

# HIDROXÁMSAV ALAPÚ SZIDEROFÓROK ÉS MODELLJEIK MANGÁN- ÉS KOBALTKOMPLEXEI

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

# Szabó Orsolya

Témavezető: Prof. Dr. Farkas Etelka egyetemi tanár

DEBRECENI EGYETEM Természettudományi Doktori Tanács Kémiai Tudományok Doktori Iskola Debrecen, 2013.

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi Doktori Tanács **Kémiai Tudományok Doktori Iskola K/2 programja** keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 2013. július 11.

a jelölt aláírása

Tanúsítom, hogy **Szabó Orsolya** doktorjelölt **2009 - 2012**. között a fent megnevezett Doktori Iskola **K/2** programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javasolom.

Debrecen, 2013. július 11.

a témavezető aláírása

## HIDROXÁMSAV ALAPÚ SZIDEROFÓROK ÉS MODELLJEIK MANGÁN- ÉS KOBALTKOMPLEXEI

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében a Kémia tudományágban

Írta: Szabó Orsolya okleveles vegyész

Készült a Debreceni Egyetem Kémiai Tudományok doktori iskolája (Koordinációs kémiai programja) keretében

## Témavezető: Dr. Farkas Etelka egyetemi tanár

A doktori szig	gorlati bizottság:	
elnök:	Dr. Kéki Sándor	
tagok:	Dr. Brücher Ernő	
	Dr. Barczáné Dr. Buvári Ágnes	
A doktori szig	gorlat időpontja: 2012. december 10.	
Az értekezés	bírálói:	
	Dr	
	Dr	
	Dr	
A bírálóbizott	tság:	
elnök:	Dr	
tagok:	Dr	
e	Dr	
	Dr.	
	Dr	
Az értekezés	védésének időpontja: 2013	

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm **Dr.** Fábián István tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy lehetővé tette számomra doktori munkám elkészítését a Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszéken.

Hálás köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, *Dr. Farkas Etelka* egyetemi tanárnak sokoldalú segítségéért, hasznos és értékes tanácsaiért, biztatásáért.

Köszönöm **Dr. Buglyó Péter** egyetemi docensnek az általa előállított ligandumok rendelkezésünkre bocsájtását és az újonnan előállított ligandum szintézisénél nyújtott szakmai segítségét, valamint **Dr. Várnagy Katalin** egyetemi docensnek az oktatásban nyújtott segítségét, tanácsait. További köszönetemet szeretném kifejezni **Dr. Sóvágó Imre** egyetemi tanárnak támogatásáért.

Köszönettel tartozom *Dr. Nagy Lajosnak* az ESI-MS mérések, *Dr. Tircsó Gyulának* a relaxometriás mérések és *Zékány Lászlónak* a kiértékelések során nyújtott segítségéért. További köszönetet érdemel *Dr. Pócsi István* és *Dr. Máthéné Szigeti Zsuzsa*, a Mikrobiális Biotechnológiai és Sejtbiológiai Tanszékről, akik a sziderofórokat biztosították méréseinkhez.

Szeretném megköszönni *Nagyné Dombi Gizellának*, Tanszéki irodavezetőnek a hivatalos ügyek intézésében nyújtott segítségét.

További köszönetemet szeretném kifejezni a *Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoport* minden régebbi és jelenlegi munkatársának a munkám során nyújtott segítségéért, valamint a baráti légkör megteremtéséért.

Végül, de semmiképp sem utolsósorban hálás köszönetemet szeretném kifejezni családomnak, páromnak és barátaimnak a türelmükért, biztatásukért és megértésükért.

A munka 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.

# TARTALOMJEGYZÉK

<b>1. BEVEZETÉS</b> 1
1.1. A vizsgált ligandumok képletei, nevei és rövidítései
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS
2.1. A hidroxámsavak, biológiai szerepük és hatásuk
2.2. A hidroxámsavak és származékaik komplexképző sajátságai
2.3. A mangán- és kobaltionok különböző oxidációs formáinak komplexképző
sajátsága10
2.4. Célkitűzések
3. KÍSÉRLETI KÖRÜLMÉNYEK ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK 16
3.1. Felhasznált vegyszerek és vizsgált ligandumok16
3.2. A GABA-ha előállítása
3.3. A vizsgálati módszerek elvi alapjai, alkalmazott kísérleti körülmények 18
3.3.1. pH-potenciometria
3.3.2. UV-látható spektrofotometria
3.3.3. Elektro-spray ionizációs tömegspektrometria (ESI-TOF-MS) 23
3.3.4. Ciklikus voltammetria
3.3.5. Relaxometria
4. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK
4.1. A vizsgált ligandumok sav-bázis sajátságai
4.2. A Mn(II) és a Co(II) kölcsönhatása monohidroxámsavakkal
4.3. A Mn(II) és a Co(II) kölcsönhatása több hidroxámsavcsoportot tartalmazó
ligandumokkal
4.3.1. A Mn(II) és a Co(II) kölcsönhatása dihidroxámsavakkal 45
4.3.2. A Mn(II) és a Co(II) kölcsönhatása trihidroxámsav alapú természetes
sziderofórokkal 49
4.3.3. A Mn(II)komplexek relaxivitása 58
4.4. A Mn(II)- és a Co(II)komplexek redox stabilitása
4.4.1. A Mn(II) - hidroxamát komplexek redox stabilitása 64
4.4.2. A Co(II) - hidroxamát komplexek redox stabilitása

5. ÖSSZEFOGLALÁS	79
6. SUMMARY	
7. IRODALOMJEGYZÉK	
8. FÜGGELÉK	

#### 1. BEVEZETÉS

A hidroxámsavak, mint kelátképző ligandumok évtizedek óta a figyelem előterében vannak. Számos ismert biológiai szerepük és hatásuk is komplexképző sajátságukhoz kapcsolódik. Egyik jelentős biológiai hatásuk az enziminhibícióhoz köthető, mely főként a monohidroxámsavakkal van kapcsolatban. Az inhibíciós mechanizmus teljesebb megértése, új inhibítorok tervezése érdekében számos 3d átmenetifém-ion monohidroxámsavakkal való kölcsönhatását tanulmányozták. Azonban csak elvétve található olyan irodalom, amiben a Mn(II)- vagy a Co(II)-monohidroxámsav rendszereket vizsgálták.

Az enziminhibíció egyik fontos lépése az inhibítor célhelyre való juttatása, amely kapcsán az utóbbi évektől kap figyelmet a kobalt(III/II)-monohidroxámsav kölcsönhatás. Az irodalom szerint Co(III)-tartalmú "prodrug"-okat fejlesztenek ki. Ezek az inert és rendkívül stabil vegyes ligandumú komplexek, mint szállítómolekulák célzottan a rákos sejtekhez juttatják az inhibítort. A kobalt tekintetében ezen aspektus keltette fel érdeklődésünket, míg a Mn(II)komplexek vonatkozásában az MRI (Mágneses Rezonanciás Képalkotás) vizsgálatok során az esetleges kontrasztanyagként való alkalmazhatóságának lehetősége érdekes volt számunkra a trihidroxámsav alapú természetes sziderofórok tekintetében.

Jelen munka során a vizsgált ligandumok között szerepelnek az enziminhibíció szempontjából potenciális jelentőségű egyszerű monohidroxámsavak, valamint aminohidroxámsavak. Utóbbiak а hidroxámsavcsoport R<sub>C</sub> szubsztituenseiben további koordinálódni képes donorcsoportot vagy kelátképzőt tartalmaznak, amely ligandumcsoportnál mindkét fémion tekintetében tanulmányoztuk, hogy a hidroxamát koordinációban játszott szerepét hogyan befolyásolja a tőle különböző kötéstávolságban lévő, illetőleg különféle típusú ún. oldalláncbeli donoratom, vagy kelátképző csoport. Egy kölcsönhatásban szerepet nem játszó donorcsoport akár további nem kovelens kötés kialakítására is képes lehet, amely az inhibíciós folyamatban fontosnak bizonyulhat pl. a szelektivitás tekintetében.

A munka részét képezte továbbá olyan, az irodalomban a Mn(II)- és a Co(II)komplexek tekintetében kevéssé, illetve egyáltalán nem vizsgált 4

trihidroxámsav alapú természetes sziderofór, valamint DFB modell dihidroxámsavak tanulmányozása.

A fémion-ligandum kölcsönhatás feltérképezése érdekében, valamennyi általunk vizsgált rendszert illetően, szigorúan anaerob körülmények között, főként pH-potenciometriás méréseket végeztünk, melyek mellett egyéb szerkezetvizsgáló módszereket is alkalmaztunk (UV-Vis spektrofotometria, ESI-MS). A Mn(II)-sziderofór és két kiválasztott -dihidroxámsav rendszer esetében relaxometriás vizsgálatok is történtek.

Tekintettel a Mn(II) és a Co(II) redox aktív voltára, vizsgálatainkat kiterjesztettük a levegő jelenlétében történő mérésekre is. A Co(II)-t tartalmazó rendszerek esetén a hidrogén-peroxid szerepelt oxidálószerként. Az oxidáció nyomon követése spektrofotometriás módszerrel történt. A sziderofórokkal, ahol kizárólagos volt a Mn(III)- illetve a Co(III)komplexek képződése ciklikus voltammetriás méréseket végezve ezen komplexek stabilitási állandóját is meghatároztuk.

Vizsgálatainkba mindösszesen 18 ligandumot vontunk be. Közülük 1 esetben, a γamino-vajsav hidroxámsav származékának (GABA-ha) esetében, a szintézis is ezen munka során történt. A vizsgált ligandumok nevei, szerkezeti képletei és rövidítései alább láthatók.

## 1.1. A vizsgált ligandumok képletei, nevei és rövidítései

Monohidroxámsavak						
	R <sub>C</sub>	R <sub>N</sub>	Név	Rövidítés		
R <sub>C</sub>	- CH <sub>3</sub>	- H	Aceto- hidroxámsav	Aha		
	- CH <sub>3</sub>	- CH <sub>3</sub>	N-Me-Aceto- hidroxámsav	<i>Me</i> Aha		
R <sub>N</sub> N OH	- C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	- H	Benzo- hidroxámsav	Bha		
	- CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	- H	γ-amino-butánsav- hidroxámsav	GABA-ha		
	R	X	Név	Rövidítés		
	- COOH	1	Aszparaginsav-β- hidroxámsav	Asp-β-ha		
$\begin{array}{c} R \\ CH \\ I \\ NH \\ H \\ $	- COOH	2	Glutaminsav-γ- hidroxámsav	Glu-γ-ha		
н, он	$\stackrel{^{+}HN}{\overset{-}CH}$	0	Hisztidin- hidroxámsav	Hiszha		

#### DFB modell dihidroxámsavak:



 $R_N = -CH_3$ 

- x = 2 y = 5 5-aza-4-oxoundekánsav-N,N'-dihidroxi-N,N'-dimetildiamid (2,5-DIHA)
- x = 3 y = 4 6-aza-5-oxoundekánsav-N,N'-dihidroxi-N,N'-dimetildiamid (3,4-DIHA)
- x = 3 y = 3 5-aza-6-oxodekánsav-N,N'-dihidroxi-N,N'-dimetildiamid (3,3-DIHA)
- x = 2 y = 4 5-aza-4-oxodekánsav-N,N'-dihidroxi-N,N'-dimetildiamid (2,4-DIHA)
- x = 2 y = 3 5-aza-4-oxononánsav-N,N'-dihidroxi-N,N'-dimetildiamid (2,3-DIHA)
- x = 2 y = 2 4-aza-5-oxooktánsav-N,N'-dihidroxi-N,N'-dimetildiamid (2,2-DIHA)

 $R_N = -H$ 

x = 2 y = 5 5-aza-4-oxoundekánsav-N,N'-dihidroxidiamid (2,5-H,H-DIHA)



5

Szabó Orsolya doktori (PhD) értekezés

### 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

#### 2.1. A hidroxámsavak, biológiai szerepük és hatásuk

A hidroxámsavak már az 1900-az évek közepén is tanulmányozott vegyületek [1]. A jellemző funkciós csoportot az **1. ábrán** látható képlettel lehet általánosan leírni.



A hidroxámsavakról általánosságban elmondható, hogy legtöbbször O,O-donorként viselkedő kelátképző vegyületek (az ily módon kialakuló redkívül stabilis öttagú kelátot hidroxamát-típusú kelátnak nevezzük), azonban, ha a szén- vagy a nitrogénatomhoz kapcsolódó szubsztituensek más koordinálódni képes donorcsoportot is tartalmaznak, akkor körülményektől függően azok is koordinálódhatnak.

Egy ligandum több hidroxámsavcsoportot is tartalmazhat, mely alapján megkülönböztetünk mono-, di-, és trihidroxámsavakat, továbbá ha a hidroxámsavcsoport nitrogénjéhez szubsztituensként H-kapcsolódik, akkor primer, ha H-től különböző a kapcsolódó oldallánc, akkor szekunder hidroxámsavakról beszélhetünk. A szubsztituensek legtöbbször jelentősen befolyásolhatják a hidroxámsavcsoportok pK értékeit is, amelyek jellemzően 8,5 - 9,5 tartományba esnek [2-3].

A primer monohidroxámsavaknál több fémion esetében is megfigyelték (fémiontól függően különböző pH értékeken), hogy a koordinálódott hidroxamátcsoport deprotonálódik, mely által stabilabb ún. hidroximát-kelát képződött (**2. ábra**) [3-5].

Hidroxámsav alapú sziderofórok és modelljeik mangán- és kobaltkomplexei



igazán hidroxámsavak vizsgálata akkor vált széleskörűvé, А amikor bebizonyosodott, hogy a természetben is megtalálhatóak. Mikroorganizmusok által termelt viszonylag kisméretű, vasmegkötő biomolekulák a sziderofórok, melyek a kelátképző csoport milyensége alapján lehetnek hidroxamát, kateholát és α-hidroxikarboxilát típusúak. A vashiányos körülmények között termelt sziderofórok, a Fe(III)-mal nagy stabilitású komplexeket képeznek, így megvédik azt a hidrolízistől, illetve ennek következtében a vas a sziderofórral kialakított komplexe formájában kerül felvételre [2, 6]. Duhme és munkatársai azt is megállapították, hogy nem csak a Fe(III), hanem a Mo(VI) felvétele is lehetséges sziderofórokkal, bizonyos nitrogénfixáló baktériumok esetében [7]. Bár magasabb rendű élőlények nem szintetizálnak sziderofórokat, de ilyen szervezetekbe bejuttatva erős komplexképző tulajdonságuk miatt jelentős biológiai hatással bírnak. Ezen hatásból kifolyólag alkalmasak az emberi szervezetben túlzott mértékben felhalmozódó, mérgezést okozó Al(III), illetve Fe(III) felesleg eltávolítására (a Thalassemia betegség gyógyítására). Ilyen típusú betegségek kezelésére alkalmazzák az évek óta forgalomban lévő Desferal nevű gyógyszert, melynek hatóanyaga a trihidroxámsav alapú természetes sziderofór, a DFB [8-9].

Az irodalomból ismeretes az is, hogy a hidroxámsavak, főként a monohidroxámsavak, bizonyos metalloenzimek katalitikus hatását gátolják azáltal, hogy a hidroxamátcsoport kölcsönhatást létesít az enzim aktív centrumában lévő kétértékű átmenetifém-ionnal, melynek következtében a szubsztrát nem tud koordinálódni. Például az acetohidroxámsav hatásosan gátolja a Ni(II)-tartalmú ureázt [10-11]. Számos más metalloenzim esetén találunk példát a hidroxámsav származékok enziminhibíciós hatására (peptid deformiláz, protein tirozin kináz, metionin aminopeptidáz) [12-15]. Ezen hatásnak a rákkutatásban is egyre nagyobb jelentőséget tulajdonítanak, pl. a Zn(II)-tartalmú hiszton deacetiláz enzim (HDAC) inhítorai közül a szuberoilanilid (SAHA) hidroxámsavnak [16-19] vagy egy újabb

HDAC inhibítor akár a malária kezelésének egy újabb alternatívájaként is felmerülhet [20]. A hidroxámsavak különféle származékai hatékony és szelektív inhibítoroknak bizonyulnak a szintén Zn(II)-t tartalmazó mátrix metalloproteináz (MMP) enzimek esetében is (pl. batimastát, marimastát, prinomastát, melyek a klinikai fázis II. vagy III. szakaszában vannak). Ezen a területen számos közlemény és nagyobb összefoglaló is született az elmúlt néhány évben, melyek alapján kiderül, hogy a klinikai kutatások igen pozitív eredményeket szolgáltatnak. A bíztató adatok azt mutatják, hogy az MMP inhibíciója akár hatékony eszközként is szolgálhat a különféle ráktípusok elleni küzdelemben [21-28]. A gyógyászatban már használják a szintén HDAC inhibítorként viselkedő Vorinostat (Zolinza<sup>R</sup>) szájon át szedhető kapszulát, mely a bőrrák bizonyos típusának kezelésében játszik fontos szerepet [29].

#### 2.2. A hidroxámsavak és származékaik komplexképző sajátságai

A Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékén a Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoportban évtizedek óta folynak kutatások a hidroxámsavak oldategyensúlyi vizsgálatával kapcsolatban. Széleskörűen tanulmányozták az  $R_N$ valamint az  $R_{\rm C}$ szubsztituensek hatását а monohidroxámsavaknál [3, 30-31]. A kapott eredmények alapján megállapították, hogy az R<sub>N</sub> helyzetben lévő elektronküldő (pl. metil) csoport nagyobb hatással van a kialakuló kelát stabilitására, mint az R<sub>C</sub> helyzetben lévő. Mivel az előbbi esetben a nitrogén nemkötő elektronpárjának delokalizálódása révén a karbonil oxigénen megnövekszik elektronsűrűség, ezáltal kelát stabilitása az а is. Monohidroxámsavak mellett számos esetben kerültek a vizsgálatok középpontjába a trihidroxámsav alapú természetes sziderofórok, úgymint a DFB [32-33] vagy a DFC. Megállapították, hogy a kisebb ionméretű fémionokkal (pl. Fe(III), Al(III), Ga(III)) a DFB, míg a nagyobb ionméretűekkel (pl. In(III), Cu(II), Ni(II), Zn(II)) a DFC képezi a kissé nagyobb stabilitású komplexeket. Ez a stabilitásbeli különbség feltehetőleg a β-helyzetben lévő kettős kötés és a hidroxamát között kialakuló konjugációval magyarázható. Mindemellett az is bizonyítást nyert, hogy a Mg(II) és az Pb(II) DFC-vel alkotott komplexei kiugróan nagy stabilitásúak a DFB-vel

képződőkhöz képest. Ezen stabilitásnövekedés egyik lehetséges magyarázata lehet, hogy a β-helyzetben lévő kettős kötés kölcsönhatásba lép a fémion vegyértékelektronjaival, ezáltal növelve a képződő komplex stabilitását [34-36].

Szintetikusan előállított DFB dihidroxámsav modelleket is tanulmányoztak. Ezen esetekben a központi kérdés annak felderítése volt, hogy hogyan befolyásolja a komplexképző sajátságot az, ha a DFB-ben találhatóhoz képest a lánc hosszát, illetve a peptidcsoport láncbeli helyét változtatják [37-39]. A kapott eredmények azt mutatták, hogy a legstabilabb komplexeket a 2,5-DIHA képezi, mely molekulában az összekötő lánc hossza és szerkezete megegyezik a DFB-vel. Azt találták, hogy a lánc hosszának rövidülése hatással van a képződő komplexek stabilitására és a komplexek stabilitása a következő sorrendben változik: 2,5-DIHA > 2,4-DIHA ~ 2,3-DIHA < 2,2-DIHA. A legrövidebb dihidroxámsav (2,2-DIHA) stabilitásbeli növekedését dimerizációval magyarázták. Továbbá megállapították, hogy a peptidcsoport helyének változtatása (3,4-DIHA és 3,3-DIHA) jelentős mértékű stabilitáscsökkenést eredményez a képződő komplexekben.

Ezidáig olyan hidroxámsavak vizsgálatáról volt szó, melyek  $R_N$  és  $R_C$  szubsztituensei alkil vagy aril oldalláncot tartalmaznak, azonban sok esetben ezen láncok más koordinálódásra képes donoratomot is tartalmazhatnak (pl. aminocsoportot). A természetben is előforduló aminosav- és peptidhidroxámsav származékokban az aminocsoport jelenlétével a lehetséges kötésmódok száma megnövekszik. A kialakuló komplexekben a koordinációs mód a hidroxamát oxigének (O,O) vagy az amino nitrogén - hidroxamát nitrogén ( $N_{amino}, N_{hidroxamát}$ ) koordinációja vagy többmagvú komplexekben kialakuló vegyes koordináció ((N,N)(O,O)) számos körülmény függvénye lehet pl. a fémion minősége vagy az aminocsoport helyzete a hidroxamátcsoporthoz képest. Ezen körülményeket az elmúlt két évtizedben széles körben tanulmányozták mind Tanszékünkön [40-45], mind más kutatócsoportokon belül is [46].

Az eddigiekben említett hidroxámsavak komplexképző sajátságát a Tanszéken már korábban feltárták számos eszcenciális, illetve toxikus fémionnal, mint pl. Ca(II), Mg(II), Cu(II), Ni(II), Zn(II), Fe(II), Mo(VI), V(V), Al(III), Pb(II), Cd(II), Pd(II). Azonban a d<sup>5</sup>-d<sup>10</sup> átmenetifémek sorát tekintve a Mn(II), illetve a Co(II) vizsgálatára csak kevés esetben volt példa. Jelen doktori munka keretein

belül ezen két fémion hidroxamát komplexeinek oldategyensúlyi viselkedésébe nyertünk nagyobb betekintést.

## 2.3. A mangán- és kobaltionok különböző oxidációs formáinak komplexképző sajátsága

A Mn(II) komplexképző sajátságára jellemző, hogy 5 párosítatlan d elektronjával nagy spinszámú, relatíve gyenge komplexeket képez, az Irving-Williams sornak megfelelően a többi átmenetifémhez képest gyengébbeket. Nincs kitüntetett geometriája. A Mn(II) a hard oxigén donoratomokat preferálja a softabb nitrogén vagy a soft kén atomokkal szemben. A Mn(II)-nél termodinamikailag stabilabb komplexeket képez a Mn(III), melyek általában torzult oktaéderes geometriával rendelkeznek. A Mn(IV)komplexekben az oktaéderes koordináció a meghatározó, továbbá gyakori a vegyes vegyértékű többmagvú [Mn(III)/Mn(IV)] komplexek µ<sub>2</sub>-oxo ligandumokkal való képződése is [47].

A mangán minden élő szervezet számára létfontosságú elem. Legfontosabb biológiai funkciója a zöld növények fotoszintézisében játszott szerepe, ahol a fotoszisztem(II)-ben (PSII) a víz oxidációjában vesz részt [48-50]. Mangánt tartalmazó enzim továbbá pl. a piruvát-karboxiláz, a glutamin-szintetáz, valamint a szuperoxid-dizmutáz (Mn-SOD), az utóbbi a szuperoxid gyökanion bontását, diszproporcióját segíti elő [51-53]. A mangántartalmú proteinekben a fémion általában +2 oxidációs állapotban fordul elő, és gyakran helyettesíthető Mg(II)ionnal az aktivitás elvesztése nélkül [50]. A mangánkomplexeket széles körben tanulmányozták, mivel az előbb említettek alapján nagy jelentőséggel bírnak a biológiai rendszerekben, azonban a mangán-hidroxamát komplexek nem kerültek a vizsgálatok középpontjába, hiszen biológiai jelentőséget nem tudtak hozzájuk kapcsolni. Azonban az elmúlt években néhány tekintetben mégis felkeltette az érdeklődést. Már a 2.1. részben említésre került, hogy a különféle hidroxámsav származékok hatékony inhibítorai lehetnek bizonyos metalloenzimeknek [10-29, 54-56], ebből kifolyólag érdekes eredményekhez juthatunk a mangán-hidroxámsav kölcsönhatását befolyásoló tényezők feltárása során. Továbbá a Mn(II) 5 párosítatlan d elektronja, hosszú relaxációs ideje, gyors vízcseréje és a Gd(III)-hoz

képest jóval kisebb mértékű toxicitásából adódóan szóba jöhet lehetséges MRI (mágneses képalkotás) kontrasztanyagként. Ezen témakörön belül egyre inkább bővül az irodalom és igen ígéretes eredményeket szolgáltat. Jelenleg az irodalomban a klinikai gyakorlatban két Mn(II) alapú kontrasztanyag alkalmazására találtunk példát. Az egyik az intravénásan adható "májspecifikus" Mn-DPDP (Teslascan<sup>™</sup>), míg a másik az orális formában szedhető ún. LumenHance<sup>™</sup>, MnCl<sub>2</sub>-t tartalmazó kontrasztanyag [57]. Legutóbbi általunk ismert adatok alapján egy újabb szájon át szedhető, "májspecifikus" kontrasztanyag már a klinikai kísérletek harmadik fázisában van (CMC-001) [58], továbbá folyamatban van egy a tüdőre specifikus kontrasztanyag fejlesztése is [59]. Mindemellett főként N- vagy N,O-vegyes donorú ligandumokkal alkotott Mn(II)komplexekre is számos adatot találunk a témához kapcsolódóan [60-64], azonban az alapvetően O,O-donorként viselkedő hidroxámsavak vonatkozásában tudomásunk szerint nincs közölt eredmény, így ezen irányba történő vizsgálatok is érdekesnek bizonyulhatnak.

Ha az irodalom áttekintését kiterjesztjük a +3-as oxidációs állapotra, akkor meglepő eredményeket találunk. Duckworth és munkatársai a Mn(II)/(III) - DFB rendszert tanulmányozták. A [Mn(III)HDFB]<sup>+</sup> komplexre kapott stabilitási állandót a [Fe(III)HDFB]<sup>+</sup> állandójával összevethetőnek találták. Ez alapján vetették fel a kérdést, hogy vajon a természetben a Mn(III) zavarhatja-e a Fe(III) felvételét [65-67]. Hasonló következtetéseket vontak le két további trihidroxámsav alapú természetes sziderofór, a pioverdin és a DFE (a DFB makrociklusos analógja) esetében is [68-69].

Az előzőekben leírtak ellenére az irodalomban meglehetősen kevés oldategyensúlyi adatot találtunk a Mn(II)- és a Mn(III)-hidroxamát komplexeket illetően. Van néhány adat a monohidroxámsavakra, illetve a DFB-re: a 60-as években már határoztak meg stabilitási állandókat a Mn(II)-acetohidroxámsavval alkotott komplexeire [70], majd 2008-ban jelent meg újabb eredmény az irodalomban a monohidroxámsavak tekintetében [71]. 2004-től kezdődően találtunk néhány közleményt elsősorban a Mn-DFB rendszerre vonatkozóan [65-66].

A kobaltnak csak két stabilis oxidációs állapota a jellemző, a +2 és a +3. A Co(II) a szoftabb donoratomokat preferálja a hard oxigén donoratomokkal szemben. Az Irving-Williams sornak megfelelően a Mn(II)-nél stabilabb komplexeket képez, azonban a sokszor vizsgált Ni(II)-höz, illetve Cu(II)-höz képest kisebb stabilitásúakat [72]. Az ismert Co(II)komplexek száma kisebb, mint a Co(III)-é, de a Co(II)komplexek sokkal változatosabbak és labilisabbak. A Co(III)komplexeket, melyek szinte kivétel nélkül kis spinszámú oktaéderes komplexek, inertségük miatt már a komplexkémiai vizsgálatok kezdetén is tanulmányozták. A Co(II)komplexek esetében a leggyakoribb típust a nagy spinszámú oktaéderes komplexek jelentik, melyek színe általában rózsaszíntől ibolyáig terjedő. A többnyire kék színű tetraéderes geometriájú komplexek szintén gyakoriak, és a kobalt(II)-re sokkal inkább jellemzőek, mint bármely más átmenetifémre [50].

Bár a többi első sorbeli átmenetifém-ionokhoz (pl. mangán, vas, réz, cink) képest a kobalt kevésbé gyakran található meg a metalloenzimekben, mégis esszenciális fémnek tekinthető valamennyi élőlény számára, beleértve az emberi szervezetet is. A kobalt biológiai szerepe döntő mértékben a B12-vitaminhoz kapcsolódik, továbbá számos enzim működéséhez szükség van B12-koenzimre, mely enzimek a metilcsoport átviteli-, izomerizációs- és redoxireakciókat katalizálják (pl. glutamátmutáz, diol-dehidráz, glicerin-dehidráz, etanol-amin-deamináz, β-lizin-izomeráz) [53]. A kobalamin alapú fehérjék mellett néhány más nem korrinvázas fehérje (pl. metionin aminopeptidáz, nitril-hidratáz, dimetil-malát-dehidrogenáz, prolidáz, glükóz-izomeráz, aldehid-dekarboniláz) aktív centruma is tartalmaz Co(II)-t [73-74]. A kobalt további biológiai szerepe a gyógyászathoz köthető, mivel a Co<sup>60</sup>-t gyakran használják különféle ráktípusok gyógykezelésében. Mindemellett a cinktartalmú enzimek általános jellemvonása, hogy a Zn(II)-t Co(II)-vel kicserélve az enzimaktivitás nem változik meg számottevően [53], ezt a sajátságot sok esetben alkalmazzák különféle enzimek vizsgálata során. Mivel a 3d<sup>10</sup> cink(II) elektrongerjesztési spektruma nem informatív, ezáltal ezen fémiont tartalmazó metalloenzimek szerkezetének spektroszkópiai vizsgálatához a cinket kobaltra cserélik a kísérletek során [75]. A kobalt előzőekben részletezett biológiai és gyakorlati jelentősége azonban nincs közvetlen összefüggésben az általunk tanulmányozott hidroxamát komplexeivel. Az elmúlt években ezen komplexek vizsgálata nem került előtérbe, csak kevés adatot találtunk a Co(II)monohidroxamát komplexekre [70-71, 76-77], illetve néhányat, amely a Co(II)-DFB kölcsönhatásával foglalkozik [70, 78]. Ahogy a 2.1. fejezetben már kifejtésre

és az előzőekben említésre került, a hidroxamát komplexek hatékony inhibítorok, ebből kifolyólag ezen irányba folyt néhány kutatás a kobalt-hidroxámsavak kölcsönhatását illetően. Az inhibíciós mechanizmus teljesebb megértéséhez, új inhibítorok tervezésének elősegítéséhez számos Co(II)-t tartalmazó kétmagvú komplexet állítottak elő. Ezek a komplexek különböző enzimek aktív centrumának modelljei, melyek kölcsönhatását különböző hidroxámsavakkal szilárd fázisban tanulmányozták [79-81].

Az irodalomban talált eredmények közül különös figyelmet érdemel a Hambley és munkatársai által közöltek. Ez a kutatócsoport különféle kinetikailag inert Co(III)komplexeket állított elő, melyek hordozó szerepet töltenek be. A kutatásuk fő célja olyan Co(III)-tartalmú "prodrug"-ok fejlesztése, melyek segítségével szelektíven gátolják az MMP enzimeket, ezáltal célzottan a daganatra lehetnek hatással. A mechanizmus arra épül, hogy a hidroxámsavat is tartalmazó vegyes ligandumú Co(III)komplex a daganatos sejtekhez jut, ahol a környezet reduktív, ezáltal sokkal labilisabb és kevésbé stabil Co(II)komplexé redukálódik, majd a redukált komplex disszociál és a hidroxámsav az MMP-hez kötődik, melynek következtében az enzim működését gátolja [25, 82-84].

Duckworth és munkatársai által közölt eredmények már a mangán kapcsán is említésre kerültek és a kobaltnál is szóba jönnek, mivel a kutatócsoport a Co(II)/Co(III) - DFB rendszert is bevonta vizsgálataiba. Az általuk meghatározott adatok azt mutatják, hogy a [Co(III)HDFB]<sup>+</sup> komplex rendkívül stabil, a stabilitási állandó értéke 5 nagyságrenddel nagyobb a [Fe(III)HDFB]<sup>+</sup> állandójánál [78].

A 2.2. részből és az előzőekben leírtakból kitűnik, hogy a DFB-vel több vonatkozásban is foglalkoztak a közelmúltban nem csak Tanszékünkön, hanem más kutatócsoportban is. Továbbá a 2.2. fejezetben az is kifejtésre került, hogy a DFC-vel is számos két- és háromértékű fémion tekintetében Tanszékünkön feltárták a komplexképző sajátságokat, valamint a különböző fémionokkal képződő komplexek stabilitásának összevetése is megtörtént a két előbb említett sziderofórral [34-36]. A jelen munka során vizsgált két további sziderofórral (DFR és TAF) azonban megelőzően nem történtek vizsgálatok a kutatócsoportunkban. Nemzetközi irodalomban is csak mindösszesen egy olyan közleményt találtunk, amely a DFR néhány fémionnal (Fe(III), Cr(III), Al(III), Ga(III), Cu(II), Zn(II)) való kölcsönhatásával foglalkozik. A kutatócsoport megállapította, hogy a

#### Szabó Orsolya doktori (PhD) értekezés

háromértékű fémionokkal egymagvú komplexek képződnek, míg többmagvú komplexek képződését tapasztalták az általuk vizsgált kétértékű fémionok esetében. Azt találták, hogy a deszferrikrocin három Cu(II), míg két Zn(II) megkötésére képes. Mindemellett vegyes fémkomplexek képződését is kimutatták, melyben egy háromértékű és egy kétértékű fémion van kötésben. A képződő komplexekben a hidroxamátcsoport szerepelt elsődleges kötőhelyként, míg az amid nitrogén alternatív kötőhelyként volt jelen [85]. A DFR és a TAF esetében a biológiai aspektust tekintve találtunk további irodalmakat, melyekben leírják, hogy az ún. Aspergillus fumigatus gomba termeli mind a triacetilfuzarinint, mind a ferricrocint [86]. Tanulmányozták azt is, hogy a transzferrinből a két sziderofór egymáshoz képest milyen sebességgel távolítja el a vasat [87]. Vizsgálták mindemellett a mikroorganizmusokban (Mycelia sterilis EP-76) a TAF által történő vas felvételét [88]. Az irodalomból az is tudott, hogy a TAF a sejten kívüli vas mobilizálásában játszik szerepet, míg a DFR a sejten belüli vas tárolásában vesz részt [89]. Leírták azt is, hogy a TAF képes más sziderofórokból "kiszedni" a vasat, és az is tudott, hogy a TAF három észtercsoportja könnyen hidrolizál a sejten belüli térben, ezáltal különféle oxidációs termékek is jelen lehetnek a sejtben [90]. A DFR és a TAF mangánnal és kobalttal való kölcsönhatásáról, oldategyensúlyi vizsgálatáról azonban nem találtunk eredményeket az irodalomban. A gombák által termelt DFC [91-93] és az általunk vizsgált két fémion komplexeivel kapcsolatban sem volt fellehető közlemény.

#### 2.4. Célkitűzések

A hidroxámsavak fémkomplexei évtizedek óta sok laboratóriumban vannak az érdeklődés előterében, beleértve a Debreceni Egyetem Bioszervetlen Kutatócsoportját is. A hidroxámsavak számos ismert biológiai szerepe és hatása komplexképző sajátságukhoz kapcsolódik. Egyik jelentős biológiai hatásuk, ahogy az a 2.1. fejezetben kifejtésre került, az enziminhibícióhoz köthető, mely főként a monohidroxámsavakhoz kapcsolódik. Az inhibíciós mechanizmus teljesebb megértése, új inhibítormolekulák tervezése érdekében számos 3d átmenetifém-ion monohidroxámsavakkal való kölcsönhatását tanulmányozták. A mangán(II)- és kobalt(II)ionok azonban kimaradtak a vizsgált fémionok sorából. Egyrészt, mert nem volt felismert biológiai jelentőségük, másrészt pedig a fémion-hidroxamát komplexek vizsgálata során számos nehézségbe lehet ütközni, mint pl. kis stabilitás vagy konkuráló redox-, illetve hidrolitikus folyamatok. A közelmúltban azonban a figyelem az előbb említett fémionokra irányult. A Mn(II)komplexek érdekesek lehetnek, mint lehetséges MRI kontrasztanyagok, a Co(II)komplexek pedig alapjául szolgálhatnak olyan Co(III)komplexek előállításához, melyek akár gyógyászati szempontból is érdekesek lehetnek.

Tekintve, hogy nagyon kevés irodalmi adatot találtunk az előbb említett fémionok hidroxamát komplexeit illetően, a hidroxámsavak viszonylag széles körét vontuk be vizsgálatainkba. Célul tűztük ki a mangán(II)- és kobalt(II)ionok kölcsönhatásának tanulmányozását számos mono-, di-, és trihidroxámsav származékkal, ami jelenti az egyensúlyi modell felállítását, a termodinamikai stabilitás. valamint redox stabilitás feltérképezését, а továbbá а mangán(II)komplexeknél a relaxivitás értékének meghatározását. Mindemellett, a fémionok redox aktivitásából adódóan, ahol annak kizárólagos képződése egyértelműen bekövetkezett, a +3-as oxidációs állapotú fémiont tartalmazó komplexek stabilitási állandójának meghatározása is célunk volt.

A vizsgált ligandumok képleteit, neveit, illetve rövidítéseit az **1.1. részben** csoportosítva foglaltuk össze.

## 3. KÍSÉRLETI KÖRÜLMÉNYEK ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

#### 3.1. Felhasznált vegyszerek és vizsgált ligandumok

Vizsgálatainkhoz a fém-törzsoldatok a megfelelő  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ , illetve  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  a.lt. tisztaságú szilárd sók háromszor ioncserélt vízben való oldásával készültek. A Co(II)-törzsoldat pontos fémion koncentrációját oxinát formában gravimetriás módszerrel a laboratóriumban már korábban meghatározták [94]. A Mn(II)-törzsoldat ismert mennyiségű sósavat is tartalmazott, melynek pontos koncentrációját pH-potenciometriásan, míg pontos fémion koncentrációját  $MnNH_4PO_4 \cdot H_2O$  alakjában, gravimetriásan határoztuk meg [94].

A vizsgált ligandumok közül az Aha-t, a Bha-t a Sigma-tól vásároltuk, míg a DFB modell-dihidroxámsavakat, (3,4-DIHA, 3,3,-DIHA, 2,5-DIHA, 2,5-*H*,*H*-DIHA, 2,4-DIHA, 2,3-DIHA, 2,2-DIHA) valamint a *Me*Aha-t Dr. Buglyó Péter szintetizálta Tanszékünkön, illetve a Lisszaboni Egyetemen [37, 39, 95]. A trihidroxámsavak közül a DFB-t mezilát formában a CIBA-GEIGY gyógyszergyártól szereztük be. A DFC-t [34], a DFR-t, valamint a TAF-ot a Mikrobiális Biotechnológiai és Sejtbiológiai Tanszék bocsájtotta rendelkezésünkre. Az aminohidroxámsavak közül a Glu- $\gamma$ -ha-t és az Asp- $\beta$ -ha-t a Sigma-tól szereztük be, míg a Hiszha [96], az  $\alpha$ -Alaha és a  $\beta$ -Alaha [40] Tanszékünkön korábbi munkák során kerültek előállításra, jelen munka során a GABA-ha-t szintetizáltuk.

A ligandumok tisztaságáról pH-potenciometriás vizsgálatok alapján győződtünk meg, mely titrálásoknál ~ 0,2 mol/dm<sup>3</sup> HCl és KOH mérőoldatokat használtunk. A sósav törzsoldat előállításához MOLAR gyártmányú tömény (37 % m/m) sósavat hígítottunk, míg a KOH törzsoldat (Merck) szilárd pasztilla feloldásával készült. Az említett mérések során az ionerősséget az általunk készített ~ 1 mol/dm<sup>3</sup> KCl (AnalaR NORMAPUR) oldattal állítottuk be.

#### 3.2. A GABA-ha előállítása

Minden vegyszer, illetve oldószer, melyet felhasználtunk a.lt. tisztaságú volt, ezáltal további tisztítást nem igényeltek. A Z- $\gamma$ -Abu-OH-t (Z-4-Aminovajsav), az etilkloroformiátot a Merck-től, az *N*-Me-morfolint és az O-benzil-hidroxilamin hidrokloridot az Aldrich-től vásároltuk. A metanolt (MeOH), valamint a tetrahidrofuránt (THF) a MOLAR-tól, míg a diklór-metánt a Scharlau-tól rendeltük. Száraz MeOH előállításához Mg-t és N<sub>2</sub> atmoszférát alkalmaztunk, a THF szárítása szintén N<sub>2</sub> alatt történt frissen préselt Na drót és benzofenon segítségével [97]. A vegyület előállításához Schlenk technikát alkalmaztunk. A termék tisztaságát <sup>1</sup>H NMR spektroszkópiás, illetve pH-potenciometriás méréssel ellenőriztük.

#### Z-y-amino-vajsav-hidroxámsav (Z-GABAHA)

4,05 g (0,025 mol) O-benzil-hidroxilamin hidrokloridot 40 cm<sup>3</sup> absz. MeOH-ban állandó kevertetés mellett, N<sub>2</sub> atmoszféra alatt jeges fürdőbe téve oldottuk. Oldódás után hozzáadtuk a KOH pasztillákat (1,38 g, 0,025 mol).

4,00 g Z- $\gamma$ -Abu-OH-t (0,017 mol) 75 cm<sup>3</sup> száraz THF-ben oldottuk állandó kevertetés mellett N<sub>2</sub> atmoszféra és jégfürdő alkalmazásával. 20 perc elteltével hozzáadtuk a 2 cm<sup>3</sup> (0,021 mol) etilkloroformiátot és a 2,4 cm<sup>3</sup> (0,022 mol) *N*-Me-morfolint. Az elegyet további 20 percen keresztül kevertettük N<sub>2</sub> alatt 0 °C körül tartva.

A két oldatot Schlenk technika alkalmazásával összeszűrtük. Ezen módszernek az az előnye, hogy az egyes oldatokból kiváló KCl, illetve az *N*-Me-morfolinsó könnyen eltávolítható. A reakcióelegyet még 2,5 órán keresztül jégbe hűtve, majd szobahőmérsékleten egy éjszakán át kevertettük. Az elegyet bepároltuk, majd a kapott halványzöldes porszerű anyagot vákuumon szárítottuk ismét egy éjszakán keresztül. A terméket diklórmetánból átkristályosítottuk. Szárítás után fehér kristályos anyagot kaptunk. Kitermelés: 2,81 g, 48%.

#### y-amino-vajsav-hidroxámsav (GABAHA)

A védőcsoport eltávolítását katalitikus hidrogénezéssel végeztük. Mivel a védett molekula stabilabb, ezért csak a mérésekhez szükséges mennyiséggel dolgoztunk. 1,00 g (0,003 mol) Z-GABAHA-t 25 cm<sup>3</sup> absz. MeOH-ban felodottuk, majd 0,20 g Pd/C katalizátort (10 % (m/m)), illetve 0,42 cm<sup>3</sup> MeOH·HCl-t (~ 7 M) adtunk hozzá. H<sub>2</sub> gáz túlnyomás alatt 4 órán keresztül kevertettük. A reakcióelegyből a katalizátort redős szűrővel szűrtük ki, majd bepároltuk. Áttetsző olajos anyagot kaptunk. Kitermelés: 0,385 g, 83%.

#### 3.3. A vizsgálati módszerek elvi alapjai, alkalmazott kísérleti körülmények

#### 3.3.1. pH-potenciometria

Vizsgálataink alapjául minden általunk tanulmányozott rendszer esetében a pH-potenciometriás mérési módszer szolgált. Célunk valamennyi esetben a képződő asszociátumok összetételének és stabilitási állandóinak meghatározása volt. Ezen módszer csak abban az esetben alkalmazható, ha a fémion és a ligandum közötti komplexképződés pH-effektussal jár. Abból kifolyólag, hogy a deprotonált ligandum gyenge bázis, a komplexképződés kompetitív reakciót jelent a proton és a fémion között. Tehát a pH méréséből következtetni lehet a képződő komplex(ek) stabilitására. A komplexképződés a következő egyenlettel írható fel:

$$p\mathbf{M} + q\mathbf{L} + r\mathbf{H} \leftrightarrow \mathbf{M}_{\mathbf{p}}\mathbf{L}_{\mathbf{q}}\mathbf{H}_{\mathbf{r}}^{*}$$
 (1)

ahol:

M: fémion, L: teljesen deprotonált ligandum, H: proton

*p*, *q*, *r*: sztöchiometriai együtthatók

(\*Az egyszerűbb kezelhetőség érdekében nem tüntettük fel a részecskék töltését.)

A képződő részecskék stabilitási szorzata az alábbi összefüggéssel definiálható:

$$\beta_{pqr} = \frac{[M_p L_q H_r]}{[M]^p [L]^q [H]^r}$$
(2)

Egy olyan oldategyensúlyi rendszer, amely egy fémiont és egy ligandumot tartalmaz háromkomponensűnek tekinthető. A komponensekre jellemző anyagmérleg az alábbi egyenletekkel írhatók fel:

$$C_{H} = [H] + \sum_{i=1}^{n} r_{i} \beta_{pqr} [M]_{i}^{p} [L]_{i}^{q} [H]_{i}^{r}$$
(3)

$$C_{M} = [M] + \sum_{i=1}^{n} p_{i} \beta_{pqr} [M]_{i}^{p} [L]_{i}^{q} [H]_{i}^{r}$$
(4)

$$C_{L} = [L] + \sum_{i=1}^{n} q_{i} \beta_{pqr} [M]_{i}^{p} [L]_{i}^{q} [H]_{i}^{r}$$
(5)

ahol:

n: a rendszerben képződő asszociátumok száma

A kísérleti adatokból a képződő fémkomplexek stabilitási szorzatainak meghatározása a Tanszéken kifejlesztett PSEQUAD számítógépes programmal történt [98]. Az értékeléshez szükséges a komponensek definiálása, jelen esetben: a proton (H), a fémion (M) és a deprotonált ligandum (L). Bemenő adatként meg kell adni ezen komponensek és a mérőoldat analitikai koncentrációját, a minta kiindulási térfogatát, a mintához adagolt mérőoldat térfogat-pH kísérleti adatpárokat, az asszociátumok (a ligandum proton-komplexei, a fémion hidroxokomplexei és a fémion-ligandum kölcsönhatásában képződő komplexek) számát és összetételét, az ismert és a közelítő stabilitási szorzatokat, továbbá a vízionszorzatot, valamint a leolvasott pH értékekről a koncentrációval kifejezett értékre történő konvertáláshoz szükséges Irving-féle korrekciós tényezőt [99]. A program a bemenő adatok alapján a (3-5) egyenletek megoldásával számolja ki a keresett stabilitási szorzatokat. A közelítést Newton-Raphson iterációval mindaddig végzi a program, míg a mérőoldatra nézve a  $\Sigma(V_{mért} - V_{számolt})^2$  értéke minimumot ad (V: a hozzáadott mérőoldat térfogata). Az iterációsorozat végén megkapjuk a finomított stabilitási szorzatokat és azok standard deviációit, valamint a mért és a számított titrálási görbék pontjaihoz tartozó |V<sub>mért</sub> - V<sub>számolt</sub>| értékek átlagát, az ún. illesztési paramétert, amely a közelítés jóságát jellemzi. A stabilitási állandók közlésekor az utolsó tizedesjegy hibáját zárójelben tüntetjük fel. A feltételezett asszociátumok összességét egy adott rendszer modelljének nevezzük.

Az a modell tekinthető elfogadhatónak, mely kémiai megfontolások alapján értelmezhető és amelynél az illesztési paraméter a legkisebb. Az általunk elfogadott illesztési paraméter mindig kisebb, mint  $1 \times 10^{-2}$  cm<sup>3</sup>. Valamennyi esetben a SUPERQUAD nevű programot használtuk a ligandumok savi disszociációs állandóinak meghatározására, valamint a ligandum- és protonkoncentrációk finomítására [100]. A SED program Windows alatt futó változatát, a MEDUSA-t alkalmaztuk a koncentráció-eloszlás számolásánál [101], mely művelethez szükséges a képződő komplexek összetételének, stabilitási állandóinak, valamint a komponensek koncentrációinak ismerete.

A pH-potenciometriás méréseket Radiometer PHM 93, illetve Radiometer PHM 84 pH-mérővel, Metrohm Dosimat 715 típusú automata bürettával, valamint Metrohm 6.0234.110 vagy 6.0210.100 kombinált üvegelektróddal végeztük. Valamennyi esetben mérőrendszerünket 0,0500 mol/dm<sup>3</sup> koncentrációjú KH-ftalát oldatra (pH = 4,008, t = 25,0 °C), illetve sav-bázis titrálásokkal vízionszorzatra (I = 0,20 mol/dm<sup>3</sup> (KCl), t = 25,0 °C, pKW = 13,76  $\pm$  0,01) hitelesítettük. Az egyensúlyi mérések során a mintákat ultratermosztáttal állandó hőmérsékleten tartottuk (t =  $25,0 \pm 0,1$  °C). Valamennyi esetben a kutatócsoportunkban kifejlesztett technika szerint inert körülmények között dolgoztunk. Minden mérés előtt a savas mintát, zárt edényben 10 - 15 percen keresztül argonnal átbuborékoltattuk, majd a titrálás egész ideje alatt folytattuk az inert gáz mintán való áramoltatását, mely egyben a minták kevertetését is biztosította. A Co(II)-aminohidroxámav rendszerek vizsgálatát a nyomnyi mennyiségű oxigén kizárása érdekében egy korábban szintén a kutatócsoportunkban kifejlesztett speciális berendezés alkalmazásával hajtottuk végre. Az említett rendszer alapja, hogy fém cinket sósavas CrCl<sub>3</sub> oldatban oldunk, melynek reakciójából felszabaduló H2-gáz a jelenlévő Cr(III)-ionokat Cr(II)-vé ezáltal rendszer alkalmas a mintába redukálja, а vezetett argon oxigénmentesítésére.

A pH-potenciometriás titrálásokat a lehetséges pH = 2 - 11 közötti tartományban vagy a csapadék megjelenéséig végeztük. A minták kiindulási térfogata 20,0 cm<sup>3</sup>, 10,0 cm<sup>3</sup>, 8,00 cm<sup>3</sup> vagy 5,00 cm<sup>3</sup> volt a rendelkezésünkre álló ligandumok mennyiségétől függően. A ligandum koncentrációja a mintákban 0,0008 - 0,005 mol/dm<sup>3</sup> között, míg a fémion-ligandum aránya 1:1 és 1:5 között változott. Minden mérés során használt ~ 0,2 mol/dm<sup>3</sup> HCl és KOH

(karbonátmentes) mérőoldatok pontos koncentrációit is pH-potenciometriás titrálással Gran-módszerének alkalmazásával határoztuk meg [102].

A pH-potenciometriás mérések eredményei alapján valamennyi rendszerre meghatároztuk az egyensúlyi modellt, illetve a képződő komplexek stabilitási állandóit. Előfordulhat azonban olyan eset, amikor egy rendszer több, kémiailag reális modellel is jól leírható. Ezen kívül ez a módszer nem ad felvilágosítást a komplexekben megvalósuló kötésmódokról vagy a komplexek geometriájáról. Tehát a pH-metriás mérések önmagukban nem elegendőek egy rendszer megbízható leírására, emiatt szükséges más szerkezeti információt nyújtó vizsgálatokat is elvégezni (pl. UV-látható spektrofotometria, ESI-MS).

#### 3.3.2. UV-látható spektrofotometria

A Co(II)-hidroxámsav rendszerekben regisztrált spektrumok alapján egyedi spektrumokat számoltunk, melyek elemzésével a képződő komplexek geometriájára, a koordinálódó hidroxamátcsoportok számára, valamint az oxidáció mértékére és termékére is következtethetünk.

A Co(II)komplexekre mind az oktaéderes, mind a tetraéderes geometria jellemző. A karakterisztikus sávok tetraéderes geometria esetében a  ${}^{4}A_{2} \rightarrow {}^{4}T_{1}(P)$ , míg oktaéderesnél a  ${}^{4}T_{1g}$  (F)  $\rightarrow {}^{4}T_{1g}$  (P) átmenethez tartoznak. Tetraéderes rendszerekben a látható tartományban lévő átmenet nagyságrendekkel intenzívebb és alacsonyabb energiaszintnél jelenik meg ( $\lambda_{\text{tetraéder}} \sim 600 - 700 \text{ nm}, \lambda_{\text{oktaéder}} \sim 500 \text{ nm}; \epsilon_{\text{tetraéder}} \sim 500 \text{ dm}^3/\text{mol}\cdot\text{cm}, \epsilon_{\text{oktaéder}} \sim 10 \text{ dm}^3/\text{mol}\cdot\text{cm})$ . Az oktaéderes komplexekhez egy a közeli IR-ben megjelenő átmenet ( ${}^{4}T_{1g}$  (F)  $\rightarrow {}^{4}T_{2g}$ ) is tartozik [103]. A spin-pálya kölcsönhatások következtében a sávok deformáltak, illetve több komponensre bomlanak (mely főként a tetraéderes geometriánál jellemző) [104]. Ezen módszerrel a Co(II)komplexek spektrális sajátságai mellett a Co(III)komplexek képződését is vizsgáltuk, melyek azonosítására a 620 nm körül megjelenő ( $\epsilon \sim 140 \text{ dm}^3/\text{mol}\cdot\text{cm}$ ), a  $(t_{2g})^5(e_g)^{1-1}T_{1g} \leftarrow (t_{2g})^{6-1}A_{1g}$  átmenethez rendelhető sávot választottuk [78, 104].

A Mn(II)komplexeket tekintve a félig töltött *d*-héj, főleg gyenge ligandumtér esetén, különös stabilitással rendelkezik, a ligandumtér stabilizációs energia nulla.

A központi ion szeksztett (<sup>6</sup>S) állapota nem elfajult, így semmilyen szimmetria esetén sem hasad fel, ezért elektrongerjesztés csak különböző multiplicitású termek között mehet végbe [104]. Ezen okból kifolyólag a Mn(II)komplexek spektruma rendkívül kis intenzitású sávokat tartalmaz, nem informatív, azonban az UValkalmas látható spektrofotometriás módszer az oxidációs folyamat tanulmányozására. A Mn(III)komplexek képződésének nyomon követésére a 310 nm körüli  $\lambda_{max}$  értékkel és a ~ 2000 dm<sup>3</sup>/mol·cm moláris abszorbanciával jellemezhető sávot használtuk [65-66], 180 perc időtartamon keresztül az első másfél órában 10, majd 30 percenként regisztrálva a spektrumokat. A képződött Mn(III)komplex időbeli stabilitását a Mn(III)-DFB rendszeren 2 héten keresztül a spektrumok rögzítésével követtük nyomon.

Az UV-látható spektrofotometriás mérésekhez Perkin Elmer Lambda 25 típusú kétsugaras spektrofotométert használtunk. A mérések hullámhossz tartománya fémiontól függően változott: 250 - 850 nm (mangán) és 350 - 800 nm (kobalt). A vizsgálatok 25,0 °C-on, 0,20 mol/dm<sup>3</sup> (KCl) ionerősség mellett, 1 cm úthosszú kvarcküvettákban folytak.

A mangániont tartalmazó minták esetében egyedi mintákat készítettünk, ahol a fémion koncentrációja 0,0003 - 0,003 mol/dm<sup>3</sup> között változott, ligandumtól függően. A fém-ligandum arányok a trihidroxámsavaknál 1:1, a dihidroxámsavaknál 1:1,5 és 1:1, míg a monohidroxámsavak esetében 1:3 voltak. Az egyedi mintákat oxigén átbuborékoltatásával oxidáltuk. A spektrumokat KOH oldattal beállított különböző pH-értékeken regisztráltuk (~7, ~8, ~9,5 és ~10) maximum 3 órán keresztül vagy az abszorbancia értékének állandósulásáig.

A kobaltiont tartalmazó minták vizsgálatához szintén egyedi mintákat készítettünk, melyekben a fémion koncentrációja 0,005 - 0,008 mol/dm<sup>3</sup> tartományba esett, a fém-ligandum arányok a mangánt fémionként tartalmazó rendszerekhez hasonlóan változtak azzal a különbséggel, hogy néhány monohidroxámsavnál 1:5 arányú minták is készültek. A Co(II)-hidroxamát rendszerek vizsgálata során méréseinket inert (Ar) atmoszféra alatt végeztük, a spektrumokat különböző pH-értékeken regisztráltuk. A minták összeállításakor a pH a savas tartományba esett, ahol a levegő oxigénje általi oxidáció nem következik be. A gumiszeptummal zárt mintákban az inert atmoszféra biztosításához egy injekciós tű segítségével vezettük az argont a mintát tartalmazó

küvettába, és a pH beállításához szükséges lúgot (KOH) is a szeptumon keresztül juttattuk a mintába. Néhány kiválasztott rendszer esetében a regisztrált spektrumokból az egyes komplexek egyedi spektrumát számoltuk a MATLAB és a PSEQUAD program alkalmazásával. A spektrofotometriás mérési módszert a Co(III)komplexek képződésének vizsgálatához is használtuk. Az oxidációt kétféleképpen hajtottuk végre: egyik esetben a mintát szabad levegőn 24 órán keresztül állni hagytuk, míg másik módszerként a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal való oxidációt alkalmaztuk [78]. A Co(III)komplex képződésére a minta színének változása mellett (rózsaszínből zöldbe fordult) a regisztrált spektrumokban a karakterisztikus sávban tapasztalható jelentős változás is utalt [78].

Tekintettel arra, hogy a DFR és a TAF ligandumokkal megelőző állandók még a Fe(III)-ionnal sem voltak ismeretesek, az összevethetőség érdekében ezen rendszereket is vizsgáltuk. A sziderofórok közül a DFR és a TAF Fe(III)-mal képezett komplexeinek stabilitási állandóit is spektrofotometriás mérésekkel határoztuk meg, mivel a komplexképződés tartománya a pH-metria mérési tartományán kívül esik. Egyedi mintákat készítettünk (ún. Batch technika alkalmazásával), mely mintákban a fémion és a ligandum koncentrációja ( $c_{Fe(III)} =$  $c_{sziderofor} = 0,0001 \text{ mol/dm}^3$ ), valamint az ionerősség (0,20 mol/dm<sup>3</sup>) is állandó volt. Az egyes mintákban a 0,20 mol/dm<sup>3</sup> KCl-ot változó mértékben HCl-ra cseréltük, ezáltal ~ 0,7 pH-t is be tudtunk állítani. Méréseinket  $\lambda = 300 - 800 \text{ nm}$  hullámhossz tartományban, 25,0 °C-on, 1 cm úthosszú kvarcküvettákban végeztük. A spektrumok illesztésével a [Fe(III)L] (L = DFR, TAF) összetételű komplexek stabilitási állandóit a PSEQUAD számítógépes program segítségével számoltuk ki.

#### 3.3.3. Elektro-spray ionizációs tömegspektrometria (ESI-TOF-MS)

A tömegspektrometria lényege, hogy a vizsgálandó anyag részecskéit ionizálják, majd a kapott ionokat elektromos térben felgyorsítják. Az ionizáció leggyakoribb módja, hogy 50-75 eV energiájú termikus elektronokkal hozunk létre ütközési ionizációt gázfázisban (EI), ekkor azonban a molekulák gyakran fragmentálódnak. Kíméletesebb ionizációs lehetőséget biztosítanak a kémiai ionizáció (CI) vagy a gyors atomokkal való bombázás (FAB) módszerei. Azért,

Szabó Orsolya doktori (PhD) értekezés

hogy ne roncsoljuk a szerkezetüket, jó megoldásnak bizonyul az ún. elektrosprayionizációs (ESI) módszer, amely esetén erős elektromos térbe porlasztjuk a már eleve ionos minta oldatát. Az ionforrásban keletkező ionokat egy gyorsítófeszültség bekapcsolásával indítjuk az analizátorba. Ha a felgyorsított ionokat mágneses térben vezetik tovább, azok a Lorenz-féle erő hatására körpályára kényszerülnek, azaz tömegüktől és töltésüktől függően más és más pályán haladnak, majd eljutnak a detektorba [105].

A fragmentáció elkerülése végett az előzőekben részletezett ionizációs technikák közül az elektrospray-ionizációt alkalmaztuk komplexeink vizsgálatához [106]. Méréseinket pozitív és negatív módban egyaránt elvégeztük, mivel a képződő komplexeink töltése mindkét tartomány vizsgálatát szükségessé tette. A regisztrált jeleket tömeg/töltés arány (m/z arány) alapján azonosítottuk.

A vizsgálatokhoz Bruker BIOTOF II ESI-TOF készüléket, Cole Palmer 74900 pumpát alkalmaztunk, az áramlási sebesség 2 µl/min volt. Szárító gázként nitrogént használtunk, melynek hőmérsékletét 100 °C-on tartottuk, a porlasztógáz (szintén nitrogén) nyomása 30 psi volt. A kapillárisra kapcsolt feszültség 4500 V, 120 V, 40 V és 30 V volt. Az m/z skálát angiotensin II és leucin-enkephalin peptidekkel hitelesítettük. Az adatgyűjtést BioTOF v 2.2, míg az adatfeldolgozást XmassBioTOF v 6.0.0 szoftverrel végeztük.

Mintáinkban ligandumtól függően változtattuk annak koncentrációját 0,0005 - 0,002 mol/dm<sup>3</sup> közötti tartományban. Rendszertől függően a fém-ligandum arányt 1:1 - 1:5, míg a pH-t ~ 7,9 - 9,5 közöttire állítottuk.

#### 3.3.4. Ciklikus voltammetria

A ciklikus voltammetria széles körben használható viszonylag egyszerű és olcsó elektrokémiai módszer, mely segítségével gyorsan nyerhetők minőségi és mennyiségi információk (pl. formálpotenciál, látszólagos stabilitási állandó) az elektronátmenettel járó folyamatokról.

Mérés során a vizsgálandó oldatba merülő megfelelő munkaelektródon a feszültséget lineárisan változtatjuk egy kezdő potenciál értéktől ( $E_{kezdeti}$ ) egy meghatározott feszültség értékig ( $E_{\lambda 1}$ ), melyet forduló potenciálnak nevezünk, ahol

a potenciálváltozás előjele megfordul és szintén lineárisan halad a második forduló potenciálig ( $E_{\lambda 1}$ ), amely általában az  $E_{kezdeti}$ -vel egyenlő. Ebben a pontban ér véget a ciklus. A potenciál változását egy referenciaelektród potenciáljához viszonyítva mérjük, mely általában telített kalomel (SCE) vagy Ag/AgCl elektród. A mérés folyamán a cellán átfolyó áramot mérjük és ábrázoljuk azt az alkalmazott feszültség függvényében. Az így kapott görbét ciklikus voltammogramnak nevezzük [107].

Amennyiben a ciklus során mindét irányú folyamat lejátszódik, a voltammogramból leolvasható a katódos  $(E_k)$  és az anódos  $(E_a)$  csúcspotenciál, amelyek számtani középértéke adja az ún. átlagpotenciált. (Valamennyi mérés kiértékelését a CACYVO nevű programmal végeztük.)

$$E_{1/2} = \frac{E_k + E_a}{2} \tag{6}$$

A kiszámított átlagpotenciálból ( $E_{1/2}$ ) a normál hidrogénelektródra vonatkoztatott formálpotenciál értékét úgy kaphatjuk meg, hogy a referenciaelektród potenciáljával korrigáljuk ( $E_{1/2(Ag/AgCl)} = 0,209$  V).

$$E^{0} = E_{1/2} + E^{0}_{Ag/AgCl}$$
(7)

A csúcsok távolsága függvénye a folyamatban átlépő elektronok számának. Egy elektronos folyamatban a távolság 59 mV. Hangsúlyozni kell, hogy a Nernstegyenlet csak termodinamikailag reverzibilis folyamatokra érvényes, tehát ha ismerjük az átlépő elektronok számát és a csúcsok távolsága nagyobb a (8) egyenletből adódónál, az valamilyen irreverzibilitásra utal [107], melynek nem csak termodinamikai, hanem kinetikai okai is lehetnek.

$$\Delta E = E_a - E_k = \frac{0.059}{n} \tag{8}$$

ahol:

n: résztvevő elektronok száma

Egy folyamat reverzibilitására a katódos és az anódos csúcsáramok ( $i_k$  és  $i_a$ ) arányából is következtethetünk, mivel ha a folyamat reverzibilis, akkor a két csúcsáram arányának egy körüli értéknek kell lennie.

Ahogy fentebb már említésre került a ciklikus voltammetriás módszer stabilitási állandó számolására is alkalmazható olyan esetekben, amikor a fémiont egyik oxidációs állapotban tartalmazó komplex stabilitási állandója ismert, a fémiont másik oxidációs állapotban tartalmazó komplex összetétele ugyanaz, akkor ez utóbbi komplex állandója az alábbi egyenlet szerint számolható:

$$E^{0}(M^{III}H_{x}L/M^{II}H_{x}L) = E^{0}(M^{III}(H_{2}O)_{6})/(M^{II}(H_{2}O)_{6}) + \frac{RT}{nF}\ln(\beta_{II}/\beta_{III})$$
(9)

ahol:

 $E^{0'}(M^{III}H_xL/M^{II}H_xL)$ : az L ligandum jelenlétében, x koordinációs számú komplex képződése mellett, a rendszerre jellemző voltammogramból számítható formálpotenciál

 $E^{0}(M^{III}(H_{2}O)_{6})/(M^{II}(H_{2}O)_{6})$ : az adott fém-aqua redoxi párra jellemző standard redoxipotenciál

 $\beta_{II}/\beta_{III}$ : a fémion redukált, illetve oxidált formáját tartalmazó fentebb definiált összetételű komplex stabilitási szorzatának hányadosa

Ciklikus voltammetriás méréseinket Metrohm gyártmányú 746 VA Trace Analyzer készülékkel végeztük. A kisebb anyagigény érdekében a csoportunkban korábban kifejlesztett mikrocella alkalmazása tűnt célszerűnek. Munkaelektródként 2 mm átmérőjű szén- (CHI104) (kobalt) vagy platinaelektródokat (mangán) (CHI102), referenciaként Ag/AgCl/3KCl mol/dm<sup>3</sup> elektródot (BASI Instr. RE-5B, MF-2079), míg segédelektródként platinaelektródot (ALS Co. Japan) használtunk. A mérések között valamennyi esetben a munkaelektród felületét 0,05 µm-es szemcseméretű alumínium-oxid szuszpenzióval megtisztogattuk. A kalibrálást a  $[Fe(CN)_6]^{3-}/[Fe(CN)_6]^{4-}$  redoxi rendszerrel végeztük (E<sup>0</sup> = 0,458 V, normál hidrogénelektródra vonatkoztatva, I = 0,5 mol/dm<sup>3</sup> KCl) [108]. Valamennyi mérést 25,0 °C-on, argon atmoszféra alatt hajtottuk végre. A mintatérfogat mindig 1,5 cm<sup>3</sup>, míg az elektrolit KNO<sub>3</sub> volt.

A mangánt tartalmazó rendszerek esetében a ligandumok koncentrációját 0,0011 - 0,0045 mol/dm<sup>3</sup>, a fémionét 0,001 - 0,0015 mol/dm<sup>3</sup>, az elektrolit

koncentrációját 0,005 - 0,075 mol/dm<sup>3</sup> tartományban változtattuk. A TAF esetében a rendelkezésre álló kevés anyag miatt a pH-metriás (hígult) mintát használtuk a ciklikus voltammetriás mérésekhez. Minden mérés előtt a Mn(II)komplexeket oxigén buborékoltatásával Mn(III)komplexekké oxidáltuk (az oxidáció részletesebb leírása a **3.3.2. részben** található), és így a mérések a redukciós folyamattal indultak. A mérési tartomány 700 - -200 mV volt, a pásztázási sebességet 5 - 500 mV/s között változtattuk.

A kobaltot tartalmazó rendszereknél a fémion koncentrációja a mintákban 0,003 mol/dm<sup>3</sup> vagy 0,015 mol/dm<sup>3</sup>, a ligandumé 0,009 mol/dm<sup>3</sup> vagy 0,0045 mol/dm<sup>3</sup>, a kálium-nitráté 0,005 mol/dm<sup>3</sup> vagy 0,01 mol/dm<sup>3</sup> volt. Mérési tartományként +200 - -600 mV-ot, pásztázási sebességet pedig 5 - 400 mV/s között változtattuk. A méréseket a kobalt esetében is oxidált (az oxidálószer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> volt), Co(III)komplexeket tartalmazó mintákkal végeztük (az oxidáció részleteit a **3.3.2.** részben foglaltuk össze).

#### 3.3.5. Relaxometria

Napjainkban széleskörűen alkalmazott orvosdiagnosztikai módszer a Mágneses Rezonanciás Képalkotás (MRI). Ezen vizsgálatoknál mágneses térbe helyezik a betegeket, és a szervezetükben lévő protonok (főként vízprotonok) relaxációsebességét vizsgálják. A felvételi idő csökkentése, valamint a képek kontrasztosságának növelése érdekében ún. kontrasztanyagokat alkalmaznak. Mivel a longitudális relaxációsebesség (T<sub>1</sub>) növekedése a jel intenzitásának növekedését eredményezi, ezáltal az ún. T<sub>1</sub> kontrasztanyagok alkalmazása vált általánossá. A kontrasztanyagok hatékonyságát a relaxivitás (R<sub>1</sub>) jellemzi, R<sub>1</sub> =  $1/T_1$ . A protonok relaxációsebességét (R<sub>1</sub> =  $1/T_1$ ) a paramágneses anyagok növelik a legnagyobb mértékben. Ezek közül is azok a fémionok, melyek félig lezárt külső elektronhéjjal rendelkeznek, pl. Mn(II), Fe(III), Gd(III). Ezen ionok esetében az elektronrelaxációs idők viszonylag hosszúak ( $10^{-9}$  s körüliek), melyből kifolyólag a párosítatlan elektronok által keltett fluktuáló mágneses térben a protonok relaxációja gyorsan végbemegy [109]. A méréseinket 20 MHz-es Minispec Bruker gyártmányú relaxométerrel végeztük. Mérés során a T<sub>1</sub>-relaxációs időket határoztuk meg, melyből a fentebb említett képlet alapján relaxivitást számoltunk. A relaxivitás additívitása alapján felírt egyenletből [110] individuális relaxivitás értékeket számoltunk a PSEQUAD program segítségével.

$$1/T_1 = R_{Mn}[Mn(H_2O)_6] + R_{MnL}[MnL] + R_{MnHL}[MnHL] + \dots + 1/T_{10}$$
(10)

ahol:

R<sub>MnL</sub>, R<sub>MnHL</sub>...: a jelenlévő Mn(II)komplexek relaxivitása R<sub>Mn</sub>[Mn(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>]: a Mn(II)<sub>aq</sub> relaxivitása 1/T<sub>10</sub>: relaxivitás Mn(II) jelenléte nélkül 1/T<sub>1</sub>: relaxivitás

A műszer az inversion-recovery módszerrel dolgozik, amely alapja, hogy a 0. időpontban 180°-os impulzust ad ki,  $\tau$  ideig vár, majd egy 90°-os impulzus után újra  $\tau$  ideig vár, aztán detektál és vár D ideig, hogy a rendszer újra egyensúlyba kerüljön. (Egy egy mérés során a műszer által automatikusan beállított 10 különböző késleltetési időt ( $\tau$ ) alkalmaztunk, és egy adott késleltetési időnél 4 mérés átlagolásával kaptuk a T<sub>1</sub>-relaxációs időket.)

Méréseinket 25,0 °C-on, 0,20 mol/dm<sup>3</sup> KCl ionerősség mellett, 0,400 cm<sup>3</sup> mintatérfogatban, inert atmoszféra (Ar) alatt végeztük. A ligandum koncentrációja valamennyi esetben 0,002 mol/dm<sup>3</sup> volt, míg a fémionét 0,0004 - 0,002 mol/dm<sup>3</sup> tartományban változtattuk. A pH ~ 7,6-t Hepes (4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetánszulfonsav), míg a pH ~ 9,3-t NEP (*N*-etil-piperazin) pufferrel állítottuk be. A TAF esetében a relaxációs időket ~ 7,8 és ~ 8,6 pH értékek mellett mértük Hepes, illetve DMP (dimetil-piperazin) pufferek alkalmazásával. A pufferkoncentráció a mintákban mindig 0,05 mol/dm<sup>3</sup> volt. A minták előkészítését is inert atmoszféra alatt végeztük. A **3.3.2. részben** leírt technika szerint folyamatosan argon gázt buborékoltattunk a mintán keresztül (szeptumon keresztül, injekciós tű segítségével), majd az argonozás megkezdését követő néhány perc elteltével a lúgos pH beállítására használt megfelelő puffert a szeptumon keresztül másik injekciós tű segítségével juttattuk a mintába.
# 4. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

#### 4.1. A vizsgált ligandumok sav-bázis sajátságai

Jelen munkában vizsgált ligandumok protonált formáinak képletei, a hidroxámavcsoportok száma szerinti csoportosítás alapján kerültek összefoglalásra az 1.1. részben. Valamennyi vizsgálat első lépésében ezen ligandumok savi disszociációs állandóit pH-potenciometriás titrálással határoztuk meg. А 1-3. meghatározott értékeket az táblázatokba foglaltuk össze. Α monohidroxámsavak, valamint a dihidroxámsavak tekintetében valamennyi esetben volt irodalmi adatunk [3, 37, 39], melyekkel az általunk meghatározottak jó egyezést mutattak. Kutatócsoportunkban az előbb említett ligandumok sav-bázis tulajdonságait korábban már elemezték [3, 37, 39], így ezek részletes kifejtésétől eltekintünk. Összességében megállapítható, hogy az egyszerű monohidroxámsavak disszociációs állandói 8,6 - 9,3 közötti tartományba esnek (1. táblázat), melyek közül az Aha a legbázikusabb, a Bha, illetve a MeAha tekintetében a szubsztituens cseréje (az előbbiben az R<sub>C</sub> csoport cseréje metilről fenilre, míg az utóbbi esetben az R<sub>N</sub> szubsztituens cseréje hidrogénről metilre) a hidroxámsavcsoportok savi erősségében több, mint fél log egység növekedést eredményez.

A GABA-ha már két disszociábilis protont tartalmaz, mivel a hidroxámsavcsoport mellett a teljesen protonált ligandum  $R_C$  szubsztituensében van egy ammóniumcsoport is. Mivel a pH-metriás módszerrel makroállandók meghatározása lehetséges, így ezen módszerrel az egyes csoportok tényleges bázicitására nem kapunk információt. Van azonban egy irodalmi előzmény, mely azt tartalmazza, hogy a GABA-ha aminocsoportja kisebb bázicitású, mint a hidroxamátcsoport [46].

Ligandum	pK1	pK2	pK3
Aha	9,25(1)	—	—

Szabó Orsolya doktori (PhD) értekezés

MeAha	8,63(1)	_	_
Bha	8,69(2)	-	-
GABA-ha	8,79(1)	10,17(1)	_
Asp-β-ha	2,18b	8,32(1)	9,48(1)
Glu-γ-ha	2,21c	8,60(1)	9,60(1)
Hisha	5,35(3)	7,11(2)	9,09(1)

(Zárójelben a standard deviáció értékei vannak feltüntetve.)

(\*Az Asp- $\beta$ -ha és a Glu- $\gamma$ -ha esetében a számolásnál az irodalomban talált karboxilátcsoporthoz tartozó p*K* értékeket rögzítettük [111-112])

Az Asp- $\beta$ -ha és a Glu- $\gamma$ -ha esetében egy további karboxilcsoport is jelen van, melyhez mindkét ligandumnál a legkisebb disszociációs állandó rendelhető [111-112]. A Hiszha oldalláncában az aminocsoport mellett egy imidazolgyűrű is található. A három proton disszociációja átfedő folymatokban játszódik le, az eddigi ismereteink alapján a mikroállandók meghatározása még nem járt sikerrel [113].

Ligandum	pK1	pK2
2,5-H,H-DIHA	8,79(5)	9,70(5)
2,5-DIHA	8,46(2)	9,23(2)
2,4-DIHA	8,44(1)	9,26(1)
2,3-DIHA	8,40(1)	9,25(1)
2,2-DIHA	8,34(1)	9,23(4)
3,4-DIHA	8,39(1)	9,31(1)
3,3-DIHA	8,37(1)	9,30(1)

(Zárójelben a standard deviáció értékei vannak feltüntetve.)

A DFB modell dihidroxámsavaknak két hidroxámsavcsoporthoz tartozó disszociábilis protonjuk van (**2. táblázat**), mely értékek a monohidroxámsavaknál meghatározottaknak közel megfelelnek. Továbbá a monohidroxámsavaknál megfigyelt trend itt is érvényesül, miszerint a primer hidroxámsav ( $R_N = -H$ , 2,5-*H*,*H*-DIHA) bázikusabb, mint a megfelelő szekunder ( $R_N = -CH_3$ , 2,5-DIHA) analógja.

A trihidroxámsav alapú természetes sziderofórok közül négyet vizsgáltunk, melyek közül a TAF esetében egyáltalán nem találtunk irodalmi előzményt, a DFR-nél

egyetlen irodalmi előzmény volt fellelhető [114], míg a DFB és DFC esetében korábbi Tanszéki eredmények is ismertek [34, 115], melyekkel az általunk meghatározottak jó egyezést mutattak. A DFB protonáltságában eltér a többi általunk vizsgált sziderofórtól, ugyanis a három hidroxámsavcsoport mellett rendelkezik egy nem koordinálódó terminális aminocsoporttal is, melyhez a 10,85(1)-ös p*K* érték rendelhető [34].

Ligandum	pK1	pK2	pK3	pK4
DFB	8,33(2)	8,96(3)	9,52(1)	10,85(1)
DFR	8,09(5)	8,93(2)	9,57(2)	-
DFC	7,93(4)	8,84(3)	9,82(3)	_
TAF	4,15(6)	8,58(5)	10,57(4)	_

(Zárójelben a standard deviáció értékeit üntettük fel.)

Összességében az mondható, hogy a négy sziderofór közül három (DFB, DFC és DFR) egymáshoz képest közel azonos pH-tartományban veszíti el a protonokat, azonban a TAF-nak van egy kiugróan kis (pK = 4,15(6)) és egy kiugróan nagy (pK = 10,57(4)) értéke. Ennek az lehet a magyarázata, hogy valószínűleg az egyik hidroxámsavcsoport deprotonálódása után a gyűrűs szerkezetben egy intramolekuláris H-kötés alakul ki, mely az egyik állandó értékének csökkenését, míg a másik növekedését eredményezi.

### 4.2. A Mn(II) és a Co(II) kölcsönhatása monohidroxámsavakkal

A jelen munkában vizsgált monohidroxámsavak (képletek az **1.1. részben** vannak feltüntetve) között szerepelnek egyszerű monohidroxámsavak (Aha, MeAha, Bha), melyek esetében az  $R_C$  és az  $R_N$  szubsztituensek további donorokat nem tartalmaztak. A hidroxámsavhoz kapcsolódó szubsztituensekbeli donorcsoport(ok) típusuktól, molekulán belüli elhelyezkedésüktől függően befolyásolhatják a képződő komplex(ek)en belül kialakuló kötésmódot, stabilitást. Ebből kifolyólag tanulmányoztuk, hogy mely esetekben marad meg a hidroxamát koordinálódásának preferenciája, illetve mikor válik az oldalláncbeli donoratomok koordinálódása kedvezményezetté. Ezen ligandumcsaládból vizsgáltunk az  $R_C$ 

szubsztituensbeli molekularészben további koordinálódni képes donorcsoportot (GABA-ha) vagy kelátképzőt (Glu-γ-ha, Asp-β-ha, Hiszha) tartalmazó aminohidroxámsavakat.

A komplexképződés tanulmányozása érdekében mindkét fémionnál elsőként pH-potenciometriás méréseket végeztünk a Kísérleti körülmények (**3.3.1.**) fejezetben részletezett arányok mellett és technika alkalmazásával.

A vizsgált egyszerű monohidroxámsavak szerkezeti képleteiből (**1.1. fejezet**) látható, hogy a ligandumok  $R_N$  vagy  $R_C$  szubsztituenseiben különböznek egymástól, mely eltérés hatással lehet a komplexképződésre pl. a molekulán belüli elektroneloszlásra gyakorolt hatásából kifolyólag vagy sztérikus okok miatt is. Reprezentatív példaként a **3. ábrán** a Mn(II)-Aha (**a**) és a Co(II)-Aha (**b**) titrálási görbéit tüntettük fel.



Komplex	Aha	Bha	
		log β	
$[MnL]^+$	3,83(2)	3,36(1)	3,52(1)
$[MnL_2]$	7,05(2)	5,89(3)	5,90(5)
$[MnH_{-1}L]$	-6,38(3)	-6,89(3)	-7,7(7)

Hidroxámsav alapú sziderofórok és modelljeik mangán- és kobaltkomplexei

A titrálási görbékből jól látható, hogy a mangán(II)iont tartalmazó rendszerekben a komplexképződés pH 6 körül indul, és a hidrolízist még a nagy ligandumfelesleg (fém-ligandum 1 : 5 arány) sem tudja megakadályozni. A Co(II) tekintetében a komplexképződés a Mn(II)-höz képest kisebb pH-n indul (pH ~ 4), nagyobb pH-effektussal, és kellően nagy fém-ligandum arány (1:5) mellett visszaszorul a hidrolízis.

A 3.3.2. fejezetben kifejtésre került mind a Mn(II), mind a Co(II) tekintetében az adott geometriához rendelhető átmenetek, illetve karakterisztikus sávok. A Mn(II)hidroxamát rendszerekre regisztrált sávok nagyon kis intenzitásúak voltak ( $\varepsilon < 1$ dm<sup>3</sup>/mol·cm), a Co(II)-iont tartalmazó rendszerek esetén jól definiált karakterisztikus sávok jelentek meg a spektrumokban. A kapott eredmények alapján megállapítottuk, hogy mindkét fémion monohidroxámsavakkal képződő komplexeiben oktaéderes geometria valósul meg. А Co(II)-egyszerű monohidroxámsav rendszerekben regisztrált spektrumok közül, reprezentatív példaként a Co(II)-Aha anaerob körülmények között, különböző pH-értékeken regisztrált spektrumait tüntettük fel a 4. ábrán.



<sup>(</sup>c<sub>ligandum</sub> = 0,005 mol/dm<sup>3</sup>; I = 0,20 mol/dm<sup>3</sup> KCl; t = 25,0 °C) (A negatív lúg ekvivalens savfölösleget jelent.)

Szabó Orsolya doktori (PhD) értekezés

ligandum 1:5 arány; I = 0,20  $mol/dm^3$  KCl)

Az oktaéderes geometriából kifolyólag három hidroxamát koordinálódására nyílik lehetőség mindkét fémion komplexeiben. A monohidroxámsav rendszerekben képződő komplexekben megvalósuló lehetséges koordinációs módokat az **5. ábrán** foglaltuk össze.

A titrálási görbék legjobb illesztésével kapott modelleket és a stabilitási állandókat tartalmazza a **4. táblázat** mindkét fémion vonatkozásában. A titrálási görbe alapján a számolások pH ~ 4 -10 közötti tartományban vagy csapadékkiválásig történtek.



Komploy	Aha	MeAha	Bha
Komplex		log β	
$[MnL]^+$	3,83(2)	3,36(1)	3,52(1)
[MnL2]	7,05(2)	5,89(3)	5,90(5)
[MnH-1L2]	-3,46(6)	-	-
[MnH-1L]	-6,38(3)	-6,89(3)	-7,7(7)
$[CoL]^+$	4,81(1)	4,55(1)	4,64(1)
[CoL2]	8,63(1)	8,33(2)	8,33(1)
$[CoL3]^{-}$	10,3(1)	10,90(5)	10,62(5)

(Zárójelben a standard deviációk értékei vannak felüntetve.)

#### Hidroxámsav alapú sziderofórok és modelljeik mangán- és kobaltkomplexei

A fenti táblázatba foglalt eredmények alapján megállapítható, hogy mindkét fémionnal alkotott rendszerekben képződik az egy-, illetve a két hidroxamátot komplex. A Mn(II)-egyszerű monohidroxámsav rendszerekben tartalmazó azonban, ahogy az a titrálási görbék alapján feltételezhető volt, a három hidroxamátot tartalmazó komplexek képződési tartománya nagymértékben átfedésben van a hidrolízis tartományával, ebből kifolyólag nem képződnek a három koordinált hidroxamátcsoportot tartalmazó komplexek. Látható, hogy az  $[MnL]^+$  és az  $[MnL_2]$  komplexek mellett  $[MnH_1L]$  és/vagy  $[MnH_1L_2]^-$  (valójában [MnL(OH)] és/vagy [MnL<sub>2</sub>(OH)]<sup>-</sup>) vegyes hidroxokomplexek képződnek, melyekben egy-, illetve kettő hidroxamát koordinálódott. A Co(II)-iont tartalmazó rendszerekben, az egy hidroxamátot tartalmazó vegyes hidroxokomplexek elsősorban fém-ligandum 1:1 aránynál, a csapadékkiválást megelőzően képződnek, melyek mellett kellően nagy ligandumfelesleg biztosításával képződik a [CoL<sub>3</sub>]<sup>-</sup> összetételű komplex. Bár a kobalt(II) első hidrolízis állandója közel egy log egységgel kisebb, mint a mangán(II)ioné (log  $K_{Mn(OH)+}$  = -10,59, log  $K_{Co(OH)+}$  = -9,65 [116]), de a Co(II)-monohidroxámsav rendszerekben a komplexképződés jóval kisebb pH-n indul, mint a Mn(II)-iont tartalmazókban, és a hidrolízis, mint a kellő ligandumfelesleggel komplexképződéssel konkuráló folyamat visszaszorítható (3. b) ábra). Ebből kifolyólag a harmadik hidroxamát koordinációja is megtörténik a hidrolízist megelőzően, bár a [CoL<sub>3</sub>]<sup>-</sup>-ra vonatkozó állandók lényegesen nagyobb hibával számolhatók.

A Co(II)-monohidroxámsav rendszerekben a [CoL<sub>3</sub>]<sup>-</sup> összetételű komplex képződését UV-látható spektrofotometriás, valamint ESI-MS mérésekkel is alátámasztottuk. A rögzített spektrumokból megállapítható (**4. ábra**), hogy spektrális változás következik be a komplexképződés előrehaladtával. A **6. a**) **ábrán** feltüntetett Co(II)-Aha 1:5 arányú koncentráció-eloszlás görbéivel a regisztrált spektrumokat (**4. ábra**) összevetve látható, hogy 8-as pH fölött, ahol a harmadik hidroxamát koordinálódása bekövetkezik,  $\lambda \sim 550$  nm megjelenik egy nagyobb moláris abszorbanciájú sáv, amely a <sup>4</sup>A<sub>2g</sub> (F)  $\leftarrow$  <sup>4</sup>T<sub>1g</sub> (F) átmenethez rendelhető [104]. A mért spektrumokból egyedi spektrumokat számoltunk (**6.b**) **ábra**), mely egyértelműen alátámasztja, hogy az előbb említett csúcs a [CoL<sub>3</sub>]<sup>-</sup> komplexhez rendelhető.



Szabó Orsolya doktori (PhD) értekezés

6. ábra: a) A Co(II)-Aha rendszerben képződő komplexek koncentráció-eloszlás görbéi fém-ligandum 1:5 arány mellett (c<sub>Aha</sub> = 0,025 mol/dm<sup>3</sup>) b) A Co(II)-Aha rendszerben képződő komplexekre, 1:3 és 1:5 aránynál regisztrált spektrumokat együtt kezelve számolt egyedi spektrumok

A triszkomplex képződésének tényleges bizonyítása érdekében egy kiválasztott ligandummal (Bha) ESI-MS méréseket is végeztünk. Az eredmények egyértelműen alátámasztották a három koordinált hidroxamátot tartalmazó komplex képződését (Co(II)-Bha rendszerben:  $CoL_2K^+$  m/z = 370,0 és  $CoL_3K_2^+$  m/z = 545,0; mérési paraméterek: pH = 9,44; fém-ligandum arány 1:5). Megállapítható, hogy a triszkomplex képződése megfelelő körülmények között (nagy pH és ligandumfelesleg) egyértelműen bizonyított a Co(II)-egyszerű monohidroxámsav rendszerekben.

Ha a képződő komplexek stabilitására gyakorolt szubsztituenshatást szeretnénk vizsgálni, akkor megtehetjük a hidroxámsavcsoport bázicitásának és a képződött komplexek stabilitási állandóinak ismeretében (**1. és 4. táblázat**). Ezen számításokat a megfelelő folyamatokra elvégezve a kapott eredményeket mindkét fémion és mindhárom egyszerű monohidroxámsav vonatkozásában az **5. táblázatban** tüntettük fel.

Folyomot	Aha	MeAha	Bha
roiyamat	log K		
$Mn(II) + HL \leftrightarrow MnL + H+$	-5.42	-5.28	-5.17
$Mn(II) + 2 HL \leftrightarrow MnL2 + 2 H+$	-11.45	-11.33	-11.48

Hidroxámsav alapú sziderofórok és modelljeik mangán- és kobaltkomplexei

$Co(II) + HL \leftrightarrow CoL + H+$	-4.45	-4.08	-4.06
$Co(II) + 2 HL \leftrightarrow CoL2 + 2 H+$	-9.87	-8.94	-9.07
$Co(II) + 3 HL \leftrightarrow CoL3 + 3 H+$	-17.35	-14.99	-15.64

A számszerűleg nagyobb érték jelenti a komplexképződés kedvezményezettebb voltát. Ha az  $R_N = -H$  (Aha) és az  $R_N = -CH_3$  (MeAha) szubsztituensek hatását nézzük, akkor megállapíthatjuk, hogy a stabilitásbeli különbség már a mangán(II)komplexeknél is megjelenik, bár nem jelentős mértékű. Azt lehet mondani, hogy a származtatott állandók közötti számszerű különbségek a hibahatáron vannak. Míg ha kobalt(II) a fémion, akkor ezen rendszerekben, ahol a képződő komplexek is nagyobb stabilitásúak, a stabilitásban megmutatkozó eltérés is jelentősebb a Mn(II)-iont tartalmazó rendszerekhez képest valamennyi komplex esetében. Mindezek alapján megállapítható, hogy a metilcsoport (elektronküldő csoport) jelentősebb hatással van a hidroxámsavcsoport nitrogénjéhez tartozó nemkötő elektronpárjának C - N kötés közötti delokalizációjára, ami ugyanakkor a karbonil oxigénen növekvő elektronsűrűséget eredményez, melynek következtében az N-metil (MeAha) származék képezi a stabilabb komplexet (az Aha-val szemben). Ezen következtetések megegyeznek a korábban Crumbliss és kutatócsoportja, valamint a kutatócsoportunk által tett megállapításokkal [3, 117-118]. Ha az R<sub>N</sub> szubsztituens fenilcsoport, akkor a primer (R<sub>N</sub> = -H) származékhoz képest nagyobb, míg a szekunderhez ( $R_N = -CH_3$ ) viszonyítva hasonló stabilitású komplexek képződnek mindkét fémionnal. Összességében megállapíthatjuk, hogy a H-t elektronküldő csoportra cserélve stabilitásnövelő hatással van a képződő komplexekre.

A Mn(II)- és a Co(II)komplexek stabilitási állandóinak összevetésével megállapítható, hogy közepes stabilitású komplexek képződnek mindkét fémionnal. Amennyiben az általunk meghatározott stabilitási állandók közül az acetohidroxámsav [ML]<sup>+</sup> összetételű komplexéhez tartozó állandókat beillesztjük a  $3d^5-d^{10}$  fémionokkal ugyanazon ligandummal alkotott megfelelő komplexéhez tartozó stabilitási állandóinak sorába [3, 45], akkor egyértelműen megállapítható, hogy azok beleillenek a nagyspinszámú, oktaéderes geometriával rendelkező komplexekre vonatkozó Irving-Williams sorba, amely szerint a különböző  $3d^5-d^{10}$ fémionokkal alkotott komplexek stabilitása a következő sorrendet követi: Mn(II) < Fe(II) < Co(II) < Ni(II) < Cu(II) > Zn(II) (**7. ábra**) [72].

Szabó Orsolya doktori (PhD) értekezés



Ezideig azon monohidroxámsavakkal kapott eredményeket ismertettük, melyek csak hidroxámsavcsoportot tartalmaztak kelátképzőként, és az R<sub>C</sub> szubsztituens valamennyi esetben metil- vagy fenilcsoport volt. A következőkben olyan hidroxámsav származékok (aminohidroxámsavak) Mn(II)-vel és Co(II)-vel végzett kísérleteinek eredményeit részletezzük, melyek az R<sub>C</sub> szubsztituensben további donorcsoportot vagy kelátképzőt tartalmaznak. Ezen ligandumcsalád alternatív kötőhelyként N-tartalmú funkciós csoportokat tartalmaz. Ismert tény és jelen munka során is tapasztaltuk, hogy a N-donoratomot tartalmazó Co(II)komplexek rendkívül érzékenyek az oxigénre. Ebből kifolyólag ezen rendszerek pH-potenciometriás vizsgálatát a **3.3.1. fejezetben** részletezett speciális technika alkalmazásával kellett végeznünk, hogy az oxigénnyomokat is eltávolítsuk. Az UV-látható spketrofotometriás méréseknél azonban nem tudtuk az oxigénnyomok tökéletes kizárását biztosítani.

A molekulán belüli további donorcsoport jelenléte növeli a koordinációs lehetőségek számát. A **8. ábrán** a megvalósuló kötésmódok közül a legvalószínűbbeket tüntettük fel, azon aminohidroxámsavakra vonatkozóan, amelyek az  $R_C$  szubsztituensükben egy további aminocsoportot tartalmaznak. Látható, hogy a hidroxamátszerű (O,O) koordináció mellett (**8. ábra a**)), az aminoés hidroxámsavcsoport nitrogénje ( $N_{amino}, N_{hidroxamát}$ ) is koordinálódhat (**8. ábra b**)), valamint vegyes koordináció is létrejöhet egy- ( $N_{amino}, O_{hidroxamát}$ ) (**8. ábra c**)), illetve többmagvú ((O,O)( $N_{amino}, N_{hidroxamát}$ )) komplexekben (**8. ábra d**)).



# 8. ábra: Néhány példa az R<sub>C</sub> szubsztituensben egy aminocsoportot tartalmazó aminohidroxámsavak legvalószínűbb koordinációs módjaira (α-Alaha: x = 0; β-Alaha: x = 1; GABA-ha x = 2)

Az előbb említett ligandumcsaládból kutatócsoportunkban korábban már vizsgálták az  $\alpha$ -Alaha és a  $\beta$ -Alaha kölcsönhatását mindkét fémionnal [40, 45]. Az előbbi esetben az aminocsoport a hidroxámsavcsoporthoz képest  $\alpha$ -, míg utóbbiban  $\beta$ helyzetben van. A jelen munka során szintetizált GABA-ha ligandumban az aminocsoport még távolabb,  $\gamma$ -helyzetben helyezkedik el a hidroxamátcsoporttól. A nitrogéneken keresztüli koordináció (**8. ábra b**)) az  $\alpha$ -Alaha tekintetében öttagú, míg a  $\beta$ -Alaha-nál hattagú kelát képződését eredményezi. A kutatócsoportbeli megelőző eredmények alapján a Mn(II)- $\alpha$ -Alaha rendszerben a hidroxamát oxigéneken keresztüli koordináció a valószínűbb, míg a Co(II)-rendszerben nagyobb pH-n a nitrogének koordinációját bizonyították. A  $\beta$ -Alaha esetében a mangánnal hidroxamátszerű koordinációt feltételeznek, míg a kobaltnál valószínűsítik, hogy bár az  $\alpha$ -Alaha-hoz képest kisebb mértékben, de a nitrogén is szerepet játszik a kölcsönhatásban [45].

A GABA-ha-nál az öttagú (O,O)-kelát mellett, a héttagú (N,N)- és (N,O)-kelát képződésére nyílik lehetőség. A többmagvú komplexekben megvalósuló vegyes koordinációs mód tekintetében, a pH-metriás mérésekből számolt oldategyensúlyi modell alapján (**6. táblázat**) megállapítható, hogy nem kedvezményezett a kétmagvú komplexek képződése. A **6. táblázatbeli** modellből az is látszik, hogy a mangánnál az egy és a két koordinált hidroxamátot tartalmazó komplexekre lehetett stabilitási állandót számolni, míg a kobalt esetében a triszkomplex ([Co(GABA-ha)<sub>3</sub>]<sup>-</sup>) is képződik.

Komulov	GABA-ha		
Komplex	Mn(II)	Co(II)	

Szabó Orsolya doktori (PhD) értekezés

$[MHL]^{2+}$	13,56(3)	14,40(3)
$[ML]^+$	3,6(2)	-
$[MH2L2]^{2+}$	26,38(9)	27,76(5)
$[MHL2]^+$	17,0(1)	18,58(4)
[ML2]	7,0(1)	-
[ML3] <sup>-</sup>	-	11,43(8)

(Zárójelben a standard deviációk értékeit tüntettük fel.)

A **6. táblázat** adatait elemezve az mondható, hogy a protonált komplexek legvalószínűbben az aminocsoportot tartalmazzák protonálva. Ha az egyszerű monohidroxámsavak Mn(II)-vel képezett egy és két koordinált hidroxamátot tartalmazó [ML]<sup>+</sup> és [ML<sub>2</sub>] komplexeinek állandóit (**4. táblázat**) összevetjük a GABA-ha megfelelő állandójával, akkor láthatjuk, hogy az értékek közel hasonlóak. Ha ezt az összevetést a Co(II)triszkomplexeivel is elvégezzük, akkor hasonló megállapításra jutunk. Tehát megállapíthatjuk, hogy ha az aminocsoport  $\gamma$ helyzetben van a hidroxámsavcsoporthoz képest, akkor az általunk vizsgált két fémionnal az minden bizonnyal mérhető mértékben nem vesz részt a komplexképződésben, a koordináció hidroxamátszerű. Ebből következően a széles pH-tartományban protonált formában lévő, nem koordinált aminocsoportnak akár további kölcsönhatás kialakítására is lehetősége nyílhat pl. egy vegyes ligandumú komplexben, hidrogénkötés kialakítására képes ligandummal növelheti a kölcsönhatás erősségét, amely esetleg a szelektivitásban játszhat fontos szerepet.

A Co(II)-GABA-ha rendszerben a három koordinált hidroxamátot tartalmazó komplex jelenlétét spektrofotometriás mérésekkel is alátámasztottuk. A különböző pH-értékeken, anaerob körülmények között regisztrált spektrumokban (**9. ábra**) nagyobb pH-n, az egyszerű monohidroxámsav rendszereknél bizonyítottan a triszkomplexhez rendelt,  $\lambda \sim 550$  nm megjelenik a nagyobb moláris abszorbanciával jellemezhető sáv.



Hidroxámsav alapú sziderofórok és modelljeik mangán- és kobaltkomplexei

 $(c_{GABA-ha} = 0.025 \text{ mol/dm}^3; \text{ fém-ligandum 1:5 arány; I} = 0.020 \text{ mol/dm}^3 \text{ KCl})$ 

Ha az oldálláncban további kelátképző csoport is jelen van a hidroxámsavcsoport mellett, akkor a ligandum lehetséges koordinációs módjainak száma még tovább nőhet. Az Asp-β-ha és a Glu-γ-ha ligandumoknál, ahogy az a 1.1. részben összefoglalt szerkezeti képletek alapján látható, egy α-aminosavszerű kelát kialakítására képes molekularész van a hidroxamátcsoporttól eltérő távolságban (β-, ill. γ-helyzetben), míg a Hiszha esetében az oldallánc hisztaminszerű kelátképzőt tartalmaz. A 10. ábrán ezen koordinációs módokra foglaltunk össze néhány példát. Az Asp-β-ha és a Glu-γ-ha esetében a hidroxamátszerű öttagú kelát mellett (10. ábra a)), aminosavszerű (Namino, Okarbonil) szintén öttagú kelát (10.ábra c)) kialakítására van lehetőség. Továbbá, ha az aminszerű koordinációt (10. ábra b)) vesszük figyelembe, akkor az az Asp- $\beta$ -hanál hattagú, míg a Glu-γ-ha-nál héttagú kelát kialakulását eredményezi. A Hiszha tekintetében az aminszerű és a hidroxamátszerű öttagú kelát mellett hisztaminszerű (10. ábra d)) koordinációval hattagú kelát képzése is elképzelhető. Továbbá tridentátszerű kötésmód is megvalósulhat és többmagvú komplexek is képződhetnek mindhárom ligandummal. Irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy a 10. ábrán bemutatott keláttípusok akár hasonló stabilitásúak is lehetnek az általunk tanulmányozott fémionok tekintetében, ebből kifolyólag elvben valamennyi koordinációs módra lehetőség nyílik [119-124].



Szabó Orsolya doktori (PhD) értekezés

# **10. ábra:** Az Asp-β-ha, a Glu-γ-ha és a Hiszha aminohidroxámsavakkal lehetséges néhány koordinációs mód

Bár a pH-metriás mérések nem szolgáltatnak direkt információt a komplexekben megvalósuló kötésmódokra, azonban az állandók elemzésével feltételezéseket tehetünk. A **7. táblázatban** a vizsgált aminohidroxámsav rendszerek titrálási görbéinek legjobb illesztéséből számolt oldategyensúlyi modelleket és a stabilitási állandókat foglaltuk össze mindkét fémionra vonatkozóan.

		Mn(II)			Co(II)	
Komplex	Asp-β- ha	Glu-γ- ha	Hisha	Asp-β-ha	Glu-γ-ha	Hisha
			lo	gβ		
[MH2L]3+	-	-	19,16(4)	-	-	-
[MHL]2+	12,41(4)	13,34(1)	12,89(6)	13,37(6)	13,85(4)	13,49(3)
[ML]+	4,31(2)	4,47(2)	-	6,65(2)	6,32(2)	7,08(3)
[MH2L2]2 +	24,72(8)	-	24,4(2)	-	27,33(5)	26,20(7)
[MHL2]+	16,1(1)	16,9(3)	17,08(6)	18,3(2)	19,40(4)	19,49(6)
[ML2]	7,43(4)	7,31(4)	9,00(4)	10,01(6)	9,62(7)	10,70(8)

(Zárójelben a standard deviációk értékeit tüntettük fel. Ugyanazon összetételű komplexhez rendelhető többféle töltés miatt azok feltüntetésétől eltekintünk.)

Az egyensúlyi modellből látszik, hogy mindkét fémionnal mono- és biszkomplexek képződnek, illetve azok különböző protonáltságú formái. Az állandók elemzésével az mondható, hogy az Asp-β-ha és a Glu-γ-ha rendszerekben képződő [ML] és  $[ML_2]^{2^-}$  komplexek stabilitási állandói minimum fél log egységgel nagyobbak az egyszerű monohidroxámsavak megfelelő komplexeihez képest (**4. táblázat**). Ez a stabilitásbeli növekedés arra utal, hogy nem tisztán hidroxamátszerű koordináció valósul meg a komplexekben. Feltételezzük, hogy a monokomplexekben ugyan a fém-ligandum arány 1:1, azonban a tényleges összetétel lehet pl. [Mn<sub>2</sub>L<sub>2</sub>]. A dimer jelenlétét a Co(II)-Asp-β-ha rendszerben az ESI-MS mérések alá is támasztották ((Co(HL)<sub>2</sub>)<sub>2</sub>H<sup>+</sup> m/z = 707,04; L = Asp-β-ha). A dimerben lévő kötésmódok egyik megvalósulási formája lehet, hogy ugyanahhoz a fémionhoz egy hidroxamátszerű-

Hidroxámsav alapú sziderofórok és modelljeik mangán- és kobaltkomplexei

és egy α-aminosavszerű kelátképző csoport is koordinálódik. A biszkomplexekben a nagyobb stabilitás eredhet pl. a tridentátszerű koordinációból, ami úgy is létrejöhet, hogy ugyanahhoz a fémionhoz a hidroxamátcsoport két oxigénje mellett az aminocsoport nitrogénje is koordinálódik. A Hiszha rendszerekben még nagyobb a stabilitásbeli különbség az egyszerű monohidroxámsavakhoz képest. A [CoL]<sup>+</sup> komplexben utalhat pl. a dimer nagyobb preferenciájára, melyben hidroxamátszerű és hisztaminszerű kelát feltételezhető, míg a biszkomplexekben pedig arra, hogy a hidroxamát mellett egyidejűleg az imidazol is koordinálódik a fémionhoz, tehát tridentátszerű kötésmód alakul ki a komplexben.

A Mn(II)- és Co(II)-monohidroxámsav rendszerek eredményeit összegezve a következő megállapításokat tehetjük:

• az egyszerű monohidroxámsav rendszerekben közepes stabilitású komplexek képződnek, az Irving-Williams trendnek megfelelően a Co(II)komplexek nagyobb stabilitásúak a Mn(II)komplexeknél

• a Co(II) - egyszerű monohidroxámsav rendszerekben képződik a triszkomplex, szemben a Mn(II)-t tartalmazó rendszerekkel, ahol a hidrolízis ezt minden vizsgált aránynál megakadályozta

 γ - helyzetben lévő aminocsoport (GABA-ha) nem befolyásolja a hidroxamátcsoport koordinációját egyik általunk vizsgált fémionnal sem

• további kelátképzőt tartalmazó monohidroxámsav (Asp-β-ha, Glu-γ-ha, Hiszha) Mn(II)- és Co(II)-rendszereiben a koordináció nem tisztán hidroxamátszerű

# 4.3. A Mn(II) és a Co(II) kölcsönhatása több hidroxámsavcsoportot tartalmazó ligandumokkal

A vizsgált ligandumok ezen csoportjába négy trihidroxámsav alapú természetes sziderofórt és hét sziderofór modell dihidroxámsavat sorolunk.

A négy sziderofórt szerkezeti hasonlóságuk alapján két csoportba osztottuk. Az **1.1. fejezetben** feltüntetett szerkezeti képletek alapján megállapítható, hogy a deszferrioxamin B (DFB) és a deszferrikrocin (DFR) három hidroxámsavcsoportját peptid alapú lánc köti össze, azonban a DFB egy nyíltláncú, flexibilisebb molekula, míg a DFR hidroxámsavcsoportjai egy gyűrűhöz kapcsolódnak, ami merevebb szerkezetet eredményez. Továbbá meg kell említeni a DFB eltérő protonáltságát is, amely a **4.1. fejezetben** már kifejtésre került. Az N',N'',N'''-triacetilfuzarinin C-t (TAF) és a deszferrikoprogént (DFC) tekintve egy gyűrűs és egy nyíltláncú molekuláról beszélünk. Mindkettőnél a hidroxámsavcsoportok mellett  $\beta$ -helyzetben van egy kettős kötés, valamint az összekötő lánc a DFC-nél egy, míg a TAF-nál három észtercsoportot is tartalmaz.

A dihidroxámsavak vonatkozásában hét DFB modell dihidroxámsav szerepelt a vizsgált ligandumaink között (1.1. fejezetben találhatók a szerkezeti képletek). Közülük a 2,5-DIHA-t tekinthetjük alapnak, hiszen ebben a ligandumban a hidroxámsavcsoportokat összekötő szénlánc hossza, illetve szerkezete megegyezik a DFB-vel. A 2,5-H,H-DIHA abban különbözik a 2,5-DIHA-tól, hogy az előbbiben az R<sub>N</sub> szubsztituens hidrogén, az utóbbiban pedig metilcsoport. A 2,4-DIHA, 2,3-DIHA és 2,2-DIHA esetében az R<sub>N</sub> szubsztituens mindig metilcsoport, azonban a szénlánc hossza rövidült egy, kettő, valamint három szénatommal. A 3,3-DIHA és 3,4-DIHA-t tekintve а hidroxámsavcsoport nitrogénjéhez mindkét dihidroxámsavnál metilcsoport kapcsolódik, azonban a peptidcsoport helyzete változik a láncban.

#### 4.3.1. A Mn(II) és a Co(II) kölcsönhatása dihidroxámsavakkal

Az előzőekben felsorolt hét dihidroxámsav kölcsönhatását tanulmányoztuk Mn(II)- és Co(II)-fémionokkal. A pH-potenciometriás mérések legjobb illesztését adó oldategyensúlyi modelleket és a képződő komplexek stabilitási állandóit a **8.** táblázatba foglaltuk. A kapott eredmény alapján megállapítottuk, hogy mindkét fémion tekintetében a dihidroxámsav rendszerekben az [ML] összetételű komplexek egymáshoz viszonyított stabilitása megfelel az irodalmi bevezetőben (**2.2. fejezet**) leírtaknak. A Co(II)-dihidroxámsav rendszerek azonban némi meglepő eredményt szolgáltattak.

Hidroxámsav alapú sziderofórok és modelljeik mangán- és kobaltkomplexei

Komplex	2,2- DIHA	2,3- DIHA	2,4- DIHA	2,5- DIHA	2,5- H,H- DIHA	3,3- DIHA	3,4- DIHA
				log β			
$[MnHL]^+$	12,84(7)	12,66(7)	12,92(6)	12,8(1)	13,43(7)	12,70(5)	12,72(1)
[MnL]	5,62(2)	5,57(2)	5,75(2)	6,25(1)	6,77(1)	4,80(2)	4,93(1)
$[Mn2L3]^{2-}$	16,3(8)	17,54(7)	17,87(8)	18,0(2)	20,43(8)	15,6(1)	14,4(2)
$[CoHL]^+$	14,19(7)	14,18(5)	14,07(7)	13,61(9)	14,01(1)	13,89(4)	13,87(3)
[CoL]	7,31(4)	7,19(3)	7,16(4)	8,09(1)	8,33(1)	6,20(3)	6,31(3)
[Co2L3] <sup>2-</sup>	-	-	-	-	23,46(8)	-	-

(Zárójelben a standard deviációk értékeit tüntettük fel.)

A képződő komplexekben a spektrális sajátságok alapján mindkét fémion esetében a dihidroxámsavakkal is oktaéderes koordinációs mód megvalósulását igazoltuk [103]. Ebből kifolyólag a koordinációs helyek telítése három hidroxamát koordinációjával lehetséges, amely a dihidroxámsavakkal csak többmagvú,  $[M_2L_3]^{2-}$ összetételű komplexben jöhet létre, oly módon, hogy két [ML] egységet egy harmadik ligandum hídként köt össze, melynek megvalósulási módját a **11. ábrán** tüntettük fel.



Az előzőekben leírtak alapján a Mn(II)- és a Co(II)-dihidroxámsav rendszerekben 1:1 arányú komplexek képződhetnek, melyekben egy- ([MHL]<sup>+</sup>), illetve két ([ML]) hidroxamát lehet koordinálva, valamint ligandumfelesleg mellett, a **11. ábrán** bemutatott kötésmóddal három koordinált hidroxamátot tartalmazó komplex is képződhet. A titrálási görbék alapján számolt egyensúlyi modell (**8. táblázat**) a Mn(II)-rendszerekben várakozásunknak megfelelően valóban az  $[MnHL]^+$ , az [MnL] és az  $[Mn_2L_3]^{2-}$  összetételű komplexek képződését mutatta, míg meglepő módon a Co(II)-dihidroxámsav rendszerekben a 2,5-*H*,*H*-DIHA kivételével a  $[Co_2L_3]^{2-}$  komplexre nem lehetett stabilitási állandót meghatározni. Ezen megállapítást, hogy a Co(II)-ionhoz a harmadik hidroxamát koordinálódása nem kedvezményezett az ESI-MS adatok is megerősítették, mivel az eredmények csupán az 1:1 arányú komplexek képződését (a Co(II)-2,2-DIHA esetében a 2:2 arányú dimer jelenlétét is) igazolták (pl. Co(II)-2,2-DIHA rendszerben: CoLK<sup>+</sup> m/z = 343,0 és Co<sub>2</sub>L<sub>2</sub>K<sup>+</sup> m/z = 647,0). Ugyanezen következtetésre juthatunk az UV-látható spektrofotometriás eredmények alapján is. Reprezentatív példaként a Co(II) - 2,4-DIHA anaerob körülmények mellett, különböző pH-értékeken, fém-ligandum 1:1 és 1:1,5 arány mellett regisztrált spektrumait mutatjuk be (**12. ábra a**) és b)).



Látható, hogy az 1:1 és a ligandumfelesleg (1:1,5 arány) mellett regisztrált spektrumok egyezést mutatnak. A Co(II)-monohidroxámsav (**4. ábra**) és a későbbiekben tárgyalt Co(II)-trihidroxámsav rendszerekre regisztrált spektrumok ugyanakkor mutatják, hogy egyértelműen lényeges különbség van a két-, illetve a három koordinált hidroxamátot tartalmazó komplexek egyedi spektrumaiban (**6.** 

Hidroxámsav alapú sziderofórok és modelljeik mangán- és kobaltkomplexei

**ábra b**)). A Co(II)-dihidroxámsav rendszereknél regisztrált spektrumok tehát azt bizonyították, hogy maximálisan két kelát koordinálódik a képződő komplexekben. Az irodalomban is leírtak hasonló eredményt. Az acetilszalicilhidroxámsav Co(II)komplexeinek vizsgálata során sem képződött a három kelátot tartalmazó komplex. A szerzők a két kelátot tartalmazó komplexeknél oktaéderes geometriát igazoltak, azonban a mágneses momentumok a tetraéderes koordiációnak feleltek meg. Erre a szokatlan viselkedésre próbáltak feltételezéseket tenni (bizonyos mértékű polimerizáció vagy a komplexek szolvatációja), de egyértelmű választ nem tudtak adni, valójában a kérdést nyitva hagyták [125].

A meglepő eredmény egyik lehetséges magyarázatául szolgálhat a sztérikus gátlás az átalunk vizsgált dihidroxámsavak esetében. Úgy tűnik, hogy a három koordinált hidroxamátot tartalmazó komplex képződése gátolt az *N*-Me-származékoknál, szemben a primer származékkal (2,5-*H*,*H*-DIHA), ahol a  $[Co_2L_3]^{2-}$ összetételű komplex képződése pH 7 fölött indul és pH 9-nél a fémion ~ 60 %-a van ezen komplexben (fém ligandum 1:1,5 aránya mellett), ahogy az a feltüntetett koncentráció-eloszlás görbén is látható (**13. ábra**).



A Mn(II)- és a Co(II)- dihidroxámsavak rendszerekben képződő komplexekről összességében megállapíthatjuk:

- mindkét fémion tekintetében a dihidroxámsav rendszerekben képződő [ML] összetételű komplexek egymáshoz viszonyított stabilitása megfelel a kutatócsoportban korábban más fémionokkal tapasztaltakkal
- a Co(II) szekunder dihidroxámsav rendszerekben a harmadik hidroxamát koordinálódása nem kedvezményezett

Szabó Orsolya doktori (PhD) értekezés

# 4.3.2. A Mn(II) és a Co(II) kölcsönhatása trihidroxámsav alapú természetes sziderofórokkal

A 14. ábrán példaképpen a Mn(II)-DFB (a)), a Mn(II)-DFR (b)), továbbá a Co(II)-DFB (c)) és a Co(II)-DFR (d)) rendszerében 1:1 arány mellett regisztrált titrálási görbéket tüntettük fel. A görbékből látható és általánosan elmondható a Mn(II)-sziderofór rendszerekről, hogy a komplexképződés pH 5 - 10 közötti tartományban játszódik le, jól definiált pH-effektussal. A két görbe összevetésekor szembe tűnhet, hogy bár egyik esetben sem mutat jelentős tagoltságot a titrálási görbe, azonban a DFR-nél a szinte vízszintes lefutás arra utal, hogy jelentősebb kooperativitás érvényesül a komplexképződés során, mint a DFB-nél. Ez arra enged következtetni, hogy a rendszerben a három hidroxamát koordinációja rendkívül kedvezményezett, míg az egy vagy a két koordinált hidroxamátot tartalmazó komplexek csak alárendelt arányban lehetnek jelen, melyet a feltüntetett koncentráció-eloszlás görbék is egyértelműen alátámasztanak (15. ábra a)) (pH 7,5 körül < 15 %-ban van jelen a [MnHDFR], míg pH 8 körül a [MnDFR]<sup>-</sup> komplex már szinte kizárólagos). A feltüntetett reprezentatív titrálási görbékhez képest a DFC-vel a komplexképződés kisebb pH-n, ~ 5,5, indul és a görbe lefutása kisebb mértékű kooperativitásra utal. Ez fejeződik ki a koncentráció-eloszlás görbékben is. Látható, hogy a rendszerben képződő részecskék közül egyik jelenléte sem elhanyagolható (15. ábra c)). A TAF-nak, ahogy az a 4.1. fejezetben kifejtésre került van egy számottevően savasabb hidroxámsavcsoportja (pK = 4,15(6)), ami azt eredményezi, hogy a komplexképződés már 3-as pH körül indul. Ennek megfelelően a koncentráció-eloszlásokban a [MnH<sub>2</sub>TAF]<sup>+</sup> összetételű komplex pH 5 körül már ~ 15 - 20 %-ban van jelen, míg a többi sziderofórnál ebben a tartományban még csak elkezdődik a komplexképződés. Továbbá pH 9.6 körül a titrálási görbében megfigyelhető egy törés a csapadékkiválás miatt.

Bár nem tüntettük fel az összes titrálási görbét, az általunk vizsgált valamennyi Mn(II)-sziderofór rendszerre megállapítható, hogy a hidroxámsavcsoportok mindhárom protonja fémindukált leszorítású, amely a három koordinált hidroxamátot tartalmazó komplex képződésére utal.





 $(c_{DFB} = 0,002 \text{ mol/dm}^3, c_{DFR} = 0,00072 \text{ mol/dm}^3; I = 0,20 \text{ mol/dm}^3 \text{ KCl};$ t = 25,0 °C)

Ahogy az a feltüntetett reprezentatív titrálási görbékből is látható (**14. ábra c**) és **d**)) a Co(II)-trihidroxámsav rendszerekben a komplexképződés a Mn(II)-vel alkotott megfelelő rendszerekhez képest kisebb pH-n indul, jellemzően pH 4 felett, és a folyamatot a mangánhoz képest nagyobb pH-effektus kíséri. A mangánhoz hasonlóan a kobalt három sziderofórral alkotott rendszerében (DFB, DFC, TAF), melyek közül a Co(II)-DFB 1:1 arányú görbéjét tüntettük fel példaként, három ekvivalens lúgfogyást tapasztaltunk. Azonban, ahogy az a **14. d**) ábrán is látható a Co(II)-DFR esetében a titrálás során két ekvivalens lúgfogyás után a fémiont

tartalmazó mintához tartozó görbe visszasimul a szabad ligandum titrálási görbéjére, ami arra enged következtetni, hogy a harmadik hidroxamát koordinációja nem következik be a komplexképződés során. Ahogy az a **4.3.1. fejezetben** kifejtésre került, hasonló tapasztalataink voltak a Co(II)-dihidroxámsav rendszerek vizsgálatakor.



Az általunk tanulmányozott Mn(II)- és Co(II)-sziderofór rendszereket illetően a pH-potenciometriás mérések alapján meghatározott egyensúlyi modellt és az egyes részecskékhez tartozó stabilitási állandókat a **9. táblázat** tartalmazza.

Komplexek	DFB	DFR	DFC	TAF
	log β			
[MnH3L] <sup>2+</sup>	32,6(1)	-	-	-
$[MnH2L]^+$	25,51(2)	-	22,56(8)	21,1(4)
[MnHL]	17,39(3)	14,2(2)	16,09(2)	15,2(1)
[MnL] <sup>-</sup>	6,81(3)	7,57(2)	8,28(3)	5,9(1)
[CoH3L] <sup>2+</sup>	32,5(3)	-	-	-
$[CoH2L]^+$	27,22(1)	-	23,85(8)	22,2(1)
[CoHL]	19,73(1)	16,65(4)	18,14(3)	16,9(1)
[CoL] <sup>-</sup>	9,06(2)	6,44(7)	9,72(5)	7,7(1)

Hidroxámsav alapú sziderofórok és modelljeik mangán- és kobaltkomplexei

(Zárójelben a standard deviációk értékeit tüntettük fel.)

Az adatok alapján megállapítható, hogy csak 1:1 arányú, különböző protonáltságú komplexek képződnek. Az  $[M(H_3L)]^{2+}$  összetételű komplex csak a DFB-vel képződhet. Feltételezhetően ezen komplexekben egy hidroxamát koordinálódik, kettő még protonált formában, koordinálatlanul van jelen, és a harmadik proton a terminális aminocsoporton található. A többi három sziderofórnál az [M(H<sub>2</sub>L)]<sup>+</sup> összetétel tartozhat az egy koordinált hidroxamátot tartalmazó komplexekhez, mely részecske a DFR esetében, ahol a titrálási görbék (14. ábra b) és d)) a lépcsőzetes folyamatok jelentős kooperativitását mutatták mérhető arányban nem képződik. A DFB esetében az  $[M(H_2L)]^+$  összetételű, míg a többi három sziderofórnál az [M(HL)] típusú komplexekben feltételezzük a két hidroxamát koordinációját. Valószínűleg az [M(HDFB)] komplexben már mindhárom hidroxamát koordinálódott, azonban a komplexképzésben részt nem vevő terminális aminocsoport még protonált formában van jelen, a három másik sziderofórnál az [ML]<sup>-</sup> összetétel tartozhat a triszkelátos komplexhez. Az [M(DFB)] komplexben a három koordinált hidroxamát és a terminális aminocsoport deprotonálódt formában való jelenlétét feltételezzük. Α komplexekben feltételezett kötésmódokat reprezentatívan a DFB-re vonatkozóan a 16. ábrán tüntettük fel.





**16.** ábra: Feltételezett kötésmódok az **a**) [M(H<sub>3</sub>DFB)]<sup>2+</sup>, a **b**) [M(H<sub>2</sub>DFB)]<sup>+</sup> és a **c**) [M(HDFB)] komplexekben

Ha a **9. táblázatba** foglalt stabilitási állandók értékeit tekintjük, akkor a két fémionnal alkotott megfelelő komplexek egymáshoz viszonyított stabilitása az Irving-Williams trendnek megfelelő [72]. Egyetlen esetben mutatkozik kivétel, nevezetesen a DFR sziderofórral képezett [ML]<sup>-</sup> típusú komplexnél. Itt a Mn(II)ionnal alkotott komplex állandója a nagyobb. Ez a relatíve kisebb stabilitása a [CoDFR]<sup>-</sup> komplexnek egyértelműen arra utal, hogy ebben a komplexben két koordinált hidroxamátcsoport mellett, egy nem koordinált, deprotonált formában lévő hidroxamátcsoport van jelen. (Ez a következtetés már a **14. d) ábrán** bemutatott titrálási görbe alapján is levonható volt.) Valószínűleg a molekula merev szerkezete (a szerkezeti képlet a **1.1. fejezetben** található), a gyűrűhöz kapcsolódó hidroxámsavcsoportokat tartalmazó "karok" térbeli elhelyezkedése sztérikusan nem kedvez a harmadik kelátképző csoport koordinációjának.

A harmadik hidroxámsavcsoport koordinációjára a Co(II)-DFB esetén egyértelmű bizonyítékot szolgáltattak a látható hullámhossz tartományban, a pH függvényében felvett spektrumok. Részletes spektrofotometriás vizsgálatok azért csak a DFB-vel történtek, mert a DFC spektrumában megjelenő igen nagy intenzitású ligandumsáv átnyúlik a látható tartományba is, ebből kifolyólag a nagyságrendekkel kisebb intenzitású (moláris abszorbanciájú) d-d sáv a ligandumsávra szuperponálódik, így az nehezen elemezhető. A DFR és a TAF esetében pedig sajnálatos módon kevés ligandum állt a rendelkezésünkre.





17. ábra: a) A Co(II) - DFB rendszer különböző pH - értékeken, inert körülmények között, fém - ligandum 1:1 arány mellett regisztrált látható spektrumai (c<sub>DFB</sub> = 0,0055 mol/dm<sup>3</sup>); b) a Co(II) - DFB rendszerben képződő komplexek egyedi spektrumai c) a Co(II) - DFB rendszerben képződő komplexek koncentráció-eloszlás görbéi 1:1 arány mellett (c<sub>DFB</sub> = 0,005 mol/dm<sup>3</sup>)

A Co(II)-DFB rendszerben a spektrumokat anaerob körülmények között, különböző pH-értékeken regisztráltuk (17. ábra a)). A felvett spektrumok alapján a  $[Co(H_2DFB)]^+$ , a [Co(HDFB)] és a  $[Co(DFB)]^$ komplexekre individuális spektrumokat számoltunk (a Co(II)aq spektrumát külön mérésben határoztuk meg) (17. ábra b)). Az egy kelátképző csoportot tartalmazó [Co(H<sub>3</sub>DFB)]<sup>2+</sup> összetételű komplexre egyedi spektrumot nem tudtunk számolni, mivel ahogy a feltüntetett koncentráció-eloszlás görbékből is látható (17. ábra c)), ez a komplex a spektrofotometriás körülmények között elhanyagolható mértékben képződik a rendszerben. Az egyedi spektrumokból egyértelműen látható, hogy a [Co(HDFB)] és a [CoDFB]<sup>-</sup> komplexekben azonos kötésmód valósul meg (az előbbi komplexben a terminális aminocsoport még protonált formában van), mely egyértelműen eltér а két koordinált hidroxamátcsoportot tartalmazó  $([Co(H_2DFB)]^+)$  komplexben megvalósulótól. Az előbb leírtak alapján azt mondhatjuk, hogy a spektrofotometriás mérések egyértelműen bizonyítják a három kelátképző csoport koordinációját a [Co(HDFB)] és a [CoDFB] komplexekben.

Ezen eredmények alapján, a [CoDFR]<sup>-</sup> kivételével valamennyi általunk vizsgált trihidroxámsav rendszerben az [ML]<sup>-</sup> típusú komplexben az előzőekben kifejtett kötésmódokat feltételezzük.

Amennyiben azt kívánjuk elemezni, hogy az egyes sziderofórok egymáshoz képest milyen stabilitású komplexeket képeznek Mn(II)-, illetőleg Co(II)-ionnal, akkor több szempontot is szem előtt kell tartanunk. Az állandók közvetlenül nem hasonlíthatók össze, mivel a DFB-nek eltérő a protonáltsága a többi sziderofórhoz képest, továbbá különösen a TAF-nak, a többihez képest nagyon eltérő a bázicitása is (**3. táblázat**). Ebből kifolyólag a megfelelő komplexek stabilitásának összevetése csak úgy lehetséges, ha a protonkompetíciós egyensúlyokkal számolunk állandókat. Mivel a ligandumok protonkomplexeire csak a makroállandókat ismerjük, az elemzést legegyértelműbben azon komplexeknél tehetjük meg, amelyek már mindhárom kelátképzőt deprotonálva tartalmazzák ([ML]<sup>-</sup>, illetőleg a DFB esetében a [M(HDFB)]).

Tehát az egyensúly és a vonatkozó állandó:

$$M + H_3L \leftrightarrow ML + 3 H^+$$
(11)

ahol:

M: fémion, H<sub>3</sub>L: teljesen protonált formában lévő ligandum, ML: a ligandumot teljesen deprotonált formában tartalmazó komplex

$$\log K = \log \beta_{ML} - \log \beta_{H_3L} \tag{12}$$

ahol:

 $\log K$ : a ligandumok összbázicitását is figyelembe vevő, a ligandumot teljesen deprotonált formában tartalmazó komplexek származtatott stabilitási állandója  $\log \beta_{ML}$ : az ML stabilitási állandója

log  $\beta_{H_{3L}}$ : az adott ligandum bruttó protonálódási állandója, amely a **3. táblázatba** foglalt pK értékekből számolható

A DFB esetében: 
$$M + H_4DFB \leftrightarrow M(HDFB) + 3 H^+$$
 (13)

ahol:

M: fémion, H<sub>4</sub>DFB: teljesen protonált formában lévő ligandum, MHDFB: a DFB három hidroxamátcsoportját deprotonált formában, míg a terminális aminocsoportot protonált formában tartalmazó komplex

A **10. táblázatba** mindkét fémion trihidroxámsavakkal alkotott három koordinált hidroxamátot ( $[ML]^-$ , [MHDFB] (M = Mn(II) és Co(II); L = DFR, DFC és TAF) tartalmazó komplexeinek származtatott állandóit foglaltuk bele. A számolt állandók úgy értelmezhetők, hogy a kisebb negatív értékkel rendelkező komplexek tekinthetők stabilabbnak.

**10. táblázat:** A Mn(II)- és a Co(II)-sziderofór rendszerekben képződő [ML]<sup>-</sup> összetételű komplexek származtatott állandói (log K)

Ligandum	HDFB	DFR	DFC	TAF
Komplex	log K			
[MnL] <sup>-</sup>	-20,00	-19,02	-18,31	-17,50
[CoL] <sup>-</sup>	-17,75	-20,15	-16,87	-15,70

A **10. táblázat** állandóinak elemzésével megállapítható, hogy mind a Mn(II)-, mind a Co(II)-sziderofór rendszerekben a DFC és a TAF ligandumok nagyobb stabilitású komplexeket képeznek, mint a DFB és a DFR. Valószínűleg ez a stabilitásnövekedés a β-helyzetben lévő kettős kötés és a hidroxamátcsoport között kialakuló konjugációval magyarázható, melyet a **18. ábrán** szemléltetünk. Tanszékünkön számos más átmenetifém-ionnal (pl. Ni(II), Cu(II), Zn(II)) hasonló stabilitásbeli különbséget tapasztaltak az [ML]<sup>-</sup> komplexek tekintetében, melyet szintén ezzel a hatással értelmeztek [34].



# 18. ábrán: A hidroxamátcsoport és a β-helyzetben lévő kettős kötés között kialakuló konjugáció

A Mn(II)-sziderofór rendszerekben bár a DFB-ben és a DFR-ben hasonló szerkezeti egységek figyelhetők meg, azonban a stabilitásban egy nagyságrend különbség mutatkozik. Valószínűleg a DFR-ben a gyűrűhöz karként kapcsolódó hidroxámsavcsoportok koordinációja sztérikusan kedvezőbb, mint a DFB nyíltláncú szerkezetében. A másik két sziderofór tekintetében a TAF képezi a több mint egy log egységgel stabilabb komplexet, melynek magyarázatául szolgálhat, hogy a komplexképződés szempontjából a TAF makrociklusos szerkezete a nyílt lánchoz képest (DFC) kedvezőbb.

A Mn(II)-rendszereknél a stabilitásbeli különbségekre tett megállapítások a Co(II)-DFR kivételével, a Co(II)-sziderofór rendszerekben is érvényesek. A származtatott állandó is alátámasztja tehát azt a következtetést, hogy a [CoDFR]<sup>-</sup> komplexben csak két hidroxamát koordinációja valószínűsíthető.

A Mn(II)- és a Co(II)- sziderofór rendszerekben a következő megállapításokat tehetjük összegzésképpen:

- csak 1:1 arányú különböző protonáltságú komplexek képződnek
- mindkét fémionnal a DFC és a TAF stabilabb komplexeket képez, mint a DFB vagy a DFR
- a Co(II) DFR rendszerben a harmadik hidroxamát koordinálódása nem kedvezményezett

#### 4.3.3. A Mn(II)komplexek relaxivitása

## Hidroxámsav alapú sziderofórok és modelljeik mangán- és kobaltkomplexei

Az irodalmi bevezetőben részletezett okok miatt egyre nagyobb figyelem irányul a Mn(II)komplexekre, mint lehetséges MRI (mágneses képalkotás) kontrasztanyagok. Ebben a tekintetben a komplexeket jellemző egyik fontos paraméter a relaxivitás érték. Tudomásunk szerint nincs irodalmi adat a Mn(II)hidroxamát komplexek relaxivitását illetően, ebből kifolyólag célul tűztük ki néhány kiválasztott Mn(II)komplex ilyen jellegű karakterizálását. A kiválasztott rendszerek között a négy trihidroxámsav alapú sziderofór szerepelt, mivel ezen ligandumokkal alkotott komplexek voltak a legstabilabbak az általunk vizsgált Mn(II)komplexek köréből.

Első lépésként a  $Mn(II)_{aq}$  relaxivitás értékét határoztuk meg saját körülményeink között. A kapott értéket ( $R_1 = 8,1 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ; 20 MHz) az irodalmi adattal ( $R_1 = 7,4 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ; 24 MHz) összevetve, az eltérő mérési paraméterek figyelembe vételével azt lehet mondani, hogy azzal jó egyezést mutat [126].

Az esetleges kontrasztanyagként való alkalmazhatóság ezen paraméter alapján történő megítélése miatt fiziológiás pH-tartományban terveztünk méréseket. Azonban a Mn(II)komplexek közepes stabilitásából adódóan ezen pHtartományban, ahogy az a feltüntetett reprezentatív koncentráció-eloszlás görbéken (15. ábra) is látszik a fémion jelentős százalékban nincs komplexbe kötve, vagyis "szabad formában" van jelen (a DFB, a DFR és a TAF esetében ~ 40%). Bár a szabad fémion koncentrációja a Mn(II)-DFC esetében fiziológiás pH-tartományban kisebb a többi három sziderofórral alkotott rendszerhez képest (< 20 %) (15. ábra c)), azonban pH  $\sim$  7,5 a rendszerben a különböző protonáltságú (egy-, két- vagy akár három kordinált hidroxamátot tartalmazó) komplexek együttes jelenléte jellemző (csakúgy, mint a DFB-nél). Emiatt olyan pH-n is terveztünk méréseket, ahol már egyértelműen a három koordinált kelátképző csoportot tartalmazó komplexek jelenléte dominál (pH ~ 9,3). Mindezek alapján a Mn(II)trihidroxámsav komplexek relaxivitását két kiválaszott pH-n határoztuk meg (pH~ 7,6 és pH ~ 9,3). A Mn(II)-TAF rendszerben a fiziológiás pH-tartományban végzett mérések mellett a kiválaszott másik pH ~ 8,6 volt. Ez utóbbi esetben azért választottunk kisebb pH-t (a másik három sziderofór rendszerhez képest), mert ahogy a be nem mutatott, de a 4.3.2. fejezetben elemzett titrálási görbe alapján megállapítottuk a rendszerben csapadékkiválás következett be. Bár a csapadékkiválás pH ~ 9,6 volt egyértelmű, de már ettől kisebb pH-n is a mérés során (pH  $\sim$  9,3) olyan mértékű volt a minta habzása, hogy az bizonytalanná tette a méréseket.

A Kísérleti Körülmények fejezetben (**3.3.5.**) leírtak szerint végzett mérések kísérleti eredményeiből számolt relaxivitás értékeket a **11. táblázat** mutatja.

**11. táblázat:** A Mn(II)-sziderofór rendszerekben mért T<sub>1</sub> relaxációs idők alapján számolt relaxivitás értékek

лIJ	DFB	DFR	DFC	TAF		
рп	Relaxivitás (mM-1s-1)					
~ 7,5	9,1 ± 0,3	8,7 ± 0,2	9,6±0,5	10,8 ± 0,3		
~ 9,3 (~ 8,6)	5,7 ± 0,3	4,6 ± 0,3	5,7 ± 0,6	9,5 ± 0,2		

(Zárójelben az átlagos eltérés értékeit tüntettük fel.)

A táblázat adatai alapján megállapítható, hogy a 9,3-as pH-n vizsgált három rendszerre kapott relxivitás a  $Mn(II)_{aq}$ -hoz képest, a várakozással megegyezően, csökkent. Ugyanakkor a Mn(II)-TAF esetében a pH ~ 8,6, és a fiziológiás pH-tartományban valamennyi sziderofórnál kapott eredmény igen meglepő, mivel nagyobb, mint a  $Mn(II)_{aq}$  relaxivitása.

Annak kiderítése érdekében, hogy ez a meglepően nagy érték honnan származhat individuális relaxivitásokat számoltunk az adott pH-n képződő komplexekre, a mért relaxációs idők, az egyensúlyi modell és a stabilitási állandók felhasználásával. Számolásunk alapja a (10) egyenlet volt (**3.3.5. rész**). A számolt, az adott komplexhez tartozó egyedi relaxivitás értékeket a **12. táblázatba** foglaltuk össze.

12. táblázat: A Mn(II)-sziderofór rendszerekben képződő néhány komplexre számolt egyedi relaxivitás értékek

Komplex	DFB	DFR	DFC	TAF
-	Indivi	xivitás (m	$M^{-1}s^{-1}$ )	

Hidroxámsav alapú sziderofórok és modelljeik mangán- és kobaltkomplexei

$[MnH_2L]^+$	12,7(1)	_	_	_
[MnHL]	4,8(1)	_	11,8(3)	10,8(5)
$[MnL]^{-}$	_	4,4(2)	5,4(2)	—

(A zárójelben a standard deviáció értékek szerepelnek.)

A 12. táblázatból látható, hogy az egy koordinált hidroxamátot tartalmazó komplexekre ( $[Mn(H_3DFB)]^{2+}$ ,  $[Mn(H_2L)]^+$ , ahol L = DFR, DFC, TAF) nem lehetett individuális relaxivitás értékeket meghatározni. Ennek az az oka, hogy ezen komplexek, ahogy a feltüntett koncentráció-eloszlások alapján is látható (15. ábra), a különböző sziderofórokkal csupán csekély százalékban vannak jelen a fiziológiás pH-tartományban, míg nagyobb pH-n már egyáltalán nem. Ugyanezen ok miatt nem lehetett egyedi relaxivitást számolni a DFR-rel képződő, [MnHL] részecskére sem (pH 7,6 körül < 10 %-ban van jelen), amit a 15. ábra a) is mutat.

A **12. táblázatbeli** adatok értelmezéséhez figyelembe kell vennünk, hogy az egyes komplexeknek a víz-protonok relaxációs idejére gyakorolt hatása (relaxivitása) függ a fémion koordinációs szférájában található vízmolekulák számától. A  $Mn(II)_{aq}$  fentebb már említett  $R_1 = 8,1 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  értékéhez képest tehát a komplexekre kisebb értékeket várhatunk. A három koordinált hidroxamátot tartalmazó komplexekhez valamennyi sziderofór esetében, ahogy azt várni lehetett (ahol azok számolhatók voltak) a  $Mn(II)_{aq}$  értékéhez képest jóval kisebb relaxivitás adatok tartoznak. Az irodalmi eredményekkel összevetve az általunk meghatározottakat, arra lehet következtetni, hogy még ezen komplexekben is, a belső koordinációs szférában lehet kb. egy vízmolekula [60]. A TAF esetében az [MnL]<sup>-</sup> típusú komplexhez tartozó egyedi relaxivitást azért nem lehetett meghatározni, mivel a mérés a többi sziderofór rendszerhez képest kisebb pH-n történt (pH ~ 8,6), olyan pH-n, ahol még a triszkelátos komplex kis koncentrációban (< 15 %) van jelen (**15. d**) ábra).

A két koordinált kelátképzőt tartalmazó komplexekhez, ami a DFB esetében [Mn(H<sub>2</sub>DFB)]<sup>+</sup>, míg a többi három sziderofór tekintetében [Mn(HL)] összetételű, az egyedi relaxivitás értékek kiugróan nagyok. Ez az átlagban két koordinált hidroxamátot tartalmazó komplexekhez rendelhető jelentős relaxivitás növekedés valószínűleg víz közvetítésével lejátszódó intramolekuláris protoncserével

magyarázható, amely a már koordinált és a még nem koordinálódó hidroxamátok között játszódik le. Hasonló viselkedést tapasztaltak a Gd-hidroxipiridonát rendszer relaxometriás sajátságainak vizsgálata során is [127].

Ezen utóbbi feltételezésünk alátámasztása érdekében relaxometriás vizsgálatok alá vetettünk két kiválasztott dihidroxámsavval, a 2,5-DIHA-val és a 2,5-*H*,*H*-DIHA-val, képződő komplexeket is, mely esetekben az [MnL] típusú komplexekben a ligandum mindkét hidroxamátcsoportja koordinálva van. A **13. táblázat** a mért és az [MnL] komplexekre számolt individuális relaxivitásokat tartalmazza. A táblázatból látható, hogy a mért értékek a Mn(II)<sub>aq</sub>-hoz képest kisebbek, és az [MnL] összetételű komplexekhez tartozó egyedi relaxivitás sem kiugróan nagy, ellentétben a trihidroxámsavak ugyanilyen kötésmódú, [MnHL] komplexeire számolt individuális relaxivitás értékekkel (**12. táblázat**).

13. táblázat: A mért és az [MnL] komplexekre számolt individuális relaxivitás értékek a Mn(II)-2,5-DIHA és 2,5-*H*,*H*-DIHA rendszerekben, pH ~ 7,6

Relaxivitás (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )				
	2,5-DIHA	2,5 <i>-H,H-</i> DIHA		
Mért	$7,6 \pm 0,3$	$7,9 \pm 0,3$		
Individuális	7,4(2)	7,9(1)		

(A mért relaxivitásnál zárójelben az átlagos eltérés értékeit tüntettük fel. Az individuális relaxivitásnál a zárójelben a standard deviáció értékek szerepelnek.)

A kapott eredmények tehát egyértelműen alátámasztják azt a feltételezést, hogy az egy jelentős relaxivitásnövelő hatás, ha a már koordinált két hidroxamátcsoport mellett jelen van egy még koordinálatlan, protonált formában lévő további hidroxámsavcsoport is a sziderofórokkal képződő komplexek esetében.

A Mn(II) - dihidroxámsavak és trihidroxámsavak relaxivitásáról összefoglalásként megállapíthatjuk:

• A Mn(II)-sziderofórok három koordinált hidroxamátcsoportot tartalmazó komplexeiben a relaxivitás a Mn(II)<sub>aq</sub>-hoz képest lecsökken, azonban

## Hidroxámsav alapú sziderofórok és modelljeik mangán- és kobaltkomplexei

meglepő módon a két koordinált kelátképzőt tartalmazó komplexekhez (melyben a harmadik kelátképző csoport még protonálva található) rendelhető individuális relaxivitás kiugróan nagy érték. A víz közvetítésével lejátszódó intramolekuláris protoncsere relaxivitást növelő hatását bizonyítottnak véljük.

# 4.4. A Mn(II)- és a Co(II)komplexek redox stabilitása

Az eddig részletezett vizsgálatokat mind szigorúan anaerob körülmények között végeztük. Ha a kísérletek nem teljes oxigén kizárása mellett zajlanak, akkor

az általunk tanulmányozott mindkét fémion redox aktív voltából adódóan azok oxidációja következhet be. A következőkben a szabad levegőn végzett kísérletek eredményeit foglaljuk össze.

Ismert tény, hogy akkor következik be szabad levegőn oxidáció, ha az adott rendszer potenciál értéke adott körülmények között kisebb, mint az O<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O, illetve O<sub>2</sub>/OH<sup>-</sup> rendszer potenciálja (pH = 0 - nál  $\varepsilon^0_{O2/H2O}$  = 1,229 V és pH = 14 - nél  $\varepsilon^0_{O2/OH^-}$  = 0,401V) [50]. A megfelelő félreakciókból ismert, hogy a rendszer redoxipotenciálja pH-függést mutat és egy adott pH-n az O<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O, illetve az O<sub>2</sub>/OH<sup>-</sup> aktuális redoxipotenciáljától (pl. pH = 7-nél  $\varepsilon \sim + 0,8$  V) kisebb redoxipotenciálú rendszerek fognak levegőn oxidálódni.

A mangán esetében a +2-es oxidációs állapot tekinthető vizes oldatban a legstabilabb formának. Semleges vagy savas közegben halványrózsaszín hexaaqua ionként ( $[Mn(H_2O)_6]^{2+}$ ) van jelen, ami ellenáll az oxidációnak, ahogy az a redoxipotenciálból is kiderül ( $\epsilon^0_{Mn(II)aq/Mn(II)aq} = 1,6$  V). Lúgos körülmények között hidrolitikus folyamatok játszódnak le, és a képződő részecskék könnyen oxidálódnak levegőn, ahogy az a potenciálok alapján is látható, pl.  $\epsilon_{Mn2O3\cdot xH2O/Mn(OH)2} = -0,2$  V [103].

A másik általunk vizsgált fémiont tekintve, a  $[Co(H_2O)_6]^{3+}/[Co(H_2O)_6]^{2+}$  redoxipotenciál értéke olyan nagy ( $\epsilon^0_{Co(III)aq/Co(II)aq} = 1,8$  V), hogy a  $[Co(H_2O)_6]^{3+}$  vizes közegben nem stabilis, oxidálja a vizet [128].

Amennyiben a fémionhoz koordinált vízmolekulákat más ligandumok váltják fel, akkor a redoxipotenciál attól függően változik (az aqua komplexekre vonatkozó értékhez képest), hogy az adott ligandummal a +2 vagy a +3 oxidációs állapotú fémion képezi a stabilisabb komplexet. A Co(III)/Co(II) néhány ligandummal képezett komplexeinek redoxipotenciálját a **14. táblázat** mutatja.

14. táblázat: A Co(III)/Co(II) - rendszer N-, és O- donorú ligandumokkal képezett komplexeinek redoxipotenciál értékei

1
---

Hidroxámsav alapú sziderofórok és modelljeik mangán- és kobaltkomplexei

$[Co(bipy)_3]^{3+} + e^- = [Co(bipy)_3]^{2+}$	0,31 <sup>[50]</sup>
$[Co(en)_3]^{3+} + e^- = [Co(en)_3]^{2+}$	0,18 <sup>[50]</sup>
$[Co(NH_3)_6]^{3+} + e^- = [Co(NH_3)_6]^{2+}$	0,108 <sup>[50]</sup>
$[Co(ox)_3]^{3-} + e^{-} = [Co(ox)_3]^{4-}$	0,57 <sup>[128]</sup>
(ahol hiny = hiniridin_en = etilén-diamin_o	$\mathbf{x} = \mathbf{o} \mathbf{x} \mathbf{a} \mathbf{b} \mathbf{t}$

A táblázatból kítűnik, hogy az 1,8 V-hoz képest valamennyi komplex redoxipotenciál értéke csökkent, azonban a N-donorú ligandumok esetében lényegesen jelentősebb a csökkenés az O-donorú ligandumokhoz képest. Ez a nagy csökkenés azt eredményezi, hogy a N-donorú ligandumot tartalmazó komplexek rendkívül érzékennyé válnak a levegő oxigénjére.

Az előzőekben leírtak alapján, mindkét fémion redox aktivitásából adódóan célunk volt az oxidáció mértékének feltárása, továbbá, ahol annak képződése egyértelműen bekövetkezik, a +3-as oxidációs állapotú komplexek stabilitási állandójának meghatározása.

### 4.4.1. A Mn(II) - hidroxamát komplexek redox stabilitása

Ahogy azt az irodalomban megjelent korábbi eredmények [65, 69] alapján tudjuk, a Mn(II)-DFB rendszer pH 7 felett érzékeny a levegő oxigénjére. Ezen tanulmányok szerint pH 7 - 11,3 közötti tartományban stabilis Mn(III)-tartalmú komplexek képződnek. Annak érdekében, hogy saját körülményeink között is információt nyerjünk ezen rendszer levegőn való viselkedéséről, a Mn(II)-DFB rendszert ezen aspektusból is tanulmányoztuk. Tekintettel arra, hogy a Mn(II)-DFB rendszert kivéve, egyéb Mn(II)-hidroxamát rendszerben képződő komplexek levegőn való viselkedésére irodalmi előzményt nem találtunk, további Mn(II)hidroxámsav rendszereket is bevontunk vizsgálatainkba. A kiválasztott ligandumok között szerepelt a monohidroxámsavak köréből egy egyszerű monohidroxámsav (Aha), aminohidroxámsavak közül hat ( $\alpha$ -Alaha,  $\beta$ -Alaha, GABA-ha, Asp- $\beta$ -ha, Glu- $\gamma$ -ha, Hiszha), két dihidroxámsav (2,5-DIHA és 3,4-DIHA), valamint a négy sziderofór (DFB, DFC, DFR és TAF). Az oxidáció nyomon követése UV - látható spektrofotometriás módszerrel történt a **3.3.2. fejezetben** leírtaknak megfelelően. A Mn(III)komplexek képződéséről a karakterisztikus UV sávnak az idő függvényében nyomon követett változásából nyertünk információt, melyet 3 órán keresztül, vagy a moláris abszorbancia állandósulásáig követtünk nyomon ( $\lambda_{max} \sim 310$  nm,  $\epsilon \sim 2000$  dm<sup>3</sup>/mol·cm [65-66]).

Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a Mn(II)-hidroxamát komplexeknél pH 7,5 alatt nincs mérhető oxidáció, azonban pH 7,5 körül és felett ligandumtól függetlenül az UV spektrumban  $\lambda \sim 310$  nm abszorpciós sáv jelenik meg. A rögzített spektrumokból látszik, hogy az oxidáció sebessége és mértéke függ mind a koordinálódó hidroxamátok számától, mind a pH-tól. A Mn-Aha komplexeket tekintve a Mn(III) jelenlétére utaló abszorpciós sáv megjelenik (már pH ~ 7,6), azonban nagyobb pH-n (pH 9 fölött) alapvonal emelkedés figyelhető meg, ami csapadékkiválásra utal (valószínűleg Mn(IV) jelenléte). Az aminohidroxámsav rendszereknél pH 7,5 felett valamennyi vizsgált rendszer rögzített spektrumaiban 310 nm körül változást tapasztaltunk az idő előrehaladtával. Az aminocsoportot a hidroxamátcsoporthoz képest γ-helyzetben tartalmazó GABA-ha és Glu-y-ha esetében egyértelműen megfigyelhető volt a spektrumokban a Mn(III)-t tartalmazó komplexekre jellemző abszorpciós sáv, azonban 3 óra sem volt elegendő pH ~ 8,5 -n az abszorbancia állandósulásához, ahogy az a Mn(II)-GABA-ha rendszerre feltüntetett különböző időközönként rögzített spektrumok alapján is látható (19. ábra). A pH további emelésével (pH ~ 9,5) alapvonal emelkedést, illetve a karakterisztikus sávban abszorbancia csökkenést tapasztaltunk, ami további folyamatok megjelenésére utal. Az aminocsoportot hidroxamátcsoporttól β-helyzetben tartalmazó а aminohidroxámsav rendszerek (β-Alaha és Asp-β-ha) a GABA-ha-hoz képest eltérően viselkedtek. A Mn(II)-\beta-Alaha és a Mn(II)-Asp-β-ha rendszerekben a rögzített spektrumok alapján, bár a Mn(III) jelenléte egyértelmű, de már kisebb pH-n (pH ~ 8,5) további folyamatokra utaló változást tapasztaltunk a spekrumokban (abszorbancia csökkenés, alapvonal emelkedés). Ha az aminocsoport még közelebb van a hidroxamátcsoporthoz (a-Alaha), akkor a Mn(III) jelenléte már pH 8,5 -nél sem egyértelmű. (A regisztrált spektrumokban a Mn(III)-ra jellemző karakterisztikus sávban jelentős abszorbancia változást nem tapasztaltunk.) A ligandumként Hiszha-t tartalmazó rendszerek levegőn való
viselkedése az aminocsoportot a hidroxámsavcsoporthoz képest β-helyzetben tartalmazó aminohidroxámsavak rendszereihez volt hasonlítható.



Tekintettel arra, hogy a jelen munka célja nem az oxidációs folyamat mechanizmusának feltérképezése volt, ebből kifolyólag a továbbiakban részletes vizsgálatok az egyszerű monohidroxámsav és aminohidroxámsav rendszerekben nem készültek.

A Mn(II)-dihidroxámsav rendszerekben hasonlóak voltak a tapasztalataink, mint az előzőekben kifejtett aminohidroxámsavak esetében. Az alkalmazott körülmények között az oxidáció nem teljes, amely valószínűleg azzal magyarázható, hogy még pH 10 körül sem a három hidroxamátcsoportot tartalmazó komplex jelenléte a domináns, amit az a feltüntetett koncentrációeloszlás görbe is igazol (**20. ábra**).



A spěktrum<sup>6</sup>a kar<sup>2</sup>akterježtikus <sup>6</sup>sávjáb<sup>2</sup>an bekövetkező változás mindenképpen a Mn(III) jelenlétére utal a képződő komplexekben, azonban a mért abszorbanciák nem érték el az adott koncentráció mellett várt értéket. (Mindemellett a 3,4-DIHA esetében pH  $\geq$  9,5 - nél fél óra elteltével a regisztrált abszorbancia értékekben csökkenést tapasztaltunk, amely, az aminohidroxámsavakhoz hasonlóan, további

folyamatok jelenlétét valószínűsíti.) Az oxidáció nem teljes voltát ESI-MS mérésekkel is bizonyítottuk, mely eredmények a Mn(II) és a Mn(III) együttes jelenlétét mutatták (Mn(III)-tartalmú vegyes-hidroxokomplex: [Mn(2,5-DIHA)(OH)]K<sup>+</sup>, m/z = 398,06 -nál; és Mn(II)-tartalmú komplex: [Mn(2,5-DIHA)]K<sup>+</sup>, m/z = 381,06 -nál).

A Mn(II)komplexek aerob körülmények között való vizsgálata során a Mn(III)komplexek kizárólagos jelenlétét csak a sziderofórok esetében tudtuk bizonyítani. A Mn(II)-DFC esetében a **4.3.2. részben** leírt ok miatt a spektrális változások nem egyszerűen követhetők nyomon. A Mn(II)-DFR és a Mn(II)-TAF rendszereknél a ligandumok korlátolt mennyisége miatt szisztematikus vizsgálatra nem nyílt lehetőségünk, ezért a négy sziderofór közül a DFB-vel végeztük a legrészletesebb vizsgálatokat (pH-függés, két héten keresztül nyomon követett időfüggés), mivel ezen ligandummal alkotott komplexek spektrumain lehetett egyértelműen nyomon követni a változást, illetve ezen ligandumból elegendő mennyiség állt rendelkezésünkre.

A **21. ábrán** látható, hogy a Mn-DFB rendszerben pH 8 körül az oxidáció 3 óra elteltével sem mondható teljesnek, míg a kis ábra azt szemlélteti, hogy ugyanazon rendszerben pH 9,5 körül a folyamat már 10 perc alatt teljesen lejátszódik. Ez a képződő +3-as oxidációs állapotú központi fémiont tartalmazó komplex rendkívül stabilis. Egy kiválaszott rendszeren (Mn(III)-DFB) két héten keresztül figyeltük a spektrális változást, azonban a spektrum ezidő alatt teljesen változatlan maradt.



körülmények között regisztrált abszorbancia spektrumok a Mn(II) -DFB rendszerben (pH = 8,0;  $c_{DFB} = 0,0011$ mol/dm<sup>3</sup>; fém-ligandum arány: 1:1).

**Belső ábra**: adott időnként regisztrált moláris abszorpciós koefficiens értékek  $\lambda_{max} = 310 \text{ nm-en a Mn-DFB}$  rendszerben (pH ~ 9,5;  $c_{DFB} = 0,001 \text{ mol/dm}^3$ ; fémligandum arány: 1:1)

A Mn(III)-tartalmú komplexek domináns voltát két sziderofór rendszernél az ESI-MS eredmények is alátámasztották: [MnHDFB]<sup>+</sup>, m/z = 613,28, valamint ahogy az a feltüntetett **22. ábrán** is látható, hogy a számolt és a mért értékek jó egyezést mutatnak.

<b>a</b> )	<b>b</b> )	22. ábra: Számolt (a)		
859,265	859,268	mért (b) ESI-MS		
		spektrumok a Mn-DFC		
		rendszerben képződő		
860 267	860.271	[MnDFC]K <sup>+</sup> részecskére		
961.266	861 271	$(pH = 9,50, c_{DFC} = 0,0005$		
861,200	8 862 273	mol/dm <sup>3</sup> ; fém-ligandum		
	.0	arány 1:1)		

A fentebb említett ok miatt a DFR és a TAF ligandumok komplexeinél a  $[MnHDFB]^+$  esetén a gyors oxidáció szempontjából megfelelőnek talált körülmény mellett (pH ~ 9,5), a spektrum idő függvényében való regisztrálása alapján megállapítható, hogy mindkét ligandumnál az oxidáció 10 percen belül teljesnek mondható.

A kevés irodalmi előzményből kiindulva a Mn(III)-tartalmú sziderofór komplexek stabilitása összevethető nagyságrendbe esik a Fe(III)-mal alkotott komplexek stabilitásával [65-67]. Ez az eredmény ösztönzött minket a Mn(III)sziderofór komplexek stabilitási állandójának meghatározására, mely érdekében ciklikus voltammetriás méréseket hajtottunk végre. A mérési körülmények és a számolás alapjául szolgáló egyenlet részletes leírása a **3.3.4. fejezetben** szerepel. A

**23. ábrán** a Mn(III)-DFB (**a**)) különböző fém-ligandum arány mellett regisztrált voltammogramjait és a Mn(III)-TAF (**b**)) rendszer voltammogramját tüntettük fel.



voltammogramok **a**) pH ~ 9,63;  $c_{KNO3} = 0,005 \text{ mol/dm}^3$ ;  $c_{Mn(III)} = 0,001 \text{ mol/dm}^3$ vagy 0,0015 mol/dm<sup>3</sup>;  $c_{DFB} = 0,0015 - 0,0045 \text{ mol/dm}^3$ ; I = 14 µA vagy I = 45 µA **b**) pH ~ 9,45;  $c_{KCI} = 0,009 \text{ mol/dm}^3$ ,  $c_{TAF} = 0,00112 \text{ mol/dm}^3$ ; I = 14 µA) (grafit munkaelektród és Ag/AgCl/3 mol/dm<sup>3</sup> KCl referenciaelektród; pásztázási sebesség: 100 mV/s)

A 23. ábra a)-n látható, hogy a DFB-nél a katódos csúcspotenciál (E<sub>k</sub>) 230 mV körül jelenik meg, míg az anódos ágban a csúcsáram értéke és a csúcspotenciál helye függ a DFB koncentrációjától, azzal együtt nő, ami arra utal, hogy maga a ligandum is redox aktív ebben a feszültségtartományban. Ezen megállapítás jó egyezésben van azzal az egyetlen korábbi irodalmi előzménnyel, amiben a Mn(III)-DFB rendszer hasonló elektrokémiai viselkedését írták le [69]. Ahogy az a feltüntetett 23. ábra b)-n is látható a TAF esetében a csúcsáramok egy körüli aránya ( $i_a/i_c = 0.95$ ) a komplex reverzibilis redox folyamatára utal. Az itt fel nem tüntetett DFC voltammogramja az utóbbihoz hasonló, a csúcsáramok aránya egy körüli ( $i_a/i_c = 0.96$ ), és nem függ a fém-ligandum aránytól. A DFR esetében a rendelkezésre álló igen csekély mennyiségű sziderofór miatt egyetlen fémionligandum aránynál történt a mérés és a csúcsáramok aránya  $i_a/i_c = 0.93$ . A DFB tekintetében az irreverzibilis folyamatból adódóan, a katódos csúcs (Ek) potenciálja szolgált alapul a formálpotenciál közelítő értékének meghatározásához. A többi három sziderofór esetében a voltammogramból leolvasott katódos (Ek) és anódos (E<sub>a</sub>) csúcspotenciál alapján történt a meghatározás. A voltammogramok alapján a

Kísérleti körülmények (**3.3.4.**) fejezetben leírtak szerint formálpotenciált számoltunk, mely értékeket a **15. táblázatba** foglaltuk össze. A meghatározott adatokból a három koordinált hidroxamátot tartalmazó komplexekre számoltunk stabilitási állandókat, mivel, ahogy az a **15. ábrán** feltüntetett koncentrációeloszlás görbéken is látszik, a ciklikus voltammetriás mérési körülmények között (pH ~ 9,5) ezen komplexek jelenléte dominál. A +3-as oxidációs állapotú központi fémiont tartalmazó komplexek stabilitási állandóinak számítása során a **9. táblázatban** szereplő, Mn(II)-t tartalmazó komplexekhez tartozó megfelelő állandókat használtuk.

		[MnHL] <sup>+</sup>	[MnL]	[FeL]
Ligandum	ε' (V)	log β		
DFB	$0,\!47 \pm 0,\!01$	$36,5 \pm 0,2$	-	30,4 <sup>[34]</sup>
DFR	$0,\!43 \pm 0,\!01$	-	~ 27	29,96(3)
DFC	$0,\!43 \pm 0,\!01$	-	$28,1 \pm 0,3$	29,35 <sup>[34]</sup>
TAF	$0,\!42 \pm 0,\!01$	-	$25,9 \pm 0,2$	27,21(3)

(A Fe(III)-DFR és a Fe(III)-TAF komplexek stabilitási állandóinak meghatározása a jelen munka során spektrofotometriásan történt. A mangánkomplexek esetén a ciklikus voltammetriás mérések alapján határoztuk meg a stabilitási állandókat. A formálpotenciáloknál és az azok alapján számolt stabilitási állandóknál zárójelben az átlagos eltérés értékei szerepelnek.

A [FeL] komplexek stabilitási állandóinál zárójelben a standard deviációk vannak feltüntetve.)

A 15. táblázat a formálpotenciálok mellett, a megfelelő Mn(II)-sziderofór komplexek stabilitási állandóinak ismeretében (a (9) egyenlet alapján) számolt Mn(III)-mal, valamint a Fe(III)-mal képződő három koordinált hidroxamátot tartalmazó komplexek stabilitási állandóit is tartalmazza. A Fe(III)-DFB és a Fe(III)-DFC rendszerekben képződő komplexek stabilitási állandói kutatócsoportunkban korábban már meghatározásra kerültek, míg a [Fe(III)DFR] és a [Fe(III)TAF] komplexekre vonatkozó értékeket jelen munka során határoztuk meg. A Fe(III)-DFR-rel alkotott komplexének stabilitására egy adatot találtunk az irodalomban (log  $\beta = 30,4$ ), amely az általunk meghatározottal jó egyezést mutat [114].

Szabó Orsolya doktori (PhD) értekezés

A táblázatba foglalt eredményekből látható, hogy a DFB-nél csak közelítő stabilitási állandót adtunk meg, mivel a fentebb tárgyalt okok miatt a voltammogramok alapján meghatározott formálpotenciál érték közelítőnek tekinthető. A másik három sziderofórt tartalmazó rendszerre nagyobb pontosággal lehetett az állandót meghatározni. A számszerű értékeket tekintve a DFB-nél figyelembe kell vennünk, hogy a [Mn(HDFB)]<sup>+</sup> stabilitási állandója magába foglalja a terminális aminocsoport protonálódási állandóját is (log K = 10,85). Ezt a korrekciót elvégezve a Mn(III) + HDFB =  $[Mn(HDFB)]^+$  egyenlettel leírható folyamathoz rendelhető log K értéke 25 körüli. Csupán erre a komplexre találtunk egyetlen irodalmi adatot [65], amely nagyobb az általunk meghatározottnál, log K = 28.6 (I = 0.1 mol/dm<sup>3</sup> NaCl; T = 298 K). Ez az eltérés a különböző mérési körülményekkel, valamint az állandónak az előbbiekben részletezett nagyobb pontatlanságával magyarázható. A Fe(III)-mal képződő komplexek stabilitását a Mn(III)-mal képződő megfelelő komplexek stabilitásával összevetve, valóban azt lehet mondani, hogy az állandók elég közeliek, tehát valóban lehet realitása annak az irodalmi felvetésnek [65-67], hogy speciális körülmények között (pl. aerob körülmény, gyengén lúgos pH-tartomány) mangánion jelenlétében módosulhat a mikoroorganizmusok vas felvétele.

Az állandók egymással való összevetése a Mn(II)-sziderofór komplexekhez hasonlóan, a 12-es egyenletet alapul véve az összbázicitás figyelembe vételével lehetséges (**16. táblázat**). Megállapíthatjuk, hogy a származtatott állandók értékei az összbázicitáshoz képest is meglehetősen nagyok. Az is látható, hogy a +3-as oxidációs állapotú fémiont tartalmazó komplexek stabilitásában is egyértelműen megmutatkozik a ligandumok szerkezetbeli eltérése, azaz a DFC és a TAF képezi a stabilabb komplexeket, mely stabilitásnövekedés szintén a  $\beta$ -helyzetben lévő kettős kötés és a hidroxamát közötti konjugációval magyarázható.

16. táblázat: A Mn(III) - sziderofór rendszerekben a feltüntett folyamatokra vonatkozó származtatott állandók (log K)

Folyamat	log K
$Mn(III) + H_4DFB \leftrightarrow Mn(III)HDFB + 3 \text{ H}^+$	-1,8
$Mn(III) + H_3DFR \leftrightarrow Mn(III)DFR + 3 \text{ H}^+$	0.41

$Mn(III) + H_3DFC \leftrightarrow Mn(III)DFC + 3 \text{ H}^+$	1.51
$Mn(III) + H_3TAF \leftrightarrow Mn(III)TAF + 3 H^+$	2.6

Megállapítható tehát, hogy a Mn(III)-sziderofór komplexek meglepően nagy stabilitásúak, melyek nagyságrendileg összevethetők a Fe(III)-mal képződő megfelelő komplexekkel.

Az állandók értékének reális voltát ellenőrizendően, az értékeket azon korrelációs egyenesre kívántuk illeszteni, mely a DFB különböző fémionokkal képezett komplexeinek stabilitási állandója és a fémionok első hidrolízis állandója között mutat lineáris összefüggést [129]. Az adatgyűjtés ugyanakkor azt mutatta, hogy a Mn(III)-ra alig közöltek hidrolízis állandót. Az egyetlen fellelt adat logK<sub>Mn(OH)2+</sub> értéke ~ 14 [130]. Tekintettel arra, hogy a DFC számos fémionnal alkotott komplexére a stabilitási állandó azonos körülmények között korábban kutatócsoportunkban meghatározásra került (I = 0,2 mol/dm<sup>3</sup> KCl, t = 25,0 °C), így ezen adatokat megkíséreltük felhasználni arra, hogy a saját kísérleti körülményeink között érvényes hidrolízis állandót jó közelítéssel megbecsüljük. Első lépésként ezen adatok felhasználásával egy korrelációs egyenest szerkesztettünk (24. ábra), amelyből egyértelműen látható, hogy a pontok ráillenek egy egyenesre [31, 34-35, 115-116, 131-135]. Ezt követően ráillesztve az általunk a [MnDFC]-re meghatározott stabilitási állandót, és ezt a pontot az x-tengelyre vetítve kaptuk a hidrolízis állandót (24. ábra szaggatott vonal), melynek értéke 11,8. Ezzel szemben az irodalomban fellelt adat 13,92 [130]. Amennyiben a [MnDFC] komplexre kapott stabilitási állandót, az irodalmi hidrolízis állandót elfogadva, illesztjük a korrelációs egyenesre (24. ábra pontozott vonal), akkor a pont elfogadhatatlanul távol esik az egyenestől.



**24.** ábra: A DFC különböző fémionokkal alkotott komplexeinek stabilitási állandói ( $\log K_1$ ) és a megfelelő fémionok első hidrolízis állandói közötti ( $\log K_1$  (OH<sup>-</sup>))

Szabó Orsolya doktori (PhD) értekezés

korrelációs egyenes [31, 34-35, 115-116, 131-135]

Amennyiben a meghatározott Mn(III) első hidrolízis állandóját ráillesztjük az irodalomból vett DFB-re vonatkozó korrelációs egyenesre [129] (**25. ábra**), akkor egyértelműen látható, hogy a kapott pont a többi pont szórásához képest közel elfogadható, de egyben azt is mutatja, hogy esetleg a [MnDFB] komplex állandója valamennyivel (1 - 2 log egységgel) nagyobb lehet.



**25. ábra:** A [MnDFB] komplex általunk meghatározott stabilitási állandója és a Mn(III) első hidrolízis állandójának ábrázolása az irodalomból vett DFB különböző fémionokkal alkotott komplexeinek stabilitási állandója és a fémionok első hidrolízis állandóinak korrelációs egyenesére [129].

A Mn(II) - hidroxamát komplexek redox stabilitásáról összességében megállapítható:

• pH 7,5 fölött minden vizsgált ligandumnál a Mn(III)-ra jellemző karakterisztikus sávban volt változás a spektrumban, azonban az oxidáció mértéke függ a pH-tól és a koordinálódó ligandumok számától

• a Mn(III)komplex kizárólagos képződését csak a sziderofóroknál tudtunk kimutatni

• a Mn(III)-sziderofór komplexekre számolt stabilitási állandók értékei a Fe(III)-mal képződő megfelelő komplexek stabilitásával összevethető nagyságrendbe esnek

• a Mn(III) első hidrolízis állandóját is meghatároztuk

#### 4.4.2. A Co(II) - hidroxamát komplexek redox stabilitása

A megtitrált minták hosszú idő után (órákig) mutatták csupán az oxidációra utaló színváltozást, kivéve az aminohidroxámsav rendszereket. A 4.4. fejezetben részletezettek alapján láthattuk, hogy a N-donorú ligandumok igen jelentősen csökkentik a Co(III)/Co(II) - rendszer redoxipotenciál értékeit. Ezen előzmények birtokában a Co(II)-aminohidroxámsav rendszerek vizsgálatát még alaposabb oxigénkizárás mellett kellett végeznünk. A pH-potenciometriás mérések során a minta oxigénmentesítése mellett az argonban lévő oxigénnyomok kizárására is figyelmet fordítottunk a 3.3.1. fejezetben részletesen leírt technika segítségével. A spektrofotometriás vizsgálatok során azonban azt tapasztaltuk, hogy a körültekintő oxigénkizárás ellenére (3.3.2. fejezetben részletezett eljárással) sem sikerült a Co(II)-aminohidroxámsav rendszereket az oxidációtól tökéletesen megvédeni. A következőkben (9. és 26. ábra) a Co(II) azon aminohidroxámsavakkal alkotott rendszereinek különböző pH-értékeken, argon buborékoltatása mellett regisztrált spektrumait tüntettük fel, amelyek az R<sub>C</sub> - oldalláncban a hidroxámsavcsoporttól eltérő ( $\alpha$ -,  $\beta$ -, illetve  $\gamma$ - helyzetben;  $\alpha$ -Alaha,  $\beta$ -Alaha és GABA-ha) távolságban tartalmaznak aminocsoportot.



Szabó Orsolya doktori (PhD) értekezés

$$(c_{\text{lig.}} = 0.025 \text{ mol/dm}^3; \text{ fém-ligandum } 1:5 \text{ arány; } I = 0.20 \text{ mol/dm}^3 \text{ KCl})$$

A spektrumok összevetésével egyértelműen megállapítható, hogy azokban jelentős különbségek mutatkoznak. A Co(II)-GAHA-ha (amikor az aminocsoport γhelyzetben van a hidroxámsavcsoporthoz képest) esetében (9. ábra) a moláris abszorbancia értékek és a spektrumok egyértelműen ( $\lambda_{max} \sim 550$  nm,  $\epsilon \sim 10$ dm<sup>3</sup>/mol·cm) [103] arra utalnak, hogy a kobalt +2-es oxidációs állapotban van a komplexekben. A β-Alaha-nál bár (26. ábra b)) a spektrum jellegében van hasonlóság az előbb említett rendszerhez képest, azonban a pH növelésével a moláris abszorbancia értékek ( $\lambda_{max} \sim 520$  nm,  $\epsilon \sim 50$  dm<sup>3</sup>/mol·cm) növekedése egyértelműen bizonyos mértékű oxidációra utal. Valószínűleg ezen rendszerben a Co(II) és a Co(III) egyidejűleg van jelen. A Co(II)-α-Alaha rendszerben regisztrált spektrumokban (**26. ábra a**)) a pH emelésével egyértelműen megjelenik  $\lambda \sim 500$ nm,  ${}^{I}A_{1g} \rightarrow {}^{I}T_{1g}$  átmenethez tartozó, nagyobb moláris abszorbanciájú ( $\varepsilon \sim 80$ dm<sup>3</sup>/mol·cm) sáv, mely a Co(III) karakterisztikus jelének felel meg [103]. Tehát az eredmények alapján megállapítható, hogy a levegőre való érzékenység az aminocsoport hidroxámsavcsoporttól való távolságának növekedésével csökken (a-Alaha >  $\beta$ -Alaha > GAHA-ha). Ezen tapasztalat a **4.2. fejezetben** részletezett ugyanezen rendszerek Co(II)komplexeiben megvalósuló koordinációs módoknak a fenti reláció szerinti változását támasztja alá.

Bár nem pillanatszerűen, mint az aminohidroxámsavaknál, de a csak hidroxamát donorcsoportokat tartalmazó rendszerekben is játszódik le oxidációs folyamat, melyből kifolyólag célunk volt annak vizsgálata, hogy a tipikusan O,Odonorként viselkedő ligandumokkal képződő komplexek hogyan viselkednek levegőn. Motiválta a munkánkat továbbá az is, hogy a kobalt(III)-hidroxamát komplexekre stabilitási állandót határozzunk meg, mely témában, ahogy azt az Irodalmi áttekintés (**2.3. fejezet**) mutatja mindösszesen egy adatot találtunk, amire meglepő módon, a megfelelő Fe(III)komplexhez képest több nagyságrenddel nagyobb értéket kaptak (log K<sub>[Co(III)HDFB]+</sub> = 37,5, szemben a log K<sub>[Fe(III)HDFB]+</sub> = 32,02 [78]).

Az oxidáció nyomon követésére a Mn(II)-hidroxamát komplexekhez hasonlóan UV-látható spektrofotometriát alkalmaztunk. Az oxidáció hatékonyabbá tétele érdekében olyan méréseket terveztünk, melyek során a Co(II)komplexek

oxidálására hidrogén-peroxidot használtunk (3.3.2. fejezet). Tapasztalataink azt mutatták, hogy az oxidációra való készség változik a hidroxamátok számával. A monohidroxámsavak esetében a látható spektrumokban a Co(III)-ra jellemző karakterisztikus sáv (λ<sub>max</sub> ~ 620 nm) [78] nem jelent meg. A dihidroxámsavaknál  $\lambda_{max} \sim 620$  nm kis mértékű abszorbancia növekedést regisztráltunk, azonban sem a monohidroxámsavat, sem a dihidroxámsavat tartalmazó minták zöld színűvé válását szemmel láthatóan egyértelműen nem tapasztaltuk. A Co(II)rendszereknél hidrogén-peroxid hozzáadását követően, trihidroxámsav а spektrumokban  $\lambda_{max} \sim 620$  nm-en jelentős abszorbancia növekedést tapasztaltunk. Továbbá a minta színe is utalt az oxidációra, mely szerint a Co(II) oktaéderes geometriájú komplexekre jellemző rózsaszínből, a Co(III)komplexhez rendelhető zöld szín jelent meg. A mangán-hidroxamát rendszerekhez hasonlóan a kobalt esetében is csak a sziderofóroknál következett az be, hogy a Co(II) gyakorlatilag teljes mértékben átvihető volt Co(III) formába. A Co(III)-DFB rendszernél ESI-MS módszerrel is bizonyítottuk Co(III)komplex domináns jelenlétét: [CoHDFB]<sup>+</sup>, m/z = 617,27.

A 27. reprezentatív ábrán a Co(III)-DFB rendszer 9-es pH-n regisztrált voltammogramja látható, melyből egyértelműen szembe tűnik a rendszer irreverzibilis elektrokémiai viselkedése, mivel csak a katódos csúcs jelenik meg. Tehát, bekövetkezik a Co(III)komplex redukciója, azonban a ciklus ideje alatt a Co(II) visszaoxidálódási folyamata már nem. Hasonló eredményre jutottunk a Co(III) valamennyi általunk vizsgált sziderofórral alkotott rendszerének vizsgálata során is.



27. ábra: A Co(III)-DFB (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidált) ciklikus voltammogramja (fém-ligandum arány 1:3; grafit munkaelektród és mol/dm<sup>3</sup> **KCl** referenciaelektród; pásztázási sebesség: 50 mV/s;  $c_{KNO3} = 0,005$  $-0.8 \text{ mol/dm}^3$ ,  $c_{\text{DFB}} = 0.009 \text{ mol/dm}^3$ )

(Kapott eredményeink teljes mértékben összhangban vannak a Hambley és munkatársai által tanulmányozott hidroxamát tartalmú Co(III) - "prodrug"-ok redox sajátságaival, melyek szintén irreverzibilis folyamatot mutattak [25, 84]). Az irreverzibilis viselkedésből adódóan a voltammogramokból csak a katódos csúcspotenciált (Ek) tudtuk leolvasni, melyből a formálpotenciál alsó, míg a stabilitási állandó felső határértékére tudtunk következtetni. A (9) egyenlet alapján, a megfelelő adatokat felhasználva (jelen esetben: a rendszer formálpotenciál értékének alsó határa és a +2-es oxidációs állapotú fémiont tartalmazó megfelelő komplex stabilitási állandója, valamint a Co(III)<sub>aq</sub>/Co(II)<sub>aq</sub> standard potenciálja), a számítást elvégezve a stabilitási állandó felső határértékét kaptuk. Az adott rendszerre vonatkozó katódos csúcspotenciál értékeket, a bruttó stabilitási állandó felső határértékeit és az azokhoz tartozó folyamatokat foglaltuk össze a 17. táblázatban, melyből látható, hogy a log  $\beta \sim 49$ -nek adódik a Co(III) + H + DFB = [CoHDFB]<sup>+</sup> folyamatra, ez az érték azonban még tartalmazza a terminális aminocsoport protonálódási állandóját. A korrekció elvégzése után (49 - 10,85) a lépcsőzetes állandóra log K ~ 38 (Co(III) + HDFB =  $[CoHDFB]^+$ ) kapunk. (Valamelyest eltérő körülmények között végzett kísérletek alapján az irodalomban log K = 37,5 a [CoHDFB]<sup>+</sup> - komplexre [78], mely jó egyezést mutat az általunk meghatározottal.)

Komplex	log β
[Co(III)HDFB] <sup>+</sup>	~ 11,2
[Co(III)DFR]	~ 10,4
[Co(III)DFC]	~ 15,4
[Co(III)TAF]	~ 13,7

és a képződő komplexek származtatott állandói (log K)

Komplex	Folyamat	$\epsilon_{k}\left(V\right)$	log β	log K
[CoHDFB] <sup>+</sup>	$Co(III) + H_4DFB \leftrightarrow Co(III)HDFB + 3 \text{ H}^+$	-0,17	~ 49	~ 11
[CoDFR]	$Co(III) + H_3DFR \leftrightarrow Co(III)DFR + 3 \text{ H}^+$	-0,22	~ 37	~ 10
[CoDFC]	$Co(III) + H_3DFC \leftrightarrow Co(III)DFC + 3 \text{ H}^+$	-0,35	~ 42	~ 15
[CoTAF]	$Co(III) + H_3TAF \leftrightarrow Co(III)TAF + 3 \text{ H}^+$	-0.15	~ 37	~ 14

A bruttó stabilitási állandók (log  $\beta$ ) ismeretében azt mondhatjuk, hogy a Co(III)sziderofór komplexek rendkívül nagy stabilitásúak. Ha az értékeket a Fe(III)-mal képződő megfelelő komplexek állandóival összevetjük (**15. táblázat**), akkor megállapíthatjuk, hogy az általunk meghatározott felső határértékek több nagyságrenddel nagyobbnak adódnak.

A **17. táblázatba** az összbázicitást figyelembe vevő korrekcióval ((11-13) összefüggések alapján) számolt származtatott állandókat is belefoglaltuk (log K). Ezekről az értékekről is azt mondhatjuk, hogy rendkívül nagyok, és csakúgy, mint a többi általunk vizsgált sziderofór rendszer esetében a DFC-vel és a TAF-fal képződő komplexek nagyobb stabilitásúak, mint a DFB-vel vagy a DFR-rel képződők.

A Co(II) - hidroxámsav rendszerben képződő komplexek redox stabilitásáról összefoglalva az mondható:

- a komplexbeli központi fémion redukciója irreverzibilis, így a voltammogramok alapján csak a katódos csúcspotenciál volt meghatározható
- a Co(III)komplex kizárólagos képződését csak a sziderofóroknál találtuk
- a Co(III)-sziderofór rendszerekben a [CoL] összetételű komplexeknél a stabilitási állandók közelítő felső határértéke volt számolható
- a Co(III)-sziderofór komplexek rendkívül nagy stabilitásúak, az általunk meghatározott stabilitási állandók felső határértékei több nagyságrenddel nagyobbak Fe(III)-mal képződő megfelelő komplexekénél

# 5. ÖSSZEFOGLALÁS

A hidroxámsavak évtizedek óta az érdeklődés előterében vannak nem csak a Debreceni Egyetem Szervetlen Kémiai Tanszékének Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoporjában, hanem számos más nemzetközi kutatólaboratóriumban is. Az utóbbi években egyre inkább a figyelem középpontjába kerültek a monohidroxámsavak különféle származékai, mint potenciális metalloenzim inhibítor molekulák. Ebből kifolyólag ezen ligandumcsalád fémionokkal való oldatbeli kölcsönhatásának feltérképezése hasznos információt szolgáltathat az inhibíciós mechanizmus teljesebb megértéséhez, valamint új inhibítormolekulák

Szabó Orsolya doktori (PhD) értekezés

tervezéséhez. Az irodalomban számos ilyen jellegű eredményt találunk a 3d átmenetifémekkel kapcsolatban, azonban a Mn(II) és a Co(II) tekintetében csak nagyon keveset. Mindemellett a közelmúltban a monohidroxámsav alapú inhibítor molekuláknak célzottan a rákos sejtekhez való juttatása kapcsán néhány Co(III)/Co(II) vegyes ligandumú (monohidroxámsavat is tartalmazó) komplex, mint "prodrug" jött szóba. Az előzőekben kifejtett biológiai hatásuk és az irodalom meglehetősen hiányos mivolta miatt célunk volt három kiválaszott egyszerű monohidroxámsav és további négy aminohidroxámsav Mn(II)- és Co(II)-ionokkal való oldatbeli kölcsönhatásának feltérképezése. További érdekes aspektus, ami a témaválasztásunkat indokolta, az Mn(II)komplexek a esetleges MRI való kontrasztanyagként alkalmazhatósága. Ezen vizsgálatokba а monohidroxámsavaknál nagyobb stabilitású komplexeket képező ligandumok bevonására volt szükség. Az ezen szempontból is vizsgált ligandumok körébe négy trihidroxámsav alapú természetes sziderofórt vontunk be. Továbbá oldategyensúlyi vizsgálatokat végeztünk a két fémion hét szintetikusan előállított DFB modell dihidroxámsavval alkotott rendszereire. Mindkét fémion redox aktivitásából adódóan a hidroxamát komplexek redox stabilitásának vizsgálatát is célul tűztük ki, valamint az esetlegesen képződő +3-as oxidációs állapotú központi fémiont tartalmazó komplexek stabilitási állandójának meghatározása is a célok között szerepelt.

Az oldategyensúlyi vizsgálatok elsődleges célja valamennyi rendszer esetében a képződő komplexek összetételének, stabilitásának meghatározása, valamint a komplexekben kialakuló kötésmódok megállapítása, mely kísérletekhez elsősorban pH-potenciometriát, UV-látható spektrofotometriát, ESI-MS technikát alkalmaztunk. A Mn(II) sziderofórokkal és két kiválasztott dihidroxámsavval képződő komplexeire relaxometriás vizsgálatok is készültek. A +3-as oxidációs állapotú központi fémiont tartalmazó komplexeknél a stabilitási állandó meghatározása céljából ciklikus voltammetriás méréseket végeztünk.

A jelen doktori munka során kapott fontosabb eredményeket az alábbi pontokban foglalhatjuk össze:

• A vizsgált ligandumok döntő része (vásárlás vagy korábbi szintézisek útján) már rendelkezésünkre állt, jelen munka során egy új hidroxámsav származék előállítására került sor (GABA-ha). A sziderofórok közül a DFB-t vásároltuk, míg a többit (DFR, DFC és TAF) a munka folyamán izolálták.

• Valamennyi ligandum savi disszociációs állandóját meghatároztuk. A ligandumok egy részére saját körülményeink között, míg két esetben (GABA-ha, DFR) más laboratóriumban meghatározott irodalmi adatok álltak rendelkezésünkre, melyekkel a mieink jó egyezést mutattak. Egy olyan sziderofór (TAF) volt, ahol teljesen irodalmi előzmény nélküli adatokat határoztunk meg. Ez esetben megállapítottuk, hogy a három disszociációs állandója közül csupán egy esik az ún. jellemző tartományba (p $K \sim 8,5 - 9,5$ ). Egy érték ettől több log egységgel kisebb (pK = 4,15(6)), míg a harmadik számottevően nagyobb (pK = 10,57(4)). Magyarázatul a H-kötés kialakulásának lehetősége áll ezen ciklikus trihidroxámsavban.

• Az egyszerű monohidroxámsavak Mn(II)- és Co(II)-rendszereire végzett vizsgálatok alapján megállapíthatjuk, hogy mindkét fémionnal közepes stabilitású komplexek képződnek, melyeknek egymáshoz viszonyított stabilitása megfelel az Irving-Williams sornak. Mindkét fémionnal képződő komplexekben oktaéderes geometria megvalósulását bizonyítottuk. A Co(II)-rendszerekben kimutattuk a három koordinált hidroxamátot tartalmazó komplexek képződését, szemben a Mn(II)-rendszerekkel, ahol annak kialakulását a hidrolízis valamennyi aránynál megakadályozta.

• Az aminohidroxámsav rendszerekben megállapítottuk mindkét fémion tekintetében, hogy a hidroxamátcsoporthoz képest  $\gamma$ -helyzetben lévő aminocsoport (GABA-ha) nem befolyásolja a hidroxamát koordinációját. Szemben a  $\beta$ helyzetben ( $\beta$ -Alaha) és még inkább az  $\alpha$ -helyzetben ( $\alpha$ -Alaha) aminocsoportot tartalmazó ligandumoknál. A hidroxámsav R<sub>C</sub> szubsztituensében további kelátképzőt tartalmazó aminohidroxámsavaknál (Asp- $\beta$ -ha, Glu- $\gamma$ -ha, Hiszha) mind a Mn(II), mind a Co(II) esetében azt feltételezzük, hogy a koordináció nem tisztán hidroxamátszerű. • Mindkét fémion dihidroxámsavakkal (DIHA) alkotott rendszereiben képződő komplexek egymáshoz viszonyított stabilitási sorrendje megegyezik a korábban más fémionnál tapasztalt sorrenddel. Ez azt jelenti, hogy a 2,5-DIHA, melynek szerkezeti egysége megegyezik a DFB-vel, képezi a legstabilabb komplexeket, a hidroxámsavcsoportokat összekötő lánc rövidülése kisebb, míg a peptidcsoport helyének változtatása nagyobb hatással van a képződő komplexek stabilitására. A Mn(II)-dihidroxámsav rendszerekben minden esetben képződik az [Mn<sub>2</sub>L<sub>3</sub>]<sup>2-</sup> összetételű, mindkét fémion vonatkozásában három koordinált hidroxamátot tartalmazó komplex. A Co(II)-DIHA rendszerekben azonban meglepő eredményt kaptunk, mivel azt tapasztaltuk, hogy a 2,5-*H*,*H*-DIHA kivételével a harmadik hidroxamát koordinációja nem kedvezményezett,

• A Mn(II)- és a Co(II)-trihidroxámsav rendszerekről megállapíthatjuk, hogy ezekben csak 1:1 arányú, különböző protonáltságú komplexek képződnek. Mindkét fémion tekintetében a DFC és a TAF nagyobb stabilitású komplexeket képez, mint a DFB vagy a DFR. Ez a stabilitásbeli növekedés a hidroxamátcsoport és a βhelyzetben lévő kettőskötés között kialakuló konjugációval magyarázható. Igazoltuk, hogy mindkét fémion komplexeiben oktaéderes koordináció valósul Megállapítottuk továbbá, hogy а Co(II)-DFR meg. rendszerben а dihidroxámsavakhoz hasonló módon a harmadik hidroxamát koordinációja nem következik be, mely valószínűleg sztérikus okokkal magyarázható.

• A Mn(II)-sziderofór rendszerekben (semleges és lúgos pH-n) végzett relaxometriás vizsgálatok eredményei azt mutatták, hogy a három koordinált hidroxamátot tartalmazó komplexekhez, várakozásunknak megfelelően, a Mn(II)<sub>aq</sub>-hoz képest számottevően kisebb individuális relaxivitás értékek tartoznak. Meglepő adatokat kaptunk azonban a két koordinált hidroxamátot tartalmazó komplexek relaxivitására, mivel azok még a Mn(II)<sub>aq</sub> értékét is jóval meghaladóak voltak. A kapott eredményt egy a víz közvetítésével lejátszódó intramolekuláris protoncserével magyaráztuk, ami a már koordinált hidroxamát és a még koordinálatlan hidroxámsavcsoport között játszódik le. Ezt a feltételezést két kiválaszott dihidroxámsavval végzett kísérletek eredményei is alátámasztották.

 A Mn(II)-hidroxámsav rendszereknél megállapíthatjuk, hogy valamennyi ligandummal pH ~ 7,5 fölött a levegő oxigénje általi oxidáció mértéke függ mind a pH-tól, mind a koordinált hidroxamátok számától. A Mn(III)komplexek sztöchiometrikus mértékben való képződését csak a sziderofórok esetében találtuk. A ciklikus voltammetriás eredmények a redoxi folyamat kvázi reverzibilis voltát mutatták a DFC és a TAF esetében, míg a DFB-nél irreverzibilitást tapasztaltunk (a DFR-ből nem állt rendelkezésünkre elegendő anyag, így arányfüggés vizsgálatára nem nyílt lehetőségünk). A regisztrált voltammogramokból leolvasott formálpotenciál értékek alapján a fémiont +3-as oxidációs állapotban tartalmazó komplexek stabilitási állandóit meghatároztuk, melyek a Fe(III)-mal képződő megfelelő komplexekkel összemérhető nagyságrendbe estek.

• A DFB és a DFC esetében, ahol számos fémionnal képezett komplex stabilitási állandója ismert, a Mn(III)-mal képződő komplexekre meghatározott stabilitási állandók reális voltának igazolása érdekében, az értékeket azon korrelációs egyenesre illesztettük, amely a ligandum különböző fémionokkal képezett komplexeinek stabilitási állandója és a fémionok első hidrolízis állandója között mutat lineáris összefüggést. Ezt az összefüggést felhasználva, a Mn(III)-DFB és a Mn(III)-DFC-vel képződő komplexekre számolt stabilitási állandók ismeretében a Mn(III) első hidrolízis állandójára (melyre az irodalomban csupán egyetlen bizonytalan adat volt fellelhető) is becslést tettünk.

• A Co(II)komplexek oxidációja nagy pH-n, hidrogén-peroxid alkalmazásával csak a sziderofórokkal volt teljes (sztöchiometrikus). A regisztrált ciklikus voltammogramok a központi fémion irreverzibilis redukcióját mutatták, mely alapján csak a katódos csúcs potenciálját tudtuk egyértelműen meghatározni, melyből kifolyólag a stabilitási állandónak egy közelítő felső határértéke került meghatározásra. A képződő Co(III)-sziderofór komplexek rendkívül stabilak, a számolt stabilitási állandók közelítő felső határértékei több nagyságrenddel nagyobbak a Fe(III)-mal képződő megfelelő komplexekénél.

Szabó Orsolya doktori (PhD) értekezés

### 6. SUMMARY

Hydroxamic acids have been in the focus of interest not only in the University of Debrecen, but also in many other international laboratory for ages. The attention has turned to derivatives of the monohydroxamic acids as potential metalloenzyme inhibitore molecules in the past few years. Therefore, the investigation of the interaction of these ligands with numerous metal ions could get a deeper understanding of the inhibition mechanism and may provide useful information for design of new inhibitor molecules. Many results can be found in the literature which deal with the 3d transition metal ion monohydroxamic acid systems, but there are very few data in connection with the interaction of Mn(II) or

Co(II) with monohydroxamic acids. Furthermore, Co(III)/Co(II)-mixed ligand (one of the ligands is monohydroxamate) complexes as prodrugs have been developed to carry the inhibitor monohydroxamate molecule directly to the cancer cells. Since there have been very few data in literature and the above mentioned biological effects, what initiated our work to investigate the interaction of Mn(II) and Co(II) ions with selcted simple monohydroxamic acids and aminohydroxamic acids in solution. Another interesting aspect is that the Mn(II) complexes can be potential candidates for application as contrast agents in medical magnetic resonance imaging. The ligands to achieve higher stability of the complexes compared to those of monohydroxamic acids were necessary to involve into these types of investigation. Trihydroxamic acid based siderophores were also investigated in this aspect. Additional solution equilibrium study was also performed with the systems of the two metal ions and DFB model dihydroxamic acids. Because both metal ions are redox active, the another aim of this work was to investigate the redox stability of hydroxamate complexes, and where the formation of the Mn(III) or Co(III) complexes were unambiguous the stability constants of the complexes containing metal ion in the +3 oxidation form was also determined.

Important aims of the solution equilibrium studies were to determine the stoichiometry and the stability of the complexes formed and to get information about the geometry, the coordination modes of the complexes. Mainly pH-potentiometric, UV-visible spectrophotometic and ESI-MS methods were used. In the cases of Mn(II)-siderophore and -dihydroxamic acid systems relaxometric measurements were also performed. The stability constants of the complexes containing metal ion in its +3 oxidation form were determined by using cyclic voltammetry.

The major results obtained from the results are as follows:

• All of the studied ligands were either bought or prepared previously except one (GABA-ha), what was synthetized in the present work. Out of the siderophores DFB was bought and the others (DFR, DFC, TAF) were isolated. • Acid dissociation constants of all the ligands were determined and the results obtained are in good agreement with the data found in literature. At one part of the ligands there was data under our conditions in literature. In the case of two ligands (DFR, GABA-ha) data of other laboratories could be found. There was one siderophore (TAF) which has no result in literature. Its pK values were determined for the first time. It has three dissociation constants but only one is in the characteristic range (p $K \sim 8,5 - 9,5$ ). One value is lower with more log units (pK = 4,15(6)) and the third one is considerably higher (pK = 10,57(4)). Hydrogen bond formation is assumed in this cyclic trihydroxamic acid.

• The results show a moderate stability of the Mn(II) and the Co(II) complexes with simple monohydroxamic acids. The stabilities follow the Irving-Williams trend, what means the somewhat higher stability of the Co(II) complexes compared to the Mn(II) ones. The octahedral geometry in the formed complexes with both metal ions was confirmed. The formation of tris-chelated complexes was found only in the Co(II)-simple monohydroxamic acid systems, but not in the Mn(II) containing systems, where this was hindered by the hydrolysis of the metal ion.

• In the case of Mn(II)- and Co(II)-aminohydroxamic acid systems, if the amino group is in the  $\gamma$ -position (GABA-ha) this has no effect on the coordination of the hydroxamate group. But it has measurable effect if it is situated at  $\beta$ -position ( $\beta$ -Alaha) and the effect is the biggest if the amino moiety is at  $\alpha$ -position ( $\alpha$ -Alaha). The coordination is not clearly hydroxamate type in the complexes formed in the Mn(II)-Asp- $\beta$ -ha, Mn(II)-Glu- $\gamma$ -ha, Mn(II)-Hisha, Co(II)-Asp- $\beta$ -ha, Co(II)-Glu- $\gamma$ -ha and Co(II)-Hisha systems.

• The trend of the stability of the formed complexes in the Mn(II)- and Co(II)-dihydroxamic acid (DIHA) systems is in good agreement with those obtained earlier with other metal ions in our lab, namely 2,5-DIHA, which has the same type of connecting chain as those in DFB, forms the most stable complexes. If the length of the connecting chain in the dihydroxamic acids is shortened the stability of the complexes decreases a bit. However, the change of the position of

the peptide group in the chain causes significant decrease of stability. In the Mn(II)-DIHA systems form the  $[Mn_2L_3]^{2-}$  complex, in which three coordinated hydroxamates per metal ion exist, was found. Surprisingly, formation of trischelated complexes was not occured in the Co(II)-DIHA systems except with the 2,5-*H*,*H*-DIHA.

• Different protonated and non-protonted complexes can be formed with 1:1 metal to ligand ratio in the Mn(II)- and the Co(II)-trihydroxamic acids systems. With both metal ions the DFC and the TAF form more stable complexes compared to the DFB or the DFR. This stability increase can be explained by the conjugation of the hydroxamate group and the double bond situating one in  $\beta$ -position to each hydroxamate function. The octahedral geometry in the formed complexes with both metal ions was confirmed. Furthermore, the coordination of the third hydroxamate group was not occured in the Co(II)-DFR system similar to the Co(II)-DIHA ones. Sterical hindrance might be responsible for these unexpected results.

• In the Mn(II)-siderophore systems the individual relaxivity values calculated for the tris-chelated complexes are as expected significantly lower than the relaxivity of Mn(II)<sub>aq</sub>. However, the values are surprisingly high in the case of bis-chelated complexes, much higher than the value of the Mn(II)<sub>aq</sub>. This phenomenon can be explained by the water mediated intramolecular prototropic exchange between the coordinated hydroxamate and the protonated, non-coordinated hydroxamic functions. This assumption was supported by the results obtained for the bis-chelated complexes with dihydroxamic acids.

• At the Mn(II)-hydroxamic acid systems we observed that, above pH 7.5 no matter what the ligand was, some oxidation occured by the air oxygen, but the rate and the extent of that reaction depend on both the pH and the number of the coordinated hydroxamates. The formation of the Mn(III) complexes was complete (stochiometric) only with syderophores. Quasy-reversibility of the redox processes was found if the ligand was DFC or TAF. However, in the case of DFB the process was irreversible. (Unfortunatelly we had small amount of DFR therefore we could

not make measurements for ratio dependence.) The formal redox potentials were determined from the registered voltammograms and the stability constants for the Mn(III)-siderophore complexes were calculated. These values are close to the stability constants of the corresponding Fe(III) complexes.

• Considering the linear correlation of the first hydrolysis constants of the metal ions with the stability constants of the formed complexes with a given ligand, we estimated the first hydrolysis constant of the Mn(III) (for what hard to find data in the literature), using the stability constants for complexes formed between DFB or DFC and numerous metal ions.

• At the Co(II)-systems the oxidation was carried out at high pH using hydrogen-peroxide and only in the case of siderophores it was complete. The registered cyclic voltammograms show the irreversible reduction of the central metal ion, therefore only the catodic peak potential could be determined from it. From this reason only the upper limit of the stability constants could be calculated for the Co(III)-siderophore complexes. On the basis of the values, we can say that the Co(III)-siderophore complexes are exceptionally stable, the upper limit of their constants are many orders of magnitude higher than the stability constants of the corresponding Fe(III) complexes.

# 7. IRODALOMJEGYZÉK

- 1. H. L. Yale, "The Hydroxamic Acids", Chem. Rev., 33 (1943) 209-256
- 2. A.L. Crumbliss, in *CRC Handbook of Microbial Iron Chelates*, Ed.: G. Winkellmann, CRC, Boca Raton, FL. (1991)
- E. Farkas, E. Kozma, M. Pethő, K.M. Herlihy, G. Micera, "Equilibrium studies on copper(II)- and iron(III)-monohydroxamates", *Polyhedron*, 17 (1998) 3331-3342
- E. Farkas, H. Csóka, I. Tóth, "New insights into the solution equilibrium of molybdenum(VI)-hydroxamate systems: <sup>1</sup>H and <sup>17</sup>O NMR spectroscopic study of

Mo(VI)-desferrioxamine B and Mo(VI)-monohydroxamic acid systems", *Dalton Trans.*, (2003) 1645-1652

- D.M. Griffith, L. Bíró, J.A. Platts, H. Müller-Bunz, E. Farkas, P. Buglyó, "Synthesis and solution behaviour of stable mono-, di- and trinuclear Pd(II) complexes of 2,5-pyridinedihydroxamic acid: X-ray crystal structure of a novel Pd(II) hydroxamato complex", *Inorg. Chim. Acta*, **380** (2012) 291-300
- A.-M. Albrecht-Gary, A.L. Crumbliss, *Metal Ions in Biological Systems*, H. Sigel, A. Sigel (eds.) Vol. 35, Marcel-Dekker, INC, New York (1998)
- A. Duhme, J. Dauter, R.C. Hider, S. Pohl, "Complexation of Molybdenum by Siderophores: Synthesis and Structure of the Double-Helical cis-Dioxomolybdenum(VI) Complex of a Bis(catecholamide) Siderophore Analogue", *Inorg. Chem.*, 35 (1996) 3059-3061
- 8. G.P. Ellis, G.B. West (ed.), *Progress in Medicinal Chemistry*, Elsevier, New York (1991)
- 9. S. Desroches, F. Biron, G. Berthon, "Aluminum speciation studies in biological fluids Part 5. A quantitative investigation of Al(III) complex equilibria with desferrioxamine, 2,3-dihydroxybenzoic acid, Tiron, CP20 (L1), and CP94 under physiological conditions, and computer-aided assessment of the aluminummobilizing capacities of these ligands in vivo", *J. Inorg. Biochem.*, **75** (1999) 27-35
- M. Arnold, D.A. Brown, O. Deeg, W. Errington, W. Haase, K. Herlihy, T.J. Kemp, H. Nimir, R. Werner, "Hydroxamate-Bridged Dinuclear Nickel Complexes as Models for Urease Inhibition", *Inorg. Chem.*, 37 (1998) 2920-2925
- D.A. Brown, L.P. Cuffe, O. Deeg, W. Errington, N.J. Fitzpatrick, W.K. Glass, K. Herlihy, T.J. Kemp, H. Nimir, "Novel elimination of hydroxylamine and formation of a nickel tetramer on reactions of glutarodihydroxamic acid with model dinickel hydrolases", *Chem. Commun.*, (1998) 2433-2434
- S.K. Grant, B.G. Green, J.W. Kozarich, "Inhibition and Structure-Activity Studies of Methionine Hydroxamic Acid Derivatives with Bacterial Peptide Deformylase", *Bioorg. Chem.*, 29 (2001) 211-222
- X. Gu, Y. Wang, A. Kumar, G. Ye, K. Parang, G. Sun, "Design and Evaluation of Hydroxamate Derivatives as Metal-Mediated Inhibitors of a Protein Tyrosine Kinase", J. Med. Chem., 49 (2006) 7532-7539
- R. Jain, A. Sundram, S. Lopez, G. Neckermann, C. Wu, C. Hackbarth, D. Chen, W. Wang, N.S. Ryder, B. Weidmann, D. Patel, J. Trias, R. White, Z. Yuan, "α-Substituted hydroxamic acids as novel bacterial deformylase inhibitor-based antibacterial agents", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **13** (2003) 4223-4228
- 15. X. Hu, J. Zhu, S. Srivathsan, D. Pei, "Peptidyl hydroxamic acids as methionine aminopeptidase inhibitors", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **14** (2004) 77-79

- Szőcs Béla, Diplomamunka, Debreceni Egyetem, Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék, 2009
- P. Guan, F. Sun, X. Hou, F. Wang, F. Yi, W. Xu, H. Fang, "Design, synthesis and preliminary bioactivity studies of 1,3,4-thiadiazole hydroxamic acid derivatives as novel histone deacetylase inhibitors", *Bioorg. Med. Chem.*, 20 (2012) 3865–3872
- G. Giannini, W. Cabri, C. Fattorusso, M. Rodriquez, "Histone deacetylase inhibitors in the treatment of cancer: overview and perspectives", *Future Med. Chem.*, 4 (2012) 1439-1460
- D. Pal, S. Saha, "Hydroxamic acid A novel molecule for anticancer therapy", J. Adv. Pharm. Techn. Res., 3 (2012) 92-99
- S.D.M. Sumanadasa, C.G. Goodman, A.J. Lucke, T. Skinner-Adams, I. Sahama, A. Haque, T.A. Do, G.I. McFadden, D.P. Fairlie, K.T. Andrews, "Experimental Therapeutics Antimalarial Activity of the Anticancer Histone Deacetylase Inhibitor SB939", *Antimicrob. Agents Chemother.*, 56 (2012) 3849-3856
- T.W. Failes, T.W. Hambley, "Towards bioreductively activated prodrugs: Fe(III) complexes of hydroxamic acids and the MMP inhibitor marimastat", *J. Inorg. Biochem.*, **101** (2007) 396–403
- R.P. Verma, C. Hansch, "Matrix metalloproteinases (MMPs): Chemical-biological functions and (Q)SARs", *Bioorg. Med. Chem.*, 15 (2007) 2223-2268
- R.K. Yadav, S.P. Gupta, P.K. Sharma, V.M. Patil, "Recent Advances in Studies on Hydroxamates as Matrix Metalloproteinase Inhibitors: A Review", *Curr. Med. Chem.*, 18 (2011) 1704-1722
- A.D. Baxter, R. Bhogal, J. Bird, J.F. Keily, D.T. Manallack, J.G. Montana, D.A. Owen, W.R. Pitt, R.J. Watson, R.E. Wills, "Arylsulphonyl hydroxamic acids: potent and selective matrix metalloproteinase inhibitors", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **11** (2001) 1465-1468
- T.W. Failes, T.W. Hambley, "Models of hypoxia activated prodrugs: Co(III) complexes of hydroxamic acids", *Dalton Trans.*, (2006) 1895-1901
- S.A. Kolodziej, S.L. Hockerman, T.L. Boehm, J.N. Carroll, G.A. DeCrescenzo, J.J. McDonald, D.A. Mischke, G.E. Munie, T.R. Fletcher, J.G. Rico, N.W. Stehle, C. Swearingen, D.P. Becker, "Orally bioavailable dual MMP-1/MMP-14 sparing, MMP-13 selective α-sulfone hydroxamates", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **20** (2010) 3557-3560
- R.A. Tommasi, S. Weiler, L.W. McQuire, O. Rogel, M. Chambers, K. Clark, J. Doughty, J. Fang, V. Ganu, J. Grob, R. Goldberg, R. Goldstein, S. LaVoice, R. Kulathila, W. Macchia, R. Melton, C. Springer, M. Walker, J. Zhang, L. Zhu, M. Shultz, "Potent and selective 2-naphthylsulfonamide substituted hydroxamic acid inhibitors of matrix metalloproteinase-13", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **21** (2011) 6440-6445

- J. Jiang, A. Thyagarajan-Sahu, V. Krchnák, A. Jedinak, G.E. Sandusky, D. Sliva, "NAHA, a Novel Hydroxamic Acid-Derivative, Inhibits Growth and Angiogenesis of Breast Cancer *In Vitro* and *In Vivo*", *PlosOne*, 7 (2012) 1-10
- D. Siegel, M. Hussein, C. Belani, F. Robert, E. Galanis, V.M. Richon, J. Garcia-Vargas, C. Sanz-Rodriguez, S. Rizvi, "Vorinostat in solid and hematologic malignancies", *Journal of Hematalogy & Oncology*, 2:31 (2009) 1-11
- E. Farkas, É.A. Enyedy, H. Csóka, "Some factors affecting metal ionmonohydroxamate interactions in aqueous solution", *J. Inorg. Biochem.*, **79** (2000) 205-211
- 31. E. Farkas, O. Szabó, "Co(II) and Co(III) hydroxamate systems: A solution equilibrium study", *Inorg. Chim. Acta*, **392** (2012) 354-361
- E. Farkas, H. Csóka, G. Micera, A. Dessi, "Copper(II), nickel(II), zinc(II), and molybdenum(VI) complexes of desferrioxamine B in aqueous solution", *J. Inorg. Biochem.*, 65 (1997) 281-286
- T. Kiss, E. Farkas, "Metal-binding Ability of Desferrioxamine B", J. Inclusion Phenom., 32 (1998) 385-403
- É.A. Enyedy, I. Pócsi, E. Farkas, "Complexation of desferricoprogen with trivalent Fe, Al, Ga, In and divalent Fe, Ni, Cu, Zn metal ions: effects of the linking chain structure on the metal binding ability of hydroxamate based siderophores", J. Inorg. Biochem., 98 (2004) 1957-1966
- 35. E. Farkas, D. Bátka, G. Kremper, I. Pócsi, "Structure-based differences between the metal ion selectivity of two siderophores desferrioxamine B (DFB) and desferricoprogen (DFC): Why DFC is much better Pb(II) sequestering agent than DFB?", *J. Inorg. Biochem.*, **102** (2008) 1654-1659
- 36. Bátka Dávid doktori (Ph.D.) értekezés, Debrecen, 2007
- E. Farkas, P. Buglyó, É.A. Enyedy, V.A. Gerlei, A.M. Santos, "Factors affecting the metal ion-hydroxamate interactions: effect of the position of the peptide function in the connecting chain on the Fe(III), Mo(VI) and V(V) complexation of some new desferrioxamine B (DFB) model dihydroxamic acids", *Inorg. Chim. Acta*, 339 (2002) 215-223
- E. Farkas, D. Bátka, Z. Pataki, P. Buglyó, M.A. Santos, "Interaction of desferrioxamine B (DFB) model dihydroxamic acids with some essential and toxic metal(II) ions: effects of the structure and length of connecting chains on the metal ion selectivity", *Dalton Trans.*, (2004) 1248-1253
- E. Farkas, P. Buglyó, É.A. Enyedy, M.A. Santos, "Factors affecting the metal ionhydroxamate interactions II: effect of the length of the connecting chain on the

Fe(III), Mo(VI) and V(V) complexation of some new desferrioxamine B (DFB) model dihydroxamic acids", *Inorg. Chim. Acta*, **357** (2004) 2451-2461

- E. Farkas, J. Szőke, T. Kiss, H. Kozlowski, W. Bal, "Complex-forming properties of L-α-alaninehydroxamic acid (2-amino-N-hydroxypropanamide)", J. Chem. Soc., Dalton Trans. (1989) 2247-2251
- 41. B. Kurzak, H. Kozlowski, E. Farkas, "Hydroxamic and aminohydroxamic acids and their complexes with metal ions", *Coord. Chem. Rev.*, **114** (1992) 169-200
- 42. É.A. Enyedy, H. Csóka, I. Lázár, G. Micera, E. Garribba, E. Farkas, "Effects of side chain amino nitrogen donor atoms on metal complexation of aminohydroxamic acids: New diaminohydroxamates chelating Ni(II) more strongly than Fe(III)", J. Chem. Soc., Dalton Trans., (2002) 2632-2640
- D. Bátka, 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
- E. Csapó, P. Buglyó, N.V. Nagy, M.A. Santos, A. Corona, E. Farkas, "Syntheses and characterization of Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> binding capability of histidinehydroxamic acid derivatives", *Polyhedron*, **29** (2010) 3137-3145
- 45. Enyedy Éva Anna, doktori (Ph.D) értekezés, Debrecen, 2002
- M. Tegoni, M. Remelli, D. Bacco, L. Marchió, F. Dallavalle, "Copper(II) 12metallacrown-4 complexes of α-, β- and γ-aminohydroxamic acids: a comparative thermodynamic study in aqueous solution", *Dalton Trans.*, (2008) 2693-2701
- A. Sigel, H. Sigel (Eds.), *Metal Ions in Biological System*, Vol. 37, Marcel-Dekker, New York (2000)
- H. Dau, M. Haumann, "Eight steps preceding O-O bond formation in oxygenic photosynthesis-a basic reaction cycle of the Photosystem II manganese complex.", *Biochim. Biophys. Acta*, **1767** (2007) 472-483
- 49. C.W. Cady, K.E. Shinopoulos, R.H. Crabtree, G.W. Brudvig, ,,[(H<sub>2</sub>O)(terpy)Mn(μ-O)<sub>2</sub>Mn(terpy)(OH<sub>2</sub>)](NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> (terpy = 2,2':6,2"-terpyridine) and its relevance to the oxygen-evolving complex of photosystem II examined through pH dependent cyclic voltammetry", *Dalton Trans.*, **39** (2010) 3985-3989
- 50. N.N. Greenwood, A. Earnshaw, *Az elemek kémiája*, Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest (1999)
- 51. J.D. Rush, Z. Maskos, W.H. Koppenol, "The superoxide dismutase activities of two higher-valent manganese complexes, Mn<sup>IV</sup> desferrioxamine and Mn<sup>III</sup> cyclam", Arch. Biochem. Biophys., 289 (1991) 97-102
- C. Bull, E.C. Niederhoffer, T. Yoshida, J.A. Free, ,, Kinetic studies of superoxide dismutases: properties of the manganese-containing protein from Thermus thermophilus", J. Am. Chem. Soc., 113 (1991) 4069-4076

- 53. Kőrös Endre, *Bioszervetlen kémia*, Gondolat Kiadó, Budapest (1980)
- 54. E.M.F. Muri, M.J. Nieto, R.D. Sindelar, J.S. Williamson, "Hydroxamic Acids as Pharmacological Agents", *Curr. Med. Chem.*, **9** (2002) 1631-165
- 55. A. Rossello, E. Nuti, M. Pia Catalani, P. Carelli, E. Orlandini, S. Rapposelli, T. Tuccinardi, S.J. Atkinson, G. Murphy, A. Balsamo, "A new development of matrix metalloproteinase inhibitors: twin hydroxamic acids as potent inhibitors of MMPs", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **15** (2005) 2311-2314
- M.S. Finnin, J.R. Donigian, A. Cohen, V.M. Richon, R.A. Rifkind, P.A. Marks, R. Breslow, N.P. Pavletich, "Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors", *Nature*, 401 (1999) 188-193
- 57. D. Pan, A.H. Schieder, S.A. Wickline, G.M. Lanza, "Manganese-based MRI contrast agents: past, present, and future", *Tetrahedron*, **67** (2011) 8431-8444
- J.T. Jorgensen, M. Rief, T.B. Brismar, M. Wagner, N. Albiin, "A new manganesebased oral contrast agent (CMC-001) for liver MRI: pharmacological and pharmaceutical aspects.", *Acta Radiol.*, 53 (2012) 707-713
- O.L. Gobbo, M. Zurek, F. Tewes, C. Ehrhardt, Y. Crémillieux, "Manganese: a new contrast agent for lung imaging?", *Contrast Media & Molecular Imaging*, 7 (2012) 542-546
- B. Drahos, J. Kotek, P. Hermann, I. Lukes, É. Tóth, "Mn<sup>2+</sup> Complexes with Pyridine-Containing 15-Membered Macrocycles: Thermodynamic, Kinetic, Crystallographic, and <sup>1</sup>H/<sup>17</sup>O Relaxation Studies", *Inorg. Chem.*, **49** (2010) 3224-3238
- Q. Zhang, J.D. Gorden, R.J. Beyers, C.R. Goldsmith, "Manganese(II)-Containing MRI Contrast Agent Employing a Neutral and Non-Macrocyclic Ligand", *Inorg. Chem.*, 50 (2011) 9365-9373
- H. Su, C. Wu, J. Zhu, T. Miao, D. Wang, C. Xia, X. Zhao, Q. Gong, B. Song, H. Ai, "Rigid Mn(II) chelate as efficient MRI contrast agent for vascular imaging" *Dalton Trans.*, 41 (2012) 14480-14483
- B. Drahos, I. Lukes, É. Tóth, "Manganese(II) Complexes as Potential Contrast Agents for MRI", *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2012 (2012) 1975-1986
- Z. Ye, Eun-Kee Jeong, X. Wu, M. Tan, S. Yin, Zheng-Rong Lu, "Polydisulfide manganese(II) complexes as non-gadolinium biodegradable macromolecular MRI contrast agents", *J. Magn. Reson. Imaging*, 35 (2012) 737-744
- O.W. Duckworth, G. Sposito, "Siderophore-Manganese(III) Interactions. I. Air-Oxidation of Manganese(II) Promoted by Desferrioxamine B", *Environ. Sci. Technol.*, **39** (2005) 6037-6044
- O.W. Duckworth, G. Sposito, "Siderophore-Manganese(III) Interactions II. Manganite Dissolution Promoted by Desferrioxamine B", *Environ. Sci. Technol.*, 39 (2005) 6045-6051

- O.W. Duckworth, J.R. Bargar, G. Sposito, "Coupled biogeochemical cycling of iron and manganese as mediated by microbial siderophores", *Biometals*, 22 (2009) 605-613
- 68. D.L. Parker, G. Sposito, B.M. Tebo, "Manganese(III) binding to a pyoverdine siderophore produced by a manganese(II)-oxidizing bacterium", *Geochim. Cosmochim. Acta*, **68** (2004) 4809-4820
- K.M. Faulkner, R.D. Stevens, I. Fridovich, "Characterization of Mn(III) Complexes of Linear and Cyclic Desferrioxamines as Mimics of Superoxide Dismutase Activity", Arch. Biochem. Biophys., 310 (1994) 341-346
- 70. G. Anderegg, F. L'Eplattenier, G. Schwarzenbach, "Hydroxamatkomplexe II. Die Anwendung der pH-Methode", *Helv. Chim. Acta*, **22** (IV) (1963) 1400-1408
- M.M. Khalil, R.K. Mahmoud, "New Insights into M(II)-Hydroxamate Interactions: The Electro-Analytical Behavior of Metal(II) Complexes Involving Monohydroxamic Acids and Diamines in an Aqueous Medium", J. Chem. Eng. Data, 53 (2008) 2318-2327
- 72. H.M.N.H. Irving, R.J.P. Williams, "The stability of transition-metal complexes", *J. Chem. Soc.*, (1953) 3192-3210
- 73. M. Kobayashi, S. Shimizu, "Cobalt proteins", Eur. J. Biochem., 261 (1999) 1-9
- 74. Sóvágó I., Bioszervetlen kémia jegyzet, Debreceni Egyetem
- W. Maret, B.L. Vallee, "Cobalt as probe and label of proteins", *Meth. Enzymol.*, 226 (1993) 52-71
- M.M. Khalil, A.E. Fazary, "Potentiometric Studies on Binary and Ternary Complexes of Di- and Trivalent Metal Ions Involving Some Hydroxamic Acids, Amino Acids, and Nucleic Acid Components", *Monatshefte für Chemie*, 135 (2004) 1455-1474
- E.M. Khairy, M.M. Shoukry, M.M. Khalil, M.M.A. Mohamed, "Metal complexes of salicylhydroxamic acid: equilibrium studies and synthesis", *Transition Met. Chem.*, 21 (1996) 176-180
- O.W. Duckworth, J.R. Bargar, A.A. Jarzecki, O. Oyerinde, T.G. Spiro, G. Sposito, "The exceptionally stable cobalt(III)-desferrioxamine B complex", *Mar. Chem.*, 113 (2009) 114-122
- 79. D.A. Brown, W. Errington, W.K. Glass, W. Haase, T.J. Kemp, H. Nimir, S.M. Ostrovsky, R. Werner, "Magnetic, Spectroscopic, and Structural Studies of Dicobalt Hydroxamates and Model Hydrolases", *Inorg. Chem.*, 40 (2001) 5962-5971
- Z. Tomkowicz, S. Ostrovsky, H. Müller-Bunz, A.J. Hussein Eltmini, M. Rams, D.A. Brown, W. Haase, "Extended Triple-Bridged Ni(II)- and Co(II)-Hydroxamate Trinuclear Complexes: Synthesis, Crystal Structures, and Magnetic Properties", *Inorg. Chem.*, 47 (2008) 6956-6963

- D.A. Brown, W.K. Glass, N.J. Fitzpatrick, T.J. Kemp, W. Errington, H. Müller-Bunz, A.J. Hussein, H. Nimir, "Mononuclear and dinuclear model hydrolases of nickel and cobalt", *Inorg. Chim. Acta*, 358 (2005) 2755-2762
- P.D. Bonnitcha, M.D. Hall, C.K. Underwood, G.J. Foran, M. Zhang, P.J. Beale, T.W. Hambley, "XANES investigation of the Co oxidation state in solution and in cancer cells treated with Co(III) complexes", *J. Inorg. Biochem.*, **100** (2006) 963-971
- M.D. Hall, T.W. Failes, N.Yamamoto, T.W. Hambley, "Bioreductive activation and drug chaperoning in cobalt pharmaceuticals", *Dalton Trans.*, (2007) 3983-3990
- T.W. Failes, C. Cullinane, C.I. Diakos, N. Yamamoto, J.G. Lyons, T.W. Hambley, "Studies of a Cobalt(III) Complex of the MMP Inhibitor Marimastat: A Potential Hypoxia-Activated Prodrug", *Chem. Eur. J.*, **13** (2007) 2974-2982
- 85. G. Zou, G.L. Boyer, "Synthesis and properties of different metal complexes of the siderophore desferricrocin", *BioMetals*, **18** (2005) 63-74
- A.H.T. Hissen, A.N.C. Wan, M.L. Warwas, L.J. Pinto, M.M. Moore, "The Aspergillus fumigatus Siderophore Biosynthetic Gene sidA, Encoding 1-Ornithine N<sup>5</sup>-Oxygenase, Is Required for Virulence", Infect. Immun., 73 (2005) 5493-5503
- A.H.T. Hissen, M.M. Moore, "Site-specific rate constants for iron acquisition from transferrin by the Aspergillus fumigatus siderophores N',N",N"'-triacetylfusarinine C and ferricrocin", J. Biol. Inorg. Chem., 10 (2005) 211-220
- J.P. Adjimani, T. Emery, "Iron Uptake in *Mycelia sterilia* EP-76", J. Bacteriol., 169 (1987) 3664-3668
- M. Schrettl, H.S. Kim, M. Eisendle, C. Kragl, W.C. Nierman, T. Heinekamp, E.R. Werner, I. Jacobsen, P. Illmer, H. Yi, A.A. Brakhage, H. Haas, "SreA-mediated iron regulation in Aspergillus fumigatus", *Mol. Microbiol.*, **70** (2008) 27-43
- 90. P. Heymann, J.F. Ernst, G. Winkelmann, "Identification of a fungal triacetylfusarinine C siderophore transport gene (TAF1) in Saccharomyces cerevisiae as a member of the major facilitator superfamily", *BioMetals*, **12** (1999) 301-306
- 91. É. Leiter, T. Emri, Gy. Gyémánt, I. Nagy, I. Pócsi, G. Winkelmann, I. Pócsi, "Penicillin V production by Penicillium chrysogenum in the presence of Fe<sup>3+</sup> and in low-iron culture medium", *Folia Microbiol.*, **46** (2001) 127-132
- V. Tóth, K. Antal, Gy. Gyémánt, M. Micskei, I. Pócsi, T. Emri, "Optimization of coprogen production in Neurospora crassa", *Acta Biol. Hung.*, 60 (2009) 321-328
- I. Pócsi, V. Jeney, P. Kertai, I. Pócsi, T. Emri, Gy. Gyémánt, L. Fésüs, J. Balla, Gy. Balla, "Fungal siderophores function as protective agents of LDL oxidation

and are promising anti-atherosclerotic metabolites in functional food", *Mol. Nutr. Food Res.*, **52** (2008) 1434-1447

- 94. Erdey László: *A kémiai analízis súlyszerinti módszerei*, Akadémiai Kiadó, Budapest, (1960)
- 95. A.H. Blatt, *Organic Syntheses*, Wiley, New York (1963)
- B. Kurzak, D. Kroczewska, J. Jezierska, M. Huza-Koralewicz, "Stability and structure of copper(II)-L-histidinehydroxamic acid complexes", *Trans. Met. Chem.*, 13 (1988) 297-302
- 97. D.D. Perrin, W.L.F. Armarego, *Purification of Laboratory Chemicals*, Pergamon, Oxford (1988)
- L. Zékány, I. Nagypál, Computational Methods for the Determination of Stability Constants, ed.: D. Leggett, Plenum Press, New York, (1985)
- H.M. Irving, M.G. Miles, L.D. Pettit, "A study of some problems in determining the stoicheiometric proton dissociation constants of complexes by potentiometric titrations using a glass electrode", *Anal. Chim. Acta*, **38** (1967) 475-488
- P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, "SUPERQUAD: an improved general program for computation of formation constants from potentiometric data", J. Chem. Soc., Dalton Trans., (1985) 1195-1200
- 101. G. Eriksson, "An algorithm for the computation of aqueous multi-component, multiphase equilibria", *Anal. Chim. Acta.*, **112** (1979) 375-383
- 102. G. Gran, "Determination of the Equivalent Point in Potentiometric Titrations", *Acta Chem. Scan.*, **4** (1950) 559-577
- 103. F.A. Cotton, G. Wilkinson, C.A. Murillo, M. Bochmann, *Advanced Inorganic Chemistry*, Sixth Edition, John Wiley & Sons, New York (1999)
- 104. Császár J., Bán M., *Optikai színkép, ligandumtér-elmélet, komplex szerkezet*, Akadémiai Kiadó, Budapest (1972)
- 105. Kiss T., Gajda T., Gyurcsik B., *Bevezetés a bioszervetlen kémiába*, Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest (2007)
- 106. D.J. Harvey, "Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of carbohydrates", *Mass Spectrometry Rev.*, **18** (1999) 349-450
- 107. Farkas E., Műszeres Analitikai Kémiai Gyakorlat Jegyzet, Debreceni Egyetem
- I.M. Kolthoff, W.J. Tomsicek, "The Oxidation Potential of the System Potassium Ferrocyanide-Potassium Ferricyanide at Various Ionic Strengths", J. Phys. Chem., 39 (1935) 945-954
- Pálinkás Zoltán, Diplomamunka, Debreceni Egyetem, Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék, 2007
- S. Cortes, E. Brucher, C.F.G.C. Geraldes, A.D. Sherry, "Potentiometry and NMR studies of 1,5,9-triazacyclododecane-N,N',N"-triacetic acid and its metal ion complexes", *Inorg. Chem.*, 29 (1990) 5-9

- 111. E. Farkas, I. Kiss, "Complexes of peptide hydroxamates. Complex formation between transition metals and L-prolyl-L-leucylglycinehydroxamic acid [Nhydroxy-7-methyl-4-oxo-5-(pyrrolidine-2'-carboxamido)-3-azaoctanamide] and Lprolyl-L-leucinehydroxamic acid [N-hydroxy-4-methyl-2-(pyrrolidine-2'carboxamido)pentanamide]", J. Chem. Soc., Dalton Trans., (1990) 749-753
- E. Farkas, D.A. Brown, R. Cittaro, W.K. Glass, "Metal complexes of glutamic acid-γ-hydroxamic acid (Glu-γ-ha)(N-Hydroxyglutamine) in aqueous solution", J. Chem. Soc., Dalton Trans., (1993) 2803-2807
- E. Farkas, B. Kurzak, "Potentiometric and Spectroscopic Studies of Binary and Ternary Copper(II) Complexes with Histidinehydroxamic Acid", *J. Coord. Chem.*, 22 (1990) 145-151
- 114. G.B. Wong, M.J. Kappel, K.N. Raymond, B. Matzanke, G. Winkelmann, "Coordination chemistry of microbial iron transport compounds. 24. Characterization of coprogen and ferricrocin, two ferric hydroxamate siderophores", J. Am. Chem. Soc., 105 (1983) 810-815
- 115. E. Farkas, É.A. Enyedy, H. Csóka, "A comparison between the chelating properties of some dihydroxamic acids, desferrioxamine B and acetohydroxamic acid", *Polyhedron*, **18** (1999) 2391-2398
- C.F. Baes Jr., R. E. Mesmer, *The Hydrolysis of Cations*, John Wiley & Sons, Inc., New York (1976)
- 117. C.P. Brink, A.L. Crumbliss, "Kinetics, mechanism, and thermodynamics of aqueous iron(III) chelation and dissociation: influence of carbon and nitrogen substituents in hydroxamic acid ligands", *Inorg. Chem.*, **23** (1984) 4708-4718
- 118. B. Monzyk, A.L. Crumbliss, "Acid dissociation constants (Ka) and their temperature dependencies (.DELTA.Ha, .DELTA.Sa) for a series of carbon- and nitrogen-substituted hydroxamic acids in aqueous solution", J. Org. Chem., 45 (1980) 4670-4675
- A. Boraei, E. Abd Alla, "Stability constants of the Ternary complexes system-M(II) amino-acids quinolines", *J. Indian Chem. Soc.*, **70** (1993) 197-201
- P. Reddy, V. Rao, "Role of secondary ligands in the structure and stability of metal-cytidine complexes in solution", *Polyhedron*, 4 (1985) 1603-1609
- 121. T. Gajda, B. Henry, J-J Delpuech, "Stereoisomerism and Equilibrium Properties of Oxygen-Carrying Cobalt(II) Complexes of Histamine and Its Derivatives: A New Approach to an Old System", *Inorg. Chem.*, **36** (1997) 1850-1859
- W.R. Harris, A.E. Martell, "Complexation and oxygenation equilibriums of cobaltous chelates of dipeptides with coordinating side groups", J. Am. Chem. Soc., 99, (1977) 6746-6750
- 123. W.S. Kittl, B.M. Rode, "Complex formation of aliphatic dipeptides with zinc(II) and manganese(II)", *Inorg. Chim. Acta*, **63** (1982) 47-52

- 124. T. Kiss, G. Deák, A. Gergely, "Complexes of 3,4-dihydroxyphenyl derivatives. VII. Mixed ligand complexes of L-dopa and related compounds", *Inorg. Chim. Acta*, 91 (1984) 269-277
- 125. V.T. Yilmaz, F. Yilmaz, "Acetylsalicylhydroxamic acid and its cobalt(II), nickel(II), copper(II) and zinc(II) complexes", *Trans. Met. Chem.*, 24 (1999) 726-729
- 126. S.H. Koenig, C. Baglin, R.D. Brown III, C.F. Brewer, "Magnetic field dependence of solvent proton relaxation induced by Gd<sup>3+</sup> and Mn<sup>2+</sup> complexes.", *Magn. Reson. Med.*, 1 (1984) 496-501
- 127. B. O'Sullivan, D.M.J. Doble, M.K. Thompson, C. Siering, J. Xu, M. Botta, S. Aime, K.N. Raymond, "The Effect of Ligand Scaffold Size on the Stability of Tripodal Hydroxypyridonate Gadolinium Complexes", *Inorg. Chem.*, 42 (2003) 2577-2583
- A.J. Bard, R. Parson, J. Jordan, *Standard Potencials in Aqueous Solution*, Marcel Dekker, INC., New York and Basel (1985)
- A. Evers, R.D. Hancock, A.E. Martell, R.J. Motekaitis, "Metal Ion Recognition in Ligands with Negatively Charged Oxygen Donor Groups. Complexation of Fe(III), Ga(III), In(III), Al(III), and Other Highly Charged Metal Ions", *Inorg. Chem.*, 28 (1989) 2189-2195
- M.J. Sisley, R.B. Jordan, "First Hydrolysis Constants of Hexaaquacobalt(III) and manganese(III): Longstanding Issues Resolved", *Inorg. Chem.*, 45 (2006) 10758-10763
- Kremper Georgina, Diplomamunka, Debreceni Egyetem, Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék, 2006
- O. Szabó, E. Farkas, "Characterization of Mn(II) and Mn(III) binding capability of natural siderophores desferrioxamine B and desferricoprogen as well as model hydroxamic acids", *Inorg. Chim. Acta*, 376 (2011) 500-508
- E. Farkas, E. Kozma, T. Kiss, I. Tóth, B. Kurzak, "Role of the NH<sub>3</sub><sup>+</sup> moiety in iron(III)-, aluminium(III)- and gallium(III)-aminohydroxamate interactions", *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, (1995) 477-481
- 134. P.L. Brown, J. Ellis, R.N. Sylva, "The hydrolysis of metal ions. Part 4. Indium(III)", J. Chem. Soc. Dalton Trans., (1982) 1911-1914
- 135. Y. Kanekiyo, S. Aizawa, N. Koshino, S. Funakashi, "Complexation equilibria of oxy-acid–2-amino-2-deoxy-d-gluconic acid-metal(II) ion ternary systems in aqueous solution as studied by potentiometry. Binding characteristics of borate and germanate", *Inorg. Chim. Acta*, **298** (2000) 154-164

# 8. FÜGGELÉK

8.1. Az értekezéshez kapcsolódó közlemények

Szabó Orsolya doktori (PhD) értekezés

1. <u>Orsolya Szabó</u>, Etelka Farkas: Characterization of Mn(II) and Mn(III) binding capability of natural siderophores desferrioxamine B and desferricoprogen as well as model hydroxamic acids

Inorganica Chimica Acta, 376 (2011) 500-508 (Impakt faktor: 1,846)

2. Etelka Farkas, <u>Orsolya Szabó</u>: Co(II) and Co(III) hydroxamate systems: A solution equilibrium study

Inorganica Chimica Acta, 392 (2012) 354-361 (Impakt faktor: 1,687)

# 8.2. Az értekezéshez szorosan nem kapcsolódó közlemények

1. Etelka Farkas, <u>Orsolya Szabó</u>, Gyula Tircsó, László Somsák: **Relaxometric** determination of binding between Mn(II) – UDP and Mn(II) - UDP-glucose in Aqueous Solution

Carbohydrate Research, 368 (2013) 68-72 (Impakt faktor: 2,044)

### 8.3. Az értekezéshez kapcsolódó előadások

1. <u>Szabó Orsolya</u>, Farkas Etelka: **Mn(II)- és Co(II)-ionok oldatbeli** kölcsönhatása hidroxámsavakkal

XLIV. Komplexkémiai Kollokvium, 2009. május 27-29, Siófok, Magyarország

Etelka Farkas, <u>Orsolya Szabó:</u> A Comparison Between Mn<sup>2+/3+</sup> and Fe<sup>2+/3+</sup>
Binding Ability of Desferrioxamine B and Model Hydroxamic Acids
10<sup>th</sup> Europen Biological Inorganic Chemistry Conference, 2010. június 22-26, Thessaloniki, Görögország

**3.** <u>Szabó Orsolya</u>, Farkas Etelka: **A Mn(II)- és Mn(III)ionok hidroxámsavakkal** való kölcsönhatásának koordinációs kémián túlmutató néhány aspektusa

MKE 1. Nemzeti Konferencia, 2011. május 22-25, Sopron, Magyarország

# 4. Etelka Farkas, <u>Orsolya Szabó:</u> Possible Biological Relevance of Complexes between Manganese(II)/(III) and Hydroxamates

11<sup>th</sup> International Symposium on Metal Ions in Biology and Medicine (ISMIBM 2011), 2011. június 20-23, Cambridge, UK

# 5. <u>Szabó Orsolya</u>, Farkas Etelka: Néhány nyitott kérdés a Co(II)-hidroxamát oldatbeli kölcsönhatását illetően

XLVI. Komplexkémiai Kollokvium, 2012. május 21-23, Mátrafüred, Magyarország

6. Etelka Farkas, <u>Orsolya Szabó:</u> Factors affecting the thermodynamic and redox stability of manganese(II)-and cobalt(II)-hydroxamate complexes *International Symposium on Metal Complexes* (ISMEC 2012), 2012. június 18-22, Lisszabon, Portugália

7. Etelka Farkas, <u>Orsolya Szabó:</u> Bioinduced Investigation on Cobalt(II)/(III) – Hydroxamate systems

12<sup>th</sup> International Symposium on Metal Ions in Biology and Medicine (ISMIBM 2013), 2013. március 11-13, Punta del Este, Uruguay

### 8.4. Az értekezéshez kapcsolódó poszterek

1. <u>Orsolya Szabó</u>, Etelka Farkas: Interaction of Mn(II) and Co(II) Ions with Hydroxamic Acids

10<sup>th</sup> International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry (ISABC10), 2009. szeptember 25-28, Debrecen, Magyarország

# 2. <u>Orsolya Szabó</u>, Etelka Farkas: Interaction of Mn(II) and Co(II) Ions with DFB and model Dihydroxamic Acids

XI. International Symposium on Inorganic Biochemistry Challenge for all Generations, 2010. szeptember 4-8, Kudowa Zdrój, Lengyelország

**3.** <u>Etelka Farkas</u>, Orsolya Szabó:  $Mn^{2+/3+}$  and  $Fe^{2+/3+}$  Binding by Natural Siderophores and Model Hydroxamic Acids

Chemistry towards Biology, 2010. szeptember 8-11, Priosten, Horvátország

4. <u>Orsolya Szabó</u>, Etelka Farkas: Interesting Differences Between the Number of Coordinated Hydroxamates in the Cobalt(II) complexes Formed with Mono-Di- and Trihydroxamates

4<sup>th</sup> European Conference on Chemistry for Life Science (4ECCLS), 2011. augusztus 31-szeptember 3, Budapest, Magyarország

# 5. Etelka Farkas, <u>Orsolya Szabó</u>, Gyula Tircsó: **Bioinspired Investigation on Complexes of Desferrioxamine B, Desferricoprogen and their Model Ligands** with Mn(II) and Mn(III)

11<sup>th</sup> International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry (11 ISABC), 2011. december 2-5, Barcelona, Spanyolország

# 6. Etelka Farkas, <u>Orsolya Szabó</u>, Gyula Tircsó: **Bioinduced investigation on** metal ion hydroxamate systems

4<sup>th</sup> EuCheMS Chemistry Congress, 2012. augusztus 26-30, Prága, Csehország

7. <u>Orsolya Szabó</u>, Etelka Farkas: Characterization of Mn(II)- and Co(II)aminohydroxamate complexes in solution

11<sup>th</sup> European Biological Inorganic Chemistry Conference (EUROBIC11),2012. szeptember 12-16, Granada, Spanyolország

# 8.5. Az értekezéshez szorosan nem kapcsolódó poszterek
Hidroxámsav alapú sziderofórok és modelljeik mangán- és kobaltkomplexei

1. <u>Orsolya Szabó</u>, Etelka Farkas, László Somsák: **Interaction Between Mn(II)** and **UDP-Glucose in Aqueous Solution** 

4<sup>th</sup> European Conference on Chemistry for Life Science (4ECCLS),

2011. augusztus 31 - szeptember 3, Budapest, Magyarország (poszterelőadás angol nyelven)