

Debreceni Egyetem
Természettudományi és Technológiai Kar
Szervetlen és Analitikai Tanszék

**Az EGTA-BBA ligandum néhány fémmel kialakuló
komplexének koordinációs kémiai vizsgálata**

TDK dolgozat

Készítette: Farkas Edit, II. évf. Vegyész MSc
Témavezető: Prof. Dr. Tóth Imre, egyetemi tanár

Debrecen, 2014

Tartalomjegyzék

I. Bevezetés	2
II. Célkitűzés	3
III. Irodalmi áttekintés.....	4
III.1. Lantanoidák komplexképző sajátosságai.....	4
III.2. MRI kontrasztanyagok	5
III.3. T ₁ kontrasztanyagok	6
III.4. T ₂ kontrasztanyagok	7
III.5. A kontrasztanyag fejlesztés új irányai	7
IV. Alkalmazott vizsgálati módszerek	9
IV.1. pH-potenciometria.....	9
IV.2. Spektrofotometria.....	10
IV.3. Relaxometria	11
V. Eredmények és értelmezésük	12
VI. Kísérleti rész	17
VII. Összefoglalás	19
VIII. Summary	20
IX. Irodalomjegyzék.....	21
X. Köszönetnyilvánítás	24

I. Bevezetés

A 21. század orvosi diagnosztikája mára olyan fejlettségi szinten áll, hogy igen nagy biztonsággal képesek vagyunk az egyes kóros folyamatok, elváltozások korai kimutatására. A rosszindulatú daganatok, szövetek vagy akár sejtek kimutatása nem jelent gondot, a nagyfelbontású és nagy érzékenységgű technikák alkalmazásával. Ugyanakkor a betegségek kialakulásának első lépése mindig valamilyen biológiai folyamatban bekövetkező parányi változás, amely egyes biológiailag fontos vegyületek, ionok mennyiségének (koncentrációjának) a változásával jár/járhat együtt. Ezeket a változásokat azonban igen nehéz követni, hiszen ezeknek a molekuláknak és ionoknak a kvantitatív megfigyelése/követése igen nehéz, speciális anyagokat és módszereket igényel.

Az orvosdiagnosztika egyik leggyakrabban alkalmazott módszere a mágneses rezonanciás képalkotás (MRI), amely egy nagy felbontással, de kis érzékenységgel rendelkező technika, ahol nem invazív úton állíthatunk fel diagnózisokat. Az MRI vizsgálatok során a beteget mágneses térbe helyezik és a testében lévő protonokat (főleg víz protonokat) radiofrekvenciás impulzussal gerjesztve kapják a mért jelet, amiből aztán az MRI kép kialakul. Az MRI hatékonysága növelhető, valamint a vizsgálat ideje csökkenthető kontrasztanyagok felhasználásával. Ma a gyakorlatban alkalmazott kontrasztanyagok kizárólag a 64-es rendszámú, 7 párosítatlan elektronnal rendelkező Gd^{3+} -ion poliaminopolikarbixilát ligandumokkal képzett komplexei tartalmazzák.

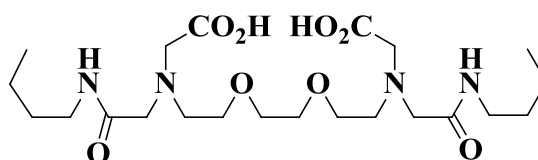
A kismolekulák, ionok koncentrációjának méréséhez speciális kontrasztanyagokra van szükség, amelyek a célvegyület koncentrációjának változására valamilyen átalakuláson mennek keresztül. Ez az átalakulás, Gd^{3+} -tartalmú kontrasztanyagok esetében, a kontrasztnövelő hatás erősségének megváltozását kell, hogy okozza, ami az MRI kép kontrasztosságának változását eredményezi.

A Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszék Ritkaföldfém kutatócsoportja már évtizedek óta foglalkozik Gd^{3+} és más fémionok komplexeinek vizsgálatával, feltérképezve azok koordinációs kémiai sajátosságait egyensúlyi, kinetikai, relaxációs és szerkezeti szempontból.

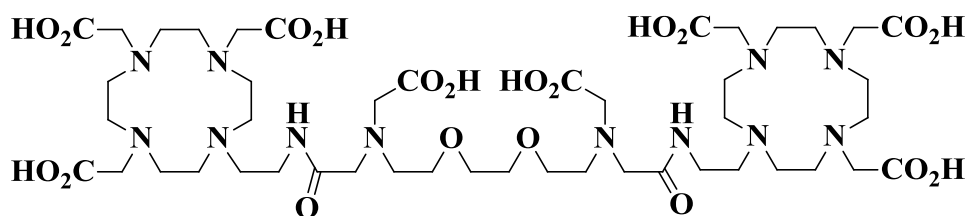
Munkám során ezekbe a kutatásokba kapcsolódtam be én is és egy a Ca^{2+} -ionok koncentrációjának *in vivo* mérésére fejlesztett MRI kontrasztanyag modellvegyületének vizsgálatában vettem részt.

II. Célkitűzés

Az általam vizsgált ligandum egy újonnan szintetizált EGTA származék az EGTA-BBA (1. ábra). A ligandum egy modellvegyület, amely alkalmas EGTA alapú Ca^{2+} -szelektív MRI kontrasztanyagok *in vivo* viselkedésének vizsgálatára. Az általunk vizsgált Ca^{2+} -szelektív kontrasztanyag esetén a molekula két végén található DO3A egységhez kötődik nagy stabilitással a Gd^{3+} -ion, míg maga EGTA-fragmens képes kötni a Ca^{2+} -iont (2. ábra). Az irodalmi stabilitási adatokból kiderül, hogy az EGTA Ca^{2+} -ion szelektív a Mg^{2+} -ionnal szemben, ugyanakkor az irodalmi adatok azt is mutatják, hogy a komplexképzőn belül két karboxilátsóport amidcsoportra történő cseréje rontja a szelektivitást (pl. DTPA-BMA esete) [1]. Mivel az $\text{EG2A2M}^{\text{DO3A}}$ vegyület esetében a két kötőhely „fűzőja” során valójában EGTA-bisz(amid) típusú vegyület köti a Ca^{2+} -iont, kíváncsiak lettünk arra, hogy ez a szelektivitás megmarad-e ebben az esetben is, mivel ilyen vegyületekre az irodalomban nem találhatók adatok. Ezáltal az EGTA-BBA modellvegyülete az $\text{EG2A2M}^{\text{DO3A}}$ ligandum DO3A egységeket összekötő fragmensének (2. ábra). A munkánk során meghatároztuk az EGTA-BBA ligandum protonálódási és néhány fémionnal (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Gd^{3+}) kialakuló komplexének stabilitási és protonálódási állandóit. Az eredményeket az anyaligandum EGTA adataival hasonlítottuk össze [1,2].



1. ábra EGTA-BBA ligandum



2. ábra $\text{EG2A2M}^{\text{DO3A}}$ ligandum

III. Irodalmi áttekintés

III.1. Lantanoidák komplexképző sajátosságai

A „ritkaföldfémek”, vagy lantanoidák közé soroljuk az f mező 57-71 rendszámú elemeit a La-tól a Lu-ig, valamint a szkandium csoportba tartozó Sc, és Y elemeket is. Az elnevezésük a lantánhoz való nagy hasonlósággal magyarázható, kezdetben „lantanida”, majd „lantanoida” (Ln) lett.

A Ln^{3+} -ionok a külső vegyértékhéjon lévő 3 elektron eltávolításával jönnek létre, és csak az f-alhéjon található elektronok számában különböznek egymástól. +3-as oxidációs állapotban fordulnak elő vizes oldatukban is, bár néhány lantanoida esetében előfordulhat a +2-es és a +4-es oxidációs állapot is. Az f-alhéjon található elektronok az $5s^2 5p^6$ külső, zárt elektronhéjat teljesen leárnyékolják, amelynek köszönhetően az ionméret a La^{3+} -tól a Lu^{3+} -ig monoton csökken [3]. Leginkább ionos kötést alakítanak ki elektronszerkezetükből adódóan.

A Ln^{3+} -ionok hard természetűek, a töltéssel rendelkező donoratomokat részesítik előnybe [4], valamint a kialakuló komplexeik stabilitása a donoratom hard jellegének növekedésével nő. Az ionmérettől függően többnyire 8, ill. 9-es koordinációs számú vegyületeket képeznek[5].

A lantanoida(III)komplexek elektronspektroszkópai viselkedése jelentősen eltér az átmeneti fémekétől. Az eltérés oka, hogy döntően az f-elektronok határozzák meg tulajdonságaikat, azonban azok nagymértékű árnyékoltsága miatt a koordinálódó ligandumok tere csak kis mértékben befolyásolja energiaállapotukat. Az átmenetifémek d-d abszorpciós sávjaival ellentétben a lantanoidák f-f sávjai meglehetősen keskenyek. A hétszeresen degenerált f-alhéjak felhasadnak a spin-pálya kölcsönhatás miatt, az így kialakult energiaszintek között f-f átmenet valósulhat meg. A hozzájuk tartozó sávok igen kis intenzitásúak ($\epsilon \approx 1 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$), mivel ezek az átmenetek tiltottak (Laport-szabály) [6].

Bizonyos lantanoidák (Ce^{3+} , Tb^{3+}) esetében jobban használhatók az $5d \leftarrow 4f$ elektronátmenetek a lantanoida(III)komplexek képződésének követésére. Ezek érzékenyebbek a komplexképződésre, mivel az 5d pályára a külső pályák árnyékoló hatása kevésbé hat. A legtöbb Ln^{3+} -ion esetében ezek az átmenetek a távoli-UV tartományba esnek, de a Ce^{3+} -, Pr^{3+} - és Tb^{3+} -ionok esetében ezek az UV tartományban találhatóak. A lantanoida(III)-komplexek

(Eu³⁺, Yb³⁺) képződése (vagy disszociációja) az UV-tartományban található ligandum→fémion töltésátviteli sávok segítségével is követhető.

A központi fémion elektronszerkezete jelentősen befolyásolja a lantanoida(III)-komplexek mágneses tulajdonságait. A Ln³⁺-ionok az Y³⁺, a La³⁺ és a Lu³⁺ kivételével paramágnesesek, mágneses momentumuk a Nd³⁺-nál és a Dy³⁺, illetve a Ho³⁺-nál maximumot mutat [7].

A lantanoidák komplexeinek fontos tulajdonsága azok stabilitási állandója, amely a lantanoida soron belül a rendszám növekedésével több különböző módon változhat, a három leggyakoribb a következő [8]:

- A rendszám növekedésével, azaz az ionsugár csökkenésével monoton növekszik a stabilitási állandó, ilyen típusúak a DCTA és az EDTA ligandum komplexei.
- A másik esetben a komplexek stabilitási állandói a Sm→Eu-ig nőnek, majd értékük közel állandó marad. Ehhez a típushoz tartozik a HEDTA.
- Egyes esetekben a kialakuló komplexek stabilitási állandói maximum görbe szerint változnak az ionméret csökkenésével. Általában a Dy-Ho körül található a maximum értéke, ilyen típusú ligandum a DTPA.

III.2. MRI kontrasztanyagok

Mára az egyik legelterjedtebb orvosi diagnosztikai eljárás a mágneses rezonanciás képalkotás (MRI). A módszer alapja, hogy az egészséges és a beteg szöveteknek eltérő a víztartalma, valamint a szövetekben található víz molekulák T₁ és T₂ relaxációs ideje is különbözik, így a szövetek jelintenzitása is eltérő [9]. Mivel sok esetben a különböző szövetek víztartalmának különbsége nem számottevő, így a relaxációs idő különbség is kicsi. Bizonyos esetekben a megbízható különbség érdekében kontrasztanyagot kell alkalmaznunk, amivel a relaxációs idők csökkenthetők, ezáltal a mérések ideje is [9]. Spin-echo impulzus szekvenciát alkalmaznak az MRI vizsgálatok során, ahol a kép kontrasztosságát a térfogategységben lévő protonok sűrűsége ($N(H)$), longitudinális és transzverzális relaxációs ideje (T₁, T₂) szabja meg. A kapott jel intenzitása (SI) a következőképpen adható meg [10]:

$$SN = N(H)[1 - e^{-TR/T_1}]e^{-TE/T_2} \quad (1)$$

ahol a TE az echo késleltetési idő, a TR az ismétlési idő. Az egyenlet alapján megállapítható, hogy a T_1 relaxációs idő csökkenése a jel intenzitás növekedését, a T_2 relaxációs idő csökkenése pedig a jel intenzitásának csökkenését eredményezi.

A kontrasztanyagok alkalmazásának szigorú követelményei vannak, mint például: jó vízoldhatóság, nagy termodinamikai stabilitás, kinetikai inertség, kis ozmotikus koncentráció, ha lehetséges szervspecifikusság és minimális dózis mellett maximális kontrasztnövelés. Emellett még fontos a relaxivitás (r_1), ami a paramágneses anyag 1 mM-os oldata által eredményezett relaxációs sebesség ($1/T_1$) növekedés a diamágneses közeghez képest [11]. A kontrasztanyagokat 2 csoportba sorolhatjuk: vannak T_1 (longitudinális relaxáció sebesség növelők, $1/T_1$) és T_2 kontrasztanyagok (transzverzális relaxáció sebesség növelők, $1/T_2$).

III.3. T_1 kontrasztanyagok

A T_1 kontrasztanyagok csökkenteni tudják a szervezetben található vízprotonok longitudinális relaxációs idejét, amelyek paramágneses, viszonylag hosszú elektron relaxációs idővel rendelkező központi fémiont tartalmaznak (Fe^{2+} , Mn^{2+} , Eu^{2+} és Gd^{3+}) amelyek sok párosítatlan elektronnal rendelkeznek. A gyakorlatban a Gd^{3+} -ion a leggyakrabban alkalmazott, mivel 7 párosítatlan elektronnal, nagy mágneses momentummal és hosszú relaxációs idővel rendelkezik (10^{-9}s). A Gd^{3+} -ion azonban erősen toxikus ($\text{LD}_{50}=0,2\text{-}0,5$ mmol/kg) [12], így csak termodinamikailag stabilis és kinetikailag inert komplexei alkalmazhatók kontrasztanyagként. Ezért a mai napig nyílt láncú, és makrociklusos poliamino-polikarbonsav komplexei vannak forgalomban, mint MRI kontrasztanyagok.

A $[\text{Gd}(\text{DTPA})]^{2-}$ -komplexet alkalmazták elsőként kontrasztanyagként [13,14], majd ezt a kinetikailag inertebb $[\text{Gd}(\text{DOTA})]^{-}$ bevezetése követte [15]. Ezen két komplex után előállították töltésnélküli származékait is, mivel a töltéssel rendelkező kontrasztanyagok injektálása során fájdalom léphet fel, a nagy ozmotikus koncentráció miatt ($[\text{Gd}(\text{DTPABMA})]$, $[\text{Gd}(\text{DTPA-BMEA})]$, $[\text{Gd}(\text{HP-DO3A})]$ és a $[\text{Gd}(\text{DO3A-B})]$) [16,17,18].

Kifejlesztettek olyan kontrasztanyagokat is, amelyek nem egyenletesen oszlanak el a szervezetben, hanem egy adott szövetben képesek dúsulni. Ezáltal nagyobb kontrasztanyag koncentrációt lehet elérni egy-egy területen kisebb mennyiség alkalmazásával. Ilyen kontrasztanyagok például a $[\text{Gd}(\text{EOB-DTPA})]^{2-}$ [19] és a $[\text{Gd}(\text{BOPTA})]^{2-}$ [20], melyeket a máj vizsgálatánál használnak, vagy a vérben található nagy fehérjékhez másodlagos kötés segítségével kötődő és adduktumot kialakító MS-325, mely angiográfiás vizsgálatokra alkalmas [21].

III.4. T₂ kontrasztanyagok

A T₂ kontrasztanyagok között legjelentősebbek a szuperparamágneses vas-oxid mikrorészecskék, melyeket eredményesen használnak MRI mérések során [22,23,24]. Összegképletük: Fe₂(III)O₃M(II)O, ahol az M(II) lehet Fe²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺, Co²⁺ vagy Mg²⁺. A szemcseméretük nagymértékben befolyásolja tulajdonságaikat [25]. A kisebb szemcseméretű vas-oxidok a vízprotonok longitudinális relaxáció sebességét növelik meg jelentősen, nagyobb szemcseméret esetén a vízprotonok transzverzális relaxáció sebessége csökkeni fog [26].

III.5. A kontrasztanyag fejlesztés új irányai

A napjainkban alkalmazott kontrasztanyagokban a Gd³⁺-ionok koordinációs szférájában az összesen 9 koordinációs helyéből nyolcat a ligandum donoratomjai, a fennmaradó egy helyet pedig egy víz molekula foglalja el. Ebből kiindulva a relaxivitás növelésére lehetőség van, ha növeljük a kötött vízmolekulák számát (*q*) a központi fémion körül, olyan ligandumok alkalmazásával, amelyek kevesebb donoratomot tartalmaznak. Ez a változtatás ugyanakkor megkönnyíti a szervezetben nagy mennyiségben előforduló ligandumok (pl. karbonát, citrát stb.) koordinációját is a központi fémionhoz, vegyesligandumú komplexet létrehozva. Az így kialakuló komplexek belső koordinációs szférájából azonban az összes vízmolekula kiszorul, így a relaxivitás értékük lecsökken.

Napjainkban az MRI kontrasztanyagokkal szemben támasztott követelmények egyre nőnek, egyik ilyen pl. a szerspecifikusság. Emiatt egyre nagyobb figyelem irányul az olyan komplexek kifejlesztésére, amelyekkel csak egyetlen szerv, szervcsoport vagy egy adott típusú szövet vizsgálható [27,28].

Nagy érdeklődés mutatkozik az ún. intelligens kontrasztanyagok iránt is, amelyek lehetőséget adnak a szövetek pH-jának [29], hőmérsékletének [30,31], vagy az oxigén parciális nyomásának mérésére [32,33,34]. Továbbá lehetőség van a szövetekben található enzimaktivitás [35] és a különböző fémionok (pl.: Ca²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, Fe³⁺) koncentrációjának meghatározására is [36,37,38]. A következő ábrán a célkitűzésben már említett EG2A2M^{DO3A}-ligandum Gd(III)-komplexének szerkezetét mutatjuk be vázlatosan Ca²⁺-ion jelenlétében és távollétében.

3. ábra: EG2A2M^{DO3A}-ligandum Gd(III)-komplexének vázlatos ábrázolása Ca²⁺-ion jelenlétében és távollétében.

IV. Alkalmazott vizsgálati módszerek

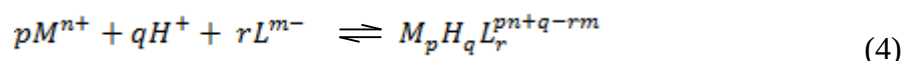
IV.1. pH-potenciometria

A pH-potenciometria egy elektroanalitikai módszer, amelyet egyensúlyi vizsgálatok során széles körűen alkalmaznak. A ligandum protonálódási állandóit és a kialakuló komplexek stabilitási és protonálódási állandóit ezzel a módszerrel határoztuk meg (kivéve a [Cu(EGTA-BBA)] komplex stabilitási állandóját). Ez az egyik legfontosabb és legpontosabb technika erre a célra, melynek alapja, hogy a ligandumhoz koordinálódó fémion hatással legyen a protonálódás egyensúlyára, tehát pH-effektussal járjon a komplexképződés. Az EGTA-BBA ligandum protonálódási állandóit a következőképpen definiálhatjuk:



$$K_i^H = \frac{[H_i L]}{[H^+][H_{i-1} L]}, i = 1, 2 \dots \quad (3)$$

Az oldat H^+ -koncentrációját más tényezők is befolyásolják, ilyen például a szabad ligandum különböző bázicitású donorcsoportjai, illetve a koordinálódó fémion és a különböző mértékben protonált ligandumok között kialakuló kompetíciós reakciók. A komplexek képződését és a stabilitási sorozatot a következőképpen adhatjuk meg:



$$\beta_{pqr} = \frac{[M_p H_q L_r^{pn+q-rm}]}{[M^{n+}]^p [H^+]^q [L^{m-}]^r} \quad (5)$$

Az általunk vizsgált rendszerek esetében 1:1 és 2:1 fém:ligandum összetételnél ML komplex képződése mellett egyszerprotonált, kétszerprotonált és kétmagvú komplexek képződését is feltételeztük. A képződő részecskék egyensúlyi állandóit az alábbi összefüggésekkel adhatjuk meg:



$$K_{ML} = \frac{[ML]}{[M][L]} \quad (7)$$



$$K_{M_2L} = \frac{[M_2L]}{[M][ML]} \quad (9)$$



$$K_{MH_iL} = \frac{[MH_iL]}{[MH_{i-1}L][H^+]} , \quad i = 1, 2, \dots \quad (11)$$

A pH-potenciometriás módszert 2-12 pH közötti tartományban alkalmazható nagy biztonsággal. Néhány esetben azonban a komplex képződése vagy a ligandum protonálódási folyamatai megkövetelik a nagyobb pH-tartomány alkalmazását, ilyen esetben 1,7 és 12,5 pH közötti tartományban dolgozhatunk. Ilyen széles pH-tartományban azonban számolni kell a meghatározott, protonálódási vagy stabilitási állandók nagyobb hibájával. Ha ilyen nagy pH-tartományban sem tudjuk követni a protonálódási vagy komplexképződési folyamatokat, akkor a vizsgálatokhoz más módszert kell választani (NMR, UV-Vis spektrofotometria) és a pH-t (vagy a sav- esetleg lúg-koncentrációt) „indikátormolekulák” segítségével vagy a c_{H^+} (c_{OH^-}) segítségével számoljuk ki/adjuk meg. A protonálódási és stabilitási állandókat a titrálás során kapott adatokból a PSEQUAD számítógépes program segítségével számítottuk ki [39].

IV.2. Spektrofotometria

Az UV-látható spektrofotometria az elektromágneses sugárzás látható tartományát (400-780 nm), és azzal szomszédos, UV-tartományt (190-400 nm) használja fel a mérésekhez. A látható és az UV tartományba eső fény alkalmas arra, hogy a fény energiája a molekula rezgési és forgási állapotai mellett a kötő és a nemkötő elektronokat is gerjessze. A képződő komplex tulajdonságait és mérhetőségét a koordinálódó fémion elektronspektroszkópiái viselkedése fogja nagymértékben meghatározni. Valamint a fémionok elnyelése kisebb nagyobb mértékben megváltozik a komplexképződés hatására, ez a változás adja az alkalmazhatóságának az alapját. Esetenként nemcsak a szabad fémionnak van fényelnyelése, hanem a ligandumnak is.

Az optimális hullámhossz kiválasztása fontos a kísérletek során, hiszen célszerű, ha csak egyetlen egy részecske nyel el az adott tartományban. Ideális esetben csak a képződő ML komplexnek van elnyelése, míg a M^{n+} szabad fémion és a L ligandum nem, vagy csak kis mértékben nyel el.

Munkám során a $[Cu(EGTA-BBA)]$ -komplex stabilitási állandójának meghatározásához használtam ezt a módszert.

IV.3. Relaxometria

A relaxometriás módszer alkalmas a Gd(III)-komplexek képződésének és disszociáció kinetikájának vizsgálatára, mivel a vízprotonokra relaxációs sebességére gyakorolt hatás különböző a szabad Gd^{3+} -ion és komplexei között.

A relaxivitas csökkenését a komplexképződés során a fémion belső koordinációs szférájában található vízmolekulák számának csökkenése eredményezi. A relaxivitas növekedése pedig a komplex disszociációjára, vagy protonált komplexek képződésére utalhat, mely során a Gd^{3+} -ionhoz újabb víz molekulák kötődnek.

A vízprotonok Gd^{3+} -komplex jelenlétében mért relaxációsebessége ($1/T_{1obs}$), a Gd(III)-komplex diamágneses ($1/T_{1d}$) és paramágneses ($1/T_{1p}$) hozzájárulásából tevődik össze (a diamágneses rész tartalmazza a tiszta vízben mért relaxációsebességet):

$$\frac{1}{T_{1obs}} = \frac{1}{T_{1d}} + \frac{1}{T_{1p}} = \frac{1}{T_{1d}} + r_1[Gd] \quad (12)$$

ahol, az r_1 a Gd(III)-komplex relaxivitása [11]. A paramágneses fémkomplexek relaxivitását a fémion belső (r_{1p}^{is}) és külső (r_{1p}^{os}) koordinációs szférájában lévő vízmolekulák protonjai és a második koordinációs szféra (r_{1p}^{2nd}) vízprotonjai relaxációsebessége összegeként adják meg [40]:

$$r_{1p}^m = r_{1p}^{is} + r_{1p}^{os} + r_{1p}^{2nd} \quad (13)$$

V. Eredmények és értelmezésük

Egy ligandum koordinációs kémiai vizsgálata minden esetben a ligandum protonálódási állandóinak meghatározásával kezdődik. Erre azért van szükség, mert az egyes fémionokkal kialakuló komplexek stabilitási és protonálódási állandóit e nélkül nem tudjuk megadni. A komplexképződés során a fémionok, valamint az oldatban található hidrogén ionok között versengés van a ligandum donoratomjaiért, ami meghatározza a rendszer jellemzőit adott pH-értékeknél lehetőséget nyújtva az egyes állandók meghatározására. Az én munkám is a ligandum protonálódási állandóinak meghatározásával kezdődött, amit pH-potenciometriás módszerrel végeztem el. A kapott pH-V(ml) adatpárok felhasználásával, a PSEQUAD program segítségével kiszámítottuk az egyes protonálódási állandókat, amelyeket az 1. táblázatban tüntettem fel, az EGTA anyaligandum megfelelő állandóival együtt [2].

1. táblázat: Az EGTA-BBA és az EGTA ligandum protonálódási állandói (25°C, 0,15 M NaCl)

	EGTA-BBA	EGTA ^a [2]
$\log K_1^H$	6,44(1)	9,09
$\log K_2^H$	5,92(1)	8,45
$\log K_3^H$	4,60(1)	2,53
$\log K_4^H$	2,38(1)	2,50
$\Sigma \log K_i^H$	19,34	22,57

A két ligandum protonálódási állandóit összehasonlítva egyértelmű, hogy az EGTA-BBA ligandum protonálódási állandói értékeiben csökkenés tapasztalható. Ez egyértelműen az acetátcsoportok amidcsoportokra történő cseréjének köszönhető, ami csökkenti a ligandum töltéssel rendelkező donoratomjainak számát, ami hatással van az esetlegesen kialakuló H⁺-kötések erősségére is. Az 1. táblázatban feltüntettük a ligandumok összbázicitását is ($\Sigma \log K_i^H$), amiből látszik, hogy az EGTA-BBA ligandum összbázicitása több mint 3 nagyságrenddel kisebb, mint az EGTA ligandumé, ami előrevetíti a fémkomplexek stabilitási állandóinak csökkenését is.

A protonálódási állandók ismeretében meghatároztuk az EGTA-BBA ligandum néhány fémionnal kialakuló komplexének stabilitási állandóját. A kapott állandókat a 2.

táblázatban tüntettem fel, ahol összehasonlítottam azokat az EGTA ligandumra kapott értékekkel [1].

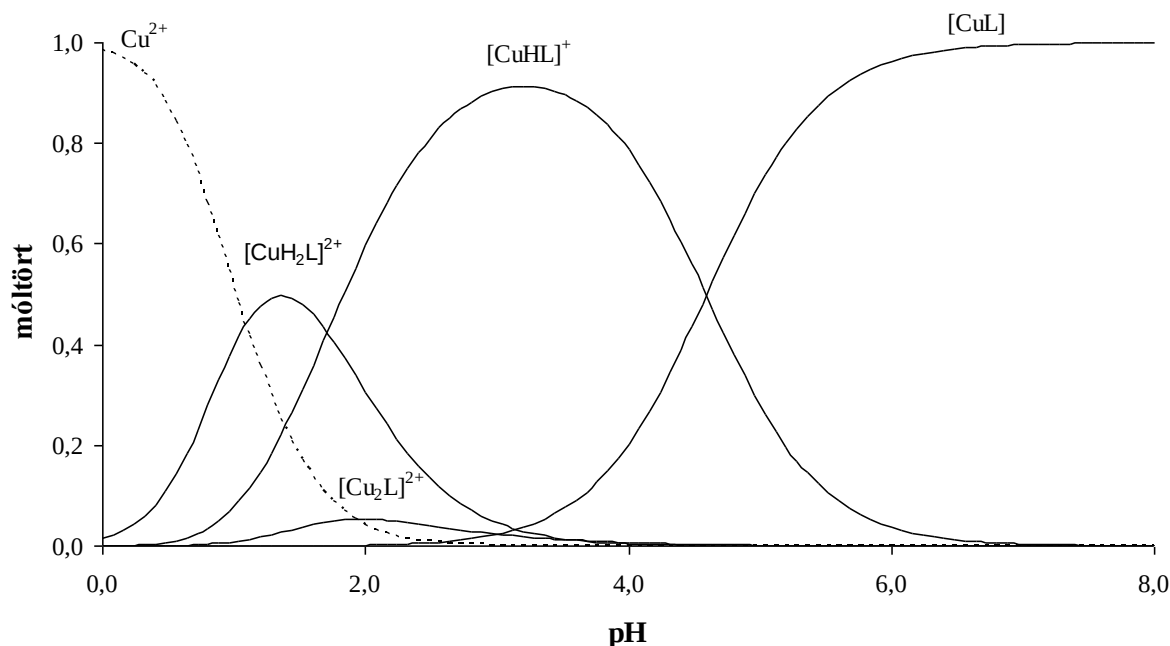
2. táblázat: Az EGTA-BBA és az EGTA ligandumok komplexeinek stabilitási és protonálódási állandói (25°C, 0,15 M NaCl)

	EGTA-BBA				EGTA ^a
	$\log K_{ML}$	$\log K_{ML}^H$	$\log K_{MHL}^H$	$\log K_{ML}^M$	$\log K_{ML}$
Mg ²⁺	–	–	–	–	5,26
Ca ²⁺	6,28(1)	4,98(1)	–	–	10,65
Gd ³⁺	11,30(4)	4,92(8)	1,80(4)	2,9(1)	17,66
Cu ^{2+b}	14,23(4)	4,52(5)	1,71(6)	5,62(3)	17,22
Zn ²⁺	8,70(6)	4,77(2)	2,93(3)	3,11(6)	12,65

^a [1] 0,10M KCl, ^b UV-látható spektrofotometriás módszer

Ahogy az az összbázicitás értékének ismeretében várható volt az EGTA-BBA komplexek esetében rendre kisebb stabilitási állandó értékeket kaptunk. A Mg²⁺-ionnal végzett titrálás adataiból nem sikerült stabilitási állandót számítani, aminek az lehet az oka, hogy a komplex egyáltalán nem, vagy csak kis mértékben képződik, annak igen kis stabilitása miatt. A Ca²⁺-ion esetében a titrálási adatokból tudtunk stabilitási állandót számolni, amely számértéke ugyan kisebb, mint az EGTA ligandum Ca²⁺-komplexére kapott érték. Ugyanakkor, az EGTA és EGTA-BBA ligandumok Ca²⁺ és a Mg²⁺-ionnal képződő komplexei stabilitását összehasonlítva egyértelmű, hogy ez az EGTA-BBA komplexképző esetében a szelektivitás nagyobb. Ez a tény igen fontos a gyakorlati felhasználás szempontjából.

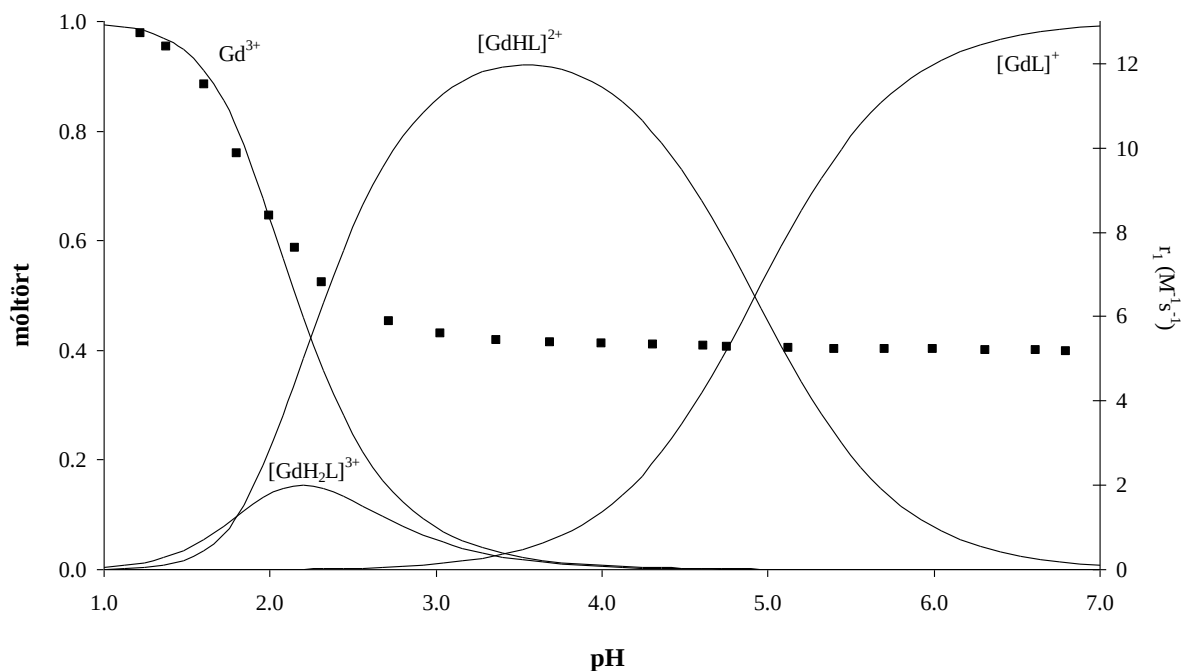
Megvizsgáltuk a Cu²⁺- és Zn²⁺-ionokkal kialakuló komplexek stabilitását is. Mind a két esetben sikerült egyszer és kétszer protonált, valamint kétmagvú komplexeket is kimutatni, ami egyáltalán nem meglepő figyelembe véve, hogy az EGTA-BBA hasonlóan az EGTA ligandumhoz 8 donoratómmal rendelkezik, míg a Cu²⁺- és Zn²⁺-ionok maximális koordinációs száma 6 lehet. Mind a két fémion EGTA-BBA komplexére kisebb stabilitási állandót kaptunk, mint az EGTA ligandummal kialakuló komplexek esetén. A [Cu(EGTA-BBA)] komplex stabilitási állandóját csak UV-látható spektrofotometriás módszerrel tudtuk meghatározni, hiszen a szabad fémion koncentrációja 2-es pH környékén 2-3% alá csökken, így stabilitási állandójának értékét nem tudtuk számolni a pH-metriás adatokból (4.ábra).



4. ábra: A $[\text{Cu}(\text{EGTA-BBA})]$ eloszlási diagramja ($C_{\text{Cu}}=C_{\text{EGTA-BBA}}=1 \text{ mM}$)

Megvizsgáltuk a $[\text{Gd}(\text{EGTA-BBA})]^+$ -komplex egyensúlyi viszonyait is. A titrálás adataiból számítani tudtuk az 1:1 összetételű komplex stabilitási, az egyszer és kétszer protonált formájának protonálódási, valamint a kétmagvú komplexének stabilitási állandóját is. A kétmagvú komplex stabilitási állandójának meghatározása csak nagy hibával volt lehetséges, annak kis értéke miatt. Itt, ellentétben a Cu^{2+} -ionokkal, a Gd^{3+} -ion 9-es koordinációs száma miatt nem kedvez a kétmagvú komplex képződésének. A $[\text{Gd}(\text{EGTA-BBA})]^+$ -komplex stabilitási állandója több mint 6 nagyságrenddel adódott kisebbnek a $[\text{Gd}(\text{EGTA})]^-$ -komplex stabilitási állandójánál, ami egyértelműen a töltéssel rendelkező donoratomok számának csökkenésére (ill. a ligandum kisebb bázicitására) vezethető vissza, figyelembe véve azt is, hogy a lantanoida(III)ionok esetében az ionos kötések kialakulása kedvező.

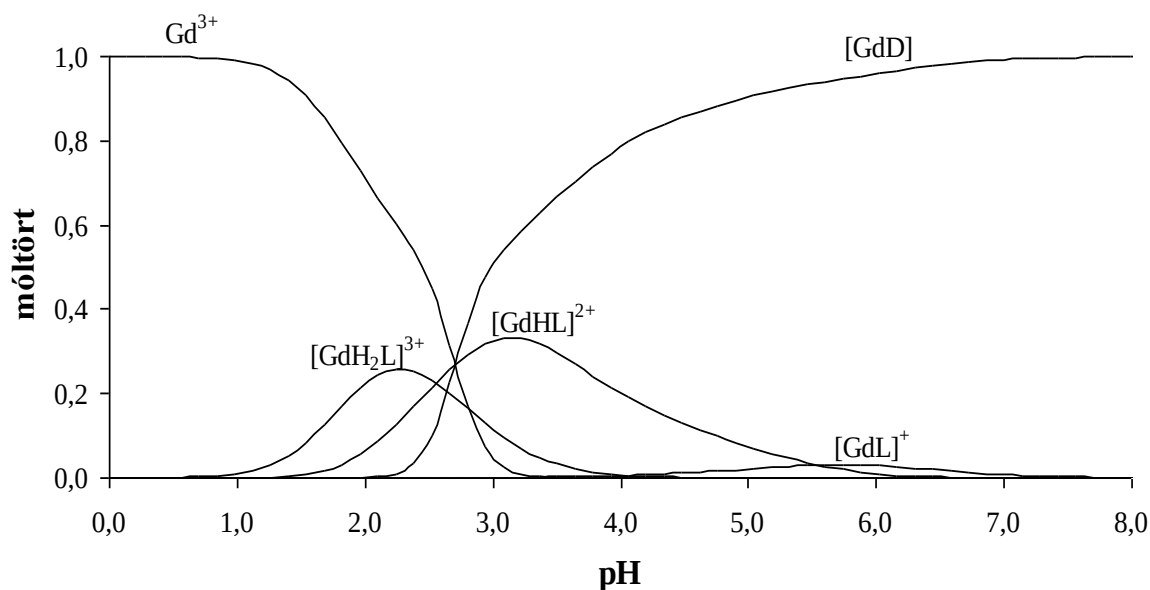
A $[\text{Gd}(\text{EGTA-BBA})]^+$ -komplex egyensúlyi modelljének igazolására megvizsgáltuk a Gd^{3+} -komplex relaxivitásának változását a pH függvényében, a vizsgálatokat 1,2 és 7 pH közötti tartományban végeztük el. A $[\text{Gd}(\text{EGTA-BBA})]^+$ -komplex relaxometriás titrálása igen érdekes tényre mutatott rá.



5. ábra: A $[\text{Gd}(\text{EGTA-BBA})]^+$ eloszlási diagramja ($c_{\text{Gd}}=c_{\text{EGTA-BBA}}=1 \text{ mM}$), valamint relaxivitásának pH függése

Ahogy az a 5. ábrán látható a $[\text{Gd}(\text{EGTA-BBA})]^+$ -komplex 1 mM-os oldatában mért relaxitás értéke gyakorlatilag állandósul $\text{pH}=3,0$ körül, ahol már 90%-ban az egyszer protonált komplex van jelen és a relaxitás értéke ezután már nem is változik számottevően. Ez azért érdekes megfigyelés, mert ilyen esetekben a protonálódás csak olyan donoratomon következhet be, ami eredendően sem koordinálódik a Gd^{3+} -ionhoz, különben a relaxitás értékének változnia kellene a pH növekedésével. Egy donoratom deprotonálódása lehetővé teszi annak koordinációját a központi fémionhoz, ami a belső szférában levő vízmolekulák számának, ezáltal a relaxitás értékének csökkenéséhez kellene, hogy vezessen. Ezt a megfigyelést további kísérletekkel akarjuk igazolni.

$\text{EG2A2M}^{\text{DO3A}}$ ligandumban, amelynek modellvegyülete az EGTA-BBA, a fémion megkötődésére 3 lehetőség kínálkozik, a két DO3A egység, valamint az azokat összekötő ún. linker, ami esetünkben az EGTA-BBA fragmens. A kontrasztanyag előállításánál, ahogy azt már a célkitűzésben is említettük, Gd^{3+} -ion felesleget alkalmazva telítik a kötőhelyeket, majd ezt követően ioncserés elválasztással távolítják el a linkerhez kötött Gd^{3+} -iont. Az így előállított kontrasztanyagban ugyanakkor bekövetkezhet a Gd^{3+} -ion áthelyeződése a DO3A egységről amennyiben az egyensúlyi viszonyok azt lehetővé teszik. Ennek vizsgálatára koncentráció eloszlási diagramot készítettünk, amit a 6. ábrán mutatunk be [40].



6. ábra: A $\text{Gd}^{3+}:\text{EGTA-BBA(L)}:\text{DO3A(D)}$ rendszer koncentráció eloszlási görbéi 2:1:2 (mM) molarány esetén.

Az ábrán látható, hogy $\text{pH} \geq 5,5$ -nél az általunk kapott egyensúlyi adatok (és a $\text{Gd}^{3+}:\text{DO3A}:\text{H}^+$ rendszerre irodalomban publikált állandók)[40] alapján az összes Gd^{3+} -ion a DO3A fragmensekhez kötődik, így nem kell számolni fémion jelentős „vándorlásával” a $[\text{Gd}_2(\text{EG2A2M}^{\text{DO3A}})]^{2-}$ -komplexben.

VI. Kísérleti rész

A vizsgálatokhoz alkálifém-, alkáliföldfém- és átmenetifém-klorid törzsoldatokat használtunk, melyeket analitikai tisztaságú sókból készítettünk kétszeresen desztillált vízben való oldással. A kinetikai vizsgálatokhoz használt puffer (NMP, N-metil-piperazin) is analitikai tisztaságú vegyszerből készült. A relaxometriás és fotometriás vizsgálatok során használt minták pH-értékeit *Metrohm 827 pH Lab* pH-mérő és *Methrom 6.0234.100* kombinált üvegelektrod alkalmazásával mértük. A mérések előtt az elektrod kétpontos kalibrációját elvégeztük. Ehhez 0,05 M KH-ftalát puffer (pH=4,005) és 0,01 M bórax puffert (pH=9,180) használtunk, amit N₂ atmoszféra alatt tároltunk a CO₂ hatásának kiküszöbölése végett. A kalibráció azért fontos, hogy az elektrod válaszfüggvénye minél szélesebb pH-tartományban 1-es meredekségű legyen. Ez a linearitás egy jól működő elektrod esetében pH=2-12 tartományban várható el. A minták pH értékeinek beállításához tömény HCl-at és szilárd NaOH-ot használtunk.

A pH potenciometriás titrálások során *Metrohm 702SM Titrino* automata titrátort és *Methrom 6.0234.100* kombinált üvegelektrodot használtunk. Az elektrod kétpontos kalibrációját itt is elvégeztük. A titrálásokat 6 cm³-es oldattérfogatban, állandó termosztálás (25±0,2 °C) és mechanikus kevertetés mellett végeztük. Az mintákat 0,15 M NaCl ionerősség mellett, pontosan ismert koncentrációjú közelítőleg 0,2 M NaOH-oldattal titráltuk. A lúgoldat koncentrációját ismert koncentrációjú KH-ftalát pufferoldat titrálásával határoztuk meg. A levegő CO₂ tartalmának kizárása, valamint az elkarbonátosodás elkerülése érdekében N₂-gázt buborékkoltattunk át a rendszeren.

Az állandó ionerősségre beállított oldatok és a kombinált üvegelektrod nátrium- vagy kálium-klorid oldata között diffúziós potenciálkülönbség jelenik meg, ami nem azonos a pH-mérő kalibrálásához használt pufferoldat és a kombinált üvegelektrod közötti potenciálkülönbséggel. Ezt az eltérést az Irving[41] és munkatársai által kidolgozott módszerrel határozzuk meg, ennek alapja, hogy 0,01 M HCl-oldatot 0,15 M NaCl ionerősség mellett lúgoldattal megtitrálunk, majd meghatározzuk a mért és a számolt pH értékek különbségét. A továbbiakban ezt az értéket használjuk fel a H⁺-ion koncentrációnak a leolvasott értékből történő kiszámításához.

A ligandum koncentrációjának meghatározása során nehézségekbe ütköztünk, mivel a pH-potenciometriás titrálásokból nem tudtuk a ligandum koncentrációját kiszámítani. Ennek magyarázata a protonálódási állandók kis értéke, aminek következtében a titrálási görbéken

nem jelenik meg a számításhoz nélkülözhetetlen 2 darab, jól elkülönülő ekvivalencia pont. A ligandum koncentrációjának meghatározására, ezért Ce^{3+} -ionnal való titrálást használtunk UV-látható spektrofotometriásan (200-400 nm, $c_{\text{Ce}^{3+}}=1$ mM, $c_{\text{EGTA-BBA}}\approx 0,1-2$ mM), valamint az ott kapott eredményeket megerősítettük Gd^{3+} -ion segítségével relaxometriásan (20 MHz, 25°C , $c_{\text{Gd}^{3+}}=0,25-5$ mM, $c_{\text{EGTA-BBA}}\approx 2$ mM).

Az EGTA-BBA ligandum protonálódási állandóinak meghatározására során a ligandum 4,0 mM oldatát ismert mennyiségű és pontos koncentrációjú HCl-oldattal, 0,15 M NaCl ionerősség mellett 0,2 M NaOH-oldattal megtitráltuk. A $\log K_i^{\text{H}}$ értékeket a ligandum esetében 250 adatpárból számítottuk ki.

pH-potenciometriásan határoztuk meg a ligandum fémionokkal képzett komplexeinek stabilitási és protonálódási állandóit is. A mérések során 2,5 mM koncentrációjú, 1:1 és 2:1 arányú oldatokat titráltunk 1,7-12,0 pH-tartományban. Az állandók meghatározása 100-200 $\text{V}(\text{cm}^3)\text{-pH}$ adatpárból történt.

A $[\text{Cu}(\text{EGTA-BBA})]$ -komplex stabilitási állandóját $\text{pH}<2$ pH tartományban spektrofotometriásan, 9 hullámhosszon (600, 625, 650, 675, 700, 725, 750, 775, 800 nm) határoztuk meg. Az egyensúlyi mérések primer adataiból a PSEQUAD program segítségével számítottuk ki a protonálódási és stabilitási állandókat [38].

A Gd(III) -komplex relaxitás értékeinek (r_{1p}) pH függését 20 MHz-en 25°C -on vizsgáltuk egy *Bruker minispec MQ20 NMR* relaxométerrel, *inversion recovery* impulzus szekvenciával végeztük ($180^\circ\text{-}\tau\text{-}90^\circ$). A mintákban a komplex koncentrációja 2 mM volt, a pH értékeket tömény HCl-val és szilárd NaOH-dal állítottuk be. A vizsgálatot 1,2 és 6,8 közötti pH tartományban végeztük el.

VII. Összefoglalás

Munkám során megvizsgáltuk az EGTA-BBA ligandumot, amely modellvegyülete egy újonnan szintetizált, a Ca^{2+} -ionok *in vivo* MRI mérésére alkalmas ligandum Ca^{2+} -ion kötő fragmensének. Az egyensúlyi vizsgálatok során meghatároztuk a ligandum protonálódási állandóit és néhány fémionnal (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Gd^{3+}) képződő komplexének stabilitási és protonálódási állandóit.

Az EGTA-BBA protonálódási állandóit összehasonlítva EGTA ligandum protonálódási állandóival megállapítható, hogy acetátcsoportok amidcsoportokkal történő helyettesítésének következményeképp az EGTA-BBA protonálódási állandói kisebbek. A protonálódási állandók értékének csökkenése az EGTA-BBA ligandum összbázicitásának több mint 3 nagyságrendnyi csökkenését eredményezi az EGTA összbázicitásához képest.

A protonálódási állandók ismeretében vizsgáltuk az egyes fémionokkal kialakuló egyensúlyi rendszereket. A $[\text{Mg}(\text{EGTA-BBA})]$ -komplex stabilitási állandóját nem sikerült meghatározni, ami annak tulajdonítható, hogy a Mg^{2+} -ion nem, vagy csak igen kis stabilitású komplexet képez az EGTA-BBA ligandummal, ami jelentős eltérés az EGTA ligandumhoz képest. Ez a viselkedés az *in vivo* felhasználás szempontjából hasznos is, hiszen így a ligandum Ca^{2+} -ionnal szemben mutatott szelektivitása nagyobb, mint az EGTA ligandumé. A Cu^{2+} -, Zn^{2+} - és Gd^{3+} -ionokkal kialakuló komplexek esetében az ML komplexek mellett kétszerprotonált és kétmagvú részecskék képződését is sikerült kimutatni.

A $[\text{Gd}(\text{EGTA-BBA})]^+$ -komplekre kapott egyensúlyi adatok felhasználásával eloszlási diagramot szerkesztettünk annak kiderítése érdekében, hogy a $[\text{Gd}_2(\text{EG2A2M}^{\text{DO3A}})]^{2-}$ -komplexben, ahol a két Gd^{3+} -ion a DO3A fragmensekhez kell, hogy kötődjön, van-e lehetőség a Gd^{3+} -ion EGTA-BBA-hoz való „átvándorlására” egyensúlyi szempontból. Az eloszlási görbék alapján megállapítottuk, hogy pH=7,4-en a Gd^{3+} -ionok 100%-ban a makrociklusos DO3A fragmensekhez kötődnek.

Érdekes eredményre jutottunk ugyanakkor a $[\text{Gd}(\text{EGTA-BBA})]^+$ -komplex relaxivitása pH-függésének vizsgálatakor, mivel a $[\text{Gd}(\text{HL})]$ -komplex deprotonálódása gyakorlatilag nem befolyásolja a relaxitás értékét. Ezek alapján a komplex protonálódása (a $[\text{Gd}(\text{HEGTA-BBA})]^{2+}$ -komplex képződése során) olyan donoratomon játszódik le, amelyik nem koordinálódik a Gd^{3+} -ionhoz. Ennek a tapasztalnak a megerősítésére további vizsgálatokat tervezünk.

VIII. Summary

The aim of this work was to examine the octadentate ligand EGTA-BBA, a compound modeling the Ca^{2+} -binding site of a newly synthesized Ca^{2+} -sensitive contrast agent suitable for *in vivo* determination of the Ca^{2+} -ion concentration via Magnetic Resonance Imaging (MRI). Equilibrium studies were performed to determine protonation constants of the ligand and stability as well as protonation constants of its complexes formed with various metal ions (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Gd^{3+}).

Comparison of the protonation constants of EGTA-BBA with those of EGTA shows that the former ligand has lower values, which is a direct consequence of the substitution of two acetate groups by amide pendants. The lower protonation constants cause the total basicity of EGTA-BBA to drop by more than 3 orders of magnitude as compared to that of EGTA.

Equilibrium systems with the different metal ions were examined, using the obtained protonation constants. The stability constant of $[\text{Mg}(\text{EGTA-BBA})]$ could not be determined, which may be attributed to the absence of Mg^{2+} -complex formation. This is a marked difference compared to EGTA and may be highly useful in future *in vivo* use, as it raises the selectivity of the ligand towards Ca^{2+} -ions. In the equilibrium involving the Cu^{2+} -, Zn^{2+} - and Gd^{3+} -ions diprotonated and dinuclear complexes were also detected besides the ML complexes.

Species distribution curves were calculated by using the data obtained for $[\text{Gd}(\text{EGTA-BBA})]^+$ to determine whether the two Gd^{3+} ions bound to the DO3A units in $[\text{Gd}_2(\text{EG2A2M}^{\text{DO3A}})]^{2-}$ are expected to be rearranged (e.g. dissociation) to the EGTA-BBA fragment. It was shown that the Gd^{3+} -ions are 100% bound to the DO3A fragments at $\text{pH} = 7.4$.

An interesting phenomenon was discovered during the pH-dependent relaxometric study of the $[\text{Gd}(\text{EGTA-BBA})]^+$ complex as a result of the protonation of the complex its relaxivity remains constant. This indicates that the protonation of the complex (formation of $[\text{Gd}(\text{HEGTA-BBA})]^{2+}$) seems to occur at a donor group that is not coordinated to Gd^{3+} ion. Further analysis of this finding is planned.

IX. Irodalomjegyzék

- [1] Negri, R., Baranyai, Zs., Tei, L., Giovenzana, G. B., Platas-Iglesias, C., Bényei, A. C., Bodnár, J., Vágner, A. and Botta, M. **2014** *Inorg. Chem.* közlésre elfogadva
- [2] Kálmán, F. K. and Tircsó, Gy., *Inorg. Chem.*, **2013**, 51, 10065;
- [3] Shannon R. D., *Acta Cryst.*, **1976**, A32, 751
- [4] Nieboer E., Structure and Bonding, **1975**, 22, 1.
- [5] Helm, L.; Merbach, A. E., *Eur. J. Solid State Inorg. Chem.*, **1991**, 28, 245.
- [6] Peacock, R. D., Structure and Bonding, **1975**, 22, 83.
- [7] Bünzli, J.-C. G.; Choppin, G. R., eds., *Lanthanide Probes in Life, Chemical and Earth Sciences: Theory and Practice*. Elsevier, Amsterdam, **1989**.
- [8] Moller, T.; Martin, D. F.; Thompson, L. C.; Ferrus, R.; Feistel, G.; Randall, W. J., *Chem. Rev.*, **1965**, 65, 1.
- [9] Jacques, V.; Desreux, J. F., *New Classes of MRI Contrast Agents*. In: Krause, W., eds., *Topics in Current Chemistry*, Vol. 221: *Contrast Agents I. Magnetic Resonance Imaging*, Berlin: Springer-Verlag, **2002**
- [10] Bünzli, J.-C. G.; Choppin, G. R., eds., *Lanthanide Probes in Life, Chemical and Earth Sciences: Theory and Practice*. Elsevier, Amsterdam, **1989**.
- [11] Tóth, É.; Helm, L. and Merbach, A. E., In *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*, Tóth, É. and Merbach, A. E., eds., Chichester: John Wiley & Sons, **2001**.
- [12] Lauffer, R. B.: *Chem. Rev.*, **1987**, 87, 901.
- [13] Weinmann, H. J.; Brasch, R. C.; Press, W. R.; Webey, G. E., *Am. J. Roentgenol*, **1984**, 142, 619.
- [14] Gries, H.; Miklautz, H., *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR*, **1984**, 16, 105.
- [15] Desreux, J.; Barthélemy, P. P., *Nucl. Med Biol.*, **1988**, 15, 9.
- [16] Shikata, F.; Tokumitsu, H.; Ichikawa, H.; Fukumori, Y., *Eur. J. Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **2002**, 53, 57.
- [17] Rizkalla, E. N.; Choppin, G. R.; Cacheris, W. P., *Inorg. Chem.*, **1993**, 32, 582.
- [18] Kumar, K.; Chang, C. A.; Tweedle, M. F., *Inorg. Chem.*, **1993**, 32, 587.

- [19] Schmitt-Willich, H.; Brehm, M.; Evers, C. L. J.; Michl, G.; Müller-Fahrnow, A.; Petrov, O.; Platzek, J.; Radüchel, B.; Sülzle, D., *Inorg. Chem.*, **1999**, 38, 1134.
- [20] Uggeri, F.; Aime, S.; Anelli, P. L.; Botta, M.; Brochetta, M.; de Haen, C.; Ermondi, G.; Grandi, M.; Paoli, P., *Inorg. Chem.*, **1995**, 34, 633.
- [21] Caravan, P.; Comuzzi, C.; Crooks, W.; McMurry, T. J.; Choppin, G. R.; Woulfe, S. R. *Inorg. Chem.* 2001, 40, 2170–6.
- [22] Bach-Gensamo, T., *Acta Radiol.*, **1993**, 387, 1.
- [23] Reimer, P.; Tombach, B., *Eur. Radiol.*, **1998**, 8, 1198.
- [24] Grubnic, S.; Padhani, A. R.; Revell, P. B.; Husband, J. E., *Am. J. Roentgenol.*, **1999**, 173, 173.
- [25] Wang, Y. X.; Hussain, S. M.; Krestin, G. P., *Eur. Radiol.*, **2001**, 11, 2319
- [26] Caravan, P.; Ellison, J. J.; McMurry, T. J.; Lauffer, R. B., *Chem. Rev.* **1999**, 99, 2293
- [27] Curbet, C.; Maton, F.; Havet, T.; Slinkin, M.; Mishra, A.; Chatel, J. F.; Muller, R. N., *Invest. Radiol.*, **1998**, 33, 752.
- [28] Hall, J.; Häner, R.; Aime, S.; Botta, M.; Faulkner, S.; Parker, D.; de Sausa, A. S., *New J. Chem.*, **1998**, 6, 627
- [29] Aime, S.; Botta, M.; Fasano, M.; Terreno, E.; Kinchesh, P.; Calabi, L.; Paleari, L., *Magn. Reson. Med.*, **1996**, 35, 648
- [30] Fossheim, S. L.; Il'yasov, K. A.; Hennig, J.; Bjornerud, A., *Acta Radiol.*, **2000**, 7, 1107
- [31] Aime, S.; Botta, M.; Gianolio, E.; Terreno, E., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, 39, 747
- [32] Aime, S.; Ascenzi, P.; Comoglio, E.; Fasano, M.; Paoletti, S., *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 9365.
- [33] Burai, L.; Tóth, É.; Seibig, S.; Merbach, A. E., *Chem. Eur. J.*, **2000**, 6, 3761
- [34] Rudin, M., *Nat. Biotechnol.*, **2000**, 18, 383
- [35] Li, W.; Fraser, S. E.; Meade, T. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 1413
- [36] Emily L. Quea and Christopher J. Chang *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, 39, 54–58
- [37] Angelo J. M. Lubag, Luis M. De Leon-Rodriguez, Shawn C. Burgess, and A. Dean Sherry, *PNAS Early Edition*, November **2011**, vol.108, no.45, 18400-18405
- [38] Zékány, L.; Nagypál, I., in *Computational Methods for Determination of Formation Constants*, ed. D. J. Legett, Plenum Press, New York, 1985, p.291.
- [39] Aime, S.; Botta, M.; Crich, S. G.; Giovenzana, G. B.; Pagliarin, R.; Piccinini, M.; Sisti, M.; Terreno, E., *J. Biol. Inorg. Chem.*, **1997**, 2, 470.

- [40] Takács A., Napoitano R., Purgel M., Bényei A. Cs., Zékány L., Brücher E., Tóth I., Baranyai Zs. and Aime S., *Inorg. Chem.*, **2014**, 2858-2572
- [41] Irving, H. M., Miles, M. G., Pettit, L., *Anal.Chim.Acta*, **1967**, 28, 475

X. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezni ki témavezetőmnek, Prof. Dr. Tóth Imrének, aki szakmai irányításával, türelmével és segítségével elősegítette szakmai előmeneteletemet.

Köszönettel tartozom Dr. Kálmán Ferenc Krisztiánnak és Dr. Tircsó Gyulának szakmai segítségükért, amely lehetővé tette ezen diplomadolgozat elkészülését.

Továbbá köszönöm Prof. Dr. Brücher Ernőnek és Dr. Baranyai Zsoltnak, hogy a szakmai tudásukkal munkámhoz hozzájárultak.

Hálásan köszönöm Takács Katalin segítségét, akire nemcsak munkám során, de a magánéletben is mindig számíthattam. Köszönöm türelmét, szeretetét és támogatását.

Szeretném megköszönni Garda Zoltánnak a ligandum szintézisét és szakmai tanácsait, továbbá Nagy Viktóriának, Vágner Adriennek, Fodor Tamásnak, Krusper Lászlónak Sebestyén Annamáriának, Molnár Enikőnek és Garai Tamásnak munkám során nyújtott segítségüket.

Hálával tartozom családomnak, akik mindvégig támogattak és bíztattak célom elérése érdekében. Köszönöm szeretetüket, türelmüket és fáradtságos munkájukat, amivel lehetővé tették, hogy idáig eljussak.

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.

Vizsgálataimat az Országos Tudományos Kutatási Alapprogramok (OTKA K-84291 és K-109029 sz. pályázatok) szintén támogatta.