

Debreceni Egyetem
Természettudományi és Technológiai Kar
Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék

A $[\text{Mn}(\text{PhDTA})]^{2-}$ -komplex egyensúlyi, kinetikai és relaxációs
tulajdonságainak vizsgálata

Tudományos Diákköri dolgozat

Póta Kristóf

Kémia BSc

III. évfolyam

Témavezetők:

Dr. Tircsó Gyula

egyetemi adjunktus

Dr. Kálmán Ferenc Krisztián

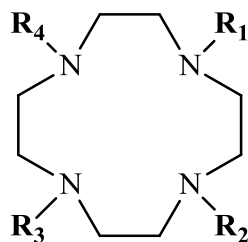
tudományos munkatárs

Debrecen, 2014

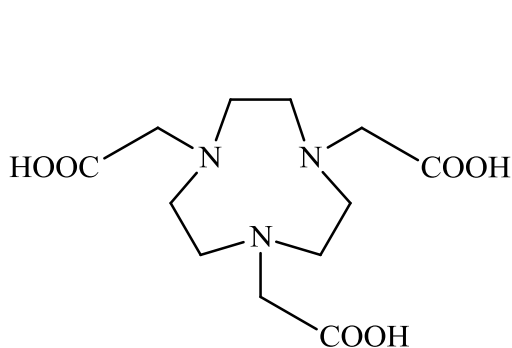
Tartalomjegyzék

I.	Bevezetés	5
II.	Irodalmi áttekintés	6
II.1.	<i>Paramágneses fémionok az orvosi diagnosztikában</i>	6
II.2.	<i>A paramágneses fémionok relaxivitása</i>	9
II.3.	<i>A mangán koordinációs kémiája</i>	10
II.4.	<i>A Mn^{2+}-poliamino-polikarboxilát és -polifoszfónát komplexei</i>	11
II.5.	<i>A vizsgált kétvegyértékű fémionok biológiai jelentősége</i>	12
III.	Célkitűzés	14
IV.	Alkalmazott vizsgálati módszerek	15
IV.1.	<i>pH-potenciometria</i>	15
IV.2.	<i>Spektrofotometria</i>	17
IV.3.	<i>Relaxometria</i>	18
V.	Eredmények	19
V.1.	<i>Egyensúlyi és relaxációs mérések</i>	19
V.2.	<i>Kinetikai mérések</i>	25
VI.	Kísérleti rész	31
VI.1.	<i>Egyensúlyi vizsgálatok</i>	31
VI.2.	<i>Kinetikai vizsgálatok</i>	32
VI.3.	<i>Relaxometriás vizsgálatok</i>	32
VII.	Összefoglalás	33
VIII.	Summary	34
IX.	Irodalomjegyzék	35

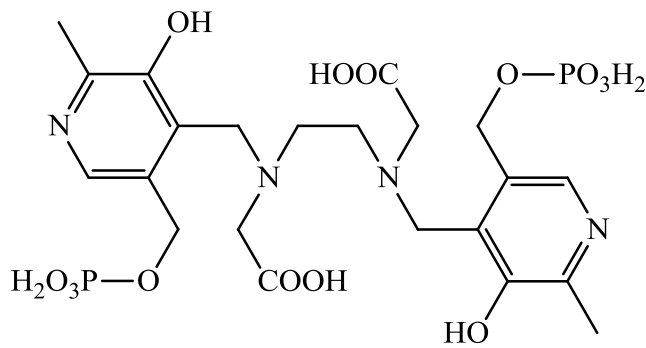
A dolgozatban előforduló ligandumok szerkezeti képletei:



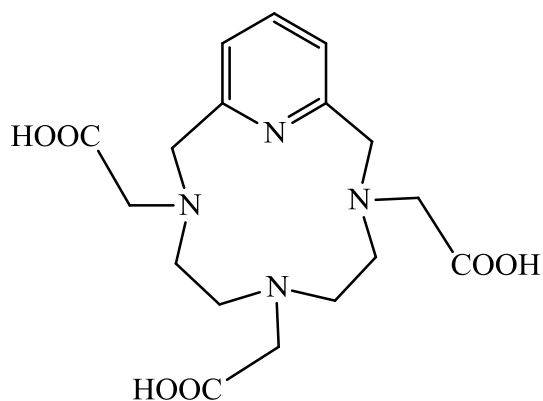
R_1	R_2	R_3	R_4	Ligandum
-H	$-\text{CH}_2-\text{COOH}$	-H	$-\text{CH}_2-\text{COOH}$	$\text{H}_2\text{DO}_2\text{A}$
-H	$-\text{CH}_2-\text{COOH}$	$-\text{CH}_2-\text{COOH}$	$-\text{CH}_2-\text{COOH}$	$\text{H}_3\text{DO}_3\text{A}$
$-\text{CH}_2-\text{COOH}$	$-\text{CH}_2-\text{COOH}$	$-\text{CH}_2-\text{COOH}$	$-\text{CH}_2-\text{COOH}$	H_4DOTA
	$-\text{CH}_2-\text{COOH}$	$-\text{CH}_2-\text{COOH}$	$-\text{CH}_2-\text{COOH}$	$\text{H}_3\text{HP-DO}_3\text{A}$
	$-\text{CH}_2-\text{COOH}$	$-\text{CH}_2-\text{COOH}$	$-\text{CH}_2-\text{COOH}$	$\text{H}_3\text{DO}_3\text{A-B}$
$-\text{CH}_2-\text{CO-NH}_2$	$-\text{CH}_2-\text{CO-NH}_2$	$-\text{CH}_2-\text{CO-NH}_2$	$-\text{CH}_2-\text{CO-NH}_2$	DOTAM
-H	$-\text{CH}_2-\text{CO-NH}_2$	$-\text{CH}_2-\text{CO-NH}_2$	$-\text{CH}_2-\text{CO-NH}_2$	DO3AM



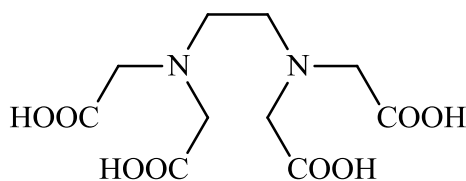
H_3NOTA



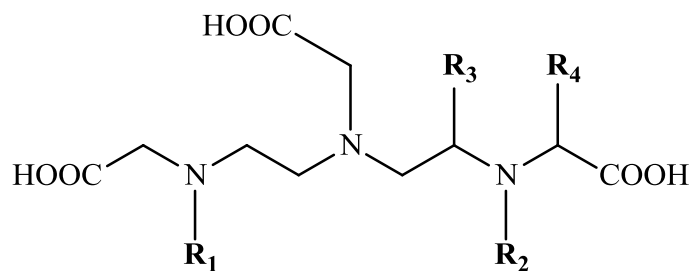
H_6DPDP

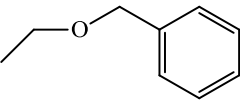
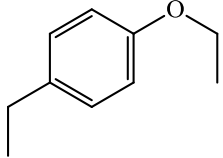
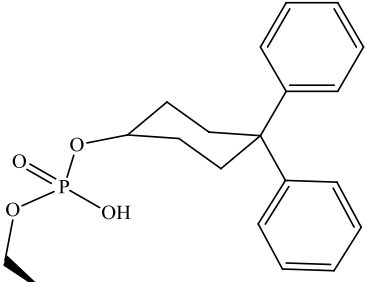


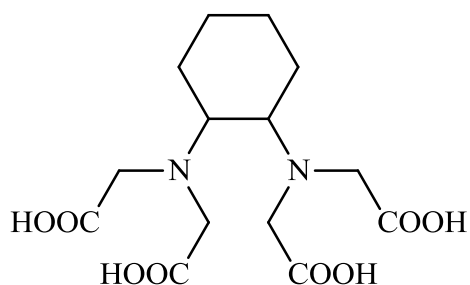
H_3PCTA



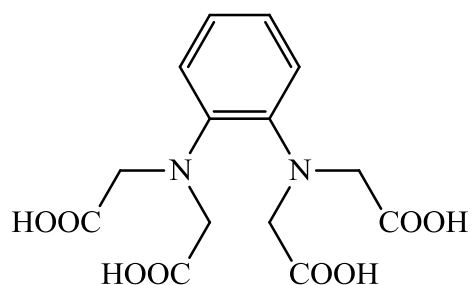
H_4EDTA



R_1	R_2	R_3	R_4	Ligandum
$-\text{CH}_2-\text{COOH}$	$-\text{CH}_2-\text{COOH}$	$-\text{H}$	$-\text{H}$	H_5DTPA
$-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-\text{Me}$	$-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-\text{Me}$	$-\text{H}$	$-\text{H}$	$\text{H}_3\text{DTPA-BMA}$
$-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-\text{Et}-\text{OMe}$	$-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-\text{Et}-\text{OMe}$	$-\text{H}$	$-\text{H}$	$\text{H}_3\text{DTPA-BMEA}$
$-\text{CH}_2-\text{COOH}$	$-\text{CH}_2-\text{COOH}$	$-\text{H}$		H_5BOPTA
$-\text{CH}_2-\text{COOH}$	$-\text{CH}_2-\text{COOH}$		$-\text{H}$	$\text{H}_5\text{EOB-DTPA}$
$-\text{CH}_2-\text{COOH}$	$-\text{CH}_2-\text{COOH}$		$-\text{H}$	MS-325



H_4CDTA



H_4PhDTA

H_4PhDTA : orto-fenilén-diamin- $\text{N,N',N'',N'''}\text{-tetraecetsav}$

I. Bevezetés

A modern orvosi diagnosztikai képalkotó eljárások fő feladata, hogy nem-invazív módon információt szolgáltatassanak az emberi testről, illetve az élő szervezetben lejátszódó folyamatokról. Az erre alkalmas módszerek a Mágneses Rezonanciás Képalkotás (MRI), a komputertomográfia (CT), a pozitron emissziós tomográfia (PET) és a foton emissziós tomográfia (SPECT). Ezen vizsgáló módszerek közös feladata az, hogy az eltérő struktúrájú és tulajdonságú szöveteket jól megkülönböztethető (kontrasztos) módon jelenítsék meg. Gyakran azonban a kapott képek kontrasztossága nem megfelelő, ezért olyan anyagok alkalmazására (ún. kontrasztanyagokra) van szükség, amelyek javítani tudják a kép minőségét. A röntgensugárzáson alapuló CT módszereknél leggyakrabban jódot vagy bárium vegyületeket használnak ilyen céllal, míg az MRI vizsgálatoknál, az eljárás elvének különbségéből adódóan, paramágneses vegyületeket (fémoxidok, komplexek, stb.) használnak.

A MRI vizsgálatokban jelenleg alkalmazott Gd^{3+} -alapú kontrasztanyagok (pl. Magnevist[®], Dotarem[®]) hatékonysága megkérdőjelezhetetlen, viszont a bennük található Gd^{3+} -ion erősen mérgező hatása, illetve a Nefrogén Szisztémás Fibrózis (NSF) miatt a kutatások új irányba fordultak. Ezek elsősorban biogén fém-komplex felhasználását célozzák, ugyanakkor kiemelkedő szerepe van a Gd^{3+} -hoz hasonlóan hét párosítatlan elektront tartalmazó ritkaföldfémionoknak (pl. Eu^{2+})^[1,2] is. A kisebb magspinnel rendelkező átmeneti fémionok közül például a Mn^{2+} -nek^[3,4], vagy a Fe^{2+} , a Ni^{2+} - és a Co^{3+} -ionoknak juthat szerep a jövőben.^[5] A Mn^{2+} -ion esetében az egyik nagy kihívást a levegő oxigénjének hatására bekövetkező oxidáció jelenti, ami a paramágneses hatás drasztikus csökkenéséhez vezet. A $\text{Mn}^{2+} \rightarrow \text{Mn}^{3+}$ redoxirendszer potenciáljának nagyobbak kell lennie + 0,8 V-nál (amit a ligandum szerkezetének hangolásával érhetünk el), hogy az oxidációra kevésbé érzékeny MRI kontrasztanyagot kapjunk (ugyanakkor a $\text{Mn}^{2+}/\text{Mn}^{3+}$ vagy a $\text{Co}^{2+}/\text{Co}^{3+}$ redoxpárra alapozva intelligens kontrasztanyagokat is lehet fejleszteni).

A Mn^{2+} -komplexek termodinamikai stabilitása jóval kisebb, ill. kevésbé inerte, mint a megfelelő Gd^{3+} -komplex. Ennek a magyarázata a vegyértékhéjon öt párosítatlan elektront tartalmazó Mn^{2+} -ion esetén, a kristálytér stabilizációs energia (CFSE) hiányában keresendő. Ezért is nagyobb kihívást jelent olyan Mn^{2+} -komplexek előállítása, melyek képesek lehetnek megteremteni a termodinamikai, relaxációs, ill. kinetikai paraméterek közötti egyensúlyt, ami elengedhetetlen az *in vivo* MRI alkalmazás tekintetében.

II. Irodalmi áttekintés

II.1. Paramágneses fémionok az orvosi diagnosztikában

Az elmúlt negyed században a paramágneses fémionok komplexei, különleges tulajdonságaiknak köszönhetően, az orvosi diagnosztika nélkülözhetetlen elemeivé váltak.^[6] Az MRI módszer nagy felbontóképességének köszönhetően komoly teret nyert a képalkotás területén, és ennek következtében megnövekedett az igény az eljárás során alkalmazott kontrasztanyagok fejlesztése iránt is.

A módszer kifejlesztése *Lauterbur* és munkatársai nevéhez kötődik, akik vizsgálataik során kétdimenziós képet készítettek szövetekről mágneses tér gradiens alkalmazásával.^[7] Az elvégzett vizsgálatokból kiderült, hogy a paramágneses anyagok hatására javul a szövetek megkülönböztethetősége a bennük lévő vízprotonok különböző relaxációs tulajdonságainak köszönhetően.^[8]

Az eltelt közel negyven év alatt a kontrasztanyagokkal végzett laboratóriumi és klinikai vizsgálatok eredményeképpen körvonalazódott, hogy a velük szemben támasztott legfontosabb követelmények a nagy termodinamikai stabilitás és inertség, biztosítandó a kis toxicitást. Emellett fontos még a jó vízoldhatóság, a kis ozmotikus koncentráció, a szervspecifikusság, és a minimális dózis melletti maximális kontrasztnövelés. A kontrasztnövelés mértékét meghatározó fontos paraméter a relaxivitás (r_1), ami a paramágneses anyag 1 mM-os oldata által eredményezett relaxációsebesség ($1/T_1$) növekedés a diamágneses közegben mérthez képest. A megfelelő relaxivitás eléréséhez, néhány kivételtől eltekintve elengedhetetlen, hogy a komplex belső koordinációs szférájában, közvetlenül a paramágneses fémionhoz legalább egy vízmolekula koordinálódjon.

Az orvosi diagnosztika során alkalmazott komplexet két nagyobb csoportra bonthatjuk a kelátképző ligandum szerkezetétől függően (nyílt láncú és makrociklusos). Napjainkban főleg a makrociklusos ligandumokat részesítik előnyben a komplexeik nagy inertsége miatt, mely csökkenti a kelátok *in vivo* disszociációját és a felszabaduló ligandum, ill. a fémion szervezetre gyakorolt káros hatásait. Az orvosi gyakorlatban is alkalmazott okta dentát H_4DOTA helyett újabban hepta- és hexa dentát ligandumokat állítottak elő, melyek lantanoidákkal képzett komplexeik relaxivitását befolyásolták, a központi fémhez koordinálódó vízmolekulák számának növelésével. Ezen komplexeknél viszont a stabilitás csökkenését tapasztalták (pl. $\text{H}_3\text{DO}_3\text{A}$).^[4]

A DO3A-hoz hasonló komplexek tulajdonságainak javítása érdekében piridin gyűrűt építettek a makrociklusba, így jóval merevebb szerkezetekhez jutottak, ami inertebb komplexeket eredményezett. A legbehatóbban tanulmányozott tagja ennek a ligandumcsaládnak a H_3PCTA komplexképző.

A mai napig kilenc Gd^{3+} -komplex jutott el a klinikai alkalmazásig, melyek közül négy a nyíltláncú H_5DTPA , a további három pedig a makrociklusos H_4DOTA ligandumok és származékainak a Gd^{3+} -komplexe. A diagnosztikai vizsgálatokban elsőként alkalmazott kontrasztanyag a $[\text{Gd}(\text{DTPA})]^{2-}$ (Magnevist[®]) volt, amit a jóval nagyobb kinetikai inertséggel rendelkező $[\text{Gd}(\text{DOTA})]^-$ (Dotarem[®]) követett.^[9-11] A komplexeket intravénásan juttatják a beteg szervezetébe, ami az injekálás helyén, a töltéssel rendelkező kontrasztanyagok hatására kialakuló jelentős ozmotikus koncentráció-különbség miatt, fájdalommal jár. Ennek a fájdalomnak a csökkentésére fejlesztették ki a $[\text{Gd}(\text{DTPA})]^{2-}$ és a $[\text{Gd}(\text{DOTA})]^-$ töltés nélküli származékait, amelyekben a ligandum egy vagy két acetát csoportját alkoholos hidroxil- vagy amidcsoportokkal helyettesítették.^[12-14] Kereskedelmi forgalomban fellelhető töltés nélküli kontrasztanyagok a $[\text{Gd}(\text{DTPA-BMA})]$ (Omniscan[®]), a $[\text{Gd}(\text{DTPA-BMEA})]$ (Optimark[®]), a $[\text{Gd}(\text{HP-DO3A})]$ (Prohance[®]) és a $[\text{Gd}(\text{DO3A-B})]$ (Gadovist[®]). Az eddigiekben bemutatott kontrasztanyagok közös sajátossága, hogy a befecskendezést követően egyenletesen oszlanak el az extracelluláris térben, és kb. 1,6 órás felezési idővel ($t_{1/2}$) a vesén keresztül kiürülnek.^[10,15]

A szervspecifikusság kifejlesztése lehetőséget teremtett arra, hogy a beinjektált kontrasztanyag mennyiségét 0,1-0,3 mmol/testsúly kg dózistról 2-10 μmol /testsúly kg dózisa csökkentsék, így kevésbé terhelve a szervezetet. Erre a célra három DTPA-származékot fejlesztettek ki, amelyek a máj, a szív és az érrendszer vizsgálatára alkalmas kontrasztanyagok voltak ($[\text{Gd}(\text{EOB-DTPA})]^{2-}$ (Eovist[®]) és $[\text{Gd}(\text{BOPTA})]^{2-}$ (Multihance[®]), ill. az MS-325 (Vasovist[®])).^[16,17]

A kontrasztanyag fejlesztés mindig törekszik a még specifikusabb komplexek előállítására, így például az érrendszer vizsgálatára alkalmazható kontrasztanyag csoportnál a paramágneses fémkomplexet a liposzóma belsejében helyezik el, ezzel biztosítva, hogy huzamosabb ideig a vérben tartózkodjon.^[18-21] Egy másik esetben az ún. intelligens kontrasztanyagoknál („smart contrast agents”) a szövetek hőmérsékletének, pH-jának, az oxigén parciális nyomásának, a bennük lévő enzimek aktivitásának, illetve az egyes fémionok (Ca^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) koncentrációjának mérésére van lehetőség.^[6,22-30] A élő szervezetről alkotott hőtéskéép információt szolgáltat a gyulladásos szövetekről; a pH-értékének pedig az egészséges és beteg szövetekben tapasztalt különbsége alapján a tumoros sejtek elhelyezkedésére következtethetünk (egészséges sejtközi állomány: pH = 7,4; tumoros

sejtközi állomány: pH = 5,8 - 6,8). Az oxigén parciális nyomásának követése a szöveteken belül lehetőséget biztosít az artériás és a vénás vér, az egészséges és a tumoros, illetve az élő és az elhalt szövetek megkülönböztetésére. Az enzimaktivitást a szubsztrát szerepét betöltő kontrasztanyagokkal lehet megvizsgálni, melyeknek a relaxivitása megváltozik az enzimkatalizált reakció során.

Nem kerülhető meg az a tény, hogy 90-es évek végén először diagnosztizált, a Gd^{3+} -alapú kontrasztanyagokkal összefüggésbe hozható betegség, az NSF előfordulása néhány százas nagyságrendű volt és jelentős részben a csökkent vesefunkcióval rendelkező betegeket érintette. A kontrasztanyag szervezetben tartózkodásának ideje alatt – a teljes kiürülés egészséges embernél tíz óra, csökkent veseműködés esetén viszont akár 40 óra is lehet – lehetőség adódik biogén fémionokkal lezajló kicserélődési reakciókra, ezáltal a felszabaduló paramágneses fémionok nem ürülnek ki a szervezetből.^[31] A probléma másik oka az, hogy a vesebetegek dialízise során nincs lehetőség a teljes vértisztításra, illetve hogy a folyamat elvégzése során a vér foszfát tartalma lokálisan megemelkedhet (a dialízis során alkalmazott oldat foszfát koncentrációja miatt), ami elősegíti a Gd^{3+} -komplex, főleg a $[\text{Gd}(\text{DTPA-BMA})]$ disszociációját, a Gd^{3+} -ion felhalmozódását.^[32] A szabad Gd^{3+} -ion erősen mérgező az élő szervezet számára, LD_{50} értéke 0,2-0,5 mmol/kg. Ezek a tények rámutattak arra, hogy a kinetikai inertség kiemelkedően fontos a biztonságos felhasználás érdekében,^[33] és előrelendítette a biztonságosabb, biogén fémiont tartalmazó komplexek előállítását célzó kutatásokat.

Az eddigi egyetlen kereskedelmi forgalomban kapható (az európai piacokról már kivont), nem Gd^{3+} -ion tartalmú kontrasztanyag, a $[\text{Mn}(\text{DPDP})]^{4-}$ (Mangafodipir, Teslascan[®]), amelyet a máj MRI vizsgálatánál alkalmaznak.^[34-36] Eltérően a Gd^{3+} -komplexeiktől, ezen komplex labilis, a májban történő dúsulását követő disszociál és a felszabaduló Mn^{2+} -ion eredményezi a kontraszt növekedését. Ellentétben a Gd^{3+} -ionnal, a Mn^{2+} -ion biogén fémion, és a szervezet rendelkezik az eltávolításhoz szükséges mechanizmusokkal. Természetesen ez csak bizonyos határkoncentrációkig érvényes, azon túl már a Mn^{2+} is toxikus hatással bír. (Míg a Mangafodipirnél az alkalmazott koncentráció 5 $\mu\text{mol/kg}$, addig ez az érték a Magnevist[®] esetén közel 100 $\mu\text{mol/kg}$.)

Az utóbbi években végzett kutatások eredményképpen sikerült olyan keresztkötött ligandumokat előállítani, melyek átmenetifémionokkal képzett komplexeinek disszociációja nem számottevő *in vivo* körülmények között. Ezek olyan ciklén és ciklám származék ligandumok, amelyek inert komplexekeket képeznek a Mn^{2+} -ionokkal, viszont pozitív töltésük

vagy kis relaxivitásuk (ami a belső szférában koordinált vízmolekula hiányából adódik) miatt nem alkalmazhatóak MRI vizsgálatok során.^[37]

II.2. A paramágneses fémionok relaxivitása

A kialakított kontraszt alapján az MRI kontrasztanyagok két csoportba sorolhatók, lehetnek T_1 -kontrasztanyagok, melyek hatása a vízprotonok longitudinális relaxációs sebességére ($1/T_1$) nagyobb, ami a jelintenzitás növekedését, így a kép világosodását okozza (pozitív kontraszt), illetve a T_2 -kontrasztanyagok, melyek a vízprotonok transzverzális relaxációs sebességét növelik jelentősen, ami a jelintenzitás csökkentését és ezzel együtt a kép sötétítéséhez (negatív kontraszt) vezet.

A vízprotonok relaxációs idejét (T_1) csökkentő anyagok főként olyan paramágneses fémionok, melyek viszonylag hosszú relaxációs idővel és sok párosítatlan elektronnal (5-7 db) rendelkeznek. A legfontosabbak a Mn^{2+} , a Fe^{3+} , az Eu^{2+} és a Gd^{3+} , melyek közül a legnagyobb hatást a Gd^{3+} -ion okozza, mivel hét párosítatlan elektronnal rendelkezik, nagy a mágneses momentuma és hosszú elektronrelaxációs idővel bír (10^{-9} s). A T_2 -kontrasztanyagok közül a legjelentősebbek a különböző szupermágneses vas-oxid mikrorészecskék, melyek közül néhányat alkalmaznak is (Lumirem[®], Abdoscan[®], Endorem[®]).^[38-40] Ezeket az anyagokat a következő összegképlettel írhatjuk le: $\text{Fe}_2^{\text{III}}\text{O}_3\text{M}^{\text{II}}\text{O}$, ahol M^{II} : Fe^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} lehet. Ezen vegyületek fizikai-kémiai tulajdonságait az összetétel mellett a szemcseméret is befolyásolja. A nagyobb szemcseméretű vas-oxid nanorészecskék a vízprotonok transzverzális, míg a kisebbek a longitudinális relaxációsebességét növelik jelentősebben.^[41]

A vízprotonok paramágneses fémkomplexek jelenlétében mért relaxációsebessége ($1/T_{\text{obs}}$) két részből, a komplex diamágneses ($1/T_{\text{ld}}$) és paramágneses ($1/T_{\text{lp}}$) hozzájárulásából tevődik össze, amit a következő összefüggéssel adhatunk meg (a diamágneses tag tartalmazza a tiszta vízben mért relaxációsebességet):

$$\frac{1}{T_{\text{obs}}} = \frac{1}{T_{\text{ld}}} + \frac{1}{T_{\text{lp}}} = \frac{1}{T_{\text{ld}}} + r_{\text{lp}}[\text{M}^{n+}] \quad (1)$$

ahol az r_{lp} a komplex relaxivitása.^[4] A paramágneses fémkomplexek relaxivitását a fémion belső ($r_{\text{lp}}^{\text{is}}$) és külső ($r_{\text{lp}}^{\text{os}}$) koordinációs szférájában lévő vízmolekulák protonjai és a második koordinációs szféra ($r_{\text{lp}}^{\text{2nd}}$) vízprotonjainak relaxációsebessége összegeként adják meg^[42]:

$$r_{1p} = r_{1p}^{\text{is}} + r_{1p}^{\text{os}} + r_{1p}^{2\text{nd}} \quad (2)$$

A fémion a vízmolekula protonjaival kialakított dipoláris kölcsönhatáson keresztül fejt ki relaxációsebességre gyakorolt hatását, így a fémion belső koordinációs szférájában lévő vízmolekulák száma (q) meghatározó tényező. A vízmolekula és a fémion közötti kölcsönhatást befolyásolja a komplex forgó mozgását jellemző rotációs korrelációs idő (τ_R), a fémion elektron spin relaxációs ideje (τ_S) és a fémionhoz koordinált vízmolekulák átlagos tartózkodási ideje (τ_m) ($1/\tau_m = k_{\text{ex}}$, vízcseresebesség), valamint a M-H távolság (r_{MH}). A belső szféra hozzájárulását a Swift-Connick elmélet tárgyalja, a külső szféra relaxivitásra gyakorolt hatását a Freed-féle elmélettel számszerűsíthetjük.^[43-45]

II.3. A mangán koordinációs kémiája

A periódusos rendszer 25. eleme a mangán, melyet Johann Gahn állított először elő elemi formában faszén és olaj keverékével hevített MnO_2 redukálásával. A mangán a 12. leggyakoribb elem és a harmadik leggyakoribb átmenetifém. Közel 300 különböző és igen elterjedt ásványban előfordul, ezek közül 12 gyakorlati jelentőséggel is bír. Oxidációs száma +2-től +7-ig terjed, emellett a standard elektród potenciálokat tekintve reaktívabb jellemű elem, mint bármely szomszédja a periódusos rendszerben ($E^\circ(\text{Cr}^{2+}/\text{Cr}) = -0,91 \text{ V}$, $E^\circ(\text{Mn}^{2+}/\text{Mn}) = -1,18 \text{ V}$, $E^\circ(\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}) = -0,44 \text{ V}$, $E^\circ(\text{Co}^{2+}/\text{Co}) = -0,28 \text{ V}$), és reakciókészsége is kiemelkedő, különösen ha szennyeződések is tartalmaz.

A mangán legstabilisabb állapota a +2 oxidációs állapot (nagy spinszámú Mn^{2+} -kation), mely a szimmetrikus d^5 elektronkonfiguráció kitüntetett stabilitásával értelmezhető. Nyomnyi mennyiségben előfordul számos növényben és baktériumban, míg az egészséges, felnőtt emberi szervezet mintegy 10-20 mg mangánt tartalmaz. A mangántartalmú fehérjékben általában a +2 oxidációs állapotban fordul elő, és gyakran helyettesíthető Mg^{2+} -ionnal az aktivitás elvesztése nélkül. Legfontosabb biológiai funkciója a zöld növények fotoszintézisében játszott szerepe, ahol a fotoszisztém-II-ben (PSII) fordul elő és a víz oxidációjában vesz részt.

A nemkoordinálódó anionokkal alkotott sók vizes oldatai a halványrózsaszínű $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ -iont tartalmazzák, ami egyike a rengeteg nagy spinszámú, oktaéderes Mn^{2+} -komplexnek, amelyek nagy többsége kelátképző ligandumokkal, mint az etiléndiamin, EDTA és oxalát nyerhető. A várakozásoknak megfelelően ezen komplexek mágneses momentuma jó

közelítéssel megegyezik a csak-spin értékkel és általában nagyon halvány színűek. Ez annak következménye, hogy a nagy spinszámú d^5 konfigurációban valamennyi d-d átmenetnek spinpárosodással kell járnia, ezért a spinátmenetek tiltottak.

A nagy spinszámú Mn^{2+} -komplexek esetén a kristálytér stabilizációs energia (CFSE) értéke zérus és így azok stabilitási állandója kisebb, mint a környező kétértékű fémionokkal kialakuló komplexeké. A CFSE nulla értéke azt is jelenti, hogy nincs kitüntetett geometriai elrendeződés, ami megmagyarázza a Mn^{2+} -komplexek sztereokémiájának más kétértékű fémionokhoz képest meglehetősen nagy változatosságát. A Mn^{2+} -komplexek egyúttal kinetikailag labilisak. A mangán koordinációs száma vegyületeiben leggyakrabban 6, de létezik 7-es ($[\text{Mn}(\text{DO3AM})]^{2+}$) és 8-as koordinációs számú komplexe ($[\text{Mn}(\text{DOTAM})]^{2+}$, $[\text{Mn}(\eta^2\text{-NO}_3)_4]^{2-}$).^[46,47]

II.4. A Mn^{2+} -poliamino-polikarboxilát és -polifoszfónát komplexei

Az aminopolikarbonsavak analógiájára könnyen levezethetők az aminopolifoszfonsavak, mindössze a $-\text{COOH}$ csoportot kell helyettesíteni $-\text{PO}_3\text{H}_2$ csoporttal. Ezen funkciós csoportok koordinációs kémiájában jelentős különbségek tapasztalhatók, melyek döntően befolyásolják a komplexek termodinamikai stabilitását és kinetikai inertségét. A legfontosabb különbségek a méret, a funkciós csoportok térszerkezete, illetve a disszociálható protonok száma és disszociációjukat jellemző savi állandó nagysága. Komplexképzési hajlamukat tekintve a foszfónátszármazékok általában stabilabb komplexet képeznek az acetátszármazékoknál, és ez a növekedés egyenes arányban áll a csoportok számának növekedésével. A koordináció módját tekintve is megfigyelhetők különbségek (hard karakterű alkáli- és alkáliföldfémionoknál létrejöhet a komplex mindössze a foszfónát karok koordinálódásával, a soft karakterű átmenetifémeknél a N-donoratomjai nagyobb valószínűséggel koordinálódnak).

A nyíltláncú ligandumok esetében a komplexek képződése pillanatszerű, ugyanakkor a disszociációjuk között eltéréseket figyelhetünk meg. A makrociklusos ligandumok esetében teljesen más a helyzet, mivel a képződés során a legtöbb esetben először egy köztitermék keletkezik, és csak ezen folyamat lejátszódása után léphet be a fémion a ligandum makrociklusa által meghatározott üregbe.

A Gd^{3+} -iont tartalmazó kontrasztanyagok MRI vizsgálatok terén tapasztalt monopóliuma miatt, a Mn^{2+} -ion poliamino-polikarboxilát és -polifoszfónát komplexeinek irodalma relaxációs és kinetikai tulajdonságok terén igencsak szegényes. A termodinamikai

stabilitásra vonatkozó adatok, melyek néhol fellelhetők a közleményekben, csupán a Ln^{3+} -ionokkal végzett kutatások melléktermékei.

Az NSF betegség megjelenése óta intenzív kutatások folynak olyan Mn^{2+} -komplexek előállítására, melyek jó alternatívát jelentenének a ritkaföldfémeket tartalmazó kontrasztanyag kiváltására. A vizsgálatok természetesen a már bevált ligandumokkal kezdődtek el, de viszonylag hamar megjelentek új típusú kelátorok is a közleményekben.^[48-51]

Az irodalmi eredményeket áttekintve kitűnik, hogy a Mn^{2+} -ionok a makrociklusos ligandumokkal és származékaikkal (pl. DOTA, NOTA) képzett komplexeinek a stabilitása kiemelkedő.^[52-54] Ezen kelátok kinetikai tulajdonságai is megfelelőek lettek volna az orvosi alkalmazáshoz, viszont a relaxációs tulajdonságaik nem érték el az alkalmazáshoz szükséges minimális értéket. Ennek oka, hogy ezekben a komplexekben a Mn^{2+} -ion belső koordinációs szférájában nem található a fémhez közvetlen koordinálódó vízmolekula.

A Mn^{2+} -ion nyíltláncú ligandumokkal alkotott komplexeinek termodinamikai tulajdonságai nem sokkal térnek el a megfelelő makrociklusos komplexektől, viszont a kinetikai inertségük több nagyságrenddel kisebbnek mutatkozott.^[55,56] Míg a $[\text{Gd}(\text{DTPA})]^{2-}$ -komplex disszociációja pH = 5 értéken 33 órás felezési idővel ($t_{1/2}$) játszódik le, addig a $[\text{Mn}(\text{DTPA})]^{3-}$ -komplex esetében olyan gyorsnak bizonyult a bomlás ezen a pH-n, hogy stopped-flow technikával sem lehetett mérni.^[57]

Jelenleg az eddig vizsgált nyíltláncú ligandumokkal képződő Mn^{2+} -komplexek közül a $[\text{Mn}(\text{CDTA})]^{2-}$ -komplex rendelkezett a legjobb kinetikai paraméterekkel.^[58] A nagyobb kinetikai inertség a ligandum két iminodiacetát csoportját összekötő etilénhídhoz kapcsolódó ciklohexán gyűrű jelenlétének köszönhető, ami jelentősen merevíti a ligandum szerkezetét, így a képződő Mn^{2+} -komplex szerkezetét is. A $[\text{Mn}(\text{CDTA})]^{2-}$ -komplex fiziológiás pH-n (pH = 7,4) körülbelül 12 órás felezési idővel disszociál, és ez a felezési idő alkalmassá teheti az orvosi alkalmazásra is. A betegekbe jutott kontrasztanyagok 1,6 órás felezési idővel ürülnek ki a szervezetből (9-11 óra után (6-7 felezési idő) a bevitt komplex koncentrációja a kezdeti érték 1%-a alá csökken). A fent említett időtartam alatt a komplex mennyiségének körülbelül a 11%-a disszociál, ami biogén fémionról lévén szó kevésbé káros a szervezet számára.

II.5. A vizsgált kétvegyértékű fémionok biológiai jelentősége

A dolgozatban vizsgált fémionok az élő szervezet szempontjából elengedhetetlenek biológiai szerepük miatt (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+}). A Mg^{2+} - és a Ca^{2+} -ionok fontos szerepet játszanak számos enzimreakcióban, mint enzimaktivátorok, vagy mint az enzim aktív

helyének részei, emellett fontos a szerkezetstabilizáló szerepük is. A Mg^{2+} ezen túl nélkülözhetetlen a fotoszintézisben, mivel a fényenergiát befogó molekula, a klorofill komponense. A Ca^{2+} számos élettani folyamatban – véralvadásban, ideg ingervezetésben, izomműködésben, csontképződésben és a sejtek közötti kötőanyag képződésében – alapvető fontosságú. A K^+ - és a Mg^{2+} -ionok a sejteken belül, a Na^+ és a Ca^{2+} pedig az extracelluláris térben találhatók nagyobb koncentrációban. Az izmok működésében pedig a Ca^{2+} - és a Mg^{2+} -ionok egyaránt fontos szerepet játszanak.^[59]

A Cu^{2+} a növény- és állatvilágban is elterjedt és redoxireakciói számos biológiai oxidációs folyamatban játszanak szerepet. Az élő szervezetben a Cu^{2+} éppen az erős komplexképző sajátossága miatt többnyire fehérjékhez kötött formában fordul elő. A biológiai szempontból aktív rézproteinek három fő típusba sorolhatóak.^[60] Az első típusú vagy "kék" rézproteinek azok a fehérjék, amelyek egyetlen réziont tartalmaznak. Ezek a metalloenzimek főleg redoxireakciókat katalizálnak (növényi lakkáz, emlős ceruloplazmin). A második típusú rézproteinekben szabályos monomer Cu^{2+} -komplexekre jellemző torzult oktaéderes koordináció valósul meg, erős ekvatoriális és igen gyenge axiális kölcsönhatásokkal (pl. szuperoxid dizmutázok). A harmadik típusú rézproteinek két Cu^+ -iont tartalmaznak körülbelül 360 pm távolságra, a fehérjén belül a hisztidil-oldalláncokhoz kapcsolódva. Ezen enzimek az oxigénmolekula szállításában és aktiválásában vesznek részt (hemocianin).

A Zn^{2+} biológiai szempontból az egyik legfontosabb fémion, így metalloenzimekben is sokkal elterjedtebb központi ion, mint a Cu^{2+} -ion. Azok az enzimek, amelyek karbonsavészterek, amidok, peptidek vagy foszfátok hidrolízisében vesznek részt, majdnem mindig Zn^{2+} -iont tartalmaznak az aktív centrumban. Zn^{2+} -iont tartalmazó enzim pl. a szénsavanhidráz, karboxipeptidáz, termolizin, alkohol-dehidrogenáz, szuperoxid-diszmutázok és az elasztáz is. A Zn^{2+} egy újabban felfedezett szerepe azokhoz a fehérjékhez kapcsolódik, amelyek a DNS bázisszekvenciájának a felismerésében játszanak szerepet, a genetikai információ átadását szabályozzák. Ezek az úgynevezett „cink ujjak” (zinc fingers) 9-10 Zn^{2+} -iont tartalmaznak tetraéderes koordinációban.^[59]

III. Célkitűzés

Az orvosi diagnosztikában alkalmazott Gd^{3+} -iont tartalmazó kontrasztanyagoknál tapasztalható problémákra potenciális megoldást jelenthet azok Mn^{2+} -komplexekkel történő helyettesítése. Ezzel a cserével csökkenthető lenne a klinikai gyakorlatban használt kontrasztanyagok toxicitása, és megőrizhető az MRI vizsgálatok során kapott képek felbontása. Amint azt az irodalmi áttekintésben is említettem a nyíltláncú ligandumok Mn^{2+} -ionokkal alkotott komplexeinek termodinamikai stabilitása elegendően nagy, viszont kinetikai inertségük nem éri el a gyakorlati alkalmazáshoz szükséges minimális értéket.

A ritka(föld)fém-csoportban Garda Zoltán PhD hallgató által előállított PhDTA ligandum a már korábban vizsgált CDTA komplexképzőnél is merevebb szerkezeti analógjának tekinthető (ciklohexilén-diamin helyett orto-feniléndiamin jelenti a molekula gerincét). Az így kapott ligandum szerkezetét tekintve eltér a CDTA ligandumtól, mivel a ciklohexán gyűrű esetében az iminodiacetát csoportok két nitrogénje a *cisz* és *transz* térhelyzetet vehet fel (a két szerkezet közötti átmenet csak a gyűrű deformációjával mehet végbe), addig az aromás π_6 elektronrendszer miatt a PhDTA esetében a molekula ezen szerkezeti egysége síkalkatú. Ennek következtében a képződő Mn^{2+} -komplex szerkezete eltérő lesz a CDTA estében vizsgált *transz* térhelyzethez képest, ami megjelenhet a komplex termodinamikai és kinetikai tulajdonságaiban is. A $[\text{Mn}(\text{PhDTA})]^{2-}$ -komplex relaxivitás értékében nem várunk jelentős különbséget a CDTA-val képzett komplexhez képest, mivel mindkét ligandum a két iminodiacetát kar jelenléte miatt két nitrogén és négy oxigén donoratómmal rendelkezik, ezért hasonló mértékben csökkentik a központi fémionhoz koordinálódó vízmolekula cseresebességét (ezt az irodalmi értékek is alátámasztják).^[61]

A nyolcvanas és a kilencvenes években már vizsgálták a PhDTA ligandum stabilitását, illetve fémkomplexeinek (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+}) termodinamikai sajátságait, de az alkalmazott módszerek (kalorimetria) és ionerősségek (1,0 M NaClO_4) miatt indokoltnak találtuk azok újbóli meghatározását a fiziológiás körülményekhez közeli ionerősség alkalmazásával (0,15 M NaCl , 25 °C).^[62-66] Másrészt, egy a közelmúltban megjelent közlemény rámutatott arra, hogy a PhDTA komplexek stabilitása akár 9-10 nagyságrenddel is eltérhet.^[67]

Ezek alapján, tehát munkám célja a PhDTA ligandum részletes koordinációs kémiai vizsgálata volt, különös tekintettel a biogén fémionokkal képződő komplexek egyensúlyára, ill. a Mn^{2+} -komplex (relaxometriás, kinetikai) tulajdonságaira.

IV. Alkalmazott vizsgálati módszerek

A következőkben a kísérleti munka során alkalmazott azon vizsgálati módszerek elméleti alapjait mutatom be, melyek a dolgozatban szereplő eredmények tárgyalásához feltétlenül szükségesek.

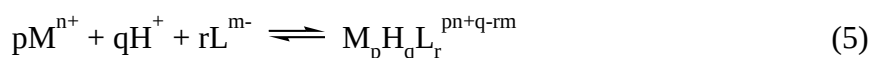
IV.1. pH-potenciometria

A munkám során Mg^{2+} -, Ca^{2+} -, Zn^{2+} -, Cu^{2+} - és Mn^{2+} -komplexek és a komplexet alkotó ligandum oldategyensúlyi vizsgálata során alkalmazott legfontosabb és legpontosabb módszer a pH-potenciometria volt. A fémkomplexek stabilitási állandóinak meghatározásához szükséges a komplexeket alkotó ligandum protonálódási állandóinak ismerete. A protonálódási állandókat általánosan a következő módon definiálhatjuk:



$$K_i^{\text{H}} = \frac{[\text{H}_i\text{L}]}{[\text{H}^+][\text{H}_{i-1}\text{L}]}, i = 1, 2, \dots \quad (4)$$

A szabad ligandum különböző bázicitású donorcsoportjai, illetve a fémionok és a különböző mértékben protonált ligandumok közötti kompetíciós reakció határozza meg az oldat H^+ -koncentrációját. A különböző összetételű komplexek általános képződési folyamatai, valamint a stabilitási szorzatokat általánosan a következőképpen definiáljuk:



$$\beta_{pqr} = \frac{[\text{M}_p\text{H}_q\text{L}_r^{pn+q-rm}]}{[\text{M}^{n+}]^p [\text{H}^+]^q [\text{L}^{m-}]^r} \quad (6)$$

Az általunk vizsgált rendszerek esetében az 1:1 összetételű ML komplexeken túl, néhány esetben számolni kellett a 2:1 összetételű kétmagvú komplexek képződésével, valamint az 1:1 és a 2:1 összetételű komplexek különböző protonált formáival. Az egymagvú és a többmagvú, valamint a protonált komplexek képződésére vonatkozó egyensúlyi folyamatokat és egyensúlyi állandókat a következő összefüggésekkel jellemezhetjük (a fémion és a ligandum töltésének jelölésétől az egyszerűség kedvéért eltekintünk):



$$K_{\text{ML}} = \frac{[\text{ML}]}{[\text{M}][\text{L}]} \quad (8)$$



$$K_{\text{MLM}'} = \frac{[\text{MLM}']}{[\text{ML}][\text{M}']} \quad (10)$$



$$K_{\text{MH}_i\text{L}} = \frac{[\text{MH}_i\text{L}]}{[\text{MH}_{i-1}\text{L}][\text{H}^+]}, i = 1, 2, \dots \quad (12)$$

Nagy stabilitású komplexek képződése során számos esetben a komplexképződési folyamat már $\text{pH} < 2$ tartományban közel teljes. Ilyen esetekben alapvetően kétféleképpen járhatunk el. Az egyik lehetőség, ha a stabilitási állandók meghatározásához más módszert választunk, ahol a pH-mérés helyett, más intenzív paramétert követve és a teljes savkoncentrációt figyelembe véve tudunk stabilitási állandót meghatározni (spektrofotometria, NMR). Egy másik lehetséges módszer, hogy a komplexképződést egy kompetíciós komplexképződési folyamattal olyan vizsgálhatóbb pH-tartományba toljuk, ahol már biztonsággal mérhető a pH. Ilyen esetekben leggyakrabban „segéd” ligandumot alkalmazhatunk.

A pH-potenciometria alkalmazása $1,8 < \text{pH} < 11,8$ tartományban ad megfelelő pontosságú eredményeket. Amennyiben a ligandum protonálódási folyamatai $\text{pH} > 11,8$, vagy a komplexképződési folyamat $\text{pH} < 1,8$ tartományban következik be és nincs mód proton kompetíció alkalmazására, ilyenkor jöhet szóba az UV-látható spektrofotometria vagy az NMR spektroszkópia. Le kell szögezni azonban, hogy az említett módszerekkel meghatározott egyensúlyi állandók hibája nagyobb, mint a pH-potenciometriás adatokból számítottaké. Az UV-látható spektrofotometria és az NMR spektroszkópia előnye azonban, hogy nemcsak egyensúlyi állandók számíthatóak az adatokból, hanem a képződő komplexek koordinációs viszonyára és szerkezetére is következtethetünk.

A titrálások során kapott adatokból a PSEQUAD számítógépes program segítségével határoztuk meg a protonálódási és stabilitási állandókat.^[68]

IV.2. Spektrofotometria

A $[\text{Cu}(\text{PhDTA})]^{2-}$ -komplex stabilitási állandójának meghatározásához és a kinetikai vizsgálatokhoz alkalmaztunk spektrofotometriás módszert. Az UV-látható spektrofotometria alkalmazásának alapja, hogy az átmenetifémionok fényabszorpciója komplexképződés hatására kisebb-nagyobb mértékben megváltozik a fémion és a ligandum tulajdonságaitól függően. A vizsgálatok során igyekeztünk olyan hullámhosszt választani, ahol lehetőleg csak egy részecskének, lehetőség szerint csak a képződő komplexnek van elnyelése, míg a szabad fémionnak és a ligandumnak az elnyelése elhanyagolható.

A $[\text{Mn}(\text{PhDTA})]^{2-}$ -komplex disszociációs sebességének vizsgálata során pszeudo-elsőrendű feltételeket biztosítottunk a fémkoncentráció nagy feleslegének (legalább tízszeres felesleg) alkalmazásával. A vizsgálatokat állandó pH-ra pufferelt közegben (a komplex disszociációja során végbemenő protonkoncentráció változás miatt), állandó ionerősség és állandó hőmérséklet mellett végeztük. A $[\text{Mn}(\text{PhDTA})]^{2-}$ -komplex disszociációja elegendően lassú volt a hagyományos spektrofotometriás mérésekhez. A folyamat során a kicserélő fémionnal kialakuló komplexnek a fényelnyelését követtük. A reakciót leíró sebességi egyenlet a következő módon adható meg:

$$-\frac{d[\text{Mn}(\text{PhDTA})]_{\text{tot}}}{dt} = k_{\text{obs}}[\text{Mn}(\text{PhDTA})]_{\text{tot}} \quad (13)$$

ahol a k_{obs} a pszeudo-elsőrendű sebességi együttható. A tot alsóindex a komplex teljes koncentrációját jelöli. A k_{obs} értékét a spektrofotometriás módszer esetében az abszorbancia t időpillanatban történő mérésével határozzuk meg a következő összefüggés alapján:

$$A_t = (A_0 - A_{\infty})e^{(-k_{\text{obs}}t)} + A_{\infty} \quad (14)$$

A (14) egyenletben az A_t a t időpillanatban mért abszorbancia, míg A_0 a reakcióelegy kiindulási, A_{∞} pedig az egyensúlyi abszorbanciája. Mivel a kicserélődési reakció 100%-ban végbemegy, ezért $A_0 = A_r$, illetve $A_{\infty} = A_v$, ahol A_r a reaktánsok – Mn^{2+} -komplex és Cu^{2+} -ion –, A_v pedig a végtermékek – Cu^{2+} -komplex és Mn^{2+} -ion – abszorbanciája.

IV.3. Relaxometria

A II.2. fejezetben részletesen tárgyaltuk a paramágneses fémionok relaxivitását. A mérések elvi alapját az adja, hogy a Mn^{2+} -ion valamint komplexeinek a vízprotonok relaxáció sebességére gyakorolt hatása eltérő. A disszociációs reakciók esetében a fémion belső szférájában található vízmolekulák száma növekszik a pH csökkentésével, ami a vízprotonok relaxációs idejének csökkenését, azaz a relaxáció sebesség növekedését eredményezi.

V. Eredmények

V.1. Egyensúlyi és relaxációs mérések

A Mn^{2+} -komplex stabilitási állandóinak meghatározásához első lépésben meg kell határoznunk a PhDTA ligandum protonálódási állandóit. Ehhez pH-potenciometriásan titráltuk a ligandumot, majd a mérések adataiból a PSEQUAD program segítségével kiszámítottuk a protonálódási állandókat. A vizsgálatok során lényeges az ionerősség megválasztása, mivel az ionerősséget beállító ionok kölcsönhatásba léphetnek a komplexet alkotó ligandummal és fémionnal. A célkitűzésben említett ionerősséget (0,15 M NaCl) azért választottuk, mert így modellezhetjük a vér NaCl koncentrációját.

A kapott protonálódási állandók az 1. táblázatban láthatóak. Összehasonlításuképpen feltüntettük a PhDTA ligandumra kalorimetriásan meghatározott vonatkozó, illetve a CDTA kapott értékeket is.

1. táblázat A PhDTA és a CDTA ligandumok protonálódási állandói
(25 °C, 0,15 M NaCl)

	H ₄ PhDTA	H ₄ PhDTA	H ₄ CDTA ^b
log K_1	6,66(5)	6,42 ^a ; 5,95 ^c	9,36
log K_2	4,85(6)	4,58 ^a ; 3,70 ^c	5,95
log K_3	3,53(7)	3,50 ^a ; 2,79 ^c	3,62
log K_4	3,32(6)	2,92 ^a ; – ^c	2,57
log K_5	–	–	1,49
$\Sigma \log K_i^H$	18,36	17,42 ^a ; 12,44 ^c	22,99

^a [62] (25 °C, 0,5 M NaClO₄); ^b [58] (25 °C, 0,15 M NaCl);

^c [67] (25 °C, 0,1 M KNO₃).

A protonálódási állandók összehasonlításából kitűnik, hogy a PhDTA ligandum protonálódási állandói kisebbek a CDTA ligandum protonálódási állandóinál, ami az összbázicitás értékét négy nagyságrenddel csökkenti. Mind a CDTA, mind a PhDTA ligandum esetén az első két protonálódás a két amin nitrogénhez tartozik, míg a további protonálódási lépések az acetátcsoporthoz rendelhetők. A két ligandum első két protonálódási állandói között tapasztalt jelentős különbség abból adódik, hogy míg a

ciklohexán gyűrű metilénsoportjai elektronküldő, addig a fenilénsoport elektronszívó sajátsággal bír, csökkenti a nitrogénekben tapasztalható elektronsűrűséget és közvetve a donoratom protonálódási állandóját.

Ahogy azt már említettük, a PhDTA ligandum harmadik és negyedik protonálódási állandója két acetátcsoporthoz tartozik. A másik két acetátcsoporthoz tartozó protonálódást pH-potenciometriával nem tudtuk mérni, ez arra enged következtetni, hogy vizes oldatban ezek a protonok könnyen disszociálnak, az erős savak protonjaihoz hasonlóan. Ugyanez a helyzet a CDTA ligandum esetében is.

Összevetve az általunk meghatározott protonálódási állandó értékeket a korábban a PhDTA-ra közöltekkel, nem tapasztaltunk jelentős különbséget. A kismértékű eltérések az alkalmazott ionerősségből, illetve kisebb valószínűséggel a mérési módszer különbségéből fakadhatnak.

A protonálódási állandók ismeretében meghatároztuk néhány biogén fémion PhDTA ligandummal képződő komplexének stabilitási és protonálódási állandóit 0,15 M-os NaCl ionerősség mellett. A kapott értékeket a 2. táblázatban mutatjuk be, ahol a PhDTA ligandumra korábban meghatározott értékei és CDTA ligandum komplexeinek stabilitási és protonálódási állandói szintén szerepelnek.

2. táblázat A PhDTA és CDTA ligandumok komplexeinek stabilitási és protonálódási állandói (25 °C, 0,15 M NaCl)

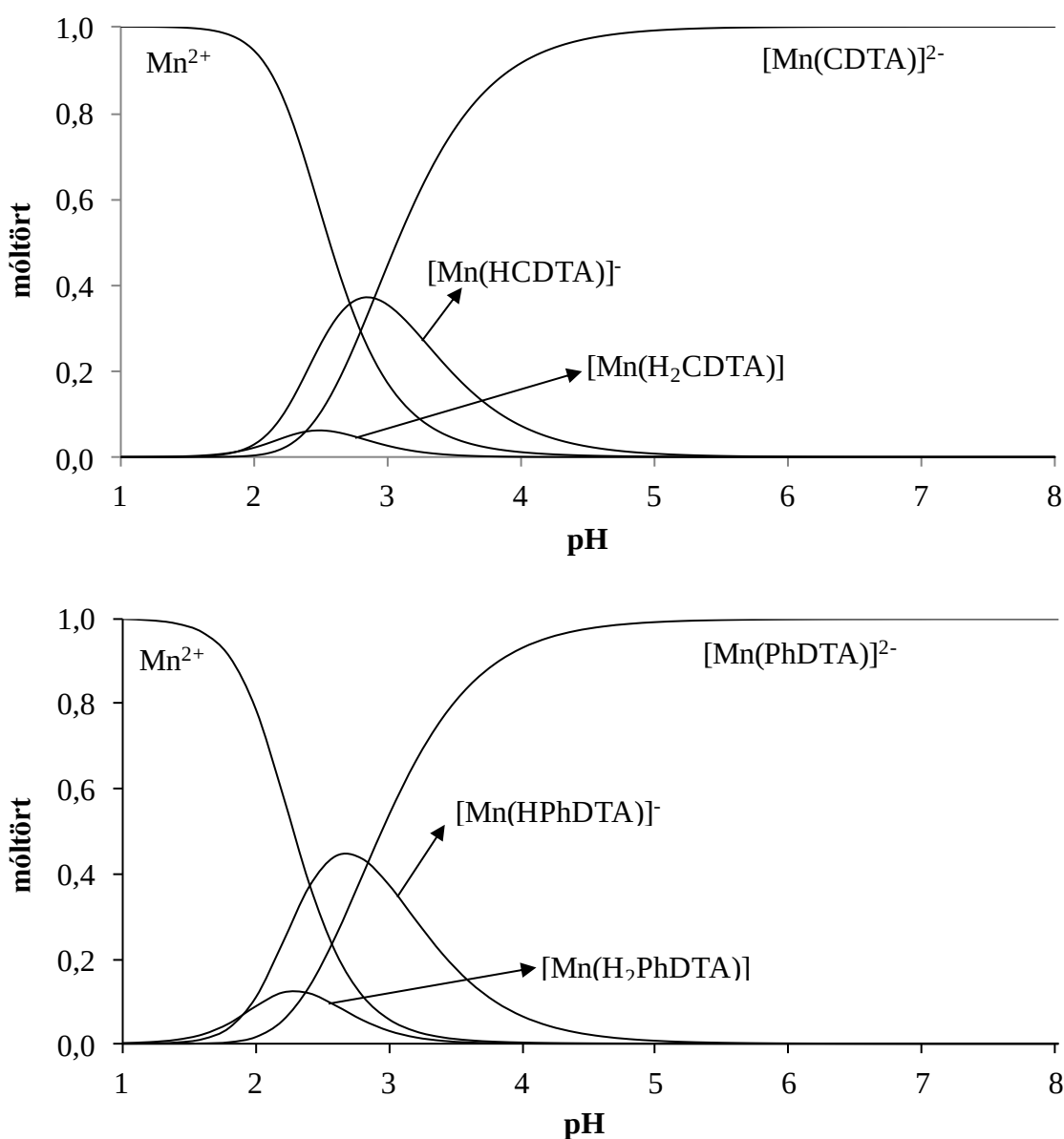
		PhDTA	PhDTA	CDTA
Mg²⁺	$\log K_{\text{ML}}$	6,94(3)	6,40 ^a ; 10,41 ^j	10,41 ^b
	$\log K_{\text{ML}}^{\text{H}}$	3,78(6)	–	–
Ca²⁺	$\log K_{\text{ML}}$	8,79(2)	8,23 ^c ; 11,25 ^j	13,15 ^d
	$\log K_{\text{ML}}^{\text{H}}$	3,38(3)	3,01 ^c	–
Mn²⁺	$\log K_{\text{ML}}$	11,79(2)	11,37 ^e	14,32 ^f
	$\log K_{\text{ML}}^{\text{H}}$	2,84(2)	–	2,90 ^f
	$\log K_{\text{MHL}}^{\text{H}}$	1,91(5)	–	1,89 ^f
	$\log K_{\text{ML}}^{\text{M}}$	–	–	–
Zn²⁺	$\log K_{\text{ML}}$	13,03(3)	12,89 ^g ; 17,99 ^j	19,32 ^h
	$\log K_{\text{ML}}^{\text{H}}$	3,56(2)	2,96 ^g	–
	$\log K_{\text{MHL}}^{\text{H}}$	1,90(3)	1,30 ^g	–
	$\log K_{\text{ML}}^{\text{M}}$	2,69(7)	–	–
Cu²⁺	$\log K_{\text{ML}}$	15,21(6) ⁱ	15,21 ^g ; 24,84 ^j	21,95 ^h
	$\log K_{\text{ML}}^{\text{H}}$	3,35(1) ⁱ	3,04 ^g	–
	$\log K_{\text{MHL}}^{\text{H}}$	2,18(1) ⁱ	1,80 ^g	–
	$\log K_{\text{ML}}^{\text{M}}$	2,75(2) ⁱ	–	–

^a [63] (25 °C, 0,5 M NaClO₄); ^b [69] (25 °C, 0,1 M KNO₃); ^c [64] (25 °C, 0,5 M KNO₃); ^d [70] (20 °C, 0,1 M NaClO₄); ^e [65] (25 °C, 1,0 M NaClO₄); ^f [58] (25 °C, 0,15 M NaCl); ^g [66] (25 °C, 1,0 M NaClO₄); ^h [71] (20 °C, 0,1 M KNO₃); ⁱ UV-látható spektrofotometriásan meghatározva, ^j [67] (25 °C, 0,1 M KNO₃).

Ahogy arra az összbecslítés értékekből számítani lehetett, a PhDTA komplexek stabilitási állandói nagyságrendekkel kisebbek, mint a CDTA komplexeké. A Mg²⁺, a Ca²⁺ és a Mn²⁺ esetében ez mindössze három-négy nagyságrend, viszont a Zn²⁺- és Cu²⁺-ionoknál mért állandók közötti különbség már több mint hat nagyságrendnyi. Ennek egyik lehetséges oka az lehet, hogy a *transz*-CDTA ligandum flexibilisebb szerkezete miatt nagyobb

termodinamikai stabilitású komplexet képez a biogén fémionokkal mint a fenilénecsoportot tartalmazó PhDTA. A képződő fémkomplexek pontos szerkezetéről röntgendiffrakciós mérésekkel bizonyosodhatnánk meg.

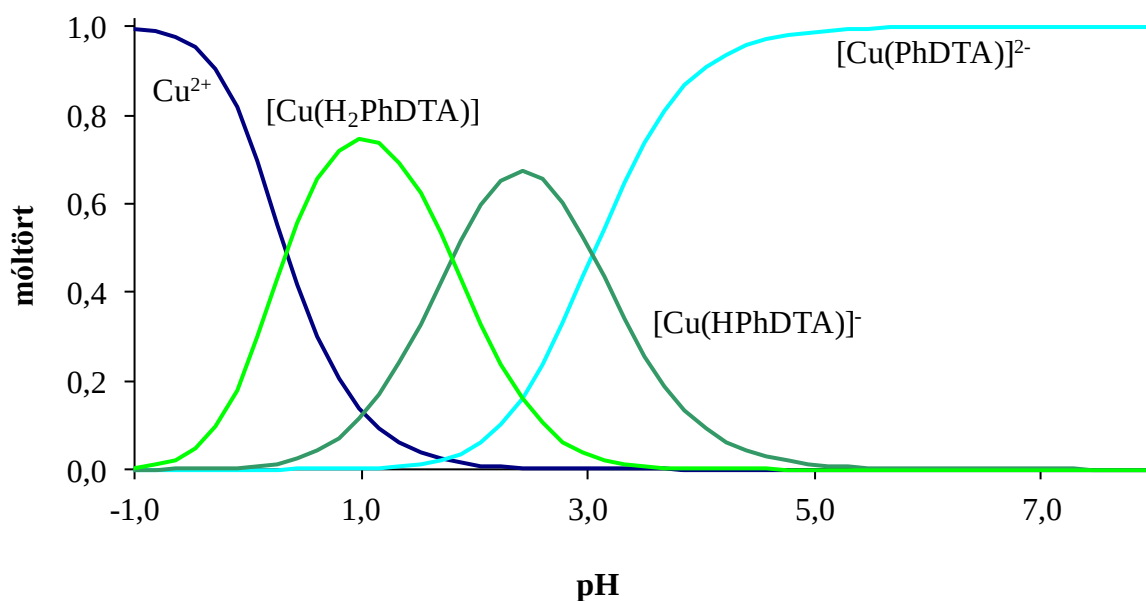
Ugyanakkor, ha az egyensúlyi vizsgálatok eredményeit felhasználva modellszámítást végzünk és elkészítjük a $[\text{Mn}(\text{PhDTA})]^{2-}$ - és a $[\text{Mn}(\text{CDTA})]^{2-}$ -komplex eloszlási diagramjait (1. ábra) azokból megállapítható, hogy a komplexképződés mind a két esetben $\text{pH} = 1,5$ körül kezdődik és $\text{pH} = 5$ körül fejeződik be, ami azt jelenti, hogy látszólagos stabilitásuk közel azonos (ezt az egyensúlyi állandók segítségével $10 \mu\text{M}$ ligandum és $1 \mu\text{M}$ Mn^{2+} koncentrációk segítségével $\text{pH} = 7,4$ -nél számolt pMn értékei is alátámasztják).



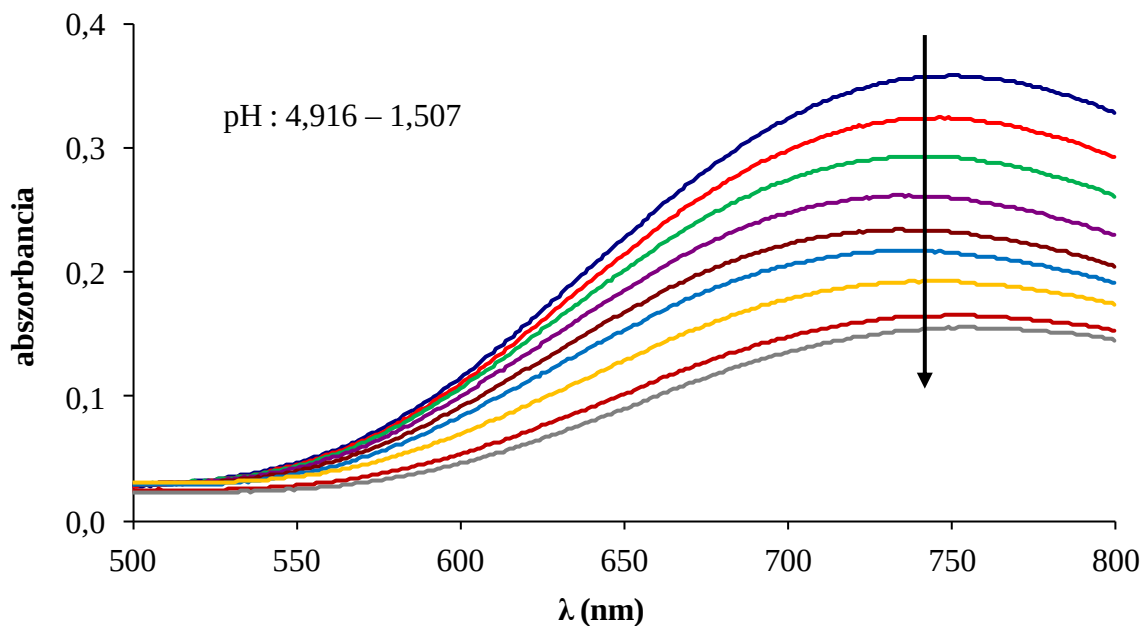
1. ábra A $[\text{Mn}(\text{PhDTA})]^{2-}$ - és a $[\text{Mn}(\text{CDTA})]^{2-}$ -komplexek eloszlási diagramja. Mindkét eloszlási diagram esetén: $[\text{L}]_{\text{tot}} = 1 \text{ mM}$, $[\text{Mn}^{2+}]_{\text{tot}} = 1 \text{ mM}$

A Mg^{2+} -, Ca^{2+} -, Mn^{2+} -, Zn^{2+} - és a Cu^{2+} -ionok egyensúlyi rendszereinél sikerült ML, egyszer (MHL) és kétszer protonált komplex (MH_2L) képződését kimutatni. A Mn^{2+} -, Zn^{2+} - és Cu^{2+} -ionokkal végzett vizsgálatok során 2:1 fém-ligandum aránynál is végeztünk titrálásokat, hogy információt nyerjünk a kétmagvú komplexek kialakulásának lehetőségéről. A Zn^{2+} - és a Cu^{2+} -ionok kis stabilitású kétmagvú komplexeket is képeznek a PhDTA ligandummal, valamint minden esetben sikerült a protonált komplexek jelenlétét is igazolni.

A $[\text{Cu}(\text{PhDTA})]^{2-}$ -komplex stabilitási állandójának meghatározását nem tudtuk mindössze a pH-potenciometrás mérés adatainak felhasználásával elvégezni, mert amint az a 2. ábrán is látható a Cu^{2+} -ion pH = 1 esetében már 85%-ban komplexben található. Ezért nagyobb savkoncentrációknál spektrofotometriás módszerrel, a $[\text{Cu}(\text{PhDTA})]^{2-}$ -komplex protonálódási állandóit felhasználva határoztuk meg Cu^{2+} -komplex stabilitási állandóját. A mért abszorpciós spektrumok a 3. ábrán láthatóak.



2. ábra A $[\text{Cu}(\text{PhDTA})]^{2-}$ -komplex eloszlásdiagramja

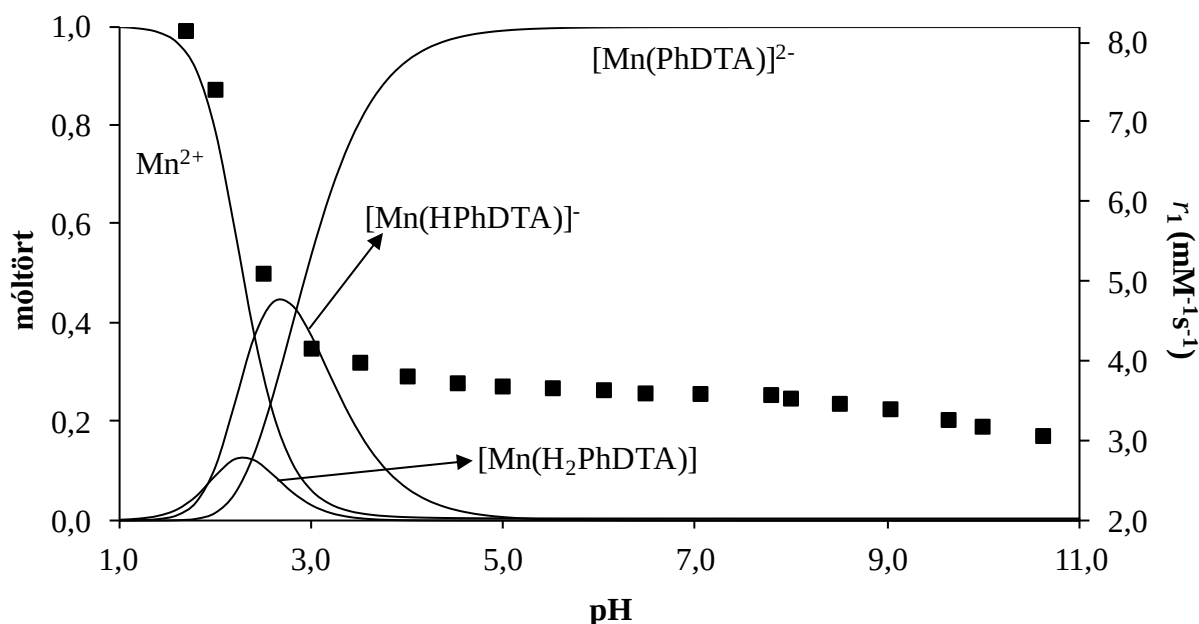


3. ábra A $[\text{Cu}(\text{PhDTA})]^{2-}$ -komplex abszorpciós spektrumai különböző pH értékeken.
 $([\text{PhDTA}] = [\text{Cu}^{2+}] = 4 \cdot 10^{-3} \text{ M})$

A $[\text{Mn}(\text{PhDTA})]^{2-}$ -komplex relaxivitásának pH-függését is megvizsgáltuk részben azért, hogy információt nyerjünk a komplex relaxitás értékéről (r_1), részben a pH-potenciometriás méréseinek alapján felállított egyensúlyi modellt kívántuk alátámasztani.

Amint az a 4. ábrán is látható a $[\text{Mn}(\text{PhDTA})]^{2-}$ -komplex eloszlási diagramján, az egyszer protonált komplex képződése nem okoz jelentős változást ($0,1 - 0,2 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) a mérhető relaxivitásban, ugyanakkor a második protonálódási folyamattal párhuzamosan megindul a komplex disszociációja is, ami a szabad Mn^{2+} -ion megjelenésének köszönhetően a relaxitás jelentős növekedését okozza.

A mért relaxitás értékek $\text{pH} = 8$ felett csökkenni kezdenek, ami annak a következménye, hogy a lúgos tartományban vegyeshidroxo-komplex képződik, ami az eredeti komplex disszociációhoz és a mangán oxidációjához vezet. A vegyeshidroxo-komplex összetételét nem vizsgáltuk, mivel az alkalmazott vizsgálati körülmények mellett a Mn^{2+} -ion a levegő oxigénjének hatására oxidálódik.



4. ábra A $[\text{Mn}(\text{PhDTA})]^{2-}$ -komplex eloszlásdiagramja ($c_{[\text{Mn}(\text{PhDTA})]^{2-}} = 1 \text{ mM}$), valamint relaxivitásának változása a pH-függvényében (25°C , $0,15 \text{ M NaCl}$, 20 MHz)

A $[\text{Mn}(\text{PhDTA})]^{2-}$ -komplex relaxitás értéke $r_1 = 3,6 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ($\text{pH} = 5 - 8$), ami megegyezik a $[\text{Mn}(\text{CDTA})]^{2-}$ -komplex esetében mért értékkel.^[58] Tehát a várakozásoknak megfelelően a ciklohexán-gyűrű cseréje fenilén-gyűrűre nem befolyásolja a képződő komplex relaxitását.

V.2. Kinetikai mérések

A Mn^{2+} -ion biogén fémion mivoltából kifolyólag, toxicitása kisebb a Gd^{3+} -ion toxicitásánál, ami elvileg megengedné a Mn^{2+} -komplexek kisebb kinetikai inertségét, ugyanakkor az élő szervezet számára nagyobb mennyiségben a Mn^{2+} is káros, és az Alzheimer kórhoz hasonló tüneteket okoz.^[72] Ezért a kutatások célja olyan Mn^{2+} -alapú kontrasztanyagok előállítása, amelyek nem disszociálnak *in vivo*, tehát nem terhelik a beteg szervezetét. Hogy információt nyerjünk a $[\text{Mn}(\text{PhDTA})]^{2-}$ -komplex inertségéről vizsgáltuk a Cu^{2+} -ionok jelenlétében lejátszódó cserereakciók sebességét.

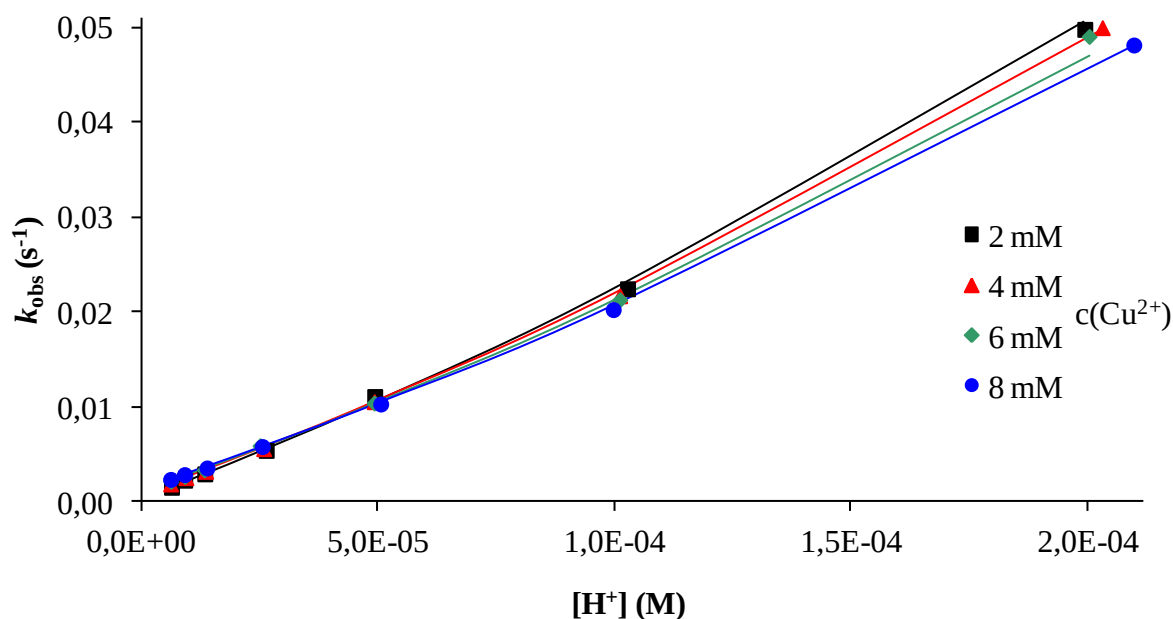
A kinetikai vizsgálatokat $3,6 - 5,2 \text{ pH}$ -tartományban végeztük Cu^{2+} kicserélő fémion alkalmazásával. A kicserélődési reakciók elegendően lassúak voltak az adott pH-tartományban ahhoz, hogy a méréseket hagyományos spektrofotometriás módszerrel kövessük.

A $[\text{Mn}(\text{PhDTA})]^{2-}$ -komplex kicserélődési reakciója a (15) egyenlettel írható le.



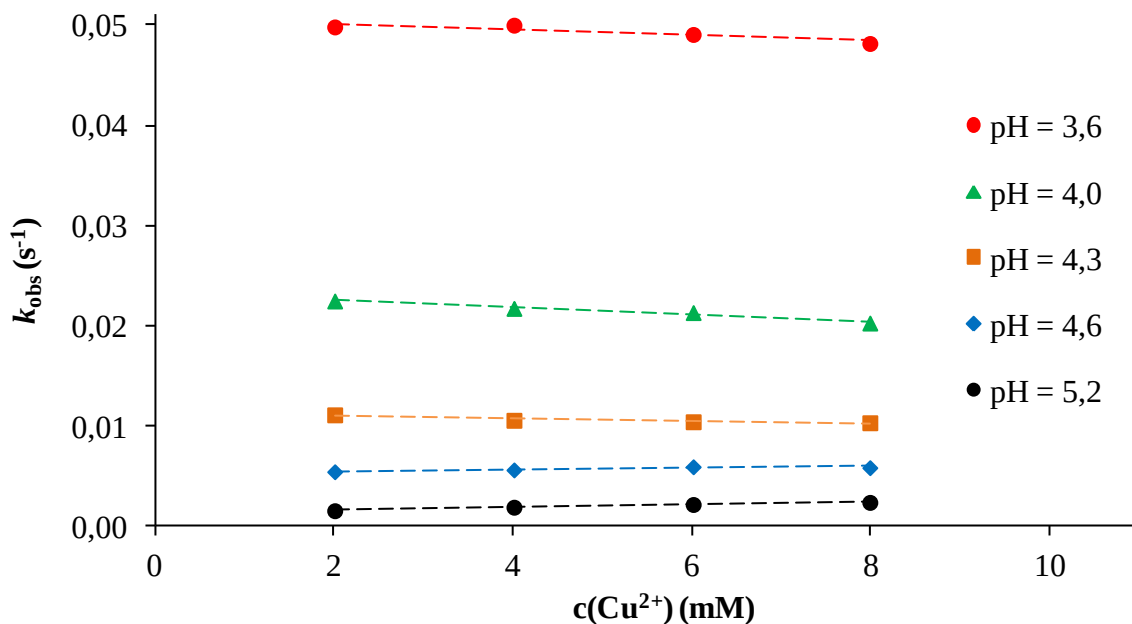
A fémcseré reakció során pszeudo-elsőrendű feltételeket biztosítottunk a kicserélő Cu^{2+} -ion koncentrációjának beállításával, amely 10, 20, 30 és 40-szerese volt a komplex koncentrációjának. A reakciók során az állandó pH-t nem koordinálódó N-metil piperazin pufferoldat segítségével biztosítottuk. A kapott idő-abszorbanca görbéket illesztve a (13) egyenletre kiszámítottuk az egyes reakcióutakra jellemző pszeudo-elsőrendű sebességi együtthatókat (k_{obs}).

A kapott pszeudo-elsőrendű sebességi együtthatók a H^+ -ion koncentrációjától való függését az 5. ábra mutatja.



5. ábra A $[\text{Mn}(\text{PhDTA})]^{2-}$ -komplex disszociációjának k_{obs} értékei a H^+ -koncentráció függvényében. A vonalak a k_{obs} értékek illesztését jelölik (25 °C, 0,15 M NaCl)

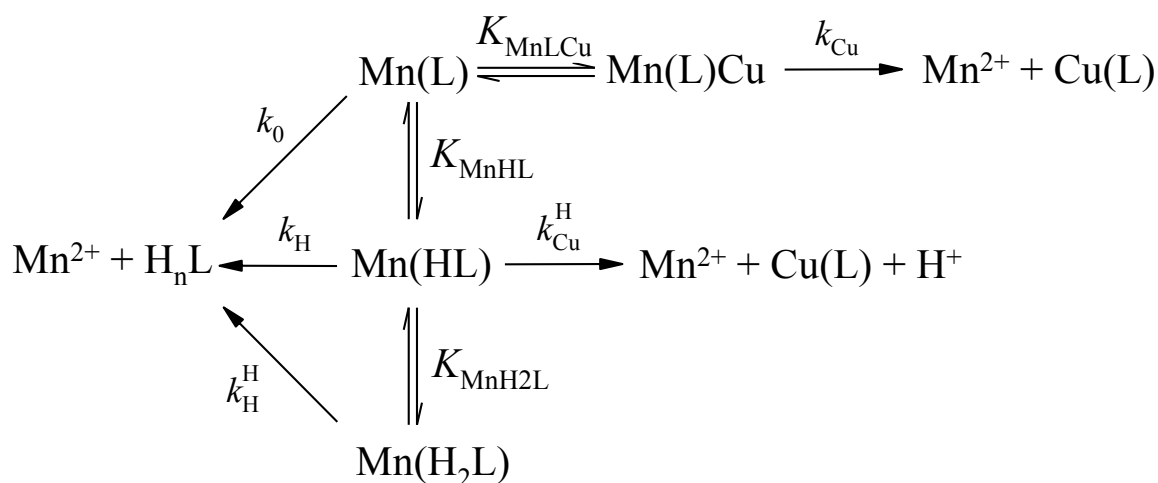
Ahogy az 5. ábrán egyértelműen látható, a reakció sebessége enyhe négyzetes függést mutat a növekvő protonkoncentrációval, illetve amint az a számítások során kiderült a fémion szerepe nem elhanyagolható, a kétmagvú köztterméken keresztül is megvalósulhat a disszociáció.



6. ábra A $[\text{Mn}(\text{PhDTA})]^{2-}$ -komplex disszociációjának k_{obs} értékei a Cu^{2+} -koncentráció függvényében. (25 °C, 0,15 M NaCl)

A kapott sebességi együtthatók értéke minden esetben növekszik a H^+ -ion koncentrációjának növekedésével, és változik a Cu^{2+} -koncentrációjával is. A komplexek disszociációja ezek alapján lejátszódhat a proton és a kicserélő fémion támadásával egyaránt. Ugyanakkor, míg a savasabb régiókban a Cu^{2+} -ion koncentrációjának növekedése a reakció lassulásához vezet, addig kisebb H^+ -ion koncentrációk esetén a Cu^{2+} növekvő koncentrációja gyorsítja a disszociációt. Ennek a viselkedésnek az lehet a magyarázata, hogy a két reakcióút (a savkatalizált, ill a fémion közvetlen támadásával lejátszódó disszociáció) verseng egymással. Ahogy az a 6. ábrán látható, a pH = 3,6 és 4,0-es értékek esetében a fémion koncentráció növekedése a reakciósebesség enyhe csökkenését, míg pH = 4,6-os érték fölött enyhe növekedését okozza (a pH = 4,8 és 5,0 értékhez tartozó pontokat nem ábrázoltuk a jobb láthatóság érdekében). A mérési pontok csökkenő vagy növekvő tendenciáját szaggatott segédvonalak szerepeltetésével tettük szemléletesebbé.

A komplex disszociációja során a 7. ábrán látható reakcióutakat feltételezhetjük. Az első egyenlet a spontán disszociációra vonatkozó (k_0), a második pedig a protonkatalizált disszociációs reakcióutakat mutatja (k_H , k_H^H), ahol a folyamat a protonált köztiterméken keresztül játszódik le. A harmadik reakcióút a kicserélő fémion támadásával lejátszódó reakcióra vonatkozik (k_{Cu}), mely során egy kétmagvú köztitermék alakul ki, amelyben a donoratombok egyenként áttevődnek a támadó fémionra. A negyedik és egyben utolsó lehetőség során a protonált komplexen következik be a kicserélő Cu^{2+} -ion támadása (k_{Cu}^H). Az ábrán látható K_{MnHL} , $K_{\text{MnH}_2\text{L}}$ és K_{MnLCu} a protonált és kétmagvú köztitermék komplexek stabilitási állandói.



7. ábra Lehetséges reakcióutak a Mn^{2+} -komplexek disszociációjában

Ezeket a reakcióutakat, valamint a köztitermékek protonálódási és stabilitási állandóit figyelembe véve felírhatunk egy általános egyenletet (16) a cserereakciók lejátszódására, melyre illesztettük a mérésekből kapott k_{obs} értékeket.

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_0 + k_1[\text{H}^+] + k_2[\text{H}^+]^2 + k_3[\text{Cu}^{2+}] + k_4[\text{Cu}^{2+}][\text{H}^+]}{1 + K_{\text{MnHL}}[\text{H}^+] + K_{\text{MnHL}}K_{\text{MnH}_2\text{L}}[\text{H}^+]^2 + K_{\text{MnLCu}}[\text{Cu}^{2+}]} \quad (16)$$

ahol $K_{\text{MnHL}} = [\text{Mn}(\text{HL})]/([\text{Mn}(\text{L})][\text{H}^+])$, $K_{\text{MnH}_2\text{L}} = [\text{Mn}(\text{H}_2\text{L})]/([\text{Mn}(\text{HL})][\text{H}^+])$, $K_{\text{MnLCu}} = [\text{Mn}(\text{L})\text{Cu}]/([\text{Mn}(\text{L})][\text{Cu}^{2+}])$, $k_1 = k_H \cdot K_{\text{MnHL}}$, $k_2 = k_H^H \cdot K_{\text{MnHL}} \cdot K_{\text{MnH}_2\text{L}}$, $k_3 = k_{\text{Cu}} \cdot K_{\text{MnLCu}}$ és $k_4 = k_{\text{Cu}}^H \cdot K_{\text{MnHL}}$.

Az illesztés során azt tapasztaltuk, hogy a két proton-katalizált reakcióút mellett, a fémion támadásának, vagyis a kétmagvú komplex képződésének is van szerepe a

disszociációban. A többi állandó vagy negatív értéket adott az illesztés során, vagy összemérhető volt saját hibájával. A fentebb felsorolt reakcióutakat figyelembe véve a disszociációs reakció pszeudo-elsőrendű sebességi együtthatója a következőképpen adható meg:

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_1[\text{H}^+] + k_2[\text{H}^+]^2 + k_3[\text{Cu}^{2+}]}{1 + K_{\text{MnLCu}}[\text{Cu}^{2+}]} \quad (17)$$

Az egyenletben szereplő sebességi együtthatók és stabilitási állandó értékét a 3. táblázatban, a $[\text{Mn}(\text{CDTA})]^{2-}$ -komplekre számított adatokkal hasonlítottuk össze. Az adatok azt mutatják, hogy a CDTA komplexe esetében a donoratomok áthelyeződése a Mn^{2+} -ionról a Cu^{2+} -ionra lassú folyamat és a kialakuló kétmagvú köztitermék egy úgynevezett „dead-end” komplex, mely lassítja a kicserélődési reakciót azáltal, hogy csökkenti a protonkatalizált úton lejátszódó reakciót. A „dead-end” komplex stabilitási állandója több mint háromszorosa a $[\text{Mn}(\text{PhDTA})]^{2-}$ -komplex esetében tapasztalt értéknek. Ezzel szemben a PhDTA ligandumnál a kétmagvú köztitermék kisebb H^+ -ion koncentrációk esetén gyorsítja a komplex disszociációját. Kisebb pH értékeknél azonban a fémkoncentráció növekedése csökkenti a sebességi együttható értékét. Ennek oka, hogy míg 4,6-os pH felett a kétmagvú köztiterméken át lejátszódó disszociáció hozzájárulása pozitív a teljes folyamathoz, addig 4,3-as pH érték alatt már ez az alternatív útvonal verseng a protonkatalizált úttal, így összességében csökkenti a pszeudo-elsőrendű reakció sebességi együtthatóját.

3. táblázat A $[\text{Mn}(\text{PhDTA})]^{2-}$ -komplex disszociációját jellemző sebességi együtthatók és stabilitási állandók (0,15 M NaCl, 25 °C)

	$[\text{Mn}(\text{PhDTA})]^{2-}$	$[\text{Mn}(\text{CDTA})]^{2- \text{ a}}$
$k_1 (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	201 ± 4	400
$k_2 (\text{M}^{-2}\text{s}^{-1})$	$(3,2 \pm 0,3) \cdot 10^5$	–
$k_3 (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	$0,20 \pm 0,01$	–
K_{MnLCu}	$25,4 \pm 3,6$	79

^a [58] (25 °C, 0,15 M NaCl).

A 3. táblázatban szereplő, $[\text{Mn}(\text{CDTA})]^{2-}$ -komplexre vonatkozó eredmények alapján látható, hogy a $[\text{Mn}(\text{PhDTA})]^{2-}$ -komplex esetében a protonkatalizált úton lefolyó disszociációs reakció sebességi együtthatója mindössze fele a $[\text{Mn}(\text{CDTA})]^{2-}$ -komplex esetében tapasztalt értéknek, ami biztató a komplex alkalmazhatóságát tekintve.

A kapott sebességi együtthatókat felhasználva kiszámítottuk a komplexek 7,4-es pH-ra és 25 °C-ra vonatkozó felezési idejét ($t_{1/2} = 23,3$ óra). Az irodalmi bevezetőben már említett, a kontrasztanyagokra vonatkozó kiürülés felezési idejével (1,6 óra) számolva a szervezetbe injektált $[\text{Mn}(\text{PhDTA})]^{2-}$ -komplex körülbelül 6%-a disszociálna a teljes kiürülési időt figyelembe véve. Bár nem vizsgáltuk, de ez az érték 37 °C-on mindenképpen nagyobb lesz (az általunk meghatározott 6%-nak a 2 - 3-szorosa). Ezen adatok figyelembevételével a vizsgált $[\text{Mn}(\text{PhDTA})]^{2-}$ -komplex *in vivo* vizsgálatokra alkalmasnak tűnik, bár inertségének további növelésével – relaxációs paramétereinek szinten tartása mellett – még biztonságosabbá tehető.

VI. Kísérleti rész

A mérésekhez és vizsgálatokhoz használt alkáli-, alkáliföldfém- és átmenetifém-klorid törzsoldatok, analitikai tisztaságú sókból (*Sigma*) készültek, kétszeresen desztillált vízben való oldással. A kinetikai vizsgálatok során használt puffer (N-metil piperazin, NMP) szintén analitikai tisztaságú vegyszerből készült.

A relaxometriás és a fotometriás vizsgálatok során használt minták pH értékeit *Metrohm 827 pH Lab* pH-mérő és *Metrohm 6.0234.100* kombinált üvegelektrod alkalmazásával mértük. A pH mérő kétpontos kalibrációja során $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{KH}_2\text{PO}_4$ (pH = 6,865), valamint KH-ftalát puffert (pH = 4,002) használtunk. A minták pH-értékeit HCl gázzal és szilárd NaOH-dal állítottuk be.

VI.1. Egyensúlyi vizsgálatok

A pH-potenciometriás vizsgálatok során, *Metrohm 6.0234.100* kombinált üvegelektrodot és *Metrohm 785 DMP Titrino* automata titrátort használtunk. A titrálásokat 6 cm^3 oldattérfogatban, állandó keverés és termosztálás mellett ($25 \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$), valamint 0,15 M NaCl ionerősség mellett, 0,2 M NaOH-oldattal végeztük. A lúgoldatok koncentrációját ismert koncentrációjú KH-ftalát pufferoldat titrálásával határoztuk meg. A mérések során és azt megelőzően a karbonátosodás elkerülése miatt N_2 -gáz buborékoltattunk át a rendszeren. A pH-mérők kétpontos kalibrációjához KH-ftalát puffer 0,05 M oldatát (pH = 4,002), valamint bórax puffer CO_2 -től elzárt, N_2 -atmoszféra alatt tartott, 0,01 M oldatát (pH = 9,177) használtuk.

Az állandó ionerősségre beállított minták oldata és a kombinált üvegelektrod kálium-klorid oldata között diffúziós potenciálkülönbség lép fel, ami nem egyezik meg a pH mérő kalibrációjához felhasznált pufferoldatok és a kombinált üvegelektrod közötti potenciálkülönbséggel. Az ebből fakadó eltérésből származó hibát az *Irving* és munkatársai által kidolgozott módszerrel határoztuk meg, amely alapján egy 0,01 M HCl-oldatot 0,15 M NaCl ionerősség mellett lúgoldattal titrálva, meghatároztuk a mért és a számított pH különbségét.^[73] Vizsgálataink során ezt az értéket használtuk fel a H^+ -ion koncentrációjának a leolvasott pH értékekből történő kiszámítására.

A PhDTA ligandum protonálódási állandóinak meghatározása során a ligandum 2 mM oldatát ismert mennyiségű és pontos koncentrációjú HCl-oldattal savanyítottuk és állandó,

0,15 M NaCl ionerősség mellett 0,2 M NaOH-oldattal titráltuk pH 1,8 - 12,0 tartományban. A $\log K_i^H$ értékeket 170 V(cm³)-pH adatpár felhasználásával számítottuk.

A ligandum fémionokkal képzett komplexének stabilitási és protonálódási állandóit is pH-potenciometriás titrálások adatiból számoltuk ki. A mérések során 2 mM-os koncentrációjú, 1:1 és 1:2 ligandum-fém arányú oldatok titráltunk 1,8 - 12,0 pH tartományban (a fémelesleg alkalmazásakor a titrálást a fémionok hidrolízise miatt leváló csapadék megjelenéséig (pH = 7 – 9) folytattuk). A komplexek protonálódási és stabilitási állandóinak meghatározása 150-200 V(cm³)-pH adatpár felhasználásával történt.

A $[\text{Cu}(\text{PhDTA})]^{2-}$ -komplex stabilitási állandóját tizenkettő különböző savkoncentráció ($[\text{H}^+] = 0,01; 0,02; 0,03, 0,04; 0,06; 0,08; 0,10; 0,20; 0,50; 1,00; 1,50; 3,00 \text{ M}$) és hét hullámhossz (800, 775, 750, 725, 700, 675, 650 nm) felhasználásával számítottuk ki. A $[\text{Cu}(\text{PhDTA})]^{2-}$ -komplex koncentrációja 4 mM-os volt.

VI.2. Kinetikai vizsgálatok

A $[\text{Mn}(\text{PhDTA})]^{2-}$ -komplex disszociációs reakcióját Cu^{2+} kicserélő fémion segítségével, spektrofotometriás módszerrel vizsgáltuk (25 °C, 300 nm). Az alkalmazott pH tartomány 3,6 - 5,2 volt. A mérésekhez Cary 100 Bio típusú spektrofotométert használtunk (1 cm-es félmikro kvarc küvetták segítségével). A mintákat minden esetben 40 mM-os NMP puffer segítségével puffereltük. A $[\text{Mn}(\text{PhDTA})]^{2-}$ -komplex koncentrációja a cserereakciók során $2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ -os volt, amihez a Cu^{2+} -ion 10-40-szeres feleslegét alkalmaztuk, hogy így biztosítsuk a pszeudo-elsőrendű feltételeket. Az összes kinetikai reakció során a komplex oldata volt pufferelve, míg a kicserélő Cu^{2+} -ion oldatában csak az ionerősséget állítottuk be.

VI.3. Relaxometriás vizsgálatok

A $[\text{Mn}(\text{PhDTA})]^{2-}$ -komplex relaxivitás értékeinek pH függését a 20 MHz-en működő Bruker Minispect MQ20 relaxométerrel vizsgáltuk, inverzió átviteli kísérlettel (inversion recovery $180^\circ\text{-}\tau\text{-}90^\circ$), nyolc különböző τ értéket alkalmazva. A mintákat 25 °C-on termosztáltuk, illetve a mérést is ezen a hőmérsékleten végeztük el. A vizsgálat során a $[\text{Mn}(\text{PhDTA})]^{2-}$ -komplex koncentrációja 1 mM-os volt (0,15 M NaCl jelenlétében), míg a pH-t 1,6 – 10,6 tartományban változtattuk.

VII. Összefoglalás

Munkám során egy aromás aminből származtatott komplexképző ligandum, a PhDTA protonálódási, illetve néhány biogén fémionnal (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+}) képzett komplexének stabilitási és protonálódási állandóit határoztam meg pH-potenciometriás és UV-látható spektrofotometriás módszerekkel. A kapott protonálódási állandó értékeket összehasonlítva a rokon CDTA liganduméival azt találtuk, hogy azok kisebbek, ami a fenilén csoport elektronszívó hatásának tulajdonítható.

A protonálódási állandók csökkenése magyarázza a PhDTA ligandum összbázicitásának csökkenését is. A kisebb összbázicitás nagyságrendekkel kisebb stabilitási állandókat eredményez a vizsgált fémkomplexek esetében, ugyanakkor a $[\text{Mn}(\text{PhDTA})]^{2-}$ - és a $[\text{Mn}(\text{CDTA})]^{2-}$ -komplexek megegyező pH-tartományban képződnek, tehát látszólagos stabilitásuk is közel azonos. A $[\text{Cu}(\text{PhDTA})]^{2-}$ termodinamikai paramétereit nem tudtuk pH-potenciometriás módszerrel meghatározni, mivel stabilitási állandója olyan nagy, hogy a komplexképződés kívül esik a pH-metria mérési tartományán (pH = 1 értéken a Cu^{2+} -ion már 85%-ban komplexált formában van). Ebben az esetben a stabilitási állandó meghatározását spektrofotometriás módszerrel végeztük el.

A $[\text{Mn}(\text{PhDTA})]^{2-}$ -komplex pH-potenciometriás módszerrel meghatározott egyensúlyi modelljének alátámasztására és relaxivitásnak meghatározására mértük a komplex relaxivitásának változását a pH-függvényében. Vizsgálatunk eredményeként a $[\text{Mn}(\text{PhDTA})]^{2-}$ -komplex relaxivitása azonosnak adódott $[\text{Mn}(\text{CDTA})]^{2-}$ -komplekxre korábban meghatározott értékkel ($r_1 = 3,6 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$), és annak a pH-függvényében történő változása alátámasztotta egyensúlyi modellünket.

A kinetikai vizsgálatok alapján a $[\text{Mn}(\text{PhDTA})]^{2-}$ -komplex a korábban vizsgált $[\text{Mn}(\text{CDTA})]^{2-}$ -komplekxhez hasonlóan megfelelő kinetikai inertséggel bír ahhoz, hogy orvosdiagnosztikai célokra alkalmazható legyen anélkül, hogy a komplex teljes disszociációjával számolnunk kelljen. Az általunk vizsgált komplex fiziológiás pH-n (pH = 7,4) és 25 °C-on 23,3 órás felezési idővel rendelkezik, mely alapján – a 1,6 órás kiürülés felezési idejének hétszeresével számolva - az injektált mennyiség csupán 6%-a disszociálna a szervezeten belül (nem szabad elfelejtenünk, hogy 37 °C-on a felezési idő csökkeni fog).

A termodinamikai, relaxációs és kinetikai paramétereit tekintve a $[\text{Mn}(\text{PhDTA})]^{2-}$ -komplex egy jelentős előrelépés a klinikai gyakorlatban is alkalmazható Mn^{2+} -alapú MRI kontrasztanyagok felé, de a ligandumok szerkezetét illetően még további fejlesztésekre van szükség.

VIII. Summary

During the present work the stability and protonation constants of the PhDTA ligand (an aromatic amine derived chelating agent) and of its complexes formed with biogenic metal ions (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+}) have been determined with the use of pH-potentiometric and UV-visible spectrophotometric methods. The acquired values were found to be lower compared to the corresponding CDTA complexes. This might be ascribed to the electron withdrawing effect of the *ortho*-phenylene group.

The decrease of protonation constants of the PhDTA ligand compared to the CDTA ligand, means a decrease in its total basicity. The lower total basicity leads to lower stability constants in the matter of the examined metal complexes. On the contrary we assume the conditional stability of the $[\text{Mn}(\text{PhDTA})]^{2-}$ -and the $[\text{Mn}(\text{CDTA})]^{2-}$ -complexes approximately the same, they are both 100% formed by pH 5. The stability constant of the $[\text{Cu}(\text{PhDTA})]^{2-}$ -complex could not be determined with the use of pH-potentiometry, because the Cu^{2+} ion fully complexed already below $\text{pH} = 1.2$. Hence the stability constant of the given complex was determined by using UV-vis spectrophotometry by following the absorption of the diprotonated complexes as a function of acid (acid concentration range of 0,01 – 3,00 M was used for this purpose).

To define its relaxivity and to confirm the equilibrium model of the $[\text{Mn}(\text{PhDTA})]^{2-}$ -complex determined with the use of pH-potentiometry the pH dependence of the its relaxivity was studied. As a result of the study, we found the relaxivity to be the same as the earlier determined value for $[\text{Mn}(\text{CDTA})]^{2-}$ -complex ($r_1 = 3.6 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$), and its change confirmed the equilibrium model used for the fitting of the titration data.

The results of the metal exchange kinetic studies revealed that the $[\text{Mn}(\text{PhDTA})]^{2-}$ -complex has slightly higher inertness than the $[\text{Mn}(\text{CDTA})]^{2-}$. At physiologic pH and 25 °C the complex possesses a half life of 23.3 hours, on this basis only 6% of the injected amount will dissociate in the body (considering seven times the 1.6 hour depletion). It has to be emphasized however that at 37 °C the extent of the dissociation will be somewhat higher, which defines the need for further ligand design, synthesis for Mn^{2+} ion complexation.

IX. Irodalomjegyzék

- [1] A. C. Silva, N. A. Bock, *Schizophrenia Bulletin*, **2008**, 34 (4), 595.
- [2] B. Drahos, J. Kotek, I. Císarova, P. Hermann, L. Helm, I. Lukeš, É. Tóth, *Inorg. Chem.*, **2011**, 50 (24), 12785.
- [3] Gy. Tircsó, Z. Kovács, A. D. Sherry, *Inorg. Chem.*, **2006**, 45 (23), 9269.
- [4] É. Tóth, L. Helm, A. E. Merbach, In *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*, É. Tóth, A. E. Merbach, eds., Chichester: John Wiley & Sons, **2001**.
- [5] P. B. Tsitovich, J. A. Sperryak, J. R. Morrow, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, 52, 13997.
- [6] V. Jacques, J. F. Desreux, *New Classes of MRI Contrast Agents*. In W. Krause, ed. *Topics in Current Chemistry*, Vol. 221: *Contrast Agents I. Magnetic Resonance Imaging*. Berlin: Springer-Verlag, **2002**.
- [7] P. C. Lauterbur, *Nature (London), New Biol.*, **1973**, 242, 190.
- [8] P. C. Lauterbur, M. H. Mendonca Dias, A. M. Rudin, In *Frontier of Biological Energetics*, Dutton, P. L.; Leigh, L. S.; Scarpa, A., eds., New York: Academic P., **1978**.
- [9] H. J. Weinmann, R. C. Brasch, W. R. Press, G. E. Webey, *Am. J. Roentgenol*, **1984**, 142, 619.
- [10] H. Gries, H. Miklantz, *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR*, **1984**, 16, 105.
- [11] J. Desreux, P. P. Barthélemy, *Nucl. Med Biol.*, **1988**, 15, 9.
- [12] F. Shikata, H. Tokumitsu, H. Ichikawa, Y. Fukumori, *Eur. J. Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **2002**, 53, 57.
- [13] E. N. Rizkalla, G. R. Choppin, W. P. Cacheris, *Inorg. Chem.*, **1993**, 32, 582.
- [14] K. Kumar, C. A. Chang, M. F. Tweedle, *Inorg. Chem.*, **1993**, 32, 587.
- [15] J.-C. G. Bünzli, G. R. Choppin, eds., *Lanthanide Probes in Life, Chemical and Earth Sciences: Theory and Practice*. Elsevier, Amsterdam, **1989**.
- [16] H. Schmitt-Willich, M. Brehm, C. L. J. Evers, G. Michl, A. Müller-Fahrnow, O. Petrov, J. Platzek, B. Radüchel, D. Sülzle, *Inorg. Chem.*, **1999**, 38, 1134.
- [17] F. Uggeri, S. Aime, P. L. Anelli, M. Botta, M. Brochetta, C. de Haen, G. Ermondi, M. Grandi, P. Paoli, *Inorg. Chem.*, **1995**, 34, 633.
- [18] P. Caravan, J. J. Ellison, T. J. McMurphy, R. B. Lauffer, *Chem. Rev.*, **1999**, 99, 2293.
- [19] E. C. Unger, T. Fritz, G. Wu et al., *J. Liposome Res.*, **1994**, 4, 811.

- [20] S. Paeuser, R. Reszka, S. Wagner, K. J. Wolf, H. J. Buhr, G. Berger, *Anti-Cancer Drug Des.*, **1997**, 12, 125.
- [21] S. L. Fossheim, J. M. Collet, S. Mansson, A. K. Fahlvik, R. N. Muller, J. Klaveness, *Invest. Radiol.*, **1998**, 33, 810.
- [22] S. Aime, M. Botta, M. Fasano, E. Terreno, P. Kinchesh, L. Calabi, L. Paleari, *Magn. Reson. Med.*, **1996**, 35, 648.
- [23] S. L. Fossheim, K. A. Il'yasov, J. Hennig, A. Bjornerud, *Acta Radiol.*, **2000**, 7, 1107.
- [24] J. Hall, R. Häner, S. Aime, M. Botta, S. Faulkner, D. Parker, A. S. de Sausa, *New J. Chem.*, **1998**, 6, 627.
- [25] S. Aime, M. Botta, E. Gianolio, E. Terreno, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, 39, 747.
- [26] S. Aime, P. Ascenzi, E. Comoglio, M. Fasano, S. Paoletti, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 9365.
- [27] L. Burai, É. Tóth, S. Seibig, A. E. Merbach, *Chem. Eur. J.*, **2000**, 6, 3761.
- [28] M. Rudin, *Nat. Biotechnol.*, **2000**, 18, 383.
- [29] W. Li, S. E. Fraser, T. J. Meade, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 1413.
- [30] E. L. Que, C. J. Chang, *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, 39, 51.
- [31] J.-M. Idee et al., *Fund. Clin. Pharmacol.*, **2006**, 20, 563.
- [32] K. A. Hruska, S. Mathew, R. Pratt, *Kidney Int.*, **2008**, 74 (2), 148.
- [33] E. Brücher, *Kinetic Stabilities of Gadolinium(III)Chelates Used as MRI Contrast Agents In Topics in Current Chemistry*, Vol. 221: Contrast Agents I. Magnetic Resonance Imaging. Berlin, Springer-Verlag, **2002**, 103.
- [34] S. M. Rocklage, W. P. Chacheris, S. C. Quay, F. E. Hahn, K. N. Raymond, *Inorg. Chem.*, **1989**, 28, 477.
- [35] G. Elizondo, C. J. Fretz, D. D. Stark, S. M. Rocklage, S. C. Quay, D. Worah, Y. M. Tsang, M. C. Chen, J. T. Ferrucci, *Radiology*, **1989**, 178, 73.
- [36] O. H. Pomeroy, M. Wendland, S. Wagner, N. Derugin, W. W. Holt, S. M. Rocklage, S. Quay, C. B. Higgins, *Invest. Radiol.*, **1989**, 24, 531.
- [37] T. J. Hubin, J. M. McCormick, S. R. Collinson, M. Buchalova, C. M. Perkins, N. W. Alcock, P. K. Kahol, A. Raghunathan, D. H. Busch, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 2512.
- [38] T. Bach-Gensamo, *Acta Radiol.*, **1993**, 387, 1.
- [39] P. Reimer, B. Tombach, *Eur. Radiol.*, **1998**, 8, 1198.
- [40] S. Grubnic, A. R. Padhani, P. B. Revell, J. E. Husband, *Am. J. Roentgenol.*, **1999**, 173, 173.

- [41] Y. X. Wang, S. M. Hussain, G. P. Krestin, *Eur. radiol.*, **2001**, 11, 2319.
- [42] S. Aime, M. Botta, S. G. Crich, G. B. Giovenzana, R. Pagliarin, M. Piccinini, M. Sisti, E. Terreno, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **1997**, 2, 470.
- [43] Z. Luz, S. Meiboom, *J. Chem. Phys.*, **1964**, 40, 1058.
- [44] R. A. Dwek, R. J. P. Williams, A. V. Xavier, *Application of Paramagnetic Probes in Biochemical Chemistry*. In: *Metal Ions in Biological Systems*, Vol. 4., A. Sigel, H. Sigel, eds., New York: Marcel Dekker Inc, **1974**.
- [45] J. H. Freed, *J. Chem. Phys.*, **1978**, 69, 4034.
- [46] N. N. Greenwood, A. Earnshaw, *Az elemek kémiája*, Nemzeti Tankönyvkiadó, **1997**.
- [47] S. Wang, T. D. Westmoreland, *Inorg. Chem.*, **2009**, 48, 719.
- [48] B. Drahoš, J. Kotek, P. Hermann, I. Lukeš, É. Tóth, *Inorg. Chem.*, **2010**, 49, 3224.
- [49] B. Drahoš, V. Kubiček, C. S. Bonett, P. Hermann, I. Lukeš, É. Tóth, *Dalton Trans.*, **2011**, 40, 1945.
- [50] B. Drahoš, Ph.D. Thesis, Prague, **2011** (Appendix 4)
- [51] F. K. Kálmán, S. Geninatti-Crich, S. Aime, *Angewandte Chemie-International Edition*, **2010**, 49, 612.
- [52] A. Bianchi, L. Calabi, C. Giorgi, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **2001**, 917.
- [53] S. Cortes et al., *Inorg. Chem.*, **1990**, 29, 5.
- [54] M. Kabachnik et al., *Izv. Akad. Nauk*, **1984**, 4, 844.
- [55] G. Anderegg, *Helv. Chim. Acta*, **1963**, 46, 1833.
- [56] A. E. S. Martell, R. M. Smith, R. J. Motekaitis, *Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes*, Database, Version 8, **2004**.
- [57] L. Sarka et al., *Chem. Eur. J.*, **2000**, 6, 719.
- [58] F. K. Kálmán, Gy. Tircsó, *Inorg. Chem.*, **2012**, 51 (19), 10065.
- [59] *The biological chemistry of the elements*. Ed. J. J. Frausto da Silva, R. J. P. Williams, 2nd edition, Oxford University Press Inc, New York, **2001**, 600.
- [60] a). *Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life*, Ed. W. Kaim, B. Schwederski, Wiley, Chichester; New York, **1994**, 187-214 b). *Bioinorganic Chemistry of Copper*, Ed. K. D. Karlin, Z. Tyeklár, Chapman and Hall, New York, **1993**, 506.
- [61] *Advances in Inorganic Chemistry*, Volume 61, Elsevier, **2009**.
- [62] A. Mederos et al., *J. Coord. Chem.*, **1986**, 14, 277.
- [63] E. Chinea et al., *Inorg. Chem.*, **1995**, 34, 1579.
- [64] J. Sanchíz et al., *Inorg. Chem.*, **1997**, 36, 4108.

- [65] K. Matsumura et al., *Inorg. Chem.*, **1987**, 26, 1419.
- [66] N. Nakasuka et al., *Inorg. Chem.*, **1985**, 24, 10.
- [67] T. Zhang et al., *Journal of Hazardous Materials*, **2013**, 262, 464.
- [68] L. Zékány, I. Nagypál, In *Computational Methods for Determination of Formation Constants*, ed. D. J. Legett, Plenum Press, New York, **1985**, 291.
- [69] T. Bohigian, A. Martell, *Prog.Rep.US Atom.En.Comm.Con.* At30-1-1823, **1960**.
- [70] G Anderegg and S Malik, *Helv. Chim. Acta*, **1970**, 53, 564.
- [71] G Anderegg, *Helv. Chim. Acta*, **1963**, 46, 1833.
- [72] D. P. Riley, *Chem. Rev.*, **1999**, 99, 2573.
- [73] H. M. Irving, M. G. Miles, L. Pettit, *Anal. Chim. Acta*, **1967**, 28, 475.

Köszönetnyilvánítás

Ez úton szeretném kifejezni köszönetemet Dr. Tircsó Gyula és Dr. Kálmán Ferenc Krisztián témavezetőimnek szakmai tanácsaikért és irányításukért, amivel lehetővé tették dolgozatom elkészültét.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Tóth Imrének és Dr. Baranyai Zsoltnak szakmai tudásukkal való támogatásukért.

Hálásan köszönöm Takács Katalinnak munkám során nyújtott segítségét.

A kutatás a **TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0043** számú **ENVIKUT** projekt keretében, az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg. Vizsgálatainkat az Országos Tudományos Kutatási Alapprogramok (**OTKA K-84291** és **K-109029** sz. pályázatok) is támogatták.