



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar
Fizikai Kémiai és Anyagtudományi Tanszék
Lágy Anyagok Kutatócsoport

Poliaszparaginsav alapú gélek valódi térhálósítási fokának meghatározása

TDK dolgozat

Készítette: **Hegyesi Nóra**

Vegyészmérnöki szak, MSc. II. évfolyam

Témavezető: **Dr. Szilágyi András**
Konzulens: **Gyarmati Benjámín**

egyetemi adjunktus
egyetemi tanársegéd

A dolgozat bemutatását a TÁMOP - 4.2.2.B-10/1--2010-0009 "Új tehetséggondozó programok és kutatások a Műegyetem tudományos műhelyeiben" című program támogatta.

Budapest, 2012

Tartalomjegyzék

Jelölések jegyzéke	3
1 Bevezetés.....	4
2 Irodalmi áttekintés	6
2.1 A gélek.....	6
2.1.1 A kémiai polimer gélek előállítása.....	6
2.1.2 Kémiai polimer gélek jellemző tulajdonságai	7
2.2 Poliaszparaginsav alapú gélek	9
2.2.1 A poliaszparaginsav	9
2.2.2 Poliaszparaginsav alapú hidrogélek előállítása.....	10
2.2.3 Poliaszparaginsav alapú hidrogélek jellemzése	11
2.3 Primer aminocsoportok szelektív analízise.....	11
2.3.1 Ninhidrin.....	12
2.3.2 Orto-ftálaldehid	13
2.3.3 2,4,6-trinitrobenzol-szulfonsav	13
3 Célkitűzések	17
4 Kísérleti rész.....	18
4.1 Felhasznált anyagok és mérési körülmények.....	18
4.1.1 Pufferek, reagens oldatok előállítása.....	18
4.2 A vizsgált rendszerek előállítása	19
4.2.1 Poliszukcinimid előállítása	19
4.2.2 Poliszukcinimid gélek és poliaszparaginsav hidrogélek előállítása.....	19
4.2.2.1 PSI-DAB és PASP-DAB gélek előállítása	19
4.2.2.2 PSI-CA és PASP-CA gélek előállítása.....	20
4.2.2.3 Glutáraldehiddel térhálósított poli(vinil-alkohol) gélek előállítása	21
4.3 Kísérleti módszerek.....	21

4.3.1	Nem elreagált keresztkötők mennyiségi meghatározása PSI-DAB gélekben TNBS-sel.....	21
4.3.2	Félig elreagált keresztkötők mennyiségének meghatározása TNBS-sel.....	23
4.3.2.1	Félig elreagált keresztkötők mennyiségének meghatározása pufferben	23
4.3.2.2	Félig elreagált keresztkötők mennyiségének meghatározása DMSO-ban ..	24
4.3.3	Aminocsoportot nem tartalmazó gél TNBS-sel való reakciójának vizsgálata DMSO-ban	26
4.3.4	Félig elreagált keresztkötők mennyiségének meghatározása PASP-CA gélekben redukció után TNBS-sel – a módszer helyességének vizsgálata.....	26
4.3.4.1	A redukálószerként alkalmazott DTT reakciója TNBS-sel.....	26
4.3.4.2	Félig elreagált keresztkötők arányának meghatározása PASP-CA gélekben redukciót követően.....	26
5	Mérési eredmények és azok kiértékelése	29
5.1	Nem elreagált keresztkötők mennyiségi meghatározása gélekben TNBS-sel.....	29
5.2	Félig elreagált keresztkötők mennyiségének meghatározása TNBS-sel.....	31
5.2.1	Félig elreagált keresztkötők mennyiségének meghatározása pufferben	31
5.2.2	Félig elreagált keresztkötők mennyiségének meghatározása DMSO-ban	32
5.3	Aminocsoportot nem tartalmazó gél TNBS-sel való reakciójának vizsgálata DMSO-ban	37
5.4	Félig elreagált keresztkötők mennyiségének meghatározása PASP-CA gélekben redukció után TNBS-sel – a módszer helyességének vizsgálata.....	37
5.4.1.1	A redukálószerként alkalmazott DTT reakciója TNBS-sel.....	37
5.4.1.2	Félig elreagált keresztkötők arányának meghatározása PASP-CA gélekben redukciót követően.....	38
5.4.1.3	A két különböző mérési módszer összehasonlítása	39
6	Összefoglalás.....	40
7	Irodalomjegyzék	42

Jelölések jegyzéke

A	abszorbancia
amin-TNP	TNBS primer aminnal való reakcióját követően keletkezett termék
CYS	ciszteamin
CA	cisztamin
DAB	1,4-diaminobután
DBA	dibutil-amin
DTT	ditiotreitol
GDA	glutáraldehid
q_m	tömeg szerinti duzzadások
PASP	poliaszparaginsav
PASP-CA	cisztaminnal térhálósított poliaszparaginsav gél
PSI	poliszukcinimid
PSI-CA	cisztaminnal térhálósított poliszukcinimid gél
PVA	poli(vinil-alkohol)
PVA-GDA	glutáraldehiddel térhálósított poli(vinil-alkohol) gél
TNBS	2,4,6-trinitro-benzol-szulfonsav
ε	moláris abszorpciós koefficiens
Ψ	térhálósítási fok

1 Bevezetés

A modern anyagtudomány egyik kiemelt fontosságú területe olyan anyagi rendszerek - úgynevezett „intelligens” polimer gélek - előállítása és vizsgálata, melyek a környezeti paraméterek (pl.: pH, hőmérséklet) megváltozására előre programozott módon változtatják fizikai és kémiai tulajdonságaikat. A polimer gélek tulajdonságait a polimer molekulák minősége, molekulatömege, valamint a polimer molekulák között kialakuló fizikai és kémiai kölcsönhatások határozzák meg. A fizikai kölcsönhatások száma statisztikusan állandó, de a polimer molekulák folyamatos mozgásának köszönhetően helyük állandóan változik. Ezzel szemben a térhálóban található kovalens kötéssel kialakított kémiai térhálópontok helye állandó. Emiatt, amikor egy kémiai térhálót szeretnénk jellemezni, elengedhetetlen ismerni az egységnyi tömegű száraz gélre eső kémiai térhálópontok számát.

A térhálópontok számának meghatározására több lehetőség kínálkozik. Gélek rugalmassági modulusainak meghatározásával, a neo-Hooke törvényt alkalmazva számítható a hálópontsűrűség. Ez az érték azonban a lánchurkolódások miatt kialakuló fizikai hálópontok miatt mindig nagyobb, mint a kovalens kötések által létrehozott kémiai térhálópontok száma. A Flory-Huggins modell felhasználásával szintén meghatározható egy térhálópont koncentráció, de alkalmazása számos hibalehetőséggel rendelkezik. Ilyenek például, hogy olyan paramétert tartalmaz (Flory-Huggins kölcsönhatási paraméter), mely erősen függ a hőmérséklettől, vagy a nyomástól, illetve a specifikus kölcsönhatások figyelembe vétele nehézségekbe ütközik. Harmadik út lehet egy olyan analitikai módszer kidolgozása, mely segítségével meghatározható azon térhálósító molekulák aránya, melyek a gél előállítása során valóban részt vesznek - kovalens kötések révén - a térháló kialakításában [1, 2].

Munkámat a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Fizikai Kémia és Anyagtudományi Tanszékén, a Lágú Anyagok Kutatócsoportban végeztem, ahol kiemelt kutatási téma a különböző diaminokkal, utólagos térhálósítással előállított poliaszparaginsav gélek előállítása és jellemzése. Munkám célja egy olyan analitikai módszer kidolgozása volt, mellyel meghatározható az előállított gélekben a ténylegesen keresztkötő térhálósító molekulák aránya, valamint a kémiai térhálópontok koncentrációja. A térhálósítószerként használt diaminok kvantitatív analízisére a primer aminocsoportok meghatározására elterjedt 2,4,6-trinitrobenzol-szulfonsavat (TNBS) használtam [3].

Munkám két fő részre tagolható. Egyrészt meghatároztam az egyáltalán nem reagáló keresztkötő molekulák számát. Másrészt – ez képezte munkám gerincét - egy új módszert dolgoztam ki a csak egyik funkciós csoportjával elreagáló térhálósító molekulák mennyiségi

meghatározásához. E két adat ismeretében számítható diaminokkal térhálósított poliaszparaginsav gélek valódi térhálósítási foka.

2 Irodalmi áttekintés

2.1 A gélek

A géleket a koherens kolloid rendszerek közé soroljuk [4, 5]. Maga a „gél” kifejezés nem egy anyagot, hanem egy kinetikailag stabilis állapotot jelöl, ahol a rendszert alkotó részecskék között a kohéziós kölcsönhatások energiája nagyobb, mint a részecskék Brown mozgásához tartozó energia. Ezek a kohéziós kölcsönhatások egy 3 dimenziós, a szilárd anyagokhoz hasonló, önálló alakkal rendelkező anyagi halmazt hoznak létre.

A gélek között jelentős szerepet töltenek be a liogélek, ahol a kohéziós kölcsönhatásokkal összetartott vázat valamilyen oldószer tölti ki. A liogélekre jellemző, hogy kisebb mechanikai hatásokkal szemben ellenállóak, illetve rugalmasan és reverzibilisen deformálódnak, ugyanakkor számos tulajdonságaikban (pl.: gőztenzió) oldatokhoz hasonlítanak. Csoportosításuk történhet a komponensek anyagi minősége alapján (polimer gél, agyagásvány gél), vagy a komponensek között kialakuló kölcsönhatások erőssége, reverzibilitása szerint (fizikai, illetve kémiai gélek).

Fizikai géleknek nevezzük azokat a térhálókat, melyeket diszperziós, orientációs, illetve ionos kölcsönhatások, valamint H-hidak tartanak egyben. Ezek a kapcsolatok a külső környezeti paraméterek (hőmérséklet, pH) adott irányú megváltozásával felbomlanak, így a gél szollá alakul, feloldódik. A kémiai gélek esetében a fizikai gélekre jellemző kölcsönhatások mellett kovalens kötések is részt vesznek a térháló összetartásában. Ezek a kémiai kötések meggátolják, hogy pusztán a fizikai paraméterek megváltozásával a gél szollá alakuljon.

A továbbiakban „gél” alatt minden esetben a munkám középpontjában álló nagy folyadéktartalmú kémiai polimer géleket értem.

2.1.1 A kémiai polimer gélek előállítása

Kémiai polimer gélek esetén a polimer láncokat valamilyen más, általában kis móltömegű molekulák kapcsolják össze, így alakítva ki a kémiai térhálót. Ezeket a „kapocsként” szolgáló molekulákat térhálósítószernek nevezik. Az előállítás során a polimer ismétlődő egységeinek és a térhálósítószer molekuláinak molarányát térhálósítási foknak (Ψ) nevezzük.

$$\Psi = \frac{n_{\text{polimer ismétlődő egység}}}{n_{\text{térhálósító molekula}}}$$

Térhálósítószernek olyan molekulák alkalmasak, melyek legalább két reaktív funkció csoportot tartalmaznak. Amennyiben egy bifunkciós térhálósító molekula mindkét funkció csoportjával polimerhez kapcsolódik – ezzel összekötve két polimer láncot – két kémiai térhálópontot hoz létre.

A kémiai gélek előállítása kétféleképpen történhet. Az egyik mód az egylépcsős vagy direkt eljárás. Ekkor a polimer monomerjeit, valamint a keresztkötő molekulákat tartalmazó oldatban egy időben történik a polimerizáció valamint a kémiai térhálópontok kialakulása. A másik lehetőség az utólagos térhálósítás. Ennél az előállítási módnál a polimer molekulákat utólag kötjük össze térhálósító molekulák segítségével [6-8].

2.1.2 Kémiai polimer gélek jellemző tulajdonságai

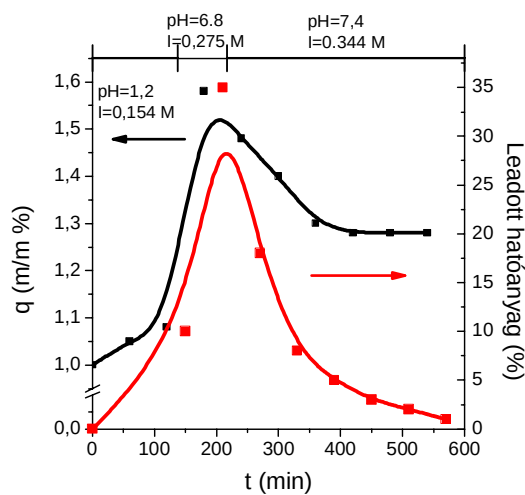
A kémiai polimer gélek népszerűsége annak köszönhető, hogy olyan anyagi rendszerek hozhatóak létre belőlük, melyek a külső környezet megváltozására (pl.: hőmérséklet, pH) valamilyen előre programozott válaszjelet adnak. A legáltalánosabb válaszjel a térfogatuk megváltozása. Amennyiben a térfogatváltozás ugrásszerűen történik, gélkollapszusról beszélünk [9].

A gél térfogatváltozását a gél duzzadásfokával jellemezhetjük. Megkülönböztetünk tömeg (q_m), illetve térfogat szerinti (q_v) duzzadásfokot:

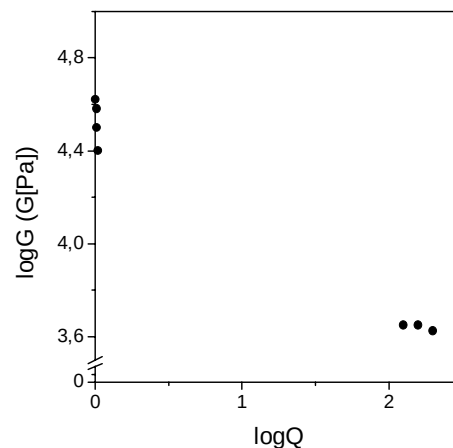
$$q_m = \frac{m_{gél}}{m_{száraz\ gél}} \quad q_v = \frac{V_{gél}}{V_{száraz\ gél}},$$

ahol $m_{gél}$ és $V_{gél}$ a duzzadt gél tömege, illetve térfogata, míg $m_{száraz\ gél}$ és $V_{száraz\ gél}$ a duzzasztószer nélküli kiszáritott gél tömege és térfogata.

Amikor a gél térfogatváltozással reagál a környezetében lejátszódó folyamatokra, jelentős mértékben megváltoznak egyéb tulajdonságai is. Egy duzzadt gélben sokkal kisebb a polimer koncentrációja (általában < 10 %), így sokkal nagyobb lehetőség nyílik kismolekulák diffúziójára gélen belül, vagy azon keresztül. Ezt szemlélteti a 2.1. ábra, ami bemutatja, hogyan változik a kioldódott hatóanyag mennyisége pH érzékeny poliakrilsav alapú hidrogélből különböző pH értékeken. Amikor a gél duzzadásfoka nagyobb, több hatóanyag oldódik ki a gélből, mint kisebb duzzadásfok esetén [10]. A gél térfogatának megváltozását a gél mechanikai tulajdonságainak megváltozása is követi. Erre mutat rá a 2.1. ábra, ahol egy poliakrilamid gél rugalmassági modulusának változását láthatjuk a duzzadásfok függvényében. Jól látszik, hogy nagyobb duzzadásfok esetén jóval kisebb rugalmassági modulus értékek mérhetőek [11].



a.



b.

2.1. ábra Kioldódott hatóanyag mennyisége poliakrilsav gélből különböző duzzadásfokok esetén (a.) [10], illetve poliakrilamid alapú anionos polielektrolit gél rugalmassági modulusa a duzzadásfok függvényében, jó oldószerben (b.)[11]

A gél térfogatváltozásának hajtóereje a szabadentalpia minimumra való törekvés. Amikor egy szilárd gél oldószerbe teszünk, két hatás érvényesül egyszerre. Egyrészt az oldószer molekulák a kémiai potenciálkülönbség hatására behatolnak a térhálóba, melyet szolvatálni igyekeznek. Ez a folyamat a szabadentalpia csökkenésével jár együtt: a molekulák keverednek, az entrópia növekszik. Ezzel párhuzamosan a gél térfogata növekszik, a polimer térháló deformálódik, ami a szabadentalpia növekedését okozza. Ezek alapján megkülönböztethetünk két szabadentalpia tagot: az elegyedési szabadentalpiát (G_{mix}), valamint a térháló deformációjához tartozó szabadentalpiát (G_{def}). A két tag egymástól független, összegük adja a gél szabadentalpiáját, melynek minimuma van a gél egyensúlyi duzzadásfokánál. Az egyensúlyi duzzadásfok értékét tehát az elegyedéshez, illetve a deformációhoz tartozó szabadentalpiát meghatározó tényezők adják meg. Ilyenek az oldószer anyagi minősége: polimer-polimer és polimer-oldószer kölcsönhatás, a térhálópontok száma, valamint a különböző állapotváltozók. Ezek között teremt kapcsolatot a Flory-Huggins egyenlet:

$$\ln(1 - \Phi_2) + \Phi_2 + \chi\Phi_2^2 + v_1 \left(\frac{v_e}{V_0} \right) \left(\Phi_2^{1/3} - \frac{\Phi_2}{2} \right) = 0,$$

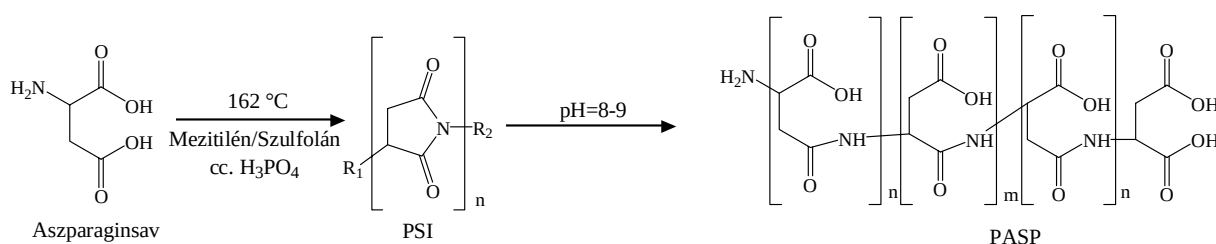
ahol Φ_2 a polimer térfogati törte az egyensúlyi duzzadásfok esetén, χ a Flory-Huggins féle kölcsönhatási paraméter, v_1 az oldószer moláris térfogata, v_e a polimer láncok száma a térhálóban, V_0 a kiszáritott gél térfogata [12].

2.2 Poliaszparaginsav alapú gélek

A természetes polimerekből (pl.: zselatin) képződött hidrogélek szerkezete és összetétele általában nem reprodukálható, valamint különböző kórokozókat tartalmazhatnak. Előnyeik, hogy biokompatibilisek, biológiai úton lebonthatók, és a sejtaktivitást is jól megfigyelhetően serkentik. A szintetikus hidrogéleknek (pl.: poliakrilsav gélek) nem természetes velejáróik ezek a bioaktív tulajdonságok, azonban jól definiált szerkezetük van, mely módosításával szabályozhatóak a tulajdonságaik: pH- és hőmérséklet érzékenység. A szintetikus úton előállított poliaszparaginsav (PASP) előnye, hogy biokompatibilis polipeptid, ugyanakkor rendelkezik a szintetikus úton előállított polimerek jól reprodukálható szerkezetével [13, 14].

2.2.1 A poliaszparaginsav

A poliaszparaginsav (PASP) kizárólag aszparaginsav egységekből felépülő homopolimer (2.2. ábra). Mivel az aminosav egységeket peptid kötések kapcsolják össze, így a polimer teljes mértékben biodegradálható. Annak köszönhetően, hogy a polimer részegységei aminosav alapúak, a biológiai lebontás során a szervezetbe nem kerülnek toxikus bomlástermékek [15].

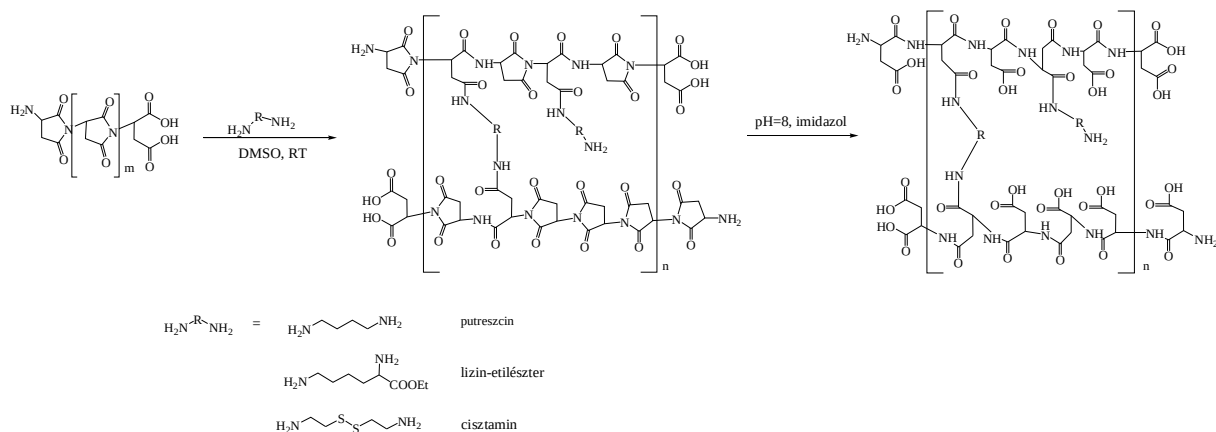


2.2. ábra Példa poliaszparaginsav előállítására

A 2.2. ábra a legelterjedtebb, polikondenzációs előállítási módját mutatja be a poliaszparaginsavnak [13-16]. További előállítási lehetőség az aszparaginsav termikus polimerizációja, illetve maleinsavanhidrid és ammónia reakciójával is poliaszparaginsavhoz juthatunk. A különböző előállítási módokkal különböző móltömegű és móltömeg-eloszlású polimerek állíthatók elő, melyeknél a lineáris polimer láncban eltérő mértékben irregularitások is megfigyelhetők. A polimer lánc szabályossága, valamint a móltömege meghatározó a polimer biológiai úton történő lebonthatóságára, valamint a polimerekből előállított gélek tulajdonságaira nézve [13, 17].

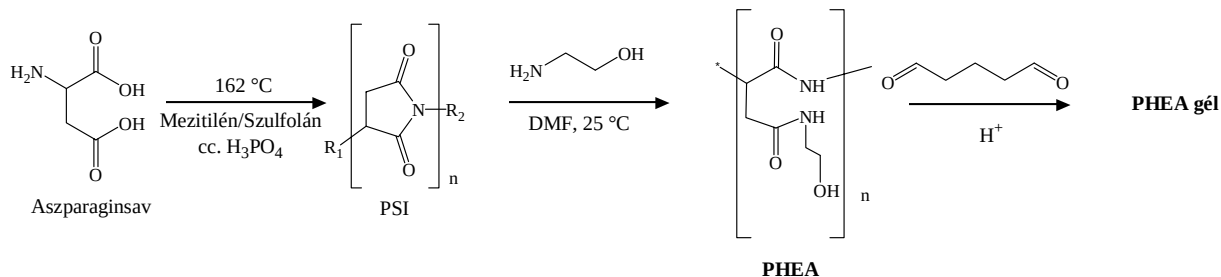
2.2.2 Poliaszparaginsav alapú hidrogélek előállítása

Poliaszparaginsav alapú hidrogélek előállíthatóak PASP vizes oldatából γ -sugárzással, azonban ez a módszer csak nagy móltömegű polimer esetében működik, és megvalósítása is nehézkes [18]. A leggyakoribb eljárás PASP alapú gélek előállítására a poliszukcinimid (PSI) alapú gélek enyhén lúgos közegben történő elhidrolizálása. A poliszukcinimid DMSO-ban valamint DMF-ben jól oldódik, és könnyen reakcióba vihető nukleofil ágensekkel a szukcinimid gyűrűk felnyílása közben, így legalább két nukleofil funkciós csoporttal rendelkező molekulákkal térhálósítható. A poliszukcinimid aminocsoporttal katalizátor nélkül, szobahőmérsékleten nukleofil addíciós reakcióba vihető, ennek köszönhető, hogy poliaszparaginsav alapú gélek legelterjedtebb térhálósítószerai a diaminok. Ezek közül is leggyakoribbak a természetben is megtalálható putreszcín (1,4-diaminobután), lizin, vagy a cisztamin (2.3. ábra) [16, 19].



2.3. ábra Poliaszparaginsav gélek előállítása poliszukcinimidből diaminokkal térhálósítva

Más, nem aminocsoportot, mint nukleofil tartalmazó keresztkötő molekula leírására az irodalomban nem találtam példát. A PSI-t más úton jellemzően úgy térhálósítják, hogy először a polimert valamilyen amin vegyülettel módosítják, majd a módosított polimer láncokat kapcsolják össze. Erre példa a poli(hidroxietyl aszpartamid) (PHEA) térhálósítása, ahol a 2-aminoetanollal módosított PSI molekulákat γ -besugárzással, vagy savas katalízis segítségével glutáraldehiddel térhálósítják (2.4. ábra) [14, 20, 21].



2.4. ábra PHEA gél előállítása [21]

2.2.3 Poliaszparaginsav alapú hidrogélek jellemzése

A poliaszparaginsav alapú gélek két legjellemzőbb tulajdonsága a nagyon jó vízmegkötő képesség, valamint a nagymértékű pH-érzékenység, melyek legszembetűnőbb megjelenési formája a gél térfogatának megváltozása. Ennek köszönhető, hogy az egyik legelterjedtebb módszer a gélek jellemzésére az egyensúlyi duzzadásfok, valamint a duzzadási kinetika vizsgálata. Ezt PASP gélek esetén a pH, a különböző komplexképző fémek (pl.: réz, kalcium) jelenléte, valamint a gél térhálósítási foka határozza meg. Míg előző két paraméter a gél környezetét jellemző érték, addig utóbbi – a térhálósítási fok – a térhálót definiálja [16, 22, 23].

A pontos térhálósítási fok, tehát a kémiai térháló összetételének meghatározásához számszerűsíteni kell azon térhálósító molekulák arányát, melyek a polimerrel egyáltalán nem reagálnak el, illetve azokét, melyek egyik funkciós csoportjukkal bekötődnek a térhálóba, de másik funkciós csoportjuk szabadon marad, így nem hoznak létre kémiai keresztkötést. A gél szintézise során a polimerizációs fok eltérő lehet, a külső körülmények, főleg a hőmérséklet, nem feltétlenül egyezik meg minden preparáció esetén és a reakcióidő is különbözhet, ezért a vizsgált gélek egységes jellemzéséhez alapvetően szükséges a valódi térhálósítási fok meghatározása.

Diaminokkal keresztkötött hidrogélek esetén olyan analitikai módszerek alkalmazása szükséges, melyek primer aminocsoportok szelektív és kvantitatív meghatározását teszik lehetővé.

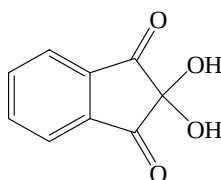
2.3 Primer aminocsoportok szelektív analízise

Az aminocsoportok meghatározásának fontossága a protein, illetve fehérje analitika jelentőségének megnövekedésével vált egyértelművé. Az élő szervezetet felépítő fehérjéket aminosav egységek alkotják. A biogén aminok az élelmiszerek természetes alkotói melyek túlzott bevitele allergiás reakciókat válthat ki. Az iparban (pl.: gyógyszeripar, kozmetikai ipar, festékanyag és növényvédőszer gyártás) a gyártási folyamatok során különböző aromás, alifás

mono-, illetve poliaminok keletkeznek közti-, illetve melléktermékként, melyek a környezetbe kerülve káros hatást fejtenek ki. Ezen vegyületek analitikai vizsgálata tehát nem kikerülhető. Analízisük legelterjedtebben kromatográfiás úton történik, ahol az elválasztást követően a molekulákat származékképzés segítségével detektálják. A legfontosabb szempontok, hogy a származékképzési reakció legyen gyors és kvantitatív, a keletkezett termék és a reagens legyen stabil [24-26].

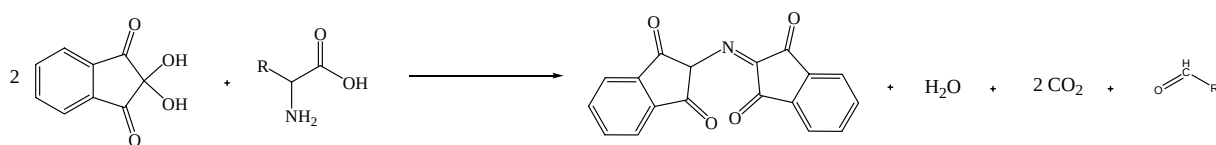
2.3.1 Ninhidrin

Miután Siegfried Ruheman 1910-ben felfedezte a ninhidrint (2.5. ábra), hamar elterjedt az analitikában aminos csoportot tartalmazó vegyületek meghatározására. Alkalmazása elsősorban a bűnügyi helyszíneléseknél, a porózus felületeken hagyott ujjlenyomatok felderítésére, valamint a szerves kémiában peptidszintézisek vékonyréteg-kromatográfiával való követésére terjedt el [26].



2.5. ábra A ninhidrin szerkezeti képlete

A ninhidrin az α -aminosavakból képződő ammóniával bíbor színű festékké kondenzálódik (kivéve a prolin és az oxoprolin esetén, ahol sárga színű reakciótermékhez jutunk). A ninhidrin peptidek és fehérjék esetén a terminális, valamint a lizin aminos csoportjával lép reakcióba, ez teszi alkalmassá az ujjlenyomatok megjelenítésére (2.6. ábra) [27].



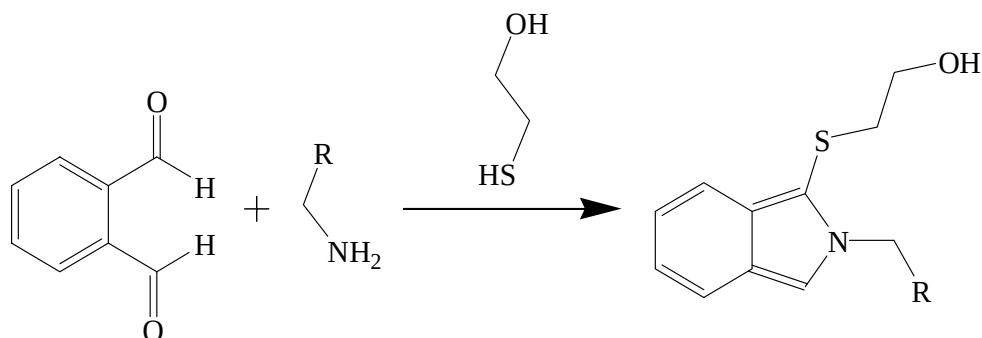
2.6. ábra Ninhidrin reakciója aminosavakkal [28]

Mennyiségi analitikai célú alkalmazása nem gyakori, mert a kimutatás érzékenységét rengeteg paraméter (pH, hőmérséklet, páratartalom) kismértékű megváltozása, valamint az oxigén jelenléte is nagyban befolyásolja [29, 30].

2.3.2 Orto-ftálaldehid

Az orto-ftálaldehid (OPA) primer aminok kimutatására használt reagens. Az OPA tiol vegyület jelenlétében primer aminokkal izoindol vegyületet képez (2.7. ábra). Az így kapott termék mind kromofór, mind fluoreszcens tulajdonsággal bír, így UV-VIS vagy fluoreszcencia spektroszkópiával is mérhető [31, 32].

Alacsony kimutatási határának köszönhetően, elsősorban kromatográfiában, oszlop utáni származékképzőként elterjedt és gyakori a használata. A 2.7. ábrán látható izoindol származék azonban nem stabil, hanem tovább képes reagálni egy másik OPA molekulával, így egy másodlagos terméket eredményezve. Munkám során azonban stabilabb reagensre volt szükségem a várhatóan hosszú reakcióidejű géles mérésekhez [33].

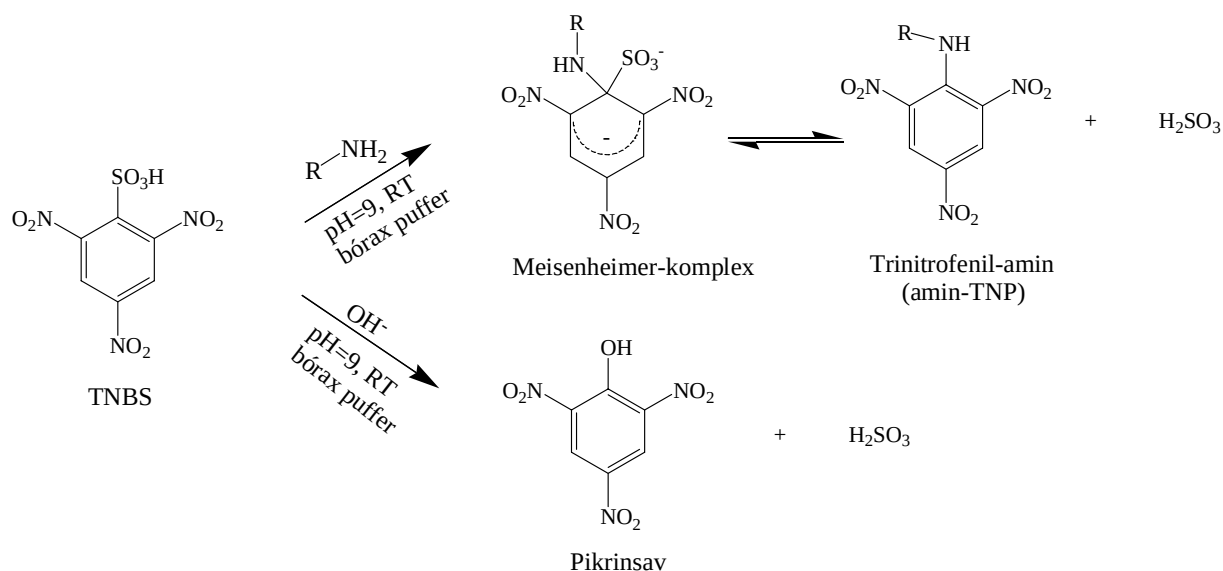


2.7. ábra Orto-ftálaldehid (OPA) reakciója primer aminokkal tiol vegyület jelenlétében [31]

2.3.3 2,4,6-trinitrobenzol-szulfonsav

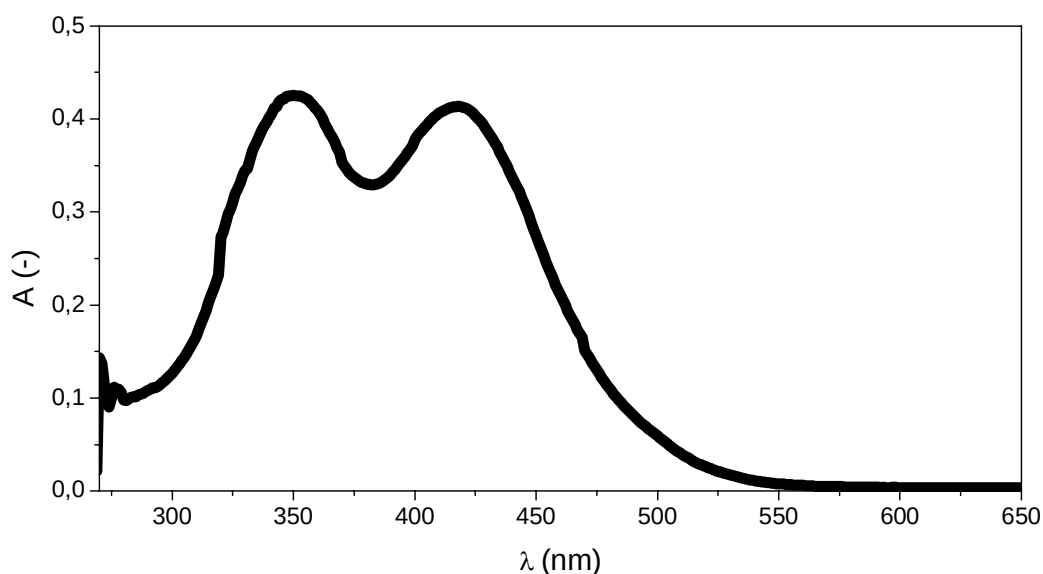
A 2,4,6,-trinitrobenzol-szulfonsavat (TNBS) először Satake alkalmazta primer aminok, elsősorban aminosavak és peptidek meghatározására enyhén lúgos közegben. A TNBS előnye, hogy szelektív, a primer aminocsoporton kívül más nukleofilekkel való reakciója az irodalom szerint nem jellemző [3, 34, 35].

A TNBS primer aminokkal enyhén lúgos közegben SN2Ar reakcióban reagál trinitrofenil-amin (amin-TNP), illetve szulfid ionok keletkezése mellett. Ezzel a reakcióval párhuzamosan a lúgos közegben a TNBS sokkal lassabb reakcióban pikrinsavvá hidrolizál el (2.8. ábra) [3].



2.8. ábra TNBS reakciói lúgos közegben

A reakció legmeghatározóbb paramétere a pH. Túl magas pH esetén ($pH > 10$) nagyobb teret nyer magának a mellékreakció, azaz a TNBS hidrolízise. Az alacsonyabb pH hátránya ($pH < 8,5$), hogy az aminos csoportok protonálódhatnak, mellyel elvesztik nukleofilitásukat, s így nem megy végbe a reakció [3, 30, 35].



2.9. ábra TNBS és glicin reakciójában kapott reakciótermék spektruma (glicin-TNP)

A pH mellett a hőmérséklet, a reakcióidő, valamint a reakció során is keletkező szulfid ionok koncentrációjának aminos kimutatásra gyakorolt hatását vizsgálták. Első alkalommal, 1960-ban Satake az aminosavakat, illetve peptideket a TNBS-sel 2 órán át $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on sötétben reagáltatta, majd az oldatot sósavval megsavanyította, azután vette fel a spektrumát. A TNBS aminosokkal képzett adduktjának spektrumát felvéve 2 csúcsmaximum figyelhető meg: az egyik

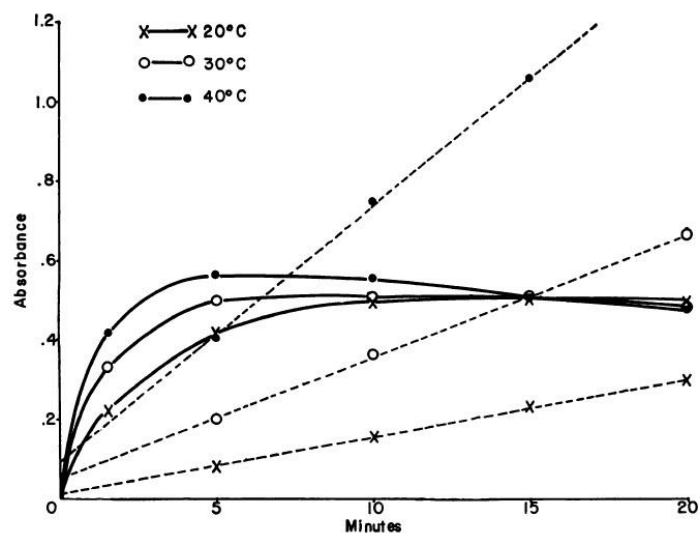
340-350 nm-nél, a másik 420 nm-nél (2.9. ábra). Satake ekkor a 340 nm-en mérhető abszorbanciát használta fel a kiértékelésekhez. Ezzel szemben az 1966-ban publikált cikkében már a reakció időt lecsökkentette 25 percre, míg a hőmérsékletet 60 °C-ra emelte, végül a méréseket átsavanyítás nélkül 420 nm-en végezte [31, 36-41].

Bizonyított, hogy a kisebb hullámhossz (340-350 nm) a trinitrofenil-aminhoz (amin-TNP) rendelhető, míg a 420 nm-es az átmeneti Meisenheimer komplexhez, ugyanis ha a reakcióelegyhez szulfit ionokat adunk, az egyensúlyt a fő termék irányából (amin-TNP) a Meisenheimer komplex felé toljuk el. A szulfit ionok adagolásának hatására a spektrum 350 nm körüli csúcsintenzitása csökken, míg a 420 nm-es csúcsé növekszik, ami igazolja a 420 nm-es csúcs Meisenheimer komplexhez rendelhetőségét. Szulfit ionok hozzáadásával növelhető a Meisenheimer komplexhez tartozó érzékenység is. A szulfit ionok nagyobb koncentrációja azonban a spektrumot torzítja, mindkét eredeti csúcs eltűnik és egy új csúcs jelenik meg 406 nm-nél, mely NMR mérésekkel bizonyítottan egy biszulfit komplexhez tartozik. Külön szulfit ionok adagolása a rendszerbe - habár a 420 nm-es elnyeléshez tartozó érzékenységet egy bizonyos szintig növeli – mégsem ajánlatos, mert két okból is elősegíti a TNBS pikrinsavvá alakulását. Egyrészt növekszik az ionerősség, ami a hidrolízisnek kedvez, másrészt a pH-t is növeli, ami szintén a pikrinsav képződését gyorsítja [26, 35, 42, 43].

A 350 nm-es csúcs amin-TNP-hez való tartozását azzal bizonyították, hogy savanyítás hatására a 420 nm-es csúcs jelentősen csökken, valamint ólom-klorid hozzáadásával ugyanezt érhetjük el. E két módszerrel a szulfit ionokat távolítjuk el a rendszerből, ami a Meisenheimer komplex átalakulásához vezet [26].

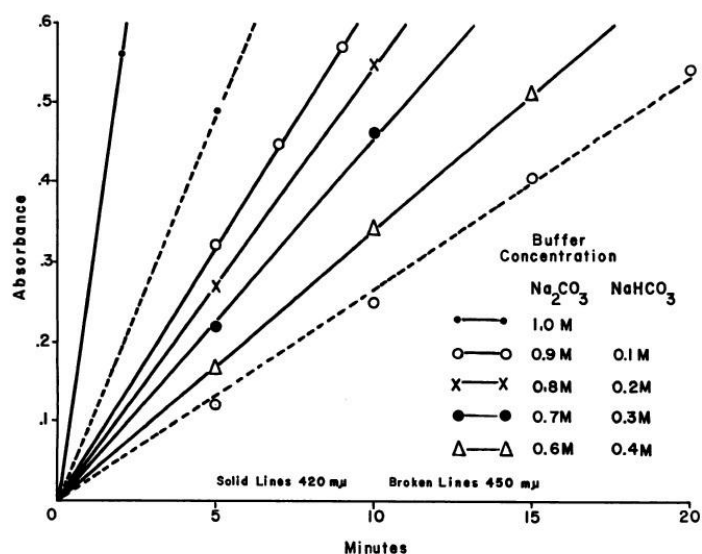
A fő reakció mellett fontos vizsgálni a reagens hidrolízisét is, mert pikrinsavnak azonos hullámhossz tartományban (~350 nm) van elnyelése, mint az amin-TNP-nek [3]. A reakciókörülményeket úgy kell megválasztani, hogy a hidrolízist minél jobban visszaszorítsuk. A két párhuzamos reakció sebességét a pH az ionkoncentráción keresztül is befolyásolja, valamint a két reakció sebességi tényezője az Arrhenius-egyenletnek megfelelően függ a hőmérséklettől. A szokásos reakcióidő 30 perc, a méréseket általában szobahőmérsékleteken végzik, legelterjedtebben 9-es, vagy 9,3-as pH-jú pufferben [3, 26, 30, 31, 37].

A TNBS kétféle reakciójának kinetikáját hasonlítja össze a 2.10. ábra a hőmérséklet függvényében. Látható, hogy az aminosavakkal való reakció sebességét a hőmérséklet kevésbé befolyásolja, ugyanakkor a hidrolízis sebességét nagyban növeli annak emelése [38]. Ebből következően a reakciót célszerű szobahőmérséklet körül végezni.



2.10. ábra TNBS és glicin reakciója során (folytonos vonal) és a TNBS hidrolízise során (szaggatott vonal) az abszorbanca változása különböző hőmérsékleteken [40]

A TNBS viselkedésének pH függését a 2.11. ábra mutatja. Látható, ahogyan a karbonát puffer összetétele változik, és a pH lúgos irányba tolódik el, abszorbanca növekedés figyelhető meg, ami a pikrinsav keletkezéséhez köthető [40].



2.11. ábra Pufferben oldott TNBS abszorbanciájának változása az idővel különböző puffer összetételek mellett [40]

A reakciókörülmények megválasztásánál szem előtt kell tehát tartani, hogy a pikrinsav keletkezése érinti az amin-TNP meghatározását a kiértékelések során. Összességében elmondható, hogy az irodalmi adatok alapján célszerű megközelítőleg pH = 9-es puffer alkalmazása, míg a hőmérsékletet érdemes 25 °C-on, vagy az alatt tartani, valamint a mérési időt minél jobban csökkenteni.

3 Célkitűzések

Munkám célja egy olyan analitikai módszer kidolgozása volt, mely segítségével diaminokkal térhálósított polimer gélek valódi térhálósítási foka meghatározható. Ehhez meg kellett határoznom azon térhálósító molekulák számát, melyek a gélesítés során nem reagálnak a polimerrel, illetve, melyek csak egyik funkciós csoportjukkal kötődnek polimerhez, így a térháló kialakításában nem vesznek részt.

Azon térhálósító molekulák mennyiségét, melyek egyáltalán nem reagálnak a polimer molekulákkal, a gélesedés után a gélből kimosva kívántam meghatározni. A kimosás után ezek a molekulák származékképzési reakciót követően UV-VIS spektroszkópia segítségével mérhetőek. Az általam választott származékképző analitikai reagens a trinitrobenzol-szulfonsav volt (TNBS).

Azon térhálósító molekulák mennyiségét, melyek csak egyik funkciós csoportjukkal reagálva nem vesznek részt a térháló kialakításában, szintén trinitrobenzol-szulfonsavval, visszaméréssel terveztem meghatározni. Hosszabb idejű reakciók (pl.: gélek, heterogén fázis) esetén azonban a TNBS bomlási reakciója lehetetlenné teszi a mennyiségi meghatározást az irodalomban leírt módszerrel. Ebből adódóan célom volt a TNBS-sel való mérésekhez azon reakciókörülmények meghatározása, melyek esetén a TNBS hidrolízisét gyakorlatilag teljesen vissza tudom szorítani, így a hidrolízise a kvantitatív eljárást hosszú meghatározási idők ellenére sem befolyásolja.

4 Kísérleti rész

4.1 Felhasznált anyagok és mérési körülmények

A következőkben felsorolt vegyszereket használtam munkám során (tisztaság, gyártó): dimetil-szulfoxid (DMSO) (99 %, Merck); L-aszparaginsav (99%, Merck); dibutil-amin (DBA) (99%, Merck), 1,4-diaminobután (DAB) (99 %, Aldrich); ciszteamin-hidroklorid (97%, Merck); KCl (99,5%, Merck); $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ -t (a.r., Merck), NaBrO_3 (99%, Merck) ditiotritol (DTT) (for biochem., Merck); N,N-dimetilformamid (DMF) (pure, Lach Ner); Milli-Q desztillált víz ($\Omega > 18.2 \mu\text{m}$, Millipore); imidazol (puriss p.a., Sigma Aldrich); 2,4,6-trinitrobenzol-szulfonsav (TNBS) (analitikai reagens; 1 M-os vizes oldata, Sigma-Aldrich); cisztamin-dihidroklorid ($> 98 \%$, Merck); glutár-aldehid (GDA) (25 % vizes oldat, Merck), poli(vinil-alkohol) (PVA) (60 kDa, Merck).

A reagenseket és oldószereket további tisztítás nélkül használtam.

A vízben hígított TNBS reagens oldatokat hetente frissen készítettem és 4°C -on, hűtőben tároltam. A DMSO-val hígított TNBS reagens oldatokat 25°C -on tároltam.

Az UV-VIS méréseket Analytik Jena SPECORD 2000 spektrofotométerrel végeztem (10 nm/s pásztázási sebesség, felbontás: $\Delta\lambda=1 \text{ nm}$).

A pufferek pH-ját Radelkis OP-271/1 kombinált üvegelektrodos pH-mérővel ellenőriztem, melyet 3 ponton kalibráltam a mérések előtt.

A munka során minden mérést és preparatív munkát szobahőmérsékleten, légköri nyomáson végeztem.

4.1.1 Pufferek, reagens oldatok előállítása

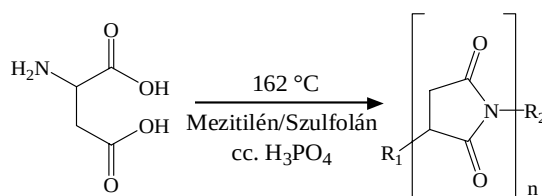
- Bórax puffer (0,1 M, pH=9,3): 38,14 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ -t 1 l-es mérőlombikban desztillált vízben feloldottam.
- Imidazol puffer (I=0,25 M, pH=8): 10,385 g imidazolt, 17,840 g KCl-ot desztillált vízben feloldva 10,73 ml 1 M-os sósav hozzáadásával mérőlombikban desztillált vízzel 1 l-re egészítettem ki
- TNBS vízben (0,030 M): 150 μl 1 M-os TNBS oldatot 5 ml-es mérőlombikban desztillált vízzel hígítottam.
- TNBS DMSO-ban (0,004 M): 20 μl 1 M-os TNBS oldatot 5 ml-es mérőlombikban DMSO-val hígítottam.

- TNBS DMSO-ban (0,030 M): 150 μ l 1 M-os TNBS oldatot 5 ml-es mérőlombikban DMSO-val hígítottam.

4.2 A vizsgált rendszerek előállítása

4.2.1 Poliszukcinimid előállítása

A polimer molekulákat az aszparaginsav foszforsav katalizálta termikus polikondenzációjával állítjuk elő nitrogén atmoszférában, mezitilén/szulfolán oldószerkeletben, 162 °C-on. Az oldatot 7 órán át refluxáltatva kevertetjük, majd a polimert metanollal csapjuk ki, desztillált vízzel mossuk, végül 25 °C-on vákuumban kiszárítjuk (4.1. ábra).



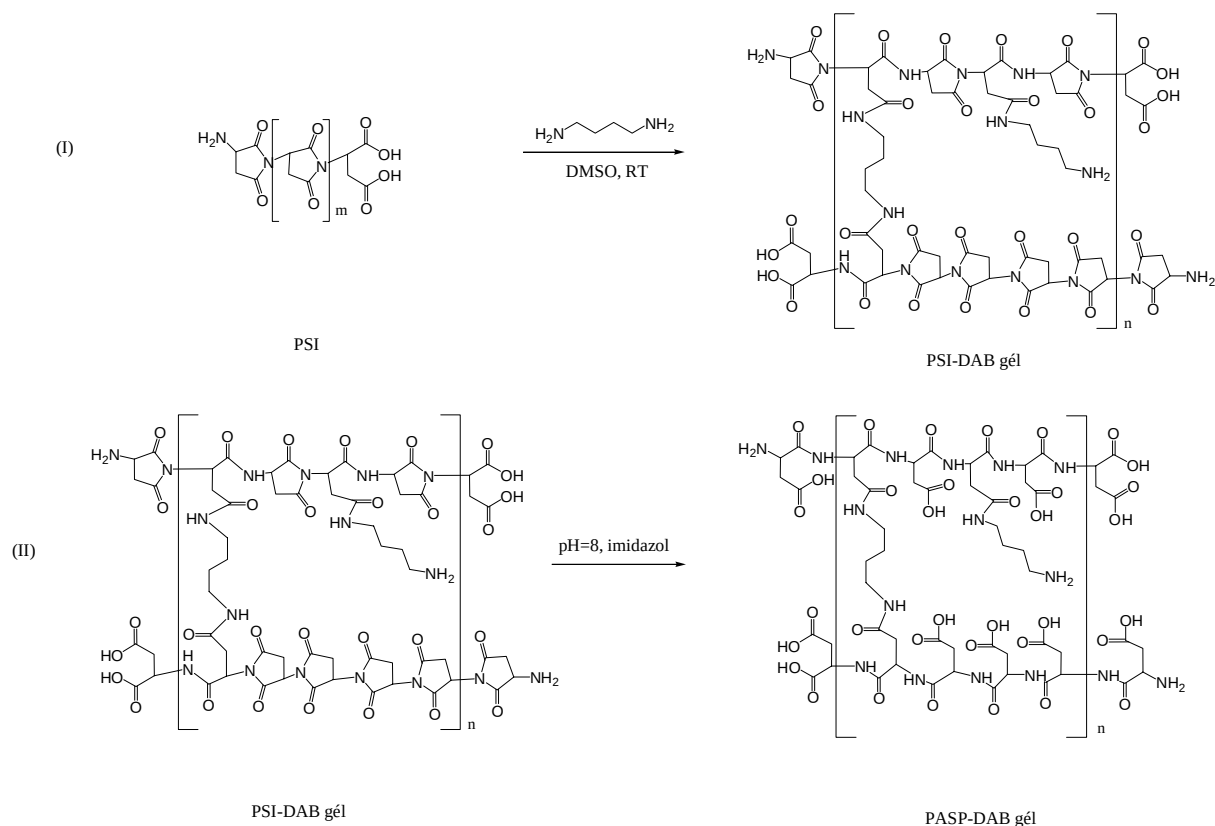
4.1. ábra PSI előállítása aszparaginsavból

4.2.2 Poliszukcinimid gélek és poliaszparaginsav hidrogélek előállítása

Munkám során 1,4-diaminobutánnal (DAB) és cisztaminnal (CA) keresztkötött poliszukcinimid (PSI) géleket állítottam elő, melyeket enyhén lúgos közegben elhidrolizálva állítottam elő poliaszparaginsav (PASP) géleket. Az összes gél előállítása szobahőmérsékleten, légköri nyomáson történt.

4.2.2.1 PSI-DAB és PASP-DAB gélek előállítása

1. A gélek előállítása során 19,4 m/m%-os PSI törzsoldatot készítettem DMSO-ban (2 mmol szukcinimid ismétlődő egység/g oldat);
2. DAB oldatot készítettem DMSO-ban (1 mmol DAB/g oldat);
3. a PSI törzsoldathoz a 4.1. táblázatban látható mennyiségű DMSO-t adtam;
4. a DAB oldatot folyamatos kevertetés közben adtam a polimer DMSO-val hígított oldatához, majd az így kapott oldatot a gélesítő formába (Eppendorf cső, üveghenger, stb.) öntöttem, végül hagytam begélesedni (4.2. ábra);
5. 24 óra elteltével a géleket kivettem az öntőformából, majd 8-as pH-jú imidazol (I=0,25 M) pufferbe tettem, hogy a szukcinimid gyűrűk felnyíljanak, s így a PSI-DAB gél poliaszparaginsav gellé (PASP-DAB) hidrolizáljon el.



4.2. ábra PASP-DAB gélek előállítása: polimer molekulák összekötése diaminobutánnal (I); szukcinimid gyűrűk felnyílása enyhén lúgos körülmények között (II)

1000 mg adott térhálósítási fokú gél előállításához szükséges összetételt tartalmazza az 4.1. táblázat.

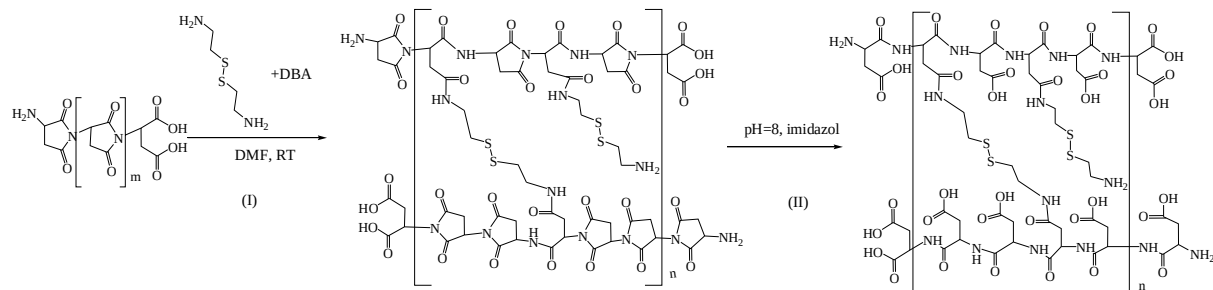
4.1. táblázat PASP-DAB gélek előállítása során alkalmazott pontos bemérési tömegek

Ψ [-]	m (PSI oldat) [mg]	m (DMSO) [mg]	m (DAB oldat) [mg]
5	500	300	200
10	500	400	100
15	500	435	65
20	500	450	50

4.2.2.2 PSI-CA és PASP-CA gélek előállítása

1. A gélek előállítása során 19,4 m/m%-os PSI törzsoldatot készítettem DMF-ben (2 mmol szukcinimid ismétlődő egység/g oldat).
2. 1000 mg gél előállítása során 500 mg PSI/DMF törzsoldatot hígítottam 45,12 mg DMF-fel, 22,5 mg szilárd cisztamin·hidrokloridot adtam hozzá, majd folyamatos kevertetés mellett 33,5 μ l DBA-t csöpögtettem hozzá.

3. Teljes elegyedés után az oldatot formába öntöttem. A gélesítést 25°C-on végeztem.
4. 24 óra elteltével az így kapott 10-es térhálósítási fokú géleket 8-as pH-jú ($I=0,25\text{ M}$) imidazol pufferbe tettem, hogy a szukcinimid gyűrűk felnyíljanak, s így a PSI-CA gél poliaszparaginsav gélle (PASP-CA) hidrolizáljon el (4.3. ábra).



4.3. ábra PASP-CA gélek előállítása: polimer láncok összekötése cisztaamminnal (I); szukcinimid gyűrűk felnyílása hidrolízis hatására enyhén lúgos körülmények között

PASP-CA gélekből kizárólag 10-es térhálósítási fokúakat vizsgáltam.

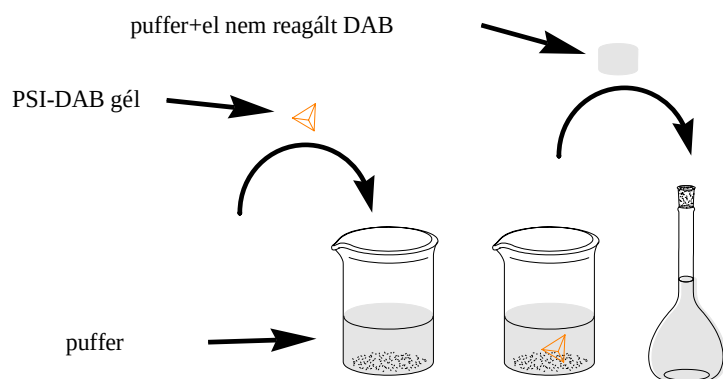
4.2.2.3 Glutáraldehiddel térhálósított poli(vinil-alkohol) gélek előállítása

1. 2,9915 g 12 m/m %-os poli(vinil-alkohol) (PVA) oldatot 1,7495 g vízzel hígítottam.
2. Az így kapott PVA oldathoz 159 μl 1 M-os glutáraldehid (GDA) vizes oldatát adtam, majd kevertetéssel homogenizáltam az elegyet.
3. Végül 100 μl 1:1-es sósavat adtam katalizátorként a rendszerhez, melyet ismételt homogenizáltam, végül gélesítő formába öntöttem.
4. Az így kapott 50-es térhálósítási fokú PVA-GDA gél vízbe tettem, így az el nem reagált GDA, polimer, valamint a katalizátorként alkalmazott HCl kioldódhatott belőle.
5. A további felhasználáshoz a gél DMSO-ba tettem, az oldószer többszöri cseréjével eltávolítottam belőle a vizet, így a gélek felvették a DMSO-ban az egyensúlyi duzzadásfokukat.

4.3 Kísérleti módszerek

4.3.1 Nem elreagált keresztkötők mennyiségi meghatározása PSI-DAB gélekben TNBS-sel

1. Ismert tömegű (~3 g) PSI-DAB gél darabokat a gélesedést követően bóráx pufferbe tettem, majd a puffer többszöri cseréjével mostam ki az el nem reagált térhálósító molekulákat (4.4. ábra). A mosófolyadékot összegyűjtöttem. Végül az összegyűjtött mosófolyadékokat mérőlombikban pufferrel 10 ml-re egészítettem ki.



4.4. ábra PSI-DAB gélből az el nem reagált térhálósító molekulák kimosása

2. Az összegyűjtött, majd 10 ml térfogatra kiegészített mosófolyadék 2 ml-éhez 50 μ l 0,030 M-os TNBS vizes reagens oldatot adtam, az elegyet 30 percen keresztül 25 °C-on termosztáltam, majd UV-VIS spektrofotométer segítségével felvettem az oldat spektrumát. Hátérnek puffer 2 ml-éhez 50 μ l 0,030 M-os TNBS vizes reagens oldatot adtam, az oldatokat 25 °C-on termosztáltam, majd UV-VIS spektrofotométer segítségével felvettem az oldatok spektrumát.
3. Ugyanezt az eljárást elvégeztem puffer helyett DMSO-val. Ekkor DMSO-val mostam ki az elreagálatlan keresztkötőket, illetve DMSO-val egészítettem ki a gyűjtött mosófolyadék térfogatát. Az UV-VIS méréseknél 2 ml folyadékhoz 50 μ l 0,030 M-os TNBS DMSO-s reagens oldatot adtam, 25 °C-on termosztáltam, végül 30 perc elteltével felvettem az oldatok spektrumát. A háttér DMSO volt, melyhez 50 μ l 0,030 M-os TNBS reagens oldatot adtam, 25 °C-on termosztáltam, végül 30 perc elteltével felvettem az oldatok spektrumát.

4.2. táblázat DAB kalibráló oldatsorozat koncentrációi pufferben, illetve DMSO-ban

Minta	c [M] (puffer)	c [M] (DMSO)
c ₁	$1,20 \cdot 10^{-5}$	$2,05 \cdot 10^{-4}$
c ₂	$2,40 \cdot 10^{-5}$	$4,10 \cdot 10^{-4}$
c ₃	$3,60 \cdot 10^{-5}$	$6,14 \cdot 10^{-4}$
c ₄	$4,80 \cdot 10^{-5}$	$8,19 \cdot 10^{-4}$
c ₅	$6,00 \cdot 10^{-5}$	$1,04 \cdot 10^{-3}$

4. Annak meghatározására, hogy milyen mennyiségben tartalmazott térhálósító molekulát az összegyűjtött mosóvíz, kalibráló oldatsorozatot készítettem a vizsgált keresztkötő

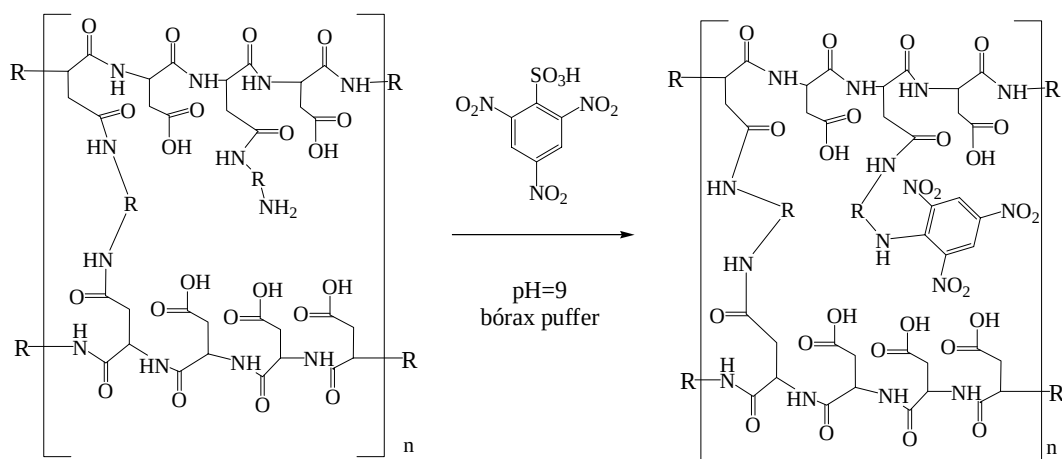
molekulával DMSO-ban, illetve pufferben. A kalibráló oldatok DAB koncentrációi a 4.2. táblázatban láthatóak. A kalibráló oldatsorozatok mérésekor a mintákkal azonos módon jártam el, azaz 2 ml DAB oldathoz 50 µl 0,030 M-os TNBS oldatot adtam, majd 30 perc elteltével vettem fel a spektrumot. Háttérnek DAB-ot nem tartalmazó 2 ml DMSO-hoz, illetve pufferhez 50 µl 0,030 M-os TNBS (DMSO esetén DMSO-s, puffer esetén vizes) reagens oldatot adtam.

4.3.2 Félig elreagált keresztkötők mennyiségének meghatározása TNBS-sel

Félig elreagált keresztkötők arányának meghatározását bórax pufferben, illetve DMSO-ban végeztem TNBS-sel történő visszaméréssel. A gélekhez feleslegben TNBS-t adtam, majd az el nem reagált TNBS molekulákat a gélekből kimostam. Ezen el nem reagált TNBS molekulák koncentrációját mértem a mosófolyadékhoz nagy feleslegben glicin oldatot adva puffer esetén, illetve DAB oldatot DMSO esetén.

4.3.2.1 Félig elreagált keresztkötők mennyiségének meghatározása pufferben

1. A mérések során ismert tömegű, ismert duzzadásfokú, különböző térhálósítási fokú, diaminobutánnal keresztkötött poliaszparaginsav gélek kb. 0,01 g-os darabját egy Eppendorf csőbe tettem, majd 1800 µl bórax puffert pipettáztam rá. Végül úgy számolva, hogy várhatóan a gélben csupán a keresztkötő molekulák 20 %-a reagál mindkét funkciós csoportjával, 200 µl 0,030 M-os TNBS oldatot adtam a rendszerhez. Az Eppendorf csöveket 25 °C-on termosztáltam, így a TNBS molekulák a gélekben található szabad primer aminocsoportokra kötődtek (4.5. ábra).
2. Három óra elteltével UV-VIS spektrofotométer segítségével felvettem az el nem reagált TNBS-t tartalmazó puffer oldatok spektrumát. További méréseket ezekkel az oldatokkal nem végeztem (Magyarázatot lásd: 5.2.1 fejezet.).

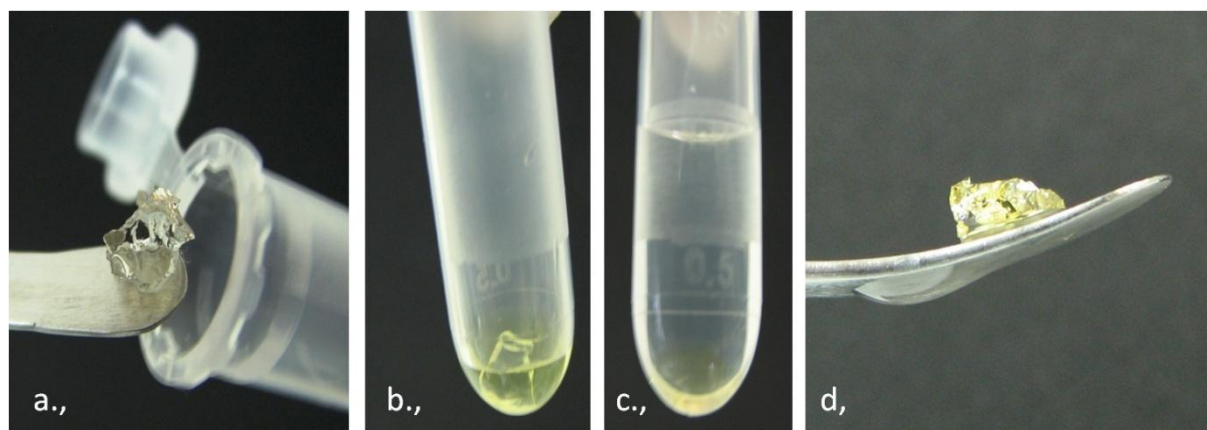


4.5. ábra PASP alapú gélek reakciója TNBS-sel pufferben

4.3.2.2 Félig elreagált keresztkötők mennyiségének meghatározása DMSO-ban

A DMSO-ban történő mérések során a géleket PSI formájában mértem, mivel a PSI-t a DMSO jobban szolvatálja, valamint feltételezhető, hogy az imidazolban történő hidrolízis során csak a szukcinimid gyűrűk nyílnak fel és a térhálósítási fok nem változik.

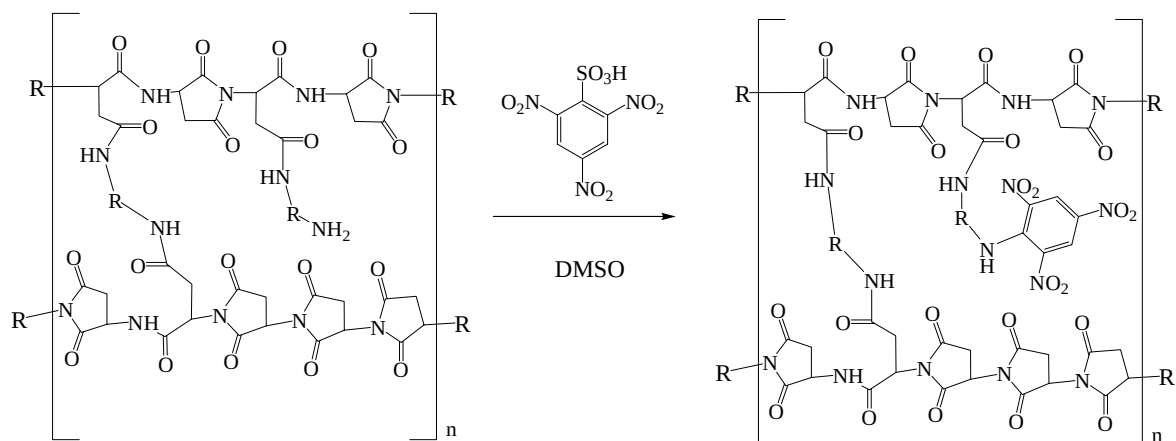
1. A mérések során ismert tömegű, ismert duzzadásfokú, különböző térhálósítási fokú, diaminobutánnal, illetve cisztaminnal keresztkötött PSI gélek kb. 0,01 g os darabját egy Eppendorf csőbe tettem, majd 375 μ l 0,04 M-os DMSO-s TNBS oldatot adtam a rendszerhez (4.6. ábra). Eután az Eppendorf csöveket 25 °C on termosztáltam, majd 3 napig reagáltattam a géleket a TNBS-sel, így a TNBS molekulák a gélekben található szabad primer aminocsoportokra kötődtek. (4.7. ábra)



4.6. ábra PSI gélekben található primer aminocsoportok mennyiségi meghatározása: a., PSI gél a mérés előtt; b., TNBS reagens oldatban ázó gél; c., a gélben el nem reagáló TNBS molekulák kimosása a gélből DMSO-val; d., a reakció következtében megsárgult gél

2. Ezután összegyűjtöttem a gélek mellől a reagens oldatot, majd 1 ml DMSO-t adtam a gélekhez. A géleken naponta cseréltem a DMSO-t, összesen 3 alkalommal. A cserék során a gélekről levett DMSO-t összegyűjtöttem.

3. Az összegyűjtött, a gélekkel el nem reagáló TNBS-t tartalmazó DMSO-t mérőlombikban 10 ml-re egészítettem ki, majd az UV-VIS mérésekhez szükséges mértékben hígítottam DMSO-val. Felvettem a gyűjtött oldatok spektrumát UV-VIS spektrofotométerrel. Annak meghatározására, hogy milyen mennyiségű elreagálatlan TNBS maradt, a hígított oldat 2 ml-éhez 50 μ l 0,004 M-os DAB oldatot adtam, az oldatokat 25 °C-on termosztáltam, majd 30 perc elteltével így is felvettem azok spektrumát.



4.7. ábra PSI alapú gélek reakciója TNBS-sel DMSO-ban

4. A visszaméréshez szükséges kalibráció esetén különböző koncentrációjú TNBS oldatok (4.3. táblázat) 2 ml-éhez 50 μ l 0,004 M koncentrációjú DMSO-ban oldott DAB-ot adtam. A mérések során a háttér DMSO volt, melynek 2 ml-éhez 50 μ l 0,004 M koncentrációjú DAB oldatot adtam. A kalibráló oldatsorozat mérését szintén 30 perc, 25 °C-on történő termosztálást követően végeztem el.

4.3. táblázat TNBS kalibráló sor koncentrációi DMSO

Minta	c [M]
c ₁	$6,00 \cdot 10^{-6}$
c ₂	$1,20 \cdot 10^{-5}$
c ₃	$1,60 \cdot 10^{-5}$
c ₄	$2,80 \cdot 10^{-5}$
c ₅	$4,00 \cdot 10^{-5}$
c ₆	$4,80 \cdot 10^{-5}$
c ₇	$5,60 \cdot 10^{-5}$

A mérések során vizsgáltam a diaminobután DMSO-ban történő reakcióját TNBS-sel: figyeltem a spektrum időbeli változását a DAB hozzáadását követően.

4.3.3 Aminocsoportot nem tartalmazó gél TNBS-sel való reakciójának vizsgálata DMSO-ban

A mérések során glutáraldehiddel térhálósított DMSO-ban duzzasztott poli(vinil-alkohol) (PVA-GDA) gél 1 g-os darabjához 375 µl 0,004 M-os TNBS DMSO-s oldatát adtam.

A mérés célja annak vizsgálata volt, hogy változik-e a TNBS mennyisége egy aminocsoportokat nem tartalmazó gélben, illetve kimosható-e a gélből a reagens, ezzel alátámasztva, hogy a TNBS nem bomlik DMSO-ban, és teljesen kimosható reakció után a gélekből.

A TNBS hozzáadását követő 3. napon elkezdtem kimosni a TNBS molekulákat a gélből, majd a 4.3.2.2 fejezetben leírtakkal azonos módon jártam el a gyűjtött mosófolyadékkal, valamint a mérések során.

4.3.4 Félig elreagált keresztkötők mennyiségének meghatározása PASP-CA gélekben redukció után TNBS-sel – a módszer helyességének vizsgálata

A méréssel arról kívántam megbizonyosodni, hogy a visszamérési módszernél valóban mindegyik aminocsoport elreagál a gélben található aminocsoportok közül a TNBS molekulával, valamint az el nem reagált TNBS molekulák maradéktalanul kimoshatóak-e a gélből. Ez a mérési módszer kizárólag cisztaminnal térhálósított géleknél alkalmazható, ahol a térhálósítószer redukálható diszulfid hidat tartalmaz.

4.3.4.1 A redukálószerként alkalmazott DTT reakciója TNBS-sel

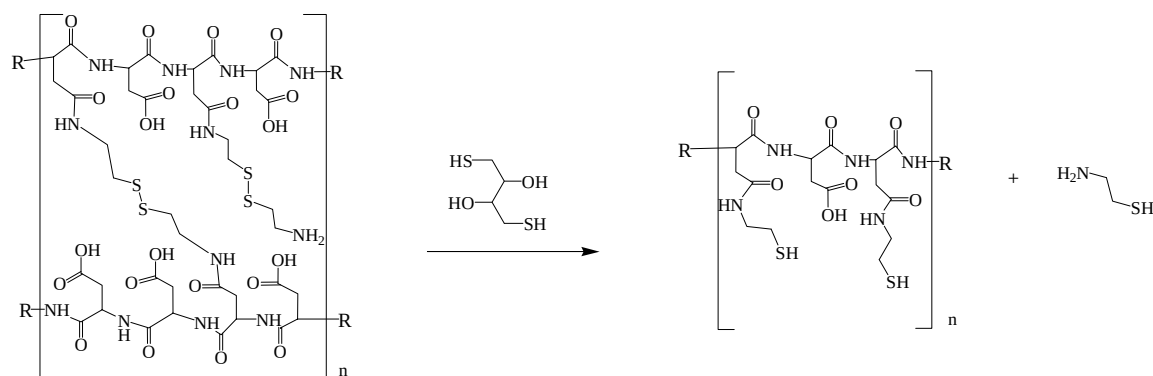
A gélek mérése előtt megvizsgáltam a redukcióhoz szükséges, nukleofil tiol csoportot tartalmazó DTT reakcióját TNBS-sel. Ehhez 2 ml $6 \cdot 10^{-5}$ M-os DTT (bórax pufferben) oldathoz 50 µl 0,030 M-os TNBS oldatot adtam, majd a rendszert 25 °C-on termosztáltam, végül 30 perc elteltével UV-VIS spektrofotométer segítségével felvettem az oldat spektrumát.

4.3.4.2 Félig elreagált keresztkötők arányának meghatározása PASP-CA gélekben redukciót követően

A mérés a következőképpen zajlott:

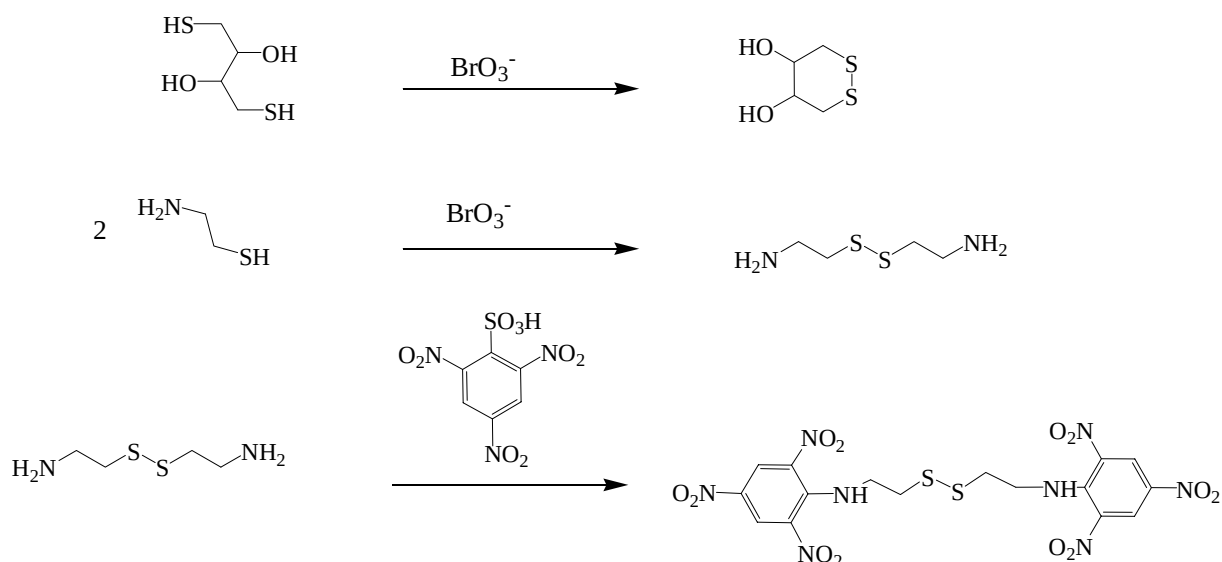
1. PASP-CA géleket az imidazol pufferből desztillált vízbe tettem, majd többszöri atmoszárral eltávolítottam belőlük a hidrolízishez használt puffert.

2. A következő lépésben ismert tömegű és duzzadásfokú géleket dializáló hártyába tettem, a gélhez ditiotreitolt (DTT) redukálószerrel adtam. Így a cisztaminnal keresztkötött gélek diszulfid hídjai felhasadtak és a gél feloldódott (4.8. ábra) [44]. A kénhidak felhasadása mind a valóban keresztkötő, mind a csak az egyik aminocsoportjával bekötő cisztamin molekulák esetén megtörténik, utóbbiaknál ciszteamin (Cys) molekulák hasadnak le. A dializáló hártyára azért van szükség, hogy a polimer molekulák azon belül maradjanak, míg a kismolekulák (Cys és DTT) ki tudjanak diffundálni rajta.
3. A gél feloldódását követően a szolt tartalmazó dializáló hártyákat desztillált vízbe tettem, majd a víz ötszöri cseréjével (összesen 5 nap) - melyet gyűjtöttem – kimostam a kismolekulás anyagokat (DTT, valamint lehasadt Cys molekulák) a dializáló hártya belsejéből.



4.8. ábra PASP-CA gélek readukciója ditiotreitollal

4. Ekkor a Cys molekulákat valamint DTT-t tartalmazó oldatot bóráx pufferben ismert térfogatúra hígítottam. Az így kapott oldatok 2 ml-éhez feleslegben NaBrO_3 -ot adtam. Így az aminok mérésével interferáló, nukleofil tiolcsoportot tartalmazó DTT molekulák a mérést nem zavaró oxidált formájává alakultak (4.9. ábra). Az oxidálószer hozzáadását követően 12 órával 50 μl 0,030 M-os TNBS oldatot adtam az oldatokhoz, a rendszert 25 °C-on termosztáltam, majd 30 perc elteltével UV-VIS spektrofotométerrel felvettem a spektrumukat (4.9. ábra).



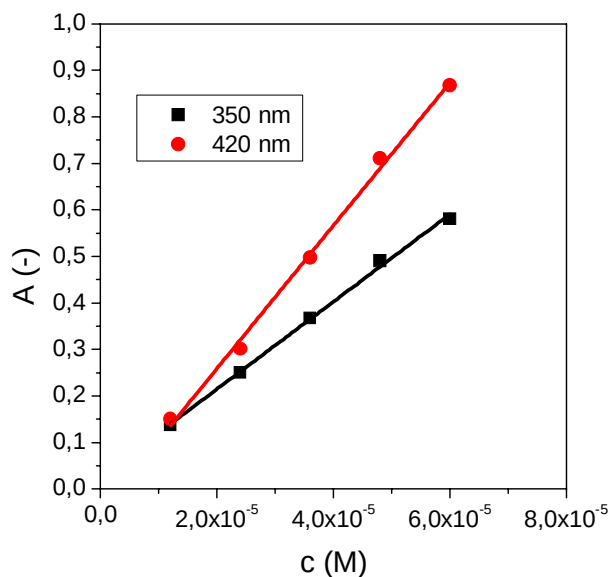
4.9. ábra DTT és CA oxidációja bromát ionok jelenlétében, valamint Cys molekulák reakciója TNBS-sel

5. Kalibrációhoz különböző koncentrációjú Cys oldatokat készítettem bóráx pufferben, melyek DTT-t a gélhez hozzáadott mennyiségben tartalmaztak. Ezen oldatok 2 ml-éhez feleslegben NaBrO_3 -ot adtam, majd ezt követő 12 órával később 50 μl 0,030 M-os TNBS oldatot adtam, a rendszert 25 °C-on termosztáltam, majd 30 perc elteltét követően UV-VIS spektrofotométerrel felvettem az oldatok spektrumát. Háttérnek ciszteamint nem tartalmazó DTT és NaBrO_3 tartalmú puffer oldatot használtam. A kiértékeléseket 420 nm-es hullámhossznál végeztem.

5 Mérési eredmények és azok kiértékelése

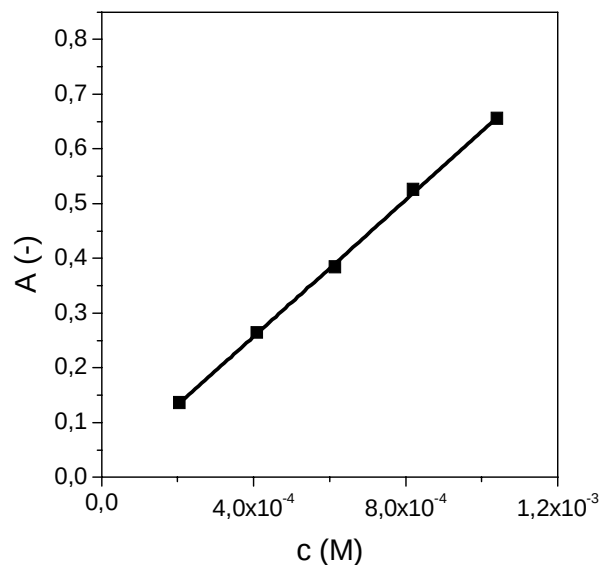
5.1 Nem elreagált keresztkötők mennyiségi meghatározása gélekben TNBS-sel

Először a nem reagált térhálósító molekulákat (DAB) kívántam meghatározni PSI-DAB és PASP-DAB gélekben. Ehhez a DAB és TNBS reakciójának felhasználásával kalibrációt készítettem.



5.1. ábra DAB kalibrációs egyenese pufferben $A(350\text{ nm})=9385 \cdot c[\text{M}]$, $R^2=0,999$; $A(420\text{ nm})=15364 \cdot c[\text{M}]$, $R^2=0,998$

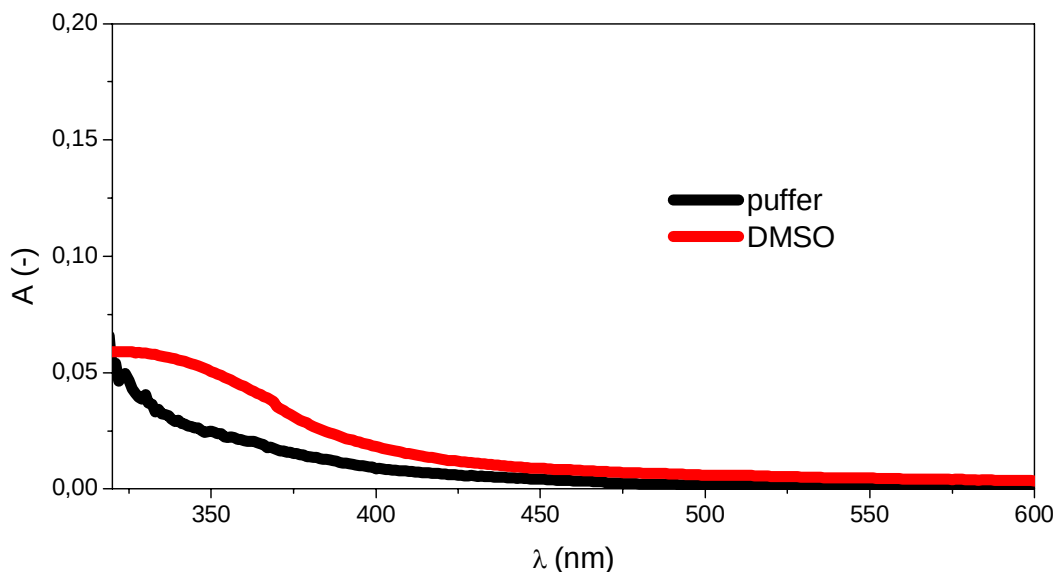
Az el nem reagált keresztkötők (DAB) mennyiségének meghatározásához pufferben készített kalibrációs egyenes az 5.1. ábrán látható. A kuvettaúthossz 1 cm, így az abszorpciós koefficiens $\epsilon(350\text{ nm})=9385\text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, $\epsilon(420\text{ nm})=15364\text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.



5.2. ábra DAB kalibráció TNBS-sel 437 nm-en DMSO-ban; $A=624,8 \cdot c [M]$ ($R^2=0,999$)

A DMSO-ban készített kalibráció az 5.2. ábrán látható ($\epsilon(437 \text{ nm})=624,8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

Az el nem reagált keresztkötőket tartalmazó DMSO, illetve puffer színe a TNBS reagens oldat hozzáadását követően szemmel láthatóan nem változott meg. Az oldat UV-VIS spektrumát felvéve, a spektrumon sem jelent meg csúcs (5.3. ábra).



5.3. ábra El nem reagált DAB-ot tartalmazó DMSO, illetve puffer mosófolyadék spektruma TNBS hozzáadása után

Pufferben $1,20 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, DMSO-ban pedig $2,05 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ DAB már kimutatható. A vizsgált gélek tömege $\sim 3 \text{ g}$, mely 20-as térhálósítási fokú géleknél (azok tartalmazzák a legkevesebb DAB-ot) $1,48 \cdot 10^{-3} \text{ mol}$ DAB-ot tartalmaznak. A mérések során a mosóvizet 10 ml-re egészítettem ki, így a kimutatható DAB mennyisége $1,2 \cdot 10^{-7} \text{ mol}$, DMSO-ban pedig

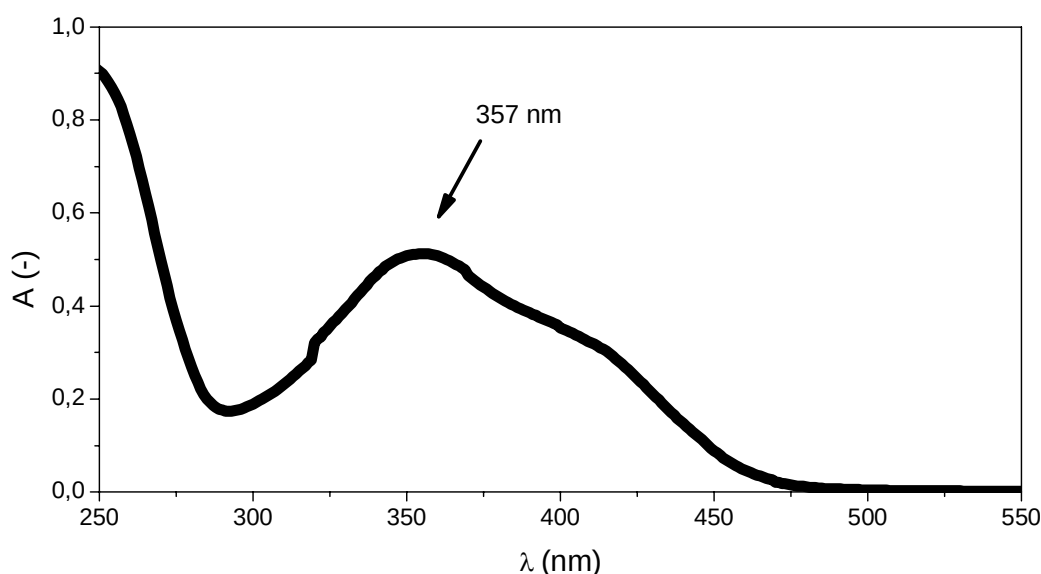
$2,05 \cdot 10^{-6}$ mol, melyek a gél preparációja során felhasznált DAB $8,1 \cdot 10^{-3}$ %-a puffer, míg 0,14 %-a DMSO-s mérés esetén.

A gélesedés során tehát 20-as térhálósítási fokú PSI-DAB gélek esetén a keresztkötők kevesebb, mint 0,15 %-a maradhatott elreagálatlanul, míg kisebb térhálósítási fok esetén ez még kisebb érték. Ez azt jelenti, hogy a DAB reaktív, nukleofil ágens aminocsoportja könnyen reakcióba vihető DMSO-ban a PSI molekulákkal és legalább egyik aminocsoportjával a polimer lánchoz kapcsolódik.

5.2 Félig elreagált keresztkötők mennyiségének meghatározása TNBS-sel

5.2.1 Félig elreagált keresztkötők mennyiségének meghatározása pufferben

Miután a PASP géleket három órán át áztattam 25 °C-on termosztált pH = 9,3-as, TNBS-t tartalmazó bórax pufferben, azt tapasztaltam, hogy a gél körülvevő puffer színe intenzíven megsárgult. Ezt két dolog magyarázhatja. Az egyik, hogy a gélben maradtak el nem reagált keresztkötő molekulák. Mivel ennek ellenkezőjét, miszerint nem maradnak elreagálatlanul keresztkötő molekulák, sikerült bebizonyítanom (ld.: 5.1 fejezet), ez nem lehetséges. A másik magyarázat a reagens hidrolízise pikrinsavvá. Ennek eldöntésére felvettem az gél körülvevő oldat spektrumát. A spektrumot mutatja az 5.4. ábra. Jól látható, hogy maximális elnyelés 350 nm-en nem, ugyanakkor 357 nm-en megjelenik. 420 nm-en szintén nincsen csúcs, csak a 350 nm-hez tartozó váll látható.



5.4. ábra TNBS-t tartalmazó pufferbe áztatott gél spektruma

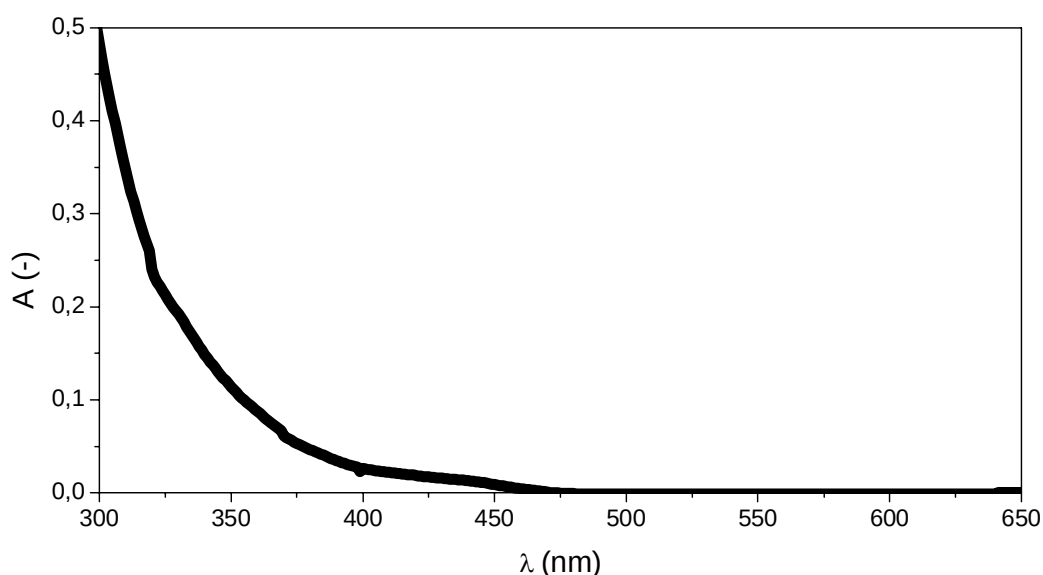
Mivel a pikrinsavnak a trinitrofenil-aminhoz képest néhány nm-rel nagyobb hullámhossznál van elnyelése, a TNBS-nek pedig ebben a hullámhossz tartományban nincs, ezért az oldat színe, illetve spektruma valószínűsíthetően pikrinsav keletkezéséhez köthető [43]. Az UV-VIS spektrum alapján ez nem jelenhető ki teljes bizonyossággal, ugyanakkor rámutat arra, hogy a félig elreagált térhálósító molekulák mennyiségének meghatározása visszaméréssel pufferben mellékreakció miatt nem lehetséges.

5.2.2 Félig elreagált keresztkötők mennyiségének meghatározása DMSO-ban

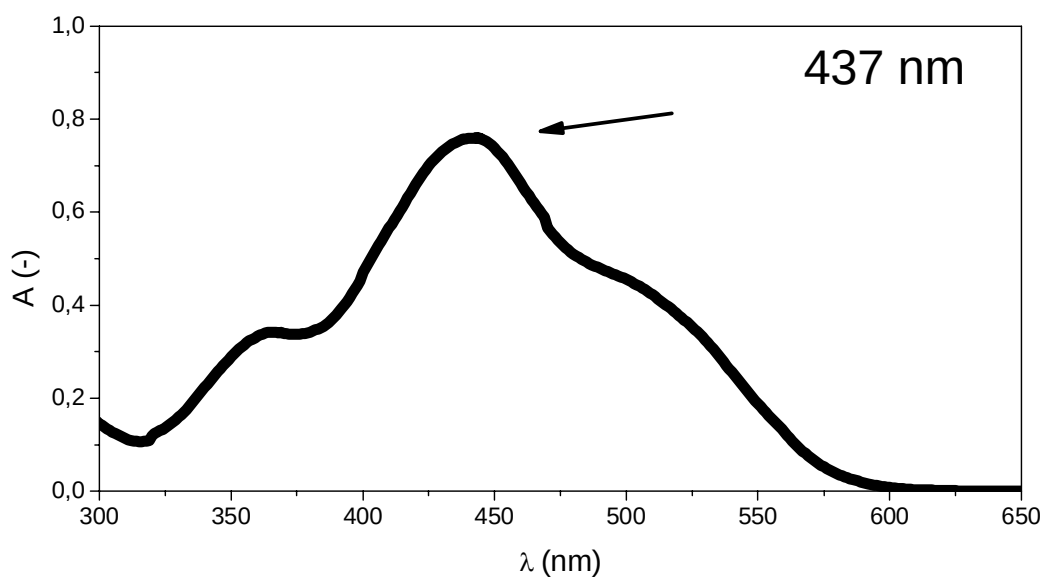
A fenti tapasztalatok kizárják pufferben való mérés lehetőségét. Szükség volt tehát a puffert lecserélni egy olyan reakció közegre, ahol nem játszódik le mellékreakció, ugyanakkor a TNBS reagál az aminocsoportokkal. A TNBS primer aminocsoporttal SN_2Ar mechanizmus szerint reagál, melynek az aprotikus, poláris oldószerek kedveznek [3]. A PSI-DAB gélek előállítása DMSO-ban történik, mely egy poláris, aprotikus oldószer, így a mérésekkel DMSO-ban próbálkoztam meg.

A PSI gélek DMSO-ban történő mérése esetén az oldat színében 3 nap elteltével sem volt tapasztalható színváltozás. A géleket körülvevő közeg ugyanolyan halványsárga maradt, mint a gélekhez való hozzáadás előtt.

Azt, hogy DMSO-ban ténylegesen nem történt a TNBS más átalakulása, mint a gélek aminocsoportjaival való reakció, a gél körülvevő oldat spektruma is bizonyítja, melyen nem láthatóak csúcsok (5.5. ábra).



5.5. ábra TNBS tartalmú DMSO-ba áztatott PSI gélek melletti oldat spektruma 3 nap áztatás után

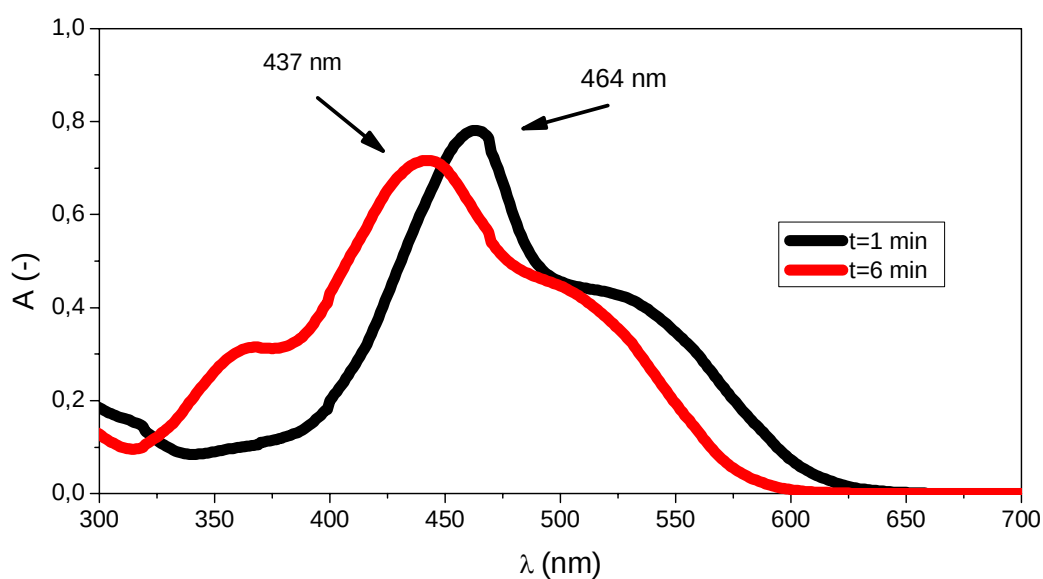


5.6. ábra TNBS reakciója DAB felesleggel DMSO-ban

Ezután felvettem annak a TNBS oldatnak a spektrumát, melyhez DAB-ot adtam nagy feleslegben a DAB hozzáadást követő 30 perc elteltével. Látható, hogy a DMSO-s közegben is reagált a TNBS a DAB-bal (5.6. ábra).

Az 5.6. ábrán látható, hogy a DMSO-ban történő TNBS DAB-bal való reakcióját követően 437 nm-en van maximális elnyelése az oldatoknak.

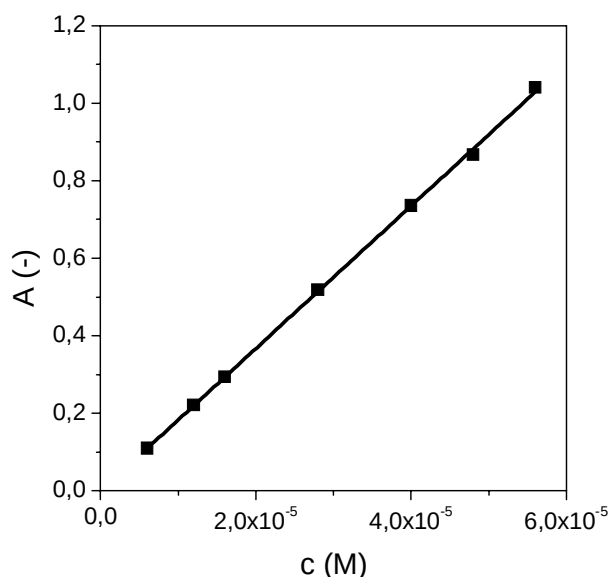
Annak megállapítására, hogy a TNBS milyen reakciótermékeihez tartozhat a csúcs, kinetikai vizsgálatokat végeztem, azaz felvettem a TNBS oldat spektrumát különböző időközönként a DAB hozzáadását követően (5.7. ábra).



5.7. ábra TNBS - DAB oldat spektrumának változása a DAB hozzáadását követően

Ekkor azt tapasztaltam, hogy kezdetben megjelenik egy csúcs 464 nm-en (ekkor az oldat színe vörös), ami elkezd csökkenni, miközben egy csúcs jelenik meg 437 nm-en, valamint egy váll 375 nm-en (ekkorra narancssárgára változik az oldat színe). A kezdetben 464 nm-en megjelenő csúcsnak 550 nm-nél, míg a 437 nm-en megjelenő csúcsnak 500 nm-nél jelenik válla. 4-5 perc elteltével sem az oldat színe, sem a spektrum nem változik tovább (5.7. ábra). Ezt azzal tudom magyarázni, hogy a kezdeti 464 nm-es csúcs a Meisenheimer komplexhez tartozik, mely az aprotikus, poláris közegben egyből átalakul trinitrofenil-aminná.

Miután megbizonyosodtam róla, hogy a DMSO-ban nem történik meg a reagens mellékreakciója, felvettem a TNBS kalibrációs egyenesét DAB-bal (5.8. ábra): $A=18390 \cdot c(M)$, $R^2=0,999$, $\lambda=437$ nm, $\epsilon(437 \text{ nm})=18390 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.



5.8. ábra TNBS kalibráció DMSO-ban DAB-bal: $A=18390 \cdot c$ (M) ($R^2=0,999$), $\lambda=437$ nm

A félig elreagált keresztkötők mennyiségét az alábbi módon számítottam (példaszámítás):

1. Mért abszorbancia: $A=0,532 \rightarrow$ kalibrációs egyenes egyenletét felhasználva:
 $c=2,89 \cdot 10^{-5} \text{ M}$
2. A mosófolyadékot ötszörösére hígítottam az UV-VIS mérés előtt $\rightarrow$
 $c_{\text{TNBS a mosófolyadékban}}=1,45 \cdot 10^{-4} \text{ M}$
3. $V_{\text{mosófolyadék}}=10 \text{ ml} \rightarrow n_{\text{kimosott TNBS}}=1,45 \cdot 10^{-6} \text{ mol}$
4. $n_{\text{hozzáadott TNBS}}=1,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \rightarrow n_{\text{elreagált TNBS}}=n_{\text{előző aminos}}=5,43 \cdot 10^{-8} \text{ mol}$

5. $m_{\text{mért gél}}=0,0086 \text{ g}$ ($q_m=10,79$) $\rightarrow m_{\text{száraz gél}}=7,97 \cdot 10^{-4} \text{ g}$; 1128 g száraz gél tartalmaz 1 mol keresztköti molekulát $\rightarrow n_{\text{preparációs keresztköti}} (\Psi=10)=7,07 \cdot 10^{-7} \text{ mol}$
6. A félig elreagált keresztköti aránya: $n/n\%=7,68 \%$ $\rightarrow \Psi_{\text{valódi}}=10,83$.

5.1. táblázat 10-es térhálósítási fokú PSI-CA gélek előállítása során csak egyik funkciós csoportjukkal elreagáló CA molekulák arányának, valamint a valódi térhálósítási fokának összefoglalása

$\Psi_{\text{preparációs}} (-)$	Csak egy funkciós csoportjukkal reagáló CA molekulák aránya (%)	$\Psi_{\text{valódi}} (-)$
10	$8,0 \pm 1,35$	$10,87 \pm 0,16$

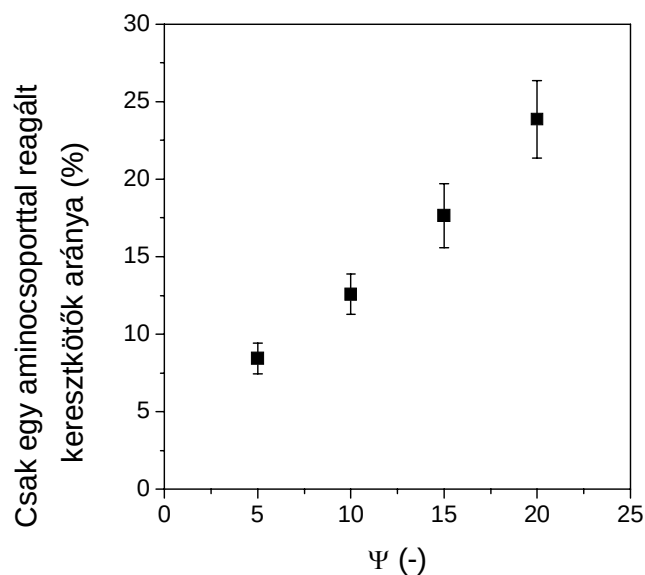
Minden vizsgált gél esetén a fenti számolás szerint jártam el, majd kiszámoltam az egyes gélekre kapott eredmények átlagát és tapasztalati szórását. A vizsgált, 10-es térhálósítási fokú PSI-CA gélek 3 párhuzamos mérése során kapott eredmények az 5.1. táblázatban láthatóak.

A PSI-DAB gélek számolásánál szintén a fenti módon jártam el. Különböző térhálósítási fokú PSI-DAB gélek esetén kapott eredmények az 5.2. táblázatban láthatóak. Minden térhálósítási fok esetén 6 párhuzamos mérést végeztem.

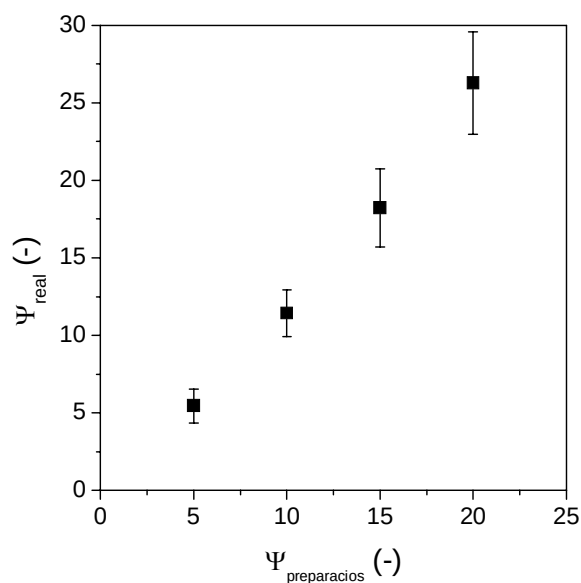
5.2. táblázat Különböző térhálósítási fokú PSI-DAB gélek előállítása során csak egyik funkciós csoportjukkal reagáló térhálósító molekulák arányának, valamint a valódi térhálósítási fokok összefoglalása

$\Psi_{\text{preparációs}} (-)$	Csak egy funkciós csoportjukkal reagáló DAB molekulák aránya (%)	$\Psi_{\text{valódi}} (-)$
5	$8,43 \pm 1,00$	$5,46 \pm 1,09$
10	$12,57 \pm 1,31$	$11,44 \pm 1,50$
15	$17,64 \pm 2,08$	$18,21 \pm 2,53$
20	$23,85 \pm 2,50$	$26,26 \pm 3,28$

Szintén a PSI-DAB gélek mérése során kapott értékeket mutatja az 5.9. ábra, a valódi térhálósítási fokok az 5.10. ábrán láthatóak.



5.9. ábra A gélesítés során polimerrel csak egyik funkciós csoportjával reagáló molekulák aránya a preparációs térhálósító molekulák számához képest PSI-DAB gélek esetén



5.10. ábra PSI-DAB gélek valódi térhálósítási foka a preparációs térhálósítási fok függvényében

Az eredményekből (5.9. ábra) egyértelműen látszik, hogy a részben és teljes mértékben bekötő DAB molekulák aránya erősen függ a kiindulási DAB koncentrációtól. A csak egyik funkciós csoportjukkal elreagáló molekulák aránya jelentős, ugyanakkor az előzetes várakozásokkal szemben, minél nagyobb a kiindulási DAB koncentráció (tehát minél kisebb a térhálósítási fok), annál nagyobb hányada reagál el mindkét végével a DAB molekuláknak. A csak egyik funkciós csoportjukkal elreagáló molekulák arányának növekedése a térhálósítási fokkal azzal magyarázható, hogy kisebb térhálósítási foknál – azaz

nagyobb mennyiségű térhálósító alkalmazása esetén - a molekulák statisztikusan közelebb kötnek be egymáshoz mindkét funkciós csoportjukkal, ezzel mintegy összehúzza a polimer molekulákat és a már kialakult térhálót. Ekkor azok a molekulák, melyek addig csak egyik funkciós csoportjukkal reagáltak el, képesek a másik funkciós csoportjukkal a közeli másik polimer molekulával reagálni.

Ezzel szemben, nagyobb térhálósítási foknál (ahol kevesebb a gél előállítás során hozzáadott DAB mennyisége) azon keresztkötő molekulák, melyek mindkét funkciós csoportjukkal bekötnek, messzebb helyezkednek el egymástól, miközben csökkentik a polimer molekulák szabad szegmens mozgását. Így a polimer láncok adott láncszakaszai messzebb helyezkednek el egymástól. Ez azt eredményezi, hogy a térhálósító molekulák nem érnek el a még szabad funkciós csoportjukkal másik polimer láncot.

5.3 Aminocsoportot nem tartalmazó gél TNBS-sel való reakciójának vizsgálata DMSO-ban

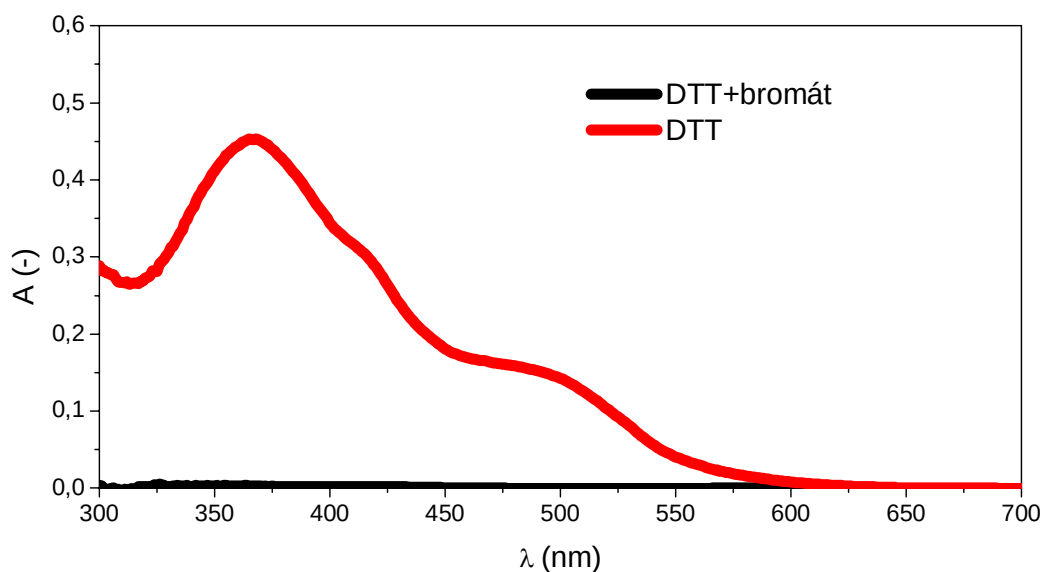
PVA gélhez hozzáadott TNBS mennyisége: $1,500 \cdot 10^{-6}$ mol volt. A mérés után a mosófolyadékban a TNBS mennyiségét az 5.8. ábrán látható kalibrációs egyenessel határoztam meg, mely $1,499 \cdot 10^{-6}$ mólnak adódott.

Ez az eredetileg a gélhez adott TNBS mennyiségének 99,93 %-a. Ez alapján elmondható, hogy a TNBS nem vesz részt reakcióban DMSO-ban duzzasztott PVA gélben, és kimosható belőle az el nem reagált reagens, amely egyértelműen bizonyítja a módszer alkalmazhatóságát gélek illetve egyéb heterogén fázisok esetén.

5.4 Félig elreagált keresztkötők mennyiségének meghatározása PASP-CA gélekben redukció után TNBS-sel – a módszer helyességének vizsgálata

5.4.1.1 A redukálószerként alkalmazott DTT reakciója TNBS-sel

A DTT interferál az amin meghatározással, ahogyan azt az 5.11. ábrán látható spektrum mutatja, hiszen a reakcióterméknek van egy csúcsmaximuma 370 nm-nél melyhez tartozik két váll 410, illetve 480 nm-nél. Ez lefedi a spektrumnak azt a tartományát, ahol az aminoszavakkal képzett addukt csúcsait is várjuk (350, illetve 420 nm).

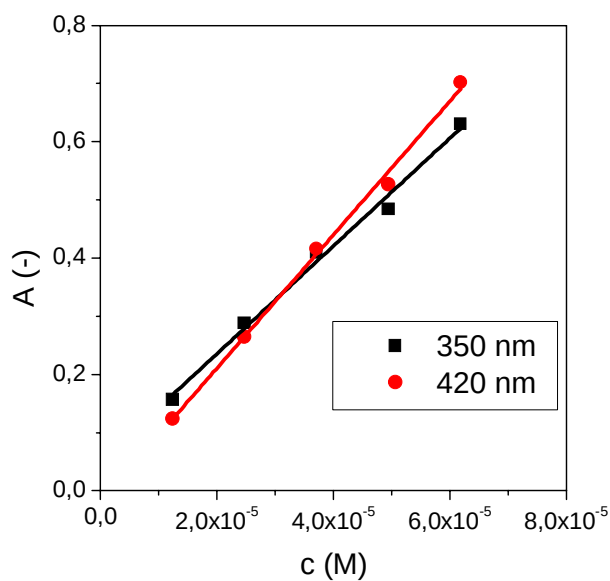


5.11. ábra DTT és TNBS reakcióját követően felvett spektrum (bromát hozzáadásával, illetve anélkül)

A DTT zavaró hatását a rendszerhez adott NaBrO_3 -tal jól láthatóan sikerült kizárni (5.11. ábra).

5.4.1.2 Félig elreagált keresztkötők arányának meghatározása PASP-CA gélekben redukciót követően

A dialízis hárttyában a DTT hatására a gélek feloldódtak. Ezután a dialízis hárttyán át kimosott oldatokat bórax pufferrel ismert térfogatra egészítettem ki, majd először NaBrO_3 -ot, majd 12 óra elteltével TNBS-t adtam hozzájuk, végül felvettem a spektrumukat.



5.12. ábra Ciszteamin kalibrációs egyenese 350, illetve 420 nm-en DTT és BrO_3^- jelenlétében pufferben

A kalibráció során ciszteamin molekulákhoz adtam DTT-t, valamint NaBrO₃-ot ugyanolyan arányban, mint a gélekhez, felvettem a spektrumokat, majd 350, illetve 420 nm-en illesztettem kalibrációs egyenest (5.12. ábra).

Az oldatok ciszteamin tartalmát a 420 nm-hez tartozó érzékenységgel számoltam ki. A redukciós mérés alapján a csak egyik funkciós csoportjával reagáló keresztkötő molekulák aránya 11,31±1,84 %.

5.4.1.3 A két különböző mérési módszer összehasonlítása

Annak meghatározására, hogy az általam kidolgozott módszerrel, azaz a TNBS-sel való visszamérési módszerrel (4.3.2.2 fejezet) mért eredmények hány %-os szignifikancia szinten egyeznek meg a redukciós módszerrel (4.3.4.2 fejezet), kétmintás t-próbát végeztem.

Ehhez első lépésben feltételeznem kellett, hogy a két méréssorozat varianciája legalább 95 %-os valószínűséggel megegyezik. Ezt F-próbával ellenőriztem.

F-próba:

$$F_{0,95}(2,2)=19 [45]$$

$$\frac{S_{\text{redukciós módszer}}^2}{S_{\text{kidolgozott módszer}}^2} = \frac{3,38}{1,83} = 1,85$$

$F_{0,95}(2,2)=19 > \frac{S_{\text{redukciós módszer}}^2}{S_{\text{kidolgozott módszer}}^2} = 1,85$, ezért a két minta reprodukálhatósága 10 %-os szinten nem különbözik egymástól szignifikánsan.

Kétmintás t-próba [45]:

Nullhipotézis: $H_0: \mu_{\text{kidolgozott módszer}} - \mu_{\text{redukciós módszer}} = 0$

$$d = \bar{x}_1 - \bar{x}_2 = 11,31 - 8,04 = 3,27$$

$$s^2 = \frac{1}{n_1 + n_2 - 2} [s_1^2(n_1 - 1) + s_2^2(n_2 - 1)] = \frac{1}{3 + 3 - 2} [3,38(3 - 1) + 1,83(3 - 1)] \\ = 2,605$$

$$s^2 = 2,605 \rightarrow s = 1,614$$

$$t = \frac{d}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} = \frac{3,27}{1,614 \sqrt{\frac{1}{3} + \frac{1}{3}}} = 2,48$$

A t-eloszlás kritikus értékei $v=4$ szabadsági fokhoz 2,776 [45]. A próbastatisztika értéke a kritikus határt nem haladja meg, tehát a nullhipotézist elfogadjuk: a két módszerrel kapott eredmények különbsége (félig elreagált keresztkötő mennyiségének arányai a preparatív keresztkötő mennyiséghez képest) 5 %-os szinten nem szignifikáns.

6 Összefoglalás

Munkám célja egy olyan analitikai módszer kidolgozása volt, mely lehetővé teszi polimer gélek térhálójában található primer aminocsoportok koncentrációjának meghatározását, ezzel lehetővé téve diaminokkal térhálósított rendszerek valódi térhálósítási fokának meghatározását.

A módszer kidolgozása során diaminobutánnal (DAB) térhálósított poliaszparaginsav (PASP) rendszereket vizsgáltam. A módszer helyességét cisztaminnal (CA) térhálósított poliaszparaginsav gélek két, független úton történő mérésével vizsgáltam. A módszer alkalmazhatóságát amint nem tartalmazó, inert poli(vinil-alkohol) (PVA) géleken bizonyítottam.

Az el nem reagált térhálósító molekulák mérésénél azt kaptam eredményül, hogy DAB-bal térhálósított gélek előállításánál során nincs kimutatható mennyiségű olyan DAB molekula, mely legalább egyik funkciós csoportjával ne kapcsolódna polimerhez.

A félig elreagált keresztkötők mennyiségének mérése során abba a problémába ütköztem, hogy a TNBS-sel való hosszabb méréseket meggátolja a reagens hidrolízise, amely melléktermék képződéséhez vezet. A hidrolízis sebessége nem mérhető össze az aminosavakkal való reakcióval, azonban hosszabb, több órás mérések esetén a maradék reagens mennyiségének pontos meghatározása csak a mellékreakció teljes kizárásával valósítható meg.

A mellékreakciót sikeresen kizártam a lúgos közeg DMSO-ra való cserélésével. Az oldószer lecserélése miatt a géleket nem poliaszparaginsav, hanem hidrolizálás előtti, poliszukcinimid (PSI) formában mértem, mivel azokat jobban szolvatálja a DMSO.

A leírt, különböző térhálósítási fokú PSI-DAB géleknél azt tapasztaltam, hogy a térhálósítási fok növekedésével (a preparáció során a gélhez adott DAB koncentrációjának csökkenésével) növekszik azon térhálósító molekulák száma, melyek csak egyik funkciós csoportjukkal reagálnak a polimerrel.

Sikerült bebizonyítani, hogy inert rendszerben (PVA gél) a TNBS nem reagál el, és a gélből maradéktalanul kimosható. A PSI-CA gélek segítségével vizsgáltam az általam kidolgozott módszer helyességét. Ehhez az általam kidolgozott módszer mellett egy másik módszerrel – mely csak a diszulfid hidakat tartalmazó cisztaminnal térhálósított molekulák esetén alkalmazható - is megmértem azon keresztkötő molekulák arányát, melyek csak egyik funkciós csoportjukkal reagálnak polimerrel. Az általam kidolgozott módszer és az ellenőrző

módszerrel kapott eredmények eltérése 5 %-os szinten nem szignifikáns, így a módszer alkalmazható diaminokkal térhálósított poliszukcinimid gélek mérésére.

További célom megtalálni azt a legrövidebb időt, amely alatt a gélek elreagálnak a TNBS-sel, valamint amely idő alatt a TNBS kimosható a gélekből, ezzel a teljes mérési időt csökkentve. Szükséges még a gélekhez adott TNBS mennyiségének optimalítása a visszamérésből, valamint a hígításokból adódó hiba csökkentésére. Végezetül a módszer várhatóan alkalmazható egyéb diaminokkal térhálósított gélekre, illetve akár további heterogén fázisú rendszerek vizsgálatára.

7 Irodalomjegyzék

- [1] M. Zrínyi, A fizikai kémia alapjai I., Műszaki Könyvkiadó, Budapest, 2004.
- [2] B. Pukánszky, J. Móczó, Műanyagok, 2011.
- [3] E.R. Kiranas, S.M. Tzouwara Karayanni, M.I. Karayannis, The reaction of glutamic acid and trinitrobenzenesulfonic acid-kinetic study and analytical application, *Talanta*, 44 (1997) 1113-1121.
- [4] L. Halász, M. Zrínyi, Bevezetés a polimerfizikába, Műszaki Könyvkiadó, Budapest, 1989.
- [5] T. Szekrényessy, G. Székely, K. Oláh, *Kolloidika II*, Műegyetemi Kiadó, Budapest, 1994.
- [6] T. Gyenes, V. Torma, M. Zrínyi, Swelling properties of aspartic acid-based hydrogels, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 319 (2008) 154-158.
- [7] S. Kurihara, S. Sakamaki, S. Mogi, T. Ogata, T. Nonaka, Crosslinking of poly(vinylalcohol)-graft-N-isopropylacrylamide copolymer membranes with glutaraldehyde and permeation of solutes through the membranes, *Polymer*, 37 (1996) 1123-1128.
- [8] T.A. Rickett, Z. Amoozgar, C.A. Tuckek, J. Park, Y. Yeo, R. Shi, Rapidly Photo-Cross-Linkable Chitosan Hydrogel for Peripheral Neurosurgeries, *Biomacromolecules*, 12 (2011) 57-65.
- [9] T. Tanaka, I. Nishio, S.T. Sun, S. Ueno-Nishio, Collapse of gels in an electric field, *Science*, 218 (1982) 467-469.
- [10] Y. Qiu, K. Park, Environment-sensitive hydrogels for drug delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 53 (2001) 321-339.
- [11] Y.D. Zaroslov, O.E. Philippove, A.R. Khokolov, Change of Elastic Modulus of Strongly Charged Hydrogels at the Collapse Transition, *Macromolecules*, 32 (1999) 1508-1513.
- [12] L.R.G. Treloar, *The physics of rubber elasticity*, Oxford University Press, Oxford, 1958.
- [13] T. Nakato, M. Yoshitake, K. Matsubara, M. Tomida, T. Kakuchi, Relationships between structure and properties of poly(aspartic acid)s, *Macromolecules*, 31 (1998) 2107-2113.
- [14] L.S. Nair, C.T. Laurencin, Biodegradable polymers as biomaterials, *Progress in Polymer Science*, 32 (2007) 762-798.
- [15] S. Roweton, S.J. Huang, G. Swift, Poly(aspartic acid): Synthesis, biodegradation, and current applications, *Journal of Environmental Polymer Degradation*, 5 (1997) 175-181.
- [16] T. Gyenes, V. Torma, B. Gyarmati, M. Zrínyi, Synthesis and swelling properties of novel pH-sensitive poly(aspartic acid) gels, *Acta Biomaterialia*, 4 (2008) 733-744.

- [17] K. Matsubara, T. Nakato, M. Tomida, H-1 and C-13 NMR characterization of poly(succinimide) prepared by thermal polycondensation of L-aspartic acid, *Macromolecules*, 30 (1997) 2305-2312.
- [18] M. Tomida, M. Yabe, Y. Arakawa, M. Kunioka, Preparation conditions and properties of biodegradable hydrogels prepared by gamma-irradiation of poly(aspartic acid)s synthesized by thermal polycondensation, *Polymer*, 38 (1997) 2791-2795.
- [19] G. Thoma, B. Ernst, F. Schwarzenbach, R.O. Duthaler, Synthesis and characterization of polyaspartic acid carbohydrate conjugates: Multivalent sialyl Lewis(x), *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 7 (1997) 1705-1708.
- [20] G. Spadaro, C. Dispenza, G. Giammona, G. Pitarresi, G. Cavallaro, Cytarabine release from beta,alpha-poly(N-hydroxyethyl)-DL-aspartamide matrices cross-linked through gamma-radiation, *Biomaterials*, 17 (1996) 953-958.
- [21] J.H. Kim, S.J. Sim, D.H. Lee, D. Kim, Y.K. Lee, Preparation and properties of biodegradable hydrogels based on glutaraldehyde-crosslinked poly(2-hydroxyethyl aspartamide), *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 10 (2004) 278-282.
- [22] Y. Zhao, H.J. Su, L. Fang, T.W. Tan, Superabsorbent hydrogels from poly(aspartic acid) with salt-, temperature- and pH-responsiveness properties, *Polymer*, 46 (2005) 5368-5376.
- [23] V. Torma, T. Gyenes, Z. Szakacs, M. Zrinyi, A novel potentiometric method for the determination of real crosslinking ratio of poly(aspartic acid) gels, *Acta Biomaterialia*, 6 (2010) 1186-1190.
- [24] A. Halasz, A. Barath, W.H. Holzapfel, The biogenic amine content of beer; the effect of barley, malting and brewing on amine concentration, *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung a-Food Research and Technology*, 208 (1999) 418-423.
- [25] H. Kataoka, Derivatization reactions for the determination of amines by gas chromatography and their applications in environmental analysis, *J. Chromatogr. A*, 733 (1996) 19-34.
- [26] S. Görög, Kémiai reakciók szerepe az analitikai kémiában, *Magyar Kémiai Folyóirat*, 109-110 (2004) 53-59.
- [27] A.H. Agiza, A.M. Smith, Determination of Amino-Acids Colorimetrically by the Ninhydrin Reaction, *East of Scotland College of Agriculture*, Edinburgh, 1951.
- [28] J.V. Castell, M. Cervera, R. Marco, A convenient micromethod for the assay of primary amines and proteins with fluorescamine. A reexamination of the conditions of reaction *Analytical Biochemistry*, 99 (1979) 379-391.

- [29] H.C. Lee, R.E. Gaensslen, *Advances in Fingerprint Technology*, 2 ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, 2001.
- [30] K.A. Holm, Automated Colorimetric Determination Of Acid Pproteinase Aactivity In Fermentation Samples Using A Trinitrobenzenesulfonic Acid Reagent, *Analyst*, 105 (1980) 18-24.
- [31] A. Grotzky, Y. Manaka, S. Fornera, M. Willeke, P. Walde, Quantification of alpha-polylysine: a comparison of four UV/Vis spectrophotometric methods, *Analytical Methods*, 2 (2010) 1448-1455.
- [32] P. Zuman, Reactions of orthophthalaldehyde and related compounds with amino acids, *Analytical Letters*, 38 (2005) 1213-1220.
- [33] Y. Mengerinka, D. Kutlánb, F. Tóthc, A. Csámpaid, I. Molnár-Perl, Advances in the evaluation of the stability and characteristics of the aminoacid and amine derivatives obtained with the o-phthaldialdehyde/3-mercaptopropionic acid and o-phthaldialdehyde/N-acetyl-l-cysteine reagents: High-performance liquid chromatography–mass spectrometry study, *J. Chromatogr. A*, 949 (2002) 99–124.
- [34] J.F. Goodwin, S.-Y. Choi, Quantification of protein solutions with trinitrobenzenesulfonic acid, *Clinical Chemistry* 16 (1970) 24-31.
- [35] G.E. Means, W.I. Congdon, M.L. Bender, Reactions of 2,4,6-trinitrobenzenesulfonate ion with amines and hydroxide ion, *Biochemistry*, 11 (1972) 3564-3571.
- [36] S.L. Snyder, P.Z. Sobocinski, An Improved 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic Acid Method, *Analytical Biochemistry*, 64 (1975) 284-288.
- [37] G. Antoni, R. Presentini, P. Neri, A simple method for the estimation of amino-groups on insoluble matrix beads, *Analytical Biochemistry*, 129 (1982) 60-63.
- [38] K. Satake, T. Okuyama, M. Ohashi, T. Shinoda, The spectrophotometric determination of amine, amino acid and peptide with 2,4,6-trinitrobenzene 1-sulfonic acid, *Journal of Biochemistry*, 47 (1960) 654-660.
- [39] K. Satake, T. Take, A. Matsuo, K. Tazaki, Y. Hiraga, Amino acid analyzer using 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid, *Journal of Biochemistry*, 60 (1966).
- [40] H.H. Brown, A Study of 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic Acid for Automated Amino Acid Chromatography, *Clinical Chemistry*, 14 (1968) 967-978.
- [41] A.J. Kuijpers, G.H.M. Engbers, J. Feijen, S.C. De Smedt, T.K.L. Meyvis, J. Demeester, J. Krijgsveld, S.A.J. Zaat, J. Dankert, Characterization of the network structure of carbodiimide cross-linked gelatin gels, *Macromolecules*, 32 (1999) 3325-3333.

- [42] R.A. Goldfarb, A kinetic study of the reactions of amino acids and peptides with trinitrobenzenesulfonic acid, *Biochemistry*, *Biochemistry*, 5 (1966) 2570–2574.
- [43] P. Cayot, G. Tainturier, The Quantification of Protein Amino Groups by the Trinitrobenzenesulfonic Acid Method: A Reexamination, *Analytical Biochemistry*, 249 (1997) 184-200.
- [44] B. Gyarmati, B. Vajna, Á. Némethy, K. László, A. Szilágyi, (2012 (közlésre elküldve)).
- [45] S. Kemény, A. Deák, Mérések tervezése és eredmények értékelése, Műszaki Könyvkiadó, Budapest, 1993.