

Szilágyi István

**METALLOENZIMEK SZERKEZETI ÉS
FUNKCIONÁLIS MODELLEZÉSE**

Doktori értekezés

Témavezetők: Dr. Kiss Tamás, egyetemi tanár

Dr. Labádi Imre, egyetemi docens

Konzulens: Dr. Pálinkó István, egyetemi docens

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi Kar

Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék

2006

TARTALOMJEGYZÉK

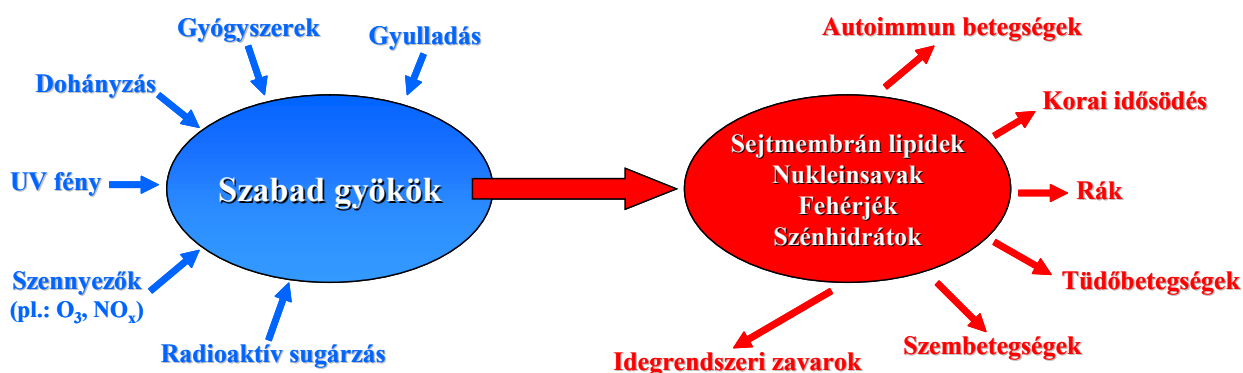
I. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK	1
II. IRODALMI ÖSSZEFOGLALÓ	4
II.1. A szuperoxid dizmutáz, kataláz és katecholáz enzimekről	4
II.2. A metalloenzimek modellezése	8
II.3. Immobilizált fémkomplexek	14
II.3.1. Immobilizálás zeolitokban és agyagásványokon	15
II.3.2. Immobilizálás szilikagélen	18
III. KÍSÉRLETI RÉSZ	21
III.1. Az anyagok előállítása	21
III.1.1. A hordozó nélküli komplexek előállítása	21
III.1.2. A komplexek immobilizálása	21
III.2. Potenciometria	23
III.3. UV-Vis spektrofotometria	24
III.4. ESR spektroszkópia	24
III.5. FT-IR spektroszkópia	25
III.6. Termikus mérések	25
III.7. Atomabszorpciós spektrofotometria	25
III.8. Tömegspektrometria	25
III.9. Ciklikus voltammetria	26
III.10. A katalizátorok enzimaktivitásának tesztelése	26
III.10.1. Szuperoxid dizmutáz (SOD) aktivitás mérése	26
III.10.2. Katecholáz aktivitás mérése	28
III.10.3. Kataláz aktivitás mérése	29
IV. OLDATEGYENSÚLYI VIZSGÁLATOK	30
IV.1. pH-potenciometriai titrálások	30
IV.1.1. Protonálódási állandók meghatározása	31
IV.1.2. Komplex stabilitási állandók meghatározása	31
IV.2. UV-Vis spektrofotometriai vizsgálatok	39
IV.3. ESR spektroszkópiai mérések	41
IV.4. Tömegspektrometriai vizsgálatok	48

IV.5. Elektrokémiai mérések	55
IV.6. Oldategyensúlyi vizsgálatok összefoglalása	56
V. IMMOBILIZÁLÁS SZERVETLEN HORDOZÓKON	58
V.1. Fémiontartalom meghatározása, fajlagos felületmérések	58
V.2. FT-IR spektroszkópiai vizsgálatok	60
V.3. ESR spektroszkópiai jellemzés	65
V.4. Termikus vizsgálatok	70
V.5. A szilárdfázisban történt vizsgálatok összefoglalása	72
VI. AZ ANYAGOK KATALITIKUS AKTIVITÁSA	75
VI.1. Szuperoxid dizmutáz (SOD) aktivitás	75
VI.2. Katechol oxidáz aktivitás	79
VI.3. Kataláz aktivitás	81
VI.4. Az enzimutánzó tulajdonságok összefoglalása	82
VII. ÖSSZEFOGLALÁS	84
VIII. SUMMARY	87
IX. IRODALOMJEGYZÉK	91
X. A SZERZŐ KÖZLEMÉNYEINEK LISTÁJA	98

I. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

A biológiai rendszerekben a kémiai reakciók legnagyobb része katalizátor jelenlétében megy végbe. Ezek a katalizátorok specifikus tulajdonságú fehérjék, amelyeket enzimeknek nevezünk. Minden enzimre egyaránt jellemző a specifitás és a katalitikus képesség, amely azt jelenti, hogy csak egy bizonyos kémiai reakciót segítenek elő, és a legtöbb esetben azt is csak megfelelő körülmények (pH, hőmérséklet stb.) között. Az enzimek jelentős része lényeges alkotóelemként fémiont tartalmaz. Az aktív centrumukban fémiont tartalmazó enzimeket összefoglalóan metalloenzimeknek nevezzük. A metalloenzimekben jelenlévő fémion az enzimmolekula része, a fém és a fehérje sztöchiometrikus aránya meghatározott érték. Fiziológias körülmények között a fémion nem szakad ki a metalloenzimből, ha azonban eltávolítjuk belőle, az enzim elveszti aktivitását [1].

A metalloenzimek között találunk olyan tulajdonságúakat, amelyek valamilyen redoxireakciót katalizálnak az élő szervezetben. Ilyenek például a szuperoxid dizmutáz, a katecholáz, a kataláz és a peroxidáz enzimek. A redoxitulajdonságú enzimek aktív centrumában olyan fémionok találhatóak, amelyek maguk is redoxitulajdonságokkal bírnak. Ilyen fém például a vas, a réz, a mangán. A fentemlített enzimeknek fontos szerepe van a szervezetben keletkező reaktív oxigénrészecskék (ROS) lebontásában [2]. A reaktív oxigénrészecskék közé tartozik például a hidrogén-peroxid, illetve a szuperoxid- és hidroxilgyök is. Utóbbiak a rendkívül toxikus szabad gyökök csoportjába tartoznak, amelyek kialakulását és hatásaikat az 1. ábra foglalja össze.

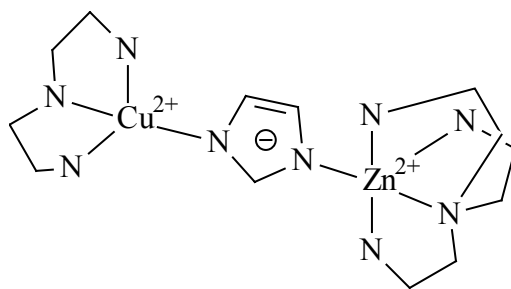


1. ábra Szabad gyökök keletkezése és következményeik.

A jelen értekezésben olvasható munka megkezdésekor a következő célokat tűztük ki. Először ismerjük meg a réz(II)-cink(II) szuperoxid dizmutáz (Cu,Zn-SOD a későbbiekben), a mangántartalmú kataláz és a katechol oxidáz enzimek szerkezetét, működését és egyéb

tulajdonságait a korábbi évek tudományos eredményei alapján. Ezek után keressünk az irodalomban egy olyan kétmagvú fémkomplexet, amely szerkezetileg modellezi a fentemlített enzimeket (lehetőleg tartalmazzon hidligandumot a fémionok között). Mivel a lehetséges modellvegyületek a természetes enzimektől leginkább abban térnek el, hogy a fémionok nem egy nagy molekulatömegű fehérjelánchoz kapcsolódnak, ezért próbáljuk meg a modellvegyületet természetes szilárd hordozókon rögzíteni, így utánozva a fehérjelánc szerkezetkialakító hatását.

A releváns irodalom elemzése után kiválasztottunk egy réz(II)- és cink(II)ionokat tartalmazó kétmagvú, a fémionok között imidazolátóhidat tartalmazó, lehetséges modellvegyületet (réz(II)-dietiléntriamin- μ -imidazolátó-cink(II)-trisz(2-aminoetil)amin (a későbbiekben Cu,Zn-komplex), 2. ábra), amelynek tulajdonságai megfelelnek az általunk elvárt követelményeknek [3].



2. ábra A réz(II)-dietiléntriamin- μ -imidazolátó-cink(II)-trisz(2-aminoetil)amin komplex szerkezete.

A kiválasztáskor a következő szempontok alapján döntöttünk a fenti vegyület mellett: (i) a molekula szerkezetileg modellezze a korábban említett természetes enzimek (szuperoxid dizmutáz, kataláz, katechol oxidáz) aktív centrumát; (ii) legyen pozitív töltésű, hogy az ioncsere-kapacitással rendelkező szilárd mátrixokon (zeolit, montmorillonit) rögzíteni tudjuk; (iii) tartalmazzon olyan ligandumot, amely kovalensen rögzíthető szilikagélhez. A fenti molekula esetében mind a dietiléntriamin, mind a trisz(2-aminoetil)amin csatolható kovalens kötéssel keresztül funkcionált szilikagélhez, a következő fejezetben olvasható módszerek segítségével. Az első két kritériumnak is megfelel a komplex, mivel szerkezete jó egyezést mutat a Cu,Zn-SOD enzim aktív centrumával (a kataláz és katecholáz enzimekhez annyiban hasonló, hogy rendelkezik redoxitulajdonságú fémionnal, illetve a két fémion között egy hidligandum tart fent közvetlen kapcsolatot) és 3+ töltéssel rendelkezik, ami alkalmassá teszi a negatív töltésű szilárd hordozók felületén történő immobilizálásra.

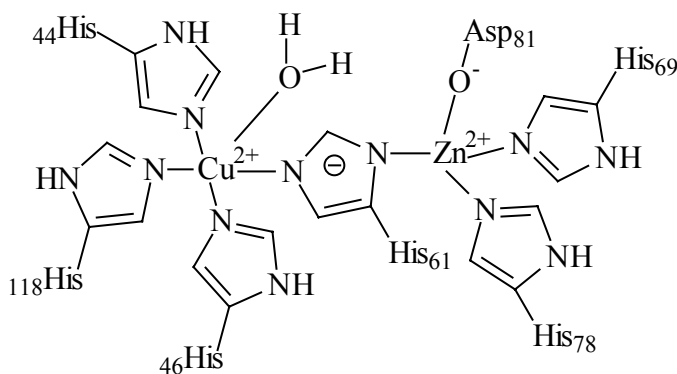
A Cu,Zn-komplexről csak az előállítás menete, illetve UV-Vis spektroszkópiai adatok álltak rendelkezésre irodalmi forrásból. Bár hasonló összetételű komplex vegyületeket már

tanulmányoztak (lásd a következő fejezetben) különféle mérési módszerekkel (röntgendiffrakció, ESR spektroszkópia, potenciometria, mágneses tulajdonságok vizsgálata, elektrokémiai mérések stb.), szükségesnek tartottuk elvégezni a komplex pontos oldategyensúlyi jellemzését, a rendelkezésre álló mérési módszerek (pH-potenciometria, UV-Vis és ESR spektroszkópia, ciklikus voltammetria, tömegspektrometria) segítségével. Mint ahogy már korábban említettük, céljaink között szerepelt a Cu,Zn-komplex rögzítése szervetlen hordozókon (szilikagél, montmorillonit), majd az előállított anyagok szerkezeti jellemzése, amihez a következő mérési módszereket hívtuk segítségül: FT-IR és ESR spektroszkópia, termikus (TG, DTA) vizsgálatok, fajlagos felület- és fémiontartalom meghatározása. A különféle módszerekkel jellemzett katalizátorok (rögzített és hordozó nélküli komplexek) enzimszerű működését különféle enzim-tesztreakciókban kívántuk tanulmányozni. Az elvégzett munka kísérleti körülményei, mérési eredményei, illetve azok elemzése, értékelése olvasható a következő oldalakon.

II. IRODALMI ÖSSZEFOGLALÓ

II.1. A szuperoxid dizmutáz, kataláz és katecholáz enzimekről

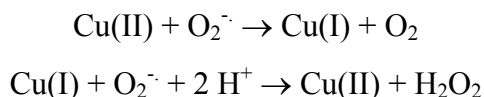
A *szuperoxid dizmutázoknak (SOD)* több fajtája ismert. Vas(III)ion-tartalmú SOD enzim található az alacsonyabb fejlettségi szintű prokariótákban, mangán(III)ion-tartalmú szintén a prokariótákban és az eukarióta sejtek mitokondriumában, míg a réz(II)- és cink(II)ion-tartalmú SOD enzimek a magasabb fejlettségi szintű eukarióta sejtekben találhatók meg [4]. A SOD enzimeknek igen fontos szerepük van az élő szervezetekben, ahol különböző aerob folyamatokban igen toxikus szuperoxid-gyökanionok keletkeznek. Ezek a rendkívül reakcióképes gyökök redoxireakcióba léphetnek olyan létfontosságú molekulákkal, mint a fehérjék és a nukleinsavak. A reakciók során bekövetkező változások könnyen vezethetnek például rákos sejtek kialakulásához. Természetesen az evolúció során az élőlényekben kialakult egy védekező rendszer a szuperoxid-gyökök ellen, aminek alapjai a szuperoxid dizmutáz enzimek. Feladatuk a szuperoxid-gyökanionok lebontása molekuláris oxigénre és hidrogén-peroxidra (a keletkező H_2O_2 lebontását vízre és molekuláris oxigénre a kataláz enzimek végzik). Jónéhány tudományos dolgozat [2, 4-9] jelent már meg a korábbiakban, amelyekben a természetes réz(II)-cink(II) szuperoxid dizmutáz (a továbbiakban Cu,Zn-SOD) enzim szerkezeti és működési tulajdonságait tanulmányozták. A Cu,Zn-SOD aktív centrumának szerkezete látható a 3. ábrán.



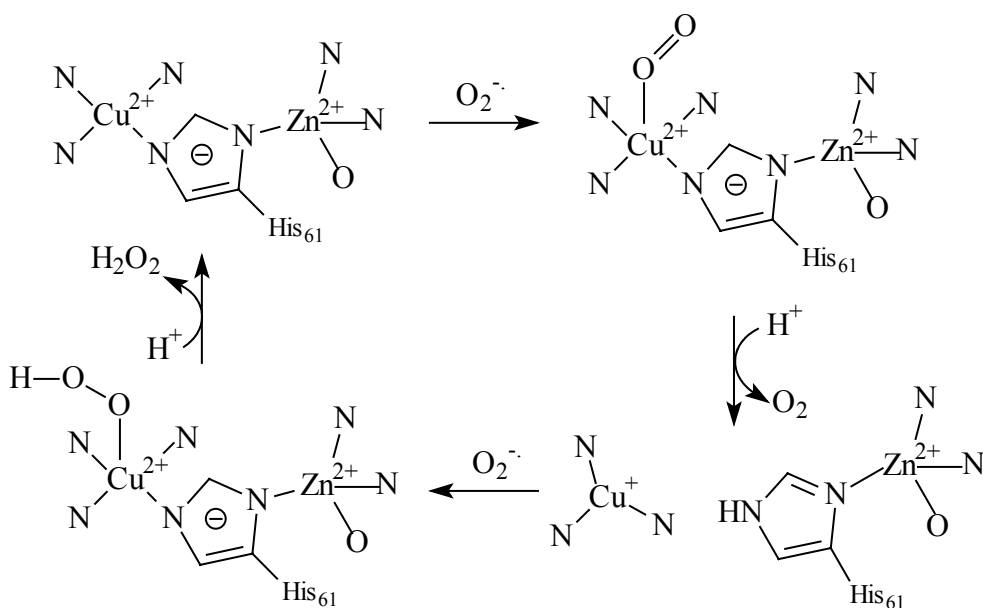
3. ábra A réz(II)-cink(II) szuperoxid dizmutáz (Cu,Zn-SOD) enzim aktív centrumának szerkezete.

Amint az ábrán látható, az aktív centrumban található két fémiont egy imidazolátóhíd kapcsolja össze. A réz(II)ionhoz ezen kívül koordinálódik egy vízmolekula és három imidazolcsoport, amelyek - hasonlóan a hídként viselkedő imidazolhoz - a fehérjében található hisztidin aminosavak oldalláncai. A cink(II)ion koordinációs környezete a következő: két hisztidin aminosavtól származó imidazolcsoport, egy aszparaginsav

karboxilcsoportja és a már említett, hídligandumként viselkedő imidazol. A réz(II)ion körüli koordinációs szféra geometriája négyzetes piramis, míg a cink(II)ionhoz torzult síknégyzetes geometria rendelhető. Az enzim és a szuperoxid-gyökök között a következő reakció játszódik le [2, 7].



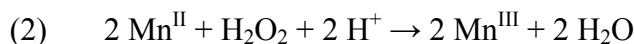
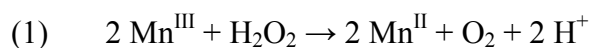
Az enzim működése során a szuperoxid-gyökanionok dizmutálását a réz(II)ion végzi, míg a cink(II)ionnak szerkezetkialakító szerepe van. Az enzim egy körfolyamat során két szuperoxid-gyököt képes lebontani, miközben ciklikusan változik mind a réz oxidációs állapota ($\text{Cu(II)} \rightarrow \text{Cu(I)} \rightarrow \text{Cu(II)}$), mind a geometriája (négyzetes piramis $\rightarrow$ tetraéder $\rightarrow$ négyzetes piramis). Az enzim működése során az első lépésben a szubsztrát kiszorítja a gyengén koordinálódó vízmolekulát a réz(II)ion koordinációs szférájából. Fontos szerkezeti változás az is, hogy a két fémiont összekapcsoló imidazolátóhíd az enzim működése során felbomlik, majd újra visszaalakul. Ezekből az információkból is gondolhatjuk, hogy az enzim működése jóval bonyolultabb, mint azt a fenti redoxireakciók mutatják. A későbbiekben látni fogjuk, hogy a cink(II)ionnak is igen fontos szerepe van a körfolyamat során, mivel az imidazolátóhíd felbomlása után neki köszönhetően marad olyan pozícióban a hídligandum, hogy az imidazolátóhíd ismét kialakulhasson a két fémion között. Az enzim pontos működési mechanizmusa a 4. ábrán látható [2, 4, 7].



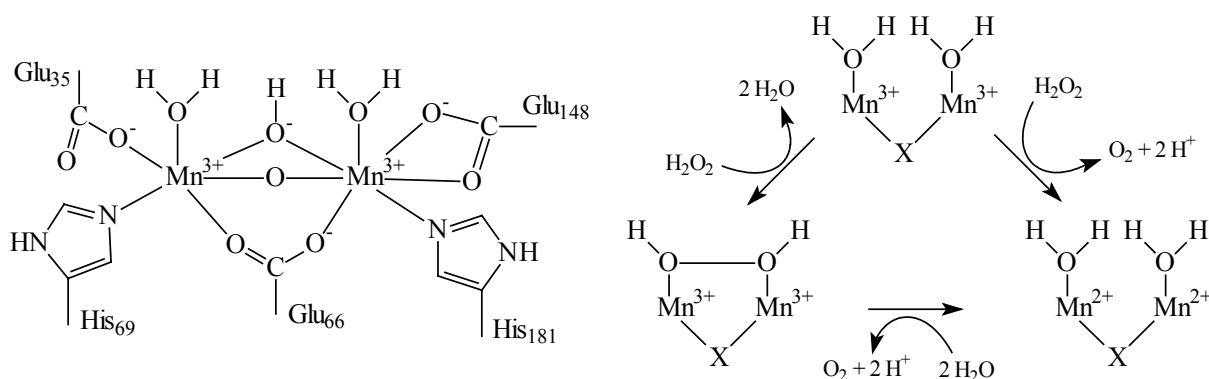
4. ábra A réz(II)-cink(II) szuperoxid dizmutáz működési mechanizmusa.

Hasonlóan a többi enzimhez, a Cu,Zn-SOD enzim is csak megfelelő körülmények között működik. Ilyen tényezők például a pH, a hőmérséklet, de vannak olyan mérgező anyagok is, amelyek képesek az enzim irreverzibilis denaturációjára (például a különféle azidok és cianidok). Ezek azért tudják a Cu,Zn-SOD működését megbénítani, mert viszonylag erősen koordinálódnak a réz(II)ionhoz és így kiszorítják a gyengén kapcsolódó vízmolekulát. Ezek után a szuperoxid-gyökion nem tud koordinálódni a réz(II)ionhoz az enzim működési körfolyamatának első lépésében (nem képes kiszorítani az azid-, vagy cianidmolekulát, mint ahogy azt teszi a víz esetében) és így nem játszódhat le a gyökök lebontásához szükséges redoxireakció.

A **kataláz** enzimek működése részben összefügg a SOD enzimek tevékenységével, ugyanis egyik feladatuk a SOD működése során keletkező hidrogén-peroxid elbontása. A kataláz enzimeknek két családja ismert. Az egyik esetben vas(III)iont tartalmazó porfirinvázis szerkezet található az aktív centrumban (hem-kataláz), míg a másik esetben a működésért felelős rész mangán(II)ionokat tartalmaz (nonhem-kataláz). Ez utóbbi esetben az aktív centrum két mangánionból áll, amelyek az enzim működése során kölcsönösen együttműködnek egymással (5. ábra). Mint már korábban említettük, a kataláz enzimek feladata a hidrogén-peroxid molekulák elbontása vízre és molekuláris oxigénre. Ez a mangántartalmú kataláz esetében a következő reakcióegyenletek szerint játszódik le [10-11].

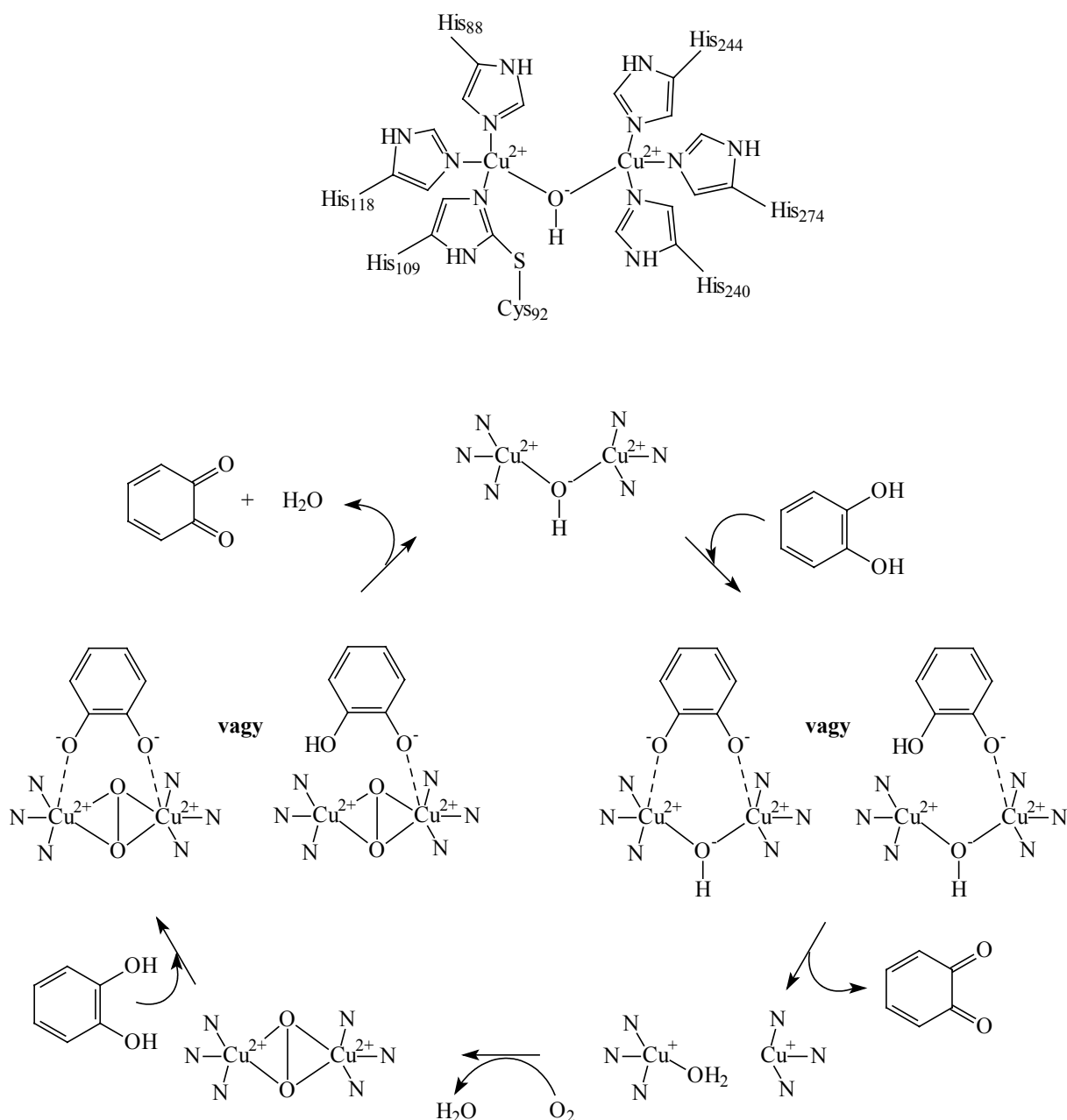


Ahogy az egyenletekből is látható, az enzim egy ciklusban két szubsztrátmolekula elbontására képes, miközben megváltozik a mangánionok oxidációs állapota. A pontos működési mechanizmus természetesen egy bonyolult folyamatot takar, amelynek első lépése látható az 5. ábrán.



5. ábra A mangántartalmú kataláz aktív centrumának szerkezete, illetve működési mechanizmusának első lépése.

Az 5. ábrán látható, hogy az enzim aktív centrumában található két mangán(III)iont három, hídként viselkedő donoratom, illetve donorcsoport kapcsolja össze. A réz(II)-cink(II) szuperoxid dizmutázzal ellentétben ez a híd nem szűnik meg az enzim működése során. A hídligandumokon kívül a következő donorcsoportok kapcsolódnak még a fémionokhoz: a fehérjeláncot alkotó aminosavak oldalláncai közül egy-egy imidazol- és karboxilcsoport (utóbbiak közül az egyik kétfogú ligandumként), valamint egy-egy vízmolekula [12-13].



6. ábra A catechol oxidáz aktív centrumának szerkezete, illetve működési mechanizmusa.

Léteznek olyan redoxitulajdonsággal bíró metalloenzimek is, amelyek molekuláris oxigén jelenlétében végeznek oxidációs folyamatokat, mint például a **katecholáz** enzimek. A

katecholázok növényekben és alacsonyabb rendű baktériumokban található enzimek, feladatuk különböző orto-difenolok (pirokatechin, katechol) átalakítása orto-kinonokká. A katechol oxidáz a 3-as típusú réztartalmú enzimek közé tartozik, ennek megfelelően aktív centrumában csatolt kétmagvú réz(II)-centrumot tartalmaz. A katecholáz enzim aktív centrumának szerkezete és működési mechanizmusa látható a 6. ábrán [14-15].

Ahogy az ábrán látható a természetes enzim aktív centrumában két réz(II)ion található, amelyeket egy hidroxohíd köt össze. A μ -hidroxocsoport mellett 3–3, a fehérjeláncot alkotó hisztidinmolekula imidazolcsoportja koordinálódik még a két réz(II)ionhoz. Érdekesség, hogy a 109-es számú hisztidinmolekula egyik szénatomjához kovalensen kapcsolódik egy cisztein aminosavtól származó kénatom is tioéter kötéssel, aminek szerepe az enzimatis működés közben lejátszódó oxidációhoz szükséges redoxpotenciál optimalizálása. Az 6. ábrán látható, hogy a természetes enzim működése során egy ciklusban két difenol oxidációjára képes, molekuláris oxigén jelenlétében. A körfolyamat során a μ -hidroxohíd felbomlik, majd visszaalakul. A redukált formában a Cu(I)-Cu(I) szeparáció viszonylag nagy; az egyik rézhez egy víz is kötődik, ami torzult trigonális piramisos geometriát eredményez; a másik réz síkháromszöges koordinációjú egy betöltetlen koordinációs hellyel. Az enzim oxidált formájában a két trigonális bipiramisos környezetű réz(II)iont egy hidroxidhíd köti össze. Ezen aktív helyhez ugyancsak hídként kötődő katechol molekula orto-kinonná oxidálódik, miközben a redukálódó rézcentrumok szeparálódnak. A redukált forma oxigénmolekulát köt meg, melynek révén μ -peroxohidas ($\text{Cu}^{2+}\text{--O}_2^{2-}\text{--Cu}^{2+}$) szerkezet alakul ki. Ez utóbbi, már réz(II)ionokat tartalmazó centrum alkalmas egy újabb katecholmolekula megkötésére. A kötött szubsztrát és a peroxid közötti elektroncsere révén képződő újabb orto-kinon egy vízmolekulával együtt távozik, illetve kialakul az enzim kiindulási, hidroxohidas oxidált formája [16-18].

II.2. A metalloenzimek modellezése

A bioszervetlen kémiai kutatások széles körben alkalmazott módszere a metalloenzimek modellezése, hiszen a modellkomplexek jóval egyszerűbbek a fehérjéknél, így könnyebben kezelhetők, egyszerűbben vizsgálhatók. Az enzimeket modellező fémkomplexek használata ugyanakkor lehetővé teszi egy-egy részfolyamat vagy egy-egy szerkezeti motívum sajátosságainak tanulmányozását is, ami a natív rendszerek esetében sokszor lehetetlen. Megfelelő modellrendszerek esetében lehetőség nyílik a gyakorlatban alkalmazható mesterséges enzimek kifejlesztésére is. Az enzimutánzó fémkomplexek irányában történő kutatások általános céljai meglehetősen különbözőek lehetnek. Különbséget teszünk

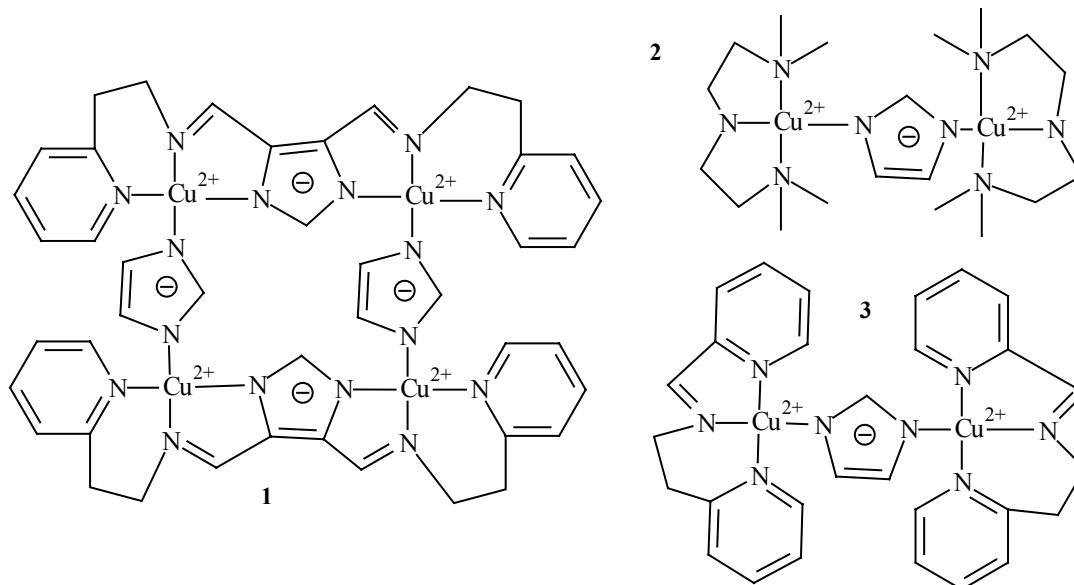
szerkezeti, illetve működésbeli modellezés között. A metalloenzimek szerkezeti modellezése alatt a metalloproteinek aktív centrumát utánzó modellvegyületek kifejlesztését értjük, amelyek a természetes enzimek redoxi, mágneses, spektrális vagy egyéb sajátosságainak, illetve az azokat megszabó tényezőknek a feltárására irányul. A funkcionális modellek részletes vizsgálata elősegítheti a metalloenzimek tevékenységének, az aktív centrum működésének jobb megismerését, illetve a gyakorlatban is használható katalizátor kifejlesztését. A funkcionális modellezés során nem feltétlenül törekszünk a kérdéses metalloenzim aktív centrumának lemásolására, bár általában a jó szerkezeti egyezés magában hordozza a kiemelkedő enzimszerű működés lehetőségét is.

A többmagvú metalloenzimek (mint például a korábban említett szuperoxid dizmutáz, kataláz és katechol oxidáz enzimek), és így a többmagvú fémkomplexek hatékonysága abban rejlik, hogy a két (vagy több) fémion együttesen jóval könnyebben láthatja el a kérdéses funkciókat, kooperatív működésük, a feladatok megosztása révén, nagyobb hatékonyságot eredményez. Az ilyen esetekben a működés szempontjából alapvető fontosságú a fémionok megfelelő térbeli helyzete valamint pozíciójuk és egymástól való távolságuk rögzítettsége a komplexben. A fémionok között kialakulhat kapcsolat egy hídként viselkedő ligandumon keresztül is, de előfordulhat az is, hogy a ligandum megfelelően közeli helyzetbe hozza őket anélkül, hogy közvetlen kapcsolódás lenne a fémionok között.

Mivel a természetes metalloenzimek aktív centrumában található fémionok koordinatív kötésekkel kapcsolódnak a fehérjék donoratomjaihoz, így az aktív centrumok tulajdonképpen egy fémkomplexnek felelnek meg. Köztudott tény, hogy a fehérjék aminosavakból állnak, amelyek koordinálódásra képes donoratomokat (O-, N-, S-atomok) tartalmaznak. A koordinációs kémiai tulajdonságaikat tekintve az aminosavak, az oligopeptidek és a fehérjék eltérnek egymástól. Az aminosavak esetében a koordinálódó atomok a karboxilcsoport oxigénatomjai, az aminos csoport nitrogénatomja, illetve az oldalláncok donoratomjai lehetnek. Oldalláncukban koordinációra képes atomokat tartalmaznak például a hisztidin (N-atomok), a cisztein (S-atomok), az aszparaginsav (O-atomok) aminosavak. A peptidek esetében viszont már változnak a koordinációs tulajdonságok, ugyanis itt már van egy új tulajdonságú donoratom, az amidkötésben résztvevő nitrogénatom. A fehérjék (beleértve a metalloenzimeket alkotó fehérjéket is) esetében általában a fémionok csak az oldalláncok megfelelő térbeli elrendeződésű donoratomjaihoz koordinálódnak, az amidnitrogének nem vesznek részt a fém-fehérje komplexek kialakításában.

A *réz(II)-cink(II) tartalmú szuperoxid dizmutáz (Cu,Zn-SOD)* szerkezeti és funkcionális modellezésére irányuló kutatások több kutatócsoport érdeklődését is felkeltették

az utóbbi évtizedekben. Közlemények sora született meg *S.J. Lippard* és munkatársai kutatásaiból, amelyekben a Cu,Zn-SOD szerkezetét utánzó modellkomplexezt vizsgáltak [19-25]. A természetes enzim szerkezetéből adódóan a vizsgálatok során imidazolátóhidat tartalmazó vegyületeket tanulmányoztak.



7. ábra *S.J. Lippard* és munkatársai által vizsgált SOD modellvegyületek.

1 – $[\text{Cu}_2\text{bpim}(\text{im})_2]^{4+}$, **2** – $[\text{Cu}_2(\text{TDMT})_2\text{im}]^{3+}$, **3** – $[[\text{Cu}(\text{pip})]_2\text{im}]^{3+}$ (im = imidazol, bpim = 4,5-bis[[(2-(2-piridil)etil)imino)metil]imidazol, TDMT = 1,1,7,7-tetrametilén-dietiléntriamin, pip = 2-bis[[(2-(2-piridil)etil)imino)metil]piridin).

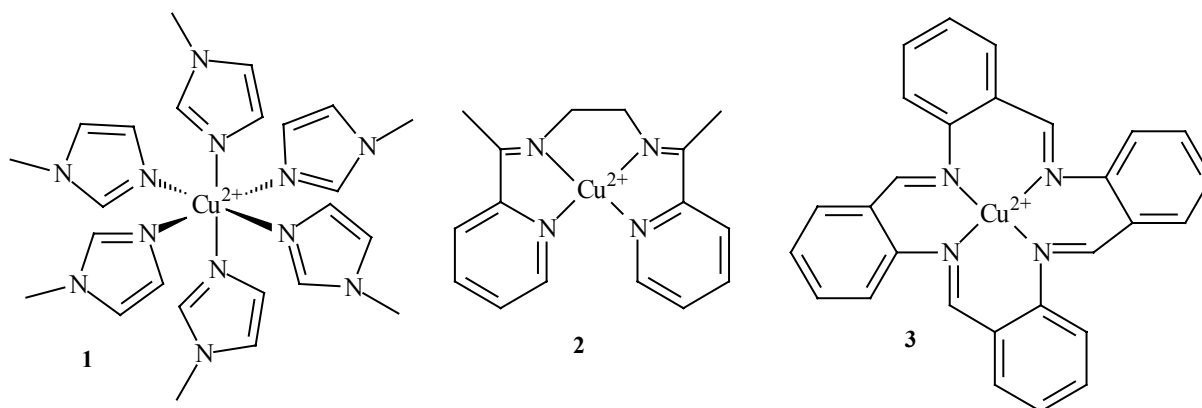
Amint az a 7. ábrán is látható, az említett kutatók ligandumként imidazol- és piridintartalmú makrociklusos vegyületeket, aminokat és imidazolt, míg fémionként réz(II)iont alkalmaztak. A pontos szerkezetet szilárd állapotban röntgendiffrakciós módszerrel határozták meg, míg vizes oldatban a leggyakrabban használt mérési módszerek az ESR spektroszkópia és a potenciometria voltak. Az esetek nagy többségében vizsgálták a komplexek mágneses tulajdonságait is, azonban ezekben a munkákban az előállított komplexek enzimaktivitását nem tanulmányozták.

R.N. Patel és munkatársai olyan többmagvú, imidazolátóhidat tartalmazó fémkomplext vizsgáltak, amelyekben ligandumként egyszerű aminokat és imidazolt, míg fémionként réz(II)-, cink(II)- és nikkel(II)ionokat használtak [26-36]. Vizsgálati módszereik a pH-függő ESR spektroszkópia, mágneses vizsgálatok, UV-Vis spektrofotometria, potenciometria és SOD tesztreakciók voltak. A vizsgált komplexek SOD aktivitása minden esetben több nagyságrenddel elmaradt a természetes enzimétől.

A fentemlített modellvegyületeken kívül további többmagvú réz(II)-réz(II), réz(II)-cink(II) komplexet is vizsgáltak, mint lehetséges SOD modellvegyületeket [37-42].

Ligandumként makrociklusos vegyületeken kívül olyan molekulákat (imidazolt, karboxilcsoportot tartalmazó vegyületek) használtak, amelyek képesek hídligandumként viselkedni két fémion között. A vizsgálati módszerek itt is hasonlóak (mágneses mérések, IR spektroszkópia, ESR spektroszkópia, SOD tesztreakció, röntgendiffrakciós mérések, ciklikus voltammetria, UV-Vis spektrofotometria) voltak, mint az előző munkákban. Néhány esetben a vizsgált komplexek igen jó szerkezeti és működési SOD modellnek bizonyultak.

A szerkezeti modellezésen kívül számos olyan eredményt közöltek [43-57], amelyekben a modellkomplex szerkezete ugyan nem hasonlított a Cu,Zn-SOD enzim aktív centrumához, de működésileg igen jól utánozta azt. Ezekben az esetekben egymagvú réz(II)komplexekről van szó, amelyekben ligandumként az előzőekhez hasonlóan imidazolt, makrociklusos vegyületeket, illetve aminokat alkalmaztak. Néhány egymagvú, SOD aktivitással rendelkező réz(II)komplex szerkezete látható a 8. ábrán.

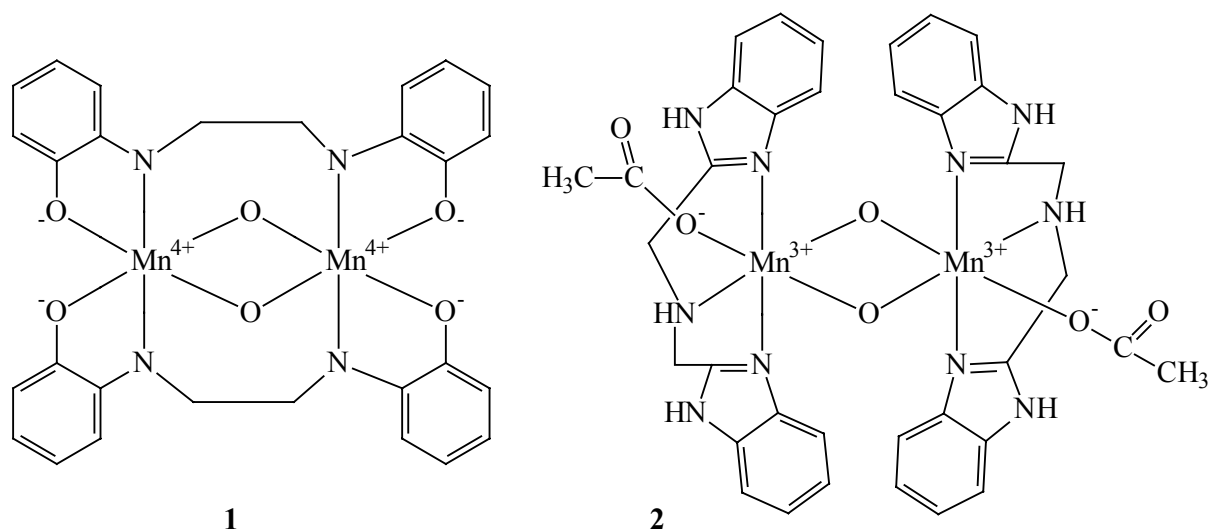


8. ábra Néhány SOD aktivitással rendelkező egymagvú réz(II)komplex. 1 – $[\text{Cu(II)(N-meim)}_6]^{2+}$, 2 – $[\text{Cu(II)apen}]^{2+}$, 3 – $[\text{Cu(II)TAAB}]^{2+}$ (N-meim = N-metilimidazol, apen = etilén-bis-(2-acetilpiridin-iminátó), TAAB = tetrabenzo-1,5,9,13-tetraaza-ciklodekán).

A korábbi években sok olyan kis molekulatömegű komplex vegyületet fejlesztettek ki, amelyek hasonló jellegű működésre képesek, mint a **mangántartalmú kataláz**. Ugyanakkor meg kell jegyeznünk, hogy ezen modellvegyületek általában kisebb aktivitással rendelkeznek, mint a natív enzim. Hasonlóan az előzőekben tárgyalt szuperoxid dizmutáz enzimhez, a modellezésre fókuszáló kutatások ebben az esetben is két irányban haladtak: szerkezeti és/vagy működésbeli utánzás. A természetes kataláz aktív centrumának szerkezetét (5. ábra) ismerve, a modellkomplexek kifejlesztése során a kutatók +2, +3 és +4 oxidációs állapotú mangánionokat tartalmazó, a fémionok között hídként viselkedő ligandumokkal rendelkező rendszereket használtak az enzim aktív centrumának szerkezeti modellezése során [58]. Ezekben a vegyületekben a gyakran különböző oxidációs állapotú fémionok közötti közvetlen kapcsolatot egyszeres oxo-, hidroxo- vagy alkoxohidak biztosítják. Ez a fajta hídkötés ritka a

mangántartalmú vegyületek között, ugyanis a dioxo- és dihidroxohidat tartalmazó komplexek termodinamikailag jóval stabilisabbnak bizonyultak a korábbi vizsgálatok alapján. Ezekben a molekulákban fémionként mangán(II), (III) és (IV)ionokat alkalmaztak egyenként és vegyesen egyaránt [59-62].

A kataláz modellkomplexek egyik nagy csoportja a kettős (bisz) oxo-, hidroxo- vagy alkoxohidat tartalmazó mangántartalmú fémkomplexek. Ezek közül is a legelterjedtebbek a bisz- μ -oxohidas dimangán vegyületek, amelyekben a mangán +2, +3 és +4 oxidációs állapotban is megtalálható [63-66]. Néhány alkoxohidat tartalmazó modellkomplex szerkezete látható a 9. ábrán.

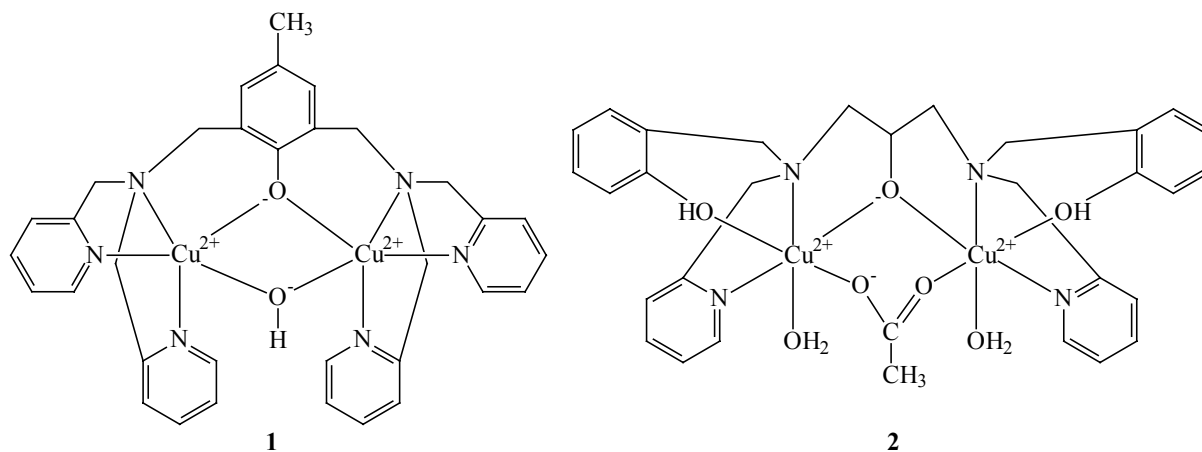


9. ábra Bisz- μ -alkoxohidat tartalmazó kataláz modellkomplexek. **1** – $(\text{Mn(IV)salpn})(\mu\text{-O})_2$, **2** – $\text{Mn(III)}_2\text{bbml}_2\text{ac}_2$ (salpn = 1,3-bisz-(szalicilidéniminató)propán, bbml = bisz(benzimidazolilmetil)amino)etanol, ac = ecetsav).

A kataláz enzim szerkezetét modellező fémkomplexek közül szintén elterjedtek a karboxiláthidat tartalmazó vegyületek. Hasonlóan a natív enzimhez, ezekben a molekulákban általában a karboxilcsoporton kívül található további hídligandum is (pl.: hidroxo-, oxo- vagy alkoxohíd) változó mennyiségben. A mangánionok oxidációs állapota ezekben az esetekben is változó: +2, +3, +4 oxidációs szám is előfordul. Az alkalmazott ligandumok tekintetében azt mondhatjuk, hogy közöttük előfordulnak nitrogén- és/vagy oxigéntartalmú makrociklusos vegyületek, karbonsavszármazékok, aminok stb. is [67-72]. A fentebb tárgyalt szerkezeti modellezésen kívül próbálkoztak olyan funkcionális modellrendszereket is előállítani, amelyekben fémionként réz(II)ionokat alkalmaztak, kihasználva annak kedvező redoxitulajdonságait [73-75]. Azonban ezekben az esetekben a vizsgált fémkomplexek több nagyságrenddel gyengébb katalitikus aktivitással rendelkeztek, mint az korábban tanulmányozott mangántartalmú vegyületek.

A most tárgyalt, kataláz enzimet modellező komplexek esetében a szerkezetet legtöbb esetben röntgendiffrakciós mérésekből határozták meg. Az előállított molekulák spektroszkópiai tulajdonságait ESR, FT-IR, Raman és UV-Vis spektroszkópiai módszerekkel vizsgálták. Néhány esetben tanulmányozták a komplexek mágneses-, illetve elektrokémiai tulajdonságait is, emellett a rendszerek oldategyensúlyi viselkedését általában pH-potenciometria módszerével vizsgálták. A modellvegyületek katalitikus aktivitását majdnem minden esetben mérték: az alkalmazott tesztreakció a hidrogén-peroxid katalitikus bontása volt, amelyben különböző módszerekkel vagy a szubsztrát, vagy pedig a képződő oxigéngáz mennyiségét követték.

Az előzőekhez hasonlóan, a **katechol oxidáz** enzim aktív centrumának szerkezetét is meghatározták korábban. Ennek hatására megindultak a kutatások a természetes enzimet modellezni képes fémkomplexek irányában. Ahogy a természetes enzim szerkezetének felkutatásában, ezen a területen is meghatározó munkát végeztek B. Krebs és munkatársai, amelyet közlemények sora bizonyít [76-78]. Az aktív centrum szerkezetét utánozva számos réz(II)ionokat tartalmazó kétmagvú fémkomplexet állítottak elő, amelyekben a fémionok között hidroxohíd, vagy hidak találhatók (10. ábra). Ezek a csoportok eltérő eredetűek lehetnek: származhatnak fenolátcsoporttól és/vagy alkoholos hidroxilcsoporttól is, de a legtöbb esetben a vízmolekulák deprotonálódásával keletkező hidroxidion tölti be a hídligandum szerepét [79-82].



10. ábra Katechol oxidáz aktivitással rendelkező modellkomplexek. **1** – $\text{Cu}_2(\text{bpmp})\text{OH}$, **2** – $\text{Cu}_2(\text{H}_2\text{-bbppnol})(i\text{-OAc})(\text{H}_2\text{O})_2$ (H-bpmp = 2,6-bisz[(bisz(2-piridilmetil)amino)metil]-4-metilfenol, $\text{H}_3\text{-bbppnol}$ = N,N -bis(2-hidroxybenzyl)- N,N' -bisz-(piridilmetil)]-2-hidroxi-1,3-propándiamin).

Egyes modellkomplexekben a fémionok között más, hídligandumként viselkedni képes molekulák tartják fent a közvetlen kapcsolatot. Ilyen ligandumok lehetnek például az imidazolcsoport, illetve a karboxilcsoport [83-84]. Kifejlesztettek olyan modellrendszereket

is, amelyekben a ligandumok több fémion megkötésére képesek, de közvetlen kapcsolat nincs közöttük. Ezekben a komplexekben egy merev „spacer” tartja a fémionokat megfelelően közeli pozícióban ahhoz, hogy katecholáz aktivitással rendelkezessenek [85-87].

A természetes enzimeket utánzó fémkomplexek tárgyalása során eddig említett modellrendszerek az aktív centrumok leegyszerűsített változatai voltak. A legnagyobb különbség a modellkomplexek és a natív enzimek aktív helyei között az, hogy az előbbieken elhanyagolták az enzimet alkotó fehérjelánc szerkezetkialakító szerepét. A fehérjelánc modellezésére jó lehetőségnek ígérkezik a modellkomplexek beépítése szilárd hordozóba, ahol a mátrix különféle kölcsönhatások révén elősegítheti egy, a természetes enzim aktív centrumához hasonló környezet létrejöttét és így a kívánatos geometriájú fémkomplex kialakulását. Az rögzített (immobilizált) fémkomplexek előállításáról, tulajdonságaikról, felhasználásukról és néhány szerves szilárd mátrix (szilikagél, montmorillonit, zeolit) tulajdonságairól a következő fejezetben olvashatunk.

II.3. Immobilizált fémkomplexek

Egy heterogenizált katalizátor rendelkezik néhány előnnyel a homogén megfelelőjével szemben (a termék könnyen elválasztható a katalizátortól, így az újra felhasználható; a hordozós katalizátor általában jobban tűri az erélyesebb reakciókörülményeket stb.), ezért a szilárd hordozóra rögzített fémkomplexek felhasználása heterogén katalizátorként elterjedőben van. Az utóbbi évtizedekben jónéhány esetben használták őket oxidációs-redukciós, polimerizációs, illetve más szerves kémiai reakcióban katalizátorként. Ilyen reakciók lehetnek például az olefin oxidáció, alkohol oxidáció, hidrogén-peroxid bontás, szuperoxid-gyökök dizmutálása, epoxidálás stb. Szilárd hordozóként általában szerves mátrixokat alkalmaztak, mint például fémoxidok, agyagásványok, zeolitok, szilikagél. Más esetekben pedig szerves polimereket (pl. polisztirol), vagy módosított felületű szén-származékokat használtak. A szerves hordozóknak azonban van néhány előnye a többiekkel szemben. Nagyon fontos a kémiai stabilitás (bizonyos esetekben a kémiai inertség), ami a szerves hordozók egyik nagy előnye. A kitűnő mechanikai stabilitás is indokolja használatukat, csakúgy, mint a termikus stabilitás (jobban ellenállnak a hőmérsékletváltozásnak, mint például a polimerek). Hasznos tulajdonságuk az is, hogy előállításukra és jellemzésükre már kidolgozott technikák állnak rendelkezésre [88-91]. A modellkomplexek immobilizálása mellett a természetes enzimek szilárd mátrixokban történő rögzítése is igen elterjedt az utóbbi időben. A heterogenizálástól különböző előnyös

tulajdonságokat remélve szuperoxid dizmutáz [92-93], kataláz [94-96], glükóz oxidáz [97], tirozináz [98] és peroxidáz [99] enzimeket immobilizáltak szilárd hordozókon.

II.3.1. Immobilizálás zeolitokban és agyagásványokon

A koordinációs kémiai kutatások zeolitokban az 1970-es években kezdődtek. Azóta a zeolitokban immobilizált fémkomplexek felhasználása heterogén katalizátorként igen széles körben elterjedt. A zeolitok egyik igen fontos tulajdonsága, hogy előállításuk során különböző módszerekkel széles skálán tudjuk változtatni a pórusméretet. Ezáltal molekulaszűrőknek is tudjuk őket használni, mivel csak a megfelelő méretű vegyületek jutnak be az anyag pórusaiba. Ezen kívül számos kedvező tulajdonságuk van, amelyek javítják a katalizátor működését különböző reakciókban. Mivel ioncsere-kapacitással rendelkeznek, ezért pozitív töltésű fémionok és fémkomplexek tudnak megkötődni a pórusokban, az elektrosztatikus kölcsönhatások segítségével. A zeolitokban rögzített fémkomplexek előállítására több módszert is kidolgoztak [100-101].

Az első módszer szerint *az előre elkészített komplexet visszük be a zeolitba*. Ezzel a módszerrel csak kationos fémkomplexeket tudunk immobilizálni, mivel a zeolit ioncsere-kapacitásának megfelelő elektrosztatikus kölcsönhatások rögzítik a komplex molekulát. A szintézist lehet vizes és nemvizes közegben is végezni. Ennél a módszernél további kritériumoknak is teljesülni kell: (a) a komplex legyen elég stabilis; (b) az oldat, amelyben az oldott komplex van, ne legyen nagyon lúgos, mert magas pH-értéken már a zeolit is oldódik; (c) a komplex legyen elég kicsi ahhoz, hogy beférjen a hordozó pórusaiba. Így általában csak aqua, ammónia és alifás aminok komplexei rögzíthetők a zeolitban.

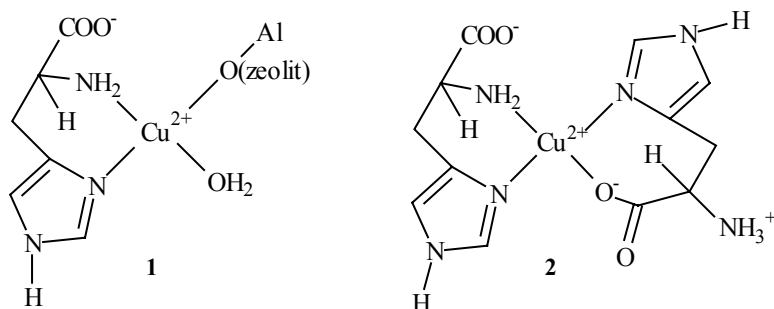
A *templátszintézis* során szintén előre elkészített fémkomplexet használunk, mint templátot, amely a zeolit szintézise során épül be a mátrixba. A módszernek két alapvető korlátja van: (a) a komplexnek stabilisnak kell lennie a szintézis körülményei között, a zeolitszintézis során ugyanis magas hőmérsékletet és lúgos pH-t alkalmazunk; (b) a komplexnek oldhatónak kell lennie az adott közegben ahhoz, hogy homogén legyen az eloszlása a reakcióelegyben.

A „*ship in a bottle*” szintézis lényege, hogy a fémiont és a ligandumot külön-külön juttatjuk be a zeolitba, így a komplexképződési reakció a szilárd mátrix belsejében játszódik le. Általában először a fémiont juttatjuk be (ioncserélt zeolitot készítünk), majd ezt követően a ligandumot. Fontos, hogy a ligandum mérete akkora legyen, hogy beférjen a zeolit pórusaiba. Dolgozhatunk vizes és nemvizes közegben egyaránt, azonban érdemes olyan oldószert

választanunk (pl. alkoholok), amelyek alacsony felületi feszültségüknek köszönhetően megkönnyítik a komplex alkotórészeinek mátrixba való bejutását.

A *komplex prekursor módszer* esetén a zeolitba bevitt komplex molekula reagál a mátrix felületével és így alakul ki az a fémkomplex, amit később katalizátorként kívánunk használni. Korábban végeztek olyan szintéziseket, amelyekben $\text{Me}_3\text{SnMn}(\text{CO})_5$ és $\text{Cl}_2(\text{tetrahidrofurán})\text{GeMo}(\text{CO})_5$ összetételű fémorganikus vegyületeket vittek be a zeolitba. Ezek az anyagok megfelelő hőmérsékleten reakcióba léptek a savas tulajdonságú zeolitfelülettel és metán, illetve hidrogén-klorid képződése közben alakult ki a várt összetételű komplex [102].

Számos publikáció [101, 103-110] jelent meg az utóbbi évtizedben *B.M. Weckhuysen* és munkatársai tollából, amelyekben zeolitokban immobilizált kobalt(II)- és réz(II)komplexeket tanulmányozásáról szólnak. Vizsgálták a fentemlített fémionok komplexképződését egyszerű ligandumokkal (víz, ammónia), nukleotidokkal (purin, adenin, guanin) és aminosavakkal (lizin, hisztidin) egyaránt. A rögzítés során a korábban említett módszereket alkalmazták. Megállapították például, hogy a zeolitokban rögzített réz(II)-hisztidin komplexekben a központi fémionhoz koordinálódhatnak a zeolit kristályrácsában található oxigénatomok is (11/1. ábra). Az is lehetséges azonban, hogy a réz(II)ionok koordinációs szférája nem változik a rögzítés során, a komplex csupán az ioncsere-kapacitásnak megfelelő elektrosztatikus kölcsönhatásokkal kötődik a szilárd mátrixhoz (11/2. ábra).

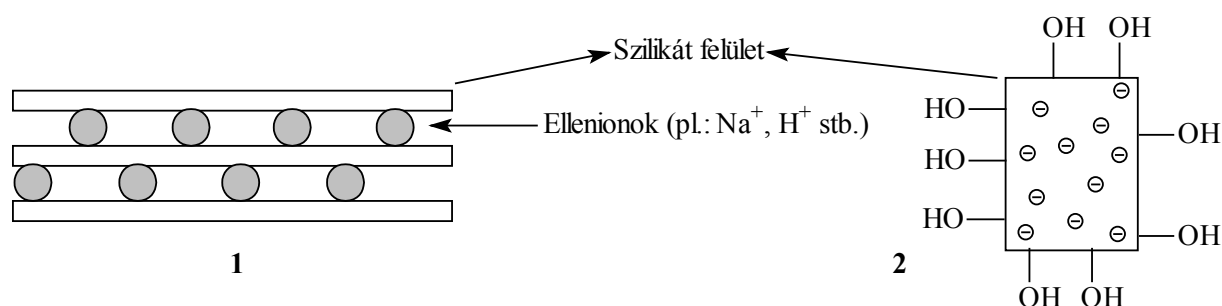


11. ábra Zeolitban rögzített réz(II)-hisztidin komplexek lehetséges szerkezetei. **1** – a réz(II)ion koordinálódik a zeolit kristályrácsában található oxigénatomhoz, **2** – az eredeti szerkezet megváltozása nélkül, elektrosztatikus kölcsönhatások rögzítik a komplexet.

A fentiekhez hasonlóan más típusú fémkomplexek rögzítésére is sor került a korábbiakban. A heterogenizálás adta előnyöket kihasználva, zeolitban immobilizált fémkomplexeket előszeretettel használnak katalizátorként alkének epoxidálása során [111-115]. A zeolitban rögzített komplexek másik nagy felhasználási területe a katalitikus oxidációs-redukciós reakciók területén van. Ebben az esetben fenolok, alkoholok oxidációját,

hidrogénezési reakciókat, illetve hidrogén-peroxid elbontást katalizálják a fentemlített anyagok [116-119].

Hasonlóan a zeolitokhoz, az agyagásványok (pl. montmorillonit) alkalmazása szilárd hordozóként igen elterjedt. A fémkomplexek rögzítése általában az előzőekben ismertetett módszerek szerint történik. A duzzadó rétegszilikátok csoportjába tartozó (megfelelő körülmények között duzzadásra képes) montmorillonit szerkezete különbözik a zeolitoktól, ugyanis itt nem pórusokról, hanem lemezes szerkezetről beszélhetünk. Az anyag TOT szerkezetű, ami azt jelenti, hogy szilícium tetraéderek (T) és alumínium oktaéderek (O) alkotják 2:1 arányban, amelyeket oxigénatomok kapcsolnak össze. A montmorillonit szintén rendelkezik ioncsere-kapacitással, ami a következő okok miatt alakult ki. A kristályrácsban található egyéb fémionok a szilícium(IV) és az alumínium(III)ionok helyén. Ilyen szennyező fémionok lehetnek például a magnézium(II), kalcium(II), réz(II), vagy vas(III)ion is. A szilíciumot helyettesítheti például alumínium(III)ion, míg az alumíniumot réz(II) vagy vas(III)ionok. A csere mértéke elérheti az 5-10 %-ot is, ezért az izomorf helyettesítések pozitív töltéshiányt hoznak létre, aminek következtében a lapok felülete negatív töltésű lesz, és így a pozitív töltésű részecskék (fémionok, fémkomplexek stb.) kapcsolódni tudnak hozzá. A lapok élein pedig hidroxicsoportok találhatóak, amelyek hidrogénhidakkal segíthetik elő a komplex molekulák megkötődését a hordozó felületén [120].

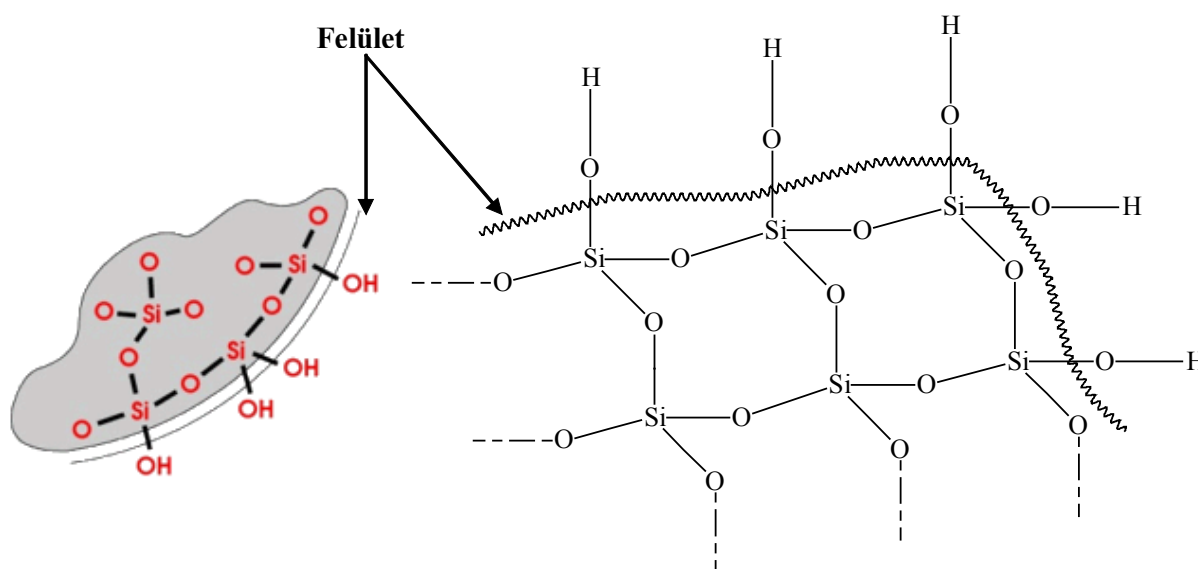


12. ábra A montmorillonit szerkezete. 1 – a lemezes szerkezet-, 2 – a felületi töltések és a hidroxilcsoportok ábrázolása.

A montmorillonit lemezes szerkezetéből adódóan lehetőség nyílik arra, hogy pozitív töltésű fémkomplexeket, illetve ligandumokat rögzítsünk az agyagásvány rétegei között. Az így előállított kitámasztott rétegszilikát fajlagos felülete jelentősen megnő, ami megkönnyíti a különböző katalitikus reakciókban résztvevő reaktánsok bejutását, illetve a termékek kijutását a katalizátor belsejéből. Ezt kihasználva montmorillonitban rögzített fémkomplexeket gyakran használnak fel katalizátorként [121-124]. Meg kell említenünk azt is, hogy a montmorillonit önmagában is képes bizonyos folyamatokat katalizálni.

II.3.2. Immobilizálás szilikagélén

Hasonlóan az előzőekben említett anyagokhoz, a szilikagélén rögzített fémkomplexek katalizátorként való felhasználása igen széles körben elterjedt. Számos előnyös tulajdonsága miatt (megfelelő morfológiai tulajdonságok, nagy fajlagos felület, kémiai ellenállóképesség, lehetőség funkciós csoportok kovalens rögzítésére stb.) az utóbbi évtizedekben igen népszerű hordozóvá vált. Szerkezete különbözik a zeolitok és az agyagásványok szerkezetétől, ugyanis ebben az esetben a kristályrácsot SiO_4^{4-} tetraéderek alkotják, amelyek egymással összekapcsolódva üreges szerkezetet hoznak létre (13. ábra). Nem jellemző rá az izomorf helyettesítés más fémionok által, ezért jóval kisebb ioncsere-kapacitással rendelkezik, mint a zeolitok és az agyagásványok. Nagyon fontos szerkezeti tulajdonsága, hogy felületén és pórusaiban hidroxilcsoportok találhatók, igen nagy felületi sűrűséggel [91]. Ez a tulajdonsága egyrészt azért előnyös, mert a hidroxilcsoportok más funkciós csoportokra lecserélhetők (funkcionált szilikagél készítése), másrészt pedig hidrogénhíd-kölcsönhatás alakulhat ki a hordozó és más elektronegatív centrumok között.

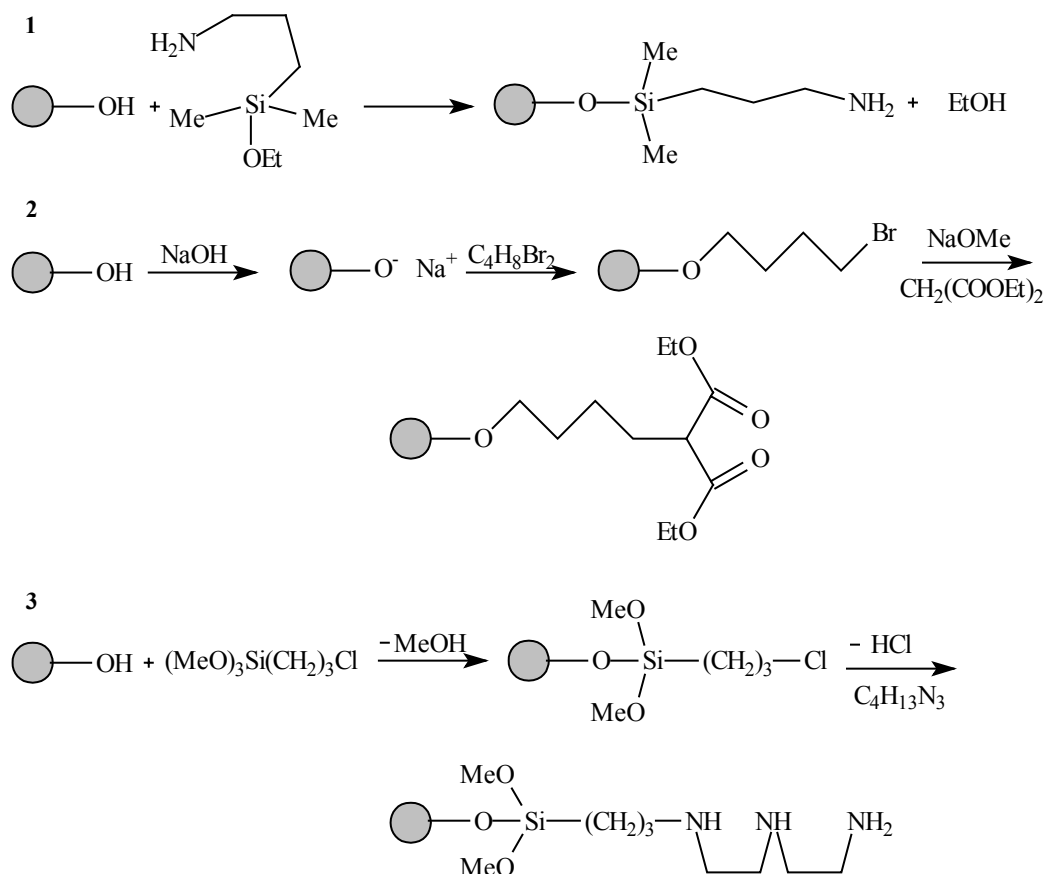


13. ábra A szilikagél sematikus szerkezete.

A szilikagél esetében a pórusok átmérője az előállítás módjától függően széles határok között változtatható ($5 \text{ \AA}$ - $3000 \text{ \AA}$). Általában a nagy pórusátmérő nem teszi lehetővé, hogy a szilikagél - a zeolitokhoz hasonlóan - molekulaszűrőként alkalmazzuk, ugyanis ebben az esetben a vegyületek legnagyobb részének bejutását nem akadályozzák szterikus hatások. A normál (nem funkcionizált) szilikagél katalitikus aktivitása jócskán elmarad az agyagásványok és zeolitok hasonló értékeitől, annak köszönhetően, hogy a tisztán előállított anyag nem tartalmaz fémion-szennyeződéseket, szerkezete szabályos, tehát nem rendelkezik

katalitikusan aktív helyekkel. A szilikagél jó adszorpciós képességekkel rendelkezik, azonban ez is elmarad a zeolitok hasonló tulajdonságaitól. Általában *van der Waals* kölcsönhatásokon alapuló fiziszorpció játszódik le, illetve elektronegatív centrummal rendelkező molekulák hidrogénkötésekkel is kapcsolódhatnak a szilárd mátrixhoz. A gyengébb adszorpciós erőknek köszönhetően a szilikagél regenerálása is könnyebb folyamat.

Fémkomplexeket az II.3.1. pontban említett módszerekkel is rögzíthetünk szilikagélen, ám ez az anyag azzal a nagy előnnyel rendelkezik más hordozókkal szemben, hogy felületi hidroxicsoportjai alkalmasak funkcionálizálásra. Ez azt jelenti, hogy kovalensen tudunk kapcsolni a felülethez arra alkalmas szerves ligandumokat. A ligandumok immobilizálását követően pedig fémionok hozzáadásával a mátrix felületén alakul ki a kívánt komplexmolekula. A funkcionáliszt szilikagélek előállítására jónéhány kidolgozott technika áll rendelkezésre [125-139]. Ezek közül néhány módszer a 14. ábrán látható.



14. ábra Szerves vegyületek rögzítése szilikagélen kovalens kötésen keresztül (a sötét kör a szilikagél tömbfázisát szimbolizálja).

Szilikagélen kovalens kötással rögzített szerves vegyületeket használnak például folyadékkromatográfiai kolonnák készítésénél is. Ezeket általában fémionok elválasztásakor alkalmazzák, tehát olyan ligandumokat (O-, N- donortatómot tartalmazó vegyületek)

rögzítenek a szilikagél oszlopon, amelyek különböző stabilitású komplexmolekulákat képeznek a vizsgált elegyben található fémionokkal [140-144]. A szilikagélen immobilizált fémkomplexek legszéleskörűbb felhasználása azonban a különböző szerves kémiai reakciók katalizálásában van [91, 145-148]: epoxidálás, olefin polimerizáció, alkán-, alkohol oxidáció stb. Ezek mellett természetesen alkalmazzák őket biológiai rendszerek modellezésére is (pl. hidrogén-peroxid bontás, szuperoxid-gyökök dizmutálása, katechol oxidáció) [149-151]. Az előállított katalizátorok szerkezetét leggyakrabban a következő módszerekkel vizsgálják [100-101]: FT-IR spektroszkópia, UV-Vis spektrofotometria, ESR spektroszkópia, Mössbauer spektroszkópia, NMR spektroszkópia, elektrokémiai módszerek, mágneses szuszceptibilitás mérés, röntgendiffrakció, fajlagos felület meghatározása, termikus- (DSC, DTA, TG) és különböző felületvizsgáló módszerek (XPS, SEM, TEM), számítógépes modellezés.

III. KÍSÉRLETI RÉSZ

III.1. Az anyagok előállítása

III.1.1. A hordozó nélküli komplexek előállítása

Az imidazolátóhidat tartalmazó, kétmagvú Cu,Zn-komplexet (réz(II)-dietiléntriamin- μ -imidazolátó-cink(II)-trisz(2-aminoetil)amin perklorát) megadott leírás [3] szerint készítettük. Réz(II)-perklorát hexahidrátot (Fluka) feloldottunk etanolban, majd 1:1 molarányban adtunk hozzá dietiléntriamint (**A**, Fluka) és imidazolt (**B**, Reanal). Egy másik edényben az előzőekkel azonos anyagmennyiségű cink(II)-perklorát hexahidrátot (Fluka) szintén feloldottunk etanolban, majd 1:1 molarányban trisz(2-aminoetil)amint (**C**, Aldrich) adtunk hozzá. A két oldatot összeöntöttük, majd kevertetés közben körülbelül felére bepároltuk. Az oldat lehülése után kékes-lilás, porszerű szilárd anyagot kaptunk, amit szűrtünk és 80 °C-on vákuumban szárítottuk.

A későbbiekben referenciaként használt CuA (réz(II)-dietiléntriamin), CuAB (réz(II)-dietiléntriamin-imidazol) és CuC (réz(II)-trisz(2-aminoetil)amin) előállítása során is a fentemlített eljárást követtük. A megfelelő mennyiségű réz(II)-perklorát hexahidrátot etanolban oldottuk, majd azonos anyagmennyiségű ligandumot adtunk hozzá. Kevertetés és bepárlás után a keletkezett szilárd anyagokat szűrtük, majd vákuumban szárítottuk.

A réz(II)-hisztidin-komplex (Cu-his) előállításánál is megadott recept alapján dolgoztunk [152], kis változtatással. Réz(II)-klorid hexahidrátot (Reanal) oldottunk fel izopropil-alkoholban, majd ötszörös anyagmennyiségű L-hisztidint (Reanal) adtunk hozzá. Az oldatot kevertetés közben bepároltuk kb. felére, majd a lehülés után kapott porszerű, kék színű anyagot szűrtük és szárítottuk 80 °C-on vákuumban.

III.1.2. A komplexek immobilizálása

Immobilizálás szilikagélen hidrogénkötések segítségével

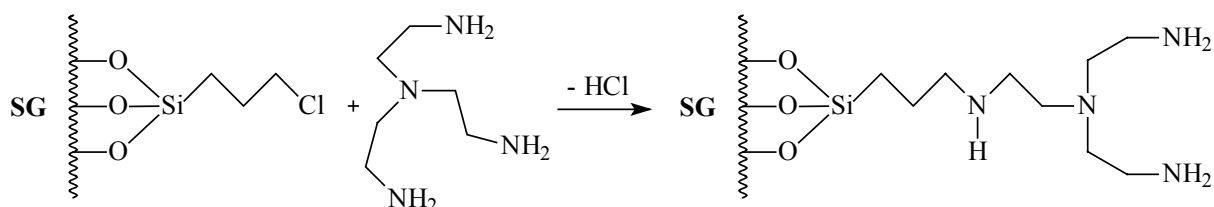
A hidrogénhíd-kölcsönhatásokkal rögzített Cu,Zn- (SG-h-Cu,Zn), CuA- (SG-h-CuA) és CuC- (SG-h-CuC) komplexeket a következő recept szerint készítettük. 0,5 g szilárd mátrixból (szilikagél (SG) (Aldrich, átlagos pórusméret: 5-25 μ m, fajlagos felület: ~ 94 m²/g, Fe³⁺ $\leq 0,001\%$, Cl⁻ $\leq 0,003\%$, pH (10 %-os vizes szuszpenzióban): $\sim 6,8$) és 100 ml izopropil-alkoholból szuszpenziót készítettünk, majd hozzáadtuk az adott komplex szintén izopropil-alkoholos oldatát. Az elegyet 24 órán át kevertettük, majd szűrtük. Ezt követően a szilárd

anyagot 100 ml izopropil-alkoholban mostuk szintén 24 órán keresztül, hogy a gyengén kötődő molekulákat eltávolítsuk a hordozó felületéről. A mosás után a kapott katalizátorokat szűrtük, majd szárítottuk vákuumban 80 °C-on.

Immobilizálás szilikagélen kovalens kötésen keresztül

A Cu,Zn-komplex kovalens rögzítése során a következők szerint jártunk el: 1,5 g 3-(diételentriamino)propil funkcionáliszt szilikagél (Aldrich, 1,84 mmol diételentriamino-csoportot tartalmaz) szuszpendáltattunk 125 ml etanolban, majd kevertetés közben 0,68 g réz(II)-perklorát hexahidráttal (1,84 mmol réz(II)ion) adtuk az elegyhez. A szuszpenziót egy órán keresztül kevertettük. Ezt követően 0,13 g (1,84 mmol) imidazolt (Reanal) adtuk hozzá, majd az elegyet kevertettük három órán át. Ugyanekkor egy másik edényben 0,69 g (1,84 mmol) cink(II)-perklorát hexahidráttal feloldottunk 30 ml etanolban és 0,20 ml (1,84 mmol) trisz(2-aminoetil)amint adtuk hozzá kevertetés közben. Az oldatot három órán keresztül kevertettük, majd a fentiek szerint készített szuszpenzióhoz öntöttük. Az ily módon nyert elegyet egy órán keresztül kevertettük, majd a kékes-lilás színű szilárd anyagot (kovalensen rögzített Cu,Zn-komplex (SG-c-Cu,Zn)) szűrtük és szárítottuk 80 °C-on, vákuumban. A fenti recept első lépését követve állítottuk elő a CuA- és CuAB-komplexek kovalensen rögzített változatát (SG-c-CuA, SG-c-CuAB) is.

A kovalensen kötött CuC-komplex (SG-c-CuC) előállítása során nem rendelkezünk előre elkészített trisz(2-aminoetil)amin funkcionáliszt szilikagéllel, tehát első lépésben ezt kellett szintetizálni. Ennek során 5,00 g 3-klórpropil funkcionáliszt szilikagél (3,63 mmol klórpropilcsoport) és 200 ml piridin szuszpenziójához adtuk 2,72 ml trisz(2-aminoetil)amint. Az elegyet egy napon át refluxáltattuk kevertetés közben. A kapott szilárd anyagot szűrtük, majd áztattuk vízben egy héten keresztül. Erre azért volt szükség, mert így el tudtuk távolítani a reakció során keletkező piridínium-kloridot a szilárd mátrixból. A reakció egyszerű ábrázolása látható a 15. ábrán.



15. ábra Trisz(2-aminoetil)amin kovalens rögzítése 3-klórpropil funkcionáliszt szilikagélre (SG = szilikagél tömbfázisa).

A fentiek alapján elkészített funkcionáliszt szilikagélből 1,0 g-ot szuszpendáltattunk 60 ml izopropil-alkoholban, majd 40 ml, 0,09222 M réz(II)-klorid izopropil-alkoholos oldatát

adtuk az elegyhez. Egy napos kevertetés után a szuszpenziót szűrtük, majd mostuk 100 ml izopropil-alkoholban szintén egy napon keresztül. Ezután a zöldes-kék színű szilárd anyagot szűrtük, majd szárítottuk 80 °C-on, vákuumban.

Immobilizálás montmorillonitban

A montmorillonitban rögzített Cu,Zn- (Mont-i-Cu,Zn), CuC- (Mont-i-CuC) és Cu-his- (Mont-i-Cu-his) komplexek előállítása során hasonlóan jártunk el. Minden esetben a hordozó ioncsere-kapacitásának megfelelő elektrosztatikus kölcsönhatásokkal rögzítettük a pozitív töltésű komplex molekulákat. 100 ml izopropil-alkoholban szuszpendáltattunk 0,5 g montmorillonitot (Bentolite-H, Laporte, ioncsere-kapacitás: 1,05 mmol/g, fajlagos felület: 60 m²/g), majd ehhez adtuk a komplex izopropil-alkoholos oldatát. Egy napon át történő kevertetés után a szilárd anyagot szűrtük, majd 100 ml izopropil-alkoholban mostuk szintén egy napon keresztül. Az így nyert katalizátorokat szűrtük, majd szárítottuk 80 °C-on, vákuumban. A Cu-his-komplex immobilizálása annyiban eltért az előzőekben leírtaktól, hogy ebben az esetben réz(II)-ioncserélt montmorillonitból indultunk ki, és ehhez adtuk a ligandum izopropil-alkoholos oldatát.

III.2. Potenciometria

A potenciometriai mérések során a pH-metria titrálás módszerét alkalmaztuk a 2–11 pH-tartományban. A mérések során a következő anyagokat használtuk fel: dietiléntriamin (Fluka), imidazol (Reanal), trisz(2-aminoetil)amin (Aldrich), Zn(ClO₄)₂·6H₂O (Fluka), Cu(ClO₄)₂·6H₂O (Fluka), KOH (Reanal), KCl (Reanal), HCl (Reanal). A titrálások Millipore Milli-Q RG típusú készülékben készített ioncserélt desztillált víz felhasználásával, vizes közegben folytak. A mérések során a következő törzsoldatokat használtuk fel:

- (1) 0,05745 M dietiléntriamin ([H⁺]=0,19854 M),
- (2) 0,05076 M imidazol ([H⁺]=0,20771 M),
- (3) 0,04855 M trisz(2-aminoetil)amin ([H⁺]=0,20045 M),
- (4) 0,02532 M Cu(ClO₄)₂,
- (5) 0,025614 M Zn(ClO₄)₂,
- (6) 0,66700 M KCl.

A törzsoldatok fémiontartalmát hagyományos komplexometriai módszerekkel, a ligandumok mennyiségét pedig pH-metria titrálással határoztuk meg. A titrálásokat termosztálható (T = 298 K) üvegedényben, Metrohm 6.0222.100 típusú kombinált

üvegelektród, illetve Dosimat 665 típusú automata buretta segítségével végeztük, az alkalmazott ionerősség 0,1 M (KCl), míg a lúg (KOH) koncentráció 0,0961 M volt. A kálium-hidroxid mérőoldat hatóértékét pontos beméréssel készített kálium-hidrogénftalát (Fluka) oldat titrálásával határoztuk meg. A mérési adatok alapján a protonálódási állandók értékeit a Superquad [153], a komplex stabilitási állandókat pedig a Psequad [154] számítógépes program segítségével határoztuk meg. A vizsgált koncentrációtartomány 0,0025–0,005 M, a kezdeti térfogat 10 ml volt. A szén-dioxid távoltartása miatt az oldatokba nitrogéngázt buborékolattunk.

III.3. UV-Vis spektrofotometria

A spektrofotometriai mérések során vizsgáltuk az előzetesen előállított Cu,Zn-komplex látható spektrumainak pH-függését, illetve összehasonlítottuk pH = 8,0 értéknél a Cu,Zn-komplex és a kiindulási anyagok látható spektrumait. A méréseket látható fény tartományában, 400–820 nm hullámhossz-értékek között végeztük. Minden egyes mérés esetében a koncentrációérték fémionokra és ligandumokra nézve egyaránt 0,0025 M volt. A pH-t HEPES (Sigma) pufferrel (0,1 M) állítottuk be, a vizsgált pH-tartomány 5,5 és 8,5 között volt. A méréseket kvarc küvetában, Hewlett Packard 8452A Diode Array típusú spektrofotométerrel végeztük szobahőmérsékleten.

III.4. ESR spektroszkópia

A vizes oldatban végzett ESR spektroszkópiai vizsgálatoknál a spektrumokat 25 °C-on, argon-atmoszféra alatt vettük fel, Bruker ElexSys 500 típusú spektrofotométer segítségével. A megfelelő pH-értékeket 0,1 M NaOH oldat felhasználásával, illetve Orion 8103BN kombinált üvegelektród segítségével állítottuk be. A szilárd minták esetében a spektrumok felvétele por alakban történt, 298 K-en, szintén a Bruker ElexSys 500 típusú spektrofotométeren 100 kHz térmodulációval.

A színeképek elemzése előtt minden esetben korrekcióba vettük a mintatartó üvegcsőtől származó háttérjelet. A spektrumok mátrix rang analízise az MRA [155], szimulációjuk pedig a 2D-EPR [156] programmal történt. Az értékelés eredményeként az egyes spektrumokat a következő paraméterekkel jellemeztük: g értékek, réz(II) hiperfinom csatolási állandó (A_o), nitrogén szuperhiperfinom csatolási állandó (a_{No}), illetve a relaxációs paraméterek (α, β, γ). A csatolási állandók és a relaxációs paraméterek értékeit gauss (G) mértékegységben adtuk meg ($1 \text{ G} = 10^{-4} \text{ T}$). A színeképek minőségét a zajjal korrigált regressziós paraméter (R) segítségével jellemeztük.

III.5. FT-IR spektroszkópia

Az FT-IR spektroszkópiai méréseket a BIO-RAD Digilab Division FTS-65 A/896 FT-IR készüléken végeztük. A spektrumokat nujol és KBr pasztilla segítségével, 25 °C-on vettük fel. A vizsgált hullámszám-tartomány 400-4000 cm^{-1} volt. A vizsgált anyagok tulajdonságainak megfelelően kombinálva a két módszert, méréseket végeztünk abszorbancia és reflektancia (diffúz reflexiós infravörös Fourier-transzformációs spektroszkópia = DRIFTS) módban is. Az utóbbi felületi információkat szolgáltat a katalizátorról. Ebben az esetben a mért érték a Kubelka-Munk $((1-R^2)/2R)$, ahol az R a reflektancia) tényező, ami az abszorbanciával arányos mennyiség. A spektrumok felvétele során 126 scan-t gyűjtöttünk, a felbontás 2 cm^{-1} volt.

III.6. Termikus mérések

A termogravimetriás (TG, DTG, DTA) méréseket Derivatograph Q típusú készüléken végeztük. A minták tömege körülbelül 100 mg (pontosan bemérve) volt, a hőmérsékletet 30–1000 °C között változtattuk, a felfűtési sebesség 10 °C/perc volt. A mérések során platina-tégelyt és levegő-atmoszférát használtunk. Referenciaként α -alumínium(III)-oxid szolgált. A görbék értékelése során a WINDER V 6.0 programot használtuk fel.

III.7. Atomabszorpciós spektrofotometria

Az előállított katalizátorok réz(II)ion- és cink(II)ion-tartalmát atomabszorpciós spektrofotometriai mérésekkel határoztuk meg. A mérés során királyvizes ($\text{HCl}:\text{HNO}_3 = 3:1$) feltárást alkalmaztunk. Az elegyet előbb két órán keresztül 140 °C-on, majd ugyancsak két órán át 180 °C-on refluxáltattuk, egy Gerhardts Kjeldatherm típusú feltárási berendezésben. A következő lépésben a szűrés után kapott oldatok réz(II)- és cink(II)ion tartalmát (mmol/g-ban) - megfelelő hígítás után - Perkin Elmer 3110 típusú atomabszorpciós spektrofotométerben határoztuk meg.

III.8. Tömegspektrometria

Az ESI-MS (electrospray ionization mass spectrometry) mérések esetében Finnigan TSQ 7000 típusú tömegspektrométert és 1 mg/ml koncentrációjú oldatokat használtunk, ahol oldószerként 2:1 víz:metanol elegyet alkalmaztunk. A méréseket pozitív ion módban végeztük, 10-1500 m/z tartományban. A spektrumok felvétele 200 °C-on történt (a fűtött kapilláris hőmérsékletén), a spektrumok izotóp-eloszlását az ICIS 8.3 program segítségével számítottuk.

A MALDI-MS (matrix assisted laser desorption/ionization) méréseket Bruker Instruments Co. Reflex III berendezésen végeztük, egy 337 nm-en működő nitrogén-lézer segítségével. A minták előkészítése során dihidroxi-benzoészav (DHB) vizes telített oldatát használtuk mátrixként, majd a tárgylemezre cseppentett mintákat szobahőmérsékleten szárítottuk.

III.9. Ciklikus voltammetria

A ciklikus voltammetriai mérések során vizes oldatokkal dolgoztunk, nitrogén-atmoszféra alatt, termosztált (25 °C) üvegedényben. A minták 1 mM komplex vegyületet, háttérelktrolitként pedig 0,1 M kálium-nitrátot tartalmaztak. Hagyományos háromelektrodos rendszert alkalmazva, munkaelektrodként üvegszén-elektrodot (Metrohm 6.1204.000) használtunk, míg az ellenelektrod platina (Radelkis), a referenciaelektrod pedig Ag/AgCl (Radelkis OP-0820P, 1 M kálium-kloriddal feltöltött) volt. A méréseket és értékelésüket számítógép-vezérelt program (EF 451) segítségével végeztük. A meghatározott elektrokémiai potenciálokat normál hidrogénelektrodra vonatkoztattuk. A mérőrendszer kalibrációját a $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ redoxifolyamat segítségével végeztük ($E_{1/2} = 236 \text{ mV}$ normál hidrogénelektrod ellenében).

III.10. A katalizátorok enzimaktivitásának vizsgálata

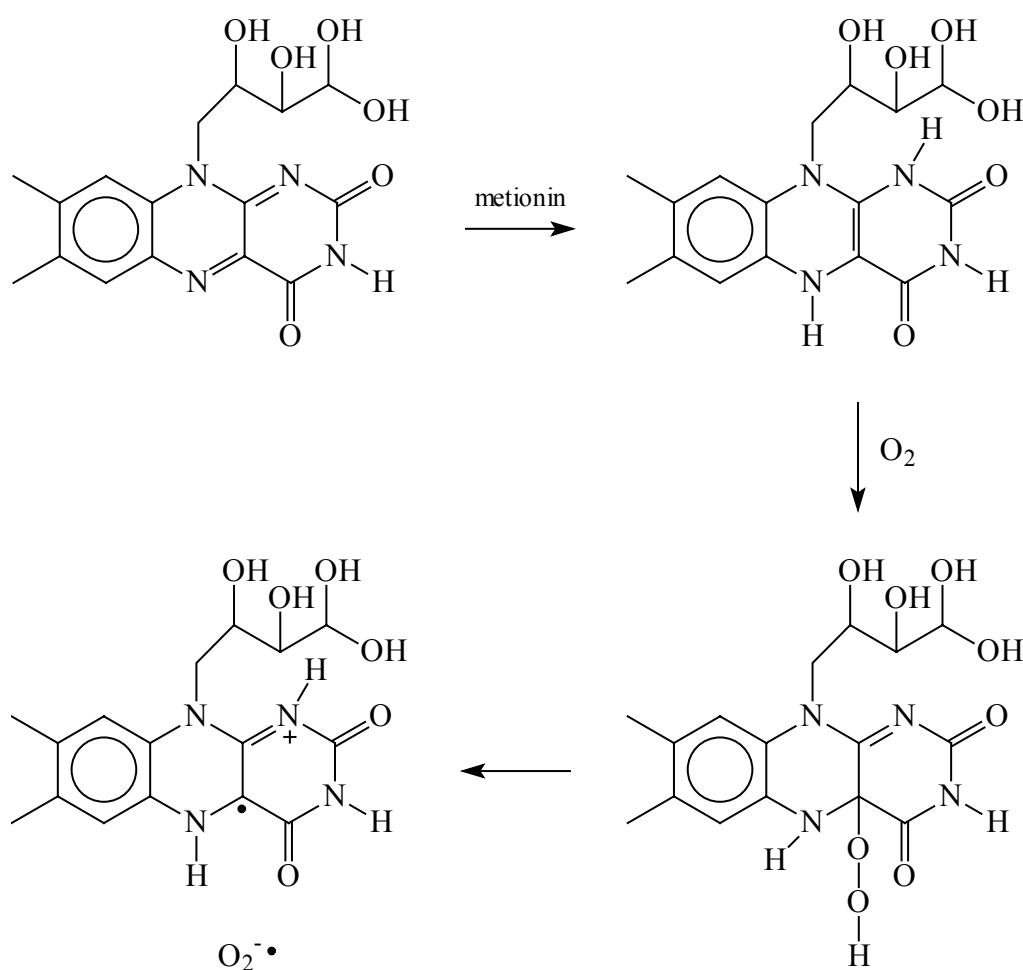
III.10.1. Szuperoxid dizmutáz (SOD) aktivitás mérése

Az előállított anyagok szuperoxid dizmutáz aktivitását a riboflavin/NBT tesztreakcióval [157-158] vizsgáltuk. A 3 ml reakcióelegy a következő összetevőket tartalmazta:

- 2,8 ml foszfát puffer ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ (Reanal), pH=7,5), ami tartalmaz 0,1 μM EDTA-t (Reanal) és 13,0 mM metionint (Reanal), illetve a vizsgálandó vegyületet a megfelelő koncentrációban;
- 0,1 ml, 5,0 mM nitro blue tetrazolium (NBT, Sigma) oldat;
- 0,1 ml, 0,2 mM riboflavin (Sigma) oldat.

A tesztreakció megvilágítás hatására, aerob körülmények között játszódik le; a fényforrás két darab egyenként 15 W-os fluoreszcens égő volt. A reakció a következőképpen megy végbe: a megvilágítás hatására a riboflavin első lépésben oxidálja a metionint, majd oxigénmolekulával való reakciójában termeli a szuperoxid-gyököket [159-162]. A lejátszódó reakciók a 16. ábrán láthatók. Az így keletkező szuperoxid-gyökök ezután reakcióba lépnek a nitro blue tetrazoliummal (NBT), amely egy szuperoxid-gyökökre érzékeny vegyület, és a

reakció folyamán a színe sárgából kékre változik. A kék szín megjelenése utal a reakció lejátszódására. A folyamatot spektrofotometriásan tudjuk követni úgy, hogy az abszorbanciát mérjük 560 nm-nél. A szuperoxid-gyökök csak megvilágítás hatására képződnek, ha kikapcsoljuk a fényforrást, megszakad a folyamat. Az elegyben levő EDTA-mennyiség más - a rendszerben esetleg jelenlévő - szennyező fémionok megkötésére szolgál. Az EDTA-komplexek inaktívak, tehát nem rendelkeznek szuperoxid dizmutáz aktivitással [159-160]. Ha enzim, vagy enzimutánczó fémkomplex van az elegyben, akkor az a keletkező szuperoxid-gyököket dizmutálja, így inhibálja az NBT redukcióját, tehát kisebb az elegy színváltozása.



16. ábra A riboflavin megvilágítás hatására lejátszódó szuperoxid-gyökanion termelő reakciói aerob körülmények között.

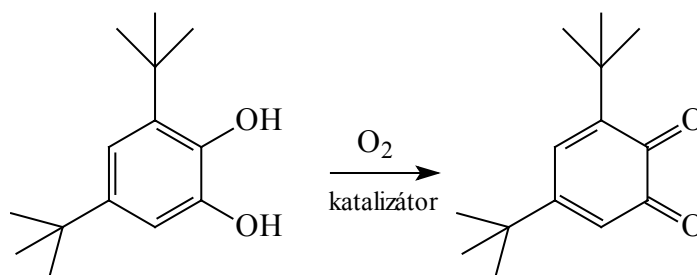
A fotoredukció lejátszódásához szükséges megvilágítást saját készítésű fénykamrában végeztük. Ez egy belül alumíniumfóliával borított papírdoboz, amelyben két 15 W-os fluoreszcens égőt helyeztünk el. Az égők között rögzített helyen voltak a küveták. Minden mérés esetében úgy jártunk el, hogy két elegyet készítettünk: az egyik nem tartalmazott komplexet, tehát ez volt a vak, míg a másik küvetában komplexet is (akár homogén, akár

heterogenizált formában) tartalmazó elegy volt. A két küvettát egyszerre világítottuk meg a fénykamrában 10 percig, majd mértük az abszorbancia-értékét 560 nm-nél. A megvilágítás azért tart 10 percig, mert korábban úgy találták, hogy ezen időtartam alatt az abszorbancia 560 nm-nél lineárisan nő, ezután pedig telítésbe megy át.

A mérési eredmények értékelése úgy zajlott, hogy minden egyes mérés után kiszámítottuk a vak, illetve a katalizátort tartalmazó elegy abszorbancia különbségét %-ban (ez az inhibíció), majd ábrázoltuk a réz(II)ion koncentrációjának függvényében. Az inhibíció-koncentráció görbéről leolvasható az 50 %-os inhibícióhoz tartozó koncentrációérték (IC_{50}), amellyel az egyes enzimutánzó vegyületek SOD aktivitását jellemezni lehet. Minél kisebb tehát az IC_{50} érték, annál jobb funkcionális SOD modell az adott anyag.

III.10.2. Katecholáz aktivitás mérése

Különböző vegyületek katecholáz aktivitásának mérése a 3,5-ditercbutil-katechol (DTBC) oxidációján alapul, miközben ditercbutil-kinon (DTBQ) keletkezik (17. ábra). A reakció aerob körülmények között, tehát oldott molekuláris oxigén hatására játszódik le [76-86]. Megfelelő katalizátor nélkül a folyamat nagyon lassan megy végbe.



17. ábra A 3,5-ditercbutil-katechol (DTBC) oxidációja 3,5-ditercbutil-kinonná (DTBQ).

Az oxidációs folyamatot spektrofotometriai módszerrel követtük, a keletkező DTBQ elnyelési hullámhosszán 400 nm-en. A reakció metanolos közegben zajlott, termosztálható 3 ml-es kvarcküvettában. A reakcióelegyet kevertettük és termosztáltuk 25 °C-on. A küvettába 2,5 ml, 0,12 mM réz(II)iont tartalmazó katalizátor és 0,5 ml, 60,0 mM DTBC metanolos oldatát mértük be. Az elegy abszorbanciáját 2, 5, 10, 15, 30, 45 és 60 perc elteltével mértük 400 és 800 nm-nél. A 800 nm-nél mért abszorbancia-értékeket (A_{800}) kivontuk a 400 nm-en leolvasott értékekből (A_{400}), így küszöbölve ki az abszorbancia mérését zavaró hatásokat. Ezután a különbségekből ($A_{400}-A_{800}$) a moláris abszorpciós koefficiens ($\lambda = 400$ nm, $\varepsilon = 1900$ M⁻¹cm⁻¹ metanolban) segítségével kiszámítottuk az elegyben található DTBQ mennyiségét. Az eredmények értékelése során az idő-DTBQ koncentráció görbékből kezdeti

sebességértékeket számítottunk, amelyekkel jellemezni tudtuk az egyes katalizátorok enzimutánzó képességét.

III.10.3. Kataláz aktivitás mérése

Mivel az élő szervezetekben a kataláz enzimek szerepe a különböző peroxidanionok elbontása vízre és molekuláris oxigénre, ezért a katalázszerű aktivitás mérésének legegyszerűbb módja a katalizátorok hidrogén-peroxid-bontó képességének vizsgálata. Számos módszer ismert a tesztreakcióban jelenlévő hidrogén-peroxid-, illetve a keletkező molekuláris oxigén mennyiségének mérésére [59-75]. Ezek közül mi a következő eljárást választottuk: 30 ml, 0,67 M koncentrációjú (20,1 mmol H_2O_2) hidrogén-peroxid oldatot mértünk be a reakcióedénybe; a reakcióelegyet kevertettük és termosztáltuk 25 °C-on; ezután 10 ml 0,21 mmol réz(II)ionot tartalmazó katalizátort adtunk az elegyhez, majd 20 percenként mintát (0,5 ml) vettünk belőle. A reakcióelegy pH-értékét 6,86-ra állítottuk be foszfát puffer (50 mM, KH_2PO_4 és Na_2HPO_4) segítségével. A kivett mintákat 7,0 ml 0,1 M koncentrációjú sósavba tettük, majd desztillált vízzel 10 ml-re egészítettük ki az oldatot (20-szoros hígítás). A minták savas kezelésére azért volt szükség, mert korábban úgy találtuk, hogy ennél a pH-értéknél a hidrogén-peroxid bomlása még katalizátor jelenlétében sem játszódik le. Ezután 3 ml-es kvarcküvetében mértük az egyes minták abszorbanciáját 240 nm-en. A reakciót 120 percen keresztül követtük. A mért abszorbancia-értékekből kalibráló egyenes segítségével kiszámítottuk a tesztreakció elegyben található hidrogén-peroxid mennyiségét, majd a számított, idő–hidrogén-peroxid koncentráció görbék segítségével meghatároztuk a reakció során elért konverziót, illetve kezdeti sebességeket, amelyekkel az egyes katalizátorok hidrogén-peroxid bontó képességét jellemezni tudtuk.

IV. OLDATEGYENSÚLYI VIZSGÁLATOK

Amint azt már az előzőekben említettük a Cu,Zn-komplex (2. ábra) előállítását és UV-Vis spektroszkópiai vizsgálatát már a korábbiakban publikálták [3]. Habár hasonló szerkezetű komplexmolekulákat már vizsgáltak az elmúlt évtizedekben számos módszerrel (II.2. fejezet), szükségesnek tartottuk az általunk használt molekula részletes szerkezetvizsgálatát elvégezni szilárd formában és vizes oldatban egyaránt. Az oldategyensúlyi viszonyokat pH-potenciometria, UV-Vis spektrofotometria, ESR spektroszkópia, tömegspektrometria és ciklikus voltammetria módszerekkel igyekeztünk tisztázni. A szilárdfázisban történt mérések (ESR spektroszkópia, TG, DTG, DTA mérések, FT-IR spektroszkópia) eredményeit a katalizátorokról (immobilizált Cu,Zn-komplexek) szóló V. fejezetben tárgyaljuk, ugyanis ezeket a méréseket használtuk fel annak igazolására, hogy a komplex megkötődött a szilárd mátrixon.

IV.1. pH-potenciometriai titrálások

A mérések során a pH-metria titrálás módszerét alkalmaztuk. Meghatároztuk a három ligandum (imidazol, dietiléntriamin, trisz(2-aminoetil)amin) protonálódási állandóit, majd a két fémion komplex stabilitási állandóit a következő rendszerekben:

A/ Protonálódási állandók meghatározása:

- dietiléntriamin,
- imidazol,
- trisz(2-aminoetil)amin.

B/ Komplex stabilitási állandók meghatározása:

- réz(II)-imidazol (1:1),
- réz(II)-dietiléntriamin (1:1),
- réz(II)-trisz(2-aminoetil)amin (1:1),
- réz(II)-dietiléntriamin-imidazol (1:1:1),
- réz(II)-trisz(2-aminoetil)amin-imidazol (1:1:1),
- cink(II)-imidazol (1:1),
- cink(II)-dietiléntriamin (1:1),
- cink(II)-trisz(2-aminoetil)amin (1:1),
- cink(II)-dietiléntriamin-imidazol (1:1:1),
- cink(II)-trisz(2-aminoetil)amin-imidazol (1:1:1),

- réz(II)-dietiléntriamin-imidazol-cink(II)-trisz(2-aminoetil)amin (1:1:1:1:1).

IV.1.1. Protonálódási állandók meghatározása

Korábbi mérésekből adatok álltak rendelkezésünkre [163-165], amelyekben az előbb említett ligandumokat vizsgálták. A mérések során meghatározott, illetve irodalmi protonálódási állandó értékek láthatók az 1. táblázatban.

1. táblázat Az imidazol, a dietiléntriamin és a trisz(2-aminoetil)amin protonálódási állandóinak ($\log\beta$) számértékei.

Ligandum	$\log\beta_{\text{mért}}$	St. Dev.	$\log\beta_{\text{irodalmi}}$	Irodalom
Imidazol (B)	7,03	0,01	7,03	[163]
dietiléntriamin (A)	9,88	0,01	9,85	[164]
	18,86	0,01	18,91	
	23,17	0,01	23,22	
trisz(2-aminoetil)amin (C)	10,02	0,04	10,14	[165]
	19,51	0,04	19,57	
	27,82	0,05	28,02	
	29,52	0,05	30,62	

A táblázat adatai alapján megállapíthatjuk, hogy a meghatározott protonálódási állandó értékek jó egyezést mutatnak a korábban publikált munkákban fellelhető adatokkal.

IV.1.2. Komplex stabilitási állandók meghatározása

Mint már korábban említettem a komplex stabilitási állandók meghatározásánál a méréseket minden esetben 1:1 fém:ligandum arányban végeztük (az egyszerűség kedvéért jelöljük az imidazolt **B**-vel, a dietiléntriamint **A**-val és a trisz(2-aminoetil)amint **C**-vel a következőkben). A mérési eredményekből azt szeretnénk volna megtudni, hogy az egyes rendszerekben milyen összetételű fémkomplexek alakulnak ki, illetve ezek milyen stabilitási állandóval rendelkeznek. A fő cél az volt, hogy az ötkomponensű (réz(II):dietiléntriamin:imidazol:cink(II):trisz(2-aminoetil)amin = 1:1:1:1:1) rendszerben bizonyítani tudjuk az imidazolátóhidat tartalmazó részecske (2. ábra) jelenlétét. Ehhez azonban az összes részrendszer esetében fel kell derítenünk a képződő komplexek összetételét és stabilitási állandóik értékét, mivel ezek az adatok szükségesek az ötkomponensű rendszer mérési adatainak kiértékelésében. A részrendszerek vizsgálata során néhány esetben irodalmi adatok is találhatók; ezeket az értékeket minden esetben feltüntettük a mért értékek mellett. A

méréseket a 2–11 pH-tartományban végeztük, néhány esetben azonban csapadék képződése akadályozta a mérést magasabb pH-értékeknél. A modellszámítások során a csapadék megjelenéséig mért pontokat vettük figyelembe.

Réz(II)–imidazol, illetve cink(II)–imidazol (B) (1:1) rendszerek

A mért, illetve az irodalomban talált CuB-, illetve ZnB- típusú komplexek stabilitási állandóit láthatjuk a 2. táblázatban.

2. táblázat A réz(II)–imidazol (CuB) és a cink(II)–imidazol (ZnB) 1:1 arányú komplexeinek stabilitási állandó ($\log\beta$) értékei.

Komplex	$\log\beta_{\text{mért}}$	St. Dev.	$\log\beta_{\text{irodalmi}}$	Irodalom
CuB	4,26	0,04	4,20	[166]
ZnB	2,58	0,02	2,56	[166]

Ebben az esetben is megállapíthatjuk, hogy az általunk mért értékek igen jó egyezést mutatnak az irodalmi adatokkal.

Réz(II)–diethylentriamin (A) (1:1) rendszer

A mérések során meghatározott részecskék összetételét és stabilitási állandóik számértékét tartalmazza a 3. táblázat. Az értékelés során kizárólag olyan komplexmolekulákat találtunk, amelyek mind az összetétel, mind a stabilitási állandók számértéke tekintetében hasonlóak a korábbi évek irodalmában fellelhető adatokhoz.

3. táblázat A réz(II)–diethylentriamin (A) 1:1 arányú rendszerében kialakuló részecskék stabilitási állandói.

Komplex	$\log\beta_{\text{mért}}$	St. Dev.	$\log\beta_{\text{irodalmi}}$	Irodalom
CuA	16,07	0,01	15,87	[164]
CuAH	18,44	0,05	18,26	[164]
CuAH ₁	7,15	0,01	6,70	[164]
Cu ₂ A ₂ H ₁	25,67	0,03	24,07	[164]

Azt valószínűsíthetjük, hogy a CuA összetételű komplexben a ligandum háromfogúként viselkedik, a réz(II)ion négy koordinációs helyéből hármat elfoglal, míg a negyedike valószínűleg egy vízmolekula koordinálódik, amely magasabb pH-értékeknél deprotonálódik és így kialakulhat a CuAH₁ összetételű részecske. A CuAH típusú komplexben a primer nitrogének egyike protonálva van, míg a Cu₂A₂H₁ összetétel esetén valószínűleg két CuA-

komplexet köt össze egy μ -hidroxohíd. Ebben az esetben a réz(II)ion négy koordinációs helyét a dietiléntriamintól származó 3 nitrogénatom, illetve a hídligandumként koordinálódó μ -hidroxocsoport foglalja el. Ez a koordinációs mód a lúgos pH tartományban valósul meg.

Réz(II)–trisz(2-aminoetil)amin (B) (1:1) rendszer

Ebben a rendszerben is a korábbi adatoknak megfelelő összetételű komplexek alakultak ki, annyi különbséggel, hogy méréseink során $\text{Cu}_2\text{C}_2\text{H}_1$ összetételű részecskét is detektáltunk, amelyben a réz(II)ion koordinációs száma hat, vagy esetleg egy aminoetil kar kiszorulásával megmarad a négyes koordinációs szám. A mérési és számítási eredmények láthatóak a 4. táblázatban.

4. táblázat A réz(II)–trisz(2-aminoetil)amin (C) 1:1 arányú rendszerben kialakuló komplexek összetétele és stabilitási állandók számértéke.

Komplex	$\log\beta_{\text{mért}}$	St. Dev.	$\log\beta_{\text{irodalmi}}$	Irodalom
CuC	18,84	0,03	19,58	[167]
CuCH	22,74	0,05	23,22	[167]
CuCH ₂	-2,18	0,05	-9,01	[168]
$\text{Cu}_2\text{C}_2\text{H}_1$	31,22	0,05	–	–

Meglepő, hogy az irodalomban nem találtunk a $\text{Cu}_2\text{C}_2\text{H}_1$ összetételű komplexre stabilitási állandó értéket. A számolások során azonban csak úgy kaptunk értékelhető eredményt, ha a modellben ezt a részecskét is számításba vettük.

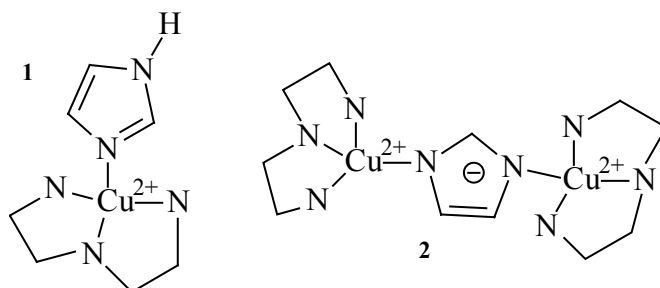
Réz(II)–dietiléntriamin–imidazol (1:1:1) rendszer

A mérési eredmények alapján számított stabilitási állandók értékei, illetve a keletkező részecskék összetétele látható az 5. táblázatban. A számítások során a Cu(II)–A (1:1), illetve a Cu(II)–B (1:1) rendszerekben előzőleg meghatározott részecskéket is figyelembe vettük.

5. táblázat A réz(II)–imidazol (B)–dietiléntriamin (A) 1:1:1 arányú rendszerben kialakuló részecskék összetétele és stabilitási állandók számértéke.

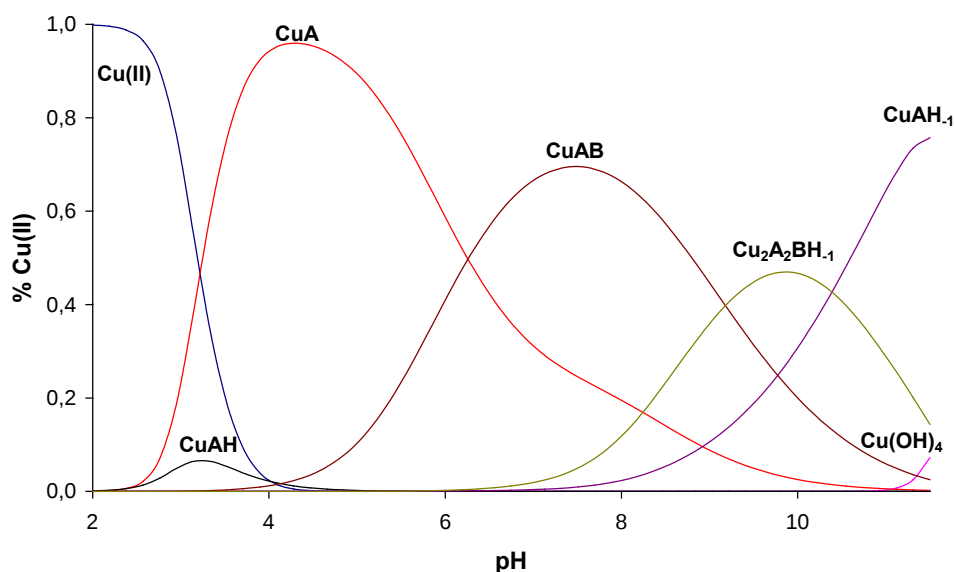
Komplex	$\log\beta_{\text{mért}}$	St. Dev.	$\log\beta_{\text{irodalmi}}$	Irodalom
CuAB	19,51	0,04	17,83	[27]
$\text{Cu}_2\text{A}_2\text{BH}_1$	29,53	0,05	28,04	[27]

A mérések során azt az eredményt kaptuk, hogy a rendszerben kialakul a **CuAB** összetételű részecske, ahol a réz(II)ion négyes koordinációs számmal szerepelhet, illetve kialakul a - valószínűleg imidazolátóhidat tartalmazó - $\text{Cu}_2\text{A}_2\text{BH}_{1.1}$ összetételű molekula is. A komplexek feltételezett szerkezete látható a 18. ábrán.



18. ábra A **CuAB** (1), illetve a $\text{Cu}_2\text{A}_2\text{BH}_{1.1}$ (2) összetételű komplexek javasolt szerkezete.

A 19. ábrán látható a rendszer eloszlásgörbéje. Savas tartományban a **CuA**, **CuAH** típusú komplexek alakulnak ki, míg 7–9 pH-értékek között a vegyes ligandumú **CuAB** részecske fordul elő legnagyobb mennyiségben. A **CuAB** komplexek pH = 7 felett kétmagvúsodnak és így kialakul a $\text{Cu}_2\text{A}_2\text{BH}_{1.1}$ összetételű molekula, amelynek feltételezett szerkezete a 18. ábrán is látható. A lúgos tartományban, pH = 8 felett, megjelenik a $\text{CuAH}_{1.1}$ összetételű komplex is, amelyben valószínűleg a dietiléntriamin 3 nitrogénje mellett egy hidroxidion koordinálódik a réz(II)ionhoz. Azt mondhatjuk tehát, hogy az oldatban pH 8–10,5 tartományban kialakul egy imidazolátóhidas szerkezetű részecske, amelyben a két réz(II)ion egy kétfogú ligandumként viselkedő imidazolcsoport kapcsolja össze.



19. ábra A réz(II):imidazol (**B**):dietiléntriamin (**A**) = 1:1:1 rendszer eloszlásgörbéje.

Réz(II)–trisz(2-aminoetil)amin–imidazol (1:1:1) rendszer

Erre a rendszerre nem találtunk irodalmi adatokat, tehát valószínűleg nem is vizsgálták korábban. A képződő komplexek összetétele és stabilitási állandók számértékei a következő táblázatban találhatóak meg.

6. táblázat A réz(II)–trisz(2-aminoetil)amin (C)–imidazol (B) 1:1:1 arányú rendszerben kialakuló komplexek összetétele és stabilitási állandók számértéke.

Komplex	logβ_{mért}	St. Dev.	logβ_{irodalmi}	Irodalom
CuCB	22,48	0,04	–	–
CuCBH ₁	12,68	0,05	–	–
Cu ₂ C ₂ BH ₁	35,30	0,05	–	–

A komplexképződés hasonló, mint az előző esetben (Cu(II)–A–B rendszer), annyi különbséggel, hogy itt kialakul a CuCBH₁ összetételű komplex is, amelyben a réz(II)ion vélhetően hatos koordinációs számmal szerepel. Feltehetően koordinálódik a trisz(2-aminoetil)amin 4 nitrogénje, egy imidazolnitrogén és egy hidroxidion, de az is előfordulhat, hogy a két aminoetil kar kiszorul a koordinációs szférából, és így négyes koordináció alakul ki a réz(II)ion körül. Itt is megfigyelhető az imidazolátóhíd kialakulása a rendszerben. Ebben az esetben is azt mondhatjuk, hogy a hídligandumként viselkedő imidazolcsoport mellett négy-négy aminnitrogén koordinálódhat a réz(II)ionhoz és a hatodik koordinációs helyre pedig egy vízmolekula kerülhet. Azonban itt is előfordulhat egy vagy két aminoetil kar kiszorulása a koordinációs szférából. Ezek azonban csak feltételezések, a komplexek pontos kötőmódjának meghatározása az ESR spektroszkópiai részben lesz olvasható.

Cink(II)–diethylentriamin (A) (1:1) és cink(II)–trisz(2-aminoetil)amin (B) (1:1) rendszerek

A két rendszerben a komplexképződés során kialakuló részecskék hasonló összetételűek, mint a réz(II)ion esetében ugyanezen ligandumokkal alkotott komplexek. Véleményünk szerint a különbség annyi, hogy a cink(II)ion majdnem mindig hatos koordinációs számmal szerepel az adott komplex molekulákban. Mindkét esetben kialakulnak, a réz(II)ionhoz hasonlóan, az 1:1 arányú komplexekből a μ -hidroxohidas részecskék is. A meghatározott stabilitási állandók értékei nem minden esetben mutatnak jó egyezést az irodalomban fellelhető adatokkal. Ennek oka egyrészt az lehet, hogy nem találtunk teljesen hasonló körülmények között elvégzett méréseket, másrészt pedig a 27. hivatkozásban szereplő adatok hitelessége és reprodukálhatósága erősen megkérdőjelezhető. A mért, illetve számított stabilitási állandók számértékei láthatóak a 7. táblázatban.

7. táblázat A cink(II)–trisz(2-aminoetil)amin (C) és a cink(II)–dietiléntriamin (A) 1:1 arányú rendszerekben kialakuló komplexek összetétele és stabilitási állandók számértéke ($\log\beta$).

Komplex	$\log\beta_{\text{mért}}$	St. Dev.	$\log\beta_{\text{irodalmi}}$	Irodalom
ZnC	14,21	0,01	14,53	[169]
ZnCH ₁	4,39	0,02	2,90	[169]
ZnCH ₂	-7,80	0,04	–	–
Zn ₂ C ₂ H ₁	20,82	0,05	–	–
ZnA	8,43	0,03	8,79	[27]
ZnAH ₁	-1,26	0,05	-3,20	[27]
Zn ₂ A ₂ H ₁	10,29	0,05	20,10	[27]

A Zn(II)–C (1:1) rendszerben kialakuló ZnCH₂ és Zn₂C₂H₁ összetételű komplexekre az irodalomban nem találtunk példát. A számolások során viszont csak akkor kaptunk értékelhető eredményt, ha a modellszámítások során (a Cu(II) rendszerekben szerzett tapasztalatok alapján) ezeket a részecskéket is figyelembe vettük.

Cink(II)–trisz(2-aminoetil)amin–imidazol (1:1:1) rendszer

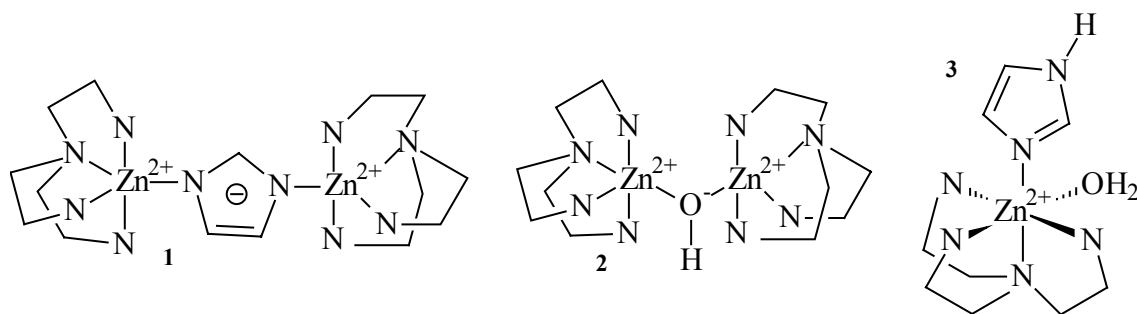
A korábbi évek irodalmában elvégzett keresések során nem találtunk olyan munkákat, amelyekben ezt a rendszert vizsgálták volna. A mérések során eredményül kapott komplex stabilitási állandók értékei láthatók a 8. táblázatban. A pH-potenciometriai mérések kiértékelésénél számításba vettük az előzőekben említett Zn(II)–B, Zn(II)–C rendszerben végzett mérések eredményeit, vagyis a modellalkotás során az ott kialakuló részecskéket, mint ismert stabilitású komplexeket vettük figyelembe.

8. táblázat A cink(II)–trisz(2-aminoetil)amin (C)–imidazol (B) 1:1:1 arányú rendszerben kialakuló komplexek stabilitási állandói ($\log\beta$).

Komplex	$\log\beta_{\text{mért}}$	St. Dev.	$\log\beta_{\text{irodalmi}}$	Irodalom
ZnCB	16,02	0,05	–	–
ZnCBH ₁	7,09	0,02	–	–
Zn ₂ C ₂ BH ₁	23,62	0,05	–	–

Látható, hogy a vegyes ligandumú ZnCB, illetve ZnCBH₁ összetételű komplexek mellett kialakul a feltehetően imidazolátóhidat tartalmazó Zn₂C₂BH₁ részecske is. Véleményünk szerint a komplexekben a cink(II)ion koordinációs száma ötös (pl. Zn₂C₂BH₁),

illetve hatos (pl. ZnCB , $\text{ZnCBH}_{1.1}$) lehet. A hídligandumot (imidazol-, illetve hidroxocsoport) tartalmazó komplexben ($\text{Zn}_2\text{C}_2\text{BH}_{1.1}$ és $\text{Zn}_2\text{C}_2\text{H}_{1.1}$) feltehetően a két cink(II)ionhoz koordinálódik az amincsoport 4 nitrogénatomja, továbbá a hídként viselkedő imidazol-, illetve egy hidroxocsoport. A cink(II)ion koordinációs száma itt véleményünk szerint ötös. Néhány komplex javasolt szerkezete látható a 20. ábrán.



20. ábra A $\text{Zn}_2\text{C}_2\text{BH}_{1.1}$ (1), a $\text{Zn}_2\text{C}_2\text{H}_{1.1}$ (2) és a ZnCB (3) összetételű komplexek javasolt szerkezete.

Cink(II)–dietiléntriamin–imidazol 1:1:1 rendszer

A rendszerben kialakuló komplexmolekulák hasonló összetételűek, mint az előző (Zn(II)–C–B) esetben. A potenciometriai titrálás kiértékelése során itt is felhasználtuk a korábbi mérések (Zn(II)–A , Zn(II)–B) eredményeit. A meghatározott részecskék összetétele és stabilitási állandók számértékei láthatók a 9. táblázatban. Hasonlóan az előző rendszerhez, itt is kialakul az imidazolátóhidas komplex és a vegyes ligandumú ZnAB összetételű részecske is. Valószínűleg itt a három, dietiléntriamin molekulától származó nitrogénatom és az imidazol nitrogénatomja mellett két vízmolekula is koordinálódik a cink(II)ionhoz, ugyanis ezek deprotonálódásával alakulhat ki a ZnABH_2 összetételű komplex.

9. táblázat A cink(II)–dietiléntriamin (A)–imidazol (B) 1:1:1 arányú rendszerben meghatározott részecskék összetétele és stabilitási állandók számértéke ($\log\beta$).

Komplex	$\log\beta_{\text{mért}}$	St. Dev.	$\log\beta_{\text{irodalmi}}$	Irodalom
ZnAB	11,22	0,03	9,80	[27]
ZnABH_2	-9,31	0,03	–	–
$\text{Zn}_2\text{A}_2\text{BH}_{1.1}$	13,98	0,05	20,26	[27]

Réz(II)–dietiléntriamin–imidazol–cink(II)–trisz(2-aminoetil)amin 1:1:1:1:1 rendszer

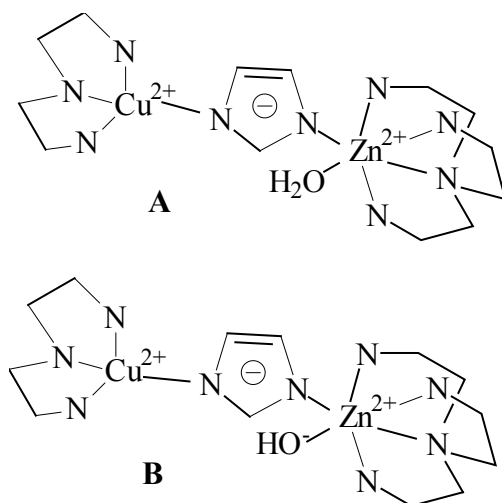
A korábbi évek irodalmában nem találtunk olyan munkát, ahol hasonlóan bonyolult rendszert vizsgáltak volna a pH-metriai titrálás módszerével. A modellszámítások során az

összes eddigi mérés eredményét felhasználtuk, minden számításba vehető részecskét figyelembe vettünk. Az új komplexek stabilitási állandó értékei a 10. táblázatban láthatók.

10. táblázat A réz(II)–dietiléntriamin (A)–imidazol (B)–cink(II)–trisz(2-aminoetil)amin (C) 1:1:1:1 rendszerben kialakuló komplexek stabilitási állandói ($\log\beta$).

Komplex	$\log\beta_{\text{mért}}$	St. Dev.	$\log\beta_{\text{irodalmi}}$	Irodalom
CuABZnCH ₁	27,44	0,03	–	–
ZnABZnCH ₂	17,30	0,03	–	–

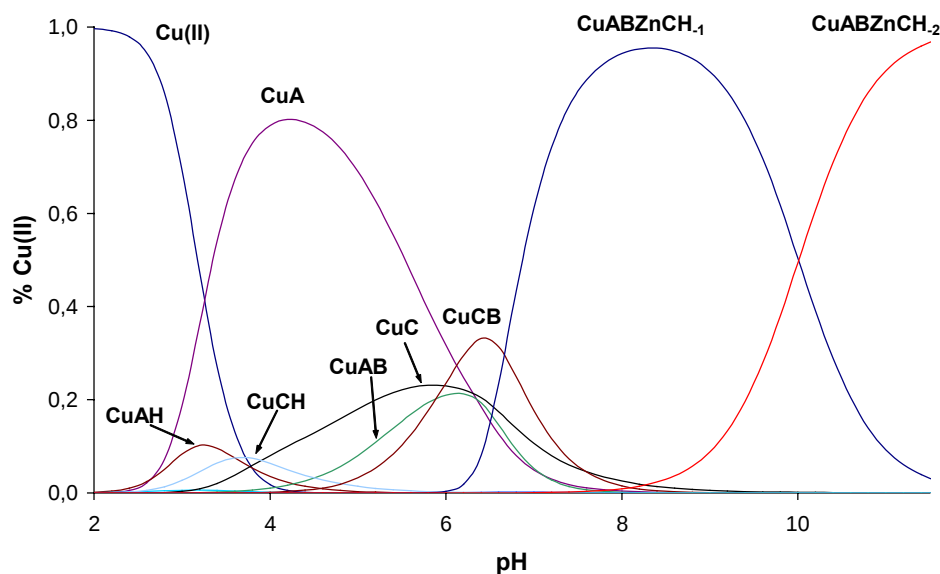
Mint ahogy a táblázat adataiból látható, az ötkomponensű rendszerben kialakul a feltehetően imidazolátóhidat tartalmazó komplex, ahol az imidazolátóhíd a réz(II)- és a cink(II)ion között tartja fent a közvetlen kapcsolatot. A cink(II)ion felőli oldalon egy trisz(2-aminoetil)amin, míg a réz(II)ion felőli oldalon egy dietiléntriamin-molekula koordinálódik. Feltehetőleg a cink(II)ion hatodik koordinációs helyére pedig egy vízmolekula kötődik, amely magasabb pH-értéken deprotonálódik. A réz(II)ion körül négyes koordináció alakulhat ki, amely szerint a négy koordinálódó nitrogénatom közül három a dietiléntriamintól, míg egy a hídimidazoltól származik. A komplexek feltételezett szerkezete látható a 21. ábrán.



21. ábra A CuABZnCH₁ (A) és a CuABZnCH₂ (B) komplexek javasolt szerkezete.

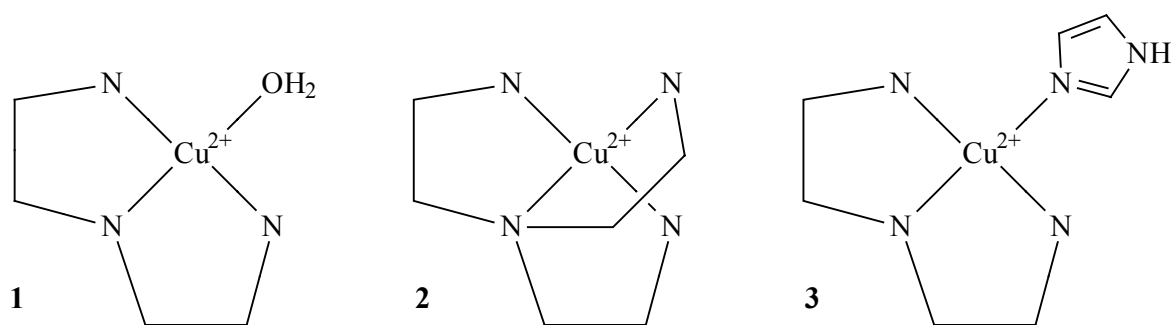
A mérések eredményei alapján azt mondhatjuk, hogy az ötkomponensű rendszerben kialakult az imidazolátóhidas részecske összetételének megfelelő komplex molekula. A rendszer eloszlásgörbéjét láthatjuk a 22. ábrán. Látható, hogy az imidazolátóhidas szerkezet pH = 6 felett kezd kialakulni, majd ugyanezen típusú komplex esetében pH = 8 felett a cink(II)ionhoz koordinálódó vízmolekula deprotonálódik. A két komplex javasolt szerkezete a 21. ábrán látható. Enyhén savas, illetve semleges pH-értéken kialakulnak a CuC, CuA, CuCB,

CuAB típusú komplexek is. A CuAB komplex javasolt szerkezetét már láthattuk a 18. ábrán, a másik három részecske szerkezete pedig a 23. ábrán látható.



22. ábra A réz(II)–dietiléntriamin (A)–imidazol (B)–cink(II)–tris(2-aminoetil)amin (C) 1:1:1:1:1 arányú rendszer eloszlásgörbéje.

Összegzésként azt mondhatjuk tehát, hogy a vizsgált ötkomponensű rendszerben a kérdéses imidazolátóhidas szerkezet kialakul, sőt pH = 7 érték felett ez a típusú molekula, illetve ennek deprotonált változata, fordul elő a legnagyobb mennyiségben. A potenciometriai mérések azonban nem adnak 100%-os bizonyítékot a komplexek létezésére, ezért további méréseket végeztünk, amelyeket a következő fejezetekben olvashatunk.

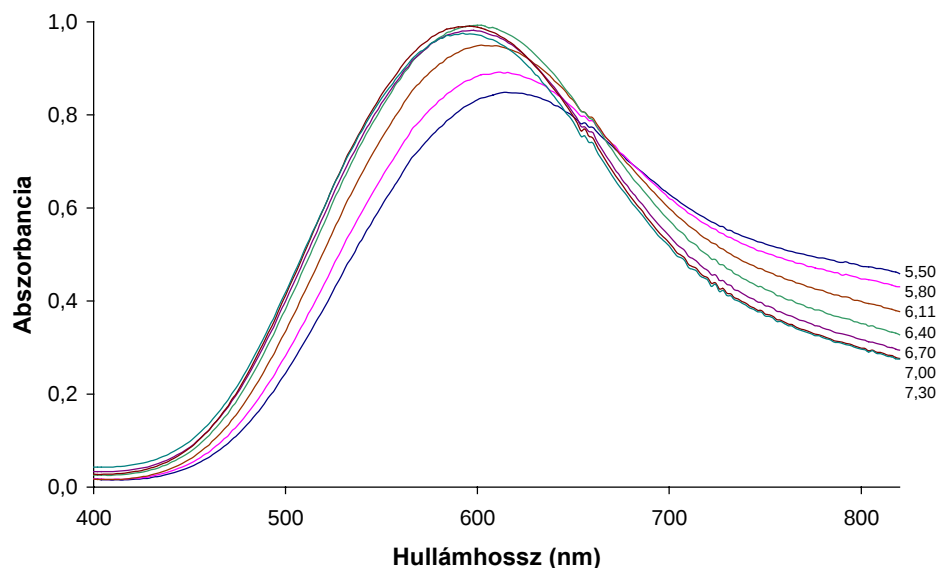


23. ábra A CuA (1), a CuC (2), illetve a CuAB (3) összetételű komplexek javasolt szerkezete.

IV.2. UV–Vis spektrofotometriai vizsgálatok

A pH-függő elektrongerjesztési spektrumok felvételénél az előre elkészített szilárd Cu,Zn-komplexből vizes oldatot ($c = 2,5 \text{ mM}$) készítettünk, és az elegyek pH-ját 3 tizedenként változtatva, HEPES puffer segítségével 5,5–8,5 értékek közé állítottuk be. A mért

spektrumok láthatóak a 24. ábrán ($\text{pH} = 5,5\text{--}7,3$). A rendszer látható spektrumai $\text{pH} = 7,3\text{--}8,5$ értékek között nem változnak, ezért - a zsúfoltság elkerülése érdekében - a 24. ábrán ezeket nem ábrázoltuk.

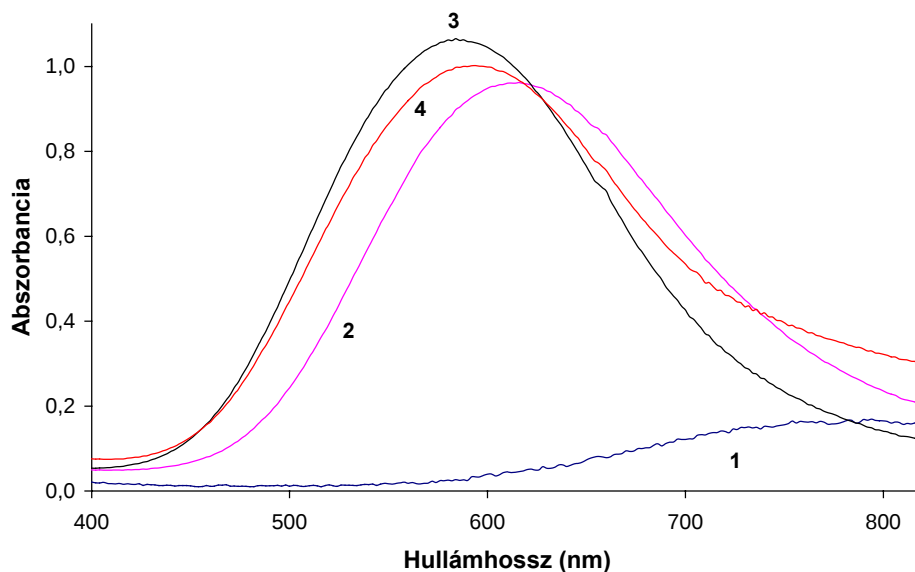


24. ábra A Cu(II)–dietiléntriamin (A)–imidazol (B)–cink(II)–tris(2-aminoetil)amin (C) rendszer elektrongerjesztési spektrumának pH-függése.

Az ábrán látható, hogy a spektrumok $\text{pH} = 6,7$ felett nem térnek el egymástól jelentősen. Ebből arra lehet következtetni, hogy a 6,7 felett kialakuló komplex szerkezete nem változik. Valószínűleg itt alakul ki az imidazolátóhidas komplex szerkezet. Ez összhangban van a pH-potenciometriai mérések eredményeivel, ugyanis a 7-es pH felett kialakuló réz(II)-dietiléntriamin- μ -imidazolátó-cink(II)-tris(2-aminoetil)amin komplex szerkezete magasabb pH-értéken nem változik jelentősen, csak a cink(II)ionhoz koordinálódó vízmolekula deprotonálódik, ami a réz(II)ion jellemző elnyelési sávjait nem változtatja meg jelentősen. A látható színek pH-függésének vizsgálata alapján azt is megállapíthatjuk, hogy a spektrumokon 820 nm-nél a pH növekedésével csökken az abszorbancia (majd $\text{pH} = 7$ felett nem változik). Ez a csökkenés valószínűleg szintén a réz(II)ion környezetében bekövetkező változáshoz rendelhető (mivel a d-d átmenethez tartozó abszorpciós sáv összetett), és a fenti megállapításokat támasztja alá.

Az UV-Vis spektrofotometriai mérések második részében összehasonlítottuk a részrendszerek ($\text{Cu(II)}_{\text{aq}}$, Cu(II)–dietiléntriamin (Cu–A), Cu(II)–dietiléntriamin–imidazol (Cu–A–B)), illetve az ötkomponensű rendszer (Cu–A–B–C–Zn) látható (400–820 nm) spektrumát $\text{pH} = 8$ értéken. A mért színek láthatók a 25. ábrán. A ligandumot is tartalmazó rendszerek esetében egy széles, d–d átmenethez tartozó abszorpciós sáv található a 400–820

nm tartományban. Az ötkomponensű rendszer abszorpciós maximuma 594 nm-nél található, amely különbözik a Cu–A–B (580 nm) és a Cu–A (612 nm) rendszerek hasonló értékeitől. Ezek alapján azt mondhatjuk, hogy a két egyszerűbb réz(II)komplex spektruma eltér az imidazolátóhidas Cu,Zn-komplex elektrongerjesztési spektrumától, ami arra utalhat, hogy a szintézis során kialakul a várt szerkezetű komplex. A 4-es, illetve a 3-as számú spektrum között a legkisebb a különbség, azonban itt is jól látható, hogy a két rendszerben kialakuló komplexek szerkezete (a réz(II)ion koordinációs környezete) nem egyezik meg.



25. ábra A $\text{Cu(II)}_{\text{aq}}$ (1) a Cu(II) –dietiléntriamin (2), a Cu(II) –dietiléntriamin–imidazol (3) és a Cu(II) –dietiléntriamin–imidazol–cink(II)–trisz(2-aminoetil)amin (4) rendszerek Vis spektrumai.

A komplexképződés pH-függésének spektrofotometriai követését arra használtuk, hogy összevegyük a potenciometriai titrálások eredményével. A két módszer eredményei alapján egyaránt valószínűsíthetjük, hogy $\text{pH} = 7$ érték felett kialakul az imidazolátóhidas Cu,Zn-komplex. A különböző komplexek spektrofotometriai mérésével arra szeretnénk volna választ kapni, hogy a receptben [3] leírt előállítás szerint a megfelelő összetételű komplex képződik-e. Erre is bizonyítékot kaptunk, hiszen a kiindulási anyagok elektrongerjesztési színeképei eltérőek voltak a termék látható spektrumától, tehát a réz(II)ion koordinációs környezete a termékben, illetve a kiindulási anyagokban különböző.

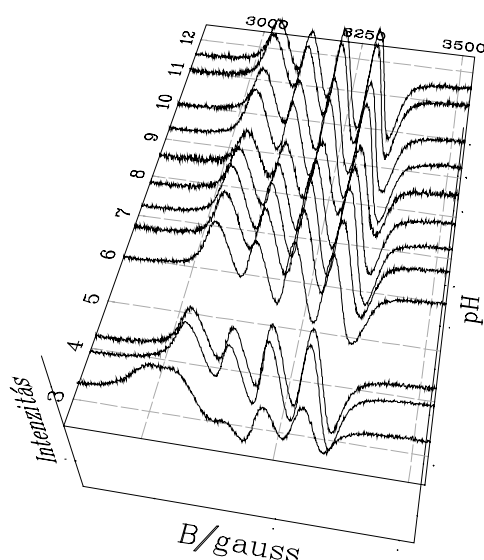
IV.3. ESR spektroszkópiai mérések

Az ESR spektroszkópiai mérések párosítatlan elektront tartalmazó molekulák, ionok vizsgálatára szolgálnak, tehát ebben az esetben csak a réz(II)ion koordinációs környezetét tudjuk tanulmányozni, a cink(II)ion komplexképzési folyamatait nem. A mérések első

résében vizsgáltuk az ötkomponensű (Cu–**A**–**B**–**C**–Zn) rendszer ESR paramétereinek pH-függését szobahőmérsékleten, a 2–11 pH-tartományban, majd hasonlóan a látható spektrofotometriai vizsgálatokhoz, összehasonlítottuk az ötkomponensű rendszer, illetve egyes részrendszerek ESR spektrumait pH = 8 értéken. A koncentráció minden esetben 0,005 M, a fém–ligandum arány pedig 1:1 volt. A következő rendszerek ESR színeképeit vettük fel méréseink során:

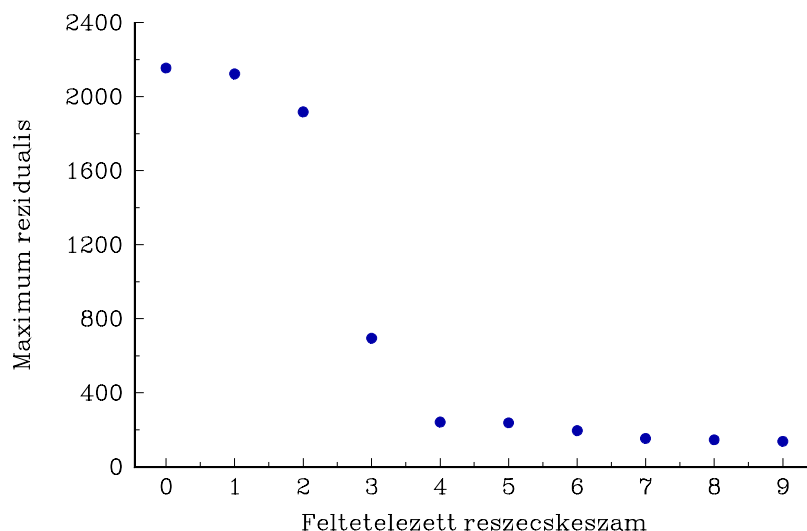
- (A) Cu(II)–dietiléntriamin (**A**) (1:1);
- (B) Cu(II)–dietiléntriamin (**A**)–imidazol (**B**) (1:1:1);
- (C) Cu(II)–trisz(2-aminoetil)amin (**C**) (1:1);
- (D) Cu(II)–trisz(2-aminoetil)amin (**C**)–imidazol (**B**) (1:1:1);
- (E) Cu(II)–dietiléntriamin–imidazol–cink(II)–trisz(2-aminoetil)amin (1:1:1:1:1).

A pH-függő ESR vizsgálatok során felvett 13 ESR spektrum (26. ábra) közül a semleges-lúgos tartomány színeképei szemmel láthatóan nagyon hasonlóak voltak. Ez arra utalt, hogy a Cu**ABZn**CH₁-komplex deprotonálódása a réz környezetétől távol következik be, mivel a két komplexet az ESR spektroszkópia nem tudja megkülönböztetni. Ez a tapasztalat első közelítésben alátámasztja ezeknek a komplexeknek a látható spektrumok alapján javasolt szerkezeteit. Mivel a spektrumok hiperfinom szerkezete jól feloldott, valamint jelentősebb intenzitáscsökkenés sem látszik, így semmilyen jel nem utal akár gyengébb, akár erősebb Cu–Cu kölcsönhatásra. Ez összhangban van azzal, hogy ilyen komplex képződését a pH-potenciometriai vizsgálatok alapján sem valószínűsíthettünk.



26. ábra A pH-függő ESR spektroszkópai vizsgálatok során felvett spektrumok.

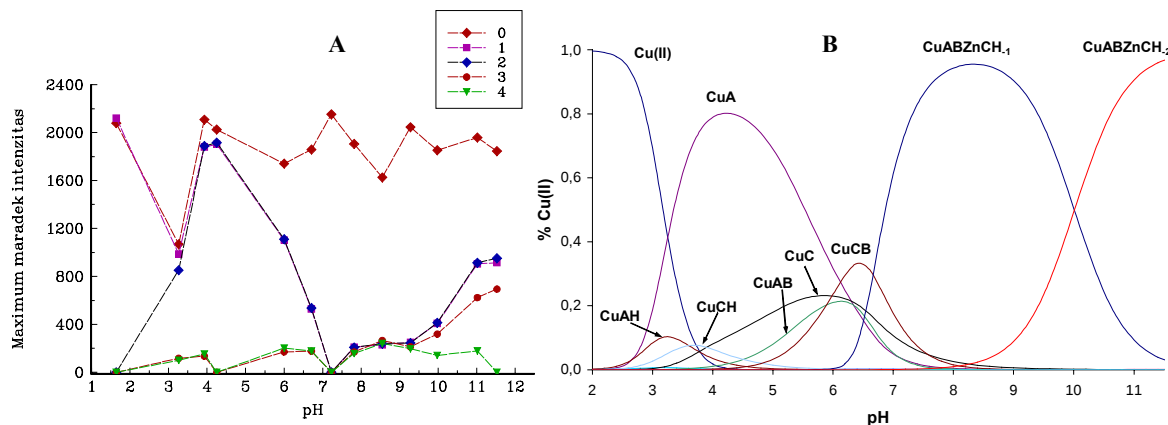
Elvégeztük a felvett ESR spektrumsorozat mátrix ranganalízisét (MRA), amely megadja a lineárisan független részecskék számát a rendszerben. Ábrázolva a feltételezett részecskék számának függvényében a maradékintenzitás-értékeket látható, hogy 4 ESR-aktív részecskét kell figyelembe venni ahhoz, hogy a maradékintenzitás a zaj értékére csökkenjen (27. ábra). Mivel a CuABZnCH_1 és CuABZnCH_2 spektrumai teljesen megegyeznek, ezt a két komplexet az ESR mérésekhez hasonlóan mátrix ranganalízissel sem lehet megkülönböztetni, tehát 1 részecskének tekintendők. Így viszont érdekes kérdés, hogy mi lehet a negyedik részecske. A pH-potenciometriai eloszlásgörbén $\text{pH} = 6$ környékén van néhány kisebb mennyiségben képződő komplex, de mivel ebben a tartományban csak egy ESR spektrum készült, ezek kimutatása nehézkes. Mindenesetre a maximum reziduális értékek 7 részecske figyelembevételéig tovább csökkennek, valószínűleg ezen kis részecskék jelenlétét jelezve, de ez a csökkenés nem tekinthető szignifikánsnak.



27. ábra Maximális intenzitásértékek ábrázolása a feltételezett ESR-aktív részecskék számának függvényében.

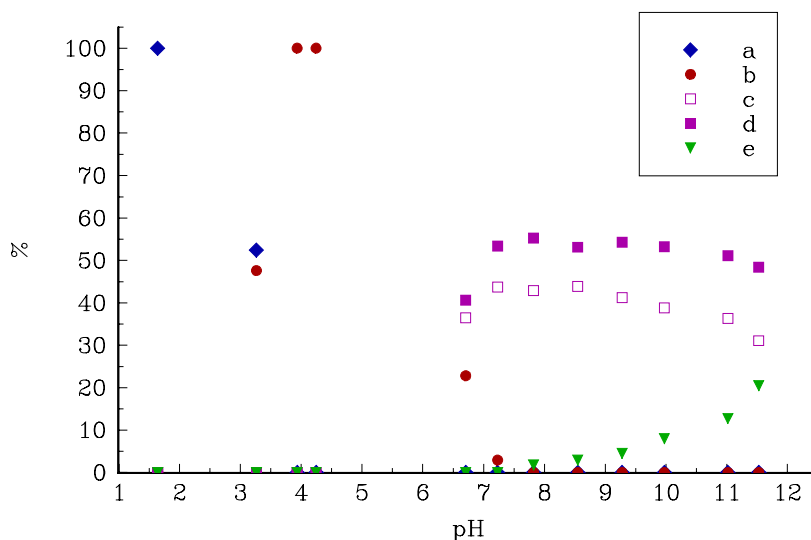
Ábrázoltuk a mátrix ranganalízissel nyerhető maradékintenzitásokat a pH függvényében (28. ábra). Ha ezt összehasonlítjuk a pH-potenciometria módszerével nyert eloszlási görbével, akkor azonosíthatjuk az MRA-val „megtalált” részecskéket. Az ábra jelmagyarázata mutatja a feltételezett részecskék számát, és a hozzá tartozó görbék jelölését. Az 1. részecske figyelembe vételekor a 6–11 pH-tartomány maximális maradékintenzitás-értékei csökkennek jelentősen, ahol a CuABZnCH_1 - és a CuABZnCH_2 -komplexek képződnek. A 2. részecske hozzáadásakor az első spektrum intenzitása csökken a zaj értékére, ez a részecske valószínűleg a réz(II)ion akvakomplexéhez rendelhető. A 3. részecske figyelembevételével a

3–6 pH-tartomány intenzitásértékei csökkennek, ahol a CuA-komplex képződik dominánsan. Egy 4. részecske figyelembevételével pedig a lúgos tartományban felvett spektrumok maximális maradékintenzitás-értékei is a zaj értékére csökkennek, tehát itt egy, a pH-potenciometriai mérések során nem detektált új komplex képződik kis mennyiségben, feltehetően CuABZnCH₃ összetétellel.



28. ábra A különböző pH-n felvett ESR spektrumokhoz tartozó maximális maradékintenzitások a feltételezett részecskeszám növelésével (A), illetve a pH-potenciometriai eredményeken alapuló eloszlásgörbe (B).

Az ESR-spektrumok kiértékelését az egydimenziós EPR programmal végeztük el. A spektrumok kielégítő leírásához 5 ESR-aktív komplexet vettünk figyelembe. A 7–11 pH tartomány spektrumait két izomerkomplex összegeként tudtuk a legjobban leírni.



29. ábra Az ESR spektrumok kiértékelése során kapott koncentráció értékek ábrázolása a pH-függvényében (a: réz(II)-akvakomplex, b: CuA-komplex, c: CuABZnCH₁- és CuABZnCH₂-komplexek egyik izomerje, d: CuABZnCH₁- és CuABZnCH₂-komplexek másik izomerje, e: CuABZnCH₃)

A $\text{pH} = 6,002$ -nél felvett spektrumot a CuA-ra és a CuABZnCH₁-re kapott két izomer színeképeinek szuperpozíciójaként sem tudtuk leírni. Valószínűleg más komplex is jelen van a rendszerben (ahogy azt a pH-potenciometriás eredmények is mutatják), de ennek paramétereit nem tudtuk meghatározni, mivel túl sok részecske van egyszerre jelen, illetve ehhez az egy mért spektrum nem volt elegendő. Az eddigiek alapján a 29. ábra betűjelei a következő komplexeket jelentik: a: réz(II)-akvakomplex, b: CuA-komplex, c: CuABZnCH₁- és CuABZnCH₂-komplexek egyik izomerje, d: CuABZnCH₁- és CuABZnCH₂-komplexek másik izomerje, e: CuABZnCH₃. Az egyes részecskékre számított ESR paraméterek átlagát az utolsó jegy szórásával a 11. táblázat tartalmazza.

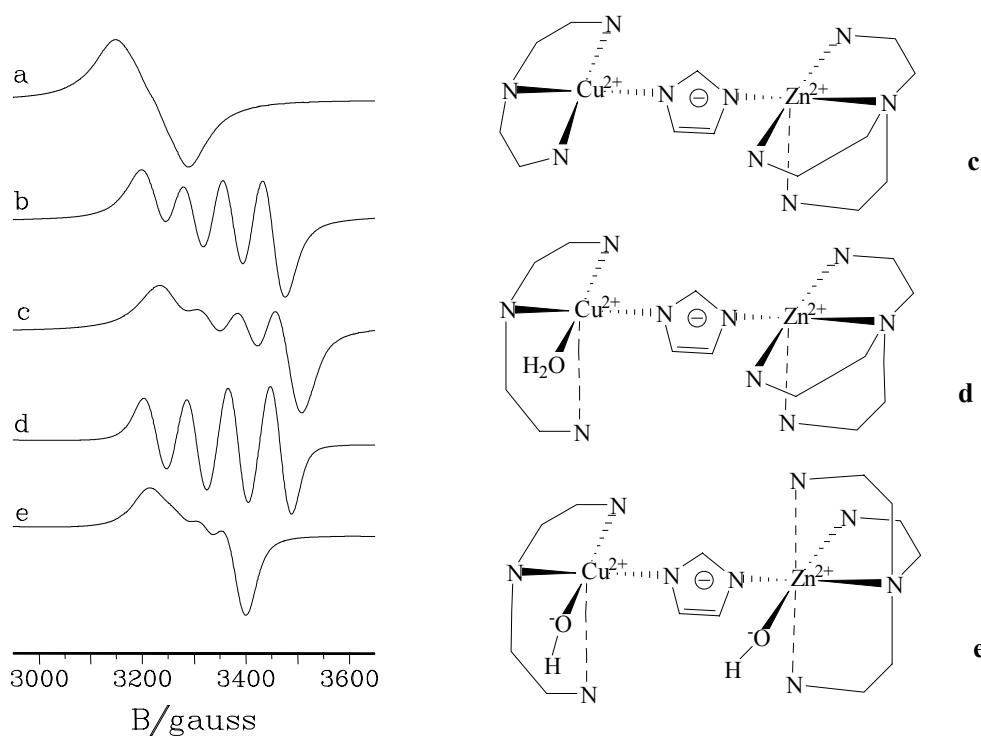
11. táblázat A figyelembe vett komplexek ESR paraméterei (a: réz(II)-akvakomplex, b: CuA-komplex, c: CuABZnCH₁- és CuABZnCH₂-komplexek egyik izomerje, d: CuABZnCH₁- és CuABZnCH₂-komplexek másik izomerje, e: CuABZnCH₃).

	a	b	c	d	e
g_o	2,1930 (1)	2,1127 (3)	2,092 (2)	2,1076 (6)	2,1334 (3)
A_o (G)	34 (1)	73,9 (4)	70 (3)	78,4 (9)	46,0 (1)
a_N (G)	–	9,4 (4)	15 (1)	11,9 (5)	7,0 (5)
		9,4 (4)	12 (1)	10,4 (6)	10,6 (4)
		11,0 (1)	9,8 (8)	10,1 (4)	14,0 (5)
			8,0 (5)		
α (G)	50 (6)	29,9 (2)	36 (1)	16 (1)	28,8 (2)
β (G)	–1,7 (1)	–4,0 (7)	–7,2 (8)	–2,9 (5)	–6 (1)
γ (G)	1,5 (1)	1,1 (4)	0,1 (1)	1,0 (3)	0,1 (1)

A spektrumok szuperhiperfinom szerkezete nem jól feloldott, így a kiértékelés nem volt igazán érzékeny a nitrogén csatolási állandókra (a_N). Az ekvatoriálisan koordinálódó nitrogén-donoratomok számára a g_o -értékekből lehetett következtetni, mivel az axiálisan kapcsolódó nitrogénatomok hatása kicsi és közvetett (a réz(II)ion alaphelyzete $d_{x^2-y^2}$ a nyújtott oktaéderes geometriában) [170]. Ha az ekvatoriálisan koordinálódó vízmolekulákat nitrogénatomok helyettesítik, a g_o -értékek csökkennek, míg az A_o -értékek növekednek. A váratlanul alacsony A_o -értékek az alacsony ligandumtér szimmetriáról adhat információt.

A „b” paraméterkészlettel leírható komplex g_o -értéke a „c” és „d” komplexekkel összevetve nagyobb, feltehetően 3 ekvatoriális N-donoratom helyezkedik el a réz(II)ion körül, ami alátámasztja a CuA-komplex látható színeképe alapján javasolt szerkezetet. A „d”

komplex kis g_0 -értéke alapján ekvatoriálisan 4 N-donoratomot tartalmaz, a másik izomer esetében vagy csak 3 N-donoratomot tartalmaz ekvatoriálisan, vagy ha 4 N-t, akkor egy vagy két erős axiális N-donoratomot is tartalmaz (30. ábra). A CuABZnCH_2 összetételű komplexekre ugyanezek az izomerszerkezetek képzelhetők el, csak ott a Zn(II) ion körül egy vízmolekula deprotonálódik, ami a paraméterekben gyakorlatilag nem okoz változást. Az „e” komplex g_0 -értéke meglehetősen nagy, 3 ekvatoriális N-donoratomnál több ebben a komplexben nem képzelhető el. A deprotonálódás során feltehetően egy ekvatoriális hidroxocsoport koordinálódott a réz(II)ionhoz, amit a rombusz torzulást jelző kis A_0 érték is alátámaszt. A paraméterek alapján számított összetevőnkénti ESR spektrumok, illetve az egyes részecskék szerkezete látható a 30. ábrán.



30. ábra A 11. táblázat adataiból számított ESR spektrumok, illetve a hozzájuk tartozó ESR-aktív komplexek szerkezete (a: réz(II)-akvakomplex, b: CuA-komplex, c: CuABZnCH₁- és CuABZnCH₂-komplexek egyik izomerje, d: CuABZnCH₁- és CuABZnCH₂-komplexek másik izomerje, e: CuABZnCH₃).

A fenti eredmények megerősítésének érdekében méréseket végeztünk a Cu–A, Cu–A–B, Cu–C és Cu–C–B rendszerek esetében is pH = 8 értéken. A pH-potenciometriai mérések alapján azt mondhatjuk, hogy ezen a pH-értéken a CuA-, CuAB-, CuC- és CuCB-komplexek vannak jelen a legnagyobb mértékben az egyes rendszerekben. A Cu–A, Cu–C és Cu–C–B esetében felvett spektrum egy komponens, míg a Cu–A–B színeké két komponens figyelembevételével volt kielégítően leírható (ezekben az esetekben a háttérjelet nem vontuk

ki, de a regressziós koefficiens így is megfelelő volt (0,992–0,995)). Az egyes rendszerek ESR paramétereit a 12. táblázatban láthatjuk.

12. táblázat A Cu–**A**, Cu–**A–B**, Cu–**C** és Cu–**C–B** rendszerekben $pH = 8$ értéken felvett ESR szinképek paramétereit (a zárójelben az utolsó számjegy szórása).

	CuA		CuAB	CuC	CuCB
g_o	2,1108 (1)	2,0923 (2)	2,1058 (1)	2,1281 (2)	2,1199 (1)
A_o (G)	74,6 (1)	77,2 (2)	79,1 (1)	52,4 (1)	53,9 (1)
a_N (G)	12,2 (1)	14,1 (2)	11,5 (1)	8,0 (6)	14,8 (2)
	7,6 (1)	12,48 (2)	11,5 (1)	8,0 (6)	14,8 (2)
	7,6 (1)	9,4 (5)	9,4 (2)	6,0 (2)	13,9 (2)
		9,4 (5)			
α (G)	26,6 (1)	34,3 (3)	24,8 (2)	53,9 (4)	29,5 (3)
β (G)	-4,00 (3)	-8,9 (2)	-2,5 (5)	-3,8 (1)	-4,8 (1)
γ (G)	0,55 (2)	0,1 (1)	0,70 (6)	0,1 (1)	0,5 (1)
		35 %	65 %		

Az ötkomponensű rendszerben detektált „b” jelű részecske ESR paramétereit igen jó egyezést mutatnak a Cu**A**-komplex hasonló adataival (lásd 11. és 12. táblázat). Ezáltal megerősítést nyert azon korábbi állításunk, miszerint az ötkomponensű rendszer „b” részecskéje a Cu**A** összetételű molekulával azonosítható. A g_o -érték (2,11) alapján azt mondhatjuk, hogy három ekvatoriális nitrogénatom koordinálódik a réz(II)ionhoz, amit a látható spektrofotometria eredményei is alátámasztanak.

A Cu–**A–B** rendszerben felvett ESR spektrum paramétereit alapján azt mondhatjuk, hogy a rendszerben két különböző koordinációs környezetű réz(II)ion található, viszont a pH-potenciometriai vizsgálatok során ebben a pH-tartományban csak a Cu**AB** összetételű részecskét tudtuk detektálni. Ennek ismeretében két izomerkomplex javasolható a Cu**AB** molekula esetében. Az egyik részecske esetében a kis g_o -érték erősebb ligandumteret jelez az ekvatoriális síkban, ami négy nitrogén koordinációjára utal. Ez alatt az **A** ligandum három donoratomját, illetve az imidazolcsoport (**B**) egy nitrogénatomját értjük. A másik izomerrészecske esetében tapasztalható nagyobb g_o -érték három ekvatoriális nitrogénatom kapcsolódásával magyarázható, míg a negyedik donoratom axiális pozíciót foglal el. Az izomerek ESR paramétereit jó egyezést mutatnak a „c” és „d” jelű komplexek hasonló

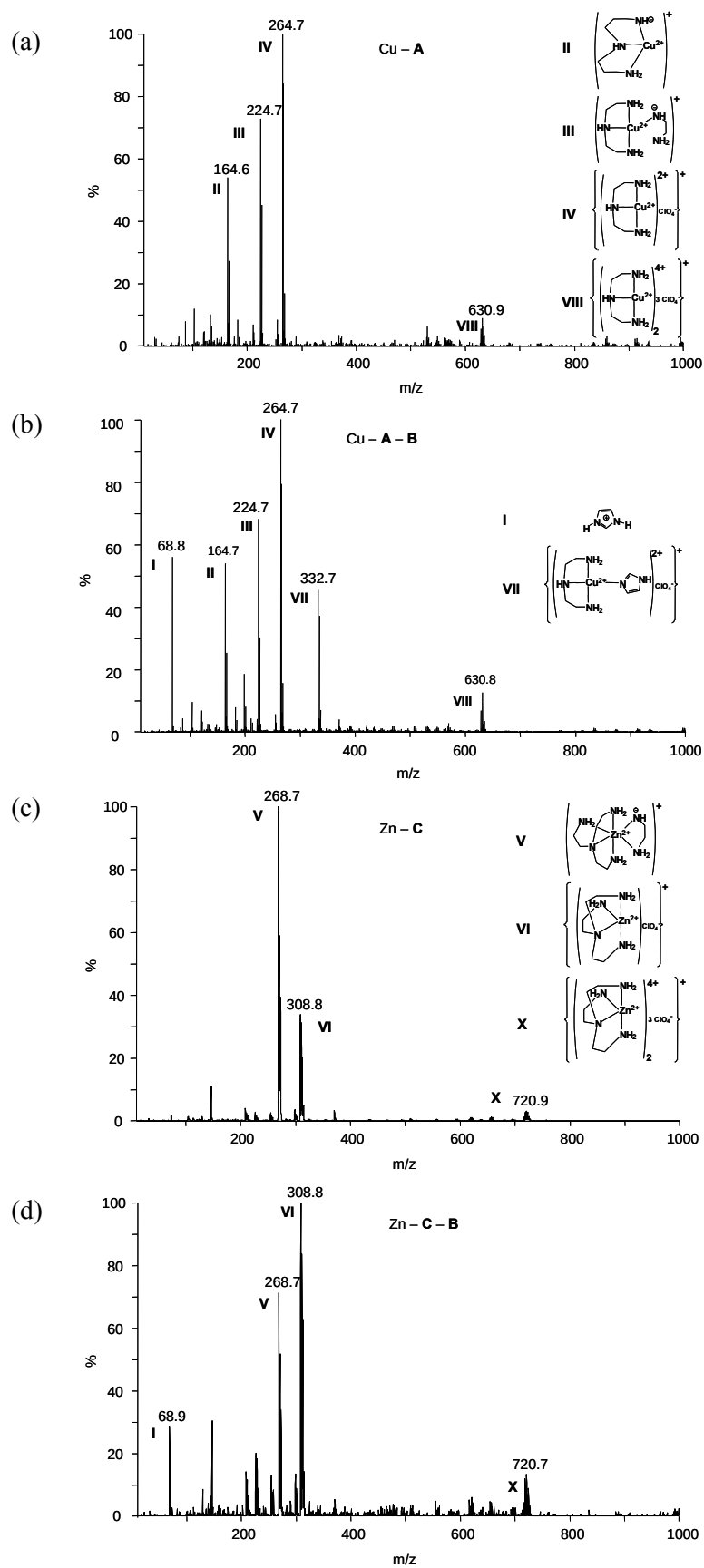
értékeivel, ami alátámasztja a CuABZnCH_1 és CuABZnCH_2 részecskék izomerjeinek szerkezetére tett korábbi javaslatainkat.

A **C** ligandum koordinálódása a réz(II)ionhoz az imidazolátóhidat tartalmazó részecske esetében kizárható a Cu-C és Cu-C-B rendszerekben végzett mérések eredményei alapján. A CuC- és CuCB- komplexek esetében tapasztalt kis g_o - és nagy A_o -értékek alapján D_{4h} szimmetriát várunk a kérdéses részecskék esetében. Ez az eltérés rombos torzulással magyarázható, amit a **C** ligandum negyedik nitrogénatomjának axiális koordinációja okoz (a másik három nitrogén ekvatoriálisan kötődik a központi réz(II)ionhoz). Hasonló ESR paraméterekkel rendelkező részecskék nem voltak az ötkomponensű rendszerben.

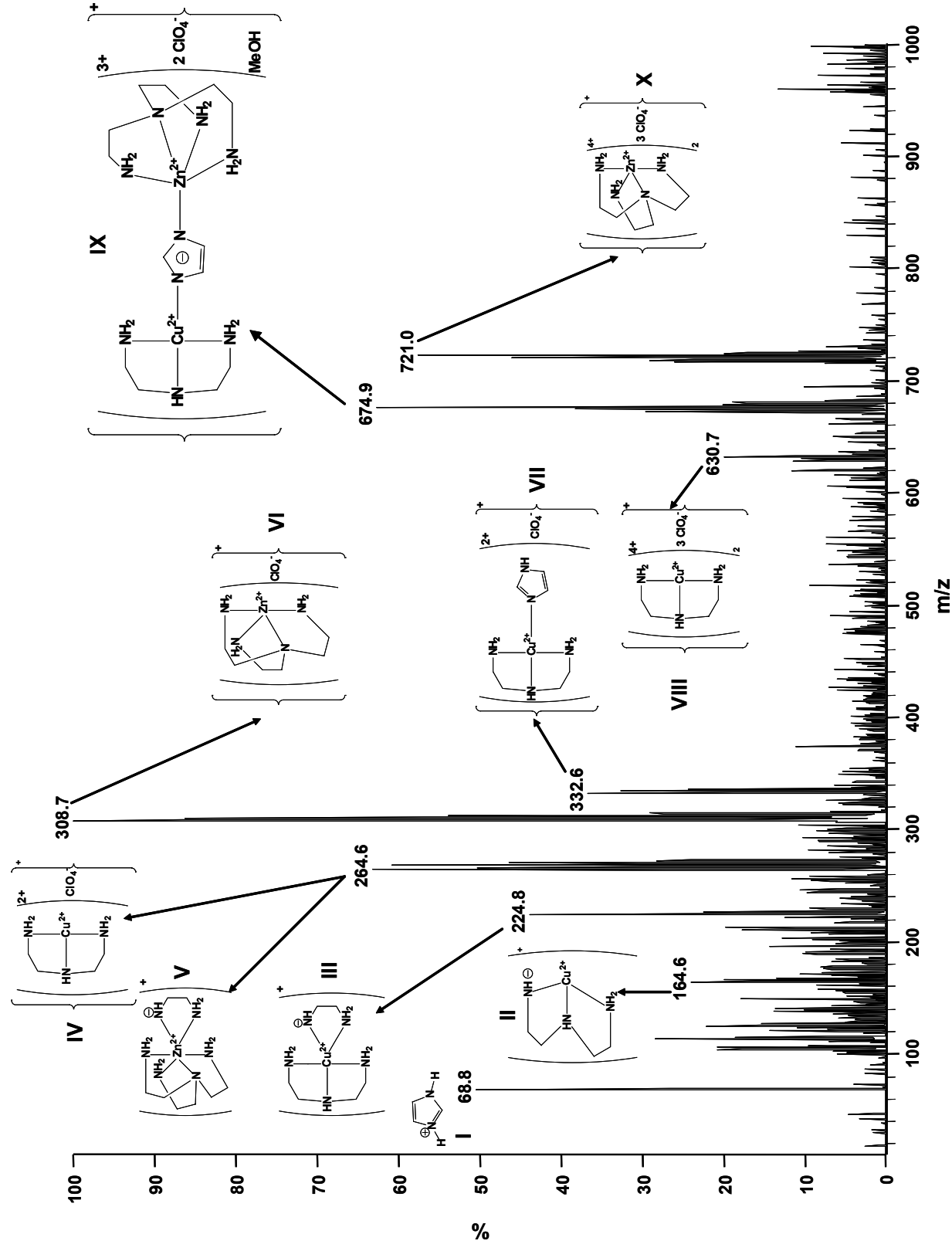
IV.4. Tömegspektrometriai vizsgálatok

Az előző három alfejezetben tárgyalt mérések eredményei alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az imidazolátóhidat tartalmazó kétmagvú komplex valóban kialakul vizes oldatban a pH 7–11 tartományban. Ezen eredmények megerősítésének érdekében elvégeztük a kérdéses rendszer tömegspektrometriai vizsgálatát. A vizsgálatok során célunk a Cu,Zn- komplex detektálása volt az ötkomponensű rendszerben, az előbb említett pH-tartományon belül. A mérési eredmények kiértékelését megkönnyítendő, tanulmányoztuk a kétkomponensű (Cu-A , Zn-C) és háromkomponensű (Cu-A-B , Zn-C-B) részrendszerekben kialakuló fémkomplexeket is. Mérési módszerként kétféle (ESI-, illetve MALDI-MS) tömegspektrometriai technikát alkalmaztunk. A vizsgálataink során felvett tömegspektrumokon a detektált m/z -értékeknek megfelelő komplexek összetételét az izotópeloszlás alapján (ICIS 8.3 program) azonosítottuk be.

Az ESI-MS mérések során felvettük az ötkomponensű rendszer, illetve egyes két-, és háromkomponensű részrendszereinek tömegspektrumait pH = 8 értéken. A részrendszerek spektrumai a 31. ábrán, míg az ötkomponensű rendszerhez tartozó spektrum a 32. ábrán láthatók. A mérési eredmények alapján azt mondhatjuk, hogy mindegyik mért mintában egyszeresen pozitív ionokat detektáltunk. Ez megfelel az előzetes elvárásoknak, mivel az ilyen viszonylagosan kisméretű molekulák esetében az elektrosztatikus tasztítás miatt többszörösen pozitív töltés nehezen képzelhető el. A Cu-A rendszerben többféle formában is azonosítottuk a CuA- komplexnek megfelelő összetételű részecskéket (31.a ábra). Az első esetben a komplex egy hidrogénatom eltávozásával éri el a kedvező töltöttségű állapotot (II részecske), míg egy másik esetben egy perklorátanion kapcsolódik ellenionként a molekulához (IV). A harmadik forma (III) alapján a ligandum bizonyos mértékű fragmentálódása is bizonyításra lelt.



31. ábra A Cu,Zn-komplex egyes részrendszereinek tömegspektrumai: (a) Cu-A, (b) Cu-A-B, (c) Zn-C, (d) Zn-C-B (pH = 8).



32. ábra Az ötkomponensű rendszer (Cu-A-B-C-Zn) ESI-MS spektruma pH = 8 értéken.

Ebben az esetben ugyanis egy negatív töltésű etiléndiamin molekula koordinálódik a CuA-komplexhez, ami a dietiléntriamin fragmentálódásából származhat. A CuA részecske kismértékben dimerizálódik (VIII), és három perklorátanion révén éri el az egyszeresen pozitív töltésű állapotot. A Cu–A–B rendszerben az előzőekben említett részecskék mindegyike megtalálható volt (31.b ábra). Ezen kívül azonosítottuk a CuAB-komplexnek megfelelő összetételű molekulát is (VII), amelyben a CuAB részecskéhez egy perklorátanion is kapcsolódik. Szintén megtalálható az imidazolcsoportnak megfelelő csúcs is a spektrumon (I), amelyben az imidazolcsoport egy hidrogénatom felvételével éri el a kedvező töltöttségű állapotot. Ez vizes közegben ezen a pH-értéken nehezen képzelhető el, de az ESI-MS körülményei között előfordulhat. Hasonlóan az imidazolcsoportoz, a másik két ligandum egyszeresen pozitív ionja is megtalálható a mért spektrumokon, ezek azonban csak igen kis mennyiségben fordulnak elő. A Zn–C–B és Zn–C rendszerekben is hasonló összetételű részecskéket detektáltunk, mint az előbb említett esetekben, annyi különbséggel, hogy itt a ZnCB-komplex disszociál az alkalmazott mérési körülmények között (31.c és d ábra). Az izotópeloszlás alapján azonosított részecskék összefoglalása látható a 13. táblázatban.

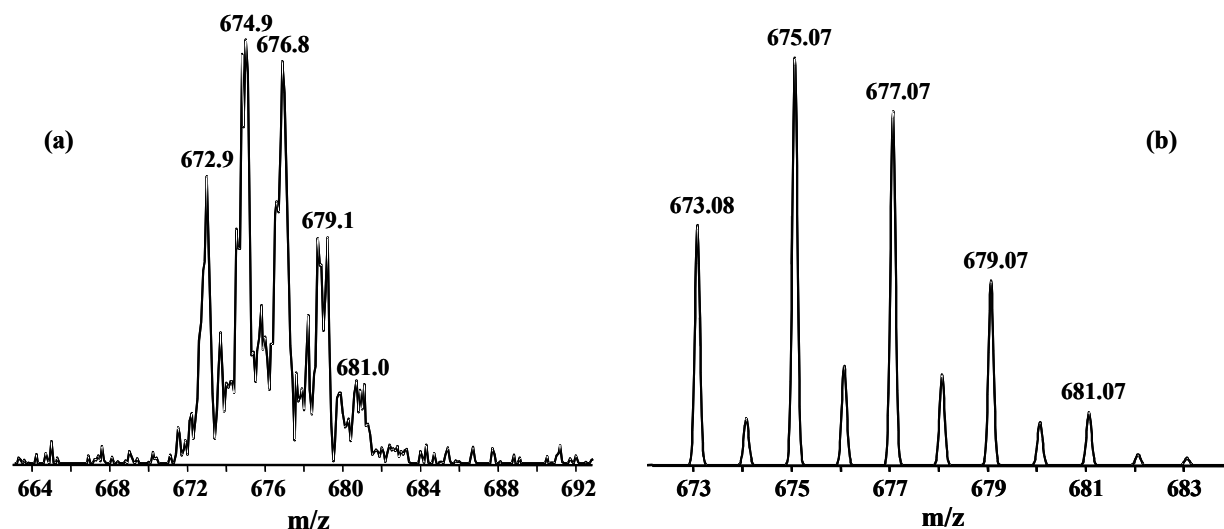
13. táblázat Az ESI-MS mérések során azonosított csúcsok m/z -értékei, számított összetételük és az ezek alapján javasolt komplexek összetétele az egyes rendszerekben.

m/z	számított összetétel (és m/z)	javasolt komplex molekula	rendszer ^a
164.6	C ₄ H ₁₂ N ₃ Cu ₁ (165)	[Cu ²⁺ -A-H ₁] ⁺	3, 4, 5
224.8	C ₆ H ₂₀ N ₅ Cu ₁ (225)	[Cu ²⁺ -A-C ₂ H ₇ N ₂] ⁺	3, 4, 5
264.6	C ₄ H ₁₃ N ₃ Cu ₁ ClO ₄ (265)	[Cu ²⁺ -A-ClO ₄] ⁺	3, 4, 5
268.7	C ₈ H ₂₅ N ₆ Zn ₁ (269)	[Zn ²⁺ -C-C ₂ H ₇ N ₂] ⁺	1, 2, 5
308.7	C ₆ H ₁₈ N ₄ Zn ₁ ClO ₄ (309)	[Zn ²⁺ -C-ClO ₄] ⁺	1, 2, 5
332.6	C ₇ H ₁₇ N ₅ Cu ₁ ClO ₄ (333)	[Cu ²⁺ -A-B-ClO ₄] ⁺	4, 5
628.7	C ₈ H ₂₆ N ₆ Cu ₂ Cl ₃ O ₁₂ (629)	[(Cu ²⁺ -A) ₂ -(ClO ₄) ₃] ⁺	3, 4, 5
672.8	C ₁₄ H ₃₈ N ₉ Cl ₂ O ₉ Cu ₁ Zn ₁ (673)	[Cu ²⁺ -A-B-C-Zn ²⁺ -H ₁ -(ClO ₄) ₃] ⁺	5
716.8	C ₁₂ H ₃₆ N ₈ Zn ₂ Cl ₃ O ₁₂ (717)	[(Zn ²⁺ -C) ₂ -(ClO ₄) ₃] ⁺	1, 2, 5

^a 1: Zn–C, 2: Zn–C–B, 3: Cu–A, 4: Cu–A–B és 5: Cu–A–B–C–Zn

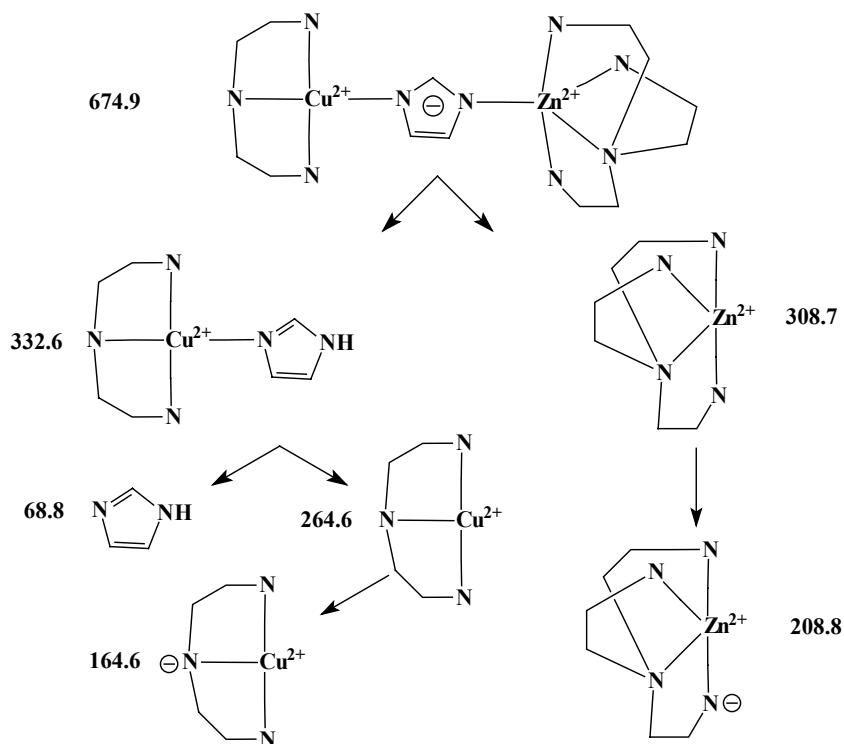
Amint az a 13. táblázat, illetve a 31. és 32. ábrák alapján látható, az ötkomponensű rendszerben egyetlen olyan részecskét detektáltunk ($m/z = 673$), ami nem található meg a részrendszerek egyikében sem. Az izotópeloszlás szimulálása során azt az eredményt kaptuk,

hogy az adott molekula összetétele azonos az imidazolátóhidas Cu,Zn-komplex összetételével. A számára kedvező töltöttségű állapotot (+1) két perklorát anion felvételével éri el. A részecske mért, illetve szimulált tömegspektruma látható a 33. ábrán.



33. ábra A Cu,Zn-komplex mért (a), illetve szimulált (b) ESI-MS spektruma.

Az ESI-tömegspektrometriai vizsgálatok eredményei alapján javaslatot tettünk a Cu,Zn-komplex fragmentálódására is az alkalmazott mérési körülmények között. A spektrumok alapján feltételezett mechanizmus látható a 34. ábrán.

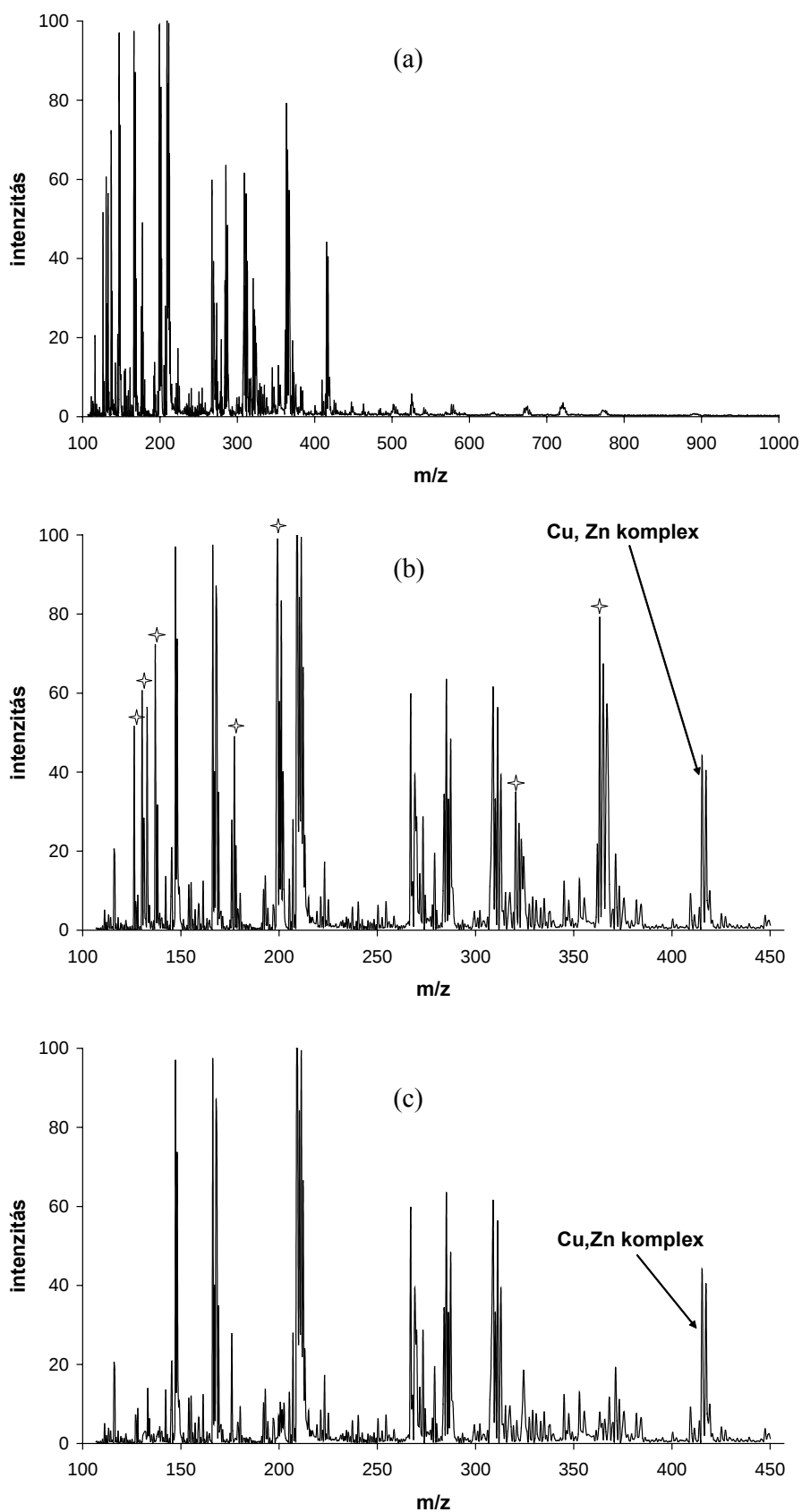


34. ábra A Cu,Zn-komplex javasolt fragmentálódási mechanizmusa.

A 34. ábrán a perklorát ellenionokat - a könnyebb áttekinthetőség kedvéért - nem tüntettük fel. Az első lépésben az imidazolátóhíd szakadása következik be a cink(II)ion felőli oldalon. Ezt követően a CuAB-komplex disszociál CuA-komplexre és imidazolmolekulára. Az utolsó lépésben mind a CuA-komplex, mind pedig a ZnC-komplex ligandumja veszít egy-egy protont. Amint azt már korábban említettük, az ESI-MS mérések során csak egyszeresen pozitív töltésű molekulákat detektáltunk a spektrumokon. A fenti mechanizmusban szereplő részecskék esetében a protondisszociáció előtti lépésekben a kedvező töltöttségű állapot (+1) megfelelő mennyiségű perklorát anion felvételével valósul meg.

A tömegspektrometriai mérések második részében megpróbálkoztunk a kérdéses molekula detektálásával MALDI-MS technikát alkalmazva. Mivel a tömegspektrometriának ezen módszere gyengébb ionizációnak veti alá a vizsgálandó vegyületet, a mérések során azt reméltük, hogy a detektálni kívánt Cu,Zn-komplex viszonylagosan nagy intenzitással jelenik meg a spektrumon. Hasonlóan az ESI-MS mérésekhez, ebben az esetben is felvettük az ötkomponensű rendszer, illetve az egyes részrendszereinek tömegspektrumait, a Cu,Zn-komplex fragmentálódását azonban itt nem vizsgáltuk. Célunk kizárólag az imidazolátóhidat tartalmazó molekulának megfelelő csúcs, illetve csúcsok azonosítása volt.

A méréseket nehezítette, hogy a keletkezett komplexek m/z -értékei a kimutatási határ alsó részében jelentkeztek, ahol a mátrix csúcsai is megtalálhatók. A könnyebb áttekinthetőség kedvéért a 35. ábrán bemutatjuk a mért spektrumot, egyéb feldolgozás nélkül (a), a mátrixhoz tartozó csúcsok bejelölése után (b), illetve a közeg által okozott csúcsok nélkül (c) is. Az ábra (a) részén látható, hogy $m/z = 450$ fölött a spektrumon nem található megfelelő intenzitású csúcs, ezért a továbbiakban csak a 100–450 tartományt ábrázoltuk. A mérési eredmények értékelése során először az alkalmazott közeg (DHB) által okozott csúcsokat azonosítottuk. Ennek érdekében felvettük a mátrixon kívül más anyagot nem tartalmazó minta MALDI spektrumát, amely alapján egyértelműen felismerhetők voltak a kérdéses sávok. Az értékelés további részében azonosítottuk a részrendszerekben található molekulákat az ötkomponensű rendszer tömegspektrumán, illetve meghatároztuk, hogy melyek azok a csúcsok, amelyhez nem rendelhető olyan részecske, amely az egyes alrendszerekben is megtalálható. Ezek alapján azt mondhatjuk, hogy egyértelműen egy csúcsot tudunk a Cu,Zn-komplex molekulához rendelni, $m/z = 415,08$ értéknél. Tehát hasonlóan az ESI-MS mérésekhez, ezzel a technikával is sikeresen kimutattuk a Cu,Zn-komplexet. Azt azonban meg kell jegyeznünk, hogy ebben az esetben a mintaelőkészítés során szilárd anyagot kaptunk, ellentétben az ESI-MS mérésekkel, ahol vizes közegben dolgoztunk a vizsgálatok során.



35. ábra Az ötkomponensű rendszer (Cu–A–B–C–Zn) MALDI-MS spektruma: (a) a mért spektrum, (b) a spektrum a mátrix, illetve a Cu,Zn-komplex csúcsainak bejelölésével, (c) a tömegspektrum a mátrix csúcsai nélkül.

IV.5. Elektrokémiai mérések

Annak érdekében, hogy a Cu,Zn-komplex redoxi viselkedését értelmezni tudjuk a későbbiekben tárgyalandó enzim tesztreakciókban, szükségesnek tartottuk a molekula oxidációs-redukációs tulajdonságainak megismerését. Munkánk során a ciklikus voltammetria módszerével tanulmányoztuk a Cu-A, Cu-A-B és Cu-A-B-C-Zn rendszerek elektrokémiai viselkedését vizes közegben. A két-, illetve a háromkomponensű elegy esetében a méréseket pH = 8 értéken végeztük, míg az ötkomponensű rendszer vizsgálata során tanulmányoztuk a komplexek redoxi viselkedését a pH = 6–8 tartományban. A mérési eredmények a 14. táblázatban láthatók.

14. táblázat A ciklikus voltammetriai mérések eredményei a különböző komplexek esetében.

komplex	pH	$E_{1/2}$ (mV) ^a	ΔE_p (mV) ^b	i_a/i_c
CuA	8	– 504,5	240,1	0,62
CuAB	8	– 480,4	161,0	0,95
CuABZnCH ₁	6	– 484,3	326,8	1,71
	7	– 459,0	141,7	0,51
	8	– 354,4	148,7	0,30

^a $E_{1/2} = (E_a - E_c)/2$; ^b $\Delta E_p = E_a - E_c$

A ciklikus voltammetriai mérések eredményei alapján a CuA-komplex esetében azt mondhatjuk, hogy a $\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^+$ redoxifolyamat irreverzibilis az alkalmazott mérési körülmények között, mivel az anódos, illetve katódos csúcs különbsége nagyobb, mint 180 mV. A táblázat adataiból az is látható, hogy az anódon és a katódon mért áramerősség hányadosa kisebb mint egy. Ez az adat arra enged következtetni, hogy a redukciós ciklus során változik a komplex geometriája, miközben a réz(II)ion réz(I)ionná redukálódik. Ismerve a két oxidációs állapot koordinációs kémiai viselkedését valószínűsíthető, hogy az eredeti síknégyzetes geometria tetraéderessé alakul át a redukció során. A CuAB-komplex esetében mért elektrokémiai adatok alapján megállapíthatjuk, hogy a redoxifolyamat kvázi reverzibilis, mivel a két csúcs távolsága 60 mV és 180 mV közötti érték. Az elektrokémiai potenciál ($E_{1/2}$) negatívabb, mint a CuA-komplex esetében, míg a két csúcs hányadosa egyhez közeli érték. Az utóbbi adat azt jelzi, hogy a redukciós ciklus során a komplex nem szenved nagymértékű geometriai változást.

A voltammetriai adatok alapján megállapíthatjuk, hogy az egymagvú (CuA és CuAB), illetve a kétmagvú (CuABZnCH₁) komplexek elektrokémiai viselkedése eltérő. A 14.

táblázat adataiból jól látható, hogy $\text{pH} = 8$ értéken a redoxpotenciál-értékek különbözőek, ami eltérő koordinációs környezetet jelent a réz(II)ion körül. Minden esetben negatív redoxpotenciál-értéket mértünk, ami jellemző a torzult oktaéderes, síknégyzetes, illetve négyzetes piramisos szerkezetű réz(II)komplexek esetében. Az ötkomponensű rendszer esetében mért elektrokémiai adatokból a következők állapíthatók meg. A katódos és az anódos csúcs különbsége igen jó egyezést mutat $\text{pH} = 7$ és $\text{pH} = 8$ értéken, míg a két csúcs hányadosa kissé különböző, azonban mindkét esetben egynél kisebb értéket tapasztaltunk. A ΔE_p értékek kvázi reverzibilis redoxifolyamatra utalnak, míg a két csúcs hányadosa arra enged következtetni, hogy a redukció során változik a komplex geometriája. Ezek alapján azt javasolhatjuk, hogy a $\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^+$ folyamat során az imidazolátóhíd felbomlik a molekulában a réz(II)ion felőli oldalon. A redoxpotenciál-értékek közötti különbség abból adódhat, hogy $\text{pH} = 7$ értéken néhány más összetételű réz(II)komplex is képződik kis mértékben (lásd pH-potenciometriai mérések), míg $\text{pH} = 8$ értéken közel 100 %-ban az imidazolátóhidat tartalmazó részecske található a rendszerben.

Az ötkomponensű rendszer elektrokémiai viselkedése teljesen megváltozik $\text{pH} = 6$ értéken. A redoxifolyamat irreverzibilissé válik, az elektrokémiai potenciál értéke pedig jó egyezést mutat a CuAB-komplex esetében mért értékkel. Ez alapján arra következtethetünk, hogy $\text{pH} = 7$ alatt a komplex disszociál, másképpen fogalmazva az imidazolátóhíd felbomlik a cink(II)ion felőli oldalon.

IV.6. Az oldategyensúlyi vizsgálatok összefoglalása

Az oldategyensúlyi vizsgálatok során célul tűztük ki a Cu,Zn-komplex részletes vizsgálatát vizes oldatban annak érdekében, hogy meggyőződjünk az imidazolátóhíd kialakulásáról a két fémion között. A mérési eredmények értékelését megkönnyítendő minden esetben vizsgáltuk a komplex részrendszereinek viselkedését is az egyes mérések során. Meghatároztuk a kialakuló részecskék összetételét (pH-potenciometria), szerkezetét (UV-Vis- és ESR spektroszkópia), molekulatömegét (tömegspektrometria), illetve elektrokémiai viselkedését (ciklikus voltammetria).

A 2–11 pH tartományban képződő részecskék összetételét, illetve stabilitási állandóik számértékét pH-potenciometriai titrálás módszerével határoztuk meg. Szintén meghatároztuk a ligandumok protonálódási állandóit, amelyek jó egyezést mutattak az irodalomban található értékekkel. A pH-potenciometriai mérések eredményei alapján azt mondhatjuk, hogy a feltételezett szerkezet kialakul, és 7–11 pH-tartományban stabilis. UV-Vis- és ESR spektroszkópiai vizsgálatokat is végeztünk a kialakuló komplexek szerkezetének megismerése

céljából. Mindkét módszerrel bizonyítottuk, hogy a Cu,Zn-komplex kialakul semleges, illetve lúgos közegben. A spektroszkópai eredmények alapján megállapítottuk, hogy a réz(II)ion körül kétféle geometria is kialakulhat, ami izomerek képződéséhez vezet. Ezek a folyamatok azonban nem befolyásolják az imidazolátóhidas szerkezetet létrejöttét. Tömegspektrometriai módszerekkel sikeresen kimutattuk a Cu,Zn-komplexnek megfelelő m/z -értékű molekula létezését $\text{pH} = 8$ értéken. Az izotópeloszlás szimulálása során azonosítottuk a részecske sztöchiometriáját, ami megfelelő egyezést mutatott az imidazolátóhidas részecske összetételével. A komplex elektrokémiai viselkedésének megismerése érdekében ciklikus voltammetriai méréseket végeztünk. Ezen eredmények alapján megállapítottuk, hogy az imidazolátóhidas molekula geometriai változást szenved a $\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^+$ folyamat során, ami valószínűleg az imidazolátóhíd felbomlásához vezet. Szintén bizonyítottuk, hogy a komplex disszociál $\text{pH} = 7$ érték alatt.

A fenti eredmények ismeretében kijelenthetjük, hogy az oldategyensúlyi vizsgálatok során a kitűzött célt sikeresen teljesítettük, mivel egyértelműen bebizonyítottuk az imidazolátóhidat tartalmazó, kétmagvú Cu,Zn-komplex létezését vizes oldatban.

V. IMMOBILIZÁLÁS SZERVETLEN HORDOZÓKON

Miután a Cu,Zn-komplex oldategyensúlyi vizsgálata megtörtént, megpróbáltuk rögzíteni a molekulát szilikagélen, illetve montmorillonitban azért, hogy a későbbiekben heterogén katalizátorként alkalmazni tudjuk. A szilikagélen történő rögzítésnél kétféle módszert alkalmaztunk: (i) rögzítés hidrogénhid-kötések segítségével (SG-h-Cu,Zn); (ii) rögzítés szilikagélre kovalens kötésen keresztül funkcionizált hordozó felhasználásával (SG-c-Cu,Zn). Montmorillonit esetében az agyagásvány ioncsere-kapacitását használtuk fel a komplex immobilizálására (Mont-i-Cu,Zn). Mivel a Cu,Zn-komplex pozitív töltésű, így rögzíthető a szilárd mátrix negatív töltésű felületén. Mivel a szilikagélnek gyakorlatilag elenyészően kicsi az ioncsere-kapacitása, ezért az első esetben a rögzítés az igen nagy sűrűséggel található felületi OH-csoportok (5–7 OH-csoport/nm²) segítségével jöhet létre. Ez úgy képzelhető el, hogy a ligandumok nitrogénatomjai, hidrogénhidakat hoznak létre a hordozó felületi OH-csoportjaival. Az előállított katalizátorok jellemzése a következő módszerekkel történt: atomabszorpciós spektroszkópia, fajlagos felület meghatározás, FT-IR spektroszkópia, ESR spektroszkópia, termikus vizsgálatok (TG/DTA). Az első három módszer esetében a vizsgálatok célja a komplex sikeres megkötődésének ellenőrzése volt. Az ESR spektroszkópia módszerével az immobilizálás során esetlegesen bekövetkező szerkezetváltozásokat vizsgáltuk. A TG/DTA mérések célja a katalizátorok termikus stabilitásának tanulmányozása volt. Természetesen ez utóbbi két módszer eredményei a sikeres megkötődést is alátámaszthatják.

V.1. Fémiontartalom meghatározása, fajlagos felületmérések

Amint azt már korábban említettük, az előállított szilárd anyagok réz(II)-, illetve cink(II)tartalmát az atomabszorpciós spektroszkópia módszerével határoztuk meg. A mérések célja a sikeres immobilizálás bizonyítása volt, ugyanis ha a katalizátor 1:1 arányban tartalmazza a két fémiont (réz(II)- és cink(II)ion), az igazolja a Cu,Zn-komplex jelenlétét a szilárd mátrixban. Természetesen ez még nem egyértelmű bizonyíték, azonban ha az FT-IR spektroszkópia módszerével igazolni tudjuk a ligandumok jelenlétét is, akkor már nagyobb biztonsággal feltételezhetjük a komplex molekula sikeres rögzülését a hordozón. A nitrogéngáz adszorpcióján alapuló fajlagos felület meghatározás (BET módszer) is szolgáltat a komplex megkötődését igazoló információt. Ugyanis abban az esetben, ha nagyobb méretű vegyület kerül a pórusokba (szilikagél), illetve a rétegek közé

(montmorillonit), a hordozó eredeti fajlagos felülete megváltozhat: akár nőhet, akár csökkenhet. Az előállított katalizátorok fémiontartalma, illetve fajlagos felületeik számértékei láthatók a 15. táblázatban.

15. táblázat Az immobilizált minták fémiontartalma, illetve fajlagos felületeik számértéke.

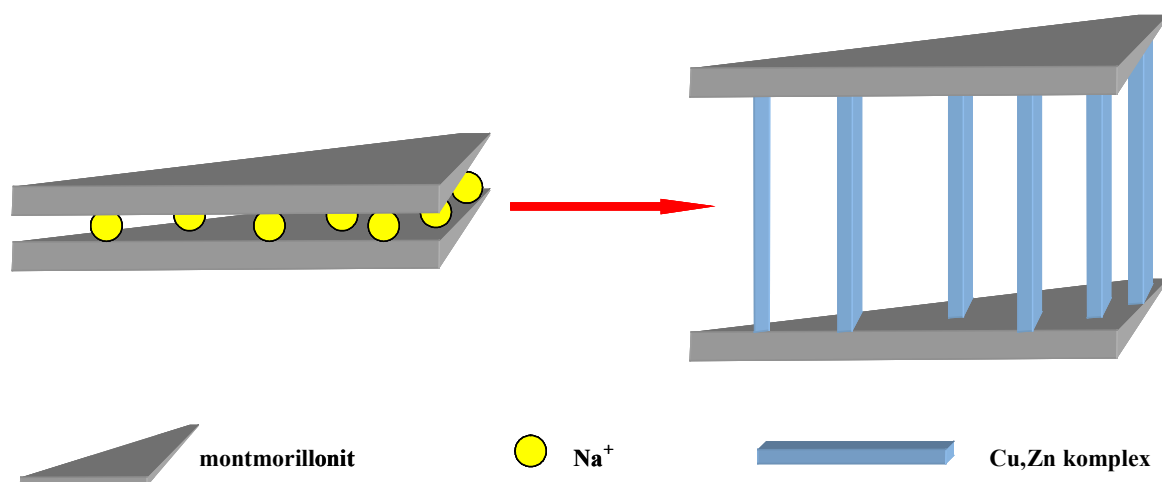
anyag ^a	Cu ²⁺ (mmol/g)	Zn ²⁺ (mmol/g)	BET felület (m ² /g)
szilikagél (SG)	–	–	93,5
SG–h–Cu,Zn	0,0159	0,0160	88,9
funkcionalizált szilikagél (SG)	–	–	49,4
SG–c–Cu,Zn	0,5752	0,5486	14,3
Montmorillonit (Mont)	–	–	59,9
Mont–i–Cu,Zn	1,0210	1,0232	172,1

^a SG–h–Cu,Zn: szilikagélen hidrogénhid-kölcsönhatásokkal rögzített Cu,Zn-komplex; SG–c–Cu,Zn: dietiléntriamin-funkcionalizált szilikagélen kovalensen rögzített Cu,Zn-komplex; Mont–i–Cu,Zn: montmorillonitban elektrosztatikus kölcsönhatásokkal rögzített Cu,Zn-komplex.

Amint az a táblázat adataiból jól látszik, a minták fémiontartalma alapján feltételezhető a Cu,Zn-komplex sikeres immobilizálása. Az atomabszorpciós spektroszkópiai mérések eredményei minden esetben 1:1 réz(II):cink(II) arányt mutattak ki a kérdéses anyagokban, ami megfelel a rögzíteni kívánt molekula fémionarányának. A Mont–i–Cu,Zn esetében meghatározott értékek jó egyezést mutatnak a hordozó ioncsere-kapacitásának (1,05 mmol/g) számértékével. Természetesen ezek az adatok még nem bizonyítják egyértelműen a sikeres immobilizálás tényét, ehhez további vizsgálatokra van szükség.

Összehasonlítva az egyes hordozók fajlagos felület értékeit a katalizátorok hasonló adataival elmondhatjuk, hogy ezek megváltoztak az immobilizálás során. A szilikagél esetében (SG–h–Cu,Zn) igen kis mértékű fajlagos felületcsökkenést tapasztaltunk. Ennek alapján azt feltételezhetjük, hogy kis mennyiségű komplex kötődött meg, és még a megkötődött molekulák - relatíve nagy méretük miatt - sem jutottak be a szilikagél pórusaiba. Azaz, véleményünk szerint a megkötődés elsősorban a szilikagél felületén játszódtott le. Jóval nagyobb mértékű felületcsökkenés figyelhető meg a dietiléntriamin-funkcionalizált szilikagélen való immobilizálás (SG–c–Cu,Zn) során. Ebben az esetben is ugyanazok mondhatóak el a változás okairól, mint az előzőekben (SG–h–Cu,Zn), kiegészítve azzal, hogy a fajlagos felület nagyobb mértékű csökkenése a nagyobb mennyiségű komplex molekula megkötődésével magyarázható, amelyek jelentősen csökkentik a pórusok hozzáférhetőségét. A montmorillonitban történő immobilizáláskor a változás iránya és mértéke is megváltozott. A katalizátor (Mont–i–Cu,Zn) fajlagos felülete majdnem háromszorosa a hordozó hasonló

értékének. Ez a változás a szilárd mátrix egyik sajátos tulajdonságának köszönhető. A montmorillonit ugyanis a duzzadó rétegszilikátok csoportjába tartozó anyag, ami azt jelenti, hogy a rétegek közötti távolságot az ellenion méretével változtatni lehet. Ezt szemlélteti a 36. ábra.



36. ábra A Cu,Zn-komplex immobilizálása montmorillonitban az ioncsere-kapacitásnak megfelelő elektrosztatikus kölcsönhatások által.

Amint az ábrán látható, a hordozóban ellenionként viselkedő nátriumionokat az immobilizálás során a jóval nagyobb méretű Cu,Zn-komplex helyettesíti (nagyobb méreténél és töltésénél fogva egyensúlyi folyamatban leszorítja a nátriumionokat a montmorillonit lapok felületéről), ami egyben a rétegek közötti távolság megnövekedését is eredményezi, illetve kitámasztott rétegszilikát keletkezésével jár. A fajlagos felületadatok ilyen mértékű és irányú megváltozása egyértelműen a komplex sikeres megkötődésére, illetve a kitámasztásra utal.

V.2. FT-IR spektroszkópiai vizsgálatok

Az FT-IR spektroszkópia módszere kiváló lehetőséget nyújt az immobilizálás sikerességének megerősítésére, ugyanis ha a ligandumok jellemző rezgési sávjai megjelennek a hordozó sávjai mellett a spektrumokon, akkor jelenlétük bizonyított az előállított katalizátorokban. Mivel az előző fejezetben tárgyalt atomabszorpciós spektroszkópiával meghatároztuk a fémionok megfelelő sztöchiometriájú jelenlétét az anyagokban, a két módszer együttesen igazolhatja a rögzítés sikerességét. Mivel a szilikagélen való rögzítések esetében (SG-c-Cu,Zn és SG-h-Cu,Zn) a komplex várhatóan a mátrix felületén kötődik meg, ezért ezekben az esetekben nem a hagyományos abszorbancia mérést alkalmaztuk, hanem az anyag felületéről teljesebb képet adó reflektanciát mértük. Az ebből származtatott mennyiség ($Kubelka-Munk = (1-R^2)/2R$, ahol R a reflektancia) arányos az abszorbanciával, illetve a

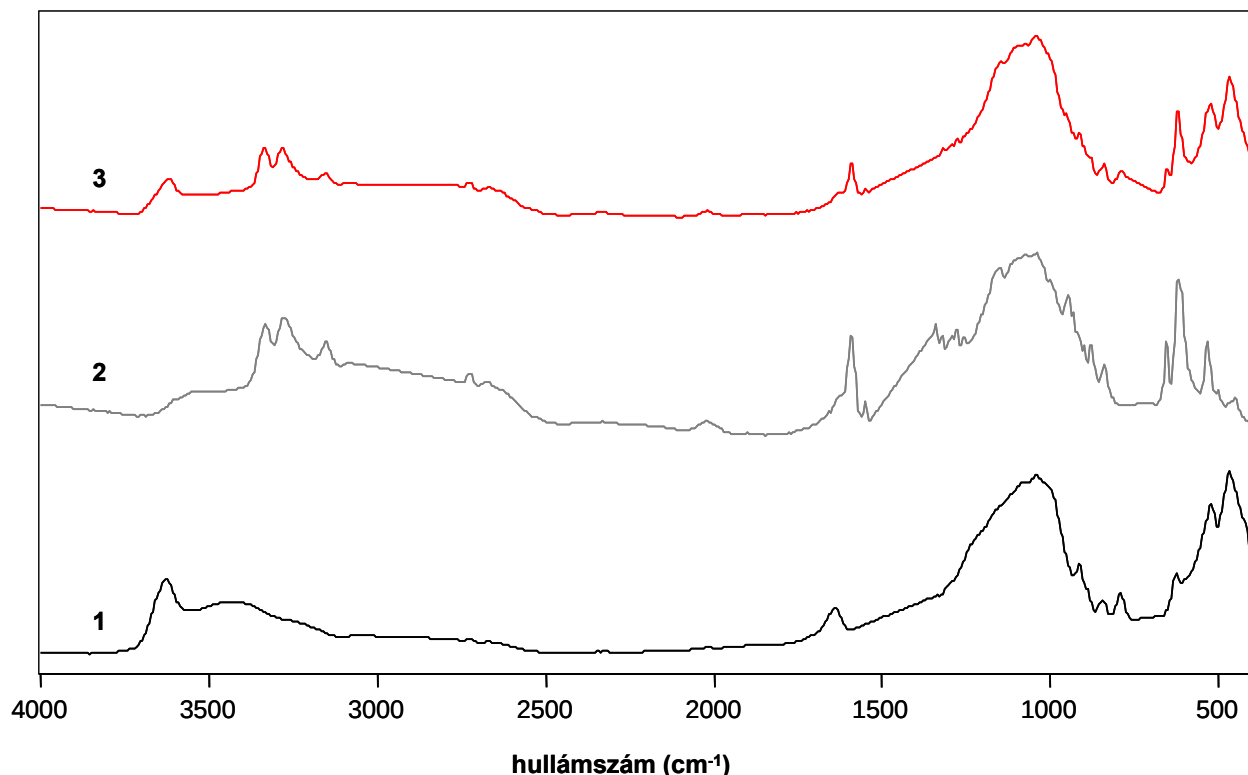
jellemző rezgési sávok megjelenése azonos hullámszámoknál várható, mint a hagyományos mérések esetében. A módszer alkalmazásának másik oka az immobilizált komplexek relatíve kis mennyisége volt, mivel a hagyományos mintaelőkészítések után a hordozó sávjai teljes mértékben elnyomják az immobilizált anyag hasonló rezgéseit. A montmorillonitban rögzített Cu,Zn-komplex esetében (Mont-i-Cu,Zn) a fentebb tárgyalt problémák nem álltak fent, ezért itt a mért mennyiség az abszorbancia volt. Minden esetben felvettük a hordozó nélküli komplex, a hordozó, illetve az előállított katalizátor FT-IR spektrumait. A mért hullámszám tartomány $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ volt.

Mint már korábban említettük, méréseink során a ligandumok jellemző rezgéseit próbáltuk azonosítani a spektrumokon, így bizonyítva a komplex megkötődését a hordozón. Pontos szerkezetvizsgálat az FT-IR spektroszkópia módszerével ezekben az esetekben nehézkes dolog lenne, ezért erre nem is vállalkoztunk. A könnyebb áttekinthetőség kedvéért a ligandumok egyes rezgéseinek irodalmi hullámszám-értékeit foglaljuk össze az alábbiakban. Azt azonban meg kell jegyeznünk, hogy ezek az értékek a tiszta anyagokra vonatkoznak, komplexképződés, illetve egyéb kölcsönhatások hatására a hullámszám-értékek eltolódhatnak, illetve az egyes rezgések intenzitása megváltozhat.

- Szimmetrikus (ν_s) és aszimmetrikus (ν_{as}) vegyértékrezgési sávok primer aminoknál ($\nu(\text{NH}_2)_s = 3250\text{--}3300\text{ cm}^{-1}$ és $\nu(\text{NH}_2)_{as} = 3330\text{--}3400\text{ cm}^{-1}$);
- vegyértékrezgési sáv a szekunder aminoknál ($\nu(\text{NH}) = 3300\text{--}3450\text{ cm}^{-1}$);
- deformációs rezgések primer ($\beta(\text{NH}_2)_s = 1580\text{--}1650\text{ cm}^{-1}$, $\gamma(\text{NH}_2)_s = 1000\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$, $\gamma(\text{NH}_2)_{as} = 600\text{--}900\text{ cm}^{-1}$), illetve szekunder ($\beta(\text{NH}) = 1490\text{--}1650\text{ cm}^{-1}$, $\gamma(\text{NH}) = 550\text{--}800\text{ cm}^{-1}$) aminocsoportok esetében;
- C–C és C–N vegyértékrezgési sávok ($\nu(\text{C–C})$ és $\nu(\text{C–N})$, amelyek együtt csoportrezgésként jelentkeznek a $1030\text{--}1430\text{ cm}^{-1}$ tartományban);
- imidazolcsoport vázrezgése (1400–1700 cm^{-1} és 500–900 cm^{-1}).

A montmorillonitban rögzített komplex (Mont-i-Cu,Zn) esetében jól látható, hogy a hordozó sávjai mellett a Cu,Zn-komplex jellemző rezgési sávjai megjelennek a katalizátor spektrumán (37. ábra). Azonosíthatóak az imidazolcsoport vázrezgése (650–700 cm^{-1}), illetve a primer és szekunder aminocsoportok deformációs rezgése (1550–1600 cm^{-1}) is. Azt megállapítani, hogy az imidazolátóhíd létezik-e, az FT-IR spektrumok alapján nem lehet. Ehhez ugyanis látni kellene az imidazol NH deformációs-, illetve vegyértékrezgéseinek eltűnését (ha híd van, akkor ezek a rezgések nem jelentkeznek, mivel a nitrogén deprotonálódik). Ez viszont nem lehetséges, mert ez a sáv a másik két amin sávjaival együtt

jelenik meg, így ha az imidazol deprotonálva van, akkor is látható az NH-rezgés a másik két ligandum jóvoltából.

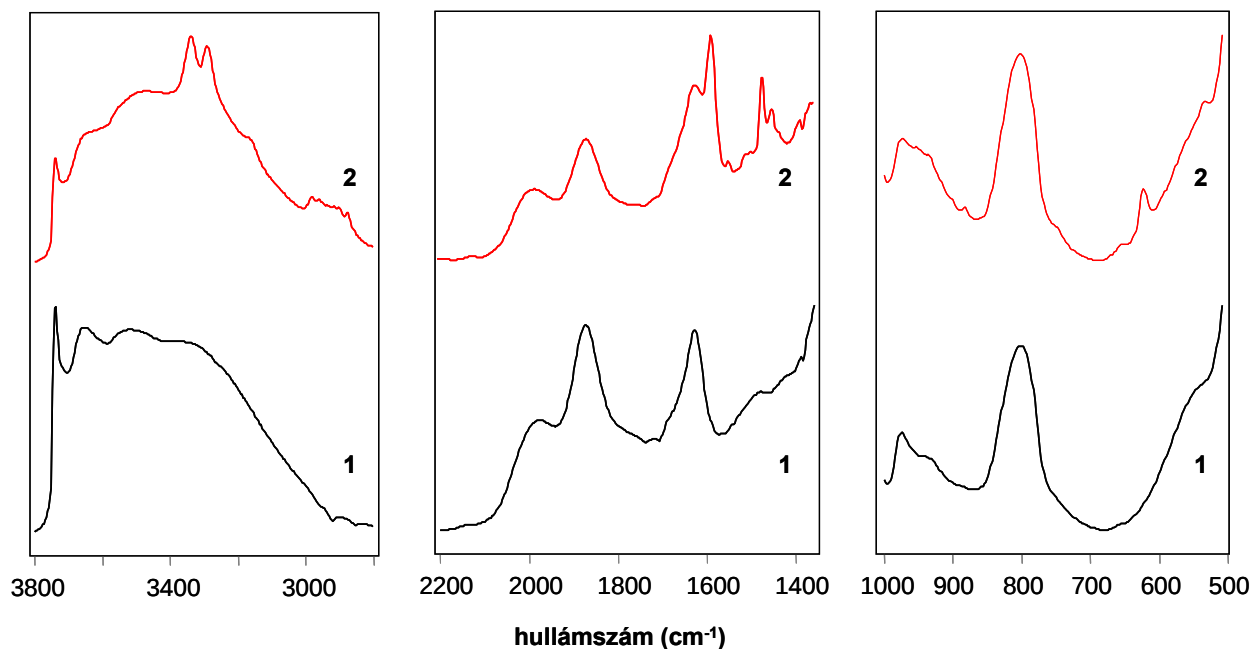


37. ábra A montmorillonit (1), a Cu,Zn komplex (2) és a montmorilloniton immobilizált Cu,Zn komplex (3) FT-IR spektruma.

Sajnos ebben az esetben nem tudjuk követni a C–N, C–O és C–C vegyértékrezgési sávok változásait. Mivel a hasonló atomtömegek (a rezgési erőállandók alig különböznek) miatt ezek együtt jelentkeznek csoportrezgésként, a 900–1300 cm⁻¹ tartományban nagy intenzitású széles jelet adnak a spektrumon. Viszont a nagy feleslegben jelen levő hordozónak is ebben a tartományban van karakterisztikus csúcsa, ezért ez elnyomja a komplex rezgési sávjait. Megfigyelhető továbbá a két amin és az imidazol szimmetrikus és aszimmetrikus vegyértékrezgéseinek megjelenése a 3100–3300 cm⁻¹ tartományban. Az OH-csoportok vegyértékrezgéseinek sávjai a montmorillonitnak és a jelenlévő kevés víznek köszönhetően vannak jelen 3000–3800 cm⁻¹ között. Kis intenzitással ugyan, de észrevehetők még a metilencsoportok szimmetrikus és aszimmetrikus vegyértékrezgései (2800–2900 cm⁻¹) is.

Hasonlóan az előző anyaghoz a szilikagélen hidrogénhid-kölcsönhatásokkal rögzíteni kívánt Cu,Zn-komplex (SG–h–Cu,Zn) esetében is, a megkötődés sikerességét FT-IR spektroszkópia módszerével is ellenőriztük. Mivel a komplex mennyisége relatíve kicsi a szilárd mátrixhoz képest (~0,7 tömegszázalék), ezért a hagyományos módszerrel nem kaptunk értékelhető spektrumokat. Ez azt jelenti, ha abszorbanciát mérünk, akkor a szilikagél rezgési

sávjai mellett a komplex jelei nem láthatók. Ezek után a méréseket reflektancia módban végeztük, amely a hordozó felületéről szolgáltat információkat. A y -tengelyen ábrázolt mennyiség a Kubelka-Munk $((1-R^2)/2R$, ahol az R a reflektancia), ami az abszorbanciával arányos mennyiség. A mért spektrumok a 38. ábrán láthatók.

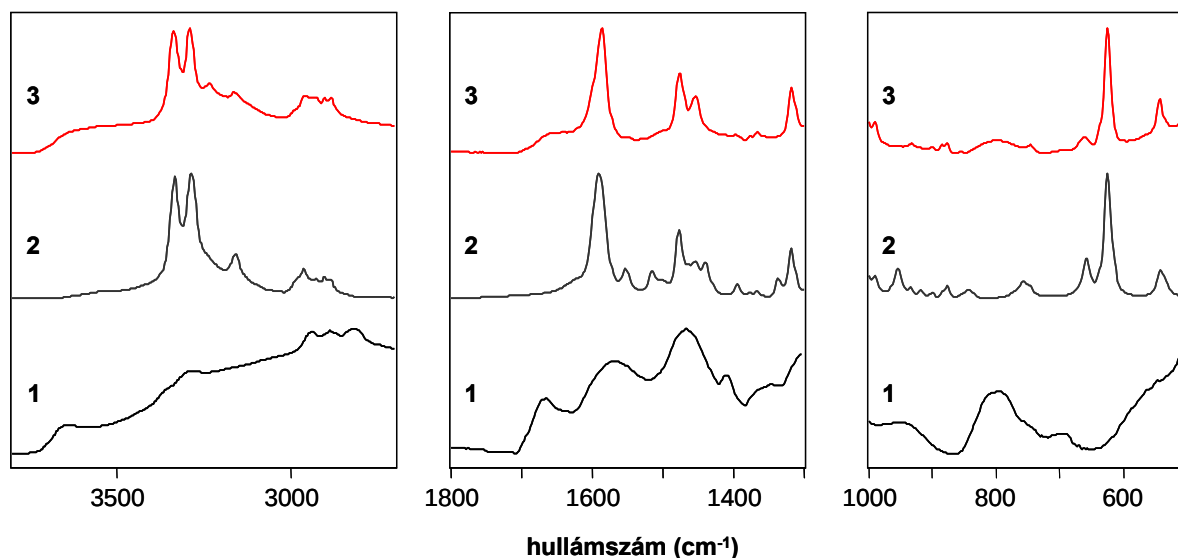


38. ábra A szilikagél (1), illetve a szilikagélen hidrogén hidakkal rögzített Cu,Zn komplex (SG-h-Cu,Zn, 2) FT-IR spektruma.

A mérési eredmények alapján azt mondhatjuk, hogy a rögzítés sikeres volt, hiszen a spektrumon megjelennek az aminok deformációs és vegyértékrezgési sávjai ($\sim 1600\text{ cm}^{-1}$ és $\sim 3300\text{ cm}^{-1}$), a metilén csoportok vegyértékrezgései ($\sim 2900\text{ cm}^{-1}$) és az imidazol vázrezgései ($\sim 600\text{ cm}^{-1}$ és $\sim 1500\text{ cm}^{-1}$) is. Továbbra sem tudtuk azonosítani a C–O, C–N, C–C kötések vegyértékrezgéseit, ugyanis hasonlóan a montmorillonit-hoz, a szilikagél esetében is az Si–O kötések vegyértékrezgései dominálnak ebben a tartományban ($1000\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$). Mivel a mérésekkel a felületről nyertünk információkat, nem tudjuk, hogy a komplex be tudott-e kerülni a szilikagél pórusaiba, vagy - ami a fajlagos felület értékekből valószínűsíthető - főként a hordozó felületén helyezkedik el.

Az FT-IR spektroszkópiai méréseket a kovalensen rögzített Cu,Zn-komplex (SG-c-Cu,Zn) esetében is reflektancia módban végeztük, hiszen elsősorban felületi információkat szerettünk volna kapni az anyagról. Mivel a funkcionáliszt szilikagélen található felületi dietiléntriamin csoportok mennyisége relatíve nagy, ezért várható volt nagyobb mennyiségű komplex immobilizálása a felületen, ami jól detektálható az FT-IR spektroszkópia ezen módszerével. Hasonlóan az előzőekhez, célunk ebben az esetben is a komplexben

megtalálható ligandumok jellemző rezgéseinek azonosítása volt. A hordozó, a Cu,Zn-komplex és az SG-c-Cu,Zn mért spektrumait láthatjuk a 39. ábrán.



39. ábra A dietiléntriamin funkcionizált szilikagél (1), a Cu,Zn-komplex (2), illetve a szilikagélen kovalensen rögzített Cu,Zn-komplex (SG-c-Cu,Zn, 3) FT-IR spektruma.

Mint ahogy az a spektrumokon is látszik, a komplex rögzítése szilikagélre kovalens kötésekkel keresztül sikeresnek mondható. A komplexre jellemző rezgési sávok igen nagy intenzitással jelennek meg a katalizátor spektrumán (3), ami arra utal, hogy viszonylag nagy mennyiségű komplex alakult ki a hordozó felületén. A színekben megjelennek az aminok deformációs és vegyértékrezgései, a metilénsoportok deformációs rezgései, illetve az imidazolcsoport vegyérték- és vázrezgései is. A Cu,Zn-komplex relatíve nagy mennyiségének köszönhetően, ebben az esetben detektálni tudtuk a C-C, C-N és C-O kötések vegyértékrezgéseinek megfelelő csoportrezgéseket is a 1030–1430 cm⁻¹ tartományban.

Az FT-IR spektroszkópai eredmények ismeretében azt mondhatjuk, hogy mindegyik esetben azonosítani tudtuk a Cu,Zn-komplext alkotó ligandumok jellemző rezgési sávjait az előállított immobilizált mintákban. Ez a tény, a fémiontartalom ismeretében (ami alapján azt mondhatjuk, hogy a réz(II)- és cink(II)ionok 1:1 molarányban vannak jelen a katalizátorokban) bizonyítja, hogy az immobilizálás mindegyik esetben sikeres volt, hiszen mind a fémionok, mind pedig a ligandumok megtalálhatók a hordozókban, illetve azok felületén. Bővebb szerkezeti jellemzésre nem vállalkoztunk ezekből az adatokból, azonban a következő fejezetben - az ESR spektroszkópai részben - megpróbálkozunk a katalizátorok szerkezetének részletesebb jellemzésével, ami arról szolgáltat információt, hogy a komplex milyen jellegű szerkezeti változásokon ment keresztül az immobilizálás során.

V.3. ESR spektroszkópiai jellemzés

Méréseink során por alakban vettük fel a szilárd Cu,Zn-komplex és a katalizátorok ESR szinképeit, majd az értékelést követően összehasonlítottuk az immobilizálás előtti, illetve utáni adatokat. A jelalakot minden esetben anizotrop jelszélességi tenzor írta le. A megfelelő ESR paraméterek számítása után azt próbáltuk meg követni, hogy a rögzítés során tapasztalhatóak-e változások a komplex szerkezetében. Ezen kívül felhasználtuk a módszert a hordozó nélküli komplex molekulában található imidazolátóhid közvetett bizonyítására is úgy, hogy összehasonlítottuk a korábbiakban vizsgált, szintén imidazolátóhidat tartalmazó, réz(II)komplexek ESR paramétereit a Cu,Zn-komplex megfelelő értékeivel. Néhány imidazolátóhidat tartalmazó réz(II)komplex, a natív enzim, illetve az általunk vizsgált anyagok ESR paramétereit láthatóak a 16. táblázatban.

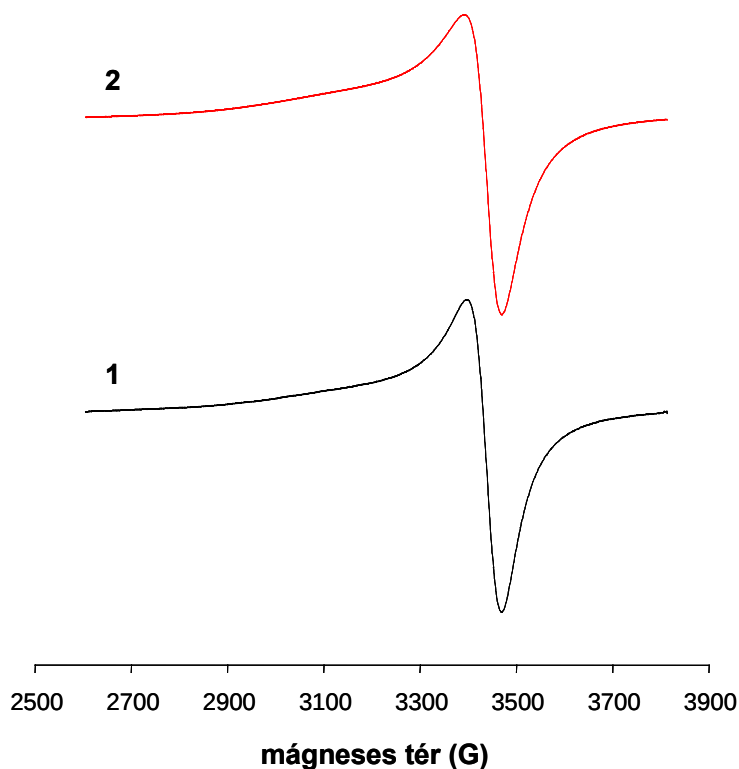
16. táblázat Néhány imidazolátóhidat tartalmazó réz(II)komplex, illetve az általunk vizsgált anyagok ESR paramétereit a g -értékekkel kifejezve.

anyagok ^a	$g_x = g_y = g_{\perp}$	$g_z = g_{\parallel}$	hivatkozás
Cu,Zn-SOD	2,07	2,26	[39]
Cu(II)– B –Zn(II)–L	2,07	2,21	[38]
glygly–Cu(II)– B –Zn(II)–glygly	2,04	2,21	[26]
dien–Cu(II)– B –Zn(II)–dien	2,05	2,20	[29]
pmdt–Cu(II)– B –Zn(II)–pmdt	2,03	2,22	[29]
Cu,Zn-komplex	2,05	2,28	saját mérés
Mont–i–Cu,Zn	2,05	2,28	saját mérés
SG–h–Cu,Zn	74 % 2,05 26 % 2,05	2,26 2,22	saját mérés
SG–c–CuA	2,10	2,12	saját mérés
SG–c–CuAB	77 % 2,05 23 % 2,05	2,26 2,22	saját mérés
SG–c–Cu,Zn	73 % 2,08 27 % 2,05	2,18 2,21	saját mérés

^a glygly = glicilglicin; L = 1,4,12,15,18,26,31,39-octaazapentaciklo[13,13,13,1]-tetratetrakontán-6,8,10,20,22,24,33,35,37-nonán; A = dietiléntriamin; pmdt = pentametiléndietiléndtriamin; B = imidazol.

A táblázat adataiból kiderül, hogy a Cu,Zn-komplex hasonló ESR paraméterekkel rendelkezik, mint a már korábban vizsgált imidazolátóhidat tartalmazó réz(II)-cink(II) heterobinukleáris rendszerek. Ez bizonyíték arra, hogy a Cu,Zn-komplex szerkezete szilárd állapotban is imidazolátóhidat tartalmaz. A $g_{\perp}$ és $g_{\parallel}$ értékek alapján azt is megállapíthatjuk, hogy a Cu,Zn-komplexben a réz(II) koordinációs környezete hasonló a natív enzim aktív centrumában találhatóhoz, ami ugyancsak az imidazolátóhid létezését erősíti meg.

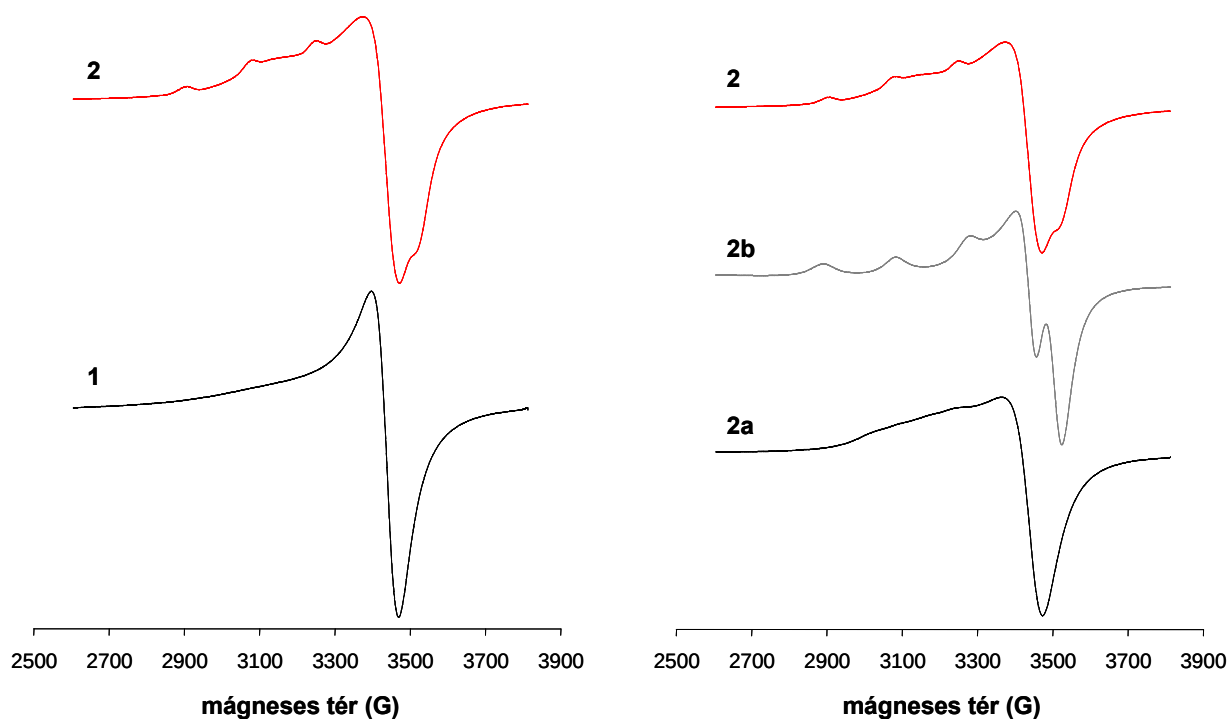
A Cu,Zn-komplex és a montmorillonitban rögzített Cu,Zn-komplex (Mont-i-Cu,Zn) esetén a mért spektrumok (40. ábra), illetve a számított ESR paraméterek (16. táblázat) összehasonlítása alapján azt mondhatjuk, hogy a Cu,Zn-komplex szerkezete nem változik lényegesen az immobilizálás során. Ezek alapján az imidazolátóhid megmaradása feltételezhető. Tehát az a rögzítési módszer, amelyek során az előre elkészített komplex molekulát visszük be a szilárd mátrix belsejébe, ebben az esetben jól működik.



40. ábra Por alakban felvett ESR spektrumok: **1** – Cu,Zn-komplex, **2** – Mont-i-Cu,Zn ($T = 298\text{ K}$).

A szilikagélen hidrogénhid-kölcsönhatásokkal rögzített Cu,Zn-komplex (SG-h-Cu,Zn) esetében is az előzőekhez hasonlóan jártunk el. Az ESR spektroszkópiai mérések során felvettük a katalizátor és a hordozó nélküli Cu,Zn-komplex spektrumait por alakban, szobahőmérsékleten. A mért színek alapján kiszámítottuk az anyagok ESR paramétereit, és vizsgáltuk az immobilizálás során fellépő szerkezeti változásokat. Mint ahogy az már a 16.

táblázat adataiból is kiderül, vizsgálataink során kétféle szerkezetű immobilizált réz(II)tartalmú részecskét detektáltunk. A hordozó nélküli komplex és az SG-h-Cu,Zn ESR színeke látható a 41. ábrán. Az utóbbi spektrum két komponensre bontható, amelyeket szintén ezen az ábrán mutatunk be.

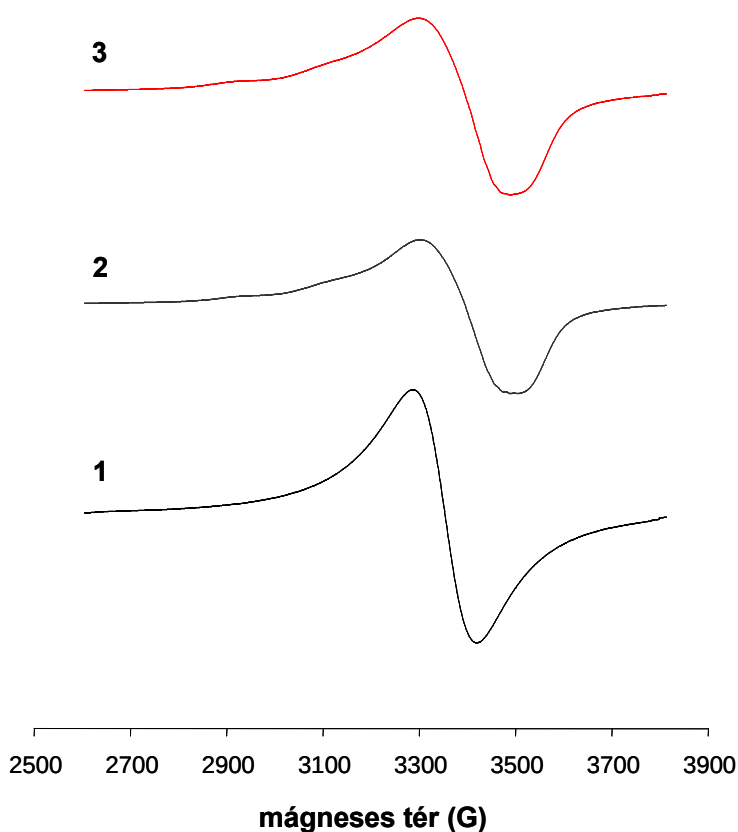


41. ábra A Cu,Zn-komplex (1), illetve az SG-h-Cu,Zn (2) ESR spektruma (a 2a és 2b színekek az SG-h-Cu,Zn katalizátorban detektált különböző szerkezetű réz(II)komplexek szimulált egyedi spektrumai).

A fenti spektrumok, illetve a számított paraméterek (16. táblázat) alapján azt mondhatjuk, hogy a szilikagélen kétféle szerkezetű réz(II)tartalmú komplex detektálható. Ez arra utal, hogy a Cu,Zn-komplex kétféleképpen kötődik meg a szilikagél felületén. A 2a komponens spektrumán nincs hiperfinom felhasadás, a 2b spektrumon azonban van. A számított ESR paramétereket a 16. táblázat 8. és 9. sora tartalmazza. A 2b spektrummal rendelkező komplex esetében jelentkező kisebb g_z érték erősebb ligandumteret jelez a réz(II)ion körül. Az a tény, hogy hiperfinom felhasadást csak ennél a komplexnél tapasztaltunk azt jelzi, hogy ebben az esetben a spin-spin kölcsönhatás gyenge, tehát a paramágneses centrumok távolabb helyezkednek el a hordozó felületén, mint a 2a spektrummal jellemzett komplex esetében.

A két komplex szerkezete az ESR paraméterek alapján különböző, a közülük a 2a spektrummal jellemzett közelíti meg jobban a hordozó nélküli molekula szerkezetét. Mivel ez teszi ki a katalizátorban található réz(II)tartalmú komplexek döntő hányadát (74 %), ezért azt

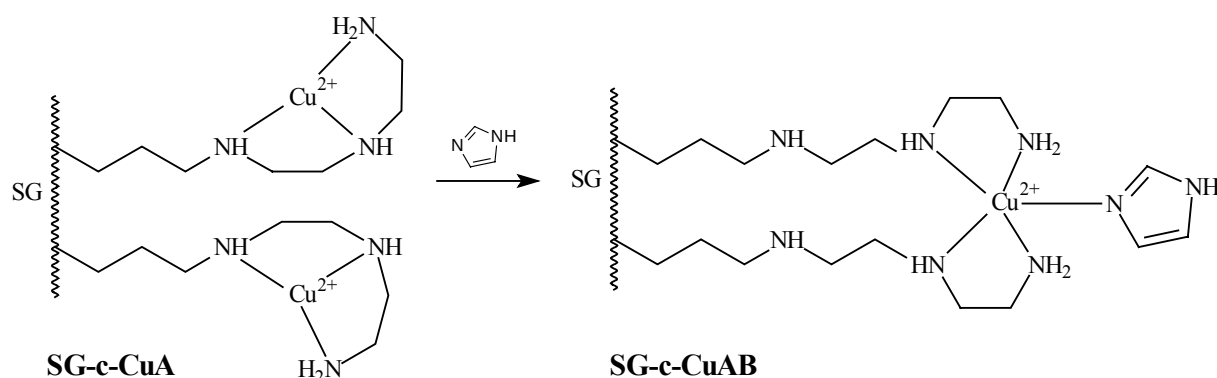
mondhatjuk, hogy a Cu,Zn-komplex rögzítése szilikagélen sikeres volt. A $g_{\parallel}$ érték kismértékű csökkenése azonban arra enged következtetni, hogy a réz(II)ion körüli geometria változik a hordozó nélküli komplexhez képest. A 16. táblázat adataiból az is kiderül, hogy ez az érték megegyezik a természetes enzim hasonló adatával. Mivel a természetes enzimben a réz(II)ion körüli nitrogénatomok axiális irányban torzult síknégyszetes geometria szerint helyezkednek el, ezért az ESR paraméterek alapján azt mondhatjuk, hogy a Cu,Zn-komplexben található síknégyszetes geometria a 2a esetben axiális irányban torzul, jobban megközelítve így a natív Cu,Zn-SOD enzim aktív centrumának szerkezetét. A 2b esetben az ESR paraméterekben bekövetkező nagyobb mértékű változások erősebb geometriai torzulásra engednek következtetni.



42. ábra Por alakban felvett ESR spektrumok: **1** – SG–c–CuA; **2** – SG–c–CuAB; **3** – SG–c–Cu,Zn.

A szilikagélhez kovalensen rögzített Cu,Zn-komplex (SG–c–Cu,Zn) esetén - hasonlóan az előzőekben tárgyalt mérésekhez - az ESR színeképeket szilárdfázisban (por alakban) vettük fel szobahőmérsékleten. A vizsgálatok során megpróbáltuk követni a katalizátor előállításának során bekövetkező szerkezeti változásokat a réz(II)ion környezetében, ezért felvettük a

dietiléntriamin-funkcionalizált szilikagél réz(II)komplexének (SG-c-CuA), a dietiléntriamin-funkcionalizált szilikagél réz(II)-imidazol komplexének (SG-c-CuAB), illetve a szilikagélen kovalensen immobilizált Cu,Zn-komplex (SG-c-Cu,Zn) ESR spektrumait. A mért színekpek a 42. ábrán láthatók, az ezekből számolt paramétereket pedig szintén a 16. táblázatban tüntettük fel. Amint az ESR színekpeken, illetve a számított paramétereken látszik, a szintézis során a réz(II)ion koordinációs környezete jelentős változásokon megy keresztül. Azt korábbi mérések alapján tudjuk, hogy a dietiléntriamin-funkcionalizált szilikagél réz(II)komplexében (SG-c-CuA) a dietiléntriamin:réz(II) arány 1:1, míg az SG-c-CuAB és SG-c-Cu,Zn anyagokban 2:1. Azt mondhatjuk tehát, hogy az imidazol molekula hozzáadása után változik meg a dietiléntriamin:réz(II)ion arány. Ez úgy jöhet létre, hogy egy réz(II)ion két dietiléntriamin (szilikagélen kovalens kötéssel rögzített) molekulához koordinálódik. Ebben az esetben a réz(II)ionhoz koordinálódik 2-2 nitrogénatom (két dietiléntriamin molekulától), illetve egy imidazol nitrogénatom. Ezt megerősítették az ESR spektroszkópiai mérések is, ugyanis a szimulációs számítások során öt nitrogéndonoratomot feltételezve a számított spektrumok jobban illeszkedtek a mért spektrumokhoz. A feltételezett szerkezeti változások szemléltetése látható a 43. ábrán.



43. ábra A réz(II)ion koordinációs szférájának változása az $SG-c-CuA + B = SG-c-CuAB$ reakció során ($SG-c-CuA$ = dietiléntriamin-funkcionalizált szilikagél réz(II)komplex, $SG-c-CuAB$ = dietiléntriamin-funkcionalizált szilikagél réz(II)-imidazol-komplex, SG = szilikagél).

Az ábrán látható reakció során kétféle szerkezetű réz(II)vegyület keletkezik, ahogy ez a spektrumokon, illetve az ESR paramétereken is látszik. A kétféle szerkezet a cink(II)-trisz(2-aminoetil)amin-komplex hozzáadása után is megmarad, bár a paraméterek kismértékű változása következik be. Ez utóbbi változás valószínűleg az imidazolátóhidas szerkezet kialakulásának köszönhető. Az eredmények alapján tehát azt mondhatjuk, hogy két olyan réz(II)vegyület található a szilikagél felületén, amelyben a réz(II)ion körüli geometria különbözik. Továbbá azt is megállapíthatjuk, hogy a katalizátorban található réz(II)tartalmú részecskék kisebb része (27 %) valószínűsíthetően hasonlóan imidazolátóhidas szerkezetű,

mint a Cu,Zn-komplex, annyi különbséggel, hogy ebben az esetben a réz(II)ionhoz koordinálódik négy nitrogénatom a kovalensen kötött dietiléntriamin molekuláktól és egy nitrogénatom az imidazolmolekulától. Tehát a réz(II)ion koordinációs száma öt, ellentétben a hordozó nélküli molekuláéval, amelyben négy. A másik réz(II)vegyület ESR paraméterei jelentősen eltérnek az imidazolátóhidas szerkezetű Cu,Zn-komplex hasonló értékeitől, így arra következtethetünk, hogy az immobilizálás során nagymértékű geometriai torzulás következett be a komplex szerkezetében.

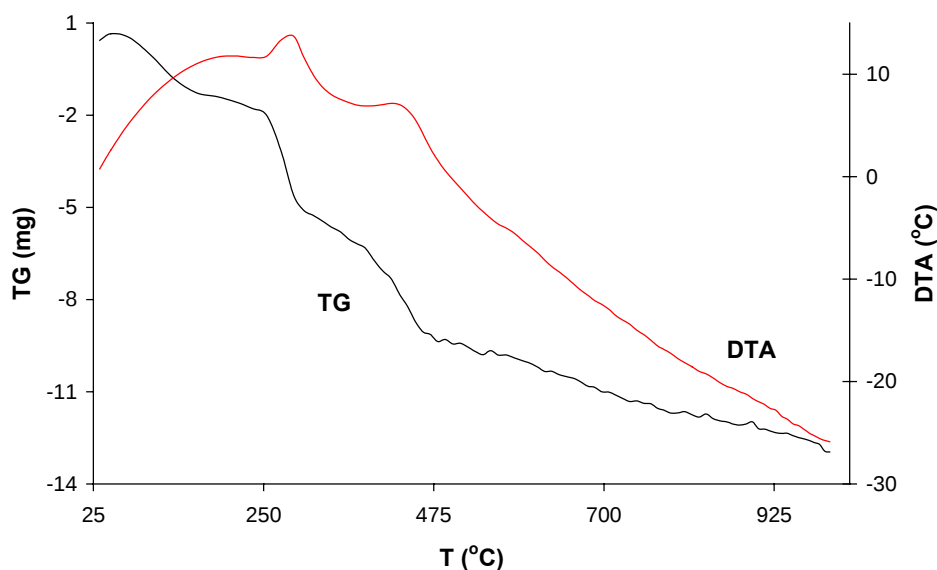
Összefoglalva a szilárdfázisban elvégzett ESR spektroszkópai mérések eredményeit azt mondhatjuk, hogy mindegyik esetben sikeresnek mondható a Cu,Zn-komplex immobilizálása. A Mont-i-Cu,Zn vizsgálata során megállapítottuk, hogy a katalizátorban található réz(II)komplexek ESR paraméterei teljesen megegyeznek a hordozó nélküli Cu,Zn-komplex hasonló értékeivel. Az SG-h-Cu,Zn esetében kétféle szerkezetű réz(II)komplex alakult ki a hordozó felületén az immobilizálás során. Ezek közül a nagyobb mértékben megtalálható összetevő ESR paraméterei jó egyezést mutatnak a Cu,Zn-komplex értékeivel, csak kismértékű torzulás feltételezhető a réz(II)ion körüli geometriában. A másik komplex nagyobb mértékű szerkezettorzulást mutat. Az SG-c-Cu,Zn katalizátor ESR spektroszkópai jellemzése során szintén kétféle szerkezetű réz(II)komplex detektálható a hordozó felületén.

V.4. Termikus vizsgálatok

A derivatográfiai vizsgálatok segítségével levegő- és nitrogénatmoszférában egyaránt elvégeztük a katalizátorok termikus jellemzését. Inert atmoszférás mérésekre azért volt szükség, mivel az előzetes vizsgálatok során úgy tapasztaltuk, hogy az anyagok egy része levegőben hevítve robbanásszerűen bomlik. Ezt a nemkívánatos folyamatot szerettük volna megakadályozni a nitrogéngáz alkalmazásával. Ez a próbálkozásunk azonban nem járt sikerrel, mivel a hordozó nélküli komplex, illetve a Mont-i-Cu,Zn esetében nitrogénatmoszférában is robbanásszerű bomlást tapasztaltunk. Ez a folyamat könnyen magyarázható, hiszen az előbb említett két anyag perklorátanion-tartalma viszonylagosan magas a többihez képest, és köztudott tény, hogy a perklorát hevítés hatására oxigént veszítve bomlik, ami a robbanásszerű bomlást elősegítheti. Az előzőeknek megfelelően a Cu,Zn-komplex és a Mont-i-Cu,Zn-katalizátor a derivatográfiai mérés során 300 °C körül, a magas nitrogén- és perklorátiontartalom miatt felrobbant a készülékben, ezért részletes termikus analízisük nem lehetséges.

A szilikagélen hidrogénhidakkal rögzített Cu,Zn-komplex (SG-h-Cu,Zn) esetében mért termoanalitikai görbék a 44. ábrán láthatóak. A TG görbe alapján azt mondhatjuk, hogy az

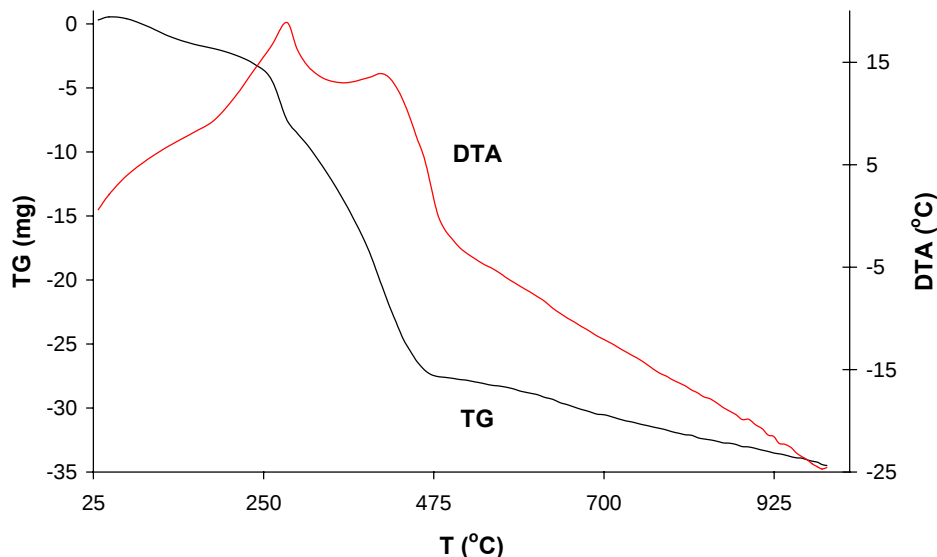
anyagból 250 °C-ig eltávozik a jelenlévő víz és az immobilizálás során használt oldószer (izopropanol). 250 °C felett két lépcsőben távozik el a szerves anyag a katalizátor felületéről. A második lépcső 470 °C körül fejeződik be. Ezen adatok alapján azt mondhatjuk, hogy a SG–h–Cu,Zn-katalizátor nagyobb termikus stabilitású, mint a hordozó nélküli Cu,Zn-komplex, hiszen az már 300 °C körül robbanásszerűen elbomlik, arról nem is beszélve, hogy a természetes enzimek denaturációja pedig már jóval alacsonyabb hőmérsékleten bekövetkezik. Ezek alapján megállapíthatjuk, hogy a SG–h–Cu,Zn előállításával egy termikusan stabilisabb enzimutánzó vegyülethez jutottunk, mint a hordozó nélküli komplex esetén.



44. ábra A szilikagélen hidrogénhid-kölcsönhatásokkal rögzített Cu, Zn-komplex (SG–h–Cu,Zn) termogravimetriai (TG), illetve differenciált termikus analízis (DTA) görbéi (a mérések során levegőatmoszférát alkalmaztunk, a fűtési sebesség 10 °C/perc volt).

A kovalens kötésen keresztül rögzített Cu,Zn-komplex (SG–c–Cu,Zn) termikus viselkedését szintén vizsgáltuk termoanalitikai módszerekkel. A méréseket levegő- és nitrogénatmoszférában egyaránt elvégeztük, és mindkét esetben hasonló eredményt kaptunk. A mérések egyik célja az volt, hogy megtudjuk, milyen termikus stabilitással rendelkezik az előállított katalizátor, a másik pedig az, hogy összehasonlítsuk a hidrogénhidakkal rögzített Cu,Zn-komplex stabilitásával. A mért termoanalitikai (TG és DTA) görbék a 45. ábrán láthatók. A mérési eredmények alapján azt mondhatjuk, hogy 100–250 °C között a katalizátor felületéről eltávozik az adszorbeált víz és a szintézis során visszamaradt etanol. Ezután a szerves anyag egy lépésben bomlik 250–475 °C között. Ez a bomlási lépcső annyiban különbözik az előzőekben tárgyaltaktól, hogy az SG–h–Cu,Zn-katalizátor esetén ez a bomlási folyamat két jól megkülönböztethető lépcsőben történik meg. Összehasonlítva az előzőekben

tárgyalt anyagok termikus stabilitásával, arra az eredményre jutunk, hogy a kovalens kötésen keresztül immobilizált Cu,Zn-komplex termikus stabilitása hasonló ahhoz, amit az SG-h-Cu,Zn esetében tapasztaltunk.



45. ábra A szilikagélhez kovalens kötésen keresztül rögzített Cu,Zn-komplex (SG-c-Cu,Zn) termogravimetriai (TG), illetve differenciált termikus analízis (DTA) görbéi (a mérések során levegőatmoszférát alkalmaztunk, a fűtési sebesség 10 °C/perc volt).

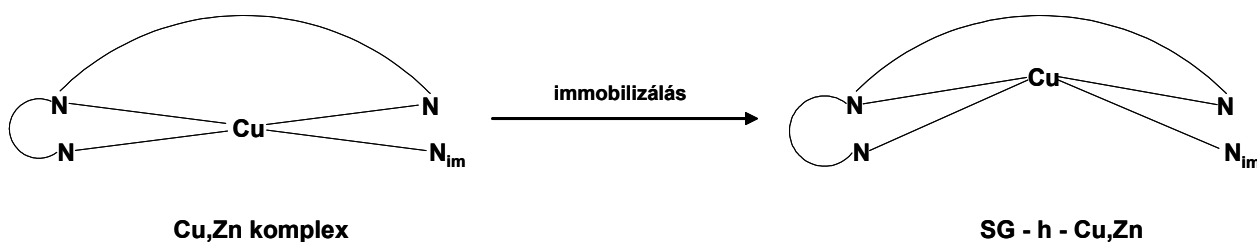
A termikus mérések eredményeit összefoglalva megállapíthatjuk tehát, hogy a szilikagélen immobilizált Cu,Zn-komplex mindkét rögzítési módszer alkalmazása esetén jobb termikus stabilitással rendelkezik, mint a rögzítetlen molekula, illetve a montmorillonitban immobilizált komplex. Bár a vizsgálatok célja az előállított katalizátorok termikus viselkedésének tanulmányozása volt, emellett azonban ismét bizonyítottuk azt is, hogy a komplex immobilizálása sikeres volt. Mondhatjuk ezt annak ismeretében, hogy a hordozók hevítése nem járt jelentősebb tömegvesztéssel egyik esetben sem, tehát a katalizátoroknál tapasztalt tömegvesztés a rögzített komplex termikus bomlásának köszönhető.

V.5. A szilárdfázisban történt vizsgálatok összefoglalása

Az V. fejezetben tárgyalt munka során megpróbálkoztunk a Cu,Zn-komplex rögzítésével szilikagél felületen, illetve a montmorillonit (Mont-i-Cu,Zn) rétegei között. Az első esetben két módszert alkalmaztunk: (i) immobilizálás szilikagélen hidrogénhid-kölcsönhatások segítségével (SG-h-Cu,Zn); (ii) kovalens rögzítés dietiléntriamin-funkcionalizált szilikagélre (SG-c-Cu,Zn). Montmorillonit esetében a hordozó ioncserekapacitásának megfelelő elektrosztatikus kölcsönhatásoktól reméltük a pozitív töltésű molekula rögzülését. Az immobilizálás sikerességét, illetve az előállított anyagok jellemzését

a következő módszerek segítségével végeztük el: atomabszorpciós spektrofotometria (AAS), BET fajlagos felület meghatározás, FT-IR és ESR spektroszkópia, termikus analízis.

A rögzített katalizátorok fémiontartalmának meghatározása után azt mondhatjuk, hogy a réz(II)- és cink(II)ionok mindegyik esetben 1:1 arányban találhatók meg az egyes anyagokban. Az FT-IR spektroszkópiai vizsgálatokkal egyértelműen bebizonyítottuk, hogy a katalizátorok mindegyike tartalmazza a Cu,Zn-komplexet alkotó ligandumokat is. A két módszer együttes alkalmazásával tehát igazolni tudtuk a Cu,Zn-komplex minden egyes alkotóelemének jelenlétét az immobilizálás után nyert anyagokban. Ez a tény mindenképpen a sikeres rögzítésre utal. A fajlagos felületérték nagymértékű megnövekedése következik be a komplex rögzítése után, ha hordozóként montmorillonitot alkalmazunk. Ebben az esetben az immobilizálás során egy kitámasztott rétegszilikátot hoztunk létre. Hordozóként szilikagélt alkalmazva mindkét esetben kismértékű fajlagos felületcsökkenést tapasztaltunk, ami a komplex felületi megkötődésére utal. Ezek az eredmények szintén az immobilizálás sikerességére utalnak.



46. ábra Az ábrán a feltételezett geometriaváltozás látható, ahogyan a Cu,Zn-komplexben a réz(II)ion síknégyzetes geometriája négyzetes piramisos szerkezetűvé alakul át a szilikagélen történő immobilizálás után (N: dietiléntriamintól származó nitrogénatom; N_{im} : az imidazolcsoport nitrogénatomja).

Az előállított vegyületek részletesebb szerkezeti jellemzésének érdekében ESR spektroszkópiai vizsgálatokat végeztünk. A mérések értékelése után megállapítottuk, hogy a Cu,Zn-komplex ESR paraméterei jó egyezést mutatnak a más, korábban vizsgált, réz(II)- és cink(II)ionok között imidazolátóhidat tartalmazó komplex vegyületek, illetve a natív Cu,Zn-SOD enzim ESR adataival. Ez az imidazolátóhíd létezésére utal a két fémion között a rögzítés után is. A Mont-i-Cu,Zn esetében a mért spektrumok alapján számított ESR paraméterek megegyeztek a hordozó nélküli komplex hasonló értékeivel, tehát a Cu,Zn-komplex jelentősebb szerkezetváltozás nélkül rögzült a hordozó rétegei között. Az SG-h-Cu,Zn-katalizátor ESR spektroszkópiai vizsgálata során kétféle szerkezetű réz(II)komplext detektáltunk a hordozó felületén. A nagyobb mértékben előforduló részecske szerkezete hasonló a hordozó nélküli komplex szerkezetéhez, azonban feltételezésünk szerint a réz(II)ion koordinációs környezete kismértékű geometriai változás szenved az immobilizálás során, ami

a természetes enzimhez hasonlóbb szerkezet kialakulásához vezet. Szerintünk a Cu,Zn-komplexben megtalálható síknégyzetes geometria torzul, vagyis a réz(II)ion a négy nitrogénatom által meghatározott sík felett helyezkedik el. Ezt az átalakulást szemlélteti a 46. ábra.

Az SG–c–Cu,Zn esetében szintén két, eltérő ESR paraméterekkel rendelkező, réz(II)komplext azonosítottunk. Végül elvégeztük a katalizátorok termoanalitikai jellemzését, amihez a termogravimetria (TG), illetve a differenciál termikus analízis (DTA) módszereket használtunk fel. A mérési eredmények minden esetben a sikeres immobilizálásra utalnak. A termikus stabilitás szempontjából vizsgálva az egyes anyagokat, azt mondhatjuk, hogy a szilikagélen rögzített Cu,Zn-komplex (SG–h–Cu,Zn és SG–c–Cu,Zn) érzékeny legkevésbé a hőmérséklet-növekedésére.

VI. AZ ANYAGOK KATALITIKUS AKTIVITÁSA

Az előző fejezetekben a Cu,Zn-komplex vizes oldatban és szilárd fázisban végzett részletes szerkezeti jellemzését ismertettük. A különböző módokon immobilizált molekula tanulmányozása során kapott eredményeket szintén bemutattuk. Ennek során bebizonyítottuk, hogy a rögzítés sikeres volt a szervetlen hordozókon, illetve jellemeztük a katalizátorok szerkezetét és termikus viselkedését is. Bebizonyítottuk, hogy sikeresen előállítottunk négy lehetséges enzimmodellező vegyületet, amelyek szerkezetileg jól utánoznak természetes kétmagvú enzimeket (főként a Cu,Zn-SOD enzimet). Természetesen ebben az esetben is igaz, hogy a „puding próbája az evés”. Ennek megfelelően vizsgáltuk az egyes katalizátorok enzimszerű működését a következő tesztreakciókban: (i) szuperoxid dizmutáz aktivitás; (ii) katechol oxidáz aktivitás; (iii) kataláz aktivitás. A mérési eredmények, illetve az azok alapján levont következtetések olvashatók a következő oldalakon.

VI.1. Szuperoxid dizmutáz (SOD) aktivitás

Mint már korábban említettük, a Cu,Zn-komplex SOD aktivitását a riboflavin/NBT tesztreakción keresztül vizsgáltuk. A tesztreakció részletes leírása a kísérleti részben megtörtént, a folyamat rövid áttekintése a következő. A riboflavin megvilágítás hatására redoxireakcióba lép a metionin molekulákkal, majd egy peroxo átmeneti állapoton keresztül kötött molekuláris oxigén kilépésével szuperoxid-gyökök keletkeznek. Az elegyben található nitro blue tetrazolium (NBT) molekulákat használjuk gyökfogóként, mivel ez egy szuperoxid-gyökökre igen érzékeny anyag. Redukciója során intenzív kék színű formazan keletkezik, amely az abszorbancia 560 nm-nél történő mérésével azonosítható. Az enzim, vagy enzimutánczó vegyület inhibálja az NBT - szuperoxid-gyök reakciót, mivel a képződő gyökkanionokat dizmutálja. A módszer előnye, hogy a megvilágítás megszűnésével a gyöktermelő folyamat leáll, tehát a reakció szabályozható. A SOD-modellező vegyületek hatékonyságát az IC_{50} értékkel jellemezhetjük, amely az 50%-os inhibícióhoz szükséges komplex koncentrációjának felel meg, amit a számított inhibíció - komplex koncentráció görbe egyenes szakaszából olvashatunk le (47. ábra). Az IC_{50} értékekkel megadott SOD aktivitás előnye, hogy más funkcionális enzimmodellező komplexek hasonló értékeivel össze tudjuk hasonlítani a vizsgált molekula esetében mért értéket. Így megtudhatjuk, hogy az adott molekula a korábban vizsgált komplexekhez képest mennyire hatékony a SOD enzim funkcionális modellezése terén. Azt azonban előzetesen meg kell jegyeznünk, hogy az

általunk vizsgált katalizátorok megfelelően nagy koncentrációban alkalmazva a tesztreakció körülményei között keletkező szuperoxid-gyökanionok közel 100 %-át képesek dizmutálni. Az előállított immobilizált, és hordozó nélküli fémkomplexek, a természetes enzim, illetve néhány korábban vizsgált réz(II)komplex SOD aktivitása az IC_{50} értékkel jellemezve, a 17. táblázatban látható.

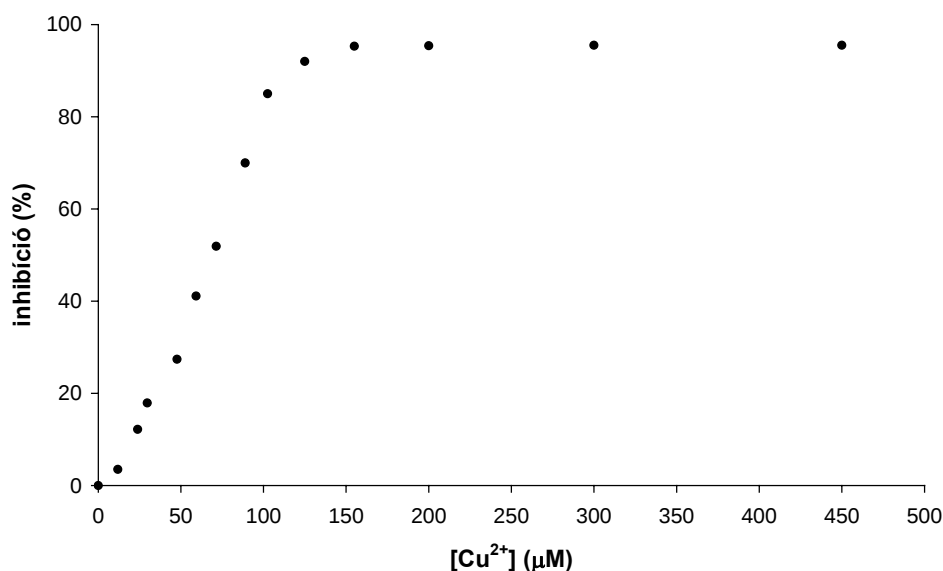
17. táblázat Néhány réz(II)tartalmú SOD modellvegyület, illetve a natív enzim SOD aktivitása az IC_{50} értékekkel kifejezve.

anyag ^a	IC_{50} (μM)	hivatkozás
Cu-PMDT	149,0	[29]
Cu-glygly	132,0	[29]
CuC	182,0	[33]
CuCB	175,0	[33]
PMDT-Cu-ox-Zn-PMDT	205,0	[36]
C-Cu-B-Cu-C	85,0	[33]
A-Cu-B-Cu-A	42,0	[29]
Cu,Zn-SOD	0,4	saját mérés
Cu,Zn-komplex	69,1	saját mérés
CuA	162,0	saját mérés
CuAB	100,5	saját mérés
Cu-his	108,6	saját mérés
Mont-i-Cu,Zn	91,0	saját mérés
Mont-i-Cu-his	251,4	saját mérés
SG-h-Cu,Zn	6,0	saját mérés
SG-h-CuA	102,9	saját mérés
SG-h-CuAB	81,6	saját mérés
SG-c-Cu,Zn	133,7	saját mérés
SG-c-CuA	162,4	saját mérés

^a PMDT = pentametiléndietiléntriamin; glygly = glicilglicin; ox = oxalát; A = dietiléntriamin; B = imidazol; C = trisz(2-aminoetil)amin; his = hisztidin; Mont-i-... = montmorillonitban immobilizált komplex; SG-h-... = szilikagélen hidrogénhid-kölcsönhatásokkal rögzített molekula; SG-c-... = szilikagélhez kovalens kötással kapcsolt komplex.

A fenti adatok alapján azt mondhatjuk, hogy a Cu,Zn-komplex SOD aktivitással rendelkezik. Aktivitása hasonló, sőt a legtöbb esetben jobb, mint a korábban vizsgált réz(II)komplexeké, de elmarad a természetes enzimétől. Fontos információ az is hogy a

Cu,Zn-komplex részei (CuA, CuAB, CuC, CuCB) jóval gyengébb SOD-utánzó képességgel rendelkeznek, mint az imidazolátóhidas molekula. Ez is közvetett bizonyíték arra, hogy az imidazolátóhíd kialakul a két fémion között és így egy jobb Cu,Zn-SOD szerkezeti modellvegyület keletkezett. A mérések eredményei alapján számított inhibíció - katalizátor-koncentráció függvények minden esetben telítési jelleget mutattak. A Cu,Zn-komplex esetében mért görbe a 47. ábrán látható.

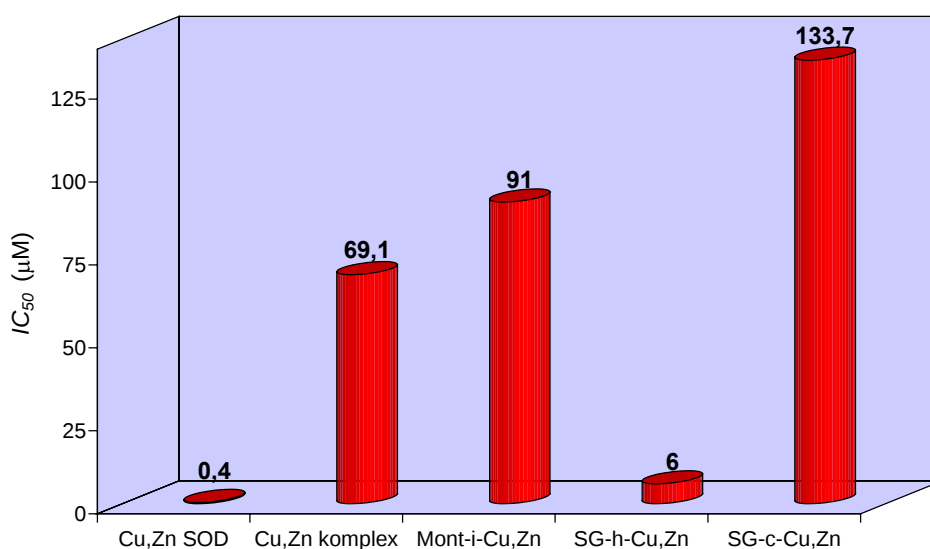


47. ábra Inhibíció (NBT – szuperoxid-gyök reakció inhibíciója) értékek a CuZn-komplex koncentrációjának függvényében.

Az immobilizált vegyületek SOD aktivitásának vizsgálatakor arra voltunk kíváncsiak, hogy a kérdéses komplexek hatékonysága hogyan változik az immobilizálás után. A Mont–i–Cu,Zn esetében már az előzőekben bizonyítottuk, hogy a komplex szerkezete nem változik lényegesen a rögzítés során. A mérési adatok (17. táblázat és 48. ábra) alapján láthatjuk, hogy az immobilizálás után a komplex vesztett aktivitásából (magasabb az 50%-os inhibícióhoz szükséges koncentráció értéke (IC_{50})). Ennek több oka is lehet, amelyek a sztérikus hatásokra vezethetőek vissza. Bár a montmorillonit lapok közötti távolság elég nagy (a Cu,Zn-komplex meg tud kötődni szerkezetváltozás nélkül), így is lehetnek olyan problémák, miszerint a szubsztrát (szuperoxid-gyökanion) nem tud eljutni a katalizátor réz(II)centrumaihoz. Az is akadály lehet, hogy a keletkező termékek (molekuláris oxigén, hidrogén-peroxid) nem elég gyorsan távoznak a katalizátorból és így hátráltatják annak működését (például a képződő molekuláris oxigén légbuborékokat alkotva, elzárhatja a szubsztrát útját a katalizátorhoz).

A mért, illetve számított IC_{50} értékek alapján azt mondhatjuk, hogy a komplex aktivitása nagymértékben megnőtt (az IC_{50} érték 69,1 μ M-ról 6,0 μ M-ra változott, 48. ábra) a

szilikagélen hidrogénhidas kölcsönhatással végzett immobilizálás után (SG-h-Cu,Zn). Aktivitása jóval nagyobb, mint amikor hordozóként montmorillonitot használtunk, de elmarad a természetes enzim szuperoxid-gyök dizmutáló képességétől. A korábban tárgyalt ESR spektroszkópiai mérések eredményeiből tudjuk, hogy a katalizátor felületén kétféle szerkezetű réz(II)komplex helyezkedik el. Azt, hogy a különböző ESR paraméterekkel rendelkező részecskék közül melyik rendelkezik nagyobb aktivitással, teljes bizonyossággal nem tudhatjuk, azonban az ESR adatok szolgáltatnak némi magyarázatot. Az egyik esetben (74 %) ugyanis a komplexek g értékei elég jó egyezést mutatnak a természetes enzim adataival (16. táblázat). Feltételezhetünk olyan jellegű szerkezeti változást, ami szerint a Cu,Zn-komplex síknégyszetes geometriájával szemben a rögzítés után torzult síknégyszet, vagy négyszetes piramis szerkezet alakul ki a réz(II)ion koordinációs szférájában (lásd V.3. fejezet, illetve 46. ábra), hasonlóan a természetes enzimhez. Ez a geometriai változás eredményezheti a katalizátor nagyobb hatékonyságát a szuperoxid-gyökök dizmutálásában.



48. ábra Az előállított katalizátorok, illetve a natív Cu,Zn-SOD enzim szuperoxid-gyök dizmutáló képessége az IC_{50} értékekkel kifejezve.

A kovalens rögzítéssel előállított anyagok közül méréseket végeztünk a dietiléntriamin-funkcionalizált szilikagél réz(II)komplex (SG-c-CuA), illetve a szilikagélen kovalensen kapcsolt Cu,Zn-komplex (SG-c-Cu,Zn) anyagok esetében is. A mért SOD aktivitás értékek szintén a 17. táblázatban láthatók. A mérési eredmények alapján azt mondhatjuk, hogy a kovalens kötésen keresztül immobilizált Cu,Zn-komplex SOD aktivitást mutat, de aktivitása elmarad (magasabb az 50%-os inhibícióhoz szükséges koncentráció (IC_{50})) a hordozó nélküli komplex esetében mért értéktől.

VI.2. Katechol oxidáz aktivitás

A katechol oxidáz aktivitásmérések 3,5-ditercbutil-katechol (DTBC) katalitikus oxidációján alapultak. Mint azt már a kísérleti részben említettük, a DTBC molekuláris oxigén hatására oxidálódik 3,5-ditercbutil-kinonná (DTBQ). A reakció katalizátor hiányában rendkívül lassú, viszont a réz(II)tartalmú vegyületek a reakciósebességet jelentősen megnövelhetik. A mérések értékelése során a képződött DTBQ mennyiségét a Beer-Lambert törvény segítségével számítottuk ki a mért abszorbancia-értékek alapján ($\lambda = 400 \text{ nm}$, $\varepsilon = 1900 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{cm}^{-1}$ metanolban). A mérések során minden esetben azonos mennyiségű DTBC-t és réz(II)iont tartalmaztak a reakcióelegyek, oldószerként pedig metanolt alkalmaztunk, tekintettel a szubsztrát vízben való kicsiny oldhatóságára. A katalizátorok hatékonyságának jellemzésére a kezdeti sebességértékeket használtuk fel. Mértük a katalizátor nélküli elegy (vak) autooxidációját is azonos körülmények között, hogy azt a későbbiekben referenciaként felhasználhassuk az egyes anyagok aktivitásának jellemzésékor. A mérési eredmények alapján számított paramétereket láthatjuk a 18. táblázatban.

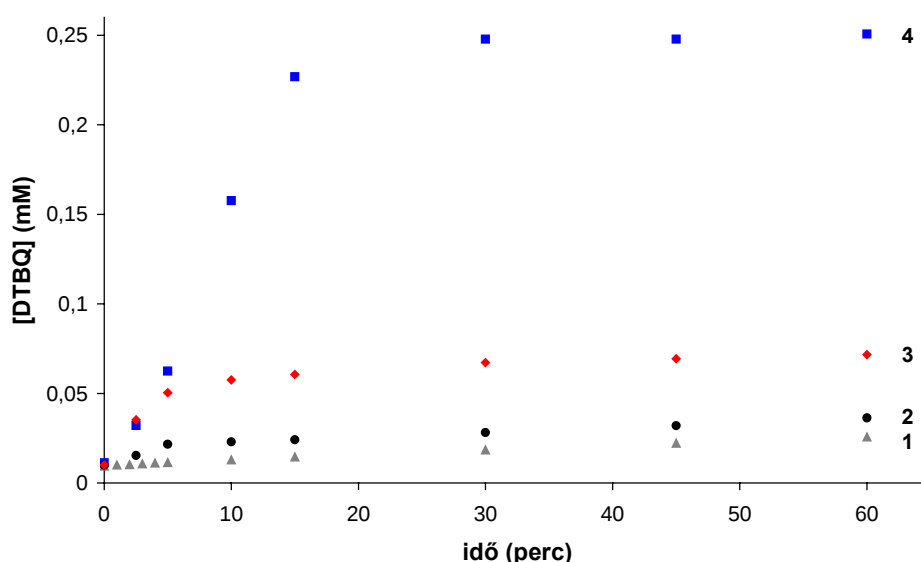
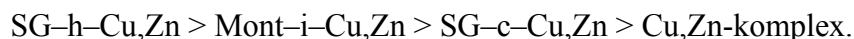
18. táblázat Az anyagok katalitikus aktivitása a $\text{DTBC} \rightarrow \text{DTBQ}$ reakcióban, a kezdeti sebesség (v_o) értékekkel kifejezve.

anyagok	$v_o \times 10^5 \text{ (mM min}^{-1}\text{)}$	v_o / v_{vak}^a	hivatkozás
Cu,Zn-komplex	32,9	13,7	saját mérés
Mont-i-Cu,Zn	808,6	336,9	saját mérés
SG-h-Cu,Zn	1506,7	627,8	saját mérés
SG-c-Cu,Zn	234,8	97,8	saját mérés
CuC	36,8	15,3	saját mérés
Mont-i-CuC	40,6	16,9	saját mérés
SG-h-CuC	63,5	26,5	saját mérés
SG-c-CuC	27,2	11,3	saját mérés

^a v_{vak} = katalizátort nem tartalmazó elegy kezdeti sebességértéke.

A DTBC autooxidációjához képest mindegyik katalizátor jelentős mértékben megnöveli a szubsztrát oxidációjának sebességét az autooxidáció hasonló értékéhez képest, tehát ez alapján azt mondhatjuk, hogy az anyagok katecholáz aktivitást mutatnak. A legnagyobb aktivitással rendelkező SG-h-Cu,Zn például 627,8-szeresére gyorsította fel a reakciót a katalizátort nem tartalmazó elegyhez képest. Ha összehasonlítjuk a hordozó nélküli, illetve az

immobilizált Cu,Zn-komplexek aktivitását (49. ábra), azt a megállapítást tehetjük, hogy a szilárd hordozóhoz történő rögzítés minden esetben megnövelte a komplex aktivitását (megnövekedtek a konverzió és a kezdeti sebességértékek is). A mért, illetve számított adatok ismeretében a vizsgált anyagokat a következő aktivitási sorrendbe állíthatjuk:

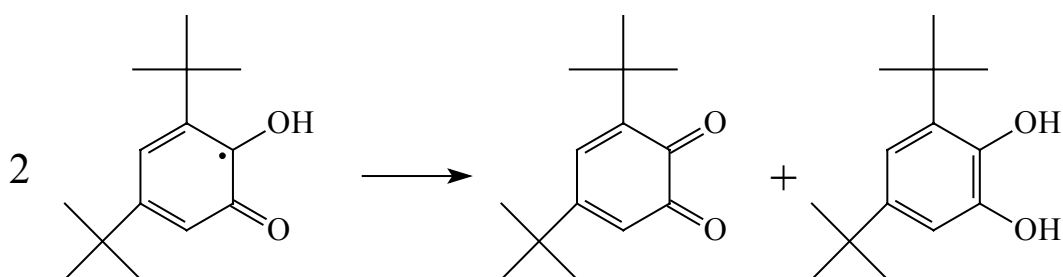


49. ábra A tesztreakció során keletkező DTBQ koncentrációja az idő függvényében (1: Cu,Zn-komplex; 2: SG-c-Cu,Zn; 3: Mont-i-Cu,Zn; 4: SG-h-Cu,Zn; [DTBC] = 10 mM; [Cu²⁺] = 0,1 mM; T = 25 °C; az oldószer metanol).

Összehasonlítva a CuC-, illetve a Cu,Zn-komplexek esetében mért aktivitásértékeket, a következő megállapításokat tehetjük. A hordozó nélküli komplexek esetében hasonló eredményt kaptunk, tehát a kétmagvú komplexben található plusz cink(II)ion nem növeli meg a Cu,Zn-komplex aktivitását. Ez várható volt annak tudatában, hogy cink(II)ion nem rendelkezik az aktivitáshoz szükséges redoxitulajdonságokkal. A hidrogénhíd-kölcsönhatások segítségével immobilizált-, illetve a montmorillonitban rögzített komplexek esetében aktivitásnövekedést tapasztaltunk a hordozó nélküli molekulához képest, bár a katalitikus aktivitásban tapasztalt javulás a CuC-komplexek esetében kisebb mértékű. A kovalens rögzítés szilikagélhez az SG-c-Cu,Zn esetében szintén megnövelte a komplex aktivitását, azonban a SG-c-CuC-katalizátornál ez kismértékben lecsökkent. Összességében azt mondhatjuk, hogy hasonlóan a SOD aktivitásmérések eredményeihez, a legjobb funkcionális enzimmodell ebben az esetben is a szilikagélen hidrogénhíd-kölcsönhatásokkal immobilizált Cu,Zn-komplex (SG-h-Cu,Zn), amely a hordozó nélküli komplex aktivitásának majdnem 50-szeresével rendelkezik. Az is érdekes tény, hogy a közvetlenül a felületen rögzített komplexek

(SG-h-Cu,Zn és Mont-i-Cu,Zn) mutatják a nagyobb aktivitást, míg a kovalensen kötött Cu,Zn-komplex esetében (ahol a hordozó felületétől viszonylag távolabb helyezkedik el a komplex) lényegesen kisebb aktivitást tapasztaltunk.

Ismerve a természetes enzim aktív centrumának szerkezetét, illetve működését, felmerülhet az a kérdés, miszerint az egymagvú réz(II)komplexek hogyan képesek a DTBC oxidálására, ugyanis a szubsztrát két hidroxilcsoportjának oxidációjához két, egymáshoz igen közel elhelyezkedő réz(II)centrum szükséges. Szerintünk ez olyan módon valósulhat meg, hogy a reakcióban szemikín keletkezik, ami ezután egy másik szemikín molekulával reagálva átalakul egy-egy DTBC-lá és DTBQ-ná. A reakció leegyszerűsített vázlata látható az 50. ábrán.



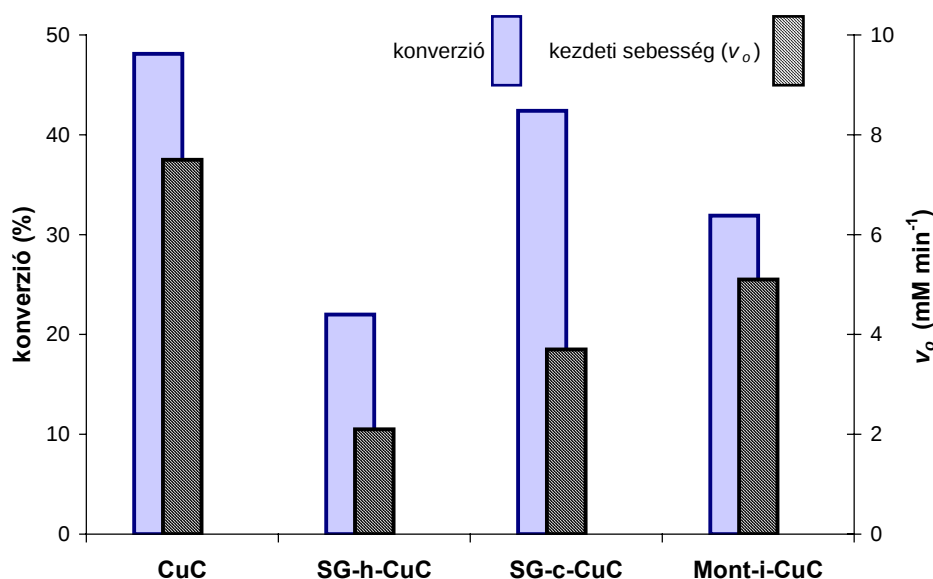
50. ábra A tesztreakció során keletkező szemikín diszproporcionálódása.

VI.3. Kataláz aktivitás

Az előállított anyagok kataláz aktivitásának vizsgálata a hidrogén-peroxid bontó képesség mérésén alapult. A mérések során a H_2O_2 mennyiségének változását követtük spektrofotometria módszerével, kihasználva, hogy a szubsztrátnak 240 nm-nél elnyelése van. A mért abszorbancia-értékekből kalibráló egyenes segítségével kiszámítottuk a tesztreakció elegyben található hidrogén-peroxid pontos mennyiségét. A mérési adatok értékelése során az elbontott H_2O_2 mennyiségét ábrázolva a reakcióidő függvényében minden esetben telítési görbét kaptunk. Ez alapján kiszámítottuk a konverzió- és kezdeti sebességértékeket, amelyeket a későbbiekben a katalizátorok hatékonyságának összehasonlítására használtunk fel. A tesztreakciók során az elegy minden esetben 0,21 mmol réz(II)iont és 20,1 mmol hidrogén-peroxidot tartalmazott (1:96 arány), míg a pH-értéket 6,9-re állítottuk be foszfátpuffer segítségével.

A mérési eredmények alapján azt mondhatjuk, hogy sem a Cu,Zn-komplex, sem immobilizált változatai (SG-h-Cu,Zn, SG-c-Cu,Zn és Mont-i-Cu,Zn) nem mutattak kataláz aktivitást az alkalmazott mérési körülmények között (két óra alatt az elegy hidrogén-peroxid tartalma kevesebb, mint 1%-kal csökkent). Ezzel ellentétben, vizsgálataink szerint a CuC-

komplex, illetve a SG–h–CuC, SG–c–CuC és Mont–i–CuC katalizátorok megfelelő kataláz aktivitással rendelkeznek. A mérési eredmények a konverzió- és a kezdeti sebességértékekkel kifejezve az 51. ábrán láthatók.



51. ábra A CuC-komplex, illetve immobilizált változatainak hidrogén-peroxid elbontáson alapuló kataláz aktivitása, a konverzióval, illetve a kezdeti sebességekkel kifejezve.

A mérési eredmények alapján azt mondhatjuk, hogy az immobilizálás után minden esetben csökkent a CuC-komplex aktivitása. A szilikagélen hidrogénhíd-kölcsönhatásokkal való immobilizálás (SG–h–CuC) után a komplex aktivitása jelentősen csökkent. Ennek oka lehet az, hogy a szilikagél pórusain bejut a komplexek egy része, és ott a szubsztrát bomlása során termelődő molekuláris oxigén nem tud távozni a szilikagél pórusai közül, így gátolva újabb H₂O₂ molekula odakerülését a komplexhez. A montmorillonitban rögzített komplex (Mont–i–CuC) aktivitáscsökkenése is hasonló szterikus okokkal magyarázható. A szilikagélen kovalens kötással rögzített komplex esetében (SG–c–CuC) a rögzített komplex molekula viszonylag távolabb van a felülettől, ezért valószínűleg ez a jelenség itt nem lép fel. Ezt valószínűsíti az a tény, hogy a konverzió értéke megközelíti a hordozó nélküli komplexét.

VI.4. Az enzimutánzó tulajdonságok összefoglalása

A VI. fejezetben bemutatott munka keretein belül vizsgáltuk hordozó nélküli és immobilizált komplex molekulák enzimutánzó képességeit. Annak érdekében, hogy megtudjuk, mennyire hatékony funkcionális modellvegyületeket állítottunk elő, olyan szubsztrátmolekulákkal (O₂⁻, O₂²⁻, 3,5-ditercbutil-katechol) vizsgáltuk kölcsönhatásukat, amelyek azonosak, vagy nagyon hasonlóak a biológiai rendszerekben megtalálhatókhöz.

Méréseink során tanulmányoztuk a katalizátorok szuperoxid dizmutáz (SOD), katechol oxidáz és kataláz modellező képességét. Azt azonban le kell szögeznünk, hogy a vizsgálataink középpontjában álló Cu,Zn-komplex szerkezeti szempontból a Cu,Zn-SOD enzimet modellezi a legjobban, ezért az enzimszerű működés tanulmányozása során is erre fektettük a legnagyobb hangsúlyt. Ugyanakkor arra is választ szeretnénk volna kapni, hogy képes-e más, szerkezetileg eltérő kétmagvú metalloenzimek funkcionális modellezésére is.

A SOD tesztreakcióban való viselkedés alapján azt mondhatjuk, hogy mind a Cu,Zn-komplex, mind egyes réz(II)tartalmú alrendszeri szuperoxid dizmutáz aktivitással rendelkeznek. Azt is megállapítottuk, hogy az immobilizálás után két esetben (SG-c-Cu,Zn és Mont-i-Cu,Zn) csökkent a komplex aktivitása. A szilikagélen hidrogénhid-kölcsönhatásokkal rögzített Cu,Zn-komplex esetében azonban jelentős aktivitásnövekedést tapasztaltunk a hordozó nélküli komplexhez képest. Ezt a jelenséget az ESR paraméterek alapján feltételezett geometriai torzulással magyarázzuk. A mérések alapján azt is elmondhatjuk, hogy a modellvegyületek aktivitása egyik esetben sem éri el a természetes enzimét.

Az anyagok katechol oxidáz aktivitásának mérési eredményei alapján megállapítottuk, hogy a vizsgált katalizátorok minden esetben enzimszerű működést mutattak. Hasonlóan a SOD tesztreakcióhoz, ebben az esetben is a hidrogénhidas rögzítési mód (SG-h-Cu,Zn) vezetett a legnagyobb mértékű aktivitásnövekedéshez. Vizsgálataink harmadik szakaszában tanulmányoztuk az anyagok kataláz aktivitását is. Eredményeink szerint a Cu,Zn-komplex és immobilizált változatai nem képesek a szubsztrátként alkalmazott hidrogén-peroxid elbontására az alkalmazott mérési körülmények között. Ez a modellezni kívánt enzim jelentősen eltérő aktív centrumának ismeretében nem is meglepő.

VII. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk során célul tűztük ki metalloenzimeket modellező fémkomplexek előállítását, illetve azok immobilizálását szerves hordozókon. Előzetes reményeink szerint a hordozó (az immobilizálás nyújtotta előnyökön túl) képes legalább részben betölteni a természetes enzimen található fehérjelánc szerkezetkialakító hatását. Vizsgálataink középpontjában egy réz(II)- és cink(II)ionokat tartalmazó kétmagvú komplex (Cu,Zn-komplex, 2. ábra) állt, amelyben a két fémiont imidazolátóhíd köti össze. Emellett tanulmányoztunk jónéhány kisebb molekulatömegű fémkomplex hasonló tulajdonságait, amelyek vagy a Cu,Zn-komplexet felépítő részrendszerek közé tartoztak (CuA, CuAB, CuC, CuCB), vagy egyéb, biológiai szempontból fontos ligandumot, illetve fémiont tartalmaztak (Cu-his). A megfelelő tulajdonságok összehasonlítása sok esetben megkönnyítette a Cu,Zn-komplex kémiai viselkedésének magyarázatát.

A Cu,Zn-komplex szerkezetileg igen jól modellezi a natív réz(II)-cink(II) szuperoxid dizmutáz (Cu,Zn-SOD) enzim aktív centrumát, mivel a fémionok minősége és mennyisége is azonos a természetes enzimen található ionokkal, és a fémionok között a komplexben is imidazolátóhíd biztosít kapcsolatot. Mivel a komplex szerkezetéről csak hiányos ismeretek álltak rendelkezésünkre, ezért munkánk első szakaszában elvégeztük a Cu,Zn-komplex, illetve egyes alrendszerének részletes vizsgálatát vizes oldatban. A mérési módszerek potenciometria, UV-Vis spektrofotometria, ESR spektroszkópia, tömegspektrometria, ciklikus voltammetria voltak.

A pH-potenciometriai titrálások során meghatároztuk a kérdéses komplexet alkotó ligandumok protonálódási állandóinak számértékét, illetve vizsgáltuk az ötkomponensű rendszerben és alrendszeriben képződő komplexmolekulák összetételét és kiszámítottuk stabilitási állandóik értékét. Az eredmények alapján azt mondhatjuk, hogy vizes oldatban 7–11 pH-értékek között döntően az imidazolátóhidas szerkezetű forma, illetve annak deprotonált változata fordul elő az ötkomponensű rendszerben.

Ezt az eredményt megerősítették a pH-függő ESR- és UV-Vis spektroszkópiai mérések is. Az előbb említett két módszer segítségével meghatároztuk a rendszerben képződő részecskék oldatbeli szerkezetét. Megállapítottuk, hogy a semleges-lúgos tartományban képződő imidazolátóhidas részecskéhez két izomerszerkezet rendelhető, a koordinálódó nitrogénatomok elhelyezkedésétől függően.

Ezek után tömegspektrometriai módszerekkel (MALDI- és ESI-MS) igazoltuk a Cu,Zn-komplex, illetve a részrendszereiben képződő molekulák létezését, molekulatömegük meghatározása és fragmentációjuk vizsgálata által.

Az oldategyensúlyi mérések végső lépésében jellemeztük a modellvegyületek elektrokémiai tulajdonságait, módszerként ciklikus voltammetriát alkalmazva. A vizsgálatok során tanulmányoztuk a Cu,Zn-komplex elektrokémiai viselkedésének pH-függését, illetve ezen tulajdonságait összehasonlítottuk egyes alrendszerei hasonló jellemzőivel. A mérési eredmények ebben az esetben is igazolták a Cu,Zn-komplex jelenlétét pH = 7 érték felett az oldatban, illetve azt is megállapítottuk, hogy a Cu,Zn-komplex megfelelően negatív potenciállal rendelkezik a szuperoxid-gyökanionok sikeres dizmutálásához.

Az oldategyensúlyi vizsgálatok után immobilizáltuk a Cu,Zn-komplex molekulát montmorillonitban (Mont-i-Cu,Zn), illetve szilikagélen. Szilárd mátrixként agyagásványt alkalmazva a hordozó ioncsere-kapacitásának megfelelő elektrosztatikus kölcsönhatások segítségével rögzítettük a komplexmolekulát a mátrix rétegei között. A szilikagél esetében kétféle rögzítési módszert választottunk: (i) immobilizálás hidrogénhid-kölcsönhatások segítségével (SG-h-Cu,Zn); (ii) kovalens rögzítés dietiléntriamin-funkcionalizált szilikagélre (SG-c-Cu,Zn). Az immobilizálás sikerességét igazoltuk, illetve a katalizátorok tulajdonságait többféle módszerrel jellemeztük.

Először meghatároztuk az immobilizálás során kapott anyagok fémiontartalmát, atomabszorpciós spektrofotometria módszerét alkalmazva. Méréseink szerint minden esetben 1:1 arányban volt jelen a két fémion a katalizátorokban, ami a sikeres megkötődésre utal. A kiindulási mátrixok és az immobilizált minták fajlagos felületértékeinek összevetése szintén alátámasztotta a komplexek rögzítésének sikerét.

Ezt követően FT-IR spektroszkópiát alkalmaztunk a Cu,Zn-komplexet alkotó ligandumok jelenlétének igazolására. A módszerrel minden egyes esetben detektálni tudtuk a dietiléntriamin, az imidazol és a trisz(2-aminoetil)amin jelenlétét a vizsgált anyagokban. Ez az eredmény, az atomabszorpciós spektrofotometriai mérésekkel kiegészítve, az immobilizálás sikerességének erős bizonyítéka.

A rögzítés során a komplexek szerkezetében bekövetkező változások megismerésének érdekében elvégeztük az anyagok ESR spektroszkópiai vizsgálatát. A montmorillonitban ioncserével történt immobilizálással kapott anyag (Mont-i-Cu,Zn) vizsgálata során megállapítottuk, hogy a Cu,Zn-komplex jelentősebb szerkezetváltozás nélkül kötődött meg a montmorillonit rétegei között. Szilikagélen mind hidrogénhidas, mind kovalens rögzítés során

kétféle szerkezetű réz(II)komplexet detektáltunk a katalizátorok felületén. Az ESR paraméterek alapján azt mondhatjuk, hogy ezeknél az anyagoknál az immobilizált molekula geometriai torzulást szenved. Az SG–h–Cu,Zn esetében a nagyobb mértékben előforduló részecske szerkezete, az ESR paraméterek alapján, jobban hasonlít a természetes Cu,Zn-SOD enzim aktív centrumához, mint a hordozó nélküli Cu,Zn-komplex.

Vizsgáltuk az anyagok termikus viselkedését is, termoanalitikai módszerekkel (TG, DTA). Megállapítottuk, hogy a szilikagélen való rögzítéssel nyert katalizátorok termikusan stabilisabbak, mint a Mont–i–Cu,Zn és a Cu,Zn-komplex, amelyek 300 °C körül robbanásszerűen elbomlanak.

Az előzőekben említett anyagok enzimaktivitását minden esetben vizsgáltuk a következő tesztreakciókban: SOD aktivitás, katechol oxidáz aktivitás és kataláz aktivitás. Mivel a Cu,Zn-komplex szerkezete alapján igen jól modellezi a natív Cu,Zn-SOD enzimet, ezért a tesztelés során is erre fektettük a legnagyobb hangsúlyt. A másik két esetben arra voltunk kíváncsiak, hogy a szerkezetileg különböző, ám ugyancsak két fémiont tartalmazó molekula mennyire hatékonyan tudja az enzimszerű működést utánozni.

A SOD tesztreakció eredményeinek ismeretében elmondhatjuk, hogy a vizsgált katalizátorok mindegyike aktivitást mutat. Ezek az adatok minden esetben elmaradnak a természetes enzim hasonló értékétől, azonban mindegyik anyagról elmondható, hogy megfelelően nagy koncentrációban a tesztreakcióban keletkező szuperoxid-gyökök 80-90 %-át dizmutálja. Az eredmények ismeretében azt mondhatjuk, hogy a Cu,Zn-komplex aktivitása nagyobb, mint az egyes alrendszerek esetében mért értékek. Ez arra utal, hogy az imidazolátóhíd kialakulása kedvezőbb enzimszerű működés megjelenésével jár. Megállapítottuk, hogy az immobilizálás a hidrogénhidas rögzítés (SG–h–Cu,Zn) esetében jelentős aktivitásnövekedéssel járt. Az itt jelentkező közel tízszeres aktivitásnövekedést a természetes enzimhez hasonló szerkezet kialakulásával magyarázhatjuk.

A katechol oxidáz tesztreakció során szintén mindegyik anyag esetében aktivitást tapasztaltunk. A Cu,Zn-komplex immobilizálása minden esetben aktivitásnövekedést eredményezett, azonban itt is a SG–h–Cu,Zn bizonyult a legaktívabbnak.

Mérési eredményeink alapján azt mondhatjuk, hogy a Cu,Zn-komplex, illetve immobilizált változatai nem mutattak kataláz aktivitást az alkalmazott tesztreakció körülményei között, azaz a komplex sem szerkezeti, sem működési szempontból nem jó kataláz modell.

VIII. SUMMARY

Generally, the active centre of the native enzymes contains metal ions coordinated by donor groups of protein side chains. Further role of the protein is to organise a relatively mobile structure around the active centre. Several native enzymes contain two or more metal ions in their active centre (for example: superoxide dismutase, catalase, catechol oxidase). The metal ions cooperate when the enzyme works and they together with their immediate surroundings the reactions of the substrates.

Since the active centre of metalloenzymes resembles a simple metal complex, the preparation of complexes with similar structure is a promising way of mimicking the enzymes. Structural and/or functional modelling the active sites are usually done by preparing complexes having the appropriate metal ion(s) and ligands of the same or similar structures found in the enzyme.

The aim of this work was to prepare and immobilise some, hopefully, enzyme mimicking metal complexes and test them in various enzymatic reactions. Inorganic materials (silica gel and montmorillonite) were used as the solid matrices in the immobilisation procedures. The guest materials were a heterobinuclear copper(II)-zinc(II) complex (Cu(II)-diethylenetriamino- μ -imidazolato-Zn(II)-tris(2-aminoethyl)amine perchlorate, denoted as Cu,Zn-complex in the followings) and its substructural complexes. The support-free as well as the immobilised materials were tested in the dismutation of the superoxide radical ion (SOD activity), the decomposition of H₂O₂ (catalase activity) and the oxidation of catechol (catecholase activity). Subsystems (CuA, CuAB, CuC, CuCB) of the Cu,Zn-complex were also studied. The Cu,Zn-complex bears some structural resemblance to the active centre of copper(II)-zinc(II) superoxide dismutase: both the complex and the native enzyme contain an imidazolate bridge between the copper(II) and zinc(II) ions.

Although the preparation and a brief UV-Vis spectroscopic study of the Cu,Zn-complex was published earlier by Japanese authors [3], full structural characterisation has not been done either in aqueous solution or the solid state. Thus, the solution chemical properties of the complex and its building units were studied first.

The speciation of the five-component system (and its subsystems) containing three ligands (diethylenetriamine, imidazole, tris(2-aminoethyl)amine), copper(II)- and zinc(II)ion in 1:1 ratio was investigated by pH potentiometric titration in the 2–11 pH region. The composition and the stability constant of the evolved species were calculated using a

computer program. The pH-metric results indicated that the imidazolate bridged Cu,Zn-complex is stable in the 7–11 pH range (deprotonation only occurred above pH 8 on the zinc(II) side, but the imidazolate bridge remained intact even under these conditions).

The EPR and UV-Vis spectra were also recorded in the same pH region. Complete structural characterisation was done for each species evolved. Two isomers were identified for the imidazolate bridged complex and a third one was also detected in the alkaline region in small amount. In our view, this complex also contains an imidazolate bridge between the metal ions and the only difference is the second deprotonation taking place on the copper(II) side.

The molecular weight of the Cu,Zn-complex was determined by two mass spectrometric methods (ESI-MS and MALDI-MS) at pH = 8. Some subsystems (CuA, CuAB, ZnC, ZnCB) were also scrutinised by mass spectrometry.

The electrochemical behaviour of the Cu,Zn-complex was determined by cyclic voltammetry. The formation of the imidazolate-bridged compound was confirmed by the electrochemical results too. In all cases negative redox potentials were measured.

The Cu,Zn-complex and some of its subsystems were immobilised on silica gel and in montmorillonite. Immobilisation was effected by electrostatic forces when montmorillonite was the host material (Mont-i-Cu,Zn). For silica gel two types of immobilisation method were applied: immobilisation *via* (i) hydrogen bonds (SG-h-Cu,Zn) or (ii) covalent linkage (SG-c-Cu,Zn). The prepared catalysts were characterised by FT-IR- and EPR spectroscopy, atomic absorption spectrophotometry, BET surface area measurement and thermal (DTA, TG) methods.

The composition of the immobilised complex was first checked through measuring the metal ion content. After dissolving the solid substances (Mont-i-Cu,Zn, SG-h-Cu,Zn, SG-c-Cu,Zn) in *aqua regia*, 1:1 copper(II) to zinc(II) ratio was found on the bases of atomic absorption spectroscopic (AAS) measurements.

The presence of the ligands (diethylenetriamine, imidazole and tris(2-aminoethyl)amine) in the solid materials was confirmed by FT-IR spectroscopy. Results obtained by the two spectroscopic methods clearly show that immobilisation of the Cu,Zn-complex was successful on the silica surface or among the layers of the montmorillonite.

In order to follow the structural changes during the immobilisation procedure, EPR spectroscopic investigation of the substances was performed. The powder EPR spectra of the montmorillonite-immobilised material and the EPR parameters revealed that the complex did

not fall apart upon immobilisation. The spectra of the host-free and the montmorillonite immobilised complex were identical indicating that there was no change in the coordination geometry upon immobilisation. As concerns the SG-h-Cu,Zn and the SG-c-Cu,Zn materials the EPR spectra of the host-free and silica-immobilised complexes differ, in addition, two types of copper(II)-containing species were detected in these substances. The EPR data indicated change in the geometry around the copper(II) ion upon immobilisation. In one of the components the EPR parameters were very similar to those of the native superoxide dismutase enzyme.

The thermal behaviour of the materials was investigated by thermogravimetry (TG) and differential thermal analysis (DTA). The silica-immobilised complexes (SG-h-Cu,Zn and SG-c-Cu,Zn) were more stable thermally than the host-free and the montmorillonite-immobilised (Mont-i-Cu,Zn) complexes.

The prepared and characterised substances were tested in various enzymatic assays; their superoxide dismutase, catalase and catechol oxidase activities were studied. The host-free Cu,Zn-complex was found to be a good functional model for the copper(II)-zinc(II) superoxide dismutase.

It was found that the Cu,Zn-complex was more active than its copper(II) containing subsystems; however, it was significantly less active than the native enzyme. Nevertheless, the Cu,Zn-complex is a potent SOD mimic considering its very low molecular weight compared to that of the native enzyme. The complex-free supports were found to be inactive in the SOD test reaction. After immobilising the Cu,Zn-complex on silica gel via hydrogen bonding the material also displayed SOD activity. The SOD activity did not merely appear but was an order of magnitude higher than that of the host-free complex. Although the immobilised substructures of the Cu,Zn-complex also displayed SOD activity, it was significantly smaller than that of the silica-immobilised Cu,Zn-complex. They were even less active than the host-free Cu-Zn complex. After immobilisation in montmorillonite the complex displayed low SOD activity, however, it was comparable to that of the host-free complex.

The catecholase activity of the host-free and immobilised complexes was tested in the catalytic oxidation of 3,5-di-*tert*-butyl catechol (DTBC) to 3,5-di-*tert*-butyl quinone (DTBQ) in the presence of dioxygen. The catecholase activity of the Cu,Zn-complex changed significantly upon immobilisation on either silica gel (SG-h-Cu,Zn and SG-c-Cu,Zn) or in

montmorillonite (Mont-i-Cu,Zn). The most active material was the SG-h-Cu,Zn. Its activity was nearly 50 folds higher than that of the host-free complex.

The catalase activities of the host-free and immobilised complexes were tested in the decomposition reaction of hydrogen peroxide yielding water and molecular oxygen. It was found that the Cu,Zn-complex and its immobilised forms had no catalase activity under these conditions.

IX. IRODALOMJEGYZÉK

- [1] Kőrös Endre, **Bioszervetlen kémia**, Gondolat Kiadó, Budapest (1980)
- [2] R.H. Holm, P. Kennepohl, E.I. Solomon, **Chem. Rev.** 96 (1996) 2239-2314
- [3] M. Sato, S. Nagae, M. Uehara, M. Nakaya, **J. Chem. Soc., Chem. Commun.** (1984) 1661-1663
- [4] B.G. Malmström, L.E. Andreasson, B. Reinhammar, **Enzymes**, Academic Press, New York (1975) 533-538
- [5] J.M. McCord, I. Fridovich, **J. Biol. Chem.** 244 (1969) 6049-6055
- [6] J.A. Fee, J. Peisach, W.B. Mims, **J. Biol. Chem.** 256 (1981) 1910-1914
- [7] J.A. Tainer, E.D. Getzoff, J.S. Richardson, D.C. Richardson, **Nature** 306 (1983) 284-286
- [8] M.W. Parker, C.C.F. Blake, **J. Mol. Biol.** 199 (1988) 649-661
- [9] I. Fridovich, **Annu. Rev. Biochem.** 64 (1995) 97-112
- [10] G.S. Waldo, S. Yu, J.E. Penner-Hahn, **J. Am. Chem. Soc.** 114 (1992) 5869-5870
- [11] V.V. Barynin, P.D. Hempstead, A.A. Vagin, S.V. Antonyuk, W.R. Melik-Adamyan, V.S. Lamzin, P.M. Harrison, P.J. Artymiuk, **J. Inorg. Biochem.** 67 (1997) 196-196
- [12] I. Michaud-Soret, L. Jacquamet, N. Debaecker-Petit, L. Le Pape, V.V. Barynin, J.-M. Latour, **Inorg. Chem.** 37 (1998) 3874-3876
- [13] V.V. Barynin, M.M. Whittaker, S.V. Antonyuk, V.S. Lamzin, P.M. Harrison, P.J. Artymiuk, J.W. Whittaker, **Structure** 9 (2001) 725-738
- [14] C. Eicken, F. Zippel, K. Buldt-Karentzopoulos, B. Krebs, **FEBS Letters** 436 (1998) 293-299
- [15] T. Klabunde, C. Eicken, J.C. Sacchettini, B. Krebs, **Nat. Struct. Biol.** 5 (1998) 1084-1090
- [16] C. Belle, J.-L. Pierre, **Eur. J. Inorg. Chem.** (2003) 4137-4146
- [17] C. Eicken, B. Krebs, J.C. Sacchettini, **Curr. Opin. Struct. Biol.** 9 (1999) 677-683
- [18] E.I. Solomon, U.M. Sundaram, T.E. Machonkin, **Chem. Rev.** 96 (1996) 2563-2605
- [19] A.E. Martin, S.J. Lippard, **J. Am. Chem. Soc.** 106 (1984) 2579-2583
- [20] P.K. Coughlin, S.J. Lippard, **Inorg. Chem.** 23 (1984) 1446-1451
- [21] P.K. Coughlin, A.E. Martin, J.C. Dewan, E.-I. Watanabe, J.E. Bulkowski, J.-M. Lehn, S.J. Lippard, **Inorg. Chem.** 23 (1984) 1004-1009
- [22] C.-L. O'Young, J.C. Dewan, H.R. Lilienthal, S.J. Lippard, **J. Am. Chem. Soc.** 100 (1978) 7291-7300
- [23] G. Kolks, S.J. Lippard, **J. Am. Chem. Soc.** 99 (1977) 5804-5806
- [24] G. Kolks, S.J. Lippard, J.V. Waszczak, H. R. Lilienthal, **J. Am. Chem. Soc.** 104 (1982) 717-725
- [25] C.-L. O'Young, S.J. Lippard, **J. Am. Chem. Soc.** 102 (1980) 4920-4924
- [26] R.N. Patel, K.B. Pandeya, **J. Inorg. Biochem.** 72 (1998) 109-114

- [27] R.N. Patel, N. Singh, R.P. Shirastava, S. Kumar, K.B. Pandeya, **J. Mol. Liq.** 89 (2000) 207-221
- [28] R.N. Patel, S. Kumar, K.B. Pandeya, **Spectrochim. Acta Part A** 56 (2000) 2791-2797
- [29] R.N. Patel, S. Kumar, K.B. Pandeya, **J. Inorg. Biochem.** 89 (2002) 61-68
- [30] R.N. Patel, S. Kumar, K.B. Pandeya, P.V. Khadikar, **Spectrochim. Acta Part A** 58 (2002) 2961-2969
- [31] N. Singh, K.K. Shukla, R.N. Patel, U.K. Chauhan, R. Shirastava, **Spectrochim. Acta Part A** 59 (2003) 3111-3122
- [32] R.N. Patel, **Spectrochim. Acta Part A** 59 (2003) 713-721
- [33] R.N. Patel, **Spectrochim. Acta Part A** 60 (2004) 2201-2208
- [34] R.N. Patel, N. Singh, K.K. Shukla, U.K. Chauhan, **Spectrochim. Acta Part A** 61 (2005) 287-297
- [35] R.N. Patel, N. Singh, K.K. Shukla, V.L.N. Gundla, U.K. Chauhan, **J. Inorg. Biochem.** 99 (2005) 651-663
- [36] R.N. Patel, N. Singh, K.K. Shukla, U.K. Chauhan, S. Chakraborty, J. Niclós-Gutierrez, A. Castineiras, **J. Inorg. Biochem.** 98 (2004) 231-237
- [37] A.L. Abuhijleh, **J. Inorg. Biochem.** 68 (1997) 167-175
- [38] J.-L. Pierre, P. Chautemps, S. Refaif, C. Beguin, A.E. Marzouki, G. Serratrice, E. Saint-Aman, P. Rey, **J. Am. Chem. Soc.** 117 (1995) 1965-1973
- [39] D. Li, S. Li, D. Yang, J. Yu, J. Huang, Y. Li, W. Tang, **Inorg. Chem.** 42 (2003) 6071-6080
- [40] B.M. Katz, V.I. Stenberg, **Polyhedron** 4 (1985) 2031-2038
- [41] M. Sato, S. Nagae, K. Ohmae, J.-I. Nakaya, **J. Chem. Soc., Dalton. Trans.** (1986) 1949-1953
- [42] Z.-W. Mao, M.-Q. Chen, X.-S. Tan, J. Liu, W.-X. Tang, **Inorg. Chem.** 34 (1995) 2889-2893
- [43] A. Bury, A.E. Underhill, D.R. Kemp, N.J. O'Shea, J.P. Smith, P.S. Gomm, **Inorg. Chim. Acta** 138 (1987) 85-89
- [44] R.G. Bhirud, T.S. Shirastava, **Inorg. Chim. Acta** 173 (1990) 121-125
- [45] Q. Lu, C.-Y. Shen, Q.-H. Luo, **Polyhedron** 12 (1993) 2005-2008
- [46] E. Bienvenue, S. Choua, M.-A. Lobo-Recio, C. Marzin, P. Pacheco, P. Seta, G. Tarrago, **J. Inorg. Biochem.** 57 (1995) 157-168
- [47] Z. Durackova, J. Labuda, **J. Inorg. Biochem.** 58 (1995) 297-303
- [48] J. Casanova, G. Alzuet, J. Borrás, J. Latorre, M. Sanaú, S. Garcia-Granda, **J. Inorg. Biochem.** 60 (1995) 219-230
- [49] J. Müller, D. Schübl, C. Maichle-Mössmer, J. Strahle, U. Weser, **J. Inorg. Biochem.** 75 (1999) 63-69
- [50] J. Casanova, G. Alzuet, S. Ferrer, J. Latorre, J.A. Ramírez, J. Borrás, **Inorg. Chim. Acta** 304 (2000) 170-177

- [51] K. Jitsukawa, M. Harata, H. Arai, H. Sakurai, H. Masuda, **Inorg. Chim. Acta** 324 (2001) 108-116
- [52] A.L. Abuhijleh, C. Woods, **Inorg. Chem. Commun.** 5 (2002) 269-273
- [53] J. Labuda, L. Feníková, Z. Durackova, **Bioelectrochem. Bioenerg.** 44 (1997) 31-35
- [54] C.-J. Feng, Q.-H. Luo, Z.-L. Wang, M.-C. Shen, H.-W. Wang, M.-H. Zhao, **J. Inorg. Biochem.** 75 (1999) 1-6
- [55] S. Autzen, H.-G. Korth, R. Boese, H. de Groot, R. Sustmann, **Eur. J. Inorg. Chem.** (2003) 1401-1410
- [56] D. Kovala-Demertzi, A. Galani, M.A. Demertzis, S. Skoulíka, C. Kotoglou, **J. Inorg. Biochem.** 98 (2004) 358-364
- [57] D.P. Riley, **Chem. Rev.** 99 (1999) 2573-2587
- [58] A.J. Wu, J.E. Penner-Hahn, V. Pecoraro, **Chem. Rev.** 104 (2004) 903-938
- [59] O. Horner, E. Anxolabehere-Mallart, M.-F. Charlot, L. Tchertanov, J. Guilhem, T.A. Mattioli, A. Boussac, **Inorg. Chem.** 38 (1999) 1222-1232
- [60] Y. Sasaki, T. Akamatsu, K. Tsuchiya, S. Ohba, M. Sakamoto, Y. Nishida, **Polyhedron** 17 (1998) 235-242
- [61] B. Cheng, F. Cukiernik, P.H. Fries, J.-C. Marchon, W.R. Scheidt, **Inorg. Chem.** 34 (1995) 4627-4639
- [62] B. Cheng, F. Cukiernik, P.H. Fries, J.-C. Marchon, W.R. Scheidt, **Inorg. Chem.** 35 (1996) 1024-1032
- [63] M.J. Baldwin, T.L. Stemmler, P.J. Riggs-Gelasco, M.L. Kirk, J.E. Penner-Hahn, V.L. Pecoraro, **J. Am. Chem. Soc.** 116 (1994) 11349-11356
- [64] E.J. Larson, V.L. Pecoraro, **J. Am. Chem. Soc.** 113 (1991) 3810-3818
- [65] J.-J. Zhang, Q.-H. Luo, C.-Y. Duan, Z.-L. Wang, Y.-H. Mei, **J. Inorg. Biochem.** 86 (2001) 573-579
- [66] H. Torayama, T. Nishide, H. Asada, M. Fujiwara, T. Matsushita, **Polyhedron** 17 (1998) 105-118
- [67] M.U. Triller, W.-Y. Hsieh, V.L. Pecoraro, A. Rompel, B. Krebs, **Inorg. Chem.** 41 (2002) 5544-5554
- [68] N. Arulsamy, J. Glerup, A. Hazell, D.J. Hodgson, C.J. McKenzie, H. Toftlund, **Inorg. Chem.** 33 (1994) 3023-3025
- [69] P.J. Pessiki, G.C. Dismukes, **J. Am. Chem. Soc.** 116 (1994) 898-903
- [70] B.C. Dave, R.S. Czernuszewicz, **Inorg. Chim. Acta** 281 (1998) 25-35
- [71] J. Gao, S.H. Zhong, **J. Mol. Catal. A Chem.** 186 (2002) 25-32
- [72] P. Karsten, A. Neves, A.J. Bortoluzzi, J. Strahle, C. Maichle-Mössmer, **Inorg. Chem. Commun.** 5 (2002) 434-438
- [73] J. Gao, A.E. Martell, R.J. Motekaitis, **Inorg. Chim. Acta** 325 (2001) 164-170

- [74] J. Gao, J. Reibenspies, A.E. Martell, S. Yizhen, D. Chen, **Inorg. Chem. Commun.** 5 (2002) 1095-1098
- [75] J. Gao, A.E. Martell, R.J. Motekaitis, **Inorg. Chim. Acta** 346 (2003) 32-42
- [76] J. Reim, B. Krebs, **J. Chem. Soc., Dalton Trans.** (1997) 3793-3804
- [77] F. Zippel, F. Ahlers, R. Werner, W. Haase, H.-F. Nolting, B. Krebs, **Inorg. Chem.** 3409-3419
- [78] N. Möller, M. Lücken, B. Krebs, **J. Inorg. Biochem.** 86 (2001) 344-344
- [79] R. Wegner, M. Gottschaldt, H. Görls, E.-G. Jager, D. Klemm, **Chem. Eur. J.** 7 (2001) 2143-2157
- [80] E. Monzani, G. Battaini, A. Perotti, L. Casella, M. Gullotti, L. Santagostini, G. Nardin, L. Randaccio, S. Geremia, P. Zanella, G. Opromolla, **Inorg. Chem.** 38 (1999) 5359-5369
- [81] S. Torelli, C. Belle, I. Gautier-Luneau, J.L. Pierre, E. Saint-Aman, J.M. Latour, L. Le Pape, D. Luneau, **Inorg. Chem.** 39 (2000) 3526-3536
- [82] S. Torelli, C. Belle, S. Hamman, J.L. Pierre, E. Saint-Aman, **Inorg. Chem.** 41 (2002) 3983-3989
- [83] J. Ackermann, F. Meyer, E. Kaifer, H. Pritzkow, **Chem. Eur. J.** 8 (2002) 247-258
- [84] O. Seneque, M. Campion, B. Douziech, M. Giorgi, E. Riviere, Y. Journaux, Y. Le Mest, O. Reinaud, **Eur. J. Inorg. Chem.** (2002) 2007-2014
- [85] D.A. Rockcliffe, A.E. Martell, **J. Mol. Catal. A Chem.** 106 (1996) 211-221
- [86] E. Monzani, L. Quinti, A. Perotti, L. Casella, M. Gullotti, L. Randaccio, S. Geremia, G. Nardin, P. Faleschini, G. Tabbi, **Inorg. Chem.** 37 (1998) 553-562
- [87] M.C. Mimmi, M. Gullotti, L. Santagostini, A. Saladino, L. Casella, E. Monzani, R. Pagliarin, **J. Mol. Catal. A Chem.** 204-205 (2003) 381-389
- [88] R.J. Booth, J.C. Hodges, **J. Am. Chem. Soc.** 119 (1997) 4882-4886
- [89] A. Valente, A.M. Botelho do Rego, M.J. Reis, I.F. Silva, A.M. Ramos, J. Vital, **Appl. Catal. A Gen.** 207 (2001) 221-228
- [90] D.E. De Vos, M. Dams, B.F. Sels, P.A. Jacobs, **Chem. Rev.** 102 (2002) 3615-3640
- [91] R. Duchateau, **Chem. Rev.** 102 (2002) 3525-3542
- [92] K. Endo, T. Miyasaka, S. Mochizuki, S. Aoyagi, N. Himi, H. Asahara, K. Tsujioka, K. Sakai, **Sens. Actuators B Chem.** 83 (2002) 30-34
- [93] B. Ge, F.W. Scheller, F. Lisdat, **Biosens. Bioelectron.** 18 (2003) 295-302
- [94] S. Akgöl, Y. Kacar, S. Özkara, H. Yavuz, A. Denizli, M.Y. Arica, **J. Mol. Catal. B Enzym.** 15 (2001) 197-206
- [95] R.C. Sosa, R.F. Parton, P.E. Neys, O. Lardinos, P.A. Jacobs, P.G. Rouxhet, **J. Mol. Catal. A Chem.** 110 (1996) 141-151
- [96] E. Horozova, N. Dimcheva, **Cent. Eur. J. Chem.** 3 (2005) 279-287
- [97] F.M. Bautista, J.M. Campelo, A. Garcia, A. Jurado, D. Luna, J.M. Marinas, A.A. Romero, **J. Mol. Catal. B Enzym.** 11 (2001) 567-577

- [98] A. Nadja, P.M. Huang, J.-M. Bollag, **J. Mol. Catal. A Chem.** 115 (1997) 305-316
- [99] A.M. Azevedo, D.M.F. Prazeres, J.M.S. Cabral, L.P. Fonseca, **J. Mol. Catal. B Enzym.** 15 (2001) 147-153
- [100] K.J. Balkus, A.G. Gabrielov, **J. Incl. Phenom. Mol. Recognit. Chem.** 21 (1995) 159-184
- [101] D.E. De Vos, P.P. Knops-Gerrits, R.F. Parton, B.M. Weckhuysen, P.A. Jacobs, R.A. Schoonheydt, **J. Incl. Phenom. Mol. Recognit. Chem.** 21 (1995) 185-213
- [102] A. Borvornwattananont, K. Moller, T. Bein, **J. Phys. Chem.** 96 (1992) 6713-6724
- [103] A.A. Verberckmoes, B.M. Weckhuysen, R.A. Schoonheydt, K. Ooms, I. Langhans, **Anal. Chim. Acta** 348 (1997) 267-272
- [104] A.A. Verberckmoes, B.M. Weckhuysen, R.A. Schoonheydt, **Microporous Mesoporous Mater.** 22 (1998) 165-178
- [105] A. Delabie, K. Pierloot, M.H. Groothaert, B.M. Weckhuysen, R.A. Schoonheydt, **Microporous Mesoporous Mater.** 37 (2000) 209-222
- [106] B.M. Weckhuysen, H. Leeman, R.A. Schoonheydt, **Phys. Chem. Chem. Phys.** 1 (1999) 2875-2880
- [107] R. Grommen, P. Manikandan, Y. Gao, T. Shane, J.J. Shane, R.A. Schoonheydt, B.M. Weckhuysen, D. Goldfarb, **J. Am. Chem. Soc.** 122 (2000) 11488-11496
- [108] L. Fu, B.M. Weckhuysen, A.A. Verberckmoes, R.A. Schoonheydt, **Clay Miner.** 31 (1996) 491-500
- [109] B.M. Weckhuysen, A.A. Verberckmoes, I.P. Vannijvel, J.A. Pelgrims, P.L. Buskens, P.A. Jacobs, R.A. Schoonheydt, **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.** 34 (1995) 2652-2654
- [110] B.M. Weckhuysen, A.A. Verberckmoes, L. Fu, R.A. Schoonheydt, **J. Phys. Chem.** 100 (1996) 9456-9461
- [111] F. Bigi, L. Moroni, R. Maggi, G. Sartori, **Chem. Commun.** (2002) 716-717
- [112] D.-W. Park, S.-D. Choi, S.-J. Choi, C.-Y. Lee, G.-J. Kim, **Catal. Lett.** 78 (2002) 145-151
- [113] Q.-H. Xia, H.-Q. Ge, C.-P. Ye, Z.-M. Lin, K.-X. Su, **Chem. Rev.** 105 (2005) 1603-1662
- [114] S. Krijnen, H.C.L. Abbenhuis, R.W.J.M. Hanssen, J.H.C. van Hooff, R.A. van Santen, **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.** 37 (1998) 356-358
- [115] K. Kamata, K. Yamaguchi, N. Mizumo, **Chem. Eur. J.** 10 (2004) 4728-4734
- [116] C. González-Arellano, A.C.M. Iglesias, F. Sanchez, **Adv. Synth. Catal.** 346 (2004) 1316-1328
- [117] M.R. Maurya, S.J.J. Titinchi, S. Chand, I.M. Mishra, **J. Mol. Catal. A Chem.** 180 (2002) 201-209
- [118] S. Desphande, D. Srinivas, P. Ratnasamy, **J. Catal.** 188 (1999) 261-269
- [119] B.T. Holland, C. Walkup, A. Stein, **J. Phys. Chem. B** 102 (1998) 4301-4309
- [120] Nemezc Ernő, **Agyagásványok**, Akadémiai Kiadó, Budapest (1973)

- [121] D. Brunel, N. Bellocq, P. Sutra, A. Cauvel, M. Laspéras, P. Moreau, F. Di Renzo, A. Galarneau, F. Fajula, **Coord. Chem. Rev.** 178-180 (1998) 1085-1108
- [122] R. Ferreira, C. Freire, B. de Castro, A.P. Carvalho, J. Pires, M.B. de Carvalho, **Eur. J. Inorg. Chem.** (2002) 3032-3038
- [123] J.M. Fraile, J.I. Garcia, C.I. Herrerias, J.A. Mayoral, O. Reiser, A. Socuéllamos, H. Werner, **Chem. Eur. J.** 10 (2004) 2997-3005
- [124] A Corma, V. Fornés, F. Rey, A. Cervilla, E. Llopis, A. Ribera, **J. Catal.** 152 (1995) 237-242
- [125] S.M. Kanan, W.T.Y. Tze, C.P. Tripp, **Langmuir** 18 (2002) 6623-6627
- [126] P.K. Jal, R.K. Dutta, M. Sudarshan, A. Saha, S.N. Bhattacharyya, S.N. Chintalapudi, B.K. Mishra, **Talanta** 55 (2001) 233-240
- [127] M.C. Smith, T.C. Furman, C. Pidgeon, **Inorg. Chem.** 26 (1987) 1965-1969
- [128] O. Leal, D.L. Anderson, R.G. Bowman, F. Basolo, R.L. Burwell, **J. Am. Chem. Soc.** 97 (1975) 5125-5129
- [129] S. Shiraishi, M. Komiyama, H. Hirai, **Bull. Chem. Soc. Jpn.** 59 (1986) 507-510
- [130] M.R. Weaver, J.M. Harris, **Anal. Chem.** 61 (1989) 1001-1010
- [131] G.M. Kloster, C.M. Taylor, S.P. Watton, **Inorg. Chem.** 38 (1999) 3954-3955
- [132] M.A. Marshall, H.A. Mottola, **Anal. Chem.** 55 (1983) 2089-2093
- [133] M.I. Burguete, J.M. Fraile, J.I. Garcia, E. Garcia-Verdugo, C.I. Herrerias, S.V. Luis, J.A. Mayoral, **J. Org. Chem.** 66 (2001) 8893-8901
- [134] E.M. Soliman, M.E. Mahmoud, S.A. Ahmed, **Talanta** 54 (2001) 243-253
- [135] N.L.D. Filho, **Polyhedron** 18 (1999) 2241-2247
- [136] O.L. Casagrande, K. Tomita, A.E. Mauro, D.R. Vollet, **Polyhedron** 15 (1996) 4179-4183
- [137] D.E. Leyden, D.S. Kendall, L.W. Burggraf, F.J. Pern, M. DeBello, **Anal. Chem.** 54 (1982) 101-105
- [138] E.A. Murphy, L. Schmid, T. Bürgi, M. Maciejewski, A. Baiker, **Chem. Mater.** 13 (2001) 1296-1304
- [139] T. Shimada, K. Aoki, Y. Shinoda, T. Nakamura, N. Tokunaga, S. Inagaki, T. Hayasi, **J. Am. Chem. Soc.** 125 (2003) 4688-4689
- [140] K. Fujimura, T. Ueda, T. Ando, **Anal. Chem.** 55 (1983) 446-450
- [141] Y. Kawaguchi, M. Tanaka, M. Nakae, K. Funazo, T. Shono, **Anal. Chem.** 55 (1983) 1852-1857
- [142] W. Wasiak, I. Rykowska, **J. Chromatogr. A** 723 (1996) 313-324
- [143] W. Wasiak, W. Urbaniak, **J. Chromatogr. A** 757 (1997) 137-143
- [144] I. Rykowska, S. Smyka, W. Urbaniak, W. Wasiak, **J. Chromatogr. A** 844 (1999) 239-248
- [145] Y. Iamamoto, K.J. Ciuffi, H.C. Sacco, L.S. Iwamoto, O.R. Nascimento, C.M.C. Prado, **J. Mol. Catal. A Chem.** 116 (1997) 405-420

- [146] G. Gelbard, T. Gauducheau, E. Vidal, V.I. Parvulescu, A. Crosman, V.M. Pop, **J. Mol. Catal. A Chem.** 182-183 (2002) 257-266
- [147] A. Molinari, R. Amadelli, V. Carassiti, A. Maldotti, **Eur. J. Inorg. Chem.** (2000) 91-96
- [148] J. Jarupatrakom, T.D. Tilley, **J. Am. Chem. Soc.** 124 (2002) 8380-8388
- [149] S.F. Oliveira, J.G.P. Espinola, W.E.S. Lemus, A.G. de Souza, C. Airoidi, **Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.** 136 (1998) 151-154
- [150] A.H. Gemeay, **Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.** 116 (1996) 277-284
- [151] M. Louloudi, K. Mitopoulou, E. Evaggelou, Y. Deligiannakis, N. Hadjiliadis, **J. Mol. Catal. A Chem.** 198 (2003) 231-240
- [152] R.J. Sundberg, R.B. Martin, **Chem. Rev.** 74 (1974) 481-517
- [153] P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, **J. Chem. Soc., Dalton Trans.** (1985) 1195-1200
- [154] L. Zékány, I. Nagypál, **Computation methods for the determination of stability constants**, Plenum Press, New York (1985)
- [155] G. Peintler, I. Nagypál, A. Jancsó, I.R. Epstein, **J. Phys. Chem. A** 101 (1997) 8013-8020
- [156] A. Rockenbauer, L. Korecz, **Appl. Magn. Reson.** 10 (1996) 29-43
- [157] R.S. Dhindsa, P. Plumb-Dhindsa, T.A. Thorpe, **J. Exp. Bot.** 32 (1981) 93-101
- [158] C. Beauchamp, I. Fridovich, **Anal. Biochem.** 44 (1971) 276-287
- [159] W.R. Frisell, C.W. Chung, C. G. Mackenzie, **J. Biol. Chem.** 234 (1959) 1297-1302
- [160] V. Massey, S. Strickland, S.G. Mayhew, L.G. Howell, P.C. Engel, R.G. Matthews, M. Schuman, P.A. Sullivan, **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 36 (1969) 891-897
- [161] D. Ballou, G. Palmer, V. Massey, **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 36 (1969) 898-904
- [162] S. Ball, T.C. Bruice, **J. Am. Chem. Soc.** 103 (1981) 5494-5503
- [163] G. Arena, M. Bindoni, V. Cardile, G. Maccarrone, M.C. Riello, E. Rizzarelli, S. Sciuto, **J. Inorg. Biochem.** 50 (1993) 31-45
- [164] A. Odani, H. Masuda, K. Inukai, O. Yamauchi, **J. Am. Chem. Soc.** 114 (1992) 6294-6300
- [165] N. Nakasuka, R.P. Martin, J.P. Scharff, **Bull. Soc. Chim. Fr.** (1975) 1973-1976
- [166] S. Sjöberg, **Pure Appl. Chem.** 69 (1997) 1549-1570
- [167] G. Anderegg, V. Gramlich, **Helv. Chim. Acta** 77 (1994) 685-690
- [168] G. Anderegg, N.G. Podder, P. Blauenstein, M. Hangartner, H. Stunzi, **J. Coord. Chem.** 4 (1975) 267-275
- [169] D. Rabenstein, G. Blakney, **Inorg. Chem.** 12 (1973) 128-135
- [170] T. Szabó-Plánka, G. Peintler, A. Rockenbauer, M. Györ, M. Varga-Fábián, L. Institórisz, L. Balázspiri, **J. Chem. Soc., Dalton Trans.** (1989) 1925-1932

X. A SZERZŐ KÖZLEMÉNYEINEK LISTÁJA

Az értekezés anyagához kapcsolódó közlemények:

1. **I. Szilágyi**, I. Labádi, K. Hernadi, I. Pálinkó, T. Kiss
Synthesis and IR spectroscopic characterisation of immobilised superoxide dismutase (SOD) mimicking complexes
Journal of Molecular Structure **744-747**, 495 (2005) IF: 1,200
2. **I. Szilágyi**, I. Labádi, K. Hernadi, I. Pálinkó, I. Fekete, L. Korecz, A. Rockenbauer, T. Kiss
Superoxide dismutase activity of a Cu-Zn complex – bare and immobilised
New Journal of Chemistry **29**, 740 (2005) IF: 2,735
3. **I. Szilágyi**, I. Labádi, K. Hernadi, T. Kiss, I. Pálinkó
Montmorillonite intercalated Cu(II)-histidine complex - synthesis, characterisation and superoxide dismutase activity
Studies in Surface Science and Catalysis **158**, 1011 (2005) IF: 0,489
4. **I. Szilágyi**, I. Labádi, K. Hernadi, I. Pálinkó, N.V. Nagy, L. Korecz, A. Rockenbauer, Z. Kele, T. Kiss
Speciation study of an imidazolate-bridged copper(II)–zinc(II) complex in aqueous solution
Journal of Inorganic Biochemistry **99**, 1619 (2005) IF: 2,225
5. **I. Szilágyi**, Z. Kele, I. Labádi, K. Hernadi, I. Pálinkó, T. Kiss
ESI–MS and MALDI–MS investigation of a superoxide dismutase mimicking imidazolato–bridged Cu–Zn complex
Rapid Communications in Mass Spectrometry **19**, 2878 (2005) IF: 2,789
6. **István Szilágyi**, László Horváth, Imre Labádi, Klara Hernadi, István Pálinkó, Tamás Kiss
Mimicking catalase and catecholase enzymes by copper(II)-containing complexes
Central European Journal of Chemistry **4**, 118 (2006) IF: 0,171

Egyéb közlemények:

1. E. Princz, **I. Szilágyi**, K. Mogyorósi and I. Labádi
Lanthanide complexes of ethylenediaminetetramethylene-phosphonic acid
Journal of Thermal Analysis and Calorimetry **69**, 427 (2002) IF: 0,598
2. I. Labádi, **I. Szilágyi**, N. I. Jakab, K. Hernádi, I. Pálinkó
Metal complexes immobilised in/on porous matrices – possible enzyme mimics
Material Science **21**, 235 (2003) IF: 0,154
3. **I. Szilágyi**, G. Nagy, K. Hernádi, I. Labádi and I. Pálinkó
Modeling copper-containing enzyme mimics
Journal of Molecular Structure THEOCHEM **666-667**, 451 (2003) IF: 1,027
4. **I. Szilágyi**, E. Pál, L. Horváth, I. Labádi
Az N-hidroxietil-glicin kölcsönhatása fémionokkal
Magyar Kémiai Folyóirat **111**, 83 (2005) IF: –

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezen értekezés a Szegedi Tudományegyetem Természettudományi Karának Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékén 2002. szeptember és 2005. augusztus között elvégzett munkám eredménye.

Ezúton szeretném megköszönni **Dr. Kiss Tamás** tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy az általa vezetett tanszéken témavezetőként a munkámat felügyelte. Köszönettel tartozom neki, hogy lehetővé tette a munkám anyagi és szakmai feltételeit.

Hálával tartozom **Dr. Pálinkó István** egyetemi docensnek, aki külső konzulensként irányította munkámat. Köszönöm értékes szakmai és baráti jellegű tanácsait, amelyekkel az elmúlt évek során ellátott, és amelyek nagyban hozzájárultak tudományos tevékenységem sikerességéhez. Ugyancsak köszönet illeti a tudományos publikációk elkészítésében nyújtott rendkívül értékes segítségéért és doktori értekezésem alapos, minden szempontból mélyreható javításáért.

Köszönetemet szeretném kifejezni **Dr. Labádi Imre** egyetemi docensnek, aki témavezetőként segítette munkámat. Hálával tartozom a kísérleti munkám során nyújtott értékes tanácsaiért.

Ugyancsak köszönettel tartozom **Dr. Hernádi Klára** egyetemi tanárnak, különösen a termikus és fajlagos felület mérések során nyújtott segítségéért, illetve doktori értekezésem alapos átnézéséért.

Hálával gondolok néhai **Meleg István** tanár úrra, középiskolai kémia tanáromra, aki a szakmai alapok megtanítása mellett pályaválasztásomat is elősegítette.

Ugyancsak köszönetemet szeretném kifejezni a Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék minden egyes egykori, illetve jelenlegi dolgozójának a zavartalan munkavégzést biztosító baráti légkör megteremtéséért.

Végül, de nem utolsósorban szeretném megköszönni szüleimnek, húgomnak, illetve menyasszonyomnak **Tündének**, hogy az évek során támogattak és kiegyensúlyozott családi háttérrel biztosítottak, ami átsegített az igazán nehéz időszakokon.

Szeged, 2006. február 28.

Szilágyi István