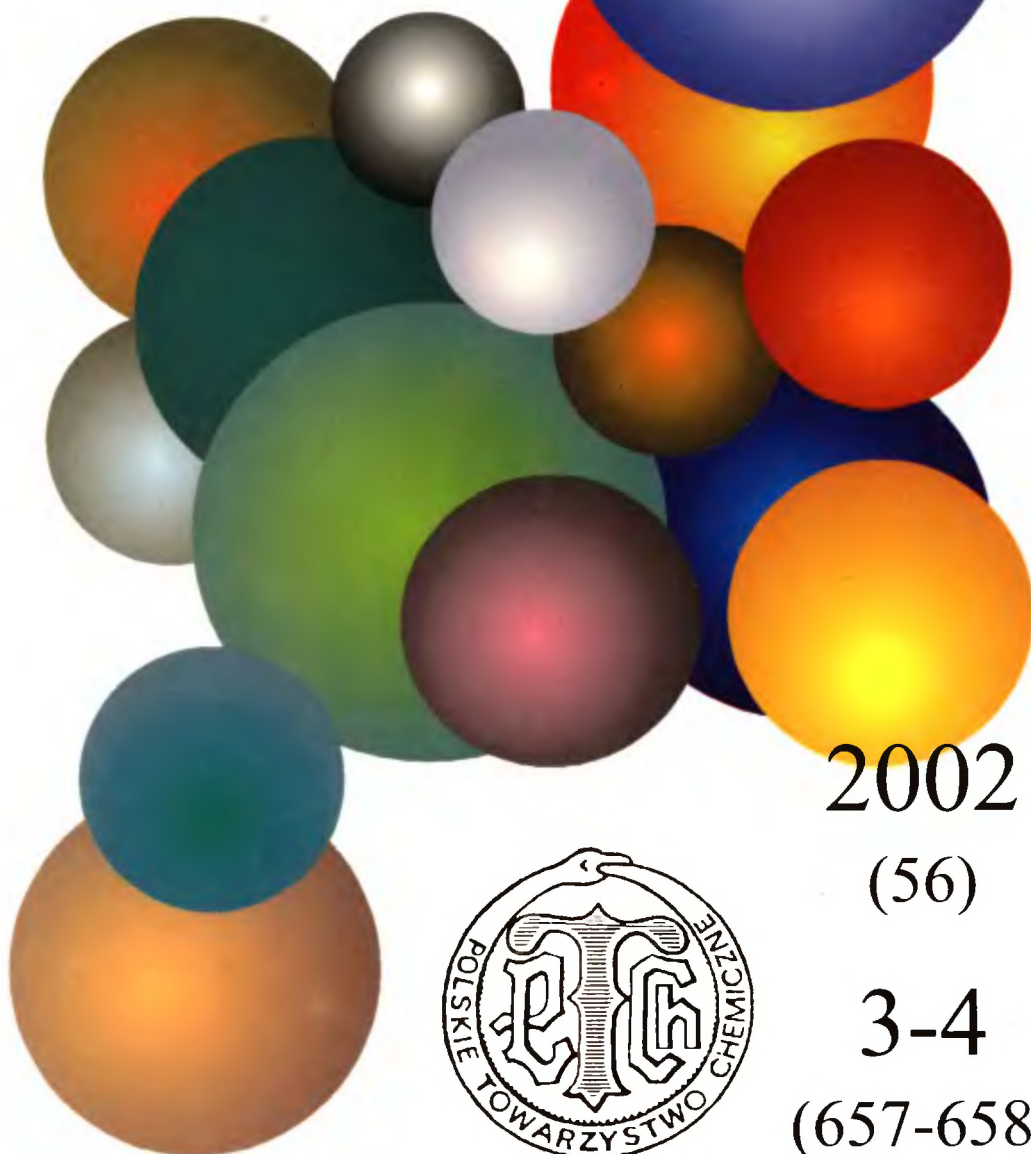


A 1203 II

Dr. 3

WIADOMOŚCI *chemiczne*



2002

(56)

3-4

(657-658)



CZASOPISMO POLSKIEGO TOWARZYSTWA CHEMICZNEGO

Publikacja dotowana przez KBN

RADA REDAKCYJNA

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

Z REDAKCJĄ STAŁE WSPÓŁPRACUJĄ

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

KOMITET REDAKCYJNY

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

REDAKTOR NACZELNY

JÓZEF J. ZIÓLKOWSKI

SEKRETARZ REDAKCJI

KRYSTYNA MARKSOWA

Korespondencję należy kierować pod adresem:

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

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

© Copyright by Redakcja „Wiadomości Chemicznych”, Wrocław 2002

REDAKTOR WYDAWNICTWA
AGNIESZKA FLASIŃSKA

ISSN 0043-5104

Maszynopis niniejszego numeru przekazano Wydawcy w marcu 2002

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

Druk i oprawa: Drukarnia Uniwersytetu Wrocławskiego

**DeNO_x NA SITACH MOLEKULARNYCH
ZAWIERAJĄCYCH MIEDŹ
CZ. II. KATALITYCZNY ROZKŁAD NO***



**DeNO_x ON COPPER-CONTAINING
MOLECULAR SIEVES**

PART II. CATALYTIC DECOMPOSITION OF NO

Izabela Sobczak, Maria Ziólek

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



Abstract

Spis akronimów

1. Reakcja katalitycznego rozkładu NO prowadzona w układzie przepływowym
 - 1.1. Wpływ warunków preparatyki katalizatora na jego aktywność w reakcji rozkładu NO
 - 1.2. Wpływ stosunku Si/Al i Cu/Al w zeolicie Cu-ZSM-5 na jego aktywność w reakcji rozkładu NO
 - 1.3. Wpływ warunków aktywacji katalizatora
 - 1.4. Wpływ warunków reakcji rozkładu NO
 - 1.5. Rola kokationów
 - 1.6. Wpływ natury atomu T w szkielecie sita molekularnego
2. Adsorpcja i przemiany NO – badania FTIR, mechanizm

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

* DeNO_x na sitach molekularnych zawierających miedź. Cz. I. Fizykochemiczna charakterystyka katalizatorów, *Wiad. Chem.*, 2002, 56 (1-2), 83-111.



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

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

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



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

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

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

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

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

ABSTRACT

Part II of the series dealing with DeNO_x carried out on copper-containing molecular sieves is devoted to the various features responsible for the catalytic activity of Cu-molecular sieves in the NO decomposition. The physico-chemical properties of the catalysts were shown in Part I („Wiadomości Chemiczne” 2002, 56, 1-2, 83), whereas in Part II they are related to the decomposition of NO.

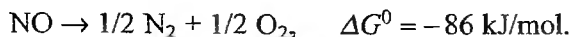
This paper describes the role of the Si/Al and Cu/Al ratios, the conditions of the catalysts preparation and activation, the influence of the T-element nature in the framework of molecular sieves as well as co-cations on the yield in the NO decomposition. Moreover, some proposals of the mechanism of this reaction described in the literature are included.

SPIS AKRONIMÓW

AIMCM-41	Mezoporowate glinokrzemianowe sito molekularne należące do M41S – struktura heksagonalna
Cu-NbZSM-5	Niobokrzemianowa forma zeolitu ZSM-5 jonowo wymienionego miedzią
Cu-ZSM-5	Glinokrzemianowa forma zeolitu ZSM-5 jonowo wymienionego miedzią
DeNO _x	Usuwanie tlenków azotu
DFT	Teoria funkcjonału gęstości
ELO	<i>Extra Lattice Oxygen</i> – tlen sieciowy w pozycji pozaszkieletowej zeolitu
EPR	Spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego
FTIR	Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera
HMS	Krzemianowy, heksagonalnie uporządkowany materiał mezoporowaty
IR	Spektroskopia w podczerwieni
MCM-41	Mezoporowate krzemianowe sito molekularne należące do M41S – struktura heksagonalna
MFI	Symbol kodowy typu struktury zeolitów
NbMCM-41	Mezoporowate niobokrzemianowe sito molekularne należące do M41S – struktura heksagonalna
NNN	<i>Next Nearest Neighbours</i> – następne najbliższe sąsiedztwo
S-1	Silikalit – krzemianowa forma zeolitu ZSM-5
SAPO	Materiały zeolitopodobne zbudowane z Si, Al, P i O
TOF	<i>Turnover frequency</i> – liczba cząsteczek reagujących w jednostce czasu na pojedynczym centrum aktywnym dostępnym dla substratów
TPD	Termoprogramowana desorpcja
TPR	Termoprogramowana redukcja
Y	Typ zeolitu (fojazyt) – struktura regularna, posiada duże komory otoczone 12-członowymi pierścieniami tlenowymi
XPS	Spektroskopia fotoelektronów wybijanych promieniowaniem rentgenowskim
XRD	Dyfrakcja promieniowania rentgenowskiego
ZSM-5	<i>Zeolite Socony Mobil</i> – typ zeolitu, ma średnie kanały otoczone 10-członowymi pierścieniami tlenowymi

1. REAKCJA KATALITYCZNEGO ROZKŁADU NO PROWADZONA W UKŁADZIE PRZEPEŁYWOWYM

Tlenek azotu(II) należy do związków termodynamicznie niestabilnych [1]:



Teoretycznie rozkład NO może zachodzić z taką szybkością, z jaką następuje jego tworzenie, jednakże reakcja hamowana jest przez wysoką energię aktywacji, wynoszącą 364 kJ/mol [1]. Z tego powodu, aby ułatwić zajście reakcji, konieczne jest użycie katalizatora do obniżenia energii aktywacji.

Dotychczas zbadano aktywność wielu rozmaitych katalizatorów w reakcji rozkładu tlenku azotu(II). Należą do nich materiały zawierające metale szlachetne, tlenki metali oraz modyfikowane zeolity. Spośród metali szlachetnych najlepszymi katalizatorami tego procesu okazały się platyna i pallad, także z dodatkiem srebra lub złota [1], jednakże znaczącą aktywność uzyskiwały one dopiero w temperaturze > 1023 K. Przebadano również całą gamę tlenków metali, co pozwoliło ustalić następujący szereg pod względem ich aktywności: Fe₂O₃ < NiO < CuO < Mn₃O₄ < Mn₂O₃ \cong La₂O₃ < Co₃O₄ [2]. Niestety, temperatura reakcji była wysoka (773–973 K), a poziom konwersji NO niewielki. Pojawiły się też doniesienia na temat aktywności tlenków typu perowskitu (tlenek Sr-Fe, La-Sr-Co, tlenki typu Y-Ba-Cu-O, La-Sr-Cu-O) w reakcji rozkładu NO [1–3]. Chociaż niektóre z nich wykazały znaczącą aktywność i dobrą stabilność struktury w wysokich temperaturach, ich aktywność w przeliczeniu na naważkę nie była wysoka z powodu ich niskiej powierzchni właściwej.

Materiałami zeolitowymi w rozkładzie NO zajęli się jako pierwsi Iwamoto i wsp. W pierwszej kolejności przebadali oni zeolity CuY [4] i stwierdzili, że maksymalną aktywność katalizatory te uzyskują w temperaturze > 723 K oraz że aktywność rośnie ze wzrostem zawartości miedzi w próbce i z czasem kontaktu katalizatora z NO. Dalsze badania grupy Iwamoto wykazały, że również zeolit Cu-ZSM-5 może katalizować rozkład NO do N₂ i O₂, przy czym stopień konwersji NO jest wyższy niż w przypadku zeolitów CuY [5, 6]. Podobne rezultaty uzyskali Li i Hall [7] oraz Wang i wsp. [8], którzy porównywali aktywność w rozkładzie NO miedziowych form zeolitów typu Y, dealuminowanego Y, mordenitu, β i ZSM-5. Najwyższą aktywność wykazał zeolit Cu-ZSM-5. Zeolit Y, mimo większych rozmiarów porów i wyższej zawartości miedzi, był mniej aktywny, wartość TOF była ok. dwa rzędy wielkości niższa niż TOF w przypadku Cu-ZSM-5. Wartości TOF dla zeolitów β i mordenitu były porównywalne i zawierały się pomiędzy TOF zeolitów Y i ZSM-5. Różnice w aktywności katalizatorów CuY i Cu-ZSM-5 autorzy pracy [8] wiążą z różną strukturą zeolitów, różnym stosunkiem Si/Al, większym stężeniem jonów Cu⁺ w aktywowanym zeolicie ZSM-5 oraz silniejszą adsorpcją NO na Cu-ZSM-5.

Mimo że od czasu odkrycia przez grupę badawczą Iwamoto [5] wysokiej aktywności zeolitów Cu-ZSM-5 w procesie rozkładu tlenku azotu(II) upłynęło już kilkanaście lat, to przez długi czas nie znaleziono równie aktywnego katalizato-

ra tej reakcji. Okazało się, że nie tylko trudno jest opracować lepszy katalizator od Cu-ZSM-5, ale też nie każdy zeolit ZSM-5 modyfikowany miedzią wykazuje podobną (wysoką) aktywność w omawianej reakcji.

Liczne badania w różnych ośrodkach badawczych wykazały, że aktywność zeolitów Cu-ZSM-5 uzależniona jest od wielu czynników, m.in. warunków preparatyki katalizatora, obróbki aktywacyjnej, stosunku Si/Al i Cu/Al, temperatury reakcji, stężenia NO. Najważniejsze wnioski dotyczące wpływu wymienionych parametrów na efektywność otrzymanego katalizatora zebrane są w dalszej części artykułu.

1.1. WPŁYW WARUNKÓW PREPARATYKI KATALIZATORA NA JEGO AKTYWNOŚĆ W REAKCJI ROZKŁADU NO

Na aktywność katalizatora Cu-ZSM-5 w reakcji rozkładu NO w dużym stopniu wpływa pH roztworu soli stosowanej do wymiany jonowej, od którego zależy uzyskany stopień wymiany jonowej na miedź (stopień wymiany wzrasta ze wzrostem wartości pH od 4,5 do 7,0) [9]. Autorzy pracy [9] wykazali, że aktywność katalizatorów, w których poziom miedzi regulowano za pomocą pH, wzrasta ze wzrostem zawartości miedzi do ok. 100% wymiany, natomiast nadmiarowo wymienione katalizatory (pH roztworu > 6,0) cechują się aktywnością porównywalną z aktywnością katalizatorów o 100% wymianie. Wzrost aktywności nadmiarowo wymienionych zeolitów (ok. 90% konwersji NO dla katalizatora o najwyższym poziomie wymiany równym 142%) uzyskano, kiedy nadmiar miedzi wprowadzono w wyniku kilkakrotnej wymiany jonowej, przy stałym pH = 5,7. Z tego wynika, że nadmiarowa miedź, wprowadzona do zeolitu przez regulację pH roztworu (> 6), nie jest aktywna w rozkładzie NO. Obserwacje te potwierdzili Vaylon i Hall [10] oraz Curtin i wsp. [11], uzyskując aktywne w reakcji rozkładu NO katalizatory Cu-ZSM-5 przy zastosowaniu pH roztworów, odpowiednio od 4 do 6,5 i od 5 do 6,5. Dla katalizatorów przygotowanych z roztworu o pH > 6,5 aktywność w rozkładzie NO spadała. Zdaniem autorów [9, 10, 12] dla niskich wartości pH (< 4) duże stężenie H⁺ w roztworze przeszkadza wymianie Na⁺ na Cu²⁺. W roztworach o wyższych pH (6,5–8) może zajść częściowa hydroliza soli z utworzeniem kationów lub klasterów w formie [Cu_x(OH)_y]^{(2x-y)+}, np. [Cu₂(OH)₂]²⁺, [Cu₂OH]³⁺ itp., oraz krystalitów typu CuO na powierzchni katalizatora (po kalcynacji przechodzą w krystality typu Cu_xO_y), które nie są aktywne w rozkładzie NO. Z tego powodu, aby uzyskać aktywne katalizatory Cu-ZSM-5 o stosunku Cu/Al > 0,5 preferuje się sposób preparatyki przez kilkakrotną wymianę z roztworu o pH ~ 5–6. Zbadano również wpływ czasu kontaktu zeolitu Cu-ZSM-5 z roztworem na jego aktywność w rozkładzie NO [13]. Stwierdzono, że dłuższy czas kontaktu zeolitu z wodą (dekantacja i suszenie po dwóch dobach od zakończenia procesu mieszania zeolitu z roztworem) przyczynia się do lepszej dyspersji miedzi w porach oraz do zwiększenia mobilności jonów miedzi przez hydratację lub hydroksylację, co daje szerszy przedział temperatur, w którym katalizator uzyskuje maksymalną aktywność.

Istotny wpływ na aktywność miedziowego katalizatora ZSM-5 ma sposób wprowadzenia metalu do sita molekularnego. W pracy [14] porównano aktywność w rozkładzie NO miedziowych katalizatorów Cu-ZSM-5 preparowanych przez wymianę jonową z roztworu, impregnację, wprowadzenie miedzi podczas syntezy i połączenie tych metod. Najwyższą konwersję NO do N₂ zaobserwowano dla katalizatora Cu(i)-Cu(s)-ZSM-5, do którego miedź wprowadzono częściowo podczas syntezy zeolitu (s), a częściowo w trakcie wymiany jonowej (i), mimo iż w przypadku tego katalizatora ilość miedzi wprowadzona podczas wymiany była mniejsza niż w katalizatorze Cu(i)-ZSM-5 otrzymanym wyłącznie przez wymianę jonową. Z drugiej strony zauważono, że impregnacja katalizatora Cu(i)-ZSM-5 miedzią nieznacznie obniża konwersję NO w porównaniu z aktywnością katalizatora wyjściowego. Ponadto stwierdzono, że NO nie ulega rozkładowi na katalizatorze Cu(s)-ZSM-5, do którego miedź wprowadzono podczas jego syntezy. Spostrzeżenie to pozwoliło wysunąć przypuszczenie, że oddziaływanie między miedzią wprowadzoną w trakcie syntezy, najprawdopodobniej rozłożoną równomiernie w całej strukturze zeolitu, a miedzią jonowo wymienioną decyduje o powstaniu dodatkowych miejsc aktywnych. Potwierdziły to badania TPD NO, wskazując na większą liczbę miejsc aktywnych w zeolicie Cu(i)-Cu(s)-ZSM-5 w porównaniu z Cu(i)-ZSM-5. Prowadzi to do wzrostu konwersji NO i jednocześnie wskazuje, że wprowadzenie miedzi podczas syntezy zeolitu, a następnie przez wymianę jonową daje w rezultacie katalizator bardziej aktywny w rozkładzie NO niż konwencjonalnie wymieniony jonowo Cu-ZSM-5.

Odmienne obserwacje dotyczące aktywności katalizatorów przygotowanych metodą wymiany jonowej z roztworu i metodą impregnacji przedstawiono w pracy [15], w której podkreślono wyższą aktywność w rozkładzie NO katalizatorów ZSM-5 i mordenitów impregnowanych solą miedzi w porównaniu z próbkami jonowo wymienionymi. Badania XRD, EPR i H₂-TPR wskazały na obecność miedzi w formie Cu²⁺, Cu⁺ i CuO w próbkach impregnowanych, przy czym ze wzrostem zawartości miedzi wzrastały także liczba i rozmiar krystalitów CuO. W omawianej reakcji przebadane zostały także zeolity Cu-ZSM-5 przygotowane przez wymianę jonową w ciele stałym [16, 17]. Stwierdzono, że katalizatory preparowane z wykorzystaniem CuCl jako źródła miedzi [17], zawierające jony Cu²⁺, powstałe w wyniku kontaktu materiału z wilgotnym powietrzem, są praktycznie nieaktywne w reakcji rozkładu NO. Tymczasem katalizatory Cu-ZSM-5 preparowane przez wymianę w ciele stałym z użyciem CuCl₂ i CuO wykazały aktywność porównywalną z zeolitami przygotowywanymi przez wymianę jonową z roztworu [16], przy podobnej zawartości miedzi.

1.2. WPŁYW STOSUNKU Si/Al I Cu/Al W ZEOLICIE Cu-ZSM-5 NA JEGO AKTYWNOŚĆ W REAKCJI ROZKŁADU NO

Aktywność katalizatorów Cu-ZSM-5 wzrasta ze wzrostem stosunku Si/Al [18] i Cu/Al [6, 7, 10, 18–21], przy czym najwyższe wartości TOF wykazują katalizatory nadmiarowo wymienione miedzią. Vaylon i Hall [10], stosując zeolity

ZSM-5 o stosunku Si/Al = 14, uzyskali wzrost wartości TOF ze wzrostem zawartości miedzi do ok. 120% wymiany jonowej. Z kolei Curtin i wsp. [22] dla zeolitu o stosunku Si/Al = 25 zaobserwowali maksimum aktywności w przypadku sita o 173% wymianie. Wzrost zawartości miedzi do 225% nie powodował już dalszego wzrostu konwersji NO. Badania XRD wykazały, że spadek aktywności katalizatora > 200% wymiany najprawdopodobniej wynika z tworzenia się fazy tlenku miedzi CuO, który blokuje kanały zeolitu [13]. Dodatkowo przy tak wysokiej zawartości miedzi obserwuje się spadek krystaliczności materiału, co powoduje zniszczenie miejsc dla utworzenia aktywnych form miedzi i przepustowości drogi dla reagentów. Tymczasem Ziółek i wsp. [20, 23] stwierdzili spadek aktywności katalizatora Cu-ZSM-5 w reakcji rozkładu NO już przy 148% wymianie na miedź (Si/Al = 27). Pirone i wsp. [24], przy zastosowaniu zeolitów o dużo wyższym stosunku Si/Al = 80, zaobserwowali wzrost aktywności katalizatora wraz ze wzrostem zawartości miedzi aż do 500% wymiany. Należy zaznaczyć, że próbki te, mimo wyższego stosunku Cu/Al w porównaniu z zeolitami badanymi przez Curtina [22], zawierały zbliżone zawartości miedzi, co wynikało z różnej wartości Si/Al. Próbkę o podobnej zawartości miedzi, ale różnych stosunkach Si/Al i Cu/Al porównywali autorzy pracy [25], którzy potwierdzili wzrost aktywności katalizatora ze wzrostem wartości obu parametrów. Stwierdzono również, że ze wzrostem Si/Al i Cu/Al wzrasta selektywność reakcji rozkładu NO do N₂, natomiast produkty w postaci NO₂ i N₂O tworzą się w mniejszej ilości [21, 25].

Zależność aktywności zeolitu od poziomu wymiany miedzi oraz fakt, że aktywność katalizatora Cu-ZSM-5 jest proporcjonalna do ilości jonów w sąsiedztwie „pojedynczych atomów Al” [18] oraz jonów Cu⁺ w próbce [26] sugeruje, że aktywną formą miedzi w rozkładzie NO jest miedź związana z pozaszkieletowym tlenem sieciowym (ELO) w postaci Cu²⁺O⁻, uzyskująca koordynację kwadratową płaską, łatwo redukowalna do Cu⁺.

W opozycji do badań udowadniających wzrost aktywności katalizatorów Cu-ZSM-5 ze wzrostem stosunku Si/Al i Cu/Al, pojawiły się prace Morettiego [27–30]. Z jego obserwacji wynika, że najbardziej aktywnymi katalizatorami w rozkładzie NO są zeolity Cu-ZSM-5 o niskim stosunku Si/Al (Si/Al = 11–17), a aktywność wzrasta ze wzrostem zawartości Al w komórce elementarnej. Zdaniem Morettiego miejscami aktywnymi w rozkładzie NO są raczej formy dime-ryczne [Cu–O–Cu]²⁺ (zlokalizowane w sąsiedztwie par Al) niż izolowane jony miedzi, a obecność glinu w NNN gra ważną rolę w stabilizacji aktywnych form miedzi. Dodatkowo stwierdzono [31], że najwyższą aktywność wykazują zeolity o stopniu wymiany 80–100% (Si/Al = 17).

1.3. WPŁYW WARUNKÓW AKTYWACJI KATALIZATORA

Rodzaj atmosfery aktywacji miedziowego katalizatora zeolitowego (powietrze, hel, wodór, tlenek węgla(II)) ma znaczące odzwierciedlenie w jego aktywności w reakcji rozkładu NO [22]. Stwierdzono, że konwersja NO, szczególnie w przypadku

nadmiarowo wymienionego miedzią zeolitu ZSM-5, po aktywacji w atmosferze wodoru (423 K) jest wyraźnie niższa (o ok. 10%) niż po aktywacji w helu (773 K). W obu przypadkach, w początkowym etapie reakcji, nie zaobserwowano pojawienia się tlenu jako produktu reakcji. Po redukcji wodorem pojawienie się tlenu i ustalenie stałego poziomu konwersji NO (z rozpoczęciem wytwarzania tlenu następuje spadek konwersji NO) wymagało dłuższego czasu. Na podstawie zaobserwowanych rezultatów wywnioskowano, że aktywacja zarówno w helu jak i w wodrze prowadzi do redukcji miedzi z wytworzeniem wakancji tlenowych w szkielecie zeolitu, przy czym obróbka wodorem przyczynia się do powstania większej ich liczby. W początkowym etapie reakcji luki tlenowe są odnawiane przez tlen powstały w wyniku rozkładu NO, stąd brak tlenu w produktach reakcji. Spadek aktywności katalizatora po redukcji H₂ autorzy wiążą z tworzeniem się agregatów miedzi na powierzchni, na co wskazały badania XPS katalizatorów (zmiana energii z 933,7 eV na 932,8 eV). Z kolei Parvulescu i wsp. [32] porównali aktywność katalizatorów Cu-ZSM-5 aktywowanych w helu i powietrzu w 773 K. Zeolity aktywowane w helu cechowały się wyższą aktywnością, ale zgodnie z rezultatami Curtina [22], tlen zaobserwowano w produktach reakcji dopiero po 60 min reakcji. Inaczej zachowała się próbka aktywowana w powietrzu. Wykazała ona niższą aktywność, ale tlen pojawił się natychmiast po rozpoczęciu reakcji. Stanowiło to potwierdzenie sugestii, że właśnie warunki redukcyjne generują wakancje tlenowe w szkielecie zeolitu.

Schay i wsp. [33] w odmienny sposób tłumaczą brak obecności tlenu w produktach początkowej fazy reakcji rozkładu NO. Ich zdaniem tlen zużywany jest na reutlenianie miedzi Cu⁺ (generowanej podczas aktywacji w argonie) z utworzeniem Cu²⁺(O)O⁻.

Tymczasem w przypadku katalizatora Cu-ZSM-5 przygotowanego metodą wymiany jonowej w ciele stałym z użyciem CuCl, obróbka w redukującej atmosferze CO/He i H₂/He w 773 K okazała się procesem korzystnym dla jego aktywności [17]. Z tego wynika, że obróbka w atmosferze CO lub H₂, prowadząca do silniejszej niż w helu redukcji Cu²⁺ do Cu⁺, przyczynia się do wzrostu aktywności tego typu katalizatorów. Zeolity aktywowane w atmosferze CO wykazywały maksymalną aktywność w temperaturze < 573 K (ok. 80% konwersji NO), podczas gdy aktywność próbek aktywowanych w wodrze była niska w temp. < 723 K, ale wysoka w temp. ≥ 773 K (100%).

1.4. WPŁYW WARUNKÓW REAKCJI ROZKŁADU NO

Stwierdzono, że katalizatory Cu-ZSM-5 przygotowane metodą wymiany jonowej z roztworu uzyskują maksymalną aktywność w zakresie temperatur 723–873 K [5, 6, 7, 10], powyżej którego aktywność lekko spada. W temperaturze > 723 K rozkład zachodzi do N₂ i O₂, podczas gdy < 723 K do N₂O [6]. Ponadto zaobserwowano [10], że temperatura, w której katalizator uzyskuje maksymalną aktywność, wzrasta ze wzrostem zawartości miedzi oraz że aktywność wzrasta ze wzrostem stężenia NO [21, 25].

1.5. ROLA KOKATIONÓW

Zbadano wpływ obecności innych metali, takich jak: Ni, Co, Ga, Ag na aktywność katalizatora Cu-ZSM-5 [14]. Niestety, nie odnotowano wzrostu konwersji NO do N_2 dla próbek zawierających Ni, Co, Ga lub Ag wprowadzonych podczas syntezy zeolitu, a następnie próbek jonowo wymienionych miedzią, w porównaniu z katalizatorem preparowanym przez wymianę jonową Cu(i)-ZSM-5. Stopnie konwersji NO uzyskane dla badanych próbek były porównywalne. Impregnacja katalizatora Cu(i)-ZSM-5 tymi metalami wywarła wręcz negatywny wpływ na konwersję NO, która uległa znacznemu zmniejszeniu. Z kolei autorzy pracy [11] zastosowali odwrotną kolejność w preparatyce katalizatora Cu-Ni/ZSM-5. W pierwszym etapie wprowadzono nikiel przez impregnację, a potem miedź w wyniku wymiany jonowej z roztworu. W przypadku nadmiarowo wymienionych miedzią zeolitów wyniki były podobne, obecność niklu prowadziła do spadku aktywności katalizatora w rozkładzie NO. Jednakże dla próbek o stopniu wymiany < 100% widoczny był lekki wzrost aktywności, mimo że zawierały one mniej miedzi od zeolitów jedynie jonowo wymienionych miedzią (1,0 i 1,3% wag Cu). Pozytywny wpływ drugiego metalu dla próbek nadmiarowo wymienionych miedzią zaobserwowano w przypadku samaru [32], przy czym zarówno miedź jak i samar wprowadzone były do sieci zeolitu jednocześnie, podczas wymiany jonowej z roztworu. Zanotowano wzrost konwersji NO o ok. 20% w porównaniu z zeolitem Cu-ZSM-5, a wartości TOF były ok. dwa razy większe. Autorzy sugerują, że samar, w ilościach dużo mniejszych od miedzi (ok. 29 atomów Cu na 1 atom Sm), najprawdopodobniej zapobiega tworzeniu klasterów miedzi, co sprzyja większej dyspersji miedzi oraz ogranicza jej migrację wewnątrz zeolitu do pozycji nieaktywnych w rozkładzie NO. Poza tym badania XPS wykazały, że obecność samaru w próbce prowadzi do zwiększenia liczby jonów Cu^+ , powstających podczas aktywacji temperaturowej w helu, co sprzyja zwiększeniu aktywności katalizatora. Innym wytłumaczeniem wzrostu aktywności zeolitów Cu-Sm-ZSM-5, przy założeniu istnienia form Cu(I)-O-Cu(II) w sieci jako miejsc aktywnych [34], jest wpływ samaru na poprawę własności utleniająco-redukcyjnych miedzi w Cu(I)-O-Cu(II), co ułatwia rozkład NO.

1.6. WPŁYW NATURY ATOMU T W SZKIELECIE SITA MOLEKULARNEGO

Zastąpienie atomów Al atomami Nb w szkielecie sita ZSM-5 prowadzi do obniżenia aktywności miedziowych katalizatorów o strukturze MFI w reakcji rozkładu NO. Uzyskana wartość TOF dla katalizatora Cu-NbZSM-5 jest ok. dwukrotnie mniejsza od tej zarejestrowanej dla Cu-ZSM-5, przy zbliżonych stosunkach Si/Al i Si/Nb, Cu/Al i Cu/Nb oraz zbliżonej zawartości miedzi w % wagowych [35]. Głębsza niż w Cu-ZSM-5 redukcja Cu^{2+} do $Cu^{\delta+}$ ($\delta < 1$) (stwierdzona na podstawie badań FTIR z adsorpcją NO) w materiałach niobokrze-

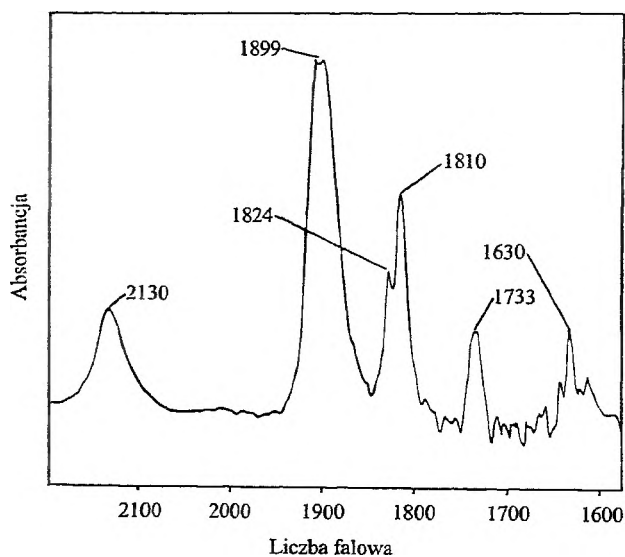
mianowych nie jest korzystna dla osiągnięcia wysokiego stopnia konwersji NO. Ponadto w przypadku zeolitów Cu-NbZSM-5 wzrost zawartości miedzi w próbce (przeciwnie niż to obserwowano dla zeolitów Cu-ZSM-5), nie sprzyja zwiększeniu aktywności katalizatora. Obecność niobu w szkielecie obniża aktywność katalizatora miedziowego ze względu na silne oddziaływanie Cu-Nb prowadzące do głębszej autoredukcji jonów miedzi, co będzie dyskutowane w dalszej części rozdziału.

Ostatnio w reakcji rozkładu NO badano także wymienione miedzią materiały typu MAIPO-11 (M = Mg lub Zn) [36] oraz silikalit S-1 (krzemianowa forma ZSM-5), AITS-1 (krzemowo-glinowo-tytanowa forma ZSM-5) [37] i materiały mezoporowate MCM-41 [23, 38]. Katalizator Cu-AITS-1 okazał się aktywniejszy od zeolitu Cu-ZSM-5, przy tym samym stopniu wymiany na miedź (100%). Dwukrotnie wyższą wartość TOF autorzy pracy [37] wiążą z wyższą kwasowością materiału Cu-AITS-1, co ich zdaniem przyczynia się do stabilizacji większej liczby jonów miedzi w katalitycznie aktywnych pozycjach. Z kolei wartości TOF uzyskane przy zastosowaniu Cu-MAIPO-11 były zbliżone do tych rejestrowanych na Cu-ZSM-5, ale przy wyższej temperaturze reakcji [36]. Badania luminescencyjne wykazały, że miedź w tego typu materiałach jest trudniej redukowalna do Cu⁺ w porównaniu z miedzią w Cu-ZSM-5, dlatego w celu osiągnięcia porównywalnej aktywności wymagana jest znacznie wyższa temperatura. Natomiast aktywność mezoporowatych sit MCM-41 (AlMCM-41 i NbMCM-41) jonowo wymienionych miedzią jest wyraźnie niższa od aktywności zeolitów Cu-ZSM-5 [23, 38], co autorzy wiążą z brakiem obecności aktywnych w rozkładzie NO jonów miedzi w koordynacji płaskiej kwadratowej. Wykazano [38], że aktywność sit MCM-41 w reakcji rozkładu NO zależy od natury atomu T w szkielecie sita. Katalizatory Cu-NbMCM-41 wykazują niższą aktywność od Cu-AlMCM-41, co związane jest z głębszą redukcją miedzi (Cu²⁺ do Cu^{δ+}, δ < 1) w matrycy niobokrzemianowej niż glinokrzemianowej [38, 39], a więc brakiem jonów Cu⁺ na powierzchni katalizatora, które według wielu autorów uważane są za konieczne do rozpoczęcia kolejnych etapów procesu rozkładu NO [40–42]. Stosunek Si/Cu/T (T = Al lub Nb), podobnie jak w przypadku zeolitów Cu-ZSM-5, odgrywa ważną rolę dla ich aktywności w omawianej reakcji. W ramach jednakowego stosunku Si/T (Si/T = 16 i 32) aktywność materiałów Cu-AlMCM-41 i Cu-NbMCM-41 wzrasta ze wzrostem stopnia wymiany na miedź [23, 38]. Jednakże katalizatory Cu-NbMCM-41 wyróżniają się tym, że nawet duży nadmiar miedzi (161%) znacząco podwyższa wartość TOF. Jednocześnie aktywność mezoporowatych sit Cu-NbMCM-41 jest nieco wyższa niż zeolitów Cu-NbZSM-5 [35]. Według autorów wynika to z różnej siły oddziaływań niob-miedź w mikro- i mezoporowatych sitach, na co wpływa struktura materiału (wpływ kątów T-O-T na moc wiązań). Materiały typu Cu-S-1 wykazały się jedynie znikomą aktywnością w reakcji rozkładu NO [36]. Tworzenie aktywnych w rozkładzie NO form miedzi wymaga zatem zarówno odpowiedniej struktury, jak i składu sita molekularnego.

2. ADSORPCJA I PRZEMIANY NO – BADANIA FTIR, MECHANIZM

Badania rozkładu NO w układzie przepływowym pozwoliły stwierdzić wysoką aktywność katalizatorów zeolitowych modyfikowanych miedzią, a szczególnie Cu-ZSM-5. Koniecznością stało się więc zidentyfikowanie i określenie natury centrów aktywnych katalizatora, sposobu ich oddziaływania z NO, związków przejściowych oraz mechanizmu reakcji. Bardzo pomocne w rozwiązaniu tych problemów okazały się badania spektroskopowe adsorpcji i desorpcji NO w podczerwieni.

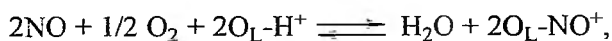
Przedmiotem badań stała się przede wszystkim identyfikacja form powstałych po adsorpcji NO w temperaturze pokojowej na zeolicie Cu-ZSM-5. Badano zarówno katalizatory po procesie autoredukcji, jak i celowo utleniane lub redukowane. Stwierdzono, że w próbkach odwadnianych w warunkach próżniowych oddziaływanie NO z Cu-ZSM-5 prowadzi do utworzenia trzech głównych kompleksów nitrozylowych: Cu^{2+}NO (νNO , 1900 cm^{-1}), Cu^+NO (νNO , 1810 cm^{-1}) i $\text{Cu}^-(\text{NO})_2$ (1824 i 1730 cm^{-1}) [43, 36, 37, 40–42, 44–46] (rys. 1).



Rys. 1. Widmo IR katalizatora Cu-ZSM-5 po adsorpcji NO [41]

W widmie IR w zakresie charakterystycznym dla rozciągających drgań NO, niektórzy autorzy [40, 43] obserwowali po adsorpcji NO na Cu-ZSM-5 także pasmo pochodzące od N_2O_3 przy ok. 1875 cm^{-1} (z dodatkowymi pasmami przy 1590 – 1550 i 1300 – 1290 cm^{-1}). Przy zastosowaniu niskich ciśnień NO w widmie IR dominuje pasmo przy 1810 cm^{-1} , co świadczy o tym, że w próbce przeważają

jony Cu^+ . Ponadto intensywność tego pasma wzrasta ze wzrostem Cu/Al [41, 43]. Ze wzrostem ciśnienia NO następuje wzrost intensywności pasma przy 1900 cm^{-1} , a spadek intensywności pasma przy 1810 cm^{-1} , co sugeruje utlenienie części Cu^+ do Cu^{2+} . Jednocześnie następuje przekształcenie mononitrozyłu Cu^+NO w dinitrozył $\text{Cu}^+(\text{NO})_2$. Ze wzrostem zawartości miedzi w próbce szybkość utleniania spada, a więc jony Cu^+ w wysoko i nadmiarowo wymienionych próbkach są bardziej stabilne. Wzrost Cu/Al w próbce prowadzi również do rozdzielenia pasma przy ok. 1900 cm^{-1} na dwie składowe: 1912 i 1895 cm^{-1} [43]. To ostatnie, przypisywane adsorpcji NO na Cu^{2+}O^- , czyli miedzi w koordynacji płaskiej kwadratowej, pochodzi od $\text{Cu}^{2+}\text{O}^-(\text{NO})$ (drżania kompleksu Cu^{2+}NO w sąsiedztwie O^-) i rośnie ze wzrostem zawartości miedzi [18, 43, 47, 48]. Kuroda i wsp. [49] zaobserwowali ponadto, że w zakresie niskich ciśnień NO pojawia się także pasmo przy 2295 cm^{-1} interpretowane przez nich jako pochodzące od N_2 (utworzonego w wyniku rozkładu NO) zaadsorbowanego na Cu^+ [50–52]. Intensywność pasma wzrasta ze wzrostem stosunku Cu/Al w próbkach. Ze wzrostem ciśnienia NO pasmo od N_2 staje się mniej intensywne, a pojawia się pasmo przy 2220 cm^{-1} od N_2O . Analiza masowa wykazała jednak, że azot w fazie gazowej występuje także przy wysokich ciśnieniach NO, co sugeruje, że wzrost ciśnienia prowadzi do blokady aktywnych miejsc Cu^+ zdolnych do adsorpcji N_2 (skoordynowanych z trzema atomami tlenu w szkielecie – typ II). Z tego wynika, że obecność jonów Cu^+ typu II jest warunkiem koniecznym dla przemian NO do N_2 . Dodatkowo, po adsorpcji NO, w widmie IR obserwuje się pasma przy 2130 i ok. 1630 cm^{-1} [40, 41, 43, 44], a niekiedy także poniżej 1600 cm^{-1} [40, 48]. Pasma te nie są interpretowane jednoznacznie. Pierwsze z nich przy 2130 cm^{-1} Cheung i wsp. [41] przypisali N_2O , Pieplu i wsp. [45], Iwamoto i wsp. [53] oraz Centi i wsp. [54] NO_2^+ lub $\text{NO}_2^{\delta+}$. Z interpretacją pochodzenia tego pasma od NO_2^+ nie zgodzili się Vaylon i Hall [44], którzy nie obserwowali pasma przy 2130 cm^{-1} po adsorpcji NO_2 . Ostatnio Hadjiivanov i wsp. [55], badając koadsorpcję NO i O_2 na zeolitach H-ZSM-5, stwierdzili, że pasmo przy 2133 cm^{-1} pochodzi od formy NO^+ zajmującej kationową pozycję w zeolicie. Po wprowadzeniu NO, a następnie O_2 , zaobserwowali oni spadek intensywności pasma przy 3610 cm^{-1} od kwasowych grup OH i równoległy wzrost intensywności pasm od cząsteczek H_2O : $1623(\delta)$, $1700(\nu_{\text{as}})$ i $3534(\nu_{\text{s}})\text{ cm}^{-1}$. Na podstawie tych obserwacji zaproponowali następującą drogę powstawania formy NO^+ :

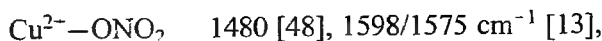


gdzie L – tlen w szkielecie zeolitu. Interpretacja ta staje się obecnie coraz powszechniej akceptowana wśród badaczy [21, 56].

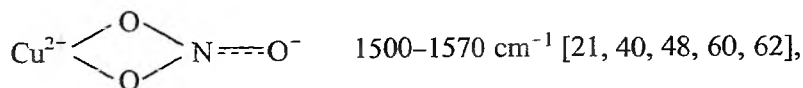
Przyporządkowanie pasm w zakresie $1630\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$ również nie jest proste. Niektórzy autorzy podają, że pasmo ok. 1630 cm^{-1} pochodzi od $\text{Cu}^{2+}\text{NO}_2$ (zaadsorbowany NO_2) [44] lub Cu^+NO_2 [57], inni przypisują je kompleksowi nitro-nitrozyłowemu $\text{Cu}^{2+}(\text{NO})(\text{NO}_2^-)$ lub formie NO_2^- [20, 23, 38, 41, 42, 58],

jeszcze inni NO_3^- [21, 40, 48, 59]. Zakres częstości drgań azotanów(V) jest szeroki. Formom NO_3 przypisuje się pasma między 1630 a 1450 cm^{-1} , przy czym możliwe są różne postacie azotanów(V), dające różne położenia pasm [13, 21, 48, 59–62]:

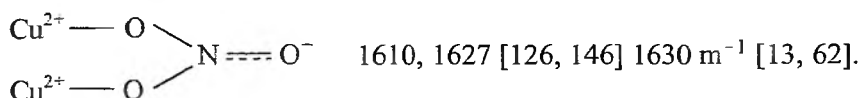
1) pojedynczo skoordynowane (*monodentate*) – jeden atom tlenu związany z jednym atomem metalu



2) podwójnie skoordynowane – kleszczowe (*bidentate chelating*) – dwa atomy tlenu związane z jednym atomem metalu

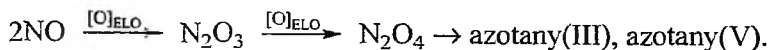


3) mostkowe (*bridged*) – dwa atomy tlenu związane z dwoma różnymi atomami metalu



Obliczenia kwantowe geometrii mostkowych azotanów(V) wskazują, że forma ta może powstawać z udziałem dimeru $[\text{Cu}^{2+} - \text{O} - \text{Cu}^{2+}]$ [16]. Za udziałem $[\text{Cu}^{2+} - \text{O} - \text{Cu}^{2+}]$ w tworzeniu tych form opowiadają się także Konduru i Chuang [41, 48]. Autorzy pracy [21] dokonali rozgraniczenia, wg którego pasma powyżej 1600 cm^{-1} (1623 i 1610 cm^{-1}) przypisali mostkowym formom azotanów(V) na Cu^{2+} , pasma poniżej 1600 cm^{-1} (1575 cm^{-1}) podwójnie skoordynowanemu kleszczowemu kompleksowi NO_3 na Cu^{2+} .

Parvulescu i wsp. [46] sugerują, że powstawanie azotanów(III) i azotanów(V) może być związane z pozaszkieletowym tlenem sieciowym (tzw. ELO), który ma właściwości utleniające i którego źródłem może być na przykład Cu^{2+}O^- . Z tego wynika, że nawet w nieobecności wolnego tlenu zaadsorbowany NO może ulegać utlenianiu wg następującego schematu:



Cheung i wsp. [41] przeprowadzili badania stabilności kompleksów powstających po adsorpcji NO. Stwierdzili, że ewakuacja w temperaturze pokojowej doprowadziła do spadku intensywności pasm przy 1900 i 1810 cm^{-1} , podczas gdy pasmo przy 1630 cm^{-1} stało się bardziej intensywne. Zatem wzrost stopnia wymiany miedzi sprzyjał silniejszej adsorpcji NO.

Autorzy prac [40, 41, 43, 57] porównywali adsorpcję NO na katalizatorach Cu-ZSM-5 utlenianych i redukowanych przed adsorpcją. Stwierdzili, że w widmach IR próbek utlenianych tlenem obecne są pasma przy ok. 1900 cm^{-1} od

Cu²⁺NO i 1810 cm⁻¹ od Cu⁺NO. Jednak słaba intensywność pasma przy 1810 cm⁻¹ wskazuje na małą liczbę jonów Cu⁻ [40, 41, 45, 63]. Wraz ze wzrostem ciśnienia NO zaobserwowano dalszy wzrost intensywności pasma przy ~1900 cm⁻¹ oraz pojawienie się nowych pasm przy 1734 i 1827 cm⁻¹ od form dinitrozylowych Cu⁺(NO)₂, z równoległym spadkiem intensywności pasma 1811 cm⁻¹ [63]. Dodatkowo niektórzy autorzy obserwowali pasma przy ok. 2130 cm⁻¹, interpretowane jako pochodzące od N₂O, NO₂⁺ czy NO⁺ [66, 141, 144] i ok. 1630–1300 cm⁻¹ [43, 40] od azotanów(III) lub azotanów(V). Wyjątek stanowi interpretacja Giamella [63], który pasmo przy 1630 cm⁻¹ obserwował jedynie na Cu-ZSM-5 o stosunku Cu/Al < 0,5 i w związku z tym przypisał je adsorpcji NO na kationach sodu. Wykazano również, że desorpcja i ponowna adsorpcja NO prowadzi do odnowienia pasm przy 1900 i 1810 cm⁻¹, jednak zmienia się ich względna intensywność [41]. Większa intensywność pasma przy 1810 cm⁻¹, szczególnie wyraźna dla próbek nadmiarowo wymienionych miedzią, świadczy o łatwiejszej redukcji Cu²⁺ do Cu⁺ w wyniku ewakuacji próbek mających stosunek Cu/Al ≥ 0,5. Podobnie jak w przypadku autoredukowanych zeolitów, kompleks Cu⁺NO wykazuje większą stabilność na nadmiarowo wymienionych zeolitach Cu-ZSM-5. Ważną rolę stabilności kompleksu Cu⁺NO podkreślają Ziółek i wsp. [20, 23]. Z ich badań z zastosowaniem spektroskopii w podczerwieni wynika, że zbyt silna chemisorpcja NO na Cu⁺, obserwowana na zeolitach Cu-ZSM-5 o wysokiej zawartości miedzi (Cu/Al ~ 0,75), prowadzi do zahamowania dalszych przemian NO, a przez to do spadku aktywności katalizatora.

Widma IR po adsorpcji NO katalizatorów celowo redukowanych za pomocą CO lub H₂ znacznie różnią się od widm próbek utlenianych [40, 41, 63]. Dominuje w nich pasmo przy 1810 cm⁻¹, świadczące o zajściu redukcji jonów Cu²⁺ do Cu⁺, pasma przy 1900 i 1630 cm⁻¹ są bardzo słabo intensywne. Obecne jest również pasmo przy 2249 cm⁻¹ pochodzące od N₂O [40, 63]. Jednakże ze wzrostem ciśnienia NO kształt widma zmienia się i staje się zbliżony do widma próbki utlenionej [41, 63]. Intensywność pasma od kompleksu Cu⁺NO maleje, a od Cu²⁺NO wzrasta z jednoczesnym pojawieniem się pasm od Cu⁻(NO)₂. Następuje więc utlenienie Cu⁺ do Cu²⁺ i redukcja NO do N₂O. Z kolei przy wydłużaniu czasu kontaktu katalizatora z NO zaobserwowano [40], że w miarę upływu czasu pasmo przy 1900 cm⁻¹ wzrasta, a pasmo przy 1810 cm⁻¹ maleje, natomiast pasmo od N₂O zanika.

Pomiary adsorpcji NO na zeolicie Y (forma ultrastabilna) i mordenicie również wskazały na obecność mieszaniny jonów Cu²⁺ i Cu⁺, w ilościach zależnych od sposobu aktywacji [41]. Jednakże jony Cu²⁺ w mordenicie trudno ulegały redukcji do Cu⁺, w odróżnieniu od tych w zeolicie Cu-ZSM-5, z nadmiarowo wymienioną miedzią. Z kolei w zeolicie Y przeciwnie, wysoką stabilnością cechowały się jony Cu⁺ i w związku z tym trudno ulegały utlenieniu do Cu²⁺.

Przeprowadzone badania adsorpcji NO na próbkach autoredukowanych, utlenionych i zredukowanych dowiodły, że tworzenie kompleksów miedzi z NO i ich trwałość zależą od rodzaju i obróbki katalizatora oraz stopnia wymiany miedzi.

Jedynie zeolity Cu-ZSM-5 wykazały dużą zdolność do odwracalnych przejść $\text{Cu}^{2+} \leftrightarrow \text{Cu}^+$. Z tego wynika, że aktywność katalizatora wymaga optymalnej trwałości jonów Cu^{2+} , tak by łatwo zachodziła zarówno ich redukcja jak i regeneracja.

Wyniki badania adsorpcji NO na mezoporowatych sitach molekularnych Cu-ALMCM-41 przygotowanych przez wymianę jonową w ciele stałym, wykazały obecność w próbce również zarówno jonów Cu^{2+} jak i Cu^+ (pasma przy 1900 i 1812 cm^{-1}). Nie stwierdzono jednakże pasm od formy dinitrozyłowej [64] oraz azotanów(III) i azotanów(V). Z kolei w przypadku sit AIMCM-41 i NbMCM-41 modyfikowanych miedzią przez wymianę jonową z roztworu stwierdzono, że tworzenie się po adsorpcji NO kompleksu Cu^+NO zależne jest od stosunków Si/Al i Si/Nb oraz Cu/Al i Cu/Nb, a także od warunków aktywacji [23, 38, 39]. Adsorpcja NO na Cu-NbMCM-41 prowadzi ponadto do powstania kompleksu $\text{Cu}^{\delta+}\text{NO}$ ($\delta < 1$) [39]. Niezależnie od stosunku Cu/Al i Cu/Nb obserwowano pojawienie się w widmach IR katalizatorów Cu-ALMCM-41 i Cu-NbMCM-41 kompleksu nitro-nitrozyłowego $\text{Cu}^{2+}(\text{NO})(\text{NO}_2^-)$ (pasmo $\sim 1630 \text{ cm}^{-1}$) [23, 38]. Dla krzemianowego, heksagonalnie uporządkowanego mezoporowatego materiału (HMS) modyfikowanego Cu i Zr, po adsorpcji NO zaobserwowano jedynie pasmo przy 1888 cm^{-1} przypisane kompleksowi Cu^{2+}NO i słabe pasmo przy ok. 1600 cm^{-1} od azotanów(V) [65]. Adsorpcja $\text{NO} + \text{O}_2$, jak i NO_2 doprowadziła do pojawienia się w widmie IR pasm w zakresie 1620–1500 cm^{-1} , odpowiadających mostkowemu (1612 cm^{-1}), kleszczowo (1578 cm^{-1}) i pojedynczo (1540 cm^{-1}) skoordynowanym azotanom(V). Dodatkowo zaobserwowano pasmo przy 1895 cm^{-1} od N_2O_3 . Stwierdzono także, że dopiero ewakuacja w 473 K obniża intensywność pasm w zakresie 1620–1500 cm^{-1} , ale pasma przy 1610 i 1578 cm^{-1} są nadal dobrze widoczne, co sugeruje, że mostkowe i kleszczowo skoordynowane azotany są najbardziej stabilnymi związkami na powierzchni HMS.

Ważnym etapem badań przemian tlenku azotu(II) jest prowadzenie obserwacji kompleksów utworzonych po adsorpcji NO w wyższych temperaturach. W odniesieniu do zeolitów Cu-ZSM-5 takie badania przeprowadzili m.in. Aylor i wsp. [40]. Zaobserwowali, że ze wzrostem temperatury (do 673 K) pasma od kompleksów Cu^+NO , Cu^{2+}NO i $\text{Cu}^{2+}\text{NO}_2^-$ szybko zmniejszają intensywność, a w temperaturze 673 K niemal zanikają. Spadkowi intensywności pasm towarzyszy pojawienie się w temperaturze 373 K pasma przy 2157 cm^{-1} , które autorzy przypisują produktowi rozkładu – N_2 . Interpretacja ta nie jest jednak zgodna z większością badań, z których wynika, że N_2 adsorbuje się na zeolitytowych sitach molekularnych modyfikowanych miedzią lub innymi metalami, dając pasmo przy 2295 [49–52] lub 2320–2350 cm^{-1} [51, 66]. Niektórzy autorzy [51, 66] obserwowali powyższe pasma IR od zaadsorbowanego N_2 , kiedy widmo było rejestrowane w obniżonej temperaturze (77 lub 120 K).

Konduru i wsp. [48] śledzili przemiany form azotanowych na zeolicie Cu-ZSM-5 w czasie odgazowywania we wzrastających temperaturach. Wzrost temperatury z 523 do 673 K prowadził do spadku intensywności pasm zarówno

od mostkowych jak i kleszczowych form azotanów(V). Jednocześnie pojawiały się pasma od kompleksu Cu⁺NO przy 1813 cm⁻¹, Cu²⁺NO przy 1909 cm⁻¹ (dla nadmiarowo wymienionych zeolitów) i N₂O przy 2220 cm⁻¹. Ziółek i wsp. wykazali [20], że powstawaniu form azotanowych sprzyja brak jonów Cu⁻ na powierzchni aktywowanego zeolitu Cu-ZSM-5. Formy azotanowe powstają w wyniku rozkładu kompleksu Cu²⁺(NO)(NO₂⁻).

Akolekar i wsp. [58] badali temperaturowe przemiany NO na wymienionych miedzią materiałach zeolitopodobnych typu SAPO. Obserwowali spadek intensywności pasm od Cu⁺NO i Cu²⁺NO ze wzrostem temperatury, a w 573 K powstawanie pasm przy 2238 cm⁻¹ od N₂O i przy 1630 cm⁻¹ od Cu²⁺(NO)(NO₂⁻). Świadczy to o konwersji NO do N₂O i form nitrylo-nitrozylowych. Kompleks Cu²⁺(NO)(NO₂⁻) został uznany za związek pośredni w reakcji rozkładu NO na mezoporowatych sitach molekularnych MCM-41 (Cu-*Al*MCM-41 i Cu-*Nb*MCM-41) [23, 38]. Jego przemiany pod wpływem temperatury prowadzą do wytworzenia produktu w postaci N₂O.

W tab. 1 zebrano położenia pasm IR najczęściej prezentowane w literaturze i ich przypisanie do odpowiednich kompleksów NO z Cu-ZSM-5 lub produktów przemiany NO.

Tabela 1. Pasma w podczerwieni tlenku azotu i produktów jego przemiany w wyższych temperaturach na sitach molekularnych zawierających miedź

Rodzaj drgań	Położenie pasma [cm ⁻¹]	Forma	Katalizator	Literatura
ν(NO) ^{δ-}	1810-1812	Cu ⁺ NO	Cu-ZSM-5	[11, 13, 20, 40, 41, 43, 44, 48, 53, 63]
	1815-1819	Cu ⁺ NO	Cu-USY	[41]
	1807-1810	Cu ⁺ NO	Cu-mordenit	[41]
	1806	Cu ⁺ NO	Cu-SAPO	[58]
	1807	Cu ⁺ NO	Cu- <i>Al</i> MCM-41	[38, 39]
	1780	Cu ^{δ+} NO (δ < 1)	Cu- <i>Nb</i> ZSM-5	[35]
	1785	Cu ^{δ+} NO (δ < 1)	Cu- <i>Nb</i> MCM-41	[38]
ν(NO) ^{δ+}	1900-1920	Cu ²⁺ NO	Cu-ZSM-5	[16, 40, 41, 44, 48, 53, 63],
	1898-1900	Cu ²⁺ NO	Cu-USY	[41]
	1905-1910	Cu ²⁺ NO	Cu-mordenit	[41]
	1900	Cu ²⁺ NO	Cu-SAPO	[58]
	1888	Cu ²⁺ NO	Cu/Zr-HMS	[65]
	1895	Cu ²⁺ NO	Cu- <i>Al</i> MCM-41	[35, 39]
	1895	Cu ²⁺ O ⁻ (NO)	Cu-ZSM-5	[40, 47, 48]
ν(NO) ₂ ^{δ-}	1824-1830	Cu ⁺ (NO) ₂	Cu-ZSM-5	[8, 13, 40, 41, 43]
	1727-1738			[48, 53, 63]
	1730-1740	Cu ⁺ (NO) ₂	Cu-USY	[41]

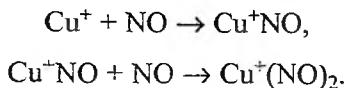
cd. tab. 1

$\nu(\text{NO})_2^{\delta-}$	1736-1738	$\text{Cu}^+(\text{NO})_2$	Cu-mordenit	[41]
	1732	$\text{Cu}^+(\text{NO})_2$	Cu-SAPO	[58]
$\nu(\text{NO}_2):(\text{NO}_3)$	1619-1630 _{asym.}	NO_2	Cu-ZSM-5	[44]
	1300-1340 _{sym.}	NO_2^-		[63]
	1630	NO_2		
	1620-1550	NO_3^-	Cu/Zr-HMS	[65]
	1630, 1613, 1577		Cu-ZSM-5	[44, 59]
	1480	O- NO_2	Cu-mordenit	[60]
	1598, 1578		Cu-ZSM-5	[13]
	1631	$\text{Cu}-\text{O} \begin{array}{l} \diagup \text{NO} \\ \diagdown \end{array}$	Cu-ZSM-5	[13]
	1627, 1611	$\text{Cu}-\text{O} \begin{array}{l} \diagup \text{NO} \\ \diagdown \end{array}$		[48]
	1570		Cu-ZSM-5	[48]
	1633	$\text{Cu} \begin{array}{l} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O} \end{array} \text{NO}$		[40]
	1500-1570		Cu-mordenit	[60]
	1600-1630	$\text{Cu}^{2+}(\text{NO})(\text{NO}_2)^-$	Cu-ZSM-5	[44]
	1632-1636	$\text{Cu}^{2+}(\text{NO})(\text{NO}_2)^-$	Cu-ZSM-5	[20]
	1627	$\text{Cu}^{2+}(\text{NO})(\text{NO}_2)^-$	Cu-SAPO	[58]
	1609-1611	$\text{Cu}^{2+}(\text{NO})(\text{NO}_2)^-$	Cu- AlMCM-41	[23]
	1606-1612	$\text{Cu}^{2+}(\text{NO})(\text{NO}_2)^-$	Cu- NbMCM-41	[38]
$\nu(\text{N}_2\text{O}_3)/(\text{N}_2\text{O}_4)$	1876, 1578	N_2O_3	Cu-ZSM-5	[40]
	1298, 1860			[8]
	1904, 1540	N_2O_3	Cu/Zr-HMS	[65]
	1723	N_2O_4	Cu-Mordenit	[60]
	1743, 1675, 1607	N_2O_4	Cu-ZSM-5	[59]
$\nu(\text{N}_2\text{O})$	2236	N_2O	Cu-ZSM-5	[40]
	2238		Cu-ZSM-5	[53]
	2249		Cu-ZSM-5	[63]
	2250		Cu-USY	[41]
	2224		Cu-ZSM-5	[43]
$\nu(\text{NO}^+)$	2130	NO^+	Cu-ZSM-5	[13, 48]
	2133	NO^+	Cu-ZSM-5	[43]

Zjawisko odwracalnych przejść miedzi $\text{Cu}^{2+} \leftrightarrow \text{Cu}^+$, wykazane w badaniach adsorpcji NO na katalizatorach Cu-ZSM-5, stało się podstawą założenia mechanizmu reakcji rozkładu NO. Taki pogląd akceptuje większość badaczy tego zagadnienia [40-42, 57], choć niekiedy ich koncepcje różnią się w niektórych etapach mechanizmu i formach związków pośrednich biorących udział w reakcji.

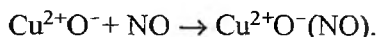
Pierwszym etapem mechanizmu jest adsorpcja NO na centrum aktywnym, za które powszechnie uważa się jon Cu^+ powstały w wyniku autoredukcji Cu^{2+} ,

z utworzeniem kompleksu nitrozylowego Cu⁺NO [17, 37, 40, 41, 48, 53, 63] i dalej dinitrozylowego Cu⁺(NO)₂ [17, 37, 40, 41, 53, 63].

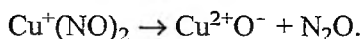


Alternatywną drogę dla tego etapu proponują Sojka i wsp. [67]. Ich zdaniem cząsteczka NO atakuje Cu⁺NO przez atom azotu, następuje utlenienie Cu⁺ do Cu²⁺ i utworzenie Cu²⁺N₂O₂⁻. Autorzy tłumaczą, że powstanie kompleksu Cu⁺NO przyczynia się do wzrostu ujemnego ładunku na atomie azotu, ligand NO staje się podatny na elektrofilowy atak drugiej cząsteczki NO z utworzeniem wiązania N–N.

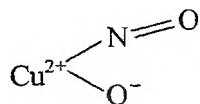
Adsorpcja NO następuje także na formie Cu²⁺O⁻, utworzonej w procesie autoredukcji, a także powstałej w wyniku dalszych przemian:



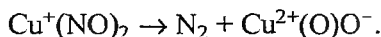
Wg Aylora i Cheunga [40, 41] powstawanie dodatkowych jonów Cu²⁺O⁻ może zachodzić przez utlenianie dinitrozyłu z jednoczesną redukcją NO do N₂O:



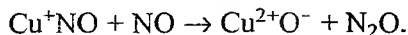
Proponowana jest następująca budowa kompleksu Cu²⁺O⁻(NO):



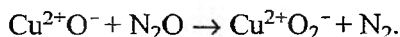
Obliczenia wykazały [42], że NO silnie wiązany jest w postaci Cu⁺NO i Cu²⁺O⁻(NO), podczas gdy w Cu⁺(NO)₂ nie wykazuje silnego wiązania. Z kolei wg Schaya i wsp. [16] dysproporcjonowanie kompleksu Cu⁺(NO)₂ prowadzi już na tym etapie reakcji do produktu rozkładu jakim jest N₂:



Zdaniem Konduru i Chuanga [21, 48] podczas przemian NO nie następuje tworzenie Cu⁺(NO)₂, a Cu²⁺O⁻ i N₂O powstają bezpośrednio w wyniku oddziaływania Cu⁺NO z NO:

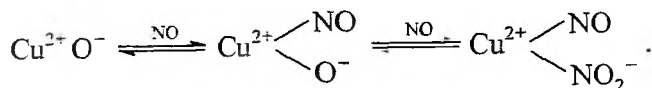


Konsekwencją ich dalszej reakcji jest wydzielenie N₂:

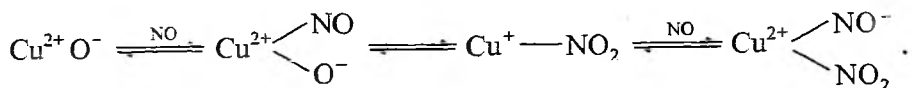


Następny etap mechanizmu reakcji rozkładu NO polega na adsorpcji kolejnej cząsteczki NO z utworzeniem związku przejściowego. Proponowane są jednak różne wzory strukturalne tych związków.

Wg Cheunga i wsp. [41] do kompleksu nitrylo-nitrozyłowego $\text{Cu}^{2+}(\text{NO})(\text{NO}_2^-)$ prowadzi następujący cykl przemian:

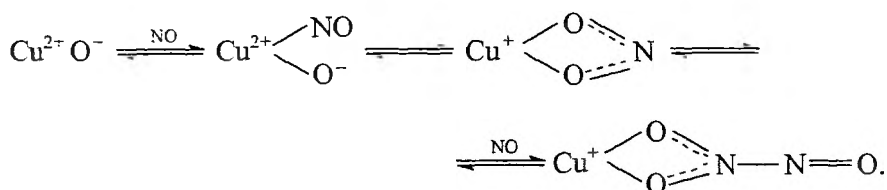


Podobną drogę przemian proponują Kevan i wsp. [57]:



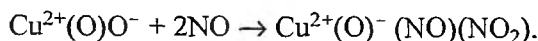
Ważną rolę związku pośredniego typu $\text{Cu}(\text{NO})(\text{NO}_2)$ w rozkładzie NO podkreślają także Li, Vaylon i Hall [44, 68], Ziótek i wsp. [20, 23, 38] oraz Gervasini [69]. Ten ostatni za pomocą badań termoprogramowanej desorpcji NO (TPD) potwierdził, że zaadsorbowany NO jest stabilizowany właśnie w postaci kompleksu nitro-nitrozyłowego.

Wg Aylora i wsp. [40] przemiany $\text{Cu}^{2+}\text{O}^-(\text{NO})$ po adsorpcji NO prowadzą do $\text{Cu}^+\text{N}_2\text{O}_3$, a więc również następuje zmiana stopnia utlenienia miedzi:



Z badań teoretycznych wynika [70], że forma $\text{Cu}(\text{NO})(\text{ONO})$ jest stabilniejsza niż $\text{Cu}(\text{N}_2\text{O}_3)$. W wysokiej temperaturze następuje jednak destabilizacja kompleksu $\text{Cu}^{2+}(\text{NO})(\text{ONO})$ i jego łatwy rozkład do N_2 i O_2 . Jest to zgodne z badaniami eksperymentalnymi rozkładu NO, gdzie znaczące ilości azotu i tlenu obserwuje się właśnie w wysokich temperaturach [40, 44, 71].

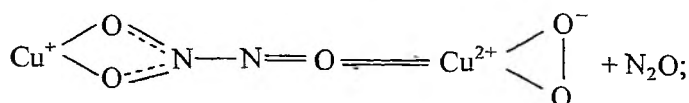
Schay i wsp. [16, 33] proponują tworzenie kompleksu $\text{Cu}^{2+}(\text{O})^-(\text{NO})(\text{NO}_2)$ jako związku pośredniego wg reakcji:



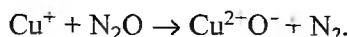
Według nich rozkład tych kompleksów przejściowych prowadzi do utworzenia produktów, czyli N_2 i O_2 , z jednoczesną regeneracją centrum aktywnego Cu^+ [16, 37, 40, 41]. Możliwe są następujące drogi przemian tego kompleksu prowadzące do produktów reakcji rozkładu NO:

1. Powstawanie azotu [40]:

- rozkład $\text{Cu}^+\text{N}_2\text{O}_3$ do $\text{Cu}^{2+}\text{O}_2^-$ i N_2O

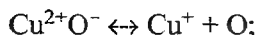


- reakcja N₂O z Cu⁺ z wytworzeniem azotu

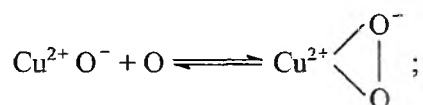


2. Powstawanie tlenu:

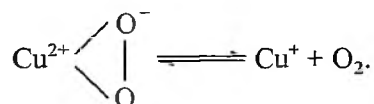
- desorpcja atomu tlenu z Cu²⁺O⁻



- reakcja atomowego tlenu z kolejną formą Cu²⁺O⁻

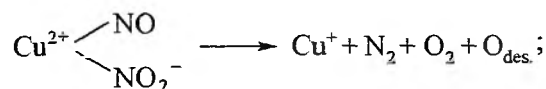


- rozkład Cu²⁺O₂⁻ z wytworzeniem O₂

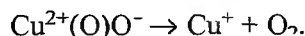
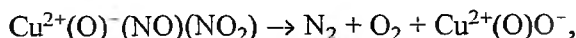


3. Równoczesne tworzenie azotu i tlenu:

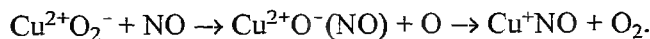
- bezpośredni rozkład Cu²⁺(NO)(NO₂⁻) do N₂ i O₂ [41]



- bezpośredni rozkład Cu²⁺(O)⁻(NO)(NO₂) [16]

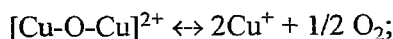


Są także inne propozycje mechanizmu reakcji rozkładu NO. Z badań Konduru i Chuanga [21] wynika, że tworzenie tlenu rozpoczyna się już na etapie adsorpcji NO na Cu²⁺O₂⁻, która prowadzi do pojawienia się tlenu atomowego, a dalej tlenu cząsteczkowego:

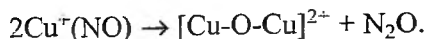


W przeciwieństwie do przedstawionych mechanizmów, Iwamoto oraz Sachtlar [53, 72, 73] uważają, że rozkład NO do N₂ i O₂ wymaga obecności kationów tlenkowych [Cu-O-Cu]²⁺ w zeolicie Cu-ZSM-5. Według Sachtlera i współpracowników możliwe są dwa mechanizmy z udziałem tych jonów:

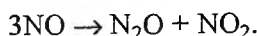
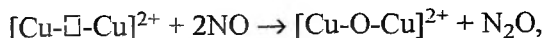
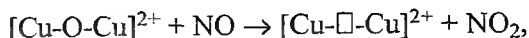
- termiczny rozkład formy [Cu-O-Cu]²⁺, który prowadzi do wytworzenia jonów Cu⁺ i O₂



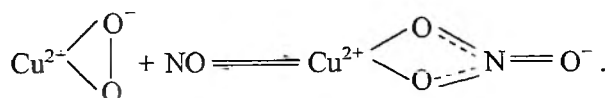
• adsorpcja NO na Cu^{2+} prowadząca do kompleksu Cu^+-NO^+ , a reutlenianie Cu^+ przez redukcję NO przyczynia się nie tylko do powstawania jonów Cu^{2+} , ale także do odnowienia form $[\text{Cu}-\text{O}-\text{Cu}]^{2+}$ z wytworzeniem N_2O :



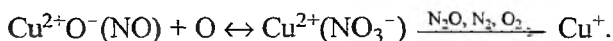
Według Wang'a i wsp. [8] oraz Schmała i wsp. [74] formy $[\text{Cu}-\text{O}-\text{Cu}]^{2+}$ grają rolę centrów aktywnych dla reakcji dysproporcjonowania NO do N_2O i NO_2 :



Produktami rozkładu NO mogą być także azotany(V). Np. wg Aylora [40] powstają tzw. kleszczowe azotany(V) zgodnie z równaniem reakcji:



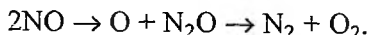
Konduru i Chuang [21, 48], jako jedną z możliwych dróg reakcji, proponują tworzenie się mostkowych form $\text{Cu}^{2+}(\text{NO}_3^-)$, które z racji swej niskiej trwałości (szczególnie w nadmiarowo wymienionych zeolitach Cu-ZSM-5) łatwo rozkładają się do N_2O , N_2 i O_2 :



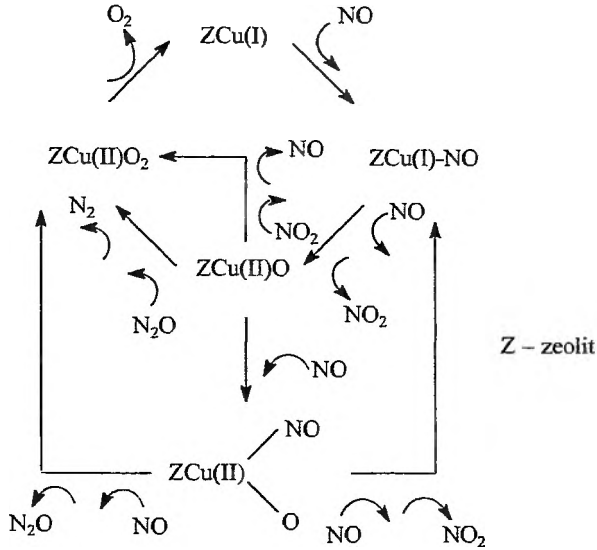
Podsumowania badań nad mechanizmem rozkładu NO dokonał A.T. Bell [42]. Zaproponowany przez niego mechanizm przedstawia rys. 2. Bell podkreśla tworzenie kompleksu Cu^+NO jako pierwszego etapu reakcji oraz ważność kompleksu zawierającego ELO tworzonego z udziałem formy Cu^{2+}O^- jako związku pośredniego prowadzącego do wytworzenia produktów. Ponadto z mechanizmu wynika, że czynnikiem odpowiedzialnym za wysoką aktywność katalizatora Cu-ZSM-5 jest odpowiednia trwałość jonów Cu^+ i Cu^{2+} , dzięki której łatwo zachodzi utlenianie Cu^+ do Cu^{2+} oraz regeneracja aktywnych centrów przez redukcję Cu^{2+} do Cu^+ [41].

Ostatnio Kevan i wsp. [57] zaproponowali mechanizm, w którym równorzędnym etapem, oprócz adsorpcji NO na Cu^+ , jest adsorpcja NO na Cu^{2+}O^- (rys. 3).

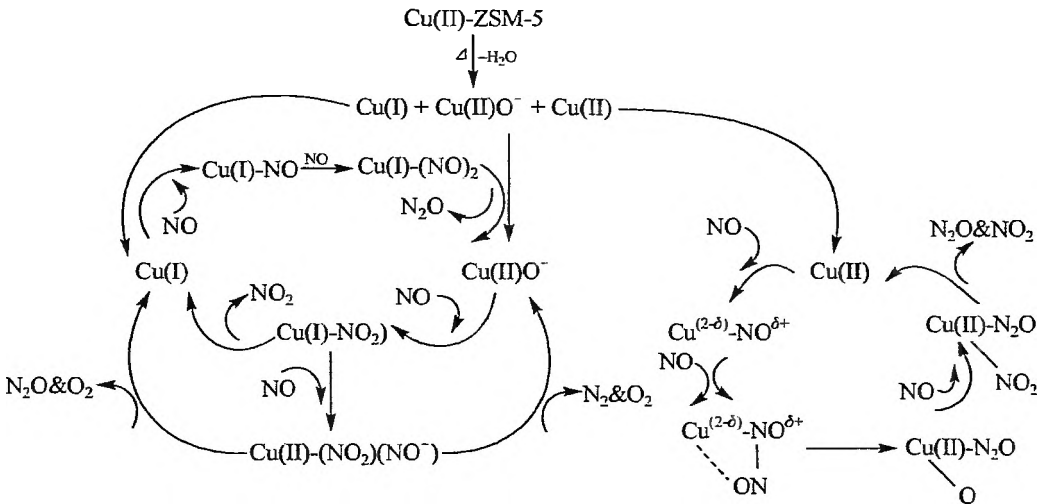
Tajimie i wsp. [75] za bazę do rozważań różnych mechanizmów rozkładu NO posłużyły obliczenia teoretyczne (DFT). Ich zdaniem najbardziej energetycznie uprzywilejowana jest reakcja typu:



Uważają, że reakcja ta składa się z dwóch etapów: rozerwania wiązania $\text{N}-\text{O}$ z utworzeniem N_2O i O oraz rozerwania wiązania w N_2O z wytworzeniem



Rys. 2. Schemat mechanizmu reakcji rozkładu NO na Cu-ZSM-5 wg Bella [42]



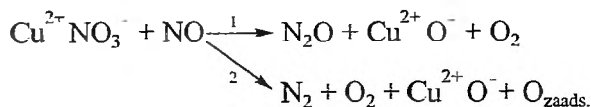
Rys. 3. Schemat mechanizmu reakcji rozkładu NO na Cu-ZSM-5 wg Kevana i wsp. [57]

N₂ i O₂. Ponadto stwierdzili, że aktywność katalizatora Cu-ZSM-5 w reakcji rozkładu NO związana jest z obecnością jonów Cu⁺ w koordynacji płaskiej kwadratowej, ze szkieletowymi jonami tlenu jako ligandami.

Odmienne poglądy co do centrów aktywnych w reakcji rozkładu NO mają przeciwnicy zachodzenia procesu autoredukcji jonów Cu²⁺. Zdaniem Shelefa [76] centrami odpowiedzialnymi za rozkład NO na Cu-ZSM-5 są jony Cu²⁺ w koordynacji płaskiej kwadratowej. Jony te są zdolne do adsorpcji dwóch cząsteczek

NO z utworzeniem gem-dinitrozyłu, które to cząsteczki łatwo desorbują się w wysokich temperaturach z jednoczesnym przegrupowaniem do N_2 i O_2 .

Badacze mechanizmu reakcji rozkładu NO na materiałach innych niż zeolity Cu-ZSM-5 również opowiadają się za mechanizmem redoks. Akolekar i wsp. [58] dla materiałów typu Cu-SAPO-34 sugerują mechanizm identyczny jak zaproponowany dla Cu-ZSM-5 przez Cheunga i wsp. [41], z kompleksem nitro-nitrozylowym $Cu^{2+}(NO)(NO_2^-)$ jako związkami pośrednimi. Z kolei Shimokawabe [60, 77] i Sirilumpen [78] odpowiednio dla wymienionych miedzią mordenitów, zeolitów Y i materiałów typu *pillared clay*, podkreślają ważność form azotanowych(V) w rozkładzie NO. Rozkład tych form prowadzi do produktów takich jak N_2O , N_2 i O_2 [78].



Bardziej prawdopodobna jest druga ścieżka reakcji, ponieważ pozwala na odbudowę azotanów(V) [77]:



PODSUMOWANIE

Mimo olbrzymiej liczby publikacji i patentów dotyczących katalizatorów zawierających miedź i ich aktywności w rozkładzie NO, które pojawiły się w minionym dziesięcioleciu, wciąż wiele zagadnień nie zostało do końca i jednoznacznie wyjaśnionych. Jednym z powodów jest brak całkowitej zgodności w ocenie form Cu aktywnych w rozkładzie NO. Wynika on w dużym stopniu z niedoskonałości metod analitycznych oraz różnych warunków obróbki wstępnej katalizatorów używanej przy ich stosowaniu (np. aktywacja próżniowa (różna wielkość próżni) w technice FTIR, w przepływie gazu w H_2 -TPR lub atmosferze powietrza w XRD). Jest to często przyczyną różnej interpretacji podobnych wyników badań. Jako przykład może posłużyć interpretacja wyników FTIR po adsorpcji NO w temperaturze pokojowej i przemianie w wyższych temperaturach na Cu-ZSM-5.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] A. Fritz, V. Pitchon, *Appl. Catal. B: Environmental*, 1997, **13**, 1.
- [2] T. Yamashita, A. Vannice, *J. Catal.*, 1996, **163**, 158.
- [3] M. Iwamoto, H. Yahiro, *Catal. Today*, 1994, **22**, 5.
- [4] S. Kagawa, S. Yokoo, M. Iwamoto, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1978, 1058.
- [5] M. Iwamoto, H. Furokawa, Y. Mine, F. Uemura, S. Mikuriya, S. Kagawa, *ibid.*, 1986, 1272.
- [6] M. Iwamoto, H. Yahiro, K. Tada, N. Mizuno, Y. Mine, S. Kagawa, *J. Phys. Chem.*, 1991, **95**, 3727.

- [7] Y. Li, W.K. Hall, J. Catal., 1991, **129**, 202.
- [8] J. Wang, N. Mizuno, M. Misono, Bull. Chem. Soc. Jpn., 1998, **71**, 947.
- [9] Y. Zhang, M. Leo, F. Sarofim, Z. Hu, M. Flytzani-Stephanopoulos, Catal. Lett., 1995, **31**, 75.
- [10] J. Vaylon, W.K. Hall, *ibid.*, 1993, **19**, 109.
- [11] G. Curtin, P. Grange, B. Delmon, Catal. Today, 1997, **35**, 121.
- [12] J. Dedecek, B. Wichterlova, J. Phys. Chem. B, 1997, **101**, 10 233.
- [13] B. Ganemi, E. Björnbom, J. Paul, Appl. Catal. B: Environmental, 1998, **17**, 293.
- [14] K. Eränen, N. Kumar, L.E. Lindfors, *ibid.*, 1994, **4**, 213.
- [15] Ch.Y. Lee, K.Y. Choi, B.H. Ha, *ibid.*, 1994, **5**, 7.
- [16] Z. Schay, H. Knözinger, L. Guzzi, G. Pal-Borbely, *ibid.*, 1998, **18**, 263.
- [17] I. Halasz, G. Pal-Borbely, H.K. Beyer, React. Kinet. Catal. Lett., 1997, **61**, 27.
- [18] B. Wichterlova, J. Dedecek, Z. Sobalik, A. Vondrova, K. Klier, J. Catal., 1997, **169**, 194.
- [19] M. Ziółek, I. Sobczak, P. Decyk, I. Nowak, Polish J. Environmental Studies, 1997, **6**, 47.
- [20] I. Sobczak, M. Ziółek, Proc. 3rd International Conference „Catalysis and Adsorption in Fuel Processing and Environmental Protection”, Kudowa Zdrój 1999, B. Pniak, J. Trawczyński, J. Walendziewski (Ed.), Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, 147.
- [21] M.V. Konduru, S.S.C. Chuang, J. Catal., 1999, **187**, 436.
- [22] T. Curtin, P. Grange, B. Delmon, Catal. Today, 1997, **36**, 57.
- [23] M. Ziółek, I. Sobczak, P. Decyk, I. Nowak, Stud. Surf. Sci. Catal., 1999, **125**, 633.
- [24] R. Pirone, P. Ciambelli, G. Moretti, G. Russo, Appl. Catal. B: Environmental, 1996, **8**, 197.
- [25] G. Centi, C. Nigro, S. Perathoner, React. Kinet. Catal. Lett., 1994, **53**, 79.
- [26] D.J. Liu, H.J. Robota, Catal. Lett., 1993, **21**, 291.
- [27] G. Moretti, *ibid.*, 1994, **23**, 135.
- [28] G. Moretti, *ibid.*, 1994, **28**, 143.
- [29] G. Moretti, C. Dossi, A. Fusi, S. Recchia, R. Psaro, Appl. Catal. B: Environmental, 1999, **20**, 67.
- [30] C. Dossi, A. Fusi, S. Recchia, R. Psaro, G. Moretti, Microporous Mesoporous Mat., 1999, **30**, 165.
- [31] M.C. Campa, V. Indovina, G. Minelli, G. Moretti, I. Pettiti, P. Porta, A. Riccio, Catal. Lett., 1994, **23**, 141.
- [32] V.I. Parvulescu, P. Oelker, P. Grange, B. Delmon, Appl. Catal. B: Environmental, 1998, **16**, 1.
- [33] Z. Schay, V. Samuel James, G. Pal-Borbely, A. Beck, A.V. Ramaswamy, L. Guzzi, J. Mol. Catal. A: Chemical, 2000, **162**, 191.
- [34] V.I. Parvulescu, M.A. Centeno, P. Grange, B. Delmon, J. Catal., 2000, **191**, 445.
- [35] I. Sobczak, P. Decyk, M. Ziółek, M. Daturi, J.C. Lavalley, L. Kevan, A.M. Prakash, J. Catal. 2002, **207**, 101.
- [36] J. Dedecek, J. Cejka, B. Wichterlova, Appl. Catal. B: Environmental, 1998, **15**, 233.
- [37] Z. Schay, L. Guzzi, Zs. Koppány, I. Nagy, A. Beck, V. Samuel, M.K. Dongare, D.P. Sabde, S.G. Hegde, A.V. Ramaswamy, Catal. Today, 1999, **54**, 569.
- [38] M. Ziółek, I. Sobczak, I. Nowak, P. Decyk, A. Lewandowska, J. Kujawa, Microporous Mesoporous Mat., 2000, **35–36**, 195.
- [39] M. Ziółek, I. Sobczak, I. Nowak, P. Decyk, J. Stoch, Stud. Surf. Sci. Catal., 2001, **135**, 07004.
- [40] A.W. Aylor, S.C. Larsen, J.A. Reimer, A.T. Bell, J. Catal., 1995, **157**, 592.
- [41] T. Cheung, S.K. Bhargava, M. Hobday, K. Foger, *ibid.*, 1996, **158**, 301.
- [42] A.T. Bell, Catal. Today, 1997, **38**, 151.
- [43] C. Henriques, M.F. Ribeiro, C. Abreu, D.M. Murphy, F. Poignant, J. Saussey, J.C. Lavalley, Appl. Catal. B: Environmental, 1998, **16**, 79.
- [44] J. Vaylon, W.K. Hall, J. Phys. Chem., 1993, **97**, 1204.
- [45] T. Pieplu, F. Poignant, A. Vallet, J. Saussey, J.C. Lavalley, Stud. Surf. Sci. Catal., 1996, **96**, 619.
- [46] V.I. Parvulescu, P. Grange, B. Delmon, J. Phys. Chem. B, 1997, **101**, 6933.
- [47] J. Dedecek, Z. Sobalik, Z. Tvaruzkova, D. Kaucky, B. Wichterlova, *ibid.*, 1995, **99**, 16 327.
- [48] M.V. Konduru, S.S.C. Chuang, *ibid.*, 1999, **103**, 5802.

- [49] Y. Kuroda, R. Kumashiro, T. Yoshimoto, M. Nagao, PCCP, 1999, **1**, 649.
- [50] Y. Kuroda, Y. Yoshikawa, S. Emura, R. Kumashiro, M. Nagao, J. Phys. Chem. B., 1999 **103**, 2155.
- [51] C. Lamberti, S. Bordiga, M. Salvalaggio, G. Spoto, A. Zecchina, F. Geobaldo, G. Vlaic, M. Bellatreccia, *ibid.*, 1997, **101**, 344.
- [52] Y. Kuroda, Y. Yoshikawa, S. Konno, H. Hamano, H. Maeda, R. Kumashiro, M. Nagao, J. Phys. Chem., 1995, **99**, 10 621.
- [53] M. Iwamoto, H. Yahiro, N. Mizuno, W.X. Zhang, Y. Mine, H. Furukawa, S. Kagawa, *ibid.*, 1992, **96**, 9360.
- [54] G. Centi, A. Gally, S. Perathoner, J. Chem. Soc., Faraday Trans., 1996, **92**, 5129.
- [55] K. Hadjiivanov, J. Saussey, J.L. Freysz, J.C. Lavalle, Catal. Lett., 1998, **52**, 103.
- [56] T. Gerlach, F.W. Schütze, M. Baerns, J. Catal., 1999, **185**, 131.
- [57] S.K. Park, V. Kurshev, Z. Luan, C.W. Lee, L. Kevan, Microporous Mesoporous Mat., 2000, **38**, 255.
- [58] D.B. Akolekar, S.K. Bhargava, K. Fogar, J. Chem. Soc., Faraday Trans., 1998, **94**, 155.
- [59] K. Hadjiivanov, D. Klissurski, G. Ramis, G. Busca, Appl. Catal. B: Environmental, 1996, **7**, 251.
- [60] M. Shimokawabe, K. Tadokoro, S. Sasaki, N. Takezawa, Appl. Catal. A: General, 1998, **166**, 215.
- [61] T. Yamashita, A. Vannice, Appl. Catal. B: Environmental, 1997, **13**, 141.
- [62] Y. Chi, S.S.C. Chuang, J. Catal. 2000, **190**, 75.
- [63] E. Giamello, D. Murphy, G. Magnacca, C. Morterra, Y. Shioya, T. Namura, M. Anpo, *ibid.*, 1992, **136**, 510.
- [64] M.J. Jia, W.Y. Lin, W.X. Zhang, F.S. Xiao, W.Q. Pang, T.H. Wu, React. Kinet. Catal. Lett., 1999, **67**, 353.
- [65] K. Hadjiivanov, L. Dimitrov, Microporous Mesoporous Mat., 1999, **27**, 49.
- [66] F. Geobaldo, C. Lamberti, G. Ricchiardi, S. Bordiga, A. Zecchina, J. Phys. Chem., 1995, **99**, 11 167.
- [67] Z. Sojka, M. Che, E. Giamello, J. Phys. Chem. B, 1997, **101**, 4831.
- [68] Y. Li, W.K. Hall, J. Catal., 1993, **143**, 520.
- [69] A. Gervasini, Appl. Catal. B: Environmental, 1997, **14**, 147.
- [70] X. Solans-Monfort, V. Branchadell, M. Sodupe, J. Phys. Chem. A, 2000, **104**, 3225.
- [71] G. Centi, S. Perathoner, Appl. Catal. A, General, 1995, **132**, 179.
- [72] J. Sarkany, J.L. d'Itri, W.M.H. Sachtler, Catal. Lett., 1992, **16**, 241.
- [73] G.D. Lei, B.J. Adelman, J. Sarkany, W.M.H. Sachtler, Appl. Catal. B: Environmental, 1995, **5**, 245.
- [74] M.C.N. Amorim de Carvalho, F.B. Passos, M. Schmal, Appl. Catal. A: General, 2000, **193**, 265.
- [75] N. Tajima, M. Hashimoto, F. Toyama, A.M. El-Nahas, K. Hirao, PCCP, 1999, **1**, 3823.
- [76] M. Shelef, Catal. Lett., 1992, **15**, 305.
- [77] M. Shimokawabe, S. Sasaki, N. Takezawa, React. Kinet. Catal. Lett., 1998, **64**, 49.
- [78] M. Sirilumpen, R.T. Yang, N. Tharapiwattananon, J. Mol. Catal. A: Chemical, 1999, **137**, 273.

**DICHROIZM KOŁOWY KWASÓW NUKLEINOWYCH
CZ. II. POLIMERY***

**CIRCULAR DICHROISM OF NUCLEIC ACIDS
PART II. POLYMERS**

Małgorzata Boczkowska

*Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN
ul. Sienkiewicza 112, 90-363 Łódź*

Abstract

Wstęp

1. Teoria aktywności optycznej polimeru

2. Interpretacja widm

2.1. Konformacja monomerów

2.2. Różnica między widmami CD dla DNA i RNA

2.3. Polinukleotydy o prostych sekwencjach

2.4. Z-DNA

2.5. Dyskusja

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

* *Dichroizm kołowy kwasów nukleinowych. Cz. I. Monomery*, Wiad. Chem., 2002, 56 (1-2), 39-56.



Dr Małgorzata Boczkowska ukończyła fizykę teoretyczną i filozofię na Uniwersytecie Łódzkim. W 2001 r. uzyskała tytuł doktora nauk chemicznych w Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi. Obecnie jest asystentem w Zakładzie Chemii Bioorganicznej CBMM i zajmuje się badaniem właściwości termodynamicznych i strukturalnych modyfikowanych oligonukleotydów.

ABSTRACT

The review presents the theoretical basis for interpretations of CD spectra of polynucleotides. A simplified version of quantum theory of circular dichroism of a polynucleotide by Tinoco and Johnson [2] is presented in detail. It is generally assumed that the optical activity of these polymers is dominated by interactions between dipoles of in-plane transitions occurring at neighbouring bases. The interaction of dipoles coming from different bases strictly depends on geometrical arrangement of bases within the helix. As a result information about geometry of the helix can be inferred from the CD spectra. The circular dichroism caused by the disturbance of the electronic system of a base by the presence of a sugar ring is usually neglected in calculations. Such a theoretical approach allows to understand differences between CD spectra of random DNA and RNA. The distance of a base pair from helix axis appeared to be the main factor responsible for these differences [25]. The approach fails in a case of polymers of non-random sequences, for example containing a repetitive motif of two bases [2, 7, 27]. It is exemplified for the d(CG)_n oligomers forming left-handed double helix called Z-DNA, where none of the theoretical calculations is able to predict the inversion of a CD spectrum characteristic for the Z form [7, 35, 36].

WSTĘP

Źródłem aktywności optycznej polimerów kwasów nukleinowych są przejścia elektronowe zachodzące w pierścieniach zasad nukleinowych. Ich charakterystyka została przedstawiona w części I niniejszego opracowania (*Dichroizm kołowy kwasów nukleinowych. Cz. I – Monomery*). Nawet jednak najdokładniejsza znajomość energii, intensywności i przestrzennego położenia dipoli tych przejść nie wystarczy, by zinterpretować widmo CD polimeru w kategoriach jego struktury przestrzennej. Potrzebna jest jeszcze teoria opisująca oddziaływania między tymi dipolami i umożliwiająca wyznaczenie na ich podstawie parametrów geometrycznych helisy. Wszystkie polimery kwasów nukleinowych, począwszy od pojedynczych nici, mają bowiem w mniejszym lub większym stopniu charakter helikalny. To usztywnienie struktury jest wynikiem oddziaływań między płaskimi, aromatycznymi pierścieniami zasad nukleinowych. Konformacje cząsteczek różnią się jednak między sobą formą helisy, czyli zbiorem wartości parametrów geometrycznych ją opisujących (tab. 1). Parametry te określa się z reguły dla podstawowej, dwuniciowej postaci kwasów nukleinowych, zwanej dupleksem, mają one jednak bardziej ogólne znaczenie.

Tabela 1. Parametry helikalne dla dupleksów DNA [1]

Parametry geometryczne	Forma helisy		
	A	B	Z
Sens helisy	Prawoskrętny	Prawoskrętny	Lewoskrętny
Kątowy skok helisy na parę zasad (°)	33,1±5,9	35,9±4,3	GC: -51,3±1,6 CG: -8,5±1,1
Liczba zasad na skręt	10,9	10,0	12,0
Liniowy skok helisy na parę zasad (Å)	2,92±0,39	3,36±0,42	GC: 3,52±0,22 CG: 4,13±0,18
Nachylenie płaszczyzny zasad względem osi helisy – <i>tilt</i> (Å)	13,0±1,9	-2,0±4,6	8,8±0,7
Skręcenie płaszczyzn pary zasad względem siebie – <i>propeller twist</i> (°)	15,4±6,2	11,7±4,8	4,4±2,8

Z punktu widzenia właściwości optycznych helikalna postać cząsteczki oznacza regularne rozmieszczenie chromoforów – płaskich pierścieni zasad nukleinowych, a co za tym idzie, indukowanych światłem w pierścieniach dipoli przejść. Regularność rozmieszczenia dipoli powoduje, że oddziaływania między nimi są średnio takie same wzdłuż całej helisy i dają początek niewielkiej liczbie wypadkowych efektów Cottona. Największy udział w powstawaniu tych efektów mają oddziaływania między najbliższymi sąsiadami. Każda zasada w duplekście, nie znajdująca się na końcu cząsteczki, ma ich pięć: jedną zasadę od strony 5' i jedną od 3' na tej samej nici oraz odpowiednio trzy zasady na nici przeciwnoleżącej. Wśród oddziaływań z tymi sąsiadami najstarsze jest to z za-

sadą komplementarną, ponieważ wtedy oddziałujące chromofory leżą prawie w jednej płaszczyźnie. O tym, jak silne są pozostałe, decydują odległości i kąty między sprzęgającymi się dipolami, wynikające bezpośrednio z geometrii danej helisy. Z tego właśnie powodu w widmach CD potencjalnie jest ukryta pełna informacja o tej geometrii.

1. TEORIA AKTYWNOŚCI OPTYCZNEJ POLIMERU

Potrzeba wydobycia informacji strukturalnej zawartej w widmach CD kwasów nukleinowych spowodowała rozwój teorii opisujących aktywność optyczną tych związków. Poszukiwania najlepszego rozwiązania zaowocowały dwoma różnymi podejściami do problemu. Pierwsze z nich oparte jest na mechanice kwantowej i polega na bezpośrednim obliczaniu sił skręcalności dla każdego przejścia indukowanego w polimerze w danym zakresie częstotliwości, z reguły w bliskim ultrafiolecie. Drugie podejście wywodzi się z klasycznej teorii optyki i pozwala przewidzieć kształt widma CD polimeru na podstawie kształtu pasm absorpcyjnych monomerów. Oba te podejścia traktowane są jako równocenne i dające porównywalne wyniki. Jednak wydaje się, że model kwantowy, zwłaszcza w swojej uproszczonej wersji zaproponowanej przez Tinoco i Johnsona [2], pozwala na lepsze zrozumienie zjawiska dichroizmu kołowego polinukleotydów. Zgodnie z tym modelem dla każdego przejścia polimeru ze stanu podstawowego $|0\rangle$ do stanu wzbudzonego $|A\rangle$ siła skręcalności wynosi

$$R_{0A} = \text{Im } \mu_{0A} m_{0A},$$

przy czym operatory dipoli μ oraz m przejścia w polimerze są rozumiane jako suma odpowiednich operatorów μ_i oraz m_i dla monomerów, stąd

$$R_{0A} = \text{Im } \sum_i \langle 0 | \mu_i | A \rangle | \sum_j \langle A | m_j | 0 \rangle.$$

Ponieważ jednak magnetyczny dipol przejścia związany jest przez operator pędu z dipolem elektrycznym, to siłę skręcalności można zapisać w postaci zależnej wyłącznie od tego ostatniego:

$$R_{0A} \frac{-\pi v_{0A}}{2c} = \sum_{ij} R_{ij} \langle 0 | \mu_i | A \rangle \langle 0 | \mu_j | A \rangle,$$

gdzie R_{ij} jest wektorem odległości między środkami monomerów i oraz j , zaś v_{0A} – częstotliwością przejścia. Aby obliczyć daną w ten sposób siłę skręcalności, trzeba znać funkcje falowe stanów polimeru $|0\rangle$ i $|A\rangle$. Formalnie znajduje się je, rozwiązując zagadnienie własne energii

$$H|K\rangle = E|K\rangle$$

dla hamiltonianu polimeru postaci $H = H^0 + V$, gdzie H^0 jest sumą hamiltonianów monomerów, V – sumaryczną energią wzajemnych oddziaływań stanów róż-

nych monomerów. W opisywanym modelu przyjmuje się jednak rozwiązanie przybliżone, w którym $|K\rangle$ jest kombinacją stanów $|a\rangle$ monomerów, do których w interesującym zakresie częstotliwości następują przejścia ze stanu podstawowego. W ten sposób polimer złożony z n monomerów, z całkowitą liczbą przejść na nich wynoszącą N , ma N różnych, pojedynczo wzbudzonych stanów o funkcjach falowych

$$|1K\rangle = \sum_a c_{a,K} |a\rangle,$$

gdzie $c_{a,K}$ są współczynnikami rozwinięcia. Każdy taki stan może poza tym oddziaływać ze stanami wzbudzonymi spoza badanego zakresu częstotliwości. Wynikiem takiego mieszania są funkcje falowe $|2K\rangle$. Ostatecznie więc stany polimeru można zapisać jako

$$|K\rangle = |1K\rangle + |2K\rangle,$$

a wyrażenie na siłę skręcalności dla przejścia $0 \rightarrow K$, w postaci

$$R_K = \frac{-\pi v_K}{2c} \sum_{ij} R_{ij} \langle 0 | \mu_{i1} | 1K \rangle \langle 0 | \mu_{j1} | 1K \rangle - \frac{-\pi v_K}{2c} \sum_{ij} R_{ij} \langle 0 | \mu_{i1} | 1K \rangle \langle 0 | \mu_{j2} | 2K \rangle = R_K^1 + R_K^2.$$

Pierwszy składnik sumy opisuje wkład pochodzący od sprzęgania się elektrycznych dipoli przejść indukowanych w danym zakresie częstotliwości w monomerach. Ponieważ zaś

$$\langle 0 | \mu_{i1} | 1K \rangle = \sum_a c_{ia,K} \langle i | 0 | \mu_{i1} | ia \rangle = \sum_a c_{ia,K} \mu_{i0a},$$

więc

$$R_K^1 = \frac{-\pi}{2c} \sum_{ij} \sum_{ab} c_{ia,K} c_{jb,K} R_{ij} \mu_{i0a} \mu_{j0b}.$$

Drugi składnik opisuje udział oddziaływań tych samych dipoli z pozostałymi, indukowanymi poza badanym zakresem, głównie w głębokim UV. Oddziaływania te można oszacować przyjmując przybliżenie Kirkwooda [3], zgodnie z którym monomer j odczuwa pole E_{j0b}^l związane z przejściem $0 \rightarrow b$ w monomerze l i reaguje na nie w stopniu zależnym od swojej polaryzowalności α_j' (tensor polaryzowalności zmodyfikowany jest w taki sposób, żeby uwzględniał wyłącznie przejścia odpowiadające częstotliwościom spoza badanego zakresu). Przy takim założeniu

$$R_K^2 = \frac{\pi}{c} \sum_{ij} \sum_l \sum_{ab} c_{ia,K} c_{lb,K} v_{i0a} E_{j0b}^l \alpha_j' \mu_{i0a} R_{ij}.$$

Do otrzymania teoretycznego widma CD nie wystarczy jednak znajomość sił skręcalności poszczególnych sygnałów. Konieczne jest jeszcze założenie, że sygnały te mają określony kształt. Jeżeli kształt ten opisać funkcją częstotliwości $v f(v - v_K)$, to poszukiwane widmo daje się przedstawić w postaci

$$\varepsilon_L - \varepsilon_R(\nu) = \nu \sum_K^N R_K f(\nu - \nu_K),$$

gdzie sumowanie odbywa się po wszystkich pasmach w danym zakresie. Rozwinięcie wyrażenia $(\varepsilon_L - \varepsilon_R(\nu)/\nu)$ w szereg Taylora wokół średniej częstotliwości $\bar{\nu}$ w badanym zakresie (260 nm), a następnie uwzględnienie tylko dwóch pierwszych członów tego rozwinięcia, prowadzi do formuły opisującej widmo w postaci:

$$\begin{aligned} \varepsilon_L - \varepsilon_R(\nu) = & \frac{\pi\nu}{c} f(\nu - \bar{\nu}) \sum_{ij} \sum_a \nu_{i0a} E_{i0a}^j \alpha'_j \mu_{i0a} R_{ij} + \\ & + \frac{\pi\nu}{2c} \frac{\partial f(\nu - \bar{\nu})}{\partial \nu} \sum_{ij} \sum_{ab} \nu_{i0a} R_{ij} \mu_{i0a} \mu_{j0b} V_{i0a,j0b}, \end{aligned}$$

przy czym następne człony rozwinięcia są pomijane, ponieważ ich udział w powstawaniu widma jest zanedbywalnie mały.

Aby przedstawiona formuła była użyteczna, wielkości występujące w niej muszą dać się zmierzyć doświadczalnie lub obliczyć teoretycznie. Ponieważ zasady nukleinowe ułożone są w helikalnym polinukleotydzie na tyle blisko siebie, że w ich wzajemnym oddziaływaniu ważny staje się kształt pierścieni, najlepsze do tego celu wydaje się tzw. przybliżenie monopol-monopol [4]. Opiera się ono na założeniu, że indukowane światłem przejścia do stanów wzbudzonych powodują zmiany gęstości elektronowej w cząsteczce. W związku z tym elektryczny dipol przejścia μ_{i0a} może być opisany przez rozkład cząstkowych ładunków ρ między jej atomami (lub grupami atomów):

$$\mu_{i0a} = \sum_s \rho_s^{i0a} r_s^i,$$

gdzie indeks s numeruje kolejne atomy monomeru i ; ρ_s^{i0a} oznacza zatem monopol atomu s monomeru i indukowany przejściem $0 \rightarrow a$, zaś r_s^i – wektor położenia tego monopolu. W tym przybliżeniu pole odczuwane przez atom t monomeru j z powodu przejścia $0 \rightarrow a$ na monomerze i daje się wyrazić jako

$$E_{i0a}^t = \sum_s \frac{\rho_s^{i0a}}{r_{st}^3} r_{st},$$

energia oddziaływania między dipolem przejścia $0 \rightarrow a$ na monomerze i a dipolem przejścia $0 \rightarrow b$ na monomerze j :

$$V_{i0a,j0b} = \sum_{st} \frac{\rho_s^{i0a} \rho_t^{j0b}}{r_{st}},$$

gdzie r_{st} to odległość między atomem s na i a atomem t na j .

W podobny sposób można przedstawić polaryzowalność jako sumę polaryzowalności poszczególnych atomów:

$$\alpha'_j = \sum_t \alpha_t^j.$$

Ostatecznie formuła opisująca widmo CD polinukleotydu przyjmuje postać:

$$\Delta\varepsilon \equiv \varepsilon_L - \varepsilon_R(\nu) = \frac{\pi\nu}{c} f(\nu - \bar{\nu}) \sum_{ij} \sum_a \nu_{i0a} \sum_{st} \frac{\rho_s^{i0a}}{r_{st}^3} r_{st} \alpha_i^j \mu_{i0a} R_{ij} +$$

$$+ \frac{\pi\nu}{2c} \frac{\partial f(\nu - \bar{\nu})}{\partial \nu} \sum_{ij} \sum_{ab} \nu_{i0a} \left[\sum_{st} \frac{\rho_s^{i0a} \rho_t^{j0b}}{r_{st}} \right] R_{ij} \mu_{i0a} \mu_{j0b}.$$

Pierwsza suma w każdym członie (po ij) oznacza, że uwzględnione muszą być wszystkie monomery i ich wzajemne oddziaływania. Przy założeniu, że w grę wchodzi jedynie cztery, najczęściej występujące w DNA i RNA zasady, w polinukleotydzie istnieje 16 różnych typów takich oddziaływań. W praktyce jednak, ponieważ siła skręcalności maleje z kwadratem odległości, w sumowaniu tym uwzględnia się zasady położone maksymalnie jeden obrót helisy nad i pod danym monomerem. W ten sposób, dla dupleksu o 10 zasadach na skręt istnieje 41 oddziaływań zasad ze sobą, które muszą być uwzględnione. Aby otrzymać $\Delta\varepsilon$ na zasadę, trzeba policzyć 16 możliwości dla każdego z tych 41 oddziaływań, zsumować je i podzielić przez 16. Druga suma (po a lub ab) oznacza konieczność uwzględnienia wszystkich przejść na zasadach, występujących w badanym rejonie widma, najczęściej między 220 a 300 nm. Wreszcie, trzecie sumowanie (po st) odbywa się po wszystkich głównych atomach (bez atomów wodoru) tworzących zasadę.

Powyższa formuła wymaga znajomości własności optycznych wyłącznie zasad nukleinowych, ponieważ wpływ szkieletu fosforanowo-cukrowego jest pominięty. Można ją jednak odpowiednio rozszerzyć w ramach tego samego formalizmu [5]. W ostatecznym wyrażeniu na dichroizm znajdzie się wtedy trzeci wyraz, opisujący oddziaływanie zasady z resztą fosforanowo-cukrową. Będzie on miał taki sam charakter jak ten opisujący oddziaływanie z reprezentowanymi przez polaryzowalności przejściami w dalekim ultrafiolecie, ponieważ ani cukier, ani grupa fosforanowa nie są chromoforami w rejonie 200–300 nm. Okazuje się jednak, że uwzględnienie tego wyrazu zmienia widma teoretyczne w minimalnym stopniu i nie wpływa na poprawę ich dopasowania do doświadczalnych [5]. Dlatego też z reguły udział szkieletu fosforanowo-cukrowego jest pomijany w obliczeniach, także w innych podejściach.

Zakładając, że własności optyczne monomerów są znane, przyjmując funkcję $\nu f(\nu - \nu_K)$ jako średnią z widm absorpcyjnych zasad występujących w polimerze i manipulując tylko parametrami helikalnymi (uwikłanymi w odpowiednich iloczynach wektorowych i skalarnych), można otrzymać teoretyczne widmo CD. Dotyczy to jednak tylko rejonu w pobliżu 260 nm, ponieważ wokół tej właśnie długości fali, jako odpowiadającej maksymalnej absorpcji w bliskim UV, dokonuje się rozwinięcia w szereg Taylora.

Bardziej rozwiniętą formą teorii kwantowej jest metoda macierzowa. O ile wersja zaproponowana przez Johnsona i Tinoco jest odmianą teorii zaburzeń pierwszego rzędu, to metoda macierzowa jest teorią zaburzeń uwzględniającą potencjały oddziaływań między dipolami, V_{ij} , wszystkich rzędów [6, 7]. Hamilto-

nian polinukleotydu jest w niej przedstawiany w postaci macierzy, której elementami diagonalnymi są energie przejść w izolowanych monomerach, niediagonalnymi zaś – energie sprzężeń między dipolami przejść różnych monomerów i energie mieszania między różnymi stanami tego samego monomeru. Te potencjały oddziaływań obliczane są przy użyciu przybliżenia monopol-monopol i geometrycznych własności polimeru. Macierz hamiltonianu jest następnie diagonalizowana w celu uzyskania wartości własnych i wektorów własnych dla przejść polinukleotydu jako całości, przy czym wartości własne odpowiadają energiom tych przejść, wektory własne zaś pozwalają otrzymać kierunki ich dipoli. Na podstawie tych danych dla każdego przejścia polinukleotydu obliczana jest wartość siły skręcalności. W tym miejscu kończy się formalne podejście kwantowo-mechaniczne. Aby otrzymać widmo CD, należy jeszcze założyć, podobnie jak w wersji opisanej wcześniej, określony kształt pasma.

Metoda macierzowa jest z powodzeniem stosowana do obliczeń dichroizmu kołowego polipeptydów [8]. Jednak w tym przypadku muszą być uwzględnione tylko dwie zmienne konformacyjne na „monomer” – kąty ϕ oraz ψ [9]. Manipulując nimi, w systematyczny sposób można badać wszystkie możliwe (i niemożliwe) struktury helikalne polipeptydów. Inaczej jest w przypadku kwasów nukleinowych, gdzie istnieje sześć różnych kątów określających konformację łańcucha fosforanowo-cukrowego (α , β , γ , δ , ϵ , ξ) i dodatkowo kąt torsyjny wokół wiązania glikozydowego (χ) [10]. Systematyczne badanie efektów Cottona w funkcji tych zmiennych konformacyjnych jest obecnie niewykonalne.

Klasyczne podejście do aktywności optycznej kwasów nukleinowych [11] wywodzi się z teorii polaryzowalności sprzężonych oscylatorów (ang. *all order, coupled oscillator polarizability theory*) rozwiniętej przez deVoe [12, 13]. Zgodnie z nią, każde przejście w monomerze reprezentowane jest przez jednowymiarowy oscylator zorientowany tak jak elektryczny dipol tego przejścia. Każdy oscylator ma charakterystyczną dla siebie zależną od częstotliwości polaryzowalność, która decyduje o jego reakcji na światło o danej długości fali. Polaryzowalność $\alpha_i(\bar{\nu})$ jest wielkością zespoloną. Jej część urojona jest proporcjonalna do $\epsilon(\bar{\nu})$, czyli intensywności pasma absorpcyjnego w danej częstotliwości. Z kolei część rzeczywista polaryzowalności związana jest z pasmem absorpcyjnym przekształceniem Kroniga-Kramersa. Aby uzyskać w tym podejściu widmo CD, trzeba znać kierunki poszczególnych oscylatorów i odległości między nimi oraz kształt pasm absorpcyjnych monomerów. Generalnie wyniki uzyskiwane tą metodą są porównywalne do tych otrzymywanych w modelu kwantowym.

2. INTERPRETACJA WIDM

2.1. KONFORMACJA MONOMERÓW

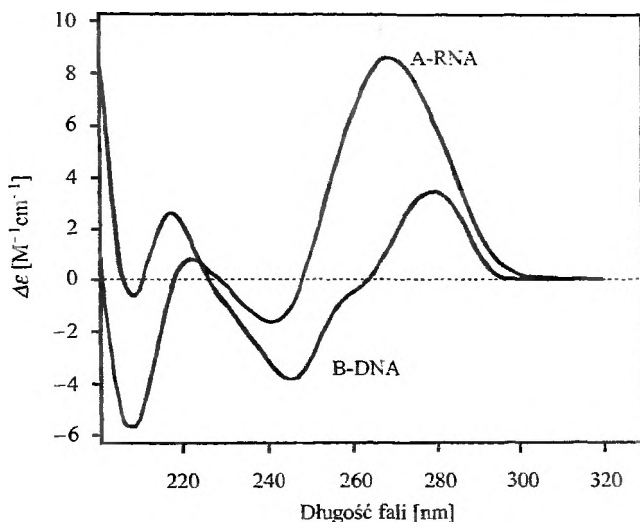
Widma teoretyczne dla wolnych monomerów – nukleozydów i nukleotydów – mogą być otrzymane zarówno w modelu kwantowym [14–16], jak i klasycznym

[17, 18]. W obu podejściach zasada traktowana jest jako główny chromofor, a reszta cukrowa (fosforanowo-cukrowa) jako zaburzający go podstawnik. Przy ograniczeniu rozważań do β -anomerów, parametrem geometrycznym, który w największym stopniu wpływa na kształt widma teoretycznego, jest kąt torsyjny χ wokół wiązania glikozydowego. Np. dla adenozyiny i deoksyadenozyiny, jeśli przyjmie się wartość tego kąta charakterystyczną dla geometrii; A-RNA ($\chi = 166^\circ$) to zlokalizowany przy 260 nm sygnał jest ujemny, natomiast dla B-DNA ($\chi = 98^\circ$) – dodatni [17]. Obecność lub brak grupy 2'-hydroksylowej wpływa na intensywność tego sygnału, jednak generalny wzór zmian wywoływanych rotacją zasady jest taki sam dla obu nukleozydów. Rotacja wokół wiązania C4-C5 nie ma efektu spektralnego, podobnie jak zmiana konformacji cukru z 2'-endo na 3'-endo [16, 17].

Nie jest możliwe bezpośrednie porównanie teoretycznych widm monomerów z doświadczalnymi, ponieważ te ostatnie są rezultatem złożenia widm dla wielu różnych konformerów realnie występujących w roztworze. Dopiero uwzględnienie wyników obliczeń rozkładu prawdopodobieństwa energii konformacyjnej [18] prowadzi do widm w dużej mierze zgodnych z doświadczeniem [17]. W tym kontekście, stosowana czasem w celu uzyskania „czystych” efektów, tj. pochodzących wyłącznie od oddziaływania zasad między sobą, procedura odejmowania widma mieszaniny monomerów od widma polinukleotydu okazuje się niewłaściwa. Widma wolnych monomerów nie są bowiem dobrym przybliżeniem udziału ich własnego dichroizmu w całkowitym CD polinukleotydu.

2.2. RÓŻNICA MIĘDZY WIDMAMI CD DLA DNA I RNA

Widma CD statystycznego, dwuniciowego DNA i RNA różnią się wyraźnie charakterem (rys.1). Różnice te skoncentrowane są w rejonie 260 nm, tj. maksimum absorpcji polinukleotydów. W roztworach wodnych widmo DNA zawiera w tym rejonie dwa pasma o prawie jednakowej intensywności, ale przeciwnym znaku, położone symetrycznie po obu stronach 260 nm. W podobnych warunkach widmo RNA charakteryzuje się obecnością intensywnego dodatniego sygnału blisko maksimum absorpcji i dużo słabszego ujemnego przy krótszych długościach fali. W przeciwieństwie do DNA suma sił skręcalności tych pasm nie jest równa zeru i widmo określane jest mianem *niekonserwatywnego*. W przeszłości przyczyn niekonserwatywności upatrywano w obecności dodatkowego centrum asymetrii związanego z grupą 2'-hydroksylową [22]. Dopiero jednak kwantowa teoria aktywności optycznej zaproponowana przez Johnsona i Tinoco [2] pozwoliła znaleźć rozwiązanie tego problemu. Zgodnie z nią, jak przedstawiono uprzednio, na widmo CD polinukleotydu składają się dwa udziały. Jeden z nich pochodzi od dynamicznego sprzężenia się dipoli przejść $\pi \rightarrow \pi^*$ między sobą, czyli od sprzężenia ekscytonowego. Sprzężenie to generuje układ pasm, dla których suma sił skręcalności powyżej 220 nm jest równa zeru, a więc odpowiada za konserwatywny charakter widma. Drugi udział pochodzi od oddziaływania tych samych di-

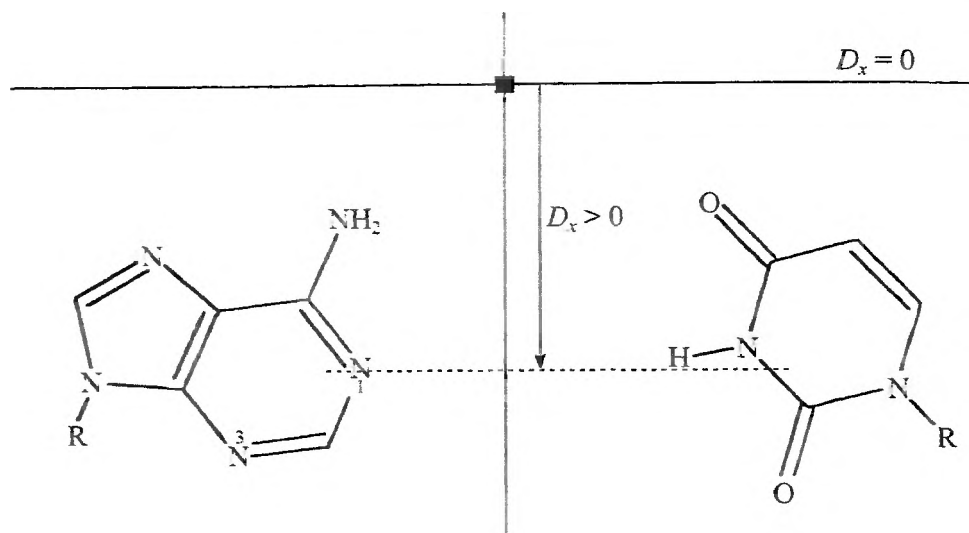


Rys. 1. Widma CD dwuniciowej helisy RNA (A-RNA) i DNA (B-DNA.) o statystycznej sekwencji

poli z reprezentowanymi przez polaryzowalności dipolami wysokoenergetycznych przejść poniżej 220 nm. Oddziaływania te prowadzą do sygnałów, dla których suma sił skręcalności powyżej 220 nm nie jest równa zero, i stanowią niekonserwatywny wkład do widma. O tym, który z tych dwóch udziałów przeważa, decyduje geometria helisy. W prawoskrętnym duplesie pewne ułożenia dipoli przejść $\pi \rightarrow \pi^*$ oddziałujących z dipolami przejść powyżej 220 nm powodują, że składnik niekonserwatywny wnosi pozytywny wkład do widma, inne, że negatywny [23]. Jednym z parametrów geometrycznych, które mają na to wpływ, jest nachylenie płaszczyzny zasad w stosunku do osi helisy (ang. *tilt*). Dla helisy z zasadami prostopadłymi do osi część sygnałów generowanych przez te oddziaływania znosi się wzajemnie, podczas gdy w przypadku zasad nachylonych większość ułożeń dipoli daje wkład pozytywny [2, 24]. To jednak nie *tilt* decyduje ostatecznie o charakterze widma statystycznego DNA i RNA, tylko odległość pary zasad od osi helisy, D_x . Jeżeli parametr ten zdefiniować jak na schemacie 1, to poszczególnym formom, zidentyfikowanym krystalograficznie, odpowiadają wartości [25]:

$$\begin{aligned} \text{A-RNA} & D_x = 4,9 \text{ \AA}, \\ \text{B-DNA} & D_x = 0,0 \text{ \AA}, \\ \text{C-DNA} & D_x = -1,5 \text{ \AA}, \\ \text{A-DNA} & D_x = 5,1 \text{ \AA}. \end{aligned}$$

Rozważania teoretyczne wykazały, że sukcesywne zmniejszanie wartości D_x , nawet przy założeniu zerowego nachylenia, zmienia widmo z pozytywnie niekonserwatywnego, charakterystycznego dla formy A-RNA i A-DNA, przez konser-



Schemat 1

watywne dla B-DNA, do negatywnie niekonserwatywnego dla C-DNA [25]. Za opisane zmiany charakteru widma odpowiedzialny jest, podobnie jak w przypadku niezerowego nachylenia, choć na większą skalę, brak znoszenia się sygnałów pochodzących od oddziaływań z kolejnymi sąsiadami. znajdującymi się nad i pod daną zasadą [25]. Przy dodatnich wartościach D_x wypadkowy wkład, wynikający z oddziaływań dipoli przejść $\pi \rightarrow \pi^*$ z dipolami przejść powyżej 220 nm, jest pozytywny. dla $D_x = 0$ jego składowe pozytywne i negatywne znoszą się nawzajem, zaś dla wartości ujemnych dominują te ostatnie. Okazuje się przy tym, że w formie A helisy, dla maksymalnie odsuniętych od osi zasad, oddziaływania z drugimi i trzecimi sąsiadami wnoszą w sumie większy wkład do widma niż oddziaływania z najbliższymi sąsiadami [2]. Dzieje się tak, ponieważ drugich i trzecich sąsiadów jest razem osiem (najbliższych tylko pięć) i chociaż zasadę dzielą od nich większe odległości, to oddziaływania z nimi wciąż są wystarczająco silne, aby, jeśli się sumują, dawać znaczący wkład do widma. W miarę zbliżania się do osi helisy od strony dodatnich wartości D_x rola oddziaływań z drugimi i trzecimi sąsiadami maleje, ponieważ sygnały generowane przez te oddziaływania znoszą się w coraz większym stopniu. Gdy zasady znajdują się na osi helisy, to główny udział w powstawaniu CD mają oddziaływania najbliższych sąsiadów dające widmo konserwatywne. Dalsze przesuwanie zasad generuje negatywnie niekonserwatywne widmo o małej intensywności, utożsamiane w przeszłości z C-DNA [20]. Rosnący udział oddziaływań z drugim i trzecim sąsiadem, tym razem o charakterze negatywnym, znosi dodatnie pasmo w rejonie 270 nm, będące wynikiem oddziaływań najbliższych sąsiadów. Okazuje się zatem, że stoso-

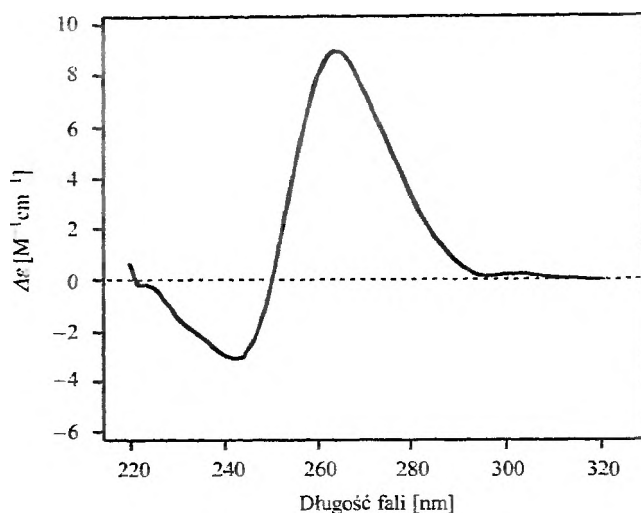
wane często do interpretacji widm CD tzw. przybliżenie najbliższego sąsiada [26] nie w każdym przypadku jest właściwe.

Widma statystycznego DNA i RNA przewidywane przez teorię Tinoco dość dobrze zgadzają się z realnie obserwowanymi widmami w niskim stężeniu soli i neutralnym pH. Chociaż obliczone położenie pasm niedokładnie odpowiada wartościom doświadczalnym, to ich liczba i znaki są właściwe [2, 24, 25]. Teoria poprawnie również przewiduje małą intensywność widm DNA w stosunku do RNA. Sukcesy te wynikają z faktu, że sekwencje zawierające statystyczny rozkład zasad generują dużą liczbę sygnałów, z których większość znosi się nawzajem. W rezultacie wypadkowe widmo daje się przybliżyć sumą tylko dwóch opisanych tu udziałów. Rozwinięta postać teorii kwantowej, jaką jest wspomniana metoda macierzowa, pozwala na prawie ilościowe odtwarzanie widm doświadczalnych takich sekwencji [7]. Zgodność z doświadczeniem osiągnięta jest przy założeniu geometrii A-RNA, A-DNA lub B-DNA i użyciu współrzędnych atomowych pochodzących z dyfrakcji rentgenowskiej odpowiednio zorientowanych włókien.

2.3. POLINUKLEOTYDY O PROSTYCH SEKWENCJACH

Polinukleotydy o sekwencjach składających się z jednej lub dwóch zasad mają specyficzne widma CD o dużej intensywności. Z jednej strony jest to rezultat mniejszej ilości oddziaływań, a więc mniejszej możliwości znoszenia się sygnałów; z drugiej zaś – często nietypowej geometrii helisy. Zdolność do teoretycznego odtwarzania tych widm stanowi sprawdzian możliwości interpretacyjnych proponowanych teorii. Niestety, jego wynik dla żadnej z nich nie jest zadowalający [2, 7, 27]. W przypadku niektórych sekwencji zgodność z doświadczeniem jest wystarczająca, dla innych nie ma jej wcale. Na przykład przy założeniu geometrii A-helisy uzyskane klasyczną metodą sprzężonych oscylatorów widmo dupleksu poli[A] poli[U] poprawnie oddaje położenie i znak sygnałów, podczas gdy uzyskane w analogiczny sposób widmo poli[AU] bardzo odbiega od doświadczalnego [27]. Prawdopodobnie oznacza to, że konformacja obu dupleksów różni się znacznie, a w szczególności, że struktura poli[AU] w roztworze nie jest w dostatecznym stopniu przybliżana przez współrzędne stanu stałego.

Stosunkowo najlepsze wyniki udało się osiągnąć w przypadku sekwencji poli[G] i poli[d(G)]. Wiadomo, że nawet krótkie oligonukleotydy zawierające nieprzerwane ciągi guanin mają tendencje do tworzenia struktur czteroniciowych, zwanych tetrapleksami, o charakterystycznym widmie CD (rys. 2). Uwzględnienie tego faktu w obliczeniach, przez przyjęcie geometrii czteroniciowej, prawoskrętnej helisy [28] umożliwiło interpretację widm doświadczalnych takich sekwencji. Graficzne złożenie w określonym stosunku widm teoretycznych dla pojedynczej nici i tetrapleksu dało bowiem w rezultacie wypadkowe widmo zgodne z obserwowanym doświadczalnie [18]. Stosunek tego złożenia może odpowiadać realnemu udziałowi każdej z form w roztworze.

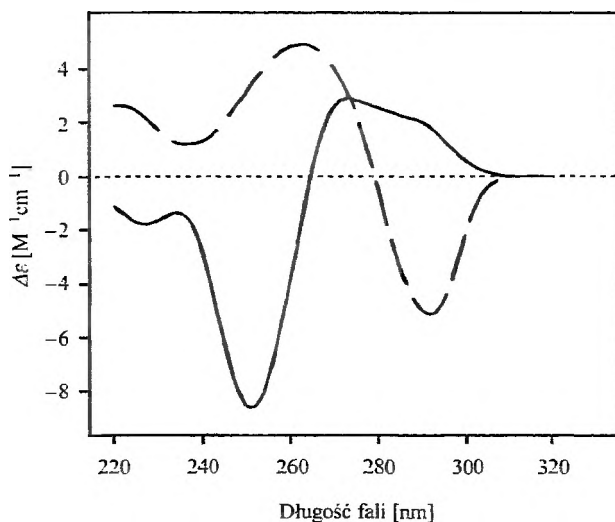


Rys. 2. Widmo CD czteroniciowej helisy o równoległym ułożeniu nici, zwanej tetrapleksem równoległym

2.4. Z-DNA

Szczególnym przypadkiem polinukleotydu o prostej sekwencji jest poli[d(GC)]. W zależności od siły jonowej środowiska może on istnieć w roztworze w postaci dwóch konformacji: standardowej, prawoskrętnej helisy typu B-DNA w niskim stężeniu soli i formy lewoskrętnej – w wysokim. Dają się one łatwo odróżnić, ponieważ przejście konformacyjne między nimi wywołuje inwersję widma CD [29] (rys. 3).

Istnieją liczne dowody na to, że struktura lewoskrętnej helisy, określona w sposób absolutny dla kryształu $d(CG)_3$ [30], rzeczywiście odpowiada strukturze obecnej w roztworze [31–34]. Dlatego też wydaje się ona szczególnie dobrym modelem do obliczeń teoretycznych. Niestety, w ramach żadnego podejścia nie udało się uzyskać efektu odwrócenia widma [7, 35, 36]. Zastosowanie w obliczeniach współrzędnych dyfrakcyjnych formy Z-DNA prowadzi bowiem do dobrej zgodności z widmem doświadczalnym, ale formy prawoskrętnej. Szczególny problem stanowi ujemne maksimum w rejonie 295 nm, którego istnienia nie przewiduje żadna z teorii bez względu na używany zestaw parametrów dla przejść $\pi \rightarrow \pi^*$. Wyjaśnieniem takiego stanu rzeczy może być założenie, że sygnał ten odpowiada przejściu prostopadłemu $n \rightarrow \pi^*$. Przejścia takie z reguły nie są uwzględniane w obliczeniach; z jednej strony, z powodu wysokiego stopnia niepewności związanego z ich określeniem, z drugiej zaś, z powodu minimalnego wpływu na kształt widm polinukleotydów w bliskim ultrafiolecie [18, 37]. Jednak chociaż pominięcie ich nie ma istotnego wpływu na widma



Rys. 3. Widma CD poli[d(CG)] w obecności 0,1 M (linia ciągła) i 3 M NaCl (linia przerywana)

CD formy prawoskrętnej, to niekoniecznie tak samo musi być w przypadku formy lewoskrętnej. Badania Z-DNA przy użyciu spektroskopii w podczerwieni i ramanowskiej wykazały istnienie w cytozynie przejścia $n \rightarrow \pi^*$ w rejonie 280–300 nm związanego z tlenem karbonylowym O2 [38], co bardzo dobrze zgadza się z przewidywaniami teoretycznymi, lokalizującymi właśnie na tym atomie orbital niewiążący o najwyższej energii [39]. Przejście to może się ujawnić w przypadku formy lewoskrętnej, ponieważ atomy tlenu O2 kolejnych cytozyn położone są w niej bardzo blisko osi helisy i prawie dokładnie jeden nad drugim [30]. Takie ułożenie powoduje, że odległości między dipolami przejść prostopadłych są niewielkie, co sprzyja ich sprzęganiu się, dając prawdopodobnie efekt spektralny w postaci wspomnianego ujemnego maksimum w 295 nm. Fakt ten nie jest jednak wykorzystywany wprost w obliczeniach teoretycznego widma Z-DNA, a w dyskusjach pojawia się raczej jako jedna z możliwości, którą należałoby uwzględnić, aby uzyskać efekt inwersji [36].

2.5. DYSKUSJA

Pierwszym warunkiem, który musi spełniać każda teoria, mająca na celu powiązanie właściwości optycznych cząsteczki z jej właściwościami geometrycznymi, jest zdolność do odtwarzania, z rozsądną dokładnością, widm doświadczalnych cząsteczek o znanej strukturze przestrzennej. Dlatego też w badaniach kwasów nukleinowych podstawę obliczeń stanowią z reguły współrzędne atomowe uzyskane z pomiarów dyfrakcyjnych zorientowanych włókien i pojedynczych

kryształów DNA i RNA. Podejście takie opiera się na założeniu, że struktury kwasów nukleinowych w roztworze i w stanie stałym są takie same. Nie zawsze jednak jest ono słuszne, czego przykładem może być forma C-DNA. Została ona opisana dla włókien DNA, jako struktura występująca przy niskiej względnej wilgotności, 44–66%. Jej charakterystyczne cechy to: przesunięcie osi helisy w kierunku małej bruzdy, średnio 9,33 zasady na skręt, oraz nachylenie płaszczyzny pary komplementarnej w stosunku do osi wynoszące ok. -8° [10]. Zastosowanie współrzędnych krystalograficznych pozwoliło uzyskać widma teoretyczne o charakterze zbliżonym do eksperymentalnych widm DNA w wysokim stężeniu soli, np. 4,5 M LiCl [37], ale zgodność ta okazała się pozorna. Późniejsze badania zakwestionowały występowanie formy C-DNA w roztworze, pokazały bowiem, że w takich warunkach podstawowe parametry geometryczne helisy wciąż odpowiadają strukturze typu B-DNA [40, 41].

Generalnie, problem stosowalności współrzędnych stanu stałego w odniesieniu do struktur obecnych w roztworze dotyczy w większej mierze DNA niż RNA. Konformacja DNA silniej bowiem zależy od sekwencji i warunków środowiska, wykazując znacznie większą zmienność. Wrażliwość widm teoretycznych DNA na bardzo małe zmiany w ułożeniu zasad, np. w formach Z' , Z_I , Z_{II} [35], sugeruje, że nawet niewielkie różnice między strukturą kryształu a tą obecną w roztworze mogą wpływać na dopasowanie widm teoretycznych do realnie obserwowanych.

Niewątpliwie zasadnicze znaczenie dla wiarygodności interpretacji widm CD mają poprawne parametry przejść: wielkość i kierunek dipoli dla przejść $\pi \rightarrow \pi^*$ oraz polaryzowalności dla wiązań generujących przejścia w dalekim ultrafiolecie. Metodą szczególnie wrażliwą na wybór parametrów dla tych ostatnich jest metoda macierzowa [7, 36]. Z kolei przejścia prostopadłe do płaszczyzny zasad są standardowo pomijane, jako bardzo niepewne, przez wszystkie metody obliczeniowe. Reguła ta może być jednak w pewnych warunkach źródłem istotnego błędu, jak to prawdopodobnie się dzieje w przypadku lewoskrętnego dupleksu czyli Z-DNA.

Oprócz geometrii i parametrów przejść, także zastosowana w obliczeniach efektywna stała dielektryczna ma znaczenie dla stopnia dopasowania między widmami teoretycznymi i doświadczalnymi [36]. Uwzględnienie tej wielkości jest niezbędne przy szacowaniu energii oddziaływania przez przestrzeń między dipolami przejść indukowanymi na różnych zasadach. Z reguły przyjmuje się stałą jej wartość dla wszystkich sprzężeń. Najczęściej jest to wartość 2,0, chociaż zdarza się nawet 4,0 [7, 11, 18, 27]. W ciekawym podejściu zaproponowanym przez Callahana i wsp. [35] efektywna stała dielektryczna zmienia się periodycznie od 0,0 do 4,0, w zależności od odległości dzielącej sprzęgające się dipole. Chociaż to ostatnie rozwiązanie wydaje się bardziej rozsądne z fizycznego punktu widzenia, nie zmienia faktu, że wartość zakładanej stałej dielektrycznej pozostaje zawsze w jakimś stopniu dowolna.

PODSUMOWANIE

Pierwotną przyczyną rozwoju teoretycznej interpretacji widm CD kwasów nukleinowych była potrzeba uzyskania informacji o absolutnej konformacji przyjmowanej przez nie w roztworze. Ponieważ kształt widma CD w bezpośredni sposób zależy od tej konformacji, rozsądne wydawało się założenie, że przy stale rosnącej sile obliczeniowej komputerów uda się na jego podstawie otrzymać potrzebne parametry geometryczne. Analizowany system okazał się jednak zbyt złożony i zawierający zbyt wiele zmiennych, których wariacje należałoby systematycznie uwzględniać w procesie dopasowywania wyników teoretycznych do doświadczalnych. Dlatego też interpretacja taka nigdy właściwie nie wyszła poza próby uzgodnienia widm przewidywanych przez teorię z realnie obserwowanymi widmami dobrze opisanych struktur, jak np. Z-DNA. Od obowiązku dostarczania absolutnych danych strukturalnych uwolnił metodę CD gwałtowny rozwój magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR), pozwalającego na uzyskiwanie informacji o wartości porównywalnej z wynikami krystalograficznymi.

Niezaprzeczalną korzyścią płynącą z teoretycznych analiz widm CD kwasów nukleinowych było powiązanie pewnych zmian parametrów helikalnych z konkretnymi efektami spektralnymi, dające w rezultacie pełniejsze zrozumienie zjawisk odpowiedzialnych za powstawanie widm o określonym kształcie. Chociaż bowiem pierwotny cel tych analiz nie został osiągnięty, to spektroskopia CD jako metoda badań strukturalnych kwasów nukleinowych nie odeszła w zapomnienie. Zamiast jednak przybliżonej informacji absolutnej dostarcza teraz dokładnych danych o zmianach konformacyjnych. Ma tu zastosowanie generalny wniosek wynikający z rozważań teoretycznych o nierozzerwalnym związku między kształtem widma CD i konformacją przyjmowaną przez DNA czy RNA w roztworze. Ponieważ konformacja ta bardzo silnie zależy od warunków środowiska, takich jak siła jonowa czy temperatura, badanie wpływu tych czynników na widma CD dostarcza istotnych informacji na temat zachodzących w niej zmian. Równie ważnym zastosowaniem spektroskopii dichroizmu kołowego kwasów nukleinowych jest przybliżona identyfikacja określonych struktur. Dokonuje się jej przez porównanie widm polinukleotydu o nieznannej konformacji z widmami, dla których dokonano już korelacji z wynikami uzyskanymi takimi metodami, jak NMR i metody rentgenostrukturalne. W ten sposób można np. stwierdzić, czy badany polinukleotyd przyjmuje strukturę trypleksu albo tetrapleksu.

Obecnie głównie dwie cechy spektroskopii CD powodują, że zainteresowanie nią nie słabnie zarówno w badaniach kwasów nukleinowych, jak i innych biomolekuł. Pierwszą jest niezwykła wrażliwość widm na zmiany konformacyjne, drugą natomiast – niewielkie wymagania odnośnie do ilości potrzebnej materii i prostota samego pomiaru. Nie wyklucza się jednak, że wciąż rosnąca moc obliczeniowa komputerów umożliwi w przyszłości jednoczesne uwzględnienie wszystkich parametrów określających konformację helisy, a także przejść prosto-

padłych do płaszczyzny zasad. Mogłoby to spowodować powrót idei uzyskiwania na podstawie widm CD danych o charakterze absolutnym. Wspomniana wcześniej technika NMR obarczona jest bowiem istotnymi ograniczeniami wynikającymi z samej istoty wykorzystywanego w niej zjawiska, a więc niemożliwymi do ominięcia. Jeżeli badana sekwencja nukleotydowa jest zbyt homogenna, np. zawiera długi ciąg identycznych reszt nukleotydowych, to niemożliwe staje się rozróżnienie sygnałów pochodzących od kolejnych zasad, a w konsekwencji – rozwiązanie struktury. W przypadkach, gdy można tego rozróżnienia dokonać i odległości zostają określone, wciąż pozostaje jeszcze konieczność założenia określonego modelu strukturalnego, do którego ewentualnie będą one pasować. Można sobie zatem wyobrazić, że dalszy rozwój teoretycznej interpretacji widm CD wypełni istniejące luki w określaniu struktury kwasów nukleinowych w roztworze.

Podziękowania

Wyrazy wdzięczności za wnikliwą analizę prezentowanego materiału składam Profesorowi Wojciechowi Stecowi.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] R.E. Dickerson, *Scientific American*, 1983, **249**, 94.
- [2] W.C. Johnson Jr., I. Tinoco Jr., *Biopolymers*, 1969, **7**, 727.
- [3] J.G. Kirkwood, *J. Chem. Phys.*, 1937, **5**, 479.
- [4] N.N.H. Teng, M.S. Itzkowitz, I. Tinoco Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, 1971, **93**, 6257.
- [5] D.S. Moor, T.E. Wagner, *Biopolymers*, 1974, **13**, 977.
- [6] P.M. Bayley, E.B. Nielsen, J.A. Schellman, *J. Phys. Chem.*, 1969, **73**, 228.
- [7] V. Rizzo, J.A. Schellman, *Biopolymers*, 1984, **23**, 435.
- [8] J.A. Shellman, W.J. Becktel, *Biopolymers*, 1983, **22**, 171.
- [9] G.E. Schultz, R.H. Schirmer, *Principles of Protein Structure*, Springer-Verlag, New York 1979, s. 18.
- [10] W. Saenger, *Nucleic Acids Structure*, Springer-Verlag, New York 1984.
- [11] L.C. Cech, W. Hug, I. Tinoco Jr., *Biopolymers*, 1976, **15**, 131.
- [12] H. DeVoe, *J. Chem. Phys.*, 1965, **43**, 3199.
- [13] C. Rosini, M. Zandomeneghi, P. Salvadori, *Tetrahedron*, 1993, **4**, 545.
- [14] D.W. Miles, L.B. Townsend, M.J. Robins, R.K. Robins, W.H. Inskip, H. Eyring, *J. Am. Chem. Soc.*, 1971, **93**, 1600.
- [15] D.W. Miles, M.J. Robins, R.K. Robins, M.W. Winkley, H. Eyring, *J. Am. Chem. Soc.*, 1969, **91**, 831.
- [16] D.W. Miles, S.J. Hahn, R.K. Robins, M.J. Robins, H. Eyring, *J. Phys. Chem.*, 1968, **72**, 1483.
- [17] D.S. Moore, *Biopolymers*, 1980, **19**, 1017.
- [18] A.L. Williams Jr., D.S. Moore, *Biopolymers*, 1983, **22**, 755.
- [19] S. Arnott, D.W.L. Hukins, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1972, **47**, 1504.
- [20] D.A. Marvin, M. Spencer, M.H.F. Wilkins, L.D. Hamilton, *J. Mol. Biol.*, 1961, **3**, 547.
- [21] S. Arnott, D.W.L. Hukins, S.D. Dover, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1972, **47**, 1392.
- [22] M. Chamberlin, R. Baldwin, P. Berg, *J. Mol. Biol.*, 1963, **7**, 334.

- [23] I. Tinoco Jr., *J. Chim. Phys.*, 1968, **65**, 91.
- [24] D.S. Studdert, R.C. Davis, *Biopolymers*, 1974, **13**, 1377.
- [25] D.S. Moore, T.E. Wagner, *Biopolymers*, 1973, **12**, 201.
- [26] D.M. Gray, I. Tinoco Jr., *Biopolymers*, 1970, **9**, 223.
- [27] C.L. Cech, I. Tinoco Jr., *Biopolymers*, 1977, **16**, 43.
- [28] S.B. Zimmerman, G.H. Cohen, D.R. Davies, *J. Mol. Biol.*, 1975, **92**, 181.
- [29] F.M. Pohl, T.M. Jovin, *J. Mol. Biol.*, 1972, **67**, 375.
- [30] A.H.J. Wang, G.J. Quigley, F.J. Kolpak, J.L. Crawford, J.H. Van Boom, G. Van der Marel, A. Rich, *Nature*, 1979, **282**, 680.
- [31] D.J. Patel, L.L. Canuel, F.M. Pohl, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1979, **76**, 2508.
- [32] D.G. Gorenstein, B.A. Luxon, E.M. Goldfield, K. Lai, D. Vegeais, *Biochemistry*, 1982, **21**, 580.
- [33] D.J. Patel, S.A. Kozłowski, A. Nordheim, *A. Rich. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1982, **79**, 1413.
- [34] T.J. Thamann, L.C. Lord, A.H.J. Wang, A. Rich, *Nucleic Acids Res.*, 1981, **9**, 5443.
- [35] D.E. Callahan, T.M. Hooker Jr., *Biopolymers*, 1987, **26**, 457.
- [36] P. Richterich, F.M. Pohl, *Biopolymers*, 1987, **26**, 231.
- [37] D.S. Studdert, R.C. Davis, *Biopolymers*, 1974, **13**, 1391.
- [38] L. Chinsky, B. Jolles, A. Laigle, P.Y. Turpin, J. Taboury, E. Taillander, *Biopolymers*, 1984, **23**, 1931.
- [39] W. Hug, I. Tinoco Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, 1974, **96**, 665.
- [40] C.Y. Chen, B.H. Pfeiffer, S.B. Zimmerman, S. Hanlon, *Biochemistry*, 1983, **22**, 4746.
- [41] S.R. Fish, C.Y. Chen, G.J. Thomas Jr., S. Hanlon, *Biochemistry*, 1983, **22**, 4751.

Praca wpłynęła do Redakcji 3 lipca 2001

**UREAZY:
ZNACZENIE, WŁAŚCIWOŚCI, KATALIZA**

**UREASES:
ROLES, PROPERTIES, CATALYSIS**

Barbara Krajewska

*Wydział Chemii, Uniwersytet Jagielloński
ul. Ingardena 3, 30-060 Kraków
e-mail: krajewsk@chemia.uj.edu.pl*

Abstract
Krótka historia
Reakcja katalityczna ureazy
Znaczenie biologiczne ureaz
Właściwości kinetyczne ureaz
Struktura białkowa ureaz
Centrum aktywne ureazy
Mechanizm katalityczny ureazy
Inhibicje ureazy
Podsumowanie
Piśmiennictwo cytowane

*Artykuł ten dedykuję Profesorowi dr. hab. Maciejowi Leszce,
byłemu Kierownikowi Zakładu Chemii Ogólnej
Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego*

Dr Barbara Krajewska jest adiunktem w Zakładzie Chemii Ogólnej Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Jej zainteresowania naukowe skupiają się na procesach zachodzących w i na membranach polimerowych z immobilizowanymi enzymami. Obecnie bada enzym ureazę w formie natywnej i immobilizowanej, jego właściwości i inhibicje, do wykorzystania w medycynie, ochronie środowiska i rolnictwie.

ABSTRACT

Urea is a ubiquitous compound in nature. It is formed in large amounts as the end product of the catabolism of nitrogen-containing compounds by most of the terrestrial animals, and used in agriculture as the most common fertilizer. If it were not for its enzymatic hydrolysis that is 10^{14} times faster than the nonenzymatic degradation, urea would rapidly accumulate in nature causing serious environmental problems. The hydrolysis of urea is catalyzed by urease (urea amidohydrolase EC 3.5.1.5) [1], an enzyme widely distributed in bacteria, fungi, algae, some invertebrates and higher plants, the first enzyme ever crystallized (1926) [2] and the first one shown to contain nickel in its active site (1975) [3]. The products of the hydrolysis are ammonia and carbamate, the latter spontaneously decomposing to ammonia and carbonic acid in an uncatalyzed reaction. The products generate an increase in pH. Despite extensive research to date the mechanism of urease action has not been fully elucidated [25a, 55a].

The negative effects of both ammonia and the reaction-generated increase in pH brought about by urease activity have profound medical and agricultural implications [54]. Several ureolytic bacteria have been recognized as pathogenic factors in human/animal infections of urinary and gastrointestinal tracts. In the former they are involved in the urinary stone formation, catheter encrustation and pyelonephritis, and in the latter in chronic active gastritis, peptic ulcers, both caused by *Helicobacter pylori*, and in hepatic coma. In agriculture urease is essential for converting urea-based fertilizers to utilizable ammonia. Too rapid a hydrolysis, however, results both in plant damage by ammonia toxicity and in the alkalization of soil and finally in the loss of nitrogen by ammonia volatilization, thus creating severe environmental and economic problems. To combat these undesirable ureolytic effects the use of urease inhibitors has been proposed. Final elucidation of the structure of the urease active site and of its catalytic mechanism will substantially facilitate the design of effective urease inhibitors at a molecular level, thus replacing tedious kinetic screening.

This paper summarizes the established knowledge on urease and reviews the recent findings on the enzyme.

KRÓTKA HISTORIA

Ureaza (amidohydrolaza mocznikowa EC 3.5.1.5), enzym o ogromnym znaczeniu w medycynie, rolnictwie i zastosowaniach analitycznych, ma długą i ciekawą historię. Wyznaczają ją następujące wydarzenia naukowe: w 1889 r. enzym rozpoznany jako katalizator przemiany mocznika w amoniak otrzymuje nazwę ureaza [1], w 1926 r. James Sumner wyodrębnia ureazę w postaci krystalicznej [2], w 1975 r. Dixon i wsp. wykazują obecność w centrum aktywnym ureazy jonów Ni(II) [3], w 1988 r. Takishima i wsp. ustalają sekwencję aminokwasową ureazy [4], w 1995 r. Jabri i wsp. określają strukturę krystaliczną i budowę centrum aktywnego enzymu [5], a w latach 1998–2001 Benini i wsp. określają struktury krystaliczne kompleksów ureazy z wybranymi inhibitorami [6–9]. 75 lat od wyodrębnienia enzymu. wypełnionych ogromną liczbą badań nie zamknęło jednak historii ureazy – do dziś nie ma zgody, jak wygląda mechanizm katalityczny enzymu.

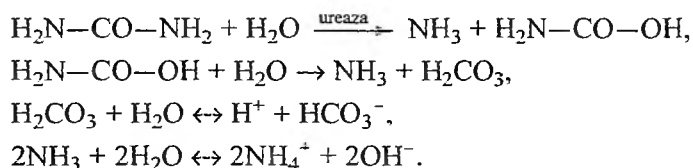
Dwa z tych wydarzeń, krystalizacja oraz wykrycie niklu, wpisują ureazę w poczet substancji o historycznym znaczeniu w rozwoju biochemii. Ureaza z nasion kanawalii mieczokształtnej (*Canavalia ensiformis*), rośliny strączkowej znanej w literaturze pod nazwą angielską *jack bean*. była pierwszym w historii enzymem otrzymanym w postaci krystalicznej, co dowiodło, że enzymy mają budowę białkową. Dokonanie Sumnera z 1926 r. [2], początkowo przyjęte ze sceptycyzmem, w pełni uznano dopiero w 1946 r., przyznając uczonemu Nagrodę Nobla. Ureaza z *jack bean* była również pierwszym w historii białkiem, w którym stwierdzono obecność niklu [3]. Odkrycie to wykazało biologiczną aktywność tego metalu – do tego czasu bowiem uważano, że nikiel, oprócz swojej toksyczności dla organizmów żywych [10–12], nie ma znaczenia biologicznego. Ze względu na to, że toksyczność niklu polega przynajmniej częściowo na jego łączeniu się z DNA i w konsekwencji na wywoływaniu zmian mutagenetycznych, znalezienie Ni jako śladowego pierwiastka odgrywającego istotną rolę w biologii bakterii, grzybów, alg i roślin wyższych było zdumiewające. Otworzyło ono nową dziedzinę określaną jako chemia bionieorganiczna niklu. Obecnie znanych jest 7 enzymów zawierających nikiel: ureaza, hydrogenaza, reduktaza metylokoenzymu M, dehydrogenaza tlenku węgla, syntaza acetylokoenzymu A, dysmutaza ponadtlenkowa i glioksaza I. Ich omówienie i prace źródłowe znaleźć można w przeglądowych artykułach [13–25a]. Z wyjątkiem ureazy i glioksazy I, ostatnio odkrytej liazy [26], wszystkie pozostałe enzymy uczestniczą w reakcjach redoks. Ureaza jest natomiast jedyną znaną hydrolazą niklową i dlatego właśnie nikiel(II) jest jej częścią, a nie występujący często w hydrolazach cynk(II) [27], pozostaje nadal niewyjaśnione.

W historii badań nad ureazą wyodrębnić można dwa okresy: 1) badań nad ureazami roślinnymi, rozpoczętych przez Sumnera w 1926 r. krystalizacją ureazy z *jack bean* [2], na które składają się głównie pionierskie prace Sumnera [2, 28, 29], dalej Kistiakowsky'ego i wsp. [30–35] i Zenera i wsp. [3, 36–45] oraz

2) późniejszych badań nad ureazami bakteryjnymi, rozpoczętych przez Larsona i Kallio w 1954 r. wyodrębnieniem pierwszej ureazy z bakterii *Bacillus pasteurii* [46], badań do których należą prace Hausingera i wsp. nad ureazą z bakterii *Klebsiella aerogenes* [5, 47–55a] i ostatnio prace Beniniego i wsp. nad ureazą z bakterii *Bacillus pasteurii* [6–9, 56–58].

REAKCJA KATALITYCZNA UREAZY

Ureaza katalizuje reakcję hydrolizy mocznika do amoniaku i kwasu karbaminowego [43], który następnie ulega spontanicznemu rozkładowi do drugiej cząsteczki amoniaku i kwasu węglowego. Uwolniony kwas węglowy i 2 cząsteczki amoniaku w roztworze wodnym pozostają w równowadze ze swoimi jonami, co powoduje, że sumaryczna reakcja podnosi pH środowiska [55]:



Reakcja enzymatyczna jest pozornie prosta, ale w istocie aktywacja i hydroliza wiązania amidowego nie są zadaniem trywialnym. Z powodu wysokiej energii rezonansowej (30–40 kcal/mol) [50] mocznik jest związkiem bardzo trwałym, a ponadto formy rezonansowe mocznika zmniejszają elektrofilowość jego węgla karbonyłowego, sprawiając, że jest on mniej podatny na atak nukleofilowy [50, 59]. Nieenzymatycznej hydrolizy mocznika nigdy nie zaobserwowano [37]. Na sposób nieenzymatyczny mocznik ulega powolnemu rozpadowi w reakcji eliminacji do amoniaku i kwasu cyjanowego z czasem półtrwania 3,6 roku niezależnie od pH w zakresie 2–12 [37, 41]. Reakcja ta jest 10^{14} razy wolniejsza od hydrolizy katalizowanej przez ureazę [36].

ZNACZENIE BIOLOGICZNE UREAZ

Mocznik jest głównym azotowym produktem końcowym przemiany materii większości zwierząt i dlatego jest on związkiem występującym powszechnie w glebach, wodach i innych częściach środowiska naturalnego [54, 55]. Nieenzymatyczny rozkład mocznika jest powolny [36, 37], co oznacza, że bez innego skutecznego sposobu degradacji nastąpiłaby w przyrodzie jego szybka akumulacja, prowadząc do poważnych problemów środowiskowych [58]. Przypuszcza się, że szerokie rozpowszechnienie ureazy jest przynajmniej częściowo odpowiedzią przyrody na „wszechobecność” mocznika [60]. Ureaza występuje w wielu bakteriach, grzybach, niektórych bezkręgowcach, algach i roślinach wyższych

[16, 29, 54, 55, 61] oraz w glebie jako tzw. ureaza glebowa [62–64]. Dzięki temu rozpowszechnieniu odgrywa ważną rolę w obiegu azotu w przyrodzie. Dla bakterii hydroliza mocznika stanowi główne źródło pozyskiwania azotu do wzrostu [29, 60]. Rośliny natomiast nie przyswajają mocznika i rola, jaką w nich odgrywa ureaza, nie jest dokładnie określona – przypuszcza się, że enzym służy roślinie do pozyskiwania azotu z mocznika powstałego w przemianach katabolicznych związków azotowych: ureidów, guanidyn i puryn [61, 65, 66] lub do użycia azotu z zasobów mocznika zakumulowanych w roślinie w okresie kiełkowania [67]. Spośród roślin wyższych szczególnie wysoką zawartością ureazy charakteryzują się rośliny strączkowe [29]. Najbogatsze w ureazę są nasiona kanawalii mieczokształtnej (ang. *jack bean*), rośliny użytkowej z rodziny bobowatych, w których enzym stanowi 0,15% suchej masy, i dlatego są one tradycyjnie najlepszym źródłem otrzymywania ureazy. Nasiona soi zawierają natomiast 0,012% ureazy.

Wśród bakterii ureolitycznych szczególne zainteresowanie budzą bakterie patogenne dla ludzi i zwierząt. Kolonizują się one łatwo w tych organizmach ze względu na dostępność mocznika. U ssaków mocznik produkowany jest w wątrobie, z krwią przenoszony do nerek, skąd wydalany jest z moczem [60, 68]. Dorosły człowiek wydalą ok. 10 kg mocznika rocznie. Stężenie mocznika w osoczu zdrowego człowieka wynosi 1–10 mM, a w moczu ok. 0,5 M [68]. Około 20–25% wyprodukowanego w organizmie mocznika pozostaje niewydalone z organizmu i zatrzymane głównie w przewodzie pokarmowym. Mocznik jest również wydzielany w organizmie przez gruczoły zewnątrzwydzielnicze w stężeniach równych stężeniu w osoczu i zatrzymywany jest głównie w komórkach nabłonka. W konsekwencji organizm ludzki pozostaje stale „nasycony” mocznikiem, będącym stale pożywką dla naturalnej flory bakteryjnej lub dla bakterii infekujących organizm. Patogennymi czynnikami infekcji są amoniak i wzrost pH środowiska [68]. W organizmie ludzkim głównymi miejscami infekcji bakteriami ureolitycznymi są drogi moczowe i przewód pokarmowy [54, 60, 68].

Infekcja dróg moczowych powoduje alkalizację normalnie obojętnego lub lekko kwaśnego moczu, sprzyjającą wytrąceniu osadów struwitu $MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$ i apatyty węglanowego $Ca_{10}(PO_4)_6CO_3$ z wodorofosforanów i kwasu węglowego. Osady te tworzą kamienie moczowe [60, 68–70], które stanowią ok. 15–20% kamieni tworzących się chorobowo. Bakterie inkorporują się w kamieniach, które w ten sposób stanowią dla nich osłonę przed antybiotykami, co utrudnia leczenie. Bakterie głównie odpowiedzialne za tworzenie się kamieni to w pierwszej kolejności *Proteus mirabilis*, a dalej bakterie ze szczepów *Pseudomonas*, *Klebsiella* i *Staphylococcus* [68, 70]. Ze względu na fakt, że miejscem łatwej infekcji tymi bakteriami są również cewniki moczowodowe, może dochodzić do ich zasklepienia z powodu krystalizacji tych kamieni [54]. Również wydzielający się w zainfekowanych drogach moczowych amoniak może przez uszkodzenie tkanki nerkowej być przyczyną ostrego zapalenia miedniczek nerkowych [54].

Główną ureolityczną bakterią chorobotwórczą w infekcjach przewodu pokarmowego jest *Helicobacter pylori*. Bakteria ta znana zaledwie od 1982 r. należy obecnie do najintensywniej badanych organizmów [71, 72]. *Helicobacter pylori* kolonizuje się w warstwie śluzu wyścielającego nabłonek żołądka. W miejscu kolonizacji wydzielający się z hydrolizy mocznika amoniak podwyższa pH silnie kwaśnego środowiska, co po pierwsze pozwala bakterii, wzrastającej jedynie w pH = 6–8, na przetrwanie, a po drugie niszczy nabłonek żołądka. Powoduje to trwający latami chroniczny stan zapalny, który może być początkiem wrzodu żołądka, a w dalszej kolejności nowotworu [60, 68, 71, 73]. Infekcje przewodu pokarmowego bakteriami ureolitycznymi przyczyniają się również do śpiączki wątrobowej [54] z powodu wzrostu stężenia toksycznego amoniaku we krwi, który niezmetyabolizowany przez wątrobę przeniesiony został do mózgu.

Obecność ureazy w glebach z kolei jest zjawiskiem o kapitalnym znaczeniu dla rolnictwa [62, 63, 74]. Aktywność ureolityczna gleb pochodzi od mikroorganizmów (grzybów i bakterii) [64, 75], ale przede wszystkim od ureazy glebowej [62]. Ureaza glebowa jest pozostałością obumarłych komórek mikroorganizmów i roślin i występuje najczęściej jako enzym pozakomórkowy, który swoją trwałość zawdzięcza immobilizacji na organicznych i mineralnych koloidach gleby [76–78]. Obecność ogromnych ilości tej trwałej formy ureazy w glebie pozwala na powszechne używanie mocznika jako nawozu. Szczególne właściwości fizykochemiczne, takie jak wysoka zawartość azotu w cząsteczce, dobra rozpuszczalność w wodzie oraz niskie koszty produkcji i łatwość oraz bezpieczeństwo użycia [62], sprawiają, że mocznik jest i, jak się wydaje, pozostanie najpowszechniej stosowanym nawozem sztucznym. Azot z mocznika staje się jednak przyswajalny przez rośliny dopiero po przekształceniu w amoniak w reakcji hydrolizy i jeśli ta zachodzi zbyt szybko, to stanowi poważne zagrożenie dla plonów i środowiska. Mianowicie, wytworzone nadmierne ilości amoniaku, akumulując się w glebie, powodują jej alkalizację oraz wywołują zmiany patologiczne w roślinach, a ponadto w rezultacie może dojść do ulatniania się amoniaku z gleby, co czyni nawożenie nieekonomicznym [62, 63, 74].

Jedną z rozważanych strategii kontroli aktywności ureazy zarówno w terapiach chorób wywołanych przez bakterie ureolityczne, jak i w rolnictwie po zastosowaniu nawozów mocznikowych jest użycie inhibitorów ureazy [58, 62, 69, 70, 74] (zob. rozdz. „Inhibicje ureazy”). Jak dotąd poszukiwania inhibitorów enzymu oparte były na seryjnych testach kinetycznych [79–81]. Skuteczność tych poszukiwań poprawi się radykalnie, gdy opracowany zostanie mechanizm katalityczny ureazy, co umożliwi projektowanie molekularne struktur enzym-inhibitor. Służy temu ogromna liczba wykonywanych w ostatnich latach badań i widoczny postęp w tym zakresie.

Ureaza ma również duże zastosowanie praktyczne. Stosuje się ją wszędzie tam, gdzie potrzebny jest rozkład mocznika, a więc: 1) do ilościowego oznaczania mocznika w postaci amoniaku, 2) jako część aktywna biosensorów na mocznik [82–87], 3) w sztucznej nerce do usuwania mocznika z krwi lub dializatu

[88–91] i 4) do oczyszczania ścieków i wód z mocznika m.in. w załogowych stacjach kosmicznych [92]. Najnowszym polem zastosowania ureazy są sensory do oznaczania stężeń substancji będących jej inhibitorami w oparciu o pomiar spadku aktywności enzymu wywołanego inhibicją [93–97].

WŁAŚCIWOŚCI KINETYCZNE UREAZ

W tab. 1 podano charakterystykę kinetyczną wybranych ureaz: stałe Michaelisa K_M , aktywności i optima pH. Wartości K_M dla większości ureaz wynoszą 1–4 mM i, jak wykazano dla ureazy z *jack bean* [39, 98, 120, 121] i ureaz bakteryjnych [47, 107], są one praktycznie niezależne od pH. Natomiast aktywność ureaz silnie zależy od pH – ureazy są aktywne w pH ok. 5–10 [28, 39, 47, 105, 107, 122–124] z optimum przypadającym najczęściej w granicach 7–8, zależnie

Tabela 1. Właściwości kinetyczne wybranych ureaz

Ureazy	K_M^a [mM]	Aktywność ^a	pH _{opt} ^a	Literatura
		$\left[\frac{\mu\text{mol mocznika}}{\text{min} \cdot \text{mg}} \right]$		
Rośliny:				
<i>Canavalia ensiformis</i>	2,9–3,6	2700–3500; 16,5	7,14–7,25	[39, 42, 98, 121, 123, 182]
Bakterie:				
<i>Aerobacter aerogenes</i>	2,8	–	7,5	[100]
<i>Arthobacter oxydans</i>	12,5	–	7,6	[99]
<i>Bacillus pasteurii</i>	235 ^b	1960	8,0	[75, 101]
<i>Brevibacterium ammoniagenes</i>	32	3570	7	[102]
<i>Helicobacter pylori</i>	0,2–0,8	1700; 19	8,0–8,2 ^c	[103–106, 143]
<i>Klebsiella aerogenes</i>	2,4	2500	7,75	[47, 48]
<i>Proteus mirabilis</i>	13	2000	7,5	[107]
<i>Providencia rettgeri</i>	10,5	30,6	7,5	[108]
<i>Providencia stuartii</i>	9,3	7100	–	[109]
<i>Selenomonas ruminantium</i>	2,2	1100	8,0	[110]
<i>Staphylococcus xylosus</i>	–	1573	7,2	[111]
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	2,5	180000	6,9–7,5	[112, 113]
Grzyby:				
<i>Aspergillus nidulans</i>	1,33	670	8,5	[114]
<i>Aspergillus niger</i>	3,0	1341	8,0	[115]
<i>Coccidioides immitis</i>	4,1	1750	8,0	[116a]
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1,03	700–800	8,0	[116]
Algi:				
<i>Nitellopsis obtusa</i>	4,5	–	–	[117]

^a W porównaniu tych wartości należy pamiętać, że zależą one od stopnia oczyszczenia enzymu oraz od warunków oznaczania, tj. temperatury, rodzaju buforu, jego składu, stężenia i pH.

^b Autorzy [75] podają, że wysoka w porównaniu z innymi ureazami wartość K_M wynika z obecności siarczynu w mieszaninie reakcyjnej.

^c Prace [105, 118, 119] podają, że ureaza z *Helicobacter pylori* ma dwa optima pH: ok. 5 i 8

od buforu. Dla ureazy z *jack bean* zależność aktywności enzymu od pH wykazuje dwa maksima, jedno dobrze wykształcone w pH ok. 7 i drugie słabiej wykształcone w pH ok. 4–5 [39], często w badaniach ignorowane. Zależność ta ujawnia udział w reakcji katalitycznej trzech grup funkcyjnych enzymu o $pK_a \approx 3,0, 6,25$ i $9,0$. Dla ureaz bakteryjnych zaobserwowano natomiast prosty „dzwonowy” kształt profilu aktywności w funkcji pH o optimum $pH = 7,5-7,75$ [47, 107, 122]. Kształt ten wskazuje na uczestnictwo w reakcji katalitycznej grupy zasadowej i kwasowej o $pK_a \approx 6,5$ i ≈ 9 [47]. W badaniach ureazy z *Klebsiella aerogenes* wartość $pK_a \approx 6,5$ przypisano His320 [125]. Autorzy tych prac wykazali ostatnio [126], że ten prosty profil aktywności jest wypadkową dwóch maksimów aktywności: jednego dominującego w $pH = 8$, któremu odpowiadają wartości $pK_a \approx 6,9$ i $9,1$, i drugiego w $pH = 5$, któremu odpowiadają $pK_a \approx 4,5$ i $6,3$, co sugeruje udział w reakcji katalitycznej ureazy czterech grup funkcyjnych enzymu.

Do 1965 r., kiedy Fishbein i wsp. zaobserwowali, że substratem ureazy jest również hydroksymocznik [127], uważano, że ureaza jest enzymem absolutnie specyficznym. Listę poznanych substratów ureazy przedstawia tab. 2. Wśród nich wyróżniają się dwie zasadnicze grupy: analogi mocznika oraz amidowe i estrowe pochodne kwasu fosforowego [37, 133]. Reakcja ureazy z substratami innymi niż mocznik jest złożona, ponieważ w większości substancje te są dla enzymu zarówno substratami, jak i inhibitorami (zob. rozdz. „Inhibicje ureazy”).

Tabela 2. Substraty ureazy

Substraty	K_M [mM]	Literatura
Mocznik $H_2N-CO-NH_2$	1–4	Tabela 1
Hydroksymocznik $H_2N-CO-NHOH$	1,25–1,6	[127]
Dihydroksymocznik $HOHN-CO-NHOH$	12,5	[129]
Semikarbazyd $H_2N-CO-NHNH_2$	60	[41]
Formamid $H_2N-CO-H$	1060; 516	[39, 130]
Acetamid $H_2N-CO-CH_3$	750; 240	[39, 121]
Tioacetamid $H_2N-CS-CH_3$	83	[121]
Tiomocznik $H_2N-CS-NH_2$	70; 210	[121, 131]
Metylomocznik $H_2N-CO-NHCH_3^a$	220; 120	[39, 132]
Etylomocznik $H_2N-CO-NHC_2H_5$	340	[132]
Karbaminian metylu $H_2N-CO-OCH_3$	490	[132]
Karbaminian etylu $H_2N-CO-OC_2H_5^a$	420	[132]
Amidy i estry kwasu fosforowego:		
amid kwasu fosforowego	–	} [37, 133]
kwas diamidofosforowy (DAP)	–	
ester fenylowy kwasu diamidofosforowego (PPD)	–	
triamid kwasu fosforowego (TPA)	–	

^a Praca [41] podaje, że związki te nie są substratami ureazy.

STRUKTURA BIAŁKOWA UREAZ

Ureazy roślinne i grzybowe mają budowę homomeryczną (składają się z jednakowych podjednostek), a bakteryjne heteromeryczną [16, 54, 55, 60].

Ureaza roślinna z fasoli *jack bean* (*Canavalia ensiformis*) jest heksamerem złożonym z identycznych podjednostek [38, 45, 134], z których każda zawiera jedno dwunikłowe centrum aktywne [3, 44]. Podjednostka enzymu składa się z 840 aminokwasów [4, 45, 135] i wobec tego jej masa, nie wliczając jonów Ni(II), wynosi 90,77 kD, a masa heksameru łącznie z 12 jonami Ni(II) 545,34 kD. Masy te dobrze odpowiadają wartościom $95 \text{ kD} \pm 5$ dla podjednostki i $590 \text{ kD} \pm 30$ dla całej cząsteczki otrzymanym wcześniej metodą sedymentacyjną [38], co potwierdziło ostatecznie heksameryczną budowę ureazy z *jack bean*. Dla porównania, podjednostka ureazy z ziaren soi (*Glycine max*) ma masę 93,5 kD i jej skład aminokwasowy jest zbliżony do składu ureazy z *jack bean* [136, 137]. Ureazy wyodrębnione z grzybów mają podjednostki o masach: ureaza z *Aspergillus nidulans* 40 kD [114], z *Aspergillus niger* 83 kD [115], z *Coccidioides immitis* 91,5 kD [138], a ze *Schizosaccharomyces pombe* 91,2 kD [139]. Chociaż ureaza z *jack bean* była pierwszym enzymem otrzymanym w formie krystalicznej [2], jej struktury krystalicznej nie udało się jak dotąd ustalić. Kryształy tej ureazy o pokroju oktaedru [2, 36, 152] zaliczone do grupy przestrzennej $F4_132$ układu regularnego [152], cechuje zbyt słaba intensywność dyfrakcji promieni rentgenowskich, by dać czytelny obraz struktury (najlepsza zanotowana rozdzielczość 3.5 \AA [152]).

Ureazy bakteryjne z wyjątkiem ureazy z *Helicobacter pylori* zbudowane są z 3 podjednostek α , β oraz γ różniących się masami: masa α 68–73 kD, masa β 8–17 kD i masa γ 8–12 kD [16, 54, 60] (rys. 1). Najczęściej cząsteczki ureaz bakteryjnych, np. z *Klebsiella aerogenes*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus pasteurii*, występują w składzie stechiometrycznym $(\alpha\beta\gamma)_3$, tj. jako trimery trimerów, a ich masy zawierają się w zakresie 190–250 kD [16, 54]. Ureazy te są cytoplazmatyczne. Dla dwóch z tych ureaz, tj. z *Klebsiella aerogenes* i *Bacillus pasteurii*, rozwiązano struktury krystaliczne. Ureazę z *Klebsiella aerogenes*, wyodrębnioną w 1987 r. [47], przebadaną strukturalnie [148] i wykrytą [152], Jabri i wsp. poddali badaniom krystalograficznym w 1995 r. [5]. Kryształy enzymu o pokroju sześcienu zaliczone do grupy przestrzennej $I2_13$ układu regularnego [152], pozwoliły osiągnąć rozdzielczość $2,2 \text{ \AA}$. Otrzymany po raz pierwszy obraz struktury enzymu i jego centrum aktywnego [5, 153] stanowił przełom w badaniach ureaz i ich mechanizmu katalitycznego. Dla ureazy z *Bacillus pasteurii* natomiast, wyodrębnionej w 1996 r. [56], zbadanej [56, 158] i wykrytą (kryształy grupy przestrzennej $P6_3 22$ układu heksagonalnego) [57], Benini i wsp. ustalili budowę krystaliczną z rozdzielczością $2,0 \text{ \AA}$ w 1999 r. [7, 58]. Wykazano, że cząsteczki tych ureaz, $(\alpha\beta\gamma)_3$, mają kształt trójkąta równobocznego oraz że zawierają 3 dwunikłowe centra aktywne, każde zlokalizowane w C-końcowej części podjednostki α , oddalone od siebie o około 50 \AA , całkowicie niezależne. Ureazę z *Helicobacter pylori* odróżniają od pozostałych ureaz bakteryjnych następujące cechy: 1) oprócz formy cytoplazmatycznej występuje ona również jako enzym, który po uwolnieniu z bakterii w pro-

ureaza roślinna z <i>jack bean</i> <i>Canavalia ensiformis</i> [4]	N— 90,77 kD —C			840 reszt
ureaza z grzybów [139] <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	91,2 kD			835 reszt
ureaza z grzybów <i>Coccidioides immitis</i> [138]	91,5 kD			839 reszt
ureaza z bakterii <i>Klebsiella aerogenes</i> [148]	γ 11,1 kD	β 11,7 kD	α 60,3 kD	101/106/567
ureaza z bakterii <i>Proteus mirabilis</i> [140]	γ 11,0 kD	β 12,2 kD	α 61,0 kD	100/109/567
ureaza z bakterii <i>Bacillus pasteurii</i> [56]	γ 11,1 kD	β 14,0 kD	α 61,4 kD	101/126/570
ureaza z bakterii [149] <i>Ureaplasma urealyticum</i>	γ 11,2 kD	β 13,6 kD	α 66,6 kD	102/121/614
ureaza z bakterii <i>Proteus vulgaris</i> [150]	γ 11,0 kD	β 12,1 kD	α 61,0 kD	100/108/567
ureaza z bakterii <i>Staphylococcus xylosum</i> [141]	γ 11,0 kD	β 15,4 kD	α 61,0 kD	98/138/571
ureaza z bakterii <i>Providencia stuartii</i> [109]	γ 9 kD	β 10 kD	α 73 kD	
ureaza z bakterii <i>Helicobacter pylori</i> [145]	β 26,5 kD		α 61,0 kD	238/569 reszt

Rys. 1. Podjednostki strukturalne ureaz

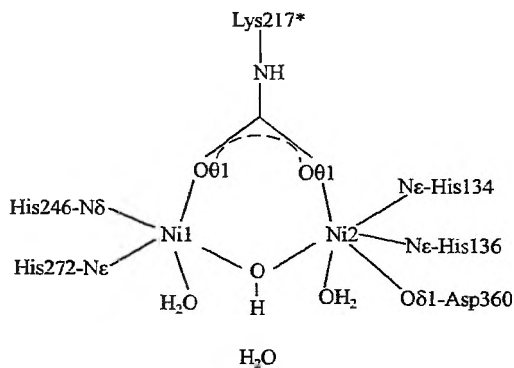
cesie zwanym „altruistyczną autolizą” zaadsorbowany jest na zewnętrznej powierzchni błony komórkowej bakterii [142] oraz że 2) zbudowana jest tylko z dwóch podjednostek: α (masa 60–66 kD) i β (masa 26–31 kD) [71, 73, 103–105, 143–145]. W 2001 r. Ha i wsp. [146] rozwiązali strukturę krystaliczną tej ureazy. Autorzy wykazali, że elementami strukturalnymi cząsteczki tej ureazy są trimery $(\alpha\beta)_3$, analogiczne do trimerów ureaz z *Klebsiella aerogenes* i *Bacillus pasteurii*, tworzące tetraedryczny kompleks $((\alpha\beta)_3)_4$ o masie 1100 kD. Tak jak w innych ureazach centrum aktywne enzymu znajduje się w podjednostce α , co oznacza, że ureaza ta ma 12 dwunuklowych centrów aktywnych, a nie 3 jak inne ureazy bakteryjne. Zaproponowano [146, 147], że ta dodekameryczna struktura $((\alpha\beta)_3)_4$ stanowi system ochronny enzymu i zapewnia mu przetrwanie w niesprzyjającym pH żołądka, a dzięki lokalizacji na powierzchni komórek również przetrwanie całej bakterii. Propozycja ta, razem z innymi sformułowanymi w oparciu o dane, że ureaza jest zlokalizowana tylko wewnątrz bakterii, jest ostatnio przedmiotem żywej dyskusji w literaturze naukowej [147a–c].

Mimo różnic w budowie IV-rzędowej ureaz roślinnych i bakteryjnych, sekwencje aminokwasowe tych ureaz są w wysokim stopniu homologiczne [16, 45,

55, 60, 61, 105, 138–151]: jednostka ($\alpha\beta\gamma$) ureaz bakteryjnych oraz jednostka ($\alpha\beta$) ureazy z *Helicobacter pylori* odpowiadają jednej podjednostce ureazy z *jack bean* (rys. 1). Porównanie sekwencji pokazuje, że podjednostki α ureaz bakteryjnych odpowiadają dwóm trzecim monomeru ureazy z *jack bean* ze strony C-końcowej, a podjednostki β i γ ureaz bakteryjnych typu ($\alpha\beta\gamma$)₃ oraz podjednostka β z *Helicobacter pylori* odpowiadają jednej trzeciej tego monomeru ze strony N-końcowej. Homologia sekwencji aminokwasowych ureaz roślinnych i bakteryjnych wskazuje, że mimo iż enzymy te różnią się wielkością i liczbą podjednostek, wszystkie są odmianami tego samego enzymu i mają taki sam mechanizm katalityczny. Potwierdzają to niemal identyczne właściwości spektroskopowe wszystkich ureaz [15] oraz fakt, że dla wielu inhibitorów obserwuje się podobną kinetykę inhibicji [54, 55] (zob. rozdz. „Inhibicje ureaz”). Jednocześnie osiągalne obecnie dane na temat struktur i mechanizmów katalitycznych enzymów pozwoliły wysunąć tezę, że rodzina ureaz jest częścią ewolucyjnej superrodziny enzymów: amidohydrolaz i fosfotriesteraz [154, 155]. Enzymy tej superrodziny katalizują reakcje hydrolizy wiązań C–N lub P–O używając metalicznych centrów aktywnych, np. deaminaza adenozynowa [156] i fosfotriesteraza [157] centrów Zn(II), ureaza centrum Ni(II) [5], wykazujących wiele wspólnych cech strukturalnych i taki sam mechanizm chemiczny.

CENTRUM AKTYWNE UREAZY

Schemat centrum aktywnego ureazy przedstawiono na rys. 2 (numeracja reszt aminokwasowych odpowiada ureazie z *Klebsiella aerogenes* [5]).



Rys. 2. Schemat centrum aktywnego ureazy (numeracja reszt aminokwasowych odpowiada ureazie z *Klebsiella aerogenes*) [5, 7, 58, 162]

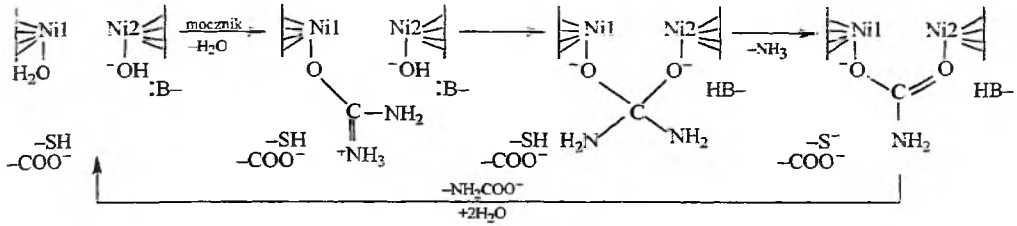
W centrum aktywnym ureazy znajdują się 2 jony Ni(II) w odległości 3,6 Å od siebie, połączone ze sobą mostkiem karboksylanowym skarbamylowanej lizy-

MECHANIZM KATALITYCZNY UREAZY

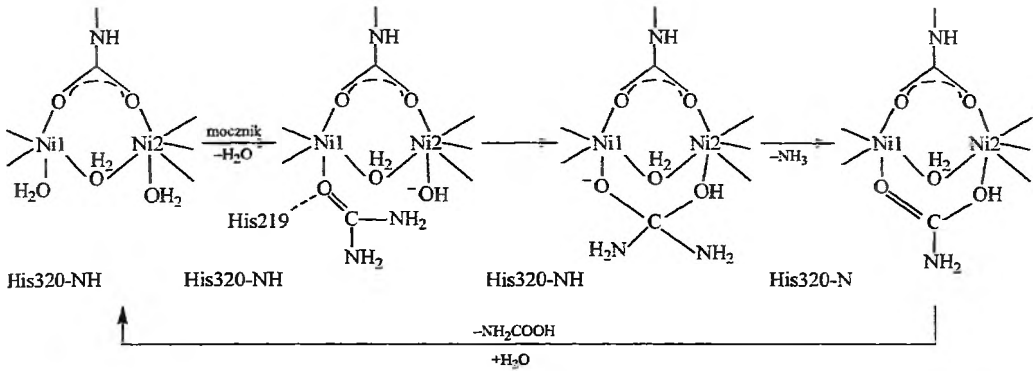
Zaproponowane dotychczas 3 modele mechanizmu katalitycznego ureazy zakładają, że analogicznie do innych hydrolaz zawierających dwurdzeniowe centra metaliczne połączone mostkiem karboksylanowym lub fosfodiostrowym [20, 27, 165], centrum nikłowe enzymu działa jak kwas Lewisa. Jeden jon Ni(II) aktywuje substrat, a drugi wodę. Aktywacja mocznika polegająca na polaryzacji jego cząsteczki ma na celu zwiększenie elektrofilowości atomu węgla jego grupy karbonylowej i jest wynikiem ściągnięcia przez jon Ni(II) elektronów z atomu węgla na atom tlenu. Aktywacja wody przez drugi jon Ni(II) ma na celu zwiększenie nukleofilowości jej cząsteczki potrzebnej do ataku na atom węgla mocznika i polega na jej deprotonacji z wytworzeniem jonu OH^- .

Pierwszy model mechanizmu katalitycznego ureazy zaproponowali w 1980 r. Dixon i wsp. [39]. Model ten, nazywany w literaturze modelem Zenera [14–17, 27], sformułowany został na podstawie badań kinetycznych ureazy z *jack bean* w reakcji hydrolizy mocznika i jego analogów, bez znajomości struktury centrum aktywnego z wyjątkiem faktu, że zawiera ono oddzielne, ale blisko położone dwa jony Ni(II) (rys. 3a). Autorzy założyli, że centrum aktywne ureazy zawiera ponadto grupę zasadową :B— (niezidentyfikową), grupę karboksylową $-\text{COO}^-$ i grupę tiolową $-\text{SH}$ cysteiny oraz że w stanie spoczynku w pH obojętnym jeden z jonów niklu, Ni1, ma skoordynowaną cząsteczkę wody, a drugi jon, Ni2, jon OH^- . Przebieg reakcji w tak zdefiniowanym centrum jest następujący: mocznik zajmuje miejsce wody na Ni1 i ulega koordynacji do tego jonu przez tlen grupy karbonylowej. W ten sposób tworzy się struktura o rozłożonym ładunku, która jest stabilizowana przez oddziaływanie elektrostatyczne jej grupy $-\text{NH}_2$ z jodem karboksylanowym $-\text{COO}^-$ centrum aktywnego. Następnie jon OH^- z Ni2 atakuje atom węgla skoordynowanego mocznika z równoczesną utratą jonu H^+ na rzecz grupy zasadowej :B—, wskutek czego tworzy się tetraedryczna struktura pośrednia łącząca obydwa jony Ni(II). Dalej grupa $-\text{SH}$ cysteiny, działając jak kwas, protonuje azot grupy amidowej, co prowadzi do uwolnienia amoniaku, pozostawiając skoordynowany przez jony Ni(II) karbaminian. Podstawienie przez wodę uwalnia jon karbaminianowy i regeneruje centrum aktywne. Choć zaproponowany jako roboczy, model Zenera stał się punktem wyjścia do rozwinięcia dalszych modeli mechanizmu katalitycznego ureazy.

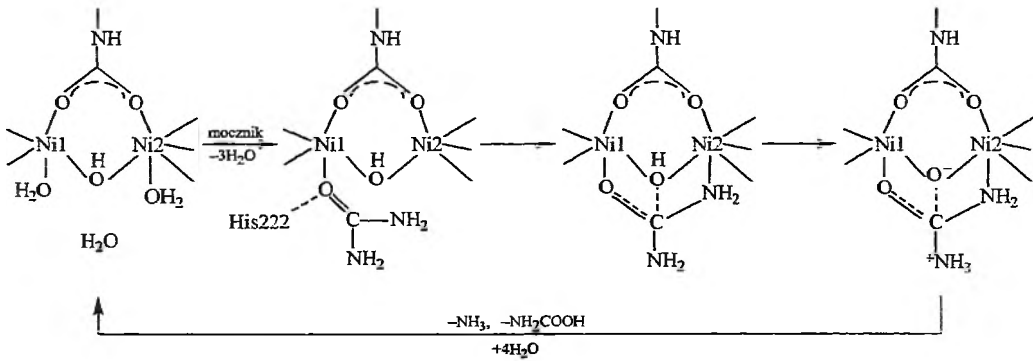
Ustalenie budowy centrum aktywnego ureazy z bakterii *Klebsiella aerogenes* [5] i badania mutagenetyczne tej ureazy, które wykazały, że spośród reszt aminokwasowych centrum aktywnego w reakcji katalitycznej istotną rolę odgrywają His219 i His320 [49, 153], a Cys319 (kwas w modelu Zenera) nie bierze bezpośredniego udziału w tym procesie [122, 162], przyniosły spekulacje na temat reszt aminokwasowych spełniających funkcję kwasu i zasady. Jabri i wsp. [5] rozpatrywali jako zasadę His320, choć wydaje się ona zajmować pozycję zbyt odległą od wody hydrolitycznej na Ni2, oraz jako kwas tę samą zasadę, w tym momencie reakcji sprotonowaną, tzn. działającą jak „wahadło” w przenoszeniu jonu H^+ .



model Zenera
(a)



model Karplusa
(b)



model Ciurlego
(c)

Rys. 3. Modele mechanizmu katalicznego ureazy: (a) Zenera [39], (b) Karplusa [50], (c) Ciurlego [9, 58]

W 1997 r. Karplus i wsp. [50], adaptując wszystkie krystalograficzne i funkcjonalne dane dotyczące ureazy, sformułowali nowatorską modyfikację modelu Zenera, w której kwestię kwasu i zasady rozwiązali przy użyciu mechanizmu

zwanego „odwrotną protonacją”. Podstawą użycia tego mechanizmu było spostrzeżenie, że His320 jest położona zbyt daleko, by jako grupa zasadowa zdeprotonować wodę hydrolityczną na Ni2, ale właściwie położona, by spełniać funkcję kwasu protonującego grupę amidową mocznika. Autorzy założyli więc, że His320 jest sprotonowana i jest kwasem, a woda-Ni2 zdeprotonowana i jest zasadą, przeciwnie niż miałyby to miejsce konwencjonalnie, kiedy to w optimum pH wynoszącym 7,75 dla ureazy z *Klebsiella aerogenes* [47], His320 ($pK_a = 6,5$ [125]) powinna być zdeprotonowana i działać jak zasada, a woda-Ni2 ($pK_a = 10,6$ [163]) sprotonowana i działać jak kwas. Konsekwencją założenia „odwrotnej protonacji” jest, że tylko ok. 0,3% cząsteczek enzymu jest aktywnych w jego optimum pH, co wg autorów rekompensowane jest przez podwyższoną reaktywność enzymu w tym stanie protonacji. W modelu Karplusa [50] przebieg reakcji jest następujący (rys. 3b): mocznik usuwa wodę z Ni1 i koordynuje się do tego jonu przez tlen grupy karbonylowej. Tę aktywację mocznika wspomagają wiązania wodorowe, jedno między His219 a tlenem karbonylowym mocznika i dodatkowo cztery utworzone między wodorami amidowymi mocznika a resztami aminokwasowymi centrum aktywnego. Wśród nich jest Cys319 znajdująca się w „klapce” centrum. Atak cząsteczki wody z Ni2 na węgiel mocznika prowadzi następnie do utworzenia tetraedrycznej struktury pośredniej. Dalej His320 protonuje azot grupy amidowej i w końcu sprotonowana struktura pośrednia rozpada się z utworzeniem kwasu karbaminowego i amoniaku. Według tak sformułowanego mechanizmu reakcja zachodzi, gdy spełnione są następujące warunki: 1) His320 jest sprotonowana (kwas), a woda-Ni2 zdeprotonowana (zasada) zgodnie z założoną „odwrotną protonacją” oraz 2) wszystkie zaangażowane w reakcję reszty aminokwasowe mają dostęp do mocznika. Cys319 uczestnicząca w aktywacji mocznika i His320, kwas dostarczający protonu grupie amidowej, znajdują się w „klapce” centrum i, by mogły się odpowiednio zbliżyć do mocznika, „klapka” musi się bezwarunkowo zamknąć. Jeśli do centrum dostanie się cząsteczka większa niż mocznik lub jeśli zablokuje się jej grupy funkcyjne, to „klapka” nie zamyka centrum aktywnego i reakcja jest hamowana (zob. rozdz. „Inhibicje ureazy”).

Ciurli i wsp. w swoich pracach na temat ureazy z *Bacillus pasteurii* [58] zakwestionowali model Karplusa, krytyce poddając brak znajomości zasady zdeprotonującej wodę na Ni2 oraz zastosowanie do tej katalizy „odwrotnej protonacji”, która pozwala tylko niewielkiej części enzymu osiągnąć stan aktywny. Opierając się na opisanej przez siebie strukturze krystalicznej kompleksu ureazy z inhibitorem kwasem diamidofosforowym (DAP) [7] i z fosforanem [9], Ciurli i wsp. sformułowali nowy model mechanizmu katalitycznego enzymu [58], w którym zaproponowali m.in., że nukleofilem w reakcji jest nie woda z Ni2, jak w modelach Zenera i Karplusa, która do tego celu musi być zdeprotonowana, lecz jon OH^- (W_B) łączący mostkiem jony Ni(II). W modelu tym (rys. 3c) mocznik w centrum aktywnym zajmuje miejsce klasteru $\text{W}_1\text{-W}_2\text{-W}_3$, którego kształt i wielkość dokładnie odpowiadają jego cząsteczce, i łączy się z jonem Ni1 przez atom tle-

nu grupy karbonylowej (wiązanie stabilizowane jest przez His222 odpowiadającą His219 w *Klebsiella aerogenes*). Następnie, albo kolejno, albo równocześnie [9] zachodzi połączenie mocznika z jodem Ni2 przez atom azotu grupy amidowej i nukleofilowy atak mostkowego jonu OH⁻ (W_B) na cząsteczkę mocznika, w tym momencie zaktywowaną przez polaryzację jej wiązań C—O i C—NH₂ i przez sieć wiązań wodorowych z resztami aminokwasowymi centrum. Tworzy się tetraedryczny związek pośredni związany z dwurdzeniowym centrum aktywnym enzymu w trzech miejscach. Jon OH⁻ (W_B) działa następnie jak kwas (wspomagany w transferze protonu przez Asp363 odpowiadający Asp360 w *Klebsiella aerogenes*) i oddaje proton odległej grupie amidowej. Ładunek dodatni tej struktury stabilizowany jest przez His323 (odpowiadającą His320 w *Klebsiella aerogenes*). W końcowym etapie z centrum aktywnego uwalnia się amoniak i kwas karbaminowy.

Model Ciurlego wg autorów rozstrzyga sporne kwestie kwasu i zasady w modelu Karplusa. Jonowi OH⁻ (W_B) z mostka niklowego autorzy przypisują podwójną rolę zarówno czynnika nukleofilowego jak i kwasu, natomiast His323 (odpowiadającej His320 w *Klebsiella aerogenes*) rolę zasady, której właściwości przejawiają się nie poprzez proces deprotonacji wody hydrolytycznej, lecz poprzez stabilizowanie dodatniego ładunku utworzonego produktu przejściowego. Model ten zawiera zatem wcześniej określone właściwości tego procesu, tj. rolę His222 (His219 w *Klebsiella aerogenes*) w wiązaniu substratu i udział w reakcji grup o pK_a = 6,5 i 9 [47]. Wartości pK_a = 9 autorzy nie przypisują żadnej reszcie aminokwasowej centrum aktywnego, lecz deprotonacji mostkowego jonu OH⁻, którego jon H⁺ w tym modelu potrzebny jest do protonacji grupy amidowej mocznika. Ponadto model ten jako pierwszy z zaproponowanych uwzględnił uczestnictwo obydwu jonów niklu w wiązaniu mocznika, a także, z powodu wyższego powinowactwa niklu niż cynku do ligandów azotowych [23], przynajmniej częściowo uzasadnia obecność w ureazie jonów Ni(II), a nie charakterystycznych dla hydrolaz jonów Zn(II) [27]. Pogląd, że mocznik wiąże się z obydwoma jonami Ni(II) i że W_B jest nukleofilem, wspierają ostatnio przeprowadzone symulacje komputerowe metodą dokowania inhibitorów i substratu w enzymie [166].

W odpowiedzi na model Ciurlego, Karplus i wsp. zmodyfikowali swój model [51, 52, 55a], uznając koordynację mocznika do obydwu jonów Ni(II) poprzez tlen grupy karboksylowej i azot grupy amidowej za uzasadnioną energetycznie i dlatego możliwą oraz przychyłając się do propozycji, że nukleofilem atakującym węgiel mocznika jest mostkowy jon OH⁻. Autorzy nie zaaprobowali jednak propozycji, że grupą kwasową dostarczającą proton do uwolnienia amoniaku jest ten sam mostkowy jon OH⁻, lecz podtrzymali swoją pierwotną koncepcję opartą na „odwrotnej protonacji”, że kwasem jest sprotonowana His320.

Jak pokazano, sformułowane do chwili obecnej modele mechanizmu katalizycznego ureazy nie są pełne i problem nadal pozostaje otwarty [25a, 55a]. Symulacje komputerowe [167] przeprowadzone na 3 zasadniczych modelach, tj. Zer-

ra z His320 jako zasadą, Karplusa i Ciurlego pozwoliły jedynie stwierdzić, że model Zenera jest mało prawdopodobny, a modeli Karplusa i Ciurlego nie da się wykluczyć i są one jednakowo prawdopodobne.

Dla pełnego obrazu badań nad ureazą dodać należy, że interesującym, pomocniczym narzędziem stosowanym równolegle w tych badaniach są modelowe, dwuniklowe związki kompleksowe imitujące centrum aktywne enzymu, na którym próbuje się obserwować hydrolizę mocznika oraz inhibicje tej reakcji [59, 168–171].

INHIBICJE UREAZY

Badanie inhibicji ureazy ma co najmniej trzy cele: 1) znalezienie inhibitorów, które spełniałyby warunki do zastosowania praktycznego w medycynie i w rolnictwie do kontroli aktywności enzymu, 2) określenie zależności aktywności enzymu od stężeń inhibitorów do zastosowania w oznaczeniach ilościowych tych substancji oraz 3) określenie mechanizmu inhibicji, co w sposób oczywisty wspiera dwa pierwsze cele, oraz dostarcza istotnych informacji o strukturze i mechanizmie katalitycznym enzymu. Ogromny postęp w tych badaniach przyniosły ostatnio prace Beniniego i wsp., w których autorzy określili struktury krystaliczne kompleksów ureazy z *Bacillus pasteurii* z wybranymi inhibitorami [6–9]. Poniżej przedstawiono wszystkie klasy znanych inhibitorów ureazy, w dyskusji skupiając się na tych, których struktury z ureazą zostały rozwiązane. Stałe inhibicji podano w tab. 3.

Mocznik i jon amonowy, substrat i produkt reakcji są inhibitorami ureazy. Mocznik jest inhibitorem akompetycyjnym, jeśli użyty w nadmiarze – stąd oznaczone wartości stałej inhibicji są wysokie w granicach 3,0–6,18 M [123, 172, 173]. Jon amonowy jest natomiast inhibitorem niekompetycyjnym o stałych inhibicji w obojętnym pH w granicach 2,1–118 mM [123, 174–176].

Analogi mocznika, wymienione w tab. 2 jako substraty ureazy, są w większości również inhibitorami enzymu. Analiza kinetyki ureazy w obecności tych związków jest trudna, gdyż obserwuje się wypadkowy efekt ich działania na enzym: na ogół w pierwszym stadium reakcji aktywność enzymu spada, by później ulec powolnej regeneracji [43, 129]. Związki te sklasyfikowano jako inhibitory kompetycyjne ureazy o słabej mocy.

Tiole, R-SH, sklasyfikowano jako proste kompetycyjne inhibitory ureazy z *jack bean* [178] i z bakterii *Klebsiella aerogenes* [48], słabe w porównaniu z innymi inhibitorami. Badania kinetyczne wykazały, że aktywna inhibicyjnie jest forma anionowa tych związków R-S⁻ [48], a badania spektroskopowe w zakresie UV [48, 178], że aniony te wiążą się z jonami Ni(II) centrum aktywnego enzymu, tworząc kompleks z przeniesieniem ładunku [40]. Modelowym związkiem tej grupy jest β-merkaptetanol HO-CH₂-CH₂-SH [40, 48, 178]. Opisana przez Beniniego i wsp. [6] struktura krystaliczna kompleksu ureazy z *Bacillus pa-*

Tabela 3. Inhibitory ureazy

Inhibitory	Typ inhibitora	K_i , mM			
		<i>Jack bean</i>	Lit.	Bakteryjna	Lit.
Mocznik (substrat)	akompetycyjny	$(3-6,4) \cdot 10^3$	[172, 173]	-	-
Jon amonowy (produkt)	niekompetycyjny	2-118	[174, 176]	-	-
Analogi mocznika:					
hydroksymocznik	kompetycyjne	1,45-3,6	[128]	0,23 (<i>Ba</i>) ^a	[102]
formamid		404	[130]	-	-
tiomocznik		70	[121]	13 ^b (<i>Hp</i>) ^c	[104]
etylomocznik		26	[177]	-	-
Tiole:					
β -merkaptioetanol	kompetycyjny	0,72	[178]	0,55 (<i>Ka</i>) ^d 4,1 (<i>Hp</i>)	[48] [106]
Kwasy acylohydroksamowe:					
kwas acetylohydroksamowy	kompetycyjny wolnowiążący	0,004 0,016	[38] [188]	0,0026 (<i>Ka</i>) 0,002 (<i>Hp</i>)	[48] [192]
Amidy i estry kwasu fosforowego:					
triamid kwasu fosforowego (PTA)	kompetycyjne wolnowiążące	$24,4 \cdot 10^{-7}$	[101]	$322 \cdot 10^{-7}$ (<i>Bp</i>) ^e	[101]
ester fenyloowy kwasu diamidofosforowego (PPD)		$1,6 \cdot 10^{-7}$	[101]	$6 \cdot 10^{-7}$ (<i>Bp</i>) $0,94 \cdot 10^{-7}$ (<i>Ka</i>)	[101] [48]
ester 4-chlorofenyloowy kwasu diamidofosforowego		$0,41 \cdot 10^{-7}$	[101]	$3,5 \cdot 10^{-7}$ (<i>Bp</i>)	[101]
N-(benzoilo) triamid kwasu fosforowego		$16,2 \cdot 10^{-7}$	[101]	$69 \cdot 10^{-7}$ (<i>Bp</i>)	[101]
N-(4-fluorobenzoilo) triamid kwasu fosforowego		-	-	$40 \cdot 10^{-7}$ (<i>Hp</i>)	[192]
Bufor fosforanowy		kompetycyjny w pH < 7,5	19 (pH = 7)	[98]	40 (pH=7)(<i>Ka</i>)
Związki boru:					
kwas borowy	kompetycyjne	0,12	[209]	0,1 (<i>Pm</i>) ^f	[107]
kwas 4-bromobenzenoborony		0,23	[211]	0,34 (<i>Ka</i>)	[48, 180]
		-	-	0,12 (<i>Pm</i>) 0,37 (<i>Ka</i>)	[107] [180]
NaF	kompetycyjny wolnowiążący	0,076	[216]	0,17 (<i>Ka</i>)	[52]
Jony metali ciężkich:					
Ni ²⁺	kompetycyjny wolnowiążący	0,0028	[229]	-	-

^a *Brevibacterium ammoniagenes*.

^b I_{50} tzn. stężenie inhibitora wywołujące spadek aktywności o 50%.

^c *Helicobacter pylori*.

^d *Klebsiella aerogenes*.

^e *Bacillus pasteurii*.

^f *Proteus mirabilis*.

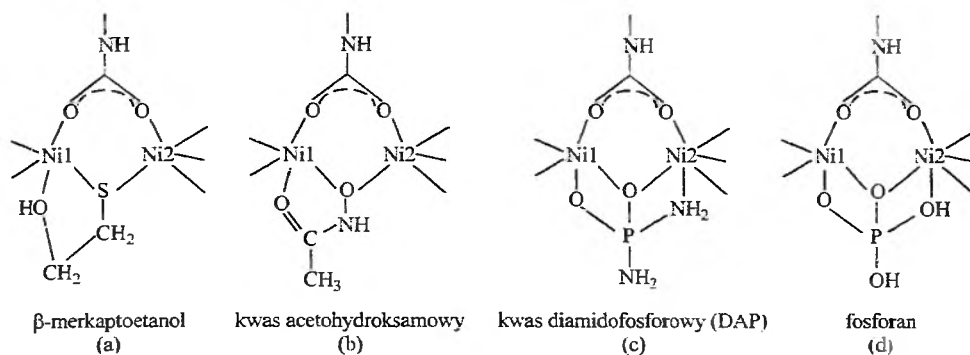
stearii z β -merkaptioetanolem podaje następujący sposób wiązania inhibitora z centrum niklowym enzymu (rys. 4a): atom S wiąże mostkiem jony Ni(II) skracając odległość Ni-Ni do 3,1 Å, a grupa OH koordynuje jon Ni1, co w efekcie daje strukturę ureaza-tiolan, w której obydwa jony Ni(II) są pięciokoordynacyjne. Oprócz cząsteczki β -merkaptioetanolu chelatującej jony Ni(II) autorzy stwierdzili w centrum aktywnym obecność drugiej cząsteczki inhibitora związanej z Cys322 przez wiązanie disiarczkowe: Cys-S-S-CH₂-CH₂-OH. Cys322

(odpowiadająca Cys319 w ureazie z *Klebsiella aerogenes*) jest częścią ruchomej „klapki” centrum i uczestniczy w aktywacji mocznika (zob. rozdz. „Mechanizm katalityczny ureazy”). Związany na sposób disiarczkowy inhibitor ogranicza mobilność „klapki”, a tym samym dostępność Cys322 do mocznika w centrum, co objawia się dezaktywacją enzymu. Autorzy przypuszczają, że ten dwójaki mechanizm inhibicji ureazy, potwierdzony przez dokowanie β -merkaptetanolu w enzymie [166], obowiązuje dla wszystkich tioli.

Z wytworzeniem wiązania disiarczkowego z resztą cysteinową centrum aktywnego łączy się z ureazą również związki disiarczkowe, $R_1-S-S-R_2$, dezaktywując enzym na sposób odwracalny. Dwa z nich: kwas 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoesowy) (DTNB) [179–181] i 2,2'-ditiopirydyna (DTDP) [180, 182], stosowano do zmiareczkowania reszt cysteinowych ureazy, dzięki czemu określono, że w centrum aktywnym znajduje się jedna istotna dla katalizy reszta cysteinowa oznaczona Cys319 w ureazie z *Klebsiella aerogenes*, Cys322 w *Bacillus pasteurii* i Cys592 w ureazie z *jack bean*, ta ostatnia o $pK_a = 9,15$ [182]. Dezaktywacja ureazy z *Klebsiella aerogenes* związkami disiarczkowymi w obecności inhibitorów kompetycyjnych wyjaśniła funkcję „klapki”, tj. wykazała, że musi być ona zamknięta, aby zaszła reakcja [180, 183]. Stwierdzono bowiem, że inhibitory kompetycyjne o małych cząsteczkach, np. kwas borowy i fosforan, łącząc się z centrum niklowym chronią enzym przed dezaktywacją związkiem disiarczkowym dzięki temu, że jako odpowiednio małe pozwalają „klapce” zamknąć centrum aktywne, natomiast inhibitory o dużych cząsteczkach zostawiają centrum aktywne otwarte, eksponując resztę cysteinową „klapki” na reakcję z tym reagentem, co prowadzi do dezaktywacji enzymu.

Tiole, z powodu niskiej efektywności inhibicyjnej, nie mają większego znaczenia praktycznego, lecz badania ich inhibicji wniosły ważny wkład w opis centrum aktywnego ureazy.

Kwasy acylohydroksamowe o ogólnym wzorze $R-NHOH$, gdzie R – grupa acylowa, w tym liczne pochodne kwasów karboksylowych alifatycznych i aromatycznych, aminokwasów i dipeptydów, stanowią ogromną grupę klasycznych inhibitorów ureaz roślinnych [38, 43, 184–188], bakteryjnych [48, 104, 186, 189–192], grzybowych [114] i glebowych [193]. Kwas acetohydroksamowy $CH_3-CO-NHOH$, wzorcowy inhibitor tej grupy, został określony jako inhibitor kompetycyjny wolnowiązący ureazy [38, 48] o średniej mocy inhibicyjnej. Sposób wiązania kwasu acetohydroksamowego z centrum aktywnym enzymu został określony na podstawie budowy krystalicznej kompleksu ureaza-kwas acetohydroksamowy ustalonej dla mutantu ureazy z *Klebsiella aerogenes* [162] i dla ureazy natywnej z *Bacillus pasteurii* [8]. Jak wykazali Benini i wsp. dla ureazy z *Bacillus pasteurii* [8], kwas acetohydroksamowy podobnie jak β -merkaptetanol wiążąc się z ureazą działa jak chelatujący ligand mostkowy (rys. 4b). Atom O grupy $-NHOH$ zastępuje mostkową grupę OH^- natywnej ureazy i tworzy się symetryczny mostek (odległość $Ni-O_B = 2,0 \text{ \AA}$), który powoduje skrócenie odległości $Ni-Ni$ do $3,5 \text{ \AA}$. Drugi atom O kwasu acetohydroksamowego wiąże się



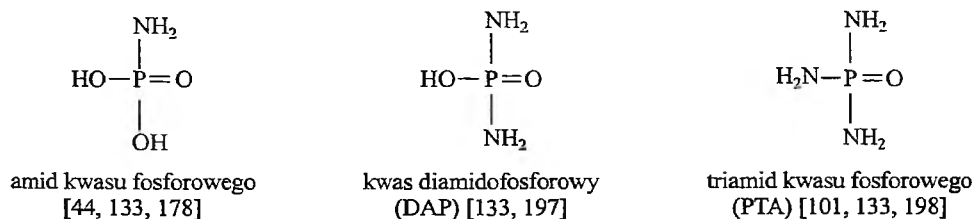
Rys. 4. Sposób wiązania inhibitorów z centrum aktywnym ureazy [6-9]

z Ni1, uzupełniając w ten sposób sferę koordynacyjną tego jonu. Nie ma zgodności co do formy, w jakiej kwas aceto hydroksamowy jest inhibitorem ureazy: prace [48, 188] podają, że jest to niezdisocjowana cząsteczka, natomiast Benini i wsp. [8], że jest to jon $\text{CH}_3\text{CONHO}^-$ powstały z cząsteczki już po jej związaniu z enzymem w kompleks enzym-inhibitor. Tworzenie się dwóch kompleksów enzym-inhibitor zostało potwierdzone przez dokowanie formy cząsteczkowej i jonowej liganda w enzymie [166].

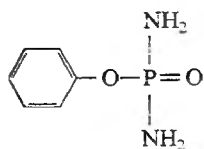
Kwas aceto hydroksamowy, z powodu swojej skuteczności inhibicyjnej i nie toksyczności [194], jest najszerzej badany inhibitorem ureazy do zastosowania w terapiach chorób spowodowanych przez bakterie produkujące ureazę, szczególnie w tworzeniu się kamieni moczowych i zapaleniu miedniczek nerkowych, lecz również w śpiączce wątrobowej, tworzeniu się kamienia nązębego i infekcjach przewodu pokarmowego [68-70, 195]. Terapie z użyciem kwasu aceto hydroksamowego, choć skuteczne zwłaszcza w infekcjach dróg moczowych, nie były jednak wolne od skutków ubocznych. Pozostałe kwasy hydroksamowe, również szeroko testowane, często wykazują silne negatywne dla zdrowia skutki uboczne, co dyskredytuje ich zastosowanie [69, 70, 196].

Pochodne kwasu fosforowego – w tej grupie inhibitorów badane były związki następujących typów:

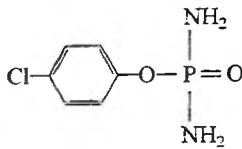
1) amidy kwasu fosforowego, np.



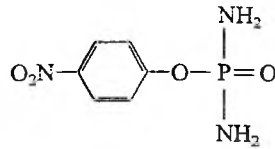
2) estry kwasu diamidofosforowego, np.



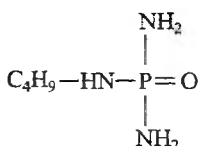
ester fenylowy kwasu
diamidofosforowego (PPD)
[48, 101, 133, 197]



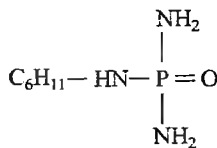
ester 4-chlorofenylowy kwasu
diamidofosforowego [101, 197]



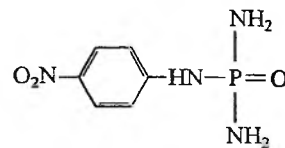
ester 4-nitrofenylowy kwasu
diamidofosforowego [197]

3) *N*-alkilo- i *N*-arylotriamidy kwasu fosforowego, np.

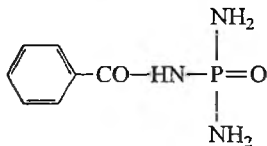
N-(*n*-butylo) triamid kwasu
fosforowego (NBPTO) [198]



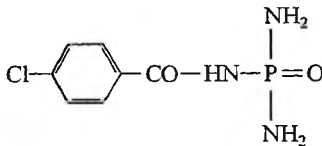
N-cykloheksylotriamid kwasu
fosforowego (CHPT) [198]



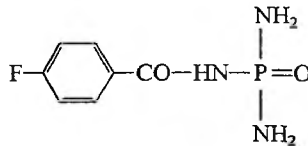
N-(4-nitrofenylo) triamid
kwasu fosforowego [101]

4) *N*-acylotriamidy kwasu fosforowego, np.

N-(benzoilo) triamid kwasu
fosforowego [101,199]



N-(4-chlorobenzoilo) triamid
kwasu fosforowego [101]

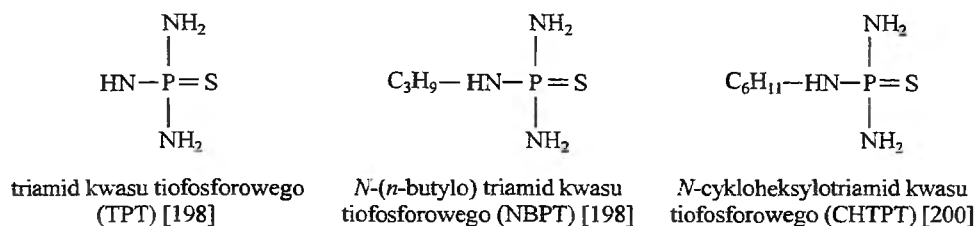


N-(4-fluorobenzoilo) triamid
kwasu fosforowego (fluorofamide)
[190, 192, 196, 197]

Pochodne kwasu fosforowego zostały określone jako inhibitory kompetycyjne wolnowiązące ureazy [48, 101, 197]. Całkowite stałe inhibicji K_i^* klasyfikują te związki jako najmocniejsze z poznanych inhibitorów enzymu. Kinetyka reakcji inhibitowanych przez te związki wskazuje, że bez względu na rodzaj inhibitora w reakcji enzymatycznej czynny inhibicyjnie jest ten sam związek pośredni [101, 133, 197]. Zasugerowano, że większe związki ulegają hydrolizie katalizowanej przez ureazę i dlatego zaliczono je do substratów enzymu i że właściwym inhibitorem enzymu jest produkt tej hydrolizy – kwas diamidofosforowy (DAP). Sam DAP jest również substratem ureazy [133]. Teza ta została zweryfikowana w pracy Beniniego i wsp. [7], w której autorzy ustalili strukturę krystaliczną kompleksu ureazy z *Bacillus pasteurii* otrzymanego w obecności estru fenylowego kwasu diamidofosforowego (PPD). W centrum aktywnym tego kompleksu autorzy nie stwierdzili obecności pierścienia aromatycznego, natomiast wykazali obe-

ność tetraedrycznej cząsteczki DAP powstałej z hydrolizy: PPD \rightarrow fenol + DAP. Cząsteczka DAP (rys. 4c) zajmuje miejsce klasteru $W_B-W_1-W_2-W_3$ wypełniającego centrum aktywne enzymu natywnego, łącząc się przez atom O z jodem Ni1 i przez atom N z Ni2. Drugi atom O cząsteczki DAP łączy mostkiem jony Ni(II), a drugi atom N skierowany jest w stronę otworu centrum aktywnego. Dokowanie DAP w ureazie [166] pokazało, że z enzymem łączy się DAP w formie anionowej $(NH_2)_2POO^-$. Ustalona struktura kompleksu ureaza-DAP pozwoliła Ciurlemu i wsp. na sformułowanie nowego modelu katalitycznego ureazy [58] (zob. rozdz. „Mechanizm katalityczny ureazy”).

Interesującym typem inhibitorów ureazy są pochodne kwasu tiofosforowego:



Wykazano mianowicie, że są one faktycznie tylko prekursorami inhibitorów [74], a stają się aktywne inhibicyjnie po konwersji w swoje analogi tlenowe [200–202], np. NBPT \rightarrow NBPTO, TPT \rightarrow PTA i CHTPT \rightarrow CHPT, wywołanej kontaktem z glebą lub innymi materiałami. Mechanizm tej konwersji nie został poznany.

Pochodne kwasu fosforowego i tiofosforowego są przedmiotem intensywnych badań nad zastosowaniem w rolnictwie i w medycynie do hamowania aktywności odpowiednio ureazy glebowej po użyciu nawozu mocznikowego [193, 198, 200–208] oraz ureazy bakteryjnej w przypadkach infekcji organizmu bakteriami ureolitycznymi, np. *Helicobacter pylori* [104, 192, 197], *Ureaplasma urealyticum* [190, 191] lub *Proteus mirabilis* [196].

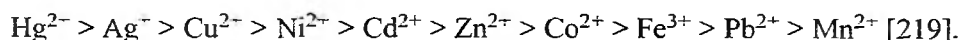
Bufor fosforanowy, szeroko stosowany w badaniach kinetycznych ureaz, rozpoznany został jako inhibitor kompetycyjny ureazy z *jack bean* w pH = 7,0 już w pracach Sumnera [28]. Kompetycyjną inhibicję ureaz w pH obojętnym potwierdziły późniejsze prace [32, 48, 98, 123, 209]: jedynie praca [173] podaje, że inhibicja ta jest typu mieszanego. Analiza tej inhibicji w zakresie pH = 5–8 wykazała dla ureaz z *Klebsiella aerogenes* [48] i z *jack bean* [98], że bufor fosforanowy jest inhibitorem kompetycyjnym, którego moc inhibicyjna maleje ze wzrostem pH i zanika w pH odpowiednio 7,0 i 7,5 oraz że w buforze fosforanowym faktycznym inhibitorem enzymu jest jon $H_2PO_4^-$ [48, 98, 178]. Słabnięcie tej inhibicji ze wzrostem pH i jej zanik w pH > 7,0–7,5 przypisano deprotonacji jonu $H_2PO_4^-$ ($pK_a = 7,2$) [98]. Rozwiązana ostatnio przez Beniniego i wsp. [9] struktura krystaliczna kompleksu ureazy z *Bacillus pasteurii* w obecności bufora fosfora-

nowego o pH = 6,3 pokazała sposób wiązania inhibitora z centrum aktywnym enzymu (rys. 4d). Tetraedryczna cząsteczka fosforanu prawie dokładnie zastępuje klaster 4 cząsteczek wody OH⁻ centrum enzymu natywnego (podobnie jak tetraedryczna cząsteczka DAP), wytwarzając 4 wiązania koordynacyjne z jonami Ni(II) przez atomy O. Jeden atom O fosforanu łączy symetrycznym mostkiem jony Ni(II) (odległość Ni—O_B = 1,9–2,0 Å) powodując skrócenie odległości Ni—Ni do 3,5 Å. dwa atomy O wiążą się z jonami Ni(II), a czwarty atom O skierowany jest w stronę kanału centrum aktywnego. Analiza wiązań wodorowych wokół cząsteczki fosforanu pozwoliła określić, że z centrum ureazy związany jest jon H₂PO₄⁻, co potwierdziło wcześniejsze wyniki kinetyczne.

Związki boru: kwas borowy i kwasy boronowe są kompetycyjnymi inhibitorami ureaz o średniej mocy [107, 209]. Inhibicja ureazy kwasem borowym ma znaczenie w analityce medycznej, ponieważ kwas ten jest stosowany jako środek antybakteryjny dodawany do moczu przed oznaczeniem enzymatycznym mocznika [210, 211]. Wykazano, że aktywna inhibicyjnie jest forma cząsteczkowa kwasu borowego B(OH)₃, a nie anion B(OH)₄⁻ [107, 212].

Fluorek sodu jako jedyny spośród halogenków [54] i innych soli sodowych [213] wykazuje znaczną inhibicję ureazy. Wbrew niektórym doniesieniom, że fluorek jest kompetycyjnym inhibitorem ureazy o $K_i = 1,2$ mM [178] lub 0,94 mM [214, 215], wykazano, że jest on inhibitorem kompetycyjnym wolnowiążącym zarówno ureazy z *jack bean* [216], jak i z bakterii *Klebsiella aerogenes* [52]. Analiza tej ostatniej pozwala sądzić, że jon fluorkowy wiąże mostkiem jony Ni(II) w miejscu mostkowej grupy OH [52].

Jony metali ciężkich są silnymi inhibitorami ureazy z *jack bean* [217–220] i ureaz bakteryjnych [102, 191, 221], a ich moc inhibicyjna maleje w szeregu [218–220]:



Zgodność tego szeregu z szeregiem rosnących iloczynów rozpuszczalności siarczków tych metali jest podstawą poglądu, że odpowiedzialna za tę inhibicję jest reakcja jonów metali z grupą tiolową reszty cysteinowej zlokalizowanej w „klapce” centrum aktywnego ureazy, z wytworzeniem siarczku [219–223]. Utworzony siarczek sprawia, że „klapka” nie może się zamknąć, co przejawia się hamowaniem reakcji (zob. rozdz. „Mechanizm katalityczny ureazy”). Pomiar tej inhibicji jest trudny z powodu reakcji wtórnych występujących w mieszaninie reakcyjnej między jonami metali a produktami reakcji, NH₃ i CO₂, z wytworzeniem odpowiednio aminakompleksów i osadów węglanu [224]. Badania oparte na pomiarach prędkości początkowej dały obraz inhibicji niekompetycyjnej ureazy tymi jonami [218–223], o stałych inhibicji zmieniających się od $K_i = 1,3 \cdot 10^{-4}$ mM dla Hg²⁺ poprzez 0,0025 mM dla Ni²⁺ do 0,17 mM dla Mn²⁺ [219]. Prace [225–228] podają niezależnie, że jest to inhibicja częściowo kompetycyjna lub mieszana, zależna od czasu reakcji. Przeprowadzone ostatnio w naszym laboratorium badania tej inhibicji oparte na rejestracji całych krzywych postępu reakcji w ukła-

dach różniących się kolejnością mieszania składników mieszaniny reakcyjnej. Wykazały z kolei na przykładzie jonów Ni^{2+} , że inhibicja ta jest kompetycyjna wolnowiążąca [229], a całkowita stała inhibicji Ni^{2+} $K_i^* = 0,0028$ mM. Nikiel jest dla ureazy szczególnym metalem – z jednej strony jako nieodzowna część centrum aktywnego, koniecznym do wzrostu aktywnego enzymu, z drugiej zaś w stężeniach wyższych inhibitorem o znacznej mocy. Autorzy sądzą, że kompetycyjny wolnowiążący mechanizm inhibicji ureazy określony dla jonów Ni^{2+} obowiązuje dla wszystkich jonów metali ciężkich.

Wrażliwość ureazy na inhibicję jonami metali ciężkich stwarza możliwość zastosowania ureazy w próbnikach do oznaczeń śladowych ilości tych metali w wodach, w glebie, ściekach i żywności [93, 230–232] w sposób szybki i niewymagający skomplikowanego sprzętu i obsługi. Konstruowane są zestawy pomiarowe wykorzystujące inhibicję ureazy natywnej [220, 223, 226, 233–236], w których enzym po pomiarze ulega zużyciu, lub ureazy immobilizowanej najczęściej na membranach jako części małych bioreaktorów lub biosensorów [97, 224, 230, 236–241], w których enzym jest regenerowany i używany wielokrotnie.

Podstawione chinony i hydrochinony. Liczne związki z tej grupy badane były tylko w kontekście zastosowania do inhibicji ureazy glebowej [62, 63]. Spośród nich najbardziej obiecujące okazały się *p*-chinon i *p*-hydrochinon [242, 243], a w dalszej kolejności dimetylowe i dichlorowe pochodne *p*-chinonu [243]. *p*-hydrochinon jest najczęściej testowanym związkiem w warunkach polowych [244, 245]. Mechanizm inhibicji ureazy tymi związkami nie został rozpoznany.

PODSUMOWANIE

75 lat intensywnych badań nad ureazą, pierwszym enzymem otrzymanym w postaci krystalicznej, nie przyniosło dotąd rozwiązania jej mechanizmu katalitycznego. Jego znajomość dostarczy narzędzia w projektowaniu molekularnym skutecznych inhibitorów enzymu, substancji, za pomocą których możliwa jest kontrola aktywności ureazy, szczególnie ważna w medycynie w terapiach chorób wywołanych bakteriami ureolitycznymi i w rolnictwie po użyciu nawozów mocznikowych. Osiągnięcie celu przybliży uczyniony w ostatnich latach dzięki technice synchrotronowej postęp w poznaniu struktur krystalicznych enzymu i jego kompleksów z inhibitorami.

Podziękowania

Praca finansowana z grantu KBN nr PB 7/T09A/048/20. Praca powstała dzięki stypendium autorki na Uniwersytecie Oksfordzkim, przyznanym przez Oxford Colleges Hospitality Scheme (St. Hilda's College, 1999 i The Queen's College, 2001). Szczególne podziękowania należą się dr Kathy Wilkes z St. Hilda's College.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] R.K. Andrews, R.L. Blakeley, B. Zerner, *Adv. Inorg. Chem.*, 1984, **6**, 245.
- [2] J.B. Sumner, *J. Biol. Chem.*, 1926, **69**, 435.
- [3] N.E. Dixon, C. Gazzola, R.L. Blakeley, B. Zerner, *J. Am. Chem. Soc.*, 1975, **97**, 4131.
- [4] K. Takishima, T. Suga, G. Mamiya, *Eur. J. Biochem.*, 1988, **175**, 151.
- [5] E. Jabri, M.B. Carr, R.P. Hausinger, P.A. Karplus, *Science*, 1995, **268**, 998.
- [6] S. Benini, W.R. Rypniewski, K.S. Wilson, S. Ciurli, S. Mangani, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 1998, **3**, 268.
- [7] S. Benini, W.R. Rypniewski, K.S. Wilson, S. Miletti, S. Ciurli, S. Mangani, *Structure*, 1999, **7**, 205.
- [8] S. Benini, W.R. Rypniewski, K.S. Wilson, S. Miletti, S. Ciurli, S. Mangani, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2000, **5**, 110.
- [9] S. Benini, W.R. Rypniewski, K.S. Wilson, S. Ciurli, S. Mangani, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2001, **6**, 778.
- [10] H. Babich, G. Stotzky, *Adv. Appl. Microbiol.*, 1983, **29**, 195.
- [11] *Nickel in the Environment*, J.O. Nriagu (red.), Wiley, New York 1980.
- [12] *Nickel and Human Health. Current Perspectives*, E. Nieboer, J.O. Nriagu (red.), Wiley, New York 1992.
- [13] R.P. Hausinger, *Microbiol. Rev.*, 1987, **51**, 22.
- [14] C.T. Walsh, W.H. Orme-Johnson, *Biochemistry*, 1987, **26**, 4901.
- [15] M.A. Halcrow, G. Christou, *Chem. Rev.*, 1994, **94**, 2421.
- [16] A.F. Kolodziej, *Prog. Inorg. Chem.*, 1994, **41**, 493.
- [17] R.P. Hausinger, *Sci. Total Environ.*, 1994, **148**, 157.
- [18] J.C. Fontecilla-Camps, *Structure & Bonding*, 1998, **91**, 1.
- [19] M.J. Maroney, G. Davidson, C.B. Allan, J. Figlar, *Structure & Bonding*, 1998, **92**, 1.
- [20] U. Ermler, W. Grabarse, S. Shima, M. Goubeaud, R.K. Thauer, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1998, **8**, 749.
- [21] M. Wasielewski, *Wiad. Chem.*, 1998, **52**, 207.
- [22] S.W. Ragsdale, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1998, **2**, 208.
- [23] R.K. Watt, P.W. Ludden, *Cell. Mol. Life Sci.*, 1999, **56**, 604.
- [24] M.J. Maroney, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1999, **3**, 188.
- [25] J.C. Fontecilla-Camps, S.W. Ragsdale, *Adv. Inorg. Chem.*, 1999, **47**, 283.
- [25a] S. Ciurli, S. Mangani, [w:] *Handbook on Metalloproteins*, I. Bertini, A. Sigel, H. Sigel (red.), Marcel Dekker, New York 2001, s. 669.
- [26] S.L. Clugston, J.F.J. Barnard, R. Kinach, D. Miedema, R. Ruman, E. Daub, J.F. Honek, *Biochemistry*, 1998, **37**, 8754.
- [27] D.E. Wilcox, *Chem. Rev.*, 1996, **96**, 2435.
- [28] S.F. Howell, J.B. Sumner, *J. Biol. Chem.*, 1934, **104**, 619.
- [29] J.B. Sumner, G.F. Somers, *Chemistry and Methods of Enzymes*, Academic Press, New York 1947, s. 154.
- [30] F.F. Ambrose, G.B. Kistiakowsky, A.G. Kridl, *J. Am. Chem. Soc.*, 1950, **72**, 317.
- [31] F.F. Ambrose, G.B. Kistiakowsky, A.G. Kridl, *J. Am. Chem. Soc.*, 1951, **73**, 1232.
- [32] G.B. Kistiakowsky, P.C. Mangelsdorf, Jr., A.J. Rosenberg, W.H.R. Shaw, *J. Am. Chem. Soc.*, 1952, **74**, 5015.
- [33] G.B. Kistiakowsky, A.J. Rosenberg, *J. Am. Chem. Soc.*, 1952, **74**, 5020.
- [34] G.B. Kistiakowsky, W.H.R. Shaw, *J. Am. Chem. Soc.*, 1953, **75**, 866.
- [35] G.B. Kistiakowsky, W.H.R. Shaw, *J. Am. Chem. Soc.*, 1953, **75**, 2751.
- [36] R.L. Blakeley, B. Zerner, *J. Mol. Catal.*, 1984, **23**, 263.
- [37] B. Zerner, *Bioorg. Chem.*, 1991, **19**, 116.

- [38] N.E. Dixon, J.A. Hinds, A.K. Fihelly, C. Gazzola, D.J. Winzor, R.L. Blakeley, B. Zerner. *Can. J. Biochem.*, 1980, **58**, 1323.
- [39] N.E. Dixon, P.W. Riddles, C. Gazzola, R.L. Blakeley, B. Zerner, *Can. J. Biochem.*, 1980, **58**, 1335.
- [40] R.L. Blakeley, N.E. Dixon, B. Zerner, *Biochim. Biophys. Acta*, 1983, **744**, 219.
- [41] C. Gazzola, R.L. Blakeley, B. Zerner, *Can. J. Biochem.*, 1973, **51**, 1325.
- [42] R.L. Blakeley, E.C. Webb, B. Zerner, *Biochemistry*, 1969, **8**, 1984.
- [43] R.L. Blakeley, J.A. Hinds, H.E. Kunze, E.C. Webb, B. Zerner, *Biochemistry*, 1969, **8**, 1991.
- [44] N.E. Dixon, C. Gazzola, J.J. Watters, R.L. Blakeley, B. Zerner, *J. Am. Chem. Soc.*, 1975, **97**, 4130.
- [45] P.W. Riddles, V. Whan, R.L. Blakeley, B. Zerner. *Gene*. 1991. **108**, 265.
- [46] A.D. Larson, R.E. Kallio, *J. Bacteriol.*, 1954, **68**, 67.
- [47] M.J. Todd, R.P. Hausinger, *J. Biol. Chem.*, 1987, **262**, 5963.
- [48] M.J. Todd, R.P. Hausinger, *J. Biol. Chem.*, 1989, **264**, 15835.
- [49] I.S. Park, R.P. Hausinger, *Prot. Sci.*, 1993, **2**, 1034.
- [50] P.A. Karplus, M.A. Pearson, R.P. Hausinger, *Acc. Chem. Res.*, 1997, **30**, 330.
- [51] M.A. Pearson, I.S. Park, R.A. Schaller, L.O. Michel, P.A. Karplus, R.P. Hausinger, *Biochemistry*, 2000, **39**, 8575.
- [52] M.J. Todd, R.P. Hausinger, *Biochemistry*, 2000, **39**, 5389.
- [53] R.P. Hausinger, G.J. Colpas, A. Soriano, *ASM News*, 2001, **67**, 78.
- [54] H.L.T. Mobley, R.P. Hausinger, *Microbiol. Rev.*, 1989, **53**, 85.
- [55] H.L.T. Mobley, M.D. Island, R.P. Hausinger, *Microbiol. Rev.*, 1995, **59**, 451.
- [55a] R.P. Hausinger, P.A. Karplus, [w:] *Handbook on Metalloproteins*, K. Wieghardt, R. Huber, T.L. Poulos, A. Messerschmidt (red.), John Wiley, West Sussex UK 2001, s. 867.
- [56] S. Benini, C. Gessa, S. Ciurli, *Soil Biol. Biochem.*, 1996, **28**, 819.
- [57] S. Benini, S. Ciurli, W.R. Rypniewski, K.S. Wilson, S. Mangani, *Acta Cryst.*, 1998, **D54**, 409.
- [58] S. Ciurli, S. Benini, W.R. Rypniewski, K.S. Wilson, S. Miletti, S. Mangani, *Coord. Chem. Rev.*, 1999, **192**, 331.
- [59] A.M. Barrios, S.J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 11751.
- [60] C.M. Collins, S.E.F. D'Orazio, *Mol. Microbiol.*, 1993, **9**, 907.
- [61] A. Sirko, R. Brodzik, *Acta Biochim. Pol.*, 2000, **47**, 1189.
- [62] R.L. Mulvaney, J.M. Bremner, *Soil Biochem.*, 1981, **5**, 153.
- [63] K.L. Sahrawat, *Plant Soil*, 1980, **57**, 335.
- [64] H.A.H. Hasan, *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 2000, **31**, 2565.
- [65] R.M. Welch, *J. Plant Nutr.*, 1981, **3**, 345.
- [66] R.G. Winkler, D.G. Blevins, J.C. Polacco, D.D. Randall, *Trends Biochem. Sci.*, 1988, **13**, 97.
- [67] L.E. Zonia, N.E. Stebbins, J.C. Polacco, *Plant Physiol.*, 1995, **107**, 1097.
- [68] R.A. Burne, Y-Y. M. Chen, *Microb. Infect.*, 2000, **2**, 533.
- [69] J.S. Rodman, *Nephron*, 1999, **81** (Suppl.), 50.
- [70] I.J.M. Rosenstein, J.M.T. Hamilton-Miller, *CRC Crit. Rev. Microbiol.*, 1984, **11**, 1.
- [71] B.E. Dunn, S.H. Phadnis, *Yale J. Biol. Med.*, 1998, **71**, 63.
- [72] D.J. McGee, H.L.T. Mobley, *Curr. Opin. Gastroenterol.*, 2000, **16**, 24.
- [73] H.L.T. Mobley, *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 1996, **10** (Suppl. 1) 57.
- [74] B.H. Byrnes, J.R. Freney, *Fert. Res.*, 1995, **42**, 251.
- [75] S. Ciurli, C. Marzadori, S. Benini, S. Deiana, C. Gessa, *Soil Biol. Biochem.*, 1996, **28**, 811.
- [76] N.M. Pettit, A.R.J. Smith, R.B. Freedman, R.G. Burns, *Soil Biol. Biochem.*, 1976, **8**, 479.
- [77] L. Gianfreda, A. De Cristofaro, M.A. Rao, A. Violante, *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 1995, **59**, 811.
- [78] C. Marzadori, O. Francioso, C. Ciavatta, C. Gessa, *Soil Biol. Biochem.*, 2000, **32**, 1893.
- [79] J.M.T. Hamilton-Miller, R.A. Gargan, *Invest. Urol.*, 1979, **16**, 327.
- [80] T. Chiyoda, K. Iida, K. Takatori, M. Kajiwara, *Chem. Pharm. Bull.*, 1998, **46**, 718.

- [81] E.B. Harris, B. Randhawa, K. Prabhakaran, *Anal. Biochem.*, 1997, **249**, 117.
- [82] I. Wałecz, R. Koncki, E. Leszczyńska, S. Głąb, *Anal. Chim. Acta*, 1995, **315**, 289.
- [83] L. Deng, H. Tan, Y. Xu, L. Nie, S. Yao, *Enzyme Microb. Technol.*, 1997, **21**, 258.
- [84] K. Ogura, K. Nakaoka, M. Nakayama, M. Kobayashi, A. Fujii, *Anal. Chim. Acta*, 1999, **384**, 219.
- [85] W. Qin, Z. Zhang, Y. Peng, *Anal. Chim. Acta*, 2000, **407**, 81.
- [86] A.B. Kharitonov, M. Zayats, N.F. Starodub, Y.M. Shirshov, *Sens. Actuators*, 2000, **B70**, 222.
- [87] A.M.G. Soto, S.A. Jaffari, S. Bone, *Biosens. Bioelectronics*, 2001, **16**, 23.
- [88] W. Drukker, F.M. Parsons, A. Gordon, [w:] *Replacement of Renal Functions by Dialysis*, W. Drukker, F.M. Parsons, J.F. Maher (red.), Martinus Nijhoff, The Hague 1979, s. 244.
- [89] M.V. Cattaneo, T.M.S. Chang, *ASAI Trans.*, 1991, **37**, 80.
- [90] G. Kibarer, G. Akovali, *Biomaterials*, 1996, **17**, 1473.
- [91] M. Roberts, *Nephrology*, 1998, **4**, 275.
- [92] L.J. Schussel, J.E. Atwater, *Chemosphere*, 1995, **30**, 985.
- [93] T. Krawczyński vel Krawczyk, *Chem. Anal. (Warsaw)*, 1998, **43**, 135.
- [94] V. Volotovskiy, N. Kim, *Electroanalysis*, 1998, **10**, 61.
- [95] A.L. Kukla, N.I. Kanjuk, N.F. Starodub, Y.M. Shirshov, *Sens. Actuators*, 1999, **B57**, 213.
- [96] N.F. Starodub, W. Torbicz, D. Pijanowska, V.M. Starodub, M.I. Kanjuk, M. Dawgul, *Sens. Actuators*, 1999, **B58**, 420.
- [97] T. Krawczyński vel Krawczyk, M. Moszczyńska, M. Trojanowicz, *Biosens. Bioelectronics*, 2000, **15**, 681.
- [98] B. Krajewska, W. Zaborska, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 1999, **6**, 75.
- [99] J. Schneider, H. Kaltwasser, *Arch. Microbiol.*, 1984, **139**, 355.
- [100] M.Y. Kamel, R.R. Hamed, *Acta Biol. Med. Ger.*, 1975, **34**, 971.
- [101] G.W. McCarty, J.M. Bremner, S.J. Lee, *Plant Soil*, 1990, **127**, 269.
- [102] H. Nakano, S. Takenishi, S. Watanabe, *Agric. Biol. Chem.*, 1984, **48**, 1495.
- [103] L.-T. Hu, H.L.T. Mobley, *Infect. Immun.*, 1990, **58**, 992.
- [104] H.L.T. Mobley, M.J. Cortesia, L.E. Rosenthal, B.D. Jones, *J. Clin. Microbiol.*, 1988, **26**, 831.
- [105] D.J. Evans, Jr, D.G. Evans, S.S. Kirkpatrick, D.Y. Graham, *Microb. Pathogen.*, 1991, **10**, 15.
- [106] M.J. Todd, J. Gomez, *Anal. Biochem.*, 2001, **296**, 179.
- [107] J.M. Breitenbach, R.P. Hausinger, *Biochem. J.*, 1988, **250**, 917.
- [108] I. Magaña-Plaza, C. Montes, J. Ruiz-Herrera, *Biochim. Biophys. Acta*, 1971, **242**, 230.
- [109] S.B. Mulrooney, M.J. Lynch, H.L.T. Mobley, R.P. Hausinger, *J. Bacteriol.*, 1988, **170**, 2202.
- [110] R. P. Hausinger, *J. Biol. Chem.*, 1986, **261**, 7866.
- [111] S. Christians, J. Jose, U. Schäfer, H. Kaltwasser, *FEMS Microbiol. Lett.*, 1991, **80**, 271.
- [112] H. Eng, J.A. Robertston, G.W. Stemke, *Can. J. Microbiol.*, 1986, **32**, 487.
- [113] D. Thirkell, A.D. Myles, B.L. Precious, J.S. Frost, J.C. Woodall, M.G. Burdon, W.C. Russell, *J. Gen. Microbiol.*, 1989, **135**, 315.
- [114] E.H. Creaser, R.L. Porter, *Int. J. Biochem.*, 1985, **17**, 1339.
- [115] P.T. Smith, A.D. King, Jr., N. Goodman, *J. Gen. Microbiol.*, 1993, **139**, 957.
- [116] M.W. Lubbers, S.B. Rodriguez, N.K. Honey, R.J. Thornton, *Can. J. Microbiol.*, 1996, **42**, 132.
- [116a] F. Mirbod, R.A. Schaller, G.T. Cole, *Med. Mycol.*, 2002, **40**, 35.
- [117] W. Karcz, B. Krajewska, W. Zaborska, *Acta Physiol. Plant.*, 2001, **23**, 329.
- [118] M. Taylor, C.S. Goodwin, Q.N. Karim, *FEMS Microbiol. Lett.*, 1988, **55**, 259.
- [119] S.D. Cesareo, S.R. Langton, *FEMS Microbiol. Lett.*, 1992, **99**, 15.
- [120] P.V. Sundaram, *Biochim. Biophys. Acta*, 1973, **321**, 319.
- [121] C. Lopreore, L.D. Byers, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1998, **349**, 299.
- [122] P.R. Martin, R.P. Hausinger, *J. Biol. Chem.*, 1992, **267**, 20024.
- [123] Y. Qin, J.M.S. Cabral, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1994, **49**, 217.

- [124] P.K. Srivastava, A.M. Kayastha, J. Mol. Catal. B: Enzym., 2001, **16**, 81.
- [125] I.S. Park, R.P. Hausinger. J. Prot. Chem.. 1993, **12**, 51.
- [126] S. Mulrooney, T. Zakharin, R.A. Schaller. R.P. Hausinger. Arch. Biochem. Biophys., 2001, **394**, 280.
- [127] W.N. Fishbein, T.S. Winter, J.D. Davidson, J. Biol. Chem., 1965, **240**, 2402.
- [128] W.N. Fishbein, P.P. Carbone, J. Biol. Chem., 1965, **240**, 2407.
- [129] W.N. Fishbein, J. Biol. Chem., 1969, **244**, 1188.
- [130] W.N. Fishbein, Biochim. Biophys. Acta, 1977, **484**, 433.
- [131] J. Bennett, E.A. Wren, Biochim. Biophys. Acta, 1977, **482**, 421.
- [132] P.V. Sundaram, K.J. Laidler. Can. J. Biochem., 1970, **48**, 1132.
- [133] R.K. Andrews, A. Dexter, R.L. Blakeley, B. Zerner, J. Am. Chem. Soc., 1986, **108**, 7124.
- [134] M. Hirai, R. Kawai-Hirai, T. Hirai, T. Ueki, Europ. J. Biochem., 1993, **215**, 55.
- [135] G. Mamiya, K. Takishima, M. Masakuni, T. Kayumi, K. Ogawa, T. Sekita, Proc. Jpn. Acad., Ser. B, 1985, **61**, 395.
- [136] J.C. Polacco, E.A. Havir, J. Biol. Chem., 1979, **254**, 1707.
- [137] R.W. Krueger, M.A. Holland, D. Chisholm, J.C. Polacco, Gene, 1987, **54**, 41.
- [138] J.-J. Yu, S.L. Smithon, P.W. Thomas, T.N. Kirkland, G.T. Cole. Gene, 1997, **198**, 387.
- [139] Y. Tange, O. Niwa, Curr. Genet., 1997, **32**, 244.
- [140] B.D. Jones, H.L.T. Mobley, J. Bacteriol., 1989, **171**, 6414.
- [141] J. Jose, U.K. Schäfer, H. Kaltwasser, Arch. Microbiol., 1994, **161**, 384.
- [142] P. Krishnamurthy, M. Parlow, J.B. Zitzer, N.B. Vakil, H.L.T. Mobley, M. Levy, S.H. Phadnis, B.E. Dunn, Infect. Immun., 1998, **66**, 5060.
- [143] B.E. Dunn, G.P. Campbell, G.I. Perez-Perez, M.J. Blazer, J. Biol. Chem., 1990, **265**, 9464.
- [144] C.L. Clayton, M.J. Pallen, H. Kleanthous, B.W. Wren, S. Tabaqchali. Nucl. Acids Res., 1990, **18**, 362.
- [145] A. Labigne, V. Cussac, P. Courcoux, J. Bacteriol., 1991, **173**, 1920.
- [146] N.-C. Ha, S.-T. Oh, J.Y. Sung, K.A. Cha, M.H. Lee, B.-H. Oh. Nature Struct. Biol., 2001, **8**, 505.
- [147] B.E. Dunn, M.G. Grütter, Nature Struct. Biol., 2001, **8**, 480.
- [147a] G. Sachs, D. Scott, D. Weeks, K. Melchers, Trends Microbiol, 2001, **9**, 532.
- [147b] N.-C. Ha, B.-H. Oh, Trends Microbiol., 2001, **9**, 534.
- [147c] K. Stingl, K. Altendorf, E.P. Bakker, Trends Microbiol., 2002, **10**, 70.
- [148] S.B. Mulrooney, R.P. Hausinger, J. Bacteriol., 1990, **172**, 5837.
- [149] A. Blanchard, Mol. Microbiol., 1990, **4**, 669.
- [150] G. Mörsdorf, H. Kaltwasser, FEMS Microbiol. Lett., 1990, **66**, 67.
- [151] S.K. Freyermuth, M. Bacanamwo, J.C. Polacco, Plant J., 2000, **21**, 53.
- [152] E. Jabri, M.H. Lee, R.P. Hausinger, P.A. Karplus, J. Mol. Biol., 1992, **227**, 934.
- [153] E. Jabri, P.A. Karplus. Biochemistry, 1996, **35**, 10616.
- [154] L. Holm, C. Sander, Proteins, 1997, **28**, 72.
- [155] J.A. Gerlt, P.C. Babbitt, Annu. Rev. Biochem., 2001, **70**, 209.
- [156] Z. Wang, F.A. Quioco, Biochemistry, 1998, **37**, 8314.
- [157] J.L. Vanhooke, M.M. Benning, F.M. Raushel, H.M. Holden, Biochemistry, 1996, **35**, 6020.
- [158] S. Benini, S. Ciurli, H.F. Noltling, S. Mangani, Europ. J. Biochem., 1996, **239**, 61.
- [159] G.H. Lorimer, M.R. Badger, T.J. Andrews, Biochemistry, 1976, **15**, 529.
- [160] I.S. Park, R.P. Hausinger, Science, 1995, **267**, 1156.
- [161] R.P. Smyj, J. Mol. Structure (Theochem), 1997, **391**, 207.
- [162] M.A. Pearson, L.O. Michel, R.P. Hausinger, P.A. Karplus, Biochemistry, 1997, **36**, 8164.
- [163] F. Basolo, R.G. Pearson, *Mechanisms of Inorganic Reactions*, Wiley, New York 1967, s. 31.
- [164] B. Krajewska, J. Bioact. Comp. Polym., 2000, **15**, 155.
- [165] S.J. Lippard, Science, 1995, **268**, 996.

- [166] F. Musiani, E. Arnofi, R. Casadio, S. Ciurli, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2001, **6**, 300.
- [167] M. Zimmer, *J. Biomol. Struct. Dynam.*, 2000, **17**, 787.
- [168] A.J. Stemmler, J.W. Kampf, M.L. Kirk, V.L. Pecoraro, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 6368.
- [169] D. Volkmer, B. Hommerich, K. Griesar, W. Haase, B. Krebs, *Inorg. Chem.*, 1996, **35**, 3792.
- [170] K. Yamaguchi, S. Koshino, F. Akagi, M. Suzuki, A. Uehara, S. Suzuki, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 5752.
- [171] A.M. Barrios, S.J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **121**, 11751.
- [172] H.J. Moynihan, C.K. Lee, W. Clark, N.-H.L. Wang, *Biotechnol. Bioeng.*, 1989, **34**, 951.
- [173] T.-C. Huang, D.-H. Chen, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 1991, **52**, 433.
- [174] J.P. Hoare, K.J. Laidler, *J. Am. Chem. Soc.*, 1950, **72**, 2487.
- [175] L. Goldstein, M. Levy, L. Shemer, *Biotechnol. Bioeng.*, 1983, **25**, 1485.
- [176] M. Leszko, W. Zaborska, B. Krajewska, *Bull. Pol. Acad. Sci.*, 1997, **45**, 129.
- [177] A.A. Saboury, A.A. Moosavi-Movahedi, *J. Enzyme Inhibition*, 1997, **11**, 217.
- [178] N.E. Dixon, R.L. Blakeley, B. Zerner, *Can. J. Biochem.*, 1980, **58**, 481.
- [179] P.W. Riddles, R.K. Andrews, R.L. Blakeley, B. Zerner, *Biochim. Biophys. Acta*, 1983, **743**, 115.
- [180] M.J. Todd, R.P. Hausinger, *J. Biol. Chem.*, 1991, **266**, 10260.
- [181] P.K. Srivastava, A.M. Kayastha, *Plant Sci.*, 2000, **159**, 149.
- [182] R. Norris, K. Brocklehurst, *Biochem. J.*, 1976, **159**, 245.
- [183] M.J. Todd, R.P. Hausinger, *J. Biol. Chem.*, 1991, **266**, 24327.
- [184] K. Kobashi, J. Hase, K. Uehara, *Biochim. Biophys. Acta*, 1962, **65**, 380.
- [185] K. Kobashi, K. Kurnaki, J. Hase, *Biochim. Biophys. Acta*, 1971, **227**, 429.
- [186] S. Odake, K. Nakahashi, T. Morikawa, S. Takebe, K. Kobashi, *Chem. Pharm. Bull.*, 1992, **40**, 2764.
- [187] W. Zaborska, M. Leszko, M. Kot, A. Juszkievicz, *Acta Biochim. Pol.*, 1997, **44**, 89.
- [188] B. Krajewska, W. Zaborska, M. Leszko, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2001, **14**, 105.
- [189] S. Odake, T. Morikawa, M. Tsuchiya, L. Imamura, K. Kobashi, *Biol. Pharm. Bull.*, 1994, **17**, 1329.
- [190] G.E. Kenny, *Yale J. Biol. Med.*, 1983, **56**, 717.
- [191] A. Blanchard, S. Razin, G.E. Kenny, M.F. Barile, *J. Bacteriol.*, 1988, **170**, 2692.
- [192] A.J. Pope, C.D.N. Toseland, B. Rushant, S. Richardson, M. McVey, J. Hills, *Dig. Dis. Sci.*, 1998, **43**, 109.
- [193] L. Qui-Xiang, J.R. Freney, D.G. Keerthisinghe, M.B. Peoples, *Soil Biol. Biochem.*, 1994, **26**, 1059.
- [194] D.P. Griffith, D.M. Musher, *Urology*, 1975, **5**, 299.
- [195] D.P. Griffith, J.R. Gibson, C.W. Clinton, D.M. Musher, *J. Urol.*, 1978, **119**, 9.
- [196] O.E. Millner, Jr., J.A. Andersen, M.E. Appler, C.E. Benjamin, J.G. Edwards, D.T. Humphrey, E.M. Shearer, *J. Urol.*, 1982, **127**, 346.
- [197] W.S. Faracci, B.V. Yang, D. O'Rourke, R.W. Spencer, *Bioorg. Med. Chem.*, 1995, **3**, 605.
- [198] D.G. Keerthisinghe, R.L. Blakeley, *Soil Biol. Biochem.*, 1995, **27**, 739.
- [199] K. Kobashi, S. Takebe, A. Numata, *J. Biochem.*, 1985, **98**, 1681.
- [200] C.B. Christianson, B.H. Byrnes, G. Carmona, *Fert. Res.*, 1990, **26**, 21.
- [201] G.L. Creason, R.M. Schmitt, E.A. Douglas, L.L. Hendrickson, *Soil Biol. Biochem.*, 1990, **22**, 209.
- [202] G.W. McCarty, J.M. Bremner, H.S. Chai, *Biol. Fert. Soils*, 1989, **8**, 123.
- [203] D.G. Keerthisinghe, J.R. Freney, *Soil Biol. Biochem.*, 1994, **26**, 1527.
- [204] C.J. Watson, H. Miller, P. Poland, D.J. Kilpatrick, M.D.B. Allen, M.K. Garrett, C.B. Christianson, *Soil Biol. Biochem.*, 1994, **26**, 1165.
- [205] L.L. Hendrickson, E.A. Douglas, *Soil Biol. Biochem.*, 1993, **25**, 1613.
- [206] L.V. Antisari, C. Marzadori, P. Gioacchini, S. Ricci, C. Gessa, *Biol. Fert. Soils*, 1996, **22**, 196.

- [207] P. Gioacchini, C. Giovannini, C. Marzadori, L.V. Antisari, A. Simoni, C. Gessa, *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 2000, **31**, 3177.
- [208] C.D.L. Rawluk, C.A. Grant, G.J. Racz, *Can. J. Soil Sci.*, 2001, **81**, 239.
- [209] B. Krajewska, W. Zaborska, M. Leszko, Z. Brzózka, *Polish J. Chem.*, 1999, **73**, 359.
- [210] J.C. Mazurkiewicz, S.A. Bingham, S. Runswick, *B.C.N. Ang. Ann. Clin. Biochem.*, 1993, **30**, 215.
- [211] G.R.D. Jones, *Ann. Clin. Biochem.*, 1997, **34**, 430.
- [212] B. Krajewska, W. Zaborska, M. Leszko, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 1997, **3**, 231.
- [213] O. Prakash, G. Bhushan, *J. Enzyme Inhibition*, 1998, **13**, 69.
- [214] A.A. Saboury, A.A. Moosavi-Movahedi, *J. Enzyme Inhibition*, 1997, **12**, 273.
- [215] A.A. Saboury, *Ind. J. Biochem. Biophys.*, 2000, **37**, 347.
- [216] M. Leszko, W. Zaborska, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 1993, **57**, 113.
- [217] W.H.R. Shaw, *J. Am. Chem. Soc.*, 1954, **76**, 2160.
- [218] W.H.R. Shaw, D.N. Raval, *J. Am. Chem. Soc.*, 1961, **83**, 3184.
- [219] B. Krajewska, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 1991, **52**, 157.
- [220] C. Preininger, O.S. Wolfbeis, *Biosens. Bioelectronics*, 1996, **11**, 981.
- [221] S. Mahadevan, F.D. Sauer, J.D. Erfle, *Biochem. J.*, 1977, **163**, 495.
- [222] E.C. Toren, Jr., F.J. Burger, *Microchim. Acta*, 1968, 1049.
- [223] D. Liu, A. Yin, K. Chen, K. Ge, L. Nie, S. Yao, *Anal. Lett.*, 1995, **28**, 1323.
- [224] R.T. Andres, R. Narayanaswamy, *Analyst*, 1995, **120**, 1549.
- [225] K. Oehlschläger, R. Hüttl, G. Wolf, *Thermochim. Acta*, 1998, **310**, 185.
- [226] M.L. Antonelli, V. Carunchio, M. Luciani, G. Vinci, *Thermochim. Acta*, 1987, **122**, 95.
- [227] O. Prakash, D.K. Wishwakarma, *J. Plant Biochem., Biotech.*, 2001, **10**, 147.
- [228] P.K. Srivastava, A.M. Kayastha, M.V. Jagannadham, *J. Biochem. Mol. Biol. Biophys.*, 2002, **6**, 1.
- [229] W. Zaborska, B. Krajewska, M. Leszko, Z. Olech, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2001, **13**, 103.
- [230] C. Tran-Minh, *J. Mol. Recognit.*, 1996, **9**, 658.
- [231] W. Brack, A. Paschke, H. Segner, R. Wennrich, G. Schüürmann, *Chemosphere*, 2000, **40**, 829.
- [232] F. Kormos, A.N. Lengauer, *Lab. Rob. Autom.*, 2000, **12**, 27.
- [233] E. Wittekindt, M. Werner, A. Reinicke, A. Herbert, P. Hansen, *Environ. Technol.*, 1996, **17**, 597.
- [234] D. Narinesingh, R. Mungal, T.T. Ngo, *Anal. Chim. Acta*, 1994, **292**, 185.
- [235] A. Prell-Swaid, G. Schwedt, *Acta Chim. Hydrobiol.*, 1994, **22**, 70.
- [236] K. Jung, G. Bitton, B. Koopman, *Water Res.*, 1995, **29**, 1929.
- [237] V. Volotovskiy, Y.J. Nam, N. Kim, *Sens. Actuators*, 1997, **B42**, 233.
- [238] T. Danzer, G. Schwedt, *Anal. Chim. Acta*, 1996, **318**, 275.
- [239] A. Zürn, B. Rabolt, M. Gräfe, H. Müller, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1994, **349**, 666.
- [240] G.A. Zhylyak, S.V. Dzyadevich, Y.J. Korpan, A.P. Soldatkin, A.V. El'skaya, *Sens. Actuators*, 1995, **B24**, 148.
- [241] R. Shi, K. Stein, G. Schwedt, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1997, **357**, 752.
- [242] J.M. Bremner, L.A. Douglas, *Soil Biol. Biochem.*, 1971, **3**, 297.
- [243] L.G. Bundy, J.M. Bremner, *Soil Biol. Biochem.*, 1973, **5**, 847.
- [244] F. Kurdali, *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 2001, **32**, 453.
- [245] X. Xu, Y. Huang, L. Zhou, G. Huang, O. Van Cleemput, *Biol. Fert. Soils*, 2001, **34**, 286.

**CHEMICZNA SYNTEZA
OLIGORYBONUKLEOTYDÓW**
**CHEMICAL SYNTHESIS
OF OLIGORIBONUCLEOTIDES**

Jan Milecki

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

Abstract

Wstęp

Podstawowe metody syntezy łańcucha oligonukleotydowego

Grupy chroniące resztę zasadową

Grupy chroniące funkcje hydroksylowe

Grupy blokujące funkcję 5'OH

Dobór grupy blokującej funkcję 2'OH w syntezie oligorybonukleotydów

Uwagi końcowe

Piśmiennictwo cytowane



Dr Jan Milecki urodził się w 1949 r. w Poznaniu. Studia chemiczne na Wydziale Matematyki, Fizyki i Chemii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu ukończył w 1972 r. i odtąd związany jest z Zakładem Spektrochemii Organicznej tegoż uniwersytetu (Wydział Chemii). Jego zainteresowania badawcze obejmują syntezę oligorybonukleotydów modyfikowanych i znakowanych izotopowo i wykorzystanie tych cząsteczek modyfikowanych do badań struktury oligorybonukleotydów. Dr Milecki odbył staże naukowe w NIH (USA), Freie Universität Berlin i na Uniwersytecie w Uppsali (Szwecja).

Z tym ostatnim ośrodkiem utrzymuje stałą współpracę naukową.

ABSTRACT

Basic issues and problems of chemical synthesis of oligoribonucleotides are presented. The paper describes three methods for construction of oligonucleotide chains:

(1) a triester method which involves activation of nucleoside phosphodiester with different azole sulfonates, and currently widely used methods employing P^{III} synthetic intermediates:

(2) a phosphoramidite method which makes use of activation of nucleoside phosphoramidites by weakly acidic azoles or azole salts,

(3) an H-phosphonate method, which uses nucleoside H-phosphonates activated by acid chlorides, both P^{III} intermediates are applied mainly in solid-support synthetic methodology.

Problems of choosing appropriate protecting group for the synthesis are discussed. The article presents properties of basic types of protecting groups for lactam, exo-amino (base-labile protection), and hydroxyl groups (acid-labile for 5' protection, acid- or specific reagent-labile for 2' protection). The problem of 2'OH protection is described in detail. In this respect acid-labile groups and alkylsilyl groups are compared and their advantages and disadvantages are discussed. More detailed discussion is devoted to the phenomenon of the silyl group migration during the synthesis of monomeric units for oligonucleotide chain assembly. Basing on the NMR study of the isomerisation reaction it was possible to determine limits of safety of the reaction conditions.

WSTĘP

Już wkrótce po ustaleniu struktury kwasów nukleinowych, a zwłaszcza po opublikowaniu przez Watsona i Cricka koncepcji zapisu i schematu przekazywania informacji genetycznej zakodowanej w strukturze DNA [1], podjęto próby syntezy fragmentów kwasów nukleinowych o zamierzonej sekwencji. W owym czasie celem chemicznej syntezy fragmentów DNA czy RNA było potwierdzenie (lub nie) ich identyczności z oligonukleotydami izolowanymi ze źródeł naturalnych i w ten sposób potwierdzenie struktury (głównie pierwszorzędowej) tych ostatnich. Szybko jednak okazało się, że syntetyczne oligonukleotydy, nawet o niewielkiej długości, mogą mieć różnorodne zastosowania.

Wiele funkcji biologicznych kwasów nukleinowych wiąże się z obecnością w nich charakterystycznych domen, czy motywów strukturalnych [2]. Rodzaj przejawianej aktywności biologicznej wynika często z trzeciorzędowej struktury fragmentów kwasu nukleinowego tworzących te domeny. Aby jak najpełniej zrozumieć mechanizm funkcjonowania takich wyróżnionych sekwencji, konieczne jest poznanie ich struktury przestrzennej oraz oznaczenie podstawowych czynników chemicznych (np. kompleksowanie kationów) i parametrów fizykochemicznych, które decydują o stabilizacji takich struktur, a także warunkują ich dynamikę konformacyjną często powiązaną z funkcją biologiczną. Izolacja ze źródeł naturalnych dostatecznych ilości takich fragmentów DNA czy RNA jest niezwykle pracochłonna, trudna, a często wręcz niemożliwa. Dlatego od wielu lat oligonukleotydy (niemodyfikowane i modyfikowane) w ilościach i o czystości koniecznych do prowadzenia takich badań pozyskuje się drogą chemicznej syntezy.

Innym obszarem zastosowań syntetycznych oligonukleotydów jest inżynieria genetyczna. Syntetyczne oligodeoksynukleotydy, zawierające zaprogramowaną informację genetyczną, połączone (T4 DNA ligazą) w dłuższy fragment dwuniciowego DNA o sekwencji genu określonego białka, mogą być włączane do plazmidów lub bakteriofagów i za pomocą tych wektorów wprowadzane do mikroorganizmów (np. do bakterii czy drożdży) [3]. W odpowiednich warunkach mikroorganizmy, transformowane obcym genem, podejmują ekspresję tych genów i produkują w dużej ilości „nie swoje” białka, używane później przez człowieka jako leki (np. insulina, hormon wzrostu i wiele innych).

Zapotrzebowanie na syntetyczne oligonukleotydy i ich analogi zaczęło wzrastać eksponencjalnie wraz z narodzinami koncepcji terapii antysensowej [4], a także z odkryciem katalitycznych właściwości RNA [5]. Dotyczy to w takim samym stopniu oligodeoksy- i oligorybonukleotydów, a ich ilość, pokrywająca potrzeby klinicznej chemoterapii, szacowana jest w skali światowej, na 2–3 tony (!) rocznie [4b].

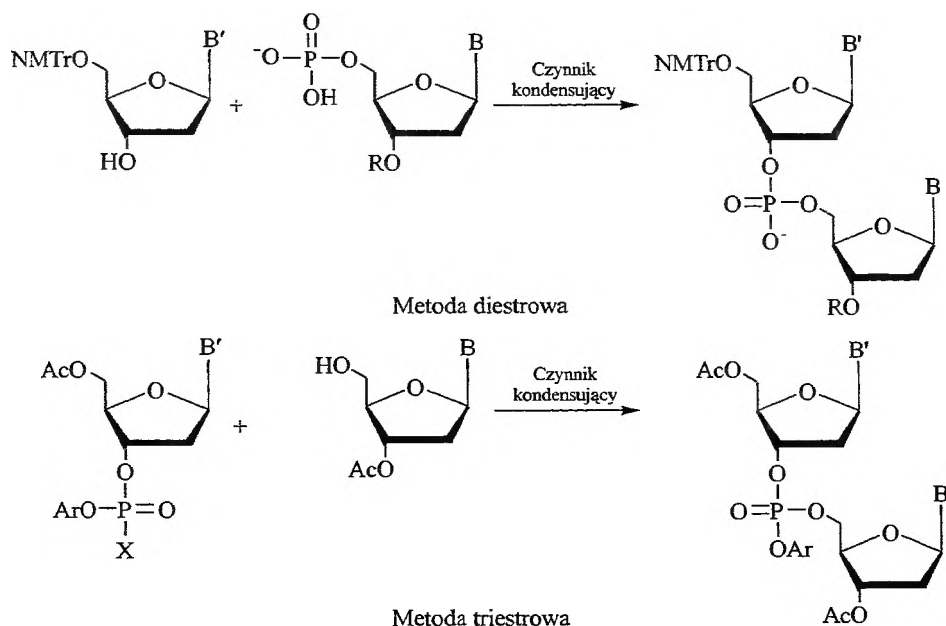
W świetle tych faktów widoczne jest, że syntetyczne oligonukleotydy stanowią zarówno ważne narzędzie w rozwiązywaniu problemów badawczych w zakresie badań podstawowych, jak i podstawowe ogniwo w realizacji najwyższej wagi multidyscyplinarnych, ważnych społecznie projektów aplikacyjnych. Tempo rozwoju metod syntezy oligodeoksynukleotydów, mimo pełnej automatyzacji

procesu syntezy, ledwo nadąża za ciągle wzrastającym zapotrzebowaniem. Jeszcze trudniejsza sytuacja jest w syntezie analogów oligonukleotydów, a szczególnie oligorybonukleotydów, do których dostęp jest wciąż mocno ograniczony. Stąd ciągła i pilna potrzeba lepszego poznania chemii kwasów nukleinowych, poszukiwania nowych pochodnych o bardziej odpowiednich do celów syntetycznych właściwościach chemicznych oraz nowych, bardziej efektywnych metod syntezy oligonukleotydów.

Podstawowe trudności w syntezie oligonukleotydów wynikają z faktu, że w nukleotydach występują potencjalnie reaktywne grupy funkcyjne o bardzo zbliżonych właściwościach – dwa reaktywne miejsca w reszcie kwasu fosforowego ROPO_3^{-2} czy dwie grupy hydroksylowe reszty cukrowej, miejsca, z których tylko jedno należy selektywnie odsłonić przed reakcją kondensacji. Dlatego dobór odpowiednich grup ochronnych oraz selektywnych i wydajnych metod ich wprowadzania i usuwania stał się jednym z najważniejszych problemów syntezy oligodeoksy-, a szczególnie oligorybonukleotydów.

PODSTAWOWE METODY SYNTEZY ŁAŃCUCHA OLIGONUKLEOTYDOWEGO

We wczesnym okresie badań nad syntezą fragmentów kwasów nukleinowych stosowano dwie metody syntezy oligonukleotydów: diestrową [6] i triestrową [7] (schemat 1).



Schemat 1. Dwie metody syntezy oligonukleotydów

Metoda diestrowa zakładała użycie monoestrów fosforanowych nukleozydów jako jednostek do syntezy wiązań internukleotydotowych. W konsekwencji rosnący łańcuch oligonukleotydotowy stawał się cząsteczką o zwiększającym się ładunku ujemnym, co powodowało trudności w prowadzeniu reakcji w większości rozpuszczalników organicznych. Ponadto produkty każdego etapu wydłużania łańcucha, a także produkt końcowy syntezy wymagały pracochłonnego oczyszczania z zastosowaniem uciążliwych technik jonowymiennych. Metoda diestrowa posłużyła zespołowi H.G. Khorany do syntezy oligomeru DNA o sekwencji genu tyrozynowego tRNA [6]. Osiągnięcie to zostało uhonorowane Nagrodą Nobla.

Mimo tego imponującego wyniku, oczywiście stały się ograniczenia metody diestrowej, polegające na trudnościach z rozpuszczalnością komponentów, niskiej (w stosunku do potrzeb syntezy) wydajności tworzenia wiązania internukleotydotowego i konieczności żmudnego oczyszczania produktów poszczególnych etapów syntezy.

Metoda triestrowa, dzięki opracowaniu i włączeniu w schemat syntezy dodatkowej grupy blokującej funkcję fosforanową, okazała się dużo bardziej efektywna. Reakcje kondensacji można było prowadzić w typowych rozpuszczalnikach organicznych, produkty miały charakter obojętny, a ich oczyszczanie można było sprawnie przeprowadzić za pomocą rutynowej chromatografii adsorpcyjnej.

Przy zastosowaniu tej metody otrzymano wiele oligomerów o długości kilkunastu, a nawet kilkudziesięciu jednostek, które po odblokowaniu i enzymatycznym połączeniu (z użyciem T4 ligazy) [8] dawały oligomery o znacznej długości, odznaczające się identycznymi właściwościami co natywne fragmenty DNA o tej samej sekwencji. Najbardziej znanym i spektakularnym osiągnięciem była dokonana pod koniec lat 70. w zespole Naranga synteza genu interferonu i *lac*-operatora [9], a także synteza genów somatostatyny i insuliny przez zespół Itakury [10]. Po wprowadzeniu tych genów metodami inżynierii genetycznej do bakterii uzyskano ekspresję odpowiednich białek. Osiągnięcie to zastosowano [11] w produkcji preparatów na potrzeby przemysłu farmaceutycznego.

Postęp w dziedzinie syntezy oligomerów DNA zawsze wyprzedzał dokonania na polu syntezy oligorybonukleotydotów. Jest to konsekwencja obecności w cząsteczce RNA dodatkowej grupy hydroksylowej w pozycji 2'. Skutki tej obecności widoczne są na każdym etapie syntezy:

– podczas otrzymywania odpowiednio zablokowanego komponentu („syntynu” [12]) do budowy łańcucha należy selektywnie zablokować grupę 2'OH, pozostawiając wolną sąsiednią grupę 3'OH o bardzo podobnym charakterze i otoczeniu sterycznym i elektronowym,

– podczas syntezy wiązania internukleotydotowego grupa blokująca 2'OH wnosi zawadę przestrzenną, spowalniając proces tworzenia tego wiązania i obniżając wydajność,

– otrzymany oligomer należy poddać dodatkowej reakcji odblokowania, w celu usunięcia grupy blokującej pozycję 2'. Nie tylko wydłuża to proces syn-

tezy, ale stwarza istotne niebezpieczeństwo izomeryzacji 2'–3' wiązania internukleotydowego lub jego rozerwania. Mimo tych trudności również w syntezie oligorybonukleotydów odnotowano wiele sukcesów [13].

Przełom w rozwoju metod syntezy RNA i DNA nastąpił jednak dopiero po wprowadzeniu dwóch nowych koncepcji:

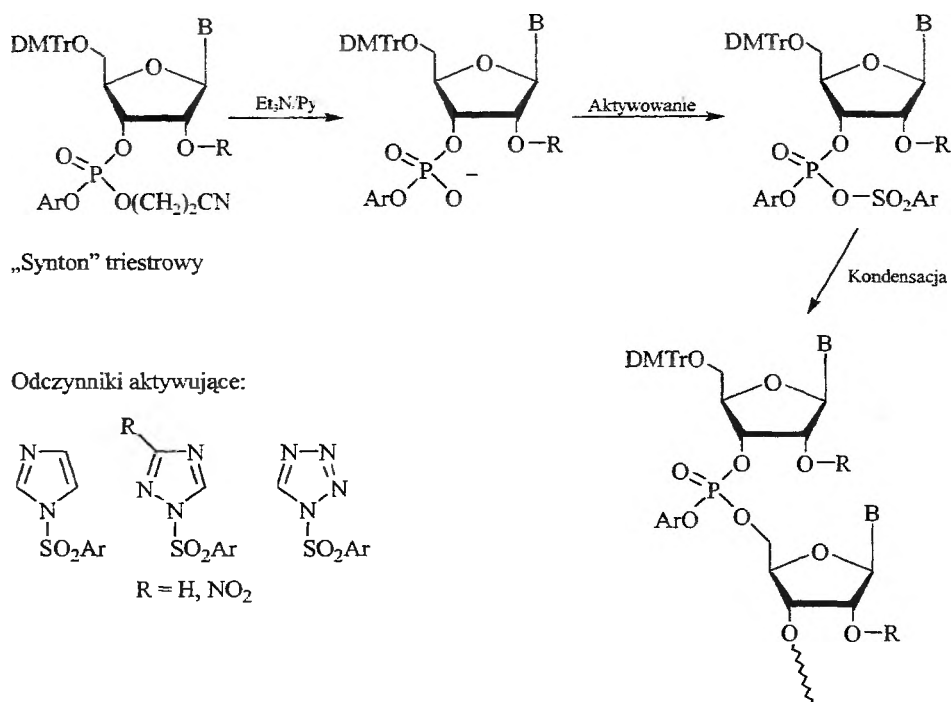
- syntezy oligonukleotydów na podłożu stałym oraz
- zastosowania nukleozydofosforynów jako „syntonów”.

Koncepcja syntezy na podłożu stałym została wprowadzona w chemii peptydów i białek przez Merrifielda [14] i już od dawna jest podstawową metodą chemicznej syntezy tych związków. W największym skrócie polega to na związaniu pierwszego monomeru z substancją stałą i prowadzeniu kolejnych reakcji na tak związanym substracie, który jest nierozpuszczalny w środowisku reakcji. Następna jednostka przyłączana do rosnącego łańcucha oligomeru zostaje tym samym przyłączona do stałego podłoża, a nieprzereagowany monomer, produkty uboczne i inne reagenty pozostają w roztworze i mogą być łatwo usunięte. Wydzielenie produktu syntezy sprowadza się więc do prostej czynności odsączenia i przemycia podłoża umieszczonego w reaktorze przepływowym. Po tej operacji podłoże jest już gotowe do następnego cyklu syntezy. Od początku próbowano zaadaptować to podejście do syntezy oligonukleotydów, ale podłoża stosowane do syntezy białek okazały się w syntezie oligonukleotydów niezbyt przydatne [15].

Dopiero opracowanie nowych podłoży bazujących na odpowiedniej wielkości ziarnach szerokoporowatej krzemionki lub szkła, sfunkcjonalizowanych łącznikami aminoalkilowymi (ang. *Long Chain AlkylAmine* – LCAA) umożliwiło przeprowadzenie wydajnych syntez [16]. Mimo swej użyteczności podłoża tego typu nie są pozbawione wad [17] i prace nad nowymi rodzajami podłoży nieustannie trwają. Obecnie stosuje się podłoża stałe o większej gęstości załadowania [18], lepszej dostępności reagentów do wydłużanego oligomeru, wyższej odporności chemicznej i lepszych parametrach mechanicznych w warunkach syntezy [19, 20].

Synteza oligonukleotydów na podłożach stałych pozwala na szybkie otrzymanie oligomerów o znacznej długości, ale jednocześnie stawia wygórowane wymagania stosowanym reagentom. Jeżeli w typowym procesie syntezy oligomeru kolejne cykle kondensacji (wydłużania łańcucha) przebiegałyby z wydajnością 98%, to wydajność oligomeru o długości 25 jednostek (24 reakcje kondensacji) wyniosłaby ok. 61%. Przy wydajności 97% wydajność syntezy 25-meru spadnie do ok. 48%, a przy wydajności kondensacji poniżej 95% synteza staje się praktycznie nieopłacalna (wydajność sumaryczna < 22%). Wspomniane tutaj wydajności kondensacji są niezwykle wysokie w porównaniu z uzyskiwanymi w typowej syntezie organicznej, gdzie wydajności powyżej 85% uznaje się za znakomite. W celu uzyskania tak wysokich wydajności reakcji w syntezie oligonukleotydów na podłożu stałym stosuje się duży nadmiar monomeru [21] (typowo ok. 10-krotny, ostatnie konstrukcje automatycznych syntetyzerów przeznaczonych do syntez w dużej skali obniżają konieczny nadmiar do 2–3-krotnego).

Wysokie wydajności tworzenia wiązań internukleotydowych osiągnano stosując coraz bardziej reaktywne pochodne fosforowe nukleozydów. W tradycyjnej metodzie triestrowej (schemat 2) stosowano związki P^V , aktywowane arylo-sulfonianami 1,2,4-triazolu, 3-nitro-1,2,4-triazolu i tetrazolu [22]. Reaktywność tak aktywowanych fosforanów jest wysoka, ale wciąż nie jest wystarczająca do szybkiego osiągnięcia pożądanego stopnia przereagowania w rozsądnie krótkim czasie.



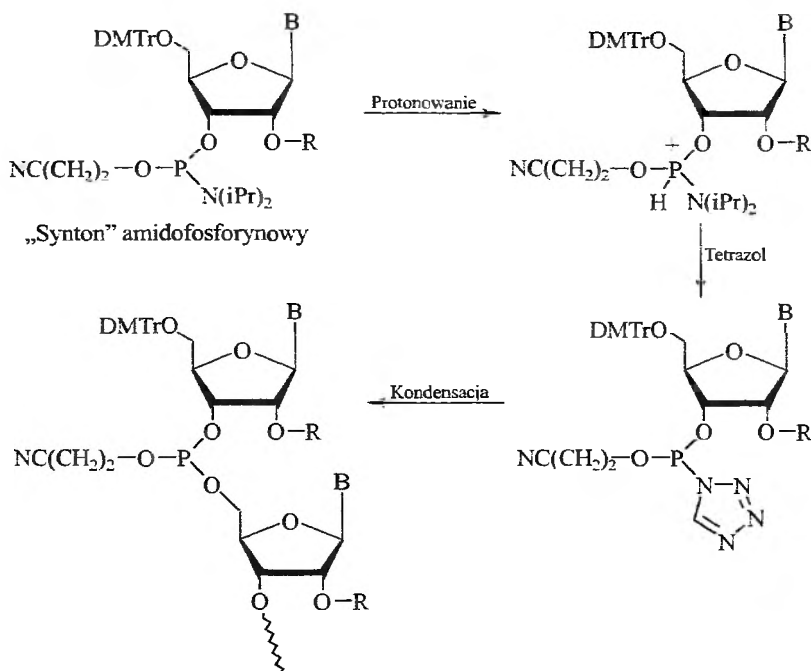
Schemat 2. Typowy system blokad i odczynniki aktywujące w syntezie metodą triestrową

Zachodzą przy tym niepożądane reakcje uboczne, jak równoległa reakcja sulfonowania grupy hydroksylowej nukleozydu [22] czy reakcje odczynnika fosforylującego z grupowaniami laktamowymi zasad azotowych [23].

Zwrócono więc uwagę na reaktywne pochodne fosforowe, a pierwszymi zastosowanymi w syntezie oligonukleotydów były chlorofosforyny nukleozydów otrzymywane *in situ* w reakcji z dichlorofosforem 2,2,2-trichloroetylu [24]. Oznaczają się one wysoką reaktywnością, która jednocześnie jest ich wadą, gdyż „syntony” chlorofosforynowe okazały się zbyt nietrwałe, by można je było przechowywać i w miarę dogodnie nimi operować.

Problem ten rozwiązano podobnie jak w przypadku syntezy przez pochodne P^V – trwałe „syntony” bezpośrednio przed reakcją kondensacji zostaje zaktywowa-

wany do wysokoreaktywnej pochodnej, która natychmiast reaguje z grupą 5'OH nukleotydu stanowiącego końcową jednostkę łańcucha. Pochodnymi fosforowymi używanymi powszechnie w syntezie oligonukleotydów są amidofosforyny nukleozydów [25, 26] (schemat 3), aktywowane przez słabe kwasy, jak tetrazol [27], podstawiony tetrazol [28] czy sole azoli i mocnych kwasów [29].

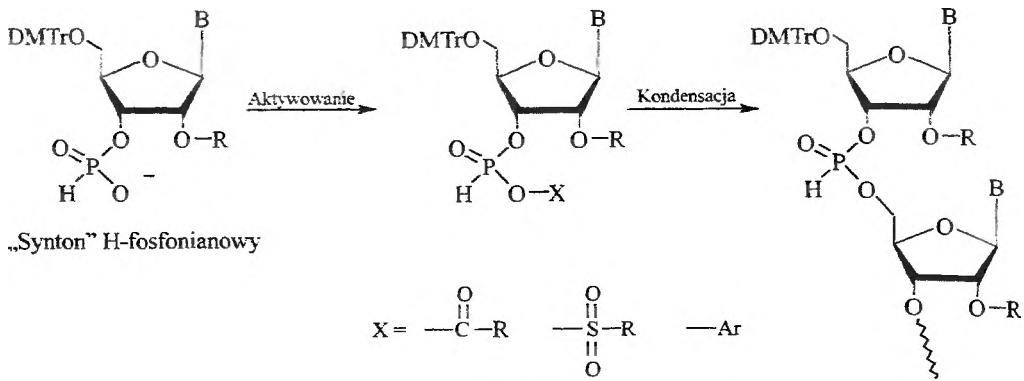


Schemat 3. Mechanizm aktywacji i kondensacji amidofosforynów

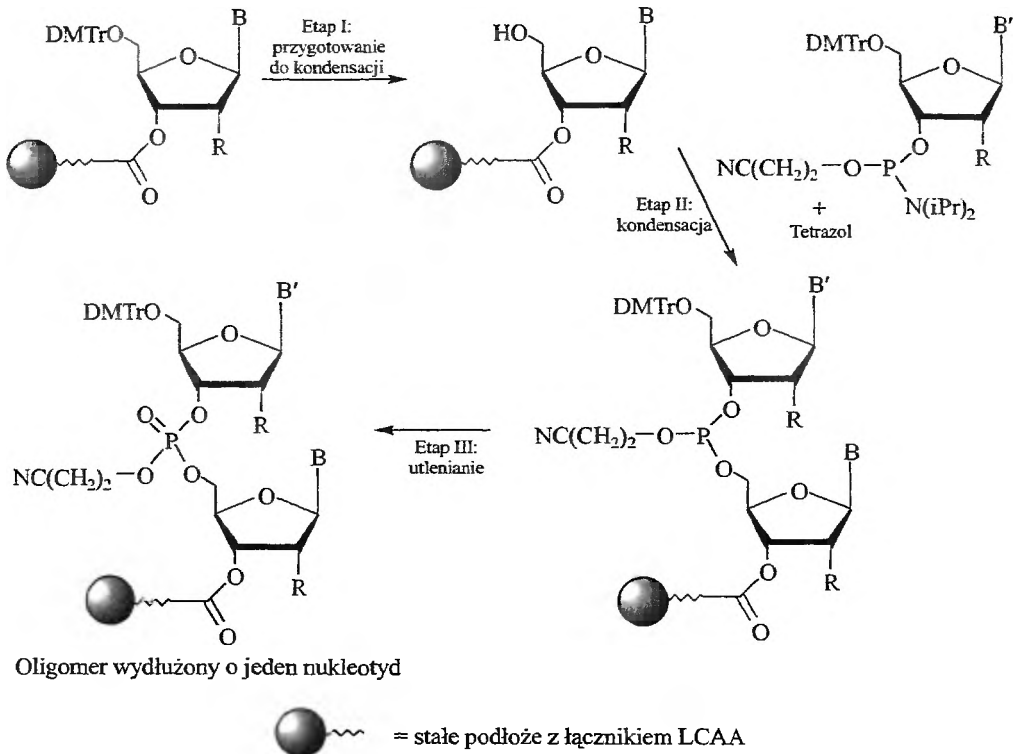
Innymi „syntonami” stosowanymi w syntezie oligonukleotydów są H-fosfoniany nukleozydów [30] (schemat 4), aktywowane przez tworzenie mieszanych bezwodników, np. w reakcji z chlorkiem piwaloilu lub chlorofosforanami [31], albo przez syntezę pośredniego arylo H-fosfonianodiestu [32].

Należało też dokonać wyboru kierunku prowadzonej syntezy łańcucha. Istnieją dwie możliwości: albo do nukleotydu z wolną grupą 3'OH dołącza się nukleotyd mający grupę 5'-fosforanową, albo też do nukleotydu z wolną grupą 5'OH dołącza się drugi nukleotyd posiadający grupę 3'-fosforanową. Każda z tych możliwości daje się realizować również na dwa sposoby: albo komponent z grupą hydroksylową stanowi koniec rosnącego łańcucha, a fragment niosący nową grupę fosforanową jest monomerem, albo na odwrót. Stwarza to teoretycznie cztery możliwe podejścia syntetyczne.

Po rozważeniu wszystkich uwarunkowań zdecydowano się na wariant budowy łańcucha poczynając od końca 3' (schemat 5) i ten sposób syntezy jest obecnie powszechnie stosowany [33, 34]. Pozostawia się wolną pierwszorzędowną



Schemat 4. Mechanizm aktywacji i kondensacji H-fosfonianów



Schemat 5. Najpowszechniej stosowana procedura syntezy oligonukleotydów na podłożu stałym

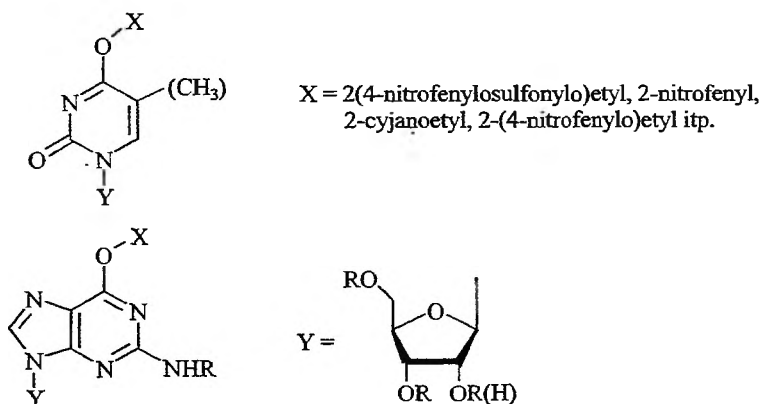
grupę 5'OH jako grupę końcową łańcucha, która atakuje zaktywowane centrum fosforowe jednostki 3'-fosforylowanej. Ten wariant zapewnia bardziej wydajne tworzenie wiązania internukleotydu, gdyż pierwszorzędowa grupa hydroksylowa ma mniejszą zawadę przestrzenną i jest łatwiej dostępna.

To podejście okazało się bardzo efektywne i uprościło syntezę do tego stopnia, że syntezę oligomeru DNA lub RNA o długości 20–30 jednostek można wykonać w ciągu jednego dnia pracy. Co więcej, nie ma potrzeby angażowania specjalistycznego laboratorium, gdyż oprócz standardowego wyposażenia wystarcza posiadanie automatycznego syntetyzera.

Przeprowadzenie syntezy oligonukleotydu według powyższego schematu jest możliwe tylko wtedy, gdy zarówno oligonukleotydy, jak i „syntony” nukleotydowe zaopatrzone są w odpowiedni system grup ochronnych umożliwiający selektywne odsłanianie centrów reaktywnych we właściwej kolejności. Wieloletnie badania i próby doprowadziły do opracowania zestawu grup blokujących, który pozwala na bliską optymalnej syntezę oligorybonukleotydów.

GRUPY CHRONIĄCE RESZTĘ ZASADOWĄ

W zasadach azotowych, obecnych w kwasach nukleinowych, występuje wiele grup funkcyjnych wymagających zablokowania podczas syntezy oligonukleotydu. W syntezie prowadzonej metodą triestrową ugrupowania imidowe i laktamowe tymidyny/urydyny i guanozyny ulegają niepożądanym reakcjom podczas fosforylacji i reakcji wydłużania łańcucha [23, 35], dając reaktywne produkty pośrednie. Podczas dalszych operacji produkty te mogą ulegać atakowi zasad lub reagentów nukleofilowych obecnych w mieszaninie reakcyjnej. Prowadzi to do produktów podstawienia w pozycjach 4 pirymidyn i 6 puryn [36] i powstania modyfikowanych jednostek nukleotydowych. Zabezpieczeniem przed taką niepożądaną modyfikacją jest blokowanie pozycji O⁴ w pirymidynach i O⁶ w purynach [37] (schemat 6). Te grupy blokujące usuwa się najczęściej przez hydrolizę w środowisku zasadowym bądź wobec wspomagających reagentów nukleofilowych.

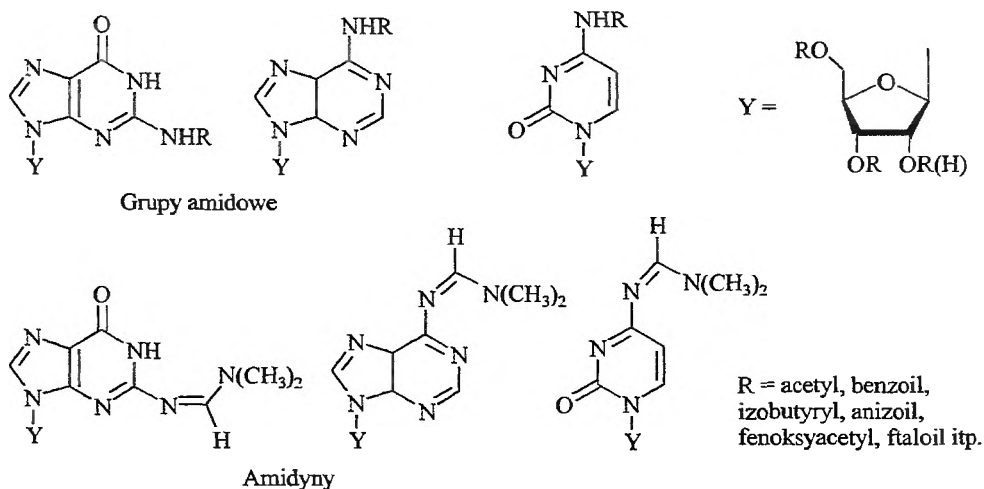


Schemat 6. Grupy blokujące funkcję laktamową

W przypadku stosowania metod P^{III} odczynniki fosfitylujące atakują również funkcje laktamowe i imidowe, jednak utworzone w wyniku tego pochodne są o wiele mniej trwałe i podczas operacji następujących po reakcji wydłużania łańcucha odtwarza się układ wyjściowej zasady azotowej [38]. By zabezpieczyć się przed niepożądaną modyfikacją, wystarczy zachować właściwą kolejność etapów procedury syntezy oligonukleotydu. Bezpośrednio po reakcji kondensacji należy przeprowadzić etap blokowania nieprzereagowanych grup 5'OH. Bezwodnik octowy w mieszaninie z 1-metyloimidazolem, używany w tej reakcji, przekształca uboczne produkty fosfitylacji w pozycjach O^4 i O^6 do wyjściowych zasad. Dopiero po tej reakcji można dokonać utlenienia wiązań internukleotydydowych z P^{III} do P^V .

Innym miejscem wymagającym zablokowania w adenozyne, cytydynie i guanozyne są funkcje egzoaminowe NH_2 . Do ich ochrony najczęściej stosuje się zasadolabilne grupy acylowe.

Przy doborze grupy blokującej należy wziąć pod uwagę dwa czynniki: trwałość i łatwość usunięcia oraz wpływ na wiązanie N-glikozydowe nukleotydu. W przypadku 2'-deoksynukleotydów, zwłaszcza adenozyne [39], przeprowadzenie grupy egzoaminowej w amidową znacznie zwiększa podatność wiązania N-glikozydowego na rozpad w środowisku kwasowym (np. podczas usuwania grupy 5'DMTr). By ustalić optymalny układ blokad, przebadano wiele pochodnych [26]. Najlepsze, obecnie powszechnie używane, to blokady acylowe (acetylowa, benzoliowa, izobutyrylowa, fenoksyacetylowa) lub pochodne amidynowe, otrzymywane w reakcjach z acetalami dimetyloformamidu (schemat 7). Blokady amidynowe zapewniają lepszą stabilność wiązania N-glikozydowego i usuwane są w łagodniejszych warunkach niż większość blokad acylowych [2(b), 26].



Schemat 7. Przykłady blokad funkcji egzoaminowej

GRUPY CHRONIĄCE FUNKCJE HYDROKSYLOWE

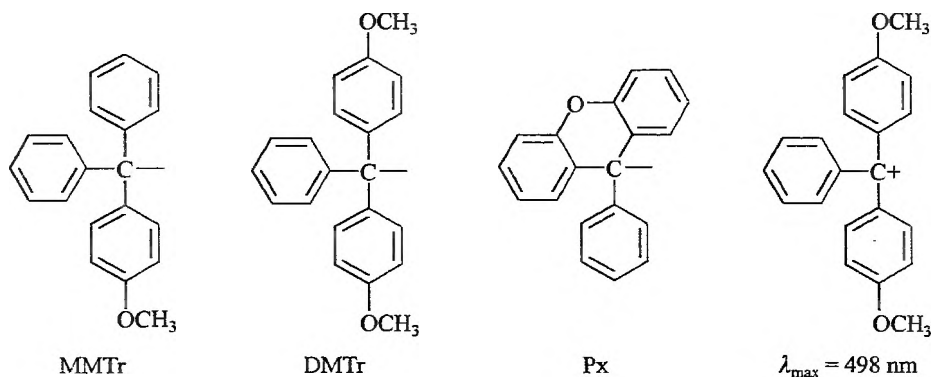
GRUPY BLOKUJĄCE FUNKCJĘ 5'OH

Jako grupy blokujące pozycję 5' powszechnie stosuje się grupy kwasolabilne oparte na rdzeniu trifenylometanu (tritylu). Największą popularność zdobyła grupa dimetoksytritylowa [40] (schemat 8, DMTr), która łączy w sobie kilka korzystnych cech:

– nadaje cząsteczkom nukleozydów i nukleotydów znaczną lipofilowość, co ułatwia ich rozpuszczanie w rozpuszczalnikach niepolarnych i oddzielenie chromatograficzne od substancji nieposiadających grupy tritylowej,

– w rozpuszczalnikach aprotonowych odszczepia się szybko i ilościowo pod wpływem kwasu, w warunkach na tyle łagodnych, że możliwe jest, ograniczone co prawda, stosowanie obok tej grupy blokującej także innych grup o charakterze kwasolabilnym,

– powstały w wyniku odszczepienia podstawiony kation trifenylometanowy służy do szybkiego i dokładnego pomiaru metodą kolorymetryczną lub konduktometryczną wydajności prowadzonej syntezy [41], co znalazło zastosowanie w monitorowaniu automatycznej syntezy oligorybonukleotydów.



Schemat 8. Grupy kwasolabilne oparte na rdzeniu trifenylometanu, używane w chemii nukleozydów i nukleotydów

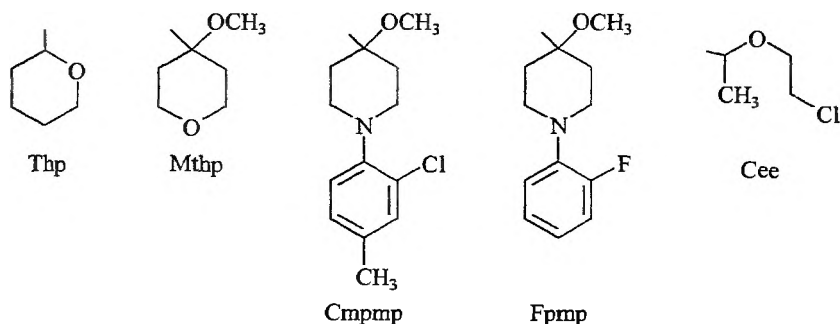
DOBÓR GRUPY BLOKUJĄCEJ FUNKCJĘ 2'OH
W SYNTEZIE OLIGORYBONUKLEOTYDÓW

DNA i RNA różni jedynie obecność funkcji hydroksylowej w położeniu 2'. Ta pozornie niewielka różnica jest źródłem wielu poważnych komplikacji na różnych etapach chemicznej syntezy łańcucha oligorybonukleotydowego [2(b), 26, 33].

Wprowadzenie jakiegokolwiek blokady na funkcję 2'OH powoduje zatłoczenie przestrzenne (nieraz znaczne) wokół centrum reakcji kondensacji. W przypadku utraty blokady grupa 2'OH usytuowana w bezpośrednim sąsiedztwie wiązania internukleotydu stanowi dodatkowe centrum reaktywne. Dalej, jeżeli warunki odblokowania grupy 2'OH faworyzują atak atomu tlenu tej grupy na atom fosforu wiązania internukleotydu, to reakcji usuwania ochrony może towarzyszyć degradacja łańcucha oligorybonukleotydu [42].

Skłonność kwasów rybonukleinowych do łatwej degradacji w środowisku zasadowym narzuca konieczność stosowania takich procedur syntezy, w których grupa 2'-OH pozostaje zablokowana. Praktycznie oznacza to, że końcowym etapem odblokowania oligomeru powinno być odblokowanie funkcji 2'OH i że ten ostatni etap nie może być prowadzony w warunkach zasadowych. Ogranicza to więc stosowanie grup zasadolabilnych (np. acylowych) jako grup blokujących 2'OH. Ponadto grupa blokująca tę szczególną funkcję musi być trwała w trakcie całej syntezy oligorybonukleotydu, gdyż jej przedwczesna utrata prowadziłaby do izomeryzacji lub rozpadu łańcucha [44].

Te wymagania spowodowały, że od lat w wielu laboratoriach na świecie poszukuje się odpowiedniej grupy blokującej funkcję 2'OH [26, 44]. Mimo tego zestaw grup blokujących przydatnych w syntezie oligomerów RNA jest nadal mocno ograniczony. Grupy stosowane do tego celu można podzielić na kwasolabilne (schemat 9) i inne.



Schemat 9. Kwasolabilne grupy blokujące 2'OH

Grupy kwasolabilne stosowane były od dawna. Mają one charakter acetalu i wiele z nich jest mniej lub bardziej rozbudowanymi pochodnymi tetrahydropyranu. Istotnym problemem jest takie zróżnicowanie właściwości kwasolabilnej grupy blokującej pozycję 2' i grupy DMTr w pozycji 5', aby można było bezpiecznie odblokować grupę 5'OH (w trakcie wydłużania łańcucha) bez naruszenia blokady 2'. Grupa Thp [42(b), 45], bardzo często stosowana w chemii organicznej do blokowania grup OH, nie jest doskonała pod tym względem. Podczas usuwania grup DMTr w niewielkim stopniu dochodzi również do jej utraty [46]

i z tego powodu nie jest obecnie stosowana w automatycznej syntezie oligorybonukleotydów. Inną niekorzystną cechą grupy Thp jest fakt, że wraz z jej wprowadzeniem w cząsteczce pojawia się nowe centrum stereogeniczne. Z tego powodu podczas syntezy „syntonów” nukleozydowych otrzymuje się mieszaninę diastereoizomerów, co mocno utrudnia rozdział i oczyszczanie produktów. Problem ten rozwiązało użycie grupy 4-metoksytetrahydropyranylowej, Mthp [47], która dzięki swej symetrii nie wносиła nowego centrum chiralności, ale jej właściwości kwasolabilne nie różniły się znacząco od Thp i wciąż nie dawała ona gwarancji w pełni selektywnego odblokowania grupy 5'DMTr.

Mankament ten został w pomysłowy sposób usunięty przez Reese'a i wsp. [48], którzy zmodyfikowali grupę Mthp tak, by zmniejszyć jej podatność na hydrolizę w warunkach kwasowych w środowisku aprotycznym, a więc w warunkach usuwania grupy DMTr. Nowa grupa blokująca (Cmpmp lub Fpmp, zob. schemat 9) zawiera atom azotu o charakterze III-rzędowej aminy aromatycznej. Podczas odblokowania grupy DMTr ten atom azotu jest protonowany, co zabezpiecza przed hydrolizą ugrupowania acetalowego. Trwałość tego typu blokady można regulować przez modulację zasadowości atomu azotu podstawnikami pierścienia aromatycznego z nim związanego. Przy doborze odpowiedniej grupy tego typu można więc usunąć grupę 5'DMTr bez naruszenia blokad funkcji 2'OH. Grupy mające takie właściwości (Cmpmp, Fpmp, schemat 9) są z powodzeniem stosowane, a jedna z nich (Fpmp) jest obecnie używana w handlowo dostępnych monomerach do syntezy oligorybonukleotydów. Blokady Fpmp (i podobne) są usuwane po zakończeniu syntezy oligorybonukleotydu działaniem wodnego buforu o umiarkowanej kwasowości.

Inną propozycją była blokada Cee [1-(2-chloroetoksy)etylowa], mająca o wiele prostszą strukturę, a wprowadzona przez Takaku [49]. Według autorów ta grupa blokująca funkcję 2'OH miała właściwości bardzo podobne do Fpmp czy Cmpmp. Nie zdobyła ona jednak uznania i nie ma późniejszych doniesień o jej stosowaniu.

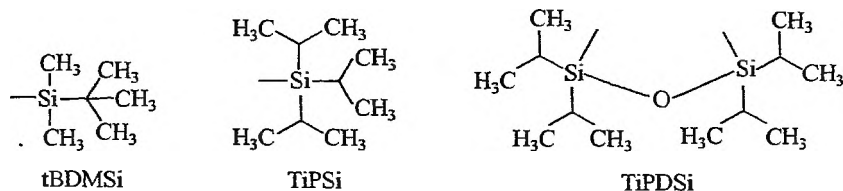
Inna koncepcja zakładała znalezienie grupy blokującej, która pozostawałaby niereaktywna przez cały czas syntezy, a jej odblokowanie przebiegałoby w warunkach specyficznych dla tej grupy blokującej, ale nieszkodliwych dla trwałości łańcucha oligomeru. Jak wspomniano uprzednio, odblokowanie w warunkach kwasowych „zarezerwowane” jest dla grupy blokującej pozycję 5', natomiast grup labilnych w warunkach zasadowych powszechnie używa się do blokowania grup egzoaminowych i funkcji fosforanowych.

Japońska grupa Ikehary i Ohtsuki [50] wprowadziła fotolabilną blokadę *o*-nitrobenzylową. Ta grupa ochronna stwarza stosunkowo niewielką zawadę przestrzenną, a jej eterowy charakter zapewnia dostateczną trwałość podczas syntezy oligorybonukleotydu. Wadą tej grupy jest, oprócz mało wydajnej syntezy monomerów, fotochemiczny proces jej usuwania. Właściwości tej grupy wymagają uciążliwego chronienia mieszanin reakcyjnych przed światłem w czasie syntezy, a następnie naświetlania końcowego produktu – oligomeru. Wymagana dłu-

gość fali używanego promieniowania jest inna niż długość fali promieniowania powodującego znane reakcje fotodimeryzacji i fotorozpadu zasad azotowych [51], jednak niebezpieczeństwo niezamierzonych modyfikacji pozostaje. Ilość niepożądanych produktów ubocznych rosła przy fotochemicznym odblokowaniu oligomeru o długości powyżej 10 jednostek nukleotydowych [52]. Jeśli dodać fakt, że stosowanie fotolabilnych blokad 2'-*O*-*o*-nitrobenzylowych może powodować poważne komplikacje podczas syntezy oligorybonukleotydów zawierających fotoczułe jednostki nukleozydowe (np. tionukleozydy), to nie można uznać tej grupy blokującej za uniwersalną.

Przełomowe znaczenie w rozwoju syntezy RNA i strategii blokowania nukleozydów odegrało wprowadzenie blokad siliowych (schemat 10). Blokujące grupy trialkilo(arylo)sililowe stosowane są bardzo często w syntezie organicznej, zwłaszcza w syntezie produktów naturalnych, np. węglowodanów, steroidów czy terpenów [53]. Ich właściwości można zmieniać w dość szerokim zakresie, zależnie od charakteru grup alkilowych lub arylowych związanych z atomem krzemu. Odporność tego typu grup ochronnych na hydrolizę waha się od niewielkiej (grupa trimetylosililowa, która może hydrolizować już pod wpływem kontaktu z wodą) do bardzo znacznej [grupa *t*-butylodifenylosililowa (tBDPSi) jest zupełnie odporna na działanie wody, wodnych roztworów zasad, rozcieńczonych kwasów, a także na warunki utleniające i redukujące], a odporność ta rośnie wraz z zatłoczeniem przestrzennym wokół atomu krzemu. Wszystkie grupy sililowe są labilne wobec jonów fluorkowych, zwłaszcza w środowisku aprotonowym.

Grupa 1,1,3,3-tetraizopropylodisiloksanylowa, TiPDSi, opracowana przez Markiewicza [54], to dwufunkcyjna blokada sililowa, zdolna do jednoczesnego blokowania pozycji 3' oraz 5', co pozostawia grupę 2'OH wolną i umożliwia selektywne przeprowadzenie na tej funkcji różnorodnych reakcji. Odporność grupy TiPDSi jest podobna do odporności innych przestrzennie rozbudowanych grup sililowych i dlatego na nukleozydzie zablokowanym tą grupą można w miarę bezpiecznie prowadzić reakcje w warunkach zasadowych i umiarkowanie kwasowych, a także reakcje niezależne od pH środowiska, np. reakcje utleniania, redukcji czy reakcje fotochemiczne. Z tych powodów grupa TiPDSi zdobyła zasłużenie ważną pozycję nie tylko w chemii nukleozydów [26, 55]. Jedną z operacji, które można dzięki tej grupie selektywnie przeprowadzić, jest wybiórcze blokowanie pozycji 2'. Z użyciem przejściowego blokowania TiPDSi wprowadza się w pozycję 2' np. blokady Thp, Mthp, Cmpmp, Fpmp [48cd]



Schemat 10. Alkilosililowe grupy blokujące stosowane w chemii oligorybonukleotydów

Pochodne alkilo(arylo)sililowe, których użycie w chemii nukleozydów zaproponował Ogilvie [56], są obecnie bardzo często stosowane do ochrony funkcji 2'OH w formie eterów sililowych. Z tego względu zasługują na nieco szersze omówienie.

Opisaną przez Coreya [57], grupę *t*-butyldimetylosililową, tBDMSi, Ogilvie zastosował jako blokadę 2'OH [56]. Nieco później w tym samym laboratorium zaproponowano [58] użycie podobnej blokady, triizopropylsililowej, TiPSi.

Grup tBDMSi czy TiPSi nie można, niestety, selektywnie wprowadzić w pozycję 2'. By osiągnąć monosililowanie pozycji 2' i 3' wykorzystuje się fakt, że duża zawada przestrzenna grupy tBDMSi znacznie utrudnia wprowadzenie jej równocześnie w obie te pozycje [59]. Działając jednym równoważnikiem molowym odpowiedniego chlorosilanu na rybonukleozyd, w którym zablokowana jest grupa 5'OH, otrzymuje się mieszaninę produktów 2'-sililowanego i 3'-sililowanego oraz niewielką ilość produktu 2',3'-disililowanego. Duża zawada przestrzenna grupy blokującej pozycję 5' (zwykle jest nią grupa DMTr) powoduje, że reakcja w pozycji 3' jest trudniejsza i izomer 2'-tBDMSi powstaje w przewadze. Przewaga ta jest różna dla różnych nukleozydów, zależy też od warunków reakcji [60]. Izomery 2' i 3' można rozdzielić chromatograficznie i izomer 2'-sililowany poddać reakcji z odczynnikami fosforylującym. Izomer 3' można łatwo odblokować za pomocą jonów F⁻ i ponownie przeprowadzić reakcję sililowania, uzyskując podobną do poprzedniej mieszaninę regioizomerów. Mieszaninę izomerów 2' i 3' można też uzyskać z czystego składnika (izomeru 2' lub 3') w reakcji izomeryzacji w roztworze metanolu [61], przy czym proces ten jest przyspieszany przez obecność zasad. Dokładniejsze badania wykazały, że w słabo zasadowym środowisku jak pirydyna zawierająca 10% wody (v/v) izomeryzacja osiąga stan równowagi (w przybliżeniu równe ilości regioizomerów 2' i 3') po 1–2 dniach, a wobec silniejszych zasad proces ten jest zdecydowanie szybszy [26]. To pozwala na otrzymanie dodatkowych ilości izomeru 2'-O-tBDMSi, gdyż wystarczy rozpuścić izomer 3'-Si w metanolu zawierającym 2% trietyloaminy, by w ciągu 1–2 godzin uzyskać równowagową mieszaninę izomerów 2' i 3' [62], z której można wyizolować pożądaną 2'-O-blokowaną nukleozyd.

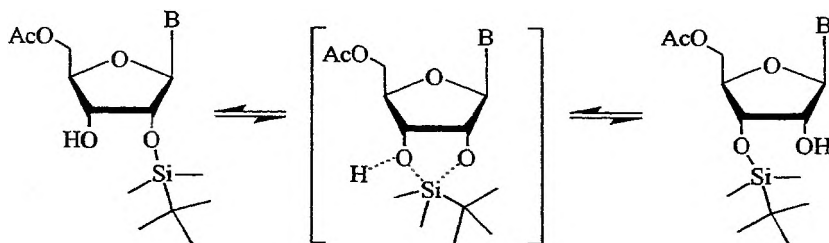
Blokada tBDMSi w chwili obecnej jest najpopularniejszą grupą blokującą, używaną w syntezie oligorybonukleotydu i stosując ją uzyskano wiele doniosłych osiągnięć, jak np. chemiczna synteza biologicznie aktywnych cząsteczek tRNA (nie zawierających jednostek modyfikowanych), a więc oligomerów długości ponad 75 jednostek [63].

Ta grupa blokująca oprócz wielu zalet ma również pewne wady i planując syntezę, należy brać pod uwagę ograniczenia związane z naturą grupy trialkylsililowej. Jednym z nich jest duża zawada przestrzenna, jaka powstaje po wprowadzeniu tej grupy w pozycję 2'. W związku z tym grupa 3'OH jest osłonięta i jej reaktywność spada. W praktyce oznacza to, że podczas syntezy na podłożu stałym czas etapu tworzenia wiązania internukleotydu należy wielokrotnie wydłużyć (w porównaniu z DNA), by uzyskać wymagane wysokie wydajności kon-

densacji. Etap ten przy syntezie DNA trwa standardowo 15 sekund, a w przypadku syntezy RNA wynosi zazwyczaj 600 sekund. Rzadko zresztą udaje się uzyskać tak dobre wydajności jak w przypadku DNA i wydajność nieco powyżej 98% w przeliczeniu na jeden etap syntezy można uznać za realny pułap możliwości. Poprawę wydajności można uzyskać, stosując bardziej aktywne promotory kondensacji [28, 29].

Zdolność grupy tBDMSi do migracji [61], użyteczna w podnoszeniu wydajności pożądanego izomeru, może być, niestety, powodem poważnych komplikacji w uzyskaniu izomerycznie czystych monomerów – 3'-fosforylowanych nukleozydów. Do wprowadzenia ugrupowania fosforowego w pozycję 3' wymagana jest obecność pomocniczego reagenta zasadowego lub nukleofilowego, który katalizuje tę reakcję, wiążąc proton grupy 3'OH. W konsekwencji dochodzi do konkurencji dwóch reakcji: fosforylacji grupy 3'OH oraz katalizowanej zasadą izomeryzacji grupy silylowej (schemat 11). Jeśli kinetyka tych dwóch procesów nie będzie dostatecznie zróżnicowana, to zachodzi niebezpieczeństwo otrzymania mieszaniny trudnych do rozdzielenia 2'- i 3'-fosforylowanych jednostek nukleotydowych. Jeżeli nie uda się dokładnie rozdzielić 2'- i 3'- fosforylowanych regioizomerów, to konsekwencje mogą być bardzo poważne, gdyż może powstać oligomer, który będzie zawierał pewną liczbę wiązań 2'-5' internukleotydowych, rozmieszczonych losowo na całej długości łańcucha. Takie izomery są wyjątkowo trudne do oddzielenia od właściwego produktu i udaje się to praktycznie w nielicznych przypadkach dla bardzo krótkich oligomerów (do ok. 4 jednostek) [64]. Dla dłuższych łańcuchów oligomer mający wszystkie wiązania 3'-5' i taki, w którym jedno z wiązań uległo izomeryzacji do 2'-5', mają tak zbliżone właściwości fizykochemiczne, że nie ma realnej możliwości ich oddzielenia. Takie cząsteczki natomiast mogą się wybitnie różnić właściwościami biologicznymi, w czym tkwi szczególne niebezpieczeństwo, ponieważ w testach fizykochemicznych syntetyczny oligorybonukleotyd wydaje się czysty i jednorodny, a w badaniach biologicznych wykazuje dalekie od oczekiwanych wyniki, których jednoznaczna interpretacja jest niemożliwa.

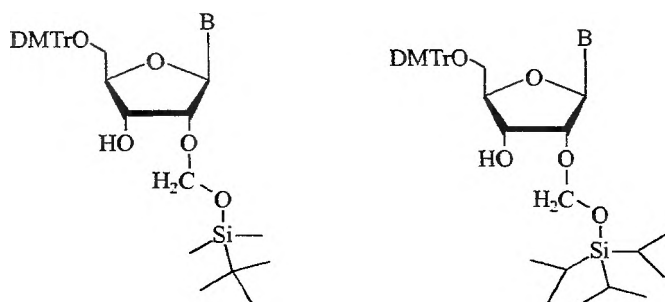
Niebezpieczeństwo wynikające z opisanego zjawiska zostało dość wcześnie dostrzeżone i wielu badaczy [59, 61, 65] zwracało uwagę na konieczność zachowania podczas syntezy takich warunków, które zminimalizują proces izomeryzacji.



Schemat 11. Mechanizm izomeryzacji 2'-3' grupy *t*-butylodimetylosilylowej

Przez systematyczne prześledzenie przebiegu reakcji fosforylacji i fosfitylacji w różnych warunkach z zastosowaniem spektroskopii ^{31}P NMR udało się określić [62], które z powszechnie stosowanych metod syntezy jednostek monomerycznych mogą być bezpiecznie zastosowane w przypadku użycia blokady tBDMSi. Okazało się, że zarówno podczas syntezy triestrów P^{V} , jak i syntezy H-fosfonianów nie dochodzi do izomeryzacji grupy silylowej. Większą ostrożność należy zachować podczas preparowania amidofosforynów rybonukleozydów, najpowszechniej używanego typu „syntonów”. Możliwość izomeryzacji można mocno ograniczyć lub całkowicie wykluczyć, jeżeli używa się jako odczynnika fosfitylującego odpowiednio reaktywnej chlorofosfiny [np. (*N,N*-diizopropylamino)(2-cyanoetoksy)chlorofosfiny]. Jest to obecnie powszechnie akceptowany sposób bezpiecznego otrzymywania nukleozydoamidofosforynów [26, 33] – syntonów w syntezie oligorybonukleotydów.

Ostatnio zaproponowano nową, zmodyfikowaną silylową grupę blokującą, która powinna w pewnym stopniu zmniejszyć wpływ zawady przestrzennej [66]. Jest to grupa z rodzaju „blokowanych grup blokujących” [67, 68], mająca strukturę acetalu, którego jednym z podstawników jest ugrupowanie trialkylsilylowe (schemat 12). Objętościowa grupa odsunięta jest od pierścienia rybozy i zawada przestrzenna wokół grupy 3'OH jest mniejsza. Polepsza to warunki reakcji, właściwości grupy blokującej zaś bardzo przypominają właściwości grup tBDMSi oraz TiPSi. Bardzo korzystną cechą tej grupy jest jej brak skłonności do izomeryzacji. Acetal mający podstawnik silylowy jest znacznie odporniejszy



Schemat 12. Acetalowe blokady silylowe „TOM”

na warunki kwasowe niż zwykle acetale i grupa ta doskonale znosi operacje stosowane podczas syntezy oligomeru. Po odblokowaniu grupy silylowej jonami fluorkowymi, pozostaje na grupie 2'OH hemiacetal formaldehydu, ugrupowanie bardzo nietrwałe, natychmiast hydrolizujące podczas przerobu mieszaniny po reakcji. Stosując tę blokadę funkcji 2' dokonano syntezy wielu oligorybonukleotydów, osiągając wysokie wydajności kondensacji (powyżej 98% na etap syntezy) [69].

UWAGI KOŃCOWE

Obecne metody syntezy oligonukleotydów są efektem wieloletnich, żmudnych i pracochłonnych badań nad tworzeniem wiązania internukleotydowego, równoległych wielowątkowych poszukiwań odpowiednich grup ochronnych i racjonalnego doboru stosowanych jednostek nukleozydowych lub nukleotydocy. Metody syntezy oligonukleotydów na podłożach stałych w połączeniu z pełną robotyzacją procesu syntezy łańcucha oligonukleotydowego umożliwiają otrzymanie fragmentów kwasów nukleinowych o założonej sekwencji i długości kilkadziesiąt jednostek nukleotydocy.

Należy podkreślić, że synteza oligorybonukleotydów, mimo dużych podobieństw do syntezy deoksyoligonukleotydów, jest trudniejsza i nadal mniej efektywna głównie ze względu na wielokrotnie niższą szybkość tworzenia wiązania internukleotydowego. O tym decyduje jedna grupa ochronna – blokada funkcji 2'-hydroksylowej. Jest to przykład, w którym pozornie wąski problem, ochrona jednej grupy wielofunkcyjnego nukleotydu, warunkuje skuteczność metody syntezy złożonych makromolekuł – oligorybonukleotydów. Dotychczasowe propozycje blokad chroniących funkcję 2'-OH są rozwiązaniami kompromisowymi, w których stabilność blokad wiąże się z zawadą przestrzenną przez nie wnoszoną (np. grupa *t*-butylo-dimetylosililowa), a to bezpośrednio wpływa na szybkość tworzenia wiązania internukleotydowego.

Tak więc problem blokady funkcji 2'-hydroksylowej w syntezie oligorybonukleotydów jest otwarty i wciąż aktualny. Jego rozwiązanie jest sprawą pilną ze względu na znaczne zapotrzebowanie na oligorybonukleotydy związane z perspektywą stosowania rybozymów w celach terapeutycznych. Dlatego konieczna jest kontynuacja badań nad rozwiązaniem tego problemu, a każda nowa propozycja ochrony grupy 2'-OH zwiększająca efektywność syntezy oligorybonukleotydów jest ze wszech miar pożądana.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] J.D. Watson, F.H.C. Crick, *Nature*, 1953, **171**, 737.
- [2] (a) W. Saenger, *Principles of Nucleic Acids Structure*, Springer, Berlin, Heidelberg 1984; (b) *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*, ed. G.M. Blackburn, M.J. Gait, Oxford University Press, Oxford 1996 (II wyd.); (c) R.T. Batey, R.P. Rambo, J.A. Doudna, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1999, **38**, 2326; (d) N. Tounekti, M. Mougel, C. Roy, R. Marquet, J.L. Darlix, J. Paoletti, B. Ehresmann, C. Ehresmann, *J. Mol. Biol.*, 1992, **223**, 205; (e) P.B. Moore, *Annu. Rev. Biochem.*, 1999, **68**, 287; (f) I. Tinoco Jr., C. Bustamante, *J. Mol. Biol.*, 1999, **293**, 271.
- [3] J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, II ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 1989.
- [4] (a) *Applied Antisense Oligonucleotide Technologies*, ed. C.A. Stein, A.M. Krieg, Wiley-Liss, New York 1998; (b) M. McCoy, *C&N News*, 2001, **79(39)**, 22.
- [5] (a) T. Cech, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1992, **2**, 605; (b) Y. Takagi, M. Warashina, W.J. Stec, K. Yoshinari, K. Taira, *Nucleic Acids Res.*, 2001, **29**, 1815.

- [6] (a) A.M. Michelson, A.R. Todd, *J. Chem. Soc.*, 1955, 2632; (b) R.L. Letsinger, V. Mahaderan, *J. Am. Chem. Soc.*, 1965, **87**, 3526; (c) C.B. Reese, R. Saffhill, *Chem. Comm.*, 1968, 767; (d) J.C. Catlin, F. Cramer, *J. Org. Chem.*, 1973, **38**, 245.
- [7] H.G. Khorana, *Science*, 1979, **203**, 614.
- [8] (a) M. Gellert, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1967, **57**, 148; (b) B. Weiss, C.C. Richardson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1967, **57**, 1201; (c) B.M. Oliveira, I.R. Lehman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1967, **57**, 1426.
- [9] (a) C.P. Bahl, R. Wu, K. Itakura, N. Katagiri, S.A. Narang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1976, **73**, 91; (b) S.A. Narang, *Tetrahedron* 1983, **39**, 3.
- [10] (a) K. Itakura, T. Hirose, R. Crea, A.D. Riggs, H.L. Heynekar, F. Bolivar, H.W. Boyer, *Science*, 1977, **198**, 1056; (b) D.V. Goeddel, D.G. Kleid, F. Bolivar, H.L. Heynekar, D.C. Yansura, T. Hirose, R. Crea, A. Kraszewski, K. Itakura, A.D. Riggs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, **76**, 106.
- [11] F. Wegenmayer, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1983, **22**, 842.
- [12] Słowo „synton” jest tu użyte niezgodnie ze znaczeniem nadanym przez twórcę tego terminu, Seebacha (*Angew. Chem.* 1979, **91**, 259, *Int. Ed.* **18**, 239). W tym nieprawidłowym znaczeniu jest jednak powszechnie używane wśród badaczy zajmujących się chemiczną syntezą oligonukleotydów. Wynika to prawdopodobnie z braku równie dogodnego zamiennika. W niniejszym tekście to określenie będzie używane w cudzysłowie.
- [13] (a) W.Z. Antkowiak, P. Dembek, J. Milecki, P. Świdorski, K. Węclawek, M. Wiewiórowski, *Bull. Acad. Pol. Sci. Ser. Chim.*, 1980, **XXVIII**, 537; (b) V. Amarnath, A.D. Broom, *Chem. Rev.*, 1977, **77**, 183; (c) W.L. Sung, S.A. Narang, *Can. J. Chem.*, 1982, **60**, 111; (d) M. Ichiba, R. Charubala, R.S. Varma, W. Pfeleiderer, *Helv. Chim. Acta*, 1986, **69**, 1768.
- [14] R.B. Merrifield, *Advan. Enzymol.*, 1969, **32**, 221.
- [15] V. Amarnath, A.D. Broom, *Chem. Rev.*, 1977, **77**, 183.
- [16] (a) M.D. Matteucci, M.H. Caruthers, *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, **103**, 3185; (b) G.R. Gough, M.J. Brunden, P.T. Gilham, *Tetrahedron Lett.*, 1981, **22**, 4177; (c) S.P. Adams, P.S. Kavka, E.J. Wykes, S.B. Holder, G.R. Galluppi, *J. Am. Chem. Soc.*, 1983, **105**, 661.
- [17] R.T. Pon, N. Usman, K.K. Ogilvie, *Biotechniques*, 1988, **6**, 768.
- [18] (a) P. Wright, D. Lloyd, W. Rapp, A. Andrus, *Tetrahedron Lett.*, 1993, **34**, 3373; (b) C. McCollum, A. Andrus, *Tetrahedron Lett.*, 1991, **32**, 4069.
- [19] H. Gao, B.L. Gaffney, R.A. Jones, *Tetrahedron Lett.*, 1991, **32**, 5477.
- [20] C.L. Scremin, G.M. Bonora, *Tetrahedron Lett.*, 1993, **34**, 4663.
- [21] W.J. Stec, G. Zon, *Tetrahedron Lett.*, 1984, **25**, 5275.
- [22] (a) N. Katagiri, K. Itakura, S.A. Narang, *Chem. Comm.*, 1974, 326; (b) J. Stawiński, T. Hozumi, S.A. Narang, *Can. J. Chem.*, 1976, **54**, 670.
- [23] (a) C.B. Reese, A. Ubasawa, *Nucl. Acids Res. Symp. Ser. No 7*, 1980, 5; (b) W.L. Sung, S.A. Narang, *Can. J. Chem.*, 1982, **60**, 111.
- [24] (a) R.L. Letsinger, W.B. Lunsford, *J. Am. Chem. Soc.*, 1976, **98**, 3655; (b) K.K. Ogilvie, N. Thierault, K.L. Sadana, *J. Am. Chem. Soc.*, 1977, **99**, 7741.
- [25] (a) S.L. Beaucage, M.H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.*, 1981, **22**, 1859; (b) N.D. Sinha, J. Biernat, H. Köster, *Tetrahedron Lett.*, 1983, **24**, 5843.
- [26] S.L. Beaucage, R.P. Iyer, *Tetrahedron*, 1992, **38**, 2223.
- [27] B.H. Dahl, J. Nielsen, O. Dahl, *Nucleic Acids Res.*, 1987, **15**, 1729.
- [28] (a) R. Vinayak, F. Colonna, D. Tsou, B. Mullah, A. Andrus, B. Sproat, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 1994, **31**, 165; (b) C. Vergeese, J. Carter, J. Yegge, S. Krivjansky, A. Settle, E. Kropp, K. Peterson, W. Pieken, *Nucleic Acids Res.*, 1998, **26**, 1046.
- [29] (a) Y. Hayakawa, M. Kataoka, R. Noyori, *J. Org. Chem.*, 1996, **61**, 7996; (b) Y. Hayakawa, R. Kawai, A. Hirota, J.I. Sugimoto, M. Kataoka, A. Sakakura, M. Hirose, R. Noyori, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123**, 8165.

- [30] (a) P.J. Garegg, I. Lindh, T. Regberg, J. Stawiński, R. Stromberg, *Tetrahedron Lett.*, 1986, **27**, 4051, 4055; (b) P.J. Garegg, T. Regberg, J. Stawiński, R. Stromberg, *Chem. Scr.*, 1986, **26**, 59; (c) B.C. Froehler, P.G. Ng, M.D. Matteucci, *Nucleic Acids Res.*, 1986, **14**, 5399.
- [31] R. Strömberg, J. Stawiński, A. Kraszewski, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 1987, 185.
- [32] M. Sobkowski, J. Stawiński, A. Sobkowska, A. Kraszewski, *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*, 1994, 1803.
- [33] *Current Protocols in Nucleic Acids Chemistry*. Wiley&Sons, rozdz. 2 i 3, 2000.
- [34] *Oligonucleotide Synthesis. A Practical Approach*, Ed. M.J. Gait, IRL Press Ltd, Oxford 1984.
- [35] C.B. Reese, A. Ubasawa, *Tetrahedron Lett.*, 1980, **21**, 2265.
- [36] K.J. Divakar, C.B. Reese, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1982, 1171; (b) W.L. Sung, *J. Org. Chem.*, 1982, **47**, 3623; (c) P.K. Bridson, W. Markiewicz, C.B. Reese, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1977, 791; (d) S. Mielewcyk, Z. Gdaniec, G. Bobrowska, R.W. Adamiak, *Nucleosides Nucleotides*, 1987, **6**, 273; (e) R.W. Adamiak, E. Biała, B. Skalski, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1985, **24**, 1054; (f) B.L. Gaffney, R.A. Jones, *Tetrahedron Lett.*, 1982, **23**, 2253, 2257.
- [37] X.-X. Zhou, J. Chattopadhyaya, *Tetrahedron*, 1986, **42**, 5149.
- [38] R.T. Pon, N. Usman, M.J. Damha, K.K. Ogilvie, *Nucleic Acids Res.*, 1986, **14**, 6453; (b) J.S. Eadie, W.J. Davidson, *Nucleic Acids Res.*, 1987, **15**, 8333.
- [39] (a) J.A. Zoltewicz, D.F. Klark, T.W. Sharpless, G. Grahe, *J. Am. Chem. Soc.*, 1970, **92**, 1741; (b) J.W. Efkavitch, C. Heiner, *Nucleosides Nucleotides*, 1985, **4**, 267.
- [40] D.H. Ramler, H.G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.*, 1962, **84**, 3112.
- [41] J. Kaufman, M. Le, G. Ross, P. Hing, E. Yu. Budiansky, E. Campbell, V. Yoshimura, V. Fitzpatrick, K. Nadimi, A. Andrus, *BioTechniques*, 1993, **14**, 834.
- [42] (a) M.D. Brown, D.I. Magrath, A.H. Neilson, A. Todd, *Nature*, 1956, **177**, 1124; (b) B.E. Griffin, M. Jarman, C.B. Reese, *Tetrahedron*, 1968, **24**, 639.
- [43] D.M. Brown, A.R. Todd, *J. Chem. Soc.*, 1952, 44.
- [44] C.B. Reese, *Tetrahedron*, 1978, **34**, 3143.
- [45] B.E. Griffin, C.B. Reese, *Tetrahedron Lett.*, 1964, 2925.
- [46] (a) J. Smrt, F. Šorm, *Coll. Czech. Chem. Comm.*, 1962, **27**, 63; (b) M. Smith, D.H. Rammler, I.H. Goldberg, H.G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.*, 1962, **84**, 430.
- [47] C.B. Reese, R. Saffhill, J.E. Sulston, *J. Am. Chem. Soc.*, 1967, **89**, 3366; *Tetrahedron*, 1970, **26**, 1023.
- [48] (a) C.B. Reese, H.T. Serafinowska, G. Zappia, *Tetrahedron Lett.*, 1986, **27**, 2291; (b) C.B. Reese, V. Rao, H.T. Serafinowska, E.A. Thompson, P.S. Yu, *Nucleosides Nucleotides*, 1991, **10**, 81; (c) M.V. Rao, C.B. Reese, V. Schehlmann, P.S. Yu, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1993, 43; (d) W. Lloyd, C.B. Reese, Q. Song, A.M. Vandersteen, C. Visintin, P.-Z. Zhang, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 2000, 165.
- [49] (a) S. Yamakage, O. Sakatsume, E. Furuyama, H. Takaku, *Tetrahedron Lett.*, 1989, **30**, 6361; (b) S. Yamakage, O. Sakatsume, H. Takaku, *Nucleic Acids Res Symp. Ser. 21*, 1989, 81; (c) O. Sakatsume, T. Yamaguchi, M. Ishikawa, I. Hirao, K.-I. Miura, H. Takaku, *Tetrahedron*, 1991, **41**, 8717.
- [50] (a) E. Ohtsuka, S. Tanaka, M. Ikehara, *Nucleic Acids Res.*, 1974, **1**, 1351; (b) T. Sakata, H. Hiroaki, Y. Oda, T. Tanaka, M. Ikehara, S. Uesugi, *Nucleic Acids Res.*, 1990, **18**, 3831.
- [51] S.Y. Wang, *Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids*, vol. 1 & 2, Academic Press, New York 1976.
- [52] O. Odai, H. Kodama, H. Hiroaki, T. Sakata, T. Tanaka, S. Uesugi, *Nucleic Acids Res.*, 1990, **18**, 5955.
- [53] (a) B.E. Cooper, *Chem. Ind.*, 1978, 794; (b) T.W. Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, New York 1981.
- [54] W.T. Markiewicz, *J. Chem. Res. (S)*, 1979, 24.

- [55] C.A.A. vanBoeckel, J.H. van Boom. *Tetrahedron*, 1985, **41**, 4567.
- [56] K.K. Ogilvie, E.A. Thompson, M.A. Quillam, J.B. Westmore, *Tetrahedron Lett.*, 1974, 2861.
- [57] E.J. Corey, A. Venkatesvarlu, *J. Am. Chem. Soc.*, 1972, **94**, 6190.
- [58] K.K. Ogilvie, *J. Carbohydrates, Nucleosides, Nucleotides*, 1976, **3**, 197.
- [59] K.K. Ogilvie, S.L. Beaucage, A.L. Schiffman, N.Y. Thierault, K.L. Sadana, *Can. J. Chem.*, 1978, **56**, 2768.
- [60] G.H. Hakimelahi, Z.A. Proba, K.K. Ogilvie. *Can. J. Chem.*, 1982, **60**, 1106.
- [61] S.S. Jones, C.B. Reese, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1979, 2762.
- [62] J. Milecki, P. Dembek, W.Z. Antkowiak, Z. Gdaniec, S. Mielewczyk, R.W. Adamiak, *Nucleosides, Nucleotides*, 1989, **8**, 463.
- [63] (a) N. Usman, K.K. Ogilvie, M.-Y. Jiang, R.J. Cedergren, *J. Am. Chem. Soc.*, 1987, **109**, 7845; (b) K.K. Ogilvie, N. Usman, K. Nicoghosian, R.J. Cedergren, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1989, **85**, 5464; (c) J.T. Goodwin, W.A. Stanick, G.D. Glick, *J. Org. Chem.*, 1994, **59**, 7941; (d) D. Gasparutto, T. Livache, H. Bazin, A.-M. Duplaa, A.M. Guy, A. Khorlin, D. Molko, A. Roget, R. Téoule, *Nucleic Acids Res.*, 1992, **20**, 5159.
- [64] R. Kierzek, dane niepublikowane.
- [65] K.L. Sadana, P.C. Loewen, *Tetrahedron Lett.*, 1978, 5095.
- [66] X. Wu, S. Pitsch, *Nucleic Acids Res.*, 1998, **26**, 4315.
- [67] A. Sandstrom, M. Kwiatkowski, J. Chattopadhyaya, *Acta Chem. Scand. B*, 1985b, **39**, 273.
- [68] S.A. Scaringe, F.E. Wincott, M.H. Caruthers, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 11820.
- [69] R. Micura, *Chem. Eur. J.*, 1999, **5**, 2077.

Praca wpłynęła do Redakcji 27 listopada 2001

KATALIZATORY REFORMINGU METANU DWUTLENKIEM WĘGLA

CATALYSTS OF CARBON DIOXIDE REFORMING OF METHANE

**Andrzej Lewicki, Tadeusz Paryjczak,
Wojciech K. Józwiak, Jacek Rynkowski***

*Instytut Chemii Ogólnej i Ekologicznej Politechniki Łódzkiej
ul. Żwirki 36, 90-924 Łódź*

Abstract

Wstęp

1. Podstawy otrzymywania gazu syntezowego metodą reformingu metanu dwutlenkiem węgla
2. Katalizatory reformingu metanu dwutlenkiem węgla
 - 2.1. Katalizatory niklowe, kobaltowe i żelazowe
 - 2.1.1. Katalizatory niklowe
 - 2.1.2. Katalizatory kobaltowe i żelazowe
 - 2.2. Platynowce jako katalizatory reformingu metanu dwutlenkiem węgla
 - 2.2.1. Katalizatory rutenowe
 - 2.2.2. Katalizatory rodowe
 - 2.2.3. Katalizatory palladowe i platynowe
3. Nośniki katalizatorów reformingu metanu dwutlenkiem węgla

Uwagi końcowe

Piśmiennictwo cytowane

* Autor, do którego należy kierować korespondencje, e-mail: jacryn@ck-sg.p.lodz.pl



Prof. dr hab. Tadeusz Paryjczak ukończył studia na Wydziale Chemicznym Politechniki Łódzkiej w 1956 r. Od 1975 r. jest dyrektorem Instytutu Chemii Ogólnej i Ekologicznej, a w latach 1975–1981, 1984–1990 oraz 1993–1999 był dziekanem Wydziału Chemicznego Politechniki Łódzkiej. Jest członkiem Komitetu Badań Naukowych na okres IV kadencji, przewodniczącym Zespołu Chemii, Technologii Chemicznej oraz Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska Komisji Badań Stosowanych KBN. Wśród jego zainteresowań naukowych są nianalityczne zastosowania chromatografii gazowej, adsorpcja i kataliza heterogeniczna. Jest autorem lub współautorem ponad 200 publikacji naukowych, kilkuset wystąpień konferencyjnych oraz monografii *Gas Chromatography in Adsorption and Catalysis*.



Prof. dr hab. Jacek Rynkowski ukończył studia na Wydziale Chemicznym Politechniki Łódzkiej w 1970 r. Od początku pracy zawodowej jest związany z Instytutem Chemii Ogólnej i Ekologicznej Politechniki Łódzkiej, w którym od 1992 r. jest zastępcą dyrektora. Przedmiotem jego działalności naukowej są obecnie zagadnienia katalizy heterogenicznej, m.in. badania właściwości fizykochemicznych i katalitycznych różnych typów naniesionych układów mono- i bimetalicznych – katalizatorów reakcji selektywnego uwodornienia aldehydów nienasyconych, wodoroodsiarczania, suchego reformingu metanu i in. oraz sensory gazów. Posiada w swoim dorobku 73 publikacje naukowe oraz ponad 70 referatów i wystąpień konferencyjnych. Od 1998 r. jest członkiem zarządu Polskiego Klubu Katalizy.



Dr hab. Wojciech Kazimierz Józwiak jest profesorem Politechniki Łódzkiej, a także prodziekanem Wydziału Chemicznego tej uczelni, który ukończył w 1969 r. Pracuje w Instytucie Chemii Ogólnej i Ekologicznej. Jest specjalistą w dziedzinie chemii fizycznej, adsorpcji i katalizy heterogenicznej. Zainteresowania naukowe obejmują m.in. oddziaływania metal-nośnik w naniesionych katalizatorach metalicznych, właściwości powierzchniowe metali, badania struktury nośników tlenkowych (Al_2O_3 , SiO_2 , MgO , CaO), w tym roli powierzchniowych grup hydroksylowych w procesach adsorpcji i katalizy. W swym dorobku posiada ok. 60 publikacji naukowych i kilkadziesiąt wystąpień konferencyjnych.



Dr inż. Andrzej Lewicki ukończył studia na Wydziale Chemicznym Politechniki Łódzkiej w 1956 r. Na tym samym wydziale obronił w 1965 r. pracę doktorską. Od 1954 r. aż do przejścia na emeryturę w 1998 r. pracował jako adiunkt początkowo w Katedrze Chemii Ogólnej, a następnie w Instytucie Chemii Ogólnej i Ekologicznej. Główne zainteresowania zawodowe to szeroko pojęta kataliza, szczególnie heterogeniczna, metody badań katalizatorów oraz dydaktyka chemii. Jest autorem i współautorem 30 publikacji, 2 patentów oraz 20 wystąpień konferencyjnych, m.in. na zjazdach Polskiego Towarzystwa Chemicznego, którego jest długoletnim członkiem.

ABSTRACT

During the past decade, there has been increasing interest in the catalytic reforming of methane with carbon dioxide. This reaction is considered as more efficient use of natural gas (methane) but also in the context of possible utilization of carbon dioxide. As both CH_4 and CO_2 are greenhouse gases, this reaction has also important environmental implications.

In this review, an emphasis was put on the recent papers, published in the period 1998–2001, which have not been reported in the comprehensive review of Bradford and Vannice [2]. Some basic thermodynamic and kinetic information about the discussed reaction and CH_4 and CO_2 activation was recalled. Then different types of catalysts were reported, first of all with the focus on nickel and platinum group based catalysts. New approaches to the mechanisms of the reaction on catalysts Ni/ZrO_2 [28, 29] and Ru/SiO_2 and $\text{Ru/Al}_2\text{O}_3$ [42] were shown.

The major difficulty in practical realization of methane reforming with CO_2 is thermodynamically favoured coke formation which deactivates the catalysts. The route leading to the improvement of this situation can be an addition of oxygen or water to the feed gas mixture or developing catalysts that minimize the rate of carbon deposition. The modification of the support, an application of bimetallic catalysts or another complex systems seem to be promising. Some of such systems were reported in the review.

Among 112 references cited in this review, 72 were published in the period 1998–2001. Therefore, the authors hope that this contribution presents a useful and reasonable supplement to Bradford and Vannice work [2].

WSTĘP

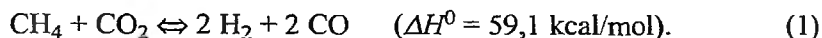
W rozpoczynającym się XXI w. gaz ziemny, którego dominującym składnikiem jest metan, stanie się jednym z najważniejszych surowców do wytwarzania cennych produktów chemicznych [1, 79, 80]. Dlatego też w ostatnim czasie wiele badań poświęcono rozwojowi katalitycznych procesów aktywacji metanu, w tym konwersji do gazu syntezowego [2, 3, 15, 79]. Konwersja metanu do CO i H₂ ma duże znaczenie, ponieważ gaz syntezowy jest ważnym surowcem m.in. w syntezie Fischera–Tropscha, syntezie metanolu, oksosyntezie i in. [4, 74, 80].

W ostatnich 10 latach obserwuje się w katalizie duże zainteresowanie tzw. „suchym” reformingiem metanu dwutlenkiem węgla. W latach 1990–2000 opublikowano na ten temat przeszło 200 prac w czołowych czasopismach chemicznych, katalitycznych, a nawet energetycznych. Najpoważniejszą pozycją jest przeglądowy artykuł Bradforda i Vannice’a [2], sumujący osiągnięcia i najważniejsze prace, dotyczące reformingu metanu dwutlenkiem węgla opublikowane do roku 1997. Również w materiałach 12 Kongresu Katalizy w Grenadzie w 2000 r. oraz V Kongresu Europacat w Limerick w 2001 r. znajduje się w sumie ponad 20 doniesień na ten temat, co świadczy o jego ciągłej aktualności [3].

Zaletą omawianego procesu jest możliwość otrzymania gazu syntezowego o niskim stosunku H₂/CO (bliskim jedności, bardziej odpowiednim w syntezie Fischera–Tropscha do otrzymywania bezsiajkowych paliw ciekłych oraz cennych związków zawierających tlen), potencjalne zmniejszenie kosztów procesu, otrzymanie CO o wysokim stopniu czystości (0,05% nieprzereagowanego metanu) [2]. Obawy, dyskusje i emocje związane z efektem cieplarnianym [5–7] także stanowią istotną przesłankę do wykorzystania CH₄ i CO₂ jako surowców chemicznych. Utylizacja tych dwóch podstawowych gazów „cieplarnianych” w procesie suchego reformingu mogłaby mieć pewne, choć ograniczone, znaczenie. zwłaszcza w przypadku odległych pól naftowych, gdzie gaz ziemny, zawierający duże ilości CO₂ jest spalany z powodu znaczących kosztów transportu.

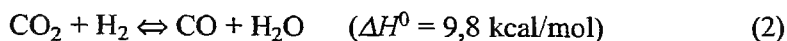
1. PODSTAWY OTRZYMYWANIA GAZU SYNTEZOWEGO METODĄ REFORMINGU METANU DWUTLENKIEM WĘGLA

Podstawowa reakcja procesu reformingu dwutlenkiem węgla może być przedstawiona następująco:

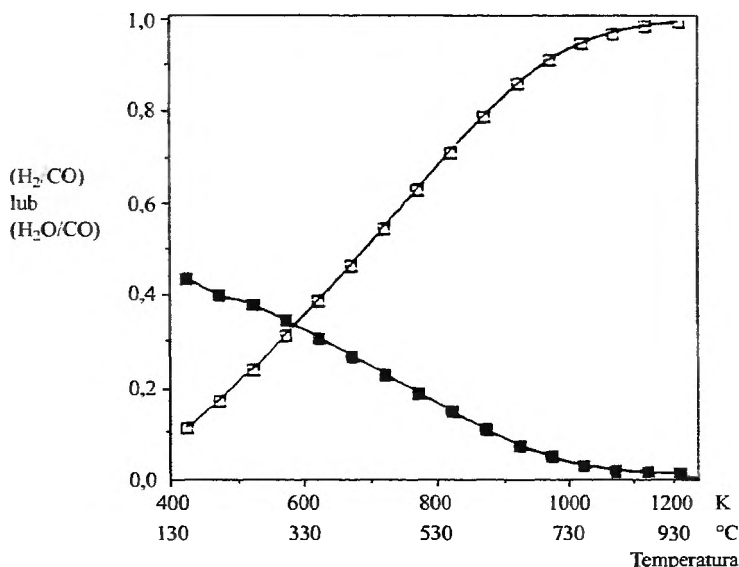


Produkty reakcji pojawiają się w temperaturze ok. 300 °C. Konwersja metanu szybko wzrasta ze wzrostem temperatury, aby w 830–930 °C osiągnąć 100% przemiany równowagowej.

Ze względu na przebiegającą równoległe reakcję



stosunek H_2/CO w otrzymanym gazie syntezowym jest zazwyczaj mniejszy od jedności (rys. 1).



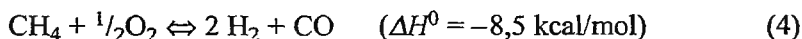
Rys. 1. Stosunki H_2/CO (□) oraz H_2O/CO (■) w reakcjach reformingu metanu dwutlenkiem węgla i reakcji odwrotnej do konwersji gazu wodnego w funkcji temperatury. Warunki reakcji $P_{\text{całk}} = 1 \text{ atm}$; $CH_4/CO_2/He = 1/1/1,8$ [2]

Gaz syntezowy jest powszechnie otrzymywany w procesie konwersji metanu z parą wodną:



W tej reakcji stosunek H_2/CO wynosi 3 lub więcej.

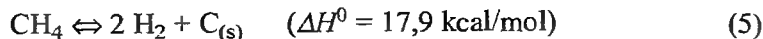
Częściowe utlenienie metanu:



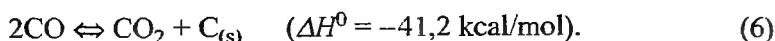
proceedzi do uzyskania gazu syntezowego, w którym stosunek H_2/CO jest zbliżony do 2. Jak wspomniano, reforming metanu dwutlenkiem węgla objawia swoje zalety w przypadku, gdy pożądany stosunek H_2/CO jest bliski jedności (np. w syntezie węglowodorów o długim łańcuchu). Produkty konwersji można wówczas użyć bezpośrednio do syntezy węglowodorów.

W ostatnich latach rozważa się możliwość zastosowania „mieszanego” reformingu [8, 9, 102], na który składa się jednoczesna reakcja metanu z CO_2 (reakcja (1)), parą wodną (reakcja (3)) i tlenem (reakcja (4)). Taki sposób prowadzenia procesu umożliwi sterowanie stosunkiem H_2/CO w zależności od potrzeb w poszczególnych syntezach. Ponadto reakcja częściowego utleniania metanu

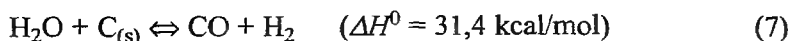
(reakcja (4)) jest egzotermiczna, co w pewnym stopniu zmniejsza zużycie energii w procesach reformingu metanu dwutlenkiem węgla i parą wodną. Zaletą „mieszanego” reformingu jest także ograniczenie osadzania się depozytu węglowego, który może powstawać z rozkładu metanu:



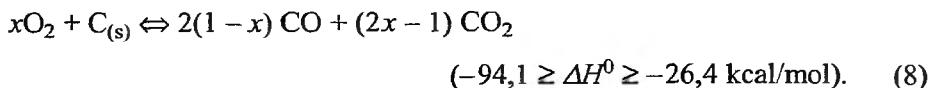
lub dysproporcjonacji CO:



Dodatek pary wodnej lub tlenu hamuje tworzenie węgla zgodnie z reakcją zgazowania:



lub utlenienia:



Złożony przebieg procesu reformingu metanu dwutlenkiem węgla prowadzi do gazowego produktu, zawierającego CO, H₂, CO₂ i H₂O. Jego skład zależy od wielu parametrów, takich jak temperatura, ciśnienie, wyjściowy skład gazu, rodzaj katalizatora i nośnika, stopień dyspersji fazy aktywnej, a także od różnych czynników kinetycznych i in. Kluczowe etapy reformingu, takie jak aktywacja CH₄ i CO₂ oraz tworzenie depozytu węglowego, w największym stopniu zależą od rodzaju katalizatora (metalu) oraz natury stosowanego nośnika [18].

Aktywacja CH₄ i CO₂ na powierzchni metali przejściowych, które wykorzystywane są jako katalizatory tego procesu (Ni, Co, Ru, Pt, Pd, Rh, Ir), zależy zarówno od czynników elektronowych, jak i geometrycznych, co oznacza, że dysocjatywna adsorpcja CH₄ i CO₂ może być strukturalnie czuła [2]. Z korelacji danych eksperymentalnych i teoretycznych wynika istotne znaczenie właściwości elektronowych [2]. Istnieje pogląd, że warunkiem dysocjacji cząsteczki metanu zaadsorbowanej na powierzchni metalu jest jej odkształcenie od formy tetraedrycznej do struktury piramidy trygonalnej, po czym następuje tunelowanie atomu wodoru przez barierę aktywacji [10], choć inni autorzy [11] za decydujące uważają jedynie to ostatnie zjawisko. Precyzyjny mechanizm dysocjatywnego adsorbpcji CH₄, która zachodzi na powierzchni metalu, nie jest do końca poznany. Rozmieszczenie powstałych rodników CH_x zależy zarówno od metalu jak i nośnika. Oddziaływania CH_x z powierzchniowym tlenem i grupami OH nośnika mogą prowadzić do tworzenia zarówno CO, jak i depozytu węglowego.

Nie jest też poznana do końca aktywacja CO₂. Jest wprowadzie ogólnie przyjęte, że chemisorpcja CO₂ na powierzchni metali przejściowych jest zdominowana przez przeniesienie elektronu z utworzeniem anionowego prekursora CO₂⁻ oraz że jest strukturalnie czuła [12], jednak to, czy zachodzi ona w formie dyso-

cjatywnej, czy nie, zależy od charakteru powierzchni metalu. Odpowiednie przykłady dla różnych metali przedstawione są w tab. 1.

Tak więc brak jest uogólniających, ogólnie przyjętych, ilościowych modeli aktywacji zarówno metanu, jak i dwutlenku węgla. Mechanizm elementarnego aktu aktywacji i zerwania wiązania chemicznego ma charakter kwantowy i jedynie obliczenia kwantowomechaniczne mogą przybliżyć jego naturę. Szczególne utrudnienia obliczeń kwantowych z zakresu katalizy na metalach wynikają z rodzaju materiałów, wobec których obserwuje się zjawiska katalityczne.

Tabela 1. Adsorpcja CO₂ na powierzchni różnych metali przejściowych [2, 12, 13]

Metal	Chemisorpcja dysocjatywna	Adsorpcja niedysocjatywna
Fe	(111), (100)	(110)
Ni	(110), (100)	(111), (100)
Cu	–	(110), (100)
Rh	(533), (711)	(111), (100)
Pd	–	(111), (100)
Ag	–	(110)
Re	(0001)	–
Pt	–	(111)

Do niedawna chemia kwantowa była niemal bezradna w przypadku obliczeń dla atomów metali ciężkich. Dopiero ostatnio rozwinięte, jakościowo nowe metody chemii kwantowej, oparte na tzw. teorii funkcjonałów gęstości (*Density Functional Theory*, DFT) stwarzają przesłanki ściślejszego opisu zjawisk katalitycznych, w tym także mechanizmów aktywacji CH₄ i CO₂ na powierzchniach metali stosowanych jako katalizatory w procesie reformingu metanu dwutlenkiem węgla.

2. KATALIZATORY REFORMINGU METANU DWUTLENKIEM WĘGLA

Obiektami badań były dotychczas przede wszystkim metale grup 8–10 układu okresowego naniesione na nośniki w postaci tlenków metali. Nośniki te, typowe dla katalizy heterogenicznej, zarówno tzw. redukowalne (m.in. CeO₂, Nb₂O₅, Ta₂O₅, TiO₂, ZrO₂) [18, 28, 29, 34–36, 38, 40, 51, 59], jak i nieredukowalne (m.in. Al₂O₃, La₂O₃, MgO, SiO₂, CaO, BaO, zeolity) [17–21, 26, 27, 40, 59, 60] stosowano zarówno w układach prostych, jak i złożonych [24, 33, 39, 82, 84]. Przedmiotem badań były również niektóre węgliki (WC, Mo₂C) [16] i siarczki (WS₂, MoS₂) [61].

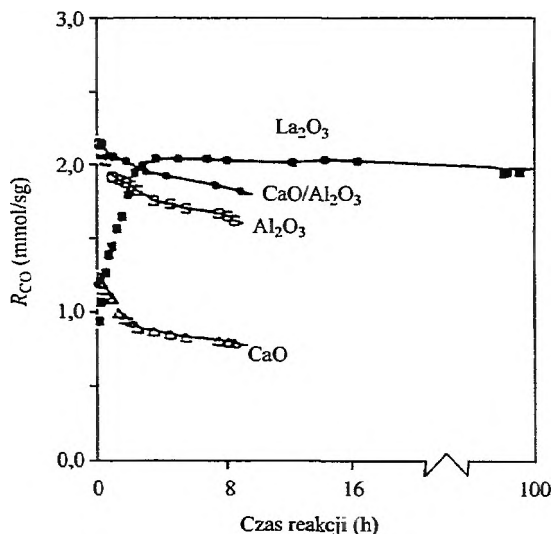
Najczęściej badanymi metalami pozostają nikiel [22–33, 39, 46, 48, 49, 52, 75, 77, 81–84, 94, 99, 104, 105, 107], ruten [21, 39–42, 45, 47, 53, 59, 87], rod

[18, 34, 50, 58, 60], platyna [36–38, 95], pallad [54, 63–65, 89], iryd [35, 66, 67]. Pewne zainteresowanie budzą także żelazo [35, 62, 78], kobalt [3, 35, 98, 100, 104], miedź [35], ren [68] oraz układy bimetaliczne Ni-Cu, Ni-Rh, Cu-Rh, Ni-Rh-Pt, Ni-Pt, Pt-Au, Pt-Sn, Ni-Ru, Ni-Pd [69–72]. Jak wspomniano, szczególne omówienie procesu reformingu metanu dwutlenkiem węgla oraz stosowanych w tym procesie katalizatorów na podstawie prac opublikowanych do 1997 r. jest przedmiotem przeglądowego artykułu Bradforda i Vannice'a [2]. W niniejszym opracowaniu skupiono się więc przede wszystkim na materiale źródłowym opublikowanym w latach 1998–2001.

2.1. KATALIZATORY NIKLOWE, KOBALTOWE I ŻELAZOWE

2.1.1. Katalizatory niklowe

Pierwsze testy z katalizatorem niklowym wykonali Fischer i Tropsch w 1928 r. [4]. Podstawowymi zaletami niklu są: wysoka aktywność, dostępność oraz niska cena. Zasadniczą wadą jest natomiast brak odporności na zawęglanie, dlatego znaczny wysiłek w badaniach skierowany jest na dogłębne poznanie i ograniczenie tego zjawiska [30, 32, 33, 44]. W 1996 r. Bradford i Vannice [25] oraz Verykios i Affrossman ze wsp. [31] opublikowali porównawcze studia, dotyczące katalizatorów niklowych naniesionych na różnych nośnikach: SiO_2 , C, TiO_2 , MgO [25] oraz $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$, CaO, La_2O_3 [31], stwierdzając istotny wpływ nośnika na aktywność i stabilność katalizatorów niklowych reformingu metanu dwutlenkiem węgla. Na rys. 2 [31] przedstawione są zmiany szybkości konwer-



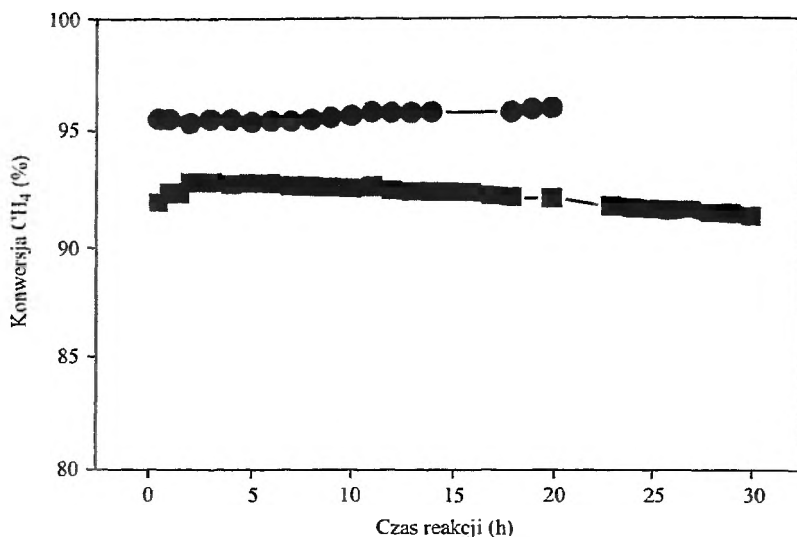
Rys. 2. Zmiana szybkości reakcji reformingu metanu dwutlenkiem węgla w zależności od czasu trwania procesu na katalizatorach niklowych naniesionych na różne nośniki. Temp. 750 °C, $\text{CH}_4/\text{CO}_2/\text{He} = 20/20/60\%$ obj., $m_{\text{kat.}} - 10$ mg, zawartość niklu – 17% mas. [3]

sji metanu i dwutlenku węgla do gazu syntezowego w zależności od czasu trwania procesu wobec katalizatorów niklowych naniesionych na różne nośniki. Katalizator Ni/La₂O₃ charakteryzuje się bardzo wysoką stabilnością. Badania metodami XPS oraz SIMS wykazały, że znaczna część powierzchni pracującego katalizatora jest wolna od depozytu węglowego. Stwierdzono ponadto występowanie na powierzchni przejściowych połączeń typu La₂O₂CO₃ oraz La₂O₂(COOH)₂, które mogą mieć udział w chemizmie tworzenia CO. Ostatnio Tspouriari i Verykios, kontynuując badania katalizatora Ni/La₂O₃, określili wpływ temperatury i ciśnień cząstkowych CH₄ i CO₂ na kinetykę suchego reformingu i zaproponowali mechanizm procesu [94]. Na podstawie wnikliwych badań metodami FTIR, XRD, XPS i HR-TEM oraz technikami izotopowymi stwierdzili, że decydującymi etapami reakcji CH₄ z CO₂ na katalizatorze Ni/La₂O₃ są: rozkład CH₄ na niklu i osadzenie węgla, który reaguje z La₂O₂CO₃ na granicy faz Ni i La₂O₂CO₃, co prowadzi do powstania CO.

Bradford i Vannice, porównując katalizatory niklowe naniesione na SiO₂, C, TiO₂, MgO [25], uważają, że w przypadku Ni/SiO₂ brak oddziaływań metal-nośnik pozwala na szybki wzrost włóknistych wiskersów węglowych, co, podobnie jak dla katalizatorów Ni/C, obniża aktywność takich układów. Natomiast znacznie mniej węgla osadza się na katalizatorach Ni/TiO₂ i Ni/MgO. W pierwszym wypadku wskutek blokady centrów niklowych w wyniku efektu SMSI (ruchliwy TiO_x na powierzchni) i dużej bariery energetycznej dla dysocjacji tlenku węgla, w drugim – w wyniku tworzenia częściowo zredukowanego stałego roztworu NiO-MgO, co stabilizuje wiązania Ni-Ni i ogranicza dyfuzję węgla do cząstek niklu.

Ciekawa próba poprawy stabilności katalizatorów niklowych została podjęta w skali przemysłowej [73]. Polegała ona na częściowym zasiarczeniu, stosowanym także dla innych układów katalitycznych [74], katalizatora niklowego (*Sulfur Passivated Reforming* – SPARG). Ograniczyło to znacznie tworzenie się węgla, nie blokując jednocześnie aktywnych centrów reakcji reformingu w wyniku znanego w katalizie efektu zespołów (*ensemble effect*). Modyfikację właściwości katalizatorów niklowych osiąga się przede wszystkim przez zastosowanie odpowiedniego nośnika [20, 26, 28, 29, 32, 33, 75, 77, 82, 84], ale także dzięki specjalnym metodom preparatyki [22, 26, 27, 30] oraz wykorzystaniu układów bimetalicznych [22, 69–72].

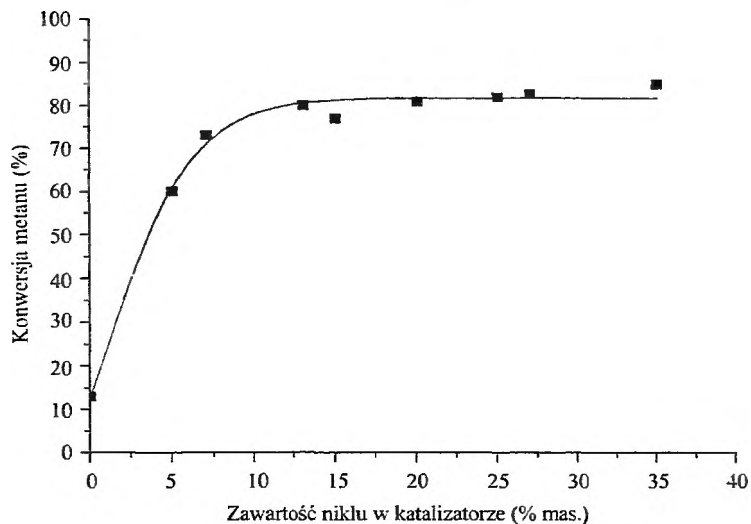
Istotną poprawę właściwości katalizatorów niklowych obserwuje się w układach, zawierających dwutlenek cyrkonu [24, 28, 29, 75, 77, 95]. Sang-Eon Park i in. [75] otrzymali obiecujące wyniki dla katalizatorów Ni/ZrO₂, zawierających zróżnicowaną w szerokim zakresie ilość niklu (od 2,5 do 23% wag.). Optymalna zawartość niklu wynosiła 13,2%. Taki katalizator wykazywał najwyższą aktywność w stosunku do obu reagentów oraz wysoką stabilność (rys. 3). Niskie stężenie centrów kwasowych Lewisa w ZrO₂ ogranicza znacznie tworzenie węgla na katalizatorze Ni/ZrO₂. Autorzy określili też optymalną temperaturę redukcji i kalcynacji katalizatora (700 °C). Poniżej tej temperatury część katalizatora pozosta-



Rys. 3. Konwersja metanu w temp. 750 °C (■) i 850 °C (●). Katalizator 13.2% Ni/ZrO₂ [75]

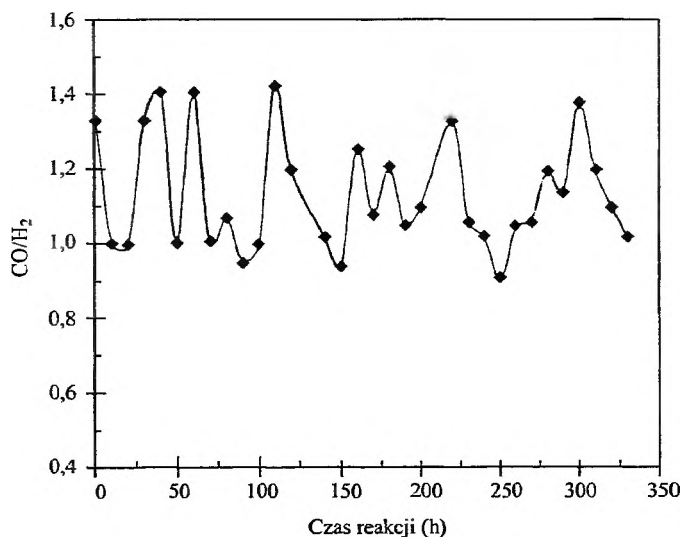
je niezredukowana, w wyższej zaś następuje spiekanie niklu. Wzrostowi aktywności sprzyja obniżenie temperatury kalcynacji. Zbyt wysoka temperatura prażenia zwiększa oddziaływania niklu z nośnikiem, co utrudnia redukcję naniesionego tlenku niklu.

Bo-Qing Xu wraz ze wsp. [28, 29] uzyskał katalizator 27% Ni/ZrO₂, którego aktywność nie ulegała zmianie w ciągu 600 godzin (konwersja 86%). Katalizator, zawierający jedynie 5% fazy aktywnej, prowadził do znacznie niższej konwersji (68%) w porównaniu z analogicznymi katalizatorami naniesionymi na Al₂O₃ oraz TiO₂ (odpowiednio 76 i 72%). Bardzo istotnymi czynnikami, warunkującymi aktywność i stabilność katalizatorów Ni/ZrO₂, okazały się wielkość cząstek prekursora nośnika Zr(OH)₄ oraz jego powierzchnia właściwa. Już sam ZrO₂ otrzymany z ultradrobnych (6 nm) cząstek Zr(OH)₄ wykazywał pewną aktywność w reakcji konwersji metanu (rys. 4). Zwiększenie zawartości Ni powyżej 10% nie wpływa już na zwiększenie konwersji. Z powodu przebiegu konkurencyjnej reakcji (2) oraz tworzenia depozytu węglowego i jego sukcesywnej eliminacji obserwuje się zmiany stosunku CO/H₂ w czasie (w przedziale 0,9–1,5) (rys. 5). Wahania te są najmniejsze dla katalizatora otrzymanego z ultradrobnych cząstek Zr(OH)₄ (Ni/ZrO₂-B). Katalizatory otrzymane z prekursorów o większym wymiarze cząstek szybko traciły swą aktywność na skutek zawęglania. Autorzy uważają, że określone warunki preparatyki ultradrobного Zr(OH)₄ (suszenie w nadkrytycznym etanolu) prowadzą do powstawania dużej liczby powierzchniowych defektów i zasadowych centrów aktywnych, sprzyjających aktywacji CO₂, a ponadto ultradrobne cząstki nośnika ułatwiają migrację tlenu do Ni i utlenianie powstałego tam, z rozkładu CH₄, węgla. Na rys. 6 przedstawiono graficznie kon-

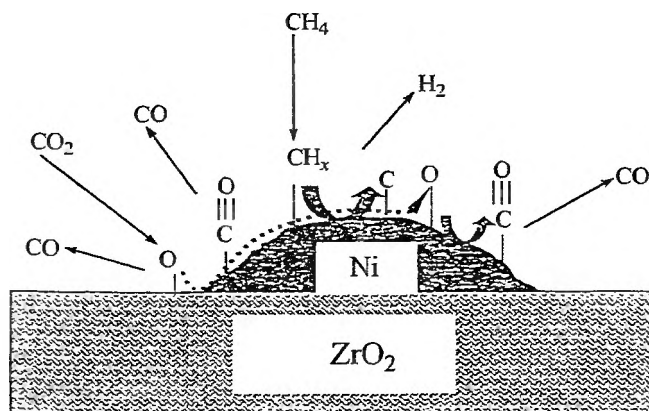


Rys. 4. Konwersja metanu na katalizatorze Ni/ZrO₂-B po 50 godz. pracy w strumieniu reagentów w zależności od zawartości niklu w katalizatorze [29]

cepcję przebiegu reformingu metanu dwutlenkiem węgla na katalizatorze Ni/ZrO₂, wg Bo Qing Xu i wsp. [28, 29]. Ostatnio Bo-Qing Xu i wsp. opublikowali podobne badania katalizatorów niklowych naniesionych na nanostrukturalny MgO [101].

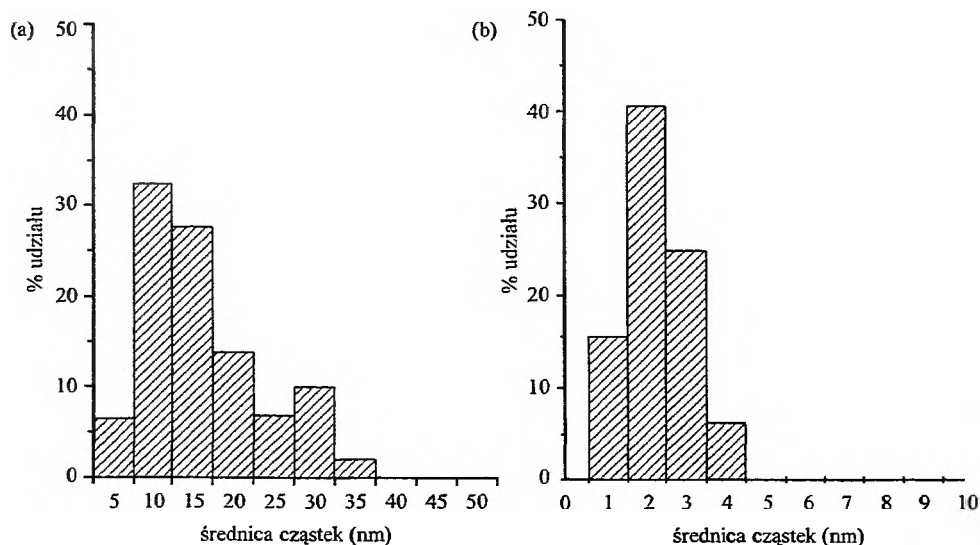


Rys. 5. Zmiany stosunku CO/H₂ na Ni/ZrO₂-B w zależności od czasu pracy katalizatora w ciągłym strumieniu reagentów [28]



Rys. 6. Graficzne wyobrażenie reformingu metanu dwutlenkiem węgla wg autorów [28, 29]

Dong Jin Suh i wsp. przedstawili ostatnio pracę, w której wykazali możliwość zastosowania Al₂O₃ jako nośnika stabilnych katalizatorów niklowych reformingu metanu dwutlenkiem węgla [30]. Katalizator otrzymano metodą zol-żel, wychodząc z octanu niklu i roztworu secbutylanu glinu (ASB) w etanolu. Prekursor suszony był w warunkach nadkrytycznych z CO₂, następnie prażony w atmosferze helu (300 °C) i tlenu (500 °C). Taka preparatyka pozwoliła na otrzymanie wysoko zdyspergowanego niklu w mezoporowatym katalizatorze, który wykazywał znaczną odporność na zawęglanie w porównaniu z katalizatorem otrzymanym metodą konwencjonalną. Na rys. 7 przedstawiono rozdział wymiarów cząstek Ni w katalizatorze otrzymanym konwencjonalną metodą impregnacyjną (a)



Rys. 7. Rozdział wymiarów cząstek Ni w katalizatorze otrzymanym metodą impregnacyjną (a) i w postaci aerożelu (b) po redukcji w 700 °C [30]

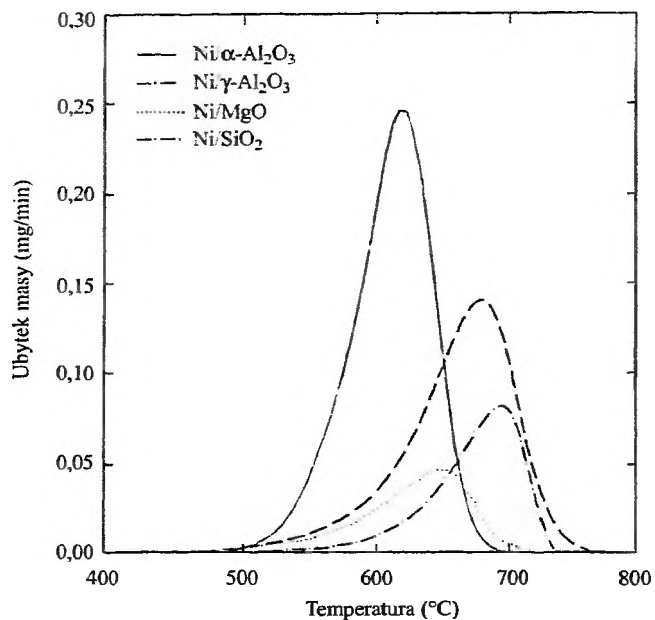
gnacyjną oraz w postaci aerożelu po redukcji w 700 °C [30]. Z wszechstronnych badań autorów (XRD, XPS, TEM) wynika, że tworzenie włóknistych depozytów węglowych zależy w znacznym stopniu od rozmiaru cząstek metalu i nasila się szczególnie wtedy, gdy średnica cząstek przekracza 7 nm. Podobną odporność na dezaktywację katalizatora Ni/Al₂O₃ otrzymanego metodą zol-żel uzyskali Castro Luna i wsp. [23].

Porównawcze badania aktywności niektórych metali (Ni, Co, Ru, Rh, Ir, Pt) naniesionych na Al₂O₃ i SiO₂ w zakresie temperatury 400–850 °C wykonali Rodriguez-Ramos i wsp. [41]. Autorzy są przekonani o decydującym wpływie nośników na wielkość konwersji metanu oraz, w niektórych przypadkach, na stabilność katalizatorów w warunkach reakcji. Jednakże decydujący wpływ na dezaktywację katalizatora wywierają, wg tych autorów, właściwości metalu. W przypadku metali naniesionych na Al₂O₃ można je pod względem aktywności uszeregować następująco: Rh > Ni > Ir > Ru ~ Pt > Co. Gdy nośnikiem jest SiO₂: Ni > Ru > Rh ~ Ir > Co ~ Pt. Najbardziej odporne na dezaktywację okazały się: Ni, Co, a szczególnie Rh/Al₂O₃. Trzeba jednak stwierdzić, że w omawianych badaniach czas kontaktu katalizatorów z mieszaniną reakcyjną był stosunkowo krótki. Uzyskane wyniki skłoniły autorów do podjęcia dalszych badań, dotyczących metali szlachetnych, które zostaną omówione w dalszej części niniejszego opracowania.

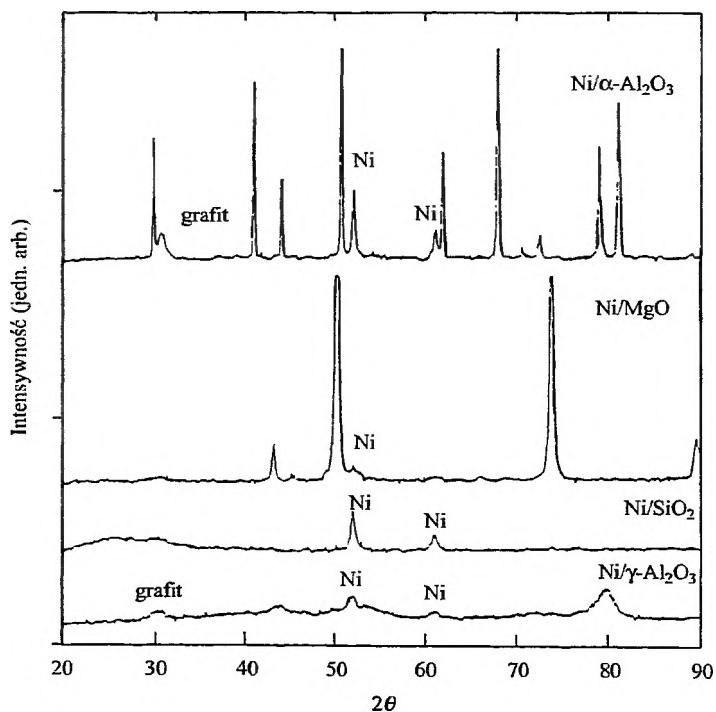
Wpływem nośników (Al₂O₃, SiO₂, MgO) oraz preparatyki na właściwości katalizatorów suchego reformingu zajmowali się także Wang i Lu [26, 27], stwierdzając, że struktura porowata nośnika i oddziaływania metal-nośnik w znacznym stopniu wpływają na aktywność katalizatora i odporność na zawęglanie. Najwyższą aktywność wykazywał Ni/γ-Al₂O₃, natomiast Ni/MgO był najbardziej odporny na dezaktywację. Te dwa typy katalizatorów stwarzają, wg autorów diskutowanych prac, największą nadzieję na zastosowanie w warunkach przemysłowych.

Wang i Lu wykonali także bardzo interesujące i wnikliwe badania osadów węglowych powstałych na katalizatorach Ni/SiO₂, Ni/α-Al₂O₃, Ni/γ-Al₂O₃, Ni/MgO. Na podstawie wyników TPO (rys. 8) i XRD (rys. 9) stwierdzili występowanie dwóch rodzajów osadu węglowego: grafitowego (na katalizatorach naniesionych na tlenkach glinu) i amorficznego (katalizatory naniesione na SiO₂ i MgO).

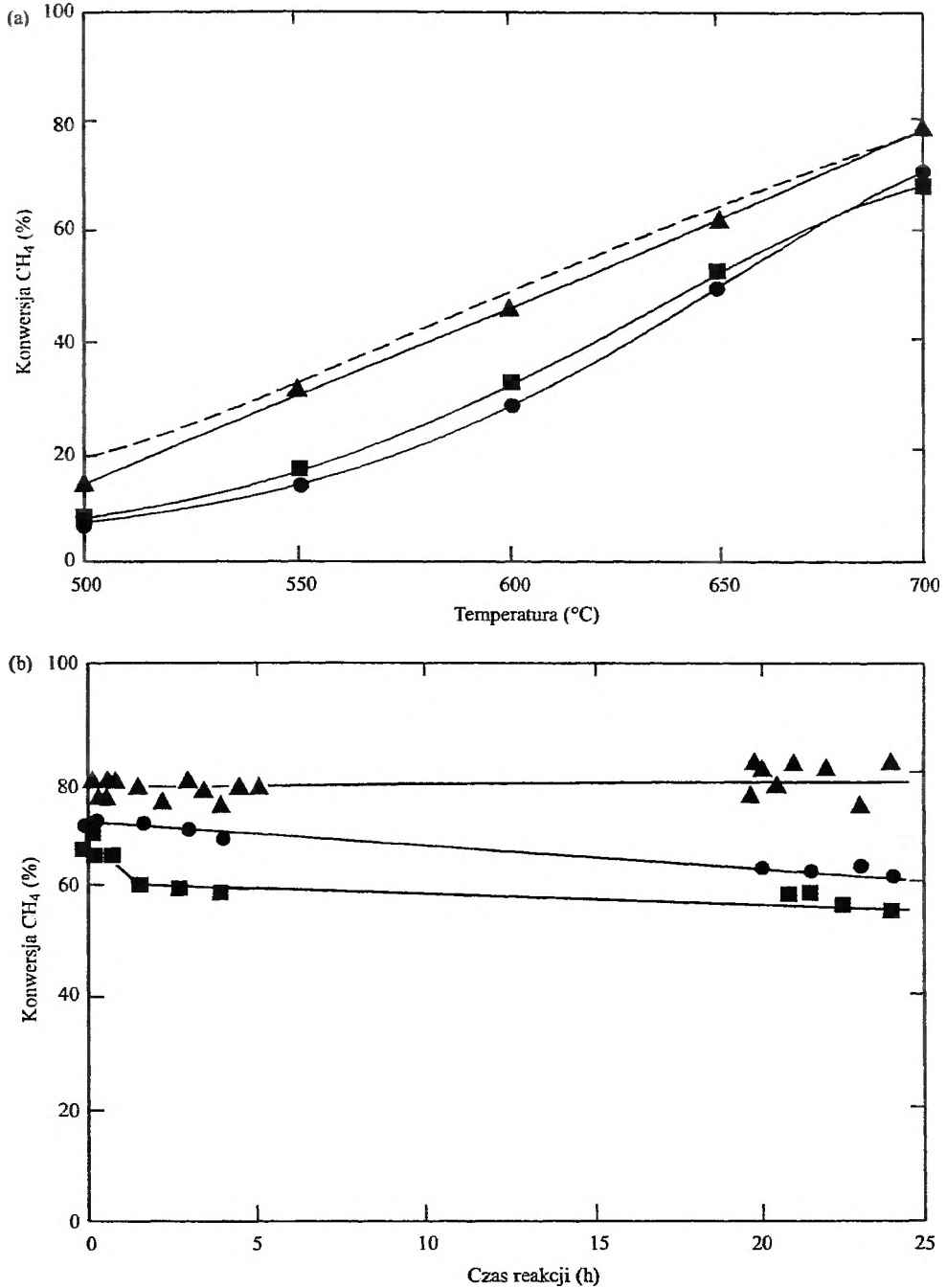
Ci sami autorzy dokonali próby określenia znaczenia prekursora katalizatora niklowego, stosując jako sole wyjściowe azotan, chlorek oraz acetyloacetonian niklu [27]. Katalizator otrzymany z azotanu wykazywał najwyższą aktywność i stabilność w 24-godzinnym teście konwersji metanu (rys. 10). Wprawdzie ulegał on znacznemu zawęglaniu, jednakże dominacja struktury grafitowej depozytu, sprzyjającej ściślemu kontaktowi węgla i metalu, ograniczała w efekcie dezaktywację katalizatora. Natomiast katalizator otrzymywany z acetyloacetonianu charakteryzował się tworzeniem na powierzchni struktur —CO—C— prowadzących do szybkiej akumulacji węgla na katalizatorze i znacznej dezaktywacji [27].



Rys. 8. Profile TPO osadów węglowych utworzonych na katalizatorach niklowych reformingu po reakcji w 700 °C [26]



Rys. 9. Dyfraktogramy XRD katalizatorów niklowych po reakcji w 700 °C [26]



Rys. 10. (a) Konwersja CH₄ na różnych katalizatorach niklowych (Ni/γ-Al₂O₃) w zależności od temperatury. Linia przerywana oznacza konwersję termodynamicznie równowagową. Ni-N (▲), Ni-Cl (●), Ni-AA (■): katalizatory otrzymane odpowiednio z roztworów azotanu, chlorku oraz acetyloacetonianu niklu. (b) Stabilność katalizatorów Ni/γ-Al₂O₃ w temperaturze 700 °C [27]

Cheng i wsp. [81] zajęli się rolą nośnika w katalizatorze Ni/ γ -Al₂O₃. Na podstawie badań TPR, TPD, XPS, XRD stwierdzili, że nikiel po kalcynacji występuje głównie w postaci NiAl₂O₄ i jest bardzo trudny do zredukowania poniżej 650 °C. Wskazuje to na silne oddziaływanie między nośnikiem i metalem. Ta oporna redukcja prowadzi do wysokiej dyspersji niklu, który w stanie Ni⁰ jest bardzo aktywny nawet wtedy, gdy tylko część niklu uległa redukcji. Tlenek glinu, wg autorów, odgrywa istotną rolę w procesie uzyskiwania wysokiej dyspersji niklu, gromadzeniu wodoru oraz w dysocjacji CO₂ w obecności wodoru i tworzeniu CO i H₂O. Para wodna może migrować do granicy faz metal-nośnik i spływać (*spillover*) na powierzchnię metalu, reagując z CH_x.

Interesujący sposób otrzymywania katalizatora niklowego (i rutenowego) zaproponowali badacze wenezuelscy i francuscy [39]. Zastosowali tlenek typu perowskitu jako nośnik katalizatorów, biorąc pod uwagę dobrze zdefiniowaną strukturę, odporność na działanie wysokiej temperatury, odporność mechaniczną i chemiczną na drastyczne warunki reakcji oraz określoną przewodność elektryczną. Tym tlenkiem był, otrzymany metodą zól-żel LnMnO₃. Autorzy zbadali wpływ licznych parametrów, takich jak ilość naniesionego metalu, temperatura reakcji, szybkość objętościowa, ciśnienie cząstkowe, czas reakcji i dobrali odpowiednie ich wartości w celu optymalizacji wydajności gazu syntezowego. Czysty LnMnO₃ jest nieaktywny w reformingu metanu CO₂. Naniesienie Ni lub Ru prowadzi do uzyskania katalizatorów o znacznej aktywności i selektywności. Katalizator niklowy wykazywał ponadto dużą odporność na zawęglanie w porównaniu z rutenowym, co zdaniem autorów stwarza obiecujące przesłanki dla wykorzystania go w warunkach przemysłowych.

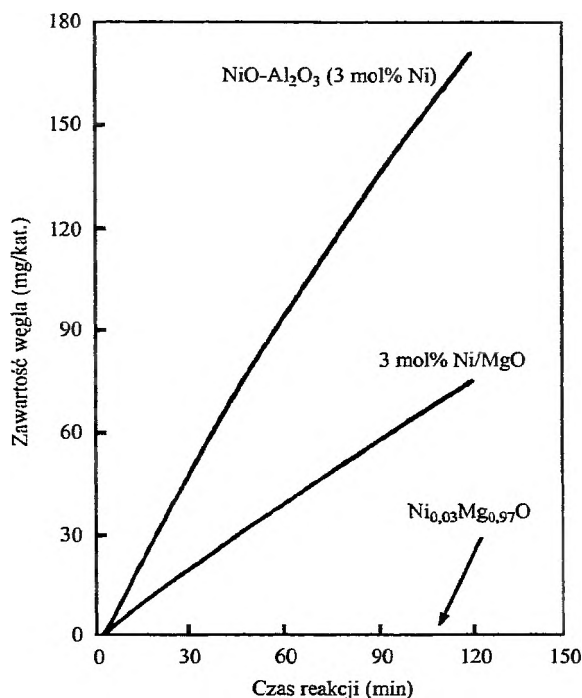
Yu-Wen Chen oraz Wei-Jen Wang [84] zastosowali fosforan glinu do modyfikacji nośników katalizatorów niklowych suchego reformingu. Stwierdzili, że katalizator Ni/MgO-Al₂O₃-AlPO₄ jest bardziej aktywny i stabilny niż Ni/Al₂O₃ i Ni/MgO-Al₂O₃, szczególnie w wysokiej temperaturze. Natomiast Sang-Eon Park i wsp. [20] stosowali złożony układ w postaci KNiCa naniesionego na NaZSM-5, który był promowany glinem. Katalizator ten wykazywał doskonałą stabilność w temperaturze 800 °C, być może na skutek tworzenia powierzchniowej warstwy węglanów hamującej tworzenie koksu i sprzyjającej usuwaniu węgla z powierzchni niklu.

Podwyższenie aktywności i stabilności katalizatorów niklowych w reakcji reformingu metanu dwutlenkiem węgla można osiągnąć m.in. przez promowanie ich innymi metalami lub wykorzystanie układów bimetalicznych [22, 69–72]. Quincoces i wsp. [22] badali wpływ dodatku molibdenu na właściwości katalizatora niklowego, stosując proporcje Mo/Ni = 0,1–1. Najlepszą stabilnością i odpornością na zawęglanie charakteryzował się katalizator, w którym Mo/Ni = 0,1. Wzrost zawartości molibdenu zwiększał wprawdzie odporność katalizatora na działanie siarki, jednakże aktywność i stabilność katalizatora ulegają obniżeniu. Korzystny wpływ dodatku molibdenu na ograniczenie depozytu węglowego można tłumaczyć efektem geometrycznym („rozcieńczenie” przez molibden aglome-

ratów niklu, na których odkłada się koks) lub efektem elektronowym (elektron-akceptorowy charakter molibdenu sprzyja osłabieniu siły adsorpcji koksu na powierzchni niklu, zmniejszając tym samym szybkość zawęglania).

Właściwości katalizatorów Ni/ZrO_2 były modyfikowane dodatkami CeO_2 i MgO [24, 82]. Zwiększały one odporność ZrO_2 na spiekanie, ograniczając przemiany fazowe tetragonalnej formy ZrO_2 w monokliniczną. Aktywność katalityczna i stabilność katalizatorów naniesionych na promotowany dwutlenek cyrkonu ($\text{Ni/ZrO}_2\text{-CeO}_2$ i $\text{Ni/ZrO}_2\text{-MgO}$) były wyższe niż katalizatorów naniesionych na monoskładnikowe tlenki ZrO_2 , CeO_2 , MgO , co można odnieść do krystalitów NiO , oddziaływań nikiel-nośnik oraz mobilności tlenu w promotowanym ZrO_2 [24].

Należy sądzić, że promotowane katalizatory niklowe, wykorzystywane w parowym reformingu, mogą znaleźć zastosowanie także w reformingu metanu dwutlenkiem węgla. Wśród promotorów, oprócz molibdenu, wymienia się m.in. wolfram, bar, potas i cer [15, 44]. Do katalizatorów niklowych można zaliczyć także zastosowane przez badaczy japońskich stałe roztwory NiO-MgO [49, 83] oraz heksagliniany $\text{LaNi}_y\text{Al}_{12-y}\text{O}_{19-\delta}$ ($y = 0,3; 0,6; 0,9; 1,0$) modyfikowane nikiem [48]. Stałe roztwory okazały się szczególnie odporne na zawęglanie (rys. 11) [49]. Okazało się [83], że na konwersję metanu dwutlenkiem wę-



Rys. 11. Zawęglanie katalizatorów $\text{Ni}_{0,03}\text{Mg}_{0,97}\text{O}$, 3 mol.% Ni/MgO i $\text{NiO-Al}_2\text{O}_3$ (3,0 mol.%) w obecności $\text{CH}_4 + \text{CO}_2$. Temperatura reakcji 500 °C [49]

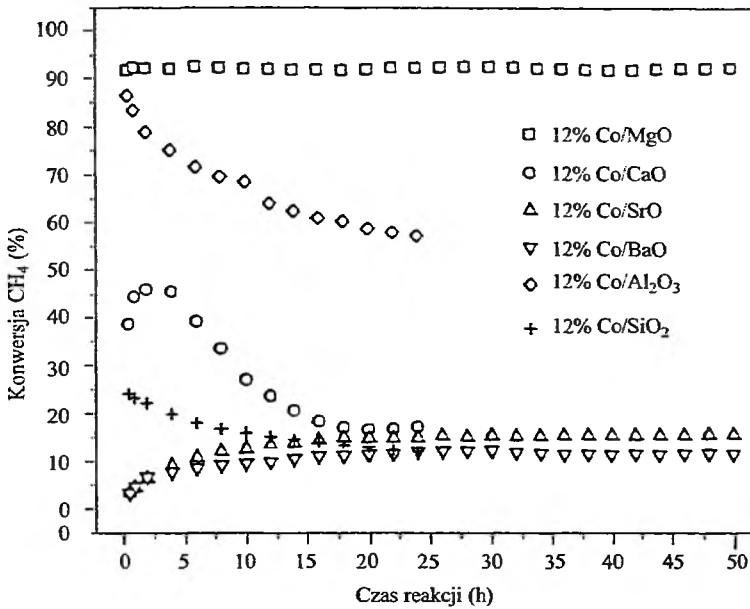
gła do gazu syntezowego w obecności stałych roztworów NiO-MgO istotny wpływ wywiera konstrukcja reaktora. Zastosowanie reaktora z warstwą fluidalną znacznie zwiększa konwersję metanu. Zredukowane heksagliniany wykazały obiecującą aktywność i stabilność katalityczną. Konwersja metanu rosła ze wzrostem ilości niklu, zastępującego glin w sieci heksaglinianów. Katalizatory te odznaczały się dużą odpornością na spiekanie i zawęglanie w porównaniu z katalizatorami naniesionymi.

Przydatność technik izotopowych w badaniach reformingu metanu dwutlenkiem węgla wykazali Ruckenstein i Yun Hang Hu [46]. Stwierdzili, że katalizator NiO/SiO₂ wykazuje minimalną aktywność na początku procesu. W miarę redukcji NiO przez metan szybkość reakcji rośnie, dowodząc, że centrum aktywnym tej reakcji jest Ni⁰. Etapem określającym szybkość reakcji reformingu jest powierzchniowa reakcja między węglem a tlenem.

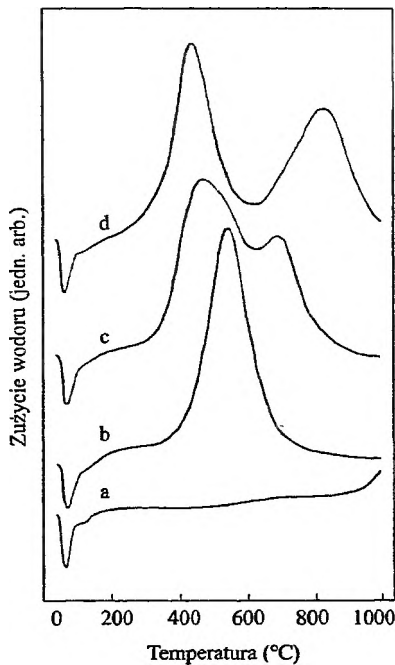
Przedmiotem badań były również bimetaliczne katalizatory niklu z miedzią, rodem, platyną, cyną [69, 71], a ostatnio z rutenem i palladem [72]. W tej ostatniej pracy Crisafulli i wsp. zbadali naniesione na SiO₂ katalizatory Ni-Ru i Ni-Pd, z zastosowaniem przede wszystkim technik TPR oraz IR. Stwierdzili, że dodatek Ru lub Pd do Ni/SiO₂ sprzyja reakcji reformingu metanu dwutlenkiem węgla, przy czym ten korzystny wpływ uwarunkowany jest zarówno rodzajem dodawanego metalu, jak i prekursora katalizatora. Najlepsze efekty uzyskano w wypadku katalizatora Ni-Ru otrzymanego z azotanów. Wysoką aktywność i stabilność tego katalizatora autorzy przypisują tworzeniu klasterów bimetalicznych Ni-Ru, których powierzchnia wzbogacona jest w nikiel. Prowadzi to do wzrostu dyspersji metalicznego niklu, co sprzyja powstawaniu bardziej reaktywnych pośrednich połączeń węglowych i ogranicza dezaktywację katalizatora.

2.1.2. Katalizatory kobaltowe i żelazowe

Podobnie jak nikiel, tak i pozostałe metale z triady żelazowców wykazują pewną aktywność w reformingu metanu dwutlenkiem węgla [19, 35, 41]. Ruckenstein i Wang [19] badali katalizatory kobaltowe naniesione na różne nośniki: MgO, CaO, SrO, BaO oraz γ -Al₂O₃ i SiO₂. Wyniki przedstawione na rys. 12 wykazały, że jedynie katalizator naniesiony na MgO charakteryzuje się stabilną aktywnością w ciągu 50 godzin. Pozostałe katalizatory bądź to szybko ulegały dezaktywacji (nośniki: γ -Al₂O₃, CaO, SiO₂) bądź też od początku wykazywały niską aktywność (nośniki SrO, BaO). Niskie aktywności katalizatorów Co/SrO oraz Co/BaO były prawdopodobnie spowodowane niedostępnością metalicznych centrów kobaltu w wyniku spiekania nośników, których powierzchnie właściwe po procesie redukcji zmniejszają się do zaledwie kilku m²/g. Podatność na redukcję badanych katalizatorów związana jest ściśle z charakterem oddziaływań między CoO i nośnikiem. Najtrudniej redukowalny jest katalizator CoO/MgO, w którym oddziaływania CoO–nośnik są najsilniejsze (rys. 13). MgO i CoO mają zbliżone parametry sieciowe i długości wiązań, są więc całkowicie mieszalne i tworzą sta-



Rys. 12. Konwersja metanu w reakcji z CO₂ na naniesionych katalizatorach kobaltowych. Warunki reakcji: temperatura 900 °C, ciśnienie 1 atm., CH₄/CO₂ = 1,0 [19]



Rys. 13. Profile TPR 12% katalizatora kobaltowego naniesionego na a) MgO, b) CaO, c) SrO, d) BaO [19]

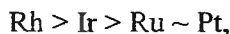
łe roztwory, co autorzy stwierdzili metodą XRD. Podatność na redukcję jonów kobaltu z roztworu stałego jest mniejsza niż monoskładnikowego CoO. W efekcie tworzą się małe klastery metalicznego kobaltu. Ponieważ są one częściowo wbudowane w nośnik, wykazują podwyższoną odporność na spiekanie. Ich wielkość nie sprzyja także tworzeniu na nich osadu węglowego.

W omówionej uprzednio porównawczej pracy Rodrigueza-Ramosa [41] autorzy wskazują na naniesione katalizatory kobaltowe jako na najbardziej odporne, obok niklowych i rodowych, na dezaktywację.

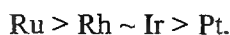
Bradford i Vannice [35], określając oddziaływania metal–nośnik i ich rolę w procesie reformingu metanu dwutlenkiem węgla, poza wieloma naniesionymi na SiO₂ i TiO₂ katalizatorami metalicznymi (Ni, Pt, Pd, Rh, Cu, Co, Ir, Ru) badali także katalizatory żelazowe. Konwersja uzyskana na tych katalizatorach była na tyle niska, że autorzy zaniechali dalszych badań.

2.2. PLATYNOWCE JAKO KATALIZATORY REFORMINGU METANU DWUTLENKIEM WĘGLA

Cenne właściwości katalityczne platynowców spowodowały, że stanowią one najliczniejszą grupę metali badanych w reakcji reformingu metanu dwutlenkiem węgla [2]. Stosowane są jako monometaliczne układy naniesione oraz jako dodatki do innych metali, najczęściej niklu. Podawane w literaturze szeregi aktywności są różne w zależności od nośników i warunków reakcji. Nie zawsze spójne są także dane podawane przez różnych autorów. Wg Ferreiry-Aparicia i wsp. [41] aktywność metali szlachetnych naniesionych na Al₂O₃ maleje w następującym szeregu:



a naniesionych na SiO₂ w następującym:



Rostrup-Nielsen [85] następująco uszeregował aktywność metali naniesionych na MgO:



Solymosi i in. [86] natomiast, badając katalizatory naniesione na Al₂O₃, przedstawili szereg:



Największym zainteresowaniem badaczy cieszą się katalizatory rutenowe i rodowe.

2.2.1. Katalizatory rutenowe

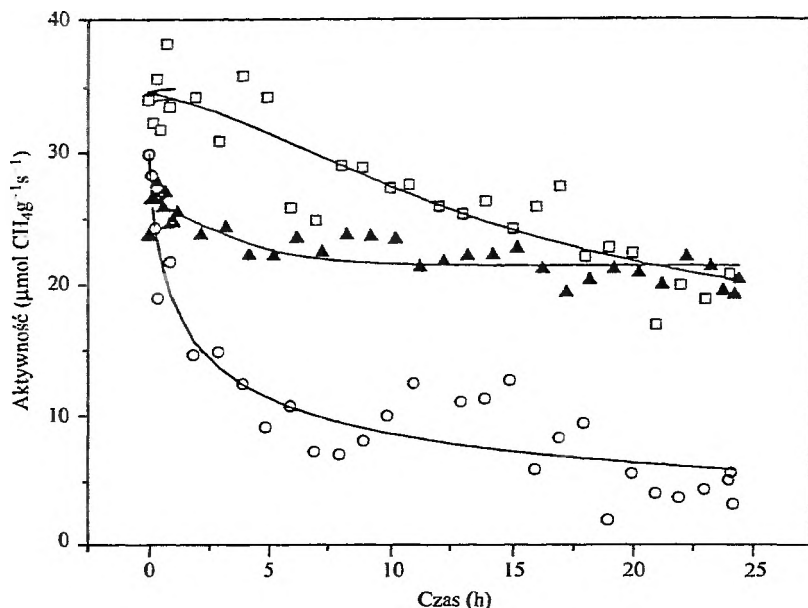
Ruten należy do najczęściej stosowanych składników katalizatorów reformingu metanu zarówno parą wodną, jak i dwutlenkiem węgla [21]. Jest również

doskonałym katalizatorem konwersji CO z parą wodną [88]. Ostatnio był przedmiotem licznych badań reakcji reformingu metanu dwutlenkiem węgla [21, 39–42, 45, 47, 53, 59, 72, 87]. Ruten budzi specjalne zainteresowanie badaczy, ponieważ w porównaniu z innymi metalami wykazuje mniejszą podatność na zawęglanie [90, 91], a przy tym odznacza się wysoką aktywnością i selektywnością w reakcji otrzymywania gazu syntezowego. Zmienność stopnia utlenienia rutenu w zależności od warunków reakcji [45] i jego oddziaływania z nośnikiem, mogą wywierać istotny wpływ na tworzenie się węglowych „species” tworzących się w wyniku rozkładu CH_4 na katalizatorze. Dlatego też wybór nośnika ma zasadnicze znaczenie. W latach 1998–2001 ukazało się wiele publikacji, poruszających to zagadnienie. Bradford i Vannice [40] badali reakcję reformingu metanu dwutlenkiem węgla, stosując katalizatory rutenowe naniesione na $\eta\text{-Al}_2\text{O}_3$, TiO_2 i sadzę o powierzchni właściwej $> 1200 \text{ m}^2/\text{g}$. Zdecydowanie niekorzystnym nośnikiem okazała się sadza, natomiast najwyższą szybkość reakcji odniesioną do liczby centrów aktywnych (TOF) autorzy osiągnęli dla katalizatora Ru/TiO_2 . Okazało się jednak, że TOF zależy silnie od szybkości objętościowej, co jest prawdopodobnie spowodowane konkurencyjnymi reakcjami, w tym uwodornieniem CO do metanu i może tłumaczyć różnice występujące między różnymi autorami.

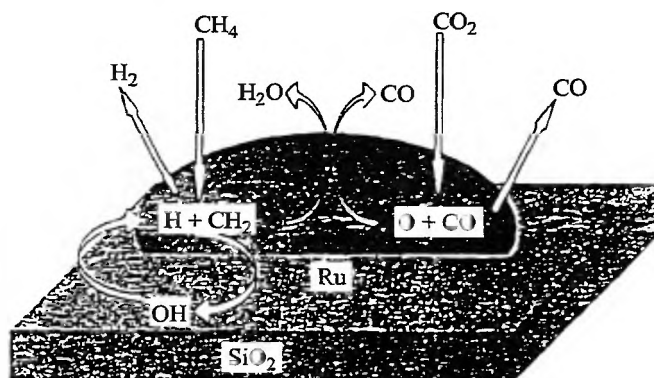
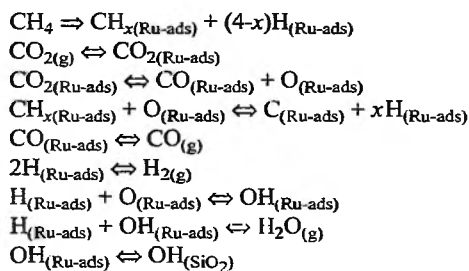
Wnikliwe badania dotyczące katalizatorów rutenowych opublikowali w latach 1998–2000 pracownicy Instytutu Katalizy i Petrochemii w Madrycie we współpracy z innymi ośrodkami badawczymi [21, 41, 42, 47]. Dotyczą one rutenu (również Co, Ni, Rh, Ir, Pt [41]) naniesionego na Al_2O_3 i SiO_2 (w jednym wypadku także grafitu [47]) i porównawczych badań fizykochemicznych zmierzających do ustalenia mechanizmu procesu suchego reformingu w obecności katalizatorów rutenowych. Ferreira-Aparicio i wsp. [41] przypisują duży wpływ nośnika na aktywność (TOF) danego metalu, ale dezaktywację skłonni są wiązać bardziej z aktywną fazą metaliczną, chociaż ostatecznie zależy ona od warunków, w jakich prowadzona jest reakcja. W wysokiej temperaturze ($750 \text{ }^\circ\text{C}$) na dezaktywację katalizatorów rutenowych mają wpływ zarówno procesy spiekania ($\text{Ru}/\text{Al}_2\text{O}_3$, Ru/SiO_2), jak i zawęglania (Ru/SiO_2).

Dalsze badania kinetyczne, z użyciem technik izotopowych i spektroskopowych potwierdziły, że najbardziej inertnym nośnikiem jest SiO_2 , co prowadzi do gromadzenia się powierzchniowego węgla na rutenie i, przez tendencję do polimeryzacji i grafityzacji, do szybkiej dezaktywacji katalizatora (rys. 14). Grafit natomiast działa jako kolektor CH_x , skracając czas zatrzymywania węglowych „species” na rutenie, co w konsekwencji daje stabilny katalizator.

Ferreira-Aparicio ze wsp. [42] zaproponowali odrębne mechanizmy reakcji dla Ru/SiO_2 i $\text{Ru}/\text{Al}_2\text{O}_3$. W pierwszym wypadku na rutenie następuje aktywacja obu reagentów, tj. CH_4 i CO_2 . Akumulacja powstałych z rozkładu CH_4 cząstek CH_x na krystalitach rutenu hamuje dysocjację CO_2 i wpływa na szybką dezaktywację katalizatora (rys. 15). Natomiast tlenek glinu stwarza możliwość kolejnych etapów aktywacji CO_2 w wyniku wytwarzania przejściowych mrówczanów na

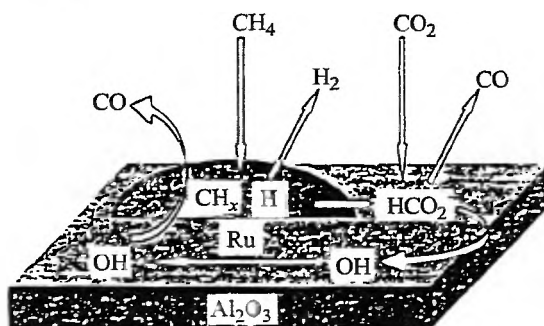
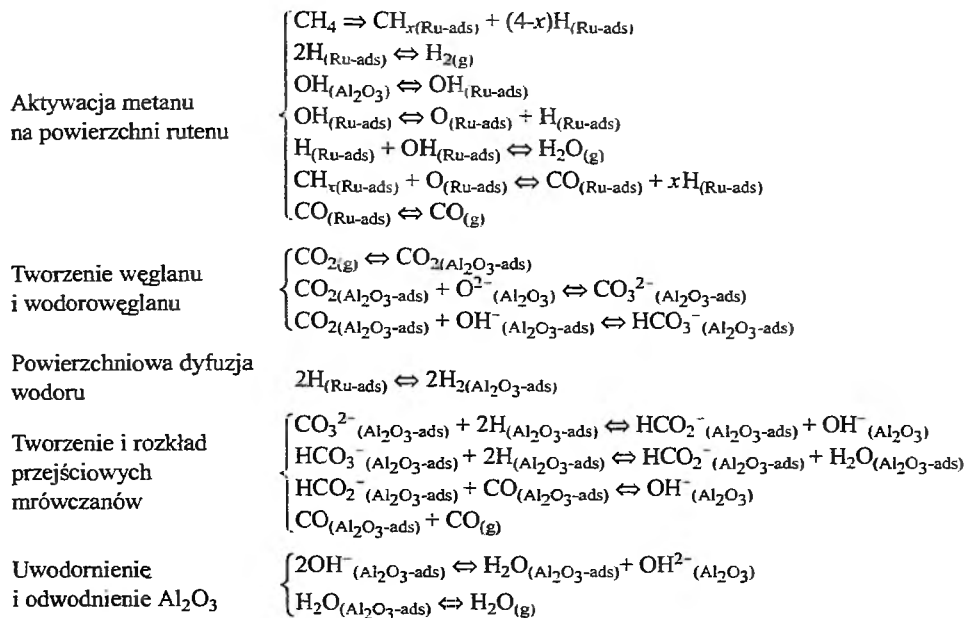


Rys. 14. Szybkość reakcji reformingu metanu dwutlenkiem węgla w temperaturze 500 °C na katalizatorach: □ – Ru/Al₂O₃, ○ – Ru/SiO₂, ▲ – Ru/grafit [47]



Rys. 15. Schemat i etapy reakcji reformingu metanu dwutlenkiem węgla na katalizatorze Ru/SiO₂ [42]

powierzchni, które rozkładając się uwalniają CO (rys. 16). Ten mechanizm, w którym kluczową rolę odgrywają grupy hydroksylowe, tłumaczy dość dobrą stabilność katalizatorów Ru/Al₂O₃ na skutek obniżenia szybkości osadzania węgla na metalu.



Rys. 16. Schemat i etapy reakcji reformingu metanu dwutlenkiem węgla na katalizatorze Ru/Al₂O₃ [42]

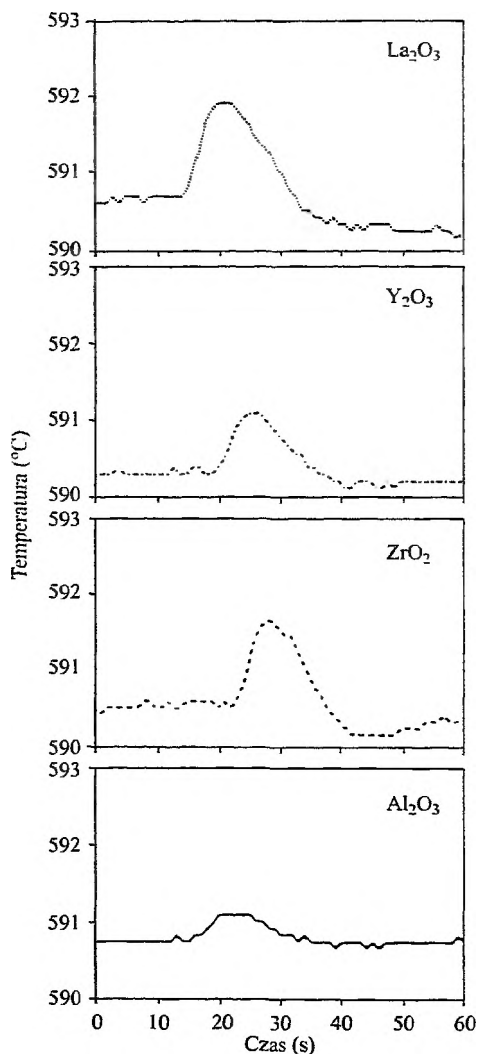
Suzuki i in. [59, 87] badali katalizatory rutenowe naniesione na Al₂O₃, Y₂O₃, La₂O₃ oraz ZrO₂. Reakcję konwersji CH₄ oraz CO₂ do gazu syntezowego oraz badania adsorpcyjne prowadzili metodą impulsową, stosując jako reagenty (adsorbaty) CO₂, ¹³CO₂, CH₄ i ¹³CH₄. Zaproponowali następujący mechanizm reakcji:

– tworzenie form Ru-CH_x w wyniku oddziaływania metanu z częścią krystalitów rutenu,

– utlenienie części Ru dwutlenkiem węgla, aktywowanym na nośniku z utworzeniem Ru-O_x i CO ,

– przeniesienie tlenu z Ru-O_x do Ru-CH_x , prowadzące do utworzenia CO i prawdopodobnie wodoru oraz odtworzenia metalicznego rutenu.

Aktywacja CO_2 na nośniku jest więc niezbędnym elementem reformingu CH_4 na metalicznym rutenie. Zachodzi ona szczególnie skutecznie w wypadku adsorpcji CO_2 na centrach zasadowych. Interesującym parametrem, odzwierciedlającym siłę oddziaływania nośników z CO_2 , wykorzystanym w omawianej pracy, był wzrost temperatury w warstwie nośnika po wprowadzeniu impulsu CO_2 (rys. 17).



Rys. 17. Zmiany temperatury w warstwie nośnika po wprowadzeniu impulsu CO_2 w temperaturze 600 °C [59]

W innej pracy Suzuki i wsp. badali właściwości przejściowych „species” CH_x [87]. Ich zdaniem, szybkość tworzenia CH_x na rutenie, w przeciwieństwie do ich reaktywności, nie zależy od rodzaju nośnika. Reaktywność jest wyższa dla katalizatorów rutenowych naniesionych na La_2O_3 , Y_2O_3 oraz ZrO_2 niż tych na Al_2O_3 . CH_x utworzone na $\text{Ru}/\text{Al}_2\text{O}_3$ nie reagują z wodorem w czasie temperaturowo-programowanej reakcji aż do temperatury 800 °C.

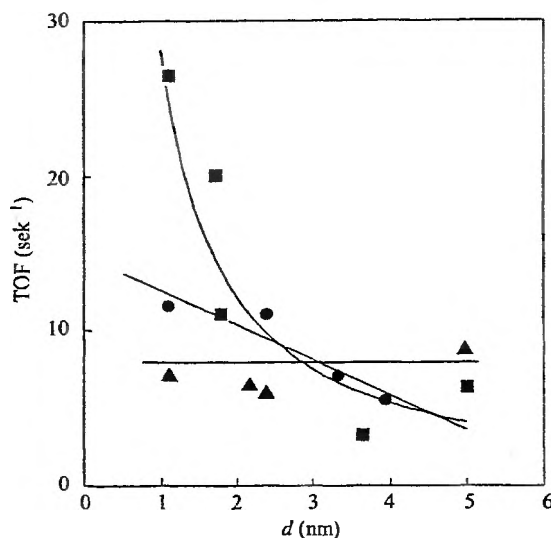
Verykios i wsp., wykorzystując technikę XPS i FTIR, badali stan utlenienia rutenu w katalizatorach $\text{Ru}/\text{Al}_2\text{O}_3$ i Ru/TiO_2 , obrabianych termicznie w różny sposób [45]. Uzyskane wyniki potwierdziły fakt silnego wpływu nośnika na chemiczne właściwości rutenu jako katalizatora. Al_2O_3 stabilizuje Ru w formach jonowych. Po działaniu wodoru w temperaturze 300 i 550 °C Ru wykazuje bardzo niską energię wiązania i niską asymetrię liniową, co można przypisać klasterom Ru^0 wtopionym w otoczenie Ru^{n+} . Obróbka wysokotemperaturowa prowadzi do agregacji cząstek Ru. Poddany działaniu mieszaniny $\text{CH}_4\text{-O}_2$ w temperaturach 500 i 700 °C ruten utlenia się.

W przeciwieństwie do poprzedniego układu Ru/TiO_2 redukuje się łatwiej i po obróbce wodorem w temperaturze 550 °C nie ulega reutlenieniu mieszaniną $\text{CH}_4\text{-O}_2$. Omawiane badania zdają się mieć szczególne znaczenie w aspekcie otrzymywania gazu syntezowego przez konwersję metanu w obecności tlenu. Interesujące właściwości katalizatora Ru/NaY , otrzymanego w wyniku wymiany jonowej z wodnego roztworu $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ zostały ostatnio zasygnalizowane przez Portugala i in. [53]. Otrzymany w wyniku określonej preparatyki, szczegółowo opisaney w pracy, katalizator wykazywał dużą odporność na dezaktywację, znacznie wyższą niż Ru/SiO_2 .

2.2.2. Katalizatory rodowe

Katalizatory rodowe są częstym obiektem badań w reakcji reformingu metanu dwutlenkiem węgla, m.in. [18, 34, 50, 58, 60]. Niektórzy autorzy uważają, że metal ten przewyższa inne platynowce pod względem aktywności i stabilności [41, 85, 87]. Verykios, Zhang i in. [34] stwierdzili silny wpływ różnych nośników [YSZ (ZrO_2 stabilizowany Y_2O_3), Al_2O_3 , TiO_2 , SiO_2 , La_2O_3 i MgO] na aktywność i dezaktywację katalizatorów rodowych. W zależności od zastosowanego nośnika, autorzy przedstawili następujący szereg aktywności katalizatorów rodowych: $\text{YSZ} > \text{Al}_2\text{O}_3 \geq \text{TiO}_2 > \text{SiO}_2 > \text{La}_2\text{O}_3 > \text{MgO}$, przy czym aktywność Rh/YSZ jest ok. 80 razy większa niż Rh/MgO . Zwraca uwagę zbieżność spadku aktywności ze zmniejszaniem się kwasowości nośników. Aktywność (TOF) katalizatorów zależy od wymiaru krystalitów rodu, zmniejszając się wraz z ich wzrostem, jednakże na stopień tej zależności silnie oddziałuje natura nośnika (rys. 18). Najbardziej odporne na dezaktywację okazały się katalizatory naniesione na YSZ oraz Al_2O_3 , najmniej natomiast – na TiO_2 i MgO .

Istnieją przynajmniej trzy czynniki, wpływające na dezaktywację badanych katalizatorów: osadzanie depozytu węglowego, spiekanie oraz zatrucie sub-



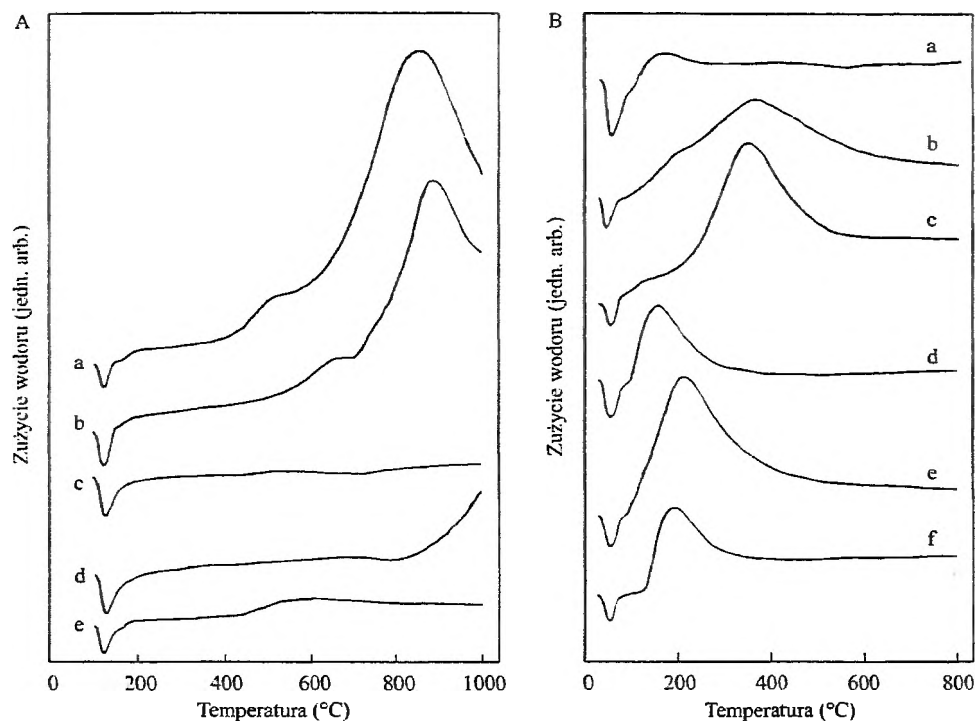
Rys. 18. Zależność początkowej aktywności właściwej (TOF) reakcji CH_4 z CO_2 od średniego wymiaru kryształitów Rh w katalizatorach Rh/ Al_2O_3 (●), Rh/ SiO_2 (▲) i Rh/ TiO_2 (■) w temperaturze $650\text{ }^\circ\text{C}$ [34]

stancjami pochodzącymi z nośnika. Przyczynę wysokiej aktywności katalizatora Rh/YSZ autorzy upatrują w zdolności nośnika do „magazynowania” znacznej ilości tlenu, który, spływając na powierzchnię rodu (*spillover*), bierze udział w powstawaniu CO, zwiększając jego ilość, pochodzącą z dysocjacji CO_2 .

Istotny wpływ nośnika (Al_2O_3 , SiO_2) na właściwości katalityczne katalizatorów rodowych stwierdzili także ostatnio Ferreira-Aparicio i in. [60]. Badacze ci sądzą, że istotny wpływ na wysoką wydajność CO i H_2 w reakcji reformingu metanu dwutlenkiem węgla wobec katalizatora Rh/ Al_2O_3 ma sposób aktywacji CO_2 – głównie na nośniku, w przeciwieństwie do Rh/ SiO_2 – na kryształach rodu. Ci sami autorzy wykonali serię badań bimetalicznych katalizatorów Rh-Cu/ Al_2O_3 [50]. Wprowadzenie, do posiadającego dużą zdolność aktywacji CH_4 katalizatora Rh/ Al_2O_3 nie aktywującej miedzi, umożliwiło autorom próbę określenia roli powierzchni międzyfazowej w Rh/ Al_2O_3 . Dla tego układu proponuje się mechanizm bifunkcyjny (aktywacja CH_4 na rodzie, natomiast CO_2 na Al_2O_3). Powierzchnia ta odgrywa kluczową rolę w dyfuzji związków przejściowych, umożliwiając utrzymanie równowagi między aktywacją CO_2 na powierzchni tlenku glinu i reakcją odwodornienia CH_4 na rodzie, a przez to uniknięcie osadzania się węgla, a więc dezaktywacji katalizatora. Dodatek miedzi powodował ograniczenie dyfuzji i spadek stabilności Rh-Cu/ Al_2O_3 w porównaniu z Rh/ Al_2O_3 . Efekty te nie są jednak tak wyraźne jak w wypadku Rh/ SiO_2 , gdy oba reagenty (CH_4 i CO_2) są aktywowane na powierzchni rodu. Dodatek miedzi nie wywierał wpływu na początkową aktywność, odnoszącą się do centrum ak-

tywnego na powierzchni, a więc wg autorów reforming metanu dwutlenkiem jest reakcją nieczułą strukturalnie, a jej przebieg zależy nie tylko od centrów umieszczonych na granicy faz Rh-Al₂O₃, ale również od pewnej liczby tych centrów Rh, które znajdują się na powierzchni.

Interesującą pracę o wpływie nośnika na właściwości naniesionego rodu opublikowali ostatnio Wang i Ruckenstein [18]. Zastosowali oni jako nośniki dwie grupy tlenków – tzw. „redukowalne” (CeO₂, Nb₂O₅, Ta₂O₅, ZrO₂) i nieredukowalne (γ-Al₂O₃, La₂O₃, MgO, SiO₂ i Y₂O₃). Na rys. 19 przedstawione są profile TPR tlenków „redukowalnych” (A) oraz katalizatorów, zawierających 0,5% Rh naniesionych na tlenki nieredukowalne oraz Ta₂O₅ (B).



Rys. 19. A. Profile TPR: a. CeO₂, b. Nb₂O₅, c. Ta₂O₅, d. TiO₂, e. ZrO₂. B. Profile TPR prażonych katalizatorów Rh (0,5%) naniesionych na: a. γ-Al₂O₃, b. La₂O₃, c. MgO, d. SiO₂, e. Y₂O₃, f. Ta₂O₅ [18]

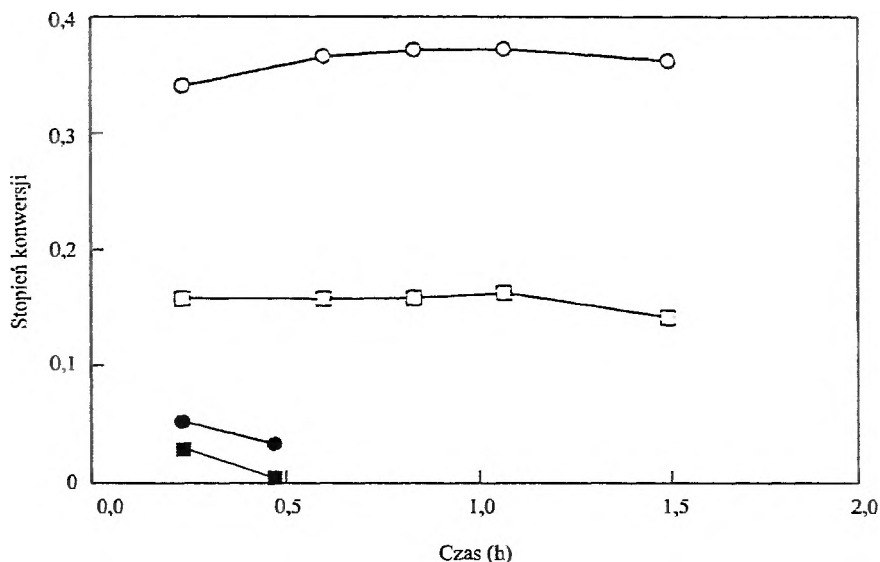
W wypadku zastosowania tlenków nieredukowalnych (γ-Al₂O₃, MgO) naniesione katalizatory rodowe wykazują stabilną aktywność w ciągu 100 godzin, (La₂O₃ – 50 godz.), która wzrasta w następującym szeregu: La₂O₃ < MgO ≅ γ-Al₂O₃. Natomiast katalizatory naniesione na tlenki „redukowalne” (z wyjątkiem Ta₂O₅), wykazują znacznie niższą aktywność, w zasadzie dyskwalifikując te nośniki jako potencjalne składniki katalizatorów, mogących mieć praktyczne zastosowanie. Jedną z przyczyn ich niskiej aktywności może być ekranowanie rodu

przez „wysepki” częściowo zredukowanych tlenków (np. TiO_x – czyli klasyczny efekt silnych oddziaływań metal-nośnik SMSI). W konkluzji Wang i Ruckenstein rekomendują MgO i Al_2O_3 jako najbardziej obiecujące nośniki rodowych katalizatorów suchego reformingu.

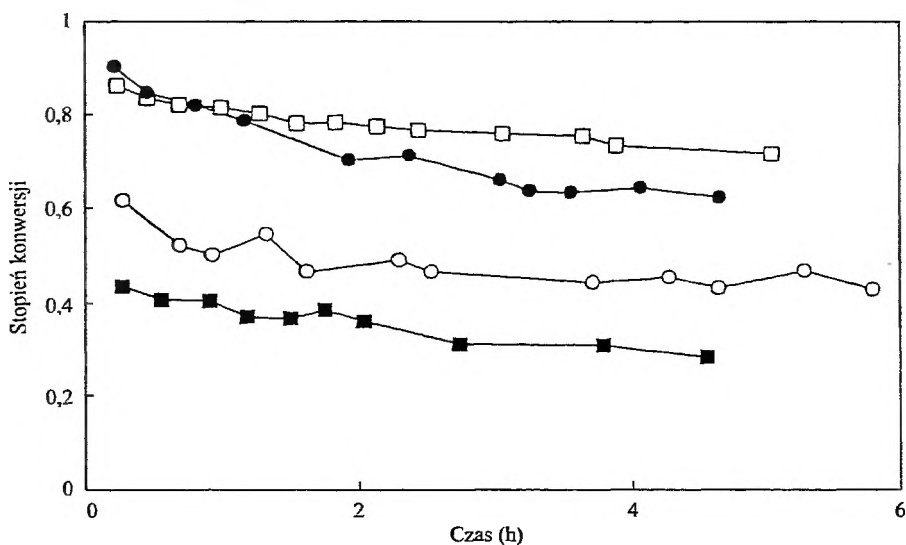
2.2.3. Katalizatory palladowe i platynowe

W ostatnich latach badania katalizatorów platynowych i palladowych ukierunkowane są przede wszystkim na ich wykorzystanie w trójfunkcyjnych katalizatorach spalin samochodowych. Jednakże są one także przedmiotem badań w procesie reformingu metanu dwutlenkiem węgla [36–38, 54, 89]. W odniesieniu do katalizatorów platynowych istnieje przekonanie, że naniesienie platyny na nośniki TiO_2 oraz ZrO_2 prowadzi do uzyskania katalizatorów efektywniejszych od naniesionych na SiO_2 i Al_2O_3 [36–38]. Bradford i Vannice przeprowadzili obszernie badania właściwości katalizatorów Pt/TiO_2 oraz modelowych układów TiO_x/Pt [35, 97]. Wyniki wskazywały na wzrost aktywności katalizatorów ze wzrostem pokrycia powierzchni metalu TiO_x . Wzrost ten został przypisany tworzeniu nowych międzyfazowych miejsc aktywnych, promujących dysocjację CH_4 i CO_2 , a także redukcję CO_2 i rozkład cząstek CH_xO . Autorzy zasugerowali także zwiększenie odporności na zawęglanie tego typu katalizatorów wskutek ochronnego działania powierzchniowej warstwy TiO_x . Przedmiotem badań Lerchera i wsp. [38, 77] były katalizatory platynowe naniesione zarówno na ZrO_2 , jak i TiO_2 oraz Al_2O_3 . Spośród badanych najwyższą aktywność oraz stabilność wykazywały katalizatory Pt/ZrO_2 . Podobne konkluzje wynikają z prac Yin-Zu Chena i wsp. [106], a także Resasco i in. [36, 37]. Rys. 20 przedstawia porównanie aktywności katalizatorów platynowych naniesionych na ZrO_2 i SiO_2 [37]. Wspomniani autorzy badali także wpływ modyfikacji katalizatorów (dodatek cyny do platyny oraz perowskitu, ceru lub lantanu do nośnika) na ich aktywność. Sposób preparatyki katalizatorów platynowo-cynowych w sposób zasadniczy wpływał na ich właściwości katalityczne (rys. 21). Dodatek promotorów nośnika (perowskity, cer, lantan) może korzystnie wpływać na właściwości katalizatorów przez zwiększenie ich odporności termicznej, zwiększenie pojemności adsorpcyjnej CO_2 oraz ograniczenie spiekania fazy metalicznej.

Katalizatorem o interesujących właściwościach w reakcji reformingu metanu zarówno dwutlenkiem węgla, jak i parą wodną okazał się Pd/CeO_2 [89]. Szybkość obu reakcji na tym katalizatorze okazała się kilka rzędów większa niż na Pd/SiO_2 lub samym nośniku, dowodząc, że kontakt między palladem a CeO_2 ma kluczowe znaczenie. Autorzy sugerują przebieg reakcji wg mechanizmu redukująco-utleniającego, w którym CO_2 i H_2O spełniają funkcję czynników utleniających zredukowaną formę nośnika w reakcji katalizowanej przez pallad. Katalizator Pd/CeO_2 jest więc aktywny na skutek ułatwionego transferu tlenu pomiędzy nośnikiem a metalem. Katalizator jest następnie redukowany przez dysocjatywną adsorpcję metanu.



Rys. 20. Konwersja metanu (kwadraty) i dwutlenku węgla (kółka) dla katalizatorów Pt/SiO₂ (zaczernione) i Pt/ZrO₂ (puste) w temperaturze 650 °C, CH₄:CO = 2:1 [37]



Rys. 21. Konwersja CO₂ na Pt/ZrO₂ (□), Pt-Sn (koimpregnacja) (■), Pt-Sn (impregnacja uprzednio kalcynowanego Pt/ZrO₂) (◻) i Pt-Sn (impregnacja Pt/ZrO₂ Sn(C₄H₉)₄) (●) [37]

Galuszka i wsp. [54] podjęli próbę wykorzystania reaktora membranowego z membraną palladową w reakcji suchego reformingu. Jednakże uzyskane wyniki nie były obiecujące, głównie z powodu osadzania się na membranie włóknistego depozytu węglowego oraz pęcznienia membrany, prowadzącego w efekcie do jej destrukcji.

3. NOŚNIKI KATALIZATORÓW REFORMINGU METANU DWUTLENKIEM WĘGLA

Nośniki stanowią nieodłączny składnik zdecydowanej większości katalizatorów testowanych dotychczas w reakcji reformingu metanu dwutlenkiem węgla, były więc w znacznym stopniu omówione w dotychczasowych rozważaniach. Praktycznie w każdym z proponowanych mechanizmów przebiegu reformingu metanu dwutlenkiem węgla [2, 29, 31, 42, 81] eksponowana jest aktywna rola nośnika. Np. jeżeli przyjąć mechanizm Vannice'a i Bradforda [2], postulujący następujące etapy reakcji:

- odwracalna dysocjacja CH_4 prowadząca do powstania wodoru i CH_x ,
- niedysocjatywna adsorpcja CO_2 na nośniku,
- promowana wodorem dysocjacja CO_2 w przestrzeni międzyfazowej metal–nośnik,

- reakcja CH_x z grupami OH (lub O) nośnika prowadząca do powstania CH_xO w przestrzeni międzyfazowej metal–nośnik,

- rozkład CH_xO do CO i H_2 w przestrzeni międzyfazowej metal–nośnik, to cztery z nich są ściśle związane z charakterem nośnika i międzyfazową granicą metal–nośnik, której rozwinięcie i właściwości zależą od zastosowanego nośnika. W referatowej pracy [2] wymienione są następujące nośniki stosowane w reakcji reformingu metanu dwutlenkiem węgla: SiO_2 , Al_2O_3 , MgO , MgCO_3 , TiO_2 , Cr_2O_3 , BaO , SrO , ZnO , MgAl_2O_4 , ZSM-5, La_2O_3 , CeO_2 , Nb_2O_5 , Eu_2O_3 , SiC , ZrO_2 , C, MgO-SiO_2 , MgO-C , $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-SiO}_2$, $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-CaO}$, $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-CaO-MgO}$, $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-CaO-TiO}_2$, $\text{MgO-Re}_2\text{O}_3\text{-Al}_2\text{O}_3$, $\text{V}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2$, $\text{ZrO}_2\text{-Y}_2\text{O}_3$, $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-CeO}_2$, $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-La}_2\text{O}_3$. W ostatnich latach do tej długiej listy doszły jeszcze perowskity, np. LaMnO_3 [39], LaCoO_3 [36], oraz układy złożone, np. $\text{ZrO}_2\text{-LaCoO}_3$ [36], $\text{MgO-Al}_2\text{O}_3\text{-AlPO}_4$, $\text{ZrO}_2\text{-CeO}_2$, $\text{ZrO}_2\text{-MgO}$ [24, 82], $\text{LaNi}_y\text{Al}_{12-y}\text{O}_{19-\delta}$ ($y = 0,3, 0,6, 0,9, 1,0$) [48], KNiCa-NaZSM-5 [20], $\text{MnO-Al}_2\text{O}_3$ [105], $\text{Y}_2\text{O}_3\text{-CeO}_2$ [107].

Podjęmowane są próby uszeregowania nośników pod kątem wzrastającej lub malejącej aktywności naniesionych na nie katalizatorów reformingu metanu dwutlenkiem węgla. Istnieją jednak w tym zakresie znaczne rozbieżności nawet dla tego samego naniesionego metalu. Wyniki w znacznym stopniu zależą od sposobu preparatyki katalizatora lub nośnika, ilości naniesionej fazy, sposobu prowadzenia i parametrów reakcji itp. Np. w odniesieniu do katalizatorów rodowych Verekios [34], Nakamura [76], Erdöhelyi [90], Basini [92] czy Wang i Ruckenstein [18] podają różne szeregi aktywności nośników.

Jak już wspomniano, w ostatnim okresie wiele miejsca w literaturze poświęcono możliwości wykorzystania ZrO_2 jako nośnika katalizatorów suchego reformingu. Osadzone na tym nośniku katalizatory charakteryzuje często wysoka odporność na zawęglanie. Bardzo interesujące są wyniki porównawczych badań Lerchera i wsp. [95] katalizatorów $\text{Pt/Al}_2\text{O}_3$ oraz Pt/ZrO_2 . Za pomocą różnych technik badali oni charakter tworzącego się podczas reakcji depozytu węglowego. W przypadku $\text{Pt/Al}_2\text{O}_3$ dezaktywacja katalizatora zachodzi powoli powyżej tem-

peratury 800 °C i szybko poniżej 600 °C. CH_x pochodzące z rozkładu metanu osadzają się na Pt i centrach Lewisa na nośniku. W wysokiej temperaturze koks z Pt jest usuwany w wyniku reakcji z CO_2 . Jednakże szybkość usuwania węgla, nie znajdującego się w sąsiedztwie bezpośredniego kontaktu Pt- Al_2O_3 , jest mała w porównaniu z szybkością rozkładu CH_4 , co w efekcie prowadzi do stopniowego pokrycia Pt węglem i zablokowania centrów aktywacji CO_2 na nośniku.

W przypadku Pt/ ZrO_2 koks jest bardziej reaktywny. Szybkość rozkładu CH_4 na Pt/ ZrO_2 jest mniejsza niż na Pt/ Al_2O_3 . Dlatego odkładanie się węgla na Pt i jego utlenianie jest zrównoważone. Ponadto, ze względu na brak silnych centrów Lewisa, koks nie osadza się na ZrO_2 w znacznym stopniu. W efekcie gromadzenie się depozytów węglowych na katalizatorze Pt/ ZrO_2 jest nieznaczne i katalizator ten wykazuje dużą stabilność aktywności. Badania mechanizmów osadzania oraz natury depozytów węglowych [96] są w odniesieniu do reformingu metanu dwutlenkiem węgla bardzo poważnym i skomplikowanym zagadnieniem, a ich szczegółowe omówienie wymagałoby odrębnego opracowania. Doskonale i często unikatowe właściwości ZrO_2 [93] zwiększyły zainteresowanie tym tlenkiem jako nośnikiem lub dodatkiem do innych katalizatorów omawianego procesu, m.in. niklowych [24, 28, 29, 75, 77, 82], rutenowych [59, 87], rodowych [18, 34] i platynowych [36–38, 106].

Poza poszukiwaniem nowych materiałów nośnikowych, w ostatnim okresie coraz większą wagę przywiązuje się do specjalnych metod preparatywnych [22, 26, 27, 30, 37, 39, 101], w tym także metody zol–żel [23, 24, 82, 98], otrzymywania stałych roztworów [49, 83, 99, 100], heksaglinianów [48] i in. Coraz więcej miejsca poświęca się różnego typu układom mieszanym [2, 24, 36, 82, 84, 103] oraz zeolitom wysokokrzemowym, szczególnie promotowanym alkaliami [20]. Właściwe zrozumienie roli nośnika i jego dobór jest bez wątpienia kluczowym elementem optymalizacji katalizatorów reformingu metanu dwutlenkiem węgla. Najistotniejsze wydaje się zrównoważenie rozkładu metanu na metalu oraz osadzanie depozytu węglowego z jego usuwaniem w wyniku utlenienia zaktywowanym na nośniku dwutlenkiem węgla.

UWAGI KOŃCOWE

Znaczna liczba opublikowanych prac badawczych (ok. 100 od czasu przygotowania przeglądowego opracowania Vannice'a i Bradforda [2]) wskazuje na niesłabnące zainteresowanie tematyką suchego reformingu metanu dwutlenkiem węgla, bardzo interesującą z naukowego punktu widzenia i ważną w aspekcie potencjalnego wykorzystania tej reakcji w praktyce przemysłowej. Mimo wielu prac i zaangażowania w badaniach wybitnych uczonych z dziedziny katalizy, np. Ruckensteina, Vannice'a, Verykiosa, Lerchera, Lunsforda i in., temat w znacznym stopniu pozostaje nadal otwarty, wyniki dotychczasowych badań nie zawsze są spójne i dające podstawy do uogólnień.

Należy sądzić, że dalsze badania będą zogniskowane na opracowaniu katalizatorów o znacznej stabilności i odporności na dezaktywację. Szczególne nadzieje w tym zakresie można wiązać z układami złożonymi (bimetaliczne lub promotowane fazy metaliczne oraz modyfikowane i wieloskładnikowe nośniki).

Praca wykonana w ramach projektu badawczego zamawianego przez Komitet Badań Naukowych Nr PBZ/KBN/018/T09/99/1c.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] J. Molenda, *Gaz ziemny*, wyd. II, WNT, Warszawa 1993.
- [2] M.C.J. Bradford, M.A. Vannice, *Cat. Rev. – Sci. Eng.*, 1999, **41**, 1.
- [3] *Materiały 12 Międzynarodowego Kongresu Katalizy*, Granada 9–14 VI 2000, *Studies in Surface Science and Catalysis*, Vol. 130, Elsevier, Amsterdam 2000; *Materiały V Kongresu Katalizy Europacat V (Abstrakty)*, Limerick 2–7 IX 2001, EFCATS.
- [4] F. Fischer, H. Tropsch, *Brennst. Chem.*, 1928, **3**, 39.
- [5] D. Dyrssen, D.R. Turner, [w:] *Carbon Dioxide Chemistry: Environmental Issues*, Ed. J. Paul, C.M. Pradier, Athenaeum Press, Cambridge 1994, s. 317.
- [6] P. Mastalerz, *Wiad. Chem.*, 2000, **54**, 227.
- [7] B. Hileman, *Chem. Eng. News* (14 IV 1997), 28.
- [8] S. Teuner, *Hydrocarbon Process.*, 1987, **66**, 52.
- [9] N.R. Udengaard, J.-H.B. Hansen, D.C. Hanson, J.A. Stal, *Oil Gas J.*, 1992, **90**, 62.
- [10] S.T. Ceyer, Q.Y. Yang, M.B. Lee, J.D. Beckerle, A.D. Johnson, *Methane Conversion*, Elsevier, Amsterdam 1988, s. 51.
- [11] R.A. van Santen, M. Neurock, *Cat. Rev. – Sci. Eng.*, 1995, **37**, 557.
- [12] F. Solymosi, *J. Mol. Cat.*, 1991, **65**, 337.
- [13] J. Wambach, H.J. Freud, [w:] *Carbon Dioxide Chemistry: Environmental Issues*, Ed. J. Paul, C.M. Pradier, Athenaeum Press, Cambridge 1994, s. 31.
- [14] *Transition State Modeling for Catalysis*, Ed. D.G. Truhlar, K. Morokuma, ACS Symposium Series, Vol. 215, American Chemical Society, Washington 1999.
- [15] T. Inui, *Catal. Today*, 1999, **51**, 361.
- [16] A.P.E. York, J.B. Claridge, A.J. Brungs, S.C. Tsang, M.L.H. Green, *Chem. Commun.*, 1997, 39; J. Sehested, C.J.H. Jacobsen, S. Rokni, J.R. Rostrup-Nielsen, *J. Catal.*, 2001, **201**, 206.
- [17] R. Dziembaj, W. Makowski, *Materiały I Kongresu Technologii Chemicznej, Szczecin 19–22 IX 1994*, Wyd. Politechniki Szczecińskiej, 1995, s. 526.
- [18] H.Y. Wang, E. Ruckenstein, *Appl. Catal. A: General*, 2000, **204**, 143.
- [19] E. Ruckenstein, H.Y. Wang, *Appl. Catal. A: General*, 2000, **204**, 25.
- [20] Jong-San Chang, Sang-Eon Park, Jung Whan Yoo, Jin-Nan Park, *J. Catal.*, 2000, **195**, 1.
- [21] A. Guerrero-Ruiz, P. Ferreira-Aparicio, M.B. Bachiller-Baeza, I. Rodriguez-Ramos, *Catal. Today*, 1998, **46**, 99.
- [22] C.E. Quincoes, S. Perez de Vargas, M.G. González, *Stud. Surf. Sci. Catal.*, 2000, **130**, 3681.
- [23] A. Castro Luna, A. Becerra, M. Dimitrijewits, C. Arciprete, *Stud. Surf. Sci. Catal.*, 2000, **130**, 3651.
- [24] J. Ascención Montoya, E. Romero, A. Monzon, C. Guimon, *Stud. Surf. Sci. Catal.*, 2000, **130**, 3669.
- [25] M.C.J. Bradford, M.A. Vannice, *Appl. Catal. A: General*, 1996, **142**, 73; M.C.J. Bradford, M.A. Vannice, *Appl. Catal. A: General*, 1996, **142**, 97.

- [26] Shaobin Wang, G.Q.M. Lu, *Appl. Catal. B: Environmental*, 1998, **16**, 269.
- [27] Shaobin Wang, G.Q.M. Lu, *Appl. Catal. A: General*, 1998, **169**, 271.
- [28] Jun-Mei Wei, Bo-Qing Xu, Jin-Lu Li, Zhen-Xing Cheng, Qi-Ming Zhu, *Appl. Catal. A: General*, 2000, **196**, L 167.
- [29] Jun-Mei Wei, Bo-Qing Xu, Zhen-Xing Cheng, Jin-Lu Li, Qi-Ming Zhu, *Stud. Surf. Sci. Catal.*, 2000, **130**, 3687.
- [30] Jin-Hong Kim, Dong Jin Suh, Tae-Jin Park, Kyung-Lim Kim, *Appl. Catal. A: General*, 2000, **197**, 191.
- [31] Z. Zang, X.E. Verykios, S.M. Mac Donald, S. Affrossman, *J. Phys. Chem.*, 1996, **100**, 744.
- [32] V.A. Tsipouriari, X.E. Verykios, *J. Catal.*, 1999, **187**, 85.
- [33] J.Z. Luo, L.Z. Gao, Z.L. Yu, C.T. Au, *Stud. Surf. Sci. Catal.* 2000, **130**, 689; J.Z. Luo, Z.L. Yu, C.F. Ng, C.T. Au, *J. Catal.*, 2000, **194**, 198.
- [34] Z.L. Zang, V.A. Tsipouriari, A.M. Efstathiou, X.E. Verykios, *J. Catal.*, 1996, **158**, 51; A.M. Efstathiou, A. Kladi, V.A. Tsipouriari, X.E. Verykios, *J. Catal.*, 1996, **158**, 64.
- [35] M.C.J. Bradford, M.A. Vannice, *Catal. Today*, 1999, **50**, 87.
- [36] S.M. Stagg-Williams, R. Soares, E. Romero, W.E. Alvarez, D.E. Resasco, *Stud. Surf. Sci. Catal.*, 2000, **130**, 3663; S.M. Stagg-Williams, F.B. Noronha, G. Fendley, D.E. Resasco, *J. Catal.*, 2000, **194**, 240.
- [37] S.M. Stagg, E. Romero, C. Padro, D.E. Resasco, *J. Catal.*, 1998, **178**, 137.
- [38] J.H. Bitter, K. Sesham, J.A. Lercher, *J. Catal.*, 1999, **183**, 336.
- [39] E. Pietri, A. Barrios, M.R. Goldwasser, M.J. Perez-Zurita, M.L. Cubeiro, J. Goldwasser, L. Leclercq, G. Leclercq, L. Gingembre, *Stud. Surf. Sci. Catal.*, 2000, **130**, 3657.
- [40] M.C.J. Bradford, M.A. Vannice, *J. Catal.* 1999, **183**, 69
- [41] P. Ferreira-Aparicio, A. Guerrero-Ruiz, I. Rodriguez-Ramos, *Appl. Catal. A: General*, 1998, **170**, 177.
- [42] P. Ferreira-Aparicio, I. Rodriguez-Ramos, J.A. Anderson, A. Guerrero-Ruiz, *Appl. Catal. A: General*, 2000, **202**, 183.
- [43] K. Hayek, R. Kramer, Z. Paál, *Appl. Catal. A: General*, 1997, **162**, 1.
- [44] T. Borowiecki, A. Gołębowski, K. Stołeczki, B. Stasińska, *Polish J. Chem. Tech.*, 1999, **1**, 2.
- [45] C. Elmasides, D.I. Kondarides, W. Grünert, X.E. Verykios, *J. Phys. Chem.*, 1999, **B103**, 5227.
- [46] Yun Hang Hu, E. Ruckenstein, *J. Phys. Chem.*, 1997, **B101**, 7563.
- [47] P. Ferreira-Aparicio, C. Marquez-Alvarez, I. Rodriguez-Ramos, Y. Schuurman, A. Guerrero-Ruiz, C. Mirodatos, *J. Catal.*, 1999, **184**, 202.
- [48] Zhalin Xu, Ming Zhen, Yingli Bi, Kaiji Zhen, *Appl. Catal. A: General*, 2000, **198**, 267.
- [49] K. Tomishige, O. Yamazaki, Y. Chen, K. Yokoyama, X. Li, K. Fujimoto, *Catal. Today*, 1998, **45**, 35.
- [50] P. Ferreira-Aparicio, M. Fernandez-Garcia, A. Guerrero-Ruiz, I. Rodriguez-Ramos, *J. Catal.*, 2000, **190**, 296.
- [51] S. Sharma, S. Hilaire, J.M. Vohs, R.J. Gorte, H-W. Jen, *J. Catal.*, 2000, **90**, 199.
- [52] X. Li, J-S. Chang, S-E. Park, *React. Kinet. Catal. Lett.*, 1999, **67**, 375.
- [53] U.L. Portugal Jr., C.M.P. Marquez, E.C.G. Araujo, E.V. Morales, M.V. Giotto, J.M.C. Bueno, *Appl. Catal. A: General*, 2000, **193**, 173.
- [54] J. Galuszka, R.N. Pandey, S. Ahmed, *Catal. Today*, 1998, **46**, 83.
- [55] Y. Wang, Y. Takahashi, Y. Ohtsuka, *J. Catal.*, 1999, **186**, 160.
- [56] N. Mimura, I. Takahara, M. Saito, T. Hattori, K. Ohkuma, M. Ando, *Catal. Today*, 1998, **45**, 61.
- [57] I. Takahara, W-C. Chang, N. Mimura, M. Saito, *Catal. Today*, 1998, **45**, 55.
- [58] F. Solymosi, A. Szöke, L. Ovári, *J. Catal.*, 1999, **186**, 269.
- [59] Na-oko Matsui, Kengo Anzai, Noriyasu Akamatsu, Kiyohara Nakagawa, Na-oki Ikenaga, Toshimitsu Suzuki, *Appl. Catal. A: General*, 1999, **179**, 247.

- [60] P. Ferreira-Aparicio, M. Fernandez-Garcia, I. Rodriguez-Ramos, A. Guerrero-Ruiz, *Stud. Surf. Sci. Catal.*, 2000, **130**, 3675.
- [61] T. Osaki, T. Horiuchi, K. Suzuki, T. Mori, *Catal. Lett.*, 1995, **35**, 39.
- [62] O. Tokunaga, S. Ogasawara, *React. Kinet. Catal. Lett.*, 1989, **39**, 69.
- [63] A. Erdöhelyi, J. Cserényi, E. Papp, F. Solymosi, *Appl. Catal. A: General*, 1994, **108**, 205.
- [64] H.M. Swaan, V.C.H. Kroll, G.A. Martin, C. Mirodatos, *Catal. Today*, 1994, **21**, 571.
- [65] M.F. Mark, W.F. Maier, *J. Catal.*, 1996, **164**, 122.
- [66] L. Basini, D. Sanfilippo, *J. Catal.*, 1995, **157**, 162.
- [67] A. Erdöhelyi, K. Fodor, F. Solymosi, *Stud. Surf. Sci. Catal.*, 1997, **107**, 525.
- [68] J.B. Claridge, M.L.H. Green, S.C. Tsang, *Catal. Today*, 1994, **12**, 455.
- [69] T. Inui, *Stud. Surf. Sci. Catal.*, 1993, **77**, 17.
- [70] T. Inui, K. Saigo, Y. Fujii, K. Fujioka, *Catal. Today*, 1995, **26**, 295.
- [71] S.M. Stagg, D.E. Resasco, *Stud. Surf. Sci. Catal.* 1997, **111**, 543.
- [72] C. Crisafulli, S. Scirè, R. Maggiore, S. Minicò, S. Galvagno, *Catal. Lett.*, 1999, **59**, 21.
- [73] J.R. Rostrup-Nielsen, *Natural Gas Conversion II*, Ed. H.E. Curry-Hyde, R.F. Howe, Elsevier Sci. B.V., Lausanne 1994, s. 25.
- [74] Ch. N. Satterfield, *Heterogeneous Catalysis in Industrial Practice*, Ed. II, Mc Graw-Hill, New York 1991, s. 367, 368.
- [75] Xinsheng Li, Jong-San Chang, Sang-Eon Park, *React. Kinet. Catal. Lett.*, 1999, **67**, 375.
- [76] J. Nakamura, K. Aikawa, K. Sato, T. Uchijima, *Catal. Lett.*, 1994, **25**, 265.
- [77] J.A. Lercher, J.H. Bitter, W. Hally, W. Niessen, K. Seshen, *Stud. Surf. Sci. Catal.*, 1996, **101**, 463.
- [78] T. Sodesawa, A. Dobashi, F. Nozaki, *React. Kinet. Catal. Lett.*, 1979, **12**, 107.
- [79] J.H. Lunsford, *Catal. Today*, 2000, **63**, 165.
- [80] J.R. Rostrup-Nielsen, *Catal. Today*, 2000, **63**, 159.
- [81] Z.X. Cheng, X.G. Zhao, J.L. Li, Q.M. Zhu, *Appl. Catal. A: General*, 2001, **205**, 31.
- [82] J.A. Montoya, E. Romero-Pascual, C. Gimon, P. Del Angel, A. Monzon, *Catal. Today*, 2000, **63**, 71.
- [83] Y. Matsuo, Y. Yoshinaga, Y. Sekine, K. Tomishige, K. Fujimoto, *Catal. Today*, 2000, **63**, 439.
- [84] Yu-Wen Chen, Wei-Jen Wang, *React. Kinet. Catal. Lett.*, 2000, **71**, 41.
- [85] J.R. Rostrup-Nielsen, J.H. Bak Hansen, *J. Catal.*, 1993, **144**, 38.
- [86] F. Solymosi, G. Kutsan, A. Erdöhelyi, *Catal. Lett.*, 1991, **11**, 149.
- [87] Na-oko Matsui, Kiyoharu Nakagawa, Na-oki Ikenaga, Toshimitsu Suzuki, *J. Catal. A: General* 2000, **194**, 115.
- [88] A. Basińska, *Katalizatory Ru/Fe₂O₃ do konwersji CO z parą wodną*, Wyd. Naukowe UAM, Poznań 2000.
- [89] S. Sharma, S. Hilaire, R.J. Gorte, *Stud. Surf. Sci. Catal.*, 2000, **130**, 677.
- [90] A. Erdöhelyi, J. Cserényi, F. Solymosi, *J. Catal.*, 1993, **141**, 287.
- [91] J.B. Claridge, M.L.H. Green, S.C. Tsang, A.P.E. York, A.T. Ashcroft, P.D. Battle, *Catal. Lett.*, 1993, **22**, 299.
- [92] L. Basini, D. Sanfilippo, *J. Catal.*, 1995, **157**, 162.
- [93] A. Lewicki, T. Paryjczak, J. Rynkowski, *Wiad. Chem.*, 1996, **50**, 879.
- [94] V.A. Tsipouriari, X.E. Verykios, *Catal. Today*, 2001, **64**, 83.
- [95] K. Nagaoka, K. Sheshan, K-i. Aika, J.A. Lercher, *J. Catal.*, 2001, **197**, 34.
- [96] J. Góralski, J. Grams, I. Ludomirska, T. Paryjczak, I. Rzeźnicka, *Wiad. Chem.*, 2000, **54**, 591.
- [97] M.C.J. Bradford, M.A. Vannice, *J. Catal.* 1998, **173**, 157.
- [98] L. Ji, S. Tang, H.C. Zeng, J. Lin, K.L. Tan, *Appl. Catal. A: General* 2001, **207**, 247; S. Tang, L. Ji, J. Lin, H.C. Zeng, K.L. Tan, K. Li, *J. Catal.*, 2000, **194**, 424.
- [99] Zheng Xu, Yumin Li, Jiyan Zhang, Liu Chang, Rongqi Zhou, Zhanting Duan, *Appl. Catal. A: General* 2001, **210**, 45.

- [100] H.Y. Wang, E. Ruckenstein, *Appl. Catal. A: General* 2001, **209**, 207.
- [101] Bo-Qing Xu, Jun-Mei Wei, Hai-Yan Wang, Ke-Qiang Sun, Qi-Ming Zhu, *Catal. Today*, 2001, **68**, 217.
- [102] A.L. Larentis, N.S. de Resende, V.M.M. Salim, J.C. Pinto, *Appl. Catal. A: General* 2001, **215**, 211.
- [103] Kap-Sung Hwang, H.Y. Zhu, G.Q. Lu, *Catal. Today*, 2001, **68**, 183.
- [104] Rong Gang Ding, Zi Feng Yan, *Catal. Today*, 2001, **68**, 135.
- [105] Seung-Ho Seok, Sung Hwan Han, Jae Sung Lee, *Appl. Catal. A: General*, 2001, **215**, 31.
- [106] Yin-Zu Chen, Biing-Jye Liaw, Ching-Fu Kao, Jung-Chih Kuo, *Appl. Catal. A: General*, 2001, **217**, 23.
- [107] J.B. Wang, Yu-Lung Tai, Wei-Ping Dow, Ta-Jen Huang, *Appl. Catal. A: General*, 2001, **218**, 69.

Praca wpłynęła do Redakcji 17 lipca 2001

**CHARAKTERYSTYKA
RÓWNOWAG KOMPLEKSOWANIA
KWASÓW IMINODI(METYLENOFOSFONOWYCH)
Z JONAMI METALI(II)**

**CHARACTERIZATION
OF COMPLEX EQUILIBRIA
OF IMINODI(METHYLENEPHOSPHONIC)
ACIDS WITH METAL(II) IONS**

Anna Kamecka, Barbara Kurzak

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

Abstract

Wstęp

1. Pochodne kwasu iminodi(metylenofosfonowego)

1.1. Właściwości kwasowo-zasadowe kwasów
iminodi(metylenofosfonowych)

1.2. Kompleksy metali(II) z kwasami iminodi(metylenofosfonowymi)

1.2.1. Kompleksy miedzi(II)

1.2.2. Kompleksy cynku(II), magnezu(II) i wapnia(II)

1.2.3. Kompleksy manganu(II), kobaltu(II) i niklu(II)

Uwagi końcowe

Piśmiennictwo cytowane



Dr Anna Lidia Kamecka urodziła się w Łukowie w 1972 r. Studia chemiczne na Wydziale Chemiczno-Matematycznym Wyższej Szkoły Rolniczo-Pedagogicznej w Siedlcach ukończyła w 1996 r. Od 1994 r. pracuje w Zakładzie Chemii Bionieorganicznej Instytutu Chemii WSR-P w Siedlcach, początkowo na stanowisku inżynierjno-technicznym, a od 1996 r. na stanowisku asystenta.

W 2001 r. otrzymała stopień doktora nauk chemicznych na Wydziale Chemiczno-Matematycznym Akademii Podlaskiej. Obecnie jest adiunktem w Zakładzie Chemii Bionieorganicznej Akademii Podlaskiej, gdzie zajmuje się chemią koordynacyjną cząsteczek o znaczeniu biologicznym. Jej główne zainteresowania naukowe związane są z badaniem procesów równowagowych w układach zawierających jony metali i fosfonowe pochodne aminokwasów.



Dr hab. Barbara Kurzak ukończyła studia na Wydziale Matematyki, Fizyki i Chemii, na kierunku chemicznym Uniwersytetu we Wrocławiu. Po ukończeniu studiów w 1975 r. podjęła pracę na stanowisku asystenta w Instytucie Chemii Nieorganicznej i Metalurgii Pierwiastków Rzadkich Politechniki Wrocławskiej. Po rocznym okresie stażu została oddelegowana na studia doktoranckie do Instytutu Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego, które ukończyła w 1979 r. zdobywając stopień doktora nauk chemicznych. Po powrocie do macierzystego instytutu Politechniki Wrocławskiej podjęła pracę na stanowisku adiunkta. W 1981 r. przeniósła się do Siedlec, podejmując pracę w Instytucie Chemii Wyższej Szkoły Rolniczo-Pedagogicznej (obecnie Akademii Podlaskiej) również na etacie adiunkta.

W 1992 r. otrzymała zespołową nagrodę naukową Ministra Edukacji Narodowej za prace z dziedziny chemii koordynacyjnej.

W 1993 r. uzyskała stopień doktora habilitowanego z zakresu chemii nieorganicznej w Instytucie Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego.

Główny nurt zainteresowań naukowych – chemia związków koordynacyjnych, przy czym prowadzone badania uwzględniają różne aspekty chemii, takie jak synteza organiczna (synteza ligandów), równowagi reakcji tworzenia związków kompleksowych w roztworach, a także badania, których celem jest poznanie zależności między budową ligandów i ich kompleksów z metalami a czynnością biologiczną samych ligandów.

ABSTRACT

The aminopolyphosphonic acids are analogues of aminopolycarboxylic acids in which the carboxyl groups (CO_2^-) are substituted by the phosphonate moieties (PO_3^{2-}). Aminopolyphosphonic acids and their derivatives have received considerable attention because of their interesting biological activity and a wide range of uses for industrial, chemical, agricultural and pharmacological purposes.

This review discusses coordination preferences of *N*-substituted iminodi(methylenephosphonic) acids to the divalent metal ions (such as magnesium, calcium, manganese, cobalt, nickel, copper and zinc) in an aqueous solution.

N-substituted derivatives of iminodi(methylenephosphonic) acids exhibit high complexation efficiency towards divalent metal ions. This results from both dinegatively charged phosphonate groups as well as the imino nitrogen present in their structure. A significant preference for an equimolar stoichiometry has been demonstrated in these systems. The only exception is the *N*-2-methyltetrahydrofuryliminodi(methylenephosphonic) acid with a tetrahydrofuryl moiety placed in the sterically favoured position that allows its oxygen atom to be an effective metal binding site. Specific interactions between metal ions and furyl oxygen result in higher binding ability of this ligand and a formation of 1:2 species.

The first part of the review deals with the acid-base properties of the considered ligands which are consistent with electronic effect of the substituents attached to the imino nitrogen. The second part of the review describes the binding properties of iminodi(methylenephosphonic) acids in copper(II) complexes. A formation of tridentate bonded species has been demonstrated in these systems. The third part of the review reports what is known about magnesium(II), calcium(II) and zinc(II) complexes of the same ligands. While the imino nitrogen is bonded in the predominate complexes in the zinc(II) systems, magnesium(II) and calcium(II) ions prefer a pure phosphonate coordination. Finally, the interactions of manganese(II), cobalt(II) and nickel(II) ions with *N*-substituted iminodi(methylenephosphonic) acids are described. For these complexes the formation of eight-membered rings is reported.

Coordination properties of iminodi(methylenephosphonic) acids are important factors to understand the role of the ligands and metal ions in biological systems.

WSTĘP

Kwasy aminofosfonowe są analogami aminokwasów, w których jedną lub więcej grup karboksylowych aminokwasu zastąpiono grupą fosfonową.

Pochodne kwasów fosfonowych są szczególnie interesujące ze względu na szerokie spektrum zastosowań w przemyśle, chemii, medycynie i rolnictwie.

Największe znaczenie w chemii i przemyśle wydają się mieć kompleksony aminofosfonowe, które można również uważać za formalne analogi znanych i powszechnie stosowanych kompleksonów, takich jak kwas etylenodiaminotetraoctowy, kwas nitylotriooctowy i in. [1–4], a które stosowane są jako inhibitory korozji oraz inhibitory osadzania się kamienia kotłowego w liniach technologicznych wody [1, 2].

Pochodne kwasów fosfonowych są stosowane również w chromatografii wymiennej oraz do ekstrakcyjnego rozdziału pierwiastków *d*- i *f*-elektronowych [2, 5, 6]. Wiele pochodnych kwasów aminofosfonowych jest stosowanych jako dodatki do tworzyw i włókien syntetycznych. W literaturze można znaleźć inne przykłady zastosowań tych związków [1, 2], takie jak te, wśród których pełnią one funkcję składników kąpieli fotograficznych, środków wybielających, preparatów flotacyjnych, kosmetyków, czy też w beczyjankowych kąpielach galwanicznych, w przemyśle papierniczym, wydobywczym, budownictwie itd.

Najbardziej istotne wydają się jednak zastosowania wynikające z różnorodnej aktywności biologicznej tych związków. Aktywność biologiczna kwasów aminofosfonowych i związków pokrewnych oraz ich rola w przyrodzie została obszernie przedstawiona w wielu artykułach przeglądowych [7–10] i monografiach [11–13].

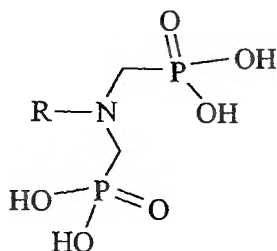
Aminofosfoniany, a w szczególności związki bisfosfonowe mają największe zastosowanie jako środki przeciwnowotworowe [14], neuroaktywne [7, 8, 11, 13] i antybakteryjne [8, 12], a także jako efektywne herbicydy, z których niektóre mają ustabilizowaną pozycję w rolnictwie [13–20]. Wysokie powinowactwo tych związków do minerałów kości – hydroksyapatytów sprawiło, że są one stosowane w leczeniu i profilaktyce układu kostnego [9, 10, 21, 22].

W układach biologicznych kwasy aminofosfonowe stanowią grupę potencjalnych ligandów zdolnych do kompleksowania jonów metali, zatem znajomość aspektów chemii koordynacyjnej może pomóc w zrozumieniu mechanizmów biologicznego działania tych związków, a także może być użyteczna w racjonalnym projektowaniu nowych środków biologicznie aktywnych.

Mając na uwadze te aspekty, podjęliśmy stosowne badania dotyczące głównie problemu równowag chemicznych w roztworach wodnych, w których uczestniczą *N*-podstawione pochodne kwasu iminodi(metylenofosfonowego) oraz dwuwartościowe jony metali, których dobór został podyktowany ich funkcją w układach biologicznych.

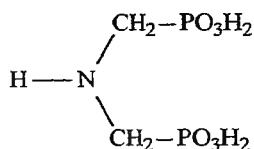
1. POCHODNE KWASU IMINODI(METYLENOFOSFONOWEGO)

N-podstawione kwasy iminodi(metylenofosfonowe) o ogólnym wzorze

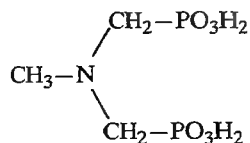


wykazują różne zdolności kompleksotwórcze w stosunku do dwuwartościowych jonów metali w zależności od budowy podstawnika R.

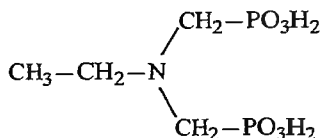
Prezentowane opracowanie dotyczy głównie ligandów przedstawionych na schemacie 1 i ich zdolności koordynacyjnych w stosunku do następujących jonów metali: Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} i Zn^{2+} .



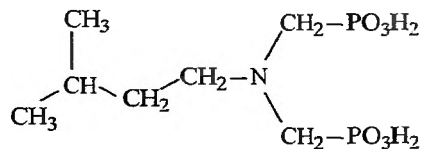
kwasy iminodi(metylenofosfonowy); Hdmph



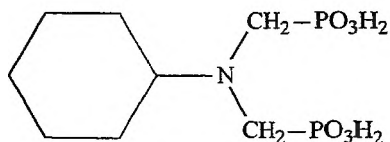
kwasy *N*-metyloiminodi(metylenofosfonowy); Medmph



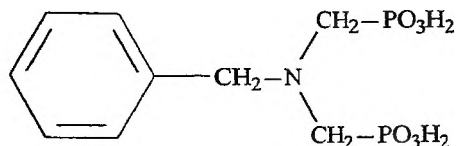
kwasy *N*-etyloiminodi(metylenofosfonowy); Etdmph



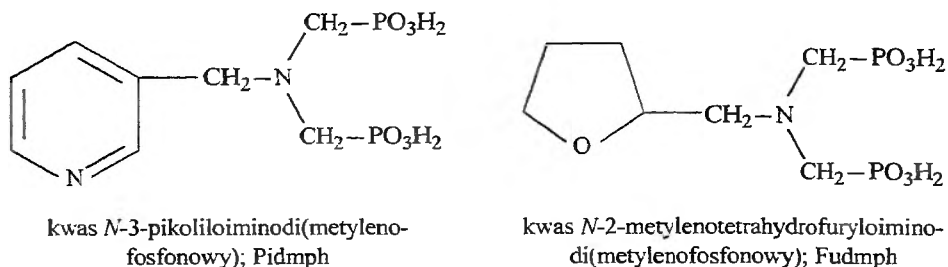
kwasy *N*-izopentyliminodi(metylenofosfonowy); Ptdmph



kwasy *N*-cykloheksyliminodi(metylenofosfonowy); Hxdmph



kwasy *N*-benzyliminodi(metylenofosfonowy); Bzdmph



Schemat 1. Kwasy iminodi(metylenofosfonowe)

Prezentowane *N*-podstawione pochodne kwasu iminodi(metylenofosfonowego) były przedmiotem badań prowadzonych w kilku ośrodkach, a rezultaty tych badań zostały opublikowane w licznych pracach i tak: dla HdmpH w pracach [23–28], dla MedmpH w pracach [28–32], dla EtdmpH w pracach [24, 28, 31, 32, 33], dla PtdmpH w pracach [28, 31, 32], dla HxdmpH w pracach [24, 28, 31, 32], dla BzdmpH w pracach [24, 28, 31, 32], dla PidmpH w pracach [28, 31, 32] oraz dla FudmpH w pracach [28, 31, 32].

Dla niektórych spośród wymienionych ligandów (HdmpH, MedmpH, EtdmpH i HxdmpH) znane są i opisane struktury kryształu ich cząsteczek [28, 34, 35].

1.1. WŁAŚCIWOŚCI KWASOWO-ZASADOWE KWASÓW IMINODI(METYLENOFOSFONOWYCH)

Wszystkie rozpatrywane *N*-podstawione pochodne kwasu iminodi(metylenofosfonowego) zawierają w swoich cząsteczkach zasadniczo trzy grupy funkcyjne: iminową i dwie grupy fosfonowe (PidmpH ma dodatkowo pirydynowy atom azotu). Są to potencjalne miejsca koordynacji tych związków.

Cząsteczki w pełni sprotonowanych ligandów HdmpH, MedmpH, EtdmpH, PtdmpH, HxdmpH, BzdmpH i FudmpH mają zasadniczo pięć zdolnych do dysocjacji protonów (H_5L^+), po dwa w każdej z dwóch obecnych grup fosfonowych $-PO_3H_2$ i jeden związany z iminowym atomem azotu $-NH_{\text{imino}}^+$. Cząsteczka PidmpH (H_6L^{2+}) dysocjując uwalnia dodatkowy szósty proton związany z atomem azotu pierścienia pirydynowego, $-NH_{\text{pyr}}^+$. Deprotonacja obu grup $-PO_3H_2$ do postaci $-PO_3H^-$ zachodzi poniżej pH 2 ($pK \approx 1,0-2,0$). Ze względu na to, że proces kompleksowania badany jest zwykle w zakresie pH 2–11,5, gdzie grupy te są już całkowicie zdeprotonowane, czyli protony te nie biorą udziału w reakcjach równowagowych, wartości stałych dysocjacji dla tych protonów nie zostały podane w tab. 1, chociaż dla wielu ligandów z tej grupy zostały one określone i podane [24–26, 30, 33].

Najbardziej zasadowym donorem wśród wymienionych ligandów jest grupa iminowa $-N_{\text{imino}}$ (tab. 1). Wartości stałych dysocjacji $pK_{NH_{\text{imino}}^+}$ dla tej grupy mieszczą się w granicach od 10,5 do 12,5 i są o ok. jednostkę logarymiczną wyż-

Tabela 1. Wartości stałych dysocjacji dla *N*-podstawionych kwasów iminodi(metylenofosfonowych). Dla uproszczenia pominięto parametry statystyczne

Kwas	$pK_{\text{NH}_2^+_{\text{pyr}}}$	$pK_{\text{PO}_3\text{H}^-}$	$pK_{\text{PO}_3\text{H}^-}$	$pK_{\text{NH}_2^+_{\text{imino}}}$	$I [\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}]$	Lit.
Hdmph	–	5,28	6,26	9,71	–	[23]
	–	4,83	5,82	10,62	1,0 (KNO ₃)	[24]
	–	4,90	5,82	10,40	0,5 (KNO ₃)	[25]
	–	5,04	6,08	10,79	0,1 (KNO ₃)	[26]
	–	4,85	6,12	10,97	0,2 (KCl)	[27]
	–	4,86	5,82	10,60	0,2 (KCl)	[31]
Medmph	–	5,00	6,23	11,93	0,1 (NaClO ₄)	[29]
	–	4,90	6,04	12,10	0,1 (KNO ₃)	[30]
	–	4,79	5,95	11,75	0,2 (KCl)	[31]
Etdmph	–	4,68	5,92	11,98	1,0 (KNO ₃)	[24]
	–	4,69	6,04	12,2	0,2 (KCl)	[31]
	–	4,70	5,92	12,42	1,0 (KNO ₃)	[33]
Ptdmph	–	4,87	6,21	12,3	0,2 (KCl)	[31]
Hxdmph	–	4,57	5,87	11,93	1,0 (KNO ₃)	[24]
	–	4,70	6,09	12,5	0,2 (KCl)	[31]
Bzdmph	–	4,59	5,96	11,15	1,0 (KNO ₃)	[24]
	–	4,73	6,19	11,32	0,2 (KCl)	[31]
Pidmph	2,94	4,93	6,09	10,40	0,2 (KCl)	[31]
Fudmph	–	4,79	6,13	11,46	0,2 (KCl)	[31]

szere od odpowiednich wartości dla analogicznych kwasów aminomonofosfonowych, gdzie $pK_{\text{NH}_2^+} \approx 10\text{--}11$ [36–40]. Wysoka wartość tej stałej jest skutkiem obecności dodatkowej, ujemnie naładowanej, grupy fosfonowej powodującej wzrost gęstości elektronowej na atomie azotu. Z drugiej strony, obecność grupy iminowej w cząsteczce kwasu iminodi(metylenofosfonowego) powoduje podwyższenie kwasowości obu grup $-\text{PO}_3\text{H}^-$ w porównaniu z kwasami alkił-*1,n*-difosfonowymi, dla których wartości odpowiednich stałych dysocjacji, opisujących deprotonację tych grup, są o ok. 2,5 jednostki pK wyższe [41–47].

Porównując wartości stałych dysocjacji pK badanych ligandów obserwuje się wyraźny wpływ rodzaju podstawnika R na właściwości kwasowo-zasadowe poszczególnych grup. Najbardziej wyraźny efekt zaobserwowano w przypadku grupy iminowej. Wśród kwasów iminodi(metylenofosfonowych) z podstawnikiem alkiłowym wzrost wartości stałej $pK_{\text{NH}_2^+_{\text{imino}}}$ następuje w szeregu: Hdmph → Medmph → Etdmph → Ptdmph, a stała dla Ptdmph jest aż o 1,7 jednostki logarytmicznej wyższa od stałej dla Hdmph [31]. Wzrost charakteru zasadowego grupy iminowej jest zgodny ze wzrostem liczby atomów węgla w podstawniku alkiłowym. Tendencja ta jest wynikiem wzrostu oddziaływania elektronodonorowego kolejnych grup alkiłowych, co prowadzi do zwiększenia gęstości elektronowej

na azocie. Natomiast największy wzrost wartości $pK_{\text{NH}_{\text{imino}}^+}$, o ok. dwie jednostki logarytmiczne, jeśli porównać tę wartość do wartości stałej dla HdmpH, powoduje podstawienie grupy cykloheksylowej przy atomie azotu. Z kolei podstawienie pierścienia benzenowego, mającego właściwości elektroakceptorowe, w miejsce jednego z atomów wodoru grupy metylowej, powoduje obniżenie wartości $pK_{\text{NH}_{\text{imino}}^+}$ o ok. 0,5 jednostki logarytmicznej w stosunku do wartości stałej dla MedmpH, a zatem wzrost charakteru kwasowego grupy $-\text{NH}_{\text{imino}}^+$ [31]. Najsilniej zaznaczone właściwości kwasowe ugrupowania iminowego ma kwas *N*-3-pikoliloiminodi(metylenofosfonowy). Obecny w cząsteczce tego kwasu pierścień pirydylowy, wskutek wyciągania elektronów przez elektroujemny atom azotu, charakteryzuje się wysoką zdolnością elektroakceptorową i wpływa na obniżenie wartości stałej $pK_{\text{NH}_{\text{imino}}^+}$. Podobny efekt był obserwowany w przypadku kwasów aminomonofosfonowych [40].

Tak więc, kierunek wzrostu charakteru zasadowego grupy iminowej, wśród badanych kwasów iminodi(metylenofosfonowych), następuje w szeregu (tab. 1): PidmpH < HdmpH < Bzdmph < FudmpH < MedmpH < EtdmpH < PtdmpH < HxdmpH.

Różnice w wartościach stałych dysocjacji odpowiednich grup fosfonowych są niewielkie, chociaż, w przypadku bardziej zasadowej grupy $-\text{PO}_3\text{H}^-$, zauważalne. Wzrost wartości $pK_{\text{PO}_3\text{H}^-}$ dla PtdmpH, w porównaniu z odpowiednią wartością dla HdmpH, wynosi około 0,4 jednostki pK , a więc w tym przypadku wpływ podstawników są zdecydowanie mniejsze niż w przypadku grupy iminowej. W przypadku bardziej kwasowej grupy $-\text{PO}_3\text{H}^-$ nie obserwuje się wyraźnych zmian wartości pK wraz ze zmianą podstawników w ligandzie.

1.2. KOMPLEKSY METALI(II) Z KWASAMI IMINODI(METYLENOFOSFONOWYMI)

Na podstawie badań potencjometrycznych i spektroskopowych (UV-VIS, EPR, NMR) otrzymano wiele informacji o rodzaju powstających połączeń koordynacyjnych, obszarach ich dominowania w zależności od kwasowości środowiska, a także sposobie koordynacji w poszczególnych kompleksach [28, 31, 32].

Ustalono, że pochodne kwasu iminodi(metylenofosfonowego) (z wyjątkiem FudmpH) tworzą zwykle kompleksy równomolowe typu: $[\text{M}(\text{H}_2\text{L})]$, $[\text{M}(\text{HL})]$, $[\text{ML}]$, $[\text{MLH}_{-1}]$ i $[\text{MLH}_{-2}]$ (w tym przypadku, jak i w całej pracy pominięto, dla uproszczenia, ładunki kompleksów). W układach z PidmpH stwierdzono występowanie dodatkowo formy protonowanej typu $[\text{M}(\text{H}_3\text{L})]$.

Modele koordynacyjne otrzymane dla układów z FudmpH, oprócz połączeń równomolowych, zawierają także kompleksy typu 1:2, mianowicie $[\text{M}(\text{HL})_2]$, $[\text{M}(\text{HL})\text{L}]$, $[\text{ML}_2]$ i ewentualnie $[\text{ML}_2\text{H}_{-1}]$.

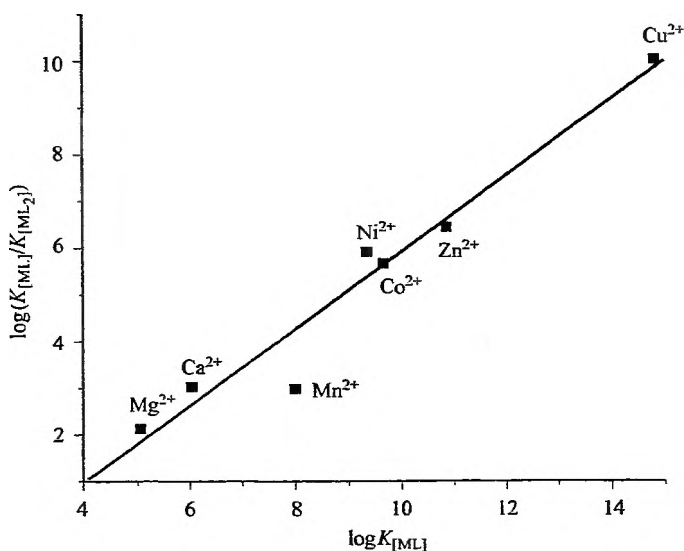
Ze względu na to, że w kompleksach magnezu(II) i wapnia(II) wiązania mają charakter głównie elektrostatyczny (w przypadku tych jonów nie występuje stabilizacja polem ligandów), są to jony słabo kompleksowane. Spośród tych dwóch jo-

nów metali, bardziej trwale kompleksy powinien tworzyć jon o większej gęstości ładunku, a zatem magnez(II). W zdecydowanej większości omawianych układów stwierdzono tę prawidłowość, czyli wyższą trwałość kompleksów magnezu(II) niż wapnia(II). Wyjątek stanowią kompleksy powstające w układach z Fudmiph, gdzie kompleks $[CaL]$ jest o ok. rząd trwalszy od kompleksu $[MgL]$ [28].

Otrzymane wartości stałych trwałości dla kompleksów nikielu(II), w układach z pochodnymi aromatycznymi (Bzdmph i Pidmiph) oraz Fudmiph, są nieznacznie niższe od wartości stałych dla kompleksów z kobaltem(II) [32]. W pracach poświęconych badaniom kwasów fosfonowych z jonami metali(II) niektórzy autorzy podają przykłady takiej wzajemnej relacji stałych tych dwóch jonów metali [24]. W pozostałych układach nie stwierdzono takich nieregularności.

W odróżnieniu od pozostałych układów, jedynie Fudmiph tworzy, z wszystkimi rozpatrywanymi jonami metali, kompleksy typu $[ML_2]$. Chociaż tworzenie tego typu kompleksów jest ze względów elektrostatycznych i sterycznych wysoce utrudnione, to stabilizujący wpływ dodatkowego donora tlenowego pierścienia furylowego powoduje, że kompleksy te powstają.

Największą tendencję do tworzenia tego typu kompleksów wykazuje jon Mg^{2+} , najniższą natomiast jon Cu^{2+} (rys. 1). Warto zauważyć, że tendencja ta zasadniczo maleje wraz ze wzrostem trwałości formy $[ML]$. Interesujący jest również fakt, że w układach z jonami Mg^{2+} , Ca^{2+} i Mn^{2+} , które wykazują najwyższą, spośród badanych układów, tendencję do tworzenia form typu 1:2, nie stwierdzono występowania form hydrokso (przynajmniej w stężeniu pozwalającym na ich wykrycie). Pozostałe układy charakteryzują się wysoką tendencją do tworzenia hydroksokompleksów, a w układzie z miedzią(II) i cynkiem(II) stwierdzono istnienie aż dwóch takich form [28, 31].



Rys. 1. Wykres zależności $\log(K_{[ML]} / K_{[ML_2]})$ od $\log K_{[ML]}$ [28, 31, 32]

1.2.1. Kompleksy miedzi(II)

Prezentowane ligandy są wysoce efektywnymi czynnikami chelatującymi w stosunku do jonów miedzi(II) [23, 24, 26, 27, 29–31]. W rezultacie proces kompleksowania tych jonów rozpoczyna się już w bardzo niskim pH (ok. 2). Z wyjątkiem kompleksu $[\text{Cu}(\text{H}_3\text{L})]$, w którym koordynacja do jonu Cu^{2+} jest realizowana wyłącznie przy udziale atomów tlenu grup fosfonowych, z wolną protonowaną grupą iminową $-\text{NH}_{\text{imino}}^+$ i pirydynową $-\text{NH}_{\text{pyr}}^+$ [31], we wszystkich pozostałych kompleksach protonowanych występuje zwykle koordynacja mieszana, tzn. oprócz jednej lub obu grup fosfonowych zaangażowany jest także iminowy atom azotu.

Deprotonacja formy $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{L})]$, która prowadzi do utworzenia kompleksu $[\text{Cu}(\text{HL})]$, nie powoduje istotnych zmian w widmach elektronowych. Położenie pasma absorpcji odpowiadającego przejściu $d-d$ w zakresie 700–750 nm wskazuje na mieszaną koordynację z udziałem jednego atomu azotu [31]. Oznacza to, że w formie $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{L})]$ do jonu miedzi(II) koordynuje $-\text{N}_{\text{imino}}$ i grupa $-\text{PO}_3\text{H}^-$, podczas gdy druga, obecna w cząsteczce grupa fosfonowa $-\text{PO}_3\text{H}^-$, pozostaje nie skoordynowana. Jej wiązanie w kompleksie następuje w formie $[\text{Cu}(\text{HL})]$, co wiąże się z jednoczesnym odszczepieniem protonu. A zatem wraz ze stopniową dysocjacją protonu następuje w kompleksie zmiana sposobu koordynacji, w której wyniku ligand z dwudonorowego w formie $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{L})]$ staje się trójdonorowy w formie $[\text{Cu}(\text{HL})]$ [31].

W przypadku HdmpH model wiązania miedzi(II) w formie $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{L})]$ wykazuje pewne różnice, tzn. protonowana pozostaje grupa iminowa [27].

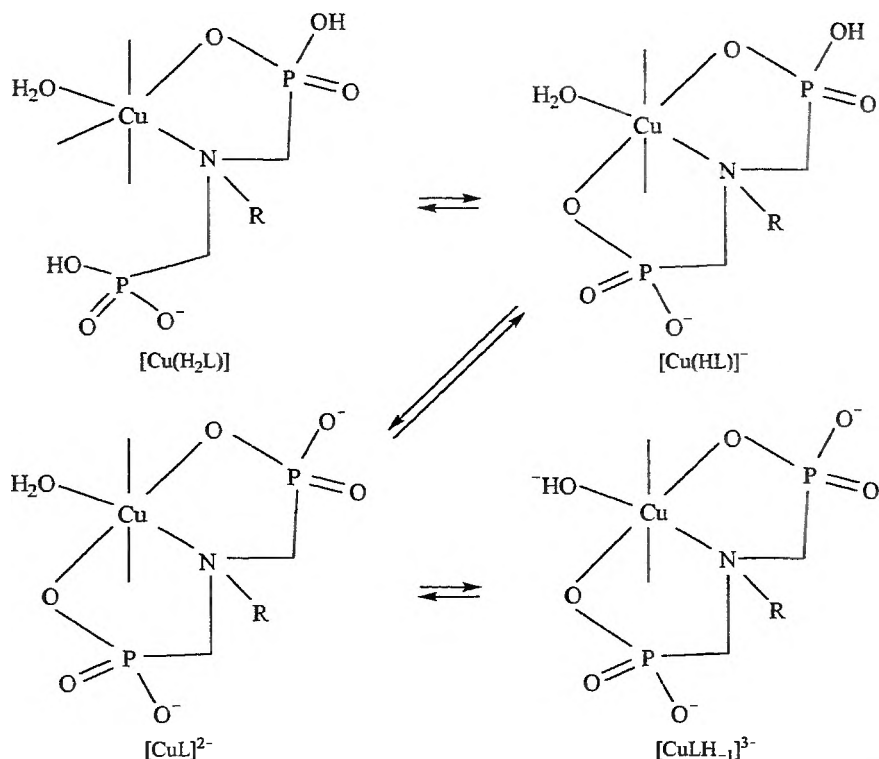
Całkowita deprotonacja kompleksu prowadzi do utworzenia formy $[\text{CuL}]$, która jest formą dominującą w szerokim przedziale pH (od 6 do 9), wiążąc praktycznie 100% metalu. Cząsteczki rozpatrywanych ligandów w tej formie koordynują za pomocą następujących grup donorowych: PO_3^{2-} , N_{imino} , PO_3^{2-} , co w konsekwencji wiąże się z utworzeniem dwóch pięciocząłonowych pierścieni chelatowych, a to prowadzi do ich wysokiej trwałości [30, 31].

Sterycznie możliwe zaangażowanie w koordynację do jonu Cu^{2+} atomów tlenu O^- obu grup fosfonowych, równocześnie z iminowym atomem azotu, potwierdzają badania krystalograficzne [48].

W widmie absorpcyjnym kompleksu $[\text{CuL}]$, w zakresie ultrafioletowym, obserwuje się występowanie dwóch pasm typu przeniesienia ładunku (CT) [31]. Pasma w zakresie 277–302 nm odpowiada przejściu LMCT $\text{N}_{\text{imino}} \rightarrow \text{Cu}^{2+}$, natomiast w zakresie 225–231 nm – przejściu LMCT $\text{O}^- \rightarrow \text{Cu}^{2+}$. Ten zakres długości fal występowania pasm CT $\text{N}_{\text{imino}} \rightarrow \text{Cu}^{2+}$ jest zgodny z zakresem dla innych kompleksów miedzi(II) z kwasami aminofosfonowymi [49].

Powyżej pH 8 zaczyna tworzyć się forma hydrokso, $[\text{CuLH}_{-1}]$, a maksymalna ilość metalu (80–90% zależnie od rodzaju liganda) związana jest w tej formie przy pH ≈ 11 [30, 31]. Przy wartości pH powyżej 10 zaczyna tworzyć się kolejny hydroksokompleks – $[\text{CuLH}_{-2}]$ [31].

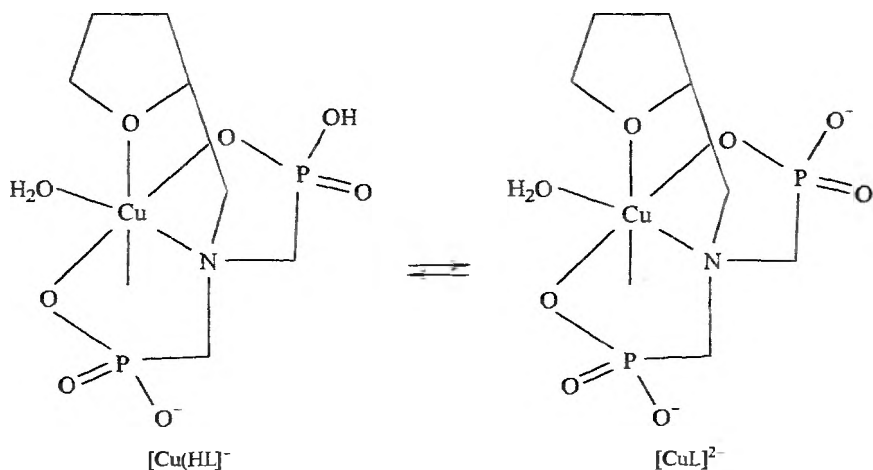
Proponowany sposób koordynacji w kompleksach, które tworzą się w omawianych układach, przedstawia schemat 2 [31].



Schemat 2. Proponowany sposób koordynacji w kompleksach tworzących się w układach Cu^{2+}/L (L = Medmph, Etdmph, Ptdmph, Hxdmph, Bzdmph i Pidmph)

Fudmph, który zawiera furylowy atom tlenu w cząsteczce, okazał się bardziej efektywnym czynnikiem chelatującym niż pozostałe ligandy [31]. Zarówno w formie $[\text{Cu}(\text{HL})]$, jak i $[\text{CuL}]$, oprócz donorów w płaszczyźnie ekwatorialnej, którymi są atomy tlenu obu grup fosfonowych oraz atom azotu ugrupowania iminowego, zawiera atom tlenu pierścienia furylowego znajdujący się w pozycji aksjalnej, w wyniku czego tworzą się trzy pięcioczłonowe pierścienie chelatu (schemat 3). Efektem takiego sposobu koordynacji jest przesunięcie maksimum absorpcji dla kompleksu $[\text{CuL}]$ z ligandem furylowym w stronę fal dłuższych o ok. 40–50 nm, w stosunku do pozostałych ligandów w tej formie [31]. Tego rodzaju zmiany w widmie absorpcyjnym są charakterystyczne dla koordynacji donora w pozycji aksjalnej [50]. Sterycznie możliwa koordynacja typu $\{\text{PO}_3^{2-}, \text{N}_{\text{imino}}, \text{PO}_3^{2-}, \text{O}_{\text{furylo}}\}$ daje w efekcie wyraźny wzrost trwałości tworzonych przez niego form kompleksowych.

Ponieważ tworzenie kompleksu jest w większości przypadków procesem opartym na konkurencji między jonem metalu i protonem, możliwe jest niekiedy



Schemat 3. Proponowany sposób koordynacji w wybranych kompleksach tworzących się w układzie $Cu^{2+}/Fudmiph$

znalezienie pewnych korelacji między stałą (stałymi) protonowania a stałą (stałymi) trwałości kompleksu tworzonego przez ligandy mające podobną budowę [51]. W rozpatrywanych układach (z wyjątkiem układu $Cu^{2+}/Fudmiph$) koordynacja liganda do jonu metalu, w chelatowych kompleksach typu $[CuL]$, realizowana jest za pomocą trzech donorów, $\{PO_3^{2-}, N_{imino}, PO_3^{2-}\}$ ulegających protonowaniu w różnych zakresach pH. W układzie z $Fudmiph$ natomiast w proces koordynacji zaangażowany jest dodatkowo atom tlenu pierścienia tetrahydrofurylowego, nie ulegający protonowaniu.

Brak wyraźnej korelacji między trwałością, wyrażoną przez $\log K_{[CuL]}$, a siłą zasadową danego liganda (rys. 2(a)) wskazuje, że siła ta nie jest jedynym czynnikiem determinującym trwałość kompleksu.

Istotną rolę odgrywają również względy przestrzenne związane ze strukturą liganda oraz liczba powstających pierścieni chelatowych w cząsteczce kompleksu. Wśród badanych ligandów można się doszukać liniowej korelacji w szeregu $Medmiph \rightarrow Etdmiph \rightarrow Hxdmiph$, w którym wraz ze wzrostem zasadowości liganda maleje trwałość kompleksu. Oczekiwany efekt wzrostu trwałości wraz ze wzrostem siły zasadowej koordynujących donorów jest najprawdopodobniej rekompensowany w nadmiarze przez ograniczenia przestrzenne powodowane zwiększaniem się rozmiaru podstawnika (R-) przy atomie azotu.

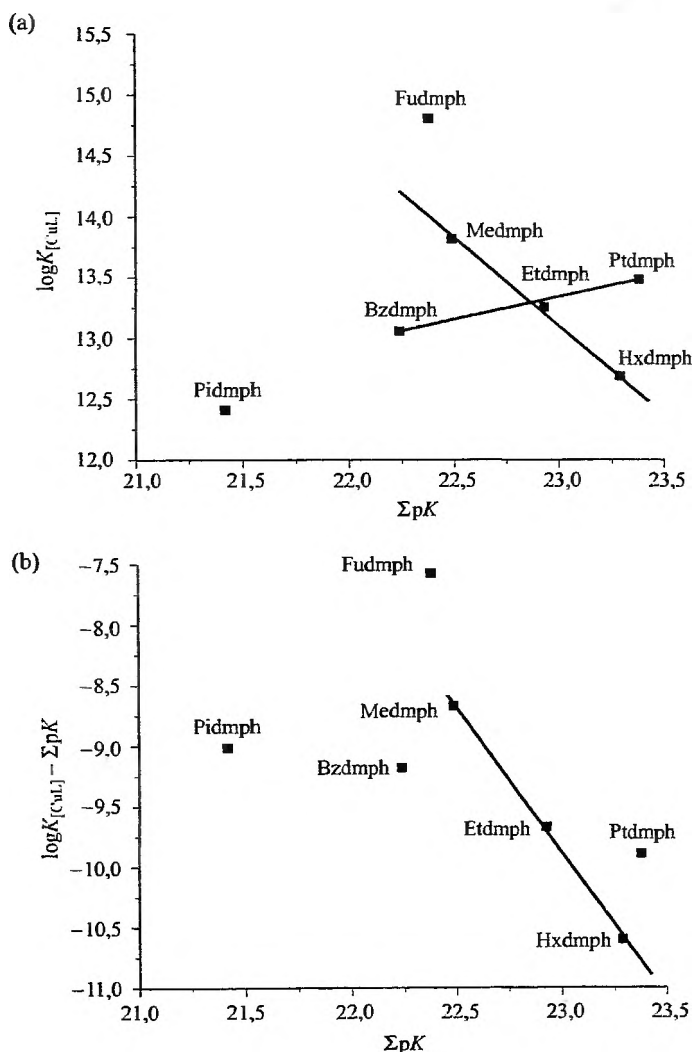
W celu porównania efektywnej siły wiązania badanych ligandów w formie $[CuL]$ wyliminowano wpływ zasadowości koordynujących donorów przez uwzględnienie wartości ΣpK w wartości $\log K_{[CuL]}$ (tab. 2).

Na podstawie tak otrzymanych wartości stwierdzono, że trwałość połączeń typu $[CuL]$ rośnie w szeregu:



Tabela 2. Wartości sumarycznych stałych trwałości oraz znormalizowanych stałych równowagi dla kompleksów jonów Cu^{2+}

Ligand	ΣpK	$\log \beta_{[\text{CuL}]}$	$\log K_{[\text{CuL}]} - \Sigma pK$	Lit.
Hdmph	21,94	12,90	-9,04	[27]
Medmph	22,49	13,82	-8,67	[31]
Etdmph	22,93	13,26	-9,67	[31]
Ptdmph	23,38	13,49	-9,89	[31]
Hxdmph	23,29	12,69	-10,60	[31]
Bzdmph	22,24	13,06	-9,18	[31]
Pidmph	21,42	12,41	-9,01	[31]
Fudmph	22,38	14,81	-7,57	[31]


 Rys. 2. Zależność wartości: (a) – $\log K_{[\text{CuL}]}$ oraz (b) – wyrażenia $\log K_{[\text{CuL}]} - \Sigma pK$ od siły zasadowej ligandów, dla *N*-podstawionych kwasów iminodi(metylenofosfonowych)

Chociaż zasadowość kwasu *N*-cykloheksyloiminodi(metylenofosfonowego) (Hxdmph) jest największa spośród wszystkich badanych ligandów, jest on najslabszym czynnikiem kompleksującym w stosunku do jonów Cu^{2+} (rys. 2(b)). Powstawanie pierścienia chelatowego jest częściowo utrudnione względami przestrzennymi związanymi z obecnością w jego cząsteczce dużego pierścienia cykloheksyloowego.

Kompleks miedzi(II) z Fudmph wykazuje najwyższą trwałość. Specyficzne oddziaływanie atomu tlenu pierścienia furylowego z jonem Cu^{2+} daje możliwość utworzenia dodatkowego pierścienia chelatowego.

Bardzo efektywnymi czynnikami chelatującymi okazują się także Pidmph i Bzdmph, które zawierają w swoich cząsteczkach pierścienie aromatyczne. Chociaż otrzymane wartości stałych $\log \beta[\text{CuL}]$ dla tych związków są niższe od wartości otrzymanych dla pochodnych alifatycznych (tab. 2), to po uwzględnieniu zasadowości koordynujących donorów obserwuje się wyraźną stabilizację ich kompleksów (rys. 2(b)). Podobny efekt wzrostu trwałości kompleksów tworzonych przez ligandy mające pierścień aromatyczny był obserwowany również przez innych autorów [37, 38].

Z rozmiarem podstawnika (R-), obecnym przy atomie azotu, wiąże się także energia przejścia CT. Wartości energii przejść LMCT $\text{N}_{\text{imino}} \rightarrow \text{Cu}^{2+}$ w kompleksie [CuL] wzrastają w kierunku [31]:

Hxdmph < Bzdmph < Ptdmph < Pidmph < Fudmph < Etdmph < Medmph
302,0 nm 288,3 nm 287,5 nm 285,9 nm 284,1 nm 283,4 nm 277,3 nm

Zatem rozmiar podstawnika bezpośrednio wpływa na siłę wiązania metal-azot iminowy. Najwyższa energia przejścia CT jest obserwowana w przypadku kompleksu, gdy $\text{R} = \text{CH}_3$, najniższa natomiast gdy $\text{R} = (\text{C}_6\text{H}_{11})$. Podobna relacja pomiędzy energiami przejść jest obserwowana w przypadku drugiego przejścia CT, tzn. $\text{O}^- \rightarrow \text{Cu}^{2+}$.

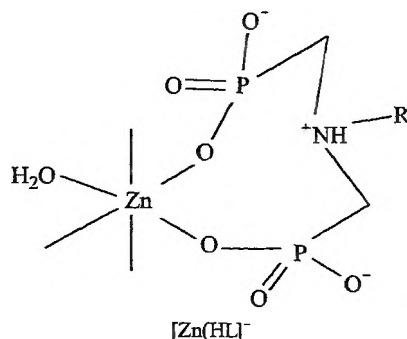
1.2.2. Kompleksy cynku(II), magnezu(II) i wapnia(II)

Oddziaływania w kompleksach metali alkalicznych oraz kompleksach cynku(II) z kwasami iminodi(metylenofosfonowymi) były przedmiotem badań prowadzonych w wielu ośrodkach [24, 26, 28, 29, 30, 33].

Koordynacja w protonowanych kompleksach powstających w układach z jonami cynku(II) odbywa się przy udziale jednej lub obu grup fosfonowych, pozostawiając protonowany iminowy atom azotu [28]. Zaangażowanie obu grup fosfonowych w koordynację wiąże się z utworzeniem ośmioczłonowego pierścienia chelatowego (schemat 4).

Ten typ pierścienia postulowano dla kompleksów tworzonych zwłaszcza przez kwasy polifosfonowe [33, 52–56]. Proponowany przez nas sposób koordynacji w kompleksie [Zn(HL)] różni się zasadniczo od proponowanego przez Sa-

wada i wsp. [30] dla kompleksu kwasu metyloiminodi(metylenofosfonowego), który zakłada zaangażowanie w koordynację iminowego atomu azotu.



Schemat 4. Proponowany sposób koordynacji w kompleksie typu [Zn(HL)]⁻ tworzącym się w układach Zn²⁺/L (L = Medmph, Etdmph, Ptdmph, Hxdmph, Bzdmph i Pidmph)

Całkowicie zdeprotonowany kompleks [ZnL] zaczyna się tworzyć powyżej pH 5 i jest formą dominującą w roztworze w zakresie pH 7-9 [30, 31]. Sposób koordynacji w tym kompleksie (z wyjątkiem Fudmph) jest analogiczny do przedstawionego na schemacie 2, a dotyczącego kompleksu [CuL], tzn. z udziałem trzech grup donorowych {PO₃²⁻, N_{imino}, PO₃²⁻}.

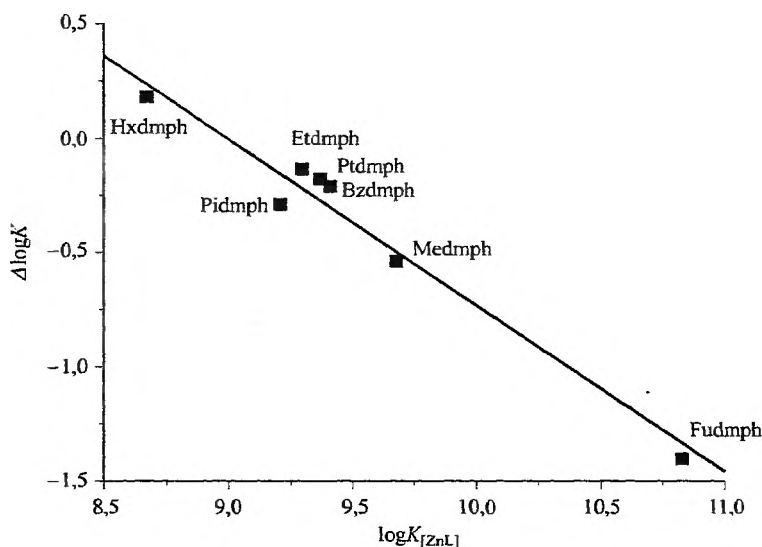
Specyficzne oddziaływanie pomiędzy tetrahydrofurylowym atomem tlenu i jonem metalu ujawnia się także w układzie z cynkiem(II) oraz odgrywa istotną rolę jako czynnik stabilizujący wiązanie metal-azot iminowy. Oddziaływanie to powoduje, że Fudmph jest czterodonorowym ligandem {PO₃²⁻, N_{imino}, PO₃²⁻, O_{furylo}} nie tylko w formie [ZnL], ale również w kompleksie [Zn(HL)], (schemat 3) [28].

W miarę wzrostu pH stężenie formy [ZnL] maleje, wzrasta natomiast stężenie hydroksokompleksu [ZnLH₋₁], który powyżej pH 10 przechodzi w kolejną formę hydrokso, [ZnLH₋₂]. Oba powstające hydroksokompleksy, we wszystkich przedstawionych w dyskusji układach, są produktem dysocjacji cząsteczek wody związanej w sferze koordynacyjnej jonów Zn²⁺ [28].

Formę kompleksową o ogólnym wzorze [ZnLOH] można rozważać jako kompleks mieszany, tzn. związek, w którym do jonu centralnego koordynują dwa różne ligandy, w diskutowanym przypadku są to: cząsteczka badanego liganda oraz grupa -OH⁻. Obliczając wartość parametru $\Delta \log K = \log K_{MLOH}^{ML} - \log K_{MOH}^M = \log K_{MOHL}^{MOH} - \log K_{ML}^M$ [28], można określić efekt wiązania grupy hydroksylowej -OH⁻ w stosunku do skompleksowanego już jonu metalu przez ligand L w formie [ZnL]. Wartość $\Delta \log K$ bliska zeru świadczy o dużej trwałości formy mieszanej w stosunku do form prostych [ZnOH] i [ZnL].

Na podstawie zależności przedstawionej na rys. 3 można stwierdzić, że wraz ze wzrostem trwałości formy kompleksowej [ZnL] maleje tendencja do tworzenia formy mieszanej [ZnLOH]. Efekt ten przejawia się, w zbliżonym do liniowe-

go, spadku wartości parametru $\Delta \log K$ dla kompleksów mieszanych wraz ze wzrostem wartości stałej $\log K_{[ZnL]}$. W układach z Etdmph, Ptdmph i Bzdmph, gdzie otrzymane wartości stałych trwałości kompleksu $[ZnL]$ są bardzo zbliżone (tab. 3), wartości parametru $\Delta \log K$ są niemal identyczne. Z kolei, dla kompleksu mieszanego powstającego w układzie z Hxdmph wartość tego parametru jest najwyższa, a zatem ligand ten wykazuje największą tendencję do tworzenia kompleksów mieszanych z jonem OH^- jako drugim ligandem. A zatem w przypadku formy $[ZnL]$ tworzonej przez badane ligandy, które w stosunku do grupy $-OH^-$ są zdecydowanie większe i mają wysoki ładunek ujemny (-4), koordynacja małego jonu hydroksylowego jest o wiele bardziej korzystna niż przyłączenie drugiej cząsteczki tego samego rodzaju liganda.



Rys. 3. Zależność wartości parametru $\Delta \log K$ dla hydroksokompleksów $[ZnLOH]$ od wartości stałej trwałości $\log K_{[ZnL]}$

Tabela 3. Wartości sumarycznych stałych trwałości oraz znormalizowanych stałych równowagi dla kompleksów jonów Mg^{2+} , Ca^{2+} i Zn^{2+} . Wartości parametru $\Delta \log K$ dla kompleksów Zn^{2+} [28]

Ligand	$\log \beta_{[ML]}$			$\log K_{[ML]} - \Sigma pK$			$\Delta \log K$ dla Zn^{2+}
	Mg^{2+}	Ca^{2+}	Zn^{2+}	Mg^{2+}	Ca^{2+}	Zn^{2+}	
Hdmph	3,47	3,11	–	-17,81	-18,17	–	–
Medmph	4,74	4,11	9,68	-17,75	-18,38	-12,81	-0,54
Etdmph	4,25	3,71	9,33	-18,68	-19,22	-13,60	-0,16
Ptdmph	4,36	3,77	9,37	-19,02	-19,61	-14,01	-0,18
Hxdmph	4,04	3,39	8,67	-19,25	-19,90	-14,62	0,18
Bzdmph	4,34	3,88	9,39	-17,90	-18,36	-12,85	-0,20
Pidmph	4,25	3,69	9,21	-17,17	-17,73	-12,21	-0,29
Fudmph	5,06	6,03	10,85	-17,32	-16,35	-11,53	-1,38

W układach z jonami Ca^{2-} i Mg^{2-} formą dominującą w szerokim przedziale pH (od 6 do 10) jest kompleks typu $[\text{M}(\text{HL})]$, podczas gdy w analogicznych układach z jonami cynku(II), w tym zakresie pH, dominowała forma $[\text{ZnL}]$. W formie tej koordynacja zarówno do jonu Mg^{2-} jak i Ca^{2-} realizowana jest wyłącznie przy udziale atomów tlenu grupy lub obu grup fosfonowych. Obecna w cząsteczkach ligandów grupa iminowa pozostaje protonowana i podobnie jak w układach z cynkiem(II), nie bierze udziału w procesie koordynacji (schemat 4).

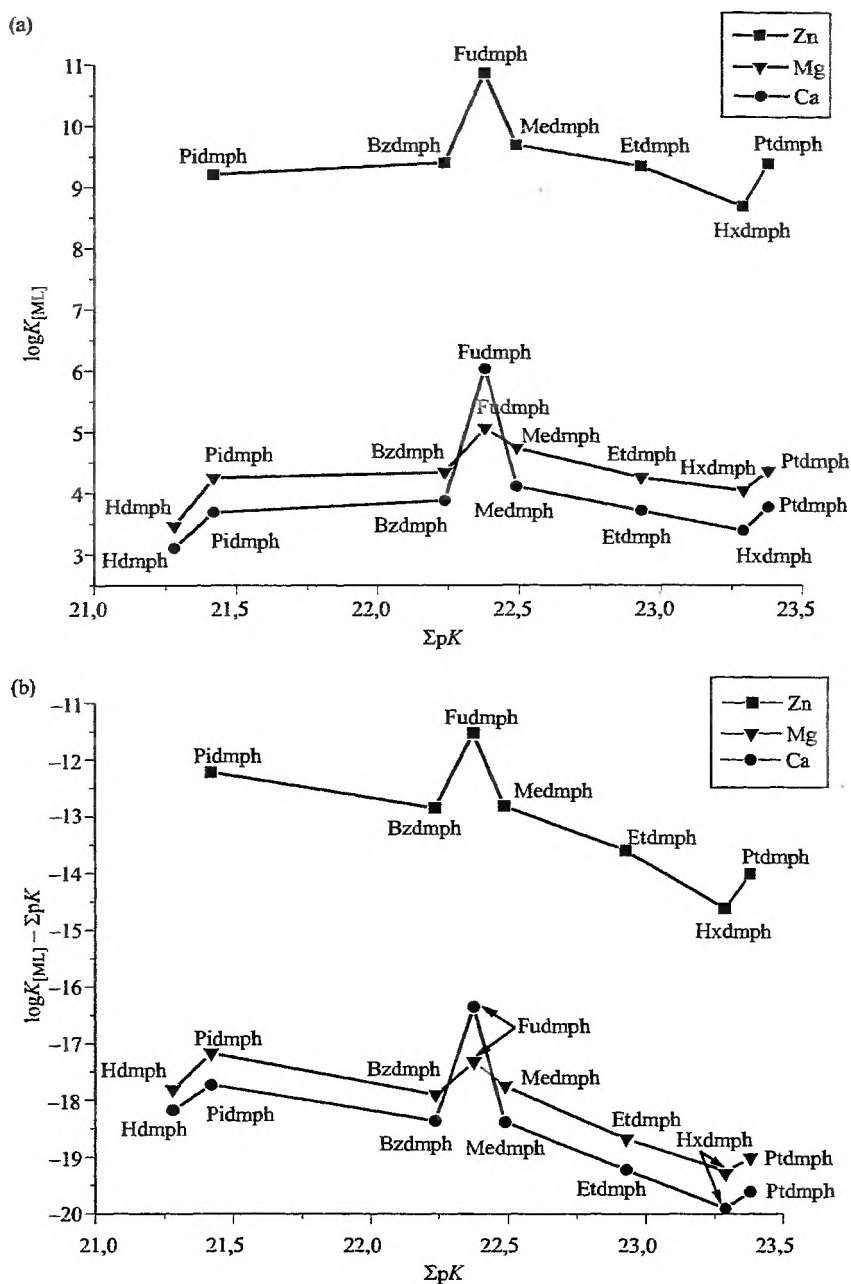
Przedstawiony sposób koordynacji w kompleksach protonowanych jest zgodny z wcześniejszymi propozycjami innych autorów [26, 30, 33], którzy także sugerowali udział wyłącznie grup fosfonowych, pozostawiając protonowany iminowy atom azotu.

Kompleks $[\text{ML}]$ rozpoczyna się tworzyć dopiero powyżej pH 10. Trwałość połączeń typu $[\text{ML}]$ z jonami Mg^{2+} oraz z jonami Ca^{2+} jest niższa odpowiednio o ok. 5 i 5,6 jednostek logarytmicznych w stosunku do połączeń tego samego typu z jonami Zn^{2+} . W proces koordynacji w kompleksie magnezu(II) zaangażowany jest, oprócz grup fosfonowych, również iminowy atom azotu. W kompleksie wapnia(II) koordynacja z udziałem grupy iminowej jest raczej mało prawdopodobna [28]. Otrzymane wyniki dotyczące sposobu koordynacji w formie $[\text{ML}]$ są zgodne z propozycją Cartera i wsp. [33], różnią się natomiast od tych przedstawionych przez zespół Sawada [30], który sugeruje zarówno w kompleksach magnezu(II) jak i wapnia(II) występowanie jonowego wiązania $\text{M}-\text{N}_{\text{imino}}$.

Podobnie jak w układzie z jonami cynku(II), Fudmph wykazuje wyższą zdolność kompleksowania w stosunku do jonów Mg^{2+} i Ca^{2+} od pozostałych ligandów. Fudmph jest najprawdopodobniej ligandem czterodonorowym, a koordynacja $\{\text{PO}_3^{2-}, \text{N}_{\text{imino}}, \text{PO}_3^{2-}, \text{O}_{\text{furylo}}\}$ jest proponowana dla kompleksów typu $[\text{ML}]$, zarówno dla magnezu(II) jak i wapnia(II) [28].

Z analizy zależności $\log K_{[\text{ML}]}$ od siły zasadowej ligandów, przedstawionej na rys. 4(a), wynika, że zasadowość liganda nie jest decydującym czynnikiem określającym trwałość kompleksów typu $[\text{ML}]$. Stałe trwałości, $\log K_{[\text{ML}]}$, dla większości ligandów w układach z jonami Zn^{2+} , Mg^{2+} oraz Ca^{2+} mieszczą się w wąskim przedziale wartości niezależnie od siły zasadowej ligandów. Wyraźny wzrost trwałości obserwuje się dla kompleksów Fudmph. Specyficzne oddziaływanie atomu tlenu pierścienia tetrahydrofurylowego z jonom metalu(II) odgrywa istotną rolę jako czynnik stabilizujący wiązanie metal(II)- N_{imino} . Interesujący jest fakt, że wpływ tego czynnika jest najslabiej zaznaczony w układzie z magnezem(II).

Najniższą trwałością charakteryzują się kompleksy tworzone przez Hdmpf w układach z Mg^{2+} i Ca^{2+} , ale najniższa jest również siła zasadowa tego liganda. Podobnie jak w układach z jonami Cu^{2+} , obserwuje się spadek trwałości kompleksu $[\text{ML}]$ wraz ze wzrostem wielkości podstawnika związanego z iminowym atomem azotu, a tym samym wraz ze wzrostem zasadowości liganda: $\text{Medmph}(\text{CH}_3) > \text{Etdmph}(\text{C}_2\text{H}_5) > \text{Hxdmph}(\text{C}_6\text{H}_{11})$.



Rys. 4. Zależność wartości: (a) – $\log K_{[ML]}$ oraz (b) – wyrażenia $\log K_{[ML]} - \Sigma pK$ od siły zasadowej ligandów dla *N*-podstawionych kwasów iminodi(metylenofosfonowych)

Uwzględnienie całkowitej zasadowości badanych ligandów w wyrażeniu $\log K_{[ML]} - \Sigma pK$ pozwala stwierdzić, że trwałość połączeń typu $[ZnL]$ rośnie w szeregu (tab. 3):

Hxdmph < Ptdmph < Etdmph < Bzdmph \approx Medmph < Pidmph < Fudmph,
połączeń typu [MgL] w szeregu:

Hxdmph < Ptdmph < Etdmph < Bzdmph \approx Hdmph \approx Medmph < Fudmph < Pidmph,
natomiast połączeń typu [CaL] w szeregu:

Hxdmph < Ptdmph < Etdmph < Bzdmph \approx Hdmph \approx Medmph < Pidmph < Fudmph.

Widoczny na rys. 4 (b) efekt obniżania się efektywnej siły wiązania badanych ligandów wraz ze wzrostem zasadowości koordynujących donorów wskazuje na to, że czynnik przestrzenny odgrywa w większości przypadków istotną rolę w tworzeniu kompleksów. Dla porównania, wartości stałych znormalizowanych, $\log K_{[MgL]} - \Sigma pK$, dla Hdmph i Medmph (ligandy różniące się wyraźnie zasadowością, a mające najbardziej zbliżony rozmiar podstawników) są prawie takie same i wynoszą odpowiednio $-17,81$ oraz $-17,75$.

Podobnie jak w układach z jonami miedzi(II), również w stosunku do jonów cynku(II) i magnezu(II) kwas Hxdmph, mimo najwyższej zasadowości, jest najsłabszym czynnikiem kompleksującym (rys. 4(b)). Ograniczenia przestrzenne, związane z obecnością pierścienia cykloheksyloвого bezpośrednio związanego z iminowym atomem azotu, są czynnikiem odgrywającym istotną rolę w procesie tworzenia tego typu kompleksu.

1.2.3. Kompleksy manganu(II), kobaltu(II) i niklu(II)

Obecna we wszystkich omawianych układach forma $[M(H_2L)]$ jest najsłabiej reprezentowaną formą, z wyjątkiem układu $M^{2+}/Pidmph$. W tym kompleksie protonowane ligandy koordynują do jonów metali jedno- lub dwufunkcyjnie, przy udziale jednej lub obu grup fosfonowych [30, 32].

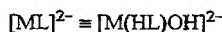
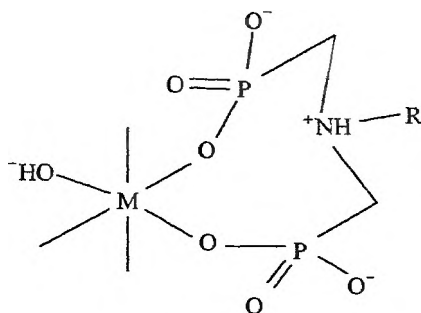
Proponowany sposób koordynacji w kompleksie typu $[M(HL)]$ jest analogiczny do przedstawionego na schemacie 4, który w przypadku koordynacji obu grup fosfonowych zakłada utworzenie ośmioczłonowego pierścienia chelatowego [32]. Proponowany sposób koordynacji jest zgodny z danymi literaturowymi jedynie w przypadku kompleksów protonowanych manganu(II) [26, 30]. W tego samego rodzaju kompleksach w układach z kobaltem(II) i niklem(II) autorzy prac zakładają udział azotu w procesie koordynacji, pozostawiając protonowaną jedną z grup fosfonowych [26, 30].

Deprotonacja formy $[M(HL)]$ w zakresie pH 6–9,5, prowadząca do utworzenia kompleksu $[ML]$, który wiąże prawie 100% jonów metalu, nie generuje żadnych istotnych zmian w widmach elektronowych otrzymanych zarówno dla układów z kobaltem(II) jak i niklem(II) przyjęto zatem, że formalnemu zapisowi formy $[ML]$ odpowiada rzeczywisty zapis $[M(HL)OH]$. W tej formie proton związany jest z iminowym atomem azotu, a grupa OH^- jest wynikiem dysocjacji cząsteczki wody związanej w kompleksie. Do jonu metalu koordynują

wyłącznie atomy tlenu grup fosfonowych [32]. W przypadku kompleksów z jodem Co^{2+} dodatkowym argumentem przemawiającym za taką interpretacją jest fakt, że cząsteczka wody w kompleksach kobaltu ma względnie wysoką kwasowość [57].

W widmach elektronowych układów Ni^{2+}/L obserwuje się, w zakresie widzialnym, dwa charakterystyczne pasma absorpcyjne [32]. Maksima pasm w zakresach 660–750 nm i 390–405 nm mogą być przypisane przejściom elektronowym w symetrii oktaedrycznej odpowiednio z poziomu ${}^3A_{2g}$ na ${}^3T_{1g}(F)$ oraz z ${}^3A_{2g}$ na ${}^3T_{1g}(P)$ [58]. Przebieg widm elektronowych dla badanych układów, w całym zakresie pH, wyraźnie zbliżony do przebiegu widma dla $[\text{Ni}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$, pozwala przyjąć, że koordynacja w obu formach $[\text{M}(\text{HL})]$ i $[\text{ML}]$ realizowana jest przy udziale tego samego typu atomów donorowych i są to donory wyłącznie tlenowe [32]. Ponadto energie jedyne przejścia typu CT (w zakresie 211–222 nm) obserwowane dla formy kompleksowej $[\text{NiL}]$, odpowiadają wartości energii obserwowanej dla tego typu przejścia w kompleksie $[\text{Ni}(\text{H}_2\text{O})_6](\text{ClO}_4)_2$ (198 nm). W tym przypadku koordynacja wyłącznie donorów tlenowych do jonu Ni^{2+} pozostaje poza wszelką wątpliwością. Przejście to zostało więc zinterpretowane jako przejście LMCT $\text{O}^- \rightarrow \text{Ni}^{2+}$ [32]. Brak drugiego pasma CT, które odpowiadałoby przejściu $\text{N}_{\text{imino}} \rightarrow \text{Ni}^{2+}$, pozwala wykluczyć udział iminowego atomu azotu w procesie koordynacji i przychylić się raczej do zaproponowanej koordynacji z udziałem jedynie grupy (grup) $-\text{PO}_3^{2-}$. Podobnie wygląda sytuacja dla układów z jonami Co^{2+} , gdzie w widmach elektronowych aż do pH 9 obserwuje się, w zakresie widzialnym, dwa pasma, przy ok. 650–660 nm i ok. 520 nm [32]. Odpowiadają one przejściom elektronowym, w symetrii oktaedrycznej, odpowiednio z poziomu ${}^4T_{1g}$ na ${}^4T_{1g}(P)$ oraz z ${}^4T_{1g}$ na ${}^4A_{2g}$, a ich położenie jest zgodne z odpowiednimi przejściami w widmie elektronowym $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ [58].

Proponowany sposób koordynacji w kompleksach typu $[\text{ML}]$, które tworzą się w omawianych układach, przedstawia schemat 5.

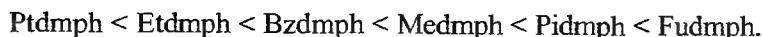


Schemat 5. Proponowany sposób koordynacji w kompleksie typu $[\text{ML}]^{2-}$ tworzącym się w układach M^{2+}/L (gdzie $\text{M}^{2+} = \text{Mn}^{2+}$, Co^{2+} i Ni^{2+} , a $\text{L} = \text{Medmph}$, Etdmph , Ptdmph , Hxdmph , Bzdmph i Pidmph)

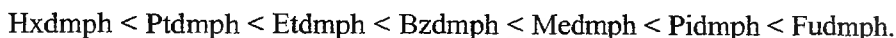
Sawada i wsp. [30] sugerują w formie [ML], zarówno w kompleksach Mn^{2+} jak i Co^{2+} czy Ni^{2+} , występowanie wiązania $M-N_{\text{imino}}$, chociaż Zhadanov i wsp. [23] w kompleksie manganu(II) wydają się tego nie potwierdzać. Należy jednak zauważyć, że autorzy dyskutują sposób koordynacji w poszczególnych kompleksach jedynie w oparciu o wyniki uzyskane z miareczkowania potencjometrycznego i nie potwierdzają go żadną inną metodą.

Podstawienie w cząsteczce kwasu iminodi(metylenofosfonowego) grupy tetrahydrofurylowej, zawierającej zdolny do koordynacji atom tlenu, wpływa wyraźnie na modyfikację właściwości kompleksujących tego związku czyniąc go, podobnie jak to miało miejsce w układach z innymi jonami metali, bardziej efektywnym czynnikiem chelatującym w stosunku do pozostałych ligandów. W rozpatrywanych układach występuje specyficzne oddziaływanie między jodem metalu i tetrahydrofurylowym atomem tlenu, najsilniejsze w kompleksie kobaltu(II) [32].

Trwałość połączeń typu [ML] w układach z jonami Co^{2+} i Ni^{2+} , po uwzględnieniu zasadowości koordynujących donorów, rośnie w szeregu (tab. 4):



Podobną sekwencję otrzymano również dla analogicznych kompleksów w układach z manganem(II):

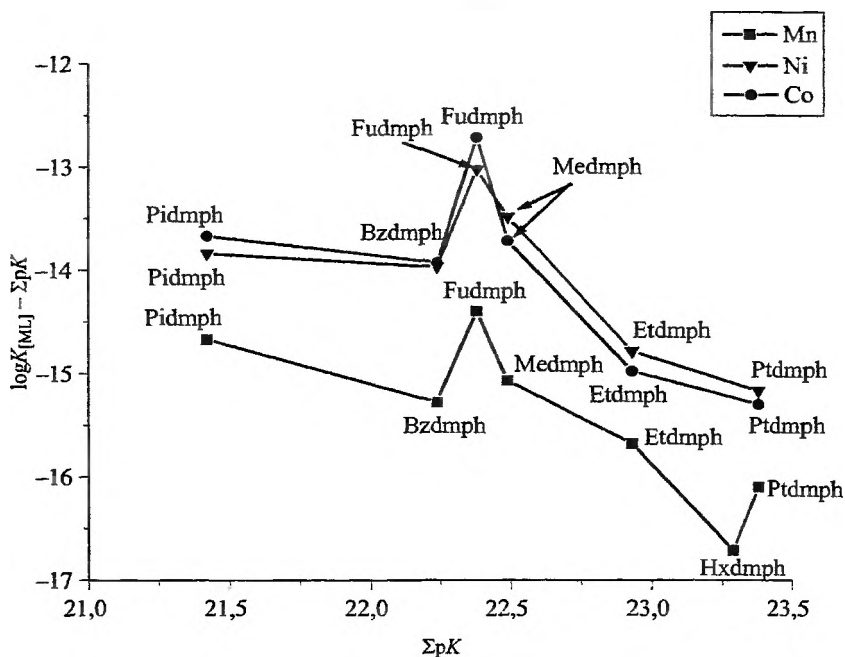


Zależność $\log K_{[ML]} - \Sigma pK$ w funkcji ΣpK , przedstawiona na rys. 5, dobrze oddaje wpływ czynników przestrzennych na trwałość badanych kompleksów. Hxdmph, chociaż wykazuje najwyższą zasadowość, okazuje się najstabszym czynnikiem kompleksującym w stosunku do jonów Mn^{2+} , ze względu na zawadę przestrzenną związaną z obecnością dużego pierścienia cykloheksyloвого bezpośrednio związanego z atomem azotu. W układach z kobaltem(II) i nikiem(II) nie stwierdzono obecności kompleksu typu [ML].

Podobnie jak w dyskutowanych wcześniej układach z innymi metalami(II), również w kompleksach z jonami Mn^{2+} , Co^{2+} i Ni^{2+} obserwuje się stabilizujący

Tabela 4. Wartości sumarycznych stałych trwałości oraz znormalizowanych stałych równowagi dla kompleksów jonów Mn^{2+} , Co^{2+} i Ni^{2+} [32]

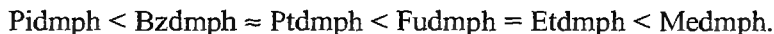
Ligand	$\log \beta_{[ML]}$			$\log K_{[ML]} - \Sigma pK$		
	Mn^{2+}	Co^{2+}	Ni^{2+}	Mn^{2+}	Co^{2+}	Ni^{2+}
Medmph	7,42	8,77	9,00	-15,07	-13,72	-13,49
Etdmph	7,25	7,95	8,14	-15,68	-14,98	-14,79
Ptdmph	7,28	8,08	8,21	-16,10	-15,30	-15,17
Hxdmph	6,58	-	-	-16,71	-	-
Bzdmph	6,96	8,31	8,27	-15,28	-13,93	-13,97
Pidmph	6,75	7,75	7,58	-14,67	-13,67	-13,84
Fudmph	7,98	9,66	9,35	-14,40	-12,72	-13,03



Rys. 5. Zależność wartości wyrażenia $\log K_{[ML]} - \Sigma pK$ od siły zasadowej ligandów dla *N*-podstawionych kwasów iminodi(metylenofosfonowych)

wpływ charakterystycznego oddziaływania atomu tlenu pierścienia tetrahydrofurylowego z jonem metalu, najslabiej zaznaczony w układzie z manganem(II) [32]. Ponadto obserwuje się wyższą względną trwałość kompleksów tworzonych przez aromatyczne kwasy iminodi(metylenofosfonowe) (Pidmiph, Bzdmiph) niż przez alifatyczne.

Należy wspomnieć, że podobnie jak miało to miejsce dla układów z jonami Cu^{2+} , energie przejść LMCT $\text{O}^- \rightarrow \text{Ni}^{2+}$ obserwowane w widmie elektronowym kompleksu $[\text{NiL}]$ wzrastają w kierunku:



Zatem energia przejścia CT wyraźnie zależy od rozmiaru podstawnika (R-) obecnego przy atomie azotu. Najwyższa energia przejścia CT jest obserwowana w przypadku kompleksu $[\text{NiL}]$ gdy $\text{R} = \text{CH}_3$, najniższa natomiast gdy $\text{R} = (\text{C}_5\text{H}_4\text{N})\text{CH}_2$ [32].

UWAGI KOŃCOWE

Istotny wpływ na właściwości kwasowo-zasadowe poszczególnych grup funkcyjnych *N*-podstawionych pochodnych kwasu iminodi(metylenofosfonowego) ma rodzaj podstawnika obecnego przy atomie azotu.

Związki te są bardzo efektywnymi czynnikami chelatującymi w stosunku do dwuwartościowych jonów metali. Jest to wynik jednoczesnej obecności w ich cząsteczkach dwóch ujemnie naładowanych grup fosfonowych oraz iminowego atomu azotu.

Ze względów elektrostatycznych i przestrzennych tworzenie przez te ligandy form kompleksowych typu $[ML_2]$ jest utrudnione, dlatego głównymi formami są kompleksy typu $[ML]$ ($[M(HL)OH]$). Stabilizujący wpływ dodatkowego donora tlenowego pierścienia furylowego sprawia, że w układach z Fudmph takie formy powstają.

Związki te reagują jako ligandy trójdonorowe, z utworzeniem dwóch sprzężonych pięcioczłonowych pierścieni chelatowych, z takimi jonami metali, jak: Mg(II), Cu(II) i Zn(II) lub jako ligandy dwudonorowe, z zaangażowaniem w koordynację jedynie grup fosfonowych, z utworzeniem ośmioczłonowego pierścienia chelatowego, z takimi jonami, jak: Ca(II), Mn(II), Co(II) i Ni(II).

Specyficzne właściwości donorowe *N*-podstawionych pochodnych kwasu iminodi(metylenofosfonowego) ujawniają się w zależności od różnych czynników, takich jak: utrudnienia steryczne związane z budową przestrzenną liganda, obecność dodatkowych miejsc koordynacyjnych, ładunek liganda, rodzaj i wielkość promienia jonowego metalu.

PIŚMIENICTWO CYTOWANE

- [1] W. Szczepaniak, J. Siepak, *Wiad. Chem.*, 1975, **29**, 193.
- [2] M.I. Kabachnik, T.Ya. Medved', N.M. Dyatlova, M.V. Rudomino, *Usp. Chim.*, 1974, **43**, 1554.
- [3] M.T.M. Zaki, E.N. Rizkalla, *Talanta*, 1980, **27**, 423.
- [4] S. Lacour, V. Deluchat, J.C. Bollinger, B. Serpaud, *Talanta*, 1998, **46**, 999.
- [5] A.R. Garifzyanov, E.Yu. Mikryukova, V.F. Toronova, *Zh. Obshch. Khim.*, 1991, **61**, 1346.
- [6] K.L. Nash, *Sep. Sci. Technol.*, 1999, **34**, 911.
- [7] P. Kafarski, P. Mastalerz, *Beitr. Wirkst. Forsch.*, 1984, **H21**, 1-110.
- [8] P. Kafarski, B. Lejczak, *Phosphorus, Sulfur, Silicon*, 1991, **63**, 193.
- [9] R.G.G. Russell, *Phosphorus, Sulfur, Silicon*, 1999, **144-146**, 793.
- [10] E. Bałczewska, P. Bałczewski, *Wiad. Chem.*, 2000, **54**, 1075.
- [11] M. Soroka, *Wybrane problemy chemii kwasów aminofosfonowych*, Prace Naukowe Instytutu Chemii Organicznej i Fizycznej Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 1987, Nr 32, seria: Monografie Nr 17.
- [12] B. Lejczak, *Aktywność biologiczna aminofosfonianów i fosfonopeptydów*, Prace Naukowe Instytutu Chemii Organicznej i Fizycznej Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 1988, Nr 32, seria: Monografie Nr 19.
- [13] B. Boduszek, *Heterocykliczne kwasy aminofosfonowe – synteza i aktywność biologiczna*, Prace Naukowe Instytutu Chemii Organicznej i Fizycznej Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 1997, Nr 38, seria: Monografie Nr 22.
- [14] B.K. Keppler, *New J. Chem.*, 1990, **14**, 389.
- [15] G. Forlani, B. Lejczak, P. Kafarski, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 1996, **55**, 180.
- [16] B. Lejczak, B. Boduszek, P. Kafarski, G. Forlani, H. Wojtasek, P. Wieczorek, *J. Plant Growth Regul.*, 1996, **15**, 109.

- [17] G. Forlani, P. Kafarski, B. Lejczak, B. Boduszek, R. Gancarz, C. Torreilles; J. Soloduch, Phosphorus, Sulfur, Silicon, 1996, **109–110**, 353.
- [18] G. Forlani, P. Kafarski, B. Lejczak, P. Wieczorek, J. Plant Growth Regul., 1997, **16**, 147.
- [19] P. Kafarski, B. Lejczak, G. Forlani, R. Gancarz, C. Torreilles, J. Grembecka, A. Ryczek, P. Wieczorek, J. Plant Growth Regul., 1997, **16**, 153.
- [20] P. Kafarski. Wiad. Chem., 1997, **51**, 125.
- [21] F.H. Ebetino, Phosphorus, Sulfur, Silicon, 1999, **144–146**, 9.
- [22] L. Widler, K.A. Jaeggi, J.R. Green, Phosphorus, Sulfur, Silicon, 1999, **144–146**, 5.
- [23] B.V. Zhadanov, L.A. Polyakova, N.V. Tsurul'nikova, T.M. Sushitskaya, V.Ya. Temkina, Koord. Khim., 1979, **5**, 1614.
- [24] F.I. Bel'skii, L.B. Goryunova, P.V. Petrovskii, T.Ya. Medved', M.I. Kabachnik, Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Khim., 1982, 103.
- [25] V.P. Vasilev, M.B. Kuturov, L.A. Kochergina, N.V. Tsurul'nikova. Zh. Obshch. Khim., 1983, **53**, 1990.
- [26] R.J. Motekaitis, A.E. Martell, J. Coord. Chem., 1985, **14**, 139.
- [27] P. Buglyo, T. Kiss, M. Dyba, M. Jeżowska-Bojczuk, H. Kozłowski, S. Bouhsina, Polyhedron, 1997, **16**, 3447.
- [28] E. Matczak-Jon, B. Kurzak, A. Kamecka, W. Sawka-Dobrowolska, P. Kafarski, J. Chem. Soc. Dalton Trans., 1999, 3627.
- [29] I. Lukes, I. Dominak, Chem. Papers. 1988, **42**, 311.
- [30] K. Sawada, T. Kanda, Y. Naganuma, T. Suzuki, J. Chem. Soc. Dalton Trans., 1993, 2557.
- [31] B. Kurzak, A. Kamecka, K. Kurzak, J. Jezińska, P. Kafarski, Polyhedron, 1998, **17**, 4403.
- [32] B. Kurzak, A. Kamecka, K. Kurzak, J. Jezińska, P. Kafarski, Polyhedron, 2000, **19**, 2083.
- [33] R.P. Carter, R.L. Carroll, R.R. Irani, Inorg. Chem., 1967, **6**, 939.
- [34] L.M. Shkol'nikova, G.V. Polyanchuk, N.M. Dyatlova, T.Ya. Medved', I.B. Goryunova, M.I. Kabachnik. Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Khim., 1985, 1035.
- [35] B.I. Makaranets, T.V. Polynova, V.K. Bel'skii, S.A. Il'ichev, M.A. Porai-Koshits, Zh. Strukt. Khim., 1985, **26**, 131.
- [36] M. Wozniak, G. Nowogrocki, Talanta, 1979, **26**, 1135.
- [37] T. Kiss, J. Balla, G. Nagy, H. Kozłowski, J. Kowalik, Inorg. Chim. Acta, 1987, **138**, 25.
- [38] T. Kiss, M. Jeżowska-Bojczuk, H. Kozłowski, P. Kafarski, K. Antczak, J. Chem. Soc. Dalton Trans., 1991, 2275.
- [39] E. Matczak-Jon, B. Kurzak, W. Sawka-Dobrowolska, B. Lejczak, P. Kafarski, J. Chem. Soc. Dalton Trans., 1998, 161.
- [40] L. Chruściński, P. Młynarz, K. Malinowska, J. Ochocki, B. Boduszek, H. Kozłowski, Inorg. Chim. Acta, 2000, **303**, 47.
- [41] G. Schwarzenbach, P. Ruckstuhl, J. Zurc, Helv. Chim. Acta, 1951, **34**, 455.
- [42] R.R. Irani, K. Moedritzer, J. Phys. Chem., 1962, **66**, 1349.
- [43] M.I. Kabachnik, R.P. Lastovskii, T.Ya. Medved', V.V. Medyntsev, I.D. Kolpakova, N.M. Dyatlova, Dokl. Akad. Nauk. SSSR, 1967, **177**, 582.
- [44] R.L. Carroll, R.R. Irani, Inorg. Chem., 1967, **6**, 1994.
- [45] R.A.M.J. Claessens, J.G.M. van der Lindem J. Inorg. Biochem., 1984, **21**, 73.
- [46] D. Sanna, G. Micera, P. Buglyo, T. Kiss, J. Chem. Soc. Dalton Trans., 1996, 87.
- [47] M. Etienne, P. Rubini, J. Bessiere, A. Walcarius, C. Grison, P.H. Coutrot, Phosphorus, Sulfur, Silicon, 2000, **161**, 75.
- [48] B.I. Makaranets, T.N. Polynova, N.D. Mitrofanova, M.A. Porai-Koshits, Zh. Strukt. Khim., 1991, **32**, 116.
- [49] B. Boduszek, M. Dyba, M. Jeżowska-Bojczuk, T. Kiss, H. Kozłowski, J. Chem. Soc. Dalton Trans., 1997, 973.
- [50] T. Kiss, E. Farkas, H. Kozłowski, Inorg. Chim. Acta, 1989, **155**, 281.

- [51] M.T. Beck, I. Nagypal, [w:] *Chemistry of Complex Equilibria*, Akad. Kiado. Budapest and Ellis Horwood, Chichester, 1990.
- [52] K. Sawada, T. Ichikawa, K. Uehara, J. Chem. Soc. Dalton Trans., 1996, 3077.
- [53] L.V. Nikitina, A.I. Grigor'ev, N.M. Dyatlova, Zh. Obshch. Khim., 1974, 44, 1669.
- [54] K. Sawada, T. Araki, T. Suzuki, Inorg. Chem., 1987, 26, 1199.
- [55] K. Sawada, T. Miyagawa, T. Sakaguchi, K. Doi, J. Chem. Soc. Dalton Trans., 1993, 3777.
- [56] V. Deluchat, J.C. Bollinger, B. Serpaud, C. Caillet, Talanta, 1997, 44, 897.
- [57] G. Schwarzenbach, E. Kampitsch, R. Steiner, Helv. Chim. Acta, 1945, 28, 1133.
- [58] A.B.P. Lever, *Inorganic Electronic Spectroscopy*, Elsevier, 1968.

Praca wpłynęła do Redakcji 17 lipca 2001

METODY OZNACZANIA L-KARNITYNY
METHODS OF L-CARNITINE DETERMINATION

Agata Łącka, Joanna Leszczyńska

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

Abstract

Wstęp

Metody oznaczania L-karnityny

Oznaczanie wolnej L-karnityny

Przygotowanie próbki

Metoda radiometryczna

Metody spektrofotometryczne

Metoda spektrofluorymetryczna

Metody enzymatyczne

Metody chromatograficzne

Inne metody oznaczania L-karnityny

Oznaczanie acylowych pochodnych L-karnityny

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane



Mgr inż. Agata Łącka jest asystentem w Zespole Chemii Bionieorganicznej i Analitycznej Instytutu Podstaw Chemii Żywności Politechniki Łódzkiej, obecnie przygotowuje rozprawę doktorską.

Głównym zakresem jej badań jest analityka chemiczna, a w szczególności wykorzystanie metod chromatograficznych i elektrochemicznych do oznaczania biologicznie czynnych składników żywności.

ABSTRACT

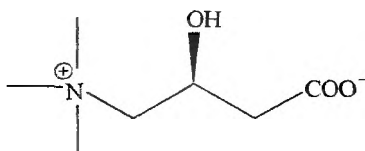
L-Carnitine (3-hydroxy-4-*N*-trimethylammonium butyric acid) plays an important role in fats metabolism, acting as an essential carrier of acyl group from cytoplasm into the mitochondria and β -oxidation products from peroxosomes. It is also responsible for detoxication of specific short- and medium-chain fatty acids [1-5]. Although carnitine is not indispensable in food and can be synthesized in the system, its deficiency accompanies many diseases. Deficiency in carnitine is characterised by muscle weakness, cardiomyopathy, deposition of fat in muscles, kidneys, liver as well as metabolic acidosis.

L-Carnitine occurs in a free form and esterificated by fatty acids. For diagnostic purposes free and total carnitine are determined after previous ester hydrolysis. Modern methods of carnitine determining are based on reversible reaction of the stoichiometric acetyl-transfer from acetyl-coenzyme A to L-carnitine catalyzed by carnitine acetyltransferase (CAT), and measurement of the content of acetyl-carnitine or free coenzyme A formed [1, 19]. Isomer D-carnitine is inactive in that reaction, *nor*-carnitine (3-hydroxy-4-dimethylammonium butyric acid) may take part, but this compound does not appear in any biologic materials. These methods of carnitine determining employ radiometric, spectrophotometric, spectrofluorimetric and enzymatic techniques.

Among the other methods of carnitine determining chromatographic methods are most frequently used, especially HPLC, but also GC chromatography is often used. Using HPLC method, one can determine the carnitine level, either immediately or in the form of 4'-bromophenacyl derivatives [46-49]. However, some authors have had difficulties in obtaining these derivatives [29] and sensitivity of determination has been not sufficient for biological samples. Various reagents were used to prepare fluorescent carnitine derivatives in the HPLC chromatography with fluorimetric detection [tab. 1]. The reactor containing immobilized enzymes was also used [58]. Carnitine can also be determined by means of gas chromatography. This method is based on the disintegration of carnitine at temp. 160 °C in the presence of NaOH and NaBH₄ [61, 62]. Under these conditions it is disintegrated into crotonylbetaine, trimethylamine and butyrolacton, which are detected with flame ionization. Among methods used less frequently mass spectroscopy and capillary electrophoresis are worth mentioning. Individual content of *O*-acyl derivatives of L-carnitine can be determined using the "radio-exchange" method or gas chromatography.

WSTĘP

L-karnityna (kwas 4-(trimetylo)amino-3-hydroksymasłowy) (rys. 1) oraz jej *O*-acylowe pochodne (acylokarnityny) są rozpowszechnione w tkankach zwierzęcych, roślinnych i w drożdżach [1]. Karnityna funkcjonuje jako główny nośnik grup acylowych z cytoplazmy do mitochondrium oraz produktów β -oksydacji z peroksosomów [2, 3]. Wykazano również, że karnityna pełni ważną funkcję przy tworzeniu mitochondrialnego koenzymu A (CoA) z acyloCoA, gdy ilość wolnego CoA limituje aktywację i akumulację metabolitów w mitochondriach [4]. Karnityna bierze udział w detoksyfikacji specyficznych krótko- i średniołańcuchowych kwasów tłuszczowych, niemetalizowanych lub metabolizowanych w niewielkim stopniu przez komórkę [5].



Rys. 1. Struktura L-karnityny

Badania nad L-karnityną dowiodły, że uczestniczy ona także w przemianie węglowodanów i białek, w procesach transmetylacji oraz stymuluje funkcje trawienia w przewodzie pokarmowym, a przez wpływ na przemianę cukrowców i białek obniża ilość ciał ketonowych we krwi i przywraca równowagę kwasowo-zasadową w tkankach i we krwi [6].

Karnityna jest syntetyzowana z L-lizyny w każdym żywym organizmie, przy czym pełny zestaw enzymów potrzebnych do tych reakcji u człowieka znajduje się tylko w wątrobie, nerkach i mózgu [7]. Zasoby karnityny człowieka o masie 70 kg wynoszą ok. 100 mmoli, z czego 98% tej ilości zlokalizowane jest w mięśniach, 1,5% w wątrobie i nerkach oraz zaledwie 0,5% w pozostałych tkankach, w tym we krwi [8]. Organizm ludzki potrafi sam syntetyzować karnitynę w ilości ocenianej na 1,2 μ moli/kg masy ciała w ciągu doby [9], jednakże ilość ta nie jest wystarczająca, zwłaszcza przy intensywnym wysiłku fizycznym, w sytuacjach stresowych itp. Utrzymanie stałej ilości karnityny w organizmie wymaga jej minimalnego dostarczenia w pożywieniu na poziomie 8–11 mg/dobę [10], a w szczególnych przypadkach (sportowcy wyczynowi) nawet 300 mg/dobę [11].

W ostatnich latach wiele chorób powiązано z niską podażą karnityny w pożywieniu. Niedobór karnityny występuje najczęściej u wcześniaków, u których w wątrobie jest fizjologicznie niska aktywność enzymów syntetyzujących karnitynę oraz u dzieci z lizynuryczną nietolerancją białek lub karmionych dietą wegetariańską [12, 13]. Choroba charakteryzuje się postępującym osłabieniem mię-

śniowym, kardiomiopatią, odkładaniem się substancji lipidowych w mięśniach, nerkach i wątrobie oraz kwasicą metaboliczną.

Bardzo często objawy niedoboru L-karnityny towarzyszą innym podstawowym chorobom, takim jak: zespół Reya, mukowiscydoza, cukrzyca. Niedobór jej pojawia się także przy długotrwałej dializoterapii, diecie eliminacyjnej, żywieniu pozajelitowym oraz długotrwałych biegunkach, w tych przypadkach spada bowiem dostępność metaboliczna karnityny. Następuje osłabienie mięśniowe, kardiomiopatia, hipoglikemia z hipoketonemią, częste infekcje i zaburzenia łąknienia [14].

METODY OZNACZANIA L-KARNITYNY

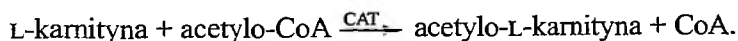
L-karnityna występuje w dwóch postaciach: wolnej i zestryfikowanej kwasami tłuszczowymi. Spośród estrów pod względem ilościowego oznaczania rozróżnia się estry krótkołańcuchowe (C₃-C₁₀) oraz długołańcuchowe (C > 12), przy czym te ostatnie są nierozpuszczalne w roztworach kwaśnych, wymagają więc innej procedury wydzielania z materiałów biologicznych. Całkowitą ilość karnityny w próbce oznacza się zatem w dwojaki sposób: tak samo jak wolny związek, po uprzednim procesie hydrolizy estrów w warunkach wysokiego pH środowiska lub sumując zawartości wolnego związku oraz jego estrów krótko- i długołańcuchowych [1, 15]. W niektórych publikacjach [16] oznaczana ilość całkowita karnityny w próbce dotyczy jednak tylko frakcji estrów rozpuszczalnych w kwasie, a co za tym idzie, ilość estrów długołańcuchowych nie jest wliczana do całkowitej ilości karnityny.

OZNACZANIE WOLNEJ L-KARNITYNY

Pierwszą opisaną metodą ilościowego oznaczania L-karnityny było wykorzystanie karnitynozależnej larwy *Tenebrio molitor* [17]. Miarą ilości karnityny w próbce był wzrost masy tego organizmu w porównaniu z przyrostem jego masy na pożywkach o znanej ilości L-karnityny.

Drugą historycznie metodą, obecnie nie wykorzystywaną ze względu na brak specyficzności, jest metoda kolorymetryczna tworzenia barwnego kompleksu grupy aminowej L-karnityny z błękitem bromofenolowym [18]. Metoda ta nie wykazywała odpowiedniej selektywności oraz była mało czuła.

Dużą część współczesnych metod oznaczania L-karnityny oparta jest, w swej początkowej części, na odwracalnej enzymatycznej reakcji acylacji wolnej L-karnityny za pomocą acetylotransferazy karnitynowej (CAT) (EC 2.3.1.7) [1, 19]. Grupa acetylowa zostaje w niej przeniesiona z acetylokoenzymu A na karnitynę, w wyniku czego zostaje uwolniona wolna cząsteczka koenzymu A (CoA), którego ilość następnie podlega oznaczeniu.



W tej reakcji uczestniczy tylko izomer L, natomiast izomer D karnityny jest nieaktywny. Przy wysokich jego stężeniach następuje inhibicja enzymu. Oprócz L-karnityny w tej reakcji może brać udział norkarnityna (kwas 3-hydroksy-4-dimetyloaminomasłowy), jednakże związek ten nie występuje w materiałach biologicznych [20].

Przygotowanie próbki

Niektóre próbki biologiczne, np. mocz lub osocze krwi, nie wymagają wstępnej obróbki. Jednakże część metod oznaczania, np. spektrofotometryczna, wymaga usunięcia z próbki związków zawierających grupy sulfhydrylowe, głównie białka. Opisywanych zostało wiele dróg postępowania: deproteinizacja kwasowa [15, 21, 22], filtracja [23], denaturacja etanolem [24] lub przez ogrzewanie [25], jednakże każda z nich ma wady, wpływające na wynik oznaczania. Kwasowa deproteinizacja wymaga neutralizacji, dając w wyniku duże stężenia soli w próbce, spowalniające reakcje. Filtracja jest kosztowna, czasochłonna i nie usuwa z próbki peptydów, tak samo jak denaturacja temperaturowa. Najlepszym sposobem wydaje się dializa próbki wyjściowej [26].

W przypadku oznaczania zawartości karnityny w tkankach, najodpowiedniejszą metodą otrzymania ekstraktu jest deproteinizacja przy użyciu roztworu kwasu chlorowego(VII) [27]. Przy oznaczaniu metodami chromatograficznymi stosuje się także ekstrakty metanolowe lub metanolowo-acetonitrylowe [28, 29, 30].

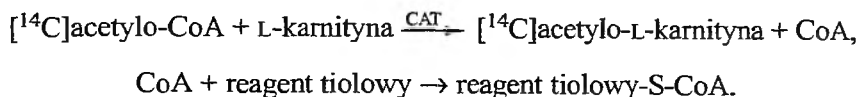
W celu oddzielania karnityny od innych składników, mających wpływ na wynik oznaczania, stosuje się oczyszczanie próbki na złożach jonowymiennych. Wykorzystuje się zazwyczaj kombinację dwóch źródeł: kationitu w formie NH_4^+ oraz anionitu. Anionit w formie OH^- jest bardzo efektywny przy usuwaniu np. kwasów karboksylowych, jednakże taki jonit hydrolizuje estry karnityny, dlatego jest zastępowany anionitem w formie chlorkowej, charakteryzującym się słabszą efektywnością usuwania kwasów [31]. Sandor i wsp. zaproponowali wykorzystanie złoża anionowymiennego w formie F^- , który w połączeniu z kationitem tworzy sól, łatwo sublimującą podczas liofilizacji próbki [32].

Stosowanych jest wiele buforów do przygotowania i stabilizacji roztworów karnityny, z których najczęściej stosowany jest bufor HEPES (kwas 4-(2-hydroksyetylo)-1-piperazynoetanosulfonowy) [1, 33]. W przypadku używania buforu tris (tris(hydroksymetylo)aminometanu) do przygotowania próbki badanej może wystąpić reakcja katalizowana przez CAT przeniesienia grupy acetylowej z acetylo-CoA na tris [34].

Metoda radiometryczna

Metoda radiometryczna uchodzi za podstawową metodę oznaczania L-karnityny i stanowi podstawę porównań innych metod oznaczania tego związku [1, 31]. Opiera się na dwóch reakcjach: w pierwszej, odwracalnej reakcji, katalizo-

wanej przez acetylotransferazę karnitynianową (CAT), znakowana izotopem ^{14}C grupa acetylowa zostaje przeniesiona na L-karnitynę. Druga reakcja polega na chemicznym wiązaniu wolnego CoA, a co za tym idzie, przesunięciu równowagi pierwszej reakcji w kierunku produktów. Jako reagent tiolowy stosuje się najczęściej *N*-etylomaleimid (NEM) [35], w rzadkich przypadkach czterotioan sodu [36], który może inhibować CAT.



Nadmiar nieprzereagowanego $[^{14}\text{C}]\text{acetylo-CoA}$ jest usuwany przy użyciu żywicy jonowymiennej (anionitu). Z powodu dodatniego ładunku na azocie grupy aminiowej w cząsteczce karnityny, $[^{14}\text{C}]\text{acetylo-L-karnityna}$ nie zostaje zatrzymana na żywicy i przechodzi do roztworu, w którym jej ilość zostaje oznaczona przy użyciu cieczowego licznika scyntylicyjnego. Zawartość karnityny w próbce wyznacza się z krzywej wzorcowej.

Znaczące błędy oznaczenia powstają w obecności dużych ilości acylokarnityn oraz acetylo-CoA w próbce, powodujących przesunięcie równowagi pierwszej reakcji. Rozwiązać ten problem można przez przepuszczenie próbki w postaci ekstraktu nadchloranowego przez złożę anionitowe lub zwiększenie stężenia radioaktywnego $[^{14}\text{C}]\text{acetylo-CoA}$ [37].

Środowisko badane nie powinno przekraczać wartości pH 7,5, aby uniknąć hydrolizy obecnych w próbce acylokarnityn, nie przeszkadzających w tym oznaczeniu oraz inaktywacji CAT. Inaktywacji tego enzymu przez jony metali zapobiega się, dodając EDTA do roztworu badanego.

Metodę stosowano do oznaczania L-karnityny w próbkach biologicznych (krew, mocz, tkanki), uzyskując granicę detekcji 50 pmol.

Metody spektrofotometryczne

W metodzie kolorymetrycznej [15], zwanej metodą DTNB, cząsteczki koenzymu A, uwolnionego w wyniku odwracalnej reakcji przeniesienia grupy acetylowej z CoA na L-karnitynę katalizowanej przez CAT, wykrywa się za pomocą reakcji z kwasem 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoesowym) (DTNB) zgodnie z reakcją opisaną poniżej. W jej wyniku tworzy się żółty anion 5-tio-2-nitrobenzoesowy (TNB^-) w ilości proporcjonalnej do zawartości karnityny w próbce.

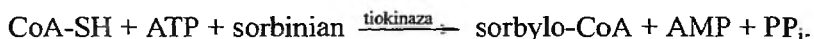


Enzym CAT jest wolno deaktywowany przez cząsteczkę DTNB. Inaktywacja enzymu może również wystąpić przy pH 8,5, jednakże obniżenie pH poniżej 7 zmniejsza stopień dysocjacji DTNB, co powoduje zaniżenie wyniku końcowego. Dlatego pomiaru dokonuje się przy pH 7,5 w środowisku buforu HEPES [15].

Obecność w próbce innych niż CoA związków z grupą tiolową może prowadzić do błędów, jednakże można to wyeliminować poprzez utlenianie tych tioli za pomocą H_2O_2 [15].

Z powodu prostoty wykonywania, opracowano wiele zautomatyzowanych metod oznaczania L-karnityny metodą DTNB służących do wykonywania większej liczby oznaczeń [23, 38, 39]. Granica detekcji w tej metodzie została określona na poziomie 5 nmol, przy jej wykorzystaniu do oznaczania L-karnityny w moczu, płazmie i tkankach.

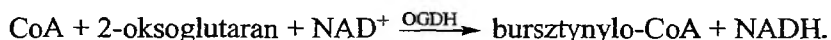
Drugą, rzadziej stosowaną metodą, jest metoda tiokinazowa [40]. Metoda ta oparta jest na dwóch reakcjach enzymatycznych, z których pierwszą jest reakcja odwracalnego przeniesienia grupy acetylowej z koenzymu A na karnitynę, katalizowana przez CAT. Druga reakcja polega na wiązaniu wolnego koenzymu A z cząsteczką sorbinianu w obecności adenozyno-5'-trifosforanu (ATP) przy udziale enzymu tiokinazy (ligaza kwas: CoA (tworząca AMP)) (EC 6.2.1.3) z utworzeniem sorbylo-koenzymu A, adenozyno-5'-monofosforanu (AMP) oraz pirofosforanu (PP_i). Pomiaru stężenia sorbylo-CoA dokonuje się przy długości fali 300 nm, a wyniki ilościowe uzyskuje się na podstawie krzywej wzorcowej.



Metoda ta wykazuje większą czułość niż metoda DTNB, jednakże ze względu na wykorzystanie dwóch reakcji enzymatycznych jest bardziej skomplikowana. Największym źródłem błędów są zmiany temperatury, gdyż ogrzewanie podczas pomiaru prowadzi do wzrostu absorbancji oraz tworzy się większa ilość niezdzysocjowanego kwasu sorbowego. Problem ten można usunąć przez dokładną kontrolę temperatury.

Metoda spektrofluorymetryczna

Metoda fluorymetryczna oznaczania ilościowego karnityny jest oparta na dwóch reakcjach enzymatycznych [40]. Pierwszą z nich jest reakcja katalizowana przez CAT przeniesienia grupy acetylowej z acetylo-CoA na karnitynę, druga reakcja jest katalizowana przez dehydrogenazę 2-oksoglutaranową (OGDH). W tej reakcji CoA reaguje z 2-oksoglutaranem w obecności dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NAD^+) z wytworzeniem cząsteczki bursztynylo-CoA. Obie reakcje zachodzą w temperaturze pokojowej w ciągu 15–30 minut. Zmiana zawartości NAD^+ jest mierzona fluorymetrycznie.

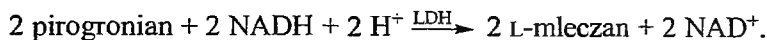
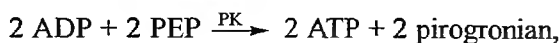
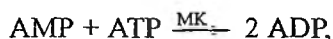
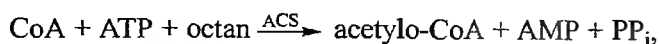


Odmianę tej metody zaproponowali Schäfer i Reichmann [41]: pomiar zmian zawartości tworzonego zredukowanego dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADH) metodą spektrofotometryczną przy długości fali 340 nm. Metoda została wykorzystana do oznaczenia L-karnityny w moczu, surowicy krwi i tkankach, a granica jej detekcji wyniosła 500 pmol.

Metody enzymatyczne

Jak to zostało opisane wcześniej, duża część metod oznaczania L-karnityny jest oparta na reakcjach enzymatycznych, jednakże w piśmiennictwie opisywane są one zazwyczaj nie jako metody enzymatyczne, lecz noszą mylące nazwy związane z metodą detekcji jednego z produktów reakcji.

Jedną z metod enzymatycznych jest metoda wykorzystywana przy oznaczaniu L-karnityny w teście enzymatycznym firmy Roche [42]. W teście tym wykorzystywany jest szereg powiązanych ze sobą substratowo reakcji enzymatycznych, które opisuje poniższy schemat:

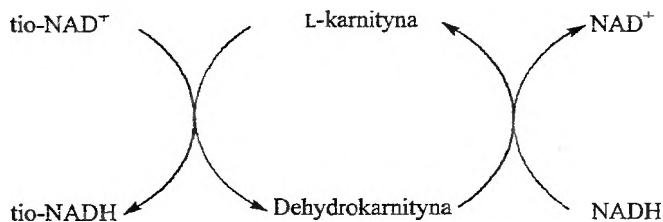


Pierwszą reakcją jest opisana uprzednio reakcja acetylowania L-karnityny z wykorzystaniem acetylotransferazy karnitynianowej. Powstający w tej reakcji koenzym A jest następnie acetylowany przez syntetazę acetylokoenzymu A (ACS) (ligaza kwas : CoA; EC 6.2.1.2) w obecności ATP z wytworzeniem AMP oraz cząsteczki pirofosforanu. Kolejna reakcja w opisywanym szeregu polega na wytworzeniu adenosyno-5'-difosforanu (ADP) przy udziale enzymu miokinazy (MK) (fosfotransferaza ATP : AMP; EC 2.7.4.3) w obecności ATP, przy czym ilość uzyskanego ADP jest równoważna połowie ilości L-karnityny w pierwszej reakcji szeregu. Czwartą reakcją, katalizowaną przez kinazę pirogronianową (PK) (fosfotransferaza ATP : pirogronian; EC 2.7.1.40), jest wytworzenie pirogronianu z fosfoenolpirogronianu (PEP) w obecności ADP. Cząsteczka pirogronianu jest substratem w ostatniej reakcji, w której przy udziale dehydrogenazy mleczanowej (LDH) (oksydoreduktaza L-mleczan : NAD; EC 1.1.1.28) następuje redukcja pirogronianu do L-mleczanu w NADH, którego ilość jest mierzona spektrofotometrycznie przy długości fali 334, 340 lub 365 nm. Ilość zużywanego w tym szeregu reakcji NADH jest równoważna połowie ilości L-karnityny.

Test enzymatyczny przeznaczony jest do oznaczania L-karnityny w moczu, osoczu i płazmie, nie podano jego granicy detekcji.

Drugą opisaną metodą enzymatyczną jest cykl enzymatyczny zaproponowany przez Takahashiego i wsp. [43]. Zachodząca cykliczna reakcja enzymatyczna, opisana przez schemat na rys. 2, katalizowana przez dehydrogenazę karnitynianową (EC 1.1.1.108), wyizolowaną z *Alicagens* sp., prowadzi do akumulacji tio-NADH przy stałej szybkości, która jest proporcjonalna do stężenia L-karnityny. Pomiaru spektrofotometrycznego dokonuje się przy długości fali 415 nm, ozna-

czenie wykonuje się w stałej temperaturze 37 °C. Autorzy [43] wykorzystali opisaną metodę do oznaczania L-karnityny w osoczu krwi. Granica detekcji tej metody nie została określona.



Rys. 2. Schemat reakcji cyklu enzymatycznego [43]

Metody chromatograficzne

Spośród metod polegających na rozdziale chromatograficznym do ilościowego oznaczania L-karnityny i jej estrów najczęściej wykorzystuje się metody z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLC).

HPLC z detekcją spektrofotometryczną. Wykorzystując metodę HPLC z detekcją spektrofotometryczną, karnitynę oznacza się bezpośrednio [44] oraz w postaci pochodnych 4'-bromo-fenacylowych [45].

Przy oznaczaniu karnityny metodą bezpośrednią [44] zastosowano kolumnę Supelcosil NH₂ (250 × 4,6 mm, i.d.; 5 μm) oraz izokratyczny przepływ fazy ruchomej, na którą składał się acetonitryl oraz 0,02 M bufor fosforanowy (pH 3) w stosunku objętościowym 75 : 25. Pomiaru dokonywano przy długości fali 205 nm. Mimo dużej prostoty (brak tworzenia pochodnych, przepływ izokratyczny fazy ruchomej) metoda ta nie jest enancjoselektywna oraz ma zbyt małą czułość oznaczeń karnityny (granica detekcji na poziomie 100 nmoli), aby mogła być wykorzystana do próbek biologicznych.

Najczęściej stosowanymi pochodnymi karnityny oznaczanymi przy rozdziale HPLC z pomiarem spektrofotometrycznym są pochodne 4'-bromofenacylowe, przy czym opisanych zostało kilka metod ich otrzymywania. W przypadku zastosowania bromku 4'-bromofenacylu (BPB) tworzą się pochodne w obecności eterów koronowych w środowisku acetonitrylu [46], eterów koronowych i wodorowęglanu potasu [47] lub *N,N*-diizopropylotetyloaminy (DIPEA) [48]. Niektórzy autorzy nie uzyskali jednak pochodnych w tych warunkach [29]. Ograniczeniem estryfikacji karnityny przy użyciu odczynników bromofenacylowych jest obecność w próbce innych związków zawierających grupę karboksylową.

Pochodne karnityny i acylokarnityn z BPB uzyskane w obecności eterów koronowych w środowisku acetonitrylu [46] podczas ogrzewania do temperatury 60 °C w płuczce ultradźwiękowej w czasie 90 minut rozdzielano na kolumnie

Ultrasphere ODS IP (250 × 4,6 mm i.d.; 5 μm) przy przepływie 1,6 ml/min fazy ruchomej, którą stanowiły rozpuszczalniki w zmiennych w czasie proporcjach: woda, acetonitryl oraz roztwory trietyloaminy i kwasu fosforowego. Uzyskano dobry rozdział pochodnych i dobrze wykształcone piki podczas pomiaru przy długości fali 245 nm oraz w czasie elucji pojedynczej próbki 55 minut. Przy tej samej długości fali występuje także absorpcja acetonitrylu i roztworu trietyloaminy, jednakże pomiar przy innej długości fali, np. 254 nm, powoduje spadek czułości metody nawet o 20%. Niekorzystny wpływ eluatu na absorbancję autorzy [46] usunęli przez pomiar w gradiencie przepływu. Minimalna granica detekcji została określona na poziomie 20 pmol.

Uzyskanie pochodnych karnityny z BPB w obecności *N,N*-diizopropylotetyloaminy (DIPEA) w środowisku acetonitrylu wymagały wstępnego przekształcenia karnityny i acylokarnityn w sole octanowe [48]. W takiej postaci karnityna reagowała z DIPEA, a tworzenie końcowej pochodnej 4'-bromofenacylowej zachodziło w łagodnych warunkach (37 °C, 30 minut). Wykorzystana w pracy kolumna Hypersil BDS C₈ (200 × 4,6 mm, i.d.; 5 μm) oraz faza ruchoma (woda, acetonitryl oraz roztwory trietyloaminy i kwasu fosforowego w proporcjach zmiennych w czasie) dały dobry rozdział pochodnych i dobrą oznaczalność przy długości fali 260 nm, przy czym czas pojedynczego oznaczenia skrócono do 30 minut.

Inną drogę otrzymywania 4'-bromofenacylowych pochodnych karnityny zaproponowali Minkler i wsp. [30]. Uzyskali oni pochodną w wyniku reakcji L-karnityny z trifluorometanosiarczanem 4'-bromofenacylu, reagentem zsyntetyzowanym w tym celu. Reakcja tworzenia pochodnej karnityny, rozdzielanej chromatograficznie, została przeprowadzona w obecności DIPEA w środowisku acetonitrylu w ciągu 10 minut w temperaturze pokojowej [49].

HPLC z detekcją fluorymetryczną. Metody HPLC z detekcją fluorymetryczną są stosowane zazwyczaj do oznaczania karnityny po reakcji z wytworzeniem odpowiedniej pochodnej. Opisano wiele odczynników wykorzystanych do tworzenia wykrywalnych w ten sposób związków, z których wybrane zostały przedstawione w tab. 1.

Rozdział chromatograficzny HPLC z detekcją fluorymetryczną został także zaproponowany przy wykorzystaniu reaktora z immobilizowanymi enzymami [58]. W tej metodzie, której schemat przedstawiono na rys. 3, karnityna i jej pochodne acylowe zostają rozdzielone na kolumnie TSK-gel ODS 80Ts (4,6 × 150 mm i.d.), a następnie zostają przepuszczone przez kolumny z osobno immobilizowanymi enzymami: hydrolazą acetylokarnitynianową (ACK), dehydrogenazą karnitynianową (CDH) (E.C. 1.1.1.108) oraz diaforazą (DIA) (EC 1.8.1.4). Podczas oznaczenia L-karnityny i jej *O*-acylowych estrów przebiegają następujące reakcje:

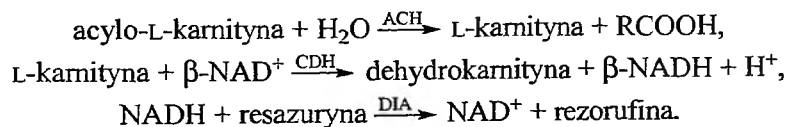
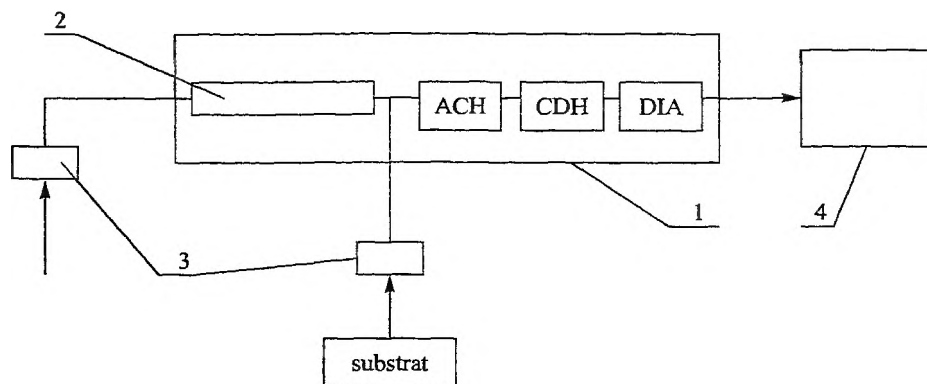


Tabela 1. Charakterystyka wybranych związków wykorzystywanych do oznaczania L-karnityny i jej estrów za pomocą metody HPLC z detekcją spektrofлуorymetryczną

Nazwa związku	λ_{ex}	λ_{em}	Granica detekcji	Lit.
Trifluorometanosulfonian 2-(2,3-naftalimino)-etylu	259	394	790 fmoi	[29]
9-antrylodiazometan (ADAM)	365	450	50 fmoi	[50]
6(4-aminofenilo)-3-cyjano-4-[4-(dietyloamino)fenilo]-2-metylopirydyna	363	533	60 fmoi	[51]
4-(2-aminoetyloamino)-7-nitro-2,1,3-benzoksadiazol (NBD-ED)	485	540	100 fmoi	[52]
2-(4-hydrazynokarbonylofenilo)-4,5-difenyloimidazol (HCPI)	340	475	nie określono	[53]
4-(2-aminoetyloamino)-N-(4-metoksyfenilo)-1,8-naftalimid	436	524	30 fmoi	[54]
3-bromo-metylo-6,7-dimetoksy-1-metylo-2(1H)chinoksalinon	380	455	nie określono	[55]
1-aminoantracen (1-AA)	248	418	100 pmol	[56, 57]



Rys. 3. Schemat aparatury do oznaczania L-karnityny techniką HPLC z reaktorem enzymatycznym [58] (1 – piec, 2 – kolumna, 3 – pompa, 4 – detektor, pozostałe objaśnienia w tekście)

Eluent, który stanowi zmienny w czasie układ metanolu, buforu fosforanowego i roztworów: siarczanu sodu oraz heptanosiarczanu sodu, jest mieszany po opuszczeniu kolumny z roztworem β -NAD⁺ i resazuryny w środowisku buforu tris-octowego jako substratem, przy przepływie 0,5 ml/min. Piec termostatowy, a wraz z nim znajdujące się wewnątrz kolumny przez cały czas pomiaru utrzymują temperaturę 40 °C, optymalną dla pracy enzymów.

Enzymy ACH i CDH nie są stabilne w rozpuszczalnikach organicznych, jednakże eluenty organiczne są wymagane jako faza ruchoma przy elucji na kolum-

nie z odwróconymi fazami [58]. Najbardziej odpowiedni z nich jest metanol, gdyż inhibuje aktywność obu wymienionych enzymów dopiero przy stężeniach powyżej 20% (obj.). W przypadku innych rozpuszczalników organicznych, np. acetonitrylu, przy porównywalnych stężeniach następuje nieodwracalna inaktywacja enzymów. Natomiast aktywność diaforazy jest inhibowana przez roztwór NAD^+ przy stężeniach większych niż 1 mmol/dm^3 [59].

Granice detekcji L-karnityny w tej metodzie autorzy [58] określili na poziomie 50–100 pmol podczas wykorzystania jej do oznaczania karnityny w moczu.

W metodzie zaproponowanej przez Manjón i wsp. [60] enzym dehydrogenazę karnitynianową (oksydoreduktaza L-karnityna : NAD^+ ; EC 1.1.1.108), wyizolowaną z *Agrobacterium* sp., immobilizowano na kolumnie ($30 \times 3,5 \text{ mm}$, $290 \mu\text{l}$), przez którą utrzymywano stały przepływ roztworu NAD^+ . Do strumienia wstrzykiwano próbkę zawierającą L-karnitynę, a ilość produkowanego w reakcji NADH była mierzona fluorymetrycznie przy długości fali wzbudzenia 340 nm i fali emisji 460 nm . Powierzchnia piku uzyskanego w wyniku analizy była uzależniona od ilości karnityny w próbce. Granicę detekcji tą metodą autorzy określili na poziomie 20 pmoli, jednakże metoda wykorzystana została tylko przy oznaczeniach L-karnityny w preparatach farmaceutycznych.

Chromatografia gazowa (GC). Do oznaczania karnityny stosowana jest także metoda chromatografii gazowej. Częsteczki karnityny oraz jej estrów są niestabilne w temperaturze ponad $100 \text{ }^\circ\text{C}$ i w takich warunkach następuje rozerwanie cząsteczek do krotonylobetainy, nienasyconego butyrolaktonu oraz trimetyloaminy. Metodę GC oparto na rozpadzie karnityny w temperaturze $160 \text{ }^\circ\text{C}$ w obecności NaOH i NaBH_4 [61, 62]. W opisanych warunkach produkt rozpadu 4-butyrolakton jest oznaczany ilościowo przy użyciu płomieniowego detektora jonizacyjnego (FID). Metodę oznaczania zastosowano dla próbek moczu, uzyskując granicę detekcji na poziomie 100 nmol.

Inne metody oznaczania L-karnityny

Metody spektrometrii masowej. Karnityna i jej *O*-acylowe pochodne ze względu na wysoką polarność oraz nietloność są słabymi kandydatami do badań konwencjonalną metodą spektroskopii masowej, dlatego wykorzystuje się metodę bombardowania szybkimi atomami (FAB) połączoną ze spektrometrią masową (MS) [63] lub tandemową spektrometrią masową (MS-MS) [64, 65]. Zawartość L-karnityny i acylokarnityn w próbce wyznacza się z porównania intensywności jonów molekularnych badanych związków w odniesieniu do wzorca wewnętrznego: [$^2\text{H}_3\text{-Me}$]-karnityny.

Estryfikacja grupy karboksylowej karnityny zwiększa aktywną powierzchnię cząsteczki i redukuje możliwość połączeń z litowcami, co powoduje obniżenie granicy detekcji metodą FAB-MS. Jako pierwsze wykorzystano estry metylowe w środowisku glicerolu [66, 67]. Metylacja w przypadku oznaczania acylokarni-

tyn nie zdaje egzaminu, gdyż w przypadku niecałkowitego przebiegu reakcji utrudnione jest odróżnienie widm masowych zestryfikowanej acylokarnityny od jej niezestryfikowanego homologu. W związku z tym Montgomery i Mamer [63] zaproponowali estryfikację grupą [$^2\text{H}_3$]metylową w środowisku glicerolu i pirydyny (10 : 1), natomiast Kodo i wsp. [68] – tworzenie i analizę estrów butylowych, których obecność dodatkowo zwiększa kilkakrotnie czułość analizy w stosunku do badanych estrów metylowych karnityny i acylokarnityn.

Metoda FAB-MS oznaczania karnityny i jej pochodnych acylowych charakteryzuje się bardzo dużą czułością, porównywalną z metodą radiometryczną, przy czym ograniczoną jedynie oddziaływaniem tła (glicerol). Wśród innych jej zalet należy wymienić prostotę pomiaru, brak strat wywołanych procedurami oczyszczania i wydzielania badanych związków oraz bardzo krótki czas wykonywania pojedynczego pomiaru (poniżej 2 minut). Największym ograniczeniem stosowania tej metody jest bardzo duży koszt zakupu odpowiedniej aparatury, na jaki nie może sobie pozwolić większość laboratoriów zajmujących się oznaczaniem zawartości L-karnityny.

Elektroda jonoselektywna. Metoda elektrochemiczna oznaczania L-karnityny oparta jest na wykorzystaniu specjalnie zaprojektowanej enzymatycznej elektrody jonoselektywnej [69, 70]. Elektroda zbudowana jest z dysku platynowego, oddzielonego od roztworu badanego półprzepuszczalną membraną. Przestrzeń między dyskiem a membraną zajmuje roztwór enzymów: dehydrogenazy karnitynowej oraz diaforazy, natomiast roztwór pomiarowy oprócz nieznannej ilości karnityny zawiera NAD^+ i $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Podczas pomiaru zachodzą dwie reakcje: w pierwszej, katalizowanej przez CDH, L-karnityna zostaje zredukowana w obecności NAD^+ z utworzeniem dehydrokarnityny i NADH, który w reakcji drugiej, katalizowanej przez diaforazę, zostaje utleniony przez heksacyjanożelazian(III). Powstały w drugiej reakcji heksacyjanożelazian(II) jest utleniany elektrolitycznie przy potencjale 0,3 V, przy czym natężenie prądu potrzebnego do utleniania jest proporcjonalne do ilości L-karnityny w próbce.

Elektroforeza kapilarna (CE). Metoda elektroforezy kapilarnej oparta jest na ruchliwości obdarzonych ładunkiem jonów w polu elektrycznym wytworzonym przez przyłożone zewnętrzne napięcie. L-karnityna i acylokarnityny stanowią bardzo dobre obiekty badań tą metodą. W środowisku kwaśnym przy $\text{pH} < 5$ mają dodatni ładunek na grupie aminowej, a o ich ruchliwości decydują masy i struktury przestrzenne związków. W podanych warunkach ulegają bezpośredniej detekcji [71], jak również po wcześniejszym uzyskaniu pochodnych L-karnityny i acylokarnityn z odczynnikami reagującymi z grupą karboksylową, takimi jak trifluorometanosulfonian 4'-bromofenacylu [72] oraz 9-antrylodiazometan [73]. W przypadku tworzenia pochodnych z niepolarnymi cząsteczkami wymagane jest zastosowanie buforów w mieszaninach: acetonitryl : woda, metanol : woda z dodatkiem SDS lub buforów w rozpuszczalnikach niewodnych [74]. Metody te zastosowano przy

oznaczeniach w moczu i plazmie, wyznaczając granicę detekcji przy stężeniu 3 nmol/cm^3 .

Spośród metod CE najbardziej czuła jest metoda elektroforezy kapilarnej sprzężona ze spektrografią masową (CE-MS) [74]. Metoda ta nie wymaga derywatywacji badanych związków, jest szybsza i wymaga mniejszego zużycia odczynników w porównaniu do metod HPLC, jednakże nie może być zastosowana do oznaczania długołańcuchowych acylokarnityn. Została ona wykorzystana w analizie moczu, krwi i plazmy, ustalając granicę detekcji na poziomie 1 nmol/cm^3 .

Obecnie kolejnym krokiem udoskonalenia metody CE-MS jest miniaturyzacja rozdziału elektroforetycznego [75, 76].

OZNACZANIE ACYLOWYCH POCHODNYCH L-KARNITYNY

Acylokarnityny oznacza się jako „całkowitą” karnitynę po uprzedniej hydrolizie przy wysokim pH roztworu. W tej postaci oznaczenia dokonuje się opisanymi już metodami: radiometryczną, spektrofotometrycznymi oraz fluorymetrycznymi. Sumaryczną ilość acylokarnityn w próbce wyznacza się, odejmując od ilości całkowitej karnityny zawartość karnityny wolnej.

Gdy wymagane jest wyznaczenie ilości indywidualnych acylokarnityn, najczęściej stosuje się metody chromatograficzne. Oprócz metod wymienionych we wcześniejszych rozdziałach, do rozdziału i identyfikacji acylokarnityn stosuje się metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) oraz prekolumnową enzymatyczną wymianę radioaktywnej [^3H]-karnityny w acylokarnitynę (metoda *radio-exchange*) [77], pomiar ilości uwolnionego acylo-CoA w wyniku reakcji katalizowanej przez CAT [78, 79], w obecności analizera kwasów karboksylowych [80] oraz z detektorem spektrometrii masowej [81, 82]. Spośród innych metod wymienia się chromatografię gazową (GC) [83–87] oraz metody bombardowania szybkimi atomami (FAB-MS) [63, 68].

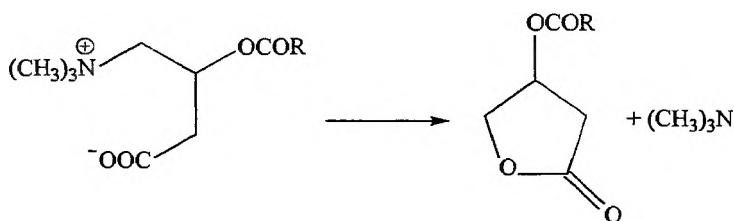
Na szczególną uwagę spośród wymienionych metod zasługuje metoda *radio-exchange*, opracowana i wykorzystana w aplikacjach przez Kenera, Bieberta, Schmidta-Sommerfelda i wsp. [77, 88]. Na znakowane cząsteczki [^3H]-L-karnityny zostają przeniesione grupy acylowe z oznaczanych acylokarnityn w reakcji katalizowanej przez acetylotransferazę karnitynową (CAT), a następnie uzyskane acylo- ^3H -karnityny rozdzielane są chromatograficznie metodą HPLC z wykorzystaniem beta-przepływowego detektora scyntylicyjnego.

Metoda *radio-exchange*, wykorzystywana do oznaczania acylokarnityn, jest określana jako wyjątkowo czuła i dająca bardzo dobre wyniki w analizie krótko- i średniołańcuchowych estrów. W przypadku uogólnienia stosowania tej metody dla wszystkich estrów karnityny i kwasów tłuszczowych wielu autorów [46, 49] krytykuje ją ze względu na ograniczoną specyficzność substratową enzymu CAT, który nie katalizuje reakcji z udziałem estrów kwasów dikarboksylowych oraz mających rozgałęzione łańcuchy, możliwość inhibicji CAT przez niektóre specy-

ficzne estry karnityny obecne w próbce, a także obecność aktywności hydrolazy acylokarnitynianowej w handlowych preparatach enzymu CAT [89]. Jednakże zdaniem Schmidta-Sommerfelda i wsp. [90] w warunkach pomiarowych aktywność hydrolazy acylokarnitynianowej nie wpływa znacząco na uzyskiwane wyniki. Spośród innych wad metody *radio-exchange* należy wymienić kilkakrotnie dłuższy czas przygotowania próbki i rozdzału chromatograficznego niż dla metod HPLC z pomiarem UV [91] oraz uzyskiwanie takiej samej czułości jak w metodach HPLC/UV [92].

Acylokarnityny, podobnie jak sama cząsteczka L-karnityny, są związkami nietłymi i o silnych właściwościach polarnych. Mimo tych ograniczeń także dla nich opracowano metody identyfikacji i oznaczania techniką chromatografii gazowej, wymagające wstępnej reakcji przekształcenia ich w lotne związki. Bieber i Kerner [93] zaproponowali wykorzystanie alkalicznej hydrolizy acylokarnityn w łagodnych warunkach, a uwolnione kwasy tłuszczowe były wprowadzane na kolumnę chromatograficzną i oznaczane przy użyciu płomieniowego detektora jonizacyjnego. Jednakże metoda ta nie potwierdza powiązania oznaczanych kwasów z obecnością acylokarnityn w badanej próbce ze względu na możliwość współwystępowania także innych źródeł grup acylowych. Modyfikacja zaproponowana przez Kumpsa i wsp. [94] polega na oddzieleniu acylokarnityn z próbki za pomocą ekstrakcji przy wykorzystaniu kolumn wypełnionych silnym kationitem.

Inny sposób przygotowania acylokarnityn do oznaczania metodą GC zaproponowali Lowes i Rose [83, 95]. Derywacja polega na cyklizacji cząsteczek do β -acyloksylaktonów w podwyższonej temperaturze w obecności diizopropyletyloaminy w środowisku acetonitrylu według reakcji, której schemat przedstawiono na rys. 4.



Rys.4. Schemat otrzymywania acyloksylaktonu z *O*-acylokarnityny

Otrzymane w ten sposób acyloksylaktony rozdzielane są chromatograficznie metodą GC i oznaczane przy użyciu detektora spektrometrii masowej. Cyklizacja pozwala dobrze rozdzielić badane związki, przy czym na szczególną uwagę zasługuje etap przygotowania próbki do rozdzału. Całkowite odparowanie rozpuszczalnika reakcyjnego (acetonitrylu) prowadzi bowiem do strat najbardziej lotnych acyloksylaktonów: acetylowego i propionylowego [95].

Huang i wsp. [84] zaproponowali inny sposób derywatywacji acylokarnityn. Najpierw są one przekształcane w estry *n*-propylowe, a następnie wprowadzane na kolumnę chromatograficzną, gdzie następuje termolityczna *N*-demetylacja pochodnej. W wyniku tego rejestruje się za pomocą detektora spektrometrii masowej acylokarnityny jako odpowiadające im estry propylowe acylo-*N*-demetylokarnityn. Opisana metoda charakteryzuje się dobrym rozdziałem badanych związków, wysoką czułością oraz krótkim czasem derywatywacji i rozdziału chromatograficznego próbki. Wadą metody jest częściowa termiczna degradacja acylokarnityn do estrów kwasów karboksylowych podczas analizy związków z długołańcuchowymi resztami acylowymi (> C₁₄).

PODSUMOWANIE

Na podstawie przeglądu literatury można stwierdzić, że oznaczanie karnityny w formie wolnej lub związanej w formie *O*-acylowych pochodnych sprawia wiele trudności.

Metody oznaczania L-karnityny, opracowane z wykorzystaniem enzymów, zwykle acetylotransferazy karnitynianowej, są najczęściej stosowane. Metody te ze względu na wrażliwość enzymów na czynniki zewnętrzne, w tym również obecność innych związków chemicznych znajdujących się w próbce biologicznej, mogą być obciążone błędami.

Wielu badaczy oznaczało karnitynę chromatograficznie ze spektrofotometryczną lub fluorymetryczną detekcją. Czułość tych metod jest jednak często zbyt niska w przypadku próbek biologicznych, a poza tym otrzymanie odpowiednich pochodnych karnityny jest czasem bardzo trudne.

Rzadko stosowane metody analityczne, takie jak np. spektroskopia masowa, ze względu na niewielką dostępność aparatury oraz wysokie koszty, również niezbyt nadają się do rutynowych analiz próbek biologicznych.

Kwestia opracowania efektywnej metody oznaczania karnityny pozostaje więc otwarta.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] J. D. McGeary, D.W. Foster, *Free and esterified carnitine. Radiometric method*, [w:] *Methods of Enzymatic Analysis*, H.U. Bergmayer (ed.), III wyd., vol. VIII, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim 1985, 474–481.
- [2] G.P. Mannaerts, L.F. Debeer, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1982, **386**, 30.
- [3] H. Ishii, S. Ishii, M. Kazama, T. Suga, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1983, **226**, 484.
- [4] C.J. Rebouche, D.D. Panagides, S.E. Nelson, *Am. J. Clin. Nutr.*, 1990, **52**, 820.
- [5] C. Vianey-Liaud, P. Divry, N. Gregersen, M. Mathieu, *J. Inher. Metab. Dis.*, 1987, **10**, 159.
- [6] S. Bączyk, Ł. Szczęśniak, *Racjonalne żywienie człowieka*, PWN, Warszawa 1990.
- [7] C.J. Rebouche, *Am. J. Clin. Nutr.*, 1991, **117**, 1147.
- [8] A.G. Engel, C.J. Rebouche, *J. Inher. Metab. Dis.*, 1984, **7**, 38.

- [9] K. Lombard, A. Olson, S. Nelson, C. Rebouche, *Am. J. Clin. Nutr.*, 1989, **50**, 301.
- [10] C. Angelini, S. Lucke, F. Cantarutti, *Neurology*, 1979, **30**, 611.
- [11] A.G. Feller, D. Rudman, *J. Nutr.*, 1988, **118**, 541.
- [12] C. Kanaka, B. Schutz, K.A. Zuppinger, *Eur. J. Pediatr.*, 1992, **31**, 819.
- [13] W. Łysiak-Szydłowska, *Pediatrica Polska*, 1994, **61**, 351.
- [14] S.C. Winter, L.S. Linn, E. Heltan, S.J.E. Taylor, *Carnitine deficiency in paediatrics*, [w:] *L-carnitine*, R. Ferrari, S. DiMauro, G. Sherwood (eds.), Academic Press, London 1992.
- [15] O.H. Wieland, T. Deufel, I. Paetzke-Brunner, *Free and esterified carnitine. Colorimetric method*, [w:] *Methods of Enzymatic Analysis*, H.U. Bergmayer (ed.), III wyd., vol. VIII, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim 1985, 481–488.
- [16] G. Cederblad, J. Carlin, D. Constantin-Teodosiu, P. Harper, E. Hultman, *Anal. Biochem.*, 1990, **185**, 274.
- [17] G. Fraenkel, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1954, **50**, 486.
- [18] S. Friedman, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1958, **75**, 24.
- [19] N.R. Marquis, I.B. Fritz, *J. Lipid. Res.*, 1964, **5**, 184.
- [20] I.B. Fritz, S.K. Schultz, *J. Biol. Chem.*, 1965, **240**, 2188.
- [21] F.P.W. Tagelaers, M.G. Pickkers, P.J. Seelen, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 1990, **27**, 967.
- [22] T. Deufel, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 1990, **28**, 307.
- [23] G. Cederblad, P. Harper, K. Lindgrel, *Clin. Chem.*, 1986, **32**, 342.
- [24] T. Bohmer, A. Rydning, H.E. Solberg, *Clin. Chim. Acta*, 1974, **22**, 1589.
- [25] S. Rodriguez-Segade, C.A. Peña, J.M. Paz, R.D. Rio, *Clin. Chem.*, 1985, **31**, 754.
- [26] Z.K. Shihabi, K.S. Oles, C.P. McCormick, J.K. Penry, *Clin. Chem.*, 1992, **38**, 1414.
- [27] A.L. Carter, T.O. Abney, H. Braver, A.H. Chuang, *Clinical Aspects of Human Carnitine Deficiency*, P.R. Borum (ed.), Pergamon Press, New York 1986.
- [28] P.E. Minkler, C.L. Hoppel, *Clin. Chim. Acta*, 1992, **212**, 55.
- [29] P.E. Minkler, E.P. Brass, W. Hiatt, S.T. Ingalls, C.L. Hoppel, *Anal. Biochem.*, 1995, **231**, 315.
- [30] P.E. Minkler, S.T. Ingalls, C.L. Hoppel, *Anal. Biochem.*, 1990, **185**, 29.
- [31] G. Cederblad, S. Lindsteadt, *Clin. Chim. Acta*, 1972, **37**, 235.
- [32] A. Sandor, J. Cseko, I. Alkonyi, *J. Chromatogr.*, 1989, **497**, 250.
- [33] A. Marzo, G. Cardace, N. Monti, S. Muck, E. Arrigoni Martelli, *J. Chromatogr.*, 1990, **527**, 247.
- [34] R.Z. Christiansen, J. Bremer, *FEBS Lett.*, 1978, **86**, 99.
- [35] R. Parvin, S.V. Pande, *Anal. Biochem.*, 1977, **79**, 190.
- [36] J.D. McGarry, D.W. Foster, *J. Lipid Res.*, 1976, **17**, 277.
- [37] R. Voeffray, J.C. Perlberger, L. Tenuud, *Helv. Chim. Acta*, 1987, **70**, 2058.
- [38] D.S. Roe, N. Terada, D.S. Millington, *Clin. Chem.*, 1992, **38**, 2215.
- [39] A. Galan, A. Padros, M. Arambarri, S. Martin, *J. Autom. Chem.*, 1998, **20**, 23.
- [40] D.J. Pearson, P.K. Tubbs, J.F.A. Chase, *Carnitine and acylcarnitines*, [w:] *Methods of Enzymatic Analysis*, H.U. Bergmayer (ed.), II wyd., vol. IV, Academic Press, New York 1974, 1758–1771.
- [41] J. Schäfer, H. Reichmann, *Clin. Chim. Acta*, 1989, **182**, 87.
- [42] *L-carnitine. Enzymatic UV test for the determination of L-carnitine in seminal plasma, serum or urine*, Roche, Cat. No. 1 242 008.
- [43] M. Takahashi, S. Ueda, H. Misaki, N. Sugiyama, K. Matsumoto, N. Matsuo, S. Murao, *Clin. Chem.*, 1994, **40**, 817.
- [44] A. Marzo, N. Monti, M. Ripamonti, E. Arrigoni Martelli, *J. Chromatogr.*, 1988, **459**, 313.
- [45] P.E. Minkler, S.T. Ingalls, C.L. Hoppel, *J. Chromatogr.*, 1987, **420**, 385.
- [46] T.A.T.G. Van Kempen, J. Odle, *J. Chromatogr.*, 1992, **584**, 157.
- [47] A.K.M.J. Bhuiyan, K. Bartlett, *Biochem. Soc. Trans.*, 1988, **16**, 796.
- [48] B.J.H.M. Poorthuis, T. Jille-Vlčková, W. Onkenhout, *Clin. Chim. Acta*, 1993, **216**, 53.

- [49] P.E. Minkler, C.L. Hoppel, J. Chromatogr. B, 1993, **613**, 203.
- [50] T. Yoshida, A. Aetake, H. Yamaguchi, N. Nimura, T. Kinoshita, J. Chromatogr., 1988, **445**, 175.
- [51] K. Nakaya, K. Funabiki, K. Shibata, H. Muramatsu, M. Matsui, Bull. Chem. Soc. Jpn., 1996, **69**, 2961.
- [52] K. Matsumoto, Y. Ichitani, N. Ogasawara, Y. Hidetaka, K. Imari, J. Chromatogr. A, 1994, **678**, 241.
- [53] N. Kuroda, Y. Ohyama, K. Nakashima, K. Nakashima, S. Akiyama, Chem. Pharm. Bull., 1996, **44**, 1525.
- [54] K. Nakaya, K. Funabiki, H. Muramatsu, K. Shibata, M. Matsui, Dyes Pigm. 1999, **43**, 235.
- [55] H. Kamimori, Y. Hamashima, M. Konishi, Anal. Biochem., 1994, **218**, 417.
- [56] M. Kobayashi, E. Ichishima, Anal. Biochem., 1990, **189**, 122.
- [57] J. Longo, G. Bruno, S. Curti, A. Mancinelli, G. Miotto, J. Chromatogr. B, 1996, **686**, 129.
- [58] K. Matsumoto, M. Takahashi, N. Takiyama, H. Misaki, N. Matsuo, S. Murano, H. Yuki, Clin. Chim. Acta, 1993, **216**, 135.
- [59] K. Matsumoto, Y. Yamada, M. Takahashi, T. Todoroki, K. Mizoguchi, H. Misaki, H. Yuki, Clin. Chem., 1990, **36**, 2072.
- [60] A. Manjón, J.M. Obón, J.L. Iborra, Anal. Biochem., 2000, **281**, 176.
- [61] L.M. Lewin, A. Pershin, B. Sklar, Anal. Biochem., 1975, **68**, 531.
- [62] G. Bosi, M.S. Refrigeri, Rass. Chim., 1983, **35**, 421.
- [63] J.A. Montgomery, O.A. Mamer, Anal. Biochem., 1989, **176**, 85.
- [64] F. Inuoe, N. Terada, H. Nakajima, M. Okochi, N. Kodo, Z. Kizaki, A. Kinugasa, T. Sawada, J. Chromatogr. B., 1999, **731**, 83.
- [65] R.D. Stevens, S.L. Hillman, S. Worthy, D. Sanders, D.S. Millington, Clin. Chem., 2000, **46**, 727.
- [66] C.R. Roe, D.S. Millington, D.A. Maltby, [w:] *Clinical Aspects of Human Carnitine Deficiency*, Borum P.R. (ed.), Pergamon, New York 1986, 97-107.
- [67] D.S. Millington, D.L. Norwood, N. Kodo, C.R. Roe, F. Inoue, Anal. Biochem., 1989, **180**, 331.
- [68] N. Kodo, D.S. Millington, D.L. Norwood, C.R. Roe, Clin. Chim. Acta, 1989, **186**, 383.
- [69] J. Soupe, M. Comtat, P. Goulas, Fr Demande FR 2 596 865, 1987.
- [70] M. Comtat, M. Galy, P. Goulas, J. Soupe, Anal. Chim. Acta. 1988, **208**, 295.
- [71] C. Mardones, N. Vizioli, C. Carducci, A. Rios, M. Valcárcel, Anal. Chim. Acta, 1999, **382**, 23.
- [72] L. Vernez, W. Thormann, S. Krähenbühl, J. Chromatogr. A., 2000, **895**, 309.
- [73] S. Kiessig, C. Vogt, J. Chromatogr. A, 1997, **781**, 475.
- [74] K. Heinig, J. Henion, J. Chromatogr. B, 1999, **735**, 171.
- [75] Y. Deng, J. Henion, J. Li, P. Thibault, C. Wang, D.J. Harrison, Anal. Chem., 2001, **73**, 639.
- [76] Y. Deng, H. Zhang, J. Henion, Anal. Chem., 2001, **73**, 1432.
- [77] E. Schmidt-Sommerfeldt, D. Penn, J. Kerner, L.L. Bieber, Clin. Chim. Acta, 1989, **181**, 231.
- [78] N. Takeyama, D. Takagi, K. Adachi, T. Tanaka, Anal. Biochem., 1986, **158**, 346.
- [79] R. Dugan, M. Schmidt, G. Hoganson, J. Steele, B. Gilles, A. Shug, Anal. Biochem., 1987, **160**, 275.
- [80] K. Kidouchi, N. Sugiyama, H. Morishita, Y. Wada, S. Nagai, J. Sakakibara, J. Chromatogr., 1987, **423**, 297.
- [81] D.J. Liberato, D.S. Millington, A.L. Yergey, Anal. Chem. Symp. Ser., 1985, **24**, 333.
- [82] C. Tallarico, S. Pace, A. Longo, Rapid Commun. Mass Spectrom., 1998, **12**, 403.
- [83] S. Lowes, M.E. Rose, Analyst, 1990, **115**, 511.
- [84] Z.H. Huang, D.A. Gage, L.L. Bieber, C.C. Sweeley, Anal. Biochem., 1991, **199**, 98.
- [85] J.F. Van Bocxlaer, A.P. De Leenheer, Clin. Chem., 1993, **39**, 1911.
- [86] C.G. Costa, E.A. Struys, A. Bootsma, H.J. Brink, L. Dorland, I. Tavares de Almeida, M. Duran, C. Jacobs, J. Lipid Res., 1997, **38**, 173.

- [87] D. Cyr, R. Giguere, Y. Giguere, B. Lemieux, *Clin. Biochem.*, 2000, **33**, 151.
- [88] J. Kerner, L.L. Bieber, *Anal. Biochem.*, 1983, **134**, 459.
- [89] F. DiLisa, N. Siliprandi, R. Barbato, R. Beanbo, G. Finocchiaro, *FASEB J.*, 1992, **6**, A1383.
- [90] E. Schmidt-Sommerfeld, D. Penn, P. Rinaldo, D. Kossak, B. Li, Z. Huang, D. Gage, *Pediatr. Res.*, 1992, **31**, 545.
- [91] P.E. Minkler, S.T. Ingalls, C.L. Hoppel, *J. Chromatogr. B*, 1994, **652**, 119.
- [92] P.E. Minkler, C.L. Hoppel, *Anal. Biochem.*, 1993, **212**, 510.
- [93] L.L. Bieber, J.J. Kerner, *Methods Enzymol.*, 1986, **123**, 264.
- [94] A. Kumps, P. Duez, Y. Mardens, *J. Chromatogr. B*, 1994, **658**, 241.
- [95] S. Lowes, M.S. Rose, G.A. Mills, R.J. Pollitt, *J. Chromatogr.*, 1992, **577**, 205.

Praca wpłynęła do Redakcji 18 maja 2001

FELIETON NAUKOWY



NOTATKI CHAOTYCZNE

XXXIX. O MELATONINIE, SEROTONINIE I BUFOTENINIE

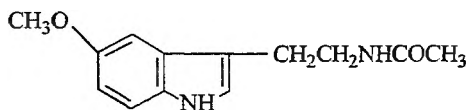
Ignacy Z. Siemion

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



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

Gazety codzienne, zwane teraz publikatorami, co pewien czas serwują nam nową sensację z nauk chemicznych. Podnoszą krzyk, że nareszcie znaleziono cudowny eliksir młodości albo panaceum na wszelkie dolegliwości. Ta wrzawa dość szybko jednak cichnie, a sensacja ulega zapomnieniu. Po jakimś zaś czasie pojawia się, oczywiście, następna, nowa sensacja. Przed kilku laty na łamach prasowych pełno było melatoniny. Dzisiaj jest ona powszechnie dostępna i można ją bez recepty kupić sobie w aptece, a wrzawa wokół niej zupełnie przycichła. W czasie zaś, gdy o niej wszędzie mówiono, miałem taką z nią przygodę. Na posiedzeniu Centralnej Komisji (tej od stopni i tytułu naukowego) podszedł do mnie profesor Józef Szarawara, fizykochemik z Politechniki Gliwickiej. Profesor Szarawara wyróżniał się w naszym gronie ciągłą gotowością do zdobywania nowych wiadomości z chemii i nauk pokrewnych. Dyskusje nad poszczególnymi „sprawami” wykorzystywał, by od referujących te sprawy dowiedzieć się czegoś nowego dla siebie. Był więc nie lada kłopotem dla superrecenzentów Komisji. A wtedy podszedł do mnie i zapytał: co to właściwie chemicznie jest ta melatonina? Potrafisz mi napisać jej wzór cząsteczkowy? Pamiętałem ten wzór, ale trochę nie po kolei. Napisałem z jakimś, jak jeszcze pamiętam, błędem. Więc teraz wracam do tej sprawy. Nie mogę przecież pozostać ze świadomością tego (małego) grzechu chemicznego. No i muszę przecież profesorowi Szarawarze przedstawić wzór poprawny. Oto on:

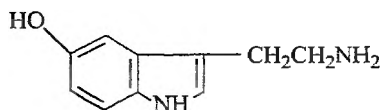


Melatonina

Jak, widzimy, melatonina jest *N*-acetylo-5-metoksytryptaminą. Jeszcze w 1958 r. wyizolowano ją z szyszynki cieląt i rok później określono jej budowę chemiczną.

Melatoninę można by nazwać hormonem dobrego samopoczucia. Jej sekrecja z szyszynki, gdzie jest produkowana, mocno wzrasta podczas snu i zmniejsza się w czasie czuwania. W naszych organizmach istnieje, regulowany zmianą: dzień–noc, dobowy cykl zmian poziomu melatoniny. Jest ona ważną częścią naszego zegara biologicznego, którego sprężynę nakręca wrażliwość na światło. O zmierzchu zanikają odbierane przez siatkówkę oka bodźce świetlne. Sygnały z siatkówki przekazywane są za pośrednictwem komórek nerwowych do szyszynki. Ich brak powoduje wzrost syntezy melatoniny.

Substratem w biosyntezie melatoniny jest serotonina, inna, odrobinę wcześniej poznana pochodna tryptaminy. W swoim czasie, a było to na przełomie lat 50. i 60. ubiegłego wieku, było wokół serotoniny sporo wrzawy, jak później wokół melatoniny. Serotonina to jeden z najważniejszych neurotransmiterów, tj. przekaźników sygnałów nerwowych.



Serotonina

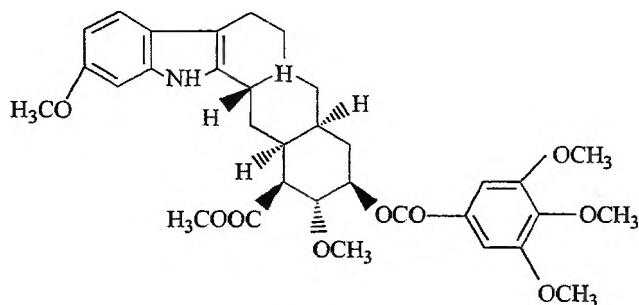
Jak wskazuje podany wzór strukturalny serotoniny, przekształcenie jej w melatoninę wymaga acetylowania grupy aminowej i eteryfikacji grupy hydroksylowej. Za te dwie reakcje odpowiedzialne są dwa enzymy: *N*-acetylotransferaza i metylotransferaza hydroksyindolowa. Przebieg biosyntezy melatoniny limituje aktywność acetylotransferazy. Aktywność tego enzymu bardzo mocno wzrasta nocą. U szczurów nawet 50- lub 100-krotnie. Produkowany i wydzielany do światła naczyń hormon jest szybko transportowany do wszystkich innych tkanek. W ten sposób szyszynka przekazuje wszystkim innym komórkom organizmu sygnał: już noc! pora spać! Dzieje się to, jak powiedziałem, bardzo szybko. Bo melatoninę zawierają wszystkie płyny ustrojowe, nie tylko krew, ale i płyn mózgowo-rdzeniowy, seminalny i follikularny. W ten sposób każda komórka organizmu poddawana jest fotoperiodycznemu rytmowi dobowemu.

„Melatonina – czytamy w ciekawym artykule R.J. Reitera [1] – pełni funkcję »oka« dla organów, które same przez się nie mogą bezpośrednio reagować na światło”. Zapamiętajmy tę wypowiedź, chociaż, dokładnie mówiąc „okiem” jest tu nie tyle melatonina, co produkujący ją narząd – szyszynka. Po operacyjnym usunięciu szyszynki zwierzęta tracą możliwość fizjologicznego przystosowania się do zmian pór roku, stają się „asezonowe”.

Swoją nazwę zawdzięcza melatonina wywoływanemu przez nią efektowi rozjaśniania czarnego ubarwienia skóry płazów. Działa więc wprost przeciwnie niż peptydowy hormon przysadki mózgowej, melanotropina (MSH). Produkcja melatoniny spada u człowieka wraz z wiekiem. Dlatego przypadki bezsenności nocnej, jakie występują u ludzi po 60. roku życia, leczy się podawaniem melatoniny. Trwają rozliczne badania nad wpływem melatoniny na wzrost tkanek nowotworowych, w chorobie Alzheimera i chorobie Parkinsona, w osteoporozie itd., a więc w licznych stanach patologicznych, znamionujących starość. Dietetycy radzą, aby niedomiar hormonu uzupełniać dietą. Duże ilości melatoniny znajdują się w ryżu, mięsie, jęczmieniu, a zwłaszcza w kukurydzy, płatkach owsianych i brokułach.

Inaczej wyglądają sprawy serotoniny. Można by ją nazwać hormonem aktywności. Wywołuje ona skurcz mięśni gładkich, wzmacnia częstotliwość oddechu, a zwężając naczynia krwionośne powoduje wzrost ciśnienia krwi. W swoim czasie wyizolowano ją z surowicy krwi wołu. Duże jej ilości znajdują się w tkance mózgowej i śledzionie. Ale – co ciekawe – bardzo obficie występuje np. w bananach. Dlatego przy diecie „wysokobananowej” (jaką miewają np. mieszkańcy strefy tropikalnej) można popaść w chorobę nadciśnieniową. Zwłaszcza wówczas, gdy równocześnie bierze się leki, będące inhibitorami aminoksydazy. Bo

enzym ten może właśnie usuwać nadmiar serotoniny w organizmie. Poziom serotoniny w tkankach obniża silnie podawanie alkaloidu rauwolfium, rezerpiny. Rezerpina powoduje uwalnianie serotoniny z tkanek do światła naczyń krwionośnych, gdzie jest ona szybko metabolizowana. Stąd bierze się antyhipertensyjne działanie rezerpiny. We wzorze cząsteczkowym rezerpiny łatwo można dostrzec fragment, będący podstawioną w pozycji 6 tryptaminą:



Rezerpina

Sama szyszynka jest niewielkim gruczołem, ułożonym pomiędzy obydwojma półkulami mózgowymi, w potylicznej części mózgu. Jak mogliśmy się przekonać, jej rola w gospodarce organizmu ludzkiego jest niebagatelna. Dlatego może nas dziś zdumiewać przeczucie, jakie miał Kartezjusz, w szyszynce właśnie umieszczając główne siedlisko duszy. Niematerialna dusza w szyszynce miała się kontaktować z materialnymi już „tchnieniami żywymi”, powodując odpowiednie ich działania. Najlepiej zresztą będzie, jak zaglądnijemy do właściwego fragmentu traktatu Kartezjusza *Namiętność duszy*, który ukazał się na rok przed śmiercią filozofa, w roku 1649:

Artykuł XXXI

W mózgu istnieje mały gruczoł, w którym dusza wykonuje swe funkcje w sposób bardziej szczególny niż w innych częściach ciała

Należy również wiedzieć, że chociaż dusza jest związana z ciałem, istnieje w nim pewna część, w której wykonuje ona swe funkcje w sposób bardziej szczególny niż we wszystkich innych; mniema się zazwyczaj, iż częścią tą jest mózg albo może serce; mózg dlatego, że w nim kończą się narządy zmysłowe, serce zaś dlatego, że w nim to jakby doznaje się uczuć. Lecz po dokładniejszym zbadaniu tej sprawy wydaje mi się, że poznałem z oczywistością, iż ową częścią ciała, w której dusza wykonuje swoje funkcje bezpośrednio, nie jest wcale serce ani też cały mózg, ale jedynie najbardziej wewnętrzna jego część, a jest nią pewien mały gruczoł, znajdujący się w środku substancji mózgowej i tak umieszczony ponad przewodem, przez który tchnienia życiowe z przednich jego jam łączą się z tchnieniami jam tylnych, że najmniejszy jego ruch wielce może wpłynąć na zmianę biegu owych tchnień i, na odwrót, najmniejsza zmiana biegu tchnień może wielce wpłynąć na zmianę ruchów tego gruczołu.

Artykuł XXXII

W jaki sposób się poznaje, że ów gruczoł jest główną siedzibą duszy

O tym, iż dusza wykonuje bezpośrednio swoje funkcje w tym gruczole, a nie gdzie indziej w ciele, przekonuje mnie to, że, jak zauważam, wszystkie inne części naszego mózgu są

podwójne, podobnie jak nasze oczy, ręce, uszy i wszelkie narządy naszych zmysłów zewnętrznych, ponieważ zaś o jakiejś rzeczy w tym samym czasie mamy jedną tylko i prostą myśl, musi przeto istnieć jakieś miejsce, gdzie podwójne obrazy wzrokowe lub inne podwójne wrażenia jakiegoś pojedynczego przedmiotu, pochodzące od podwójnych narządów innych zmysłów, mogłyby się połączyć w jedno, zanim podążą do duszy, aby jej nie przedstawiały dwóch przedmiotów zamiast jednego. Można więc łatwo zrozumieć, że owe obrazy lub inne wrażenia łączą się w tym gruczole za pośrednictwem tchnień życiowych, które wypełniają jamy mózgu, i nie ma żadnego innego miejsca w ciele, gdzie by one mogły się tak łatwo zjednoczyć, jak w tym właśnie gruczole [2].

Pomińmy dalsze, interesujące zresztą, wywody filozofa o tym, jak dusza i ciało działają na siebie nawzajem. Jest tam wiele domysłów, które można by uważać za prekursorskie względem dzisiejszej nauki o przewodzeniu bodźców nerwowych. Odwaga, z jaką wielki ten filozof brał się za rozstrzygnięcie najsubtelniejszych spraw organizacji funkcjonowania żywego organizmu, może dziś zdumiewać. Ale były to czasy, kiedy spekulacja naukowa czy filozoficzna wyżej była ceniona niż wyniki raczkujących badań eksperymentalnych.

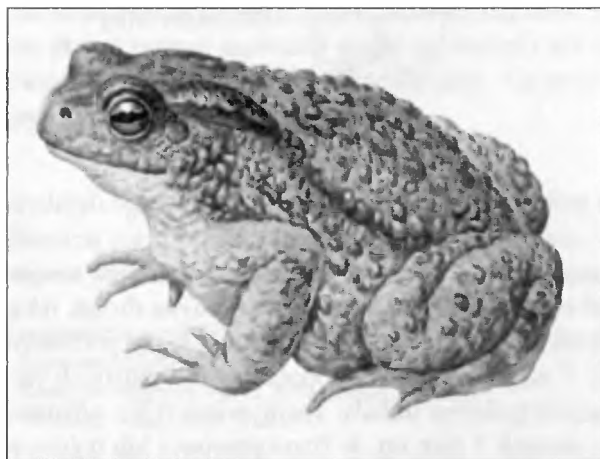
Dodajmy jeszcze, że przekonanie o specjalnej i ważnej roli szyszynki w organizmie ludzkim utrzymywało się długo potem. Traf chciał, że zbierając materiał do tej notatki, trafiłem przypadkowo na ślad takich przekonań zapisany we wspomnieniach Rauschninga. Rauschning był w latach 30. ubiegłego wieku prezydentem Senatu Wolnego Miasta Gdańska. Początkowo sympatyzował z nabierającym siły ruchem hitlerowskim. Hitlerowi też zależało na całkowitym zjednaniu sobie gdańskiego polityka. Zapraszał Rauschninga do Kancelarii Rzeszy i prowadził z nim długie rozmowy, wyjawiając mu swe plany polityczne. Plany te przeraziły Rauschninga. Porzucił swój urząd i udał na emigrację, gdzie niedowierzającemu światu usiłował powiedzieć prawdę o brunatnej zarazie. Referując swoje rozmowy z Hitlerem zapisał m.in.:

Hitler uważał, że fundamentem jego wizji jest mistyczna biologia czy też raczej biologiczna mistyka [...] Według niego celem dalszego rozwoju człowieka miała być zdolność „magicznego widzenia” [...] Rozprowiał o pewnym monachijskim uczonym, który oprócz fachowych książek naukowych napisał kilka ciekawych rzeczy na temat pierwotnego świata, legend i ludzkości, o wizjonerskich zdolnościach dawnych ludzi, o formie poznania oraz nadnaturalnej w naszym odczuciu władzy nad racjonalnymi prawami przyrody. Mówił coś o „oku cyklopa”, niewidzialnym potylicznym oku, które było kiedyś narządem magicznej łączności z Wszechświatem, a dziś zachowało się tylko w skarłatej formie szyszynki [3].

Szyszynka jako trzecie oko. Czy to nam nie przypomina tego, co dziś o szyszynce i melatoninie wiemy? Inna rzecz, iż zdumiewa, dokąd to trafiły fantazje fizjologiczne Kartezjusza.

Historia związków naturalnych, zawierających układ 5-hydroksytryptaminowy, nie zaczyna się zresztą od serotoniny i melatoniny. Rozpoczęły ją na początku lat 30. ubiegłego wieku badania nad bufoteniną. Autorem tych badań był Heinrich Wieland (1877–1957). Wieland otrzymał w 1927 r. Nagrodę Nobla za „badania nad budową kwasów żółciowych i związków pokrewnych”. Domeną jego prac chemicznych była więc chemia steroidów. Ale jego zainteresowania

badawcze były szerokie: miał poważne osiągnięcia w zakresie metody syntezy organicznej i w chemii alkaloidów. Na początku lat 30. podjął dwa nowe wątki badawcze: zajął się wydzieleniem i oznaczeniem budowy chemicznej toksycznych związków produkowanych przez ropuchę *Bufo bufo* oraz jeszcze bardziej groźnych substancji występujących w tkankach muchomor zielonego *Amanita*

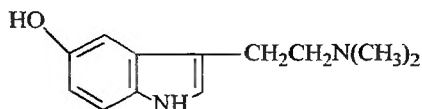


Ropucha szara (*Bufo bufo*) – M. Młynarski, *Plazy i gady*
Polski. Atlas, Warszawa 1996

phalloides. W tamtych latach nie było jeszcze szybkich i nieinwazyjnych metod spektroskopowych badania struktury cząsteczek organicznych. Badania struktury opierały się na żmudnych procedurach „odbudowy chemicznej”. Terminu „odbudowa” nie znają już młodzi chemicy. Oznaczał on stopniową i planową degradację cząsteczek badanego związku. Analizując rodzaj produktów degradacji, jakie powstawały podczas określonych reakcji chemicznych, można było stopniowo odtworzyć wszystkie elementy budowy wyjściowych cząsteczek. Była to więc czysto chemiczna droga postępowania, droga, która dziś często urzeka arcyinteligentnym doбором użytych reakcji, jak i w ogóle finezją, chemicznego rozumowania. Badania takie miały jednak swoją piętę Achillesa. Wymagały znacznych ilości oczyszczonych substancji naturalnych. Chemik musiał dysponować dużą ilością materiału badawczego.

Przygotowując atak na toksyny ropuchy spowodował więc Wieland, by w okolicy Freiburga w Bryzgowii odłowiono 27 tys. tych zwierząt. Z ich gruczołów, które znajdują się z tyłu głowy, za oczami, wyciśnięto zjadliwą wydzielinę. Nie było to trudne, z gruczołu podrażnionego pręcikiem szklanym wystrzeliwuje strumień żrącej cieczy, silnie drażniącej błony śluzowe, m.in. oka. Dlatego badacze podczas tej operacji musieli chronić oczy okularami. Pamiętam, jak w dzieciństwie osobiście poznałem na sobie działanie tej wydzieliny. W ciemnej piwnicy nadepnąłem nieostrożnie na ropuchę i zostałem obłany tym płynem. Szyb-

ko pobiegłem obmyć się do strumienia i był to najstosowniejszy sposób postępowania. Z wydzieliny 27 tys. ropuch, które zresztą po opisanej operacji wypuszczano na wolność, wyizolował zespół Wielanda 5,5 g czystej substancji, którą nazwano bufoteniną. Okazało się, że jest to *N,N*-dimetyloserotonina:



Bufotenina

Bufotenina jest silnym środkiem halucynogennym, o działaniu podobnym do działania LSD i meskaliny. Najtrudniejszą częścią prac, prowadzących do ustalenia budowy cząsteczkowej bufoteniny, było oznaczenie miejsca podstawienia pierścienia indolowego grupą hydroksylową. Jediną drogą, jaką można było tu pójść, była synteza organiczna. Wieland uważał [4], że podstawienie pierścienia w pozycji 4 lub 7 jest mało prawdopodobne. Bo w znanych już wtedy alkaloidach, zawierających podobne układy, znajdowano tylko substancje podstawione hydroksylem w pozycji 5 (jak np. w fizostygmynie) lub 6 (jak w harminie), ale nigdy w pozycjach 4 bądź 7. Więc podstawienie w pozycji 5 lub 6 bufoteniny wydawało się Wielandowi bardziej prawdopodobne. Prace syntetyczne rozpoczęto od syntezy 6-hydroksypochoďnej *N,N*-dimetylotryptaminy. I tu czekało badaczy rozczarowanie. Wprawdzie temperatura topnienia, rozpuszczalność i postać krystaliczna otrzymanej soli tetrametyloamoniowej syntetycznego produktu były zgodne z danymi dla analogicznej pochoďnej bufoteniny, ale oba produkty, zmieszane ze sobą, dawały bardzo duŹe obniŹenie temperatury topnienia, sięgające 40 °C. Nie były to więć związki identyczne. W tej sytuacji zabrał się Wieland do syntezy 5-hydroksypochoďnej i tu trafił właściwie.

W pracach Wielanda nad bufoteniną uczestniczył jego syn, Theodor, później bardzo wybitny chemik peptydowy. W 1937 r. doktoryzował się on u swego ojca. Ich wspólne badania dotyczyły innego składnika wydzieliny ropuchy, bufotioniny [5]. Ale jak już powiedzieliśmy, w tym samym czasie, kiedy zespół Wielanda rozpoczął prace nad toksynami ropuchy, zajął się on również toksynami zielonego muchomora. Ta tematyka była znacznie trudniejsza. Heinrich Wieland nie zaszedł w niej daleko. Stała się natomiast główną domeną prac jego syna. Na tym polu zdziałał on bardzo wiele. Nie udało mu się wprawdzie powtórzyć sukcesu Ojca – uzyskać Nagrody Nobla (otrzymał ją natomiast zięć Heinricha Wielanda, Feodor Lynen, za badania nad metabolizmem kwasów tłuszczowych), ale zdobył bardzo szerokie międzynarodowe uznanie.

I otóż, ku swemu zaskoczeniu, Theodor Wieland znalazł w tkankach innego muchomora, muchomora żółtego (*Amanita mappa*), a w śladach nawet i w tkankach „prawdziwego” muchomora, *Amanita muscaria*, bufoteninę właśnie [6].

Sprawy melatoniny i przysadki zaprowadziły nas nieoczekiwanie na manowce polityki, w stronę mętnej mistyki twórcy ruchu narodowosocjalistycznego. Nie uciekniemy od tych spraw również teraz, mówiąc o Wielandach. Heinrich Wieland był jednym z nielicznych niemieckich uczonych, którzy nie ukrywali swego niechętnego stosunku do reżimu hitlerowskiego. Odważył się nawet, jakkolwiek w ostrożny sposób, bronić swego asystenta przed sądem ludowym, ustanowionym po zamachu na Hitlera. Była to wtedy nie lada odwaga. Inna sprawa, że sąd (który zresztą skazał owego asystenta bodaj na śmierć) nie mógł sobie pozwolić na dobieranie się do skóry bądź co bądź Noblisty. Ale przecież wsadził do kryminału jego syna, Theodora.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] R.J. Reiter, *Melatonin: the chemical expression of darkness*, Mol. Cell Endocrinology, 1991, 79, C153-C158.
- [2] R. Descartes, *Namiętność duszy*, PWN, Warszawa 1986, s. 84-85.
- [3] H. Rauschnig, *Rozmowy z Hitlerem*, Iskry, Warszawa 1994, s. 260.
- [4] H. Wieland, W. Konz, H. Mittasch, Ann., 1934, 513, 1.
- [5] H. Wieland, Th. Wieland, Ann., 1937, 528, 234.
- [6] Th. Wieland, W. Motzel, Ann., 1953, 581, 10.

NOWE WYDAWNICTWA



Andrzej Molski, **Wprowadzenie do kinetyki chemicznej**, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa 2001, 159 s., oprawa miękka, cena 19 zł

Wprowadzenie do kinetyki chemicznej jest kolejnym tomem wydanym w ramach serii *Wykłady z chemii fizycznej*, publikowanej przez WNT, w której ukazało się już kilka opracowań z innych dziedzin.

W liczącym 158 stron podręczniku, w sposób bardzo skondensowany przedstawiono obszerny materiał, dotyczący podstawowych zagadnień kinetyki chemicznej. Książka składa się z 6 rozdziałów poprzedzonych wstępem oraz 4-stronicowym wykazem ważniejszych oznaczeń i symboli, ułatwiającym studiowanie prezentowanych zagadnień. Opracowanie zawiera zestaw pozycji literaturowych, pogrupowanych według prezentowanych problemów, które mogą być wykorzystane przy wyborze dalszej lektury w zależności od zainteresowań czytelnika.

Tematem pierwszych czterech rozdziałów są podstawy koncepcyjne kinetyki chemicznej.

W rozdziale 1 przedstawiono elementarne pojęcia kinetyki chemicznej, takie jak szybkość reakcji, molekularność reakcji, czas połowicznej przemiany, rząd reakcji, równanie kinetyczne, stała szybkości reakcji, mechanizm procesu itp. Zdefiniowano pojęcie kinetyki formalnej oraz zwrócono uwagę na ograniczenia w zakresie stosowalności jej zasad przy formułowaniu mechanizmów i równań kinetycznych reakcji złożonych. Omówiono wpływ temperatury na szybkość reakcji chemicznych. Na podstawie równania Arrheniusa i Eyringa przedstawiono sposoby wyznaczania termodynamicznych parametrów aktywacji.

Matematyczne metody stosowane do ilościowego opisu kinetyki reakcji zaprezentowano w rozdziale 2. Wyprowadzono i przedyskutowano kinetyczne równania szybkości prostych reakcji pierwszego, drugiego i n -tego rzędu. W oparciu o zasady kinetyki formalnej wyprowadzono odpowiednie równania szybkości dla reakcji odwracalnych, równoległych i następczych. Dla wszystkich omawianych typów reakcji zaprezentowano graficzne zależności stężeń reagentów od czasu reakcji. Szeroko stosowaną w kinetyce metodę stanów stacjonarnych omówiono na przykładzie mechanizmów Lindemanna dla reakcji jednocząsteczkowych w gazach oraz schematu Michaelisa-Menten, opisującego kinetykę reakcji enzymatycznych.

W kolejnym, 3 rozdziale Autor omawia klasyczne metody wyznaczania krzywych kinetycznych – spektroskopową, polarymetryczną, konduktometryczną, a także techniki badania reakcji szybkich metodą przepływu ciągłego oraz zatrzymanego. Omawia relaksacyjne sposoby wyznaczania szybkości reakcji równowagowych na podstawie analizy kształtu linii widmowych NMR oraz EPR i bardziej popularnej metody skoku temperatury. Dla reakcji biegnących w fazie gazowej zaprezentowana została technika wiązek skrzyżowanych.

W drugiej części tego rozdziału przedstawiono metody wyznaczania stałych szybkości i rzędów reakcji. Można je podzielić na metody wykorzystujące bezpośrednio postać równania kinetycznego (tzw. metody różniczkowe) oraz metody oparte na rozwiązaniu równań kinetycznych (tzw. metody całkowe). Przedyskutowano problem niejednoznacznej identyfikowalności modeli kinetycznych. Odpowiedź na pytanie, czy parametry modelu kinetycznego są identyfikowalne na podstawie dostępnej informacji, ma podstawowe znaczenie dla planowania eksperymentów, natomiast rozróżnialność modeli złożonych procesów odgrywa istotną rolę przy interpretowaniu danych kinetycznych i wskazuje na ograniczenia poznawcze kinetyki chemicznej.

W rozdziale 4 omówiono dwie podstawowe teorie kinetyki chemicznej, umożliwiające uporządkowanie i zrozumienie olbrzymiej liczby kinetycznych danych eksperymentalnych – teorię zderzeń, zgodnie z którą oddziaływanie chemiczne występuje przy każdym zderzeniu reagujących cząstek, jeżeli są one odpowiednio względem siebie zorientowane i mają energię wystarczającą do pokonania bariery potencjału, oraz teorię stanu przejściowego, która pozwala obliczyć szybkość reakcji, jeżeli znane są niektóre parametry charakteryzujące powierzchnię energii potencjalnej. W porównaniu z teorią zderzeń teoria stanu przejściowego jest bardziej użyteczna w rozważaniach na temat wpływu struktury reagentów i rozpuszczalnika na szybkość reakcji. Pozwala ona m.in. na interpretację wpływu siły jonowej na współczynniki aktywności reagentów i kompleksu aktywnego.

Na zakończenie rozdziału 4 omówiono elementy teorii Smoluchowskiego–Debye’a oraz Collinsa–Kimballa, dotyczące reakcji w roztworach, których szybkość ograniczona jest częściowo lub całkowicie szybkością dyfuzji. Są to reakcje, które wymagają innego modelu niż teoria stanu przejściowego i teoria zderzeń aktywnych.

Rozdział 5, zatytułowany „Wybrane zagadnienia kinetyki chemicznej”, rozpoczyna krótkie wprowadzenie do programu obliczeń symbolicznych Maple V. Programy tego typu niezwykle upraszczają rozwiązywanie problemów matematycznych (analitycznych i numerycznych) przy studio-waniu chemii fizycznej. Przykładem schematów reakcyjnych, wymagających złożonej analizy matematycznej, są reakcje oscylacyjne. Chemia procesów oscylacyjnych jest odległa od powszechnie znanych, klasycznych zasad przebiegu reakcji odwracalnych. XIX-wieczne pojęcie równowagi chemicznej nie nadaje się do jej opisu. Jest to chemia o zupełnie nowym obliczu, której matematyczna strona staje się coraz bardziej przystępna dzięki szybkiemu rozwojowi nowoczesnych technik komputerowych. Autor przedstawia wybrane modele reakcji oscylacyjnych, najstarszy – Lotki–Volterra, z jednym zmiennym w czasie stężeniem, oraz nowsze – zwane Brusselatorem i Oregonator-em, z dwoma i trzema zmiennymi stężeniami.

Dalsze rozważania poświęcone są korelacjom kinetycznym, wiążącym wartości stałych szybkości lub stałych równowag podobnych reakcji z charakterystycznymi cechami reagenta lub reakcji, np. z wielkościami termodynamicznymi. Autor omawia korelację Brønsteda, odnoszącą się do szybkości reakcji katalizowanych kwasami lub zasadami, korelację Hammetta dla reakcji *meta* i *para* podstawionych pochodnych benzenu, korelację Tefela dla reakcji elektrodowych oraz korelację Marcusa dla reakcji przeniesienia elektronu. W rozdziale tym bardzo zwięźle omówiona jest kataliza hetero- i homogeniczna (w tym kataliza kwasowo-zasadowa) oraz kinetyka reakcji enzymatycznych. Kinetykę reakcji enzymatycznych omówiono w zakresie wychodzącym poza prosty schemat Michaelisa–Menten, co niewątpliwie zainteresuje studentów specjalizujących się w zakresie chemii medycznej, biochemii i biotechnologii.

W końcowej części rozdziału omówiono mechanizm reakcji łańcuchowych w fazie gazowej i w roztworze, uwzględniając wzajemne oddziaływanie na siebie procesów cząstkowych, tj. inicjowanie, rozwijanie, rozgałęzianie i zakończenie łańcuchów, które określają ogólną kinetyczną charakterystykę reakcji.

Ostatni rozdział „Granice kinetyki chemicznej” odbiega charakterem od rozdziałów pozostałych. Omówiono w nim zagadnienia będące przedmiotem obecnie prowadzonych badań kinetycznych, co jest w zasadzie krótkim wprowadzeniem do femtochemii i spektroskopii pojedynczych cząstek. Przełomem w spektroskopii czasowo rozdzielczej było wynalezienie laserów impuls-

wych. Niezwykły postęp w generowaniu ultrakrótkich impulsów światła oraz rosnąca czułość detektorów umożliwiły zwiększenie czasowej zdolności rozdzielczej przyrządów pomiarowych od milisekund (10^{-3} s) do femtosekund (10^{-15} s). Stworzyło to nieograniczone możliwości badania dynamiki stanów przejściowych reakcji chemicznych oraz kinetyki przemian elementarnych. Najnowsze osiągnięcia w tej dziedzinie pozwalają na prowadzenie badań spektroskopowych pojedynczych cząstek w warunkach fizjologicznych, co znacznie rozszerza możliwości poznawcze biofizyki i biochemii organizmów żywych.

Książkę uważam za publikację wartościową, ponieważ ujmuje w jednym tomie wiele ważnych pojęć, które dotychczas można było znaleźć w rozległej literaturze specjalistycznej. Ujęcie tak szerokiego tematu w formie bardzo krótkiej, wymagającej dużej zwięzłości sformułowań i selekcji materiału, nie jest łatwe. Zawsze bowiem istnieje obawa wprowadzenia nieścisłości oraz niezupełnie trafnych wyrażań. Niebezpieczeństw tych Autorowi w zasadzie udało się uniknąć. Jednak konieczność znacznych uproszczeń i skrótów może mniej zaawansowanemu w tematyce czytelnikowi stwarzać trudności we właściwym zrozumieniu niektórych problemów bez korzystania z literatury uzupełniającej. Mimo drobnych usterek korektorskich książka napisana jest z dużą starannością. O trudnych zagadnieniach mówi językiem przystępnym i zrozumiałym. Poszczególne rozdziały ilustrowane są przykładami wybranych reakcji chemicznych oraz zadaniami do samodzielnego rozwiązania. Czytelnikowi pragnącemu pogłębić wiadomości poleca się podstawowe prace z dziedzin przytoczonych w spisie literatury. Proponowany materiał literaturowy wydaje się zupełnie wystarczający, chociaż w pozycji „Podręczniki do kinetyki” brakuje mi (może bardziej ze względów historycznych niż praktycznych) takich klasycznych pozycji, jak K.J. Laidlera *Chemical Kinetics*, czy też A.A. Frosta i R.G. Pearsona *Kinetics and Mechanism. A Study of Homogenous Chemical Reactions*. Pragnę również zwrócić uwagę na jedno z bardziej interesujących opracowań, R.G. Wilkinsona *Kinetics and Mechanism of Reactions of Transition Metal Complexes*, szczególnie na drugie wydanie z 1991 r., zawierające liczne przykłady mechanizmów reakcji prostych i złożonych oraz ciekawych problemów kinetycznych.

Recenzowana książka jest podręcznikiem akademickim godnym uwagi ze względu na dobór treści i jasność ich prezentowania. Adresowana jest głównie do studentów i absolwentów wydziałów chemicznych i nauk pokrewnych wyższych uczelni. Z pełnym przekonaniem polecam ją również nauczycielom akademickim oraz słuchaczom studiów doktoranckich, interesującym się problemami kinetyki i dynamiki procesów chemicznych.

Bogdan Banas

Susan McMurry, **Chemia organiczna, Rozwiązania problemów**, Tłumaczenie zbiorowe z języka angielskiego. ISBN 83-01-13373-2. PWN, Warszawa 2001. Stron 672 + 8 wstępu
Tytuł oryginału: *Study Guide and Solutions Manual for McMurry's Organic Chemistry Fourth Edition*, International Thompson Publishing Company, 1996

Książka Susan McMurry stanowi uzupełnienie znanego w Polsce podręcznika *Chemia organiczna* autorstwa Johna McMurry'ego (PWN, Warszawa 2000), szczególnie cenionego za trafnie dobrane ćwiczenia i problemy. Zawiera ona prawidłowe rozwiązania wszystkich zadań zamieszczonych w obu tomach podręcznika. Większość rozwiązań jest opatrzona celnymi i wyczerpującymi komentarzami. Pozwolą one czytelnikowi nie tylko na sprawdzenie swojej wiedzy, ale również na zapoznanie się z właściwym i pełnym tokiem rozumowania podczas rozwiązywania problemów.

Polskie wydanie recenzowanej książki było tłumaczone przez zespół w składzie: W. Boczoń, H. Koroniak i J. Milecki, który wcześniej dokonał bardzo udanego tłumaczenia podręcznika J. McMurry'ego *Chemia organiczna*. Gwarantuje to stosowanie w książce *Rozwiązania problemów* takiej samej jak w podręczniku terminologii chemicznej.

Publikacja zawiera ponadto kilka bardzo przydatnych dodatków:

„Synteza grup funkcyjnych” – zestawienie podstawowych metod syntez, służących do wprowadzania ważniejszych grup funkcyjnych do cząsteczki. Podano w nim także odnośniki do odpowiedniego podrozdziału podręcznika.

„Reakcje grup funkcyjnych” – podsumowanie reakcji, którym ulegają ważniejsze grupy funkcyjne, również zawierający odnośniki do odpowiednich podrozdziałów podręcznika.

„Odczynniki w chemii organicznej” – alfabetyczne zestawienie blisko stu najważniejszych odczynników stosowanych w syntezie organicznej wraz z krótkim opisem ich zastosowania i odnośnikami do podręcznika.

„Reakcje imienne” – przedstawienie wybranych reakcji i odczynników imiennych użytych w podręczniku wraz z opisami, schematami reakcji i odsyłaczami.

„Skróty” – objaśnienia niektórych skrótów i symboli stosowanych w chemii organicznej.

„Częstości pasm absorpcyjnych” – zestawienie zarówno częstości pasm absorpcyjnych w podczerwieni dla poszczególnych grup funkcyjnych związków organicznych, jak i wartości przesunięć chemicznych, konsekwentnie opatrzonych odnośnikami do podręcznika.

W *Rozwiązaniu problemów* znalazły się również dwa dodatkowe uzupełnienia:

„40 najważniejszych związków organicznych produkowanych przemysłowo w USA w 1994 roku” i „Laureaci Nagrody Nobla w dziedzinie chemii”. Choć rozdziały te nie są przydatne do rozwiązywania zadań z *Podręcznika*, to na pewno uatrakcyjnią książkę i zainteresują studentów uczących się chemii organicznej.

Każdy rozdział książki kończy się „Wskazówkami dla studenta”. Wprowadzie podrozdziały te nie zawierają żadnych wskazówek, ale stanowią zgrabne podsumowania poszczególnych rozdziałów i opisują cele dydaktyczne zawartych w nich zadań.

Uważam, że mankamentem książki jest brak tekstów zadań do przedstawionych w niej rozwiązań. Czyni to książkę Susan McMurry *Rozwiązania problemów* integralną częścią podręcznika Johna McMurry’ego *Chemia organiczna*, zupełnie nieprzydatną tym, którzy go nie posiadają. Korzystanie z książki wymaga jednoczesnego wertowania podręcznika. Myślę, że powtórzenie w recenzowanej książce pytań z podręcznika tylko nieznacznie zwiększyłyby jej objętość, ale za to bardzo istotnie ułatwiłyby korzystanie z niej.

Mam też zastrzeżenie do przedstawionych rozwiązań problemów syntetycznych. Zazwyczaj syntezę chemiczną określonej substancji organicznej można realizować na wiele sposobów, a wybór „optymalnej” metody jest z reguły podyktowany względami ekonomicznymi, nieustannie zmieniającymi się wraz z kosztami syntez (ceny odczynników chemicznych, aparatury i robocizny ulegają ciągłym zmianom). Dlatego wymaga się od chemików syntetyków umiejętności znajdowania i proponowania wielu różnych metod syntezy tego samego związku chemicznego. Niestety, książka Susan McMurry nie zachęca do takich poszukiwań, wskazując zazwyczaj tylko jedno z prawidłowych rozwiązań problemów syntetycznych, nie sugerując nawet, że nie jest to rozwiązanie jedyne.

Mimo tych uwag uważam, że recenzowana książka ułatwi czytelnikowi opanowanie chemii organicznej z podręcznika Johna McMurry’ego i umożliwi sprawdzenie swojej wiedzy. Dlatego książkę Susan McMurry *Chemia organiczna, Rozwiązania problemów* polecam tym, którzy już posiadają podręcznik Johna McMurry’ego *Chemia organiczna* i pragną z niego korzystać.

Zbigniew Szewczuk

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Książki wysyłamy na koszt zamawiającego. Zamówienia prosimy kierować pod adresem: Redakcja „Wiadomości Chemicznych”, ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław. Opłaty należy 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.

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 pisania artykułu. Piśmiennictwo cytowane powinno uwzględniać najnowsze prace krajowe i zagraniczne z dziedziny, której dotyczy artykuł.

Maszynopisy (wydruki komputerowe) należy nadsyłać do Redakcji w **dwóch egzemplarzach**: oryginał i kopia lub kserokopia pisana jednostronnie, z zachowaniem podwójnej interlinii i marginesu szerokości 5 cm z **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 obszerne 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. Przysłanie 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. Pożądany 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.

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



DO CZYTELNIKÓW „WIADOMOŚCI CHEMICZNYCH”

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

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

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

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

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

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

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

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

Redakcja „Wiadomości Chemicznych”

SPIS TREŚCI

Izabela SOBCZAK, Maria ZIÓLEK: DeNO _x na sitach molekularnych zawierających miedź. Cz. II. Katalityczny rozkład NO	177
Małgorzata BOCZKOWSKA: Dichroizm kołowy kwasów nukleinowych. Cz. II. Polimery	203
Barbara KRAJEWSKA: Ureazy: znaczenie, właściwości, kataliza	223
Jan MILECKI: Chemiczna synteza oligorybonukleotydów	255
Andrzej LEWICKI, Tadeusz PARYJCZAK, Wojciech K. JÓZWIAK, Jacek RYMKOWSKI: Katali- zatory reformingu metanu dwutlenkiem węgla.	279
Anna KAMECKA, Barbara KURZAK: Charakterystyka równowag kompleksowania kwasów iminodi(metylenofosfonowych) z jonami metali(II)	315
Agata ŁACKA, Joanna LESZCZYŃSKA: Metody oznaczania L-karnityny	341
Felieton naukowy	
Ignacy Z. SIEMION: Notatki chaotyczne. XXXIX. O melatoninie, serotoninie i bufoteninie	361
Nowe wydawnictwa	371

W NASTĘPNYM ZESZYCIE UKAŻĄ SIĘ:

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