



**Lipidkeverékek hidrogénezése vizes közegben palládium(II)-
alizarinvörös és ruténium(II)-karbén komplex
katalizátorokkal**

Doktori (PhD) értekezés

Csabai Péter

Debreceni Egyetem
Természettudományi Kar
Debrecen, 2004

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Joó Ferenc egyetemi tanárnak, hogy az elmúlt évek során - időt és fáradságot nem kímélve – egyengette pályafutásomat, megismertetett a kutatómunka szépségével, izgalmával, és hogy mindvégig támogatta fejlődésemet, előrehaladásomat.

Külön köszönet illeti Horváth Henriettát, aki külföldi tapasztalatait átadva jelentősen hozzájárult eredményeim eléréséhez. Szeretnék köszönetet mondani Fekete Mariannának a közös kísérletezéseink alkalmával tanúsított segítőkészségéért. Köszönöm munkatársaim, Dr. Elek János, Papp Gábor, Dr. Kovács József, Dr. Novákné Papp Éva, Dr. Nádasdi Levente, Józai István és Csajbók Éva munkám során nyújtott nélkülözhetetlen segítségét.

Szeretném megköszönni Nagy Eszter Mártának és Dr. Nagy Zoltánnak a pH potenciometrikus titrálások, Török Jánosnak és Nagy Lajosnak a tömegspektrometriás mérések, Antek Évának az IR-analízisek, és Dr. Bényei Attilának a röntgen szerkezet-meghatározás alkalmával nyújtott segítségét.

Köszönet illeti Dr. Kathó Ágnes és Dr. Bányai Istvánt, akikhez bármikor fordulhattam kérdéseimmel, szakmai problémáimmal.

Köszönöm Dr. Víg Lászlónak és Dr. Balogh Gábornak, az MTA SzBK munkatársainak, hogy a kísérleteimhez szükséges lipideket rendelkezésemre bocsátották, és hasznos tanácsaikkal, javaslataikkal hozzájárultak munkám sikerességéhez.

Köszönettel tartozom Dr. Fülöp Ferencnek, a SZOTE Gyógyszerkémiai Intézet vezetőjének az elemanalízisek lehetővé tételéért, valamint Varga Istvánnénak a mérések kivitelezéséért.

Szeretném megköszönni Varga Ildikónak a munkám gyakorlati része során nyújtott rengeteg segítségét.

Végül, de nem utolsósorban köszönöm Jeszenszky András és Kovács Gábor barátaimnak az egyetemi éveink alatt szerzett emlékezetes pillanatok.

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem TTK kémia doktori program Reakciókinetika és Katalízis (K/1) alprogramja keretében készítettem 2001-2004 között és ezúton benyújtom a Debreceni Egyetem TTK doktori PhD fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 2004.....

a jelölt aláírása

Tanúsítom, hogy Csabai Péter doktorjelölt 2001-2004 között a fent megnevezett Doktori Iskola Reakciókinetika és Katalízis (K/1) programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javaslom.

Debrecen, 2004.....

a témavezető aláírása

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	1
2. IRODALMI ELŐZMÉNYEK	9
2.1. A BIOLÓGIAI MEMBRÁNOK SZERKEZETE, FELÉPÍTÉSE	9
2.1.1. Membránalkotó lipidek	9
2.1.1.a. Fosfolipidek	9
2.1.1.b. Glikolipidek	10
2.1.1.c. Szfingolipidek	11
2.1.2. A Singer-Nicolson féle folyadék-mozaik modell	12
2.1.3. A dinamikusan struktúrált mozaik modell – a lipid „raft”-elmélet	13
2.2. A MEMBRÁN-HIDROGÉNEZÉS JELENTŐSÉGE, ÉLETTANI HATÁSAI	15
2.3. MEMBRÁN-HIDROGÉNEZŐ KATALIZÁTOROK	17
2.3.1. Adams-katalizátor	17
2.3.3. Átmenetifém-foszfin komplexek	17
2.3.3.a. Vízben nem oldódó foszfin-komplexek	17
2.3.3.b. Vízoldható foszfin-komplexek	19
2.3.4. Szulfonált alizarin komplexek	20
2.4. N-HETEROCIKLUSOS KARBÉN-KOMPLEXEK, MINT POTENCIÁLIS MEMBRÁN-HIDROGÉNEZŐ KATALIZÁTOROK	21
2.4.1. A karbének általános jellemzése	21
2.4.2. Imidazol-2-ilidének (NHC-karbének)	22
2.4.2.a. Vízoldható NHC-karbén komplexek	23
2.4.3. NHC-karbén komplexek előállítása	25
2.4.4. NHC karbének felhasználási lehetőségei katalitikus folyamatokban	27
2.4.4.a. Gyűrű felnyílásos metatézises polimerizáció (ROMP)	28
2.4.4.b. Telomerizáció	28
2.4.4.c. Hidroformilezés	29
2.4.4.d. Hidroszililezés	29
2.4.4.e. Hidrogén transzfer reakciók	30
2.4.4.f. Hidrogénezés	30
3. CÉLKITŰZÉSEK	31
4. KÍSÉRLETI ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	32
4.1. FELHASZNÁLT ANYAGOK, VEGYSZEREK	32
4.2. ELŐÁLLÍTOTT VEGYÜLETEK	33
4.2.1. $[\text{RuCl}_2(\text{p-cimol})]_2$ előállítása	34
4.2.2. 1-(nátrium-etil-2-szulfonát)-3-(etil-2-szulfonát) imidazólium betain előállítása	34
4.2.3. $[\text{Ag}(1\text{-butil-3-metil-imidazol-2-ilidén})][\text{AgCl}]$ előállítása	35
4.2.4. $[\text{RuCl}_2(1\text{-butil-3-metil-imidazol-2-ilidén})(\text{p-cimol})]$ (1) előállítása	35
4.3. KÍSÉRLETI MÓDSZEREK, KÍSÉRLETI TECHNIKÁK	36
4.3.1. Lipid diszperziók készítése	36
4.3.2. Lipidek hidrogénezése	37
4.3.3. Egyéb szubsztrátumok hidrogénezése	38
4.3.4. Hidrogénezési konverziók meghatározása	38
4.3.5. Ru(II) -karbén komplexek szerkezetazonosítása	40
4.3.6. pH potenciometrikus titrálások	41
5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEŚÜK	42
5.1. LIPIDEK, LIPIDKEVERÉKEK Pd(QS)_2 -VEL TÖRTÉNŐ HIDROGÉNEZÉSÉNEK VIZSGÁLATA	42
5.1.1. DOPC hidrogénezése	42
5.1.2. Kétkomponensű DOPE-DOPC lipidkeverékek hidrogénezése	44
5.1.3. Kétkomponensű DOPE-DOPC lipidkeverékek hidrogénezése koleszterin jelenlétében	46
5.1.4. Synechocystis PCC 6803-ból izolált lipidkeverék hidrogénezése	47
5.1.5. Foszfátidil-glicerol (PG) hidrogénezése	49
5.1.6. Szójalecitin hidrogénezése	50
5.2. Ru(II) -N-HETEROCIKLUSOS KARBÉN KOMPLEXEK ELŐÁLLÍTÁSA ÉS SZERKEZETAZONOSÍTÁSA	52

5.2.1. $[RuCl_2(1\text{-butil-3-metil-imidazol-2-ilidén})(p\text{-cimol})]$ (1) szintézise.....	52
5.2.2. $[RuCl_2(1\text{-butil-3-metil-imidazol-2-ilidén})(p\text{-cimol})]$ (1) szerkezet-azonosítása	52
5.2.3. $[RuCl_2(1\text{-butil-3-metil-imidazol-2-ilidén})(p\text{-cimol})]$ (1) pH-potenciometrikus titrálása.....	57
5.2.3.a. pH-sztatikus titrálások	59
5.2.4. $[RuClL(PTA)(p\text{-cimol})]$ (4a) és $[Ru(H_2O)L(PTA)(p\text{-cimol})]$ (4b) „in situ” vizes oldatban történő előállítása és szerkezetazonosítása	62
5.3. $Ru(II)$ -N-HETEROCIKLUSOS KARBÉN KOMPLEXEK ALKALMAZÁSA HOMOGÉN KATALITIKUS FOLYAMATOKBAN.....	66
5.3.1. Hidrogénezés	66
5.3.2. Redox izomerizáció	69
5.3.3. Hidrogén transzfer reakciók	73
5.4. LIPIDKEVERÉKEK HIDROGÉNEZÉSE NHC -KARBÉN KOMPLEXEKKEL	74
5.4.1. DOPC hidrogénezése	74
5.4.2. <i>Synechocystis</i> PCC 6803-ból izolált lipidkeverék hidrogénezése.....	76
5.4.3. Szójalecitin hidrogénezése	78
6. ÖSSZEFOGLALÁS	80
7. SUMMARY	83
IRODALOMJEGYZÉK	86

A dolgozatban előforduló rövidítések magyarázata:

BMIMCl: 1-butil-3-metil-imidazólium-klorid

***t*-BuOK:** *terc*-butoxi-kálium

DGDG: digalaktozil-diacil-glicerol

DHB: 2,5-dihidroxi-benzoesav

DMSO: dimetil-szulfoxid

DOPC: dioleil-foszfátidil-kolin

DOPE: dioleil-foszfátidil-etanolamin

ESI: elektron spray ionizáció

ESR: elektron-spin rezonancia

FRET: fluoreszcencia energia transzfer

HSP: heat shock protein

IMes: bisz-(1,3-(2,4,6-trimetil-fenil)imidazol-2-ilidén)

MALDI: mátrix segített lézer deszorpció és ionizáció

MGDG: monogalaktozil-diacil-glicerol

NHC-karbén: N-heterociklusos karbén

Pd(QS)₂: palládium(II)-alizarinvörös

PC: foszfátidil-kolin

PCy₃: triciklohexil-foszfín

PE: foszfátidil-etanolamin

PG: foszfátidil-glicerol

PPh₃: trifenil-foszfín

PTA: 1,3,5-triaza-7-foszfadamantán

ROMP: gyűrű felnyílásos metatézises polimerizáció

SL: szulfolipid

TOF: (Turnover Frequency):óránkénti katalitikus ciklusszám (átalakult szubsztátum)(katalizátor x idő)⁻¹, mol/mol h

TOF-MS: (Time of Flight) repülési idő detektorral felszerelt tömegspektrométer

***m*TPPDS:** fenil-bisz(3-szulfófenil)-foszfín

***m*TPPMS:** difenil-(3-szulfófenil)-foszfín

***p*TPPMS:** difenil-(4-szulfófenil)-foszfín

***m*TPPTS:** trisz(3-szulfófenil)-foszfín

18:0: 18 szénatomos telített zsírsav

18:1(2)(3): 18 szénatomos, egy (két) (három) telítetlen kötést tartalmazó zsírsav

16:0-18:1 lipid: olyan lipid, mely egy 16:0 és egy 18:1 zsírsavrészt tartalmaz

C₁₀H₁₄: *p*-cimol

[RuCl₂L(C₁₀H₁₄)] $\Rightarrow$ **L:** 1-butil-3-metil-imidazol-2-ilidén

1. Bevezetés

Az élő sejteket határoló biológiai membránok számos egyéb alkotórész mellett két fő komponensből, lipidekből és fehérjékből épülnek fel. A membránok elsődleges szerepe a sejt mechanikai védelme, környezetétől történő elszigetelése. A sejtmembránokkal szembeni egyik legfontosabb követelmény, hogy a rajtuk keresztül végbemenő anyag- és energiatranszport teljesen zavartalan legyen, hiszen csak így valósulhat meg a sejt akadály nélküli anyagcsereje, illetve más sejtekkel történő együttműködése. E tekintetben a membránok nagy jelentőséggel bíró fizikai állapotjelzője a fluiditás. A fluiditás befolyásolásában kitüntetett szerepe van a membrán felépítésében részt vevő telített illetve telítetlen lipidek arányának. Általában igaz, hogy minél több telített zsírsavrészt tartalmaz egy biomembrán, annál „keményebb”, ridegebb, annál kevésbé átjárható.

A membránok sajátságai, ezáltal az egész sejt működése tehát megváltoztatható a telített és telítetlen zsírsavarány módosításával, vagyis a membránbeli lipidek telítetlen szén-szén kötéseinek katalitikus hidrogénezésével. Az iparban használatos hidrogénezési körülmények (mint például a tercier-foszfin/kobalt rendszerekkel ($[\text{CoH}(\text{CO})_3(\text{Pbu}^n_3)]$, $[\text{CoH}(\text{CO})_3(\text{PPh}_3)]$) végrehajtott hidrogénezéshez szükséges 30 atm nyomás és 150-200°C hőmérséklet)¹ élő sejtek esetében természetesen nem alkalmazhatóak. Ennél sokkal enyhébb körülményeket kell teremteni.

A sejtek hidrogénezésekor az egyetlen szóba jöhető oldószer a víz, a legtöbb más oldószer ugyanis a sejt pusztulásához vezet. A biomembránok, illetőleg lipidkeverékek valódi vizes oldatai nem állíthatók elő. Vízben történő diszpergálással úgynevezett liposzómák nyerhetők, melyek – az adott lipid molekula szerkezetétől függően – különböző szerkezetű micellákat, vagy vezikulákat tartalmaznak.² A lipid-hidrogénező katalizátorokkal szemben támasztott alapkövetelmény a vízoldékonyságon kívül, hogy sem önmaguk, sem pedig a reakció során keletkező termékek ne legyenek mérgezőek a sejt számára. A hidrogénezésnek enyhe körülmények (max 37°C, 1-10 bar H_2 nyomás) között kell végbemennie, melyeket a sejtek még károsodás nélkül képesek elviselni. Fontos továbbá, hogy a katalizátor szelektíven működjön, vagyis csak a zsírsavrészek $\text{C}=\text{C}$ kötéseit redukálja, a $\text{C}=\text{O}$ és egyéb telítetlen csoportok hidrogénezésében viszont inaktív legyen.

Munkám során a már ismert palládium(II)-alizarinvörös ($\text{Pd}(\text{QS})_2$), illetve az általam előállított ruténium(II)-N-heterociklusos karbén komplexek hidrogénező aktivitását vizsgáltam részletesen.

2. Irodalmi előzmények

2.1. A biológiai membránok szerkezete, felépítése

2.1.1. Membránalkotó lipidek

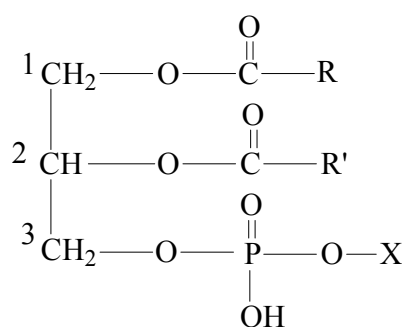
A lipidek családjába olyan vegyületek tartoznak, melyek kizárólag apoláros zsíroldószerekben (pl. kloroform, benzol, szén-tetraklorid) oldódnak. Megkülönböztetünk elszappanosítható és nem elszappanosítható lipideket. Az előbbiek lúgos főzés hatására komponensekre (általában zsírsavakra, glicerinre, alkoholokra) hidrolizálnak, míg az utóbbiak (pl. terpének, szteroidok) változatlanok maradnak.

A membránt felépítő lipideket több nagy csoportba sorolják. Munkám szempontjából a két legfontosabb család a foszfolipidek és a glikolipidek osztálya volt, de említést érdemelnek a szfingolipidek is, melyek jelentős szerepet játszanak a membrán inhomogenitásáért felelős lipid „raftok” (lásd 2.1.3. pont) kialakításában.³

2.1.1.a. Foszfolipidek

A foszfolipidek általános szerkezete (2.1.1.a. ábra) glicerín molekulából kiindulva származtatható oly módon, hogy a glicerín 1-es és 2-es szénatomján lévő OH-csoportot egy-egy nagy szénatomszámú, telített vagy telítetlen zsírsav (RCOO és R'COO), a harmadik OH-csoportot pedig egy foszforsav észteresíti. A foszforsavrész egyik szabad hidroxil-csoportjához további csoportok kapcsolódhatnak. Ezek minősége szerint több fontos foszfolipidet különböztetünk meg, melyek nagy mennyiségben fordulnak elő az élő szervezetek sejtmembránjaiban.

2.1.1.a. ábra A foszfolipidek általános szerkezete



$\text{X} = \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{NH}_2 \quad \rightarrow \quad \text{foszfatidil-etanolamin (PE)}$

$X = \text{CH}_2\text{--CH}_2\text{--N}^+(\text{Me})_3 \rightarrow$ foszfatidil-kolin (PC)

$X = \text{CH}_2\text{--CH(OH)--CH}_2\text{--OH} \rightarrow$ foszfatidil-glicerol (PG)

A foszfatidil-etanolamin ill. foszfatidil-kolin főleg növényi és állati membránokban található meg, míg a foszfatidil-glicerol a baktériumok fontos membránalkotója.

Az észterező zsírsavak tekintetében is viszonylag nagy változatosság tapasztalható. A legfontosabbak a következők:

$R, R' = (\text{CH}_2)_7\text{--CH=CH--}(\text{CH}_2)_5\text{--CH}_3 \rightarrow$ palmitoleil (16:1)

$R, R' = (\text{CH}_2)_7\text{--CH=CH--}(\text{CH}_2)_7\text{--CH}_3 \rightarrow$ oleil (18:1)

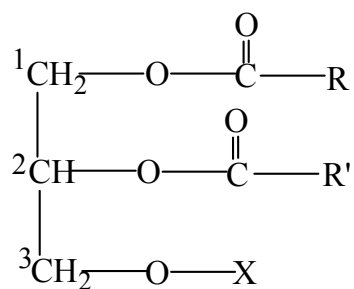
$R, R' = (\text{CH}_2)_7\text{--CH=CH--CH}_2\text{--CH=CH--}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3 \rightarrow$ linoleil (18:2)

$R, R' = (\text{CH}_2)_7\text{CH=CHCH}_2\text{CH=CHCH}_2\text{CH=CHCH}_2\text{CH}_3 \rightarrow$ linolenil(18:3)

A zsírsavakban található kettős kötéseknek nagy szerepe van a zsírsavlánc, így a lipid molekula térszerkezetének a kialakításában. A telített láncok egyenesek, míg a telítetlen lipidek apoláros láncokban törések figyelhetők meg a C=C kötések jelenléte miatt. A telített lipidek kisebb térigénye szorosabb illeszkedést biztosít a membránban, mely jelentős hatással van a sejt bizonyos tulajdonságaira (lásd 2.2. pont).

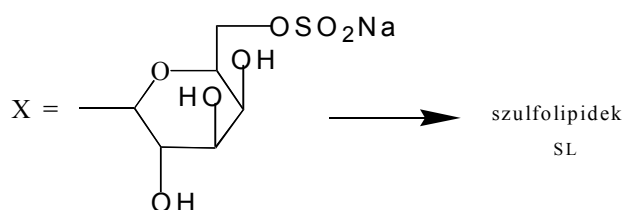
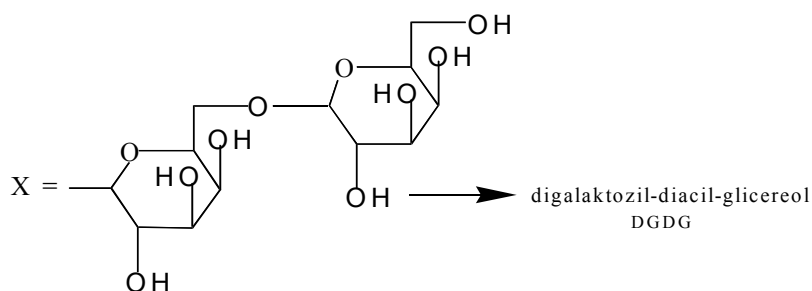
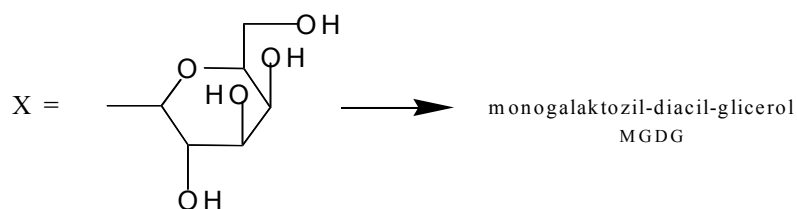
2.1.1.b. Glikolipidek

A glikolipidek szerkezete szintén glicerinnél származtatható (2.1.1.b. ábra), de esetükben a poláris molekularészlet valamilyen szénhidrát, foszforsavrést nem tartalmaznak. A glikolipidek legfontosabb képviselői a monogalaktozil-diacil-glicerol (MGDG), a digalaktozil-diacil-glicerol (DGDG), illetve a szulfolipidek (SL).



2.1.1.b. **ábra** A glikolipidek általános szerkezete

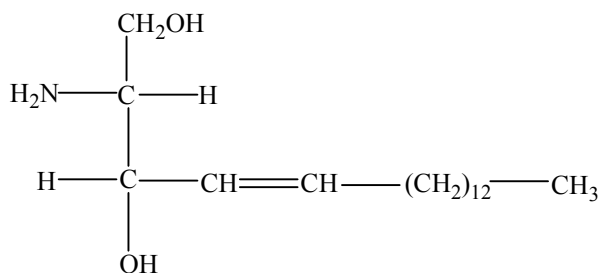
Az R és R' zsírsav-csoportok az imént látottakhoz hasonlóan tetszőlegesen kombinálódhatnak.



2.1.1.c. *Szfingolipidek*

A sejtmembránok tanulmányozása során elért legújabb kutatási eredmények kapcsán feltétlenül meg kell említeni a szfingolipidek osztályát. A szfingolipidek, amellet hogy nagy mennyiségben megtalálhatók az agyban és az idegsejtekben⁴, fontos alkotóelemei a lipid-fehérje, valamint a lipid-lipid kölcsönhatások eredményeként képződő lipid „raftoknak” (2.1.3. pont).

A szfingolipidek közös molekularészlete a szfingozin (2.1.1.c. ábra). A szfingozin N-acilezett származékai közül a legfontosabbak a szfingomielin, a ceramid, a cerebrozidok, illetve a glikoszfingolipidek.



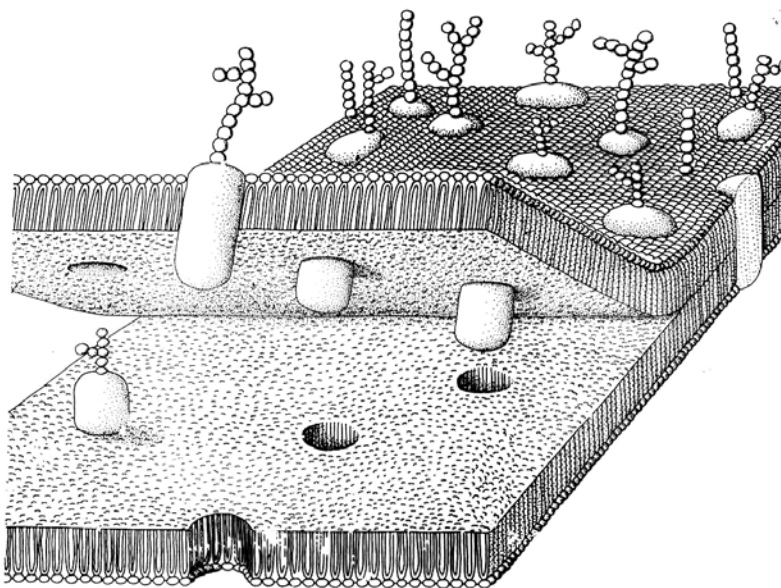
2.1.1.c. ábra A szfingolipidek közös molekularészlete: a szfingozin

Az említett lipid típusok közös sajátossága az amfipatikus szerkezet, ami azt jelenti, hogy a molekulák egy kis méretű poláros „fejrészt”, valamint egy hosszú apoláros „farokrészt” tartalmaznak. Ez elengedhetetlenül fontos a micellaképzési, így a membránképzési hajlam szempontjából is.

2.1.2. A Singer-Nicolson féle folyadék-mozaik modell

A biológiai membránok szerkezetét leíró elméletek közül hosszú ideig (kb. 30 évig) a Singer-Nicolson féle folyadék-mozaik modell⁵ volt a legelterjedtebb. Eszerint a membránt egy amfipatikus szerkezetű lipid molekulákból álló kettősréteg alkotja, melyben a lipid molekulák apoláros részeikkel egymás felé tekintenek, míg poláros csoportjaik a sejt belső, illetve külső tere felé irányulnak (2.1.2. ábra). A lipid kettősrétegbe kisebb-nagyobb mértékben fehérjéreszek mélyednek bele. Ezek közül egyesek teljesen átérlik a memb

ránt, kapcsolatot teremtve az intra- és extracelluláris tér között (pl: citokróm oxidáz, ATP-áz). Ezeket integráns fehérjéknek nevezzük, melyek nem távolíthatók el a kettősrétegből a membránszerkezet megbomlása nélkül. A perifériás fehérjék elvétele azonban, melyek csak részben mélyednek bele a külső vagy belső lipidrétegbe, általában nem okoz drámai változást.⁴



2.1.2. ábra A biológiai membránok kettősréteg szerkezete

A modell szerint mind a lipidek, mind pedig a fehérjék szabadon mozoghatnak, „úszhatnak” a membránban. Liposzómákon végzett ESR-vizsgálatokkal bebizonyították, hogy a lipidmolekulák saját rétegükön belül meglehetősen gyorsan változtatják a helyzetüket, diffúziós állandójuk mintegy 10^{-14} - 10^{-18} m^2s^{-1} .⁶ Ezzel ellentétben az egyik rétegből a másikba történő átjutás jóval ritkábban következik be. A fehérje komponensek szintén képesek lassú, oldalirányú helyváltoztató mozgásra. A sejtmembránt tehát végső soron a fehérjerészek két dimenziós orientáltságú oldatának tekinthetjük a viszkózus lipid kettősrétegben.^{7,8}

A Singer-Nicolson modell hiányossága, hogy homogénnek tekinti az egyes lipidfélések membránbeli eloszlását. A membrán alkotórészeinek eloszlása azonban közel sem egyenletes, kisebb nagyobb inhomogenitások mindenhol megfigyelhetők. A membránban elhelyezkedő egyedi lipidek hidrogénezéssel, illetve egyéb módosításokkal szembeni reaktivitása pedig függ az adott lipid molekula környezetétől.

2.1.3. A dinamikusan struktúrált mozaik modell – a lipid „raft”-elmélet

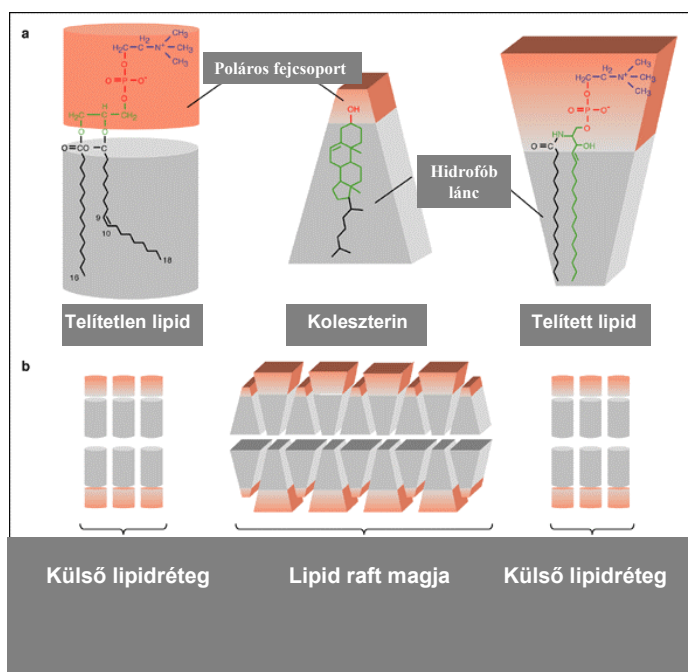
A műszeres technikák fejlődésével az utóbbi időben lehetőség nyílt a membránok szerkezetének egészen apró részletekig történő felderítésére. A Singer-Nicolson modell megdőlni látszik, hiszen számos új eredmény nem egyeztethető össze az eredeti membránszerkezeti leírással. Számos esetben mutattak ki például hierarchikusan felépülő szupramolekuláris protein-

komplexekeket a sejtmembránban,^{9,10} illetőleg felfigyeltek azok gátolt diffúziójára^{11,12}. Ezeket a pontosan körülhatárolható membránbeli doméneket „raftoknak” nevezték el¹³.

FRET (Fluoreszcencia Rezonancia Energia Transzfer) mérésekkel például 1-10 nm-es molekula-asszociátumokat detektáltak, míg elektron mikroszkópia, illetve pásztázó térérő mikroszkópia kombinált alkalmazásával magasabb szintű receptor-szerveződéseket is kimutattak limfocita sejtek vizsgálata során.¹⁴ ImmunoGold jelölés segítségével egyes receptorok esetében akár 400-800 nm-es nagyságú klasztereket is sikerült azonosítani.¹⁵

A raftok szerkezetének tüzetesebb tanulmányozása fényt derített arra, hogy a membránbeli fehérjemolekulák bizonyos lipidmolekulákat gyűjtenek maguk köré kisebb-nagyobb méretű klasztereket képezve. A raftok a lipid kettősréteg exoplazmikus részében főként koleszterint és szfingolipideket, endoplazmikus részében pedig koleszterint és telített foszfolipideket tartalmaznak.³ A raft „magját” egy fluidabb szerkezetű, telítetlen lipidekben gazdag „köpeny” veszi körül¹⁶, melyben nagy mennyiségben található meg foszfatidil-kolin, illetve foszfatidil-etanolamin molekulák.¹⁷ A raft lipidösszetételét azonban jelentős mértékben befolyásolja a raftot alkotó fehérjék minősége, hiszen ezen klaszterek fő összetartó ereje a protein-lipid kölcsönhatás. Egy fehérje akkor létesít könnyebben kapcsolatot egy adott lipidféleséggel, ha bizonyos szintű hasonlóságok fedezhetők fel a molekulák térszerkezetében. A térszerkezetet lipid molekulák esetében a zsírsavláncban található kettős kötések száma és helyzete szabja meg. Nem szabad elfeledkeznünk arról sem, hogy a lipid raftok kialakításában fontos szerepe van a koleszterinnek, mely a molekulák közé ékelődve hatással van a szerkezeten belüli összetartó erőkre (2.1.3. ábra.). A koleszterin fontos szerepet játszik a raftok méretének és tagoltságának kialakításában is.¹⁸

A sejtmembránok szerkezete pillanatról pillanatra változik. A stabilis domének élettartama mindössze néhányszor tíz másodpercben mérhető¹²; a lipid raftok folyamatosan átrendeződnek és változtatják helyüket, melynek során újabb, eltérő méretű aggregátumok jönnek létre. Mindezek együttesen teszik lehetővé, hogy a lipid raftok fontos szerepet töltsenek be a jelátviteli folyamatokban.



2.1.3. ábra A lipid raftok felépítésének sematikus rajza

(forrás: Expert Reviews in Molecular Medicine, 2002, Cambridge University Press)

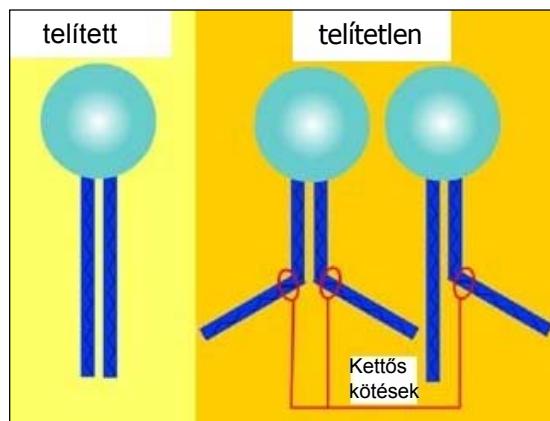
A membránban lipid raftok kialakulásával számoló új elméletet *dinamikusán strukturált mozaik modellnek*¹⁹ nevezték el, ahol a hangsúlyt a mozaik szerkezetre, nem pedig a membrán fluid, folyadék jellegére helyezik.

2.2. A membrán-hidrogénezés jelentősége, élettani hatásai

A membránbeli telített és telítetlen lipidek aránya hatással van a sejt bizonyos tulajdonságaira, működésére. Az egyik ilyen tulajdonság például a sejtek hőtűrő képessége. Sokáig rejtély volt a kutatók számára, hogy hogyan képesek érzékelni a sejtek a környezetükben bekövetkező hőmérsékletváltozást. Később kiderült, hogy léteznek ún. HSP (Heat Shock Protein) fehérjék, melyek szerepet játszanak a hőmérséklet-változásra adott sejtválasz realizálásában. A HSP fehérjék indukálásához szükséges szenzorok^{20,21} attól függően érzékelik a hőmérséklet-változást, hogy milyen mennyiségű telített lipidet tartalmaz a sejtmembrán. Az tehát, hogy a membránban elhelyezkedő szenzorok milyen hőmérsékleten „kapcsolnak be”, azaz hogy milyen hőmérsékleten indul meg a HSP proteinek képződése, jelentős mértékben függ a membrán fluiditásától, vagyis telítettségi fokától.

Minél több telített lipidet tartalmaz a sejtmembrán, annál „keményebb”, annál kevésbé fluid szerkezetű. Ellenben egy többségében telítetlen lipidekből álló membrán ugyanolyan hőmérsékleten sokkal folyékonyabb, lazább szerkezetű. A különbség oka a lipidek

zsírsavrészeiben található kettős kötések által előidézett térszerkezet-változásban keresendő (2.2. ábra).



2.2. ábra telített és telítetlen lipidek térszerkezete

Mint az a fenti ábrán megfigyelhető, a telített lipid molekulák zsírsavláncai egyenes lefutásúak, törést nem tartalmaznak. Ezzel ellentétben, ha a láncban kettős kötés található, mely általában cisz konformációjú, a szénlánc törést tartalmaz, ami a molekula jóval nagyobb térigényét eredményezi. A szerkezeteket szemügyre véve világosan adódik, hogy a telített lipidek szorosabb illeszkedést képesek megvalósítani a membránban, míg a telítetlen lipid molekulák távolabb helyezkednek el egymástól.

Az élő sejtek membránjainak lipidösszetétele megváltoztatható. Megfigyelték például, hogy a *Synechocystis PCC 6803* nevű cianobaktérium tilakoid membránja sokkal fluidabb, azaz több telítetlen lipidet tartalmaz abban az esetben, ha a sejteket alacsony hőmérsékleten (22°C) nevelik. A 36°C -on nevelt sejtek membránjában ugyanakkor a telített lipid komponensek dominálnak. A hősokk-vizsgálatok során kiderült, hogy a HSP fehérjék termelődését kiváltó membránbeli szenzorok aktiválódása a 22°C -on nevelt sejtek esetében alacsonyabb hőmérsékleti határértéknél ($38\text{--}40^{\circ}\text{C}$) következik be, mint a 36°C -on neveltek esetében (44°C).²² A fentiek alapján nem meglepő a cianobaktériumok hőmérséklet emeléshez, illetve csökkentéshez való alkalmazkodó képessége, mely a telített és telítetlen lipidek arányával, illetve a lipidek fehérjékhez viszonyított membránbeli mennyiségével hozható összefüggésbe.^{23,24}

A sejtek membránösszetétele, így a sejtek bizonyos sajátságai mesterségesen, katalitikus hidrogénezés útján is megváltoztathatók. Az *Anacystis nidulans* kékalga sejtek fokozatos hidrogénezésekor például az egyre nagyobb számú telített lipid komponens megjelenésével csökken a sejt fagyűrő képessége, vagyis a sejtpusztulás már magasabb hőmérsékleten bekövetkezik, mint a fluidabb membránszerkezettel rendelkező sejtek esetében.²⁵

A membránbeli lipidek hidrogénezése befolyással lehet a membránon keresztül végbemenő transzport folyamatokra is. A fent említettekből egyenesen következik, hogy a sok telített lipidet tartalmazó membrán merevebb, így a rajta keresztül megvalósuló anyag-transzport folyamatok gátoltak, a molekulák átjutása nehezebb.

A biológiai membránok hidrogénezése tehát számos élettani hatás változását vonhatja maga után. Talán ennek is köszönhető, hogy a kutatókat régóta foglalkoztatja a membránalkotó lipidek katalitikus hidrogénezésében aktív vízoldható katalizátorok előállítása.

2.3. Membrán-hidrogénező katalizátorok

Hosszú időn keresztül nem sikerült olyan katalizátort találni, mellyel vizes oldatban, enyhe körülmények között véghezvihető lenne a sejtmembránokat felépítő telítetlen lipidek hidrogénezése.

Az alábbiakban néhány katalizátor típus kerül feltüntetésre. Az egyes katalizátorok bemutatása nem szigorúan előállításuk időrendjében történik, hanem lipid hidrogénezésre való felhasználhatóságuk alapján, a legkevésbé alkalmasoktól haladva a legeredményesebben alkalmazhatókig.

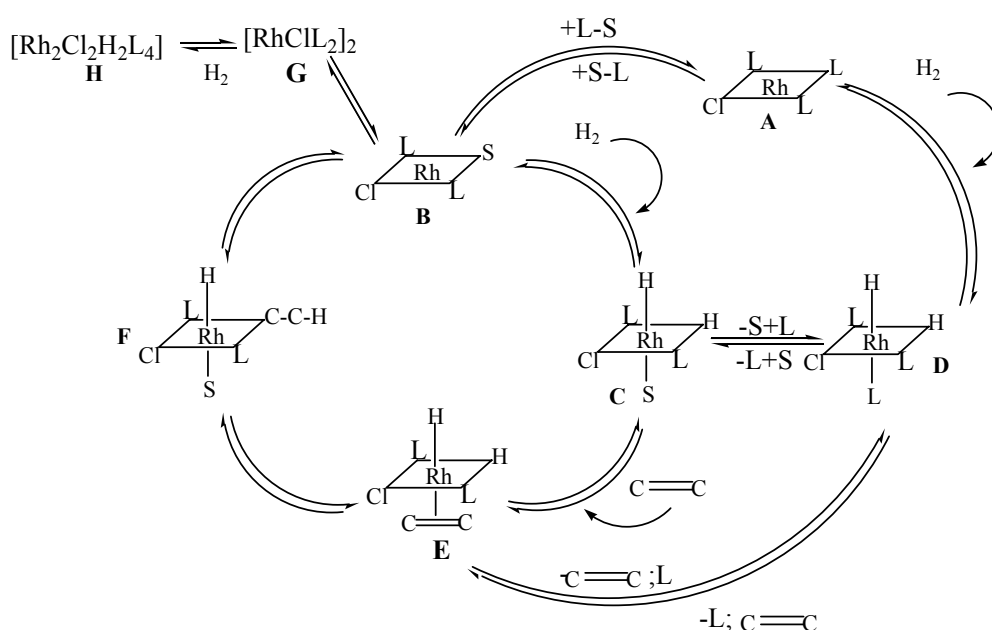
2.3.1. Adams-katalizátor

Chapman és Quinn nevéhez fűződnek azok a kísérletek^{26,27}, melyekben szójalecitinből izolált foszfatidil-kolint hidrogéniztek Adams-katalizátor (PtO_2) jelenlétében, tetrahidrofurán oldószerben. Azt tapasztalták, hogy a hidrogénizett elegyben jelentősen megnőtt a nagyobb telítettségi fokú (18:0, 18:1) zsírsavak aránya a kiindulási állapothoz képest. A reakciót vizes közegben lejátszatra azonban nem történt átalakulás.

2.3.3. Átmenetifém-foszfin komplexek

2.3.3.a. Vízben nem oldódó foszfin-komplexek

Számos katalitikus folyamat aktív katalizátorai az átmenetifémek foszfin ligandumokkal (PMe_3 , PEt_3 , $\text{P}(t\text{-Bu})_3$, PPh_3 , $\text{P}(p\text{-tolil})_3$, stb.) képzett komplexei. A foszfin ligandumok általában a foszfor atom nemkötő elektronpárján keresztül kapcsolódnak a központi fémionhoz, stabilizálva annak alacsony oxidációs állapotú formáit. Ezen komplexek legismertebb képviselője a Wilkinson-katalizátor ($[\text{RhCl}(\text{PPh}_3)_3]$), melynek előállítását és hidrogénező aktivitását 1965-ben közölték.²⁸ A telítetlen szén-szén kötések hidrogénezését leíró katalitikus ciklus vázlatát a 2.3.3.a. ábrán figyelhetők meg.



2.3.3.a. ábra Az $[\text{RhClL}_3]$ ($\text{L} = \text{PPh}_3$) komplex által katalizált alkén hidrogénezés katalitikus ciklusa

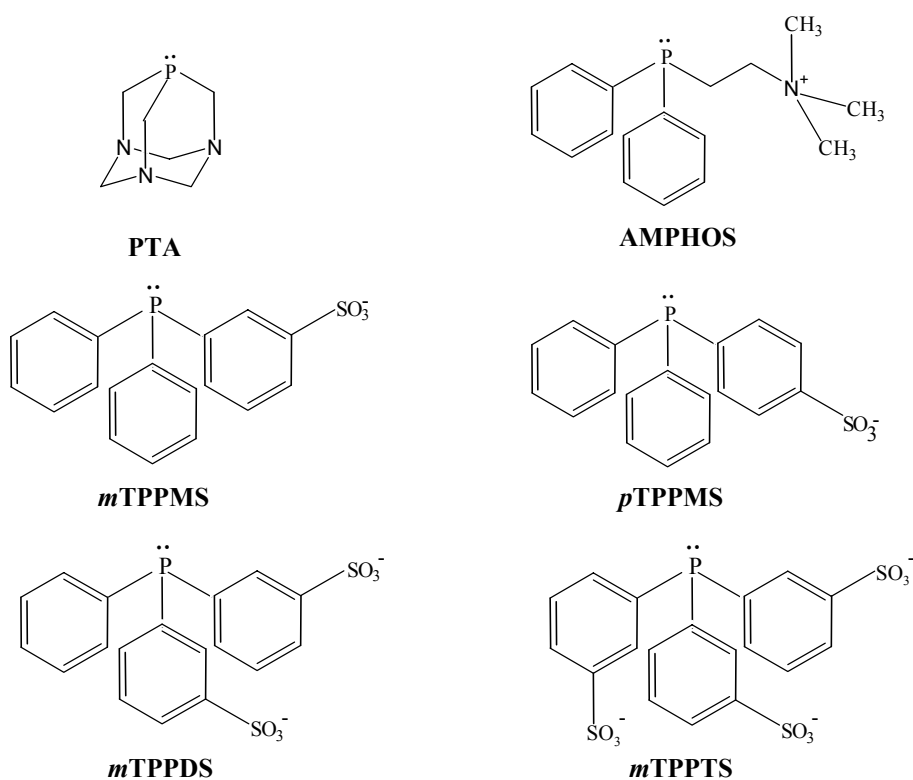
A belső kör a fő katalitikus ciklust szemlélteti, melyben a di-(tercier-foszfin)-ródiium(I) komplex (**B**) valamilyen klorid-hidas olefin tartalmú komplexből (pl. $[\text{RhCl}(\text{C}_2\text{H}_4)_2]_2$, vagy $[\text{RhCl}(\text{C}_8\text{H}_{14})_2]_2$) *in situ* keletkezik két ekvivalens mennyiségű terciér-foszfin hozzáadására. (Ezt a lépést az ábra nem tartalmazza, csupán a már kialakult **B** komplex látható) Közvetlenül $[\text{RhCl}(\text{PPh}_3)_3]$ (**A**) alkalmazása során a hidrogén aktiválása, illetőleg a szubsztrátum hidrogénezése nagy valószínűséggel a külső ciklusnak megfelelően következik be.

Biomembránok hidrogénezésére azonban ez a katalizátor sem alkalmas, mivel egyrészt rosszul oldódik vízben, másrészt nem távolítható el a szubsztrátumtól anélkül, hogy a membrán szerkezete megsérülne. Ugyanez mondható el a többi, vízben nem oldódó átmenetifém-foszfin komplexről is.

2.3.3.b. Vízoldható foszfin-komplexek

A legtöbb foszfin nem oldódik vízben. Ezeket legegyszerűbben valamilyen ionos, vagy erősen poláros csoport ($-\text{SO}_3^-$, $-\text{COO}^-$, $-\text{OH}$, $-\text{NH}_3^+$) beépítésével lehet vízben oldhatóvá tenni (2.3.3.b. ábra). Léteznek azonban olyan nitrogén tartalmú foszfinok is (pl: PTA, AMPHOS), melyek eleve vízoldhatóak, így a belőlük képzett komplexek is rendelkeznek ezzel a tulajdonsággal.

A 2.3.3.b. ábrán feltüntetett *m*TPPMS ligandummal képzett átmenetifém-komplexeiket elsőként Joó és Beck állította elő, illetve használta vizes közegű membrán-hidrogénezési reakciók



katalizálására.²⁹ A komplexekben központi fémionként ródiumot, ruténiumot és irídiumot, alkalmaztak. A kinetikai vizsgálatok arra világítottak rá, hogy az olyan Ru- és Rh- komplexek, melyekben a foszfin/fémion arány 2, sokkal aktívabbak azoknál, melyek három szulfonált foszfin-ligandumot tartalmaznak fémiononként.

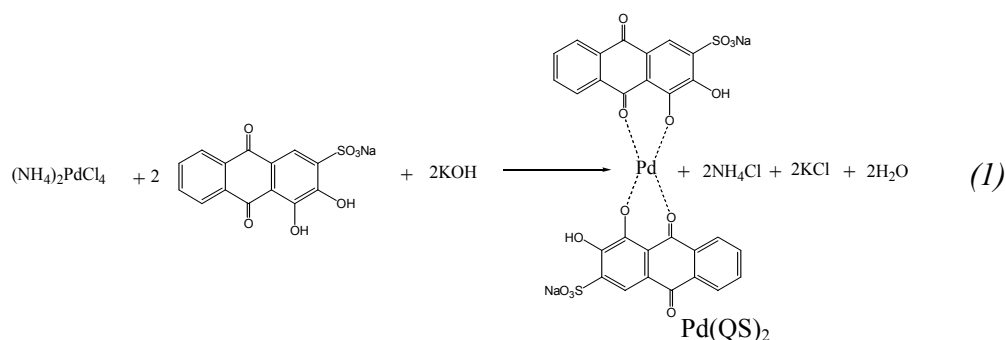
2.3.3.b. ábra Vízoldható foszfin-ligandumok

A szulfonált trifenil-foszfin ligandumokkal képzett átmenetifém-komplexeik legnagyobb problémája az oxigénre való fokozott érzékenység, mely jelentősen megnehezíti a velük való munkát.

2.3.4. Szulfonált alizarin komplexek

Az oxigén-érzékenység problémáját küszöbölte ki Bulatov, aki Pd, Pt és Ru különböző szulfonált alizarin-komplexeit állította elő.³⁰ Ezen vegyületek vízdoldhatóak, oxigénre kevésbé érzékenyek, és rendkívül stabilisak. A vegyületcsalád egyik legismertebb képviselője a palládium(II)-alizarinvörös (Pd(QS)₂) komplex, melyet mind a mai napig elterjedten alkalmaznak biomembránok és lipid-rendszerek hidrogénezésére. Munkám során Pd(QS)₂-vel katalizált lipid-hidrogénezési reakciók követésére dolgoztam ki megfelelő analitikai módszert, és hasonlítottam össze az egyedi lipidféleségek lipidkeverékekben mutatott reaktivitását (lásd *Eredmények és értékelésük*).

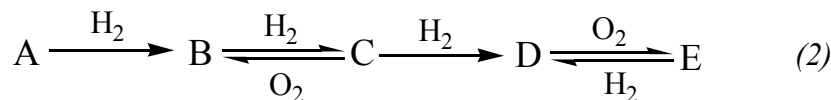
A Pd(QS)₂ előállítható (NH₄)₂PdCl₄ és alizarinvörös reakciójában KOH jelenlétében³⁰:



A Pd(QS)₂ minden tekintetben megfelel a membrán-hidrogénező katalizátorokkal szemben támasztott követelményeknek (vízdoldható, enyhe körülmények közt hidrogénez, a reakció után a szubsztrátumtól elválasztható). Ezen előnyök mellett megemlíthető a szelektivitás is. Szelektív membrán-lipid hidrogénezést sikerült ugyanis megvalósítani Pd(QS)₂ katalizátorral kloroplaszt szuszpenziók esetében.³¹ A termékek vizsgálata során bizonyossá vált, hogy a tilakoid membrán lipidjeinek C=C kötése jelentős mértékben hidrogéneződtek, míg az egyéb telítetlen komponensek gyakorlatilag változatlanok maradtak.

A Pd(QS)₂ szinte egyedüli hátrányaként a katalizátor előzetes aktiválásának szükségessége említhető. A kutatások fényt derítettek arra, hogy vizes oldatban, hidrogén atmoszféra jelenlétében, illetve távollétében a komplexnek öt különböző formája létezik (*A*, *B*, *C*, *D* és *E*), melyek oldataik színe, illetve UV-VIS spektrumaik alapján különböztethetők meg egymástól. Az öt forma szerkezete mind a mai napig ismeretlen, de bizonyított tény, hogy katalitikus aktivitással

csak a *B*, *C* és *D* forma rendelkezik. (A lipid hidrogénezési reakciók során a *B* forma vizes oldatát használtam.) A különböző szerkezetek egymásba alakíthatóságának lehetőségei a következők:³²



Az ESR-mérések alapján kiderült, hogy *C* és *E* szabad gyökök, míg *A*, *B* és *D* nem paramágnesesek.

A katalizátor aktiválása (lásd 4.3.2. fejezet) elkerülhetetlen, hiszen ha a szubsztrátumot csak egyszerűen a katalizátor *A* formájának oldatához adjuk, és így végezzük a hidrogénezéseket, reprodukálhatatlan eredményeket kapunk. Ennek feltehetőleg az az oka, hogy a reakcióelegy tökéletes oxigénmentesítése még ismételt evakuálási lépésekkel sem érhető el. A nyomokban bennmaradó oxigén így gyökfogó szerepet tölthet be a gyökös hidrogénezési mechanizmusban. Emiatt jelentős szubsztrátum hidrogéneződés nem történik, amíg O_2 van jelen a rendszerben. Ha viszont a *B* formát előzetesen kialakítjuk, nincs indukciós szakasz, a hidrogénezés azonnal elkezdődik.³²

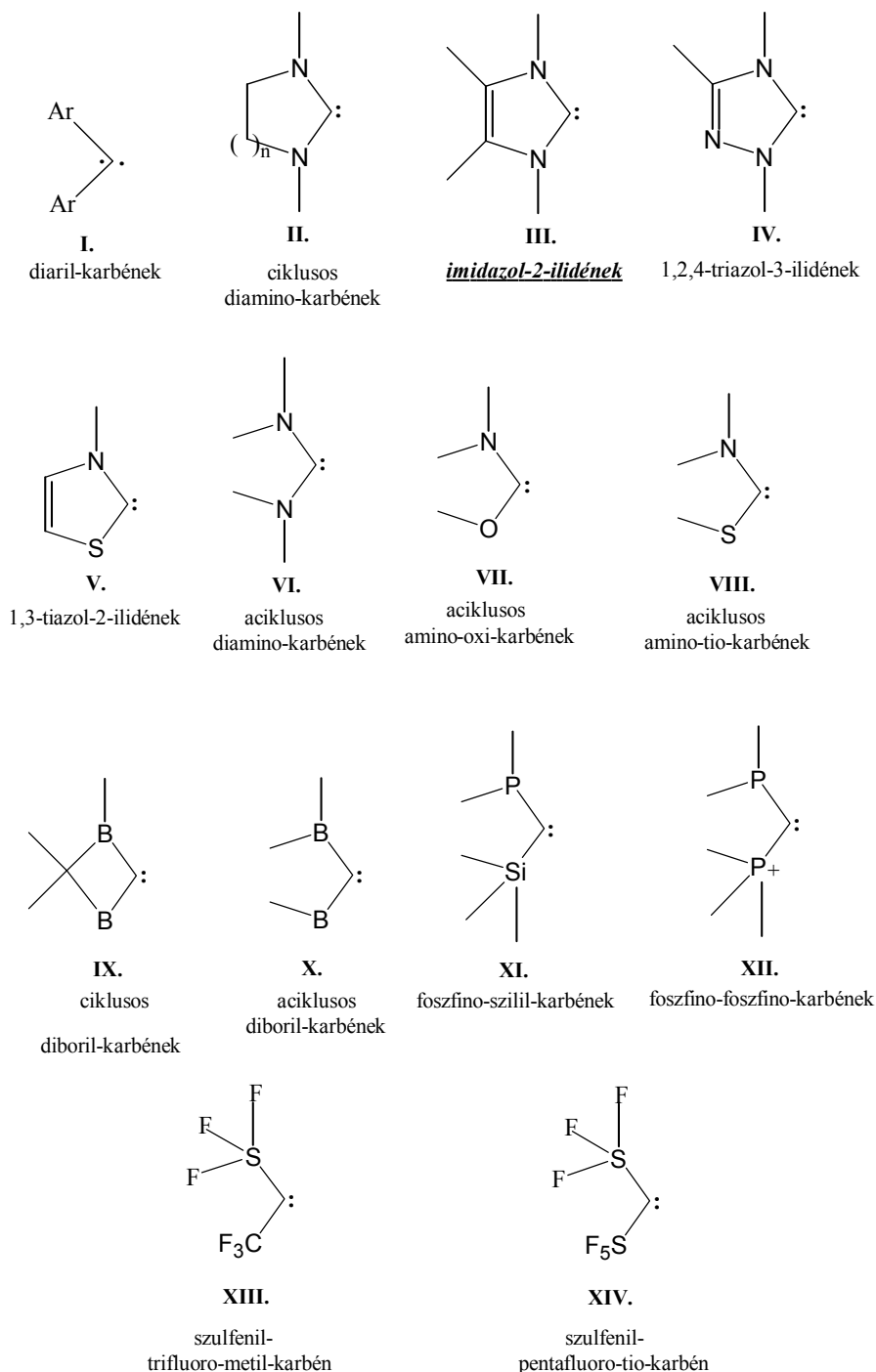
2.4. *N*-heterociklusos karbén-komplexek, mint potenciális membrán-hidrogénező katalizátorok

2.4.1. *A* karbének általános jellemzése

Karbéneknek nevezzük azokat a töltés nélküli szerves vegyületeket, melyekben olyan két vegyértékű szénatom található melynek vegyértékhéján mindössze hat elektron helyezkedik el. A karbén vegyületekben a karbén szénatom menti kötés lehet egyenes vagy hajlított, a hibridizáció mértékétől függően. Lineáris geometria esetén *sp* hibridizációjú szénatommal számolhatunk, ahol a nemkötő elektronok két nemkötő degenerált orbitálon (p_x és p_y) jelennek meg. A lineáris geometria csak különleges esetekben valósulhat meg, a legtöbb karbén vegyület hajlított szerkezetű. Ilyenkor a nemkötő pályák degeneráltsága megszűnik, a karbén szénatom sp^2 -típusú hibridizációt vesz fel úgy, hogy a p_y pálya gyakorlatilag változatlan marad, míg a p_x orbitál *s* sajátságokhoz jutva stabilizálódik.³³

A karbén vegyületek régóta ismertek, először Curtius³⁴ és Staudinger³⁵ munkáiban kerültek említésre. Az utóbbi körülbelül 50 évben a karbének mint egyes reakciók átmeneti termékei váltak ismertté. A karbén-kémia robbanásszerű fejlődése azonban csak akkor következett be, amikor sor került az első diaril-karbének³⁶, valamint a heteroatomot is tartalmazó

ún. szinglet karbénok előállítására.^{37,38} (A karbén vegyületek csoportosítása a 2.4.1. ábrán látható.) A karbén-kémia területe jelentősen kibővült, amikor felfedezték a karbénok nagyszerű komplexképző sajátosságait. Az első fém-karbén komplexek megjelenése egy új, sokszínű, modern kémia megszületését jelentette.



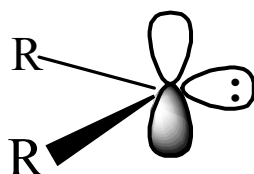
2.4.1..ábra Karbén vegyületek csoportosítása

2.4.2. Imidazol-2-ilidének (NHC-karbénok)

Az imidazol-2-ilidének a nitrogén heteroatomokat tartalmazó, ún. N-heterociklusos karbén (NHC-karbén) családjába tartoznak (lásd 2.4.1. ábra). A továbbiakban az egyszerűség kedvéért az „imidazol-2-ilidének” helyett az „NHC-karbén” elnevezést fogom használni.

Az utóbbi évtizedben, azt követően, hogy az első röntgen-szerkezet megszületett az első kristályos NHC-karbén vegyületről³⁹, jelentősen megnőtt a karbén ezen családjába tartozó újonnan előállított vegyületek száma. Az új komplexek széles körben alkalmazhatónak bizonyultak különféle kémiai folyamatok katalizálására.

Az NHC-karbén karbén szénatomjának elektronszerkezete az ún. *szinglet karbén modell* (1A_1) alapján értelmezhető, mely szerint a szén megközelítőleg sp^2 hibridizációs állapotú. Ilyen körülmények között a két szubsztituens, illetve a magányos elektronpár a három sp^2 hibrid orbitálon helyezkedik el, míg a szénatomon egy formálisan üres p pálya marad (2.4.2. ábra). A szénen található magányos elektronpár kémiaiailag hasonlóan viselkedik, mint a foszfinok esetén a foszfor nemkötő elektronpárja.



2.4.2. ábra A karbén szénatom elektronszerkezete NHC karbének esetében

A nemkötő elektronpár különböző fémionokhoz koordinálódhat, fém–NHC karbén komplexek képződését eredményezve. Az NHC-karbén magányos elektronpárja jóval bázisosabb, mint a foszfinok hasonló elektronjai. A formálisan üres p -orbitál gyenge π -akceptorként funkcionálhat, de irányultsága más, mint a P-X σ^* -pályáké a foszfinok esetében.⁴⁰ A fentiek együttesen teszik lehetővé, hogy az NHC-karbén-komplexekben egy rendkívül erős fém-szén kötés alakulhasson ki a komplexek kiemelkedő stabilitását eredményezve.

2.4.2.a. Vízoldható NHC-karbén komplexek

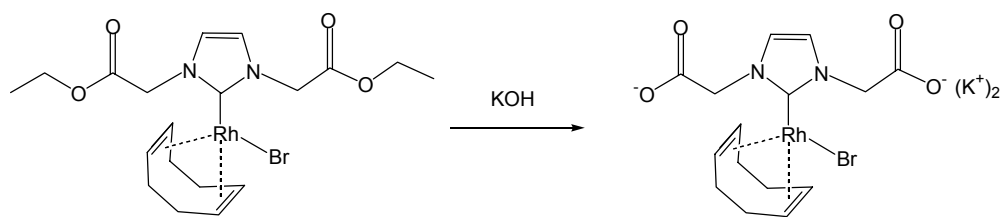
Az irodalomból csak kevés vízoldható N-heterociklusos karbén komplex ismert. Ezek nagy részét is *in situ* állították elő és használták fel különböző kémiai folyamatok katalizálására anélkül, hogy azonosították volna az oldatban kialakuló részecskék szerkezetét.

Herrmann és munkatársai ródium(I) és ródium(III) vegyületekből, valamint a megfelelő imidazólium sókból kiindulva *in situ* állították elő vizes közegben NHC-karbén komplexeket. A

kialakuló komplexek vizes oldatát közvetlenül olefinek hidroformilezési reakcióinak katalizálására használták fel. A komplexeket azonban szilárd formában nem izolálták, szerkezetüket nem derítették fel.⁴¹

Az NHC-karbén komplexek vízdoldhatósága elvileg kétféle módon valósulhat meg. Az egyik lehetőség, hogy a karbén poláros csoportot tartalmaz, vagy vízben való oldáskor fellépő hidrolízis révén alakul ki ilyen csoport (2.4.2.a.1. ábra). A másik lehetőség, hogy a karbén töltéssel rendelkező komplex részeként szerepel. Ez a töltött részecske kialakulhat semleges komplexből is, melyben a központi fémionhoz könnyen disszociáló negatív töltésű csoport koordinálódik (halogén), mely eltávozva a koordinációs szférából pozitív töltésű kationos komplexet hagy maga után. A nitrogéneken lévő szubsztituensek természetesen ilyen esetben sem lehetnek túl nagy méretűek.

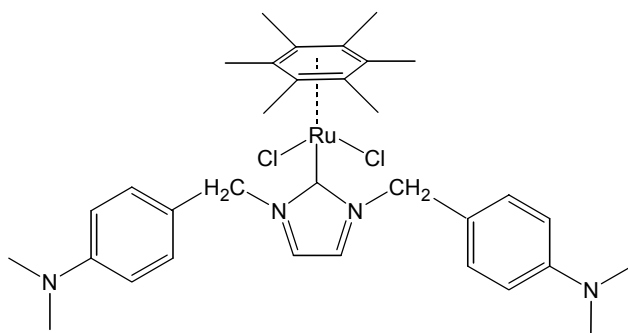
NHC-karbén komplex vízdoldhatóvá tételére látunk példát a 2.4.2.a.1. ábrán.⁴²



2.4.2.a.1. ábra Ródiium(I)-NHC karbén komplex vízdoldhatóvá tétele

Az ábrán feltüntetett KOH-os kezelés hatására hidrolízist követően bisz-kálium-acetát só alakul ki, mely sárga szilárd anyag formájában izolálható, és meglehetősen jól oldódik vízben.

A kis számú ismert vízdoldható NHC-karbén komplexek egyik képviselője a 2.4.2.a.2. ábrán feltüntetett, a 2,3-dimetil-furán előállításánál katalizátorként használt Ru(II)-NHC-karbén komplex.⁴³



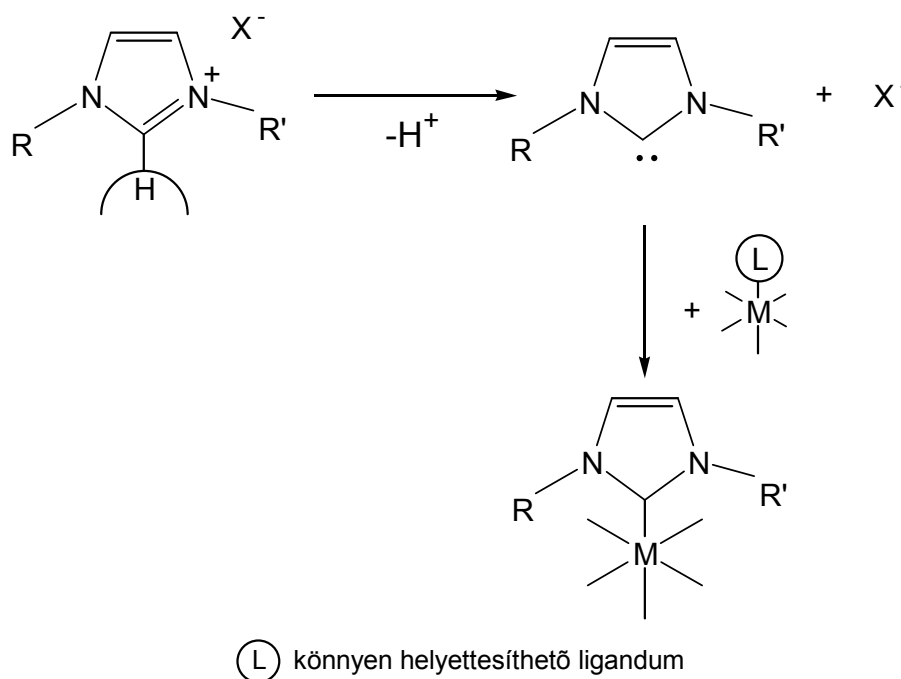
2.4.2.a.2. ábra Vízdoldható Ru(II)-NHC-karbén komplex

A vegyület barna színű szilárd anyagként preparálható, melynek karbén-szén jele a ^{13}C -NMR spektrumban CDCl_3 -as oldatban 205 ppm-nél jelentkezik.

Az irodalomból stabilis vízdoldható ezüst(I)-NHC-karbén komplex is ismert (a munkám során előállított ezüst(I)-karbén komplex rendkívül bomlékony – lásd kísérleti rész). Kétmagvú ezüst-komplexet úgy tettek stabilissá, hogy ligandumként makrociklusos NHC-karbén vegyületet alkalmaztak.⁴⁴

2.4.3. NHC-karbén komplexek előállítása

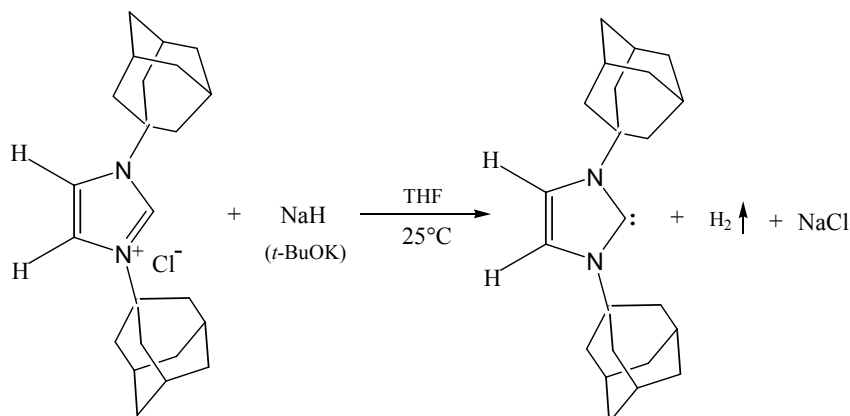
N-heterociklusos karbén komplexek legegyszerűbben imidazólium sókból kiindulva állíthatók elő (2.4.3.a. ábra).



2.4.3.a. ábra NHC karbének előállítása

A karbénképzés legfontosabb lépése az imidazólium só két nitrogénje között elhelyezkedő CH-csoport deprotonálása. A proton kilépésével semleges töltésű karbén részecske keletkezik az addig kvaterner nitrogént tartalmazó sóból. A szénatomon lévő nemkötő elektronpár ezután oldat fázisban könnyen koordinálódhat valamilyen fémionhoz. Karbén-komplexeket leggyakrabban úgy állítanak elő, hogy az *in situ* képzett karbén ligandumot olyan fémkompleksszel hozzák össze, mely könnyen helyettesíthető csoportot tartalmaz. Az egyes komplex-előállítási módszerek lényegében a deprotonálást végző bázis minőségében térnek el egymástól. Arduengo és

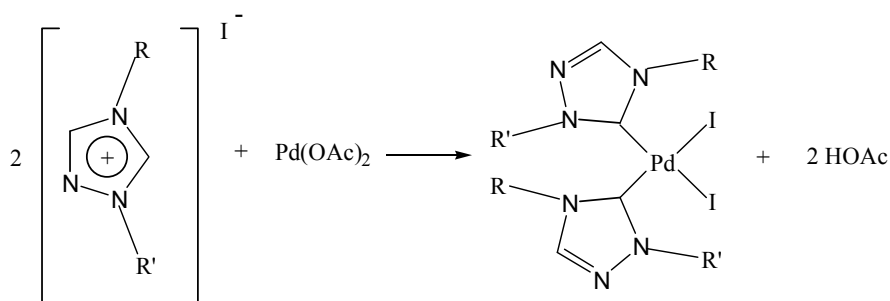
munkatársai klasszikusnak számító közleményében³⁹ az első kristályos karbén vegyület (1,3-di-1-adamantil-imidazol-2-ilidén) előállítása során a proton leválasztását nátrium-hidriddel, illetve *tert*-butoxi-káliummal (*t*-BuOK) oldották meg (2.4.3.b. ábra).



2.4.3.b. ábra Az első kristályos karbén vegyület előállítása

A keletkező vegyület azért preparálható kristályos formában, mert a nitrogéneken elhelyezkedő két nagy méretű szubsztituens megakadályozza a dimerképződés révén történő stabilizálódást. Általában igaz, hogy a nagyméretű szubsztituensek hozzájárulnak az NHC karbének stabilitásának növeléséhez, azonban komplexképzéskor, mint azt az elért eredményeimből is látni fogjuk, nem feltétlenül szükséges nagy térkitöltésű szubsztituenseket választani stabilis ruténium(II)-NHC karbén-komplexek előállításához. A Ru-C kötés ugyanis elegendően erős ahhoz, hogy biztosítsa a keletkező komplexek stabilitását.

Előfordulhat olyan eset is, amikor a deprotonáló ágens valamilyen fém-só. Erre példa a palládium-acetát, mellyel Herrmann és munkatársai állítottak elő palládium(II)-karbén komplexeket⁴⁵ tetrahidrofurán oldószerben.(2.4.3.c. ábra).

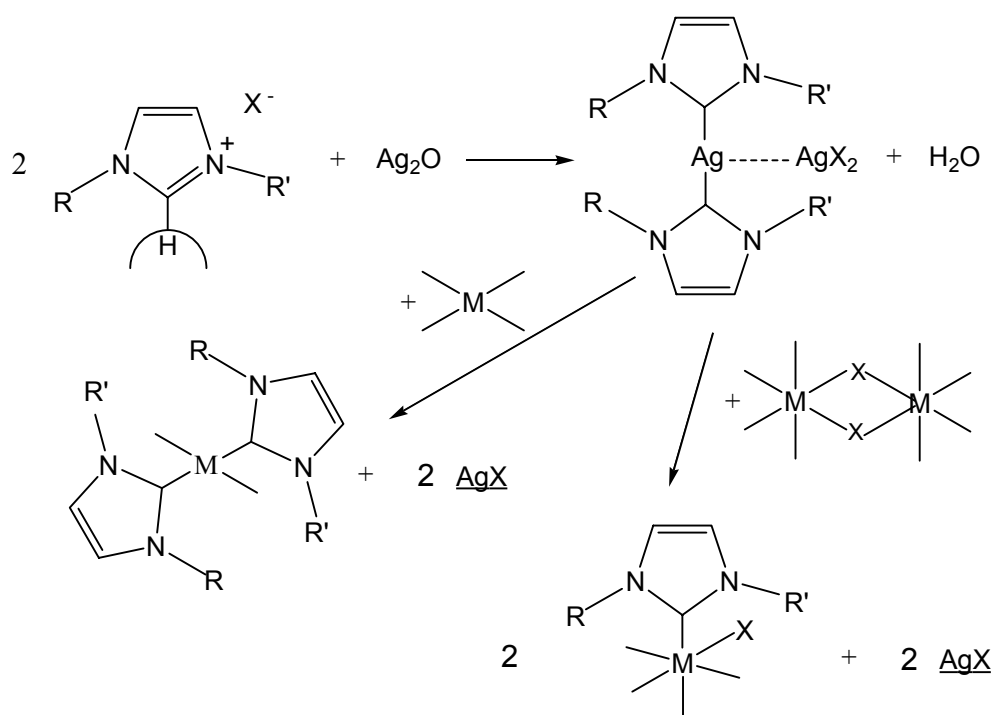


2.4.3.c. ábra Pd(II) karbén-komplexek előállítása Pd(OAc)₂ bázissal

A karbénképzés Cs₂CO₃ jelenlétében is kivitelezhető szerves oldószerekben. Dixneuf és munkatársai klórbenzolban *in situ* állítottak elő gyűrű felnyílásos polimerizációt elősegítő

katalizátort kétmagvú $[\text{RuCl}_2(\text{arén})]_2$ komplex és nagy térkitöltésű szubsztituenseket tartalmazó imidazólium sók reakciójában.⁴⁶ A keletkezett katalizátorok szerkezetét azonban nem azonosították, mindössze katalitikus aktivitásukat tanulmányozták.

Munkám szempontjából alapvető jelentőségű az ezüst metatézises karbén-komplex előállítás, melynek során a kívánt komplex preparálását egy ezüst(I)-oxiddal történő Ag-karbén képzés előzi meg (2.3.4.d. ábra). Az Ag-karbén komplexek fokozott reaktivitással rendelkeznek a C-Ag kötés kis stabilitása miatt. Ez teszi lehetővé, hogy különböző átmenetifém komplexekkel reagálva a megfelelő fém – karbén komplex már közönséges körülmények között kialakulhasson.



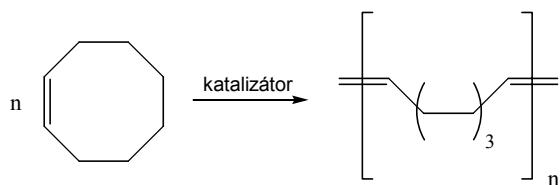
2.3.4.d. ábra Fém – karbén komplex előállítása ezüst metatézises módszerrel
(M: átmenetifém, X: halogén)

2.4.4. NHC karbének felhasználási lehetőségei katalitikus folyamatokban

Az N-heterociklusos karbén-komplexek rendkívül sokféle kémiai folyamat katalizálásában használhatók eredménnyel, lipidkeverékek hidrogénezésére azonban mindezidáig egyetlen képviselőjüket sem alkalmazták. A következőkben néhány reakciótípust sorolok fel a teljesség igénye nélkül.

2.4.4.a. Gyűrű felnyíló metatézises polimerizáció (ROMP)

Gyűrű felnyíló metatézises polimerizációról cikloalkének esetében beszélhetünk. A folyamat lényege, hogy n darab gyűrű felnyílásával egy n darab monomeregységet tartalmazó telítetlen polimerlánc alakul ki (2.4.4.a. ábra).

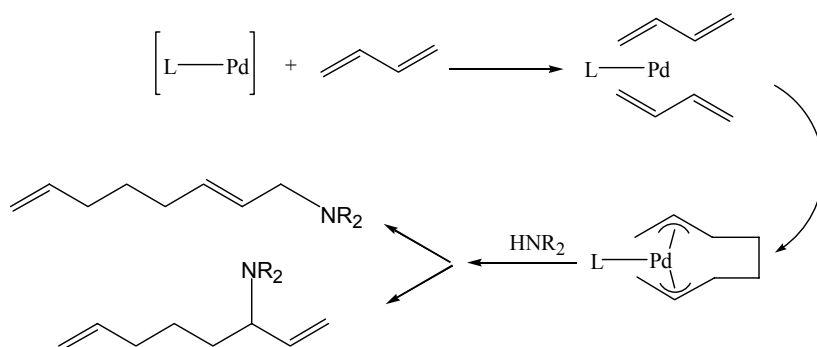


2.4.4.a. ábra Gyűrű felnyíló metatézises polimerizáció

A gyűrű felnyílás és az azt követő polimerizáció kiváló katalizátorai a ruténium(II)-karbén komplexek. $[RuCl_2(\text{arén})(\text{karbén})]$ vegyületekkel már szobahőmérsékleten sikerült megvalósítani a ciklooktén polimerizációját látható fényel történő besugárzás mellett.⁴⁷

2.4.4.b. Telomerizáció

A telomerizáció rövid láncú oligomerek diénekből történő képződését és nukleofilekkel ezt követő reakcióját jelenti. A folyamat – a gyűrű felnyíló polimerizációval együtt – a 100 %-os atom-hatékonyságú reakciótípusok közé sorolható, hiszen a kiindulási diének minden egyes atomja beépül a keletkező láncokba.



2.4.4.b. ábra A telomerizáció mechanizmusa

1,3-butadién és különböző aminok reakciójában létrejövő telomerek képződését érték el $[(\text{NHC})\text{Pd}(\text{allil})]\text{X}$ típusú kationos komplexek jelenlétében (X: BF_4 , PF_6) enyhe reakciókörülmények és kis katalizátor koncentrációk mellett (2.4.4.b. ábra).⁴⁸

2.4.4.c. Hidroformilezés

A hidroformilezés aldehidek előállítására szolgáló módszer; egy H- és egy CHO-csoport addícióját jelenti $\text{C}=\text{C}$ kettős kötésre:

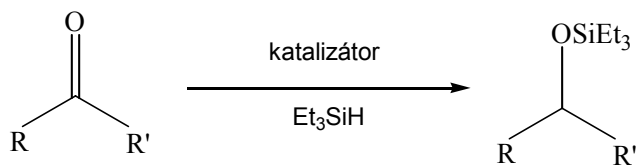


A hidroformilezés az egyik legjelentősebb ipari folyamat, melynek kivitelezésére leginkább Co, illetve Rh katalizátor rendszereket alkalmaznak. A legfontosabb katalizátorok a következők: $[\text{CoH}(\text{CO})_4]$, $[\text{CoH}(\text{CO}_2)\text{PBU}_3]$, $[\text{RhH}(\text{CO})_3]$.¹

Annak ellenére, hogy ipari méretekben még nem terjedtek el, egyre gyakrabban alkalmaznak *in situ* előállított átmenetifém (főleg ródium) – NHC-karbén komplexeket {pl.: 1-metil-3-(butil-4-szulfonát) imidazólium betain + ródium(III)-acetát, vagy 1-metil-3-(nátrium-etil-szulfonát) imidazólium-bromid + ródium(III)-acetát} hidroformilezési reakciók katalizálására⁴¹. Ezen komplexek jóval enyhébb reakciókörülmények (0,1-30 bar, 20-180°C) alkalmazását teszik lehetővé, mint az imént említett hagyományos katalizátorok (10-300 bar, 100-180°C).

2.4.4.d. Hidroszililezés

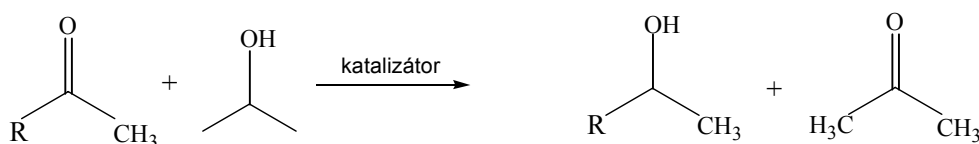
Sikerrel használtak $[(\text{NHC})\text{Cu}(\text{I})\text{Cl}]$ katalizátorokat különféle ketonok hidroszililezésére enyhe körülmények között toluolban⁴⁹. A hidroszililezés során a keton redukálódik, $\text{C}=\text{O}$ csoportjának π -kötése megszűnik, helyette egy erős oxigén-szilícium kötés alakul ki (2.4.4.d. ábra).



A hidroszililezés lényegében olyan keton-redukciós módszer, mely védőcsoporttal rendelkező alkoholok keletkezéséhez vezet.

2.4.4.e. Hidrogén transzfer reakciók

A hidrogén transzfer reakciók C=C és C=O kötést tartalmazó vegyületek redukálására alkalmasak. A reakciókhoz mindig szükség van egy olyan reakciópartnerre, mely a folyamatban oxidálódik (hidrogént veszít), míg a telítetlen vegyület redukálódik (felveszi a leadott hidrogént) (2.4.4.e. ábra).



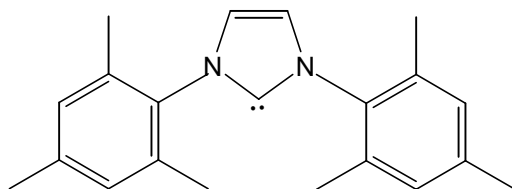
2.4.4.e. ábra Hidrogén transzfer reakció karbonil vegyületek esetében

Jelentős konverziókat értek el fenil-propionaldehid hidrogén transzfer reakcióiban 2-propanol oldószerben iridium-bisz-NHC karbén komplexekkel.⁵⁰

2.4.4.f. Hidrogénezés

Munkám szempontjából kiemelt jelentőséggel bír a telítetlen szén-szén kötések homogénkatalitikus hidrogénezése, hiszen a membránban fellelhető lipidek szénláncái is ilyen kötések tartalmaznak.

Nolan és munkatársai megfigyelték, hogy ha $[\text{HRu}(\text{CO})\text{Cl}(\text{PCy}_3)_3]$ (PCy_3 = triciklohexil-foszfín) komplexben a nagy térkitöltésű foszfín ligandumot IMes (bisz-(1,3-(2,4,6-trimetil-fenil)imidazol-2-ilidén)) (2.4.4.f. ábra) csoportra cserélik, nagyobb aktivitású katalizátorhoz jutnak hexén, allil-benzol és ciklooktén hidrogénezésekor.⁵¹



2.4.4.f. ábra Az IMes, egy tipikus karbén ligandum szerkezeti képlete

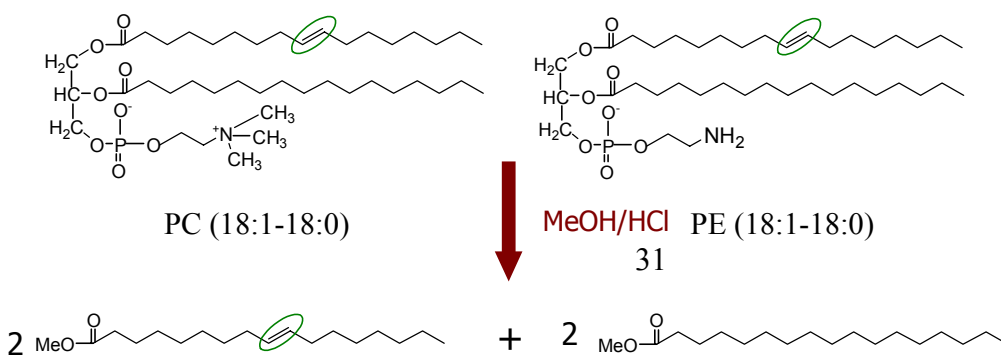
A tapasztalatok alapján általában igaz, hogy ha egy átmenetifém-komplex foszfin ligandumait karbén ligandumokra cseréljük, nagyobb katalitikus aktivitással rendelkező komplexhez jutunk.^{52,53}

Az iménti példák alapján jól látható, hogy az átmenetifém-NHC karbén komplexek enyhe körülmények között képesek katalitikus aktivitást kifejteni a legkülönbözőbb kémiai reakciókban.

3. Célkitűzések

Munkám során olyan vízzoldható hidrogénező katalizátorok előállítása volt a fő cél, melyek az élő sejtek számára is elviselhető körülmények között ($T < 37^\circ\text{C}$, $p = 1-10$ bar, $\text{pH} \sim 7$) képesek szelektíven hidrogénezní a membránbeli lipidek $\text{C}=\text{C}$ kettős kötéseit. Az irodalmi előzmények figyelembe vételével választásunk az N-heterociklusos karbén komplexekre esett, hiszen az előbb felsorolt előnyök mellett fontos volt számunkra a katalizátor továbbépíthetőségének lehetősége is. Az NHC karbének nitrogén atomjain található szubsztituensek megváltoztatásával vagy cseréjével ugyanis tetszőleges hosszúságú láncal/láncokkal rendelkező ligandumokhoz juthatunk. A raft-elmélet ismeretében így olyan hosszúláncú hidrogénező katalizátorok előállítására nyílhat lehetőség, melyek egyik végükön a raftok proteinjeihez történő kapcsolódásra alkalmas funkciós csoportot, másik végükön komplexképző ligandumot tartalmaznak. Ilyen katalizátorokkal – a membránbeli proteinekhez történő hozzákötődés után – megoldható lenne a raftokban felhalmozódó azonos típusú lipidfeleségek szelektív hidrogénezése a többi lipiddel szemben.

A sejtmembrán nem tekinthető ideális oldatnak, vagyis az egyedi lipidfeleségek hidrogénezéssel szembeni reaktivitása függ a lipid környezetétől, és az átlagos lipidösszetételtől



Másik fő célunk éppen ezért az volt, hogy megfelelő analitikai eljárást dolgozzunk ki egyedi lipidek lipidkeverékekben mutatott hidrogéneződésének nyomon követésére. Többkomponensű lipidkeverékek hidrogénezési konverzióit eddig ugyanis főként gázkromatográfiával határozták meg, melynek hátránya, hogy a lipidek csekély illékonyaságuk miatt nem mérhetők közvetlenül, ezért átészterezésre van szükség. Az átészterezés eredményeként viszont olyan zsírsav-észter keverékhez jutunk, melyből a teljes hidrogénezési konverziót ugyan megadhatjuk, de nem tudjuk, hogy melyik zsírsav-észter melyik típusú lipid molekulából származik (3. ábra). Az egyedi lipidfélések reaktivitására vonatkozó információ tehát nem szerezhető.

3. ábra Lipidek átészterezése gázkromatográfiás analízishez

Az egyedi lipidek keverékekben történő reaktivitás-meghatározására a tömegspektrometria (MALDI-TOF-MS) bizonyult a legalkalmasabb technikának. Az új karbén katalizátorok előállítására előtt terveink között szerepelt a lipid meghatározás pontos kidolgozása, melyhez a hidrogénezéseket a már jól bevált palládium(II)-alizarinvörös ($\text{Pd}(\text{QS})_2$) katalizátorral kívántuk elvégezni. Külön figyelmet fordítottunk annak a kérdésnek a megválaszolására, hogy létezik-e reaktivitásbeli különbség az egyes lipidek között közös liposzómákban való hidrogénezéskor. Ebből a szempontból többféle, különböző számú lipid komponenst tartalmazó természetes, és mesterséges eredetű keverék vizsgálatát tűztük ki célul. Végezetül terveink között szerepelt az új karbén komplexek szerkezetének meghatározása, a katalitikus aktivitások különböző kémiai folyamatokban történő vizsgálata, illetve a lipid hidrogénezési reakciókban való felhasználhatóság tanulmányozása.

4. Kísérleti anyagok és módszerek

4.1. Felhasznált anyagok, vegyszerek

A hidrogénezési kísérleteim során felhasznált lipideket több forrásból szereztük be. A liofilizált por alakban forgalmazott *diolail-foszfátidil-kolint* (DOPC), *diolail-foszfátidil-etanolamint* (DOPE), illetve *foszfátidil-glicerolt* (PG) a SIGMA-tól vásároltuk. A *Synechocystis PCC 6803* baktérium tilakoid membránjából nyerhető négykomponensű lipidelegyet, (*monogalaktozil-diacil-glicerol* (MGDG), *digalaktozil-diacil-glicerol* (DGDG), *foszfátidil-glicerol* (PG), *szulfolipid* (SL)) Szegeden, az MTA SZBK Biokémiai Intézetében izolálták, és 1 mg/ml koncentrációjú kloroformos oldat formájában bocsátották rendelkezésemre. A többkomponensű *sojalecitin* lipidkeveréket gyógyszertárban vásároltuk.

A hidrogénezési kísérleteknél alkalmazott hidrogén gáz (99,5%), valamint az inert gázok (argon, nitrogén) (99,99%) a Linde cég termékei voltak, felhasználásuk közvetlenül a palackból történt.

A hidrogénezési reakciók egy részénél a katalizátor szerepét betöltő palládium(II)-alizarinvörös ($\text{Pd}(\text{QS})_2$) komplexet az irodalomból ismert módon állítottam elő.³⁰ Az anyag összetételét és tisztaságát NMR és MS technikákkal ellenőriztem.

A Ru(II)-karbén komplexek preparálásához szükséges *1-butil-3-metil-imidazólium-kloridot* (*BMIMCl*) szintén ismert recept alapján preparáltam.⁵⁴ A legtöbb esetben felhasználás előtt szükség volt a *BMIMCl* vákuumban történő szárítására, ugyanis az anyag hamar elfolyósodhat a levegő nedvességtartalmának megkötése miatt.

Kísérleteim során az irodalomból még nem ismert módon állítottam elő 1-(nátrium-etil-2-szulfonát)-3-(etil-2-szulfonát) imidazólium betaint. A reakcióhoz felhasznált *paraformaldehid*, *taurin* (2-amino-etán-szulfonsav), illetve 40 %-os *glioxál* oldat az ALDRICH termékei voltak.

A Ru(II)-karbén komplexeket az irodalomból ismeretes ezüst-metatézises módszerrel állítottam elő (lásd később), melyhez az ezüst(I)-oxidot egyszerűen 0,1 M-os AgNO_3 és NaOH oldatok azonos térfogatainak összeöntésével, és a keletkező csapadék szűrésével nyertem.

A Ru(II)-karbén komplexek szintézise során a ruténium forrás a kétmagvú $[\text{RuCl}_2(p\text{-cimol})]_2$ komplex volt (*p-cimol* = 4-izopropil toluol). Előállításához⁵⁵ a $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ -t a Johnson-Matthey bocsátotta rendelkezésünkre, a 85 %-os terpinent az ALDRICH-től szereztük be, míg a egyes karbén/foszfin komplex előállításához szükséges 1,3,5-triaza-7-foszfadamantánt (PTA) irodalmi recept alapján szintetizáltam.⁵⁶

A hidrogénezendő oldatok pH-ját 0,1 M-os $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ foszfát pufferrel állítottam be A reagensek analitikai tisztaságúak voltak.

A felhasznált oldószerek szintén analitikai tisztaságúak voltak, kivéve a MALDI- és ESI-TOF-MS méréseknél alkalmazott HPLC tisztaságú vizet, metanolt, etanolt, tetrahidrofuránt és kloroformot.

A MALDI mérések során *2,5-dihidroxi-benzoésav* (*DHB*) mátrixszal dolgoztam (ALDRICH), az NMR mérésekhez 99,9 %-os D_2O -t, CDCl_3 -t, CD_2Cl_2 -t és *DMSO*-t (Cambridge Isotope Laboratories Inc.) használtam.

4.2. Előállított vegyületek

4.2.1. $[RuCl_2(p\text{-cimol})]_2$ előállítása

0,885 g (3,38 mmol) $RuCl_3 \cdot 3H_2O$ -t Ar alatt feloldottam 50 ml absz. etanolban. Az így kapott barna színű oldathoz egy adagban 7,5 ml ($\rho = 0,837$ g/ml) 85 %-os α -terpinent mértem (41,04 mmol), majd keverés közben 4 órán keresztül reflux hőmérsékleten tartottam a reakcióelegyet. A reakció végeztével hűlni hagytam az oldatot, melyből sötét vörös, csillogó kristályok váltak ki. A szilárd anyagot szűrtem, dietil-éterrel mostam, majd szárítottam. A szűrletet felfogtam, az oldószer kb. felét elpároltam, majd a betöményített oldatot éjszakára hűtőszekrénybe tettem. Másnapra ebben is kristályos anyag jelent meg, melyet az előbbiekhöz hasonlóan szűrtem, mostam és szárítottam. Kitermelés: 0,72 g (1,18 mmol) (35%). A termék tisztaságát 1H - és ^{13}C -NMR technikával ellenőriztem.

4.2.2. 1-(nátrium-etil-2-szulfonát)-3-(etil-2-szulfonát) imidazólium betain előállítása

Az 1-(nátrium-etil-2-szulfonát)-3-(etil-2-szulfonát) imidazólium betain az irodalomból már ismert vegyület, melynek preparálási lépéseit Herrmann és munkatársai írták le imidazol és 2-bróm-etán-szulfonsav reakciójában.⁴¹ A vegyületet azonban más kiindulási anyagokból, más körülmények között is sikerült előállítanom. A szintézis megvalósításának ötletét az Arduengo által 1,3-diszubsztituált imidazólium sók előállítására szabadalmaztatott leírás adta.⁵⁷

Háromnyakú lombikba 0,9 g (0,03 mol) paraformaldehidet mértem, melyhez 5 ml vizet adtam. Mivel a paraformaldehid nem oldódott vízben, 4 ml toluol segítségével szuszpenziót készítettem, és melegítés közben oldottam fel az anyagot. 3,75 g (0,03 mol) taurint melegítés közben 5 ml vízben oldottam, majd a tiszta oldatot egyszerre adtam a paraformaldehid oldatához. 15 perc kevertetést követően újabb 3,75 g taurin/5 ml víz oldatot juttattam a reakcióelegybe. Újabb 15 perc kevertetés után az oldatot hűlni hagytam, majd lassú ütemben 5 ml 6 M-os HCl oldatot (0,03 mol) csepegtettem a rendszerbe kb 20 perc alatt. A HCl hozzáadását követő 5 perc múlva 3,44 ml 40 %-os (0,015 mol) glioxál oldatot csepegtettem a lombikba. Ezután újra felmelegítettem az oldatot, és 2 óráig refluxáltattam. A reakció végeztével az oldószert vákuumban elpároltam, mire fehér zsírszerű anyagot kaptam, melyet 20-20 ml etanollal majd éterrel mostam. Kitermelés: 7,16 g (25,21 mmol) (84%). A terméket ESI-TOF-MS technikával azonosítottam, tisztaságát 1H -NMR mérésekkel ellenőriztem.

4.2.3. $[Ag(1\text{-butil-3-metil-imidazol-2-ilidén})_2][AgCl]$ előállítása

0,30 g (1,72 mmol) 1-butil-3-metil-imidazólium kloridot (BMIMCl) 25 ml diklórmétánban oldottam, majd az oldatot Schlenk edénybe töltöttem. A BMIMCl oldatához Ar atmoszféra alatt 0,24 g (1,03 mmol) ezüst(I)-oxidot adtam. Az Ag_2O nem oldódott fel, de 3 órá, $50^\circ C$ -on végzett keverés hatására szemmel láthatóan csökkent a mennyisége, miközben az oldat halvány sárga színűvé vált. A reakció végeztével kiszűrtem az elreagálatlan Ag_2O -t, ügyelve arra, hogy az oldat levegővel ne érintkezzen. Az így kapott diklórmétános oldatot a legtöbb esetben közvetlenül használtam fel a további szintetikus lépések kivitelezéséhez. A termék vízre és oxigénre rendkívül érzékeny, sárga színű viaszos szilárd anyag formájában izolálható az oldószer vákuumban történő elpárologtatásával. Kitermelés: 0,32 g (0,57 mmol) (66%). 1H -NMR (360 MHz, 298 K, CD_2Cl_2) δ 0.95 (t, 6H, $N-CH_2CH_2CH_2CH_3$), 1.34 (szextet, 4H, $N-CH_2CH_2CH_2CH_3$), 1.81 (kvintet, 4H, $N-CH_2CH_2CH_2CH_3$), 3.84 (s, 6H, $N-CH_3$), 4.12 (t, 4 H, $N-CH_2CH_2CH_2CH_3$), 7.10 (s, 4 H, $CH=CH$). ^{13}C -NMR (90 MHz, 298 K, CD_2Cl_2) δ 13.38 (CH_2-CH_3), 19.59 ($N-CH_2CH_2CH_2$), 33.41 ($N-CH_2CH_2$), 38.67 ($N-CH_3$), 51.58 ($N-CH_2$), 121.00 ($CH=CH$), 122.25 ($CH=CH$), 179.64 (NCN).

4.2.4. $[RuCl_2(1\text{-butil-3-metil-imidazol-2-ilidén})(p\text{-cimol})]$ (**1**) előállítása

0,27 g (0,44 mmol) $[RuCl_2(p\text{-cimol})]$ komplexet 5 ml diklórmétánban Ar alatt feloldottam, majd az oldatot $[Ag(1\text{-butil-3-metil-imidazol-2-ilidén})_2][AgCl]$ oldatához adtam (0,25 g (0,49 mmol) 7,5 ml CH_2Cl_2 -ben). Azonnali csapadékkiválást figyeltem meg ($AgCl$), de a reakció teljessé tételéhez az elegyet $40^\circ C$ -on még 2 órán át kevertettem. A keletkező Ru(II)-kARBÉN komplex levegőre nem érzékeny, ezért az $AgCl$ csapadék szűrését már nem szükséges inerten végezni. A kapott szűrletet szárazra párolva egy barna, ragacsos anyaghoz jutottam. A nyersterméket tartalmazó Schlenk-edényt ezután folyékony nitrogénben lehűtöttem, majd 5 ml étert adtam az anyaghoz. Néhány perces triturálás és intenzív kevertetés után a barna ragacsos anyag halvány narancssárga szilárd csapadékká kezdett átalakulni. Ekkor az étert Pasteur pipettával eltávolítottam, a kis mennyiségű maradék oldószert vákuumban leszívattam, majd a reakcióedényt újra lehűtöttem az éteres kezeléshez. Ezen műveleteket addig ismételtam, míg a ragacsos barna anyag egésze át nem alakult narancssárga szilárd anyaggá. A termék levegőre nem érzékeny, vizes oldatban napokon keresztül eltartható anélkül, hogy szerkezete megváltozna. Kitermelés: 0,25 g (61%). Analitikai tisztaságú anyag diklórmétános oldatból nyerhető hexán

rétegzésével történő kristálynövesztéssel. MS (ESI): m/z 373 $[M-2Cl-H]^+$, 409 $[M-Cl]^+$. 1H -NMR (360 MHz, 298 K, CD_2Cl_2) δ 1.04 (t, 3H, $N-CH_2CH_2CH_2CH_3$), 1.31 (d, 6H, $CH_3-CH-CH_3$), 1.47 (szextet, 2H, $N-CH_2CH_2CH_2CH_3$), 1.74 (kvintet, 2H, $N-CH_2CH_2CH_2CH_3$), 2.02 (s, 3H, $C-CH_3$) 2.97 (heptet, 1H, $CH_3-CH-CH_3$), 4.01 (s, 3H, $N-CH_3$), 4.49 (t, 2H, $N-CH_2CH_2CH_2CH_3$), 5.01-5.43 (m, 4H, $-CH-$), 7.11 (d, 1H, $N-CH=CH-N$), 7.16 (d, 1H, $N-CH=CH-N$). ^{13}C -NMR (90 MHz, 298 K, CD_2Cl_2) δ 13.71 ($-CH_2CH_3$), 18.34 ($C-CH_3$), 20.10 ($N-CH_2CH_2CH_2$), 21.42 ($CH-CH_3$), 30.72 ($CH-CH_3$), 33.82 ($N-CH_2CH_2$), 39.34 ($N-CH_3$), 51.21 ($N-CH_2$), 81.17, 81.74 ($CH-CH$), 98.85 ($C-CH_3$), 108.91 ($CH-CH(CH_3)_2$), 121.51, 124.02 ($N-CH=CH-N$) 173.68 (NCN). Számolt elemösszetétel $C_{18}H_{28}N_2Cl_2Ru$ -ra: C, 48.65; H, 6.35; N, 6.30; Cl, 15.96%. Elemanalízis során meghatározott: C, 48.10; H, 6.50; N, 6.76; Cl, 15.57%.

4.3. Kísérleti módszerek, kísérleti technikák

4.3.1. Lipid diszperziók készítése

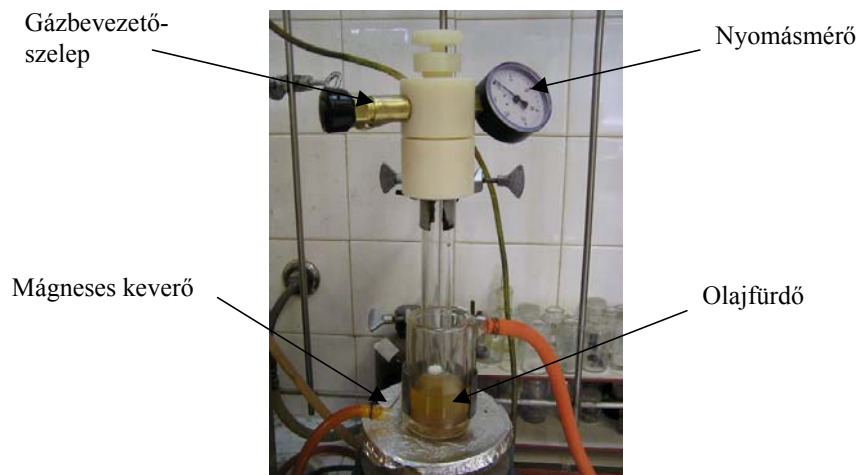
Minthogy a hidrogénezési reakciókat vizes közegben hajtottam végre, szükség volt a lipidek illetve lipidkeverékek vízben (0,1 M foszfát-pufferben) történő diszpergálására.

Egy tipikus diszperzió készítési eljárás során első lépésként a felhasználni kívánt lipidekből, vagy lipidkeverékekből (*Synechocystis* tilakoid lipidek, szójalecitin) kloroformos törzsoldatot ($C = 10$ mg/ml) készítettem. Ezt követően a megfelelő lipid oldatokból a kívánt mennyiségeket egy lerövidített, vastag falú kémcsőbe, vagy egy 25 ml-es főzőpohárba mértem, attól függően, hogy mekkora volt a vizes közeg tervezett térfogata, majd a kloroformot inert gáz (N_2 , Ar) ráfúvatásával elpárologtattam. Hidrogénezés során az össz lipid koncentráció az alkalmazott katalizátortól függően 0,1-1 mg/ml volt.

A kívánt mennyiségű foszfát puffert ($pH = 6,9$) a kémcsőbe vagy a főzőpohárba töltöttem, és BRANSON SONIFIER 250 típusú ultrahangos dezintegrátorral 5V kimenő feszültség mellett 20 % teljesítményen 3x2 percig szonikáltattam az oldatot jeges-vizes hűtés közben. A szonikálás eredményeképpen enyhén opálos kolloid oldatokat kaptam, melyeket közvetlenül használtam fel hidrogénezési reakciókban.

4.3.2. Lipidek hidrogénezése

Kísérleteim során a lipidek hidrogénezését az alkalmazott nyomás nagyságától függően mágneses keverővel ellátott Schlenk-edényben ($p = 1$ bar), vagy vastag falú nyomásálló üveg



reaktorban (4.3.2. ábra) valósítottam meg.

4.3.2. ábra Nyomásálló üveg reaktor

A katalizátor előzetes aktiválása csak a $\text{Pd}(\text{QS})_2$ esetében volt szükséges a $\text{Ru}(\text{II})$ -kARBÉN komplexeket szilárd formában adtam a szubsztrátum oldatához. A $\text{Pd}(\text{QS})_2$ már atmoszfÉrikus nyomáson is jelentős konverziókat okoz, ezért a hidrogénezéseket ezzel a komplexszel egyszerűen Schlenk-edényben végeztem. A $\text{Ru}(\text{II})$ -kARBÉN katalizátorokkal történő hidrogénezési reakciókat viszont nagyobb nyomáson (10 bar) kellett kiviteleznem, ilyenkor a nyomásálló reaktort használtam.

Kis nyomásokon, $\text{Pd}(\text{QS})_2$ katalizátor alkalmazása mellett tehát a megfelelő lipid vagy lipidkeverék vizes diszperzióját ($V = 5$ ml, $C = 0,1\text{-}0,2$ mg/ml) Schlenk-edénybe töltöttem, előzetesen a termosztátot a kívánt hőmérsékletre állítottam (általában 37°C). A reakcióedény lezárása után az oldat fölötti gáztérben található levegőt vákuumszivattyú segítségével leszívattam, majd H_2 atmoszfÉra alá helyeztem a rendszert. Ezen műveleteket 3-4-szer ismételtam meg egymás után a tökéletes oxigénmentesítés céljából.

A lipid hidrogénezési reakciók kivitelezése során a $\text{Pd}(\text{QS})_2$ katalitikusan aktív *B* formáját mindig közvetlenül felhasználás előtt állítottam elő oly módon, hogy a szilárd $\text{Pd}(\text{QS})_2$ -t pH 6,9-es 0,1 M-os foszfát-pufferben oldottam (*A* forma), majd az így nyert oldatot mindaddig hidrogén alatt tartottam, míg az oldat lilás színe át nem váltott sárgára (*C* forma). Ezután a H_2 atmoszfÉrát megszüntettem, majd az oldat levegővel történő érintkezésekor a kívánt *B* forma képződött. A lipid hidrogénezési reakciókhoz ezt az oldatot használtam fel. Az aktív formába hozott

katalizátort a Schlenk-edény zárókupakjában lévő szeptumon keresztül, fecskendő segítségével juttattam a lipid reakcióelegybe ($C_{\text{kat}}=9,5 \mu\text{g/ml}$).

A Ru(II)-kARBén katalizátorok nagyobb nyomások alkalmazását követelték meg. Az általában 1 mg/ml koncentrációjú (1,27 mM) lipid diszperzió 3 ml-éhez adtam hozzá a szilárd katalizátort (2,5 mg; 1,88 mM), illetőleg – amennyiben vegyes foszfin/kARBén katalizátort kívántam *in situ* előállítani – enyhe feleslegben a PTA-t (1 mg; 2,12 mM). A reaktort lezártam, néhányszor evakuáltam (annak ellenére, hogy a katalizátor nem érzékeny O_2 -re), majd hidrogénnel a kívánt nyomásra töltöttem fel.

4.3.3. Egyéb szubsztrátumok hidrogénezése

Mielőtt az újonnan előállított Ru(II)-kARBén katalizátorokat lipidek hidrogénezésére használtam volna, egyszerűbb és olcsóbb szubsztrátumokon teszteltem őket. A C=C és/vagy C=O kötések tartalmazó vegyületek 3 ml, 0,667 M-os „oldatait” (az apoláris szubsztrátumok ugyanis vízben nem oldódtak) nyomásálló üveg reaktorban készítettem el (4.3.2. ábra), melyhez a katalizátor megfelelő mennyiségét mértem (6,3 mg; 4,73 mM). A hidrogénnel való feltöltést a cső evakuálása előzte meg. Vízben nem oldódó szubsztrátumok esetén sem használtam a víz mellett külön szerves fázist, kizárólag egyfázisú rendszerekkel dolgoztam.

4.3.4. Hidrogénezési konverziók meghatározása

Lipidkeverékek *egyedi lipidjeinek* hidrogénezési konverzióit *MALDI-TOF-MS* technikával határoztam meg. A hidrogénezett vizes lipid diszperziókat kloroformos/metanolos (2:1) extrakciónak vettem alá. A diszperziókhoz kétszeres térfogatú kloroform/metanol elegyet mértem, az extrahálást kémcsórázó (vortex) segítségével végeztem. A két fázis elválása után a felső vizes részt Pasteur-pipettával távolítottam el. Az alsó kloroformos fázist kevés (0,1-0,2 g) vízmentes MgSO_4 -tal szárítottam, majd tiszta kémcsőbe szűrtem és szárazra pároltam. A beszáradt anyagokat a kémcső faláról annyi kloroformmal oldottam le, hogy kb. 5mg/ml koncentrációjú oldatokat nyerjek.

Mátrixként minden mérésnél 2,5-dihidroxibenzoesavat (DHB) alkalmaztam, melyből Eppendorf-csőben 1ml 20 mg/ml koncentrációjú oldatot készítettem. Az oldószer $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 1:1 arányú elegye volt.

Bizonyos méréseknél Na^+ -t kellett a vizsgálandó rendszerbe juttatnom, hogy a lipidkeveréket alkotó lipidek jelei összemérhető intenzitásúak legyenek. DOPE-DOPC

keverékekben például a DOPE $[M+H]^+$ csúcsai gyengén, vagy egyáltalán nem látszanak a DOPC $[M+H]^+$ csúcsai mellett, ha viszont Na^+ -t adunk az oldatba, a megfelelő $[M+Na]^+$ jelek – $[DOPE+Na]^+$, illetve $[DOPC+Na]^+$ – intenzitása összemérhető. E célból telített etanolos NaCl oldatot készítettem úgy, hogy 1ml EtOH-hoz 5 mg NaCl-t adtam.

Az egyes oldatokat Eppendorf-csövekben mértem össze a következők szerint:

- 5 μ l minta
- 15 μ l NaCl/EtOH (szükség szerint)
- 50 μ l DHB

Az így létrejött elegyekből 0,5 μ l térfogatokat cseppentettem fel a mintatartó lemezre, ahol az oldószer szinte azonnal elpárolgott, és csak a kristályos szilárd anyag maradt vissza.

Méréseimet BRUKER Biflex III MALDI-TOF-MS készülékkel hajtottam végre pozitív ionmódban, refletron üzemmód alkalmazásával. Kísérleteim során a lézerimpulzusok száma 120-ra, a csillapítás értéke 63–72% közötti értékre volt beállítva. A spektrumok kiértékelését az XMASS 5.0 szoftverrel végeztem.

A lipid hidrogénezés *összkonverziójának* meghatározására *szójalecitin* minták esetében *gázkromatográfiát* alkalmaztam. Ekkor a hidrogénezést és kloroformos extrakciót követően beszárított mintára ampullában 4-5 ml 5%-os HCl-MeOH elegyet töltöttem, majd a leforrasztott ampullát 3 órára 80°C-on blokk termosztátba („block therm”) helyeztem. Az átészterezés befejeztével a mintákat kevés (kb 0,5 ml) víz hozzáadása után 2ml n-hexánnal extraháltam. Átészterezéskor a zsírsavak megfelelő metil-észterei képződtek, melyek már megfelelő illékonyságúak voltak a gázkromatográfiás elemzéshez.^{2,58} Szárítás ($MgSO_4$) és ampullába szűrés után az oldószert elpárolgattam, majd a mérés előtt 50-60 μ l n-hexánnal oldottam le a lipideket az üveg faláról.

Szójalecitin és *Synechocystis* minták vizsgálatakor az *összkonverziót* a következő képlet alapján számítottam ki:

$$\text{Konverzió} = \left\{ 1 - \frac{A(16:1) + A(18:1) + 2A(18:2) + 3A(18:3)}{B(16:1) + B(18:1) + 2B(18:2) + 3B(18:3)} \right\} * 100$$

A: az adott zsírsav %-os mennyisége a hidrogénezett elegyben

B: az adott zsírsav %-os mennyisége a hidrogénezés előtt

A *Synechocystis* lipidkeverék egyedi lipidjeinek azonosítása, illetve az azokból származó zsírsavak arányának meghatározása tömegspektrometrián (MALDI-TOF) történt.

A gázkromatográfiás meghatározásokat HEWLETT-PACKARD 5890 Series II típusú gázkromatográf segítségével hajtottam végre SP 2330 kapilláris kolonnán, lángionizációs detektorral, a következő hőmérsékleti paraméterek mellett:

$$T_{\text{detektor}} = 250^{\circ}\text{C}$$

$$T_{\text{injektor}} = 250^{\circ}\text{C}$$

$$T_{\text{kolonna}} = 170^{\circ}\text{C}$$

A C=C és/vagy C=O kötések tartalmazó egyéb szubsztrátumok hidrogénezési konverzióit ^1H -NMR technikával határoztam meg. Vízoldható vegyületek hidrogénezése után közvetlenül a reakcióelegyből vettem mintát (kb. 0,5 ml), melyhez NMR-csőben D_2O -t (kb. 0,2 - 0,3 ml) adtam. Vízben nem oldódó anyagok esetében kloroformos extrakciót hajtottam végre, a szerves fázist bepároltam, majd CDCl_3 -mal mintát készítettem.

4.3.5. Ru(II)-kARBÉN komplexek szerkezetazonosítása

A Ru(II)-kARBÉN komplexek szerkezetazonosításához szükséges ^1H - ^{31}P - és ^{13}C -NMR méréseket szobahőmérsékleten, BRUKER DRX 360 típusú NMR készüléken végeztem.

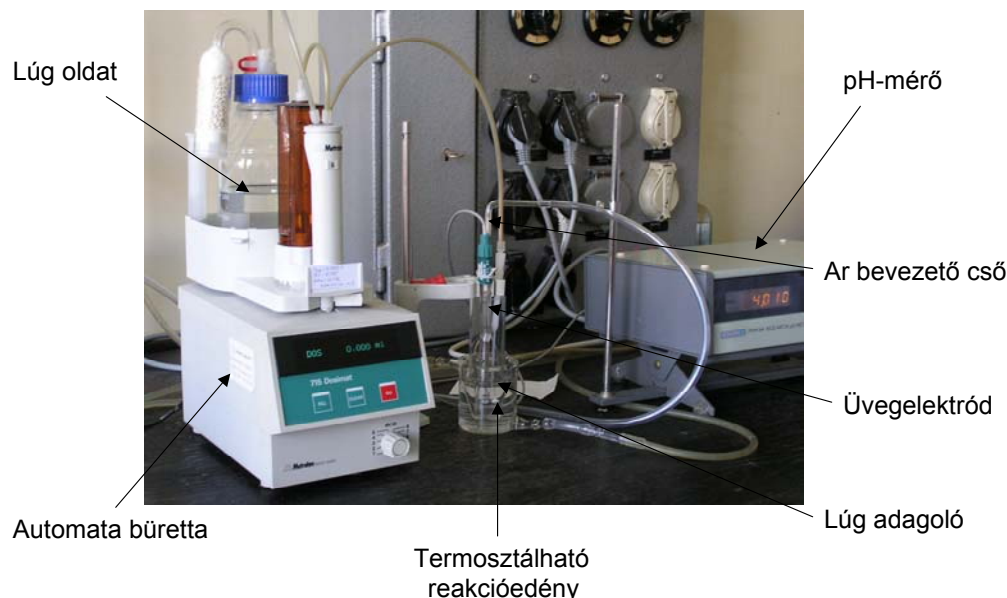
A tömegspektrometriás adatokat BRUKER BioTOF II ESI-TOF tömegspektrométer segítségével gyűjtöttem be.

A kristályos $[\text{RuCl}_2(1\text{-butil-3-metil-imidazol-2-ilidén})(\text{p-cimol})]$ (**1**) komplex röntgen-krisztallográfiás szerkezetazonosítása 20°C hőmérsékleten történt Enraf Nonius MACH3 diffraktométerrel. A meghatározást egyetemünk röntgen-krisztallográfiás laboratóriumában Dr. Bényei Attila tudományos főmunkatárs végezte.

Az **1**+PTA reakciót spektrofotometrián követtem. A mérések során **1** koncentrációja 0,93 mM, a PTA törzsoldat koncentrációja 16,25 mM volt. A PTA törzsoldatot 20 μl -es részletekben adtam a küvettában lévő 2 ml térfogatú **1** oldatához. A spektrumokat 370-550 nm hullámhossz-tartományban Hitachi U2000 típusú spektrofotométer segítségével vettem fel.

4.3.6. pH potenciometrikus titrálások

Az 1-es komplex pH-potenciometrikus titrálását Metrohm 6.0234.100 kombinált üvegelektóddal felszerelt Metrohm 702 S14 automata titráló rendszerrel végeztem (4.3.6. ábra).



4.3.6. ábra Metrohm 702 S14 automata titráló rendszer

A titrálandó oldatot úgy állítottam össze, hogy bemértem 0,01788 g (0,04027 mmol) komplexet, 5,00 ml 0,0200 M-os sósavat, 1,00 ml 1,0000 M-os KCl oldatot, és 5 ml desztillált vizet. Az így kapott oldatot 0,1950 M-os KOH oldattal titráltam meg. Az automata adagoló úgy volt beállítva, hogy az egyes KOH részletek (5 μ l) hozzáadása között 100 s teljen el. Az oldat keveredését folyamatos argon buborékoltatás biztosította. A titrálási adatok kiértékelése PSEQUAD programmal történt, a pH függvényében megfigyelhető részecskeeloszlást MEDUSA v. 9 programmal számítottam és ábrázoltam.

Az 1-es komplex pH-sztatikus (állandó pH értéken végzett) titrálását pH 7,5-ön és pH 10,8-on valósítottam meg. A pH-sztatikus titrálás lényege, hogy a mérés során állandó értéken tartjuk a pH-t, vagyis ha például a vizsgált rendszerben proton-termelő folyamat indul meg, a mérőműszer lúgot adagol a titrálandó oldatba. Ilyen esetben a fogyott lúgtérfogatból tudunk következtetni a keletkező protonok mennyiségére. A hőmérsékletet mindkét titrálásnál 60°C-ra állítottam, a titráló KOH koncentrációja 0,0965 mol/dm³, a komplex koncentrációja 4,51x10⁻³ mol/dm³ volt. Az állandó ionerősséget KCl-dal állítottam be (0,1 M).

5. Eredmények és értékelésük

5.1. Lipidek, lipidkeverékek $Pd(QS)_2$ -vel történő hidrogénezésének vizsgálata

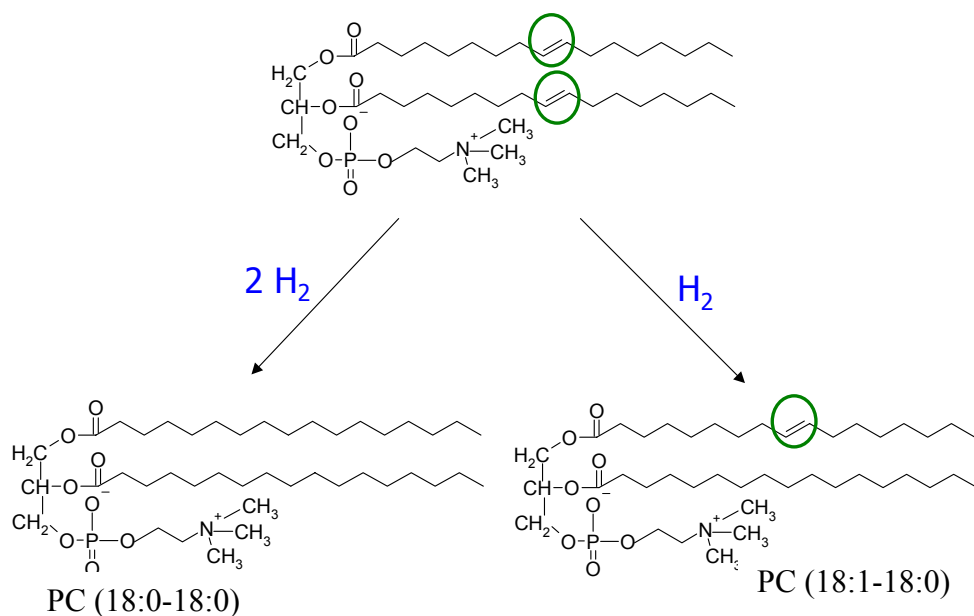
5.1.1. DOPC hidrogénezése

A Ru(II)-NHC karbén komplexek előállítását, illetve vizes közegű lipid hidrogénezési reakciókban történő felhasználását az egyedi lipidek hidrogénezési konverzióinak meghatározására alkalmas analitikai módszer kidolgozása előzte meg.

A szakirodalom bővelkedik olyan közleményekben, melyekben a nemillékony lipidek vizsgálatára a tömegspektrometriát találták a leginkább alkalmazhatónak.⁵⁹⁻⁶¹ Ezen előzmények után a lipid-hidrogénezés tanulmányozására a MALDI-TOF-MS technikát választottuk.

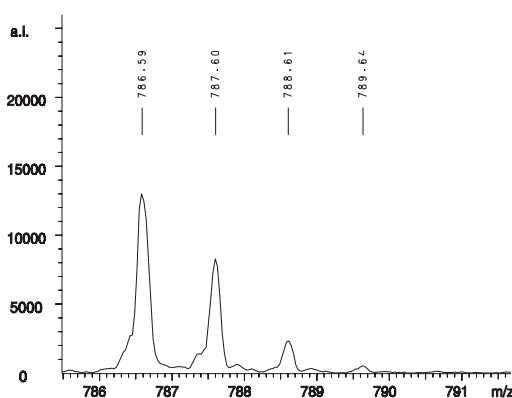
Kísérleteimet a két telítetlen C=C kötést tartalmazó DOPC hidrogénezésének vizsgálatával kezdtem. A reakcióban két termék képződésére nyílik lehetőség; az egyik C=C kötés hidrogeneződésével egy félig telített (18:1-18:0), mindkét C=C kötés hidrogeneződésével pedig egy teljesen telített (18:0-18:0) lipid alakul ki (5.1.1.a. ábra).

Várakozásainknak megfelelően a DOPC, illetve a hidrogénezés során képződő termékek kiválóan detektálhatóak voltak MALDI-TOF-MS-sel (5.1.1.b. és 5.1.1.c. ábra). Mátrixként DHB-t alkalmaztam, a többi kipróbált mátrix (*SA* – szinapiksav, *DIT* – ditranol, *CHCA* – α -ciano-4-hidroxi-fahéjsav, *HABA* – 2-(4-hidroxi-fenil-azo)-benzoesav) használata mellett ugyanis nem kaptam jó minőségű spektrumokat. A módosítatlan DOPC MALDI-spektrumában jelentkező 786 Da tömegszámú csúcs a DOPC molekulaion csúcsa, mely az ionizáció során, proton felvételével keletkező $[M+H]^+$ iont jelöli. A nagyobb m/z értékeknél (787, 788, 789 Da) észlelhető csúcsok izotópcsúcsok, melyek intenzitásaránya függ ; DOPC (18:1-18:1) pító elemek minőségétől, azok természetes izotópjainak számától, az egyes izotópok gyakoriságától. Az izotópcsúcsok mintázatából tehát minőségi analitikai információk származtathatók az adott vegyület összetételére vonatkozóan.

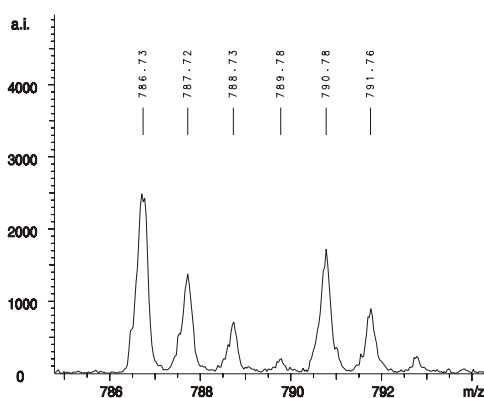


5.1.1.a. ábra DOPC hidrogénezése

A hidrogénezett minta spektrumát (5.1.1.c. ábra) szemügyre véve látható, hogy $\text{Pd}(\text{QS})_2$ jelenlétében már 2 perces, 30°C -on és 106 kPa-on végzett hidrogénezés hatására is 790 Da-nál egy viszonylag nagy intenzitású csúcs jelentkezik, mely a teljesen telített (18:0-18:0) lipidnek felel meg. A félig telített forma (18:0-18:1) csúcsa 788-nál figyelhető meg. Megjegyzendő azonban, hogy ez a jel egybeolvad a 786-os csúcs második izotópcsúcsával. Az izotópcsúcs-hozzájárulás levonását követően a hidrogénezés utáni lipidösszetétel az 5.1.a. táblázatban látható.



5.1.1.b. ábra DOPC MALDI-spektruma



5.1.1.c. ábra Hidrogénezett DOPC MALDI-spektruma; $[\text{Pd}(\text{QS})_2]=12,1\mu\text{M}$, $[\text{DOPC}]=127\mu\text{M}$
 $T=30^\circ\text{C}$, $p(\text{H}_2)=106\text{ kPa}$, $t=2\text{ perc}$

Lipid zsírsavösszetétele	Lipid mennyisége a hidrogénezett keverékben (mol%)
18:1-18:1	55,61
18:0-18:1	5,94
18:0-18:0	38,45

5.1.1. táblázat DOPC hidrogénezés utáni termékelegeye
(18:1 → olajsav, 18:0 → sztearinsav)

Érdekes, hogy a 18:1-18:0 lipid mennyisége meglehetősen csekély a hidrogénezett elegyben. Ez azt jelenti, hogy ha a katalizátor kölcsönhatásba kerül a DOPC molekulával, akkor annak mindkét telítetlen kötését hidrogénezzi, a félig telített termék pedig csak kis valószínűséggel keletkezik.

Láthatjuk tehát, hogy MALDI-MS segítségével meghatározható a DOPC hidrogénezett diszperziójának lipidösszetétele, míg a gázkromatográfia legfeljebb a 18:1 illetve 18:0 zsírsavak arányáról, vagyis a telítetlen kötések hidrogénezésének összkonverziójáról ad felvilágosítást. A MALDI mérések eredményeként kapott konverzió (41,42 %) jó egyezést mutat a gázkromatográfias adatokból számolt értékkel (42,48 %).

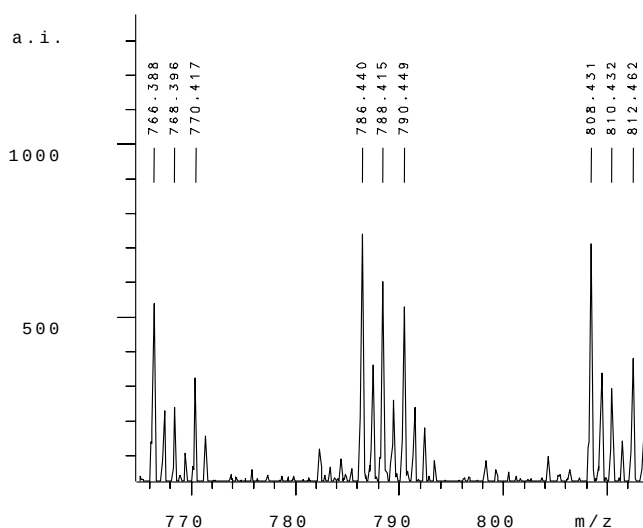
5.1.2. Kétkomponensű DOPE-DOPC lipidkeverékek hidrogénezése

Kutatómunkám következő pontjaként az egyes komponenseket különböző arányban tartalmazó DOPE-DOPC lipidkeverékek hidrogénezését végeztem el, és vizsgáltam az egyedi komponensek keverékbeli reaktivitását. Ismert tény, hogy vizes közegben történő diszpergáláskor a két lipidféleség eltérő szerkezetű vezikulákat hoz létre. Amíg a DOPC kettős réteget alkot, addig a DOPE hexagonális struktúrát képez.²

A kísérletek során arra a kérdésre is kerestem a választ, hogy függ-e a DOPE illetve a DOPC reaktivitása attól, hogy melyik komponens van túlsúlyban a keverékben, azaz melyik vezikulaszerkezet dominál.

DOPE, illetve DOPC egymás mellett történő kimutatása során azzal a problémával szembesültem, hogy – feltehetőleg az eltérő molekulaszervezetből adódóan – az előbbi lipid jelei nem, vagy csak nagyon gyengén látszottak a MALDI-spektrumokban (függetlenül az alkalmazott mátrixtól) a DOPC jelei mellett. A probléma még abban az esetben is fennállt, ha nagyrészt (80%-ban) DOPE alkotta a mintát. Ennek feltehetőleg az az oka, hogy a belső só szerkezettel

rendelkező DOPC, mely kvaterner nitrogént és negatív töltésű oxigént tartalmaz, sokkal könnyebben protonálódik a mérési körülmények között. Annak érdekében tehát, hogy értékelhető méréseket tudjak végezni, valamilyen módon összemérhető intenzitásúvá kellett tennem a jeleket. Megfigyeltem, hogy a MALDI-minta előkészítése során telített etanolos NaCl oldatot (15 µl) adva a hidrogénezett lipidkeverék extrakció után nyert kloroformos oldatához, a két lipid $[M+Na]^+$ spektrumbeli csúcsai már összemérhető intenzitásúak voltak (5.1.2. ábra).



5.1.2. ábra DOPE-DOPC 4:1 arányú keverékének hidrogénezés utáni MALDI-spektruma

$[DOPE+Na]^+$: 766 Da, $[DOPC+Na]^+$: 808 Da, $[DOPC+H]^+$: 786 Da

$[Pd(QS)_2] = 12,1 \mu M$, $[lipid] ([DOPE]+[DOPC]) = 127 \mu M$, $T = 30^\circ C$, $p(H_2) = 109 \text{ kPa}$, $t = 2,5 \text{ perc}$

A 766, 768 és 770 Da-os csúcsok rendre a foszfatidil-etanolamin nátrium ionnal ionizált telítetlen (DOPE), félig telített és telített formáihoz rendelhetők. A foszfatidil-kolin megfelelő Na-csúcsai 808, 810, illetve 812 Da-nál jelentkeznek, míg a 786-790 tömegszámú jelek a foszfatidil-kolin $[M+H]^+$ jelei.

A hidrogénezés utáni konverziókat úgy határoztam meg az egyes lipidfélésekre, hogy az izotópcsúcs hozzájárulások levonása után összeadtam a telítetlen (18:1-18:1), a félig telített (18:1-18:0) és a telített (18:0-18:0) molekulaion-csúcsok intenzitás értékeit (100 %), majd kiszámoltam a termékelegy komponenseinek mennyiségét. A termékelegy lipidösszetételének ismeretében végül megadtam a hidrogéneződött kettős kötések arányát.

Az elvégzett kísérletek alapján kiderült, hogy a kétkomponensű DOPE-DOPC lipidkeverék összetételétől gyakorlatilag független az egyedi lipidek hidrogénezéssel szembeni reaktivitása (5.1.2. táblázat).

Keverék összetétele		Hidrogéneződés mértéke			
DOPE	DOPC	DOPE		DOPC	
(%)	(%)	(%)	nmol	(%)	nmol
20	80	69,77	93,77	66,63	339,08
40	60	66,44	178,60	59,77	228,13
50	50	62,86	211,22	60,50	192,43
60	40	70,81	285,52	72,12	183,51
80	20	63,26	340,11	56,16	71,45

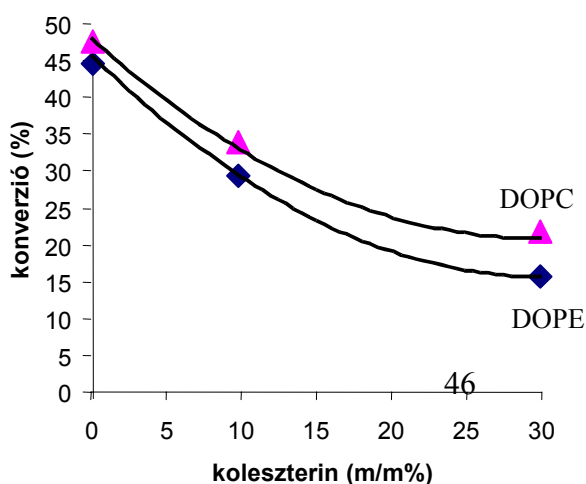
5.1.2. táblázat DOPE-DOPC lipidkeverékek hidrogénezése

[Pd(QS)₂] = 12,1 μM, [lipid] ([DOPE]+[DOPC]) = 0,1 mg/ml, T = 30°C, p(H₂) = 109 kPa, t = 30 perc

A MALDI-technika alkalmazása tehát lehetővé tette, hogy egymás mellett határozzam meg a különböző lipidfélések egyedi reaktivitását. Más analitikai módszerekkel ez a feladat ilyen egyszerűen és pontosan nem lett volna elvégezhető.

5.1.3. Kétkomponensű DOPE-DOPC lipidkeverékek hidrogénezése koleszterin jelenlétében

Az emlős, köztük az emberi sejtek membránjai jelentős mennyiségben tartalmaznak koleszterint, melynek nagy szerepe van a lipid raftok szerkezetének kialakításában. Az egyszerű DOPE/DOPC/koleszterin rendszer vizsgálatával arra kerestem a választ, hogy hogyan befolyásolja a koleszterin jelenléte az egyedi lipidek hidrogénezéskor mutatott reaktivitását. E célból DOPE:DOPC 1:1 arányú keverékét különböző mennyiségű koleszterin hozzáadása mellett diszpergáltam 6,9-es pH-jú foszfát-puffer oldatban. Az így kapott vizes diszperziót a szokott módon, szigorúan azonos körülmények között hidrogéneztem Pd(QS)₂ katalizátorral, a konverziókat MALDI-TOF-MS-sel határoztam meg (5.1.3. ábra).



5.1.3. ábra DOPE-DOPC 1:1 arányú keverékének hidrogénezése koleszterin jelenlétében

[Pd(QS)₂] = 12,1 μM, [lipid] ([DOPE]+[DOPC]) = 127 μM, T = 30°C, p(H₂) = 109 kPa, t = 5 perc

Az eredmények értékelésekor azt tapasztaltam, hogy a koleszterin mennyiségének növekedésével mindkét komponens hidrogénezési konverziója körülbelül azonos mértékben csökkent, bár a DOPC reaktivitása valamivel nagyobb volt az egyes minták esetében (5.1.3. táblázat).

Hidrogénezési konverzió (%)		
Koleszterin (m/m%)	DOPE	DOPC
0	45,86	48,11
10	29,19	32,83
30	15,65	20,90

5.1.3. táblázat DOPE és DOPC reaktivitásának változása koleszterin hatására

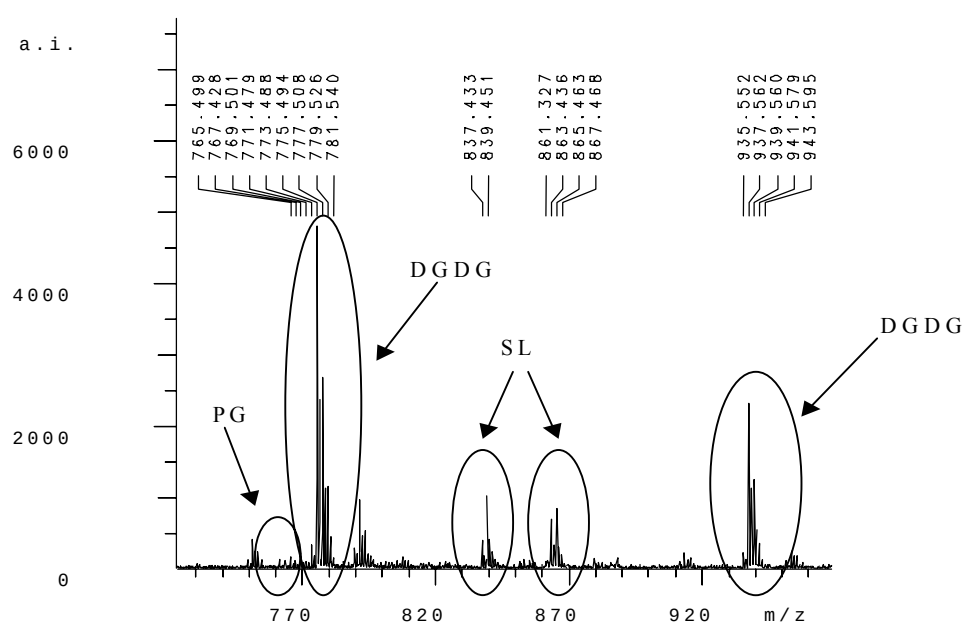
A konverzió értékek csökkenése azzal magyarázható, hogy a koleszterin molekulák beépülve a membránba –jelen esetben a vezikulákba – szoros illeszkedést biztosítva merevítik annak szerkezetét, aminek következtében a katalizátor nehezebben tud hozzáférni a megfelelő lipid molekulákhoz, így a hidrogéneződés mértéke szükségszerűen lecsökken.

5.1.4. *Synechocystis PCC 6803*-ból izolált lipidkeverék hidrogénezése

A *Synechocystis PCC 6803* nevű cianobaktérium tilakoid membránjából egy négykomponensű lipidkeverék (MGDG, DGDG, PG, SL) izolálható. Az egyes komponenseken belül többféle lipid molekulát különböztethetünk meg, melyek a zsírsavrészek minőségében különböznek egymástól. (Az MGDG elnevezés például olyan lipideket jelöl, melyek fejcsoportja közös, az MGDG-re jellemző, a zsírsavrészek viszont eltérőek.) A *Synechocystis* lipidkeverék hidrogénezésével a növényi sejtmembránok hidrogénezését kívántuk modellezni.

Ahhoz azonban, hogy az egyes lipidfélések reaktivitását meghatározhassuk, legelőször azonosítani kellett a tilakoid membránból izolálható lipidmolekulákat. Ennek megvalósítására a tömegspektrometria nyújtott lehetőséget. Az egyes lipidek egymás mellett történő kimutatása ebben az esetben is úgy volt lehetséges, hogy a MALDI minták készítése során 15 µl telített etanolos NaCl oldatot adtam a DHB-t és a mintát tartalmazó oldatokhoz.. A *Synechocystis* PCC 6803 tilakoid membránjából izolált lipidkeverék MALDI spektruma az 5.1.4.a. ábrán látható, míg az egyes lipid típusokon belül előforduló különböző zsírsavrészeket tartalmazó egyedi lipid molekulákat az 5.1.4.a. táblázatban tüntettem fel.

5.1.4.a. ábra A *Synechocystis* PCC 6803 tilakoid membránjából izolált lipidkeverék MALDI-spektruma



MGDG		DGDG		PG		SL	
Tömeg (Da)	Zsírsav összetétel	Tömeg (Da)	Zsírsav összetétel	Tömeg (Da)	Zsírsav összetétel	Tömeg (Da)	Zsírsav összetétel
773	16:1-18:3	935	16:1-18:3	765	16:1-18:3	837	16:0-16:1
775	16:0-18:3	937	16:0-18:3	767	16:0-18:3	839	16:0-16:0
777	16:0-18:2	939	16:0-18:2	769	16:0-18:2	861	16:0-18:3
779	16:0-18:1	941	16:0-18:1	771	16:0-18:1	863	16:0-18:2
781	16:0-18:0	943	16:0-18:0	773	16:0-18:0	865	16:0-18:1
						867	16:0-18:0

5.1.4.a. táblázat A *Synechocystis* PCC 6803 tilakoid membránt alkotó lipidek

A négykomponensű lipidkeverék hidrogénezése során reaktivitásbeli különbségeket sikerült kimutatnom az egyes lipidfélések között. A hidrogénezés körülményei, illetőleg a konverzió értékek az 5.1.4.b. táblázatban láthatóak.

Szembevetendő, hogy a telítetlen zsírsavrészek (18:3, 16:1) aránya az egyes lipid típusokon belül lecsökkent a hidrogénezés hatására, míg a nagyobb telítettségi fokú zsírsavak mennyisége (főként a teljesen telített 18:0-é) jelentősen megnőtt. A zsírsavösszetétel változása alapján kiszámoltam az egyes lipid típusokra vonatkozó összkonverzió értékeket. Megállapítottam, hogy a hidrogénezés körülményei között az MGDG és a DGDG körülbelül kétszer akkora konverziót ért el (23,01, illetve 24,40 %), mint az SL és a PG (11,95, valamint 11,40 %).

		16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	Konv. (%)
Hidro- géne- zetlen	MGDG	47,33	2,66	0,85	4,80	12,95	31,42	
	DGDG	45,96	4,04	1,40	2,43	11,62	34,55	
	SL	64,77	7,83	2,07	10,61	12,54	2,18	
	PG	49,00	8,98	2,70	8,57	12,85	17,90	
Hidro- géne- zett	MGDG	47,71	2,29	5,68	12,29	12,41	19,61	23,01
	DGDG	48,04	1,96	4,91	10,28	12,65	22,15	24,40
	SL	66,06	6,49	3,56	12,76	8,56	2,57	11,95
	PG	49,00	7,20	8,12	9,08	10,15	16,44	11,40

5.1.4.b. táblázat *Synechocystis* tilakoid lipidkeverék hidrogénezése

[Pd(QS)₂] = 12 μM, [lipid] = 0,2 mg/ml, T = 30°C, p(H₂) = 109 kPa, t = 5 perc

Az összkonverziók számítása a 4.3.4. fejezetben bemutatott képlet alapján történt.

5.1.5. Foszfatidil-glicerol (PG) hidrogénezése

Kutatómunkám során azt is vizsgáltam, hogy tapasztalható-e valamiféle reaktivitásbeli különbség abban az esetben, ha a *Synechocystis* membránlipidek egyikét nem a lipidelegyenben, hanem önmagában diszpergálom, illetve hidrogénezem. Kísérleteimet foszfatidil-glicerollal (PG) végeztem, mivel a *Synechocystis* tilakoid membránja ebből tartalmaz a legkevesebbet, így várhatóan ennek módosul leginkább a vezikulaszerkezete a keverék-diszperzióban. A PG önmagában történő hidrogénezésének konverziója mindössze 6,04%-nak adódott, míg a keverékbeli konverzió 11,40% volt. Megállapítható tehát, hogy a *Synechocystis* lipidkeverékben a PG nagyobb fokú hidrogéneződése érhető el, mint abban az esetben, amikor a lipid önállóan van jelen a diszperzióban. A különbség minden bizonnyal abból adódik, hogy az önmagában rosszul diszpergálható PG a közös vezikulában a többi lipid hatására egy olyan szerkezetbe épül be, melyben a katalizátor molekulái könnyebben hozzáférnek a szubsztrátum molekuláihoz.

5.1.6. Szójalecitin hidrogénezése

A szójalecitin gyógyszertárakban is kapható fontos táplálék-kiegészítő, mely gyakorlatilag nem más, mint telítetlen, illetve többszörösen telítetlen lipidek keveréke. Épp ennek köszönheti jótékony élettani hatásait, hiszen a telítetlen zsírsavak kiemelt szerepet játszanak a vér káros koleszterinszintjének csökkentésében.

A szójalecitin meglehetősen sok komponenst tartalmazó összetett lipidkeverék. Ebből kifolyólag az összes lipid komponens azonosítása, illetve az egyedi lipidekre vonatkozó hidrogénezési konverziók meghatározása nem volt megvalósítható. Átészterezést követően azonban lehetővé vált a lipideket alkotó zsírsavak arányának gázkromatográfiásan történő megadása. Ezen adatokból az összkonverzió könnyedén kiszámítható az 5.1.4. fejezetben bemutatott képlet alapján.

Az 5.1.6. táblázatban a szójalecitin hidrogénezés előtti és utáni zsírsavösszetételét tüntettem fel. Jól látható, hogy a telített komponensek mennyisége számottevően megnőtt a reakció során. (A 16:0 mennyisége feltehetőleg azért nem nőtt, mert a kiindulási szójalecitin nem tartalmazott kimutatható mennyiségű 16:1 zsírsavrészeket.)

Retenciós idő (perc)	Zsírsv	%-os arány hid- rogénezés előtt	%-os arány hid- rogénezés után
7,78	16:0	27,82	24,44
11,78	18:0	6,56	26,84
13,16	18:1	8,88	24,29
15,85	18:2	51,56	13,13
19,10	18:3	5,18	1,29

5.1.6. táblázat Szójalecitin gázkromatográfiásan meghatározott zsírsavösszetétele hidrogénezés előtt és után; $[Pd(QS)_2] = 12 \mu M$,
 $[lipid] = 1,43 \text{ mg/ml}$, $T = 30^\circ C$, $p(H_2) = 109 \text{ kPa}$, $t = 30 \text{ perc}$

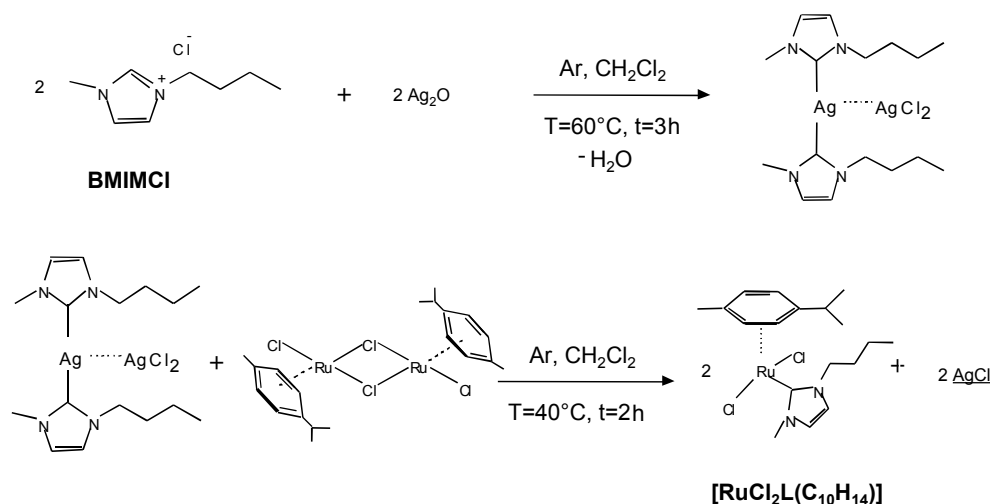
A szójalecitin összkonverziója a fent látható kísérleti körülmények között 57,33 %-nak adódott.

Összességében tehát megállapítható, hogy a vizsgált lipidkeverékek esetében a MALDI-TOF-MS – DHB mátrix és NaCl alkalmazásával – lehetővé teszi az egyedi lipidek azonosítását és reaktivitásának meghatározását.

5.2. Ru(II)-N-heterociklusos karbén komplexek előállítása és szerkezetazonosítása

5.2.1. $[RuCl_2(1\text{-butil-3-metil-imidazol-2-ilidén})(p\text{-cimol})]$ (**1**) szintézise

A lipid hidrogénezési reakciók katalizálására szánt **1** komplexet az irodalmi részben bemutatott ezüst(I) metatézises reakcióban állítottam elő (5.2.1.a. ábra).



5.2.1. ábra $[RuCl_2L(C_{10}H_{14})]$ előállítása ezüst(I) metatézises módszerrel

L: 1-butil-3-metil-imidazol-2-ilidén

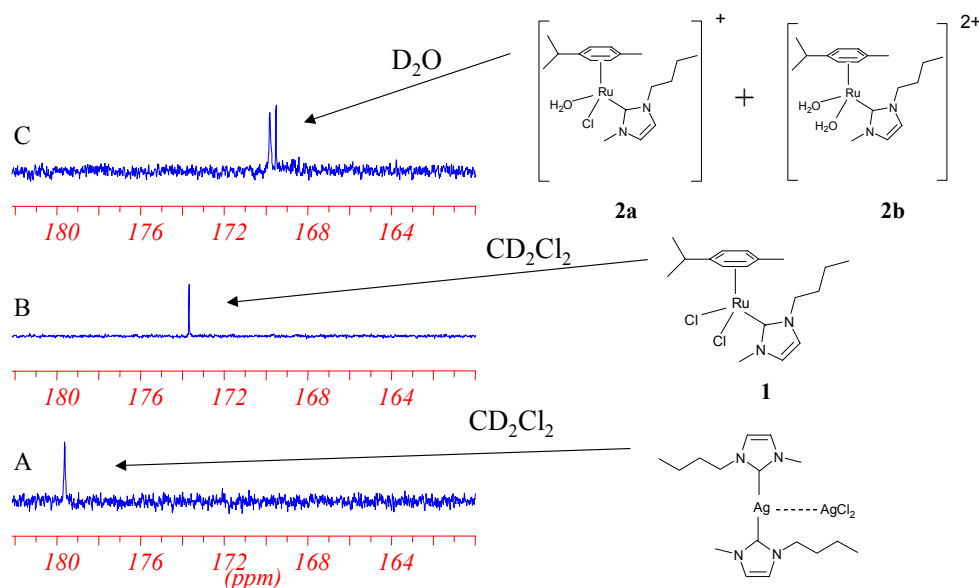
Az ábrán bemutatott eljárás lényege, hogy az imidazólium sóból (BMIMCl) Ag_2O segítségével egy ezüst(I) karbén komplexet képzünk, melyet $[RuCl_2(C_{10}H_{14})]_2$ -szel reagáltatva megkapjuk az átmenetifém NHC karbén komplexét (**1**). A reakció első lépésében az imidazólium só deprotonálódásával létrejövő ezüst(I) karbén komplex rendkívül kis hidrolitikus és oxidatív stabilitással rendelkezik. Víz, illetőleg oxigén hatására azonnal $Ag_{(sz)}$ kiválása mellett bomlik. Ez a fokozott instabilitás teszi azonban lehetővé azt, hogy a komplex karbén-átvivőként szolgáljon a Ru(II)-karbén katalizátor előállítása során. Az ezüst(I) karbént ugyanis a $[RuCl_2(C_{10}H_{14})]_2$ dimerrel reagáltatva kialakul a Ru(II)-NHC-karbén komplex (**1**). A keletkező **1** meglehetősen stabilis vegyület az erős Ru-C kötésnek köszönhetően, vizes oldatban akár hetekig is eltartható bomlás nélkül.

5.2.2. $[RuCl_2(1\text{-butil-3-metil-imidazol-2-ilidén})(p\text{-cimol})]$ (**1**) szerkezet-azonosítása

A halvány narancssárga **1** ^{13}C -NMR spektrumát CD_2Cl_2 -ben felvéve a karbén szénatomokra jellemző kémiai eltolódás tartományban ($\delta = 173,7$ ppm-nél) jól látható szinglet jelet detektáltam (Az $[\text{AgL}_2][\text{AgCl}_2]$ ezüst-karbén komplex esetében is nyomon követhető volt a karbén ligandum kialakulása, CD_2Cl_2 -ben 173,7 ppm-nél jelentkezett a megfelelő N-C-N szinglet rezonancia.) (5.2.2.a. ábra – A és B spektrum).

Az előállított **1** komplex MALDI-tömegspektrumában két jelet azonosítottam: az egyik klorid ligandum eltávolításával kialakuló $[\text{M}-\text{Cl}]^+$ (409 Da), illetve a mindkét klorid leszakadásával keletkező $[\text{M}-2\text{Cl}]^+$ (373 Da) molekulaion-csúcsokat (5.2.2.b. ábra). A spektrumban megfigyelhető sok csúcsból álló izotópcsúcs-mintázat jellemző a ruténium vegyületekre, mivel a ruténiumnak 16 természetes izotópja létezik.

Annak ellenére, hogy a semleges **1** komplexet apoláros cimos, és poláros funkciós csoportot nem tartalmazó karbén építi fel, kiváló vízoldhatóságot tapasztaltam. A szilárd anyag maradék nélkül feloldódott, barna színű oldat létrejöttét eredményezve. A komplex D_2O -s oldatának ^{13}C -NMR spektrumában két szinglet karbén-jelet detektáltam 169,5 ppm és 169,8 ppm kémiai eltolódásoknál (5.2.2.a. ábra – C spektrum).

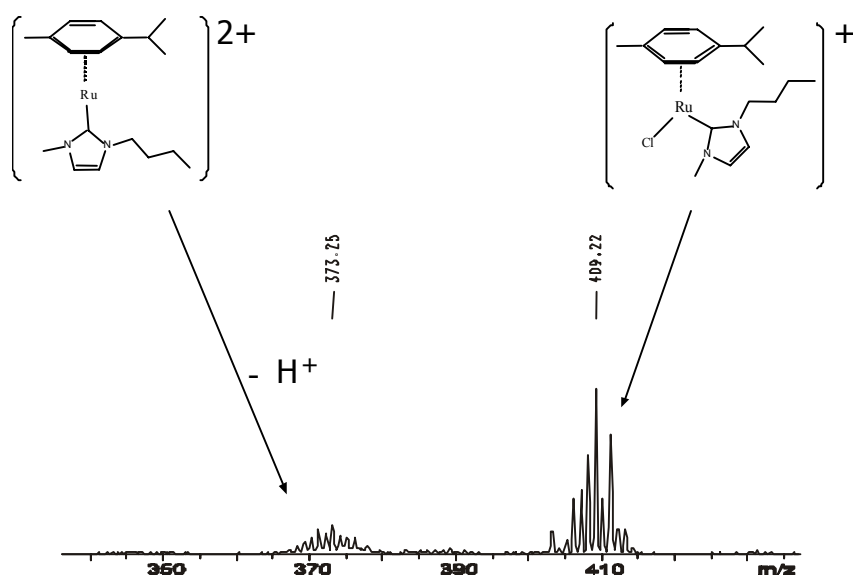
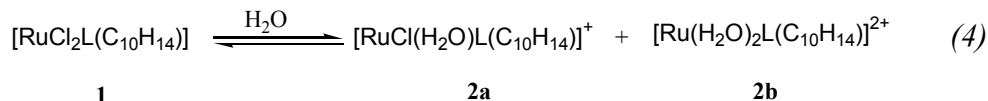


5.2.2.a. ábra A: $[\text{AgL}_2][\text{AgCl}_2]$ ^{13}C -NMR spektruma CD_2Cl_2 -ben

B: **1** ^{13}C -NMR spektruma CD_2Cl_2 -ben

C: **1** ^{13}C -NMR spektruma D_2O -ban

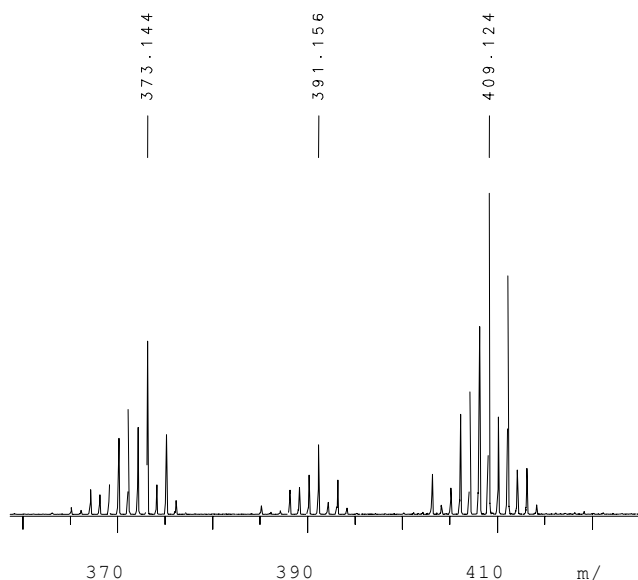
A két jel két különböző részecskének tulajdonítható, ugyanis vizes oldatban **1** klorid disszociációt szenved, melynek következtében az egyszeres pozitív töltésű $[\text{RuCl}(\text{H}_2\text{O})\text{L}(\text{C}_{10}\text{H}_{14})]^+$ (**2a**), illetve a kétszeres pozitív töltésű $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_2\text{L}(\text{C}_{10}\text{H}_{14})]^{2+}$ (**2b**) keletkezik:



5.2.2.b. ábra $[\text{RuCl}_2\text{L}(\text{C}_{10}\text{H}_{14})]$ (**1**) MALDI-TOF-MS spektruma;
mátrix: DHB, $[\text{M}-2\text{Cl}-\text{H}]^+$: 373 Da, $[\text{M}-\text{Cl}]^+$: 409 Da

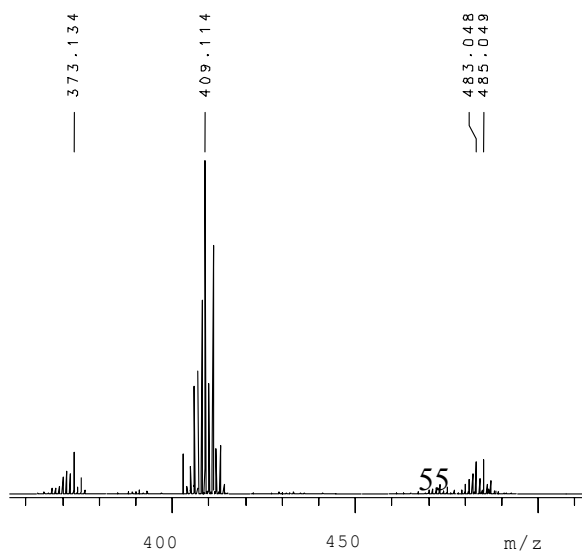
A komplex vizes oldatának vizsgálatakor felvetődött annak a lehetősége is, hogy az oldatban előforduló két részecske a disszociálatlan dikloro származék (**1**), valamint a mono-kloro – mono akva (**2a**) származék. Ennek a kérdésnek a tisztázása ESI-TOF-MS módszerrel történt.

A komplex vizes oldatának tömegspektrumában (5.2.2.c. ábra) 409 Da-nál megfigyelhető csúcs jelölheti egyrészt az **1**-ből klorid veszteséssel kialakuló kationt ($[\text{1}-\text{Cl}]^+$), másrészt a **2a**-ból H_2O eltávozásával létrejövő pozitív töltésű részecskét ($[\text{2a}-\text{H}_2\text{O}]^+$). A 373 Da tömegszámú csúcs lehet az **1**-ből két klorid veszteséssel (és egy proton leadásával) keletkező ion ($[\text{1}-2\text{Cl}-\text{H}]^+$), lehet a **2a**-ból klorid és víz kilépésével (és egy proton leadásával) képződő ion ($[\text{2a}-\text{Cl}-\text{H}_2\text{O}-\text{H}]^+$), de lehet a **2b**-ből két vízmolekula (és egy proton) veszteséssel kialakuló töltött részecske ($[\text{2b}-2\text{H}_2\text{O}-\text{H}]^+$) is. A komplex vizes fázisban felvett spektrumából tehát nem állapítható meg közvetlenül, hogy mely részecskék léteznek valójában az oldatban.



5.2.2.c. ábra $[\text{RuCl}_2\text{L}(\text{C}_{10}\text{H}_{14})]$ (**1**) ESI-TOF-MS spektruma;
 $[\text{M}-2\text{Cl}-\text{H}]^+$: 373 Da, $[\text{M}-\text{Cl}]^+$: 409 Da, $[\text{M}-2\text{Cl}+\text{H}_2\text{O}-\text{H}]^+$: 391 Da

Amennyiben az ESI-TOF spektrumot 0,1 M-os KCl oldatban vettem fel, azt tapasztaltam, hogy a 373 Da-nál található csúcs intenzitása erőteljesen lecsökkent a 409 Da-os csúcs intenzitásához képest, és 483 Da-nál egy új csúcs jelent meg (5.2.2.d. ábra). A tömegspektrometriás eredmények kiegészítése végett felvettem a kloridos oldat ^{13}C -NMR spektrumát is. A kérdéses karbén-régióban mindössze egy jel mutatkozott (169,8 ppm-nél), a közönséges vizes oldatban detektálható másik jel (169,5 ppm) eltűnt. A klorid feleslegben megmaradó jel nagy valószínűséggel **1**, vagy **2a** jele, hiszen a három részecske közül **2b** az, amelyik nem tartalmaz kloridot, így a klorid felesleg ennek nem kedvez. Az ESI-spektrum 483 Da-os csúcsa nem más, mint az **1**-es komplex K^+ -al ionizált jele ($[\text{1}+\text{K}]^+$), vagyis klorid feleslegben a disszociálatlan dikloro-származék (**1**) kimutatható az oldatban. De vajon közönséges vizes oldatban melyik két részecskét azonosíthatjuk?

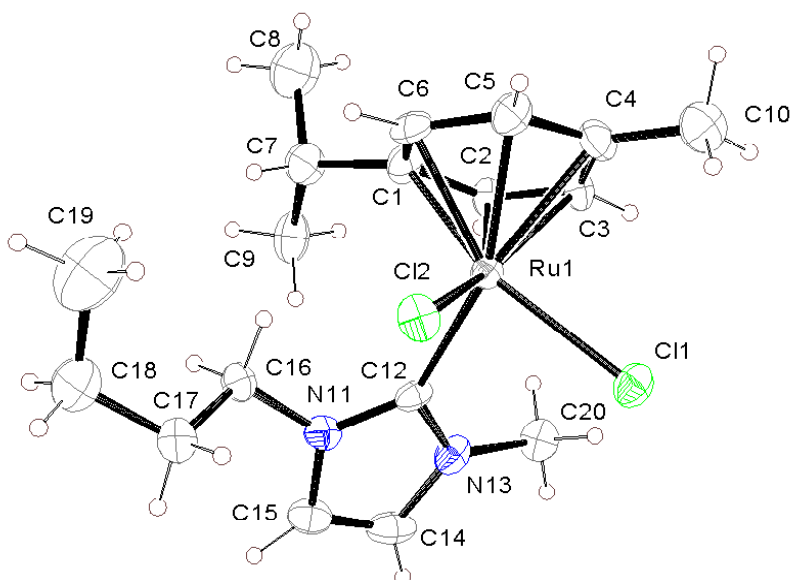


5.2.2.d. ábra $[\text{RuCl}_2\text{L}(\text{C}_{10}\text{H}_{14})]$ (**1**) ESI-TOF-MS spektruma 0,1 M-os KCl oldatban;
[M-2Cl-H]⁺: 373 Da, [M-Cl]⁺: 409 Da, [M+K]⁺: 483 Da

A válaszhoz tisztázni kellett hogy nem csak azért látszik-e a 483-as csúcs 0,1 M-os KCl oldatban, mert kálium ionok kerülnek a rendszerbe és a vizes oldatban egyébként is jelen lévő **1** részecskék ekkor válnak „láthatóvá” a spektrumban ($[\text{1}+\text{K}]^+$). Ennek megválaszolására **1**-t 0,1 M-os KNO₃-ban oldottam (így klorid nem, kizárólag kálium ionok kerültek a rendszerbe), és felvettem az oldat ESI-spektrumát. Azt tapasztaltam, hogy 483 Da-nál ($[\text{1}+\text{K}]^+$) nem jelentkezett semmiféle csúcs, vagyis klorid mentes vizes oldatban **1** nincs jelen.

A kísérletek alapján tehát megállapítható, hogy az előállított $[\text{RuCl}_2\text{L}(\text{C}_{10}\text{H}_{14})]$ komplex közönséges vizes oldatában két részecske, **2a** és **2b** létezik. 0,1 M-os KCl oldatban **2b** nincs jelen, a domináns részecske **2a**, viszont a disszociálatlan dikloro származék (**1**) kis mennyisége is kimutatható. Töményebb klorid-oldatokban (0,5 M KCl) **1** mennyisége növekszik, de még ekkor is **2a** az uralkodó forma. Kísérleteim során azt is megfigyeltem, hogy a klorid koncentráció növelésével csökken a komplex oldhatósága. Ez érthető is, hiszen egyre több semleges töltésű **1** lesz az oldatban, melynek oldhatósága rosszabb, mint akár **2a**-é, akár **2b**-é. Tömény klorid oldatokban (0,5 M) értékelhető ¹³C-NMR-spektrumokat sem sikerült produkálnom a minta rossz oldhatósága miatt, így ilyen esetekben a komplexek vizsgálatában egyedül a tömegspektrometriára hagyatkozhattam.

Az előállított Ru(II)-NHC karbén komplex kristályszerkezetét röntgen-krisztallográfiával határoztuk meg. Az egykristályok növesztése diklór-metános oldatból hexán rárétegzésével történt, melynek eredményeként vékony, hosszúk alakú, narancssárga színű kristályok keletkeztek (0,35 x 0,25 x 0,1 mm). Az elemi cella térfogata 1980,7(4) Å³-nek adódott (a = 10,7371(10) Å, b = 12,6167(10) Å, c = 16,800(2) Å, α = 112,05(1)°, β = 93,31(1)°, γ = 107,02(1)°), a sűrűsége 1,49 g/cm³-nek. A komplex Ortep-rajza az 5.2.2.e. ábrán látható. A meghatározott szerkezetek jóságát leíró R faktor a megengedett 10 % helyett 12 % volt, amit az okozott, hogy az egyik klorid ligandum két pozíciót foglalt el 85:15 arányban. Ilyen R érték mellett a molekula kötésszögeit és kötéstávolságait nem diszkutálhatjuk, de a kapott szerkezetből így is jól látszik az atomok várakozásnak megfelelő konnektivitása.

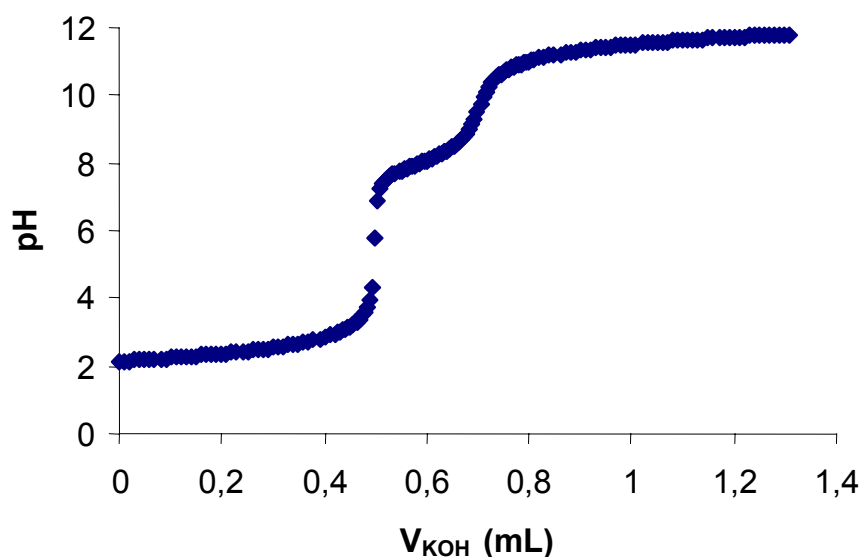


5.2.2.e. ábra $[\text{RuCl}_2\text{L}(\text{C}_{10}\text{H}_{14})]$ (1) Ortep-rajza

5.2.3. $[\text{RuCl}_2(1\text{-butil-3-metil-imidazol-2-ilidén})(p\text{-cimol})]$ (1) pH-potenciometrikus titrálása.

Átmenetifém – NHC-karbén komplexek sav-bázis sajátosságait mindezidáig nem tanulmányozták pH-potenciometrikus titrálással. A pH-potenciometrikus titrálás során elkészítjük a vizsgálandó komplex adott pH-jú (általában savas) oldatát, majd pontosan ismert koncentrációjú lúgoldatot adagolunk hozzá, miközben a pH változását detektáljuk a hozzáadott lúgoldat térfogatának függvényében. Ha a vizsgált komplexek protolitikus folyamatokban vesznek részt, akkor a kapott titrálási görbe pontjai alapján megadhatjuk az oldatban adott pH-n jelenlévő részecskék minőségét és mennyiségét.

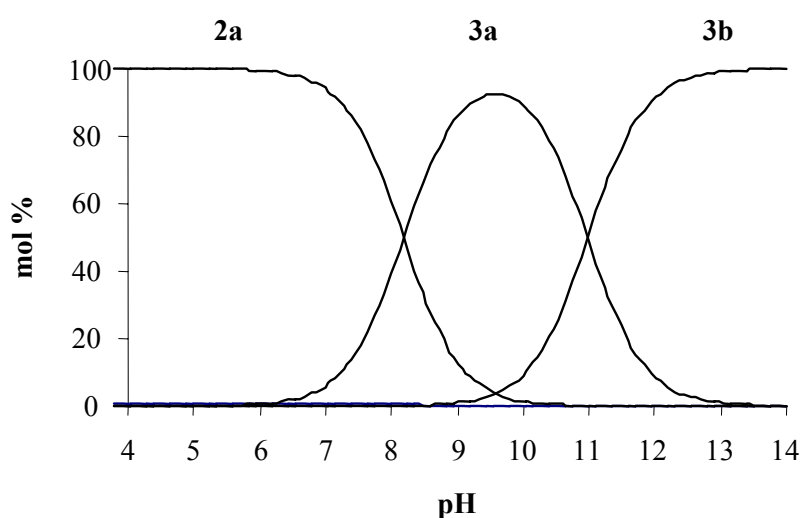
1 KOH oldattal történő pH-potenciometrikus titrálása során az 5.2.3.a. ábrán látható



titrálási görbéhez jutottam.

5.2.3.a. ábra $[\text{RuCl}_2\text{L}(\text{C}_{10}\text{H}_{14})]$ (**1**) pH-potenciometrikus titrálási görbéje
[KOH] = 0,1950 M, $[\text{Cl}^-]_{\text{össz}} = 0,1$ M, $[\text{HCl}] = 9,09 \times 10^{-3}$ M, $[\text{Ru}] = 3,67 \times 10^{-3}$ M, $T = 25^\circ\text{C}$

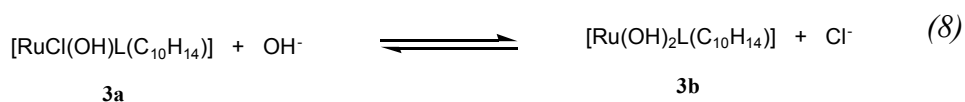
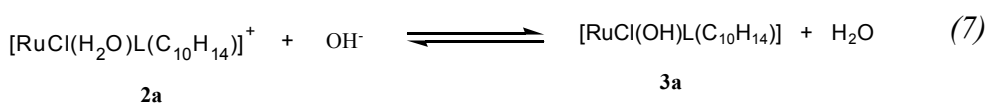
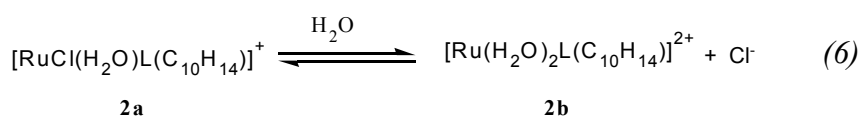
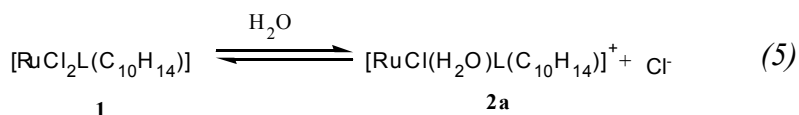
A kapott két lépcsős titrálási görbe alapján a megfelelő szoftverek segítségével részecske-eloszlást számoltam a pH függvényében (5.2.3.b. ábra). Jól látható, hogy 0,1 M-os klorid-oldatban pH 6-ig kizárólag **2a** van az oldatban. A lúg koncentrációjának növekedésével, pH 7 fölött megjelenik a $\text{H}_2\text{O} - \text{OH}^-$ cserével kialakuló $[\text{RuCl}(\text{OH})\text{L}(\text{C}_{10}\text{H}_{14})]$ (**3a**) komplex. pH 9 és pH 10 között ez a részecske található meg túlnyomórészt az oldatban. A pH további



emelkedésével azonban ennek a koncentrációja is csökken, a klorid ligandum fokozatosan OH^- -ra cserélődik, és pH 12-n gyakorlatilag már csak a dihidroxo-komplex ($[\text{Ru}(\text{OH})_2\text{L}(\text{C}_{10}\text{H}_{14})]$ (**3b**)) mutatható ki. Fontos megjegyezni, hogy a ^{13}C -NMR mérések tanulsága szerint a Ru(II)-kARBén komplex Ru-C kötése a vizsgált pH tartományban (2-12) mindvégig stabilis volt, még erősen savas közegben (pH 2) is, ahol a ligandum kARBén-szénatomjának protonálódását vártuk. A titrálás során oldhatatlan polimerek képződését, illetve kolloidális csapadék kiválását nem figyeltem meg, ami azért rendkívül fontos, mert így valóban *homogén* katalízist valósíthatunk meg vizes közegben a preparált komplexszel, a pH értékétől függetlenül.

5.2.3.b. ábra Részecske-eloszlás a pH függvényében
[KOH] = 0,1950 M, $[\text{Cl}^-]_{\text{össz}} = 0,1$ M, $[\text{HCl}] = 9,09 \times 10^{-3}$ M, $[\text{Ru}] = 3,67 \times 10^{-3}$ M, $T = 25^\circ\text{C}$

A következőkben összefoglalásképpen tekintjük át **1** közönséges vizes oldatában és lúgos pH-n a klorid-tartalmú oldatban fennálló egyensúlyokat:



Megjegyzendő, hogy klorid hozzáadása nélkül végezve a titrálást bonyolultabb rendszerhez jutottam volna, mivel az oldatban ilyenkor **2b** jelenlétével is számolni kell. **2b** hidroxid-ionnal való reakciójában **3b** keletkezése mellett elvileg lehetőség nyílik egy monohidroxo-monoakva komplex $[\text{Ru}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})\text{L}(\text{C}_{10}\text{H}_{14})]^+$ kialakulására is. Munkám során azonban ezt a rendszert nem tanulmányoztam.

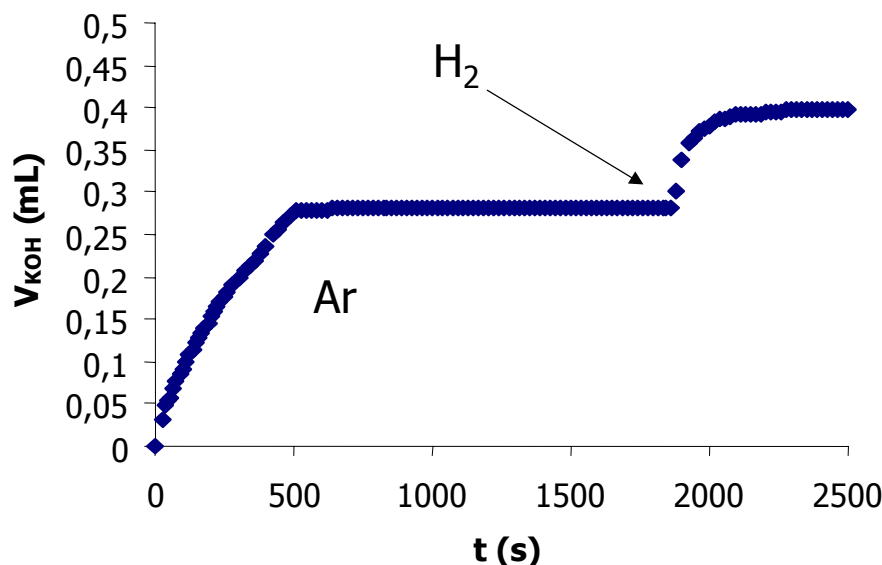
5.2.3.a. pH-sztatikus titrálások

A pH-sztatikus titrálások során valamilyen módon „megzavarjuk” az adott pH-n egyensúlyban lévő rendszert, melyben ennek hatására proton- (vagy hidroxid-ion-) termelő folyamat indul meg. A pH állandó értéken tartása érdekében a burettából automatikusan pontosan ismert koncentrációjú lúg (vagy sav) kerül az oldatba, melynek mennyiségét mérjük, így egyrészt könnyedén eldönthetjük, hogy a zavaró hatás vált-e ki H^+ (vagy OH^-) termelődést, másrészt meghatározhatjuk a keletkező protonok (illetőleg hidroxid-ionok) mennyiségét.

1 pH-sztatikus titrálását két pH-n (pH 7,5 és pH 10,8) végeztem el. A „zavaró” hatás hidrogén gáz átbuborékoltatása volt. Ezt a kísérletet azért végeztem el, hogy megtudjam, a komplex vizes oldatban reakcióba lép-e hidrogénnel, illetve hogy milyen módon történik a H_2

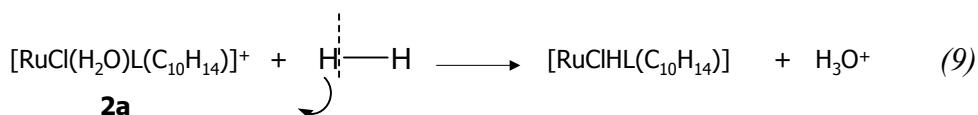
molekula aktiválása. A hidrogénnel való reakció ugyanis elengedhetetlen a komplex hidrogénező katalizátorként történő felhasználása szempontjából.

A pH 7,5-en kivitelezett pH-sztatikus titrálás titrálási görbéje az 5.2.3.a.1. ábrán látható.



5.2.3.a.1. ábra $[\text{RuCl}_2\text{L}(\text{C}_{10}\text{H}_{14})]$ (1) pH-sztatikus titrálási görbéje pH 7,5-en
 $[\text{KOH}] = 0,0965 \text{ M}$, $[\text{Cl}^-]_{\text{össz}} = 0,1 \text{ M}$, $[\text{Ru}] = 4,51 \times 10^{-3} \text{ M}$, $T = 60^\circ\text{C}$

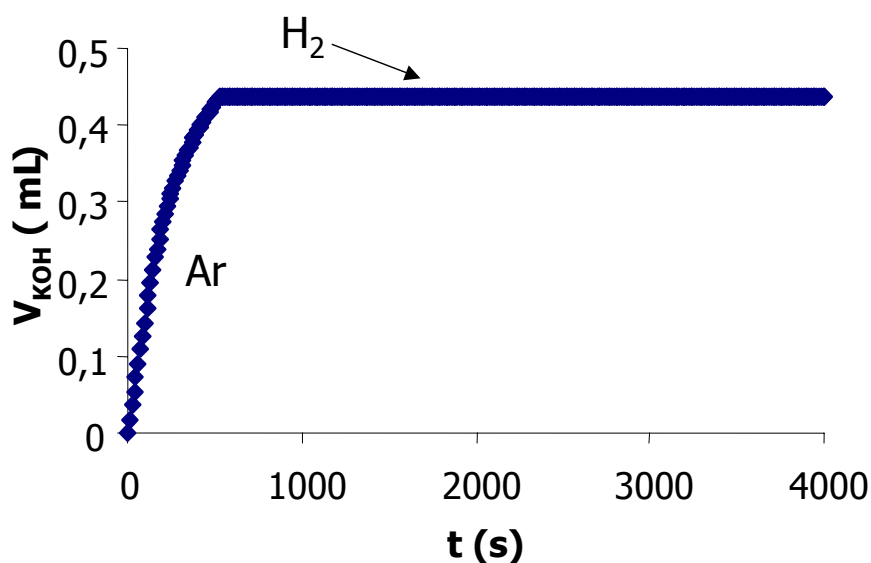
Titrálás előtt az ionerősséget 0,1 M-os KCl oldattal állítottam be, ekkor ugyanis **1** oldódását követően semleges oldatban **2a** a domináns részecske a rendszerben. A szilárd **1** komplex Ar alatt történő feloldásakor rögtön lúgfogyást tapasztaltam a bekövetkező hidrolízis miatt (0 - kb. 500 sec). A komplex feloldódása után továbbra is argont buborékolattam át az oldaton, de újabb KOH fogyást nem tapasztaltam. Kb. 1800 sec elteltével az argon áramot hidrogén áramra cseréltem. Ekkor az addig sárga oldat pirossá vált, és azonnali proton termelődés indult meg, melyet lúg adagolással semlegesített a rendszer. A görbe második lépcsője tehát **2a** hidrogénnel való reakcióját jelöli:



A reakcióban a hidrogén molekula heterolitikusan hasad hidrid-ionra és protonra. A víz – hidrid csere eredményeként a semleges töltésű $[\text{RuClHL}(\text{C}_{10}\text{H}_{14})]$ hidrid részecske alakul ki, a

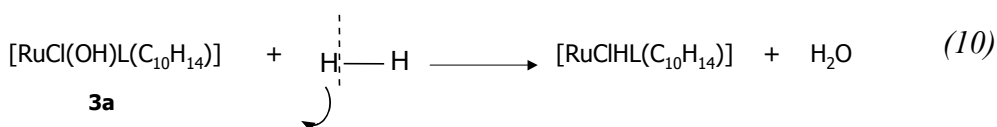
koordinációs szférából kilépő víz pedig a hidrogén molekulából származó protonnal H_3O^+ -t képez, mely a titrálás során lúg adagolását indukálja.

A pH 10,8-en felvett pH-sztatikus titrálási görbe eltér az előzőtől (5.2.3.a.2. ábra). **1** oldásakor az 5.2.3.b ábra alapján két különböző részecske alakul ki az oldatban: **3a**, illetve **3b**. Proton termelő folyamatot azonban ennél a titrálásnál csak akkor figyeltem meg, amikor a szilárd komplexet feloldottam. Az argon áramot hidrogén áramra cserélve nem indult be olyan folyamat mely KOH-fogyást vont volna maga után, annak ellenére, hogy az oldatban a hidrid részecskék kialakulását jelző piros szín megjelent. Mi tehát az oka annak, hogy színváltozást látunk, proton termelődést viszont nem?



5.2.3.a.2. ábra $[\text{RuCl}_2\text{L}(\text{C}_{10}\text{H}_{14})]$ (**1**) pH-sztatikus titrálási görbéje pH 10,8-en
 $[\text{KOH}] = 0,0965 \text{ M}$, $[\text{Cl}^-]_{\text{össz}} = 0,1 \text{ M}$, $[\text{Ru}] = 4,51 \times 10^{-3} \text{ M}$, $T = 60^\circ\text{C}$

Ha megvizsgáljuk **3a** és **3b** hidrogénnel történő reakcióját, arra jutunk, hogy a heterolitikusan hasadó hidrogén molekulából képződő hidrid-ion cserél a koordinációs szférában lévő hidroxid-ionnal, mely aztán a H_2 -ből származó protonnal reagálva víz képződését eredményezi. Bruttó proton termelés tehát nincs:

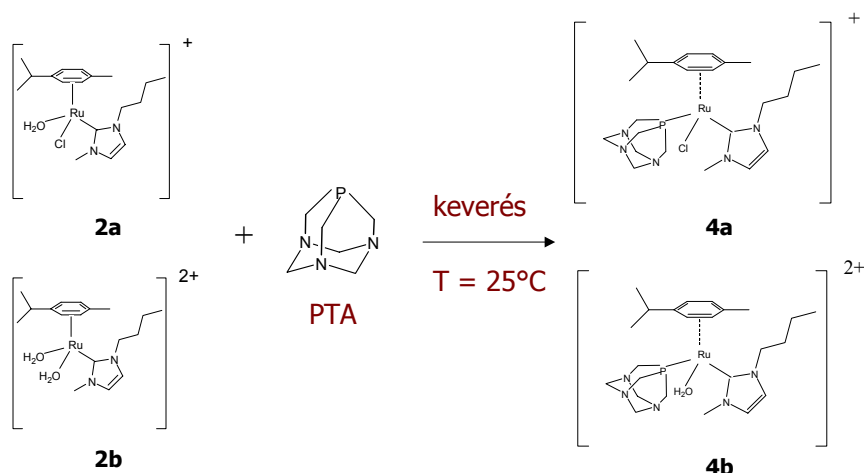


oldatában lévő részecskék miként fejtik ki hidrogénező aktivitásukat, miként aktiválják a hidrogén molekulát különböző pH-kon. A hidrogén molekula a komplexekkel való reakcióban minkét vizsgált pH-n heterolitikusan hasad, melynek eredményeképpen proton és hidrid-ion képződik.

5.2.4. $[RuClL(PTA)(p\text{-cimol})]$ (**4a**) és $[Ru(H_2O)L(PTA)(p\text{-cimol})]$ (**4b**) „in situ” vizes oldatban történő előállítása és szerkezetazonosítása

Munkám során ligandum-csere reakciókban karbén, illetve foszfin ligandumokat egyaránt tartalmazó Ru(II)-komplexeket is előállítottam. Foszfin ligandumként PTA-t alkalmaztam. A komplexképzés vizes oldatban egyszerűen úgy történt, hogy **1** vizes oldatához (semleges oldatban **2a** és **2b** van jelen) egy ekvivalensnyi mennyiségű PTA-t tartalmazó oldatot adtam, és a reakcióelegyet szobahőmérsékleten kevertettem. A két oldat összeöntésekor azonnali színváltozást tapasztaltam: az addig sárgás-barna oldat egyértelműen sárga színű lett. A végbemenő folyamatokat az 5.2.4.a. ábrán tüntettem fel.

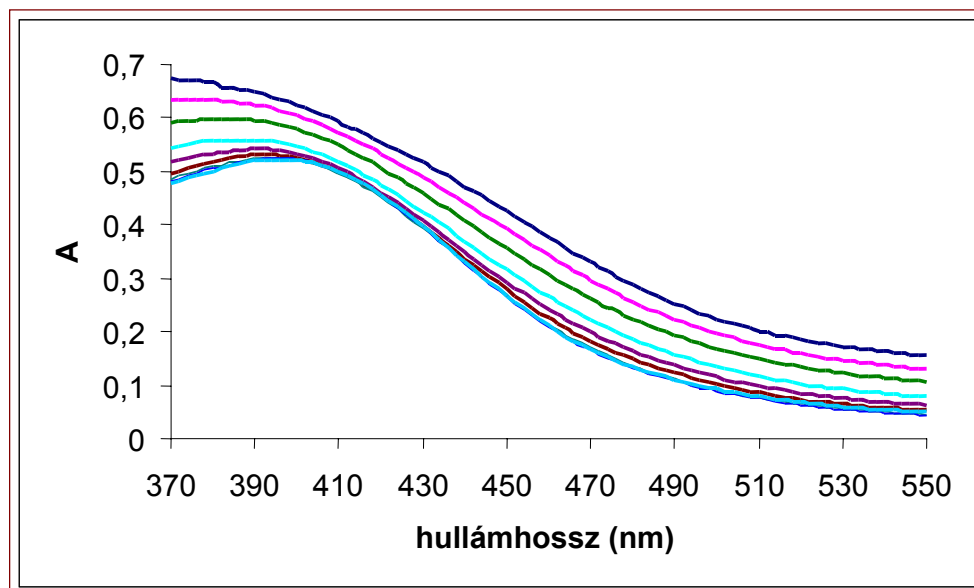
5.2.4.a. ábra $[RuClL(PTA)(p\text{-cimol})]^+$ (**4a**) és $[Ru(H_2O)L(PTA)(p\text{-cimol})]^{2+}$ (**4b**) előállítása



A reakcióban két komplex keletkezik: egy monokloro – mono-PTA (**4a**), valamint egy monoakva – mono-PTA (**4b**) származék. Arra vonatkozóan, hogy melyik részecske melyik részecskéből alakul ki (azaz hogy H_2O – PTA vagy Cl^- -PTA csere történik-e) nem áll rendelkezésre bizonyíték, mindössze a kiindulási és a termékelegy összetétele határozható meg.

A PTA tartalmú komplexek képződését fotometriásan követtem. Úgy jártam el, hogy felvettem a PTA-t még nem (csak **2a**-t és **2b**-t) tartalmazó oldat spektrumát 370 – 550 nm hullámhossz tartományban, majd kis adagokban megkezdtem a PTA oldat adagolását. A PTA oldatát olyan töménységre készítettem, hogy két ekvivalensnyi mennyiség hozzáadása még ne

okozzon jelentős hígulást. Az egyes részletek hozzáadását követően az oldatokat a küvettában jól összeráztam, majd kb. 5 perc állás után felvettem a spektrumukat (5.2.4.b. ábra).

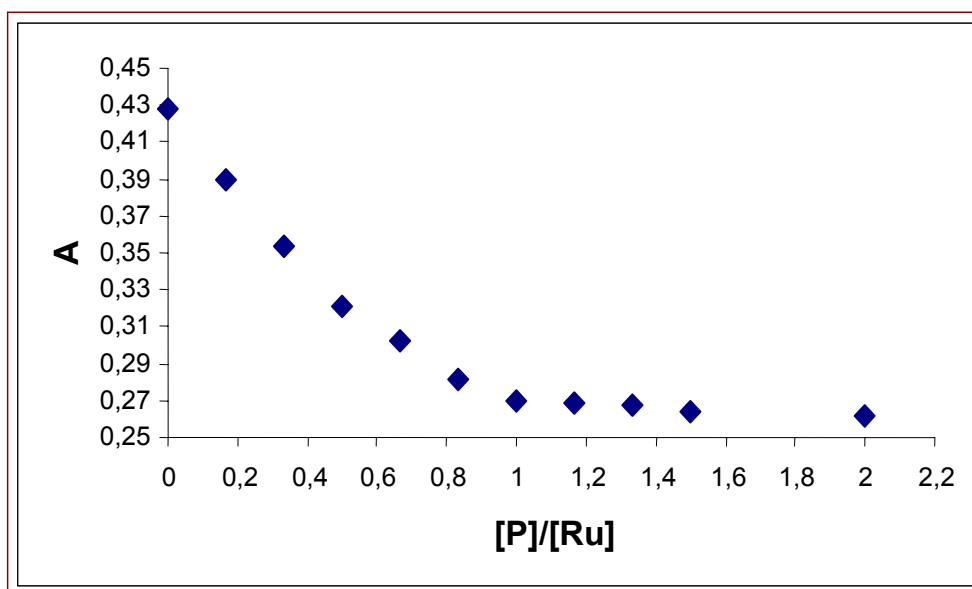


5.2.4.b. ábra Ru(II)-karbén-PTA komplexek képződésének nyomon követése spektrofotometriásan

[Ru] = 0,98 mM, [PTA-törzsoldat] = 16,25 mM, T = 25°C

Azt tapasztaltam, hogy eleinte PTA hozzáadására az oldat abszorbanciája a vizsgált hullámhossz-tartomány minden pontjában csökkent, majd mikor a Ru:PTA arány elérte az egyet, további spektrális változás már nem következett be.

A fotometriás vizsgálatokat úgy is elvégeztem, hogy a vizsgált tartományból kiválasztottam egy hullámhosszat ($\lambda = 450$ nm), és ezen a hullámhosszon mértem a PTA-adagolás hatására bekövetkező abszorbancia változást (5.2.4.c. ábra).

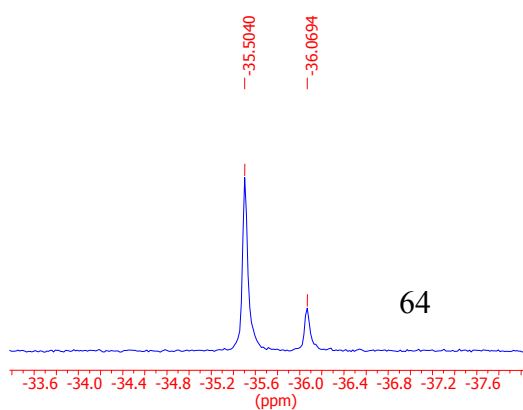


5.2.4.c. ábra Ru(II)-karbén-PTA komplexek képződésének tanulmányozása állandó hullámhosszon
 $[Ru] = 0,98 \text{ mM}$, $[PTA\text{-törzsoldat}] = 16,25 \text{ mM}$, $T = 25^\circ\text{C}$

A kapott görbéből jól látszik, hogy eleinte közel lineárisan csökken az abszorbanca a PTA adagolásával, majd töréspont következik a görbe lefutásában. A görbe nem lineárisan csökkenő szakasza ($[P]/[Ru] = 0,6-1$ között) azzal értelmezhető, hogy a PTA-részletek hozzáadása között eltelt 5 perc a kialakuló Ru(II)-karbén-PTA komplex nagyobb koncentrációja esetén már nem elegendő ahhoz, hogy a PTA teljes mennyisége beépüljön. Emiatt a lineáris szakasz meghosszabbításának és a töréspont utáni egyenes szakasznak a metszéspontja 1-nél kisebb $[P]/[Ru]$ aránynál található. A PTA-t kétszeres feleslegben tartalmazó oldat ($[P]/[Ru] = 2$) abszorbanciáját 24 óra múlva újra megmérve azt tapasztaltam, hogy a mért érték ($A = 0,223$) kisebb volt, mint az egy nappal korábban kapott ($A = 0,262$). A reakció teljessé válásához tehát szobahőmérsékleten meglehetősen hosszú időre van szükség.

A fotometriás mérésekből következtetésként levonható, hogy közönséges körülmények között csak egy ekvivalensnyi PTA épül be a Ru(II)-karbén komplex koordinációs szférájába. A képződő vegyes Ru(II)-karbén-foszfín komplexek vízben stabilisak. További reakciókra utaló jel (abszorbanca változás) nem figyelhető meg.

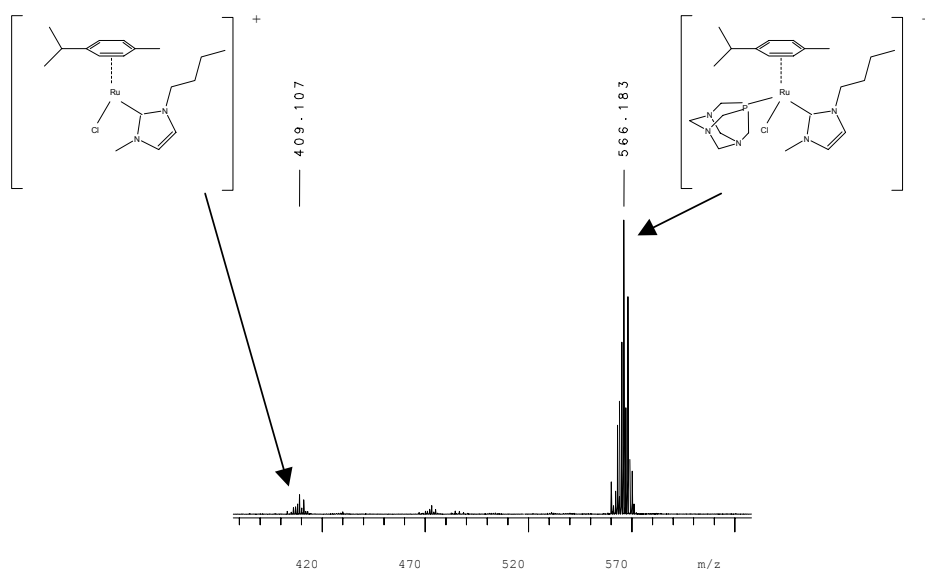
A **4a** és **4b** részecskék azonosítása ^{31}P -NMR-rel, illetve ESI-TOF-MS-sel történt. Az „in situ” előállított karbén/foszfín komplexek D_2O -val készült oldatának ^{31}P -NMR spektrumában két



jel látszott: -35,5 és -36,1 ppm-nél (5.2.4.d. ábra).

5.2.4.d. ábra 1 + PTA D₂O-val készült oldatának ³¹P-NMR spektruma

A ¹³C-NMR spektrumban szintén két jelet kaptam a karbén-szén tartományban 165,4, illetve 165,6 ppm-nél. A jelek azonosítása klorid hozzáadással történt; 0,1 M-os KCl oldatban a foszfor-spektrum -36,1 ppm-nél lévő jelének intenzitása jelentősen lecsökkent a másik jeléhez képest. Így ez a jel **4b**-hez, a -35,5 ppm-es jel **4a**-hoz rendelhető. 0,1 M-os klorid oldatban tehát **4a** az uralkodó részecske, ezt igazolja az alábbi ESI-TOF-spektrum is (5.2.4.e. ábra), ahol 566 Da-nál figyelhető meg az egyszerűen pozitív töltésű **4a** csúcsa. A 409 Da-os csúcs feltehetőleg a PTA leszakadásával kialakuló fragmens molekulaiont jelöli.



5.2.4.e. ábra [RuClL(PTA)(p-cimol)]⁺ (**4a**) ESI-TOF-MS spektruma;
[M]⁺ : 566 Da, [M-PTA]⁺: 409 Da

Mint az az eddig elvégzett kísérletekből kiderül, az előállított Ru(II)-NHC karbén komplexek tehát jól oldódnak vízben, rendkívül stabilisak az erős C-Ru kötésnek köszönhetően (oxigén jelenlétében is dolgozhatunk velük), ezen kívül hidrogénnel is reakcióba lépnek. A fenti tulajdonságok alapján a komplexeket jó eséllyel alkalmazhatjuk katalizátorként különböző hidrogénezési reakciókban.

5.3. Ru(II)-N-heterociklusos karbén komplexek alkalmazása homogénkatalitikus folyamatokban

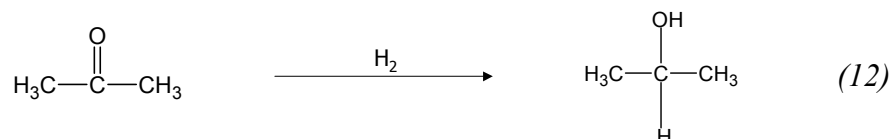
Az előállított NHC-karbén komplexek többféle kémiai reakció katalizálására is alkalmazhatónak bizonyultak vizes közegben, enyhe reakciókörülmények között.

5.3.1. Hidrogénezés

Kutatómunkám legfőbb célja az volt, hogy biológiai membránok hidrogénezésére alkalmas katalizátort állítsak elő. A hidrogénező katalizátorként funkcionáló ruténium-komplexek aktivitását és kemoselektivitását olyan egyszerű szubsztrátumok hidrogénezési reakcióiban derítettem fel, melyek esetében egyszerűen és gyorsan meghatározhatók voltak a konverzió értékek (^1H -NMR technikával).

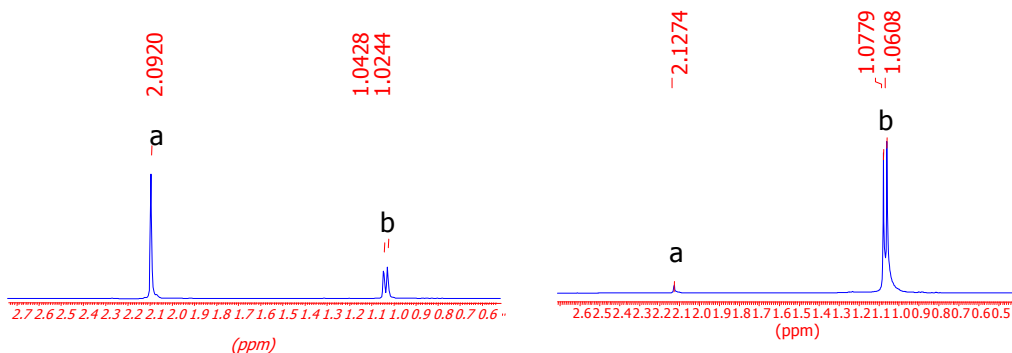
Az irodalomból nem állt rendelkezésre olyan adat, mely szerint vízdoldható Ru(II)-NHC-karbén komplexet használtak volna telítetlen szubsztrátumok hidrogénezésére. Ez a tény is hozzájárult ahhoz, hogy az alábbi C=C és C=O kötéseket tartalmazó vegyületek hidrogénezését megvalósítsam, az előállított katalizátorok jelenlétében.

Az acetone C=O kötésének hidrogéneződése során 2-propanol keletkezik:



Kísérleteimhez azért választottam acetont, hogy megtudjam, a Ru(II)-karbén komplexek aktívak-e ketonok hidrogénezésében. Az **1** komplexhez hasonló szerkezetű $[\text{RuCl}_2(\text{PR}_3)(\text{C}_{10}\text{H}_{14})]$ (PR_3 = PTA vagy *m*TPPTS) foszfin analóg ugyanis inaktívnak bizonyult ketonok hidrogénezésében^{62,63}.

Aceton hidrogénezését **1**, illetve **1**+PTA (**4a**+**4b**, továbbiakban **4**) katalizátorokkal végeztem el pH 6,9-en, 80 °C-on. Ezen körülmények között **1** katalizátorral 33,6 %-os konverziót értem el, **4**-gyel ennek a háromszorosát, 98,2 %-ot. Az acetone átalakulását ^1H -NMR-rel követtem (5.3.1.a. és b. ábra).



5.3.1.a. ábra Aceton hidrogénezése **1** katalizátorral

$p(\text{H}_2) = 10 \text{ bar}$, $T = 80^\circ\text{C}$, $[\text{Ru}] = 4,73 \text{ mM}$,

$[\text{acetone}] = 667 \text{ mM}$, $t = 1 \text{ óra}$, $\text{pH} = 6,9$

a: acetone ($-\text{CH}_3$), b: 2-propanol ($\text{CH}-\text{CH}_3$)

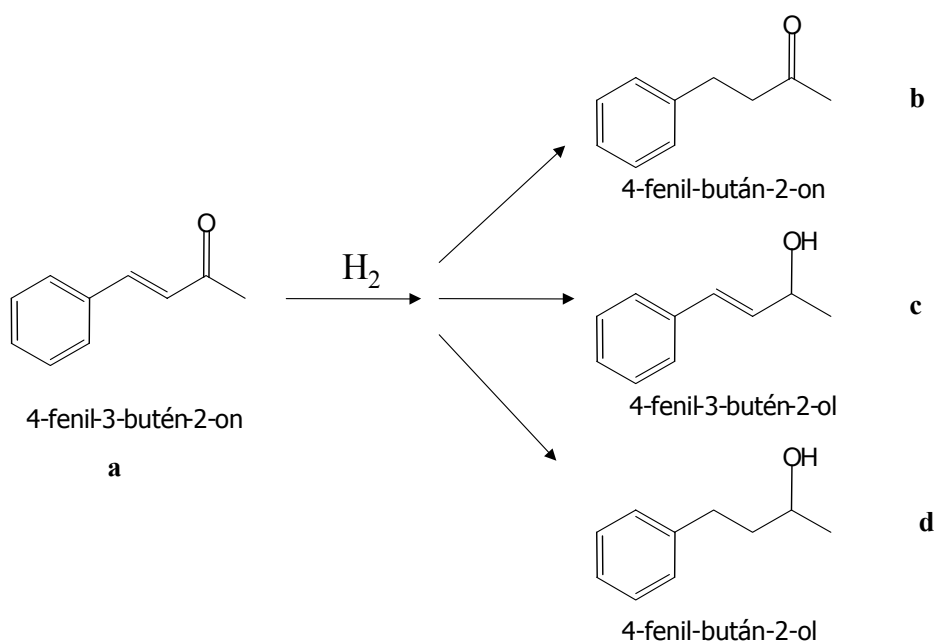
5.3.1.b. ábra Aceton hidrogénezése **4** katalizátorral

$p(\text{H}_2) = 10 \text{ bar}$, $T = 80^\circ\text{C}$, $[\text{Ru}] = 4,73 \text{ mM}$,

$[\text{acetone}] = 667 \text{ mM}$, $t = 1 \text{ óra}$, $\text{pH} = 6,9$

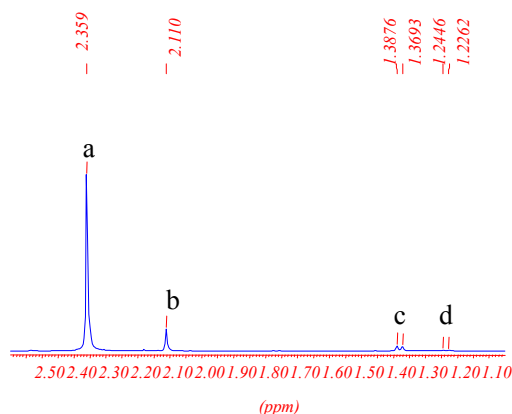
Egy másik keton, acetofenon hidrogénezési reakcióiban is **4** bizonyult aktívabbnak (**1**: 28,4 %. **4**: 46,1 %). Megállapíthatjuk tehát, hogy mind a karbén, mind pedig a karbén/PTA ligandumokkal rendelkező komplex aktív ketonok hidrogénezésében, szemben a karbént nem tartalmazó foszfin analógokkal.

A következőkben olyan szubsztrátumot kerestem, amely $\text{C}=\text{C}$ és $\text{C}=\text{O}$ kötést egyaránt tartalmaz. Választásom a benzilidén acetone (4-fenil-3-buten-2-on) esett, melynek hidrogénezése során három különböző termék képződhet (5.3.1.c. ábra) attól függően, hogy a $\text{C}=\text{C}$ (b), a $\text{C}=\text{O}$ (c), vagy mind a két kötés hidrogéneződik-e (d).

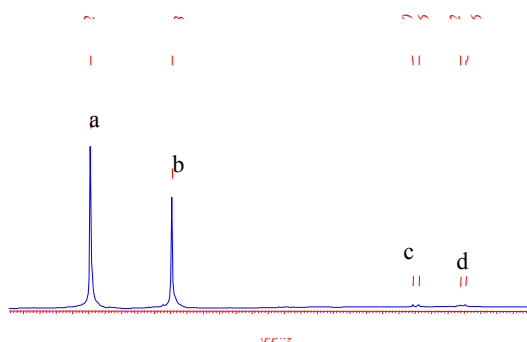


5.3.1.c. ábra Benzilidén-aceton hidrogénezése

Az 5.3.1.d. és e. ábrán az **1**, illetve **4** katalizátor jelenlétében végzett hidrogénezés eredményét tanulmányozhatjuk.



5.3.1.d. ábra Benzilidén-aceton hidrogénezése **1** katalizátorral $p(\text{H}_2) = 10$ bar, $T = 80^\circ\text{C}$, $[\text{Ru}] = 4,73$ mM, $[\text{benzilidén-aceton}] = 667$ mM, $t = 1$ óra, $\text{pH} = 6,9$



5.3.1.e. ábra Benzilidén-aceton hidrogénezése **4** katalizátorral $p(\text{H}_2) = 10$ bar, $T = 80^\circ\text{C}$, $[\text{Ru}] = 4,73$ mM, $[\text{benzilidén-aceton}] = 667$ mM, $t = 1$ óra, $\text{pH} = 6,9$

Azonos körülmények között **1**-el 18,7 %-os konverziót tapasztaltam, míg a hidrogénezés szelektivitása b-re, azaz a C=C kötés telítésével kialakuló 4-fenil-bután-2-onra 61,7 %-os volt. **4** alkalmazásával 42,3 %-os konverziót, és 91,9 %-os szelektivitást értem el, vagyis a C=O kötés elhanyagolható mértékben hidrogéneződött a C=C kötés mellett.

A hidrogénezési reakciókat többféle szubsztrátummal is elvégeztem. A kapott eredményeket az 5.3.1. táblázatban tüntettem fel.

Szubsztrátum	Katalizátor			
	[RuCl ₂ L(C ₁₀ H ₁₄)] (1)		1+PTA (4)	
	Konverzió (%)	TOF (h ⁻¹)	Konverzió (%)	TOF (h ⁻¹)
Aceton	33,6	47	98,2	139
Acetofenon	28,4	40	46,1	65
Allil-alkohol	85,6	121	95,6	135
Benzilidén- aceton	18,7	26	42,3	60
Fahéjaldehid	27,3	39	42,0	59
Propanal	78,3	110	86,2	122
4-sztirol- szulfonsav Na-só	3,5	5	27,4	39

5.3.1. táblázat Különféle szubsztrátumok hidrogénezése **1** és **4** katalizátorokkal
 $p(\text{H}_2) = 10 \text{ bar}$, $T = 80^\circ\text{C}$, $[\text{Ru}] = 4,73 \text{ mM}$, $[\text{szubsztrátum}] = 667 \text{ mM}$, $t = 1 \text{ óra}$, $\text{pH} = 6,9$

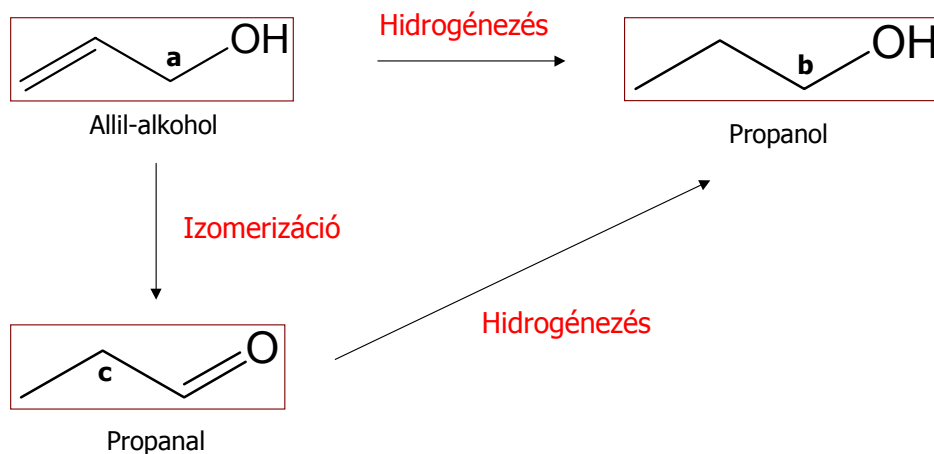
A **4** katalizátor minden vizsgált szubsztrátum esetében nagyobb aktivitást mutatott, mint **1**. Érdemes kiemelni az aceton, az allil-alkohol, illetve a propanal hidrogénezését, hiszen itt különösen nagy (90 % körüli) konverziókat tapasztaltam. Az **1** katalizátorral alig (3,5 %) hidrogénezhető 4-sztirol-szulfonsav Na sója **4** jelenlétében 27,4 %-os konverziót szenvedett. A viszonylag kis reaktivitás oka valószínűleg az, hogy ebben az esetben a hidrogénezés más mechanizmus (gyökös) szerint játszódik le.

5.3.2. Redox izomerizáció

Allil-alkohol hidrogénezése során derült ki, hogy az előállított Ru(II)-kARBÉN komplexek aktív katalizátorai a redox izomerizációs reakcióknak. Az irodalomban eddig nem volt példa olyan vízzoldható átmenetifém NHC-kARBÉN komplexre, mely ilyen típusú reakciókban mutatott volna aktivitást.

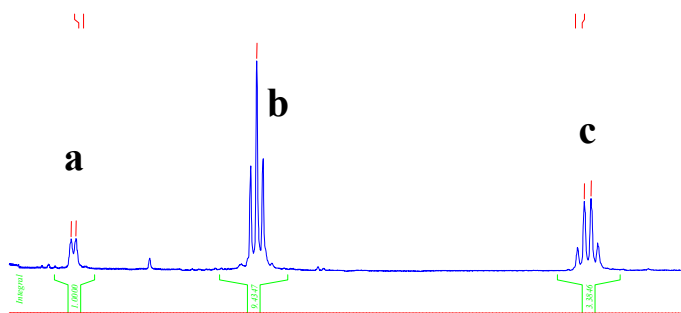
Az allil-alkohol **1**-el történő hidrogénezése során a C=C kettős kötés telítésével kialakuló 1-propanol keletkezését vártam. Meglepő módon azonban a termékelegy vizsgálata során kiderült, hogy a ¹H-NMR spektrumokban plusz jelek mutatkoznak. Mint később bebizonyosodott, a hidrogénezés körülményei között két termék: 1-propanol, valamint propanal keletkezik. Érdekes, hogy az izomerizáció csak hidrogén jelenlétében megy végbe, vagyis az átalakulás valamilyen hidrid részecskéhez kötött.

Megfigyeltem azt is, hogy a termékek aránya függ az alkalmazott körülményektől (reakcióidő, hőmérséklet). Ha rövidebb ideig futtatjuk a reakciót (80°C-on 60-90 perc), a propanal viszonylag nagy mennyiségben keletkezik. Ha azonban kellően hosszú időt biztosítunk a reakció számára (3-4 óra), az is elérhető, hogy kizárólag csak propanol képződjön. A kísérleti eredmények szerint az allil-alkohol hidrogénezése során az 5.3.2.a. ábrán vázolt folyamatokkal számolhatunk.



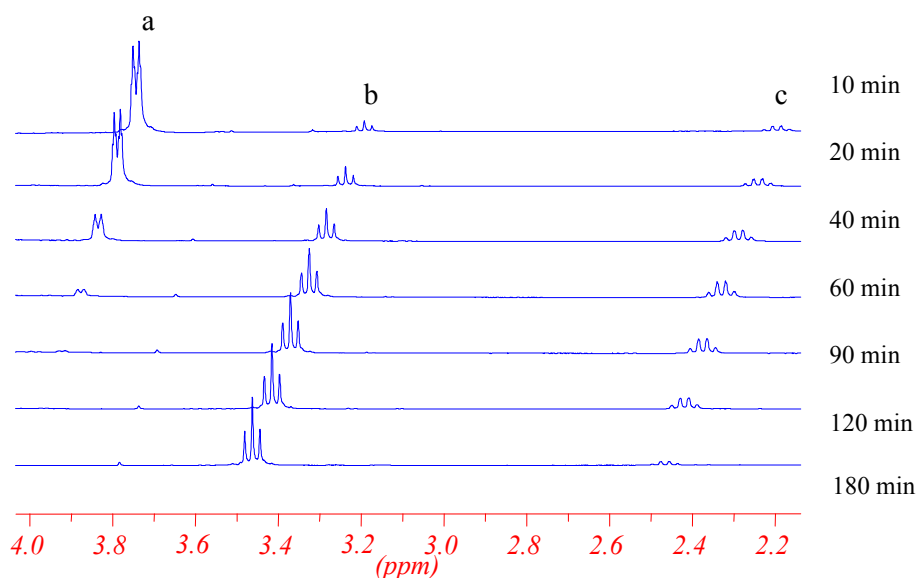
5.3.2.a. ábra Allil-alkohol hidrogénezése és redox izomerizációja

Az allil-alkohol C=C kötésének hidrogénezésével propanol, izomerizációjával propanal alakul ki. A képződő aldehid C=O kötése azonban ugyancsak hidrogeneződhet, melynek eredményeképpen szintén propanol keletkezik. A mindhárom részecskét tartalmazó reakcióelegy ^1H -NMR spektruma az 5.3.2.b. ábrán figyelhető meg.



5.3.2.b. ábra Allil-alkohol hidrogénezés utáni ^1H -NMR spektruma; $p(\text{H}_2) = 10$ bar, $T = 80^\circ\text{C}$, $[\text{I}] = 4,73$ mM, $[\text{allil-alkohol}] = 667$ mM, $t = 1$ óra, $\text{pH} = 6,9$ (**a**:allil-alkohol, **b**: propanol, **c**: propanal)

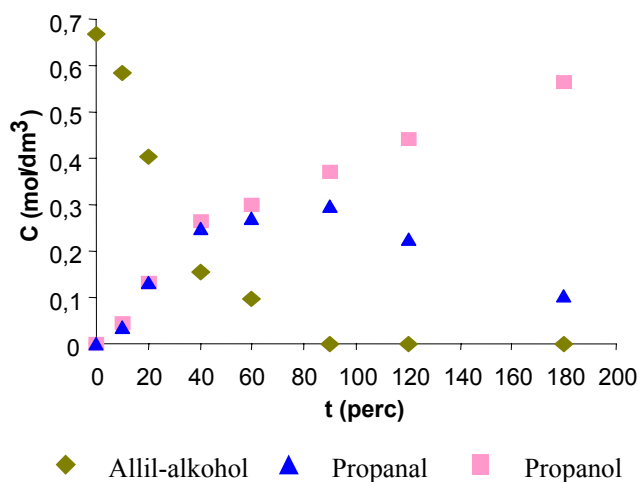
Munkám során megvizsgáltam, hogy a hidrogénezési reakció során a reakcióelegyből különböző időközönként mintát véve hogyan alakul az egyes komponensek egymáshoz viszonyított aránya. A kapott ^1H -NMR spektrumokat (5.3.2.c. ábra) szemügyre véve láthatjuk, hogy 10 perc elteltével még csak épphogy kezdenek megjelenni a termékek jelei. Kb. 60 perc után az allil-alkohol elfogy, megindul a propanal hidrogéneződése propanollá. Végül a reakcióelegyben már csak az alkohol mutatható ki.



5.3.2.c. ábra A konverzió időbeli változása

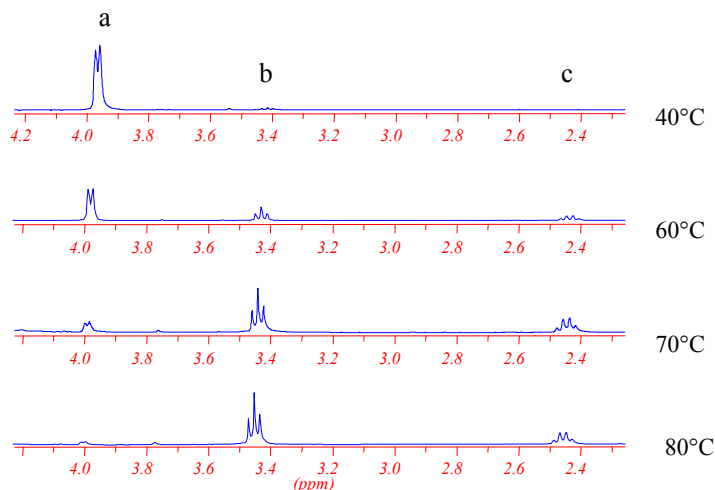
$p(\text{H}_2) = 10 \text{ bar}$, $T = 80^\circ\text{C}$, $[\mathbf{1}] = 4,73 \text{ mM}$, $[\text{allil-alkohol}] = 667 \text{ mM}$, $\text{pH} = 6,9$

Mindaddig, amíg a kiindulási allil-alkohol kb. 90 %-a át nem alakul, a két termék egymással párhuzamosan, nagyjából 1:1 arányban képződik. Az allil-alkohol elfogyását követően megkezdődik a propanal átalakulása propanollá (5.3.2.d. ábra) A propanal egyébként meglehetősen gyorsan reagál hidrogénnel mind az **1**, mind pedig a **4**-es katalizátor jelenlétében (5.3.1. táblázat).



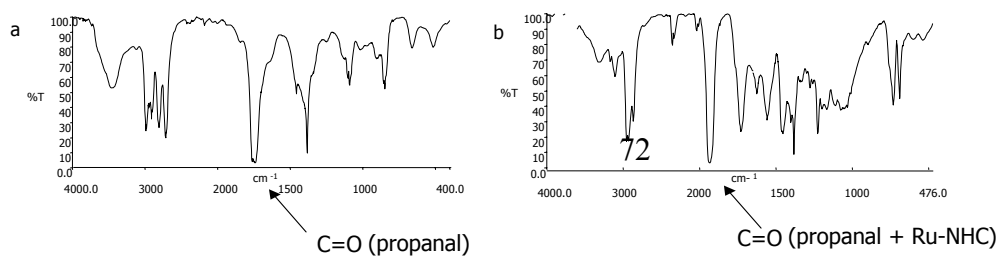
5.3.2.d. ábra Allil-alkohol hidrogénezése és izomerizációja – reaktánsok koncentrációjának időbeli változása; $p(\text{H}_2) = 10$ bar, $T = 80^\circ\text{C}$, $[\text{I}] = 4,73$ mM, $[\text{allil-alkohol}] = 667$ mM, $\text{pH} = 6,9$

Az allil-alkohol hidrogénezését **1** katalizátorral különböző hőmérsékleteken elvégezve azt tapasztaltam, hogy alacsony hőmérsékleten (40°C) egy órás reakcióidő alatt sem történik átalakulás. A hőmérséklet emelésével azonban nő a konverzió, 80°C -on a kezdeti allil-alkohol mennyiség csaknem 100 %-a elreagál (5.3.2.e. ábra).



5.3.2.e. ábra Allil-alkohol hidrogénezése és izomerizációja – A konverzió hőmérsékletfüggése; $p(\text{H}_2) = 10$ bar, $t = 1$ óra, $[\text{I}] = 4,73$ mM, $[\text{allil-alkohol}] = 667$ mM, $\text{pH} = 6,9$

Az izomerizációs reakció egyik termékeként képződő propanal önmagában történő hidrogénezése során IR-spektroszkópiával megvizsgáltam, hogy a $\text{C}=\text{O}$ rezgések tekintetében van-e különbség a tiszta propanal, illetve az **1** katalizátort is tartalmazó hidrogénezés utáni



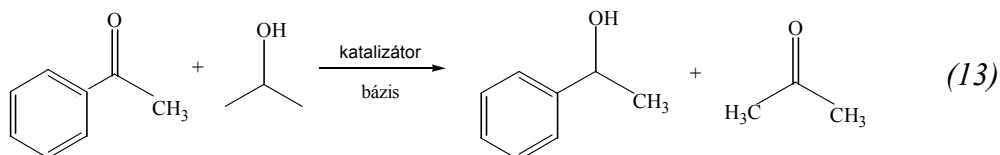
propanalos oldat között (5.3.2.f. ábra)

5.3.2.f. ábra Propanal IR-spektruma (a), Propanal + **1** IR-spektruma (b) ($p(\text{H}_2) = 10 \text{ bar}$, $t = 1 \text{ óra}$, $T = 70^\circ\text{C}$, $[\mathbf{1}] = 4,73 \text{ mM}$, $[\text{propanal}] = 667 \text{ mM}$)

A hidrogénezési reakciót 1 óra elteltével állítottam le, ekkor a kiindulási propanal 65,4 %-a alakult át. Az IR-spektrumokat a reakcióelegy bepárlása után KBr-ban vettem fel úgy, hogy a minta diklór-metános oldatát a már elkészített pasztillára cseppentettem. Azt tapasztaltam, hogy a tiszta propanal IR-spektrumában megfigyelhető karbonil-sáv ($\nu = 1743 \text{ cm}^{-1}$) az **1** jelenlétében hidrogénezett propanal esetében eltolódik (1937 cm^{-1}). Ennek az a magyarázata, hogy a hidrogénezés körülményei között egy ruténium-karbonil ($\text{Ru} \cdots \text{C}=\text{O}$) kötés alakul ki, mely megváltoztatja a karbonil rezgés frekvenciáját.

5.3.3. Hidrogén transzfer reakciók

A vizsgált Ru(II)-NHC karbén komplexek hidrogén transzfer reakciók katalízisében is aktívnak bizonyultak. Kísérleteim során az acetofenont választottam szubsztrátumnak, a hidrogén donor reakciópartner 2-propanol volt. A hidrogén transzfer a következő egyenlet szerint megy végbe:



A reakciókban a 2-propanol nemcsak a reakciópartner szerepét tölti be, de oldószerül is szolgál a szubsztrátum, illetve a katalizátor számára. A hidrogén transzfer lejátszódásához szükség van valamilyen bázisra, mely elősegíti a hidrogén-donor dehidrogéneződését. Kísérleteim során K_2CO_3 -ot és KOH-ot használtam erre a célra. A reakciókat **4** jelenlétében játszottam le, a konverziókat ^1H -NMR-rel határoztam meg. Bizonyos esetekben vizet adtam a reakcióelegyhez, mely a kapott konverziókat jelentősen lecsökkentette. A különböző bázisok jelenlétében kapott konverziókat és óránkénti katalitikus ciklusszámokat (TOF) az 5.3.3. táblázatban tüntettem fel.

Bázis	Hozzáadott víz	Konverzió (%)	TOF (h^{-1})
-------	----------------	---------------	-------------------------

K ₂ CO ₃	-	67,97	9,44
K ₂ CO ₃	+	8,11	1,13
KOH	-	96,33	13,38
KOH	+	0,21	0,03

5.3.3. táblázat Acetofenon hidrogén transzfer reakciója K₂CO₃ és KOH jelenlétében **4** katalizátorral

t = 2,5 óra, [4] = 25,74 mM, [acetofenon] = 1,00 M, [bázis] = 475,54 mM, V_{reakcióelegy} = 1,12 ml, hozzáadott víz: 0,1 ml

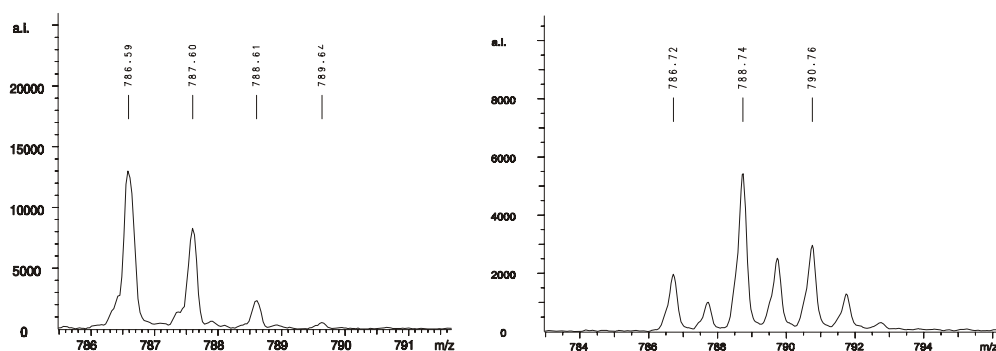
A két bázis közül a KOH alkalmazása esetén kaptam nagyobb konverziókat, ami érthető is, hiszen a KOH erősebb bázis, mint a K₂CO₃, így a 2-propanol dehidrogénezésében eredményesebben használható. Vízet adva a reakcióelegyekhez a hidrogén transzfer reakciók konverziói visszaestek, KOH esetében gyakorlatilag nem történt átalakulás. Ez a jelenség kétféleképpen is magyarázható. Elképzelhető egyrészt, hogy a reakció során kialakuló ruténium-akva komplex sokkal stabilisabb, mint az alkoholos komplex, így gyakorlatilag a víz kiszorítja az alkoholt a koordinációs szférából, megakadályozva annak átalakulását. Az is okozhatja azonban a konverziók csökkenését, hogy víz jelenlétében a hidroxid-ionok hidratálódnak, és deprotonáló képességük lecsökken a „csupasz” ionokéhoz képest.

5.4. Lipidkeverékek hidrogénezése NHC-karbén komplexekkel

5.4.1. DOPC hidrogénezése

Az új Ru(II)-NHC-karbén komplexek katalitikus aktivitásának megállapítására a tömegspektrometriásan jól mérhető DOPC-t választottam szubsztrátumnak. Az egyéb telítetlen szubsztrátumok hidrogénezése során jól bevált kísérleti körülményeken változtatnom kellett, hiszen – minthogy a katalizátort a későbbiekben élő sejtek membránjainak hidrogénezésére szeretnénk felhasználni – a hőmérséklet nem haladhatta meg a 37°C-ot. Emiatt azonban nagyobb katalizátor koncentrációkra, és hosszabb reakcióidőkre volt szükség.

A DOPC hidrogénezés előtti, valamint **1**-el történő hidrogénezése utáni MALDI-spektrumai, illetve a hidrogénezés körülményei az 5.4.1.a. és b. ábrán láthatóak.



5.4.1.a. ábra DOPC MALDI-spektruma**5.4.1.b. ábra** Hidrogénezett DOPC MALDI-spektruma; [1]=1,88mM, [DOPC]=1,27mM
T=37°C, p(H₂)=10 bar, t=3 óra

Ha a hidrogénezett lipid spektrumát összevetjük az 5.1.1.c. ábrán feltüntetett spektrummal, jól láthatjuk, hogy amíg Pd(QS)₂ katalizátorral a félig telített (18:0-18:1) (m/z = 788 Da) lipid csekély mennyiségben képződik (5,94 %), addig **1** jelenlétében a félig telített forma (55,26 %) dominál a hidrogénezett reakcióelegyben (5.4.1.a. táblázat).

Lipid zsírsavösszetétele	Lipid mennyisége a hidrogénezett keverékben (mol%)
18:1-18:1	21,65
18:0-18:1	55,26
18:0-18:0	23,09

5.4.1.a. táblázat DOPC hidrogénezés utáni termékelegeye
(18:1 → olajsav, 18:0 → sztearinsav)

Az **1** katalizátor tehát valószínűleg egy C=C kötés hidrogénezését követően „elengedi” a szubsztrátumot, a második telítetlen kötés hidrogénezése csak akkor következik be, ha a katalizátor és a félig telített lipid molekula újra kapcsolatba kerül.

Ha összehasonlítjuk a Pd(QS)₂, illetve az **1**-es komplex aktivitását, azt állapíthatjuk meg, hogy az előbbi katalizátor jóval aktívabb, hiszen kisebb koncentrációban (12,1 µM), 30°C-on, 2 perces reakcióidő alatt okoz majdnem akkora (41,42 %) mértékű hidrogéneződést, mint a [RuCl₂L(C₁₀H₁₄)] (**1**) (Konverzió: 50,72 %) 37°C-on, 3 óra alatt. Élő sejtek hidrogénezésekor azonban nem feltétlenül előnyös, ha a katalizátor rövid idő alatt nagy mértékű hidrogéneződést okoz, mivel a membrán hirtelen annyira „megkeményedhet”, hogy a sejtek elpusztulnak. A sejtmembrán módosításakor gyakran célravezetőbb a lassú, kis konverziókig menő hidrogénezés.

A DOPC hidrogénezését az iméntivel teljesen megegyező körülmények között (lásd 5.4.1.b. ábra aláírása) a PTA tartalmú **4** katalizátorral elvégezve nem tapasztaltam hidrogéneződést. Megjegyzendő, hogy a reakció során az oldat színváltozása (sárgásbarnából piros) sem következett be, vagyis a hidrogénezésben kulcsszerepet játszó hidrid részecske nem

alakult ki 37°C-on. Érdekes viszont, hogy más szubsztrátum esetében (*Synechocystis*, szójalecitin), illetve közönséges vizes oldatban már ezen a hőmérsékleten is tapasztaltam színváltozást és csekély mértékű hidrogénező aktivitást.

A DOPC magasabb hőmérsékleten végzett hidrogénezésekor a konverzió jelentősebb volt a PTA-t is tartalmazó **4** katalizátor esetén, mint az **1** jelenlétében kivitelezett reakció során (5.4.1.b. táblázat).

Hőmérséklet (°C)	Katalizátor	
	[RuCl ₂ L(C ₁₀ H ₁₄)] (1)	[RuCl(PTA)L(C ₁₀ H ₁₄)] ⁺ / [Ru(H ₂ O)(PTA)L(C ₁₀ H ₁₄)] ²⁺ (4)
	Konverzió (%)	Konverzió (%)
37	50,72	0
50	88,78	92,87
65	95,79	100
80	100	100

5.4.1.b. táblázat DOPC hidrogénezése **1** és **4** katalizátorokkal különböző hőmérsékleteken

[katalizátor] = 1,88mM, [DOPC] = 1,27mM, p(H₂) = 10 bar, t = 3 óra, pH = 6,9

A tapasztaltak alapján megállapítható, hogy alacsonyabb hőmérsékleteken (30-40°C) **1**, magasabb hőmérsékleteken **4** hidrogénező aktivitása nagyobb. A **4** komplexből hidrid részecske képződését eredményező folyamatnak feltehetőleg nagyobb az aktiválási energiája, így a hidrid csak magasabb hőmérsékleten alakul ki jelentős mennyiségben.

5.4.2. *Synechocystis* PCC 6803-ból izolált lipidkeverék hidrogénezése

A *Synechocystis* PCC 6803 tilakoid membránjából izolált négykomponensű lipidkeverék egyedi lipidféleségeinek reaktivitását sikerrel tanulmányoztam Pd(QS)₂-vel katalizált hidrogénezési reakciókban. Ezen előzmény után a *Synechocystis*-lipidkeveréket alkalmasnak véltem a Ru(II)-NHC-karbén katalizátorok aktivitásának vizsgálatára, valamint az egyes lipidek reaktivásbeli eltéréseinek meghatározására is.

A hidrogénezéseket továbbra is enyhe körülmények között (37°C, 10 bar H₂ nyomás) hajtottam végre, a konverziókat MALDI-TOF-MS-sel határoztam meg. Az **1** katalizátorral végzett hidrogénezés eredményeit az 5.4.2.a. táblázat szemlélteti. A hidrogénezés során még

hangsúlyosabb volt a különbség az MGDG/DGDG, valamint a PG és az SL konverziói között, mint Pd(QS)₂ esetében. Az MGDG 23,29, a DGDG 18,09 %-os konverziót szenvedett, míg a másik két lipid közül az SL összes kettős kötéseinek mindössze 3,10 %-a hidrogéneződött, a PG esetében pedig egyáltalán nem történt kimutatható átalakulás. Úgy tűnik tehát, hogy a PG és az SL az alkalmazott katalizátortól függetlenül a legtöbb esetben kisebb reaktivitást mutat hidrogénezési reakciókban, mint a *Synechocystis* lipidkeverékben megtalálható másik két komponens.

Ezt támasztja alá a 4 katalizátor jelenlétében kivitelezett hidrogénezési reakció termékelegyenek vizsgálata is (5.4.2.b. táblázat).

		16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	Konv. (%)
Hidro- géné- zetlen	MGDG	47,33	2,66	0,85	4,80	12,95	31,42	
	DGDG	45,96	4,04	1,40	2,43	11,62	34,55	
	SL	64,77	7,83	2,07	10,61	12,54	2,18	
	PG	49,00	8,98	2,70	8,57	12,85	17,90	
Hidro- géné- zett	MGDG	46,98	3,02	5,12	10,66	18,47	15,75	23,29
	DGDG	43,23	6,76	3,44	9,74	17,76	19,07	18,09
	SL	62,84	3,53	8,15	9,47	12,52	3,49	3,10
	PG	39,68	10,31	4,37	9,93	13,43	22,28	-

5.4.2.a.táblázat *Synechocystis* tilakoid lipidkeverék hidrogénezése

[1] = 1,88mM, [lipid] = 0,1 mg/ml, V = 3 ml, T = 37°C, p(H₂) = 10 bar, t = 3 óra, pH = 6,9

		16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	Konv. (%)
Hidro- géné- zetlen	MGDG	47,33	2,66	0,85	4,80	12,95	31,42	
	DGDG	45,96	4,04	1,40	2,43	11,62	34,55	
	SL	64,77	7,83	2,07	10,61	12,54	2,18	
	PG	49,00	8,98	2,70	8,57	12,85	17,90	

Hidro- géne- zett	MGDG	48,54	1,46	1,44	5,59	16,49	26,48	6,36
	DGDG	47,54	2,46	0,55	4,35	16,35	28,75	5,70
	SL	64,76	4,39	3,00	11,24	13,92	2,69	-
	PG	36,98	10,09	2,94	17,46	15,19	17,34	3,17

5.4.2.b. táblázat *Synechocystis* tilakoid lipidkeverék hidrogénezése

[1] = 1,88mM, [lipid] = 0,1mg/ml, V = 3 ml, T = 37°C, p(H₂) = 10 bar, t = 3 óra, pH = 6,9

Az 5.4.2.b. táblázat adatai szerint mindegyik lipidféleség csekély mértékben hidrogéneződött (SL esetében nem mutatható ki változás), bár az MGDG és a DGDG továbbra is nagyobb reaktivitást tanúsított, mint a PG és az SL.

A kapott eredmények egybevágnak a DOPC hidrogénezése során tapasztaltakkal, vagyis alacsony hőmérsékleten (37°C-on) végzett hidrogénezési reakciókban **1** aktívabb, mint **4**.

5.4.3. Szójalecitin hidrogénezése

Az **1** és **4** katalizátorokat szójalecitin hidrogénezése során is kipróbáltam. A reakciókat 37, illetve 80°C-on hajtottam végre. A hidrogénezés összkonverzióját – sokkomponensű, bonyolult lipidkeverék lévén – gázkromatográfiásan határoztam meg. A 37°C-os hidrogénezés eredményeit az 5.4.3.a. táblázatban tüntettem fel.

Hidrogénezetlen					Hidrogénezett (37°C)									
Zsírsav					Katalizátor									
					[RuCl ₂ L(C ₁₀ H ₁₄)] (1)					1 +PTA (4)				
					Zsírsav					Zsírsav				
16:0 (%)	18:0 (%)	18:1 (%)	18:2 (%)	18:3 (%)	16:0 (%)	18:0 (%)	18:1 (%)	18:2 (%)	18:3 (%)	16:0 (%)	18:0 (%)	18:1 (%)	18:2 (%)	18:3 (%)
20,14	4,01	8,69	59,61	7,55	23,23	6,31	13,32	51,59	5,55	20,52	4,69	9,59	57,79	7,41
					Konv.-össz: 11,56 %					Konv.-össz: 2,10 %				

5.4.3.a. táblázat Szójalecitin hidrogénezése 37°C-on **1**, illetve **4** katalizátorral

[katalizátor] = 4,73 mM, [szójalecitin] = 10 mg/ml, V = 3 ml, p(H₂) = 10 bar, t = 3 óra, pH = 6,9

Látható, hogy **1** alkalmazásakor az összes kettős kötés 11,56 %-a hidrogéneződött, míg a **4** katalizátorral csupán 2,10 %-os konverzió valósult meg. Ez az eredmény a várakozásnak megfelelő, hiszen alacsony hőmérsékleten az eddigi lipid hidrogénezési kísérletekben mindig **1** bizonyult aktívabbnak.

Magasabb hőmérsékleten (80°C-on) viszont **4** használatakor tapasztaltam jóval nagyobb mértékű hidrogéneződést (5.4.3.b. táblázat).

Hidrogénezetlen					Hidrogénezett (80°C)									
Zsírsav					Katalizátor									
					[RuCl ₂ L(C ₁₀ H ₁₄)] (1)					1 +PTA (4)				
					Zsírsav					Zsírsav				
16:0 (%)	18:0 (%)	18:1 (%)	18:2 (%)	18:3 (%)	16:0 (%)	18:0 (%)	18:1 (%)	18:2 (%)	18:3 (%)	16:0 (%)	18:0 (%)	18:1 (%)	18:2 (%)	18:3 (%)
20,14	4,01	8,69	59,61	7,55	24,89	7,26	15,96	47,42	4,47	19,65	80,22	0	0,13	0
					Konv. _{össz} : 17,50 %					Konv. _{össz} : 99,83 %				

5.4.3.b. táblázat Szójalecitin hidrogénezése 37°C-on **1**, illetve **4** katalizátorral
[katalizátor] = 4,73 mM, [szójalecitin] = 10 mg/ml, V = 3 ml, p(H₂) = 10 bar, t = 3 óra, pH = 6,9

A szubsztrátumként bemért szójalecitin szinte összes C=C kötése telítődött (konv.= 99,83 %). Az **1** katalizátorral is némileg nagyobb konverziót sikerült elérni, de a különbség a 37°C-os hidrogénezéshez képest közel sem olyan szignifikáns, mint **4** esetében. Természetesen a 80°C hőmérséklet nem biokompatibilis, élő sejtek esetén nem alkalmazható.

Összességében megállapíthatjuk, hogy az előállított Ru(II)-N-heterociklusos karbén komplexek alkalmasak lipidkeverékek vizes közegben, enyhe körülmények között történő hidrogénezésére. Az **1** és **4** katalizátor nem mutat akkora hidrogénező aktivitást, mint a Pd(QS)₂, ami azonban nem kimondottan jelent hátrányt, mivel élő sejtek hidrogénezésekor a túlzottan nagy konverziók könnyen a sejt pusztulásához vezethetnek.

6. Összefoglalás

Munkám során a sejtmembránokat felépítő telítetlen lipidek vizes közegű hidrogénezését tanulmányoztam palládium(II)-alizarinvörös ($\text{Pd}(\text{QS})_2$), illetve ruténium(II)-N-heterociklusos karbén komplex katalizátorokkal.

A lipidek azonosításához, illetve keverékekben az egyedi lipidek egymás mellett történő kimutatásához megfelelő analitikai módszert dolgoztam ki. A MALDI-TOF-MS technika segítségével lehetővé vált különböző lipidkeverékekben az *egyedi* lipidek hidrogénezéssel szembeni reaktivitásának nyomon követése is. A módszer előnye, hogy nem igényli a lipid komponensek előzetes szétválasztását (kromatográfia), illetve a keverékek különösebb tisztítását.

DOPC $\text{Pd}(\text{QS})_2$ -vel történő hidrogénezésekor MALDI-technikával sikerült megadni az egyes lipidféleségek (18:1-18:1, 18:1-18:0, 18:0-18:0) arányát a hidrogénezett elegyben. Gázkromatográfiával mindössze a zsírsavak (18:1 és 18:0) aránya adható meg.

DOPE-DOPC különböző arányú keverékek hidrogénezésekor a két komponens reaktivitása jelentősen nem különbözött, a mért konverziók közel azonosak voltak. DOPE és DOPC 1:1 arányú keverékéhez koleszterint adagolva – a vezikulaszervezet merevebbé válása miatt – lecsökkentek a hidrogénezési konverziók. A két komponens reaktivitása közel azonos mértékben változott.

Hidrogénezéssel szembeni reaktivitás-különbségeket mutattam ki többkomponensű lipidkeverék egyedi lipidféleségei között. A *Synechocystis PCC 6803* cianobaktérium tilakoid membránjából izolált négykomponensű lipidkeverék $\text{Pd}(\text{QS})_2$ -vel történő hidrogénezésekor az MGDG és a DGDG kb. kétszer akkora mértékű konverziót ért el (23,01 %, illetve 24,40 %), mint az SL és a PG (11,95 %, illetve 11,40 %).

Munkám során vízoldható Ru(II)-NHC karbén komplexeket szintetizáltam, melyek enyhe körülmények között is aktívak különböző szubsztrátumok $\text{C}=\text{C}$, illetve $\text{C}=\text{O}$ kötéseinek hidrogénezésében, valamint redox izomerizációs, illetve hidrogén transzfer reakciók katalízisében. Ezek az első átmenetifém – NHC-karbén komplexek, melyek ilyen típusú reakciókban katalizátorként alkalmazásra kerültek.

A $[\text{RuCl}_2\text{L}(\text{C}_{10}\text{H}_{14})]$ (L = 1-butil-3-metil-imidazol-2-ilidén) (**1**) komplexet az irodalomból ismert ezüst metatézises reakcióval állítottam elő. A komplex erős Ru-C kötést tartalmaz, ennek köszönhetően jelentős hidrolitikus és oxidatív stabilitással rendelkezik a vizsgált teljes pH-tartományban (pH 2-12). **1** vízben történő oldásakor $[\text{RuCl}(\text{H}_2\text{O})\text{L}(\text{C}_{10}\text{H}_{14})]^+$ (**2a**) és

$[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_2\text{L}(\text{C}_{10}\text{H}_{14})]^{2+}$ (**2b**) komplex kationok keletkeznek. A részecskék létezését ESI-MS és ^{13}C -NMR technikákkal igazoltam. 0,1 M-os KCl oldatban **2a** az uralkodó részecsketípus. **1** vizes oldatához egy ekvivalens mennyiségű PTA-t adva $[\text{RuCl}(\text{PTA})\text{L}(\text{C}_{10}\text{H}_{14})]^+$ (**4a**) és $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{PTA})\text{L}(\text{C}_{10}\text{H}_{14})]^{2+}$ (**4b**) képződését figyeltem meg. 0,1 M KCl oldatban túlnyomórészt **4a** fordul elő.

Elsőként tanulmányoztam átmenetifém-N-heterociklusos komplex sav-bázis sajátságait pH potenciometrikus titrálással. Az **1** vizes oldatára kapott titrálási görbe alapján részecskeloszlást számoltam a pH függvényében. pH 7 alatt 0,1 M-os klorid koncentráció mellett **2a** található meg az oldatban, majd a pH növekedésével megjelenik a monohidroxo- ($[\text{RuCl}(\text{OH})\text{L}(\text{C}_{10}\text{H}_{14})]$) (**3a**), illetőleg a dihidroxo-komplex ($[\text{Ru}(\text{OH})_2\text{L}(\text{C}_{10}\text{H}_{14})]$) (**3b**). A hidrid-részecskék vizes oldatban történő képződését pH-sztatikus titrálással vizsgáltam.

Az előállított Ru(II)-karbén komplexeket sikerrel alkalmaztam ketonok hidrogénezésére. Az **1** katalizátorral analóg szerkezetű foszfin-komplexek ($[\text{RuCl}_2(\text{PR}_3)(\text{C}_{10}\text{H}_{14})]$) ($\text{PR}_3 = \text{PTA}$ vagy *m*TPPTS) ketonok hidrogénezésében nem mutatnak aktivitást.

Benzilidén-aceton hidrogénezésekor a **4** katalizátorral 42,3 %-os konverziót, és 91,9 %-os szelektivitást tapasztaltam a C=C kötés telítésére vonatkozóan. Az **1** katalizátorral mindössze 18,7 %-os konverziót és 61,7 %-os szelektivitást kaptam.

Minden vizsgált szubsztrátum (5.3.1. táblázat) 80°C-on és 10 bar H_2 -nyomáson történő hidrogénezése során **4** bizonyult aktívabbnak.

Az előállított Ru(II)-karbén katalizátorok az első olyan vízzeloldható átmenetifém-NHC karbén komplexek, melyek redox izomerizációs reakciókban katalitikus aktivitást mutattak. Munkám során az allil-alkohol redox izomerizációját tanulmányoztam részletesen. Megfigyeltem, hogy a propanal keletkezéséhez vezető izomerizáció csak hidrogén atmoszférában következik be, vagyis a folyamat valószínűleg valamilyen hidrid-részecskéhez kötött.

Az acetofenon és 2-propanol között végbemenő hidrogén transzfer reakciója során KOH jelenlétében nagyobb konverziókat értem el, mint K_2CO_3 alkalmazásakor. A reakciókban a 2-propanol töltötte be az oldószer szerepét. Vizet adva a reakcióelegyekhez a konverziók jelentős csökkenését tapasztaltam. KOH bázis esetében víz hozzáadásakor a reakció teljesen befagyott.

A Ru(II)-karbén komplexek szelektíven hidrogéneztek különböző lipid molekulák C=C kötéseit az élő sejtek számára is elviselhető körülmények ($T = 37^\circ\text{C}$, $p(\text{H}_2) = 10$ bar, semleges oldat) között.

A vizsgált lipidek (DOPC, *Synechocystis*, szójalecitin) hidrogénezése során enyhe körülmények között **1** minden esetben aktív volt, míg **4** a DOPC hidrogénezésekor egyáltalán nem okozott átalakulást, és a másik két minta esetében is csak csekély mértékű konverzió volt detektálható. *Synechocystis* lipidkeverék vizsgálatakor a $\text{Pd}(\text{QS})_2$ -vel katalizált reakcióhoz

hasnolán hidrogénezéssel szembeni reaktivitás különbséget mutattam ki az egyes lipidféleségek között Ru(II)-kARBén komplexek alkalmazása során. A reaktivitás különbségek **1** használatakor voltak a leghangsúlyosabbak: Az MGDG 23,29, a DGDG 18,09 %-os konverziót szenvedett, míg az SL mindössze 3,10 %-a alakult át, a PG esetében pedig nem történt kimutatható változás.

Szójalecitin hidrogénezésekor 37°C-on **1** jelenlétében 11,56 %-os, **4** jelenlétében 2,10 %-os konverziót detektáltam. 80°C-on az **1** katalizátorral 17,50 %-os, a **4** katalizátorral 99,83 %-os konverziót értem el.

Megállapítható tehát, hogy alacsony hőmérsékleten **1** alkalmazható eredményesebben lipidkeverékek hidrogénezésére. A Pd(QS)₂-höz képest **1** hidrogénező aktivitása ugyan kisebb, ez azonban nem feltétlenül jelent hátrányt élő sejtek membránjainak hidrogénezésekor, ahol a túl nagy konverziók végzetesek lehetnek a sejt számára.

Munkám során az irodalomból nem ismert módon állítottam elő 1-(nátrium-etil-2-szulfonát)-3-(etil-2-szulfonát) imidazólium betaint, mely ligandumként funkcionálhat új Ru(II)-NHC-kARBén komplexek előállításakor.

7. Summary

The most important aim of this work was the study of the hydrogenation of unsaturated lipid constituents of cell membranes in aqueous solutions catalysed by palladium(II) alizarin red ($\text{Pd}(\text{QS})_2$) and ruthenium(II)-N-heterocyclic carbene complexes.

The detection of individual lipid molecules in lipid mixtures meets several problems. Most analytical methods – such as gas chromatography – are inappropriate to identify individual lipids without previous separation of the components or modification of the sample. Since lipids are non-volatile compounds, gas chromatographic study requires a trans-esterification carried out by MeOH/HCl , which leads to the formation of fatty acid esters derived from the lipid molecules found in the mixture. Thus gas chromatography provides information only on the ratio of the different fatty acid residues, however the ratio of individual lipids remains unknown.

One of the aims of this study was to develop a fast and reliable method for the detection of various lipids and the determination of the reactivity of individual lipid molecules in lipid mixtures upon hydrogenation. MALDI-TOF-MS has proved to be an excellent technique to solve these problems.

The hydrogenation of dioleoyl-phosphatidyl-choline (DOPC) – a lipid containing two $\text{C}=\text{C}$ double bonds – could be followed by mass spectrometry. It turned out that the hydrogenation catalysed by $\text{Pd}(\text{QS})_2$ leads to the formation of a half saturated (18:0-18:1) and a fully saturated (18:0-18:0) product. The concentration of the half saturated product in the hydrogenated mixture is smaller (5.94 %) than that of the fully saturated product (38,45 %).

The hydrogenation of DOPE (dioleoyl-phosphatidyl-ethanolamine) and DOPC mixtures of different ratios was carried out in the presence of $\text{Pd}(\text{QS})_2$. We met the problem that the presence of DOPC prevents the detection of DOPE by MALDI-TOF-MS. To produce spectra in which the two components display signals of comparable intensities, solutions of NaCl in ethanol were added to the samples. MALDI-TOF measurements revealed that the reactivity of these two lipids is similar, no significant differences in conversions were detected, regardless of the ratio of the lipids in the mixtures. The hydrogenation of DOPE:DOPC = 1:1 mixtures was examined in the presence of different amounts of cholesterol. The reactivity of both components decreased by about the same extent.

Different reactivities of the individual lipid species were obtained by the use of $\text{Pd}(\text{QS})_2$ in the hydrogenation ($T = 37^\circ\text{C}$) of lipid mixtures extracted from the thylakoid membrane of *Synechocystis PCC 6803*. It was found that MGDG and DGDG exhibit higher conversions (23.01 and 24.40 % respectively) than SL and PG (11.95 and 11.40 %).

With the aim of extending the armory of available catalysts, new water soluble Ru(II)-N-heterocyclic carbene complexes were synthesized. These proved to be active in hydrogenation, hydrogen transfer and redox isomerisation reactions under mild conditions. These are the first transition metal – NHC carbene complexes that catalyse the above processes in aqueous solutions. The selective hydrogenation of the C=C bonds of membrane lipids is also possible by these complexes under conditions tolerable even by live cells.

[RuCl₂L(C₁₀H₁₄)] (**1**) was prepared by the carbene transfer methodology. [RuCl₂(C₁₀H₁₄)₂] was reacted with [AgL₂][AgCl₂] obtained in the reaction of 1-butyl-3-methylimidazolium chloride and Ag₂O in CH₂Cl₂. The complex contains a strong Ru-C bond that provides enhanced hydrolytic and oxidative stability. Interestingly **1** dissolves well in water, however, in a D₂O solution two singlet ¹³C resonances (169.5 and 169.8 ppm) are seen in the NMR spectrum. These two signals are assigned to [RuCl(H₂O)L(C₁₀H₁₄)]⁺ (**2a**) and [Ru(H₂O)₂L(C₁₀H₁₄)]²⁺ (**2b**). Conversely, in 0.1 M KCl solutions only the peak at 169.8 ppm (**2a**) remains observable. The presence of these two particles in the aqueous solution of **1** was confirmed by ESI-TOF-MS. In concentrated (> 0.5 M) chloride solutions the presence of the undissociated **1** is significant.

The addition of PTA to the aqueous solution of **1** resulted in the formation of two new Ru-complexes: [RuCl(PTA)L(C₁₀H₁₄)]⁺ (**4a**) and [Ru(H₂O)(PTA)L(C₁₀H₁₄)]²⁺ (**4b**). The species are characterised by singlet ³¹P-resonances at –35.5 ppm and –36.1 ppm. On the addition of KCl the resonance at –36.1 ppm (**4b**) almost disappears.

Our work is the first study that reports the pH-potentiometric titration of a transition metal – N-heterocyclic carbene complex (**1**). According to ¹³C-NMR spectra Ru(II)-NHC carbene complexes are stable in a wide (2-12) pH range. On the basis of pH-potentiometric titrations the particles that exist at different pH values could be identified. Under pH 7 in 0.1 M KCl solutions the major species is **2a**, which can be titrated as a diacid. In basic solutions [RuCl(OH)L(C₁₀H₁₄)] (**3a**) and [Ru(OH)₂L(C₁₀H₁₄)] (**3b**) could be identified.

The formation of hydrido-particles was studied by pH-static titrations. It is concluded that hydrogen is activated in the reaction with Ru-NHC carbene complexes by the heterolytic splitting of the H-H bond.

The new Ru-complexes were used to hydrogenate ketones (acetone and acetophenone). It is remarkable, that hydrogenation of ketones was not observed with the phosphine complexes analogous to **1** ([RuCl₂(PR₃)(C₁₀H₁₄))] (PR₃ = PTA or *m*TPPTS).

Benzilideneacetone contains both a C=C and a C=O bond. The hydrogenation of benzilideneacetone in the presence of **1** resulted only in 18.7 % conversion and 61.7 % selectivity

to the hydrogenation of the C=C bond. However, by the application of **4** (**1**+PTA) as a catalyst, 42.3 % conversion and 91.9 % selectivity was determined.

The hydrogenation of various substrates catalysed by **1** and **4** was studied. In these reactions ($T = 80^{\circ}\text{C}$, $p(\text{H}_2) = 10 \text{ bar}$) **4** proved to be more active in the case of all substrates compared to **1**.

The Ru(II)-NHC-carbenes studied in this work are the first transition metal – NHC complexes that catalyse redox isomerization. The hydrogenation of allyl alcohol led to the formation of propanol and propanal. Until about 90 % total conversion propanol and propanal were produced in approximately 1:1 ratio. Following that propanol was formed on the expense of propanal. Redox isomerization was observed exclusively under hydrogen atmosphere. The changes of the concentration of the reactants were studied in the function of time and temperature.

The examination of the hydrogen transfer reaction between 2-propanol and acetophenone revealed that the reactivity is higher when KOH (conversion = 96.33 %) is used as a base instead of K_2CO_3 (conversion = 67.97 %). However, on the addition of water the conversions decreased significantly. In the case of KOH the hydrogen transfer reaction was almost totally blocked in the presence of water (8,2 vol %).

The new water soluble Ru(II)-NHC-carbene complexes were used to hydrogenate lipid mixtures under mild conditions ($T = 37^{\circ}\text{C}$, $p(\text{H}_2) = 10 \text{ bar}$, $\text{pH} = 6.9$ (phosphate buffer)). Lipids have never been hydrogenated by transition metal – carbene complexes before.

Under these conditions **1** displayed hydrogenating activity for all studied lipids (DOPC, *Synechocystis* PCC 6803, soy-bean lecithin), whereas **4** did not hydrogenate DOPC, furthermore in the case of the other two samples low conversions were detected ($T = 37^{\circ}\text{C}$).

The hydrogenation of DOPC catalysed by **1** led to the formation of a half saturated (18:0-18:1) and a fully saturated (18:0-18:0) product, however – on the contrary to the hydrogenation by $\text{Pd}(\text{QS})_2$ – the concentration of the half saturated product in the hydrogenated mixture was higher (55.26 %) than that of the fully saturated product (23.09 %).

Differences in the reactivities of individual lipids upon hydrogenation catalysed by Ru(II)-carbene complexes were also experienced in the case of *Synechocystis* PCC 6803. Reactivity differences between lipid constituents were extremely significant when **1** was used as a catalyst; MGDG and DGDG reached relatively high conversions (23.29 and 18.09 % respectively), whereas only 3.10 % of the unsaturated bonds of SL were hydrogenated. Besides this, no hydrogenation of PG was observed.

In the hydrogenation of soy-bean lecithin by **1** at 37°C , 11.56 % of the double bonds were saturated, while in the presence of **4** only 2.10 % conversion was obtained. However at 80°C the

conversion detected on the application of **4** was 99.83 %, whereas with catalyst **1** it was only 17.50 %.

It is concluded that the new water soluble Ru(II)-NHC-carbene complexes exhibit activity in the hydrogenation of membrane lipids. Catalyst **1** is more active at low temperatures, while **4** shows higher activities at elevated temperatures, probably because of the high activation energy barrier of the formation of the hydrido particle. The activity of these catalysts is not as high as it is observed in the case of Pd(QS)₂, nevertheless such catalyst activities are in most cases suited for the hydrogenation of cell suspensions where high conversions may even be lethal.

Irodalomjegyzék

- 1) C. Masters: *Homogeneous Transition Metal Catalysis*; Chapman and Hall: London New York, **1981**.
- 2) L. Vigh; I. Horváth; F. Joó; G. A. Thomson *Biochim. Biophys. A.* **1987**, 921, 171.
- 3) E. K. Fridrikson; P. A. Shipkova; E. D. Sheets; D. Holowka; B. Baird; F. W. McLafferty *Biochemistry* **1999**, 38, 8056-8063.
- 4) Elődi Pál: *Biokémia*; Akadémiai Kiadó: Budapest, **1983**.
- 5) S. J. Singer; G. L. Nicolson *Science* **1972**, 175, 720-731.
- 6) Törő Imre: *Az élet alapjai*; Gondolat Kiadó: Budapest, **1989**.
- 7) K. Jacobson; E. D. Sheets; R. Simson *Science* **1995**, 268, 1441-1442.
- 8) E. D. Sheets; R. Simson; K. Jacobson *Curr. Opin. Cell. Biol.* **1995**, 7, 707-714.
- 9) S. Damjanovich; J. Matkó; L. Mátyus; G. J. Szabó; J. Szöllősi; C. Pieri; T. Farkas; R. J. Gáspár *Cytometry* **1998**, 33, 225-234.
- 10) S. Damjanovich; L. Bene; J. Matkó; L. Mátyus; Z. Krasznai; G. Szabó; C. Pieri; R. Gáspár; J. Szöllősi *Biophys. Chem.* **1999**, 82, 99-108.
- 11) A. Kusumi; Y. Sako; M. Yamamoto *Biophys. J.* **1993**, 65, 2021-2040.
- 12) C. Dietrich; B. Yang; T. Fujiwara; A. Kusumi; K. Jacobson *Biophys. J.* **2002**, 82, 274-284.
- 13) K. Simons; E. Ikonen *Nature* **1997**, 387, 569-572.
- 14) S. Damjanovich; G. Vereb; A. Schaper; A. Jenei; J. Matkó; J. P. Starink; G. Q. Fox; D. J. Arndt-Jovin; T. M. Jovin *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 80, 1122-1126.
- 15) G. Vereb; J. Matkó; G. Vámosi; S. M. Ibrahim; E. Magyar; S. Varga; J. Szöllősi; A. Jenei; R. Gáspár, J.; T. A. Waldmann *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 6013-6018.
- 16) R. Schroeder; E. London; D. Brown *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 12130-12134.
- 17) T. S. Blom; M. Koivusalo; E. Kuismanen; R. Kostianen; P. Somerharju; E. Ikonen *Biochemistry* **2001**, 40, 14635-14644.
- 18) K. G. Rothberg; Y. S. Ying; B. A. Kamen; R. G. Anderson *J. Cell. Biol.* **1990**, 111, 2931-2938.
- 19) G. Vereb; J. Szöllősi; J. Matkó; P. Nagy; T. Farkas; L. Vigh; L. Mátyus; T. A. Waldmann; S. Damjanovich *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 8053-8058.
- 20) L. Vigh; D. A. Los; I. Horváth; N. Murata *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 9090-9094.
- 21) L. Carratú; S. Franceschelli; C. L. Pardini; G. S. Kobayashi; I. Horváth; L. Vigh; B. Maresca *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 3870-3875.

- 22) I. Horváth; A. Glatz; V. Varvasovszki; Zs. Török; T. Páli; G. Balogh; E. Kovács; L. Nádasdi; S. Benkő; F. Joó; L. Vígh *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 3513-3518.
- 23) E. Kovács; Z. Török; I. Horváth; L. Vígh *Plant. Phys. Biochem.* **1994**, *32*, 285-293.
- 24) Z. Török; I. Horváth; P. Goloubinoff; E. Kovács; A. Glatz; G. Balogh; L. Vígh *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 2192-2197.
- 25) L. Vígh; Z. Gombos; F. Joó *FEBS Lett.* **1985**, *191*, 200.
- 26) D. Chapman; P. J. Quinn *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1976**, *73*, 3971-3975.
- 27) D. Chapman; P. J. Quinn *Chem. Phys. Lipids* **1976**, *17*, 363-372.
- 28) J. F. Young; J. A. Osborn; H. F. Jardine; G. Wilkinson *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1965**, 131.
- 29) Joó F.; Beck M. T. *Magyar Kémiai Folyóirat* **1973**, *19*, 189-191.
- 30) A. V. Bulatov; A. T. Nikitaev; M. L. Khidekel *Izv. Akad. Nauk. SSSR Ser. Khim.* **1981**, *9*, 924-925.
- 31) B. Szalontai; M. Droppa; L. Vígh; F. Joó; G. Horváth *Photobiochem. Photobiophys.* **1986**, *10*, 233-240.
- 32) F. Joó; N. Balogh; L. I. Horváth; G. Filep; I. Horváth; L. Vígh *Anal. Biochem.* **1991**, *194*, 34-40.
- 33) D. Bourissou; O. Guerret; F. P. Gabbai; G. Bertrand *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 39-91.
- 34) E. Buchner; Curtius, T. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1885**, *8*, 2377.
- 35) H. Staudinger; O. Kupfer *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1912**, *45*, 501.
- 36) H. Tomioka *Acc. Chem. Res.* **1997**, *30*, 315.
- 37) W. A. Herrmann; C. Köcher *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 2162.
- 38) D. Bourissou; G. Bertrand *Adv. Organomet. Chem.* **1999**, *44*, 175.
- 39) A. J. Arduengo, I.; R. L. Harlow; M. Kline *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 361.
- 40) A. J. Arduengo, I.; T. Bannenberg *The Strem Chemiker* **2002**, *19*, 2-8.
- 41) W. A. Herrmann et al. *US Patent 5,663,451* **1997**.
- 42) W. A. Herrmann; L. J. Gooßen; M. Spiegler *J. Organomet. Chem.* **1997**, *547*, 357-366.
- 43) I. Özdemir; B. Yigit; B. Cetinkaya; D. Ülkü; M. Nawaz Tahir; C. Arici *J. Organomet. Chem.* **2001**, *633*, 27-32.
- 44) J. C. Garrison; R. S. Simons; C. A. Tessier; Youngs, W. J. *J. Organomet. Chem.* **2003**, *673*, 1-4.
- 45) W. A. Herrmann; J. Fischer; K. Öfele; G. R. J. Artus *J. Organomet. Chem.* **1997**, *530*, 259-262.
- 46) R. Castarlenas; I. Alaoui-Abdallaoui; D. Sémeril; B. Mernari; S. Guesmi; P. H. Dixneuf *New. J. Chem.* **2003**, *27*, 6-8.
- 47) L. Delaude; A. Demonceau; A. F. Noels *Chem. Commun.* **2001**, 986-987.
- 48) M. S. Viciu; F. K. Zinn; E. D. Stevens; S. P. Nolan *Organometallics* **2003**, *22*, 3175-3177.
- 49) H. Kaur; F. K. Zinn; E. D. Stevens; S. P. Nolan *Organometallics* **2004**, *23*, 1157-1160.
- 50) J. R. Miecznikowski; R. H. Crabtree *Organometallics* **2004**, *23*, 629-631.
- 51) H. M. Lee; D. C. Smith; Z. He; E. D. Stevens; C. S. Yi; S. P. Nolan *Organometallics* **2001**, *20*, 794-797.
- 52) T. Westkamp; W. C. Schattenmann; M. Spiegler; W. A. Herrmann *Angew. Chem., Int. Ed.* **1998**, *37*, 2490.
- 53) M. Scholl; T. M. Trnka; J. P. Morgan; R. H. Grubbs *Tetrahedron. Lett.* **1999**, *40*, 2247.
- 54) J. Dupont; C. S. Consorti; P. A. Z. Suarez; R. F. de Souza *Org. Synth.* **2002**, *79*, 236-243.
- 55) M. A. Bennett; A. K. Smith *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1974**, 233-241.
- 56) D. J. Daigle; A. B. Peppermann; S. L. Vail *J. Heterocyclic Chem.* **1974**, *11*, 407.
- 57) A. J. Arduengo, e. a. *US Patent 5,182,405* **1993**.
- 58) L. Vígh; F. Joó; P. R. Van Hasselt; P. J. C. Kuiper *J. Mol. Catal.* **1983**, *22*, 15-19.
- 59) R. C. Murphy; J. Fiedler; J. Hevko *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 479-526.
- 60) J. Schiller; O. Zschöring; M. Petkovic; M. Muller; J. Arnhold; K. Arnold *J. Lipid Res.* **2001**, *42*, 1501-1508.

- 61) J. Schiller; K. Muller; R. Suss; J. Arnhold; C. Gey; A. Herrmann; J. Lessig; K. Arnold; P. Muller *Chem. Phys. Lipids* **2003**, 126, 85-94.
- 62) C. S. Allardyce; P. J. Dyson; D. J. Ellis; P. A. Salter; Scopelliti, R. *J. Organomet. Chem.* **2003**, 668, 35-42.
- 63) H. Horváth; G. Laurenczy; Á. Kathó *J. Organomet. Chem.* **2004**, 689, 1036-1045.