

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék



TDK dolgozat

Antitumor Ru(II)-címol-piridinkarbonsav komplexek oldategyensúlyi vizsgálata és kölcsönhatásuk humán szérum albuminnal

Bruszel Bella

III. Kémia BSc

TÉMAVEZETŐK:

Dr. Enyedy Éva Anna

egyetemi adjunktus

Sija Éva Ilona

tudományos segédmunkatárs

Szeged

2012

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK.....	1
1. TARTALMI ÖSSZEFOGLALÓ	2
2. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS	3
2.1. Fémkomplexek szerepe a gyógyászatban, a rákellenes terápiában	3
2.2. [Ru(II)- η^6 - <i>p</i> -cimol], mint „fém-ion” és ligandumok bemutatása	6
2.2.1. [Ru(II)- η^6 - <i>p</i> -cimol] hidrolízisének folyamatai	6
2.2.2. Ligandumok és komplexeik rövid bemutatása.....	9
2.2.3. A humán szérum albumin rövid bemutatása.....	9
3. CÉLKITŰZÉS	10
4. KÍSÉRLETI RÉSZ.....	11
4.1. Felhasznált vegyszerek	11
4.2. pH-potenciometriás mérések: elvi alapok és körülmények	11
4.3. UV-látható spektrofotometria	14
4.4. ^1H Mágneses magrezonancia spektroszkópia (^1H NMR).....	15
4.5. Spektrofluorimetriás mérések.	16
5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTELMEZÉSÜK	17
5.1. [Ru(II)- η^6 - <i>p</i> -cimol] hidrolízisének vizsgálatai	17
5.2. A ligandumok sav-bázis és spektrális változásai	19
5.3. [Ru(II)- η^6 - <i>p</i> -cimol]-pikolinsav rendszer komplexképződési folyamatainak vizsgálata kloridmentes közegben	21
5.4. [Ru(II)- η^6 - <i>p</i> -cimol]-pikolinsav és [Ru(II)- η^6 - <i>p</i> -cimol]-6-metil-pikolinsav rendszerek komplexképződési folyamatainak vizsgálata klorid-tartalmú közegben ...	25
5.5. [Ru(II)- η^6 - <i>p</i> -cimol] és [Ru(II)- η^6 - <i>p</i> -cimol]-pikolinsav kölcsönhatása humán szérum albuminnal	31
6. ÖSSZEFOGLALÁS	35
7. IRODALOMJEGYZÉK	36
8. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS	38

1. TARTALMI ÖSSZEFOGLALÓ

Az elmúlt évtizedekben a daganatos betegségek gyógyítására irányuló kutatásokban egyre nagyobb figyelmet kapnak az átmenetifémek komplexei. Napjainkban számos kutatás irányul olyan fémkomplexek kifejlesztésére, melyek citotoxikus hatása specifikus a rákos sejtekre. Ígéretes kutatások folynak fémorganikus ruténium(III/II) vegyületekkel is, melyek közül több vegyületnek klinikai tesztelése is folyik. Munkánk során a $[\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol(X)}_3]$ ($\text{X: H}_2\text{O/ Cl}^-$) (O,N) piridinkarbonsav típusú ligandumokkal (pikolinsav és 6-metil-pikolinsav) való kölcsönhatását vizsgáltuk oldategyensúlyi módszerekkel, pH-potenciometriás, UV-látható spektrofotometriás és ^1H NMR mérésekkel vizes közegben.

Mivel egy bioaktív fémkomplex farmakokinetikai jellemzéséhez hozzátartozik a vér transzportfehérjéivel való kölcsönhatásának leírása is, vizsgáltuk a $[\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}]$ és pikolinsav komplexének humán szérum albuminhoz való kötődését, mely folyamatot spektrofotometriánál követtünk. $[\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}]$ -pikolinsav rendszer esetén kloridmentes közegben megállapítottuk, hogy csak $[\text{MLX}]$ ($\text{X}=\text{H}_2\text{O}, \text{OH}^-, \text{Cl}^-$) komplexek képződnek és ez a komplexképződés már pH 2 alatt is jelentős. Ezért az $[\text{ML}]^+$ részecske stabilitási szorzatát spektrofotometriánál határoztuk meg pH 0,8-2 tartományban. pH 2-11,5 között a $\text{Ru(II)}(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})$ -pikolinsav komplex nem disszociál. Kloridos közegben is hasonló eredményeket kaptunk, a számolt állandók alapján megállapítottuk, hogy az oldatban lévő kloridion kis mértékben visszaszorítja a pikolinsav $[\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}]$ -hoz való koordinálódását, de a komplex pH 2-11,5 tartományban ennek ellenére sem disszociál. A $[\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}]$ -6-metil-pikolinsav rendszert kloridos közegben vizsgáltuk és megállapítottuk, hogy a speciáció hasonló a pikolinsavas rendszerhez. Valószínű a komplex kisebb stabilitása az oka annak, hogy pH 10 felett látjuk a szabad ligandum, illetve fém megjelenését, azaz a komplex disszociál. A fehérjekölcsönhatásra vonatkozó méréseink alapján megállapítottuk, hogy a pikolinsav jelenléte jelentősen gátolja a $[\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}]$ transzportfehérjén való megkötődését, valamint a $[\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}]$ fehérjéhez való kötődése gátolja az I. és II. kötőhelyeken a warfarin és danzil-glicin megkötődését.

Kulcsszavak: rákellenes fémkomplexek, oldategyensúly, ruténium-arén komplexek, fehérje kölcsönhatás, HSA

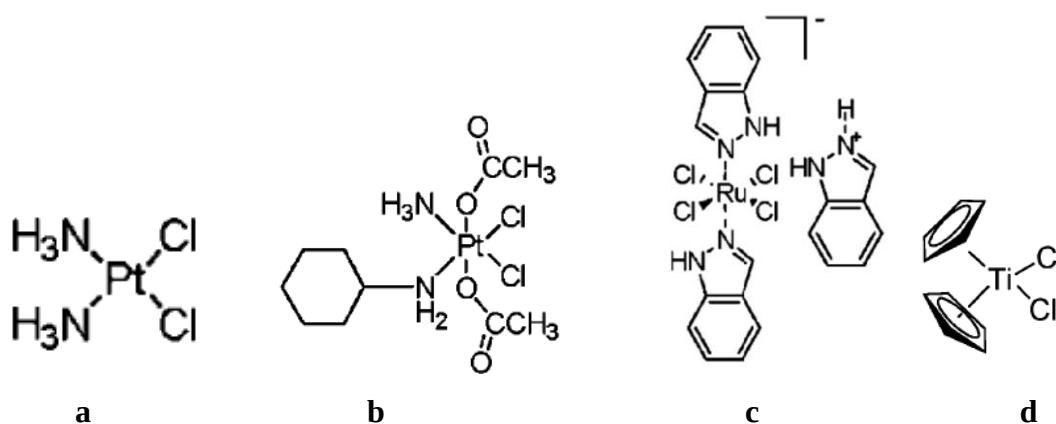
2. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Fémkomplexek szerepe a gyógyászatban, a rákellenes terápiában

A ma használt gyógyszerek túlnyomó többsége szerves vegyület és a fémtartalmú gyógyszerek jelentőségét alulértékelik. Pedig számos fémtartalmú gyógyszert használnak terápiás célokra. Ezek közül talán a legfontosabb a platina-tartalmú rákellenes készítmények, de sok egyéb betegség, például a szifilisz és a fekély gyógyítására is fémionokat tartalmazó gyógyszert használnak.

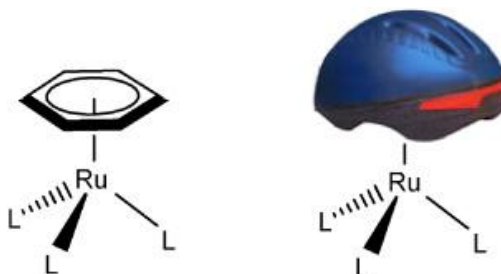
Az első fémtartalmú szerek só formájában tartalmaztak fémeket. Ilyen például a Li_2CO_3 , mániás depresszió ellen, valamint az AgNO_3 és egyéb higany sók oldata, amit fertőtlenítésre használnak [1]. Rákellenes terápiában fémkomplexeket is alkalmaznak. Ezek közül a legelterjedtebb a ciszplatín (1978, 1. ábra) a karboplatin (1993) és az oxaliplatin (2002), satraplatin (1. ábra) [2,3]. Ezeken kívül a heptaplatin csak Japánban és Dél-Koreában jóváhagyott kemoterápiás szer [4]. Azonban ezek a platínakomplex vegyületek nem rendelkeznek kellő szelektivitással, valamint egyes kutatások szerint nem halmozódnak fel kellőképp a tumorsejtekben (a bevitt komplex csupán 1%-a van a DNS-hez kötve), ami súlyos mellékhatásokat eredményez: hányást, hasmenést és az immunrendszer legyengülését. Ezeken felül a rákos sejt rezisztenssé válhat, vagy eleve az volt a platina-vegyületekre, ami nagyban gátolja a terápia eredményességét [5].

Ezen indokok miatt fontossá vált, hogy a platina-tartalmú terápiás szereket más fémtartalmú készítményekkel váltsák fel (1. ábra). Hogy kiküszöböljék a nemkívánatos mellékhatásokat, más hatásmechanizmusú, másfajta fémek, például ruténium, gallium, titán komplexei felé fordultak, amik kisebb toxicitást és nagyobb szelektivitást mutatnak.



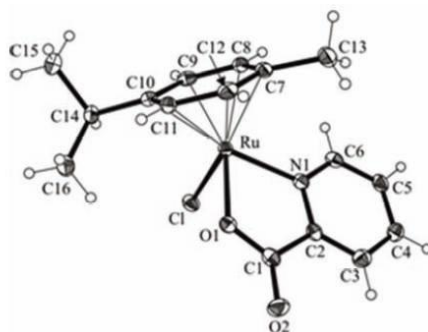
1. ábra: A gyógyászatban használt néhány fémkomplex szerkezeti képlete
(a: ciszplatín, b: satraplatin, c: KP1019 Ru(III)-komplex, d: titanocén-diklorid)

A Ru(III)-komplexek közül kettő (indazólium transz[tetraklorido(bisz(1H-indazol)rutenát(III)], KP1019 (1. ábra) és imidazólium transz[tetraklorido(dimetilszulfoxid)(1H imidazol)rutenát(III)], NAMI-A) már sikeresen túljutott klinikai fázis I vizsgálatokon [5-8]. A hatásmechanizmusa alapján pl. a KP1019 a véráramba kerülésekor döntően a humán szérum albuminhoz kötődik ideiglenesen, majd a feltételezések szerint a transferrinhez kötődve a transferrin receptorok segítségével jut be a sejtbe, ahol Ru(II)-vé redukálódik [9, 10]. Ez az aktiváció fontos lépése. Emiatt merült fel, hogy alkalmas lehet, ha Ru(II)-komplexet juttatunk közvetlenül a szervezetbe. Mivel ez az állapot oxidációra hajlamos, ezért stabilizálni kellett a +2-es oxidációs állapotban. Ezt arén típusú vegyületekkel (pl. benzol, cimol, toluol) érték el, ami egy félszendvics szerkezetű molekulát eredményezett (2. ábra) [11].



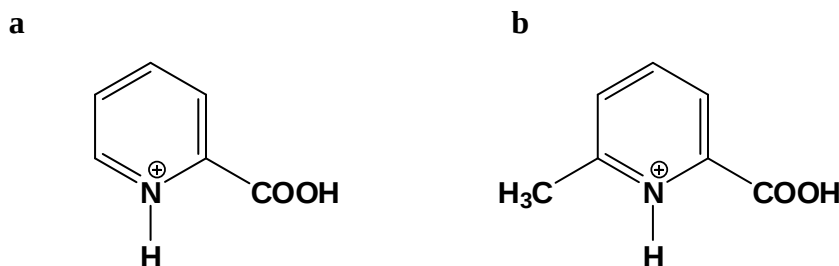
2. ábra: A félszendvics szerkezetű Ru(II)-arén vegyületekben az arén védi a fémiont az oxidációtól [11]

Ebben az esetben az arén stabilizálja a ruténiumot az adott oxidációs állapotban, oly módon, hogy három koordinációs helyet szabadon hagy „zongoraszék” típusú geometriában. Az arén vegyületeknek nem csupán stabilizáló szerepük van: hidrofíl tulajdonságot is biztosít a komplexnek, ami segítheti a sejtbe való bejutást, valamint kinetikailag labilisabbá teszi a ligandumszubsztitúciót. A maradék három koordinációs helyre kötődő ligandumok erősen befolyásolják a komplex stabilitását és a biológiai hatását is. Az eddigi legígéretesebb megoldás, ha a Ru(II) kettő koordinációs helyét egy kétfogú, például (O,O), (O,S), (O,N), (N,N) donoratomokat tartalmazó ligandum foglalja el [12-14]. Ezek közül jelentős biológiai aktivitása a (O,N) donoratomos ligandumot (pl. pikolinsavat) tartalmazó komplexnek van: közepes aktivitású, és az (O,O) donoratomú ligandumot (pl. maltol) tartalmazó komplexnél nagyobb citotoxicitású [15, 16]. A harmadik koordinációs helyet egy könnyen távozó csoportként gyakran egy halogenid (pl. klorid) foglalja el, ami oldatban vízre cserélődhet, részben vagy teljesen. A pikolinsavat tartalmazó komplex szerkezete szilárd formában is ismert (3. ábra) [15].



3. ábra: Ru(II)- η^6 -*p*-cimol-pikolinát komplex röntgen diffrakciós szerkezete [15]

Fontos a komplex szerkezetének fiziológias pH-n vizes oldatban való ismerete a biológiai mechanizmus, illetve az aktivitás tanulmányozása miatt. Ezért vizsgáltuk a pikolinsav [Ru(II)- η^6 -*p*-cimol] komplexét kloridos, illetve kloridmentes közegben a ligandum 6-metil származékának bevonásával (4. ábra).



4. ábra: Pikolinsav (**a.**) és 6-metil-pikolinsav (**b.**) szerkezete a teljesen protonált formákban

A platina tartalmú szerek a legelfogadottabb elmélet szerint a DNS-hez kötődnek, így fejtik ki sejtosztódást gátló és sejthalát okozó hatásukat. Míg a ruténium(III/II)-tartalmú fémorganikus vegyületek az előzetes feltevésekkel ellentétben nem a DNS-hez kötődnek, hanem minden valószínűség szerint a replikációt és a transzkripciót segítő fehérjéket támadják [17,18]. A ruténium komplexek alkalmazásának a Pt-vegyületektől eltérő feltételezett mechanizmus alapján előnye lehet, hogy a ciszplatinra rezisztens sejtek esetében is sokszor hatásosak.

Az eddigi kutatási eredmények azt mutatták, hogy a [Ru(II)- η^6 -*p*-cimol] etiléndiaminnal képzett komplexe kötődhet a vérben legnagyobb koncentrációban előforduló transzportfehérjéhez, a humán szérum albuminhoz (HSA) [19], felmerül a kérdés, hogy az általunk vizsgált komplexeknek milyen a kölcsönhatása a vér legfontosabb szállító fehérjéivel (HSA, transferrin)

2.2. [Ru(II)- η^6 -*p*-cimol], mint „fém-ion” és ligandumok bemutatása

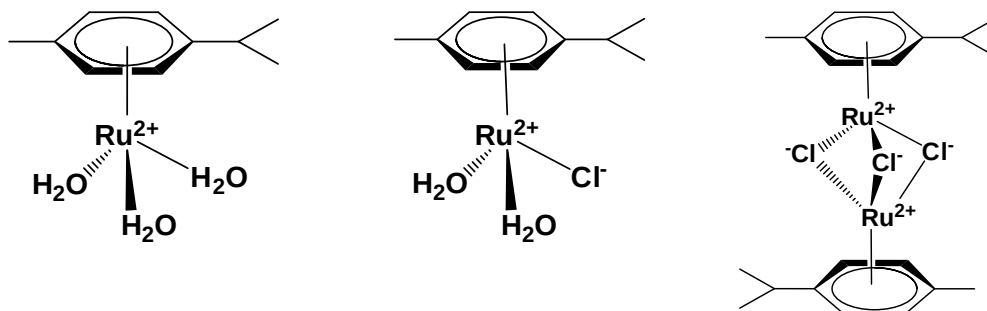
2.2.1. [Ru(II)- η^6 -*p*-cimol] hidrolízisének folyamatai

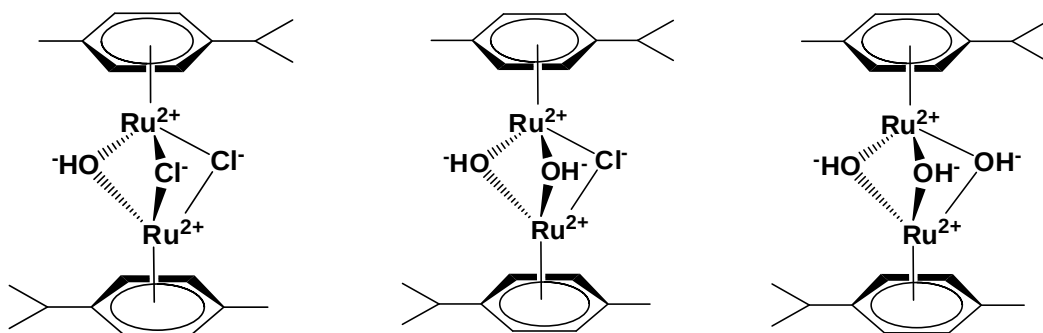
$[\text{Ru(II)-}\eta^6\text{-}p\text{-cimol(X)}_3]^{n+}$ ($\text{X} = \text{H}_2\text{O}, \text{Cl}^-$; $n = -1 \rightarrow +2$; a töltés feltüntetését a későbbiekben elhanyagoljuk az egyszerűség kedvéért) fémorganikus vegyületet a $[\text{Ru(II)}_2(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})_2\text{Cl}_2]\text{Cl}_2$ dimer komplex vízben való oldásával nyerhetjük. Az oldódás folyamán, a kloridok, az oldat klorid-tartalmától függően részben, vagy teljesen vízre cserélődnek. Ezt a folyamatot Buglyó P. és munkatársai már részletesen vizsgálták klorid- és kloridmentes közegben [20]. Kloridmentes rendszer esetén pH 3-ig három vízmolekula foglalja el a $[\text{Ru(II)-}\eta^6\text{-}p\text{-cimol}]$ szabad koordinációs helyeit, majd pH 3 felett elindul az akva-komplex hidrolízise. pH 5 felett már a $[(\text{Ru(II)-}\eta^6\text{-}p\text{-cimol})_2(\text{OH})_3]^+$ komplex a domináns részecske (5. ábra).



5. ábra: $[\text{Ru(II)-}\eta^6\text{-}p\text{-cimol(H}_2\text{O)}_3]^{2+}$ és $[(\text{Ru(II)-}\eta^6\text{-}p\text{-cimol})_2(\text{OH})_3]^+$ komplexek szerkezeti képlete (klorid-mentes vizes közegben megjelenő formák) [15]

Kloridionokat tartalmazó oldatban a rendszer egyensúlyi folyamatai bonyolultabb képet mutatnak. A kloridion képes versengeni a vízmolekulákkal a koordinációs helyekért, így többféle részecske alakul ki, amiket a 6. ábrán tüntettünk fel. A koordinálódó kloridionok kismértékben képesek visszaszorítani a $[\text{Ru(II)-}\eta^6\text{-}p\text{-cimol(X)}_3]$ ($\text{X} = \text{H}_2\text{O}$ vagy Cl^-) hidrolízisét. Az azonosított részecskék szerkezetét és azok irodalomban közölt stabilitási állandóit a 6. ábra és a 1. Táblázat foglalja össze.





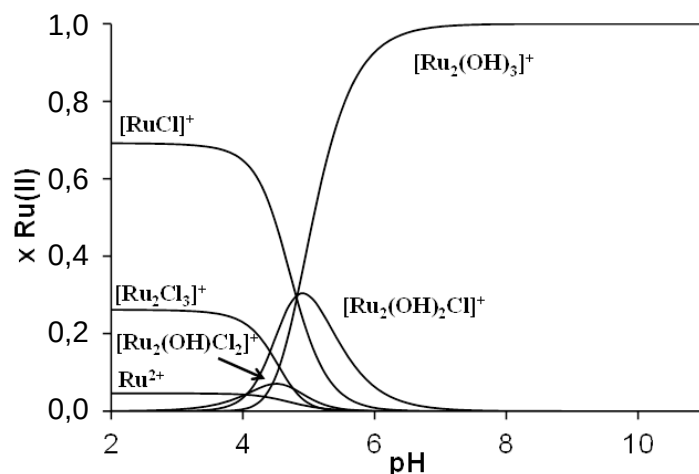
6. ábra: Kloridion-tartalmú vizes közegben jelenlévő, ill. megjelenhető [Ru(II)- η^6 -*p*-cimol]-komplexek szerkezeti képlete [15]

1. Táblázat: Kloridion-tartalmú vizes oldatban beazonosított [Ru(II)- η^6 -*p*-cimol] komplexek összetétele és stabilitási szorzatai [15]

Azonosított komplexek	$\lg\beta$
$[\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$	-
$[\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimolCl}(\text{H}_2\text{O})_2]^+$	1,82(1) ^a
	1,88(5) ^b
	1,9(1) ^c
$[\{\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}\}_2(\mu^2\text{-Cl})_3]^+$	6,60(4) ^a
	6,8(1) ^c
$[\{\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}\}_2(\mu^2\text{-OH})(\mu^2\text{-Cl})_2]^+$	1,14(6) ^a
$[\{\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}\}_2(\mu^2\text{-OH})2(\mu^2\text{-Cl})]^+$	-3,63(2) ^a
$[\{\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}\}_2(\mu^2\text{-OH})_3]^+$	-9,16(1) ^a

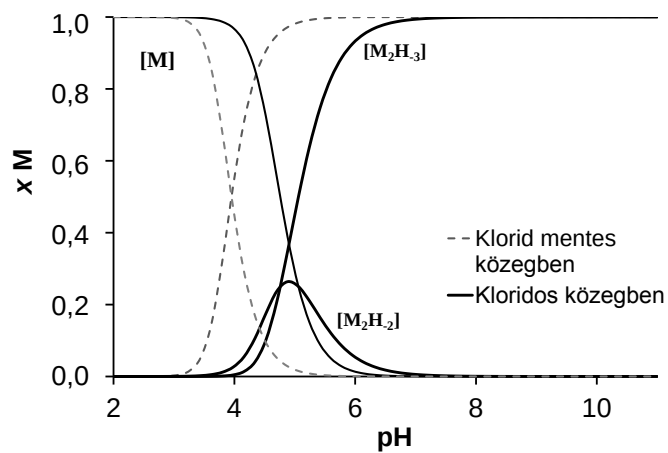
^a pH-potenciometria, ^b UV-látható spektrofotometria, ^c ¹H NMR mérésekkel meghatározott stabilitási szorzatok

A kloro- és hidroxó-komplexekre vonatkozó irodalmi adatok alapján 0,2 M KCl-ot tartalmazó oldatra számolt koncentrációeloszlási diagramot a 7. ábra mutatja.



7. ábra: $[\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}]$ koncentrációeloszlási diagramja 0,2 M KCl tartalmú vizes oldatban. ($c_M = 2,0 \times 10^{-3}$ M, $t = 25$ °C) [20]

A bonyolult kép ellenére a kloridos közegben mért rendszerek viselkedése a korábban használt 2009-es modellel is jó közelítéssel leírható [21], (8. ábra), amely nem feltételezte a kloro-komplexek jelenlétét, hanem csak háromféle részecskét vettek be a modellbe ($M = [(\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol})]$; M_2H_2 : $[(\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol})_2(\text{OH})_2]$ és M_2H_3 : $[(\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol})_2(\text{OH})_3]$). A kloridiont tartalmazó rendszerek kiértékelésénél mi is ezt az egyszerűsített modellt használtuk a fémion hidrolízisének a leírására.



8. ábra: $[\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}]$ koncentrációeloszlási diagramja vízben (szaggatott vonal, $I = 0,2$ M KNO_3) és az egyszerűsített modellt alapul véve 0,2 M KCl tartalmú vizes közegben (folytonos vonal) ($c_M = 2,0 \times 10^{-3}$ M, $t = 25$ °C)

2.2.2. Ligandumok és komplexeik rövid bemutatása

A pikolinsav és 6-metil származéknak biológiai hatásáról és komplexképző tulajdonságáról már számtalan irodalmi tanulmányban írnak [15]. Maga a pikolinsav önmagában nem citotoxikus, gyógyászati céllal több fémkomplexét is kipróbálták. Vanádium és cinkkomplexét, mint potenciális antidiabetikus hatású komplexet tesztelték már [22]. [Ru(II)- η^6 -p-cimol]-komplexe, melynek röntgen szerkezetét az irodalmi bevezetőben már bemutattuk (3. ábra), rákellenes aktivitást mutat [12]. Vizsgálták a komplex biológiai aktivitását Hela (human cervix carcinoma = méhnyakrák) és FemX (melanoma) rákos sejtvonalakon [15]. A meghatározott IC_{50} értékek (azaz az a koncentráció, melynél 50 százalékos sejthalál következik be) (IC_{50} = 81,97 μ M HeLa és 36,23 μ M FemX sejtvonalon) közepes aktivitást mutatnak [15].

A pikolinsav és 6-metil származékának sav-bázis és spektrális tulajdonságait az 5.2. fejezetben a kísérleti eredmények tárgyalásánál mutatjuk be, szerkezetüket a 4. ábra mutatja.

2.2.3. A humán szérum albumin rövid bemutatása

A humán szérum albumin (HSA) az emlősök szervezetében a legnagyobb koncentrációban megtalálható szérumfehérje (c ~630 μ M). Széleskörű funkciója van, pl. vér pH pufferelése, ozmózisnyomás biztosítása az érpályában, különböző szervetlen ionok és szerves molekulák szállítása. A HSA egyetlen globuláris molekula. Szerkezetileg három egységre (doménre) osztható, ezek az I-es, II-es és III-as egység. A molekula egyetlen Trp214 aminosavat tartalmaz az úgynevezett I. kötőhelyen, és ha ennek az aminosavnak a környezetében megkötődik egy vegyület, akkor egyértelmű intenzitáscsökkenést mérhetünk [23]. A [Ru(II)- η^6 -p-cimol] kötődését HSA-on kötőhely markerek, warfarin (I. kötőhely), danzil-glicin (II. kötőhely) segítségével vizsgáltuk. Ezeknek az anyagoknak önállóan kicsi az emissziós intenzitása, de abban az esetben, ha a fehérjéhez kötődnek sokszorosára nő az intenzitás. Így, ha egy vegyület gátolja a kötőhely marker megkötődését (pl. mert ugyanazon a helyen kötődik a fehérjéhez), akkor azt egyértelmű intenzitáscsökkenés kíséri. Ezeken a kötőhelyeken kívül a molekulában számos His imidazol-N, Met-S ill. Cys34 tiol-S is van, ami potenciális donoratomok, melyhez koordinálódhat a [Ru(II)- η^6 -p-cimol].

3. CÉLKITŰZÉS

Munkánk célja, hogy a potenciálisan rákellenes hatású $[\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}]\text{-pikolinsav}$ komplexegyensúlyait jellemezzük hagyományos oldategyensúlyi- és szerkezetvizsgáló módszerekkel, kloridos- és kloridion-mentes vizes oldatokban. Tanulmányozzuk a komplexképződés folyamatát a pikolinsav 6-metil származékával is kloridos közegben, hogy megtudjuk, hogy a ligandumon lévő metil-csoport jelenléte milyen hatással van a képződő komplexek stabilitására. Továbbá, információt szeretnénk nyerni arról, hogy maga a $[\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}]$ illetve pikolinsavval alkotott komplexe képes-e megkötődni a humán szérum albumin transzport fehérjén.

Ezért vizsgáljuk:

- a ligandumok deprotonálódási folyamatait pH-potenciometriás, UV-látható spektrofotometriás és ^1H NMR mérések segítségével (részben az irodalmi eredmények reprodukálása céljából);
- $\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}$ hidrolízis folyamatait pH-potenciometriás, UV-látható spektrofotometriás és ^1H NMR mérések segítségével KCl vagy KNO_3 ionerősséget állító só jelenlétében (részben az irodalmi eredmények reprodukálása céljából);
- a pikolinsav és 6-metil-pikolinsav $[\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}]$ -al képzett komplexeinek sztöchiometriáját és stabilitását pH-potenciometriás, UV-látható spektrofotometriás és ^1H NMR módszerekkel klorid jelenlétében és a kloridion-mentes közegben;
- valamint fiziológias pH-n (pH 7,4) vizsgáljuk a $[\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}]$ és $[\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol-pikolinát}]$ humán szérum albuminnal való kölcsönhatását spektrofluorimetriás mérésekkel.

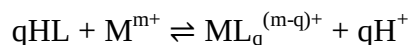
4. KÍSÉRLETI RÉSZ

4.1. Felhasznált vegyszerek

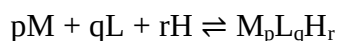
A pikolinsavat (pic), 6-metil-pikolinsavat (6-Mepic), racém warfarint (WF), danzilglicint (DG), human szérum albumint (HSA) (zsírsavat tartalmazó A1653), KCl-ot, KNO₃-t, AgNO₃-ot, HCl-ot, HNO₃-ot, KOH-ot, NaH₂PO₄-ot, Na₂HPO₄-ot és NaCl-ot a Sigma-Aldrichtől szereztük be. Az anyagokat további tisztítás nélkül használtuk fel. A ligandum oldatok pontos koncentrációját pH-potenciometriás mérésekkel határoztuk meg, a mérési eredményeket a HYPERQUAD nevű programmal értékeltük ki [24]. A [Ru(II)-η⁶-*p*-cimolCl₂]₂ komplexet Prof. Bernhard K. Keppler (Bécsi Egyetem, Szervetlen Kémiai Intézet) kutatócsoportjából kaptuk. A törzsoldatokat ismert mennyiségű [Ru(II)-η⁶-*p*-cimol] dimer vízben való feloldásával készítettük. A kloridmentesítés során ekvivalens mennyiségű AgNO₃-ot adtunk az oldathoz, majd leszűrtük, eltávolítva az oldatból a kivált AgCl csapadékot. A [Ru(II)-η⁶-*p*-cimol] oldatok pontos koncentrációját pH-potenciometria segítségével határoztuk meg alkalmazva a [Ru(II)-η⁶-*p*-cimol]-hidroxo komplexekre megadott irodalmi értékeket mind a kloridos, mind a kloridmentes közeg esetén [20, 21]. HSA oldatot minden mérés előtt frissen készítettünk, koncentrációját UV spektruma alapján határoztuk meg $\varepsilon_{280 \text{ nm}}(\text{HSA}) = 36850 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [25]. A WF és a DG oldatokat a mérések előtt egy ekvivalens NaOH hozzáadásával készítettük, koncentrációjukat UV-látható spektrofotometriás mérésekkel határoztuk meg: $\varepsilon_{308 \text{ nm}}(\text{WF}) = 14475 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\varepsilon_{327 \text{ nm}}(\text{DG}) = 5068 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [26].

4.2. pH-potenciometriás mérések: elvi alapok kísérleti körülmények

A pH-potenciometria alkalmazására az ad lehetőséget, hogy a fémion-ligandum kölcsönhatás befolyásolja a H⁺ - ligandum kölcsönhatást, azaz kompetitív reakció játszódik le a H⁺ és a központi fémion között. Így a H⁺-koncentrációjának méréséből következtetni lehet a képződő komplex stabilitására. A folyamat az alábbi egyenlettel írható le:



A továbbiakban a töltéseket az egyszerűbb áttekinthetőség érdekében elhanyagoljuk. Fémion (M), teljesen deprotonált ligandumot (L) és protont (H) tartalmazó rendszerek esetében az egyensúlyi egyenletek a következőképpen írhatók fel:



Ezen egyenletek alapján a stabilitási szorzat:

$$\beta_{pqr} = \frac{[M_p L_q H_r]}{[M]^p [L]^q [H]^r}$$

A potenciometriás mérések során az elektrolit oldatba merülő elektród felületén kialakuló elektródpotenciált mérjük. A Nernst-egyenlet teremt kapcsolatot a potenciál ($E_{\text{elméleti}}$), valamint az azt létrehozó elektródaktív komponens koncentrációja között, amely a pH-metriás mérések esetén nem más, mint a H^+ -ionok aktivitása:

$$E_{\text{elméleti}} = E^0 + (RT/nF) \times \ln a(H^+)$$

melyben:

E^0 - a rendszer standardpotenciálja; R - az egyetemes gázállandó (8,314 J/mol K)

T - a hőmérséklet (K); n - az elektronszám változása az elektródfolyamatban

F - Faraday állandó (96487 C/mol)

Potenciometriás titrálások során a mérőoldat fogyásának függvényében mérjük az elektródpotenciál változását, melyet az alábbi egyenlet ír le:

$$E_{\text{számolt}} = E' - m_E \times \text{pH}$$

melyben:

E' : formális standard elektródpotenciál, mely figyelembe veszi a referencia elektród potenciálját, a diffúziós potenciált és az oldat aktuális közepes aktivitási együtthatóját

m_E : az aktuális meredekség; $m_E = 2,303 \times RT/zF$.

Annak érdekében, hogy a mért elektródpotenciálból pH-t tudjunk számolni, egy adott mérőrendszer esetén meg kell határozni a Nernst-egyenletben szereplő egyéb paramétereket, azaz a mérőrendszert kalibrálni kell. A mérőrendszer kalibrálása erős sav-erős bázis titrálással történt. A titrálási görbéket Gran-módszerrel [27] értékeltük ki. A módszer alkalmas a titrált és titráló oldatok pontos koncentrációjának meghatározására minden olyan rendszerben, ahol érvényes a Nernst-egyenlet. A módszer alapja, hogy az egyes titrálási pontokban érvényes egyensúlyi koncentrációk kiszámításához használt összefüggéseket úgy transzformáljuk, hogy lineáris regresszióval kiszámítható legyen minden szükséges adat. A mért pH értékeket úgy alakítjuk át, hogy a transzformált adatokat a titráló oldat térfogatának függvényében ábrázolva az x-tengelyt az ekvivalencia pontban metsző egyenest kapjunk. Az oldatok koncentrációi és a fogyás ismeretében a pH számítható az erős sav-erős bázis titrálás minden olyan pontjában, ahol a víz autodisszociációja elhanyagolható és az erős sav még feleslegben van. Az így számított pH érték és a mért pH érték azonban nem azonos.

A kétféle pH érték egy állandó értékkel tér el egymástól, amit Irving-faktornak (IRV) nevezünk [28].

$$IRV = pH_{\text{mért}} - pH_{\text{számított}}$$

Az ekvivalenciapont után a titrált és titráló oldatok pontos koncentrációiból az oldatok pOH értéke kiszámítható, valamint az Irving-faktorról korrigált pH értékek. Így a lúgos tartományban mért adatpárok alkalmasak a vízionszorzat tízes alapú negatív logaritmusának, pK_w számítására a következő képlet alapján:

$$pK_w = -\lg([H^+] \times [OH^-]) = p[H^+] + p[OH^-] = (pH_{\text{mért}} - IRV) - \lg[OH^-]$$

A ligandumok protonálódási állandóit és a fémkomplexek stabilitási állandóit pH-potenciometriás titrálásokkal határoztuk meg 25 °C±0,1-on vizes oldatban 0,20 M KCl vagy 0,20 M KNO₃ ionerősség mellett. A titrálásokat ismert koncentrációjú (0,20 M) karbonátmentes KOH mérőoldattal végeztük. A HCl, HNO₃, KOH oldatok pontos koncentrációját pH-potenciometriás titrálásokkal határoztuk meg. A mérésekhez kombinált elektróddal (6.0234.100 típusú) felszerelt Orion 710A pH-mérőt és Methrom 665 Dosimat automata bürettát használtunk. A mérőrendszert erős sav-erős bázis (HCl/HNO₃-KOH) titrálásokra kalibráltuk. Az átlagos vízionszorzat (pK_w) értékére 13,76 ± 0,01 értéket kaptunk, ami jól egyezik az irodalmi értékekkel [29]. A méréseket pH 2,0-11,5 tartományban végeztük 10,00 cm³-es kiindulási térfogatban állandó kevertetés és argon gáz buborékolatás mellett. A titrálások során 2 mM-os ligandumkoncentráció mellett a fém-ligandum arány 1:1-1:4 volt.

A képződő komplexek összetételének és stabilitási szorzatainak meghatározásához a PSEQUAD nevű programot használtuk [30]. Az értékelések során komponensként szerepeltek: a fémion (M, azaz [Ru(II)-η⁶-p-cimol(X)₃] (X = H₂O, Cl⁻); , a proton (H) és a teljesen deprotonált ligandum (L). A programban bemenő adatként a komponenseken kívül szerepelnek természetesen a mintához adott mérőoldat térfogat-pH kísérleti adatpárok, az asszociátumok (protonált ligandum, fém-ligandum-komplexek és hidroxó-komplexek) száma, az asszociátumok összetétele, a komponensek kiindulási teljes koncentrációja, az ismert és az ismeretlen (közelítő) stabilitási szorzatok és különböző állandók, pl. titrálóoldat koncentrációja, vízionszorzat, Irving-féle korrekciós tényező. A program a keresett stabilitási szorzatokat az M, L és H komponensekre felírt anyagmérlegegyenletek megoldásával adja, ahol n a rendszerben képződő asszociátumok számát, p, q, r pedig a sztöchiometriai együtthatókat jelöli.

$$c_M = [M] + \sum_{i=1}^n p_i \beta_{p_i q_i r_i} [M]^{p_i} [L]^{q_i} [H]^{r_i}$$

$$c_L = [L] + \sum_{i=1}^n q_i \beta_{p_i q_i r_i} [M]^{p_i} [L]^{q_i} [H]^{r_i}$$

$$c_H = [H] + \sum_{i=1}^n r_i \beta_{p_i q_i r_i} [M]^{p_i} [L]^{q_i} [H]^{r_i}$$

A program az általunk feltételezett asszociátumok és közelítő stabilitási szorzatok figyelembevételével, Newton-Raphson iterációval végzi a közelítést egészen addig, amíg a titráló oldatra nézve a $(V_{\text{mért}} - V_{\text{számolt}})^2$ értéke minimumot ad, ahol V a titráló oldat térfogata. A program minden megadott pH-értéknél kiszámolja a képződő részecskék egyensúlyi koncentrációját és az adott pontokhoz tartozó standard deviációk értékét. Az iteráció sorozat végén megkapjuk a finomított stabilitási szorzatokat, a kísérleti és számított titrálási görbék pontjaihoz tartozó illesztési paramétert. A koncentráció eloszlási görbék számolása a komplexek összetételének, stabilitási állandójának és a komponensek teljes koncentrációjának ismeretében a MEDUSA nevű program segítségével történt [31].

4.3. UV-látható spektrofotometria

Spektrofotometriásan mérhetők azok az anyagok, amelyek az adott spektrumtartományban fényt nyelnek el, tehát kromofórok. Az UV (200-400 nm) és a látható fény (400-800 nm) tartományában a fényabszorpció a molekula vagy az atom elektroneloszlását változtatja meg. Az elektronok a gerjesztés hatására a kisebb energiájú elektronpályákról a nagyobb energiájúakra kerülnek. Az UV-látható színek tartomány abszorpciós sávjai nagyon szélesek, ezért minőségi analitikai alkalmazásuk korlátozott, viszont a kvantitatív analitika egyik legszélesebb körben használt módszere. A koncentrációmérés alapjául a Lambert-Beer törvény szolgál: $A = \varepsilon \times l \times c$ ahol, A : mért abszorbanancia; ε : moláris abszorbanancia [$\text{mol}^{-1} \text{M}^{-1}$]; l : úthossz [cm], c : koncentráció [M]. A törvény csak híg oldatokra érvényes, mely a spektrofotometria egyik előnye a kis anyagigény miatt.

A spektrofotometriás méréseket $25,0 \pm 0,2$ °C-on, állandó ionerősség mellett (0,2 M KCl vagy KNO_3) és 200-820 nm hullámhossztartományban végeztük egy Hewlett-Packard 8452A diódasoros spektrofotométeren. A kuvetta úthossza 1 cm volt. A karbonátmentesség érdekében nagy tisztaságú argongázt buborékolattunk át az oldatokon. A titrálásokhoz ismert koncentrációjú (0,2 M) karbonátmentes KOH oldatot használtunk.

A spektrofotometriás titrálásokat különböző összetételű, csak ligandumot, illetve különböző fém-ligandum arányt tartalmazó minták esetén végeztünk. A ligandumkoncentrációt 0,12 mM-ra állítottuk be, a fém ligandum arány 1:1 és 1:2 volt. Készültek egyedi minták is pH 1,0-2,0 tartományban 0,2 M ionerősség mellett. Az egyedi mintákban a KCl (ill. KNO_3) tartalmat fokozatosan HCl-ra (ill. HNO_3 -ra) cserélve változtattuk a pH-t, amelynek értékét az egyedi minták erős sav tartalma alapján számoltuk.

4.4. ^1H Mágneses magrezonancia spektroszkópia (^1H NMR)

Az NMR spektroszkópia az egyik leghatékonyabb szerkezetvizsgáló módszer, mellyel a mágneses atommagok azonosíthatók. A módszer a zérustól eltérő magspinnel rendelkező elemek, illetve vegyületek azonosítására alkalmazható. Az eljárás a mágneses mag és a külső mágneses tér közötti kölcsönhatáson alapul. A magok mágneses momentuma a külső mágneses tér irányába áll be, és mint tengely körül kering. A külső mágneses tér hatására a mag energiája $2I+1$ energianívóra hasad fel, amelyek közötti energiakülönbség arányosan nő a külső mágneses térrel. Az energianívók között megfelelő mágneses sugárzással átmenetek hozhatók létre. Az átmenet létrejöttéhez adott frekvenciájú sugárzás szükséges. Ennek következtében az eljárásnak rezonancia jellege van. Az atommagot körülvevő elektronfelhőben a külső mágneses tér diamágnességet indukál, amely megváltoztatja a külső mágneses tér értékét a mag helyén, ezáltal árnyékoló hatást fejt ki. Ez minden atomnál más és más rezonanciafrekvenciánál jelenik meg. A kémiai környezet ilyen jellegű befolyásoló hatását kémiai eltolódásnak (δ) nevezzük. A kémiai eltolódás információt ad a kémiai szerkezetről. A kémiai eltolódáson a mag saját rezonanciafrekvenciája és egy referenciaként választott anyag (pl. tetrametil-szilán (TMS), 4,4-dimetil-4-szilapentán-1-szulfonsav (DSS)) rezonanciafrekvenciájának a különbségét értjük. A jelek intenzitása arányos az értük felelős magok számával, tehát meghatározható a különböző kémiai környezetben előforduló azonos magok relatív száma is. A szomszédos magok spinjei kölcsönhatnak egymással, melynek következtében az egyes magok jelei felhasadnak. A jelfelhasadás miatt a mag NMR-jele nem egy szingulett, hanem egy jelcsoport, valamilyen multipliett lesz. A multipliett jelei közti távolságot, Hz-ben kifejezve, csatolási állandónak nevezzük.

A méréseinket Bruker Ultrashield 500 Plus készüléken végeztük. Referenciaanyagként 4,4-dimetil-4-szilapentán-1-szulfonsavat (DSS) alkalmaztunk. A minták elkészítéséhez oldószerként 10% (v/v) $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ elegyet használtunk. A mintákban lévő ligandumkoncentráció általában 2 mM volt, a titrálást ismert koncentrációjú KOH oldattal végeztük 0,20 M-os ionerősség (KCl vagy KNO_3) mellett. A ligandumokat és a $[(\text{Ru}(\text{II})-\eta^6\text{-p-cimol})]$ komplexet először önmagában, majd változó fém-ligandum arány ($\text{M:L} = 1:1$ és $1:2$) mellett titráltuk. A $[\text{Ru}(\text{II})-\eta^6\text{-p-cimol}(\text{L})\text{X}]$ komplexek harmadik koordinációs helyén történő $\text{H}_2\text{O}/\text{Cl}^-$ cserefolyamatot állandó pH-n (pH 3,5) változó kloridion-koncentráció (4-500 mM) mellett vizsgáltuk.

4.5. Spektrofluorimetriás mérések

A spektrofluorimetria napjaink közkedvelt vizsgálati módszere. Népszerűségét elsősorban kis anyagigényének (kis térfogat, μM -os koncentráció) köszönheti. Többek között fehérjék, valamint fehérjékkel kölcsönható vegyületek vizsgálatára alkalmazható. Nagy hátránya azonban, hogy a mért intenzitásváltozásokból csak közvetve következtethetünk a kötődés helyére. Továbbá a kötőhely marker anyagokkal történő kompetíciós vizsgálatok csak az adott kötőhelyről való leszorítást jelzik, ami nem feltétlenül egyezik a fehérjéről való teljes leszorítással. A módszer azon alapszik, hogy bizonyos vegyületek az UV-látható sugárzás abszorpciója következtében fotolumineszcenciát mutatnak, azaz fényt emittálnak. Amennyiben a fény kisugárzása a gerjesztés után 10^{-4} másodpercnél rövidebb idő alatt következik be, fluoreszcens fényről beszélünk. A fehérjékben három olyan aminosav található, amely fluoreszcens: a fenilalanin (Phe), tirozin (Tyr) és a triptofán (Trp). Alkalmas gerjesztés mellett a HSA bizonyos vegyületekkel komplexet képezve intenzív fluoreszcenciát mutat. Ilyen vegyületek az általunk kötőhely markerként felhasznált WF és DG.

A fluorimetriás spektrumokat Hitachi-F4500 típusú fluoriméterrel vettük fel $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$ -on 1 cm-es úthosszú kvarc küvettát használva. Az összes mintát 15 mM foszfát pufferben készítettük el 100,5 mM NaCl és 1,5 mM KCl jelenlétében pH 7,4-n. (Így biztosítottuk a vérnek megfelelő pH-t, a kloridion-koncentrációt és közelítőleg a Na^+/K^+ arányt.) A minták inkubációs ideje 2, 4 és 24 óra volt. A mintákban állandó, 0,5 μM HSA koncentrációt és változó $[\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}]$ illetve $[\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol(L)X}]$ arányt alkalmaztunk. A DG és WF kötőhely markerek használatakor a HSA-kötőhely marker arány mindig 1:1 volt. A gerjesztő hullámhossz (λ_{EX}) 280 nm (Tyr) és 295 nm (Trp) volt, az emissziós spektrumokat a (λ_{EM}) 310-650 nm-es tartományban mértük 10 nm/5 nm vagy 5 nm/ 5nm-es monokromátor résszélesség mellett. A kötőhelymarkerek jelenlétében a WF esetén λ_{EX} 310 nm, λ_{EM} 320-500 nm, a DG esetében λ_{EX} 335 nm, λ_{EM} 350-600 nm volt. A fluorimetriásan mért minták UV-látható spektrumait is felvettük, melyek segítségével minden esetben megállapítható volt, hogy a minták önabszorpciója elhanyagolható (Abszorbancia $< 0,02$ mind a λ_{EX} , mind a λ_{EM} hullámhosszán), így az azzal való korrekció nem szükséges.

5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉLMEZÉSÜK

5.1. [Ru(II)- η^6 -*p*-cimol] hidrolízisének vizsgálata

Mint ahogy azt korábbi (2.2.1) fejezetben részletesen kifejtettük, a [Ru(II)- η^6 -*p*-cimol] hidrolízise kloridos- és kloridmentes közegben az irodalomból már jól ismert [20,21]. Kísérleti munkánk során azonban szükséges volt a fémion hidrolízisének vizsgálatára a mi laboratóriumi körülményeink között is. Célunk egyrészt az eredmények reprodukálása volt, másrészt a [Ru(II)- η^6 -*p*-cimol]-ligandum rendszerek UV-látható és ^1H NMR spektrumainak kiértékeléséhez igen hasznosnak bizonyult a fémion saját pH-függő spektrumainak ismerete. Ezért pH-potenciometria, UV-látható spektrofotometria és ^1H -NMR módszerekkel vizsgáltuk a hidrolitikus folyamatokat klorid- és kloridmentes közegben. Az általunk meghatározott állandók (2. Táblázat) viszonylag jó egyezést mutatnak a korábbi irodalmi adatokkal [20, 21].

2. Táblázat: Fém-hidroxo komplexek különböző módszerekkel meghatározott stabilitási szorzatai^a ($t = 25^\circ\text{C}$, $I = 0,20 \text{ M}^{\text{b,c}}$)

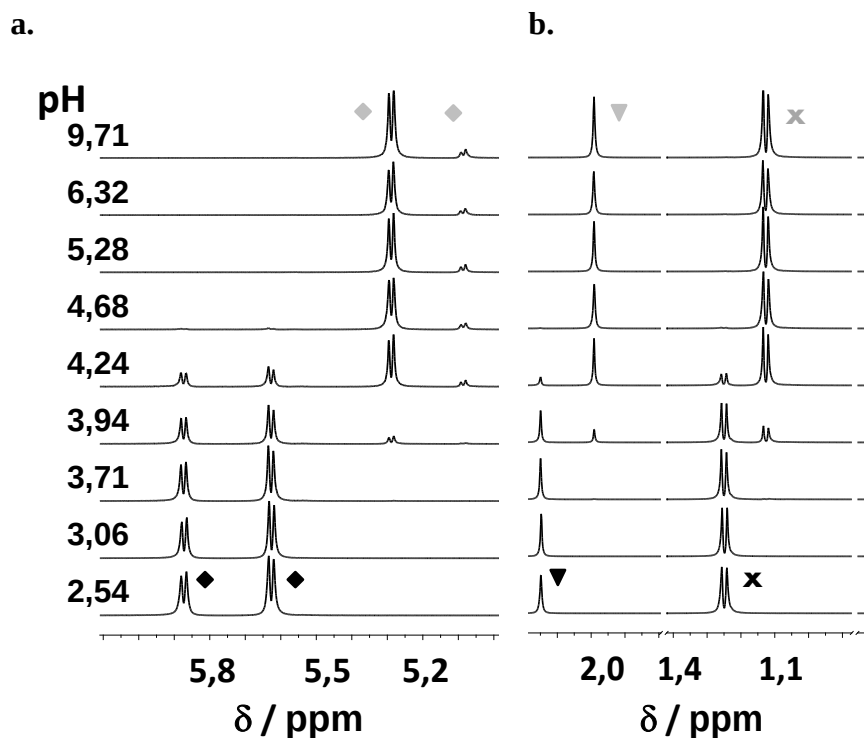
	$\lg\beta [\text{M}_2\text{H}_2]$	$\lg\beta [\text{M}_2\text{H}_3]$
klorid-mentes közegben^b:		
pH-metria	-	-9,36(2)
UV-látható sp.	-	-9,38(1)
klorid-tartalmú közegben^c:		
pH-metria	-6,97(2)	-11,97(1)
UV-látható sp.	-7,02(5)	-11,68(6)

^a A zárójelben az állandókra számol SD értékek vannak feltüntetve.

^b $I = 0,2 \text{ M KNO}_3$; ^c $I = 0,2 \text{ M KCl}$

Kloridmentes, 0,2 M ionerősségű nitrát-tartalmú vizes közegben az részecskék speciációja viszonylag egyszerű képet mutat. Csupán két komplex jelenléte bizonyítható az oldatban. Erősen savas közegben a $[\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ részecske domináns, majd $\text{pH} > 3,5$ felett elindul az akva-komplex hidrolízise, és lúgos közegben a kétmagvú $[(\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol})_2(\text{OH})_3]^+$ komplex jelenléte már kizárólagos. A két részecskéhez tartozó jelek az ^1H NMR spektrumokon egyértelműen beazonosíthatók (9. ábra). Az egyes részecskék protonjaihoz rendelhető csúcsok integrálja alapján becsült részecske arány jól egyezik az UV-

látható fotometriás és pH-metriás titrálások alapján meghatározott állandókból számolt eloszlásokkal (10. ábra).

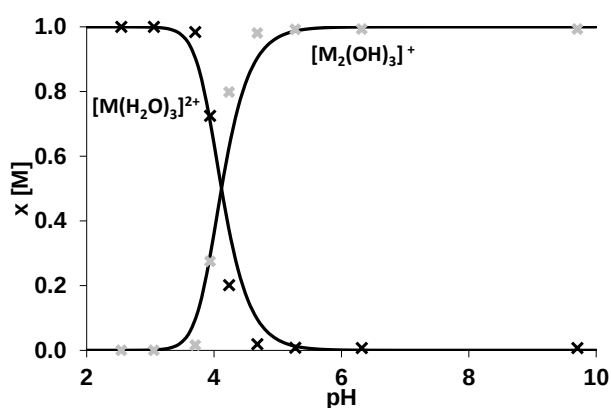


9. ábra: $[\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}]$ pH-függő ^1H NMR spektrumainak részletei a spektrum aromás (a.) és alifás (b.) régiójában kloridmentes közegben.

$[\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ jelei: ♦ Ar(CH); ▼ CH_3 ; x iProp(CH_3).

$[(\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol})_2(\text{OH})_3]^+$ jelei: ♦ Ar(CH); ▼ CH_3 ; x iProp(CH_3).

($c_M = 1,0 \times 10^{-3}$ M, $I = 0,2$ M KNO_3 , $t = 25$ °C, 10% D_2O)



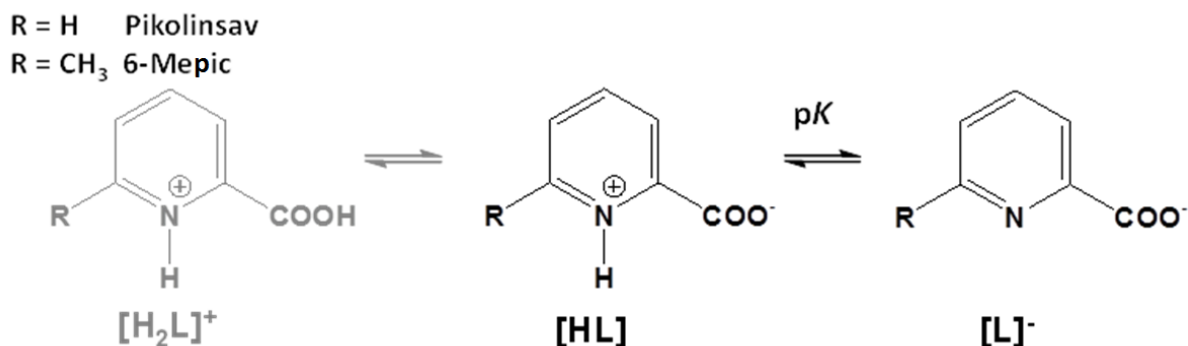
10. ábra: A $[\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}]$ hidrolízisének koncentráció eloszlásdiagramja a pH-potenciometriás titrálások alapján meghatározott stabilitási állandó (folytonos vonalak), és az ^1H NMR spektrumok iProp(CH_3) jeleinek csúcs alatti területeiből számolt értékek alapján (x).

($c_M = 1,0 \times 10^{-3}$ M, $I = 0,2$ M KNO_3 , $t = 25$ °C, 10% D_2O)

Kloridos rendszerben, ahogyan azt már említettük a kloridion koordinációja miatt, lényegesen többféle részecske van jelen, mint kloridmentesben (7. ábra, 2.2.1. fejezet). Azonban, a bonyolult speciáció ellenére (8. ábra, 2.2.1. fejezet), a rendszer jól leírható csupán három részecske (M , M_2H_2 , M_2H_3) jelenlétének feltételezésével (9. ábra, 2.2.1. fejezet) [20]. A kétmagvú hidroxo-komplexek stabilitási állandóit pH-potenciometriás módszer mellett UV-látható spektrofotometriával is meghatároztuk (2. Táblázat). A meghatározott állandók jó egyezést mutatnak debreceni kutatócsoport által korábban meghatározottal [20, 21].

5.2. A ligandumok sav-bázis és spektrális tulajdonságai

A ligandumok szerkezeti képletét, és jellemző proton disszociációs folyamatait a 11. ábrán tüntettük fel. Teljesen protonált formában mindkét ligandumnak két disszociálabilis protonja van ($[H_2L]^+$ - szürkével jelölt szerkezet). Azonban a karboxil-csoport hidrogénionja már $pH < 2$ disszociál ($pK_{COOH} \sim 1$). A karboxil-csoport nagyon savas pK -ja a deprotonálódott karboxilát-csoport oxigénje és a protonált piridin-N között kialakuló intramolekuláris H-kötéssel magyarázható [32]. A 6-metil-pikolinsav (6-Mepic) nagyobb bázicitását a ligandumon lévő elektronküldő metil-csoport okozza.



11. ábra: A ligandumok szerkezeti képlete, és proton disszociációs folyamatai

A ligandumok sav-bázis egyensúlyait pH-potenciometriás, UV-látható spektrofotometriás és 1H NMR spektroszkópiai módszerekkel vizsgáltuk, a kapott proton disszociációs állandókat a 3. Táblázatban mutatjuk be. Az irodalomból ezek már jól ismert adatok [33], célunk egyrészt az volt, hogy a mi laboratóriumi körülményeink között ezeket az eredményeket reprodukáljuk, másrészt a ligandumok részletes vizsgálata megkönnyíti $[Ru(II)-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}]$ -al való komplexképződési folyamatok értelmezését.

3. Táblázat: A ligandumok különböző módszerekkel meghatározott proton disszociációs állandói^a (t = 25°C, I = 0,20 M KCl)

	pK [HL] pikolinsav	pK [HL] 6-metil-pikolinsav
irodalmi adat [27]	5,19	5,81
mért állandó		
pH-potenciometria:	5,17(1) ^b	5,82(1)
UV-látható sp.:	5,14(1)	5,86(1)
¹ H-NMR	5,16(1)	5,91(1)

^a A zárójelben az állandókra számolt SD értékek vannak feltüntetve.

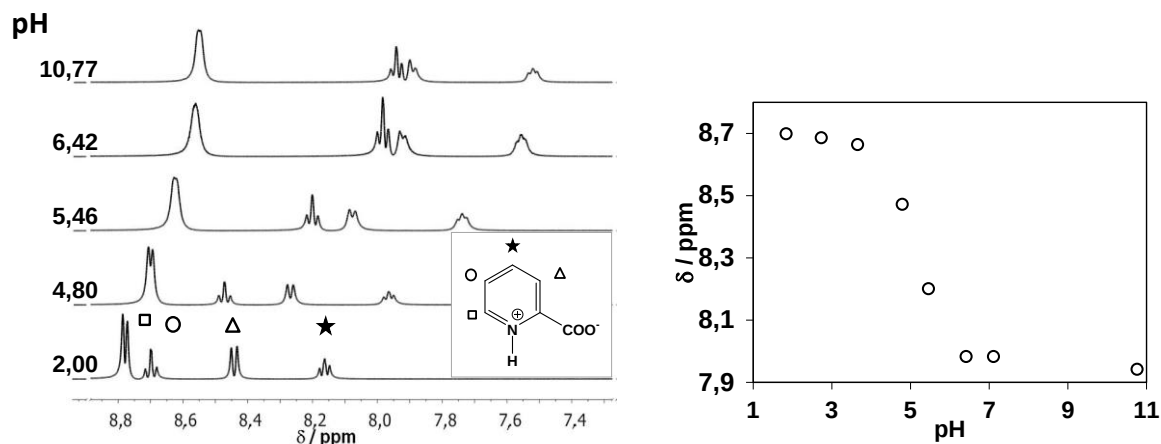
^b pK = 5,15(1) 0,2 M KNO₃ közegben

Az UV-látható spektrumok felbontásával a PSEQUAD programmal [29] számoltuk a ligandumok különböző protonáltsági fokú állapotához tartozó egyedi spektrumokat (4. Táblázat).

4. Táblázat: A ligandumok [HL] és [L]⁻ formáinak moláris abszorbancia értékei és kémiai eltolódásai

pikolinsav				6-metil-pikolinsav		
UV-látható spektrofotometria						
$\varepsilon_{\max}$ [HL]	8610 M ⁻¹ ×cm ⁻¹ (λ=264 nm)			6956 M ⁻¹ ×cm ⁻¹ (λ=274 nm)		
$\varepsilon_{\max}$ [L] ⁻	4906 M ⁻¹ ×cm ⁻¹ (λ=264 nm)			4120 M ⁻¹ ×cm ⁻¹ (λ=272 nm)		
¹ H NMR	CH(3) (d)	8,43	ppm	CH(3) (d)	7,93	ppm
[HL]	CH(4) (t)	8,15	ppm	CH(4) (t)	8,49	ppm
	CH(5) (t)	8,69	ppm	CH(5) (d)	8,20	ppm
	CH(6) (d)	8,77	ppm	CH ₃ (6)(s)	2,83	ppm
¹ H NMR	CH(3) (d)	7,90	ppm	CH(3) (d)	7,38	ppm
[L] ⁻	CH(4) (t)	7,53	ppm	CH(4) (t)	7,80	ppm
	CH(5) (t)	7,95	ppm	CH(5) (d)	7,68	ppm
	CH(6) (d)	8,56	ppm	CH ₃ (6)(s)	2,53	ppm

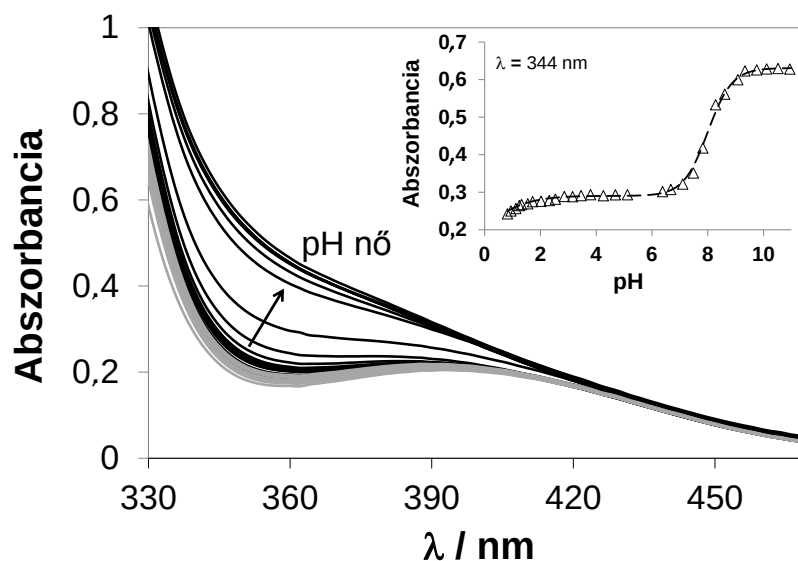
A deprotonálódást ^1H NMR mérésekkel is követtük (12. ábra), és meghatároztuk a $[\text{HL}]$ és $[\text{L}]$ forma határeltolódásait (4. Táblázat). A különböző módszerrel kapott állandók jó egyezést mutatnak egymással és az irodalmi adatokkal is.



12. ábra: A pikolinsav reprezentatív pH-függő ^1H NMR spektrumai, és CH(5) triplet jeleinek eltolódása ($\circ$) a pH-függvényében ($c_L = 1,0 \times 10^{-3}$ M, $I = 0,2$ M KCl, $t = 25$ °C, 10% D_2O)

5.3. $[\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}]$ -pikolinsav rendszer komplex képződési folyamatainak vizsgálata klordmentes közegben

A $[\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}]$ -pikolinsav komplexképződési folyamatát leíró stabilitási állandókat pH-potenciometriás és UV-látható spektrofotometriás mérésekből határoztuk meg. A pH-metriás mérések titrálási görbéi alapján az látszott, hogy pH 2-nél már szinte teljes a protonleszorítás, ezért az $[\text{ML}]$ komplex stabilitási állandójának meghatározása ezzel a módszerrel nem volt lehetséges. Emiatt pH 0,8 – 11 tartományban fotometriás méréseket végeztünk, és a pH függő UV-látható spektrum töltésátviteli sávjainak változásából számoltuk az állandókat. pH 0,8 – 2 tartományban egyedi mintákat készítettünk, az állandó ionerősséget megtartva a mintákban, a KNO_3 tartalmat fokozatosan HNO_3 -ra cseréltük, míg pH 2 – 11 között titrálás során rögzítettük az abszorpciós spektrumokat (13. ábra).



13. ábra: A $[\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}]\text{-pikolinsav}$ rendszer pH-függő UV-látható spektrumai. A szürkével jelölt rész a pH 0,8 – 2 tartományban felvett egyedi minták spektrumai, a fekete görbék a titrálás folyamán pH 2 – 11 között felvett, hígítással korrigált abszorbancia spektrumai. A beszúrt diagram az abszorbancia változását mutatja a pH-függvényében $\lambda = 344 \text{ nm}$ -en ($c_L = c_M = 3,2 \times 10^{-4} \text{ M}$, $I = 0,2 \text{ M KNO}_3/\text{HNO}_3$, $t = 25^\circ \text{C}$)

A spektrumok 330 – 500 nm hullámhossz tartományát figyelembe véve PSEQUAD [24] programmal számoltuk $[\text{ML}]$ és $[\text{MLH}_{-1}]$ stabilitási állandóját. A fotometriás mérések alapján meghatároztuk $\lg\beta [\text{ML}]$ értékét rögzítve értékeltük ki a pH-metriás titrálási görbék bázikus pH-tartományba eső pontjait (5. Táblázat).

5. Táblázat: $[\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}]\text{-pikolinát}$ komplexek különböző módszerekkel meghatározott stabilitási szorzatai^a, proton disszociációs és származtatott állandói ($t = 25^\circ \text{C}$, $I = 0,20 \text{ M KNO}_3$)

	$\lg\beta [\text{ML}]$	$\lg\beta [\text{MLH}_{-1}]$	$\text{p}K [\text{ML}]$	$\lg K^c$
pH-metria	-	0,86(2)	8,04 ^b	-
UV-látható sp.	8,90(1)	0,90(2)	8,00 ^b	3,75
$^1\text{H NMR}$	-	-	8,10(1)	-

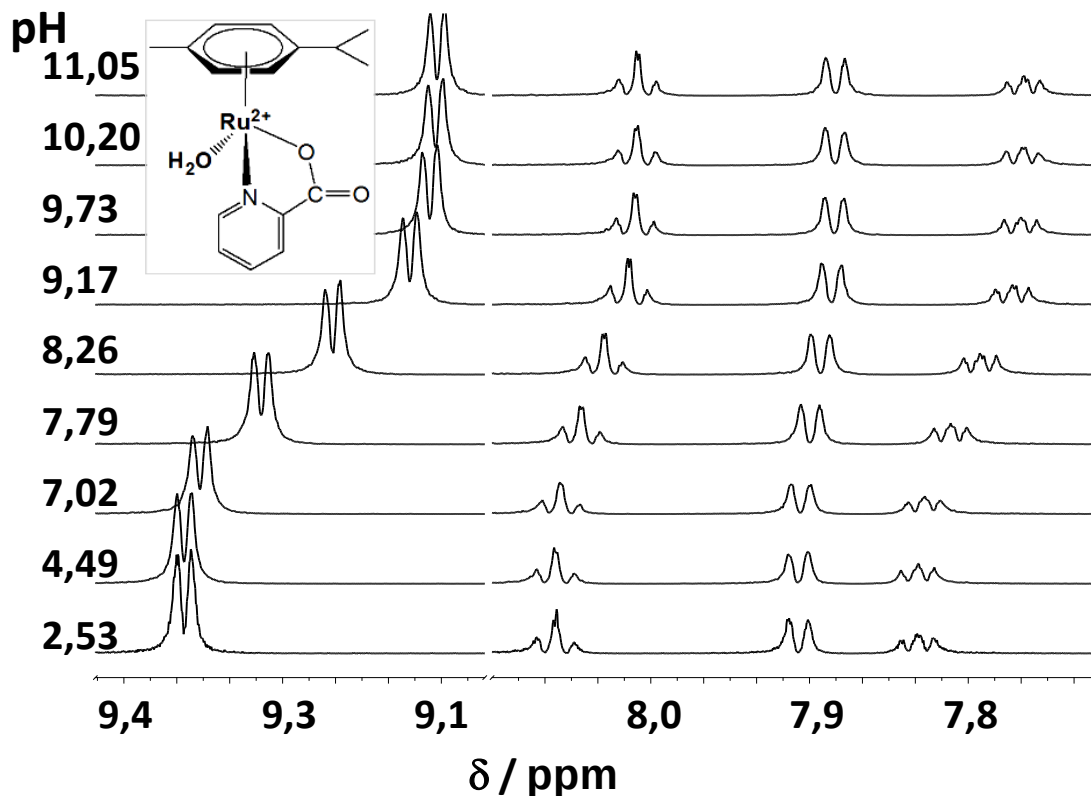
^a A zárójelben az állandókra számolt SD értékek vannak feltüntetve.

^b $\text{p}K = \lg\beta [\text{ML}] - \lg\beta [\text{MLH}_{-1}]$

^c $[\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+} + \text{HL} \rightleftharpoons [\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}(\text{H}_2\text{O})\text{L}]^+ + \text{H}^+ + 2 \text{H}_2\text{O}$

$\lg K = \lg\beta [\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}(\text{H}_2\text{O})\text{L}]^+ - \text{p}K(\text{HL})$

A pH-potenciometriás és UV-látható spektrofotometriás vizsgálatainkat ^1H NMR mérésekkel egészítettük ki. Rögzítettük a $[\text{Ru}(\text{II})-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}]\text{-pikolinsav}$ rendszer pH-függő NMR spektrumait (14. ábra).

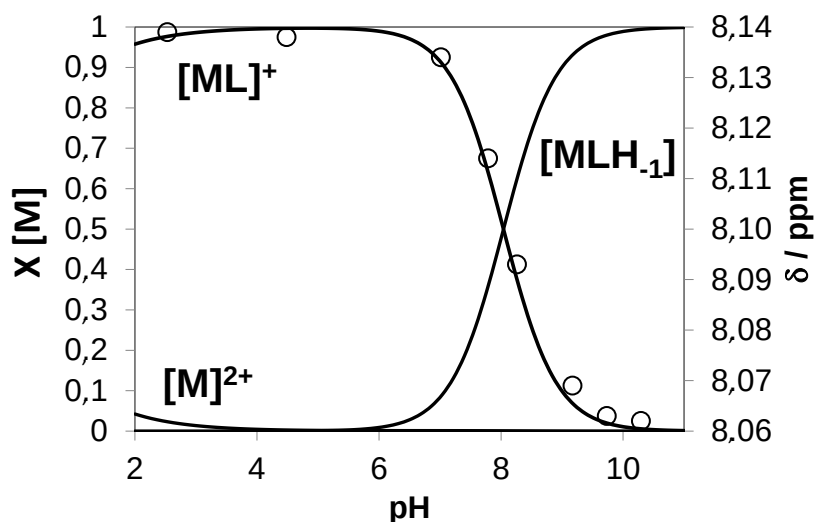


14. ábra: $[\text{Ru}(\text{II})-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}]\text{-pikolinsav}$ 1:1 arányú rendszer pH függő ^1H NMR spektrumai a ligandum aromás protonjaihoz tartozó jelek kémiai eltolódásnak tartományában. ($c_L = c_M = 1,0 \times 10^{-3}$ M, $I = 0,2$ M KNO_3 , $t = 25$ °C, 10% D_2O)

A spektrumokon pH 2,5-nél már nem látható a szabad ligandum illetve fém jele, megerősítve ezzel pH-metriás és fotometriás méréseink eredményét. pH 7 felett a komplex jelei alacsonyabb ppm értékek felé tolódnak el. Az eltolódás az



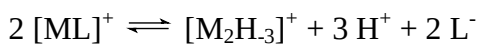
folyamathoz rendelhető. A 16. ábrán jól látható, hogy a pikolinsav CH(5) csoportjához tartozó proton eltolódásának mértéke jó korrelációt mutat az UV-látható spektrofotometriás és pH-potenciometriás mérésekből meghatározott állandó alapján számolt koncentrációeloszlással (15. ábra).



15. ábra: Koncentrációeloszlási görbék a $[\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}]\text{-pikolinsav}$ rendszerre 1:1 fém-ligandum arány mellett és az ^1H NMR spektrumok adatai alapján meghatározott ligandumhoz tartozó CH(5) csoport jeleinek eltolódásai (○). ($c_L = c_M = 1,0 \times 10^{-3}$ M, $I = 0,2$ M KNO_3 , $t = 25$ °C, 10% D_2O)

Az ^1H NMR jelek pH-függő eltolódásaiból számolni tudtuk az $[\text{ML}]^+$ komplex proton disszociációs állandó értékét (5. Táblázat). A meghatározott érték jó egyezést mutat a pH-metriás és fotometriás mérésekből meghatározott állandókból számolt pK értékekkel.

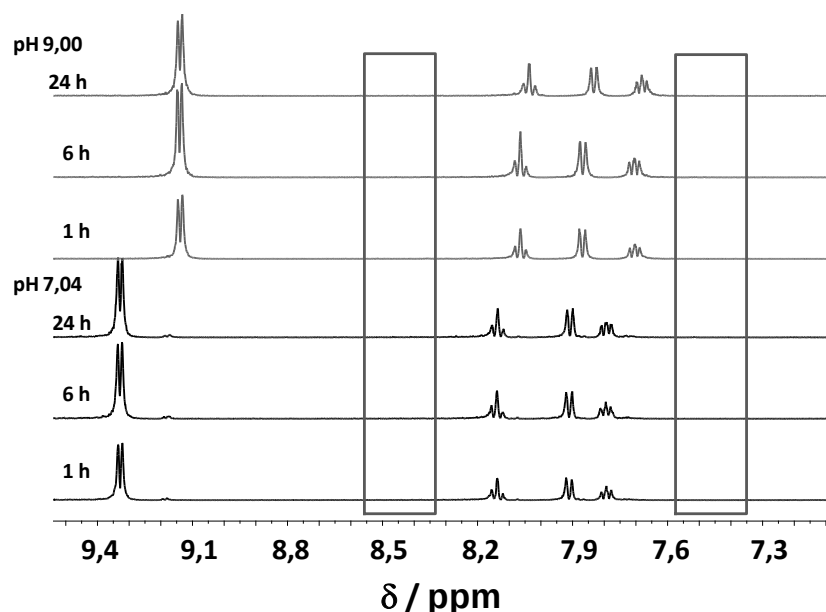
A mérések azt mutatták, hogy az $[\text{ML}]^+$ ($[\text{MLH}_{-1}]$) komplex(ek) bázikus tartományban sem disszociál(nak), azaz nem jelent meg a rendszerben szabad fém illetve szabad ligandum. Bár termodinamikai alapon a hidrolízis állandókat ismerve várnánk a trihidroxo kétmagvú részecske képződését, az nem jelent meg a 7,04-es és a 9,00-es pH-jú rendszerben egy nap után sem (16. ábra). Ennek feltehetően kinetikai oka van [34].



illetve



reakciók lassú folyamatok, lejátszódásuknak kinetikai gátja lehet.



16. ábra: $[\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}]\text{-pikolinsav}$ 1:1 arányú rendszer pH 7,04 és pH 9,00-n felvett ^1H NMR spektrumai 1, 6 és 24 óra múlva a ligandum aromás protonjaihoz tartozó jelek kémiai eltolódásának tartományában. A bekeretezett spektrumrészletek jelzik a szabad ligandum jeleinek helyét a spektrumon. ($c_L = c_M = 1,0 \times 10^{-3}$ M, $I = 0,2$ M KNO_3 , $t = 25$ °C, 10% D_2O)

Az $[\text{ML}]^+$ komplex esetén feltehetően a pikolinsav (N,O) koordinálódik a fémhez [15], savas tartományban a harmadik koordinációs helyen H_2O molekula van, ami lúgos közegben deprotonálódik, amit a ^1H NMR spektrumokon megfigyelhető jeleltolódás jelez. Ennek megfelelően az $[\text{MLH}_{-1}]$ részecske a valóságban egy vegyes hidroxó, azaz $[\text{ML}(\text{OH})]$ komplex.

5.4. $[\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}]\text{-pikolinsav}$ és $[\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}]\text{-6-metil-pikolinsav}$ rendszerek komplex képződési folyamatainak vizsgálata klorid-tartalmú közegben

$[\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}]\text{-pikolinsav}$ rendszerben kloridion jelenlétében annak koordinációja viaszoríthatja a komplexképződést a nitrátos közegben tapasztaltakhoz képest, de a fémion általi proton leszorítás a ligandumról még így is nagyon jelentős pH 2-n. Ezért hasonlóan a nitrátos közegben végzett vizsgálatainkhoz, UV-látható spektrofotometria segítségével határoztuk meg az $[\text{ML}]$ komplex stabilitási állandóját. (A KCl jelenlétében már nem tüntetjük fel a komplexek töltését, mert a koordinált vízmolekula részben kloridra van cserélve. Emiatt ebben a közegben meghatározott állandók látszólagos állandóknak tekinthetők, 0,2 M kloridion-koncentráció mellett.) A 230-538 nm-es hullámhossz

tartományban mért spektrumok kiértékelése során nem vettük figyelembe a ligandumsávokat, mert a ligandum karboxil-csoport H^+ -jének disszociációja kis mértékben megváltoztathatja a számolt állandók értékét. pH 0,8 – 2 között egyedi mintákat állítottunk össze, a minta KCl tartalmát fokozatosan HCl-re cseréltük, megtartva az állandó 0,2 M-os ionerősséget. pH 2 – 11 között titrálást végeztünk, és közben rögzítettük a minták abszorbancia spektrumait. A fotometriás mérésekből meghatároztuk $[ML]$ és $[MLH_{-1}]$ komplexek stabilitási szorzatait. A pH-metriás titrálások kiértékelése során a fotometriás mérésekből meghatározott $lg\beta [ML]$ állandót rögzítve határoztuk meg az $[MLH_{-1}]$ komplex stabilitási szorzatát (6. Táblázat).

6. Táblázat: $[Ru(II)-\eta^6-p\text{-cimol}]$ -pikolinát és $[Ru(II)-\eta^6-p\text{-cimol}]$ -6-metil-pikolinát komplexek különböző módszerekkel meghatározott stabilitási szorzatai^a, proton disszociációs és származtatott stabilitási állandói ($t = 25^\circ C$, $I = 0,20 \text{ M KCl}$)

	$lg\beta$ [ML]	$lg\beta$ [MLH ₋₁]	pK [ML]	lgK^c	lgK^* (H ₂ O/Cl) ^d
L = pic					
pH-metria	-	-0,75(2)	8,89 ^b	-	-
UV-látható sp.	8,14(1)	-0,76(2)	8,90 ^b	3,00	-
¹ H NMR	-	-	8,19(1)	-	1,83(6)
L = 6-Mepic					
pH-metria	-	-1,60(3)	9,04 ^b	-	-
UV-látható sp.	7,44(1)	-1,63(4)	9,07 ^b	1,58	-
¹ H NMR	-	-	9,22(2)	-	1,45(5)

^a A zárójelben az állandókra számolt SD értékek vannak feltüntetve.

^b $pK = lg\beta [ML] - lg\beta [MLH_{-1}]$

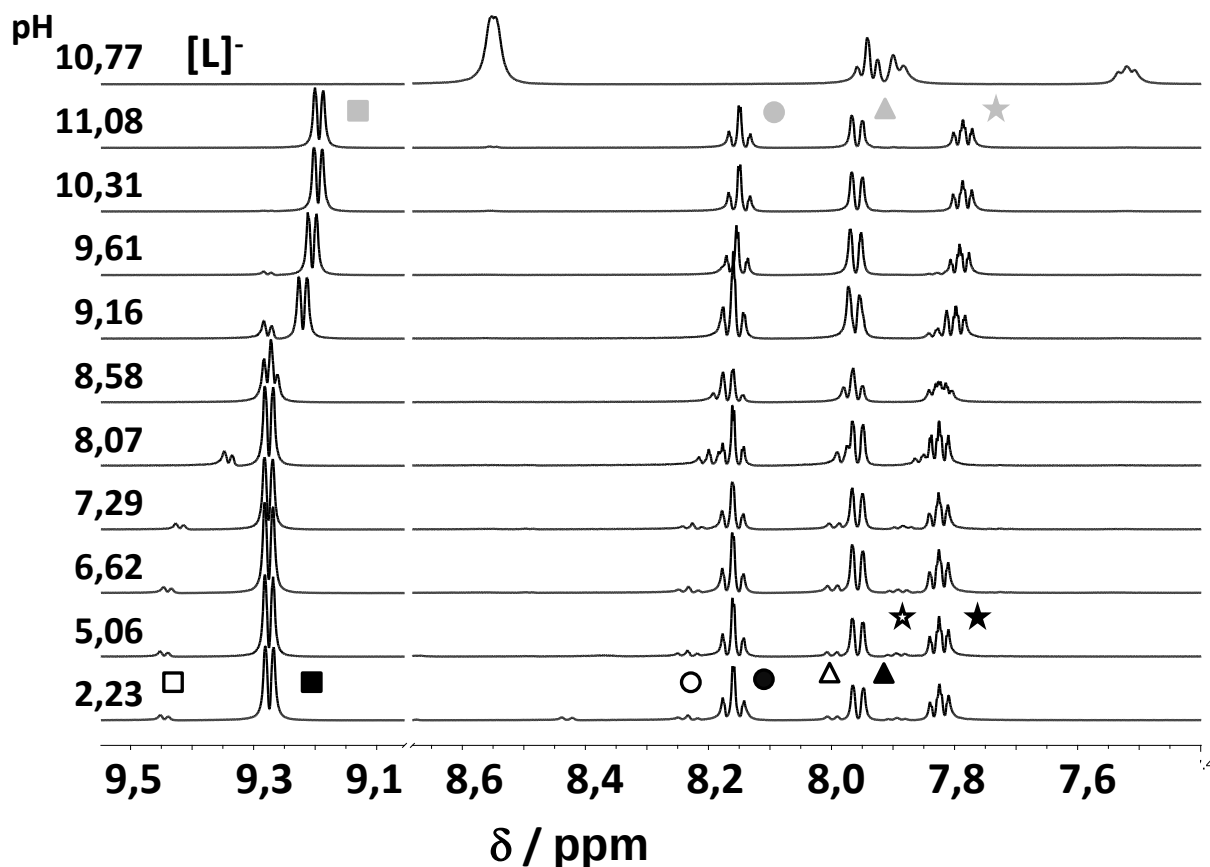
^c $[Ru(II)-\eta^6-p\text{-cimol}(X)_3] + HL \rightleftharpoons [Ru(II)-\eta^6-p\text{-cimol}(L)X] + H^+ + 2 X$ ($X = H_2O$ vagy Cl^-)

$lgK = lg\beta [Ru(II)-\eta^6-p\text{-cimol}(L)X] - pK_a(HL)$

^d $[Ru(II)-\eta^6-p\text{-cimol}(L)(H_2O)]^+ + Cl^- \rightleftharpoons [Ru(II)-\eta^6-p\text{-cimol}(L)Cl] + H_2O$

Az $lg\beta [ML]$ stabilitási szorzatok (kloridos és nitrátos közegben mérve) összevetésével és a ligandumok bázicitásával korrigált stabilitási állandóit közvetlenül összehasonlítva láthatjuk, hogy nitrátos közegben az értékek nagyobbak, ami arra utal, hogy a klorid jelenléte valóban visszaszorítja a komplexképződést.

A rendszerben lejátszódó folyamatokat ^1H NMR mérésekkel is vizsgáltuk. A 17. ábrán látható pH-függő NMR spektrumokból arra következtettünk, hogy a trihidroxo dimer részecske, illetve szabad ligandum klorid jelenlétében nem jelenik meg. A rendszer leírása tehát a nitrátos közegéhez hasonló.



17. ábra: $[\text{Ru}(\text{II})-\eta^6\text{-p-cimol}]\text{-pikolinsav}$ 1:1 arányú rendszer pH függő ^1H NMR spektrumai a ligandum aromás protonjaihoz tartozó jelek kémiai eltolódásának tartományában, és a szabad ligandum spektruma (legfelül).

CH(6): $\square$ $[\text{ML}(\text{H}_2\text{O})]^+$; $\blacksquare$ $[\text{MLCl}]$; $\blacksquare$ $[\text{ML}(\text{OH})]$;

CH(5): $\circ$ $[\text{ML}(\text{H}_2\text{O})]^+$; $\bullet$ $[\text{MLCl}]$; $\bullet$ $[\text{ML}(\text{OH})]$;

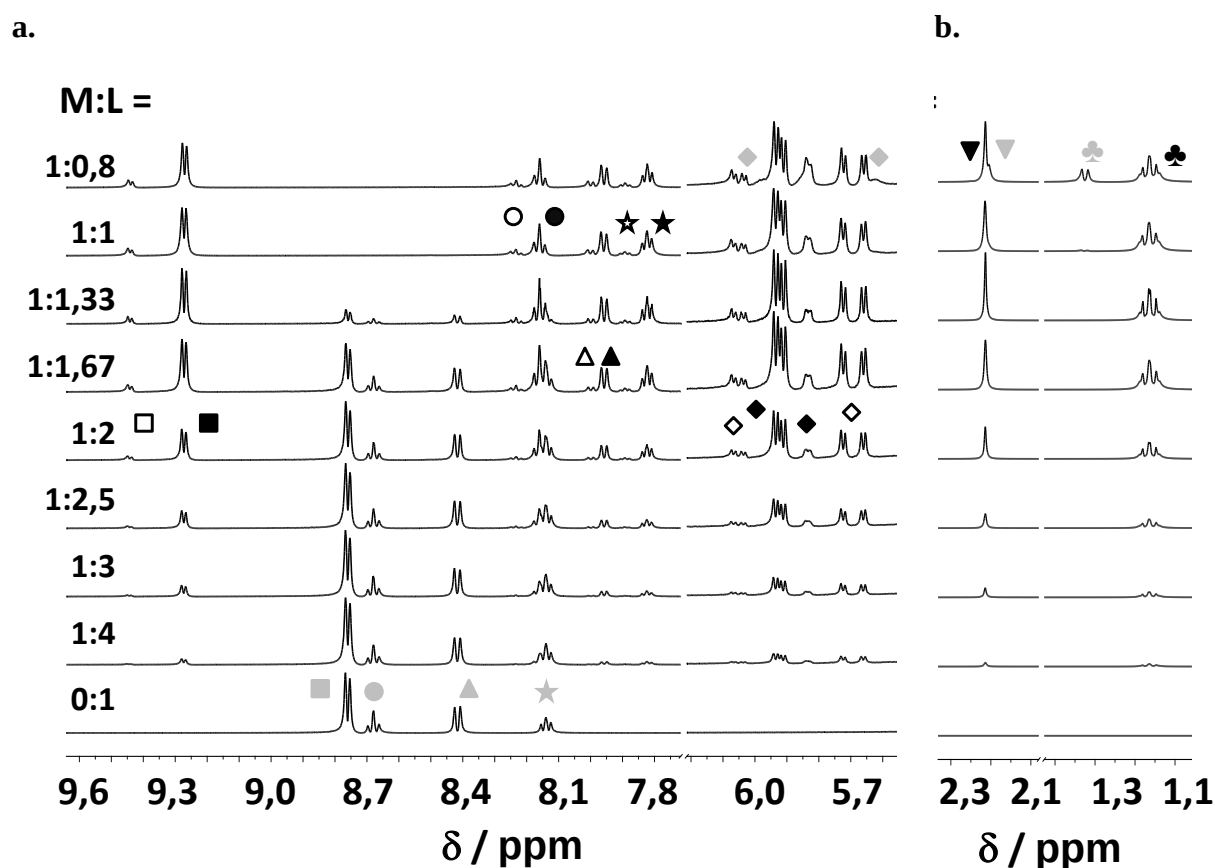
CH(3): $\triangle$ $[\text{ML}(\text{H}_2\text{O})]^+$; $\blacktriangle$ $[\text{MLCl}]$; $\blacktriangle$ $[\text{ML}(\text{OH})]$;

CH(4): üres csillag $[\text{ML}(\text{H}_2\text{O})]^+$; fekete csillag $[\text{MLCl}]$; szürke csillag $[\text{ML}(\text{OH})]$.

($c_L = c_M = 1,0 \times 10^{-3}$ M, $I = 0,2$ M KCl, $t = 25$ °C, 10% D_2O)

Az irodalomban leírták a piridin-nitrogén egyfogú koordinációját is (ahol nem volt jelen más donortom a ligandumban), amit röntgen-kristallográfiával támasztottak alá [35]. Annak bizonyítására, hogy a mi rendszerünkben nem történik meg a ligandum egyfogú koordinációja a kétfogú mellett pl. egy bisz-ligandumú komplex képződése révén, azaz hogy

kizárólag mono-komplexek képződnek, pH-függő ^1H NMR spektrumokat vettünk fel 1:2 fém-ligandum arány mellett, illetve pH 3,2-n különböző fém-ligandum aránynál (18. ábra). A mért spektrumok azt mutatják, hogy a nem kötött pikolinsavon kívül csak olyan részecskék vannak jelen, amit az 1:1 fém-ligandum aránynál is azonosítottunk, tehát bisz-komplex képződését kizárhatjuk. Tanszéki eredmények azt mutatták, hogy pl. a tiomaltol esetén a ligandum képes kenen keresztüli egyfogú koordinációra is bisz-, és trisz-komplexekben [36].



18. ábra: $[\text{Ru}(\text{II})-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}]$ -pikolinsav változó fém-ligandum arány mellett felvett ^1H NMR spektrumainak részletei az aromás (a.) és alifás (b.) régiókban.

Lig CH(6): □ $[\text{ML}(\text{H}_2\text{O})]^+$; ■ $[\text{MLCl}]$; ▀ $[\text{HL}]$;

Lig CH(5): ○ $[\text{ML}(\text{H}_2\text{O})]^+$; ● $[\text{MLCl}]$; ● $[\text{HL}]$;

Lig CH(3): △ $[\text{ML}(\text{H}_2\text{O})]^+$; ▲ $[\text{MLCl}]$; ▲ $[\text{HL}]$;

Lig CH(4): üres csillag $[\text{ML}(\text{H}_2\text{O})]^+$; fekete csillag $[\text{MLCl}]$; szürke csillag $[\text{HL}]$;

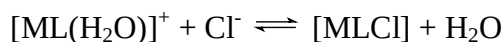
$[\text{Ru}(\text{II})-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}]$ Ar(CH): ◇ $[\text{ML}(\text{H}_2\text{O})]^+$; ◆ $[\text{MLCl}]$; ◆ $[\text{Ru}(\text{II})-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}(\text{X})_3]$ (X = H_2O vagy Cl^-)

$[\text{Ru}(\text{II})-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}]$ Me(CH₃): ▼ $[\text{ML}]$; ▼ $[\text{Ru}(\text{II})-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}(\text{X})_3]$ (X = H_2O vagy Cl^-)

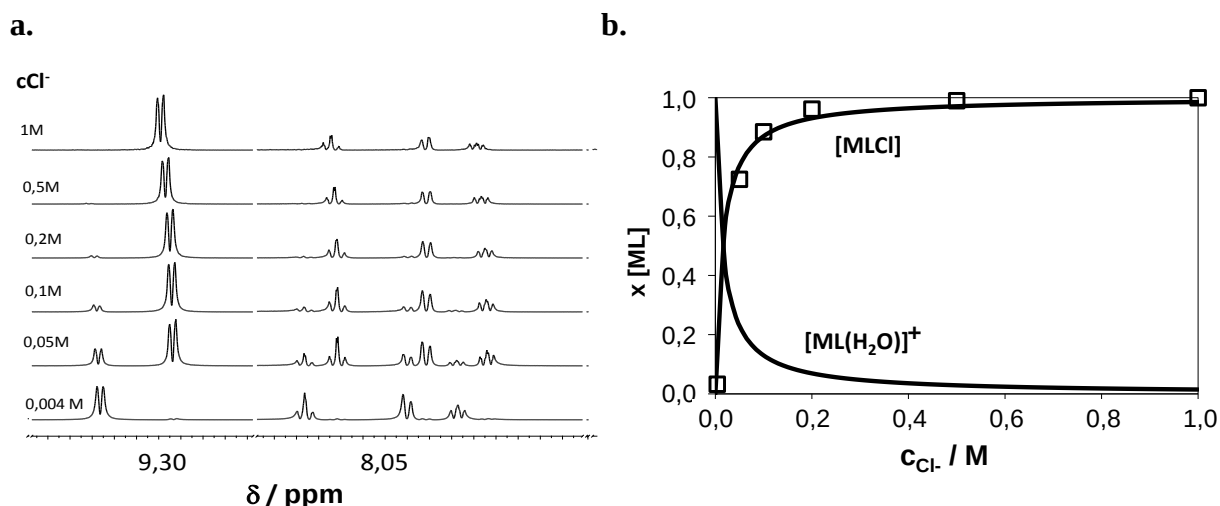
$[\text{Ru}(\text{II})-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}]$ iProp(CH₃): ♣ $[\text{ML}]$; ♣ $[\text{Ru}(\text{II})-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}(\text{X})_3]$ (X = H_2O vagy Cl^-)

(pH = 3,2; $c_L = 2 \times 10^{-3}$ M; I = 0,2 M KCl, t = 25 °C, 10% D_2O)

Ahogy a 18. és 19. ábrákon is láthatjuk, az [ML] komplex képződési tartományában, minden jelcsoportnak a kisebb intenzitású „párját” is megtaláljuk. A kisebb intenzitású jelek az akva-, a nagyobbak a kloro-komplexhez tartoznak. A spektrumon a kloro- és akva-komplexek jelei jól elkülönülnek, mert a klorid/víz csere NMR időskálán lassú folyamat. A kloro/akva cserét részletesen is vizsgáltuk pH 3,2-n 1:1 fém-ligandum arány mellett. A mérés segítette a 18. és 19. ábrákon bemutatott kloro- és akva- részecskék beazonosítását, másrészt az



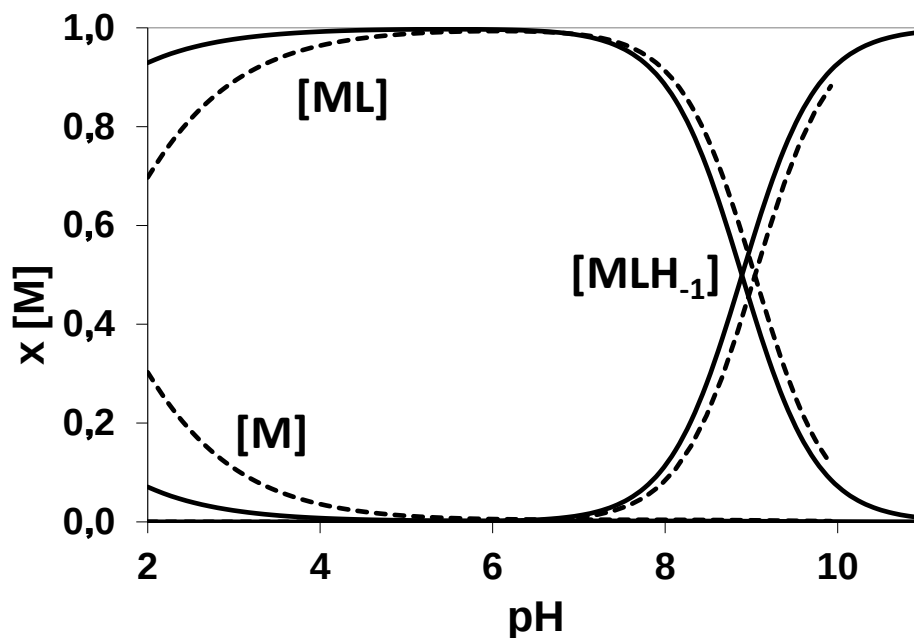
folyamat egyensúlyi állandóját is meg tudtuk becsülni. A csúcsok alatti területek arányaiból tudtuk meghatározni a kloro:akva részecskék arányát. A 19. ábrán a becsült állandó alapján számolt $[\text{ML}(\text{H}_2\text{O})]^+ - [\text{MLCl}]$ komplexek koncentrációeloszlási görbéit mutatjuk be a kloridion koncentráció függvényében (pH = 3,2) az integrálok alapján kapott értékekkel együtt.



19. ábra: $[\text{Ru}(\text{II})-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}]$ -pikolinsav rendszer ^1H NMR spektruma a ligandum aromás protonjaihoz tartozó jelek kémiai eltolódásának tartományában **(a.)** és az ebből számolt $[\text{ML}(\text{H}_2\text{O})]^+ - [\text{MLCl}]$ részecskeeloszlás **(b.)** változó a klorid-koncentráció függvényében (pH 3,2; $c_{[\text{ML}]}$ = $1,0 \times 10^{-3}$ M, t = 25 °C, 10% D_2O ; □: az integrálarányokból kapott értékek, folytonos vonal: a $\text{H}_2\text{O}/\text{Cl}^-$ cserére vonatkozó állandóval számolt értékek)

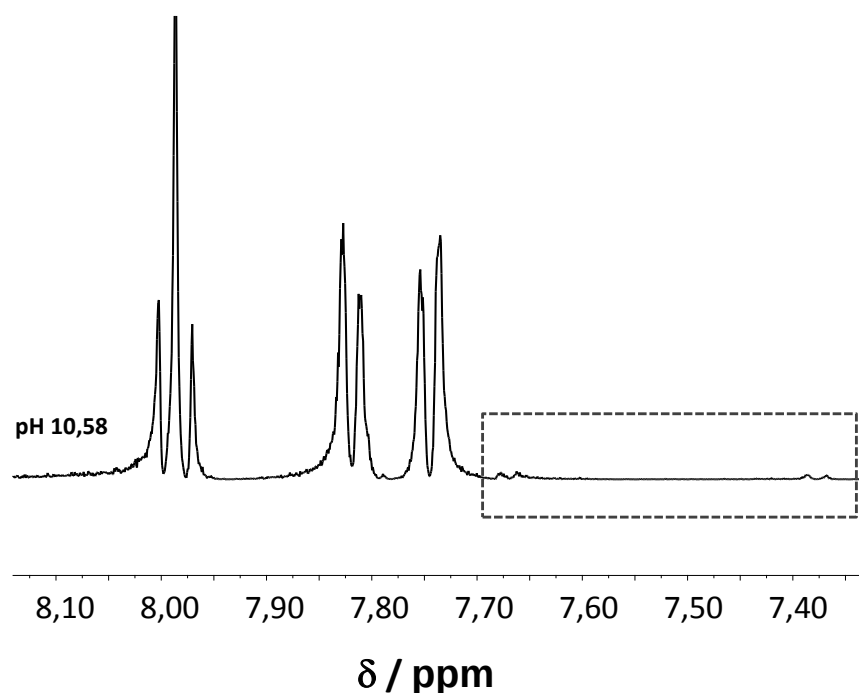
A 6-metil-pikolinsavat tartalmazó rendszer esetén a $[\text{Ru}(\text{II})-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}]$ -pikolinsav rendszerek vizsgálatánál elvégzett mérési módszereket, és kiértékeléseket végeztük el. A spektrofotometriásan és pH-potenciometriásan meghatározott állandók az 6. Táblázatban láthatók. A stabilitási szorzatok közvetlen összevetése alapján is látszik, de a ligandumok bázicitásával korrigált állandók is mutatják, hogy a 6-metil-pikolinsav kisebb stabilitású komplexet képez a $[\text{Ru}(\text{II})-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}]$ -lal, mint a pikolinsav. Hasonló tendenciát figyeltek meg cink(II) és vanadil(IV)ionok komplexei esetén is, ott a pikolinsav kompakt méretével

magyarázták a nagyobb stabilitást a 6-metil-pikolinsavhoz képest. [37]. A meghatározott stabilitási szorzatok segítségével számolt koncentrációeloszlási görbéket a két rendszerre a 20. ábrán mutatjuk be.



20. ábra: $[\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}]\text{-pikolinsav}$ (folyamatos vonalak) és $[\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}]\text{-6-metil-pikolinsav}$ (szaggatott vonalak) rendszerek koncentrációeloszlási görbéi ($c_L = c_M = 2,0 \times 10^{-3} \text{ M}$, $I = 0,2 \text{ M KCl}$, $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$)

Feltehetően a kisebb stabilitás miatt láthatjuk a 6-metil-pikolinsav komplexének disszociációját pH 10 felett, azaz a szabad ligandum és a trihidroxo kétmagvú részecske megjelenését (21. ábra), ami a pikolinsavas rendszerben nem volt megfigyelhető.



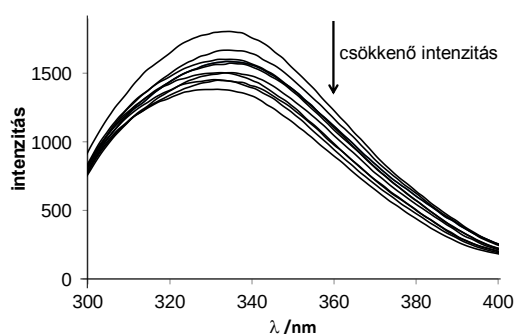
21. ábra: [Ru(II)- η^6 -*p*-cimol]-6-metil-pikolinsav rendszer ^1H NMR spektruma lúgos közegben (pH 10,58), a ligandum aromás protonjaihoz tartozó jelek kémiai eltolódásának tartományában. A szaggatott vonallal bekeretezett rész jelzi a szabad ligandum megjelenését.

($c_L = c_M = 2,0 \times 10^{-3}$ M, I = 0,2 M KCl, $t = 25$ °C, 10% D_2O)

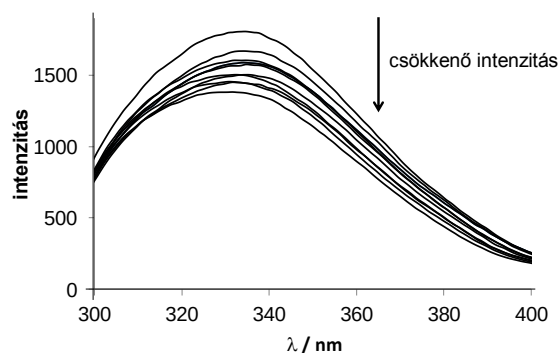
5.5. [Ru(II)- η^6 -*p*-cimol] és [Ru(II)- η^6 -*p*-cimol-pikolinát] komplex kölcsönhatása humán szérum albuminnal

A kölcsönhatást spektrofлуorimetriásan vizsgáltuk kétféle gerjesztési hullámhosszt használva. A 280 nm-on elsősorban a fehérje Tyr aminosavjait, míg a 295 nm-n a HSA egyedüli triptofánját tudjuk gerjeszteni. Ezen utóbbi az I. kötőhelynél található. Az emittált fény intenzitása általában lecsökken, ha az I. kötőhelyen, vagy annak közelében kötődik a fehérjéhez a fémkomplex, illetve maga a [Ru(II)- η^6 -*p*-cimol]. A kötődést különböző HSA-[Ru(II)- η^6 -*p*-cimol] illetve HSA-([Ru(II)- η^6 -*p*-cimol]-pikolinát) arányok mellett vizsgáltuk spektrofлуorimetriás mérésekkel különböző inkubációs (2 óra, 24 óra (22. ábra)) idők mellett.

a.)

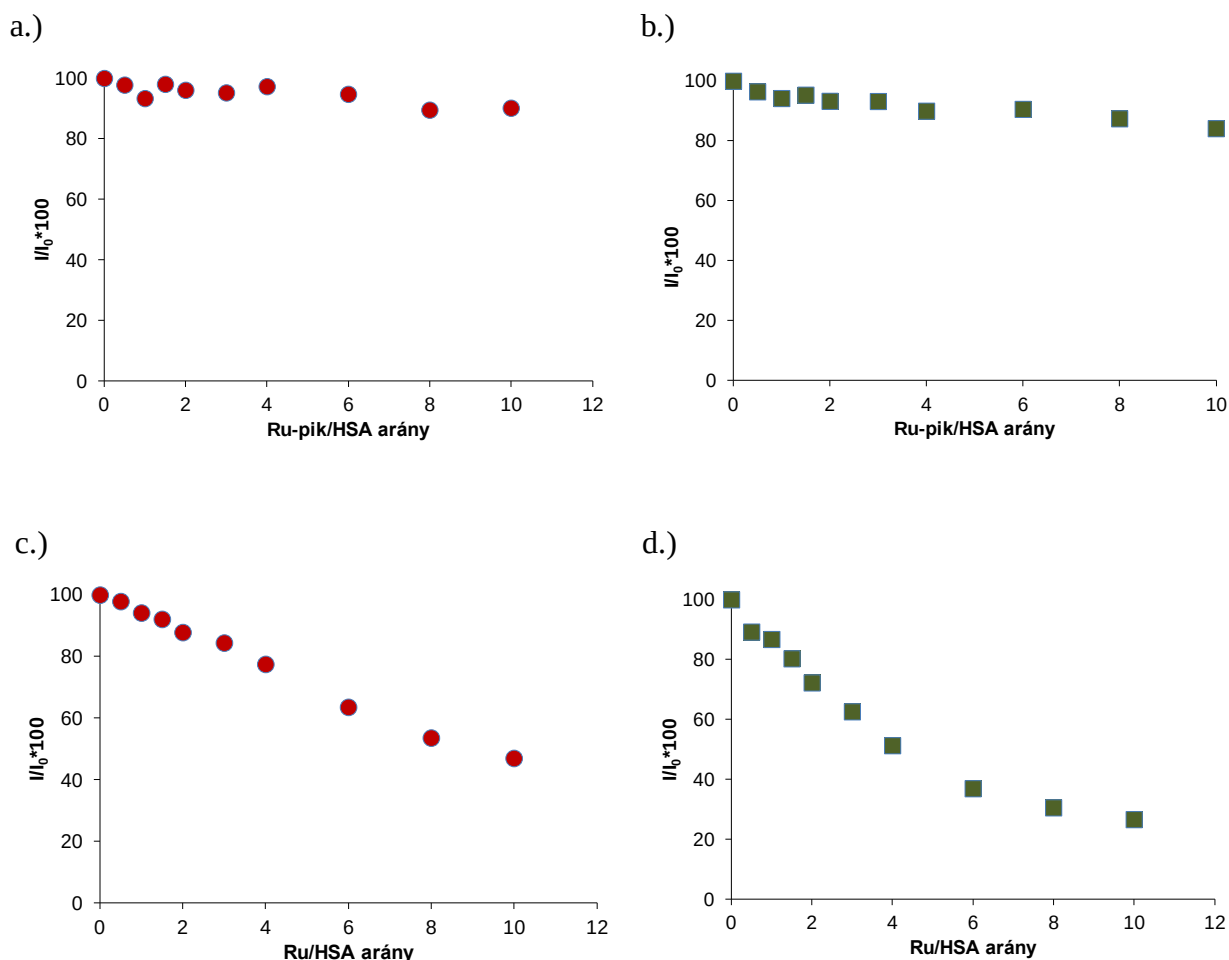


b.)



22. ábra: A $[\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}]$ -pikolinsav spektrofлуорimetriás spektruma 2 óra (a) és egy nap után $\text{pH} = 7,4$; $t = 25^\circ\text{C}$; $\lambda_{\text{EX}} = 280\text{ nm}$ (a) és 295 nm (b); $c_{\text{HSA}} = 0,5\text{ }\mu\text{M}$; HSA: $[\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}]$ -pikolinsav = 1:0,5–1:10.

A mérésekből kiderül, hogy mind a Tyr és a Trp214 emissziós spektrumában a növekvő Ru(II) -komplex arány intenzitáscsökkenést okoz, ami arra utal, hogy a $[\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}]$ és a $[\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}]$ -pikolinsav képes kötődni a fehérjéhez. A bekötődés viszonylag lassú folyamat. A két órás inkubációs idő elteltével jelentős intenzitáscsökkenést láttunk, de az egy napos minták esetében további csökkenést tapasztaltunk, azaz nem elég a két óra inkubációs idő az egyensúly beállításához. Az egy napos és a két napos minták között viszont már nem láttunk különbséget, amiből arra következtettünk, hogy az egyensúly egy nap alatt beállt. Ha az intenzitáscsökkenéseket összehasonlítjuk a $[\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}]$ és a $[\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}]$ -pikolinsav komplexre látjuk, hogy a csökkenés a $[\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}]$ esetében jelentősen nagyobb (23. ábra). Ebből arra következtettünk, hogy a $[\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}]$ pikolinsavval képzett komplexének viszonylagos nagy stabilitása miatt a ligandum koordinációja gátolja a $[\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}]$ bekötődését; azaz a HSA és a ligandum ebben az esetben összemérhetően verseng a fémionért.



23. ábra: [Ru(II)- η^6 -*p*-cimol]-pikolinsav-HSA (a,c) és [Ru(II)- η^6 -*p*-cimol]-HSA (b,d) intenzitásváltozása az arány változásának függvényében 2 óra (a, c) és egy nap (b, d) inkubációs idő elteltével
 pH = 7,4; $t = 25\text{ }^\circ\text{C}$; $\lambda_{\text{EX}} = 295\text{ nm}$; $c_{\text{HSA}} = 0,5\text{ }\mu\text{M}$; HSA: [Ru(II)- η^6 -*p*-cimol]-pikolinsav = HSA: [Ru(II)- η^6 -*p*-cimol] = 1:0,5–1:10.

Továbbá vizsgáltuk a [Ru(II)- η^6 -*p*-cimol] ill. pikolinsav komplexének a HSA egyes kötőhelyein a kötőhely markerek (WF, DG) megkötődésére kifejtett hatását. A mérések során mind a két kötőhely marker esetén a hozzáadott [Ru(II)- η^6 -*p*-cimol] ill. pikolinsav komplex egyértelmű intenzitáscsökkenést okozott. (A vizsgált Ru(II)-vegyületek, ill. a pikolinsav nem fluorescens.) Azonban a [Ru(II)- η^6 -*p*-cimol]-pikolinsav komplex esetén ez az emissziós spektrum változása sokkal kevésbé volt számottevő, mert tízszeres komplexfelesleg esetén is csak 20%-os intenzitáscsökkenést láttunk, mint a [Ru(II)- η^6 -*p*-cimol] esetén. Ami ismét arra utal, hogy a pikolinsav képes gátolni fémion fehérjéhez való kötődését. A [Ru(II)- η^6 -*p*-cimol] feltehetően nem hidrofób kölcsönhatások révén kötődik a HSA-hoz, hanem annak His, Met,

Cys aminosavjainak oldallánci donorcsoportjaihoz koordinálódik. Ez a kötődés azonban képest befolyásolni a HSA I. és II. kötőhelyének kötési sajátságait is.

A HSA-nal való kölcsönhatást részletesebben szeretnénk még tanulmányozni a közeljövőben, valamint bevonjuk majd a vizsgálatokba a humán szérum transzferrint is.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk során a $[\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}(\text{X})_3]$ ($\text{X: H}_2\text{O/ Cl}^-$) (O,N) piridinkarbonsav típusú ligandumokkal (pikolinsav és 6-metil-pikolinsav) képzett komplexeit vizsgáltuk, melyek közül a $[\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}]$ -pikolinsav komplexnek van bizonyítottan citotoxikus hatása. UV-látható spektrofotometriás, pH-potenciometriás és ^1H NMR méréseket végeztünk kloridos és kloridmentes (nitrátos) közegben. Meghatároztuk a ligandumok proton disszociációs- és a $[\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}]$ hidrolízis állandóit is, melyek az irodalmi adatokkal jó egyezést mutatnak.

Új eredményként megállapítottuk, hogy kloridmentes közegben a $[\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}]$ -pikolinsav rendszer esetén csak mono-ligandum komplexek képződnek és ez a komplexképződés már savas pH-n is nagyon jelentős. Az $[\text{ML}]^+$ komplex stabilitási szorzatát spektrofotometriásan határoztuk meg pH 0,8-2 tartományban. A pH 2-11,5 között a $[\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}]$ -pikolinsav komplex nem disszociál.

Kloridiont tartalmazó rendszerre is hasonló eredményeket kaptunk. A kapott állandók alapján megállapítottuk, hogy az oldatban jelenlévő klorid a $[\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}]$ -hoz való koordinálódása révén visszaszorítja valamelyest annak pikolinsavval való komplexképződését, de a komplex ennek ellenre sem disszociál pH 2-11,5 között 24 h eltelté után sem. A ^1H NMR spektrumok alapján egyértelműsíteni lehetett a kloro-komplexek jelenlétét az akva-komplexek mellett.

A $[\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}]$ -6-metil-pikolinsav rendszer esetén csak kloridos közegben végeztünk méréseket. A speciáció hasonló, mint a pikolinsav esetén, de a keletkező komplexek kisebb stabilitásúak, bázikus pH tartományban már megfigyelhető a komplexek disszociációja.

Spektrofluorimetriásan vizsgáltuk a $[\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}]$ és a $[\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}]$ -pikolinsav kölcsönhatását humán szérum albuminnal. Megállapítottuk, hogy a pikolinsav jelenléte jelentősen gátolja a $[\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}]$ transzportfehérjén való megkötődését. A $[\text{Ru(II)}-\eta^6\text{-}p\text{-cimol}]$ fehérjéhez való kötődése gátolja az I. és II. kötőhelyeken a warfarin és danzil-glicin megkötődését.

7. IRODALOMJEGYZÉK

- [1] H.K Manji, R.H Lenox, *Neuropsychopharmacol.*, 19, **1998**, 161–240.
- [2] M. Rosenberg, L. VanCamp, T. Krigas *Nature*, 205, **1965**, 698–699.
- [3] E. Wong, C.M. Giandomenico, *Chem. Rev.*, 99 **1999**, 2451–2466.
- [4] M. Galanski, M.A. Jakupec, B.K. Keppler, *Curr. Med. Chem.*, 12, **2005**, 2075–2094.
- [5] F. Muggia, *Gynecologic Oncology*, 112, **2009**, 275–281.
- [6] C.G. Hartinger, S. Zorbas-Seifried, M.A. Jakupec, B. Kynast, H. Zorbas, B. K. Keppler, *J. Inorg. Biochem.*, 100, **2006**, 891–904.
- [7] G. S. Smith, B. Therrien, *Dalton Trans.*, 40, **2011**, 10793–10800.
- [8] L. R. Bernstein, *Metallotherapeutic Drugs and Metal-Based Diagnostic Agents: The Use of Metals in Medicine*, (Eds: Gielen and Tiekink) **2005**, John Wiley & Sons, Ltd, 259–277.
- [9] A.R. Timerbaev, C.G. Hartinger, S.S. Aleksenko, B.K. Keppler, *Chem. Rev.*, 106, **2006**, 2224–2248.
- [10] W.H. Ang, P.J. Dyson, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2006**, 4003–4018.
- [11] B. Therrien, *Coord. Chem. Rev.*, 253, **2009**, 493–519.
- [12] W.H. Ang, A. Casini, G. Sava, P.J. Dyson, *J. Organomet. Chem.*, 696, **2011**, 989–998.
- [13] A.M. Pizarro, M. Melchart, A. Habtemariam, L. Salassa, F.P.A. Fabbiani, S. Parsons, P.J. Sadler, *Inorg. Chem.*, 49, **2010**, 3310–3319.
- [14] W. Kandioller, A. Kurzwernhart, M. Hanif, S.M. Meier, H. Henke, B.K. Keppler, C.G. Hartinger; *J. Organomet. Chem.*, 696, **2011**, 999–1010.
- [15] I. Ivanović, S. Grgurić-Šipka, N. Gligorićević, S. Radulović, A. Roller, Ž. L. Tešić, B. K. Keppler, *J. Serb. Chem. Soc.*, **2011**, 53–61.
- [16] W. Kandioller, A. Kurzwernhart, M. Hanif, S.M. Meier, H. Henke, B.K. Keppler, C.G. Hartinger; *J. Organomet. Chem.*, 696, **2011**, 999–1010.
- [17] K.S. Smalley, R. Contractor, N.K. Haass, A.N. Kulp, G.E. Atilla-Gokcumen, D.S. Williams, *Cancer Res.*, 67, **2007**, 209–217.
- [18] W.H. Ang, A. De Luca, C. Chapuis-Bernasconi, L. Juillerat-Jeanneret, M. Lo Bello, P.J. Dyson, *ChemMedChem*, **2007**, 1799–1806.
- [19] A.M. Pizarro, A. Habtemariam, P.J. Sadler; *Top. Organomet. Chem*, 32, **2010**, 21–56.
- [20] L. Bíró, E. Farkas, P. Buglyó, *Dalton Trans.* 41, **2012**, 285–291.
- [21] P. Buglyó, E. Farkas, *Dalton Trans.* 39, **2009**, 8063–8070.

- [22] T. Kiss, T. Jakusch, D. Hollender, É. A. Enyedy, L. Horváth, J. Inorg. Biochem., 103, **2009**, 527–535.
- [23] G. Fanali, A. di Masi, V. Trezza, M. Marino, M. Fasano, P. Ascenzi, Mol. Aspects Med., 33, **2012**, 209–290.
- [24] P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, Talanta 43, **1996**, 1739–1753.
- [25] N.D. Chasteen, J.K. Grady, C.E. Holloway, Inorg. Chem., 25, **1986**, 2754–2760.
- [26] O. Dömötör, C.G. Hartinger, A.K. Bytze, T. Kiss, B.K. Keppler, E.A. Enyedy, J. Biol. Inorg. Chem., **2012** *in press*; DOI: 10.1007/s00775-012-0944-6
- [27] G. Gran, Acta Chem. Scand., 4, **1950**, 559–577.
- [28] H.M. Irving, M.G. Miles, L.D. Petit, Anal. Chim. Acta, 38, **1967**, 475–482.
- [29] SCQuery, The IUPAC Stability Constants Database, Academic Software (Version 5.5), Royal Society of Chemistry, **1993–2005**.
- [30] L. Zékány, I. Nagypál, in: Computational Methods for the Determination of Stability Constants (Ed.: D. L. Leggett), Plenum Press, New York, **1985**, 291–353.
- [31] Ignasi Puigdomenech, Medusa (Making equilibrium diagrams using sophisticated algorithms), Royal Institute of Technology, Stockholm, **2009**
- [32] E. Kiss, E. Garribba, G. Micera, T. Kiss, H. Sakurai, J. Inorg. Biochem., 78, **2000**, 97–108.
- [33] É.A. Enyedy, A. Lakatos, L. Horváth, T. Kiss, J. Inorg. Biochem., 102, **2008**, 1473–1485.
- [34] M. Hanif, H. Henke, S.M. Meier, S. Martić, M. Labib, W. Kandioller, M.A. Jakupec, V. B. Arion, H.B. Kraatz, B.K. Keppler, C.G. Hartinger, Inorg. Chem., 49, **2010**, 7953–7963.
- [35] S. Grgurić-Sipka, I. Ivanović, G. Rakić, N. Todorović, N. Gligorićević, S. Radulović, V.B. Arion, B.K. Keppler, Z.L. Tesić.; Eur. J. Med. Chem., **2010**, 1051–1058.
- [36] É.A. Enyedy, É. Sija, T. Jakusch, C.G. Hartinger, B.K. Keppler, T. Kiss, *nem közölt eredmények*
- [37] T. Jakusch, K. Gajda-Schranz, Y. Adachi, H. Sakurai, T. Kiss, L. Horváth, J. Inorg. Biochem., 100, **2006**, 1521–1526.

8. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani **Dr. Enyedy Éva Anna** egyetemi adjunktusnak és **Sija Éva Ilona** tudományos segédmunkatársnak a segítőkész szakmai irányításért és a munkám során felmerülő elméleti és gyakorlati problémák megoldásához nyújtott segítségért, mely nélkül ezen dolgozat nem készült volna el.

Köszönettel tartozom **Dr. Kiss Tamás** tanszékvezető egyetemi tanárnak, aki lehetővé tette, hogy TDK dolgozatomat elkészítsem a Szegedi Tudományegyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékén.

Köszönetet szeretnék mondani a Bioszervetlen Kutatócsoport tagjainak, hallgatóinak és volt hallgatóinak a baráti légkör megteremtéséért és hasznos tanácsaikért, melyekkel segítették munkámat.