

Debreceni Egyetem
Természettudományi és Technológiai Kar
Szervetlen és Analitikai Tanszék

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

Diplomadolgozat

Készítette: Farkas Edit, II. évf. vegyész MSc hallgató
Témavezetők: Prof. Dr. Tóth Imre egyetemi tanár és
Dr. Kálmán Ferenc Krisztián tudományos munkatárs

Debrecen, 2014

Tartalomjegyzék

I. Bevezetés.....	2
II. Célkitűzés.....	3
III. Irodalmi áttekintés	5
III.1. Lantanoidák komplexképző sajátosságai	5
III.2. MRI kontrasztanyagok.....	7
III.3. T ₁ kontrasztanyagok	7
III.4. T ₂ kontrasztanyagok	8
III.5. A kontrasztanyag fejlesztés új irányai	8
IV. Alkalmazott vizsgálati módszerek.....	11
IV.1. pH-potenciometria	11
IV.2. Spektrofotometria	12
IV.3. Relaxometria.....	14
V. Eredmények és értelmezésük.....	15
V.1. Egyensúlyi vizsgálatok	15
V.2. Kinetikai vizsgálatok.....	20
VI. Kísérleti rész.....	24
VI.1. Egyensúlyi vizsgálatok	24
VI.2. Kinetikai vizsgálatok	25
VII. Összefoglalás	27
VIII. Summary.....	28
IX. Irodalomjegyzék.....	29
X. Köszönetnyilvánítás.....	32

I. Bevezetés

A 21. század orvosi diagnosztikája mára olyan fejlettségi szinten áll, hogy igen nagy biztonsággal képes 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 igen nehéz követni, hiszen ezeknek a molekuláknak és ionoknak a kvantitatív megfigyelése/követése, 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, ami elsősorban anatómiai információt tartalmaz. 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 poliamino-polikarbixilát 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 a Gd^{3+} -tartalmú kontrasztanyagok esetében a kontrasztnövelő hatás erősségének megváltozását kell hogy okozza, ami az MRI kép kontrasztosságának változását eredményezi.

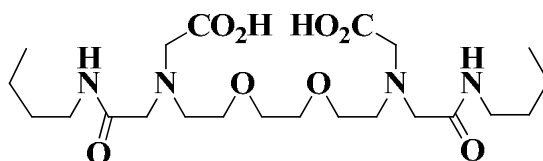
A Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszék Ritka(föld)fém kutatócsoportja már évtizedek óta foglalkozik Gd^{3+} és más fémionok komplexeinek vizsgálatával, feltérképezve azok koordinációs kémiai sajátosságait egyensúlyi, kinetikai, relaxációs és szerkezeti szempontból.

Munkám során ezekbe a kutatásokba kapcsolódtam be, és egy a Ca^{2+} -ionok koncentrációjának *in vivo* mérésére fejlesztett MRI kontrasztanyag modellvegyületének vizsgálatát végeztem el.

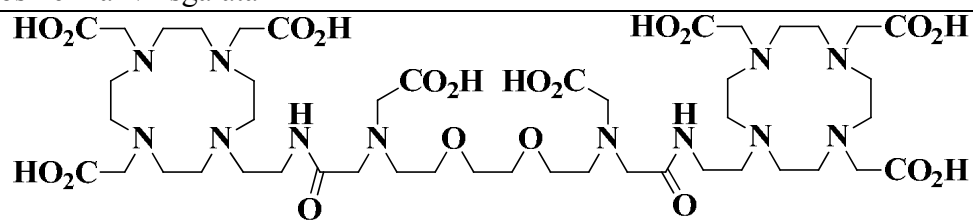
II. Célkitűzés

Az általam vizsgált ligandum egy újonnan szintetizált anyag, az EGTA (etilén-glikol tetraacetát) bisz-amid származéka, az etilén-glikol tetraacetát bisz-butiamid, EGTA-BBA (1. ábra). A ligandum egy modellvegyület, amely egy olyan EGTA alapú Ca^{2+} -szelektív MRI kontrasztanyagok alkotórésze, amit távlatilag *in vivo* alkalmazásra szánunk. Az általunk vizsgált Ca^{2+} -szelektív kontrasztanyag esetén a molekula két végén található DO3A egységhez kötődik nagy stabilitással a két paramágneses Gd^{3+} -ion, míg maga az 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 karboxilátcsoport amidcsoportra történő cseréje rontja a szelektivitást. Ezt tapasztalták pl. DTPA-BMA esetében.[1] Mivel az $\text{EG2A2M}^{\text{DO3A}}$ vegyület esetében a két kötőhely „fúziója” során valójában EGTA-bisz(amid) típusú vegyület köti a Ca^{2+} -iont, ezáltal az EGTA-BBA modellvegyülete az $\text{EG2A2M}^{\text{DO3A}}$ ligandum DO3A egységeket összekötő fragmensének (2. ábra). Kíváncsiak vagyunk arra, hogy a szelektivitás megmarad-e? Ilyen vegyületekre az irodalomban nem találhatók adatok. 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 EGTA anyaligandum adataival hasonlítottuk össze.[1,2]

A Ca^{2+} -ion szelektív kontrasztanyagokat a gyakorlatban úgy állítják elő, hogy többszörös feleslegben alkalmazzák a Gd^{3+} -iont a ligandumhoz képest, majd a komplexképződést követően a Gd^{3+} -ion feleslegét Chelex ® ioncserélő gyanta segítségével távolítják el, ami természetesen csak akkor lehetséges, ha a Gd^{3+} -ion EGTA fragmensével képződő komplexe gyorsan bomlik, azaz a kinetikai inertsége kicsi. Ebből az okból másodlagos célunk az EGTA-BBA ligandum Gd^{3+} -ionnal alkotott komplex kinetikai inertségének vizsgálata volt.



1. ábra Az etilén-glikol tetraacetát bisz-butilamid, EGTA-BBA ligandum szerkezete



2. ábra EG2A2M^{DO3A} ligandum szerkezete

III. Irodalmi áttekintés

III.1. Lantanoidák komplexképző sajátosságai

A „ritkaföldfémek”, vagy lantanoidák közé soroljuk 56-os rendszámú lantánt és az f mező 57-71 rendszámú elemeit a Ce-től a Lu-ig, valamint tágabb értelemben a szkandium csoportba tartozó Sc, és Y elemeket is. Az elnevezésük a lantánhoz való nagy hasonlósággal magyarázható, a név 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 $5s^25p^6$ 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 hard donorumokat részesítik előnybe,[4] valamint a kialakuló komplexeik stabilitása a donorum hard jellegének növekedésével nő. Az ionmérettől függően többnyire 8, ill. 9-es koordinációs számmal képeznek vegyületeket.[5]

A lantanoida(III)komplexelektronspektroszkópiai 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. 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)komplexelektronspektroszkópiájának 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 a mérhető UV tartományban találhatók. A lantanoida(III)-komplexelek (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 Ln^{3+} -ionok az Y^{3+} , a La^{3+} és a Lu^{3+} kivételével paramágnesesek, mágneses momentumuk a Nd^{3+} -nál és a Dy^{3+} , illetve a Ho^{3+} -nál maximumot mutat.[7]

A lantanoidák komplexeinek fontos adata a stabilitási állandó, amnek az értéke 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(transz-1,2-ciklohexiléndinitrilotetraecetsav) és az EDTA (etiléndiamintetraecetsav) ligandum komplexei.
- A másik esetben a komplexek stabilitási állandói a Sm-tól az 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.

A lantanoida(III)-komplexek kinetikai sajátosságaira jelentős hatással vannak a koordinálódó ligandumok tulajdonságai. A nyílt láncú, protonált több funkciós ligandumok esetében a komplex képződés gyors, pillanatszerű. A képződés sebességmeghatározó lépése a kelátgyűrű kialakulása vagy valamilyen protontranszfer folyamat lehet.[9] A makrociklusos ligandumokkal a komplexképződés sokkal lassabb. A ligandum donoratomjainak protoncsere-sebessége és a ligandum merevsége is befolyásolhatja a komplex képződést.

A kelátképző ligandumokkal kialakuló komplexek savkatalizált disszociációja általában lassú folyamat. Savkatalizált úton lejátszódott disszociáció mellett nyíltláncú ligandumok esetében szerepe lehet egy másik fémion (fémcsere), valamint egy másik ligandum (ligandumcsere) közvetlen támadásának is. A disszociációs reakciók sebessége vagy növekszik a H^+ -ion koncentráció első és második hatványával,[10,11] vagy telítési görbe jellegű is lehet.[12,13] A Ln(III)-komplexek ligandumcsere reakcióira általában savkatalizált disszociatív út jellemző. Abban az esetben, ha a központi fémion belső koordinációs szférája nem teljesen telített, a ligandum szubsztitúciós reakciók a kicserélő ligandum közvetlen támadásával, vegyes ligandumú köztitermék képződésén keresztül is lejátszódhatnak. [14]

A protonkatalizált disszociáció során a protonálódás az oldallánc donorcsoportján következik be, majd a proton a ligandum vázának egy nitrogén atomjára kerül, eközben pedig a fém kilép a koordinációs kalitkából. A fémcsere reakció esetében a támadó fémion kölcsönhatást alakít

ki a ligandum köponti fémionhoz nem koordinálódó csoportjaival kétmagvú köztiterméket képezve, majd a ligandum funkciós csoportjai fokozatosan átkerülnek a központi fémionról a kicserélő fémionra.[10,15]

III.2. MRI kontrasztanyagok

Mára az egyik legelterjedtebb orvosdiagnosztikai 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 T_1 és T_2 relaxációs ideje is különbözik, így a szövetek jelintenzitása is eltérő.[16] 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 csökken.[16] 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 (T_1 , T_2) szabja meg. A kapott jel intenzitása (SI) a következőképpen adható meg:[17]

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

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. Ez utóbbit a relaxivitás (r_1) jellemzi, ami a paramágneses anyag 1 mM-os oldata által eredményezett relaxációs sebesség ($1/T_1$) növekedés a diamágneses közeghez képest.[18] 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 ($\text{LD}_{50}=0,2-0,5$ mmol/kg),[19] 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,[20,21] majd ezt a kinetikailag inertebb $[\text{Gd}(\text{DOTA})]^{-}$ bevezetése követte.[22] Ezen két komplex után előállították töltés nélküli származékait is, mivel a töltéssel rendelkező kontrasztanyagok injekciója 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 $[\text{Gd}(\text{DO3A-B})]$).[23,24,25]

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 is. Ilyen kontrasztanyagok például a $[\text{Gd}(\text{EOB-DTPA})]^{2-}$ [26] és a $[\text{Gd}(\text{BOPTA})]^{2-}$ [27], melyeket a máj vizsgálatánál használnak, vagy a vérben található nagy fehérjéhez másodlagos kötés segítségével kötődő és adduktumot kialakító MS-325, mely angiográfiás vizsgálatokra alkalmas.[28]

III.4. T_2 kontrasztanyagok

A T_2 kontrasztanyagok között legjelentősebbek a szuperparamágneses vas-oxid mikrorészecskék, melyeket eredményesen használnak MRI mérések során [29,30,31]. Összegképletük: $\text{Fe}_2(\text{III})\text{O}_3\text{M}(\text{II})\text{O}$, ahol az $\text{M}(\text{II})$ lehet Fe^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} vagy Mg^{2+} . A szemcseméretük nagymértékben befolyásolja tulajdonságaikat.[31] A kisebb szemcseméretű vas-oxidok a vízprotonok longitudinális relaxáció sebességét növelik meg jelentősen, nagyobb szemcseméret esetén a vízprotonok transzverzális relaxáció sebessége csökkeni fog.[32]

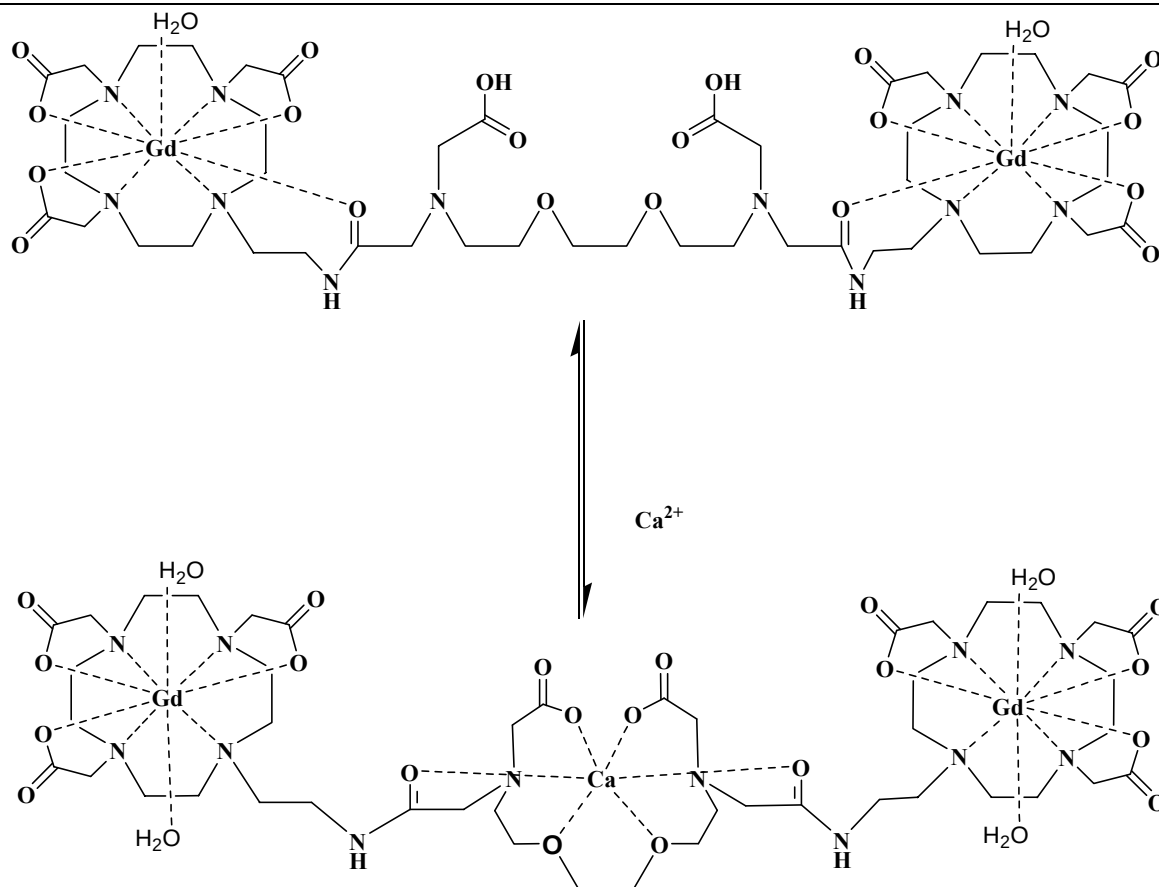
III.5. A kontrasztanyag fejlesztés új irányai

A napjainkban alkalmazott kontrasztanyagokban a Gd^{3+} -ionok koordinációs szférájában az összesen 9 koordinációs helyből 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 esetenként az összes vízmolekula kiszorul, így a relaxitás értékük lecsökken.

Napjainkban az MRI kontrasztanyagokkal szemben támasztott követelmények egyre nőnek, egyik ilyen pl. a szervspecifikusság. Emiatt egyre nagyobb figyelem irányul az olyan komplexek kifejlesztésére, amelyekkel csak egyetlen szerv, szervcsoport vagy egy adott típusú szövet vizsgálható.[33,34]

Nagy érdeklődés mutatkozik az ún. intelligens kontrasztanyagok iránt is, amelyek lehetőséget adnak a szövetek pH-jának, [35] hőmérsékletének,[36,37] vagy az oxigén parciális nyomásának mérésére.[38,39,40] Továbbá lehetőség van a szövetekben található enzimaktivitás [41] és a különböző fémionok (pl.: Ca^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+}) koncentrációjának meghatározására is.[42,43,44] A következő ábrán a célkitűzésben már említett $\text{EG2A2M}^{\text{DO3A}}$ -ligandum Gd(III)-komplexének szerkezetét mutatjuk be vázlatosan Ca^{2+} -ion jelenlétében és távollétében.



3. ábra: EG2A2M^{DO3A}-ligandum Gd(III)-komplexének vázlatos ábrázolása Ca^{2+} -ion jelenlétében és távollétében.

IV. Alkalmazott vizsgálati módszerek

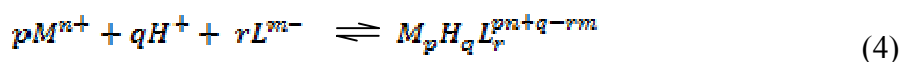
IV.1. pH-potenciometria

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. Az alkalmazhatóság feltétele, 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 egyszer protonált, kétszer protonált 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.[45]

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 mérhetőségét a koordinálódó fémion elektronspektroszkópai viselkedése fogja nagymértékben meghatározni, a fémionok elnyelése kisebb nagyobb mértékben megváltozik a komplexképződés hatására. Esetenként nemcsak a 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 $[Gd(EGTA-BBA)]^+$ -komplex kinetikai inertségének vizsgálata során, valamint a $[Cu(EGTA-BBA)]$ -komplex stabilitási állandójának meghatározásához használtam ezt a módszert.

A kinetikai inertség vizsgálatát pszeudo-elsőrendű feltételek mellett végezzük, ahol a kicserélő fémiont legalább tízszeres feleslegben alkalmazzuk a komplex koncentrációjához viszonyítva. A vizsgálatokat több különböző pH-n és több különböző fémion koncentráció mellett végezzük el. A különböző pH-n és fémion koncentrációk mellett felvett pontokból információt kapunk arról, hogy a H^+ -ion és a kicserélő fémion milyen és mekkora mértékű hatással van a komplexek disszociációjára. A vizsgált komplex disszociációs sebessége pszeudo-elsőrendű feltételek mellett a következőképpen adható meg:

$$-\frac{d[GdL]}{dt} = k_{obs}[GdL]_{tot} \quad (12)$$

ahol a k_{obs} a pszeudo-elsőrendű sebességi állandót jelöli, míg a $[GdL]_{tot}$ pedig a komplex teljes koncentrációját. A k_{obs} értékét a spektrofotometriás módszer esetén a t időpillanatban mért abszorbancia értékkel határozzuk meg:

$$A_t = (A_0 - A_e)e^{(-k_{obs}t)} + A_e \quad (13)$$

ahol A_t a t időpillanatban mért abszorbancia, A_0 a kezdeti A_e pedig az egyensúlyi abszorbanciát jelöli.

Ha a komplex képződése vagy disszociációja gyorsan, vagy akár pillanatszerűen játszódik le, vagyis egy konvencionális spektrofotométerrel nem tudjuk követni, akkor úgynevezett stopped-flow technikát (a „megállított áramlás” módszerét) kell alkalmaznunk. A módszer lényege, hogy a reaktánsok oldatait gyorsan, azonos időpillanatban a fényútban elhelyezett átfolyó küvetába fecskendezzük. A vizsgálat idejére az áramlást leállítjuk, és detektáljuk az abszorbancia változást.

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 esetében.

A relaxivitas csökkenését a komplexképződés során elsősorban 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 relaxációsebesség ($1/T_{\text{lobs}}$), a Gd(III)-komplex diamágneses ($1/T_{\text{ld}}$) és paramágneses ($1/T_{\text{lp}}$) hozzájárulásából tevődik össze (a diamágneses rész tartalmazza a tiszta vízben mért relaxációsebességet):

$$\frac{1}{T_{\text{lobs}}} = \frac{1}{T_{\text{ld}}} + \frac{1}{T_{\text{lp}}} = \frac{1}{T_{\text{ld}}} + r_1[\text{Gd}] \quad (14)$$

ahol, az r_1 a Gd(III)-komplex relaxivitása.[18] A paramágneses fémkomplexek relaxivitasát 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 ($r_{\text{lp}}^{2\text{nd}}$) vízprotonjai relaxációsebessége összegeként adják meg:[46]

$$r_{\text{lp}}^{\text{m}} = r_{\text{lp}}^{\text{is}} + r_{\text{lp}}^{\text{os}} + r_{\text{lp}}^{2\text{nd}} \quad (15)$$

V. Eredmények és értelmezésük

V.1. Egyensúlyi vizsgálatok

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
$\sum \log K_i^H$	19,34	22,57

A két ligandum protonálódási állandóit összehasonlítva egyértelmű, hogy az EGTA-BBA ligandum protonálódási állandói értékében 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 ($\sum \log K_i^H$), 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]

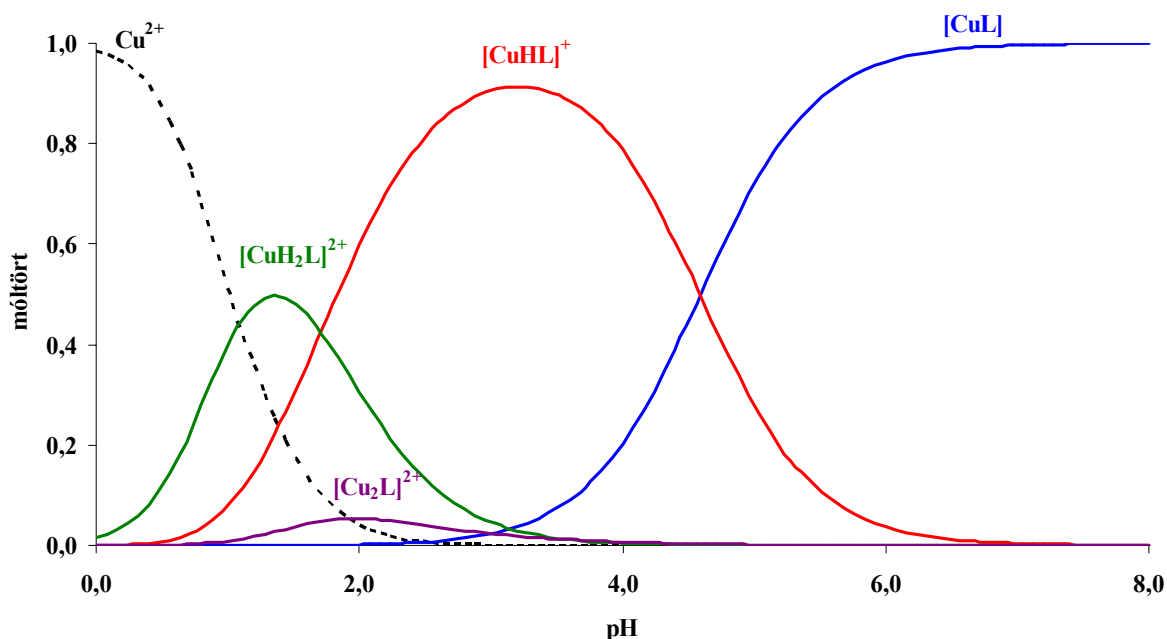
2. táblázat: Az EGTA-BBA és az EGTA ligandumok komplexeinek stabilitási és protonálódási állandói (25°C, 0,15 M NaCl)

	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 volt 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.

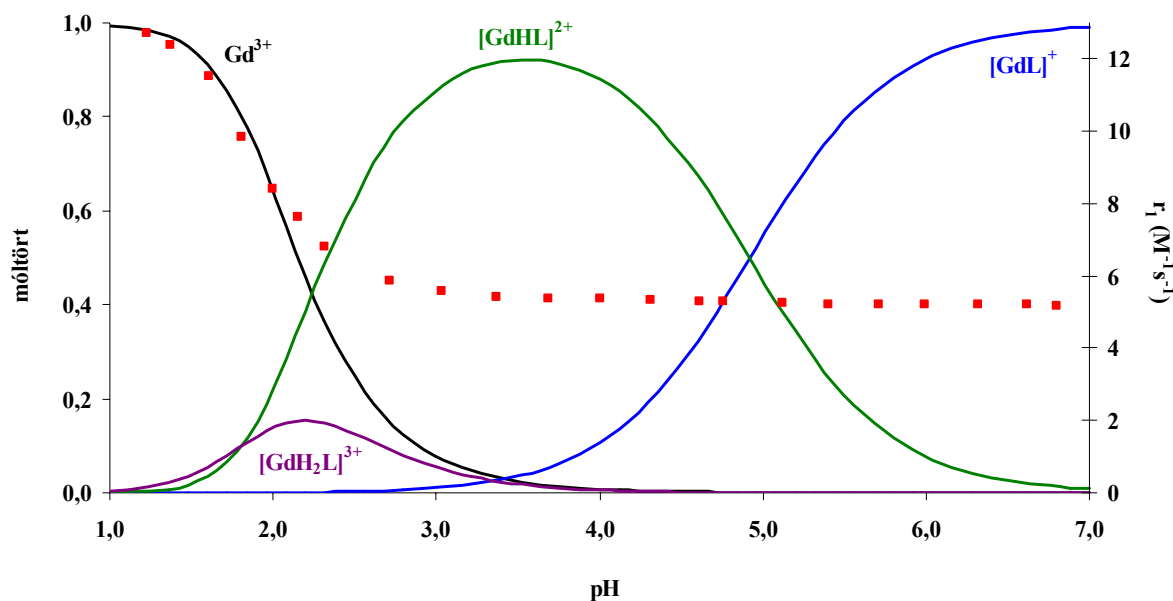
Megvizsgáltuk a Cu²⁺- és Zn²⁺-ionokkal kialakuló komplexek stabilitását is. Mind a két esetben sikerült egyszer és kétszer protonált, valamint kétmagvú komplexeket is kimutatni, ami egyáltalán nem meglepő figyelembe véve azt, hogy az EGTA-BBA hasonlóan az EGTA ligandumhoz 8 donoratómmal rendelkezik, 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 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 a kedvező.

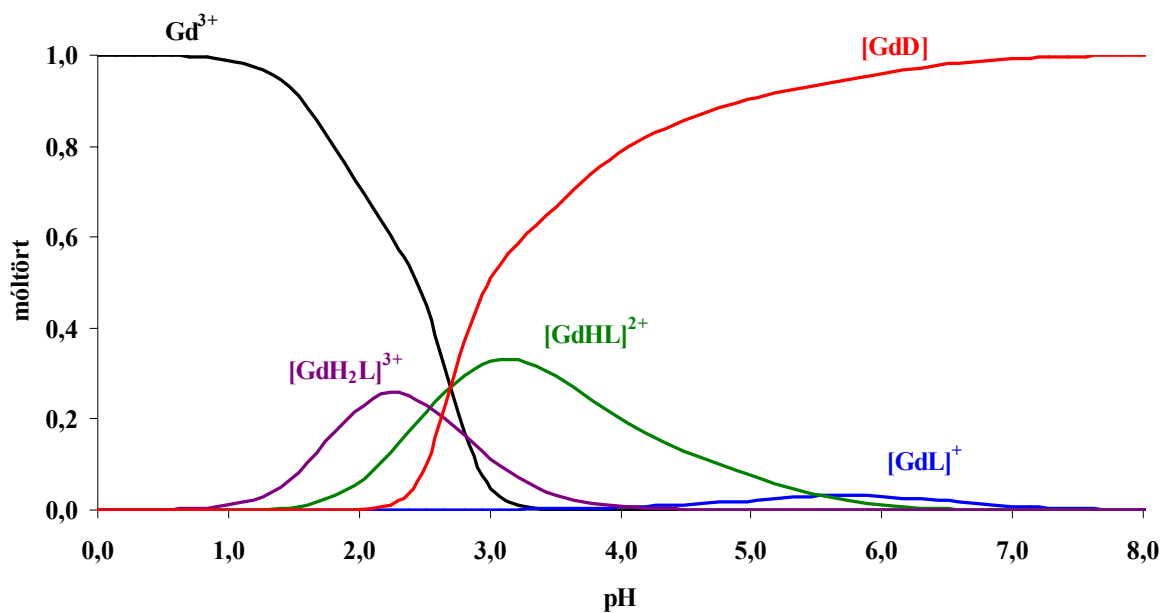
A $[\text{Gd}(\text{EGTA-BBA})]^+$ -komplex egyensúlyi modelljének igazolására megvizsgáltuk a Gd^{3+} -komplex relaxivitásának változását a pH függvényében, a vizsgálatokat 1,2 és 7 pH közötti tartományban végeztük el. A $[\text{Gd}(\text{EGTA-BBA})]^+$ -komplex relaxometriás titrálása igen érdekes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

$\text{EG2A2M}^{\text{DO3A}}$ ligandumban, amelynek modellvegyülete az EGTA-BBA, a fémion megkötődésére 3 lehetőség kínálkozik, a két DO3A egység, valamint az azokat összekötő ún. linker, ami esetünkben (a Ca-kötő helynek szánt) EGTA-BBA fragmens. A kontrasztanyag előállítása során, 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.[47]



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

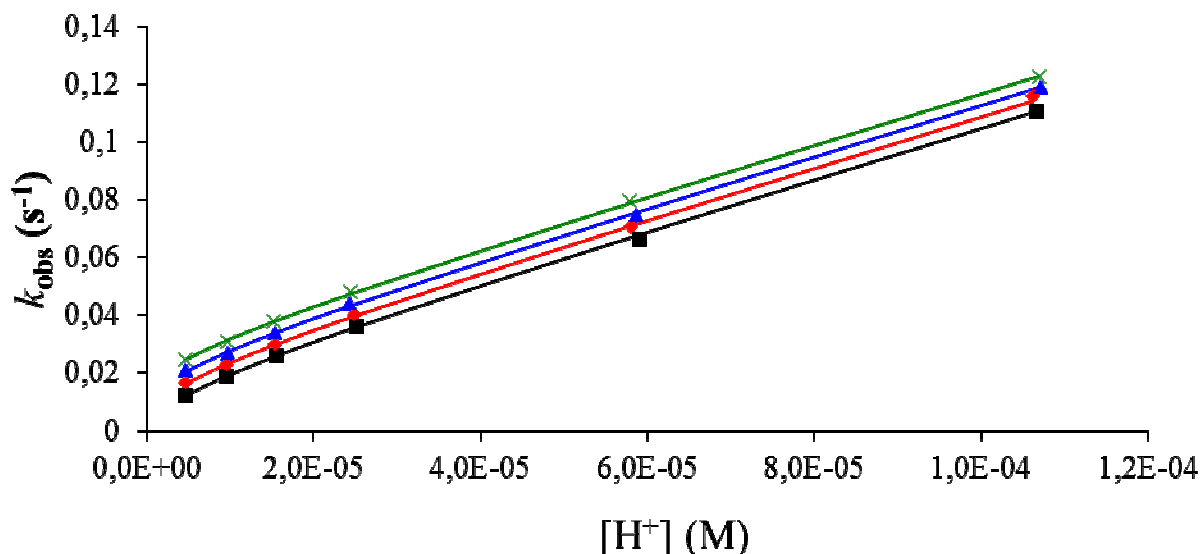
Az ábrán látható, hogy $\text{pH} \geq 5,5$ -nél az általunk kapott egyensúlyi adatok (és a $\text{Gd}^{3+}:\text{DO3A}:\text{H}^+$ rendszerre irodalomban publikált állandók)[47] alapján az összes Gd^{3+} -ion a DO3A fragmensekhez kötődik, így nem kell számolni fémion jelentős „vándorlásával” a $[\text{Gd}_2(\text{EG2A2M}^{\text{DO3A}})]^{2-}$ -komplexben.

V.2. Kinetikai vizsgálatok

A korábban már említettük, hogy az *in vivo* diagnosztikában alkalmazott, illetve alkalmazni kívánt Gd-komplexeknek számos kritériumnak kell megfelelniük. Az egyik ilyen fontos kritérium a komplexek nagy kinetikai inertsége, hiszen kerülendő, hogy a szervezetbe bejutatott komplex az ott jelenlévő endogén fémionokkal és ligandumokkal reakcióba lépjen. Esetünkben azonban a Ca-kötő helyen nem kedvező a nagy kinetikai inertség, hiszen a $[\text{Gd}_2(\text{EG2A2M}^{\text{DO3A}})]^{2-}$ -komplex előállítása során a két DO3A egységet összekötő linkerhez koordinálódó Gd^{3+} -iont ioncserés elválasztással távolítják el, ami csak akkor lehetséges, ha a fémion gyorsan disszociál az EGTA-bisz(amid) nyújtotta koordinációs környezetből. Ez azt jelenti, hogy a $[\text{Gd}(\text{EGTA-BBA})]^+$ -komplexnek kinetikai labilisnak kell lennie. (A Ca-megkötésnek is reverzibilisnek és gyorsnak kell persze lenni.) Ebből az okból kifolyólag vizsgáltuk a komplex kinetikai inertségét Cu^{2+} kicserélő fémion (fémioncsere reakciók) segítségével. A kicserélő fémion nagy feleslegét alkalmazva a reakció pszeudo-elsőrendűnek tekinthető és a kinetikai paraméterek könnyebben értelmezhetők. A vizsgálatokat 4,0 és 5,3 pH-tartományban végeztük. Az Cu^{2+} -ionnal lejátszódó cserereakciók olyan gyorsak voltak, hogy azokat csak stopped-flow technikával tudtuk követni. A kicserélődési reakciók egyenlete a következőképpen adható meg:

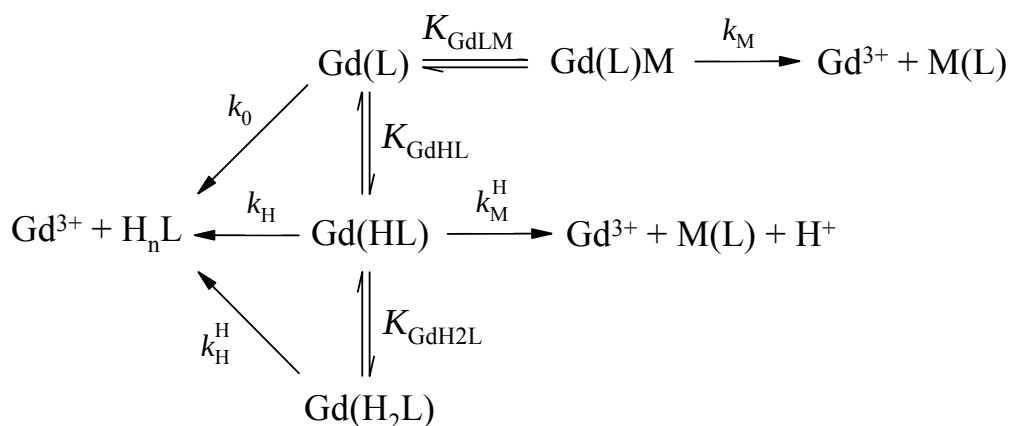


A vizsgálatokat a képződő végtermék $[\text{Cu}(\text{EGTA-BBA})]$ -komplex abszorpciós sávján 300 nm-es spektrofotometriásan követtük. A kicserélődési és a disszociációs reakciók a már előzőekben tárgyalt (12)-es egyenlettel írhatóak le. Az egyes pH-értékeknél és fémion koncentrációnál kapott k_{obs} pszeudo-elsőrendű sebességi állandókat a 7. ábrán mutatom be.



3. ábra: A $[\text{Gd}(\text{EGTA-BBA})]^+$ -komplex disszociációjának k_{obs} értékei a H^+ -koncentráció függvényében. Az alkalmazott Cu^{2+} -ion fölösleg letről fölfelé haladva 10, 20, 30 és 40-szeres (25 °C, 0,15 M NaCl).

Az 7. ábrán jól látszik, hogy a reakció sebessége nő mind a H^+ -ion, mind a Cu^{2+} -ion koncentrációjának növekedésével. Ez a viselkedés azt jelenti, hogy a komplex disszociációja bekövetkezhet annak protonálódását követően, valamint lehetőség van a kicserélő fémion közvetlen támadására is, amikor a disszociáció egy kétmagvú köztitermék kialakulásán keresztül játszódik le. Ezen reakció utak mellett lehetőség van még a komplex spontán disszociációjára is, valamint a kicserélő fémion támadhatja a protonált komplexet is. Ezeket a reakcióutakat mutatjuk be az alábbi általános, a Gd^{3+} -komplexek disszociációját jellemző sémán.



4. ábra: Lehetséges reakció utak a Gd(III)-komplexek disszociációjában.

A k_0 , k_{GdHL} , $k_{\text{GdHL}}^{\text{H}}$, k_{GdLM} és $k_{\text{GdLM}}^{\text{H}}$ sebességi állandók a komplex spontán, proton-katalizált, fém-katalizált és proton-fém-katalizált (amikor a kicserélő fémion a protonált komplexen támad) reakcióutak sebességi állandóit, a K_{GdHL} , $K_{\text{GdH}_2\text{L}}$ és K_{GdLM} pedig a protonált és kétmagvú közttermék komplexek protonálódási és stabilitási állandóit jelölik.

Figyelembe véve az egyes reakcióutakat és a képződő közttermékek stabilitási állandóit, a pszeudo-elsőrendű sebességi állandó a következőképpen adható meg:

$$k_d = \frac{k_0 + k_1[\text{H}^+] + k_2[\text{H}^+]^2 + k_3[\text{M}^{n+}] + k_4[\text{M}][\text{H}^+]}{1 + K_{\text{GdHL}}[\text{H}^+] + K_{\text{GdHL}}K_{\text{GdH}_2\text{L}}[\text{H}^+]^2 + K_{\text{GdLM}}[\text{M}]} \quad (17)$$

, ahol $k_1 = k_{\text{H}} \cdot K_{\text{GdHL}}$, $k_2 = k_{\text{H}}^{\text{H}} \cdot K_{\text{GdHL}} \cdot K_{\text{GdH}_2\text{L}}$, $k_3 = k_{\text{M}} \cdot K_{\text{GdLM}}$, $k_4 = k_{\text{M}}^{\text{H}} \cdot K_{\text{GdHL}}$,
 $K_{\text{GdHL}} = [\text{Gd}(\text{HL})]/[\text{Gd}(\text{L})][\text{H}^+]$, $K_{\text{GdH}_2\text{L}} = [\text{Gd}(\text{H}_2\text{L})]/[\text{Gd}(\text{HL})][\text{H}^+]$, és
 $K_{\text{GdLM}} = [\text{Gd}(\text{L})\text{M}]/[\text{Gd}(\text{L})][\text{M}]$.

A kapott k_{obs} pszeudo-elsőrendű sebességi állandókat a (17)-es egyenletre illesztve a 3. táblázatban bemutatott eredményeket kaptam. A k_0 sebességi állandót, valamint a kétszer protonált és a kétmagvú közttermékek egyensúlyi állandóit nem tudtuk számítani, míg a $\log K_{\text{GdHL}}$ protonálódási állandót rögzítettük az egyensúlyi mérések alapján.

3. táblázat: A $[\text{Gd}(\text{EGTA-BBA})]^+$ -komplex disszociációs reakcióit jellemző sebességi állandók (0,15M NaCl)

	$[\text{Gd}(\text{EGTA-BBA})]^+$	$[\text{Gd}(\text{EGTA})]^{-\text{a}}$
$k_1 \text{ (mM}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$	$(2,1 \pm 0,04) \times 10^3$	60
$k_2 \text{ (mM}^{-2}\text{s}^{-1}\text{)}$	$(7,3 \pm 0,1) \times 10^7$	$2,2 \times 10^6$
$k_3 \text{ (mM}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$	$2,14 \pm 0,06$	4,7
$k_4 \text{ (mM}^{-2}\text{s}^{-1}\text{)}$	$(1,6 \pm 0,1) \times 10^5$	$2,2 \times 10^4$
$K_{\text{H}} \text{ (mM}^{-1}\text{)}$	83000 (pH-pot.)	100 (pH-pot.)

^a [1] 0,10 M KCl

A sebességi állandók alapján megállapítható, hogy a $[\text{Gd}(\text{EGTA-BBA})]^+$ -komplex lényegesen gyorsabban disszociál, mint a $[\text{Gd}(\text{EGTA})]^{-}$ -komplex, ami a gyengébb koordinációnak, a kialakuló komplex flexibilisebb szerkezetének köszönhető. A komplexek

kinetikai inertségének összehasonlítása egyszerűbb disszociációjuk felezési idejének ($t_{1/2}$) segítségével. A két komplex felezési idejét pH=6-os értékre a savkatalizált disszociációjukat jellemző sebességi állandók felhasználásával számoltuk ki. Ennek (csak a savkatalizált disszociációra jellemző sebességi állandók alkalmazásának a felezési idő számolásakor) elsősorban az a magyarázata, hogy az ioncserés tisztítás során ezek a disszociációs utak azok, amelyekkel számolni kell (hiszen fémion feleslegétől szabadulunk meg). Az így kiszámolt felezési idők értékei 5,8 és 185,7 percnak adódtak a $[\text{Gd}(\text{EGTA-BBA})]^+$ és $[\text{Gd}(\text{EGTA})]^-$ komplexre, amiből látszik, hogy az EGTA-BBA ligandum több mint 1 nagyságrenddel kisebb kinetikai inertséggel bíró komplexet képez a Gd^{3+} -ionnal. Az eredmény azt is jól mutatja, hogy az ioncserés elválasztás során lehetőség van a linkerhez kötött Gd^{3+} -ion eltávolítására az adott komplex gyors disszociációja miatt.

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.

VI.1. Egyensúlyi vizsgálatok

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, termosztálás (25±0,2 °C) és mechanikus kevertetés mellett végeztük. A 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, az elkarbonátosodás elkerülése érdekében N₂-gázt buborékolattunk 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[48] 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. Így a kapott állandók un. sztöchiometriai állandók.

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 két, 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 ellenőriztük Gd^{3+} -ionnal való titrálással, relaxometriás végpontjelzéssel is (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 $\log K_i^H$ 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 V(cm³)-pH adatpárból történt.

A $[\text{Cu}(\text{EGTA-BBA})]$ -komplex stabilitási állandóját pH<2 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.[45]

A Gd(III)-komplex relaxivitás értékeinek (r_{1p}) pH függését 20 MHz-en 25°C-on vizsgáltuk egy *Bruker minispec MQ20 NMR* relaxométerrel, *inversion recovery* impulzus szekvenciával (180°- τ -90°). 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.

VI.2. Kinetikai vizsgálatok

A Gd(III)-komplex fémcsere reakciójának sebességét Cu^{2+} kicserélő fémion alkalmazásával stopped-flow technikával vizsgáltuk, a készülék típusa Applied Photophysics DX-17MX, az elemzéshez pedig az Applied Photophysics programot használtuk. A reakciókat 10-40-szeres kicserélő fémion feleslege mellett, 300 nm-es hullámhosszon, 0,2 mM komplex koncentráció alkalmazásával végeztük. A mintákat N-metil-piperazinnal (50 mM) puffereltük, pH értékeit tömény HCl és szilárd NaOH segítségével állítottuk be, majd a

reakciók végén ismét megmértük az oldatok pH-ját. A kinetikai vizsgálatokat 4,0-5,3 pH tartományban végeztük, ahol a Cu^{2+} -ion hidrolízisével még nem kell számolni.

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 kétszer protonált és kétmagvú részecskék képződését is sikerült kimutatni.

A $[\text{Gd}(\text{EGTA-BBA})]^+$ -komplexre kapott egyensúlyi adatok felhasználásával modell számításokat végeztünk annak kiderítésére, hogy a $[\text{Gd}_2(\text{EG2A2M}^{\text{DO3A}})]^{2-}$ -komplexben van-e lehetőség a Gd^{3+} -ion EGTA-BBA-hoz való „átvándorlására”. Megállapítottuk, hogy pH=7,4-en a Gd^{3+} -ionok 100%-ban a makrociklusos DO3A fragmensekhez kötődnek.

Érdekes eredményre jutottunk 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, azaz a $[\text{Gd}(\text{HEGTA-BBA})]^{2+}$ -komplex képződése során a protonálódás olyan donoratomon játszódik le, amelyik nem koordinálódik a Gd^{3+} -ionhoz.

A $[\text{Gd}(\text{EGTA-BBA})]^+$ fémioncsere reakcióinak vizsgálata alapján a komplex kinetikai inertsége több mint egy nagyságrenddel kisebb, mint azt a $[\text{Gd}(\text{EGTA})]$ -komplex esetében tapasztalták. Ez a látszólag kedvezőtlen eredmény valójában biztató a mi szempontunkból, hiszen a $[\text{Gd}_2(\text{EG2A2M}^{\text{DO3A}})]^{2-}$ -komplex Gd^{3+} -ion feleslegben történő előállítását követő ioncserés tisztítás folyamat során a Gd^{3+} -ion gyors disszociációja az EGTA-BBA fragmensből elengedhetetlen.

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+}). Inertness of the $[\text{Gd}(\text{EGTA-BBA})]^+$ was also studied.

Comparison of the protonation constants of EGTA-BBA with those of EGTA showed that the former ligand were lower values, which was a direct consequence of the substitution of two acetate groups by amide pendants. The lower protonation constants caused 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. The stability constant of $[\text{Mg}(\text{EGTA-BBA})]$ could not be determined, which might be attributed to the absence of Mg^{2+} -complex formation. This was a marked difference compared to EGTA and may be highly useful in future for *in vivo* use, as it raised 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.

Model calculations for $[\text{Gd}(\text{EGTA-BBA})]^+$ were done to determine whether the two Gd^{3+} ions bound to the DO3A units in $[\text{Gd}_2(\text{EG2A2M}^{\text{DO3A}})]^{2-}$ could be rearranged (e.g. via dissociation) to the EGTA-BBA fragment. It was shown that the Gd^{3+} -ions were 100% bound to the DO3A fragments at $\text{pH} = 7.4$.

The pH-dependent relaxometric study of the $[\text{Gd}(\text{EGTA-BBA})]^+$ complex indicated that the protonation of the complex (formation of $[\text{Gd}(\text{HEGTA-BBA})]^{2+}$) occurred at a donor group that was not coordinated to Gd^{3+} ion.

The metal exchange reactions of the $[\text{Gd}(\text{EGTA-BBA})]^+$ showed that it was less inert than the $[\text{Gd}(\text{EGTA})]^-$ as the rate constants characterizing the acid and metal ion assisted dissociation were more than one order of magnitude larger for the given complex. The lowered inertness is an advantage as the quick dissociation of Gd^{3+} from the EGTA-BBA fragment in the $[\text{Gd}_2(\text{EG2A2M}^{\text{DO3A}})]^{2-}$ is necessary for the ion-exchange technique be employed in the purification procedure of the complex.

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] Nyssen, G. A.; Margerum, D.W., *Inorg.Chem.*, **1970**, 9, 1814
- [10] Brücher, E.; Laurency, G., *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **1981**, 43, 2089.
- [11] Brücher, E.; Sherry, A. D., *Inorg. Chem.*, **1990**, 29, 1555.
- [12] Tóth, É.; Brücher, E.; Lázár, I.; Tóth, I., *Inorg Chem.*, **1994**, 33, 3724
- [13] Kumar, K.; Jin, T.; Wang, X.; Desreux, J. F.; Tweedle, M. F., *Inorg. Chem.*, **1994**, 33, 3823
- [14] Brücher, E.; Bányai, I., *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 1980, 42, 749.
- [15] Smith, G. F.; Margerum, D. W., *Inorg. Chem.*, **1969**, 8, 135.
- [16] 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**
- [17] Bünzli, J.-C. G.; Choppin, G. R., eds., *Lanthanide Probes in Life, Chemical and Earth Sciences: Theory and Practice*. Elsevier, Amsterdam, **1989**.
- [18] 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**.
- [19] Lauffer, R. B.: *Chem. Rev.*, **1987**, 87, 901.

- [20] Weinmann, H. J.; Brasch, R. C.; Press, W. R.; Webey, G. E., *Am. J. Roentgenol*, **1984**, 142, 619.
- [21] Gries, H.; Miklautz, H., *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR*, **1984**, 16, 105.
- [22] Desreux, J.; Barthélemy, P. P., *Nucl. Med Biol.*, **1988**, 15, 9.
- [23] Shikata, F.; Tokumitsu, H.; Ichikawa, H.; Fukumori, Y., *Eur. J. Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **2002**, 53, 57.
- [24] Rizkalla, E. N.; Choppin, G. R.; Cacheris, W. P., *Inorg. Chem.*, **1993**, 32, 582.
- [25] Kumar, K.; Chang, C. A.; Tweedle, M. F., *Inorg. Chem.*, **1993**, 32, 587.
- [26] 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.
- [27] 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.
- [28] Caravan, P.; Comuzzi, C.; Crooks, W.; McMurry, T. J.; Choppin, G. R.; Woulfe, S. R. *Inorg. Chem.* 2001, 40, 2170–6.
- [29] Bach-Gensamo, T., *Acta Radiol.*, **1993**, 387, 1.
- [30] Reimer, P.; Tombach, B., *Eur. Radiol.*, **1998**, 8, 1198.
- [31] Grubnic, S.; Padhani, A. R.; Revell, P. B.; Husband, J. E., *Am. J. Roentgenol.*, **1999**, 173, 173.
- [32] Wang, Y. X.; Hussain, S. M.; Krestin, G. P., *Eur. Radiol.*, **2001**, 11, 2319
- [33] Caravan, P.; Ellison, J. J.; McMurry, T. J.; Lauffer, R. B., *Chem. Rev.* **1999**, 99, 2293
- [34] Curbet, C.; Maton, F.; Havet, T.; Slinkin, M.; Mishra, A.; Chatel, J. F.; Muller, R. N., *Invest. Radiol.*, **1998**, 33, 752.
- [35] Hall, J.; Häner, R.; Aime, S.; Botta, M.; Faulkner, S.; Parker, D.; de Sausa, A. S., *New J. Chem.*, **1998**, 6, 627
- [36] Aime, S.; Botta, M.; Fasano, M.; Terreno, E.; Kinches, P.; Calabi, L.; Paleari, L., *Magn. Reson. Med.*, **1996**, 35, 648
- [37] Fossheim, S. L.; Il'yasov, K. A.; Hennig, J.; Bjornerud, A., *Acta Radiol.*, **2000**, 7, 1107
- [38] Aime, S.; Botta, M.; Gianolio, E.; Terreno, E., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, 39, 747
- [39] Aime, S.; Ascenzi, P.; Comoglio, E.; Fasano, M.; Paoletti, S., *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 9365.
- [40] Burai, L.; Tóth, É.; Seibig, S.; Merbach, A. E., *Chem. Eur. J.*, **2000**, 6, 3761
- [41] Rudin, M., *Nat. Biotechnol.*, **2000**, 18, 383
- [42] Li, W.; Fraser, S. E.; Meade, T. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 1413

- [43] Emily L. Quea and Christopher J. Chang *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, 39, 54–58
- [44] 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
- [45] Zékány, L.; Nagypál, I., in Computational Methods for Determination of Formation Constants, ed. D. J. Legett, Plenum Press, New York, 1985, p.291.
- [46] 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.
- [47] 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
- [48] Irving, H. M., Miles, M. G., Pettit, L., *Anal.Chim.Acta*, **1967**, 28, 475

X. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezni ki témavezetőimnek, Prof. Dr. Tóth Imrének és Dr. Kálmán Ferenc Krisztiánnak, akik szakmai irányításával, türelmével és segítségével elősegítette szakmai előmeneteletemet.

Köszönettel tartozom 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 fáradságos 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.