



**Pb(II) és Cd(II) nehézfémionok kölcsönhatása
hidroxámsavakkal**

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Bátka Dávid

Témavezető: Prof. Dr. Farkas Etelka

Debreceni Egyetem
Természettudományi Doktori Tanács
Kémia Doktori Iskola
Debrecen, 2007

1 BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉSEK

A Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékén már közel két évtizede foglalkoznak a hidroxámsavakkal, amelyek jelentősége közismerten a jó komplexképző tulajdonságukon alapul. A mikroorganizmusok által termelt hidroxámsav alapú sziderofórok az alacsonyabb rendű élőlényekben a Fe(III)-ion felvételében, tárolásában, szállításában játszanak szerepet. A sziderofórok egyik képviselőjét, a deszferrioxamin B-t (DFB) régóta használják a Desferal gyógyszer hatóanyagaként Fe(III) felesleg és Al(III) szervezetből történő kivonására. A hidroxámsavak sziderofórbeli biológiai szerepe mellett számos élettani hatásuk (pl. antitumor, antibiotikus) ismert. Az utóbbi években kiterjedten tanulmányozzák az aminosavak hidroxámsav származékainak, az aminohidroxámsavaknak a metalloenzim-inhibíciós képességét, ahol az enzim aktív centrumában lévő fémionjához koordinálódva képesek a szubsztrát molekula kötődését meggátolni, ezáltal az enzim működését blokkolni.

Számos hidroxámsav Fe(III)-ionnal és több egyéb fémionnal alkotott rendszerei mára már sok szempontból felderítettnek mondhatóak. A toxikus hatású Cd(II) és Pb(II) nehézfémionok hidroxámsavakkal alkotott rendszereiről azonban mindmáig csak kisszámú irodalmi közlemény született. Mivel ezen nehézfémionok nagy mennyiségben kerülnek felhasználásra, amely során a környezetbe jutva, onnan potenciálisan a szervezetbe kerülve időben elhúzódó, széles spektrumú mérgezést okoznak, ezért nagy jelentőségű, hogy legyen ismert módszer a szervezetből való kivonásukra, amelyekre a legelterjedtebb módszerek kelátképzésen alapulnak.

A rendelkezésre álló kis számú közlemény miatt célunk volt a Cd(II)- és az Pb(II)-ion valamint a hidroxámsavak közötti kölcsönhatás alapvető jellemzőinek felderítése, mely során tanulmányoztuk a hidroxámsavcsoporthoz ($R_C\text{COR}_N\text{NOH}$) kapcsolódó szubsztituensek (R_C , R_N) kelát-stabilitásra gyakorolt hatását.

Ismert, hogy amennyiben a ligandum kettő vagy három hidroxámsavcsoportot tartalmaz, az azokat összekötő lánc szerkezete befolyásolja a képződő komplexek stabilitását és szerkezetét. A „lánc-hatás” feltérképezése céljából vizsgáltunk két természetes trihidroxámsavat, a DFB-t és a DFC-t, valamint a DFB modell-dihidroxámsavait.

Vizsgálatainkba olyan ligandumokat is bevontunk, melyek a hidroxámsavcsoporton kívül csak egy amino-N donort tartalmaztak, α -, β -, esetleg γ -helyzetben, de olyanokat is, melyekben még további, u.n. oldalláncbeli donor volt megtalálható (aminohidroxámsavak). A munka során három olyan hidroxámsavszármazékot szintetizáltunk, melyekben α -, illetve β -helyzetben nem aminocsoport, hanem imidazol-gyűrű szerepelt (imidazolhidroxámsavak). Korábbi tanszéki eredmények alapján ismertté vált, hogy a Cd(II)- α -alaninhidroxámsav kölcsönhatás alapvetően gyenge; kis stabilitású hidroxamát típusú komplexek képződését találták. Ezért a vizsgálataink azokkal a ligandumokkal, melyek több, eltérő donorcsoportot is tartalmaznak, (aminohidroxámsavak és imidazolhidroxámsavak) csak az Pb(II)-ionnal való kölcsönhatás felderítésére szorítkoztak.

2 ALKALMAZOTT VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

pH-potenciometria: Alapvető vizsgálati módszerünk révén minden rendszerre elvégeztük ezen méréseket, amelyek magukban foglalták a ligandumok protonálódási és a képződő fémkomplexek stabilitási állandóinak meghatározását is ($T = 278 \text{ K}$, $I = 0,2 \text{ M KNO}_3$). Az adatok elemzéséhez a PSEQUAD és a SUPERQUAD számítógépes programokat használtunk.

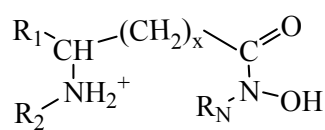
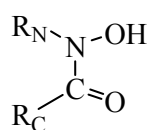
$^1\text{H-NMR}$ spektroszkópia: Az NMR szerkezetvizsgáló módszert felhasználtuk a ligandumok tisztaságának ellenőrzésére, azok protonálódási folyamatainak feltérképezéséhez, továbbá az Pb(II)-hidroxamát rendszerekben képződő komplexek összetételének és szerkezetének alaposabb megértéséhez is a pH-potenciometriánál megadott körülmények között D_2O oldószerben.



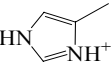
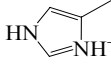
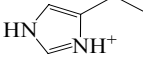
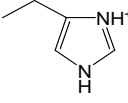
Tömegspektrometria (ESI-MS): A kismértékű fragmentáció miatt a komplexekhez direkt jelek rendelhetőek, amelyek a megfelelő töltés/tömeg arány (m/z arány) és a jellemző izotópeloszlás alapján beazonosíthatóak, ezért az ESI-MS spektrometriát a képződő komplexek sztöchiometriájának megállapítására használtuk több esetben a Cd(II)- illetve az Pb(II)-di-, amino- és imidazolhidroxámsav rendszerekben.

A jelen doktori munka keretein belül vizsgált ligandumok egy részét a Sigma-tól vagy a CIBA-GEIGY-től szereztük be, a kereskedelemben nem hozzáférhető ligandumok a Debreceni Egyetemen, vagy együttműködések keretén belül kerültek előállításra.

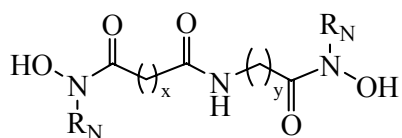
A ligandumok protonált formáinak képlete alább, csoportosításuk szerint különválasztva látható.

Monohidroxámsavak:

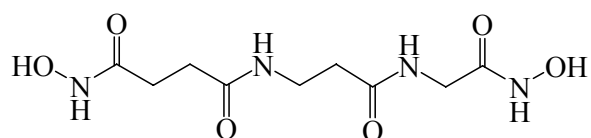


R_N	R_C	rövidítés	R_1	R_2	x	R_N	rövidítés
Egyszerű monohidroxámsavak			aminohidroxámsavak				
-H	-CH ₃	Aha	-CH ₃	-H	0	-H	α -Alaha
-H		Bha	-CH ₃	-H	0	-CH ₃	N-Me- α -Alaha
-CH ₃	-CH ₃	N-Me-Aha	-H	-H	1	-H	β -Alaha
	-CH ₃	N-Ph-Aha	-H	-H	1	-CH ₃	N-Me- β -Alaha
Imidazolhidroxámsavak			-H	-CH ₃	0	-H	Sarha
-H		Im-4-Cha	-COOH	-H	1	-H	Asp- β -ha
-CH ₃		N-Me-Im-4-Cha	-COOH	-H	2	-H	Glu- γ -ha
-H		Im-4-Aha		-H	0	-H	Hisha

Dihidroxámsavak:



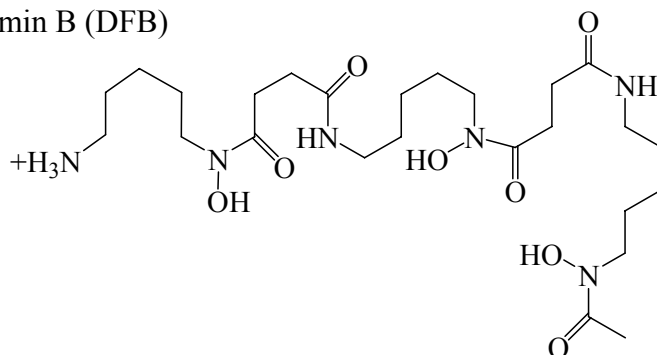
x	y	R _N	név
2	5	-CH ₃	2,5-DIHA
3	4	-CH ₃	3,4-DIHA
2	4	-CH ₃	2,4-DIHA
3	3	-CH ₃	3,3-DIHA
2	3	-CH ₃	2,3-DIHA
2	2	-CH ₃	2,2-DIHA
2	5	-H	2,5- <i>H,H</i> -DIHA
2	2	-H	2,2- <i>H,H</i> -DIHA



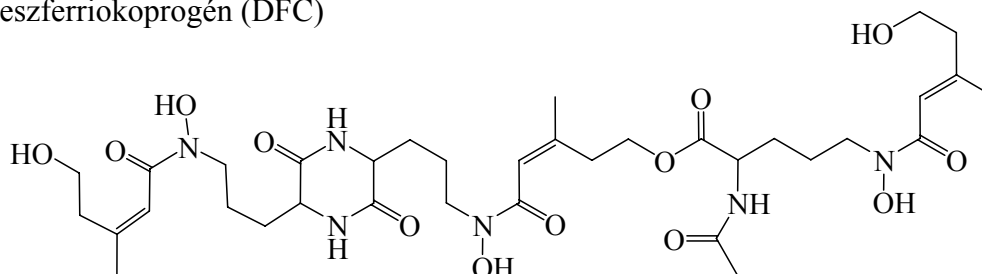
2,2,1-*H,H*-DIHA

Trihidroxámsavak:

Deszferrioxamin B (DFB)



Deszferriokoprogén (DFC)



3 ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

A doktori munka keretén belül méréseket végeztünk 26 ligandum Pb(II)-, 15 Cd(II)-ionnal alkotott egyensúlyi rendszerével (a Tanszéken korábban a Cd(II)- α -Alaha-ban csupán gyenge, hidroxamát típusú koordinációt találtak, ezért a Cd(II)-amino- és imidazolhidroxámsav rendszerek elemzésétől eltekintettünk). Méréseink során meghatároztuk a ligandumok protonálódási állandóit, a fémes rendszerekben képződő komplexek stabilitási szorzatait. A komplexekhez rendelhető szerkezetekre, a bennük található kötésmódokra $^1\text{H-NMR}$ és ESI-MS mérésekkel gyűjtöttünk információkat. Meghatároztuk kísérleti körülményeink között az Pb(II)-ion hidrolízis állandóit. Módszert dolgoztunk ki három ligandum előállítására, további három esetben volt szükség reproduktív szintézisre. Kísérletet tettünk $^{113}\text{Cd-NMR}$ és $^{207}\text{Pb-NMR}$ módszerek alkalmazására a komplexek kötésmódjának megállapítására.

3.1 Sav-bázis sajátosságok

- Meghatároztuk a ligandumok protonálódási állandóit 0,2 M KNO_3 ionerősség mellett, amelyek minden korábban már vizsgált ligandum esetében jó egyezést mutatnak a 0,2 M KCl mellett mértekkel. Az újként előállított ligandumok (Im-4-Aha, *N*-Me- β -Alaha és 2,2,1-*H,H*-DIHA) állandóit ugyancsak meghatároztuk és ezeket a többi ligandum állandóinak trendjébe illeszkedőnek találtuk. Nevezetesen: (1) Az Im-4-Aha imidazol-N-je bázikusabb, mint az ezen donort a hidroxámsavcsoporthoz viszonyítva egy kötéssel közelebb (α -helyzetben) tartalmazó Im-4-Cha-beli, viszont határozottan kevésbé bázikus, mint a szabad imidazol azonos nitrogénje. Így itt is megvalósul a hidroxamát és az imidazol-N protonálódási folyamatai pH-tartományának elkülönülése. (2) Az *N*-Me- β -Alaha állandóit a β -Alaha, *N*-Me- α -Alaha és az α -Alaha értékeivel összevetve elemeztük. Megállapítottuk, hogy a β -Alaha-ban is már meglévő kisebb hidroxamát bázicitás a metilcsoport ($\text{R}_\text{N} = -\text{H} \rightarrow -\text{CH}_3$) bekerülésével tovább csökken és ílymódon az *N*-Me- β -Alaha-ban az aminocsoport már lényegében elkülönült folyamatban protonálódik. (3) A dihidroxámsavak (DIHA) közül a 2,2,1-*H,H*-DIHA protonálódási állandói is

megfelelnek a más DIHA-kal mért korábbi vizsgálatok eredményeinek, amelyek gyenge, téren-át ható kölcsönhatást feltételeznek a funkciós csoportok között.

3.2 Cd(II)-, Pb(II)- egyszerű monohidroxámsav rendszerek

- A vizsgált fém-monohidroxamát rendszereket elemezve megállapítottuk, hogy mindkét fémion a vizsgálati körülményeink között csak két hidroxamát-kelátot képez, továbbá, hogy a Cd(II) közel két nagyságrenddel kisebb stabilitású hidroxamát-kelátot képez, mint az Pb(II)-ion. A négy egyszerű monohidroxámsavval vizsgált R_N illetve R_C szubsztituensek hatása mindkét fémionnal csekély mértékűnek adódott.

3.3 Cd(II)-, Pb(II)-DFB modell-dihidroxámsav rendszerek

- E ligandumcsoportban alapmolekulának a 2,5-DIHA tekinthető, melyben a két kelátképző csoportot a DFB-beli láncokkal pontosan azonos szerkezetű lánc köti össze. A további dihidroxámsavakban az alapmolekulához képest vagy a peptidcsoport láncbeli helye eltérő, vagy a lánc nem egy, hanem két peptidcsoportot tartalmaz, vagy egyre rövidebb a két funkciós csoportot összekötő lánc, illetőleg két esetben az $R_N = -H \rightarrow -CH_3$ -ra történő cseréjének hatását ugyancsak vizsgáltuk. A kapott eredmények alapján elmondható, hogy a 2,5-DIHA képezi a legstabilisabb komplexeket a Cd(II)-ionnal, az Pb(II)-ionnal viszont a 2,2-*H,H*-DIHA. Ez az eredmény az Pb(II) nemkötő elektronpárjának a nagy térigényével magyarázható, amely a koordinációra szabadon maradt helyeket olyan mértékben összezsúfolja, hogy azokhoz a 2,2-*H,H*-DIHA szerkezete még jobban illeszkedő (a jelentősen megnövekedett stabilitási állandó erre utal), mint a 2,5-DIHA-é. E komplex monomer voltát ESI-MS eredmények igazolták. Ugyanakkor a Cd(II)-ionnal már a legstabilisabb komplexeket képező 2,5-DIHA-val alkotott rendszerében is egyensúlyban van a bisz-kelátos komplexek monomer $[MA]$ és a dimer $[M_2A_2]$ formája, vagyis a két láncvégi hidroxamát egyazon fémionhoz való koordinációja nem kedvezményezett.

- A láncban található peptidcsoport 2,5-DIHA-hoz képest megváltozott helyzete, hasonlóan a második peptidcsoport megjelenéséhez, mindkét fémionnál drasztikusan csökkenti a képződő bisz-kelátos komplexek stabilitását. Az összekötő szénlánc hosszának csökkenése a vizsgált tartományban kismértékben csökkenti a komplexek stabilitását, az R_N szubsztituens $-CH_3$, $-H$ cseréjével csak a ligandum bázicitásának megfelelő mértékű hatást állapítottunk meg.

3.4 Cd(II)-, Pb(II)-trihidroxámsav rendszerek

- A trihidroxámsavak minden korábbi modell-rendszertől stabilisabb komplexet képeznek mindkét vizsgált fémionnal. Összehasonlítva a DFB és DFC fémmegkötő képességét, a DFC mindkét vizsgált fémiont erősebben kötötte, amely a DFB-hez képest egy kötésszámmal hosszabb láncával és a hidroxámsav-csoportokhoz képest β -helyzetű kettőskötéssel magyarázható. Az Pb(II) esetében kiugróan nagy stabilitás figyelhető meg a DFC-vel, amely a β -helyzetű kettőskötés és a 6s elektronok kölcsönhatására vezethető vissza.

- Míg a Cd(II) a DFB-vel és a DFC-vel is képez trisz-kelátos komplexeket, a Pb(II)-ion, hasonlóan a korábban megállapítottakhoz, maximálisan két hidroxamátot fogad. A ligandum szabadon maradt harmadik csoport képes másik fémiont megkötni a DFB-vel $[M_3A_2H_2]$, illetve a DFC-vel $[M_3A_2]$ összetételű komplexben.

3.5 Pb(II)-aminohidroxámsav rendszerek

- Az Pb(II)-aminohidroxamát rendszerek leírhatóak voltak a monohidroxamátokhoz hasonló stabilitású mono- és biszkomplexek képződésével, azonban pH 7 felett a primer α -aminohidroxámsavak rendszereiben nagy stabilitású, vegyes kötésmódú komplex jelenik meg $[MAH_{.1}]_x$ összetétellel, amelyben a hidroxamát (O,O) kelát mellett a ligandum öttagú ($N_{\text{amino}}, N_{\text{hidroximát}}$) keláttal is fémionhoz kapcsolódik, ezáltal egy többmagvú komplex képződik. Ennek szerkezetét ESI-MS spektrumok is igazolták.

- Amennyiben a ligandum az ún. oldalláncában karboxilát-, vagy imidazolcsoportot tartalmaz, azok a hidroxamát-kelát mellett gyenge kölcsönhatásba lépnek a fémionnal.

3.6 Pb(II)-imidazolhidroxámsav rendszerek

- Az Pb(II)-imidazolhidroxámsavak rendszereiben a kölcsönhatás a fémion és a ligandum között egy egységgel kisebb pH-n kezdődik, mint a korábban bemutatott esetekben, és az imidazol-N koordinációban játszott szerepe mindhárom esetben bizonyítást nyert.

- A primer α -aminohidroxamátoknál tapasztalt vegyes kötésmódú $[PbAH_{.1}]_x$ komplex nem jelenik meg, amennyiben az α -helyzetű amino-N-t kisebb bázikusságú imidazol-N-re cseréljük (Pb(II)-Im-4-Cha). A csapadék leválását megelőző pH tartományban azonban az uralkodó hidroxamátszerű kötésmód mellett polimer részecskék jelennek meg, amelyekben bizonyítottan az imidazol-N is részt vesz a koordinációban.

- Az Pb(II)-N-Me-Im-4-Cha rendszerben az imidazol-N a horgonydonor és a teljes vizsgált pH tartományban a fémionhoz kötött állapotban marad. A komplexképződés kezdeti pH tartományában megjelenő $[PbAH]^{2+}$ komplexben feltehetően ($N_{imidazol}, O_{karbonil}$) kelát alakul ki, majd pH 6-nál megfigyelhető a kötésmódváltás és az $[PbA]^+$ -ban valószínűleg ($N_{imidazol}, O_{hidroxamát}$) kelát létezik.

- Az Im-4-Aha, ahol a hidroxámsavcsoporthoz képest az imidazolcsoport β -helyzetű, a komplexképződés a kezdeti, döntően hidroxamátszerűt követően tridentát módon valósul meg.

4 AZ EREDMÉNYEK VÁRHATÓ HASZNOSÍTÁSI LEHETŐSÉGEI

Vizsgálataink célja az eddig még nem tanulmányozott kölcsönhatás alaposabb felderítése két toxikus nehézfémion, a Cd(II) és az Pb(II) valamint a hidroxámsavak között. A hidroxámsavak jelentősége komplexképző sajátásaikon alapul. Munkánk célja, alapkutatás jellegéből adódóan a Cd(II)- illetve Pb(II)-hidroxamát rendszerekben képződő komplexek stabilitási viszonyainak és szerkezetük felderítése

volt. Ezen eredmények a későbbiekben fontos adatokkal szolgálhatnak olyan biológiai kutatásokhoz, amelyek során ezen fémionok mobilizálása a cél, legyen az szennyvíz, talaj, vagy éppen az emberi szervezet.

5 TUDOMÁNYOS PUBLIKÁCIÓK

Az értekezéshez kapcsolódó közlemények:

3. E. Farkas, D. Bátka, P. Buglyó and M. A. Santos: **Hydroxamic acids as potential lead(II) sequestering agents: Factors affecting lead(II) binding properties of hydroxamic acids**, *Metal Ions in Biology and Medicine*, vol 9. eds: M. C. Alpoim, P. V. Morais, M. A. Santos, A. J. Cristovao, J. A. Centro, P. Collery. 2006. (21th – 24th may, 2006, Lisboa, Portugal)
2. D. Bátka and E. Farkas: **Pb(II)-binding capability of aminohydroxamic acids: Primary hydroxamic acid derivatives of α -amino acids as possible sequestering agents for Pb(II)**, *J. Inorg. Biochem.*, **100** (2006) 27-35
1. E. Farkas, D. Bátka, Z. Pataki, P. Buglyó and M. A. Santos: **Interaction of desferrioxamine B (DFB) model dihydroxamic acids with some essential (Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+}) and toxic (Cd^{2+} , Pb^{2+}) metal(II) ions: effects of the structure and length of connecting chains on the metal ion selectivity**, *Dalton Trans.*, (2004) 1248-1253

Az értekezéshez nem kapcsolódó közlemény

1. E. Farkas, D. Bátka, E. Csapó, P. Buglyó, W. Haase and D. Sanna: **Synthesis and Characterization of Cu^{2+} , Ni^{2+} and Zn^{2+} Binding Capability of Some Amino- and Imidazole Hydroxamic Acids: Effects of Substitution of Side Chain Amino-N for Imidazole-N or Hydroxamic-N-H for -N-CH₃ on Metal Complexation**, *Polyhedron*, **26** (2007) 543-554

Az értekezéshez kapcsolódó előadások és poszterek

8. D. Bátka, E. Farkas (poszter): **Effect of imidazole and amino nitrogen atoms of hydroxamic acid derivatives on lead(II) binding properties**, *X. International Symposium on Bioinorganic Chemistry*, 20th – 25th September, 2005, Szklarska Poreba, Poland
7. D. Bátka, E. Farkas (angol nyelvű előadás): **Lead(II) binding capabilities of hydroxamic acids**, *XXI. International Conference on Coordination and Bioinorganic Chemistry*, 5th – 10th June, 2005, Smolenice, Slovakia
6. Bátka D., Farkas E. (előadás): **Az ólom(II) - aminohidroxámsavak közötti kölcsönhatás tanulmányozása**, *XL. Komplexkémiai Kollokvium*, 2005. május 18 -20, Dobogókő, Magyarország
5. E. Farkas, D. Bátka, P. Buglyó and M. A. Santos (poszter): **Factors affecting the metal binding ability of new model dihydroxamic acids: effect of the peptide moieties situating in the**

connecting chain, *7th European Biological Inorganic Chemistry Conference*, 29th August – 2nd September, 2004, Garmisch-Patenkirchen, Germany

4. D. Bátka, E. Farkas (poszter): **Interaction between new desferrioxamine B (DFB) model dihydroxamic acid and M(II) ions: effect of the complex geometry on the stoichiometry of the bis-chelated complex**, *IX International Symposium on Inorganic Biochemistry*, 4th-7th September, 2003, Szklarska Poreba, Poland

3. D. Bátka, E. Farkas (poszter): **Interaction between new desferrioxamine B (DFB) model dihydroxamic acid and M(II) ions: effect of the complex geometry on the stoichiometry of the bis-chelated complex**, *28th International Conference on Solution Chemistry*, 23th – 28th August, 2003, Debrecen, Hungary

2. Bátka D., Farkas E. (előadás): **Kadmium(II) és Ólom(II) toxikus nehézfémionok kölcsönhatása hidroxámsavakkal**, *XXVI. Kémiai Előadói Napok*, 2003. október 27 – 29, Szeged, Magyarország

1. Bátka D., Farkas E. (előadás): **Kadmium(II) és Ólom(II) toxikus nehézfémionok kölcsönhatása hidroxámsavakkal**, *XXXVIII. Komplexkémiái Kollokvium*, 2003. május 19 -22 Gyula, Magyarország

Az értekezéshez nem kapcsolódó előadások és posztetek

3. Bátka D., Csóka H., Farkas E. (előadás): **Az imidazolcsoport szerepe a vas(III) – hidroxamát kölcsönhatásban**, *XLII. Komplexkémiái Kollokvium*, 2006. május 31 – június 2, Mátrafüred, Magyarország

2. E. Farkas, D. Bátka, É. A. Enyedy (poszter): **Some factors affecting metal ion selectivity of natural siderophores, desferrioxamine B and desferriocoprogen**, *X. International Symposium on Bioinorganic Chemistry*, 20th – 25th September, 2005, Szklarska Poreba, Poland

1. Enyedy É. A., Bátka D., Farkas E. (előadás): **Az összekötő lánc hatása hidroxámsav alapú sziderofórok fémmegkötő sajátosságára: a deszferriokoprogén és a deszferrioxamin B eredményeinek összevetése**, *XXXIX. Komplexkémiái Kollokvium*, 2004. május 26 -28, Agárd-Gárdony, Magyarország