

Részletes szakmai beszámoló

**Dendrimer pszeudofázisok fizikai kémiai tanulmányozása:
dendrimerek módosítása, oldategyensúlyainak, szerkezetének és
dinamikájának vizsgálata**

című OTKA nemzetközi kiegészítő pályázatáról

A beszámoló jelentős részeket változatlanul vett át az OTKA 49044-es tematikus pályázat zárójelentéséből, mert annak kiegészítő pályázata volt.

Bevezetés

A bevezetés néhány nem szakmai momentumot is tartalmaz, abból a célból, hogy a munkatervtől való időbeli és szakmai eltérést megindokoljam. Amikor a pályázatot elnyertem, még a Debreceni Egyetem Fizikai Kémiai Tanszékének beosztott docense voltam. Az ötletet 2003-as amerikai (Ann Arbor Michigan) utamról hoztam magammal, ahol a PAMAM dendrimerek templátként való alkalmazásával CeO_2 nanorészecskék előállításával foglalkoztam [1]. Azt tapasztaltam, hogy az oldatbeli szerkezet és egyensúlyok ismerete nélkül nagyon sok felesleges kísérletet kellett végeznünk. Itt kezdtünk el *Balogh Lajossal* (University of Michigan, Department of Bionanotechnology) és *Ország István*nal (DE Fizikai Kémiai Tanszék) a dendrimerek fizikai kémiájáról beszélgetni. A pályázat megnyerése után a munkát Magyarországon hármásban kezdtük el, *Berka Márta* (DE Kolloid- és Környezetkémiai Tanszék) csatlakozott a csoporthoz. Rá egy évre egy nemzetközi OTKA kiegészítést nyertünk, és így *Balogh Lajos* is hivatalosan csoport tagja lett. Így alakult ki a nemzetközi kiegészítő csoport.

Mire ez megtörtént, *Balogh Lajos* Ann Arbor-ból a Buffalo-i (NY) Rosswell Park Cancer Institute-hoz került és bár ott támogatták a közös kutatást (a támogatási szerződést már ott írták alá), ő inkább csak a tanácsaival vett részt az elméleti munkában, mert orvosi alkalmazott kutatásokra állt át. A nemzetközi együttműködés keretében *Dr. Berka Márta* 6 hetet (2007-2008-ban) *Bányai István* 6 hetet 2008-ban töltött Buffalo-ban. *Dr. Balogh Lajos* az OTKA pályázat időtartama alatt három alkalommal töltött Magyarországon 4-6 hetet, és itt nyílt alkalmunk az elméleti jellegű munkára, valamint az utolsó évben gyakorlatilag a kísérleti munka áttelepítésére.

A kémiai része a munkánknak a dendrimerek oldatbeli vizsgálata volt. Elsősorban NMR és potenciometriás módszerekkel. *A pályázat és a terv lényege az volt, hogy a kismolekulákkal való kölcsönhatáson keresztül fogjuk a nagy molekulák oldatbeli viselkedését tanulmányozni. A nagymolekulák a poli-amido-amin (PAMAM) dendrimerek voltak. A kismolekulák, a „kémmolekulák” a tervek szerint a víz, a foszfátion és bár nem molekulák a fluoridion, valamint néhány fémion.* A Buffalo-i csoport MRI kontraszt anyagokat is kutatott. Itt jött az ötlet nem gadolínium alapú kontrasztanyagok

szintézisére. A terv dendrimerek porfirinnel való funkcionálizálása volt, majd mangán(III) komplexek előállítására. Azonban ezt már Buffalóban a csoport leépítése miatt nem tudták megcsinálni. Itt Debrecenben mi megkezdjük a mangán(III)-porfirin komplexek bevizsgálását, és meghatároztuk a vízcseré sebességét. A jelen helyzet szerint beszereztük a megfelelő mennyiségű dendrimereket és a porfirinnel való funkcionálizálást megpróbáljuk, mert ígéretesnek tűnik a projekt.

Eredmények a dendrimerekkel kapcsolatban

A dendrimerek szintézise és analitikája.

Ez gyakorlatilag az ismerkedés volt a dendrimerek kémiájával. A kísérletek a pályázat megnyerése előtt Ann Arborban készültek, a dolgozatokat pedig később írtuk meg [1-4]. Az CeO₂ nanorészecskékről szóló eredményeket, csak kéziratban létezik, a társszerzők egyelőre visszatartják, valószínűleg mert nem egyeznek az eredmények a várakozásaikkal. Nem igazán tudható, hogy 5-6 éve mire várnak még, de természetesen csak akkor közölhető, ha beleegyeznek. A kézirat készen van.

A PAMAM dendrimerek analitikájában kulcskérdés a dendrimer tökéletessége. Megállapítottuk, hogy a kapilláris elektroforézis csak kvalitatív minősítésre alkalmas, akár a generációk közötti vizsgálatokat nézzük, akár azonos generációknál a szubsztitúciós százalékot vizsgáljuk. [2,3] Kombinált kapilláris elektroforézis és 1-2 D multinukleáris NMR mérésekkel megállapítottuk, hogy már az első generációs dendrimereknél is szerkezeti devianciák vannak (generációs természetesen nincs) ezek jelentős része öröklődhet a generációkon át. A szubsztitúciós deviancia ennél a lépésnél keletkezik, és terjedhet.[4] *E kutatások előzték meg a diffúziós NMR technikának az alkalmazását és a kismolekulák „bevetését”.*

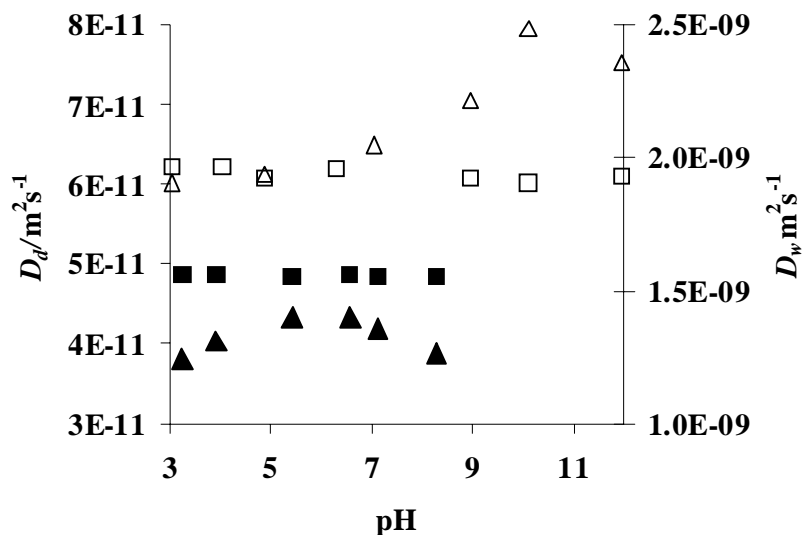
Az ötödik generációs dendrimerek diffúziója vízben

Az alapgondolat az volt, hogy megmérjük a dendrimerek és a víz látszólagos diffúziós együtthatóját különböző koncentrációkon, pH-kon és két különböző dendrimer esetében. A egyik dendrimer az alapvegyület, azaz egy NH₂ végcsoportú, ötödik generációs etiléndiamin alapú PAMAM dendrimer: PAMAM_E5.NH₂. Ez 126 protonálható terciér nitrogént és 128 protonálható primer amin csoportot tartalmazott. A másik dendrimer egy a végcsoportokat 100 %-ig borostyánkőssavval funkcionálizált PAMAM_E5.SAH. Ez a dendrimer protonálható a terciér nitrogéneken, míg a karboxilát végcsoportok esetében deprotonálódás következik be megfelelő pH-n.

A kapott eredmények a következők:

A teljes koncentráció függvényében a dendrimerek látszólagos diffúzió együtthatója csökken még igen híg oldatokban is. Megállapítottuk, hogy elsősorban a diffúziós

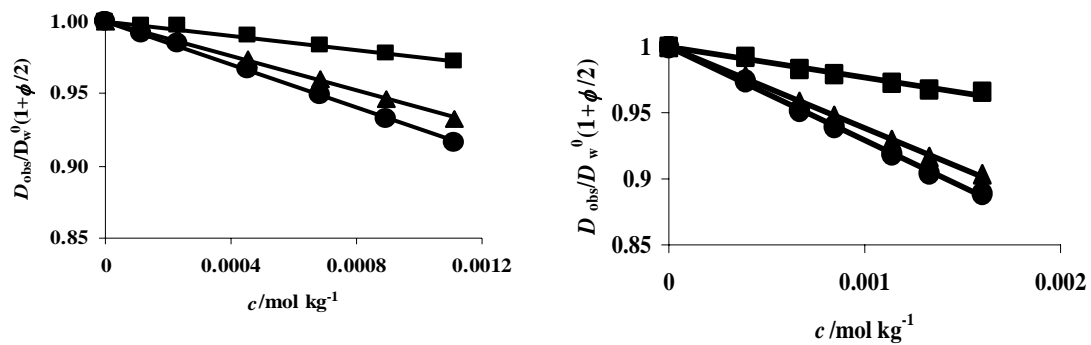
obstrukció a felelős ezért, azaz úgy viselkednek, mint a merev falú gömb alakú kolloidok. A hidrodinamikai sugarakat a diffúzió együtthatók zérus koncentrációra extrapolált értékeiből meghatároztuk. A pH függvényében a meghatározott pK-eknek megfelelően az E5.NH₂ diffúziós együtthatója monoton nő, amint fokozatosan veszíti el a töltését, míg a E5.SAH diffúzió együtthatója maximumot mutat az izoelektromos pontján, ahol a legkisebb a mérete.



A víz (D_2O) és az E5.NH₂X dendrimerek diffúziósebességének pH függése. Az \square és \blacksquare szimbólumok a víz míg az \triangle and \blacktriangle dendrimerek diffúzió sebességét mutatják. E5.NH₂ az üres ($c = 0.37 \text{ mmol kg}^{-1}$ 300 K) az E5.SAH a tele szimbólumoknak felel meg ($c = 0.41 \text{ mmol/kg}$, $T = 293 \text{ K}$)

A víz diffúzió együtthatója szintén csökkent a dendrimer koncentrációjának függvényében (1. ábra), amit a diffúziós obstrukció, és a hidratáció segítségével írtunk le, és meghatároztuk a hidratációs számot. Levezettük a megfelelő egyenletet, az obstrukcióval korrigált diffúzió együtthatóra és a moláris koncentrációra vonatkoztatva:

$$\frac{D_w^{obs} (1 + \varphi / 2)}{D_w^0} = 1 - n_{wd} M_w c_d$$



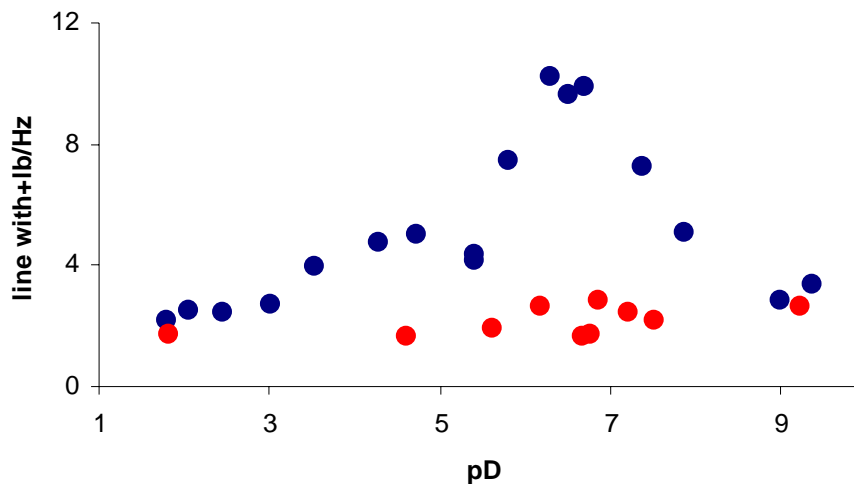
1. ábra Az E5.SAH (bal) és az E5.NH₂ (jobb) oldatában a víz (D₂O) diffúzió sebessége a dendrimer koncentrációjának függvényében

Megállapítottuk, hogy mind a 3.05 nm, mind a 3.37 nm hidrodinamikai sugarú dendrimer mintegy 4000 vízmolekulát tartalmaz (n_{wd}). [5, 6]. Ez a szám lényegesen nagyobb, mint a molekuladinamikai modellekből adódó szám, illetve kisszögű neutronszerésből származó adatok. Amit mi meghatároztunk az azoknak vízmolekuláknak a száma, amelyek együtt diffundálnak a dendrimerekkel, de gyorsan cserélődnek a tömbfázisban lévő vízzel. Ennek fényében, még az is elképzelhető, hogy ez sem a teljes hidratációs szám.

A PAMAM_E5.NH₂ kölcsönhatása foszfáttal

A foszfátion választásának két oka volt. Az egyik, hogy igen jól mérhető NMR mag a ³¹P. A másik pedig az, hogy a méretkizárásos kromatográfia egyik leggyakoribb puffere a citrát mellett a foszfát. Voltak indikációk az analitikai eredmények hibáira. Az orvosi alkalmazások esetében a dendrimerek gyakran nem kovalens kötéssel kötődő gyógyszereket szállíthatnak. A vérben lévő foszfát ionok könnyen kiszoríthatják a gyógyszer-molekulákat a dendrimerekből, ezért kölcsönhatás ismerete igen fontos.

A foszfát puffer ³¹P NMR spektruma érdekességet mutat dendrimerek jelenlétében. A kémiai eltolódása gyakorlatilag nem változik, azonban a vonalszélesség igen. A pH függvényében jellegzetes maximumot mutat. A vonalszélességnek nincs gyakorlatilag hőmérsékletfüggése, azaz relaxációs effektusról van szó.

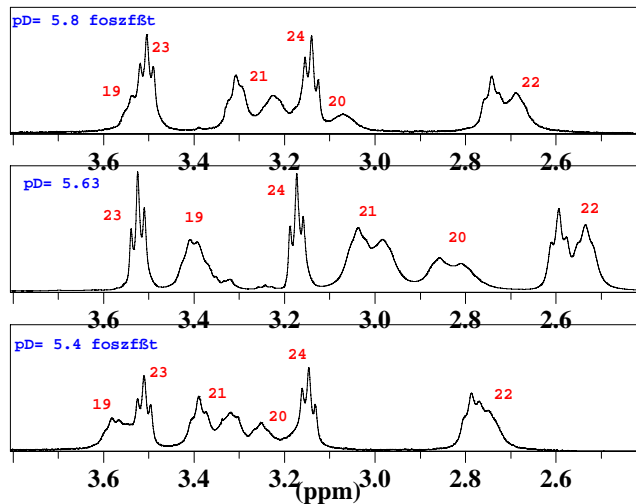


2. ábra A foszfát puffer ^{31}P jelének vonalszélessége a pH függvényében, E5.NH₂ jelenlétében (kék) és anélkül (piros).

I. Táblázat Diffúzió együtthatók a foszfát jelenlétében és távollétében

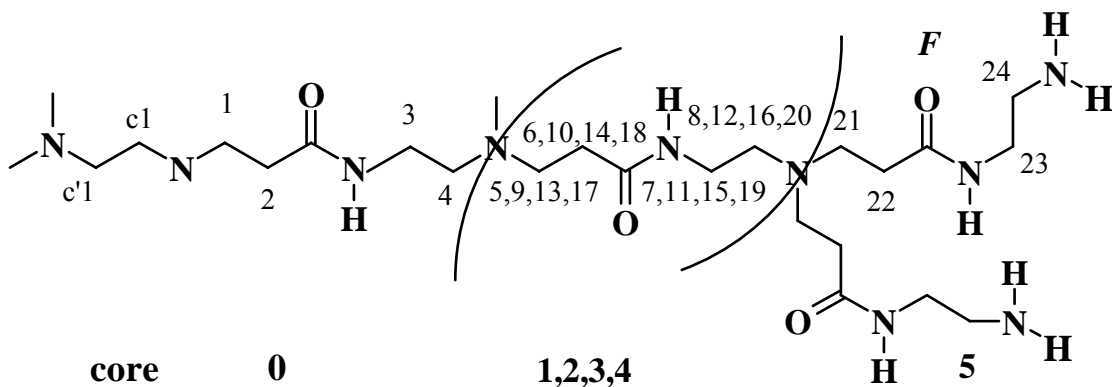
pH	D(E5.NH ₂)/ (m ² /s)	D(D ₂ O+de) (m ² /s)	D(PO ₄ +de) (m ² /s)	D(PO ₄) (m ² /s)	D(D ₂ O) (m ² /s)
2.45	5.50×10^{-11}	1.90×10^{-9}	5.30×10^{-10}	8.36×10^{-10}	
6.69	6.74×10^{-11}	1.90×10^{-9}	5.13×10^{-10}	7.69×10^{-10}	1.93×10^{-9}
9.77	6.45×10^{-11}	1.92×10^{-9}	5.60×10^{-10}	7.38×10^{-10}	
Foszfát nélkül					
2.06	4.52×10^{-11}	1.76×10^{-9}			
10.08	7.00×10^{-11}	1.82×10^{-9}			1.93×10^{-9}
13.13	7.13×10^{-11}	1.68×10^{-9}			

Az I. táblázatban mutatjuk a diffúzió mérések eredményeit. A táblázat 1-3. sorában foszfát jelenlétében mérhető diffúzió adatok vannak, míg az 5-7. sorban annak távollétében. Az első oszlop azt mutatja, hogy a foszfát a dendrimer méretét nem nagyon változtatja, azaz a méretkizárásos kromatográfiánál nem okozhat a foszfát puffer jelentős hibát. A második oszlop, amely szerint a foszfát jelenlétében a dendrimer nem lassítja víz diffúzióját, egyelőre nem magyarázható, további kísérletekkel kívánjuk ezt igazolni, és utána magyarázni. A foszfát diffúziósebessége viszont 35 %-kal csökken, aminek alapján jelentős mennyiségű foszfát diffundál a dendrimerrel, mintegy 120 foszfátion van egy molekulában.



3. ábra Az E5.NH₂ dendrimer ¹H-NMR spektruma foszfát jelenlétében (alsó és felső) és távollétében (középső).

A 3. ábra azt mutatja, hogy a foszfát, a 19 és 20-as és a 21 és 22-es szénatomon lévő hidrogének kémiai eltolódását változtatja meg a legjobban, amelyek a tercier nitrogének melletti hidrogének (4. ábra). A pH függés vizsgálata azt mutatja, hogy a (terc)N...H...OPO₃H típusú H-híd szerkezet alakulhat ki pH ~ 6 körül. Savas és lúgos közegben viszont a foszfát kikerül a molekula „felszínére”.



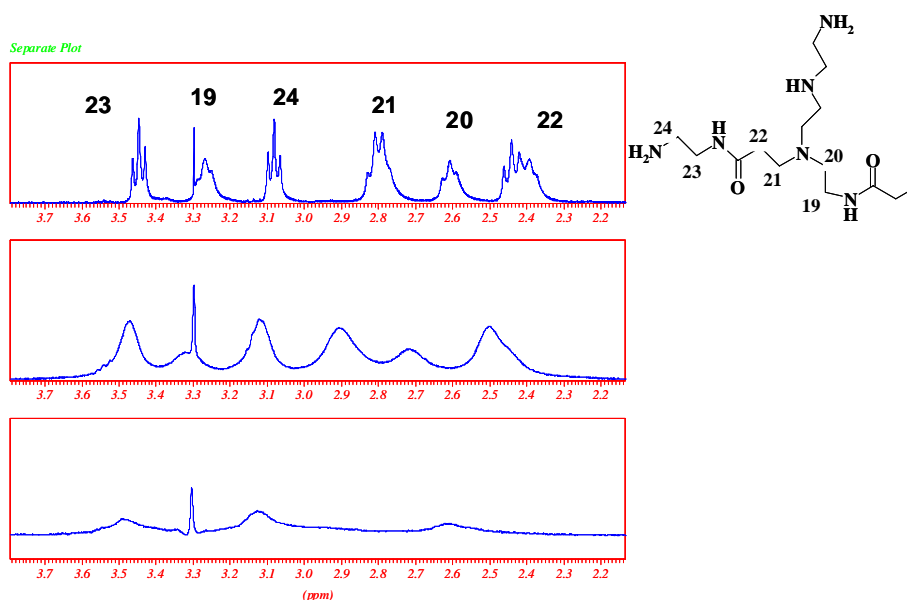
4. ábra A PAMAM_E5.NH₂ egy karjának, „dendronjának” rajza. A számok az NMR azonosításra szolgálnak.

Kölcsönhatások fémionokkal

E program pont eredetileg szintén a „kém molekula” (ion) terv része volt, azonban a fémionokkal való kölcsönhatás gyakorlati aspektusai ezt háttérbe szorították. A fémionokkal való kölcsönhatások nem olyan egyszerűek, mint a semleges molekulák és az anionok esetében, így az észlelések a dendrimerek szerkezeti aspektusaira közvetett. A dendrimerekben lévő sok donortom miatt, vissza kellett térnünk a tradicionális koordinációs kémiai módszerekhez a jelenségek megértése céljából. Ezzel magyarázható a lassabb haladás.

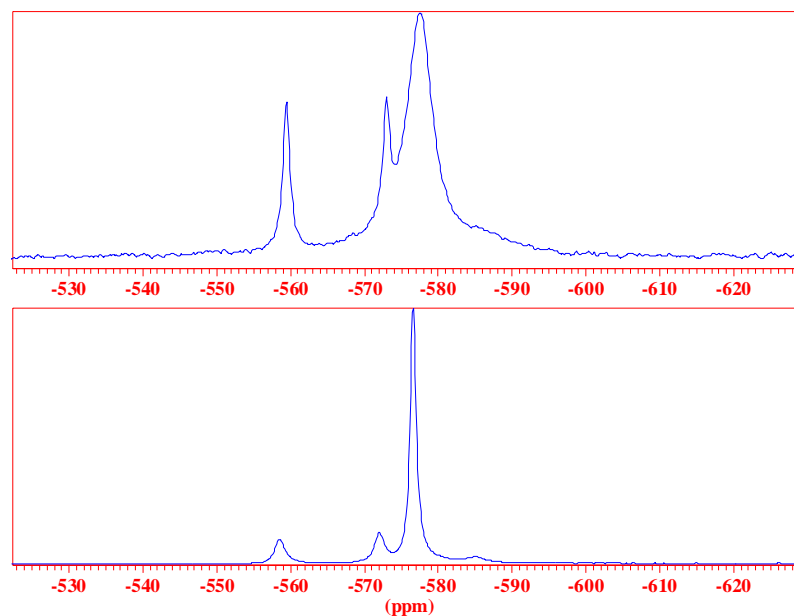
A dendrimerek a Cu^{2+} -ionokat – nem meglepő módon – erősen kötik. Méréseink a „sztöchiometriát” tudták meghatározni, mintegy 80 rézion kötődik meg maximálisan az E5.NH₂-ben. A pH-metriás és fotometriás párhuzamos titrálások sokféle koordinációt sugallnak. A kvantitatív kezelése a szokásos kiértékelő szoftverekkel kudarcba fulladt: nem tudtuk a feladatot még definiálni sem. A felületi komplexképződés konstans kapacitás modellje működőképesnek tűnik, igen jó illesztéseket kapunk, azonban a kolloid részecskék kapott kapacitása értelmezhetetlenül nagy. Ennek megoldásán, jelentésén és értelmezésén dolgozunk.

Az NMR vizsgálatok azt mutatják, hogy a komplexképződés itt is a tercier nitrogéneken kezdődik, amint az 5. ábra ¹H-NMR spektrumain tükröződik, paramágneses jelszélesedés formájában.



5. ábra Az E5.NH₂ ¹H-NMR spektrumai növekvő (felülről lefelé) rézion koncentráció mellett, pH 9-10 között.

Érdekesebb a helyzet a vanádium esetében. Ekkor az ^{51}V -NMR mérések szerint nem találunk specifikus koordinációt. Ez nem meglepő, mert a vanadátok inkább oxigén donor atomokat kedvelik. A vanadátok speciációja (a kémiai eltolódás alapján) lényegében nem változik a dendrimerek távollétében lévőhöz képest (H_2VO_4^- és tetramer izopolisav), azonban az így kialakult komplexek relaxációs sebessége (vonalszélessége) drámaian megnövekszik (6. ábra). A vanadátot tartalmazó oldatban a dendrimer diffúziósebessége mintegy kétszerese a vanádiumot nem tartalmazó dendrimerének, azaz csökken a méret. A jelenség teljes vizsgálatát, amiben ezeknek az észleléseknek az ellenőrzése is beletartozik, a foszfát analógiájára folytatjuk, és annak közlése után tervezzük megjelentetni.



6. ábra ^{51}V - NMR 40 mM vanadát oldatban pH=7.8. A dendrimer mennyisége 1/25-szorosa a vanadátnak.

A dendrimerekkel kapcsolatos általános összegzés

A dendrimerekkel kapcsolatos újabb eredményeink publikálását másfél éve kezdtük meg a diffúzió mérésekkel. Az első rövid közleményünket a *Langmuir*-ben lényegében elfogadták, néhány újabb kísérletet kértek. Ennek végzése során derült ki, hogy az általunk leírt hidratációs szám meghatározási módszere nem új, 1982-ben publikálták az alapelvet nem ionos tenzidekre. Ennek fényében teljes átdolgozást határoztunk el, a közleményt a szerkesztővel egyetértésben nem vontuk vissza, hanem lényegesen átdolgoztuk és azt előzetes kommunikáció helyett teljes dolgozatként küldtük

be ugyanebbe a folyóiratba. Ez nagyon sok időt vett igénybe, de az elméleti részt is átdolgozva (bizonyos aspektusaiban továbbra is új!), nagy valószínűséggel értékes közlemény keletkezik belőle.[5]

A foszfátionokat tartalmazó dendrimerek eredményei készen vannak, itt Balogh Lajos és Kéri Mónika már írja a közleményt, amelyet márciusban véglegesítünk, amikor egyéb programjának megfelelően Balogh Lajos újra Debrecenbe jön.

A vanádiumos rendszer esetében a ^{51}V -NMR mérések kulcsszerepet játszanak. Az a gondolatunk támadt, hogy az ionos folyadékok jó modellrendszerei lehetnek a dendrimerek belsejében levő állapotoknak, legalábbis NMR spektroszkópiai szempontból. Ez sajnos (szerencsére) „nem jött be”, ehelyett egy szép közlemény született (a jelen OTKA támogatásával), amelyből a tanulságok mellett arra jutottunk, hogy a vanadátok reakcióba lépnek az ionos folyadékokkal (!). [6]

Publikációk:

1. I. Bányai, L. P. Balogh, Zhang, C. ...: **The mechanism of formation of CeO_2 nanoparticles from aqueous solution, in presence of hexamethylenetetramine.**
To be published (?)
2. X. Shi, I. Bányai, M.T. Islam, Wojciech Lesniak, Denzel D. Davis, James R. Baker Jr., Lajos P. Balogh: **Generational, skeletal and substitutional diversities in generation one poly(amidoamine) dendrimers.**
Polymer 3022 46 **2005**
3. Shi X, Bányai I, Rodriguez K, Islam MT, Lesniak W, Balogh P, Balogh LP, Baker JR: **Electrophoretic mobility and molecular distribution studies of poly(amidoamine) dendrimers of defined charges**
Electrophoresis 27 (9): 1758-1767 **2006**
4. Shi XY, Bányai I, Lesniak WG, Islam MT, Orszagh I, Balogh P, Baker JR, Balogh LP: **Capillary electrophoresis of polycationic poly(amidoamine) dendrimers**
Electrophoresis 26 (15): 2949-2959 **2005**
5. István Bányai* Márta Berka, Zoltán Nagy, Wojciech G. Lesniak and Lajos P. Balogh: **Size and Water Content of Poly(Amidoamine) Dendrimers of Fifth Generation in Aqueous Solution.**
Langmuir (közlésre beküldve)
6. I. Bányai, V. Conte*, L. Pettersson, A. Silvagni: **On the Nature of V(V) Species in Hydrophilic Ionic Liquids: a Spectroscopic Approach**
Eur. J. Inorg. Chem. (34) 5373-5381 2008
7. M. Kéri, L.P. Balogh, Z. Nagy I, Bányai: **PAMAM denrimers in phosphate buffer: a multinuclear NMR study.**
kéziratban

Általános összegzés

Véleményünk szerint a dendrimerek és a poliaminosavak kutatása jelentős eredményekre vezet. A dendrimereket mint közel tökéletes, bár igen drága vegyületeket modellanyagként lehet alkalmazni a kutatások módszertanának megtervezésére és eredményei értékelésének kidolgozására.

E makromolekulák mérete az 1-10 nanométeres tartományba esik. Ez megfelel a nanotechnológia legbiztatóbb mérettartományának. Ez általánosabb alkalmazási perspektívákat jelez előre.

A nano-méretű anyagok kutatási területének „gyors lerablása” úgy tűnik befejeződött. Most e terület stabilizálása folyik, azaz tere van a megfontolt alap kutatásnak. Ez kevésbé költséges, mint a fejlesztés, azonban a haszna is csak közvetett. Mindenesetre e pályázat öt éve alatt a Debrecen Egyetem Kolloid- és Környezetkémiai Tanszékén kialakult egy erős kutatócsoport, amely a kolloid (nano) méretű ligandumok és fémkomplexeik kémiájával foglalkozik. Hatékonyan alkalmazza az NMR spektroszkópiát, mint fő szerkezetvizsgáló módszert, ebben együttműködésre kész, „szabad vegyértékei” vannak. Tervezni és kivitelezni tudunk új ligandumokat, azok minősítését is el tudjuk végezni. Meg tudjuk vizsgálni alkalmazásukat fémmegkötő flokkulensekként és kolloid (nano) méretű katalizátorként.