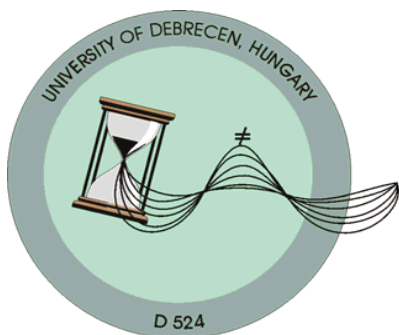




Az 1-metil-triptofán és a triptofánamid oxidációja peroxomonoszulfát-ionnal

Balogh Ágnes és Csimbók Ervin
IV. vegyészmérnök Bsc.

Témavezető: Dr. Lente Gábor
egyetemi docens

Debreceni Egyetem, Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék

2012.

TARTALOM

1. Bevezetés	3
2. Irodalmi áttekintés	4
2.1. A szabad triptofán, valamint a peptidekben és fehérjékben lévő triptofán oxidációja	4
2.2. A triptofán oxidációjának mechanizmusa néhány szervesetlen gyök-anionnal	4
2.3. A triptofán oxidációjának vizsgálata plazma lipoproteinekben	5
2.4. Aminosavak oxidációjának kinetikája és mechanizmusa peroxomonoszulfát jelenlétében	5
2.5. Vizes triptofán fotoionizációja nanoszekundomos UV lézerrel: A hidratált elektron bomlásának, kinetikájának, mechanizmusának, mennyiségi kitermelésének hőmérsékletfüggése	6
3. Célkitűzések	7
4. Kísérleti körülmények	8
5. Eredmények és értelmezésük	9
5.1. Triptofánmaddal végzett kísérletek	9
5.1.1. Előkísérletek	9
5.1.2. Mérési eredmények és értelmezésük	12
5.2. 1-metil triptofánnal végzett kísérletek	23
5.2.1. 1-metil-triptofán és a peroxomonoszulfát-ion reakciója puffer nélkül	23
5.2.2. 1-metil-triptofán és a peroxomonoszulfát-ion reakciója puffer jelenlétében	24
5.2.3. 1-metil-triptofán és a peroxomonoszulfát-ion reakciója puffer jelenlétében a reakció végbemenetelét követő vizsgálat	26
5.2.4. 1-metil-triptofán és a peroxomonoszulfát-ion reakciója savas közegben	27
6. Összefoglalás	30
8. Köszönetnyilvánítás	31
9. Irodalomjegyzék	32

1. Bevezetés

A triptofán a 20 létfontosságú aminosav egyike. Esszenciális aminosav, azaz az emberi szervezet nem képes előállítani, azonban az egészséges működéshez nélkülözhetetlen, így táplálékkal kell pótolni (például: tej, tojás, hal, csokoládé, földimogyoró). L- és D-sztereoizomerei egyaránt ismertek, de az utóbbi természetben való előfordulása nagyon ritka. A szervezet B_3 -vitamint, illetve szerotonint állít elő a triptofánból. A növények antranilsavból vagy sikimisavból szintetizálják. A triptofánt először Frederick Hopkins izolálta a kazein hidrolízise során 1901-ben. Egyik szerkezetileg fontos jellemzője az oldalláncban található indolgyűrű.

Az indol kondenzált policiklusos heteroaromás vegyület, melynek elsősorban származékai a jelentősek. Jellemző reakciója az addíciós (polimerizációs) és az elektrofil szubsztitúció. Az indolgyűrű reaktívabb részét a heterogyűrű képviseli. A kondenzált benzolgyűrű a savérzékenységet nem szünteti meg, csak kis mértékben csökkenti.

A kálium-peroxomonoszulfátot (KHSO_5) széles körben használják oxidálószerként. Kereskedelmi forgalomba összetett sóként oxon ($2\text{KHSO}_5 \cdot \text{K}_2\text{SO}_4 \cdot \text{KHSO}_4$) néven kerül. Felhasználják a medencék vizének tisztántartásához, csökkentve ezzel a klórfelhasználást, valamint szennyvizek toxikus vegyületektől való mentesítésére is alkalmazzák. Az oxon és a triptofán reakciója az említett felhasználások miatt vizsgálendő, mivel az ivóvízkészleten keresztül az emberi szervezetbe juthatnak a bomlástermékek. Ezért fontos a triptofán oxidálószerrel való reakcióinak kinetikai tanulmányozása.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A szabad triptofán, valamint a peptidekben és fehérjékben lévő triptofán oxidációja³

Ebben a munkában a fehérjékben és peptidekben lévő szabad triptofán és kötött triptofánegységek oxidációját tanulmányozták hidrogén-peroxiddal. A szabad triptofánon kívül négy triptofántartalmú peptidet és lizozimet használnak vizes közegben szubsztrátként. A triptofán oxidációs sebességének és a 16 lehetséges bomlástermék képződésének vizsgálatánál RP-HPLC-t (fordított fázisú HPLC), UV-Vis-t, fluoreszcenciás, valamint diódasoros detektálást alkalmaztak. Ezekkel a vizsgálati módszerekkel bizonyították, hogy a triptofán bomlási sebessége a lizozim, rövid-láncú peptidek, szabad triptofán sorrendben növekszik. A teljes triptofánvesztésnek csak a 20 %-át lehet megmagyarázni az azonosított bomlástermékekkel. Oxindolalanint (Oia), 3a-hidroxi-1,2,3,3a,8,8a-hexahidropirrolo[2,3-b]indol-2-karbonsavat (PIC), N-formilkinurenint (NFK), dioxindolalanint (DiOia), kinurenint (Kyn) és 5-hidroxitriptofánt (5-OH-Trp) azonosítottak bomlási termékeként. A triptofán szerkezetében lévő pirrolgyűrű bizonyult a leghajlamosabbnak az oxidációra. A rövidebb peptideket, mint a H-Ala-Trp-Ala-OH-t a Pronáz-E enzim teljes mértékben hidrolizálja, fő bomlási termékeként Oia és NFK azonosítható, a Kyn-t, DiOia-t, PIC-t és az 5-OH-Trp-t pedig csak kis mennyiségben lehetett kimutatni. Fehérjékben hidrogén-peroxiddal történő oxidáció során Kyn, Oia, és DiOia jelenlétét tapasztalták. Megállapították, hogy a peptidekben sokkal kevesebb bomlásterméket lehet kimutatni.

2.2. A triptofán oxidációjának mechanizmusa néhány szervesetlen gyök-anionnal⁴

A halogenidionok, a tiocianátion, a karbonátion és a szelenit ion hidroxilgyökökkel való oxidációja során keletkező gyökök oxidálják az aminosavakat, így például a triptofánt és a tirozint is. A bromidionból, tiocianátionból, karbonátionból és szelenit ionból képződött gyökök és a triptofán közötti reakcióban nyert termékek spektrumai és kinetikai tulajdonságai nagyon hasonlóak mind semleges, mind lúgos közegben. A triptofán szabad gyök képződését kísérő spektrális változás és a megfigyelt bomlási kinetikát 3-as pH-n is tanulmányozták. A tapasztalatok szerint a triptofán (TrpH) oxidációja Br_2^- és $(\text{SCN})_2^-$ gyök-anionokkal olyan gyököt ad, amelyeket protonálódik ($\text{pK} \sim 4.3$) és 3-as pH-n egyszeres pozitív töltéssel

rendelkezik. A protonált szabad gyökös TrpH^+ további reakcióba lép tiocianáttal, emiatt az $(\text{SCN})_2^-$ látszólagos reaktivitása csökken a folyamat során, különösen kicsi pH-n, nagy tiocianát- vagy kicsi triptofánkoncentráció esetében. A tiocianát és a triptofán reakciójának kinetikai modellje a tiocianát ion egyensúlyi koncentrációjának a változtatását javasolja protonnal TrpH -val és tiocianáttal. A cikk szerzői modellt állítottak fel, amely értelmezte a kinetikai és egyensúlyi megfigyeléseket.

2.3. A triptofán oxidációjának vizsgálata plazma lipoproteinekben⁵

A humán lipoproteinek apoprotein komponenseinek [high-density lipoprotein (HDL) és low-density lipoprotein (LDL)] és ezek alosztályának oxidációja során mérték a triptofán fluoreszcijának csökkenését a mieloperoxidáz/ $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Cl}^-$ rendszerben. A triptofán az egyik legérzékenyebb aminosav a hipoklorossavval való oxidációval szemben. A nagyobb hidrogén-peroxid-koncentráció mindkét lipoproteinben gátló hatást fejt ki. Ez a tény azzal magyarázható, hogy a mieloperoxidáz a H_2O_2 -t katalázszerű aktivitása révén HOCl keletkezése nélkül bontja le. Ez úgy lehetséges, hogy vagy a HOCl túlzott termelése vezet a mieloperoxidáz gyors inaktiváláshoz, vagy a H_2O_2 reagál a hipoklorossavval oxigénatomot adva. Az LDL és HDL-lel lezajló reakciók optimális sebessége pH = 6 esetén figyelhető meg. A HDL gyorsabban változik, mint az LDL, melynek oka a különböző méret és különböző fehérjék/lipid arány lehet. Megfigyelték, hogy nincs különbség az LDL alosztályainak reakciósebességében.

2.4. Aminosavak oxidációjának kinetikája és mechanizmusa peroxomonoszulfátion jelenlétében⁶

Ebben a munkában az aminosavak (AA) oxidációjának kinetikáját tanulmányozták a peroxomonoszulfát-ion (PMS) jelenlétében, formaldehid távol- és jelenlétében. A vizsgálatok alapján az alábbi eredményeket kapták:

- állandó $[\text{H}^+]$ és formaldehid nélkül a sebességi egyenlet: $\frac{-d[\text{PMS}]}{dt} = k_a [\text{AA}][\text{PMS}]$
- állandó $[\text{H}^+]$ és formaldehid jelenlétében a sebességi egyenlet:

$$\frac{-d[\text{PMS}]}{dt} = k_b [\text{AA}][\text{HCHO}][\text{PMS}] + k_c [\text{HCHO}][\text{PMS}]$$

Az aminosav és a peroxomonoszulfát-ion közötti reakció formaldehid jelenlétében kb. 10^5 faktossal gyorsabb. Ez valószínűleg a Schiff-bázis-képződés katalitikus hatásának tudható be. Az aminosavak és a peroxomonoszulfát-ion között lejátszódó oxidációs folyamatban a valin jelentősen különbözik a többi aminosavtól (például glicin, alanin, leucin stb). A valin oxidációja peroxomonoszulfát-ionnal bruttó másodrendű kinetikát mutat állandó $[H^+]$ mellett, és elsőrendű mind az aminosavra, mind az az oxidálószerre nézve. A többi aminosav oxidációjában viszont a termék, azaz az aldehid katalizálja a folyamatot. Ez a tapasztalat magyarázható azzal, hogy az aminosavak oxidációjából származó termék adduktumot (Schiff-bázist) képez az eredeti aminosavval. A valin esetében viszont a Schiff-bázis képződése valószínűleg nem lehetséges a szterikus gátlások miatt. Annak érdekében, hogy megtalálják a valin viselkedéséért felelős szterikus gátlás forrását a peroxomonoszulfáttal való oxidáció során, a formaldehid katalitikus hatását néhány évtrendileg fontos aminosav, mint például a β -fenilalanint, izoleucint és treonin esetében is elvégezték a peroxomonoszulfáttal való oxidációs reakcióban.

2.5 Vizes triptofán fotoionizációja nanoszekundumos UV lézerrel: a hidratált elektron bomlásának, a folyamat kinetikájának és mechanizmusának vizsgálata⁷

Ebben a munkában a vizes triptofán oldat természetes pH-n való fotoionizációját 266 nm-en tanulmányozták 3-18 mJ energiájú, és 7 ns impulzusidejű lézer villanófény-fotolízissel. Abszorbanciamérések segítségével hidratált elektronokat sikerült detektálni a folyamatban. A fotoionizációs mechanizmus az egy- és kétfotonos eljárások kombinációjának bizonyult. A triplett állapot és a fotoionizáció energiától való függésének mérési eredményei azt sugallták, hogy mindkét eljárás tartalmazza ugyanazt az egy- és kétfotonos köztiterméket. A hidratált elektronok száma a hőmérséklet növekedésének hatására növekszik, ez elsősorban az egyfotonos fotoionizációs útnak tulajdonítható. A hidratált elektronok bomlása nem volt leírható exponenciális függvénnyel.

3. Célkitűzések

Tudományos diákköri dolgozatunk célja két triptofánszármazék, az 1-metil-L-triptofán és L-triptofánamid és a peroxomonoszulfát-ion közötti reakciók kinetikai tanulmányozása volt. Elsődleges feladatunknak tűztük ki az oxidációs folyamatban a lépések számának s az első lépés(ek) sebességi egyenletének meghatározását.

4. Kísérleti körülmények

Kísérleteinkben a triptofánszármazékainkból (Aldrich) többnyire 1×10^{-3} M koncentrációjú oldatokat készítettünk, ahol az analitikai mérlegen bemért szilárd mintáinknak moláris tömegei:

- 1-metil-triptofán : 218,25 g/mol
- triptofánamid : 239,70 g/mol

A peroxomonoszulfát-ion koncentrációját 2×10^{-3} M - 0,5 M tartományban változtuk az egyes kísérletek során. Az oldatok elkészítéséhez szilárd oxont használtunk ($2\text{KHSO}_5 \cdot \text{K}_2\text{SO}_4 \cdot \text{KHSO}_4$). Ez más peroxoszámazékhoz képest igen stabil vegyület, ennek ellenére hatóanyagtartalmát bizonyos időközönként ellenőrizni kell jodometriás titrálással. A szilárd anyag vizes oldata jóval kevésbé stabil, mint a szilárd anyag, ebből kifolyólag az oldatot minden alkalommal frissen készítettük. A kísérleteknél használt oxidálószer moláris tömege 344,03 g/mol, az anyag közvetlenül a mérések előtt meghatározott összegképlete $1,787\text{KHSO}_5 \cdot \text{K}_2\text{SO}_4 \cdot \text{KHSO}_4$ volt.

A triptofán oxidációját savas és semleges közegben egyaránt vizsgáltuk. Ezen kísérleteknél foszfátpuffert, illetve kénsavat használtunk. A kénsavat a koncentrációnak megfelelően egy előzően elkészített törzsoldatból hígítottuk. A foszfátpuffert analitikai mérlegen bemért szilárd NaH_2PO_4 -ból (156,01 g 50 cm^3 -ben) és szilárd Na_2HPO_4 -ból (177,99 g 50 cm^3 -ben) készített oldatok elegyítésével állítottuk elő (100 cm^3).

Méréseinket Shimadzu UV-1800 spektrofotométeren, Perkin Elmer Lambda 2S UV/Vis spektrofotométeren, valamint Perkin Elmer Lambda spektrofotométeren végeztük. Az utóbbi műszerben nyolc férőhelyes küvettaváltó van, amely hosszú idejű reakciók kinetikai vizsgálatára a szokásosnál lényegesen időtakarékosabb lehetőséget nyújt. Minden esetben dugós kvarc tandemkuvettát vagy hagyományos dugós kuvettákat használtunk (Hellma Suprasil). A mérési hullámhossztartomány 200-400 nm között volt. Eredményeink kiértékeléséhez Origin® 6.1 és Microsoft Office 2010® programokat használtuk.

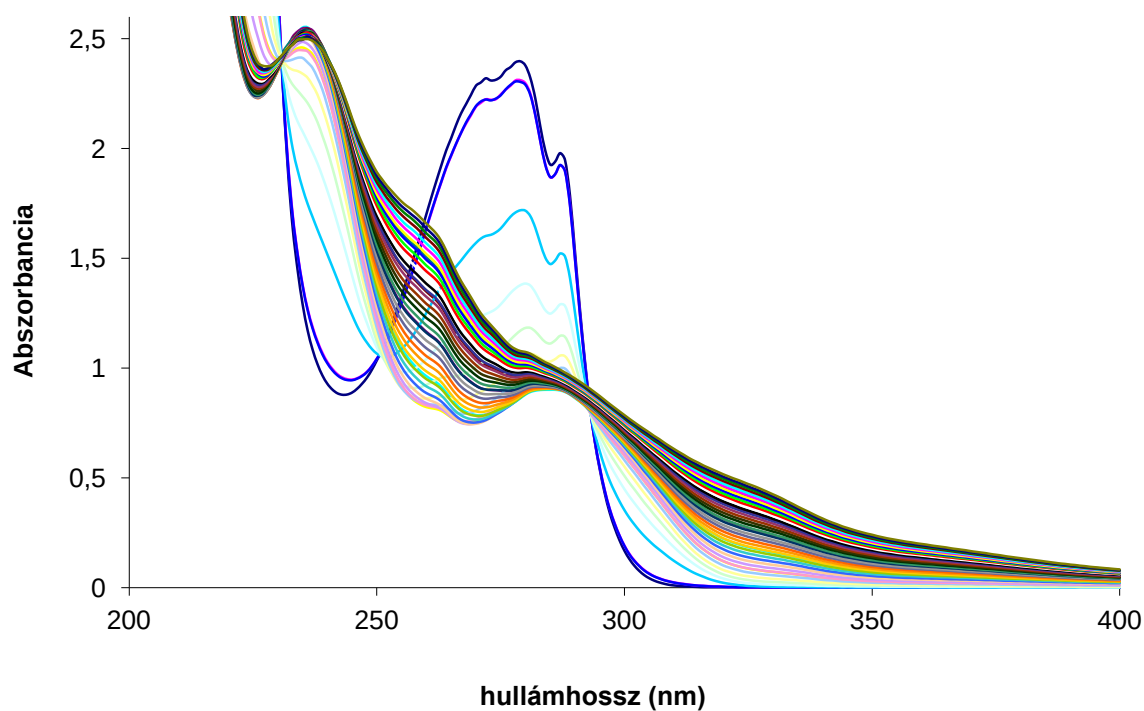
Minden reakciót 25°C -on termosztált környezetben vizsgáltunk.

5. Eredmények és értelmezésük

5.1. Triptofánamiddal végzett kísérletek

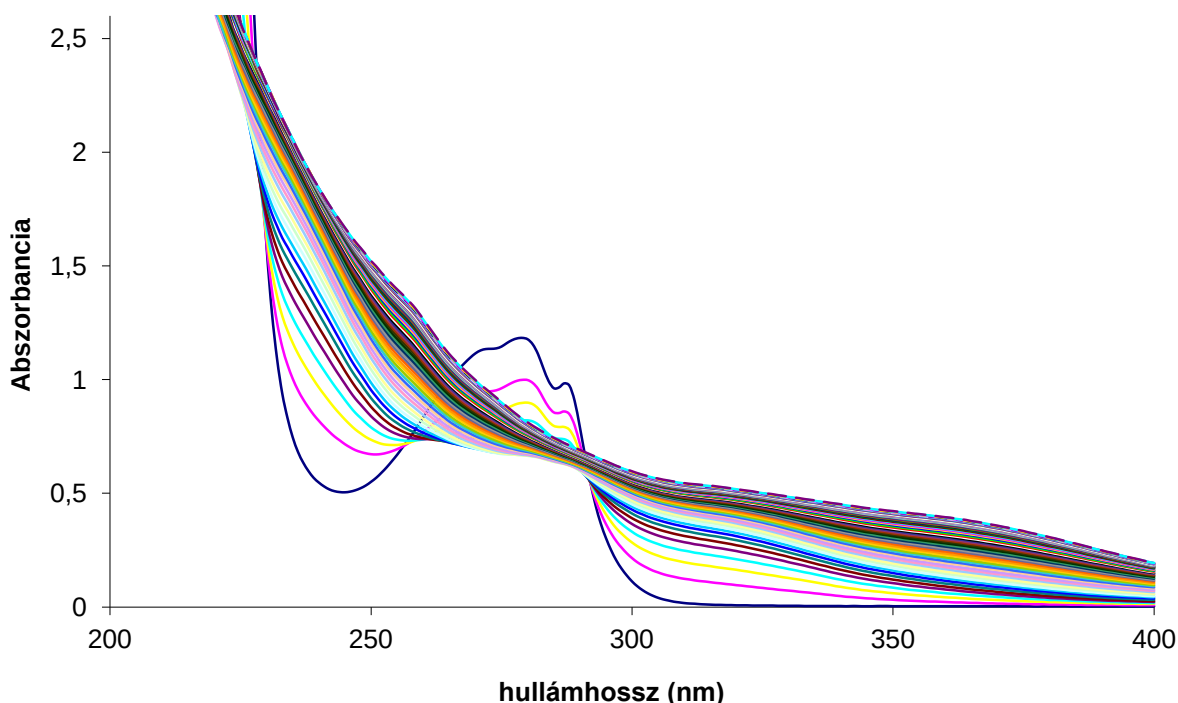
5.1.1. Előkísérletek

Az előkísérleteink során a spektrumokat kétsugaras, pásztázó spektrofotométeren vettük fel. A vizsgálatoknál tandemküvettát használtunk, 200-400 nm-ig terjedő ultraibolya tartományban. A triptofánamid-oldat koncentrációját 1×10^{-3} M-nak, az oxon koncentrációját pedig 2×10^{-3} M-nak választottuk. A keverés után 5 percenként összesen 60 spektrumot regisztráltunk. Az 1. ábra szemlélteti, hogy a kinetikai méréseknél a 278 nm olyan hullámhossz, amelyen jelentős változásokat lehet detektálni.

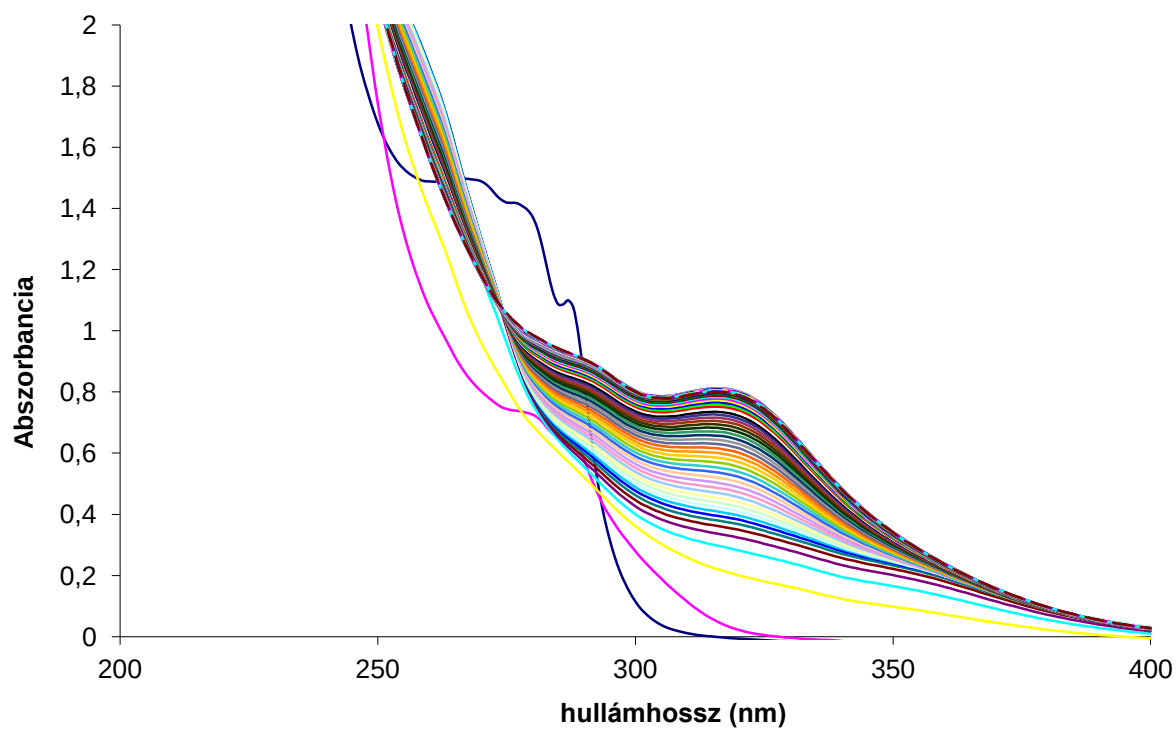


1. ábra Triptofánamid és peroxomonoszulfát-ion reakciója; $[\text{Trp}] = 1 \times 10^{-3}$ M, $[\text{HSO}_5^-] = 2 \times 10^{-3}$ M, $T = 25^\circ\text{C}$, 200-400 nm

Következő lépésként vizsgáltuk a triptofánamid és a peroxomonoszulfát-ion reakcióját savas és semleges közegben. A 2. ábra a foszfátpufferben detektált spektrális változásokat mutatja közel 7-es pH-n. A 3. ábra pedig ugyanezen reakciót kénsavas közegben 3,3-as pH-n. A triptofánamid-oldat koncentrációja 1×10^{-3} M, a peroxomonoszulfát-ion koncentrációja pedig 1×10^{-3} M volt mindkét esetben. A kísérlet kivitelezésénél az előzőekhez hasonlóan tandemküvetét használtunk és a spektrumot keverés előtt egyszer, illetve keverés után 5 órán keresztül 5 percenként vettük fel. Mindhárom ábrára jellemző, hogy csak viszonylag szűk időintervallumban található rajtuk izobesztikus pont, vagyis összességében a teljes reakcióban nincsen. A spektrumok azonban több helyen is átmetszik egymást. Ebből egyértelműen következik, hogy a tanulmányozott reakció több kinetikai lépést tartalmaz.



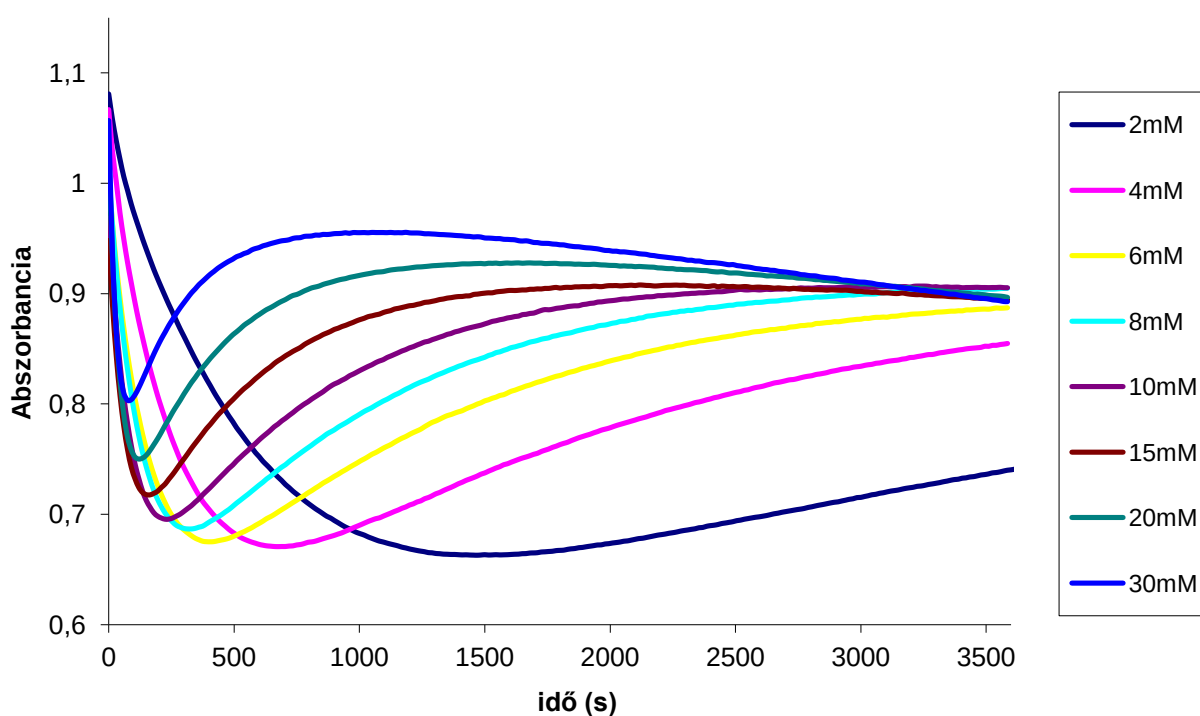
2. ábra A triptofánamid és a peroxomonoszulfát-ion közötti reakció foszfátpufferben; $[\text{Trp}] = 1 \times 10^{-3}$ M, $[\text{HSO}_5^-] = 2 \times 10^{-3}$ M, $[\text{foszfátpuffer}] = 0,1$ M, $\text{pH} \approx 7$, $T = 25^\circ\text{C}$, 200-400 nm



3. ábra Triptofánamid és a peroxomonszulfát reakciója savas (H_2SO_4) közegben; $[\text{Trp}] = 1 \times 10^{-3} \text{ M}$, $[\text{HSO}_5^-] = 1 \times 10^{-3}$, $[\text{H}_2\text{SO}_4] = 0,1 \text{ M}$, $\text{pH} = 3,3$, $T = 25^\circ \text{C}$, 200-400 nm

5.1.2. Részletes kinetikai vizsgálat

A sebességi egyenletet a pszeudozérusrendek módszerével határoztuk meg, azaz az egyik reaktánshoz képest a többit nagy feleslegben alkalmaztuk. A triptofánamid különböző koncentrációjú oxidálószerrel történő reakcióját szemlélteti a 4. ábra. Ezeknél a kísérleteknél a triptofán a meghatározó reaktáns, így a görbealak analíziséből ennek rendűségére lehet következtetni. Az abszorbancia-idő görbéken az oxonfeleslegtől függően egy vagy két szélsőérték van, ebből egyértelműen következik, hogy legalább három egymást követő folyamat történik az első óra alatt. A HSO_5^- rendűségére vonhatunk le következtetést, a nagy feleslegben alkalmazott oxidálószer koncentrációváltozásának vizsgálatából. A görbék első, csökkenő szakaszát exponenciális (pszeudo-elsőrendű) görbével igen jól lehetett illeszteni, így a sorozat első reakciója triptofánra nézve elsőrendű.



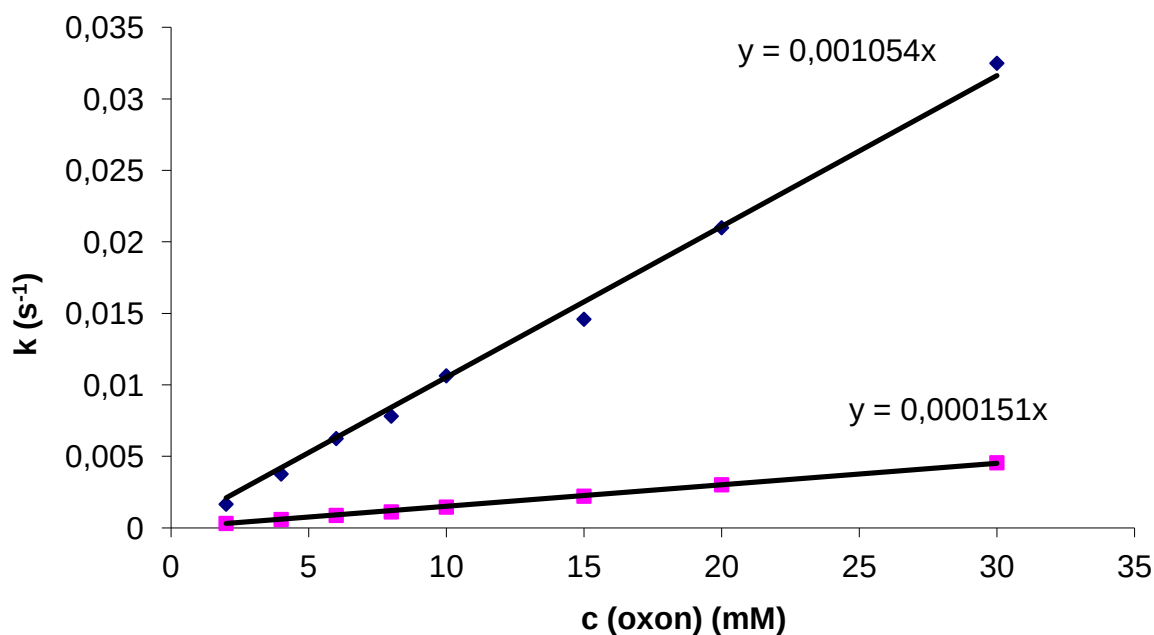
4. ábra A triptofánamid és peroxomonoszulfát-ion reakciója foszfátpuffer alkalmazásával;
 $[\text{Trp}] = 1 \times 10^{-4} \text{ M}$; $[\text{HSO}_5^-] = 2 \times 10^{-3} \text{ M} - 3 \times 10^{-2} \text{ M}$; $T = 25^\circ \text{C}$

A görbék kezdeti szakaszának nemlineáris legkisebb négyzetes illesztésével minden esetben meghatároztuk a pszeudo-elsőrendű sebességi állandóját (k_1). Az adatokat az 1. táblázatban foglaltuk össze. Az illesztés azt mutatta, hogy a görbék hosszabb szakaszát kétexponenciális görbével is jól lehetett értelmezni. Az 1. táblázat ezért tartalmazza a második illesztett pszeudo-elsőrendű sebességi állandót is (k_2).

Az így kapott sebességi együtthatókat ábrázoltuk az oxonkoncentráció függvényében, melyet az 5. ábra szemléltet.

1. táblázat Az egysége koncentrációkhoz tartozó sebességi együtthatók

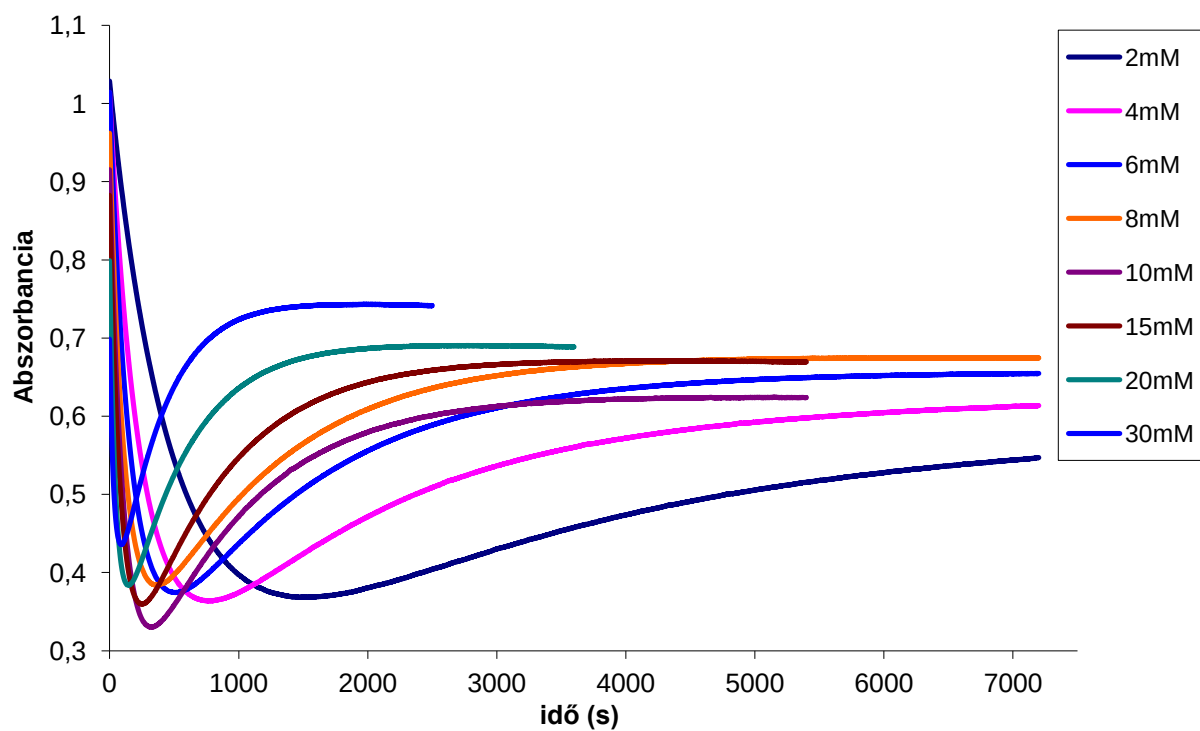
Oxonkoncentráció (mM)	$k_1 (s^{-1})$	$k_2 (s^{-1})$
2	0,001667	0,0003229
4	0,003776	0,000598
6	0,00626	0,000884
8	0,007823	0,00113
10	0,010645	0,0014648
15	0,0146	0,002228
20	0,021	0,0030256
30	0,0325	0,0045648



5. ábra Sebességi együtthatók ábrázolása az oxon koncentrációjának függvényében,
 $k_1 = \blacklozenge$ $k_2 = \blacksquare$

Az előzőekben ismertetett kísérletet savas közegben is elvégeztük, ugyanazon kísérleti körülmények alkalmazásával. Az oxidálószer koncentrációja ismételtén $2 \times 10^{-3} \text{ M} - 3 \times 10^{-3} \text{ M}$ között változott, a triptofánamid-oldat koncentrációját pedig $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ -nak vettük. A savas közeget 0,3 M kénsavval (H_2SO_4) biztosítottuk, melyet 1 M-os törzsoldat hígításával készítettük el. Ezen mérési eredmények a 6. ábra foglalja össze. Megállapítható, hogy az oxidálószer koncentrációjának a növekedésével egyre kevesebb idő szükséges a reakció végbemeneteléhez.

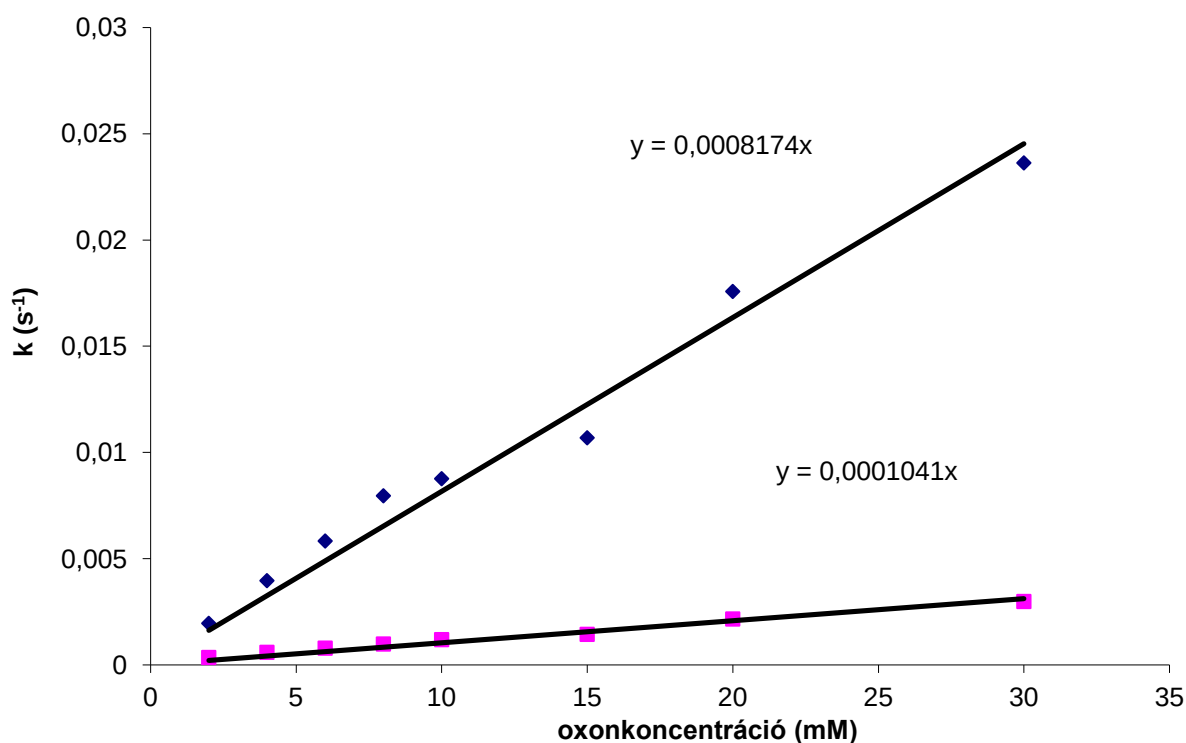
Legkisebb négyzetes illesztéssel meghatároztuk minden görbének a pszeudo-elsőrendű sebességi állandóit, amelyeket a 2. táblázatban foglaltuk össze.



6. ábra A triptofánamid és változó peroxomonoszulfát koncentráció közötti reakció savas közegben ; $[\text{Trp}] = 1 \times 10^{-4} \text{ M}$; $[\text{HSO}_5^-] = 2 \times 10^{-3} \text{ M} - 3 \times 10^{-2} \text{ M}$; $T = 25^\circ \text{C}$

2. táblázat Az oxonkoncentrációhoz tartozó k_1 és k_2 sebességi együtthatók

Oxonkoncentráció (mM)	$k_1 (\text{s}^{-1})$	$k_2 (\text{s}^{-1})$
2	0,001954	0,000347
4	0,003963	0,000589
6	0,005828	0,000786
8	0,007955	0,000981
10	0,00876	0,001187
15	0,010685	0,001435
20	0,017572	0,002158
30	0,02362	0,002982

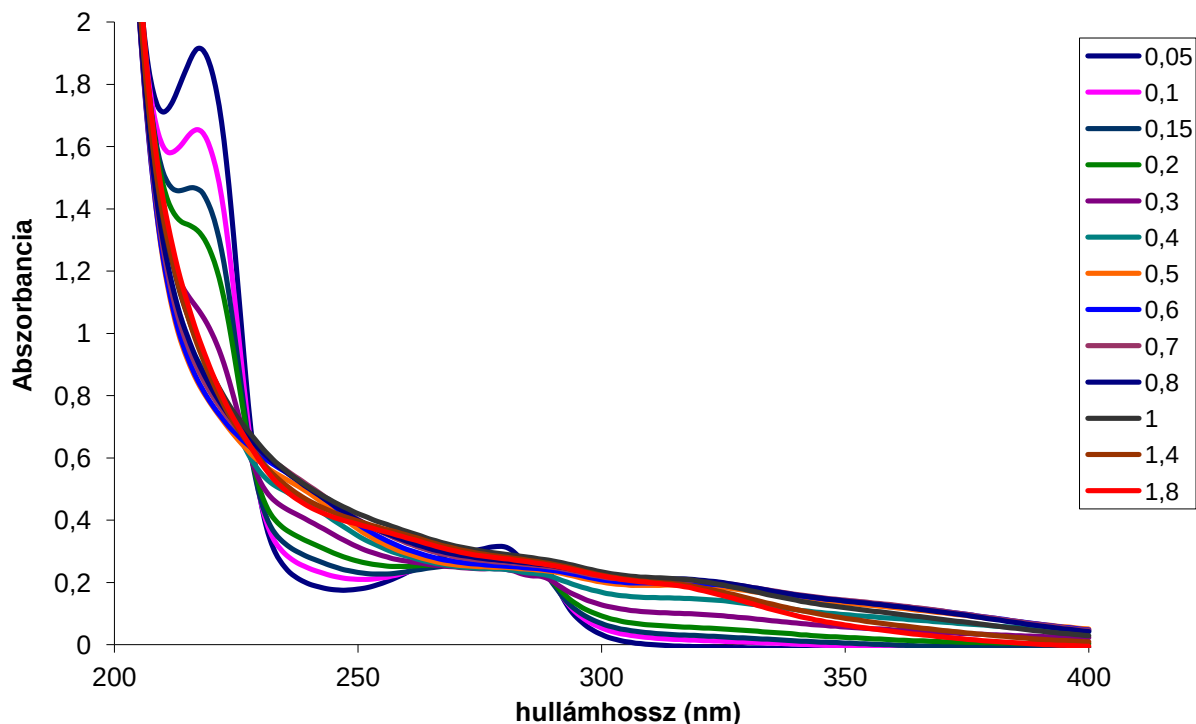


7. ábra Sebességi együtthatók ábrázolása az oxonkoncentráció függvényében.

Mindkét koncentrációfüggést vizsgálva megállapítható, hogy a pH nincs számottevő hatással az oxidációra, mivel mind savas, mind pedig semleges közegben a sebességi állandók, így a sebességi egyenlet is hasonlóak.

A reakció sztöchiometriáját is vizsgáltuk: ebben az esetben nem a küvetában lejátszódó folyamat spektrális változásait rögzítettük, hanem a már végbement reakció abszorbanciaváltozását mértük a hullámhossz függvényében spektrofotometriás titrálás segítségével. Az oxon koncentrációja $0,05 \times 10^{-3} \text{ M}$ – $1,8 \times 10^{-3} \text{ M}$ között változott. A triptofánamid-oldat koncentrációját $0,2 \times 10^{-3} \text{ M}$ -nak választottuk. A kísérletsorozatot foszfátpuffer jelenlétében végeztük. A triptofánamidot, a puffert és az oxidálószer 1:1:1 arányban összekevertük, majd egy napig állni hagytuk a reakció teljes végbemenetele

érdekében. Másnap termosztált környezetben felvettük az egyes koncentrációkhoz tartozó spektrumokat, melyet a 8. ábra szemléltet.



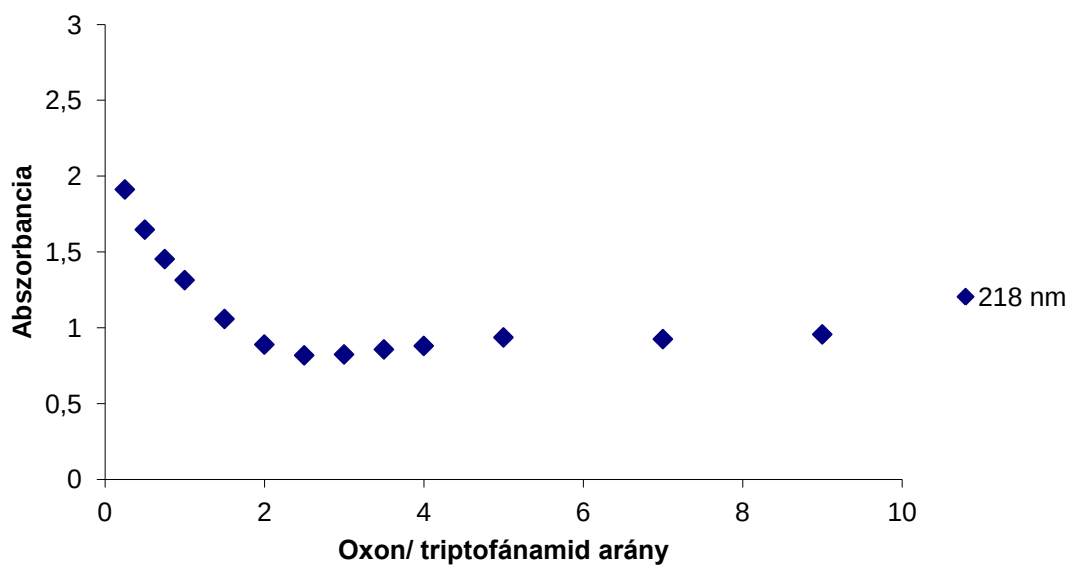
8. ábra A triptofánamid, a foszfátpuffer és a változó koncentrációjú oxidálószer 1:1:1 arányú elegyének reakciója $[\text{Trp}] = 0,2 \times 10^{-3} \text{ M}$; $[\text{HSO}_5^-] = 0,05 \times 10^{-3} \text{ M} - 1,8 \times 10^{-3} \text{ M}$; $T = 25^\circ \text{C}$, 200-400 nm

A sztöchiometriai arányok meghatározásához a 8. ábrát figyelembe véve kiválasztottunk 4 olyan hullámhosszat, ahol a legnagyobb az abszorbanciaváltozás, illetve 2 olyat, ahol a legkisebb a változás. Ezeknél a hullámhosszaknál mért abszorbanciaértékeket ábrázoltuk az oxon és a triptofánamid koncentrációarányának a függvényében, amit az 9. ábra szemléltet. Az eredményeket a 3. táblázatban foglaltuk össze.

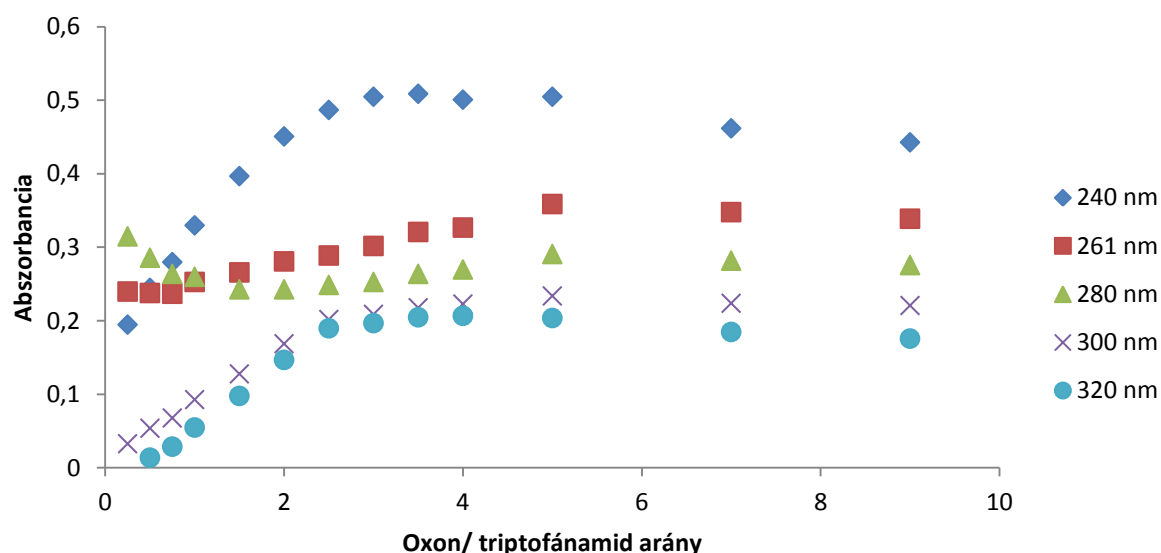
3. táblázat Abszorbanciaértékek az oxon és triptofánamid arányának függvényében a vizsgált hullámhosszakon

oxon/trp	218nm	240nm	261nm	280nm	300nm	320nm
0,25	1,912	0,195	0,24	0,315	0,033	-0,006
0,5	1,647	0,245	0,238	0,286	0,054	0,014
0,75	1,453	0,28	0,237	0,264	0,068	0,029
1	1,314	0,33	0,253	0,26	0,093	0,055
1,5	1,058	0,397	0,266	0,243	0,128	0,098
2	0,889	0,451	0,281	0,243	0,169	0,147
2,5	0,818	0,487	0,289	0,249	0,202	0,19
3	0,824	0,505	0,302	0,253	0,209	0,197
3,5	0,857	0,509	0,321	0,264	0,218	0,205
4	0,88	0,501	0,327	0,27	0,223	0,207
5	0,936	0,505	0,359	0,291	0,234	0,204
7	0,925	0,462	0,348	0,282	0,224	0,185
9	0,956	0,443	0,339	0,276	0,221	0,176

A jobb szemléltethetőség érdekében az eredményeket két diagramban ábrázoltuk, mivel 218 nm-en a nagy abszorbancia változás miatt a többi hullámhosszon a töréspont nem volt annyira észrevehető.

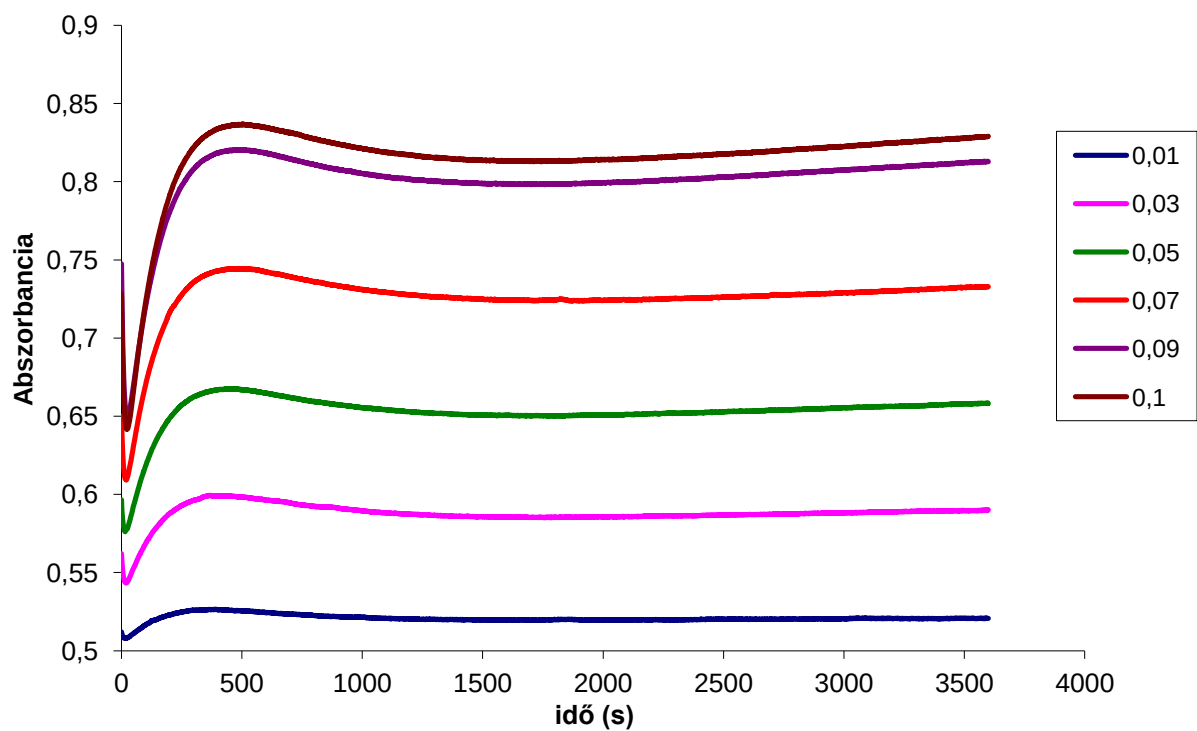


9. ábra 218 nm-en mért abszorbancia értékek ábrázolása az oxon és triptofánamid arányának függvényében

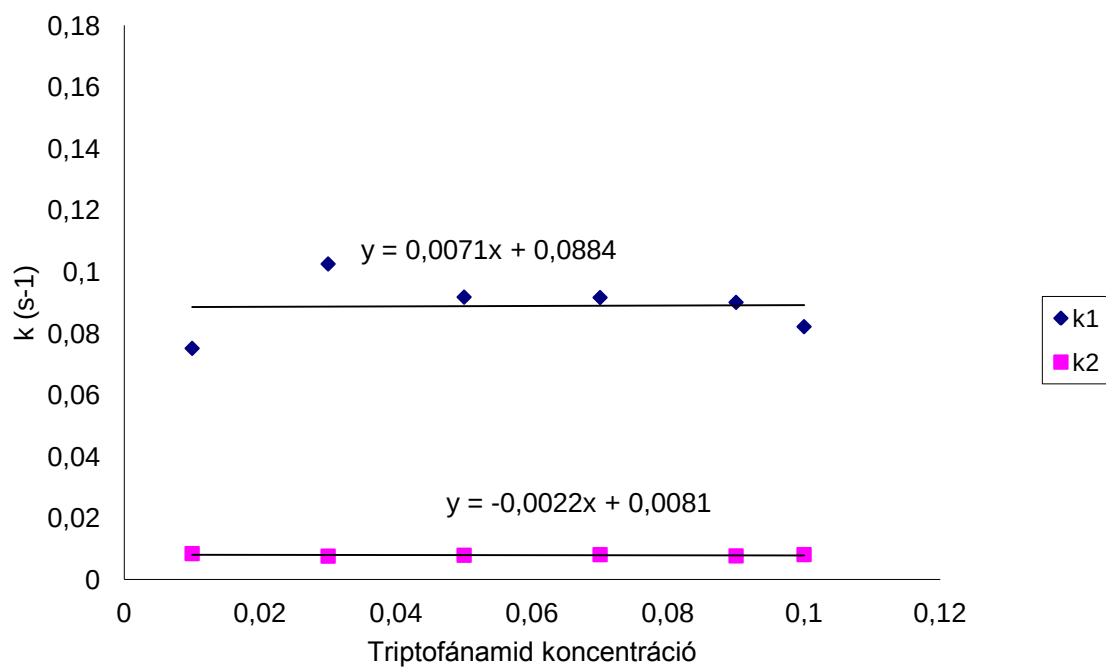


10. ábra Oxon/triptofánamid arány és az abszorbancia értékek függvénye 240, 261, 280, 300 valamint 320 nm-en.

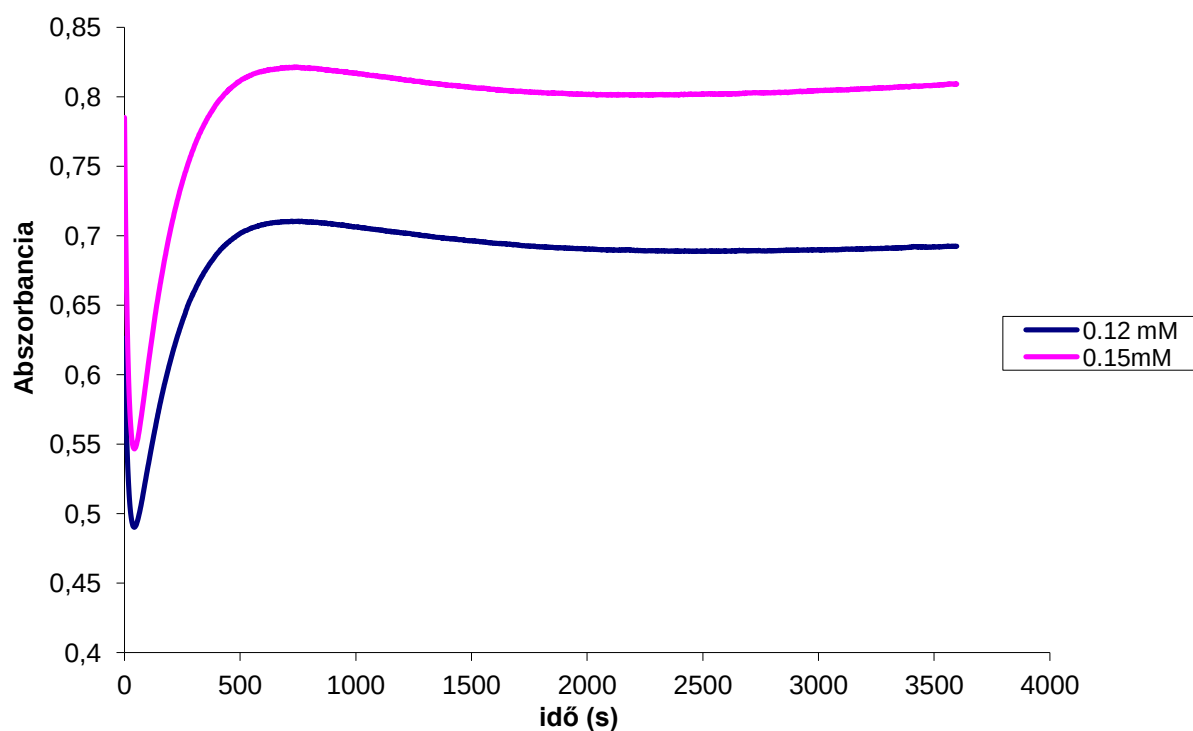
Kísérleti munkáinkban nemcsak változó oxonkoncentráció mellett vizsgáltuk a triptofánamid és a peroxomonoszulfát közötti reakciót, hanem változó triptofánamid-koncentráció mellett is. A triptofánamid koncentráció $0,01 \times 10^{-3} \text{ M}$ – $0,15 \times 10^{-3} \text{ M}$ között változott, az oxidálószerkoncentrációt $0,02 \text{ M}$ -nak választottuk. A méréseket savas közegben végeztük 25°C -on. Ezek az ábrák jól szemléltetik, hogy a triptofánamid mennyiségének növekedésével egyre nagyobb mennyiségben keletkeznek a termékek. A kétexponenciális illesztések (12. ábra) a várakozásnak megfelelően azt mutatták, hogy a pszeudo-elsőrendű sebességi állandók függetlenek a meghatározó reaktáns koncentrációjától.



11. ábra Változó triptofánamid koncentrációkor mért abszorbania függvények, savas közegben.

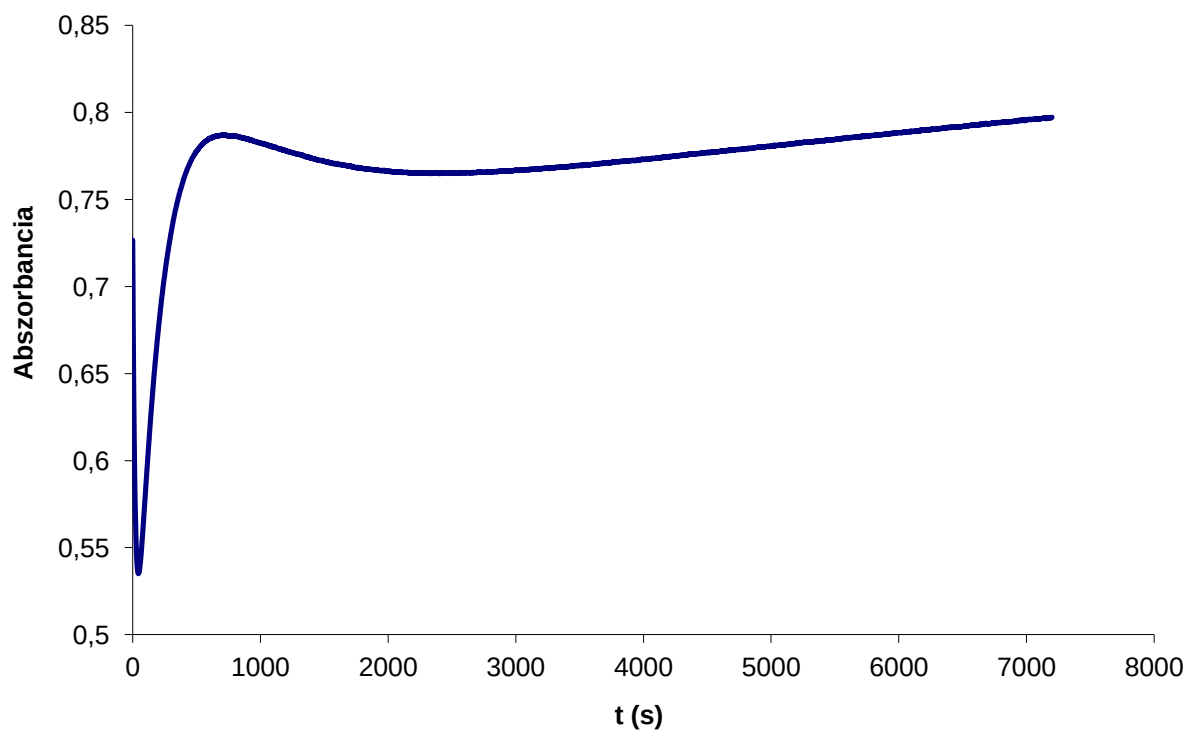


12. ábra Sebességi együtthatók ábrázolása a triptofánamid koncentráció függvényében

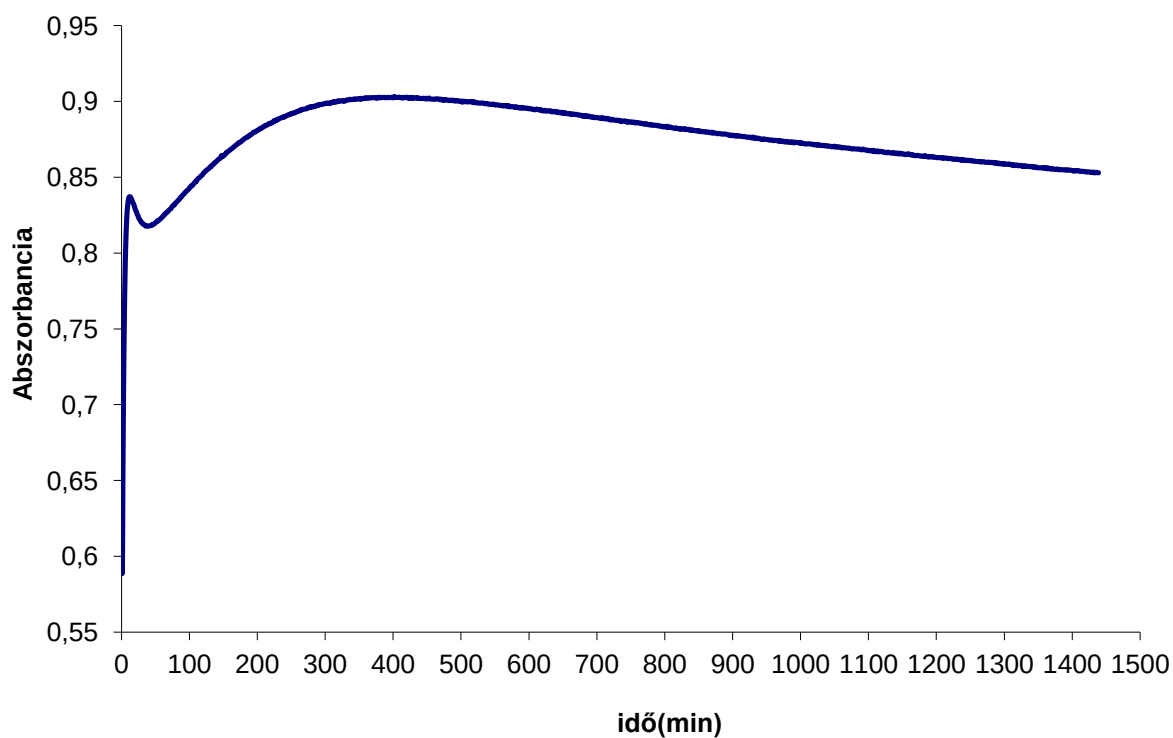


13. ábra $0,12 \times 10^{-3}$ M és $0,15 \times 10^{-3}$ M triptofánamid és az oxidálószer közötti reakció savas közegben.

A 13. ábrából arra lehet következtetni, hogy a reakció nem ment végbe teljes mértékben, ezért ezt a kísérletet megismételtük egy hosszabb időskálán (14. ábra). A mérés végeztével a görbéről 3 szélsőérték olvasható le, és megfigyelhető, hogy a reakció még ebben az esetben sem játszódott le teljesen, ezért újra megismételve ezt a reakciót 24 órán keresztül vizsgáltuk, aminek a spektrumát a 15. ábra szemléltet. Az ilyen hosszú időskálán detektált kinetikai görbék egészen egyediek: négy szélsőérték található rajtuk. Ez a tapasztalat legalább öt egymást követő folyamatra utal, így a kinetikai görbe illesztésére elvileg az ötexponeenciális függvény lenne alkalmas, ennek részletesebb tanulmányozását a közeljövőben tervezzük.



14. ábra A triptofánamid és az oxon reakciójának követése savas közegben 278 nm-en

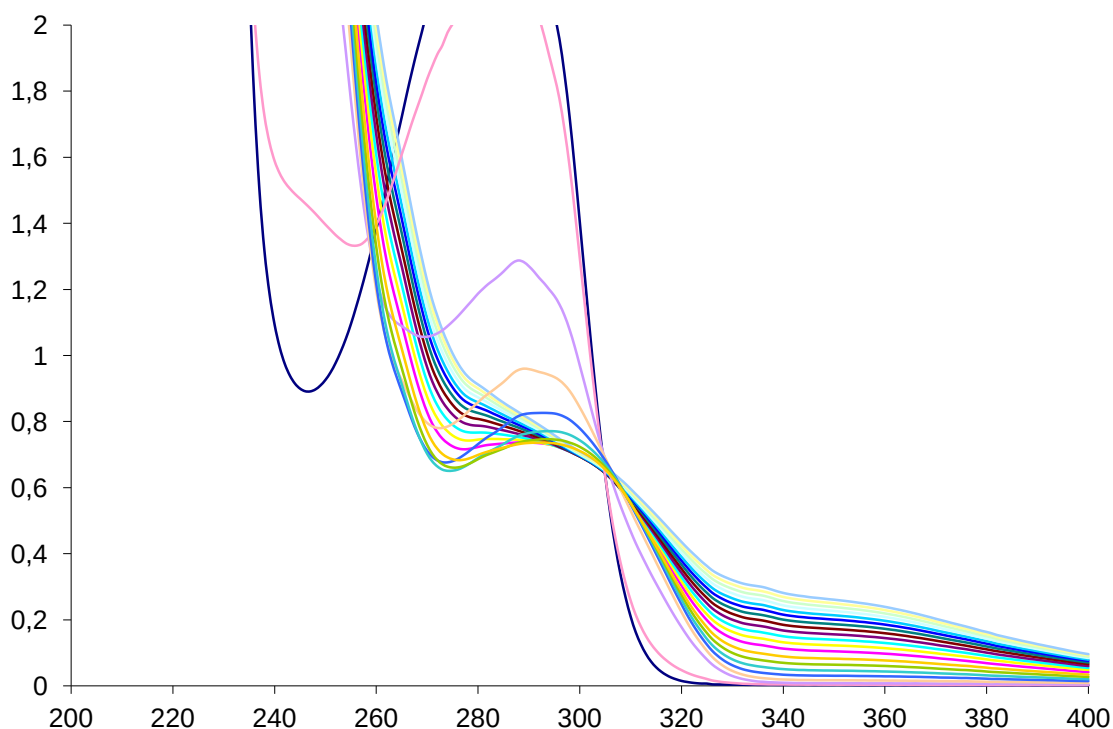


15. ábra $0,15 \times 10^{-3}$ M triptofánamid és az oxon reakciójának detektálása 24 órás időintervallumban.

5.2 1-metil-triptofánnal végzett kísérletek

5.2.1 1-metil-triptofán és peroxomonoszulfát-ion reakciója puffer nélkül

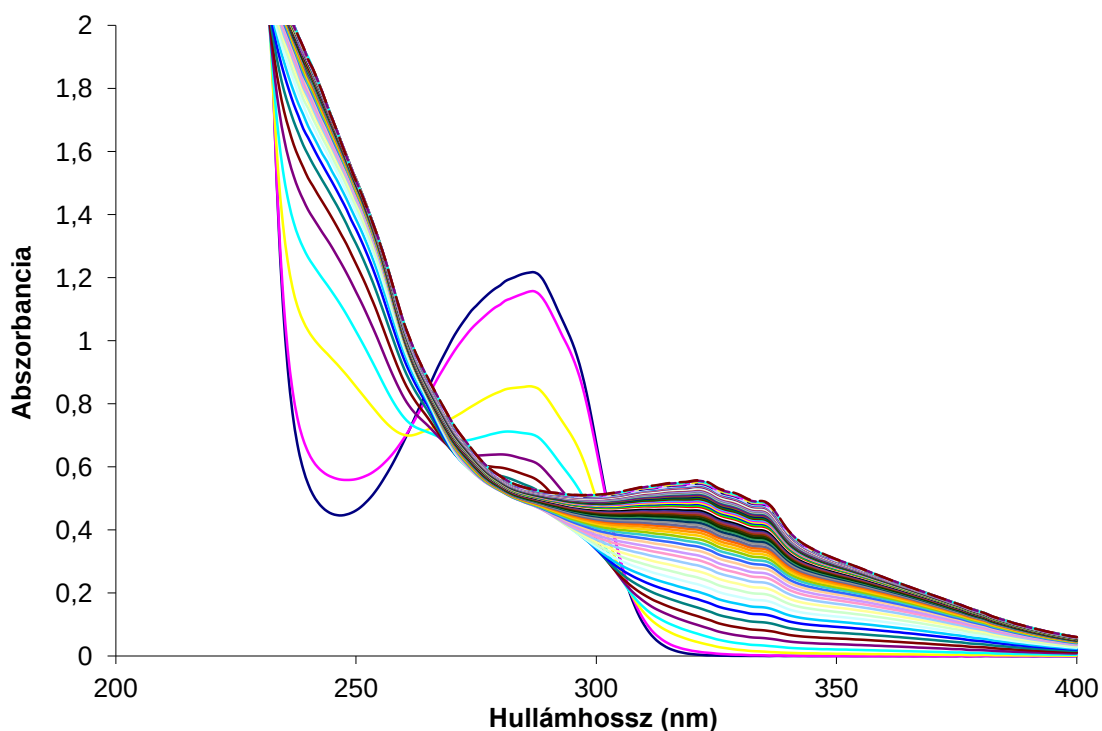
Előkísérleteinket kétsugaras, pásztázó spektrofotométerrel való spektrumfelvétellel készítettük, tandemküvettaát használva. A tandemküvetta egyik részébe az 1×10^{-3} M koncentrációjú 1-metil-L-triptofánt, a másik részébe a 2×10^{-3} M koncentrációjú oxont tettünk. A küvetta feltöltése után keverés nélkül a spektrofotométerbe helyeztük és felvettük spektrumát. Majd az oldatok egymással történő reagáltatása után 5 órán keresztül 5 percenként történt a spektrumfelvétel. Ezen kinetikai mérésekből adódóan a vizsgálatainkat 296 nm-es hullámhosszon folytattuk, mivel itt észlelhető a legnagyobb abszorbancia változás.



16. ábra 1-metil-triptofán és peroxomonoszulfát-ion reakciója; $[\text{Trp}] = 1 \times 10^{-3} \text{ M}$, $[\text{HSO}_5^-] = 2 \times 10^{-3} \text{ M}$, $T = 25^\circ\text{C}$, 200-400 nm

5.2.2 1-metil-triptofán és peroxomonoszulfát-ion reakciója puffer jelenlétében

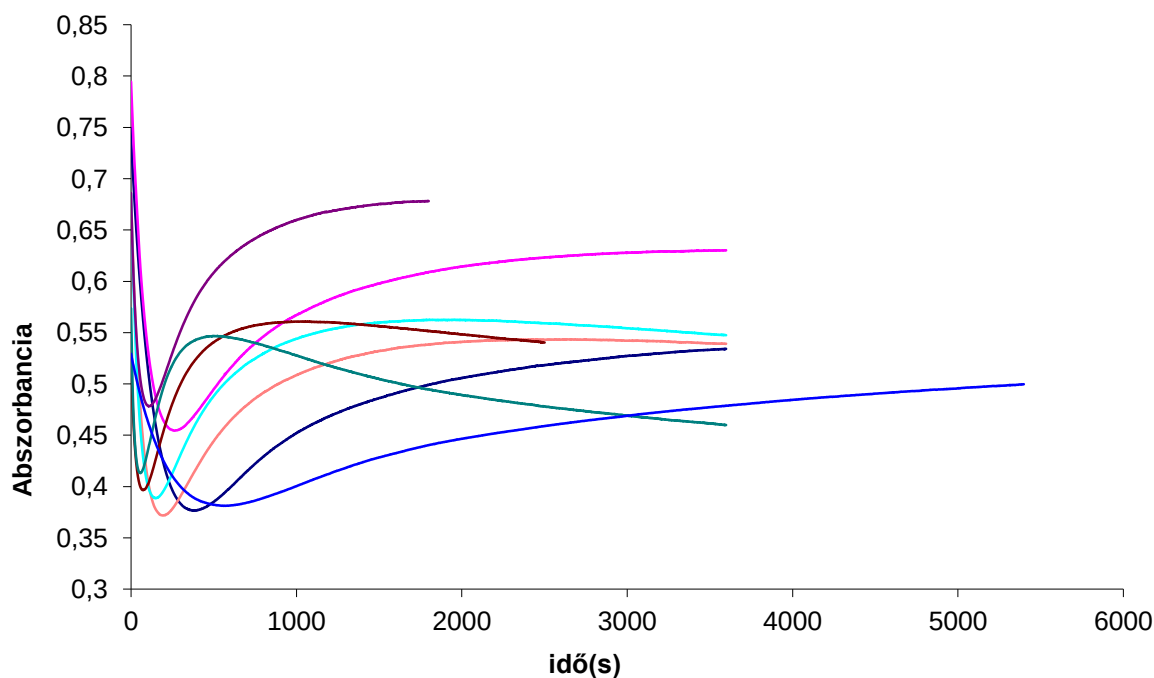
A kinetikai vizsgálatot foszfátpuffer (Na_2HPO_4 és NaH_2PO_4 megfelelő anyagmennyiség arányú keveréke) jelenlétében is a spektrumfelvétel előzte meg, a pufferrel beállított pH körülbelül 7-es volt. Az 1-metil-triptofán-oldat koncentrációja 1×10^{-3} M, az oxoné pedig ennek kétszerese. A spektrális változásokat mutatja a 17. ábra. A diagramon eleinte 260 nm ($A \approx 0,8$) és 310 nm ($A \approx 0,4$) körüli izobesztikus pontra hasonló metszéspontok a folyamat előrehaladásával megszűnnek. A spektrumoknak így összességében nincs közös metszéspontja, ami egyértelmű bizonyíték több reakciólépés jelenlétére.



17. ábra 1-metil-triptofán és peroxomonoszulfát-ion reakciója foszfátpuffer jelenlétében; $[\text{Trp}] = 1 \times 10^{-3}$ M, $[\text{HSO}_5^-] = 2 \times 10^{-3}$ M, puffereletlen pH, $T=25^\circ\text{C}$

A spektrumsorok felvételét követően megállapítottuk a továbbiak vizsgálatokhoz optimális 296 nm-es hullámhosszat. A kinetikai vizsgálatok során az 1-metil-triptofán koncentrációját nem változtattuk, ugyanolyan pH-n vizsgáltuk a reakció oxonkoncentrációtól való függését (18. ábra). A küvettabeli koncentráció az oxonra nézve 2 mM és 30 mM között változott. A

küvétába mindig az 1-metil-triptofán oldatot pipettáztunk utoljára, a végtérfogat 3000 μl volt. Az 18. ábrán látható, hogy a 2 mM-os oxon koncentrációjakor a reakció teljes lejátszódásához 90 percnél több idő kell, viszont töményebb koncentrációban ez a folyamat egyre gyorsabbnak bizonyul.



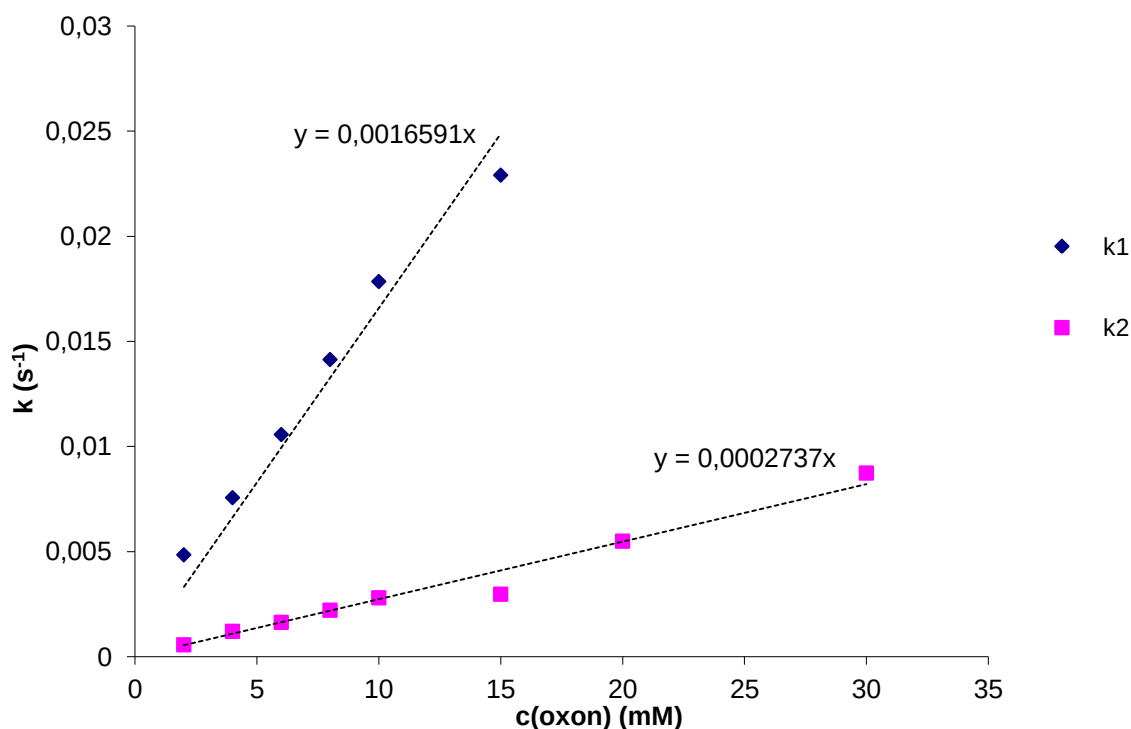
18. ábra 1-metil-triptofán és peroxomonoszulfát-ion reakciójának koncentrációfüggése foszfátpuffer jelenlétében; $[\text{Trp}] = 1 \times 10^{-4} \text{ M}$, $[\text{HSO}_5^-] = 2\text{-}30 \text{ mM}$, puffereletlen pH, $T = 25^\circ\text{C}$

Részletesebb tanulmányozás céljából a 18. ábrán látható görbék, valamint a pszeudozérus-rendek módszerének segítségével meghatároztuk a sebességi állandókat és a sebességi egyenletet. Ezen módszer lényege, hogy ahhoz a reaktánshoz képest, melynek koncentrációváltozását követjük, a többi nagy feleslegben (itt az oxidálószer) alkalmazzuk,⁸ így az oxidálószer koncentrációjának változtatásával a peroxomonoszulfát-ion rendűségére következtethetünk.

Nemlineáris legkisebb négyzetes illesztéssel az egyes görbékhez a 4. táblázatban szereplő sebességi együtthatókat kaptuk. Ennek ábrázolását szemlélteti a 19. ábra.

4. táblázat Az oxonkoncentrációkhoz tartozó sebességi együtthatók

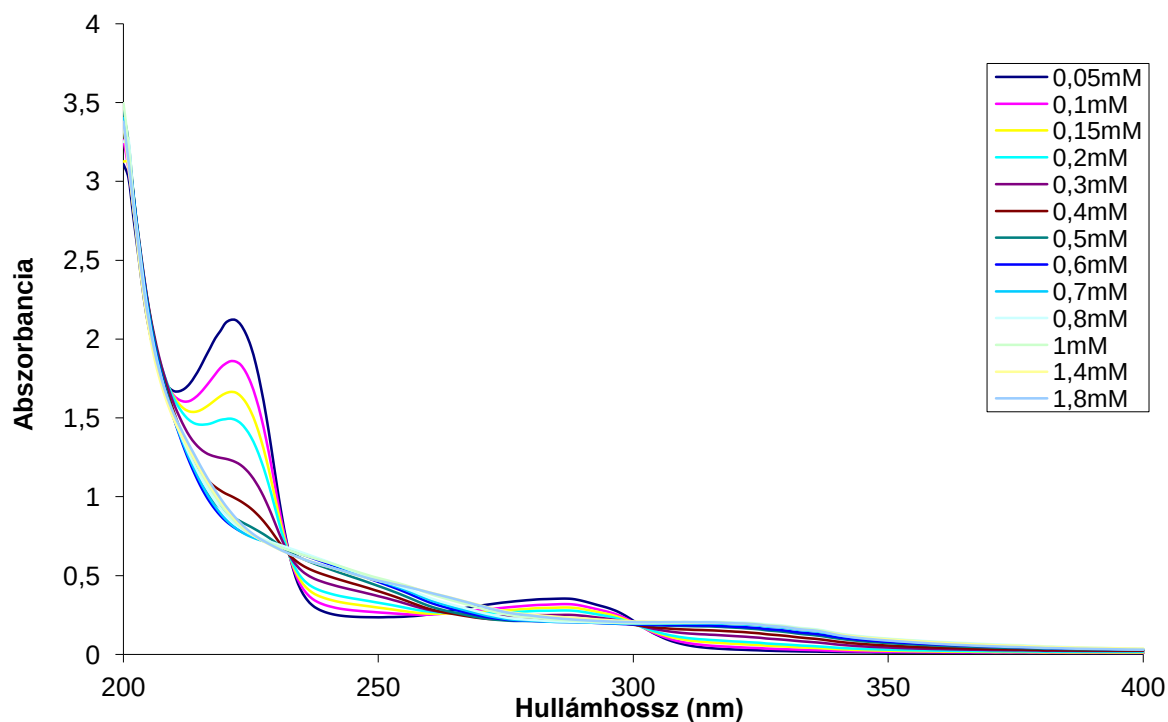
c(oxon)	2	4	6	8	10	15	20	30
$k_1(\text{s}^{-1})$	0,00484	0,00756	0,0106	0,0141	0,0178	0,0229	0,0237	0,0338
$k_2(\text{s}^{-1})$	0,000560	0,00120	0,00162	0,00221	0,00280	0,00297	0,00549	0,00873



19. ábra Sebességi együtthatók az oxon koncentrációjának függvényében foszfátpuffer jelenlétében

5.2.3 1-metil-triptofán és peroxomonoszulfát-ion reakciója puffer jelenlétében a reakció végbemenetelét követő vizsgálat

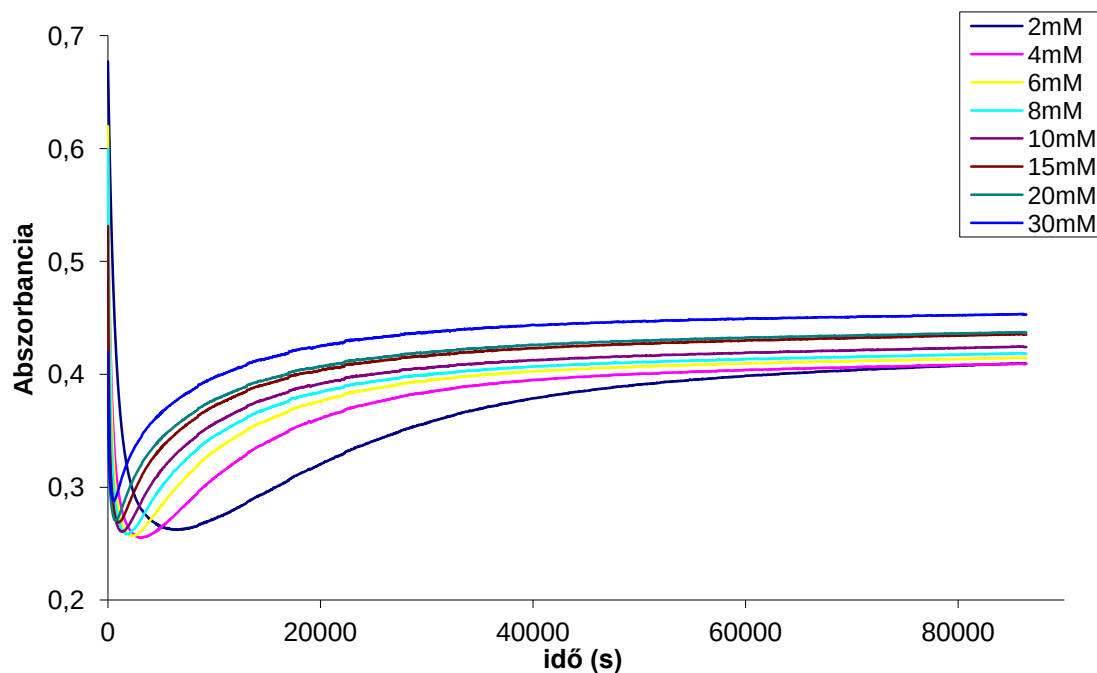
Az előző kísérletsorozathoz hasonlóan a következő esetben is a foszfátpufferrel ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{NaH}_2\text{PO}_4$) hoztuk létre a semleges közeget, és a foszfátpuffer:oxon:1-metil-triptofán 1:1:1 sztöchiometriai arányba kevert elegyeit 1 napi állás után a reakció végbemenetelét követően vizsgáltuk spektrofotometriás méréssel. Ezt szemlélteti a 20. ábra.



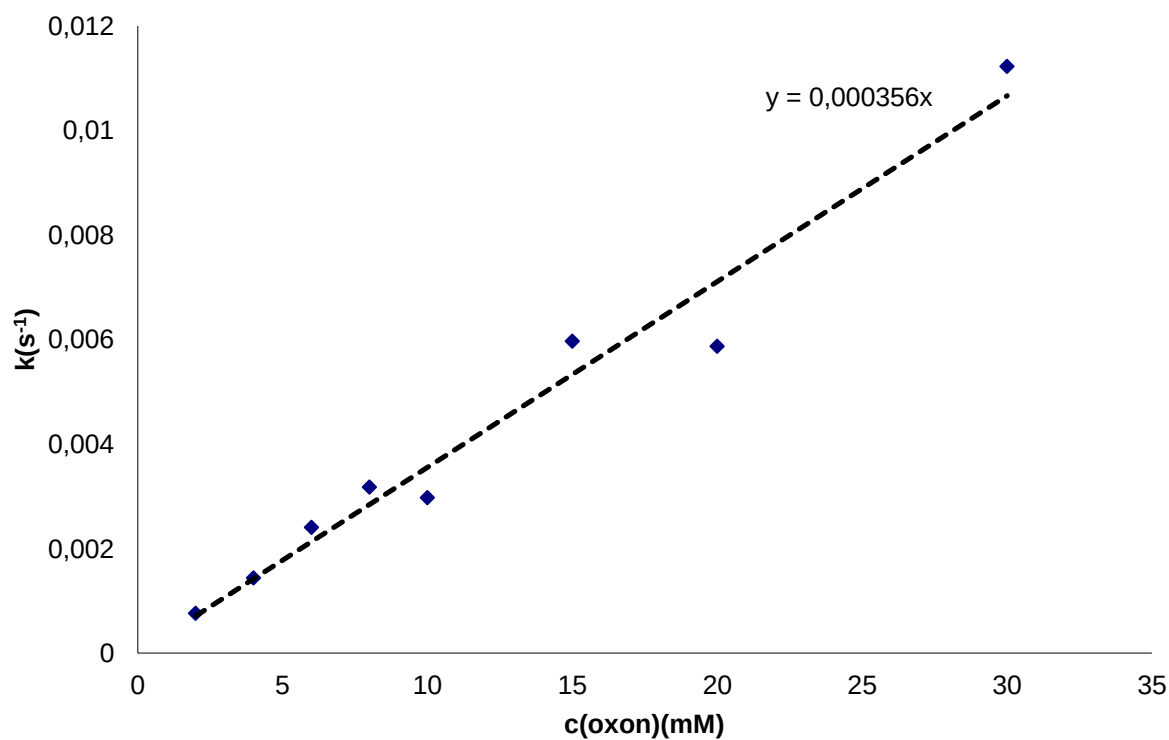
20. ábra 1-metil-triptofán és peroxomonoszulfát-ion reakciójának koncentrációfüggése foszfátpuffer jelenlétében; [Trp] = 0,2 mM; $[\text{HSO}_5^-]$ = 0,05-1,8mM, puffereletlen pH, $T=25^\circ\text{C}$

5.2.4 1-metil-triptofán és a peroxomonoszulfát-ion reakciója savas közegben

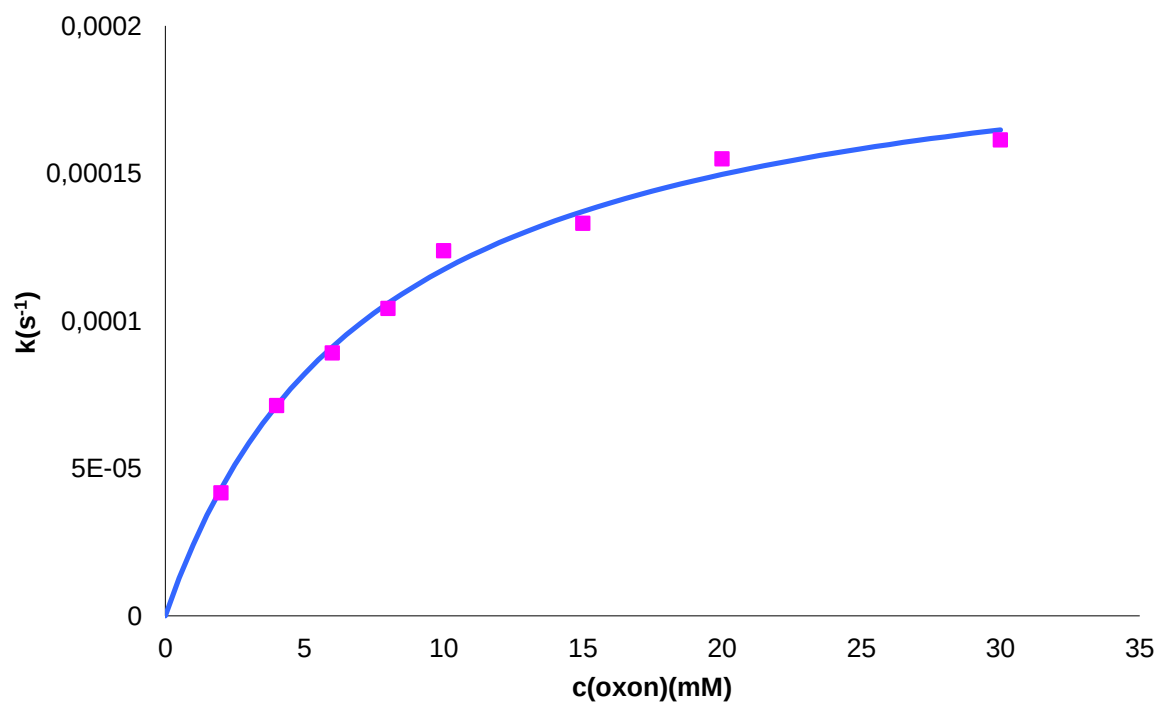
Az előzőekben már láttuk, hogyan viselkedik a vizsgált rendszer puffer nélkül. Továbbmenve savas tartományban való viselkedésére keressük a választ, melyben kénsav áll a segítségünkre. Ennek a vizsgálatnak a grafikus ábrázolását a 21. ábra szemlélteti.



21. ábra 1-metil-triptofán és peroxomonoszulfát-ion reakciójának koncentrációfüggése kénsav jelenlétében; $[\text{Trp}] = 1 \times 10^{-3} \text{ M}$; $[\text{HSO}_5^-] = 2\text{-}30\text{mM}$, $\text{pH} < 7$, $T = 25^\circ\text{C}$, 24 órás mérés



22. ábra Sebességi együtthatók az oxon koncentrációjának függvényében kénsav jelenlétében



23. ábra Sebességi együtthatók az oxon koncentrációjának függvényében kénsav jelenlétében

6. Összefoglalás

Tudományos diákköri munkánk során a triptofánamid és az 1-metil-triptofán peroxomonoszulfát-ion közötti reakció kinetikáját és mechanizmusát vizsgáló kísérleteket végeztünk. A triptofánamid esetén 278 nm-es hullámhosszon, valamint az 1-metil-triptofán esetén a 296 nm-es hullámhosszon végzett spektrofotometriás vizsgálatok alapján arra következtettünk, hogy a görbék első, csökkenő szakaszát exponenciális görbével jól lehet illeszteni, így az említett két triptofánszármazékokra tekintve elsőrendű. A görbék hosszabb szakaszát kétexponenciális görbével jól lehet értelmezni, így meghatároztuk a másodrendű sebességi együtthatókat is. Következtetésképpen levonható, hogy a reakciók oxonra nézve is elsőrendűek. Spektrofotometriás titrálás segítségével a reakció sztöchiometriájára következtethetünk. Az általunk vizsgált mindkét triptofánszármazék esetében ezen kísérletek alapján megállapítható, hogy a reakció több lépést tartalmaz. A két vegyület vizsgálatát összehasonlítva arra következtethetünk, hogy sem az amid sem pedig a metil csoport nem befolyásolja a reakció végbemenetelét. A kísérleteket savas és semleges pH-n is elvégeztük és megállapítottuk, hogy a pH nincs számottevő hatással az oxidációra. A triptofánamid változó koncentrációjának a vizsgálata során a vártnak megfelelően azt a következtetést kaptuk, hogy a meghatározó reaktáns koncentrációjától a pszeudo elsőrendű sebességi állandók függetlenek.

8. Köszönetnyilvánítás

Köszönetünket szeretnénk kifejezni Dr. Lente Gábor egyetemi docensnek, aki segítette a tanszéken végzett munkánkat, valamint szakmai tanácsokkal látott el minket. A kiértékelések során használt szoftverek kezelésére megtanított.

Köszönjük még a D-524 labor minden kutatójának, hallgatójának és dolgozójának segítségét a tudományos diákköri dolgozatunk elkészítéséhez.

Köszönettel tartozunk még az összes egyetemi oktatónak, akik a dolgozat elkészítéséhez szükséges tudást átadták nekünk.

A tudományos munkához a TÁMOP-4.2.2/B-10/-1-2010-0024 és TÁMOP 4.2.1/B-09/1/KONV-2010-0007 pályázatok nyújtottak anyagi segítséget.

9. Irodalomjegyzék

1. <http://en.wikipedia.org/wiki/Tryptophan>
2. http://en.wikipedia.org/wiki/Potassium_peroxymonosulfate
3. T. J. Simat and H. Steinhart *J. Agric Food Chem*, **1998**, 46,p: 490-498
4. Marion L. Posener, Gerald E. Adams, Peter Wardman and Robert B Chundall Chemistry Department, The University, Nottingham NG7 2RD, **1976**, p:2231-2239
5. Andreas Jerlich, Michal Hammel, Fabianne Nigon, M.John Chapman, R Jörg Schaur *Eur. J. Biochem*, **2000**, 267, p:4137-4143
6. M.S. Ramachandran and T.S. Vivekanandam, **1984**, 23, p:4929-4935
7. Kenneth L. Stevenson, George A. Papadantonakis, Pierre R. LeBreton, **2000**, 133, p:159-167
8. P. W. Atkins, *Fizikai kémia, III. Változások*, Nemzeti Tankönyvkiadó, **2002**, 961