

Válaszok
Kubinyi Miklós egyetemi tanár, az MTA doktora
bírálatára

Köszönöm Kubinyi professzor úrnak, hogy doktori munkámat áttekintette és értékelését elvégezte. Köszönöm segítő szándékú észrevételeit. Értekezésemben a kismolekulák és befogadó molekulák gyenge kölcsönhatásaira vonatkozó vizsgálati eredményeimet mutattam be a trifluormetil-fenil származékok és kalixarének kölcsönhatásából kiindulva. Azt a valós kutatási szekvenciát követtem, amit az egyes rendszerek vizsgálata közben felmerülő kérdések, majd a kérdések megválaszolásához szükséges modellek felépítése, majd azok vizsgálata diktált. Így előfordulhatott, hogy kimaradtak olyan részleteket, melyek sok munkát igényeltek, kisebb súlyuk miatt mégis nem kerültek a dolgozatba, azonban a magyarázatokhoz ezek tárgyalása esetleg fontos lett volna. Kérem, hogy válaszaimat ezek figyelembe vételével értékelje.

Az Anyagok és Módszerek fejezethez tett észrevételekkel kapcsolatban az anyagok beszerzési forrásainak tekintetében a kalixarén származékok szintézisét Bitter István professzor úr (BME), a kavítandók szintézisét Kollár László professzor úr (PTE) csoportja végezte. Munkájukért a dolgozatban köszönetet mondtam. A benzotrifluorid származékok esetében sajnos elfelejtettem jelezni, hogy azt szintén Kollár professzor úr csoportja szintetizálta.

A fluoreszcencia élettartam mérését fázisfluorimetriás módszerrel végeztük az említett előnyök miatt. A gerjesztő fény intenzitásának modulációját készülékünk egy Pockels-cellával valósítja meg külső elektromos térrel modulált optikai forgatóképesség felhasználásával. Ezt a modulációt a mi készülékünkben 1 Hz és 300 MHz között szabályozhatjuk. Az adott frekvencián modulált gerjesztés ugyanolyan frekvenciával modulált emissziót eredményez, a készülék e két hullámvonalat fáziseltolódását méri. A készülék nagy pontosságú beállítást igényel, különösen, ha figyelembe vesszük, hogy 300 MHz esetén a modulált gerjesztőfény intenzitásának két maximuma között eltelt idő alatt a fény hozzávetőlegesen 1 m-t tesz meg. Emiatt referenciaként, 0 élettartamú mintaként kolloid rendszerek Rayleigh-szórását használtuk, az e mintát tartalmazó küvetát ugyanazon pozícióba helyeztük, mint magát a mérendő anyagot tartalmazó küvetát. Kolloid rendszerként glikogén oldatot használtunk, ill. tapasztalatunk szerint kiválóan megfelelt az erősen hígított tej is, amennyiben ügyeltünk arra, hogy utóbbinak a fluoreszcenciája ne zavarjon.

Raman mérések eredményeit a dolgozatban nem taglaltam. Annak oka, hogy a műszerek között mégis felsoroltam az volt, hogy szeretnénk volna megmérni a rezgési állapotoknak a gyenge komplexek képződése során bekövetkező megváltozását. Ilyen számításokat végeztünk, ezek ellenőrzéséhez is szeretnénk volna ezeket felhasználni. Sajnos azt tapasztaltuk, hogy egyrésről a gyenge komplexek esetében a rezgésállapotok nagy teljesítménysűrűségű fényforrás alkalmazásával annyira megváltoznak, hogy a molekula saját rezgési sajátságai helyett mást, a lézeres megvilágítás hatására bekövetkező változásokat mérjük.

Az 5. tézispontban közölt megállapításokat a (*J. Incl. Phen. Macrocycl. Chem.* 64(3-4) (2009) 283-288.) közleményünk alapján, egy rezorcinarén és egy kavítand származék komplexképzésének összehasonlításakor az 56. oldalon tettem. Ebben a munkában *para*-krezol szegmensekből felépülő kalixarén gazdamolekuláknak és fenol vendégmolekuláknak a disszociációját vizsgáltuk. A mérések azt mutatták, hogy az oldószer a disszociáció sebességét jelentősen módosítja, a számítógépes modellezés pedig arra utalt, hogy ezt a molekuláris

mozgások által nyomonkövethető különböző kinetikus energiaeloszlás okozza. Mivel ilyen hatással szteroidok palládiumkatalizált reakciói, ill. gerjesztett aszimmetrikus olefinek disszociációja kapcsán korábban is találkoztunk (*J. Phys. Chem. A* 106, (2002) 6319-6324.; *Chem. Phys. Lett.* 388 (2004) 84-88.; *J. Biochem. Biophys. Meth.* 61(1-2) (2004) 69-75.) az érvelésemet megalapozottnak vélem, igaz annak részletes kifejtése a dolgozatban elmaradt.

Kérdések:

1. Mit tekint gyenge kölcsönhatásnak? Az értekezésben leírt komplexek stabilitási állandói sok nagyságrendet felölelnek ($10^1 - 10^7 \text{ M}^{-1}$).

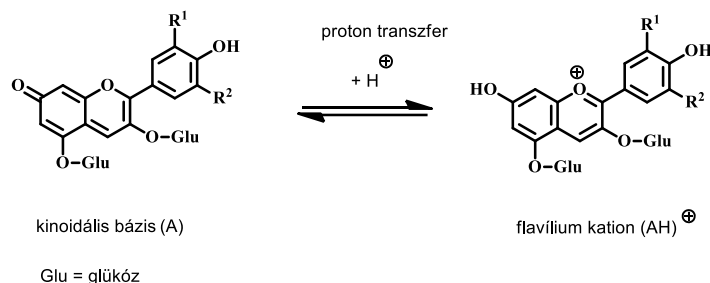
A legtöbb mérést szobahőmérsékleten, vagy annak közelében végeztem, így a stabilitási állandók alkalmasnak tűnhetnek az egyes komplexek stabilitásának összehasonlítására. Azonban a kölcsönhatás erősségének jellemzésére a stabilitási állandóknál előnyösebbnek tartom a molekulák asszociációját kísérő szabadentalpia csökkenést és e tekintetben a legfeljebb néhány 10 kJ/mol szabadentalpia csökkenéssel kísért molekuláris kölcsönhatást tekintem – ill. tekinti az irodalom – gyenge kölcsönhatásnak. A szabadentalpia fluoreszcenciás módszerrel történő meghatározására a van't Hoff egyenletet használtuk, ami viszont közelítéseket tartalmaz például arra vonatkozóan, hogy feltételezzük az adott hőmérséklettartományban az entalpia és entrópia hőmérsékletfüggetlenségét. Ez a feltételezés azonban a tapasztalat szerint nem okoz nagy hibát, emiatt is nagyon elterjedt az egyenlet alkalmazása.

2. A stabilitási állandók értékei mellett feltüntette azok hibáját is. Milyen módon számította ezeket a hibákat ?

A stabilitási állandók meghatározása háromféleképpen történt: Egyrészt a Hyperquad stabilitási állandó számoló program segítségével, másrészt a Benesi – Hildebrand módszerrel, harmadrészt pedig a 2.6 és 2.7 egyenletek segítségével. Az első esetben több mérési adatsor, vagyis spektrum beolvasását követően a hiba a program által számításra kerül, ez pedig az egyes spektrumsorozatokból számított stabilitási állandók szórása. A spektrumsorozatok azt jelentik, hogy az egyes sorozatokhoz külön oldatsorozatokot is készítettünk, tehát nem ugyanazon mintát mértük meg többször. Egy-egy koncentrációsorozathoz tartozott egy spektrumsorozat és ezekből került több, legkevesebb három beolvasásra a Hyperquad programba. A második esetben a Benesi – Hildebrand egyenlet felhasználásával ugyanezt, tehát a fentieket végeztük, csak manuálisan: az egyes koncentrációsorozatokhoz az egyenlettel egy stabilitási állandót számítottunk, majd az egyes párhuzamos sorozatokhoz számított állandókból határoztuk meg a szórását. A harmadik esetben egyszerűsítésre kényszerültünk: ebben az esetben az illesztési algoritmus nem a stabilitási állandókat tekintette változó paraméternek, hanem a komplexképződést kísérő termodinamikai paramétereket. Tekintettel arra, hogy a stabilitási állandó és a szabadentalpia változás között logaritmikus összefüggés van, a stabilitási állandók várhatóan matematikai értelemben normális eloszlása aszimmetrikussá válik. Ezért itt azt tettük, hogy a termodinamikai paraméterek szórását az átlaghoz adva kiszámítottuk a stabilitási állandót mindkét irányban és a nagyobbik eltéréstől az átlaghoz tartozó stabilitási állandót kivonva kapott értéket tekintettük a mérés hibájának. A fentiekkel kapcsolatban meg szeretném említeni, hogy a mérések előtt természetesen egyaránt ellenőriztük a műszerünk és a mintáink hosszú idejű stabilitását is. Egy – egy spektrumot 3 pásztázás átlagaként rögzítettünk.

3. A malvidin-3-O-glükozid képletén pozitív töltés van – a Wikipediában is ez a képlet látható. Mi adja a kompenzáló negatív töltést ?

A malvidin-3-O-glükozid a kinoidális bázis szerkezetből protonfelvétellel (transzferrel) keletkezik alacsony pH-n. E vegyületeket egyrészt a francia Extrasynthese (Genay, France) cégtől vásároltuk, itt klorid ellenionnal kapható, másrészt vörösborokból extraháltuk HPLC-vel. A vegyület klorid ellenionnal kapható a Sigma-nál is, de ezt a származékot nem használtuk.



4. A kalixarének és benzolszármazék komplexképzésére a fluoreszcencia anizotrópia időfüggéséből is következtetett. Érdemes lenne-e a mért anizotrópia élettartamokat értékelni a Stokes-Einstein-Debye egyenlet alapján, tehát kapcsolatba hozni a komplex térfogatával és az oldószer viszkozitásával ?

A témakörben készült első néhány közleményünk megjelenését követően több hazai és külföldi kolléga felvetette, hogy ha a solvatációs héjban jelentős változások történnek, akkor azt érdemes volna neutrondiffrakciós mérésekkel megvizsgálni. Ehhez kézenfekvő lett volna a Stokes-Einstein-Debye egyenlettel a professzor úr által említett adatokból a solvatációs héj méretét becsülni. A mi készülékünk fázisfluorimetriás módszerrel mér időbeli változásokat, a Pockels-cella által amúgy is gyengébb gerjesztést a készülékünkben alkalmazott Glan-Thompson prizmák annyira legyengítik, hogy kielégítően pontos mérésre nincs lehetőség. Mindemellett az általunk meghatározott anizotrópia-élettartamok úgy érzem ahhoz kielégítően pontosak, hogy a komplexképződés tényét igazolják. Amennyiben az adatokat behelyettesítjük a Stokes-Einstein-Debye egyenletbe, akkor a komplex kismértékű térfogatnövekedésére kapunk adatot. Azonban ez a növekedés biztosan hamis, mert a vendégmolekula inklúziója során annak tömege változik – mintegy 10-20 százalékkal nő -, a térfogata kevésbé változik. A tömeg változását azonban az egyenlet nem írja le, azt esetleg a diffúziós állandó változását figyelembe véve lehetne számításokra használni. Felmerült azonban a kérdés, hogy ha a solvatációs héj annak nagyobb stabilitása miatt növekszik, akkor kimutatható-e ez a Stokes-Einstein-Debye egyenlettel? Ehhez a következőképpen jártunk el: kalix[6]arén hexaszulfonát esetében triptofánnal vízben és víz-etanol elegyben 286 K-en azonos stabilitást mértünk. Ez azt jelentette, hogy várhatóan ugyanannyi komplex képződik a 10^{-5} M kalixarént és 10^{-4} M triptofánt tartalmazó oldatban. Ha feltételezzük, hogy a két oldatban – a solvatációs héj kivételével minden azonos, akkor a rotációs diffúzió növekedéséből 6,4 százalékos térfogatnövekedést kapunk. Ez nem tekinthető szignifikánsnak, emellett az eltérő klaszterképződés miatt sokkal összetettebb a folyamat, például a lokális viszkozitás is megváltozhat. Utóbbi egyébként is fellép, hiszen az eltérő fluoreszcencia hatások miatt a gerjesztést követően a sugárzásmentes relaxációk a molekula környezetét eltérően melegítik, ami eltérő lokális viszkozitást eredményezhet. E tekintetben a Stokes-Einstein-Debye egyenletre vonatkozó kritika több közleményben is megjelent.

5. (39. o.) Kiszámította kvantumkémiai módszerrel a kalixarén-benzotrifluorid komplex kölcsönhatási energiáját, és azt találta, hogy azok jól korrelálnak a komplexek mért képződéshőjével. A közvetlen összehasonlításban akadálynak tekinti, hogy a számított

energia 0 K-re vonatkozik, a mérés pedig szobahőmérsékleten történt. Hogyan lehetne kvantumkémiai úton számítani az egyensúlyi állandó, a reakcióentalpia és –entrópia 298 K-os értékét?

A termodinamikai mennyiségek számítása rotációs – rezgési analízis elvégzését teszi szükségessé, ami igen jelentős számítási kapacitást igényel. Ez annak ellenére van így, hogy ráadásul a rezgési tulajdonságok számítása szinte kizárólag harmonikus közelítésben történik. Az említett vizsgálatok idején a relatíve nagy molekulaméret miatt kalixarén komplexek esetére a szabadentalpia számítása nem volt kivitelezhető. A másik probléma az, hogy a mérések az oldószer jelentős entrópiajárulékát valószínűsítik, így az oldószert tömbfázisként kezelő módszerek alkalmazásával éppen azok a kérdések maradnak nyitottak, amikre a kísérletek utalnak, vagyis az alkalmazott protikus oldószerek szerkezete a solvatációs héjban eltér a tömbfázis szerkezetétől. Nagy problémát jelent, hogy kellő pontosságú optimált geometriát eredményező számítások esetén esélyt sem látunk a rotációs – rezgési analízis elvégzésére. E problémát metanol klaszterek benzolgyűrűhöz történő koordinációjára vonatkozó eredményeink mutatták (*J. Phys. Chem. A* 115 (2011) 10556–10564.) Ettől függetlenül a közelmúltban mikotoxinok és ciklodextrinek kölcsönhatására vonatkozóan az igen erős közelítést tartalmazó AM1 szemiempirikus módszerrel számítottunk szabadentalpiát és ebből egyensúlyi állandókat. Az eredményeink sok esetben igen jó egyezést mutattak a kísérletekkel. Az egyezés azonban inkább a véletlennek köszönhető, ugyanis ilyen szintű számítások esetén legfeljebb a számított egyensúlyi állandók valamely fizikai vagy szerkezeti paraméter (például a toxinok töltése) szerinti változásának a tendenciáját hasonlíthatjuk össze.

6. Hogyan határozta meg az oldószer-relaxációs időket? A dinamikus Stokes-eltolódást mérve?

Az oldószer-relaxációs idők meghatározása a dinamikus Stokes-eltolódás mérésével történt. Az oldószer-relaxáció mérését a gazdamolekulák fluoreszcenciáját releváns jelként használva az alábbiak szerint végeztük figyelembe véve, hogy oldószer-relaxációról inklúziós komplexek estében csak a befogadó molekula solvatációja kapcsán beszélhetünk, mert a vendégmolekula a komplex képződése során elveszítheti a solvatációs héját. Felhasználva, hogy az oldószer molekulái az oldott fluoreszkáló molekulának a gerjesztés következtében megváltozott elektroneloszlását igyekeznek követni, a fluorofor emissziós spektruma időben változik. Ezt a változást a hullámhosszkálán ábrázolt emissziós spektrum súlypontjának eltolódásával követhetjük, az eltolódás mértékét az idő függvényében vizsgáljuk. Fázisfluorimetriás technikát alkalmazva ez úgy történik, hogy a steady-state fluoreszcencia spektrum tartományában több – általában 20 – egymástól ekvidisztáns távolságban lévő hullámszámon megmérjük a fluoreszcencia élettartamát. Készülékünk ezt 2-5 ps-os pontossággal határozza meg. Ezen élettartamokat és a steady-state spektrumot felhasználva kiszámítjuk az emissziós spektrum időbeli változását. Ehhez energiaskálát használunk, ezért is ügyelünk arra, hogy a fluoreszcencia élettartam mérése energiában ekvidisztáns pontokban történjen. Az emissziós spektrum eltolódása időben exponenciális. Ezen számítások a Fluorolog tau3 készülékünk saját szoftverével történtek. Az adott számítógépes program maximum négy exponenciálisig tudja érdemben a kiértékelést elvégezni, a mi méréseink során főként monoexponenciális, egy esetben biexponenciális lefutású eltolódást tapasztaltunk. Itt szeretném megemlíteni, hogy ezek a mérések sokkal komplikáltabbak, mint például a laser-flash módszerrel végzett mérések, azonban a gerjesztés inkohérens volta és kis teljesítménysűrűsége a molekuláris rendszer szerkezetét a mérés során kevésbé zavarja, mint a lézeres gerjesztést alkalmazó módszerek.

7. Miért választotta az antracént fluoreszcens próbának az oldószer-relaxációs vizsgálatokhoz? Nem előnyösebb „charge transfer” próbát választani, amelyek az S_1 és S_0 állapotú dipólusmomentuma nagyon különböző, azaz a Lippert-egyenlet szerint nagy a Stokes-eltolódása?

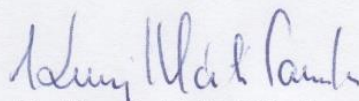
De igen, előnyösebb volna „charge transfer” próbát választani. Az antracénre teljesen technikai okokból esett a választás: amikor egy 2007-es konferencián az első oldószer-elegyes eredményeket bemutattam, egy résztvevő, Koichi Iwata professzor felajánlotta, hogy az ő műszerparkjukkal végezzünk el egy szisztematikus mérésorozatot a benzol-naftalin-antracén vegyületcsoportra. (Ezért is jegyezzük a professzor úr által említett közleményt Koichi professzorral közösen). A három vegyületből végül az antracén maradt, mert a naftalin esetében az azulén irányába haladtunk tovább az ő rendhagyó, Kasha-szabályt sértő fluoreszcenciája – mintegy ezerszer intenzívebb S_2 - S_0 átmenete - miatt. Sajnos az azulénes eredményeket később sem tudtuk használni, mert az azulén belső konverzióval naftalinná alakul. Mindamellet professzor úr felvetése alapján „charge transfer” próbákkal biztosan fogunk vizsgálatokat végezni.

8. (86. o.) A malvidin-glükozidról írja, hogy fluoreszcencia lecsengése (az értekezésben – hibásan – élettartama) biexponenciális jellegű. A két komponens a flavonszarmazék kromán ill. dimetoxifenol részéhez rendeli. Ez így furcsán hangzik, mert a fluoreszcencia többnyire a molekula egyetlen átmenetéből, az $S_1 \rightarrow S_0$ -ből származik. Nem lehetséges, hogy a gerjesztett állapotú molekula valamilyen reakciója (pl. proton leadás/felvétel, vagy a fenilcsoport elfordulása) okozza a biexponenciális lecsengést?

A fluoreszcencia élettartam méréseket kétféle módszerrel végeztük el, egyrésztől fázisfluorimetrián, másrészt lézer-impulzus forrás alkalmazásával, utóbbit Iwata professzor fent említett laboratóriumában. A szintelen kromenolra végzett vizsgálatok, ill. ezeknek összevetése a malvidinra kapott eredményekkel professzor úr felvetését látszanak igazolni: a molekula sík, ill. tört szerkezetéért felelős 2-es szénatom gerjesztést követő deprotonálódását sikerült megfigyelni. Ez körülbelül 10 ps alatt játszódik le. Ezt természetesen a gyűrű elfordulása is követi, de az egész folyamat reverzibilis, tehát az adott, savas körülmények között gyorsan újra protonálódik. Az, hogy a deprotonált forma mégis megjelenhet, az annak köszönhető, hogy a gyűrű mozgása a protonálódás sebességét csökkenti. E vizsgálatokat jelenleg is folytatjuk, reményeink szerint a közeljövőben a kérdésre választ fogunk találni.

Végezetül ismételten köszönöm Kubinyi Miklós professzor úr bírálatát, dicsérő és kritikus megállapításait, valamint eredményeim pozitív megítélését. Tisztelettel kérem válaszaim elfogadását.

Pécs, 2020. október 20.


Dr. Kunsági-Máté Sándor