wyniku hydrolizy i kondensacji tworzy szkielet krzemionkowy, natomiast grupa „-A” kompleksuje jon metalu wprowadzonej do układu soli. Obie grupy połączone są łańcuchem węglowodorowym dowolnej długości, najczęściej $n = 1$ lub 3. Po utlenieniu w podwyższonej temperaturze składników organicznych oraz redukcji wodorem utworzonego tlenku metalu powstaje materiał, w którym silnie rozdrobniony metal jest równomiernie zdyspergowany w nieorganicznej matrycy krzemionkowej. Przedstawiono to na schemacie 7.



Schemat 7. Otrzymywanie metalu zdyspergowanego w krzemionce

Najczęściej do otrzymywania nanokompozytów wykorzystywane są silany z grupami aminowymi. Grupy aminowe tworzą z większością metali kompleksy stosunkowo słabe, w związku z czym są one także słabo stabilizowane w trakcie utleniania części organicznej. Otrzymane w ten sposób nanokompozyty zawierają przeważnie cząsteczki metalu o wielkości ok. 10–30 nm [97]. Zastosowanie silanów z grupą diketonową, tworzącą z metalami trwałe kompleksy chelatowe,

pozwoili na otrzymanie nanokompozytów o bardzo małych i równomiernych cząstkach metalu. W przypadku niklu średnia wielkość cząstek wynosiła 2–3 nm [97, 101]. Zmniejszenie wielkości cząstek dodatnio wpływa na katalityczne właściwości metali osadzonych na nośnikach [102, 103]. Dlatego nanokompozyty zawierające bardzo silnie rozdrobniony metal równomiernie zdyspergowany w nieorganicznej matrycy są niezwykle interesującym materiałem do zastosowania w roli katalizatorów heterogenicznych. Poza tym mogą mieć zastosowanie w elektronice [104] lub jako materiały o właściwościach magnetycznych [105]. Wysoka aktywność silnie rozdrobnionych metali może być także wykorzystana przy produkcji pochłaniaczy tlenu stosowanych w opakowaniach do żywności [106].

Przedstawione powyżej przykłady wskazują jedynie główne kierunki zastosowań związków krzemorganicznych z grupami β -diketonowymi i nie wyczerpują wszystkich możliwości ich wykorzystania, w szczególności związanych z przekształceniem grupy diketonowej, tak jak to przedstawiono na schemacie 1. Obszerne omówienie jednej z reakcji tego typu, tzn. przekształcenie krzemorganicznych diketonów w pochodne ketoiminowe (reakcja (b) na schemacie 1) będzie przedmiotem odrębnego opracowania.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] D.E. Fenton, [w:] *Comprehensive Coordination Chemistry*, G. Wilkinson (red.), Pergamon Press, Oxford 1987, 2, rozdz. 23.
- [2] A.J. Waring, [w:] *Comprehensive Organic Chemistry*, D. Barton, D. Ollis (red.), Pergamon Press, Oxford 1979, 1, rozdz. 5.2.
- [3] R.C. Mehrotra, R. Bohra, D.P. Gaur, *Metal β -diketonates and allied derivatives*, Academic Press, London 1978.
- [4] A.R. Siedle, [w:] *Comprehensive Coordination Chemistry*, G. Wilkinson (red.), Pergamon Press, Oxford 1987, 2, rozdz. 15.4.
- [5] G. Künstle, [w:] *Ullmans Encyklopädie der Technische Chemie*, Verlag Chemie, Weinheim 1982, 14, 41.
- [6] W. Noll, *Chemie und Technologie der Silicone*, Verlag Chemie, Weinheim 1968.
- [7] H.R. Kricheldorf (red.), *Silicon in Polymer Synthesis*, Springer, Berlin 1996.
- [8] U. Deschler, P. Kleinschmit, P. Panster, *Angew. Chem. Int.*, 1986, 25, 236.
- [9] W.A. Mottola, J.R. Steinmetz (red.), *Chemically Modified Surfaces*, Elsevier, Amsterdam 1992.
- [10] E.P. Plueddemann, *Silane Coupling Agents*, Plenum Press, New York 1982.
- [11] K.G. Allum, R.D. Hancock, I.V. Howell, S. McKenzie, R.G. Pitkethly, P.J. Robinson, *J. Organomet. Chem.*, 1975, 87, 203.
- [12] K.G. Allum, R.D. Hancock, I.V. Howell, S. McKenzie, R.G. Pitkethly, P.J. Robinson, *J. Catal.*, 1976, 43, 322.
- [13] G. Fort, *Brit. Pat. Appl.*, 1,473,335 [Chem. Abstr. 87 (1977) 135899s].
- [14] H. Yoshioka, K. Sato, M. Yamaya, A. Itagaki, *Eur. Pat. Appl.*, EP 286.387 [Chem. Abstr. 110 (1989) 75793j].
- [15] B. Marciniak (red.), *Hydrosililowanie*, PWN, Warszawa 1981, rozdz. 3.6.
- [16] B. Marciniak, J. Guliński, W. Urbaniak, *Hydrosilylation*, Pergamon Press 1991, rozdz. 3.
- [17] J. Ojima, Y. Nagai, *J. Organometal Chem.*, 1973, 57, C42.

- [18] R. Kuwano, M. Sawamura, J. Shirai, M. Takahashi, Y. Ito, *Tetrahedron Lett.*, 1995, **36**, 5239.
- [19] D. Yu. Lyshenko, L.A. Belyakova, *React. Kinet. Catal. Lett.*, 1993, **50**, 333.
- [20] L.H. Sommer, R.P. Pioch, *J. Am. Chem. Soc.*, 1954, **76**, 1606.
- [21] S. Pawlenko, *Organosilicon Chemistry*, de Gruyter, Berlin 1986.
- [22] N.V. Komarov, V.K. Roman, *Zh. Obshch. Khim.* 1965, **35**, 2017.
- [23] A. Hofer, H. Kuckertz, M. Sander, *Macromol. Chem.*, 1966, 90.
- [24] M. Sander, H. Kuckertz, *Ger. Pat.* 1,202,78. [Chem. Abstr. 65 (1966) 3398c].
- [25] M. Sander, H. Kuckertz, *Ger. Pat.* 1,242,877 [Chem. Abstr. 68 (1969) 3064m].
- [26] T.M. Shepherd, *Chem. Ind.*, 1970, 567.
- [27] H.O. House, *Nowoczesne reakcje syntezy organicznej*. PWN, Warszawa 1979, rozdz. 9.
- [28] A.W. Johnson, E. Markham, R. Price, *Org. Syntheses*, 1962, **42**, 75.
- [29] A.L. Kurts, N.K. Genkina, A. Macias, I.P. Beletskaya, O.A. Reutov, *Tetrahedron*, 1971, **29**, 4777.
- [30] W.J. Noble, F.H. Morris, *J. Org. Chem.*, 1969, **34**, 1969.
- [31] B.C. Ranu, S. Bhar, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 1992, 365.
- [32] P. Boldt, H. Militzer, *Tetrahedron Lett.*, 1966, **30**, 3599.
- [33] J.H. Clark, J.M. Miller, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 1977, 1743.
- [34] R.M. Moriarty, R.K. Vaid, T.R. Kasaulinga, B.K. Vaid, T.E. Hopkins, *Tetrahedron*, 1988, **44**, 1603.
- [35] O. Suzuki, S. Inone, K. Sato, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1989, **62**, 239.
- [36] S.W. Zhang, T. Mitsudo, T. Kondo, Y. Watanabe, *J. Organometal. Chem.*, 1993, **450**, 197.
- [37] K. Okuro, M. Furumune, M. Miura, M. Nomura, *J. Org. Chem.*, 1993, **58**, 7606.
- [38] M. Mukhopadhyay, J. Iqbal, *Tetrahedron Lett.*, 1995, **36**, 6761.
- [39] C.P. Fei, T.H. Chan, *Synthesis*, 1982, 467.
- [40] C. Cattivola, F. Figueras, J.I. Garcia, J.A. Mayoral, M.M. Zurbano, *Synth. Commun.*, 1995, **25**, 1745.
- [41] M.T. Ismail, *Bull. Chem. Soc. France*, 1987, **3**, 438.
- [42] J. Marquet, M. Moreno-Manas, *Synthesis*, 1979, 348.
- [43] J. Guliński, H. Maciejewski, *Chemik*, 1998, **51**, 119.
- [44] B. Marciniak, J. Guliński, *Polimery*, 1992, **37**, 72.
- [45] G.V. Lisichkin, G.V. Kudryavtsev, *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, 1979, **247**, 117.
- [46] A.Ya. Yuffa, V.V. Berentsveig, G.V. Kudryavtsev, G.V. Lisichkin, *Kinet. Katal.*, 1981, **22**, 1469.
- [47] G.V. Lisichkin, G.V. Kudryavtsev, L.N. Nesterenko, *Zh. Anal. Khim.*, 1983, **38**, 1684.
- [48] G.V. Kudryavtsev, V.M. Ivanov, G.V. Lisichkin, *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, 1980, **250**, 635.
- [49] G.V. Kudryavtsev, G.V. Lisichkin, V.M. Ivanov, *Zh. Anal. Khim.*, 1983, **38**, 22.
- [50] D.S. Kendall, D.E. Leyden, L.W. Burggraf, F.J. Pern, *Appl. Spectrosc.*, 1982, **36**, 436.
- [51] B. Marciniak, Z.W. Kornetka, W. Urbaniak, *J. Mol. Catal.* 1981, **12**, 221.
- [52] W. Urbaniak, U. Schubert, *Liebigs Ann. Chem.* 1991, 1221.
- [53] S.T. Yoffe, K.V. Vatsuro, E.E. Kugutcheva, M.J. Kubachnik, *Tetrahedron Lett.*, 1965, **10**, 593.
- [54] W. Urbaniak, U. Schubert, *Patent RP 165113* [Chem. Abstr.125 (1995) 276179x].
- [55] W. Urbaniak, U. Schubert, *Patent RP 165181* [Chem. Abstr. 125 (1995) 276180r].
- [56] J. March, *Chemia organiczna. Reakcje, mechanizmy, budowa*, WNT, Warszawa 1975, rozdz. 10.
- [57] W. Urbaniak, *Technologia produkcji 3-(3-trietoksylopropylo)acetyloacetonu w skali 10 ton/rok*, Sprawozdanie z projektu badawczego 701979101, Poznań 1993.
- [58] M.O. Farrel, C.H. Van Dyke, L.J. Boucher, S.J. Metlin, *J. Organometal Chem.*, 1979, **172**, 367.
- [59] W. Urbaniak, *Polskie zgł. pat.* P-338677, 1998.
- [60] L.W. Reeves, *Canadian J. Chem.*, 1957, **35**, 1351
- [61] W. Urbaniak, *Polskie zgł. pat.* P-330680, 1998.

- [62] G.L. Linden, M.F. Faron, J. Catal., 1977, 48, 284.
- [63] W. Urbaniak, Polskie zgł. pat., (2001).
- [64] H.H. Weetall, [w:] *Immobilized Enzymes for Industrial Reactors*. R.A. Messing (red.), Academic Press, New York 1975.
- [65] F. Janowski, G. Fischer, W. Urbaniak, Z. Foltynowicz, B. Marciniak, J. Chem. Tech. Biotechnol., 1991, 51, 263.
- [66] W. Urbaniak, B. Gierczyk, Polskie zgł. pat. P-324147, 1997.
- [67] K.L. Mittal (red.), *Silanes and Other Coupling Agents*, VSP, Utrecht 1992.
- [68] B. Marciniak, J. Guliński, J. Mirecki, Z. Foltynowicz, Polimery, 1990, 35, 213.
- [69] H. Maciejewski, J. Guliński, B. Marciniak, Polimery, 1998, 43, 74.
- [70] W. Urbaniak, B. Marciniak, Polimery, 1998, 43, 148.
- [71] H. Maciejewski, J. Guliński, B. Marciniak, Polimery, 1998, 43, 219.
- [72] M. Ślebioda, Z. Wodecki, A.M. Kołodziejczyk, W. Nowicki, Chem. Anal., 1994, 39, 149.
- [73] C. Kantipuly, S. Katragodda, A. Chow, H.D. Gesser, Talanta, 1990, 37, 491.
- [74] V. Schurig, Chromatographia, 1980, 13, 263.
- [75] C.F. Pool, S.K. Pool, *Chromatography Today*, Elsevier, Amsterdam 1992.
- [76] W. Wasiak, *Chemicznie związane kompleksy metali przejściowych jako fazy stacjonarne dla chromatografii gazowej*, Wyd. UAM, Poznań 1988.
- [77] K.K. Unger, *Packings and Stationary Phases in Chromatographic Techniques*, Marcel Dekker Inc., New York 1990.
- [78] W. Wasiak, W. Urbaniak, J. Obst, R. Wawrzyniak, Acta Chromatographica, 1992, 1, 56.
- [79] I. Rykowska, R. Wawrzyniak, W. Wasiak, Chem. Anal., (Warsaw), 1994, 39, 335.
- [80] W. Wasiak, I. Rykowska, J. Chromatography A, 1996, 723, 313.
- [81] W. Wasiak, I. Rykowska, Acta Chromatographica, 1997, 7, 88.
- [82] W. Wasiak, I. Rykowska, Chromatographia, 1998, 48, 284.
- [83] W. Wasiak, I. Rykowska, J. Chromatography A, 1997, 773, 209.
- [84] W. Wasiak, W. Urbaniak, Patent RP 167702 [Chem. Abstr. 124 (1994) 359569e].
- [85] W. Wasiak, W. Urbaniak, Patent RP 168209 [Chem. Abstr. 124 (1994) 359568d].
- [86] W. Urbaniak, I. Rykowska, Applied Catal. A (wysłane do druku).
- [87] M. Čapka, Collect. Czech. Chem. Commun., 1990, 55, 2803.
- [88] F.R. Hartley, *Supported Metal Complexes*, Reidel, Dordrecht 1985.
- [89] F. Ciardelli, E. Tsuchida, D. Wöhrle (red.), *Macromolecule-Metal Complexes*, Springer, Berlin 1996.
- [90] M.G.L. Petrucci, A.K. Kakkar, Adv. Mater., 1996, 8, 251.
- [91] E. Lindener, T. Schneller, F. Auer, H.A. Mayer, Angew. Chem. Int., 1999, 38, 2154.
- [92] H. Werner, U. Möhring, J. Organometal Chem., 1994, 475, 277.
- [93] M. Čapka, M. Czakoova, W. Urbaniak, U. Schubert, J. Mol. Catal., 1992, 74, 335.
- [94] W. Urbaniak, B. Marciniak, H. Maciejewski, Polskie zgł. pat. P-330674.
- [95] B. Marciniak, H. Maciejewski, J. Guliński, B. Maciejewska, W. Duczmal, J. Organometal Chem., 1996, 521, 245.
- [96] R.A. Roy, R. Roy, Mat. Res. Bull., 1984, 19, 169.
- [97] U. Schubert, B. Breitscheidel, H. Buhler, Ch. Egger, W. Urbaniak, Mat. Res. Soc. Symp. Proc., 1992, 271, 621.
- [98] L.L. Hench, J.K. West, Chem. Rev., 1990, 90, 33.
- [99] C.J. Brinker, G. Scherer, *Sol-Gel Processing*, Academic Press, Boston 1990.
- [100] U. Schubert, New J. Chem., 1994, 18, 1049.
- [101] W. Urbaniak, Z. Foltynowicz, Polskie zgł. pat. P-330678, 1998.
- [102] M. Che, C.O. Bennett, Adv. Catal., 1989, 36, 55.
- [103] J.A. Moulijn, P.W.N.M. Van Leenwen, R.A. Van Santen, *Catalysis, An Integrated Approach to Homogeneous, Heterogeneous and Industrial Catalysis*, Elsevier, Amsterdam 1993, rozdz. 9.

- [104] P. Marquardt, G. Nimtz, B. Mühlischlegel, *Solid State Comm.*, 1998, **65**, 539.
[105] H. Henglein, *Top. Curr. Chem.*, 1988, **143**, 113.
[106] B. Czerniawski, J. Michniewicz, *Opakowania żywności*, *Agro Food Technology*, 1998, 953.

Praca wpłynęła do Redakcji 16 lutego 2001

**ENZYMATYCZNA DEGRADACJA
ZWIĄZKÓW CHLOROWCOORGANICZNYCH**
ENZYMATIC DEGRADATION
OF HALOGENATED ORGANIC COMPOUNDS

Andrzej Lewandowicz

*Instytut Techniki Radiacyjnej, Wydział Chemiczny Politechniki Łódzkiej
ul. Żeromskiego 116, 90-924 Łódź*

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Dehalogenacja redukcyjna i halorespiracja

1.1. Dejodynacja u ssaków

2. Dehalogenacja katalizowana przez dehydratazy dehalogenujące

3. Dehydrodehalogenacja

4. Dehalogenacja tiolityczna

5. Dehalogenacja oksygenolityczna

6. Fenolooksydazy i sprzężanie oksydacyjne

7. Dehalogenacja hydrolityczna

7.1. Dehalogenazy 2-halokwasowe

7.2. Dehalogenaza fluorooctanowa

7.3. Dehalogenaza 4-chlorobenzoilo-CoA

7.4. Dehalogenazy haloalkanowe

7.5. Dehalogenaza haloalkanowa z *Xanthobacter autotrophicus* GJ10

7.6. Dehalogenaza haloalkanowa z *Rhodococcus rhodochrous*

8. Dehalogenacja kometaboliczna

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane



Mgr inż. Andrzej Lewandowicz urodził się w 1974 r. w Łodzi. W 1997 r. ukończył studia na Wydziale Chemicznym Politechniki Łódzkiej, uzyskując tytuł mgra inż. i podejmując studia doktoranckie na Wydziale Chemicznym Politechniki Łódzkiej. Tematem jego pracy doktorskiej są badania nad efektami izotopowymi chloru reakcji katalizowanych przez dehalogenazy.

Jest również absolwentem Wydziału Lekarskiego Akademii Medycznej w Łodzi, którą ukończył w 2000 r., uzyskując tytuł lekarza medycyny.

ABSTRACT

Degradation of the halogenated organic compound poses ecological, sanitary, as well as synthetic and other problems. Enzymatic degradation of these compounds seems to be a promising option.

There are many natural sources of the chlorinated organic compounds, as well as those connected with human activity. The first source dominates [1], however, human production cannot be ignored, due to the considerable toxicity of the compounds produced and their dissemination [2].

The mechanisms, by which enzymes called dehalogenases catalyze halogen-carbon bond breaking vary. Dehalogenases following different pathways were isolated from many microorganisms [20-48, 55-58]. Their substrates are usually involved in halorespiration processes, so dehalogenation is also involved in carbon source and energy supply [21-22, 27, 39]. Moreover, cometabolic dehalogenation is possible [106, 125-133]. Dehalogenases are also present in mammals. For example, iodine dehalogenases (so called deiodinases) are necessary for thyroid hormones homeostasis [15, 52-56].

Hydrolytic dehalogenases are currently the most studied among all classes of dehalogenases. They include such unusual enzymes as 4-chlorobenzoil-CoA dehalogenase [88-95], which is capable of breaking chlorine-aromatic carbon bond at room temperature and neutral pH, and fluoroacetate dehalogenase which cleaves the carbon-fluorine bond [81-87]. For some of these enzymes three-dimensional structures are available now and mechanistic details have been studied [85, 93, 103-106, 123]. This contribution summarizes the present knowledge of enzymatic catalysis of this unusual chemical processes with special consideration on reaction mechanism of the best known hydrolytic dehalogenases [73-123].

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

| | |
|-------|--|
| 4-CBA | – 4-chlorobenzoesan |
| 4-FBA | – 4-fluorobenzoesan |
| 4-HBA | – 4-hydroksybenzoesan |
| BA | – benzoesan |
| CoA | – koenzym A |
| DCE | – 1,2-dichloroetan |
| DDT | – 1,1,1-trichloro-2,2-bis-(4'-chlorofenylo)etan |
| DHaA | – dehalogenaza haloalkanowa z <i>Rhodococcus rhodochrous</i> |
| DHIA | – dehalogenaza haloalkanowa z <i>Xanthobacter autotrophicus</i> GJ10 |
| GSH | – glutation |
| HPO | – halogenopochodne organiczne |
| NADH | – dinukleotydy nikotynoamidoadeninowy |
| PCE | – perchloroetylen |
| TCE | – trichloroetylen |
| TETRA | – tetrachlorometan |
| VC | – chlorek winylu |

WPROWADZENIE

Organiczne związki chlorowcopochodne (halogenopochodne organiczne – HPO) stanowią szeroką grupę substancji zarówno wytwarzanych w wielkich ilościach przez mikroorganizmy, jak i produkowanych przez człowieka. Ocenia się, że w biosferze występuje ponad 2000 różnych naturalnych halogenopochodnych [1]. Wysoka bioaktywność niektórych z nich, a z drugiej strony znaczna trwałość połączeń chlorowcoorganicznych, powodują, że związki te mogą być niebezpieczne dla człowieka i środowiska [2], chociaż należy pamiętać, że HPO stanowią również niezbędne ogniwa w regulacji fizjologicznych procesów biochemicznych.

Toksyczność, w tym rakotwórczość wielu HPO udokumentowano w obszer-nych badaniach klinicznych, dotyczących m.in. powszechnie stosowanych rozpuszczalników chloroorganicznych: czterochlorku węgla, trichloroetenu, dichloroetanu, czterochloroetenu [3–12]. Właściwości rakotwórcze, genotoksyczne i teratogenne zostały bezspornie udokumentowane w przypadku chlorku winylu (VC – *vinyl chloride*) syntezowanego sztucznie, jako półprodukt do syntezy polichlor-ku winylu [13].

Organiczne związki halogenopochodne pełnią też kluczową funkcję w fizjologicznej bądź terapeutycznej regulacji przemian metabolicznych. Halopochodnymi organicznymi o wielkiej aktywności biochemicznej wytwarzanymi naturalnie i syntetycznie są np. antybiotyki, w tym chlorotetracyklina ze *Streptomyces* sp., chloramfenikol z pożywki *Streptomyces venezuelae*, a także substancje o właściwościach grzybobójczych, przeciwnowotworowych i przeciwwirusowych [14]. Niezwykle ważną grupę organicznych związków HPO stanowią hormony tarczycy, trijodotyronina i tyroksyna, oraz ich metabolity diiodotyrozyna i monojodotyrozyna, niezbędne do prawidłowego rozwoju psychicznego i fizycznego człowieka i innych ssaków [15].

Inną, bardzo ważną i interesującą grupę HPO stanowią fluorowane analogi hormonów kory nadnerczy. Modyfikacja naturalnych kortykosteroidów polegająca na wprowadzeniu atomu fluoru w pozycję 9 α wzmacnia ich działanie przeciwzapalne od 5 do 25 razy w porównaniu z niemodyfikowanym, naturalnym gliko-kortykosteroidem hydrokortyzonem, czego przykładem są triamcynolon oraz deksametazon [14].

Badania nad enzymami katalizującymi rozpad chlorowcopochodnych organicznych są w pełni uzasadnione zarówno ze względów poznawczych, jak i zdrowotnych oraz ekologicznych. Istotnym problemem jest znalezienie efektywnych metod degradacji szkodliwych organicznych HPO do związków obojętnych dla środowiska i zdrowia człowieka. Problem detoksyfikacji chlorowcopochodnych organicznych sprowadza się głównie do znalezienia wydajnych i tanich metod rozkładu wiązania węgiel–halogen, a przede wszystkim węgiel–chlor, z powodu największego rozpowszechnienia chloropochodnych organicznych.

Zupełnie odrębnym problemem, wykraczającym poza ramy tego opracowania, jest unieszkodliwianie chlorowcopochodnych organicznych stosowanych ja-

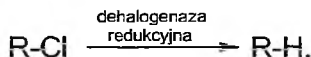
ko chemiczne materiały bojowe. Należy tutaj wymienić przede wszystkim inhibitory acetylocholinoestazy, jak Soman, Sarin, związki zawierające bardzo silne wiązanie fluor-fosfor.

Degradacja halogenopochodnych organicznych katalizowana enzymatycznie stanowi metodę o dużych perspektywach rozwoju, zwłaszcza w związku z możliwościami modyfikacji enzymów zmieniających ich specyficzność oraz aktywność. Co więcej, znalezienie dehalogenaz działających w sposób odwracalny mogłoby otworzyć nową drogę stereo- i regiospecyficznych metod syntezy leków będących związkami halogenopochodnymi. Szczególnie obiecujące mogłoby być zastosowanie „odwracalnych” dehalogenaz hydrolizujących, zdolnych wprowadzić anion chlorowca w miejsce anionu hydroksylowego bez procesu utleniania zachodzącego w typowych procesach chlorowania, co wymaga zabezpieczenia wielu redukujących grup funkcyjnych.

Pierwsze badania nad dehalogencją enzymatyczną sięgające lat 50. dotyczyły enzymów dehalogenujących kwasy halogenoocetowe. Enzymy te znaleziono u *Pseudomonas* sp. [16–18]. Ze względu na duże możliwości praktyczne zastosowań, badania nad dehalogenazami w dalszym ciągu rozwijają się dynamicznie i do chwili obecnej znaleziono wiele mikroorganizmów tlenowych i beztlenowych [19], wytwarzających enzymy katalizujące proces dehalogenacji przebiegający według różnych mechanizmów [20–22, 39]. Z wyjątkiem dehalogenazy z *Mycobacterium tuberculosis* [102], mikroorganizmy mające zdolność metabolizowania HPO znaleziono praktycznie tylko w środowisku zanieczyszczonym pochodnymi chlorowcoorganicznymi.

1. DEHALOGENACJA REDUKCYJNA I HALORESPIRACJA

Reakcje te zostały opisane szczegółowo przez Bedarda i Quensena, a także El Fantroussiego, Mohna oraz Tiedje [23–25]. Dehalogenacja redukcyjna przebiega według ogólnego schematu:

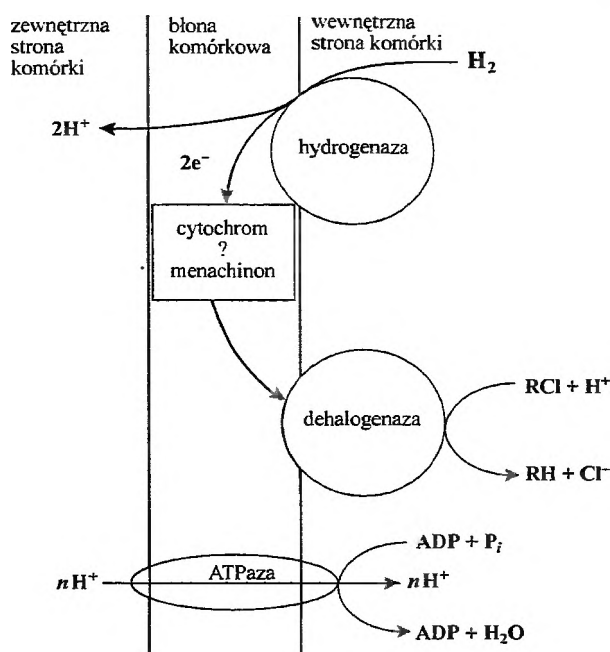


Wykazano, że kofaktorem dehalogenaz redukcyjnych jest układ korynoidalny Co(I) oraz klastery żelazowo-siarczkowe Fe_8S_8 [26].

Chociaż funkcji metabolicznej HPO u mikroorganizmów katalizujących proces dehalogenacji redukcyjnej do końca jeszcze nie wyjaśniono, to ustalono jednak, że dehalogenacja redukcyjna wykorzystywana jest przez wiele bakterii jako źródło energii w procesie tzw. „halorespiracji”.

Zaobserwowano, że potencjały redoks wielu układów halogenopochodna/produkt dehalogenacji, jak np. układu chlorobenzen/benzen (266 mV), tetrachloroeten/trichloroeten (478 mV), mieszczą się w tym samym zakresie co potencjały redoks układu azotan/azotyn (433 mV), znajdującego się u wielu bakterii wiążących azot.

Na tej podstawie wywnioskowano, że chlorowane węglowodory mogą być w odpowiednich warunkach źródłem energii, pełniąc funkcję utleniacza. Zaproponowano model reakcji zachodzących podczas tzw. „halorespiracji” (schemat 1), w której dehalogenacja redukcyjna sprzężona jest z oksydacyjną fosforylacją będącą źródłem ATP [27, 39]. Gradient pH wytwarzany w procesie redukcji, zużywającej jony wodorowe wewnątrz komórki, sprzężony jest z procesem transportu jonów H^+ z zewnątrz komórki i syntezą ATP katalizowaną przez wewnątrz błonową ATP-azę.

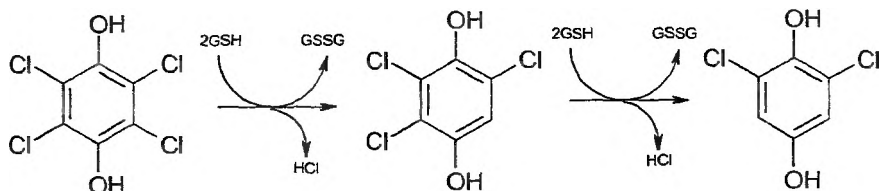


Schemat 1. Proponowany schemat „halorespiracji” na (podstawie [39], za zgodą Wiley-VCH, Weinheim)

Wiele badań nad dehalogenazami redukcyjnymi wiąże się z problemem biodegradacji trójchloroetylenu, czterochloroetylenu, a także chlorku winylu, którego źródłem, oprócz produkcji przemysłowej, może być częściowa biodegradacja czterochloroetylenu i trójchloroetylenu, powszechnie stosowanych rozpuszczalników zanieczyszczających gleby i zbiorniki wodne. W wielu przypadkach redukcja tych halogenopochodnych przez bakterie zdolne do dehalogenacji zatrzymuje się na etapie *cis*-1,2-dichloroetenu lub chlorku winylu, produktu zdecydowanie bardziej toksycznego niż PCE i TCE. Znalezione jednak bakterie produkujące enzymy katalizujące całkowitą redukcję PCE i TCE do etenu [28] oraz enzymy dehalogenujące redukcyjnie chlorek winylu [29–32].

Ważnym problemem wydaje się również biodegradacja aromatycznych halogenopochodnych, w tym chlorofenoli. Enzymem dehalogenującym redukcyjnie tego typu związki i poddawany wielu badaniom jest np. dehalogenaza tetrahy-

drochinonowa konwertująca czterochlorohydrochinon do 2,6-dichlorohydrochinonu w obecności glutationu (schemat 2), znaleziona u bakterii *Sphingomonas chlorophenolica*, dehalogenujących także pięciochlorofenol [33–37].



Schemat 2. Dwustopniowa dehalogenacja czterochlorohydrochinonu

Znaleziono także bakterie zdolne do dehalogenacji redukcyjnej chlorofenolu [27] oraz polichlorowanych bifenyli (PCB) [38–39].

Tab. 1 przedstawia niektóre bakterie zdolne do redukcyjnej dehalogenacji chlorowcopochodnych.

Tabela 1. Przykłady mikroorganizmów dehalogenujących redukcyjnie

| Mikroorganizm | Substrat |
|--|----------------------------------|
| <i>Dehalobacter restrictus</i> [40] <i>Dehalococcoides ethenogenes</i> [41] <i>Desulfitobacterium</i> sp. [42] <i>Dehalospirillum multivorans</i> [43] <i>Phanerochaete chrysosporium</i> [44] | trójchloroeten, czterochloroeten |
| <i>Dehalococcoides ethenogenes</i> [29] | chlorek winylu |
| <i>Phanerochaete chrysosporium</i> [45] | czterochlorek węgla |
| <i>Sphingomonas paucimobilis</i> UT26 [46] | sześciochlorocykloheksan |
| <i>Desulfitobacterium chlororespirans</i> [47] <i>Desulfitobacterium frappieri</i> [48] <i>Desulfitobacterium dehalogenans</i> [49] <i>Desulfomonile tiedjei</i> [50] <i>Rhodopseudomonas palustris</i> [51] | chlorowcowęglowodory aromatyczne |

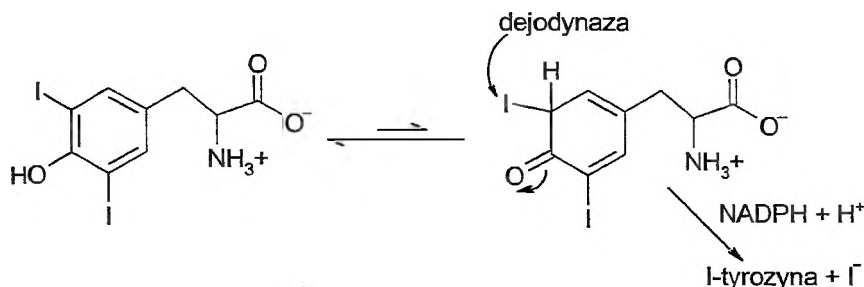
1.1. DEJODYNACJA U SSAKÓW

Interesującym przykładem procesu dehalogenacji redukcyjnej jest dejodynacja monojodotyrozyny i dijudotyrozyny – metabolitów hormonów tarczycy, tyroksyny, trijudotyroniny, zachodząca m.in. w gruczole tarczycy ssaków. Reakcja ta, katalizowana przez dejodynazę jodotyrozynową (EC 3.8.1.4), umożliwia wtórne użycie jodu endogennego [52], co zapobiega objawom endogennej hipotyreozy, stanowi niedoboru tych hormonów [53]. Stwierdzono bowiem, że nieaktywne prekursorzy hormonów tarczycy, 3-monojodotyrozyna (MIT) oraz 3,5-dijodotyrozyna (DIT), powstające przez jodyzację reszt tyrozylowych w zjodowanej tyreoglobulinie, albo zostają wykorzystane do syntezy tyroksyny i trijudotyroniny,

albo, o ile nie zostaną poddane dehalogenacji z udziałem dejodynazy, są wydalane z moczem, co prowadzi do utraty jodu znajdującego się w organizmie [54].

Wykazano jednak, że z kolei nadczynność dejodynazy jodotyroninowej typu III dehalogenującej tyroksynę, zaobserwowana w przypadku niektórych nowotworów, prowadzi do objawów ostrej hipotyreozy [55].

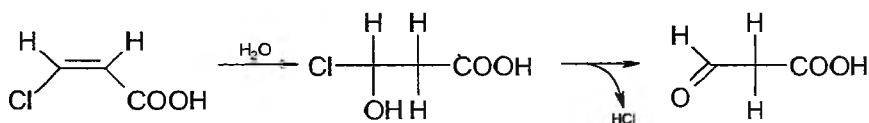
Mechanizm reakcji dejodynacji mono- i diiodotyrozyny przez dejodynazę jodotyrozynową nie został jeszcze poznany, nie została także określona struktura krystalograficzna enzymu. Wiele danych eksperymentalnych dotyczących reakcji dejodynacji wskazuje jednak na mechanizm z udziałem niearomatycznego produktu przejściowego zilustrowanego na schemacie 3 [56].



Schemat 3. Dejodynacja zachodząca prawdopodobnie przez niearomatyczny produkt przejściowy

2. DEHALOGENACJA KATALIZOWANA PRZEZ DEHYDRATAZY DEHALOGENUJĄCE

Istota dehalogenacji katalizowanej przez dehydratazę dehalogenującą polega na addycji cząsteczki wody do nienasyconego wiązania węgiel-węgiel i następnie spontanicznej eliminacji chlorowodoru. Proces ten został zaobserwowany przez Hartmansa w przypadku dehalogenacji kwasu 3-chloroakrylowego [39, 57] (schemat 4).

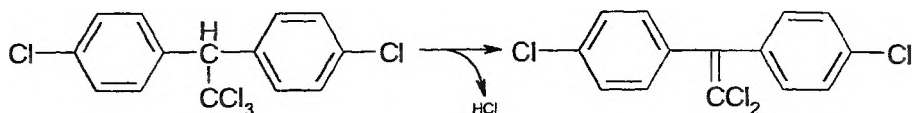


Schemat 4. Dehalogenacja kwasu 3-chloroakrylowego przez dehydratazę dehalogenującą

3. DEHYDRODEHALOGENACJA

Reakcja ta polega na jednoczesnym usunięciu atomu chloru i atomu wodoru z sąsiedniego atomu węgla. Poznano m.in. liazy dehalogenujące w ten sposób DDT (schemat 5), tzw. DDT-dehydrochlorynazę, należącą do S-transferaz gluta-

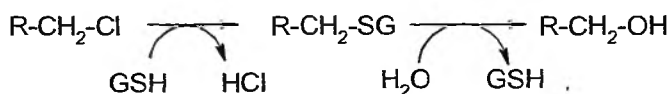
tionowych (EC 4.5.1.1), wytwarzaną przez niektóre owady odporne na ten insektycyd (*Musca domestica*, *Anopheles minimus*) [58–60] a także dehydrochlorynazę 3-chloro-D-alaninową z *Pseudomonas putida* [61].



Schemat 5. Dehydrochlorynacja DDT katalizowana przez DDT-dehydrochlorynazę

4. DEHALOGENACJA TIOLITYCZNA

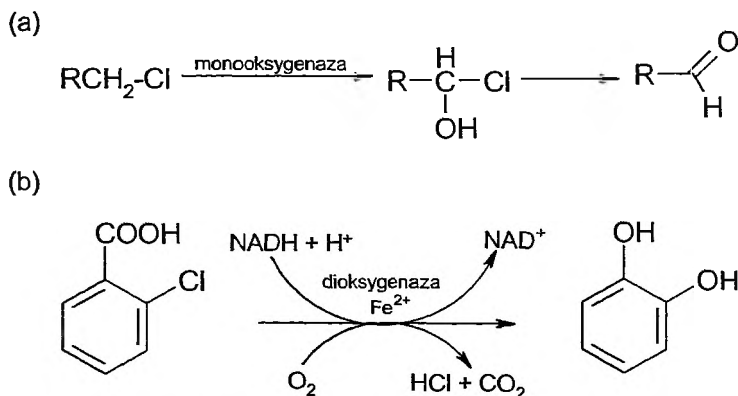
Zaobserwowano również, że niektóre szczepy bakterii [39, 62, 63] degradują dichlorometan wykorzystując glutation (GSH) według poniższego schematu:



Schemat 6. Schemat dehalogenacji tiolitycznej

5. DEHALOGENACJA OKSYGENOLITYCZNA

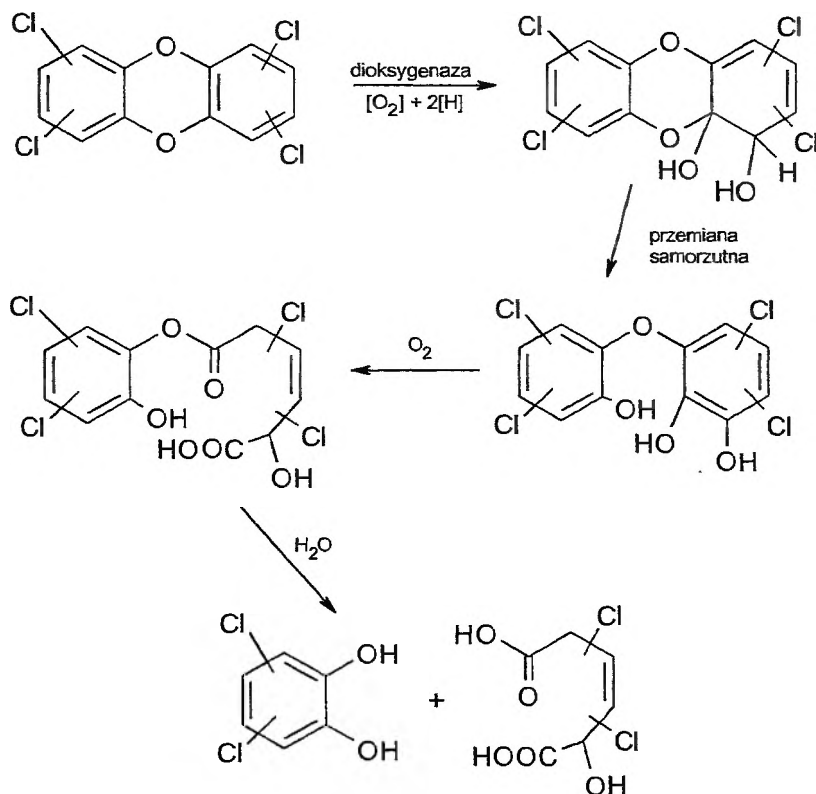
Dehalogenację oksygenolityczną katalizują mono- oraz dioksygenazy. Enzymy te zawierają komponent redukujący, współdziałający z koenzymem NADH, oraz komponent utleniający, który współdziała z klastrami żelazo-siarczkowymi. Reakcje dehalogenacji oksygenolitycznej przebiegają według schematu [39]:



Schemat 7. (a) – dehalogenacja katalizowana przez monooxygenazę, (b) – dehalogenacja katalizowana przez dioksygenazę

Sądzi się, że oksygenazy dehalogenujące wywodzą się z tej samej grupy enzymów co ich analogi niedehalogenujące, ale ich zakres substratowy jest znacznie szerszy [64].

Spektakularnym przykładem dehalogenacji oksygenolitycznej jest również dehalogenacja chlorowanych dibenzodioskyn, katalizowana przez dehalogenazę ze *Sphingomonas* sp. RW1 i przebiegająca według schematu 8 [26].



Schemat 8. Schemat dehalogenacji oksygenolitycznej chlorowanych dibenzodioskyn

Znaleziono wiele szczepów bakterii zdolnych do degradacji tych związków i badania nad nimi prowadzone są w dalszym ciągu [65–68].

6. FENOLOOKSYDAZY I SPRZĘGANIE OKSYDACYJNE

Enzymy zaliczane do fenolooksydaz, tj. monoooksygenaza monofenolowa, zwana tyrozynazą, oraz oksydaza polifenolowa („lakkaza”) i niektóre peroksydazy wytwarzane przez bakterie obecne w glebach, dehalogenują chlorowane fenole w procesie zwanym „sprzęganiem oksydacyjnym”. Proces ten obejmuje tworzenie *orto*-chinonów i anionów fenoksylowych bądź też rodników fenoksylo-

wych, polimeryzację w wyniku ataku nukleofilowego anionu fenoksylogo lub rodnika na *orto*-chinon, połączoną z dehalogenacją (lub bez niej, co zależy od pH środowiska) oraz wiązanie produktów reakcji fenolooksydaz do substancji humusowych obecnych w glebie. Sprzężanie oksydacyjne uważa się za najważniejszy mechanizm oczyszczania gleby z polichlorowanych fenoli [69–72]. W dostępnych źródłach literaturowych nie pokazano pełnego szlaku przemian chemicznych opisanych w tekście.

7. DEHALOGENACJA HYDROLITYCZNA

Mechanizm dehalogenacji hydrolitycznej oparty jest na hydrolizie wiązań węgiel-halogen. Zarówno mechanizmy hydrolizy, jak i specyfika substratów dehalogenaz hydrolizujących są bardzo zróżnicowane. Poznano enzymy hydrolizujące wiązania węgiel-halogen zarówno w przypadku alifatycznych, jak i aromatycznych chlorowcopochodnych. W chwili obecnej są to dehalogenazy najlepiej zbadane i pod względem struktury krystalograficznej, i aspektów mechanistycznych, dlatego zostały opisane tutaj najbardziej szczegółowo.

Bardzo ciekawe wyniki badań mechanizmu i kinetyki obrazują obecny stan wiedzy oraz zakres zainteresowań enzymologów zajmujących się tą klasą enzymów.

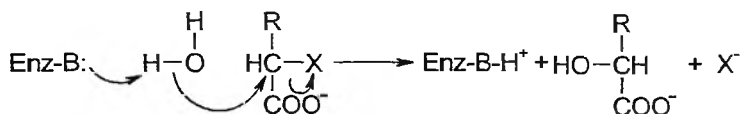
7.1. DEHALOGENAZY 2-HALOKWASOWE

Ponad 20 dehalogenaz hydrolizujących wiązanie węgiel-halogen w kwasach 2-halogenokarboksylogowych (EC 3.8.1), znalezionych do tej pory w różnych bakteriach, historycznie dzieli się na cztery grupy zależnie od specyficzności względem substratu i stereospecyfiki reakcji względem enancjomerów kwasu 2-chloropropionowego [73]. Dwie z nich wykazują aktywność tylko wobec substratu o konfiguracji L lub D, prowadząc do produktu z inwersją bądź zachowaniem konfiguracji przy chiralnym atomie węgla. Pozostałe dwie klasy są aktywne wobec obu stereoisomerów, prowadząc do hydrolizy z inwersją bądź retencją konfiguracji.

Enzym o poznanej strukturze krystalograficznej, dehalogenaza 2-L-dehalogenaza z *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 należący do klasy dehalogenaz katalizujących hydrolizę L-halokwasów z inwersją konfiguracji, wykazuje 40% podobieństwa sekwencji z siedmioma innymi dehalogenazami L-2-halokwasowymi z różnych szczepów *Pseudomonas*, a także dehalogenazą halokwasową z *Moraxella* sp. B [74].

Dobrze poznanym pod względem mechanizmu reakcji enzymem należącym do klasy EC 3.8.1.2 jest dehalogenaza DL-2-halokwasowa z *Pseudomonas* sp. 113 [75–77]. Enzym hydrolizuje oba enancjomery optycznie czynnych 2-halokwasów o długości łańcucha do czterech atomów węgla. Reakcja przebiega z inwersją konfiguracji.

Analiza widm masowych enzymu po reakcji 2-chloropropionianu w $H_2^{18}O$ wykazała, że dehalogenacja katalizowana przez enzym nie przebiega przez tworzenie przejściowego estru, a hydroliza wiązania węgiel-halogen odbywa się przez bezpośredni atak nukleofilowy zaktywowanej cząsteczki wody [78] (schemat 9). Widmo masowe wykazało, że żaden z peptydów otrzymanych w wyniku trawienia trypsyną enzymu po reakcji z 2-chloropropionianem w $H_2^{18}O$ nie zawierał ciężkiego izotopu tlenu, przez co wykluczono tworzenie przejściowego estru z jego następczą hydrolizą, która zachodziłaby z wymianą izotopową tlenu grupy karboksylowej.



Schemat 9. Mechanizm dehalogenacji katalizowanej przez dehalogenazę DL-2-halokwasową; X = Cl, Br

Reakcja katalizowana przez zbadaną dehalogenazę L-2-halokwasową z *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 [74], hydrolizującą jedynie L-2-halokwasu do D-2-hydroksykwasów, przebiega z kolei z udziałem przejściowego estru [79], a najwolniejszym etapem reakcji jest hydroliza tego produktu pośredniego [80].

Mechanizm reakcji dehalogenazy DL-halokwasowej stanowi pewien ewenement, biorąc pod uwagę, że kluczowym etapem reakcji katalizowanych przez do tej pory poznane dehalogenazy hydrolizujące jest atak nukleofilowy tlenu grupy karboksylowej kwasowego aminokwasu i następująca po nim hydroliza produktu pośredniego.

7.2. DEHALOGENAZA FLUROOCTANOWA

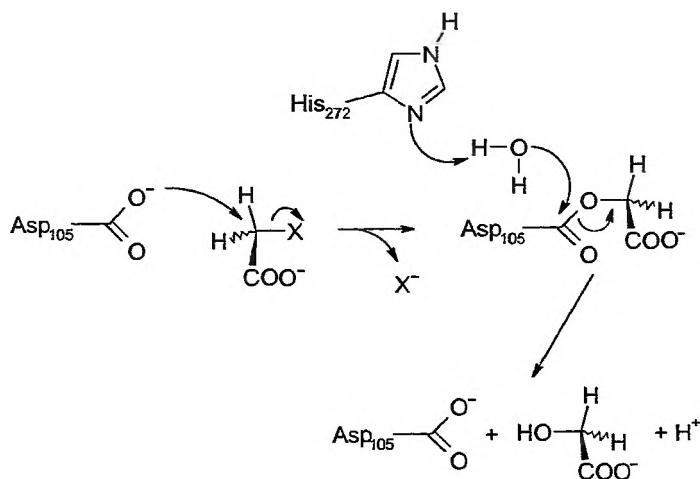
Dehalogenaza fluorooctanowa z *Moraxella* sp. B (EC 3.8.1.3) [81] jest enzymem należącym do klasy α/β -hydrolaz, wykazującym znaczne podobieństwo sekwencji z dehalogenazą haloalkanową z *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 [82].

Enzym ten katalizuje hydrolityczny rozpad wiązania węgiel-fluor, którego energia dysocjacji jest jedną z najwyższych wśród naturalnie występujących związków [83]. Jak do tej pory, jest to jedyny poznany enzym katalizujący rozpad wiązania węgiel-fluor. Substratem enzymu są jednak także inne HPO [84]. W tab. 2 podano względne aktywności dehalogenazy fluorooctanowej względem wybranych substratów.

Mechanizm dehalogenacji katalizowanej przez dehalogenazę fluorooctanową polega na ataku nukleofilowym tlenu grupy karboksylowej reszty Asp105 z utworzeniem estru i inwersją konfiguracji oraz następczej hydrolizie powstałego produktu pośredniego za pomocą cząsteczki wody aktywowanej w wyniku utworzenia wiązania wodorowego z azotem reszty His272 (schemat 10) [84].

Tabela 2. Względne aktywności dehalogenazy fluorooctanowej w stosunku do wybranych substratów

| Substrat | Względna aktywność |
|--------------------------------|--------------------|
| Fluorooctan | 480 |
| Chlorooctan | 100 |
| Bromooctan | 60 |
| Jodooctan | 2 |
| Dichlorooctan | 1 |
| Trichlorooctan | 0 |
| 2-chloropropionian, chloroetan | 0 |
| 2-chloroacetamid, chlorometan | 0 |



Schemat 10. Mechanizm dehalogenacji katalizowanej przez dehalogenazę fluorooctanową; X = F, Cl, Br

Najwolniejszym etapem reakcji nie jest jednak atak nukleofilowy, ale uwalnianie anionu chlorkowego z centrum aktywnego enzymu [85, 86], chociaż w przypadku homologicznej hydroksylazy epoksydowej należącej również do α/β -hydrolaz etapem determinującym szybkość reakcji jest hydroliza pośredniego estru [87].

Rola reszty His272 w etapie hydrolizy dowiedziona została przez wykazanie braku aktywności mutanta His272Asn, mimo że w tym przypadku również następowało tworzenie produktu pośredniego, estru, w wyniku alkilacji reszty Asp105.

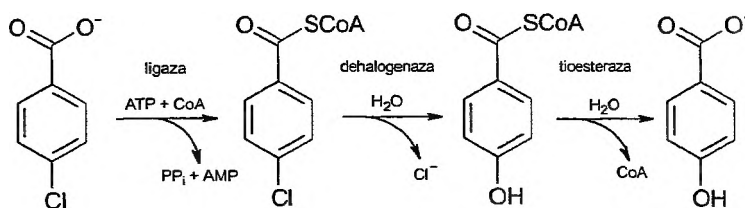
7.3. DEHALOGENAZA 4-CHLOROBENZOILO-CoA

Niezwykle interesujący enzym dehalogenaza 4-chlorobenzoilo-CoA (4-chlorobenzoilo-koenzym A) z *Pseudomonas* sp. CBS-3 [88-91], katalizuje hydrolizę wiązania węgiel-chlor w pierścieniu aromatycznym przy 25 °C i optymalnym pH = 7,5. Inhibitorami kompetycyjnymi enzymu są 4-fluorobenzoilo-CoA oraz benzoilo-CoA, jakkolwiek enzym wiąże się z nimi znacznie słabiej niż z substratem [92]. W tab. 3 podane są parametry kinetyczne, w tym stała Michaelisa K_M i jej odpowiednik K_s dla inhibitorów.

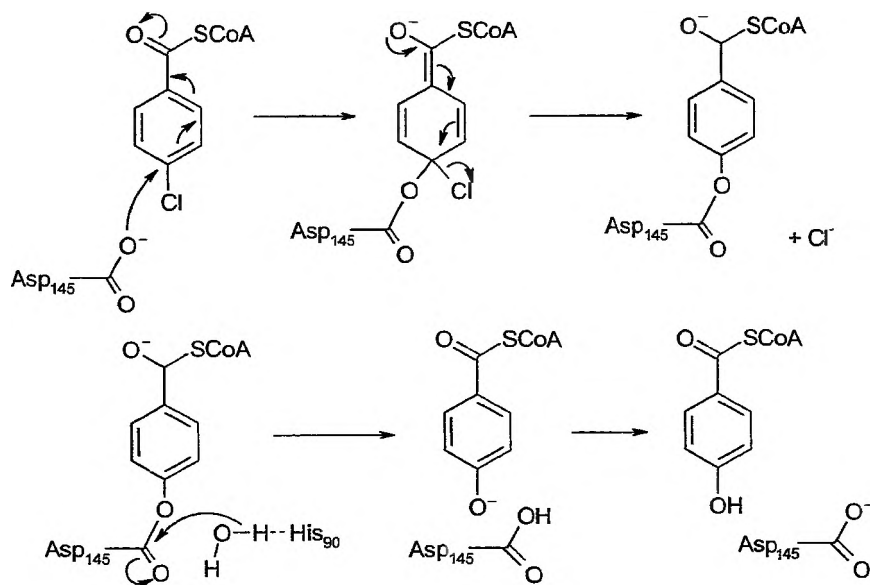
Tabela 3. Parametry kinetyczne dehalogenazy 4-chlorobenzoylo-CoA z *Pseudomonas* sp. 3-CBS

| Substrat/inhibitor | K_M lub K_i [μM] | k_{cat} [s^{-1}] |
|--------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|
| 4-CBA-CoA | $3,7 \pm 0,3$ | $0,60 \pm 0,01$ |
| 4-FBA-CoA | 40 ± 5 | – |
| BA-CoA | 72 ± 8 | – |

Dehalogenaza ta jest homotetramerem o masie cząsteczkowej 122 000 i określonej strukturze krystalograficznej [93]. *In vivo* enzym współdziała z ligazą 4-chlorobenzoylo-CoA oraz tioesterazą 4-hydroksybenzoylo-CoA [94]. Metabolizm 4-chlorobenzoesanu u *Pseudomonas* sp. CBS-3 opiera się na schemacie 11.

Schemat 11. Etapy dehalogenacji 4-CBA u *Pseudomonas* sp. CBS-3

Dehalogenacja 4-chlorobenzoesanu związanego z koenzymem A odbywa się przez utworzenie kompleksu Meisenheimera w wyniku ataku tlenu grupy karbonylowej Asp145. Po odłączeniu chlorku następuje hydroliza arylowanego enzymu za pomocą cząsteczki wody aktywowanej przez His90 (schemat 12) [95].



Schemat 12. Mechanizm reakcji dehalogenazy 4-chlorobenzoylo-CoA

7.4. DEHALOGENAZY HALOALKANOWE

Dehalogenaza haloalkanowa (EC 3.8.1.5) wyodrębniona została z mikroorganizmów, rosnących w glebie zanieczyszczonej 1-haloalkanami, 1-bromoalkanami oraz α,ω -dihaloalkanami, przez Janssen i wsp. [96]. Znane są obecnie sekwencje aminokwasowe dehalogenaz produkowanych przez *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 z rodziny bakterii wiążących azot (dehalogenaza haloalkanowa DHIA) [97, 98], *Sphingomonas paucimobilis* UT26 (dehalogenaza haloalkanowa LinB) [99], *Rhodococcus rhodochrous* (dehalogenaza haloalkanowa DHaA) [100, 101], jakkolwiek dehalogenazy haloalkanowe znaleziono ostatnio u *Mycobacterium* sp., w tym *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv [102], czynnika etiologicznego gruźlicy.

7.5. DEHALOGENAZA HALOALKANOWA Z *XANTHOBACTER AUTOTROPHICUS* GJ10

Dehalogenaza haloalkanowa z *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 (określana skrótem DHIA) jest najlepiej poznaną dehalogenazą hydrolityczną. Przytoczone tutaj wyniki badań mechanizmu, szczególnie z zastosowaniem mutacji punktowych oraz badań izotopowych, są przykładem wielkiej użyteczności obu metod również w badaniu tej klasy enzymów.

DHIA jest monomerycznym enzymem o masie cząsteczkowej 36 000, składającym się z 310 aminokwasów, o sekwencji zbliżonej do dehalogenazy fluoroctanowej z *Moraxella* sp. B [80]. Struktura krystalograficzna enzymu została opracowana przez Dijkstrę i wsp. [103, 104, 106]. DHIA przejawia największą aktywność względem 1,2-dichloroetanu. Katalizuje hydrolizę 1,2-dichloroetanu (DCE) do 2-chloroetanolu, umożliwiając bakterii dalszy metabolizm powstałego produktu [105]. Substratem DHIA jest również 1,2-dibromoetan (DBE), jakkolwiek w tym przypadku następuje dalsza hydroliza 2-bromoetanolu do glikolu etylenowego [85]. DHIA osiąga maksymalną aktywność przy pH = 8,2 w temp. 37 °C, a traci ją całkowicie przy 50 °C. Energia aktywacji reakcji z DCE wynosi około 55 kJ/mol. Reakcja przebiega według kinetyki Michaelisa-Menten.

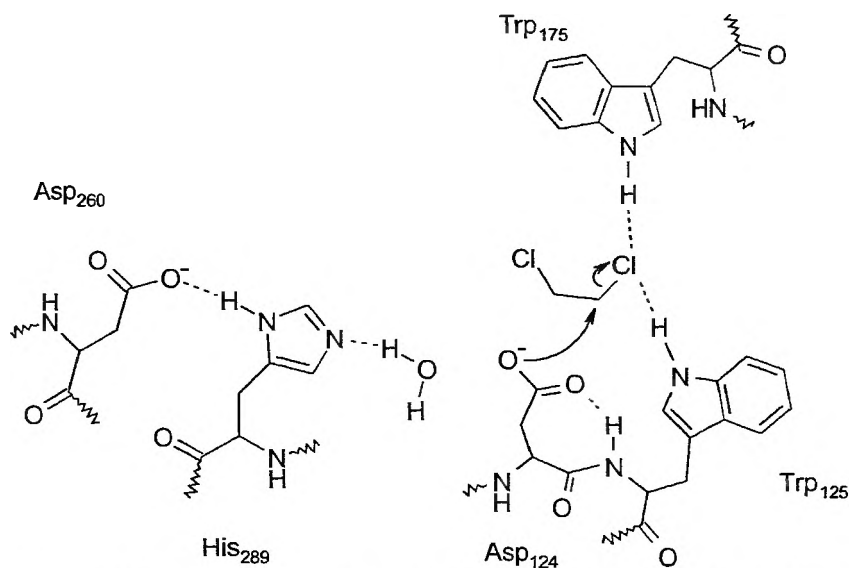
Oprócz DCE i DBE substratami enzymu jest też wiele innych haloalkanów. W tab. 4 przedstawiono względne aktywności tego enzymu dla poszczególnych substratów [106].

Badania krystalograficzne udowodniły, że w kompleksie enzym-substrat DHIA-DCE, odchodzący atom Cl_α leży pomiędzy azotami indolowymi reszt tryptofanowych Trp125 oraz Trp175, co umożliwia wytworzenie oddziaływań między chlorem i wodorami azotów indolowych [103].

Pierwszym etapem reakcji jest atak nukleofilowy tlenu grupy karboksylowej reszty asparaginianowej Asp124 (schemat 13). Udowodnienie, że nukleofilem jest grupa karboksylowa Asp124, a nie zaktywowana cząsteczka wody, stało się możliwe dzięki badaniom nad inkorporacją tlenu ^{18}O do enzymu i produktu,

Tabela 4. Względne aktywności DHIA wobec poszczególnych substratów

| Substrat | Aktywność względna [%] |
|---------------------------------------|------------------------|
| 1,2-dichloroetan | 100 |
| 1,2-dibromoetan | 94 |
| 1,3-dichloropropan | 80 |
| 1-chloropropan | 51 |
| 3-chloropropen | 45 |
| 1-chlorobutan | 31 |
| 1-bromopropan | 29 |
| chlorometan | 28 |
| chloroetan | 24 |
| bromoetan | 24 |
| 1-jodopropan | 14 |
| dichlorometan, 1,1-dichloroetan | 0 |
| 1,1,2-dichloroetan, 2-chloropropan | 0 |
| 1,2-dichloropropan, 1-chloropentan | 0 |
| 1,6-dichloroheksan, 1,9-dichlorononan | 0 |
| 2-chloroetanol | 0 |

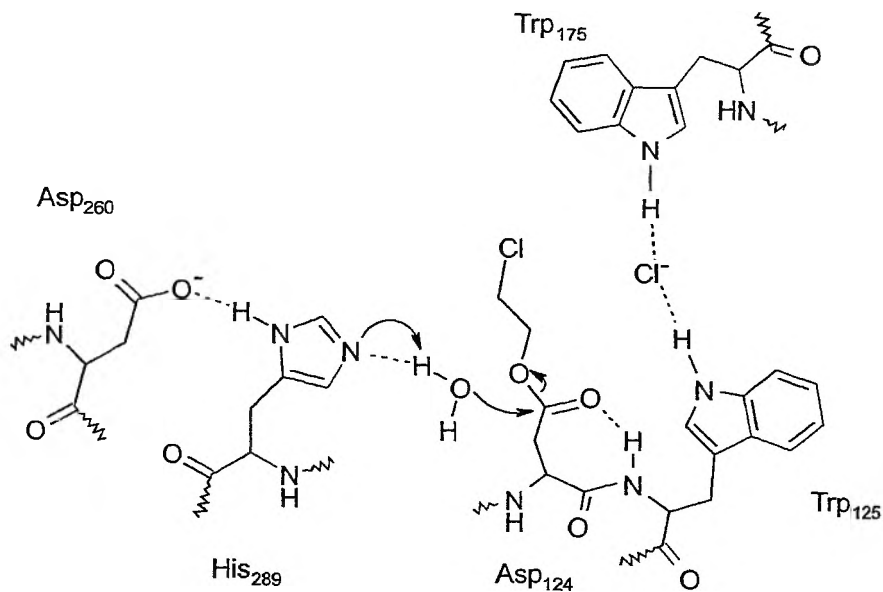


Schemat 13. Pierwszy etap reakcji. Atak nukleofilowy tlenu grupy karboksylowej Asp124 na węgiel DCE

2-chloroetanolu. Badania wykazały, że w reakcji prowadzonej w środowisku $H_2^{18}O$ ciężki izotop tlenu ulega włączeniu zarówno do enzymu, jak i produktu hydrolizy, co możliwe jest tylko przy założeniu wymienionego wyżej mechanizmu z udziałem Asp124 jako nukleofila [107].

W kolejnym etapie następuje hydroliza powstałego estru – produktu pośredniego za pomocą zaktywowanej cząsteczki wody. Aktywacja odbywa się poprzez polaryzację ładunku w układzie utworzonych wiązań wodorowych między

ϵ -azotem histydynowym nieuprotionowanej histydyny His289 i atomem tlenu wody oraz prawdopodobnie między wodorem związanym z δ -azotem His289 i atomem tlenu grupy karboksylowej kwasu asparaginowego Asp260 (schemat 14). Na istnienie obojętnej formy His289 niezbędnej do katalizy wskazuje spadek aktywności enzymu w środowisku kwaśnym przy $\text{pH} = 5,2$ [113]. Analiza tautomerii pierścienia imidazolowego His289 wskazująca na tautomer H- δ His289 przeprowadzona została przez Bruica [108] w oparciu o modelowanie metodą dynamiki molekularnej. Powyżej przedstawioną rolę His289 udowodnił także Janssen ze wsp. [109] w badaniach nad mutantem His289Gln. Zastąpienie His289 przez glutaminę (Gln) spowodowało 660-krotny spadek aktywności hydrolytycznej enzymu. Badania z zastosowaniem spektrometrii masowej wykazały kumulację pośredniego estru podczas reakcji mutantu z DBE bądź z 1-bromopropanem, co świadczy o tym, że mutacja nie ma znaczącego wpływu na pierwszy etap reakcji.



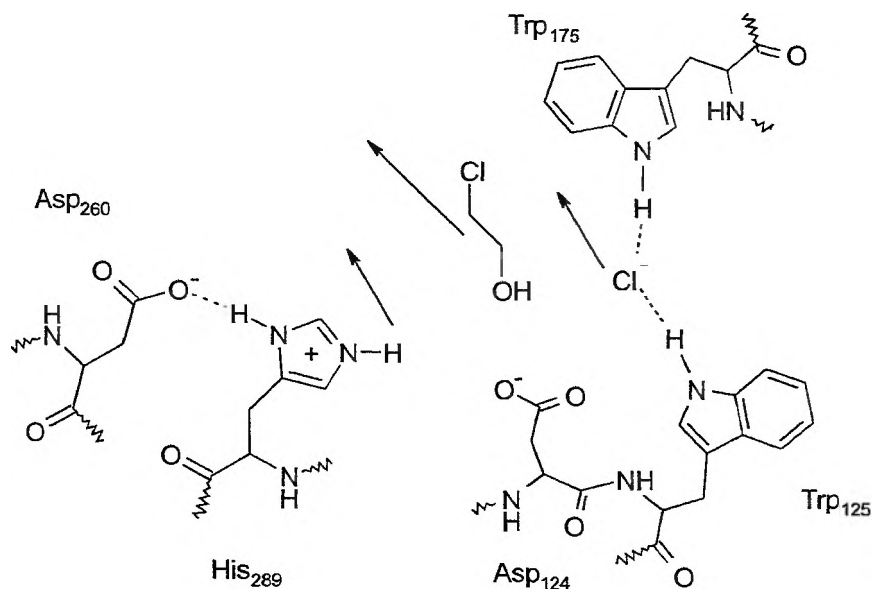
Schemat 14. Hydroliza produktu pośredniego. Aktywacja wody przez polaryzację w układzie wytworzonych wiązań wodorowych

Ponadto stwierdzono, że stała dysocjacji kompleksu anionu bromkowego ze zmutowanym enzymem spada 1000-krotnie w przypadku zalkilowanego mutantu, tzn. pośredniego estru wytworzonego między Asp124 i DBE (analogicznego jak na schemacie 14) przy $\text{pH} = 8$, chociaż powinowactwo niezalkilowanego mutantu do Br^- nawet w środowisku kwaśnym ($\text{pH} = 6$) jest bardzo małe. Obserwacje te dowodzą również, że His289 protonowana w drugim etapie jest konieczna do odpowiedniego wiązania halogenku (kation His289, schemat 15), równoważąc ujemny ładunek Asp124. Silne wiązanie halogenku przez zalkilowany i zmu-

towany enzym wskazuje również na to, że anion halogenkowy nie opuszcza centrum aktywnego, zanim ester nie ulegnie hydrolizie.

Badania nad mutantem Asp260Asn wykazującym brak aktywności zasugerowały, że Asp260 pełni pomocniczą funkcję w katalizie hydrolizy pośredniego estru [110]. Funkcja Asp260 nie jest jednak dokładnie zrozumiana. Reszta ta może odgrywać rolę stabilizującą kation His289 powstający podczas odrywania protonu od wody w etapie hydrolizy estru, jak też rozważane jest jej znaczenie strukturalne, stabilizujące geometrię centrum aktywnego bądź umożliwiające odpowiednie położenie His289 [110].

Na końcu reakcji, po utworzeniu 2-chloroetanolu w wyniku przejścia protonu z grupy karboksylowej Asp124 na anion 2-chloroetanolu, zachodzi proces niechemiczny (schemat 15). Następuje uwolnienie produktów, w tym jonu halogenkowego.



Schemat 15. Końcowy etap niechemiczny. Uwolnienie produktów z centrum aktywnego

Badania krystalograficzne nad wiązaniem halogenków przez centrum aktywne dehalogenazy wykazały, że jon halogenkowy stabilizowany jest przez wiązania wodorowe utworzone z wodorami indolowymi reszt Trp125 i Trp175 (odpowiednio o długości 3,4 i 3,3 Å) i leży w płaszczyźnie pierścieni indolowych [111, 112]. Udowodniono, że w przeciwieństwie do naturalnego enzymu mutanty Trp175Phe (tryptofan zastąpiony feniloalaniną), Trp175Tyr (tryptofan zastąpiony tyrozyną) nie podlegają inhibicji akompetycyjnej przez jony halogenkowe (stała inhibicji dla naturalnego enzymu: $K_{ii}Cl^- = 19 \pm 0,91$ mM, $K_{ii}Br^- = 2,5 \pm 0,19$ mM przy pH = 8,2), co wskazuje na bardzo silne wiązanie anionu chlorkowego z wodorem indolowym Trp175 w naturalnym enzymie [113]. Ponadto w przypadku

mutacji Trp175Phe następuje 10-krotny wzrost K_M i 5-krotny spadek k_{kat} , co potwierdza, że Trp175 ma także znaczny udział w wiązaniu substratu i dowodzi ważnej roli tej reszty w aktywacji wiązania węgiel-halogen. Badania przeprowadzone nad mutantem Trp125Phe wykazały również wzrost K_M , w porównaniu z enzymem naturalnym, świadczący o znaczeniu Trp125 przy wiązaniu substratu [114].

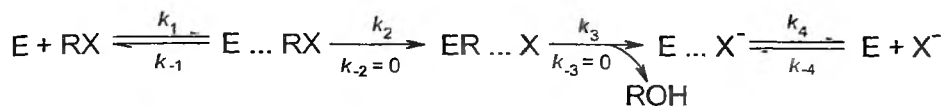
Badania kinetyczne i krystalograficzne nad wiązaniem halogenków do enzymu przy stężeniach 20–1000 mM sugerują szybkie tworzenie tzw. *collision complex*, słabego połączenia enzymu z halogenkiem znajdującym się przy powierzchni białka, po czym następują zmiany konformacji i wejście jonu do centrum aktywnego [115].

Kinetyka badanych mutantów Thr197Ala (treonina 197 zastąpiona alaniną), Phe294Ala nie wykazująca parabolicznego wzrostu szybkości wiązania ze wzrostem stężenia bromków sugeruje, że te przypowierzchniowo usytuowane aminokwasy odgrywają kluczową rolę podczas transportu substratu/produktu przez tunel prowadzący do centrum aktywnego (schemat 16).



Schemat 16. Struktura DHIA. Zaznaczone Thr197, Phe294 usytuowane na początku tunelu prowadzącego do centrum aktywnego. Zaznaczono DCE, Trp125, Trp175, Asp124

Schemat kinetyczny reakcji katalizowanej przez DHIA przedstawia się następująco:



Schemat 17. Schemat kinetyczny reakcji katalizowanej przez DHIA

Nieobecność DCE po inkubacji enzymu z 2-chloroetanolem według Jansse-
na i wsp. dowodzi, że dehalogenacja jest procesem nieodwracalnym i stałe szyb-
kości k_{-2} , k_{-3} można uważać za bliskie zera [85]. Wyznaczone w naszym labo-
ratorium, za pomocą techniki FAB-IRMS [116], kinetyczne efekty izotopowe
chloru reakcji z DCE ($1,0045 \pm 0,0004$) oraz reakcji z tzw. „powolnym substra-
tem”, chlorkiem 1-butylu ($1,0066 \pm 0,0004$), sugerują, że etap dehalogenacji jest
odwracalny. Obliczenia teoretyczne tych efektów izotopowych, wykonane
w schemacie ONIOM [117] na poziomie (DFT/PM3), wskazują, że obserwowany
doświadczalnie kinetyczny efekt izotopowy reakcji z chlorkiem 1-butylu jest
związany z etapem zrywania wiązania węgiel-chlor. Otrzymane wartości kine-
tycznych efektów izotopowych chloru są zgodne z wynikami badań kinetyki
przedstacjonarnej i stacjonarnej tylko dla mechanizmu, w którym k_{-2} jest różne
od zera [118]. Natomiast obserwowana nieodwracalność całej reakcji wynikać
może z bliskiej zera wartości stałej szybkości k_{-3} .

Analiza kinetyki przedstacjonarnej i stacjonarnej wykazała, że etapem deter-
minującym szybkość reakcji dehalogenacji DCE i DBE jest uwalnianie jonu
chlorkowego z centrum aktywnego enzymu, zachodzące jako ostatni etap proce-
su dehalogenacji [85]. Uwalnianie alkoholu prawdopodobnie nie stanowi etapu
ograniczającego szybkość reakcji, o czym wnioskowano z powodu niemożności
zaobserwowania w badaniach rentgenograficznych alkoholu w wykrystalizowa-
nym enzymie po reakcji z DCE, podczas gdy z łatwością udokumentowano ist-
nienie kompleksów enzymu z halogenkiem, a także ze względu na blisko 1000
razy wyższą wartość K_M produktu w stosunku do K_M substratu (tab. 5), co ozna-
cza, że utworzony alkohol łatwo dyfunduje z centrum aktywnego [104].

Tabela 5. Parametry kinetyczne DHIA dla wybranych substratów [85]

| Substrat | X = Cl | | | X = Br | | |
|---|------------|------------------------------|--|------------|------------------------------|--|
| | K_M [mM] | k_{kat} [s ⁻¹] | k_{kat}/K_M [M ⁻¹ ·s ⁻¹] | K_M [mM] | k_{kat} [s ⁻¹] | k_{kat}/K_M [M ⁻¹ ·s ⁻¹] |
| XCH ₂ CH ₂ X | 0,53 | 3,3 | $6,2 \cdot 10^3$ | 0,01 | 3,0 | $3,0 \cdot 10^5$ |
| CH ₃ (CH ₂) ₂ CH ₂ X | 2,2 | 1,5 | $6,8 \cdot 10^2$ | 0,06 | 0,94 | $1,6 \cdot 10^4$ |
| CH ₃ (CH ₂) ₄ CH ₂ X | 1,4 | 0,088 | 63 | 0,3 | 0,64 | $2,1 \cdot 10^3$ |
| CH ₂ XCHXCH ₃ | 13 | 0,15 | 12 | 1,3 | 2,1 | $1,6 \cdot 10^3$ |
| HOCH ₂ CH ₂ X | > 400 | 0 | 0,70 | 1,1 | 2,8 | $2,5 \cdot 10^2$ |
| CH ₂ X ₂ | > 100 | 0 | 0,70 | 2,4 | 3,9 | $1,6 \cdot 10^3$ |

K_M – stała Michaelisa, k_{kat} – stała katalityczna (wartości przy pH = 8,2, 30 °C)

Z drugiej strony, z faktu występowania inhibicji akompetycyjnej przez jony halogenkowe wywnioskowano, że jony halogenkowe nie łączą się z wolnym enzymem i dlatego nie mogą być ostatnim produktem uwalnianym z enzymu [113, 199].

W świetle opisanych wcześniej wyników badań nad siłą wiązania halogenków ze zalkilowanym i zmutowanym enzymem, przemawiających również na korzyść hipotezy o uwalnianiu chlorków jako procesie zachodzącym na końcu reakcji [109], alternatywna hipoteza co do kolejności uwalniania halogenków wydaje się mocno wątpliwa, tym bardziej, że otrzymane zależności $(1/V) = f(1/[S])$ (odwrotność szybkości początkowej w funkcji odwrotności stężenia substratu) charakterystyczne dla inhibicji akompetycyjnej można byłoby zaobserwować także w przypadku łączenia się inhibitora z kompleksem ES. Szybkość uwalniania anionu halogenkowego determinowana jest przez powolną izomeryzację enzymu zachodzącą ze stałą szybkości 10 s^{-1} , lub 14 s^{-1} , odpowiednio dla jonów bromkowych i chlorkowych [120].

Hipotezę, że zmiany konformacyjne towarzyszą uwalnianiu anionu halogenkowego, potwierdza według Janssen i wsp. [120] obserwowane spowolnienie izomeryzacji enzymu w środowisku D_2O , objawiające się obniżeniem wartości k_{kar} przy braku efektu izotopowego k_{kar}/K_M . Wiadomo bowiem, że D_2O zwiększa siłę wiązań wodorowych i oddziaływań hydrofobowych, a także zabezpiecza niektóre białka przed denaturacją termiczną, nieodłącznie związaną ze zmianami konformacyjnymi [121, 122].

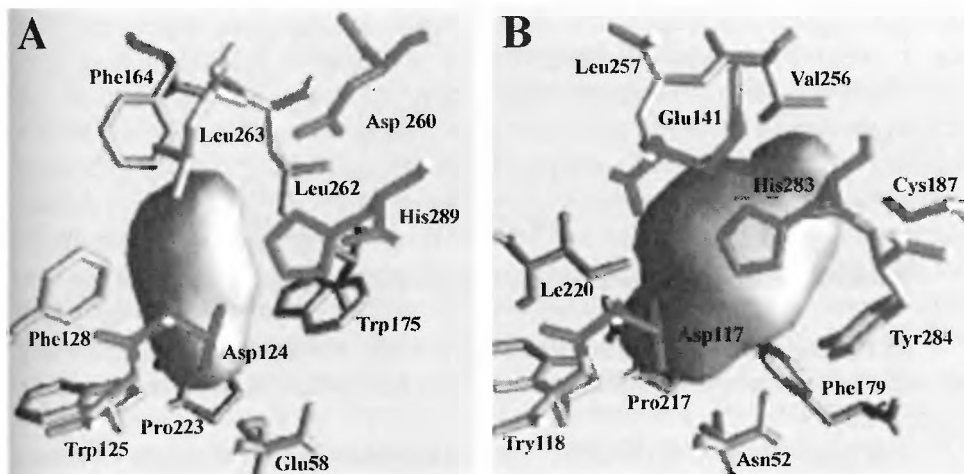
Ciekawą kwestią jest odmienna kinetyka reakcji dehalogenacji wyższych haloalkanów oraz haloalkanów rozgałęzionych. W przypadku 1-chloroheksanu oraz 1,2-dichloropropanu etapem determinującym szybkość reakcji jest rozpad wiązania węgiel-chlor, a nie uwalnianie halogenku [113].

7.6. DEHALOGENAZA HALOALKANOWA Z *RHODOCOCCUS RHODOCHROUS*

Chociaż sekwencja dehalogenazy haloalkanowej z *Rhodococcus rhodochrous* (oznaczana symbolem DHaA) jest homologiczna z DHIA w 30%, enzym charakteryzuje się znacząco inną preferencją substratów, a także i odmienną zdolnością wiązania halogenków [101, 113]. Potencjalnymi substratami DHaA są 1,2-dichloropropan, 1,2,3-dichloropropan, 1,2-dichlorobutan i preferowana jest hydroliza wiązania węgiel-halogen przy drugorzędowym atomie węgla, co sugeruje udział mechanizmu $\text{S}_{\text{N}}1$. Enzym ten może mieć szerokie zastosowanie, gdyż odpowiednie haloohydryny powstające z wymienionych substratów mogą służyć do produkcji epoksydów.

Oprócz acyklicznych drugorzędowych halogenków substratami DHaA są również dość duże halogenki cykliczne: chlorek i bromek cyklobutyłu, bromek cyklopentyłu.

Zdolność hydrolizy wyższych halogenków wynika z większej pojemności centrum aktywnego DHaA (187 \AA^3) w porównaniu z DHIA (96 \AA^3) (schemat 18) [123].



Schemat 18. Modele centrum aktywnego DHIA (A) i DHaA (B) [101]. Zaznaczona objętość centrum aktywnego według modelu GRASP [123] (za zgodą American Chemical Society)

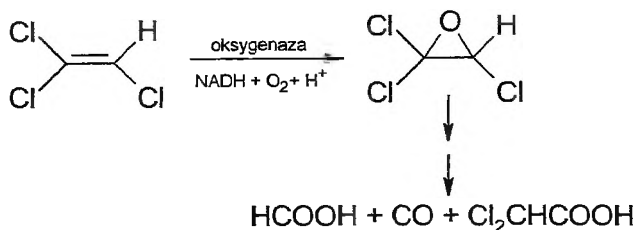
DHaA nie podlega inhibicji przez jony halogenkowe co wiąże się z brakiem reszty tryptofanowej, korespondującej z Trp175 w DHIA, odpowiedzialnej za wiązanie halogenków [101].

8. DEHALOGENACJA KOMETABOLICZNA

Oprócz bakterii, wykorzystujących halogenopochodne organiczne jako źródła węgla i energii, wiele mikroorganizmów zdolnych do biodegradacji związków chlorowcoorganicznych potrafi metabolizować je tylko w drodze kometabolizmu, zarówno w procesach utleniania, redukcji, jak i hydrolizy. W tym przypadku halogenopochodna organiczna nie będąca składnikiem odżywczym metabolizowana jest przez układ enzymatyczny katalizujący degradację związków koniecznych do podtrzymania rozwoju i wzrostu mikroorganizmu i tylko w obecności takich substancji (tj. „pierwszorzędowych substratów”) halogenopochodna ta może ulegać bioremediacji. Poznano organizmy degradujące kometabolicznie m.in. trichloroeten, chlorek winylu, 1,1-dichloroeten, 1,2-dichloroeten, chlorometan [106, 124–126].

Dehalogenacja kometaboliczna, z racji tworzenia reaktywnych produktów pośrednich, jest często procesem samoograniczającym się. Podczas degradacji kometabolicznej trichloroetenu (schemat 19) reaktywne epoksydy, powstające pod wpływem działania oksygenazy, powodują dezaktywację enzymu przez jego

alkilację, co wykazały badania z inkorporacją węgla C-14 ze znakowanego TCE. Inaktywacja enzymu następowała po konwersji 200 cząsteczek substratu przez jedną cząsteczkę enzymu [127].



Schemat 19. Kometaboliczna degradacja TCE przez mikroorganizmy utleniające eten

Wykazano jednak, że wprowadzenie czynników redukujących, np. mrówczanu, redukuje toksyczność produktów pośrednich, umożliwiając dalszą dehalogenację [128].

Praktyczne zastosowanie dehalogenacji kometabolicznej wymaga wykorzystania bioreaktorów pracujących w dwóch trybach, w trybie „wzrostu” i w trybie „degradacji”. Najpierw biomasa zawierająca bakterie zasilana jest w składniki odżywcze (substrat pierwszorzędowy), a następnie wprowadza się substrat poddawany dehalogenacji oraz czynnik redukujący. W przypadku degradacji chloroformu lub TCE przez metanotropową bakterię *Methylosinus trichosporium*, przez biomasę przepuszcza się metan i tlen, a następnie mrówczan i chlorowcopochodną poddawaną biodegradacji [128]. Opracowano również reaktory z ciągłym przepływem substratu pierwszorzędowego i substratu dehalogenowanego, jednak układy te cechowała gorsza wydajność. Trwają także badania nad bioremediacją *in situ* przez stymulację wzrostu bakterii metanotropowych naturalnie występujących w zanieczyszczonych zbiornikach wodnych. Nasycenie skażonej wody metanem i tlenem ma stymulować wzrost bakterii utleniających metan i jednocześnie kometabolizujących zanieczyszczenia chlorowcopochodne [129]. Badano również kometaboliczną bioremediację *in situ* chlorowcopochodnych organicznych, w tym trichloroetenu i 1,2-dichloroetenu, prowadzoną przez bakterie utleniające toluen [130, 131], eten [132] oraz butan [133].

PODSUMOWANIE

Biorąc pod uwagę ogromne rozpowszechnienie halogenopochodnych organicznych i toksyczne właściwości wielu z nich z jednej strony, a z drugiej – wszechstronną stosowalność oraz niezbędność także w procesach fizjologicznych, można powiedzieć, że badania nad enzymami dehalogenującymi mają wielce praktyczne znaczenie, co obok walorów poznawczych wyjaśnia ogromne zainteresowanie tym tematem.

Choć poznano wiele gatunków bakterii zdolnych do metabolizowania halogenopochodnych organicznych, to dokładna analiza mechanizmu dehalogenacji na podstawie określonej struktury krystalograficznej oczyszczonego enzymu możliwa była w nielicznych przypadkach. Najlepiej poznane pod tym względem są dehalogenazy hydrolityczne. Analiza struktury centrum aktywnego, wspomagana m.in. badaniami efektów izotopowych, modelowaniem molekularnym, zastosowaniem mutacji punktowych, pozwoliła określić rolę poszczególnych aminokwasów w procesie katalizy oraz wyjaśniła wiele aspektów kinetycznych. Poznane dehalogenazy degradują jednak tylko proste chlorowcopochodne o niskich masach cząsteczkowych. Również nie zawsze dehalogenacja przebiega aż do momentu usunięcia wszystkich atomów chloru. Pewne problemy stwarza np. dehalogenacja redukcyjna trichloroetenu za pomocą niektórych szczepów bakterii, zatrzymująca się na etapie chlorku winylu, będącego produktem znacznie bardziej szkodliwym niż sam substrat. Również degradacja kometaboliczna wymaga rozwiązania kwestii „uodpornienia” mikroorganizmów kometabolizujących, niszczonej przez produkty degradacji chloropochodnych. Problemem, który zapewne długo pozostanie nie rozwiązany, jest biodegradacja związków wielochloroorganicznych o dużej masie cząsteczkowej, stwarzających zagrożenie w przypadku degradacji termicznej czy fotodegradacji i powodujących duże problemy związane ze składowaniem. Niezwykła zdolność niektórych dehalogenaz do rozkładu wiązań halogen-węgiel aromatyczny może stanowić również cenną alternatywę dla chemicznych metod syntezy, wymagających często drastycznych warunków, będąc przy tym metodą o bardzo dużej regio- i stereospecyficzności.

Także dehalogenazy katalizujące dejodynację, zachodzącą jako proces fizjologiczny u człowieka, stanowią przedmiot zainteresowań z racji badań nad zaburzeniami homeostazy jodu i hormonów tarczycy oraz odpowiednimi metodami terapii. Zainteresowanie enzymami dehalogenującymi dotyczy wielu dziedzin nauki, dlatego tematyka ta rozwija się intensywnie.

Praca dofinansowana przez Komitet Badań Naukowych.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] P. Mastalerz, *Wiad. Chem.*, 1995, **49**, 117.
- [2] S. Hooper, C. Pettigrew, G. Saylor, *Environ. Toxicol. Chem.*, 1990, **9**, 655.
- [3] S. Frangson, J. Peters, *Am. J. Industr. Med.*, 1993, **24**, 355.
- [4] O. Axelson, *Cancer Morbidity and Exposure to Trichloroethylene. International Conference on Organic Solvent Toxicity*, Abstract Book, 1984, **126**.
- [5] O. Axelson, K. Andersson, C. Hogstedt, B. Holmberg, G. Molina, A. De Verdier, *J. Occup. Med.*, 1978, **20**, 194.
- [6] S. Lagakos, B. Wessen, M. Zelen, *J. Am. Stat. Assoc.*, 1986, **81**, 583.
- [7] International Agency for Research on Cancer: Trichloroethylene IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risk Hum. Suppl., 1987, **7**, 364.
- [8] R. Duh, N. Asal, *Am. J. Public Health*, 1984, **74**, 1278.
- [9] D. Silverman, L. Levin, R. Hoover, P. Hartge, *J. Natl. Cancer Inst.*, 1989, **81**, 1472.

- [10] *Rozpuszczalniki organiczne – ostre zatrucia*, M. Kotwica (red.), Instytut Medycyny Pracy, Łódź 1994.
- [11] G. Gribble, *J. Chem. Educ.*, 1973, **50**, 460.
- [12] J. Peters, D. Garabrant, S. Preston-Martin, M. Yu, *Scand. J. Work Environ. Health*, 1987, **13**, 180.
- [13] *Wytyczne szacowania ryzyka zdrowotnego dla czynników rakotwórczych*, S. Czerczak (red.), Instytut Medycyny Pracy, Łódź 1997
- [14] W. Kostowski, P. Kubikowski, *Farmakologia kliniczna*, PZWL, Warszawa 1996.
- [15] *The Thyroid, A Fundamental and Clinical Text*, L. Braverman, R. Utiger, J.B. Lippincott Company, 6th ed., New York, 1991.
- [16] H. Jensen, *Can. J. Microbiol.*, 1957, **3**, 151.
- [17] H. Jensen, *Acta Agr. Scand.*, 1959, **9**, 421.
- [18] H. Jensen, *Acta Agr. Scand.*, 1960, **10**, 83.
- [19] D.B. Janssen, B. Withold, *Aerobic and anaerobic degradation of halogenated aliphatics*, [w:] W.H. Sigel, A. Sigel (red.), *Metal Ions in Biological Systems*, vol. 28, Marcel Dekker, Inc., New York 1992, s. 299–327.
- [20] M.D. Lee, J.M. Odom, Buchanan, R.J., *Annu. Rev. Microbiol.*, 1998, **52**, 423.
- [21] D.B. Janssen, T. Bosma, G.J. Poelarends, *Mechanism of Biohalogenation and Dehalogenation*, North-Holland 1997, s. 119.
- [22] P.E. Swanson, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1999, **10**, 365.
- [23] D. Bedard, J. Quensen, *Microbial Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals*, L.Y. Young, C.E. Cerniglia, (red.), 127–216, Wiley-Liss, New York 1995.
- [24] S. El Fantroussi, H. Naveau, S. Agathos, *Biotechnol. Prog.*, 1998, **14**, 167.
- [25] W. Mohn, J. Tiedje, *Microbiol. Rev.*, 1992, **56**, 482.
- [26] L. Wackett, *Microbial Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals*, Wiley-Liss, New York 1995.
- [27] H. Smidt, A.D. Akkermans, J. Van der Oost, W.M. de Vos, *Enzyme Microb. Technol.*, 2001, **27**(10), 812.
- [28] J. Magnuson, S. Stern, J. Gossett, S. Zinder, D. Burris, *Appl. Environ. Microbiol.* 1998, **64**, 1270.
- [29] X. Maymo-Gatell, I. Nijenhuis, H. Zinder, *Environ. Sci. Technol.*, 2001, **35**, 516.
- [30] J.T. Leethem, J.R. Larson, *Int. In Situ On-Site Biorem. Symp.*, 4th, Vol. 3, 167, Battelle Press, Columbus, Ohio 1997.
- [31] D. Graves, D. Pohlmann, S. Ingram, *Nat. Attenuation Consid. Case Stud.: Rem. Chlorinated Recalcitrant Compd.*, International Conference, 2nd, 121, Batelle Press, Columbus, Ohio 2000.
- [32] X. Maymo-Gatell, I. Nijenhuis, S.H. Zinder, *Environ. Sci. Technol.*, 2001, **35**, 516.
- [33] D. McCarthy, D. Louie, S. Copley, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 11337.
- [34] S. Copley, *Trends. Biochem. Sci.*, 2000, **25**, 261.
- [35] L. Xun, E. Topp, C. Orser, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1992, **182**, 361.
- [36] D. McCarthy, S. Navarrete, W. Willett, P. Babbitt, S. Copley, *Biochemistry*, 1996, **35**, 14634.
- [37] K. Anandarajah, P. Kiefer, B. Donohoe, S. Copley, *Biochemistry*, 2000, **39**, 5303.
- [38] D.A. Abramowicz, *Biotechnology*, 1990, **10**, 241.
- [39] C. Wischnak, R. Müller, *Biotechnology* (2nd ed.), 2000, **11b**, 241, J. Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
- [40] C. Hollinger, D. Hahn, H. Harmsen, W. Ludwig, W. Schumacher, *Arch. Microbiol.*, 1998, **169**, 313.
- [41] X. Maymo-Gatell, Y. Chien, J. Gosset, S. Zinder, *Science*, 1997, **276**, 1568.
- [42] L. Krumholz, R. Sharp, S. Fishbain, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, **62**, 4108.
- [43] H. Scholz-Muramatsu, A. Neumann, M. Messmer, E. Moore, G. Diekert, *Arch. Microbiol.*, 1995, **163**, 48.

- [44] A. Khindaria, T.A. Grover, *Environ. Sci. Technol.*, 1995, **29**, 719.
- [45] A. Khindaria, T.A. Grover, *Environ. Sci. Technol.*, 1995, **29**, 719.
- [46] Y. Nagata, K. Hynkova, J. Damborsky, M. Takagi, *Protein. Expr. Purif.*, 1999, **17**, 299.
- [47] R. Sanford, J. Cole, F. Löffler, J. Tiedje, *Appl. Environ. Microbiol.* 1996, **62**, 800.
- [48] B. Bouchard, R. Beaudet, R. Villemur, G. McSween, F. Lepine, J. Bisailon, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1996, **46**, 1010.
- [49] I. Utkin, C. Woese, J. Wiegel, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1994, **44**, 612.
- [50] K. DeWeerd, L. Mandelco, R. Tanner, C. Woese, J. Suflita, *Arch. Microbiol.*, 1990, **154**, 23.
- [51] U. Noh, D. Hormisch, F. Giffhorn, G.-W. Kohring, *Appl. Microbiol.*, 1998, **63**, 1867.
- [52] A. Goswami, I. Rosenberg, *Endocrinology*, 1977, **101**, 331.
- [53] J. Stanbury, A. Kassenaar, J. Meijer, *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, 1956, **16**, 848.
- [54] E. Szczeklik, *Enzymologia kliniczna*, PZWL, Warszawa 1974.
- [55] S. Huang, H. Tu, J. Havney, M. Venihaki, A. Butte, *New England Journal of Medicine*, 2000, **343**, 185.
- [56] M. Kunishima, J. Friedman, S. Rokita, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 4722.
- [57] S. Hartmans, M. Jansen, M.J. Van der Werf, J.A. De Bont, *J. Gen. Microbiol.* 1991, **137**, 2025
- [58] H. Lipke, C.W. Kearns, *J. Biol. Chem.*, 1959, **234**, 2123 (I część) i 2129 (II część).
- [59] M. Ishida, *Agric. Biol. Chem.*, 1968, **32**, 947.
- [60] J. Chang, R.W. Chadwick, J.C. Allison, Y.O. Hayes, D.L. Talley, C.E. Autry, *J. Appl. Bacteriol.*, 1994, **77**, 709.
- [61] T. Nagasawa, T. Ishii, H. Yamada, *Arch. Microbiol.*, 1988, **149**, 413.
- [62] D. Kohler-Staub, T. Leisinger, *J. Gen. Bacteriol.*, 1986, **132**, 2837.
- [63] G. Stucki, M. Thuer, *Environ. Sci. Technol.*, 1995, **29**, 2339.
- [64] S. Harayama, M. Kok, E. Neidle, *Annu. Rev. Microbiol.*, 1992, **46**, 565.
- [65] S. Takada, M. Nakamura, T. Matsueda, R. Kondo, K. Sakai, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, **62**, 4323.
- [66] R. Wittich, *Landes Bioscience*, 1998, **1**, Austin, TX.
- [67] P. Bünz, A. Cook, *J. Bacteriol.*, 1993, **175**, 6467.
- [68] H. Tsuji, S. Okada, E. Oide, G. Kawai, T. Tanaka, *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 11319786 A2* 24 Nov 1999 Heisei, 8.
- [69] R.D. Vidic, M.T. Suidan, R.C. Brenner, *Environ. Sci. Technol.*, 1993, **27**, 2079.
- [70] J. Dec, J.M. Bollag, *Environ. Sci. Technol.*, 1994, **28**, 484.
- [71] J.W. Park, J. Dec, J.E. Kim, J.M. Bollag, *Environ. Sci. Technol.*, 1999, **33**, 2028.
- [72] J.W. Park, J. Dec, J.E. Kim, J.M. Bollag, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 2000, **38**, 405.
- [73] S. Fetzner, F. Lingens, *Microbiol. Rev.*, 1994, **58**, 641.
- [74] T. Kurihara, J.Q. Liu, V. Nardi-Dei, H. Koshikawa, N. Esaki, K. Soda, *J. Biochem.*, 1995, **117**, 1317.
- [75] K. Motosugi, N. Esaki, K. Soda, *J. Bacteriol.*, 1982, **150**, 522.
- [76] A. Weightman, A. Weightman, J. Slater, *J. Gen. Microbiol.*, 1982, **128**, 1755.
- [77] J. Leigh, A. Skinner, R. Cooper, *FEMS Microbiol. Lett.*, 1988, **49**, 353.
- [78] V. Nardi-Dei, T. Kurihara, C. Park, M. Miyagi, S. Tsunasawa, K. Soda, N. Esaki, *J. Biol. Chem.*, 1999, **274**, 20977.
- [79] I. Ridder, H. Rozeboom, K. Kalk, B. Dijkstra, *J. Biol. Chem.*, 1999, **274**, 30672.
- [80] J. Liu, T. Kurihara, M. Miyagi, N. Esaki, K. Soda, *J. Biol. Chem.*, 1995, **270**, 18309.
- [81] H. Kawasaki, N. Tone, K. Tonomura, *Agric. Biol. Chem.*, 1981, **45**, 29.
- [82] D. Ollis, E. Cheab, M. Cygler, B. Dijkstra, F. Frolow, S. Franken, M. Harel, S. Remington, I. Silman, J. Schrag, J. Sussman, K. Verschueren, Goldman, *Protein Eng.*, 1992, **5**, 197.
- [83] P. Goldman, *Science*, 1969, **164**, 1123.
- [84] J. Liu, T. Kurihara, S. Ichiyama, M. Miyagi, S. Tsunasawa, H. Kawasaki, K. Soda, N. Esaki, *J. Biol. Chem.*, 1998, **273**, 30897.

- [85] J. Schanstra, J. Kingma, D. Janssen, *J. Biol. Chem.*, 1996, **271**, 14747.
- [86] J. Schanstra, D. Janssen, *Biochemistry*, 1996, **35**, 5624.
- [87] L. Laughlin, H. Tzeng, S. Lin, R. Armstrong, *Biochemistry*, 1998, **37**, 2897.
- [88] P. Babbitt, G. Kenyon, B. Martin, H. Charest, M. Sylvestre, J. Scholten, K. Chang, P. Liang, D. Dunaway-Mariano, *Biochemistry*, 1992, **31**, 5594.
- [89] P. Savard, H. Charest, M. Sylvestre, F. Shareck, J. Scholten, D. Dunaway-Mariano, *Can. J. Microbiol.*, 1992, **38**, 1074.
- [90] J. Slater, A. Bull, D. Hardman, *J. Biodegrad.*, 1995, **6**, 181.
- [91] F. Löffler, F. Lingens, R. Muller, *Biodegradation*, 1995, **6**, 202.
- [92] G. Yang, R. Liu, K. Taylor, H. Xiang, J. Price, D. Dunaway-Mariano, *Biochemistry*, 1996, **35**, 10879.
- [93] M. Benning, K. Taylor, R. Liu, G. Yang, H. Xiang, G. Wesenberg, D. Dunaway-Mariano, H. Holden, *Biochemistry*, 1996, **35**, 8103.
- [94] K. Chang, P. Liang, W. Beck, J. Scholten, D. Dunaway-Mariano, *Biochemistry*, 1992, **31**, 5605.
- [95] J. Clarkson, P. Tonge, K. Taylor, D. Dunaway-Mariano, P. Carey, *Biochemistry*, 1997, **36**, 10192.
- [96] D. Janssen, F. Pries, J. Van der Ploeg, *Annu. Rev. Microbiol.*, 1994, **48**, 163.
- [97] J. Wiegel, D. Wilke, J. Baumgarten, R. Opitz, H. Schlegel, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1978, **28**, 573.
- [98] D. Janssen, F. Pries, J. Ploeg, B. Kazemier, P. Terpstra, B. Withold, *J. Bacteriol.*, 1989, **171**, 6791.
- [99] Y. Nagata, K. Miyauchi, J. Damborsky, K. Manova, A. Ansorgova, M. Takagi, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, **63**, 3707.
- [100] A. Kulakova, M. Larkin, L. Kulakov, *Microbiology*, 1997, **143**, 109.
- [101] J. Newman, T. Peat, R. Richard, L. Kan, P. Swanson, J. Affholter, I. Holmas, J. Schindler, C. Unkefer, T. Terwilliger, *Biochemistry*, 1999, **38**, 16105.
- [102] A. Jesenska, I. Sedlacek, J. Damborsky, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, **66**, 219.
- [103] K. Verschueren, F. Seljee, H. Rozeboom, K. Kalk, B. Dijkstra, *Nature*, 1993, **363**, 693.
- [104] K.H. Verschueren, S.M. Franken, H.J. Rozeboom, K.H. Kalk, B.W. Dijkstra, *J. Mol. Biol.*, **232**(1993), 856.
- [105] D. Janssen, A. Scheper, L. Dijkhuizen, B. Withold, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1985, **49**, 673.
- [106] S. Keuning, D. Janssen, B. Withold, *J. Bacteriol.*, 1985, **163**, 635.
- [107] F. Pries, J. Kingma, M. Pentenga, G. Pouderoyen, C. Jeronimus-Stratingh, A. Bruins, D. Janssen, *Biochemistry*, 1994, **33**, 1242.
- [108] F. Lightstone, Y. Zheng, T. Bruice, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 5611.
- [109] F. Pries, J. Kingma, G. Krooshof, C. Jeronimus-Stratingh, A. Bruins, A.D. Janssen, *J. Biol. Chem.*, 1995, **270**, 10405.
- [110] G. Krooshof, E. Kwant, J. Damborsky, J. Koca, D. Janssen, *Biochemistry*, 1997, **36**, 9571.
- [111] G. Krooshof, I. Ridder, W. Armand, J. Tepper, G. Vos, H. Rozeboom, K. Kalk, B. Dijkstra, D. Janssen, *Biochemistry*, 1998, **37**, 15013.
- [112] K. Verschueren, J. Kingma, H. Rozeboom, K. Kalk, D. Janssen, B. Dijkstra, *Biochemistry*, 1993, **32**, 9031.
- [113] J. Schindler, P. Naranjo, D. Honaberger, C. Chang, J. Brainard, L. Vanderberg, C. Unkefer, *Biochemistry*, 1999, **38**, 5772.
- [114] C. Kennes, F. Pries, G. Krooshof, E. Bokma, J. Kingma, D. Janssen, *Eur. J. Biochem.* 1995, **238**, 403.
- [115] M. Pikkemaat, I. Ridder, H. Rozeboom, K. Kalk, B. Dijkstra, D. Janssen, *Biochemistry*, 1999, **38**, 12052.
- [116] K.C. Westaway, T. Koerner, Y.-R. Fang, J. Rudziński, P. Paneth, *Anal. Chem.*, 1998, **70**, 3548.

- [117] S. Humbel, S. Sieber, K. Morokuma. *J. Chem. Phys.*, 1996, **105**, 1959.
- [118] A. Lewandowicz, J. Rudziński, L. Tronstad, M. Widersten, P. Ryberg, O. Matsson, P. Paneth, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123**, 4550.
- [119] W. Cleland, *Method. Enzymol.*, 1979, **63**, 103.
- [120] J. Schanstra, D. Janssen, *Biochemistry*, 1996, **35**, 5624.
- [121] L. Antonino, R. Kautz, T. Nakano, R. Fox, A. Fink, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1991, **88**, 7715.
- [122] P. Masson, M. Laurentie, *Biochim. Biophys. Acta*, 1988, **957**, 111.
- [123] A. Nicholls, R. Bharadwaj, B. Honig, *Biophys. J.*, 1993, **64**.
- [124] R.S. Hanson, T.E. Hanson, *Microbiol. Rev.*, 1996, **60**, 439.
- [125] M.E. Rasche, R.E. Hicks, M.R. Hyman, D.J. Arp, *J. Bacteriol.*, 1990, **172**, 5368.
- [126] K.S. Sorenson, L.N. Peterson, R.L. Ely, *Int. In Situ On-Site Biorem. Symp. 5th*, Vol. 2, 147–155, Battelle Press: Columbus, Ohio 1999.
- [127] B.S. Ensley, *Ann. Rev. Microbiol.*, 1991, **45**, 283.
- [128] G.E. Speitel, J.M. Leonard, *Water Environ. Res.*, 1992, **64**, 712.
- [129] L. Sempriani, P.L. McCarty, *Biostimulation and biotransformation modeling*, [w:] *In situ Aquifer Restoration of Chlorinated Aliphatics by Methanotrophic Bacteria*, EPA/600/2-89/033, 239–250, 1989.
- [130] P.L. McCarty, M.N. Goltz, G.D. Hopkins, M.E., Dolan, J.P. Allan, B.T. Kawakami, T.J. Carrothers, *Environ. Sci. Technol.*, 1998, **32**, 88.
- [131] A. E. Mars, G.T. Prins, P. Wietzes, W. de Koning, D.B. Janssen, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, **64**, 208.
- [132] P. Koziollek, S. Bauer, H.-J. Knackmuss, *Contam. Soil. 1998, Proc. FZK/TNO Int. Conf.*, 6th, Vol. 2, 1071, London.
- [133] F.A. Perriello, G.A. DiCesare, J. Noris, R.C. Johnson, G. Jalal, S. Simkins, *Contam. Soils*, 1999, **4**, 295.

Praca wpłynęła do Redakcji 6 lutego 2001

**Z BADAŃ NAD SPEKTROSKOPIĄ UV-VIS
KOMPLEKSÓW METALI PRZEJŚCIOWYCH
Z ZASADAMI SCHIFFA W ROZTWORACH**
STUDIES ON SOLUTION UV-VIS SPECTROSCOPY
OF TRANSITION METAL COMPLEXES
WITH SCHIFF BASES

Krzysztof Kurzak, Iwona Kuźniarska-Biernacka

*Zakład Problemów Teoretycznych Chemii Nieorganicznej,
Instytut Chemii, Akademia Podlaska
ul. 3 Maja 54, 08-110 Siedlce*

Abstract

Wstęp

Charakterystyka zasad Schiffa

1. Stereochemia
2. Widma elektronowe ligandów

Charakterystyka związków metali z zasadami Schiffa

1. Stereochemia
2. Symetria związków kompleksowych z zasadami Schiffa a widma
 - 2.1. Kompleksy miedzi(II)
 - 2.2. Kompleksy kobaltu(II)

Piśmiennictwo cytowane



Dr hab. Krzysztof Kurzak, profesor Akademii Podlaskiej w Siedlcach, ukończył studia na Wydziale Matematyki, Fizyki i Chemii, na kierunku chemicznym Uniwersytetu we Wrocławiu. Po ukończeniu studiów w 1975 r. podjął pracę na stanowisku asystenta w Instytucie Chemii Nieorganicznej i Metalurgii Pierwiastków Rzadkich Politechniki Wrocławskiej. W 1981 r. przeniósł się do Wyższej Szkoły Rolniczo-Pedagogicznej w Siedlcach (obecnie Akademii Podlaskiej). W 1983 r. uzyskał stopień doktora nauk chemicznych, a w 1993 – stopień doktora habilitowanego z zakresu chemii nieorganicznej na

Wydziale Chemii Politechniki Wrocławskiej. Jest kierownikiem Zakładu Problemów Teoretycznych Chemii Nieorganicznej.

Główny nurt zainteresowań naukowych – spektroskopia i właściwości związków koordynacyjnych metali przejściowych, komputerowe metody analizy widm absorpcyjnych związków kompleksowych, metody obliczeniowe w chemii.

Opublikował ponad 40 prac naukowych, głównie w czasopismach międzynarodowych, jest także współautorem 1 książki i skryptu. Jest promotorem 33 prac magisterskich i 3 doktorskich.



Dr Iwona Kuźniarska-Biernacka ukończyła studia na kierunku chemicznym Wydziału Chemiczno-Matematycznego Wyższej Szkoły Rolniczo-Pedagogicznej w Siedlcach. Po ukończeniu studiów w 1996 r. zatrudniona została w Zakładzie Problemów Teoretycznych Chemii Nieorganicznej Instytutu Chemii WSR-P w Siedlcach (obecnie Akademii Podlaskiej) na stanowisku asystenta. W 2001 r. uzyskała stopień doktora nauk chemicznych w Instytucie Chemii Nieorganicznej i Metalurgii Pierwiastków Rzadkich Politechniki Wrocławskiej.

Zainteresowania naukowe: spektroskopia elektronowa związków kompleksowych metali przejściowych z zasadami Schiffa. Współautorka 4 publikacji w czasopismach międzynarodowych.

ABSTRACT

Metal complexes derived from Schiff bases have been known for one hundred years. The complexes have played important role in the development of coordination chemistry. This situation is manifested by huge number of publications ranging from the physicochemical to biochemical relevant studies of these complexes. The reasons for this sustained interest in those compounds are undoubtedly many but important among them must be their general ease to preparation, and diverse properties, e.g., their ability to reversibly bind oxygen, catalytic activity, photochromic and thermochromic properties.

Schiff bases are those compounds containing the azomethine group ($-RHC=N-$) and usually formed by the condensation of amine with carbonyl compound. Bases which are effective as coordinating ligands bear a functional group, usually $-OH$, so near the site of condensation that a five- or six-membered chelate ring can be formed upon reaction with a metal ion. Tautomeric equilibrium of three tautomers is possible for Schiff base compounds: imine, enamine and keto-imine. The presence of the imine and enamine tautomeric forms depends on the formation of intramolecular hydrogen bond. It is claimed that enamine form is dominant in naphthaldimines while imine form in salicylaldimines. The distribution of the tautomeric equilibrium is strongly dependent on the solvents. The presence of keto-imine form is insignificant for Schiff base compounds, but is found in the case of β -diketones and arylimines of β -ketoethers.

The most significant complexes of the salicylaldimines are of the types: bi-, tri- and tetracoordinate. The geometry of Schiff base complexes depends on substituent at the coordinating nitrogen atoms. For tetracoordinate copper(II) complexes different type of geometry is possible. A planar structure has been established for the copper(II) complexes (with bidentate Schiff base) where the substituent is hydrogen atom, hydroxyl, methyl, *n*-butyl or *n*-amyl group. On the other hand the copper(II) complexes where the substituent is isopropyl or *tert*-butyl are pseudo-tetrahedral.

For tetracoordinate cobalt(II), either a square-planar or pseudo-tetrahedral geometry is possible. A pseudo-tetrahedral structure has been established for the cobalt(II) complexes (with bidentate Schiff base) where the substituent is *n*-propyl, isopropyl, *n*-butyl, *tert*-butyl, cyclohexyl or aryl group. Cobalt(II) complexes with bidentate Schiff bases where the substituent is hydrogen atom or hydroxyl group have a planar geometry, because of formation of hydrogen bonding between hydrogen (from hydroxyl group) and oxygen (from aldehyde linkage). Geometry of this type is characteristic for cobalt(II) complexes with Schiff base tetradentate (e.g., with salicylidene-ethylenediamine).

The aim of this account is to summarize the results of studies of structural and spectroscopic properties on Schiff bases and their complexes. These have been reviewed based on 104 articles.

WSTĘP

Pierwsze syntezy kompleksów metali z zasadami Schiffa wykonane były w latach 40. ubiegłego stulecia. Te „stare” związki cieszą się nadal ogromną popularnością. Świadczy o tym olbrzymia liczba publikacji z wielu dziedzin, od fizykochemii do biochemii. Ogromna liczba związków tego typu jest trwała chemicznie, co ułatwia przeprowadzanie różnych badań na tych kompleksach. Duże różnicowanie w strukturze samych ligandów i możliwość różnej koordynacji sprawia, że liczba tej klasy związków stale wzrasta. Kompleksy metali przejściowych pierwszego szeregu z zasadami Schiffa, a w szczególności miedzi(II), niklu(II) i kobaltu(II), były badane w wielu aspektach: odkryta została ich rola w reakcjach enzymatycznych, stosowano je jako modele bardziej skomplikowanych układów biologicznych [1–6], badano efekty steryczne [7–16] oraz struktury kryształów [17–43]. Znaczną uwagę zwrócono także na ich strukturalne zmiany spowodowane rozmiarem i właściwościami podstawnika przy azocie iminowym.

Przedstawiony poniżej przegląd literaturowy, poszerzony o badania własne, dotyczy charakterystyki zasad Schiffa i ich kompleksów z metalami przejściowymi, a w szczególności z miedzią(II) i kobaltem(II). Głównym celem pracy jest przedstawienie wpływu podstawników w części aldehydowej i aminowej ligandów na geometrię form kompleksowych zarówno w stanie stałym, jak i w roztworach oraz wpływu rozpuszczalnika i podstawników na ich widma.

CHARAKTERYSTYKA ZASAD SCHIFFA

Definicja. Zasady Schiffa są to związki złożone z ugrupowania azometynowego ($-RHC=N-$) zwykle tworzone przez kondensację aminy z aktywnym związkiem karbonylowym. Ligandami efektywnymi są te, które mają grupy funkcyjne. Najczęściej spotykana jest grupa $-OH$. W reakcjach z jonami metalu zwykle tworzą pierścienie pięcio- lub sześciocłonowe. Z powodu wielkiej elastyczności w tworzeniu zasad Schiffa można otrzymać wiele ligandów o różnych typach struktur. Na przykład: zasady Schiffa dwu- i polidonorowe, pochodzące od aldehydu salicylowego (2-hydroksybenzylidenoiminy) oraz od β -ketonów (ketoiminy), zasady Schiffa alifatyczne oraz utworzone z kondensacji aminy funkcyjnie podstawionej i związków 1,2-dikarbonylowych.

Znaczenie biologiczne. Od opublikowanej w 1933 r. przez Pfeifferra obserwacji zmiany barwy kompleksu $[Co(salen)]$ ($H_2salen = 2$ -hydroksybenzylidenoetylenodiamina) z czerwonej na czarną, nie przestano interesować się związkami tego typu. Zwłaszcza, że zjawisko to zinterpretował nieco później, bo w 1938 r., Tsumaki jako odwracalne przyłączanie tlenu z powietrza [2, 44]. Mechanizm przyłączania odwracalnego tlenu w takich układach był badany w latach 70. Pojawily się przypuszczenia, że proces absorpcji tlenu przez kompleks $[Co(salen)]$

jest podobny do odbywającego się w przyrodzie procesu, w którym główną rolę odgrywają hemoglobina i hemerytryna. Najprostszą drogą do poznania mechanizmu omawianej reakcji było wyznaczenie struktur kompleksów powstających w wyniku tego procesu. Po badaniach wstępnych okazało się, że produkty reakcji są zależne od wielu czynników, takich jak temperatura, użyty rozpuszczalnik i in. Niemniej jednak doniesienia o składzie i formach proponowanych uzyskiwanych produktów były różne, a często nawet sprzeczne. Dopiero Ochiai [45] w 1973 r. podał mechanizm przyłączania tlenu przez [Co(salen)]. Ustalił, że w pierwszym etapie, przy wysokim ciśnieniu tlenu, absorbowana jest więcej niż jedna cząsteczka O₂ przez jeden mol kobaltu(II) z utworzeniem formy monomerycznej typu CoO₂. Następnie znacznie wolniej tworzy się dimer typu Co—O—Co. Opisany kierunek badań związków kompleksowych z zasadami Schiffa nie był jedyny, faktem jest, że badania tego typu są bardzo ważne i pomocne w rozwiązywaniu podobnych problemów związanych z procesami zachodzącymi w przyrodzie. Jakkolwiek biologiczne znaczenie zasad Schiffa oraz ich kompleksów to nie tylko zdolność do odwracalnego przyłączania tlenu, ale także wiele innych aspektów. Omawiany powyżej kompleks [Co(salen)] dzięki swoim właściwościom znalazł zastosowanie w wielu reakcjach utleniania i redukcji. Wykorzystywano go jako katalizator w reakcjach utleniania fenoli, indoli, amin i innych substancji [46].

Okazało się, że niemałą rolę w dziedzinie chemii bionieorganicznej odgrywają kompleksy miedzi(II) z trójdonorowymi zasadami Schiffa. Te kompleksy służą jako wartościowy, nieenzymatyczny model witaminy B₆. Ponadto wykazują one właściwości przeciwzapalne i przeciwbakteryjne [47].

Kompleksy miedzi(II), niklu(II), kobaltu(II) i cynku(II) z dwudonorowymi zasadami Schiffa pochodzącymi od aldehydu salicylowego i prostego aminokwasu, tj. glicyny, wykazują silne właściwości inhibitorów dla następujących grzybów: *Gypseum*, *Floccesum*, *Canis* i *Rubrum* [48].

Parashar i Sharma [3] badali właściwości biologiczne zasad Schiffa, a w szczególności Hsap (2-hydroksybenzylideno-2-aminopirydyna) oraz jego kompleksów z miedzią (II) i kobaltem(II). Badania prowadzili na bakteriach *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* oraz grzybach *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Candia albicans*. Z badań wynika, że związki kompleksowe wykazują wyższą aktywność antybakteryjną niż ligandy. Z badanych kompleksów największą aktywnością przeciwzapalną charakteryzuje się kompleks [Co(sap)₂].

Same ligandy odgrywają znaczącą rolę w chemii bioorganicznej. Są produktami przejściowymi reakcji enzymatycznych [49], np.: dekarboksylacji β- lub α-ketonokwasów czy enzymatycznej kondensacji aldolowej oraz kondensacji Claisena. W reakcjach biochemicznych powstają często na skutek łączenia się związków karbonylowych z białkami, np. powstawanie rodopsyny (zasady Schiffa) w wyniku reakcji 4,5-*cis*-retinalu (izomer witaminy A) z opsyną (białko) w procesie widzenia.

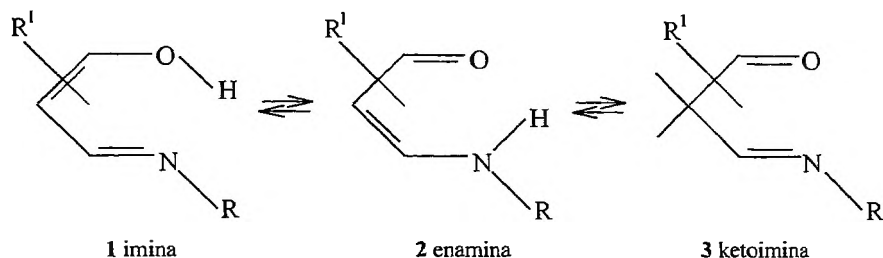
1. STEREOCHEMIA

Różnorodność form tautomerycznych oraz występowanie izomerów geometrycznych spowodowały rozpoczęcie badań nad stereochemią zasad Schiffa. Na przełomie lat 60. i 70. wzrosło zainteresowanie właściwościami fototropowymi stałych zasad Schiffa pochodzących od aldehydu salicylowego. Zauważono, że podczas naświetlania stałych zasad Schiffa światłem UV kryształy jasnożółte zmieniały barwę na czerwoną. Proces ten można odwrócić fotochromowo (naświetlając je światłem VIS) lub w sposób termiczny (przez podwyższenie temperatury). Zjawisko to tłumaczono jako odwracalny tautomerizm formy iminowej. Badania opisywanych zjawisk prowadzono głównie na krystalicznych zasadach Schiffa lub matrycach szklanych w niskich temperaturach [50]. Badano także wpływ równowag na widma elektronowe stałych zasad Schiffa pod wpływem promieniowania UV czy temperatury. Ze względu na czynnik powodujący zmiany w widmach zasady te podzielono na dwie klasy. Pierwsza charakteryzuje się pasmem absorpcyjnym przy ok. $20\ 800\ \text{cm}^{-1}$, którego zanikanie spowodowane jest naświetlaniem (fotochromizm). Druga charakteryzuje się pasmem w temperaturze pokojowej w tym samym zakresie, ale jego intensywność zmniejsza się wraz ze zmniejszaniem temperatury, aż w końcu zanika w temperaturze ciekłego powietrza (termochromizm). Oba procesy są odwracalne. Wysłunięto hipotezę [51], że cząsteczki wykazujące termochromizm są płaskie, natomiast odkształcone wykazują fotochromizm. Badania tego typu stały się przesłanką do stworzenia hipotezy, że tautomerizm może występować także w roztworach. Badania spektroskopowe roztworów zasad Schiffa, prowadzone w temperaturze pokojowej, potwierdziły tę hipotezę [52–56]. Dowiedziono, że obecność w roztworze form tautomerycznych (iminowej i enaminowej) zależy od wewnątrzcząsteczkowego wiązania wodorowego między azotem (ugrupowanie iminowe) a wodorem (grupa hydroksylowa). Równowaga tautomeryczna powinna wzrastać ze wzrostem zasadowości azotu iminowego lub ze wzrostem kwasowości grupy hydroksylowej [57]. Zauważono także, że formą dominującą dla zasad Schiffa pochodzących od aldehydu naftoesowego jest enamina, podczas gdy dominacja formy iminowej w równowagach tautomerycznych zasad Schiffa pochodzących od aldehydu salicylowego zależy od polarności rozpuszczalnika. Pomiar spektrofotometryczne wykazały, że pasmo absorpcyjne poniżej $25\ 000\ \text{cm}^{-1}$ jest charakterystyczne dla formy enaminowej zasad Schiffa. Interesujący jest fakt, że w zasadach Schiffa pochodzących od aldehydu naftoesowego i aniliny zawsze obserwowane jest pasmo przy $25\ 000\ \text{cm}^{-1}$, świadczące o udziale formy enaminowej. W ligandach pochodzących od aldehydu salicylowego i aniliny pasmo to nie jest obserwowane ani w rozpuszczalnikach polarnych, ani niepolarnych. Obserwuje się je jedynie dla zakwaszonych roztworów wodnych [58].

Ledbetter [55] badał spektroskopowo równowagi tautomeryczne zasad Schiffa pochodzących od *o*- i *p*-hydroksybenzaldehydu w roztworach. Na podstawie widm roztworów w EtOH, cykloheksanolu i ich mieszaninie stwierdził istnienie

punktów izobestycznych, związanych z występowaniem dwóch form liganda charakteryzujących się absorpcją w tym zakresie. Dokładniejsze badania strukturalne oparte na strukturze molekularnej dla Hsalan (2-hydroksybenzylidenoanilina) i jej pochodnych wykazały w roztworach alkoholowych o właściwościach kwasowych istnienie równowagi tautomerycznej form: iminowej \rightleftharpoons enaminiowej.

Zasady Schiffa pochodzące od aldehydu salicylowego mogą występować w postaci trzech izomerów tautomerycznych [15], które przedstawiono na schemacie 1. Obecność form tautomerycznych: iminowej (1) i enaminiowej (2), zależy od tworzenia wewnątrzcząsteczkowego wiązania wodorowego. Na podstawie badań ciał stałych stwierdzono, że forma 2 jest dominująca dla naftyldenoiimin, a forma 1 dla 2-hydroksybenzylidenoimin. Obecność obu typów równowag w roztworach jest zależna od polarności rozpuszczalnika [58].



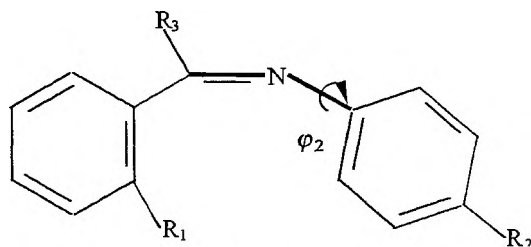
Schemat 1

Forma ketoiminowa (3) jest energetycznie korzystna dla zasad Schiffa pochodzących od β -aminopropenonu (tionów) lub 2-hydroksy- (tio-, seleno-) heteroaromatycznych aldehydów, np. pyrrolowych, tiofenowych, furanowych i ich pochodnych oraz azoli. Forma 3 jest dominująca, zarówno w roztworach, jak i w ciałach stałych, niezależnie od podstawnika w ugrupowaniu aldehydowym czy iminowym oraz rodzaju rozpuszczalnika i temperatury. Dla zasad Schiffa pochodzących od aldehydu salicylowego i arylowej aminy oraz od aldehydu 2-hydroksy-3-naftoesowego i aminy arylowej lub alkilowej formą dominującą w roztworach jest 1, w zależności od polarności rozpuszczalnika. Tak duże zróżnicowanie w strukturach tego typu zasad Schiffa jest związane z podstawieniem przy azocie aminowym grupy arylowej grupą alkilową. Takie podstawienie (gdy atomem donorowym w ugrupowaniu aldehydowym jest O, S lub Se) stabilizuje formę 3. Alkilowe lub aryłowe podstawniki przy węglu azometynowym i grupa odciągająca elektrony z aldehydowej części występuje głównie w formie 1. Przesunięcie równowagi tautomerycznej w stronę 3 zależy od rodzaju rozpuszczalnika. Rozpuszczalniki protyczne i aprotyczne z dużą stałą dielektryczną sprzyjają występowaniu formy 3.

Z przedstawionych danych wynika, że kierunek równowagi tautomerycznej zasad Schiffa jest zależny głównie od właściwości kwasowych rozpuszczalnika. Przewodzone więc badania wpływu stężenia jonu wodorowego w rozpuszczalniku na widma zasad Schiffa pochodzących od aldehydu salicylowego, 3-hydroksy-izoałdehydu nikotynowego i waliny [59]. Najprostszym sposobem przeprowadzenia ba-

dań tego typu byłyby badania potencjometryczne w wodzie. Jednak tej klasy związki w wodzie ulegają całkowitej hydrolizie prowadzącej do utworzenia aldehydu i aminokwasu. Próby mieszania rozpuszczalników organicznych z wodą (np. 1,4-dioksan, DX) także nie przyniosły pozytywnych rezultatów. Niemniej jednak, badania takie zostały przeprowadzone w DX, który zakwaszono kwasem octowym [60]. Widmo 2-hydroksybenzylidenowaliny w „obojętnym” DX charakteryzuje się czterema maksimami przy około 24 300, 31 100, 35 800 i 38 200 cm^{-1} . Pasma przy 24 300 i 35 800 cm^{-1} autorzy [60] przyporządkowali przejściom związanym z formą **2**, a pozostałe (przy około 31 100 i 38 200 cm^{-1}) z formą **3**. Ze wzrostem stężenia jonów wodorowych intensywność maksimów odpowiadających przejściom formy **2** (przy około 24 300 i 35 800 cm^{-1}) maleje, a formy **3** wzrasta. Takie zmiany w widmie powodują powstawanie punktów izobestycznych przy około 28 500, 33 300 i 37 000 cm^{-1} . Ostatecznie tworzą się dwa maksima przy około 31 150 i 38 300 cm^{-1} odpowiadające formie protonowanej tautomeru **3**. Podobne zmiany zaobserwowano dla zasady Schiffa pochodzącej od 3-hydroksy-izaldehydu nikotynowego i waliny [60] oraz pochodzących od aldehydu salicylowego i *o*-metoksyaniliny czy *n*-butylaminy [61]. Ze wzrostem stężenia jonów hydroksylowych w roztworze, widma omawianych ligandów zmieniają się w podobny sposób. Takie zmiany równowagowe prowadzą do utworzenia formy deprotonowanej tautomeru **1**.

Niektórych właściwości fizycznych zasad Schiffa nie można wyjaśnić istnieniem ich izomerów tautomerycznych i geometrycznych. Celowe wydało się więc rozważenie ich izomerów konformacyjnych. Początkowo zakładano, że cząsteczka zasady Schiffa jest płaska, a kąt zaznaczony na schemacie 2 linią pogrubioną wynosi 180° . Przy takiej konformacji nie można było wytłumaczyć następujących właściwości zasad Schiffa: niskiej intensywności długofalowych pasm, słabej zasadowości, niestabilności izomeru *syn* oraz anomalii w wartościach momentu dipolowego. Stwierdzono, że wszystkie powyższe zagadnienia można wytłumaczyć jedynie przy założeniu, że pierścień aminowy nie jest współpłaszczyznowy z mostkiem $\text{C}=\text{N}$ i pierścieniem aldehydowym. Podstawnik arylowy przy azocie iminowym (R_2) jest zwykle skręcony wzdłuż osi wiązania $\text{C}-\text{N}$ o kąt φ_2 , podczas gdy pierścień aromatyczny z części aldehydowej jest współpłaszczyznowy z grupą azometynową.



Schemat 2

Charakter zasad Schiffa jest związany z efektami sterycznymi i elektronowymi. Na przykład, jeśli podstawniki: w części aminowej (R_2) oraz przy węglu azo-

metynowym (R_3) są akceptorami elektronów, to powodują wzrost wartości kąta φ_2 (konformacja odkształcona), podczas gdy podstawnik donorowy części aminowej (R_2) zmniejsza go [15]. Niemniej ta prosta zależność nie zawsze jest spełniona, zwłaszcza dla ciał stałych, w których występuje wiele mezomorficznych modyfikacji. Podstawnik hydroksylowy (pozycja *orto*) w ugrupowaniu aldehydowym tylko nieznacznie wpływa na całkowitą konformację cząsteczki, np. kąt φ_2 dla *N*-fenylobenzylidenoimin wynosi $55,2^\circ$ i 49° w przypadku odpowiednich *N*-fenylo-2-hydroksybenzylidenoimin. Konformacja skręcona zasad Schiffa była potwierdzona różnymi metodami zarówno dla ciała stałego [62], jak i roztworów [63, 64] oraz obliczeniami teoretycznymi [65–67].

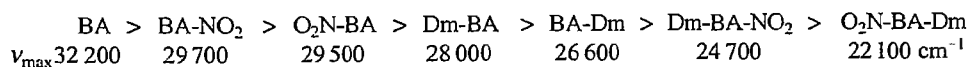
Niższa zasadowość zasad Schiffa, niż np. pirydyny, wynika z większej delokalizacji pary elektronowej na skutek konformacji odkształconej [68].

Różnice w wartościach momentów dipolowych w *para*- i niepodstawionych zasadach Schiffa jest tłumaczone dodatkowym oddziaływaniem elektronów azotu iminowego z elektronami podstawnika (np. NO_2). Oddziaływania tego typu są możliwe tylko przy konformacji odkształconej.

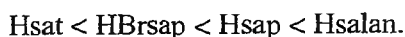
Wszystkie omawiane efekty mają wpływ na widma liganda. Niska intensywność pasm długofalowych związana jest także z wielkością kąta $\text{C}=\text{N}-\text{C}_{\text{pierścień aminowy}}$ [68]. Ze wzrostem kąta zmniejsza się intensywność pasm odpowiadających przejściom $\pi \rightarrow \pi^*$ (przy około $36\,000\text{ cm}^{-1}$). Intensywność pasm przy około $37\,000\text{ cm}^{-1}$ nie zależy od wartości kąta, jest ona związana głównie z przeniesieniem ładunku z pierścienia aminowego do mostka $\text{C}=\text{N}$. Pasma to jest charakterystyczne dla wszystkich konformacji zasad Schiffa. Intensywność pasma o wyższej energii (około $38\,500\text{ cm}^{-1}$) maleje ze wzrostem kąta $\text{C}=\text{N}-\text{C}_{\text{pierścień aminowy}}$. Intensywność pasm wysokoenergetycznych (powyżej $48\,500\text{ cm}^{-1}$) jest niezależna od kąta.

2. WIDMA ELEKTRONOWE LIGANDÓW

Zdarza się, że związki organiczne charakteryzują się zerową absorbancją w części UV i VIS. Intensywność barwy tej klasy związków zależy od liczby wiązań podwójnych oraz polarności cząsteczki. Prowadzono badania wpływu podstawnika na widma stilbenu i azobenzenu (symetryczne grupy chromoforowe $-\text{CH}=\text{CH}-$ lub $-\text{N}=\text{N}-$), które wykazały znaczny wpływ podstawnika na widma tych związków. Badania rozszerzono o cząsteczki bardziej skomplikowane mające asymetryczne grupy chromoforowe – zasady Schiffa ($-\text{CH}=\text{N}-$). Badania wpływu podstawnika, w pierścieniach benzenowych aldehydu i aminy, w pozycji *para*, na widma elektronowe pochodnych benzylidenoaniliny (BA) [69] prowadziły do podobnych wniosków. Obserwowano przesunięcie batochromowe maksimum długofalowego w szeregu (gdzie $\text{Dm} = (\text{CH}_3)_2$):



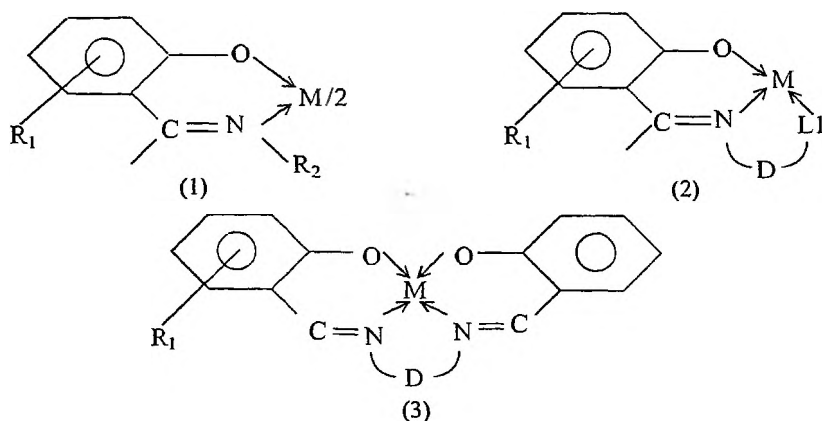
Ledbetter [55, 57] badał wpływ podstawnika na widma roztworów alkoholowych zasad Schiffa pochodzących od aldehydu salicylowego i aniliny. Z badań wynika, że jedynie maksimum przy ok. $37\,200\text{ cm}^{-1}$ nie zmienia położenia dla szeregu podstawników. W naszych badaniach [70] dotyczących zasad Schiffa, pochodzących od aldehydu salicylowego i 2-aminopirydyny (Hsap), 2-aminotiazolu (Hsat), aniliny (Hsalan) oraz aldehydu 5-bromosalicylowego i 2-aminopirydyny (HBr sap), stwierdzono, że zmiany w widmach są widoczne głównie w zakresie $28\,000\text{--}29\,000\text{ cm}^{-1}$. Ogólnie można stwierdzić przesunięcie hipsokromowe widm w tym zakresie, w kolejności:



Wpływ rozpuszczalnika na widma badanych ligandów ujawnia się w efektach hipo- i hiperchromowych.

CHARAKTERYSTYKA ZWIĄZKÓW METALI Z ZASADAMI SCHIFFA

Najczęściej spotykane struktury kompleksów metali z zasadami Schiffa, pochodzącymi od aldehydu salicylowego, przedstawiono na schemacie 3. W przypadku struktury (1) istnienie izomerów *cis* i *trans* uwarunkowane jest wielkością podstawnika R_2 . Na schemacie przedstawiono tylko formy monomeryczne, jakie z reguły tworzą kompleksy z ligandami tego typu. Niemniej jednak kompleksy te często występują w formach dimerycznych, zwłaszcza w przypadku ligandów cztero- oraz trójdonorowych. Tworzą one wówczas formy cztero- lub pięciokoordynacyjne. W zależności od liczby grup aminowych w łańcuchu alifatycznym D (struktura (3), schemat 3) może zmieniać się donorowość ligandów. Kiedy łańcuch stanowi amina drugorzędowa, np. 1,7-diamino-dipropyloamina, ligand jest pięciodonorowy (dwa donory tlenowe pochodzące od aldehydu salicylowego i trzy azotowe od aminy).



Schemat 3

1. STEREOCHEMIA

Holm i O'Connor [10] sugerowali, że stereochemia czterokoordynacyjnych kompleksów miedzi(II) i niklu(II) (azoto- i tlenodonorowych) zależy od podstawnika przy azocie iminowym. Kompleksy te są płaskie, kiedy podstawnikiem jest wodór, natomiast w obecności podstawnika większego geometria jest albo płaska, albo pseudotetraedryczna. Chociaż atom miedzi jest bardziej „odporny” na przyjmowanie symetrii tetraedrycznej, geometria kompleksów zależy głównie od typu liganda, efektów sterycznych wiązań wodorowych i naprężeń powodowanych przez podstawnik przy azocie iminowym.

Stwierdzono, za pomocą badań struktury kryształu, że ligandy mają płaską *trans* geometrię dookoła atomu miedzi (amina alkilowa). Geometria płaska jest nieznacznie odkształcona tetraedrycznie. O odkształceniu świadczą kąty N—Cu—N (178°) i O—Cu—O (176°). Są one typowe dla niewielkiego odkształcenia tetraedrycznego od geometrii płaskiej.

Kompleksy czterokoordynacyjne z zasadami Schiffa typu MN_2O_2 mogą występować zarówno w tetraedrycznych, jak i w płaskich strukturach. Cechuje je zdolność do zmian izomerycznych, tj. stereoizomerii (zmiana geometrii wokół jonu metalu) i izomerii geometrycznej. Układ mniej energetyczny (bardziej stabilny) może odpowiadać zarówno geometrii płaskiej, jak i tetraedrycznej. Zdolność metali do tworzenia tetraedrycznych kompleksów z zasadami Schiffa izosterycznymi wzrasta w następującym szeregu [15, 71]:



W przypadku metali o konfiguracji d^0 i d^{10} struktura płaska oczekiwana jest tylko jako stan przejściowy w reakcji wzajemnej przemiany tetraedrycznych form enancjomerycznych. Z badań mechaniki kwantowej wynika, że różnica energii między strukturą płaską a tetraedryczną zmniejsza się dla mniej elektroujemnych metali i dla bardziej elektroujemnych atomów donorowych.

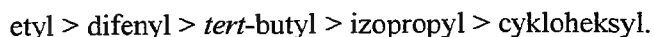
2. SYMETRIA ZWIĄZKÓW KOMPLEKSOWYCH Z ZASADAMI SCHIFFA A WIDMA

2.1. Kompleksy miedzi(II)

Wiele kompleksów miedzi(II) z dwudonorowymi zasadami Schiffa, pochodzącymi od aldehydu salicylowego, zostało zbadanych. Większość związków tego typu była rozważana jako związki o geometrii kwadratowej. Niektóre z nich istnieją w postaci dimerycznych cząsteczek, które mają bardzo słabe wiązanie między atomami miedzi.

Geometria tej klasy związków zależy głównie od podstawnika R_2 przy azocie iminowym (schemat 3). Jeśli podstawnikiem tym jest grupa aryłowa lub alkilowa (H, OH, CH_3 , *n*-propyl, *n*-butyl), to kompleksy charakteryzują się płaską geometrią chromoforu [14], przy czym zwykle konformacja kompleksu jest na-

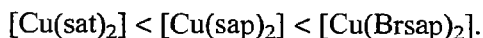
przemianległa [10, 72]. Odształcenie od takiej geometrii może nastąpić, kiedy występują znaczne przeszkody steryczne. Kiedy podstawnik stanowi grupa *tert*-butylowa, izopropylowa czy cykloheksylowa, kompleksy z tego typu ligandami są pseudotetraedryczne [73, 74, 88]. Na podstawie widm elektronowych oraz badań struktur kryształów stwierdzono, że odształcenie tetraedryczne maleje w następującym szeregu [8, 75]:



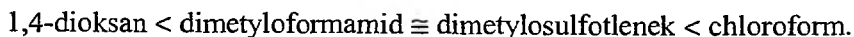
Badania krystalograficzne wykazały, że kąt między płaszczyznami tworzonymi przez ugrupowania N—Cu—O dla kompleksów z podstawioną grupą etylową wynosi 36°, difenylową – 37°, *tert*-butylową – 54°, grupą izopropylową 60° [8, 75].

Płaskie kompleksy z podstawnikiem *n*-butylowym charakteryzują się szerokim pasmem przy ok. 16 000 cm⁻¹, podczas gdy formy tetraedryczne z podstawnikiem *tert*-butylowym absorbują przy ok. 9000 i 13 000 cm⁻¹. Tetraedryczna i płaska geometria kompleksów miedzi z zasadami Schiffa pochodzącymi od aldehydu salicylowego zależy także od podstawnika w ugrupowaniu aldehydowym. Kiedy podstawnik ten stanowi wodór, grupa metylowa w położeniu 3 lub 5, kompleksy tego typu mają geometrię tetraedryczną. W przypadku gdy podstawnikami są: chlor w położeniu 3 lub 5, brom w położeniu 3, grupa nitrowa w położeniu 3 lub 5, kompleksy są płaskie [14]. Kompleksy 2-hydroksybenzylidenoiminowe miedzi(II), które w ciele stałym są płaskimi izomerami *trans*, w roztworach nie zmieniają swojej geometrii. Widma pola ligandów związków tego typu nie zmieniają się w czasie. Stałe są także momenty magnetyczne ich roztworów. Moment magnetyczny zmienia się w zakresie 1,83–1,86 μ_B w rozpuszczalnikach niepolarnych [7] i praktycznie nie zmienia się w stosunku do ciała stałego.

W naszych badaniach [70] nad kompleksami miedzi(II) z dwudonorowymi zasadami Schiffa pochodzącymi od aldehydu salicylowego, jego pochodnych i amin aromatycznych stwierdzono, że podstawniki przy azocie iminowym i w części aldehydowej ligandów wpływają na intensywność maksimów widm. Szczególnie przy ok. 25 000 cm⁻¹ obserwowany jest efekt hiperchromowy w kolejności:



Zmiany geometrii chromoforu pod wpływem rozpuszczalnika występują w przypadku kompleksów [Cu(sapN)₂] (HsapN=2-hydroksybenzylideno-5-nitro-2-aminopirydyna) i [Cu(Nsap)₂] (HsapN=2-hydroksy-5-nitrobenzylideno-2-aminopirydyna). W przypadkach gdy nie zmienia się pierwsza sfera koordynacyjna, intensywność maksimów w widmach roztworów kompleksów zależy od rozpuszczalnika. W zakresie VIS obserwuje się efekt hipochromowy w kolejności:



Kompleksy z trójdonorowymi zasadami Schiffa: 2-hydroksybenzylidenoimi-
nami w stanie stałym występują w postaci dimerów [76]. W rozpuszczalnikach
donorowych tworzą one pseudotetraedryczne solwaty. W pirydynie solwaty takie
zmieniają geometrię na piramidę tetragonalną, w której cząsteczka pirydyny jest
skoordynowana w pozycji aksjalnej [77, 78]. Geometria piramidy tetragonalnej
jest charakterystyczna także dla mieszanych kompleksów miedzi(II) z trójdo-
norowymi zasadami Schiffa. Badania struktur kryształów kompleksów miedzi z za-
sadami Schiffa pochodzącymi od aldehydu salicylowego i glicyny prowadził
Warda [79–81]. W każdym z przypadków geometrię wokół jonu centralnego opi-
sywał jako piramidę tetragonalną utworzoną przez atomy donorowe, pochodzą-
ce od zasady Schiffa (N,O₂), oraz ligandy jednodonorowe wody, 2,3-dimetylopi-
rydyny [80] lub inne.

Przykładem pięciokoordynacyjnego kompleksu o geometrii piramidy tetra-
gonalnej jest kompleks miedzi(II) z H₂salen (przy uwzględnieniu wiązania mię-
dzycząsteczkowego Cu–O'). Widma stałego kompleksu wykazują bowiem cha-
rakteryistyczne dla pięciokoordynacyjnych kompleksów maksima w zakresie VIS
przy ok. 20 800 i 17 300 cm⁻¹ [82].

Znane są także kompleksy miedzi(II) z pięciodonorowymi zasadami Schif-
fa. Przykładami takich ligandów są pochodne 2-hydroksybenzylidenedipropyle-
notriaminy. Ich kompleksy z miedzią(II) mają geometrię bipiramidy trygonalnej
[83]. Widma refleksyjne omawianych kompleksów w części VIS charakteryzują
się maksimami przy ok. 12 500 cm⁻¹ i przegięciami przy ok. 11 000 cm⁻¹. Prze-
gięcia te są słabiej wykształcone dla widm roztworów. Geometria takich komple-
ksów jest trwała i nie ulega zmianie nawet w silnie donorowych rozpuszczalni-
kach.

Na podstawie widm elektronowych stwierdzono, że w rozpuszczalnikach
o silnych właściwościach donorowych, np. w pirydynie, czterokoordynacyjne
kompleksy miedzi(II) mogą przyłączać jedną lub dwie cząsteczki rozpuszczalni-
ka w zależności od warunków sterycznych. W widmach kompleksów, w których
podstawnik przy azocie iminowym stanowi grupa *tert*-butylowa lub izopropylowa,
praktycznie nie zauważono zmian w różnych rozpuszczalnikach. Świadczy
to o braku zmian lub bardzo małych zmianach konfiguracyjnych. Kompleksy
miedzi(II) z zasadami Schiffa pochodzącymi od aldehydu salicylowego i dwu-
podstawionej aminy aromatycznej w roztworach zachowują się odmiennie.
Związki tego typu w rozpuszczalnikach o silnych właściwościach donorowych
tworzą formy pięciokoordynacyjne. Kompleksy z czterodonorowymi ligandami
typu H₂salen w rozpuszczalnikach o silnych właściwościach donorowych zmie-
niają geometrię i tworzą formy pięcio- lub sześciokoordynacyjne.

2.2. Kompleksy kobaltu(II)

Kompleksy kobaltu(II) z dwudonorowymi zasadami Schiffa pochodzącymi od
aldehydu salicylowego badane są od dawna. Dla takich czterokoordynacyjnych

kompleksów kobaltu(II) możliwe są geometrie kwadratowa i tetraedryczna. Opierając się na widmach elektronowych, a w szczególności na pasmach pola ligandów, oraz właściwościach magnetycznych, można stwierdzić, że kompleksy z dwudonorowymi zasadami Schiffa pochodzącymi od aldehydu salicylowego mają symetrię tetraedryczną i są wysokospinowe. Zmiany położenia i intensywności pasm pola ligandów dla kompleksów o różnych geometriach (oktaedryczna i tetraedryczna) są tak oczywiste, że mogą służyć jako potwierdzenie ich stereochemii [84].

Tak jak i w innych kompleksach z zasadami Schiffa, największe różnice w strukturze powoduje zmiana podstawnika przy azocie iminowym. Kiedy podstawnikiem tym jest wodór, zmiany podstawnika w części aldehydowej nie powodują zmian stereochemicznych kompleksów monomerycznych zarówno w cieple stałym, jak i w roztworze. Kompleksy z zasadami Schiffa mającymi podstawniki rozbudowane przy azocie iminowym, np. grupę propylową, butylową [85], izopropylową, *tert*-butylową, cykloheksylową czy arylową, są pseudotetraedryczne [8, 86]. Taka stereochemia była udowodniona przez badania struktur kryształów, kompleksów kobaltu z 2-hydroksybenzylidenoizopropylaminą [10, 87, 88] i 2-hydroksybenzylidenobutylaminą [10, 87–89]. Oba związki wykazywały duże podobieństwo we właściwościach magnetycznych i spektroskopowych. Inne tego typu związki kobaltu(II), dla których nieznanne są struktury kryształów, wykazują podobne właściwości, więc z dużym prawdopodobieństwem są także tetraedryczne [86]. Ogólnie kompleksy tetraedryczne kobaltu(II) z dwudonorowymi zasadami Schiffa mają momenty magnetyczne w zakresie 4,2–4,5 μ_B [12, 90, 91] i ich elektronowe widma absorpcyjne w roztworach charakteryzują się maksimami [86, 92, 93] przy ok. 7600, 10 700 i 19 200 cm^{-1} .

West [94] badał wpływ dodatku wody na widmo kompleksu $[\text{Co}(\text{salan})_2]$ w etanolu. W swojej pracy przedstawił widma $[\text{Co}(\text{salan})_2]$ w etanolu absolutnym oraz w jego 10% mieszaninie z wodą. Autor porównał widma: kompleksu (absolutny i 10% etanol $c = 4 \times 10^{-5}\text{M}$) oraz liganda (10% etanol, $c = 8 \times 10^{-5}\text{M}$). Na podstawie tego doświadczenia West [94] wykazał, że zanikanie pasma przy ok. 35 000 cm^{-1} w widmie kompleksu w etanolu absolutnym można przyporządkować zmianie geometrii chromoforu z tetraedrycznej na oktaedryczną z utworzeniem formy $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$. Elektronowe widmo kompleksu w 10% etanolu było zbliżone do widma liganda, co jest dowodem, według autora, na obecność Hsalan w roztworze. Swoje rozważania poparł pomiarami przewodnictwa molowego roztworów, którego wartości wzrastają wraz z rozcieńczeniem etanolu wodą.

W naszych badaniach [70] dotyczących kompleksów kobaltu(II) z dwudonorowymi zasadami Schiffa pochodzącymi od aldehydu salicylowego, jego pochodnych i amin aromatycznych nie zajmowaliśmy się mieszaninami rozpuszczalników, ale podobne efekty zauważono podczas rozcieńczania roztworów. Zauważono wpływ rozpuszczalnika na widma w zakresie NIR-VIS. Stwierdzono efekt hipochromowy maksimów przy około 11 000 cm^{-1} w kolejności rozpuszczalników:

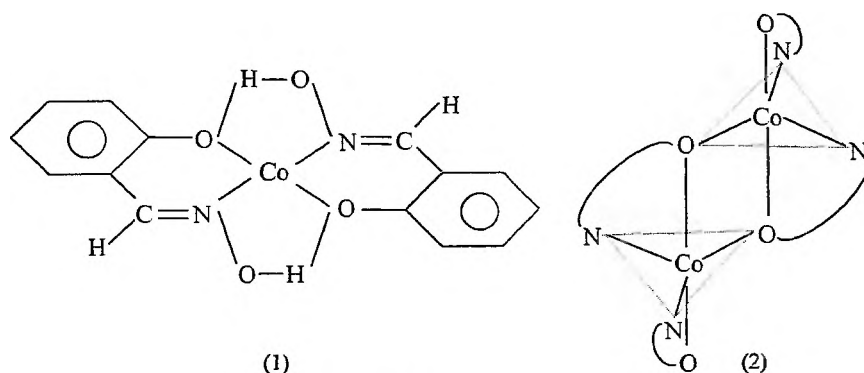
chloroform > dimetyloformamid > dimetylosulfotlenek.

Zauważono, że w zakresie UV przy zachowaniu zbliżonych stężeń rozpuszczalniki wpływają tylko na zmiany intensywności pasm. Intensywność widm roztworów kompleksów kobaltu(II) w zakresie 11 000–33 000 cm^{-1} zależy od właściwości rozpuszczalników. Intensywność maksimów (efekt hipochromowy) maleje ze wzrostem DN rozpuszczalników.

chloroform > dimetyloformamid > dimetylosulfotlenek.

Wpływ podstawnika w ugrupowaniu aldehydowym na widmo kompleksu w zakresie NIR-VIS jest nieznaczny. Podstawnik przy azocie iminowym natomiast wpływa znacząco na intensywność widm kompleksów kobaltu(II) w omawianym zakresie.

Dwudonorowe zasady Schiffa pochodzące od aldehydu salicylowego mogą tworzyć kompleksy z kobaltem(II) o geometrii płaskiej [12]. Są one niskospinowe, a ich moment magnetyczny mieści się w przedziale 2,2–2,6 μ_B . W takich przypadkach podstawnikiem przy azocie iminowym jest wodór lub grupa hydroksylowa. Geometria taka jest trwała ze względu na tworzenie wiązań wodorowych odpowiednio N–H–O i O–H–O. Drugie z nich przedstawione jest na schemacie 4 (struktura (1)).



Schemat 4

Geometria płaska jest charakterystyczna dla kompleksów kobaltu(II) z czterodonorowymi zasadami Schiffa pochodzącymi od aldehydu salicylowego [8, 12, 15, 95–101] lub acetyloacetonu [12, 99–102]. Widma elektronowe takich kompleksów charakteryzuje maksimum przy około 8300 cm^{-1} ($\epsilon_{\text{max}} \approx 20 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), które można przyporządkować przejściom typu $d-d$ [8, 98, 102].

Rzadziej spotykane są kompleksy kobaltu(II) pięciokoordynacyjne z zasadami Schiffa. Jednym z najbardziej znanych kompleksów tego typu jest związek z 2-hydroksybenzylidenometyloaminą. Geometria tego kompleksu była opisywana początkowo jako płaska [85], ale na podstawie badań krystalograficznych

stwierdzono, że otoczenie jonu kobaltu(II) ma geometrię bipiramidy trygonalnej [103], którą przedstawiono na schemacie 4 (struktura (2)). Znane są także pięciokoordynacyjne kompleksy kobaltu(II) o geometrii piramidy tetragonalnej. Przykładami takich związków są kompleksy z ligandami pochodzącymi od aldehydu salicylowego i *N,N*-dietyloetylenodiaminy [8, 99, 104].

W przypadku rozpuszczalników zdolnych do koordynowania, jak np. pirydyna, geometria wokół jonu kobaltu(II) może być różna. Dlatego badania w rozpuszczalnikach dostarczają ważnych informacji na temat stereochemii. Jeśli podstawnikiem przy azocie iminowym jest łańcuch alkilowy, to w pirydyinie kompleksy koordynują dodatkowo dwie cząsteczki rozpuszczalnika w pozycjach aksjalnych, przez co stają się sześciokoordynacyjne (pseudooktaedryczne) [86]. Z drugiej strony jednak, tetraedryczna geometria kompleksu kobaltu(II), z grupą *tert*-butylową jako podstawnikiem przy azocie iminowym, zostaje zachowana nawet w pirydyinie [8]. Jest to spowodowane warunkami sterycznymi. W przypadku kiedy podstawnikami są rozgałęzione łańcuchy alkilowe, np. izopropan czy *sec*-butyl, steryczna przeszkoda nie jest taka duża jak dla grupy *tert*-butylowej, ale znacznie większa niż w przypadku łańcuchów alkilowych. Widma elektronowe tych kompleksów w pirydyinie tylko nieznacznie różnią się od widm w niedonorowych rozpuszczalnikach. To przemawia za tym, że w układach pirydynowych zachodzi równowaga form tetraedrycznej i oktaedrycznej, być może łącznie z formą pięciokoordynacyjną. Obliczono, że w temperaturze pokojowej zawartość procentowa formy tetraedrycznej dla kompleksu kobaltu(II) z 2-hydroksybenzylidenoizopropiloaminą wynosi ok. 90%, a dla kompleksu z 2-hydroksybenzylidenocykloheksylaminą wynosi ok. 55%, przy zaniedbaniu obecności formy pięciokoordynacyjnej [8]. Koordynacja rozpuszczalnika (dwie cząsteczki pirydyny w pozycji aksjalnej) występuje również w przypadku zasad Schiffa pochodzących od aminy aromatycznej (podstawnikiem przy azocie iminowym jest benzen, chlorobenzen, naftyl lub ich pochodne) [90]. Nie dotyczy to kompleksów kobaltu(II) z 2-hydroksybenzylideno-2,6-dimetylofenyloaminą i 2-hydroksybenzylideno-2,6-dietylofenyloaminą [8, 16, 105], w których przeszkody steryczne są znaczne. Widma elektronowe w pirydyinie obu kompleksów różnią się od typowych dla tetraedrycznych i oktaedrycznych kompleksów kobaltu(II). Na podstawie widm i efektów sterycznych stwierdzono, że w pirydyinie tworzy się głównie pięciokoordynacyjna forma kompleksowa. Solwat pięciokoordynacyjny jest w równowadze z tetraedryczną formą kompleksową. Stężenie formy sześciokoordynacyjnej (o ile taka istnieje) jest nieznaczące. Równowaga w roztworze pirydynowym zależy nieznacznie od podstawnika R_1 (schemat 3) w ugrupowaniu aldehydowym. Kompleksy kobaltu(II) z zasadami Schiffa pochodzącymi od aldehydu salicylowego lub jego pochodnych i tej samej aminy w roztworach zachowują się podobnie. Ogólnie w pirydyinie kompleksy z zasadami Schiffa z podstawionym ugrupowaniem aldehydowym mają większą tendencję do tworzenia pięcio- lub sześciokoordynacyjnych form kompleksowych niż odpowiadające im kompleksy z nie podstawionymi ligandami.

Chemia kompleksów metali z zasadami Schiffa rozwija się w różnych kierunkach. Przedstawione w niniejszym artykule badania dotyczące aspektów strukturalnych i spektroskopowych prezentują obecny stan wiedzy z tej dziedziny.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] A.R. Amundsen, J. Whelan, B. Bosnich, *J. Am. Chem. Soc.*, 1977, **99**, 6730.
- [2] R.D. Jones, D.A. Summerville, F. Basolo, *Chem. Rev.*, 1979, **79**, 139.
- [3] R.K. Parashar, R.C. Sharma, *Inorg. Chim. Acta*, 1988, **151**, 201.
- [4] R.W. Saalfrank, O. Struck, D. Danion, J. Hassa, L. Toupet, *Chem. Mater.*, 1994, **6**, 1432.
- [5] J. Costamagna, J. Vargas, R. Latorre, A. Alvarado, G. Mena, *Coord. Chem. Rev.*, 1992, **119**, 67.
- [6] E.V. Rybak-Akimova, W. Otto, P. Deardolf, R. Roesner, D.H. Bush, *Inorg. Chem.*, 1997, **36**, 2746.
- [7] L. Sacconi, *Coord. Chem. Rev.*, 1966, **1**, 126.
- [8] S. Yamada, *Coord. Chem. Rev.*, 1966, **1**, 415.
- [9] R.H. Holm, G.W. Everett, Jr., A. Chakravorty, *Progr. Inorg. Chem.*, 1966, **7**, 83.
- [10] H. Holm, J.M. O'Connor, *Progr. Inorg. Chem.*, 1971, **14**, 241.
- [11] M. Calligaris, G. Nardin, L. Randaccio, *Coord. Chem. Rev.*, 1972, **7**, 385.
- [12] J. Császár, *Acta Phys. Chem.*, 1982, **28**, 59.
- [13] M. Melnik, *Coord. Chem. Rev.*, 1982, **42**, 259.
- [14] S. Yamada, A. Takeuchi, *Coord. Chem. Rev.*, 1982, **43**, 187.
- [15] A.D. Garnovskii, A.L. Nivorozhkin, V.I. Minkin, *Coord. Chem. Rev.*, 1993, **126**, 1.
- [16] S. Yamada, *Coord. Chem. Rev.*, 1999, **190-192**, 537.
- [17] E. Frasson, C. Panattoni, L. Sacconi, *J. Phys. Chem.*, 1959, **63**, 1908.
- [18] D. Hall, T.N. Waters, *J. Chem. Soc.*, 1960, 2644.
- [19] J. Ferguson, *J. Chem. Phys.*, 1961, **34**, 611.
- [20] E. Frasson, C. Panattoni, *Z. Kristallogr.*, 1961, **116**, 154.
- [21] G.R. Clark, D. Hall, T.N. Waters, *J. Chem. Soc. (A)*, 1969, 2808.
- [22] M.D. Hobday, T.D. Smith, *Coord. Chem. Rev.*, 1972, 311.
- [23] J.M. Bindlish, S.C. Bhatia, P.C. Jain, *Acta Cryst., Sect. B*, 1976, **32**, 2848.
- [24] R.J. Buther, E. Sinn, *Inorg. Chem.*, 1976, **15**, 1604.
- [25] N.B. Pahor, M. Calligaris, P. Delise, G. Dodic, G. Nardin, L. Randaccio, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1976, 2478.
- [26] H. Tamura, K. Ogawa, A. Takeuchi, S. Yamada, *Chem. Lett.*, 1977, 889.
- [27] A.G. Manfredotti, C. Guastini, *Acta Cryst., Sect. C*, 1983, **39**, 867.
- [28] M.G.B. Drew, R.N. Prasad, R.P. Sharma, *Acta Cryst., Sect. C*, 1985, **41**, 1755.
- [29] T.C. Jones, T.N. Waters, *Croat. Chem. Acta*, 1986, **59**, 825.
- [30] B. Kamenar, B. Kaitner, A. Stefanovic, *Acta Cryst., Sect. C*, 1990, **46**, 1627.
- [31] B. Kamenar, B. Kaitner, A. Stefanovic, *Acta Cryst., Sect. C*, 1990, **46**, 1923.
- [32] N. Hoshino, H. Murakami, Y. Matsunaga, T. Inabe, Y. Maruyama, *Inorg. Chem.*, 1990, 1177.
- [33] H. Sakiyama, H. Okwa, N. Matsumoto, S. Kida, *Bull. Chem. Soc., Japan*, 1991, **64**, 2644.
- [34] A. Takeuchi, H. Kuma, S. Yamada, *Syn. React. Inorg. Met. Org. Chem.*, 1994, **24**, 171.
- [35] B. Kamenar, A. Stefanovic, I. Zigrovic, *Z. Kristallogr.*, 1995, **210**, 662.
- [36] B. Kamenar, A. Stefanovic, B. Sorgic, *Z. Kristallogr.*, 1995, **210**, 728.
- [37] B. Kamenar, A. Stefanovic, S. Antolic, *Z. Kristallogr.*, 1995, **210**, 730.
- [38] W. Maniukiewicz, M. Bukowska-Strzyżewska, *J. Chem. Crystallography*, 1996, **26**, 43.
- [39] Y. Elerman, M. Geselle, *Acta Cryst., Sect. C*, 1997, **53**, 549.
- [40] O. Atakol, H. Nazir, M.N. Tahir, D. Ulku, *Anal. Sci.*, 1997, **13**, 519.

- [41] R. Hernandezmolina, A. Mederos, P. Gili, S. Dominguez, P. Nunez, G. Germain, T. Debaerdemaeker, *Inorg. Chim. Acta*, 1997, **256**, 319.
- [42] X.R. Bu, C.R. Jackson, D. Vanderveer, X.Z. You, Q.J. Meng, R.X. Wang, *Polyhedron*, 1997, **16**, 2991.
- [43] T.H. Lu, H.H. Yao, J.M. Lo, S.F. Tung, *Acta Cryst., Sect. C*, 1998, **54**, 1600.
- [44] M. Calvin, R.H. Bailes, W.K. Wilmarth, *J. Am. Chem. Soc.*, 1946, **68**, 2254.
- [45] E.I. Ochiai, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 1973, **35**, 1727.
- [46] E. Eichhorn, A. Rieker, B. Speiser, H. Stahl, *Inorg. Chem.*, 1997, **36**, 3307.
- [47] A. Garciaraso, J.J. Fiol, F. Badenas, M. Quiros, *Polyhedron*, 1996, **15**, 407.
- [48] Z. Wang, Z.S. Wu, Z.H. Yen, Z.F. Le, X.D. Zhu, Q.H. Huang, *Syn. React. Inorg. Met. Org. Chem.*, 1994, **24**, 1453.
- [49] P. Kafarski, B. Lejczak, *Chemia bioorganiczna*. PWN, Warszawa 1994.
- [50] D. Higelin, H. Sixl, *Chem. Phys.*, 1983, **77**, 391.
- [51] J. Bergman, L. Leiserowitz, K. Osaki, *J. Chem. Soc.*, 1964, 2086.
- [52] M.D. Cohen, G.M.J. Schmidt, S. Flavian, *J. Chem. Soc.*, 1964, 2041.
- [53] M.D. Cohen, Y. Hirschberg, G.M.J. Schmidt, *J. Chem. Soc.*, 1964, 2051.
- [54] M.D. Cohen, Y. Hirschberg, G.M.J. Schmidt, *J. Chem. Soc.*, 1964, 2060.
- [55] J.W. Ledbetter, Jr., *J. Phys. Chem.*, 1966, **70**, 2245.
- [56] E. Hadjoudis, M. Vittorakis, I. Mostakali-Mavridis, *Tetrahedron*, 1987, **43**, 1345.
- [57] J.W. Ledbetter, *J. Phys. Chem.*, 1968, **72**, 4111.
- [58] M. Yildiz, Z. Kiliç, T. Hökelek, *J. Mol. Struct.*, 1998, **441**, 1.
- [59] D. Heinert, A. Martell, *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, **85**, 183.
- [60] D. Heinert, A. Martell, *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, **85**, 189.
- [61] R. Herzfeld, P. Nagy, *Spectrosc. Lett.*, 1999, **32**, 57.
- [62] E. Ito, H. Oji, T. Araki, K. Oichi, H. Ishii, Y. Ouchi, T. Ohta, N. Kosugi, Y. Maruyama, T. Naito, T. Inabe, K. Seki, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 6336.
- [63] P. Skrabal, J. Steiger, H. Zollinger, *Helv. Chim. Acta*, 1975, **58**, 800.
- [64] R. Akaba, K. Tokumaru, T. Kobayashi, *Bull. Chem. Soc., Japan*, 1980, **53**, 1993.
- [65] W.F. Smith, *Tetrahedron*, 1963, **19**, 445.
- [66] T. Bally, E. Haselbach, S. Lanyiova, F. Marschner, M. Rossi, *Helv. Chim. Acta*, 1976, **59**, 486.
- [67] P. Jacques, J. Faure, *Theor. Chim. Acta*, 1977, **46**, 307.
- [68] V.I. Minkin, Y.A. Zhdanov, E.A. Medyantzeva, Y.A. Ostroumov, *Tetrahedron*, 1967, **23**, 3651.
- [69] R. Gaiwnecki, *Wiad. Chem.*, 1977, **31**, 685.
- [70] (a) I. Kuźniarska-Biernacka, *Spektrochemiczne właściwości kompleksów miedzi(II) i kobaltu(II) z zasadami Schiffa w roztworach*, praca doktorska, Politechnika Wrocławska, Wrocław 2001; (b) K. Kurzak, I. Kuźniarska-Biernacka, B. Kurzak, J. Jezierska, *J. Solution Chem.*, 2001, **30**, 709 (i prace tam cytowane).
- [71] G.V. Panova, N.K. Vikulova, V.M. Potapov, *Usp. Khim.*, 1980, **49**, 1234.
- [72] S.C. Bhatia, J.M. Bindlish, A.R. Saini, P.C. Jain, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1981, 1773.
- [73] S. Yamada, A. Nishikawa, *Bull. Chem. Soc.*, 1963, **36**, 755.
- [74] R. Knoch, A. Wilk, K.J. Wannowius, D. Reinen, H. Elias, *Inorg. Chem.*, 1990, **29**, 3799.
- [75] T.P. Chesman, D. Hall, T.N. Waters, *J. Chem. Soc. (A)*, 1966, 694.
- [76] J. Jezierska, *Struktura elektronowa a własności magnetyczne kompleksów miedzi(II) i wana-dylu(II) z zasadami Schiffa* (praca doktorska), Uniwersytet Wrocławski, Wrocław 1977.
- [77] T. Toki, Y. Muto, M. Kato, K. Imai, H.B. Jonassen, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 1972, **34**, 3377.
- [78] M. Leluk, B. Jeżowska-Trzebiatowska, J. Jezierska, *Polyhedron*, 1991, **10**, 1653.
- [79] S. Warda, *Acta. Cryst., Sect. C*, 1996, **52**, 2763.
- [80] S. Warda, *Acta. Cryst., Sect. C*, 1998, **54**, 187.
- [81] S. Warda, *Acta. Cryst., Sect. C*, 1998, **54**, 189.
- [82] J. Ferguson, *J. Phys. Chem.*, 1961, **34**, 2206.

- [83] L. Sacconi, I. Bertini, *J. Am. Chem. Soc.*, 1966, **88**, 5180.
- [84] A.B.P. Lever, *Inorganic Electronic Spectroscopy*, Elsevier, Amsterdam 1984.
- [85] H. Nishikawa, S. Yamada, R. Thuschida, *Z. Anorg. Chem.*, 1962, **316**, 270.
- [86] H. Nishikawa, S. Yamada, *Bull. Chem. Soc., Japan*, 1964, **31**, 1154.
- [87] L. Sacconi, P. Paoletti, M. Ciampolini, *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, **85**, 411.
- [88] L. Sacconi, M. Ciampolini, *J. Chem. Soc.*, 1964, 276.
- [89] L. Sacconi, M. Ciampolini, F. Maggio, G. Del Re, *J. Am. Chem. Soc.*, 1960, **82**, 815.
- [90] L. Sacconi, M. Ciampolini, F. Maggio, F.P. Cavasino, *J. Am. Chem. Soc.*, 1962, **84**, 3246.
- [91] B.O. West, *J. Chem. Soc.*, 1962, 1374.
- [92] A.P. Terent'ev, G.V. Panova, E.G. Rukhadze, *Zh. Obsch. Khim.*, 1964, **34**, 3019.
- [93] F. Tunã, L. Patron, *Rev. Roum. Chim.*, 1997, **42**, 677.
- [94] B. West, *J. Chem. Soc.*, 1952, 3123.
- [95] M.A. Hitchman, *Inorg. Chem.*, 1977, **16**, 1985.
- [96] M.A. Hitchman, *Inorg. Chim. Acta*, 1977, **26**, 273.
- [97] A. Ceulemans, M. Dendooven, L.G. Vanquickenborne, *Inorg. Chem.*, 1985, **24**, 1159.
- [98] H. Nishikawa, S. Yamada, *Bull. Chem. Soc., Japan*, 1964, **37**, 8.
- [99] G.W. Everett, Jr., R.H. Holm, *J. Am. Chem. Soc.*, 1966, **88**, 2442.
- [100] C.J. Hipp, W.A. Baker, Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, 1970, **92**, 792.
- [101] R.J. Deeth, M.J. Duer, M. Gerloch, *Inorg. Chem.*, 1987, **26**, 2573.
- [102] F.L. Urbach, R.D. Bereman, J.A. Topich, M. Hariharan, B.J. Kalbacher, *J. Am. Chem. Soc.*, 1974, **96**, 5063.
- [103] L. Sacconi, M. Ciampolini, G.P. Speroni, *J. Am. Chem. Soc.*, 1965, **87**, 3102.
- [104] L. Sacconi, L.P. Orioli, M.D. Vaira, *J. Am. Chem. Soc.*, 1965, **87**, 2059.
- [105] S. Yamada, H. Nishikawa, *Bull. Chem. Soc., Japan*, 1965, **38**, 683.

Praca wpłynęła do Redakcji 8 grudnia 2000

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

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

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

A. Huczko, P. Byszewski, *Fulereny i nanorurki węglowe*, cena 5 zł

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**METODY ZATEŻANIA ANALITÓW
W KAPILARZE W WYSOKOSPRAWNEJ
ELEKTROFOREZIE KAPILARNEJ**

**MODES OF ON-CAPILLARY SAMPLE
CONCENTRATION IN HIGH PERFORMANCE
CAPILLARY ELECTROPHORESIS**

Angelika Mrass, Edward Bald

*Zakład Chemii Środowiska, Katedra Technologii Chemicznej
i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki
ul. Pomorska 163, 90-236 Łódź*

Abstract

Stosowane skróty

Wstęp

1. Zateżanie izotachforetyczne

2. Zateżanie przez spiętrzanie

2.1. Spiętrzanie w elektroforezie strefowej

2.1.1. Normalne spiętrzanie

2.1.2. Spiętrzanie z dużą strefą próbki

2.1.3. Spiętrzanie z zastosowaniem mieszaniny acetonitrylu i soli

2.1.4. Spiętrzanie przez wprowadzanie próbki ze wzmocnieniem pola elektrycznego

2.2. Spiętrzanie w micelarnej chromatografii elektrokinetycznej

2.2.1. Normalne spiętrzanie

2.2.2. Spiętrzanie z odwróconą polaryzacją elektrod

2.2.3. Spiętrzanie z użyciem przeciwnie migrujących miceli

2.2.4. Spiętrzanie przez wprowadzanie próbki ze wzmocnieniem pola elektrycznego

3. Zateżanie przez zmiatanie

3.1. Zateżanie przez elektrokinetyczne wprowadzanie próbki techniką kationowo selektywnego wyczerpywania i zmiatanie

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane



Angelika Mrass ukończyła studia na Uniwersytecie Łódzkim, na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi, na kierunku Ochrona Środowiska w 1998 r., uzyskując tytuł magistra. Jest słuchaczką dziennego studium doktoranckiego na Wydziale Fizyki i Chemii Uniwersytetu Łódzkiego. Wykonuje pracę doktorską w dziedzinie zastosowań technik elektromigracyjnych do oznaczania środowiskowo ważnych, zredukowanych związków siarki. Odbyla staż naukowy na Uniwersytecie Carla von Ossietzky'ego, Niemcy, w zakresie analizy skażeń wewnątrz pomieszczeń z zastosowaniem łączonych technik instrumentalnych.



Edward Bald ukończył studia w Katedrze Technologii Chemicznej i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego w 1964 r. Po uzyskaniu stopnia doktora na tym samym Uniwersytecie w 1971 r. studiował przez dwa lata chemię organiczną na Uniwersytecie Tokijskim pod kierunkiem prof. Teruaki Mukaiyama. Od 1981 r. przez dwa lata przebywał na Uniwersytecie Ottawskim w Kanadzie, gdzie wykładał chemię ogólną oraz prowadził badania w dziedzinie chemii organicznej polimerów, współpracując z prof. Jeanem Frechetem. Stopień doktora habilitowanego uzyskał w 1987 r. Jest zatrudniony na stanowisku profesora nadzwyczajnego na Uniwersytecie Łódzkim, gdzie pełni funkcję kierownika Zakładu Chemii Środowiska. Jest autorem lub współautorem kilkudziesięciu oryginalnych prac naukowych. Jego aktualne zainteresowania naukowe dotyczą biochemii i roli organicznych związków siarki w przemianach fizjologicznych i patologicznych w organizmie człowieka, analizy związków siarki w próbkach biologicznych oraz derywatyzacji chemicznej w wysokosprawnej chromatografii cieczowej i wysokosprawnej elektroforezie kapilarniej.

ABSTRACT

High performance capillary electrophoresis (HPCE) [1-6] was born of the marriage of the powerful separation mechanisms of electrophoresis with the instrumentation and automation concepts of chromatography and it has developed into an exciting and extremely powerful analytical technique in recent years. Numerous advantages, such as short analysis times, high separation efficiencies, low consumption of chemicals and simplicity of the instrument make HPCE competitive to other separation techniques. One of the greatest advantages is its diverse application range, mainly due to a numerous modes of separation. Originally considered primarily for the analysis of biological macromolecules, it has proved useful for separations of compounds such as amino acids, vitamins, pesticides, inorganic ions, organic acids, dyes, surfactants, peptides and proteins, carbohydrates, oligonucleotides and DNA restriction fragments, and even whole cells and virus particles. Moreover, HPCE makes the separation of chiral compounds possible.

However, one restraint of the HPCE techniques is the low concentration sensitivity as a consequence of limited optical pathlength for directed on-capillary photometric detection (the most popular HPCE mode of detection) and the limited volume of sample solution that can be injected into the capillary. Therefore one of the greatest challenges in the area of HPCE methods development is to lower limits of detection (LLD) which is at least an order of magnitude higher than in high performance liquid chromatography (HPLC).

Several on-line strategies have been demonstrated to decrease LLD in HPCE, like introducing detector cell with extended pathlength [7-11], powerful detectors, i.e. laser-induced fluorescence [12, 13], on-line preconcentrators with the use of solid-phase extraction materials, coated/impregnated membranes [14] or ion-exchange flow injection system coupled to capillary electrophoresis [15].

Among different remedies, on-capillary concentration techniques are easy to apply and do not require alteration of HPCE instrumentation, which are isotachophoretic preconcentration, sample stacking – originally developed for ionic compounds, and recently introduced for micellar electrokinetic chromatography (MEKC) sweeping technique.

Mechanisms of concentration in diverse techniques are different. The concentration effect in isotachopheresis (ITP) relies on the adjustment of the concentration of the dilute sample to the higher concentration of the leading electrolyte [16-19]. Preconcentration by ITP can be performed online [20-22] or in coupled columns [23-27]. In sample stacking [28-33], the concentration effect relies on the difference in electrophoretic velocities between the high- and low-conductivity zones (background electrolyte and sample zones, respectively). Sample stacking technique can be performed in CZE [34-50] as well as in MEKC [51-63] mode. From 10 to more than 1000-fold improvements in detector response have been documented. Sweeping [64-68], a new concept in MEKC, is defined as the picking and accumulating of analyte molecules by pseudostationary phase that enters and fills the sample zone upon application of voltage. As on-capillary concentration technique, it has provided more than 5000-fold increases in detection sensitivity. Recently developed a cation-selective exhaustive injection and sweeping technique [69] improves peak heights of cation analytes a million-fold.

STOSOWANE SKRÓTY

- CEC – kapilarna elektrochromatografia (ang. *capillary electrochromatography*)
CGE – kapilarna elektroforeza żelowa (ang. *capillary gel electrophoresis*)
CIEF – kapilarne izoelektroogniskowanie (ang. *capillary isoelectric focusing*)
CITP – kapilarna izotachoforeza (ang. *capillary isotachopheresis*)
CSEI-S – elektrokinetyczne wprowadzanie próbki techniką kationowo-selektywnego wyczerpywania i zmiatanie (ang. *cation-selective exhaustive injection and sweeping*)
CZE – kapilarna elektroforeza strefowa (ang. *capillary zone electrophoresis*)
EKC – elektrokinetyczna chromatografia (ang. *electrokinetic chromatography*)
EOF – przepływ elektroosmotyczny (ang. *electroosmotic flow*)
FESI – spiętrzanie przez wprowadzanie próbki ze wzmocnieniem pola elektrycznego (ang. *field-enhanced sample stacking*)
FESI-PS – spiętrzanie próbki ze wzmocnieniem pola elektrycznego i zmianą polaryzacji (ang. *field-enhanced sample injection with polarity switching*)
FESI-RMM – spiętrzanie próbki ze wzmocnieniem pola elektrycznego z użyciem przeciwnie migrujących miceli (ang. *field-enhanced sample injection with reversed migrating micelles*)
HPCE – wysokosprawna elektroforeza kapilarna (ang. *high performance capillary electrophoresis*)
HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. *high performance liquid chromatography*)
ITP – izotachoforeza (ang. *isotachopheresis*)
LLD – dolny limit detekcji (ang. *low limit of detection*)
LVSS – spiętrzanie z dużą strefą próbki (ang. *large volume sample stacking*)
MEKC – micelarna elektrokinetyczna chromatografia (ang. *micellar electrokinetic chromatography*)
NSM – normalne spiętrzanie (ang. *normal stacking mode*)
REPSM – spiętrzanie z odwróconą polaryzacją elektrod (ang. *reversed electrode polarity stacking mode*)
SANaCl – spiętrzanie z zastosowaniem mieszaniny acetonitrylu i soli (ang. *stacking by acetonitrile-salt mixtures*)
SDS – dodecylosiarczan sodu (ang. *sodium dodecyl sulfate*)
SRMM – spiętrzanie z użyciem przeciwnie migrujących miceli (ang. *stacking with reverse migrating micelles*)
SRMM-WP – spiętrzanie z użyciem przeciwnie migrujących miceli i strefy wodnej (ang. *stacking using reverse migrating micelles and water plug*)
SS – spiętrzanie próbki (ang. *sample stacking*)

WSTĘP

Wysokosprawna elektroforeza kapilarna (HPCE) [1–3] jest wysokorozdzielczą techniką separacyjną, która w procesie rozdzielania cząsteczek i jonów wykorzystuje zjawisko elektroforezy. Zjawisko elektroforezy polega na migracji cząsteczek naładowanych w polu elektrycznym w wyniku przyciągania lub odpychania. Inicjatorem badań prowadzonych z wykorzystaniem elektroforezy był szwedzki chemik Tiselius, który w 1937 r. zastosował ją do rozdzielania mieszaniny protein. Po umieszczeniu mieszaniny protein w rurce między roztworami dwóch buforów i po przyłożeniu pola elektrycznego zaobserwował ruch składników próbki, których kierunek i szybkość zdeterminowana była odpowiednio ich ładunkiem i ruchliwością. W 1948 r. Tiselius za swoje dokonania w dziedzinie nauk separacyjnych otrzymał Nagrodę Nobla.

Sprawność rozdzielania w wolnym roztworze jest ograniczona przez dyfuzję termiczną oraz konwekcję. Dlatego elektroforeza tradycyjna przeprowadzana jest w mediach zapobiegających konwekcji, np. w poliakrylamidzie lub żelu agarowym. Wadą tego rozwiązania jest długi czas analizy, mała sprawność, trudności z detekcją i automatyzacją. Alternatywne do sztabek są rurki o wąskim przekroju oraz kapilary. Zastosowanie kapilary uwolniło od zjawiska konwekcji i dyfuzji oraz umożliwiło utrzymanie stałej temperatury medium analitycznego wewnątrz rurki. Początkowo stosowano szklane lub teflonowe kapilary o wewnętrznej średnicy 200 μm . W latach 80. po raz pierwszy użyto krzemionkowej kapilary o średnicy 75 μm . Wtedy też Jorgenson [4, 5] rozszerzył teorię elektroforezy, opisał zależności między operacyjnymi parametrami i jakością rozdzielania oraz wykazał potencjalne zastosowania wysokosprawnej elektroforezy kapilarnej (HPCE) jako techniki analitycznej.

Dzięki wielu zaletom HPCE, z których najważniejsze to krótki czas analizy, wysoka sprawność rozdzielania (liczba pól teoretycznych od 10^5 do 10^6), niskie zużycie odczynników i prosta budowa aparatu sprawia, że HPCE stała się konkurencyjna wśród innych technik separacyjnych. Początkowo rozwinięta do separacji makrocząsteczek, obecnie znalazła zastosowanie do rozdzielania takich analitów, jak: aminokwasy, witaminy, pestycydy, jony nieorganiczne, kwasy organiczne, barwniki, surfaktanty, peptydy oraz białka, węglowodany, oligonukleotydy oraz fragmenty DNA, a nawet całe komórki czy fragmenty wirusów. HPCE umożliwia także separację i analizę związków chiralnych. Podstawy HPCE zostały opisane w wielu wydawnictwach książkowych wydanych w języku angielskim [1–3, 19]; w języku polskim technikę tę spopularyzował Witkiewicz [6].

Uniwersalność wysokosprawnej elektroforezy kapilarnej (HPCE) po części związana jest z istnieniem różnych technik separacyjnych. Mechanizmy rozdzielania w każdej technice są różne, co umożliwia wykorzystanie elektroforezy w wielu dziedzinach nauki. W ramach HPCE wyróżnia się sześć podstawowych technik separacyjnych, które zostały zestawione w tab. 1; są to: kapilarna elektroforeza strefowa (CZE), kapilarna izotachoforeza (CITP), elektrokinetyczna

chromatografia (EKC), kapilarna elektroforeza żelowa (CGE), kapilarne izoelektroogniskowanie (CIEF), kapilarna elektrochromatografia (CEC).

W obrębie elektrokinetycznej chromatografii (EKC) można wydzielić kilka metod separacji, są to: EKC powinowactwa, cyklodekstrynowa EKC, dendrymeryczna EKC, EKC oparta na wymianie liganda, jonowymienna EKC, mikroemulsyjna EKC, micelarna EKC, micelarna EKC z zastosowaniem cyklodekstryn, rezorkarena EKC, zawieszona EKC.

Tabela 1. Techniki separacyjne wysokosprawnej elektroforezy kapilarnej (HPCE)

| Technika separacyjna | Podstawa separacji |
|----------------------------------|---|
| Elektroforeza strefowa | Ruchliwość w wolnym roztworze |
| Izotachoforeza | Poruszające się granice |
| Elektrokinetyczna chromatografia | Powinowactwo do fazy pseudostacjonarnej |
| Elektroforeza żelowa | Rozmiar i ładunek jonu |
| Izoelektroogniskowanie | Punkt izoelektryczny |
| Elektrochromatografia | Powinowactwo do fazy stacjonarnej |

Jednym z wyzwań podczas optymalizacji warunków elektroforetycznych metody w HPCE jest obniżenie dolnego limitu detekcji (LLD), wyrażanego w liczbie jednostek stężeniowych. W HPCE uzyskuje się LLD przynajmniej o rząd wielkości większy niż w HPLC. Wysoki LLD jest konsekwencją dwóch czynników: ograniczonej drogi optycznej w najpopularniejszej w HPCE detekcji w kapilarze [7] oraz niewielkiej objętości roztworu próbki, która może być wprowadzona do kapilary. Dodatkowo w celu uzyskania dobrej sprawności oraz krótkich czasów analizy konieczne jest stosowanie kapilar o małych wewnętrznych średnicach. Ponieważ przekrój kapilary jest kołowy, rzeczywista długość drogi optycznej jest zredukowana do 80% wewnętrznej średnicy [7].

Znanych jest wiele metod obniżania dolnego limitu detekcji (LLD) w HPCE. Jedną z nich jest wydłużenie drogi optycznej w obrębie kapilary [8, 9]. Zastosowanie bańki w obszarze detekcji kapilary lub celki w kształcie litery „Z” [10] umożliwia zwiększenie sygnału detektora odpowiednio: 3-krotnie i 10-krotnie. Natomiast zastosowanie celki wysokiej czułości, której kapilara w obszarze detekcji ma przekrój prostokąta, umożliwia podniesienie sygnału detektora 20-krotnie [11]. Ponieważ szum także zostaje zwiększony, realny wzrost czułości detekcji wyrażony stosunkiem sygnału do szumu dla celki Z oraz celki wysokiej czułości jest 10-krotny. Celka wysokiej czułości charakteryzuje się jednak większym zakresem liniowości (powyżej 2000 mAU) w porównaniu z celką Z (do 600 mAU). W celu uzyskania rozdzielonych pików na elektroferogramie w przypadku celki Z i celki wysokiej czułości strefy rozdzielonych analitów muszą być odległe od siebie o co najmniej 3 mm. Inną metodą obniżenia dolnego limitu detekcji (LLD) jest użycie detektorów wysokiej czułości, np. detektora z laserowo indukowaną fluorescencją umożliwia uzyskanie LLD rzędu attomoli [12, 13]. Kolejnym sposobem zwiększenia czułości detekcji jest zastosowanie zatężania

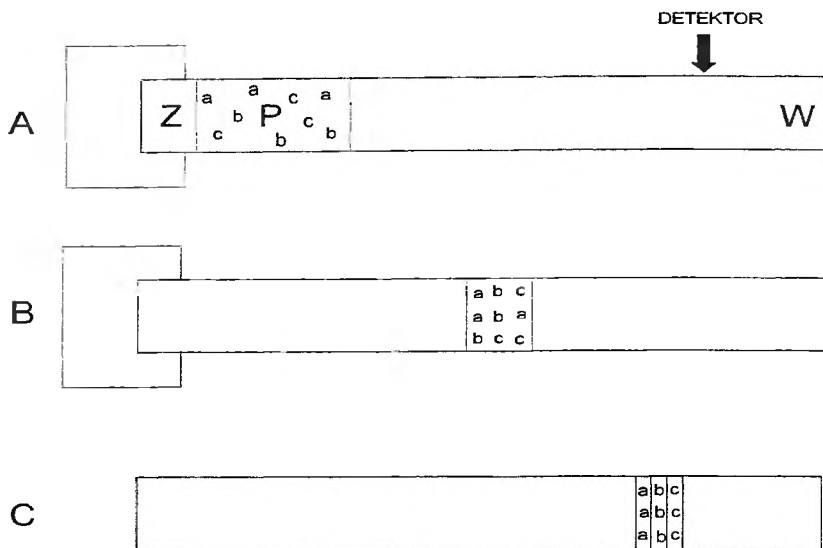
w układzie pomiarowym przez użycie materiałów do ekstrakcji do fazy stałej, powlekanych membran [14] lub wymienniczy jonowych w systemie analizy przepływowo-wstrzykowej sprzężonej z kapilarą [15]. Ten ostatni sposób wymaga rozbudowy systemu analitycznego z konsekwencjami w postaci wydłużenia czasu analizy i wzrostu jej kosztów.

Wśród różnych technik umożliwiających obniżenie dolnego limitu detekcji (LLD) w HPCE, metody zatężania analitów w kapilarze są łatwe do zastosowania i, co najważniejsze, nie wymagają konieczności zmiany oprzyrządowania. Należą do nich zatężanie izotachforetyczne, zatężanie przez spiętrzanie oraz niedawno rozwinięte w micelarnej elektrokinetycznej chromatografii (MEKC) – zatężanie przez zmiatanie.

1. ZATĘŻANIE IZOTACHOFORETYCZNE

W technice zatężania izotachforetycznego [2, 16–19] wykorzystuje się unikatową cechę izotachforezy (ITP) polegającą na wyrównaniu stężenia składników próbki do stężenia elektrolitu wodącego. Próbka zostaje umieszczona między dwoma buforami: wiodącym i zakończającym, które charakteryzują się odpowiednio wysoką i niską ruchliwością elektroforetyczną. Bufory dobiera się tak, aby ruchliwości jonów wiodących i zakończających obejmowały ruchliwości jonów analitów w próbce. Ponadto stężenie jonów wiodących powinno być odpowiednio wysokie, aby nastąpiło zjawisko zwiężenia strefy analitów. Przy stałym natężeniu prądu jony obecne w próbce ulegają skupieniu w wąską strefę z jonami o największej ruchliwości w jej czole.

Zatężanie izotachforetyczne, przedstawione na rys. 1, wykorzystuje się jako etap wstępny do dalszej analizy innymi technikami elektroforetycznymi, np. elektroforezą strefową (CZE), micelną elektrokinetyczną chromatografią (MEKC), elektroforezą żelową (CGE). Proces analityczny obejmujący zatężanie izotachforetyczne oraz separację składników próbki w drodze elektroforezy strefowej (CZE) może odbywać się w jednej kapilarze [20–22]. W tym przypadku do kapilary w następującej kolejności wprowadzane zostają: bufor wiodący, próbka, bufor zakończający. Przy stałym natężeniu prądu zachodzi proces izotachforezy (ITP), którego rezultatem jest skupienie jonowych analitów w wąską strefę. Po zakończeniu zatężania próbki bufor zakończający zastępowany jest buforem wiodącym, w wyniku czego zachodzi zwykła elektroforeza strefowa. W innej metodzie [20] jony o dużej ruchliwości (jony wiodące) wprowadzone zostają do próbki, a jony buforu podstawowego pełnią funkcję jonów zakończających. Po wytworzeniu pola elektrycznego składniki próbki tworzą wąską strefę charakterystyczną dla ITP, stężenie elektrolitu wodącego maleje w wyniku dyfuzji jonów, w efekcie czego pole elektryczne staje się jednorodne w całej kapilarze i proces izotachforezy (ITP) przechodzi w elektroforezę strefową (CZE) bez konieczności wymiany żadnego z buforów.



Rys. 1. Zateżenie izotachoforetyczne. A – wprowadzenie buforu wiodącego (W) próbki, (P) oraz buforu zakończonego (Z); B – izotachoforetyczne zateżenie strefy P; C – separacja analitów metodą CZE

Inna technika ITP-CZE wykorzystuje sprzężone kapilary [23–27]. Proces izotachoforezy (ITP) odbywa się w kapilarze o dużej pojemności, do której wprowadzona jest próbka w dużej objętości. Następnie zateżona próbka, w objętości kilku nanolitów, wprowadzana jest do zwykłej kapilary w celu jej separacji na drodze elektroforezy strefowej (CZE). Wadą tej techniki jest konieczność użycia dwóch sprzężonych kapilar, które nie stanowią wyposażenia większości aparatów do HPCE. Jednak technika ta umożliwi lepszy efekt zateżenia, gdyż objętość wprowadzonej próbki może być znacznie większa niż w przypadku ITP-CZE prowadzonej w jednej kapilarze.

Za pomocą technik izotachoforetycznych (ITP) nie można zateżać jednocześnie anionów i kationów.

Technikę ITP-CZE wykorzystano do separacji nukleotydów, barwników azowych [23] a także aminokwasów [25].

2. ZATEŻENIE PRZEZ SPIĘTRZANIE

2.1. SPIĘTRZANIE W ELEKTROFOREZIE STREFOWEJ

Zateżenie przez spiętrzenie (SS) po raz pierwszy zostało zaprezentowane przez Mikkersa [28], a szerokie badania nad tą techniką prowadzili w początkach lat 90. Burgi i Chien [29–33]. Zateżenie przez spiętrzenie polega na powstaniu

różnicy w prędkościach elektroforetycznych pomiędzy strefami o wysokim i niskim przewodnictwie, odpowiednio strefami buforu i próbki. Zjawisko spiętrzenia zachodzi na pseudostacjonarnej granicy powstałej między tymi strefami w wyniku ruchu jonów próbki poprzez tę granicę. Techniki zatężania przez spiętrzenie w elektroforezie strefowej umożliwiają podniesienie sygnału detektora od 10 do 1000 razy.

2.1.1. Normalne spiętrzenie. W technice zatężania przez spiętrzenie [34, 35], próbkę przygotowuje się w wodzie lub rozcieńczonym buforze, a następnie hydrodynamicznie wprowadza do kapilary w dużej objętości. Kapilara jest uprzednio kondycjonowana buforem o wyższym stężeniu niż próbka. Wprowadzona próbka tworzy strefę o niższym przewodnictwie niż strefa buforu. Po przyłożeniu wysokiego napięcia jony w strefie próbki pod wpływem wyższego pola elektrycznego niż w strefie buforu poruszają się z dużą prędkością elektroforetyczną. Po przekroczeniu tzw. pseudostacjonarnej granicy wchodzi w strefę buforu o dużym przewodnictwie i niskim polu elektrycznym, przez co ich prędkości elektroforetyczne nagle zmniejszają się, tworząc wąską stężoną strefę. Następnie ta wąska, zatężona strefa ulega separacji na zasadach elektroforezy strefowej.

Proces spiętrzenia zachodzi dla cząstek obdarzonych zarówno ładunkiem dodatnim, jak i ujemnym. Kationy spiętrzają się w przedniej części strefy próbki – czyli w kierunku katody, aniony natomiast w części tylnej – czyli w kierunku anody. Cząsteczki obojętne koeluuują ze strefą próbki.

Teoretycznie, wielkość spiętrzenia jest proporcjonalna do stopnia wzmocnienia pola elektrycznego; im większa różnica w stężeniu między próbka a buforem, tym większe spiętrzenie i w efekcie osiąga się węższe i wyższe piki. Zatem stosunkowo długa strefa próbki przygotowana w wodzie lub buforze o bardzo niskim stężeniu powinna być spiętrzona w bardzo wąską strefę w buforze do analizy o wysokim stężeniu. Jednak w wyniku różnicy między lokalnymi prędkościami elektroforetycznymi jonów a prędkością całkowitego przepływu elektroosmotycznego następuje pewne poszerzenie pasma próbki. Aby uzyskać optymalne warunki separacji, należy doświadczalnie wyznaczyć największą objętość próbki, która może zostać wprowadzona do kapilary bez ubocznego efektu poszerzenia pasma.

2.1.2. Spiętrzenie z dużą strefą próbki. Technika spiętrzenia z dużą strefą próbki (LVSS) zapobiega rozmyciu pasma próbki i umożliwia uzyskanie wysokiej rozdzielczości [33–37]. W tym celu po zakończeniu procesu spiętrzenia matryca, w której przygotowana jest próbka, musi zostać usunięta. Aby fizycznie przesunąć spiętrzoną strefę z matrycy próbki w strefę buforu, można wykorzystać zawór przełączający. Innym sposobem jest usunięcie matrycy próbki przez wypompowanie jej z kapilary przy użyciu przepływu elektroosmotycznego (EOF). Ta technika ma zastosowanie tylko do jonów o przeciwnej ruchliwości w stosunku do całkowitego EOF. Po przyłożeniu napięcia z wykorzystaniem polaryzacji

dotodniej aniony ulegają spiętrzeniu w tylnej części strefy próbki i podczas procesu elektroforezy, w rezultacie przepływu elektroosmotycznego, podążają wraz z tą strefą w kierunku katody. Jeśli natychmiast po wprowadzeniu do kapilary próbki polaryzacja elektrod zostanie odwrócona, to matryca próbki zostanie wypchnięta z kapilary, podczas gdy aniony przyciągane przez anodę zostaną zatrzymane. Kiedy matryca próbki zostanie prawie całkowicie usunięta z kapilary (proces ten może być kontrolowany przez monitorowanie natężenia prądu), polaryzacja znów jest przełączana na dodatnią i może nastąpić separacja anionów.

W niektórych typach aparatów do wysokosprawnej elektroforezy kapilarnej (HPCE) zmiana polaryzacji elektrod podczas analizy może stanowić problem. W takiej sytuacji w analizie anionów można zastosować modyfikatory przepływu elektroosmotycznego (EOF), np. bromek tetrade cylotrimetyloamoniowy [38, 39] lub bufory do analizy o niskim pH [40, 41].

Separację kationów z wykorzystaniem techniki spiętrzenia z dużą strefą próbki (LVSS) ze zmianą polaryzacji elektrod osiąga się przez nadanie ścianie kapilary ładunku dodatniego, co jednocześnie powoduje zmianę kierunku przepływu elektroosmotycznego (EOF). W tym celu do buforu dodaje się bromku cetylotrimetyloamoniowego [42, 43].

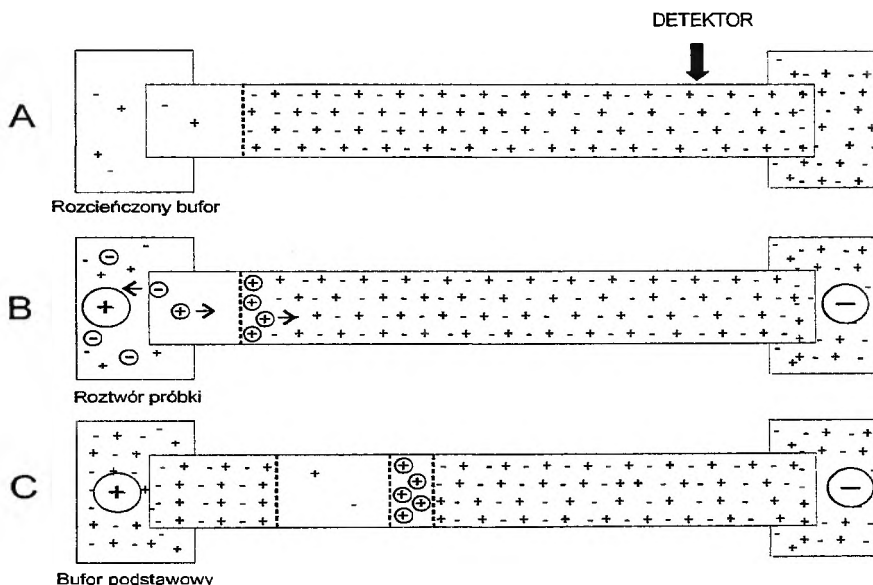
Technikę spiętrzenia z dużą strefą próbki (LVSS) zastosowano do oznaczania fenylohydantoiny, kwasu asparaginowego, kwasu glutaminowego [37, 39], wykorzystana została także w analizie narkotyków w medycynie sądowej [43].

2.1.3. Spiętrzenie z zastosowaniem mieszaniny acetonitrylu i soli. Metody zateżnienia przez spiętrzenie, w których próbkę przygotowuje się w wodzie lub rozcieńczonym buforze, można stosować jedynie do próbek, które nie zawierają dużych ilości protein czy soli. W praktyce metody te nie są zbyt użyteczne do analizy związków, które występują w niewielkim stężeniu w próbkach biologicznych. W technice spiętrzenia z zastosowaniem mieszaniny acetonitrylu i soli (SA-NaCl) próbkę rozpuszczoną w mieszaninie acetonitrylu i 1% chlorku sodu (2:1, v/v) wprowadza się hydrodynamicznie do kapilary [44–46]. W nieobecności soli, ze względu na bardzo niskie przewodnictwo acetonitrylu, obserwuje się ograniczony efekt spiętrzenia. Po dodaniu do próbki soli efekt spiętrzenia ulega wzmożeniu dzięki wielu skomplikowanym mechanizmom. Dwa czynniki, które odgrywają główną rolę w procesie tego rodzaju spiętrzenia, to: ograniczona rozpuszczalność soli nieorganicznych w acetonitrylu oraz niskie przewodnictwo samego acetonitrylu. Jony nieorganiczne słabo rozpuszczalne w acetonitrylu migrują wraz z wodą, pozostawiając z tyłu bardziej stężoną i węższą strefę acetonitrylu zawierającą słabo zjonizowane, organiczne związki, co przypomina efekt wysalania w ekstrakcji ciecz-ciecz. Po przyłożeniu napięcia jony znajdujące się w bogatej w wodę przedniej strefie próbki wkraczają w obszar o niższym polu elektrycznym i nagle zwalniają. Natomiast jony znajdujące się w tylnej acetonitrylowej części strefy próbki doświadczają oddziaływań większej siły pola elektrycznego i migrują szybciej. Dzięki temu, że przednia krawędź strefy próbki po-

rusza się wolniej, a tylna szybciej, uzyskuje się efekt spiętrzenia i w konsekwencji bardzo wąską strefę.

Obecność acetonitrylu powoduje, że białka zostają usunięte z próbki, eliminowany jest także ujemny wpływ wysokiego stężenia jonów nieorganicznych. Poza tym do kapilary może zostać wprowadzona próbka zajmująca nawet 1/3 długości kapilary, co pozwala na uzyskanie dużego spiętrzenia i w efekcie osiąga się znaczne polepszenie sygnału detektora. Metoda ta znalazła zastosowanie w rozdzielaniu i analizie małych cząstek w surowicy, moczu, żywności, tkankach oraz próbkach przemysłowych [45, 46].

2.1.4. Spiętrzenie przez wprowadzanie próbki ze wzmocnieniem pola elektrycznego. Alternatywnym sposobem zwiększenia sygnału detektora w elektroforezie strefowej (CZE) jest wprowadzenie próbki, przygotowanej w wodzie lub bardzo rozcieńczonym buforze, metodą elektrokinetyczną ze wzmocnieniem pola elektrycznego (FESI). W tradycyjnej metodzie wprowadzania elektrokinetycznego próbka przygotowana jest w buforze o tym samym stężeniu co bufor stosowany podczas analizy, a objętość roztworu próbki, która może być wprowadzona do kapilary, jest ograniczona. W technice spiętrzenia przez wprowadzanie próbki ze wzmocnieniem pola elektrycznego, przedstawionej na rys. 2 [31, 47–49], próbka jest przygotowana w rozcieńczonym buforze o tym samym składzie



Rys. 2. Spiętrzenie przez wprowadzanie próbki ze wzmocnieniem pola elektrycznego. A – wprowadzenie krótkiej strefy rozcieńczonego buforu; B – elektrokinetyczne wprowadzenie próbki przygotowanej w rozcieńczonym buforze; C – po wprowadzeniu próbki naczynko z próbką przy końcu wejściowym kapilary jest zamieniane na naczynko z buforem podstawowym. W celu wprowadzenia do kapilary anionów polaryzacja elektrod podczas ich wprowadzania jest ustawiana na ujemną, a następnie przełączana na dodatnią. Granice zatężania są zaznaczone linią przerywaną

co bufor do analizy. Przed wprowadzaniem próbki, do kapilary wprowadzana jest wąska strefa rozcieńczonego buforu. Po przyłożeniu napięcia w punkcie wprowadzenia następuje wzmocnienie siły pola elektrycznego, w wyniku czego jony uzyskują wysokie ruchliwości elektroforetyczne. Ponieważ w obecności wzmocnionego pola elektrycznego prędkość przepływu elektroosmotycznego (EOF) jest znacznie mniejsza od ruchliwości jonów w próbce, anality zostaną gwałtownie wprowadzone do kapilary. Wprowadzanie próbki z zastosowaniem wzmocnionego pola może znacznie zwiększyć objętość jonów wprowadzonych do kapilary. Po wprowadzeniu do kapilary próbki, aby umożliwić separację, naczynko z próbką przy końcu wejściowym kapilary jest zastępowane naczynkiem z buforem i przykładane jest wysokie napięcie. Gdy jony ze strefy o niskim stężeniu wmigrują w strefę buforu o dużym stężeniu, doświadczają niższej siły pola elektrycznego, gwałtownie zwalniają i spiętrzają się w wąską strefę o zwiększonym stężeniu.

Efektywna długość strefy zajmowanej przez próbkę, wprowadzoną do kapilary techniką wzmocnionego pola, jest mniejsza od strefy, jaką uzyskuje się w przypadku standardowego elektrokinetycznego wprowadzenia próbki, ze względu na zjawisko spiętrzenia. Metodę spiętrzenia przez wprowadzanie próbki ze wzmocnieniem pola elektrycznego (FESI), w zależności od polaryzacji elektrod, można stosować do wprowadzenia i spiętrzenia kationów oraz anionów, jednak z założeniem, że w przypadku niezgodności kierunków migracji jonów oraz przepływu elektroosmotycznego ten ostatni będzie większy. W praktyce warunek ten jest trudny do osiągnięcia, gdyż prędkość migracji jonów wielokrotnie przewyższa przepływ elektroosmotyczny (obecność wzmocnionego pola elektrycznego). W obecności przepływu elektroosmotycznego (EOF), podczas wprowadzania próbki, do kapilary zostaną wprowadzone tylko jony, które migrują zgodnie z jego kierunkiem. Po przyłożeniu napięcia z zastosowaniem polaryzacji dodatniej EOF odbywa się w kierunku od anody do katody, wysokie pole elektryczne wytworzone w punkcie wprowadzenia spowoduje usunięcie jonów o ruchliwościach przeciwnych do kierunku EOF (w tym przypadku anionów), czyli możliwa staje się analiza jedynie kationów. Jeśli podczas wprowadzania próbki stosuje się polaryzację ujemną, to do kapilary zostaną wprowadzone tylko aniony, które jednak zostaną wypchnięte przez przepływ elektroosmotyczny (EOF).

Zastosowanie zmiany polaryzacji elektrod w technice spiętrzenia próbki ze wzmocnieniem pola elektrycznego i zmianą polaryzacji elektrod (FESI-PS) umożliwia wprowadzanie, a następnie separację, zarówno kationów, jak i anionów w czasie jednej analizy. Najpierw do kapilary zostają wprowadzone aniony z zastosowaniem polaryzacji ujemnej, następnie polaryzacja jest zmieniana, aby umożliwić wprowadzanie kationów oraz separację wszystkich jonów. Krótka strefa rozcieńczonego buforu wprowadzona hydrodynamicznie przed wprowadzaniem próbki pozwala na wprowadzanie i zateżnienie anionów głęboko w kapilarze. Bufor użyty do przygotowania próbki oraz wąska strefa rozcieńczonego bu-

foru poruszają się w kierunku ujścia kapilary, tzn. w kierunku przeciwnym do wchodzących do kapilary z większą szybkością anionów. Zatem strefa rozcieńczonego buforu powinna być wystarczająco długa, aby część jej została w kapilarze przed zakończeniem wprowadzania. Podczas wprowadzania próbki z odwróconą polaryzacją jony obdarzone ładunkiem dodatnim są odpychane od kapilary. Po wprowadzeniu do kapilary próbki naczynko z próbką przy końcu wejściowym kapilary jest zastępowane naczynkiem z buforem i przykładane jest wysokie napięcie z zastosowaniem polaryzacji dodatniej. Przepływ elektroosmotyczny (EOF) oraz strefa próbki migrują w kierunku katody, aniony natomiast migrują w kierunku anody. Gdy aniony wejdą w strefę buforu o wysokim stężeniu, doświadczą niższego pola elektrycznego i zwolnią, spiętrzając się w wąską strefę. W przypadku gdy prędkość EOF jest większa od prędkości migracji anionów, aniony podążają podobnie jak kationy w kierunku katody. Technike spiętrzania przez wprowadzanie próbki ze wzmocnieniem pola elektrycznego (FESI) zastosowano do oznaczania fenylohydantoiny, argininy i histydyny [48].

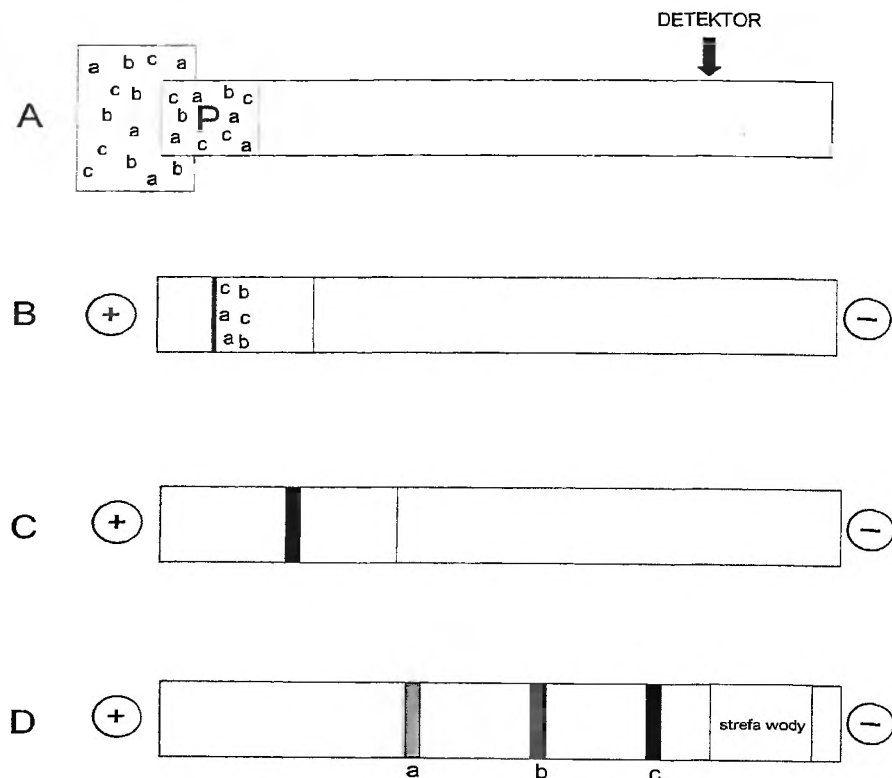
2.2. SPIĘTRZANIE W MICELARNEJ CHROMATOGRAFII ELEKTROKINETYCZNEJ

Początkowo uważano, że technik zateżania przez spiętrzanie nie można zastosować do cząsteczek obojętnych, ze względu na to, że cząsteczki te są nieaktywne w polu elektrycznym [51, 52]. Dodanie środków powierzchniowo czynnych do buforu podstawowego umożliwiło nadanie cząsteczkom obojętnym efektywnych ruchliwości elektroforetycznych i rozwinięcie kilku technik spiętrzania w ramach micelarnej elektrokinetycznej chromatografii (MEKC) [53–63]. Techniki zateżania przez spiętrzanie w MEKC umożliwiają zwiększenie sygnału detektora od 10 do 100 razy.

2.2.1. Normalne spiętrzanie. W technice normalnego spiętrzania (NSM), przedstawionej na rys. 3 [53, 54], próbka przygotowana w wodzie lub micelarnej matrycy o niskim przewodnictwie jest wprowadzana hydrodynamicznie jako długa strefa, po uprzednim skondycjonowaniu kapilary micelarnym buforem o obojętnym pH. Po przyłożeniu napięcia z zastosowaniem polaryzacji dodatniej micelle w strefie próbki oddziałują z cząsteczkami obojętymi, porywają je i spiętrzają w wąską strefę. Następnie strefa ta ulega rozdzielению na zasadach micelarnej elektrokinetycznej chromatografii (MEKC).

Wadą techniki NSM jest to, że na granicach spiętrzonej strefy może dochodzić do zjawiska dyspersji, spowodowanego lokalnymi różnicami w prędkościach elektroforetycznych pomiędzy strefami o niskim i wysokim przewodnictwie. Poza tym czas wprowadzenia próbki dłuższy niż 40 sekund powoduje poszerzenie pików i w rezultacie pogorszenie separacji.

Technikę normalnego spiętrzania (NSM) zastosowano do oznaczania rezorcyny, 1-naftolu, 2-naftolu [54].



Rys. 3. Normalne spiętrzanie w micelarnej elektrokinetycznej chromatografii (MEKC). A – hydrodynamiczne wprowadzenie próbki; B – micelle w strefie próbki oddziałują z analitami i spiętrzają się na granicy strefy próbki o niskim przewodnictwie i buforu; C – anality zostają spiętrzone w wąską, stężoną strefę; D – separacja analitów na zasadach MEKC

2.2.2. Spiętrzanie z odwróconą polaryzacją elektrod. W technice spiętrzania z odwróconą polaryzacją elektrod (REPSM) [53, 55] próbka przygotowana w wodzie lub micelarnej matrycy o niskim przewodnictwie jest wprowadzana hydrodynamicznie jako długa strefa (dłuższa niż w technice NSM), po uprzednim skondycjonowaniu kapilary buforem o obojętnym pH. Po przyłożeniu napięcia z zastosowaniem polaryzacji ujemnej micelle wprowadzone elektrokinetycznie do kapilary z naczynka wejściowego porywają i spiętrzają anality w wąską strefę, a matryca próbki jest usuwana przez przepływ elektroosmotyczny (EOF). Prąd powinien być uważnie kontrolowany i kiedy jego wartość osiągnie 97–99% wartości zmierzonej po skondycjonowaniu kapilary buforem, polaryzacja jest przełączana z ujemnej na dodatnią. W polaryzacji dodatniej strefy zatężonych substancji są rozdzielane na zasadzie micelarnej elektrokinetycznej chromatografii (MEKC).

Zaletą tej techniki jest to, że ze względu na usunięcie matrycy próbki do kapilary można wprowadzić dużą objętość próbki bez pogorszenia rozdzielczości.

Zjawisko dyspersji na granicy spiętrzonej strefy, spowodowane przez lokalne nie-dopasowania prędkości elektroforetycznych, między strefami o niskim i wysokim przewodnictwie, jest także zmniejszone. Jednak wadą tej techniki jest konieczność zmiany polaryzacji, co może prowadzić do pogorszenia precyzji wyników analiz, gdyż objętość próbki pozostająca w kapilarze po zmianie polaryzacji jest zmienna podczas kolejnych analiz. Poza tym zmiana polaryzacji może stanowić problem w niektórych aparatach HPCE.

Technikę spiętrzania z odwróconą polaryzacją elektrod (REPSM) zastosowano do oznaczania rezorcyny, 1-naftolu, 2-naftolu oraz 1,6-dihydroksynaftalenu [55].

2.2.3. Spiętrzanie z użyciem przeciwnie migrujących miceli. W technice spiętrzania z użyciem przeciwnie migrujących miceli (SRMM) [56] próbka przygotowana najlepiej w wodzie jest wprowadzana hydrodynamicznie, po skondycjonowaniu kapilary buforem o niskim pH. W niskim pH (< 5) prędkość elektroforetyczna anionowych miceli dodecylosiarczanu sodu (SDS) jest wyższa niż przepływ elektroosmotyczny (EOF), w wyniku czego micelle swobodnie migrują w kierunku anody. Po przyłożeniu napięcia z zastosowaniem polaryzacji ujemnej micelle z naczynka przy katodzie wnikają do strefy zajmowanej przez próbkę i następuje spiętrzanie cząsteczek analitów w wąską strefę, następnie matryca próbki zostaje usunięta dzięki przepływowi elektroosmotycznemu skierowanemu w stronę katody i dalej następuje rozdzielenie stref.

Zaletą techniki spiętrzania z użyciem przeciwnie migrujących miceli (SRMM) jest to, że może być stosowany bardzo długi czas wprowadzania próbki bez konieczności zmiany polaryzacji. Ponadto dzięki temu, że matryca próbki zostaje usunięta, nie obserwuje się pogorszenia w rozdzieleniu pików i uzyskuje się znaczne polepszenie sygnału detektora.

Technikę SRMM zastosowano do oznaczania fenantrenu, 2,3,5-trimetylofenolu, *p*-etylofenolu, *m*-chlorofenolu, *o*-chlorofenolu, 4-metylofenolu, 2-metylofenolu, *p*-nitrofenolu, *o*-fluorofenolu i fenolu [56].

Techniką pokrewną do spiętrzania z użyciem przeciwnie migrujących miceli (SRMM) jest spiętrzanie z użyciem przeciwnie migrujących miceli i strefy wodnej (SRMM-WP) [57, 58]. W tej technice, po skondycjonowaniu kapilary buforem o niskim pH, hydrodynamicznie wprowadzana jest strefa wody, a następnie próbka jako długa strefa. Próbkę uprzednio przygotowuje się w micelarnej matrycy o niskim przewodnictwie. Strefa wodna przedłuża strefę o niskim przewodnictwie, ponieważ ma wyższą siłę pola elektrycznego w porównaniu do strefy zajmowanej przez próbkę. Zatem efektywne prędkości elektroforetyczne komponentów próbki są wyższe w strefie wodnej niż w micelarnej strefie próbki; w ten sposób możliwe jest bardziej efektywne spiętrzanie. Spiętrzanie następuje na granicy między strefą wodną a strefą buforu. Także zjawisko poszerzenia strefy spowodowane obecnością miceli jest eliminowane. Po przyłożeniu napięcia z zastosowaniem polaryzacji ujemnej zachodzi skupienie stref analitów,

usunięcie z próbki matrycy i wodnej strefy i dalej separacja skupionych stref substancji.

Technika spiętrzania z użyciem przeciwnie migrujących miceli i strefy wodnej (SRMM-WP) jest selektywna dla substancji charakteryzujących się wysokim współczynnikiem retencji – czyli dla związków silnie hydrofobowych, co może stanowić zarówno zaletę, jak i wadę. W przypadku gdy interesujące nas analizy są hydrofobowe, a chcemy pozbyć się związków hydrofilowych, jest to duża zaleta. Inną zaletą tej techniki jest to, że micelle pomagają w rozpuszczaniu hydrofobowych analitów. Technikę SRMM-WP zastosowano do oznaczania takich steroidów, jak testosteron i kortyzon oraz policyklicznych węglowodorów aromatycznych, jak fenantren i naftalen [57].

2.2.4. Spiętrzanie przez wprowadzanie próbki ze wzmocnieniem pola elektrycznego. W technice spiętrzania próbki ze wzmocnieniem pola elektrycznego (FESI) po skondycjonowaniu kapilary buforem o obojętnym pH do kapilary zostaje hydrodynamicznie wprowadzona strefa wodna [59–61]. Próbka przygotowana w micelarnym roztworze o niskim przewodnictwie w obojętnym pH jest elektrokinetycznie wprowadzana z zastosowaniem polaryzacji ujemnej. Naczynko z buforem jest zastępowane naczynkiem z próbką, kiedy natężenie prądu osiągnie 97–99% wartości zmierzonej po skondycjonowaniu kapilary buforem. Następnie polaryzacja ujemna jest przełączana na polaryzację dodatnią. Użycie buforu z kationowym surfaktantem umożliwia elektrokinetyczne wprowadzanie z zastosowaniem dodatniej polaryzacji elektrod [62].

Zaletą techniki spiętrzania ze wzmocnieniem pola elektrycznego (FESI) w micelarnej elektrokinetycznej chromatografii (MEKC) jest to, że próbki przygotowuje się w micelarnych roztworach, co ułatwia rozpuszczalność hydrofobowych związków. Jednak tylko wysokocząsteczkowe surfaktanty znalazły zastosowanie w technice FESI, a substancje, które chcemy analizować, powinny charakteryzować się wysokimi współczynnikami retencji.

Technikę FESI w MEKC zastosowano do oznaczania estronu, estradiolu oraz estrogenu w moczu [59], a także takich opioidów, jak kodeina i morfina [61].

Schemat przedstawiony powyżej może być także użyty do przedstawienia techniki spiętrzania próbki ze wzmocnieniem pola elektrycznego z użyciem przeciwnie migrujących miceli (FESI-RMM) [63], z tym że w FESI-RMM nie ma zmiany polaryzacji, stosowany bufor ma niskie pH, próbka jest także przygotowana w micelarnym roztworze o niskim przewodnictwie, ale w niskim pH. Wprowadzanie próbki oraz separacja odbywają się z zastosowaniem polaryzacji ujemnej. Naczynko z buforem zastępuje naczynko z próbką, kiedy osiągnięte zostaje 70–90% wartości natężenia prądu zmierzonej po skondycjonowaniu kapilary buforem. Procent pierwotnej wartości natężenia prądu jest niższy niż w spiętrzaniu próbki ze wzmocnieniem pola elektrycznego (FESI); strefa wodna jest także krótsza.

Podobna do spiętrzania ze wzmocnieniem pola elektrycznego (FESI) i spiętrzania z użyciem przeciwnie migrujących miceli i strefy wodnej (SRMM-WP), technika spiętrzania próbki ze wzmocnieniem pola elektrycznego z użyciem przeciwnie migrujących miceli (FESI-RMM) jest stosowana do średnio i silnie hydrofobowych substancji. Zaletą tej techniki jest to, że jako surfaktant SDS ma efektywne zastosowanie. Poza tym uzyskuje się tu lepsze kształty pików niż w technice spiętrzania z użyciem przeciwnie migrujących miceli (SRMM).

Technikę FESI-RMM zastosowano do oznaczania fenoli, a także progesteronu, testosteronu, hydrokortyzonu i kortyzonu [63].

3. ZATĘŻANIE PRZEZ ZMIATANIE

Zjawisko zmiatania (ang. *sweeping effect*) polega na zgarnianiu analitów przez fazę pseudostacjonarną, która wchodzi i wypełnia strefę próbki po przyłożeniu napięcia. Zjawisko zmiatania po raz pierwszy zostało zaobserwowane przez Gilgesa [64], ale nie zostało przez niego dokładnie udokumentowane. Technikę tę jako nową metodę zatężania w micelarnej elektrokinetycznej chromatografii (MEKC) po raz pierwszy opisał Terabe [65] w 1998 r. i porównał ją do użycia miotły w celu dokładnego zmiecenia ziaren ryżu rozsypanych na podłodze.

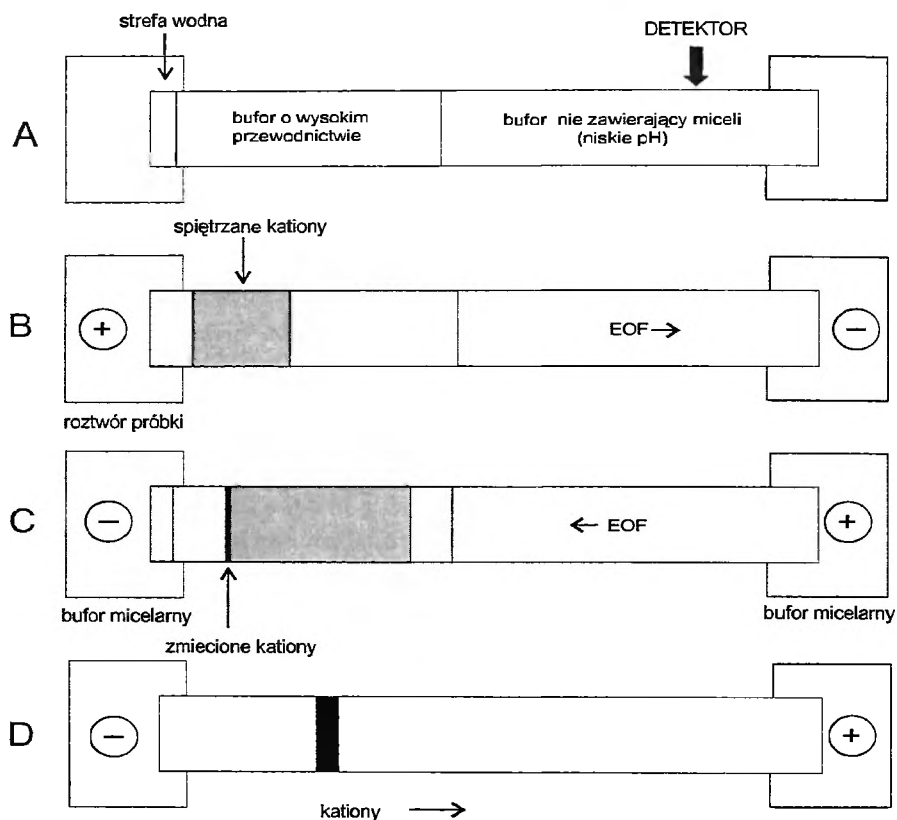
Anality przygotowane są w matrycy o tym samym przewodnictwie co bufor do analizy. Kapilarę kondycjonuje się buforem o bardzo niskim pH, co powoduje protonowanie grup silanolowych ściany kapilary i po przyłożeniu napięcia przepływ elektroosmotyczny jest znacznie zredukowany. Próbka zostaje hydrodynamicznie wprowadzona jako długa strefa. Po przyłożeniu napięcia z zastosowaniem polaryzacji ujemnej micelle z buforu (katoda) migrują w strefę próbki i zmiatają anality w wąskie strefy (w zależności od ich współczynników retencji). Następnie te wąskie, skoncentrowane strefy analitów oddziałujących z micelami ulegają rozdzielaniu na zasadach MEKC. Ponieważ przepływ elektroosmotyczny (EOF) jest bliski zeru, ruchliwość miceli jest znacznie większa od ruchliwości EOF i micelle wraz z analitami wędrują od katody do anody. Jako pierwsze migrują anality o największym powinowactwie do miceli, jako ostatnie natomiast cząsteczki, które w ogóle nie oddziałują z micelami.

Dzięki tej metodzie można zwiększyć sygnał detektora nawet 5000 razy. Ponadto metoda ta jest niezależna od EOF i można ją stosować zarówno dla jonów, jak i cząsteczek nie obdarzonych ładunkiem. Dodatkową zaletą jest to, że można manipulować matrycą próbki (zmiana pH, dodatek organicznych rozpuszczalników) w celu zwiększenia rozpuszczalności analitów, lub optymalizować skład i pH buforu w celu zwiększenia efektu zmiatania [66–68].

Technikę zmiatania w micelarnej elektrokinetycznej chromatografii (MEKC) zastosowano do oznaczania takich związków jak: testosteron, estrogen czy cholina [65].

3.1. ZATĘŻANIE PRZEZ ELEKTROKINETYCZNE WPROWADZANIE PRÓBKII TECHNIKĄ KATIONOWO SELEKTYWNEGO WYCZERPYWANIA I ZMIATANIE

W metodzie zateżenia przez elektrokinetyczne wprowadzanie próbki techniką kationowo selektywnego wyczerpywania i zmiatanie (CSEI-S), przedstawionej na rys. 4 [69], kapilara kondycjonowana jest buforem o niskim pH (nie zawierającym miceli). Następnie do kapilary hydrodynamicznie wprowadzana jest długa strefa buforu o wysokim przewodnictwie oraz krótka strefa wodna. Z kolei z zastosowaniem polaryzacji dodatniej do kapilary elektrokinetycznie wprowadzane są kationy z próbki wcześniej przygotowanej w wodzie lub roztworze o niskim przewodnictwie. Czas wprowadzania jest długi (ok. 10 minut), co powoduje wytworzenie w kapilarze bardzo długiej strefy kationów, ale o stężeniu



Rys. 4. Zateżanie przez elektrokinetyczne wprowadzanie próbki techniką kationowo selektywnego wyczerpywania i zmiatanie (CSEI-S). A – kapilara skondycjonowana buforem o niskim pH nie zawierającym miceli; wprowadzenie buforu o wysokim przewodnictwie i krótkiej strefy wodnej; B – elektrokinetyczne wprowadzenie próbki z zastosowaniem polaryzacji dodatniej, kationy ulegają spiętrzeniu na granicy między strefą wodną i buforu o wysokim przewodnictwie; C – przyłożenie napięcia z zastosowaniem polaryzacji ujemnej; micelle z naczynka wejściowego wkraczają w strefę spiętrzonej próbki i zmiatają anality w wąskie strefy; D – końcowy efekt wyczerpywania i zmiatania; dalej następuje separacja zateżonych analitów na drodze MEKC

analitów większym niż w próbce. Natychmiast po wprowadzeniu kationów do obu końców kapilary podstawiane zostają naczynka z buforem o niskim pH zawierającym anionowe micelle. Po przyłożeniu do kapilary napięcia z zastosowaniem polaryzacji ujemnej anionowe micelle wchodzą do kapilary, zmiatają kationowe anality w wąskie strefy, po czym zachodzi separacja zateżonych analitów na zasadach micelarnej elektrokinetycznej chromatografii (MEKC).

Technika ta umożliwia polepszenie sygnału detektora w analizie kationowych związków hydrofobowych ok. milion razy, co do tej pory jest największym osiągnięciem w technikach zateżania w kapilarze.

Technikę zateżania przez elektrokinetyczne wprowadzanie próbki techniką kationowo selektywnego wyczerpywania i zmiatania (CSEI-S) zastosowano do oznaczania metoprololu, acebutololu, 1-naftyloaminy oraz laudanozyny [69].

PODSUMOWANIE

Technika wysokosprawnej elektroforezy kapilarnej (HPCE), komplementarna w stosunku do wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), ze względu na dużą rozdzielczość oraz podatność na automatyzację i miniaturyzację, stanowi unikatowe narzędzie do analizy śladowych i ultraśladowych ilości substancji w próbkach o skomplikowanych matrycach. Prognozuje się, że po zastosowaniu „technologii chipów” HPCE zrewolucjonizuje badania w dziedzinie biologii i medycyny molekularnej oraz wczesną diagnostykę lekarską. Już dziś możliwe jest prowadzenie analiz na poziomie pojedynczych komórek roślin i zwierząt [70] w celu lepszego zrozumienia procesów w nich zachodzących, przez śledzenie zmian jakościowych i ilościowych. Realna staje się perspektywa rutynowych analiz składników obecnych w złożonych próbkach w ilościach atto- i ceptomolowych. Warunkiem koniecznym do realizacji tego celu jest podwyższenie czułości stężeniowej HPCE, możliwe do osiągnięcia przez modyfikację chemiczną analitów, wprowadzanie czułych detektorów, zateżanie próbki przed wprowadzaniem do kapilary oraz w kapilarze. Wysiłki eksperymentatorów z różnych ośrodków naukowych prowadzące do opracowania efektywnych sposobów zateżania analitów po wprowadzeniu próbki do kapilary zostały pokrótce opisane w tym artykule. Zateżanie w kapilarze, proste w wykonaniu i bez dodatkowych inwestycji aparaturowych, umożliwia podniesienie czułości analizy od dziesięciu do miliona razy.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] D.N. Heigher, *High Performance Capillary Electrophoresis*, Hewlett Packard GmbH, Waldbronn 1992.
- [2] S.F.Y. Li, *Capillary Electrophoresis*, Elsevier, Amsterdam 1993.
- [3] R. Weinberger, *Practical Capillary Electrophoresis*, Academic Press, San Diego 1993.
- [4] J.W. Jorgenson, K.D. Lukacs, *Science*, 1983, **222**, 266.

- [5] J.W. Jorgenson, *Anal. Chem.*, 1986, **556**, 743A.
- [6] Z. Witkiewicz, *Podstawy chromatografii*, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 2000.
- [7] D.N. Heiger, P. Kaltenbach, *Electrophoresis*, 1994, **15**, 1234.
- [8] N.M. Djordjevic, M. Widder, R. Kuhn, *J. High. Res. Chromatogr.*, 1997, **20**, 189.
- [9] G. Ross, P. Kaltenbach, D. Heilger, *Today's Chemist at Work*, 1997, **6(8)**, 31.
- [10] S.E. Moring, R.T. Reel, R.E.J. Van Soest, *Anal. Chem.*, 1993, **65**, 3545.
- [11] Biuletyn techniczny firmy Hewlett Packard, publikacja nr 12-5965-5984E, 1997.
- [12] D.B. Craig, J.C.Y. Wong, N.J. Dovichi, *Anal. Chem.*, 1996, **68**, 697.
- [13] C.J. Smith, J. Grainger, D.G. Patterson Jr., *J. Chromatogr. A*, 1998, **803**, 241.
- [14] A.J. Tomlinson, L.M. Benson, N.A. Guzman, S. Naylor, *J. Chromatogr. A*, 1996, **744**, 3.
- [15] L. Arce, P. Kuban, A. Ros, M. Valcarcel, B. Karlberg, *Anal. Chim. Acta*, 1999, **390**, 39.
- [16] L.N. Ornstein, *Acad. Sci. Ann.*, 1964, **121**, 321.
- [17] B.J. Davis, *N.Y. Acad. Sci. Ann.*, 1964, **121**, 404.
- [18] F.M. Everaerts, J.L. Beckers, T.P.E.M. Verheggen, *Isotachophoresis: Theory, Instrumentation, and Applications*, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 1976, Vol. 6.
- [19] P.R. Brown, E. Grushka, *Advances in Chromatography*, Marcel Dekker, New York 1997.
- [20] F. Foret, E. Szoki, B.L. Karger, *J. Chromatogr.*, 1992, **3**, 608.
- [21] T.J. Thompson, F. Foret, P. Vouros, B.L. Karger, *Anal. Chem.*, 1993, **65**, 900.
- [22] L. Krivankova, P. Gebauer, P. Boček, *J. Chromatogr. A*, 1995, **716**, 35.
- [23] F. Foret, V. Sustacek, P. Boček, *J. Microcol. Sep.*, 1990, **2**, 229.
- [24] D. Kaniansky, J. Marak, *J. Chromatogr.*, 1990, **498**, 191.
- [25] D.S. Stegehius, H. Irth, U.R. Tjaden, J. van der Greef, *J. Chromatogr.*, 1991, **538**, 393.
- [26] C. Schwer, B. Gas, F. Lottspeich, E. Kenndler, *Anal. Chem.*, 1993, **65**, 2108.
- [27] S. Chen, M.L. Lee, *Anal. Chem.*, 1998, **70**, 3777.
- [28] F.E.P. Mikkers, F.M. Everaerts, T.P.E.M. Verheggen, *J. Chromatogr.*, 1979, **169**, 21.
- [29] D.S. Burgi, R.L. Chien, *J. Microcol. Sep.*, 1991, **3**, 199.
- [30] D.S. Burgi, R.L. Chien, *Anal. Chem.* 1991, **63**, 2042.
- [31] R.L. Chien, *Anal. Chem.*, 1991, **63**, 2866.
- [32] R.L. Chien, D.S. Burgi, *Anal. Chem.*, 1992, **64**, 489A.
- [33] D.S. Burgi, R.L. Chien, *Anal. Biochem.*, 1992, **202**, 306.
- [34] S.E. Moring, J. Colburn, P.D. Grossman, H.H. Lauer, *LC-GC*, 1989, **8**, 34.
- [35] R.L. Chien, J.C. Helmer, *Anal. Chem.*, 1991, **63**, 1354.
- [36] R.L. Chien, D.S. Burgi, *Anal. Chem.*, 1992, **64**, 1046.
- [37] M. Albert, L. Debusschere, C. Demesmay, J.L. Rocca, *J. Chromatogr. A*, 1997, **757**, 281.
- [38] D.S. Burgi, *Anal. Chem.*, 1993, **65**, 3726.
- [39] M. Albert, L. Debusschere, C. Demesmay, J.L. Rocca, *J. Chromatogr. A*, 1997, **757**, 291.
- [40] J.P. Quirino, S. Terabe, *J. Chromatogr. A*, 1999, **850**, 339.
- [41] Y. He, H.K. Lee, *Anal. Chem.*, 1999, **71**, 995.
- [42] P. Jandik, W.R. Jones, *J. Chromatogr.*, 1991, **546**, 431.
- [43] G. McGrath, W.F. Smyth, *J. Chromatogr. B*, 1996, **681**, 125.
- [44] Z.K. Shihabi, M.S. Constantinescu, *Clin. Chem.*, 1992, **38**, 2117.
- [45] Z.K. Shihabi, *J. Chromatogr. A*, 1993, **652**, 471.
- [46] Z.K. Shihabi, *J. Cap. Electroph.*, 1995, **2(6)**, 267.
- [47] R.L. Chien, J.C. Helmer, *Anal. Chem.*, 1991, **63**, 1354.
- [48] R.L. Chien, D.S. Burgi, *J. Chromatogr.*, 1991, **559**, 141.
- [49] C.X. Zhang, W. Thormann, *Anal. Chem.*, 1996, **68**, 2523.
- [50] R.L. Chien, D.S. Burgi, *J. Chromatogr.*, 1991, **559**, 153.
- [51] R. Szucs, J. Vindevogel, P. Sandra, L.C. Verhagen, *Chromatographia*, 1993, **36**, 323.
- [52] J. Vindevogel, P. Sandra, *Introduction to Micellar Electrokinetic Chromatography*, Hüthig, Heidelberg 1992.

- [53] Z. Liu, P. Sam, S.R. Sirimanne, P.C. McClure, J. Grainger, D.G. Patterson, *J. Chromatogr. A*, 1994, **673**, 125.
- [54] J.P. Quirino, S. Terabe, *J. Chromatogr. A*, 1997, **781**, 119.
- [55] J.P. Quirino, S. Terabe, *J. Chromatogr. A*, 1997, **791**, 255.
- [56] J.P. Quirino, S. Terabe, *Anal. Chem.*, 1998, **70**, 149.
- [57] J.P. Quirino, S. Terabe, *J. Chromatogr. B*, 1998, **714**, 29.
- [58] J.P. Quirino, S. Terabe, K. Otsuka, B. Vincent, G. Vigh, *J. Chromatogr. A*, 1999, **838**, 3.
- [59] J.P. Quirino, S. Terabe, *J. Chromatogr. A*, 1998, **798**, 251.
- [60] A. Farran, S. Ruiz, C. Serra, M. Aguilar, *J. Chromatogr. A*, 1996, **737**, 109.
- [61] C.X. Zhang, W. Thormann, *Anal. Chem.*, 1998, **70**, 540.
- [62] K.R. Nielsen, J.P. Foley, *J. Chromatogr. A*, 1994, **686**, 283.
- [63] J.P. Quirino, S. Terabe, *Anal. Chem.*, 1998, **70**, 1893.
- [64] M. Gilges, *Chromatographia*, 1997, **44**, 191.
- [65] J.P. Quirino, S. Terabe, *Science*, 1998, **282**, 456.
- [66] J.P. Quirino, S. Terabe, *Anal. Chem.*, 1999, **71**, 1638.
- [67] J. Palmer, N.J. Munro, J.P. Landers, *Anal. Chem.*, 1999, **71**, 1679.
- [68] J.P. Quirino, S. Terabe, P. Boček, *Anal. Chem.*, 2000, **72**, 1934.
- [69] J.P. Quirino, S. Terabe, *Anal. Chem.*, 2000, **72**, 1023.
- [70] L.M. Shaner, P.R. Brown, *J. Liq. Chromatogr.*, 2000, **23**, 975.

Praca wpłynęła do Redakcji 16 stycznia 2001

REGULAMIN DLA AUTORÓW

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

Maszynopisy (wydruki komputerowe) należy nadsyłać do Redakcji w **dwóch egzemplarzach**: oryginał i kopia lub kserokopia pisana jednostronnie, z zachowaniem podwójnej interlinii i marginesu szerokości 5 cm z **prawej** strony; pierwszy wiersz akapitu należy zaznaczyć wcięciem na 5 uderzeń w klawisz. Na pierwszej stronie pod tytułem polskim należy umieścić tytuł w języku angielskim, adres autora oraz spis rozdziałów. Praca powinna zawierać obszerny streszczenie w języku angielskim (do 1,5 strony maszynopisu z cytowaniem piśmiennictwa i odsyłaczami do tabel i rysunków w tekście). Na osobnej kartce prosimy o krótką (do 150 wyrazów) notkę z informacją o uprawianej przez Autora tematyce naukowej i przebiegu pracy. Prosimy o podanie tytułu naukowego i miejsca pracy oraz o dołączenie aktualnego zdjęcia. Przystanie tych informacji będziemy traktować jako zgodę na ich publikację.

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

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

Tabele należy ponumerować cyframi arabskimi oraz podać ich tytuły.

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

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

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

FELIETON NAUKOWY



**NOTATKI CHAOTYCZNE
XXXVI. ZMIENNE FATA PYTAŃ KARDYNALNYCH**

Ignacy Z. Siemion

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

Wchodzącego w nurt tej samej rzeki
omywają wciąż nowe wody...
Heraklit



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

8 lipca 1880 roku, na otwartym posiedzeniu Akademii Nauk w Berlinie, znany fizjolog i badacz elektryczności zwierzęcej, Emil Du Bois Reymond wygłosił wykład o tytule: „Die sieben Welträtsel” (Siedem zagadek bytu) [1]. Wykład wywołał wielki rezonans, czemu pewnie sprzyjało i oficjalne stanowisko zajmowane przez uczonego. Był on permanentnym sekretarzem Pruskiej Akademii Nauk. Niecodzienny też był moment wygłoszenia wykładu. Odbył się on w ramach uroczystości Roku Leibniza, które wtedy obchodzono. Wykład chwalono powszechnie i uznano za wyraz skromności nauki, która wie, jakie są jej możliwości i ograniczenia.

Du Bois Reymond przedstawił w swoim wystąpieniu listę siedmiu wielkich pytań, na które nauka nie umie odpowiedzieć. Można by rzec – listę siedmiu pytań kardynalnych. A oto te pytania – zagadki:

po pierwsze – co jest istotą materii i siły?

po wtóre – jakie jest pochodzenie ruchu?

po trzecie – jak powstało życie?

po czwarte – skąd i jak wynikła celowość zachowań Przyrody?

po piąte – jak powstała wrażliwość zmysłowa?

po szóste – jak powstało rozumne myślenie i związany z nim język?

i po siódme – czy istnieje wolna wola?

Trzy z tych pytań – pierwsze, drugie i piąte – uznał uczonego za nierozwiązalne. Nazwał je pytaniami transcendentalnymi. Trzy dalsze – trzecie, czwarte i szóste – za bardzo trudne, ale przecież w zasadzie do rozwiązania. O siódmym pytaniu właściwie się nie wypowiedział. Z łatwością możemy zauważyć, że wielkie pytania Du Bois Reymonda podszyte były metafizycznymi zgoła niepokojami i w jakiejś mierze nawiązywały do dyskusji ontologicznych, toczonych przez wieki wśród adherentów różnorodnych prądów religijnych i filozoficznych. Ale reprezentowały one również aktualne niepokoje współczesnej uczonego nauki. Listę pytań zestawiał fizjolog. Dlatego wyraźnie odcisnęły się w nich biologiczne głównie zainteresowania i przemyślenia uczonego.

Dwadzieścia lat później wyzwanie Du Bois Reymonda podjął nie mniej od niego sławny niemiecki biolog, Ernest Haeckel. Wyznawca i propagator darwinizmu, czynny był jako współtwórca Ruchu Monistów, rodzaju uczonej sekty, propagującej Religię Nauki i światopogląd nazywany materialistycznym. I otóż, w 1899 roku Haeckel wydał dzieło o zacięciu popularnonaukowym: *Die Welträtsel*. Postanowił w nim opowiedzieć, co też nauka sądzi o pytaniach Du Bois Reymonda i odpowiedziach na nie. Jak powiedzieliśmy, Haeckel był zwolennikiem materialistycznego monizmu, to jest poglądu uznającego jednorodność natury Rzeczywistości. Dla Haeckla była to natura materialna, nie duchowa. Według tego autora pytania Du Bois Reymonda były w dużej mierze pytaniami urojonymi. Bo też według niego pytanie pierwsze, drugie i piąte znajduje łatwe wytłumaczenie w generalnym poglądzie na istotę substancji, trzecie zaś, czwarte i szóste dają się rozwiązać na gruncie teorii rozwoju Przyrody. Siódme z pytań zdaniem Haeckla w ogóle „nie może być przedmiotem naukowych rozstrząsań”.

Książka Haeckla stała się niemal natychmiast rodzajem manifestu i rodzajem pisma świętego ruchów monistycznych, ale również i społecznych ruchów o charakterze radykalnym. Wystarczy powiedzieć, że w latach 1899–1928 wyszło w świat czternaście wydań książki. Książka ukazała się również (w 1905 roku) w przekładzie polskim, pod zmienionym jednak tytułem, bo jako *Zarys filozofii monistycznej* [2].

Nie ma co ukrywać – książka szokować mogła swoim antyreligijnym i antyklerykalnym ostrzem. Zapewne ta właśnie jej strona powodowała, że w państwach autokratycznych, jak Rosja, przyjęto ją wrogo. To znaczy wrogo przyjęły ją rządy i cenzura. Pierwsze jej rosyjskie wydanie wyszło w roku 1902, a więc trzy lata po ukazaniu się dzieła. W tłumaczeniu pominięto trzy rozdziały, a we wszystkich innych wykreślono fragmenty dotyczące religii. Niewiele to pomogło. Cenzura zakazała rozpowszechniania książki. Lipskie wydanie z 1906 roku zostało w Rosji skonfiskowane, podobnie jak wydanie moskiewskie z roku 1907. Skonfiskowano także przekład łotewski (Łotwa była częścią imperium carów), wydany w Rydze w roku 1908. Pełny tekst rosyjskiego przekładu książki Haeckla ukazał się w Rosji dopiero w 1922 roku. A przecież książka miała ambicję przedstawienia w popularny sposób poglądów określonej grupy ludzi nauki i jej treści można było odnieść do dyskusji naukowych! Nie mamy jednak wcale zamiaru bliżej wchodzić w szczegóły rozwijanej w książce Haeckla argumentacji. Lista pytań Du Bois Reymonda była nam potrzebna, by zdać sobie sprawę z tego, jakie to pytania niepokoiły naukę u schyłku XIX wieku. I by zadać jeszcze jedno pytanie: czy i w jakim stopniu zmieniła się lista „pytań kardynalnych” po stu z górą latach?

Szczęśliwie jesteśmy w stanie przeprowadzić takie porównanie. W roku 1989 ukazała się bowiem książka cenionego popularyzatora nauki, a z zawodu matematyka, J.L. Castiego pt. *Paradigms Lost*. A niedawno, bo w 2000 roku, wyszło nowe jej wydanie, pod nieco zmienionym tytułem: *Paradigms Regained* [3]. W nowym wydaniu swojej książki autor uwzględnił zmianę sytuacji, jaką spowodowały dalsze badania naukowe. Książkę tę potraktowano poważnie: recenzja z niej ukazała się nawet na łamach „Nature”. Casti formułuje w niej nową listę pytań kardynalnych. Tych, które niepokoją nam współczesny świat naukowy. Docieką też, jakich to odpowiedzi udziela współczesna nauka na te pytania. W tym celu stosuje Casti procedurę dochodzenia sądowego. Zestawia argumenty przemawiające za konkretną odpowiedzią i argumenty jej przeciwne. Waży, niczym sędzia, argumenty stron i wydaje ostrożne orzeczenie.

Warto spojrzeć na listę problemów kardynalnych postawionych w tej książce. Oto ona:

- po pierwsze – pochodzenie życia,
- po wtóre – genetyczne uwarunkowania zachowań socjalnych człowieka,
- po trzecie – sposób powstania języka mówionego ludzi,
- po czwarte – możliwość zbudowania maszyny myślącej (sztuczna inteligencja),

po piąte – kwestia istnienia inteligencji pozaziemskiej,
po szóste – istota rzeczywistości kwantowej.

Już nawet pobieżny rzut oka na dwie, rozdzielone stuleciem, listy pytań kardynalnych pokazuje, że ich duch uległ dramatycznej zmianie. Niemal zniknął z listy Castiego metafizyczny odcień niepokoju Du Bois Reymonda. W pytaniach nie chodzi już o to, skąd się to wszystko wzięło. Starają się one dociec, jakie ono właściwie jest. Pytania stały się jakby bardziej pragmatyczne. Na obydwu listach widnieją tylko dwa niezmienione pytania. To o pochodzenie życia i to o drogi powstawania języka ludzkiego. Zniknęły gdzieś pytania czwarte i piąte z listy Du Bois Reymonda. I pojawiły się sprawy zupełnie nowe. Takie, jak pytanie o genetyczne uwarunkowania zachowań socjalnych, o możliwość wytworzenia sztucznej inteligencji czy istnienia inteligencji pozaziemskich. Takich pytań w ogóle jeszcze nie stawiano przed stu laty. Nie istniała, poza pierwszymi jej załączkami, genetyka. Nie miano jeszcze pojęcia, że wyłoni się przed nami świat rzeczywistości kwantowej. Pytania o istnienie innych, oprócz ludzkiej, inteligencji w Kosmosie, czy o możliwość wytworzenia sztucznej inteligencji – jeśli je zadawano – w ogóle jeszcze nie nabierały jakiegokolwiek odniesienia do zadań praktycznych. A co dopiero mówić o związkach między genetyką a zachowaniami socjalnymi?

W mojej notatce chcę uniknąć spraw szczegółowych. Nie wgłębiałem się więc w argumentację Du Bois Reymonda i nie będę się wgłębiał w treści książki Castiego. Ale nie mogę się oprzeć chęci przytoczenia przynajmniej jednej z przedstawionych przez Castiego ilustracji do kwestii genetycznych uwarunkowań zachowań socjalnych właśnie. Nie dotyczy ona ludzi, lecz świata zwierzęcego. Istnieją dwie odmiany normicy amerykańskiej. Jedna zamieszkuje prerię, druga góry. Samiczki tej pierwszej odmiany wyróżniają zachowania rodzinne, opiekuńcze wobec potomstwa. Samiczki drugiej odmiany porzucają swoje potomstwo zaraz po urodzeniu i w ogóle nie zajmują się jego losem. Jak się okazało, ta diametralna różnica zachowań ma podłoże biochemiczne. Mózgi samiczek obydwu odmian różnią się rozlokowaniem w tkance mózgowej receptorów oksytocyny, hormonu peptydowego regulującego ciążę i połów. A więc to genetyka decyduje o tych bardzo ważnych zachowaniach zwierząt.

Ale o tym tylko nawiasem. Wracając do porównań obydwu list pytań kardynalnych stwierdzmy jeszcze, że najważniejsze dla Du Bois Reymonda pytania o istotę materii i siły oraz o pochodzenie ruchu uległy na liście Castiego gruntownej transformacji, bo jakąś ich część odnaleźć przecież możemy w pytaniu o istotę rzeczywistości mikroświata. Odkrycie mikroświata potrząsnęło filarami dawnej fizyki, tej z czasów Du Bois Reymonda i Haeckla. Wywołało niekończące się dyskusje o tym, z czym właściwie na tym poziomie organizacji Przyrody mamy do czynienia. Padają tam nowe pytania, które zaledwie potrafię powtórzyć:

Jaka rzeczywistość odpowiada obliczonym funkcjom falowym?

W jakiej mierze pomiar kreuje rzeczywistość kwantową?

Czy mikroświat jest realnością, czy też, jak chcą niektórzy, superpozycją stanów?

Czy mechanika kwantowa to tylko system obliczeniowy, a jej wyniki mają charakter statystyczny?

Fizyka mikroświata nie jest zdroworozsądkowa, odbiega od intuicji ludzkich. Nic, tylko westchnąć: jak ogromnie zmienił się świat nauki od czasów Du Bois Reymonda i Haeckla! Ale to nie znaczy przecież, by pytania niepokojące XIX-wiecznych uczonych znalazły ostateczne odpowiedzi. Po prostu przestaliśmy się nimi zajmować, „zeszły z celownika”. Bo jeśli chodzi o stawianie nowych i poniechanie dawniejszych pytań, to sprawy rozgrywają się na sposób, o którym tak pisał J. Dewey:

Stare idee ustępują powoli. Są bowiem czymś więcej niż abstrakcyjnymi logicznymi formami i kategoriami. Są to nawyki, predyspozycje, głęboko zakorzenione postawy niechęci i upodobania. Prócz tego przeważa przekonanie – choć historia wykazała, że jest to złudzenie – iż wszystkie pytania, które stawia ludzki umysł, mogą zostać rozwiązane w kategoriach alternatyw takich, jakie same prezentują. W rzeczywistości jednak postęp intelektualny zazwyczaj przejawia się w prostej rezygnacji z pytań z obydwoma członami alternatywy. Wynika to z ich zmniejszającej się żywotności i zmiany aktualnych zainteresowań. Nie rozwiązujemy ich – mijamy je, idąc dalej. Stare pytania znikają, rozplywają się, a ich miejsce zajmują nowe, odpowiadające zmienionym kierunkom wysiłków i preferencji [5].

Co wydaje się ciekawe, w mniejszym stopniu ulegają z biegiem czasu zmianom światopoglądowe wybory uczonych. W roku 1916 amerykański psycholog, James Leuba, przeprowadził wśród uczonych USA bardzo ciekawą ankietę. Poprosił w niej o odpowiedź na trzy pytania: o wiarę respondenta w Boga, o osobistą wiarę w ludzką nieśmiertelność i o stopień odczuwania potrzeby własnej nieśmiertelności. Adresaci ankiety to tysiąc wybranych „na chybił trafił” naukowców, figurujących w tomie „American Men of Science” za rok 1910. Ankieta była doskonale przyjęta. Odpowiedziało na nią ok. 70% zapytanych. Jak się okazało, wiarę w Boga zadeklarowało ok. 40% respondentów. Nieco więcej było wierzących w życie pośmiertne. Ta ostatnia sprawa mogłaby się wydawać dziwna. Ale dla wielu respondentów to pośmiertne życie było rodzajem roztopienia się w Przyrodzie, a dla innych – trwaniem w pamięci potomnych.

I oto, w roku 1996, równo 80 lat po ankiecie Leuby, powtórzyli ją E.J. Larson i L. Witham. Znów „na chybił trafił” wybrali oni nazwiska tysiąca uczonych, kierując się ich obecnością w aktualnym wydaniu tomu „American Men and Women of Science”. (Zwróćmy uwagę, że w tytule tomu z 1910 roku uczonych kobiet jeszcze nie było; daje to pojęcie o socjologicznych zmianach, jakie zaszły w obrębie zawodu uczonego.) Odzew na ankietę był, tak jak poprzednio, znaczny. Uzyskano 60% odpowiedzi. Porównanie wyników obydwu ankiet znaleźć można w nie tak dawnym numerze „Nature” [6]. Oto ono:

| Porównanie odpowiedzi na ankietę w roku 1916 i 1996 (w procentach) | 1916 | 1996 |
|--|------|------|
| Wiara w Boga osobowego | | |
| osobista wiara | 41,8 | 39,3 |
| osobista niewiara | 41,5 | 45,3 |
| postawa agnostyczna lub wątpienie | 16,7 | 14,5 |

Wiara w ludzką nieśmiertelność

| | | |
|-----------------------------------|----------|------|
| osobista wiara | 50,6 | 38,0 |
| osobista niewiara | ok. 20,0 | 46,9 |
| postawa agnostyczna lub wątpienie | ok. 30,0 | 15,0 |

Odczuwanie potrzeby nieśmiertelności

| | | |
|-------------------------|------|------|
| intensywne | 34,0 | 9,9 |
| umiarkowane | 39,0 | 25,9 |
| w ogóle brak odczuwania | 27,0 | 64,2 |

Rzuca się w oczy, że odsetek uczonych wierzących w Boga zmienił się tylko nieznacznie w ciągu tych 80 lat. W małym też stopniu zmieniła się zarówno liczba niewierzących w istnienie Boga, jak i liczba „agnostyków”. Poważne zmiany natomiast nastąpiły w rubryce „wiara w ludzką nieśmiertelność”. Liczba wierzących w nią spadła o 14%, a niewierzących wzrosła o 27%. Równocześnie bardzo zmalała liczba wątpiących. Najciekawsze jednak zmiany nastąpiły w rubryce odczuwania potrzeby nieśmiertelności. Aż 64,2% respondentów zadeklarowało brak chęci przedłużenia swego żywota w nieskończoność. Myślę, że mogło im jednak chodzić o rodzaj nieśmiertelności ziemskiej, o zwykłe ziemskie bytowanie, przedłużone w nieskończoność. Bo tak przecież wyobrażamy sobie nieśmiertelność. Przypominam sobie rozmowę, którą kiedyś, dawno temu, prowadziłem w uniwersyteckiej stołówce z kolegą, fizykiem-teoretykiem. Rozmawialiśmy o ziemskiej nieśmiertelności właśnie, dosłownie rozumianej. Natchniony lekturą Darwina klarowałem mu, że byłby to koniec ewolucji gatunku, wydarzenie katastrofalne dla jego przyszłości. Westchnął ciężko. – Ale przecież – powiedział – przynasz, że z punktu widzenia nawet tych samych interesów gatunku byłoby korzystne zachowanie wybitnych inteligencji... Szkoda skazywać na zagładę takie wybrane, wybitne inteligencje... – Uśmiechnąłem się po cichutku. Zbyt wyraźnie wpisywały się w te słowa zarówno jego osobiste pragnienia, jak i bardzo wysoka samoocena.

Przedstawione wyżej ankiety objęły uczonych najróżniejszych specjalizacji. W odpowiedziach ujawniły więc się pewne preferencje zawodowe. W ankiecie przeprowadzonej w 1996 roku wśród deklarujących wiarę w Boga najwyższy był odsetek matematyków (44,6%). Nie wierzyło zaś w Boga 77,9% fizyków i astronomów. Zupełnie inaczej wyglądały wyniki pierwszej ankiety. Wtedy najwięcej niewierzących było wśród biologów (69,5%).

Co jednak najbardziej uderza w ankiecie Larsona i Withama, to ogromny wzrost liczby uczonych, którzy osobistej nieśmiertelności wcale nie pragną. Jak już powiedziałem, obawiam się, że myśląc o nieśmiertelności mieli oni na uwadze przedłużenie nad miarę swojego ziemskiego bytowania. I tego właśnie wcale nie pragną. Bo niewątpliwie przedłużenie średniego czasu trwania życia, jakie nastąpiło w ciągu minionych stu lat, wydłużyło głównie okres starości, okres cierpień i umierania. Czas zmagania się z nieuleczalną chorobą. A to przykra perspektywa. Myślę, że tutaj właśnie leżą przyczyny tak nieoczekiwanej odpowiedzi, udzielonej przez ankietowanych na pytanie o odczuwanie potrzeby nieśmiertelności.

PIŚMIENICTWO CYTOWANE

- [1] E. Du Bois Reymond, *Die sieben Welträtsel*, Leipzig 1882.
- [2] E. Haeckel, *Zarys filozofii monistycznej*, Warszawa-Lwów 1905.
- [3] J.L. Casti, *Paradigms Regained: A Further Exploration of the Mysteries of Modern Science*, Little, Brown a. Co, London 2000.
- [4] M. Baumann, *Nature*, 2000, **406**, 564.
- [5] J. Dewey, *Wpływ darwinizmu na filozofię*, [w:] *Wielkie eseje w nauce*, Prószyński i S-ka, Warszawa 1998, s. 45.
- [6] E.J. Larson, L. Witham, *Nature*, 1997, **386**, 435.

NOWE WYDAWNICTWA



Biotechnologia żywności, praca zbiorowa, pod red. Włodzimierza Bednarskiego i Arnolda Repsa, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 2001, 486 s., cena 49,50 zł, twarda oprawa

Opiniowana książka stanowi obszerne, blisko 500-stronicowe dzieło przygotowane przez 9 naukowców, przeważnie pracowników naukowo-dydaktycznych Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Autorami podręcznika, w porządku alfabetycznym, są: dr inż. Marek Adamczak; dr hab. Andrzej Babuchowski, prof. UWM; prof. dr hab. Włodzimierz Bednarski; dr hab. Lucjan Jędrychowski; dr inż. Jadwiga Kowalewska-Piontas; dr hab. Jacek Leman, prof. UWM; prof. dr hab. Arnold Reps; dr hab. Anna Sałek; prof. dr hab. Tomasz Twardowski.

Podręcznik zawiera 10 rozdziałów, które w sposób syntetyczny i kompetentny przedstawiają wybrane zagadnienia współczesnej biotechnologii żywności, jej perspektywy i najważniejsze osiągnięcia. Dobór i zakres materiału prezentowanego w tej książce jest ciekawy i wychodzi naprzeciw oczekiwaniom czytelników. Redaktorzy naukowi podręcznika zrezygnowali z zamieszczenia w nim podstawowych informacji, takich jak morfologia, cykle rozwojowe, fizjologia czy metabolizm drobnoustrojów przemysłowych, ogólnie dostępnych w wielu bardzo dobrych podręcznikach, zarówno krajowych, jak i zagranicznych. Zakres tematyczny podręcznika jest szeroki i dotyczy w głównej mierze klasycznej biotechnologii, a więc wykorzystania naturalnych szczepów drobnoustrojów oraz enzymów do prowadzenia procesów biosyntezy, biotransformacji i biodegradacji. Lektura tego podręcznika umożliwia czytelnikowi zapoznanie się ze środowiskiem i surowcami stosowanymi w procesach biotechnologicznych oraz metodami pozyskiwania drogą biotechnologiczną funkcjonalnych dodatków do żywności (aminokwasów, enzymów, polisacharydów, związków aromatycznych, szczepionek do procesów fermentacyjnych w żywności itp.). Książka wprowadza w zagadnienia produkcji fermentowanej żywności i napojów alkoholowych, zaznajamia z problematyką enzymatycznej modyfikacji składników żywności oraz biotechnologicznymi metodami zagospodarowania produktów ubocznych i odpadowych przemysłu rolno-spożywczego. W podręczniku nie pominięto ważnych aspektów inżynierskich i procesowych, takich jak budowa bioreaktorów, sposoby prowadzenia bioprocessów oraz operacje jednostkowe w procesach biotechnologicznych. Ponadto cztery odrębne rozdziały podręcznika poświęcono biotechnologii molekularnej i jej znaczeniu w produkcji i analizie żywności. Przedstawiono w nich wybrane zagadnienia z zakresu biologii molekularnej i wykorzystania metod inżynierii genetycznej i komórkowej w doskonaleniu drobnoustrojów przemysłowych, omówiono najważniejsze trendy i dokonania w dziedzinie biotechnologii roślin i zwierząt, naświetlono etyczne i prawne aspekty stosowania modyfikowanych genetycznie organizmów w produkcji żywności oraz poruszono problematykę zastosowania biosensorów i metod immunoenzymatycznych w analizie żywności. Całość

opracowania wieńczy bardzo przydatny czytelnikowi leksykon, objaśniający znaczenie ok. 200 starannie wyselekcjonowanych terminów biotechnologicznych.

Poszczególne rozdziały podręcznika prezentują wysoki poziom merytoryczny i zostały opracowane na podstawie najnowszych pozycji piśmiennictwa – większość cytowań stanowią prace oryginalne i przeglądowe ogłoszone drukiem w ostatniej dekadzie. Krytyczne uwagi kieruję jedynie pod adresem podrozdziałów 4.1-4.7, w których czytelnik może natknąć się na wiele niepoprawnych, żargonowych określeń (np. „zaszczep”, „prędkość wzrostu”, „faza troficzna”, „bioreaktor fakultatywny niedotleniony”, „bioreaktor rurowy z zastosowaniem powrotu”). Większość rozdziałów jest napisana jasnym i zrozumiałym językiem. Cennym atutem podręcznika jest bogata dokumentacja graficzna (99 rysunków) i tabelaryczna (79 tabel), przygotowana w sposób przejrzysty i zrozumiały, co znakomicie ułatwia przyswajanie prezentowanych w nim wiadomości.

Podręcznik adresowany jest do studentów uczelni rolniczych, medycznych i politechnik, do nauczycieli akademickich tych uczelni, a także do pracowników przemysłu spożywczego, specjalizujących się w zakresie biotechnologii żywności, technologii żywności i żywienia człowieka. Przedstawione w nim treści są zgodne z aktualnym stanem wiedzy i znajdują się w zakresie programów kształcenia na wymienionych kierunkach i specjalnościach. Uważam tę nową pozycję wydawniczą za wartościową i bardzo potrzebną. Wypełni ona znakomicie lukę w materiałach dydaktycznych dotyczących biotechnologii żywności i niewątpliwie będzie z powodzeniem spełniać swą edukacyjną rolę.

Maria Wojtatowicz

DO CZYTELNIKÓW „WIADOMOŚCI CHEMICZNYCH”

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

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

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

- prenumerata „Wiadomości Chemicznych” na rok 2002 wraz ze składką członkowską, w ramach której dostarczany jest „Orbital”, wynosi 75 zł (składka – 65 zł, prenumerata – 10 zł);
- emeryci oraz nauczyciele szkół średnich i podstawowych płacą 25 zł (składka – 15 zł, prenumerata – 10 zł);
- dla studentów, członków PTCh, składka wraz z prenumeratą „Wiadomości Chemicznych” wynosi 18 zł (składka – 8 zł, prenumerata – 10 zł).

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

PTCh Warszawa, ul. Freta 16
BIG BG SA IV O/Warszawa, Nr 11601120-6594-132

Redakcja „Wiadomości Chemicznych”



SPIS TREŚCI

| | |
|--|-----|
| Agnieszka GRYSZKIEWICZ, Izabella JASTRZĘBSKA, Jacek W. MORZYCKI: Nowe produkty naturalne o działaniu cytostatycznym | 793 |
| Ryszard FRANKOWSKI, Wojciech MASZEWSKI, Zygfryd SMIATACZ: Cyklitole | 821 |
| Bogdan FALKIEWICZ, Kazimierz WIŚNIEWSKI, Aleksandra S. KOŁODZIEJCZYK: Alternatywne mediatory reakcji Mitsunobu | 849 |
| Włodzimierz URBANIAK: Krzemoorganiczne pochodne β -diketonów – synteza, właściwości i główne zastosowania | 859 |
| Andrzej LEWANDOWICZ: Enzymatyczna degradacja związków chlorowcoorganicznych | 883 |
| Krzysztof KURZAK, Iwona KUŹNIARSKA-BIERNACKA: Z badań nad spektroskopią UV-VIS kompleksów metali przejściowych z zasadami Schiffa w roztworach | 913 |
| Angelika MRASS, Edward BALD: Metody zatażania analitów w kapilarze w wysoko-sprawnej elektroforezie kapilarnej | 933 |
| Felieton naukowy | |
| Ignacy Z. SIEMION: Notatki chaotyczne. XXXVI. Zmienne fata pytań kardynalnych | 955 |
| Nowe wydawnictwa | 963 |

W NASTĘPNYM ZESZYCIE UKAŻĄ SIĘ:

| | |
|--|--|
| Zbigniew Paweł ZAGÓRSKI: Chemia radiacyjna i powstanie życia na Ziemi | |
| Jadwiga WILSKA-JESZKA, Anna PODSEDEK: Bioflawonoidy jako naturalne antyoksydanty | |
| Stanisław KARSKI, Iwona LUDOMIRSKA, Izabela WITOŃSKA: Wpływ temperatury redukcji na właściwości sorpcyjne i katalityczne naniesionych układów metalicznych | |
| Stefan LIS, Sławomir BUT: Badania heteropolianionów skondensowanych i ich kompleksów z jonami lantanowców(III) metodami spektroskopowymi | |
| Krzysztof JOŹWIĄK, Halina SZUMIŁO, Edward SOCZEWSKI: Lipofilowość, metody wyznaczania i rola w działaniu biologicznym substancji chemicznych | |
| Sławomir WIELIŃSKI, Andrzej OLSZANOWSKI: Wykorzystanie HPLC do oznaczania witamin rozpuszczalnych w tłuszczach | |
| Radosław TRĘBIŃSKI, Andrzej MARANDA: Przemiany grafitu i azotku boru w falach uderzeniowych | |

Felieton naukowy

Ignacy Z. SIEMION: Notatki chaotyczne. XXXVII. O odkryciach przedwcześnie

Kronika

Doktorat *honoris causa* Prof. dra hab. Lucjana Sobczyka

Sprawozdanie Komitetu Głównego Olimpiady Chemicznej z XLVII olimpiady w roku szkolnym 2000/2001

Nowe wydawnictwa

Informacje