

A „Protein molekulák adszorpciójának in situ molekuláris szintű jellemzése fogászati implantátumok nanostrukturált felületén összegfrekvencia-keltési spektroszkópiával” című OTKA kutatási projekt záróbeszámolója.

Az összegfrekvencia-keltési spektroszkópia (Sum Frequency Generation Vibrational Spectroscopy, SFG) olyan új nemlineáris optikai rezgési spektroszkópiai módszer, amely előnyösen alkalmazható centroszimmetrikus közegek (gázok, oldatok, szilárd testek) határfelületein kialakuló molekuláris szerkezetek jellemzésére. A módszer gyors nemzetközi terjedése évtizedünk elejére, a jelen projekt megpályázásának időszakára esett. Az MTA Kémiai Kutatóközpont is ekkoriban állította üzembe SFG spektrométerét, így a projekttel elsődleges célunk az új módszer alkalmazási területének kiszélesítése mellett a mérési eljárás meghonosítása, a hazai alkalmazások bevezetése volt.

A kutatás célja és fő eredményei

Az emberi testben alkalmazott implantátumokkal szemben támasztott egyik alapvető elvárás, hogy szövetbarát tulajdonságúak legyenek, így a kilökődés veszélyét minimálisra lehessen csökkenteni. Az implantátumok anyaga, illetve a felületükön lévő funkcionális réteg döntő mértékben befolyásolja az implantátum biokompatibilitását. A titán részben kedvező mechanikai tulajdonságai, részben a felületén kialakuló oxidréteg sajátosságai miatt a legszélesebb körben felhasznált biokompatibilis fém. A projekt alapvető célkitűzése a biokompatibilitás molekuláris hátterének tanulmányozása volt aminosavak és proteinek titán-dioxidon és más biológiai szempontból potenciálisan jelentős felületeken lejátszódó adszorpciójának vizsgálata segítségével.

A projekt megvalósítása során az adszorpció folyamán bekövetkező molekuláris szerkezeti változásokat kívántuk összegfrekvencia-keltési spektroszkópiás mérésekkel megismerni és lehetőség szerint korreláltatni a hordozófelület nanoskálájú morfológiájával. A pályázat megfogalmazása idején, de még a szerződésalkötéskor rendelkezésre álló információk alapján is megvalósíthatónak tűnt az elképzelés, hiszen sikerült SFG spektrumokat kapni Ti felületen adszorbeált protein molekulákról és nem látszott kivitelezhetetlennek hozzávetőleges szerkezeti információk megállapítása a spektrumok alapján [A.1]. A projekt harmadik évére, részben saját vizsgálataink, részben pedig a határfelületeken adszorbeált proteinek SFG vizsgálatával foglalkozó más laboratóriumok addigra nyilvánosságra került eredményei alapján felismertük, hogy az eredeti elgondolások szerint elvégzett kísérletek nem fognak igazán értékes, az alapvető megértést elősegítő, publikációs szempontból is jól hasznosítható eredményeket hozni. Ennek okait a későbbiekben részletesen is kifejtjük. Így a munka során a hangsúly fokozatosan eltolódott olyan, a szerződés munkatervében is szereplő részfeladatok irányába, amelyek megvalósítása sikeresnek ígérkezett, ez azonban szükségszerűen magával hozta a projekt céljainak újraértelmezését. Ennek megfelelően a kutatás célkitűzései kisméretű biomolekulák, elsősorban aminosavak szilárd-oldat határfelületen lejátszódó adszorpciójának megismerése, a kötésviszonyok elemzése irányába módosultak, bár nem adtuk fel a fehérje adszorbeátumok orientációs tulajdonságainak meghatározására irányuló erőfeszítéseket sem.

A projekt során elért legfontosabb eredményeink:

- Számos aminosav adszorpció tulajdonságait vizsgálva megállapítottuk, hogy a kvarcüveg-aminosav oldat határfelületen nem alakul ki rendezett adszorbeált réteg, míg a kalcium-fluorid-aszparaginsav oldat határfelületen aminosav kristályok nukleálódása figyelhető meg. Az aminosavak többsége a titán-dioxidon is gyengén adszorbeálódik, egyedül a savas oldalláncú aminosavak, mint az aszparaginsav vagy a glutaminsav, alkotnak rendezett adszorbeált réteget.
- Az aszparaginsav példáján keresztül tisztáztuk a savas aminosavak titán-dioxidhoz való kötődésének részleteit és meghatároztuk az adszorbeátumok orientációját.
- Fehérjeadszorpcióval kapcsolatos vizsgálataink során módszert dolgoztunk ki a határfelületen elhelyezkedő protein molekulák orientációs paramétereinek kombinált lineáris és nemlineáris optikai spektroszkópiai mérések alapján történő meghatározására. Egy gyakorlati példa kapcsán molekuláris szintű modellt adtunk a véralvadási kaszkád töltött felületen adszorbeálódó XII. faktorának aktiválódási mechanizmusára.

A következőkben először részletesen bemutatjuk a projekt kutatási eseményeit és indokoljuk a munkatervtől való eltérést. Ezt követi az új tudományos eredmények leírása, a téma továbbvitelének, illetve a megszerzett ismeretek hasznosítási lehetőségeinek ismertetése, végül a költségtervben eszközölt – OTKA Iroda által engedélyezett – változások tömör indoklása.

A kutatás főbb eseményei, munkatervtől való eltérések

2003

A kutatás első évében a munkatervnek megfelelően megalapozó jellegű vizsgálatokat végeztünk. A további munka előfeltételeként normál reflexiós geometriában vizsgálható (natív vagy mesterségesen növesztett oxiddal borított) titán rétegeket alakítottunk ki kvarcüveg hordozón vékonyréteg-technológiai eszközökkel. Ezek a minták az ún. *ex situ* spektroszkópiai mérések során használhatók (ekkor a TiO₂ felületre rászáritott adszorbeátumok spektrumát mérjük a TiO₂-levegő határfelületen). Ezen kívül átlátszó mintákat is létrehoztunk *in situ* vizsgálatok céljára (ekkor megfelelően átlátszó ablakon alakítjuk ki a TiO₂ réteget, majd a TiO₂-oldat határfelületen mérjük az adszorbeátumok spektrumát az ablakon keresztül). Az első minták ebben az esetben is kvarcüvegen (2700 cm⁻¹ felett átlátszó) készültek, bár a kalcium-fluorid (1000 cm⁻¹ felett átlátszó) sok esetben előnyösebb lehet.

A TiO₂ felületek tisztítására nedves kémiai vagy fizikai eszközöket alkalmaztunk és röntgen-fotoelektron-spektroszkópiai mérésekkel meghatároztuk a tisztítást kísérő felületkémiai változásokat.

Kísérleteztünk nedves kémiai rétegekialakítási eljárásokkal is (TiCl₄ vagy Ti-izopropoxid hidrolízise), a keletkezett rétegek stabilitása, fényszórási tulajdonságai vagy megtisztíthatóságuk azonban lényegesen rosszabbnak bizonyult, mint a vékonyréteg-technológiai úton készített mintáké.

2004

A kutatás második évének központi feladata aminosavak adszorpciójának tanulmányozása volt TiO₂ felületen, mind *ex situ*, mind *in situ* körülmények között. A kísérletek eredményes végrehajtása jelentős újdonságot ígért, hiszen az aminosavak titán-dioxidon, de általában oxid felületeken oldatból lejátszódó adszorpciójáról sem állt rendelkezésre sok információ, ugyanakkor éppen csak demonstrálták, hogy összegfrekvencia-keltési spektroszkópiával lehetséges folyadék-folyadék [A.2], folyadék-levegő [A.3] vagy elektrokémiai határfelületen [A.4] aminosavaktól származó jelet kapni.

Az első kísérleteket *ex situ* körülmények között hajtottuk végre. A tipikusan igen kicsi jelek azt mutatták, hogy savas aminosavakból (aszparaginsav, glutaminsav) kialakul egy adszorbeált réteg, ugyanakkor feltehetően a spektrumokhoz bizonyos járulékot ad az atmoszférikus eredetű szennyezés is, ami a szárítást követően adszorbeálódik a laborlevegőn tartott mintára. A tapasztalatok arra ösztönöztek, hogy a további vizsgálatokat inkább *in situ* körülmények között próbáljuk elvégezni, részben azért, mert ekkor a szennyező réteg kialakulásával nem kell számolnunk, részben pedig azért, mert a szilárd-oldat határfelületen kapott eredmények biológiai szempontból jóval relevánsabbak, mint a szárítás utáni szilárd-levegő határfelületről kapott adatok.

Az *in situ* kísérletek megkezdésekor ésszerűnek tűnt, hogy magát a hordozót (ablakot) is megvizsgáljuk aminosav-adszorpció tulajdonságok szempontjából, egyben meg akartuk ismerni a teljes belső visszaverődés geometriája által nyújtott mérési lehetőségeket [A.5], ahol becslések szerint az érzékenység kb. egy nagyságrenddel növelhető a normál reflexiós geometriához képest. Így először egy kvarcüveg prizma befogó melletti oldalát használtuk mintafelületként. Az első eredmények azt mutatták, hogy a SiO₂ által orientált vízmolekulák jelei uralják a spektrumokat, bár esetenként igen gyenge C-H jeleket is látni véltünk.

Az aminosav-adszorpció kísérletekkel párhuzamosan vas- és réz hordozón kialakított sztearoil-hidroxámsav és 1-foszfono-oktadekán Langmuir-Blodgett monorétegek és önszerveződő rétegek SFG spektrumait is tanulmányoztuk. A viszonylag jól definiált szerkezetű rétegek a jelen kutatás szempontjából modellként szolgáltak az adszorbeátumok orientációeloszlásának meghatározásához. Az egyszerű modellrendszer a kezdeti reprodukálhatósági gondok leküzdése után nem okozott kísérleti problémákat, így a projekt első közleményei (köztük az SFG módszert részletesen bemutató első magyar nyelvű publikáció, amelyben röviden szólunk titán vékonyrétegen lejátszódó fehérjeadszorpció *ex situ* körülmények között végzett előkísérleteiről is) ezekből a vizsgálatokból születtek meg [B.1, B.2].

2005

Az előzőekben ismertetett, nem eléggé meggyőző eredmények, illetve az a felismerésünk, hogy az aminosavak adszorpciójának *in situ* tanulmányozása az irodalmi adatokhoz képest jelentős új ismereteket eredményezhet, arra készítetett, hogy ezen folyamatok tanulmányozását a kutatás harmadik évében is folytassuk.

A gondosan megtisztított kvarc prizmán megismételt *in situ* adszorpciós vizsgálatok következtében negatív eredményt adtak, ugyanakkor az *ex situ* körülmények között végzett kísérletek során aminosav kristálykák keletkezését igazoltuk.

Ezzel párhuzamosan megkezdtük az *in situ* aminosav-adszorpciós kísérleteket TiO₂-on. Mivel ekkor még nem állt a rendelkezésünkre a teljes belső visszaverődés geometriájához szükséges, prizmán kialakított átlátszó TiO₂ réteg, a kezdeti kísérleteket kvarcüveg ablakon kialakított TiO₂ réteg felhasználásával végeztük el. Aszparaginsav oldatot használva sikerült adszorbeált aminosav-réteghez rendelhető, igen gyenge metilén jeleket detektálni, a kísérletek azonban arról is meggyőztek, hogy a TiO₂-oldat határfelületről csak a teljes belső visszaverődés geometriájában kaphatunk publikálásra is alkalmas jel/zaj viszony mellett spektrumokat.

Az aminosav-adszorpciós kísérletek mellett 2005-ben foglalkoztunk kis peptidok TiO₂ felületen történő adszorpciójának *in situ* vizsgálatával, szintén kvarcüveg ablakon kialakított TiO₂ réteg segítségével. Mindkét modellmolekulánk, a Gly-Phe és az Asp-Phe-metilészter (aszpartám) is kimondottan erős affinitást mutatott a TiO₂ iránt. Az adszorbeátumok orientációjának vizsgálatához szükséges lett volna a kapott jelek asszignációja, ami azonban csak bizonyos mértékig sikerült, részben a normál reflexiós geometriából adódó nem túl jó jel/zaj viszony következtében.

Az a felismerés, hogy az értékelhető spektrumokhoz a könnyen kezelhető és módosítható, olcsón létrehozható, sík ablakfelületen kialakított TiO₂ réteg helyett az utólag nem manipulálható ugyanakkor költséges, prizmán kialakított réteget kell használnunk, nyilvánvalóvá tette, hogy a projekt egyik lényeges célkitűzését, nevezetesen a felületi morfológia biomolekuláris adszorpcióra való hatásának tanulmányozását fel kell adnunk. Így a kutatómunka továbbvitelére nézve két lehetőség állt előttünk. Az egyik az volt, hogy a fő hangsúly az aminosavak adszorpciójának *in situ* vizsgálatára tolódik, ami belátható időn belül publikációs lehetőséget ígér, bár az eredeti munkatervtől összességében jelentős eltérést eredményez. A másik lehetőségünk az volt, hogy a munkatervvel jobban összhangban maradván az aminosav SFG spektrumok *in situ* körülmények közti detektálhatóságának demonstrálását követően TiO₂-protein oldat határfelületekkel kezdünk foglalkozni.

A választásban segített az a körülmény, hogy ebben az időben kezdtek megjelenni olyan publikációk, amelyek protein molekulák polimer felületen lejátszódó adszorpciójának konformációs változásokban megnyilvánuló következményeit vizsgálták összegfrekvencia-keltési spektroszkópiával [A.5, A.6]. Ezek a munkák egyértelművé tették, hogy érdemi információkat a proteinek amid sávjainak vizsgálatával kaphatunk, a könnyebben mérhető C-H rezgések legfeljebb kiegészítő adatokat adhatnak. Az amid sávok vizsgálata szintén megköveteli a teljes visszaverődés geometriájának alkalmazását, méghozzá kalcium-fluorid prizma segítségével, amelynek a használatában, tisztításában illetve TiO₂ réteggel való bevonásában akkor még semmilyen gyakorlatunk nem volt.

Így az aminosav-adszorpciós folyamatok tanulmányozásának folytatása mellett döntöttünk.

2006

Az év elejére sikerült beszerezni a kutatás folytatásához szükséges, TiO₂-al bevont kvarcüveg prizmákat. Az új geometriai elrendezésnek köszönhetően megnövekedett érzékenység mellett SFG méréseink kimutatták, hogy a nedves kémiai felülettisztítási eljárások által adott felületek nem eléggé mentesek a szénhidrogén szennyeződéstől. Új tisztítási technológiaként az ultraibolya-ózonos kezelést [A.7, A.8] vezettük be.

A TiO₂-aminosav oldat határfelület teljes belső visszaverődésben felvett SFG spektrumai a korábbi adatokkal összhangban egyértelműsítették, hogy a savas aminosavak rendezett adszorbeált réteget alkotnak a felületen. Megállapítottuk továbbá, hogy a szénhidrogén (pl. fenilalanin) vagy a semleges (pl. glutamin) oldalláncú molekulák csak minimális adszorpciót mutatnak.

Az aminosav adszorbeátumok karboxil rezgéseinek megfigyeléséhez kvarcüveg prizma helyett kalcium-fluorid prizmán kellett a TiO₂ réteget kialakítani. Ennek előkísérleteként megállapítottuk,

hogy a légköri eredetű szénhidrogén szennyeződés a CaF_2 felületéről is eltávolítható az UV-ózonos kezeléssel. A CaF_2 -aszparaginsav oldat határfelület SFG vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy már *in situ* körülmények között is kialakulnak kisméretű kristályok.

Az aminosavak kvarcúvegen, kalcium-fluoridon és titán-dioxidon mutatott adszorpciójának összehasonlításából konferencia előadás mellett folyóiratcikk született [B.3].

Részletes modellszámításokkal elemeztük az SFG módszer helyét a határfelületi molekulák orientációeloszlását megadó eloszlásfüggvény meghatározásában. A munka eredményeként folyóirat cikk született [B.4]. Az elvi természetű eredményeket hasznosítottuk töltött polimer felületen végbemenő proteinadszorpció vizsgálata során is, ahol a véralvadási kaszkádban szereplő Faktor XII nevű fehérje orientációváltozását figyeltük meg a felületi töltés függvényében. [B.5].

2006-ban a Műszaki és Természettudományi Kollégium engedélyezte a jelen szerződés futamidejének egy évvel történő meghosszabbítását.

2007

A projekt lezárásaként a titán-dioxidon adszorbeálódott aminosavak karboxil rezgéseit vizsgáltuk az SFG módszerrel. Ehhez TiO_2 bevonattal ellátott CaF_2 prizmákat szereztünk be. A réteg tapadása sajnos nem bizonyult megfelelőnek: hosszabb szilárd-folyadék határfelületen végzett kísérletek után a bevonat levált a prizmáról. Ennek ellenére a prizmák segítségével sikerült felvenni aszparaginsav adszorbeátumok karboxil rezgéseinek SFG spektrumait, amelyek igen értékes információkat nyújtanak a molekulák titán-dioxidhoz koordinálódásának részleteiről. Az eredmények alapján újabb folyóirat cikk született [B.6].

Új tudományos ismeretek

Fém-oxid hordozón adszorbeált rétegek szerkezetének jellemzése összegfrekvencia-keltési spektroszkópiával [B.1, B.2]

Az összegfrekvencia-keltési spektroszkópia egyik alapvető tulajdonsága, hogy segítségével lehetőség nyílik a határfelületi adszorbeátumok orientációeloszlásának kvantitatív meghatározására, így az orientációs vizsgálatok a projekt egyik lényeges feladatcsoportját képezték. Bár az orientációs analízis általános alapjait már korábban lefektették [A.9, A.10], egyszerű fémhordozós modellrendszereken részletesebb megalapozó vizsgálatokat végeztünk, elsősorban azért, mert a fém jelenléte – erős nemrezonáns SFG jelei következtében – megnehezítheti az orientációs információk megszerzését. A Langmuir-Blodgett technikával kialakított monorétegek nagyfokú rendezettségüknek köszönhetően kitűnő modellrendszereknek ígértek ezen vizsgálatok céljaira.

A kísérletek során üveg-, vas- és réz hordozón kialakított sztearoil-hidroxámsav és oktadecil-foszfonsav Langmuir-Blodgett monorétegek és önszerveződő rétegek szerkezetét tanulmányoztuk SFG mérések segítségével. Igazoltuk, hogy – a várakozásokkal összhangban – a Langmuir-Blodgett technika jól rendezett felületi monoréteget eredményez. A molekulák orientációs viszonyai a nemrezonáns háttértől mentes üveg hordozón könnyen meghatározhatók voltak. Az üveg és fém hordozón kapott SFG spektrumok összevetésével kimutattuk, hogy az *all-trans* konformációjú alkilcsoportok metil csoportjai fejcsoporttól és hordozótól függetlenül kb. $10\text{-}20^\circ$ -al dőlnek a felületi normálshoz képest. A fém hordozós rétegek kötésviszonyairól röntgen-fotoelektron-spektroszkópiával (XPS) szereztünk információt. A molekulák a deprotonált fejcsoportokon keresztül lépnek kölcsönhatásba a natív oxiddal borított fém felület hidroxilcsoportjaival.

Így a jól definiált szerkezetű LB rétegekkel végzett vizsgálatokkal sikerült fém felületen validálni az orientációs analízis eszköztárát.

Titán-dioxid rétegek kialakítása és felületkémiai tulajdonságai

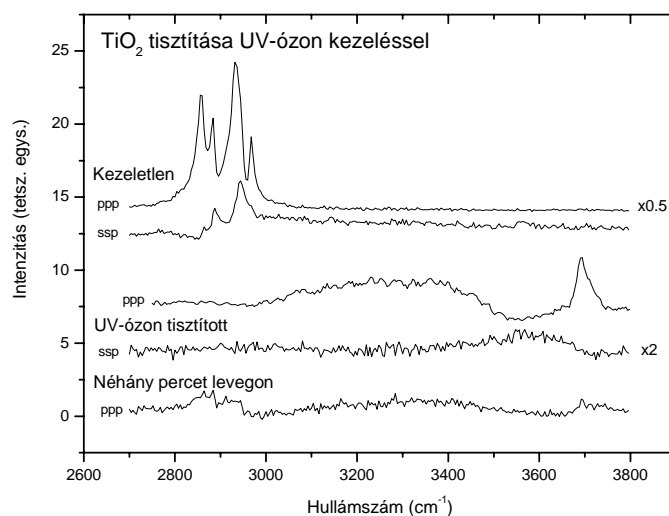
A projekt szempontjából szintén igen fontos volt a vizsgálandó Ti/TiO_2 hordozók létrehozásának, kezelésének technológiáját kialakítani, illetve a minták felületkémiai tulajdonságait meghatározni. Az összes, szobalevegőnek kitett felületen spontán kialakul egy néhány nanométeres, szénhidrogéneket és vízgőzt tartalmazó szennyező réteg, amelynek jelei megakadályozhatják az adszorbeátumok spektroszkópiai azonosítását. Így a vizsgálandó felületek megtisztítására külön

erőfeszítéseket kellett tennünk a jelen projektben is. A mintakezelés és tisztítás technológiáját megalapozó vizsgálatokhoz az SFG mellett az XPS módszert is kiterjedten használtuk.

Megállapítottuk, hogy stabilis, jól tapadó TiO_2 rétegeket hozhatunk létre SiO_2 hordozón vékonyréteg-technológiai eszközökkel (akár igen vékony Ti réteg termikus oxidálásával, akár TiO_2 bevonat közvetlen előállításával oxid párologtatásával). A minták fényszóródás és átlátszóság szempontjából megfelelőnek bizonyultak, így alkalmasak voltak a normál reflexiós geometriában végzett vizsgálatokra mind *ex situ*, mind pedig *in situ* körülmények között. Mivel az SFG méréshez szükséges, hogy a hangolható infravörös fénysugár lehetőleg minimális gyengüléssel érje el a vizsgálandó határfelületet, az *in situ* méréshez a TiO_2 réteget a hordozón keresztül kellett megvilágítanunk, ami infravörös minőségű kvarcüveg esetén biztosította a spektroszkópiai mérések lehetőségét a 2700 cm^{-1} -nél nagyobb hullámszámok tartományában. A kalcium-fluorid elvben szélesebb transzmissziós tartománnyal rendelkezik (1000 cm^{-1} fölött), de a rajta kialakított TiO_2 réteg tapadása nem bizonyult optimálisnak.

A TiO_2 felületek az SFG normál reflexiós geometria által biztosított érzékenységi határáig megtisztíthatóak voltak mind nedves kémiai módszerekkel (H_2O_2 vagy $\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$ oldatban maratás), mind pedig kisenergiás ionbombázással. XPS mérésekkel jelentős felületkémiai különbségeket találtunk azonban az eltérő módszerekkel tisztított minták között: a nedves kémiai módszerek gyakorlatilag hibamentes TiO_2 felületet eredményeztek, míg az ionbombázott felületen még a levegőn történő visszaoxidálódást követően is sok volt az oxigénhiányos hely.

A projekt későbbi szakaszában a teljes visszaverődés geometriájának megnövelt érzékenysége miatt újra foglalkoznunk kellett a felülettisztítás problémájával. Az SFG mérések során kiderült, hogy a korábban alkalmazott eljárások nem adnak teljesen kielégítő eredményt, így új tisztítási technológiát kellett kipróbálnunk. A feladatra a félvezető-technológiából származó ultrabolya-ózonos felületkezelés bizonyult a legalkalmasabbnak: rövid kezelési idő után rendkívül hidrophil felületet kaptunk, amelyen az XPS és SFG mérések egybehangzó tanúbizonysága szerint szénhidrogén szennyeződés csak nyomokban fordul elő.



1. ábra. Kvarcüveg prizmára párologtatott TiO_2 réteg megtisztítása ultrabolya-ózonos kezeléssel. A spektrumok a teljes visszaverődés geometriájában készültek.

Az 1. ábrán jól látható, hogy a kezeletlen mintán $2800\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ között intenzív sávokat adó szénhidrogén szennyeződés a kezelés során teljesen eltűnik a felületről, bár néhány perc levegőn való tárolás után megindul a visszaépülése. Legalább ennyire érdekes, hogy a megtisztított felületen O-H rezgések jelennek meg. A széles sáv $3100\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$ között hidrogénkötésben levő $-\text{OH}$ csoportoktól származik, míg az éles csúcs 3700 cm^{-1} -nél szabad (tehát hidrogénkötésben részt nem vevő) hidroxilcsoportokra jellemző. Mivel az UV-kezelés oxigén vakanciákat kelt a TiO_2 felületén, amelyek a légkörből adszorbeálódó vízzel reagálva felületi hidroxilcsoportokat eredményeznek [A.7], a felület

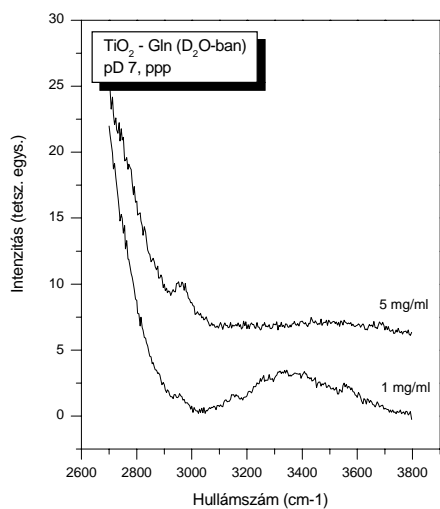
rendkívül hidrofíl. Az SFG adatok alapján azonban nem sikerült egyértelműen eldönteni, vajon a felületi hidroxilcsoportok vagy az adszorbeált és jól rendezett felületi vízréteg spektrumát látjuk-e.

Aminosavak kölcsönhatása hidrofíl titán-dioxiddal [B.6]

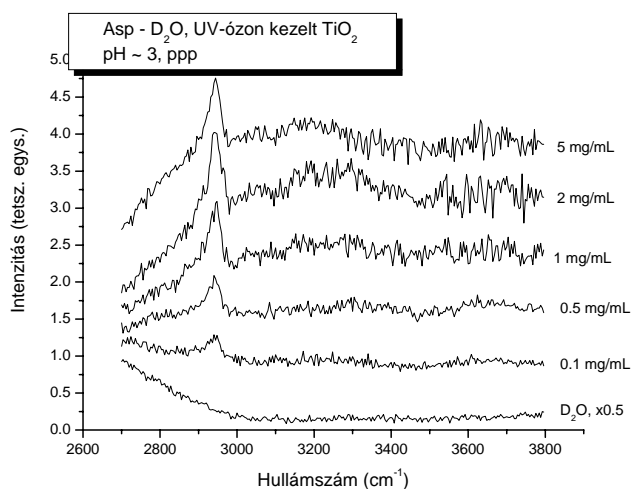
A titán-dioxid felületkezelési technológiájának birtokában elvégeztük aminosavak oldatból történő adszorpciójának *in situ* vizsgálatát a TiO_2 -oldat határfelületén. A teljes visszaverődés geometriájában kapott eredmények szerint az aminosavak többsége alig hat kölcsön a titán-dioxiddal. A 2. ábrán az amid oldalláncot tartalmazó glutaminra vonatkozó adatok láthatók. A kísérletet nehézvízben végeztük, hogy a normál víz erős O-H sávjai ne takarják el teljesen az aminosav eredetű jeleket. A C-H és O-H rezgések spektrális tartományát bemutató ábrán jól látható, hogy bár a nagyobb koncentráció mellett kapunk kis C-H jelet 2960 cm^{-1} közelében, a kisebb koncentrációnál ez a sáv gyakorlatilag eltűnik (a széles csúcs 3400 cm^{-1} tájékán a mintába került kis mennyiségű normál víz szennyezés következménye). Hasonló negatív eredményt kaphatunk szénhidrogén oldalláncú aminosavakkal (pl. fenilalanin) is.

Ha azonban savas oldalláncú aminosavakkal (aszparaginsav, glutaminsav) végezzük el az adszorpciókísérletet (3. ábra), kiderül, hogy a molekulák rendezett határfelületi adszorbeált réteget képeznek. Az ábrán látható, hogy viszonylag széles koncentráció-tartományban mérhetünk erős aminosav eredetű szénhidrogén jelet a határfelületen. A csúcs az aszparaginsav molekulák szimmetrikus metilén rezgéséhez rendelhető.

Az aszparaginsav karboxil rezgéseinek asszignációja és analízise azt mutatja, hogy a molekulák mindkét karboxil csoportja a TiO_2 felülethez koordinálódik. Míg az egyikük monodentális módon közvetlenül kötődik egy felületi Ti ionhoz, a másikat valószínűleg hidrogénkötés stabilizálja. A metilén csoport SFG jele alapján arra következtethetünk, hogy a csoport szimmetriatengelye nagyjából párhuzamos a felület normálisával, ami jó összhangban van a karboxil csoportokon át megvalósuló kötődés feltételezésével.



2. ábra. A TiO_2 -nehésvizes glutamin oldat határfelület SFG spektrumai. A kis hullámszámok felé növekvő alapjel a nehézvíz O-D rezgéseinek tulajdonítható.



3. ábra. A TiO_2 -nehésvizes aszparaginsav oldat határfelületének SFG spektrumai az aminosav-koncentráció függvényében.

Glutaminsav esetében nagyon hasonló viselkedést tapasztaltunk. Az eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy a savas oldallánc a rendezett aminosav-réteg kialakulásának előfeltétele a TiO_2 -oldat határfelületén. Megfigyelésünk egyben azt is valószínűsíti, hogy a nagyszámú savas aminosavat tartalmazó peptidek különösen erősen adszorbeálódnak titán-dioxidon, és jó összhangban van az aszparaginsav tartalmú aszpartám gyors és erős adszorpciójára vonatkozó tapasztalatunkkal.

Aminosavak adszorpciója egyéb hidrofil felületeken [B.3]

Kísérleti technikánk azt is lehetővé tette, hogy különböző UV-ózonos kezeléssel hidrofilizált hordozófelületeken összehasonlíthassuk az aminosavak adszorpcióját.

A gondosan megtisztított SiO₂ prizmán végzett *in situ* adszorpciós vizsgálatok következetesen negatív eredményt adtak, ami alapján meg kellett állapítanunk, hogy a kvarcüveg-aminosav oldat határfelületen nem alakul ki rendezett adszorbeált réteg. Ugyanakkor igazoltuk, hogy a kvarcüveg felülettel érintkező aminosavak az oldószer eltávozása után kisméretű, változatos orientációjú kristálykákba rendeződnek. A folyamat (a nemcentroszimmetrikus kristálykákhoz rendelhető tömbi SFG jel időbeli változása alapján) néhányszor tíz perc leforgása alatt lejátsszódik.

A CaF₂-aszparaginsav oldat határfelület SFG vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy már *in situ* körülmények között, az oldódási határnál lényegesen hígabb oldatból is kialakulnak kisméretű kristálykák, amelyek jelenlétéről erős tömbi jelek árulkodnak.

TiO₂-n ugyanakkor, mint azt már fentebb leírtuk, a savas aminosavak rendezett adszorbeált réteget alkotnak. A réteg szerkezete gyakorlatilag változatlan marad az aminosav oldatból való eltávolítás és szárítás után is. Semleges vagy szénhidrogén oldalláncú aminosavak esetében azonban nem tapasztalhatunk számottevő adszorpciót, sem krisztallitok kialakulását.

Proteinek orientációs és konformációs viszonyainak meghatározása [B.4, B.5]

Bár a projekt legérdekesebb eredményei a korábban részletezett okok miatt aminosav-adszorpciós folyamatok kapcsán születtek, a TiO₂-nél könnyebben kezelhető felületeken végeztünk protein-adszorpcióval kapcsolatos vizsgálatokat is.

Először egy elvi jellegű munkában [B.4] összehasonlítottuk a lineáris optikai spektroszkópiák (infravörös, Raman), az összegfrekvencia-keltési spektroszkópia, illetőleg a magasabb rendű nemlineáris optikai spektroszkópiái módszerek által szolgáltatott orientációs információt. Megállapítottuk, hogy a különböző módszerek különböző, egymást kiegészítő adatokat nyújtanak, amelyek megfeleltethetők az orientációeloszlási függvény momentumainak. Ennek alapján eljárást adtunk az eloszlásfüggvény rekonstruálására a maximális entrópia módszer segítségével. Eljárásunk használatosságát gyakorlati példákon keresztül illusztráltuk.

Egy másik munkában a véralvadási kaszkádban szerepet játszó Faktor XII elnevezésű protein adszorpcióját vizsgáltuk polisztirol-protein oldat határfelületen [B.5]. Biológiai kísérletekből korábban is ismeretes volt, hogy a Faktor XII negatív töltésű felületeken adszorbeálódik és aktiválódik, de az aktiválódást kísérő molekulaszervezeti változásokról nem állt rendelkezésre sok információ.

A jelen kísérletsorozatban a negatívan töltött felületet polisztirol szulfonálásával hoztuk létre. Az adszorbeált molekulák orientációs és konformációs viszonyait infravörös spektroszkópiával és SFG-vel, az adszorbeált mennyiséget kvarckristály mikromérleggel határoztuk meg.

Megállapítottuk, hogy a határfelületen adszorbeált protein mennyisége nem függ a felületi töltések sűrűségétől, amit a szulfonálás szintjével szabályozhatunk. Az infravörös mérések szerint az adszorbeátumok konformációja sem volt érzékeny a felületi töltésmennyiségre, a teljes visszaverődés geometriájában felvett SFG spektrumok mégis lényeges változásokat mutattak a töltés függvényében az amid sávok tartományában. A kísérleti adatok értelmezése azt mutatta, hogy növekvő töltéssűrűség mellett egyre rendezettebbé válik az adszorbeált réteg szerkezete, és a molekulák egyre inkább olyan orientációt vesznek fel, amelyben könnyen aktiválhatók, miközben másodlagos szerkezetüket lényegében megőrzik.

A kutatási téma további lehetséges irányai

A projekt legfontosabb, világviszonylatban is újdonságnak számító eredménye, hogy az összegfrekvencia-keltési spektroszkópia, mint ilyen célra korábban nem alkalmazott felületspektroszkópiái technika segítségével meghatároztuk egyes aminosavak adszorpciós viselkedését több, biológiai szempontból potenciálisan jelentős szilárd-folyadék határfelületen. A munka során lényeges információkat szereztünk a titán-dioxidon kialakuló aszparaginsav adszorbeátumok orientációs és kötésviszonyairól. Nyilvánvaló azonban, hogy adósak maradtunk a kötésviszonyok koncentráció- és pH-függő változásainak feltárásával, aminek jórészt technikai okai (a TiO₂ vékonyréteg gyenge tapadása CaF₂-hoz) voltak. Az eredmények összevetése a glutaminsavval

elvégzett hasonló vizsgálatok során nyert adatokkal szintén érdekes következtetések levonására adhat alkalmat.

Nagyon lényegesnek tartjuk, hogy a projekt során kidolgoztuk a TiO₂-folyadék határfelületek *in situ* SFG vizsgálatának metodikáját. A szerzett tapasztalatok számtalan későbbi kutatásban lehetnek felhasználhatók, feltételezve, hogy sikerül megoldani a CaF₂ és a TiO₂ közti adhézió problémáját.

A teljes visszaverődés geometriájában elvégzett SFG mérések teljesítőképességének korlátain belül tanulmányozhatjuk például különböző proteinek kölcsönhatását a felülettel, közelítve ezzel a projekt eredeti célkitűzéseire. Részletesen megvizsgálhatjuk különböző önszerveződő rétegek kialakulásának lépéseit éppúgy, mint a szilárd-oldat határfelületen adszorbeálódott molekulák átalakulásait, reakcióit. Ez utóbbi folyamatok tanulmányozása kapcsán a TiO₂ felület megfelelő módosításával modellszintű információkat szerezhethetünk a szilárd-oldat határfelületen végbemenő heterogén katalitikus reakciókról, ami lehetőséget nyújthat egy kevésbé ismert, de gyakorlati szempontból rendkívül jelentős katalitikus rendszer jobb megismerésére.

A költségtervtől való eltérések

A kutatás folyamán két alkalommal került sor a költségtervtől való lényegesebb eltérésre.

Miután Laboratóriumunk nem sokkal a szerződés megkötése előtt, 2002 elején kezdett működni, a projekt kezdetén még nem állt rendelkezésre minden felszerelés, ami a mindennapos munkához szükséges. Bár arra számítottunk, hogy ezeket az eszközbeszerzéseket más forrásból tudjuk finanszírozni, az analitikai mérleg esetében ez kivitelezhetetlennek bizonyult. Így a mérleget jelen projekt terhére vettük meg, miután a terven felüli eszközbeszerzéshez megkaptuk az OTKA Iroda engedélyét (KO-3845/2005).

A kutatómunka végére nyilvánvalóvá vált, hogy mivel a futamidő alatt a tervezettnél kevesebb külföldi útra került sor, a Konferencia részvétel és a Napidíj költségvetési sorokon jelentősebb maradványösszeg keletkezett. Ugyanakkor SFG spektrométerünk további üzemben tartásához elkerülhetetlenné vált egy AgGaS₂ nemlineáris optikai kristály beszerzése, amit az OTKA Iroda engedélyének (KO-16893/2007) birtokában részben a projekt maradványösszegéből finanszíroztunk.

Köszönetnyilvánítás

E helyen szeretnénk köszönetet mondani az OTKA támogatásáért, amellyel hozzájárult az összegfrekvencia-keltési spektroszkópia magyarországi bevezetéséhez.

Irodalom

A.) A jelentésben hivatkozott irodalom

- [A.1] Z. Pászti, J. Wang, M. L. Clarke, Z. Chen, J. Phys. Chem. B 108 (2004) 7779
- [A.2] M. R. Watry, G. L. Richmond, J. Phys. Chem. B 106 (2002) 12517
- [A.3] N. Ji, Y.-R. Shen, J. Chem. Phys. 120 (2004) 7107
- [A.4] J. Kim, K. C. Chou, G. A. Somorjai, J. Phys. Chem B 106 (2002) 9198
- [A.5] J. Wang, M.A. Even, X. Chen, A.H. Schmaier, J.H. Waite, Z. Chen, J. Am. Chem. Soc. 125 (2005) 9914
- [A.6] M.L. Clarke, J. Wang, Z. Chen, J. Phys. Chem. B 109 (2005) 22027
- [A.7] C.-Y. Wang, H. Groenzin, M. J. Shultz, Langmuir 19 (2003) 7330
- [A.8] J. R. Vig, in: W. Kern (ed.): Handbook of Semiconductor Wafer Cleaning Technology, Ch. 6., Noyes Publications, Westwood (NJ) (1993)
- [A.9] X. Zhuang, P. B. Miranda, D. Kim, Y. R. Shen, Phys. Rev. B 59 (1999) 12632
- [A.10] A. G. Lambert, P. B. Davies, D. J. Neivandt, Appl. Spectrosc. Rev. 40 (2005) 103

B.) A projekt eredményeit bemutató publikációk

- [B.1] Keszthelyi T., Pászti Z., Rigó T., Hakkel O., Telegdi J., Guzzi L., *Magy. Kém. Foly.* 111 (2005) 70
- [B.2] T. Keszthelyi, Z. Pászti, T. Rigó, O. Hakkel, J. Telegdi, L. Guzzi, *J. Phys. Chem. B* 110 (2006) 8701
- [B.3] Z. Pászti, T. Keszthelyi, O. Hakkel, L. Guzzi, *J. Phys.: Condens. Matter* nyomdában (2008)
- [B.4] J. Wang, Z. Pászti, M.L. Clarke, X. Chen, Z. Chen, *J. Phys. Chem. B* 111 (2007) 6088
- [B.5] X. Chen, J. Wang, Z. Pászti, F. Wang, J.N. Schrauben, V. Tarabara, A. Schmaier, Z. Chen, *Anal. Bioanal. Chem.* 388 (2007) 65
- [B.6] Z. Pászti, L. Guzzi, *Vib. Spectrosc.* (közlésre benyújtva)