Potenciális inzulinutánzó oxovanádium(IV)-komplexek (bio)speciációja

Doktori (Ph.D.) értekezés

Dörnyei Ágnes

Témavezető: Dr. Kiss Tamás

Szegedi Tudományegyetem,

Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék

Szeged, 2008

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék ... 1

1. Bevezetés ... 3
   1.1. A vanádium ... 6
   1.2. A vanádium biokémiája ... 8
      1.2.1 Vanádium az alacsonyabb rendű élő szervezetekben ... 9
      1.2.2 Vanádium az emberi szervezetben ... 13
      1.2.3. Inzulinutánzó hatás ... 14
   1.3. Az oxovanádium(IV)ion oldatkémiája, koordinációs kémiája ... 19

2. Alkalmazott vizsgálati módszerek, kísérleti körülmények ... 22
   2.1. Felhasznált anyagok ... 22
   2.2. pH-potenciometria ... 23
   2.3. Oxovanádium(IV)komplexek elektrongerjesztési spektroszkópiája ... 27
   2.3. Oxovanádium(IV)komplexek CD-spektroszkópiája ... 29
   2.4. Oxovanádium(IV)komplexek ESR-spektroszkópiája ... 30

3. Kísérleti eredmények és értékelésük ... 35
   3.1. Potenciális inzulinutánzó oxovanádium(IV)komplexek ... 35
      3.1.1. Oxovanádium(IV)–aldársav rendszerek ... 35
         3.1.1.1. Irodalmi áttekintés ... 35
         3.1.1.2. A vizsgált aldársavak sav-bázis sajátságai ... 40
         3.1.1.3. Az aldársavak oxovanádium(IV)komplexei ... 40
         3.1.1.4. Az oxovanádium(IV)-aldársav-komplexek oldatszerkezete ... 43
      3.1.2. Sal_2en típusú Schiff-bázis származékok oxovanádium(IV)kötő sajátságai ... 50
         3.1.2.1. Irodalmi áttekintés ... 50
         3.1.2.2. Piridoxálból és etiléndiaminból képzett Schiff-bázis és redukált Schiff-bázis ... 53
            3.1.2.2.1. A ligandumok sav-bázis sajátságai ... 54
            3.1.2.2.2. A ligandumok oxovanádium(IV)komplexei ... 59
         3.1.2.3. Szalicilaldehidből és diamino-karbonsavakból képzett redukált Schiff-bázisok ... 66
            3.1.2.3.1. A ligandumok sav-bázis sajátságai ... 66
            3.1.2.3.2. A ligandumok oxovanádium(IV)komplexei ... 68
   3.2. Inzulinutánzó oxovanádium(IV)komplexek kölcsönhatása sejtalkotó bioligandumokkal ... 76
      3.2.1. A vizsgált oxovanádium(IV)komplexek irodalmi áttekintése ... 77
      3.2.2. Az ATP hatása az inzulinutánzó oxovanádium(IV)komplexekre ... 79
         3.2.2.1. $V^{IV}O$–ATP rendszer ... 79
         3.2.2.2. $V^{IV}O$–maltol/dipikolinsav–ATP rendszerek ... 81

3.2.3. A GSH hatása az inzulinutánzó oxovanádium(IV)komplexekre 85
3.2.3.1. $V^{IV}O$–GSH rendszer 85
3.2.3.2. $V^{IV}O$–maltol/dipikolinsav–GSH rendszerek 87
4. Összefoglalás 92
5. Summary 95
Köszönetnyilvánítás 100
Függelék 101
Irodalomjegyzék 103

1. Bevezetés

A cukorbetegség (*diabetes mellitus,* DM) modern korunk egyik legfenyegetőbb világszintű „járványa”. A betegek száma évről évre jelentősen növekszik: míg az 1990-es években „csak” 100-135 millió cukorbeteg élt világszerte, addig 2007-re már közel 250 millióra becsülik számukat. A cukorbetegség az inzulin abszolút (I. típusú vagy inzulinfüggő DM) vagy relatív hiánya (II. típusú vagy nem inzulinfüggő DM) nyomán alakul ki. Az inzulin endogén peptidhormon, fontos szerepet játszik a szénhidrátháztartás működésében, szervezetünk anyagcsere-folyamataiban. Ennek megfelelően a betegséget megnövekedett vércukorszint, számos anyagcserezavar, hosszabb távon különféle szövődmények jellemzik. Gyógymódja jelenleg nem ismert, ezért a cukorbetegek egy életen át tartó kezelésre szorulnak. Az inzulin ma is az első számú gyógyszer a cukorbetegség terápiájában.

Közel három évtizede fedezték fel, hogy vanádiumvegyületek képesek az inzulin egyes alapvető hatásait utánozni, fokozni. A vanádium kémiájával foglalkozó kutatók egyik célja olyan gyógyszer kifejlesztése, amely megkönnyítené a cukorbetegek kezelését. A biológiai vizsgálatok szervetlen vanadátsókkal és peroxo-vanadátkomplexekkel kezdődtek, majd a kevésbé toxikus oxovanádium(IV)komplexek kerültek az érdeklődés középpontjába. Megfelelő komplexképző alkalmazásával lecsökkenthető az egyébként mérgező fémből az inzulinutánzó hatás eléréséhez szükséges dózis. Számos kis molekulatömegű, fiziológiás pH-n megfelelő stabilitású, főleg semleges $V^{IV}O$-komplexet találtak *in vitro* és *in vivo* hatásosnak.

A vanádiumvegyületek előnye az inzulinkészítményekkel szemben az, hogy szájon át szedve is csökkentik a vércukorszintet, míg a peptidet az emésztőenzimek elbontják. Hátrányuk, hogy ezek a fémvegyületek nem specifikusan hatnak, így a fellépő mellékhatások, illetve a toxicitás még megoldandó problémát jelent. A vanádiumkomplexek hatása feltehetően a vanadátion és a foszfátion geometriai és kémiai hasonlóságára vezethető vissza. Ennek köszönhetően a vanádium a +5-ös oxidációs állapotban reverzibilisen gátol számos foszfátanyagcserében résztvevő enzimet. Az „inzulin-utánzó” hatás pontos mechanizmusa jelenleg még nem ismert.

Egy fémion oldatbeli állapota, kémiai formája (speciációja) alapvető fontosságú a biológiai hatás szempontjából. Ugyanis ez határozza meg, hogy az adott elem eljut-e egyáltalán azon helyekre, ahol a biológiai hatását kifejti. Azt is figyelembe kell vennünk, hogy bizonyos mértékig –függetlenül az alkalmazott fémtartalmú gyógyszer kiindulási kémiai formájától – a fémion a biológiai nedvek és szövetek nagyszámú potenciális fémionkötő molekuláival való kölcsönhatás eredményeként sorozatos átalakulásokon mehet keresztül.

A vanádiumkomplexek biológiai folyadékokban való speciációjára vonatkozó vizsgálatok arra utalnak, hogy a hordozóligandum elsősorban a komplex gyomorból történő felszívódását befolyásolja, míg a véráramban a vér kis és nagy molekulatömegű vanádiumkötő biomolekulái (citrát és transzferrin) szállíthatják a vanádiumot.

In vitro a vanádiumvegyületek többféle módon is bejuthatnak a sejtbe, akár passzív diffúzió révén is. A szervezetben a sejtekig eljutva, majd benn a sejtekben ligandumcsere-, valamint redoxi-reakciókban vesznek részt a különböző sejten kívüli és sejtalkotó bioligandumokkal. H. Sakurai és munkatársai szerint a vanádium jellemző oxidációs állapota a citoszolban +4-es, a jelenlévő redukálószerek (pl. redukált glutation, Cys stb.) biztosítják ehhez a megfelelő „reduktív" környezetet. Jelen dolgozatban kizárólag a vizsgált $V^{IV}O$-rendszereket mutatjuk be, természetesen a megjelent közleményekben ezzel párhuzamosan a hordozóligandumok vanádium(V)kötő sajátságait is jellemeztük.

A vanádiumvegyületek oldatkémiájának felderítése segíthet potenciális gyógyszermolekulák tervezésében és a biológiai hatásért felelős részecskék azonosításában is. Célkitűzéseink közt szerepelt, hogy oldategyensúlyi vizsgálatok alapján modellezzük, (1) milyen $V^{IV}O$-komplexek képződnek potenciális hordozóligandumokkal, illetve (2) mi történik a szervezetben – azon belül is a sejtekben – a bejuttatott vanádiummal. A potenciális inzulinutánzó $V^{IV}O$-komplexek (bio)speciációjának modellezése érdekében pH-potenciometriás módszerrel meghatároztuk a kiválasztott hordozóligandumok $V^{IV}O$-komplexeinek összetételét, stabilitási állandóit és ezen keresztül a képződő részecskék eloszlását. Majd ESR-, elektrongerjesztési és – amennyiben lehetséges – CD-spektroszkópiás módszerekkel jellemeztük az adott $V^{IV}O$ – ligandum rendszereket. Javaslatot tettünk az összetétel, a stabilitási állandók és a spektrális viselkedés alapján a keletkezett komplexek kötésmódjára.

A hordozóligandumok kiválasztása során azt vettük figyelembe, hogy a vizsgálandó vegyület donorcsoportjainak minősége és elrendeződése révén képes legyen a vanádium megkötésére; megfelelő stabilitású $V^{IV}O$-komplex képződjön a fiziológiás pH-tartományban. A $V^{IV}O^{2+}$ inkább hard fémionként viselkedik, azaz erősebb kölcsönhatásra képes oxigéndonor-atomot tartalmazó komplexképzőkkel, mint nitrogént vagy ként tartalmazókkal.

Az egyik kiválasztott ligandumcsalád a szénhidrátszármazékok közé, mégpedig az aldohexózok erőteljes oxidációja révén keletkező aldársavak (α,ω-polihidroxi-dikarbonsav) közé tartozik. Ennek a vegyülettípusnak két tagját vizsgáltuk: a D-glükársavat és a galaktársavat.[1]

A másik vizsgált potenciális hordozóligandum-család az úgynevezett sal_2en típusú Schiff-bázis származékok családja. A sal_2en (N,N'-bisz(szalicilaldehid)etilén-diimin) két szalicilaldehid és egy etilén-diamin kondenzációs termékeként állítható elő. Az egyik módosítási lehetőség az aldiminkötések telítése, mely révén flexibilisebb szerkezetű származékot kapunk. A másik lehetőség az o-hidroxi-benzaldehid és/vagy a diamin módosítása, cseréje: a potenciális fémionkötő funkciós csoportok beépítésével a ligandum térkitöltése, lipofil/hidrofil jellege, vanádiumkötő sajátsága is változtatható. Az o-hidroxi-benzaldehidet piridoxálra (B_6-vitamin aktivitású piridinszármazékra), míg az etilén-diamint 2,3-diamino-propionsavra, illetve 2,5-diamino-pentánsavra (ornitinre) cseréltük. Az így előállított ligandumok – pyr_2en, $rpyr_2en$, sal_2dpa, sal_2orn – $V^{IV}O$-val képzett komplexeit jellemeztük.[2,3]

A kutatócsoportunk (az SZTE-MTA Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoportja) korábban már tanulmányozta, hogy egyes potenciális inzulinutánzó $V^{IV}O$-komplexek milyen kölcsönhatásba lépnek a vérszérum kis és nagy molekulatömegű alkotóival. A komplexek sejtalkotókkal, így a redukált glutationnal (GSH), nukleotidokkal (pl. adenozin-5'-trifoszfát: ATP) való kölcsönhatásának vizsgálata nyújthat további felvilágosítást arra, hogy mi játszódik le a sejtekben, ami a biológiai hatáshoz vezet. Mindezek tükrében olyan terner rendszerek oldategyensúlyi vizsgálatát hajtottuk végre, ahol a $V^{IV}O$ mellett hordozóligandumként: maltol vagy dipikolinsav, sejtalkotó biomolekulaként: ATP vagy GSH volt jelen.[4]

Az értekezés első fejezetében a vanádium bioszervetlen kémiáját és a vanádiumvegyületek inzulinutánzó hatásával foglalkozó irodalmat tekinthetjük át. Az alkalmazott kísérleti módszerek bemutatását (2. fejezet) az eredmények ismertetése (3. fejezet) követi. A 3.1. fejezetben a fent említett potenciális hordozóligandumok-családok $V^{IV}O$-kötő tulajdonságát mutatjuk be, míg a 3.2. fejezetben néhány gyógyszerjelölt $V^{IV}O$-komplex és a sejtekben nagy mennyiségben jelen lévő biomolekula (ATP, GSH) kölcsönhatását elemezzük. Könnyebb összehasonlíthatóság kedvéért az irodalmi előzményeket közvetlenül az eredményeinket tárgyaló alfejezetek előtt ismertetjük.

1.1. A vanádium

A vanádiumot 1802-ben A. M. del Rio fedezte fel először mexikói barna ólomércben. Különféle oxidációs állapotú vegyületeinek sokszínűségéről előbb pankrómiumnak, majd a sóinak megsavanyításával kapott vörös színre utalva végül eritróniumnak (vörös) nevezte el az addig ismeretlen elemet. Felfedezését sajnos néhány évvel később visszavonta H. V. Collett-Descotils hatására, aki végül is meggyőzte arról, hogy a kérdéses ércminta valójában csak bázikus ólom-kromátot tartalmazott. 1831-ben N. G. Sefström fedezte fel újra az elemet svéd vasérc olvasztásakor kapott termékek között, és ő nevezte el vanádiumnak Vanadis, a szépség és termékenység skandináv istennője után vegyületeinek színgazdagsága és változatossága miatt. Még ugyanabban az évben F. Wöhler megállapította, hogy az eritrónium és a vanádium azonosak voltak. A majdnem tiszta elem izolálására 1867-ig várni kellett, először H. E. Rosco állította elő a fémet kloridjának hidrogénes redukciója révén.[5,6,7]

A vanádium a periódusos rendszer 23. eleme, a nióbiummal és a tantállal együtt alkotják az 5. csoportot,[8] elektronszerkezete $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 4s^2 3d^3$. Két természetes izotópja létezik: az ^{51}V (gyakorisága 99,75 %), valamint az ^{50}V (0,25%), ez utóbbi kismértékben radioaktív (felezési ideje $1{,}4\times10^{17}$ év).[9,10] Az elemi vanádium szürkés, ezüstös fém, tipikus fémes tércentrált kockarács-szerkezettel. A teljesen tiszta vanádium viszonylag puha és nyújtható, de csekély mennyiségű szennyező anyag már keménnyé és rideggé teszi. A korróziónak ellenáll, ami a felületén képződő oxidrétegnek tulajdonítható. Vegyületeiben a vanádium +5-től –3-ig terjedő formális oxidációs számokkal rendelkezik, a legstabilabb állapotai normál körülmények között a +4 és a +5, de még a +3, illetve a +2 oxidációs állapotoknak is (melyek erős redukálószerek) van jól jellemzett kationos kémiájuk.[5]

Becslések szerint a földkéreg átlagos vanádiumtartalma 0,0136% (136 ppm), és ezzel a vanádium a tizenkilencedik leggyakoribb elem, valamint az ötödik leggyakoribb átmenetifém a vas, a titán, a mangán és a cirkónium után, miközben a cinknél, illetve a réznél körülbelül kétszer, az ólomnál tízszer, a molibdénnél százszor gyakoribb. Elemi állapotban nem, csak vegyületeiben, elsősorban réz, cink, ólom, vas és egyéb elemek vanadátjaiként fordul elő. Fő kereskedelmi ásványforrása az ausztrál, a dél-afrikai, a kínai és az orosz titánovas magnetit.[11] Az egyik legfontosabb ásványa a poliszulfid patronit (VS_4), de hard fém révén inkább oxigénvegyületeiben fordul elő, pl. a vanadinitben ($PbCl_2{\cdot}3Pb_3(VO_4)_2$; del Rio ércmintája is ezt tartalmazta) és a karnotitban ($K(UO_2)(VO_4){\cdot}1{,}5H_2O$). A vanádium számottevő mennyiségben fordul elő a nyersolajban, a szenekben és a bitumenes kőzetekben porfiringyűrűbe beépülve. Az olajmaradékokból, illetve az elégetéskor keletkező kürtőkoromból ki is nyerhető.

Kevés olyan ásvány ismert, melyből a vanádium főtermékként gazdaságosan izolálható, ezért általában más elemek (pl. vas, foszfor, uránium) előállítása során melléktermékként vagy társult termékként nyerik ki. Függetlenül a vanádiumforrástól (érc, olaj, melléktermék vagy használt

katalizátor) a feldolgozás során elsősorban vanádiumpentaoxid előállítása a cél – ez a vanádiumvegyületek, illetve a fém ipari előállításának elsődleges kiindulási anyaga –, majd ebből állítják elő a fémet redukcióval. Mivel azonban a termelt vanádium több mint 80%-át acélötvözőként használják fel, a redukciót rendszerint vas vagy vasérc jelenlétében elektromos kemencében végzik, és így ferrovanádiumot nyernek, amit további finomítás nélkül használnak fel. Ha tiszta vanádiumra van szükség, akkor vagy VCl_5-ot vagy V_2O_5-ot redukálnak hidrogénnel, magnéziummal vagy fémkalciummal. Részlegesen tisztított vanádiumot alkálifém kloridos vagy bromidos olvadékának elektrolízisével állítanak még elő.

A világ vanádiumtermelése 2006-ban 62400 tonna volt,[12] melynek kb. 85–95%-a különféle metallurgiai eljárásokban került felhasználásra, ennek is kb. 75–85%-a az acélgyártásban. Ötvöző elemként számos fém (pl. vas, alumínium, titán) mechanikai tulajdonságait javítja. A vanádium szerepe acéladalékként abban áll, hogy az acél széntartalmával V_4C_3-vegyületet képez, ami egyenletesen eloszolva finomszemcsés acélt eredményez. Ez az acélnak nagy kopásállóságot, jelentős rezgésállóságot és magas hőmérsékleten is nagy szilárdságot kölcsönöz. Ilyen ötvözetet széleskörűen használnak rugók és nagy sebességgel mozgó alkatrészek, szerszámok készítéséhez elsősorban az autó-, vonat- és repülőgépgyártásban. Például Henry Ford volt az első 1908-ban, aki már alkalmazta ezt a híres T-modell megalkotása során.[7] Az alumíniumötvözetek esetében 2,5–4,0% vanádiumadalék szintén előnyös szemcseméretet eredményez, így kedvező hőtágulási, elektromos ellenállás tényezővel rendelkező, magas hőmérsékleten is nagy szilárdságú alkatrészeket kaphatunk belőlük. Ezek a különféle összetételű titán-alumínium-vanádium, illetve vanádium-titán-szén ötvözetek a repülőgépiparban kerülnek alkalmazásra, míg vanádium-nióbium ötvözeteket használnak az űrtechnológiában.

Többértékű átmenetifémként sárgától a zöldig és pirostól a feketéig sokféle színárnyalatban előfordulnak vegyületei, melyeket előszeretettel alkalmaznak színezőanyagként a kerámiaiparban, üvegiparban, valamint a textil- és bőriparban. Sőt már 1874-től használnak vanádiumvegyületeket, pentaoxidot a fényképészetben és a színesfilm-gyártásban előhívószerként, érzékenyítőfestékként és színezékként.

A vanádium másik jelentős alkalmazási területe a vegyipar, ahol a hordozóra (pl. SiO_2, Al_2O_3, TiO_2 és ZrO_2) felvitt oxidjait katalizátorként elterjedten használják. Az átmenetifém-oxid alapú katalizátorok közül a vanádiumtartalmúak állnak az utóbbi időben az érdeklődés középpontjában.[13] Vanádiumvegyületek nemcsak oxidatív átalakulások, hanem egyéb reakciók (pl. Ziegler-Natta)[14] katalizátorai is lehetnek, így az iparban a kénsav és egyéb vegyszerek előállítása (pl. maleinsav-anhidrid benzolból; ftálsav-anhidrid naftalinból vagy buténből vagy o-xilolból stb.) mellett előszeretettel alkalmazták ezeket a műanyaggyártás során is.[7]

A vanádium széleskörű elterjedésért a természetben az emberi tevékenység is felelős a környezetszennyezés, a fosszilis üzemanyagokat (petróleum, olaj, szén) használó erőművek kibocsátása révén.

1.2. A vanádium biokémiája

Régóta tudjuk, hogy bizonyos fémek fontos szerepet töltenek be az élő szervezetekben, hiányuk súlyos rendellenességeket idéz elő. Számos tényezőtől függ, hogy egy adott fém az evolúció során az életfolyamatok nélkülözhetetlen elemévé válik-e vagy sem. Ezek közül hármat emelnénk ki: (1) előfordulás (biohozzáférhetőség): megtalálható-e (különösen) a hidroszférában, a földi lét bölcsőjének tartott tengerekben; (2) funkcionalitás: rendelkezik-e a biológiai folyamatokban való részvételhez szükséges megfelelő komplexképző és/vagy redoxisajátsággal; (3) toxicitás: fiziológiás körülmények közt mérgező-e, és ha igen, milyen formában és mértékben.

A vanádium hozzáférhetőségét tekintve napjainkban az ötödik leggyakoribb átmenetifém a földkéregben (lásd előző fejezet), és második a tengerek vizében. A tengerek vanádiumkoncentrációja 20–35 nM, ennél csak a 100 nM-ban előforduló molibdénből van több a vizekben, csak összehasonlításképp a vas koncentrációja mindösszesen 0,02–1 nM.[15,16]

Biológiai szempontból a vanádium magasabb oxidációs állapotai érdekesek, szerepe a +3, +4, +5 oxidációs állapotoknak bizonyított,[17] de egyes enzimekben a +2-es is előfordulhat az enzimreakció köztitermékeként. Az 1. táblázat tartalmazza a vanádium különböző, biológiailag releváns oxidációs állapotai közti átmenetek redoxipotenciálját.[6,18]

1. táblázat A feltüntetett félcellafolyamatokhoz tartozó potenciálértékek

félcellafolyamatok	E^o	$E_{pH=7}$
$V^{3+} + e^- = V^{2+}$	–0,26	
$V^{IV}O^{2+} + 2\,H^+ + e^- = V^{3+} + H_2O$	+0,36	–0,47
$V^{V}O_2^{+} + 2\,H^+ + e^- = V^{IV}O^{2+} + H_2O$	+1,00	+0,17
$H_2V^{V}O_4^{-} + 4\,H^+ + e^- = V^{IV}O^{2+} + 3H_2O$	+1,31	–0,34

Az emberi szervezetben fiziológiás körülmények között (3–7 pH-tartományban, aerob vizes közegben) elsősorban a +5 oxidációs állapotú oxoanion, a vanadát(V) egyszeresen és kétszeresen protonált formája ($H_2V^{V}O_4^{-}$ és $H^{V}VO_4^{2-}$, pK_s=8,1)[19], valamint a +4 oxidációs állapotú oxokation ($V^{IV}O^{2+}$) található meg. Miközben a $H_2VO_4^{-} + 4H^+ + e^- = VO^{2+} + 3H_2O$ redoxifolyamat 7-es pH-n mérhető redoxipotenciálja (lásd 1. táblázat) miatt a $V^{IV}O^{2+}$ ion aerob körülmények közt könnyen vanadáttá oxidálható, a sejtben – anaerob körülmények között – a vanadátot $V^{IV}O^{2+}$ ionná redukálják a sejtalkotó redukálószerek: a glutation és egyéb ciszteint tartalmazó oligopeptidek, fehérjék vagy az aszkorbinsav, NADH és különböző fenoltartalmú vegyületek.[15] Erélyes redukálószer jelenlétében vanádium(III)vegyületek keletkezése sem zárható ki.

A kationos vanádium(III/IV)részecskék pH 7 körül csak abban az esetben stabilisak vizes oldatban, ha erős vanádiumkötő ligandumok koordinálódnak hozzájuk; egyébként elhidrolizálnak, az oldatból csapadék formájában kiválnak. A vanádium a magasabb oxidációs állapotokban inkább hard fémionként viselkedik, erősebb kölcsönhatásra képes oxigéndonor-atomot tartalmazó komplex-

képzőkkel, mint nitrogént vagy ként tartalmazókkal (mindezek ellenére a kénhez való kötődése sem elhanyagolható). A vanádiumvegyületek oldatkémiáját, élettani hatásait a következő alfejezetekben mutatjuk be részletesebben.

A vanádium a környezeti gyakoriságához képest kis mértékű felhalmozódást mutat az emberi szervezetben, bár eddig nem bizonyították, hogy az emlősök számára létfontosságú. Ultranyomelem, gyakorlatilag minden növényi és állati sejtben megtalálható nagyon kis ($<10^{-8}$ M) koncentrációban. Eközben bizonyos alacsonyabb rendű, elsősorban tengeri élőlények szervezetében nagyobb mértékű felhalmozódást is kimutattak. A feldúsulás vagy egy védelmi mechanizmus eredménye (a tengervízben viszonylag nagy mennyiségben jelenlévő, egyébként mérgező fémiont így választják ki a szervezetükből), vagy bizonyos biokémiai folyamatokhoz van szükségük ezeknek az élőlényeknek ekkora mennyiségre.

1.2.1 Vanádium az alacsonyabb rendű élő szervezetekben

A zsákállatok (*Tunicata*) altörzsébe, az aszcídiák (*Ascidiacea*) osztályába tartozó két alosztály (az *Aplousobranchia* és az *Phlebobranchia*)[20,21] fajai is képesek vanádiumot felhalmozni a tengervízből. 1911-ben M. Henz figyelt fel erre a jelenségre a *Phallusia mammillata* faj (1. ábra) vérsejtjeit vizsgálva.[22] A dúsítási tényező a 10^6–10^7 értéket is elérheti, például a *P. mammillata* egyedeinek vérében ~20 mM a vanádium-koncentráció,[23] míg a legnagyobb értéket (~350 mM-t) az *Ascidia gemmata* faj esetében mérték.[24] H. Michibata és munkatársai kimutatták, hogy az elsődleges vanadocita (a fém tárolásáért felelős vanádiumtartalmú sejt) a pecsétgyűrű alakú vérsejt.[25] A vanádium jelentős része (több mint 90–95%-a)[26,27] +3-as, a többi pedig +4-es oxidációs állapotban van jelen a vérsejt sejtüregében jelentős mennyiségű szulfát- és hidrogénion mellett.[28] A V(III)-mennyisége és a mérhető pH között korreláció fedezhető fel: minél több a V(III), annál kisebb a pH (a fent említett *A. gemmata* faj esetében pH=1,86 értéket mértek).[24] Ezt egyrészt a V(III)-hoz koordinálódó vízmolekulák hidrolízisével, másrészt a felhalmozáshoz energiát biztosító V–ATPáz működésével magyarázzák. Egyelőre még nem teljesen tisztázott, hogy ezek az élőlények miért raktározzák el a vanádiumot, egyes feltételezések szerint az anyagcsere melléktermékeként halmozódik fel szervezetükben. Érdekesség, hogy ezt a fémtartalmat tartják a nyersolajok, olajpalák fő vanádiumforrásának.

1. ábra *Phallusia mammillata*

A vanádium a tengervízből vanadát(V) ($H_2VO_4^-$) formában jut be a zsákállatok szervezetébe a foszfát- és a szulfátcsatornákon keresztül.[15] A V(V)-öt a vérsejtekbe jutva V(IV)-gyé redukálják az ott található redukálószerek (pl. a pentóz-foszfát ciklusban termelődő NADPH), majd vanádiumkötő fehérjékhez, ún. vanabinokhoz[29] kötődve szállítódik a sejtüreg membránjához. A vanádium a sejtüregbe bejutva tovább redukálódik V(III)-má egyelőre ismeretlen folyamatokban. Különféle

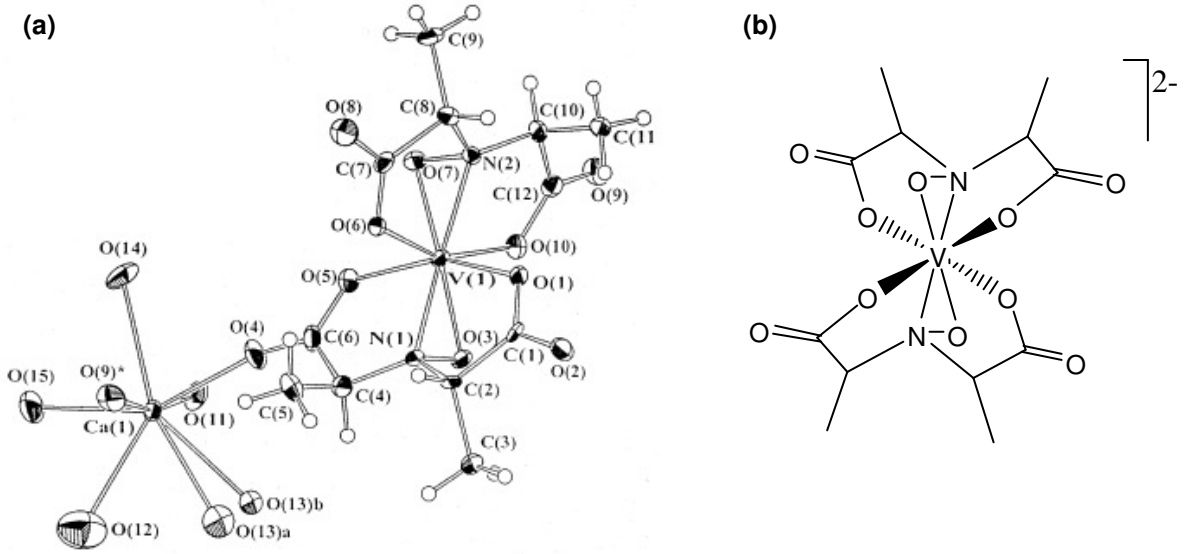
feltételezések szerint a zsákállatokban található tunikrómok (hidroxi-dopa egységekből álló peptid pigmentek) is fontos szerepet játszanak a vanádium felhalmozódásában (akár redukáló-, akár komplexképző szerként), bár ellentmond ennek az, hogy ezek a di- és trifenolszármazékok elsősorban más helyen: más típusú, korábban vanadocitának tartott vérsejtekben fordulnak elő.

1993-ban a tenger élővilágának egy másik képviselőjében, a soksertéjű gyűrűsférgek (*Polychaeta*) közé tartozó *Pseudopotamilla occelatá*ban (2. ábra) is nagy mennyiségű (~5-6 μg/g szárazanyagra nézve) vanádiumot mutattak ki. A vanádium itt is főleg V(III) formában dúsul fel az állat feji részében (a legyezőszerű kopoltyú koronában), a felhám apikális sejtüregeiben. A vanádium funkciója eddig ismeretlen, egyes feltételezések szerint az oxigén felvételében és tárolásában játszik szerepet.[30,31]

2. ábra *Pseudopotamilla occelata*

3. ábra *Amanita muscaria*

A galócák (*Amanita*) nemzetségébe tartozó gombafajok rendszerint mind tartalmaznak vanádiumot, ugyan jóval kisebb mennyiségben (1–400 ppm), mint a zsákállatok. A légyölő galóca (*Amanita muscaria,* 3. ábra) vanádium-tartalma néhány egyéb fajjal együtt azonban kiemelkedően magas: 36–250 ppm.[32] Ezekben a gombákban a vanádium egy oxocsoportot nem tartalmazó, „csupasz” V(IV)-komplexként fordul elő (4. ábra), melyet 1972-ben E. Bayer és H. Kneifel izolált először, és nevezett el amavadinnak.[33] Ebben a komplexben a vanádium koordinációs száma nyolc, a V(IV)-centrumhoz négy karboxilátcsoport és két, bidentát módon koordinálódó hidroxilamid-csoport kapcsolódik[34,35] (4. ábra). Biológiai funkciója ennek a vegyületnek sem ismert. Az amavadin



4. ábra a) Az anionos amavadin kristályszerkezete Ca^{2+} ellenionnal: $[Ca(H_2O)_5][\Delta\text{-}V(S,S\text{-hidpa})_2]\cdot 2H_2O$[34] hidpa: N-hidroxiimino-2,2’-dipropionsav. **b)** Az amavadin szerkezete

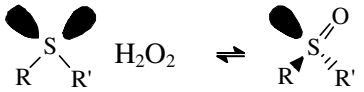
képes egyelektronos reverzibilis redoxifolyamatra biológiai rendszerekben. Bizonyos vanádium-vegyületekről közismert, hogy képesek oxotranszfer-reakciókat katalizálni, így egyes nézetek szerint ez a vegyület akár egy oxotranszfer enzim kofaktorának maradványa is lehet.[15]

Ismertek olyan vanádiumtartalmú enzimek (pl. a vanádiumfüggő haloperoxidázok és a vanádium-nitrogenáz enzim), melyekben a vanádium tölti be az aktív centrum szerepét. A vanádium és a molibdén közti átlós rokonságnak jelentős szerepe lehet ezeknek az enzimeknek a kialakulásában.

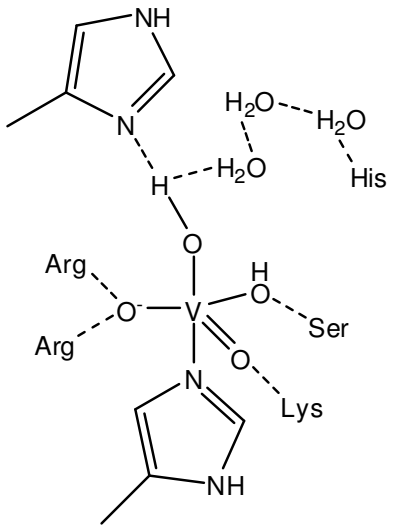
A vanádiumfüggő haloperoxidázok egymagvú V(V) kofaktort tartalmazó metalloenzimek, melyek a halogenidionok hidrogénperoxidos oxidációját katalizálják (1. egyenlet). A képződő hipohalogénessav különböző szerves szubsztrátokkal, nukleofil akceptorokkal (2. egyenlet) lép reakcióba; míg szubsztrát hiányában szingulett oxigént fejleszt. Ezek az enzimek tioéterek, valamint tiocianátok oxidációját is képesek katalizálni. Prokirális szulfoxidok esetében ez az oxotranszfer-reakció rendszerint enantioszelektíven (3. egyenlet) játszódik le.[15]

[1] $X^- + H_2O_2 + H^+ \rightleftharpoons HOX + H_2O$

[2] $HOX + RH \rightleftharpoons RX + H_2O$

[3] + 

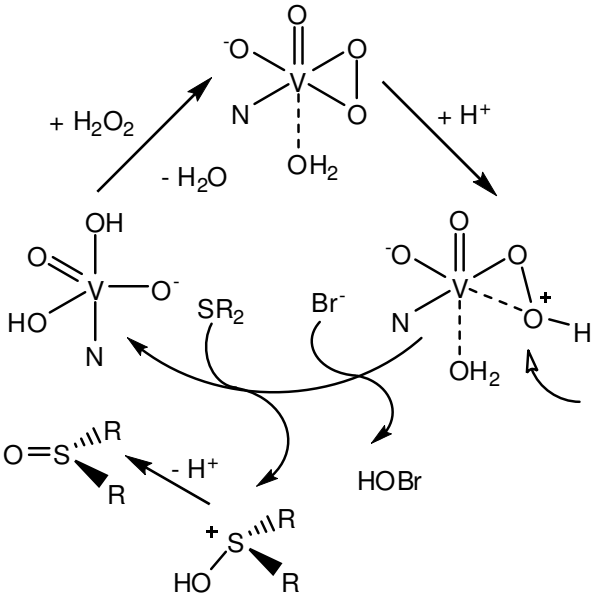
Az egyes vanádiumfüggő haloperoxidázok elnevezése azon alapszik, hogy melyik az a legelektronegatívabb halogenid, amelyiket az enzim még képes oxidálni. Így a kloroperoxidázok még a kloridiont is, a bromoperoxidázok a kloridiont már nem, de a bromid- és a jodidiont még igen, míg a jodoperoxidázok már csak a jodidiont képesek oxidálni. Az enzimcsalád leginkább a barnamoszatokban fordul elő, de több vörösmoszatban, egy zöldmoszatban, két gomba-, illetve egy zuzmófajban is kimutatták.[36,37] A tengeri moszatokban lévő bromo-/jodoperoxidázok közül az *Ascophyllum nodosum*[38] barnamoszatból és a *Corallina officinalis*[39] vörösmoszatból izolált enzimek röntgenkrisztallográfiás szerkezetét határozták már meg. A *Curvularia inaequalis*[40,41,42] penészgombában lévő kloroperoxidáz natív és peroxoformájának szerkezete is ismert. A különböző fajokban lévő enzimek aminosavsorrendjein elvégzett homológiai vizsgálatok alapján elmondható, hogy az aktív centrumban lévő, a vanádium környezetének kialakításában résztvevő aminosavak megegyeznek. A natív enzimben a vanádium +5-ös oxidációs állapotban van, a központi atom geometriája trigonális bipiramis (5. ábra). A fehérjezsebben lévő hidrogénvanadát központi fémcentrumhoz egy hisztidin-nitrogén koordinálódik közvetlenül, a szerkezetet a vanadát oxigénatomjai és a környező oldalláncok (egy hisztidin, két arginin, egy lizin és egy szerin) között létrejövő hidrogénhidak stabilizálják. A



5. ábra Az *Ascophyllum nodosum* bromoperoxidázának aktív centruma

feltételezett reakciómechanizmus szerint (6. ábra) a vanádium oxidációs száma nem, csak koordinációs száma változik a katalitikus folyamat egyes lépései során. Az enzim peroxoformájában a központi atom geometriája négyzetes piramisos. Valószínűsíthetően egy hidroperoxo átmeneti állapot biztosítja a halogenidionok nukleofil támadásának célpontját.

A vanádiumfüggő haloperoxidáz enzimek egyik legérdekesebb sajátossága, amit szintén homológiai vizsgálatok támasztanak alá, hogy szerkezeti rokonság mutatható ki köztük és egyes savas foszfatázok (pl. a glükóz-6-foszfatáz, *Escherichia blattae*-ban lévő bíborsavfoszfatáz) aktív centruma között.[43] Valószínűleg egy savas foszfatáz az eredete ezen haloperoxidázoknak. Ezek után nem meglepő, hogy a vanadátszegény peroxidázok foszfatáz-aktivitást is mutatnak, továbbá a vanadát inhibeált foszfatázok mérsékelt peroxidáz-aktivitással rendelkeznek. Szembeszökő hasonlóság figyelhető meg a vanádiumfüggő haloperoxidázok és a vanadáttartalmú foszfatázok aktív centruma között is.



6. ábra A haloperoxidázok feltételezett működési mechanizmusa

Az *Azotobacter* nemzetségbe tartozó nitrogénfixáló baktériumok (pl. *Azotobacter vinelandii, Azotobacter chroococcum*) képesek molibdénhiány és alacsony hőmérséklet esetén vanádium-nitrogenáz enzimet termelni a molibdén-nitrogenáz helyett.[15,44] Ez az enzim katalizálja a nitrogén reduktív protonálódását ammóniumionná. A vanádium egy vas-kén klaszterbe épül be, az egyik vasat helyettesíti. A vanádium koordinációs szférája valószínűleg hasonlít a FeMo-kofaktorban lévő molibdénére, azaz három, a szomszédos vas centrumokat és a vanádiumot összekötő hídként funkcionáló szulfidból, valamint egy hisztidinből és a homocitrát centrális karboxilát- és alkoxid-csoportjából áll.

1.2.2 Vanádium az emberi szervezetben

A vanádium nagyon kis koncentrációban (0,03–150 ng/g) az emberi szövetekben is megtalálható ultranyomelem, összmennyiségét a szervezetben körülbelül 100 μg-ra becsülik. Jelenlegi ismereteink alapján – biológiai funkciója és hiánybetegsége sem ismert – az ember számára nem tekinthető létfontosságú nyomelemnek. Oxidációs állapotától és a szervezetbe juttatott vegyületének tulajdonságaitól függően kis koncentrációban a vanádiumnak is lehet pozitív hatása a szervezet működésére, míg nagyobb mennyiségben mérgezővé válhat.

Egy átlagos ember számára a táplálékban lévő vanádiummennyiség fedezi a szervezete vanádiumigényét. A biztonságos és elegendő napi vanádiumbevitelt 10–50 μg között határozták meg. A vanádium elég sok élelmiszerben megtalálható: borokban, gyümölcslevekben, olajos magvakban és gabonafélékben is sikerült viszonylag jelentős mennyiségben kimutatni. A fűszernövények közül a petrezselyem, a kapor, a fekete bors, valamint egyes gombák és természetesen a tengeri élőlények: rákok, kagylók tartalmaznak nagyobb mennyiséget belőle. Ezekben általában +4-es, illetve +5-ös oxidációs állapotban fordul elő. A gyomor savas körülményei közt a vanádium jelentős része V(IV)-gyé alakul, és ebben a formában halad keresztül az emésztőrendszeren, majd kiürül a szervezetből. Általában az elfogyasztott mennyiségnek csak igen kis része – rendes körülmények közt a természetes eredetű táplálékokban lévő vanádiumnak csupán 1–3%-a – szívódik fel, de ezt még számos tényező befolyásolja. Amellett, hogy milyen egyéb élelmiszermolekulák vannak a gyomorban, jelentős szerepe van a vanadát redukciósebességének is, mivel a V(V) 3–5-ször hatásosabban szívódik fel, mint a V(IV). Viszonylag keveset tudunk a vanádium anyagcseréjének mechanizmusairól (felszívódás, szállítás stb.) és a visszatartást befolyásoló tényezőkről. A vanadát feltehetően a foszfát, esetleg más aniontranszport segítségével juthat be a szervezetbe, míg a vérbe kerülve minden kétséget kizáróan $V^{IV}O$-gyé redukálódik különböző redukálószerek hatására, mint például a plazmában található aszkorbinsav, cisztein, illetve különböző katecholaminok, vagy a vörösvérsejtekben található redukált glutation által. A $V^{IV}O$ elsősorban a transzferrinhez kötve szállítódik a vérben, és a vasban gazdag szervekben dúsul fel (máj, lép), ahol jelentős mennyiségű $V^{IV}O$ kötődik a ferritinhez.[45] A vanádium vizelettel és ürülékkel távozik a szervezetből. Érdekes, hogy a vizeletben talált vanádium egy része transzferrinhez kötődik.[45] A kiürülés idejét az életkor, a táplálkozási szokások, valamint a foglalkozási terhelés és számos központi idegrendszeri megbetegedés (pl. mániákus depresszió, *sclerosis multiplex*) befolyásolja. Megnövekedett vanádiumterhelés hatására vanádium halmozódhat fel egyes szervekben: a vesében, a májban, a lépben, a tüdőben, az izomzatban és a csontokban, de megtalálható a nyálban és az anyatejben is. A legnagyobb koncentrációt a vesében (5–15 ppm) és a csontokban érheti el (5–25 ppm).[46] A csontban a $V^{IV}O$ a foszfátionhoz koordinálódik.[47]

A vanádium viszonylag mérgező elem az ember számára, különböző akut és krónikus mérgezési tüneteket vált ki. Bőrön keresztül nem igazán szívódik fel, így nem mérgező, viszont belélegezve már veszélyes lehet. Lenyelve sem jelent nagyobb kockázatot a csekély felszívódás miatt,

viszont közvetlenül a véráramba juttatva igen. Állatkísérletek alapján lenyelve napi 10-20 mg/nap vagy 10-20 μg/g már mérgező, míg az embernél 20 mg V_2O_5 intravénásan beadva már akut tüneteket vált ki: légúti elváltozások, görcsök jelentkeznek, zöld nyelv, valamint fokozott nyálképződés, hányás, hasmenés, és alacsony testhőmérséklet stb. figyelhető meg. Természetesen a vanádiumvegyület természetétől is függ a toxicitás mértéke. Általában a V(V)-öt mérgezőbbnek tartják, mint a V(IV)-et,[48,49] valószínűleg a jobb felszívódás és a sejtszintű folyamatokban való nagyobb mértékű részvétele miatt. Ellentmond ennek az, hogy újabb vizsgálatok különböző vanádium(IV/V)komplexek toxicitását összehasonlítva – egér fibroblaszt sejteken végzett *in vitro* mérések alapján – a vegyületek +5 állapotban bizonyultak kevésbé mérgezőnek.[50] A krónikus vanádiummérgezés különféle tüneteit igazolták, úgymint neurotoxicitást, hepatotoxicitást, nefrotoxicitást stb.

A vanádiumtartalmú ($VOSO_4$) étrendkiegészítők régóta népszerűek a testépítők körében. Úgy tartják, hogy ezek segítenek az izomtömeg növelésében és a vércukorszint kontrollálásában, bár a vanádium izomépítő hatását eddig nem tudták alátámasztani: egy, egészséges atléták részvételével végzett vizsgálat szerint még 0,5 mg/kg/nap orális dózis esetén sincs szignifikáns hatás.[51] Egyes magyar étrendkiegészítő készítmények is tartalmaznak vanádiumot, pl. a Béres Actival termékek 12 μg-ot.

1.2.3. Inzulinutánzó hatás

A vanádiumvegyületek közel harminc éve felfedezett inzulinutánzó, inzulinserkentő hatása kétségtelenül jelentős mértékben hozzájárult ahhoz, hogy megismerjük ennek az átmenetifémnek a biokémiáját. Azóta a vanádiumvegyületek és a cukorbetegség kapcsolatát kiterjedten vizsgálták.

A cukorbetegség modern korunk egyik leggyorsabban terjedő és legköltségesebb „járványa". Krónikus betegség, amely genetikai és környezeti tényezők együttes hatására jön létre anyagcserezavarok és érrendszeri szövődmények képében. Az anyagcserezavarra a vércukor rendellenesen magas szintje (hiperglikémia) jellemző, ami együtt jár a fehérje- és a zsíranyagcsere, valamint a só-víz és a sav-bázis háztartás zavaraival. Kezelés nélkül a hosszabb ideig fennálló hiperglikémia súlyos idült szövődményekhez vezet: elsősorban ér- és idegrendszeri, szemfenéki, valamint a vesét érintő komplikációk lépnek fel.

Cukorbetegségben a cukoranyagcserét alapvetően szabályozó peptidhormon, az inzulin hatása csökken, vagy azért, mert kevesebbet termel a hasnyálmirigy, vagy azért, mert a sejtek rezisztenssé válnak rá, emiatt a szervezet egyes sejtjei nem képesek a vérből a cukrot felvenni. Ez alapján definiálják a cukorbetegség két fő típusát: az I. típus az inzulinhiányos, más néven inzulinfüggő (IDDM: Insulin Dependent DM), míg a II. típus az inzulinrezisztens, azaz a nem inzulinfüggő (NIDDM: Non-Insulin Dependent DM) diabétesz. A két említett elsődleges csoport mellett megkülönböztetnek még egyéb alcsoportokat. A III. csoportba, a gesztációs cukorbetegek (GDM) közé azok tartoznak, akiknél a terhesség alatt lép fel először a diabétesz. Az anya szervezete

hormonokat termel a magzat kihordása érdekében. Ezek a hormonok egyes nők esetében zavart okoznak az anya szervezetének inzulinfelhasználásában, emiatt a kismama vércukorszintje megnő. Ha a jelenséget nem kezelik időben, anya és gyermeke számára egyaránt nagy veszélyt jelenthet. Az összes terhesség 3–5 %-ában figyelhető meg, és rendszerint szülés után normalizálódik, de az érintett nők kb. 50 %-ában évekkel később II. típusú diabétesz alakul ki. Egyéb specifikus típusba sorolnak számos, az inzulintermelést vagy inzulinhatást érintő genetikai eltérést, illetve számos egyéb betegséget, amelyek másodlagosan inzulinrezisztenciához és/vagy inzulinszekréció defektushoz vezetnek, ilyen például a hasnyálmirigy-gyulladás okozta pankreaszdiabétesz. Az összes eseteknek csak 1–2 %-a sorolható ide.

Az I. típusú DM-ben az inzulintermelő β-sejtek elpusztulása okozza az inzulinhiányt; általában autoimmun eredetű, fiatalkori megbetegedés, a cukorbetegek kb. 5–10%-át érinti. A kezelése inzulininjekció formájában történik. A II. típusú DM sokkal gyakoribb, a cukorbetegek kb. 90–95%-a szenved ebben. Bár a betegség kialakulásában fontos tényezők: a kor, a testsúly és bizonyos genetikai faktorok, a kifejlődésében az életmód is jelentős szerepet játszik. Ezt igazolja a betegek növekvő száma a világ fejlett társadalmaiban, így ez a típusú cukorbetegség mind elterjedésében, mind kimenetelében az egyik legnagyobb népegészségügyi probléma világszerte. A betegek általában jelentős súlytöbblettel rendelkező közép- és időskorúak. Szervezetükben ugyan jelen van az inzulin, de nem tudja kifejteni hatását, mert a célsejtek inzulinérzékenysége lecsökkent. Kezelése szigorú diéta mellett szintetikus gyógyszerekkel (pl. szulfanilureákkal, biguanidokkal, alfa-glukozidáz-gátlókkal, inzulinérzékenyítőkkel) folyik. Az inzulintermelő sejtek kimerülése után ebben az esetben is szükséges inzulinadagolás.

Említést érdemel, hogy a háziállatok körében is egyre gyakoribb a II. típusú DM. Elterjedése hasonló okokra vezethető vissza, mint az embereknél: elhízás, mozgásszegény életmód, nem megfelelő táplálkozás. Egyes kereskedelemben kapható macskaeledelek rengeteg szénhidrátot tartalmaznak, miközben a macskáknak húsevőként erre nincs szükségük. Esetükben az inzulinterápia még nehézkesebb, így az állatorvosi gyakorlatban is igen szükséges egy megfelelő orálisan alkalmazható gyógyszer bevezetése.

Az inzulin a hasnyálmirigy Langerhans szigeteinek β-sejtjei által termelt hormon, molekulatömege közel 6 kDa, összesen 51 aminosavból áll, amelyek két polipeptidlánc között oszlanak meg: az A-lánc 21, a B-lánc 30 aminosavból épül fel, két diszulfidkötés kapcsolja össze a láncokat, és egy további diszulfidhíd található az A-láncban. Az inzulin a megemelkedett vércukorszint hatására termelődik. Elősegíti a glükóz, az aminosavak és a zsírsavak véráramból történő felvételét, majd aktiválja ezek intracelluláris felhasználásának/raktározásnak enzimeit (glükogenezis ↑, lipogenezis ↑ és fehérjeszintézis ↑), gátolja a glükoneogenezist és az ellenregulációs hormonok (pl. glükagon) által kiváltott katabolikus folyamatokat, mint például a glükogén, a zsír és a fehérje lebontását (glükogenolízis ↓, lipolízis ↓ vagy ketogenezis ↓).

Az inzulint felfedezése óta (1922) alkalmazzák a cukorbetegség terápiájában. F. G. Banting és J. J. Macleod 1923-ban orvosi és élettani Nobel-díjat kaptak felfedezésükért. Sajnos a terápia során csak injekció útján lehet a peptidet a szervezetbe bejuttatni, mivel a szájon át bevett inzulin nem szívódik fel, nagy része lebomlik az emésztési folyamatokban. Igen sok cukorbeteg szeretné az inzulininjekciót tablettás kezelésre átváltani, és a gyógyszeripar világszerte sokféle kutatást végez ennek a problémának a megoldására.

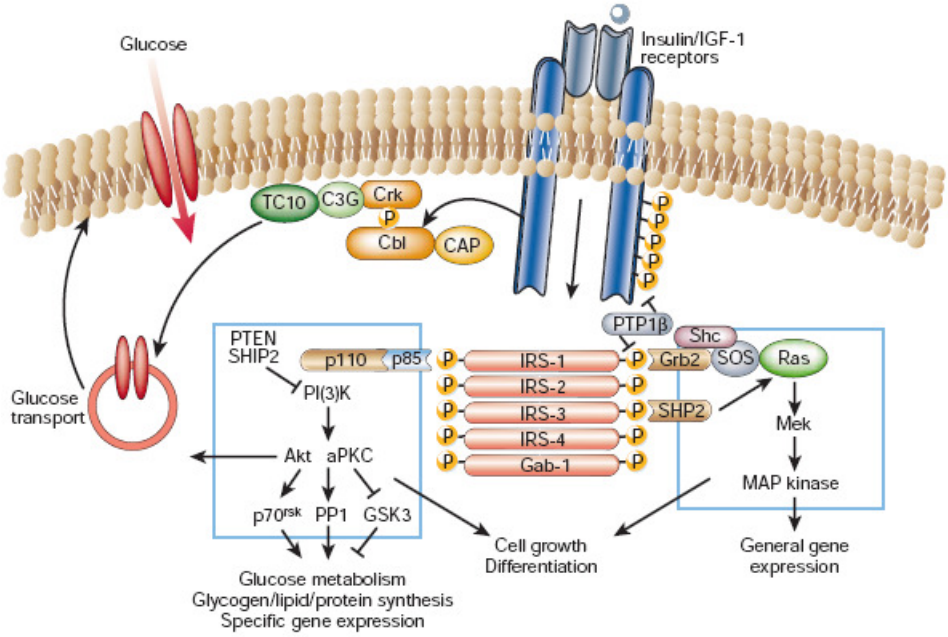
Vanádiumvegyületekről már régóta köztudott, hogy csökkentik a vércukorszintet: az első feljegyzés az inzulin felfedezését is megelőzve 1899-ből származik.[52] Az 1980-as években került ismét az érdeklődés középpontjába a vanádiumkémiának ez a területe. 1979-ben jelent meg az első közlemény a szájon át adott vanadát *in vitro* és 1985-ben az *in vivo* inzulinutánzó hatásáról. Azóta számtalan *in vitro* kísérletet végeztek különböző inzulinérzékeny sejttípusokon (pl. izom-, zsír- és májsejteken) vanádiumvegyületekkel.[50,53,54,55,56] Ezek során a vanádium gyakorlatilag minden téren az inzulinhoz hasonló hatást mutatott.[57,58,59] Stimulálta a glükózfelvételt és -oxidációt, a glükogénszintézist, a lipoprotein lipázaktivitását, a lipogenezist és visszaszorította a lipolízist. A szükséges vanádiummennyiség a μM – mM tartományban mozogott nemcsak a vegyülettípustól, hanem a kezelés időtartamától függően (általában kisebb dózis szükséges egy hosszabb távú kezelés során).

Vanádiumtartalmú vegyületekkel számos inzulinszerű hatást sikerült kiváltani mindkét típusú cukorbetegség esetén *in vivo* vizsgálatok során is. Ezeket a kísérleteket leggyakrabban ún. állatmodelleken hajtották végre: az STZ (streptozotocin hatására elölik a hasnyálmirigy β-sejtjeit) és a BB (spontán diabéteszes BioBreeding Wistar) patkányokon, az I. típusú diabétesz modelljein vagy génmutáció révén II. típusú diabéteszes ob/ob vagy db/db egereken, esetleg a Zucker fa/fa patkányokon.[57,60,61] Korlátozott számban humán kísérleteket is folytattak.[62,63,64] Általában pozitívan hatott a kezelés a vércukorszintre, a zsíranyagcserére, a testsúlyra stb. Ráadásul számos kulcsfontosságú, cukor- és zsíranyagcsere-folyamatokat szabályozó enzim abnormális működése is helyreállt. A perifériás szövetek inzulinérzékenysége és ennek következtében ezek glükóz-felhasználása is javult. A kívánt inzulinszerű hatás általában valamivel hosszabb idő után jelentkezett az *in vivo* kísérletek során, mint az *in vitro* esetekben, miközben a hatás a kezelést követően, a vanádiumbevitel leállítása után is tartott még egy ideig. Ez arra utal, hogy a célsejt elérése időbe kerül a sejtvonalaknál összetettebb rendszerben, valamint a szervezetben a terápia során bizonyos mértékben felhalmozódik a vanádium. Fontos hangsúlyozni, hogy a plazma inzulinszintje nem nő a kezelések alatt, így nem az inzulintermelés serkentése révén hat a vanádium.

Azonban minden pozitívuma ellenére az inzulin természetesen nem cserélhető vanádiumra. Az a megfigyelés, hogy a vanádium glükózszintcsökkentő hatása függ az endogén inzulin mennyiségétől, felveti a kérdést, hogy a vanádium az inzulin teljes hiányában is hat-e, vagy csupán inzulinérzékenyítő hatása van. [65]

A vanádium fiziológiás hatását elsősorban a vanadát- és a foszfátionok közti kémiai hasonlóságra, a köztük lévő geometriai és elektronszerkezeti analógiára vezetik vissza. A vanadátion – amely HVO_4^{2-} formájában négyes koordinációjú – mind geometriailag, mind sav-bázis tulajdonságaiban emlékeztet a foszfátionra, viszont azzal ellentétben képes ötös és hatos koordinációjú adduktumok képzésére, valamint geometriaváltásra is. Feltételezhető, hogy hatékony és reverzibilis inhibitora lehet az összes olyan enzimnek, amely a foszfátion vagy a foszforilált vegyületek reakcióit katalizálja.

A vanádiumvegyületek inzulinszerű hatásának pontos mechanizmusa jelenleg még nem teljesen ismert. Az inzulin aktiválja az inzulinreceptort azáltal, hogy hozzákötődik. Ez a receptor egy transzmembrán glikoprotein, amely diszulfidhidakkal kovalensen összekapcsolt két α és két β alegységből áll. Az inzulin az extracelluláris α alegységhez kötődik, a β alegység egy rövid extracelluláris részből, egy transzmembrán doménből és egy intracelluláris részből áll, amely az inzulin által szabályozott tirozinkináz-aktivitásért felelős. Ahogy az inzulin α alegységhez kötődik, megváltozik a receptor konformációja. Ennek hatására az egyik β alegység tirozin oldalláncokat foszforilál a szomszédos β alegységben. Beindul a 7. ábrán feltüntetett szignál transzdukciós kaszkád.



7. ábra Az inzulin kötődésének hatására működésbe lépő szignál transzdukció kaszkádok. Ezt a szemléletes ábrát a [66] cikkből vettük, a lépések részletes bemutatását lásd ott

A vanádiumvegyületek számos ponton hatást gyakorolhatnak erre a reakciósorozatra. Az inzulinreceptor (IRE),[67] az inzulinreceptor-szubsztrát 1 (IRS-1), a foszfatidilinozitol 3-kináz (PI(3)K),[68] a mitogén aktivált protein kináz (MAP kinase)[69,70] és a riboszomális S6 kináz[70] aktiválását is dokumentálták már. Általában úgy tartják, hogy nem a kaszkád kezdetén fejti ki a vanádium a hatását, mivel a quercetinnel blokkolt receptorok esetén is hatásos. Így az inzulinutánzó hatás inkább a foszfotirozin-foszfatáz enzimek inhibeálásához köthető, és nem az inzulinreceptor β alegységében

jelenlévő fehérje-tirozinkináz aktiválásához.[57] Következésképpen a vanádiumvegyületek hatásmechanizmusa sokrétű, és különbözik az inzulinétól,[60] ráadásul a különböző vanádiumvegyületek (pl. eltérő oxidációs állapotban) részben eltérő módon hathatnak.

Különböző vanádiumkomplexek előállítása és inzulinutánzó hatásuk tesztelése a 1980-as években kezdődött azzal a céllal, hogy nagy biológiai aktivitású, kis toxicitású, jól felszívódó, a gyógyászatban alkalmazható vegyületet találjanak az egyébként hatásos, csak az alkalmazott mennyiségben kismértékben mérgező nátriumvanadát helyett.

Fémtartalmú gyógyszerek kifejlesztése során a kívánt biológiai aktivitással rendelkező fémion megfelelő komplexét kell megtervezni, előállítani, majd jellemezni. A ligandumok szerepét nem lehet eléggé hangsúlyozni: a biológiai hatása az alkalmazott vegyület, komplex módosításával finomhangolható. A ligandumok szerepe sokrétű:

(1) módosíthatják a fémion (orális/szisztematikus) biohozzáférhetőségét;

(2) elősegíthetik a fémion célba juttatását bizonyos szövetekben, enzimekhez;

(3) szállíthatják, tárolhatják vagy esetleg kiüríthetik a fémiont a szervezetből attól függően, hogy milyen stabil komplexet képeznek;

(4) biztosíthatják a szövetek védelmét a toxikus fémionok esetében;

(5) vagy épp ellenkezőleg növelhetik a szövetek farmakológialag hasznos fémionfelvételét;

(6) módosíthatják a vegyület reaktivitását vagy épp az inertségét.

Olyan funkciós csoportok beépítése, melyek kedvezően kötődnek membránreceptorokhoz (pl. glikozil részek) vagy természetes hormonokat képesek utánozni, elősegítik a ligandumok célspecifitását és közben hozzájárulnak a fémkomplexek szélesebbkörű diagnosztikai és gyógyászati alkalmazásához.

Egy kifejlesztett hatóanyag tesztelése a molekuláris és a sejtbiológiai laboratóriumokban kezdődik *in vitro* és *in vivo* körülmények közt, és több év kell ahhoz, hogy klinikai kipróbálásra, majd mindennapi használatba kerüljön gyógyszer formájában. A klinikai tesztek I. fázisában általában kevés, önként vállalkozó egészséges emberen vizsgálják a tolerált dózist, a hatóanyag metabolizmusának sebességét, kiürülését a szervezetből, azaz farmakokinetikáját. Az előállított komplexek közül mind a mai napig egyedül a bisz(etilmaltoláto)oxovanádium(IV) (BEOV) vett rész ilyen klinikai vizsgálaton (Medeval Ltd., Manchester, UK), mely pozitív eredménnyel zárult.[71]

Az állatmodelleken tesztelt hatásos vanádiumkomplexek jelentős része semleges $V^{IV}O$-biszkomplex[72,73] változatos donoratomokkal (O_4,O_2N_2, O_2,S_2, N_2,S_2, S_4)[74]. Vizsgáltak ezen felül peroxovanadát- és V(III)vegyületeket is.[72,73] Egy összehasonlító *in vitro* vizsgálat szerint nincs lényeges különbség a vizsgált több, mint húsz komplex hatásának mértékében.[50] Ezek a vegyületek szájon át adva minden kétséget kizárólag elbomlanak, a hordozóligandumok disszociálnak a savas kémhatású (pH~2) gyomornedvekben még akkor is, ha semleges pH-n a komplexek eléggé stabilisnak bizonyultak. Megfelelő kapszulázási technikával „becsomagolt” tabletta esetében elkerülhető, hogy a komplex a gyomor körülményei közt szétessen, így a felszívódás során még fontos szerepe lehet a hordozóligandumnak. Viszont a biológiai nedvek endogén vagy exogén fémionkötő kis- és

nagymolekulái részben vagy egészében kiszoríthatják ezeket a molekulákat a $V^{IV}O$-komplexeikből. A vegyes ligandumú komplexképződés lehetősége tehát nem hagyható figyelmen kívül. Kutatócsoportunk korábban már tanulmányozta, hogy egyes potenciális inzulinutánzó $V^{IV}O$-komplexek milyen kölcsönhatásba lépnek a vérszérum kis és nagy molekulatömegű alkotóival. A transzferrin $V^{IV}O$ mono- és biszkomplexének stabilitása ismeretében az mondhatjuk, hogy a legtöbb tesztelt hordozóligandum[75,76,77,78,79] azonos koncentráció esetén nem versenyezhet a transzferrin oxovanádiumkötő képességével. A véráramba kerülve a komplex szétesik, és a ligandumnak valószínűleg nincs további meghatározó szerepe.

1.3. Az oxovanádium(IV)ion oldatkémiája, koordinációs kémiája

Vizes oldatban a vanádium pH~2-nél $V^{V}O_2^{+}$, $V^{IV}O^{2+}$, V^{3+}, illetve V^{2+} hidratált ionként fordul elő, ez utóbbi azonban a pH növekedésével redukálja a vizet.[5] A vanádium(IV) az egyik legstabilisabb oxidációs állapota a vanádiumnak, jellemző vegyületei $V^{IV}O^{2+}$ egységet tartalmaznak. A vanadil kation a legstabilisabb kétatomos kation, illetve a legstabilisabb oxoion az átmenetifémek első sorában.[5,80]

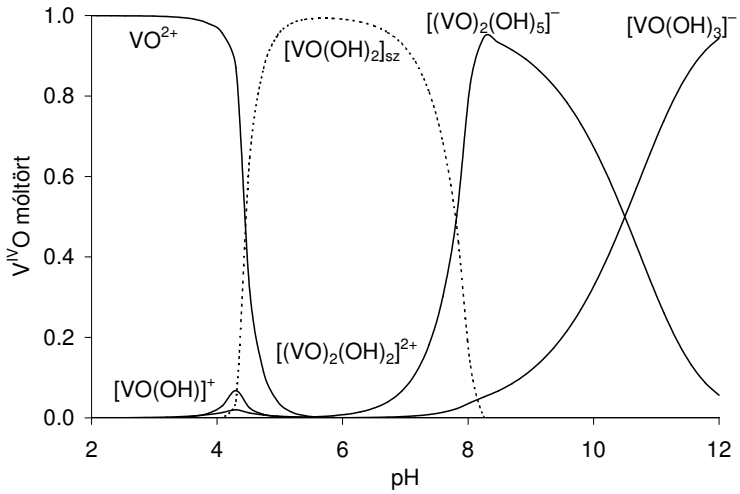
2. táblázat A $V^{IV}O$-hidroxokomplexek stabilitási állandói ($M_pL_qH_r$)

(p, q, r)	részecske	lgβ	hivatkozás
(1, 0, –1)	$[VO(OH)]^{+}$	–5,94	[81]*
(2, 0, –2)	$[(VO)_2(OH)_2]^{2+}$	–6,95	[81]*
(2, 0, –5)	$[(VO)_2(OH)_5]^{-}$	–22,5	[82]
(1, 0, –3)	$[VO(OH)_3]^{-}$	–18,0	[83]

* A Davies egyenlet segítségével a 0,2 M ionerősségre átszámolva

A $V^{IV}O^{2+}$ savas közegben $[VO(H_2O)_5]^{2+}$ összetételű kék színű akvakomplexet képez. A pH növelésével megfelelő komplexképző ligandum hiányában a fémion hidrolizál. Koncentrációtól függően körülbelül pH~4-nél $[VO(OH)]^{+}$ és $[(VO)_2(OH)_2]^{2+}$ összetételű hidroxokomplexek képződnek,[84] majd kiválik a világoskék színű $VO(OH)_2$ csapadék.[85] Ez a csapadék – az oxovanádium(IV)ion amfoter karaktere miatt – lúgosabb közegben (pH ~ 8) hidroxokomplexek képződése közben visszaoldódik. Az ekkor képződő komplexek minden bizonnyal többmagvú részecskék, összetételük meglehetősen bizonytalan. A meghatározást nehezíti lassú képződésük, oxidációra való hajlamuk. Míg a $V^{IV}O$ vizes oldata savas körülmények között (pH<3) nem érzékeny a levegő oxigénjére, viszont semleges és lúgos közegben igen. A feltételezett részecskék a következők: $[(VO)_2(OH)_5]^{-}$,[86] $[(VO)_4(OH)_{10}]^{2-}$,[87,88,89] $[(VO)_2(OH)_6]^{2-}$,[88] $[VO(OH)_3]_n^{n-}$,[80] $[VO(OH)_3]^{-}$.[90] A rendszer bizonytalansága a meghatározott egyensúlyi állandókban is jelentkezik. A megfelelő adatok hiányában csak közelítő, pH~6 felett maximum a tendenciákat jellemző eloszlásgörbe ismertethető a $V^{IV}O$ hidrolíziséről az irodalomban fellelhető stabilitási állandók alapján (2. táblázat).

A méréseink kiértékelése során alkalmazott, a fémion hidrolízisét leíró modellt a 2. táblázat, a képződő részecskék eloszlásgörbéjét a 8. ábra tartalmazza (a felhasznált oldhatósági szorzat $L(VO(OH)_2) = 1{,}08\times10^{-22}$) [85].

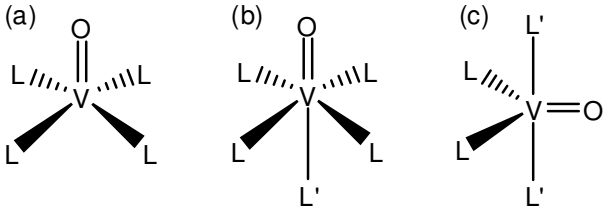


8. ábra A $V^{IV}O$-hidrolízis eloszlásgörbéje ($[V^{IV}O]_{tot}$ = 0,001 M; I=0,20 M KCl)

A vanádiumkomplexek geometriája függ a koordinációs számtól, a formális oxidációs számtól és a koordinálódó ligandumok elektromos és sztérikus természetétől. Néhány biológiai példa a koordinációs szám változatosságára: 8-as koordinációs szám van a nem-oxo, azaz csupasz V(IV)-et tartalmazó amavadinban, 6-os a vanádiumtartalmú nitrogenáz enzimben és a $V^{IV}O$–transzferrin komplexben, 5-ös a vanádiumfüggő haloperoxidázokban, a vanadát(V)–uridin–ribonukleáz A enzimben vagy a $V^{IV}O$–porfirin komplexben, míg 4-es van a vanadát(V)–ribonukleáz T_1 komplexben.

A vanádium(IV)komplexek jelentős többsége V=O kötést tartalmaz, csak meglehetősen erős komplexképzők (pl. katecholok, hidroxámsavak) képesek ezt vizes oldatban megbontani. A $V^{IV}O^{2+}$ képes stabilis kationos, anionos vagy semleges komplexet is képezni sokféle ligandumtípussal.

A vanadiloxigén jelenléte a komplexek geometriájára (9. ábra) is jelentős hatással van. A $V^{IV}O^{2+}$ általában (a) 5-ös koordinációs számú tetragonális piramisos komplexet vagy (b) 6-os koordinációjú torzult oktaéderes vagy tetragonális bipiramisos komplexet képez. A vanadiloxigén a piramis csúcsán (axiálisan), míg a vanádium kissé az ekvatoriális donoratomok által definiált sík felett (0,035–0,055 Å-mel) helyezkedik el. Nagy térkitöltésű ligandumok, esetleg egyéb okok miatt kialakulhat a trigonális bipiramis (c) elrendeződés is, de a $V^{IV}O$-tól nem idegen a teljesen torzult geometria sem.



9. ábra A $V^{IV}O$-komplexek lehetséges geometriái: (a) tetragonális piramis, (b) tetragonális bipiramis vagy torzult oktaéder, (c) trigonális bipiramis

A vanadiloxigénhez képest ekvatoriális pozícióban található ligandumok kötődése erősebb, valamint kevésbé labilis, mint az axiálisban lévőké. Számos kétfogú ligandum biszkomplexe esetében

egy speciális cisz-transz izoméria alakul ki, attól függően, hogy a koordinációs szférában található vízmolekula cisz vagy transz helyzetben van-e a vanadiloxigénhez képest.

Összehasonlítva a $V^{IV}O$-komplexek stabilitási állandóit az Irwing-Williams sorban található fémionok (Cu^{2+}, Ni^{2+}, Co^{2+}, Fe^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+}) megfelelő állandóival megállapítható, hogy a csak oxigéndonoratomot tartalmazó komplexképzők esetében (oxálsav, malonsav, szalicilsav stb.) a $V^{IV}O^{2+}$ ion még a Cu(II)ionnál is stabilisabb komplexet képez, számos esetben akár nagyságrendekkel is. A csak nitrogén donoratomokat tartalmazó ligandumok esetében a $V^{IV}O$-komplexek stabilitása nagyságrendekkel kisebb, mint a Cu(II)komplexeké, csak a Fe(II) kompexeivel mérhető körülbelül össze. Az oxigén és nitrogén donoratomokat vegyesen tartalmazó ligandumok esetén a komplexek stabilitása nagyjából a Cu(II)- és a Ni(II)komplexek stabilitása közé esik. Mindez összhangban van azzal, hogy a $V^{IV}O$ ion inkább a „hard" fémionok csoportjába sorolható: oxigén donoratomot tartalmazó komplexképzőkkel erősebb kölcsönhatásra képes, mint nitrogént tartalmazókkal, bár mindezek ellenére a tiolát kénhez való kötődése sem elhanyagolható.[80]

A szilárd $V^{IV}O$-komplexek röntgenszerkezetét összehasonlítva megállapítható, hogy a nitrogén donoratomok általában messzebb találhatóak, mint az oxigén donorok, természetesen a kötéstávolság függ a donoratom minőségétől is. Az oxigén esetében fenolát < alkoholát < karboxilát < víz, míg nitrogén esetében amid < imin ≅ amin < aromás N sorrend állítható fel.[80]

2. Alkalmazott vizsgálati módszerek, kísérleti körülmények

2.1. Felhasznált anyagok

A mérésekhez a kereskedelmi forgalomban kapható vegyszereket az Aldrich, a Fluka vagy a Reanal cégektől szereztük be. A pH-potenciometriás titrálásokhoz használt KOH (Fluka) puriss., a HCl (Reanal) a.l.t. minőségű volt. Az ionerősség beállításához használt KCl-oldatot a Reanal cég a.l.t. minőségű termékéből készítettük.

A $V^{IV}O^{2+}$ ionnal történő komplexképződés tanulmányozásához ~0,20 M koncentrációjú $V^{IV}OCl_2$ törzsoldat megfelelő mennyiségeit használtuk. A fémion törzsoldatot Nagypál István és Fábián István módszerének[91] módosításával a.l.t. minőségű nátriumvanadát (Fluka) vizes oldatából készítettük. A vanádium(V) redukálása sósavas közegben kéndioxiddal, az így keletkező szulfátionok eltávolítása báriumkloriddal (Reanal) történt. Ez az oldat három évig eltarthatónak bizonyult. Az újabb $V^{IV}OCl_2$ törzsoldatot már $V^{IV}OSO_4 \cdot xH_2O$-ból (min. 97%, Aldrich) készítettük, a szulfátionokat ebben az esetben is báriumkloriddal távolítottuk el. A $V^{IV}O^{2+}$ iont savas közegben tároltuk – a törzsoldatok ~0,2 M koncentrációban sósavat is tartalmaztak –, hogy a fémion oxidációját elkerüljük.

A $V^{IV}OCl_2$ törzsoldat pontos fémion-koncentrációját permanganometriás, illetve cerimetriás, míg a pontos hidrogénion koncentrációját pH-potenciometriás titrálással határoztuk meg. A pH-metriás titrálást a fémion hidrolízise (a vanádiumhidroxidok megjelenése) előtt befejeztük, majd az adott szakaszt Gran-módszerrel[92] kiértékeltük. A törzsoldat savtartalmának ismeretében a fémion-koncentrációt pH-potenciometriásan is ellenőriztük. A $V^{IV}O^{2+}$ ionhoz tízszeres feleslegben laktátsót adtunk, majd mértük a komplexképződés során felszabaduló hidrogénion mennyiségét. Az alkalmazott α-hidroxi-karbonsavsó esetében a komplexképződés során két ekvivalens proton szabadult fel $V^{IV}O^{2+}$ iononként.[93,94]

A vizsgált ligandumok közül a D-glükársav min. 98% (Aldrich), a galaktársav min. 95,8% (Sigma), a piridoxamin min. 99,0% (Fluka) tisztaságú, míg a maltol, a dipikolinsav, az adenozin-5'-trifoszfát (ATP) és a redukált glutation (GSH) puriss. minőségű (Sigma) volt. A kereskedelmi forgalomban nem kapható ligandumokat az együttműködő portugál kutatócsoport (Centro Química Estrutural, Instituto Superior Técnico, Lisszabon, a csoport vezetője: Prof. João Costa Pessoa) munkatársai: Isabel Correira (pyr_2en, $rpyr_2en$)[2] és Susana Marcão (sal_2dpa, sal_2orn)[3] állították elő. A szintézishez Merck, Sigma, Aldrich vagy Calbiochem vegyszereket használtak. Az előállított ligandumok tisztaságát elemanalízissel, ^1H NMR-méréssel és pH-potenciometriás titrálással ellenőriztük.

2.2. pH-potenciometria

Elméleti háttér

A ligandumok protonálódási állandóit, valamint a képződött komplexek összetételét és stabilitási állandóit potenciometriás módszerrel határoztuk meg.

Vizes oldatban lejátszódó, egyensúlyra vezető reakciók vizsgálatára a pH-potenciometria kiválóan alkalmas minden olyan esetben, amikor a reakció lejátszódása protontermelődéssel vagy -fogyással jár. Ekkor az oldat pH-ja és az oldatba merülő pH-szelektív üvegelektróddal mért potenciál is megváltozik.

A gyenge bázis ligandumok esetében a hidrogénion és a fémion verseng a ligandum kötőhelyeiért. A komplexképződés során a fémion a részben vagy teljesen protonált ligandumról képes egy vagy akár több protont is leszorítani. Így az oldat pH-jának követésével következtetni lehet a képződő komplexek összetételére és stabilitására.

Egy $M_pL_qH_r$ összetételű komplex bruttó stabilitási állandóját (β_{pqr}) az alábbi általános komplexképződési egyensúly alapján a következő [1] képlettel definiálhatjuk:

$$pM + qL + rH \rightleftharpoons M_pL_qH_r \qquad \beta_{pqr} = \frac{[M_pL_qH_r]}{[M]^p[L]^q[H]^r} \qquad [1]$$

M a fémiont, L a teljesen deprotonált ligandumot, H a protont jelöli a feltüntetett egyenletekben. A töltéseket az egyszerűség kedvért nem jelöljük. A komplexek esetében a p és a q sztöchiometriai együttható csak pozitív egész szám lehet. Eközben az r lehet negatív egész szám is abban az esetben, ha hidroxidiont jelöl, vagy ha a fémion hatására a ligandum olyan funkciós csoportja deprotonálódik, amely egyébként nem deprotonálódna a mérhető pH-tartományban. A fenti egyenletek p = 0 mellett a ligandum sav-bázis folyamatait, míg q = 0 esetében a fémion hidrolízisét leíró egyenletekké egyszerűsödnek, r = 0 esetben viszont nincs pH-effektus, a reakció pH-potenciometriásan nem követhető.

A keresett állandókat a komponensekre felírható anyagmérlegek nemlineáris egyenlet-rendszerének megoldása szolgáltatja, ahol c_M, c_L és c_H az egyes komponensek teljes koncentrációját, n a képződő asszociátumok számát, p, q, r és β_{pqr} a feljebb ismertetett sztöchiometriai együtthatókat és a bruttó stabilitási állandót, míg [M], [L] és [H] az egyes komponensek egyensúlyi (szabad) koncentrációját jelöli.

$$c_M = [M] + \sum_{i=1}^{n} p_i \beta_{pqr} [M]_i^p [L]_i^q [H]_i^r \qquad [2]$$

$$c_L = [L] + \sum_{i=1}^{n} q_i \beta_{pqr} [M]_i^p [L]_i^q [H]_i^r \qquad [3]$$

$$c_H = [H] + \sum_{i=1}^{n} r_i \beta_{pqr} [M]_i^p [L]_i^q [H]_i^r \qquad [4]$$

Bizonyos esetekben egy adott komplexkémiai reakcióra nézve informatívabb az adott folyamatra jellemző egyensúlyi állandó, amelyet a reakcióban részt vevő és a reakció során keletkező komplexek stabilitási állandóiból származtathatunk.

$$M_pL_qH_r \rightleftharpoons M_pL_qH_{r-1} + H^+ \qquad pK_{pqr} = \lg\beta_{pqr} - \lg\beta_{pq(r-1)} \qquad [5]$$

$$ML + L \rightleftharpoons ML_2 \qquad \lg K_{ML_2} = \lg\beta_{ML_2} - \lg\beta_{ML} \qquad [6]$$

$$M + ML_2 \rightleftharpoons 2\ ML \qquad \lg(K_1/K_2) = 2\cdot\lg\beta_{ML} - \lg\beta_{ML_2} \qquad [7]$$

Vegyes ligandumú rendszerek esetében a kompetíciós reakció a következő egyenlettel írható le, és az alábbi stabilitási állandóval jellemezhető:

$$pM + q^AA + q^BB + rH \rightleftharpoons M_pA_{q^A}B_{q^B}H_r \qquad \beta_{pq^Aq^Br} = \frac{[M_pA_{q^A}B_{q^B}H_r]}{[M]^p[A]^{q^A}[B]^{q^B}[H]^r} \qquad [8]$$

A és B két különböző ligandumot, míg q^A és q^B a megfelelő sztöchiometriai együtthatókat jelöli. A megoldandó nemlineáris egyenletrendszer pedig a következőképp alakul:

$$c_M = [M] + \sum_{i=1}^{n} p_i\beta_{pq^Aq^Br}[M]_i^p[A]_i^{q^A}[B]_i^{q^B}[H]_i^r \qquad [9]$$

$$c_A = [A] + \sum_{i=1}^{n} q_i^A\beta_{pq^Aq^Br}[M]_i^p[A]_i^{q^A}[B]_i^{q^B}[H]_i^r \qquad [10]$$

$$c_B = [B] + \sum_{i=1}^{n} q_i^B\beta_{pq^Aq^Br}[M]_i^p[A]_i^{q^A}[B]_i^{q^B}[H]_i^r \qquad [11]$$

$$c_H = [H] + \sum_{i=1}^{n} r_i\beta_{pq^Aq^Br}[M]_i^p[A]_i^{q^A}[B]_i^{q^B}[H]_i^r \qquad [12]$$

Az MAB összetételű terner komplexek statisztikus mértékű képződésére számítható egy stabilitási állandó a törzskomplexek stabilitási állandóinak felhasználásával:

$$\lg\beta_{MAB}^{stat} = \frac{1}{2}\cdot(\lg\beta_{MA_2} + \lg\beta_{MB_2}) + \lg 2 \qquad [13]$$

A mért stabilitási állandó és a statisztikus állandó különbségét stabilizációs állandónak nevezzük:

$$\Delta\lg\beta = \lg\beta^{mért} - \lg\beta^{stat} \qquad [14]$$

Az MAB összetételű komplexek stabilitását jellemezhetjük még a keverési állandóval (X) és a kicserélődési vagy megoszlási állandóval (K_M).[95,96,97,98] Ezek az állandók a következő reakciók alapján és az alábbi egyenletek segítségével számíthatók ki:

$$MA_2 + MB_2 \rightleftharpoons 2\ MAB \qquad \lg X = 2\cdot\lg\beta_{MAB} - \lg\beta_{MA_2} - \lg\beta_{MB_2} \qquad [15]$$

$$MA + MB \rightleftharpoons MAB + M \qquad \Delta\lg K_M = \lg\beta_{MAB} - \lg\beta_{MA} - \lg\beta_{MB} \qquad [16]$$

A $\Delta\lg K_M$ összehasonlítja a B ligandumnak az M fémionhoz és az MA komplexhez, valamint az A ligandumnak az M fémionhoz és az MB komplexhez való koordinálódását. A $\Delta\lg K_M$ és a lgX értéke közvetlenül nem függ a ligandum bázicitásától.

A terner komplexek stabilitását befolyásoló tényezőket két csoportba sorolhatjuk. Egyrészt lehetnek közvetett hatások, amelyekben a ligandumok közvetlenül a fémionhoz koordinálódnak: a) töltéssemlegesítődés, b) sztérikus tényezők (nagy térkitöltésű csoportok, kelátgyűrű mérete, a

koordinációra képes donoratomok száma nagyobb, mint a rendelkezésre álló koordinációs helyek száma), c) bizonyos 3d fémionok és heteroaromás N-bázisok közötti π viszontkoordináció (különösen, ha a másik ligandum O-donor). A másik csoportba a közvetlen intarmolekuláris ligandum-ligandum kölcsönhatások tartoznak: a) kovalens kötés képződése (pl. Schiff-bázis képződés), b) ionos kölcsönhatások a koordinált ligandumok ellentétes töltésű oldalláncai között, c) hidrogénkötés-képződés a fémionhoz kötött két ligandum között, d) aromás gyűrűk π elektronrendszerei közötti hidrofób „stacking" kölcsönhatás.[95,96,97]

Kísérleti körülmények

A pH-potenciometriás titrálásokat vizes közegben, inert atmoszférán (Ar), állandó hőmérsékleten (25,0 ± 0,1 ^{o}C), állandó ionerősség (I = 0,20 M, KCl) és állandó keverés mellett végeztük. Az argon gázt közvetlenül a reakcióelegyekbe buborékoltattuk minden titrálás során, illetve már megkezdésük előtt legalább 5 percig. A levegő kizárását a rendszerből az indokolta, hogy a $V^{IV}O$-ion oxidációra hajlamos, továbbá a levegő széndioxidtartalma lúgos közegben zavaró pH-effektust okoz. A minták állandó ionerősségét (0,20 M) megfelelő mennyiségű, 1,00 M koncentrációjú KCl-oldatnak a titrálandó oldathoz való hozzáadásával biztosítottuk. Ez az ionerősség jó pontossággal megegyezik a KOH titrálóoldat koncentrációjával, ugyanakkor jóval nagyobb, mint a titrálandó oldat fémion- és ligandumkoncentrációjának az összege, ezáltal biztosítható a titrálás során az állandó ionerősség. A titrálandó oldatok kiindulási térfogata rendszerint 20–25 cm^3 volt, amennyiben ehhez nem állt elegendő mennyiségű ligandum rendelkezésre, kisebb térfogatokban végeztük a méréseket (5–10 cm^3).

A titrálószert, a 0,20 M-os KOH-mérőoldatot frissen kiforralt, majd inert atmoszférán (Ar) lehűtött kétszeresen ioncserélt vízből és ezzel előzőleg karbonátmentesre mosott KOH pasztillából készítettük. A mérőoldat hatóértékét pontos beméréssel készült 0,0500 M-os kálium-hidrogén-ftalát oldat pH-potenciometriás titrálásával határoztuk meg. A mérőrendszer kalibrációjához, a savas pH beállításához, esetleges visszatitrálásokhoz használt 0,20 M-os HCl-mérőoldatot tömény HCl-oldatból hígítással készítettük, pontos koncentrációját a 0,20 M-os KOH-mérőoldattal határoztuk meg.

A titrálásokat személyi számítógép által vezérelt Metrohm (Dosimat 665 vagy 765) automata bürettából és Orion (710A vagy 720) pH-mérőhöz csatlakoztatott Metrohm (6.0234.100 vagy 6.0222.100) kombinált üvegelektródból álló mérőrendszerrel hajtottuk végre. Minden mérés előtt elvégeztük a pH-mérő egypontos kalibrációját melyhez 0,0500 M-os kálium-hidrogén-ftalát oldatot használtunk (25,0 ^{o}C-on ennek a puffernek a pH-ja 4,005). A teljes mérőrendszer kétpontos kalibrációját is minden nap legalább két alkalommal végrehajtottuk. Az egyik pontot a már említett 4,005-ös pH-jú kálium-hidrogén-ftalát oldat jelentette. Míg a másik pontot, a vízionszorzat negatív logaritmusát (pK_v) egy erős sav (HCl) – erős bázis (KOH) titrálás módosított Gran-módszer[92] szerint történő kiértékelésével határoztuk meg. A kiértékelés során az ún. Irving-faktort[99] (IRV), a savas és lúgos ághoz rendelhető ekvivalenciapontokat (Ep_s, Ep_l) is meghatároztuk. Az Irving-faktor a mért pH-

érték, illetve a tényleges pH közötti konstans eltérés, mely figyelembe veszi az aktivitási együtthatót, illetve az elektród-elektrolit határfelületen fellépő határfelületi potenciált. A két ekvivalenciapont közti eltérés jellemzi a mérőrendszer hibáit: a lúg mérőoldat esetleges karbonátszennyezését, az elektród nernsti funkcióktól való eltérését. A kalibrációt akkor fogadtuk el, ha pK_v értéke[100] 13,755±0,010 volt (egyébként a pH-mérő beállításain módosítottunk), illetve ha a két ekvivalenciapont közötti különbség nem haladta meg az 1%-ot.

A titrálások során a vezérlőprogram minden egyes mérőoldat-adagolás után megfelelő ideig várt az egyensúly beállására, majd rögzítette a mérőoldatfogyás (cm^3) – pH adatpárokat, az egyensúly beálláshoz szükséges időt. A vezérlést oly módon választottuk meg, hogy a titrálási pontok között 0,1 pH-egység különbség legyen. Azt az állapotot tekintettük egyensúlynak, amikor a ligandumtitrálások és a kalibrálások esetében 15 másodpercig, a fémes titrálásoknál pedig 40 másodpercig $\Delta pH \leq 0{,}002$ volt. A fémes titrálások esetében a hosszabb várakozási időt a $V^{IV}O$-ion kinetikailag inertebb volta indokolja. A pH stabilizálódására maximálisan 10 percet vártunk, amennyiben ez az adott pontban nem következett be, abban az esetben azt a kiértékelésből kihagytuk.

A fémes mérések során használt koncentrációkat, fémion – ligandum arányokat, illetve a mérhetőnek (illeszthetőnek) bizonyult pH-tartományokat lásd a függelékben.

A pH-potenciometriás mérések kiértékelését számítógépes programok segítségével végeztük el. A titrálási adatokból a keletkező komplexek stabilitási állandóit a PSEQUAD[101] programmal számítottuk ki. Ehhez meg kellett még adni az egyes minták pontos fémion-, ligandum-, proton-koncentrációját, azaz az egyes komponensek (M, L, H) teljes koncentrációját, a ligandum savi disszociációs állandóit, valamint a fémion hidrolízis állandóit és a kalibrációval meghatározott Irving-faktor értékét is. A számolások során ortogonális illesztést alkalmaztunk, a térfogat-pH hibaarányt 1:1-nek állítottuk be. A ligandumtörzsoldatok pontos koncentrációját, illetve savtartalmát, valamint a ligandumok protonálódási állandóit legalább két különböző koncentrációjú (0,002 és 0,004 M) ligandumtitrálás alapján határoztuk meg a SUPERQUAD program[102] segítségével. A kapott stabilitási állandó értékek alapján a rendszerre jellemző koncentrációeloszlási görbéket a SED program segítségével szerkesztettük meg.

A számítások során a $V^{IV}O$ négy hidroxokomplexének rendelkezésünkre álló stabilitási állandóját vettük figyelembe (lásd 2. táblázat). A két pozitív töltésű hidrolízis részecske ($[VO(OH)]^+$, $[(VO)_2(OH)_2]^{2+}$) stabilitási állandójának nagysága a kiértékelést gyakorlatilag nem befolyásolja, hiszen az alkalmazott koncentrációtartományban (1-4 mM) jelentősebb előfordulásuk esetén (> 5%) a rendszerből kicsapódó $VO(OH)_2$ a további mérést lehetetlenné teszi. A másik két részecskének mind az összetétele, mind stabilitási állandójának értéke meglehetősen bizonytalan, továbbá a megjelenésük során észlelt lassú folyamatra magyarázattal szolgálhat esetleg az oxidációra való érzékenységük is. Ennek értelmében a speciácó azokon a pH-tartományokon, ahol a hidrolízisrészecskék megjelennek, csupán a tendenciák leírását szolgálhatja.

2.3. Oxovanádium(IV)komplexek elektrongerjesztési spektroszkópiája

Elméleti háttér

A vanádium elektronkonfigurációja +4-es oxidációs állapotban [Ar]$3d^1$. A d pályák degeneráltsága komplexképződés során a ligandumok erőterének hatására megszűnik. Különböző energiájú termekre hasadnak fel a ligandumok erősségétől, koordinációs számtól, és képződő komplexek szimmetriaviszonyaitól függően. Ahogy az 1.3. fejezetben is említettük a vanádium(IV) – oxofilitásának köszönhetően – a komplexek túlnyomó többségében oxovanádium(IV)ion formában fordul elő. Az oxocsoport jelenléte egyrészt a képződő komplex geometriáját, szimmetriaviszonyait, másrészt a d-pályák energiasorrendjét befolyásolja, mivel jelentős az oxocsoport axiális ligandumtér hozzájárulása (10. ábra).

A vanádium(IV)vegyületek elektrongerjesztési spektrumaiban a közeli IR-től egészen az UV-tartományig megjelenő sávok:

(1) a d-d átmenetekhez (lásd alább);

(2) a központi fémion és a ligandum közötti töltésátviteli folyamatokhoz

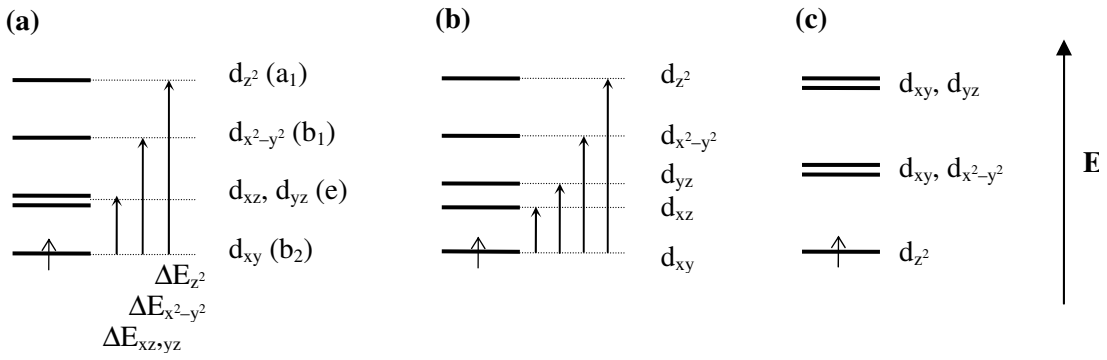
(fémion → ligandum: $d_\pi \rightarrow \pi$ vagy ligandum → fémion: $\pi \rightarrow d_\pi$);

(3) a ligandum molekulán belüli ($\pi \rightarrow \pi^*$ és $n \rightarrow \pi^*$) átmeneteihez rendelhetők.

Ezek közül a Laporte-tiltott, spin megengedett, d-d átmenetekhez tartoznak a kisebb energiájú sávok, maximum négy. A moláris abszorbancia értékek általában ~20 – ~200 $dm^3mol^{-1}cm^{-1}$ között változhatnak, [103] de „csupasz”, nem-oxo vanádium(IV)-et tartalmazó katecholáto- vagy hidroxamáto-komplexek esetében ez ~5000 – 7000 $dm^3mol^{-1}cm^{-1}$ is lehet.[104]

A $V^{IV}O$-komplexek esetében általánosnak mondható a torzult oktaéderes vagy tetragonális bipiramisos geometria, melynek megfelelően ezek a komplexek a C_{4v} pontcsoportba tartoznak (négyszeres forgástengellyel és függőleges tükörsíkkal rendelkeznek). A párosítatlan d elektron egy az xy síkban lévő σ nemkötő pályán van (10. ábra). Az x és y tengelyek az ekvatoriálisan koordinálódó ligandumok, míg a z tengely a V=O kötés irányába mutat. A d pályák energiasorrendje Ballhausen és Gray[105] szerint a $[VO(H_2O)_5]^{2+}$ esetében $3d_{xy} < 3d_{xz} = 3d_{yz} < 3d_{x^2-y^2} << 3d_{z^2}$ (vagy másképp $b_2 < e < b_1 < a_1$). A $[VO(H_2O)_5]^{2+}$ elektrongerjesztési spektrumában három, d-d átmenethez rendelhető sáv detektálható: (1) $d_{xy} \rightarrow d_{xz,yz}$: λ_{max} = 760 nm, (2) $d_{xy} \rightarrow d_{x^2-y^2}$: λ_{max} = 625 nm, (3) $d_{xy} \rightarrow d_{z^2}$: λ_{max} = 350–400 nm. A legnagyobb energiájú sávot más $V^{IV}O$-komplexek esetében a sokkal intenzívebb töltésátviteli sávok gyakran elfedik, vagy csak vállként jelentkezik az ultraibolya tartományban. Az $e(d_{xz,yz})$ és $b_1(d_{x^2-y^2})$ szintek relatív energiáját elsősorban az ekvatoriálisan koordinálódó ligandumok σ donor erőssége és a V=O π kötés közti egyensúly szabja meg. A biológiai rendszerekben jelenlevő vegyes ligandumú komplexek vagy kelátgyűrűk kialakulása számos esetben a szimmetria csökkenéséhez vezethet, amikor megszűnik a d_{xz} és d_{yz} pályák elfajultsága, és ilyenkor egy újabb abszorpciós sáv jelenhet meg a spektrumban (pl. a C_{2v} szimmetria esetében lásd 10. ábra).

A nem-oxo komplexek geometriája öttagú kétfogú kelátképzőkkel a trigonális prizmához közelít, amely esetben az oxovanádium párosítatlan elektronjának alapállapota az általános d_{xy} helyett a d_{z^2} pályára kerül. Mindez természetesen a spektrális, többek között az ESR-paraméterek drámai megváltozásával is együtt jár (a jellemző $g_{zz} < g_{xx} \cong g_{yy} < 2{,}0023$ és $A_{zz} > A_{xx} \cong A_{yy}$ helyett a $g_{xx} \sim g_{yy} < g_{zz} \sim 2{,}0023$ és $A_{zz} << A_{yy} \sim A_{xx}$).



10. ábra (a) A C_{4v} és **(b)** a C_{2v} szimmetriával rendelkező $V^{IV}O$-komplexek, illetve **(c)** a D_{3h} V^{IV}-komplexek d pályáinak energiaszint-diagramja

Kísérleti körülmények

A látható elektrongerjesztési spektrumok felvételéhez a HP8452 diódasoros, Hitachi U-2000 és Perkin-Elmer lambda 9, illetve Jasco Uvidec 610 spektrofotométert alkalmaztunk. A vizsgált hullámhossztartomány a diódasoros készülék mellett 350-820 nm, míg a többi készülék esetében 400-900 nm volt. Rendszerint a spektrofotometriás mérésekhez 1 vagy 3 cm-es úthosszúságú küvettát használtunk. A mintaelőkészítés során inert atmoszférán dolgoztunk (Ar vagy N_2). Minden esetben állandó fémion-ligandum arányok mellett az elektrongerjesztési spektrumok pH-függését vizsgáltuk. Az alkalmazott koncentráció és fémion-ligandum arányokat lásd az adott rendszereket tárgyaló alfejezetekben.

2.3. Oxovanádium(IV)komplexek CD-spektroszkópiája

Elméleti háttér

A cirkuláris dikroizmus spektroszkópia az optikailag aktív molekulák fontos vizsgálati módszere. Az optikai aktivitás feltétele, hogy a molekulának ne legyen másodrendű szimmetriaeleme (tükörsíkja, inverziós centruma, tükrözésesforgástengelye). A jobbra és a balra cirkulárisan polarizált sugárzás elnyelődése optikailag aktív közegben eltérő lesz, aminek eredményeként elliptikusan poláros fényt kapunk. A síkban polarizált fény két összetevőjének különböző abszorpcióját cirkuláris dikroizmusnak, vagy felfedezőjéről Cotton-effektusnak nevezik. A kétféle fénysugár abszorpciójának különbségét ($\Delta\varepsilon$) a hullámhossz (λ) függvényében ábrázolva megkapjuk a cirkuláris dikroizmus (CD) görbét. A CD-görbe maximumai, illetve minimumai az elektrongerjesztési abszorpciós spektrum maximuma helyén, illetve ahhoz igen közel jelentkeznek.

A $V^{IV}O$-komplexek optikai aktivitása a koordinálódó ligandum saját – a komplexképződés előtt is meglevő – kiralitásától, vagy a komplexképződés során a központi fémionon vagy a ligandumon létrejövő aszimmetriától származhat. A $V^{IV}O$-ion geometriájából adódóan nagy számú optikai izomer képződésére van lehetőség. Akkor is felléphet optikai izoméria, ha a $V^{IV}O$-ion körül a síknégyzetes geometria pszeudotetraéderessé torzul. Akirális komponensekből (fémion, ligandum) képződő királis komplexek esetében a két enantiomer mindig azonos arányban lesz jelen az oldatban: racém elegyet kapunk; az ellentétes előjelű, azonos nagyságú Cotton-effektusok kioltják egymást. Csak kinetikailag inert komplexek esetében lehet elválasztani és vizsgálni ezeket az enantiomer-párokat. Amennyiben a ligandum a komplexképződés előtt is királis volt, akkor a komplexképződés során kapott oldat is optikailag aktív lesz. Királis ligandumokkal képződő $V^{IV}O$-komplexek esetében minél közelebb van a kiralitáscentrum a központi fémionhoz (kromofor csoporthoz), annál erősebb Cotton-effektust tapasztalhatunk a d-d tartományban. Viszont a fémionhoz kapcsolódó különböző donorcsoportok nem azonos hatásfokkal továbbítják a királis információt. Például a di- és tripeptidek Cu(II)-komplexeinek esetében a hatásosság az alábbi sorrendben csökken: amidnitrigén > deprotonált amidnitrogén > karboxilátoxigén > aminonitrogén.[106]

Kísérleti körülmények

A CD-méréseket a lisszaboni partner intézetnél (Centro Química Estrutural, Instituto Superior Técnico) végeztük Prof. João Costa Pessoa, Isabel Correira és Susana Marcão közreműködésével. A spektrumokat JASCO 720 spektropolariméteren, állandó hőmérsékletre termosztált (25,0±0,3 °C)) vizes oldatokban vettük fel. A vizsgált hullámhossztartomány jelen esetben 400–1000 nm volt (a készülék a 200–700 nm tartományban is képes mérni), és 2 cm-es úthosszúságú küvettákat használtunk. A mintaelőkészítés során inert atmoszférán dolgoztunk (N_2), állandó fémion-ligandum arányok mellett a minta pH-ját változtattuk. Az alkalmazott koncentráció és fémion-ligandum arányokat lásd az adott rendszereket tárgyaló alfejezetekben.

2.4. Oxovanádium(IV)komplexek ESR-spektroszkópiája

Elméleti háttér

Az elektronspin-rezonancia (ESR) spektroszkópia párosítatlan elektront tartalmazó (paramágneses) molekulák és ionok fontos vizsgálati módszere. Elektronspin-rezonancia lép fel, ha a külső mágneses térben pörgő elektron spinállapota elektromágneses sugárzás hatására átfordul. A rezonanciaabszorpció energiáját az alábbi egyenlet írja le:

$$E = h\nu = g_e \cdot \mu_B \cdot H_{lokális} = g \cdot \mu_B \cdot H \qquad [17]$$

Az egyenletben h a Planck állandó, ν a besugárzás frekvenciája, g_e az elektron g-tényezője, μ_B a Bohr-magneton, $H_{lokális}$ a lokális mágneses tér, g a komplex (vagy gyök) g-tényezője és H az alkalmazott mágneses tér.

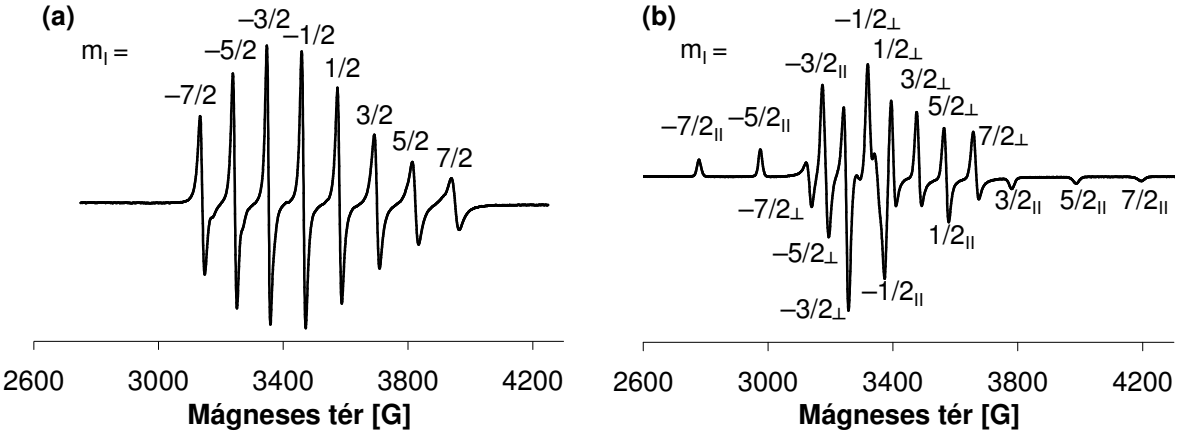
Az ESR-spektroszkópiában azt mérjük, hogy milyen mágneses térnél jön létre rezonancia a részecskék és az alkalmazott monokromatikus sugárzás között. A gyakorlatban használt berendezések a konstans frekvenciájú (X-band: ~9 GHz, Q-band: ~35 GHz) elektromágneses sugárzás mellett a mágneses teret változtatják. A rezonanciaabszorpcióhoz tartozó mágneses tér – azaz az abból meghatározható g-tényező – a paramágneses mag elektronikus (egyben kémiai) környezetéről szolgáltat információt. A komplex és az elektron g-tényezője közti eltérés attól függ, hogy az alkalmazott tér milyen lokális elektronáramokat indukál a vizsgált komplexben. Az ESR-spektrumban a mért abszorpció energiájának első deriváltját ábrázoljuk a mágneses térerő függvényében. A spektrumvonalak integrált intenzitása a részecskék koncentrációjáról, míg a sávok vonalszélessége a cserefolyamatok sebességéről, valamint a szimmetriaviszonyokról nyújt felvilágosítást.

A fémion és a koordinálódó ligandum magspinjeinek hatására hiperfinom, illetve szuper-hiperfinom felhasadás jelentkezhet a spektrumban. A felhasadás oka az, hogy a magok mágneses momentumától származó mágneses tér hat a párosítatlan elektronok mágneses momentumára. Általános esetben egy I spinű mag a spektrumban olyan finomszerkezetet hoz létre a $\Delta S = 1$, $\Delta I = 0$ átmenetnek megfelelően, amely $(2 \cdot I + 1)$ számú, azonos intenzitású vonalból áll.

A párosítatlan elektronra – a $V^{IV}O$-komplexek szerkezetéből adódóan – a tér különböző irányaiba eltérő hatások hatnak. Szobahőmérsékleten, oldatfázisban, kis molekulatömegű komplexek esetében ezek az eltérések kiegyenlítődnek, izotróp spektrumot kapunk. Szilárd mintáknál, fagyasztott oldatoknál, illetve nagyméretű metalloproteinek szobahőmérsékletű oldatmintáinál axiális, esetleg rombos spektrumról beszélhetünk attól függően, hogy milyen a komplex szimmetriája.

A vanádium +4-es oxidációs állapotban paramágneses, egy párosítatlan elektronnal rendelkezik (d^1 elektronkonfigurációjú, $S = 1/2$). Ennek az elektronnak a relaxációsebessége más átmenetifém-ionokéhoz hasonlítva viszonylag kicsi, ezáltal a $V^{IV}O$-komplexek ESR-spektruma még szobahőmérsékleten is viszonylag keskenyek sávokból áll. A 99,76 % természetes gyakoriságú ^{51}V izotóp magspinje $I = 7/2$, így a $V^{IV}O^{2+}$ ionnak és komplexeinek vizes oldatban szobahőmérsékleten nyolc hiperfinom vonalból álló, jellegzetes ESR-spektrumuk van (a 11. (a) ábrán látható izotróp

spektrum A_0 és g_0 paraméterekkel jellemezhető). A lefagyasztott oldatok és kristályok spektruma általában axiális: nyolc párhuzamos és nyolc merőleges sávból áll (11. (b) ábra, paraméterei: $g_{\parallel} = g_z$, $g_{\perp} = g_x = g_y$ és $A_{\parallel} = A_z$, $A_{\perp} = A_x = A_y$). Szimmetriaviszonyoktól függően a spektrum rombos torzulást mutathat ($A_x \neq A_y$ és $g_x - g_y > 0{,}006$), mivel C_{4v}-nél alacsonyabb (pl. C_{2v}, D_{2h}, D_2) szimmetriájú komplex esetében mágneses „in-plane" anizotrópia léphet fel. Viszont az ilyen alacsony szimmetriájú komplexek spektruma is lehet rombos helyett axiális, az ezt eredményező mechanizmust R. L. Belford és munkatársai írták le. [107] Ezek alapján a mágneses szimmetriából nem feltétlenül következtethetünk a komplex szimmetriájára.



11. ábra A $[VO(H_2O)_5]^{2+}$oldatának "X-band" ESR-spektruma **(a)** szobahőmérsékleten (RT), **(b)** cseppfolyós nitrogénben (LT)

A $V^{IV}O$-komplexek esetében a d^1 elektron alapállapotban a nemkötő d_{xy} pályán található, szuperhiperfinom kölcsönhatás is elképzelhető az elektron és a vanádium ekvatoriális környezetében található magok között. Az erre jellemző csatolási állandó értéke általában kisebb a természetes vonalszélességnél (ami ~10G)[80], ennek folytán az ESR-spektrumban szuperhiperfinom felhasadás nem jelentkezik (egy pár kivételtől eltekintve: pl. ^{31}P)[108]. Pulzustechnikákkal (ESEEM, ENDOR) ezek a kölcsönhatások is mérhetőek. Az axiálisan koordinálódó donorcsoport gyakorlatilag nincs hatással az ESR-spektrumra, mivel meglehetősen távol esik a d_{xy} síkban található elektrontól.

A komplexképződés során, a ligandumtér erősségének növekedésével az ESR-paraméterek is változnak: a g-tényező értéke nő, miközben a csatolási állandó értéke csökken. Ez utóbbi jól detektálható, széles tartományban változik az ekvatoriális síkban koordinálódó donorcsoportok minőségének függvényében: a gyenge ligandumterű vízmolekulától ($[VO(H_2O)_5]^{2+}$: $A_0 = 106{,}3\times10^{-4}$ cm^{-1}; $A_{\parallel} = 182{,}6\times10^{-4}$ cm^{-1}), az erős ligandumterű komplexképző CN^--ig ($[VO(CN)_5]^{3-}$: $A_0 = 77\times10^{-4}$ cm^{-1}; $A_{\parallel} = 138\times10^{-4}$ cm^{-1}). A különböző donoratomokat tartalmazó komplexek viszonylag jól elkülöníthető csoportokat képeznek az A_o–g_o illetve $A_{\parallel}$–$g_{\parallel}$ diagrammokon. [80] Tehát a $V^{IV}O$-komplexek ESR-paraméterei (A, g) ismeretében javaslatot tehetünk a központi atom ekvatoriális síkjában található donorcsoportok minőségére. A mágneses tér dimenziójában megadott csatolási állandó értéke készülékfüggő (függ az alkalmazott elektromágneses sugárzás frekvenciájától). Az

összehasonlíthatóság kedvéért a csatolási állandókat hullámszám dimenzóban (A [cm^{-1}]) célszerű megadni az alábbi összefüggésnek megfelelően:

$$A[cm^{-1}] = \frac{g \cdot \mu_B \cdot a}{h \cdot c} \qquad [18]$$

ahol *g* a komplex g-tényezője, μ_B a Bohr-magneton [$J \cdot T^{-1}$], *a* a csatolási állandó [T] (1 T = 10^4 Gauss), *h* a Planck állandó [$J \cdot s^{-1}$] és *c* a fénysebesség [$cm \cdot s^{-1}$].

K. Wüthlich[109] javasolta, később N. D. Chasteen[80] továbbfejlesztett, majd V. L. Pecoraro és munkatársai[110] kiegészítették azt az empirikus megfigyelést miszerint a csatolási álladó értéke (A_o, $A_{\|}$) becsülhető az ekvatoriális donoratomok egyedi hozzájárulásának értékeiből:

$$A_{0,becs.} = \sum_i A_{0,i} \quad \text{vagy} \quad A_{\|,becs.} = \sum_i A_{\|,i} \qquad [19]$$

A párhuzamos csatolási állandó számított és mért értéke között kisebb az eltérés, mint $1{,}5 \times 10^{-4}$ cm^{-1} az izotróp, illetve 3×10^{-4} cm^{-1} az axiális spektrumok esetében. A csatolási állandó egyedi hozzájárulás értékeit (3. táblázat) rendszerint modellvegyületek alapján határozták meg. Bár a geometria és az axiális pozícióban található koordináció jelentősen nem befolyásolja a csatolási állandó értékeket, ennek ellenkezőjére is található példa az irodalomban: az imidazolgyűrű és az ekvatoriális sík által bezárt szög jelentősen befolyásolja az imidazol egyedi hozzájárulását[111], valamint az imidazol és kisebb mértékben a tiocianát axiális koordinációja megváltoztatja az $A_{\|}$ értékét.[112,113]

3. táblázat Az oxovanádium(IV)ionhoz ekvatoriálisan koordinálódó donorcsoportok egyedi csatolási állandó hozzájárulás értékei [10^{-4} cm^{-1}].

koordinálódó csoport	**$A_{\|}$ hozzájárulás**	**A_o hozzájárulás**	**hivatkozás**
H_2O	45,7	26,6	80
imidazol (merőleges helyzetben)	45,5		110
alifás imin	44,4		110
Cl^-	44,1		110
Amid oxigén (DMF, HC(O)NRR')	43,7		110
Ar-COO^-	42,7	25,03	80
R-COO^-	42,7	24,43	80
PO_4^{3-}	42,5		110
piridin-N	40,3	21,9	80
R-NH_2	40,1	20,95	80
imidazol (párhuzamos helyzetben)	40		110
OH^-	38,7	20,23	80
Ar-O^-	38,6	20,48	80
acetil-acetonát (1O ekv.)	37,6		110
R-O^-	35,3	17,18	80
Ar-S^-	35,3	17,78	80
R-S^-	31,9	16,58	80

A kétmagvú $V^{IV}O$-komplexek esetében a paramágneses központi fémionok közt mágneses kölcsönhatás lép fel. Ennek köszönhetően a két ion csatolásakor egy szingulett (S=0), illetve egy triplett (S=1) állapot jön létre $-J \cdot S_1 \cdot S_2$ energiakülönbséggel. A triplett szintek felhasadása (M_s= 1, 0, –1) a mágneses dipol-dipol kölcsönhatás és az anizotóp spinkicserélődéstől függ. Ha a paramágneses kölcsönhatás gyenge, a zérus-tér felhasadás kizárólag a dipol-dipol kölcsönhatás eredménye. A zérustér felhasadás értékéből (D) a csatolódó centrumok távolságára és egymáshoz viszonyított helyzetére tudunk következtetni. Abban az esetben, ha túl nagy a távolság a kölcsönható ionok közt, D értéke kicsi, a zérus-tér felhasadás finomszerkezete nem, csak egy széles, pszeudoizotróp jel figyelhető meg. Viszont, ha a távolság túl kicsi (D értéke nagy), nem detektálható ESR-jel.

A zérus-tér felhasadás ESR-paraméterei (D, g) valamint a $V^{IV}O$-centrumok közti távolság (R), és a ϑ szög (a $V^{IV}O$-ionok koordinációs síkjára merőleges egyenes és a két fémiont összekötő egyenes által bezárt szög) közti kapcsolatot a Stevens egyenlet[114] írja le:

$$D = \frac{0{,}325 \cdot g_{\parallel}^{2}}{R^{3}} \left| 1 - 3 \cdot \cos^{2} \vartheta \right| \qquad [20]$$

A $V^{IV}O$-centrumok közti távolság kifejezésére egy másik független összefüggés[115] is ismert, mely csak abban az esetben érvényes, ha D kizárólag a dipol-dipol kölcsönhatás eredményeként lép fel:

$$D = 1{,}39 \times 10^{4} \left(\frac{g}{R^{3}} \right) \qquad [21]$$

Ezen összefüggések alapján az ESR-paraméterekből a komplexek szerkezetére vonatkozóan kvantitatív információkhoz juthatunk.

Kísérleti körülmények

Az ESR-mérések egy része ($V^{IV}O$ – D-glükársav/galaktársav rendszerek) az olasz (University of Sassari, Department of Chemistry, Eugenio Garribba és Prof. Giovanni Micera közreműködésével), másik része (a dolgozatban tárgyalt összes többi rendszer) a portugál partner intézettel (Centro Química Estrutural, Instituto Superior Técnico, Isabel Correira, Susana Marcão és Prof. João Costa Pessoa közreműködésével) folyó együttműködés keretein belül készült.

Varian E-9 spektrométeren (9,15 GHz) T = 140 (LT) és 298 K-n (RT) , vizes oldatban történtek a $V^{IV}O$–aldársav rendszerekkel kapcsolatos mérések. A szobahőmérsékletű spektrumok erősítése a fagyasztott oldatokéhoz képest ötszörös volt, míg a spektrométer többi beállítása megegyezett. Fagyasztás előtt pár csepp DMSO-t is adtunk a mintákhoz, hogy megfelelő legyen az üvegképződés (a DMSO az alkalmazott kísérleti körülmények között nem koordinálódik a $V^{IV}O^{2+}$ ionhoz).

Az összes többi rendszer esetében egy Bruker ESR ER 200D X-band (9,43 GHz) spektrométerrel vettük fel a fagyasztott (T = 77 K), vizes minták LT ESR-spektrumát. A készüléket a $VOSO_4$ spektruma alapján kalibráltuk (g = 1,933 A = $182{,}6 \times 10^{-4}$ cm^{-1}), a lefagyasztás előtt 4% etilén-

glikolt adtunk a mintákhoz szintén a jobb üvegképződés érdekében (az etilénglikol koordinációjától is eltekinthetünk a vizsgálati körülményeink között).

Az alkalmazott koncentráció és fémion-ligandum arányokat lásd az adott rendszereket tárgyaló alfejezetekben. A vizsgált $V^{IV}O$-rendszerek ESR-spektrumait Rockenbauer Antal és Korecz László által ESR-spektrumok szimulációjára kifejlesztett programjával értékeltük ki, a részecskéket jellemző g-tényező, valamint A csatolási állandó értékét ezzel határoztuk meg.[116]

A szobahőmérsékletű minták ESR-spektruma izotróp, a fagyasztott mintáké általában axiális, míg néhány esetben rombos volt. A V=O kötés irányába eső, azaz a külső mágneses térrel párhuzamos átmenetekhez nagyobb hiperfinom csatolási állandó rendelhető, mint a merőlegesekhez. Ezért a felvett ESR-spektrumok a nagy térhez tartozó párhuzamos tartományának részletét (az m_I = +3/2, +5/2, +7/2 -hez tartozó átmeneteket) ábrázoltuk általában, mivel ezek a csúcsok a legérzékenyebbek a $V^{IV}O$ kémiai környezetének változására.

3. Kísérleti eredmények és értékelésük

3.1. Potenciális inzulinutánzó oxovanádium(IV)komplexek

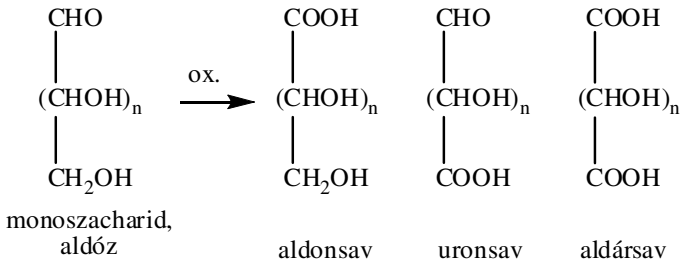
Ebben a fejezetben két ligandumcsalád $V^{IV}O$-komplexképző sajátságait fogjuk bemutatni. A 3.1.1. alfejezetben a szénhidrátszármazékok közé tartozó aldársavak közül két aldohexózból képződő α,ω-polihidroxi-dikarbonsavval foglalkozunk. A 3.1.2. alfejezetben a sal_2en típusú Schiff-bázis-származékok két típusát jellemezzük. Az egyes alfejezetek elején a vizsgált ligandumtípusokkal foglalkozó közlemények összefoglalása tekinthető át.

3.1.1. Oxovanádium(IV)–aldársav rendszerek[1]

3.1.1.1. Irodalmi áttekintés

Az egyszerű szénhidrátok oxigéndonor oxo-, illetve relatíve nagyszámú hidroxilcsoportjai sem képesek a vízmolekulákat a fémion elsődleges koordinációs szférájából kiszorítani. Savas és semleges pH-n a hidroxilcsoportokon való nagy protonkompetíció miatt gyenge ezeknek a polihidroxi vegyületeknek a fémionmegkötő képessége.[117] Mivel a $V^{IV}O^{2+}$ ion hidrolízisre való hajlama jelentős, ezért a szénhidrát molekulában bizonyos horgonycsoportok (pl. karboxilátcsoport) jelenléte szükséges a megfelelő erősségű kötés kialakításához. Miután a ligandum megkötötte a $V^{IV}O$-iont, könnyen bekövetkezik az alkoholos hidroxilcsoportok (fémionindukált) deprotonálódása, és nagyobb pH-n akár négy alkoholátcsoport is koordinálódhat a fémionhoz.[118,119]

A szénhidrátszármazékok közül a monoszacharidok oxidációs termékeként képződő különböző cukorsavak karboxilcsoportjai kitűnő horgonydonorcsoportok lehetnek a fémionmegkötésben. Az oxidáció mértéke és helye szerint három típusba – aldonsav, uronsav és aldársav – soroljuk az aldózokból képződő cukorsavakat (12. ábra). Például az aldohexóz D-glükózból a D-glükonsav, a D-glükuronsav és a D-glükársav származtatható.



12. ábra A monoszacharidok oxidációs termékeként képződő cukorsavtípusok
Az aldohexózok és származékaik esetében n = 4

A polihidroxi-α,ω-dikarbonsavak közé tartozó aldársavak tulajdonképpen két horgony karboxilátcsoportot tartalmaznak, feltételezhetően jól kötik a vanádiumot. Két diasztereomer aldózból (D-glükóz és D-galaktóz) képződő aldársavak (a D-glükársav és a galaktársav) vanádiumkomplex-

képző tulajdonságait vizsgáltuk. Az irodalomban a különféle cukorsavtípusokkal, α-hidroxi-karbonsavakkal és polihidroxi-α,ω-dikarbonsavakkal kapcsolatos közleményeket tekintettük át.

Az egyes cukorsavtípusok eltérő biológiai jelentőséggel bírnak. A D-glükózból származtatott aldonsav, a D-glükonsav foszforilált alakban a szénhidrát-anyagcsere intermedierje. Az uronsavak közül a D-glükuronsav, a D-galakturonsav és a D-mannuronsav különféle poliszacharidok alkotórésze. A D-glükuronsav a szervezet számára káros (rákkeltő) hidroxiltartalmú vegyületekkel (pl. szteroid hormonokkal és egyéb lipofil toxinokkal) glikozidokat képez, növeli vízoldékonyságukat, elősegíti a vizelettel való távozásukat (méregtelenítés).[120] A β-glükuronidáz enzim ezeknek a glükuronidoknak a hidrolízisét katalizálja; ezáltal csökkenti a méregtelenítő hatást, növeli a különböző – különösen a hormonfüggő – ráktípusok kialakulásának a kockázatát. Klinikai modellkísérletekben kimutatták, hogy az aldársavak közé tartozó D-glükársav és a belőle képződő lakton(ok) rákellenes hatással rendelkeznek. A méregtelenítő hatást a β-glükuronidáz enzim működésének inhibeálásával vagy az ösztrogén gyomor-bél traktusból történő újrafelszívódásának mérséklésével magyarázzák. A D-glükársav kis mértékben az emberi szervezetben is képződik, számos gyümölcsben és zöldségben is megtalálható, nagyobb mennyiségben a narancs, a grépfrút, az alma és a keresztes virágúak tartalmazzák. Kálciumsóját étrendkiegészítőként forgalmazzák.[121]

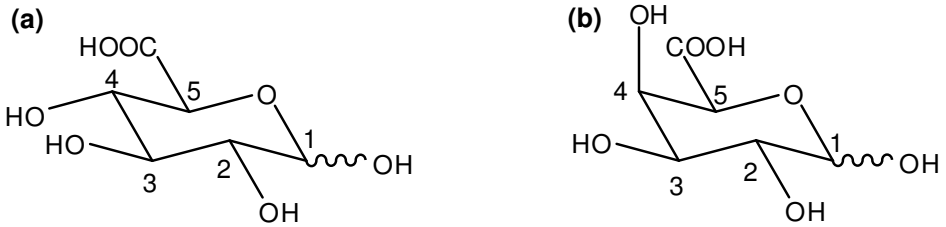
A cukorsavak – köztük az aldársavak is – hajlamosak a molekulán belüli észterképzésre, ha ezáltal feszültségmentes ötös vagy hatos gyűrűt tartalmazó lakton képződik. Egyes aldársavaknál (pl. D-glükársav, D-mannársav) mindkét karboxilcsoport laktonná zárulhat, dilakton is képződhet, míg másoknál (pl. galaktársav) még a monolakton is nehezen alakul ki.[122] Vizsgálataink során a laktonképződést úgy próbáltuk kiküszöbölni, hogy az aldársavtörzsoldatok a ligandum mellett egy ekvivalens lúgot is tartalmaztak, valamint az ligandumoldatokat minden mérés előtt frissen készítettük el. A ligandumtitrálások alapján elmondhatjuk, hogy még a D-glükársav esetében sem tapasztaltunk laktonképződést a kísérleti körülményeink között.

A D-glükóz és a D-galaktóz cukorsav származékai közül a D-glükonsav[123,124], a D-glükuronsav és a D-galakturonsav[125] $V^{IV}O$-kötő sajátságait jellemezték már. A D-glükársav és a galaktársav esetében pedig számos más (főleg) átmenetifémiokkal kapcsolatos eredmény található az irodalomban.

B. Szpoganicz és munkatársai diabéteszes patkányokon végzett modellkísérlet során bizonyították, hogy a D-glükonsav $V^{IV}O$-komplexe intraperitoneálisan és orálisan is szignifikánsan csökkenti a vércukorszintet.[123] A D-glükonsav fiziológiás pH-n is képes oldatban tartani a vanádiumot: kísérleti körülményeik között nem tapasztaltak csapadékképződést, hidrolízist. Elsősorban egymagvú komplexek képződését feltételezték ($[VOL]^{+}$, $[VOLH_x]^{x+1}$, x = –1, –2, –3, –4) egy, kis mennyiségben pH 8 körül megjelenő, hidroxohidas, kétmagvú komplex ($[(VO)_2L_2H_{-5}]^{3-}$) mellett. E. J. Baran és munkatársaival[124] ellentétben, akik $[VO(LH_{-1})_2]^{2-}$ és $[VO(LH_{-2})_2]^{4-}$ szilárd komplexeket izoláltak, biszkomplexképződést oldatban nem tudtak kimutatni. A karboxilát koordinációját követően lejátszódik az alkoholos hidroxilcsoport(ok) koordinálódása, majd deprotonálódása. Ugyan a szerzők a

pH 5–8 tartományban egyetlen $[VOLH_{-2}]^{2-}$ részecske képződésével írják le a rendszert, helytállóbb lenne a $[(VO)_2L_2H_{-4}]^{2-}$ összetétel, mivel a közölt ESR-spektrum jellege (pH= 7,25: kis jelintenzitás és széles, izotróp jelre rakódnak rá a csúcsok) dimerizációra utal.

A diasztereomer D-glükuronsav (Glu-Ac) és D-galakturonsav (Gal-Ac) vizsgálata[125] során G. Micera és munkatársai azt tapasztalták, hogy a kelátképződést jelentősen befolyásolta a 4. szénatomhoz kapcsolódó hidroxilcsoport helyzete. A vizsgált uronsavak csak ebben az egy szénatom konfigurációjában (C4) különböznek. Vizsgálataikhoz a ligandumok stabilis, hattagú laktolgyűrűs formáját használták (13. ábra).



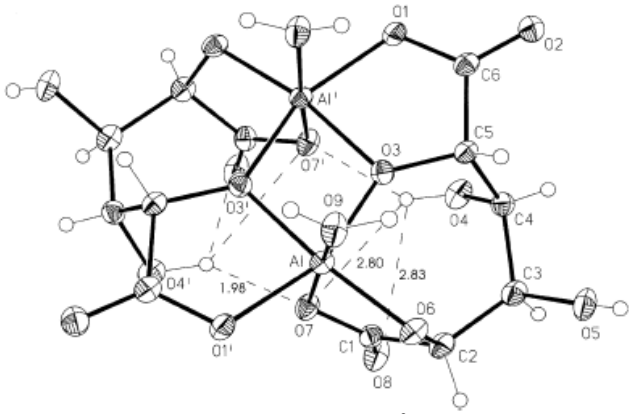
13. ábra (a) A D-glükuronsav, (**b**) a D-galakturonsav laktolgyűrűs szerkezete

A savas pH-tartományban mindkét ligandummal először $[VOL]^+$, illetve $[VOL_2]$ részecske képződik. A karboxilát- mellett az alkoholos hidroxilcsoport koordinálódásával, majd deprotonálódásával hattagú kelátgyűrű kialakulására van lehetőség. A pH~4 felett képződő $[VOLH_{-1}]$ komplexben a karboxilát- mellett a 4. pozícióban lévő alkoholátcsoport vehet részt a koordinációban. A Gal-Ac esetében, mikor a karboxilcsoporthoz képest cisz helyzetű a koordinálódó hidroxilcsoport, sokkal kedvezményezettebb a kelátképződés. A $[VOLH_{-1}]$ egymagvú komplex mellett a $2\times(COO^-,O^-)$ koordinációjú $[VOL_2H_{-2}]^{2-}$ biszkomplex is megfigyelhető. A Glu-Ac esetében a szomszédos funkciós csoportok egymáshoz képest transz helyzetűek, emiatt nehezebben jön létre a (COO^-, O^-) kelátgyűrű. Erre a sztérikus okra (feszülő gyűrű) vezethető vissza az is, hogy kisebb stabilitású $[VOLH_{-1}]$ komplex képeződik, míg a $[VOL_2H_{-2}]^{2-}$ biszkomplex egyáltalán nem alakul ki. A pH = 5 – 8 tartományban a $[(VO)_2L_2H_{-4}]^{2-}$, azaz a $[(VO)_2(LH_{-1})_2(OH)_2]^{2-}$ részecske lesz a domináns, amelyben a két $[VOLH_{-1}]$ egységet két μ-hidroxilcsoport köt össze. Majd pH~8 felett a vanádium hidrolízis részecskék – a ($[(VO)_2(OH)_5]^-$ és a $[(VO)(OH)_3]^-$) – mellett vegyes, illetve tiszta cukorszerű cisz-diolát kötésmóddal rendelkező komplexek képződnek: $[(VO)_2(LH_{-1})(LH_{-2})(OH)_2]^{3-}$, másképp $[(VO)_2L_2H_{-5}]^{3-}$ és $[VO(LH_{-2})_2]^{4-}$. Ezzel szemben a Gal-Ac ligandum pH~8 felett is vissza tudja szorítani a fémion hidrolízisét: nagyságrendekkel stabilisabb komplexeket képez a $V^{IV}O^{2+}$ ionnal, mint a Glu-Ac. Továbbá $(COO^-,O^-)(O^-,O^-)$ vegyes kötésmódú $[VOL_2H_{-3}]^{3-}$ biszkomplex is kialakul a Glu-Ac esetében ismertetett komplexeken felül.

J. G. Velasco és munkatársai[126] a D-glükársav és a Cu(II), Ni(II), Mn(II), Co(II), Cd(II) és Fe(III) ionok kölcsönhatását vizsgálták. Eredményeik azt mutatják, hogy kétértékű ionok esetében $[MLH_{-1}]^-$ összetételű részecskék képződnek elsősorban, melyekben két karboxilát mellett egy alkoholát (feltehetően az egyik α pozícióban lévő) is a koordinációs szférában található. A Cu(II)ion esetében polimer részecskéket és egy CuL_2 összetételű biszkomplexet is feltételeztek az oldatban. A

Fe(III) monokomplexe két alkoholátot is tartalmaz a koordinációs szférában, ezen felül kimutattak egy FeL_3 összetételű triszkomplexet is, amelyben hat karboxilát koordinálódik a fémionhoz.

A D-glükársav Al(III) kölcsönhatást vizsgálva A. E. Martell és munkatársai[127] a karboxilát-mellett két alkoholátcsoport koordinációját feltételezték $[AlLH_{-2}]^{-}$ összetétellel. T. Kiss és munkatársainak [128] eredménye azt bizonyítja, hogy pH = 5 – 8 tartományban uralkodóan egy részecske létezik (az $[Al_2L_2H_{-4}]^{2-}$ összetételű), amelyben – a röntgenkrisztallográfiás mérések alapján (14. ábra) – egy Al(III)ionhoz a két alkoholáthídon felül a két ligandum egy-egy karboxilcsoportja és további egy alkoholát koordinálódik. A koordinációban csak a karboxilcsoporthoz képest α pozícióban lévő alkoholos hidroxilcsoportok vesznek részt.



14. ábra A D-glükársav $[Al_2L_2H_{-4}]^{2-}$ komplexének röntgenszerkezete[128]

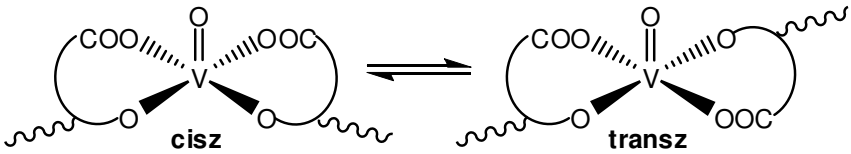
M. Saladini és munkatársai[129] a galaktársav és a Co(II), Ni(II), Cd(II), Pb(II) és Hg(II) ionok kölcsönhatását vizsgálták. Egymagvú, különböző protonáltsági állapotú mono- és biszkomplexek ([ML], $[MLH_{-1}]^{-}$, $[MLH_{-2}]^{2-}$ és $[ML_2]^{2-}$, $[ML_2H_{-1}]^{3-}$, $[ML_2H_{-2}]^{4-}$) képződését feltételezték mindegyik fémionnal. A savas pH-n képződő [ML] komplexben a karboxilát mellett egy (a Co(II) és a Ni(II) esetében) vagy kettő (a Pb(II) és a Cd(II) esetében) alkoholos hidroxilcsoport is részt vehet a fémion megkötésében (a bázicitással korrigált stabilitási állandók alapján). A $Hg(OH)_2$ csapadék képződését nem volt képes a galaktársav visszaszorítani. A Co(II) és Ni(II) ionok esetében polimer részecskék képződését sem zárták ki, a Cu(II)ionnal kapott hasonló eredményeik[130]: a $[CuL(bpy)]_n \cdot 2nH_2O$ kristályszerkezete alapján. A Cu(II)ionnal a galaktársav szintén [CuL] összetételű, (COO^{-}, OH) koordinációs módú komplexet képez savas pH-n. Ez a komplex stabilisabb, mint az aldonsavakkal képződő azonos koordinációjú $[CuL]^{+}$ komplex. A gyűrűs galakturonsavhoz képest, pedig több mint egy nagyságrend a stabilitásnövekedés. A pH növelésével kooperatív módon két alkoholos hidroxilcsoport is deprotonálódik a fémion hatására. A $[CuLH_{-2}]^{2-}$ komplex fiziológiás pH-n csaknem 100%-ban képződik.

Számos α-hidroxi-karbonsav (2-hidroxi-etánsav, más néven glikolsav, 2-hidroxi-propánsav, más néven tejsav, 2-hidroxi-izobutánsav, 2-hidroxi-2-metil-butánsav, 2-etil-2-hidroxi-butánsav, 2-fenil-2-hidroxi-etánsav, 2,2-difenil-2-hidroxi-etánsav) $V^{IV}O$-komplexének vizsgálata[93] során G. Micera és munkatársai kimutatták, hogy a komplexképződés mindenesetben már pH = 3 körül megkezdődik. Először $[VOL]^{+}$ és $[VOL_2]$ komplexek jönnek létre (kivéve a nagy térkitöltésű fenilcsoportot tartalmazó hidroxikarbonsavakat). A $[VOL]^{+}$ komplexek bázicitással korrigált stabilitási állandói a ligandumok (COO^{-},OH) koordinációt támasztják alá. A pH fokozatos növelésével a koordinációs szférában lévő az alkoholos hidroxilcsoport deprotonálódik, és $[VOLH_{-1}]$ (COO^{-},O^{-}), $[VOL_2H_{-1}]^{-}$ (COO^{-},O^{-});(COO^{-},OH), $[VOL_2H_{-2}]^{2-}$ 2×(COO^{-},O^{-}) komplexek képződnek. A képződő

komplexek stabilitása függ az α-szénatomhoz kapcsolódó szubsztituensek minőségétől. Az elektronvonzó csoportok (pl. a fenilcsoport) például elősegítik az alkoholos hidroxilcsoportok deprotonálódását, míg az elektronküldő alkilcsoportok esetében a $[VOL_2]$ komplex stabilisabb. Az elektrongerjesztési spektroszkópiás mérések alapján megállapították, hogy a biszkomplexekben a ligandumok a $V^{IV}O$-ion ekvatoriális síkjában transz elrendeződésűek, és a szubsztituensek térkitöltésétől függően a komplex geometriája a trigonális bipiramis felé torzulhat.

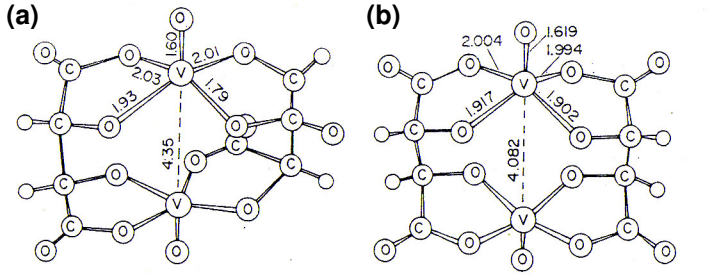
A legegyszerűbb polihidroxi-α,ω-dikarbonsav a borkősav, két kiralitás centruma és három sztereoizomere van. T. Kiss és munkatársai mindhárom (a D, az L és a *mezo*) borkősav, illetve a D- és az L-borkősav racém elegyének komplexképző tulajdonságait vizsgálva[94] azt találták, hogy a *mezo* forma egy kissé eltérő komplexképző sajátságot mutat. A D-, az L- és a DL-borkősav esetében kizárólag a savas pH-tartományban képződik egymagvú $V^{IV}O$-komplex ([VOL]), a pH-t növelve kétmagvú komplexek jelennek meg a rendszerben ($[(VO)_2L_2H_x]^x$ x = –1, –2, –3, –4). A *mezo*-borkősavval a kétmagvú komplexek képződése nem kedvezményezett, helyettük gyűrűs, hárommagvú komplexek ($(VO)_3L_3H_x$, x = –3, –4, –5, –6) jönnek létre.

Az előbb említett kétmagvú (dimer) komplexek esetében cisz-transz izomerek képződésével kell számolni. Két azonos ligandum két-két (különböző) foggal koordinálódik a központi fémionhoz, miközben az axiális pozícióban vagy egy oldószermolekula van, vagy nincs semmi. A cisz izomerben az azonos funkciós csoportok térközelben, míg a transz izomerben a különböző csoportok váltakozva helyezkednek el a fémion ekvatoriális síkjában (15. ábra).



15. ábra Cisz-transz izomerek kötésmódja

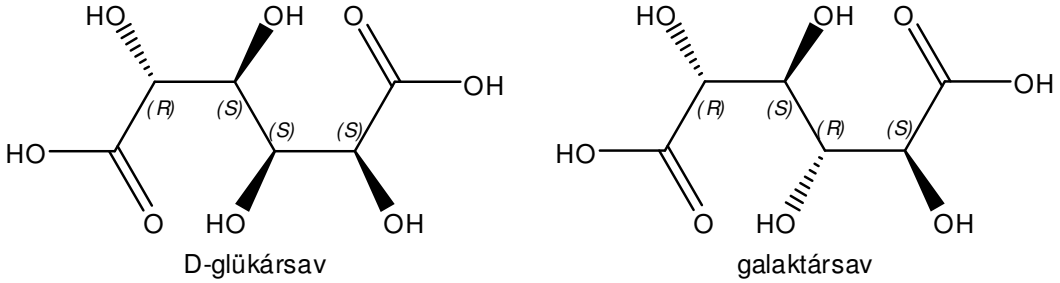
A kétmagvú $V^{IV}O$-borkősav-komplexek esetében a dimerizáció bizonyos szempontból sztereoszelektíven játszódik le. Amennyiben a királis D- vagy L-borkősav kétmagvú komplexeiről van szó (16. (a) ábra) a transz izomer jön létre. Racém elegyük esetén egy D- és egy L-tartarát köti össze a két centrumot, az oldatból a cisz komplex izolálható (16. (b) ábra).



16. ábra A $[(VO)_2L_2]^{4-}$ komplexek sematikus szerkezete. **(a)** $(NH_4)_4[(VO_2)\{(+)\text{-tart}\}_2]\cdot H_2O$[131] és **(b)** $Na_4[(VO_2)\{(+)\text{-tart}\}\{(-)\text{-tart}\}]\cdot 12H_2O$[132]. Ez az ábra a [82]-es összefoglalóban szerepelt

3.1.1.2. A vizsgált aldársavak sav-bázis sajátságai

A hat szénatomot tartalmazó aldársavak közé tartozik a D-glükársav és a galaktársav (triviális nevükön a D-cukorsav és a nyálkasav). Mindkettő hat potenciális vanádiumkötőhelyet – két karboxil-, illetve négy alkoholos hidroxilcsoportot – tartalmaz. A két ligandum diasztereomer párt alkot, csak egyetlen szénatomjuk (C4) konfigurációja eltérő (17. ábra). Míg a D-glükársav optikailag aktív, addig a szimmetriacentrumot tartalmazó galaktársav inaktív (a molekula fedésbe hozható a tükörképi párjával).



17. ábra A vizsgált aldársavak szerkezeti képlete

A ligandumok két-két karboxilcsoportja átfedő, lépcsőzetes deprotonálódási folyamatokban vesz részt, míg a négy-négy alkoholos hidroxilcsoport a vizsgálati körülmények (pH < 11,5) között nem deprotonálódik. A mért protonálódási állandókból (4. táblázat) számított pK-értékek közti különbség (0,83 és 0,80) csak kis mértékben tér el a statisztikus értéktől (0,60). Ez a statisztikus pK-különbség olyan kétértékű savak átfedő disszociációs egyensúlyait jellemzi, ahol a két, azonos savi erősségű funkciós csoport a molekulán belül elkülönülve, egymástól függetlenül, azonos valószínűséggel deprotonálódik. Ez alapján feltételezhető, hogy ezeknél az aldársavaknál már olyan nagy a távolság a láncvégi karboxilcsoportok között, hogy alig hatnak egymásra. A két ligandum protonálódási állandói közti minimális különbség arra enged következtetni, hogy a 4. szénatom konfigurációja közti eltérés nem befolyásolja a láncvégi karboxilcsoportok deprotonálódását. Ez összhangban van azzal a megállapítással, hogy a királis ligandumok deprotonálódási folyamatai általában nem sztereoszelektíven játszódnak le. A mért állandók jó egyezést mutatnak a korábbi irodalmi adatokkal figyelembe véve a kísérleti körülmények (ionerősség értéke, ionerősség-beállító elektrolit minősége) közti eltérést. [126, 127, 128, 133]

3.1.1.3. Az aldársavak oxovanádium(IV)komplexei

A pH-potenciometriás vizsgálatok arra utalnak, hogy a $V^{IV}O$-ion és a vizsgált aldársavak között viszonylag erős a kölcsönhatás: már ekvimoláris ligandummennyiség képes a fémiont oldatban tartani, a $VO(OH)_2$ csapadék megjelenését megakadályozni. Ugyan csapadékképződést nagyobb pH-n sem tapasztaltunk, viszont több pontban 10-10 perc várakozás után sem állt be az egyensúly, pH-potenciometriásan pontosan nem mérhető, lassú folyamatok játszódtak le (pH=7,5–8,0 felett a D-glükársav esetében és pH=6,0–6,5 felett a galaktársav esetében a fémion-ligandum aránytól és a

fémion-koncentrációtól függően). Feltehetően megkezdődik a $V^{IV}O$-ion hidrolízise, a $[(VO)_2(OH)_5]^-$ részecske lassú képződése, miközben a ligandum kiszorul a koordinációs szférából.

4. táblázat A D-glükársav és a galaktársav protonálódási és $V^{IV}O$-komplexeinek ($M_pL_qH_r$) stabilitási állandói (I = 0,2 M KCl, T = 25,0 °C)

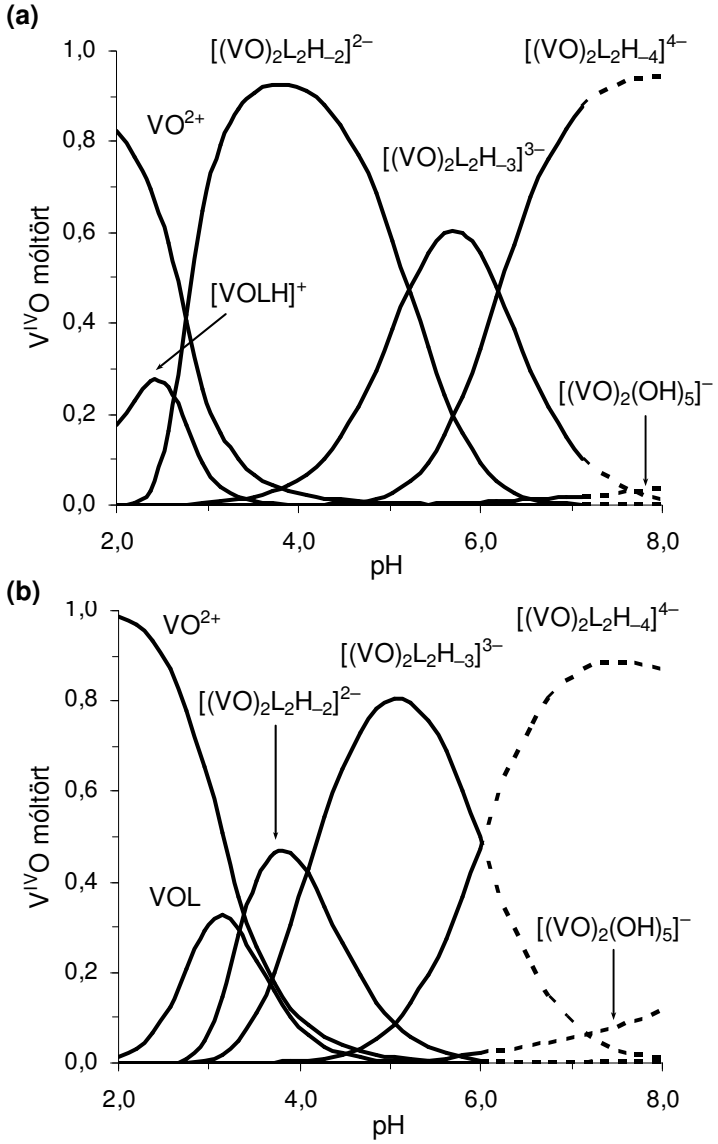
		D-glükársav		galaktársav	
(p, q, r)	**részecske**	**lg*β***	**p*K***	**lg*β***	**p*K***
(0, 1, 2)	LH_2	6,99(2)	3,08	6,96(2)	3,08
(0, 1, 1)	LH^-	3,91(2)	3,91	3,88(2)	3,88
(1, 1, 1)	$[VOLH]^+$	6,84(8)		–	
(1, 1, 0)	[VOL]	–		3,56(6)	
(2, 2, –2)	$[(VO)_2L_2H_{-2}]^{2-}$	5,87(6)	5,22	3,08(6)	4,23
(2, 2, –3)	$[(VO)_2L_2H_{-3}]^{3-}$	0,65(9)	6,20	–1,00(7)	5,97
(2, 2, –4)	$[(VO)_2L_2H_{-4}]^{4-}$	–5,55(9)	–	–7,01(9)	–
	Mérési pontok száma:	260		183	
	Illesztési paraméter[a] [cm^3]:	$1,6\times10^{-2}$		$1,3\times10^{-2}$	
bázicitással korrigált stabilitási állandók		$VO^{2+} + LH_2 \rightleftharpoons [VOLH]^+ + H^+$			
		$VO^{2+} + LH^- \rightleftharpoons [VOL] + H^+$			
$\lg K^* = \lg\beta([VOLH]^+) - \lg\beta(LH_2) =$		–0,15		–	
$\lg K^* = \lg\beta(VOL) - \lg\beta(LH^-) =$		–		–0,32	

[a] Az illesztési paraméter a mért és a számított állandókkal visszaszámolt titrálási görbék átlagos eltérése mérőoldat fogyásban kifejezve.

A 4. táblázat a legjobb speciációs modellt és a képződő komplexek pH-potenciometriás mérések alapján meghatározott stabilitási állandóit tartalmazza. A vizsgált $V^{IV}O$ – aldársav rendszerekben képződő részecskék eloszlásgörbéit a 18. ábrán tüntettük fel.

A pH-potenciometriás mérések alapján a $V^{IV}O$-ion jelenlétében mindkét ligandummal csak 1:1 összetételű, egy-, illetve kétmagvú komplexek képződtek. A modellszámítások során az α-hidroxi-karbonsavak, illetve a borkősav irodalmi adataira támaszkodva olyan komplexek megjelenését feltételeztük, melyekben a terminális karboxilátcsoport(ok) mellett, alkoholos hidroxil-, illetve nagyobb pH-n alkoholátcsoport(ok) koordinálódnak a $V^{IV}O$-centrumhoz.

Kis pH-n a D-glükársavval $[VOLH]^+$, a galaktársavval VOL összetételű egymagvú komplexet képez először a $V^{IV}O^{2+}$ ion. Az eltérő sztöchiometria ellenére mindkét részecskében azonos koordinációs mód (egyfogú COO^- vagy kétfogú (COO^-, OH)) feltételezhető, valószínűleg csak a nem koordinálódó karboxilátcsoport protonáltsági állapota eltérő. Az alkoholos hidroxilcsoport koordinálódására utal az, hogy a komplexek bázicitással korrigált stabilitási állandója (lgK* = –0,15/–0,32) több mint két nagyságrenddel nagyobb a monokarboxilát koordinációjú, egyszerű karbonsavak megfelelő állandójánál (lgK*: ecetsav –2,75; propánsav –2,76, butánsav –2,68).[93] Az eltérő sztöchiometriát magyarázhatja az is, hogy a fémionkoordináció hatására a karboxil- és az alkoholos hidroxilcsoportok közötti intramolekuláris hidrogénhidas rendszer különbözőképpen változik meg. Esetleg okozhatja a pH-mérés nagyobb bizonytalansága is a pH<2 tartományban.



18. ábra (a) A $V^{IV}O$ – D-glükársav, illetve **(b)** a $V^{IV}O$ – galaktársav rendszerben képződő komplexek eloszlásgörbéje $[V^{IV}O]_{tot} = [L]_{tot} = 4$mM. A szaggatott vonallal jelzett rész csak a tendenciák leírására alkalmas, a pH-potenciometriás mérés nagyobb bizonytalanságára utal

Mindkét $V^{IV}O$–aldársav rendszerben pH~3 és 8 között különböző protonáltsági állapotú, kétmagvú $[(VO)_2L_2H_x]^x$ (x = –2, –3, –4) komplexek képződnek. A speciációs modell finomítása során a PSEQUAD programmal az egymagvú komplexek ($[VOLH_{-1}]^-$, $[VOLH_{-2}]^{2-}$) stabilitási állandóit egyáltalán nem tudtuk meghatározni abban az esetben, ha egyidejűleg dimerjeiknek megfelelő összetételű, kétmagvú komplexek ($[VOLH_{-1}]_2^{2-}$, $[VOLH_{-2}]_2^{4-}$) jelenlétét is feltételeztük. A csak a monomer, illetve kizárólag a dimer komplexeket tartalmazó modellek közül az utóbbi illesztési paramétere szignifikánsan jobb (feleakkora), mint az előbbié. A jelcsendes szobahőmérsékletű ESR-spektrumok is a spincsatolt többmagvú komplexek jelenlétét támasztják alá. A fagyasztott oldatok ESR-spektrumai nagyobb pH-n a kétmagvú komplexek széles, elnyúlt jele mellett egymagvú mono- és/vagy biszkomplexek megjelenését is valószínűsítik, melyek képződését pH-potenciometriásan egyensúlyi mérési pontok hiányában nem tudunk alátámasztani.

A pH-potenciometriás mérések alapján a D-glükársav valamivel erősebben köti a $V^{IV}O$-iont, mint a galaktársav. A kétmagvú komplexek stabilitási állandóit összehasonlítva a D-glükársav esetében a megfelelő értékek 1,5–2,8 egységgel nagyobbak. Az eloszlásgörbéken (18. ábra) megfigyelhető, hogy míg a D-glükársavas rendszerben pH = 2 -nél a fémion kb ~20%-a már aládrsav-komplexben van, addig ugyanezen a pH-n még gyakorlatilag nincs komplexképződés a galaktársavval. Az alkoholos hidroxilcsoport koordinálódása és fémionindukált deprotonálódása – mely a dimer részecskék képződése során válik teljessé – a D-glükársav esetében közel egy egységgel kisebb pH-n kezdődik. Eközben a hidrolízis (a $[(VO)_2(OH)_5]^-$ részecske képződése) a galaktársav esetében játszódik le kisebb pH-n. A két ligandum közül a D-glükársavval erősebb a kölcsönhatás, mert ez az aldársav szorul ki valamivel nagyobb pH-n a $V^{IV}O$-ion koordinációs szférájából.

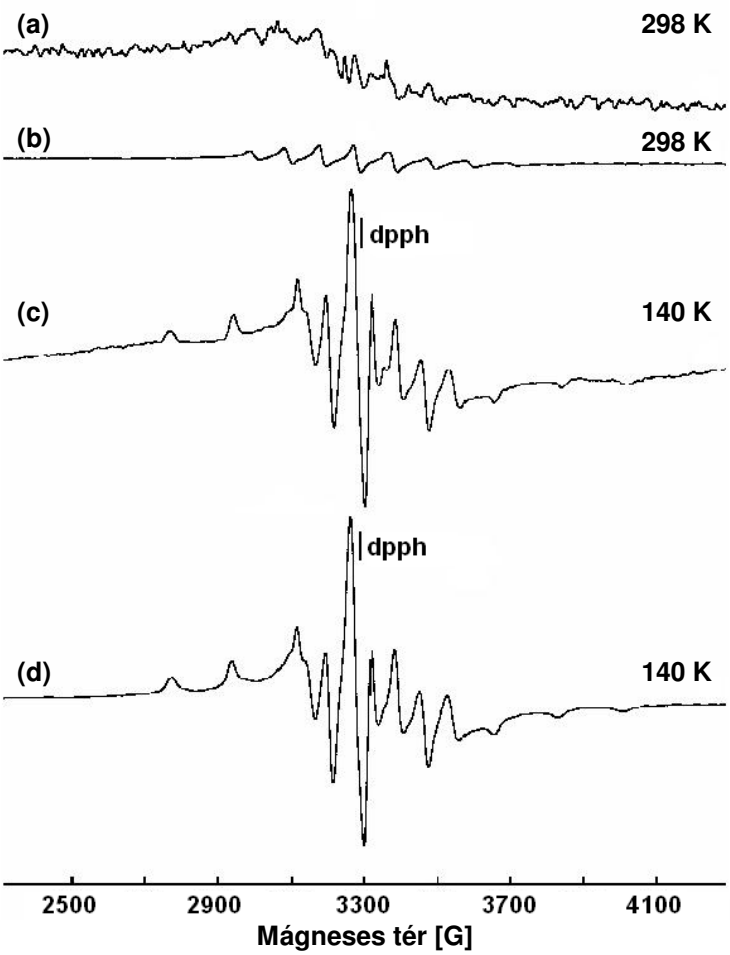
3.1.1.4. Az oxovanádium(IV)-aldársav-komplexek oldatszerkezete

A képződő komplexek kötésmódjára az RT (T = 298 K) és LT (T = 140 K) ESR-, illetve elektrongerjesztési spektroszkópiás mérések alapján tettünk javaslatot.

A szobahőmérsékletű és a fagyasztott minták ESR-spektrumai között szignifikáns intenzitás-különbség figyelhető meg (19. ábra). A $V^{IV}O$ – D-glükársav rendszer esetében az „ESR-csendes" szobahőmérsékletű spektrumok (pH = 3,5 – 6) teljes mértékben alátámasztják, hogy ebben a pH-tartományban elsősorban spincsatolt kétmagvú komplexek képződnek. A két aldársav kissé eltérő komplexképző tulajdonságát bizonyítja, hogy a galaktársavval szobahőmérsékleten is lehetett egymagvú komplexhez rendelhető jeleket detektálni; az intenzitás a $V^{IV}O$ teljes mennyiségének kevesebb, mint 10 %-a. Ezek alapján megállapítottuk, hogy a 4. szénatom eltérő konfigurációja hatással van a vizsgált aldársavak dimerizációjára ugyanúgy, mint az Al(III)komplexek[128] esetében.

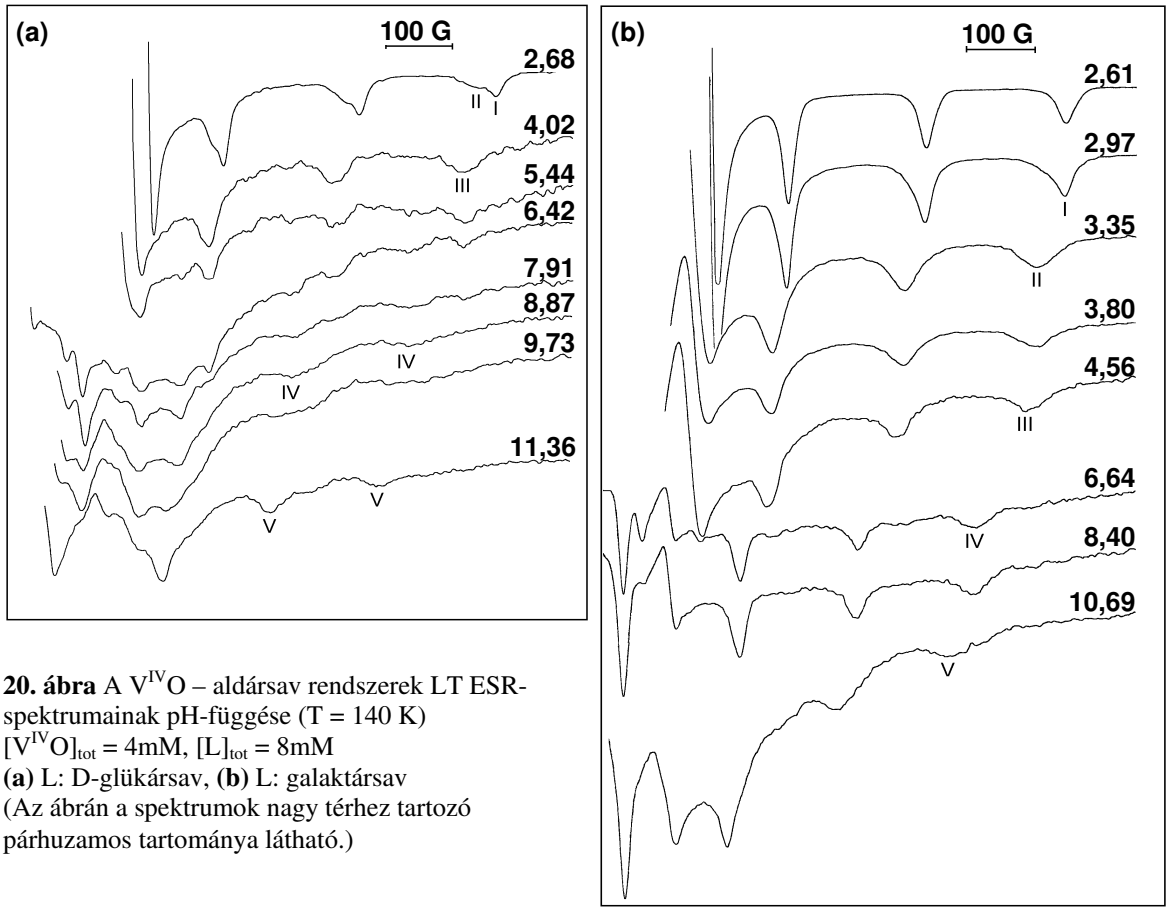
Mindkét vizsgált rendszer esetében a dimerizáció endoterm ($\Delta H > 0$), a hőmérséklet emelésével a monomer-dimer egyensúly a dimerképződés irányába tolódik el. A folyamat hajtóereje ($\Delta G < 0$, $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$) az entrópiaváltozásban keresendő. Az egymagvú és a kétmagvú komplexek, illetve a ligandumok hidratáltsága jelentősen befolyásolja a dimerizációval járó entrópiaváltozást. Jelen esetben azért beszélhetünk entrópiavezérelt dimerizációról, mert a monomer komplexekben a fémionhoz koordinálódó ligandumrész feltehetően jelentősen hidratált, így az eredő entrópianövekedés – mivel nagyszámú vízmolekula szabadul fel – a dimerizáció okozta entrópiacsökkenés ellenére nagy lesz ($\Delta S >> 0$).

A 20. ábrán a 140 K-en felvett LT ESR-spektrumok nagy térhez tartozó párhuzamos tartománya látható. Az 5. táblázat tartalmazza az ESR-mérések alapján meghatározott, a megfelelő komplexekhez rendelt ESR-paramétereket, illetve a javasolt kötésmódokat.



19. ábra A $V^{IV}O$ – aldársav rendszerek ESR-spektrumainak hőmérsékletfüggése **(a) és (c)** L: D-glükársav, pH = 4,02, **(b) és (d)** L: galaktársav, pH = 4,56 ($[V^{IV}O]_{tot}$ = 4mM, $[L]_{tot}$ = 8mM) erősítés: 298 K-n (a) 8×10^3 (b) $2{,}5\times10^3$; 140 K-n (c) 4×10^3 (d) 5×10^2

Mindkét rendszerben a pH-potenciometriás részecskeeloszlásnak megfelelően pH~3–3,5 alatt két részecske jele különböztethető meg az LT ESR-spektrumokban (20. ábra): a nagyobb intenzitású (I) csúcs a szabad fémionhoz ($[VO(H_2O)_5]^{2+}$), míg a (II) csúcs a $VOLH^+$/VOL komplexhez rendelhető. Irodalmi adatok[125] alapján a $VOLH^+$/VOL komplex ESR-paraméterei a ligandum karboxilát-, illetve alkoholos hidroxilcsoporton (COO^-, OH) keresztüli koordinációjának felelnek meg. Nagyobb pH-n felvett LT ESR-spektrumok is alátámasztják a többmagvú komplexek képződését (különösen a $V^{IV}O$ – D-glükársav rendszer esetében), ugyanis a pH növelésével jelentősebb spektrumintenzitás-csökkenés figyelhető meg. A $[VOLH_{-1}]_2^{2-}$ dimer komplex képződésének megfelelő pH-tartományban (20. (a) ábra pH= 4,02 – 6,42 és 20. (b) ábra pH= 4,56) az ezzel egyensúlyban lévő $[VOLH_{-1}]^-$ monomer komplex jele (III) is detektálható. Lejátszódik a koordinálódó alkoholos hidroxilcsoport fémionindukált deprotonálódása. Az ESR-paraméterek a ligandumok (COO^-, O^-) kötésmódjára utalnak. Attól függően, hogy az α vagy a β alkoholát koordinálódik a fémionhoz, öt- vagy hattagú kelátkomplex képződhet. Hasonló rendszerek irodalmi adatai a stabilisabb öttagú kelátgyűrű kialakulását, az α hidroxilcsoport koordinálódását valószínűsítik.



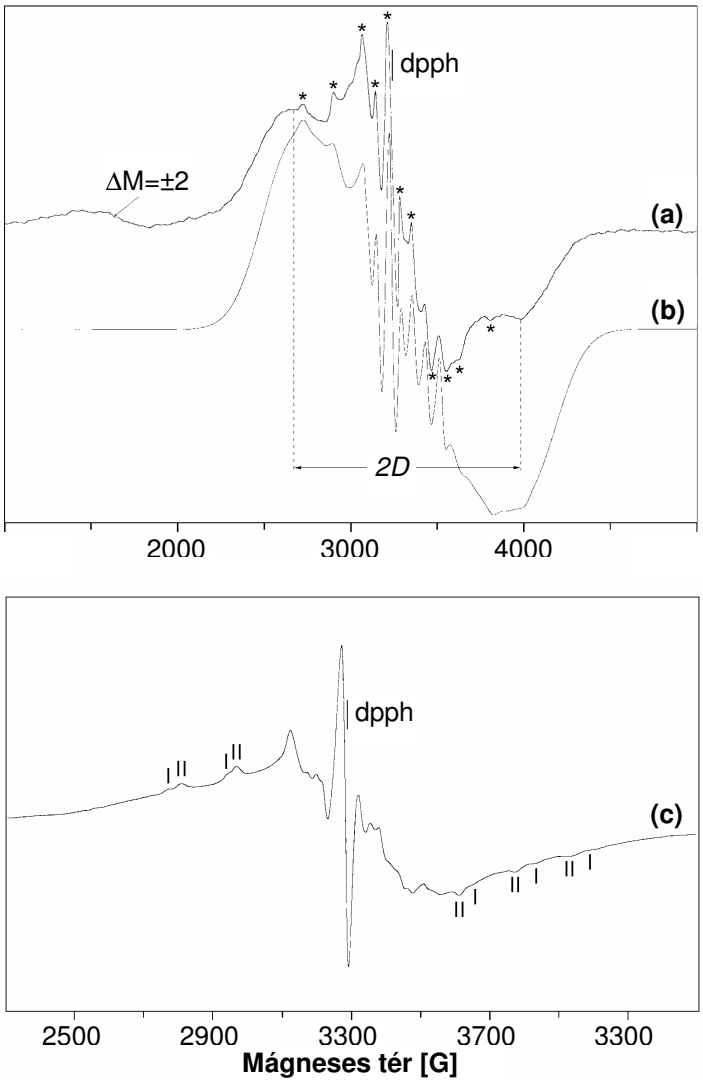
20. ábra A $V^{IV}O$ – aldársav rendszerek LT ESR-spektrumainak pH-függése (T = 140 K)
$[V^{IV}O]_{tot}$ = 4mM, $[L]_{tot}$ = 8mM
(a) L: D-glükársav, **(b)** L: galaktársav
(Az ábrán a spektrumok nagy térhez tartozó párhuzamos tartománya látható.)

A lúgos pH-tartományban biszkomplex (IV: $[VOL_2H_{-2}]^{4-}$?) jelenik meg az oldatban, melyben a kötésmód: 2×(COO^-, O^-). Mivel pH ~7,5 felett a pH-potenciometriás mérések során már nem állt be az egyensúly, így kizárólag az ESR-mérésekből nem áll rendelkezésre elegendő információ ahhoz, hogy ennek a részecskének a pontos sztöchiometriát megbízhatóan igazoljuk. A pH~10 felett detektálható (V) $[VOL_2H_{-4}]^{6-}$ részecskében csak a deprotonált alkoholos hidroxilcsoportok, 2×(O^-,O^-) koordinálódhatnak a $V^{IV}O$-hoz ugyanúgy, ahogy már számos szénhidrátszármazék esetében megfigyelték.[118]

5. táblázat A $V^{IV}O$ – aldársav rendszerekben képződő részecskék ESR-paraméterei és a javasolt kötésmódjuk

		D-glükársav		galaktársav		
	részecske	$g_{\parallel}$	$A_{\parallel}$ [10^{-4} cm^{-1}]	$g_{\parallel}$	$A_{\parallel}$ [10^{-4} cm^{-1}]	**javasolt kötésmód**
I	VO^{2+}	1,935	178	1,935	178	–
II	$[VOLH]^+$ / VOL	1,939	171	1,939	170	(COO^-, OH)
III	$[VOLH_{-1}]^-$	1,941	168	1,942	167	(COO^-, O^-)
III*	$[VOLH_{-1}]_2^{2-}$	széles jel, tiltott átmenet, zérus-tér felhasadás		széles jel, tiltott átmenet –		(COO^-, O^-);(COO^-, OH) (COO^-, O^-);(COO^-, OH)
IV	$[VOL_2H_{-2}]^{4-}$ (?)	1,951	153	1,951	154	(COO^-, O^-);(COO^-, O^-)
V	$[VOL_2H_{-4}]^{6-}$	1,959	146	1,957	148	(O^-, O^-);(O^-, O^-)

A monomer-dimer egyensúlyt az összkoncentráció növelése is a dimerizáció irányába tolja el. Többszörösére növelt összkoncentráció mellett felvett LT ESR-spektrumok (21. ábra) is szolgáltathatnak információt a kétmagvú dimer komplexek képződéséről.



21. ábra A $V^{IV}O$ – aldársav rendszerek LT ESR-spektrumai (T = 140 K) $[V^{IV}O]_{tot} = [L]_{tot} = 20$ mM
(a) L: D-glükársav, pH = 4,19 (*: $[VOLH_{-1}]^{-}$) **(b)** Az (a) spektrum alapján meghatározott ESR-paraméterekkel szimulált spektrum (használt program: Bruker WINEPR SimFonia)
(c) L: galaktársav, pH = 6,47 (**I**: $[VOLH_{-1}]^{-}$), **II**: $[VOL_2H_{-2}]^{4-}$)

A $V^{IV}O$ – D-glükársav rendszer esetében a 3,5 – 5,5 pH-tartományban egy „half-field" izotróp jel (21. (a) ábrán ΔM = ±2 jelöléssel) jelentkezik 1660 G-os középponttal (g = 3,945). Ez a csúcs két paramágneses ion csatolására jellemző, a ΔM = ±2 kiválasztási szabálynak megfelelő tiltott átmenetről van szó. A ΔM = ±1 kiválasztási szabálynak megfelelő tartományban a zérus-tér felhasadás (*D*) tenzor párhuzamos komponensének két rezonanciája figyelhető meg D = 633,2 G (580×10^{-4} cm^{-1}) csatolás-sal, a hozzátartozó $g_{||}$ értéke 1,962. A 21. (a) ábrán jelölt két szélső jel távolsága (1266,4 G) kétszerese a D csatolás értékének. A *D*-tenzor merőleges komponensei nem válnak el valószínűleg a nagyon nagy vonalszélességű jelek miatt, jeleiket elfedik az egymagvú részecskékhez tartozó csúcsok. A *D*-tenzor párhuzamos komponenséhez rendelhető jelek is „eltűnnek" pH~5,5 felett, és csak egy széles,

pszeudoizotróp jel szuperponálódik az egymagvú komplexek gyenge jelére. Eközben pH~10-ig megmarad a $\Delta M = \pm 2$ tartományban a ~1680 G térnél (g = 3,898) jelentkező izotróp jel, mely a kétmagvú részecskék jelenlétére utal.

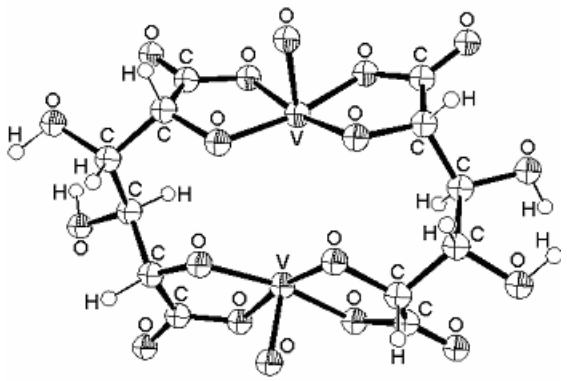
A $V^{IV}O$ – galaktársav rendszer esetében is detektálható a $\Delta M = \pm 2$ „tiltott átmenetnek" megfelelő izotróp sáv a pH = 4 – 10 tartományban (1640 G térnél, g = 3,993), viszont a spektrum jellege eltér a D-glükársavétól (21.(c) ábra). Az egymagvú komplexek jelei egy széles, feloldatlan, kisebb intenzitású, izotróp jelre rakódnak rá; zérus-tér felhasadásra utaló átmenetet nem tapasztalunk.

A zérus-tér felhasadás értékéből a kísérleti részben leírt módon próbáltunk a csatoló $V^{IV}O$-centrumok távolságára (R) közelítést adni. Eaton és munkatársai[115] által megadott [21] egyenlet alapján ha D értéke 633,2 G, akkor R várhatóan 3,50 Å. A Hyperchem program[134] segítségével végzett molekulamechanikai számítások során szerkezetoptimalizálást hajtottunk végre a $[(VO)_2L_2H_{-4}]^{4-}$ dimer esetében. Ennél a kétmagvú komplexnél is számolnunk kell a cisz-transz izomériával ugyanúgy, mint az összes α-hidroxi-karbonsav dimernél (pl. a borkősavnál[94]).

6. táblázat A HyperChem program segítségével optimalizált szerkezetek paraméterei (R, ϑ) és a Stevens egyenlet alapján ezekből számított zérus-tér felhasadás (D) értékek ($g_{\parallel}$ = 1,962).

	D-glükársav			**galaktársav**		
	R [Å]	**ϑ** [°]	**D** [10^{-4} cm^{-1}]	**R** [Å]	**ϑ** [°]	**D** [10^{-4} cm^{-1}]
cisz	**3,47**	**167,2**	**555**	3,53	163,9	503
transz	4,39	169,8	282	4,44	175,4	283

R: $V^{IV}O$-centrumok közti távolság
ϑ: $V^{IV}O$-ionok koordinációs síkjára merőleges egyenes és a két fémiont összekötő egyenes által bezárt szög

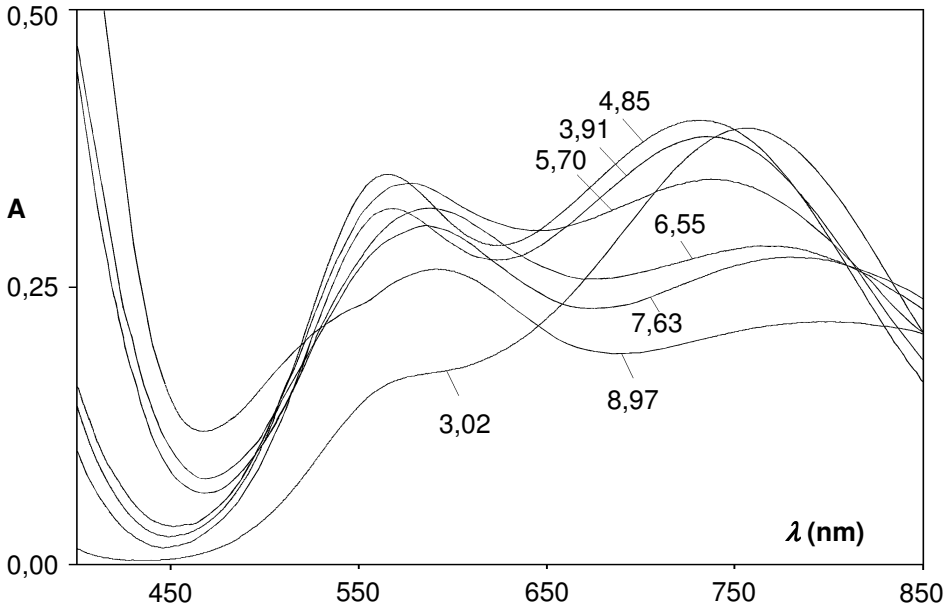


22. ábra A D-glükársavval képzett, $[(VO)_2L_2H_{-4}]^{4-}$ összetételű komplex egy lehetséges *cisz* izomerének a HyperChem programmal optimalizált szerkezete

Mindkét aldársavval egy lehetséges cisz, illetve egy transz izomer szerkezetét optimalizáltuk, miközben azt feltételeztük, hogy az energetikailag kedvezőbb öttagú kelátgyűrűk képződnek. A szerkezetoptimalizáláshoz a szemiempirikus AM1 modellt[135] használtuk. Az erőteret a D- és a DL-(racém elegy) borkősav kétmagvú $V^{IV}O$-komplexére[131,132] validáltuk. A D-glükársav és a galaktársav komplexek modellezett szerkezeti paramétereiből a [18] Stevens egyenlet[114] alapján zérus-tér

felhasadási tényezőt számoltunk (6. táblázat). A négy szerkezet közül csak a 22. ábrán feltüntetett, cisz izomer esetében egyezett viszonylag jól a számított ($D_{számított}$= 555×10^{-4} cm^{-1}) és a kísérletileg mért érték ($D_{mért}$= 580×10^{-4}cm^{-1}). A transz izomerekben a két paramágneses centrum már valószínűleg távol van egymástól, vagy a $V^{IV}O$-centrumok ekvatoriális síkja által bezárt szög nem megfelelő, ezért nem detektálható a felhasadás. A galaktársav cisz izomere sem rendelkezik megfelelő szerkezeti paraméterekkel, a 4. OH-csoport miatt a $V^{IV}O$-centrumok között viszonylag nagyobb a távolság.

Az elektrongerjesztési spektroszkópiás mérések szintén fontos információt nyújtanak a vizsgált ligandumok koordinációs módjáról, amit a $V^{IV}O$ – D-glükársav rendszer alapján szeretnék bemutatni (23. ábra). A ligandum egyfogú COO^- vagy kétfogú (COO^-, OH) koordinációjával képződő komplexek abszorpciós spektruma hasonlít az akvakomplex spektrumához; csak annyi a különbség, hogy a $d_{xy} \rightarrow d_{xz,yz}$: átmenetnek megfelelő sáv 760 nm körül kismértékben eltolódik, míg a $d_{xy} \rightarrow d_{x^2-y^2}$ átmenethez tartozó sáv jobban elválik, kisebb hullámhossztartomány irányába (~560 nm) tolódik (23. ábrán a 3,02-es pH-hoz tartozó spektrum).



23. ábra A $V^{IV}O$ – D-glükársav rendszer elektrongerjesztési spektrumainak pH-függése ($[V^{IV}O]_{tot}$ = $[L]_{tot}$ = 20mM)

Miközben az alkoholos hidroxilcsoport deprotonálódik, alkoholát donorcsoport koordinálódik a $[(VOLH_{-1})_2]^{2-}$ részecskében, egy újabb maximum figyelhető meg körülbelül 565 nm-nél, és a 760 nm-nél lévő sáv az alacsonyabb hullámhossztartomány felé tolódik el (23. ábra pH = 3,91 – 4,85). Ez egyezésben van a $[(VOLH_{-1})_2]^{2-}$ részecskére feltételezett 2×[(COO^-,OH)(COO^-,O^-)] vegyes koordinációs móddal.

Az alacsony energiájú átmenet a nagyobb hullámhossztartomány (>770 nm) felé tolódik el pH~5,5 felett. Ugyanakkor a centrális sávon részleges felhasadás figyelhető meg: az átmenet maximuma körülbelül 590 nm-re esik, és 535 nm körül jelentkezik egy vállt (23. ábra pH= 5,70 – 7,63). Ez a tendencia nagyon hasonlít az α-hidroxi-karbonsavaknál tapasztaltakhoz.[93] Például a

glikolsavval két központi átmenet figyelhető meg 606 és 532 nm-nél, míg a kinasavval 606 és 536 nm-nél. Ezek a sávok a tetragonális piramis és a trigonális bipiramis közti átmeneti geometriával rendelkező rendszerekre jellemzőek. A D-glükársav ligandumként a $[(VO)_2L_2H_{-4}]^{4-}$ komplexben hasonlóképpen viselkedik, mint egy LH α-hidroxi-karbonsav a $[(VO)_2L_2H_{-2}]$ részecskében. Miközben a $[(VO)_2L_2H_{-2}]^{2-}$ komplex deprotonálódik – $[(VO)_2L_2H_{-3}]^{3-}$ és $[(VO)_2L_2H_{-4}]^{4-}$ képződik (pH > 7,63) $2\times[(COO^-, O^-)\ (COO^-, O^-)]$ kötésmóddal –, a központi fémion körüli geometria a trigonális bipiramis felé torzul az elektrongerjesztési spektroszkópiás mérések alapján (lásd 23. ábrán a spektrum további változásait pH 8,97 értéken)[136].

Összefoglalás

Megállapítottuk, hogy a vizsgált aldársavak láncvégi karboxilátcsoportjai megfelelő horgony-donorcsoportok, ezek a szénhidrátszármazékok széles pH-tartományban – még a fiziológiás pH-n is – stabilis komplexeket képeznek a $V^{IV}O^{2+}$ ionnal. Mindkét rendszerben ($V^{IV}O$ – D-glükársav/galaktársav) 1:1 összetételű, egy- és kétmagvú $V^{IV}O$-komplexek képeződnek. Az alkoholos hidroxilcsoportok is részt vesznek a fémion megkötésében, növelik a fémion és a ligandum közti kölcsönhatás erősségét. A koordinálódott alkoholos hidroxilcsoportok fémionindukált deprotonálódása pH= 3–4 felett kezdődik, ezzel a folyamattal párhuzamosan lejátszódik egy dimerizáció is. Cisz-transz kétmagvú izomerek képződését támasztják alá az ESR-mérések. Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a D-glükársav valamivel erősebben komplexképző, mint a galaktársav.

3.1.2. Sal_2en típusú Schiff-bázis származékok oxovanádium(IV)kötő sajátságai

A másik vizsgált potenciális hordozóligandum-család az úgynevezett sal_2en típusú Schiff-bázisok és származékaik. A >C=NH csoportot tartalmazó vegyületeket imineknek nevezzük; ha a hidrogénatom helyén szubsztituens áll (>C=N–R), akkor beszélhetünk Schiff-bázisokról vagy azometinekről. A sal_2en két szalicilaldehid és egy etilén-diamin kondenzációs termékeként állítható elő. Az aldimin kötések borohidrides telítésével (szekunder aminok közé tartozó) redukált Schiff-bázist kapunk. Mind a szalicilaldehid, mind a diamin cseréjével, azaz a potenciális fémionkötő funkciós csoportok módosításával változtatható a ligandum térkitöltése, lipofil/hidrofil jellege, fémion- azon belül a vanádiumkötő sajátsága.

(1) A szalicilaldehidet piridoxálra (B_6-vitamin aktivitású piridinszármazékra);

(2) az etilén-diamint 2,3-diamino-propionsavra, illetve 2,5-diamino-pentánsavra cseréltük.

A 3.1.2.2. alfejezetben a pyr_2en: N,N'-etilén-bisz(piridoximin) és az $rpyr_2en$: N,N'-etilén-bisz(piridoxamin), a 3.1.2.3. alfejezetben pedig a sal_2dpa: N,N'-bisz(2-hidroxibenzil)-2,3-diamino-propánsav és a sal_2orn: N,N'-bisz(2-hidroxibenzil)-2,5-diamino-pentánsav oxovanádium(IV)kötő sajátságait mutatjuk be.

3.1.2.1. Irodalmi áttekintés

Először néhány négyfogú Schiff-bázis típus, majd a sal_2en és származékainak a $V^{IV}O$-komplexeivel foglalkozó közleményeket tekintjük át. Végül az általunk is vizsgált sal_2en-származékok közül az $rpyr_2en$ és a sal_2dpa átmenetifémekkel képzett komplexeit ismertetjük.

Négyfogú Schiff-bázisok szilárd $V^{IV}O$-komplexeit már többen előállították, elemezték. Ezek közül két típust emelnénk ki: az egyik egy diamin- és két szalicilaldehid-származék reakciójából képződik, a másik egy diaminból és két diketonból származtatható. Természetesen a szubsztituensek minőségétől függ a Schiff-bázisnak magának és fémkomplexeinek az oldhatósága. Legtöbbjük nem vagy alig oldódik vízben.

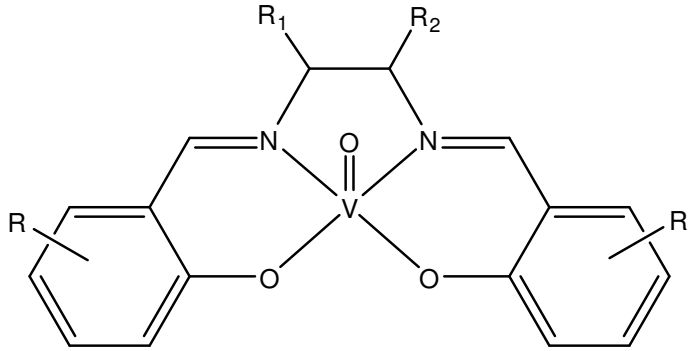
A diamin- és a szalicilaldehid-származékok kondenzációs termékeként keletkező Schiff-bázisok 1:1 sztöchiometriával rendelkező $V^{IV}O$-komplexeket képeznek. Ezek a vegyületek szilárd fázisban végtelen hosszú lánccá kapcsolódhatnak össze úgy, hogy a vanadiloxigén a szomszédos $V^{IV}O$-centrumhoz axiálisan koordinálódik. Egyes szerzők szerint nemcsak mágneses spin-spin csatolás létezik ezekben a komplexekben, hanem kismértékű ferromágneses csatolás is fellép. Ha a diamin szénatomszáma négynél nagyobb, akkor már nem monomer komplexek keletkeznek.

A Schiff-bázisokkal alkotott $V^{IV}O$-komplexekben a központi $V^{IV}O$-ion négyes vagy ötös koordinációs számú lehet az oldószer és a ligandum minőségétől függően. Szerkezeti izoméria is megfigyelhető azokban az esetekben, amikor egy oldószermolekula is koordinálódik a fémionhoz a ligandum négy donorcsoportja mellett. Attól függően, hogy az oldószermolekula (pl. víz) a vanadil-

oxigénhez képest milyen pozíciót foglal el cisz, illetve transz izomereket különböztetünk meg. (Az α-hidroxi-karbonsavaknál máshogy definiáltuk a cisz-transz izomereket.)

A diamin és a β-diketon kondenzációs termékeként keletkező Schiff-bázisok szintén 1:1 sztöchiometriával rendelkező $V^{IV}O$-komplexeket képeznek. Ellenben legtöbbjük monomer, nincsen bennük V–V csatolás; ötös koordinációs számúak, tetragonális piramisos szerkezetűek. Ugyanúgy különféle sztereoizomerek jöhetnek létre, mint a szalicilaldehid-származékokból képződött Schiff-bázisoknál, és a $V^{IV}O$-ion körüli tetraéderes torzulás is kimutatható. [82]

S. A. Fairhurst és munkatársai szerint a négyfogú, kétszeres negatív töltéssel rendelkező Schiff-bázisokkal alkotott szilárd $V^{IV}O$-komplexek két csoportra oszthatók. Az egyik csoportba azok a zöld színű vegyületek tartoznak, melyek központi fémionja ötös koordinációs számú, de kristályszerkezetükben nincsenek intermolekuláris kölcsönhatások. A másik csoportba tartozó sárgásbarna komplexek viszont kristályos állapotban polimerizálódnak. A négyfogú Schiff-bázisok közül a dianion N,N'-2,2-dimetiltrimetilén-bisz[szalicilidéniminát(2–)] $V^{IV}O$-komplexének [VO(salnptn)] szerkezetéről érdekes dolgot fedeztek fel. Szilárd állapotban a komplex ugyanúgy polimerizálódik ···V=O→V=O→V=O··· láncokon keresztül, mint a második csoport komplexei, viszont míg a salnptn donoratomjai (N, N', O, O') egy síkban vannak, és a vanádiumatom efelett helyezkedik el, addig a salnptn váz „esernyő" alakú. A [VO(OMe)(salnptn)] kristályszerkezetéről kimutatták, hogy a vanadiloxigénjével a metoxicsoport oxigénje egyértelműen cisz helyzetben található. A [VO(OMe)(salen)] (salen: N,N'-etilén-bisz(szalicilidéniminát)) komplex NMR-spektrumai igazolták, hogy oldatban is létezhet a cisz geometria. Szerintük a cisz szerkezet kialakulása annak a következménye, hogy a koordinációs szférában két erős π-kötő ligandum (O^{2-}, MeO^{-}) található.[137]



24. ábra Egy általános sal_2en típusú Schiff-bázis $V^{IV}O$-komplexének egy lehetséges szerkezete

A sal_2en típusú Schiff-bázisok $V^{IV}O$-komplexei (24. ábra) aerob körülmények között vizes oldatban egyrészt oxidálódhatnak (a fémionon), másrészt elhidrolizálhatnak (a ligandumon). A Schiff-bázis redukciójával előállított aminok (sal_2an) stabilisabb komplexeket képeznek (legalább a ligandum ellenáll a hidrolízisnek). Számos négyfogú sal_2en típusú ligandum $V^{IV}O$-komplexét potenciális inzulinérzékenyítő-szerként emlegetik. A [$V^{IV}O(sal_2en)$] komplex hatására – egy, alloxán hatására cukorbeteg patkányokon végzett kísérlet szerint – a megnövekedett vércukorszint normalizálódik,[138]

sőt az állatok inkább hipoglikémiás állapotba kerülnek; viszont a kezelés abbahagyása után a hatás azonnal elmúlik, visszaáll a magas vércukorszint (hiperglikémia).

A sal_2en és a $V^{IV}O$-komplexe sem oldódik vízben. J. Costa Pessoa, T. Kiss és munkatársaik többek között a sal_2en egyes vízoldható származékainak [$(SO_3\text{-sal})_2en$ és $R(SO_3\text{-sal})_2en$, ahol SO_3-sal = szaliciladehid-5-szulfonát] vanádiumkomplexeit jellemezték.[139] A Schiff-bázis esetében jelentős a hidrolízis. A redukált Schiff-bázis esetében – a $V^{IV}O–R(SO_3\text{-sal})_2en$ rendszerben – csak pH ~ 9,5 felett tapasztaltak lassú, hidrolízisre vagy oxidációra utaló folyamatot. A ligandum 1:1 összetételű, különböző protonáltsági állapotú ($[VOLH_x]^{x-2}$, x = 2, 0, –1) komplexeket képez. A pH~4 felett, mintegy 10%-ban képződő $[VOLH_2]$ komplex koordinációs módja: (NH, Ph–O^-, 2×H_2O). A pH = 5–8 tartományban közel 100%-ban képződik a $[VOL]^{2-}$ komplex ($\lg\beta_{110}$ = 18,97). Ennek a komplexnek két szerkezeti izomere különböztethető meg az oldatban az ESR-mérések alapján. A (2×NH, 2×Ph–O^-) kötésmódú, transz izomer a domináns. A pH~9 felett képződő (pK~9,5) $[VOLH_{-1}]^{3-}$ komplex egyik ekvatoriális pozícióját valószínűleg egy OH^- foglalja el.

Kutatócsoportunk az N,N'-etilén-bisz(piridoxamin) ($rpyr_2en$) komplexképző sajátságait is vizsgálta már Zn(II)[140], Cu(II) és Ni(II)[141] fémionokkal. Mindegyik rendszerben képződött 1:1 összetételű komplex (lásd 7. táblázat). Az $[MLH_x]^x$ (x = 2–0) részecskék kötésmódja azonos (2×NH_{amino}, 2×Pyr–O^-), csak a nem koordinálódó piridin nitrogén protonáltsági állapota eltérő. A Ni(II)ion kissé eltérő módon viselkedik: ligandumfelesleg mellett jelentős a biszkomplexképződés pH~6 felett, amely megakadályozza a semleges [ML] csapadék képződését. Ezekben az oktaéderes biszkomplexekben a két ligandum három-három foggal koordinálódik a központi fémionhoz. A Zn(II)ion esetében, pedig pH~10 felett egy hidrolízis részecske $[ZnLH_{-1}]^-$ jelenik meg. Mindegyik fémionnal különböző szerkezeti izomerek képződésére van lehetőség.

7. táblázat A különböző átmeneti fémion–$rpyr_2en$ rendszerekben képződő azonos összetételű részecskék ($M_pL_qH_r$) stabilitási állandója (I = 0,2 M KCl, T = 25,0 °C)

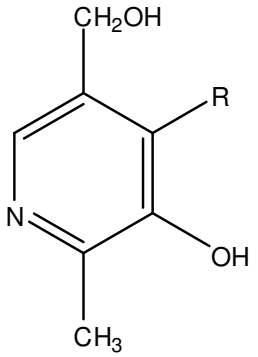
(p, q, r)	részecske	Zn(II)[a]: $\lg\beta$[140]	Cu(II): $\lg\beta$[141]	Ni(II)[b]: $\lg\beta$[141]
(1, 1, 2)	$[MLH_2]^{2+}$	27,08	35,3	28,52
(1, 1, 1)	$[MLH]^+$	19,64	28,04	20,62
(1, 1, 0)	[ML]	11,53	19,98	11,98

[a] Zn(II)ionnal $[ZnLH_{-1}]^-$ komplex is képződik
[b] a rendszerben különböző protonáltsági állapotú biszkomplexek is képződnek: $[NiL_2H_x]^{x-4}$, x = 4–0

A N,N'-bisz(2-hidroxibenzil)-2,3-diamino-propánsav (sal_2dpa) komplexképző sajátságait Cu(II) és Fe(III) fémionokkal T. Gajda és munkatársai mutatták be.[142] Az aszimmetrikus, ötfogú sal_2dpa mindkét fémionnal nagy stabilitású, különböző protonáltsági állapotú, 1:1 összetételű komplexeket képez ($[FeLH_x]^x$: x = 2, 0, –1; $[CuLH_x]^{x-1}$, x = 3, 2, 1, 0). Fe(III) komplexek koordinációs módjára a spektrális vizsgálatok alapján tettek javaslatot: az $[FeLH_2]^{2+}$ (NH, Ph–O^-, COO^-), az [FeL] (2×NH, 2×Ph–O^-, COO^-) és az $[FeLH_{-1}]^-$ (2×NH, 2×PhO^-, COO^-, OH^-) koordinációjú. A Cu(II)-

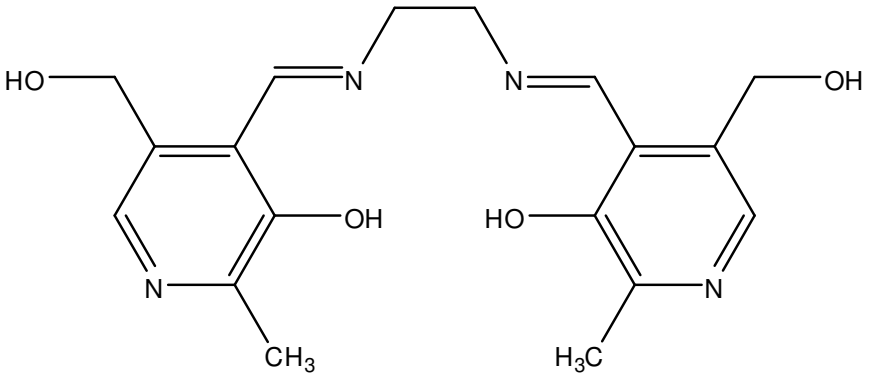
sal_2dpa rendszer ESR-spektrumai a $[CuLH_x]^{x-1}$ (x = 2–0) részecskék esetében különböző kötési izomerek jelenlétére, mikroszkopikus komplexképződési folyamatokra utalnak. A pH 6–11 tartományban kizárólag a (2×NH, 2×Ph–O^-, COO^-/H_2O) koordinációjú $[CuL]^-$ komplex képződik ($lg\beta_{110}$ = 21,58, I = 0,1 M (NaCl)). Fémfelesleg mellett kétmagvú komplexet is kimutattak mindkét fémionnal. A pH = 5–6 között domináns $[Fe_2LH_{-3}]$ egyik ritka példájául szolgál a karboxiláthidas kétmagvú Fe(III)komplexeknek. A csak kis mennyiségben megjelenő $[Cu_2L]^+$ részecske jelenlétét a spin-csatolt dimerekre jellemző ESR-jel támasztotta alá.

3.1.2.2. Piridoxálból és etiléndiaminból képzett Schiff-bázis és redukált Schiff-bázis[2]



25. ábra Piridoxinok:
R = CHO piridoxál
R = CH_2NH_2 piridoxamin
R = CH_2OH piridoxol

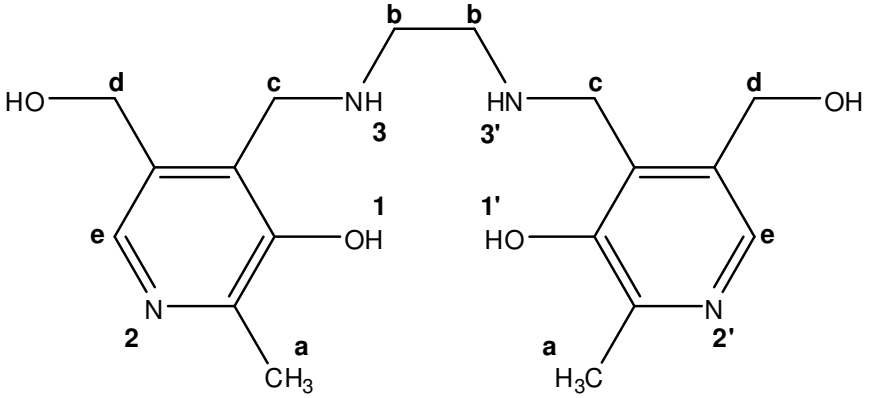
A piridoxál, a piridoxamin és a piridoxol is a B_6-vitamin aktivitású piridinszármazékok csoportjába, azaz a piridoxinok (25. ábra) közé tartozik. Részt vesznek számos anyagcsere-folyamat szabályozásában: az aminosavak, a fehérjék és az esszenciális zsírsavak anyagcseréjében, az aminosavak átalakulásaiban. A B_6-vitamin nélkülözhetetlen az ideg- és az immunrendszer működéséhez, a bőrfelület épségének megőrzéséhez és a vérképzéshez. A piridoxinok enzimatikus úton átalakulhatnak egymásba, illetve foszfátjuk alakjában számos enzimatikus dekarboxilezésben, transz- és dezaminálásban, foszforilezésben stb. vesznek részt.[143]



26. ábra A H_2pyr_2en Schiff-bázis szerkezete

Az N,N'-etilén-bisz(piridoximin) (pyr_2en) Schiff-bázis, mely két piridoxál és egy etiléndiamin jól kristályosodó kondenzációs terméke (26. ábra). A piridoxál az élő szervezetben is reagál különböző aminokkal Schiff-bázis típusú vegyületeket létrehozva. A két aldimin kötés telítésével állítható elő az N,N'-etilén-bisz(piridoxamin) ($rpyr_2en$) redukált Schiff-bázis, amely koordinációs kémiai szempontból a piridoxamin dimerjének tekinthető (27. ábra).

A pyr_2en és az $rpyr_2en$ szervezetbarát alkotóik, illetve donorcsoportjaik kedvező elrendeződése révén a fémionok szervezetbe juttatásában is szerepet játszhatnak. Modellvegyületként a piridoxamin (pyrN) vanádiumkötő sajátságait is jellemeztük (25. ábra).



27. ábra A H_2rpyr_2en redukált Schiff-bázis szerkezete. ^1H NMR-spektrumokban megjelenő jeleknek megfelelően a nem labilis, ekvivalens protonokat azonos betűkkel jelöltük

3.1.2.2.1. A ligandumok sav-bázis sajátságai

A pyr_2en és az $rpyr_2en$ teljesen protonált formában ($[H_6L]^{4+}$) háromszor két darab disszociábilis protont tartalmazó funkciós csoporttal – két protonált imino-/ amino-, két fenolos hidroxil- és két protonált piridiniumcsoporttal – rendelkezik. A négy darab alkoholos hidroxilcsoport (Pyr–CH_2<u>OH</u>) a vizsgálati körülmények (pH < 11,5) között nem deprotonálódik. A meghatározott protonálódási állandókat a 8. táblázatban tüntettük fel.

8. táblázat Az N,N'-etilén-bisz(piridoximin) (pyr_2en), az N,N'-etilén-bisz(piridoxamin) ($rpyr_2en$) és a piridoxamin (pyrN) pH-potenciometriás, illetve ^1H NMR titrálással meghatározott protonálódási állandói (I = 0,2 M KCl, T = 25,0 °C), illetve a piridoxál (pyrO) irodalmi adatai (I = 1,0 M KCl, T = 25,0 °C)[144]

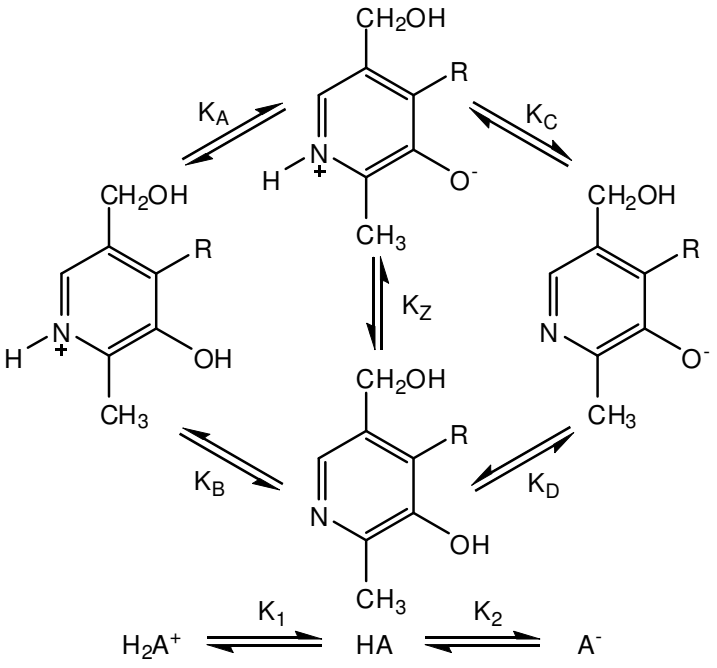
	pyr_2en		**$rpyr_2en$**			**pyrN**			**pyrO**
részecske	**lgβ**	**pK**	**lgβ**	**pK**	**[^{1}H NMR]**	**lgβ**	**pK**	**[^{1}H NMR]**	**pK**
H_6L	42,02(5)	3,76	38,60(2)	2,23	[–]	–			
H_5L	38,26(5)	4,43	36,37(2)	3,04	[–]	–			
H_4L	33,83(4)	6,89	33,33(1)	5,98	[5,5(2)]	–			
H_3L	26,94(3)	8,08	27,35(1)	7,68	[7,6(2)]	21,61(1)	3,36	[3,32(5)]	
H_2L	18,86(3)	8,79	19,67(1)	9,15	[8,9(4)]	18,25(1)	7,99	[8,1(1)]	3,90
HL	10,07(2)	10,07	10,52(1)	10,52	[10,7(4)]	10,26(1)	10,26	[10,6(3)]	8,28
L									12,93

A sal_2en típusú Schiff-bázisok oldatban részlegesen, savas pH-n akár teljesen elhidrolizálhatnak,[145,146] $V^{IV}O$-komplexeik diszproporcionálódhatnak.[147,148,149] Ezeket a folyamatokat az oldószer minősége is befolyásolja. A pyr_2en Schiff-bázis vízoldható, és sokkal stabilisabb vízben, mint a sal_2en. A pyr_2en protonálódási állandói pH-potenciometriásan meghatározhatóak vizes oldatban. A ^1H NMR-mérések során sem tapasztaltunk hidrolízisre utaló jelet a pH = 2–7 tartományban, míg pH = 7 felett megjelent egy hidrolízistermék (piridoxál) gyenge, aldehid proton jele. Ez a kismértékű, lúgos pH-n lejátszódó hidrolízis magyarázhatja, hogy a meghatározott állandók

bizonytalansága körülbelül kétszer nagyobb a Schiff-bázis esetében, mint a redukált ligandumnál. Az $rpyr_2en$ is jól oldódik vízben, amiben a pH-potenciometriás és a ^1H NMR-mérések szerint stabilis (a pH = 1–13 tartományban).

A 3-hidroxi-piridin-származékok sav-bázis sajátságait kiterjedten tanulmányozták már.[150, 151,152] A teljesen protonált piridoxamin $[H_3pyrN]^{2+}$ három, a piridoxál $[H_2pyrO]^+$ két lépcsős deprotonálódási folyamatban vesz részt pH=11,5-ig. A piridoxamin ~10,3-es pK-értéke főleg a protonált aminocsoport deprotonálódásához rendelhető. A piridoxál hemiacetál formája nagyon lúgos pH-n (pH>12–13) további egy proton leadására képes $[H_{-1}pyrO]^{2-}$ képződése közben.

Attól függően, hogy milyen sorrendben deprotonálódik a „fenolos" OH, illetve a piridinium NH^+, mikroegyensúlyi folyamatok játszódnak le. Az egyszeresen deprotonált forma két különböző állapotban – semleges és ikerionos formában (28. ábra) – is létezhet.



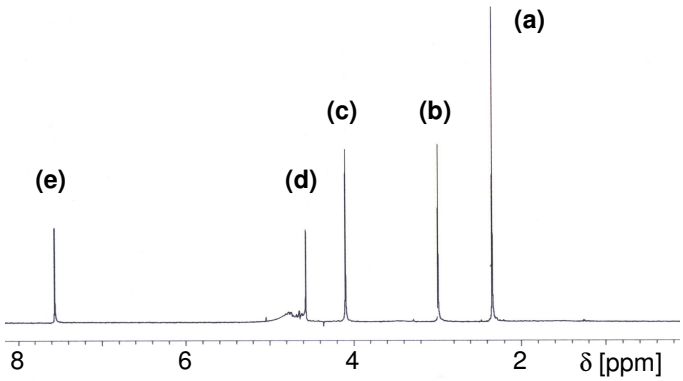
28. ábra A piridoxinok deprotonálódási folyamatai, mikro- (K_A, K_B, K_C, K_D, K_Z), illetve makroegyensúlyi állandói (K_1, K_2)

D. E. Metzler és E. E. Snell különböző összetételű dioxán-víz elegyekben felvett UV-spektrumok alapján próbálta megbecsülni a két forma százalékos arányát, illetve a K_z izomerációs egyensúlyi állandó értékét (lásd 28. ábra) semleges vizes oldatban.[151] A következőket kapták a semleges forma mennyiségére: 46% a 3-hidroxi-piridin ($K_z = 1,2$), 12% a piridoxol ($K_z = 8$), 8% a piridoxál ($K_z = 12$) és 3% a piridoxamin ($K_z = 40$) esetében. Ezek alapján a semleges vizes oldatban az ikerionos forma tekinthető a domináns izomernek (a „fenolos" hidroxilcsoport deprotonált, míg a piridin-N protonált), miközben a semleges részecske mennyisége is szignifikáns. A piridoxál és a piridoxamin 3–4-es pK-értéke – a fentiek alapján – főleg a Pyr–OH-hoz, a 8 körüli pK-juk pedig elsősorban a piridinium NH^+-hoz rendelhető.

Általánosságban elmondhatjuk, hogy a 3-hidroxi-piridin típusú vegyületekben a „fenolos” OH pK-értéke a piridinium NH^+ pK-értékével összemérhető lesz, a legtöbb származék esetében kisebb is annál. Összehasonlításképpen a fenol, és a piridin protonálódási állandója (pK): 9,8[153], illetve 5,4[154]. Az N-metil-piridoxol egyetlen pK-értéke (4,92)[150] is azt bizonyítja, hogy a 3-as pozícióban lévő hidroxilcsoport savasságát jelentősen megnöveli az elektronszívó hatású piridin-N (főleg ha ez a nitrogén még protonált is). A piridoxamin esetében a gyűrűnitrogénen felül az elektronszívó oldallánci aminocsoport is csökkenti a Pyr–OH-hoz tartozó pK értékét. Viszont a piridoxamin hidroxil- és az aminocsoportja között létrejövő hidrogénhidas kölcsönhatás miatt a két kölcsönható funkciós csoport sav-bázis folyamatait nem lehet teljesen függetlenül kezelni. A létrejövő hidrogénhíd a (HA)B és az A(HB) részecskéket megkülönböztethetetlenné teszi (A···H···B).

A redukált Schiff-bázis ($rpyr_2en$) bizonyos szempontból a piridoxamin dimerjének tekinthető. Ráadásul mindkét vizsgált ligandumban a két amino-/iminocsoport elég közel van egymáshoz – csak egy etilénhíd választja el őket – ahhoz, hogy a fent említett hatásokon túl molekulán belüli további kölcsönhatások bonyolítsák a képet. A hidrogénhíd kölcsönhatás a Schiff-bázis esetében valószínűleg gyengébb, mivel az első két pK-érték magasabb, míg az utolsó kettő alacsonyabb a redukált ligandumhoz képest.

Mivel a pH-potenciometria segítségével csak makroszkopikus állandókat tudunk meghatározni, ezért annak igazolására, hogy a vizsgált Schiff-bázis típusú ligandumaink esetében is a Pyr–OH savasabb a piridinium NH^+-nál a pH-potenciometriás méréseinket ^1H NMR, illetve spektrofotometriás titrálásokkal egészítettük ki. Ezeket a spektroszkópiai méréseket a redukált Schiff-bázis esetében mutatjuk be.



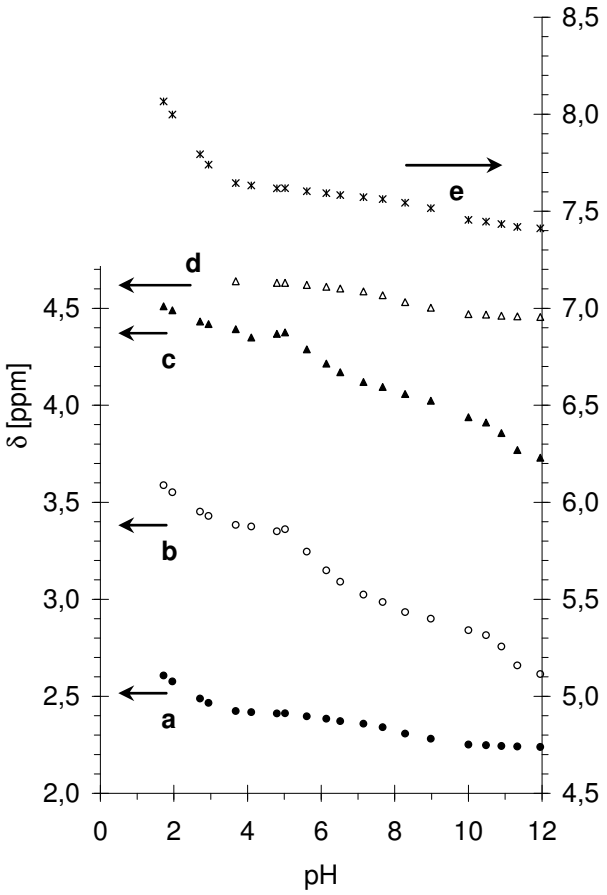
29. ábra Az $rpyr_2en$ D_2O-ban felvett ^1H NMR-spektruma (pH=7,7, T=25,0±0,1°C). A kis mennyiségű H_2O jelét előtelítési pulzus szekvenciával elnyomtuk. (a) Pyr–C<u>H</u>$_3$, (b) –C<u>H</u>$_2$CH$_2$–, (c) Pyr–C<u>H</u>$_2$–NH–, (d) Pyr–C<u>H</u>$_2$–OH, (e) aromás H

A ^1H NMR időskálán a H_nL^{n-2} (n = 0–6) részecskék között gyors a csere. Ennek köszönhető az, hogy ahogy a pH csökken (vagyis n száma nő), nem jelenik meg új csúcs a ^1H NMR-spektrumban (29. ábra), csak a meglévők tolódnak el a kisebb tér (a nagyobb kémiai eltolódás) irányába. Az ekvivalens magok kémiai környezete a titrálás során a közelükben lévő ionizálható csoportok sav-bázis folyamatainak hatására változik: például a N- és az O-atomok protonálódása csökkenti a szomszédos szénatomokhoz kapcsolódó, nem labilis protonokra kifejtett árnyékoló hatást.

A redukált Schiff-bázis ^{1}H NMR-spektrumának pH-függése a 30. ábrán követhető nyomon (a betűk a 27. ábrán feltüntetett szerkezet megfelelő protonjait jelölik). A kémiai eltolódás pH-függése az alábbi képlettel írható le:

$$\delta_i = \delta_{0i} + \sum_i \frac{\Delta_i}{1+10^{(pK_i - pH)}} \qquad [22]$$

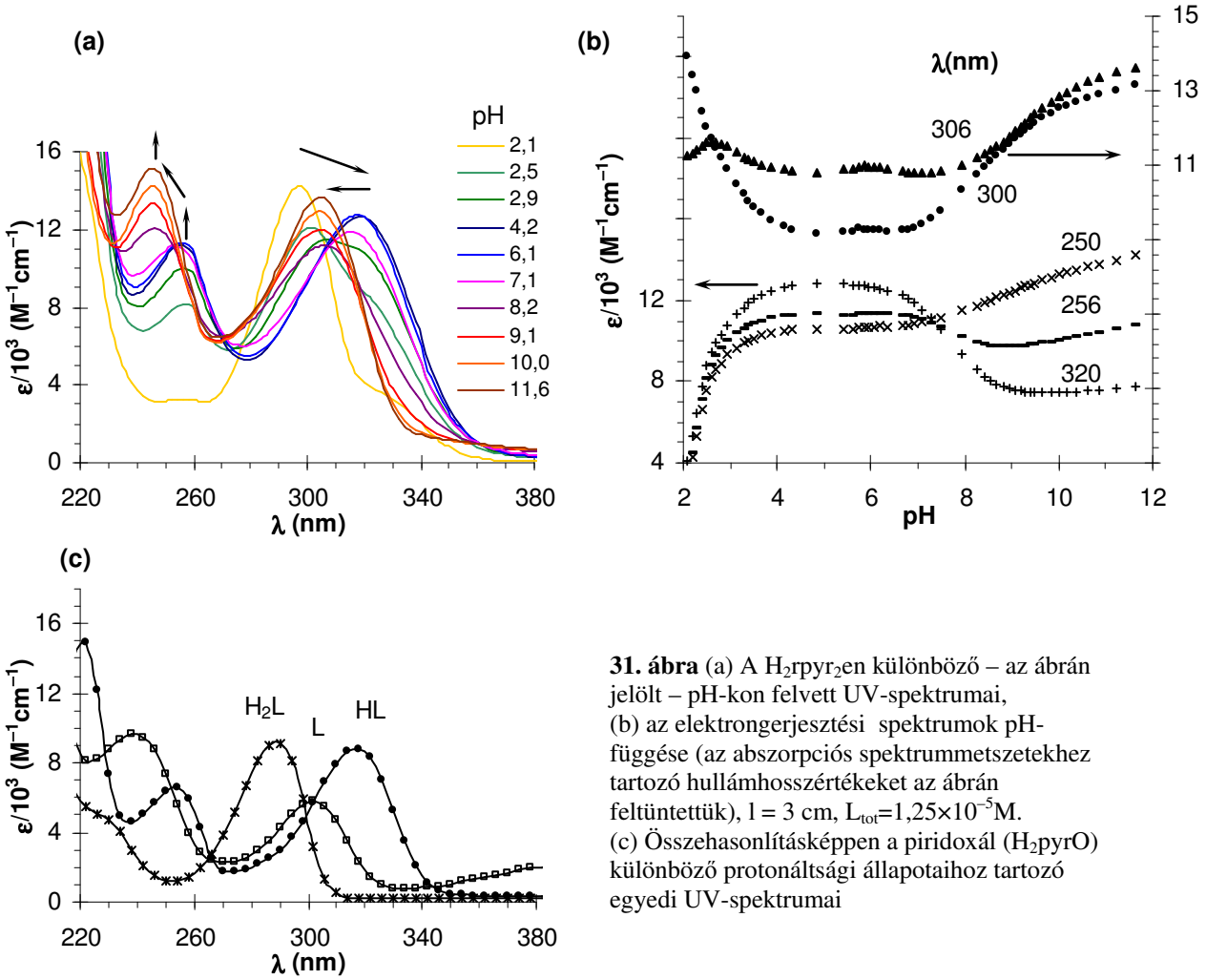
ahol δ_{0i} a teljesen deprotonált ligandumhoz (L^{2-}) tartozó kémiai eltolódás értéke, a Δ_i pedig az i-edik protonálódási állandóhoz (pK_i) tartozó kémiai eltolódás változás mértéke (i = 1–6). A ligandum makroszkopikus protonálódási állandóit a ^{1}H NMR-mérések alapján is meghatároztuk: a Δ_i és a pKi értékeket finomítva a mért és a [22] egyenlet alapján számított kémiai eltolódás értékek különbségét minimalizáltuk.



30. ábra A H_2rpyr_2en ^{1}H NMR titrálási görbéi
(a) Pyr–C<u>H</u>$_3$, (b) –C<u>H</u>$_2$CH$_2$–, (c) Pyr–C<u>H</u>$_2$–NH–,
(d) Pyr–C<u>H</u>$_2$–OH, (e) aromás H

Az egyes funkciós csoportok protonálódási állandóinak meghatározását, a mikrofolyamatok pontos feltérképezését ezzel a módszerrel sem tudtuk megoldani. A ligandum egyes részei kölcsönhatnak, mivel a molekula viszonylag kisméretű és az aromás gyűrűn, valamint a kiterjedt hidrogénhíd rendszeren keresztül hatást gyakorolhatnak egymásra a csoportok. A ligandum bármely részén bekövetkező protonálódás vagy deprotonálódás különböző mértékben ugyan, de hatással lehet valamennyi funkciós csoport kémiai eltolódására. Például a Pyr–OH protonálódása vagy deprotonálódása nemcsak a piridingyűrűre és a hozzá kapcsolódó funkciós csoportok protonjaira, hanem az aminocsoportra és az azzal szomszédos magokra is hat (a–e). A piridinium NH^+ deprotonálódása szintén hatást gyakorol majdnem mindegyik protonra – (a) a C<u>H</u>$_3$, (c) a PyrC<u>H</u>$_2$N, (d) a PyrC<u>H</u>$_2$OH és (e) az aromás protonra (lásd 30. ábra) – az aromás gyűrűn keresztül.

A redukált Schiff-bázis UV-tartományban felvett elektrongerjesztési spektrumain is jól követhetők a 3-hidroxi-piridin típusú vegyületeknél megfigyelt[151] változások (31. ábra). A pH-potenciometriásan meghatározott pK-k közül az első kettő elkülönül a többitől.



31. ábra (a) A H_2rpyr_2en különböző – az ábrán jelölt – pH-kon felvett UV-spektrumai, (b) az elektrongerjesztési spektrumok pH-függése (az abszorpciós spektrummetszetekhez tartozó hullámhosszértékeket az ábrán feltüntettük), l = 3 cm, L_{tot}=1,25×10^{-5}M. (c) Összehasonlításképpen a piridoxál (H_2pyrO) különböző protonáltsági állapotaihoz tartozó egyedi UV-spektrumai

Az UV-spektrumok is alátámasztják azt, hogy az $rpyr_2en$ esetében is a Pyr–OH csoportok deprotonálódnak először (kis pH-n). A teljesen protonált részecske és a „di-ikerionos" forma abszorpciós maximumaihoz tartozó hullámhossz értékek közötti különbség (22 nm) ugyan kisebb, mint a 3-hidroxi-piridin típusú vegyületekre közölt 32 ± 3 nm.[151] A következő kétszer két deprotonálódási folyamat nem választható el tisztán egymástól. A pH = 6,5 – 9,5 tartományban változik legtöbbet a spektrum, valószínűleg a piridinnitrogéneken lejátszódó sav-bázis folyamatoknak köszönhetően.

Az NMR és a spektrofotometriás titrálások alapján a funkciós csoportok savi erősségéről az alábbi kvalitatív képet kaptuk: a két Pyr–OH a legsavasabb, majd az egyik protonált aminocsoport és a két piridinium NH^+ következik, a sort a másik protonált aminocsoport zárja.

3.1.2.2.2. A ligandumok oxovanádium(IV)komplexei

A $V^{IV}O$ – pyr_2en/$rpyr_2en$ rendszerek esetében a pH-potenciometriás méréseket pH~5-ig, illetve pH~8-ig, míg a piridoxaminnal (pyrN) pH~7-ig tudtuk elvégezni. Nagyobb pH-n csapadékkiválást észleltünk, a semleges [VO(pyr_2en)], [VO($rpyr_2en$)], [VO$(pyrN)_2$] összetételű komplexek kiváltak az oldatból.

Bár mind a pyr_2en, mind az $rpyr_2en$ hatfogú, a donorcsoportok molekulán belüli elrendeződése azt mutatja, hogy egyidejűleg nincs lehetőség mind a hat donoratom egy központi fémionhoz történő koordinálódására. A két piridin-N a molekulán belül sztérikusan elkülönül a többi funkciós csoporttól. Várható, hogy nem vesznek részt a fémion megkötésében. A 9. táblázat a legjobb speciációs modellt és a képződő komplexek pH-potenciometriás mérések alapján meghatározott stabilitási állandóit tartalmazza. A vizsgált rendszerekben képződő részecskék eloszlásgörbéi a 32. ábrán láthatóak.

9. táblázat Az N,N'-etilén-bisz(piridoximin) (pyr_2en), az N,N'-etilén-bisz(piridoxamin) ($rpyr_2en$) és a piridoxamin (pyrN) oxovanádium(IV)ionnal alkotott komplexeinek ($M_pL_qH_r$) stabilitási állandói. A töltéseket nem jelöltük (I = 0,2 M KCl, T = 25,0 °C)

		pyr_2en		**$rpyr_2en$**		**pyrN**	
(p, q, r)	**részecske**	**lgβ**	**pK**	**lgβ**	**pK**	**lgβ**	**pK**
(1, 1, 4)	$VOLH_4$	36,46(5)		–		–	
(1, 1, 2)	$VOLH_2$	28,01(3)	4,94	32,97(1)	6,74	–	
(1, 1, 1)	VOLH	23,07(3)	~6	26,23(2)	7,59	16,58(1)	5,51
(1, 1, 0)	VOL	~17		18,64(2)		11,07(4)	
(1, 2, 2)	VOL_2H_2	–		–		31,36(7)	6,05
(1, 2, 1)	VOL_2H	–		–		25,31(2)	7,58
(1, 2, 0)	VOL_2	–		–		17,73(12)	
Mérési pontok száma:		113		316		317	
Illesztési paraméter[a] [cm^3]:		$6{,}1\times10^{-3}$		$6{,}6\times10^{-3}$		$1{,}9\times10^{-3}$	
bázicitással korrigált stabilitási állandók							
$VO^{2+} + LH_6^{4+} \rightleftharpoons [VOLH_2]^{2+} + 4H^+$				$(VO^{2+} + 2\,LH_3^{2+} \rightleftharpoons [VOL_2H_2]^{2+} + 4H^+)^*$			
$VO^{2+} + LH_4^{2+} \rightleftharpoons [VOLH_4]^{2+} + 2H^+$				$(VO^{2+} + LH_3^{2+} \rightleftharpoons [VOLH]^{2+} + 2H^+)^{**}$			
$\lg K^* = \lg\beta(VOLH_2) - \lg\beta(LH_6)$		–14,01		–5,63		$(-11{,}86)^*$	
$\lg K^* = \lg\beta(VOLH_4) - \lg\beta(LH_6)$		–5,56				$(-5{,}03)^{**}$	

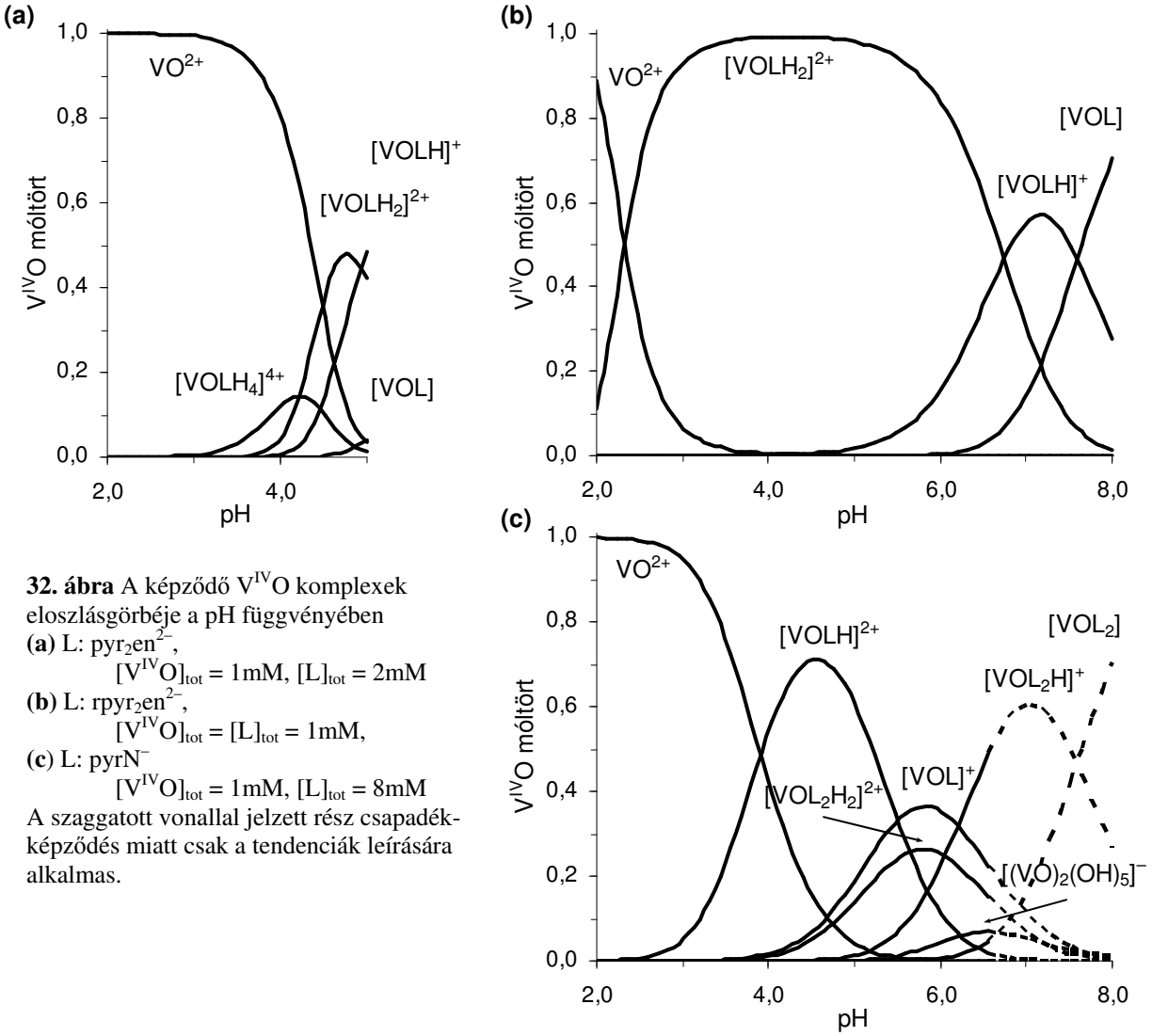
[a] Az illesztési paraméter a mért és a számított állandókkal visszaszámolt titrálási görbék átlagos eltérése mérőoldat fogyásban kifejezve.

A modellszámítások során a négy potenciális donorcsoportot tartalmazó Schiff-bázisokhoz hasonlóan a $V^{IV}O$–pyr_2en/$rpyr_2en$ rendszerekben is csak 1:1 összetételű komplexek képződését feltételeztük, míg a potenciálisan kétfogú pyrN-nel biszkomplexek kialakulására is van lehetőség. A pyr_2en esetében a semleges [VOL] komplex stabilitási állandóját csak közelítőleg tudtuk

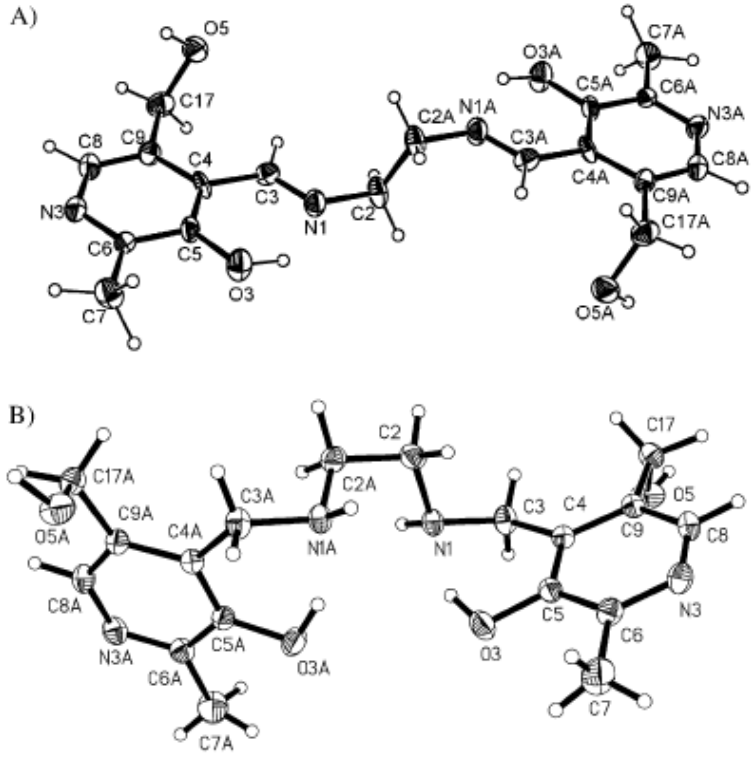
meghatározni, mivel a komplex kis oldhatósága miatt képződését pH-potenciometriásan csak ~10%-os mértékig tudtuk nyomon követni. A képződő komplexek kötésmódjára LT ESR- és UV-Vis spektroszkópiás mérések alapján tettünk javaslatot.

A $V^{IV}O$–pyr_2en/$rpyr_2en$ rendszerekben pH-potenciometriásan $[VOLH_n]^{n+}$ (n = 2–0) összetételű részecskék képződését mutattuk ki, míg a pyr_2en esetében kis pH-n a komplexképződés a $[VOLH_4]^{4+}$ részecske megjelenésével kezdődik. Az eloszlásgörbék (32. (a-b) ábra) összehasonlítása alapján elmondható, hogy az $rpyr_2en$ redukált Schiff-bázis jóval erősebb fémionkötő képességgel rendelkezik, mint a pyr_2en Schiff-bázis. Míg az $rpyr_2en$ már pH~2 alatt elkezdi a vanádiumot kötni $[VOLH_2]^{2+}$ formájában, addig a pyr_2en-nel csak pH~3 felett képződik egyáltalán $V^{IV}O$-komplex ($[VOLH_4]^{4+}$) és csak pH~3,6 felett jelenik meg a $[VOLH_2]^{2+}$. A proton-helyettesítési reakciók egyensúlyi állandója ($VO^{2+} + H_6L^{4+} \rightleftharpoons [VOLH_2]^{2+} + 4H^+$, lgK*: a bázicitással korrigált stabilitási állandó) is azt mutatja, hogy az $rpyr_2en$ mintegy nyolc nagyságrenddel stabilisabb $V^{IV}O$-komplexet képez.

A pyr_2en Schiff-bázis jóval gyengébb vanádiumkötő képessége az iminocsoport kettős kötése okozta merevebb ligandumszerkezettel, a ligandum kedvezőtlen preorganizációjával értelmezhető, amit a ligandumok röntgenszerkezete is alátámaszt (33. ábra).



32. ábra A képződő $V^{IV}O$ komplexek eloszlásgörbéje a pH függvényében
(a) L: pyr_2en^{2-},
$[V^{IV}O]_{tot}$ = 1mM, $[L]_{tot}$ = 2mM
(b) L: $rpyr_2en^{2-}$,
$[V^{IV}O]_{tot} = [L]_{tot}$ = 1mM,
(c) L: $pyrN^-$
$[V^{IV}O]_{tot}$ = 1mM, $[L]_{tot}$ = 8mM
A szaggatott vonallal jelzett rész csapadékképződés miatt csak a tendenciák leírására alkalmas.

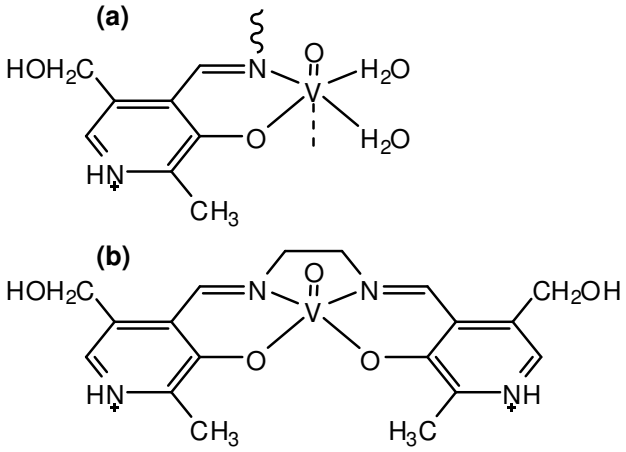


33. ábra A) A H_2pyr_2en és **B)** a H_2rpyr_2en röntgenszerkezete (ORTEP diagramok)

A pyr_2en molekula mindkét fele planáris (0,01 Å-n belül), az etiléndiamin híd transz (180°-os torziós szöggel), míg az N=C és a N–CH_2 kötések transz (179,3(5)°) és gauche (80,08(8)°) konformációval rendelkeznek. Eközben az $rpyr_2en$ molekula egyik fele sem planáris, és a piridingyűrűk is 92°-ot zárnak be egymással.

A szerkezetbeli különbség okozza azt is, hogy a pyr_2en esetében nem jön létre azonnal a $[VOLH_2]^{2+}$ komplex, hanem kezdetben a ligandum csak két donoratomon – az egymás melletti fenolos hidroxil- és iminocsoporton – keresztül koordinálódik, a képződő komplex $[VOLH_4]^{4+}$ összetételű.

A $[VOLH_2]^{2+}$ részecskében a két fenolos hidroxil-, a két amino-, illetve iminocsoportokon keresztül koordinálódhatnak a ligandumok a fémionhoz, és a két nem koordinálódó piridin-N protonált. A komplexben lévő két piridinium NH^+ deprotonálódásával $[VOLH]^+$, illetve [VOL] összetételű komplexek képződnek. A $[VOLH_2]^{2+}$ és a $[VOLH]^+$ pK-értéke a redukált Schiff-bázis esetében a ligandum harmadik és negyedik pK értékével mutat hasonlóságot a piridiniumcsoport deprotonálódását alátámasztva, míg a Schiff-bázis esetében azoknál közel két nagyságrenddel kisebb értékeket kapunk.

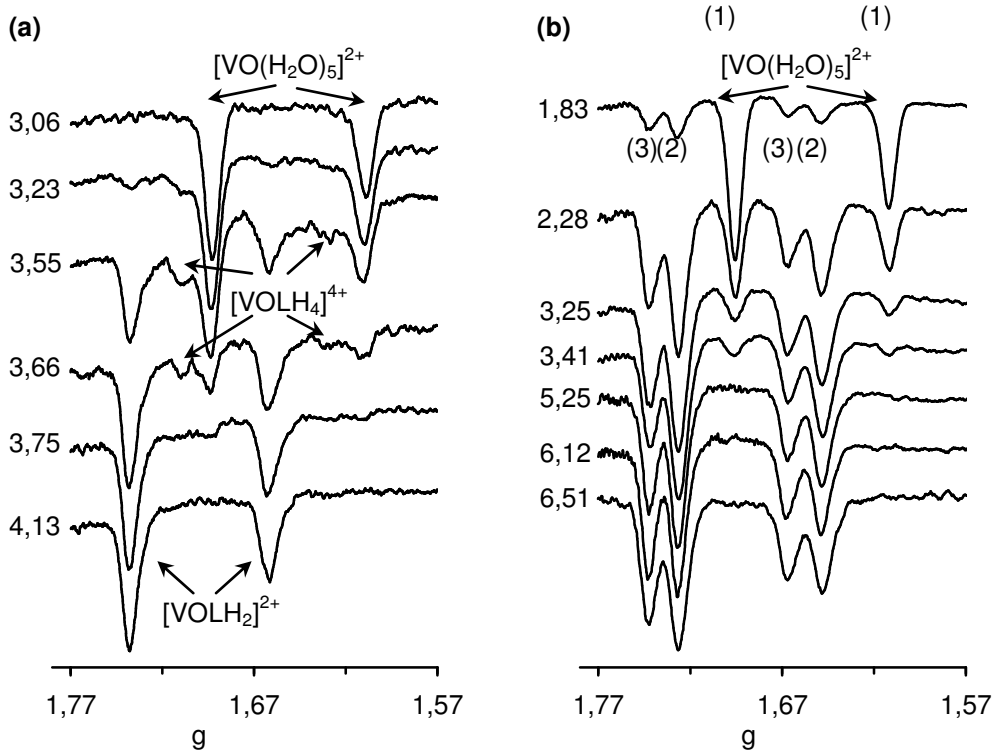


34. ábra (a) $[VOpyrH_4]^{4+}$, **(b)** $[VOpyrH_2]^{2+}$ komplexek javasolt kötésmódja

A piridoxamin – a 9. táblázatban feltüntetett proton-helyettesítési reakciók egyensúlyi állandója alapján – gyengébb komplexképző mint a „dimerje”, viszont valamivel erősebb mint a Schiff-bázis (32. (c) ábra).

A $V^{IV}O$–pyrN rendszerben csak pH~2,5 felett képződik $V^{IV}O$-komplex: a $[VOLH]^{2+}$ összetételű és (Pyr–O^-, N_{amino}) koordinációs módú. A piridinum NH^+ deprotonálódásával a $[VOL]^+$ komplexet kapjuk. A második ligandum koordinálódásával (lgK(VOLH/VOL_2H_2) = 1,80) a $[VOL_2H_2]^{2+}$ összetételű, 2×(Pyr–O^-, N_{amino}) koordinációs módú biszkomplex jelenik meg az oldatban közel 33%-ban. A piridinum NH^+ csoportok további deprotonálódásával a $[VOL_2H]^+$ és a semleges $[VOL_2]$ képződik, amely ki is csapódik az oldatból. Az ESR-mérések (10. táblázat) is alátámasztják a pH-potenciometriás eredményeket.

A $V^{IV}O$–pyr_2en/$rpyr_2en$ rendszerekben a 77 K-en felvett LT ESR-spektrumok nagy térhez tartozó párhuzamos tartománya a 35. ábrán látható, míg a 10. táblázat tartalmazza a komplexek ESR-paramétereit. Dimerizációra utaló spektrumintenzitás-csökkenést egyik esetben sem tapasztaltunk a pH növelésével.



35. ábra A $V^{IV}O$ – pyr_2en/$rpyr_2en$ rendszerek LT ESR-spektrumainak pH-függése (T = 77 K)
(a) L: pyr_2en^{2-}, $[V^{IV}O]_{tot}$ = 5mM, $[L]_{tot}$ = 30mM **(b)** L: $rpyr_2en^{2-}$, $[V^{IV}O]_{tot}$ = $[L]_{tot}$ = 5mM
(A minták pH-ját a spektrumrészletek mellett feltüntettük)

A Schiff-bázis esetében a pH-potenciometriás méréseknek megfelelően az ESR-spektrumokon (35. (a) ábrán) is három, egymástól eltérő koordinációjú részecske jelenik meg: $[VO(H_2O)_5]^{2+}$, $[VOLH_4]^{4+}$, $[VOLH_n]^{n+}$ (n=2–0). A javasolt kötésmódok alapján (34. ábra) számított A_z értékek (170×10^{-4} cm^{-1} és 158×10^{-4} cm^{-1}) jól egyeznek a mért értékekkel (10. táblázat). A $[VOLH_2]^{2+}$ komplex deprotonálódása során a koordinációs mód, így a minta LT ESR-spektruma sem változik, ez a piridinnitrogéneken lejátszódó folyamatokat támasztja alá. A $[VOLH_n]^{n+}$ részecskék spektruma már nem axiális, hanem rombos (a koordinációs szféra torzul a „merevített” szerkezete miatt).

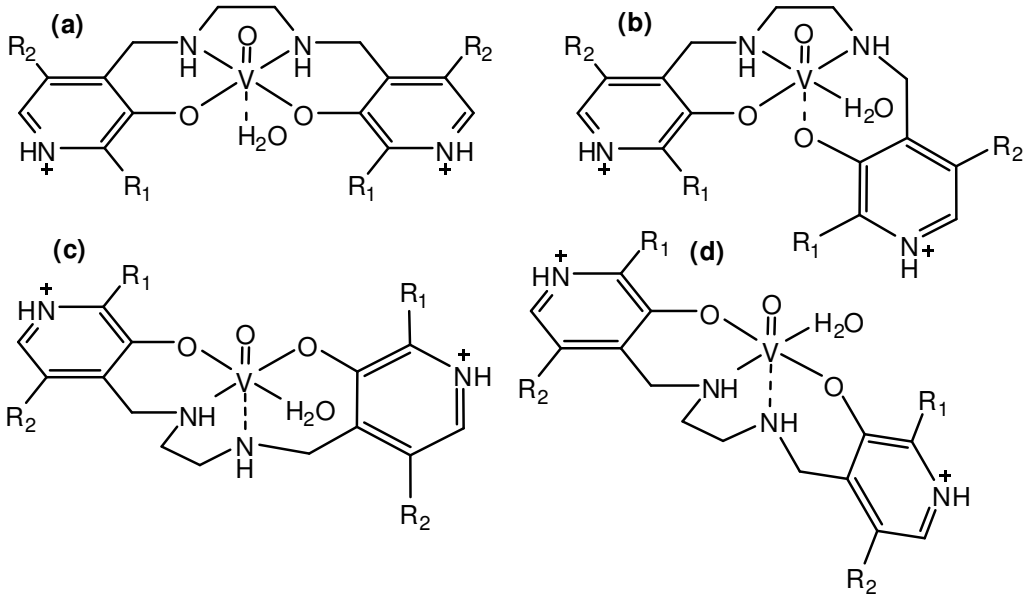
10. táblázat A képződő komplexek ESR-paraméterei

		g_x	g_y	A_x [10^{-4} cm^{-1}]	A_y	g_z	A_z [10^{-4} cm^{-1}]
$[VO(pyr_2en)H_4]^{4+}$						~1,942	~172
$[VO(pyr_2en)H_n]^{n+}$ (n = 2–0)		1,982	1,978	46,2	56,2	1,956	158,7
$[VO(rpyr_2en)H_n]^{n+}$ (n = 2–0)[a]							
cisz izomer[b]	pH= 3,5–4,5	1,981		57,2		1,953	166,2
	pH= 7,05	1,981		56,0		1,953	165,0
	pH= 7,60	1,981		56,0		1,951	163,7
transz izomer[b]	pH= 3,5–4,5	1,981		50,6		1,960	158,2
	pH= 7,05	1,980		50,7		1,960	157,5
	pH= 7,60	1,980		51,5		1,960	157,0
$[VO(pyrN)H_n]^{n+1}$ (n = 1, 0)		1,976		58,5		1,943	169,3
$[VO(pyrN)_2H_n]^{n+}$ (n = 2–0)		1,986		59,5		1,945	159,4

[a] A speciáció alapján a minta oldatok összetétele: pH=3,5–4,5: 100% $[VOLH_2]^{2+}$; pH= 7,05: 28% $[VOLH_2]^{2+}$, 56% $[VOLH]^{+}$, 16% [VOL]; pH= 7,60: 6% $[VOLH_2]^{2+}$, 46% $[VOLH]^{+}$, 47% [VOL]

[b] Ebben az esetben a koordinálódó H_2O és a V=O csoport térhelyzete alapján definiáltuk az izomereket.

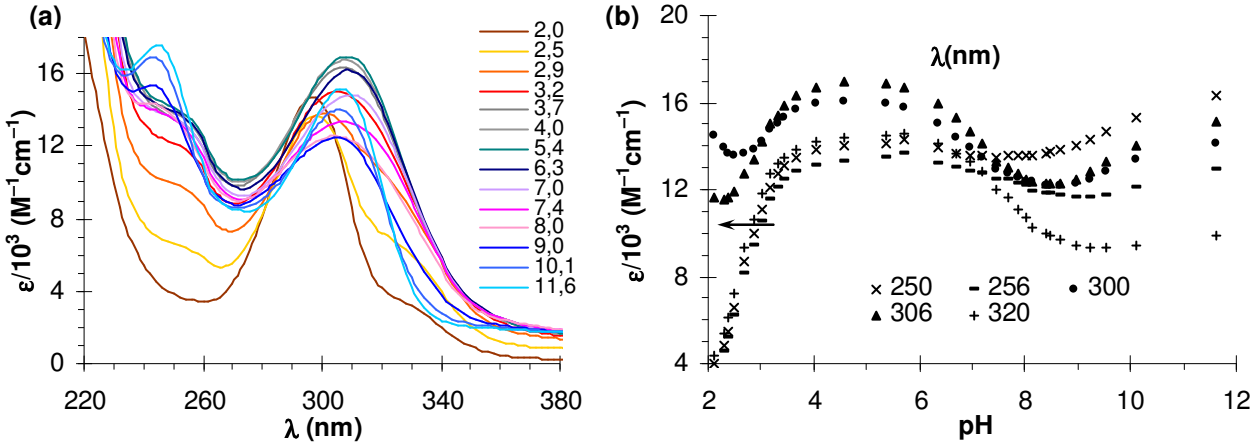
A $V^{IV}O$–$rpyr_2en$ minták LT ESR-spektrumaiban is három, egymástól eltérő koordinációjú részecskének megfelelő csúcs figyelhető meg (35. (b) ábra). A pH~2-nél jelenlévő (1) csúcs egyértelműen a szabad fémionhoz ($[VO(H_2O)_5]^{2+}$) rendelhető. A (2) és a (3) részecske aránya a pH = 2 – 6 tartományban gyakorlatilag állandó, ami azt mutatja, hogy a két részecske protonáltsági állapota, összetétele azonos, csak szerkezetük, koordinációs módjuk eltérő, tehát szerkezeti izomerek. A koordinációs szférát egy oldószermolekula (víz) telíti, a $V^{IV}O^{2+}$ koordinációs száma öt lesz. Ebben az esetben a koordinálódó vízmolekula pozíciója – a H_2O és a V=O csoport térhelyzete – alapján különböztetjük meg a cisz és a transz izomereket.[155,156]



36. ábra A $[VO(rpyr_2en)H_2]^{2+}$ komplex javasolt kötésmódjai, illetve az azok alapján becsült ESR-paraméterek **(a)** cisz izomer, A_z= 158×10^{-4} cm^{-1}; **(b), (c), (d)** transz izomerek, mindháromnál A_z= 164–165 ×10^{-4} cm^{-1}

A 36. ábrán feltüntetett lehetséges koordinációs módoknak megfelelő, számított A_z értékek jól egyeznek a mért értékekkel (10. táblázat). Az egyféle cisz (36. ábra (a) szerkezet) mellett a háromféle transz komplex közül – elméleti számítások alapján – a 36. ábra (b) ábrán feltüntetett koordinációs mód: (Pyr–O^-, N_{amino}, N_{amino}, $H_2O)_{ekv}$ a legkedvezőbb energetikailag. A $[VOLH_2]^{2+}$ komplex deprotonálódása során (pH>6) a nem koordinálódó piridinium NH^+ protonvesztésével nem jön létre új koordinációs mód, ellenben kismértékben megváltozik a két izomer aránya az ESR-mérések szerint.

A $V^{IV}O$–rpyr$_2$en 1:1 rendszerben felvett UV-spektrumok pH-függése a 37. ábrán követhető nyomon. Mivel ezen spektrális vizsgálatokat a komplexek nagy moláris abszorpciós koefficiensei miatt két nagyságrenddel alacsonyabb koncentrációtartományban végeztük el, mint a többi mérést, csapadékkiválást nem tapasztaltunk. A pH = 3 – 5,5 tartományban – ahol a $[VOLH_2]^{2+}$ már kialakult – gyakorlatilag nem tapasztalunk spektrális változást. Ahogy a ligandum – fémionhoz koordinálódó donorcsoportjaitól viszonylag távol eső – piridiniumcsoportjai deprotonálódnak (pH=5,5 – 8,0), a 310 nm-nél jelentkező sáv kismértékben az alacsonyabb hullámhossztartomány felé tolódik, miközben intenzitása is csökken. A spektrális változások pH ~ 9 felett teljes egészében megegyeznek a szabad ligandumnál tapasztaltakkal. A ligandum kiszorul a koordinációs szférából és $V^{IV}O$-hidroxokomplexek képződnek.



37. ábra (a) A $V^{IV}O$–rpyr$_2$en rendszer különböző – az ábrán jelölt – pH-kon felvett UV-spektrumai, (b) az elektrongerjesztési spektrumok pH-függése (az abszorpciós spektrummetszetekhez tartozó hullámhosszértékeket az ábrán feltüntettük), l = 3 cm, $[M]_{tot} = L_{tot}=1{,}25\times10^{-5}$M.

Összefoglalás

Az ebben a fejezetben bemutatott – pyr$_2$en és rpyr$_2$en – potenciális hordozóligandumok között egyetlen szerkezeti különbség van, mégpedig az, hogy a Schiff-bázis két imino-, a redukált Schiff-bázis pedig két aminocsoporttal rendelkezik. A kettős kötések merevebb szerkezetet eredményeznek, mely jelentősen befolyásolja a sav-bázis és komplexképződési folyamatokat. Mindkét ligandum döntően négy foggal (2×Pyr–O^-, 2×$N_{amino/imino}$) koordinálódik a fémionhoz. Attól függően, hogy egy további vízmolekula axiálisan, vagy ekvatoriálisan köt be a koordinációs szférába szerkezeti (cisz-transz) izomerek képződnek. Az ESR-vizsgálatok alapján javaslatot tettünk az izomerekben lévő központi

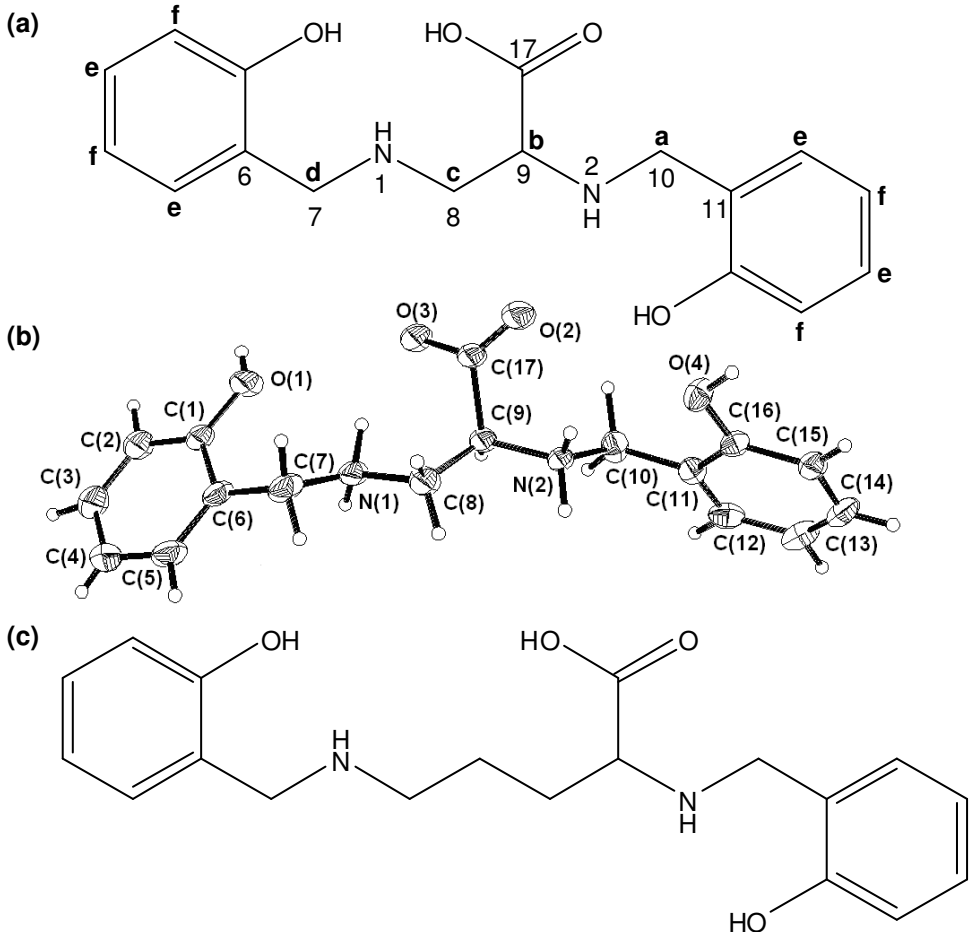
fémion környezetére. A kettős kötésekkel merevített szerkezetének köszönhetően először (kis pH-n) csak az egyik fele koordinálódik a pyr_2en *Schiff-bázisnak. A redukált Schiff-bázis jobb komplexképző, mert flexibilisebb és stabilisabb molekula. A különböző átmenetifém-ionokkal képződő* $[MLH_x]^{x+}$ *(x = 0, 1, 2; L:* $rpyr_2en$*) komplexek bázicitással korrigált stabilitási állandóit összehasonlítva az alábbi stabilitási sorrendet kapjuk:* $Cu^{II} > V^{IV}O > Ni^{II} > Zn^{II}$.

3.1.2.3. Szalicilaldehidből és diamino-karbonsavakból képzett redukált Schiff-bázisok[3]

A szimmetrikus sal_2en-származékok után ebben az alfejezetben két aszimmetrikus redukált Schiff-bázis $V^{IV}O$-kötő sajátságait mutatjuk be. Mindkét ligandum egy extra karboxilcsoportot tartalmaz, mely jelentős szerepet játszhat a fém oldatban tartásában, megváltoztatva a komplexek szerkezetét és stabilitását.

3.1.2.3.1. A ligandumok sav-bázis sajátságai

Az N,N'-bisz(2-hidroxibenzil)-2,3-diamino-propánsav (sal_2dpa), valamint az N,N'-bisz(2-hidroxibenzil)-2,5-diamino-pentánsav (sal_2orn) teljesen protonált formában $[H_5L]^{2+}$ öt darab disszociábilis protont tartalmazó funkciós csoporttal – két protonált amino-, két fenolos hidroxil- és egy karboxilcsoporttal – rendelkezik (38. ábra).



38. ábra (a) H_3sal_2dpa és **(c)** H_3sal_2orn szerkezete. Az **(a)** ábrán a nem labilis protonok betűjelölése a ^1H NMR spektrumokban megjelenő jelek hozzárendelését segítik. A **(b)** ábrán a $H_4sal_2dpa^+Cl^-$ röntgenszerkezete látható (ORTEP diagram, az ellipszoidok a nem-hidrogén atomok esetében 30%-os valószínűségi szintet jelölnek)

A két ligandum szerkezete közti egyetlen különbség az, hogy eltérő méretű (szénatomszámú) diamino-karbonsav-híd köti össze a két-két 2-hidroxibenzilcsoportot: a sal_2orn egy etiléncsoporttal többet tartalmaz. Mivel redukált Schiff-bázisokról van szó, szerkezetük flexibilis. Többféle hidrogénhíd is kialakulhat a molekulákon belül – $Ph–O^-\cdots H^+\cdots N$, $COO^-\cdots H^+\cdots N$, $Ph–O^-\cdots H^+\cdots {}^-OOC$

vagy akár mindhárom csoport részvételével –, amennyiben a megfelelő funkciós csoportok elég közel kerülnek egymáshoz (38. ábra).

A ligandumok pH-potenciometriás titrálások alapján meghatározott protonálódási állandóit, illetve pK-értékeit a 11. táblázat tartalmazza. A sal_2dpa esetében a mért állandók jól egyeznek a korábban, eltérő körülményekre (I = 0,1 M NaCl) közölt értékekkel.[142] A sal_2orn-ból csak a pH-potenciometriás titrálásokhoz elegendő mennyiség állt rendelkezésre, egyéb (spektroszkópiai) méréseket nem végeztünk ezzel a ligandummal.

11. táblázat Az N,N'-bisz(2-hidroxibenzil)-2,3-diamino-propánsav (sal_2dpa) és az N,N'-bisz(2-hidroxibenzil)-2,5-diamino-pentánsav (sal_2orn) protonálódási állandói (I=0,2 M KCl, T=25,0 °C)

	sal_2dpa		**sal_2orn**	
részecske	**lgβ**	**pK**	**lgβ**	**pK**
H_5L^{2+}	–	<1,6	40,31(3)	1,70
H_4L^{+}	35,54(3)	5,91	38,61(4)	7,71
H_3L	29,60(2)	8,45	30,90(3)	8,84
H_2L^{-}	21,15(2)	10,07	22,06(3)	10,45
HL^{2-}	11,09(1)	11,09	11,61(2)	11,61

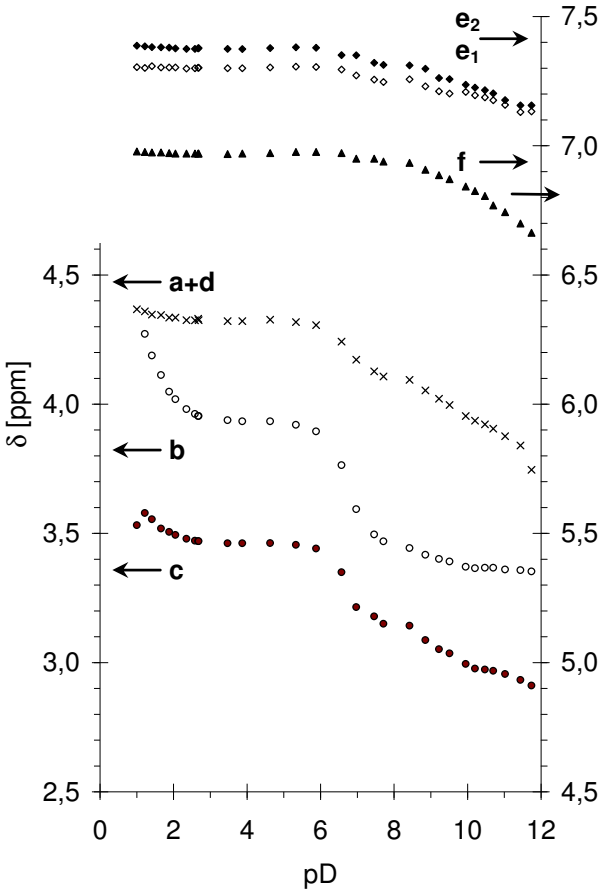
Mindkét ligandum esetében az első – a karboxilcsoport deprotonálódásához rendelhető – pK elkülönül a többitől, a sal_2dpa esetében a második lépésről is elmondható ugyanez. Attól függően, hogy a két fenolos OH, és a két amino NH^+ milyen sorrendben deprotonálódik, különféle részecskék képződnek, mikroegyensúlyi folyamatokkal kell számolni. A pH-potenciometria csak makroállandók meghatározására alkalmas: a 11. táblázatban feltüntetett állandók többsége nem rendelhető egyértelműen egy-egy funkciós csoporthoz.

Az elektronszívó hatású protonált aminocsoportok közelsége és a létrejövő hidrogénhidak miatt a ligandumok több nagyságrenddel erősebb savak a megfelelő alifás karbonsavaknál[93] ($pK_{sal_2dpa} < 1,6$ illetve $pK_{sal_2orn} \sim 1,7$). A szerkezetbeli különbségből adódóan eltérő hidrogénhídrendszer jön létre a két molekulában. A sal_2orn esetében egy extra etiléncsoport növeli a távolságot a karboxil- és a távolabbi aminocsoport között – kisebb lesz köztük a kölcsönhatás –, ami miatt ez a ligandum „valamivel" gyengébb sav. A sal_2dpa esetében viszont a karboxilcsoport pontos protonálódási állandóját mérési pontok hiányában meg sem tudtuk határozni (a pH-mérés a pH<2 tartományban nagy hibával terhelt). A két ligandum többi állandóját összehasonlítva is megfigyelhető, hogy a sal_2dpa pK-értékei 0,4–1,8 egységgel kisebbek, mint a sal_2orn megfelelő értékei.

A sal_2dpa ^1H NMR-spektrumának pD-függéséből próbáltunk további információt szerezni a ligandum sav-bázis folyamatairól (39. ábra). A karboxilcsoport deprotonálódása során ($H_5L^{2+} \rightleftharpoons H_4L^+ + H^+$, pH<2) során a C(9)-hez kapcsolódó (b) proton kémiai eltolódása változik legtöbbet, miközben a C(8)-hoz kapcsolódó (c) proton jele is eltolódik. A pH = 2–5 tartományban ez a H_4L^+ részecske a domináns (pK_2=5,91), nincs spektrális változás. Korábbi spektrofotometriás vizsgálatok[142] alátámasztották, hogy a második deprotonálódási folyamat ($H_4L^+ \rightleftharpoons H_3L + H^+$) jórészt

az egyik aminocsoporthoz rendelhető. A 39. ábrán megfigyelhető, hogy a pD~6,5-nél az aminocsoportok szomszédságában lévő protonok (a–d) kémiai eltolódása változik jelentősen, főleg a C(9)-hez kapcsolódó (b) proton jele, ami arra utal, hogy a karboxilcsoporthoz közelebbi aminocsoport lehet a savasabb. A következő három deprotonálódási lépés során a fenolát gyűrűk intramolekuláris átmeneteihez rendelhető elnyelési sávok (238 és a 292 nm) intenzitása fokozatosan növekszik. [142]

A ^{1}H NMR titrálás is alátámasztja, hogy átfedő mikroegyensúlyi folyamatok játszódnak le. A karboxilát-, az amino- és a fenolos hidroxilcsoportok között létrejövő intramolekuláris hidrogénhidas rendszer tovább bonyolítja a képet, mivel a csoportok közötti másodlagos kölcsönhatás miatt nem lehet egyértelműen megkülönböztetni a képződő részecskéket. A mikroegyensúlyi folyamatok pontos feltérképezését ebben az esetben sem tudtuk megoldani, mivel a funkciós csoportok deprotonálódása nemcsak a szomszédos, hanem a távolabb lévő protonok kémiai eltolódását is befolyásolja köszönhetően a köztük fellépő kölcsönhatásoknak.



39. ábra A sal_2dpa D_2O-ban felvett ^{1}H NMR titrálási görbéi ($[L]_{tot}$~5mM). A titrálást visszafelé hajtottuk végre, azaz pH~12-től indultunk és HCl-oldat megfelelő részleteivel csökkentettük a pH-t. pH~5 alatt csapadékkiválást tapasztaltunk. Az NMR-mérések során a csapadék a cső aljában volt. A betűk a 38. (a) ábrán feltüntetett szerkezet megfelelő protonjait jelölik. Az egyszerűség kedvéért a kémiai eltolódás értékek átlagát ábrázoltuk, mind a multiplettek, mind a közel azonos értéknél jelentkező, egyébként nem ekvivalens magoknál is

3.1.2.3.2. A ligandumok oxovanádium(IV)komplexei

Speciációs modellek

A 12. táblázat a legjobb speciációs modelleket és a $V^{IV}O$-komplexek pH-potenciometriás mérések alapján meghatározott stabilitási állandóit tartalmazza. A vizsgált rendszerekben képződő részecskék eloszlásgörbéi a 40. ábrán láthatóak. A sal_2dpa $V^{IV}O$-komplexeinek kötésmódjára elektrongerjesztési, CD- és LT ESR-spektroszkópiás mérések alapján tettünk javaslatot.

A modellszámítások során a $V^{IV}O$–sal_2dpa/sal_2orn rendszerekben elsősorban 1:1 összetételű komplexek képződését feltételeztük a négy potenciális donorcsoportot (2×Ph–O^{-} és 2×N_{amino}) tartalmazó sal_2en típusú Schiff-bázisok $V^{IV}O$-kötő sajátságai alapján. Mindkét ligandum ötfogú, a diamino-karbonsav-híd karboxilcsoportja kétmagvú részecskék kialakulását is lehetővé teszi (lásd a sal_2dpa Cu(II)- és Fe(III)-komplexeit[142]).

A $V^{IV}O$–sal_2dpa rendszer pH-potenciometriás titrálása során pH~10,5, illetve egyes spektroszkópiai mérés során pH~11 felett az egyensúly lassabban áll be, ami hidrolízisre és/vagy oxidációra utal. Kétmagvú komplexek képződését támaszthatja alá az, hogy nem képződik csapadék egész pH~4,5-ig a fémionfelesleget (M:L = 3:2 $[M]_{tot}$= 3mM és 1,5mM) tartalmazó mintákban sem.

A sal_2orn gyengébb vanádiumkötő képességgel rendelkezik: a pH-potenciometriás titrálások során 1:1 fémion-ligandum aránynál csak pH~5-ig áll be az egyensúly (nagyobb pH-n csapadék képződik). Ligandumfelesleget tartalmazó minták esetében is hidrolízisrészecskék megjelenésére utal az, hogy a pH = 5–7 tartományban lassabb a pH-stabilizáció.

12. táblázat N,N'-bisz(2-hidroxibenzil)-2,3-diamino-propánsav ($sa_{l2}dpa$), valamint az N,N'-bisz(2-hidroxibenzil)-2,5-diamino-pentánsav (sal_2orn) oxovanádium(IV)ionnal alkotott komplexeinek ($M_pL_qH_r$) stabilitási állandói. A legjobb speciációs modellt kiemeltük (I = 0,2 M KCl, T = 25,0 °C)

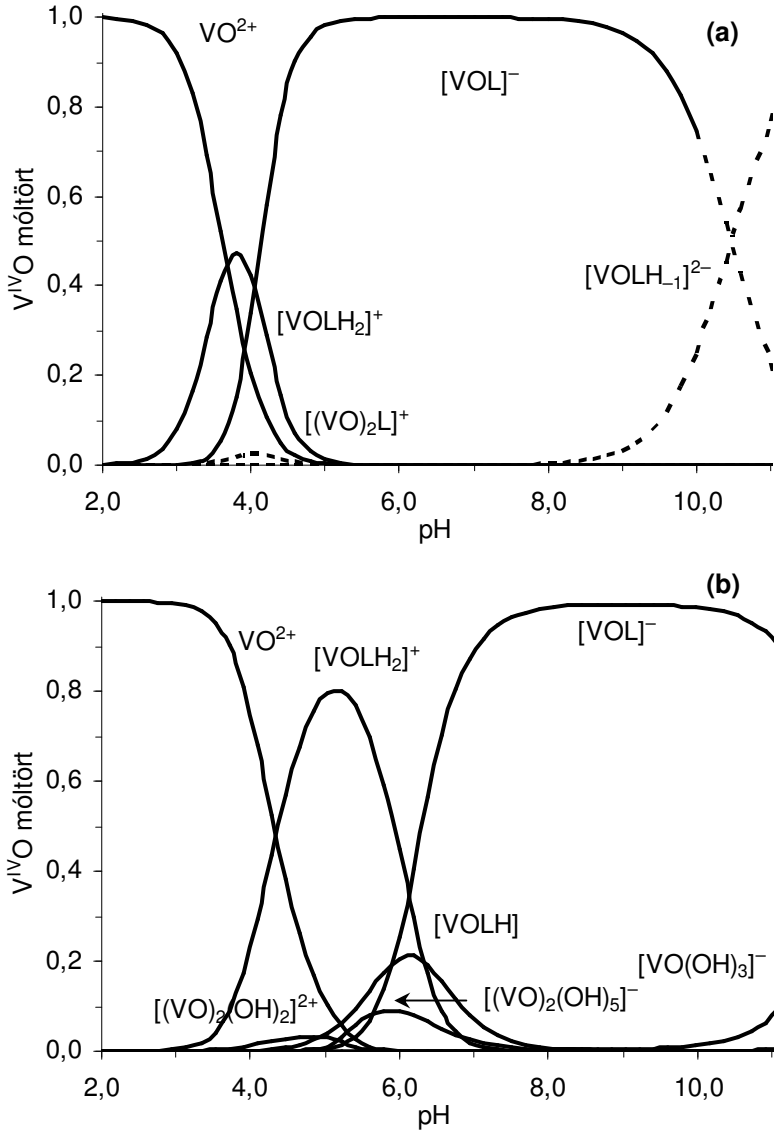
		sal_2dpa			**sal_2orn**		
(p, q, r)	**részecske**	**(1) lgβ**	(2) lgβ	**pK**	**(1) lgβ**	(2) lgβ	**pK**
(1, 1, 2)	$[VOLH_2]^+$	**31,49(1)**	31,49(1)		**33,23(1)**	33,22(1)	6,31
(1, 1, 1)	VOLH	**–**	–		**26,92(5)**	26,89(6)	5,93
(1, 1, 0)	$[VOL]^-$	**23,39(1)**	23,39(1)	10,47	**20,99(2)**	20,99(2)	
(1, 1, –1)	$[VOLH_{-1}]^{2-}$	**12,92(3)**	–		**–**	8,50(12)	
(2, 1, 0)	$[(VO)_2L]^+$	**25,65(10)**	25,66(27)		**–**	26,14(21)	
Mérési pontok száma:		369	369		422	422	
Illesztési paraméter[a] [cm^3]:		$5{,}46\times10^{-3}$	$1{,}42\times10^{-2}$		$2{,}84\times10^{-3}$	$2{,}78\times10^{-3}$	
bázicitással korrigált stabilitási állandók							
$VO^{2+} + LH_4 \rightleftharpoons VOLH_2 + 2H^+$							
lg$K$*= lgβ($VOLH_2$) – lgβ(LH_4)		–4,05			–5,39		

[a] Az illesztési paraméter a mért és a számított állandókkal visszaszámolt titrálási görbék átlagos eltérése mérőoldat fogyásban kifejezve

A $V^{IV}O$–sal_2dpa rendszerben elsősorban egymagvú komplexek ($[VOLH_2]^+$ és $[VOL]^-$) képződnek, míg a $[(VO)_2L]^+$ összetételű, kétmagvú részecske stabilitási állandójának bizonytalansága nagyobb. A $[VOLH_{-1}]^{2-}$ komplex képződését a spektrofotometriás és az ESR-mérések nem támasztják alá, csak a CD-spektrumok utalnak pH~12 felett egy újabb részecske megjelenésére, viszont ennek a részecskének – a pH-potenciometriás mérések alapján – két pH-egységgel kisebb értéknél kellene képződnie. Amennyiben ezt a komplexet kivesszük a modellből, az illesztési paraméter jelentősen romlik (több mint kétszeresére nő). Előfordulhat, hogy egy axiálisan koordinálódó OH^--ról van szó, de az is lehet, hogy a hidrolízisrészecskék stabilitási állandójának nagy bizonytalansága, nem egyensúlyi képződésük és/vagy oxidációs hajlamuk okozza az eltérést. A VOLH komplex létezését pH-potenciometriásan sem tudtuk alátámasztani. A stabilitási állandóját (lgβ = 25,7(7)) csak nagy hibával tudtuk volna jellemezni. Az ebből számított protonálódási állandó (pK~5,8) jól egyezik a ligandum második pK-értékével, így megállapíthatjuk, hogy a titrálások során ezt a pH-effektust valószínűleg nem a komplex képződése okozza.

A $V^{IV}O$–sal_2orn rendszert leíró legjobb speciációs modell a $[VOLH_2]^+$, VOLH, $[VOL]^-$ részecskéket tartalmazza, a $[(VO)_2L]^+$ és $[VOLH_{-1}]^{2-}$ részecskék képződésének feltételezése alig javítaná az illeszkedési paramétert, stabilitási állandójuk nagyobb hibával terhelt.

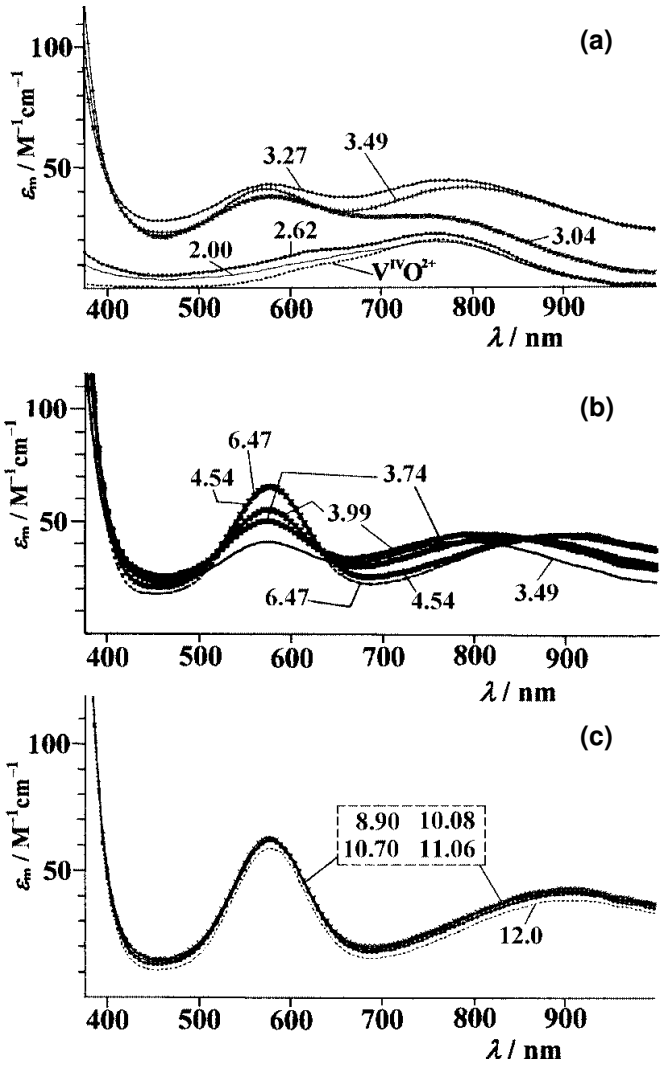
Az eloszlásgörbék alapján (40. ábra) is látszik, hogy a sal_2dpa ligandum elsősorban pH 5–9 között kitűnő vanádiumkötő, mivel ebben a pH-tartományban kizárólag a $[VOL]^-$ komplexben fordul elő a fémion. A kis pH-n képződő $[VOLH_2]^+$ összetételű részecskében a ligandum háromfogú koordinációja a legvalószínűbb. A $R(SO_3\text{-}sal)_2en$[139] és a sal_2dpa $VOLH_2$ komplexének bázicitással korrigált stabilitási állandóját ($\lg K^* = \lg\beta_{112} - \lg\beta_{014} = -6{,}23$ és $-4{,}05$) összehasonlítva megállapíthatjuk, hogy az extra karboxilcsoport jelentős stabilitásnövekedést okoz. A nem koordinálódó protonált funkciós csoportok a fémion hatására kooperatív módon deprotonálódnak és egyből a $[VOL]^-$ összetételű komplex képződik.



40. ábra A képződő $V^{IV}O$ komplexek eloszlásgörbéje a pH függvényében
(a) L: sal_2dpa^{3-}, **(b)** L: sal_2orn^{3-}, $[V^{IV}O]_{tot} = [L]_{tot} = 1mM$;
A szaggatott vonallal jelzett részecskék képződése bizonytalan

A sal_2orn gyengébb vanádiumkötő, mint a sal_2dpa. Az azonos összetételű komplexek nagyobb pH-n képződnek, miközben a hidrolízisrészecskék ($[(VO)_2(OH)_5]^-$ és $[(VO)(OH)_3]^-$) képződése is jelentősebb. Amennyiben összehasonlítjuk a két $[VOL]^-$ komplex stabilitási állandóját ($\Delta lg\beta_{110}$= $lg\beta_{110}(sal_2dpa) - lg\beta_{110}(sal_2orn) = 2{,}40$), vagy a $[VOLH_2]^+$ komplexek bázicitással korrigált stabilitási állandóit ($\Delta lgK^* = lgK^*(sal_2dpa) - lgK^*(sal_2orn) = 1{,}34$), azt láthatjuk, hogy a sal_2dpa esetében egy-két nagyságrenddel erősebb a kölcsönhatás. Ez a stabilitáskülönbség a gyűrűk távolságával, az azokat összekötő híd mérete közti eltéréssel magyarázható. A sal_2orn $V^{IV}O$-komplexekben nagyobb méretű, kisebb stabilitású kelátgyűrű alakul ki. A sal_2orn $[VOLH_2]^+$ komplexének esetében a fémionindukált kooperatív deprotonlódás sem olyan jelentős, a VOLH összetételű részecske is illeszthető, ugyan kifejezetten a képződési pH-tartományában (pH = 5–7) okoz gondot a mérések során a hidrolízis (a $[(VO)_2(OH)_5]^-$ képződése).

Spektroszkópiai vizsgálatok

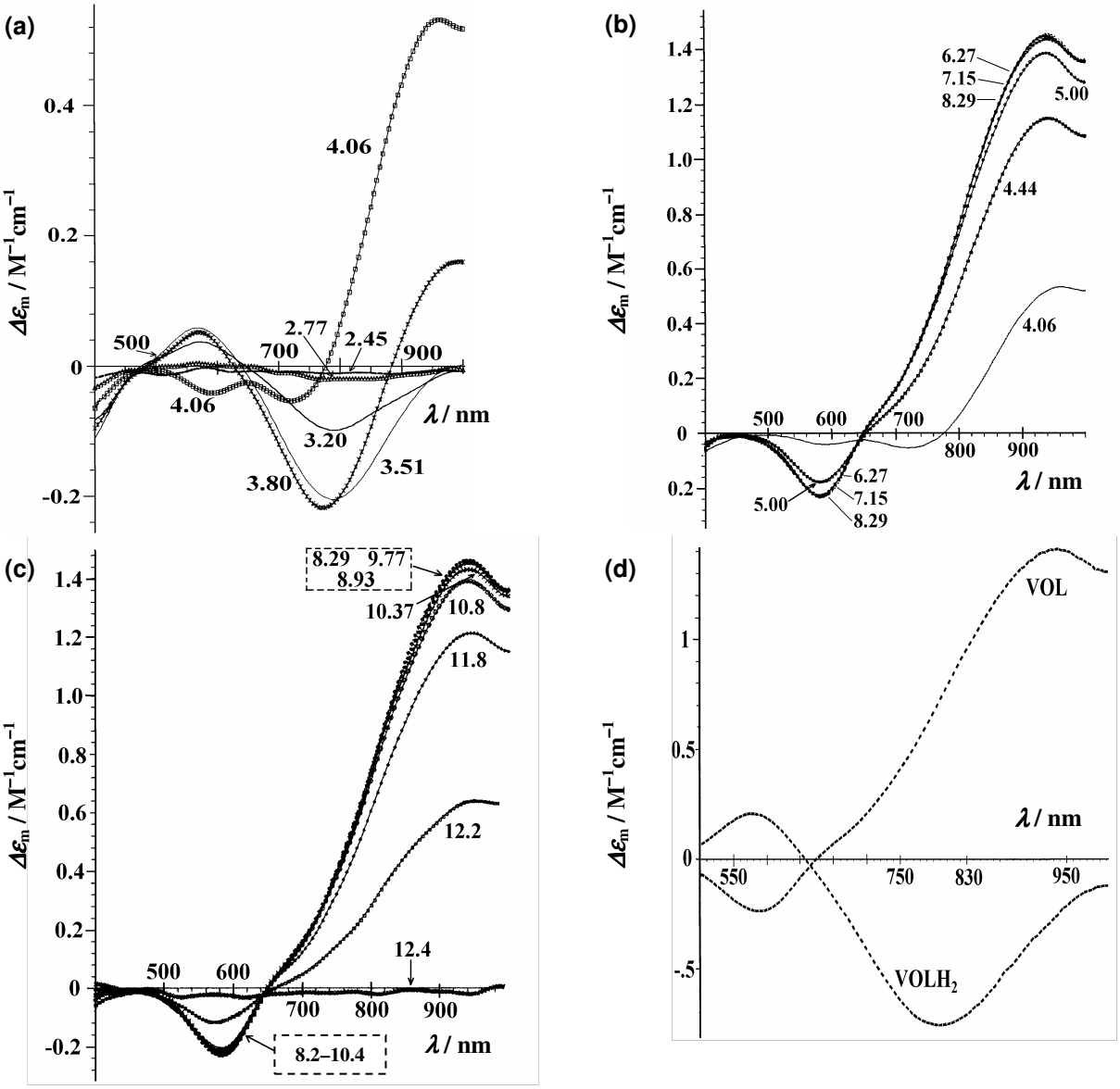


41. ábra A $V^{IV}O$–sal_2dpa rendszer elektrongerjesztési spektrumainak pH-függése három pH-tartományra bontva. A spektrumokhoz tartózó pH-értékeket feltüntettük az ábrán ($[M]_{tot}=[L]_{tot}$ ~3 mM)

Spektroszkópiai méréseket csak a $V^{IV}O$–sal_2dpa rendszer esetében végeztünk. A látható tartományban felvett elektron-gerjesztési spektrumok is alátámasztják a pH-potenciometriás eredményeket (lásd 41. ábra). A spektrum pH~2,60-ig megegyezik a $[VO(H_2O)_5]^{2+}$ részecske spektrumával, majd a sávok (I: $d_{xy} \rightarrow d_{xz}$, d_{yz} és II: $d_{xy} \rightarrow d_{x^2-y^2}$) fokozatosan elválnak egymástól, ami a ligandumtér erősségének növekedésére utal. A pH = 5,0–11,0 tartományban itt sem változik a spektrum ($\lambda_{max}\approx575$ nm és $\varepsilon_m\approx 65$ $M^{-1}cm^{-1}$; $\lambda_{max}\approx910$ nm és $\Delta\varepsilon_m\approx43$ $M^{-1}cm^{-1}$), ami alátámasztja a $[VOL]^-$ komplex predominanciáját.

A fenolát O-donor kooordinálódása a 380–400 nm hullámhossztartományban követhető nyomon a látható spektrumokon. A pH növelése ebben a tartományban fokozatos, kisebb-nagyobb mértékű intenzitásnövekedést okoz pH~4-ig, majd pH~12-ig alig változik. Ez arra utal, hogy már kis pH-n jelentős az $Ph–O^-$ koordinálódása.

A komplexképződés CD-spektroszkópiás módszerrel is nyomon követhető, amennyiben a titrálást a királis ligandum optikailag tiszta enantiomerjével hajtjuk végre. A ligandum kiralitás centrumához közeli donoratomok koordinálódásával a központi $V^{IV}O$-ion is aszimmetrikussá válik, és a látható tartományban (a d-d átmeneteknek megfelelően) is detektálhatunk Cotton-effektust. A sal_2dpa esetében a C(9)-atom a kiralitás centrum (38. ábra), a központi fémionon létrejövő aszimmetria a COO^->N(2)>N(1)>>Ph–O^- sorrendben csökken. A CD-méréseinket a $V^{IV}O$–sal_2dpa rendszerben az ligandum L enantiomerjével hajtottuk végre.



42. ábra (a–c) A $V^{IV}O$ – sal_2-L-dpa rendszer CD-spektrumainak pH-függése három pH-tartományra bontva. A spektrumokhoz tartózó pH-értékeket feltüntettük az ábrán. ($[M]_{tot}=[L]_{tot}$ ~3 mM)
A **(d)** ábrán a $[VOLH_2]^+$ és a $[VOL]^-$ komplex PSEQUAD program segítségével a 12. táblázatban feltüntetett legjobb speciációs modell alapján számított egyedi CD-spektruma látható

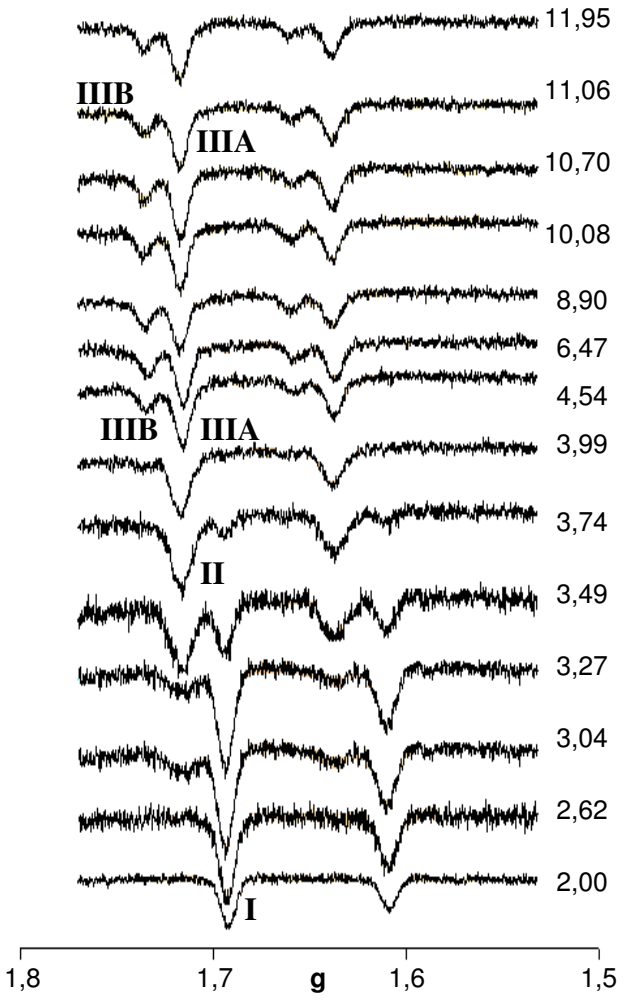
A 42. ábrán a $V^{IV}O$–sal_2-L-dpa rendszer CD-spektrumainak pH-függése kísérhető nyomon, illetve a $[VOLH_2]^+$ és a $[VOL]^-$ komplex PSEQUAD program segítségével számított egyedi CD-spektruma látható. Kis pH-n nem detektálható CD-jel a 400–1000 nm hullámhossztartományban,

mivel az eloszlásgörbének megfelelően pH~2,6-ig csak a CD-inaktív $[VO(H_2O)_5]^{2+}$ az egyetlen vanádiumtartalmú részecske. Ahogy a $[(VO)LH_2]^+$ képződik pH~3,5-ig a spektrumok (–,+,–) mintázatúak (λ_{max}<400 nm ($\Delta\varepsilon_m$<0); λ_{max}~565 nm ($\Delta\varepsilon_m$>0), λ_{max}~790 nm ($\Delta\varepsilon_m$<0)). A pH=3,5–5,0 tartományban, a $[VOL]^-$ képződése során ez a mintázat jelentősen átalakul, majd a pH=5–10,5 között nem változik, két Cotton-effektus (λ_{max}=585 nm és $\Delta\varepsilon_m$= –0,23 mol^{-1} dm^{-3} cm^{-1} λ_{max}=945 nm és $\Delta\varepsilon_m$=+1,46 mol^{-1} dm^{-3} cm^{-1}) figyelhető meg a vizsgált hullámhossztartományban. A pH=10,5–11,5 tartományban hidrolízisre és/vagy oxidációra utaló intenzitáscsökkenést tapasztalunk.

A 43. ábrán a 77 K-en felvett LT ESR-spektrumok nagy térhez tartozó párhuzamos tartománya látható, míg a 13. táblázat tartalmazza a komplexek ESR-paramétereit.

13. táblázat A képződő komplexek ESR-paraméterei

	$g_{x,y}$	$A_{x,y}$ [10^{-4} cm^{-1}]	g_z	A_z [10^{-4} cm^{-1}]
$[VOLH_2]^+$ (II)	1,963	50,9	1,948	171,1
$[VOL]^-$ (IIIA)	1,978	58,0	1,944	167,9
$[VOL]^-$ (IIIB)	1,978	57,2	1,954	161,4



Az ESR-spektrumokon négy, különböző koordinációs móddal rendelkező komplex jele különböztethető meg. Kis pH-n, pH~3-ig egyedül a $[VO(H_2O)_5]^{2+}$ akvakomplex (I) van jelen, majd pH=3,04-nél a $[(VO)LH_2]^+$ (II) részecske is detektálható. A pH = 4,5–12 tartományban megfigyelhető két jel (IIIA A_z=167,9×10^{-4} cm^{-1} és IIIB A_z=161,4×10^{-4} cm^{-1}) aránya gyakorlatilag állandó, tehát a két komplex protonáltsági állapota és összetétele megegyezik, csak koordinációs módjuk eltérő. A $[VOL]^-$ összetételhez szerkezeti izomerek tartoznak. Egész a nagy pH-kon (pH_{max} = 11,95) sem jelenik meg újabb csúcs, viszont az ESR-aktív $[VO(OH)_3]^-$ hidrolízisrészecske jelét (A_z = 162×10^{-4} cm^{-1}) a IIIB részecske jele elfedheti.

43. ábra A $V^{IV}O$ – sal_2dpa rendszer LT ESR-spektrumainak pH-függése.
A spektrumokhoz tartozó pH-értékeket feltüntettük az ábrán (T = 77 K, $[V^{IV}O]_{tot}$ = $[L]_{tot}$ = 3mM)

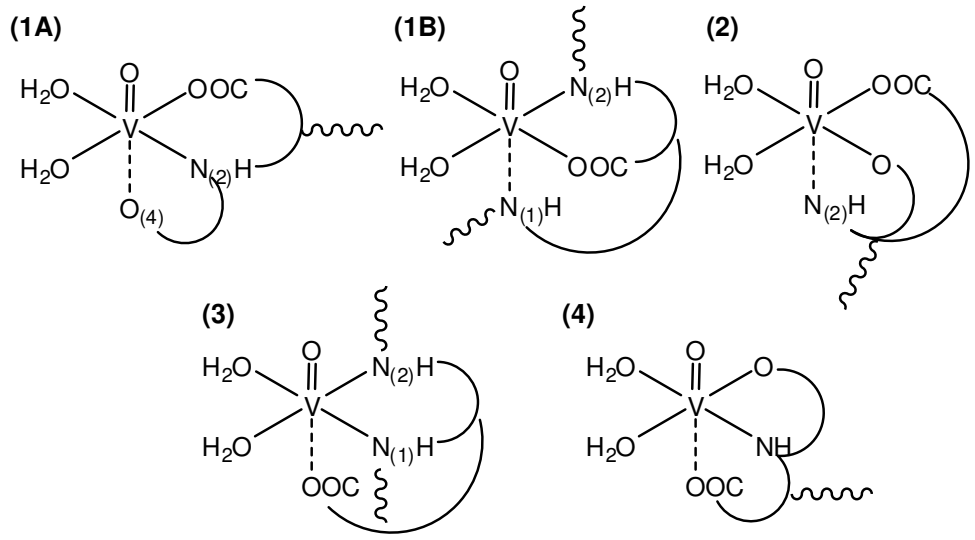
Koordinációs módok

A $V^{IV}O$-sal_2dpa-komplexekben a fémion ekvatoriális környezetére az ESR-mérések alapján az additivitási szabálynak megfelelően – a többi spektroszkópiai mérést is figyelembe véve – tettünk javaslatot (14. táblázat). Az axiálisan koordinálódó donoratomokról nem rendelkezünk információval.

14. táblázat A $V^{IV}O$–sal_2dpa rendszerben képződő komplexek potenciális kötésmódjai az ESR-spektroszkópiai mérések alapján. (A_z [10^{-4} cm^{-1}])

részecske		**ekvatoriálisan koordinálódó donorcsoportok**				A_z **számított**	A_z **mért**
$VOLH_2$ (II)	(1)	$2\times H_2O$	COO^-	N_{amino}		173,5	**171,1**
	(2)	$2\times H_2O$	COO^-		$Ph–O^-$	172,3	
	(3)	$2\times H_2O$		$2\times N_{amino}$		171,5	
	(4)	$2\times H_2O$		N_{amino}	$Ph–O^-$	170,2	
VOL (IIIA)	(1)	H_2O	COO^-		$2\times Ph–O^-$	165,5	**167,9**
	(2)	H_2O		$2\times N_{amino}$	$Ph–O^-$	164,6	
VOL (IIIB)	(1)	H_2O		N_{amino}	$2\times Ph–O^-$	163,8	**161,4**
	(2)		COO^-	N_{amino}	$2\times Ph–O^-$	160,0	
	(3)			$2\times N_{amino}$	$2\times Ph–O^-$	157,9	

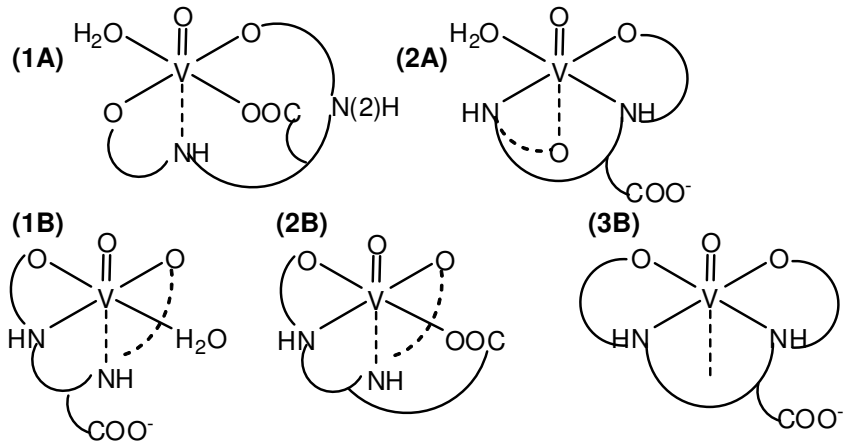
A $[VOLH_2]^+$ komplex esetében két nem koordinálódó funkciós csoport protonált, miközben a másik három donorcsoport a vanádiumhoz kötődik. A karboxilcsoport már fémion nélkül is deprotonálódik pH=2 alatt. A karboxilát koordinálódását támasztja alá, hogy több nagyságrenddel stabilisabb a sal_2dpa komplexe, mint a $R(SO_3\text{-}sal)_2en$[139] azonos összetételű, (N_{amino}, $Ph–O^-$, $2\times H_2O$) kötésmódú komplexe. A karboxilát akár ekvatoriális, akár axiális pozícióba is beköthet. A másik két donorcsoport a komplexképződés során deprotonálódik miközben vagy a molekula egyik fele (N_{amino}, $Ph–O^-$), vagy a molekula „közepe”, a diamino-karbonsav-híd két aminocsoportja koordinálódik (44. ábra). Ezekre a kötési izomerekre becsült A_z ESR-paramétere értéke a hibahatáron belül közelíti a mért értéket (14. táblázat).



44. ábra A $[VOLH_2]^+$ komplex lehetséges kötésmódjai

Az elektrongerjesztési spektrumok alapján a $[VOLH_2]^+$ komplexben egy fenolát, míg a CD-spektrumok nagy intenzitása alapján, pedig a kiralitás centrumhoz közeli csoportok (vagy a COO^-, vagy a N(2)) ekvatoriális koordinációja feltételezhető. Ezeknek a feltételeknek a 44. ábrán feltüntetett (2)-es és (4)-es szerkezet is megfelel.

A $[VOL]^{2-}$ komplex esetében már bonyolultabb a helyzet (45. ábra), mivel az ESR-mérések szerint kétféle környezet alakul ki a $V^{IV}O$-centrum körül. A nagyobb A_z csatolási állandóval jellemezhető (IIIA) izomer esetében a logikusnak tűnő szerkezetek közül a (1)-es becsült állandója a legnagyobb. Az a probléma ezzel a kötésmóddal (H_2O, COO^-, $2\times Ph–O^-)_{ekv}(N_{amino})_{ax}$, hogy inkább a VOLH összetételhez rendelhető. A pH= 4–6 tartományban a nem koordinálódó aminocsoport részben még protonált, a savasabb (N2) is csak ~5,9-es pK-val deprotonálódik. A becsült ESR-paraméterek és a többi spektrális vizsgálat alapján a 14. táblázatban szereplő többi kötésmód mind elképzelhető.



45. ábra A $[VOL]^-$ komplex lehetséges kötésmódjai

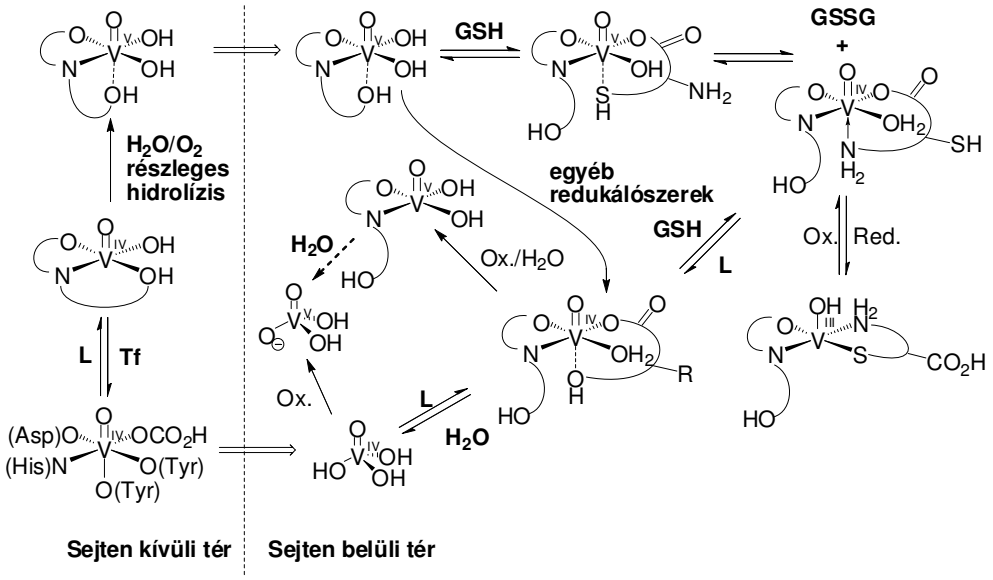
A spektrális adatok tehát mindegyik komplex esetén különböző kötési izomerek párhuzamos jelenlétét valószínűsítik.

Összefoglalás

Ebben a fejezetben a redukált sal_2en-származékok közül az etiléndiamin/diamino-karbonsav cserével előállított sal_2dpa és sal_2orn ligandumok sav-bázis és $V^{IV}O$-kötő sajátságait jellemeztük. A két bemutatott komplexképző között egyetlen szerkezeti különbség van, mégpedig az, hogy a diamino-karbonsav-híd eltérő méretű. Ez a különbség eredményezi azt, hogy a sal_2dpa nemcsak savasabb vegyület, hanem erősebb $V^{IV}O$-kötő is, mint a sal_2orn. A komplexképződés csak pH~3 és pH~4 felett kezdődik a sal_2dpa-val és a sal_2orn-nal. Először a molekulák három-három foggal koordinálódnak, majd a pH növelésével további két-két funkciós csoport deprotonálódik kooperatív módon a fémion hatására. Döntően 1:1 összetételű $V^{IV}O$-komplexek képződnek a vizsgált rendszerekben. Az extra karboxilcsoport révén stabilisabb $V^{IV}O$-komplexeket képez az ötfogú sal_2dpa, mint a négyfogú sal_2en-származék, a vízoldható $R(SO_3\text{-}sal)_2en$. A $V^{IV}O$-sal_2dpa rendszer spektrális vizsgálatai alapján javaslatot tettünk a komplexekben lévő központi fémion környezetére.

3.2. Inzulinutánzó oxovanádium(IV)komplexek kölcsönhatása sejtalkotó bioligandumokkal[4]

In vitro a vanádiumvegyületek többféle módon is bejuthatnak a sejtbe: (1) vanadátként a foszfát- vagy más aniontranszport mechanizmussal, (2) $V^{IV}O$-ként transzferrinhez kötve, vagy akár (3) passzív diffúzió révén is. Eközben szájon át szedve – általában a komplex kiindulási formájától függetlenül – ligandumcsere- és/vagy redoxireakciókban vesznek részt a szervezetben lévő sejten kívüli és sejtalkotó bioligandumokkal (46. ábra). [50,157]



46. ábra Az inzulinutánzó vanádiumkomplexek potenciális ligandumcsere- és redoxireakciói a vérszérumban és a sejtekben.[50,157]

A sejten belüli térben a redukálószerek redukálhatják a vanádium(IV/V)komplexeket. A leggyakrabban emlegetett redukálószer-jelölt a glutation (GSH). A komplexek stabilitásától függ, hogy milyen mértékben redukálható a központi fémion. A GSH mM nagyságrendű sejtenbelüli koncentrációja azt jelenti, a vanádiumhoz képest (μM) a redukálószer nagy feleslegben (közel ezerszeres mennyiségben) fordul elő. Így a sejtekben a vanádium alacsonyabb oxidációs állapot(ok)ban fordulhat elő. A $V^{IV}O$-hez a GSH-, illetve a GSSG-felesleg (oxidált glutation) is koordinálódhat. Azt is figyelembe kell venni a biológiai hatásért felelős forma meghatározása, modellezése során, hogy a redoxireakciók mellett a kis és a nagy molekulatömegű sejtalkotó bioligandumokkal komplexképződés is lejátszódhat. Az adenozin-nukleotidok (pl. az adenozin-5'-trifoszfát, más néven az ATP) szintén mM koncentrációban fordulnak elő a sejten belül, és kölcsönhatásuk a sejtbe jutó fémionokkal, fémkomplexekkel igen valószínű.

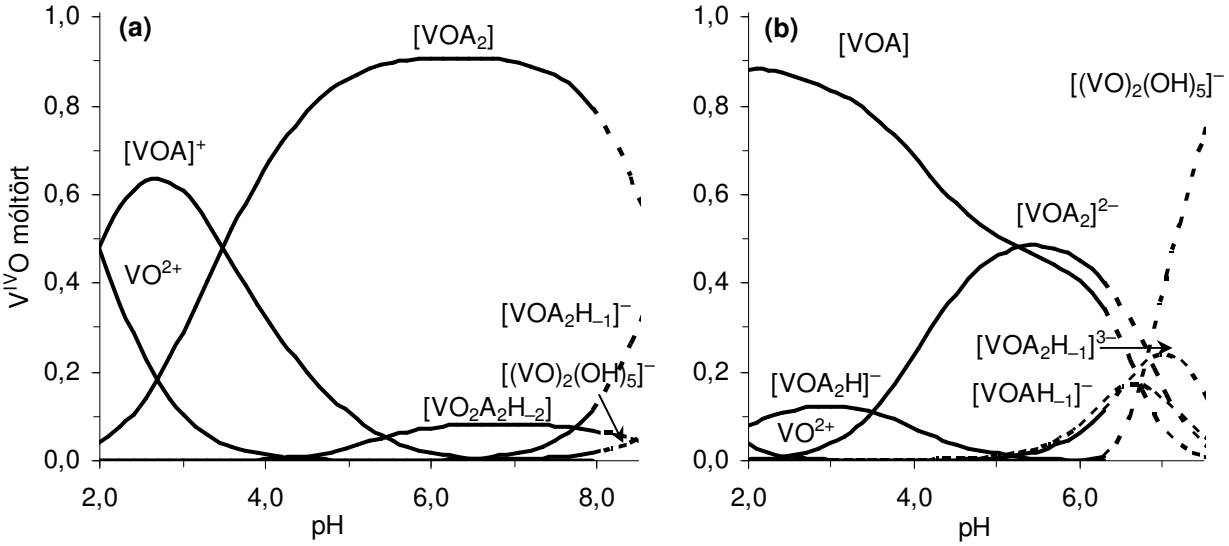
A következő alfejezetekben azt fogjuk bemutatni, hogy az inzulinutánzó maltol és dipikolinsav $V^{IV}O$-komplexek milyen ligandumcsere-reakciókban vehetnek részt az ATP-vel és a GSH-val.

3.2.1. A vizsgált oxovanádium(IV)komplexek irodalmi áttekintése

A maltol (3-hidroxi-2-metil-4-piron) és származékainak semleges $V^{IV}O$-biszkomplexei (pl. BMOV, BEOV) ígéretes hatóanyag jelöltek a humán klinikumban, míg a dipikolinsav (2,6-piridindikarbonsav) semleges monokomplexét az állatorvosi gyakorlatban szeretnék kipróbálni. [71,158] A $V^{IV}O$–maltol/dipikolinsav biner rendszerek az irodalomból ismertek. A 15. táblázat a közölt protonálódási- és stabilitási állandókat, míg a 47. ábra a vizsgálati körülményeink közt képződő részecskék eloszlásgörbéjét tartalmazza.[78,156,159] Az irodalmi adatok alapján először a hordozóligandumok $V^{IV}O$-kötő sajátságait tekintjük át.

15. táblázat A vizsgált (A) hordozóligandumok: a maltol és a dipikolinsav protonálódási és $V^{IV}O$-ionnal alkotott komplexeinek ($M_pA_qH_r$, A: $malt^-$/$dipik^{2-}$) stabilitási állandói. Egyszerűség kedvéért a töltéseket nem jelöltük (I = 0,2 M KCl, T = 25,0 °C)

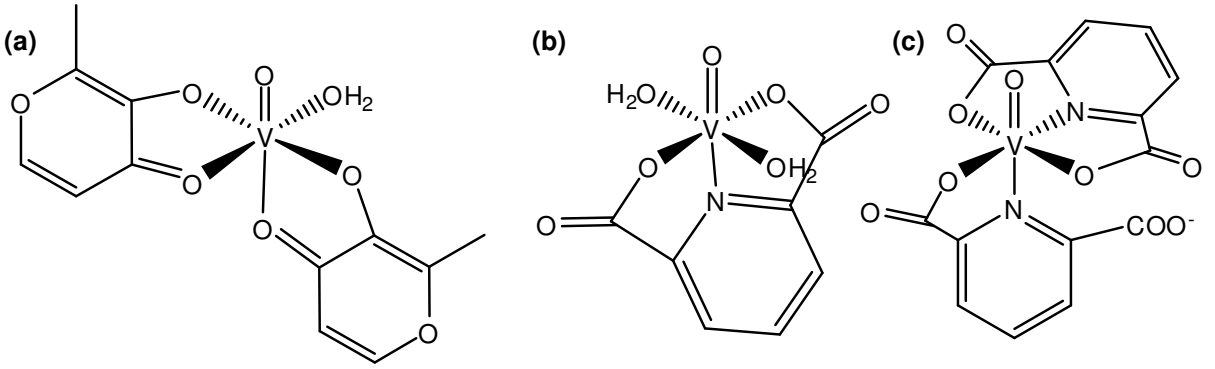
		maltol[78,156]		**dipikolinsav**[159]	
(p, q, r)	**részecske**	**lg*β***	**p*K***	**lg*β***	**p*K***
(0, 1, 2)	H_2A	-		6,63(1)	2,06
(0, 1, 1)	HA	8,44(1)	8,44	4,57(1)	4,57
(1, 1, 0)	VOA	8,69(2)		6,69(1)	6,72
(1, 1, –1)	$VOAH_{-1}$	-		–0,03(2)	
(1, 2, 1)	VOA_2H	-		12,96(5)	3,49
(1, 2, 0)	VOA_2	16,29(5)	8,8	9,47(1)	6,85
(1, 2, –1)	VOA_2H_{-1}	7,5(1)		2,62(5)	
(2, 2, –2)	$(VOAH_{-1})_2$	9,88(6)		-	
lg *K* (VOA + A ⇌ VOA_2)		7,60		2,78	
lg *K* (VOA/VOA_2)		1,09		3,91	
lg *K** (VO^{2+} + HA ⇌ VOA + H^+)		0,25		2,12	
lg *K** (VOA + HA ⇌ VOA_2 + H^+)		–0,84		–1,79	



47. ábra A $V^{IV}O$ – (A) hordozóligandum rendszerben képződő részecskék eloszlásgörbéje a pH függvényében, **a)** A: $malt^-$, **(b)** A: $dipik^{2-}$, $[V^{IV}O]_{tot}$ = 4mM, $[A]_{tot}$ = 8mM. A szaggatott vonallal jelzett rész csak a tendenciák leírására alkalmas, a pH-potenciometriás mérés nagyobb bizonytalanságára utal

Mindkét hordozóligandum mono- és biszkomplexeket képez a $V^{IV}O$-ionnal. A koordinálódó donorcsoportok eltérő bázicitását is figyelembevevő protonkiszorítási állandók azt mutatják, hogy míg a monokomplex esetében a dipikolinsav, addig a biszkomplexnél a maltol $V^{IV}O$-komplexe a stabilisabb.

Maltollal a semleges biszkomplex $[VO(malt)_2(H_2O)]$ – mely jó membránt ranszport sajátságokkal rendelkezik – a domináns részecske pH 4 és 8 között. A ligandum az oxo- és az alkoholátcsoportján (O=, O^-) keresztül koordinálódik a $V^{IV}O$-centrumhoz, miközben öttagú kelátgyűrűt alakít ki a fémion körül (48. ábra). Két geometriai izomer formája ismert: a cisz és a transz. Az elnevezés ebben az esetben a V=O és a koordinálódó oldószermolekula (vízmolekula) helyzetét jelöli. A komplex transz formában kristályosodik, míg szobahőmérsékleten semleges, vizes oldatban az ESR-mérések szerint elsősorban a cisz izomer képződik.[78,156,160,161,162] Egy újabb tanulmány szerint – metanolos fagyasztott minták ENDOR vizsgálatai alapján – kizárólag a cisz izomer van jelen vizes oldatban.[163] (Gyengébben koordinálódó oldószerekben az egyensúly a transz izomer irányába tolódhat el.) Vizes oldatban a pH növelésével a biszkomplex veszíthet egy protont a koordinálódó vízmolekuláról. Ehhez a deprotonálódáshoz tartozó viszonylag kis pK-érték is (8,8) a vízmolekula ekvatoriális koordinációját, a cisz izomer képződését támasztja alá. Az egymagvú és a kétmagvú vegyes hidroxokomplexek képződése átfedésben van a $V^{IV}O$-ion hidrolízisével, amit nagyobb pH-n (pH>9) az ESR-jelek intenzitásának jelentős csökkenése is alátámaszt.



48. ábra (a) A cisz $[VO(malt)_2(H_2O)]$, **(b)** a $[VO(dipik)(H_2O)_2]$ és **(c)** a $[VO(dipik)_2]^{2-}$ egy-egy lehetséges szerkezete

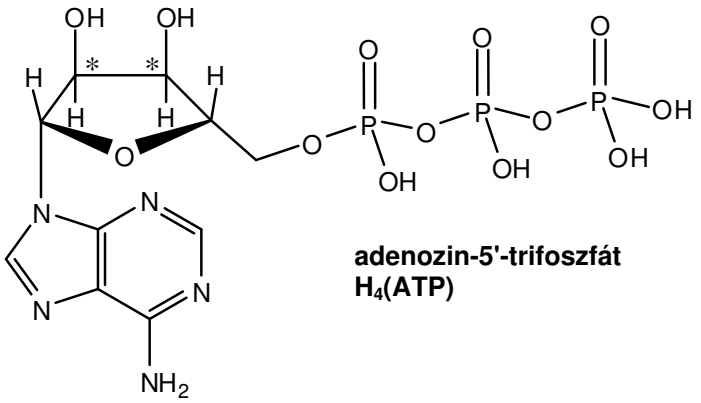
A dipikolinsav háromfogú ligandum. Kis pH-n a ligandum két karboxilcsoport egy-egy oxigénatomján, illetve a piridin nitrogénatomján keresztül koordinálódik a $V^{IV}O$-ionhoz. Öttagú csatolt kelátgyűrűk stabilizálják a dipikolinsav monokomplexét, mely már pH~2-n közel 90%-ban képződik. ESR-mérések szerint a semleges $[VO(dipik)(H_2O)_2]$ komplexben a két karboxilátcsoport ekvatoriálisan, míg a piridin-N axiálisan koordinálódik (48. ábra). A nagy $\lg K(VOA/VOA_2)$ érték arra utal, hogy a második ligandum koordinációja nem kedvezményezett. A képződő $[VO(dipik)_2]^{2-}$ biszkomplex koordinációs szférája telített: az egyik ligandum három ($2\times COO^-$,N), míg a másik már csak két donoratomján (COO^-,N) keresztül kötődik a központi fémionhoz (48. ábra). Az ekvatoriálisan és az axiálisan koordinálódó donoratomok $(3\times COO^-, N)_{ekv}(N)_{ax}$ különféle kombinációja képzelhető el,

izomerek képződhetnek. A biológiailag releváns semleges pH-n a dipikolinát nem valami hatásos $V^{IV}O$-kötő molekula: vegyes hidroxokomplexek és különféle $V^{IV}O$-hidrolízisrészecskék jelennek meg az oldatban a mono- és biszkomplexek mellett (pH>6 felett már a pH-potenciometriás mérések során nem áll be az egyensúly).

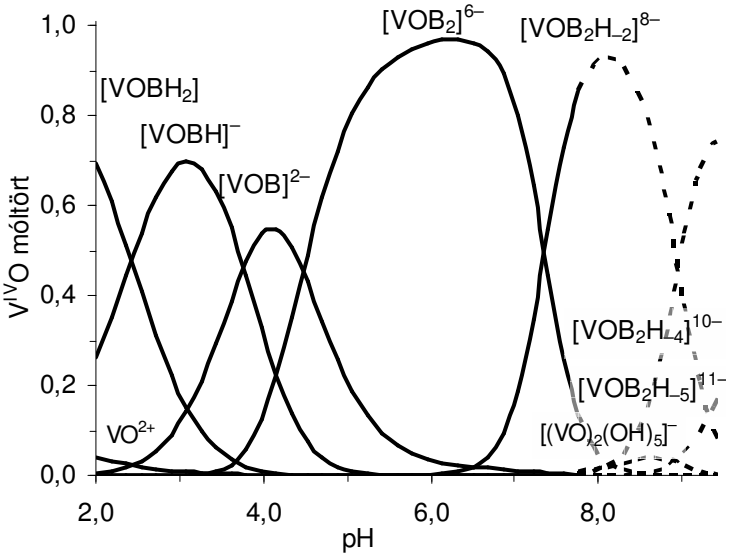
3.2.2. Az ATP hatása az inzulinutánzó oxovanádium(IV)komplexekre

3.2.2.1. $V^{IV}O$–ATP rendszer

Az ATP az élő sejtek legfontosabb energiaforrása, a baktériumoktól a gombákon és növényeken keresztül az emberig az ATP-molekula a táplálékból származó energia legfőbb raktározója, ill. szolgáltatója az életfolyamatok számára. Az ATP egy adenozinmolekulából és a hozzá kapcsolódó három foszfátcsoportból épül fel. A legutolsó foszfátcsoport lehasítása során adenozin-difoszfát (ADP) keletkezik, valamint energia szabadul fel, amelyet a sejt kémiai folyamatainak sokasága képes felhasználni. Az ATP-nek az ADP-ből való képzéséhez ugyanígy nagy energiabefektetés szükséges, amelyet a sejtekben a cukrok és egyéb tápanyagok lebontása, elsősorban oxidációja biztosít.



Az irodalomban már közölt $V^{IV}O$–ATP speciációs modellt[164] szerettük volna felhasználni a $V^{IV}O$ – hordozóligandum – ATP terner rendszerek leírása során, viszont ez a modell a vizes oldatban bizonyítottan képződő, $[(VO)_2(OH)_5]^-$ összetételű, $V^{IV}O$-hidrolízisrészecskét[82,83] még nem tartalmazta. A pH-potenciometriás méréseket megismételtük, a korábbi spektroszkópiai vizsgálatokat, pedig CD-mérésekkel egészítettük ki. A 16. táblázat a legjobb speciációs modellt, a 49. ábra a tízszeres ATP-felesleg mellett képződő részecskék eloszlásgörbéjét tartalmazza.



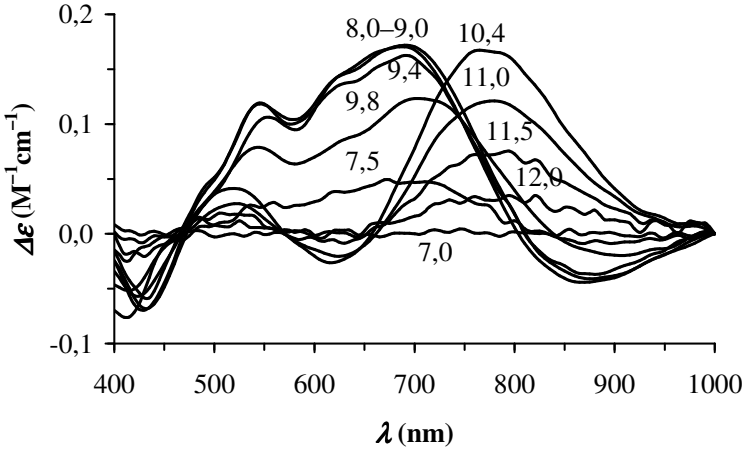
49. ábra A $V^{IV}O$ – ATP rendszerben képződő részecskék eloszlásgörbéje a pH függvényében. A szaggatott vonallal jelzett rész csak a tendenciák leírására alkalmas a pH-potenciometriás mérés nagyobb bizonytalanságára utal B: ATP^{4-}, $[V^{IV}O]_{tot}$ = 4mM, $[B]_{tot}$ = 40mM.

Az ATP hatásos $V^{IV}O$-kötő molekula savas és semleges pH-n. Ebben a pH-tartományban a terminális foszfátcsoport(ok) vesznek részt a fémion megkötésében, $[VOBH_x]^{x-2}$ (x = 2, 1, 0) és $[VOB_2]^{6-}$ összetételű komplexek képződnek. A gyengén lúgos pH-tartományban amennyiben az ATP nincs vagy csak kis feleslegben van, elkezdődik a hidrolízis: a többmagvú hidroxorészecskék megjelennek az oldatban a $V^{IV}O$-ATP komplexek mellett. A pH-potenciometriás titrálások szerint pH~7 felett lassú folyamat játszódik le, ugyan 10 perc alatt stabilizálódik a pH, beáll az egyensúly. Nagyobb pH-n – a 8,8–10,4 pH-tartományban – már nem áll be az egyensúly még tízszeres ATP-felesleg mellett sem. Az itt képződő komplexekre közölt stabilitási állandók csak becsült értékeknek tekinthetők. A korábbi modellben[164] kétmagvú, dihidroxohidas komplexek $[(VO)_2B_2H_x]^{x-4}$ (x= –2, –3, –4) képződésével próbálták leírni ezt a tartományt, illetve az ESR-spektrumban jelentkező intenzitáscsökkenést, miközben a hidrolízis ($[(VO)_2(OH)_5]^-$) lehet ezért a felelős. Nagyobb pH-n lecsökken a protonkompetíció a ribózrész alkoholát donoratomjain, a cukorrész válik a fő kötőhellyé. A gyengén lúgos tartományban a $[VOB_2H_{-2}]^{8-}$ részecske képződik, melyben vegyes kötésmód valósul meg: az egyik ATP-molekula a foszfátláncon, míg a másik a ribóz vicinális alkoholátcsoportjain keresztül koordinálódik a központi fémionhoz. A $[VOB_2H_{-4}]^{10-}$ komplexben mindkét ATP-molekula a cukorrészen köti meg a fémiont. A koordinációs mód átalakulása során tapasztaltuk a lassabb pH-stabilizációt.

16. táblázat Az ATP protonálódási és oxovanádium(IV)-ionnal alkotott komplexeinek ($M_pL_qH_r$) stabilitási állandói.
(B: ATP^{4-}, I = 0,2 M KCl, T = 25,0 °C)

		ATP	
(p, q, r)	**részecske**	**lg*β***	**p*K***
(0, 1, 3)	H_3B^-	11,71	~1,5
(0, 1, 2)	H_2B^{2-}	10,26	3,94
(0, 1, 1)	HB^{3-}	6,32	6,32
(1, 1, 2)	$[VOBH_2]$	13,06(3)	2,42
(1, 1, 1)	$[VOBH]^-$	10,64(2)	3,77
(1, 1, 0)	$[VOB]^{2-}$	6,87(1)	
(1, 2, 0)	$[VOB_2]^{6-}$	10,30(2)	
(1, 2, –2)	$[VOB_2H_{-2}]^{8-}$	–4,41(4)	
(1, 2, –4)	$[VOB_2H_{-4}]^{10-}$	–22,30(15)	10,07
(1, 2, –5)	$[VOB_2H_{-5}]^{11-}$	–32,37(9)	
(2, 2, –2)	$[(VO)_2B_2H_{-2}]^{6-}$	3,38(16)	
Mérési pontok száma		708	
Illesztési paraméter [cm^3]:		$9{,}2\times10^{-3}$	

A CD-spektrumok (50. ábra) a ribózrész koordinációjáról nyújtanak információt, mivel mindkét alkoholát királis szénatomhoz kapcsolódik. A foszfátkoordinációjú komplexek nem CD-aktívak.



50. ábra A $V^{IV}O$-ATP rendszer CD-spektrumainak pH-függése $[VO]_{tot}$=4mM, $[ATP]_{tot}$=40mM, A spektrumokhoz tartozó pH-értékeket az ábrán feltüntettük

A $[VOB_2H_x]^{x-6}$ (x = –2, –4, (–5)) összetételű komplexek elsősorban a számunkra érdekes fizológiás pH-tartomány felett képződnek. A CD-spektrumokon nyomon követhető a koordinációs mód változása. Miközben a $(PO_3^{2-}–O–PO_2^{-}–O–PO_2^{-}–)(O^{-},O^{-})$ kötésmódú $[VOB_2H_{-2}]^{8-}$ komplex képződik (pH~8–9) a CD-spektrumok (–,+,–) mintázatúak (λ_{max} ~ 430 nm ($\Delta\varepsilon_m$<0), λ_{max} ~ 540, 625, 690 nm ($\Delta\varepsilon_m$>0), λ_{max}~860 nm ($\Delta\varepsilon_m$<0)). A 2×(O^{-},O^{-}) kötésmódú $[VOB_2H_{-4}]^{10-}$ részecske képződésével (lásd 50. ábra pH=10,4) a mintázat jelentősen átalakul: λ_{max} ~ 410 nm ($\Delta\varepsilon_m$<0), λ_{max} ~ 510 nm ($\Delta\varepsilon_m$>0), λ_{max}~615 nm ($\Delta\varepsilon_m$<0), λ_{max} ~ 770 nm ($\Delta\varepsilon_m$>0). Az erősen lúgos tartományban egy extra deprotonálódási folyamatot ($[VOB_2H_{-5}]^{-11}$ képződését) detektáltunk mind a pH-potenciometriás, mind a CD-mérések során. Valószínűleg az axiálisan koordinálódó vízmolekula deprotonálódik (az ESR-mérések során nem detektáltak új jelet).[164] Elképzelhető az is, hogy a hidrolízis részecskék stabilitási állandójának hibája, illetve az esetleges oxidáció okozza ezt a pH-effektust.

3.2.2.2. $V^{IV}O$–maltol/dipikolinsav–ATP rendszerek

A pH-potenciometriás titrálási görbéket a maltolt, mint hordozóligandumot tartalmazó terner rendszerek esetében $[VOAB]^{3-}$, $[VOABH_{-2}]^{5-}$, míg a dipikolinsavat tartalmazó terner rendszereknél $[VOAB]^{4-}$, $[VOABH_{-1}]^{5-}$, $[VOABH_{-2}]^{6-}$ vegyes ligandumú komplexek képződésével tudtuk leírni. A legjobb speciációs modelleket a 17. táblázat tartalmazza (a biner alrendszereket lásd a 15. és a 16. táblázatban). Az összetétel alapján feltételezhető, hogy a VOAB vegyes ligandumú komplexekben a foszfátdonorokon keresztül kötődik az egyes monomer VOA komplexekhez az ATP-molekula. A $VOABH_{-2}$ komplexeknél a fémion-koordináció hatására az ATP ribózrészének alkoholos hidroxil-csoportjai deprotonálódnak.

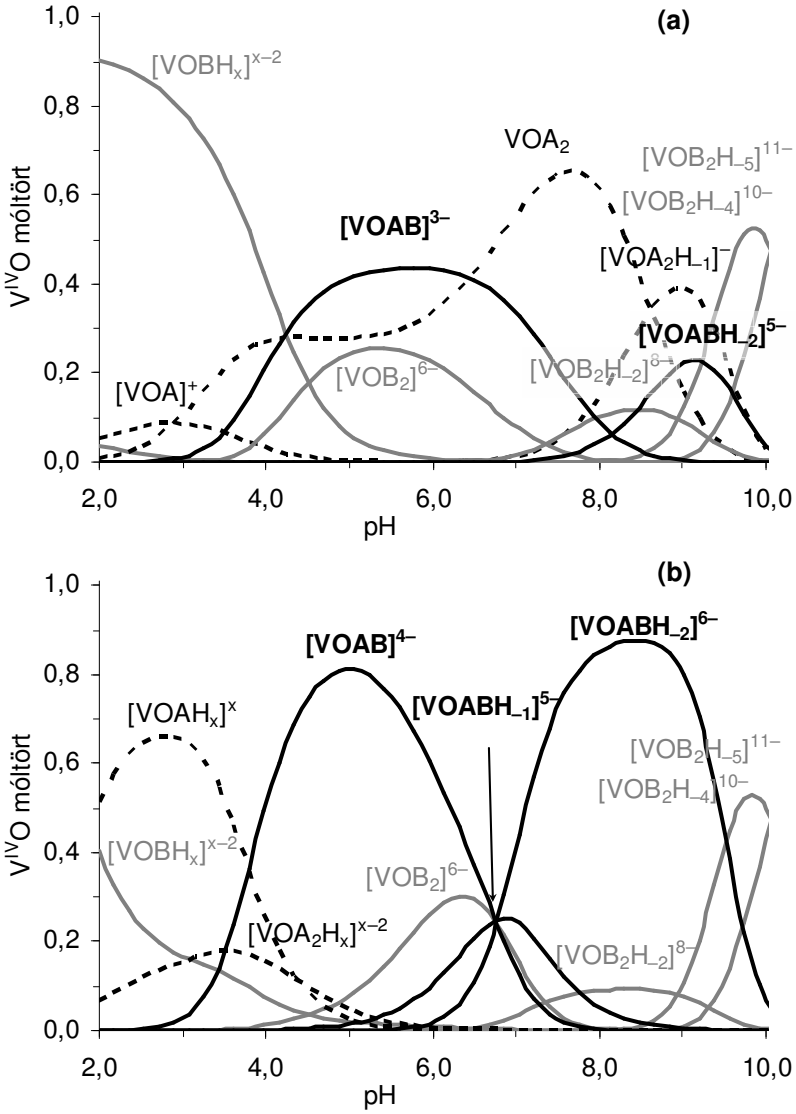
A 17. táblázatban feltüntetett reakciók stabilitási állandói alapján következtetéseket tudunk levonni a VOAB terner komplexek képződéséről, relatív stabilitásáról.

17. táblázat A $V^{IV}O$–(A) hordozóligandum–(B) ATP rendszerekben képződő komplexek ($M_pA_{q^A}B_{q^B}H_r$) stabilitási állandói, illetve különböző származtatott állandók. (A: $malt^{-}$/$dipik^{2-}$, B: ATP^{4-}, I = 0,2 M KCl, T = 25,0 °C)

	A ligandum:	**maltol**	**dipikolinsav**
(p, q^A, q^B, r)	**komplex**	**lgβ**	**lgβ**
(1, 1, 1, 0)	VOAB	13,53(6)	10,98(3)
(1, 1, 1, –1)	$VOABH_{-1}$	–	4,19(6)
(1, 1, 1, –2)	$VOABH_{-2}$	–2,77(41)	–2,58(4)
Mérési pontok száma		236	374
Illesztési paraméter [cm^3]:		$1,58\times10^{-2}$	$1,83\times10^{-2}$
reakcióegyenlet	**származtatott állandó**		
VOB+B ⇌ VOB_2	lg *K* (VOB+B)	3,43	3,43
VOA+B ⇌ VOAB	lg *K* (VOA+B)	4,84	4,29
VOA+A ⇌ VOA_2	lg *K* (VOA+A)	7,60	2,78
VOB+A ⇌ VOAB	lg *K* (VOB+A)	6,66	4,11

A gyengén savas pH-tartományban képződő VOAB terner komplex a dipikolinsavval uralkodó részecske, a maltollal viszont csak kismértékben kedvezményezett (lásd eloszlásgörbék, 51. ábra). Hasonlítsuk össze az ATP biszkomplexének és a vegyes ligandumú komplexek képződési folyamatait, stabilitási állandóit!

Mindkét A ligandum esetében a lg*K*(VOA+B) származtatott egyensúlyi állandó nagyobb, mint a lg*K*(VOB+B); azaz a terner komplex képződése kedvezményezettebb, mint az ATP biszkomplexé valószínűleg elektrosztatikus és/vagy sztérikus okok miatt. A nagynegatív töltésű (B^{4-}) ATP-ligandum szívesebben koordinálódik a maltol egyszeresen pozitív ($[VOA]^{+}$) vagy a dipikolinsav semleges ([VOA]) monokomplexéhez, mint a kétszeresen negatív töltésű, saját $[VOB]^{2-}$ komplexéhez.



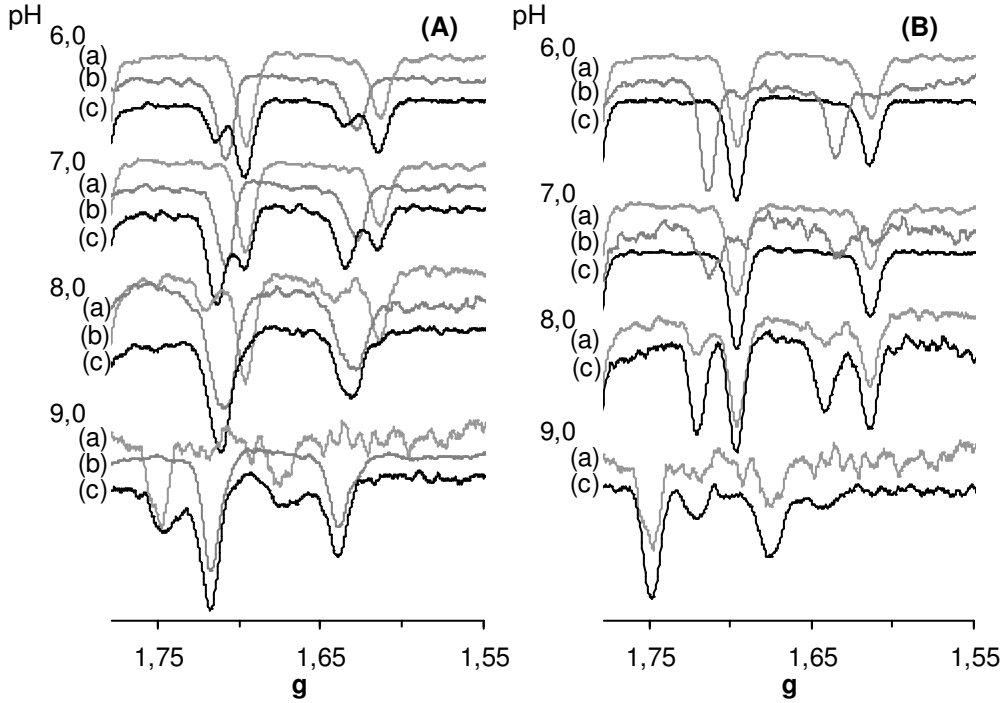
51. ábra $V^{IV}O$–(A) hordozóligandum–(B) ATP rendszerekben képződő komplexek eloszlásgörbéje
A: **(a)** $malt^{-}$/ **(b)** $dipik^{2-}$, B: ATP^{4-}, $[V^{IV}O]_{tot}$ = 4mM, $[A]_{tot}$ = 8mM, $[B]_{tot}$ = 40mM, I = 0,2 M KCl, T = 25,0 °C

A hordozóligandumok biszkomplexeinek és a vegyes ligandumú komplexek stabilitását összehasonlítva már eltérő a két ligandum viselkedése. Az egyszeresen negatív töltésű maltol koordinálódása a saját egyszeresen pozitív monokomplexéhez valamivel kedvezőbb, mint az ATP

kétszeresen negatív töltésű monokomplexéhez (szintén elektrosztatikus okok miatt): lg*K*(VOA+A) nagyobb, mint a lg*K*(VOB+A). A dipikolinsav VOA_2 biszkomplexe kevésbé stabilis, ennek megfelelően – az elektrosztatikus megfontolások ellenére – a kétszeresen negatív dipikolinát viszont szívesebben koordinálódik az ATP monokomplexéhez, mint a sajátjához: lg*K*(VOA+A) kisebb, mint a lg*K*(VOB+A). Valószínűleg ez a folyamat sztérikus okokra, a koordinációs szféra telítettségére vezethető vissza. A dipikolinsav biszkomplexében a második ligandum már csak bidentát módon (COO^-, N) kötődhet, miközben a $[VOB]^{2-}$ ATP-komplexből két ekvatoriális és egy axiális vízmolekulát is kiszoríthat a vegyes ligandumú komplex képződése során. Természetesen ezek a származtatott állandók csak akkor használhatók, ha az összehasonlított komplexek geometriája megegyezik.

Fiziológiás körülmények közt (pH~7) a maltol erősebben, hatásosabban köti a $V^{IV}O$-t, mint a dipikolinsav. A matol mint hordozóligandum biner biszkomplexként is jelen van a vegyes ligandumú terner komplex és az ATP-komplexek mellett (lásd 51. ábra). Míg a dipikolinsav esetében elsősorban terner komplexek képződnek. Az ATP könnyen kiszorítja a második dipikolinsavat a $[VOA_2]^{2-}$ biszkomplexből, illetve könnyen koordinálódik a kismennyiségben még jelenlévő semleges monokomplexhez [VOA] is.

Az 51. (a) ábrán látható eloszlásgörbék a spektrális vizsgálatoknál használt $V^{IV}O$-koncentrációt, illetve fémion-ligandum arányt modellezik. Az 52. ábrán a $V^{IV}O$–hordozóligandum, a $V^{IV}O$–ATP és a $V^{IV}O$–hordozóligandum–ATP rendszerek LT EPR spektrumainak pH-függése hasonlítható össze. A képződő részecskék ESR-paramétereit a 18. táblázat tartalmazza.



52. ábra (a) $V^{IV}O$–ATP, (b) $V^{IV}O$–hordozóligandum és a (c) $V^{IV}O$– hordozóligandum–ATP rendszerek LT EPR spektrumainak pH-függése **(A)** maltol, **(B)** dipikolinsav a hordozóligandum $[V^{IV}O]_{tot}$ = 4mM, $[\text{hordozóligandum}]_{tot}$ = 8mM, $[ATP]_{tot}$ = 40mM, a spektrumokhoz tartozó pH-értékeket az ábrán feltüntettük

A maltol $[VOAB]^{2-}$ komplex képződésének megfelelő pH-tartományban egy új csúcs detektálható a LT ESR-spektrumokban (g_z =1,941, A_z = 169,1×10^{-4} cm^{-1}). Ellenben a $[VOABH_{-2}]^{5-}$ összetételű részecskéhez nem rendelhető egyértelműen új ESR-jel. Ezt magyarázhatja egyrészt az, hogy a számolt eloszlásgörbe alapján a $V^{IV}O$ csak mintegy 20%-a fordul elő ebben a formában; másrészt az, hogy a részecske pH-potenciometriásan meghatározott stabilitási állandója is meglehetősen nagy hibával terhelt (ráadásul mind a két biner alrendszerben pH~9 felett hidrolízis és nem egyensúlyi folyamatok játszódnak le). A CD-mérések (53. ábra) a pH = 8 – 9 tartományban egyértelműen egy új, optikailag aktív részecske képződését igazolják alátámasztva a $[VOABH_{-2}]^{5-}$ komplex (O^-, =O)(O^-, O^-) koordinációját. Nagyobb pH-n a $[VOB_2H_{-4\ (-5)}]^{7-\ (8-)}$ biner ATP-komplex(ek)nek megfelelő spektrum detektálható. A hordozóligandum kiszorul a koordinációs szférából, csak az ATP ribózrészének alkoholátcsoportjai kötik a vanádiumot.

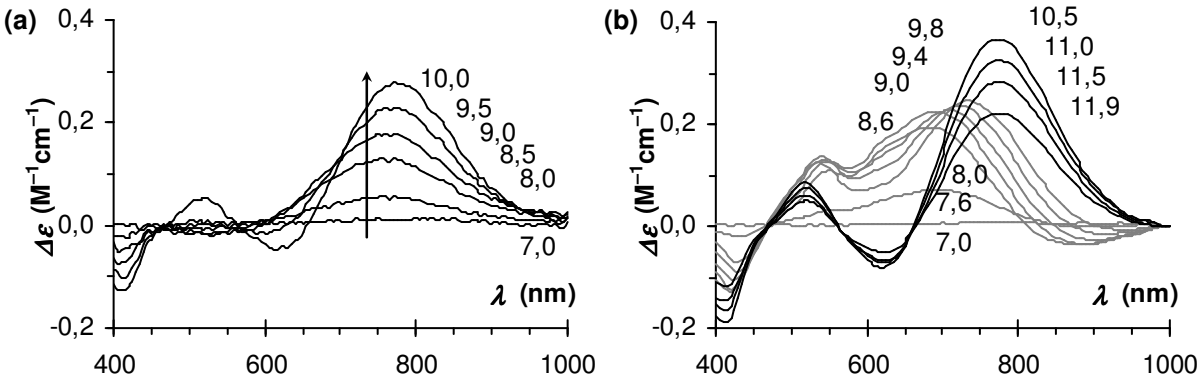
18. táblázat A hordozóligandum, ATP biner és terner rendszerekben képződő részecskék ESR-paraméterei, valamint a javasolt kötésmódok

részecske	g_z	A_z [×10^4 cm^{-1}]	**kötésmód**
malt			
$[VOA]^+$	1,937	175,1	(O^-,=O) 2×H_2O
$[VOA_2]$	1,938	171,4	(O^-,=O) (O^-,=O_{ax}) H_2O
$[VOA_2H_{-1}]^-$	1,942	166,8	(O^-,=O) (O^-,=O_{ax}) OH^-
dipik			
[VOA]	1,931	178,4	(COO^-,COO^-) 2×H_2O
$[VOA_2]^{2-}$	1,939	167,8	(COO^-,COO^-)(COO^-,$N_{piridin}$)
ATP			
$[VOBH_x]^{x-2}$	1,930	181,8	(**PO_3^{2-}**–O–**PO_2^-**–O–PO_2^-–) 2×H_2O
$[VOB_2]^{6-}$	1,933	178,4	2×(**PO_3^{2-}**–O–**PO_2^-**–O–PO_2^-–)
$[VOB_2H_{-2}]^{8-}$	1,946	166,8	(**PO_3^{2-}**–O–**PO_2^-**–O–PO_2^-–) (O^-,O^-)
$[VOB_2H_{-4}]^{10-}$	1,958	151,8	(O^-,O^-) (O^-,O^-)
malt+ATP			
$[VOAB]^{3-}$	1,941	169,1	(O^-,=O) (**PO_3^{2-}**–O–**PO_2^-**–O–PO_2^-–)
$[VOABH_{-2}]^{5-}$	1,943	166,4 ?	(O^-,=O) (O^-,O^-)
dipik+ATP			
$[VOAB]^{4-}$	1,933	178,1	(COO^-,COO^-) (**PO_3^{2-}**–O–**PO_2^-**–O–PO_2^-–)
$[VOABH_{-1}]^{5-}$	?	?	
$[VOABH_{-2}]^{6-}$	1,946	167,0	(COO^-,COO^-) (O^-,O^-)

A dipikolinsav és az ATP funkciós csoportjainak ligandumtér-erősségi sorrendjét összehasonlítva – (H_2O ≤) COO^- ≈ PO_3^{2-}–O–PO_2–O–PO_2– < O^-_{cuk} < $N_{piridil}$ – megállapítható, hogy az ATP trifoszfátláncának vagy a dipikolinsav karboxilátcsoportjainak koordinációja nem jelent szignifikánsan eltérő ligandtumteret, koordinációs szférát. Nem várható jelentős spektrális különbség ezen funkciós csoportok koordinációjának kombinációja során sem. A dipikolinsav semleges monokomplexe [VOA], az ATP biszkomplexe $[VOB_2]^{6-}$ és minden bizonnyal a $[VOAB]^{4-}$ vegyes

ligandumú komplex is közel azonos ESR-paraméterekkel rendelkezik (18. táblázat). Ezzel összhangban van az, hogy a $V^{IV}O$–dipik–ATP terner rendszer 77K-en felvett LT ESR-spektrumaiban (52. ábra) nem detektálható új csúcs (a biner rendszerekhez képest).

A terner rendszerben képződő komplexek ESR-paraméterei is alátámasztják azt, hogy az ATP megakadályozza a második hordozóligandum koordinációját: nem mutatható ki piridil-N a központi fémion ekvatoriális síkjában. A $V^{IV}O$–ATP és $V^{IV}O$–dipik biner rendszerekhez képest a terner rendszerben visszaszorul a hidrolízis, a két ligandum együtt hatásosabban köti a $V^{IV}O$-iont, mint külön-külön. Erre utal a jobb jel-zaj arány az ESR-spektrumokban (lásd 52. (b) ábrán), és a terner rendszer CD-spektrumainak nagyobb intenzitása (lásd 53. (b) ábra). Mivel a CD-spektrumokban csak a ribózrész koordinációjával detektálható jelentős pozitív Cotton-effektus (λ_{max} ~ 760 nm), bizonyított, hogy a $[VOABH_{-2}]^{6-}$ koordinációs módja: (COO^-, COO^-)(O^-, O^-).

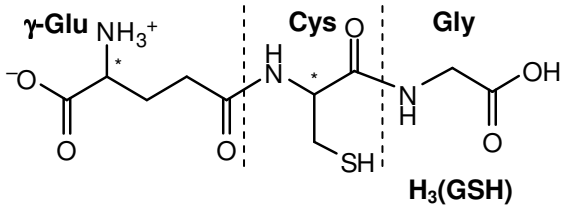


53. ábra A $V^{IV}O$–hordozóligandum–ATP rendszerek CD-spektrumainak pH-függése
(a) maltol, **(b)** dipikolinsav a hordozóligandum. $[V^{IV}O]_{tot}$ = 4mM, $[\text{hordozóligandum}]_{tot}$ = 8mM, $[ATP]_{tot}$ = 40mM A spektrumokhoz tartozó pH-értékeket az ábrán feltüntettük

3.2.3. A GSH hatása az inzulinutánzó oxovanádium(IV)komplexekre

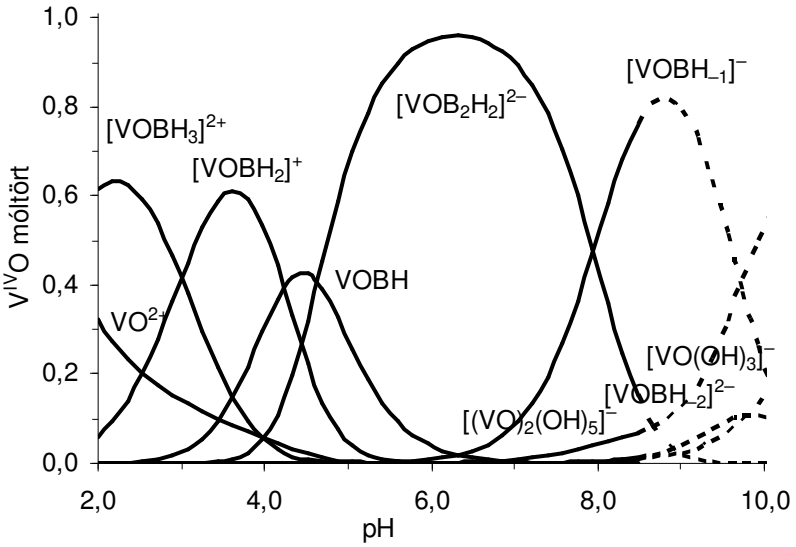
3.2.3.1. $V^{IV}O$–GSH rendszer

A redukált glutation (továbbiakban GSH) hatásának értelmezéséhez először a ligandum $V^{IV}O$-kötő sajátságait kell ismernünk. A GSH (γ-glutamil-L-ciszteinil-glicin) egy természetes tripeptid nyolc, potenciális fémkötő donorcsoporttal. Az élő sejtek nélkülözhetetlen alkotóeleme, és a leggyakoribb sejten belüli nem fehérje tiol. A GSH fontos szerepet játszik a vanádium biokémiájában is. Számos közlemény foglalkozik a GSH és a V(V) között lejátszódó redoxireakcióval, amely során $V^{IV}O$, illetve oxidált glutation (GSSG) keletkezik. A humán vörösvérsejtekben a GSH koncentrációja 2-3 mM, míg a GSSG ennek 1-2%.



Nagyszámú publikáció található az irodalomban[165,166,167] a $V^{IV}O$-ion GSH-val képzett komplexeiről. J. Costa Pessoa és munkatársainak közleményére[167] támaszkodva a 19. táblázatban

szereplő speciációs modellt használtuk a kölcsönhatások leírására. A 54. ábrán látható eloszlásgörbék a spektrális vizsgálatoknál használt $V^{IV}O$-koncentrációt, illetve fémion-ligandum arányt modellezik.



54. ábra A $V^{IV}O$ – GSH rendszerben képződő részecskék eloszlásgörbéje a pH függvényében. A szaggatott vonallal jelzett rész csak a tendenciák leírására alkalmas, a pH-potenciometriás mérés nagyobb bizonytalanságára utal. B: GSH^{3-}, $[V^{IV}O]_{tot}$ = 4mM, $[B]_{tot}$ = 200mM.

A GSH az ATP-hez képest jóval gyengébben köti a $V^{IV}O$-iont. 1:10, illetve 1:25 fémion-ligandum arány mellett ugyan nem tapasztalható a $VO(OH)_2$ hidroxidcsapadék leválása, azonban már pH~7 felett jelentőssé válik a $V^{IV}O$ hirdolízise. A terner rendszerek spektrális vizsgálatai során ezért használtunk a fémionhoz képest 25-, 50- és 100-szoros GSH-feleseleget.

19. táblázat A GSH protonálódási és oxovanádium(IV)-ionnal alkotott komplexeinek ($M_pL_qH_r$) stabilitási állandói. (B: GSH^{3-}, I = 0,2 M KCl, T = 25,0 °C)

		GSH	
(p, q, r)	**részecske**	**lg*β***	**p*K***
(0, 1, 4)	H_4B^+	23,67(5)	2,09
(0, 1, 3)	H_3B	21,58(2)	3,45
(0, 1, 2)	H_2B^-	18,13(2)	8,63
(0, 1, 1)	HB^{2-}	9,50(2)	9,50
(1, 1, 3)	$[VOBH_3]^{2+}$	22,9(3)	2,8
(1, 1, 2)	$[VOBH_2]^+$	20,1(1)	4,3
(1, 1, 1)	[VOBH]	15,8(1)	
(1, 2, 2)	$[VOB_2H_2]^{2-}$	29,7(2)	
(1, 1, –1)	$[VOBH_{-1}]^-$	3,0(2)	10,3
(1, 1, –2)	$[VOBH_{-2}]^{2-}$	–7,3(3)	

A $[VOBH_3]^{2+}$ komplexben egy karboxilátcsoport koordinációja valószínűsíthető, amely a CD-spektroszkópiás, illetve a glutation-etilészterrel történő összehasonlító mérések alapján inkább a glutaminsavrészen található. A komplex CD-spektruma jelentősen eltér az egyszerű aminosavak (Ala, Ser, Glu) megfelelő $V^{IV}O$-komplexeinek spektrumaitól, így egy, esetleg két karbonilcsoport koordinációja stabilizálhatja a szerkezetet. A pK = 2,8 deprotonálódási lépcsővel kialakuló $[VOBH_2]^+$ komplex (spektrális paraméterei alapján) egy vagy két karboxilát- és egy vagy két karbonilcsoportot tartalmazhat a $V^{IV}O$-hoz kötve, amelyekből az egyik axiálisan koordinálódik. A [VOBH] részecske esetében a sztöchiometriai összetételnél fogva (az SH csoport marad még protonált), illetve az ESR-paraméterek alapján egy aminocsoport is részt vesz a fémmegkötésben.

A pH 5 és 7 között képződő $[VOB_2H_2]^{2-}$ legvalószínűbb kötésmódját 2×(COO^-, NH_2) az aminosavak biszkomplexeire (Ala, Ser) jellemző ESR-paraméterek, és a látható CD-, valamint az

elektrongerjesztési spektrumok jó egyezése igazolja. Az 1 mM-t meghaladó $V^{IV}O$-koncentráció, valamint legalább tízszeres ligandumfelesleg mellett ez a bisz(aminosav)-típusú kötésmóddal rendelkező $[VOB_2H_2]^{2-}$ komplex a domináns ebben a pH-tartományban.

A pH további növelése két folyamatot indít el: a fémion hidrolízisét, illetve a tiolátcsoport koordinációját. A két folyamat viszonyát a fémion-ligandum arány határozza meg. A $[VOBH_{-1}]^{2-}$ összetételhez két, egymással egyensúlyban lévő, izomer szerkezet rendelhető az ESR-mérések alapján. Az egyikben a tiolátcsoport, a másik, minor komponensben a deprotonált amidnitrogén koordinálódása valószínűsíthető.

3.2.3.2. $V^{IV}O$–maltol/dipikolinsav–GSH rendszerek

A terner rendszerek pH-potenciometriás titrálása során a maximum nyolcszoros, illetve ötszörös GSH-felesleg mellett is bekövetkezett a hidrolízis (a maltoltartalmú rendszernél pH~9, a dipikolinsav-tartalmúnál pH~6 fölött). Nagyobb GSH-koncentráció alkalmazása tovább növelte volna a pH-potenciometriás számolások pontatlanságát a ligandumfelesleg növekvő pufferkapacitása miatt. Ugyanis a nagy feleslegben lévő ligandum sav-bázis folyamatai elfedhetik a fémion indukált deprotonálódási reakciók nagyságrendekkel kisebb pH-effektusait.

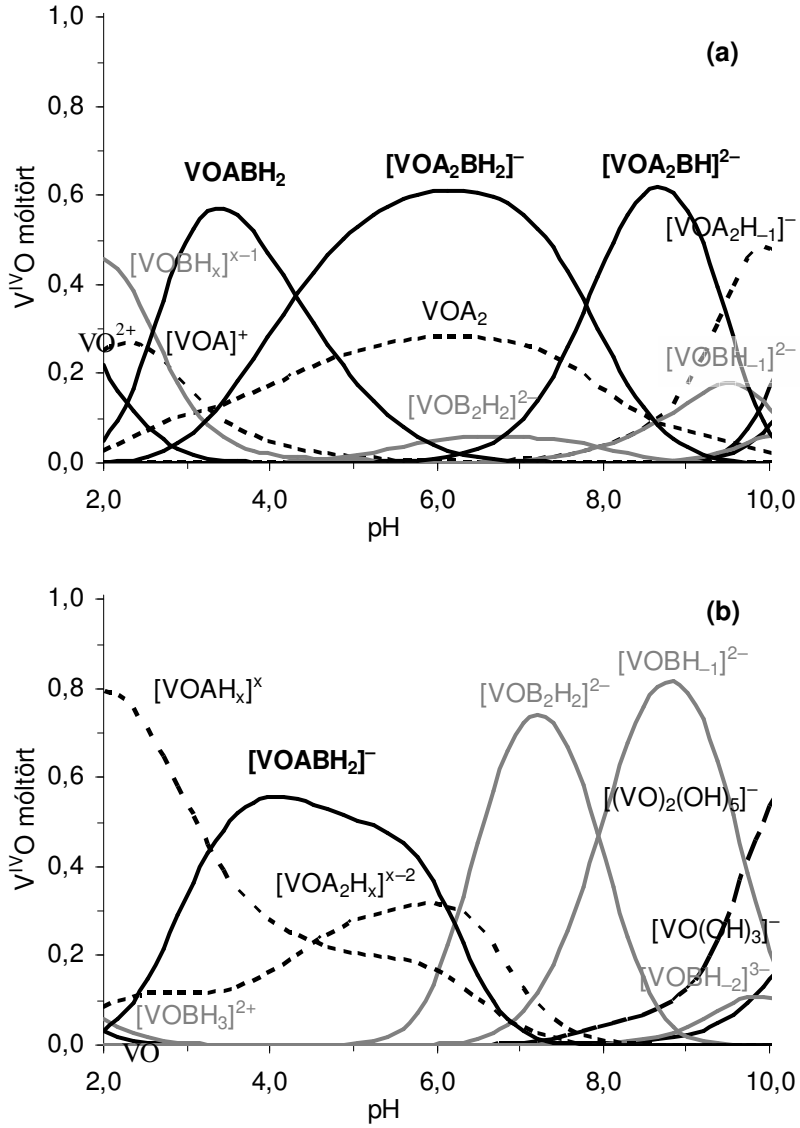
20. táblázat A $V^{IV}O$–(A) hordozóligandum–(B) GSH rendszerekben képződő komplexek ($M_pA_{q^A}B_{q^B}H_r$) stabilitási állandói (A: $malt^-/dipik^{2-}$, B: GSH^{3-}, I = 0,2 M KCl, T = 25,0 °C)

		A ligandum:	**maltol**	**dipikolinsav**
(p, q^A, q^B, r)	**komplex**		**lgβ**	**lgβ**
(1, 1, 1, 2)	$VOABH_2$		28,6(1)	26,0(2)
(1, 2, 1, 2)	VOA_2BH_2		35,5(3)	–
(1, 2, 1, 1)	VOA_2BH		27,7(2)	–
Mérési pontok száma			314	318
Illesztési paraméter [cm^3]:			$6{,}5\times10^{-3}$	$8{,}5\times10^{-3}$

A pH-potenciometriás titrálási görbéket a vegyes ligandumú komplexek nélkül – csak a biner komplexekkel – is kielégítően (illesztési paraméter < $1{,}0\times10^{-2}$ cm^3) le lehet írni. Azonban nagyobb GSH-felesleg mellett a terner rendszerek ESR-spektrumaiban biner komplexekhez nem rendelhető, új jelek detektálhatóak. A 20. táblázatban szereplő vegyes ligandumú komplexekkel értelmezhető a terner rendszerek spektrális viselkedése. A 55. ábrán látható eloszlásgörbék a spektrális vizsgálatoknál használt $V^{IV}O$-koncentrációt, illetve fémion-ligandum arányt modellezik.

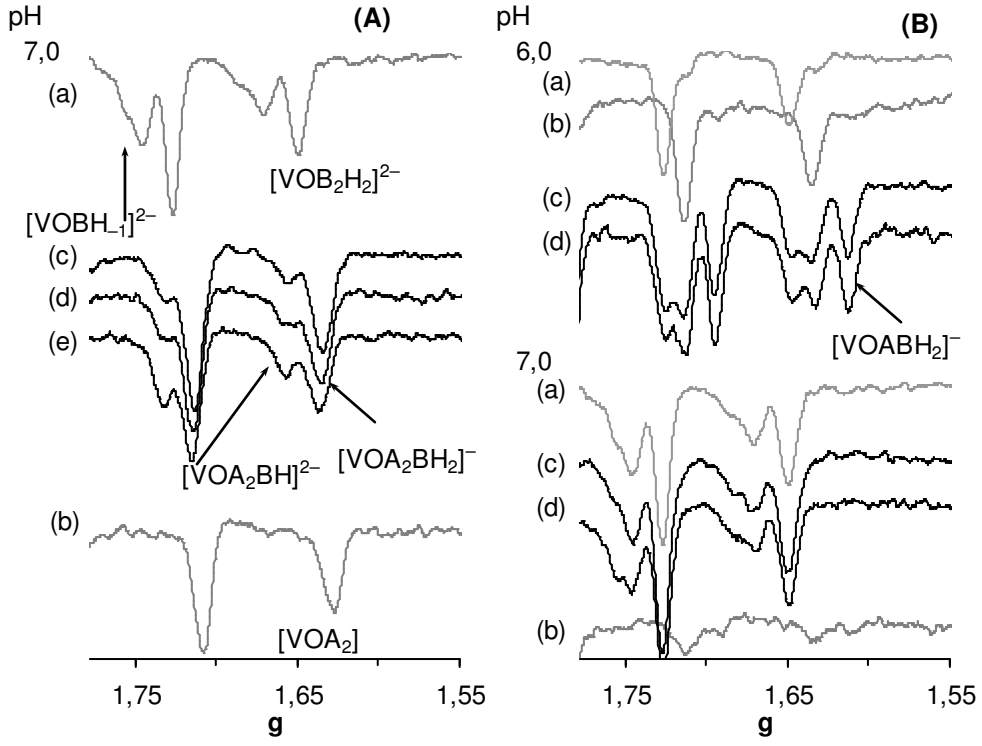
A dipikolinsavval a gyengén savas pH-tartományban $[VOABH_2]^-$ vegyes ligandumú komplex képződik. A maltolt, mint hordozóligandumot tartalmazó terner rendszerek esetében a $[VOABH_2]$ mellett $[VOA_2BH_2]^-$ és $[VOA_2BH]^{2-}$ összetételű komplexek is detektálhatóak, köszönhetően annak, hogy a maltol vizes oldatban előszeretettel képez olyan biszkomplexet (a cisz izomert), amely ekvatoriális síkjában „szabad” koordinációs helyet, azaz könnyen lecserélhető vízmolekulát tartalmaz.

A $V^{IV}O$ – dipikolinsav – GSH-rendszerben kis pH-n a dipikolinsav köti a $V^{IV}O$-t. A pH = 3–6 tartományban a modellszámítások szerint legalább 25-szörös GSH-felesleg mellett lesz a $[VOABH_2]^-$ terner komplex domináns. A komplexre meghatározott stabilitási állandó nagy bizonytalanságához hozzájárulhat, hogy a koordinálódó karboxilcsoport deprotonálódása (pK_2(COOH) = 3,45) és a komplexképződés is közel azonos pH-tartományban játszódik le, kicsi a fémionindukált koordináció mérhető pH-effektusa. Ahogy nő a pH és csökken a dipikolinsav $V^{IV}O$-kötő képessége, kizárólag GSH biner komplexek lesznek jelen az oldatban. A hordozóligandum kiszorul a koordinációs szférából pH~6,5 felett.



55. ábra $V^{IV}O$–(A) hordozóligandum–(B) GSH rendszerekben képződő komplexek eloszlásgörbéje. A: **(a)** $malt^-$/ **(b)** $dipik^{2-}$, B: GSH^{3-}, $[V^{IV}O]_{tot}$ = 4mM, $[A]_{tot}$ = 8mM, $[B]_{tot}$ = 200mM, I = 0,2 M KCl, T = 25,0 °C

A koordinálódó donoratomokra a spektrális vizsgálatok alapján tettünk javaslatot. Az 56. ábrán a különböző biner és terner rendszerek LT EPR-spektrumai hasonlíthatóak össze, a képződő részecskék ESR-paramétereit a 21. táblázat tartalmazza.



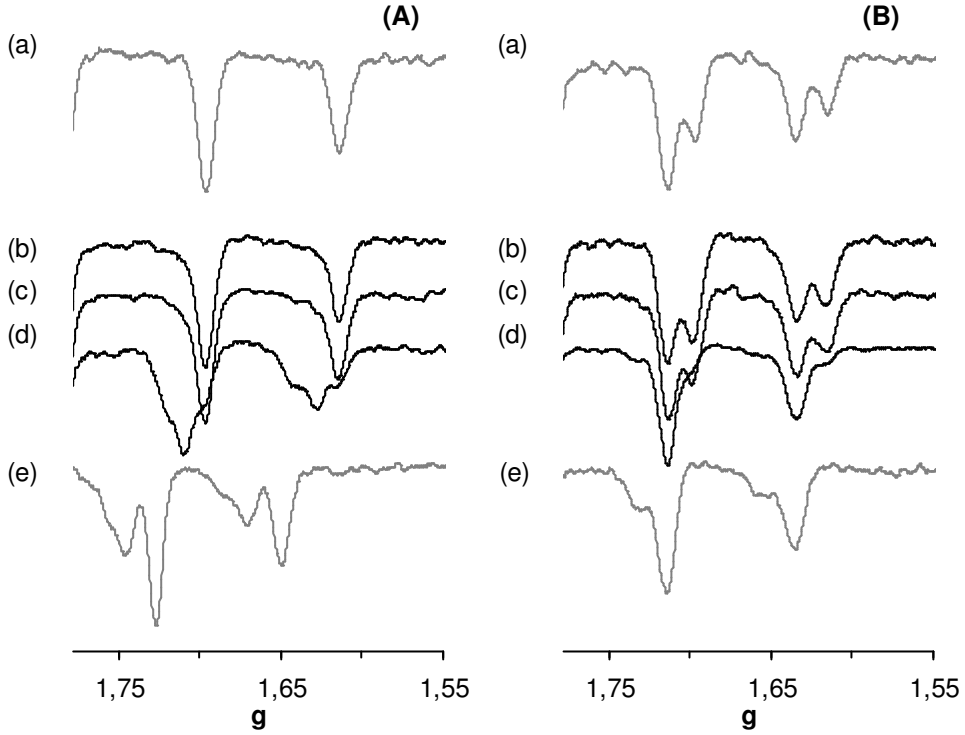
56. ábra (a) $V^{IV}O$ – GSH, (b) $V^{IV}O$ – hordozóligandum és a (c,d,e) $V^{IV}O$ – hordozóligandum –GSH rendszerek LT EPR spektrumai (pH-értékek fel vannak tüntetve).
(A) maltol, **(B)** dipikolinsav a hordozóligandum. $[V^{IV}O]_{tot}$ = 4mM, $[\text{hordozóligandum}]_{tot}$ = 8mM, $[GSH]_{tot}$ = 100mM (c), 200mM (d), 400mM (e)

21. táblázat A hordozóligandum, GSH biner és terner rendszerekben képződő részecskék ESR-paraméterei, valamint a javasolt kötésmódok

részecske	g_z	A_z [$\times 10^4$ cm^{-1}]	**kötésmód**
malt			
$[VOA]^+$	1,937	175,1	$(O^-,=O)$ $2\times H_2O$
$[VOA_2]$	1,938	171,4	$(O^-,=O)$ $(O^-,=O_{ax})$ H_2O
$[VOA_2H_{-1}]^-$	1,942	166,8	$(O^-,=O)$ $(O^-,=O_{ax})$ OH^-
dipik			
[VOA]	1,931	178,4	(COO^-,COO^-) $2\times H_2O$
$[VOA_2]^{2-}$	1,939	167,8	$(COO^-,COO^-)(COO^-,N_{piridin})$
GSH			
$[VOBH_2]^+$	1,937	174,2	(COO^-, 1vagy 2 amid-O)
[VOBH]	1,941	170,0	(1 vagy 2 COO^-, amid-O) $(\text{amid-O})_{ax}$
$[VOB_2H_2]^{2-}$	1,948	163,8	$2\times$ (COO^-, NH_2)
$[VOBH_{-1}]^{2-}$ (I)	1,956	154,5	(COO^-/ amid-O, NH_2, S^-) OH^-
$[VOBH_{-1}]^{2-}$ (II)	1,959	147,0	(COO^-, NH_2, S^-, amid-N^-)
dipik+GSH			
$[VOABH_2]^-$	1,930	177,2	(COO^-,COO^-) (COO^-, amid-O/H_2O)
malt+GSH			
$VOABH_2$	1,936	174,2	$(O^-,=O)$ (COO^-, amid-O/H_2O)
$[VOA_2BH_2]^-$	1,941	169,0	$(O^-,=O)$ $(O^-,=O_{ax})$ (COO^-)
$[VOA_2BH]^{2-}$	1,949	159,1	$(O^-,=O)$ $(O^-,=O_{ax})$ (S^-)

A $[VOABH_2]$ terner komplexekben a hordozóligandumok a megfelelő donorcsoportjaikon $((=O, O^-)_{malt}$, vagy $(COO^-, COO^-)_{dipik})$, míg a GSH az egyik karboxilátcsoportján (feltehetően a C terminálison) keresztül koordinálódik a központi fémionhoz, esetleg egy GSH peptidkarbonil-oxigén stabilizálja a szerkezetet (a tiolát- és az aminocsoport protonált). A $V^{IV}O$–dipik–GSH rendszer esetében közel jelcsendes CD-spektrumok támasztják alá a glicin rész koordinációját savas pH-n, a gyengén savas és semleges pH-n mért CD-aktivitás pedig a $[VOB_2H_2]^{2-}$ komplex képződéséhez rendelhető.

A $[VOA_2BH_2]^-$ és $[VOA_2BH]^{2-}$ összetételű, $V^{IV}O$–maltol–GSH vegyes ligandumú komplexekben a GSH kizárólag monodentát módon koordinálódhat a maltol cisz $[VOA_2]$ biszkomplexéhez, miközben kiszorítja az ekvatoriális síkban lévő vízmolekulát. A gyenge CD-jel alapján itt is a glicinrész koordinációja valószínűsíthető, csak pH 7 fölött várható a tiolátcsoport részvétele a fémkötésben. A $[VOA_2BH]^{2-}$ részecske ESR-paramétere is a monodentát tiolátkoordinációt támasztja alá: a $\{(O^-,=O)(O^-,=O_{ax})(S^-)_{ekv}\}$ kötésmódra becsült $A_z= 158\times10^{-4}$ cm^{-1}, míg a mért $A_z= 159\times10^{-4}$ cm^{-1}.



57. ábra Különböző összetételű vegyes ligandumú rendszerek pH=7-en felvett LT ESR spektrumrészletei:
(A) hordozóligandum nélkül és (B) 8mM maltol jelenlétében, $[V^{IV}O]_{tot}$ = 4mM
(a) $V^{IV}O$ – ATP 1:10, (b) $V^{IV}O$ – ATP – GSH 1:10:25, (c) $V^{IV}O$ – ATP – GSH 1:10:50,
(d) $V^{IV}O$ – ATP – GSH 1:2,5:50, (e) $V^{IV}O$ – GSH 1:50

Végeztünk olyan ESR-spektroszkópiás vizsgálatokat is, amelyek során a két vizsgált sejtalkotó ligandumot (ATP, GSH) egyszerre adtuk a $V^{IV}O$-hez, illetve a $V^{IV}O$ – maltol rendszerhez (lásd 57. ábra). A fémion és a hordozóligandum koncentrációját állandó értéken tartva a feleslegben alkalmazott ATP és GSH arányát változtattuk. Arra voltunk kíváncsiak, hogy vajon a feleslegben alkalmazott GSH versenyképes partner-e az ATP-nek a vanádium megkötésében.

Azt tapasztaltuk, hogy ameddig az ATP legalább tízszeres feleslegben van a $V^{IV}O$-hoz képest, elsősorban $V^{IV}O$-ATP biner, illetve $V^{IV}O$-hordozóligandum-ATP vegyes ligandumú komplexek képződnek. A $V^{IV}O$ – ATP – GSH rendszerben kis ATP feleslegnél két új csúcsot detektáltunk, mely vegyes ligandumú komplexképződésre utal (A_z = 172,1×10^{-4} cm^{-1}, A_z = 165,7×10^{-4} cm^{-1}). Kisebb ATP-feleslegnél a hordozóligandumot is tartalmazó rendszerben a jelek arányának változása a GSH koordinációját valószínűsíti. Amennyiben nagy feleslegben vannak ezek a sejtalkotó bioligandumok a potenciális inzulinutánzó komplexhez képest – márpedig a sejtben jelentős a feleslegük–, a GSH nem versenyképes partnere az ATP-nek a biner és terner $V^{IV}O$-komplexképzésben.

Összefoglalás

Eredményeink alapján a szervezetbe inzulinutánzó hatású $V^{IV}O$-komplexként bejutatott fémion biológiai hatásért felelős formájának meghatározásakor, nem hagyhatjuk figyelmen kívül a vegyes ligandumú komplexek képződését a sejtalkotó ATP-vel. Az ATP savas és semleges pH-n a terminális foszfátlánc donoratomjai, míg lúgos pH-n a ribózrész alkoholátjain keresztül koordinálódik a fémionhoz, illetve a fémion-hordozóligandum monokomplexekhez. A vizsgált ligandumok közül a maltol erősebben, hatásosabban köti a $V^{IV}O$-iont fiziológiás körülmények közt, mint a dipikolinsav. A $V^{IV}O$–maltol–ATP rendszerben csak a gyengén savas pH-tartományban viszonylag kedvezményezett a VOAB vegyes ligandumú komplex képződése, míg a fiziológiás pH-n a VOA_2 maltol biszkomplex a domináns. A $V^{IV}O$–dipikolinsav–ATP rendszerben a teljes vizsgált pH-tartományban a vegyes ligandumú komplexek képződése a jellemző, a két ligandum együtt hatásosabban köti a vanádiumot, mint külön-külön. Megállapítottuk, hogy a GSH nem képez olyan stabilis vegyes ligandumú komplexeket, mint az ATP. Vizsgálataink alapján elmondhatjuk, hogy a GSH elsősorban a szervezetben lévő redoxipuffer fontos alkotóelemeként tölt be jelentős szerepet a vanádium biokémiájában, és nem komplexképzőszerként. Természetesen a biológiai rendszerekben, az emberi szervezetben is könnyen oxidálódhatnak a $V^{IV}O$-vegyületek. További vizsgálatokat tervezünk a GSH és a különböző inzulinutánzó V(V)-komplexek között lejátszódó redoxireakció kinetikájának meghatározására.

4. Összefoglalás

A cukorbetegség napjainkban mind elterjedésében, mind kimenetelében az egyik legnagyobb népegészségügyi probléma világszerte. A vanádium kémiájával foglalkozó kutatók egy része olyan vanádiumtartalmú gyógyszert vagy gyógyhatású készítményt szeretne kifejleszteni, amely szájon át alkalmazva megkönnyítené a cukorbetegek mindennapjait, helyettesíthetné, vagy kiegészíthetné az inzulinterápiát. Közel három évtizede került újra az érdeklődés középpontjába az a felfedezés, hogy a vanádiumvegyületek csökkentik a vércukorszintet, képesek „utánozni", fokozni az inzulin egyes alapvető biológiai hatásait. Azóta számos vanádiumkomplexet szintetizáltak és találtak hatásosnak a biológiai vizsgálatok során, de a pontos hatásmechanizmusuk még nem ismert.

A vanádium oldatbeli állapota, kémiai formája (speciációja) elsődleges fontosságú a fiziológiai hatás szempontjából. Munkánk során egyrészt potenciális hordozóligandumok $V^{IV}O$-kötő képességét, másrészt inzulinutánzó $V^{IV}O$-komplexek és sejtalkotó, vanádiumkötő biomolekulák kölcsönhatását jellemeztük. Az oldategyensúlyi vizsgálatok során meghatároztuk a képződő $V^{IV}O$-komplexek összetételét és stabilitási állandóit, majd spektrális vizsgálatok alapján javaslatot tettünk oldatszerkezetükre, a ligandumok kötésmódjára.

Az aldársavak láncvégi karboxilcsoportjai kitűnő horgonydonorcsoportok lehetnek a fémionmegkötésben. Megállapítottuk, hogy mind a D-glükársav, mind a galaktársav széles pH-tartományban hatásosan köti a $V^{IV}O$-iont; 1:1 összetételű, egy- és kétmagvú $V^{IV}O$-komplexeket képez. Diasztereomer aldársavakról van szó, a 4. szénatomuk konfigurációjában különböznek. Azt tapasztaltuk, hogy ugyan a ligandumok deprotonálódási folyamatai nem, viszont a komplexképződés – elsősorban a kétmagvú komplexeknél – sztereoszelektíven játszódik le. Csak kis pH-n figyelhető meg egymagvú $[VOL]/[VOLH]^+$ komplex, melyben – a bázicitással korrigált stabilitási állandó és a spektrális (ESR, UV-Vis) paraméterek alapján – egy karboxilátcsoport mellett egy alkoholos hidroxil-csoport vesz részt a fémionkötésben. A horgonycsoportként funkcionáló karboxilát koordinációja megkönnyíti az alkoholos hidroxilcsoport bekötését ugyanúgy, ahogy a többi cukorsavtípusnál (aldonsav, uronsav). A pH növelésével a fémion hatására az alkoholos hidroxilcsoport deprotonálódik. Ez a fémionindukált folyamat a kétmagvú vagy dimer komplexek képződése során válik teljessé. A viszonylag jelcsendes szobahőmérsékletű ESR-spektrumok is spincsatolt kétmagvú komplexek képződését támasztják alá. A fagyasztott minták ESR-spektruma arról tanúskodik, hogy a monomer-dimer egyensúly a hőmérséklet csökkenésével a monomerek irányába tolódik el. Ezekben a rendszerekben entrópiavezérelt endoterm dimerizáció játszódik le. A dimerek esetében az α-hidoxi-karbonsavakra jellemző cisz-transz izomériát figyelembe véve javaslatot tettünk a $V^{IV}O$-centrumok környezetére. Tulajdonképpen mindkét aldársav – a képződő komplexek stabilitása alapján – alkalmas lehet a vanádium szervezetbe juttatására. Méréseink azt támasztják alá, hogy a D-glükársav valamivel erősebb komplexképző, így jobb hordozóligandum lehet, mint a galaktársav.

A sal_2en-származékok közül a szalicilaldehid/piridoxál cserével előállított pyr_2en Schiff-bázis (N,N'-etilén-bisz(piridoximin)) és a $rpyr_2$en redukált Schiff-bázis (N,N'-etilén-bisz(piridoximin)) $V^{IV}O$-kötő sajátságait jellemeztük. Megállapítottuk, hogy mindkét esetben a ligandum döntően négy foggal – a két fenolát- és a két amino-/iminocsoporton keresztül – csatolt kelátgyűrűket képezve koordinálódik a központi fémionhoz. Majd a $[VOLH_2]^{2+}$ monokomplex a nem koordinálódó piridiniumcsoportok deprotonálódásával alakul tovább. A semleges [VOL] komplexek rosszul oldódnak vízben, a pH-potenciometriás mérési körülmények közt néhány mM-nál nagyobb koncentrációnál már kicsapódnak az oldatból (a pyr_2en semleges komplexének az oldhatósága a kisebb). A pyr_2en Schiff-bázis az aldimin kötéseknek köszönhetően viszonylag merev szerkezettel rendelkezik, mely befolyásolja a komplexképző képességét is: nagyságrendekkel gyengébben köti a $V^{IV}O$-t, mint a flexibilisebb $rpyr_2$en. A donorcsoportok kedvezőtlen preorganizációjának köszönhetően kis pH-n a pyr_2en ligandum először csak két foggal koordinálódik a fémionhoz a $[VOLH_4]^{4+}$ komplexben. Érdekes geometriai izomériát tapasztaltunk a redukált Schiff-bázis $[VO(rpyr_2en)H_n]^{n+}$ (n = 2, 1, 0) komplexeinél. Az ESR-vizsgálatok alapján javaslatot tettünk az izomerekben lévő központi fémion környezetére. A különböző átmenetifém-ionokkal képződő $[M(rpyr_2en)H_x]^{x+}$ komplexek bázicitással korrigált stabilitási álladóját összehasonlítva az alábbi stabilitási sorrendet kapjuk: $Cu^{II} > V^{IV}O > Ni^{II} > Zn^{II}$.

A redukált sal_2en-származékok közül az etiléndiamin/diamino-karbonsav cserével előállított sal_2dpa (N,N'-bisz(2-hidroxibenzil)-2,3-diamino-propánsav) és sal_2orn (N,N'-bisz(2-hidroxibenzil)-2,5-diamino-pentánsav) $V^{IV}O$-kötő képességét jellemeztük. A ligandumok közötti szerkezeti különbség – eltérő méretű diamino-karbonsav-híd – azt eredményezi, hogy a sal_2dpa nemcsak savasabb vegyület, hanem erősebb $V^{IV}O$-kötő is mint a sal_2orn. Megállapítottuk, hogy mindkét ligandum döntően 1:1 összetételű komplexet képez a $V^{IV}O$-ionnal. Az extra karboxilcsoport révén stabilisabb $V^{IV}O$-komplexeket képez az ötfogú sal_2dpa, mint a négyfogú sal_2en-származék, a vízoldható $R(SO_3\text{-sal})_2$en. A sal_2dpa és a sal_2orn csak pH~3 és pH~4 felett kezd $V^{IV}O$-komplexet képezni, míg a pH= 5,0 – 9,0, valamint a pH = 7,0 – 10,0 tartományban kiválóan köti a vanádiumot (a fémion közel 100%-a $[VOL]^-$ komplexben van jelen az oldatban). A $[VOL]^-$ komplexek stabilitási és a $[VOLH_2]^+$ komplexek bázicitással korrigált stabilitási állandóit összehasonlítva megállapítottuk, hogy a sal_2dpa esetében egy-két nagyságrenddel erősebb a kölcsönhatás a fémion és a ligandum között. A komplexképződés kezdetén csak a ligandumok fele koordinálódik, majd kooperatív módon további két csoport deprotonálódik és kötődik a központi fématomhoz. Az ESR-mérések szerkezeti izomerek képződését támasztják alá. A $V^{IV}O$-sal_2dpa rendszer spektrális vizsgálatai alapján javaslatot tettünk a komplexekben lévő központi fémion környezetére.

Az egyik lényeges különbség a két vizsgált sal_2en-származéktípus között az, hogy míg a pyr_2en és az $rpyr_2$en semleges, addig a sal_2dpa és a sal_2orn egyszeresen negatív töltésű VOL komplexet képez fiziológiás pH-n. Az ötfogú sal_2dpa extra karboxilcsoportja – a többi potenciálisan csak négyfogú sal_2en-származékokhoz képest – nemcsak a $V^{IV}O$-komplexek stabilitásnövekedést, hanem

azok eltérő töltését (membránt ranszport sajátságát) is eredményezi. Az $rpyr_2$en ligandumban lévő elektronszívó piridinnitrogének pedig a fenolos hidroxilcsoportok savasságát növelik előnyösebb fémionkötő képességét kölcsönözve ezzel a molekulának. Ezek az eredmények jól kiegészítik az esetlegesen biológiai hatással bíró $V^{IV}O$ – Schiff-bázis típusú komplexekről meglévő ismereteinket.

Az inzulinutánzó vanádiumkomplexek közül a maltol és a dipikolinsav komplexeinek kölcsönhatását, ligandumcsere-reakcióit modelleztük sejtalkotó biomolekulákkal. A sejtek kis molekulatömegű vanadofil molekulái közül a mM-os koncentrációban jelenlevő, erős komplexképző nukleotidot, az ATP-t és a vanádiummal komplexképző- és redoxireakciókra is képes GSH-t választottuk. Mindkét hordozóligandum esetében az ATP-vel a pH-potenciometriás, és a spektrális vizsgálatok alapján is vegyes ligandumú komplexképződést mutattunk ki. Savas és semleges pH-n az ATP terminális foszfátcsoportjain, míg a gyengén lúgos pH-tartományban a ribózrész alkoholátjain keresztül koordinálódik a központi fémionhoz, illetve a fémion-hordozóligandum monokomplexekhez. A vizsgált hordozóligandumok közül a maltol erősebben, hatásosabban köti a $V^{IV}O$-iont fiziológiás körülmények közt, mint a dipikolinsav. A $V^{IV}O$–maltol–ATP rendszerben csak a gyengén savas pH-tartományban kedvezményezett a VOAB vegyes ligandumú komplex képződése, a fiziológiás pH-n a VOA_2 bisz(maltolato)komplex a domináns. A $V^{IV}O$–dipikolinsav–ATP rendszer teljes vizsgált pH-tartományában terner komplexek képződése a jellemző, a két ligandum együtt hatásosabban köti a vanádiumot, mint külön-külön. Megállapítottuk, hogy a GSH nem képez olyan stabilis vegyes ligandumú komplexeket, mint az ATP. A pH-potenciometriás mérések során alkalmazott GSH-felesleg nem volt képes megakadályozni a $V^{IV}O$ részleges hidrolízisét; így vegyes ligandumú komplexképződést a GSH-val csak spektrálisan, nagy GSH-felesleg mellett tudtunk kimutatni. Az ESR-paraméterek értéke alapján valószínű, hogy a GSH a Gly végén monodentát (COO^-) vagy bidentát (COO^-, amid-O) kötésmóddal koordinálódik a $VOABH_2$ komplexekben. Maltollal olyan vegyes ligandumú komplexet is detektáltunk, melyben a GSH a tiolátcsoportján keresztül köt be a bisz(maltolato)komplex szabad ekvatoriális pozíciójába. Megállapítottuk, hogy az ATP mint viszonylag jó komplexképző a ligandumcsere-reakciókban, a GSH pedig mint kevésbé jó komplexképző elsősorban a szervezetben lévő redoxipuffer fontos alkotóelemeként tölt be jelentős szerepet a vanádium biokémiájában. Eredményeink tehát arra utalnak, hogy a sejtekben a biológiai hatásért felelős vanádiumkomplexek modellezésekor figyelembe kell vennünk az ATP biner és terner komplexeit. További vizsgálatokat tervezünk a GSH és a különböző inzulinutánzó V(V)-komplexek között lejátszódó redoxireakció kinetikájának meghatározására.

5. Summary

The number of patients suffering *diabetes mellitus* (DM) is increasing year-by-year and it has risen to approximately 250 million worldwide in 2007. DM is defined as a disease that results in chronic hyperglycemia due to an absolute or relative lack of insulin and/or insulin resistance that in turn impairs glucose, protein and lipid metabolism, and finally entrains the characteristic secondary complications. Trials for the use of vanadium in treating DM was first reported in 1899, which was 23 years before F. G. Banting and C. Best discovered insulin and used it to treat diabetic patients. However, pharmaceutical interest in vanadium as an insulin substitute started in the 1980s.

The insulin-like effects of vanadium compounds proved by *in vitro* and *in vivo* studies were first reported in 1979 and in 1985, respectively. Even simple inorganic vanadium salts in the oxidation state of +4 and +5 (like vanadylsulfate or sodium vanadate) were shown to mimic most of the physiological effects of insulin, such as stimulation of glucose uptake and metabolism in fat cells, or enhancement of glycogenesis in muscles and liver, or inhibition of reformation of glucose (gluconeogenesis) from proteins, or stimulation of fatty acid formation in adipocytes. The main advantage of these vanadium compounds to insulin is that they may be administered orally. Accordingly, the aim of the research in this field is to make vanadium compounds which can reach the target cells with high efficacy. According to our present views, these compounds should have low molecular mass, should be neutral and should have optimal lipophilicity in order to be mobile and cross cell membranes easily. Large number of V(IV,V) complexes have been prepared and tested; one of them [VO(ethylmaltol)$_2$] has passed Clinical Phase 1 test (Medeval Ltd., Manchester, UK).

Most of vanadium's biologically important reactions occur in water-based environments such as blood plasma and intracellular fluids. Therefore the knowledge of the distribution and chemical speciation of the vanadium compounds in aqueous solution is of the utmost importance. Accordingly, the solution speciation and the binding modes of the $V^{IV}O$ complexes of selected ligands were investigated and were discussed in this thesis. pH-potentiometry was used to determine the stoichiometry and stability constants of the complexes formed, and spectroscopic (UV-VIS, CD and EPR) measurements were made to establish the most probable structures of the complexes present in aqueous solution. Some carbohydrate and Schiff base derivatives were selected as potential carrier ligands. In order to assess the molecular form of vanadium insulin-mimetic complexes in cells, the interactions in the model systems of $V^{IV}O$-maltolate and $V^{IV}O$-dipicolinate with various vanadofil cell components also were studied.

In consequence of the strong hydrolytic tendency of the $V^{IV}O^{2+}$ and the usually low stability of the complexes with polyalcohols in neutral or acidic aqueous solution, the presence of suitable anchoring donor groups (e.g. carboxylates) in carbohydrate derivatives (e.g. sugar acids) plays a decisive role in the complex formation processes. Once the $V^{IV}O^{2+}$ ion is bound to the ligand, it can

promote deprotonation of the alcoholic hydroxyl groups and strongly coordinate up to four such functions. Sugar acids are monosaccharide derivatives that have an alcoholic hydroxyl group oxidized to a carboxyl group. In aldaric acids both the terminal hydroxyl and the aldehyde functional groups of an aldose have been oxidized. The aldaric acids, in general, may be efficient carriers of vanadium even in the physiological pH range, because they or their derivatives are produced naturally in small amounts by mammals, including humans, and the arrangement of the two carboxylic and the alcoholic donors is suitable for metal ion binding. The $V^{IV}O$ complexes formed with two diastereomeric aldaric acids (D-glucaric or D-saccharic acid, and galactaric or mucic acid) were characterized in aqueous solution.

Both of the aldaric acids studied proved to be fairly strong vanadium binders in the weakly acidic and neutral pH range. At basic pH, the ligand molecules are partly displaced by OH^-. The speciation results indicate that, apart from minor amounts of a mononuclear complex [VOL] or [VOLH] existing at very acidic pH, dinuclear species $[(VO)_2L_2H_x]$ (x = −2, −3 −4) predominate in the whole pH range studied up to pH ~ 8 in these systems. Complex formation starts at the terminal COO^- functions and probably the adjacent alcoholic-OH groups strengthen the interactions between the metal ion and the ligands, as clearly reflected by the basicity-adjusted stability constants. The $V^{IV}O$-promoted deprotonation and coordination of the very weakly acidic alcoholic-OH groups of the ligands start at a pH as low as 2.5–3, but occur only in oligonuclear, mostly EPR-silent dinuclear complexes. Interestingly, dissociation of the $V^{IV}O$ dimers and formation of the corresponding EPR-active mononuclear species is favored at 140 K, as clearly proved by the LT EPR measurements. The dimerization is endothermic and entropy governed in these cases. The dimer formation is somewhat more favored for the D-glucaric acid, than for galactaric acid. These chiral ligands do not exhibit stereoselectivity in protonation reactions; meanwhile for the formation of dinuclear complexes the stereoselectivity was established. In the case of the dinuclear $[(VO)_2L_2H_x]$ (x = −2 and −4) complexes, an interesting pH-dependent cis–trans isomeric equilibrium characteristic for the α-hydroxycarboxylic acids is assumed and analyzed by EPR and molecular modeling. At low pH, the formation of the cis isomer is probable. According to the pH-metry and EPR investigations the D-glucaric acid is a somewhat more efficient $V^{IV}O$ binder than the galactaric acid.

The other studied potential carrier ligands, the sal_2en-type molecules present versatile steric, electronic and lipophilic properties. They may be easily prepared by the condensation of two compounds: (i) an aromatic o-hydroxyaldehyde and (ii) a diamine, the hydrophilic–lipophilic balance being easily fine-tuned by choosing the appropriate amine precursors and ring substituents of the aldehyde. For instance, a pendant carboxylate group may help with the coupling of the ligand to other molecules that may target the compound to specific biological sites, thereby anticipating the possibility of minimizing its toxicity and increasing its efficacy. Several vanadium complexes of the Schiff base sal_2en {N,N'-ethylenediaminebis(salicylideneiminato)} and related ligands have been

proposed as insulin-enhancing agents, and for the treatment of obesity and hypertension. To date, only $[V^{IV}O(sal_2en)]$ has been tested *in vivo* for insulin-mimetic activity.

Pyridoxal and pyridoxamine are forms of vitamin B6, known cofactors required by many enzymes. They are nontoxic metabolites and fairly soluble in aqueous solution. Pyridoxal-containing vanadium complexes are therefore of potential therapeutic interest. The Schiff base ligand of pyridoxal and ethylenediamine (pyr_2en) and its hydrolytically more stable reduced derivative ($rpyr_2en$) proved to be efficient binders of $V^{IV}O$. Both pyr_2en and $rpyr_2en$ were found to form basically similar 1:1 complexes ($[V^{IV}OLH_x]^{x+}$, x = 2, 1, 0), the tetradentate coordination of the ligands through two phenolate-O and two amine/imine-N being the predominant binding mode. The pyridinium-N atoms of the pyridoxal rings do not take part in the coordination but are involved in acid-base reactions. We have highlighted the differences in the binding abilities of the Schiff base and its reduced derivative towards $V^{IV}O^{2+}$, which is clearly demonstrated by the values of the proton displacement constants (K*) characteristic to the formation equilibrium: $V^{IV}O^{2+} + H_6L^{4+} \rightleftharpoons [V^{IV}OLH_2]^{2+} + 4H^+$; the lgK* values are –14.1 and –5.63 for pyr_2en and $rpyr_2en$, respectively. So thus, the solution speciation revealed that the $rpyr_2en$ formed more stable complexes with $V^{IV}O$ than the pyr_2en itself. This difference in the stability may probably be explained by the much higher flexibility of the reduced Schiff base ligand, lacking the –C=N double bonds, thus resulting in significantly less strain and/or better ligand-metal orbital overlap in the complexes formed. The pyr_2en forms $[VOLH_4]^{4+}$ complex too, only the half of the molecule coordinates through a phenolate-O and an amine-N. The pyr_2en ligand itself may also hydrolyze as other Schiff bases. EPR studies indicated the presence of various isomeric species in the solution of the $V^{IV}O$ – $rpyr_2en$ system. Upon comparison with the $V^{IV}O$–, Ni^{II}– and Cu^{II}–$rpyr_2en$ systems, the proton displacement constants of the $[V^{IV}OLH_x]^{x+}$ complexes, give the stability order $Cu^{II} > V^{IV}O > Ni^{II} > Zn^{II}$.

The $V^{IV}O$ complexes of two asymmetric sal_2en-type reduced Schiff bases (sal_2dpa: N,N'-bis(2-hydroxybenzyl)-2,3-diamino-propionic acid and sal_2orn: N,N'-bis(2-hydroxybenzyl)-2,5-diamino-pentanoic acid) bearing a pendant carboxylate group were also discussed in this thesis. The only structural difference between the studied ligands, the sal_2dpa and the sal_2orn, is the size of the diamino-carboxylic acid connecting the two 2-hydroxylbenzyl parts of the molecules. Both pentadentate ligands form stable and differently protonated basically 1:1 complexes with $V^{IV}O$ in aqueous solution. Complex formation is started only above pH 3–4. Meanwhile the $[VOL]^-$ is the only species with sal_2dpa between pH 5–9, and with sal_2orn between pH 7–10. At metal excess sal_2dpa is able to bind two $V^{IV}O^{2+}$ ions. In the $[VOLH_2]^+$ complex the half of the molecules is coordinated tridentately, then two other donor groups deprotonate cooperatively and coordinate to the metal centre. We have highlighted the differences in the binding abilities of this pentatdentate (sal_2dpa) and an other water soluble but tetradentate sal_2en derivative ($R(SO_3\text{-}sal)_2en$), coordination of the extra carboxylate group increases the stability of the $VOLH_2$ complex. The arrangement of the donor atoms of sal_2dpa is

more suitable for metal ion binding, than that of sal_2orn. This is the reason why the sal_2dpa proved to be more efficient $V^{IV}O$ chelator than the sal_2orn. It is clearly demonstrated by the difference in stability constants of $[VOL]^-$ complexes or in the basicity-adjusted stability constants of $[VOLH_2]^+$ complexes. EPR studies indicated the presence of various isomeric species in the solution of the $V^{IV}O$–sal_2dpa system.

During and after absorption, insulin-mimetic drugs will interact with numerous vanadofil exogenous or endogenous biomolecules. Accordingly, the actual chemical forms of vanadium, how it is transported in the blood serum, crosses cell membranes, interacts with cell constituents, and thus interferes into glucose metabolic reactions, will differ from the original form of the vanadium compound. Via the redox and complexation reactions, the finely-tuned speciation of vanadium may lead to the efficiency of the metal to mimic the effects of insulin. The original complexes may remain partially intact, i.e. they keep the original carrier ligand bound to vanadium(IV/V), although the endogenous binders of the biological fluids displace them partially e.g. through the formation of ternary complexes. Accordingly, if the carrier ligands find a way to reach the cell some of the cell constituents will compete with them for the central metal ion. Reduced glutathione (GSH) and adenosine-5'-triphosphate (ATP) are present in rather high concentration in the cell in high excess to the insulin-mimetic compounds and thus their interactions with potential insulin-enhancing $V^{IV}O$ complexes of maltol and dipicolinic acid were studied.

Ternary $V^{IV}O$ complex formation was confirmed by pH-potentiometry and spectroscopic measurements with the ATP and both the carrier ligands. ATP coordinates to $V^{IV}O$ through the posphate moiety in the acidic and neutral pH range, and through the ribose residue in basic solutions. The biscomplex formation is more favored with maltol than dipicolinic acid. As a strong $V^{IV}O$ chelator, ATP displaces easier the second dipicolinic acid from the coordination sphere of $V^{IV}O$. In case of the $V^{IV}O$–dipic–ATP system, at the physiological pH only ternary complexes will exist besides binary ATP complexes; meanwhile biscomplexes of maltol are present in significant amount in the solution of the $V^{IV}O$–maltol–ATP system. GSH is a much weaker $V^{IV}O$ binder, although it is also present in high excess in the cell. At a 10-fold excess of GSH, ternary complex formation could be detected only with rather high uncertainty in the pH-potentiometric titrations, and this excess of GSH was not enough to prevent the partial hydrolysis of the metal ion above pH 6.5–8.0. Higher GSH concentrations could not be used in the pH-potentiometry because of the high buffer capacity of the ligand. Ternary complexes were detected by EPR measurement at a relatively high excess of GSH. Considering the EPR parameters and the CD spectra recorded, we conclude that GSH most probably coordinates at the Gly end through (COO^-, amide-O or H_2O) donors in $VOABH_2$ complexes. With maltol some VOA_2BH_2 and VOA_2BH complexes were also assumed. The participation of the S donor of GSH is possible above pH 7. However, when ATP and GSH are considered as $V^{IV}O$ binder, ATP is much stronger and GSH will not be able to compete with ATP for binding of $V^{IV}O$. Considering these

two important cell constituents our results suggest that if somehow the carrier ligand finds a way to enter the cell, strong $V^{IV}O$ binder cell constituents will fight to displace it. From among the important cell constituents ATP as a strong $V^{IV}O$ binder will chelate the metal ion in ternary complexes, meanwhile GSH probably takes part in the reduction of V(V) to V(IV) instead of complex formation. The time course of the parallel redox and complexation reaction needs further investigation.

Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt témavezetőmnek, Dr. Kiss Tamásnak szeretném megköszönni a rengeteg szakmai és emberi támogatást, türelmet. Köszönöm, hogy irányítása alatt bekapcsolódhattam az MTA-SZTE Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoport nemzetközi kooperációban folytatott kutatásaiba (COST D21/009/01 és TéT projektekbe), és ezáltal részt vehettem külföldi tanulmányutakon és több, nagyszabású nemzetközi konferencián is.

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Jakusch Tamásnak, aki témavezetőként tanulmányaim korábbi szakaszában (TDK- és diplomamunkám ideje alatt) bevezetett a vanádiumkémia és a tudományos kutatás rejtelmeibe. Hálával tartozom a hasznos és nélkülözhetetlen tanácsaiért, amelyekkel munkámat mindvégig segítette.

A továbbiakban együttműködő partnereinknek szeretnék köszönetet mondani:

- Köszönettel tartozom Prof. João Costa Pessoa-nak, hogy lehetővé tette számomra, hogy kutatócsoportjában (Instituto Superior Tecnico, Centro Química Estrutural, Lisszabon, Portugália) végezzem el *A potenciális inzulinutánzó $V^{IV}O$-komplexek és sejtalkotó bioligandum kölcsönhatása* témakörben az ESR- és CD-spektroszkópiai méréseket.
- Köszönöm Susana Marcão-nak, Dr. Isabel Correia-nak és Prof. João Costa Pessoa-nak (Instituto Superior Tecnico, Lisszabon, Portugália) a *Schiff-bázis származékok $V^{IV}O$-komplexei*nek vizsgálata során nyújtott nélkülözhetetlen segítségét.
- Köszönöm Dr. Eugenio Garribbának és Prof. Giovanni Micerának (University of Sassari, Department of Chemistry, Centro Química Estrutural, Olaszország) a *$V^{IV}O$-aldársav kölcsönhatás* vizsgálata során nyújtott nélkülözhetetlen segítségét.

Köszönöm az SZTE Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék minden volt és jelenlegi munkatársának a munkám során adott hasznos tanácsaikat és segítségüket, valamint a baráti légkört.

És végül szeretnék köszönetet mondani barátaimnak, családomnak és vőlegényemnek, Topán Lászlónak.

Függelék

A pH-potenciometriás mérések kivitelezésekor használt körülmények: össztérfogat, fémion-ligandum arány (M : L), illetve az értékeléskor felhasznált pH-tartomány.

ligandum	össztérfogat (cm^3)	M : L (mM : mM)	pH-tartomány
D-glükársav	25	4 : 4	2,0–7,6
	25	2 : 2	2,3–7,6
	25	2 : 4	2,1–7,4
	25	1 : 2	2,4–7,7
	25	1 : 4	2,1–8,0
galaktársav	25	4 : 4	3,0–6,2
	25	2 : 2	2,1–6,3
	25	2 : 4	2,8–6,0
	25	1 : 2	2,2–6,2
	25	1 : 4	2,3–7,1
pyr_2en	10	4 : 4	2,0–5,1
	10	2 : 2	2,3–4,5
	10	1 : 2	2,3–5,2
	10	1 : 4	2,1–5,3
$rpyr_2en$	10	4 : 4	1,9–7,3
	10	2 : 2	2,1–7,5
	10	2 : 4	2,0–7,9
	10	1 : 2	2,2–8,5
	10	1 : 4	2,0–8,5
	15	1,3 : 0,6	2,3–8,4
	15	2,6 : 0,6	2,1–8,4
pyrN	10	4 : 4	1,9–4,6
	10	2 : 2	2,1–4,7
	10	2 : 4	2,0–4,8
	10	1 : 4	2,0–4,9
	20	0,5 : 1	2,5–5,0
	20	1 : 8	2,0–6,6
	20	0,5 : 4	2,3–6,8
	20	0,5 : 6	2,3–6,8
sal_2dpa	20	3 : 2	2,2–4,6
	20	1,5 : 1	2,3–4,5
	20	2 : 2	2,3–9,6
	20	1 : 1	2,3–5,6
	20	1 : 2	2,0–11,3
	20	0,5 : 1	2,6–11,3
	20	0,5 : 2	2,3–11,3

ligandum	össztérfogat (cm^3)	M : L (mM : mM)	pH-tartomány
sal_2orn	5	4 : 4	2,2–5,0
	10	2 : 2	2,3–5,0
	5	4 : 2	2,1–11,5
	5	1 : 2	2,3–11,5
	5	1 : 3	2,2–11,5
ATP	25	2 : 2	2,2–6,8
	25	2 : 4	2,1–5,8
	25	1 : 2	2,3–7,2
	25	1 : 4	2,1–7,2
	25	0,6 : 4	2,1–7,0
	25	0,4 : 4	2,1–6,8
	25	1 : 8	1,9–11,7
	25	0,8 : 8	1,9–11,7
	25	1 : 4	2,0–8,2 ;10,4–11,7
	25	0,6 : 4	2,0–8,2 ;10,4–11,7

A ligandum	B ligandum	össztérfogat (cm^3)	M : A : B (mM : mM: mM)	pH-tartomány
maltol	ATP	25	1 : 1 : 2	2,2–7,0
		25	1 : 2 : 2	2,0–8,5
		25	1 : 2 : 4	2,0–9,0
		25	2 : 2 : 4	2,0–7,0
dipik	ATP	25	1 : 1 : 1	2,6–6,0
		25	1 : 1 : 2	2,6–8,6
		25	1 : 1 : 5	2,6–9,0
		25	1 : 2 : 2	2,6–9,0
		25	1 : 2 : 5	2,6–9,0
		25	2 : 2 : 2	2,6–6,0
		25	2 : 2 : 5	2,6–9,0
maltol	GSH	25	1 : 1 : 1	2,4–5,4
		25	1 : 1 : 2	2,4–5,4
		25	1 : 2 : 1	2,1–8,8
		25	1 : 2 : 2	2,2–9,2
			1 : 2 : 4	2,2–9,2
		25	1 : 2 : 8	2,3–9,5
dipik	GSH	25	1 : 1 : 1	2,1–5,9
		25	1 : 1 : 2	2,0–6,1
		25	1 : 1 : 5	2,0–6,0
		25	1 : 2 : 2	2,0–6,5
		25	1 : 2 : 5	2,1–6,5
		25	2 : 2 : 2	2,1–5,1
		25	2 : 2 : 5	2,1–5,8

Irodalomjegyzék

[1] Á. Dörnyei, E. Garribba, T. Jakusch, P. Forgó, G. Micera, T. Kiss, *Dalton Trans*. **2004**, *12*, 1882.

[2] I. Correia, J. Costa Pessoa, M.T. Duarte, R.T. Henriques, M.F.M. Piedade, L.F. Veiros, T. Jakusch, Á. Dörnyei, T. Kiss, M.M.C.A. Castro, C.F.G.C. Geraldes, F. Avecilla, *Chem.–A Eur. J.* **2004**, *10,* 2301.

[3] J. Costa Pessoa, S. Marcão, I. Correia, G. Gonçalves, A. Dörnyei, T. Kiss, T. Jakusch, I. Tomaz, M.M.C.A. Castro, C.F.G.C. Geraldes, F. Avecilla, *Eur. J. Inorg. Chem*. **2006**, *18,* 3595.

[4] Á. Dörnyei, S. Marcão, J. Costa Pessoa, T. Jakusch, T. Kiss, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2006**, *18,* 3614.

[5] N. N. Greenwood, A. Earnshaw: *Az elemek kémiája*, Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest (1999) III. kötet, 22. fejezet, 1335–1368.

[6] *Metal ions in Biological systems* (szerkesztők: Helmut Sigel és Astrid Sigel) Marcel Dekker, New York (1995) 31. kötet, 1. fejezet; D. Rehder: *Inorganic Considerations on the Function of Vanadium in Biological Systems*, 1–43.

[7] Vanadium in the Enviroment, Part 1: Chemistry and Biochemistry (szerkesztő: Jerome O. Nriagu) John Wiley & Sons, New York (1998) 30. kötet, 1. fejezet; J. O. Nriagu: *History, Occurrence, and Uses of Vanadium,* 1–24.

[8] E. Fluck, *Pure Appl. Chem*, 60, 431-436 (19988); G. J. Leigh (ed.), *Nomenclature of Inorganic Chemistry*; IUPAC Recommendations 1990, Blackwell, Oxford, 1990, 298 pp.

[9] IUPAC Commission on Atomic Weights and Isotopic Abundances, *Pure Appl. Chem.* **1998**, *70*, 217–235.

[10] J. J. Simpson, P. Jagam, A. A. Pilt, *Phys. Rev.* C **1985**, *31*, 575.

[11] H. E. Hilliard, Vanadium. In Bureau of Mines Minerals Yearbook. U.S. Department of the Interior, Washington, D.C.

[12] Mineral Commodity Summary 2007, U.S. Department of the Interior, U.S. Geological Survey Washington, D.C.

[13] B. M. Weckhuysen, D. E. Keller, *Catal. Today* **2003,** *78*, 25.

[14] S. Gambarotta, *Coord. Chem. Rev.* **2003**, *237,* 229.

[15] D. Rehder, *Inorg. Chem. Commun.* **2003**, *6,* 604.

[16] A. Butler, *Science* **1998**, *281,* 207.

[17] D. C. Crans, M. Mahroof-Tahir, A. D. Keramidas, *Mol. Cell. Biochem.* **1995**, *153,* 17.

[18] *Metal ions in Biological systems* (szerkesztők: Helmut Sigel és Astrid Sigel) Marcel Dekker, New York (1995) 31. kötet, 18. fejezet; C. Djordjevic: *Antitumor Activity of Vanadium Compounds*, 595–615.

[19] K. Elvingson, A. G. Baró, L. Pettersson, *Inorg. Chem.* **1996**, *35,* 3388.

[20] S. W. Taylor, B. Kammerer, E. Bayer, *Chem. Rev.* **1997**, *97,* 333.

[21] S. G. Brand, C. J. Hawkins, A. T. Marshall, G. W. Nette, D. L. Parry, *Comp. Biochem. Physiol. B* **1989**, *93,* 425.

[22] M. Henze, *Z. Physiol. Chem.* **1991**, *72,* 494.

[23] H. Michibata, T. Terada, N. Anada, K. Yamakawa, T. Numakunai, *Biol. Bull.* **1986**, *171*, 672.

[24] H. Michibata, Y. Iwata, J. Hirata, *J. Exp. Zool.* **1991**, *257,* 306.

[25] H. Michibata, N. Yamaguchi, T. Uyama, T. Ueki, *Coord. Chem. Rev.* **2003**, *237,* 41.

[26] *Metal ions in Biological systems* (szerkesztők: Helmut Sigel és Astrid Sigel) Marcel Dekker, New York (1995) 31. kötet, 13. fejezet; M. J. Smith, D. E. Ryan, K. Nakanishi, P. Frank, K. O. Hodgson: *Vanadium in ascidians and the chemistry of tunichromes*, 424–474.

[27] K. Kustin, W. E. Robinson, R. B. Frankel, K. Spartalian, *J. Inorg. Biochem.* **1996**, *63,* 223.

[28] Patrick Frank, Robert M. K. Carlson, Elaine J. Carlson, Keith O. Hodgson, *Coord. Chem. Rev.* **2003**, *237,* 31.

[29] T. Kanda, Y. Nose, J. Wuchiyama, T. Uyama, Y. Moriyama, H. Michibata, *Zool. Sci.* **1997**, *14,* 37.

[30] *Metal ions in Biological systems* (szerkesztők: Helmut Sigel és Astrid Sigel) Marcel Dekker, New York (1995) 31. kötet, 14. fejezet; T. Ishii, I. Nakai, K. Okoshi: *Biochemical significance of vanadium in a polychaete worm*, 491–509.

[31] Vanadium in the Enviroment, Part 1: Chemistry and Biochemistry (szerkesztő: Jerome O. Nriagu) John Wiley & Sons, New York (1998) 30. kötet, 9. fejezet; T. Ishii: *Characterization of vanadium in the fan worm, Pseudopotamilla occelata*, 199–216.

[32] *Metal ions in Biological systems* (szerkesztők: Helmut Sigel és Astrid Sigel) Marcel Dekker, New York (1995) 31. kötet, 12. fejezet; E. Bayer: *Amavadin, the Vanadium Compound of Amanitae*, 408–421.

[33] E. Bayer, H. Kneifel, *Z. Naturforsch., B: Chem. Sci.* **1972**, *27*, 207.

[34] R. E. Berry, E.M. Armstrong, R. L. Beddoes, D. Collison, S. N. Ertok, M. Helliwell, C. D. Garner, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1999**, *38,* 795.

[35] C. D. Garner, E. M. Armstrong, R. E. Berry, R. L. Beddoes, D. Collison, J. Jon, A. Cooney, S. N. Ertok, M. Helliwell, *J. Inorg. Biochem.* **2000**, *80,* 17.

[36] *Metal ions in Biological systems* (szerkesztők: Helmut Sigel és Astrid Sigel) Marcel Dekker, New York (1995) 31. kötet, 10. fejezet; H. Vilter: *Vanadium-dependent haloperoxidases*, 325–362.

[37] P. Barnett, W. Hemrika, H. L. Dekker, A. O. Muijsers, R. Renirie, R. Wever, J. Biol. Chem. **1998**, *273,* 23381.

[38] M. Weyand, H.-J. Hecht, M. Kieß, M.-F. Liaud, H. Vilter, D. Schomburg, *J. Mol. Biol*. **1999**, *293,* 595.

[39] M.I. Isupov, A.R. Dalby, A.A. Brindley, Y. Izumi, T. Tanabe, G.N. Murshudov, J.A. Littlechild, *J. Mol. Biol.* **2000**, *299,* 1035.

[40] A. Messerschmidt, R. Wever, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93,* 392.

[41] A. Messerschmidt, L. Prade, R. Wever, *Biol. Chem*. **1997**, 378, 309.

[42] S. Macedo-Ribeiro, W. Hemrika, R. Renirie, R. Wever and A. Messerschmidt, *J. Biol. Inorg. Chem.* **1999**, *4*, 209.

[43] W. Hemrika, R. Renirie, H.L. Dekker, P. Barnett, R. Wever, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 2145.

[44] R. R. Eady, *Coord. Chem. Rev.* **2003**, *237*, 23.

[45] *Metal ions in Biological systems* (szerkesztők: Helmut Sigel és Astrid Sigel) Marcel Dekker, New York (1995) 31. kötet, 16. fejezet; F. H. Nielsen: *Vanadium in Mammalian Physiology and Nutrition*, 543–573.

[46] *Vanadium in the Environment* (szerkesztő: Jerome O. Nriagu) John Wiley& Sons Inc., New York (1998) 2. rész (*Advances in Environmental Science and Technology* 31. kötet) 2. fejezet; K. H. Thompson, M.Battel, J. H. McNeill: *Toxicity of Vanadium in Mammals*. 21–38.

[47] S. A. Dikanov, B. D. Liboiron, K. H. Thompson, E. Vera, V. G. Yuen, J. H. McNeill, C. Orvig, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11004.

[48] E. Sabbioni, G. Pozzi, S. Devos, A. Pintar, L. Casella, M. Fischbach, *Carcinogenesis* **1993**, *14*, 2565.

[49] J. J. Rodríguez–Mercado, E. Roldán–Reyes, M. Altamirano–Lozano, *Toxicol. Lett.* **2003**, *144*, 359.

[50] D. Rehder, J. Costa Pessoa, C. F. G. C. Geraldes, M. M. C. A. Castro, T. Kabanos, T. Kiss, B. Meier, G. Micera, L. Pettersson, M. Rangel, A. Salifoglou, I. Turel, D. Wang, *J. Biol. Inorg. Chem*. **2002**, *7*, 384.

[51] J. P. Fawcett, S. J. Farquhar, R. J. Walker, *Int. J. Sport Nutr.* **1996**, *6*, 382.

[52] B. M. Lyonett, E. Martin, *La Press Medicale* **1899**, *1*, 191.

[53] Y. Shechter, S. J. Karlish, *Nature* **1980**, *284*, 556.

[54] D. M. Barnes, D. B. Sykes, Y. Shechter, D. S. Miller, *J. Cell Physiol.* **1995**, *162*, 154.

[55] E. L. Tolman, E. Barris, M. Burns, A. Pansini, R. Partridge, *Life Sci.* **1979**, *25*, 1159.

[56] L. Agius, W. J. Vaartjes, *Biochem. J.* **1982**, *202*, 791.

[57] I. Goldwaser, D. Gefel, E. Gershonov, M. Fridkin, Y. Shechter, *J. Inorg. Biochem.* **2000**, *80*, 21.

[58] N. Sekar, J. Li, Y. Shechter, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1996**, *31*, 339.

[59] Y. Shechter, *Diabetes* **1990**, *39*, 1.

[60] Y. Shechter, I. Goldwaser, M. Mironchik, M. Fridkin, D. Gefel, *Coord. Chem. Rev.* **2003**, *237*, 3.

[61] C. E. Heyliger, A. G. Tahiliani, J. H. McNeill, *Science* **1985**, *227*, 1474.

[62] M. Halberstam, N. Cohen, P. Shlimovich, L. Rossetti, H. Shamoon, *Diabetes* **1996**, *45*, 659.

[63] N. Cohen, M. Halberstam, P. Shlimovich, C. J. Chang, H. Shamoon, L. Rossetti, *J. Clin. Invest.* **1995**, *95*, 2501.

[64] A. B. Goldfine, D. C. Simonson, F. Folli, M. E. Patti, C. R. Kahn, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1995**, *80*, 3311.

[65] Margaret C. Cam, Roger W. Brownsey, John H. McNeill, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **2000**, *78*, 829.

[66] A. R. Saltiel and C. R. Kahn, *Nature* **2001**, *414*, 799.

[67] B. I. Posner, R. Faure, J. W. Burgess, A. P. Bevan, D. Lachance, G. Zhang–Sun, I. G. Fantus, J. B. Ng, D. A. Hall, B. Soo Lum, A. Shaver, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 4596.

[68] P. A. Wilden, D. Broadway, *J. Cell. Biochem.* **1995**, *58*, 279.

[69] Z. Zhao, Z. Tan, C. D. Diltz, M. You, E. H. Fischer, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 22251.

[70] S. K. Pandey, J. L. Chiasson, A. K. Srivastava, *Mol. Cell. Biochem.* **1995**, *153*, 69.

[71] K. H. Thompson, C. Orvig, *Dalton Trans*. **2006**, 761.

[72] K. H. Thompson, J. H. McNeill, C. Orvig, *Chem. Rev.***1999**, *99*, 2561.

[73] K. H. Thompson, C. Orvig, *Dalton Trans.* **2000**, *17*, 2885.

[74] H. Sakurai, Y. Kojima, Y. Yoshikawa, K. Kawabe, H. Yasui, *Coord. Chem. Rev.* **2002**, *226*, 187.

[75] E. Kiss, K. Kawabe, A. Tamura, T. Jakusch, H. Sakurai, T. Kiss, *J. Inorg. Biochem.* **2003**, *95*, 69.

[76] J. Gätjens, B. Meier, T. Kiss, E. M. Nagy; P. Buglyó, H. Sakurai, K. Kawabe, D. Rehder,. *Chem.–A Eur. J.* **2003**, *9*, 4924.

[77] P. Buglyó, T. Kiss, E. Kiss, D. Sanna, E. Garribba, G. Micera, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2002**, 11, 2275.

[78] T. Kiss, E. Kiss, G. Micera, D. Sanna, *Inorg. Chim. Acta* **1998,** *283,* 202.

[79] E. Kiss, E. Garribba, G. Micera, T. Kiss, H. Sakurai, *J. Inorg. Biochem.* **2000**, 78, 97.

[80] *Biological Magnetic Resonance* (Szerkesztők: L. J. Berliner és J. Reuben) 3. kötet, Plenum Press, New York (1981) 3. kötet, 2. fejezet, N. D. Chasteen: *Vanadyl(IV) EPR spin probes, Inorganic and biochemical aspects.* 53–119.

[81] R. P. Henry, P. C. H. Mitchell, J. E. Prue, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1973**, *11*, 1156.

[82] L. F. Vilas Boas, J. Costa Pessoa, *Comprehensive Coordination Chemistry*, (Szerkesztők: G. Wilkinson, R. D. Gillard, J. A. McCleverty), Pergamon Press, Oxford, **1987**, 3. kötet, 453–583.

[83] A. Komura, M. Hayashi, H. Imanaga, *Bull. Chem. Soc. Jpn.***1977**, *50*, 2927.

[84] F. J. C. Rossotti, H. S. Rossotti, *Acta Chem. Scand.* **1955**, *9*, 1177.

[85] J. Francavilla, N. D. Chasteen, *Inorg. Chem.* **1975**, *14*, 2860.

[86] L. P. Ducret, *Ann. Chim. (Paris)* **1951**, *6*, S12, 705.

[87] H. T. S. Britton, G. Welford, *J Chem. Soc.*, **1940**, 758.

[88] J. J. Lingane, L. Meites, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *69*, 1882.

[89] S. Ostrowetsky, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1964**, *5*, 1012.

[90] M. M. Iannuzzi, P. H. Rieger, *Inorg. Chem.* **1975**, *14*, 2895.

[91] I. Nagypál, I. Fábián, *Inorg. Chim. Acta* **1982**, *61*, 109.

[92] G. Gran, *Acta Chem. Scand.* **1950**, *4*, 559.

[93] G. Micera, D. Sanna, A. Dessi, T. Kiss, P. Buglyó, *Gazz. Chim. It.* **1993**, 123, 573.

[94] T. Kiss, P. Buglyó, D. Sanna, G. Micera, P. Decock, D. Dewaele, *Inorg. Chim. Acta.* **1995**, 239, 145.

[95] H. Sigel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1975**, *14*, 394.

[96] H. Sigel, (IUPAC) *Coordination Chemistry-20*, (Szerkesztő: D. Banerjea), Pergamon Press New York, 1980, 27–45.

[97] T. Kiss, Biocoordination chemistry: coordination equilibria in biologically active systems, (Szerkesztő: K. Burger), Ellis Horwood series in inorganic chemistry, New York, 1990, 56.

[98] M. T. Beck, I. Nagypál, Chemistry of complex equlibria, Ellis Horwood series in inorganic chemistry, John and Sons, New York, 1990.

[99] H. M. Irving, M. G. Miles, L. D. Pettit, *Anal. Chim. Acta* **1967**, *38*, 475.

[100] E. Högfeldt, Stability Constants of Metal-Ion Complexes, Part A. Inorganic Ligands, Pergamon, New York, 1982, 32.

[101] L. Zékány, I. Nagypál, Computation methods for the determination of stability constants, szerk. D. Leggett, Plenum press, New York (1985)

[102] P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1985**, 1195.

[103] *Metal ions in Biological systems* (szerkesztők: Helmut Sigel és Astrid Sigel) Marcel Dekker, New York (1995) 31. kötet, 19. fejezet; C. D. Garner, D. Collison, F. E. Mabbs: *Methods for the Spectroscopic Characterization of Vanadium Centers in Biological and Related Chemical Systems*, 617–670.

[104] P.Buglyó, A. Dessi, T. Kiss, G. Micera, D. Sanna, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1993**, 2057.

[105] C. J. Ballhausen, H. B. Gray, *Inorg. Chem.* **1962**, *1*, 111.

[106] H. Sigel, R. B. Martin, *Chem. Rev.* **1982**, *82*, 385.

[107] R. L. Belford, B. Harrowfield, J. R. Pilbrow, *J. Magn. Reson.* **1977**, *28*, 433.

[108] *Vanadium in the Environment* (szerkesztő: Jerome O. Nriagu) John Wiley& Sons Inc., New York (1998) 1. rész (Advances in Environmental Science and Technology) 30. kötet, 7. fejezet; G. Micera, D. Sanna: *Spectroscopic methods for the characterization of vanadium complexes,* 131–166.

[109] K. Wüthrich, *Helv. Chim. Acta* **1965**, *48*, 1012.

[110] T. S. Smith, R. LoBrutto, V. L. Pecoraro, *Coord. Chem. Rev.* **2002**, *228*, 1.

[111] T. S. Smith, C. A. Root, J. W. Kampf, P. G. Rasmussen, V. L. Pecoraro, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 767.

[112] E. J. Tolis, K. D. Soulti, T. A. Kabanos, C. P. Raptopoulou, A. Terzis, Y. Deligiannakis, *Chem. Comm. (Cambridge)* **2000**, *7*, 601.

[113] C. P. Aznar, Y. Deligiannakis, E. J. Tolis, T. Kabanos, M. Brynda, R. D. Britt, *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 4310.

[114] K. W. H. Stevens, *Proc. Roy. Soc. (London)* **1952**, *A214*, 237.

[115] S. S. Eaton, K. M. More, B. M. Sawant, G. R. Eaton, *J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, *105*, 6560.

[116] A. Rockenbauer, L. Korecz, *Appl. Magn. Reson.* **1996**, *10*, 29.

[117] B. Gyurcsik, L. Nagy, *Coord. Chem. Rev.* **2000**, *203*, 81.

[118] M. Banca, G. Micera, A. Dessi, H. Kozlowski, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1989**, 1283.

[119] M. Banca, G. Micera, A. Dessi, H. Kozlowski, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1990**, 1997.

[120] Elődi Pál, Biokémia, Akadémiai Kiadó, Budapest 1980, 6. fejezet, 180.

[121] *Altern. Med. Rev.* **2002**, *7(4)*, 336.

[122] Furka Árpád, Szerves kémia, Nemzeti Tankönyvkiadó, budapest, 1998, 8. fejezet, 811–812.

[123] M. Guiotoku, F. R. M. B. Silva, J. C. Azzolini, A. L. R. Merce, A. S. Mangrich, L. F. Sala, B. Szpoganicz, *Polyhedron* **2007**, *26*, 1269.

[124] P. A. M. Williams, D. A. Barrio, S. B. Etcheverry, E. J. Baran, *J. Inorg. Biochem.* **2004**, *98*, 333.

[125] E. Garribba, E. Lodyga-Chruscinska, D. Sanna, G. Micera, *Inorg. Chim. Acta* **2001**, 322, 87.

[126] J. G. Velasco, J. Ortega, J. Sancho, *J. Inorg. Nucl. Chem.* **1976**, *38,* 889.

[127] R. J. Motekaitis, A. E. Martell, *Inorg. Chem.* **1984**, *23*, 18.

[128] A. Lakatos, R. Bertani, T. Kiss, A. Venzo, M. Casarin, F. Benetollo, P. Ganis, D. Favretto, *Chem.–A Eur. J.* **2004**, *10*, 1281.

[129] M. Saladini, E. Ferrari, L. Menabue, *J. Inorg. Biochem.* **2002**, *92*, 121.

[130] M. Saladini, M. Candini, D. Iacopino, L. Menabue, *Inorg. Chim. Acta* **1999**, *292*, 189.

[131] J. G. Forrest, C. K. Prout, *J. Chem. Soc. A* **1967**, 1312.

[132] R. E. Tapscott, R. L. Belford, I. C. Paul, *Inorg. Chem.* **1968**, 7, 356.

[133] E. Bottari, *Monatsh. Chem.* **1968**, *99*, 176.

[134] *HyperChem, Hypercube release 6.0*, license No. 500-10001245, Hypercube Inc., Waterloo, Ontario, Canada, 1997; *AMSOL, Version 6.5.1*, 1998.

[135] M. J. S. Devar, E. G. Zoebisch, E. F. Healy, J. J. Stewart, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 3902.

[136] E. Garribba, G. Micera, A. Panzanelli, D. Sanna, *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 3981.

[137] S. A. Fairhurst, D. L. Hughes, U. Kleinkes, G. J. Leigh, J. R. Sanders, J. Weisner, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1995**, 321.

[138] N. Durai, G. Saminathan, *J. Clin. Biochem. Nutr.* **1997**, *22*, 31.

[139] I. Correia, J. Costa Pessoa, M. T. Duarte, M. F. M. Piedade, T. Jackush, T. Kiss, M. M. C. A. Castro, C. F. G. C. Geraldes, F. Avecilla, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2005**, 732.

[140] I. Correia, A. Dornyei, F. Avecilla, T. Kiss, J. Costa Pessoa, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2006**, *3,* 656.

[141] I. Correia, A. Dornyei, T. Jakusch, F. Avecilla, T. Kiss, J.C. Pessoa, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2006**, *14,* 2819.

[142] A. Jancsó, Z. Paksi, S. Mikkola, A. Rockenbauer, T. Gajda, *J. Inorg. Biochem.* **2005**, *99,* 1480.

[143] Elődi Pál, Biokémia, Akadémiai Kiadó, Budapest 1980, 18. fejezet.

[144] E. Leporati, *Anal. Chim. Acta* **1985**, *170*, 287.

[145] R. J. Motekaitis, A. E. Martell, *Inorg.Chem.* **1988**, *27*, 2718.

[146] F. Lloret, J. Moratal, J. Faus, *J.Chem.Soc., Dalton Trans.* **1983**, 1743.

[147] J. A. Bonadies, W. M. Butler, V. L. Pecoraro, C. J. Carrano, *Inorg. Chem.* **1987**, *26*, 1218.

[148] Z. Liu, F. C. Anson, *Inorg.Chem.* **2000**, *39*, 274.

[149] Z. Liu, F. C. Anson, *Inorg.Chem.* **2001**, *40*, 1329.

[150] S. A. Harris, T. J. Webb, K. Folkers, *J. Am. Chem. Soc.* **1940**, 62, 3198.

[151] D.E. Metzler, E. E. Snell, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77,* 2431.

[152] D.E. Metzler, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79,* 485.

[153] A. E. Martell, R. M. Smith, C*ritical Stability Constants*; Plenum Press: New York, 1977; p 181.

[154] M. Hynes, M. O'Dowd, *J. Chem. Soc., Dalton Trans* **1987**, 563.

[155] S. S Amin, K. Cryer, B. Zhang, S. K. Dutta, S. S. Eaton, O. P. Anderson, S. M. Miller, B. A. Reul, S. M. Brichard, D. C. Crans, *Inorg. Chem.* **2000,** *39,* 406.

[156] P. Buglyó, E. Kiss, I. Fábián, T. Kiss, D. Sanna, E. Garribba, G. Micera, *Inorg. Chim. Acta* **2000**, *306,* 174.

[157] T. Kiss and T. Jakusch: *^{23}V Insulin-mimetic vanadium-containing compounds*, Metallotherapeutic Drugs and Metal-based Diagnostic Agents: The Use of Metals in Medicine, szerkesztők: Gielen and Tieknik, 2005 John Wiley & Sons Ltd.

[158] D. C. Crans*, J. Inorg. Biochem.* **2000**, *80*, 123.

[159] T. Jakusch, W. Jin, L. Yang, T. Kiss, D.C. Crans*, J. Inorg. Biochem.* **2003**, *95,* 1.

[160] P. Caravan, L. Gelmini, N. Glover, F. G. Herring, H. Li, J. H. McNeill, S. J. Rettig, I. A. Seyawati, E. Shuter, Y. Sun, A. S. Tracey, V. G. Yuen, C. Orvig, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 12759.

[161] Y. Sun, B. R. James, S. J. Rettig, C. Orvig, *Inorg. Chem.* **1996**, *35*, 1667.

[162] G. R. Hanson, Y. Sun, C. Orvig, *Inorg. Chem.* **1996**, *35*, 6507.

[163] D. Mustafi, M. W. Makinen, *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 5580.

[164] E. Alberico, D. Dewaele, T. Kiss, G. Micera, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1995**, *3*, 425.

[165] A. Dessi, G. Micera, D. Sanna, *J. Inorg. Biochem.* **1993**, *52*, 275.

[166] A. J. Tasiopoulos, A. N. Troganis, A. Evangelou, C. P. Raptopoulou, A. Terzis, Y. G. Deligiannakis, T. A. Kabanos, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 910.

[167] J. Costa Pessoa, I. Tomaz, T. Kiss, E. Kiss, P. Buglyó, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2002**, *7*, 225.