

A $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ kölcsönhatása 1-metil-imidazollal és N-acetil-hisztaminnal



TDK dolgozat

Készítette: **Bihari Zsolt**
Vegyész MSc. II.

Témavezető: **Dr. Buglyó Péter**
egyetemi docens

Debreceni Egyetem, Természettudományi és Technológiai Kar
Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék
Debrecen, 2012

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani *Dr. Fábián István* tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy lehetővé tette számomra a TDK dolgozat elkészítését az általa vezetett Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszéken.

Köszönetemet szeretném kifejezni *Dr. Buglyó Péter* egyetemi docensnek a munkám során nyújtott segítségéért.

Köszönöm *Prof. Dr. Farkas Etelka* egyetemi tanárnak és *Dr. Várnagy Katalin* egyetemi docensnek, hogy kérdéseimmel bármikor számíthattam a segítségükre.

Köszönöm *Bíró Linda* PhD hallgatónak és *Godó Attila* műszaki szolgálatónak a munkám során adott hasznos tanácsaikat és az NMR mérésekben nyújtott segítségüket.

Köszönet illeti *Dr. Nagy Lajos* egyetemi adjunktust, *Biri Bernadett* PhD hallgatót és *Nagy Tibor* PhD hallgatót az ESI-MS mérésekben nyújtott segítségéért.

Köszönöm továbbá a *Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoport* minden tagjának, hogy a munkám elvégzéséhez baráti légkört biztosítottak.

Szeretném köszönetemet kifejezni *családomnak* és a *kedvesemnek*, hogy mindvégig támogattak, mellettem álltak.

Köszönettel tartozom a TÁMOP-4.2.2/B-10/-1-2010-0024 jelű pályázat anyagi támogatásának.

Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés	4
2.	Irodalmi áttekintés	5
3.	Célkitűzés	14
4.	Kísérleti körülmények és vizsgálati módszerek.....	15
4.1	Felhasznált vegyszerek.....	15
4.2	Alkalmazott eszközök és módszerek.....	15
4.2.1	<i>pH-potenciometria</i>	15
4.2.2	<i>Mágneses magrezonancia-spektroszkópia</i>	17
4.2.3	<i>Tömegspektrometria</i>	19
5.	Eredmények és értelmezésük	20
5.1	pH-potenciometriás eredmények.....	20
5.1.1	<i>A ligandumok protonálódási folyamatai.....</i>	20
5.1.2	<i>A $[Ru(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})(H_2O)_3]^{2+}$ - ligandum rendszerek jellemzése.....</i>	20
5.2	1H -NMR eredmények.....	23
5.2.1	<i>A ligandumok 1H-NMR spektrumainak pH-függése</i>	23
5.2.2	<i>A $[Ru(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})(H_2O)_3]^{2+}$ - ligandum rendszerek 1H-NMR spektrumainak pH-függése</i>	25
5.3	ESI-TOF-MS eredmények	32
6.	Összefoglalás	35
7.	Summary	36
8.	Irodalomjegyzék	37

1. Bevezetés

Napjainkban intenzív kutatások folynak antitumor aktivitással, de kisebb toxicitással rendelkező fémkomplexek előállítására. Az irodalomban jól ismert, nagyszámú rákellenes szert állítottak eddig elő, és vizsgálták az előállított vegyületek oldatfázisban történő átalakulási reakcióit. Megállapították azt is, hogy ezekben a komplexekben lévő viszonylag inert Ru(III) fémion az élő szervezetben könnyen átalakul a sokkal labilisabb és reaktívabb Ru(II) oxidációs állapotá, amely felelős lehet a megfigyelt citotoxicitásért, és amelyet például egy félszendvics fémorganikus szerkezetben aromás ligandumokkal is stabilizálni lehet.¹⁻²

A szervezetben, a vérérszékben nagyszámú fémion megkötésére alkalmas molekula van. Ezek közül a legjelentősebbek az olyan fehérjemolekulák, amelyek felületi hisztidin aminosav molekularészletük imidazol csoportjával képesek a ruténium(II) kation megkötésére fiziológias körülmények között. Számos fémionnal vizsgálták ezeket a kölcsönhatásokat.³⁻⁴

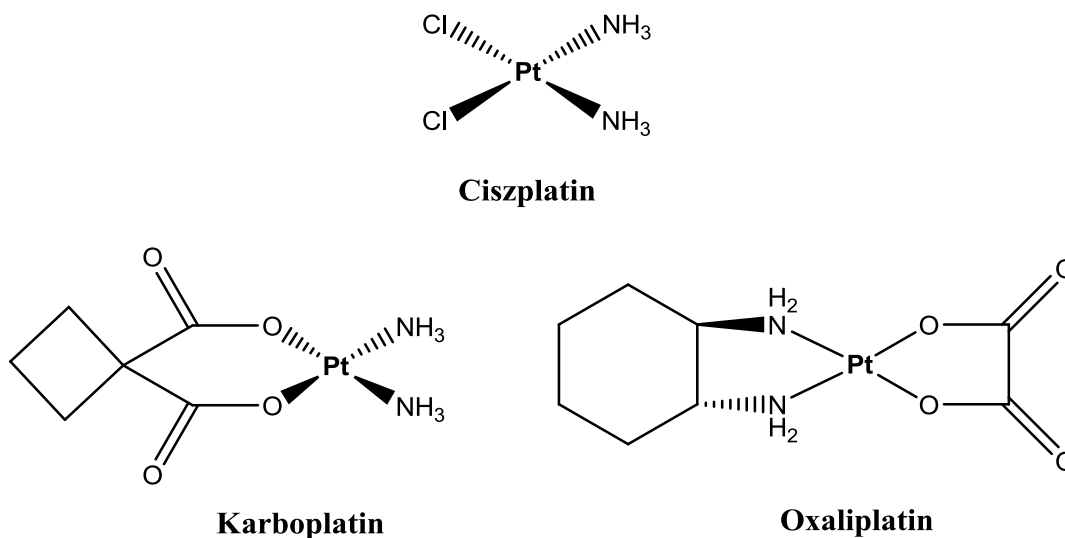
Az irodalomban található kísérleti eredmények alapján elmondható, hogy a szervezetben megtalálható legtöbb N-donor ligandum alkalmas a ruténium(II) megkötésére. A biológiai rendszerekben igen gyakran előforduló fémion megkötő hely, a hisztidin imidazol oldalláncának nitrogénje. Ilyen lehet a humán szérum albumin (HSA), a fehérje transferrin (Tf), és az immunoglobulin (Ig) is.⁵⁻⁶

Ennek megfelelően a tudományos diákköri munkám során, a félszendvics típusú $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ kation és a hisztidintartalmú, modellezésre alkalmas ligandumok - 1-metil-imidazol és N-acetil-hisztamin – közötti kölcsönhatást vizsgáltuk, amelyekkel modellezni tudjuk a biológiai rendszerekben előforduló, fentiekben említett kis és nagy biomolekulák oldalláncában található imidazol-gyűrű nitrogénjének a fémionhoz való koordinálódását.

Az oldategyensúlyi vizsgálatokhoz pH-potenciometriát, ^1H -NMR spektroszkópiát és ESI-TOF-MS spektrometria módszereket alkalmaztunk.

2. Irodalmi áttekintés

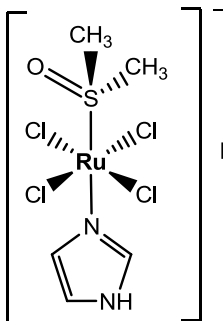
A gyógyászatban használatos tumorelles hatású cisz-diammin-dikloro-platina(II) (röviden: ciszplatin) névű fémkomplex a modern szervetlen kémia megjelenését jelentette a gyógyszerkémiaiában. Ez a vegyület és több másik platinakomplex eredményesen alkalmazható egyes rákos megbetegedések kezelésében (1. ábra).⁷



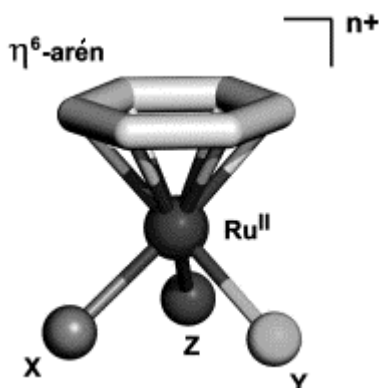
1. ábra: Kemoterápiában használatos platina-alapú vegyületek.⁷

A kezelések során azonban számos mellékhatás lépett fel, pl. dózisfüggő, kumulatív veseelégtelenség, neurológiai tünetek (már az első adag beadása után is), a nagyfrekvencia tartományú hallás elvesztése, néha teljes sükettség, homályos látás és színtévesztés, erős hányinger, hányás (általában 1- 4 órával a kezelés megkezdése után lépnek fel és 24 órán át tarthatnak), anorexia.

Ezért napjainkban is intenzív kutatások folynak hasonló antitumor aktivitással, de kisebb toxicitással rendelkező fémkomplexek előállítására. A platina-csoportba tartozó fémes elem, a ruténium és vegyületei is így kerültek a kutatás előterébe (2. ábra).



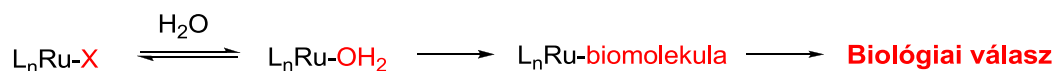
ligandumokkal is stabilizálni lehet (3. ábra). Ilyenkor egy ún. „zongoraszék” geometriájú komplex alakul ki.¹³



3. ábra: A $[(\eta^6\text{-arén})\text{Ru}(\text{XY})(\text{Z})]$ komplexek szerkezete.¹³

Ezek olyan fémorganikus vegyületek, melyekben a Ru(II) kationhoz egy aromás rendszer kötődik hexahapto koordinációval, hat egyenrangú fém-szén kötést kialakítva. A nagyszámban előállított és vizsgált félszendvics fémorganikus komplexekben a hexahapto kötésmódú aromás ligandum mellett található három koordinációs hely közül kettőt általában egy (XY) kelátképző, pl. kinetikailag inert komplexet létrehozó NN-donor ligandum vagy kelátképző OO-donor foglalhatja el. A harmadik koordinációs helyen valamilyen egyfogú ligandum található, leggyakrabban halogenidion, mely vizes oldatban vízre cserélődhet, ami egy reaktívabb akvakomplex kialakulását eredményezi.

Az η^6 -arén stabilizálja a +2-es oxidációs állapotú ruténiumot és hidrofóbbá is teszi, mely fokozza a biomolekuláris felismerési folyamatokat, a ruténium szállítását a sejtmembránokon át és növeli a komplexek vízben való oldhatóságát, mely fontos a klinikai vizsgálatokhoz (1. séma).



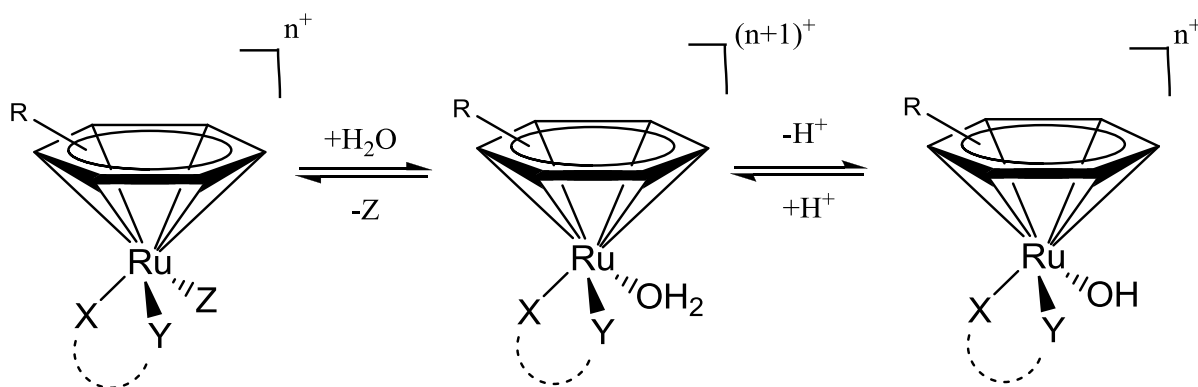
1. séma: A Ru(II)-arén-komplexek általános reaktivitási sémája.

Sadler és munkatársai megállapították,¹⁴ hogy egy adott $[\text{Ru}(\eta^6\text{-arén})(\text{XY})(\text{Z})]$ komplex esetén a vérplazmában, ahol a kloridion koncentrációja körülbelül 104 mM, a komplex döntően a harmadik koordinációs helyén kloridiont tartalmazó formában, míg a sejt

citoplazmában ($[\text{Cl}^-] = 23 \text{ mM}$) és főleg a sejtmagban ($[\text{Cl}^-] = 4 \text{ mM}$) döntően már akva- vagy inaktív hidroxokomplex formájában van jelen.

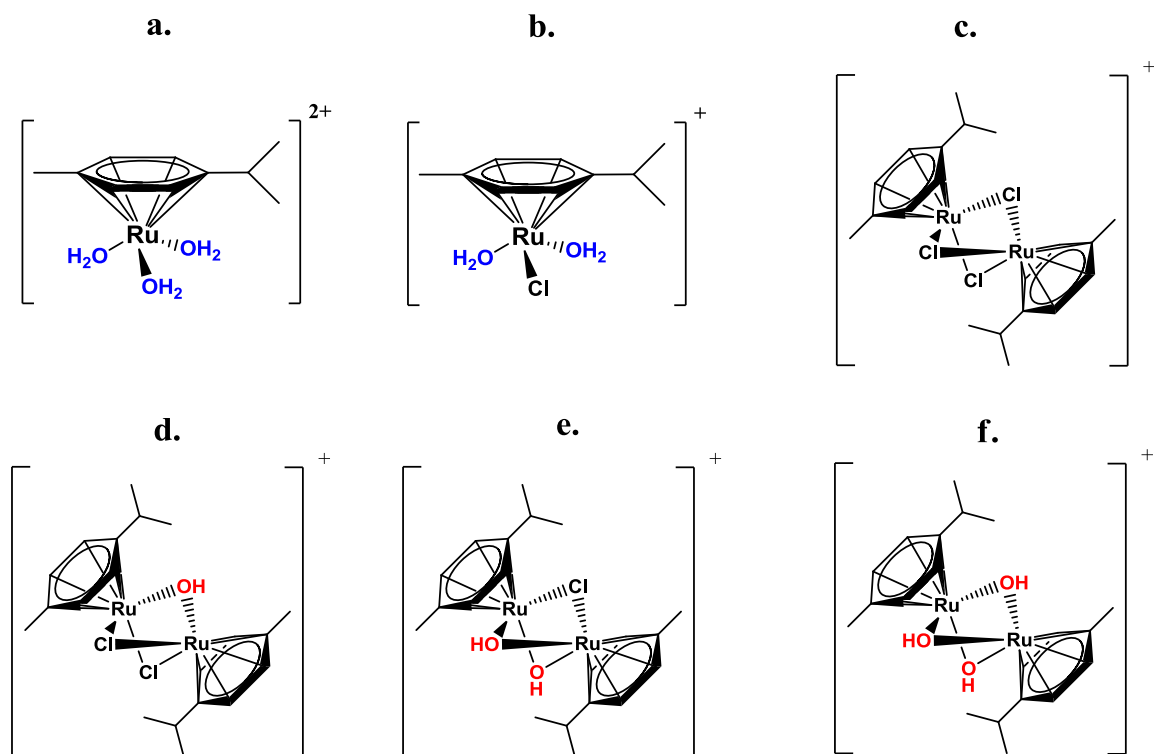
„Különböző aromás ligandumokat tartalmazó félszendvics Ru(II) kationok hidrolitikus tulajdonságai” című szakdolgozatom során részletesen vizsgáltam a hidrolízis menetét, illetve az oldatfázisban, különböző pH-kon képződő komplexek szerkezetét.¹⁵

Ismernünk kell az átalakulás sebességét, a koordinálódó víz-molekula pK_a értékét. Ez az érték a kapcsolódó ligandumtól függően elég széles határok közt változhat. Azaz, ha mérjük az akvakomplexben koordinálódó víz pK_a értékét, következtetni tudunk, hogy a komplex alkalmazható lesz e majd a gyógyászatban (2. séma).

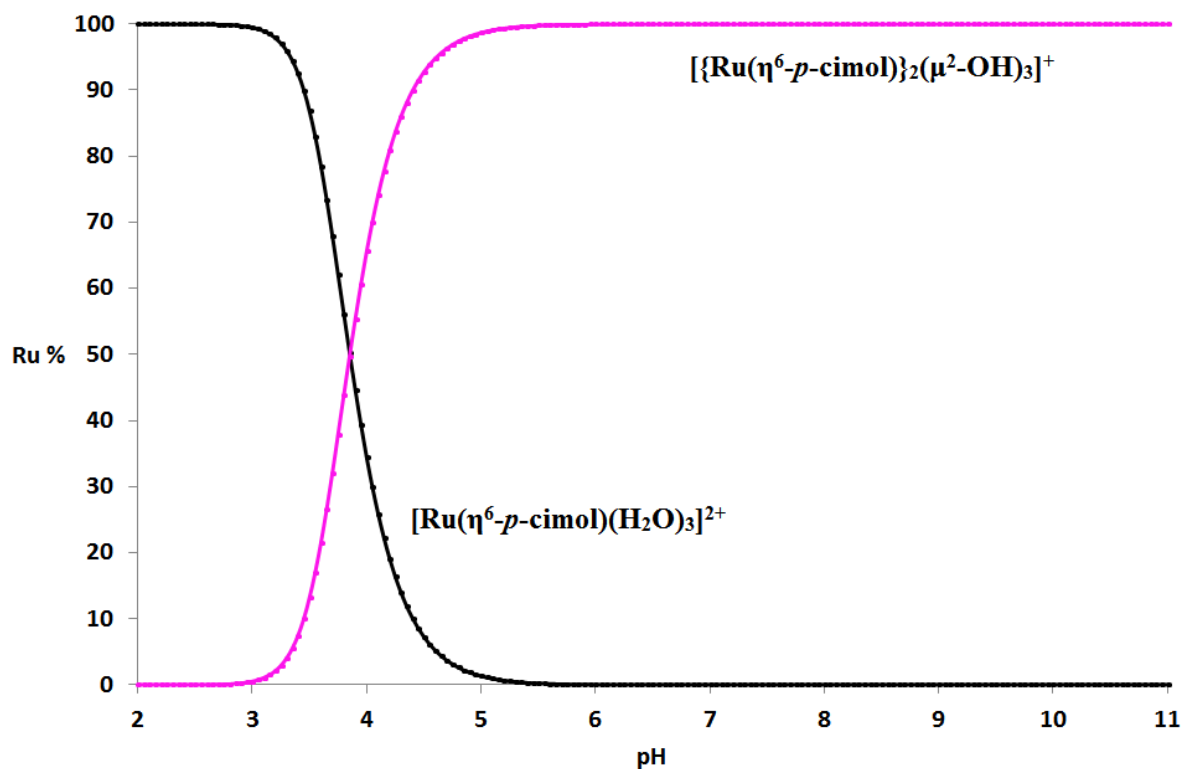


2. séma: Az akvakomplex kialakulása és hidrolízise.
Z: halogenidion, X-Y: kétfogú ligandum.

A Debreceni Egyetemen a Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoportban részletesen megvizsgálták a $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ kation ($p\text{-cimol} = 1\text{-metil-4-izopropil-benzol}$) viselkedését és hidroxámsavakkal való kölcsönhatását vizes oldatban pH-potenciometriás, UV-látható spektrofotometriás, $^1\text{H-NMR}$ és ESI-TOF-MS módszerekkel. Ezen vizsgálatok során kiderült, hogy kloridion jelenlétében a $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ komplex mellett $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{Cl})]^+$ és $[\{\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\}_2(\mu^2\text{-Cl})_3]^+$ van jelen. A fémion hidrolízisekor a pH 4 - 6 tartományban egy kétmagvú vegyes kloro-hidroxo komplex a $[\{\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\}_2(\mu^2\text{-Cl})_2(\mu^2\text{-OH})]^+$ és $[\{\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\}_2(\mu^2\text{-Cl})(\mu^2\text{-OH})_2]^+$, az afeletti pH tartományban pedig egy kétmagvú trihidroxohidas komplex, $[\{\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\}_2(\mu^2\text{-OH})_3]^+$ képződik reverzibilis folyamatokban (4. ábra).¹⁶⁻¹⁷ Az $I = 0,2 \text{ M KNO}_3$ ionerősség esetében azonban csak a $[\{\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\}_2(\mu^2\text{-OH})_3]^+$ összetételű hidroxokomplex volt jelen (5. ábra). Ezért a munkánk során az oldategyensúlyi vizsgálatokat KNO_3 ionerősség mellett végeztük.



4. **ábra:** A $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cym})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ (a), $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{Cl})]^+$ (b), $[\{\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\}_2(\mu^2\text{-Cl})_3]^+$ (c), $[\{\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\}_2(\mu^2\text{-Cl})_2(\mu^2\text{-OH})]^+$ (d), $[\{\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\}_2(\mu^2\text{-Cl})(\mu^2\text{-OH})_2]^+$ (e) és a $[\{\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\}_2(\mu^2\text{-OH})_3]^+$ (f) javasolt oldatszerkezete.



5. **ábra:** A $\text{H}^+ - [\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cym})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ rendszer számított koncentráció eloszlás görbéi.
($I = 0,2 \text{ M KNO}_3$)

Azt, hogy az antitumor tulajdonságú Ru(II)-komplexek szerkezetbeli aktivitását vagy inaktivitását mélyebben megértsük, fontos megismerni ezeknek a komplexeknek az átalakulását és kölcsönhatását. A szervezetbe juttatott ruténium tartalmú komplexek bekerülve a véráramba, az ott jelenlévő kis- és nagy molekulatömegű fémmegkötésre alkalmas vegyületekkel jutnak el a megfelelő helyre, ahol kifejtetik rákellenes hatásukat.

Ezért részletes vizsgálatok szükségesek annak a megismeréséhez, hogy a komplexképződés miként megy végbe a vérérszékben található kis és nagy biomolekulákkal. Ugyanis fontos az, hogy az akvakomplex a sejtben érje el a maximumot, a vérérszékben pedig minimális legyen.

A szervezetben, a vérérszékben található vérfehérjék, plazmafehérjék közül kiemelném az albumint, amely a legnagyobb mennyiségben fordul elő a vérplazmában. Az albumin az egyik legrégebb óta ismert és talán az egyik leginkább tanulmányozott fehérje. A ~66 kDa molekulatömegű human szérum albumin (HSA) az emberi vérplazmában előforduló leggyakoribb fehérje (koncentrációja 600 – 700 $\mu\text{mol/L}$), melyet a máj szintetizál. Számtalan ligandum megkötéséért felelős, mint például zsírsavak, fémionok, metabolitok. Jelentős szerepet játszik a gyógyszerek transzportjában, hatékonyságuk meghatározásában és detoxifikálásában.

Fontos még megemlíteni a globulinokat - a *gamma* a szervezet védekező képességében (immunfolyamatok) fontosak, termelésük fokozódásával a szervezet védekező képessége megnő a fertőző betegségekkel szemben - az *alfa1* a lipidek transzportjában játszanak fontos szerepet, emellett megkötik a tripszint - az *alfa2* a réz szállításában, illetve a szétesett vörösvértestek szabad hemoglobinját kötik meg - a *béta*-globulinok közül a transferrin a vas szállításáért felelős.

A transferrin fő funkciója az, hogy a vasat a felszívódás, a tárolás vagy a lebomlás helyéről a felhasználási helyekre szállítsa. A transferrinek ~80 kDa molekulatömegű glikoproteinek. Egyetlen polipeptidláncból állnak, melynek harmadlagos szerkezete két alegységet határoz meg, ezek mindegyike tartalmaz egy-egy vaskötő helyet. Az emberi vérben, $c = 25 - 40 \mu\text{mol/L}$ koncentrációtartományban fordul elő.

Az irodalomban többféle ruténium tartalmú komplexet tanulmányoztak. Ismeretesebb olyan platina(II)-t és ruténium(II)-t tartalmazó vegyes komplexek is, amelyeknek az amiloid- β -peptid aggregátum gátló hatását vizsgálták Alzheimer kórban szenvedő betegek esetében. Ezek, a két fémiont tartalmazó vegyületek új utat nyithatnak az A β inhibálásában.¹⁸

Vannak azonban olyan félszendvics típusú ruténium(II) vegyületek is, melyek kis peptidekkel alkotott komplexképződése során jellegzetes színváltozást mutatnak, ez alapján

jellemeztek dipeptideket. Mintegy szenzorai bizonyos aminosavaknak, peptideknek és amino glicerideknek.¹⁹

Sok Ru(II)- és Ru(III)-ammin komplex szelektíven kötődik a biomolekulák oldalláncához. Számos antitumor hatású ruténium tartalmú vegyület a transferrinhez való kapcsolódása során jut el a rákos sejtekhez és ott aktiválódik, DNS-hez kötve pedig apoptozist indukál. A vizsgálatok azt mutatták, hogy számos fehérje oldalláncában található, könnyen hozzáférhető hisztidin imidazol nitrogénjéhez képesek koordinálódni ezek a ruténium komplexek (pl.: $[(\text{H}_2\text{O})(\text{NH}_3)_5\text{Ru(II)}]^{2+}$, $[\text{Cl}(\text{NH}_3)_5\text{Ru}]^{2+}$, transz- $[(\text{Im})_2\text{Cl}_4\text{Ru}]^-$ és transz- $[(\text{Im})(\text{DMSO})\text{Cl}_4\text{Ru}]^-$).²⁰

Mindemellett vizsgálatokat végeztek az antitumor hatású, aromás ligandumot tartalmazó ruténium komplexek hisztidin, citokróm-c és oligonukleotidokkal való komplexképződésének vizsgálatára. A nagy teljesítményű folyadékkromatográfiás és NMR mérések alapján az találták, hogy a $[(\eta^6\text{-bip})\text{Ru(en)}]^{2+}$ kation egy szabad koordinációs helye, a hisztidin imidazolgyűrűjén lévő N δ -nitrogénhez is, és a N ϵ -hez is tud koordinálódni, kialakítva a $[(\eta^6\text{-bip})\text{Ru(en)}(\text{N}\delta\text{-L-His})]^{2+}$ és $[(\eta^6\text{-bip})\text{Ru(en)}(\text{N}\epsilon\text{-L-His})]^{2+}$ komplexeket. Ez a fajta kötés az N-terminálisan védett N-Acetil-hisztamin tautomerizációja során is így történik. A kapott eredmények bizonyítására 2D (TOCSY) NMR spektroszkópiás módszert is alkalmaztak, illetve ESI-MS spektrometriával is vizsgálták a képződött komplexeket.

Vizsgálták a $[(\eta^6\text{-p-cimol})\text{RuCl}_2(\text{H}_2\text{O})]$ komplex lizozim enzim 15-ös számmal jelölt hisztidinjéhez való koordinálódását (6. ábra), illetve tanulmányozták antitumor hatású ruténium(III) komplexek ($\text{HIm}[\text{Ru}(\text{Im})_2\text{Cl}_4]$, $\text{HInd}[\text{Ru}(\text{Ind})_2\text{Cl}_4]$) koordinálódását a His253, His597, His590 és His654 csoportokat tartalmazó humán laktoferrinhez. Azt találták, hogy a hisztidin tartalmú fehérjék N-donoratomja kedvelt kötőhely mind a Ru(II) és Ru(III) számára. További vizsgálatokat végeztek a $[(\eta^6\text{-bip})\text{Ru(en)Cl}][\text{PF}_6]$ komplexszel. A vizsgálatok eredményei azt mutatták, hogy vizes oldatfázisban lassú komplexképződés során, az L-hisztaminnal való reakcióban, az N δ és a N ϵ -kötésű ruténium-komplexek képződtek. Az aminosavakhoz és a peptidekhez való relatíve gyenge kötődése teszi lehetővé azt, hogy a komplexek a megfelelő helyen, a rákos sejtekben aktiválódjanak.²¹⁻²²

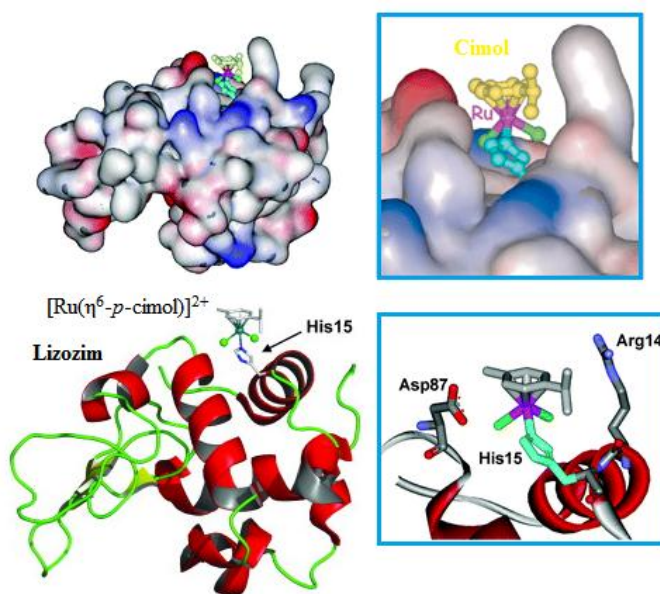
Az utóbbi pár évtizedben feltalált platina és ruténium alapú komplexek közül több is a klinikai kipróbálás fázisába lépett. Azonban a különbség a toxicitásukban van. A ruténium alapú komplexek kevésbé toxikusak, mint a platina alapú antitumor komplexek. Kutatásokat végeztek annak felderítésére, hogy hogyan koordinálódik a komplex a transferrinhez, és hogy hogyan szállítódik a rákos sejtekig, ahol aktiválódik és kifejti hatását.²³

A CD-spektroszkópiás és UV-látható spektrofotometriás módszerekkel is vizsgálták az arén-Ru(II)-klorokomplexek humán szérum albuminnal (HSA), apotranszferrinnel és holotranszferrinnel való kötődésük során a malária ellenes és antitumor hatásukat.²⁴⁻²⁵

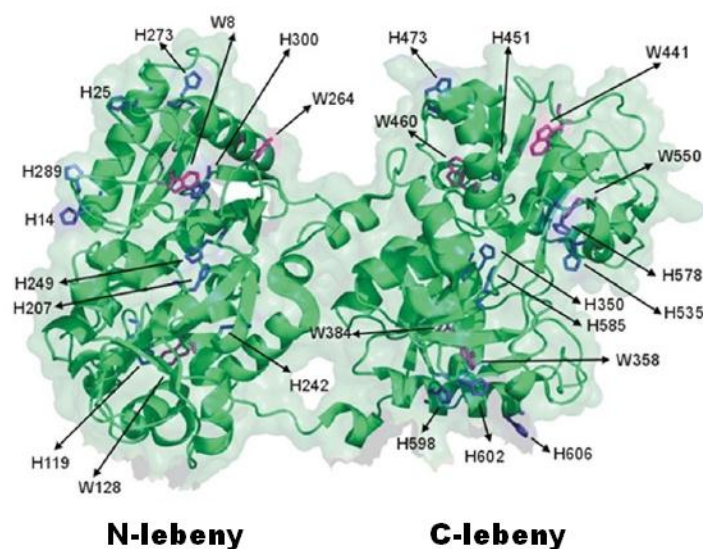
Az irodalmi áttekintésben feltüntetett KP418 és KP1019 nevű vegyületek a klinikai vizsgálatok I. fázisába léptek. Ezeket a komplexeket EPR, elektron paramágneses rezonancia spektroszkópiával tanulmányozták, megfigyelték a karakterisztikus kapcsolódásokat mind a HSA-hoz és a hsTf-hez, illetve az összes humán-szérumhoz. A koordinálódás minden esetben kinetikailag lassú volt.²⁶⁻²⁷

A ruténium(III)-at tartalmazó NAMI-A komplex a szérum-albuminnal és szérum-transzferrinnel alkotott adduktumait is vizsgálták.²⁸ Röntgentkristallográfiás vizsgálatokkal betekintést nyertek, hogy hogyan szállítódik a transzferrinhez való kötődéssel a sejtekig.²⁹ Mindemellett kapilláris zónaelektroforézis és SEC-IC, ICP-MS vizsgálatokat is elvégeztek annak érdekében, hogy a vérszérumban található szérum fehérjékkel való kölcsönhatást tanulmányozhassák. Azt találták, hogy 24 órával a kezelések után, a megvizsgált minták albumintartalma lecsökkent, azonban a ruténium-albumin aggregátumok száma megnövekedett. Ezekkel a módszerekkel a detektálást rövid idő alatt és kis mintamennyiséggel tudták elvégezni.³⁰

Példaként a 6. ábrán feltüntettem a félszendvics szerkezettel stabilizált ruténium(II) kation koordinálódását a His15 imidazol nitrogénjéhez, mely a lizozim enzim oldalláncában található.



6. ábra: A $[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cimol})(\text{Cl})_2(\text{His15-Lizozim})]$, félszendvics típusú Ru(II)-enzim komplex röntgen kristályszerkezete látható.³¹



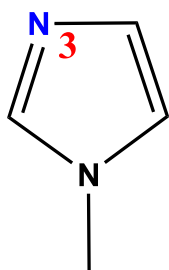
7. ábra: A hisztidin oldalláncok elhelyezkedése (kékekkel jelölt) a humán szérum apo-Transzferrin A-láncának kristályszerkezetében.³²

Az irodalomban található eredmények alapján elmondható, hogy a szervezetben megtalálható legtöbb N-donor ligandum alkalmas a ruténium(II) megkötésére.

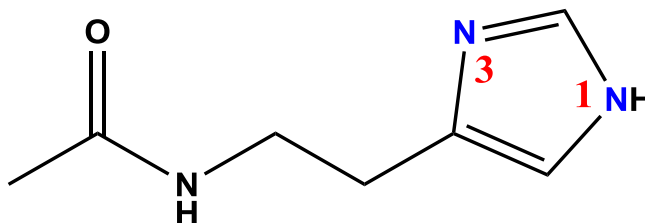
A ruténium(II)-komplex vegyületek szervezetbe kerülésekor nem csak a kloridion képes lecserélődni, hanem teljes mértékben disszociálhat a molekula szabad ligandumra, illetve a fémionra. Így ezek a részecskék kölcsönhatásba is léphetnek a vészsérumban, szövetnedvekben, sejtplazmában található egyéb vegyületekkel. Ezek a kölcsönhatások különböző mértékben befolyásolhatják a ligandumcsere sebességét, ezáltal az adott komplex biológiai aktivitását is, így feltárásuk elengedhetetlen a molekulatervezésben és ugyanezért érdemes oldategyensúlyi vizsgálatokat is végezni különféle, vérben is megtalálható potenciális ligandumokkal. A fémion kis és nagy molekulához igen gyakran koordinatív kötéssel kapcsolódik. A kötések erősségének, illetve a kialakuló komplexek stabilitását befolyásoló tényezőknek az ismeretében információk nyerhetők a szervezetben lejátszódó biokémiai folyamatok mechanizmusáról. Fehérjék esetén az oldalláncok szerepe megnő, ők szolgáltatják az elsődleges fémion kötőhelyet. Metalloenzimek esetén a fémionok számára gyakori kötődési hely a hisztidin aminosav imidazolgyűrűje. Itt a koordináció az imidazol nitrogénatomján keresztül valósul meg. Következésképpen, a ruténium komplexek gyakran szelektíven koordinálódnak a fehérjék oldalláncában található hisztidin imidazol nitrogénjeihez, és a purin nukleotidok imidazol-gyűrűjének N(7)-es nitrogénjéhez és ez az előnye a proteinek, oligonukleotidok és nukleinsavaknak, hogy eljuttatják a megfelelő helyre a fémiont tartalmazó komplexeket.

3. Célkitűzés

Az irodalmi áttekintésben ismertett információk alapján vizsgálataink célja a $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ kation olyan, imidazol gyűrűt tartalmazó ligandumokkal való kölcsönhatásának vizsgálata, amelyek modellezni tudják a fehérjék oldalláncában előforduló, a ruténium(II) megkötésére alkalmas N-donoratomokat. Az oldatfázisban kialakuló komplexek összetételének és tulajdonságainak felderítéséhez pH-potenciometriás, ^1H -NMR és ESI-TOF-MS módszereket használunk. Mivel a szervezetbe bejutott ruténium komplexből esetlegesen képződő ruténium akvakomplex az oldat pH-jától függően inaktív hidroxokomplexszerű alakulhat, így fontos megismerni, hogy fiziológiás körülmények között milyen részecskék vannak jelen a rendszerben. A fémiont és ligandumot tartalmazó rendszerekben képződő komplexek stabilitásának felderítésével lehetővé válna újabb, nagyobb hatékonyságú fémkomplexek, mint kemoterápiák tervezése. A komplexképződés tanulmányozásához felhasznált egyik ilyen vegyület az 1-metil-imidazol, melynek a 3-as helyzetben lévő nitrogén, N(3) donoratomján keresztül tud koordinálódni a félszendvics típusú ruténium(II) kationhoz. A másik ligandum pedig az N-acetil-hisztamin, melynek sajátossága az, hogy a tautomerizációs folyamatoknak köszönhetően az N(1) és az N(3) nitrogénjén bekövetkezhet a protonálódás vagy a fémion koordinálódása (8. ábra).



1-metil-imidazol (MeIm)



N-acetil-hisztamin (AcHm)

8. ábra: A vizsgálni kívánt két ligandum szerkezeti képlete.

4. Kísérleti körülmények és vizsgálati módszerek

4.1 Felhasznált vegyszerek

A kísérletekhez használt *1-metil-imidazol*-t és az *N-acetil-hisztamin*-t a Sigma-Aldrich gyártotta. A ligandumok további tisztítása nélkül, a megfelelő tömegű anyag bemérésével törzsoldatot készítettünk.

A $[Ru(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})Cl_2]_2$ dimert irodalmi módszerrel állítottuk elő.³³ Az ehhez használt *α -terpinén*-t az Acros Organics cég szállította.

A pH-potenciometriás és az ESI-TOF-MS mérésekhez a ruténium törzsoldatot a megfelelő mennyiségű szilárd $[Ru(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})Cl_2]_2$ dimer háromszor ioncserélt vízben való oldásával,³⁴ majd Reanal gyártmányú *ezüst-nitrát*-tal ($AgNO_3$) történő kloridmentesítéssel készítettük.

A titrálásokat $0,2183 \text{ mol/dm}^3$ koncentrációjú karbonátmentes *KOH* oldattal végeztük. A pufferek használt *KH-ftalát* törzsoldatot közvetlen beméréssel készítettük Aldrich gyártmányú *KH-ftalát*-ból. A $0,1929 \text{ mol/dm}^3$ koncentrációjú *HNO₃* mérőoldatot tömény salétromsav hígításával készítettük. Koncentrációját *KOH* mérőoldattal határoztuk meg.

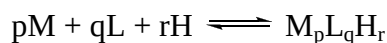
A $^1\text{H-NMR}$ vizsgálatokhoz a szilárd *Ru*-dimert Merck gyártmányú, 99,96% izotóptisztaságú *deuterált víz*be oldottuk és kloridmentesítettük a törzsoldatot.

4.2 Alkalmazott eszközök és módszerek

4.2.1 pH-potenciometria

A módszer elméleti háttere

Az oldatfázisban végbemenő komplexképződési folyamatok egyensúlyi vizsgálatának kiváló módszere a pH-potenciometria. Amennyiben a komplexképződés pH effektussal jár, tehát ha a fémion hatással van a ligandum protonálódási egyensúlyára, akkor alkalmazható ez a módszer. A vizsgálatokkal a képződő asszociátumok összetételét és stabilitási állandóit határozhatjuk meg, a következőkben leírtak alapján. Az általános komplexképződés az itt feltüntetett egyenlettel írható fel:



ahol M a fémion, L a ligandum, H a proton, p, q, r pedig sztöchiometriai számok. (Az egyszerűbb kezelhetőség miatt a részecskék töltését nem tüntettük fel.) Egy $M_pL_qH_r$ általános összetételű komplex β_{pqr} stabilitási állandója pedig az alábbi egyenlet szerint definiálható:

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

Amennyiben a rendszer csak fémiont, ligandumot és protont tartalmaz, akkor az háromkomponensűnek tekinthető. Erre a három komponensre felírt anyagmérlegek a következők:

$$\begin{aligned} C_M &= [M] + \sum_{i=1}^n p_i \beta_{pqr} [M]_i^p [L]_i^q [H]_i^r \\ C_L &= [L] + \sum_{i=1}^n q_i \beta_{pqr} [M]_i^p [L]_i^q [H]_i^r \\ C_H &= [H] + \sum_{i=1}^n r_i \beta_{pqr} [M]_i^p [L]_i^q [H]_i^r \end{aligned}$$

Ha a ligandum protonált formája és a fémkomplexe között mérhető kompetíció van, akkor a komplexek stabilitási állandóit meghatározhatjuk a titrálási görbe elemzésével. A számításokat a Tanszéken kifejlesztett PSEQUAD programmal végeztük, ez a program iterációs módszerrel finomítja a kezdetileg beállított állandókat.³⁵ A komponensekre felírt anyagmérlegek megoldásával, iterációs módszer segítségével meghatározza a feltételezett komplexek stabilitási állandóit. Az értékelések során először bemenő adatként meg kell adnunk a komponensek és asszociátumok számát, és az utóbbiak pontos sztöchiometriai összetételét, a komponensek kiindulási teljes koncentrációját, az ismert és az ismeretlen, közelítő stabilitási szorzatokat. A számolt stabilitási állandók mellett a zárójelben lévő érték minden esetben a standard deviációt jelöli. A fémes rendszerek mérését megelőzően a ligandum protonálódási állandóit határoztuk meg a SUPERQUAD programmal.³⁶

Kísérleti körülmények

A méréseket Mettler Toledo T50 titrátorral és Metrohm 6.0255.100 típusú double junction üvegelektóddal végeztük. A mérőműszert minden méréssorozat előtt az ismert módon hitelesítettük kálium-hidrogén-ftalátra, ($t = 25\text{ °C}$, $\text{pH} = 4,005$) és vízionszorzatra sav-bázis titrálások segítségével ($I = 0,20\text{ mol/dm}^3$, $t = 25\text{ °C}$, $\text{pK}_w = 13,756$). A hidrogénion-

koncentrációt az Irving-féle korrekciót figyelembe véve a mért pH értékekből határoztuk meg.³⁷ A pH-potenciometriás méréseknél a 25,0 °C-os hőmérsékletet ultratermosztáttal tartottuk fent. A minták titrálása speciálisan kialakított csiszolatos titrálóedényekben történtek, tisztított argon atmoszféra alatt, kizárva az oxigén és szén-dioxid bejutását a rendszerekbe, illetve a gázáram biztosította a kevertetést is. A minták össztérfogata minden esetben 15,00 cm³ volt.

A komplexképződés tanulmányozásához az 1:1, 1:2 és 1:3 fémion-ligandum arányú mintákat állítottuk össze. A különböző arányú fémes rendszerekben az 1-metil-imidazol ligandum koncentrációja, $c_{\text{MeIm}} = 2,9 \text{ mM}$ volt, az N-acetil-hisztamin esetében ez a koncentráció, $c_{\text{AcHm}} = 3,2 \text{ mM}$. A különböző arányú mintákban csak a fémion koncentrációját változtattuk a megfelelő arányhoz illően. A ligandum pK mérésnél a titrálási paramétereket: $dt = 90 \text{ mp}$, $dV = 0,05 \text{ ml}$, míg a fémes rendszernél az egyensúlyi titrálási értékeket: $t_{\text{min}} = 150 \text{ mp}$, $t_{\text{max}} = 900 \text{ mp}$ és az adagolás térfogatát, $dV = 0,012 \text{ ml}$ -re állítottuk. A mérések során az ionerősséget 1,0 mol/dm³-es koncentrációjú KNO₃ oldattal 0,20 mol/dm³ értékre állítottuk be. A ligandum törzsoldat pontos koncentrációjának meghatározásához HCl oldat hozzáadásával a ligandum protonált formáját alakítottuk ki, ezután KOH mérőoldattal titráltuk. A felvett titrálási görbéket pedig a SUPERQUAD nevű program segítségével értékeltük ki. A KOH oldat pontos koncentrációját ismert koncentrációjú KH-ftalát oldat titrálási görbéjéből Gran-féle linearizációval határoztuk meg.³⁸ Több reális modell esetén (pl. ha két részecske képződése azonos pH-effektussal jár) a pH-potenciometria alapvető, de nem elegendő az oldatban keletkező részecskéknek és azok eloszlásának feltérképezéséhez. Az ilyen esetekben segítségül hívunk más, elsősorban szerkezeti információkat hordozó módszereket, pl.: NMR spektroszkópiát, amely kiegészíti a potenciometriás méréseket.

4.2.2 Mágneses magrezonancia-spektroszkópia

A módszer elméleti háttere

Az NMR (**N**uclear **M**agnetic **R**esonance), magyarul mágneses magrezonancia spektroszkópia az egyik legtöbb információt szolgáltató szerkezetvizsgáló módszer, amely a minta molekuláit alkotó atomok fizikai tulajdonságait használja ki a szerkezetre vonatkozó információk kinyeréséhez. Az NMR-spektroszkópiával azok az atommagok vizsgálhatók, melyeknek protonszáma, neutronszáma, vagy mindkettőnek a száma páratlan, zérustól eltérő eredő magspinnel rendelkeznek. Ezeket nevezzük NMR-aktív magoknak. A mágneses

magrezonancia jelenségének fizikai alapját a Zeemann-felhasadás jelenti. Homogén mágneses térben az NMR-aktív magok energiaállapota $2I+1$ energianívóra hasad fel, ahol I a magspin kvantumszám. A létrejött energiaszintek közötti átmenetek megfelelő, adott frekvenciájú (a rádiótartományba eső) elektromágneses sugárzással gerjeszthetők, tehát a jelenségnek rezonancia jellege van. A létrejött nívók közötti energiakülönbség a külső mágneses tér erősségének növekedésével nő. A valós rendszerekben az atommagot elektronok veszik körül, melyek mozgásuk során saját mágneses teret hoznak létre, ami módosítja – erősíti, vagy gyengíti a külső teret a mag környezetében. Ezt nevezzük kémiai árnyékolásnak. A kémiai árnyékolás következtében az atommag abszorpciós frekvenciája eltolódik az árnyékolatlan maghoz képest. Ezt nevezzük kémiai eltolódásnak (δ). A kémiai árnyékolás, és így a kémiai eltolódás mértéke függ az adott atommag körüli elektroneloszlástól, vagyis az adott mag kémiai környezetétől. Az egyes, eltérően árnyékolt magok NMR-jelei különböző energiaabszorpciójuk miatt elkülönülten jelennek meg. A jelek spektrumbeli helyzetének megadására - egy alkalmasan megválasztott referenciaanyag NMR-jelére vonatkoztatva - a kémiai eltolódást használják. A kapott jel multiplicitása a csatoló partnerek számának és minőségének függvénye, és egyértelmű felvilágosítást ad az adott mag molekulán belül elfoglalt helyéről. A kapott multipllett jelei közti távolságot csatolási állandónak (J) nevezzük és Hz-ben adjuk meg.

Kísérleti körülmények

A ^1H -NMR méréseket Bruker WP 360 SY típusú készülékkel végeztük, a spektrumok kiértékelése pedig az 1D-WinNMR program segítségével történt. A kémiai eltolódások értékeit ppm-ben adtuk meg a belső standard (TSP) jeléhez viszonyítva. A $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ - MeIm és $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ - AcHm rendszereket 1:1 és 1:3 aránynál különböző pH értékeken vizsgáltuk.

A fémes törzsoldat elkészítéséhez kimértük az ezüst-nitrátot és hozzáértük a megfelelő mennyiségű $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Cl}_2]_2$ dimert. Oldószerként deuterált vizet használtunk. A kloridmentesítéssel nyert, leszűrt törzsoldatok térfogata $8,0\text{ cm}^3$ volt. A fémiont és ligandumot tartalmazó törzsoldat $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Cl}_2]_2$, KNO_3 , ligandum, D_2O , DNO_3 és TSP felhasználásával készült, a minták minden esetben $600\text{ }\mu\text{l}$ térfogatúak voltak. A ligandumtörzsoldat hasonló módon, de dimer nélkül készült, a mintatérfogat itt is $600\text{ }\mu\text{l}$ volt. Az ionerősséget $c = 1,0\text{ M}$ -os KNO_3 -mal $0,20\text{ M}$ -ra állítottuk. A pH beállítását DNO_3 és NaOD oldattal végeztük. A mintákban mért pD értékeket az alábbi összefüggés alapján pH-vá

számoltuk át: $pD + 0,40 = pH$, az így kiszámolt pH értékeket tüntettük fel az NMR spektrumokon.³⁹ Minden mérés előtt, miután beállítottuk a megfelelő pH-kat, hagytuk a mintákat minimum egy órát állni, hogy beálljon az egyensúly. Az N-acetil-hisztamin esetében 24 órával később is megtörtént a fém-es rendszer 1H -NMR spektrumainak a felvétele, azonban jelváltozás nem volt tapasztalható.

4.2.3 Tömegspektrometria

A módszer elméleti háttere

A tömegspektrometria (**Mass Spectrometry, MS**) a különböző molekulák, atomok ionizációján, majd ezen ionok relatív tömegének meghatározásán alapuló, nagy hatékonyságú analitikai és szerkezetvizsgáló módszer. A tömegspektrometriás analízis előnye, hogy kis anyagmennyiségek és komplex biológiai minták komponenseinek kvalitatív és kvantitatív meghatározására alkalmas. Egyre nagyobb teret hódít előnyeinek köszönhetően a komplex biológiai minták analízisében. A biomolekulák analízise szempontjából fontos előrelépést jelentő ionizációs mód az ESI (**ElectroSpray Ionization**). Ez egyaránt lehetővé teszi kis és nagy molekulatömegű biopolimerek (peptidek, proteinek, szénhidrátok, DNS fragmensek) és lipidek vizsgálatát is. Az egyes (m/z) értékekhez tartozó ionok relatív intenzitása mérhető, így fel tudunk venni egy tömegspektrumot, ami a relatív intenzitást ábrázolja az (m/z) függvényében. Ez a mérési módszer rendkívül pontos, így a természetes izotóp eloszlás ismeretében pontosan meg tudjuk határozni, hogy milyen összegképlet rendelhető az egyes intenzitás csoportokhoz.

Kísérleti körülmények

A méréseket Bruker micrOTOF-Q ESI-TOF tömegspektrométerrel végeztük. Az 1:1 és 1:3 arányú fém-es rendszereket különböző pH értékeken, pozitív módban vizsgáltuk. A törzsoldatok a dimer kloridmentesítésével nyert $[Ru(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})(H_2O)_3]^{2+}$ -t, ligandumot és háromszor ioncserélt vizet tartalmaztak. A pH beállítására vizes HNO_3 , illetve KOH oldatokat használtunk, a mintatérfogat 700 μl volt. A megfelelően kloridmentesített és 0,45 μm -es mikroszűrőn leszűrt ruténium-törzsoldat fémion és ligandum koncentrációja az 1:1 aránynál azonos volt, $c = 3,0 \text{ mM}$. Az 1:3 arányú mintáknál a $c_{Ru} = 1,0 \text{ mM}$ és $c_{lig} = 3,0 \text{ mM}$ volt.

5. Eredmények és értelmezésük

5.1 pH-potenciometriás eredmények

5.1.1 A ligandumok protonálódási folyamatai

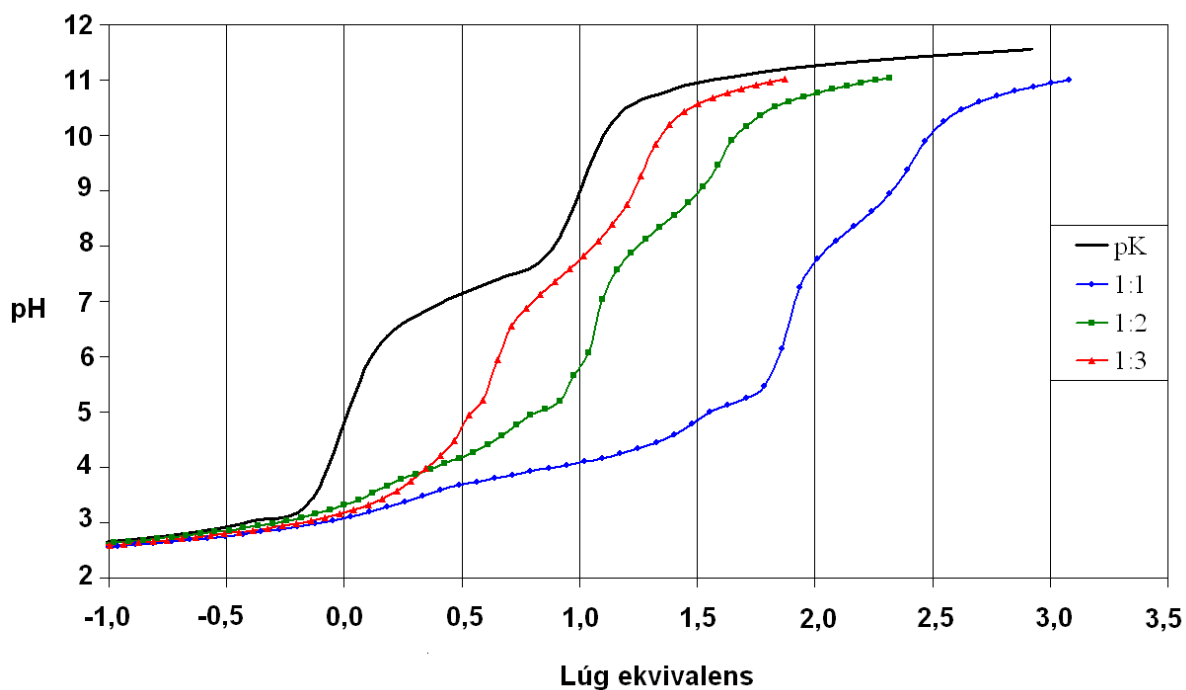
A felhasznált 1-metil-imidazol, illetve N-acetil-hisztamin ligandumok protonálódási állandóit már korábban meghatározták, azonban ezt mi is elvégeztük azért, hogy a mi kísérleti körülményeink mellett is rendelkezésünkre álljanak ezek az adatok. Az 1. táblázatban feltüntetett két ligandum esetében meghatározott protonálódási állandó jó egyezést mutatott az irodalmi értékekkel.⁴⁰⁻⁴¹

1. **táblázat:** A ligandumok pH-potenciometriásan meghatározott protonálódási állandó értékei, $t = 25,0\text{ }^{\circ}\text{C}$, $I = 0,20\text{ mol/dm}^3$ (KNO_3).

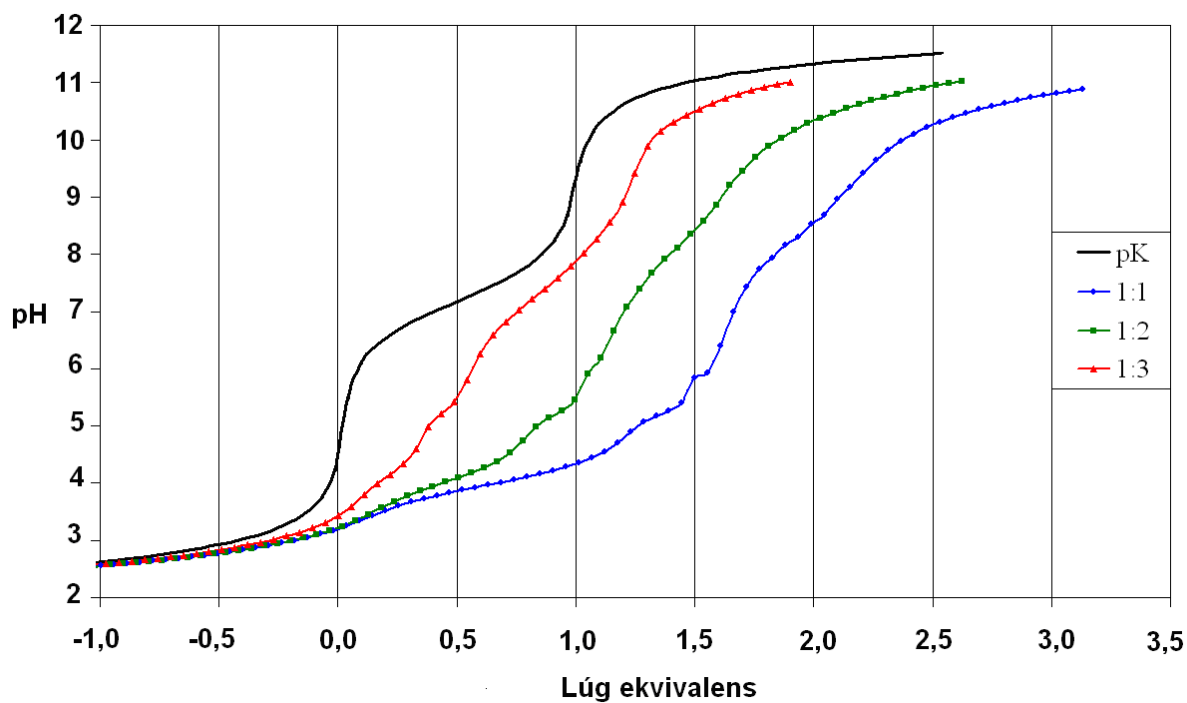
Ligandum	log β	
	Irodalmi ⁴⁰⁻⁴¹	Mért
1-metil-imidazol	7,06	7,09(1)
N-acetil-hisztamin	7,02	7,06(1)

5.1.2 A $[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cimol})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ - ligandum rendszerek jellemzése

Az oldategyensúlyi vizsgálatok során különböző fémion - ligandum arányoknál végeztük a pH-potenciometriás vizsgálatokat a $[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cimol})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ - MeIm és a $[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cimol})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ - AcHm rendszereknél. Az így kapott titrálási görbék lúgekvivalensre való átszámolása után kapott ábráin együtt látszik a ligandum (pK), illetve az 1:1, 1:2 és az 1:3 arányú rendszerek (9. – 10. ábra). Megfigyelhető, hogy már pH ~3 felett elválnak a fémiont is tartalmazó minták görbéi a csak ligandumot tartalmazó minta titrálási görbájátől, ami azzal magyarázható, hogy már ilyen savas közegben is van komplexképződés.



9. ábra: A $\text{H}^+ - \text{MeIm}$ (pK), valamint a $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+} - \text{MeIm}$ rendszerben 1:1 (kék), 1:2 (zöld) és 1:3 (piros) aránynál felvett titrálási görbéi.



10. ábra: A $\text{H}^+ - \text{AcHm}$ (pK), valamint a $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+} - \text{AcHm}$ rendszerben 1:1 (kék), 1:2 (zöld) és 1:3 (piros) aránynál felvett titrálási görbéi.

Összehasonlítva a megfelelő ligandumokhoz tartozó titrálási görbéket (9. – 10. ábra) az 1:1 arányú fémes rendszerekkel, azt tapasztalhatjuk, hogy a komplexképződési folyamat pH ~ 5 fölött már átfed valamilyen a komplexképződés szempontjából lassú folyamattal, illetve a hidrolízissel, amely során inert trihidroxihidas $[\{Ru(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\}_2(\mu^2\text{-OH})_3]^+$ összetételű hidroxokomplex (5. ábra/f.) keletkezik, így a komplexképződés rendkívül lassúvá, egyensúlyi szempontból nem kezelhetővé válik. A pH-potenciometriás módszer kísérleti körülményeiben leírt paraméterek mellett a fémes rendszerek egyensúlyban való titrálása során $t_{\max} = 15$ perc várakozási idő alatt sem állt be az egyensúly, így a PSEQUAD számítógépes szoftverrel csak a pH ~ 5-ig lejátszódó komplexképződést lehetett nyomon követni. Az így kapott kevés titrálási pont miatt csak nagy hibával lehetett kiszámítani a feltételezett komplexek a stabilitási állandó értékét, csak az ML összetételű komplex volt számolható.

Az acetil-hisztamin tartalmú fémes rendszerek pH-potenciometriás mérése esetében figyelembe kell venni, hogy a tautomerizációs folyamatoknak köszönhetően az imidazolcsoport mindkét nitrogénje alkalmas proton, illetve fémion megkötésére. Mivel a ligandum monodentát módon kapcsolódik a fémionhoz, elvileg mindkét csoport koordinációjára lehetőség nyílik. Mivel a két izomer képződés azonos pH-effektussal jár, így a pH-potenciometria nem alkalmas az egyes részecskék mennyiségének meghatározására. Ezért és a fenti lassú folyamatok miatt, az oldatfázisban kialakuló komplexek szerkezetének felderítésére $^1\text{H-NMR}$ és ESI-TOF-MS módszert alkalmaztunk.

5.2 ^1H -NMR eredmények

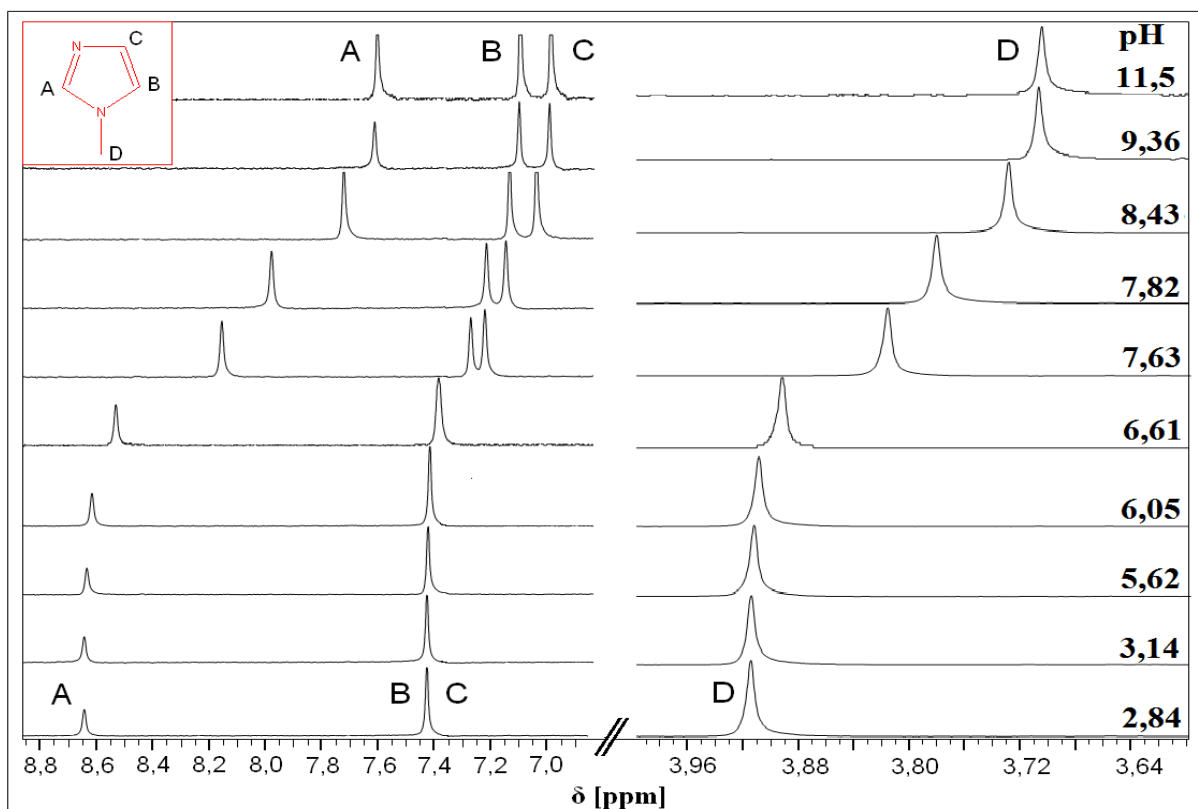
5.2.1 A ligandumok ^1H -NMR spektrumainak pH-függése

Az igen lassú folyamatok miatt a pH-potenciometriás titrálás nem bizonyult a megfelelő módszernek a képződő komplexek összetételének és stabilitási állandóinak a meghatározására. Ezért NMR spektroszkópiás méréseket is elvégeztünk. Nehésvízben felvettük a ligandumok ^1H -NMR spektrumainak pD függését. A pH-potenciometriásan meghatározott ligandum protonálódási állandókkal (1. táblázat) jó egyezést kaptunk a ^1H -NMR módszerrel, itt is pH ~ 7 körülre esik mind a két ligandum pK_a értéke. A 11. és 12. ábrán a spektrum ablak bal felső sarkában a vegyület szerkezetében található protonokhoz hozzárendeltem a mért jeleket. Természetesen savas pH-n a protonált, míg lúgos pH-tartományban, a ligandum pK_a értékének megfelelő pH fölött a deprotonált forma van jelen.

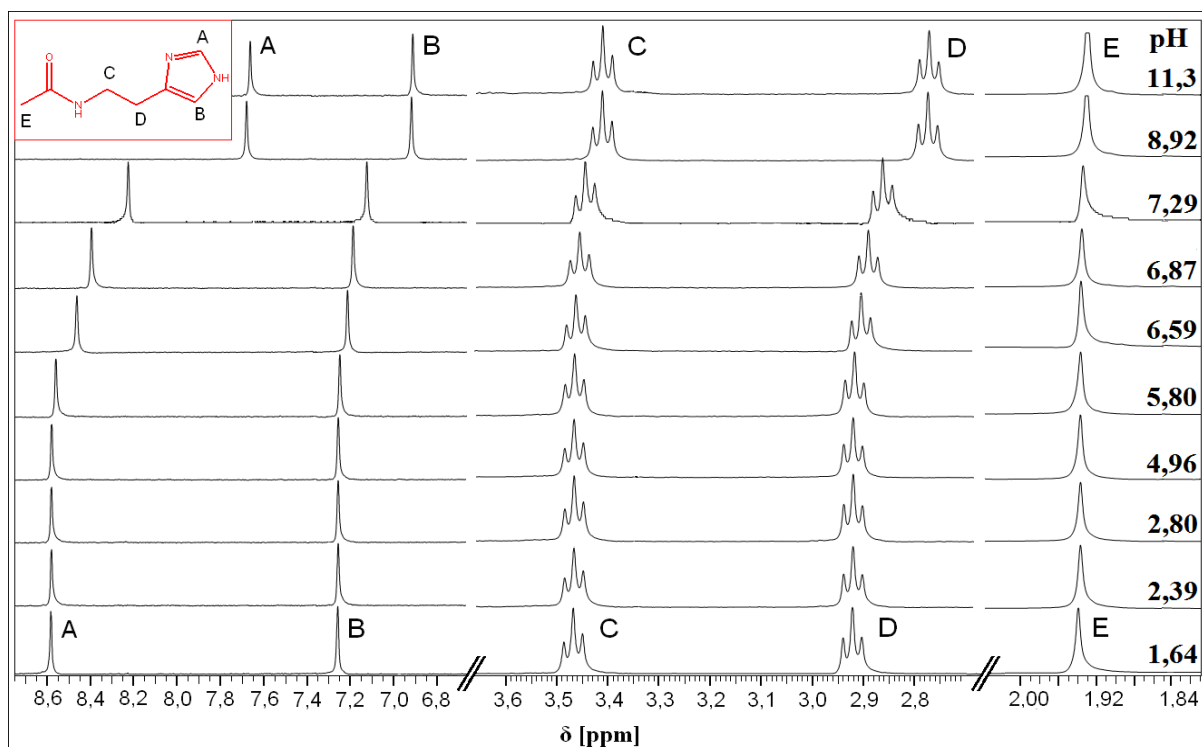
Az 1-metil-imidazol esetében a savas pH-n a gyors csere miatt jelösszeolvadás történt, ezért kezdetben egy szingletet kapunk. A 7,4 ppm kémiai eltolódásnál lévő szingletet integráltuk és két protonnak, a **B**- és a **C**-jelének felelt meg. Ahogy növeltük a pH-t, a két jel külön szingletként jelent meg a pH 7 fölött. Az is megfigyelhető még, hogy az 1-metil-imidazol **D**-vel jelölt metil csoporton lévő három hidrogén $\delta = 3,90$ ppm-ről a $\delta = 3,72$ ppm-re, a nagyobb térerősség irányába tolódott, a $\Delta\delta = 0,18$ ppm. Míg a két nitrogén közötti **A**-val jelölt hidrogénél az eltolódás mértéke ennek több mint ötszöröse, $\Delta\delta \sim 1,0$ ppm.

Ugyanez figyelhető meg az acetil-hisztamin ligandumnál is (12. és 13. ábra). Az AcHm molekula viszonylag kisméretű, így a protonálódás vagy deprotonálódás hatással lehet valamennyi csoport kémiai eltolódására. Ahogy azonban azt a 12. ábra mutatja, az **E**-vel jelölt acetil CH_3 -csoportján lévő három hidrogénre hat legkevésbé a pH növelése, azaz a molekula deprotonálódása, illetve komplexbe való kötődés. Mindemellett az imidazol gyűrűn lévő két nitrogén közötti, **A**-val és **B**-vel jelölt hidrogének kémiai környezete jobban megváltozik, ezért nagyobb eltolódást szenved.

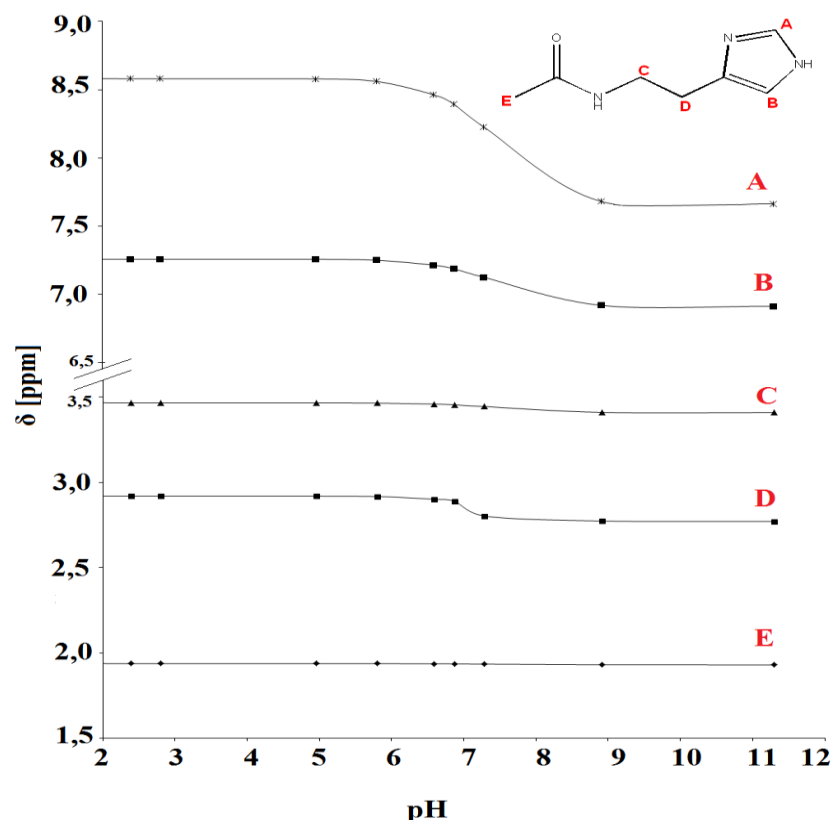
Ha nincs zavaró tényező, például a jelek egymásba tolódása, akkor a komplexképződés jól megfigyelhető lenne a 7,0 – 9,0 ppm-tartományban. Az 1-metil-imidazol esetében azonban pont ez volt a probléma az aromás gyűrűn lévő protonok jeleivel, így a 15. ábrán az alifás tartományt tüntettem fel, hogy jellemezzem a keletkező komplexek mennyiségét, illetve minőségét.



11. ábra: Az 1-metil-imidazol ligandum D_2O -ban felvett ^1H -NMR spektrumai különböző pH-értékeken. ($I = 0,2\text{M KNO}_3$)



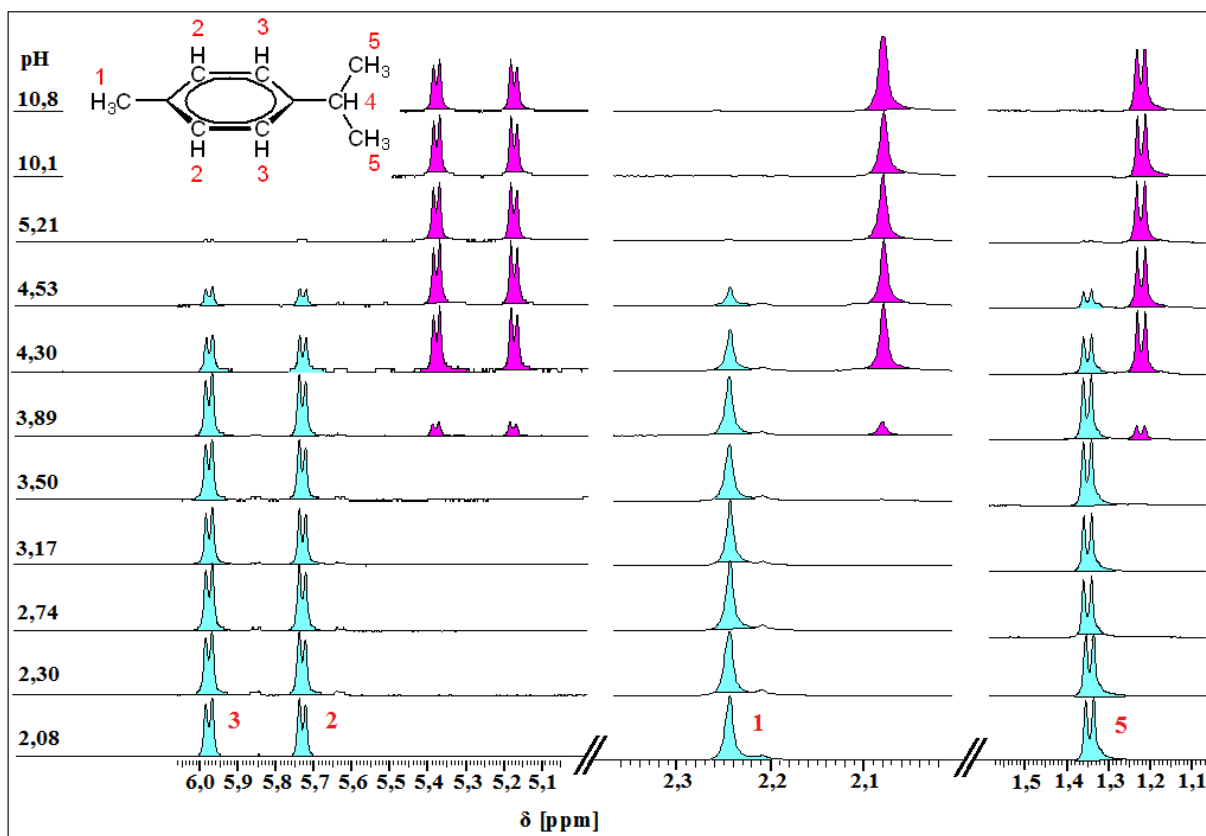
12. ábra: Az N-acetil-hisztamin ligandum D_2O -ban felvett ^1H -NMR spektrumai különböző pH-értékeken. ($I = 0,2\text{M KNO}_3$)



13. ábra: Az N-AcHm ligandum egyes hidrogénjeihez tartozó kémiai eltolódás értékek változása a pH függvényében.

5.2.2 A $[Ru(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})(H_2O)_3]^{2+}$ - ligandum rendszerek $^1H\text{-NMR}$ spektrumainak pH-függése

Először a $[Ru(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})(H_2O)_3]^{2+}$ tartalmú minták $^1H\text{-NMR}$ spektrumainak a pH függését vizsgáltuk, állandó ionerősség mellett ($I = 0,2 \text{ M KNO}_3$). A 14. ábrán feltüntetett független mérések alapján a spektrumban a pH 2,1 - 4,5 tartományban beazonosítható a $[Ru(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})(H_2O)_3]^{2+}$ összetételű akvakomplex, fémionhoz kapcsolódó $p\text{-cimol}$ jelei közül az izopropil két CH_3 -csoportjainak dublettje 1,33 - 1,35 ppm, míg a gyűrű részhez kapcsolódó 1-es számmal jelzett metil-csoport szinglett jele 2,24 ppm kémiai eltolódásnál azonosítható be. Az izopropil metin hidrogénjéhez rendelhető multiplett 2,8 ppm-nél jelenik meg. A gyűrűhidrogének jelei az 5,7 és 6,0 ppm közötti aromás tartományban láthatók, két dublett formájában (14. ábra). A világoskékkel jelölt akvakomplex jelei pH ~ 5 körül lecsökkennek és helyette a lilával jelölt, kisebb ppm tartományban megjelenő $[Ru(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})_2(\mu^2\text{-OH})_3]^+$ összetételű hidroxokomplex van jelen pH ~ 4 -től, azaz megtörténik az akvakomplex hidrolízise. A továbbiakban az összes ábrán ilyen színnel jelöltük ezeket a részecskéket, ugyanis ez megtalálható mind a két ligandum fémes rendszereiben.



14. ábra: A $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ kation, hexahapto kötésmódú 1-metil-4-izopropil-benzol liganduma különböző pH-kon, D_2O -ban felvett ^1H -NMR spektrumai. A spektrumon nem jelöltem az izopropil CH-csoportjához tartozó heptettet. ($I = 0,2 \text{ M KNO}_3$)

A $[\{\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\}_2(\mu^2\text{-OH})_3]^+$ összetételű hidroxokomplex p -cimol jelei közül az izopropil két CH_3 -csoportjának dublettje 1,20 - 1,22 ppm, míg a gyűrű részhez kapcsolódó 1-es számmal jelzett metil-csoportnak a jele 2,08 ppm kémiai eltoldásnál látható. A képződő $[\{\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\}_2(\mu^2\text{-OH})_3]^+$ összetételű hidroxokomplex gyűrűhidrogénjeinek jelei az 5,17 - 5,37 ppm-nél található.

A komplexképződést általában a gyűrűhidrogének aromás jelein és a gyűrűmetil szinglettjén keresztül a legegyszerűbb nyomon követni. Mint azt a későbbiekben is látni fogjuk (15. ábra), esetünkben célszerűbb volt az 1-metil-imidazolt tartalmazó fémes rendszerben az alifás, azon belül is a p -cimol izopropil, illetve a gyűrűmetil jeltartományát felhasználni a komplexképződés tanulmányozására.

A $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ - MeIm rendszer ^1H -NMR vizsgálata

A 11. ábrán ismertettük a metil-imidazol ligandum pH függő NMR spektrumait. Ezek alapján a 15. ábrán lévő spektrumban a protonált és deprotonált szabad ligandum jeleit beazonosíthatjuk, ezt citromsárga színnel jelöltük. Mind az 1:1 és 1:3 aránynál egy bizonyos komplexhez tartozó jeleket azonos színnel jelöltük.

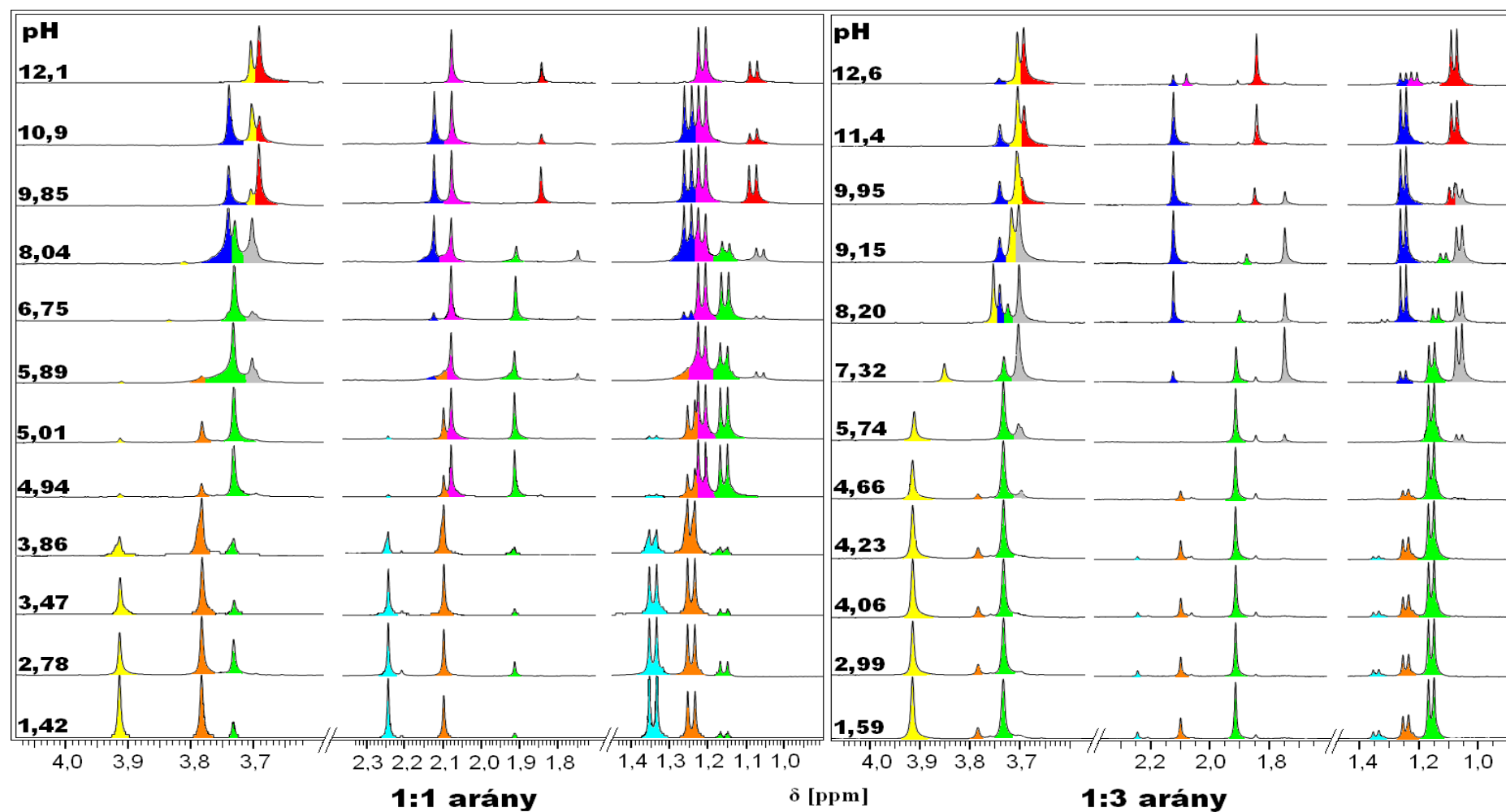
A 15. ábrán a $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ - MeIm rendszer spektrumában a komplexképződés tanulmányozására három tartományt vehetünk igényben. A három tartomány közül kettő a 14. ábrán látható *p*-cimol aromás gyűrűhöz tartozik, itt nem jelenik meg a ligandum jele. Az egyik az 1,0 - 1,4 ppm tartomány, mely az *iPr*-metilekhez rendelhető, a másik a gyűrűmetilekhez, mely az 1,8 - 2,3 ppm-ig tart. A harmadik tartomány 3,7 - 4,0 ppm-nél, az ahol a fémhez tartozó *p*-cimol jelek nem látszanak, azonban a citromsárga színnel jelölt metil-imidazol CH_3 -csoportjának szinglettje feltűnik. Mivel a komplexben kötött metil-imidazol gyűrűmetil csoportja egy szinglettet ad, így az adott pH-n jelenlévő részecskék száma megegyezik a jelek számával. Ugyanez mondható el az *iPr* metilek dublettjeinek tartományában és a *p*-cimol gyűrűmetil tartományában is. Az eddigi ismereteink alapján az akvakomplex és a $[\{\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\}_2(\mu^2\text{-OH})_3]^+$ összetételű hidroxokomplex jeleit beazonosítva információt kapunk arról, hogy az adott pH-n feltehetően milyen komplex van jelen. Mindezt összevetve a ligandum tartománnyal, azzal jó egyezést mutat, azaz ott is tudjuk követni a komplexképződést.

Ezek alapján elmondhatjuk, hogy a metil-imidazol fémes rendszerében az 1:1 aránynál, a legsavasabb pH-n, az 1,0 - 1,4 ppm között három jól elkülönült dublett, azaz három komplex van jelen (15. ábra). Világoskékkel jelöltük az akvakomplexet, közvetlen mellette kisebb ppm-nél a narancssárgával, és ennél is kisebb ~1,15 ppm-nél a zöld színnel jelölt komplex jelei találhatóak. Ilyen nagy hidrogénion koncentrációnál (pH ~1,5) még nem kezdődik el a hidrolízis, ezért itt a komplexek akvakomplex formájában vannak jelen, azaz vagy víz molekula és/vagy a ligandum foglalja el a fémion három szabad koordinációs helyének valamelyikét.

A savas pH-n keletkező komplexek összetételét szeretnénk meghatározni, akkor a protonált szabad MeIm ligandum jelét kell figyelniünk, ugyanis ennek a jelnek $\delta = 3,9$ ppm-nél ha nagy az intenzitása, akkor arra következtethetünk, hogy a ligandumnak csak kis része van komplexben kötve. Ezt támasztja alá az is, hogy ha nagy mennyiségben van jelen az akvakomplex *p*-cimol gyűrűjének az *iPr* metilek szinglettje (1,34 ppm) és gyűrűmetil jele (2,24 ppm).

Ha a 15. ábrán összehasonlítjuk az 1:1 arányú rendszert az 1:3 arányúval, akkor azt tapasztaljuk, hogy pH ~ 2 körül az 1,0 és 1,4 ppm tartományban jelenlévő narancssárga és zöld színnel jelölt komplex aránya megfordul az 1:3 arányban, az 1:1 arányhoz képest. Ez figyelhető meg az 1,8 – 2,3 ppm között, illetve a 3,7 és 4,0 ppm közötti szakasznál is. Mindebből arra lehet következtetni, hogy az 1:1 aránynál nagy mennyiségben jelenlévő narancssárgával jelölt jel feltehetően egy ML összetételű komplexhez tartozik, hiszen a szabad ligandum és az akvakomplex is nagy mennyiségben van jelen, továbbá nincs ligandum felesleg a mintában. 1:3 aránynál is nagy mennyiségben van jelen a szabad ligandum, azonban az akvakomplex jelintenzitása kicsi, így a narancssárgával jelölt részecskéhez képest jelentős mennyiségű zöld színnel jelölt komplex feltehetően 1:2 összetételű. Igaz, hogy a ligandum a fémhez képest háromszor akkora koncentrációban van jelen a mintában, de mivel a szabad ligandum jele nagy, illetve a narancssárga színnel jelölt részecske már tartalmaz 1:1 arányban ligandumot, ezért nem marad annyi ligandum a rendszerben, hogy a Ru(II) fémion mind a három koordinációs helyét betöltse, ezért nem lehet 1:3 összetételű a zölddel jelölt részecske.

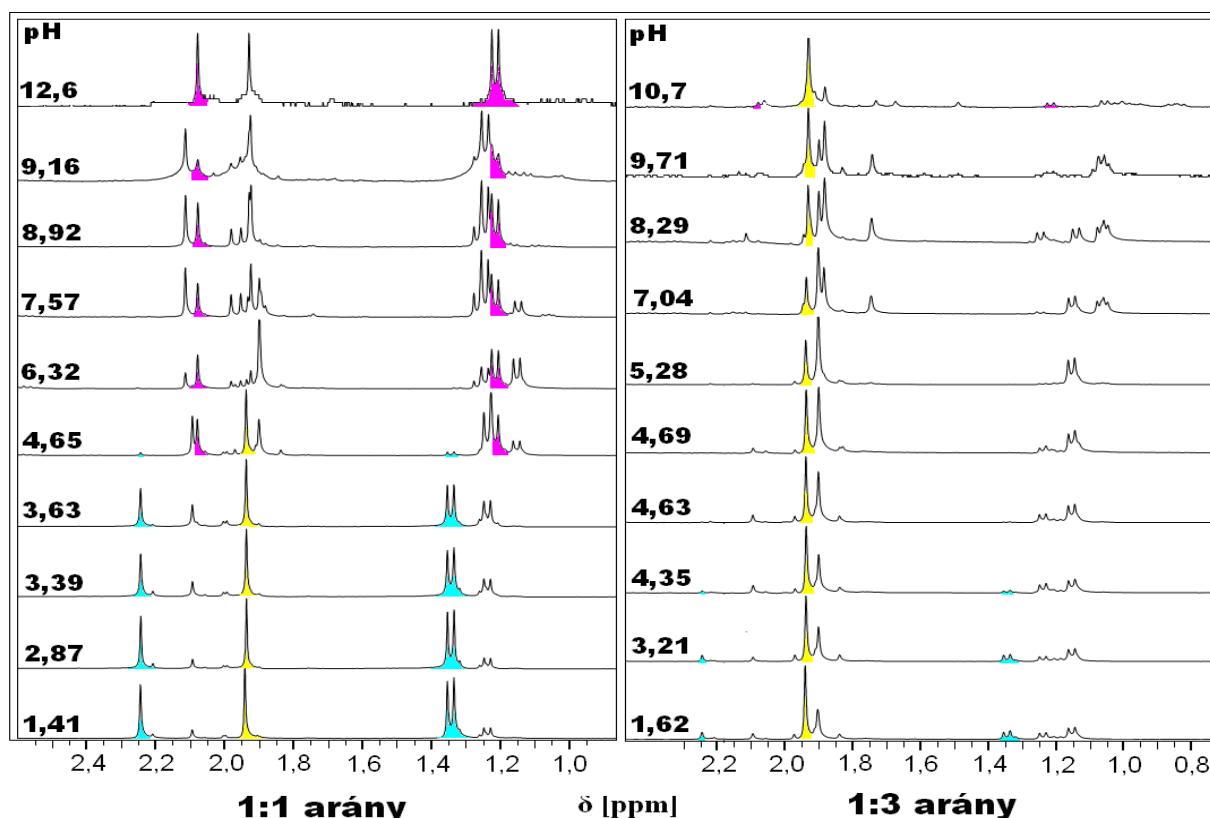
A pH 12 fölött felvett spektrumokban 1:1 arány esetében két komplex jeleit láthatjuk a 1,0 és 1,4 ppm tartományban, ami a *p*-cimol *iPr* metiljeihez rendelhető dublettek. Ebből a két jelből a lila színnel jelölt részecskét már korábban azonosítottuk, ez a $[\{Ru(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\}_2(\mu^2\text{-OH})_3]^+$ összetételű hidroxokomplex. Azonban emellett látható a piros színnel jelölt másik részecske is. Ugyanezeket a következtetéseket vonhatjuk le az 1:3 aránynál felvett spektrumban is. Azonban ott a hidrolízis visszaszorul és harmadik komplexként egy sötétkék színnel jelölt részecske jelei látszanak, de fő részecske a piros színnel jelölt volt. Az ESI-MS módszerrel az 1:1 és 1:3 aránynál felvett spektrumok alapján megállapítottuk, hogy egy ML(OH) összetételű részecskéhez rendelhető (19. ábra). Ezt támasztja alá az is, hogy a metil-imidazol gyűrűmetil tartományában nagy intenzitással megjelenik a szabad ligandum jele, azaz nincs minden ligandum komplexben kötve. Illetve mivel nagyon nagy a hidroxid-ion koncentrációja és 1:3 aránynál csak kis mennyiségben van jelen a $[\{Ru(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\}_2(\mu^2\text{-OH})_3]^+$ összetételű hidroxokomplex, ezért a pirossal jelölt részecske valamilyen hidroxokomplex formájában lehet jelen a mintában. Az eddig felállított rendszer alapján a narancssárga és a piros részecskék egymáshoz tartoznak. A narancssárgával jelölt részecske hidrolízisével keletkezik a piros színnel jelölt részecske. Az eddig ismertetett jelek mellett még megtalálható a sötétkék színű, illetve a szürke színnel jelölt komplexek jelei is. Eddigi ismereteink alapján, ezen komplexek összetételéről még nincs információ.



15. ábra: A ^1H -NMR spektrumon különböző színnel jelölt részecskék a $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ - 1-MeIm rendszer 1:1 és 1:3 arányánál.

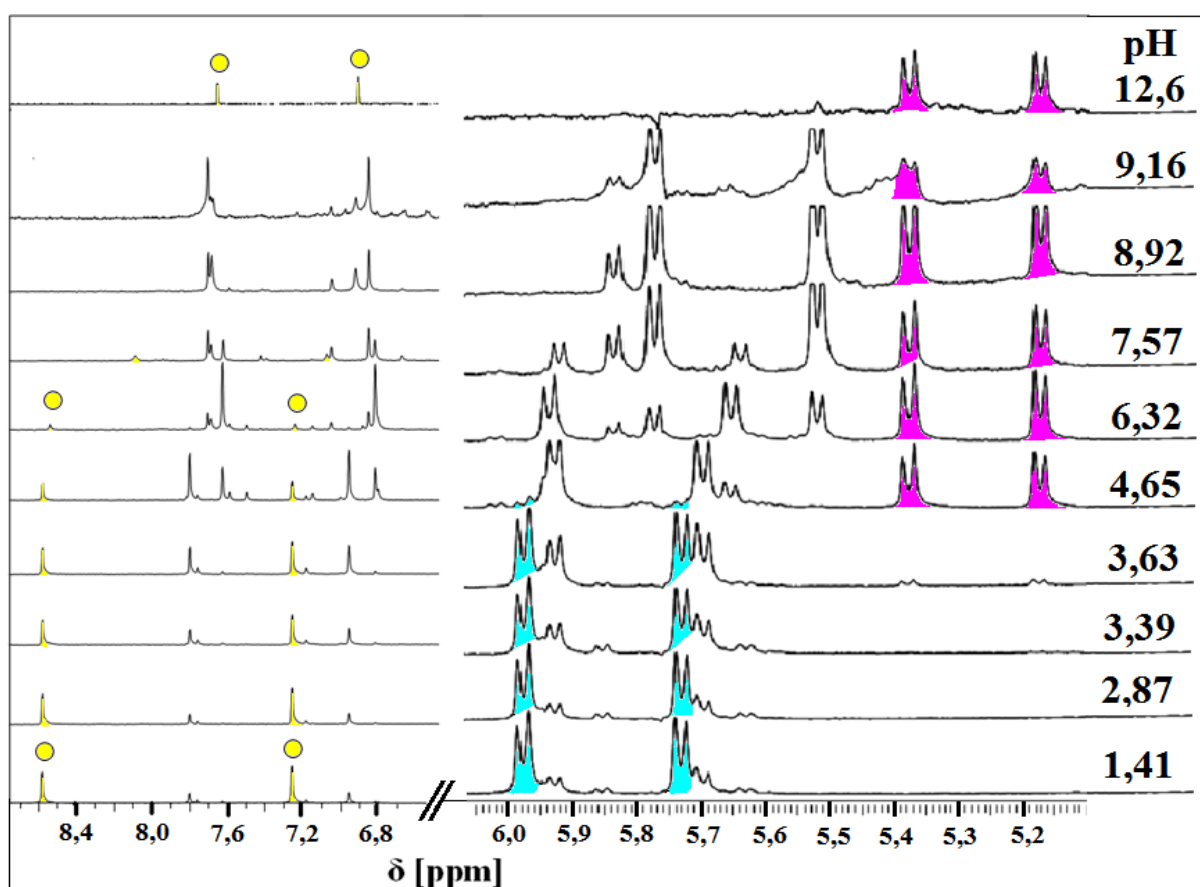
A $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ - AcHm rendszer ^1H -NMR vizsgálata

A $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ - N-acetil-hisztamin fémrendszer jellemzésekor először célszerű volt a ligandumnak a pH-függő NMR spektrumaiból kiindulnunk. Az 5.2.1 – A ligandumok ^1H -NMR spektrumainak pH-függése fejezetben a 12. és 13. ábrán feltüntetett spektrumok alapján már beszéltünk arról, hogy milyen hatással lehet a protonálódási folyamat a ligandum egyes csoportjaira. Az N-acetil-hisztamin esetében nem elegendő az alifás tartomány elemzése, lásd 16. ábra. Lúgos közegben az N-acetil-hisztamin oldalláncban található pirrol típusú NH-csoport deprotonálódása és koordinációja is lejátszódik. Mivel az AcHm-nél az N(1), illetve az N(3) donoratombok koordinációja eltérő elektroneloszlást eredményez az aromás imidazolgyűrűben, így az ^1H -NMR spektroszkópia a C(2)H és C(5)H protonok kémiai eltolódásán keresztül alkalmas lehet az izomerek megkülönböztetésére (17. ábra). A 15. ábrával kapcsolatban elmondottak alapján a 16. ábrán feltüntetett spektrumon beazonosítható az akvakomplex, a $[\{\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\}_2(\mu^2\text{-OH})_3]^+$ összetételű hidroxokomplex, illetve a szabad ligandum jele.



16. ábra: A ^1H -NMR spektrumon különböző színnel jelölt részecskék a $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ - N-acetil-hisztamin rendszer 1:1 és 13: arányánál.

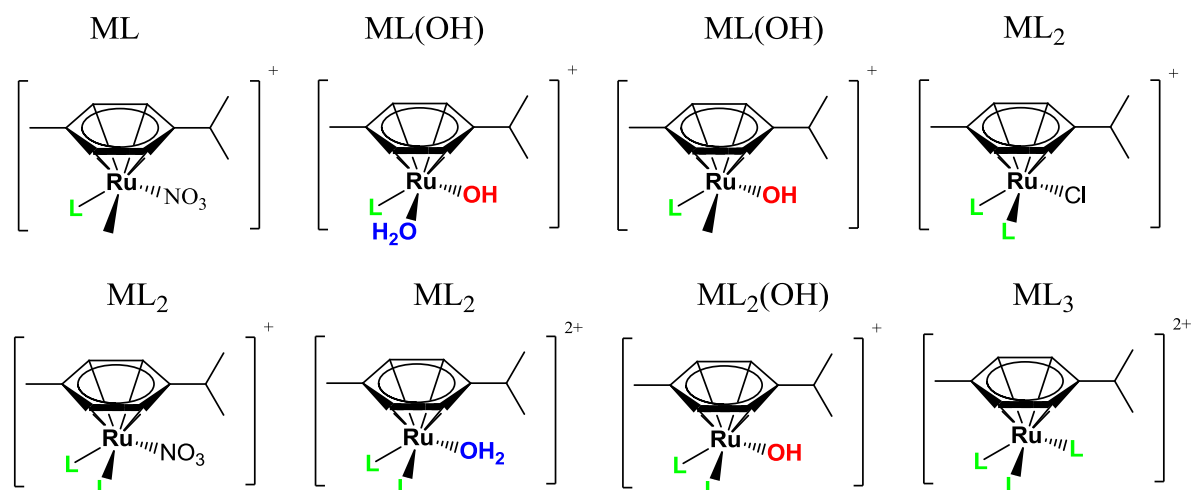
Ha a metil-imidazol ligandumot tartalmazó 1:1 és 1:3 arányú fémes rendszereket összehasonlítjuk az acetil-hisztamin fémes rendszerével, akkor azt tapasztaljuk, hogy az akvakomplex szintén nagy mennyiségben vannak jelen az 1:1 arányú mintában a legsavasabb pH-n, mely az 1:3 aránynál visszaszorul. Mindemellett az 1:1 arányú minta pH ~ 12 -nél regisztrált spektrumaiban a $[\{\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\}_2(\mu^2\text{-OH})_3]^+$ összetételű hidroxokomplex nagy mennyiségben van jelen, és ez is visszaszorul az 1:3 aránynál. Az 1:1 arányú Ru-AcHm fémes rendszer ^1H -NMR spektrumát a 17. ábrán tüntettem fel. Az ábrán jól látszik, hogy az aromás tartomány elemzése bonyolult, a jelek egymásba tolódnak, ez nehezíti a jelcsoportok azonosítását. A jelek beazonosításához további NMR vizsgálatokat tervezünk a képződő komplexek tulajdonságainak és összetételének meghatározására.



17. ábra: 1:1 arányú $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ - AcHm rendszer ^1H -NMR spektrumainak aromás tartománya.

5.3 ESI-TOF-MS eredmények

A pH-potenciometriás és NMR spektroszkópiás méréseket alátámasztva egy harmadik módszert, a tömegspektrometriát is alkalmaztuk a komplexek jellemzésére.



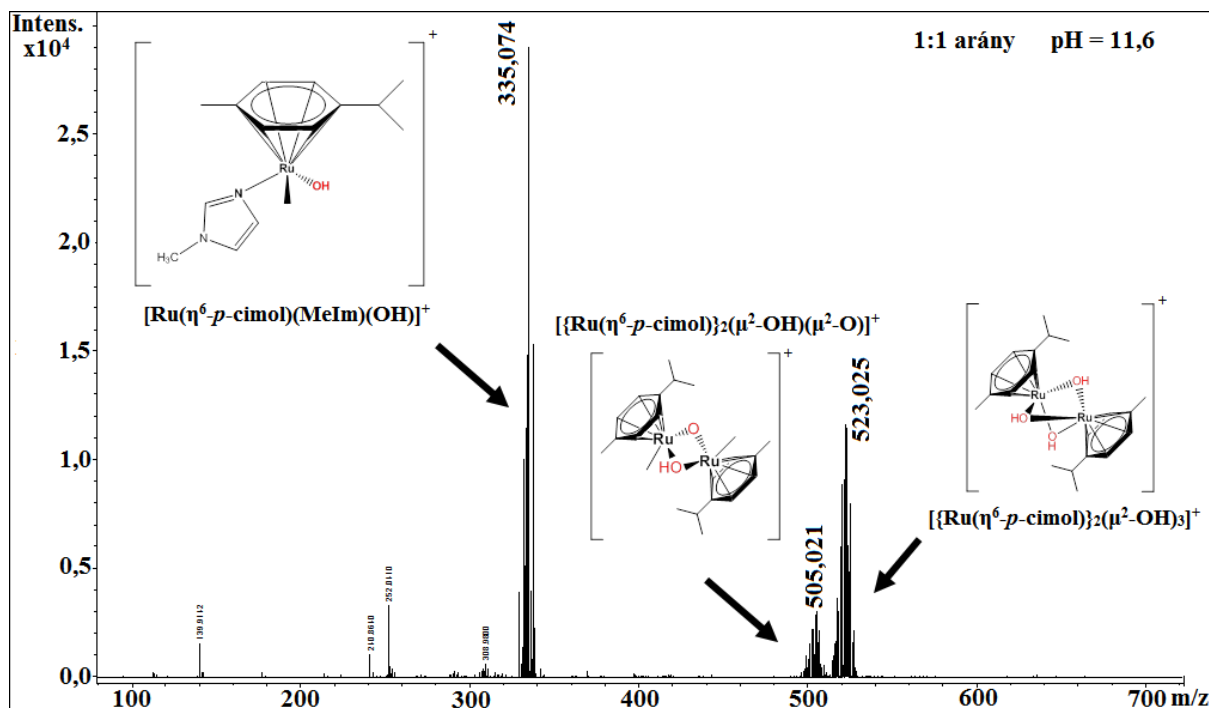
18. ábra: A 2. táblázatban szereplő, 1:3 aránynál detektálható legfontosabb csúcsok és javasolt részecskék oldatszerkezetei.

2. táblázat: 1:3 arányban detektálható részecskék mért és szimulált jelei.

1:3 arány	Ligandum (L)			
	MeIm		AcHm	
	Mért	Szimulált	Mért	Szimulált
$[\text{Ru}(\eta^6\text{-Cimol})(\text{L})(\text{NO}_3)]^+$	380,0564	380,0547	451,0892	451,0919
$[\text{Ru}(\eta^6\text{-Cimol})(\text{L})(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]^+$	353,0426	353,0801	424,0741	424,1173
$[\text{Ru}(\eta^6\text{-Cimol})(\text{L})(\text{OH})]^+$	335,0731	335,0696	406,1087	406,1073
$[\text{Ru}(\eta^6\text{-Cimol})(\text{L})_2(\text{Cl})]^+$	435,0878	435,0885	577,1375	577,1629
$[\text{Ru}(\eta^6\text{-Cimol})(\text{L})_2(\text{NO}_3)]^+$	-	-	604,1576	604,1823
$[\text{Ru}(\eta^6\text{-Cimol})(\text{L})_2(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$	-	-	280,1005	280,1022
$[\text{Ru}(\eta^6\text{-Cimol})(\text{L})_2(\text{OH})]^+$	417,1244	417,1228	559,1856	559,1972
$[\text{Ru}(\eta^6\text{-Cimol})(\text{L})_3]^{2+}$	241,0865	241,0863	347,6523	347,6421
$[\text{Ru}_2(\eta^6\text{-Cimol})_2(\text{O})(\text{OH})]^+$	505,0094	505,0262	505,0121	505,0262
$[\text{Ru}_2(\eta^6\text{-Cimol})_2(\text{OH})_3]^+$	523,0247	523,0368	523,0238	523,0368

A 18. ábrán a két ligandum 1:1 és 1:3 arányú fémes rendszereiben, különböző pH-kon detektálható javasolt részecskék szerkezetét tüntettük fel. Ezeknek a részecskéknek a mért és számított jeleit a 2. táblázatban gyűjtöttük össze.

A $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ – metil-imidazol rendszer 1:1 és 1:3 aránynál felvett ^1H -NMR spektrumában (15. ábra) a pirossal jelölt $[\text{ML}(\text{OH})]^+$ összetételű hidroxokomplex szerkezetét ESI-MS módszerrel igazoltuk, ugyanis ez a részecske volt jelen a legnagyobb intenzitással a lúgos pH-n (19. ábra).



19. ábra: 1:1 arányú $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ - MeIm rendszer ESI-MS spektruma lúgos pH-n.

A 3. táblázatban feltüntettem a különböző pH-értékeken, 1:3 aránynál regisztrált részecskék általános jelöléseit. Félkövér betűvel kiemeltük azon komplexeket, amelyek legnagyobb intenzitással voltak detektálhatóak az adott pH-n, az adott ligandum esetében. A ^1H -NMR spektrumokból levont következtetésekből kapott információk a komplexek szerkezetéről, jó egyezést mutattak a 3. táblázatban feltüntetett részecskékkel. A táblázatban nem tüntettem fel a $[\{\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\}_2(\mu^2\text{-OH})(\mu^2\text{-O})]^+$ hidroxokomplexet, azonban ez minden esetben az 505,021 m/z-nél jelen volt akkor, amikor a $[\{\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\}_2(\mu^2\text{-OH})_3]^+$ összetételű hidroxokomplex is megjelent.

3. táblázat: A $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ -ligandum 1:1 és 1:3 arányú fémes rendszerekben, különböző pH-kon detektálható részecskéinek összetétele.

1:1 arány	MeIm	1:3 arány	MeIm	1:1 arány	AcHm	1:3 arány	AcHm
pH		pH		pH		pH	
1,67	$[\text{ML}]^+$	1,61	$[\text{ML}]^+$	1,65	$[\text{ML}]^+$	1,59	$[\text{ML}(\text{OH})]^+$
	$[\text{ML}(\text{OH})]^+$		$[\text{ML}(\text{OH})]^+$		$[\text{ML}(\text{OH})]^+$		
	$[\text{ML}_2]^+$		$[\text{ML}_2]^+$				
3,19	$[\text{ML}]^+$	3,22	$[\text{ML}(\text{OH})]^+$	3,27	$[\text{ML}]^+$	3,13	$[\text{ML}]^+$
	$[\text{ML}(\text{OH})]^+$		$[\text{ML}_2]^+$		$[\text{ML}(\text{OH})]^+$		$[\text{ML}(\text{OH})]^+$
	$[\text{ML}_2]^+$		$[\text{ML}_3]^{2+}$		$[\text{ML}_2]^+$		$[\text{ML}_3]^{2+}$
5,49	$[\text{ML}]^+$	4,67	$[\text{ML}(\text{OH})]^+$	5,38	$[\text{ML}]^+$	5,60	$[\text{ML}]^+$
	$[\text{ML}(\text{OH})]^+$				$[\text{ML}(\text{OH})]^+$		$[\text{ML}(\text{OH})]^+$
	$[\text{ML}_2]^+$				$[\text{ML}_2]^+$		$[\text{ML}_2]^+$
	$[\text{M}_2(\text{OH})_3]^+$				$[\text{ML}_2(\text{OH})]^+$		$[\text{ML}_2(\text{OH})]^+$
6,43	$[\text{ML}]^+$	6,91	$[\text{ML}(\text{OH})]^+$	7,24	$[\text{ML}]^+$	7,20	$[\text{ML}]^+$
	$[\text{ML}(\text{OH})]^+$				$[\text{ML}(\text{OH})]^+$		$[\text{ML}(\text{OH})]^+$
	$[\text{ML}_2]^+$				$[\text{ML}_2]^+$		$[\text{ML}_2]^+$
	$[\text{ML}_2(\text{OH})]^+$				$[\text{ML}_2]^+$		$[\text{ML}_2(\text{OH})]^+$
	$[\text{M}_2(\text{OH})_3]^+$				$[\text{M}_2(\text{OH})_3]^+$		$[\text{ML}_3]^{2+}$
8,50	$[\text{ML}]^+$	8,06	$[\text{ML}(\text{OH})]^+$	8,50	$[\text{ML}(\text{OH})]^+$	9,07	$[\text{ML}(\text{OH})]^+$
	$[\text{ML}(\text{OH})]^+$						
	$[\text{ML}_2]^+$				$[\text{ML}_3]^{2+}$		$[\text{ML}_2]^+$
	$[\text{ML}_2(\text{OH})]^+$						$[\text{ML}_2(\text{OH})]^+$
	$[\text{ML}_3]^{2+}$						$[\text{ML}_3]^{2+}$
	$[\text{M}_2(\text{OH})_3]^+$				$[\text{M}_2(\text{OH})_3]^+$		$[\text{M}_2(\text{OH})_3]^+$
11,7	$[\text{ML}(\text{OH})]^+$	11,2	$[\text{ML}]^+$	11,6	$[\text{M}_2(\text{OH})_3]^+$	11,5	$[\text{M}_2(\text{OH})_3]^+$
	$[\text{ML}_2(\text{OH})]^+$		$[\text{ML}(\text{OH})]^+$				
	$[\text{M}_2(\text{OH})_3]^+$		$[\text{ML}_2(\text{OH})]^+$				

6. Összefoglalás

A kutatómunkám során a hexahapto kötésmódú 1-metil-4-izopropil-benzol (*p*-cimol) aromás ligandumot tartalmazó félszendvics, fémorganikus ruténium(II) kation 1-metilimidazol (MeIm) és N-acetil-hisztamin (AcHm) ligandumokkal, oldatfázisban történő komplexképződését vizsgáltam. Három módszert alkalmaztunk a képződő komplexek összetételének és stabilitási állandóinak a meghatározásához, a pH-potenciometriát, a ^1H -NMR spektroszkópiát és az ESI-TOF-MS spektrometriát.

A pH-potenciometriás módszerrel meghatároztuk a ligandumok protonálódási állandóit. Vizsgáltuk a fémes rendszerekben történő komplexképződést, ahol a lassú reakció folyamatok, illetve a már savas pH-tartományban megjelenő inaktív hidroxokomplex képződése megghiúsította a pH 5 fölött lejátszódó komplexképződési folyamatok jellemzését. A szokásos várakozási idő, 10 - 15 perc alatt sem állt be az egyensúly a fémes rendszereknél.

Emiatt ^1H -NMR spektroszkópiás módszert hívtunk segítségül. Felvettük a ligandumok spektrumait, illetve az 1:1 és 1:3 arányú fémes rendszereket vizsgáltuk. Az 1:1, illetve 1:3 aránynál a szabad fémion aromás liganduma és az imidazol modell ligandumok jelei mellett feltűnt egy valószínűleg 1:1 és 1:2 összetételű komplex, melynek mennyisége a pH növelésével változott. Mind a két ligandum esetében az 1:3 arányú fémes rendszerekben a ligandum feleslege esetén a hidrolízis visszaszorult.

További vizsgálatokat végeztünk ESI-TOF tömegspektrometriás módszerrel. Az 1:1 és 1:3 arányú mintáknál kapott spektrumok kiértékelése során megállapítottuk, hogy a $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ - metil-imidazol rendszerben, a pH 12 fölött egy $\text{ML}(\text{OH})$ összetételű komplex van jelen. Emellett detektálható volt a ML , ML_2 és annak hidroxokomplexe a $\text{ML}_2(\text{OH})$ összetételű részecske, illetve kis intenzitással megjelent az ML_3 összetételű komplex is a fémes rendszerekben. A pH ~ 5 fölött mind a két ligandum esetében a fémes mintákban megjelent a trihidroxihidas $[\{\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\}_2(\mu^2\text{-OH})_3]^+$ hidroxokomplex is.

A többi rendszerbeli részecske összetételének tisztázására további NMR spektroszkópiás és ESI-TOF-MS vizsgálatokat is tervezünk.

Emellett, a különböző pozícióban hisztidin aminosavat tartalmazó kis oligopeptidek szilárdfázisú peptidszintézisét is szeretnénk elvégezni és $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ -megkötő képességüket is tanulmányozni, hogy a képződő komplexek összetételét, stabilitási állandóit és oldatszerkezetét meghatározzuk.

7. Summary

During my research work I studied the complex formation processes of half-sandwich, organometallic ruthenium(II) cation containing hexahapto bonded 1-methyl-4-isopropylbenzene (*p*-cym) with 1-methyl-imidazole (MeIm) and N-Acetyl-histamine (AcHm). Three methods were used for determining the composition of the complexes and their stability constants: pH-potentiometry, ^1H NMR spectroscopy and ESI-TOF-MS spectrometry.

The protonation constants of the ligands were determined by pH-potentiometry. The complex formation processes in the metal ion – ligand systems were also investigated, however, the slow reaction steps and the appearance of the inactive hydroxo complex in the acidic pH range prevented the characterization of the complex formation processes above pH 5. The usual waiting time during these titrations was 10-15 minutes but it was not enough to reach pH equilibrium.

Due to these problems we used ^1H NMR spectroscopy for further investigations. The spectra of the ligands were registered and samples with 1:1 and 1:3 metal ion to ligand ratios were studied. For the metal ion containing systems signals belonging to the complexed species appeared (both of 1:1 and 1:2 ratios) beside the signals attributable to the aromatic ligand of the free metal ion and that of the model imidazole ligands. The amount of the complex changed with the increase of pH. For both peptides in the 1:3 metal ion to ligand systems the hydrolysis is hindered because of the presence of ligand excess.

Further experiments were done by ESI-TOF mass spectrometric method. After the evaluation of the spectra for the 1:1 and 1:3 samples we concluded that a complex with $\text{ML}(\text{OH})$ composition is present above pH 12 in the $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ – MeIm system. Other complexes were also detected in the metal ion containing systems with ML , ML_2 , $\text{ML}_2(\text{OH})$ compositions and a ML_3 species with small intensity. Above pH ~ 5 the formation of a trihydroxo bridged $[\{\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\}_2(\mu^2\text{-OH})_3]^+$ complex was also proved for both of the ligands.

For clarifying the compositions of the other species in solution further NMR spectroscopic and ESI-TOF-MS investigations are planned.

We are also planning the solid phase peptide synthesis of short oligopeptides containing histidines at various positions in the chain and afterwards we would like to study their $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ binding capabilities in order to determine the compositions, stability constants and solution structures of the complexes formed.

8. Irodalomjegyzék

1. E. Reisner, V. B. Arion, B. K. Keppler, A. J. L. Pombeiro, *Inorg. Chim. Acta*, **2008**, 361, 1569-1583
2. M. Brindell, I. Stawoska, J. Supel, A. Skoczowski, G. Stochel, R. J. van Eldik, *Biol. Inorg. Chem.*, **2008**, 13, 909-918
3. W. R. Harris, L. Messori, *Coord. Chem. Rev.*, **2002**, 228, 237-262
4. L. Messori, P. Orioli, D. Vullo, E. Alessio, E. Iengo, *Eur. J. Biochem.*, **2000**, 267, 1206
5. A. Martínez, J. Suárez, T. Shand, R. S. Magliozzo, R. A. Sánchez-Delgado, *J. Inorg. Biochem.*, **2011**, 105, 1, 39-45
6. W. H. Ang, P. J. Dyson, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2006**, 4003-4018
7. Cisplatin, (ed.: B. Lippert), Wiley-VCH, Weinheim, **1999**
8. Y. K. Yan, M. Melchart, A. Habtemariam, P. J. Sadler, *Chem. Commun.*, **2005**, 4764
9. M. A. Jakupiec, M. Galanski, V. B. Arion, C. G. Hartinger, B. K. Keppler, *Dalton Trans.*, **2008**, 183-194
10. J. M. Rademaker-Lakhai, D. Van Den Bongard, D. Pluim, J. H. Beijnen, J. H. M. Schellens, *Clin. Cancer Res.*, **2004**, 10, 3717-3727
11. C. G. Hartinger, S. Zorbas-Seifried, M. A. Jakupiec, B. Kynast, H. Zorbas, B. K. Keppler, *J. Inorg. Biochem.*, **2006**, 100, 891-904
12. L. Messori, F.G. Vilchez, R. Vilaplana, F. Piccioli, E. Alessio, B. Keppler, *Met. Based Drugs*, **2000**, 7, 335
13. R. Morris, A. Habtemariam, Z. Guo, S. Parsons, P. J. Sadler, *Inorg. Chim. Acta*, **2002**, 339, 551-559
14. P. C. A. Bruijninx, P. J. Sadler, *Adv. Inorg. Chem.*, **2009**, 61, 1-62
15. Zs. Bihari, *Szakdolgozat*, Debreceni Egyetem, **2011**
16. P. Buglyó, E. Farkas, *Dalton Trans.*, **2009**, 8063
17. L. Bíró, E. Farkas, P. Buglyó, *Dalton Trans.*, **2010**, 39, 10272-10278
18. A. Kumar, L. Moody, J. F. Olaivar, N. A. Lewis, R. L. Khade, A. A. Holder, Y. Zhang, V. Rangachari, *ACS Chemical Neuroscience*, **2010**, 1, 691-701
19. K. Severin, *Chem. Commun.*, **2006**, 3859-38677
20. M. J. Clarke, *Coord. Chem. Rev.*, **2002**, 232, 69-93
21. H. M. Chen, J. A. Parkinson, S. Parsons, R. A. Coxall, R. O. Gould, P. J. Sadler, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 3064-3082
22. F. Wang, J. Bella, J. A. Parkinson, P. J. Sadler, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2005**, 10, 147-155
23. A. Bergamo, G. Sava, *Dalton Trans.*, **2011**, Vol. 40, 31, 7817-7823
24. A. Martinez, J. Suarez, T. Shand, R. S. Magliozzo, R. A. Sanchez-Delgado, *J. Inorg. Biochem.*, **2011**, Vol. 105, 1, 39-45
25. J. C. Pessoa, I. Tomaz, *Curr. Med. Chem.*, **2010**, Vol. 17, 31, 3701-3738
26. N. Cetinbas, M. I. Webb, J. A. Dubland, C. J. Walsby, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2010**, Vol. 15, 2, 131-145

27. M. Pongratz, P. Schluga, M. A. Jakupec, V. B. Arion, C. G. Hartinger, G. Allmaier, B. K. Keppler, *J. Anal. At. Spectrom.*, **2004**, Vol. 19, 1, 46-51
28. A. Bergamo, L. Messori, F. Piccioli, M. Cocchietto, G. Sava, *Investigational New Drugs*, **2003**, Vol. 21, 4, 401-411
29. C. A. Smith, A. J. SutherlandSmith, B. K. Keppler, F. Kratz, E. N. Baker, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **1996**, Vol. 1, 5, 424-431
30. A. K. Bytze, K. Boeck, G. Hermann, S. Hann, B. K. Keppler, C. G. Hartinger, G. Koellensperger, *Metallomics*, **2011**, 3, 1049-1055
31. C. A. Pieter Bruijninx, P. J. Sadler, *Adv. in Inorg. Chem.*, **2009**, Vol. 61, 1-62
32. O. Mazuryk, K. Kurpiewska, K. Lewiński, G. Stochel, M. Brindell, *J. Inorg. Bio. Chem.*, **2012**, Vol. 116, 11-18
33. M. A. Bennett, A. K. Smith, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1974**, 233
34. L. Bíró, *Diplomamunka*, Debreceni Egyetem, **2009**
35. L. Zékány, I. Nagypál, in *Computational Methods for the Determination of Stability Constants*, ed.: D. Leggett, Plenum Press, New York, **1985**
36. P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1985**, 1195
37. H. M. Irving, M. G. Miles, L. D. Pettit, *Anal. Chim. Acta*, **1967**, 38, 475
38. G. Gran, *Acta Chem. Scan.*, **1950**, 4, 559
39. K. Mikkelsen, S. O. Nielsen, *J. Phys. Chem.*, **1960**, 64, 5, 632-637
40. J. A. Dean, *Lange's Handbook of Chemistry, 15th ed.*, McGraw-Hill, New York, **1979**, 899
41. M. Wienken, A. Kiss, I. Sóvágó, E. Fusch, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1997**, 563