



Politechnika Łódzka

ZESZYTY NAUKOWE

CHEMIA SPOŻYWCZA I BIOTECHNOLOGIA

Nr 70

ŁÓDŹ 2006

POLITECHNIKA ŁÓDZKA

ZESZYTY NAUKOWE

Nr 984

CHEMIA SPOŻYWCZA
I BIOTECHNOLOGIA

ZESZYT SIEDEMDZIESIĄTY

ŁÓDŹ 2006

ZESZYTY NAUKOWE POLITECHNIKI ŁÓDZKIEJ
НАУЧНЫЕ ЗАПИСКИ
ЛОДЗИНСКОГО ПОЛИТЕХНИЧЕСКОГО ИНСТИТУТА
SCIENTIFIC BULLETIN OF ŁÓDŹ TECHNICAL UNIVERSITY
BULLETIN SCIENTIFIQUE DE L'ECOLE POLYTECHNIQUE
DE ŁÓDŹ
WISSENSCHAFTLICHE HEFTE
DER TECHNISCHEN HOCHSCHULE IN ŁÓDŹ

Redaktor Działu: **dr hab. Danuta Kalemba, prof. PŁ**

© Copyright by Politechnika Łódzka 2006

Adres Redakcji – Адрес Редакции – Editor's Office
Adresse de Redaction – Schriftleitungsadresse:

WYDAWNICTWO POLITECHNIKI ŁÓDZKIEJ

90-924 Łódź, ul. Wólczańska 223

tel./fax (0-42) 684-07-93

e-mail: a-row-1@sir.p.lodz.pl

ISSN 1509-7013

Nakład 150 egz. Ark. druk. 6,6. Papier offset. 80 g 70 x 100
Druk ukończono w listopadzie 2006 r.
Wykonano w Drukarni offsetowej WIST, 95-100 Zgierz, ul. Barona 8B

SPIS TREŚCI – CONTENTS

Julia Gibka, Marek Gliński – Derivatives of undecan-x-ones ($X = 2 - 6$) synthesis and spectral data	5
Tomasz Leszczyński, Henryk Duński – Studies of interaction between m-AMSA and DNA by viscometric and melting profiles methods	13
Dorota Sobczuk, Rebecca Craig, Marta Nogueroles, Slavica Radišić, Boheng Shen, Susanne Simon – The study of the interactions between naproxen and N-acetyl-L-tyrosine ethyl ester.....	23
Piotr Dziugan – Zastosowanie tac z kratownicą w procesie liofilizacji biopreparatu zawierającego bakterie <i>Lactobacillus plantarum</i>	37
Izabela Lubecka, Eugeniusz Pogorzelski - Wpływ procesu technologicznego na stężenia związków mineralnych w soku i koncentracie jabłkowym	43
Magdalena Dolot, Krzysztof Śmigielski Monika Wesołowska – Analiza wybranych składników odżywczych w żeńszenu amerykańskim (<i>Panax quinquefolium</i> L.) uprawianym w Polsce	53
Tomasz Leszczyński, Henryk Duński – Sposoby wiązania cząsteczek ligandów z DNA	65
Katarzyna Śliżewska, Joanna Biernasiak, Zdzisława Libudzisz – Probiotyki jako alternatywa dla antybiotyków.....	79
Anna Sykuła, Elżbieta Łodyga-Chruścińska, Marek Zakrzewski – Polimorfizm – jego wpływ na substancje farmaceutyczne	93

JULIA GIBKA**Institute of General Food Chemistry, Technical University of Łódź****MAREK GLIŃSKI****Faculty of Chemistry, Warsaw Technical University**

DERIVATIVES OF UNDECAN-X-ONES (X = 2 – 6) SYNTHESIS AND SPECTRAL DATA

Review: **dr hab. Krzysztof Śmigielski**

Undecan-x-ones ($x = 2 - 6$) have been used as starting materials in the synthesis of ethylene and propylene acetals, undecan-x-ols and their acetates. Acetals were prepared in the reaction between ketones and ethane-1,2-diol or propane-1,2-diol in toluene in the presence of sulfosalicylic acid as a catalyst. Alcohols were synthesised in the reduction of ketones with sodium borohydride in water/propan-2-ol. Acetates were prepared by esterification of alcohols with acetic anhydride in the presence of sodium acetate. All derivatives were prepared in a 2 – 5 g scale. Ethylene acetal of undecan-3-one and all propylene acetals are newly prepared compounds. Physical properties (boiling point, refractive index) and spectral data (IR, ^1H NMR) for all the synthesized derivatives of undecan-x-ones have been determined.

1. Introduction

The direct transformation of carboxylic acids into ketones in the presence of metal oxide catalysts (catalytic ketonization) has been known since 1895 [1]:



The ketonization of two different acids (cross-ketonization) leads to the formation of three ketones or if formic acid is used to aldehyde and ketone.

Recently, we studied the ketonization reaction in a continuous mode under flow conditions in the presence of many metal oxides as catalysts [2-4]. Esters were employed as precursors of acids, when the use of acid was inconvenient or not feasible. Various aliphatic [5, 6] and aralkyl [7, 8] ketones can be obtained in the cross-ketonization of the appropriate esters. The ketonization of esters of dicarboxylic acids (cyclo-ketonization) leads to the formation of cyclic ketones [9-11].

Ketones are raw materials for the preparation of many valuable derivatives. The relation between the structure of organic compounds and their odor properties has been studied for many years. In our two former works, we have demonstrated the dependence of the structure of straight-chain symmetric aliphatic C₇-C₁₅ ketones and also straight-chain metameric C₁₃ aliphatic ketones and the derivatives of both groups of ketones on their odor [12, 13]. In this work, we report the details of the synthesis of a group of undecan-x-one (x=2-6) derivatives, such as ethylene and propylene acetals, undecan-x-ols and their acetates. Their odor characteristics and odor threshold concentrations have been determined very recently and will soon be reported by us [14].

2. Experimental

Ketones: A series of undecan-x-ones, where $x = 2 - 6$, was prepared directly from carboxylic acids in a single step synthesis, according to the method described elsewhere [15]. All ketones were purified by distillation under reduced pressure prior to use. The purity of the synthesised ketones, their physical properties and spectral data were also determined by us [15].

Diols: Ethane-1,2-diol (p.a. POCH Gliwice, Poland) and propane-1,2-diol (p. a.. VEB Laborchemie APOLDA) were used as received.

Other reagents: Sulfosalicylic acid (purum p.a., Fluka), toluene (p.a. POCH Gliwice, Poland), NaBH₄ (98%, Aldrich), acetic anhydride (p.a. International Enzymes Ltd), sodium acetate (anhydrous, p.a., POCH Gliwice, Poland) and propan-2-ol (p.a., POCH Gliwice, Poland) were used as received.

Methods: The ¹H NMR spectra were recorded on a Bruker 250 DPX spectrometer, in CDCl₃ using TMS as internal standard. The IR spectra were measured using Specord M 80 spectrometer (film or KBr pellet). Microanalyses were performed on a Perkin Elmer 2400 CHN elemental analyser. Melting points (uncorrected) were determined on Boetius apparatus. The purity of compounds was confirmed by GC/MS, IR, ¹H NMR and the measurements of refractive index.

3. Results

Ethylene and propylene acetals of undecan-*x*-ones, undecan-*x*-ols and undec-*x*-yl acetates were prepared starting from undecan-*x*-ones. The details of the synthesis are summarized briefly for each group of compounds in four general procedures given below:

*Synthesis of ethylene acetals of undecan-*x*-ones (2e–6e)***

A mixture of ketone (4.26 g, 0.025 mole), ethylene glycol (2.33 g, 0.0375 mole), 1 g of sulfosalicylic acid and 70 cm³ of toluene was heated under reflux for 1.5 h. Water was separated as heteroazeotrope with toluene in a Dean-Stark trap. After cooling, water (100 cm³) was added to the reaction mixture and the layers separated. The water layer was extracted (3 x 20 cm³) with toluene and organic layers were collected, washed with brine and with 5% Na₂CO₃ solution and dried over MgSO₄. After decantation from above the drying agent the solvent was evaporated in a rotatory evaporator. The crude product was distilled under reduced pressure.

*Propylene acetals of undecan-*x*-ones (2p–6p)*

A mixture of ketone (4.26 g, 0.025 mole), propylene glycol (2.85 g, 0.0375 mole), 1 g of sulfosalicylic acid and 70 cm³ of toluene was heated under reflux for 1.5 h. Water was separated as heteroazeotrope with toluene in a Dean-Stark trap. After cooling, water (100 cm³) was added to the reaction mixture and the layers separated. The water layer was extracted (3 x 20 cm³) with toluene and organic layers were collected, washed with brine and with 5% Na₂CO₃ solution and dried over MgSO₄. After decantation from above the drying agent the solvent was evaporated in a rotatory evaporator. The crude product was distilled under reduced pressure.

*Undecan-*x*-ols (2u–6u)*

To the stirred solution of (4.26 g, 0.025 mole) of undecan-*x*-one in 100 cm³ of propan-2-ol a solution of NaBH₄ (1.00 g, 0.026 mole) in 30 cm³ 50/50 v/v water – propan-2-ol was slowly dropped at room temperature. The mixture was stirred for 10 h, 150 cm³ of water added and 2-propanol was distilled off in a rotatory evaporator. The resulted mixture was separated, the water layer extracted with hexane (3 x 20 cm³) and extracts collected. The organic layer was washed with brine, water until neutral and dried over MgSO₄. After decantation from above the drying agent the solvent was evaporated in a rotatory evaporator. The crude product was distilled under reduced pressure.

** the number refers to the position of carbonyl group in the starting ketone, the letter is assigned to the type of derivative; e – ethylene acetal, p – propylene acetal, u – undecanol, a- acetate.

Undec-x-yl acetates (2a-6a)

A mixture of undecan-x-ol (2.58 g, 0.015 mole), acetic anhydride (1.60 g, 0.016 mole) and anhydrous sodium acetate (0.50 g, 0.006 mole) was heated under reflux for 5-6 h. To the cold mixture 50 cm³ of water was added and heated under reflux for 15 min. After cooling, the layers were separated, the water layer was extracted with toluene (3 x 30 cm³). The organic layers were collected, washed with brine and with 5% NaHCO₃ solution until neutral and dried over MgSO₄. After decantation from above the drying agent toluene was removed in a rotatory evaporator. The crude product was distilled under reduced pressure.

Physical properties and spectral data for all synthesized compounds are collected in Tables 1-4.

Table1

Physical properties of ethylene and propylene acetals of undecan-x-ones

Code No.	Bp [°C/mm Hg]	n ²⁰ _D (exp)	n ²⁰ _D (lit)	Yield [%]
2e	80-2/0.5	1.4288	--	73
3e ^x	84-8/0.6	1.4301	--	65
4e	82-4/0.6	1.4289	--	63
5e	78-80/0.4	1.4288	--	63
6e	84-5/1.0 ^a	1.4296	--	58
2p ^x	80-1/0.5	1.4374	--	70
3p ^x	81-2/0.5	1.4372	--	63
4p ^x	75-6/0.4	1.4378	--	58
5p ^x	84-6/0.7	1.4380	--	61
6p ^x	86-8/1.0	1.4351	--	58

^x – newly prepared compound;

^a – 131-3°C/25 mm Hg [16].

Table 2Physical properties of undecan-*x*-ols and their acetates

Code No.	Bp [°C/mm Hg]	n_D^{20} (exp)	n_D^{20} (lit)	Yield [%]
2u	78-9/0.5 ^a	1.4382	1.4400 ^a	91
3u	82-4/0.6 ^b	1.4357	1.4367 ^b	84
4u	76-7/0.4 ^c	1.4351	1.4345 ^c	86
5u	87/0.8 ^d	1.4262	1.4248 ^d	86
6u	77-9/0.6 ^e	1.4362	1.4355 ^e	84
2a	66-7/0.5 ^f	1.4260	1.4256 ^b	88
3a	63-4/0.4 ^g	1.4259	1.4254 ^g	81
4a ^x	70-3/0.6	1.4261	--	81
5a	60-2/0.3 ^h	1.4265	--	75
6a ^x	71-4/0.8	1.4262	--	78

^x – newly prepared compound; ^a – b.p. 79-81°C/1 mm Hg [17]; ^b – b.p. 117°C/16 mm Hg [18];^c – b.p. 78-80°C/1 mm Hg [19]; ^d – b.p. 139-40°C/17 mm Hg [20]; ^e – b.p. 130-2°C/28 mm Hg [21];^f – b.p. 109-110°C/6 mm Hg [22]; ^g – b.p. 125°C/18 mm Hg [23]; ^h – b.p. 239.3- 240.8°C [24].**Table 3**Spectral data for the obtained ethylene and propylene acetals of undecan-*x*-ones

Code No.	GC purity [%]	IR [cm ⁻¹]	¹ H NMR ^a [δ ppm]
2e	98.9	3000, 2850, 1480, 1380, 1110;	0.82 (3H, t, J = 6.9), 1.16 (3H, s), 1.30 (14H, m), 1.56 (2H, m), 3.89 (4H, s);
3e	99.3	3000, 2850, 1490, 1330, 1120;	0.89 (6H, m), 1.31 (12H, m), 1.62 (4H, m), 3.92 (4H, s);
4e	99.1	3000, 2850, 1480, 1360, 1100;	0.88 (6H, m), 1.33 (12H, m), 1.54 (4H, m), 3.90 (4H, s);
5e	99.2	3050, 2860, 1500, 1350, 1120;	0.89 (6H, m), 1.29 (12H, m), 1.60 (4H, m), 3.93 (4H, s);
6e	99.2	3000, 2850, 1480, 1360, 1120;	0.88 (6H, m), 1.31 (12H, m), 1.59 (4H, m), 3.92 (4H, s);
2p	99.2	3000, 2850, 1480, 1370, 1110;	0.84 (3H, t, J = 7.0), 1.19 (14H, m), 1.33 (3H, m), 1.56 (2H, m), 3.36 (3H, m), 4.02 (2H, m), 4.15 (1H, m);
3p	99.3	3000, 2850, 1490, 1370, 1110;	0.83 (6H, m), 1.19 (12H, m), 1.55 (4H, m), 3.33 (3H, m), 3.99 (2H, m), 4.12 (1H, m);
4p	99.6	3000, 2850, 1480, 1370, 1100;	0.89 (6H, m), 1.24 (12H, m), 1.58 (4H, m), 3.31 (3H, m), 4.01 (2H, m), 4.11 (1H, m);
5p	99.3	3000, 2850, 1480, 1350, 1110;	0.88 (6H, m), 1.30 (12H, m), 1.59 (4H, m), 3.32 (3H, m), 4.02 (2H, m), 4.14 (1H, m);
6p	99.4	3000, 2850, 1480, 1360, 1110;	0.88 (6H, m), 1.30 (12H, m), 1.56 (4H, m), 3.33 (3H, m), 4.01 (2H, m), 4.16 (1H, m);

^a - J in [Hz]

Table 4

Spectral data for the obtained undecan-x-ols and their acetates

Code No.	GC purity [%]	IR [cm ⁻¹]	¹ H NMR ^a [δ ppm]
2u	98.9	3380, 3000, 2850, 1480, 1160;	0.91 (3H, t, J = 7.5), 1.19 (3H, t, J = 7.5), 1.46 (16H, m), 1.90 (1H, s), 3.52 (1H, m);
3u	99.8	3380, 3000, 2850, 1480, 1150;	0.91 (6H, m), 1.30 (12H, m), 1.46 (5H, m), 3.52 (1H, m);
4u	98.8	3380, 3000, 2850, 1480, 1150;	0.90 (6H, m), 1.33 (12H, m), 1.46 (5H, m), 3.52 (1H, tt, J ₁ = J ₂ = 7.5);
5u	99.1	3400, 3000, 2850, 1480, 1150;	0.90 (6H, tt, J ₁ = J ₂ = 7.5), 1.48 (16H, m), 1.70 (1H, s), 3.40 (1H, tt, J ₁ = J ₂ = 7.5);
6u	99.2	3350, 3000, 2850, 1480, 1160;	0.88 (6H, tt, J ₁ = J ₂ = 7.5), 1.48 (16H, m), 1.84 (1H, s), 3.52 (1H, tt, J ₁ = J ₂ = 7.5);
2a	99.1	3000, 2850, 1740, 1480, 1245;	0.89 (3H, t, J = 7.0), 1.14 (3H, d, J = 4.3), 1.26 (16H, m); 1.94 (3H, s), 5.10 (1H, m);
3a	99.1	3000, 2850, 1740, 1480, 1270;	0.84 (6H, m), 1.22 (12H, m), 1.46 (4H, m), 1.97 (3H, s), 4.74 (1H, m);
4a	99.3	3000, 2850, 1740, 1480, 1260;	0.89 (6H, m), 1.22 (12H, m), 1.44 (4H, m), 1.99 (3H, s), 4.67 (1H, m);
5a	98.9	3000, 2800, 1735, 1480, 1280;	0.88 (6H, m), 1.26 (12H, m), 1.59 (4H, m), 2.03 (3H, s), 4.81 (1H, m);
6a	99.2	3000, 2850, 1740, 1480, 1260;	0.89 (6H, m), 1.22 (12H, m), 1.51 (4H, m), 1.99 (3H, s), 4.89 (1H, m);

^a – J in [Hz].

Acknowledgment. Financial support from the Polish State Committee for Scientific Research (Grant KBN No. 3T09B 062 28) is gratefully acknowledged.

References

- [1] **Squibb E.:** Improvement in the manufacture of acetone. *J. Am. Chem. Soc.*, 17, 187, (1895).
- [2] **Gliński M., Kijeński J., Jakubowski A.:** Ketones from monocarboxylic acids: Catalytic ketonization over oxide systems. *Appl. Catal. A: Gen.*, 128, 209, (1995).
- [3] **Gliński M., Kijeński J.:** Decarboxylative coupling of heptanoic acid. Manganese, cerium and zirconium oxides as catalysts. *Appl. Catal. A: Gen.*, 190, 87, (2000).
- [4] **Gliński M., Kijeński J.:** Catalytic ketonization of carboxylic acids. Synthesis of saturated and unsaturated ketones. *React. Kinet. Catal. Lett.*, 69, 123, (2000).
- [5] **Gliński M., Szymański W. and Łomot D.:** Catalytic ketonization over oxide catalysts. Part VII. Ketonization and cross-ketonization of aliphatic esters over CeO₂ and ZrO₂ on alumina. *Polish J. Chem.*, 77, 1033, (2003).
- [6] **Gliński M., Szymański W., Łomot D.:** Catalytic ketonization over oxide catalysts. Part X. Transformation of various alkyl heptanoates. *Appl. Catal. A: Gen.*, 281, 205, (2005).

- [7] **Gliński M., Szudybill J.:** Catalytic ketonization over oxide catalysts. Part VI. Cross-ketonization of aliphatic and aromatic esters. *React. Kinet. Catal. Lett.*, 77, 335, (2002).
- [8] **Gliński M., Kościak A., Jerzak A., Synoradzki L.:** Catalytic ket-onization over oxide catalysts. Part XI. Cross-ketonization of esters of aliphatic and aromatic acids. *Polish J. Chem.*, 79, 995, (2005).
- [9] **Gliński M., Kaszubski M.:** Catalytic ketonization over oxide catalysts. Part IV. Cycloketonization of diethyl hexanoate. *React. Kinet. Catal. Lett.*, 70, 271, (2000).
- [10] **Gliński M., Kaszubski M.:** Catalytic ketonization over oxide catalysts. Part V. Synthesis of cyclopentanone over $\text{MnO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$ catalysts. *Polish J. Chem.*, 76, 1037, (2002).
- [11] **Gliński M., Kaszubski M.:** Catalytic ketonization over oxide catalysts. Part VIII. Synthesis of cycloalkanones in cycloketonization of various dialkyl alkanodates. *React. Kinet. Catal. Lett.*, 82, 157, (2004).
- [12] **Gibka J., Góra J., Gliński M., Kijeński J.:** Synthesis and odor characteristics of some aliphatic C-7 to C-13 ketones, alcohols and their derivatives. *Perfumer & Flavorist*, 24, 19, (1999).
- [13] **Gibka J., Gliński M.:** Odor characteristics of aliphatic metamer C-13 ketone, alcohols and their derivatives. *Perfumer & Flavorist*, 29, 42, (2004).
- [14] **Gibka J., Gliński M.:** Olfactory properties of undecan-*x*-ones, undecan-*x*-ols (*x*=2-5) and their derivatives. *Flavour Fragrance J.*, (submitted).
- [15] **Gliński M., Gibka J.:** Catalytic ketonization over oxide catalysts. Part IX. Single step synthesis of aliphatic saturated and unsaturated C_{11} - C_{13} ketones from carboxylic acids. *Polish J. Chem.*, 78, 299, (2004).
- [16] **Audier H., Fetizon M., Gramain J., Schalbar J., Waegel B.:**
- [17] Orientation de la fragmentation en spectrométrie de masse par l'instruction de groupes fonctionnels. *Bull. Soc. Chim. Fr.* 1880, (1964).
- [18] **Zakharkin L.I., Babich S.A.:** Синтез эфиров оксодекановой кислоты из теломеров бутадиена. *Zh. Org. Khim.*, 15, 1378, (1979).
- [19] **Pickard C.W., Kenyon J.:** The constitution of tannins. Part IV. Absorption spectra of natural phlobatannins and synthetic flavpinacols. *J. Chem. Soc.*, 1940, (1935).
- [20] **Dashunin V. M., Maeva R. V.:** Замещенные лактоны и их превращения. *Zh. Org. Khim.*, 1, 996, (1965).
- [21] **Shuikin N. J., Pozdnyak N. A.:** Каталитическое алкилирование тетралина. *Izv. Akad. Nauk SSSR Ser. Khim.* 2, 324, (1962).
- [22] **Carrington R. A. G., Evans H. C.:** Alkyl sulphates. Part II. Spectra of the cyclohexylammonium salt in the 880 cm^{-1} region. *J. Chem. Soc.*, 1701 (1957).
- [23] **Tattje R.:** Essential oil of *Ruta graveolens*. *Pharm. Weekbl.*, 105, 1241, (1970).
- [24] **Kenyon J.:** Investigations on the dependence of rotatory power on chemical constitution. Part VII. Some esters of the carbinols of the formula $\text{C}_2\text{H}_5\text{CH}(\text{OH})\text{R}$. *J. Chem. Soc.*, 2241, (1914).
- [25] **Byrtschenko S.:** Über das n-Butylhexylcarbinol. *Chem. Zentralbl.*, II(24), 1744, (1910).

POCHODNE UNDEKAN-X-ONÓW (X = 2 – 6): SYNTEZA I CHARAKTERYSTYKA SPEKTRALNA

Streszczenie

W artykule opisano wykorzystanie undekan-x-onów ($x=2-6$) do syntezy pochodnych, takich jak acetale etylenowe i propylenowe, undekan-x-ole i ich octany. Syntezę acetalu wykonywano poddając ketony reakcji odpowiednio z glikolem etylenowym i propylenowym w toluenie w obecności kwasu toluenosulfonowego jako katalizatora. Alkohole otrzymywano w reakcji redukcji ketonów wodorkiem borowosodowym w wodnym propan-2-olu. Octany undekanolu otrzymywano w reakcji estryfikacji alkoholi bezwodnikiem octowym wobec octanu sodowego. Wszystkie pochodne otrzymywano w skali 5g. Acetale etylenowe i propylenowe otrzymano z wydajnościami rzędu 55-73%, a undekanoole i ich octany z wydajnościami 75–91%. Acetal etylenowy undekan-3-onu i wszystkie acetale propylenowe undekanonów nie są opisane w literaturze chemicznej. Określono właściwości fizyczne (temperatura wrzenia, współczynnik załamania światła) i spektralne (IR, ^1H NMR) otrzymanych związków.

Instytut Podstaw Chemii Żywności
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Politechnika Łódzka

TOMASZ LESZCZYŃSKI
HENRYK DUŃSKI
Institute of General Food Chemistry
Technical University of Łódź

STUDIES OF INTERACTION BETWEEN (m-AMSA) AND DNA BY VISCOMETRIC AND MELTING PROFILES METHODS

Review: **prof. dr hab. Stanisław Wysocki**

We have examined the interactions between m-AMSA and CT-DNA, using melting profiles and viscometric techniques methods. We observed the increase of thermal stability of DNA after binding m-AMSA, depending on the concentration of the ligand in the solution. The maximal increase of the melting temperature of the m-AMSA/DNA system in comparison to pure DNA, was 6°C for the concentration of m-AMSA to DNA of 0,5. Viscometric examination of interaction of m-AMSA with DNA unambiguously indicate intercalation type of bounds. In the saturation state, 2,76 base pairs occur for one ligand molecule.

1. Introduction

For many years, the nature of the interactions of small molecules to DNA has been a concern of not only physical chemistry, but mainly medical chemistry. Considering the major role of DNA in the regulation of biochemical processes, compounds capable of interacting with it, exhibit a wide spectrum of biological activity, especially the antitumor one.

The m-AMSA itself was, synthesized by Cane in early 70s [1], and belongs to acridine derivatives class. It is characterized by wide bacteriostatic and cytostatic action, and is a leukemia cure [[2]]. Despite of years lasting research, its interactions with DNA, especially at low concentration, is not well known.

Small molecules can interact with DNA in a variety of ways such as: surface binding to their minor or major grooves, intercalation between adjacent base pairs, covalent attachments to the double helix, or electrostatic binding.

Molecular interaction of the drug with DNA may have a great importance to its biological activity. For instance, of the two isomers: o-AMSA and m-AMSA, the first has a higher DNA association constant, but only the second has a strong antitumour effect. In the case of m-AMSA, this cytotoxic effect is due to favorable arrangement of methoxy group, which allows creation of a complex with topoisomerase II and its inhibition [3], [4].

In this paper, type and strength of m-AMSA to DNA binding was examined using viscometric and melting profiles techniques. These activities were essential part of wider research over the mechanism of interactions of acridine derivatives (especially m-AMSA) and DNA. The research were conducted by our Biophysical Chemistry Team and allowed to define the type of binding and size exclusion parameters of this ligand.

2. Experimental details

2.1. Materials

The calf thymus DNA (CT-DNA) and 4'-(9-acridinylamino) methanesulfon-m-anisidide (m-AMSA) produced by Sigma and ethidium bromide (EB) produced by Merck were used in the experiment.

The DNA was dissolved in 0,01 M phosphate buffer (pH 7,0) containing 0,001 M EDTA. Millipore deionized water was used for making aqueous solution. Other reagents were at least analytical grade and were used without further purification.

2.2. Methods

The concentration of both dyes and DNA was calculated on the basis of measured absorbance of the solution, using $\epsilon_{260} = 12824 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [5] for DNA, $\epsilon_{434} = 1200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [6] and $\epsilon_{480} = 5600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [7] for m-AMSA and EB respectively. Spectrometric measurements were conducted with BECKMAN DU 7500 spectrophotometer.

Sonificated DNA solutions and freshly made m-AMSA and EB solutions were used. The ligands were prepared from more concentrated DMSO solutions, due to its weak solubility in water [8].

The melting temperature measurements employed spectrophotometric methods [6]. The meter was: Varian Cary 5E spectrophotometer, equipped with thermostated measuring system.

The sample of DNA (typical concentration $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ base pairs) with dye and phosphate buffer as reference material was heated till temperature stabilization and absorbance was measured.

The absorbance measurement was conducted at wavelength of $\lambda = 260\text{nm}$ for DNA and occasionally at $\lambda = 434\text{nm}$ for m-AMSA. The temperature range was 300-360K, at the interval of 2°C .

The viscosity measurements were conducted using Ubbelohde viscometer, submerged in a water bath, maintained at $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Flow times were measured 3 times, with a stopwatch of accuracy of $\pm 0,1\text{s}$, and the average time over all replicates was recorded. Viscometric titrations were conducted according to Wilson's procedure [9].

Sonificated DNA solution, at $2 \times 10^{-4}\text{ M}$ base pairs concentration, was placed in viscosimeter. Small volume ($0,05\text{-}0,1\text{ ml}$), of concentrated solution of EB or m-AMSA in DMSO of $1,28 \times 10^{-3}\text{ M}$ and $2,25 \times 10^{-3}\text{ M}$ respectively, were directly added and flow times were measured after each addition.

The relative solution viscosity was calculated with formula (1)

$$\eta/\eta_0 = (t-t_0)/(t_{\text{DNA}}-t_0) \quad (1)$$

where t_0 and t_{DNA} – flow times buffer and buffer containing DNA, t – flow times of buffer containing DNA after ligand addition.

The helix unwinding angle of DNA – Φ , induced by binding m-AMSA was determined by measured flow time of reference standard EB. This compound has well documented unwinding angle of 26° [6], [10], [11].

The Φ induced by binding m-AMSA can be determined using the following relationship [12]:

$$\Phi_E * v_E = \Phi_m * v_m \quad (2)$$

where: Φ_E and v_E reflect the ethidium-induced helix unwinding angle and critical saturation ratios, respectively, while Φ_m and v_m are the corresponding m-AMSA parameters.

3. Results and discussion

3.1. Thermal melting studies of binding between m-AMSA and DNA

Fig. 1 presents graphical method of determination of the melting temperature (T_M). Since all examined profiles were almost linear in the melting region, T_M could be determined as the average of starting and final temperatures of melting process.

In most of the measurements, melting process was traced by estimation of DNA absorbance (at $\lambda=260\text{nm}$). Example curves are presented at Fig. 2 and all the results of the measurements are compiled in Tab. 1.

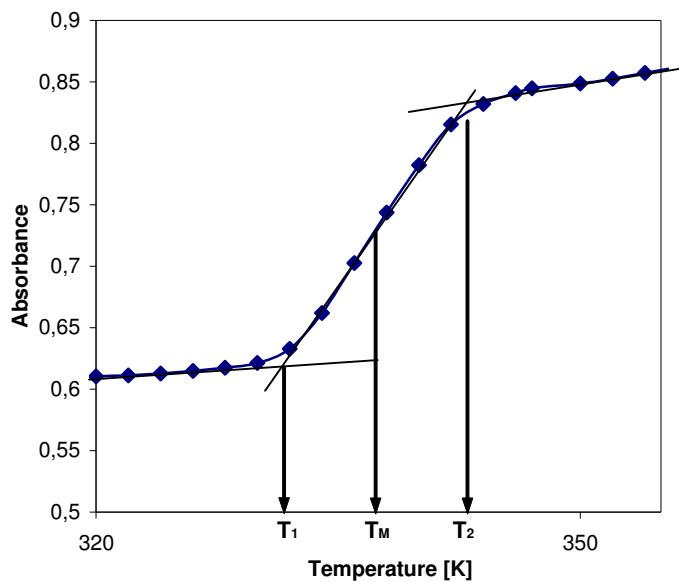


Fig. 1. Graphical method determining the melting temperature T_M . T_1 and T_2 are the starting and final temperatures of melting process

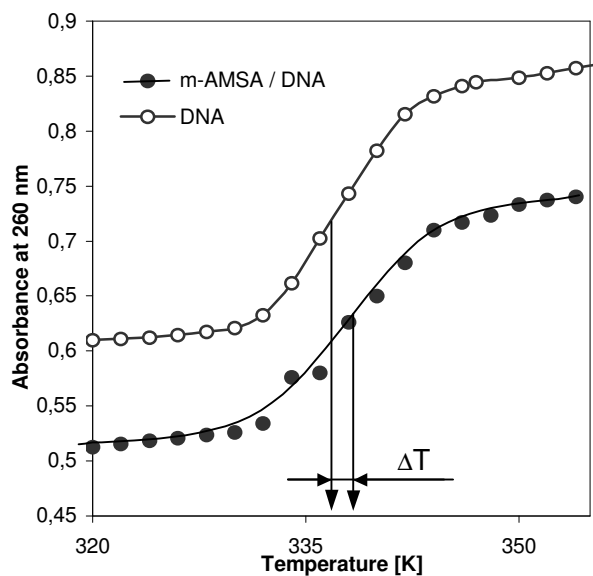


Fig. 2. UV melting profiles of DNA with m-AMSA at $r = 0,1$ where r is the total ligand to base pair ratio

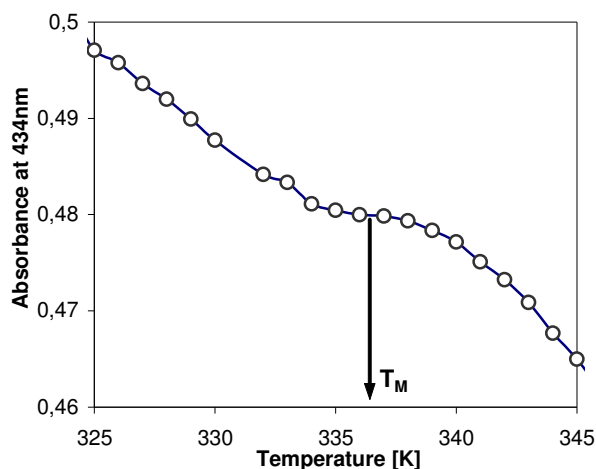


Fig. 3. The absorbance of the solution of DNA and m-AMSA ($r = 0,2$) with respect to heating temperature

Table 1

Melting temperature T_M DNA samples

Samples	DNA melting temperatures [°C]	ΔT_M [°C]
DNA	$63,5 \pm 0,5$	-
m-AMSA / DNA = 0,1	$65 \pm 0,5$	1,5
m-AMSA / DNA = 0,5	$69,5 \pm 0,5$	6
m-AMSA / DNA = 0,2 (experimental conditions in Fig.3)	$63,5 \pm 0,5$	0

In our experiment we observed a repeatable melting temperature of $63,5 \pm 0,1^\circ\text{C}$. The result is close to values obtained by Gomley [13] and Sissi [14], which were $65 \pm 1,6^\circ\text{C}$ and $65,6^\circ\text{C}$, but differs from some other results ($58,5^\circ\text{C}$ presented in [15]). Observed differences of T_M of CT-DNA, derive from varying experiment conditions, in particular ionic strength and buffer pH.

Adding m-AMSA to the solution results in DNA thermal stability increase. This leads to rise of ΔT_M parameter, depending on the m-AMSA concentration in the solution. For example increasing $r = 0,1$ to $0,5$, causes a rise of ΔT_M from 1°C to 6°C . These results are in perfect agreement with Antonini [6] and Bailly [16], who achieved the rise of ΔT_M from 1°C to 5°C , for the same r value as ours.

The rise of m-AMSA concentration in the solution, increases the amount of molecules reacting with DNA and its thermal stability. A question arises, what is the mechanism of interaction between the ligand and DNA, and whether its dissociation accompanies the melting process. The last we tried to answer, observing the amount of dissociating ligand during DNA melting process. In that, we took advantage of the fact that molar extinction coefficients of

m-AMSA free and bound to DNA differs significantly [17], [18]. The results of the experiment are presented in Fig. 3. A surprising effect of gradual decrease of absorbance at temperature rise, may be observed. The effect is caused by low thermal stability of m-AMSA, exposed to long term (c.a. 3 hours) heating. The mentioned low thermal ligand stability is corroborated by observed changes in the shape and intensity of the spectrum of m-AMSA bound with DNA, at room temperature close to T_M [these results will be published].

The determined value of T_M (Fig. 3) is the same as in the solution containing only DNA. Moreover, the amount of ligand dissociated from DNA, in the melting process, is small. The results, suggest that most of the bound m-AMSA dissociates before the melting process is initiated and the rest is bound so strongly that it moves the process towards higher temperatures. It is also possible that only one of the two types of m-AMSA with DNA bound dissociates [these results will be published] or the behavior is due to heterorganic structure of DNA [18].

3.2. Determining the type of binding with viscometric titrations

The analysis of the shapes of viscometric titrations curves is a convenient way to determine the type of binding of ligand with DNA [19], [20]. Fig. 4 and 5 present relative viscosity (η/η_0) versus ligand to DNA ratio (r), during the titrations, for m-AMSA and EB. The last is a typical intercalator. In both cases, one may observe nearly linear increase of relative viscosity, collapsing at approximately $\sim 1,95$ for m-AMSA and $\sim 1,6$ for EB. Above these points the η/η_0 rise is less dynamical.

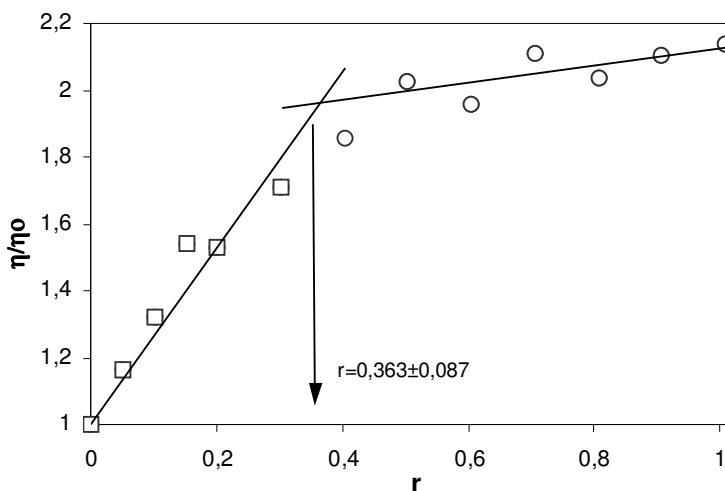


Fig. 4. Viscometric titrations of DNA with m-AMSA;
 r_s is the critical saturation ratio

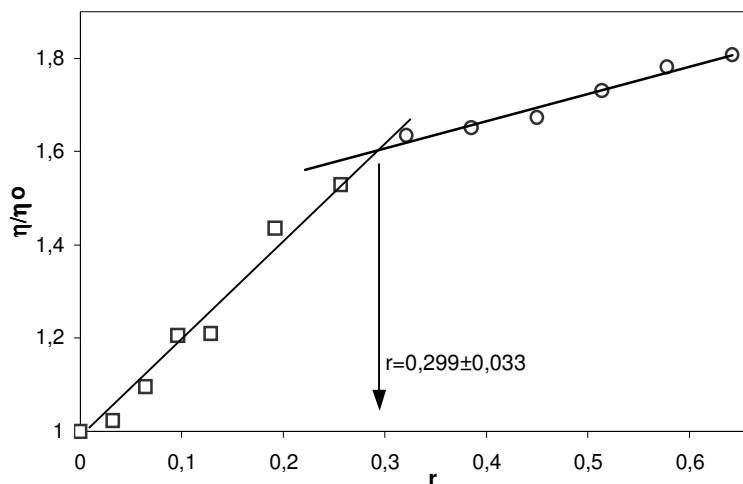


Fig. 5. Viscometric titrations of DNA with EB

These results lead to the following conclusions:

- in both cases collapse of relative viscosity occurs, at values characteristic for intercalation process ($\eta/\eta_0 = 1.9 \pm 0.3$ [20])
- collapse point is strictly related to critical saturation ratio r_s being the maximal amount of intercalating ligand molecules relative to one base pair of DNA

We obtained $r_s = 0.363 \pm 0.087$ for m-AMSA and $r_s = 0.299 \pm 0.033$ for EB (Fig. 4 and 5).

The reciprocal of r_s is, so called, size exclusion parameter ω , useful for describing the binding isotherms. The value of this parameter for m-AMSA was calculated to be 2.76 ± 0.66 , which is convergent with the results of Rebecca [18]. Simultaneously, the value was 3.34 ± 0.37 for EB, which is close to the outcome we achieved during the fluorescent measurements ($\omega = 2.86 \pm 0.12$ [these results will be published]).

Using the equation 2 with the values of r_s , unwinding angle was determined to be $21.5^\circ \pm 3.8^\circ$ for m-AMSA. The angle value is close to 21° found by S.Neidle [21], Denny [22] and 20.5° in [23] or 20° in [24].

Typical unwinding angle of DNA in β form is 36° . Intercalation of the ligand leads to its deterioration to 10° - 26° [25], which is characteristic for this process. The value of 21.5° , achieved by us, stays within the range characteristic for intercalators and confirms this type of binding of m-AMSA with DNA.

As a result of intercalation the first and the second structure of DNA stays intact. Unwinding due to a slipped ligand is a reason for the change of tertiary DNA structure. The DNA molecule is partly elongated and the distance between two neighboring base pairs increases by 3,4Å to 7-8Å on average [26].

The increase in thermal stability of DNA after binding with m-AMSA, manifesting as the rise of melting temperature of double DNA helix, is considered to be a proof for intercalation as well [27].

References

- [1] **Cain B.F., Seelye R.N., Atwell G.J.:** Potantial Antitumor Agents. 14. Acridylmethanesulfonanilides, *J. Med. Chem.* 17, 9, 922-930, (1974).
- [2] **Pastwa Elżbieta.:** Ph.D. thesis 1998.
- [3] **Rene B., Fosse P., Khelifa T., Jacquemin-Sablon A., Bailly C.:** The 1'-substituent on the anilino ring of the antitumor drug amsacrine is a critical element for topoisomerase II inhibition and cytotoxicity, *Mol Pharmacol*, 49, 343-350, (1996).
- [4] **Rene B., Fosse P., Khelifa T., Jacquemin-Sablon A., Bailly C.:** Cytotoxicity and interaction of amsacrine derivatives with topoisomerase II: role of the 1' substitute on the aniline nucleus, *Bull Cancer*. Oct; 84, 10, 941-948, (1997).
- [5] **Suh D., Oh Y-K., Chaires J.:** Determining the binding mode of DNA sequence specific Compounds, *Process Biochemistry*, 37, 521-525, (2001).
- [6] **Bourdouxhe-Housiaux C., Colson P., Houssier C., Waring M.J., BaillyC.:** Interaction of a DNA-Threading Netropsin-Amsacrine Combilexin with DNA and Chromatin, *Biochemistry*, 35, 14, 4251-4264, (1996).
- [7] **Liu C., Zhou J., Xu H.:** Interaction of the copper(II) macrocyclic complexes with DNA studied by fluorescence quenching of ethidium, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 71, 1-6, (1998).
- [8] **Watkins R.M., Graves D.E.:** Interactions of Anilinoacridines with Nucleic Acids: Effects of Substituent Modifications on DNA-Binding Properties, *Biochemistry*, 30, 17, 4277-4283 (1991).
- [9] **Jones R.L., Lanier A.C., Keel R.A., Wilson W.D.:** The effect of ionic strenght on DNA-ligand unwinding angles for acridine and quinolin derivatives, *Nucleic Acids Res.* 8, 1613-1624 (1980).
- [10] **Li T-K.:** Human Topoisomerase I Poisoning by Protoberberines: Potential Roles for Both Drug-DNA and Drug-Enzyme Interactions, *Biochemistry*, 39, 24, 7107-7116, (2000).
- [11] **Cain B.F., Baguley B.C., Denny W.A.:** Potential Antitumor Agents. 28. Deoxyribonucleic Acid Polyintercalating Agents, *J. Med. Chem.*, 21, 7, 658-668, (1978).
- [12] **Cantor C.R., Schimmel P.R.:** Biophysical Chemistry, Part 1: The Conformation of Biological Macromolecules, pp 311-341, W.H. Freeman, San Francisco (1985).
- [13] **Gormley P.E., Sethi V.S., Cysyk R.L.:** Interaction of 4'-(9-Acridinyloamino) methanesulfon-m-anisidide with DNA and Inhibition of Oncornavirus Reverse

- Transcriptase and Cellular Nucleic Acid Polymerases, *Cancer Research*, 38, 5, 1300-1306, (1978).
- [14] **Sissi C., Bolgan L., Moro S., Zagotto G., Bailly C., Menta E., Capranico G., Palumbo M.:** DNA-binding preferences of bisantrene analogs: relevance to the sequence specificity of drug-mediated topoisomerase II poisoning, *Molecular Pharmacology*, 54, 6, 1036-1045, (1998).
- [15] **Vijayalakshmi, R.; Kanthimathi, M.; Subramanian, V.; Nair, B. U.:** Interaction of DNA with [Cr(Schiff base)(H₂O)₂]ClO₄, *Biochim Biophys Acta*, 1475, 157-162, (2000).
- [16] **Antonini I., Polucci P., Jenkins T.C., Kelland L.R., Menta E., Pescalli N., Stefanska B., Mazerski J., Martelli S.:** "1-[(w-Aminoalkyl)amino]-4-[N-(w-aminoalkyl)carbamoyl]-9-oxo-9,10-dihydroacridines as intercalating cytotoxic agents: Synthesis, DNA binding and biological evaluation, *J. Med. Chem.*, 40, 23, 3749-3755, (1997).
- [17] **Hudecz F., Kajtar J., Szekerke M.:** Interaction of the antitumour drug 4'-(9-acridinylamino)-methanesulfon-m-anisidine.HCl (m-AMSA) with nucleic acids, *Nucleic Acids Research*, 24, 6959-6973, (1981).
- [18] **Elmore R.H., Wadkins R.M., Graves D.E.:** Cooperative binding of m-AMSA to nucleic acids, *Nucleic Acids Research*, 16, 20, 9707-9719, (1988).
- [19] **Pilch D.S., Kirolos M.A., Liu X., Plum G.E. Breslauer K.J.:** Berenil (1,3-bis (4'-amidinophenyl)triazene) Binding to DNA Duplexes and to a RNA Duplex - Evidence for Both Intercalative and Minor-Groove Binding-Properties, *Biochemistry*, 34, 31, 9962-9976, (1995).
- [20] **Wilson W.D., Tanious F.A., Watson R.A., Barton H.J., Strekowska A., Harden D.B., Strekowski L.:** Interaction of Unfused Aromatic Cations with DNA: A New Class of Intercalators, *Biochemistry*, 28, 5, 1984-1992, (1989)
- [21] **Neidle S., Webster G.D., Baguley B.C. Denny W.A.:** Nucleic Acid Binding Drugs-XIV. The Crystal Structure of 1-methyl Amsacrine Hydrochloride; Relationships to DNA-Binding Ability and Anti-Tumour Activity, *Biochemical Pharmacology*, 35, 22, 3915-3921, (1986).
- [22] **Feigon J., Denny W.A., Leupin W., Kearns D.R.:** Interaction of Antitumor Drugs with Natural DNA: 1HnmR Study of Binding Mode and Kinetics, *J. Med. Chem.*, 27, 4, 450-465, (1984).
- [23] **Denny W.A., Atwell G.J., Baguley B.C.:** Potential Antitumor Agents. 39. Anilino Ring Geometry of Amsacrine and Derivatives: Relationship to DNA Binding and Antitumor Activity, *J. Med. Chem.*, 26, 11, 1625-1630, (1983).
- [24] **Baguley B.C., Cain B.F.:** Comparison of the in Vivo and in Vitro Antileukemic Activity of Monosubstituted Derivatives of 41-(9-Acridinyloamino)methanesulfon-m-anisidide, *Molecular Pharmacology*, 22, 2, 486-492, (1982).
- [25] **Waring, M.J.:** Variation of the supercoils in closed circular DNA by binding of antibiotics and drugs: evidence for molecular models involving intercalation. *J. Mol. Biol.* 54, 247-279, (1970).
- [26] **Cohen G., Eisenberg H.:** Viscosity and Sedimentation Study of Sonicated DNA-Proflavine Complexes, *Biopolymers*, 8, 45-55, (1969).
- [27] **Crothers D.M.:** Statistical Thermodynamics of Nucleic Acid Melting Transitions with Coupled Binding Equilibria, *Biopolymers*, 10, 2147-2160, (1971).

BADANIA ODDZIAŁYWAŃ POMIĘDZY m-AMSA A DNA METODAMI WISKOZYMETRYCZNYMI ORAZ PROFILI TOPNIENIA DNA

Streszczenie

W pracy badano oddziaływania pomiędzy m-AMSA i CT-DNA metodami wiskozymetrycznymi oraz profili topnienia DNA. Zaobserwowano wzrost stabilności termicznej DNA po związaniu m-AMSA, która zależała od stosunku stężeń m-AMSA/DNA. Największy wzrost temperatury topnienia badanego układu względem roztworu DNA wyniósł 6°C dla stosunku m-AMSA/DNA = 0,5. Pomiary wiskozymetryczne wskazały jednoznacznie na interkalacyjny sposób wiązania m-AMSA z DNA. W stanie wysycenia jedna cząsteczka m-AMSA przypadała średnio na 2,76 par zasad DNA.

Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Politechnika Łódzka

DOROTA SOBCZUK

**Institute of General Food Chemistry
Technical University of Łódź, Poland**

REBECCA CRAIG

**The School of Pharmacy
The Queen's University of Belfast
Medical Biology Centre, Belfast
BT9 7BL, Northern Ireland, U.K.**

MARTA NOGUEROLES

**Facultad de Ciencias
Universidad de Alicante, Alicante, Spain**

SLAVICA RADIŠIĆ

**Department of Pharmacy
Faculty of Medicine, Banja Luka, 78000 Banja Luka, Bosnia**

BOHENG SHEN

**School of Biosciences
University of Birmingham, Edgbaston, Birmingham, B15 2TT, U.K.**

SUSANNE SIMON

**Biozentrum of the University of Basel
CH-4056 Basel, Switzerland**

THE STUDY OF THE INTERACTIONS BETWEEN NAPROXEN AND N-ACETYL-L-TYROSINE ETHYL ESTER

Review: prof. dr hab. Stanisław Wysocki

The interaction between naproxen and N-acetyl-L-tyrosine ethyl ester was investigated using UV-Vis absorption and fluorescence methods and the results indicate that an interaction is present in the

ground state. Hydrogen bond formation between these two molecules in complexation was illustrated by the computer optimised complex. This theory was supported by the increased fluorescence lifetime decay observed, the Gibbs free energy for complexation and also by the geometry of the complex.

1. Introduction

Naproxen, S(+)-6-methoxy- β -methyl-2-naphthalene acetyl acid (fig. 1), is a non-steroidal anti-inflammatory agent of the family of arylpropionic acids, with anti-inflammatory, analgesic, and anti-pyretic properties often used in the treatment of rheumatic and arthritic disease [1]. All of the drugs from this pharmacological group inhibit the cyclo-oxygenase enzyme by binding to the enzyme active site and presumably blocking access of the substrate to Tyr-385 [2].

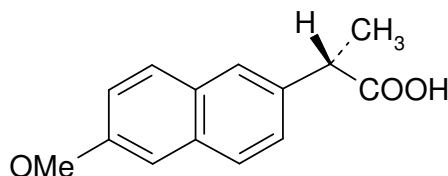


Fig. 1. The chemical structure of S-naproxen

N-acetyl-L-tyrosine ethyl ester (ATEE) (fig. 2) is used here to represent the amino acid tyrosine. In peptides, only the phenol group is available for interaction as the carboxyl and amino groups are involved in peptide bonds. Tyrosine is therefore esterified to ATEE, in which the only free group for interaction is also the phenol group.

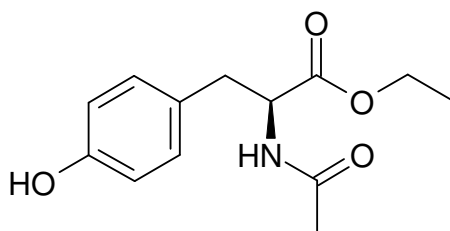


Fig. 2. The chemical structure of ATEE

The UV-Vis spectrum of naproxen in phosphate buffered saline (PBS), described by Moore et al, shows four absorption bands with maxima at 230nm, 270nm, 320nm, and 330nm. The emission spectra of naproxen in PBS at room

temperature shows maxima at 355nm, and the calculated fluorescence quantum yield (Φ_F) is 0.40 [3].

The UV absorption spectra of ATEE in water, measured by Ali et al, shows two peaks with maxima at 230nm and 275nm [4]. The fluorescence emission spectra of ATEE solution shows a maximum at 301nm, with excitation at 280nm, as described by Nevin et al [5].

Naproxen has been shown to photosensitize single stranded break in double stranded, supercoiled DNA *in vitro*, and was therefore chosen for this experiment due to its possible use as an inhibitory agent for some enzymes, including topoisomerases [6]. Topoisomerases form an intermediate between the phosphoryl group of the DNA backbone and the tyrosine of the enzyme active site, and are therefore important for DNA replication, which is augmented in cancer pathology [7]. It is hoped that this inhibitory process will occur on interaction with tyrosine, which is an amino acid important in many enzymes, including topoisomerase I. The anticipated complex formed between naproxen and tyrosine should result in inhibition. The suggested complex between these molecules involves the carboxyl group of naproxen and phenol group of ATEE, and if this occurs, it would facilitate the possible use of naproxen in photodynamic therapy in cancer treatment.

The aim of this investigation is to find if there is any interaction between naproxen and N-acetyl-L-tyrosine ethyl ester (ATEE), in the ground and excited states. We have applied a photophysical approach for studying the specific interaction between these two molecules. The methodology we used in our investigation is UV absorption spectroscopy, steady state fluorescence spectroscopy, and time-resolved fluorescence spectroscopy.

2. Experimental Details

2.1. Materials

Naproxen and N-acetyl-L-tyrosine ethyl ester (ATEE), produced by Sigma were used in the experiment, and were dissolved in 0.1M phosphate buffer (pH 7.0). All reagents were at least analytical grade and were used without further purification.

2.2. Methods

Absorption measurements were obtained using a Nicolet Evolution 300 UV-Vis spectrophotometer (resolution 1nm; A range 0-6) from Thermo Electron Corporation.

Steady-state fluorescence measurements were made using spectrofluorometer Fluoromax-2 (2000 signals/noise) from Jobin Yvon-Spex. Solutions were placed into a 10mm stoppered quartz cuvette and temperature was kept constant at 27°C. Titrations were made with a constant ATEE concentration while varying the concentration of naproxen.

Kinetics of the fluorescence decay were measured using a time-resolved fluorometer (Edinburgh Instruments OB-920) using a pulsed nanosecond nitrogen lamp as an excitation source and temperature was again constant at 27°C. The decay curves were analyzed using F 900 Spectrometer Software.

The complex structure between naproxen and ATEE was optimized with the program Gaussian 3.0, firstly utilizing the method Universal Force Field (UFF) [8] and then with AM1 [9]. S-naproxen was used in the complex optimization.

3. Results and Discussion

3.1. Experimental Results

3.1.1. UV

In fig. 3 the spectrum for ATEE shows a maximum at 275nm which corresponds with the literature value [4]. Naproxen shows four peaks at 262nm, 271nm, 317nm and 330nm. The peak at 262nm differs from the literature values which do not include this maximum [3].

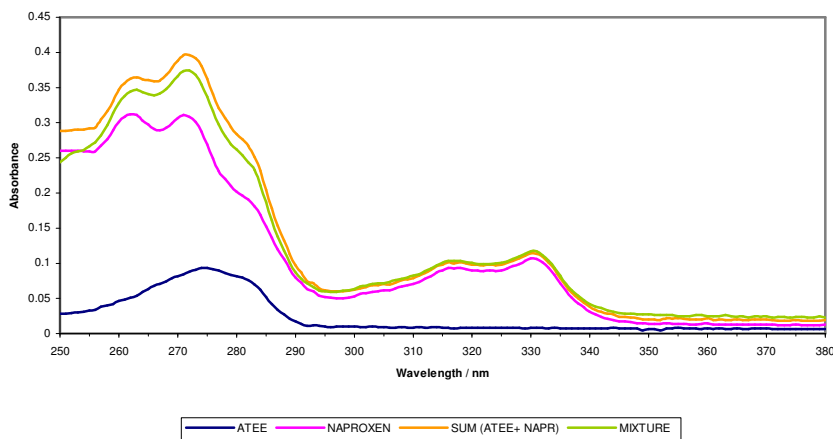


Fig. 3. The absorption spectra of ATEE ($5 \times 10^{-5} \text{M}$), naproxen ($5 \times 10^{-5} \text{M}$) and the mixture

The mixture and the theoretical sum of the absorbances of ATEE and naproxen show maxima at the same wavelengths but the absorbance of the mixture in the tyrosine region (260-285nm) is lower than that of the theoretical sum in comparison to the red end.

The observed difference between the UV spectral lines is not large indicating that this technique has low sensitivity, therefore fluorescence emission was employed to improve sensitivity.

3.1.2. Fluorescence

The steady state fluorescence emission spectra (fig. 4) obtained for ATEE and naproxen show maxima at 303.5nm and 355nm respectively, which are comparable with the literature values [3,5]. The fluorescence quantum yield of the mixture (exc. 280nm) is lower than that of both ATEE and naproxen in the regions of the maximal intensity. This gives an indication of some interaction between naproxen and ATEE.

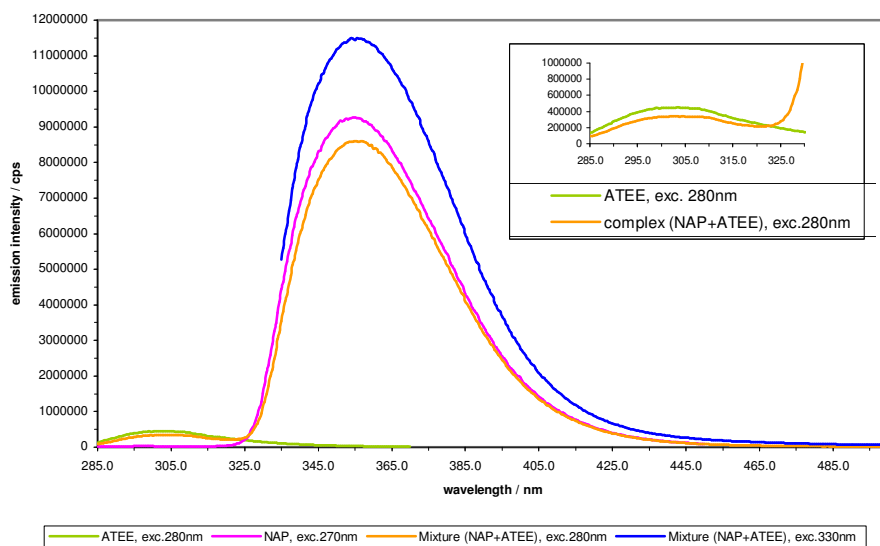


Fig. 4. Emission spectra of ATEE, naproxen and complex (NAP+ATEE); a magnification of the spectrum from 285-330nm can be seen in the insert

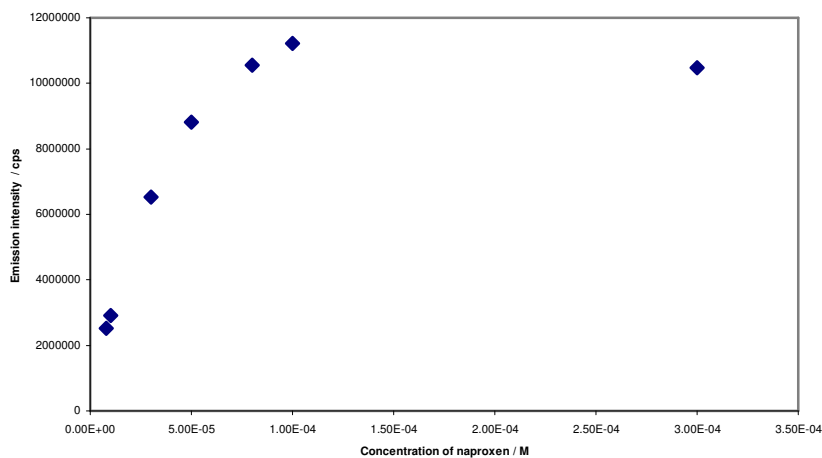


Fig. 5. A plot of the maximum emission intensity of the complex at 355nm against the concentration of naproxen, excitation 270nm

It can be seen from fig. 5 that the fluorescence quantum yield of the complex increases with increasing naproxen concentration until a constant intensity is reached, where all the ATEE (constant concentration, $5 \times 10^{-5} \text{M}$) is involved in complex formation so that no further complexes can be produced.

3.1.3. Stern-Volmer

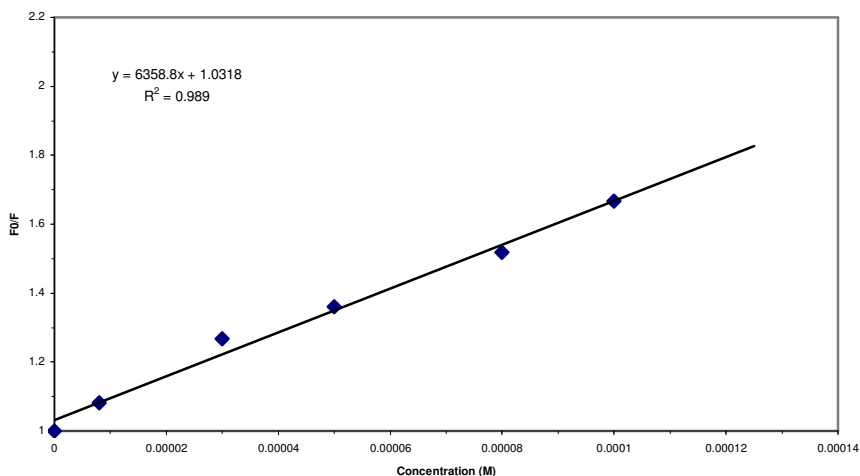


Fig. 6. Stern-Volmer plot for ATEE fluorescence quenching by naproxen ($[\text{ATEE}] = 5 \times 10^{-5} \text{M}$)

The quenching of ATEE fluorescence by naproxen is described by the Stern-Volmer plot (fig. 6), and the relationship:

$$\frac{F_0}{F_i} = (1 + k_q \cdot \tau_0 \cdot [Q]_i) \cdot (1 + K \cdot [Q]_o) \quad (1)$$

where: F_0 – fluorescence intensity in the absence of quencher (naproxen)
 F_i – fluorescence intensity for changing concentration of quencher
 k_q – rate constant for quenching
 τ_0 – lifetime of fluorescence decay of chromophore in the absence of quencher
 $[Q]_i$ – concentration of free quencher
 K – equilibrium constant for complex formation in ground state, in the presence of quencher
 $[Q]_o$ – analytical concentration of quencher

The first bracket describes dynamic quenching and the second describes static quenching. The straight line obtained in the Stern-Volmer plot is therefore indicative of the presence of either purely static or dynamic quenching but it is not possible to determine which occurred. Time resolved fluorescence spectroscopy was therefore used to determine the decay times, thus enabling the differentiation between the presence of static and dynamic quenching.

3.1.4. Time-resolved Fluorescence

The kinetics of the fluorescence decay of ATEE and the complex (em. 302nm) are di-exponential, whereas the decay of naproxen and the complex (em. 355nm) is mono-exponential. The τ_2 value for ATEE and the complex are comparable. The τ_1 value of the complex (em. 302nm) is larger than that for ATEE. This result is opposite to that expected if quenching occurs in the excited state, therefore indicating that complex forms in the ground state. As dynamic quenching can only occur in the excited state, it can be concluded from this result that only static quenching is present so analysis hereafter will be performed neglecting the former.

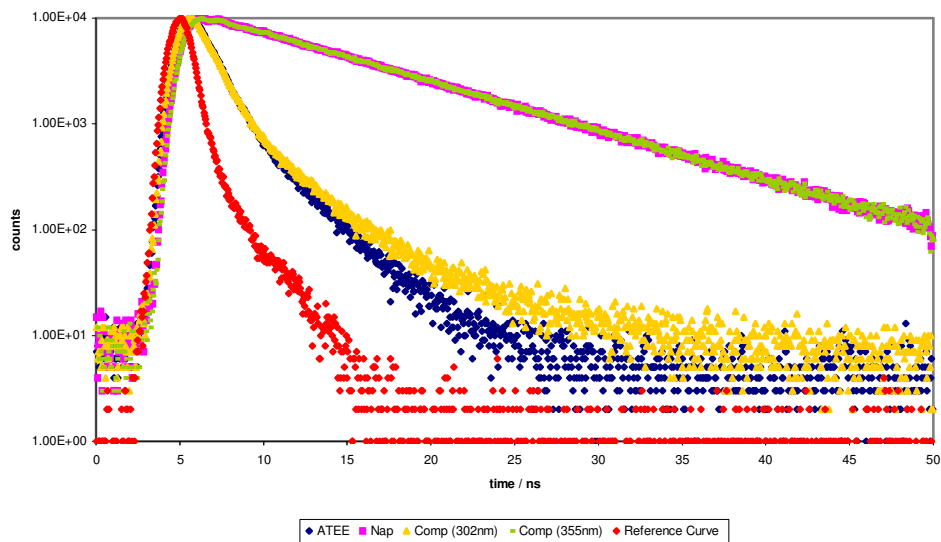


Fig. 7. Fluorescence time decay for ATEE (5E-5M), naproxen (5E-5M) and complex (ATEE+NAP)

Table 1

Fluorescence lifetime decays for ATEE, naproxen and complex em. 302nm and 355nm, obtained from time resolved fluorescence spectroscopy

	τ_1		τ_2		Average τ
	(ns)	B_1	(ns)	B_2	(ns)
ATEE	3.377	0.004	1.013	0.068	1.400
Complex, em. 302nm	4.683	0.003	0.997	0.071	1.607
Naproxen	9.283	0.039	-	-	-
Complex, em. 355nm	9.306	0.040	-	-	-

The first bracket of equation 1 can be omitted:

$$\frac{F_0}{F_i} = (1 + K \cdot [Q]_0) \quad (2)$$

and the equilibrium constant, K attained from the slope of the Stern-Volmer plot. This value is $6.36 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, and will be denoted as K_1 .

To compare the results from practical and theoretical, the K value from the practical was recalculated using equation 3. The Stern-Volmer equation describing K_1 assumes that the naproxen (quencher) concentration is much greater than that of ATEE but this assumption does not hold for this experiment as the concentrations are comparable so it was necessary to use equation 3.

The ratio F_0/F_i can be calculated from:

$$\frac{F_0}{F_i} = \frac{C_T^o}{(C_T^o - C_K)} \quad (3)$$

where: C_T^o – analytical concentration of ATEE

C_K – concentration of complex

Because:

$$F_i = \alpha \cdot \sum_i \cdot \Phi_i \cdot \epsilon_i \cdot C_i \quad (4)$$

where: α – apparatus factors

Φ_i : – fluorescence quantum yield of i

ϵ_i – molar extinction coefficient of i

C_i – concentration of i

with the consideration that $A \leq 0.1$

$$F_i = \alpha (\Phi_T \cdot \epsilon_T \cdot C_T + \Phi_N \cdot \epsilon_N \cdot C_N + \Phi_K \cdot \epsilon_K \cdot C_K) \quad (5)$$

From the experimental conditions ($\lambda_{exc}=280nm$, $\lambda_{em}=302nm$), it can be seen that:

$$\Phi_N = 0 \quad \Phi_K = 0$$

In this case the equation for F_i has the form:

$$F_i = \alpha \cdot \Phi_T \cdot \epsilon_T \cdot C_T \quad (6)$$

Under the equilibrium conditions, the concentration of free ATEE molecules is less than the analytical value of the concentration of the complex so that equation 6 has the form:

$$F_i = \alpha \cdot \Phi_T \cdot \epsilon_T \cdot (C_T^o - C_K) \quad (7)$$

The intensity of fluorescence emission without naproxen is equal to:

$$F_0 = \alpha \cdot \Phi_T^o \cdot \epsilon_T \cdot C_T^o \quad (8)$$

Therefore the Stern-Volmer equation can be described with the formula:

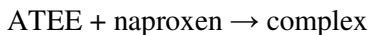
$$\frac{F_o}{F_i} = \frac{\alpha \cdot \Phi_T^o \cdot \epsilon_T \cdot C_T^o}{\alpha \cdot \Phi_T \cdot \epsilon_T \cdot (C_T^o - C_K)} = \frac{C_T^o}{(C_T^o - C_K)} \quad (9)$$

Because $\langle \tau_T \rangle = \langle \tau_K \rangle$ it can be concluded that

$$\Phi_T^o = \Phi_K$$

Therefore equation 3 has the form as it is written above.

From the definition of the equilibrium constant for the reaction:



and the mass law, the following equation is obtained:

$$K = \frac{C_K}{(C_T^o - C_K) \cdot (C_N^o - C_K)} \quad (10)$$

The acceptable physical root of this equation gives C_K :

$$C_K = \frac{1}{2} \left\{ \left(C_N^o + C_T^o + \frac{1}{K} \right) - \sqrt{\left(C_N^o + C_T^o + \frac{1}{K} \right)^2 - 4C_N^o C_T^o} \right\} \quad (11)$$

C_T^o and C_N^o are the initial concentrations of ATEE and naproxen respectively, calculated from the computer data, C_K is the concentration of the complex.

C_K from equation 11 can be substituted into equation 3 in order to calculate K .

The graph obtained by fitting the experimental data to equation 3 using the Slidewrite program has a better fit than the Stern-Volmer plot (fig. 6).

The K value (K_3) obtained is $6.05 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ (Fig. 8).

From this K value, it is possible to calculate the Gibbs free energy:

$$K = \exp\left(-\frac{\Delta G}{RT}\right) \quad (12)$$

where R is the universal gas constant and T is the absolute temperature (298K).

The calculation of ΔG with K_3 using a rearrangement of equation 12, gives a value of -21.56 KJ/mol .

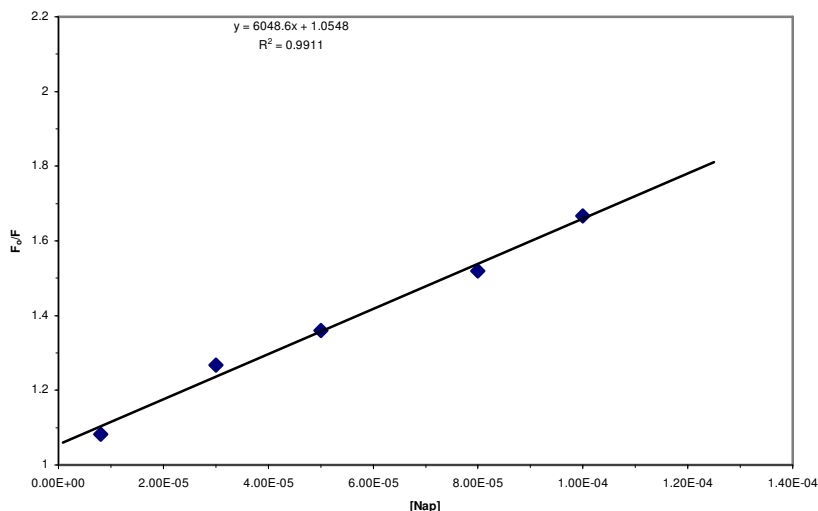


Fig. 8. Fitting graph for Stern-Volmer plot

3.2. Theoretical results

To calculate the theoretical ΔG , the computer data values were substituted into equation 13.

$$\Delta G = G_k - (G_N + G_T) \quad (13)$$

where ΔG is the Gibbs free energy, G_K is the free energy of the complex, G_N is the free energy of naproxen, G_T is the free energy of ATEE.

The calculated theoretical ΔG is -30.456 KJ/mol. This value is similar to literature values for hydrogen bonding (20 kJ/mol) [10]. The theoretical structure was optimized in vacuum, neglecting the effect of solvation which occurred in the experiment, and therefore resulting in the difference in values ΔG .

From this theoretical value of ΔG , K_2 was calculated using equation 12 giving a value of $2.19 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, which is higher than K_3 ($6.05 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$) due to the solvation effects previously discussed.

The distance in O-H...O in the optimized complex is 2.92 Å, which is comparable to the literature value of 2.8 Å [10]. The angle 1-4-2 is 149°, and not linear due to disruption of the bond angle by oxygen 3. The angle of the hydroxyl group in free ATEE is 107.9°, compared with 109.4° when in the complex. A red shift in the frequency of the stretch vibration of the C-O bond in the hydroxyl group of ATEE is observed from 1686.15 cm⁻¹ in free ATEE to 1677.73 cm⁻¹ when in the complex. This is characteristic for the formation of a hydrogen bond.

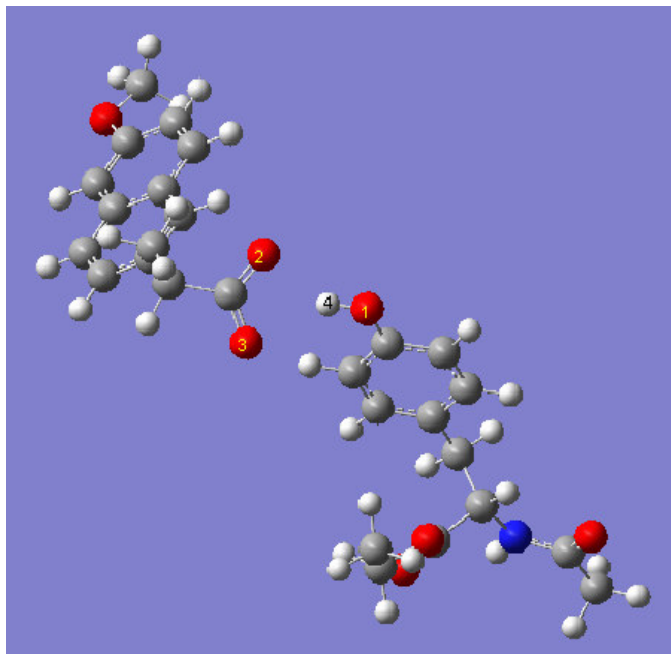


Fig. 9. The optimized structure of the complex between naproxen and ATEE

4. Conclusions

Both the theoretical (-30.456 KJ/mol) and experimental (-21.56KJ/mol) ΔG values agree with the energy of formation of hydrogen bonds [10].

It has been shown that there is an interaction between naproxen and ATEE in the ground state due to the small difference in absorbance values between the complex and the sum of the absorbances of ATEE and naproxen, and to the increase in fluorescence lifetime decay. The suggested complex structure obtained from optimization is stabilized by hydrogen bonds and this theory is supported by the increased τ_1 value, as it is known that hydrogen bond formation can increase the fluorescence lifetime of a chromophore group [11].

The geometry of the optimized complex structure and the red shift in hydrogen bond vibrations supports the proposed formation of hydrogen bonds in complex formation between naproxen and ATEE.

It can therefore be concluded that naproxen and ATEE interact by hydrogen bond formation.

Acknowledgements: The authors would like to thank Prof. S. Wysocki, head of the Institute of General Food Chemistry, who funded the project and provided the practical equipment. We acknowledge A. Kowalska for the

knowledge of the Gaussian and HyperChem programs. Furthermore, thanks to IAESTE for the opportunity to gain invaluable work experience.

References

- [1] **Junquere, E., Aicart, E.:** A fluorimetric, potentiometric and conductimetric study of the aqueous solutions of naproxen and its association with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *International Journal of Pharmaceutics*, 176: 169-178, (1999).
- [2] **Loll, P. J., Picot, D., Ekabo, O., Garavito, R.M.:** Synthesis and use of iodinated nonsteroidal anti-inflammatory drug analogues as crystallographic probes of the prostaglandin H2 synthetase cyclooxygenase active site. *Biochemistry*, 35: 7330-7340, (1996).
- [3] **Moore, D. E., Chappuis, P.P.:** A comparative study of the photochemistry of the non-steroidal anti-inflammatory drugs naproxen, benoxaprofen and indomethacin. *Photochem. Photobiol.*, 65: 828-832, (1988).
- [4] **Ali, F. E., Barnham, K. J., Barrow, C. J., Sparovic, F.:** Metal catalysed oxidation of tyrosine residues by different oxidation systems of copper/hydrogen peroxide. *J. Inorganic Biochemistry*, 98: 173-184, (2004).
- [5] **Nevin, A., Cather, S., Anglos, D., Fotakis, C.:** Analysis of protein-based binding media found in paintings using laser induced fluorescence spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, 573-574: 341-346, (2006).
- [6] **Bosca, F., Marin, M. L., Miranda, M. A.:** Photoreactivity of the nonsteroidal anti-inflammatory 2-arylpropionic acids with photosensitizing side effects. *Photochemistry and Photobiology*, 74 (5): 637-655, (2001).
- [7] **Pommier, Y., Pourquier, P., Fan, Y., Strumberg, D.:** Mechanism of action of eukaryotic DNA topoisomerase I and drug targeted to the enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1400: 83-106, (1998).
- [8] **Rappé, A. K., et al.:** UFF, a full periodic table force field for molecular mechanics and molecular dynamics simulations. *J. Am. Chem. Soc.*, 114: 10024-10035, (1992).
- [9] **Dewar, M. J. S., Zoebisch, E. G., Healy, E. F., Stewart, J. J. P.:** AM1: A new general purpose quantum mechanical molecular model. *J. Am. Chem. Soc.*, 107: 3902-3909, (1984).
- [10] **Atkins, P., De Paula, J.:** *Atkins's Physical Chemistry* 8th ed. Oxford; New York: Oxford University Press, 634, (2006).
- [11] **Armbruster C., Knapp M., Rechthaler K., Schamschule R., Parusel A. B. J., Kohler G., Wehrmann W.:** Fluorescence properties of 1-heptanoylpyrene: a probe for hydrogen bonding in microaggregates and biological membranes. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 125: 29-38, (1999).

BADANIA ODDZIAŁYWAŃ POMIĘDZY NAPROXENEM I N-ACETYLOWYM ESTREM ETYLOWYM L-TYROZINY

Streszczenie

W pracy zbadano oddziaływanie pomiędzy naproxenem i N-acetylowym estrem etylowym L-tyrozyny metodami spektroskopii absorpcyjnej UV-Vis i fluorescencyjnymi. Wyniki wskazują na istnienie interakcji między cząsteczkami w stanie podstawowym. Powstawanie wiązania wodorowego pomiędzy tymi dwoma molekułami zobrażowane zostało poprzez komputerową optymalizację kompleksu. Teorię tą potwierdza wydłużenie czasu życia fluorescencji kompleksu, energia kompleksowania Gibbsa oraz geometria cząsteczki kompleksu.

Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Politechnika Łódzka

PIOTR DZIUGAN**Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii****Politechnika Łódzka**

ZASTOSOWANIE TAC Z KRATOWNICĄ W PROCESIE LIOFILIZACJI BIOPREPARATU ZAWIERAJĄCEGO BAKTERIE *LACTOBACILLUS PLANTARUM*

Opiniodawca: **dr hab. Lucjan Kala, prof. PŁ**

*Analizowano możliwość intensyfikacji procesu liofilizacji biopreparatu zawierającego bakterie *Lactobacillus plantarum* przez zastosowanie tac z kratownicą. Wykonano badania porównawcze kinetyki procesu liofilizacji biopreparatu z użyciem tac z kratownicą i tac bez kratownicy. Wykazano, że zastosowanie kratownicy skracало proces liofilizacji o 1,5 godziny i nie wpływało na obniżenie jakości produktu. Liczba drobnoustrojów przeżywających w próbach suszonych na tacy z kratownicą ($5,4 \times 10^9$ j.t.k./g.s.s.) nie różniła się znacząco od liczby mikroorganizmów w biopreparacie suszonym na tacy bez kratownicy ($5,6 \times 10^9$ j.t.k./g.s.s.).*

1. Wprowadzenie

Tradycja wyrobu mlecznych produktów fermentowanych, a zwłaszcza jogurtu jest bardzo stara i szacuje się, że technologie te były znane około 4000 lat temu. Również bardzo dawno akceptowano przekonanie o dobroczynnym wpływie na zdrowie człowieka mlecznych napojów fermentowanych. Jak podaje stara perska legenda Abraham zawdzięczał swoją długowieczność i płodność spożywaniu dużych ilości jogurtu. Legenda ta została obecnie naukowo potwierdzona. Spożywanie aktywnych biologicznie produktów fermentowanych przy udziale bakterii mlekowych pomaga utrzymać w dobrej kondycji funkcje trawienne, co ma szczególne znaczenie dla osób w podeszłym wieku.

Szerokim zainteresowaniem cieszą się fermentowane produkty pochodzenia zwierzęcego nie tylko mleczne jak jogurt, kefir, lecz także fermentowane wędliny typu Salami. W Europie Wschodniej dużym uznaniem cieszą się tradycyjne fermentowane produkty pochodzenia roślinnego, takie jak ogórki kiszone, kapusta kiszona, a nawet grzyby. Stwierdzono, że odpowiedzialne za fermentację surowców roślinnych są bakterie *Lactobacillaceae*, a głównie szczep *Lactobacillus plantarum*. Liczne badania dowodzą, że bakterie *L. plantarum* posiadają właściwości profilaktyczne przez regulację mikroflory układu pokarmowego, łagodzą one dolegliwości jelitowe występujące u przewlekłe chorych oraz po zabiegach operacyjnych. W Instytucie Technologii Fermentacji i Mikrobiologii opracowano biopreparat probiotyczny, zawierający żywe bakterie *L. plantarum* (fot. 1). Jest to produkt całkowicie naturalny, bogaty w bioaktywne komponenty, niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania organizmu ludzkiego. W skład biopreparatu wchodzi:

- mleko sojowe w postaci sproszkowanej,
- mąka sojowa,
- lecytyna wykazująca działanie ochronne na komórki *L. Plantarum*, a w organizmie ludzkim obniżająca poziom cholesterolu we krwi i wspomagająca system nerwowy.

Skład podłoża hodowlanego, warunki namnażania drobnoustrojów i utrwalania biopreparatu zostały tak dobrane, by zapewnić wysoką aktywność produktu, wykorzystując wyłącznie naturalne surowce, spełniające różne funkcje biologiczne i gwarantujące jednocześnie niskie koszty produkcji. Umożliwi to szeroką dostępność produktu dla masowego klienta, w przeciwieństwie do obecnych na rynku biopreparatów probiotycznych, których stosowanie jest ograniczone do wąskiej grupy klientów ze względu na ich wysoką cenę.

Jako metodę utrwalania biobiopreparatu wybrano liofilizację [2,3,4]. Podczas badań wstępnych suszenia sublimacyjnego w warunkach przemysłowych napotkano na problem polegający na wybrzuszaniu się biopreparatu na tacy, przez co tracił on dobry kontakt z tacą i półką grzewczą. Ciepło na przemianę fazową było pobierane z produktu, czego konsekwencją było obniżenie jego temperatury i wydłużenie czasu suszenia do 40 godzin. Opisane zjawisko obserwowano szczególnie podczas suszenia sublimacyjnego biobiopreparatu o grubości warstwy 15 mm (rys.1). Rozwiązaniem problemu może być zastosowanie tac z kratownicą (fot. 2).

2. Część doświadczalna

2.1. Materiały i metody badań

Do produkcji biopreparatu wykorzystano szczep bakterii fermentacji mlekowej – *L. plantarum* pochodzący z Kolekcji Czystych Kultur Instytutu Technologii Fermentacji i Mikrobiologii PŁ. Zaszczepione tymi drobnoustrojami podłoże DBH [1] inkubowano przez 24 godziny w tempera-turze 30°C. Tak otrzymane inokulum użyto do zaszczepienia podłoża sojowego (Tabela 1).

Tabela 1
Skład podłoża sojowego

Składnik	Zawartość [%]
Mąka sojowa	20
Mleko sojowe	77
Inokulum	3

Po 24 godzinnej fermentacji mlekowej podłoża sojowego otrzymano biopreparat, do którego dodawano substancje ochronne (krioprotektanty):

- CaCO_3 w wyliczonej ilości zapewniającej pełne związanie wytworzonego kwasu mlekowego,
- lecytyna 1,5%,
- sacharoza 1,5 g/100 g.

Biopreparat po fermentacji umieszczano w warstwie 1 cm na tacach z kratownicami (fot. 2) i na tacach bez kratownic. Temperatura biopreparatu wynosiła 16°C. Następnie tace z biopreparatem umieszczono w komorze sublimacyjnej liofilizatora i załączono chłodzenie płyt. Biopreparat zamrażano do temp. –26° C. Po osiągnięciu tej temperatury załączono pompę próżniową. Po uzyskaniu ciśnienia 12 Pa włączono podgrzewanie półek liofilizatora. Zadana temperaturę 30°C płyty osiągnęły po 7 godzinach. Suszenie sublimacyjne prowadzono przy temperaturze półek 30°C. Liofilizację przerywano po 16 godzinach kiedy temperatura produktu na tacy z kratownicą zrównała się z temperaturą półki (30°C).

W badaniach wykorzystano liofilizator ZIRBUS CryoDry 75, który posiada unikalny system chłodzenia kondensora i płyt grzewczych ciekłym azotem.

W surowym i wysuszonym biopreparacie liczbę zdolnych do wzrostu bakterii fermentacji mlekowej oznaczono metodą płytkową.

2.2. Wyniki badań i dyskusja

Wytworzenie omawianego biopreparatu następuje w wyniku fermentacji mlekowej przy użyciu szczepu bakterii *L. plantarum* podłoża sojowego. Składniki podłoża hodowlanego (tabela 1) zapewniają dynamiczny rozwój *L. plantarum*.

Po 24 godz. fermentacji ich liczba wzrosła do rzędu 10^{10} j.t.k./g.s.s.. Utrwalanie biopreparatu następowało w procesie liofilizacji co zabezpieczało wartość biologiczną biopreparatu oraz długi okres jego trwałości.

Parametry liofilizacji biopreparatu na tacy z kratownicą i na tacy bez kratownicy w przemysłowym liofilizatorze ZIRBUS CryoDry 75 przedstawiono na rysunku 2.

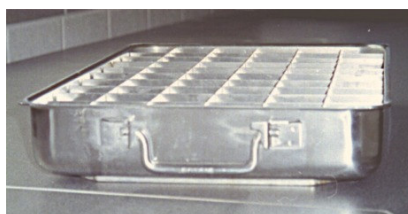
Dzięki zastosowaniu kratownicy następowała intensyfikacja wymiany ciepła, co przyczyniło się do zwiększenia szybkości zamrażania. Biopreparat na tacy z kratownicą zamraża się licząc od chwili osiągnięcia temperatury krioskopowej z szybkością 0,25 K/min. Biopreparat rozłożony na tacy bez kratownicy zamrażał się z szybkością 0,16 K/min.

W momencie, gdy biopreparat osiągnął temperaturę -26°C , uruchomiono pompy próżniowe. Po uzyskaniu w komorze sublimacyjnej zadanego ciśnienia 12 Pa załączono grzanie płyt. Rozpoczęto w ten sposób dostarczanie ciepła do biopreparatu, niezbędnego do przemiany fazowej jaką jest sublimacja lodu. Do 14,5 godziny trwania procesu suszenia, temperatura biopreparatu na tacy z kratownicą pozostawała niższa od temperatury biopreparatu znajdującego się na tacy bez kratownicy. Rozwinięcie powierzchni suszenia uzyskane dzięki kratownicy intensyfikowało sublimację wody. Ponadto podczas suszenia nie obserwowano wybrzuszania badanego biopreparatu.

Zasadniczy etap suszenia kończył się jednakowo dla obu biopreparatów po 16 godzinach, gdy osiągnęły one temperaturę 0°C . Wyraźne różnice wystąpiły w okresie dosuszania. Produkt umieszczony na tacy z kratownicą osiągnął temperaturę 20°C szybciej o 1,5 godziny niż próba suszona na tacy bez kratownicy. Wskazuje to, że w przypadku biopreparatu na tacy z kratownicą, większa ilość wilgoci była usunięta na drodze sublimacyjnej. Liczba drobnoustrojów przeżywających w próbce suszonej na tacy z kratownicą ($5,4 \times 10^9$ j.t.k./g.s.s.) nie różniła się znacząco od liczby żywych komórek w biopreparacie suszonym na tacy bez kratownicy ($5,6 \times 10^9$ j.t.k./g.s.s.).



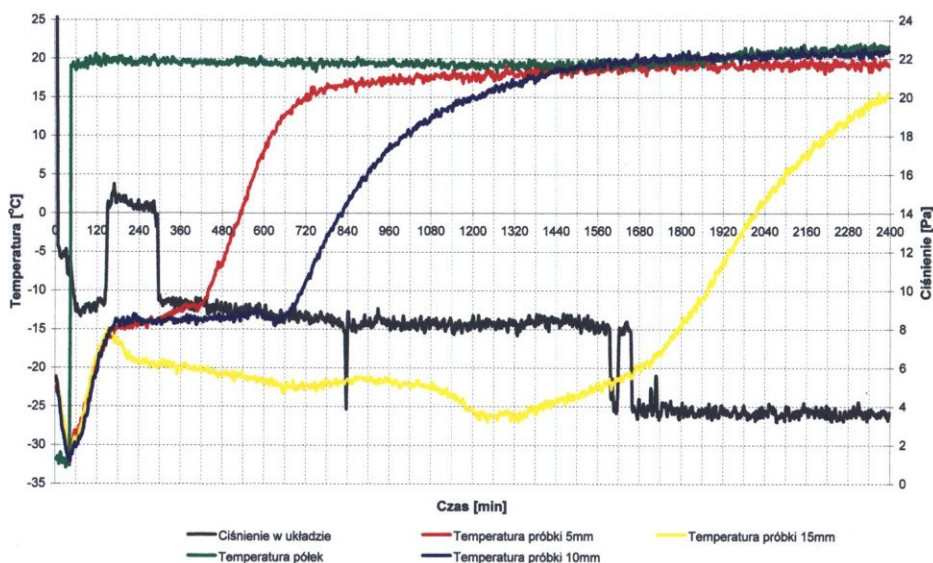
Fot. 1. Biopreparat probiotyczny suszony na tacy z kratownicą



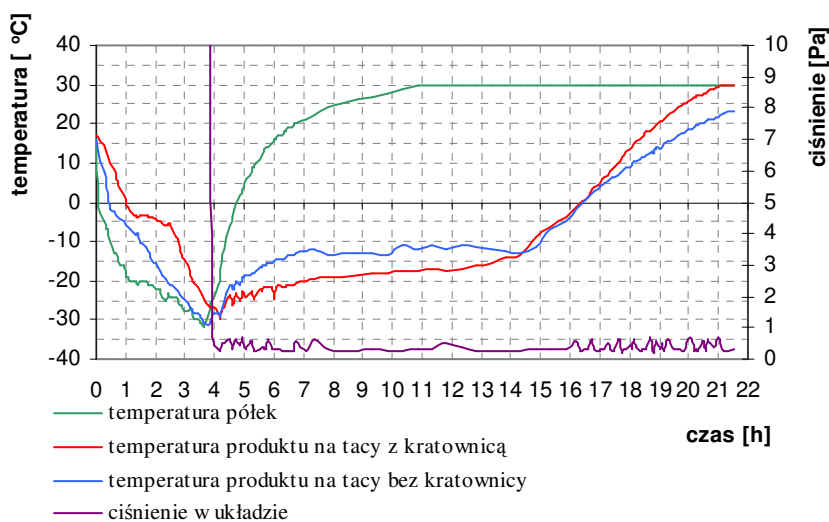
Fot. 2. Taca z kratownicą do liofilizacji biopreparatu

Podsumowując, można stwierdzić, że dzięki zastosowaniu kratownic uniknięto deformacji biopreparatu podczas suszenia i pogorszenia warunków transportu ciepła. Zastosowanie kratownicy skracало proces liofilizacji o 1,5 godziny i nie

wpływało na obniżenie przeżywalności bakterii *L. plantarum*. Wymienione efekty mają istotne znaczenie w przemysłowej produkcji biopreparatu. Wobec bardzo wysokich kosztów liofilizacji skrócenie czasu suszenia sublimacyjnego o 1,5 godziny ma wymierne znaczenie ekonomiczne.



Rys. 1. Przykładowa rejestracja suszenia sublimacyjnego prób biopreparatu o grubości warstwy 5mm, 10mm i 15mm. przy temperaturze półek 20°C



Rys. 2. Rejestracja parametrów liofilizacji biopreparatu probiotycznego na tacy z kratownicą i bez w liofilizatorze ZIRBUS CryoDry 75

Literatura

- [1] **Burbianka M., Pliszka A., Burzyńska H.:** Mikrobiologia żywności. Warszawa: PZWL, 1983, s. 60-62, 333-337.
- [2] **Geherke H.H., Pralle K., Deckwer W.D.:** Freeze Drying of Microorganisms – Influence of Cooling Rate on Survival. Food Biotechnology. 1992, vol. 6, nr 1, s. 35-49.
- [3] **Tutowa E.G., Kuc P.C.:** Suszenie produktów biosyntezy. Warszawa: WNT, 1991, s.16-29, 158-170.
- [4] **Wang W.:** Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. International Journal of Pharmaceutics. 2000, nr 203, s. 1-60.

APPLICATION OF GRILLE FOR FREEZE DRYING PROCESS OF BIOPREPARATE WITH BACTERIA OF *LACTOBACILLUS PLANTARUM*

Summary

The purpose of the study was to analyse the possibility intensification of freeze drying process of biopreparate with bacteria of *Lactobacillus plantarum*. The process was leaded to use a grille.

The research of kinetic of freeze drying process was made with or without to use grille.

The result of this study show that to use a grille reduce of time of freeze drying process about 1,5 hour, without reduction of product quality.

Institute of Fermentation Technology and Microbiology
Technical University of Łódź

IZABELA LUBECKA, EUGENIUSZ POGORZELSKI**Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności****Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii****Politechnika Łódzka**

WPŁYW PROCESU TECHNOLOGICZNEGO NA STĘŻENIA ZWIĄZKÓW MINERALNYCH W SOKU I KONCENTRACIE JABŁKOWYM

Opiniodawca: **dr hab. Wojciech Ambroziak prof. nadzw. PŁ**

Przedmiotem analiz były próby soku jabłkowego: bezpośrednio po tłoczeniu, po procesie depektynizacji, po klarowaniu, ultrafiltracji i zagęszczaniu. Na podstawie przeprowadzonych badań oraz oceny wyników można stwierdzić, że zawartość substancji mineralnych zmienia się w trakcie całego procesu technologicznego. Wykazano, że zarówno rodzaj użytego preparatu enzymatycznego podczas procesu depektynizacji, jak i ilość środka klarującego, ma wpływ na skład popiołu soku jabłkowego. Zastosowanie procesu ultrafiltracji spowodowało zatrzymanie badanych pierwiastków, w tym jonów wapnia, przez membrany filtracyjne i obniżenie ich zawartości w finalnym produkcie.

1. Wprowadzenie

Związkami mineralnymi organizmów roślinnych, środków spożywczych i napojów nazywa się te składniki, które po spaleniu pozostają w postaci popiołu. W przeważającej ilości występują w popiołach takie pierwiastki, jak: wapń, fosfor, chlor, sód, potas, magnez, natomiast w ilościach bardzo małych, np.: żelazo, cynk, miedź, mangan, molibden. Pierwiastki wchodzące w skład popiołu mogą występować w napojach nie tylko w postaci związków zdysocjowanych (solach), ale również w formie związków kompleksowych [1].

Surowiec przeznaczony do produkcji wina, taki jak moszcz bądź sok powinien zawierać odpowiednią ilość związków mineralnych, gdyż stanowią one naturalny korzystny składnik pożywki dla drożdży podczas procesu

fermentacji. Zarówno ich nadmiar jak i niedobór może być powodem nieprawidłowego przebiegu tego procesu [2]. W technologii winiarskiej minimalna zawartość popiołu zarówno w moszczach jak i w winach, jest wielkością normowaną. Pozwala to na określenie stopnia rozcieńczenia moszczu i kontrolę ewentualnych zafałszowań [3,4]. W soku przeznaczonym na rynek właściwa zawartość związków mineralnych zapewnia konsumentom korzyści zdrowotne, ze względu na ich wysokie właściwości dietetyczne.

Zawartość składników mineralnych w owocach zależy od wielu czynników, a zwłaszcza od typu gleby, na której rosną rośliny, warunków klimatycznych, rodzaju i ilości stosowanych nawozów, stopnia dojrzałości zbieranych owoców [5], a także od stopnia zanieczyszczenia środowiska [6] oraz warunków przechowywania i transportu owoców [7-9]. W soku skład jakościowy popiołu nie różni się od składu popiołu surowca przeznaczonego do ich produkcji. Jednak na skład ilościowy popiołu w produkcie końcowym znacznie wpływa sposób przeprowadzenia poszczególnych etapów procesu technologicznego otrzymywania finalnego produktu [10,11].

Przedmiotem zainteresowania i celem wykonanej pracy było określenie wpływu sposobu przeprowadzenia procesu technologicznego, a zwłaszcza etapu depektynizacji, klarowania i ultrafiltracji, na zawartość substancji mineralnych, głównie jonów wapnia, w soku jabłkowym. Ponadto przeprowadzono badania nad wpływem różnych handlowych preparatów enzymatycznych i ilości dodawanych środków klarujących na zawartość magnezu, wapnia, sodu i potasu w koncentracie jabłkowym. Praca ta jest kontynuacją badań mających na celu określenie przyczyn występowania w soku jabłkowym osadu, którego główny składnik zidentyfikowano jako uwodniony kwaśny jabłczan wapnia $\text{Ca}^{2+} \cdot 2(\text{C}_4\text{H}_5\text{O}_5) \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Podwyższona ilość jonów wapnia w finalnym produkcie, czyli w koncentracie jabłkowym, przy podwyższonej kwasowości odpowiada za powstanie tego typu osadu. Według informacji uzyskanych od producentów koncentratów jabłkowych osady krystaliczne występują dość rzadko w tym produkcie, ale stanowią uciążliwą wadę powodującą niedrożność zaworów i przewodów, co utrudnia tym samym pobieranie koncentratu z tanków przechowalniczych [12].

2. Materiał i metody

W badaniach wykorzystano próbki soków i koncentratu jabłkowego z zakładu „Hortex” w Skierniewicach. Próbkę soków były pobrane z kolejnych pięciu etapów otrzymywania zagęszczonego soku jabłkowego, a mianowicie: po procesie rozdrabniania, depektynizacji, po dodaniu środka klarującego, ultrafiltracji i zagęszczania.

W kolejnych etapach technologicznych stosowano następujące środki:

- w procesie depektynizacji enzymy firmy Novozymes:
 - preparat Pectinex 100 L do depektynizacji soku przed zagęszczaniem stosowany w dawce 0,41l na 12m³,
 - preparat Amylase AG 300L o aktywności glikoamylazy, stosowany w celu degradacji skrobi w sokach owocowych w dawce 0,15l na 12m³,
- w procesie klarowania:
 - SIHA-AktivBentonit firmy Begerow Polska Sp. Z o.o. - bentonit sodowo-wapniowy o bardzo wysokich zdolnościach adsorpcyjno-klarujących dozowany w dawce 30kg na 12m³ lub 60kg na 12m³,
 - SIHA Gelatine „fine granulated” firmy Begerow Polska Sp. z o.o. – żelatyna o optymalnej do klarowania soków i win liczbie Blooma, w postaci drobnoziarnistej, bardzo dobrze rozpuszczalnej stosowana w dawce 0,3kg na 12m³ lub 0,5kg na 12m³,
 - Baykisol 30 – żel kwasu krzemowego firmy Bayer AG o bardzo szerokim zakresie działania, doskonale współpracujący z żelatyną, przeznaczony do klarowania soków z owoców ziarnkowych, jagodowych i win w dawce 1,5kg na 12m³ lub 2,5kg na 12m³,
- do zabiegu ultrafiltracji wykorzystano membrany Kocha.

Przeprowadzono także proces depektynizacji soku surowego po rozdrobnieniu jabłek za pomocą trzech różnych handlowych preparatów pektynolitycznych:

- Novoform 115 – producent Novozymes, oddział w Warszawie
- Pektopol PT-400 – producent Zakłady Przemysłu Owocowo – Warzywnego „Pektowin” Sp.z o.o. w Jaśle
- Pectinex SMASH – producent Novozymes, oddział w Warszawie

Analizę identyfikacji ilościowej i jakościowej metali wapnia, magnezu, sodu i potasu występujących w sokach i koncentracie jabłkowym wykonano metodą spektrometrii absorpcji atomowej (AAS). Analizę pierwiastków przeprowadzono przy użyciu spektrometru AAS-FIAS model 3110 z FIAS-100 firmy Perkin Elmer, metodą płomieniową z użyciem palnika acetylenowo – tlenowego. Warunkiem koniecznym użycia płomieniowej metody AAS było uprzednie przeprowadzenie procesu mineralizacji badanych próbek. Mineralizację przeprowadzono na mokro z użyciem kwasu HNO₃ jako czynnika utleniającego, techniką mikrofalową pod zwiększonym ciśnieniem, w układzie zamkniętym w mineralizatorze mikrofalowym Ethos Plus firmy Milestone. Otrzymane w ten sposób próbki rozcieńczono do objętości 50 ml wodą zdemineralizowaną, a następnie poddano analizie. Roztwory sporządzono w oparciu o standardy i odczynniki firmy Baker. Poziom wykrywalności w tej analizie wynosił 1,0 µg na dm³ [13,14]. Dla każdej badanej próbki analizę wykonano w trzech powtórzeniach dla dwóch kolejnych eksperymentów prowadzonych dla każdego

etapu technologicznego, a w tabelach przedstawiono średnie wyniki oznaczeń $\bar{x} \pm \text{SD}$, dla $n = 6$.

3. Wyniki i dyskusja

Jednym z etapów procesu technologicznego otrzymywania koncentratu jabłkowego jest depektynizacja miazgi jabłkowej. Proces pektynolizy prowadzony jest przy użyciu preparatów pektynolitycznych, które z reguły zawierają kompleks enzymów pektynolitycznych z mniejszą lub większą zawartością pektynoesterazy (EC 3.1.1.11). Pektynosteraza jest to enzym, który hydrolizuje wiązania estrowe w pektynie powodując uwolnienie alkoholu metylowego i powstanie wolnych grup karboksylowych. Do wolnej grupy karboksylowej przyłączają się wówczas jony wapnia dając usieciowane kompleksy pektynianu wapnia, które oklejają zawieszone w soku cząsteczki zmętnień i wytrącają się w postaci kłaczkowatego osadu oddzielanego w czasie filtracji [15-17]. Tak więc można by przypuszczać, że po obróbce enzymatycznej soku jabłkowego pozostanie w nim większa ilość jonów wapnia, jeżeli stosowane preparaty pektynolityczne będą ubogie lub pozbawione pektynoesterazy.

W pracy w etapie depektynizacji miazgi jabłkowej stosowano trzy handlowe preparaty pektynolityczne, z których dwa zawierały znaczne ilości pektynoesterazy (Pectinex SMASH, Pektopol PT-400), a trzeci zawierał w przewodzie liażę pektynianową (Novoferm 115). W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że najwyższe zawartości oznaczanych pierwiastków występują w soku surowym z miazgi jabłkowej nie poddanej pektynolizie. Widoczne różnice zaobserwowano jedynie w przypadku jonów wapnia, których stężenie w sokach otrzymanych z miazgi poddanej pektynolizie różnymi preparatami enzymatycznymi było uzależnione od rodzaju zastosowanego preparatu. Najniższą stężenie jonów wapnia ($15\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) było w próbie, gdzie użyto preparatu Pectinex SMASH z deklarowanym udziałem w jego składzie enzymu pektynoesterazy. Preparat Pektopol PT-400 charakteryzujący się mniejszą zawartością pektynoesteraz powodował obniżenie stężenia jonów Ca^{2+} z $23\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ w soku surowym do $17\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ po procesie depektynizacji. Natomiast największe stężenie jonów wapnia występowało w sokach otrzymanych z miazgi traktowanej preparatem Novoferm 115 ($20\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$).

Obok jonów wapnia w sokach jabłkowych badano także stężenia innych pierwiastków wchodzących w skład popiołu soków jabłkowych – jonów Mg^{2+} , K^{+} i Na^{+} . Stężenie jonów magnezu wahało się w granicach od 28 do $34\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, jonów sodu od 16 do $21\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, natomiast najwięcej wśród oznaczanych pierwiastków znajdowało się jonów potasu $57\text{-}69\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Jednak biorąc pod uwagę obliczenia odchyłeń standardowych dla $n = 6$ nie można jednoznacznie

stwierdzić, czy zastosowane preparaty enzymatyczne wpływają na stężenia magnezu, sodu i potasu. Wyniki oznaczeń przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1

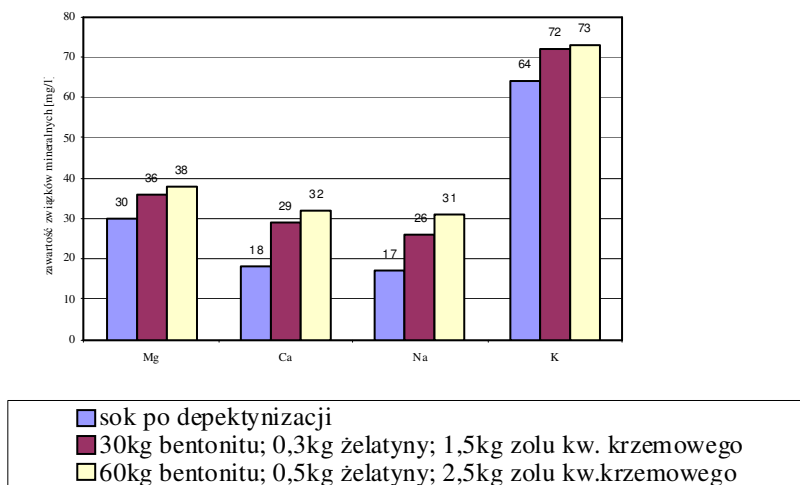
Stężenia związków mineralnych w soku jabłkowym ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) w zależności od zastosowanego preparatu enzymatycznego podczas procesu depektynizacji

Parametr	Sok surowy	Stosowany preparat enzymatyczny		
		Pektopol PT – 400	Novoferm 115	Pectinex SMASH
Magnez	$34 \pm 2,2$	$33 \pm 1,4$	$31 \pm 1,4$	$28 \pm 1,5$
Wapń	$23 \pm 1,6$	$17 \pm 1,7$	$20 \pm 1,9$	$15 \pm 2,1$
Sód	$21 \pm 1,8$	$20 \pm 2,3$	$16 \pm 1,5$	$18 \pm 1,5$
Potas	$69 \pm 1,8$	$67 \pm 2,2$	$63 \pm 2,5$	$57 \pm 1,6$

Podano wartości średnie $\bar{x} \pm \text{SD}$, dla $n = 6$.

Obok procesu depektynizacji zabiegiem, który wpływa na ilość oznaczanych pierwiastków w soku jest dodatek środka klarującego.

Proces klarowania ma na celu usunięcie zmętnień spowodowanych przez utrzymujące się w soku bardzo rozdrobnione nierozpuszczalne składniki. Zmętnienie i duża lepkość moszczu jabłkowego wiąże się głównie z obecnością w nim słabo rozpuszczalnego, wysokocząsteczkowego kwasu pektynowego, koloidów o charakterze węglowodanów lub białek, a także cząsteczek ścian komórkowych czy zanieczyszczeń. Do klarowania stosuje się szereg środków, które po zmieszaniu z sokiem wytrącają się wraz ze zmętnieniami w postaci osadów. Do tej grupy zalicza się m.in. żelatynę, żol kwasu krzemowego oraz bentonit [18]. W badaniach zastosowano wymienione środki klarujące dodawane do soku po etapie depektynizacji, w dwóch różnych dawkach. W pierwszej serii na 12 m^3 soku użyto: 30kg bentonitu, 0,3kg żelatyny i 1,5kg zolu kwasu krzemowego. Natomiast w serii drugiej zastosowano: 60kg bentonitu, 0,5kg żelatyny i 2,5kg zolu kwasu krzemowego (rys. 1).



Rys. 1. Wpływ ilości środków klarujących na stężenie związków mineralnych w soku jabłkowym; podano wartości średnie dla $n = 6$

Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że stosowane środki klarujące powodują wzrost związków mineralnych w soku. W procesie klarowania stosowano w przeważającej mierze bentonit. Głównym składnikiem, który decyduje o właściwościach bentonitu jest minerał ilasty – montmorylonit o wzorze $\text{Si}_4\text{Al}_{1,5}\text{Mg}_{0,5}\text{O}_{10}(\text{OH})_2\text{Ca}_{0,25}$. Jest to warstwowo zbudowany, krystaliczny glinokrzemian, posiadający między warstwami m.in. jony wapnia, magnezu, sodu [19]. Ze względu na to, że bentonit jest minerałem, należy spodziewać się, używając go do klarowania, iż może on podnieść ilość poszczególnych pierwiastków w produkcie, co wykazano w badaniach. W sokach pierwszej serii odnotowano wyraźny wzrost zawartości magnezu z 30 do 36 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, wapnia z 18 do 29 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, sodu z 17 do 26 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ oraz potasu z 64 do 72 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Zaobserwowano również, że stężenie oznaczanych pierwiastków w soku jabłkowym zależy od ilości dodawanego w procesie klarowania bentonitu, żelatyny i zolu kwasu krzemowego. Im były większe ilości stosowanych środków klarujących, tym obserwowano większy przyrost związków mineralnych w soku.

Radykalne zmiany w technologii otrzymywania koncentratów przed etapem zagęszczaniem nastąpiły wraz z wprowadzeniem do przemysłu procesu filtracji membranowej. Filtracja membranowa, w przeciwieństwie do tradycyjnych metod filtracyjnych, charakteryzuje się mniejszymi kosztami energii, wymaga małego nakładu czasu i pracy, a w dodatku w wyniku jej zastosowania otrzymuje się sok o wysokiej jakości. Wśród procesów membranowych coraz powszechniej stosowaną metodą w praktyce przemysłowej produkcji soku

jabłkowego jest ultrafiltracja [20-22]. Proces ultrafiltracji polega na fizycznym oddzieleniu cząstek stałych od filtratu w skutek przejścia przez membranę półprzepuszczalną. W wyniku przeprowadzonych analiz stwierdzono, że proces ten spowodował zatrzymanie badanych pierwiastków, w tym jonów wapnia, na membranie filtracyjnej i obniżenie ich zawartości w soku po ultrafiltracji w granicach od 7 do 35% ich stężenia wyjściowego [tabela 2].

Tabela 2

Zmiany stężenia wybranych związków mineralnych ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) w kolejnych etapach procesu produkcji koncentratu jabłkowego

Parametr	Próbki soków				
	po rozdrobnieniu	po depektynizacji	po klarowaniu	po ultrafiltracji	po zagęszczeniu
Magnez	$34 \pm 2,2$	$30 \pm 2,0$	$37 \pm 1,8$	$32 \pm 1,5$	$104 \pm 2,4$
Wapń	$23 \pm 1,6$	$18 \pm 1,5$	$30 \pm 2,1$	$25 \pm 1,4$	$93 \pm 1,3$
Sód	$21 \pm 1,8$	$17 \pm 1,2$	$28 \pm 2,5$	$18 \pm 2,0$	$74 \pm 1,5$
Potas	$69 \pm 1,8$	$64 \pm 2,0$	$72 \pm 1,6$	$67 \pm 1,3$	$265 \pm 2,4$

Podano wartości średnie $\bar{x} \pm \text{SD}$, dla $n = 6$.

Ogólne kryteria jakościowe dla zagęszczonych soków owocowych, w tym także wymagania dotyczące zawartości wapnia, magnezu, sodu i potasu, określa w obrębie Unii Europejskiej, „Code of Practice” – Kodeks Praktyki, wydany przez Stowarzyszenie Producentów Soków i Nektarów z Owoców i Warzyw czyli AIJN (Association of the Industry of Juice and Nectars from Fruits and Vegetables of the European Economic Community). Odpowiednia zawartość poszczególnych pierwiastków jak i innych parametrów fizyko – chemicznych ujętych w Kodeksie Praktyki pozwala na ustalenie autentyczności i identyczności soków. Wymagania AIJN dotyczące wartości poszczególnych pierwiastków w analizowanym koncentracie zostały spełnione w przypadku wapnia. Ilości sodu i magnezu uzyskane w próbce z koncentratem były za wysokie w stosunku do wymagań AIJN. Na uwagę zasługuje zbyt mała ilość potasu w próbce, która według wymagań AIJN powinna być w przybliżeniu około sześć razy wyższa [23].

4. Podsumowanie

Zastosowanie spektrometrii absorpcji atomowej pozwoliło na ilościowe oznaczenie jonów Ca (II), Na (I), Mg (II) i K (I) w próbkach soku i koncentratu jabłkowego. Stwierdzono, że na stężenie tych pierwiastków wpływają poszczególne etapy procesu technologicznego. Zarówno proces depektynizacji, klarowania jak i ultrafiltracji powodował zmiany w stężeniu oznaczanych związków mineralnych. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że głównie poziom wapnia był uzależniony od zastosowanego preparatu enzymatycznego podczas procesu depektynizacji. Proces ultrafiltracji wpłynął natomiast na obniżenie zawartości substancji mineralnych, w tym także jonów wapnia w soku. Wskazuje to na fakt, iż mimo działania enzymów pewna ilość związków mineralnych pozostaje w formie kompleksów zatrzymywanych przez membrany filtracyjne. Zawartości pierwiastków w soku zależne są także od bentonitu jako środka klarującego stosowanego do zabiegu klarowania, który podwyższa ilości badanych pierwiastków.

Badania były finansowane przez Grant promotorski KBN nr 2P06T09126.

Literatura

- [1] **Sikorski Z.:** Chemiczne i funkcjonalne właściwości składników żywności, 76-93, WNT, Warszawa 1996.
- [2] **Blateyron L., Sablayrolles J. M.:** Stuck and slow fermentations in enology: statistical study of causes effectiveness of combined additions of oxygen and diammonium phosphate, *Journal of Bioscience And Bioengineering*, 2, 184-189, 2001.
- [3] **Czyżycki A., Laskowska J., Cytlak D.:** Bilans substancji mineralnych w procesie produkcji win owocowych i napojów alkoholowych, *Przemysł Fermentacyjny I Owocowo-Warzywny*, 5, 26-30, 1999.
- [4] **Wzorek W., Pogorzelski E.:** Technologia winiarstwa owocowego i gronowego. Sigma Not, 42, Warszawa 1998.
- [5] **Drake S.R., Eisele T.A.:** Quality of 'gala' apples as influenced by harvest maturity, storage atmosphere and concomitant storage with 'bartlett' pears, *Journal of Food Quality*, 20, 41-51, 1997.
- [6] **Drake S.R., Eisele T.A.:** Influence of harvest date and controlled atmosphere storage delay on the color and quality of 'delicious' apples stored in a purgetype controlled atmosphere environment, *Horticultural Techniques*, 4, 3, 260-263, 1994.
- [7] **Drake S.R., Elfving D.C., Eisele T.A.:** Harvest maturity and storage affect quality of 'crisp pink' (pink lady) apples, *Horticultural Techniques*, 12, 3, 388-391, 2002.
- [8] **Drake S.R., Eisele T.A.:** Carbohydrate and acid contents of gala apples and bartlett pears from regular and controlled atmosphere storage, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3181-3184, 1999.

- [9] **Drake S.R., Eisele T.A.:** The partial compositional characteristics of apple juice from 175 apples varieties, *Journal of Food Composition and Analysis*, 18, 213-221, 2005.
- [10] **Spanos G.A., Wrolstad R.E., Heatherbell D.A.:** Influence of processing and storage on the phenolic composition of apple juice, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 1572-1579, 1990.
- [11] **Wrolstad R.E., Heatherbell D.A., Spanos G.A., Durst R.W., Hsu J., Yorgey B.M.:** Processing and storage influences on the chemical composition and quality of apple, pear and grape juice concentrates. In: Jen J.J., *Quality Factors of Fruit and Vegetables*, American Chemical Society, Washington, DC, 270-292, 1989.
- [12] **Pogorzelski E., Wieczorek M., Lubecka I.:** Identyfikacja krystalicznych osadów w koncentracie jabłkowym metodą rentgenografii strukturalnej, *Przemysł Fermentacyjny i Owocowo – Warzywny*, 3, 24-27, 2001.
- [13] **Cygański A.:** Metody spektroskopowe w chemii analitycznej, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa 1993.
- [14] Polska Norma PN-EN 1134:1999, Soki owocowe i warzywne. Oznaczanie zawartości sodu, potasu, wapnia i magnezu metodą spektrometrii absorpcji atomowej (AAS).
- [15] **Endres H.V.:** *Fluss. Obst*, 55, 11, 645, 648-650, 1988.
- [16] **Wucherpennig K. i in.:** *Institut Zur Lebensmittel Technologie Verfahrenstech*, 39, 5, 383-393, 1988.
- [17] **Pijanowski E., Mrożek S., Horubała A., Jarczyk A.:** *Technologia produktów owocowych i warzywnych*, PWRiL, Warszawa 1973.
- [18] **Litewska L., Ichas H., Jarecka K., Pieczonka W.:** Kształtowanie się klarowności pitnego soku jabłkowego w procesie produkcji, *Przemysł Fermentacyjny i Rolny*, 10, 37, 1970.
- [19] **Sauvage L., Frank D., Stearne J., Millikan M.B.:** Trace metal studies of selected white wines: an alternative approach, *Analytica Chimica Acta*, 223-230, 2002.
- [20] **Alvarez S., Alvarez R., Riera F.A., Coca J.:** Influence of depectinization on apple juice ultrafiltration, *Colloids and Surfaces*, 138, 377-382, 1998.
- [21] **Kroll J.:** Zastosowanie procesów membranowych w produkcji koncentratu jabłkowego, *Przemysł Spożywczy*, 8, 56-57, 2001.
- [22] **Venegas A., Martinez J.A., Borquez R.:** Ultrafiltration performance of Carbosep membranes for clarification of apple juice, *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 36, 397-406, 2003.
- [23] **Niewiarowicz B.:** Wyniki polskiego zagęszczonego soku jabłkowego a wymagania rynku UE, *Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny*, 10, 38-40, 1998.

INFLUENCE OF MANUFACTURING PROCESS ON CONCENTRATIONS OF MINERAL COMPOUND IN APPLE JUICE AND CONCENTRATE

Summary

The changes of mineral compounds during the whole manufacturing process from row apple juice up to apple juice concentrate were analysed by AAS method. Samples of juice for analyses of magnesium, calcium, sodium and potassium were taken after pressing, depectinization, clarification and ultrafiltration. Each of technical operation used influenced the composition of ash in apple juice. Depectinization and clarification decreased ash content. But ultrafiltration the mineral compounds were retained by the membranes and during therefore their content in the juice was decreased. The addition of bentonit as clarificant significantly increased composition of ash in apple juice.

Institute of Fermentation Technology and Microbiology
Technical University of Lodz

MAGDALENA DOLOT, KRZYSZTOF ŚMIGIELSKI

MONIKA WESOŁOWSKA

Instytut Podstaw Chemii Żywności

Politechnika Łódzka

ANALIZA WYBRANYCH SKŁADNIKÓW ODŻYWCZYCH W ŻEŃSZENIU AMERYKAŃSKIM (*PANAX QUINQUEFOLIUM* L.) UPRAWIANYM W POLSCE

Opiniodawca: **dr hab. Józef Kula, prof. PŁ**

*W pracy przedstawiono przeprowadzone badania z zakresu analizy wybranych składników odżywczych polskiej uprawy żeńszenia amerykańskiego (*Panax quinquefolium* L.). Szczególną uwagę zwrócono na analizę zawartości tłuszczu oraz składu kwasów tłuszczowych w różnych częściach żeńszenia pochodzących z różnego okresu wegetacji rośliny.*

1. Wprowadzenie

Naturalne produkty roślinne używane są od dawnych czasów do leczenia wielu chorób, do poprawy funkcji organizmu oraz w celach profilaktycznych. Jednak żadna z roślin na świecie nie osiągnęła tak dużej popularności jak żeńszień. Korzeń żeńszenia od wieków znany jest i ceniony za względu na swoje lecznicze właściwości. Odkrycie tych właściwości ludzkość zawdzięcza medycynie Wschodu. Roślina jest stosowana w lecznictwie od przeszło pięciu tysięcy lat jako panaceum na wszystkie schorzenia.

Żeńszień jest wieloletnią rośliną zieloną z rodziny araliowatych (Araliaceae) [3, 7, 21]. W obrębie rodzaju *Panax* opisano do chwili obecnej 20 gatunków, jednak tylko kilka z nich jest stosowanych w lecznictwie. Do najwcześniej i najlepiej poznanych odmian należą [5]: *Panax ginseng* C. A. Meyer, *Panax quinquefolium* L., *Panax japonicus*, *Panax vietnamensis*, *Panax notoginseng*.

Wszystkie odmiany żeńszenia w większym lub mniejszym stopniu różnią się między sobą zarówno składem chemicznym, jak i właściwościami.

Surowcem zielarskim i leczniczym jest korzeń żeńszenia, uznawany za uniwersalny środek o wielokierunkowym działaniu i stosowany w najróżniejszych dziedzinach medycyny. Pierwsze współczesne opracowania dotyczące farmakologii żeńszenia zostały opublikowane na przełomie lat 50. i 60. dwudziestego wieku [20].

Surowiec stanowią zarówno świeże, jak i wysuszone korzenie, które w zależności od obróbki mogą być białe albo czerwone. Białym żeńszeniem określa się korzeń suszony na słońcu. Czerwony żeńszek to korzeń po obróbce parą wodną i wysoką temperaturą, barwa zmienia się na skutek reakcji chemicznych wywołanych działaniem temperatury [5]. Mocne ogrzanie korzeni niszczy enzymy rozszczepiające związki czynne, stabilizuje to surowiec i powoduje, że działa on tak samo silnie jak świeży surowiec [25]. Tak przygotowany korzeń może być przechowywany przez dłuższy okres i jest preferowany w tradycyjnej medycynie azjatyckiej [23]. Przeprowadzone badania wykazały, że obie formy surowca różnią się w niewielkim stopniu pod względem składu chemicznego i praktycznie wykazują takie same właściwości farmakologiczne [21].

Skład chemiczny, z czym wiąże się także aktywność biologiczna żeńszenia jest uzależniony od kilku czynników, m.in. odmiany i wieku rośliny, miejsca, warunków uprawy, a także od czasu zbiorów. Poziom biologicznie czynnych związków wzrasta wraz z wiekiem rośliny, najlepsze właściwości wykazuje materiał 4-6 letni [11]. Szereg prowadzonych badań pozwolił na wykrycie i zidentyfikowanie w korzeniu żeńszenia około 200 substancji biologicznie aktywnych [10]. Żeńszek zawiera m.in. polisacharydy, poliacetyleny, fawonoidy, kwasy tłuszczowe, związki azotowe. Ponadto w surowcu obecne są rozpuszczalne w wodzie witaminy, olejki eteryczne, gumy, żywice, choliny i mikroelementy [2, 21].

Najważniejszą grupą substancji biologicznie czynnych izolowanych z korzenia żeńszenia są saponiny triterpenowe (ginsenozydy, panaksozydy). Wśród ginsenozydów, ze względu na budowę chemiczną, wyróżnia się związki zawierające szkielet kwasu oleanolowego, strukturę 20-(S)protopanaksadiolu oraz 20-(S)protopanaksatriolu [12, 13, 20]. Do chwili obecnej zidentyfikowano około 30 różnych ginsenozydów [1, 20], występujących w korzeniu, liściach i kwiatach żeńszenia, w ilości 1,7% do 6% suchej masy [11]. Poszczególne ginsenozydy z każdej grupy różnią się rodzajem podstawionych grup cukrowych [20]. Zawartość ginsenozydów w korzeniu żeńszenia zależy od wieku rośliny i warunków uprawy (naświetlenie, skład mineralny gleby) [11, 20].

Żeńszek zawiera także znaczne ilości mikro- i makroelementów oraz witamin. Wśród witamin stwierdzono m.in. retinol (A), kwas askorbinowy (C), niacynę (PP), tokoferole (E), witaminy z grupy B – B₁, B₂, B₁₂. Pierwiastki śladowe określone w surowcu to: wapń, miedź, fosfor, cynk, potas, żelazo, magnez, sód, siarka, molibden, mangan, krzem, stront, bar, bor, nikiel, chrom, kobalt, selen [4, 14].

Do biologicznie aktywnych składników żeńszenia należy również zaliczyć lotne olejki o złożonym składzie [24], uzyskiwane z różnych jego części, posiadające zdolność hamowania rozwoju komórek nowotworowych [6, 23].

Żeńszęń uznawany jest za środek profilaktyczny i wspomagający, używany w celu podniesienia wydolności psychofizycznej organizmu, wzmocnienia w okresach zmęczenia i osłabienia, braku koncentracji i podczas rekonwalescencji. Działa adaptogennie, antyoksydacyjne i antywirusowo, przeciwdziała starzeniu się a na poziomie komórkowym wpływa na czynność poszczególnych organów i układów (nerwowego, hormonalnego, sercowo-naczyniowego, immunologicznego i trawiennego) [8, 23, 26].

Duże znaczenie dla leczniczego oddziaływania żeńszenia mają jego właściwości antyoksydacyjne. Obok ginsenozydów dużą rolę w zmiataniu wolnych rodników wykazują kwasy fenolowe, występujące w formie wolnej, zestryfikowanej lub w postaci związków nierozpuszczalnych w wodzie. Badania prowadzone na ekstraktach z żeńszenia, wykazały zdolność do zmiatania wolnych rodników, wiązania pierwiastków przejściowych, hamowania peroksydacji kwasu linolowego oraz inhibicji oksydacji białek membranowych mózgu i homogenatów tkanek zwierzęcych głównie przez biologicznie aktywne składniki ekstraktów – ginsenozydy [9]. Żeńszęń wykazuje także działanie radioprotekcyjne na promieniowanie X i γ , pobudzając procesy naprawcze DNA [10].

Wielokierunkowe oddziaływanie żeńszenia na organizm powoduje, że uważa się go za uniwersalne lekarstwo polecane w wielu dolegliwościach i schorzeniach, m.in. ogólnym osłabieniu i rekonwalescencji, fizycznym i umysłowym przemęczeniu, chorobach sercowo-naczyniowych, przewlekłych chorobach żołądka i jelit, chorobach wątroby i nerek, cukrzycy, gruźlicy, wzmożonej senności, niektórych formach impotencji, zaburzeniach nerwowych i psychicznych, braku apetytu, chorobach nowotworowych, niedokrwistości, obniżonej odporności organizmu na stres, czy osłabionej tolerancji na czynniki zewnętrzne [5].

Pomimo pozytywnego działania na ludzki organizm, żeńszęń nie jest wskazany m.in. podczas okresu ciąży i karmienia piersią, dla osób z nadciśnieniem, ze zmianami miażdżycowymi naczyń serca i mózgu, z osłabioną krzepialnością krwi, dla chorych na astmę i rozedmę płuc.

Zażywanie zbyt dużych dawek żeńszenia może doprowadzić do pojawienia się efektów ubocznych w postaci bezsenności, nerwowości, zaburzeń żołądkowo-jelitowych, a nawet symptomów depresji. Składniki żeńszenia mogą wchodzić w interakcje z niektórymi lekami, m.in. inhibitorami oksydaz oraz lekami regulującymi lepkość krwi [5, 10].

Obecnie dostępnych jest wiele produktów farmaceutycznych z zawartością żeńszenia – kapsułki, tabletki, herbaty, nalewki, syropy. Na rynku surowców dostępne są zarówno suszone korzenie w formie np. kandyzowanych plastrów, jak i ekstrakty tej rośliny, stosowane w recepturach preparatów kosmetycznych, odżywczych, regenerujących płynów do kąpieli, lotionów i szamponów [5, 13].

W wielu krajach upowszechniło się stosowanie żeńszenia nie tylko jako lekarstwa i środka wspomagającego organizm, ale także jako dodatku do żywności. W USA i Kanadzie spożywa się cukierki i napoje z dodatkiem żeńszenia, w Korei popularne są sałatki, zupy i herbatki, a w Chinach napoje orzeźwiające i alkoholowe.

2. Cześć doświadczalna

2.1. Materiały i metody badań

Celem przeprowadzonych badań była analiza wybranych odżywczych składników żeńszenia amerykańskiego (*Panax quinquefolium* L.) pochodzącego z uprawy w Polsce [19].

Materiałem roślinnym wykorzystanym do badań były:

- 2-, 3-, 4-letni suszony korzeń,
- 2-, 3-, 4-letnie suszone liście.

W ramach przeprowadzonych badań wykonano:

- analizę składników liści i korzeni żeńszenia w zależności od ich wieku, poprzez wykonanie badań:
 - ekstraktu ogólnego,
 - białka – metoda Kjeldahla,
 - składników mineralnych,
- analizę zawartości tłuszczu (metoda Soxhleta) oraz składu kwasów tłuszczowych w różnych częściach żeńszenia.

2.1.1. Ekstrakt ogólny

Oznaczenie ekstraktu ogólnego przeprowadzono zgodnie z Polską Normą [17]. Ekstrakcji poddano suszone liści oraz korzenie żeńszenia. Próbki do analiz rozdrobniono i ekstrahowano, następnie ostudzono, przefiltrowano i wykonano pomiar refraktometryczny procentowej zawartości ekstraktu. Wyniki pomiaru przedstawia rys. 1.

2.1.2. Białko

Oznaczenie białka przeprowadzono metodą Kjeldahla wg Polskiej Normy [16]. Metoda polega na utlenieniu substancji organicznej za pomocą stężonego kwasu siarkowego w obecności katalizatorów w temperaturze wrzenia, tj. ok. 300°C. Próbki materiału roślinnego poddano mineralizacji, następnie destylowano w aparacie Parnasa. Uzyskane wyniki analiz przedstawia rys. 2.

2.1.3. Popiołu i zanieczyszczenia mineralne

Oznaczenie zawartości zanieczyszczeń mineralnych przeprowadzono według Polskiej Normy [18]. Wysuszone liście i korzenie spopielono na czaszy grzejnej, a następnie 4h w piecu muflowym w temperaturze 525°C. Otrzymany popiół zważono, a następnie rozpuszczono w kwasie solnym i przesączono przez bezpopiołowy sączek. Sączek z osadem suszono w piecu muflowym. Wyniki zawartości popiołu w analizowanych próbkach żeńszenu przedstawia rys. 3, natomiast poziom zanieczyszczeń mineralnych przedstawia rys. 4.

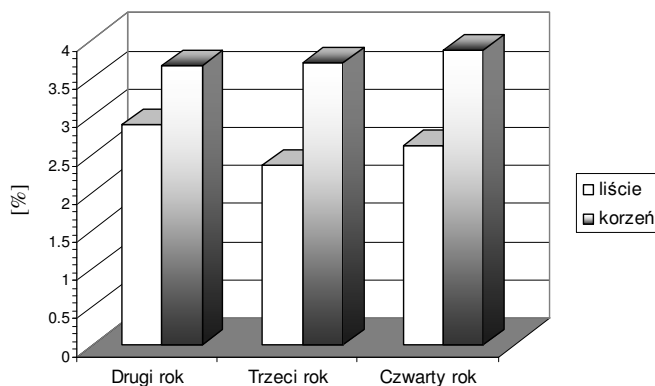
2.1.4. Tłuszcz i kwasy tłuszczowe

Tłuszcz z materiału roślinnego wyodrębnilo metodą Soxhleta [15]. Metoda oznaczenia tłuszczu polega na ekstrakcji substancji tłuszczowych z badanej próby przy użyciu heksanu i wagowym oznaczeniu ilości ekstraktu po odparowaniu substancji rozpuszczającej. Określenie składu i zawartości kwasów tłuszczowych przeprowadzono metodą polegającą na zmydleniu acylogliceroli za pomocą metanowego roztworu NaOH. Mydła przekształca się następnie w estry metylowe przez reakcję z kompleksem trifluorek boru/metanol.

Identyfikację składu kwasów tłuszczowych przeprowadzono za pomocą analizy GC przy użyciu ich estrów metylowych jako substancji wzorcowych.

Zawartość kwasów tłuszczowych w liściach przedstawia rys. 5, w korzeniach żeńszenu – rys. 6.

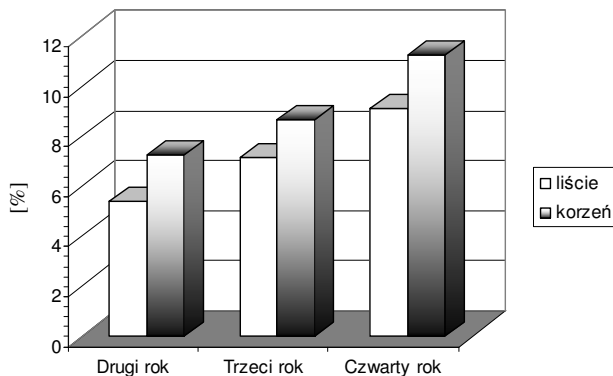
2.2. Wyniki i dyskusja wyników badań



Rys. 1. Zawartość ekstraktu ogólnego w różnych częściach żeńszenu amerykańskiego (*Panax quinquefolium* L.) uprawianego w Polsce

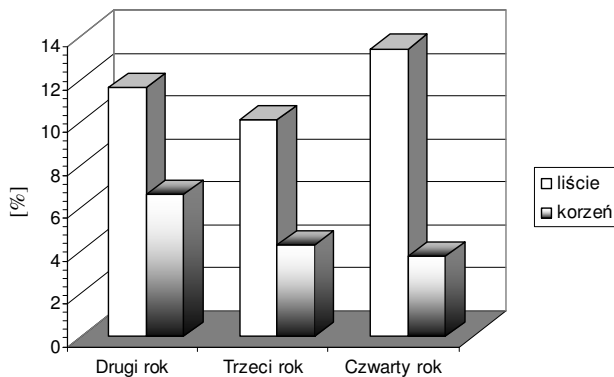
Zawartość ekstraktu ogólnego w badanych próbkach korzeni jest zbliżona i średnio wynosiła około 3,74%. Ekstrakt ogólny określony w liściach jest niższy i

wynosi od 2,35% dla liści 3-letnich do 2,9% dla liści pochodzących z drugiego roku wegetacji rośliny. Średnia zawartość ekstraktu ogólnego w liściach wynosi 2,62%.



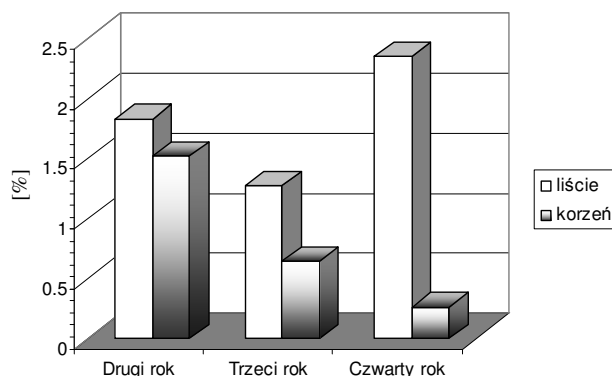
Rys. 2. Zawartość białka w liściach i korzeniach żeńszenia amerykańskiego (*Panax quinquefolium* L.)

Analiza zawartości białek wykazała, że ich najwyższą ilością charakteryzuje się korzeń żeńszenia amerykańskiego pochodzącego z czwartego roku wegetacji. Najmniejsze zawartości białka w liściach stwierdzono w przypadku liści 2-letnich, dla których zawartość ta wynosiła 5,39% i była prawie dwukrotnie niższa, niż w przypadku liści pochodzących z czwartego roku wegetacji rośliny.



Rys. 3. Zawartość popiołu w liściach i korzeniach żeńszenia amerykańskiego (*Panax quinquefolium* L.) pochodzących z różnych okresów wegetacji

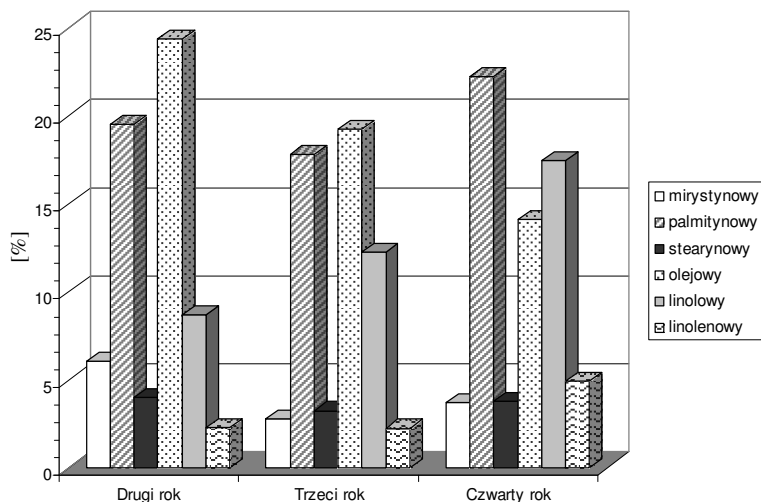
Zawartość popiołu w korzeniach wahała się od 3,72% dla korzenia 4-letniego do 6,6% dla korzenia 2-letniego. W liściach ilość popiołu była wyższa i wynosiła od 10,07% (3-letnie) do 13,4% (4-letnie).



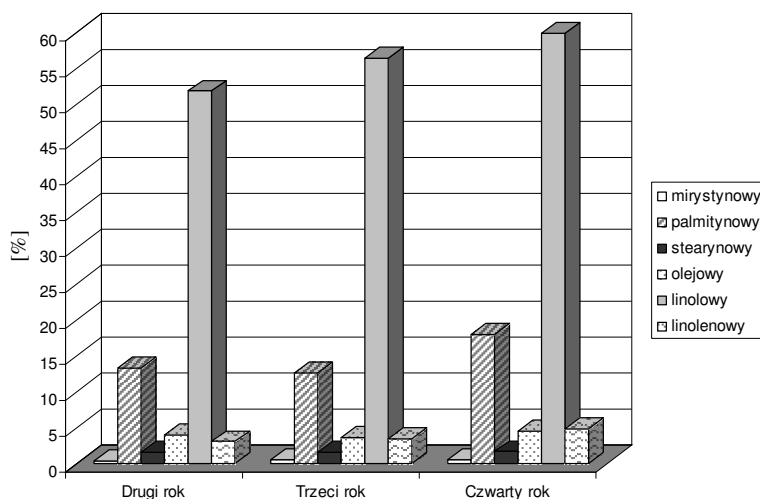
Rys. 4. Zawartość zanieczyszczeń mineralnych (popiół nierozpuszczalny w kwasie solnym) w różnych częściach żeńszenu amerykańskiego (*Panax quinquefolium* L.)

Określenie zawartości zanieczyszczeń mineralnych (popiołu nierozpuszczalnego w kwasie solnym) wykazało, iż w przypadku korzeni ich najwyższą ilością charakteryzuje się korzeń pochodzący z pierwszego roku wegetacji rośliny – 1,52%. Poziom zawartości zanieczyszczeń mineralnych w liściach był wyższy, niż w korzeniach i wyniósł od 1,27% – liście 3-letnie do 2,35% liście 4-letnie.

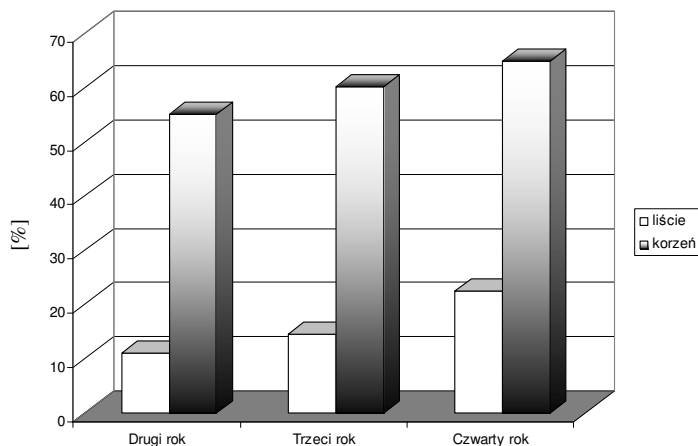
Analiza składu i zawartości kwasów tłuszczowych triacylogliceroli tłuszczu w liściach żeńszenu amerykańskiego pozwoliła na zidentyfikowanie średnio 62,9% kwasów tłuszczowych, natomiast w korzeniach 82,9%.



Rys 5. Skład i zawartość kwasów tłuszczowych triacylogliceroli tłuszczu z liści żeńszenu amerykańskiego (*Panax quinquefolium* L.) pochodzących z różnych okresów wegetacji



Rys. 6. Skład i zawartość kwasów tłuszczowych triacylogliceroli tłuszczu z korzeni żeńszenu amerykańskiego (*Panax quinquefolium* L.) pochodzących z różnych okresów wegetacji



Rys. 7. Zawartość kwasów tłuszczowych triacylogliceroli tłuszczu z liści i korzeni żeńszenu amerykańskiego (*Panax quinquefolium* L.) pochodzących z różnych okresów wegetacji

Dominującymi kwasami tłuszczowymi triacylogliceroli liści są: kwas olejowy w ilości 24,36% w liściach 2-letnich, 19,24% w liściach 3-letnich, 14,1% w liściach pochodzących z czwartego roku wegetacji, oraz kwas palmitynowy w ilościach 19,51%, 17,8%, 22,23% odpowiednio w liściach 2-, 3-, 4-letnich. Najmniej liście zawierają kwasu mirystynowego średnio ok. 4,19%.

Korzenie charakteryzowały się najwyższą zawartością kwasu linolowego średnio ok. 78,18% i najniższą kwasu mirystynowego ok. 0,57%. Średnia zawartość drugiego oznaczanego nienasyconego kwasu tłuszczowego (kwas linolenowy) była niższa o około 16 razy od zawartości kwasu linolowego i wynosiła 4,9%.

3. Podsumowanie

Zawartość suchej substancji oraz ekstraktu ogólnego w badanym materiale jest podobna we wszystkich częściach żeńszenu. Zróżnicowany wiek rośliny, a także analiza różnych jej części, nie wykazuje istotniejszego wpływu na zawartość ekstraktu i suchej substancji.

Poziom białka w roślinie wzrasta wraz z jej wiekiem. Tendencja ta jest widoczna zarówno dla korzeni, jak i liści badanego surowca.

Ilość popiołu i zanieczyszczeń mineralnych maleje wraz ze wzrostem czasu wegetacji rośliny.

Wyniki przeprowadzonych analiz wykazują, że żeńszek stanowi dobre źródło nienasyconych kwasów tłuszczowych – linolowego i linolenowego, które są niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania organizmu. Zawartość kwasu linolenowego ma duże znaczenie, ze względu na jego wysoką aktywność biologiczną. Kwasem tłuszczowym tłuszczu pozyskanego z korzenia żeńszenu, występującym w największej ilości, jest kwas linolowy 18:2 (9,12), którego zawartość wynosi nawet 60% oznaczonych kwasów.

Wraz z wiekiem żeńszenu wzrasta zawartość kwasów nienasyconych i wielokrotnie nienasyconych w liściach. Nasuwa to wniosek, że liście żeńszenu amerykańskiego (*Panax quinquefolium* L.) uznawane dotychczas za produkt odpadowy, mogą zostać wykorzystane jako dobre źródło nienasyconych kwasów tłuszczowych do produkcji żywności funkcjonalnej.

4. Literatura

- [1] **Awang D.V.C.:** The neglected ginsenosides of North American ginseng (*Panax quinquefolius* L.). J. Herbs. Spices Med. Plants. 7(2) 103-109 (2000).
- [2] **Court W.E.:** Ginseng the genus *Panax*. (Medicinal and aromatic plants industrial profiles, v. 15). Harwood Academic Publishers 7-199 (2000).
- [3] **Cui J.-F., Björkhem I., Eneroth P.:** Gas chromatographic-mass spectrometric determination of 20(S)-protopanaxadiol and 20(S)-protopanaxatriol for study on human urinary excretion of ginsenosides after ingestion of ginseng preparations. J. Chromatogr. B, 689, 349-355 (1997).
- [4] **Dolot M., Śmigielski K., Baławejder M., Puczkowski S.:** Analiza składu pierwiastkowego korzeni i liści żeńszenu pięciolistnego (*Panax quinquefolium* L.)

- uprawianego w Polsce, XLVIIth PTCh Meeting, Wrocław 2004.09.12-17, poster presentation P054.
- [5] **Dolot M., Śmigielski K.:** Żeńszeń amerykański (*Panax quinquefolium* L.) – skład chemiczny, właściwości antyoksydacyjne, zastosowanie, Polish Journal of Cosmetology, 1, 30–45 (2005).
- [6] **Dongyan H., Weihua Z., Ruihua H.:** Separation and determination of chemical constituents in the volatile oil of three traditional Chinese crude drugs. J. Pharm. Biomed. Anal. 17, 1423-1426 (1998).
- [7] **Du X.W., Wills R.B., Stuart D.L.:** Changes in neutral and malonyl ginsenosides in American ginseng (*Panax quinquefolium* L.) during drying, storage and ethanolic extraction. Food Chem. 86, 155-159 (2004).
- [8] **Kennedy D.O., Scholey A.B.:** Ginseng: potential for the enhancement of cognitive performance and mood. Pharmacol. Biochem. Behav. 75, 687-700 (2003).
- [9] **Kim Y.K., Guo Q., Packer L.:** Free radical scavenging activity of red ginseng aqueous extracts. Toxicology 172, 149-156 (2002).
- [10] **Kochan E., Caban S., Chmiel A.:** Aktywność biologiczna i farmakologiczna metabolitów żeńszenia. Farmacja Polska, Tom 62, 2, 70–77 (2006).
- [11] **Kołodziej B.:** Studia nad wzrostem rozwojem oraz uprawą żeńszenia amerykańskiego (*Panax quinquefolium* L.). Rozprawy Naukowe Akademii Rolniczej w Lublinie. Wyd. Akademii Rolniczej w Lublinie, zesz. 266, Lublin (2003).
- [12] **Kwon S.W., Han S.B., Park I.H., Kom J.M., Park M.K., Park J.H.:** Liquid chromatographic determination of less polar ginsenosides in processed ginseng. J. Chromatogr. A, 921, 335-339 (2001).
- [13] **Ludwiczuk A., Wolski T., Berbeć S.:** Chromatographic analysis of ginsenosides occurring in the roots of American ginseng (*Panax quinquefolium* L.) and in Asian ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) preparations. J. Planar Chromatogr. 15, 147-150 (2002).
- [14] Phytochemical and Ethnobotanical Databases, Agricultural Research Service, <http://www.ars-grin.gov/duke/>
- [15] PN–71/A–88021 Wyroby cukiernicze trwałe. Oznaczanie zawartości tłuszczu.
- [16] PN–75/A–04018 Produkty rolniczo–żywnościowe. Oznaczanie azotu metodą Kjeldahla i przeliczanie na białko.
- [17] PN–90/A–75101/02 Przetwory owocowe i warzywne. Przygotowanie próbek i metody badań fizykochemicznych. Oznaczanie zawartości ekstraktu ogólnego.
- [18] PN–90/A–75101/18 Przetwory owocowe i warzywne. Przygotowanie próbek i metody badań fizykochemicznych. Oznaczanie zawartości zanieczyszczeń mineralnych.
- [19] Polska Plantacja Żeńszenia, Sławomir Chmiel, <http://www.zenszen.firmanet.pl/>
- [20] **Shibata S.:** Chemistry and cancer preventing activities of ginseng saponins and some related triterpenoid compounds. J. Korean Med. Sci. 16, 28-37 (2001).
- [21] **Shu Y.Y., Ko M.Y., Chang Y.S.:** Microwave-assisted extraction of ginsenosides from ginseng root. Microchem J. (2002).
- [22] **Stelmach W.:** Żeńszeń właściwy *Panax ginseng* C.A. Meyer. Cz. I. Wiadomości Zielarskie, 2, 3, 4, 13-15, 22, 10-11 (1998).
- [23] **Sticher O.:** Getting to the root of ginseng. CHEMTECH 28, 26–32 (1998).

- [24] Śmigielski K., Dolot M., Raj A.: Composition of the essentials oils of ginseng roots of *Panax quinquefolium* L. and *Panax ginseng* C.A. Meyer. J. Essent. Oil – Bear. Plants – w druku.
- [25] Wałęsa H., Kochan E.: Lecznicze właściwości żeńszenu. Polish Journal of Cosmetology, 3, 154-161 (2001).
- [26] Xie J.-T., Mehendale S.R., Wang A., Han A.H., Wu J.A., Osinski J., Yuan Ch.-S.: American ginseng leaf: ginsenosides analysis and hypoglycaemic activity. Pharm. Res. 49, 113-117 (2004).

ANALYSIS OF CHOSEN NUTRITIOUS COMPONENTS IN AMERICAN GINSENG (*PANAX QUINQUEFOLIUM* L.) CULTIVATED IN POLAND

Summary

In this work analysis of conducted researches of selected nutrient components from polish cultivation of American ginseng (*Panax quinquefolium* L.) was achieved.

Plant material used for testing was dried roots and leaves of ginseng sourced from three following seasons of plant vegetation. In the frames of realized researches analysis of total extract, protein contents using Kjeldahl method, mineral elements, fat contents using Soxhlet method and fat acids composition were conducted.

Special lookout was turned onto fat content and fat acids composition analysis in leaves and roots of ginseng from different stages of plant vegetation.

Dry content and total extract of analyzed material is similar in every parts of ginseng. Differential plant age and analysis of their different parts show no significant influence on extract content and dry residue. Protein content level increased with plant age. This tendency is visible both for roots and leaves of analyzed raw material. Ash and mineral contamination amount decrease with the increasing of the plant vegetation time.

Results of conducted analysis show that ginseng is good source of unsaturated fat acids – linoleic and linolenic acids, which are necessary for correct organism working. Linolenic acid content has large signification, in respect of his high biological activity. Fat acid from fat gained from ginseng root which is present in highest amount is linoleic acid 18:2 (9, 12), which content is about 60% of determined acids.

With age of ginseng, unsaturated and many times unsaturated acids content increased in leaves. It suggest that leaves of American ginseng (*Panax quinquefolium* L.) can be used as good source of unsaturated fat acids for production of functional food.

TOMASZ LESZCZYŃSKI, HENRYK DUŃSKI
Instytut Podstaw Chemii Żywności
Politechnika Łódzka

SPOSOBY WIĄZANIA CZĄSTECZEK LIGANDÓW Z DNA

Opiniodawca: **prof. dr hab. Wojciech Stanisław Wysocki**

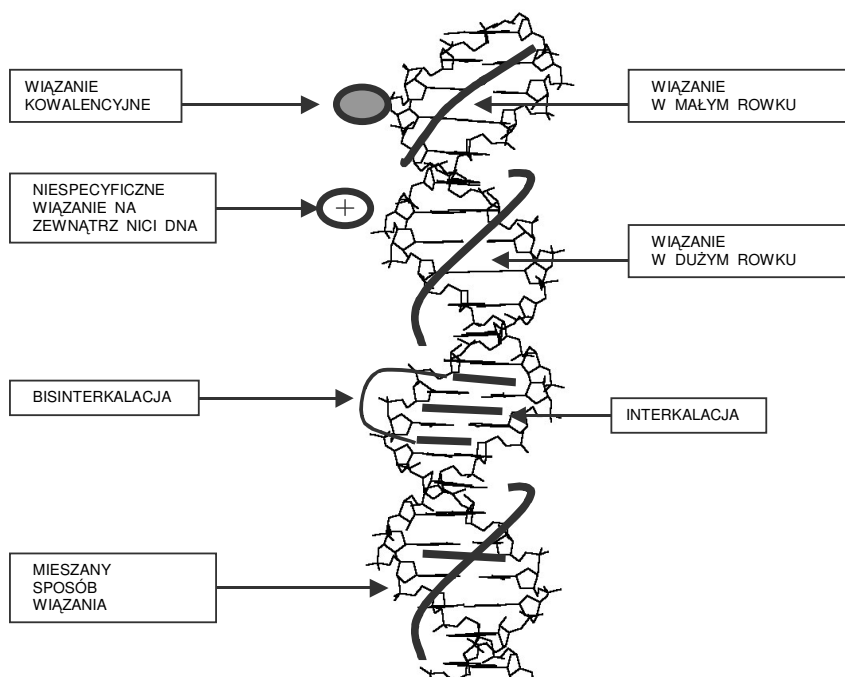
W pracy omówiono różne grupy ligandów o zróżnicowanych sposobach wiązania z DNA. Scharakteryzowano sposoby wiązania ligandów z DNA oraz omówiono cechy charakterystyczne w ich strukturze determinujące sposób, w jaki oddziałują z tą makromolekułą.

1. Wprowadzenie

Rozwój metod leczenia nowotworów, jaki miał miejsce w ostatnich 20 latach wskazuje na konieczność poszukiwania wciąż nowych, skuteczniejszych i bardziej bezpiecznych leków. Mimo szybkiego rozwoju nowoczesnych sposobów walki z nowotworami, chemoterapia pozostaje jedną z ważniejszych, a w przypadku niektórych nowotworów (np. białaczka), jedyną metodą leczenia. Lecznicze właściwości większości dotychczas opracowanych leków przeciwnowotworowych wiążą się z ich oddziaływaniem z DNA. Istnieje nieliczna grupa leków przeciwnowotworowych, których aktywność biologiczna nie jest oparta na oddziaływaniu z DNA (np. Taxol). Warto zauważyć, że DNA jest prawdopodobnie najlepiej strukturalnie scharakteryzowaną makromolekułą, co czyni ją atrakcyjnym obiektem dla poszukiwań nowych związków, mogących być potencjalnymi lekami nakierowanymi na DNA. Racjonalne planowanie struktur nowych leków wymaga szczegółowego zrozumienia oddziaływań istniejących już leków z DNA [1].

Najważniejsze cechy charakterystyczne wiązania leku z DNA, jakie wpływają na aktywność biologiczną leku to: miejsce wiązania leku z DNA, specyficzność sekwencyjna wiązania oraz kinetyka asocjacji/dysocjacji.

Istnieje kilka sposobów wiązania (oddziaływania) cząsteczek liganda z łańcuchem DNA (rys. 1): interkalacja, bisinterkalacja, wiązanie w małym lub dużym rowku, wiązanie kowalencyjne, niespecyficzne wiązanie na zewnątrz nici DNA oraz mieszany sposób wiązania. Istota tych oddziaływań zostanie omówiona w dalszej części opracowania. Sposoby wiązania liganda z DNA wymienione powyżej stanowią podstawę klasyfikacji związków oddziaływujących z kwasem deoksyrybonukleinowym [2]. Alternatywny (rzadziej stosowany) podział związków oddziałujących z DNA opiera się na budowie chemicznej ligandów [3] i nie będzie tutaj omawiany.



Rys. 1. Sposoby wiązania cząsteczek z DNA

2. Interkalatory

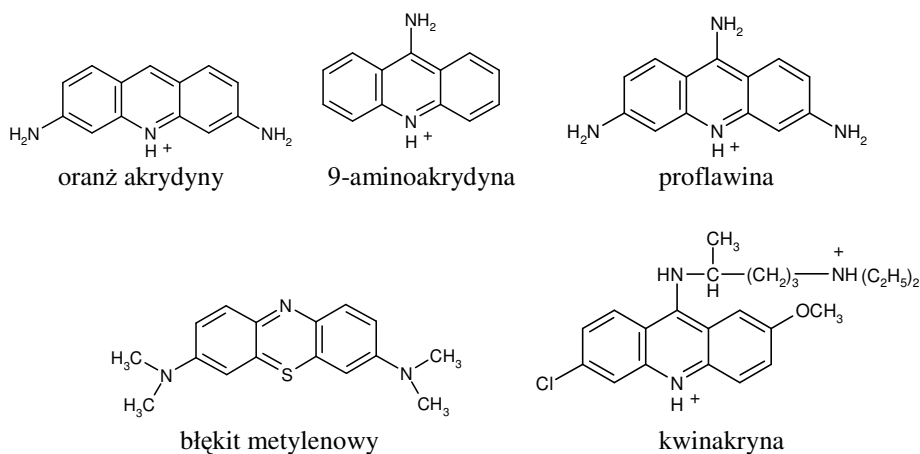
Po raz pierwszy koncepcję interkalacji zaproponował Lerman i wsp. w roku 1961 [4]. Termin interkalacja pochodzi od łacińskiego *intercalare*, co oznacza wsuwać się; jest zarezerwowany dla specyficznego sposobu wiązania polegającego na wsuwaniu się płaskich heterocyklicznych, aromatycznych układów o grubości 2-3,7 Å, pomiędzy pary zasad w podwójnej helisie DNA. Płaski interkalator jest utrzymywany sztywno w orientacji prostopadłej do osi heliksu.

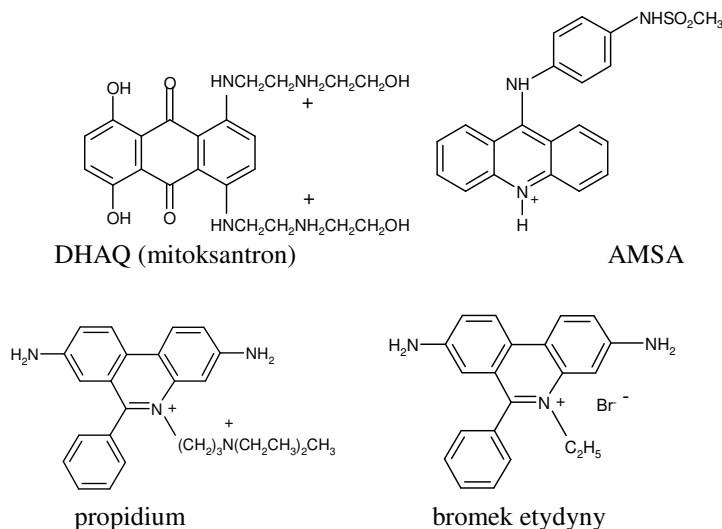
Uważa się, że DNA wiąże maksymalnie jedną cząsteczkę interkalującego liganda na 2-2,5 pary zasad. Warunkiem niezbędnym tworzenia się kompleksu interkalacyjnego jest występowanie w cząsteczce liganda obszaru płaskiego [5], [6]. Dla optymalnej interkalacji płaska część molekuly powinna mieć powierzchnię minimum $28 \text{ \AA}^2$, czyli trzy lub cztery pierścienie tworzące strukturę aromatyczną [7].

Kompleks interkalacyjny stabilizowany jest przez nakładanie się orbitali π chromoforu i zasad azotowych (wiązanie typu „stacking”), poprzez wiązanie hydrofobowe i wiązanie z przeniesieniem ładunku. Związki interkalujące są ligandami, które nie posiadają zasadniczo specyficzności w stosunku do zasad, jedynie preferują sekwencje, w których występuje przewaga niektórych par, np. powinowactwo bromku etydyny jest większe wobec par GC [4], [8].

Po interkalacji, pierwszo- i drugorzędowa struktura DNA pozostaje nienaruszona. Na skutek rozwinięcia fragmentu DNA, spowodowanego wsunięciem ligandem, zmianie ulega trzeciorzędowa struktura DNA – cząsteczka DNA zostaje częściowo wydłużona. Odległości pomiędzy dwiema sąsiadującymi parami zasad kompleksu interkalacyjnego zwiększają się średnio z $3,4 \text{ \AA}$ do $7-8 \text{ \AA}$. Uzyskane podczas interkalacji częściowe rozkręcenie heliksu charakteryzowane jest kątem rozkręcenia, który jest różnicą pomiędzy typowym kątem skręcenia (dla α -helisy wynosi on 36°) a kątem powstałym po interkalacji. Redukcja kąta skręcenia podwójnej helisy DNA wynosząca w zależności od chromofora $10^\circ - 26^\circ$ jest charakterystyczna dla procesu interkalacji [9].

Spośród związków interkalujących do DNA należy wymienić oranż akrydyny [10], kwinakrynę [11], [12], propidium [13], bromek etydyny, amsakrynę [14], mitoksantron (DHAQ) [14], [15], błękit metylenowy [16], aktynomycynę D [17], proflawinę, 9-aminoakrydynę [5]. Wzory strukturalne wyżej wymienionych interkalatorów zostały zebrane na rys. 2.





Rys. 2. Wzory strukturalne interkalatorów

2. Związki lokujące się w małym rowku DNA

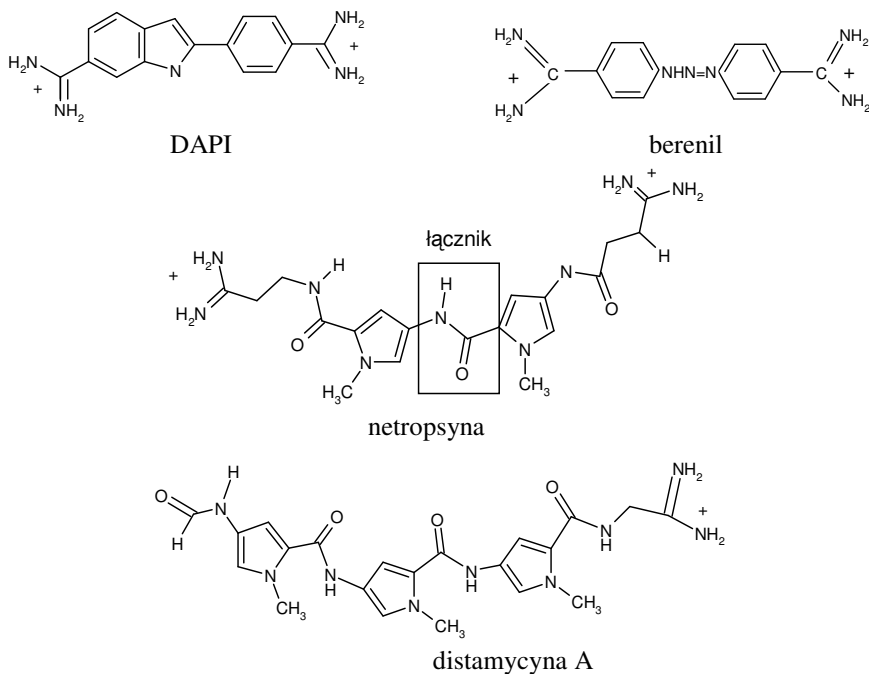
Cechą charakterystyczną w budowie tych związków jest występowanie kilku pojedynczych, rzadziej podwójnych pierścieni – głównie aromatycznych – oddzielonych od siebie krótkim łącznikiem (przykładowo: w przypadku netropsyny łącznikiem jest grupa amidowa (rys. 3)). Związki te charakteryzują się liniową, wydłużoną i giętą strukturą umożliwiającą dopasowanie się związku do kształtu małego rowka, co pozwala na pojawienie się oddziaływań pomiędzy grupami funkcyjnymi liganda a wnętrzem małego rowka, wpływając stabilizująco na trwałość powstałego kompleksu.

Do tej klasy związków należą m.in. distamycyna A oraz netropsyna [18], [19]. Wspomniane związki są naturalnymi polipeptydami wiążącymi się preferencyjnie do sekwencji bogatych w pary AT [20], [21], [22], [23]. Związki te wykazują aktywność biologiczną jako leki przeciwwirusowe [20].

W przypadku niektórych związków z tej klasy sposób ich oddziaływania zależy w dużym stopniu od warunków zewnętrznych (głównie od siły jonowej i pH), a także od lokalnej sekwencji par zasad w DNA.

Przykładem jest berenil, który także wykazuje specyficzność wiązania do miejsc DNA bogatych w pary AT, lecz znacznie mniejszą od distamycyny A. Wiąże się on w małym rowku w podwójnej helisie DNA, przy czym miejsce wiązania jest wielkości 4 par zasad [20]. Berenil może również interkalować oraz wiązać się w małym rowku dwuniciowych fragmentów RNA [2].

Do związków lokujących się w małym rowku DNA należy także błękit metylenowy [24] oraz DAPI. Związki te wiążą się w małym rowku DNA, w miejscach bogatych w pary AT, natomiast interkalują w miejsca bogate w pary GC [6], [25].



Rys. 3. Przykładowe związki lokujące się w małym rowku DNA

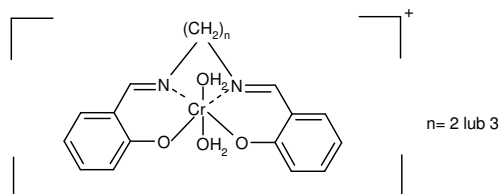
3. Związki łączące się w dużym rowku DNA

Wiązanie w dużym rowku jest zjawiskiem dość rzadkim. Znacznie większa „objętość” dużego rowka czyni go dostępnym miejscem wiązania dla większych cząsteczek (np. białka) niż te, które lokalizują się w małym rowku. Omawiany typ wiązania dotyczy głównie związków, w których oprócz fragmentu struktury wiążącego się (przeważnie słabo) w dużym rowku DNA, występują inne struktury, pozwalające silnie połączyć cząsteczkę z DNA (np. na drodze interkalacji lub wiązania kowalencyjnego). Występowanie dodatkowych grup funkcyjnych jest często kluczowe, gdyż oddziaływania występujące w dużym rowku są zbyt słabe, by utrzymać tam ligand.

W dużym rowku wiążą się pewne kompleksy chromu III i zasady Shiffa np.: $[\text{Cr}(\text{1,2-bis}(\text{salicylidenoamino})\text{etano}(\text{H}_2\text{O})_2)]^+$ (rys. 4) [26].

Związkiem lokującym się w dużym rowku jest błękit metylenowy, jednak takie oddziaływanie w przypadku tego związku występuje tylko w stosunku do poli(dA)·poli(dT) [24], [27].

W dużym rowku może wiązać się także bromek etydyny (EB), ale tylko w roztworach o bardzo wysokim stężeniu EB [28], [29]. Istnieją przypuszczenia, że netropsyna może wiązać się także w dużym rowku polimera poli(dG-dC)·poli(dG-dC) [30].



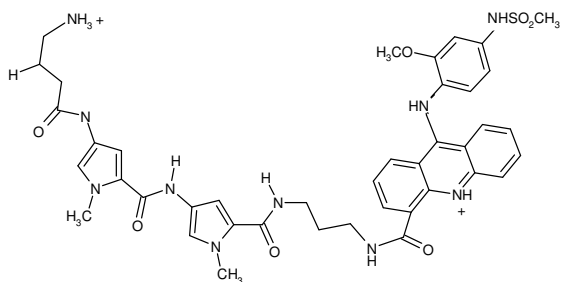
Rys. 4. Przykład związku lokującego się w dużym rowku DNA – $[\text{Cr}(1,2\text{-bis}(\text{salicylidenoamino})\text{etano}(\text{H}_2\text{O})_2)]^+$

4. „Combilexins” i inne związki o mieszanym sposobie wiązania z DNA

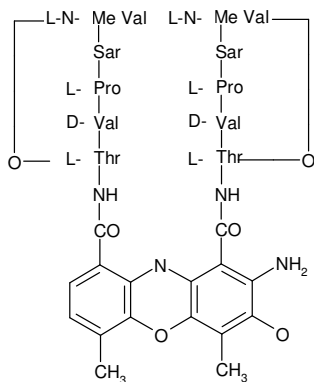
Combilexins (molekuły hybrydowe) jest to grupa ligandów DNA zawierająca element wiążący się w małym rowku oraz interkalujący chromofor. Częsteczki te budzą duże zainteresowanie przemysłu farmaceutycznego. Koncepcja kombinowanego sposobu oddziaływania z DNA pozwala na zaprojektowanie takiej struktury, która będzie silnie lub specyficznie, bądź jednocześnie silnie i specyficznie wiązała się z DNA, jednocześnie oddziaływała z topoisomerazami, a być może nawet ułatwiała cząsteczce leku проникnięcie do wnętrza komórki. Tego typu związki stabilizują DNA i większość z nich oddziałuje z topoisomerazami np.: NetAmsa [30] (rys. 5).

Ciekawym przykładem związków interkalujących i wiążących się z DNA równolegle w obydwu rowkach jest noglamycyna, altromycyna B i aktynomycyna (rys. 5). Noglamycyna zbudowana jest z podjednostek, które po interkalacji chromoforu lokują się „wystając” do obu rowków [31]. Altromycyna B interkaluje do DNA pomiędzy pary AT a GC. Jej łańcuch disacharydowy lokuje się w małym rowku, podczas gdy podstawnik monosacharydowy w dużym. W wyniku takiej interkalacji grupa epoksydowa znajduje się w dużym rowku, gdzie kowalencyjnie wiąże się z azotem N7 guaniny [32]. Aktynomycyna [6], [17] interkaluje a jej fragmenty peptydowe lokują się w małym rowku.

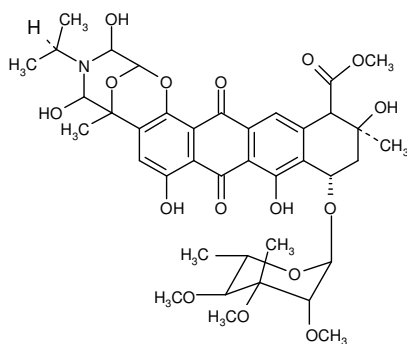
Daunorubicyna (daunomycyna), doksorubicyna (adriamycyna) (rys. 5), które są antybiotykami antracyklinowymi interkalują, podczas gdy ich reszta cukrowa lokuje się w małym rowku a fragment zwany kotwicą tworzy wiązania wodorowe [33], [34]. Wiązanie ich ma charakter kooperatywny – związanie jednej cząsteczki ułatwia wiązanie następnej [35].



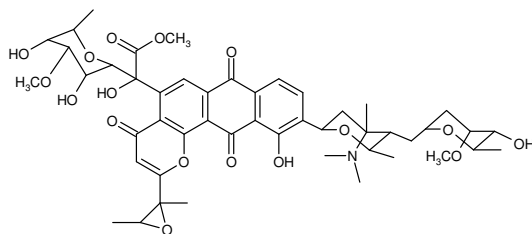
NetAmsa



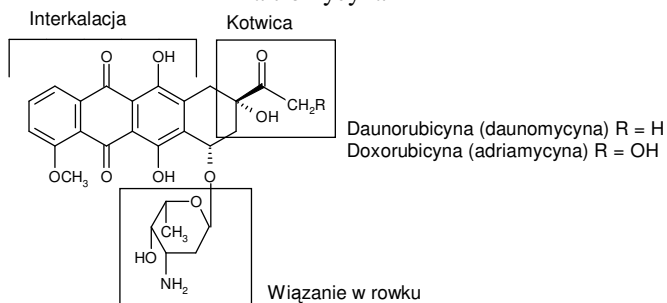
aktynomycyna



noglamycyna



altromycyna B



daunomycyna i adriamycyna

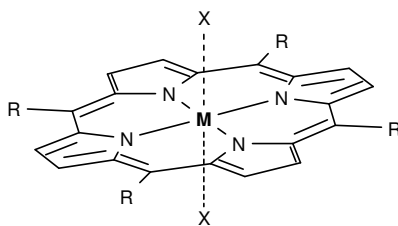
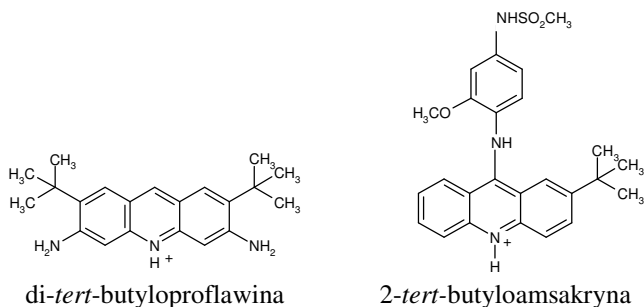
Rys. 5. Przykładowe struktury związków o kombinowanym sposobie wiązania z DNA

5. Związki niespecyficznie wiążące się na zewnątrz nici DNA

Cechami charakterystycznymi tej grupy związków są występowanie na ich powierzchni ładunku dodatniego umożliwiającego występowanie oddziaływania elektrostatycznego z ujemnie naładowanym DNA (tak zwane wiązanie elektrostatyczne na zewnątrz nici DNA) oraz obecność grupy stanowiącej zawadę steryczną uniemożliwiającą penetrację do wnętrza DNA. Związki te nie interkalują, ani też nie lokują się w rowkach. Częsteczką związaną z DNA jest utrzymywana na zewnątrz heliksu.

Przykładem związków niespecyficznie wiążących się z DNA jest di-*tert*-butyloproflawina oraz 2-*tert*-butyloamsakryna (rys. 6). Mimo, że związki te normalnie wiążą się z DNA przez interkalację, dołączenie grupy *tert*-butylowej stwarza steryczną zawadę uniemożliwiającą ten proces [36].

Porfiryny to interesująca grupa związków, które mogą elektrostatycznie wiązać się z DNA na zewnątrz łańcucha lub nawet interkalować. Sposób oddziaływania zależy przede wszystkim od liczby koordynacyjnej centralnego atomu metalu, a także od typu DNA [37] (rys. 6).



metaloporfiryna

podstawnik X jest obecny lub nie w zależności od wartościowości metalu

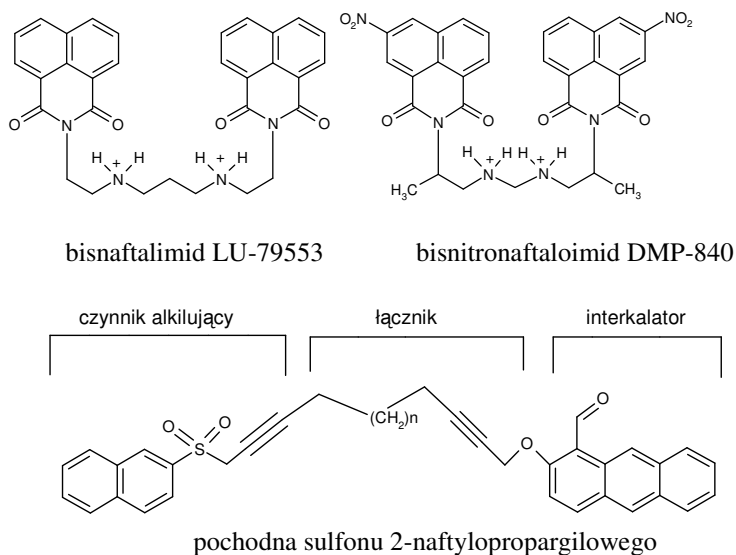
Rys. 6. Przykładowe struktury związków wiążących się na zewnątrz nici DNA

6. Bisinterkalatory

Bisinterkalatory (interkalatory bifunkcyjne) zbudowane są z dwóch cząsteczek interkalatorów (monomerów) oddzielonych od siebie łącznikiem, czyli długim łańcuchem najczęściej $[\text{CH}_2]_n$, np. bisnaftalimid LU-79553 (rys. 7). Bisinterkalatory wykazują wyższe stałe wiązania niż odpowiednie monomery [38], [39].

Do jednych z prostszych przykładów interkalatorów bifunkcyjnych należą: homodimer etydyny i heterodimer akrydyny z etydyną [40]. Innym bisinterkalatorem jest bisnaftaloimid DMP-840 [39] (rys. 7). Do ciekawych interkalatorów bifunkcyjnych należą pochodne sulfonu 2-naftylopropargilowego. Obecność czynnika alkilującego w strukturze wspomnianych pochodnych umożliwia tworzenie dodatkowego wiązania z DNA, które jest wiązaniem kowalencyjnym [41] (rys. 7).

Wysokie stałe wiązania i duża specyficzność wiązania w stosunku do DNA są powodem prowadzenia intensywnych prac badawczych nad tą klasą związków [30], [38], [42], [43].



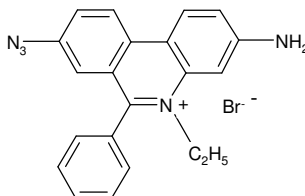
Rys. 7. Przykładowe struktury bisinterkalatorów

7. Związki tworzące z DNA wiązanie kowalencyjne

Do tytułowej grupy związków należą wymienione już wcześniej: altromycyna B [32], pochodne sulfonu 2-naftylopropargilowego [41] (rys. 7).

W przypadku niektórych związków (np. monoazydek etydyny, 7-azydo-aktynomycyna) powstawanie wiązania kowalencyjnego może być spowodowane

działaniem światła widzialnego. Monoazydek etydyny (rys. 8) – analog bromku etydyny łączy się z DNA podobnie jak bromek etydyny, ale po fotolizie światłem widzialnym grupa azydkowa jest aktywowana do aktywnego nitrenu i uzyskuje się *in situ* kowalencyjne przyłączenie etydyny [44], [45], [46], [47]. Analogicznie fotoliza grupy azydkowej 7-azydo-aktynomycyny do wysoce reaktywnego nitrenu powoduje powstanie wiązania kowalencyjnego z DNA [17].



Rys. 8. Monoazydek etydyny

8. Literatura

- [1] **Bourdouxhe-Housiaux C., Colson P., Houssier C., Waring M.J., Bailly C.:** Interaction of a DNA-Threading Netropsin-Amsacrine Combilexin with DNA and Chromatin, *Biochemistry*, 35, 14, 4251-4264, (1996).
- [2] **Pilch D.S., Kirolos M.A., Liu X., Plum G.E., Breslauer K.J.:** Berenil (1,3-bis(4'-amidinophenyl)triazene) Binding to DNA Duplexes and to a RNA Duplex - Evidence for Both Intercalative and Minor-Groove Binding-Properties, *Biochemistry*, 34, 31, 9962-9976, (1995).
- [3] **Kiwamu Yamaoka,:** Effect of Chemical structures of Acridine and Triphenylmethane Dyes on the Induced Optical Activity of DNA-Dye Complexes, *Biopolymers*, 11, 2537-2561, (1972).
- [4] **Lerman, L.S.:** Structural considerations in the interactions of DNA and acridines, *J. Mol. Biol.* 3, 18-30, (1961).
- [5] **Hogan M., Dattagupta N., Crothers D.M.:** Transient Electric Dichroism Studies of the Structure of the DNA Complex with Intercalated Drugs, *Biochemistry*, 18, 2, 280-288, (1979).
- [6] **Tanious F.A.:** DAPI (4',6-Diamino-2-phenylindole) Binds Differently to DNA and RNA: Minor-Groove Binding at AT Sites and Intercalation at AU Sites, *Biochemistry*, 31, 12, 3103-3112, (1992).
- [7] **Pindur U., Haber M., Sattler K.:** Antitumor Active Drugs as Intercalators of Deoxyribonucleic Acid (Molecular Models of intercalation Complexes), *Journal of Chemical Education*, 70, 4, 263-272, (1993).
- [8] **Pastwa Elżbieta.:** Praca doktorska Akademia Medyczna w Łodzi, 1998. Promotor: dr hab. Leszek Szmigiero
- [9] **Waring, M. J.:** Variation of the supercoils in closed circular DNA by binding of antibiotics and drugs: Evidence for molecular models involving intercalation, *J. Mol. Biol.* 54, 247-279, (1970).

- [10] **Fredericq E., Houssier C.:** Study of the Intercalation of DNA and Acridine Orange by Various Optical Methods, *Biopolymers*, 11, 2281-2308, (1972).
- [11] **Hard T., Fan P., Magde D., Kearns D.R.:** On The Flexibility of DNA: Time-Resolved Fluorescence Polarization of Intercalated Quinacrine and 9-Amino-6-chloro-2-methoxyacridine, *J. Phys. Chem.* 93, 10, 4338-4345, (1989).
- [12] **Wilson W.D., Lopp I.G.:** Analysis of Cooperativity and Ion Effects in the Interaction of Quinacrine with DNA, *Biopolymers*, 18, 3025-3041, (1979).
- [13] **Wilson W.D., Krishnamoorthy C.R., Wang Y-H., Smith I.C.:** Mechanism of Intercalation: Ion Effects on the Equilibrium and Kinetic Constants for the Interaction of Propidium and Ethidium with DNA, *Biopolymers*, 24, 1941-1961, (1985).
- [14] **Nitiss J.L., Zhou J., Rose A., Hsiung Y., Gale K.C., Osheroff N.:** The Bis(naphthalimide) DMP-840 Causes Cytotoxicity by Its Action against Eukaryotic Topoisomerase II, *Biochemistry*, 37, 9, 3078-3085, (1998).
- [15] **Rosenberg L.S., Carvlin M.J., Krugh T.R.:** The Antitumor Agent Mitoxantrone Binds Cooperatively to DNA: Evidence for Heterogeneity in DNA Conformation, *Biochemistry*, 25, 5, 1002-1008, (1986).
- [16] **Atherton S.J., Harriman A.:** Photochemistry of Intercalated Methylene Blue: Photoinduced Hydrogen Atom Abstraction from Guanine and Adenine, *J. Am. Chem. Soc.* 115, 5, 1816-1822, (1993).
- [17] **Bailly C., Graves D.E., Ridge G., Waring M.J.:** Use of a Photoactive Derivative of Actinomycin to Investigate Shuffling Between Binding Sites on DNA, *Biochemistry*, 33, 29, 8736-8745, (1994).
- [18] **Rentzeperis D., Marky L.A.:** Netropsin Binding as a Thermodynamic Probe of the Grooves of Parallel DNA, *J. Am. Chem. Soc.* 115, 5, 1645-1650, (1993).
- [19] **Fritzsche H.:** Infrared linear dichroism studies of DNA-drug complexes: quantitative determination of the drug-induced restriction of the B-A transition, *Nucleic Acids Research*, 22, 5, 787-791, (1994).
- [20] **Braithwaite A.W., Baguley B.C.:** Existence of an Extended Series of Antitumor Compounds Which Bind to Deoxyribonucleic Acid by Nonintercalative Means, *Biochemistry*, 19, 6, 1101-1106, (1980).
- [21] **Dattagupta N., Hogan M., Crothers D.M.:** Interaction of Netropsin and Distamycin with Deoxyribonucleic Acid: Electric Dichroism Study, *Biochemistry*, 19, 26, 5998-6005, (1980).
- [22] **Rentzeperis D., Marky L.A.:** Interaction of Minor Groove Ligands to an AAATT/AATTT Site: Correlation of Thermodynamic Characterization and Solution Structure, *Biochemistry*, 34, 9, 2937-2945, (1995).
- [23] **Lah J.:** Binding of Distamycin A and Netropsin to the 12mer DNA Duplexes Containing Mixed AT GC Sequences with At Most Five or Three Successive AT Base Pairs, *Biochemistry*, 39, 31, 9317-9326, (2000).
- [24] **Roths R.:** Methylene Blue Binding to DNA with GC Base Sequence: A Modeling Study, *J. Am. Chem. Soc.* 122, 12, 2860-2866, (2000).
- [25] **Wilson W.D.:** DNA Sequence Dependent Binding Modes of 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI), *Biochemistry*, 29, 36, 8452-8461, (1990).
- [26] **Vijayalakshmi R., Kanthimathi M., Subramanian V., Nair, B.U.:** Interaction of DNA with [Cr(Schiff base)(H₂O)₂]ClO₄, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1475, 157-162, (2000).

- [27] **Tuite E., Norden B.:** Sequence-specific interactions of methylene blue with polynucleotides and DNA: a spectroscopic study, *J. Am. Chem. Soc.* 116, 17, 7548-7556, (1994).
- [28] **Warning M.J.:** Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids, *J. Mol. Biol.* 13, 269-282, (1965).
- [29] **Jakeway S. C.:** Consideration of end effect of DNA hybridization in selection of fluorescent dyes for development of optical biosensors, *Can. J. Chem.* 77, 2083-2087, (1999).
- [30] **Bourdouxhe-Housiaux C., Colson P., Houssier C., Waring M.J., Christian Bailly, C.:** Interaction of a DNA-Threading Netropsin-Amsacrine Combilexin with DNA and Chromatin, *Biochemistry*, 35, 14, 4251-4264, (1996).
- [31] **Liaw Y-C., Gao Y-G., Robinson H., van der Marel G.A., van Boom J.H., Wang A.H-J.,** Antitumor Drug Nogalamycin Binds DNA in Both Grooves Simultaneously; Molecular Structure of Nogalamycin-DNA Complex, *Biochemistry*, 28, 26, 9913-9918, (1989).
- [32] **Hansen M., Hurley L.,** Altromycin B Threads the DNA helix interacting with Both the Major and the Minor Grooves To Position Itself for Site-Directed Alkylation of Guanine N7, *J. Am. Chem. Soc.* 117, 9, 2421-2429, (1995).
- [33] **Chaires J.B., Satyanarayana S., Suh D., Fokt I., Przewloka T., Priebe W.:** Parsing the Free Energy of Anthracycline Antibiotic Binding to DNA, *Biochemistry*, 35, 7, 2047-2053, (1996).
- [34] **Wang A.H-J.:** Interactions between an Anthracycline Antibiotic and DNA; Molecular Structure of Daunomycin Complexed to d(CpGpTpApCpG) at 1,2 Angstrom Resolution, *Biochemistry*, 26, 4, 1152-1163, (1987).
- [35] **Graves D.E., Krugh, T.R.:** Adriamycin and Daunorubicin Bind in a Cooperative Manner to Deoxyribonucleic Acid, *Biochemistry*, 22, 16, 3941-3947, (1983).
- [36] **Feigon J., Denny W.A., Leupin W., Kearns D.R.:** Interaction of Antitumor Drugs with Natural DNA: ¹H NMR Study of Binding Mode and Kinetics, *J. Med. Chem.* 27, 4, 450-465, (1984).
- [37] **Strickland J.A., Marzilli L.G., Gay K.M., Wilson W.D.:** Porphyrin and Metalloporphyrin Binding to DNA Polymers: Rate and Equilibrium Binding Studies, *Biochemistry*, 27, 24, 8870-8878, (1988).
- [38] **Gallego J., Reid B.R.:** Solution Structure and Dynamics of a Complex between DNA and the Antitumor Bisnaphthalimide LU-79553: Intercalated Ring Flipping on the Millisecond Time Scale, *Biochemistry*, 38, 46, 15104-15115, (1999).
- [39] **Spicer J.A.,** Bis(phenazine-1-carboxamides): Structure-Activity Relationships for a New Class of Dual Topoisomerase I/II-Directed Anticancer Drugs, *J. Med. Chem.* 43, 7, 1350-1358, (2000).
- [40] **Gaugain B.:** DNA Bifunctional Intercalators. 2. Fluorescence Properties and DNA Binding Interaction of an Ethidium Homodimer and an Acridine Ethidium Heterodimer, *Biochemistry*, 17, 24, 5078-5088, (1978).
- [41] **Dai W-M., Chow C.W., Zhou L.:** Bifunctional 2-naphthyl propargylic sulfones Exhibiting high DNA intercalating and alkylating activity, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 9, 19, 2789-2794, (1999).
- [42] **Jourdan M., Garcia J., Lhomme J., Teulade-Fichou M-P., Vigneron J-P., Lehn J-M.:** Threading Bis-Intercalation of a Macrocyclic Bisacridine at Abasic Sites in

- DNA: Nuclear Magnetic Resonance and Molecular Modeling Study, *Biochemistry*, 38, 43, 14205-14213, (1999).
- [43] **Spicer J.A.:** Bis(phenazine-1-carboxamides): Structure-Activity Relationships for a New Class of Dual Topoisomerase I/II-Directed Anticancer Drugs, *J. Med. Chem.* 43, 7, 1350-1358, (2000).
- [44] **Bolton P.H., Kearns D.R.:** Spectroscopic properties of ethidium monoazide: a fluorescent photoaffinity label for nucleic acids, *Nucleic Acids Research*, 5, 12, 4891-4903, (1978).
- [45] **Connelly P., Ghosaini L., Hu C-Q., Kitamura S., Tanaka A., Sturtevant J.M.:** A Differential Scanning Calorimetric Study of the Thermal Unfolding of Seven Mutant Forms of Phage T4 Lysozyme, *Biochemistry*, 30, 7, 1887-1891, (1991).
- [46] **Gilbert P.L., Graves D.E., Britt M., Chaires J.B.:** Inhibition of the B to Z Transition in Poly(dGdC)*Poly(dGdC) by Covalent Attachment of Ethidium: Kinetic Studies, *Biochemistry*, 30, 45, 10931-10937, (1991).
- [47] **Marx G., Zhou H., Graves D.E., Osheroff N.:** Covalent Attachment of Ethidium Results in Enhanced Topoisomerase II-Mediated DNA Cleavage, *Biochemistry*, 36, 50, 15844-15891, (1997).

THE MODES OF BINDING OF LIGAND MOLECULES WITH DNA

Summary

In this paper, we characterized various modes of bindings of ligand molecules with DNA, including intercalation, bisintercalation, binding in minor or major groove of DNA, non-specific binding outside DNA, covalent binding and mixed binding mode - characteristic for hybrid molecules named combilexins. We discussed the structural features of ligand affecting its interactions and, in case mixed binding mode ligands, external factors influencing occurrence of specific mode.

Department of Biotechnology and Food Sciences
Technical University of Łódź

**KATARZYNA ŚLIŻEWSKA, JOANNA BIERNASIAK
ZDZISŁAWA LIBUDZISZ**

**Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii
Politechnika Łódzka**

PROBIOTYKI JAKO ALTERNATYWA DLA ANTYBIOTYKÓW

Opiniodawca: **dr hab. Zofia Żakowska, prof. PŁ**

W pracy przedstawiono przegląd danych literaturowych dotyczących stosowania antybiotykowych stymulatorów wzrostu w żywieniu zwierząt. Omówiono również celowość zastosowania probiotyków jako rozwiązania alternatywnego w stosunku do antybiotyków.

1. Wprowadzenie

Wiek XX, to wiek intensyfikacji produkcji roślinnej i zwierzęcej w celu zaspokojenia zapotrzebowania na żywność, szczególnie na białko zwierzęce dla wciąż powiększającej się populacji ludzkiej. Ta intensyfikacja wymagała i nadal wymaga stosowania różnych dodatków paszowych, wspomagających proces wzrostu zwierząt.

Dodatki paszowe obejmują substancje, które nie są niezbędne dla życia i prawidłowego rozwoju zwierząt, ale wprowadzone do diety wspomagają procesy trawienia i wchłaniania składników pokarmowych oraz korzystnie wpływają na ogólny stan zdrowotny zwierząt. Do najważniejszych dodatków paszowych należą m.in. antybiotyki, probiotyki, enzymy, aminokwasy [17].

2. Antybiotykowe stymulatory wzrostu

Substancje antydrobnoustrojowe zastosowane u zwierząt pełnią cztery różne funkcje: terapeutyczną, metafilaktyczną, profilaktyczną i promotora wzrostu.

Terapeutyczne stosowanie antybiotyków ma na celu kontrolowanie istniejących infekcji bakteryjnych. Sposoby aplikacji leku zależne są od liczby

zwierząt. Indywidualnie leczone są zwierzęta domowe, jak również konie sportowe, krowy mleczne i cielęta. Antybiotyk podawany jest tylko osobnikom z objawami chorobowymi, a dawka leku dostosowana jest do stanu zdrowia zwierzęcia. Takie leczenie nie jest możliwe przy stadzie zwierząt liczącym 30000 sztuk (brojlery), czy 100 sztuk (świnie). W takich wypadkach, aby zapobiec rozprzestrzenianiu się choroby, podaje się leki całemu stadu w chwili wystąpienia objawów choroby u pojedynczych sztuk. Aplikowanie leków stadom liczącym po kilkaset sztuk zwierząt określa się jako **metafilaktyczne**. Wczesne podanie antybiotyku zmniejsza liczbę chorych lub martwych zwierząt. Zużywa się również mniejsze ilości leku, a cały proces leczenia jest mniej kosztowny. Antybiotyki podaje się wraz z wodą lub w paszy.

Profilaktyczne podawanie antybiotyku ma zapobiegać możliwym chorobom, na jakie narażone są zwierzęta w tak zwanych momentach kluczowych, jak na przykład mieszanie osobników pochodzących z różnych stad. Na początku u zwierząt nie obserwuje się jeszcze objawów choroby lecz wiadomo, że pojawienie się ich jest bardzo prawdopodobne.

Coraz bardziej krytykowany jest ostatni cel podawania antybiotyków – przyspieszanie wzrostu i zwiększanie masy mięsnej zwierząt. **Antybiotykowe promotory wzrostu** poprawiają również wydajność paszy, co obniża koszty chowu. Z żywieniowego punktu widzenia obecność antybiotyków w paszy powoduje pocienienie ścianek przewodu pokarmowego (jelit) oraz lepsze ich ukrwienie. Dzięki tym zmianom w budowie anatomicznej obserwuje się zwiększone wchłanianie składników pokarmowych ze światła jelit [20, 26, 27, 28, 29]. Dotyczy to zarówno związków azotowych, cukrów prostych, witamin jak i składników mineralnych. Poprawa strawności powoduje, że z tej samej porcji paszy zwierzę może wykorzystać więcej składników pokarmowych na przemianę podstawowe lub do produkcji. W ten sposób poprawia się wykorzystanie paszy. Wpływ na lepszą strawność paszy ma także stabilizacja mikroflory bakteryjnej, czyli hamowanie, namnażania się bakterii niekorzystnych, a sprzyjanie rozwojowi bakterii pożądanym w przewodzie pokarmowym zwierzęcia.

Dane ze sprzedaży antybiotyków w Unii Europejskiej i Szwajcarii podane przez Europejską Federację Zdrowia Zwierząt (FEDESA) w 1997 roku wskazują, że 5 460 000 kg antybiotyków wykorzystano w medycynie ludzkiej, 3 465 000 kg w medycynie zwierząt oraz 1 575 000 kg jako zwierzęcych promotorów wzrostu. W przeliczeniu na kilogram masy ciała średnie antybiotykowe dawki wynosiły odpowiednio 241 mg/kg dla ludzi i 54 mg/kg dla zwierząt. Zwrócono również uwagę na nieostrożne użycie antybiotyków w krajach z intensywną produkcją zwierzęcą, np.: w Hiszpanii, Grecji i Wielkiej Brytanii antybiotykowe dawki wynosiły odpowiednio: 103, 134, 148 mg/kg, były, zatem wyższe od średniej dawki, podczas gdy w Austrii, Danii, Finlandii, Irlandii i Szwecji były zdecydowanie niższe i wynosiły: 6, 24, 24, 12 i 24 mg/kg [18, 26, 27, 28, 29].

W tym samym roku opublikowano raport rządu szwedzkiego, w którym opisano wpływ antybiotyków dostających się wraz z odchodami zwierząt produkcyjnych do gleby na mikroflorę glebową; raport ten koncentrował się jednak głównie na problemie zagrożenia dla ludzi i zwierząt ze strony antybiotykoopornych szczepów bakterii wyselekcjonowanych pod wpływem antybiotyków, pomijając zagadnienia związane z ekologią mikroorganizmów w środowiskach naturalnych.

Stwierdzono, że antybiotykowa oporność może mieć dwie formy: naturalną i nabytą. Wrodzona lub naturalna oporność na poszczególne antybiotyki lub grupy antybiotyków jest bardzo rozpowszechniona wśród bakterii, co jest odbiciem ewolucyjnym przystosowania bakterii do naturalnych toksyn występujących w środowisku. Oporność naturalna związana jest najczęściej z enzymatycznym rozkładem leku, np.: rozerwaniem pierścienia betalaktamowego penicylin przez penicylinazę (β -laktamazę) wytwarzaną przez bakterie penicyli-nooporne. Synteza enzymów kodowana jest przez geny zlokalizowane w plazmidach lub genomie komórki. Dość często szczepy odporne na antybiotyki mają zmniejszoną przepuszczalność ściany i błony komórkowej, wówczas lek nie wnika do tak zmienionego drobnoustroju i nie powoduje zmian hamujących jego namnożenie [1].

Oporność nabyta związana jest z przypadkową zmianą chromosomu w komórce bakteryjnej (mutacją) obejmującą geny kodujące antybiotykowy cel w komórce. U bakterii geny oporności odnajdowane są w wyspecjalizowanych formach DNA, takich jak: plazmidy (pozachromosomalne, koliste lub liniowe fragmenty DNA), transpozony (elementy plazmidów lub chromosomów). Oporność może być także determinowana przez bakteriofagi (wirusy infekujące komórkę bakteryjną) lub przez wolne DNA obecne w środowisku (fragmenty DNA pochodzące z lizy komórek).

Nabywanie oporności może wystąpić na drodze koniugacji (dwie żywe komórki bakteryjne), transpozycji (ruch transpozonu między cząsteczkami DNA - przechodzenie z plazmidu na plazmid lub z plazmidu na chromosom), transdukcji (wprowadzenie genu oporności przez infekujący bakteriofag) lub transformacji (rekombinacja nieuszkodzonego odcinka DNA, otrzymanego z bakterii zabitych, z DNA żywych bakterii o odmiennych cechach genetycznych).

Zarówno u ludzi, jak i zwierząt skóra i jelito kolonizowane są przez różną florę bakteryjną. W momencie kontaktu z antybiotykiem w określonym stężeniu podatne bakterie zostają zahamowane w rozwoju lub zniszczone, a odporne bakterie obecne w florze mogą się mnożyć (w większym lub mniejszym rozmiarze). Stłumienie wrażliwych na antybiotyki bakterii stwarza także okazje do kolonizacji przez odporne bakterie pochodzące z zewnętrznych źródeł. Zatem ciągłe lub powtarzające stosowanie antybiotyków sprzyja nie tylko powstawaniu, ale także wzmocnieniu oporności u bakterii [4, 5, 16, 23, 24, 26].

Przenoszenie antydrobnoustrojowej oporności między zwierzętami a ludźmi może odbywać się w następujący sposób:

- rozwój opornych bakterii u zwierząt,
- przenoszenie opornych bakterii od zwierząt do ludzi,
- infekcje u ludzi często kończące się niepowodzeniem w leczeniu.

Antydrobnoustrojowa oporność może rozwijać się u bakterii, występujących indywidualnie, zarówno u ludzi jak i zwierząt, narażonych na antydrobnoustrojowe substancje. Dalsze rozprzestrzenianie oporności bakteryjnej pomiędzy różnymi gospodarzami może występować bezpośrednio przez skórę, materiał biologiczny (ślina, kał) lub przez skażoną żywność, paszę, powietrze lub wodę. Kiedy oporne bakterie docierają do nowego gospodarza mogą kolonizować i infekować lub pozostawać w nowym środowisku przez krótki czas. Podczas tego okresu oporne bakterie mogą, nie tylko przekazywać geny oporności innym bakteriom obecnym w danym środowisku, ale mogą również je przyjmować. Długotrwała obecność w określonym środowisku sprzyja zarówno przekazywaniu, jak i przyjmowaniu genów oporności. Czynniki sprzyjające długoterminowej kolonizacji obejmują niską specyficzność gospodarza na kolonizujące bakterie, zredukowaną fizjologiczną florę bakteryjną i osłabiony system odpornościowy (trwające infekcje).

Stwierdzono, że antybiotykooporne, patogenne bakterie wywołujące infekcje u ludzi *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium Enterica, *Campylobacter* sp. i *Enterococcus* sp. pochodzą od zwierząt. Łańcuch pokarmowy to główna droga, przez którą wymienione bakterie docierają do ludzi. Takie patogeny mogą rozprzestrzeniać się między ludźmi różnymi drogami. Dlatego należy rozważyć, czy wyżej wymienione bakterie izolowane z ludzkich źródeł mogą pochodzić od zwierząt, czy produktów zwierzęcych.

Transfer wielu opornych, patogennych bakterii od zwierząt do ludzi jest często trudny do udowodnienia, nawet przy użyciu najnowszych metod molekularnych. Te trudności wynikają głównie z klonowej struktury patogenów udowodnionej dla *Salmonella* Typhimurium DT104 i *Salmonella* Enteritidis PT4 izolowanych z różnych geograficznych i zwierzęcych źródeł [3]. Inne patogenne bakterie, takie jak: *Campylobacter jejuni* lub *Enterococcus* sp. prezentują odmienną sytuację; te bakterie charakteryzują się wysoce różnorodnym układem genomu, w związku z czym dopasowanie par izolowanych ze zwierząt, produktów zwierzęcych i ludzi może być rzadkością. Zatem udowodnienie kierunku przekazywania oporności przez bakteryjne plazmidy lub transpozony u ludzi i zwierząt jest jeszcze trudniejsze do osiągnięcia [7, 10, 16, 29, 31, 32].

Od kiedy w medycynie ludzkiej i zwierzęcej zastosowano antybiotyki tych samych klas, takie jak tetracykliny, aminoglikozydy, makrolidy i β -laktamowe, oporność na wymienione farmaceutyki została wyselekcjonowana i rozpowszechniona, zarówno u ludzi jak i zwierząt.

Charakterystyczne analizy dotyczące genów oporności i plazmidów szczepów *Staphylococcus*, zarówno ludzkich jak i zwierzęcych ujawniły obecność identycznych genów oporności umiejscowionych na nierozpoznawalnych pla-

zmidach. Takie wyniki dostarczają ważne dowody na przekazywanie plazmidów między ludzkimi i zwierzęcymi bakteriami, ale w większości przypadków niemożliwe jest odtworzenie, gdzie i kiedy rozwinął się oryginalny plazmid oraz kolejność mających miejsce transferów.

Nie ulega wątpliwości, że ryzyko nabywania opornych bakterii od zwierząt jest wyższe u osób, które pozostają w zamkniętym kontakcie ze zwierzętami albo produktami zwierzęcymi (np. rolnicy, pracownicy rzeźni). Najwyższe ryzyko dotyczy weterynarzy, którzy codziennie kontaktują się z klinicznie chorymi zwierzętami i tych, którzy pracują w środowiskach bogatych w substancje anty-drobnoustrojowe i środki odkażające.

Podsumowując można stwierdzić, iż to mało prawdopodobne, że przenoszenie genów oporności może zachodzić jedynie między bakteriami wewnątrz populacji zwierzęcej lub ludzkiej. Rozpowszechnianie opornych bakterii od zwierząt do ludzi jest w zasadzie możliwe, a w literaturze istnieją dowody, że takie transfery nie tylko zdarzyły się, ale miały charakter dwustronny [26].

Dotychczasowa wiedza na temat wpływu antybiotykowych stymulatorów wzrostu na środowisko naturalne sprowadza się do kilku prostych stwierdzeń:

- powodują one zakłócenia równowagi ekologicznej w glebie i w wodzie (polegające głównie na zachwianiu równowagi pomiędzy bakteriami i grzybami glebowymi),
- powodują straty azotu z gleby.

Dalsze zmiany mogą być tylko przewidywalne jako następstwo opisanych wyżej procesów prowadzących do wyjałowienia gleby, ucieczki soli pokarmowych do wód gruntowych i spadku populacji pierwotnej (eutrofizacja wód) [17].

3. Probiotyki

Z danych literaturowych wynika, iż uzupełnienie diety w odpowiednie gatunki bakteryjne o udokumentowanych właściwościach probiotycznych, pozwala na utrzymanie homeostazy przewodu pokarmowego, powiększając tolerancję organizmu na niekorzystne bodźce zewnętrzne, ułatwia procesy trawienia i zwiększa przyswajalność składników pasz, a w przypadku konieczności stosowania antybiotyków w celach leczniczych przyspiesza okres rekonwalescencji.

Preparaty probiotyczne jako naturalne stymulatory wzrostu mogą być rozwiązaniem alternatywnym dla antybiotyków.

Słowo probiotyk pochodzi z języka greckiego i znaczy „dla życia”. W miarę rozwoju nauki definicje probiotyków ulegały uzupełnianiu. Po raz pierwszy terminu probiotyk użył w 1965 roku Lilly i Stillwel w odniesieniu do substancji wytwarzanych przez mikroorganizmy i stymulujących wzrost człowieka i zwierząt. W 1974 roku Parker użył tego terminu dla organizmów i substancji, które przyczyniają się do zachowania równowagi mikroflory jelito-

wej gospodarza. Fuller w 1989 roku uzupełnił pojęcie probiotyku i określił je jako „żywe, mikrobiologiczne uzupełnienie pokarmu”, które korzystnie wpływa na żywiciela poprzez poprawę równowagi jego mikroflory jelitowej. Probiotyki są obecnie definiowane jako preparaty lub produkty zawierające żywe, zdefiniowane mikroorganizmy i wystarczająco liczne, które oddziałują na mikroflorę (przez wszczepienie lub kolonizację) w różnych organach gospodarza i przez to wywierają u niego korzystne działanie na zdrowie [11, 25].

Określenie probiotyk jest zastrzeżone dla preparatów lub produktów, które spełniają następujące kryteria [18, 22]:

- zawierają żywe komórki, np. liofilizowane komórki albo bakterie czynne w produktach mleczarskich, czy innych produktach fermentowanych,
- poprawiają stan zdrowia człowieka lub zwierząt (co może też obejmować stymulację wzrostu zwierząt),
- korzystny efekt wywierają w jamie ustnej bądź w przewodzie pokarmowym (podawane jako dodatki do żywności lub preparaty farmaceutyczne), w górnych drogach oddechowych (stosowane w postaci aerozoli) lub w przewodzie moczowo-płciowym (preparaty miejscowe).

Skuteczność korzystnego oddziaływania probiotycznych szczepów bakterii fermentacji mlekowej (LAB) na organizm człowieka lub zwierząt jest uwarunkowana wieloma czynnikami, dlatego ważna jest właściwa selekcja i dobór szczepów oraz systematyczne dostarczanie organizmowi dużej liczby żywych komórek. Zawartość żywych komórek w różnych preparatach probiotycznych waha się od 10^5 do 10^9 CFU/g. W żywieniu zwierząt stosuje się najczęściej probiotyki zawierające bakterie z rodzaju *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* oraz drożdże *Saccharomyces cerevisiae*. Gatunki bakterii, najczęściej stosowane w preparatach probiotycznych dla zwierząt oraz nazwy tych preparatów przedstawiono w tabeli 1.

W przewodzie pokarmowym zwierząt występuje ponad 200 różnych typów bakterii. Tempo jego kolonizacji przebiega stopniowo i zależy od warunków zoohigienicznych, składu i spożycia paszy oraz procesu kaprofacji. Mikroflorę przewodu pokarmowego ze względu na funkcje, jakie pełni w organizmie można podzielić na trzy grupy [32]:

- drobnoustroje korzystne – hamujące wzrost bakterii szkodliwych i stymulujące wiele ważnych funkcji przewodu pokarmowego i organizmu gospodarza np.: *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*,
- drobnoustroje potencjalnie szkodliwe – których obecność i negatywne oddziaływanie ujawnia się w przypadku zaburzeń funkcjonowania przewodu pokarmowego np.: *Escherichia coli*,
- drobnoustroje bezwzględnie szkodliwe – zakłócające fizjologiczne funkcje przewodu pokarmowego (np. wywołując biegunki), produkujące toksyny i substancje kancerogenne np.: niektóre gatunki *Clostridium* sp.

Tabela 1

Drobnoustroje stosowane do otrzymywania preparatów
probiotycznych dla zwierząt [11, 20]

Nazwa handlowa preparatu	Przeznaczenie	Mikroorganizmy
Acid-Pak-4-Way Wacter	drób indyki rzeźne świnie	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Enterococcus faecium</i>
Biogen D	drób	<i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Pediococcus faecium</i>
Biogen T	prosięta tuczniki warchlaki	<i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Enterococcus faecium</i>
Cerbiopor	maciory loszki prosięta tuczniki warchlaki	<i>Lactobacillus: acidophilus, brevis, casei, fermentum, lactis, plantarum</i> <i>Bacillus: subtilis, megaterium, pumilus</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Cellulomonas sp.</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Cernivet LBC	cielęta prosięta	<i>Enterococcus faecium</i>
Lactiferm	cielęta drób prosięta	<i>Enterococcus faecium</i> M-74
Oralin	cielęta drób	<i>Enterococcus faecium</i> DSM 10663/NCIMB10415
Probiomix	cielęta drób	<i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Lactobacillus amylovorus</i> <i>Enterococcus faecium</i>
Probios	drób maciory prosięta warchlaki	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Enterococcus faecium</i>
Probiosacc C-I	cielęta	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Provita LE	prosięta cielęta	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> DSM 7133 <i>Enterococcus faecium</i> DSM 7134
Yea Sacc	bydło	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CBS 493.94

Preparaty probiotyczne podawane zwierzętom hodowlanym w paszy lub zaaplikowane oralnie, wpływają korzystnie na ich wzrost, poprzez stymulujące oddziaływanie na przewód pokarmowy i procesy w nim zachodzące. Odpowiednio dobrane bakterie probiotyczne determinują przyswajanie paszy, pełniąc jednocześnie rolę regulatora równowagi mikroflory przewodu pokarmowego

zwierząt. Efekty działania preparatów probiotycznych zbliżone są do efektów uzyskanych w wyniku zastosowania antybiotyków paszowych, bowiem jedne i drugie redukują liczbę bakterii patogennych, jednak sposób ich działania jest różny. Probiotyki jako naturalne stymulatory wzrostu nie powodują żadnych skutków ubocznych i nie implikują odkładania się szkodliwych substancji obcych, stąd nie mają okresu karencji i nie ma niebezpieczeństwa ich przedawkowania. Z punktu widzenia konsumenta i producenta żywności ważne jest również, że stosowanie probiotyków dzięki możliwości obniżania, a nawet całkowitej eliminacji konieczności stosowania antybiotyków, jest sposobem otrzymywania bezpiecznej żywności.

Analizując biologiczny i biochemiczny mechanizm działania probiotyków należy zwrócić uwagę na szczegółowe i różnorakie funkcje, jakie pełnią one w organizmie ludzi lub zwierząt. Do funkcji tych należy:

- **Produkcja substancji antybakteryjnych, tj.: kwasy organiczne, nadtlenek wodoru, bakteriocyny** [2, 4, 19, 21, 22].

Antybakteryjny wpływ kwasów organicznych może być wynikiem gwałtownego obniżenia pH poza zakres optymalnej wartości dla wzrostu i inhibicję aktywności biochemicznej mikroorganizmów przez niezdysocjowane cząsteczki kwasu. Kwas mlekowy posiada zdolności konserwujące, w którym ważną rolę odgrywają trzy czynniki: efekt samego pH, stopień dysocjacji kwasu, swoista aktywność cząsteczki kwasu.

Kwas mlekowy jako słaby kwas w płynnych środowiskach jest tylko częściowo zdysocjowany. W formie niezdysocjowanej może przenikać przez lipidową błonę komórkową. We wnętrzu komórki przy wyższym pH cytoplazmy, kwas mlekowy dysocjuje, zakwaszając treść komórki. Uwalniając potencjalnie toksyczne aniony wodorotlenowe zaburza gradient protonowy w błonach, stanowiący siłę napędową aktywnego transportu. Zakwaszanie cytoplazmy przez kwas mlekowy jest jednym z najważniejszych czynników hamujących rozwój drobnoustrojów. Kwas mlekowy hamuje wzrost bakterii gnilnych, w tym i bakterii gram-ujemnych, a także niektórych pleśni.

Kwas octowy może natomiast oddziaływać na membrany komórkowe, neutralizując potencjał elektrochemiczny komórki. Obecność kwasu octowego, oprócz obniżenia wartości pH podłoża, może powodować denaturację wewnątrzkomórkowych białek oraz redukcję wartości pH wewnątrz komórki. Kwas octowy w obecności kwasu mlekowego wykazuje synergizm w inhibicji wzrostu drożdży i pleśni, a także może oddziaływać na rozwój bakterii gnilnych, bakterii z rodzaju *Clostridium* oraz z rodzaju *Salmonella*.

Kolejnym czynnikiem hamującym rozwój mikroorganizmów patogennych jest H_2O_2 produkowany przez niektóre szczepy bakterii z rodzaju *Lactobacillus* w ilościach przekraczających progi toksyczności dla patogenów. Nadtlenek wodoru może hamować rozwój lub zabijać mikroorganizmy, które nie posiadają lub mają niski poziom enzymów, takich jak peroksydaza, katalaza czy dysmutaza

nadtlenkowa, zabezpieczających przed utlenieniem mostków disiarczkowych w białkach komórkowych.

Jedną z bardziej interesujących grup substancji zdolnych do antagonistycznego oddziaływania na szereg drobnoustrojów patogennych stanowią bakteriocyny. Są to substancje białkowe wytwarzane i wydalone poza komórkę przez liczne szczepy bakterii, które działają zabójczo lub bakteriostatycznie na drobnoustroje wrażliwe, oddziałując na błony komórkowe bakterii posiadających zdolne do ich przyłączania receptory. Jednym z głównych producentów bakteriocyn są bakterie z rodzaju *Lactobacillus*, ale również *Enterococcus faecium*, *Lactococcus lactis* czy *Streptococcus thermophilus*. Zdolność bakterii do wytwarzania bakteriocyn jest zakodowana w DNA plazmidowym lub chromosomalnym. Genowi odpowiedzialnemu za produkcję tego typu substancji towarzyszy zawsze gen oporności na własną bakteriocynę. Najbardziej znane bakteriocyny wytwarzane przez bakterie fermentacji mlekowej to: nizyna, acidolina, acidofilina, lactacyna, lactocydyna, reuteryna, laktolina i enterocyna. Substancje te wykazują wysoką aktywność antybakteryjną w stosunku do: *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus* sp., *Listeria* sp., *Klebsiella* sp., *Proteus* sp.

- **Zdolność adhezji do nabłonka jelit [10]**

Bakterie mające pełnić rolę probiotyków muszą wykazywać się zdolnością przylegania do powierzchni śluzówki zwierzęcego przewodu pokarmowego. Najbardziej wartościowe jako probiotyki są te gatunki, które za pomocą fimbrii zdolne są do trwałego powiązania adhezyjnego z receptorami przewodu pokarmowego gospodarza. Szczep nie posiadający takich zdolności działa tylko tak długo, jak długo przebywa w przewodzie pokarmowym i nie zostanie wydalony do środowiska wraz z niestrawionym pokarmem. Jeżeli nastąpi kolonizacja, to drobnoustrój zawarty w probiotyku zajmuje w ekosystemie miejsce, które mógłby zająć patogen.

- **Stymulacja wydolności systemu immunologicznego [8]**

Przewód pokarmowy noworodków zwierząt w pierwszych godzinach życia jest jałowy. Ponadto zwierzęta rodzą się albo bez własnych przeciwciał, albo są zaopatrzone w immunoglobuliny matczyne, które przenikają przez łożysko. Zanim noworodek wyprodukuje swoje przeciwciała, dochodzi do zasiedlenia jego przewodu pokarmowego przez drobnoustroje ze środowiska. Dlatego szczególne znaczenie mają probiotyki, które tworząc w śluzówce jelita naturalny „biofilm” (zdolność adhezji), stanowią barierę przeciw potencjalnie patogennym czynnikom i zwiększają w ten sposób odporność organizmu. Probiotyczna stymulacja immunologiczna przejawia się również we wzmożonej produkcji immunoglobulin, podwyższeniu aktywności makrofagów i limfocytów i stymulacji produkcji γ -interferonu. Składniki ściany komórkowej bakterii fermentacji mlekowej pobudzają aktywność makrofagów, które poprzez zwiększoną ilość

wolnych rodników tlenowych i enzymów lizosomalnych są zdolne do szybkiego niszczenia drobnoustrojów.

- **Zwiększenie wykorzystania paszy - produkcja i wydzielanie enzymów hydrolitycznych [13]**

Niestrawione węglowodany utrudniają dostęp soków trawiennych do składników pokarmowych zawartych w komórkach pasz roślinnych oraz mają zdolność wiązania znacznych ilości wody. U młodych zwierząt, żywionych paszą zawierającą znaczny udział rozpuszczalnych niestrawionych węglowodanów, obserwuje się pogorszenie wskaźników produkcyjnych i rozwolnienie odchodów, a niekiedy także skłonność do występowania niedoboru witamin i składników mineralnych. Bakterie probiotyczne wytwarzają enzymy rozkładające węglowodany, takie jak β -glukany. Zwiększają również aktywność enzymów własnych gospodarza, takich jak β -galaktozydaza, sacharoza i maltaza.

Jako mikroorganizmy probiotyczne wykorzystuje się również drożdże. Najwięcej badań poświęcono probiotycznym właściwościom drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Są one wykorzystywane w żywieniu zwierząt w dwojaki sposób: jako źródło białka oraz w postaci żywych kultur w celu poprawienia funkcjonowania przewodu pokarmowego. Jednym z głównych efektów stosowania tych drożdży jest lepsze wykorzystanie paszy oraz zwiększenie masy ciała zwierząt. Obecność drożdży wpływa jednak przede wszystkim na aktywność metaboliczną bakterii mlekowych, które pozostają z nimi w układzie symbiotycznym. Drożdże produkują witaminy z grupy B, od których zależy dobry wzrost bakterii. Efektem działania drożdży jest również obniżenie koncentracji amoniaku, lepszy rozkład celulozy, zmniejszenie ilości cukrów rozpuszczalnych oraz metanolu. Zmniejszenie stężenia amoniaku w żwacu o 20-34% ma miejsce wraz ze wzrostem populacji mikroorganizmów, co może być związane z pobieraniem amoniaku przez drożdże. Składniki ściany komórkowej drożdży, w tym głównie glukan i mannan zabezpieczają przewód pokarmowy przed bakteriami patogennymi, tj.: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*. Wynikiem tych wszystkich zmian jest stabilizacja procesów fermentacyjnych oraz pH środowiska, co w istotny sposób wpływa na zdrowotności i produktywności zwierząt [14, 23].

4. Podsumowanie

Dotychczasowe badania wskazują na możliwość i celowość zastosowania probiotyków jako rozwiązania alternatywnego w stosunku do antybiotyków. Wysoka aktywność probiotyczna bakterii mlekowych oraz drożdży pozwala przypuszczać, że preparaty probiotyczne zawierające te organizmy będą coraz częściej stosowane do celów profilaktycznych i leczniczych, nie tylko w weterynarii, lecz także w medycynie. Wszystkie starania czynione w związku zastąpieniem antybiotyków preparatami probiotycznymi są na ogół naprawie-

niem błędów i szkód, jakie zostały wywołane przez ingerencję człowieka w środowisko bytowania zwierząt [9].

Przemysłowa hodowla zwierząt, a zwłaszcza nowoczesne sposoby żywienia, niosą z sobą zagrożenia do rozwiązania, których dotychczas stosowane były antybiotykowe stymulatory wzrostu. Obecnie nauka wiąże duże nadzieje z probiotykami, które mogą być rozwiązaniem alternatywnym w stosunku do antybiotyków.

5. Literatura

- [1] **Abigail A.:** Mikrobiologia: Różnorodność, chorobotwórczość i środowisko, PWN, Warszawa, 378-390, (2003).
- [2] **Adams M.R., Hall C.J.:** Growth inhibition of food - borne pathogens by lactic and acetic acid and their mixtures, *Int. J. Food Sci. Technol.*, 23, 278-291, (1988).
- [3] **Baggesen DL., Sandvang D., Aarestrup FM.:** Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 isolated from Denmark and comparison with isolates from Europe and the United States, *J. Clin. Microbiol.*, 38, 1581-1586, (2000).
- [4] **Barbosa T. M.:** The impact of antibiotic use on resistance development and persistence, *Drug Resist. Updat.*, 3, 303-311, (2000).
- [5] **Baquero F., Blázquez J.:** Evolution of antibiotic resistance, *TREE*, 12, 482-487, (1997).
- [6] **Boris S., Barbés C.:** Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens, *Microb. Inf.*, 2, 543-546, (2000).
- [7] **Bogaard A.E., Stobberingh E.E.:** Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans, *Int. J. Antimicrob. Agents*, 14, 327-335, (2000).
- [8] **Fooks L.J., Fuller R., Gibson G.R.:** Prebiotic, probiotics and human gut microbiology, *Int. Dairy I.*, 9, 53-61, (1999).
- [9] **Grzybowski R.A., Stecka K.M., Szkudzińska-Rzekowiak E.A., Milewski J.A.:** Bakterie fermentacji mlekowej jako składniki preparatów probiotycznych. W: Bakterie fermentacji mlekowej. Klasyfikacja, metabolizm, genetyka, wykorzystanie (red.) Z. Libudzisz, P. Walczak, J. Bardowski, Wydawnictwo PŁ, 98-121, (1998)
- [10] **Hamer D.H.:** From farm to the kitchen table: the negative impact of antimicrobial use in animals on humans, *Nutr. Rev.*, 60, 261-264, (2002).
- [11] **Holzappel W.H., Schillinger U.:** Introduction to pre- and probiotics, *Food Res. Int.*, 35, 109-116, (2002).
- [12] **Johnston A.M.:** Animals and antibiotics, *Int. J. Antimicrob. Agents*, 18, 291-294, (2001)
- [13] **Koreleski J.:** Skuteczność enzymów paszowych w żywieniu drobiu, *Hodowca drobiu*, 1-5, (2001).
- [14] **Lipiński K.:** Mechanizm działania probiotyków paszowych, *Trzoda Chlewna*, 1, 65-67, (1998).
- [15] **Lisitch M.:** Antibiotic resistance - the interplay between antibiotic use in animals and human beings, *Infect. Dis.*, 3, 47-51, (2003).

- [16] **Markiewicz Z., Kwiatkowski Z.A.:** Bakterie, antybiotyki, lekooporność. Wydawnictwo Naukowe PWN, 109-163, (2001).
- [17] **Opaliński K.:** Potencjalne zagrożenia dla środowiska związane z wykorzystaniem w hodowli zwierząt produktów paszowych oraz niezbędne minimum badań pozwalające na stwierdzenie czy ich stosowanie będzie wywierało na środowisko niekorzystny wpływ, PWN, Warszawa, (2003).
- [18] **Ouwehand A.C., Isolauri E., Kirjavainen P.V., Salminen S.J.:** Probiotics: mechanisms and established effects, *Int. Dairy J.*, 9, 43-52, (1999).
- [19] **Perdigon G., Alvarez S., Medici M.:** Systemic and local augmentation of the immune response in mice by feeding with milk fermented with *Lactobacillus acidophilus* and/or *Lactobacillus casei*. W: *Foods, Nutrition & Immunity*. red.) M. Paubert-Braquet, Ch. Dupont, R. Paoletti, Dyn. Nutr. Res. Basel, 1, 66-76, (1992).
- [20] **Podkówka Z., Podkówka W.:** Probiotyki w żywieniu świń. Trzoda chlewna, 5, 35-37, (1999).
- [21] **Rial D.R.:** The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health, *J. Nutr.*, 130, 396S-420S, (2000).
- [22] **Salminen S., Ouwehand A., Isolauri E.:** Clinical applications of probiotic bacteria, *Int. Dairy J.*, 8, 563-572, (1998).
- [23] **Salisbury J. G., Nicholls T. J., Lammerding A. M., Turnidge J., Nunn M.J.:** A risk analysis framework for the long - term mangement of antibiotic resistance in food - producing animals. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 20, 153-164, (2002).
- [24] **Salyers A.:** Mikrobiologia: różnorodność, chorobotwórczość i środowisko, PWN, Warszawa, 139-161, (2003).
- [25] **Schrezenmeir J., de Vrese M.:** Probiotics, prebiotics and synbiotics - approaching a definition, *Am. J. Clin. Nutr.*, 73, 361S-364S, (2001).
- [26] **Schwarz S., Kehrenberg C., Walsh T. R.:** Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production, *Int. J. Antimicrob. Agents*, 17, 431-437, (2000).
- [27] **Special Report.:** Antibiotics Used in Farm Animals Causing Hard -To -Treat Infections in Humans, *Tufts Univ. Health Nutr. Lett.*, November, 4-5, (2001).
- [28] **Ternak G.:** Antibiotics may act as growth obesity promoters in humans as an inadvertent result of antibiotic pollution?, *Med. Hypotheses*, 64, 14-16, (2005).
- [29] **Teuber M.:** Veterinary use and antibiotic resistance, *Curr. Opin. Microbiol.*, 4, 493-499, (2001).
- [30] **Thomke S., Elwinger K.:** Growth promotants in feeding pigs and poultry, Growth and feed efficiency responses to antibiotic growth promotants, *Ann. Zootech.*, 47, 85-97, (1998).
- [31] **Van den Braak N., van Belkum A., van Keulen M., Vliegenthart J., Verbrugh H., Endtz H.:** Molecular characterization of vancomycin resistant enterococci from hospitalized patients and poultry products in the Netherlands, *J. Clin. Microbiol.*, 36, 1927-1932, (1998).
- [32] **Zduńczyk Z.:** Probiotyki i prebiotyki, oddziaływanie lokalne i systemowe, *Przeżywność Spożywczy*, 4, 6-8, (2002).

PROBIOTICS AS ALTERNATIVE FOR ANTIBIOTICS

Summary

The work includes the relevant literature on the applying of antibiotics growth stimulators in nourishment of animals. Advisability of use probiotics as alternative solution in relation to antibiotics was talked over also.

Institute of Technology Fermentation and Microbiology
Technical University of Łódź

ANNA SYKUŁA**ELŻBIETA ŁODYGA-CHRUŚCIŃSKA****Instytut Podstaw Chemii Żywności****Politechnika Łódzka****MAREK ZAKRZEWSKI****Analytics s. z o.o. Łódź**

POLIMORFIZM – JEGO WPŁYW NA SUBSTANCJE FARMACEUTYCZNE

Opiniodawca: **prof. dr hab. inż. Marek Główka**

Polimorfizm jest obecnie ważnym zjawiskiem w dziedzinie farmacji. Istnieje wiele substancji farmaceutycznych wykazujących zjawisko polimorfizmu bądź pseudopolimorfizmu. Wiele farmaceutyków może posiadać różne struktury krystaliczne, co ma istotny wpływ na właściwości postaci leku. W tym celu wykonuje się różnorodne analizy odmian polimorficznych. W oparciu o dane literaturowe przedstawiono przekrojowy opis możliwych struktur krystalicznych, ich właściwości, zależności między strukturą a właściwościami oraz najważniejsze techniki badań odmian polimorficznych różnych leków (m.in. metody rentgenowskiej analizy dyfrakcyjnej, metody spektroskopowe, metody termiczne).

1. Wprowadzenie

Pojęcia polimorfizmu używa się w biologii, chemii czy krystalografii. Polimorfizm opisuje zjawisko występowania związków naturalnych i syntetycznych w różnych odmianach krystalicznych [1], a ogólniej, polimorfizm to wielopostaciowość związku chemicznego [2]. Z fizycznego punktu widzenia odmiany polimorficzne nie są różnymi stanami skupienia. Jednakże transformacja jednej odmiany w drugą jest interpretowana jako przejście fazowe (tzw. przemianą pierwszego rzędu). Przejścia tego typu nie zachodzą w ściśle określonych temperaturach, lecz są zależne od termicznej historii próbek, co powoduje, że dany

związek może występować w różnych odmianach polimorficznych w tej samej temperaturze [1]. Do lat pięćdziesiątych ubiegłego wieku strukturami krystalicznym różnych substancji interesowali się jedynie krystalografowie. Zainteresowanie tym zjawiskiem wzrosło, gdy zaobserwowano je wśród substancji farmaceutycznych. Obecnie laboratoria dużych firm farmaceutycznych przeprowadzają systematyczne badania, które mają na celu wykrywanie i projektowanie form polimorficznych substancji aktywnych i pomocniczych. Konieczność prowadzenia diagnostyki polimorficznej wymagana jest również w dokumentacji rejestracyjnej leków, gdzie w części dotyczącej właściwości fizykochemicznych znajduje się dział poświęcony polimorfizmowi substancji aktywnej [1]. Dlatego też występowanie polimorfizmu jest obecnie bardzo ważną cechą każdej substancji aktywnej. W związku z tym każda firma farmaceutyczna musi przebadать dany farmaceutyk oraz stwierdzić fakt występowania lub niewystępowania odmian polimorficznych substancji aktywnej.

1.1. Podział odmian polimorficznych

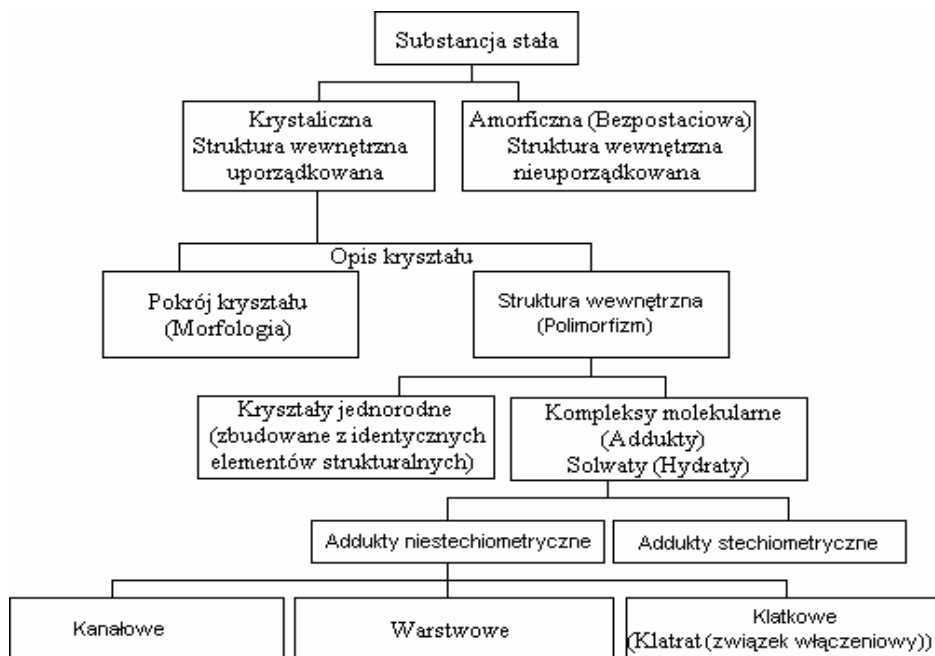
Jak wiadomo polimorfy to substancje aktywne występujące w dwóch lub więcej fazach krystalicznych, które mają różne ułożenie i/lub konformacje cząsteczek w komórce kryształu, są to tzw. „rzeczywiste” polimorfy [3-7]. Wyróżnia się też solwaty (pseudopolimorfy) – formy krystaliczne zawierające stechiometryczną lub niestechiometryczną ilość rozpuszczalnika. Jeśli rozpuszczalnikiem jest woda, to takie solwaty nazywa się hydratami [3]. Klasyfikację substancji stałych przedstawia rys. 1.

Kompleksy molekularne zawierające rozpuszczalnik mogą łatwo krystalizować, ponieważ różne cząsteczki mogą lepiej wypełnić przestrzeń niż identyczne. Najprawdopodobniej spowodowane jest to symetrią adduktu, zmianami konformacyjnymi wywołanymi utworzeniem adduktu, a także zdolnością do tworzenia wiązań wodorowych pomiędzy rozpuszczalnikiem a związkiem aktywnym biologicznie [5].

Solvaty desolvatowane są kryształami powstałymi poprzez desolvatację. Posiadają one strukturalne właściwości solwatów. Takie solwaty są zwykle mniej uporządkowane oraz trudniejsze do zbadania. Tego typu związki mogą być otrzymywane tylko z solwatów. Często są one niestabilne i wykazują duże powinowactwo do rozpuszczalnika, który zostaje związany w komórce krystalicznej. Hydraty odwodnione często absorbują wodę z powietrza, by zappełnić wolne przestrzenie w strukturze krystalicznej [5].

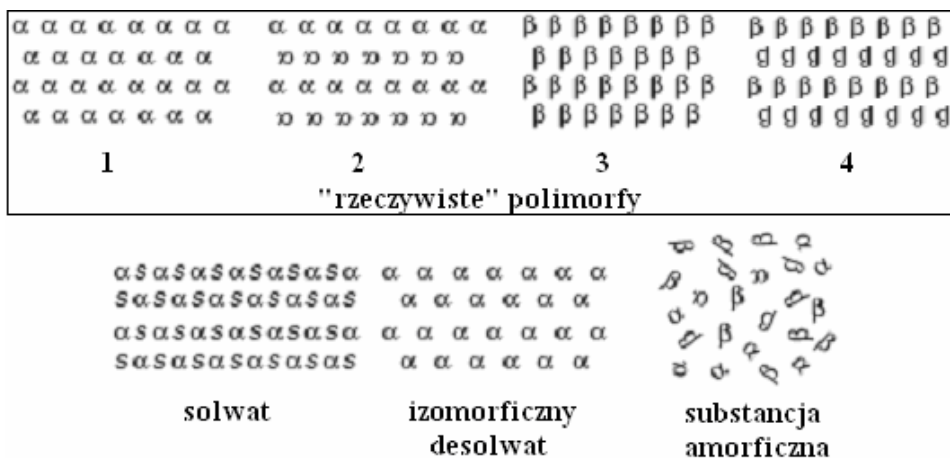
Substancje amorficzne (szkło, kauczuk) są zwykle zbudowane z makrocząsteczek (polimery, białka) [5]. Substancje pochodzenia roślinnego lub zwierzęcego często nie mogą uzyskać w stanie stałym charakterystycznego uporządkowania kryształu, są one bowiem zbudowane z różnych rodzajów cząsteczek, powstających zgodnie z prawami biologii. Na ogół nie są to więc substancje czyste.

Takimi przykładami może być skóra czy drewno [8]. Substancje amorficzne ze związków krystalicznych można otrzymać poprzez mielenie, rozproszenie ciała stałego, liofilizację itp. Związki te są mniej stabilne zarówno z chemicznego, jak i fizycznego punktu widzenia, tzn. wykazują mniejszą gęstość, większą rozpuszczalność, szybciej sublimują i są bardziej higroskopijne niż ich krystaliczne odpowiedniki [5].



Rys. 1. Klasyfikacja substancji stałych

Podział substancji stałych obrazowo został przedstawiony na rys. 2. „Rzeczywiste” polimorfy są wolne od cząsteczek rozpuszczalnika i posiadają różne upakowanie i/lub konformacje. Forma 1 różni się od 2 pod względem upakowania (ta sama sytuacja ma miejsce w przypadku formy 3 i 4). Natomiast forma 1 od formy 3 oraz forma 2 od formy 4 różni się konformacją cząsteczek (polimorfy konformacyjne) [7].



Rys. 2. Różne formy polimorficzne substancji farmaceutycznych.

α – cząsteczka oznaczająca substancję farmaceutyczną, β – cząsteczka oznaczająca tę samą substancję farmaceutyczną (o innej konformacji), s – rozpuszczalnik

1.2. Właściwości odmian polimorficznych

Istnieje siedem podstawowych układów krystalograficznych, według których można sklasyfikować wszystkie znane kryształy. Do układów krystalograficznych zaliczamy układ: trójskośny, jednoskośny, rombowy, trygonalny, tetragonalny, heksagonalny i regularny. W stanie stałym molekuly mogą również krystalizować w układzie nieuporządkowanym, przypadkowym, tworząc fazę bezpostaciową, tj. amorficzną [8].

Występowanie form polimorficznych wiąże się z występowaniem różnic w sieci krystalicznej lub parametrach charakteryzujących komórkę elementarną. Zarówno odmiany polimorficzne, jak i pseudopolimorficzne charakteryzują się tym samym składem chemicznym i wykazują te same właściwości w fazie ciekłej i gazowej, natomiast w fazie stałej różnią się właściwościami fizycznymi [1], takimi jak np.: temperatura topnienia i sublimacji, gęstość, twardość, prężność par, współczynnik załamania światła, kolor, kształt kryształu, rozpuszczalność, szybkość i ciepło rozpuszczania, stabilność, higroskopijność, reaktywność w stanie stałym oraz właściwości mechaniczne [1-3, 5, 6, 10, 11]. Jedną z najważniejszych konsekwencji występowania form polimorficznych substancji farmaceutycznych jest ich różna biodostępność [1-3, 5, 6, 10-13], co ma wpływ na biofarmaceutyczną klasyfikację leków (BCS od Biopharmaceutics Classification System) [1].

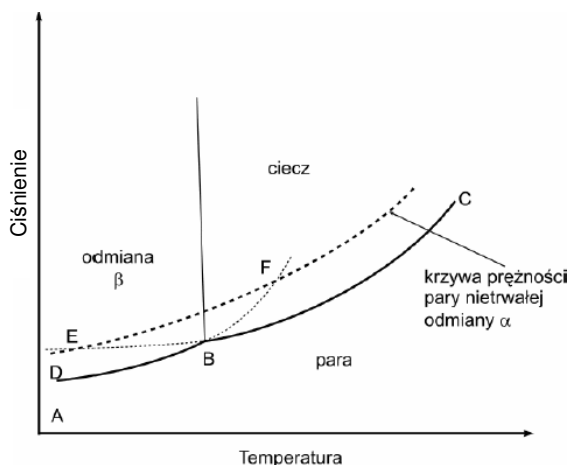
Odmiany polimorficzne różnią się między sobą zarówno właściwościami fizycznymi, ale mogą też różnić się właściwościami chemicznymi, np. w przypadku reakcji w fazie stałej lub w działaniu farmakologicznym, gdyż

mogą wykazywać inną biodostępność. Różnice te zanikają wraz z likwidacją sieci krystalicznej, a więc z chwilą rozpuszczenia lub stopienia substancji aktywnej. Fakt, że szybkość wchłaniania substancji aktywnej biologicznie z leku podanego doustnie zależy od szybkości jej rozpuszczania powoduje, że różne postaci polimorficzne różniące się szybkością rozpuszczania mogą być w różnym stopniu wykorzystane przez organizm. Istnieje możliwość, że jedna z odmian polimorficznych będzie wykazywała pożądane działanie farmakodynamiczne, a inna nie, ponieważ z racji małej rozpuszczalności, a zatem i małej szybkości wchłaniania, nie uzyska się we krwi odpowiedniego leczniczego stężenia farmaceutyku [10, 11]. Taki przypadek wyraźnej różnicy aktywności leczniczej, jak również toksyczności w zależności od budowy krystalicznej można zauważyć np. w przypadku indometacyny. Odmiana γ w porównaniu do odmiany α wykazuje większą aktywność oraz mniejszą toksyczność [10]. Innym przykładem jest kwas acetylosalicylowy (aspiryna). Dwie krańcowe odmiany tego związku, z uwagi na duże różnice rozpuszczalności (przy podaniu doustnym obserwuje się różnice w stężeniu w surowicy krwi dochodzące do 70%), wydają się być najistotniejsze dla biodostępności tego leku [2].

1.3. Przemiany form polimorficznych

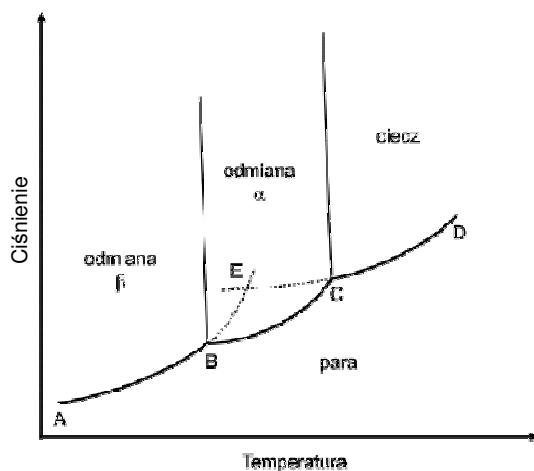
Wiele substancji farmaceutycznych może posiadać różne struktury krystaliczne. W przypadku krystalizacji polimorficznej substancji leczniczej, w roztworze ustala się stan równowagi, prowadzący zwykle do powstania tylko jednej odmiany krystalicznej [2]. Wpływ na powstającą odmianę polimorficzną ma rodzaj rozpuszczalnika i innych substancji, mieszanie, stosowanie różnych stężeń oraz szybkość krystalizacji [14]. Zmiana jednego z tych czynników może doprowadzić do transformacji form polimorficznych [15]. Przejście z jednej formy w drugą może przebiegać z różną szybkością [2]. Wyróżnia się dwie transformacje form polimorficznych: przemianę nieodwracalną i odwracalną. Egzotermiczne występowanie w fazie stałej formy metastabilnej (odmiana łatwo rozpuszczalna, która wykazuje niższą temperaturę topnienia) w stabilną jest procesem nieodwracalnym i nazywane jest przemianą monotropową. Ciepło przemiany fazy o niższej temperaturze topnienia jest mniejsze niż wysokotopliwej fazy stabilnej w przypadku, gdy różnice temperatur topnienia obu form nie przekraczają 20°C. Fazę metastabilną można otrzymać poprzez krystalizację z cieczy, np. podczas szybkiego chłodzenia. Przemiana enancjotropowa dotyczy odwracalnego procesu, zachodzącego w przypadku, gdy następuje endotermiczne przejście formy o niższej temperaturze topnienia w formę o wyższej temperaturze topnienia. Zatem ciepło przemiany fazy o niższej temperaturze topnienia jest większe niż ciepło topnienia formy wysokotopliwej. Wysokotopliwa forma oznaczana jest jako forma I lub alfa (α), a pozostałe formy, tj. niestabilne opis-

wane są jako II, III lub beta (β), gamma (γ) w kolejności obniżającej się temperatury topnienia [1].



Rys. 3. Diagram fazowy z monotropią

Faza metastabilna β w całym zakresie temperatur posiada wyższą wartość prężności par niż trwała odmiana α (rys. 3). Dwie krzywe widoczne na tym rysunku nie mają punktu wspólnego, zatem fazy te nie mogą być ze sobą w równowadze. W całym zakresie temperatur możliwa jest samorzutna przemiana w kierunku od nietrwałej fazy β w trwałą fazę α . Odmianę β można otrzymać z odmiany α jedynie poprzez fazę ciekłą, osiągając punkt topnienia (pkt B), a następnie przechłodzona ciecz przechodzi w fazę β w temperaturze poniżej temperatury topnienia (pkt E) [16, 17].



Rys. 4. Diagram fazowy z enancjotropią

Na rys.4 każda z faz posiada zakres równowagi z parą przy możliwie najniższej prężności par w danym zakresie temperatur, tzn. jest fazą termodynamicznie trwałą. W punkcie B zachodzi w określonej temperaturze przemiana polimorficzna, pomiędzy dwoma stałymi fazami trwałymi (niskotemperaturową β i wysokotemperaturową α). Obydwie fazy są też w równowadze z parą. Analogicznie, w punkcie C zachodzi przemiana dwóch faz w stanie równowagi z parą, tj. fazy α i fazy ciekłej. W momencie szybkiego chłodzenia fazy ciekłej równowaga w punkcie C może nie być osiągnięta i powstaje w ten sposób przechłodzona ciecz (linia przerywana przedłużona poza punkt C). Podobnie podczas szybkiego ogrzewania fazy β (powyżej punktu B) w miejscu odmiany wysokotemperaturowej można otrzymać przechłodzoną ciecz [16, 17].

Przemiany polimorficzne prowadzą do zmian położenia co najmniej części atomów czy jonów względem siebie. Wyróżnia się przemiany fazowe zachodzące bez zrywania silnych wiązań, przeważnie z niewielką zmianą konformacji, w której zachodzi nieznaczna deformacja sieci krystalicznej. Zachodzi ona szybko i odwracalnie (np. kwarc β w kwarc α) oraz przemiany fazowe ze zrywaniem wiązań i zasadniczą przebudową sieci krystalicznej. Przemiany tego typu zachodzą bardzo powoli.

Proces transformacji jednego polimorfu w drugi może zachodzić podczas suszenia, przechowywania substancji, procesu przetwarzania czy procesu tabletkowania (siła zgniatania) [1, 2]. Nieoczekiwane pojawianie się lub zanikanie wybranej formy polimorficznej może prowadzić do poważnych farmaceutycznych konsekwencji [1]. Problemy związane z przemianą jednej formy krystalicznej w drugą mają szczególne znaczenie w przypadku preparatów zawierających duże dawki substancji leczniczej, ponieważ z uwagi na małą zawartość składników pomocniczych w tych preparatach, niepożądana zmiana formy krystalicznej substancji leczniczej wywiera decydujący wpływ na właściwości postaci leku [18]. Dlatego też, wszelakie analizy odmian polimorficznych, w tym jakościowe i ilościowe, muszą być przeprowadzone na wczesnym etapie badań substancji i formy leku.

1.4. Przykładowe substancje wykazujące polimorfizm

Istnieje wiele substancji farmaceutycznych wykazujących zjawisko polimorfizmu lub pseudopolimorfizmu. Barbiturany, steroidy, sulfonamidy, antybiotyki (faza stała może zawierać więcej odmian polimorficznych), niesterydowe leki przeciwzapalne, pochodne uracylu i miejscowych anestetyków charakteryzują się występowaniem różnych form krystalicznych. W szczególności ostatnia grupa związków posiada wysoką liczbę polimorficznych przedstawicieli. Są one podzielone na trzy grupy: (1) estrowa (LAE) z krótkim okresem działania, (2) amidowa (LAA) ze średnim lub długim okresem działania i (3) grupa związków posiadające różne struktury cząsteczkowe, np. ketony czy etery (tabela 1) [5].

Tabela 1

Grupa	Przykłady związków
LAE	benzokaina, butamben, izobutamben, prokaina, chloroprokaina, hydroksyprokaina, dimetokaina, leucynokaina, butakaina, oksybuprokaina, amylkaina, tetrakaina, hydroksytetrakaina, kornekaina, butyksokaina, proksymetakaina, paretoksykaina, surfakaina
LAA	prilokaina, mepiwakaina, bupiwakaina, lidokaina, cinchokaina
eter/ketony	pramokaina, diklonina, propipokaina

2. Metody analizy form polimorficznych

W celu otrzymania dokładnej charakterystyki substancji farmaceutycznych stosuje się wiele metod, ponieważ łączne zastosowanie kilku z nich pozwala na pewne zidentyfikowanie i wyodrębnienie wszystkich modyfikacji. W badaniach zjawiska polimorfizmu wykorzystuje się metody rentgenowskiej analizy dyfrakcyjnej (dyfraktometria proszkowa (XRPD od X-ray Powder Diffraction), rentgenowską dyfrakcyjną analizę strukturalną monokryształów (XRD-MCSA od X-ray Diffractonal Monocrystal Structure Analysis)), metody spektroskopowe (spektroskopia w podczerwieni (IR – Infrared Spectroscopy), spektroskopia Ramanowską, spektroskopię NMR (Nuclear Magnetic Resonance), metody termiczne (różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC od Differential Scanning Calorimetry), analize termooptyczną, analizę termogravimetryczną (TG - Thermogravimetry)), pomiary właściwości fizycznych (rozpuszczalność) oraz metody mikroskopowe (mikroskopia skaningowa, mikroskopia stereoskopowa).

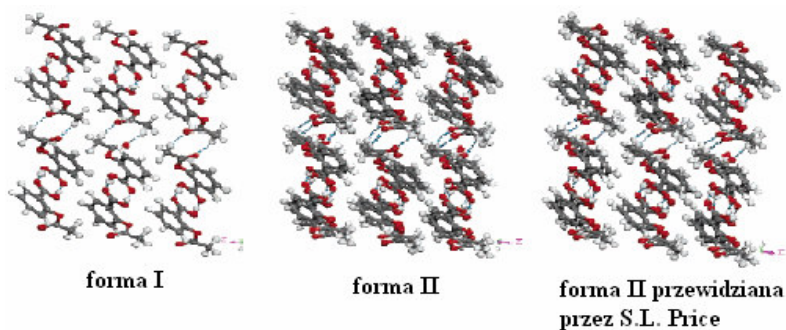
2.1. Metody rentgenowskiej analizy dyfrakcyjnej

XRPD jest niezastąpioną metodą wykorzystywaną w wykrywaniu i identyfikacji polimorfów, ponieważ różne struktury krystaliczne dają różne obrazy dyfrakcyjne. Metodą tą można opisać również odmiany amorficzne. W niektórych przypadkach proszkowa dyfrakcja rentgenowska stosowana jest również do oznaczania parametrów komórki jednostkowej i grupy przestrzennej oraz struktury cząsteczkowej. Tego typu metoda może być zastosowana do oznaczania stopnia krystaliczności, analizy jakościowej form polimorficznych czy kinetyki reakcji ciał stałych [1, 3, 19]. W metodzie tej bada się próbki w stanie sproszkowanym. Dane dyfrakcyjne są otrzymywane w postaci dyfraktogramów przedstawiających zależność intensywności refleksów dyfrakcyjnych od odległości międzypłaszczyznowej d lub kąta odbicia braggowskiego 2θ . Dyfraktogram jest właściwy dla każdej struktury i stanowi charakterystyczny i niepowtarzalny obraz dyfrakcyjny danej substancji o określonym upakowaniu [1].

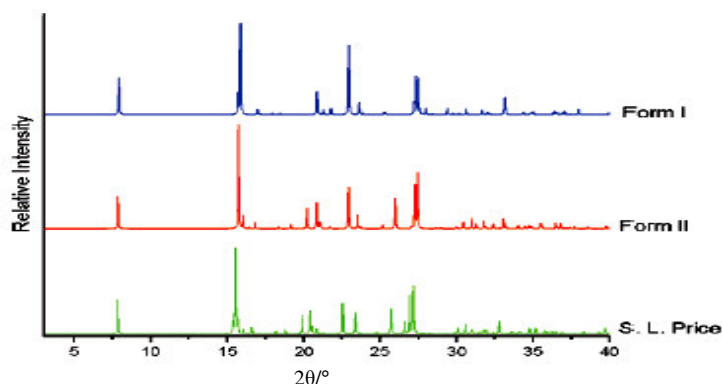
XRD-MCSA pozwala określić atomową budowę kryształu, a więc dostarcza najbardziej cennych informacji o formie polimorficznej, tzn. pozwala wyznaczyć parametry sieci, symetrię przestrzenną oraz położenia atomów w komórce elementarnej. Aby móc przeprowadzić tego typu badania, należy otrzymać pojedyncze kryształy o odpowiedniej wielkości i jakości.

Metodami rentgenograficznej analizy strukturalnej można więc identyfikować i charakteryzować formy polimorficzne.

Jak już wspomniano wcześniej, jednym z przykładów substancji farmaceutycznej wykazującej polimorfizm jest kwas acetylosalicylowy (aspiryna). Poniżej na rys.5 i 6 przedstawiono trzy formy polimorficzne aspiryny [20, 21]. Forma I jest substancją wyjściową, forma II jest wynikiem krystalizacji w stosunku 1:1 aspiryny i levetiracetamu z gorącego acetonitrylu, natomiast forma II przewidziana przez S.L. Price jest rezultatem zastosowania metod *ab initio* do zoptymalizowanych cząsteczkowych konformerów [21]. Każdą z form zbadano metodą XRPD.



Rys. 5.



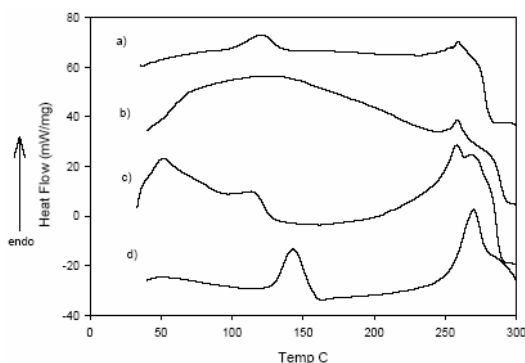
Rys. 6. Symulowane dyfraktogramy proszkowe dla poszczególnych odmian polimorficznych (forma I, II i II zaproponowana przez S.L. Price). Na dyfraktogramie formy II i S.L. Price można zauważyć dodatkowy pik w obrębie 2θ : 20 i 26° w porównaniu z obrazem dyfrakcyjnym formy I [20]

2.2. Analiza termiczna

Kolejną grupą metod wykorzystywanych w diagnostyce polimorficznej są metody analizy termicznej m.in. różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC) i termograwimetria (TG).

DSC jest nowoczesną i precyzyjną techniką, pozwalającą na analizowanie w szerokim zakresie temperatur efektów fizycznych i chemicznych, jakim ulegają substancje stosowane w farmacji, mieszaniny tych substancji, preparaty farmaceutyczne oraz półprodukty wytwarzane na różnych etapach procesu technologicznego, a ponadto surowce farmaceutyczne podczas zmian temperatury prowadzonych w kontrolowany sposób. DSC jest metodą zapewniającą szybką analizę próbki bez jej wstępnego przygotowania. Najważniejsze procesy, jakie można badać za pomocą DSC to topnienie, krystalizacja, parowanie, równowagi fazowe, sublimacja, przemiany zeszczenia i polimorficzne, dehydratacja, izomeryzacja, adsorpcja i rozkład. Możliwość powtarzania procesów ogrzewania i chłodzenia badanych próbek pozwala w wielu przypadkach na wykrycie form metastabilnych i eutektyków. Dla form amorficznych nie obserwuje się na krzywych DSC pików związanych z topnieniem substancji. Prawidłową interpretację sygnałów obserwowanych na krzywych DSC umożliwia analiza TG [1, 3, 18, 22, 23]. Metoda TG w połączeniu z DSC stanowi doskonałe narzędzie analityczne, umożliwiające badanie pseudopolimorfów, np. śledzenie zmian strukturalnych hydratów lub solwatów substancji farmaceutycznych, przechowywanych w ustalonych warunkach temperatury oraz wilgotności powietrza, w celu ustalenia ich stabilności.

Przykładem wykorzystania techniki DSC jest badanie przemian polimorficznych chlorowodoru bupiwakainy (BupiHCl). Pomiary przeprowadzono dla czterech różnych wykrystalizowanych próbek BupiHCl, z a) wody, b) acetonitrylu, c) metanolu, d) izopropanolu (rys. 7).



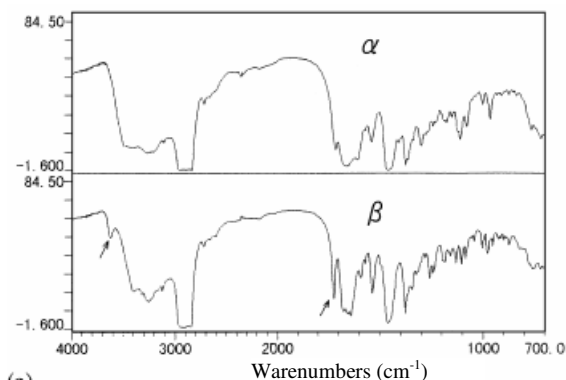
Rys.7. Krzywe DSC BupiwakainyHCl wykrystalizowanej odpowiednio z a) wody, b) acetonitrylu, c) metanolu, d) izopropanolu. Wszystkie krzywe DSC przedstawiają różne przypadki desolwatacji oznaczone jako piki endotermiczne, występujące w zakresie temperatur 50 - 200°C. Proces topnienia dla tych substancji zachodzi w temperaturze powyżej 250°C [12]

2.3. Metoda spektroskopii w podczerwieni (IR)

Inną grupą metod wykorzystywanych w badaniu polimorfizmu są metody spektroskopowe. Metoda spektroskopii w podczerwieni (IR) jest jedną z nich. Spektroskopia IR pozwala przeprowadzić zarówno identyfikację form polimorficznych substancji czynnych, badanie ich składu polimorficznego jak również identyfikację składu polimorficznego substancji czynnych zawartych w formie leku (tabletkach lub kapsułkach) [1, 24-26].

Dla dużej części substancji farmaceutycznych formy polimorficzne zostały opisane w literaturze i wówczas identyfikacja formy badanej substancji przebiega w odniesieniu do danych literaturowych. Jednakże dla wielu farmaceutyków formy polimorficzne nie zostały do tej pory zbadane. Podczas badań otrzymuje się próbki różniące się widmami IR w cieple stałym, które mogą wskazywać na istnienie różnych odmian polimorficznych danej substancji. Może zaistnieć również taka sytuacja, w której dyfraktogramy proszkowe dla określonych próbek tej samej substancji mogą się między sobą różnić, natomiast widma IR będą identyczne. Tego typu zjawisko występuje w przypadku indobufenu [1].

Metoda spektroskopii w podczerwieni może być również wykorzystana w diagnostyce polimorficznej substancji w formie leku, zarówno do analizy form zawierających dużo (np. ok.30%), jak i mało substancji aktywnej (np. ok. 3% w masie tabletkowej). Za pomocą IR można określić, jaką odmianę polimorficzną użyto w tabletkach. W tym celu należy otrzymać widmo z tabletki oraz placebo. Niestety, ze względu na małą zazwyczaj ilość substancji czynnej znalezienie zakresu diagnostycznego pozwalającego na ilościowe oznaczanie zawartości niepożądanego formy polimorficznej substancji aktywnej w postaci leku jest dość trudne [1]. Na rys. 8. przedstawiono przykładowe widmo IR przedstawiające dwie formy polimorficzne substancji aktywnej - taltirelinu.



Rys. 8. Identyfikacja dwóch form polimorficznych (α i β) substancji taltirelin metodą IR.

Charakterystyczny pik absorpcji formy β zaobserwowano dla częstości 3600 cm^{-1} .

Ostry pik o częstości 1670 cm^{-1} , odpowiadający rozciągającemu się wiązaniu $\text{C}=\text{O}$ formy β jest wyższy w porównaniu z wykresem IR dla formy α [27]

3. Podsumowanie

Polimorfizm jest zjawiskiem bardzo ważnym w sferze badań substancji farmaceutycznych. Wiele farmaceutyków wykazuje różne formy polimorficzne, które charakteryzują się zróżnicowanymi właściwościami fizycznymi jak i chemicznymi. Z tego względu przeprowadza się serię badań różnymi metodami (metoda rentgenowskiej analizy dyfrakcyjnej, analiza termiczna, metoda spektroskopii w podczerwieni) w celu opisanie wszelkich możliwych odmian krystalicznych danej substancji leczniczej [28]. Poza wpływem polimorfizmu na jakość leku jego charakterystyka jest ważna również z innych powodów:

- formy krystaliczne mogą być opatentowane;
- wśród odmian polimorficznych można zaobserwować „rzeczywiste” polimorfy oraz solваты zwane czasami pseudopolimorfami. Niektóre z nich krystalizują łatwo, inne tworzą substancje amorficzne. Część polimorfów oraz pseudopolimorfów krystalizuje zgodnie z przewidywaniem, a część z nich jest nietrwała i nie ma praktycznego znaczenia;
- polimorfizm stanowi unikalną możliwość badania zależności pomiędzy strukturą a właściwościami w związkach organicznych;
- występowanie odmian polimorficznych można wykorzystać do optymalizacji pewnych właściwości fizycznych (np. rozpuszczalność czy biodostępności).

Wynika stąd, że polimorfizm jest ważnym parametrem w charakterystyce substancji farmaceutycznych, a badania mu poświęcone przyczyniają się do rozwoju farmakologii i medycyny.

4. Literatura

- [1] **Beczkowicz H., Glice M., Korczak K., Kosmacińska B., Łaszc M., Maruszak W.:** Polimorfizm substancji farmaceutycznych. *Przemysł Chemiczny*, 85, 354-359, (2000).
- [2] **Kieć-Konowicz K.:** Wybrane zagadnienia z metod poszukiwania i otrzymywania środków leczniczych. Wyd. Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków. 137-138, (2000).
- [3] **Yu L.X., Furness M.S., Raw A., Woodland Outlaw K.P., Nashed N.E., Ramos E., Miller S.P.F., Adams R.C., Fang F. Patel R.M., Holcombe, Jr. F.O., Chiu Y-y., Hussain A.S.:** Scientific Considerations of Pharmaceutical Solid Polymorphism in Abbreviated New Drug Application. *Pharmaceutical Research*, 20, 531-536, (2003).
- [4] **Thompson M.D., Authelin J-R.:** Chemical Development of the Drug Substance Solid Form. *Process Chemistry in the Pharmaceutical Industry* (ed) Gadamasetti K.G., Marcel Dekker USA (1999).
- [5] **Schmidt A.C.:** The Role of Molecular Structure in the Crystal Polymorphism of Local Anesthetic Drugs: Crystal Polymorphism of Local Anesthetic Drugs, Part X. *Pharmaceutical Research*, 22, 2121-2133, (2005).

- [6] **Zakrzewski A. & M.**, Solid State Characterization of Pharmaceuticals, Pergamon, Tychy, (2006).
- [7] **Yu L., Reutzel M., Stephenson G.A.**: Physical characterization of polymorphic drugs: an integrated characterization strategy. PSTT, 1, 118-127, (1998).
- [8] **Haleblan J.K.**: Characterization of habits and crystalline modification of solids and their pharmaceutical applications. J. Pharm. Sci., 64, 1269-1288, (1975).
- [9] **Meerssche M.V., Feneau-Dupont J.**: Krystalografia i chemia strukturalna, PWN, Warszawa, (1984).
- [10] **Pawelczyk E., Płotkowiak Z., Zając M.**: Chemiczna analiza leków, PZWL, Warszawa, (1981).
- [11] **Singhal D., Curatolo W.**: Drug polymorphism and dosage form design: a practical perspective. Advanced Drug Delivery Rev., 56, 335-347, 2004.
- [12] **Łodyga-Chruścińska E., Zakrzewski M., Kuberski S., Paluszkiwicz A., Diniebnier R.E., Sugimoto K.**: Preliminary Characterization of New Polymorphic Form of Bupivacaine HCl. Annals of Polish Chemical Society, 2, 87-90, (2005).
- [13] **Snider D.A., Addicks W., Owens W.**: Polymorphism in generic drug product development. Advanced Drug Delivery Rev., 56, 391-395, (2004).
- [14] **Paluszkiwicz A.** Otrzymywanie różnych form leku Bupiwakainy HCl i ich podstawowa charakterystyka (praca magisterska). Instytut Podstaw Chemii Żywności, (2005).
- [15] Encyklopedia techniki, Chemia. Wydanie 4. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa, (1993).
- [16] **Rodriguez-Spony B., Price Ch.P., Jayasankar A., Metzger A.J., Rodriguez-Hornedo N.**: General principles of pharmaceutical solid polymorphism : a supramolecular perspective. Advanced Drug Delivery Rev., 56, 241-274, (2004).
- [17] **Handke M.**: Krystalochemia krzemianów, Uczelniane Wydawnictwa Naukowo-Dydaktyczne, Kraków, str. 82-84, (2005).
- [18] **Wesołowski M.**: Różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC) w technologii stałych postaci leków wybrane przykłady zastosowań. Farmacja Polska, 59, 1007-1020, (2003).
- [19] **Yamamura S., Momose Y.**: Quantitative analysis of crystalline pharmaceuticals In powders and tablets by a pattern-fitting procedure using X-ray powder diffraction data. Int.J.Pharm., 212, 203-212, (2001).
- [20] **Vishweshwar P., McMahon J.A., Oliveira M., Peterson M.L., Zawotko M.J.**: The Predictably Elusive Form II of Aspirin. J.Am.Chem.Soc., 127, 16802-16803, (2005).
- [21] **Ouvrard C., Price S.L.**: Toward Crystal Structure Prediction for Conformationally Flexible Molecules: The Headaches Illustrated by Aspirin. Crystal Growth & Design, 4, 1119-1127, (2004).
- [22] **Skoog D.A., Heller F.J., Nieman T.A.**: Principles of Instrumental Analysis (Fifth Edition), USA, (1998).
- [23] **Bond L., Allen S., Davies M.C., Roberts C.J., Shivji A.P., Tendler S.J.B., Williams P.M., Zhang J.**: Differential scanning calorimetry and scanning thermal microscopy analysis of pharmaceutical materials. Int.J.Pharm., 243, 71-82, (2002).
- [24] **Kalinkova G.N.**: Infrared spectroscopy in pharmacy. Vibrational Spectroscopy, 19, 307-320, (1999).

- [25] **Pfeffer_Henning S., Piechom P., Bellus M., Goldbronn C., Tedesco E.:** Physico-chemical characterization of an active pharmaceutical ingredient. Crystal polymorphism and structural analysis. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 77, 663-679, (2004).
- [26] **Gandhi R.B., Bogardus J.B., Bugay D.E., Perrone R.K., Kaplan M.A.:** Pharmaceutical relationships of three solid state forms of stavudine. *International Journal of Pharmaceutics*, 201, 221-237, (2000).
- [27] **Maruyama S., Ooshima H.:** Crystallization behavior of taltirelin polymorphs in a mixture of water and methanol. *Journal of Crystal Growth*, 212, 239-245, (2000).
- [28] **Vippagunta S.R., Brittain H.G., Grant D.J.W.:** Crystalline solids. *Advanced Drug Delivery Rev.*, 48, 3-26, (2001).

IMPACT OF POLYMORPHISM ON PHARMACEUTICAL SUBSTANCES

Summary

Polymorphism phenomenon plays a very important role in the pharmacy. It is well-established that many pharmaceutical solids can exist in several polymorphic or pseudopolymorphic forms. Polymorphs of pharmaceutical substances have crucial influence on drug properties. Therefore, there are various analytical methods characterizing polymorphic crystal forms. Based on literature data authors review the key elements of polymorph characterization: crystal structures, properties, structure property relationships and several-important techniques (X-ray diffraction, thermal analysis and IR spectroscopy).

Institute of General Food Chemistry
Technical University of Łódź

