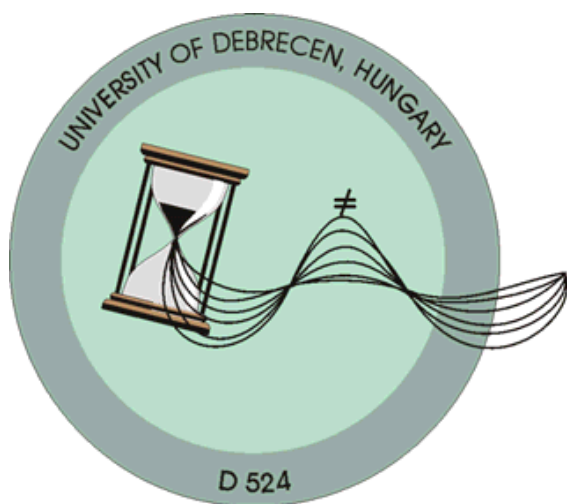




Dopamin és norepinefrin oxidációja peroxomonoszulfát-ionnal

Tudományos Diákköri dolgozat

Lövei Alida
Vegyész MSc I.

Kricsfalusi Nikoletta
Kémia BSc III.

Témavezető:
Dr. Lente Gábor
egyetemi docens



Debreceni Egyetem, Természettudományi és Technológiai Kar,
Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszék

2012.

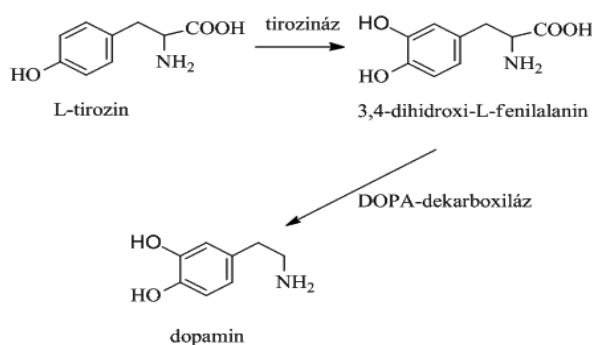
Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	3
2. Irodalmi áttekintés	5
2.1. A peroxomonoszulfát-ion általános jellemzése	5
2.2. A dopamin reakciója Fe^{3+} -ionnal	6
2.3. Dopamin oxidációja peroxomonoszulfát-ionnal, vas(III) katalizátor jelenlétében	7
2.4. A dopamin hidroxilgyökkel való oxidációja	9
2.5. Néhány catecholamin perjódsavval történő oxidációja	10
2.6. A norepinefrin oxidációja	11
3. Célkitűzések	14
4. Alkalmazott kísérleti módszerek	15
4.1. Felhasznált vegyszerek	15
4.1.1. Az oxon tisztaságának meghatározása	15
4.1.2. Dopamin törzsoldat készítése	15
4.1.3. Norepinefrin törzsoldat készítése	15
4.1.4. Foszfát alapú pufferoldat készítése	16
4.2. A mérésekhez használt műszerek és számítógépes programok	16
5. Eredmények és értelmezésük	17
5.1. Előkísérletek	17
5.2. A dopamin oxidációja	20
5.2.1. A reakció részletes kinetikai vizsgálata	20
5.2.2. Tömegspektrometriás termékazonosítás	30
5.2.3. ^1H -NMR vizsgálatok	32
5.3. A norepinefrin oxidációja	34
5.3.1. A reakció részletes kinetikai vizsgálata	34
5.3.2. Tömegspektrometriás termékazonosítás	45
5.3.3. ^1H -NMR vizsgálatok	46
6. Összefoglalás	48
7. Köszönetnyilvánítás	49
8. Irodalomjegyzék	50

1. Bevezetés

A katecholamin-család tagjaként a dopamin (kémiái képlete: $C_6H_3(OH)_2-CH_2-CH_2-NH_2$) az egyik legfontosabb, az élő szervezetben termelődő vegyület, amely prekursora két neurotranszmitternek, az epinefrinnek (adrenalin), valamint a norepinefrinnek (noradrenalin). A központi idegrendszerben fejti ki hatását és neurotranszmitteri szerepet tölt be, aktiválva a dopamin-receptorokat (D1, D2, D3, D4 és D5). Az agyban neurohormonként van jelen, s a hipotalamusz termeli. Legfőbb szerepe hormonként, hogy gátolja a prolaktin felszabadulását a hipofízis elülső lebenyéből. Mivel a hipotalamusz szoros kapcsolatban áll a limbikus rendszerrel, amely az érzelmi életért és a válaszreakciókért felelős, a dopaminnak is fontos szerepe van a motiváltság és az érzelmek kialakításában. A dopamin egyfajta jutalmazása az agynak az egyed felé, amely akkor szabadul fel, ha valamilyen pozitív hatás éri az élőlényt. Ekkor nyugalom- és elégedettségérzetet kelt. Ha gyakran, nagy mennyiségben termelődik, függőség is kialakulhat. Fontos szerepet játszik a mozgáskoordinációban, ha túlermelődik a szervezetben, nem kívánt izomrángást okoz. Használható intravénás gyógyszerként, amely a szimpatikus idegrendszerre fejti ki hatását, emelve a pulzusszámot és a vérnyomást. A Parkinson-kóros betegek szervezetében nem szabadul fel megfelelő mennyiségű dopamin, így azok dopamin-szintjét gyógyszeresen kell növelni. A dopamin nem léphet át a vér-agy gáton, így a gyógyszer nem befolyásolja közvetlenül a központi idegrendszert, ehhez ugyanis az erekből a szinapszisba kellene jutnia, amire szerkezete miatt képtelen. A dopamin mennyiségét az agyban L-DOPA-val növelik, ez a dopamin prekursora, viszonylag könnyen átjut a vér-agy gáton.

A dopamin bioszintézise főként az agyi ideghálózaton és a mellékvesében történik.



1. ábra. A dopamin bioszintézise

A folyamat első és egyben sebességhatározó lépése az L-tirozin hidroxilezése tirozin-hidroxiláz enzim hatására 3,4-dihidroxi-L-fenilalaninná, azaz L-DOPA-vá. Ezt követően az L-DOPA dekarboxileződik (DOPA-dekarboxiláz enzim hatására), így egy karboxilcsoport eltávolításával dopamin képződik. Egyes neuronokban a dopamin béta-hidroxiláz enzim segítségével továbbalakulhat norepinefrinné. A dopamin és származékainak metabolizmusa az élő szervezetben három módon történhet: transzporter hatás útján, enzimatis bomlással vagy diffúzióval. Az enzimatis bomlás egy oxidatív folyamat, ezért is érdekes a dopamin oxidációjának vizsgálata laboratóriumi körülmények között.¹

A norepinefrin egy katecholamin-hormon és neurotranszmitter. A pozitív izgalmi állapotért felelős, és függőséget is kiválthat. Stresszhormonként az agynak azt a részét érinti, amely a figyelmet és a válaszreakciókat ellenőrzi. Ha bizonyos agyterületen a noradrenalin funkcionális elégtelensége észlelhető, az depressziót vált ki, ezzel szemben a mániát a túlműködés okozza. A noradrenalin az adrenalinál sokkal erősebben szűkíti az ereket, közvetlenül emeli a szívfrekvenciát, glükózt szabadít fel az energiaraktárakból, és növeli az izomtónust. Gyógyszerként a noradrenalin emeli a szisztolés és diasztolés vérnyomást, ez kompenzáló vagusreflexet vált ki, amely semlegesíti a szívgyorsító hatást.

Hormonként a mellékvesében termelődik és onnan választódik ki a vérbe, neurotranszmitterként a központi és a szimpatikus idegrendszerben is jelen van, ahol a noradrenerg neuronok bocsátják ki a szinaptikus ingerületátvitel során.

A norepinefrin bioszintézise szintén az 1. ábra szerint megy végbe, a dopaminból dopamin- β -hidroxiláz enzim segítségével alakul ki a norepinefrin.²

2. Irodalmi áttekintés

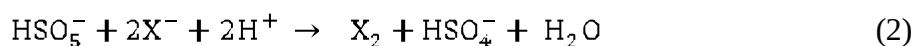
2.1. A peroxomonoszulfát-ion általános jellemzése

A peroxomonoszulfát-ion a peroxo-monokénsav (H_2SO_5 , Caro-sav) savmaradékionja. Erős, egybázisú sav, melynek olvadáspontja $45\text{ }^\circ\text{C}$. A tiszta, vízmentes állapotban lévő sav színtelen kristályokat képez, és már szobahőmérsékleten is robbanékony, bomlásterméke a kénsav és az oxigén. A peroxo-monokénsav összetett sója az oxon ($2\text{KHSO}_5 \cdot \text{K}_2\text{SO}_4 \cdot \text{KHSO}_4$), mely laboratóriumokban széles körben alkalmazott erélyes oxidálószer. Oldatában nem stabilis, néhány napos felezési idővel spontán bomlik, azonban szilárd állapotban évekig eltartható. A H_2SO_5 disszociációjának első lépésében erős sav, míg második savi disszociációjának pK -ja ~ 9 , azaz 9-es pH-ig a HSO_5^- , e fölött pedig a kétszer deprotonált SO_5^{2-} forma dominál.³

A reakciók aktiválási entrópiájának felhasználásával sikerült különbséget tenni egyelektronos (valószínűleg elektrontranszfer) és kételektronos (valószínűleg oxigéntranszfer) reakcióutak között. A HSO_5^- reakcióiban főleg a kételektronos út jellemző (különösen a halogenidionokkal történő reakció során), mivel egyelektronos út esetén köztermékként nagy energiájú szulfátiongyök ($\text{SO}_4^{\cdot -}$) keletkezik.⁴

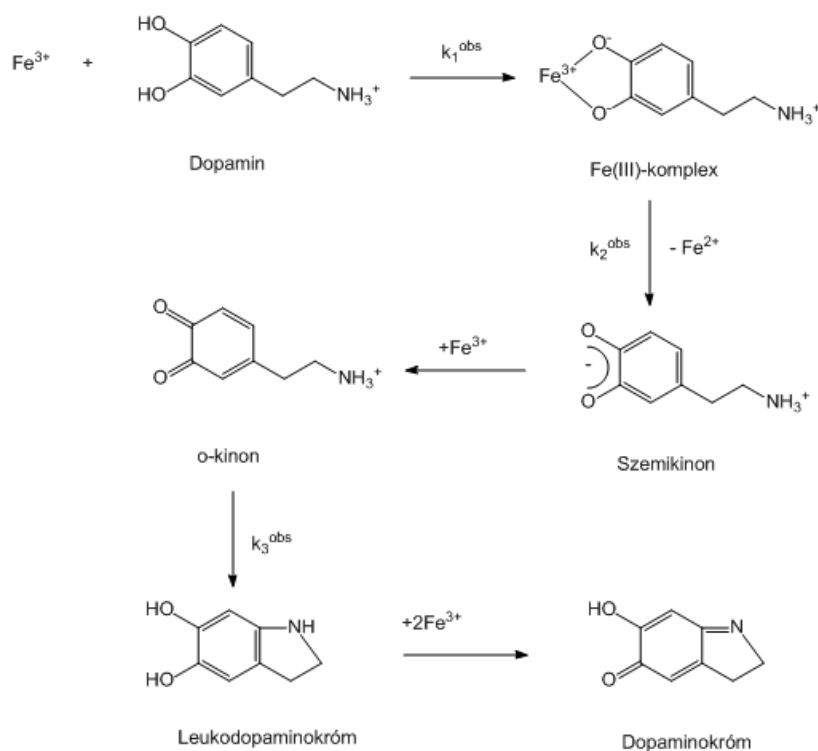


A peroxomonoszulfát-ion alkalmazása oxidálószerként akkor ajánlott, ha a H_2O_2 -dal nem megy végbe a reakció, vagy ha azt nagy feleslegben kell alkalmazni a H_2O_2 diszproporciója miatt. A peroxomonoszulfát-ion alkalmazása könnyű kezelhetősége mellett környezetkémiai szempontból is előnyös, mivel redukált formája, a szulfátion nem okoz jelentős környezeti károkat. A HSO_5^- halogenidionokkal, elsősorban kloridionnal való reakciója nagy jelentőséggel bír a gyakorlatban. Természetes vizekben megfelelő pH-n, nátrium-kloridos oldatban vagy nagy NaCl tartalmú vizekben (tengervízben) oxon hatására hipokloriton keletkezik, amely képes elpusztítani a baktériumokat. Ebből adódóan az oxon jelentős fertőtlenítőszer, ám az oxont alkalmazó vízkezelési eljárásokban komoly veszélyt jelenthet a kloridion első lépésben történő átalakulása mérgező klórgázzá.



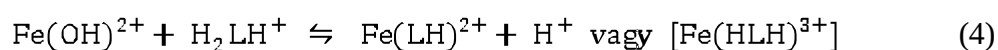
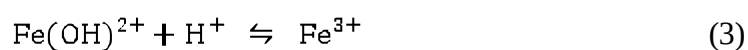
2.2. A dopamin reakciója Fe^{3+} -ionnal⁵

Usama El-Ayaan és Erwin Herlinger tanulmányozták a dopamin reakcióját Fe^{3+} -ionnal savas oldatokban, anaerob körülmények között. Az eredményeik összefoglalása a következő ábrán látható.

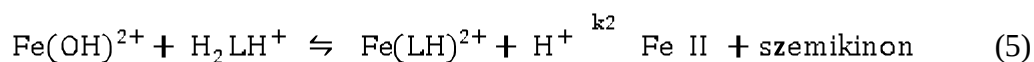


2. ábra. A dopamin és Fe^{3+} közötti reakció kinetikai sémája

Megfigyelték, hogy a Fe^{3+} (amely jelentős részben Fe(OH)^{2+} formában van jelen) gyors, reverzibilis reakcióban reagál a dopaminnal, amelynek során zöld színű vas(III)-komplex képződik. A reakciót stopped-flow technikával követték. 1,8-as pH felett a komplex-képződési reakció Fe^{3+} -ra és dopaminra is elsőrendű kinetikát mutatott, de kisebb pH-n dopaminra nézve már nem elsőrendű. A $k_{1\text{obs}}$ -t ábrázolva az alkalmazott pH függvényében, a kapott görbe minimumot mutat pH = 1,5 körül. Nagyobb pH-értékeknél (> 1,5) a reakció sebességének meredek növekedése tapasztalható, ami azzal magyarázható, hogy a kevésbé savas közegben a sokkal reaktívabb Fe(OH)^{2+} forma egyre növekvő mennyiségben van jelen.



A második lépésben lassú belsőszférás elektrontranszferrel szemikinonyok és Fe^{2+} képződik, ez a sebességhatározó lépés, amely annyira lassú, hogy klasszikus kinetikai módszerekkel is követhető. Mivel a $k_{2\text{obs}}$ értéke nő a pH-val, feltételezhető, hogy igen reakcióképes protonált komplexről van szó, amelyben a dopamin monodentát ligandumként szerepel. A szemikinson gyök képződése felírható a következőképpen:



A komplex kialakulását és szemikinson gyökké való bomlását 700 nm-en követték. Mivel a képződött szemikinsongyök nem stabilis, gyorsan továbboxidálódik orto-kinonná. A reakciót oxidálószer-feleslegben végezve azt tapasztalták, hogy a következő lépésben – a katecholamin kinon formájára jellemzően – spontán belső Michael-addíciós reakcióval gyűrűzáródás történik. Mivel a gyűrűzáródás egyik feltétele az aminocsoport deprotonálódása, ez egy lassú lépés lesz, ugyanis az aminocsoporthoz tartozó protonálódási állandó nagy, tehát a deprotonálódási lépés viszonylag lassú. Az orto-kinon képződését és átalakulását leukodopaminokrómmá 380 nm-en követték. A gyűrűzáródás során képződött leukodopamin továbboxidálódik rózsaszín dopaminokrómmá.

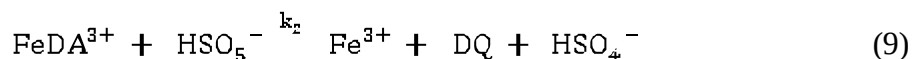
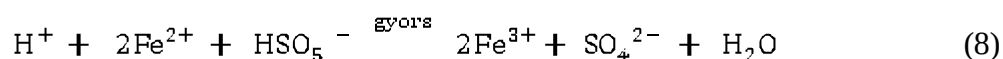
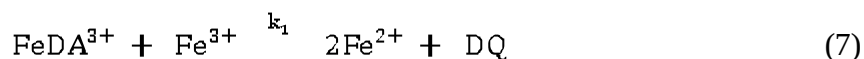
2.3. Dopamin oxidációja peroxomonoszulfát-ionnal, vas(III) katalizátor jelenlétében⁶

Simon Adrienn diplomamunkájában foglalta össze a dopamin peroxomonoszulfát-ionnal, Fe^{3+} katalizátor jelenlétében történő oxidációjának vizsgálatával kapcsolatos eredményeit. Azt tapasztalta, hogy a peroxomonoszulfát-ion savas közegben közvetlenül nem oxidálja a dopamint. Mivel a vas(III) oxidál, és a peroxomonoszulfát-ion oxidálja a Fe^{2+} -t, felmerült a lehetőség, hogy a Fe^{3+} katalizálja a dopamin és peroxomonoszulfát-ion reakcióját. Méréseit a termék elnyelésének hullámhosszán, 390 nm-en végezte, a Fe^{3+} -iont katalitikus mennyiségben alkalmazta, a sav pedig nagy feleslegben volt jelen.

Ebben a munkában megvizsgálták a reakciósebesség dopamin-koncentráció függését is. Az így kapott kinetikai görbén látható, hogy a DA-koncentrációt növelve növekszik a reakció sebessége is. A kinetikai görbét a kezdeti sebességek módszerével kiértékelve, a kezdeti sebességeket a DA-koncentráció függvényében ábrázolva nulla tengelymetszetű egyenest kapott, azaz a reakció dopaminra nézve elsőrendű. Az oxonkoncentráció-függés vizsgálata esetén a kapott kinetikai görbéken látható, hogy az oxonkoncentrációjának növelésével a hosszabb reakcióidőhöz tartozó abszorbancia csökken, eszerint a kezdeti szakaszban képződő termék továbboxidálódik. Az oxonkoncentráció függvényében ábrázolva a kezdeti

sebességeket egyenest kapott (tehát oxonra nézve elsőrendű a reakció), amelynek tengelymetszete nem nulla. Ez arra utal, hogy a peroxomonoszulfát-ion távollétében is történik oxidáció a Fe^{3+} -ionnal. A katalizátor rendűségét vizsgálva azt tapasztalta, hogy a Fe^{3+} -ionra nézve a reakció kevert első- és másodrendű.

A mérési eredményekkel összhangban a következő kinetikai modellt javasolta a reakcióra:



A vas(III) a dopaminnal az első, egyensúlyi lépésben komplexet képez. A reakció sebességmeghatározó lépése a komplex oxidálása, ami peroxomonoszulfát-ion vagy vas(III) hatására következik be. Az oxidációban keletkezett Fe^{2+} -t a peroxomonoszulfát-ion gyors lépésben visszaoxidálja Fe^{3+} -ionná.

A modell alapján levezetett sebességi egyenlet:

$$\text{FeDA}^{3+} = K_1 \text{Fe}^{3+} \text{DA} \quad (10)$$

$$v = k_1 \text{Fe}^{3+} \text{FeDA}^{3+} + k_2 \text{FeDA}^{3+} \text{HSO}_5^- \quad (11)$$

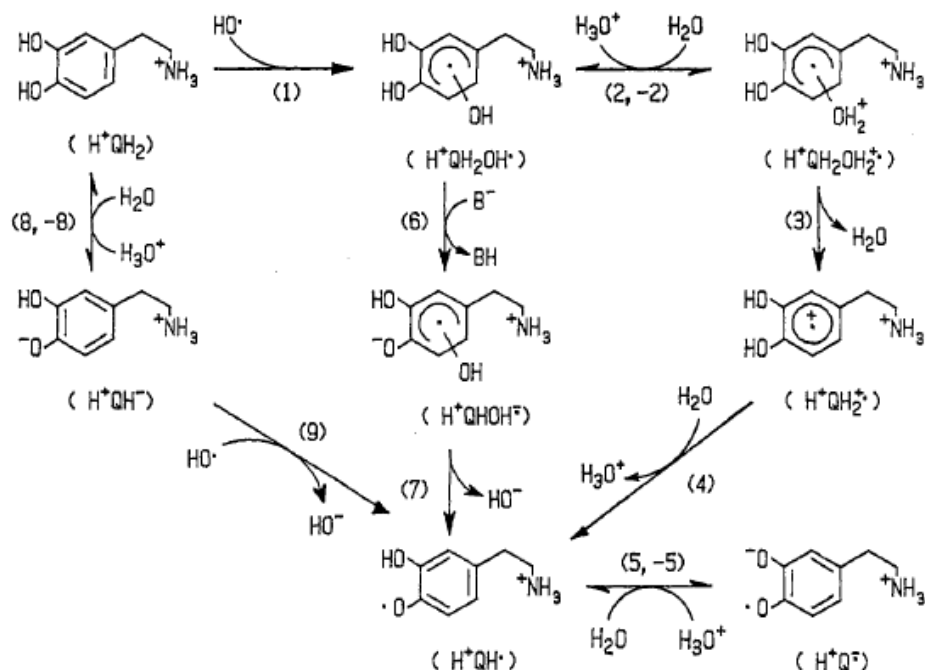
$$v = k_1 K_1 \text{Fe}^{3+ 2} \text{DA} + k_2 K_1 \text{Fe}^{3+} \text{DA} \text{HSO}_5^- \quad (12)$$

$$v = K_1 k_1 \text{Fe}^{3+ 2} + k_2 \text{Fe}^{3+} \text{HSO}_5^- [\text{DA}] \quad (13)$$

A sebességi egyenlet alapján a reakció elsőrendű peroxomonoszulfát-ionra és dopaminra nézve, Fe^{3+} -ionra nézve kevert első- és másodrendű kinetikát mutat.⁶

2.4. A dopamin hidroxilgyökökkel való oxidációja⁷

Helen W. Richter és Walter H. Waddell a dopamin hidroxilgyökökkel való oxidációját vizsgálták vizes közegben impulzusradiolízis technikával, fotometriás detektálással. Eredményeik összefoglalása a következő ábrán látható.



3.ábra. A dopamin hidroxilgyökökkel való reakciója

Az oxidáció folyamatának várt sorrendje: 1. az $\text{OH}^\bullet$ addíciója az aromás gyűrűre, hidroxiciklohexadienil gyököt képezve, 2. bázis vagy savkatalizált víz elimináció, szemikinin-gyök képződésével, 3. egyensúly a szemikiningyök és szemikinin-gyök-anion között. Mivel az $\text{OH}^\bullet$ addícióhoz, vízeliminációhoz és a biomolekuláris bomláshoz jellemző abszorbancia-változások tartoznak, a reakció részlépései egyértelműen nyomon követhetőek. A reakció fő sajátosságai, részlépései: 1. $\text{OH}^\bullet$ addíciója az aromás gyűrűre, hidroxiciklohexadienil gyök képződik (1), 2. $\text{OH}^\bullet$ reakciója deprotonált dopaminnal, belső szférás elektrontranszferral szemikinin-gyök ($\text{H}^+\text{QH}^\bullet$) képződik (9), 3. sav-bázis katalizált víz-elimináció során a $\text{H}^+\text{QH}_2\text{OH}^\bullet$ formából szemikinin-gyök keletkezik, amelynek sebessége minimumot mutat 4-5-ös pH értékeknél, 4. és utolsó lépésként szemikinin-gyök és szemikinin-gyök-anion képződik bimolekuláris reakcióban (5).

A dopamin és $\text{OH}^\bullet$ reakcióját 4,7-es pH-n tanulmányozták, ahol a vízelimináció sebessége minimális, és ezen folyamatra másodrendű sebességi együtthatót állapítottak meg (k_1).

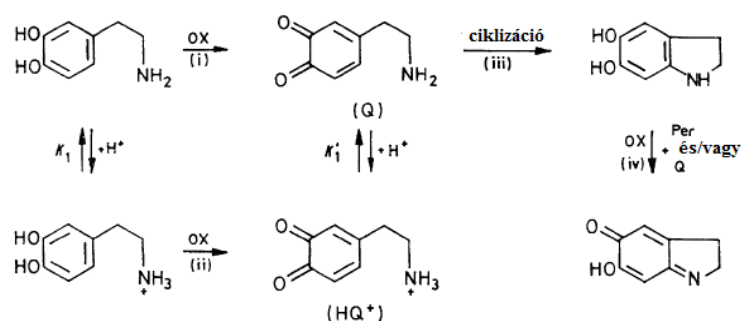
Különböző pH-értéken (4,7 és 3,1) vizsgálva a spektrális változásokat azt tapasztalták, hogy a 4,7-es pH-n felvett spektrumon 338 nm és 314 nm-nél látható két csúcs közül a 314 nm-nél

jelentkező hipszokróim eltolódást szenved, ha a pH-t 3,1-re változtatjuk. Ez összhangban van azzal a feltételezéssel, hogy a szemikínon-gyökanion átalakulása szemikínon-gyökké akkor lehetséges, ha a pH-t lecsökkentjük, ilyenkor a vízeliminációval járó átalakulás irányába tolódik el az egyensúly.

A savkatalizált vízelimináció első lépése a hidroxí-ciklohexadienil gyök protonálódása: a H^+ a bázikusabb, az addíció során belépett OH-csoporthoz kapcsolódik (2). Ezt egy vízmolekula gyors kilépése követi, fenilgyökkation képződése közben (3). A keletkező részecske nagyon reakcióképes, amely proton leadásával stabilizálódik, és szemikínon-gyök képződik (4). A hidroxí-ciklohexadienil gyök báziskatalizált vízeliminációs reakciója $pH > 4,5$ értékeknél lehetséges, ahol az első lépésben az egyik, savasabb fenolos OH-csoport deprotonálódása következik be bázis hatására (6), majd az így kialakult deprotonált adduktum hidroxidion kilépésével stabilizálódik, szemikínongyök képződése közben (7).

2.5. Néhány catecholamin perjódssavval történő oxidációja⁸

Ezio Pelizzetti, Edoardo Mentasti és Edmondo Pramauro három, biológiailag nagyon jelentős vegyület – az adrenalin, L-dopa, dopamin – perjódssavval történő oxidációjának kinetikáját és mechanizmusát tanulmányozták. A dopamin teljes oxidációs reakciójára a következő mechanizmust ajánlották:



4. ábra. A dopamin és a perjódssav reakciójának mechanizmusa

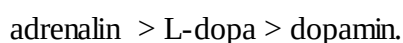
Az o-benzokínon kialakulását 0-7 pH-tartományban és különböző hőmérséklet-értékeken vizsgálták: az L-dopa és dopamin oxidációját 25 °C-on, az adrenalinét pedig 15 °C-on. A pH beállításához acetát- (pH = 4-6) és foszfát-puffert (pH > 6) alkalmaztak, a reakciót 390 nm-en követték. A mérési eredményekből arra következtettek, hogy a reakció másodrendű, és a következő sebességi egyenlethez jutottak:

$$-\frac{d[Cat]}{dt} = k_o[Cat]_t[Per]_t \quad (14)$$

Azt tapasztalták, hogy mindhárom catecholamin esetében az első oxidációs lépés erős pH-függést mutat. A mérés során perjódsvávelesleget alkalmazva pH > 4 esetén azt tapasztalták, hogy a kialakult o-benzokinin egy lassú, gyűrűzárási reakcióban továbbalakul leukoaminokrómmá, amely gyorsan továbboxidálódik aminokrómmá. A reakciót 480 nm-en követték. Mivel a gyűrűzáródás végbemeneteléhez elengedhetetlen az aminocsoport deprotonálódása (amely a nagy protonálódási állandó miatt lassú folyamat), a reakció sebessége erősen függ az alkalmazott pH-tól. A pH = 4-8 tartományban az o-benzokinin oxidációjához tartozó sebességi együttható:

$$k_{obs} = \frac{k_c K'_1}{(K'_1 + [H^+])} \quad (15)$$

(ahol a K'_1 az aminocsoport savi disszociációs állandójának felel meg). pH > 9 esetén viszont azt tapasztalták, hogy a gyűrűzárás sebessége közel független a pH-tól. A vizsgált vegyületek esetén a gyűrűzáródás sebessége a következőképpen alakul:

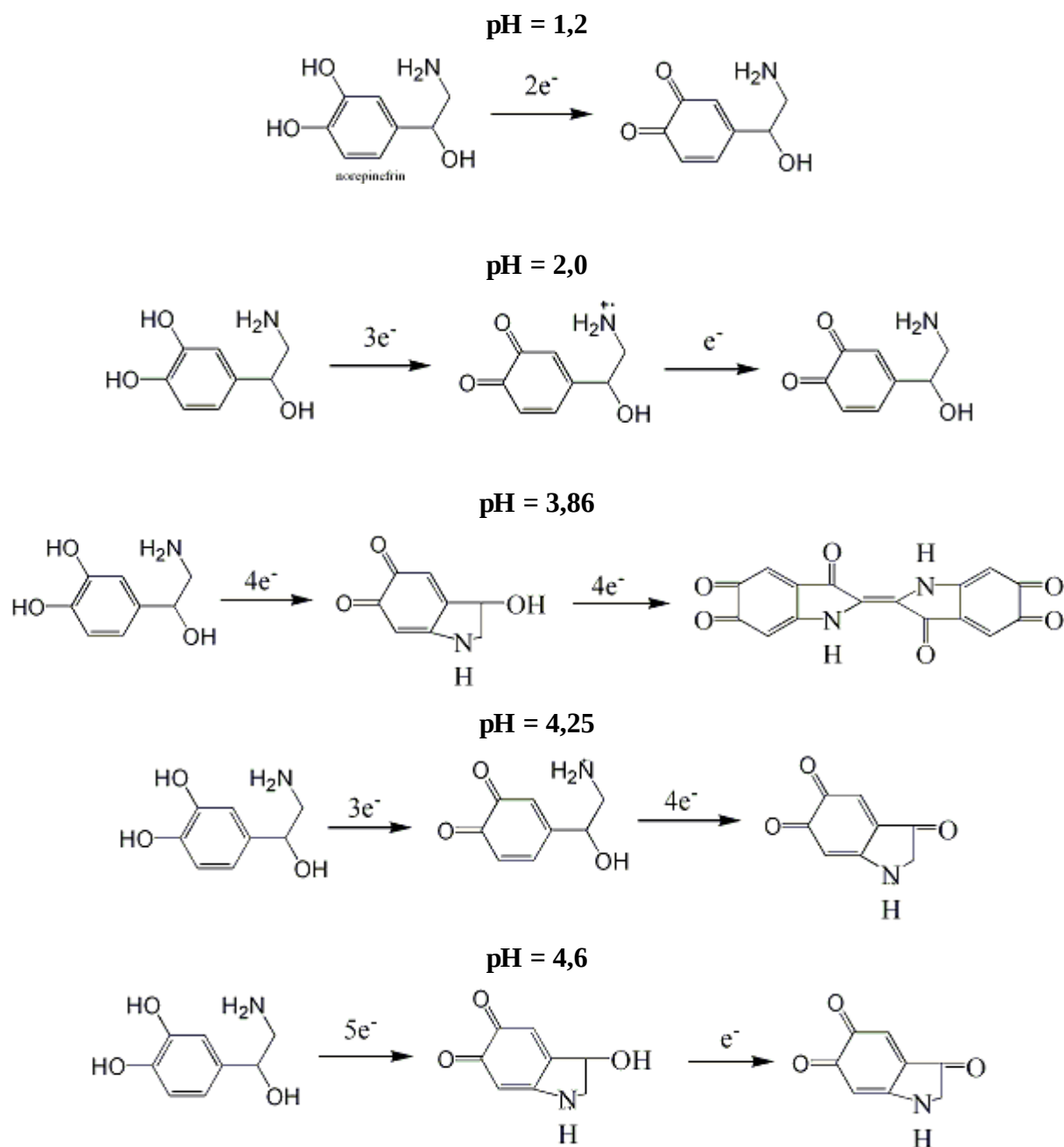


2.6. A norepinefrin oxidációja⁹

Wu Xinguo és Cai Ruxiu a norepinefrin oxidációját vizsgálták különböző oxidálószerrel, és arra a megállapításra jutottak, hogy a köztermékek, a végtermékek és a reakcióutak jelentősen függenek az oxidálószerrel.

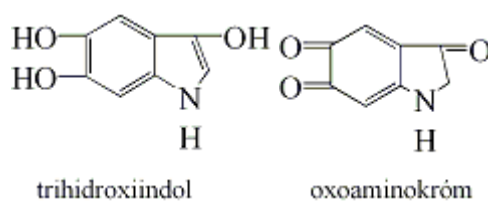
Először $[\text{Fe}(\text{phen})_3^{3+}]$ -nel vizsgálták a folyamatot: ekkor gyengén savas közegben vörös színű ferroin, vagyis $[\text{Fe}(\text{phen})_3^{2+}]$ komplex keletkezik. A reakció meglehetősen gyors, így stopped-flow technikával követték nyomon. Különböző pH-értékeken vizsgálták a reakciót, látható volt, hogy a pH növekedésével nemcsak a sebességek, hanem az abszorbanciaértékek is nőttek. A kinetikai görbét két szakaszra lehet osztani: a kezdeti szakaszban gyors reakció játszódik le, a végén pedig egy lassabb folyamat. Ez egymás után lejátszódó reakciókra utal, azaz a köztermék és a végtermék elektronvesztésben vagy a ferroinmolekulák számában különbözik. Azt gondolták, hogy háromféleképpen mehet a reakció: (1) a köztermék 3, 5 vagy 7 elektronvesztéssel keletkezik, (2) először 4 e^- -t veszít, ebből keletkezik az összesen 6

e^- veszteséssel termék, (3) a végső termék összesen $8 e^-$ veszteséssel keletkezik. Ezzel szemben más viselkedést tapasztaltak:



5. ábra A norepinefrin oxidálása $[\text{Fe}(\text{phen})_3^{3+}]$ -tal, különböző pH-értékeken

Következőnek oldott O_2 -nel vizsgálták lúgos közegben a reakciót, amely megfelelő redukálószer jelenlétében megy végbe mint pl. az aszkorbinsav. Fluoreszcens trihidroxiindol keletkezik, amely nem stabil, így tovább oxidálódik valamilyen nem fluoreszcens anyaggá. A végső termék szerkezete ismeretlen, de valószínűleg oxoaminokróm, ami a 6. ábrán látható.



6. ábra Norepinefrin O_2 -nel való oxidálásának lehetséges termékei

Hexacianoferráttal $[Fe(CN)_6]^{3-}$ gyengén savas közegben vizsgálták az oxidációt, ahol egy piros terméket kaptak. Különböző pH-értékeken is vizsgálták a reakciót. Kisebb pH-értékeken a kinetikai görbén látszik, hogy az oxidáció kezdeti fázisát megtartja, míg nagyobb pH-n a kezdeti periódus csökken és a kinetikai görbe alapján egyszerű elsőrendű reakció játszódik le, amely nem megy el aminokróm állapotig. Ez jelentős különbség a lúgos közegben végbemenő reakcióhoz képest, ott ugyanis trihidroxiindol állapotig megy a reakció, ami átrendeződik aminokrómmá, majd további oxidációval nem fluoreszcens termék keletkezik.

3. Célkitűzések

Kísérleti munkánk célja a dopamin és norepinefrin peroxomonoszulfát-ion hatására történő oxidációjának részletes kinetikai vizsgálata, a lejátszódó mechanizmus megismerése. A kinetikai sajátságok feltárása alapján kinetikai modellt kívánunk felállítani a reakciók során tett megfigyelések és mérések értelmezésére.

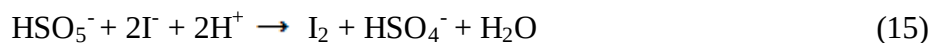
4. Kísérleti körülmények

4.1. Felhasznált vegyszerek

A kísérletek során a dopamintörzsoldat készítéséhez szilárd dopamin-hidrokloridot ($\text{C}_8\text{H}_{12}\text{NO}_2\cdot\text{HCl}$, Sigma-Aldrich) használtunk. A norepinefrin-törzsoldat készítéséhez szilárd norepinefrin-L-bitartarátot használtunk ($\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_3\cdot\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$, Sigma-Aldrich). A peroxomonoszulfát-ion oldatát összetett káliumsójából ($2\text{KHSO}_5\cdot\text{K}_2\text{SO}_4\cdot\text{KHSO}_4$) készítettük, mely a kereskedelemben Oxone[®] néven kapható. A pH beállításához foszfát puffert ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Reanal) és ecetsav/nátrium-acetát puffert használtunk. Az oldatokat háromszor ioncserélt és ultraszűrt (MILLI-Q RG tisztítórendszer) vízből készítettük.

4.1.1. Az oxon tisztaságának meghatározása

Kutatócsoportunkban meghatározták az oxon tisztaságát jodometriás titrálással. A jód a (14) egyenletnek megfelelően keletkezik. A keletkező jód koncentrációját nátrium-tioszulfát segítségével határozták meg.



A mérések szerint a KHSO_5 -tartalom kb. 90%-a a bemérés alapján számolható értéknek. További kísérleteink során mindig figyelembe vettük ezt a tényezőt, és ez alapján számoltuk ki a peroxomonoszulfát-ion oldatbeli koncentrációját.

4.1.2. Dopamintörzsoldat készítése

A dopamintörzsoldatot szilárd hidrokloridjából bemérés alapján állítottuk elő, a szilárd anyagot háromszor ioncserélt vízben oldottuk fel. A törzsoldatokat hűtőben tároltuk, egy törzsoldatot maximum két napig használtunk.

4.1.3. Norepinefrin-törzsoldat készítése

A norepinefrin-törzsoldatokat szilárd formájából bemérés alapján állítottuk elő, háromszor ioncserélt desztillált vízben feloldva. A norepinefrin-oldat stabilitását spektrofotometriásan

ellenőriztük, azt tapasztaltuk, hogy a felhasználás során számottevő változás nem történik. A törzsoldatokat hűtőben tároltuk, maximum 2 napig használtuk fel.

4.1.4. Foszfátalapú pufferoldat készítése

A reakcióelegy pH-jának beállítására foszfátpuffert alkalmaztunk. A törzsoldatot szilárd $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, illetve $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ bemérésével készült, azonos koncentrációjú oldatok 1:1 arányú elegyből állítottuk elő, pH~7 beállításához.

4.2. A mérésekhez használt műszerek és számítógépes programok

A spektrofotometriás vizsgálatokat PERKIN ELMER UV/VIS LAMBDA 25 pásztázó spektrofotométerrel és HP-8453 diódasoros spektrofotométerrel végeztük kvarcküvetákban. A 25.0 ± 0.1 °C-os hőmérséklet állandóságát HETO CBN 18-30 termosztáttal és cirkuláló vízfürdővel biztosítottuk. Az eredmények kiértékelése a spektrofotométer saját szoftverével, MicromathScientist és Microsoft Excel számítógépes programokkal történt. A jodometriás titrálásokhoz Metrohm 785 DMP Titrino automata titrátort használtunk, melyhez 6.0420.100 számú Pt-elektrodát csatlakoztattunk.

A pszeduo-elsőrendű sebességi állandók meghatározása úgy történt, hogy a kinetikai görbék alkalmas szakaszát exponenciális görbével illesztettük. Ehhez gyakran az első néhány pont és a görbe végének figyelmen kívül hagyására is szükség volt. Az illeszkedés ilyen körülmények között megfelelő volt, de maguk a görbék minden esetben több egymás utáni lépést tükröztek, s ezekből általában az elsőt vizsgáltuk a pszeduo-elsőrendű sebességi állandó koncentráció függésének tanulmányozásával.

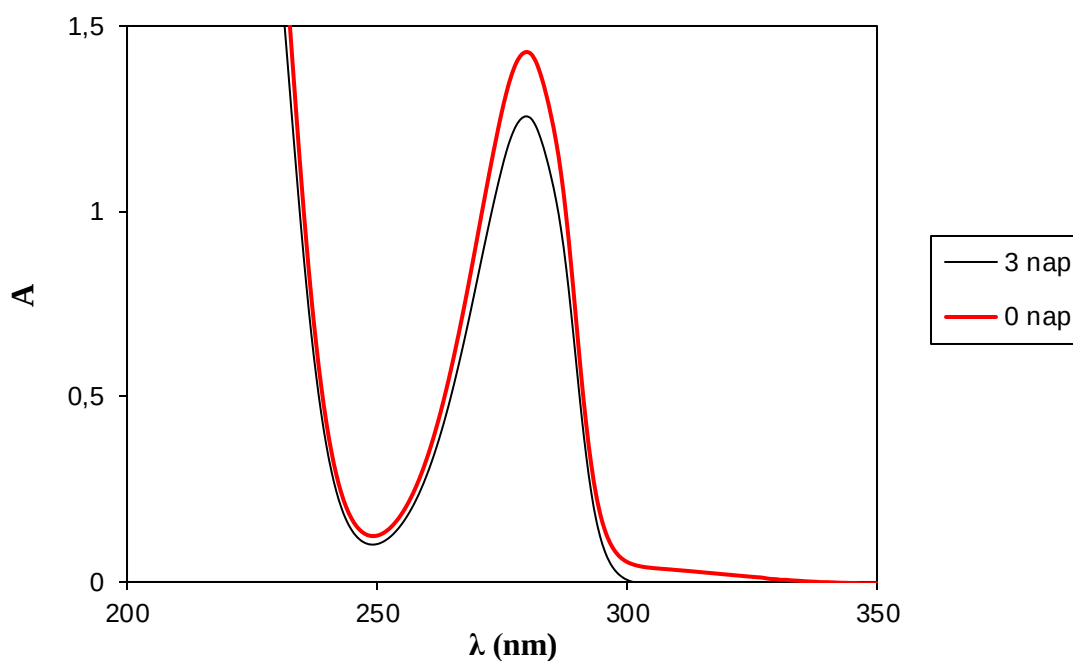
Az NMR-spektroszkópiás vizsgálatot egy Bruker 360 MHz-es készülékkel végeztük. Az eredmények kiértékelése WinNMR és Mestrec szoftverrel történt, a ppm skálát a deuterált oldószer maradékjelére kalibráltuk.

A tömegspektrometriás vizsgálatához BrukerMicrOTOF-Q berendezést használtunk. A mérés elektropray ionizációs módszerrel történt, mely során pozitív ionokat detektáltunk.

5. Eredmények és értelmezésük

5.1. Előkísérletek

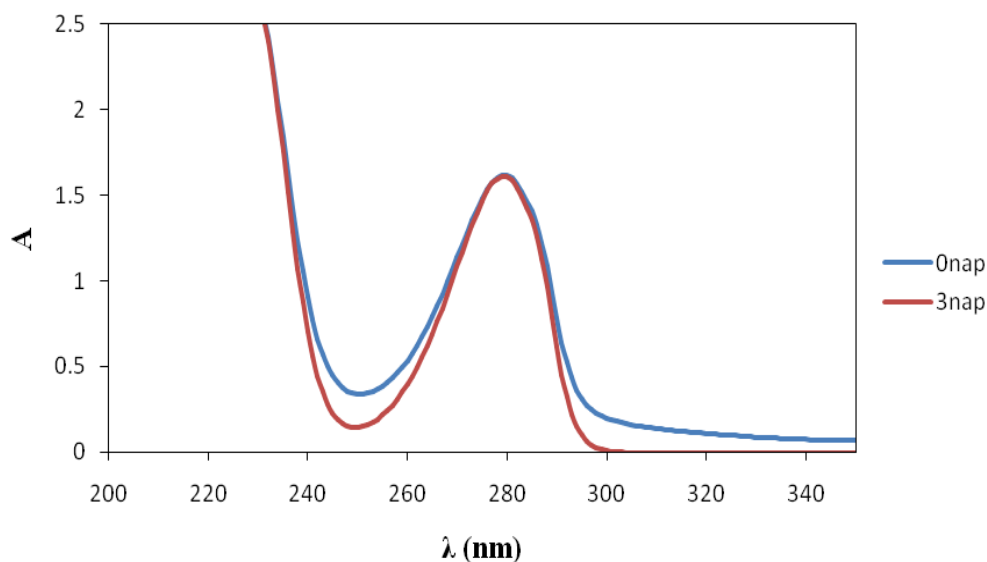
Előkísérleteink során spektrofotometriásan ellenőriztük az dopamin oldatának stabilitását. Felvettük egy törzsoldat spektrumát néhány perccel az elkészítése után, majd 3 napos várakozás után megismételtük a mérést. A spektrumokat a 7. ábra mutatja be, látható, hogy 3 nap alatt számottevő változás történt, az abszorbancia észrevehetően csökkent. Ezért a kísérleti munkában ugyanazt a dopamin törzsoldatot 2 napnál tovább nem használtuk.



7. ábra A dopamin-oldat stabilitásának ellenőrzése

$$[DA]_{3\text{nap}} = 0,54 \text{ mM}, [DA]_{0\text{nap}} = 0,57 \text{ mM}$$

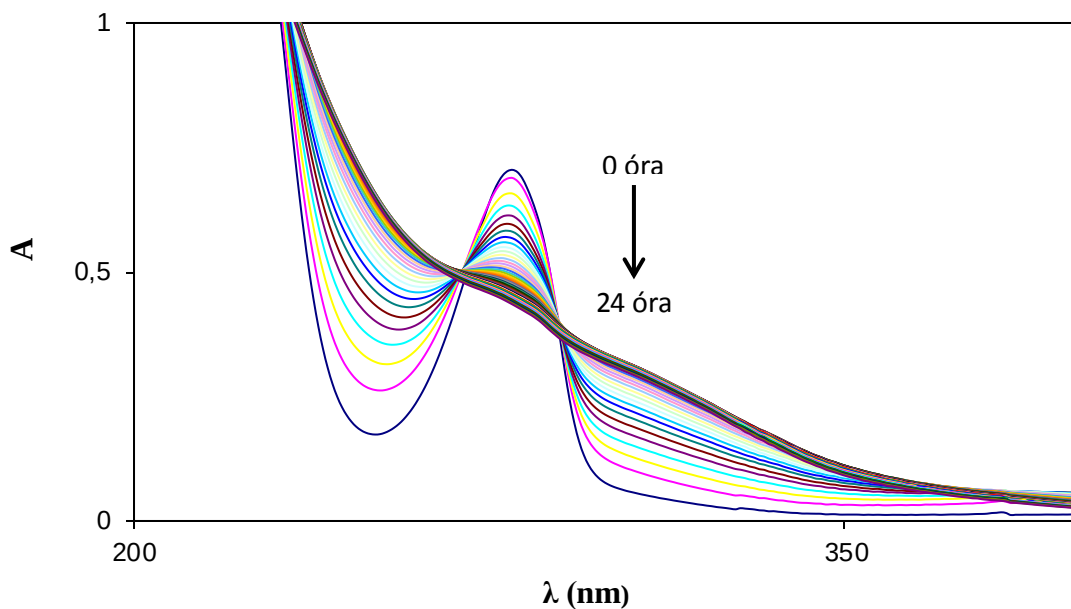
A norepinefrin-oldat stabilitását hasonlóképpen vizsgáltuk. A 8. ábrán jól látható, hogy a spektrum jellege 3 nap után egy kissé megváltozott, bár a csúcson mért abszorbancia lényegében nem változott. Így a későbbiekben 2 napnál tovább nem használtunk egy norepinefrin-oldatot.



8. ábra A norepinefrin-oldat stabilitásának ellenőrzése

[norepinefrin]0nap = 1,3 mM, [norepinefrin]3nap = 1,2 mM

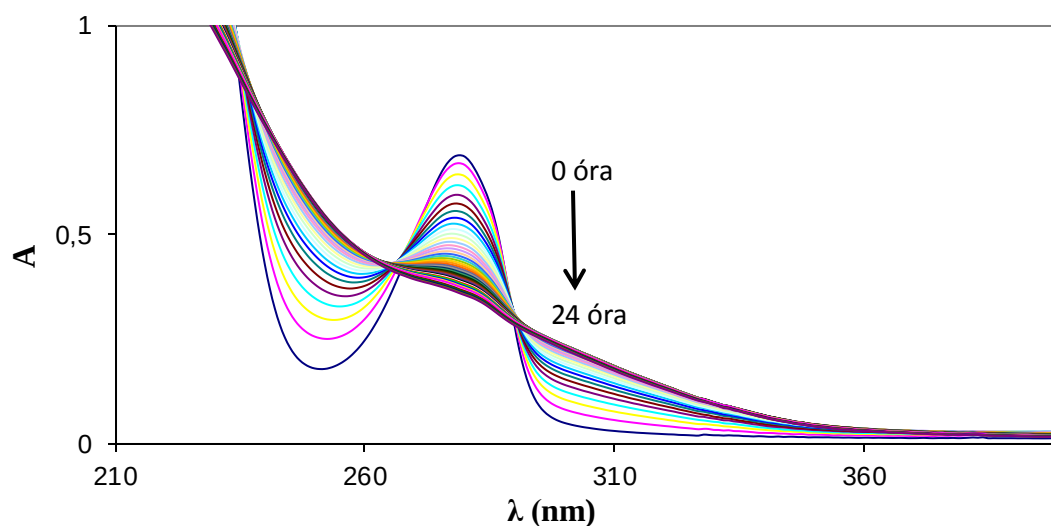
A dopamin és a peroxomonoszulfát-ion közötti reakció követése folyamán észlelt spektrális változások a 9. ábrán láthatók. A reakciókörülményeket úgy választottuk meg, hogy a dopamin és a peroxomonoszulfát-ion közel 1:1 arányban legyen jelen, valamint a pH-t 7-re állítottuk be foszfátpuffer segítségével. Az oxidációt 24 órán keresztül követtük, fél óránként vettünk fel egy spektrumot. Az 9. ábrán bemutatott spektrális változások azt tükrözik, hogy a dopamin jól azonosítható, kb. 280 nm-nél jelentkező elnyelési maximuma az oxidációs reakció során eltűnik, és 24 óra alatt olyan, végsőnek tekinthető spektrum alakul ki, amely jellegzetes ugyan, de csúcsok nincsenek benne. A folyamat első részében a spektrumok metszéspontjait akár izobesztikus pontoknak is lehetne nevezni, de ezek a reakció előrehaladtával eltolódnak, vagyis a teljes, 24 órás időtartamban már semmiképp nem lehet olyan hullámhosszt találni, ahol az abszorbancia állandó lenne. Ezek a megfigyelések elég egyértelműen többlépéses folyamatra utalnak, amely nem meglepő, hiszen a dopaminból több különböző oxidációs termék is keletkezhet. A kinetikai erőfeszítéseinket arra irányítottuk, hogy ezen folyamatok közül egyet (lehetőleg az elsőt) elkülönítve tanulmányozzuk a többitől. További méréseinket az elnyelési maximumon, $\lambda = 279$ nm-en, foszfátpufferes közegben végeztük.



9. ábra Spektrális változás a dopamin és peroxomonoszulfát-ion közötti reakció során

$[\text{HSO}_5^-] = 2 \cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$, $[\text{DA}] = 2 \cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$, [foszfát puffer] = 0,1 M, pH=7

Az előkísérletek során észlelt, a norepinefrin és az oxidálószer közötti reakció során tapasztalható spektrális változást tanulmányoztuk, ez a 10. ábrán látható. A kezdetben megjelenő izobesztikus pontok időbeli eltolódásai többlépéses folyamatra utalnak. A további részletes kinetikai méréseinket mindig a kiindulási anyag elnyelésének egy jól követhető hullámhosszán, szintén $\lambda = 279 \text{ nm}$ -en végeztük, foszfátpufferes közegben.



10. ábra Spektrális változás a norepinefrin és oxon közötti reakcióban.

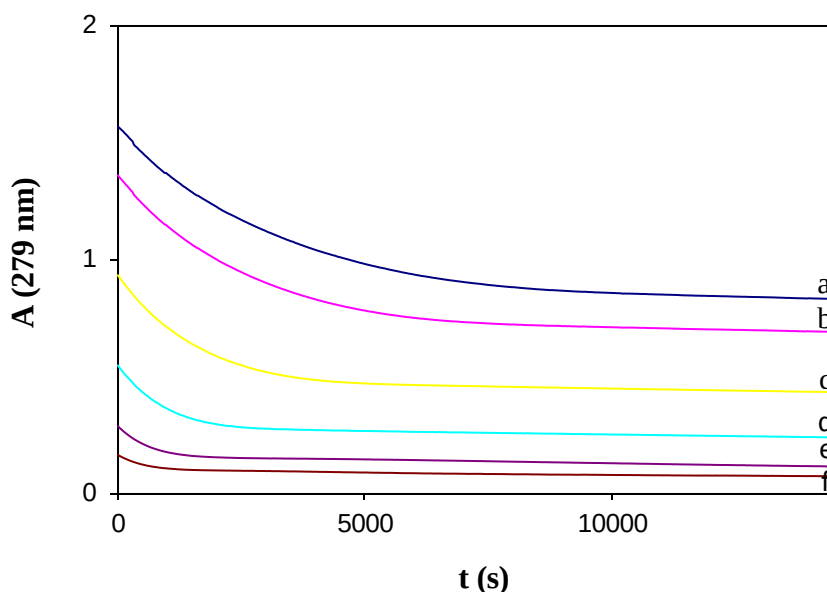
Az oxidációt 24 órán keresztül követtük, 30 percenként vettünk fel egy spektrumot.

[norepinefrin] = 0,23 mM, $[\text{HSO}_5^-] = 0,20 \text{ mM}$, [foszfát-puffer] = 0,1 M

5.2. A dopamin oxidációja

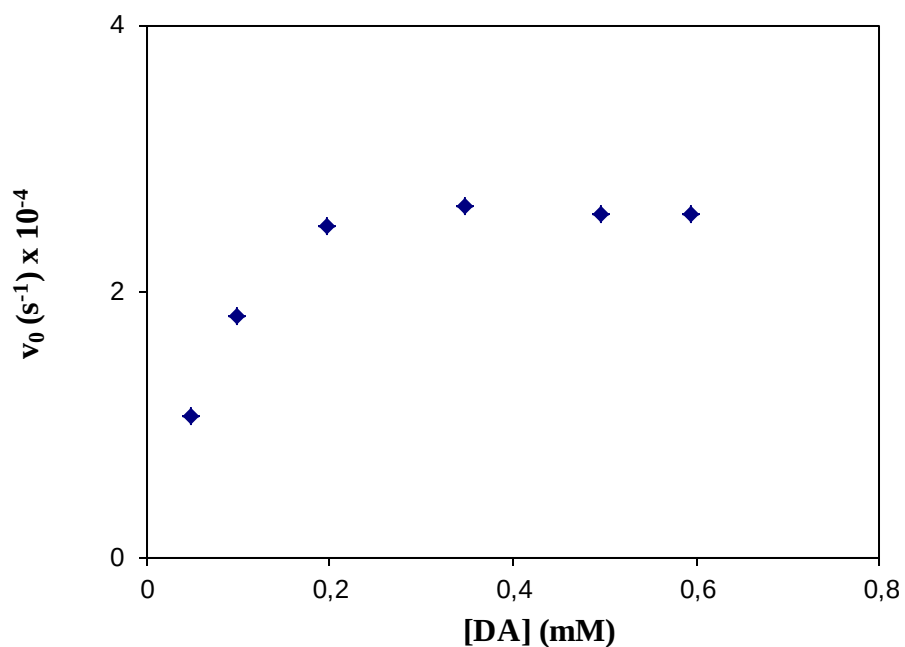
5.2.1. A reakció részletes kinetikai vizsgálata

Megvizsgáltuk a reakciósebesség dopaminkoncentráció-függését 7-es pH-n úgy, hogy a peroxomonoszulfát-ion koncentrációját (0,0115 M) állandó értéken tartottuk. A reakciót 4 órán keresztül, $\lambda = 279$ nm-en követtük. A kapott kinetikai görbéket a 11. ábrán mutatjuk be. Látható, hogy a dopamin koncentrációjának növelésével a reakciósebesség is nő.

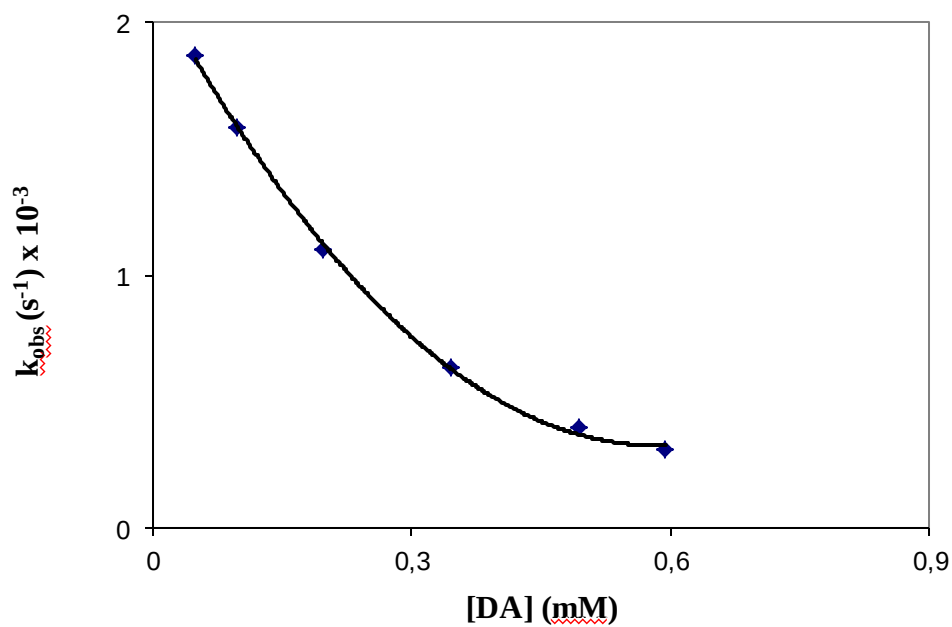


11. ábra. A dopamin és peroxomonoszulfát-ion közötti reakcióban mért kinetikai görbék
[HSO₅⁻] = 0,0115 M, [DA] = 0,594 mM (a), 0,495 mM (b), 0,35 mM (c), 0,2 mM (d),
0,1 mM (e), 0,05 mM (f), [foszfátpuffer] = 0,1 M, pH = 7

A görbéket a kezdeti sebességek módszerével értékeltük ki. A dopamin-koncentráció függvényében ábrázolva a kezdeti sebességeket azt tapasztaltuk, hogy a kapott pontok telítési jellegű görbét követnek, nagy dopaminkoncentráció esetében a sebesség már független volt a koncentrációtól (12. ábra). Ennek ellenére az első, mintegy 5%-os konverziót jelentő szakasz levágása után a kísérleti görbéket exponenciális görbével elfogadhatóan lehetett illeszteni. A nemlineáris illesztéssel kapott, különböző dopaminkoncentrációkhoz tartozó k_{obs} értékeket ábrázolva a kapott pontok csökkenő tendenciát mutatnak (13. ábra). Ezt a jelenséget a munka jelenlegi állapotában nem tudjuk értelmezni, a jövőben mindenképpen további erőfeszítéseket kell tenni.

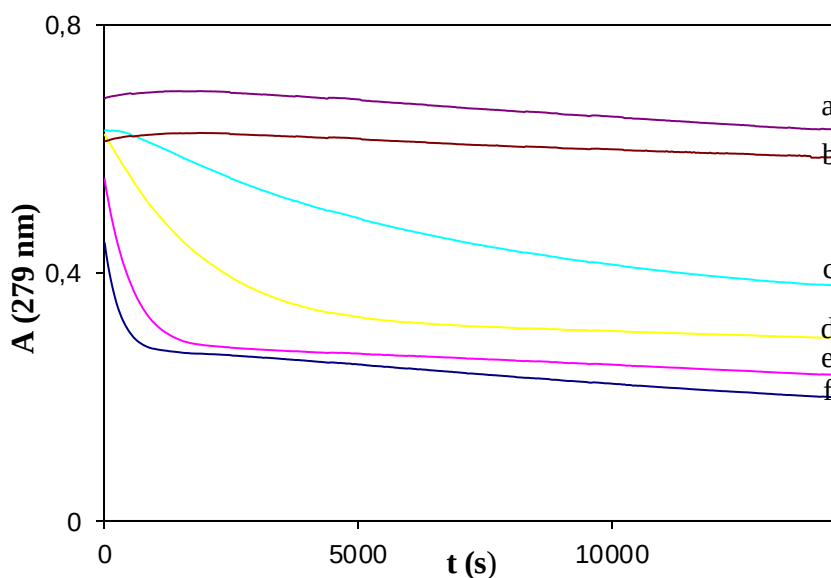


12. ábra. A kezdeti sebesség dopamin-koncentrációfüggése a dopamin és peroxomonoszulfát-ion közötti reakcióban, $[\text{HSO}_5^-] = 0,0115 \text{ M}$, $[\text{foszfátpuffer}] = 0,1 \text{ M}$, $\text{pH} = 7,0$



13. ábra. A pszeudo-elsőrendű sebességi állandó dopamin-koncentrációfüggése a dopamin és peroxomonoszulfát-ion közötti reakcióban,
 $[\text{HSO}_5^-] = 0,0115 \text{ M}$, $[\text{foszfátpuffer}] = 0,1 \text{ M}$, $\text{pH} = 7,0$

Tanulmányoztuk a reakciósebesség függését a peroxomonoszulfát-ion koncentrációjától is. Ekkor a dopamin koncentrációját (0,2 mM) állandó értéken hagytuk, a peroxomonoszulfát-iont nagy feleslegekben alkalmaztuk (~5, ~10, ~20, ~50, ~80 és ~120-szoros felesleg). A reakciót 4 órán keresztül követtük $\lambda=279$ nm-en. A kapott kinetikai görbék az 14. ábrán láthatóak.

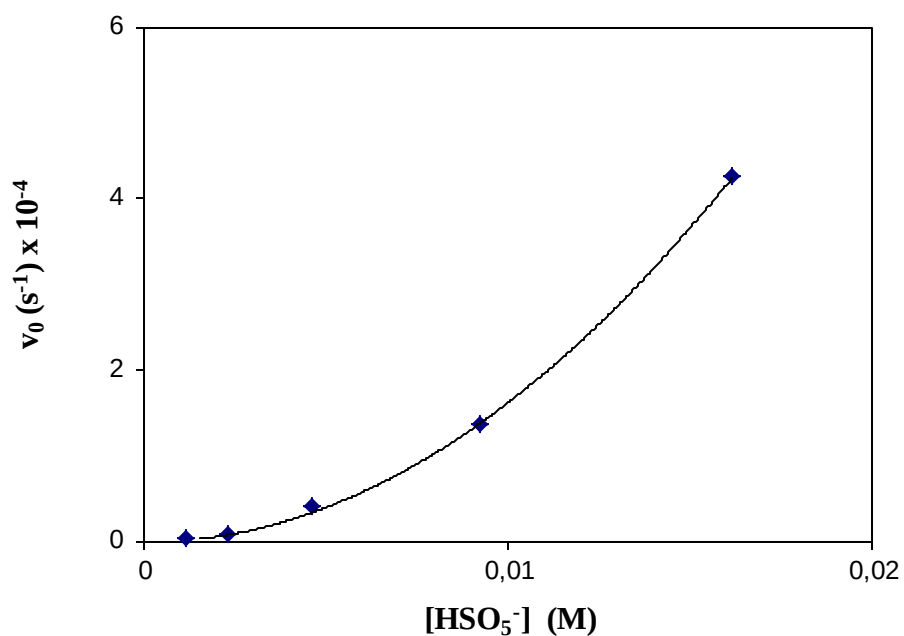


14. ábra A dopamin és peroxomonoszulfát-ion közötti reakcióban mért kinetikai görbék

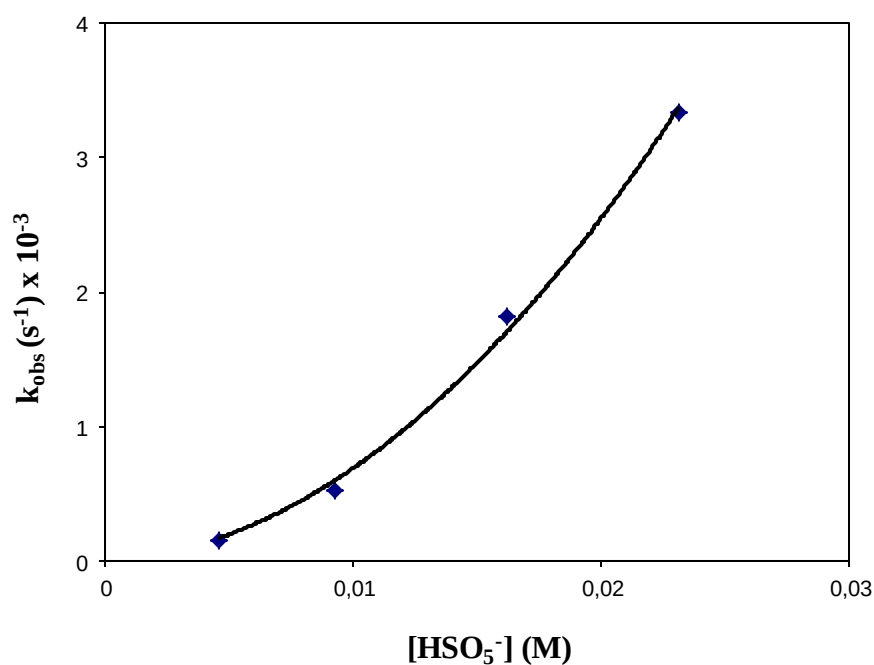
[DA] = 0,22 mM, $[\text{HSO}_5^-] = 1,2$ mM (a), 2,3mM (b), 4,60 mM (c),

9,40 mM (d), 16,2 mM (e), 23,2 mM (f) [foszfátpuffer] = 0,1 M, pH = 7,0

A kezdeti sebességeket ábrázolva a peroxomonoszulfát-ion koncentrációjának függvényében felfelé hajló görbét kaptunk (15. ábra). A kapott pontokra egy másodfokú polinom illeszthető, amelynek tengelymetszete nulla. Az oxonra nézve tehát kevert első- és másodrendű kinetikai sajátságot tapasztaltunk. A görbék exponenciális illesztésével kapott k_{obs} értékeket ábrázolva a peroxomonoszulfát-ion koncentrációjának függvényében nagyon hasonló jellegű függést mutatott: a kapott pontokra nulla tengelymetszetű, másodfokú polinom illeszthető (16. ábra).

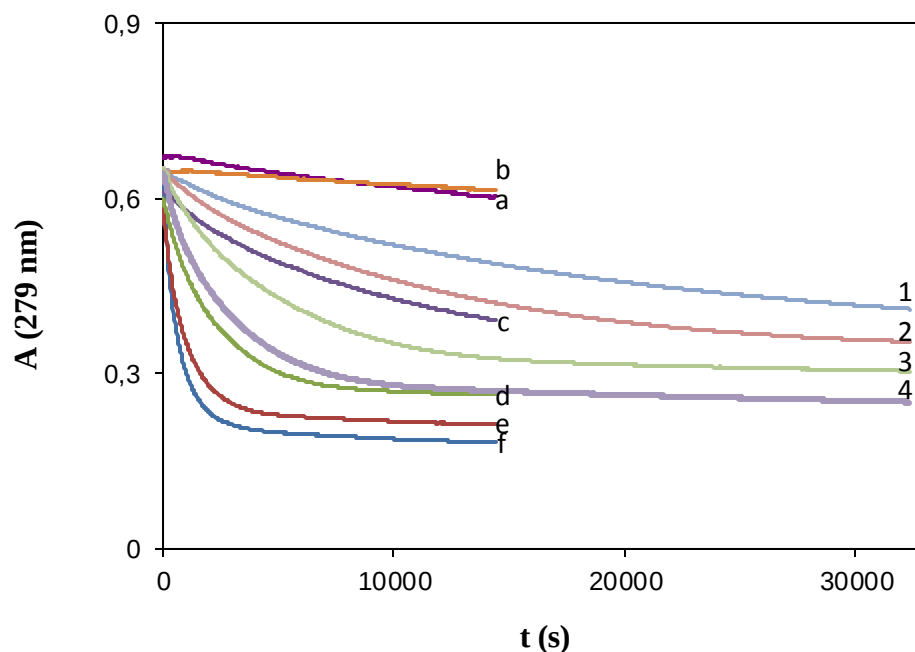


15. ábra A kezdeti reakciósebesség függése a peroxomonoszulfát-ion koncentrációjától a dopamin és peroxomonoszulfát-ion közötti reakcióban, $[\text{DA}] = 0,22 \text{ mM}$, $[\text{foszfátpuffer}] = 0,1 \text{ M}$, $\text{pH} = 7,0$



16. ábra A pszeudo-elsőrendű sebességi állandó függése a peroxomonoszulfát-ion koncentrációjától a dopamin és peroxomonoszulfát-ion közötti reakcióban, $[\text{DA}] = 0,22 \text{ mM}$, $[\text{foszfátpuffer}] = 0,1 \text{ M}$, $\text{pH} = 7,0$

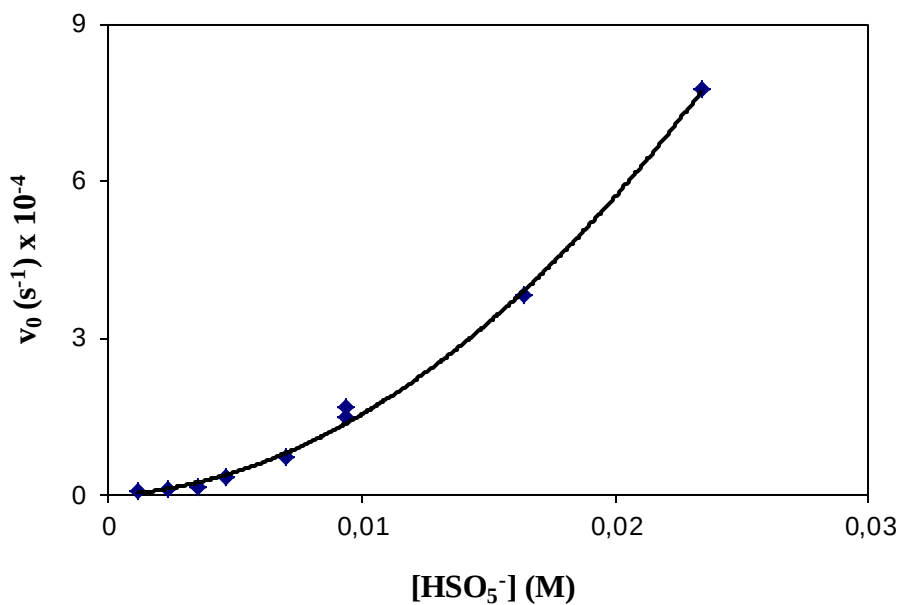
A reakciósebesség függését a peroxomonoszulfát-ion koncentrációjától megvizsgáltuk más foszfátpuffer összetétel mellett is, savasabb pH-n. Az a, b, c, d, e, f görbék esetén, melyeknél az oxidálószer-felesleg megegyezik az előző, 7-es pH-jú közegben való mérések során alkalmazott feleslegekkel, a reakciót 4 órán keresztül követtük. A kisebb peroxomonoszulfát-ion koncentrációkhoz tartozó görbék esetében látható, hogy a reakció még nem ment végbe teljesen, ezért végeztünk egy hosszabb, 9 órás mérést is két megegyező, illetve két köztes koncentráció-értéknél is (~15, ~20, ~30, ~50-szeres felesleg). A kapott kinetikai görbék a 17. ábrán láthatóak.



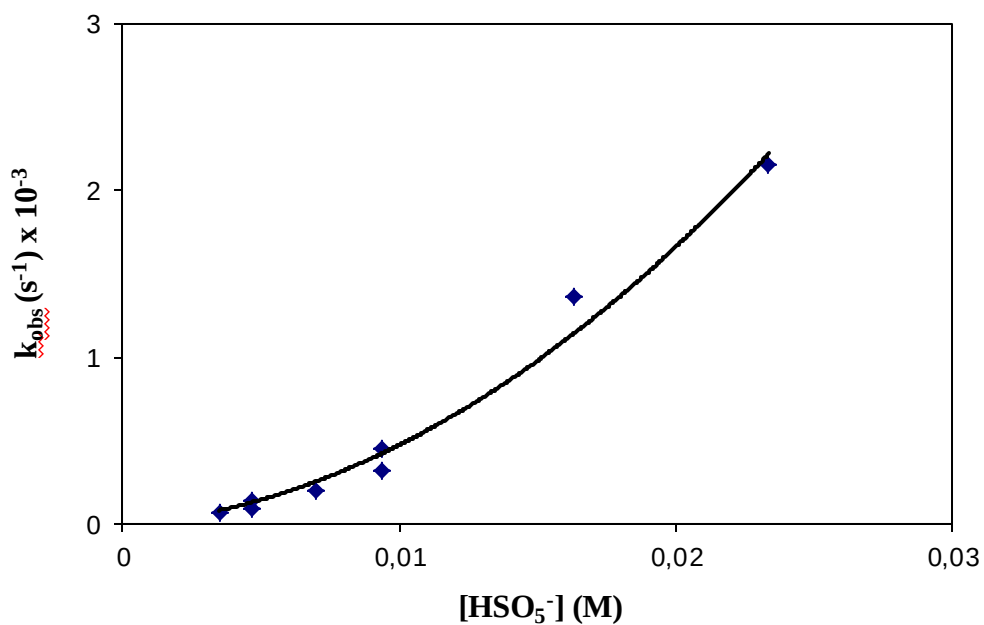
17. ábra A dopamin és peroxomonoszulfát-ion közötti reakcióban mért kinetikai görbék

[DA] = 0,20 mM, $[\text{HSO}_5^-]$ = 1,2 mM (a), 2,3mM (b), 4,60 mM (c), 9,40 mM (d), 16,2 mM (e), 23,2 mM (f),
3,5 mM (1), 4,6 mM (2), 7,0 mM (3), 9,4 mM (4) [foszfátpuffer] = 0,07 M, pH = 6,2

A görbék kiértékelése a kezdeti sebességek módszerével történt. Látható, hogy a peroxomonoszulfát-ion koncentrációjának függvényében ábrázolva a kezdeti sebességeket, a pontokra ismét másodfokú polinominális görbe illeszthető, azaz a peroxomonoszulfát-ionra savasabb közegben is kevert első- és másodrendű kinetikai sajátság tapasztalható (18. ábra). Az illesztett k_{obs} értékeket is ábrázoltuk a peroxomonoszulfát-ion koncentrációjának függvényében. A kapott pontokra szintén másodrendű polinomot tudtunk illeszteni (19. ábra).

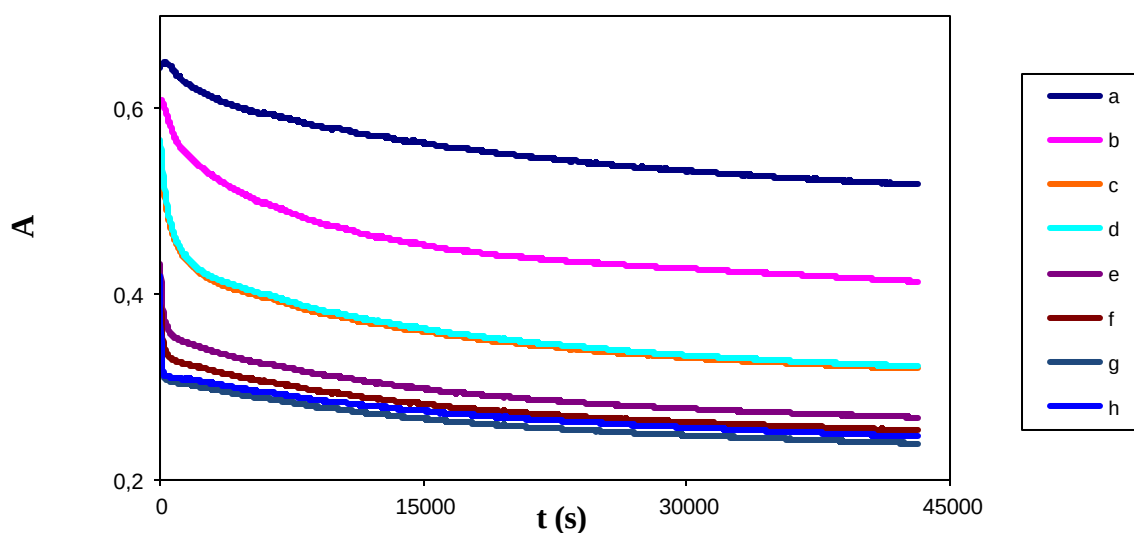


18. ábra. A kezdeti reakciósebesség függése a peroxomonoszulfát-ion koncentrációjától a dopamin és peroxomonoszulfát-ion közötti reakcióban, $[\text{DA}] = 0,20 \text{ mM}$, $[\text{foszfátpuffer}] = 0,07 \text{ M}$, $\text{pH} = 6,2$

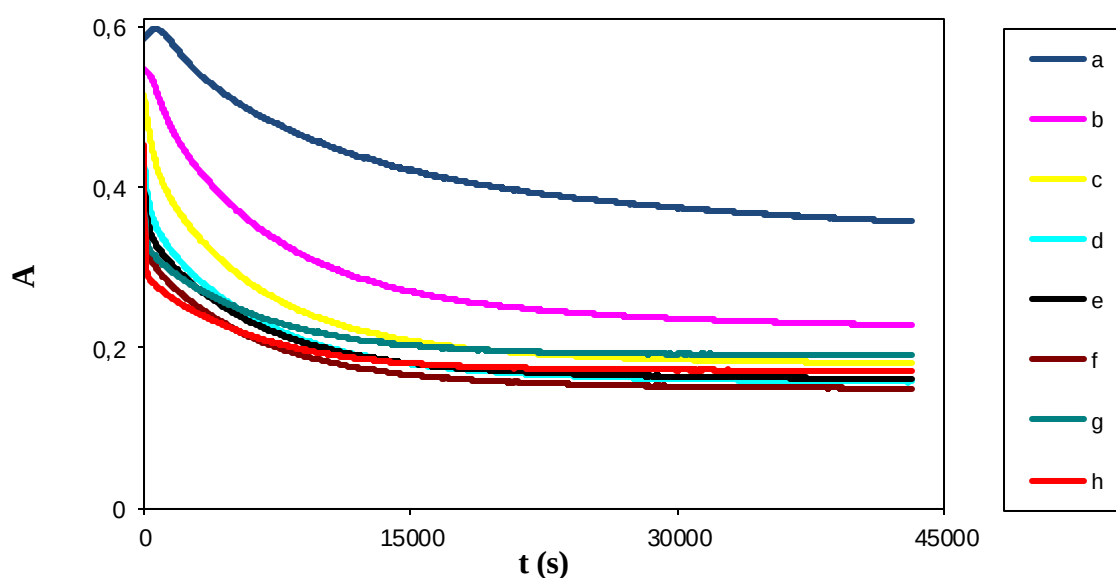


19. ábra. A pszeudo-elsőrendű sebességi állandó függése a peroxomonoszulfát-ion koncentrációjától a dopamin és peroxomonoszulfát-ion közötti reakcióban, $[\text{DA}] = 0,20 \text{ mM}$, $[\text{foszfátpuffer}] = 0,07 \text{ M}$, $\text{pH} = 6,2$

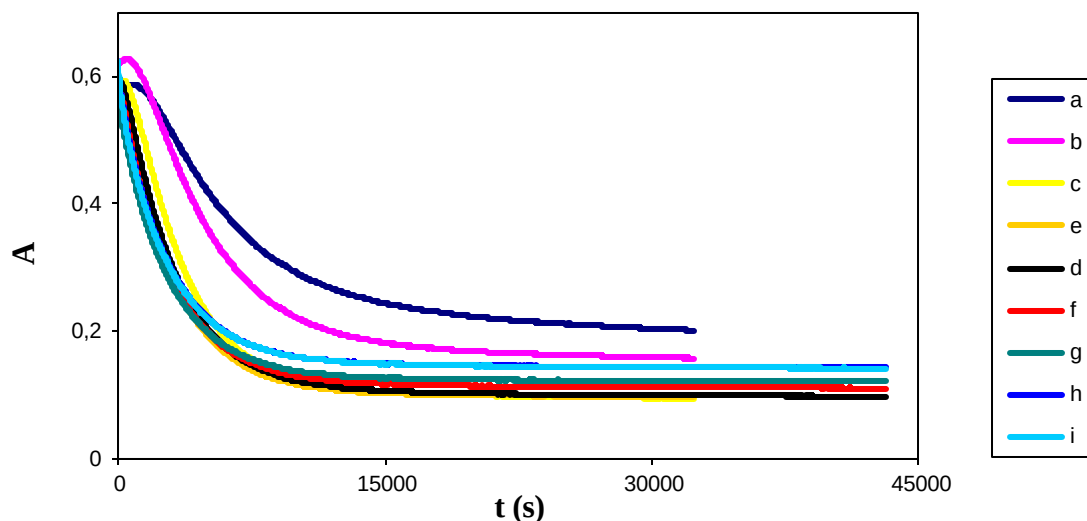
A továbbiakban arról gyűjtöttünk információt, hogyan változik a reakciósebesség a peroxomonoszulfát-ion koncentrációjának függvényében még savasabb körülmények között. A pH-t rendre 5,2, 4,7, és 4,0 értékekre állítottuk ecetsav/nátrium-acetát puffer segítségével, és pszeudoelsőrendű körülményeket alkalmaztunk. A reakciót 12 órán keresztül követtük, szintén 279 nm-en. A kapott kinetikai görbék a következő ábrákon láthatók (20. ábra, 21. ábra, 22. ábra).



20. ábra. A dopamin és peroxomonoszulfát-ion közötti reakció során kapott kinetikai görbék
 $[DA] = 0,24 \text{ mM}$, $[HSO_5^-] = 1,2 \text{ mM}$ (a), $2,3 \text{ mM}$ (b), $4,6 \text{ mM}$ (c), $7,0 \text{ mM}$ (d), $9,3 \text{ mM}$ (e), $11,6 \text{ mM}$ (f),
 $16,2 \text{ mM}$ (g), $23,2 \text{ mM}$ (h), $[puffer] = 0,502 \text{ M}$, $pH = 5,2$

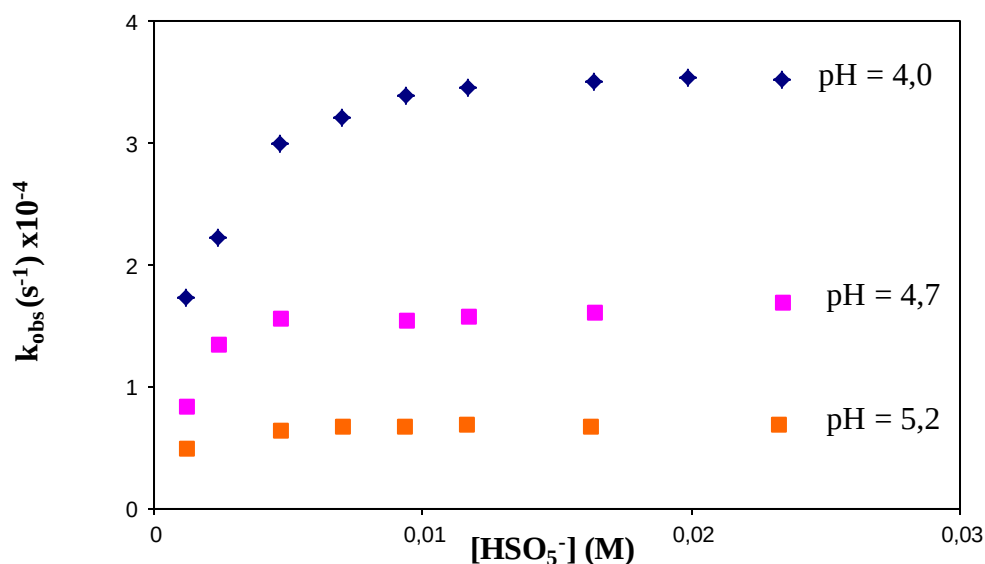


21. ábra. A dopamin és peroxomonoszulfát-ion közötti reakció során kapott kinetikai görbék
 $[DA] = 0,22 \text{ mM}$, $[HSO_5^-] = 1,2 \text{ mM}$ (a), $2,3 \text{ mM}$ (b), $4,7 \text{ mM}$ (c), $7,0 \text{ mM}$ (d), $9,3 \text{ mM}$ (e), $11,7 \text{ mM}$ (f),
 $16,4 \text{ mM}$ (g), $23,4 \text{ mM}$ (h), $[puffer] = 0,171 \text{ M}$, $pH = 4,7$



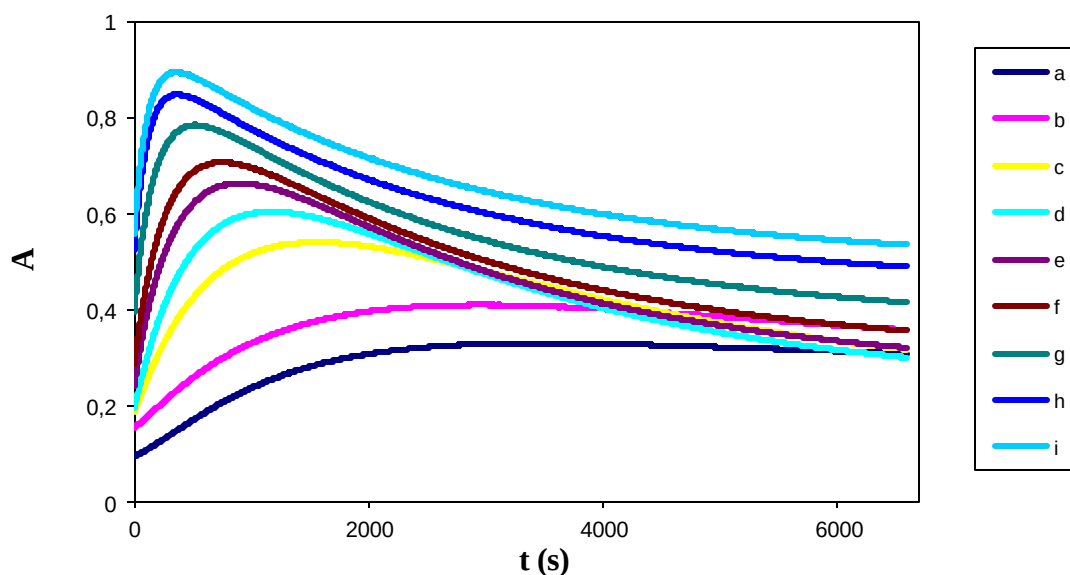
22. ábra. A dopamin és peroxomonoszulfát-ion közötti reakció során kapott kinetikai görbék
 $[DA] = 0,22 \text{ mM}$, $[HSO_5^-] = 1,2 \text{ mM}$ (a), $2,3 \text{ mM}$ (b), $4,7 \text{ mM}$ (c), $7,0 \text{ mM}$ (d), $9,4 \text{ mM}$ (e), $11,7 \text{ mM}$ (f), $16,4 \text{ mM}$ (g), $19,9 \text{ mM}$ (h), $23,4$ (i), $[puffer] = 0,299 \text{ M}$, $pH = 4,0$

A kinetikai görbék exponenciális illesztésével kapott pszeudo-elsőrendű sebességi állandókat ábrázoltuk az alkalmazott peroxomonoszulfát-ionkoncentráció függvényében. Az így kapott görbéket a 23. ábrán mutatjuk be. Látható, hogy mindhárom pH esetén a reakció a peroxomonoszulfát-ionra telítési kinetikát mutat, tehát a több lépésben lejátszódó oxidációs folyamat második lépésében nagy peroxomonoszulfát-ion koncentrációknál az oxidálószer már nem befolyásolja a reakciósebességet.

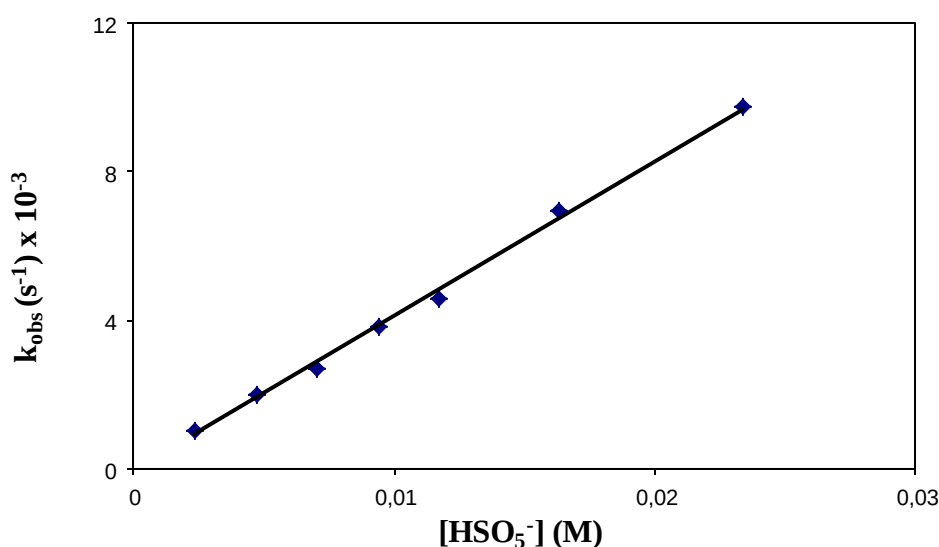


23. ábra. A pszeudo-elsőrendű sebességi állandó függése a peroxomonoszulfát-ion koncentrációjától a dopamin és peroxomonoszulfát-ion közötti reakcióban
 $[DA] = 0,24 \text{ mM}$, $[puffer] = 0,502 \text{ M}$ ($pH = 5,2$), $[puffer] = 0,171 \text{ M}$ ($pH=4,7$), $[puffer] = 0,299 \text{ M}$ ($pH= 4,0$)

4,0-es pH-jú közegben, 250 nm-en is tanulmányoztuk a reakció során észlelhető spektrális változásokat. A reakciót ~2 órán keresztül követtük, 2 másodpercenként vettünk fel egy-egy pontot. A kinetikai görbéket és a görbék elejére történő exponenciális illesztéssel kapott pszeudoelsőrendű sebességi állandók ábrázolását a peroxomonoszulfát-ion koncentrációjának függvényében a következő két ábrán mutatjuk be (24. ábra, 25. ábra). A kapott pontokra egy origón átmenő egyenest tudtunk illeszteni, tehát a reakció kezdeti szakasza a peroxomonoszulfát-ionra nézve elsőrendű kinetikát mutat.

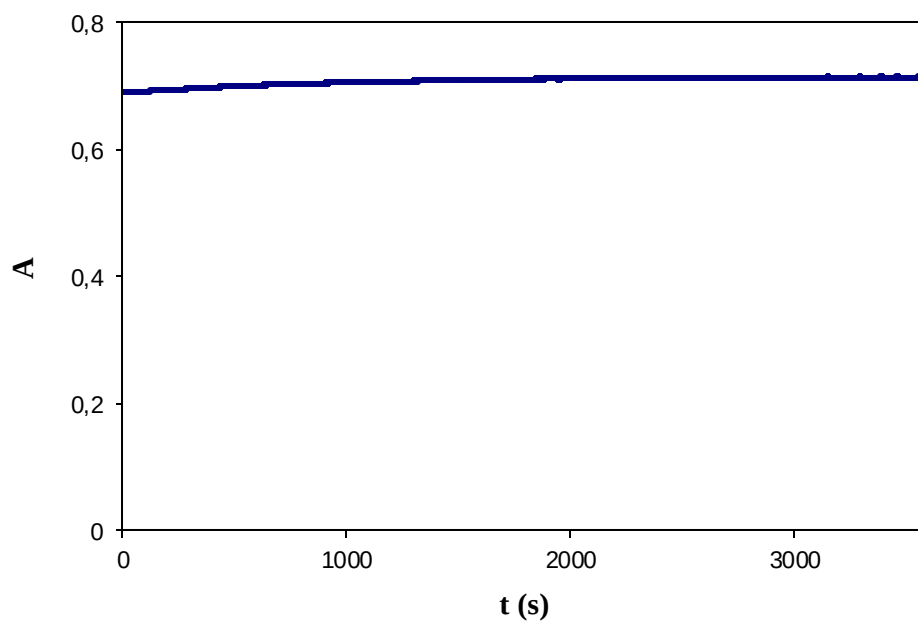


24. ábra. A dopamin és peroxomonoszulfát-ion közötti reakció során észlelhető változások, 250 nm-en [DA] = 0,22 mM, $[\text{HSO}_5^-]$ = 1,2 mM (a), 2,3 mM (b), 4,7 mM (c), 7,0 mM (d), 9,4 mM (e), 11,7 mM (f), 16,4 mM (g), 19,9 mM (h), 23,4 (i), [puffer] = 0,299 M, pH = 4,0



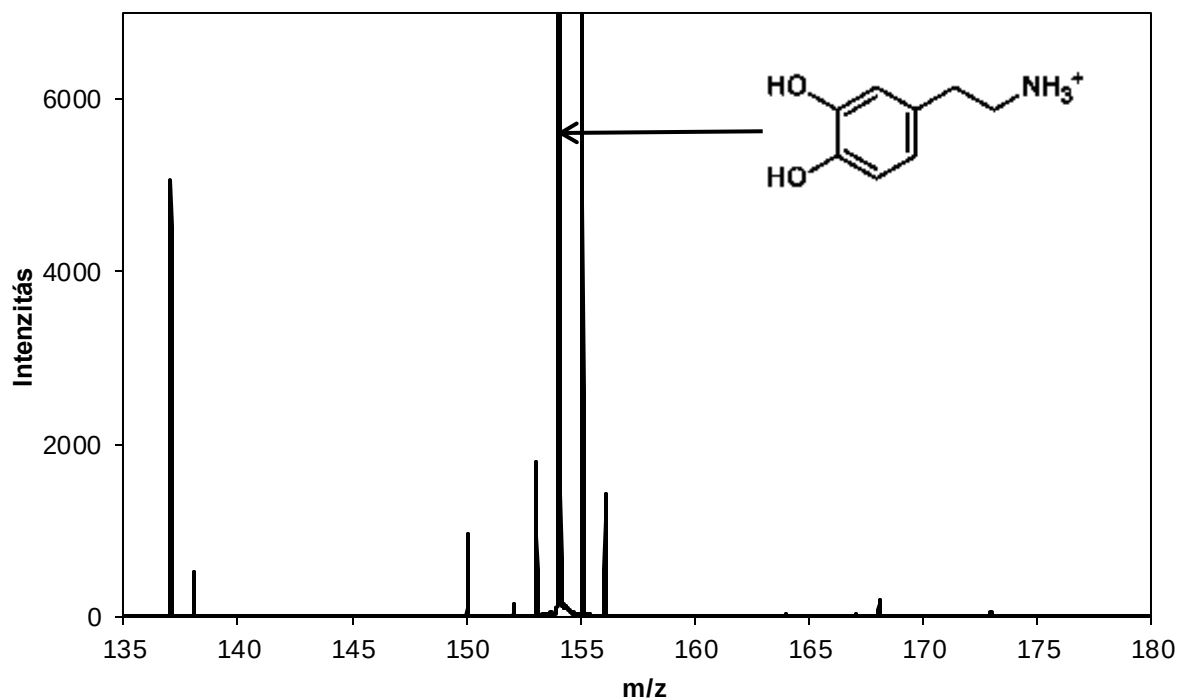
25. ábra. A pszeudo-elsőrendű sebességi állandó függése a peroxomonoszulfát-ion koncentrációjától a dopamin és peroxomonoszulfát-ion közötti reakcióban [DA] = 0,22 mM, [puffer] = 0,299, pH = 4,0

Megvizsgáltuk, végbemegy-e az oxidáció 1,5-ös pH-jú közegben (26. ábra). Az esetleges reakciót 1 órán keresztül követtük 279 nm-en, a pH beállításához kénsavat használtunk. Az ábrán is látható, hogy a mérés ideje alatt számottevő változás nem történt.

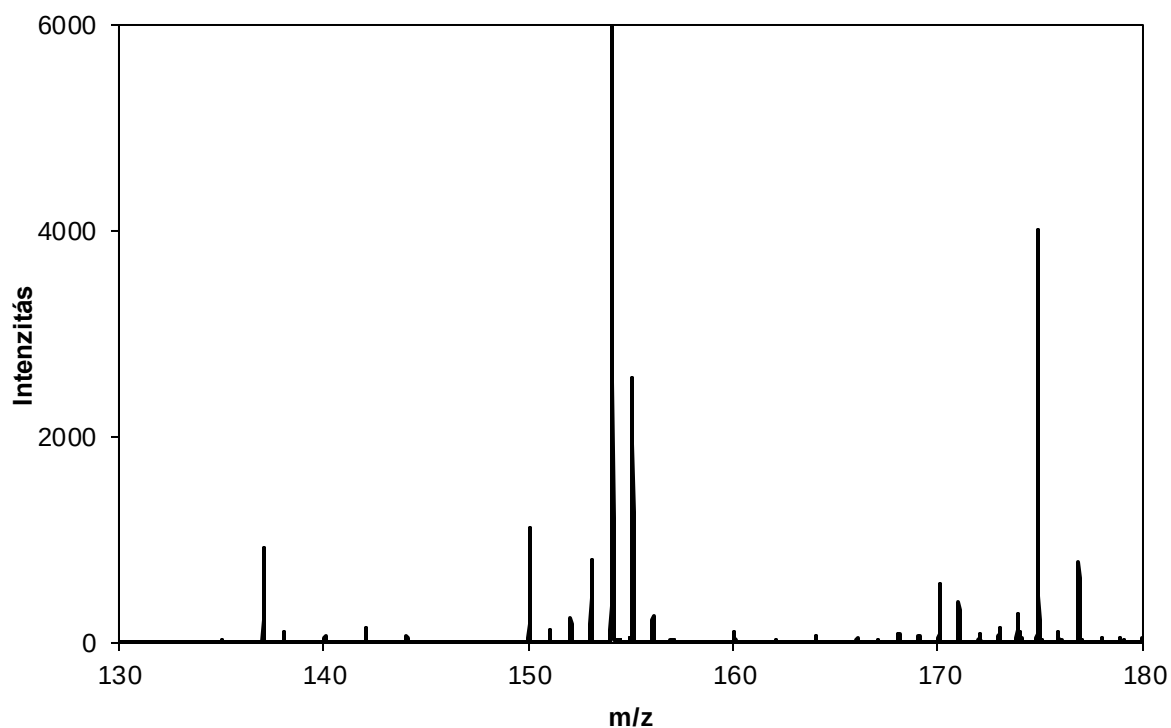


26. ábra. A dopamin és peroxomonoszulfát-ion közötti reakció 1,5-ös pH-n, 279 nm-en
[DA] = 0,22 mM, [HSO₅⁻] = 23,4 mM, [H₂SO₄] = 0,01 M

5.2.2. Tömegspektrometriás termékazonosítás

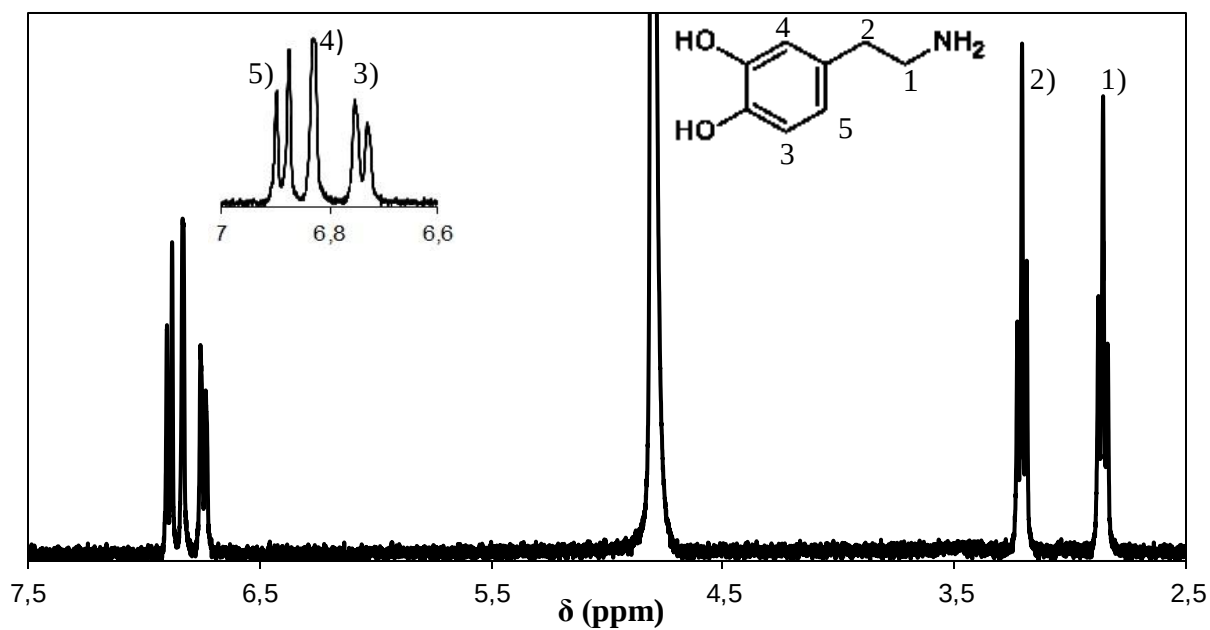
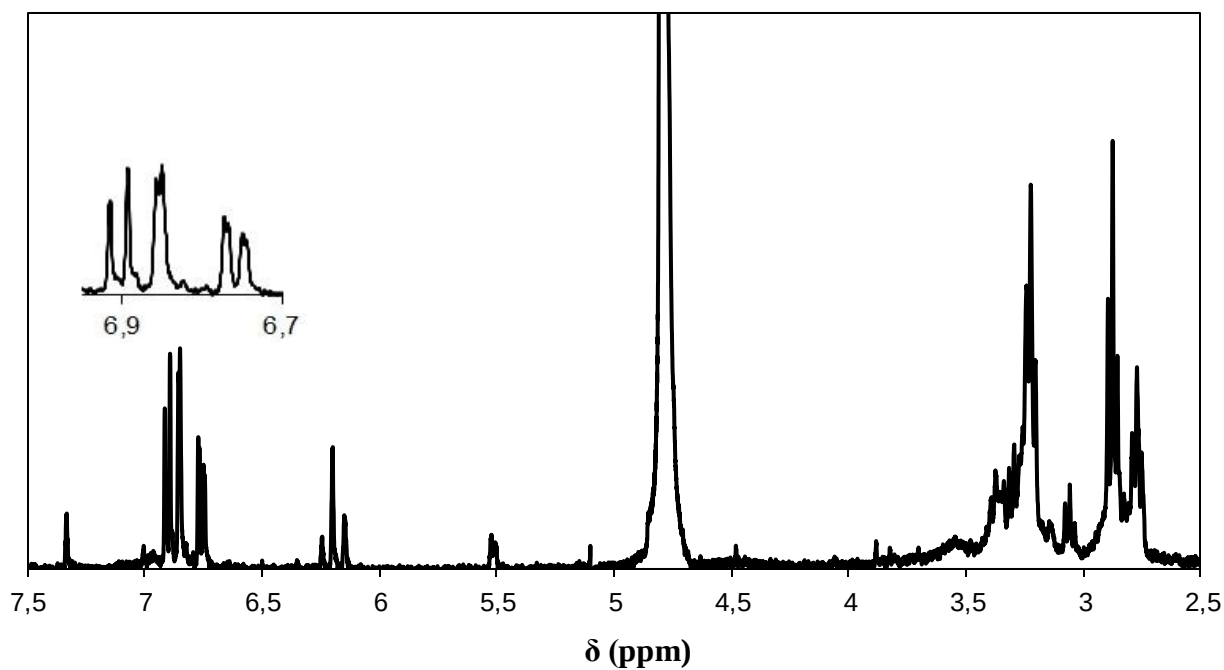


27. ábra A dopamin tömegspektruma [DA] = 8,3 mM



28. ábra 150 perccel a reakció elindítása után felvett tömegspektrum, [DA] = 8,3 mM, [HSO₅⁻] = 26 mM

A dopamin tömegspektrumán (27. ábra) könnyen beazonosítható a protonált dopaminhoz tartozó molekula-ion csúcs 154 m/z értéknél. Egy szintén nagy intenzitású csúcs található 137 m/z -nél, amely valószínűleg OH-vesztésből ered. A 150 perccel a reakció elindítása után felvett tömegspektrumon (28. ábra) 151 m/z -nél megjelent egy kisebb intenzitású jel, tehát a reakcióelegy már tartalmaz valamilyen közterméket, ami valószínűleg a dopamin o-kinon formájából képződő kationhoz rendelhető. Ez a feltevés összhangban áll azzal, hogy a reakcióelegy spektrumán a 137 m/z értéknél látható csúcs jelentősen kisebb intenzitással jelenik meg, azaz kevesebb OH-vesztés történik. A 170-es m/z értéknél látható csúcs a 154-nél tapasztalható molekulaionhoz képest egy oxigénatommal többet tartalmazó molekulához tartozhat. Erre kézenfekvő feltételezés lehet a dopaminból keletkező N-oxid, már csak azért is, mert a peroxomonoszulfát-ion többnyire lényegesen aktívabb oxigéntranszfer reakciókban, mint közvetlen elektrontranszferben. A legnagyobb új csúcs a kiindulási elegy tömegspektrumához képest 175-ös m/z aránynál tapasztalható. Erről elképzelhető hogy a 137-nél a dopamin tömegspektrumában is megjelenő molekula egy olyan változata, amelyben a pozitív töltés protonálódás helyett egy káliumionnal való asszociáció okozza ($-H + K$), tehát ez is a dopaminhoz (kiindulási anyag) tartozik. Ez azért lehetséges, mert az oxidálószerként használt oxonban kálium az ellenion. Ugyanakkor a kiindulási spektrumban ennek megjelenése nem várható, mert ott az oldat még nem tartalmaz káliumiont.

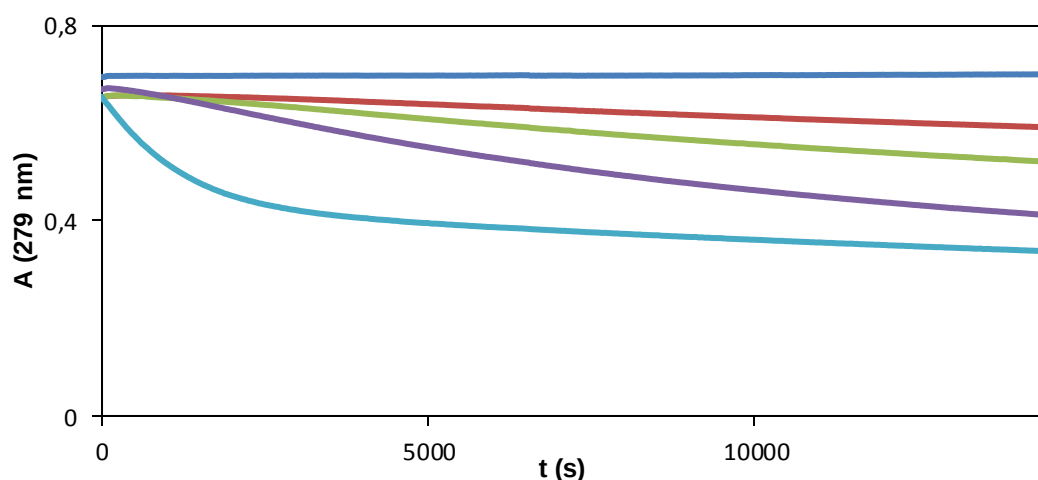
5.2.3. ^1H -NMR vizsgálatok29. ábra. A dopamin ^1H -NMR spektruma, $[\text{DA}] = 10 \text{ mM}$ 30. ábra. 2 héttel a reakció elindítása után felvett ^1H -NMR spektrum
 $[\text{DA}] = 10 \text{ mM}$, $[\text{HSO}_5^-] = 60 \text{ mM}$

A dopamint tartalmazó oldat ^1H -NMR spektrumán (29. ábra) a kicsi kémiai eltolódásnál (2,9-3,2 ppm) látható tripletek az alifás lánc metilén-csoportjainak hidrogénjeihez rendelhetők, a nagyobb eltolódásnál (6,7-6,9 ppm) látható két dublett és egy szinglett pedig az aromás hidrogénekhez. A két héttel a reakció elindítása után felvett ^1H -NMR spektrumon (30. ábra) jelentős számú újabb csúcs figyelhető meg, amelyeket nem sikerült egyértelműen beazonosítanunk, mindennek előtt az igen csekély intenzitás miatt. Azt tapasztaltuk, hogy az alkalmazott oxidálószer-felesleg nem volt elegendő ahhoz, hogy a reakció teljesen végbemenjen, azonban az alifás hidrogénekhez rendelhető csúcsok nagy integrálértéke alapján elmondható, hogy a reakcióelegy a dopaminon kívül több különböző oxidációs terméket is tartalmaz. Az aromás tartománnyal való összevetés alapján az is valószínűsíthető, hogy a kiindulási dopaminban lévő aromás hidrogének nagyobb valószínűséggel oxidálódtak, mint az oldalláncban lévő alifások.

5.3. Norepinefrin oxidációja

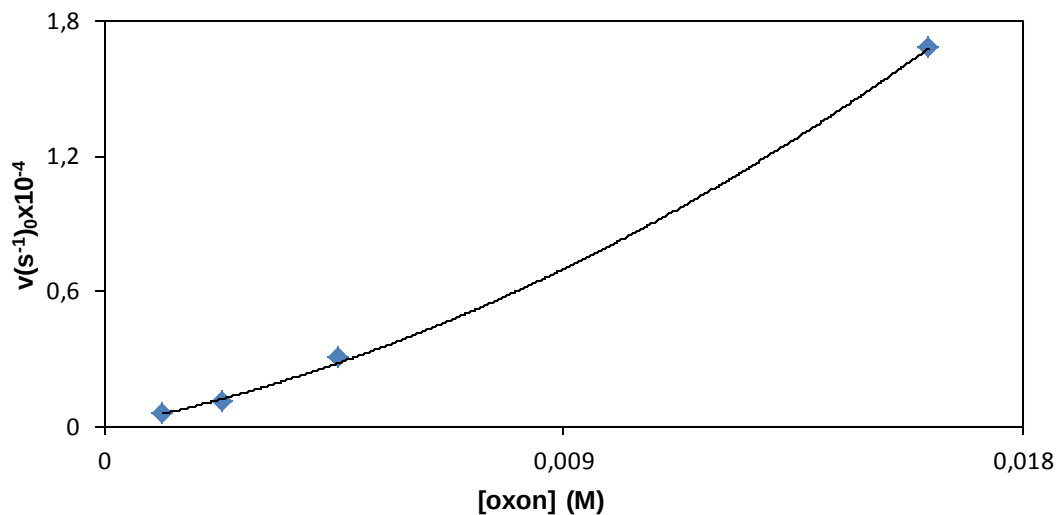
5.3.1. A reakció részletes kinetikai vizsgálata

A reakciósebesség koncentrációfüggését a kezdeti sebességek módszerével tanulmányoztuk. Az oxonkoncentráció-függés vizsgálatokor foszfátpufferes közegben végeztük a méréseket, így a pH~7 maradt, a norepinefrin oldat koncentrációt állandó, $c = 0,23 \text{ mmol/dm}^3$ értéken tartottuk. A méréseket 279 nm-en végeztük.



31. ábra Kinetikai görbék különböző oxidálószer koncentrációknál a norepinefrin és oxon közötti reakcióban, [norepinefrin] = 0,23 mM, [foszfátpuffer] = 0,10 M, oxon koncentrációk (fentről lefelé): 0 mM, 1,2 mM, 2,3 mM, 4,6 mM, 16,2 mM

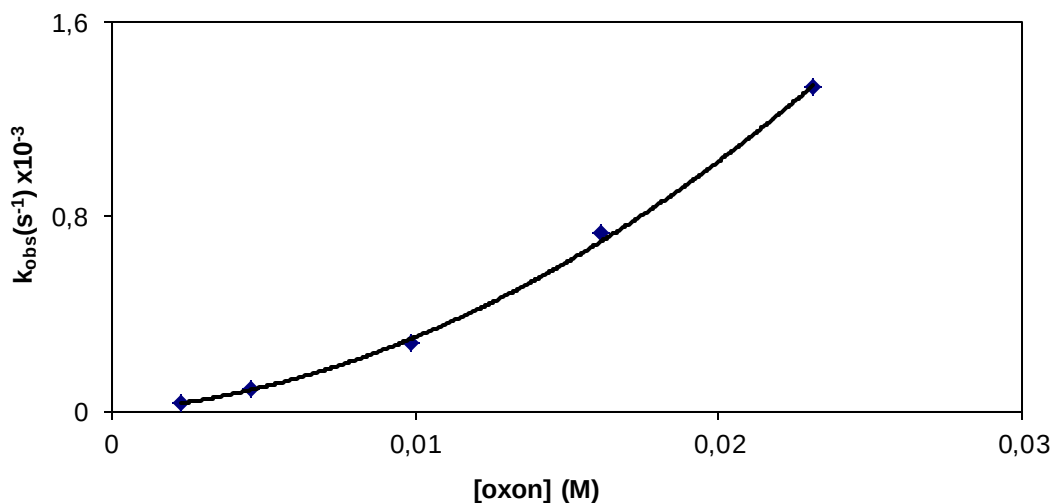
A kapott kinetikai görbéket a 31. ábra mutatja be, ezeket a kezdeti sebességek módszerével értékeltük ki, amely a 32. ábrán látható.



32. ábra. A norepinefrin és oxon közötti reakció reakciósebességének változása

[norepinefrin] = 0,23 mM, [foszfátpuffer] = 0,1 M

Látható, hogy az oxon koncentrációt növelve a reakciósebesség is nő. A kapott pontokra egy másodrendű polinom illeszthető, amely kevert első- és másodrendre utal.

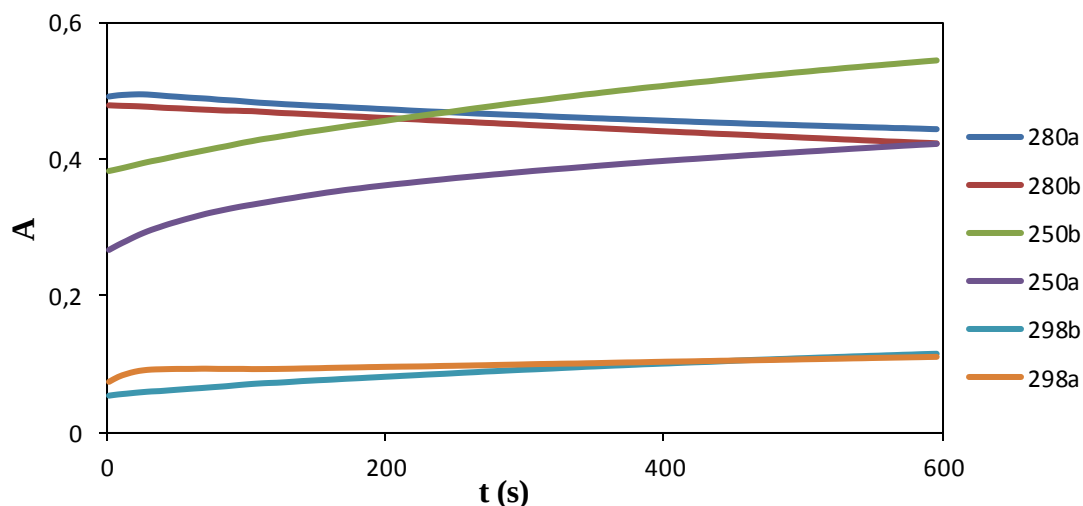


33. ábra. Pszeudo-elsőrendű sebességi állandók az oxon-koncentráció függvényében a norepinefrin és oxon reakciójában

[norepinefrin] = 0,23 mM, [foszfátpuffer] = 0,1 M

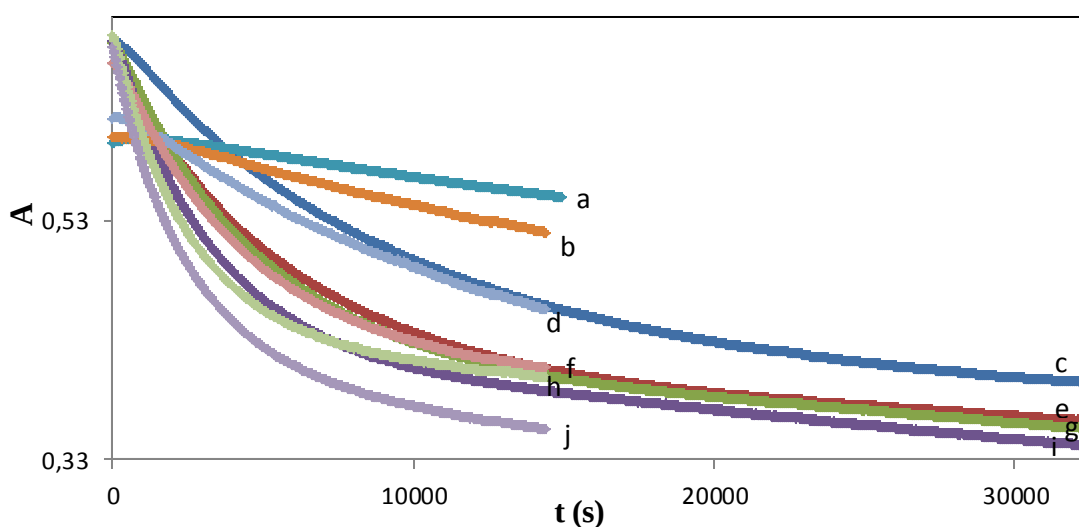
A pszeudo-elsőrendű sebességi állandók az oxon koncentrációk függvényében ábrázolva (33. ábra) origón átmenő parabolát adnak. Ez azt jelenti, hogy oxonra nézve a reakció mehet első- illetve másodrendű úton is.

Különböző koncentrációjú oxonoldatok reakcióját norepinefrinnel diódasoros spektrofotométerrel is követtük egy órán keresztül, a spektrális változások a 34. ábrán láthatók.

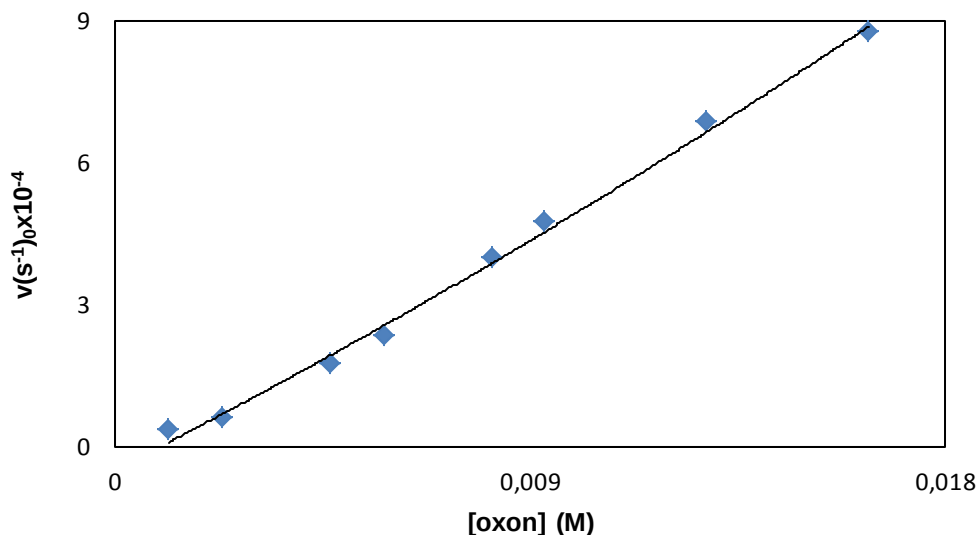


34. ábra. Különböző hullámhosszakon látható spektrális változások a norepinefrin és oxon reakciójakor
[norepinefrin] = 0,23 mM, [foszfátpuffer] = 0,1 M, a: 0,0175 M oxon, b: 0,035 M oxon

Oxonra nézve a koncentrációfüggést megvizsgáltuk más foszfátpuffer összetétel mellett is, savasabb pH-n (pH=6,2). A 35. ábrán látható kinetikai görbéket kaptuk.



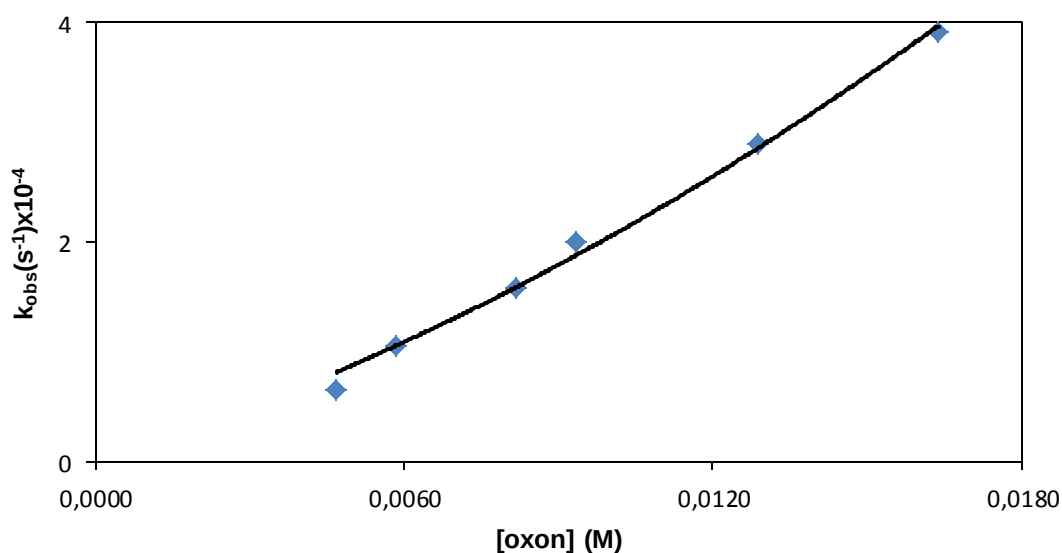
35. ábra A norepinefrin és oxon közötti reakció kinetikai görbéinek [oxon] függése
[norepinefrin] = 0,23 mM, [foszfátpuffer] = 0,07 M (pH = 6,25),
oxon koncentrációk : 1,2 mM (a), 2,3 mM (b), 4,7 mM (c), 5,8 mM (d), 8,2 mM (e), 9,3 mM (f), 9,4 mM (g),
12,8 mM (h), 16,4 mM (i), 23,4 mM (j)



36. ábra A norepinefrin és az oxon közötti reakció kezdeti sebességének változása az [oxon] változását nézve
[norepinefrin]=0,23 mM, [foszfátpuffer]=0,07 M

A reakciósebességet az oxonkoncentráció függvényében ábrázolva savasabb pH-n szintén másodfokú polinom illeszthető a pontokra. (36. ábra)

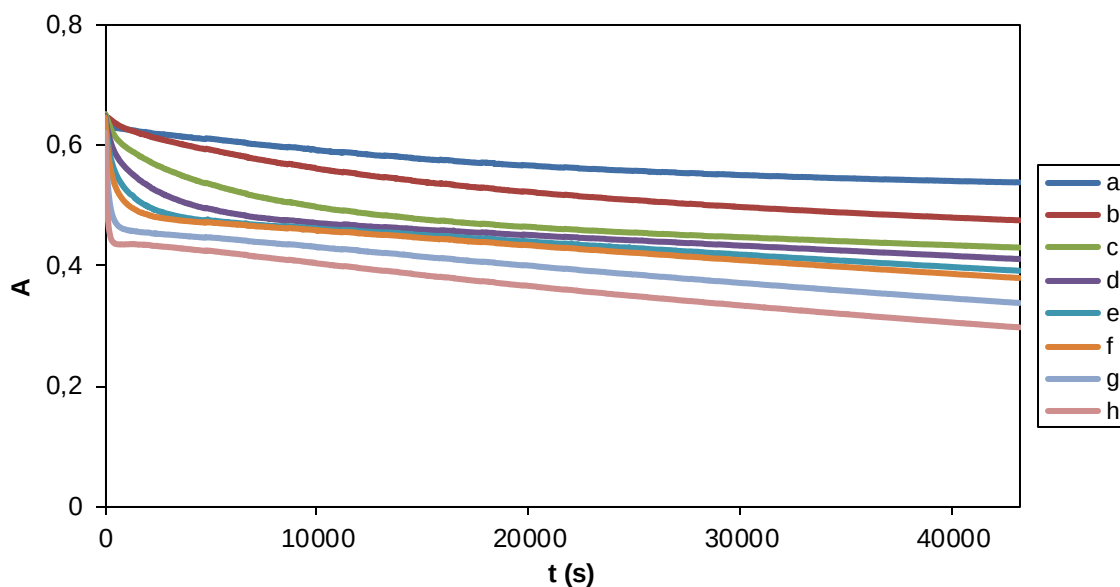
A pszeudo-elsőrendű sebességi állandókat az oxonkoncentráció függvényében ábrázolva a pontokra szintén origón átmenő parabola illeszthető (37. ábra). A parabola alakjából látszik, hogy ebben az esetben az elsőrendű reakció van nagyobb súlyban.



37. ábra A pszeudoelsőrendű sebességi állandó oxonkoncentráció-függése a norepinefrin és a peroxomonoszulfát-ion reakciójában

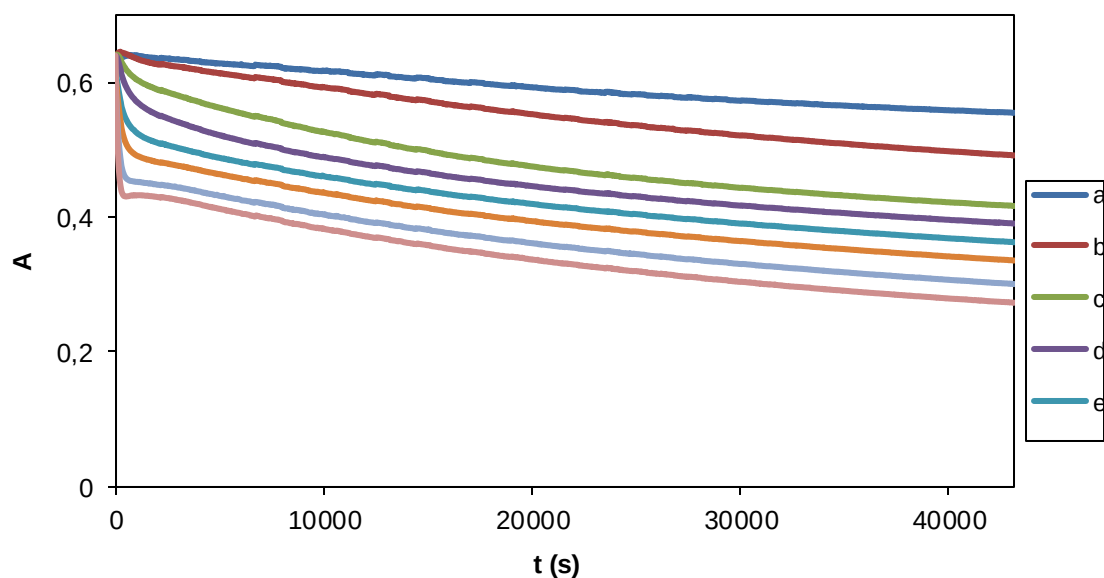
[norepinefrin] = 0,23 mM, [foszfátpuffer] = 0,07 M, pH=6,25

Az oxonkoncentráció függését más pufferrendszerrel, ecetsav-nátrium-acetát elegyével, a pH-t fokozatosan csökkentve (5,2; 4,7; 4,0) is vizsgáltuk a reakciót. 12 illetve 9 órán keresztül végeztük méréseinket $\lambda = 279$ nm-en, szintén pszeudoelsőrendű körülmények között. A kinetikai változások a 38., 39. és 40. ábrán láthatóak.



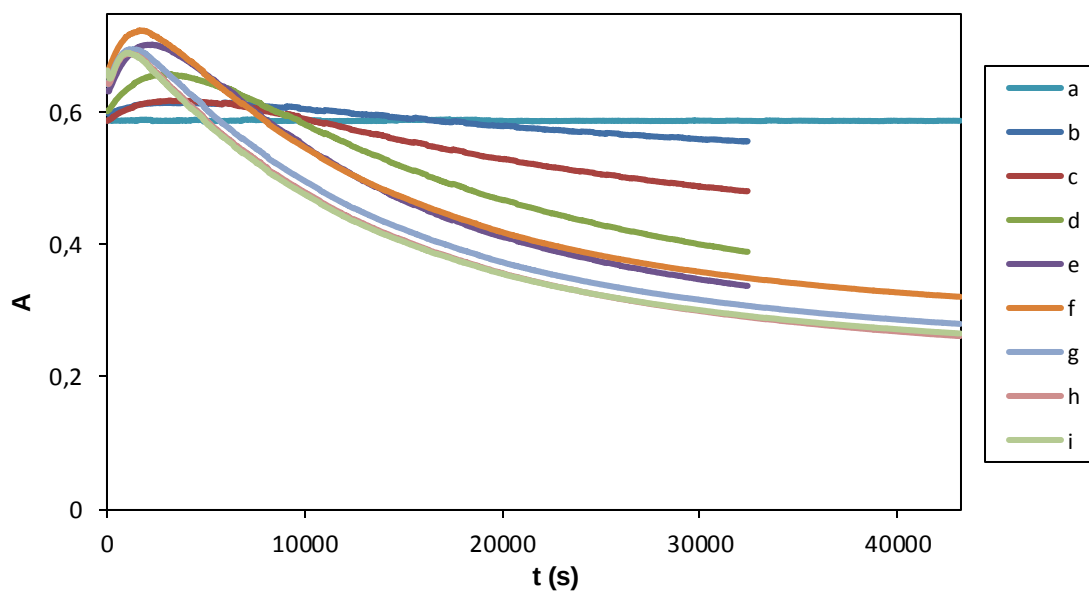
38. ábra 5,2 pH-n követett kinetikai változások norepinefrin és oxon reakciójakor

[norepinefrin] = 0,24 mM, [oxon] = 1,2 mM (a), 2,3 mM (b), 4,7 mM (c), 7,0 mM (d), 9,3 mM (e), 11,7 mM (f), 16,4 mM (g), 23,4 mM (h), [acetát puffer] = 0,50 M pH = 5,2



39. ábra Norepinefrin és oxon reakciójában bekövetkező kinetikai változások

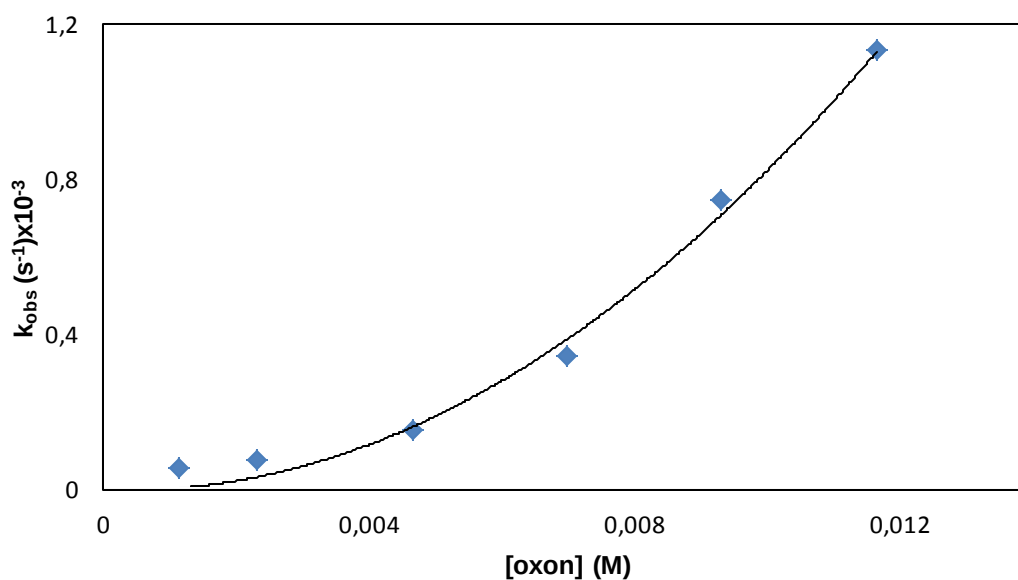
[norepinefrin] = 0,24 mM, [oxon] = 1,2 mM (a), 2,3mM (b), 4,7 mM (c), 7,0 mM (d), 9,4 mM (e), 11,7 mM (f), 16,4 mM (g), 23,4 mM (h), [acetát puffer] = 0,17 M, pH = 4,7



40. ábra Kinetikai változások norepinefrin és oxon reakciójakor

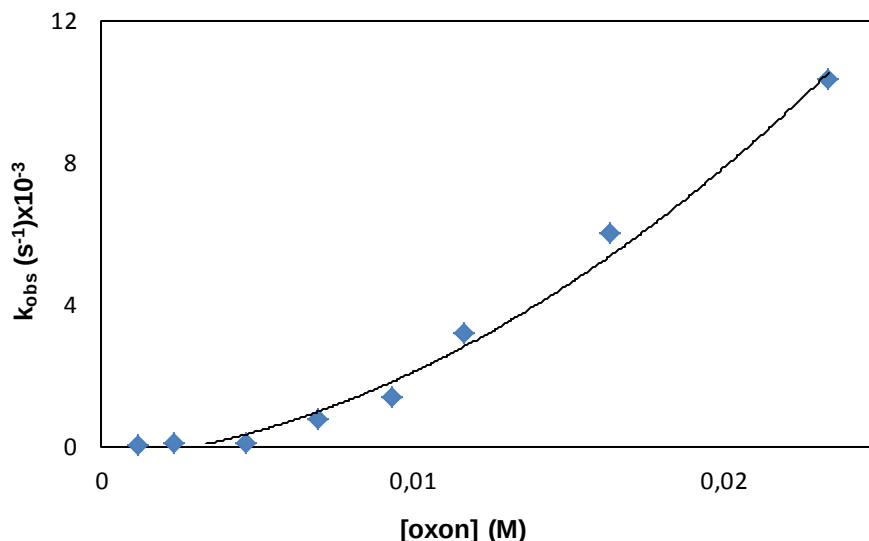
[norepinefrin] = 0,23 mM, [oxon] = 0 mM (a), 1,2 mM (b), 2,3 mM (c), 4,7 mM (d), 9,4 mM (e), 11,8 mM (f), 16,5 mM (g), 20,1 mM (h), 23,6 mM (i), [acetát puffer] = 0,30 M, pH = 4,0

5,2-es és 4,7-es pH esetén a kinetikai görbékre exponenciális illesztéssel a sebességi együtthatókat meghatároztuk, majd ezeket az oxon koncentrációk függvényében ábráztuk. (41. ábra, 42. ábra)



41. ábra Pszeudo-elsőrendű sebességi állandók változása az oxonkoncentrációk függvényében

[norepinefrin] = 0,24 mM, [acetát puffer] = 0,50 M, pH = 5,2

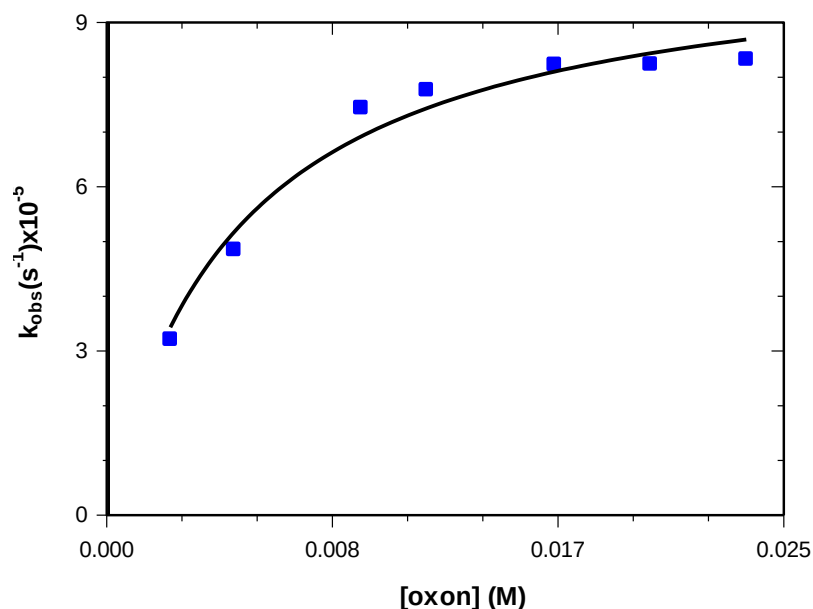


42. ábra Pszeudoelsőrendű sebességi állandók az oxonkoncentrációk függvényében

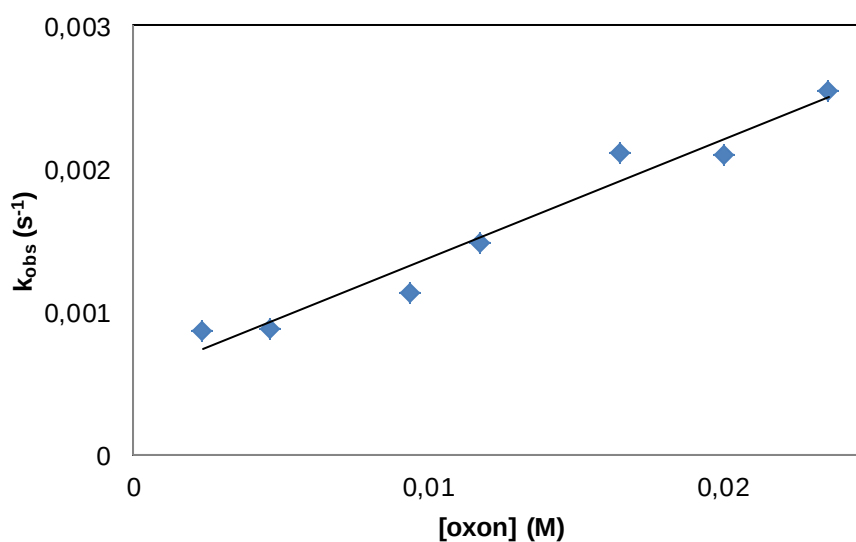
[norepinefrin] = 0,24 mM, [acetát puffer] = 0,17 M, pH = 4,7

4,0 pH-n a kapott kinetikai görbékre 2 exponenciális függvényeket illesztve a kapott pszeudoelsőrendű sebességi állandókat az oxonkoncentráció függvényében ábrázolva egy telítési görbe illeszthető a pontokra. Ugyanezt az eredményt kaptuk, ha a kinetikai görbék kezdeti emelkedő szakaszát levágva illesztettünk exponenciális függvényt. (43. ábra) A telítési görbe arra utal, hogy a második folyamatban nagy oxonkoncentrációnál a peroxomonoszulfát-ion a sebességmeghatározó lépést nem befolyásolja.

Ezután az előzőleg levágott kezdeti emelkedő szakaszokra illesztettünk exponenciális függvényt. A kapott pszeudo-elsőrendű sebességi állandókat az oxonkoncentráció függvényében ábrázolva a pontokra egy egyenes illeszthető (44. ábra). Ez azt jelenti, hogy ilyen körülmények között oxonra nézve elsőrendű a reakció.

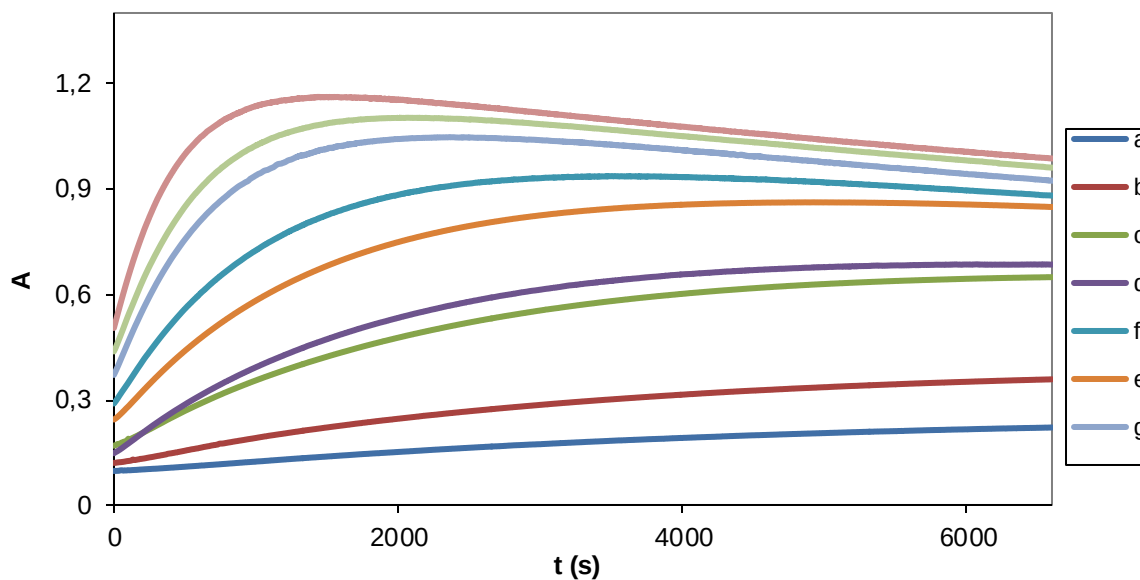


43. ábra Pszeudo-elsőrendű sebességi állandók az oxonkoncentrációk függvényében
 [norepinefrin] = 0,23mM, [acetát puffer] = 0,30 M, pH = 4



44. ábra Pszeudo-elsőrendű sebességi állandók az oxonkoncentrációk függvényében
 [norepinefrin] = 0,23mM, [acetát puffer] = 0,30 M, pH = 4

4,0 pH-n a kinetikai vizsgálatokat egy másik hullámhosszon, $\lambda = 250$ nm-en is elvégeztük. Ebben az esetben csak a reakció kezdeti szakaszát vizsgáltuk, így a méréseket közel 2 óráig végeztük 2 másodpercenként felvéve a pontokat. A 45. ábrán láthatóak a kinetikai görbék.

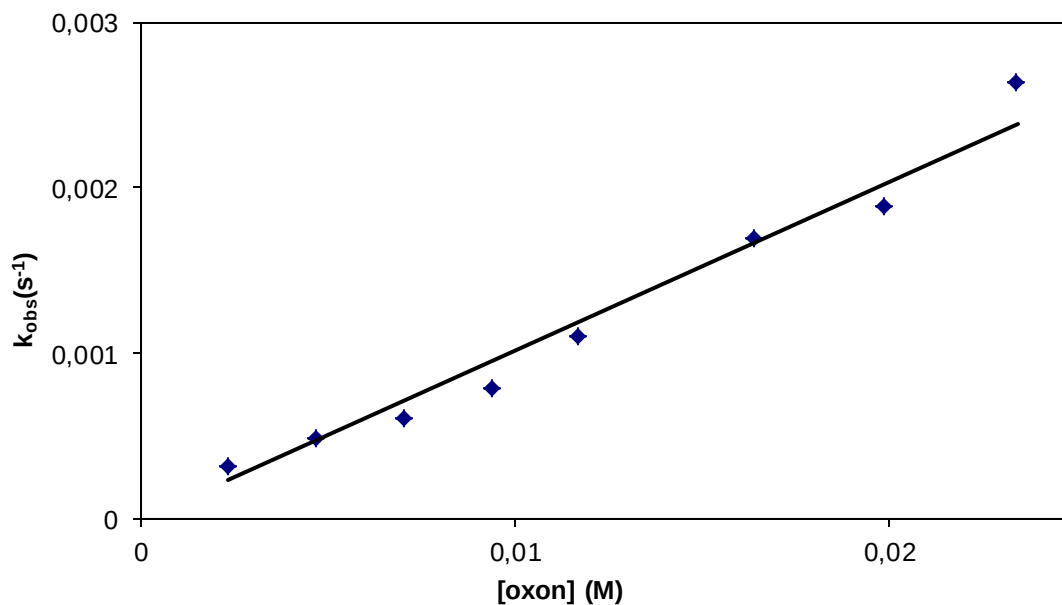


45. ábra A norepinefrin és oxon reakciójának kinetikai vizsgálata $\lambda=250$ nm-en

[norepinefrin] = 0,24 mM, [oxon] = 1,2 mM (a), 2,3 mM (b), 4,7 mM (c), 7,0 mM (d), 9,4 mM (e), 11,7 mM (f), 16,4 mM (g), 19,9 mM (h), 23,4 mM (i), [acetát puffer] = 0,36 M, pH = 4,0

Az exponenciális illesztéssel kapott pszeudoelsőrendű sebességi állandók peroxomonoszulfát-ion koncentráció függvényében történő ábrázolását a következő ábrán mutatjuk be.

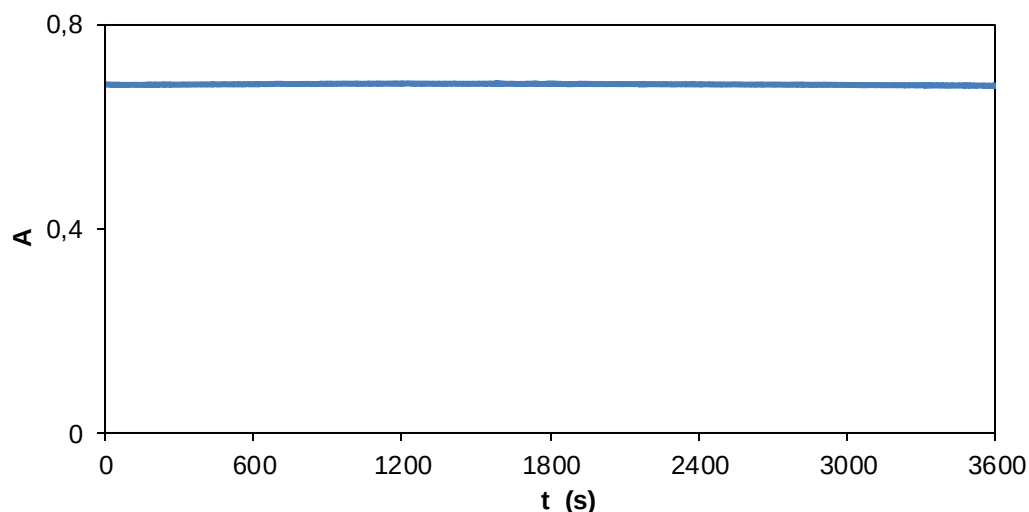
A pontokra egy origón átmenő egyenes illeszthető, ami arra utal, hogy pH = 4,0-en a norepinefrin és az oxon között lejátszódó reakció kezdeti szakasza elsőrendű oxonra nézve.



46. ábra Pszeudo-elsőrendű sebességi állandók változása az oxonkoncentráció növelésével

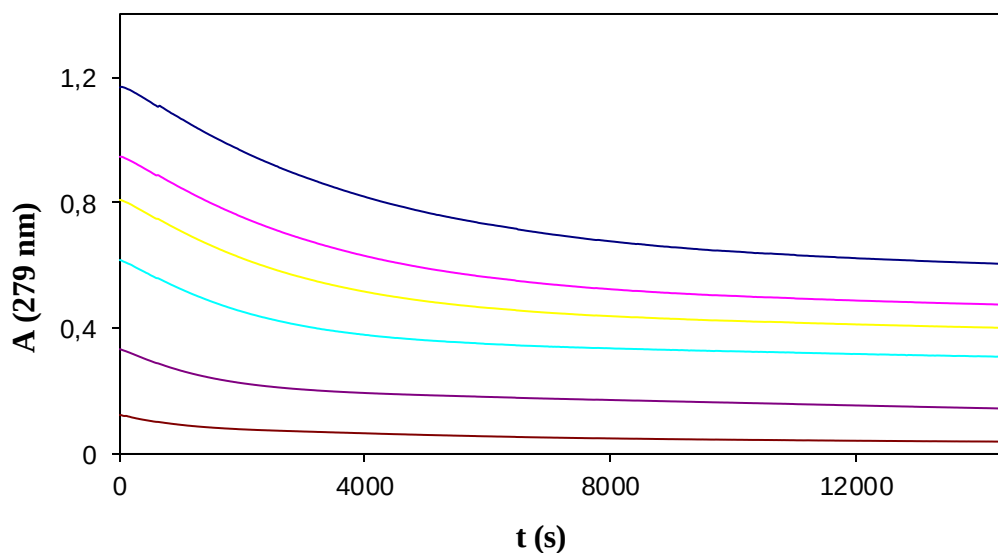
[norepinefrin] = 0,24 mM, [acetát puffer] = 0,36 M, pH = 4,0

1,5 pH-n is vizsgáltuk a norepinefrin és oxon közötti esetleges reakciót. Ebben az esetben kénsavat használtunk a pH beállításához, a reakciót 1 órán keresztül követtük. Amint az a 47. ábrán is látható nem játszódott le reakció.



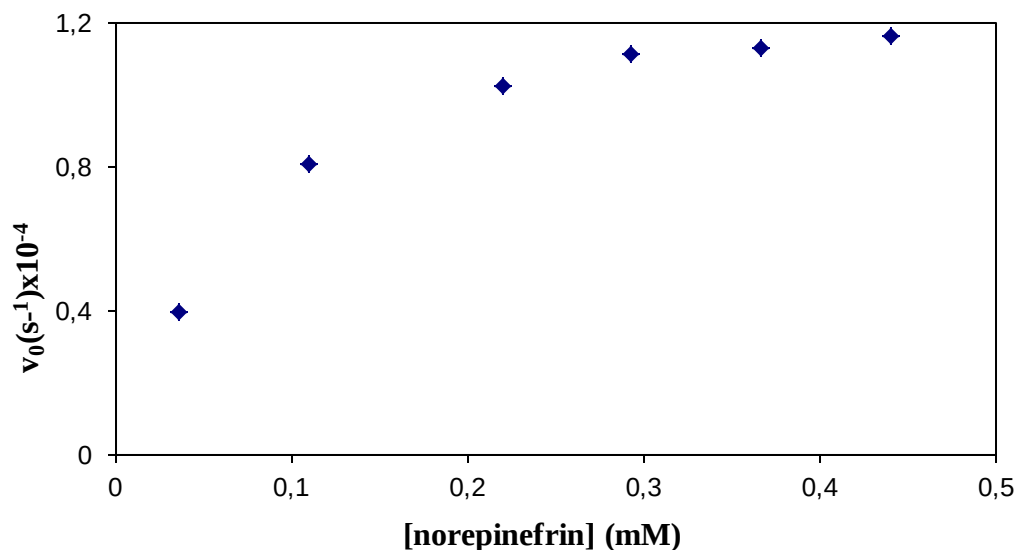
47. ábra Oxon és norepinefrin reakciójának vizsgálata 1,5-ös pH-n
[norepinefrin] = 0,24 mM, [oxon] = 23,5 mM [kénsav] = 0,01 M

Megvizsgáltuk a koncentrációfüggést norepinefrinre nézve is pszeudo-nulladrendű körülmények között, a többi reaktáns koncentrációját állandó értéken tartottuk. Tapasztalatainkat a 48. ábra mutatja be.



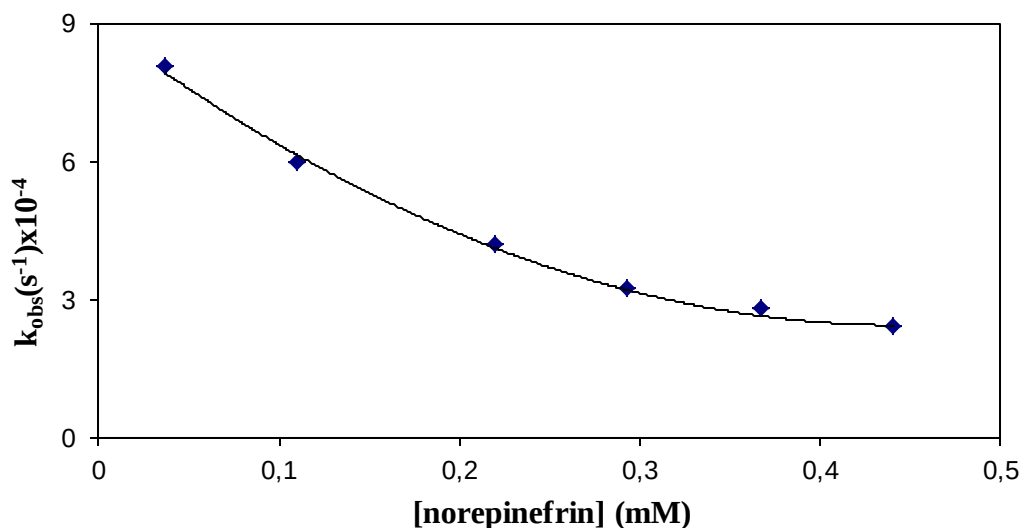
48. ábra Kinetikai görbék a norepinefrin oxonnal való oxidációjában, $[\text{HSO}_5^-] = 0,01 \text{ M}$ [foszfátpuffer] = 0,1 M
Norepinefrin-koncentrációk (fentről lefelé)= 0,44 mM, 0,37 mM, 0,3 mM, 0,22 mM, 0,11 mM, 0,04 mM

A norepinefrin-koncentráció függvényében ábrázolva a kezdeti sebességeket azt tapasztaltuk, hogy az elején a norepinefrin koncentráció növelésével nőtt a reakciósebesség, majd telítési görbe jelleget vett fel (49. ábra).



49. ábra A kezdeti sebesség változása a norepinefrin koncentráció függvényében a norepinefrin és az oxon reakciójában

$[HSO_5^-] = 0,01 \text{ M}$, $[\text{foszfátpuffer}] = 0,1 \text{ M}$

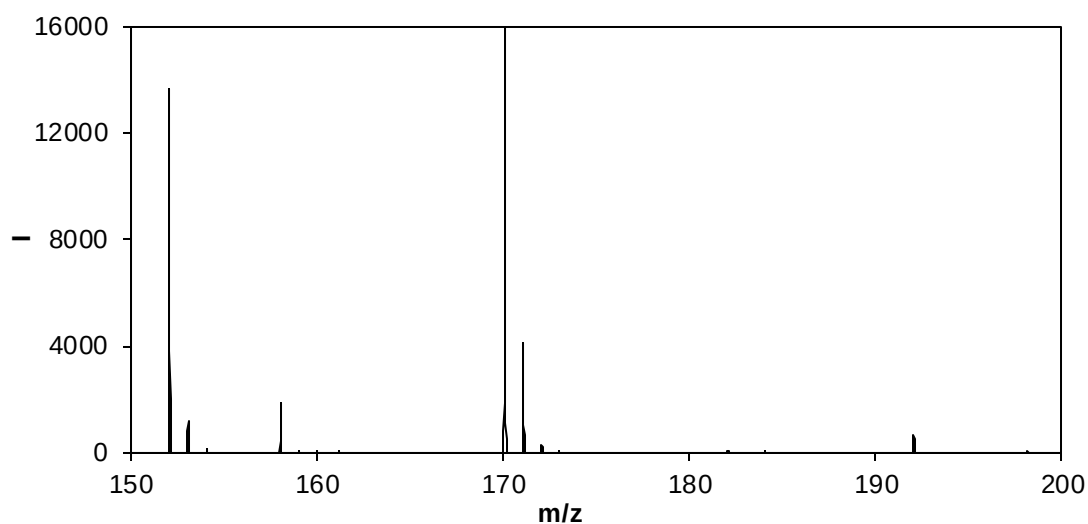


50. ábra A pszeudoelsőrendű sebességi állandó norepinefrinkoncentráció-függése a norepinefrin és a peroxomonoszulfát-ion reakciójában

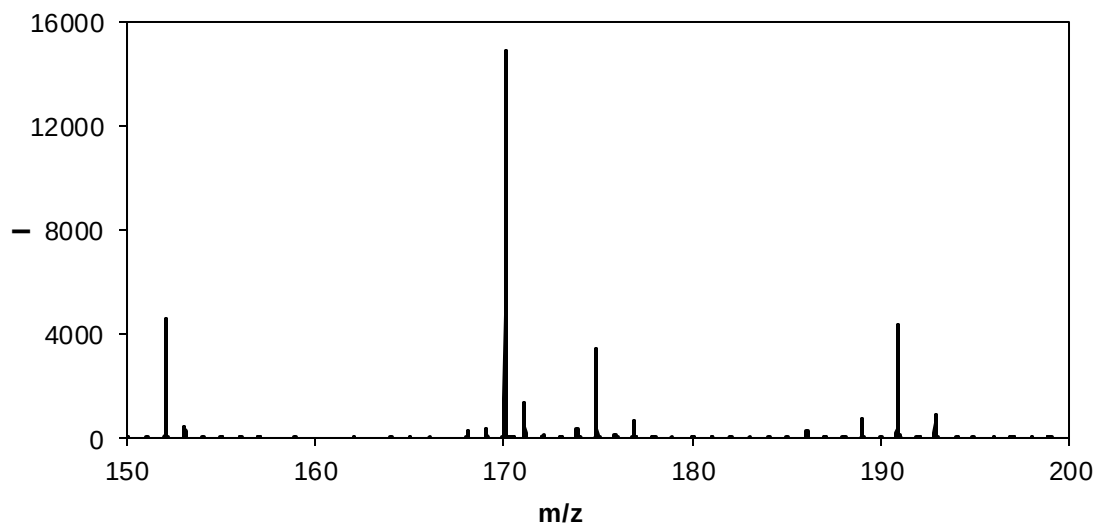
$[HSO_5^-] = 0,01 \text{ M}$, $[\text{foszfátpuffer}] = 0,1 \text{ M}$

A 50. ábrán a nemlineáris illesztéssel kapott, különböző norepinefrin-koncentrációkhoz tartozó k_{obs} értékek függvényében ábrázolva kapott pontok csökkenő tendenciát mutatnak.

5.3.2. Tömegspektrometriás termékazonosítás



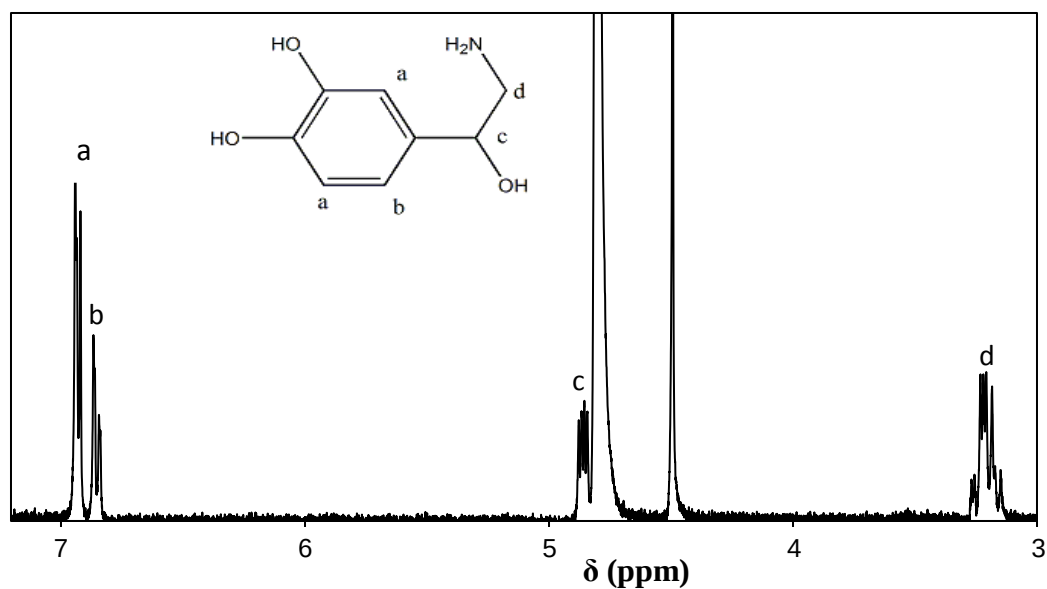
51. ábra A norepinefrin-oldat tömegspektruma látható. [norepinefrin] = 15,8 mM



52. ábra A norepinefrin és az oxon közötti reakció tömegspektruma, a reakció elindítása után 2,5 órával
[norepinefrin] = 6,65 mM, $[\text{HSO}_5^-]$ = 20,24 mM

A norepinefrin tömegspektrumán (51. ábra) 170-nél látható a molekulaioncsúcs, ami a norepinefrin protonált formája. A reakcióelegy tömegspektrumán (52. ábra) megjelenő új csúcs 168-nál valószínűleg a norepinefrinből két elektron vesztésével keletkező orto-kinon forma. A többi csúcs egyértelmű azonosítására még további erőfeszítések szükségesek.

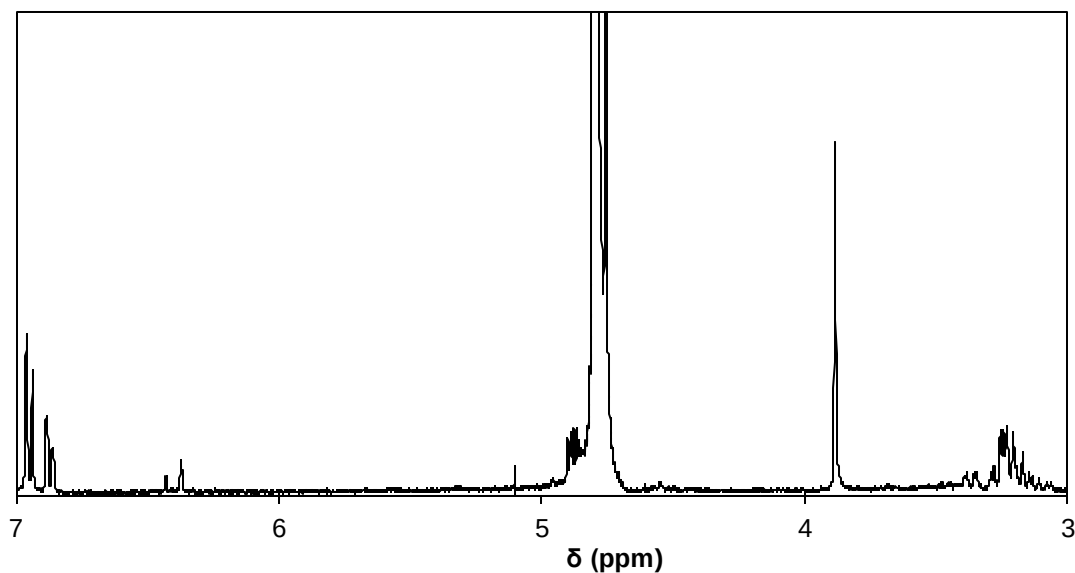
5.3.3. ^1H -NMR vizsgálatok



53. ábra A norepinefrin ^1H -NMR spektruma

[norepinefrin] = 9,93 mM

A norepinefrin ^1H -NMR spektrumán sikerült beazonosítani a csúcsokat, ami az 53. ábrán látható. A ~4,5 ppm kémiai eltolódásnál látható csúcs nem a norepinefrinhez tartozik, hanem a tartarátionhoz (mivel a törzsoldatokat norepinefrin-L-bitartarátból készítettük).



54. ábra ^1H -NMR spektrum a reakció elindítása után 2 héttel

[norepinefrin] = 9,93 mM, $[\text{HSO}_5^-] = 50,4 \text{ mM}$

A reakció ^1H -NMR vizsgálatakor valószínűleg nem volt elég az oxidálószer-felesleg, hogy a terméket láthassuk, a norepinefrin kis mennyiségben megmaradt, ez a két spektrumot összehasonlítva látható. A tartarát jele beleolvadt a vízjelbe, mivel az oxon hozzáadása miatt megváltozott a pH, hatással van a kémiai eltolódásra is. Megjelentek új csúcsok is, de ezek alapján még nem lehet beazonosítani a terméket.

6. Összefoglalás

Jelen munkában a norepinefrin és a dopamin oxidációját tanulmányoztuk peroxomonoszulfát-ion jelenlétében, elsősorban UV-vis spektrofotometriás detektálási módszerrel.

Az előkísérleteink során rögzített spektrális változások alapján megállapítottuk, hogy a vizsgált reakciók többlépéses folyamatok, illetve kiválasztottunk egy jól követhető hullámhosszt, melyen további méréseinket végezhetjük (279 nm).

A reakciók sztöchiometriáját elektropray tömegspektrometriás és ^1H -NMR módszerrel is megkíséreltük tanulmányozni. Vizsgálataink során egyértelmű következtetést nem tudunk levonni, az eredmények azonban azt valószínűsítik, hogy a többlépéses reakció első oxidációs közterméke mindkét katecholamin esetében a kételektronos oxidációval keletkező o-kinon forma, s emellett, a dopamin esetén dopamin-N-oxid képződésére utaló jelek is tapasztalhatók.

A dopamin és peroxomonoszulfát-ion közötti reakció kinetikai vizsgálatokor tapasztaltak arra utaltak, hogy a reakció dopaminra nézve telítési, míg peroxomonoszulfát-ionra nézve kevert első- és másodrendű kinetikát mutat ($\text{pH} = 7,0; 6,2; 5,2; 4,7$). A 4-es pH-n végzett vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a több lépésben lejátszódó oxidációs folyamat első lépésében a peroxomonoszulfát-ionra nézve elsőrendű a reakció, míg a következő lépésben nagy peroxomonoszulfát-ion koncentrációknál az oxidálószer már nem befolyásolja a reakciósebességet. Megállapítottuk, hogy erősen savas közegben ($\text{pH} = 1,5$) számottevő változás már nem történik.

A norepinefrin és a peroxomonoszulfát-ion között lejátszódó reakció esetén a kezdeti reakciósebesség koncentrációfüggésének vizsgálatokor tapasztaltak arra utaltak, hogy oxonra nézve kevert első- és másodrendű, míg norepinefrinre nézve elsőrendű kinetikát mutat ($\text{pH} = 7,0; 6,2; 5,2; 4,7$). A 4-es pH-n mért kinetikai görbék jelentősen eltértek az addig tapasztaltaktól. Az oxonra nézve elsőrendű kinetika állapítható meg az először lejátszódó reakcióra, azonban a második folyamat telítési kinetikát mutat, a reakciósebességet nagy oxonkoncentrációknál a peroxomonoszulfát-ion nem befolyásolja. Erősen savas közegben ($\text{pH} = 1,5$) nem megy végbe a reakció.

Megalapozott kinetikai modellek felállítása azonban, elsősorban az oxidációs folyamatok igen összetett jellege miatt, még további kísérleti munkát igényel.

.7. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőmnek, Dr. Lente Gábor egyetemi docensnek, amiért lehetővé tette számomra a kutatócsoportba való bekapcsolódást, a munkámat irányította, és a hozzá szükséges feltételeket biztosította. Hálás vagyok, mert megismertetett a reakciókinetika alapszereivel, és hasznos tanácsokkal látott el.

Köszönettel tartozom Bellér Gábor Ph.D. hallgatónak munkám elejének koordinálásáért és Kalmár József Ph.D. hallgatónak a munkám során nyújtott segítségért.

Köszönöm a D-524-es és D-427-es labor tagjainak a sok segítséget, és a laborra jellemző vidám hangulatot.

Szeretném megköszönni családomnak és barátaimnak, hogy mindvégig támogattak és biztattak.

8. Irodalomjegyzék

¹<http://en.wikipedia.org/wiki/Dopamine>

²<http://hu.wikipedia.org/wiki/Noradrenalin>

³G. Lente, J. Kalmár, Zs. Baranyai, A. Kun, I. Kék, D. Bajusz, M. Takács, L. Veres, I. Fábíán; Inorg. Chem., 2009, 48(4), 1763-1773

⁴Caro, H. Z.; Angew. Chem. 1898, 11, 845

⁵El-Ayaan, U.; Herlinger, E.; Jamesonb, R. F.; Linert, W. Dalton Trans. 1997, 2813-2818

⁶A. Simon: Dopaminszármazékok oxidálása peroxomonoszulfát-ionnal, vas(III) katalizátor jelenlétében, Diplomamunka, Debreceni Egyetem 2009.

⁷Richter, W., H.; Wadell, H., W.; J. Am. Chem. Soc., 1983, 5434-5440

⁸Pelizzetti, E.; Mentasti, E.; Prarnauro, E.; J. Chem. Soc., PerkinTrans. 2, 1976, 1651-1655

⁹Xinguo, W.; Ruixiu C.; Chemical Journal on Internet 2005, 9, 58