

TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI DOLGOZAT

Az ólom(II)ionok kölcsönhatásának vizsgálata peptidhidroxámsavakkal

Ozsváth András

Kémia BSc
III. évfolyam

Témavezető: Dr. Buglyó Péter
egyetemi docens

Debreceni Egyetem
Természettudományi és Technológiai Kar
Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék
2014

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, *Dr. Buglyó Péter* egyetemi docensnek a munkám során nyújtott elengedhetetlen segítségét és hasznos tanácsait.

Köszönöm *Szőcs Bélának*, hogy a ligandumok szintézisében nagyfokú segítséget nyújtott, valamint megosztotta velem hasznos tapasztalatait.

Köszönettel tartozom *Godó Attila* műszaki szolgáltatónak az NMR-mérésekben, és *Dr. Nagy Lajos* egyetemi adjunktusnak az ESI-MS mérések során nyújtott segítségéért.

Továbbá szeretném megköszönni a *Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoport* minden tagjának, hogy a munkám elvégzéséhez baráti légkört biztosítottak.

A dolgozat a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0043 pályázat anyagi támogatásával készült.

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS.....	1
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	2
2.1. Az ólom(II)ion koordinációs kémiája	2
2.2. A hidroxámsavak szerkezete és sav-bázis tulajdonsága	3
2.3. A hidroxámsavak koordinációs kémiája	4
2.4. Az aminosavak és peptidek sav-bázis tulajdonságai	5
2.5. Az aminosavak és peptidek koordinációs kémiája.....	6
2.6. Az aminohidroxámsavak jellemzése	7
2.7. A peptidhidroxámsavak koordinációs kémiája	8
2.8. Az ólom(II)ion kölcsönhatása az említett ligandumokkal	9
3. CÉLKITŰZÉSEK.....	11
4. KÍSÉRLETI KÖRÜLMÉNYEK ÉS AKALMAZOTT MÓDSZEREK	12
4.1. Felhasznált vegyszerek.....	12
4.2. A vizsgált ligandum előállítása	12
4.2.1. Z-AlaAlaN(Me)OH előállítása	12
4.2.2. H-AlaAlaN(Me)OH·HCl előállítása	13
4.3. Alkalmazott vizsgálati módszerek	13
4.3.1. pH-potenciometria	13
4.3.2. NMR-spektroszkópia.....	15
4.3.3. Tömegspektrometria.....	16
5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTELMEZÉSÜK.....	17
5.1. Az AlaAlaN(Me)OH előállítása.....	17
5.2. Oldategyensúlyi vizsgálatok	18
5.2.1. A ligandumok sav-bázis tulajdonságai	18
5.2.2. Az Pb^{2+} -tartalmú rendszerek jellemzése	20
6. ÖSSZEFOGLALÁS	30
7. SUMMARY.....	31
8. IRODALMI HIVATKOZÁSOK.....	32

1. BEVEZETÉS

Az ólmot, mint fémeket az emberiség régóta ismeri, használja könnyű hozzáférhetősége és megmunkálhatósága miatt. Éppen ezért nagyon hamar felismerték, hogy az ólomnak káros élettani hatásai vannak. Ennek ellenére az ólom különböző vegyületeit később is alkalmazták többek között a festékiparban, de magát a fémeket is, például akkumulátorokban, a nyomdaiparban és vízvezetékben is gyártottak belőle. A legnagyobb szennyezést azonban a tetraetil-ólmot (PbEt_4) okozta, amit kopogásgátló üzemanyag-adalékként használtak, így különböző ólom vegyületek kerültek a légkörbe.

A trialkil-ólmot kationok (PbR_3^+) rendkívül mérgezőek, mert képesek áthatolni a vér-agy gáton, így károsítják a vértképző szerveket, gátolják a vas beépülését a porfirinvázba, ezzel hosszútávon vérszegénységet okozva. Mindezek mellett károsítják még az idegrendszert, és az emésztőrendszert is.¹

Mivel az ólomnak ilyen széles körben mutatkozik meg a káros hatása a szervezetben, ezért szükséges kifejleszteni olyan vegyületeket, melyek szelektíven képesek megkötni a fémiont és csökkenteni, vagy kizárni annak toxicitását.

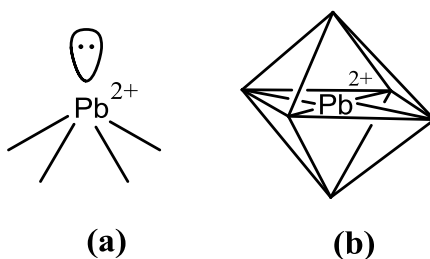
A hidroxámsavak jól ismert, kiváló fémion-megkötők. Az ólom(II)-vel való kölcsönhatásukra vonatkozóan azt találták, hogy kis, illetve közepes stabilitású komplexeket képeznek, így valószínűleg nem megfelelőek a toxikus ólom(II) szervezetből való eltávolítására.³ Ezen ligandumok módosításával azonban fémion-megkötő képességük is változhat. Ilyen módosított származékok például a peptidhidroxámsavak, melyek oxigén és nitrogén donoratomokat is tartalmaznak. Dolgozatomban két peptidhidroxámsav Pb(II)-vel való kölcsönhatását vizsgáltam.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Az ólom(II)ion koordinációs kémiája

Az ólomion rendelkezhet +2-es és +4-es töltéssel, de ezek közül a +2-es oxidációs állapot a stabilabb, a +4-es formája erősen oxidáló hatású. Ez az inertpárhatással magyarázható: az átmenetifémek mellett található csoportokban az elemből képződött ion stabilitása a csoportban lefelé haladva a kisebb oxidációs állapot felé növekszik. Ez azt jelenti, hogy a 4. főcsoportban a C, Si, Ge, Sn, Pb irányban növekszik a +2-es oxidációs állapot stabilitása. Az ólom +4-es oxidációs állapota általában ólomorganikus vegyületekben fordul elő (pl.: PbEt_4).²

Az ólom $6s^26p^2$ vegyérték elektronszerkezettel rendelkezik. Attól függően, hogy a 6s elektronok részt vesznek-e a koordinációs kötés kialakításában, az ólomnak kétféle geometriájú komplexeit ismerjük. Ha nem vesznek részt a koordinációban, azaz nemkötő elektronpárként vannak jelen, akkor a fémion koordinációs száma négy, és tetragonális piramisos geometriájú komplexek képződnek, ahol a központi ólomion aszimmetriacentrumként viselkedik a nemkötő elektronpárjának köszönhetően (1./a ábra). Ilyen geometriájú komplexek főleg hard karakterű donoratomokkal képződnek (pl.: O).

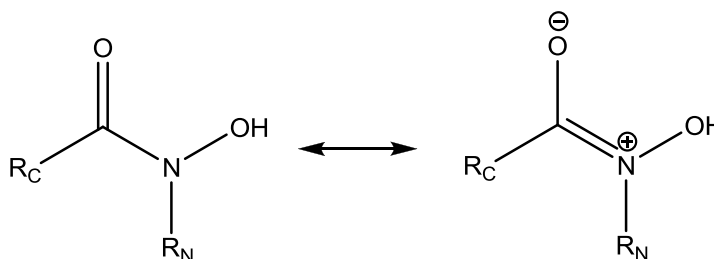


1. ábra: A tetragonális piramisos (a) és az oktaéderez (b) geometriájú ólom(II) komplexek

A másik esetben sp hibridizáció következik be, azaz a 6s elektronok keverednek a p elektronokkal, így egy gömbszimmetrikus szerkezet jön létre, ahol az ólom koordinációs száma hat (1./b ábra). Ez a geometria általában soft donoratomokkal jön létre (pl.: S).³

2.2. A hidroxámsavak szerkezete és sav-bázis tulajdonsága

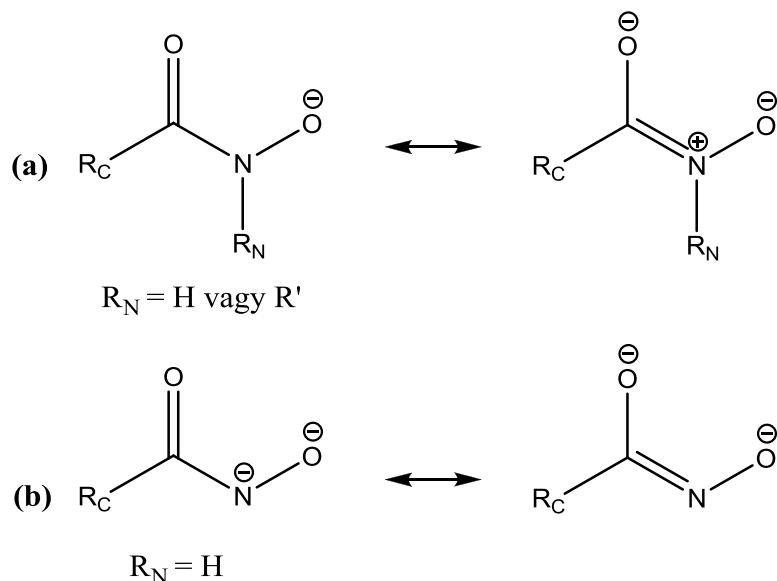
A hidroxámsavak azok a vegyületek, melyek tartalmazzák a hidroxámsavcsoportot (2. ábra). Előállításuk aktív karbonsavszármazék (sav-klorid, észter) és hidroxilamin acil nukleofil szubsztitúciós reakciójával történik. Attól függően, hogy primer, vagy szekunder hidroxilaminból állítjuk elő, primer és szekunder hidroxámsavakról beszélünk. A hidroxámsavakra jellemző, hogy a karbonil oxigén π -elektronjai delokalizálódnak a CNO kötésen, így a C-N kötés kettőskötés jellegű lesz, ezért gátolt rotáció lép fel, aminek következtében a hidroxámsavcsoport planáris szerkezetű. A gátolt rotáció miatt a hidroxámsavak esetén geometriai izoméria lép fel.^{3;4}



2. ábra: A hidroxámsavak általános képlete határszerkezettel

Röntgenkristallográfiás mérésekkel megállapították, hogy az acetohidroxámsav ($R_C = \text{Me}$, $R_N = \text{H}$ (ahaH)) szilárd fázisban *cisz* konfigurációjú, míg az N- és C-szubsztituált hidroxámsavak esetén az *E* izomer jelenik meg a szubsztituensek sztérikus hatásainak köszönhetően. ^1H -NMR mérésekkel igazolták, hogy ez a tendencia érvényes oldatokban is.

A hidroxámsavak gyenge savak, $pK = 8,5-9,4$ vizes oldatban. Azt találták, hogy aprotikus oldószerben (pl.: DMSO-ban) N-H savakként viselkednek, így hidroximát aniont képeznek. Vizes oldatban OH-deprotonálódással hidroxamát anion képződik, melyre ugyancsak jellemző a delokalizáció miatt kialakuló részleges C-N kettőskötés, így a hidroxamát anion is planáris (3./a ábra). Ennek következtében itt is *cisz-transz* (vagy *Z/E*) izoméria lép fel. Primer hidroxámsavak esetén az N-H proton elvesztése a hidroximát dianiont eredményezi (3./b ábra). A hidroximát dianionra is felírható a hidroxamátéhoz hasonló határszerkezeti forma, így rá is jellemző a gátolt rotáció és a geometriai izoméria.

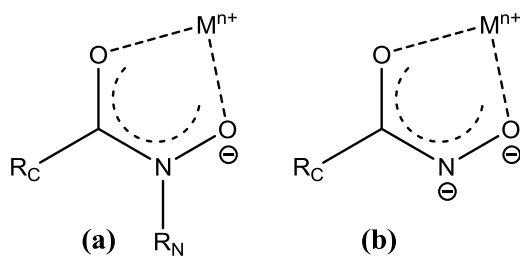


3. ábra: A hidroxamát- (a) és a hidroximátion (b), valamint lehetséges határszerkezeti formái

A hidroxámsavak savasságára nagymértékben hatnak a molekulán található szubsztituensek. Kimutatták, hogy az N-szubsztituált hidroxámsavak savassága megnő, ezért az N-metilacetohidroxámsav ($\text{R}_\text{C} = \text{R}_\text{N} = \text{Me}$, $\text{pK} = 8,80$) erősebb sav, mint az ahaH ($\text{pK} = 9,28$), mert az elektronküldő metil csoport a konjugált formát képes stabilizálni.⁵

2.3. A hidroxámsavak koordinációs kémiája

A hidroxámsavak oxigéndonor ligandumok, a fémionnal öttagú kelátot képeznek. A hidroxámsavak kétféle komplexet képezhetnek. Az egyik lehetőség az $[\text{O}_\text{karbonil}, \text{O}_\text{hidroxamát}]$ koordináció, az így kialakult komplexeket hidroxamátó komplexeknek nevezzük (4./a ábra). A másik esetben az NH protonvesztésével akár a nitrogén is részt vehet egy második fémion megkötésében, ekkor hidroximátó komplex keletkezik (4./b ábra). Ez utóbbi szerkezet csak a primer hidroxámsavak esetén teljesül.^{3; 4}



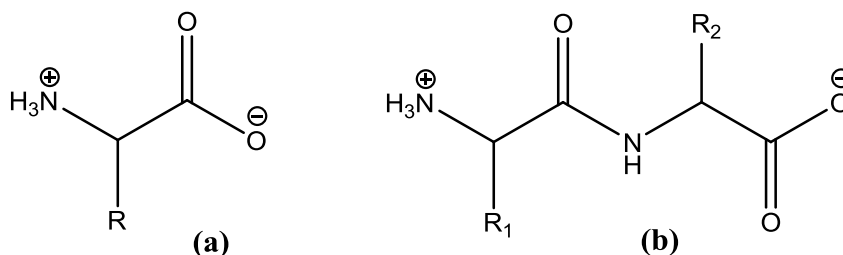
4. ábra: A hidroxamátó (a) és a hidroximátó (b) komplex szerkezete

Különböző fémionokkal különböző szerkezetű komplexek alakulnak ki. Az oktaéderez hard karakterű fémionokkal (Fe(III), Co(III)) egymagvú hidroxamátó/-imátó komplexek képződnek, a koordinációs szféra telítésével. A „borderline” Cu(II)-vel síknégyszetes geometriájú egymagvú hidroximátó kelát alakul ki. Megállapították azt is, hogy a nikkel(II) NO hidas biszkomplexeket alakít ki ahaH-val és benzohidroxámsavval.⁵

A hidroxámsavak fémionmegkötő képességének leginkább az élő szervezetben van jelentősége. A sziderofórok (melyek egyik csoportját hidroxamátok alkotják) felelősek a Fe(III) felvételéért és szállításáért. Szerepük azért fontos, mert stabil komplexet képeznek a Fe(III)-mal, így megakadályozzák annak hidrolízisét fiziológiás pH-n. A hidroxámsavak képesek inhibálni fémion tartalmú enzimeket (pl.: a nikkel(II) tartamú ureázt).^{3; 6}

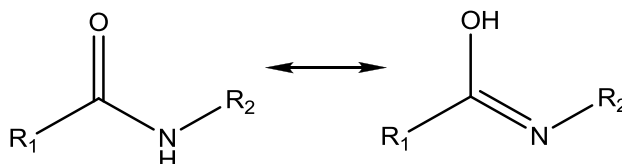
2.4. Az aminosavak és peptidek sav-bázis tulajdonságai

Az aminosavak szerkezetüket tekintve tartalmazznak amino- és karboxilcsoportot is (5./a ábra). Attól függően, hogy az aminocsoport az α , β vagy γ szénatomon helyezkedik el, beszélünk α -, β -, és γ -aminosavokról. Vizes oldatban az α -aminosavak ikerionos formában vannak jelen. Ezekben az aminosavakban a $pK_{\text{karboxilát}} \sim 2-2,5$ és a $pK_{\text{amino}} \sim 9-10$.



5. ábra: Egy aminosav (a) és egy dipeptid (b) általános szerkezete

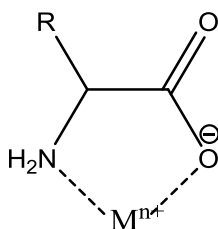
A dipeptidekben az amino- és karboxilcsoportok egymástól távolabb helyezkednek el (5./b ábra). Továbbá, a peptidkötésben a C=O csoport π -kötése delokalizálódik az OCN atomokon, ennek következtében a C-N kötés kettőskötés jellegűvé válik, tehát a peptidkötés planáris szerkezetű (6. ábra). A delokalizáció következtében csökken a karboxilcsoport savassága ($pK \sim 3$) és csökken az aminos csoport bázicitása ($pK \sim 8$). A peptidkötés a delokalizációnak köszönhetően meglehetősen stabil, ezért az amids csoport nagyon gyenge sav. ⁴



6. ábra: A peptidkötés szerkezete rezonancia formákkal

2.5. Az aminosavak és peptidek koordinációs kémiája

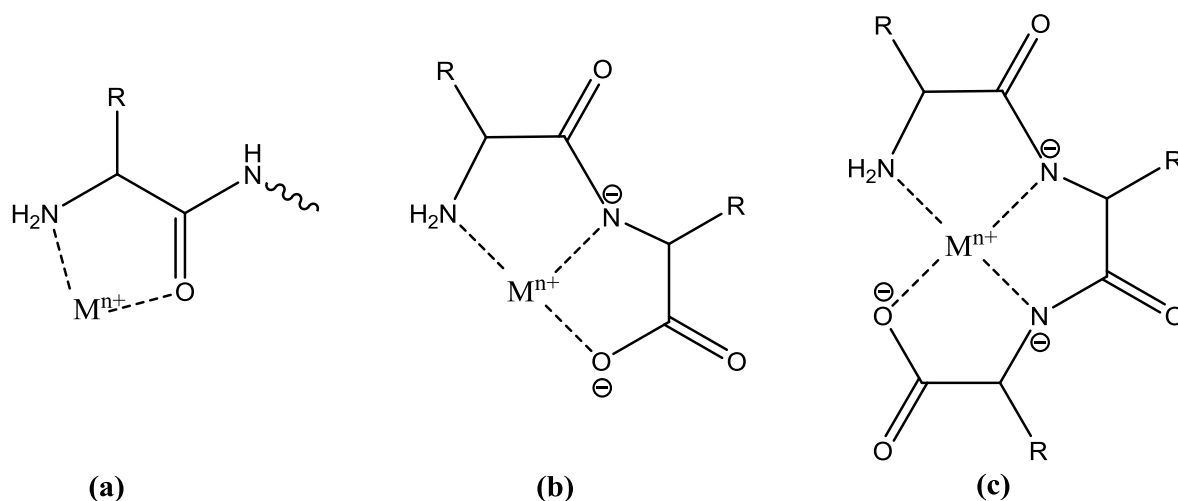
Az α -aminosavakban az aminos csoport és a karboxiláts csoport oxigénje egymáshoz képest kelátképző helyzetben vannak, így a fémionnal öttagú kelátot hoznak létre (7. ábra).



7. ábra: Aminosavak [MA] összetételű komplexe

Peptidek esetén ez a koordináció nem lehetséges, hiszen a terminális amino- és karboxiláts csoportok egymástól távol helyezkednek el. Savas közegben az aminos csoport és a peptidkötés karbonil oxigénje alakítja ki a fémionnal a kelátot, közepes stabilitású [MA] komplexet eredményezve (8./a ábra). A pH növelésével a fémion az oxigén helyett az amidcsoport nitrogénjéhez koordinálódhat, és az deprotonálódik, így [MAH₋₁] összetételű komplex keletkezik (8./b ábra), ahol dipeptidek esetén a karboxilát oxigén is részt vesz a

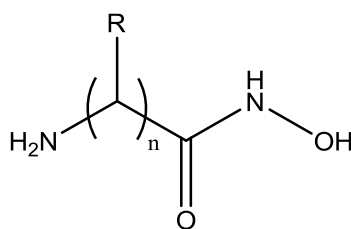
koordinációban. Tripeptidek esetén a második amid nitrogén is deprotonálódhat, így $[\text{MAH}_2]$ összetételű komplexet alkotva (8./c ábra).⁴



8. ábra: Peptidek $[\text{MA}]$ (a), $[\text{MAH}_1]$ (b), és $[\text{MAH}_2]$ (c) összetételű komplexei

2.6. Az aminoszavak jellemzése

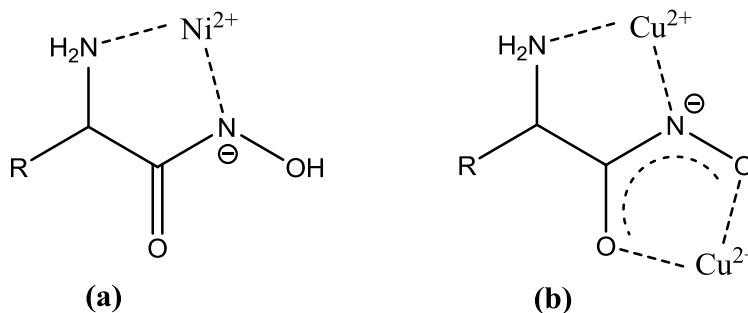
Az aminoszavak a hidroxámsavcsoport mellett aminoszortot is tartalmaznak. Attól függően, hogy az aminoszort a hidroxámsavcsoportoz képest α vagy β szénatomon helyezkedik el, beszélünk α - és β -aminoszavokról (9. ábra).



9. ábra: Az α - ($n = 1$), és β - ($n = 2$) aminoszavak szerkezete

Az α -aminoszavak esetén különböző koordinációk lehetségesek. Hard karakterű fémionok esetén (pl.: Fe(III), Al(III)) $[\text{O},\text{O}]$ donatoratomú hidroxamát kelátok alakulnak ki. A nitrogént kedvelő soft fémionokkal (Pl.: Ni(II)) ezen ligandumok öttagú $[\text{N}_{\text{amino}}, \text{N}_{\text{hidroximát}}]$ kelátot alkotnak (10./a ábra). A „borderline” Cu(II)-ionokkal egyaránt lehetséges $[\text{O},\text{O}]$ és

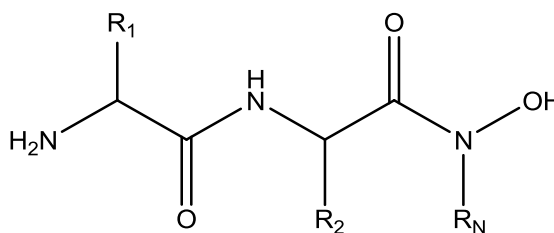
[N,N] koordináció is, ezért ezen fémionnal kétmagvú komplexek képződnek (10./b ábra). A β -aminohidroxámsavak esetén a Cu(II)-ionokkal nagy stabilitású, ötmagvú, úgynevezett fémkorona komplexek jönnek létre, melyek vizes oldatban széles pH-tartományban jelen vannak.^{3; 4}



10. ábra: Az α -aminohidroxámsavakkal megvalósuló [N,N] (a) és vegyes koordinációjú [N,N] és [O,O] (b) kelátok

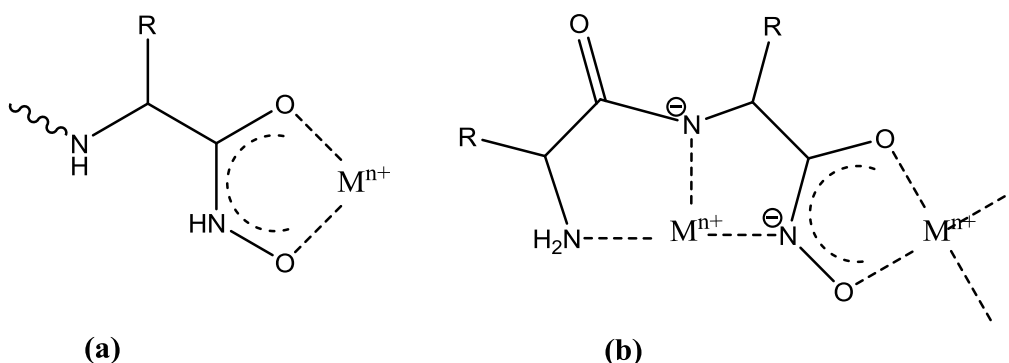
2.7. A peptidhidroxámsavak koordinációs kémiája

A peptidhidroxámsavak koordinációs kémiai szempontból kétféle vegyületből épülnek fel: peptidből és hidroxámsavból (11. ábra). A hidroxámsavcsoport képes koordinálni a hard karakterű fémionokat, míg a peptidben található amino és amid nitrogének, valamint a hidroximát nitrogén jó donortoma soft fémionoknak. A ligandumok előállítása általában acil nukleofil szubsztitúciós reakcióval történik oly módon, hogy egy N-terminálison általában Z-védett (Z = benzil-oxikarbonil-csoport) peptidet, melynek karboxilát vége aktivált (pl. metilészter), reagáltatnak hidroxilaminnal (ha a célvegyület szekunder hidroxámsav, akkor szubsztituált hidroxilaminnal).⁴



11. ábra: A dipeptidhidroxámsavak általános szerkezete

Egy tanulmányban vizsgálták a primer dipeptidhidroxámsavak kölcsönhatását Fe(III)-, Al(III)-, Ni(II)-, és Cu(II)-ionokkal, és azt találták, hogy a hard karakterű Fe(III)- és Al(III)-ionok kizárólag [O,O] donorú hidroxamát kelátot hoznak létre (12./a ábra). Azt is megállapították, hogy a Cu(II) létrehozhat hidroxamát kelátot, illetve [NH₂, N_{amid}, N_{hidroximát}] kelátot is; először a hidroxamát oxigéneken keresztül történik a koordináció, majd a pH emelésével bekövetkezik a peptidváz koordinációja is (12./b ábra), és keletkezhetnek két, illetve hárommagvú komplexek is.⁸



12. ábra: A peptidhidroxámsavak koordinációs típusai: hidroxamát típusú [O,O] kelát (a), valamint vegyes koordinációjú [O,O] és [NH₂, N_{amid}, N_{hidroximát}] típusú kelát (b)

2.8. Az ólom(II)ion kölcsönhatása az említett ligandumokkal

A hidroxámsavak és az ólom(II)ion közötti kölcsönhatást több tanulmányban vizsgálták. Megállapították, hogy a monohidroxamátok közül kettőt képes fogadni a fémion, feltehetően a tetragonális piramisos koordinációs szférának köszönhetően. Ugyancsak az aszimmetrikus koordinációs szférával magyarázható az, hogy a dihidroxámsavak közül a rövidebb szénláncú származékok bizonyultak a legjobb komplexképzőknek, ugyanis a nemkötő elektronpár nagy térkitöltése miatt a koordinációs helyek zsúfoltnak helyezkednek el.

A trihidroxámsavak közül a DFB-vel (Deszferroxamin B) és DFC-vel (Deszferrikoprogén) végeztek vizsgálatokat. Azt találták, hogy mind a DFB, mind a DFC jó komplexképzője az ólom(II)-nek, így DFB-vel [Pb₃A₂H₂] összetételű, míg DFC-vel [Pb₃A₂] összetételű komplexek keletkeztek.³

Egy tanulmányban megállapították azt is, hogy a polihidroxamátokkal az ólom(II)ion stabil komplexet képez, aminek fontos gyakorlati jelentősége lehet, ugyanis emiatt olcsó, megbízható és pontos Pb^{2+} -szelektív elektród készíthető belőlük.⁷

Az ólom(II)-aminohidroxámsav rendszereknél meghatározó szerepet játszik az aminocsoport helyzete. A β -aminohidroxámsavakkal a fémion hidroxamát típusú mono- és biszkomplexeket hoz létre. Az α -aminohidroxámsavak esetén viszont $[\text{N}_{\text{amino}}, \text{N}_{\text{hidroximát}}]$, valamint $[\text{O}, \text{O}]$ kelátok is kialakulnak, így szterikus okok miatt többmagvú komplexek keletkeznek.³

Az Pb(II)-peptidhidroxámsav kölcsönhatásokra vonatkozóan nem találtunk adatokat az irodalomban.

3. CÉLKITŰZÉSEK

A szervezetben felhalmozódott toxikus hatású ólom(II)ionok eltávolítására elvileg alkalmas jelöltek lehetnek az oxigén és nitrogén donoratomokkal is rendelkező peptidhidroxámsavak. Ezek azonban a szervezetben fiziológiás körülmények között koordinálhatnak más, akár létfontosságú fémionokat is, ezzel komoly károkat okozva. Továbbá, szükséges ismernünk az ólom(II)ion és a peptidhidroxámsavak közötti kölcsönhatás erősségét ilyen körülmények között.

A dolgozatom keretében az ólom(II)ionok és két dipeptidhidroxámsav, az AlaAlaNH₂OH és az AlaAlaN(Me)OH közötti kölcsönhatások oldategyensúlyi vizsgálatát végeztük el. Mivel az AlaAlaN(Me)OH nem állt rendelkezésünkre, ezért munkánk ezen ligandum előállításával kezdődött. Az oldatfázisú vizsgálatokat pH-potenciometriás, ESI-MS tömegspektrometriás és ¹H-NMR spektroszkópiás módszerekkel folytattuk.

4. KÍSÉRLETI KÖRÜLMÉNYEK ÉS ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

4.1. Felhasznált vegyszerek

Az AlaAlaN(Me)OH szintéziséhez Z-AlaAla-OMe-ből indultunk ki, melyet a Bachem AG (Svájc) gyártott. A ligandum előállításához alkalmazott N-metil-hidroxilamin-hidrokloridot a Merck-től vásároltuk, az oldószerként használt metanolt a Molar szállította.

A szilárd $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ Fluka gyártmányú volt, a belőle készült törzsoldat koncentrációját komplexometriás titrálással határoztunk meg.

A sav-bázis titrálásokat karbonátmentesített, argon alatt tárolt, előzőleg 0,0500 M koncentrációjú kálium-hidrogén-ftalát-oldatra meghatározott pontosan ismert koncentrációjú KOH-oldattal végeztük. A kálium-hidrogén-ftalátot az Aldrich szállította.

Az NMR-méréseknél oldószerként használt 99,9%-os izotóptisztaságú nehézvizet az Aldrich-től szereztük be.

4.2. A vizsgált ligandum előállítása

4.2.1. Z-AlaAlaN(Me)OH előállítása:

Gömblobbikban feloldottunk 940 mg (11,24 mmol) $\text{HN}(\text{CH}_3)_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ -t 25 ml metanolban, majd a lombikot 0 °C-ra hűtöttük. Lehűlés után hozzáadtuk a 900 mg (22,5 mmol) NaOH 16 ml metanollal készült oldatát, aminek következtében a reakcióelegy csapadékosá vált. Az így kapott elegyhez hozzáadtuk az 1,155 g (3,75 mmol) Z-AlaAla-OCH₃-t, majd az elegyet 0 °C-on 3 órán keresztül kevertettük, a reakciót VRK-val követtük (futtatóelegy: $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH} = 9:1$; előhívás: UV-fény (365 nm) és FeCl_3 -oldat permete). Ezután a reakcióelegyet sósavval átsavanyítottuk, majd a tiszta oldat CH_2Cl_2 -al történő extrakciója után (3 x 20 ml) a szerves fázist extraháltuk 3 x 20 ml 0,05 M NaOH-oldattal. A vizes fázist 2 M sósavval gyorsan átsavanyítva extraháltuk 3 x 20 ml diklórmétánnal. Az összegyűjtött szerves fázisokról MgSO_4 -on történő szárítás után a szerves oldószert rotációs vákuumbepárlóval távolítottuk el, majd a kapott olajszerű anyagot diklórmétán/dietil-éter elegyből átkristályosítottuk. A végtermék fehér színű szilárd anyag. Kitermelés: 450 mg (37%).

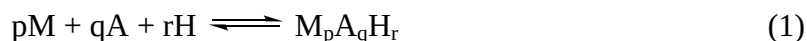
4.2.2. H-AlaAlaN(Me)OH·HCl előállítása:

Kétnyakú lombikba bemértünk 330 mg (1,0206 mmol) Z-AlaAlaN(Me)OH-t, majd a lombikot nitrogénnel átöblítettük. Nitrogén atmoszféra alatt hozzáadtunk 117 mg Pd/C katalizátort és 20 ml *absz.* metanolt. Ezután hozzáadtunk 500 µl 7 M metanosos HCl-oldatot, majd H₂ túlnyomáson 2 órán át kevertettük. A redukció végeztével a katalizátort kiszűrtük, majd a szűrletet rotációs vákuumbepárlón szárazra pároltuk. A végtermék fehér színű higroszkópos. Kitermelés: 248 mg (93%)

Analízis: ¹H-NMR (360 MHz, D₂O) Az oldószer jeléhez viszonyítva (δ = 4,79) δ: 1,36-1,38 (d, 3H, -CH₃); 1,53-1,55 (d, 3H, -CH₃); 3,26 (s, 3H, NCH₃); 4,08-4,14 (q, 1H, -CH); 4,93-4,99 (q, 1H, -CH)

4.3. Alkalmazott vizsgálati módszerek**4.3.1. pH-potenciometria**

A komplexképződés vizsgálatához általánosan alkalmazott módszer a pH-potenciometria. Az eljárás abban az esetben használható, ha a komplexképződés pH-effektussal jár, tehát a folyamat hatással van a ligandum protonálódási egyensúlyára. Ezzel a módszerrel a képződő részecskék összetételét, és stabilitási állandóit határoztuk meg. A komplexképződés általánosan az 1. reakcióegyenlettel adható meg (a töltésektől az egyszerűbb kezelhetőség kedvéért eltekintünk):



Az M a fémiont, az A a ligandumot jelöli, a p, q és r pedig a szöchiometriai együtthatók. Egy M_pA_qH_r összetételű komplex β_{pqr} stabilitási állandója a következőképp adható meg:

$$\beta_{pqr} = \frac{[M_pA_qH_r]}{[M]^p[A]^q[H]^r} \quad (2)$$

Ha az egyensúlyi rendszer csak fémiont, ligandumot és protont tartalmaz, akkor háromkomponensűnek tekinthető. Ezen három komponensre felírható anyagmérlegek a következők:

$$C_H = [H] + \sum_{i=1}^n r_i \beta_{pqr} [M]_i^p [A]_i^q [H]_i^r$$

$$C_M = [M] + \sum_{i=1}^n p_i \beta_{pqr} [M]_i^p [A]_i^q [H]_i^r$$

$$C_A = [A] + \sum_{i=1}^n q_i \beta_{pqr} [M]_i^p [A]_i^q [H]_i^r$$

Ha a rendszerben kompetíció áll fenn a ligandum protonált formája és fémkomplexe között, akkor lehetőségünk van a stabilitási állandók meghatározására a titrálási görbék elemzésével. A keletkező komplexek stabilitási állandóit a Tanszéken kifejlesztett PSEQUAD programmal végeztük, mely iterációs módszerrel finomítja a kezdeti értékeket.⁹ A számításhoz bemenő adatként meg kell adni a komponensek számát, valamint a képződő részecskék számát és összetételét, továbbá be kell még vinni a komponensek kiindulási teljes koncentrációját és a közelítő stabilitási állandókat. Ezután a szoftver a komponensekre felírt anyagmérlegek megoldásával határozza meg a stabilitási állandókat.

Egy pH-metriás modell közelítésének jóságát az illesztési paraméter fejezi ki, mely a titrálószer térfogatokkal kifejezett $\Sigma(V_{\text{mért}} - V_{\text{számolt}})^2$ értékkel adható meg.

A kialakult komplexek protondiszociációs folyamatait úgynevezett származtatott állandókkal jellemezzük. A pK_{MAH} értékkel az [MAH] komplex deprotonlódására vonatkozó egyensúlyi állandót fejezzük ki, melyet a következőképpen adhatunk meg (a töltésektől az egyszerűbb kezelhetőség érdekében eltekintünk):



A pH-potenciometriás méréseket Mettler Toledo T50 titrátorral és Metrohm 6.0255.100 típusú double junction kombinált üvegelektóddal végeztük. Az Irving-faktor¹⁰ és a vízion szorzat meghatározásához HNO₃-oldatot titráltunk pontosan ismert koncentrációjú KOH-oldattal, melyet előzőleg kálium-hidrogén-ftalátra határoztunk meg. A méréseket 0,2 M KNO₃ ionerősség mellett végeztük, a mérőrendszert 0,0500 M koncentrációjú kálium-hidrogén-ftalát pufferoldattal kalibráltuk (pH = 4,008; T = 25 °C). A ligandumok protonálódási állandóit, valamint a törzsoldatok pontos koncentrációit KOH-oldattal történő titrálással határoztuk meg

oly módon, hogy előzőleg a ligandumokat a törzsoldatokhoz adott HNO_3 -oldattal teljesen protonált formába hoztuk. A ligandumok protonálódási állandóit, valamint hatóanyagtartalmukat SUPERQUAD program segítségével számoltuk.¹¹ A méréseket minden esetben 25 °C-on, 15,00 ml térfogatban végeztük. A minták kevertetését, valamint oxigénmentesítését argon gáz mintán át történő buborékoltatásával valósítottuk meg. A fémion tartalmú rendszerek vizsgálatához mindkét ligandum esetében 1:1 és 1:2 fémion-ligandum arányú mintákat állítottunk össze. A képződött komplexek stabilitási állandóit a PSEQUAD⁹ programmal határoztuk meg.

4.3.2. NMR-spektroszkópia

A mágneses magrezonancia (NMR) spektroszkópia korunk egyik legjelentősebb szerkezetvizsgáló módszere, hiszen mindközül ez a leginformatívabb. Ezen módszerrel olyan atommagok vizsgálhatók, melyek proton- vagy neutronszáma, vagy mindkettő páratlan, azaz nem nulla magspinnel rendelkeznek. Ezek az úgynevezett NMR-aktív magok, melyek energiaállapota homogén mágneses térben a Zeemann-felhasadásnak köszönhetően $2I+1$ energiaszintre hasad, ahol I a magspin kvantumszám. Az így létrejött energianívók közötti átmenetek a rádiótartományba eső hullámhosszúságú elektromágneses sugárzással gerjeszthetők. A molekulákban az atommagot elektronok veszik körül, melyeknek szintén van mágneses terük, melyek erősíthetik, vagy gyengíthetik a mágneses teret a mag környezetében. Ezt nevezzük kémiai árnyékolásnak. Az árnyékolás miatt az atommag elnyelési frekvenciája eltolódik az árnyékolatlan maghoz képest; ezt a jelenséget nevezzük kémiai eltolódásnak. A kémiai eltolódás mértéke függ az elektroneloszlástól, így a különböző kémiai környezetben lévő atommagok különböző jeleket adnak a spektrumban. A jelek spektrumban elfoglalt helyének azonosításához a kémiai eltolódás értékeket használjuk ($[\delta] = \text{ppm}$), ennek abszolút értékét valamilyen, a mintához adott standardhoz viszonyítva adjuk meg. Az NMR-aktív atommagok mágneses momentumai egymással kölcsönhatásban vannak. Ez azt jelenti, hogy az egyes magok energiaszintje kis mértékben megváltozik, mely a spektrumban úgy jelenik meg, hogy a jelek multiplettekre hasadnak fel. Ezt a kölcsönhatást spin-spin csatolásnak nevezzük. A jelek egymáshoz viszonyított multiplicitása segítségével az egyes magok pontos helyét megadhatjuk a molekulában. A spin-spin csatolás mértéke az egymástól maximum három kötésnyire található atomok között a legszámottevőbb. A multiplettek jelei közötti távolságot nevezzük csatolási állandónak ($[J] = \text{Hz}$).

Az NMR spektroszkópiát felhasználtuk a ligandumok előállításánál során a termékek szerkezetének és tisztaságának meghatározásához, valamint a módszer az oldategyensúlyi

mérésekben is segítségünkre volt. A ^1H -NMR méréseket Bruker DRX 360 műszeren végeztük. Az egyensúlyi vizsgálatok során a mintákat nehézvízben oldottuk fel, és a minták térfogata 600 μl volt. Az oldatok pH-ját NaOD és DNO_3 hozzáadásával állítottuk be, az ionerősség 0,2 M volt KNO_3 -ra nézve. A kapott spektrumokat WinNMR program segítségével értékeltük ki, a kémiai eltolódás értékeket az oldószer jeléhez viszonyítva adtuk meg.

4.3.3. Tömegspektrometria

A tömegspektrometria (MS) napjainkban széles körben alkalmazott szerkezetvizsgálati módszer. A módszer elvi alapja, hogy a mintát legtöbbször gázfázisban valamilyen részecskével (ion, elektron) bombázzák, aminek hatására a vizsgált molekulából ionok képződnek. A keletkezett ionokat ezután tömeg/töltés (m/z) értékek szerint szétválogatjuk a tömeganalizátor segítségével, majd valamilyen detektorral detektáljuk azokat.

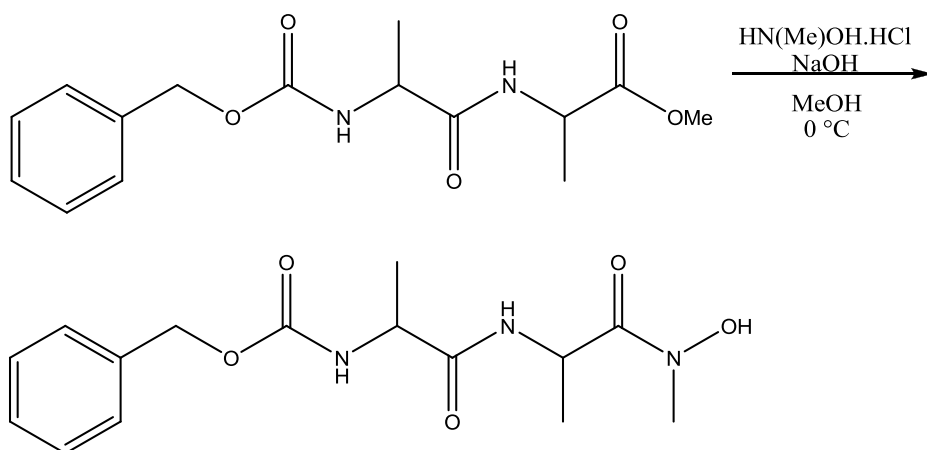
A tömegspektrometriás elemzéseket ESI-TOF-MS technikával végeztük. A vizsgálatok célja a pH-potenciometriás mérések során meghatározott komplexek összetételének bizonyítása volt. Az ESI (Elektro Spray Ionizáció) egy lágy ionizációs technika, melynek előnye, hogy molekulaionok képződnek a vizsgált molekula fragmentációja nélkül, így az adott részecskék könnyen beazonosíthatók az m/z értékek alapján. A spektrumban kapott csúcsok asszignációját a mért és a számított izotópeloszlás összehasonlításával végeztük.

Az MS méréseket Bruker micrOTOF-Q ESI-TOF készülékkel végeztük, pozitív módban. A méréseket mindkét rendszernél 1:1 és 1:2 fémion-ligandum aránynál végeztük, a vizsgált minták térfogata 1 ml volt, koncentrációjuk minden esetben 1 mM volt a ligandumra nézve. A pH-kat a pH-metriás mérésekből számított koncentrációeloszlás-görbék szerint állítottuk be vizes KOH és HNO_3 -oldatokkal.

5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTELMEZÉSÜK

5.1. Az AlaAlaN(Me)OH előállítása

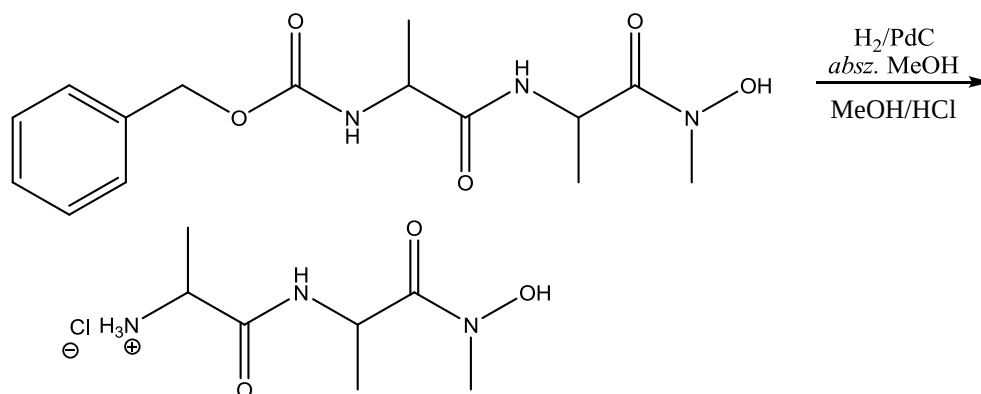
A Z-AlaAlaN(Me)OH-t acil nukleofil szubsztitúciós reakcióval állítottuk elő Z-AlaAla-OMe és HN(Me)OH·HCl reakciójából a következő reakcióegyenlet szerint:



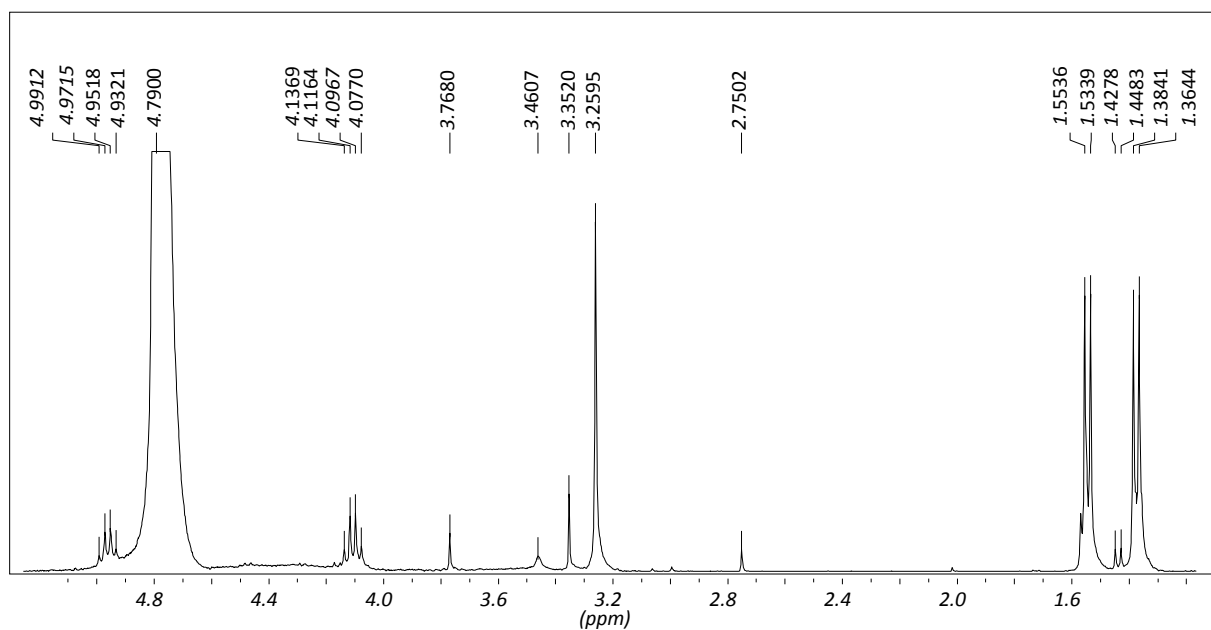
A benzil-oxikarbonil védőcsoport azért szükséges, hogy a dipeptid metilészter nukleofil sajátságú N-terminális végét kizárjuk a reakcióból így megakadályozzuk a melléktermékek képződését.

A reakció lejátszódása után a terméket többszöri extrakcióval izoláltuk. Elsőként a terméket sósavval protonáljuk, és az így kapott semleges molekulát a szerves fázisba juttatjuk, így eltávolítva a protonált $\text{H}_2^+\text{N}(\text{Me})\text{OH}$ -t, majd onnan KOH-dal történő deprotonálás után újra a vizes fázisba, ezzel eltávolítva az át nem alakult metilésztert. Ezt követően gyorsan átsavanyítva ismét a szerves fázisba juttattuk, és az így kapott oldatról eltávolítva az oldószert jutottunk a Z-védett AlaAlaN(Me)OH-hoz.

A védőcsoport eltávolítását katalitikus hidrogénezéssel valósítottuk meg, és a termékből hidroklorid sót képeztünk az alábbi reakcióegyenlet szerint:



Az előállított ligandum szerkezetét és tisztaságát ^1H -NMR spektroszkópiával ellenőriztük. Az elkészült spektrum a 13. ábrán látható.



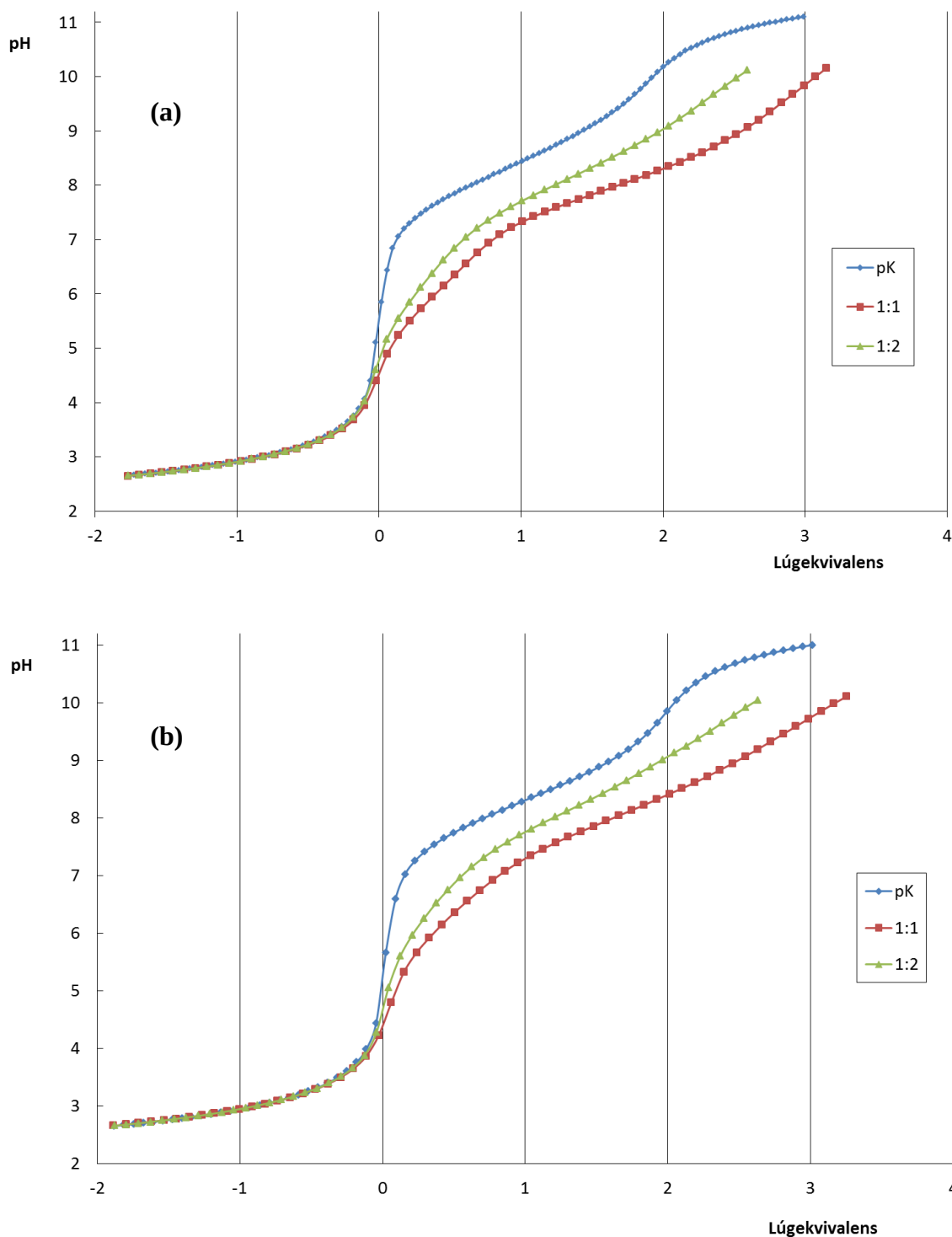
13. ábra: Az AlaAlaNH(Me)OH ^1H -NMR spektruma (a jelek hozzárendelése a 4.2.2. fejezetben látható)

5.2. Oldategyensúlyi vizsgálatok

5.2.1. A ligandumok sav-bázis tulajdonságai

A pH-potenciometriás mérések során meghatároztuk a vizsgált ligandumok protonálódási állandóit, melyek az irodalomban már ismertek.⁴ A szabad ligandum titrálásával

ellenőrizhetjük a vegyület tisztaságát, valamint meghatározhatjuk a pontos hatóanyag-tartalmat is. A mérés során kapott titrálási görbék a 14. ábrán láthatóak.



14. ábra: Az Pb(II)-AlaAlaNH₂ (a) és az Pb(II)-AlaAlaN(Me)OH (b) rendszerek titrálási görbéi

A 14. ábrán látható „pK” jelű titrálási görbéken megfigyelhető, hogy pH = 5-ig a ligandumhoz adott erős sav közömbösítése történik meg, majd a ligandumok a pH = 7-10

tartományban két, egymással átfedő lépésben deprotonálódnak, mely folyamatok az ammónium- és a hidroxámsavcsoportokhoz rendelhetők. Az irodalomban ismeretes, hogy az ammóniumcsoport a kissé savasabb.⁴ A ligandumok protonálódási állandóit az 1. táblázatban foglaltam össze.

5.2.2. Az Pb²⁺-tartalmú rendszerek jellemzése

A pH-potenciometriás titrálásokat elvégeztük közelítőleg 1:1 és 1:2 fémion-ligandum arányok mellett is. A 14. ábrán bemutatott titrálási görbékből látható, hogy az ólomiont is tartalmazó minták görbéi pH 4 körül elválnak a szabad ligandumétól, ami komplexképződésre utal. Az eltérés azért mutatkozik, mert a koordinálódó fémion a protonált donortomról leszorítja a protont, és az így keletkezett „extra” savmennyiséget titráljuk. Mivel az Pb²⁺-tartalmú rendszerek titrálási görbéinek lefutása nem különbözik jelentősen a szabad ligandumok titrálási görbéitől, ezért többféle oldatbeli részecske egyidejű jelenlétét feltételezhetjük.

Az ólom(II)-tartalmú rendszerek titrálási görbéiből a PSEQUAD program⁹ segítségével meghatároztuk a képződő komplexek összetételét és stabilitási állandóit, melyek néhány származtatott értékkel együtt az 1. táblázatban láthatóak.

1. táblázat: A ligandumok protonálódási állandói, valamint a képződő Pb²⁺-komplexek összetétele és stabilitási szorzatai*

	AlaAlaNH ₂ OH		AlaAlaN(Me)OH	
Részecske	logK		logK	
HA	8,87 (1)		8,67 (1)	
H ₂ A	7,74 (1)		7,73 (1)	
–	„A” modell logβ	„B” modell logβ	„A” modell logβ	„B” modell logβ
[PbAH] ²⁺	13,37 (2)	13,44 (2)	13,15 (4)	13,24 (4)
[PbA] ⁺	5,51 (2)	–	5,40 (4)	–
[PbA ₂]	9,18 (4)	9,32 (4)	8,49 (10)	8,72 (8)
[Pb ₂ A ₂] ²⁺	–	14,29 (4)	–	14,06 (6)
pK _{PbAH}	7,86	–	7,75	–
log(K _{PbA} /K _{PbA₂})	1,84	–	2,31	–
Illesztés (Δcm ³)	0,00354	0,00385	0,00548	0,00567
Pontok száma	77	77	135	135

*Zárójelben a 3σ standard deviáció értékek szerepelnek.

Mivel a pH-potenciometria nem alkalmas a keletkező komplexek szerkezetének megadására, így egy adott összetételű részecskéhez többféle szerkezet tartozhat. A képződő komplexek lehetséges oldatbeli szerkezetei a 15. ábrán láthatók.

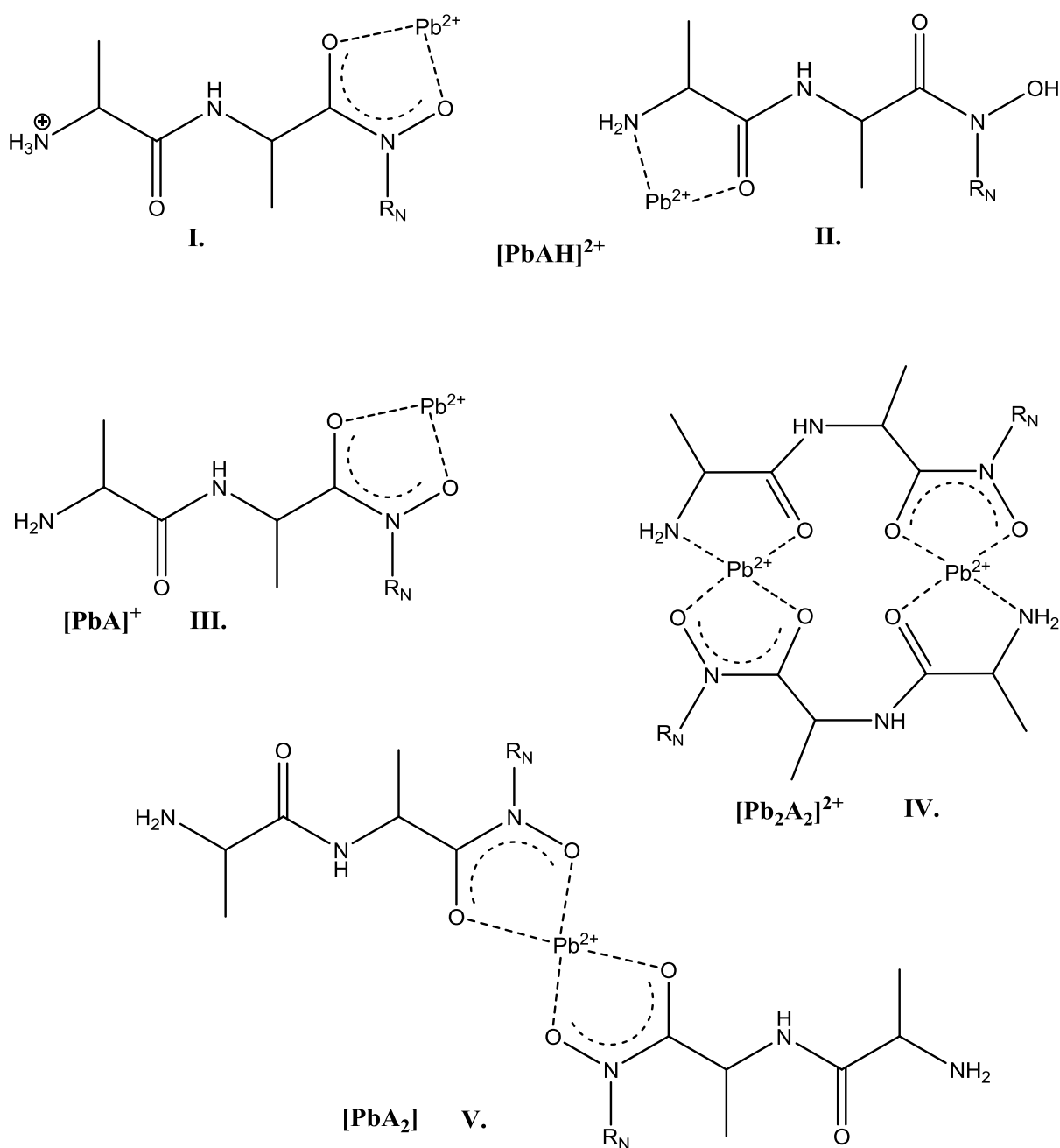
Amint az az 1. táblázat adatai alapján látható, a komplexképződés mindkét esetben két modellel írható le, melyek jó illeszkedést adtak. Az „A” modell szerint $[\text{PbA}]^+$ komplex keletkezik, ami a „B” modellben $[\text{Pb}_2\text{A}_2]^{2+}$ komplexszel helyettesíthető a számolás során. Ezen két összetételű komplex között pH-potenciometriával nem tudunk különbséget tenni, hiszen képződésük egyforma pH-effektussal jár.

A komplexképződés mindkét rendszer esetén $\text{pH} = 4$ körül indul $[\text{PbAH}]^{2+}$ komplex keletkezésével. Ezen összetételű komplex a 15. ábrán látható **I.** vagy **II.** szerkezettel adható meg. A pH további emelésével a $[\text{PbAH}]^{2+}$ -ból az „A” modell szerint $[\text{PbA}]^+$ komplex keletkezik (15. ábra, **III.** szerkezet), míg a „B” modellben $[\text{Pb}_2\text{A}_2]^{2+}$ összetételű komplex jön létre (15. ábra, **IV.** szerkezet).

Az „A” modellt feltételezve a 3. egyenlet szerint számolt $\text{p}K_{\text{PbAH}}$ értékek mindkét rendszer esetén gyakorlatilag megegyeznek a ligandumok ammóniumcsoportjainak protonálódási állandóival, így arra következtethetünk, hogy a terminális aminocsoport nem vesz részt a fémion megkötésében, így a 15. ábrán látható **I.** szerkezetű komplexek kialakulása feltételezhető a $[\text{PbAH}]^{2+}$ komplexek esetén.

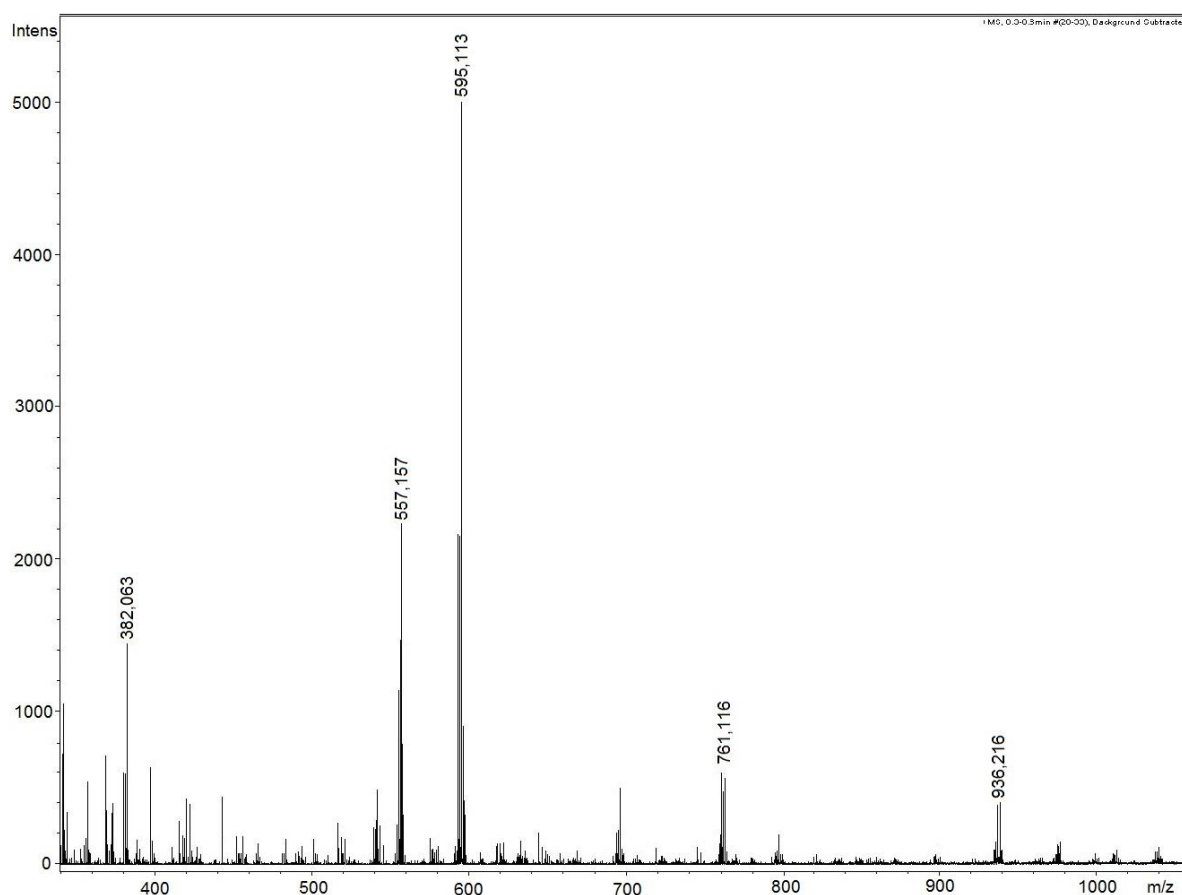
Tovább növelve a pH-t két ligandum koordinációjával kialakul a $[\text{PbA}_2]$ összetételű komplex, melynek szerkezete a 15./V. ábrán látható. A $\log(K_{\text{PbA}}/K_{\text{PbA}_2})$ értékből megállapíthatjuk, hogy a K_{PbA_2} mindkét rendszer esetén kb. két nagyságrenddel kisebb, mint a K_{PbA} , tehát a $[\text{PbA}_2]$ összetételű biszkomplex keletkezése nem kedvezményezett, képződése a hidroxokomplexek mellett várható.

A pH-potenciometriás mérések alapján megállapítható, hogy a két ligandum nem mutat számottevő különbséget az Pb^{2+} -ion megkötő képességükben. A primer peptidhidroxámsav (mely esetén hidroximát kelát kialakulása is lehetséges) úgy viselkedik, mint a szekunder peptidhidroxámsav, ami arra enged következtetni, hogy a peptidváz koordinációja nem valószínű.



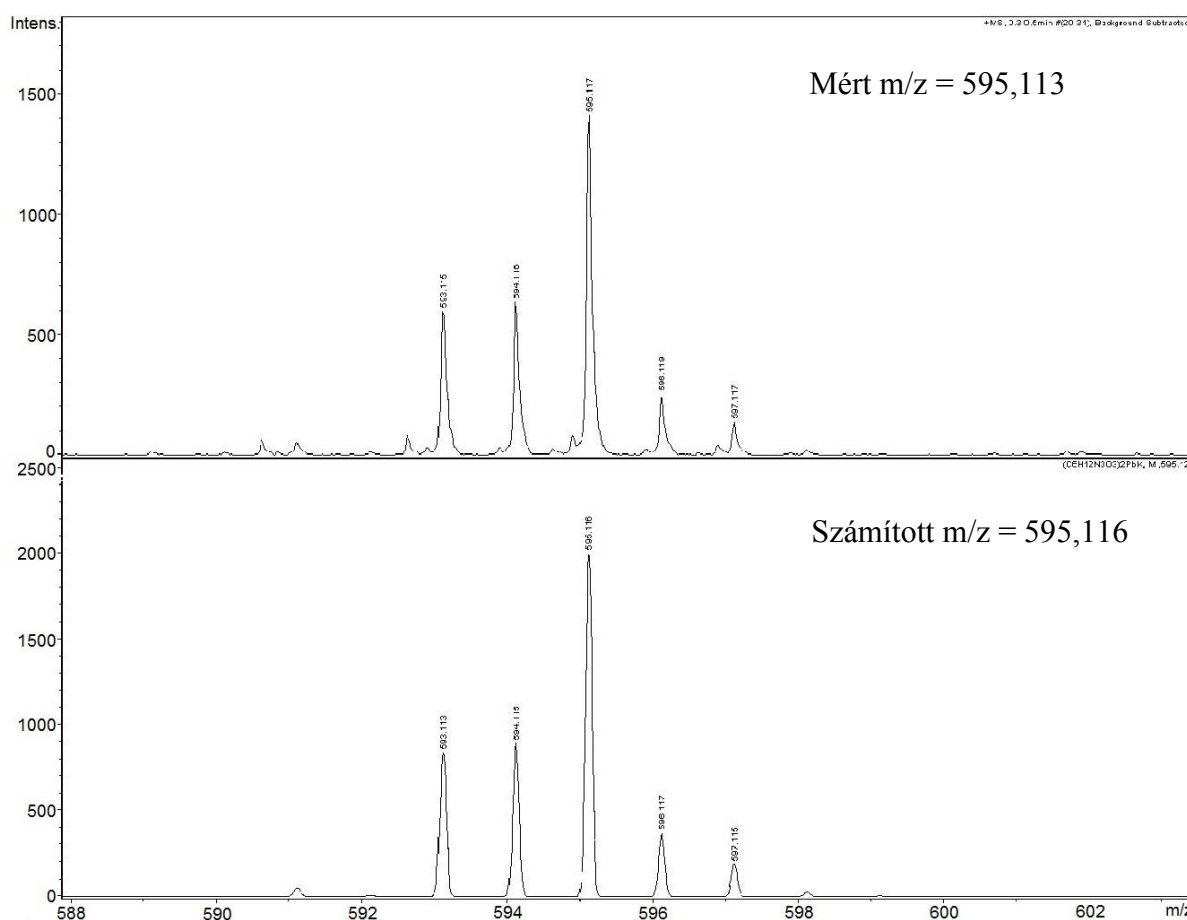
15. ábra: A képződő komplexek lehetséges oldatbeli szerkezetei

A pH-metriás modell alátámasztására, valamint a monomer-dimer kérdés eldöntésére ESI-MS-spektrometriás méréseket is végeztünk. Az MS mérésekkel azonosítottuk a $[PbA]^+$, valamint a $[PbA_2]$ semleges komplex H^+ - és K^+ -ionokkal alkotott molekulaionjait. Reprezentatív példaként a 16. ábrán az Pb(II)-AlaAlaNH₂OH 1:1 fémion-ligandum arányú rendszer tömegspektruma látható 8,65-ös pH-n.



16. ábra: Az Pb(II)-AlaAlaNH₂ rendszer ESI-MS spektruma 1:1 fémion-ligandum arány mellett, pH = 8,65

A 16. ábrán látható, hogy a legintenzívebb csúcsot az 595,113-as m/z értékkel rendelkező $[\text{PbA}_2]\text{K}^+$ ion adta. A második legintenzívebb csúcs (m/z = 557,157) is ehhez a komplexhez rendelhető, ám ekkor protonnal ionizált formában repül. A 382,063-as csúcs a $[\text{PbA}]^+$ komplextől származik. Megfigyelhető még, hogy kis mennyiségben keletkezett egy 761,116 m/z értékkel rendelkező ion is, ami a $[\text{Pb}_2\text{A}_2\text{H}_2]^+$ -hoz rendelhető. A csúcsokhoz tartozó összetételt a számított és a mért izotópeloszlások összehasonlításával végeztük. A 17. ábrán a legintenzívebb csúcs számított és mért izotópeloszlása látható.



17. ábra: A mért és számított izotópeloszlások $[\text{PbA}_2]\text{K}^+$ ionra

Mint ahogy az a 17. ábrán látható, a mért és számított izotópeloszlások a $[\text{PbA}_2]\text{K}^+$ ion esetében megegyeznek, ami igazolja a komplex összetételét. Ez az egyezés az összes detektált részecske esetén fennáll. A főbb csúcsok esetén mért és számított m/z értékeket a 2. táblázatban foglaltam össze.

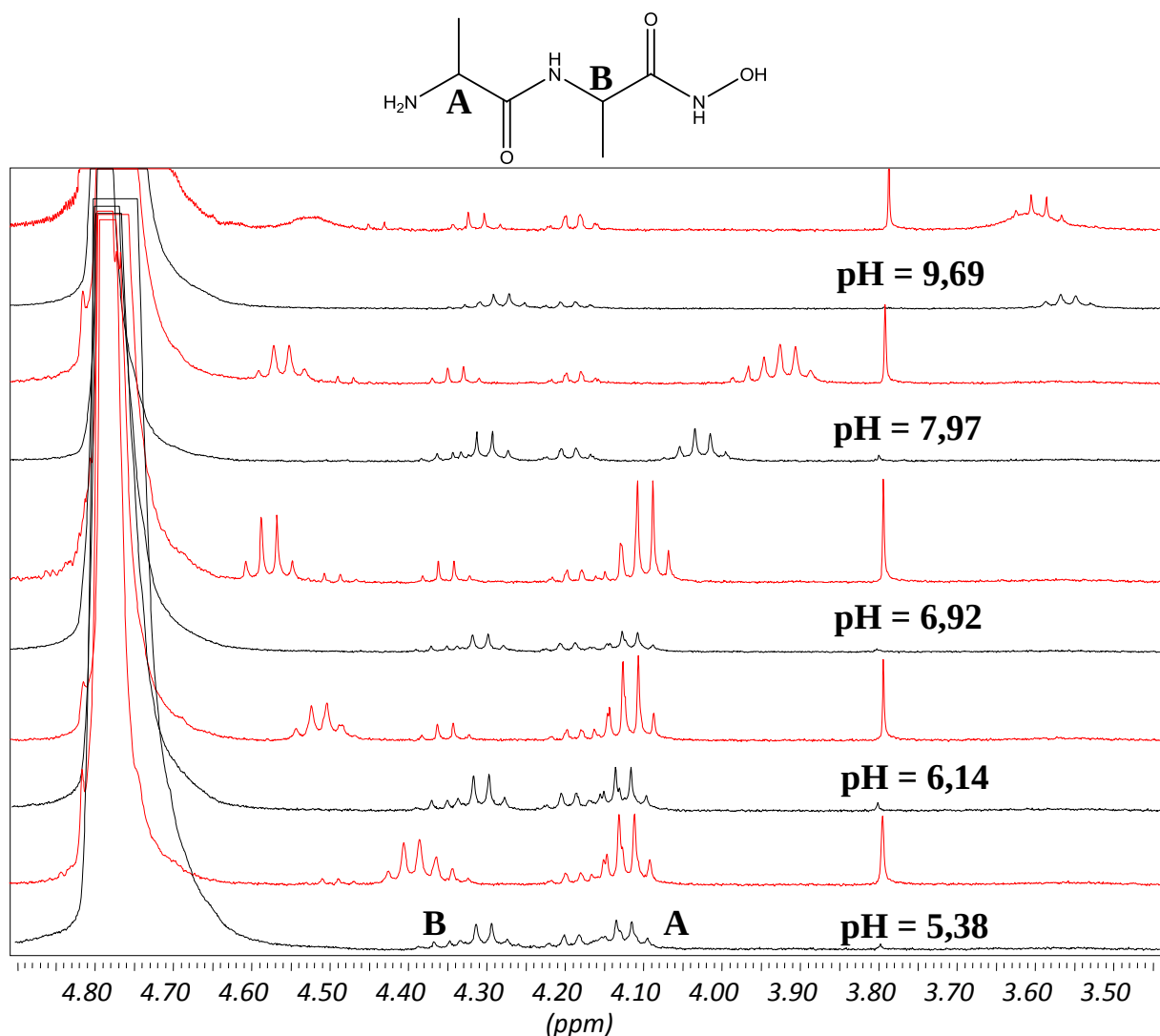
2. táblázat: Az Pb(II)-AlaAlaNHOH rendszerben keletkezett komplexek mért és számított m/z értékei

Részecske	Számított m/z	Mért m/z
$[\text{PbA}]^+$	382,064	382,063
$[\text{PbA}_2]\text{H}^+$	557,160	557,157
$[\text{PbA}_2]\text{K}^+$	595,116	595,113
$[\text{Pb}_2\text{A}_2\text{H}_2]\text{H}^+$	761,119	761,116

A tömegspektrumban (16. ábra) jól látható, hogy jelen van $[\text{PbA}]^+$ és a dimernek megfelelő $[\text{Pb}_2\text{A}_2\text{H}_2]^+$ is. Ezen eredmények alapján a pH-metriás „A” és „B” modell is megfelelő lehet. Ennek eldöntésére vizsgálatainkat ^1H -NMR mérésekkel is kiegészítettük.

A ^1H -NMR mérések során különböző pH-jú ligandum mintákat, valamint 1:1 fémion-ligandum arányú rendszereket mértünk. A szabad ligandumok metin protonjai (18. ábra, fent) érzékenyek mind a deprotonálódásra, mind pedig a koordinációra, ezért a komplexképződést a ligandum metin jeleinek kémiai eltolódás változásán keresztül követtük.

A 18. ábrán a szabad AlaAlaNH₂ különböző pH-értékeken regisztrált ^1H -NMR spektrumai láthatóak feketével jelölve, míg piros színnel az Pb(II)-AlaAlaNH₂ 1:1 fémion-ligandum arányú rendszer ^1H -NMR spektrumait jelöltem. Az ábrákon a ligandum metin jelei láthatók, „A” jelöli az aminocsoport melletti, „B” pedig a hidroxámsavcsoportoz közlebbi metin hidrogéneket.

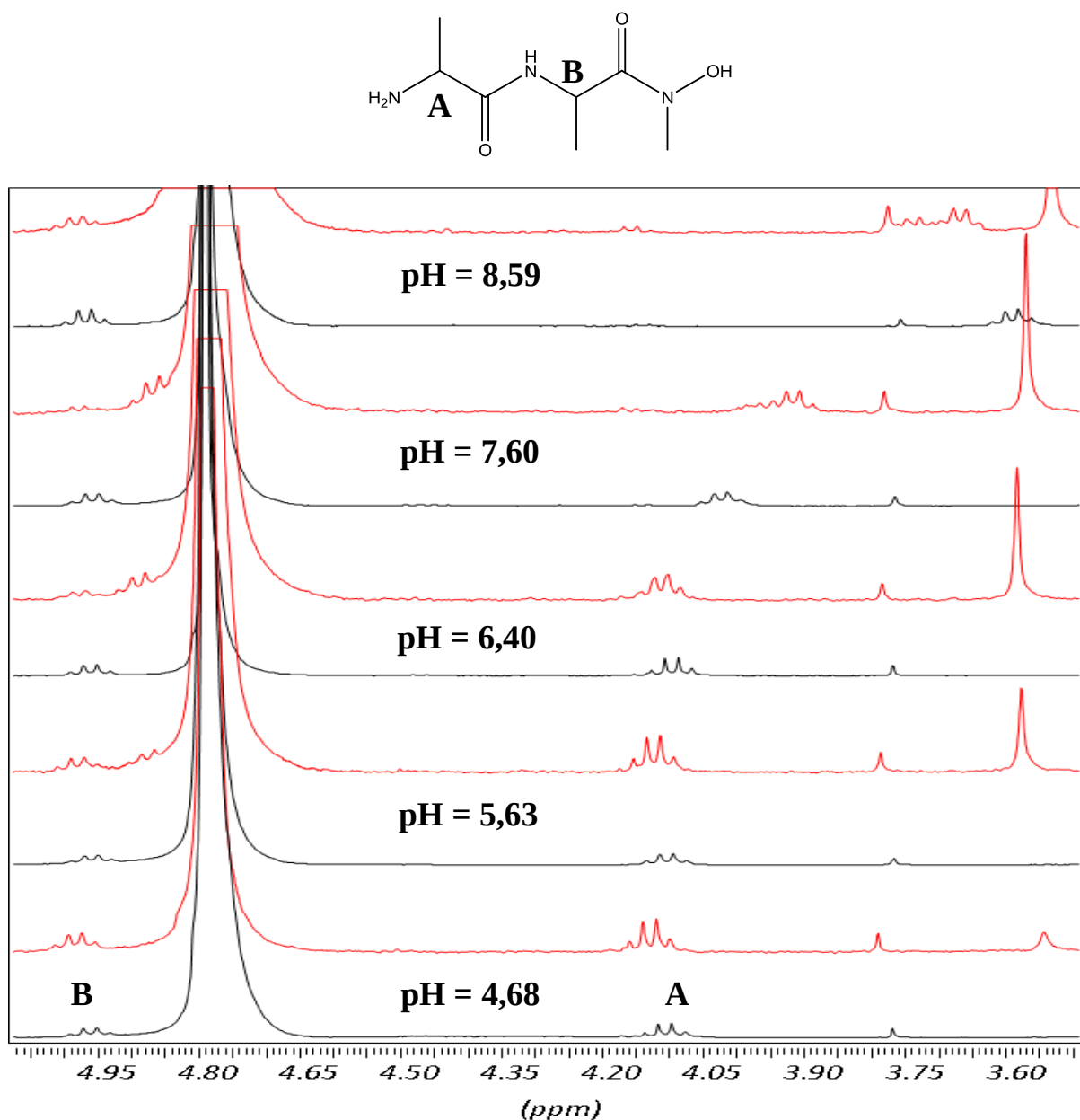


18. ábra: Az AlaAlaNH₂ metin jelei (fekete) és az Pb(II)-AlaAlaNH₂ 1:1 fémion-ligandum arányú rendszer (piros) ^1H -NMR spektrumai különböző pH-értékeken

Ahogy azt a 18. ábrán a szabad ligandum fekete színnel jelölt spektrumain láthatjuk, a pH emelésével az aminocsoporthoz közelebbi „A” metin jel kémiai eltolódása pH = 7 fölött a nagyobb mágneses térerősség felé mozdul, ami az ammóniumcsoport deprotonálódását jelzi. A pH további emelése révén pH = 8 felett a hidroxámsavcsoporthoz közelebbi metin jel kémiai eltolódása is kis mértékben a kisebb kémiai eltolódás felé változik, ami a hidroxámsavcsoport deprotonálódását jelzi. Ez azt jelenti, hogy az ammóniumcsoport savasabb, mint a hidroxámsavcsoport, ami összhangban van az irodalomban korábban közölt megállapítással.⁴

Az Pb(II)-iont is tartalmazó minták pirossal jelzett spektrumain azt láthatjuk, hogy pH=4 fölött a hidroxámsavcsoporthoz közelebbi „B” metin jel kémiai eltolódása a pH emelésével folyamatosan nő, ami hidroxamát koordinációra utal, tehát a $[\text{PbAH}]^{2+}$ szerkezete a 15. ábrán látható **I.** szerkezetnek felel meg. Ez a változás egészen kb. pH = 7-ig tart, amikor az aminocsoporthoz közelebbi metin jel a nagyobb mágneses térerősség felé tolódik. Mivel ez a változás nagyobb mértékű, mint amit a szabad ligandum esetén tapasztaltunk, ezért $[\text{N}_{\text{amino}}, \text{O}_{\text{karbonil}}]$ koordinációra következtethetünk. Tehát ezen megállapítások is alátámasztják, hogy a $[\text{Pb}_2\text{A}_2]^{2+}$ összetételű komplex is képződik a rendszerben, mely legvalószínűbb szerkezete a 15. ábrán feltüntetett **IV.** szerkezettel adható meg.

A méréseket megismételtük az AlaAlaN(Me)OH illetve az Pb(II)-AlaAlaN(Me)OH 1:1 fémion-ligandum arányú rendszer esetén is. A kapott spektrumok a 19. ábrán láthatók.



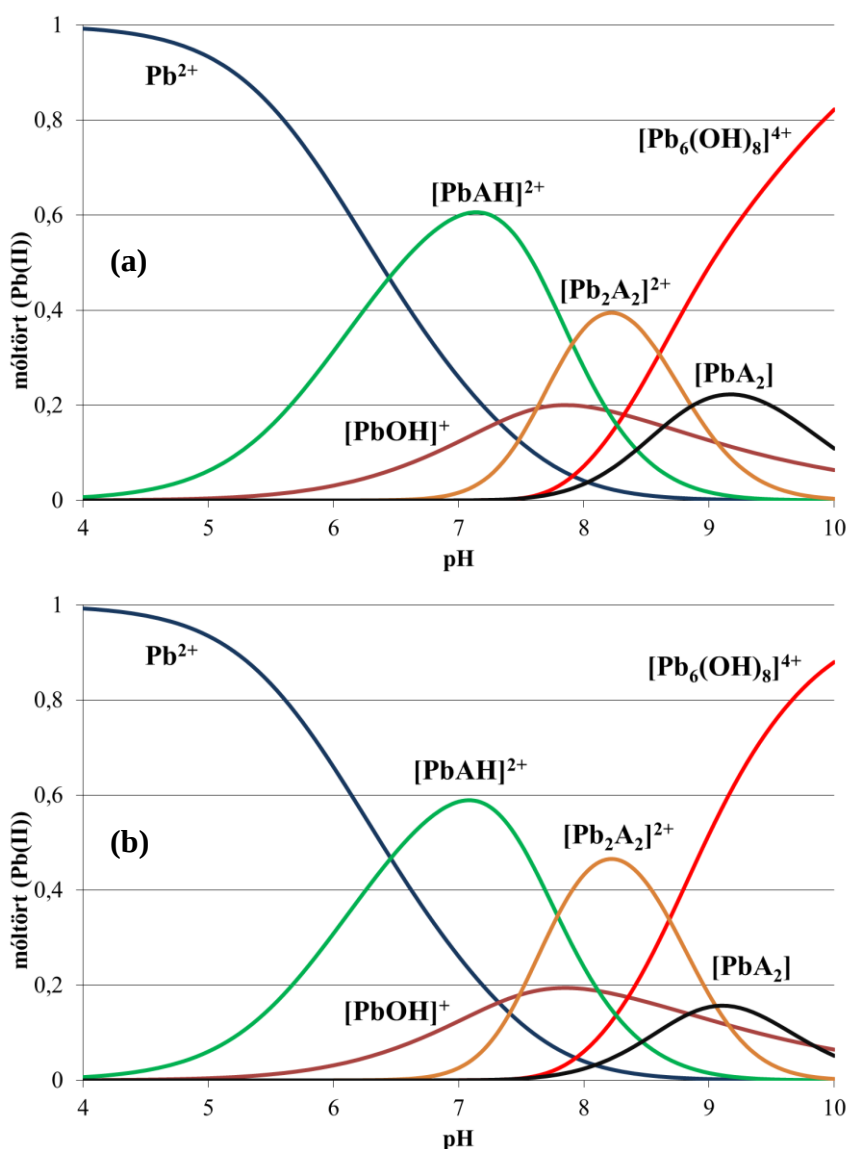
19. ábra: Az AlaAlaN(Me)OH metin jelei (fekete) és az Pb(II)-AlaAlaN(Me)OH 1:1 fémion-ligandum arányú rendszer (piros) ¹H-NMR spektrumai különböző pH-értékeken

A 19. ábrán feltüntetett spektrumokon ugyanazok a kémiai eltolódás változások figyelhetők meg, mint a primer dipeptidhidroxámsav esetén, azzal a különbséggel, hogy az ólom(II) tartalmú rendszerek esetén jelkettőződést figyelhetünk meg a „B” jelű metin protonok esetén, ami lassú ligandumcserére utal. Ez szintén összhangban van azzal az irodalomban megállapított ténnyel, miszerint a szekunder hidroxámsavak kinetikailag inertebb komplexet alkotnak az ólom(II)ionokkal, mint a primer hidroxámsavak.³

A 18. és 19. ábrabeli megfelelő spektrumok nagyfokú hasonlósága is alátámasztja az azonos pH-potenciometriás modelleket a kétféle ligandumra. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy a primer peptidhidroxámsav esetén sem alakul ki a peptidváz koordinációja.

A fenti NMR eredmények alapján feltételezhetjük a „B” modell helyességét, hiszen a ^1H -NMR mérésekből megállapítottuk, hogy $\text{pH} = 4$ fölött bekövetkezik a hidroxamát koordináció, majd $\text{pH} = 7$ fölött bekövetkezik az $[\text{N}_{\text{amino}}, \text{O}_{\text{karbonil}}]$ koordináció is, ezen kötési mód pedig a $[\text{Pb}_2\text{A}_2]^{2+}$ IV. szerkezetű komplex kialakulása során valósul meg.

E következtetés alapján elkészítettük az Pb(II)-AlaAlaNH OH és az Pb(II)-AlaAlaN(Me) OH rendszerek koncentráció eloszlási görbéit 1:1 fémion-ligandum arány mellett, melyek a 20. ábrán láthatók.



20. ábra: Az Pb(II)-AlaAlaNH OH (a) és az Pb(II)-AlaAlaN(Me) OH (b) 1:1 fémion-ligandum arányú rendszerek koncentráció eloszlási görbéi, $c_{\text{Pb(II)}} = c_{\text{lig}} = 1,5 \text{ mM}$

A két rendszer koncentráció eloszlási görbéit (20. ábra) összevetve megállapíthatjuk, hogy nincs jelentős különbség a két rendszer között. A komplexképződés mindkét esetben $\text{pH} = 4$ fölött indul a $[\text{PbAH}]^{2+}$ komplex képződésével, majd $\text{pH} = 7$ fölött indul a $[\text{Pb}_2\text{A}_2]^{2+}$ keletkezése, $\text{pH} = 9$ fölött pedig megjelenik a $[\text{PbA}_2]$ komplex is. Ezek összhangban vannak a ^1H -NMR mérésekkel, miszerint $\text{pH} = 4$ fölött hidroxamát koordináció történik, tehát a $[\text{PbAH}]^{2+}$ összetételű komplexhez feltehetően az **I.** szerkezet tartozhat. Azt is megállapítottuk, hogy $\text{pH} = 7$ fölött $[\text{N}_{\text{amino}}, \text{O}_{\text{karbonil}}]$ koordináció történik, és a koncentráció eloszlási görbén láthatjuk, hogy ekkor kezd képződni a $[\text{Pb}_2\text{A}_2]^{2+}$ komplex.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkám során az ólom(II)ionok kölcsönhatását vizsgáltam két dipeptidhidroxámsavval, az AlaAlaNH₂-val és az AlaAlaN(Me)OH-val pH-potenciometriás, ¹H-NMR spektroszkópiás és ESI-MS spektrometriás módszerek segítségével. Mivel korábbi vizsgálatok nem mutattak erős kölcsönhatást az igen toxikus ólom(II)ionok és monohidroxámsavak között, ezért jelen munkában a dipeptidhidroxámsavakkal végeztünk vizsgálatokat, melyek az oxigén donoratomokon túl softabb karakterű nitrogén atomokat is tartalmaznak. Mivel a szekunder származék nem állt rendelkezésünkre, ezért azt mi magunk állítottuk elő.

A pH-potenciometriás eredmények alapján két modellt feltételeztünk attól függően, hogy $[PbA]^+$ vagy $[Pb_2A_2]^{2+}$ komplex keletkezik-e. Ennek eldöntésére ESI-MS vizsgálatokat végeztünk különböző pH-jú rendszereken, és azt kaptuk, hogy keletkezik $[PbA]^+$ komplex, de jelen van a $[Pb_2A_2]^{2+}$ is. Összhangban a pH-potenciometriás modellel, ¹H-NMR mérésekkel kimutattuk, hogy 1:1 fémion-ligandum arány mellett pH = 4 fölött a $[PbAH]^{2+}$ komplexben hidroxamát kelát alakul ki, majd pH = 7 fölött $[N_{\text{amino}}, O_{\text{karbonil}}]$ kötési mód is detektálható, ami azt támasztja alá, hogy a hidroxamát kötési módú $[PbA]^+$ mellett $[Pb_2A_2]^{2+}$ is megjelenik. A „B” modellnek megfelelő koncentráció eloszlási görbék ábrázolása után láthatóvá vált, hogy a pH-potenciometria, valamint a ¹H-NMR spektroszkópia összhangban van egymással, ezért a „B”modell helyességét feltételezhetjük.

A különböző vizsgálati módszerekkel nyert eredmények alapján összességében elmondható, hogy nem mutatkozott számottevő különbség a primer és szekunder dipeptidhidroxámsavak ólom(II)ion megkötő képessége között. Hidroximát kelát kialakulását egyik rendszer esetén sem tudtuk kimutatni, mint ahogy szintén nem tudtuk igazolni a peptidváz koordinációját sem. Továbbá a vizsgálatok során arra is fény derült, hogy a peptidváz jelenléte nem eredményezi stabilabb ólom(II) komplexek kialakulását a monohidroxámsavakhoz képest.

7. SUMMARY

In this study we have investigated the interactions between toxic lead(II)ions and two peptide hydroxamic acids, AlaAlaNH₂OH and AlaAla(Me)OH by the methods of pH-potenciometry, ESI-MS and ¹H-NMR. It has been shown earlier that monohydroxamic acids are not effective lead(II) binders. Therefore, we extended our study in this work to the complexation of peptide hydroxamic acids containing softer N donor atoms too beside the (O,O) donor set. The AlaAlaN(Me)OH was also prepared during this work.

According to the pH-potenciometric results, we suppose two models differing only on the formation of [PbA]⁺ or [Pb₂A₂]²⁺ complexes. In order to distinguish between the models we have carried out ESI-MS investigations in metal ion containing systems at different pH values. We have detected the coexistence of [PbA]⁺ and [Pb₂A₂]²⁺. pH-potenciometric and ¹H-NMR results indicated that for 1:1 metal ion to ligand ratio, above pH = 4 [PbAH]²⁺ with hydroxamate coordination is formed. Above pH = 7 [N_{amino},O_{carbonyl}] formation can be detected, suggesting the parallel formation of hydroxamate type [PbA]⁺, [Pb₂A₂]²⁺. After plotting the concentration distribution curves for model „B” and taking into account the ¹H-NMR results we suppose that model „B” is the correct.

As a result of different investigation methods, we could not make a distinction between lead(II)ion binding capability of primary and secondary peptide hydroxamic acids. We were able to detect neither the formation of hydroxamate type chelate nor the coordination of the peptide framework. Moreover, our studies indicate that the presence of the peptide framework does not result in the formation of more stable Pb(II)-complexes than those of monohydroxamates.

8. IRODALMI HIVATKOZÁSOK

1. Kiss T.; Gajda T.; Gyurcsik B. *Bevezetés a bioszervetlen kémiába*, Nemzeti Tankönyvkiadó, **2007**
2. Greenwood, N. N.; Earnshaw, A. *Az elemek kémiája*, Nemzeti Tankönyvkiadó, **2004**.
3. Bátka D. *Doktori (PhD) értekezés*, Debreceni Egyetem, Debrecen, **2007**
4. Nagy E. M. *Doktori (PhD) értekezés*, Debreceni Egyetem, Debrecen **2006**
5. Codd, R. *Coord. Chem. Rev.*, **2008**, 252, 1387-1408.
6. Bátka D.; Farkas E. *J. Inorg. Biochem.*, **2006**, 100, 27-35.
7. Anuar, K.; Hamdan, S. *Talanta*, **1992**, 39, 1653-1656
8. Buglyó P.; Nagy E. M.; Farkas E.; Sóvágó I.; Sanna, D.; Micera, G. *Polyhedron*, **2007**, 26, 1625-1633
9. Zékány L.; Nagypál I. in *Computational Methods for the Determination of Stability Constants*, ed.: Leggett, D., Plenum Press, New York **1985**
10. Irving, H.M., Miles, M.G., Pettit, L.D. *Anal. Chim. Acta*, **1967**, 38, 475-488
11. Gans, P.; Sabatini, A.; Vacca, A. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1985**, 1195