

**Cu(II)–bisz(imidazolil)-származékok redoxi sajátosságainak és SOD
aktivitásának vizsgálata**

Készítette: Csire Gizella
II. Vegyész MSc

Témavezető: Dr. Várnagy Katalin
egyetemi docens

Debreceni Egyetem
Természettudományi és Technológiai Kar
Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék
2012

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	1
2. Irodalmi áttekintés	2
2.1. Bisz(imidazol-2-il)-metil-csoportot tartalmazó ligandumok komplexkémiai viselkedése	2
2.2. Cu(II)-komplexek redoxi sajátosságainak vizsgálata.....	6
2.3. Cu,Zn-SOD enzim és SOD modell Cu(II)-komplexek.....	10
3. Kísérleti körülmények	13
3.1. pH-potenciometria elvi alapjai	13
3.1.1. pH-potenciometria gyakorlati megvalósítása.....	15
3.2. Ciklikus voltammetria	16
3.2.1. A módszer elméleti háttere.....	16
3.2.2. A ciklikus voltammetriában használt elektródtípusok	18
3.2.3. Méréskor lejátszódó folyamatok	20
3.2.4. A görbék információtartalma és értékelése	21
3.2.5. A módszer lehetséges felhasználási területei	22
3.2.6. Ciklikus voltammetria gyakorlati megvalósítása	22
3.3. SOD enzim aktivitás mérése	22
4. Kísérleti eredmények és kiértékelésük	24
4.1. Potenciometriás adatok értékelése	24
4.2. CV görbe paramétereinek értékelése.....	29
4.3. SOD aktivitás mérésének az értékelése.....	33
5. Összefoglalás	42
6. Summary	43
7. Irodalomjegyzék	44

1. Bevezetés

Az imidazol az egyik legfontosabb heterociklusos aromás vegyület. Összegképlete $C_3H_4N_2$, molekulaformája planáris öttagú gyűrű, kristályszerkezete monoklin.

Ismert, hogy a metalloenzimekben a hisztidin imidazolgyűrűi nagyon gyakran a fémionok kötődési helyei. Például a szénsavanhidrázban három imidazolgyűrűhöz és egy karboxilát-anionhoz Zn(II)-ion kötődik, míg a plasztocianinban Cu(II)-ion kapcsolódik két imidazolgyűrűhöz és két kénatomhoz, a Cu,Zn-szuperoxid-diszmutáz (Cu,Zn-SOD) enzimen mind a Cu(II)-, mind a Zn(II)-ion imidazolgyűrűhöz koordinálódik, és az aktív centrumban lévő fémionokat egy imidazoláto-híd köti össze. Ezen enzimek aktív centrumában a peptidláncok háromdimenziós szerkezete az imidazolcsoportokat olyan közeli helyzetbe hozza, hogy ugyanahhoz a fémionhoz tudnak kötődni. Így ezen enzimeknek jó modelljei lehetnek azok az egyszerű imidazolszármazékok, amelyekben két imidazolcsoport alifás hídon keresztül kapcsolódik össze. Ilyenek például: bisz(imidazol-2-il)-metán (BIM), bisz(imidazol-2-il)-metil-amin (BIMA), 3[bisz(imidazol-2-il)]-propionsav (BIP) és egyéb aminosavláncokat tartalmazó származékok.

A legegyszerűbb bisz(imidazolil)-származékok (BIMA, BIM és BIP) mellett számos bisz(imidazolil)-csoportot tartalmazó aminosav és peptidszármazék átmenetifém ionokkal (Cu(II), Zn(II), Ni(II) és Co(II)) való komplexképződését tanulmányozták.¹⁻³ Az eredmények azt tükrözik, hogy a vizsgált fémionok az imidazolnitogénekhez koordinálódva hattagú kelátgyűrűn keresztül stabilis mono- és biszkomplexekeket képeznek, tehát a bisz(imidazol-2-il)-metil-csoport (továbbiakban bisz(imidazolil)-csoport) alkalmas ezen fémionok megkötésére. Emellett egyes aminosav- (pl. His-BIMA), illetve dipeptid származékok esetén fiziológiás és lúgos pH tartományban imidazoláto-hidat tartalmazó többmagvú komplexek keletkezését is kimutatták.

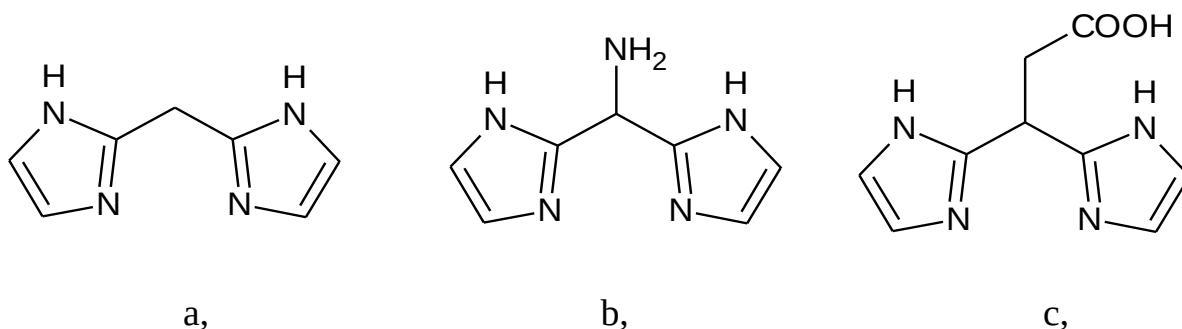
Számos Cu(II)-ionot tartalmazó metalloenzim, metalloprotein, így például a SOD enzim is redoxi folyamatokat katalizál az élő szervezetben, melyben Cu(II)/Cu(I) átalakulás valósul meg. Így annak az eldöntésére, hogy a bisz(imidazolil)-csoportot tartalmazó ligandumok Cu(II)-komplexei alkalmasak-e a SOD enzim modellezésére, a keletkező komplexek redoxi paramétereinek és SOD aktivitásának vizsgálata megfelelő információkat adhat.

Célkitűzés: Néhány bisz(imidazolil)-származékok elektrokémiai (BIMA, His-BIMA, β -Ala-BIMA, BIP) és SOD aktivitásának (His-BIMA, β -Ala-BIMA, Gly-BIMA) vizsgálata.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Bisz(imidazol-2-il)-metil-csoportot tartalmazó ligandumok komplexkéimiai viselkedése

Az egyszerű bisz(imidazolil)-származékok, mint a bisz(imidazol-2-il)-metán (BIM), bisz(imidazol-2-il)-metil-amin (BIMA) és bisz(imidazol-2-il)-propionsav (BIP) (1. ábra) vizsgálata¹⁻² során kapott eredményekből azt a következtetést vonhatták le, hogy a teljes pH-tartományban bekövetkezik a fémionok koordinálódása az imidazolgyűrűn. Stabilis mono- és biszkomplexek képződnek, melyekben az imidazolgyűrűk ekvatoriálisan helyezkednek el, 2 illetve 4 imidazolnitrogén donoratom koordinációján keresztül [2N ill. 4N koordináció] (2. ábra). A második ligandum belépése valamennyi esetben gátolt. Ezen felül az is kiderült, hogy az oldalláncok megjelenése hatással van a komplexképződésre.

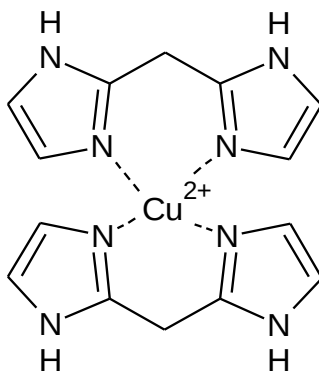


1. ábra: A legegyszerűbb bisz(imidazolil)-származékok szerkezeti képlete

a, bisz(imidazol-2-il)-metán (BIM)

b, bisz(imidazol-2-il)-metil-amin (BIMA)

c, 3[bisz(imidazol-2-il)]-propionsav (BIP)

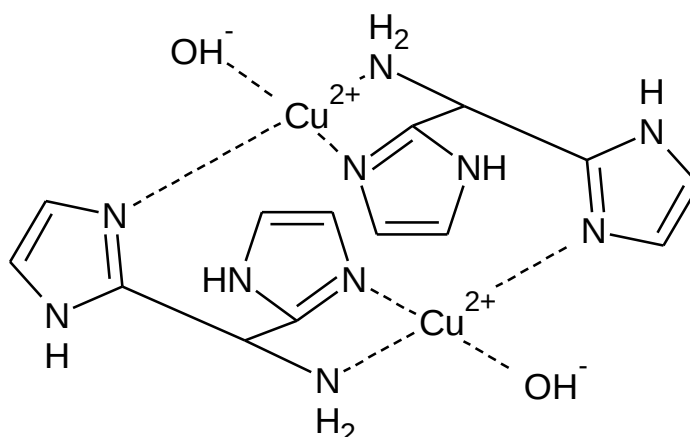


2. ábra: Cu(II)–BIM rendszerben kialakuló 4N koordináció

BIP esetén a karboxilcsoport jelenléte különböző protonált részecskék ($[\text{MAH}]^{3+}$, $[\text{MA}_2\text{H}_2]^{4+}$, $[\text{MA}_2\text{H}]^{3+}$) keletkezését eredményezi. Nagyobb pH-n a karboxilát gyenge axiális koordinációt alakít ki a fémionnal.

A ligandum szabad aminocsoportja is jelentősen befolyásolja a koordinációt a BIMA esetén. Savas tartományban a két imidazolgyűrű vesz részt a koordinációban, de a pH emelésével bekövetkezik a protonált aminocsoport deprotonálódása és így ez a csoport ekvatoriális helyzetben koordinálódhat. Cu(II)–BIMA rendszer ekvimoláris oldatában semleges pH-n ez a koordináció valósul meg: egy kétmagvú $[\text{M}_2\text{A}_2\text{H}_2]^{2+}$ összetételű komplex keletkezik, amelyben a fémionhoz egy amino-, egy imidazolnitrogén, egy hidroxidion és a híd szerepét betöltő másik ligandum imidazolnitrogénje koordinálódik (3. ábra).

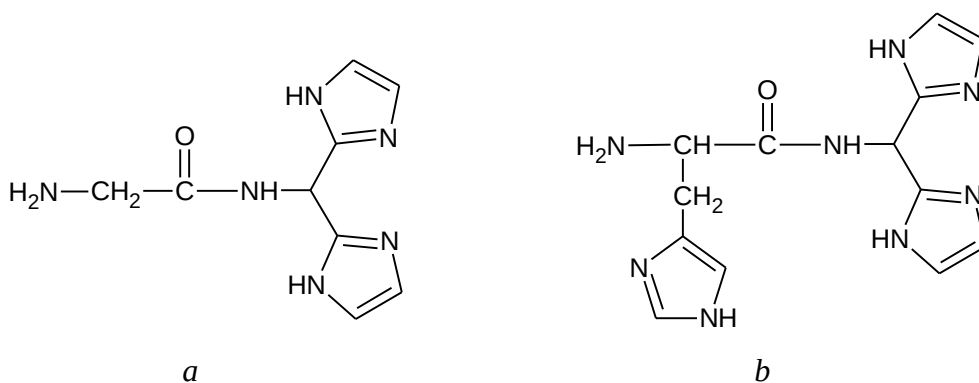
Ligandumfelesleg esetén biszkomplexek képződnek, így a második imidazolgyűrű kizorul az ekvatoriális helyzetből és csak gyenge axiális koordinációt tud kialakítani a fémionnal.



3. ábra: A Cu(II)–BIMA rendszerben az aminocsoport deprotonálódása után kialakuló $[\text{Cu}_2\text{A}_2(\text{OH})_2]^{2+}$ dimer szerkezete

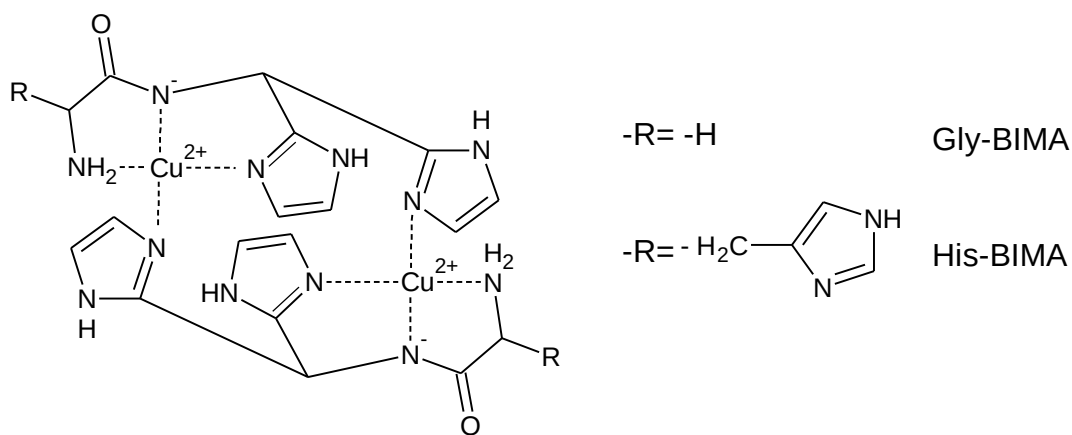
A BIMA aminocsoportja lehetővé tette, hogy ezen keresztül amidkötéssel aminosavat vagy peptidláncot kapcsoljanak a bisz(imidazolil)-csoporthoz. Így számos, különböző aminosav-, dipeptid- és tripeptid-származékot állítottak elő, amelyek lehetőséget adtak annak vizsgálatára, hogy a kapcsolódó aminosavak szabad aminocsoportja, illetve a különböző oldalláncbéli donorcsoportok hogyan befolyásolják a kialakuló komplexek szerkezetét, stabilitását.

Ezen aminosav-származékok közül a legegyszerűbb a N-glicil-bisz(imidazol-2-il)-metil-amin (Gly-BIMA), és az általunk vizsgált hisztidil-bisz(imidazol-2-il)-metil-amin (His-BIMA) szerkezete a 4/a-b. ábrán látható.



4. ábra: A Gly-BIMA (a) és a His-BIMA (b) szerkezete

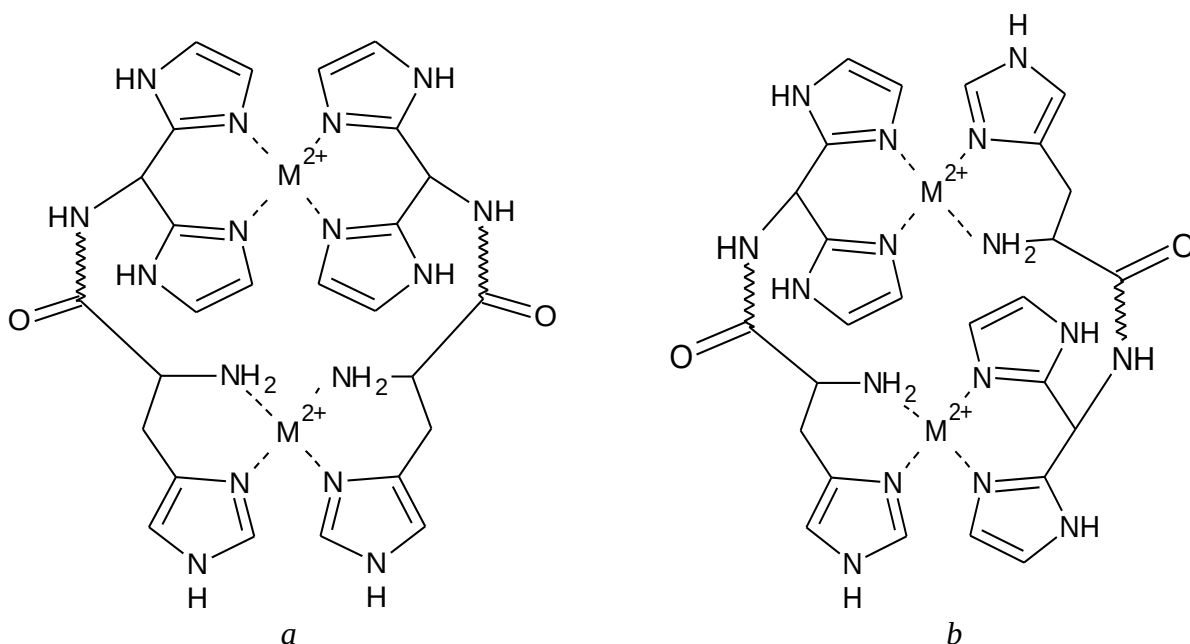
Cu(II)-ionnal történő vizsgálatok során megállapították, hogy savas pH-tartományban ($\text{pH} < 5$) ugyanazon koordináció alakul ki, mint az alapvegyületeknél, míg az aminos csoport protonált. A pH emelésével azonban az aminos csoport deprotonálódik és ezzel párhuzamosan az amid csoport is, ami peptidszerű ($[\text{N}(\text{amino}), \text{N}(\text{amid}), \text{N}(\text{imidazol})]$), a továbbiakban (NH_2 , N^- , $\text{N}(\text{Im})$) koordinációt tesz lehetővé. A fémion további szabad koordinációs helyei által lehetőség adódik kétmagvú komplexek kialakulására imidazol-hídon keresztül, $[\text{M}_2\text{A}_2\text{H}_{-2}]^{2+}$ komplex képződése közben (5. ábra). $\text{pH} > 8$ esetén extra lúgfogyasztó folyamat tapasztalható, amely vegyes hidroxokomplex, az $[\text{MAH}_{-2}]$ keletkezésével értelmezhető.³⁻⁴



5. ábra: A Cu(II)–Gly-BIMA rendszerben képződő $[\text{M}_2\text{A}_2\text{H}_{-2}]^{2+}$ összetételű komplex szerkezete

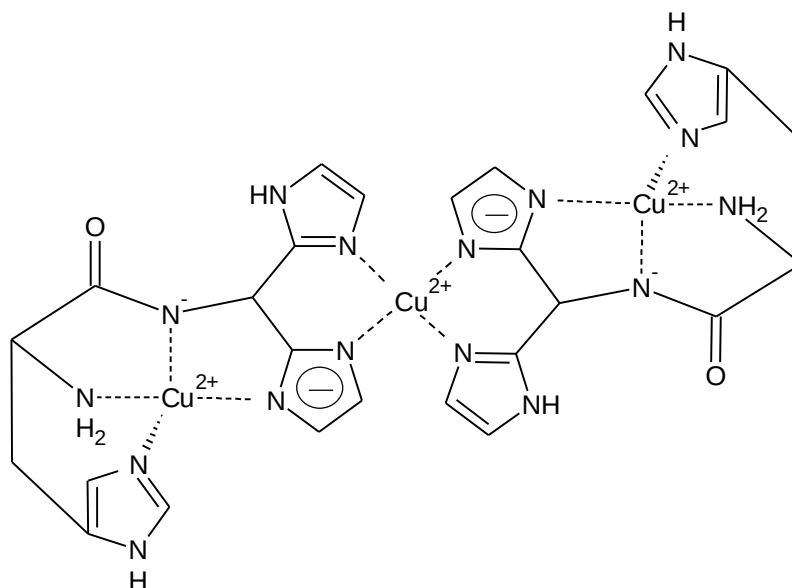
His-BIMA ligandum fő fémionmegkötőhelye savas pH-tartományban a két aromás gyűrű (a bisz(imidazolil)-csoport), mely hattagú kelátot képezve koordinálódik. Savas pH-n hisztaminszerű koordináció kialakulására is lehetőség van az N-terminális amino és imidazol részvételével. A kétféle koordinációs mód együttes jelenléte lehetővé teszi fémfelesleg esetén kétmagvú komplex, 1:1 fémion:ligandum aránynál pedig szimmetrikus vagy aszimmetrikus ligandumhidas dimerek kialakulását (6/a–b. ábra). A Gly-BIMA-hoz képest nagyobb pH-n

alakul ki a dipeptidszerű (NH_2 , N^- , $\text{N}(\text{Im})$) koordináció – főleg ligandumfelesleg esetén – a nagy stabilitású biszkomplexek jelenléte miatt. Dimer szerkezetek alakulnak ki His-BIMA ligandummal semleges pH-n is. A hidcsoport mindkét esetben a bisz(imidazolil)-rész szabad imidazolcsoportja $[\text{Cu}_2\text{A}_2\text{H}_2]^{2+}$ (5. ábra), és nem a hisztidin-imidazolgyűrű. A Cu(II)–His-BIMA rendszerben a semleges pH-n képződő dimerben (5. ábra) a hisztidin-imidazolgyűrűjének axiális koordinációja megakadályozza a hidrolízist lúgos tartományban is, így itt végbemegy a dimer imidazolcsoportján a pirrol-típusú N(1)H nitrogének deprotonálódása. Ez a folyamat 8,5-ös pK-értékkel jellemezhető.



6/a–b. ábra: Szimmetrikus (a) és aszimmetrikus (b) ligandumhidas dimerek a His-BIMA esetén

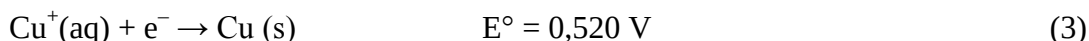
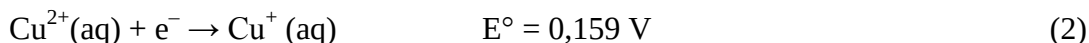
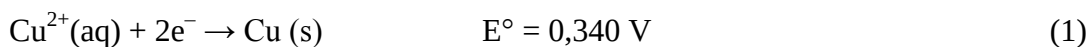
His-BIMA esetében 3:2 Cu(II):ligandum arányú komplex is kialakul, melyben szintén deprotonálódott a ligandumok egy-egy pirrol-típusú nitrogénje, és egy négy aromás nitrogén által koordinált réz(II)ion hídként köt össze két ligandumot $[\text{Cu}_3\text{A}_2\text{H}_4]^{2+}$ (7. ábra). Ez a szerkezet már 5,5-ös, azaz fiziológiás pH-n kialakul. 3:2 fémion/ligandum aránynál széles pH-tartományban uralkodó ez a hárommagvú komplex.⁵ Ez a ligandum jó modellje lehet a Cu,Zn-SOD enzim aktív centrumának.



7. ábra: A Cu(II)–His-BIMA rendszerben képződő $[Cu_3A_2H_4]^{2+}$ összetételű komplex szerkezete

2.2. Cu(II)-komplexek redoxi sajátságainak vizsgálata

A Cu(II)-ionok elemi rézzé, illetve Cu(I)-ionná alakulását és a Cu(I)-ion elemi rézzé történő redukcióját a következő redoxipotenciál értékek jellemzik vizes közegben⁶:



A Cu,Zn-szuperoxid-diszmutáz enzim működésekor Cu(II)/Cu(I) redoxireakció valósul meg, mely egy elektron-átmenettel jár, és az oda- és visszaalakulás is megtörténik. Ahhoz, hogy ezt az enzimet modellezni tudjuk, ismernünk kell, mind a rézre mind pedig a Cu(II)-ligandum rendszerben kialakuló komplexekre jellemző formálpotenciál értékeket. A komplexképződés megváltoztatja a fenti egyenletekben szereplő redoxipotenciál értékeket. A Cu(II)/Cu(I) rendszer redoxipotenciál értékeit nagymértékben a Cu(II)-komplexek koordinációs módja változtatja meg. A Cu(II)-ion komplex vegyületeiben a leggyakoribb koordinációs szám a 4, 5 és 6, de szabályos geometriák csak ritkán fordulnak elő, a legjellemzőbb a tetragonálisan torzult oktaédes szerkezet. A Cu(I)-ion ezzel ellentétben viszont tetraédes, síkháromszöges vagy lineáris szerkezetű lehet, a koordinációs szám értékétől függően.⁷ Ciklikus voltammetriás mérés során a Cu(II)-iont a komplexben Cu(I)-ionná redukáljuk, majd azt visszaoxidáljuk Cu(II)-ionná, eközben megváltozik a sztereokémiája a komplexnek az oldatban. Ennek eredményeképpen többnyire kvázireverzibilis redoxi folyamat megy végbe, a

katódos és az anódos csúcsok szeparációja nagyobb, mint ami az egyelektronos redoxi folyamatok esetén várható.

Már korábban is vizsgálták a különböző ligandumok által létrehozott Cu(II)-komplexek redoxi sajátságait. Vizsgáltak egyszerű ligandumok, mint a piridin és az imidazol, illetve aminosavak és hisztidint tartalmazó oligopeptidek Cu(II)-ionnal alkotott komplexeit. Az 1. táblázat tartalmazza az egyes rendszerekre jellemző redoxipotenciál értékeket.

1. táblázat: Különböző típusú ligandumok Cu(II)-komplexeinek redoxipotenciál értékei^a (NHE = normál hidrogén elektród, SCE = telített kalomel elektród)

ligandum	redoxipotenciál érték (V)	vonatkoztatási elektród
piridin ⁸	0,240	NHE
Imidazol ⁸	0,317	NHE
Hisztidin ⁸	–0,170	NHE
ciklo(GH) ₄ ⁹	0,195	NHE
ciklo(GHG) ₂ ⁹	0,219	NHE
GH, GHG, GHK, GGH ^{10,11}	–0,220–(–0,120)	SCE
Ac-HGGG-NH ₂ ¹²	–0,299–(–0,270)	NHE
Ac-(PHGGGWGQ) _n -NH ₂ ahol n=1,2,4 ^{12,13}	–0,530–(–0,299)	NHE
Ac-GGGTH-NH ₂ ¹⁵	0,040	Ag/AgCl
N-Ac-His ¹⁷	0,338	NHE
N-Ac-Hm ¹⁷	0,293	NHE
Ac-HXH-NHMe, Ac- HXXH-NH ₂ , Ac-HHGH- NHMe, Ac-HHVGDNH ₂ , Ac-HXHZH-NH ₂ , Ac- S3H4-NH ₂ ^{b 17}	0,200-0,350	NHE

^a: a nagybetűk az egyes aminosavakat jelentik, úgymint G: glicin, H: hisztidin, K: lizin, P: prolin, Q: glutamin, T: treonin, W: triptofán. Ac az acetyl csoportot jelöli, amivel védik a peptidek N-terminális aminocsoportját.

^b X,Z lehet G: glicin, V: valin, A: alanin, P: prolin, S: szarkozin. Me a metilcsoportot jelöli.

A piridin és imidazol egyszerű ligandumok aromás nitrogéneket tartalmaznak, és azon keresztül kapcsolódnak a fémionhoz monodentát módon a Cu(II)-komplex kialakulásakor. Könnyen redukálható a Cu(II)-ion, mely átalakulás egy elektron-átmenettel jár és pozitív redoxipotenciál jellemzi a folyamatot. A hisztidin esetében negatívabb formálpotenciál értéket mértek, ez arra utal, hogy stabilisabb komplex keletkezik (háromfogú koordináció is megvalósulhat), melyben a fémion az imidazolnitrogéneken kívül az aminocsoporthoz is koordinálódik.⁸

Szintén pozitív redoxipotenciál értékeket mértek hisztidint tartalmazó ciklopeptidek Cu(II)-komplexeinek vizsgálata során. Az 1. táblázatban feltüntetett ciklopeptid ligandumok Cu(II)-komplexei egy elektron-átmenettel járó kvázireverzibilis redoxi reakcióban vesznek részt, a ciklikus voltammetriás mérésből adódó anódos és katódos csúcs távolsága nagyobbak adódnak, mint 0,059 V. A legnagyobb pozitív redoxipotenciál értéket a $[\text{Cu}\{\text{ciklo}(\text{Gly-His})_4\}]^{2+}$ komplexre kapták a vizsgálatok során, amelyben a fémion az imidazolnitrogéneken keresztül koordinálódik. Ahol az amidnitrogén is deprotonálódik a folyamat során, ott kisebb értéket mértek.⁹

Nem védett és védett peptid származékok Cu(II)-komplexeit is vizsgálták (1. táblázat), amelyek tartalmaznak legalább egy hisztidint. Számos esetben amidnitrogénes koordinációjú Cu(II)-komplexeiket vizsgálták. A hisztidintartalmú ligandumok esetében az amidnitrogének deprotonálódása következtében kialakuló komplexek fémcentrumba nehezebben redukálható, vagyis negatívabb redoxipotenciál értékek mérhetőek.

Így negatív redoxipotenciál érték jellemzi az egy hisztidint tartalmazó GGH, illetve Ac-HGGH-NH₂ fiziológiás, illetve enyhén lúgos tartományban képződő komplexeit, valamint a prion fehérje fémmegkötéséért felelős szekvenciák, az Ac-PHGGGWGQ-NH₂ és Ac-(PHGGGWGQ)₂-NH₂ komplexeit is.¹⁰⁻¹²

A negatív redoxipotenciál érték azzal magyarázható, hogy a koordinációs szférában helyet foglaló amidnitrogének erősítik az ekvatoriális teret, ami a Cu(I)-ionnak nem kedvez. A két oktapeptid egységet tartalmazó Ac-(PHGGGWGQ)₂-NH₂ ligandum esetében az egy és két Cu(II)-iont is tartalmazó komplexre $\sim -0,450$ V redoxipotenciál értéket kaptak.¹⁴ A prion fehérjében az ötödik Cu(II)-ion megkötésében a GGGTH szekvencia játszik szerepet.¹⁵ A 6,7-es pH-értéken kialakuló $[\text{CuAH}_2]$ komplexhez tartozó redoxi folyamatot tanulmányozták, ami egyelektronos, kvázireverzibilis redoxireakció. A kapott redoxipotenciál érték sokkal pozitívabb, mint ami az eddig mért hisztidintartalmú peptideket jellemzi.

Kutatócsoportunkban is végeztek ciklikus voltammetriás méréseket, aminosavak egyszerű hisztidinszármazékok és védett multihisztidin peptidek Cu(II)-komplexeinek vizsgálatára (1. táblázat) .

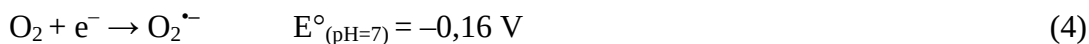
Az aminosavak esetén a $[CuA_2]$ komplexek redoxipotenciál értékei mind 0 V körüliek, az megállapítható ebből, hogy nincs jelentős hatása az oldalláncnak ezekre az értékekre. A legnagyobb hatása az imidazol oldalláncnak van, hisztidin esetében a kapott érték $\sim -0,2$ V körüli, amely azt mutatta, hogy stabilisabb lesz a kialakuló komplex a többihez képest. Az egyszerű hisztidinszármazékok $[CuA_2]$ komplexeiben a ligandum egyfogú koordinációval kötődik a fémionhoz egy imidazolnitrogénen keresztül. Ciklikus voltammetriás mérése során pozitív redoxipotenciál értékeket kaptak. Ez azt mutatja, hogy a fémcentrum könnyen oxidálható és redukálható.¹⁶

Olyan multihisztidin tartalmú peptidek Cu(II)-komplexeit is vizsgálták, amelyben a fémcentrum csak imidazolnitrogénen keresztül koordinálódik. A lejátszódó reakció ebben az esetben is egyelektronos, kvázireverzibilis, mint a korábban említett komplexeknél. Az anódos és katódos csúcsok közötti távolságok pedig nagyobbak adódnak, mint 0,059 V. Ez azzal magyarázható, hogy az elektród felületén lassú elektrontranszfer folyamat megy végbe. A két hisztidint tartalmazó ligandumok esetében $[CuA]$ és $[CuA_2]$ komplexek alakulnak ki enyhén savas és semleges pH-tartományban. A $[CuA]$ komplexekben kettő, míg a $[CuA_2]$ komplexekben négy imidazolnitrogénen keresztül valósul meg a fémion koordinációja. A kettőnél több hisztidint tartalmazó ligandumok a Cu(II)-ionnal 1:1 arányú komplexeket hoznak létre. Az uralkodó részecske az 5-7-es pH-tartományban a $[CuA]$.

A peptidek $[CuA_2]$ komplexeinek redukálhatósága hasonló az egyszerű hisztidinszármazékokhoz, 0,200-0,400 V tartományba esik, de ebben az esetben a ligandumok kétfogú koordinációval négy imidazolnitrogénen keresztül kötik a fémiont. A $[CuA]$ komplexeik redoxipotenciál értékei is a 0,200-0,400 V-os tartományba esnek. Ezek az értékek függenek a peptidláncban lévő hisztidinek számától és egymáshoz viszonyított helyzetétől is. 2, 3, 4 imidazol koordinációjú komplexek alakulnak ki. A koordinálódó imidazolnitrogének számának növekedésével csökken a redoxipotenciál érték, azaz stabilisabb komplex képződik. Egyre telítettebbé válik a fémion koordinációs szférája az imidazolnitrogének számának növekedésével, ami stabilisabb szerkezetet eredményez. Megállapítható, hogy a komplexek formálpotenciál értékeinek változása szoros összefüggésben áll a komplex stabilitásával. Minél stabilisabb a komplex, annál nehezebben lehet redukálni azt, ami negatívabb redoxipotenciál értéket eredményez. A több hisztidint tartalmazó ligandumok $[CuA]$

komplexei nehezebben redukálhatóak, mint a $[\text{CuA}_2]$ komplexek. Mivel ezek az értékek a pozitív potenciáltartományba esnek, így ezek a komplexek potenciális SOD modellek.¹⁷

Ahhoz hogy egy komplex a szuperoxid gyökaniont elbonthassa, a megsemmisítéshez szükséges reakcióra jellemző potenciál tartományba ($-0,16 \text{ V} - 0,89 \text{ V}$) kell, hogy essen a redoxipotenciál értéke.



A Cu,Zn-SOD enzimre jellemző formálpotenciál értékét is megmérték, ami $0,360 \text{ V}$ -nak adódott, ez beleesik a fent említett reakció redoxipotenciál értékének tartományába.¹⁸

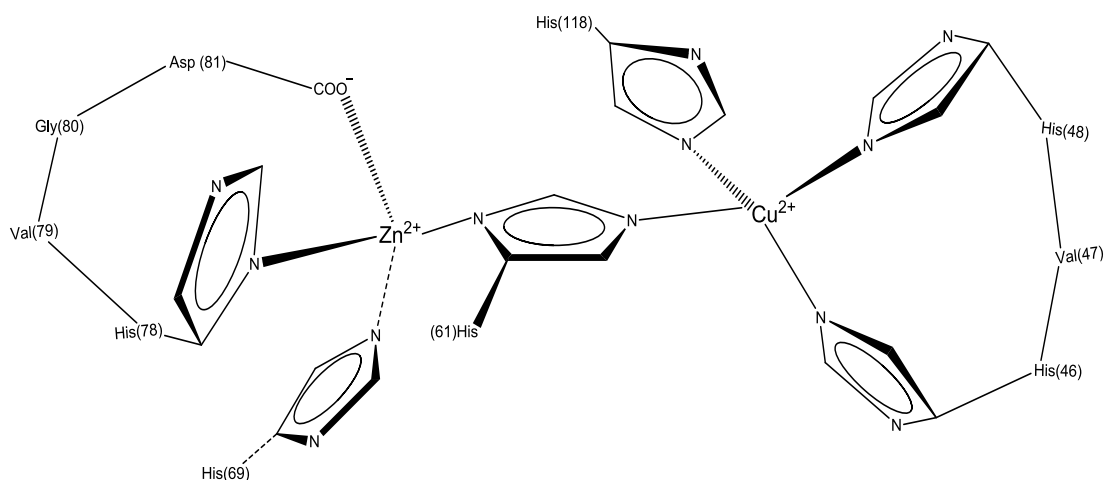
2.3. Cu,Zn-SOD enzim és SOD modell Cu(II)-komplexek

A réz(II)ionoknak nagy az affinitása a nitrogén (N) és kén (S) donoratomokhoz, így a réztartalmú enzimek esetében a hisztidin aminosav imidazolgyűrűjének nitrogén atomja(i) a legfontosabb fémionmegkötőhelyek, mind a Cu(I)-ion, mind a Cu(II)-ion oxidációs állapotok esetén. A cisztein tiol- és esetenként a metionin tioétercsoportjának S donoratomjai is szerepet játszhatnak a koordinációban.

A Cu,Zn-szuperoxid-diszmutáz enzim egy „nem kék réz” fehérje, ami az élő szervezetben jelenlévő és arra rendkívül káros szuperoxid gyökök elbontásáért felelős.¹⁹ Két viszonylag kis alapegységből áll, és mindegyik alegység tartalmaz egy Cu(II)- és egy Zn(II)-iont, melyeket oxidált formában egy imidazolátgyűrű hídligandumként köt össze. A réz(II)ion koordinációs szférájában további három hisztidin és egy aszparaginsav található. A cink(II)ion koordinációs szférája közel tetraéderes, a réz(II)ioné erősen torzult, átmenetet képez a négyzetes piramis és trigonális bipiramisos geometria között. Az enzim aktív centruma (8. ábra) képes az $\text{O}_2^{\bullet -}$ (szuperoxid gyökanion) elbontására²⁰, melyben a szuperoxid gyökanion diszproporcionálódik ($2\text{O}_2^{\bullet -} \rightarrow \text{O}_2 + \text{O}_2^{2-}$). A reakció során hidrogén-peroxid is keletkezik, melynek diszproporciója oxigén és víz végtermékek keletkezését eredményezi kataláz vagy peroxidáz enzimek közreműködésével.

A Cu,Zn-SOD által katalizált folyamat leegyszerűsített mechanizmusa a következő reakcióegyenletekkel írható le:





8. ábra: A Cu,Zn-SOD enzim aktív centrumának szerkezete

A réz(II)ion az első lépésben O_2 -vé oxidálja a $\text{O}_2^{\bullet-}$ -t, a második lépésben pedig a réz(I)ion peroxidá redukálja szuperoxid gyökaniont. Az enzim egyetlen katalitikus ciklus során két szuperoxid gyökaniont képes átalakítani, miközben a réz(II)ion oxidációs állapota ciklikusan $\text{Cu(II)} \rightarrow \text{Cu(I)} \rightarrow \text{Cu(II)}$ sorrendben változik, geometriája pedig a négyzetes piramis $\rightarrow$ torzult tetraéder $\rightarrow$ négyzetes piramis változásokon megy át. Feltételezhetően a Cu(II)- és Zn(II)-iont összekapcsoló imidazolato-híd az enzim működése során felbomlik, majd újra visszaalakul. Ebben a folyamatban a cink(II)ionnak fontos szerepe van, mivel hatására marad a hisztidin olyan helyzetben, hogy az imidazolato-híd ismét kialakulhasson a katalitikus ciklus végén.

A szuperoxid-diszmutáz enzimekben a fémionok nem a fehérje felszínén helyezkednek el, hanem a másodlagos szerkezeti motívumok által kialakított megfelelő üregekben. A fehérjerésznek további szerepe van, például reakciópartnerek megfelelő sztereokémiai elrendezésében, hidrofíl vagy hidrofób környezet biztosításában, és a szubsztrátnak a katalitikus helyre történő szállításában. Ez utóbbi funkciót a Cu,Zn-szuperoxid-diszmutáz enzim esetében egy pozitív töltéssel rendelkező csatorna tölti be, ami a negatív töltésű szuperoxid gyökanion szubsztrátot a reakciócentumba vezeti. Az enzimkatalizált folyamat meglehetősen bonyolult.

Korábbi vizsgálatok során megállapították, hogy a legjobb SOD modellek eddig a homo- és heterodimer, imidazolato-hidas makrociklusos ligandumok Cu(II)-komplexei, de a peptidligandumok körében is találtak hatékony modellvegyületeket.

A publikált eredmények alapján, a különböző fém-ligandum rendszerekben tapasztalt eltérő aktivitást a Cu(II)-komplexek termodinamikai stabilitásával és az ekvatoriális síkban ható ligandumtér erősségével hozták összefüggésbe.

A szuperoxid-diszmutáz aktivitás mérése során egy gyors, gyökös mechanizmusú redoxireakció sebességi állandóját kellene meghatározni. Ez a közvetlen módszer drága és speciális technikákat igényel. A Cu(II)-ligandum rendszerek szuperoxid-diszmutáz aktivitása közvetett módon, a xantin/NBT tesztreakció segítségével követhetővé válik. A reakció kivitelezése során az alkalmazott tetrazólium-só gyökfogóként viselkedik, a szuperoxid gyökanion ($O_2^{\bullet-}$) hatására igen érzékeny és szelektív folyamatban a megfelelő formázánszármazékká redukálódik.

Korábbi vizsgálatok során azt állapították meg, hogy a Cu(II)-foszfát rendszer önmagában is mutat SOD aktivitást ($1,06 \cdot 10^{-6}$ mol/dm³). Azonban meg kell jegyezni, hogy a Cu(II)-foszfát komplexek kis stabilitásúak, ezért ezekben a rendszerekben a szabad fémion mellett többnyire csak hidrolizált részecskék vannak jelen az oldatban, tehát a mért aktivitás ezekhez a részecskékhez rendelhető. Az eddigi ismeretek alapján az a következtetés is levonható, hogy nem lehet teljes bizonyossággal megállapítani, hogy a vizsgált komplexek szerkezete hogyan befolyásolja a SOD aktivitást, mert a különböző szerkezetű Cu(II)-komplexek, különböző körülmények között meghatározott IC₅₀ értékei igen hasonlóak, és minden esetben legalább két nagyságrenddel elmaradnak a Cu,Zn-SOD enzim aktivitásától.²⁰

3. Kísérleti körülmények

3.1. pH-potenciometria elvi alapjai²¹

A potenciometria olyan elektroanalitikai módszer, amely során egy elektrolitoldatba merülő két elektródból összeállított elektrokémiai cella elektródjai között fennálló potenciálkülönbséget mérjük. Az elektródok felületén kialakuló elektródpotenciálok közvetlenül nem határozhatók meg, csak a két potenciál különbségének mérésére van lehetőségünk. Az elektródpotenciál (E) és az azt kialakító elektroaktív komponens koncentrációja (c) (pontosabban aktivitása (a)) közötti összefüggést a Nernst-egyenlet írja le:

$$E = E^\circ + \frac{RT}{zF} \ln \frac{c_{ox}}{c_{red}}, \quad (8)$$

ahol E° a standard elektródpotenciál, R az egyetemes gázállandó, T az abszolút hőmérséklet, z az oxidált és redukált formák oxidációs számának a különbsége, F a Faraday-féle szám, míg c_{ox} illetve c_{red} a komponens oxidált illetve redukált formáinak a koncentrációja, ugyanis híg vizes oldatok esetén $c \approx a$ feltételezésével a koncentráció értékek használhatók. Egy elsőfajú fémelektrod esetén (M fém merül M^{n+} ionokat tartalmazó oldatba) $c_{red} = 1 \text{ mol/dm}^3$. Megállapodás alapján a hidrogénelektrod potenciálját 0,000 V-nak tekintjük, így elvileg bármelyik elektród potenciálja számszerűsíthető a megfelelő elektródokból összeállított elektrokémiai cella feszültségének a mérésével.

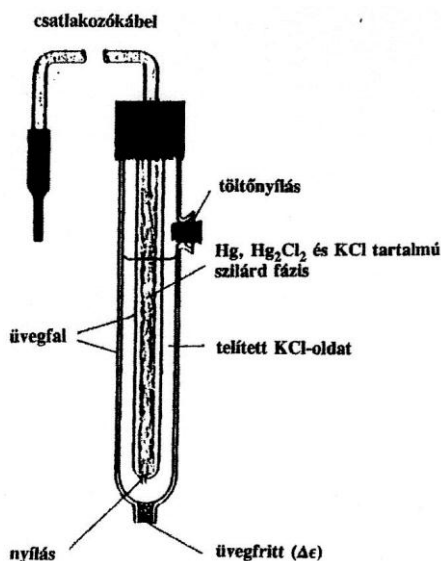
Ha a mérés során az egyik elektród potenciálját állandó értéken tartjuk és a másik elektród potenciálja a Nernst-egyenlet szerint függ a mérni kívánt komponens koncentrációjától, akkor az elektrokémiai cellán mért feszültség felhasználásával a keresett komponens koncentrációja meghatározható. Az állandó potenciálú elektródot referenciaelektrodnak (vonatkoztatási- vagy viszonyítóelektrodnak), míg a másikat indikátorelektrodnak (mérőelektrodnak) nevezzük.

Referenciaelektrodként gyakran használnak ún. másodfajú fémelektrodot, amely egy fémből áll, ami rosszul oldódó sóját és a só anionjának egy jól oldódó sóját tartalmazó oldatba merül. Ilyenek például az ezüst/ezüst-klorid vagy a telített kalomel elektród (SCE) (9. ábra), amelyek az $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}$ illetve a $\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2/\text{KCl}$ rendszereket tartalmazzák. Ezeknek a másodfajú elektródoknak a potenciálja állandó (ha $[\text{Cl}^-] = \text{állandó}$ és $T = \text{állandó}$).

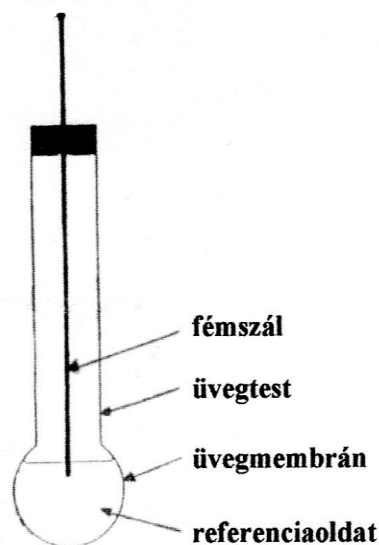
Az indikátorelektrod fontos tulajdonsága, hogy gyorsan és reverzibilisen tudja változtatni a potenciálját a mérni kívánt ion koncentrációjának a változásával. Az

indikátorelektrodok egyik fontos csoportját a membránelektrodok, egy másikat pedig az inert, (nemes)fémlektrodok alkotják.

A membránelektrodok ideális esetben csak egy adott ion vagy molekula mennyiségével arányos potenciált hoznak létre. Ez úgy alakul ki, hogy a membrán belső oldalán egy zárt térben referenciaoldat van, míg a membrán külső része a vizsgált oldattal érintkezik. A membrán belső és külső részén eltérő töltés alakul ki, amely az ún. membránpotenciált eredményezi.



9. ábra: Telített kalomel elektród



10. ábra Hidrogénion-szelektív elektród

pH mérésre általában hidrogénion-szelektív elektródot (10. ábra) alkalmazunk, amely egy vékony üvegmembránt tartalmaz, és belülről egy adott pH-jú referenciaoldattal érintkezik. Az elektródot eltérő hidrogénion koncentrációjú (pH-jú) oldatokba helyezve a membrán külső oldalán eltérő potenciálok alakulnak ki, így az elektród – mivel potenciálja megváltozik – felhasználható pH mérésre.

A potenciometriás méréseknek két területe ismert. Az ún. direkt potenciometria során a mérendő feszültség pontos értékére vagyunk kíváncsiak (amelyből a Nernst-egyenlet alapján a keresett mintabeli komponens koncentrációja közvetlenül meghatározható; pl. egy minta pH-jának közvetlen mérése). A potenciometrikus titrálás során a keresett komponens ismert koncentrációjú reagenssel visszük kémiai reakcióba és a titrálás során a mért feszültség értékeit a titrálószer térfogatának a függvényében ábrázolva titrálási görbét veszünk fel. A direkt potenciometria esetén fontos a mérőrendszer kalibrációja, amely általában kalibrációs egyenes felvételét jelenti a mérendő komponens koncentrációjának a meghatározása előtt. pH közvetlen mérésekor ($[H^+]$ meghatározása) ezt ismert pH-jú pufferoldatokkal végezzük. A

potenciometrikus titrálások esetén az ekvivalenciaponthoz tartozó mérőoldat térfogatot keressük (a titrálási görbe inflexiós pontja), amelynek helyzete azonban nem függ a kalibrálástól, így itt a mérőrendszer külön hitelesítése nem szükséges.

3.1.1. pH-potenciometria gyakorlati megvalósítása

Potenciometriás módszerrel határoztuk meg a ligandumok deprotonálódási állandóját és a minták koncentrációit. A ligandumok koncentrációját és pK-értékeit pHM 84 (Radiometer) digitális pH-mérővel és 6.0234.100 (Metrohm) kombinált üvegelektóddal végeztük. A pontosan ismert koncentrációjú, karbonátmentes (karbonáttartalom < 0,2%) KOH-oldatot Dosimat 715 (Metrohm) automata bürettával adagoltuk. A többi ligandum esetében a mérések kivitelezésére egy számítógép által vezérelt automata MOL-AcS bürettát (amit egy 2,5 cm³ végtérfogatú Hamilton fecskendőből alakítottak ki) és egy MOLSPIN pH-mérőt használtunk, amihez egy Metrohm 6.0234.100 kombinált üvegelektród csatlakozott.

A rendszert vizes oldatban tanulmányoztuk. Minden titrálás előtt az elektródot 0,0500 mol/dm³ koncentrációjú kálium-hidrogén-ftalát oldattal [melynek pH-ja 298 K (25 °C) hőmérsékleten 4,005] kalibráltuk. Az állandó hőmérsékletet ultratermosztáttal, a levegő kizárását, valamint a kevertetést pedig katalitikusan tisztított argongáz átbuborékolásával biztosítottuk.

Minták térfogata 4,00 cm³ volt. A ligandumok tervezett kezdeti koncentrációja ~ 4·10⁻³ mol/dm³ volt. A ligandumok pontos koncentrációját potenciometrikus titrálással ellenőriztük. A titrálás során fellépő térfogatnövekedést a kiértékelésre használt számítógépes program figyelembe vette. Az oldat állandó ionerősségét (0,20 mol/dm³), a BIMA ligandumnál megfelelő mennyiségű, 1,00 mol/dm³ koncentrációjú KCl-oldatnak, a többi ligandum esetében 1,00 mol/dm³ KNO₃-oldatnak a titráló oldathoz való hozzáadásával biztosítottuk. Ez az ionerősség jó pontossággal megegyezik a KOH titrálóoldat koncentrációjával, ugyanakkor jóval nagyobb, mint a titrálendő oldat ligandum koncentrációja. Ez biztosítja azt, hogy a titrálás során az oldat ionerőssége gyakorlatilag ne változzon. A diffúziós potenciál kiküszöbölésére Irving és munkatársai által javasolt módszert alkalmaztuk.²²

A potenciometriás mérések kiértékelését számítógépes program segítségével végeztük el. A ligandumok protonálódási állandóit és a komponensek (A és H) pontos kiindulási koncentrációját SUPERQUAD programmal²³ határoztuk meg. A komplexek stabilitási állandóit PSEQUAD program²⁴ segítségével számolhatók.

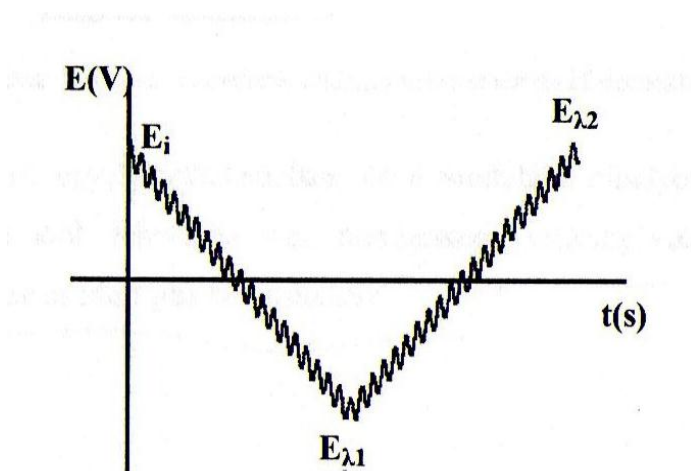
A ligandum protonálódási állandói és a komplexek stabilitási állandói a következő általános egyensúlyi összefüggéssel jellemezhetők:

$$pM + qA + rH = M_p A_q H_r \quad \beta_{pqr} = \frac{[M_p A_q H_r]}{[M]^p \cdot [A]^q \cdot [H]^r} \quad (9)$$

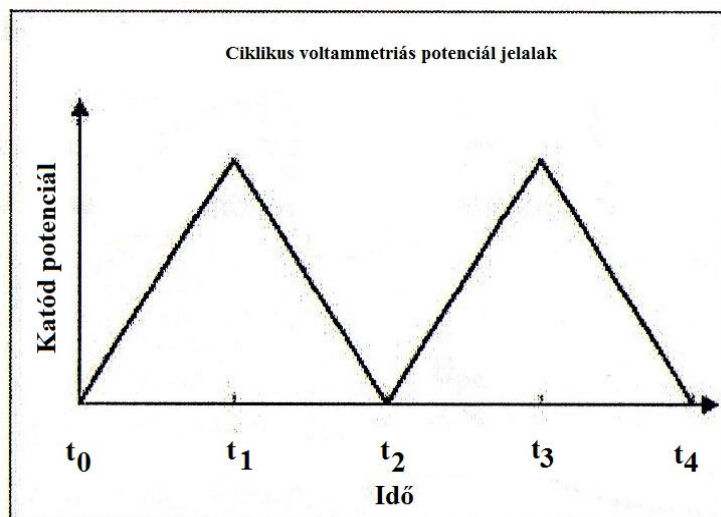
3.2. Ciklikus voltammetria²⁵⁻²⁷

3.2.1. A módszer elméleti háttere

A polarográfiához hasonlóan a ciklikus voltammetria is egy feszültségszabályozással működő módszer. Stabil referenciaelektród rendszert használva az elektródpotenciál értéke a kívánt módon változtatható. Az átfolyó áramot itt is, mint a polarográfiában a munka- és az ellenelektród között mérik. A vizsgálandó oldatba merülő megfelelő munkaelektród potenciálját egy kezdő értékről (E_i) lineárisan változtatjuk a fordulópontpotenciálnak nevezett ($E_{\lambda 1}$) értékig, ahol a potenciálváltozás előjele megfordul és szintén lineárisan halad a második fordulópontpotenciál ($E_{\lambda 2}$), amely általában E_i -vel egyenlő (11. ábra). Ebben a pontban a ciklus véget ér, és ha szükséges, megszakítás nélkül újra kezdhethetjük.



11. ábra: A ciklikus voltammetriánál használt potenciál jelalak
(E az alkalmazott potenciál, t az idő)

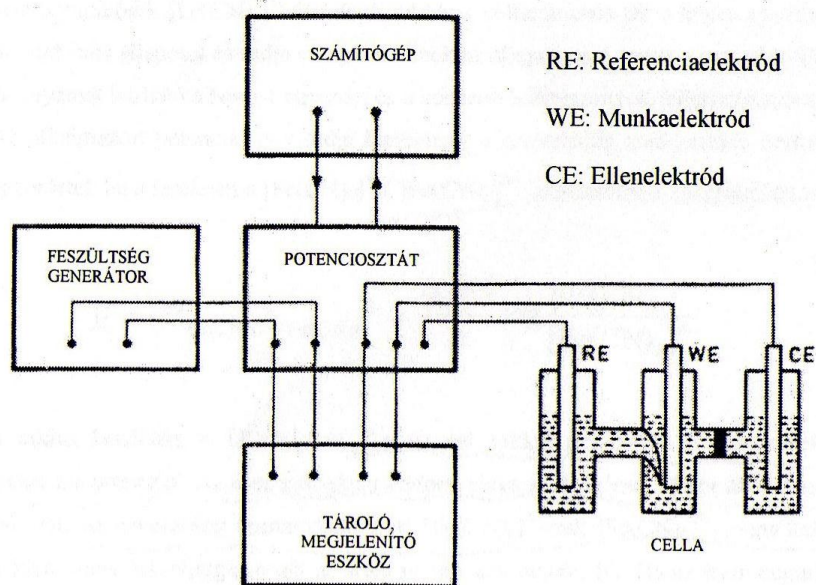


12. ábra: Ciklikus voltammetriás potenciál jelalak

A ciklikus voltammetriában a váltófeszültséget háromszögjel szerint kapcsoljuk az elektródra (12. ábra). Ennek megfelelően az emelkedő lineáris szakaszon (t_0 – t_1 -ig) az elektród katódként szerepel, az ezt követő lineárisan csökkenő szakaszon (t_1 – t_2 -ig) anódként. Az ilyen feszültségprogram szerint felvett görbék a depolarizátor katódos redukcióját és anódos oxidációját egyaránt tükrözik. A görbe felső szakasza a redukciós folyamatot mutatja. Ez annyiban különbözik a szokványos program formájától, hogy a határáram elérése után az áramsűrűség csökken, maximumot ér el, majd a t_1 pontban, amikor a polarizáció megfordul, megindul az anódos folyamat. Utóbbi az anódos oxidációhoz szükséges potenciálminimum megjelenésével jár. Reverzibilis reakciók esetén a katódos és az anódos csúcsok nagysága közel azonos és a két csúcs közötti potenciálkülönbség: $\frac{0,059}{n} \text{ V}$. A rendszerre jellemző féllépcsőpotenciál-érték az anódos és katódos csúcs közötti távolság felénél van. Irreverzibilis folyamatoknál a két csúcs távolsága nagyobb, végső esetben pedig, ha az oxidáció sebessége nagyon kicsi, az anódos csúcs meg sem jelenik a görbén.

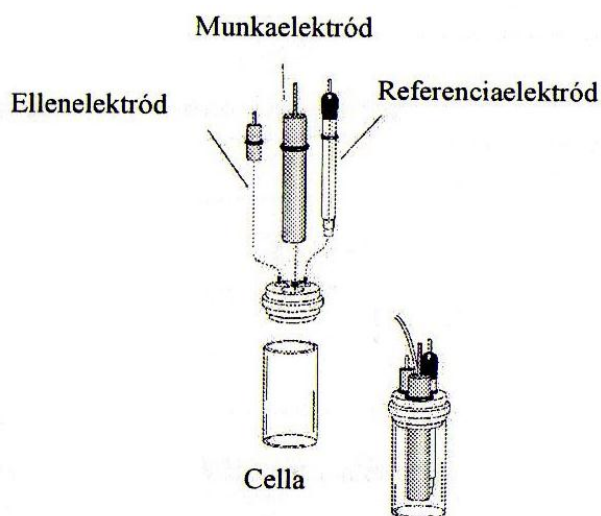
A felfutási periódusok hosszát a felfutási sebesség határozza meg. A mérés folyamán, a cellán átfolyó áramot mérjük és ábrázoljuk az alkalmazott feszültség függvényében. Az így nyert görbét ciklikus voltammogramnak nevezzük.

A polarográfiás és a voltammetriás módszerek néhány alkatrésztípuson alapulnak, ebből következik, hogy a legtöbb polarográfiás módszerre vonatkozó megállapítás alapján véve alkalmazható a ciklikus voltammetriára is (13. ábra).



13. ábra: Műszeres elrendezés ciklikus voltammetriás kísérletekhez

A részegységek lehetnek egy készülékben, de a moduláris elhelyezés is lehetséges. A mérőcella kialakítására több lehetőség van, mindenképp szükség van azonban a három elektród stabil befogására és inert gáz bevezetésére (14. ábra).



14. ábra: Ciklikus voltammetriás mérőcella felépítése

3.2.2. A ciklikus voltammetriában használatos elektród típusok

a, Munkaelektrodok

A munkaelektrodokat négy csoportba oszthatjuk: inert, reaktív, fotokémiaailag gerjeszthető vagy félvezető, szintetikus vagy kémiaailag módosított elektródok. Az egyes csoportok között gyakori az átfedés.

Azok az inert elektródok, amelyek nem lépnek kémiai vagy elektrokémiai reakcióba a számunkra fontos potenciáltartományban, a leginkább keresett elektródok az oldatfázisban lejátszódó reakciók tanulmányozásakor. A felületi hibák hiánya (folyadékelektrod), a könnyebb tisztítási eljárások és a hidrogénfejlődéshez szükséges nagy katódos túlfeszültség miatt a Hg-elektrod a legnépszerűbb ilyen elektród.

Mivel a higany anódosan könnyen oldódik, nem alkalmazható az anódos tartományban. Az ilyen folyamatokat elsősorban Pt-elektroddal mérjük.

Vizes oldatokban oxidréteg képződik az anódos tartományban, és a hidrogén fejlődése behatárolja a katódos potenciáltartományt. Nemvizes közegben azonban a Pt-elektrod széles potenciáltartományban alkalmazható.

Számos szénelektrodot is használni kezdtek a voltammetriás kutatásokban. Ezek az elektródok széles anódos és katódos potenciáltartománnyal rendelkeznek mind vizes mind nemvizes közegben. Ma az elektrokémiában az üvegszerű vagy üveges szénelektrod a legszélesebb körben alkalmazott szénelektrod anyag. Nagy mechanikai stabilitása, kismértékű porozitása, széles potenciáltartományban mutatott inertsége, jó vezetőképessége és a mérések reprodukálhatósága egyaránt indokolják használatát.

b, Referenciaelektrodok

A referenciaelektroddal szemben nagyon egyszerű az általános elvárás. Nem változhat a potenciálértéke, amikor külső feszültséget kapcsolnak a cella munkaelektrod-referenciaelektrod rendszerére. A referenciaelektrodnak kémiai szempontból stabilisnak kell lennie. A standard referenciaelektrod rendszer a reverzibilis hidrogénelektrod, ahol H^+ -ionok és a hidrogén gáz egy kormozott platina elektróddal ellátott elektrolitikus félcellában vannak.

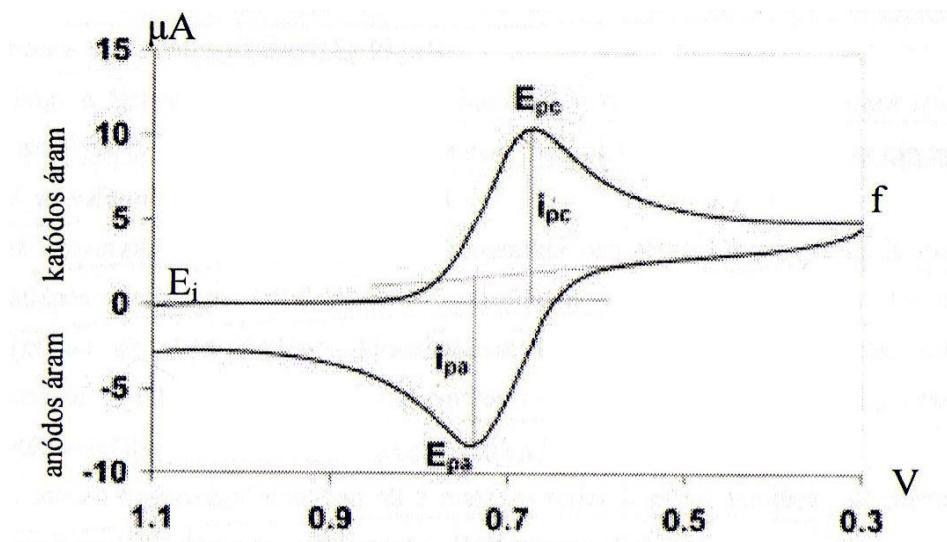
A legnépszerűbb referenciaelektrodok az úgynevezett másodfajú elektródok, ahol az egyensúlyi elektródpotenciál egy olyan iontól függ, amelyik nem vesz részt közvetlenül az elektródreakcióban. Az ilyen elektródok potenciálját könnyű állandó értéken tartani.

c, Ellenelektrodok

A voltammetriás mérések során az áram a munka- és az ellenelektrod között folyik. A Pt-elektrodok szerencsére teljesítik a legtöbb követelményt, és ezek a legszélesebb körben használt elektródok vizes, nemvizes és sóoldékot tartalmazó közegben egyaránt. Általában a Pt-elektrodokat tekercsek vagy vékony fóliák formájában használják. Az elektródfelületnek határozottan nagyobbak kell lennie, mint a munkaelektrod felületének, azért, hogy biztosítsuk, azt, hogy a határáramot nem az ellenelektrod felülete szabja meg.

3.2.3. Méréskor lejátszódó folyamatok

Mivel a ciklikus voltammetriában standard mérőoldatként $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ -oldatot használunk, a méréskor lejátszódó folyamatok ennek példáján szemléltethetők a legegyszerűbben (15. ábra).



15. ábra: Tipikus ciklikus voltammogram

A potenciál változása először negatív, és amikor elegendően negatív lesz ahhoz, hogy redukálja a $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ -iont, katódos áram jelenik meg. Mivel az oldatot nem kevertetjük az elektród felületén, a $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ -ionok fokozatosan $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ -ionokká alakulnak.

Ahogy a $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ koncentrációja csökken, a felületen a katódos áram csúcsot ér el, majd csökken. Az f pontnál a feszültség változás előjelet vált, de a potenciál továbbra is elég negatív a redukcióhoz, tehát az áram továbbra is katódos. Mikor a potenciál elég negatív lesz ahhoz, hogy a következő folyamat végbemenjen:



akkor az áram előjele megváltozik. Az anódos áram gyorsan növekszik, majd maximumot ér el.

Mikor a felületen kezd a $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ koncentrációja csökkenni, az áram is csökken. Tehát az első félciklusban elektrokémiai reakcióval keletkezett $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ a második félciklusban visszaoxidálódik $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ -ionná. A ciklikus voltammetriával tehát gyorsan lehet előállítani új oxidációs állapotot és vizsgálható ennek az állapotnak a változása a második félciklus alatt. A folyamat leírható a Nernst-egyenlet és a koncentrációviszonyok felhasználásával. Az alkalmazott potenciál úgy tudja kielégíteni a reverzibilis rendszerekre

érvényes Nernst-egyenletet, ha a felületen a $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ arány mindig megfelelően változik.

$$E = E^\circ_{\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-} / \text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}} + \frac{0,059}{n} \log \frac{[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}}{[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}} \quad (11)$$

A ciklus kezdetén az alkalmazott E-potenciál sokkal pozitívabb E° -nél, amely a redoxipotenciál. Az n az iononként átlépett elektronok száma. Mikor E negatív irányba változik, az egyenlőség fenntartásához az $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ -nak $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ -ionná kell alakulnia. A logaritmus összefüggés miatt az áram meredeken emelkedik. Ha az áram negatívabb lesz a formálpotenciálnál, a $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ koncentrációjának gyakorlatilag nullának kell lennie a felületen. Ez a diffúzió miatt nem valósul meg. Továbbra is folyik áram a felülethez vándorolt $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ -ionok redukciójából adódóan.

3.2.4. A görbék információtartalma és értékelése

Ha felírjuk a Nernst-egyenletet a csúcsokhoz tartozó potenciálokra és elvégezzük a szükséges átalakításokat, megkapjuk a

$$E^\circ = \frac{E_{pc} + E_{pa}}{2} \quad (12)$$

egyenletet. A redoxipotenciál a két csúcs számtani közepével egyezik meg.

Továbbá igaz, hogy

$$E_{pa} - E_{pc} = \frac{0,059}{n} V \quad (13)$$

Vagyis a csúcsok távolsága függvénye a folyamatban átlépő elektronok számának. Egy egyelektronos folyamatban a távolság 0,059 V.

Fontos, hogy a Nernst-egyenlet csak termodinamikailag reverzibilis folyamatokra érvényes, tehát ha ismerjük az átlépő elektronok számát és a csúcsok távolsága nagyobb az egyenletből adódónál, az valamilyen irreverzibilitásra utal. Ennek az irreverzibilitásnak nemcsak termodinamikai oka lehet. Okozhatja az is, hogy az elektronátlépés lassú, így felborulnak a koncentrációviszonyok a felületen. Ez a tény lehetőséget ad az elektronátlépés kinetikájának tanulmányozására a felfutási sebesség változtatásával. A felfutás nem lassítható végtelen mértékben, mivel a diffúzió és a rázkódás következtében lejátszódó keveredés megváltoztatja a felületi koncentrációt.

Az áramcsúcsok magassága arányban áll a reaktáns teljes koncentrációjával, de mennyiségi meghatározásra elsősorban nem ezt a mérési eljárást használjuk.

A ciklikus voltammetria fő erőssége, hogy képes vizsgálni az elektrontranszfer után csatoltan lejátszódó kémiai reakciókat, és azok kinetikáját. Erre az anódos és a katódos áramcsúcsok magasságviszonyának vizsgálata ad lehetőséget.

Például:



Látható, hogy ha a felfutás lassabb az irreverzibilis kémiai reakciónál az R anyag egy része átalakul mielőtt visszaoxidálódhatna, tehát az anódos áram kisebb lesz a katódosnál.

3.2.5. A módszer lehetséges felhasználási területei

A ciklikus voltammetria széles körben alkalmazható elektrokémiai módszer. Gyorsan nyerhetők vele mennyiségi és minőségi információk az elektronátmenettel járó folyamatokról. Jó közelítéssel lehet meghatározni a formálpotenciálokat, aminek további jelentősége, hogy lehetőséget teremt komplex ionok képződési állandóinak meghatározására, ahol E° közvetlen potenciometrikus meghatározása a bomlékonyság miatt nem lehetséges.

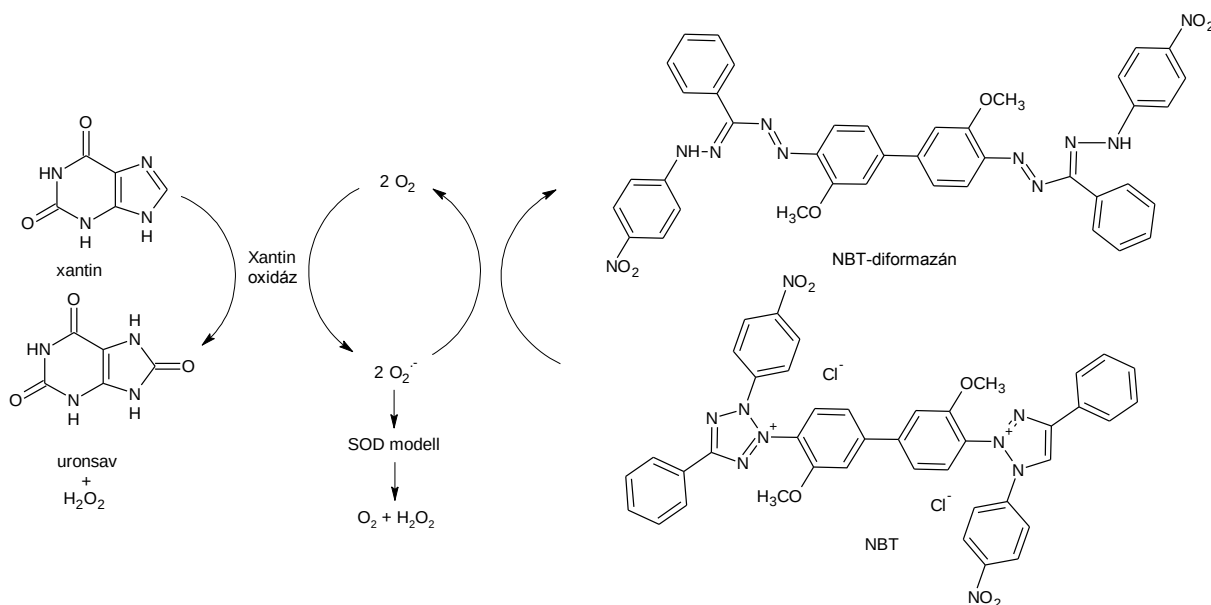
3.2.6. Ciklikus voltammetria gyakorlati megvalósítása

A méréseket 746-747 VA típusú ciklikus voltamméteren végeztük. A kísérletsorozat első lépésében meggyőződünk arról, hogy a mintát tartalmazó ligandum mérése esetén nem történik redoxi folyamat. A ligandumok és Cu(II)-komplexeik ciklikus voltammetriás vizsgálata során 25, 50 illetve 100 mV/s scan sebességet alkalmaztunk. A szabad ligandumokat 140 μ A és a komplexeket 45 μ A áramerősség mellett mértük, grafit elektróddal 300 - (-1100) mV tartományban, platina elektróddal 800 - (-400) mV tartományban. A méréseket 1 cm³ térfogatban, a tanszéken tervezett mikrocellában végeztük el.²⁸ A mintaoldatban a Cu(II):ligandum aránya 1:8 volt. Az értékeléshez szükséges paramétereket CACYVO program segítségével nyerhetjük.

3.3 SOD enzim aktivitás mérése²⁹

A Cu,Zn-szuperoxid-diszmutáz (Cu,Zn-SOD) enzim a szuperoxid gyökianionná történő diszproporcióját katalizálja ($k \sim 2,0 \cdot 10^9$ s⁻¹ mol⁻¹ dm³, pH= 7,4). Valamely Cu(II)-komplex SOD aktivitásának mérésére az egyik legelterjedtebb módszer a xantin oxidáz enzim

által termelt $O_2^{\cdot-}$ és a nitrokék-tetrazólium-klorid (nitro-blue-tetrazolium-klorid, NBT) közötti reakció nyomon követése. Az aktív fémkomplex csökkenti a szuperoxid gyökanyon koncentrációját, ezzel inhibálja a NBT-só redukcióját, ami a keletkező lila színű diformazánra jellemző 560 nm-nél mért abszorbancia csökkenését eredményezi a fémkomplext nem tartalmazó rendszerben mérhetőhöz képest (16. ábra).



16. ábra: A SOD aktivitás méréséhez használt modellreakció sematikus ábrázolása

A SOD aktivitás mérésére foszfát pufferben (Na_2HPO_4 és NaH_2PO_4 $c=5,0 \cdot 10^{-2}$ mol/dm³) oldott, $5,0 \cdot 10^{-5}$ mol/dm³ koncentrációjú NBT-oldatot használtunk, a xantin koncentrációja $1,0 \cdot 10^{-4}$ mol/dm³ volt. A xantin oxidáz mennyiségét úgy állítottuk be, hogy az abszorbancia változás 560 nm-nél $0,025-0,028 \text{ min}^{-1}$ érték között változzon. Az NBT redukcióját változó koncentrációjú Cu(II)-komplex jelenlétében, illetve annak távollétében is vizsgáltuk, teljes Cu(II)-ion koncentráció $5,0 \cdot 10^{-8}-2,0 \cdot 10^{-6}$ mol/dm³ között változott. Először egy vak minta abszorbancia változását vettük fel 560 nm-en nyolc perc alatt. A vak minta tartalmazta az NBT-t, a xantint, valamint a xantin oxidáz enzimet. Ez a $0,025-0,028 \text{ min}^{-1}$ abszorbanciaváltozás beállításához szükséges. A további mérések során a kiinduló minta tartalmazta a xantint, a xantin oxidázt, az NBT-t és a ligandumot is – ez a vakpróba. Az abszorbancia változását az idő függvényében négy percre vizsgáltuk, majd hozzáadtuk a megfelelő térfogatú $CuCl_2$ -oldatot és mértük az abszorbanciaváltozást a következő négy percben. Ezáltal minden mérési pontban a Cu(II)-komplex mellett a vakpróbát is vizsgáltuk.

4. Kísérleti eredmények és kiértékelésük

4.1. Potenciometriás adatok értékelése

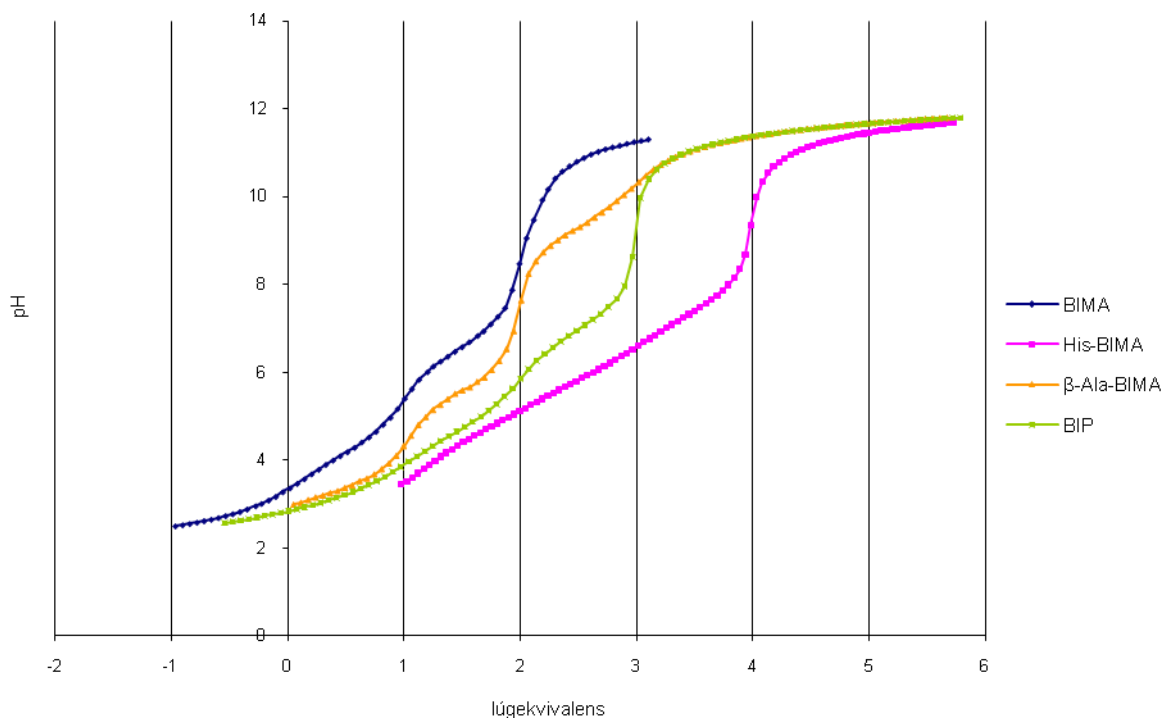
A mérés során a szabad ligandumok mintáit pH-potenciometriával vizsgáltuk (17. ábra). A szabad ligandum titrálása lehetőséget adott a ligandum deprotonálódási állandóinak valamint az oldat pontos koncentrációjának meghatározására. A mérési eredményekből számított adatok (2. táblázat) jól egyeznek az irodalmi adatokkal.

A BIMA-nál a kiindulási forma a H_3A forma lenne. A titrálási görbén csak két deprotonálódási folyamat látható. A harmadik lépés erősen savas tartományban van már, amely nem követhető potenciometriásan. Ezek alapján két deprotonálódási állandó határozható meg. Az egyik deprotonálódási állandó a BIMA aminocsoportjához, míg a másik a ligandum egyik imidazolnitrogénjéhez rendelhető.

A β -Ala-BIMA esetében a kiindulási forma a H_3A . A távolabb kerülő NH_2 -csoport kevésbé csökkenti az imidazol pK értékeit, ezáltal azok meghatározhatóak lesznek. Az egyes pK értékek az amino, és a két imidazolnitrogénhez tartoznak.

A His-BIMA ligandumnál a kiindulási forma a H_4A , mivel az oldalláncban is megjelenik egy imidazolgyűrű. A két imidazolnitrogén pK_i értékei kisebbek, mint a β -Ala-BIMA esetén (az oldalláncban jelenlévő imidazolcsoport miatt), de erősen savanyított oldatban meghatározható, tehát megadható mind a négy deprotonálódási állandó értéke. Miután a pontos koncentráció a titrálási görbe $pH=4-10$ közötti tartományban megjelenő ekvivalenciapontokból határozható meg, így a titráláshoz összeállított minta pH -ja 3,45 volt, ebből következően a legkisebb pK értékét a ligandum törzsoldat ellenőrzése során nem határoztuk meg.

A BIP ligandumot a H_3A forma jellemzi. Az imidazolnitrogének deprotonálódási állandója nem csökken olyan mértékben, mint a BIMA-nál, mert a BIP karboxilcsoportjának nincs olyan elektronszívó hatása, mint a BIMA aminocsoportjának.



17. ábra: A szabad ligandumok titrálási görbéi (mintatérfogat 4,00 cm³)

2. táblázat: BIMA, His-BIMA, β -Ala-BIMA és BIP képződési ($\lg\beta$) és deprotonálódási (pK) állandói ($t=25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $I=0,20\text{ mol/dm}^3$, BIMA esetén KCl, másik három ligandumra KNO₃)

	BIMA		His-BIMA		β -Ala-BIMA		BIP	
HA	6,51 (1)	6,49	7,30 (9)	7,28	9,23 (2)	9,23	6,86 (9)	6,97
H ₂ A	10,58 (2)	10,56	13,02 (1)	13,09	14,73 (3)	14,74	11,46 (2)	11,59
H ₃ A	-	-	17,36 (3)	17,62	17,77 (5)	17,87	14,18 (5)	14,34
H ₄ A	-	-	-	20,23	-	-	-	-
pK(-COOH)	-	-	-	-	-	-	2,72 (5)	2,75
pK N(Im)	-	-	-	2,61	3,04 (5)	3,13	4,60 (1)	4,62
pK N(Im)	4,07 (2)	4,07	4,34 (3)	4,53	5,50 (3)	5,51	6,86 (9)	6,97
pK N(His)	-	-	5,72 (1)	5,81	-	-	-	-
pK (NH ₂)	6,51 (1)	6,49	7,30 (9)	7,28	9,23 (2)	9,23	-	-
hivatkozás	-	2	-	3	-	20	-	2
	Mért érték	-	Mért érték	-	Mért érték	-	Mért érték	-
C_{lig} (mol/dm ³)	0,00765	-	0,00928	-	0,00799	-	0,00717	-

A korábbi tapasztalatok azt mutatták, hogy a vizsgált Cu(II)-komplexek esetében csak ligandumfelesleg esetén végezhető ciklikus voltametriás mérés. Így a Cu(II):ligandum 1:8

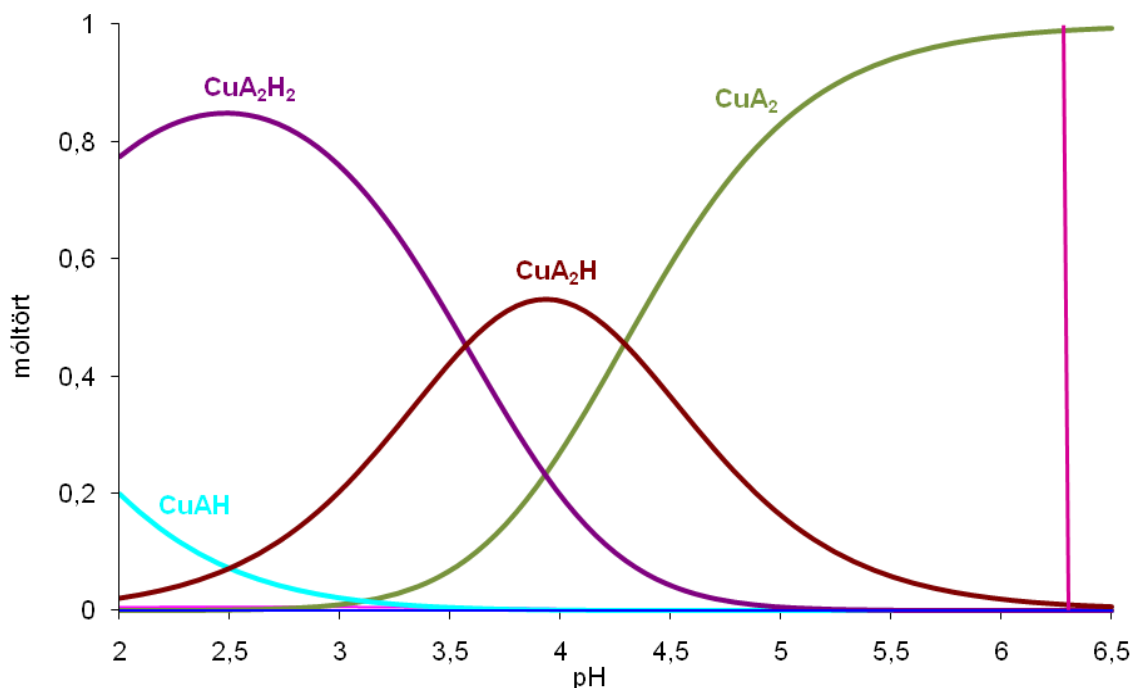
arányhoz tartozó eloszlásokat készítettünk, a korábban meghatározott stabilitási állandók felhasználásával (3. táblázat).

3. táblázat: A vizsgált ligandumok Cu(II)-ionnal alkotott komplexeinek stabilitási állandói ($\lg\beta$) ($t=25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $I=0,20\text{ mol/dm}^3\text{ KCl}$)

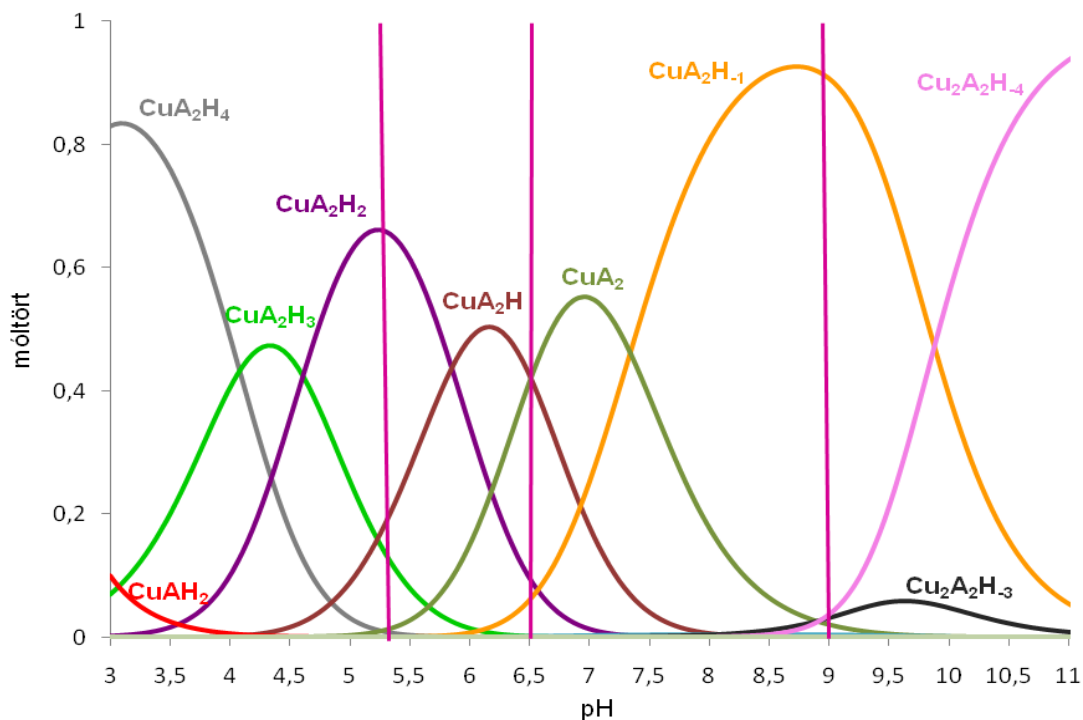
	BIMA ²	His-BIMA ³	β -Ala-BIMA ²⁰	BIP ²
MAH ₂	-	19,29	-	-
MAH	14,0	-	17,28	13,36
MA	9,89	-	11,95	10,13
MAH ₋₂	-	-	-3,52	-
MA ₂ H ₄	-	37,20	-	-
MA ₂ H ₃	-	33,12	-	-
MA ₂ H ₂	25,21	28,51	32,73	-
MA ₂ H	21,5	22,66	-	21,20
MA ₂	16,89	16,15	-	17,29
MA ₂ H ₋₁	-	8,81	-	-
M ₂ A ₂	-	25,68	-	-
M ₂ A ₂ H ₋₁	18,43	19,75	-	-
M ₂ A ₂ H ₋₂	12,78	13,58	13,93	-
M ₂ A ₂ H ₋₃	-	5,45	-	-
M ₂ A ₂ H ₋₄	-	-3,48	-	-
M ₂ A	-	15,36	-	-
M ₃ L ₂ H ₋₄	-	8,53	6,64	-

A Cu(II):BIMA 1:8 arányhoz tartozó eloszlást a 18. ábra mutatja. Az ábráról leolvasható, hogy pH=4-nél a [CuA₂H] forma van jelen döntő mennyiségben, de nem kizárólagosan. Ellenben pH=6-nál már csak a [CuA₂] forma van jelen. Ebből következően a [CuA₂] komplex redoxi paraméterei határozhatók meg pH=6 felett. A Cu(II):His-BIMA rendszerhez tartozó eloszlásból (19. ábra) leolvasható, hogy nemcsak egyféle Cu(II)-komplex van jelen egy adott pH-n. A minták pH-ját ezért úgy állítottunk be, hogy egyféle Cu(II)-komplex legyen túlnyomó többségben jelen az oldatban. Így a kiválasztott pH-k rendre 5,3 ahol [CuA₂H₂], 6,5 ahol [CuA₂], és 9,0 ahol a [CuA₂H₋₁] forma van jelen nagyobb mennyiségben. A β -Ala-BIMA Cu(II)-ionnal alkotott komplexeinek eloszlásából (20. ábra) az olvasható le, hogy a savas tartományban a [CuA₂H₂], 8,2-es pH körül a [Cu₂A₂H₋₂] – de nem kizárólagosan – és 10-es pH felett a [CuAH₋₂] komplex van jelen az oldatban 1:8 aránynál. A BIP Cu(II)-ionnal alkotott komplexeinek eloszlásából (21. ábra) látható, hogy a savas tartományban, nagy mennyiségben a [CuAH] forma van jelen, de ezenkívül más részecskék is vannak, kb. 6-os pH-tól kezdve kizárólag a [CuA₂] forma van jelen az oldatban.

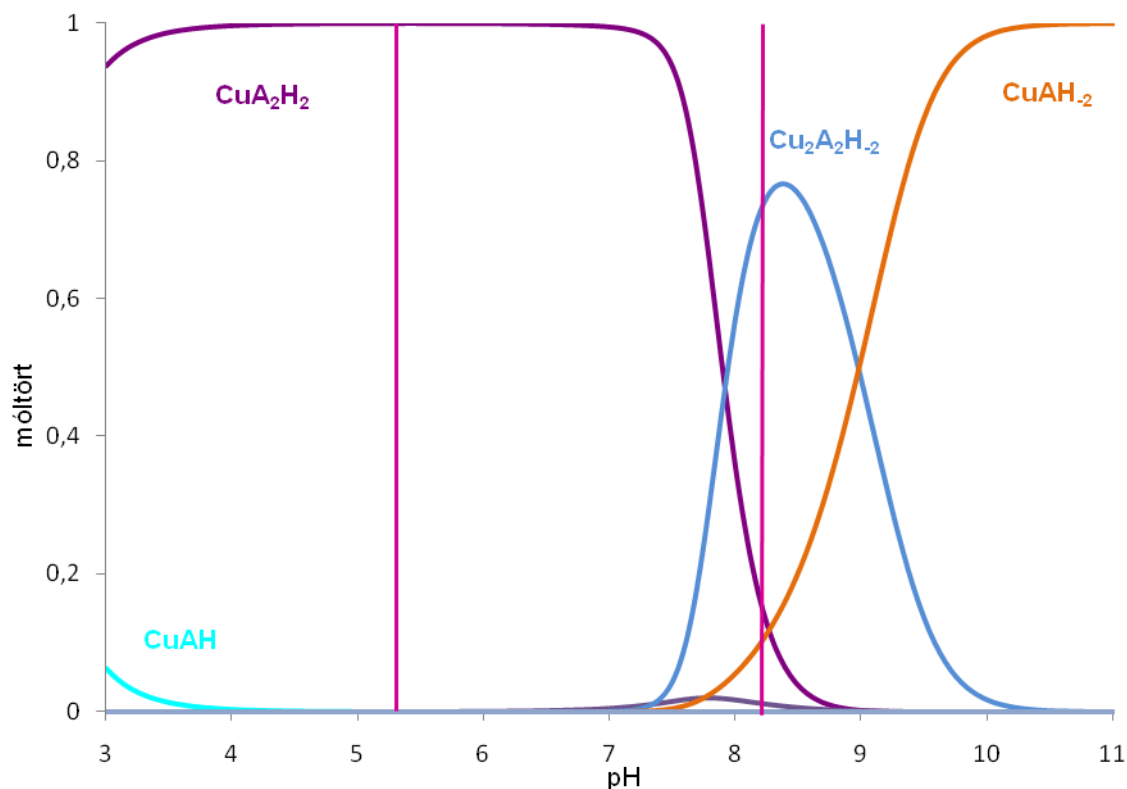
Így ciklikus voltammetriás méréssel lehetőség volt a $[\text{CuA}_2]$ részecske redoxi paramétereit meghatározni 7-es pH-n. Az egyes ligandumok esetén a méréseknél beállított pH értékeket az eloszlási görbéken bejelöltem.



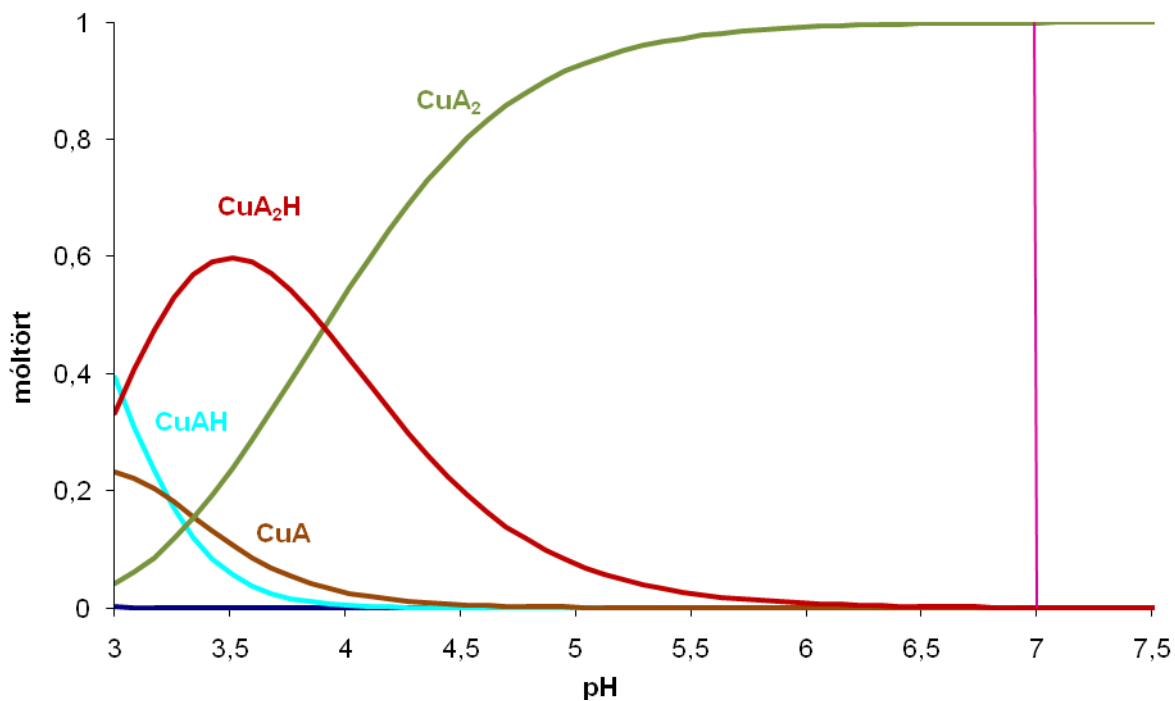
18. ábra: Cu(II):BIMA rendszerben képződő komplexek eloszlási görbéi a pH függvényében ($c_{\text{Cu(II)}} = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$, $c_{\text{A}} = 7,6 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$)



19. ábra: Cu(II):His-BIMA rendszerben képződő komplexek eloszlási görbéi a pH függvényében ($c_{\text{Cu(II)}} = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$, $c_{\text{A}} = 8 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$)



20. ábra: Cu(II): β -Ala-BIMA rendszerben képződő komplexek eloszlási görbéi a pH függvényében ($c_{\text{Cu(II)}} = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$, $c_A = 8 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$)



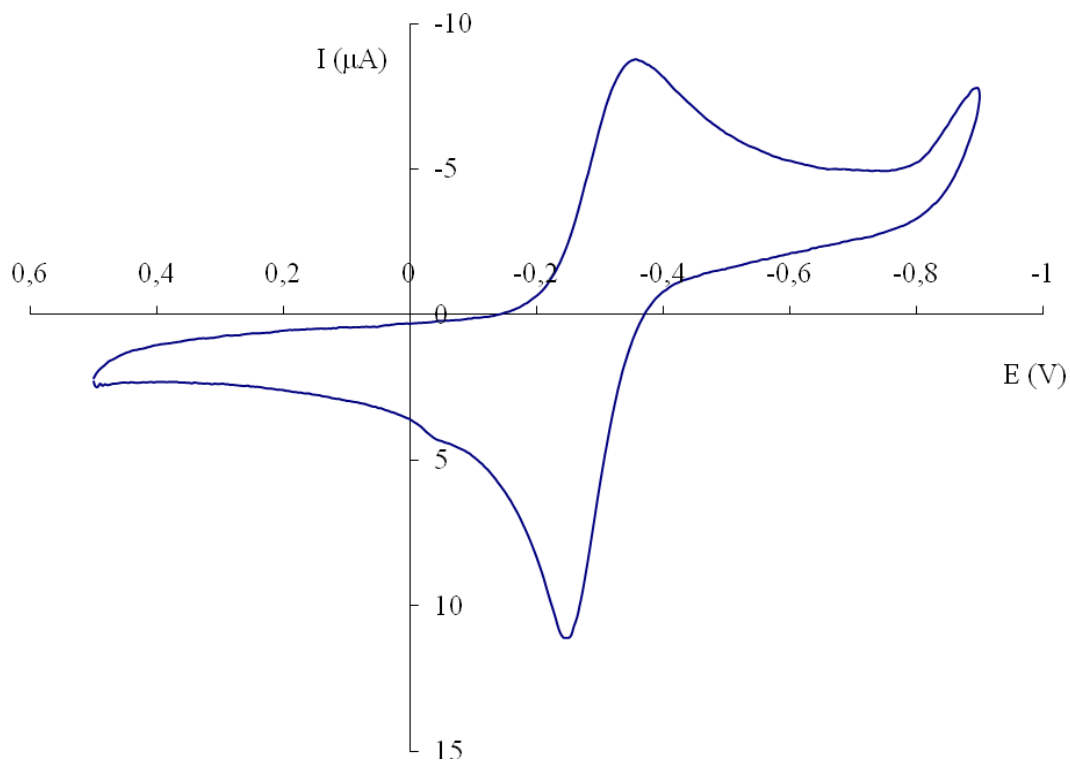
21. ábra: Cu(II):BIP rendszerben képződő komplexek eloszlási görbéi a pH függvényében ($c_{\text{Cu(II)}} = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$, $c_A = 8 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$)

A méréseket Cu(II):ligandum, 1:8 aránynál végeztük. Megtalálva a megfelelő paramétereket (mérési tartomány, pásztázási sebesség, elektród), és ezen beállításokon mérve kaptuk meg a Cu(II)-ligandum rendszer CV görbéit (22-25. *ábra*), majd ezeket a görbéket a CACYVO programmal kiértékelve a 4. táblázatban lévő eredményekhez jutottunk.

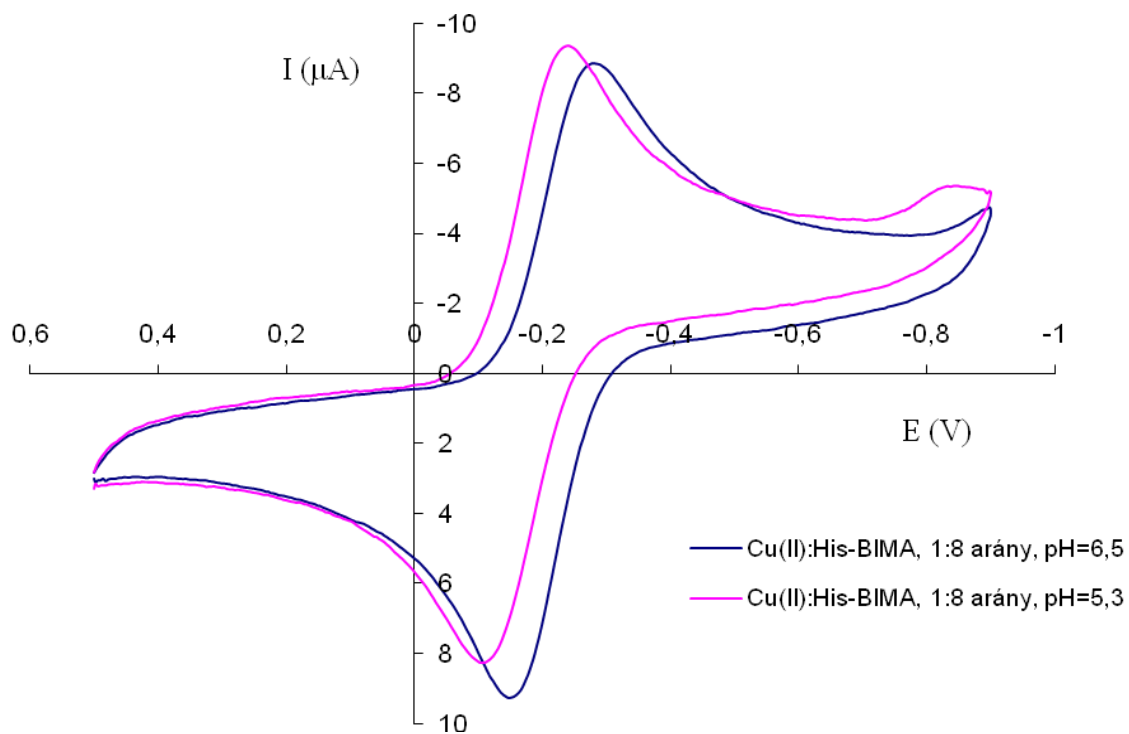
4.2. A CV görbék paramétereinek értékelése

A ciklikus voltammetriás görbékről leolvasott paramétereket a 4. táblázat tartalmazza. A két csúcs közötti különbség nagyobbak adódott, mint a 0,059 V elméleti érték. A Cu(II)-komplexekre általában az elméletitől eltérő, nagyobb érték a jellemző. A két csúcs aránya közel van az egyhez. Ez a két paraméter arra utal, hogy egy elektron-átmenettel járó, kvázireverzibilis a lejátszódó folyamat, Cu(II)→Cu(I) átalakulás valósul meg.

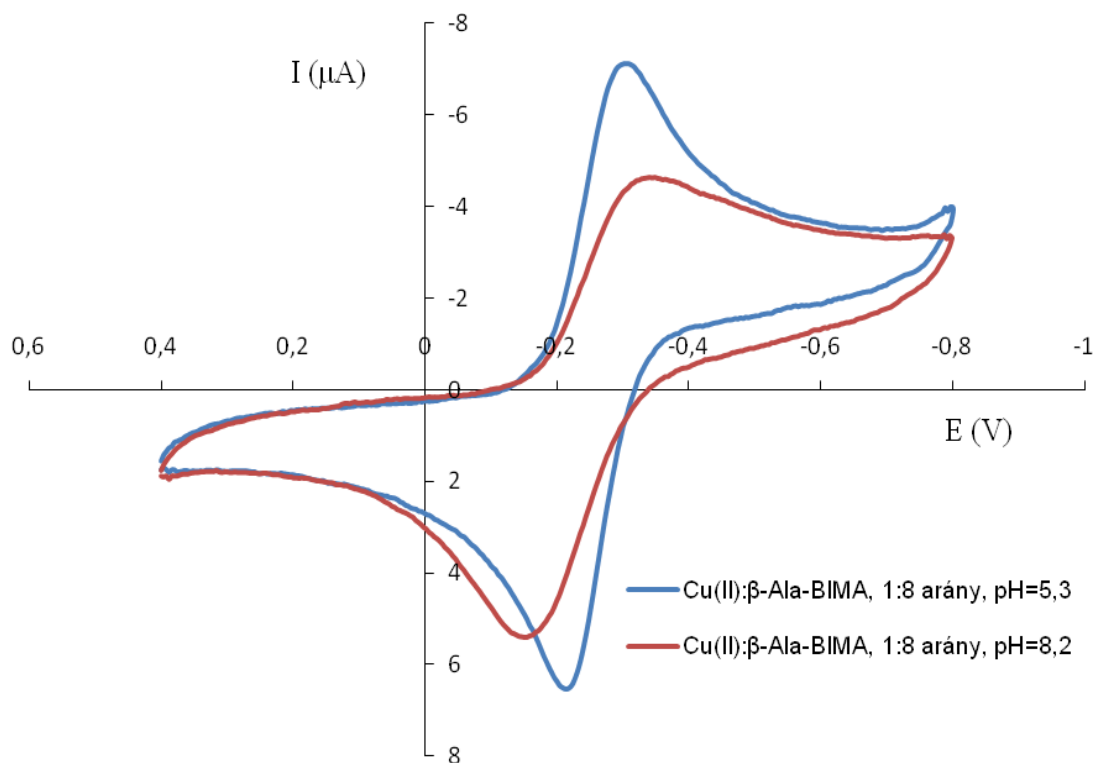
A His-BIMA és β-Ala-BIMA esetén jól értékelhető görbék csak nagy ligandum feleslegnél vehetők fel, savas illetve semleges körülmények között, valamint a β-Ala-BIMA esetében enyhén lúgos tartományban (22-25. *ábra*). Valamennyi esetben 1:8 aránynál a biszkomplexek formálpotenciálja mérhető, minden esetben négy imidazol koordináció valósul meg. A komplexek összetételében mutatkozó különbség a nem koordinálódó amino- és imidazolcsoportok eltérő protonáltságából adódik. Ez a deprotonálódás a His-BIMA esetében csekély mértékű változást eredményez. A pH további emelésének hatására jelentősen megnő a csúcstávolság, a komplex elbomlik. β-Ala-BIMA esetén a deprotonálással párhuzamosan a kétmagvú [Cu₂A₂H₂] részecske lesz a meghatározó az oldatban. Ennek keletkezése a redoxipotenciál értékének kismértékű növekedését eredményezi, ellentétben a His-BIMA-val. A kétmagvú komplex megjelenése növeli az oxidáló képességet. A pH további növelésével a β-Ala-BIMA esetén sem mérhető ciklikus voltammogram. 1:1 aránynál a komplexekre jellemző formálpotenciál egyik esetben sem mérhető, a leolvasott értékek alapján feltehetően a Cu²⁺/Cu⁺ mellett Cu⁺/Cu átalakulás is megvalósul.



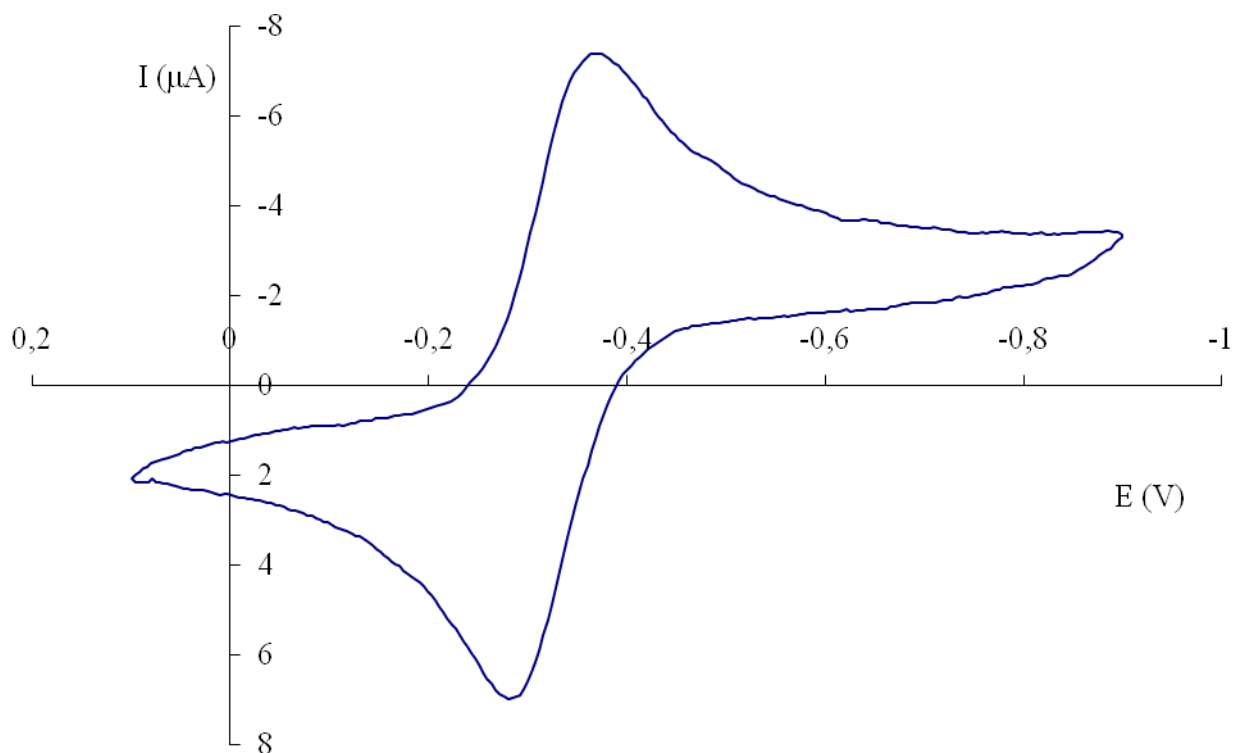
22. ábra: Cu(II):BIMA rendszer ciklikus voltammogramja ($t=25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $I=45\text{ }\mu\text{A}$, 100 mV/s scan sebesség, $\text{pH}=8,8$)



23. ábra: Cu(II):His-BIMA rendszer ciklikus voltammogramja ($t=25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $I=45\text{ }\mu\text{A}$, 100 mV/s scan, két különböző pH-n)



24. ábra: Cu(II): β -Ala-BIMA rendszer ciklikus voltammogramja ($t=25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $I=45\text{ }\mu\text{A}$, 50 mV/s scan, két különböző pH-n)



25. ábra: Cu(II):BIP rendszer ciklikus voltammogramja ($t=25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $I=45\text{ }\mu\text{A}$, 50 mV/s scan, $\text{pH}=7,0$)

Itt is megállapítható, hogy minél stabilisabb a keletkező komplex, annál nehezebben lehet azt redukálni, és a formálpotenciál érték annál negatívabb. Ha a kapott értékeket összehasonlítjuk más egyszerűbb bisz(imidazolil)-származékok redoxipotenciál értékeivel²⁷, akkor látható, hogy hasonló redoxipotenciál jellemzi az adott [CuA₂] komplexeket (5. táblázat). A ligandum méretének növekedése növeli a komplex redukálhatóságát és ez összhangban van a komplexekre jellemző stabilitási állandók értékeivel.

Az értékekből jól látszik, hogy a négy rendszer közül a Cu(II)–BIMA és Cu(II)–BIP rendszernek van a legkisebb redoxipotenciálja, így ezek a legnehezebben redukálható komplexek. BIMA koordinációja eltér a másik két ligandumétól, mert az aminocsoport is koordinálódik, a BIP esetén pedig háromfogú koordináció valósul meg, így ezzel stabilizálja a komplexet.

4. táblázat: A BIMA, His-BIMA, β -Ala-BIMA és BIP redoxi paraméterei

Ligandum	BIMA	His-BIMA			β -Ala-BIMA		BIP
Cu:A	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8
Komplex	CuA ₂	CuA ₂ H ₂	CuA ₂	CuA ₂ H ₁	CuA ₂ H ₂	Cu ₂ A ₂ H ₂	CuA ₂
pH	6,3	5,3	6,5	9,0	5,3	8,2	7,0
I _k (μ A)	–8,5	–9,1	–8,8	–1,6	–7,0	–4,3	–7,2
I _a (μ A)	11,7	9,0	9,3	1,6	7,2	5,0	7,9
ΔE (V)	0,11	0,14	0,13	0,46	0,096	0,19	0,089
I _a /I _k	1,4	0,99	1,1	1,00	1,03	1,16	1,1
$\varepsilon_{1/2}$ (V)	–0,301	–0,171	–0,212	–0,142	–0,261	–0,247	–0,327
ε° (V)	–0,091	0,039	–0,0024	–0,068	–0,051	–0,037	–0,117

5. táblázat: Egyszerű bisz(imidazolil)-származékok redoxipotenciál értékei

CuA ₂	Z-Gly-BIMA ³⁰	His-BIMA ³	Z-Ala-BIMA ³⁰	BIM ³⁰	BIMA ²	BIP ²
ε° (V)	0,045	–0,0024	–0,023	–0,071	–0,091	–0,117
lg β	14,5	16,15	16,04	17,03	16,89	17,29

SOD modell szempontjából a kapott redoxipotenciál értékek az O₂^{•–} elbontásához szükséges potenciáltartományba esnek. Ahhoz, hogy megállapítsuk a komplexek valóban jó SOD modellek-e, nem elegendő a redoxipotenciál értékét ismerni, meg kell mérni a SOD aktivitást is. A His-BIMA esetében a hárommagvú komplex ciklikus voltammetriás mérése nem is lehetséges, mert a rendszerben nincs elegendően nagy ligandumfelesleg. Így a

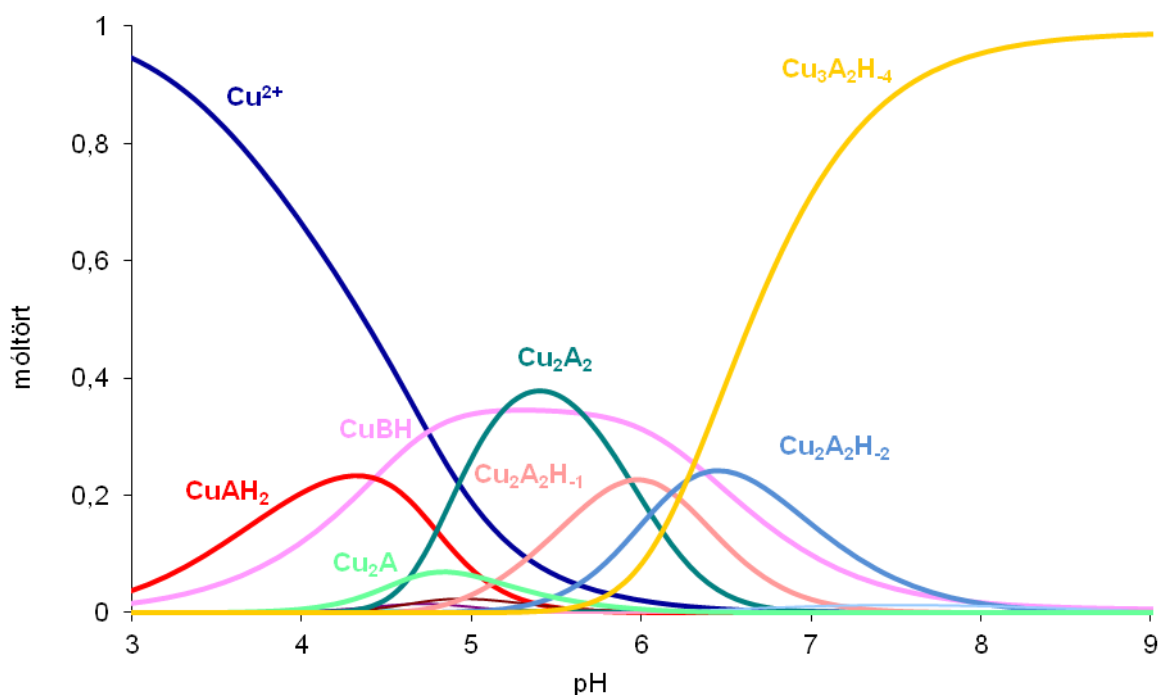
következő célunk az imidazol koordinációjú komplexek és az imidazoláto-hidas komplex SOD aktivitásának meghatározása volt.

4.3. SOD aktivitás mérésének az értékelése

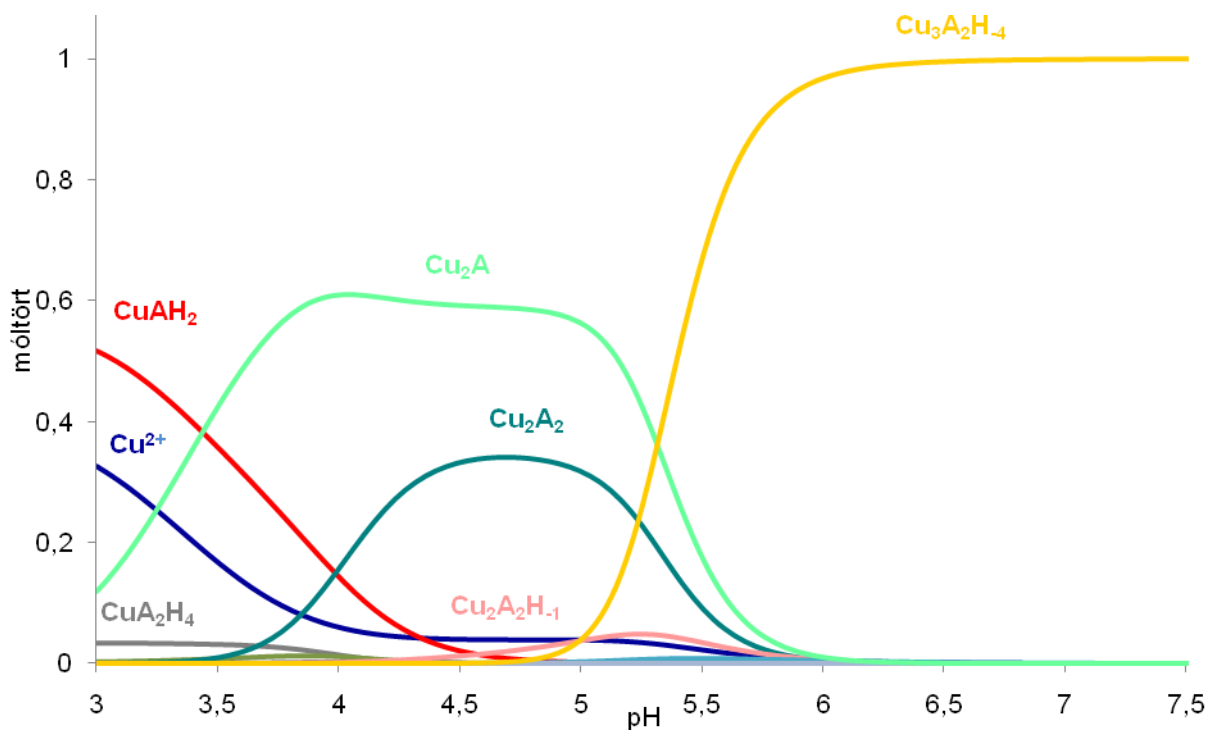
A különböző bisz(imidazolil)-származékok Cu(II)-ionnal alkotott komplexeinek a SOD aktivitását határoztuk meg, 6,8- és 7,4-es pH-n. A vizsgált ligandumok a His-BIMA, Gly-BIMA és β -Ala-BIMA. Valamint megmértük a Cu,Zn-SOD enzim aktivitását is a fentebb említett két pH-n. Valamennyi esetben 1:10 fémion:ligandum aránynál végeztük a mérést, és emellett a Cu(II):His-BIMA 3:2 arányú rendszert is vizsgáltuk.

Az irodalomból ismert, hogy a 3:2 arányú rendszerben fiziológiás pH-n a His-BIMA egy hárommagvú imidazoláto-hidas szerkezetű komplexet (5. *ábra*) alakít ki. Imidazoláto-híd a SOD enzimben is jelen van, csak Cu(II)- illetve Zn(II)-ionok között jön létre az imidazoláto-hidas szerkezet, így a $[\text{Cu}_3\text{A}_2\text{H}_4]$ komplex jó SOD modell lehet. A CV adatok csak nagy ligandumfelesleg esetén határozhatóak meg, így e rendszert ciklikus voltammetriával nem tudtuk vizsgálni, de a SOD aktivitása meghatározható volt.

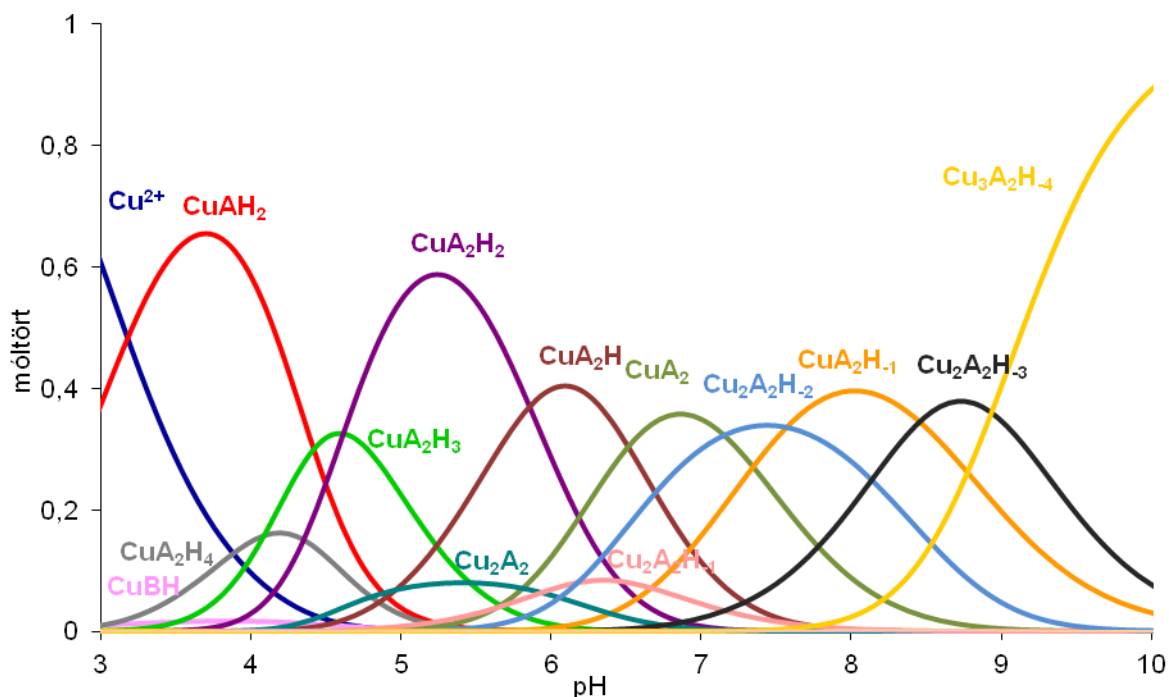
A SOD aktivitás mérését foszfát pufferben hajtottuk végre, amelyben az összfoszfát koncentráció jelentősen nagyobb a liganduménál. A 26. *ábra* a Cu(II):His-BIMA 3:2 arányú rendszerének olyan eloszlási görbét mutatja be, melynél figyelembe vettük a foszfátion jelenlétét (B komponens) és az alkalmazott kis fémion koncentrációt, és összehasonlításként a 27. *ábra* ugyanennek a rendszernek az eloszlását szemlélteti foszfátmentes oldatban. Összehasonlítva a két eloszlást az állapítható meg, hogy a savas tartományban az egyes pH-kon a részecskék nem egyforma arányban vannak jelen. A komplexképződés a foszfátiont tartalmazó és három nagyságrenddel kisebb fémion koncentrációjú rendszerben 4-es pH felett indul meg, míg a foszfátmentes oldatban, nagyobb fémion koncentrációnál 3-as pH-n már nagyobb mennyiségben van jelen komplex az oldatban, mint szabad Cu(II)-ion. Ugyanakkor az is elmondható, hogy mindkét esetben 7-es pH felett legnagyobb mennyiségben a $[\text{Cu}_3\text{A}_2\text{H}_4]$ összetételű részecske van jelen a rendszerben. A kiválasztott 7,4-es pH-n erre a hárommagvú komplexre határoztuk meg a SOD aktivitás értékét. A 28-30. *ábrán* látható a további vizsgált ligandumok Cu(II)-ionnal alkotott komplexeinek eloszlása, amelyben a fémion:ligandum aránya 1:10, a rendszer foszfátiont is tartalmaz és a Cu^{2+} koncentráció megfelel a SOD aktivitás mérésénél alkalmazott koncentrációval.



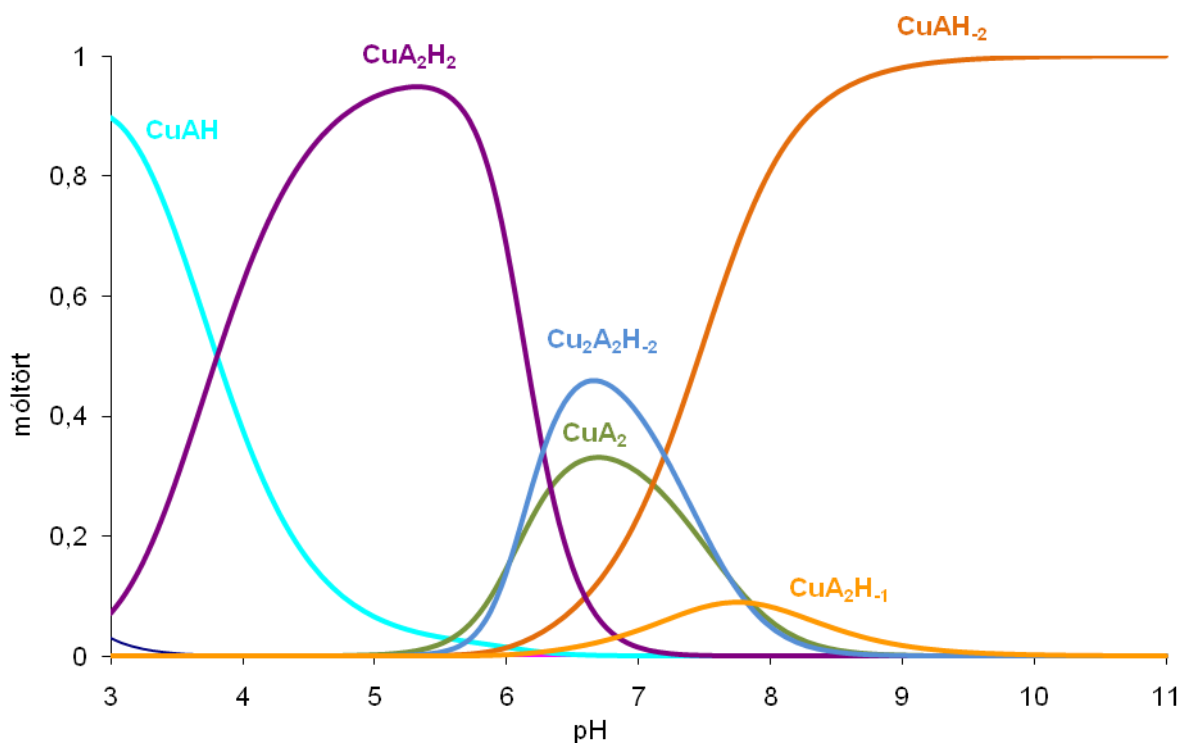
26. ábra: Cu(II):His-BIMA rendszerben képződő komplexek eloszlási görbéi a pH függvényében ($c_{\text{Cu(II)}} = 3 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$, $c_A = 2 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$, $c_B = 5 \cdot 10^{-2} \text{ mol/dm}^3$)



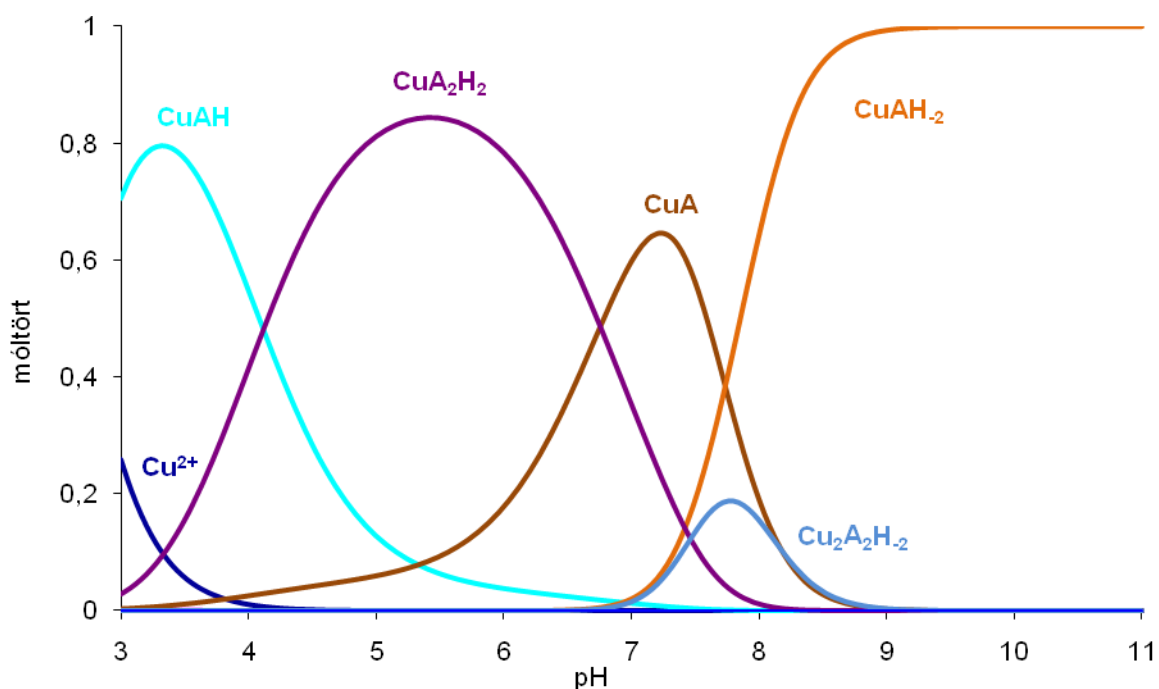
27. ábra: Cu(II):His-BIMA rendszerben képződő komplexek eloszlási görbéi a pH függvényében ($c_{\text{Cu(II)}} = 3 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$, $c_A = 2 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$)



28. ábra: Cu(II):His-BIMA rendszerben képződő komplexek eloszlási görbéi a pH függvényében ($c_{\text{Cu(II)}} = 2 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$, $c_A = 2 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$, $c_B = 5 \cdot 10^{-2} \text{ mol/dm}^3$)



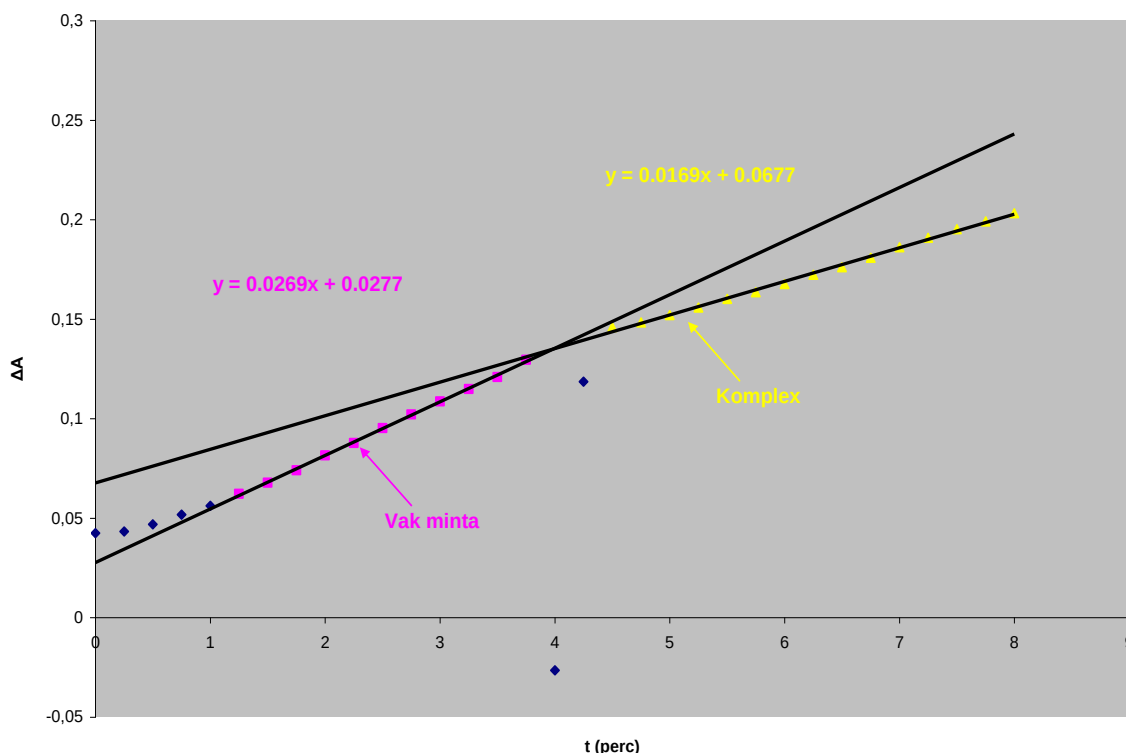
29. ábra: Cu(II):Gly-BIMA rendszerben képződő komplexek eloszlási görbéi a pH függvényében ($c_{\text{Cu(II)}} = 2 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$, $c_A = 2 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$, $c_B = 5 \cdot 10^{-2} \text{ mol/dm}^3$)



30. ábra: Cu(II): β -Ala-BIMA rendszerben képződő komplexek eloszlási görbéi a pH függvényében ($c_{\text{Cu(II)}} = 2 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$, $c_A = 2 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$, $c_B = 5 \cdot 10^{-2} \text{ mol/dm}^3$)

A SOD aktivitás mérése során az abszorbancia változását nyolc perces időintervallumban vizsgáltuk. Az első négy percben a vak minta abszorbancia változását mutatja a 31. ábrán a rózsaszín négyzetekre fektetett egyenes. Ugyanezen az ábrán a következő négy perchez rendelhető a komplex abszorbancia változása, ami a sárga háromszögekre fektetett egyenes, és látható, hogy eltér a vak minta meredekségétől. Az egyes egyenesek meredeksége rendre $\frac{\Delta A^{\text{vak}}}{t}$, $\frac{\Delta A^{\text{komplex}}}{t}$. Ezeket az értékeket behelyettesítve az inhibíciós egyenletbe (16. egyenlet), kiszámítható az egyes Cu(II)-komplex koncentrációkhoz tartozó inhibíció.

$$\% \text{inhibíció} = \frac{\left(\frac{\Delta A}{t}\right)^{\text{vak}} - \left(\frac{\Delta A}{t}\right)^{\text{komplex}}}{\left(\frac{\Delta A}{t}\right)^{\text{vak}}} \cdot 100 \quad (16)$$

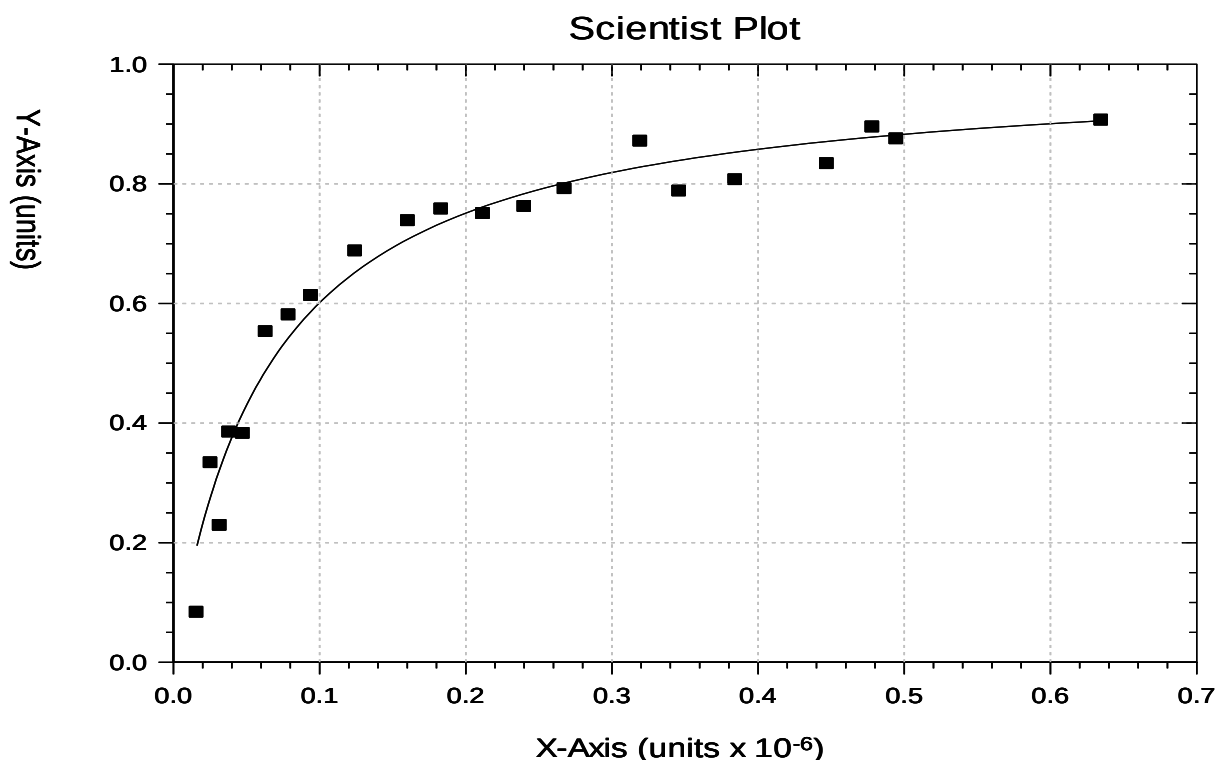


31. ábra: Az abszorbanca változása az idő függvényében egy adott koncentrációra, 4 percig a vakpróba, majd utána a komplex vizsgálata ($[\text{Cu}_3\text{A}_2\text{H}_4]^{2+}$ komplex, pH=7,4)

A SOD aktivitással rendelkező vegyületek aktivitását az IC_{50} értékkel szokás jellemezni. Ez azt a komplex-koncentrációt jelöli, amelynél a diformazán képződése az enzimutánczó vegyület távollétében mért értékhez képest a felére csökken.

A Cu(II)-komplex koncentráció függvényében ábrázolva a %-os inhibíció értékét, egy telítési görbét kapunk, az illesztést a Scientist Plot nevű programmal végeztük, ezt a 32. ábra szemlélteti. A program által számított A és B paraméterekből meg lehet határozni az 50%-os inhibícióhoz tartozó Cu(II)-komplex koncentrációját a következő egyenlet alapján:

$$0,5 = \frac{A \cdot \text{konc}}{B + \text{konc}} \quad (17)$$



32. ábra: $[\text{Cu}_3\text{A}_2\text{H}_4]^{2+}$ komplex SOD aktivitásának telítési görbéje

Az így kapott SOD aktivitás értékek mellett – más körülményeket használó kutatócsoportok eredményeivel történő jobb összehasonlítása érdekében – relatív aktivitás értékeket számoltunk, melyet a 18. egyenlet mutat be:

$$\text{relatív aktivitás} = \frac{IC_{50}(\text{Cu, Zn} - \text{SOD})}{IC_{50}(\text{komplex})} \cdot 100 \quad (18)$$

A kapott értékeket a 6. táblázat mutatja be, kiegészítve néhány irodalmi adattal.

A Cu,Zn-SOD enzim aktivitása 6,8-as és 7,4-es pH-n eltérő, a 6,8-as pH-n kapott aktivitás nagyobb a másik pH-n mért értékhez képest. A Cu(II):His-BIMA 3:2 arányú rendszer SOD aktivitás mérését végeztük el 7,4-es pH-n. Az eloszlásból (26. ábra) látható, hogy 7-es pH felett a legnagyobb mennyiségben a $[\text{Cu}_3\text{A}_2\text{H}_4]$ komplex van jelen. Cu(II):His-BIMA 1:10 arányú rendszer SOD aktivitását is megmértük 7,4-es pH-n. Ezen a pH-n imidazol koordinációjú komplexek vannak jelen. Ugyanezen a pH-n vizsgáltuk még az 1:10 arányhoz tartozó Gly-BIMA Cu(II)-ionnal alkotott komplexeit is. Ebben a rendszerben is több részecske van jelen az adott pH-n, melyek imidazol koordinációjúak. 6,8-s pH-n megmértük a Cu(II):ligandum 1:10 arányú rendszer SOD aktivitását is két ligandum, a β -Ala-BIMA és a Gly-BIMA esetében. A vizsgált oldatban kettő és három imidazol koordinációjú komplexek vannak jelen, valamint amidnitrogén és aminonitrogén is koordinálódik a fémionhoz.

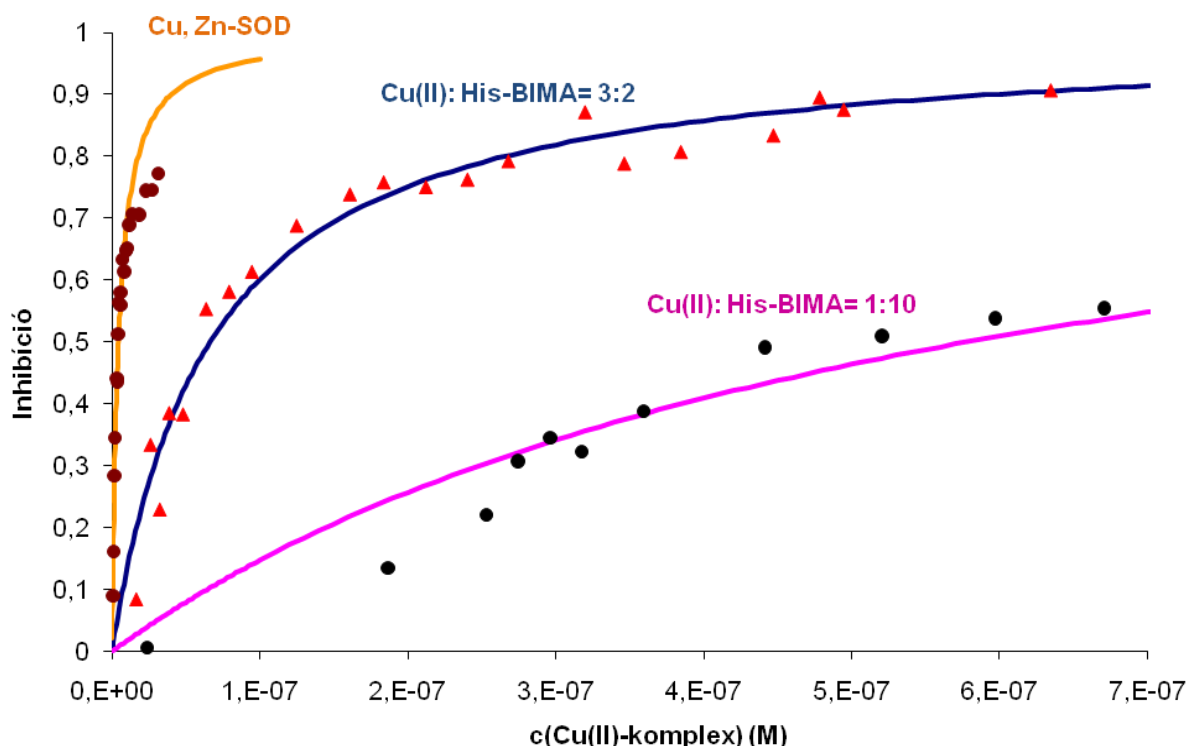
6. táblázat: Az általunk vizsgált Cu(II)-komplexe SOD aktivitása összehasonlítva néhány nagy aktivitást mutató Cu(II)-peptidkomplex korábban meghatározott IC₅₀ értékével

pH	Komplex	IC ₅₀ (μM)	Relatív aktivitás (%)	Részecskék	Koordinációs mód
7,4	Cu,Zn-SOD	0,0044	100	-	-
	Cu,Zn-SOD ³¹	0,0084		-	-
	Cu(II):H ⁺ -PO ₄ ³⁻	0,34	1,30	-	-
	Cu(II):H ⁺ -PO ₄ ³⁻³²	1,06		-	-
	Cu(II):His-BIMA 3:2	0,070	6,27	M ₃ A ₂ H ₄	4N(Im) + imidazolátó-híd
	Cu(II):His-BIMA 1:10	0,64	0,69	M ₂ A ₂ H ₂ , MA ₂ , MA ₂ H ₁	2N(Im), N ⁻ , NH ₂
	Cu(II):Gly-BIMA 1:10	4,2	0,10	MAH, M ₂ A ₂ H ₂	2N(Im) 2N(Im), N ⁻ , NH ₂
	Cu(II):Ac-(HNP GYP) ₂ -NH ₂ ³³	0,188	2,34	MAH	
	Cu(II):Ac-(PHGGGWGQ) ₄ -NH ₂ 1:1 ³³	0,175	2,51	MA	
6,8	Cu(II)-Ac-S3H4-NH ₂ ¹⁷	0,046	9,56	MA	4N(Im)
	Cu(II):Ac-HPHH-NH ₂ 1:1 ¹⁹	0,26	3,23	MAH ₁	2N ⁻ , N(Im)
	Cu(II):HVH 1:1 ³⁴	0,20	0,60	MAH ₁ MAH ₂	2N(Im), N ⁻ , NH ₂
	Cu, Zn-SOD	0,0028	100	-	-
	Cu, Zn-SOD ³⁵	0,0045		-	-
	Cu(II):H ⁺ -PO ₄ ³⁻	0,30	0,92	-	-
	Cu(II):β-Ala-BIMA 1:10	0,12	2,39	MA, MA ₂ H ₂	
	Cu(II):Gly-BIMA 1:10	0,27	1,04	M ₂ A ₂ H ₂ , MA ₂	2N(Im), N ⁻ , NH ₂ 3N(Im), N ⁻ , NH ₂
	Cu(II):Ac-HHGH-OH ³⁶	0,13	2,13	MA	3N(Im)

A Cu,Zn-SOD enzim relatív aktivitását 100%-nak véve, az állapítható meg, hogy 7,4-es pH-n a legnagyobb SOD aktivitása a hárommagvú komplexnek van, de még ez sem éri el a natív enzim aktivitásának a 10%-át. A relatív aktivitás értékek a Cu(II)–Gly-BIMA és Cu(II)– β -Ala-BIMA rendszerben kialakuló komplexek esetén a 6,8-as pH-n megmért Cu,Zn-SOD enzim relatív aktivitásához (100%) viszonyítva elenyészően kicsik.

A biszimidazol koordinációjú komplexek esetén gyakorlatilag nincs aktivitás. Jelentősebb mértékű aktivitása a Cu(II):His-BIMA 3:2 arányú (pH=7,4-es) rendszerben kialakuló imidazolato-hidas komplexnek van. Ezt összehasonlítva néhány nagy aktivitást mutató Cu(II)-peptidkomplex korábban meghatározott IC_{50} értékével (6. táblázat), az a következtetés vonható le, hogy a hárommagvú részecske aktivitása nagyobb a Cu(II)-ionhoz, illetve a többi vizsgált komplexhez képest, viszont a Cu,Zn-SOD enzimhez képest egy nagyságrenddel kisebb. Ha a relatív aktivitásokat megnézzük, akkor még a legnagyobb aktivitást mutató komplex értéke is csak 6,27%-ot ér el.

A 33. ábrán a Cu(II)-komplexek koncentrációjának függvényében ábrázolt inhibíció értékek láthatók. Telítési görbe jellegűek. A görbék jól szemléltetik az eltérő inhibíciós értékeket a Cu,Zn-SOD, az imidazolato-hidas komplex és a Cu(II):His-BIMA 1:10 aránynál kialakuló $[CuA_2]$ komplex között. A SOD-nak van a legnagyobb aktivitása. Az imidazolato-hidas komplex is egy nagyságrenddel kisebb aktivitás értéket mutat.



33. ábra: Az általunk vizsgált rendszerek inhibíciós görbéi, az egyes vonalakon a különböző jelzések a mérési pontokat jelölik (pH=7,4)

Az irodalomból ismert és a 6. táblázat adataiból az is látható, hogy a Cu(II)-Ac-HHGH-OH rendszerben képződő komplexek közül a pH 6,8-nál megjelenő, három imidazolnitrogén koordinációt tartalmazó $[\text{CuA}]^+$ részecske nagyobb aktivitású, míg a következő deprotonálódás során képződő $[\text{CuAH}_{-1}]$ részecske ($[3\text{N}(\text{Im}), \text{OH}^-]$ koordináció) aktivitása kisebb. A $[\text{CuA}]$ részecske nagyobb aktivitására magyarázatot ad annak egyszeresen pozitív töltése és, hogy ebben az esetben a fémion körül az ekvatoriális síkban lévő ligandumok kisebb térerőssége jobb hozzáférhetőséget biztosít a szuperoxid gyökanion számára. Feltételezések szerint, ha egy adott komplexben amidnitrogének koordinációja valósul meg, akkor a megnövekvő ligandumtér megnehezíti a $\text{O}_2^{\bullet-}$ axiális koordinációját, ami magyarázat lehet a csökkent aktivitásra. Több, modellezésére használt Cu(II)-komplex SOD aktivitás vizsgálatából az az általános következtetés vonható le, hogy az imidazolnitrogének koordinációja kedvező, míg az amidnitrogének koordinációja csökkenti a SOD aktivitást. A SOD aktivitás további csökkenését az is befolyásolhatja, hogy milyen stabilitású komplex képződik. Azon szerkezet esetén, ami nagy stabilitású – például ha két amidnitrogén koordinációja stabilizálja a Cu(II)-komplexet – a Cu(II)-ion Cu(I)-ionná történő redukciója nehezen fog megvalósulni. A nagyobb számú imidazolnitrogén koordinációja az enzimatisz aktivitás növekedését vonja maga után, tehát dimer, trimer ligandumok esetén nagyobb SOD aktivitás érhető el, mint a monomernél. A kutatások azt mutatják, hogy azoknál a komplexeknél, amelyekben van szabad koordinációs hely a szuperoxid gyökanion számára, nagyobb SOD aktivitás mérhető és a kétmagvú komplexek nagyobb SOD aktivitást mutatnak, mint az egymagvúak.²⁰

Ezekkel a megfigyelésekkel összhangban állnak az eredményeink. A biszimidazol koordinációjú komplexekben – bár csak imidazol koordináció valósul meg – a Cu(II) koordinációs szférája telített és szimmetrikus, torzult oktaéderes geometria feltételezhető, így a szuperoxid gyökanion számára nincs szabad koordinációs hely. Jelentősebb aktivitás csak a többmagvú komplexeknél figyelhető meg.

Összességében megállapíthatjuk, hogy a vizsgált komplexeink nem igazán jó SOD modellek, de a korábban vizsgált ligandumokhoz képest nagyobb relatív aktivitást mutat az imidazoláto-hidas komplex, így ebben az irányban kell a vizsgálatokat folytatni.

5. Összefoglalás

Az egyszerű bisz(imidazolil)-csoportot tartalmazó származékok esetén a koordináció 2, illetve 4 imidazolnitrogén donoratomon keresztül valósul meg. A Cu(II):His-BIMA 3:2 arányú rendszerben kialakuló hárommagvú komplex egy imidazoláto-hidas szerkezetet tartalmaz. A bisz(imidazolil) koordinációjú komplexek, valamint a Cu(II):His-BIMA 3:2 arányú rendszerben kialakuló $[\text{Cu}_3\text{A}_2\text{H}_4]$ összetételű komplex szerkezetében hasonlítanak a Cu,Zn-szuperoxid-diszmutáz (Cu,Zn-SOD) enzim aktív centrumához, amelyben a fémionok imidazolnitrogénekhez koordinálódnak és a két fémiont egy imidazoláto-híd köti össze. Így ezen enzimnek jó modelljei lehetnek az egyszerű bisz(imidazolil)-származékok Cu(II)-ionnal alkotott komplexei.

Célkitűzésünk a BIMA, a His-BIMA, β -Ala-BIMA, Gly-BIMA és BIP deprotonálódási állandóinak, valamint pontos koncentrációjának ellenőrzése, Cu(II)-komplexeik redoxi paramétereinek meghatározása, és SOD aktivitásának vizsgálata volt.

A ciklikus voltammetriás vizsgálatok során megállapítottuk, hogy a bisz(imidazolil) koordinációjú komplexek redoxipotenciál értékei hasonlóak, és közel vannak a nullához. A folyamat egy elektron-átmenettel járó, kvázireverzibilis reakció, és $\text{Cu(II)} \rightarrow \text{Cu(I)}$ átalakulás valósul meg. A redoxipotenciál értékek alapján megállapítottuk, hogy a kialakuló Cu(II)-komplexek stabilisabbak, mint a Cu(I)-ionnal képzett komplexek. A bisz(imidazolil) koordinációjú komplexekre jellemző formálpotenciál értékek a 0 V körüli tartományba estek, amely értékek benne vannak a SOD aktivitáshoz szükséges potenciál tartományban, de annak alsó határát közelítik meg.

A Cu(II):His-BIMA 3:2 arányú rendszerben kialakuló imidazoláto-hidas komplex redoxi sajátságainak meghatározására nem volt alkalmas a ciklikus voltammetria. Ugyanakkor SOD aktivitás mérésére lehetőség volt. Így három biszimidazol koordinációjú biszkomplexnek valamint a Cu(II)–His-BIMA rendszerben képződő hárommagvú komplexnek a SOD aktivitását is megvizsgáltuk. A hárommagvú komplex aktivitása nagyobb, mint a korábban meghatározott Cu(II)-peptidkomplexek IC_{50} értéke és relatív aktivitása, viszont a Cu,Zn-SOD-enzimhez képest egy nagyságrenddel kisebb. Ez a komplex így jó kiindulópontot jelenthet megfelelő SOD modellek tervezésében.

6. Summary

In the case of simple bis(imidazolyl) derivatives the coordination of the metal ion occurs through 2 or 4 imidazole nitrogen donoratoms. The complex that is formed in the Cu:His-BIMA system at 3:2 metal ion / ligand ratio contains an imidazolato bridge. Complexes with bis(imidazolyl) type of coordination and the complex: $[Cu_3A_2H_4]$ that is formed in the Cu(II):His-BIMA system are very similar to the active centre of Cu,Zn-superoxide dismutase enzyme as in the native enzyme Cu(II) and Zn(II) are connected through an imidazolato bridge. Thus the Cu(II) complexes of the simple bis(imidazolyl) derivatives can be good structural models of the enzyme.

Our aim was to check the deprotonation constants and the precise concentration of BIMA, His-BIMA and β -Ala-BIMA, to determine the redox parameters of some Cu(II) complexes and to measure the SOD activity of a complex.

Based on the cyclic voltammetric studies we concluded that the formal reduction potential values of the complexes containing bis(imidazolyl) coordination are similar to each other and close to zero. The process is a one-electron quasi reversible redox process during which the Cu(II) is reduced to Cu(I). The formal reduction potential values show that the complexes formed with Cu(II) ion are more stable than the complexes formed with Cu(I) ion.

The redox parameters of the imidazolato bridged complex – that is formed in the Cu:His-BIMA system at 3:2 metal ion / ligand ratio – could not be determined by cyclic voltammetry. However, we could measure the SOD activity of this complex. Its SOD activity is bigger than that of the previously determined Cu(II)-peptide complexes but compared to the native enzyme it is still one order of magnitude lower. These results reflect that the complex can be a good structural model of the SOD enzyme.

7. Irodalomjegyzék

- 1 Várnagy, K., Sóvágó, I., Ágoston, K., Likó, Zs., Süli-Vargha, H.: Magyar Kémiai Folyóirat, **100**, 127 (1994)
- 2 Várnagy, K., Sóvágó, I., Ágoston, K., Likó, Zs., Süli-Vargha, H., Sanna D., Micera, G.: J. Chem Soc. Dalton Trans., 2939 (1994)
- 3 Ősz, K., Várnagy, K., Süli-Vargha, H., Sanna, D., Micera, G., Sóvágó, I.: Inorg. Chim. Acta, **339**, 373 (2002)
- 4 Ősz, K., Várnagy, K., Süli-Vargha, H., Sanna, D., Micera, G., Sóvágó, I.: J. Chem. Soc. Dalton Trans., 2009 (2003)
- 5 Ősz Katalin: Doktori (PhD) értekezés, Debrecen (2003)
- 6 Bard, A.J., Parsons R., Jordan J., *Standard potentials in aqueous solution*, Marcel Dekker Incl., New York (1985)
- 7 Greenwood, N.N., Earnshaw, A., *Chemistry of the Elements 2ed.*, Butterworth-Heinemann (1997)
- 8 James, B.R., Williams, R.J.P., 2007-2019, (1961)
- 9 Bonomo, R.P., Impellizzeri, G., Pappalardo, G., Purrello, R., Rizzarelli, E., Tabbi, G., J. Chem. Soc., Dalton Trans., 3851-3857, (1998)
- 10 Takehara, K., Ide, Y., Inorg. Chim. Acta, **186**, 73-78 (1991)
- 11 Takehara, K., Ide, Y., Inorg. Chim. Acta, **183**, 195-202 (1991)
- 12 Bonomo, R.P., Impellizzeri, G., Pappalardo, G., Rizzarelli, E., Tabbi, G., Chem. Eur. J., **6** (22), 4195-4202 (2000)
- 13 Bonomo, R.P., Di Natale, G., Rizzarelli, E., Tabbi, G., Vagliasindi, L.I., Dalton Trans., 3637-2646 (2009)
- 14 Bonomo, R.P., Pappalardo, G., Rizzarelli, E., Tabbi, G., Vagliasindi, L.I., Dalton Trans., 3805-3816 (2008)
- 15 Hureau, C., Charlet, L., Dorlet, P., Gonnet, F., Spadini, L., Anxolabéhère-Mallart, E., Girerd, J-J., J. Biol. Inorg. Chem., **11**, 735-744 (2006)
- 16 Timári Sarolta: Doktori (PhD) értekezés, Debrecen (2012)
- 17 Timári, S., Cerea, R., Várnagy, K., J. Inorg. Biochem., **105** 1009-1017 (2011)

- 18 Azab, H.A., Banci, L., Borsari M., Luchinat, C., Sola, M., Viezzoli, M.S., *Inorg. Chem.*, **31** 4649-4655 (1992)
- 19 Simon, I.N.: Doktori (Ph.D.) értekezés, Szeged (2008)
- 20 Kállay Csilla: Doktori (PhD) értekezés, Debrecen (2005)
- 21 Buglyó, P., *pH-metria*, Oktatási segédanyag, Debrecen (2009)
- 22 Irving, H. M., Miles, M.C., Pettit, L. D.: *Anal. Chim. Acta*, **38**, 475 (1967)
- 23 Gans, P., Sabatini, A., Vacca, A.: *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1195 (1985)
- 24 Zékány, L., Nagypál, I.: *Computation Methods for the Determination of Formation Constants*, **8**, (ed.: Leggett, D. J.) 291 (1985). Plenum Press, New York
- 25 Farkas, E., *Ciklikus voltammetria feladata a műszeres analitika gyakorlaton*, Oktatási segédanyag, Debrecen
- 26 Kissinger, P. T., Heineman, W. R.: *J. Chem. Edu.*, **60**, 290-293 (1983)
- 27 Balogh, G.: Diplomamunka, Debrecen (2009)
- 28 Cerea, R.: Diplomamunka, Debrecen (2010)
- 29 Szilágyi, I., Labádi, I., Hernádi, K., Pálinkó, I., Nagy, N.V., Korecz, L., Rockenbauer, A., Kele, Z., Kiss, T.: *J. Inorg. Biochem.*, **99**, 1619-1629 (2005)
- 30 Demjén, J.: Diplomamunka, Debrecen (2010)
- 31 Muller, J., Felix, K., Maichle, C., Lengfelder, E., Strahle, J., Weser, U.: *Inorg. Chim. Acta*, **233**, 11, (1995)
- 32 Bonomo, R.P., Bruno, V., Conte, E., De Guido, G., La Mendola, D., Maccarone, G., Nicoletti, F., Rizzarelli, E., Sortino, S., Vecchio, G.: *Dalton Trans.*, 4406 (2003)
- 33 Stanczak, P., Kozłowski, H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **352**, 198-202. (2007)
- 34 Boka, B., Myari, A., Sóvágó, I., Hadjiliadis, N.: *J. Inorg. Biochem.*, **98**, 113 (2004)
- 35 Jancsó, A., Paksi, Z., Jakab, N.I., Gyurcsik, B., Rockenbauer, A., Gajda, T., *Dalton Trans.*: 3187 (2005)
- 36 Casolaro, M., Chelli, M., Ginanneschi, M., Laschi, F., Messori, L., Muniz-Miranda, M., Papini, A.M., Kowalik-Jakonwska, T. and Kozłowski, H., *J. Inorg. Biochem.*, **89**, 181-190 (2002)

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Fábián István tanszékvezetőnek, hogy TDK munkámat az általa vezetett Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszéken készíthettem el.

Őszintén köszönöm témavezetőmnek, Dr. Várnagy Katalin egyetemi docensnek, hogy a közösen végzett munka során rengeteg dologra megtanított, önzetlenül segített mindenben és nagy türelemmel magyarázta el az új módszerek elméleti hátterét, használatát.

Köszönettel tartozom a Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoport minden tagjának, hogy kérdéseimre választ adtak, és baráti légkört biztosítottak munkám elvégzéséhez.

Külön köszönöm Timári Saroltának, hogy megtanította a műszerek használatát, és tanácsért mindig fordulhattam hozzá.

A dolgozat a TÁMOP-4.2.2/B-10/-1-2010-0024 pályázat anyagi támogatásával készült.