

DETERMINAREA AMPEROMETRICĂ A UNOR IONI AI METALELOR GRELE PRIN INTERACȚIE CU ANUMITE ENZIME DIN CLASA OXIDAZELOR

Carmela Negulescu*, A. Ciucu**, C. Ciucu***, V. Magearu****

REZUMAT

Se prezintă o metodă bioelectrochimică de determinare a unor ioni ai metalelor grele. Metoda s-a bazat pe efectul inhibitor ai ionilor metalelor grele asupra activității enzimelor din clasa oxidazelor. Activitatea enzimatică a fost determinată prin intermediul unui senzor amperometric pentru apa oxigenată. A fost evaluat efectul inhibitor asupra enzimelor din soluție și immobilizate covalent pe suporturi polimerice. Hg(II) a fost ionul metalic care a inhibat majoritatea enzimelor și în mod special glicerol-3-P oxidaza. Hg(II) a fost determinat pe domeniul 0,05-0,5 ppm folosind enzima în soluție. Prin utilizarea altor oxidaze Hg(II) a fost de asemenea determinat pe domeniul 0,5-10 ppm. Alți ioni metalici testați au inhibat enzimele din clasa oxidazelor mult mai specific.

Cuvinte cheie: amperometric, ioni metalici, inhibiție, oxidaze, clinic

ABSTRACT

Amperometric detection of some heavy metals by interaction with selected oxidases enzymes

A bioelectrochemical method for the determination of heavy metal ions has been developed. This method is based on the inhibition effect of metal ions on the enzymatic activity of oxidase enzymes. The enzymatic activity was determined with an amperometric hydrogen peroxide probe. The inhibition effect on enzymes in solution and covalently immobilized on polymeric supports has been evaluated. Hg(II) was the metal ion that inhibited almost all the enzymes, particularly glycerol-3-P oxidase. Hg(II) was detected in the 0.05/ 0.5 ppm range with the enzyme in solution. Calibration curves for Hg(II) were also obtained with the other oxidase enzymes in the 0.5/ 10 ppm range. The other metal ions tested inhibited the enzymes more specifically.

Key Words: amperometric, heavy metals, inhibition, oxidases, clinical

INTRODUCERE

Este cunoscut faptul că enzimele din clasa oxidazelor sunt inhibitate de ioni ai metalelor grele [1,3]. La nivel molecular, inhibiția activității anumitor enzime pare să implice grupările sulfhidril (SH) ale acestor proteine. Această proprietate stă la baza construcției unor biosenzori amperometrici pentru detecția metalelor grele. Senzorul amperometric cel mai frecvent utilizat în acest scop este cel pentru apa oxigenată (H_2O_2).

În această lucrare se prezintă o metodă bioelectrochimică pentru determinarea unor ioni ai metalelor grele, metodă care se bazează pe efectul de inhibiție a ionilor de metal asupra activității anumitor enzime din clasa oxidazelor. Activitatea enzimatică a fost determinată cu electrodul pentru H_2O_2 [2,4,5]. A fost urmărit efectul de inhibiție asupra enzimelor care au fost folosite în soluție, precum și immobilizate. Hg(II) a fost ionul metalic care a inhibat aproape toate enzimele testate, în principal glicerol-3-fosfat oxidaza.

EXPERIMENTAL

Reactivi și soluții

Glutamat-, lizin- și glutatation oxidaza au fost obținute de la firma Fluka; restul enzimelor au fost de la Sigma Co. Toți reactivii analitici folosiți au fost de puritate analitică.

APARATURĂ

În cadrul determinărilor s-a folosit un detector amperometric de la Amel (Italia) cuplat la un înregistrator x-t model 868 (Amel-Italia). Pentru determinarea apei oxigenate s-a folosit un senzor pentru H_2O_2 (figura 1); senzorul pentru H_2O_2 constă dintr-un electrod de platină polarizat la + 0,65 V față de un electrod de referință Ag/AgCl. Membrana enzimatică este plasată la suprafața senzorului între alte două membrane: una din acetat de celuloză (100 MWCO) care protejează electrodul de platină de interferenții electrochimice și o membrană de dializă ce protejează enzimele de atacul microbian. Celula electrochimică folosită pentru determinarea activităților enzimatică și a măsurătorilor de inhibiție a avut un volum de 3 ml și a fost termostată la 25 °C.

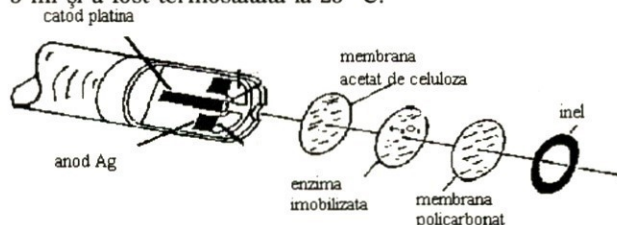


Fig. 1. Reprezentarea schematică a biosenzorului pentru ioni ai metalelor grele

*Biochimist drd. Carmela Negulescu, Wyeth Whitehall, București

** Prof. dr. Anton Ciucu, Catedra de Chimie Analitică, Facultatea de Chimie, Universitatea din București

*** Cristian Ciucu, Facultatea de Fizică, Universitatea din București

**** Vasile Magearu, Facultatea de Chimie, Universitatea din București

Determinarea activității oxidazelor

Activitatea enzimelor reprezintă o măsură a concentrației acestora în probele biologice și se exprimă prin unități internaționale (UI). O unitate de activitate internațională este definită ca fiind cea cantitate de enzimă care catalizează transformarea unui micromol de substrat/ minut în condiții optime de temperatură și pH [6].

Măsurarea activității enzimaticе, în soluție, a diferitelor enzime din clasa oxidazelor având la bază senzorul de apă oxigenată s-a efectuat conform procedurii următor [4]: proba care conține ioni metalici și substratul enzimei a fost lăsată să se echilibreze timp de 3 minute într-o soluție tampon de lucru, la un pH optim, până s-a obținut un curent de bază stabil. Ulterior s-a adăugat soluția enzimatică realizată în tamponul de lucru și s-a înregistrat curentul timp de 3 minute.

În tabelul 1 sunt prezentate rezultatele obținute pentru determinarea activității unor oxidaze în soluție. Din datele prezentate în tabelul 1, putem concluziona că electrodul pentru apă oxigenată poate fi utilizat pentru măsurarea activității oxidazelor, acesta prezentând o bună sensibilitate și reproductibilitate.

Procedeele de determinare a ionilor metalici prin inhibiția enzimelor solubile și imobilizate

În scopul realizării unor biosenzori bazați pe oxidaze pentru determinarea metalelor grele s-a studiat acțiunea inhibitorie a ionilor de metal asupra enzimelor solubile și imobilizate.

Enzimele studiate au fost imobilizate covalent pe diferite suporturi polimerice, folosind în acest scop trei tehnici diferite și anume:

(i) imobilizarea directă pe membrane Immobilon, (ii) imobilizarea pe plasă de nylon și (iii) imobilizarea pe o membrană de policarbonat, folosindu-se drept reactivi de cuplare albumină serică bovină și glutaraldehida.

Apa oxigenată produsă în urma reacțiilor cu enzimele din clasa oxidazelor s-a măsurat cu senzorul amperometric pentru H_2O_2 , ea fiind ulterior corelată cu cantitatea de enzimă din soluție, și/sau la o concentrație fixă de enzimă, ea putând fi corelată cu concentrația de inhibitor (ion metalic) prezent în soluția probei de analizat.

Activitatea enzimatică relativă (reziduală) s-a determinat prin incubarea unei cantități fixe de enzimă în prezența ionilor metalici (10 ppm), timp de 30 de minute, la temperatura camerei, ulterior adăugându-se soluția conținând substratul enzimatic specific. În tabelul 2 este indicată activitatea relativă a enzimelor solubile studiate, după incubarea cu ioni metalici

Tab. 1 Determinarea activității enzimaticе a unor enzime din clasa oxidazelor cu senzorul amperometric pentru H_2O_2 .

Enzima	Substrat	pH	Scara (UI/L)	R	RSD (%)
Glucoz-oxidaza (Aspergillus Niger)	Glucoza 2 mM	7,5	20-250	1,000	2,9
Colin-oxidaza (alcaligenes sp.)	Colina 1 mM	8,0	5-50	0,998	3,0
Xantin-oxidaza (buttermilk)	Xantina 0,2 mM	7,5	2-15	0,981	6,1
Sarcosin-oxidaza (Bacillus sp.)	Sarcosina 1 mM	8,3	0,1-2	0,999	6,9
Alcool-oxidaza (Hansenula sp.)	Metanol 1 mM	7,5	10-60	0,995	5,5
L-aminoacid-oxidaza (Crotalus Atrox Venom)	L-leucina 0,3 mM	7,8	1-10	0,998	4,3
Glicerol-3-P-oxidaza (Aerococcus sp.)	3-P-glicerol 1 mM	8,0	40-200	0,998	2,7
L- lactat-oxidaza (Pediococcus sp.)	Lactat 1 mM	7,2	20-100	0,998	3,2
Lisin-oxidaza (Trichoderma Viride)	Lisina 1 mM	7,5	5-40	0,997	7,3
Glutamat-oxidaza (Streptomyces sp.)	Glutamat 1 mM	7,5	5-20	1,000	3,0
Glutation-oxidaza (Penicillum sp.)	Glutation 1 mM	7,5	5-20	0,999	3,8
D-aminoacid-oxidaza (porcine kidney)	D-alanina 1 mM	8,3	20-60	0,998	3,8
Oxalat-oxidaza (Barley seedlings)	Oxalat 1 mM	4,0	100-400	0,992	5,5
Piruvat-oxidaza (Pediococcus sp.)	Piruvat 1 mM	7,5	5-25	0,995	5,9
Acool-oxidaza (Pichia Pastoris)	Metanol 1 mM	7,5	5-25	1,000	8,4

diferiți. Din tabel se poate observa că Hg(II) inhibă aproape majoritatea enzimelor testate, în timp ce ionii de Zn(II), Sn(II), Mo(VI) și Cr(III) nu prezintă nici un efect inhibitor asupra enzimelor.

Pentru studii relative la acțiunea inhibitorie a metalelor asupra aceluiași enzimă imobilizată, au fost selectate sistemele de ioni metalici/ enzime care conduc la o inhibiție mai mare de 30%.

Concentrația ionului metalic utilizată în studiul efectului asupra aceluiași enzimă imobilizată covalent a fost de 10 ppm, concentrație care a condus la o inhibiție semnificativă asupra enzimei din soluție. Tabelul 3 indică comparativ rezultatele obținute pentru diferite sisteme ioni metalici/enzime în soluție și imobilizate studiate.

Din studiile efectuate se pot trasa curbele de calibrare pentru diferiții ioni metalici care inhibă enzima liberă și imobilizată realizate la concentrații fixe de substrat. Curbele au fost obținute prin incubarea enzimelor cu diferite concentrații de ioni metalici și pentru timpi diferiți de reacție: 10, 20 și 30 de minute.

Determinarea ionilor metalelor grele

Determinarea cadmiului

Singura enzimă inhibată de ionii de Cd (II) a fost D-aminoacid-oxidaza. Utilizând enzima în soluție, pentru ionii de Cd s-a obținut o curbă de calibrare pe domeniul de

concentrații 5-20 ppm, limita de detecție fiind de 2 ppm. Deși această determinare nu a fost foarte sensibilă, ea este interesantă din cauza selectivității sale. De fapt, dintre toate metalele testate, doar Cd (II) inhibă enzima cu un procent mai mare decât 20 % (tabelul 3). Enzima imobilizată nu a fost inhibată de 10 ppm de Cd (II).

Determinarea cuprului

Cu(II) a inhibat puternic alcool-oxidaza, în timp ce a prezentat un efect mai scăzut asupra celorlalte enzime. Cu(II) poate fi determinat pe domeniul de concentrații cuprins între 1-7 ppm, cu o limită de detecție de 1 ppm. Enzima mai este inhibată și de ionii de Hg (II), astfel că o determinare cantitativă a Cu(II) este posibilă doar în absența acestor doi ioni de metal.

Enzima imobilizată este mai puternic inhibată, fapt care permite determinarea ionilor Cu(II) pe domeniul 0,05-0,5 ppm, cu o limită de detecție de 0,03 ppm (tabelul 3).

Inhibiția este ireversibilă, enzima imobilizată fiind mai reactivă față de Cu(II) decât față de Hg(II) și V(V). Astfel, pentru determinarea Cu(II), ar fi de preferat să se utilizeze enzima imobilizată.

Determinarea mercurului

Hg(II) a inhibat aproape toate enzimele testate, cel mai puternic fiind inhibată glicerol-3-P-oxidaza și alcool-oxidaza (tabelul 3). Utilizându-se alcool-oxidaza și 3-P-glicerol-oxidaza Hg(II) a fost determinat pe domeniul 0,3-1 ppm și respectiv 0,05-0,5 ppm. Determinarea Hg (II) având la bază aceste enzime este destul de selectivă (tabelul 3). În figura 1A sunt redată curbele de calibrare pentru Hg(II), la diferiți timpi de incubare.

Sensibilitatea determinării ionilor de mercur prin intermediul enzimelor imobilizate este mai mică decât în cazul folosirii enzimelor în soluție (tabelul 3).

Curba de calibrare pentru ionii de Hg(II) care inhibă activitatea glicerol-3-P-oxidazei imobilizate este redată în figura 1B. Limita de detecție este de 0,02. Alcool-oxidaza a fost singura enzimă care a prezentat o inhibiție mai mare în forma imobilizată comparativ cu aceea din soluție. Aceasta s-a mai observat și pentru Cu(II). Ambele sisteme enzimatică au indicat o inhibiție ireversibilă față de Hg(II).

Determinarea nichelului

Sarcosin-oxidaza este selectiv inhibată de Ni(II) (tabelul 3). Utilizând enzima în soluție, s-a obținut o curbă de calibrare pe domeniul 1-10 ppm, limita de detecție fiind de 1 ppm (figura 2A).

Tab. 2 Activitatea relativă a unor enzime din clasa oxidazelor, după incubare cu 10 ppm a ionului metalic, timp de 30 min., la temperatura camerei.

Enzima	UI/ml.	activitate relativă (%)											
		As (V)	Cd (II)	Cr (III)	Hg (II)	Pb (II)	Ni (II)	Cu (II)	Zn (II)	Sn (II)	Mo (VI)	V (V)	Se (IV)
Glucoz-Oxidaza	0,08	101	99	96	97	95	107	84	97	95	105	98	100
Colin-oxidaza	0,07	104	102	102	6	100	96	71	93	106	102	96	98
Xantin-oxidaza	0,01	89	112	112	80	92	109	85	93	95	104	91	102
Sarcosin-oxidaza	0,05	98	109	109	81	106	46	96	114	86	96	74	93
Alcool-oxidaza (Hans. Sp.)	0,04	95	96	96	38	103	88	97	101	103	106	61	109
Alcool-oxidaza (Pichia P)	0,05	108	102	102	0	98	78	27	96	101	95	44	108
L-aminoacid-oxidaza	0,01	92	94	94	37	80	101	89	96	91	94	82	88
Glicerol 3-P-oxidaza	0,45	92	93	93	0	94	101	92	98	99	97	93	98
Lactat-oxidaza	0,03	101	102	102	16	97	100	101	94	107	105	95	103
Lisin-oxidaza	0,01	85	99	99	10	88	90	80	93	95	99	83	99
Glutamat-oxidaza	0,01	106	107	107	5	108	95	94	99	106	96	97	107
Glutation-oxidaza	0,01	105	78	78	62	99	97	104	95	101	95	60	44
D-aminoacid-oxidaza	0,04	105	64	64	84	101	106	72	104	107	105	79	100
Oxalat-oxidaza	0,05	98	102	102	89	103	104	98	96	99	100	88	101
Piruvat-oxidaza	0,07	103	96	96	81	105	94	94	98	102	99	96	98

Tab. 3 Determinarea ionilor metalelor grele utilizând enzimele din clasa oxidazelor în soluție și imobilizate prin tehnici covalente.

Ion metalic	enzima	domeniul de conc. (ppm)		l.d. (ppm)	
		Liberă	Imobilizată	Liberă	Imobilizată
Hg(II)	Alcool-oxidaza	0,3 / 1	0,1 / 0,5	0,25	0,05
Hg(II)	Glicerol-3-P-oxidaza	0,05 / 0,5	1 / 10	0,02	0,50
Hg(II)	Lactat-oxidaza	0,3 / 1,5	---	0,05	---
Hg(II)	Lisin-oxidaza	0,25 / 1,5	---	0,20	---
Hg(II)	Colin-oxidaza	1 / 10	2 / 10	0,50	1,00
Hg(II)	Glutamat-oxidaza	0,5 / 2	---	0,20	---
Hg(II)	L-aminoacid-oxidaza	2 / 10	---	0,80	---
V(V)	Alcool-oxidaza	3 / 14	---	2,00	---
V(V)	Glutation-oxidaza	3 / 14	0,3 / 2	1,00	0,20
Cd(II)	D-aminoacid-oxidaza	5 / 15	---	2,00	---
Cu(II)	Alcool-oxidaza	1 / 7	0,05 / 0,5	1,00	0,03
Ni(II)	Sarcosin-oxidaza	1 / 10	0,15 / 1	1,00	0,05
Se(IV)	Glutation-oxidaza	1 / 10	0,02 / 0,4	0,50	0,015

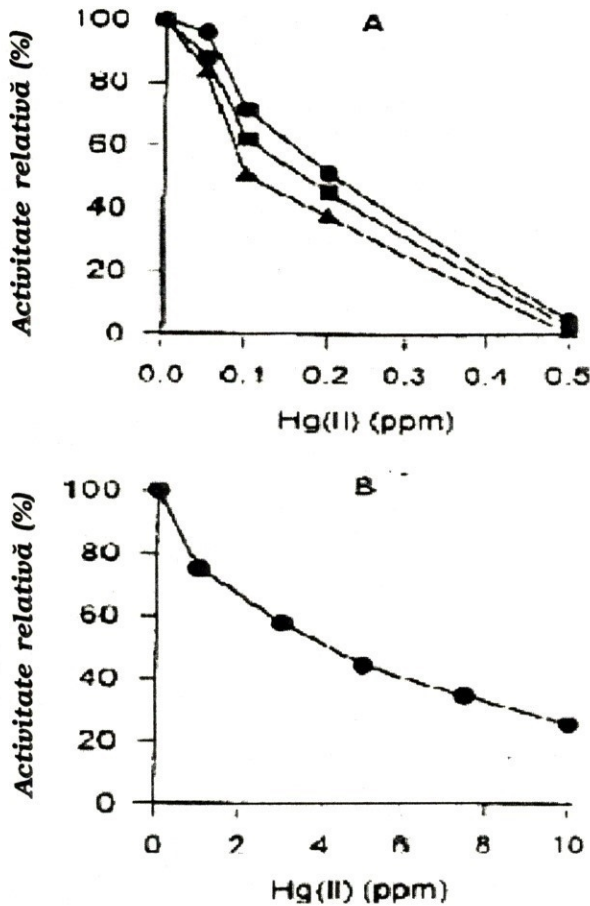


Fig. 1 Curbele de calibrare pentru Hg(II), utilizând glicerol 3-fosfat-oxidaza. A = enzima liberă pentru diferiți timpi de incubare (10, 20 și 30 min); B = enzima imobilizată covalent

Curba de calibrare (0,2-1 ppm) pentru Ni(II) este indicată în figura 2B, limita de detecție fiind de 0,05 ppm. Și în acest caz inhibiția a fost ireversibilă.

Determinarea Se(IV)

Dintre toate enzimele utilizate, Se(IV) a inhibat doar glutation-oxidaza. Se(IV) a fost determinat pe domeniul 1-10 ppm, limita de detecție fiind de 0,05 ppm (tabelul 3)

Glutation-oxidaza imobilizată a prezentat o inhibiție mai mare față de Se(IV). Ionul metallic a fost determinat pe un domeniu de concentrații 0,02-0,4 ppm, cu o limită de detecție de 0,015 ppm (tabelul 3).

Determinarea V(V)

V(V) inhibă alcool-oxidaza și glutation-oxidaza. În acest caz se poate determina V(V) pe un domeniu cuprins între 0-15 ppm cu o bună sensibilitate (tabelul 4.3). Ca și în cazul Se(IV), determinarea V(V) a fost mai sensibilă utilizând enzima imobilizată (0,3-2 ppm) și inhibiția a fost reversibilă.

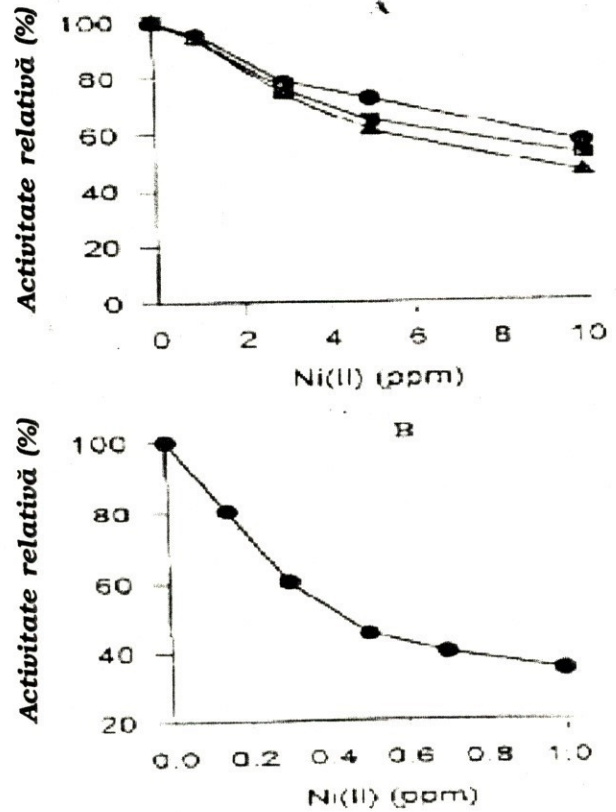


Fig. 2 Curbele de calibrare pentru Ni(II), utilizând sarcosin-oxidaza. A = enzima liberă. B = enzima imobilizată covalent

Construcția și caracterizarea biosenzorilor amperometrici bazați pe oxidaze

În urma studiilor prezentate mai sus, pentru fiecare din enzimele utilizate s-a selectat metoda de imobilizare care a condus la o sensibilitate maximă și un domeniu mare de linearitate.

Ulterior membranele enzimice selectate au fost fixate pe suprafața membranei de acetat de celuloză a electrodului pentru apa oxigenată (H_2O_2), obținându-se astfel diferiți biosenzori care au fost evaluați din punct de vedere al limitei de detecție, reproductibilității, linearității și stabilității răspunsului față de substrat. În tabelul 4 sunt redată rezultatele experimentale obținute.

Studiile efectuate au condus la selectarea biosenzorilor care prezintă caracteristici optime de răspuns, aceștia fiind ulterior testați și evaluați pentru determinarea ionilor metalici care inhibă activitatea enzimelor și conduc deci la o scădere a răspunsului biosenzorului.

Tab. 4 Răspunsul biosenzorilor bazați pe sensorul de H_2O_2 față de substratele specifice ale unor enzime din clasa oxidazelor.

Enzima/ Substratul	Imobilizare	Domeniul de linearitate (M)	Limita de detectie (M)	RSD (%)
Lactat-oxidaza/ Lactat	Immobilon	$1 \times 10^{-6}/4 \times 10^{-4}$	5×10^{-7}	3,4
	BSA-glut.	$5 \times 10^{-6}/8 \times 10^{-4}$	2×10^{-6}	4,3
	Naylon net	$3 \times 10^{-6}/2 \times 10^{-4}$	1×10^{-6}	5,1
Glutation- oxidaza/ Glutation	Immobilon	$2 \times 10^{-7}/5 \times 10^{-4}$	5×10^{-7}	4,6
	BSA-glut.	$1 \times 10^{-5}/1 \times 10^{-3}$	1×10^{-5}	3,7
	Naylon net	$5 \times 10^{-5}/1 \times 10^{-3}$	2×10^{-5}	4,2
Glutamat- oxidaza/ Glutamat	Immobilon	$1 \times 10^{-6}/6 \times 10^{-4}$	5×10^{-7}	4,6
	BSA-glut.	$1 \times 10^{-7}/1,5 \times 10^{-3}$	1×10^{-5}	3,7
	Naylon net	$2 \times 10^{-7}/4 \times 10^{-4}$	2×10^{-5}	4,2
L-aminoacid- oxidaza/ Aminoacizii	Immobilon	$5 \times 10^{-7}/4 \times 10^{-4}$	1×10^{-5}	5,1
	BSA-glut.	$3 \times 10^{-6}/1 \times 10^{-3}$	1×10^{-6}	3,7
	Naylon net	$5 \times 10^{-7}/1 \times 10^{-3}$	5×10^{-6}	4,6
Colin-oxidaza/ Colina	Immobilon	$4 \times 10^{-7}/4 \times 10^{-4}$	1×10^{-5}	6,7
	BSA-glut.	$1 \times 10^{-6}/1,2 \times 10^{-3}$	1×10^{-6}	4,3
	Naylon net	$1 \times 10^{-6}/4 \times 10^{-4}$	5×10^{-7}	6,1
Sarcosin- oxidaza/ Sarcosina	Immobilon	$1 \times 10^{-6}/6 \times 10^{-4}$	5×10^{-7}	3,9
	BSA-glut.	$1 \times 10^{-6}/2 \times 10^{-4}$	4×10^{-7}	7,2
	Naylon net	$5 \times 10^{-7}/5 \times 10^{-5}$	2×10^{-7}	4,5
Alcool-oxidaza/ Alcol	Immobilon	$1 \times 10^{-7}/4 \times 10^{-4}$	5×10^{-6}	5,6
	BSA-glut.	$2 \times 10^{-6}/2 \times 10^{-4}$	1×10^{-6}	4,9
	Naylon net	$1 \times 10^{-6}/1 \times 10^{-4}$	5×10^{-7}	4,6
Glicerol-3-P- oxidaza	Immobilon	$1 \times 10^{-6}/5 \times 10^{-4}$	5×10^{-7}	4,3
	BSA-glut.	$2 \times 10^{-7}/8 \times 10^{-4}$	1×10^{-5}	6,8
	Naylon net	$1 \times 10^{-5}/6 \times 10^{-4}$	5×10^{-6}	4,1

CONCLUZII

Din studiile efectuate s-a constatat că ionii de Hg(II) au fost ionii metalici care au inhibat aproape majoritatea enzimelor din clasa oxidazelor studiate, ei fiind determinați pe un domeniu cuprins între 0,5-10 ppm.

Alți ioni metalici testați au inhibat, într-un mod mai specific, enzimele. Astfel, sistemele de ioni metalici/enzime

care au condus la o inhibiție puternică au fost: Se(IV)/glutation-oxidaza, Ni(II)/sarcosin-oxidaza, V(V)/glutation-oxidaza, Cu(II)/alcool-oxidaza și Cd(II)/D-aminoacid-oxidaza. Toți acești ioni de metal au fost detectați pe domeniul de concentrații 0,1-10 ppm, utilizând enzimele în soluție sau imobilizate covalent. Determinarea ionilor metalici prin intermediul biosenzorilor este rapidă, simplă și ieftină.

BIBLIOGRAFIE

1. Bertocchi P.; Ciranni E.; Compagnone D.; Magearu V.; Paleschi G.; Pirvutoiu S.; Valvo L.; *Flow injection analysis of mercury(II) in pharmaceuticals based on enzyme inhibition and biosensor detection*, J. Pharm. Biomed. Anal. (1999) **20**, 263-269.
2. Ciucu A.; Magearu V.; Luca C.; «Enzyme Electrode for Hydrogen Peroxide», Anal. Lett. (1985) **18**, 299-313.
3. Ciucu A.; «Aplicațiile Analitice ale Biosenzorilor în Controlul Poluării Mediului», Editura Ars Docendi, București, 2001.
4. Compagnone D.; Paleschi G.; Imperiali P.; Varallo G.; *Enzyme inhibition based detection of heavy metals using H_2O_2 electrochemical probes.*, Artif. Nat. Percept., Proc. Ital. Conf. Sens. Microsyst. (1997) 74-78.
5. Compagnone D.; Lupu A.S.; Ciucu A.; Magearu V.; Cremsini C.; Paleschi G.; *Fast Amperometric FIA Procedure for Heavy Metal Detection Using Enzyme Inhibition* Anal. Lett. (2001) **34**, 17-27.
6. Drash G.A.; in *Handbook on Metals in Clinical and Analytical Chemistry*, Seiler H.G.; Siegel A.; Sigel H., Eds., Marcel Dekker New York, 1994, pp. 479-493.