



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék

TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI DOLGOZAT

Egy új C-terminális hisztidint tartalmazó tripodális peptid előállítása és réz(II)komplexeinek vizsgálata

KÉSZÍTETTE:

Borsos Péter

Kémia Bsc, V. szemeszter

TÉMAVEZETŐ:

Dr. Gajda Tamás egyetemi tanár

Dancs Ágnes PhD hallgató

Szeged

2014

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés és irodalmi áttekintés	2.
1.1. Tripodális ligandumok/peptidek, mint enzimmodellek	2.
1.2. Hisztidintartalmú peptidek fémkötő sajátságai	4.
1.3. Peptidkomplexek enzimutánzó katalitikus tulajdonságai	5.
2. Célkitűzés	9.
3. Kísérleti rész.....	10.
3.1. Szintézis és tisztítás	10.
3.2. Potenciometria	11.
3.3 UV-Vis spektrofotometria, CD spektroszkópia	12.
3.4. Az enzimutánzó aktivitás mérése	13.
3.4.1. Szuperoxid-dizmutáz aktivitás	14.
3.4.2. Pirokatechin-oxidáz aktivitás	16.
4. Kísérleti eredmények és értékelésük	19.
4.1. A ligandum azonosítása, tisztítása	19.
4.2. A ligandum oldategyensúlyi viszonyai	21.
4.3. A ligandum réz(II)komplexei	22.
4.4. A réz(II) komplexek enzimutánzó sajátsága.....	31.
4.4.1. Pirokatechin-oxidáz aktivitás	31.
4.4.2. Szuperoxid dizmutáz aktivitás vizsgálata.....	35.
5. Összefoglalás.....	37.
6. Irodalomjegyzék.....	38.

1. Bevezetés és irodalmi áttekintés

1.1. Tripodális ligandumok/peptidek, mint enzimmodellek

A modern bioszervetlen kémiai kutatások egyik fő területe a metalloenzimek működésének mind részletesebb megértése, valamint a gyakorlat számára is hasznos mesterséges enzimek kifejlesztése. Az ilyen kisméretű enzimutánzó tulajdonságú molekulák alkalmazásának számos előnye van a natív enzimekkel szemben: szerkezetük viszonylag egyszerű, feltérképezhető, térszerkezetük és működésük sokkal kevésbé érzékeny a környezeti hatásokra (pH, ionerősség, oldószer, hőmérséklet stb.), így sejten kívüli környezetben is vizsgálhatóak, s a vizsgálati eredmények könnyebben értelmezhetőek (pl. spektroszkópiai vizsgálatok). Egyszerűbb felépítésük miatt kontrolláltan módosíthatóak, ami által a katalitikus hatás optimálható. Ezen kívül sok esetben olcsóbbak/könnyebben előállíthatóak vagy nyerhetőek, mint az enzimek, s viszonylag hosszú ideig eltarthatók.

A metalloenzimek aktív centrumában lévő fémionok számos módon járulhatnak hozzá a katalitikus aktivitásához:

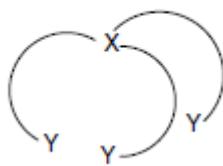
- a) a szubsztrát koordinációja révén aktiválja azt (Lewis-sav aktiválás),
- b) stabilizálhatja az átmeneti állapotot, ezzel csökkentve az aktiválási energiát,
- c) stabilizálhatja a távozó csoportot,
- d) vegyértékváltó fémionok közvetlenül segíthetnek az elektronátmenet megvalósulásában.

Ideális esetben ezek a modellkomplexek esetében is megjelennek. Könnyen belátható, hogy az enzimutánzó komplex nagy termodinamikai stabilitása mellett, fenti funkciók kialakításához/finomhangolásához elengedhetetlen ligandumunk szerkezeti variálhatósága.

Ezen elvárásoknak megfelelhetnek az ún. tripodális peptidek.

A koordinációs kémiában már régóta jól ismert a *tripodális ligandumok* előnyös fémkötő sajátságai. Az irodalomban vizsgált legegyszerűbb tripodális ligandumokra (ld. 1. ábra) általánosan jellemző, hogy megfelelő hosszúságú „lábak” esetén preferálják az ötös koordinációs számú geometriákat, ahol maga a ligandum négyfogú koordinációt valósít meg [1]. A komplexek geometriája – fémiontól, ill. az ötödik kötőhelyen koordinálódó ligandumtól függően - trigonális bipiramis vagy tetragonális piramis (vagy a kettő közötti átmenet) lehet. Ez a koordinációs elrendeződés igen előnyös lehet az enzimutánzó komplexek kifejlesztése szempontjából, hiszen az ötödik pozícióban gyengébben koordinálódó donorcsoport viszonylag könnyen lecserélhető pl. egy szubsztrátmolekulára, vagyis az

aktivitást biztosító fémcentrum hozzáférhetővé válik a szubsztrát számára, egy metalloenzim aktív centrumához hasonlóan.



1. ábra: Egy négyfogú tripodális ligandum általános szerkezete.

Az ilyen tripodális ligandumok további funkcionálizálása különleges tulajdonságok kialakítását eredményezheti, pl. elősegíthető a szubsztrát megkötése és aktiválása (pl. sav/bázis katalízis révén), vagy további fémion(ok) megkötődése válik lehetővé. Így, ezek ígéretes alapvegyületek lehetnek az enzimutánczó komplexek kialakítása szempontjából.

A képződő komplexek kiemelkedő stabilitását a tripodális szerkezet által biztosított csatolt kelátgyűrűrendszer okozza. Megfelelő donorcsoportok jelenlétében e ligandumok lehetővé teszik a metalloenzimek aktív centrumára hasonlító, szerkezetileg viszonylag merev, preorganizált fémkötőhelyek kialakulását. Emellett a tripodális ligandumok alkalmasak lehetnek arra, hogy a fémion körül 4-és és/vagy 5-ös koordinációs számú geometriákat stabilizáljanak, melyek az enzimek aktív centrumában elterjedten fordulnak elő. Bár még ezzel a tripodális 'állványzattal' sem lehetséges a metalloenzimek aktív centrumának bonyolultságát visszaadni, az ilyen komplexek felfoghatók az aktív centrum egyszerűsített szerkezeti modelljeként.

Az irodalomban tripodális pszeuropeptid ligandumok fémionkoordinációjának vizsgálatára csak nagyon kevés adat található. *Pujol* és kutatótársai egy nitrilotriecetsav (NTA) alapú ciszteintartalmú ligandumot állítottak elő és vizsgáltak a réz(I)ionok szelektív megkötése céljából. [2], ui. az emberi szervezetben a réz metabolizmus során fellépő rendellenességek eredményeképpen kialakulhatnak intracelluláris rézfeldúsulások, amelyek sejtkárosodást okoznak. Ez a ciszteintartalmú kelátor nagy stabilitással köti meg a Cu(I)-iont ($\log\beta=19.2$, pH=7.4). *Gelinsky* és munkatársai hisztidin- és cisztein-etilésztert kapcsoltak aromás (benzol-1,3,5-trikarbonsav) és alifás jellegű (trisz(karboxietil)nitrometán) tripodális alapokhoz peptidkötés kialakításával. A ligandumok cink(II)komplexei a szénsavanhidráz ill. a mátrix metalloproteináz enzimek biomimetikus modelljeiként foghatóak fel, melyek alkalmasak lehetnek hidrolitikus hasítások elősegítésére is [3]. *Ibrahim* és munkatársai pedig három TREN-alapú tripodális N_π -benzilhisztidin származék előállítását és vizsgálatát végezték el,

melyek cink(II)komplexei hatékonyan képesek katalizálni a foszfortriészterkötés hidrolízisét [4]. Szabad imidazol- és karboxilát-csoportokat tartalmazó tripodális peptidet ismereteink szerint eddig még nem vizsgáltak.

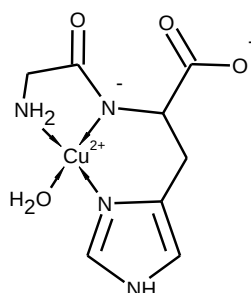
1.2. Hisztidintartalmú peptidek fémkötő sajátosságai

A koordinációs kémia által előszeretettel vizsgált biológiai ihletésű ligandumok a peptidek, melyek az élő szervezetben működő fehérjék építőelemei. Már legegyszerűbb képviselőik koordinációs sajátosságai is nagyfokú eltérést mutatnak az aminosavak tulajdonságaihoz képest: di-, tri- és oligopeptidek fémkomplexei esetén a növekvő tagszámmal egyre kevésbé tud megvalósulni az aminosavaknál jellemző kétfogú $\{NH_2, COO^-\}$ koordináció, mert az amino- és a karboxilcsoport már túlságosan távol helyezkedik el egymástól ahhoz, hogy stabilis kelátgyűrű alakuljon ki. Azonban az átmenetifémionok egy része (pl.: arany(III)-, palládium(II)-, réz(II)-, nikkel(II)- és ritkábban a cink(II)ion) képes elősegíteni a peptidek amidnitrogénjének deprotonálódását. Ekkor nagy stabilitású, csatolt kelátgyűrűs szerkezet, az ún. peptidszerű koordináció alakulhat ki a fémion körül.

A legegyszerűbb hisztidint és peptidkötést is tartalmazó ligandumok a dipeptidek. Ezeket többféleképpen csoportosíthatjuk: (a) a hisztidin pozíciója szerint megkülönböztethetünk N- és C-terminális hisztidint tartalmazóakat, (b) terminálisan védett-, illetve nem védett peptideket, valamint (c) a hisztidin melletti aminosav természete szerint koordinálódó, ill. nem koordinálódó oldalláncot tartalmazó peptideket. A szabad terminálissal rendelkező peptidek komplexkémiájáról, melyek hisztidint és nem koordinálódó oldalláncú aminosavat tartalmaznak, számos irodalmi hivatkozás lelhető fel. Ezen ligandumok a His-X és X-His (ahol X = glicin, alanin, valin és fenilalanin), koordinációs viselkedésük szemléletesen bemutatható a réz(II)ionokkal képzett komplexein keresztül.

A hisztidint az N-terminálison tartalmazó His-X ligandum semleges körüli pH-n domináns réz(II)komplexe a CuL_2 , ahol a réz(II) koordinációs szférájában két kelátgyűrű alakulhat ki. A a láncvégi $-NH_2$ és az imidazolnitrogén részvételével kialakuló hattedű kelátgyűrű az ún. hisztamin-típusú koordináció jellemzője az igen nagy stabilitás, ami több pH-egységgel eltolhatja, vagy ligandumfelesleg esetén meg is akadályozhatja az amidnitrogének fémion-indukált deprotonálódását [5,6]. Ennek megfelelően a His-Gly peptid CuL_2 komplexének kiemelkedő stabilitása miatt nem alakul ki a lúgos pH-tartományban sem amidkoordinált részecske.

Ha a hisztidint C-terminális helyzetbe építjük be a peptidbe, akkor lehetővé válik az amino-, az amid- és az imidazolnitrogének egyidejű koordinációja a komplexben. A Gly-His dipeptid réz(II)komplexei esetében már pH 4 környékén kialakul a domináns CuH_{-1}L részecske, amely pH 10-ig egyeduralkodó az oldatban. A komplex kiemelkedő stabilitása egy csatolt öttagú $\{\text{NH}_2, \text{N}^-\}$ és egy hattagú $\{\text{N}^-, \text{N}_{\text{im}}\}$ kelátgyűrűpár kialakulásának az eredménye [5,6].



2. ábra: A Gly-His peptid CuH_{-1}L komplexének szerkezete.

Az így kialakuló réz(II)komplex koordinációs szférája telítetlen, a negyedik pozíciót pl. egy vízmolekula, ligandumfelesleg esetén egy másik ligandum foglalhatja el. A lúgos pH tartományban ezt a pozíciót egy másik ligandum deprotonált imidazolát-nitrogénje is elfoglalhatja, ennek következtében egy sajátos tetramer komplex, az imidazoláthidas $\text{Cu}_4\text{H}_{-8}\text{L}_4$ részecske jön létre [6].

Ezek alapján megállapítható, hogy a kis tagszámú peptidek koordinációs sajátosságait illetően a hisztidin aminosavak száma mellett annak a szekvenciában elfoglalt helyzete is döntően befolyásolja a képződő komplexek stabilitását és szerkezetét.

1.3. Peptidkomplexek enzimutánzó katalitikus tulajdonságai

A réz a növény- és állatvilágban egyaránt igen elterjedten előforduló nyomelem: az átmenetifémek közül csak a vas és a cink fordul elő nála nagyobb mennyiségben. A rezet tartalmazó fehérjék számos folyamatban érintettek az élő szervezetben; pl. oxigénszállítás, elektronszállítás, illetve redoxi folyamatokat katalizáló enzimek alkotóelemei. A felnőtt emberi szervezetben a réz éppen az erős komplexképző sajátossága miatt szinte kizárólag fehérjékhez kötött formában (rézproteinekben) fordul elő. A biológiai szempontból aktív rézproteineket három fő típusba lehet sorolni [7]:

- 1. típusú vagy "kék"- rézfehérjék azok a proteinek, amelyek egyetlen rezet tartalmaznak egy erősen torzult, 2N(imidazol)-, S(tiol)-, S(tioéter)-donoratomok által meghatározott koordinációs környezetben. Ez a réz(II)-re jellemző síknégyszeges torzult

oktaéderes (4N donoratom) és a réz(I)-re jellemző tetraéderes (4S-donoratom) koordináció közötti átmenetet jelenti.

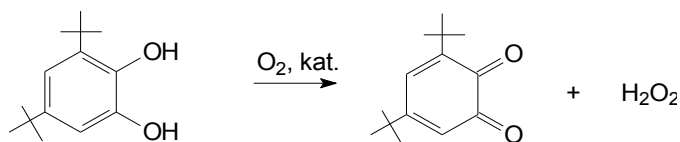
- A 2. típusú rézfehérjékben, torzult oktaéderes koordináció valósul meg, erős ekvatoriális és gyenge axiális kölcsönhatásokkal. Ebbe a típusba tartoznak többek közt a szuperoxid-dizmutáz enzimek.

- A 3. típusú rézfehérjék két réziont tartalmaznak egymástól kb. 360 pm távolságra. Ezekben a metalloproteinekben a réz a fehérjéhez hisztidil-oldalláncokon keresztül kapcsolódik. Ebbe a csoportba tartozó enzimek általában oxigenáz/oxidáz aktivitással is rendelkeznek. Ide tartozik pl. a hemocianin, a tirozináz és pirokatechin oxidáz is.

A pirokatechin oxidáz enzim funkciója a difenolok orto-kinonokká történő kételektronos oxidációjának elősegítése. Ezen oxidázok oxidált állapotában két mágnesesen összekapcsolt fémcentrum található, mindkettő három-három hisztidin imidazolnitrogén által koordinált [7], és egy hidroxohíddal vannak összekötve, amely elfoglalja a koordinációs szféra negyedik helyét a trigonális piramisos szerkezetben. A redukált formában egyik rézionhoz víz és három imidazolgyűrű koordinálódik torzult trigonális piramisos geometriában, a második fémcentrum síknégyszetes koordinációs geometriával (egy üres koordinációs helytel) rendelkezik.

A pirokatechin oxidáz típusú reakciók széleskörűen alkalmazottak az enzimutánzó fémkomplexek vizsgálata során. Általánosan elterjedt modellreakció a pirokatechin oxidáz aktivitás meghatározására a 3,5-di-tercbutil-pirokatechin (H_2DTBC) szubsztrát oxidációja dioxigénnel. A réz(II)tartalmú katalizátor jelenlétében lejátszódó reakció terméke kizárólag 3,5-di-tercbutil-1,2-benzokinon (DTBQ) és hidrogén-peroxid. Bár a pirokatechin oxidáz aktivitásnak nem előfeltétele a natív enzimre is jellemző kétmagvú rézcentrum megléte, ezen binukleáris komplexek azonban általában nagyobb aktivitással bírnak, amit a két rézion kooperativitásával lehet magyarázni [8].

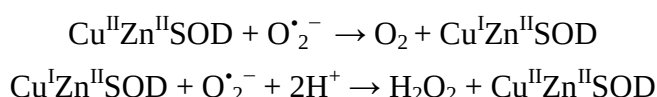
2002-ben publikált munkájukban Neves és munkatársai javaslatot tettek a kétmagvú rézkomplexek által katalizált reakció mechanizmusára [9], eszerint két fémionhoz koordinált vízmolekula deprotonálódása teszi lehetővé a katalízist, a két hidroxidiont a pirokatechin két OH-csoportja re-protonálja, s a két H_2O -t kiszorítva koordinálódik, így megtörténhet az oxidáció.



3. ábra: A 3,5-di-tercbutil-pirokatechin (H₂DTBC) modellszubsztrát katalitikus oxidációja.

Az elmúlt években több peptid típusú, ill. hasonló karakterű kismolekulás ligandum réz(II)komplexeinek pirokatechin oxidáz aktivitását vizsgálták a kutatócsoportban, illetve együttműködő partnerkutatócsoportokban. A peptid típusú komplexek körében elsőként az N-terminális végen védett Ac-HHGH-OH peptid CuH₁L komplexéről igazolták, hogy pH ~ 10 körüli optimummal katalizálja a H₂DTBC oxidációját [10]. *Speier* és munkatársai két tetrapiridil típusú ligandum rézkomplexeinek pirokatechin oxidáz aktivitását vizsgálták, részletes reakciómechanizmust mutatva be a kétmagvú rézkomplexek által történő katalízisre [8].

Az enzimutánzó rendszerek szintén gyakran vizsgált funkciója a SOD (szuperoxid dizmutáz) aktivitás. Az eukarióta szervezetekben a Cu/Zn-SOD metalloenzim végzi a nagy reaktivitású szuperoxid gyökanion katalitikus diszproporcionálását, ezáltal csökkenti az oxidatív stresszt. Ezen enzimből mind a Zn²⁺, mind a Cu²⁺ hisztidin oldalláncok imidazolnitrogénjei által van koordinálva. A rézcentrum a szuperoxid gyökanion által ciklikus folyamatban oxidálódik és redukálódik: az első lépésben a gyökanion redukálja a Cu/Zn-SOD réz(II)ionját, miközben belőle dioxigén keletkezik; második lépésben pedig egy újabb gyökanion oxidálja a réz(I)-et, önmaga pedig hidrogén-peroxiddá redukálódik:

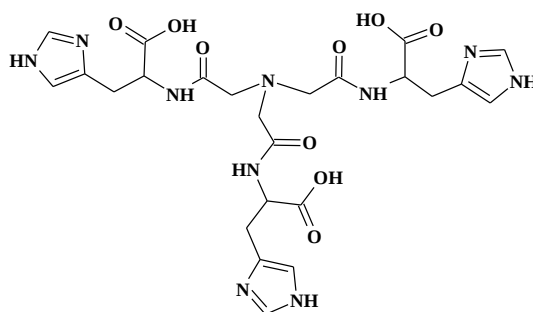


A hisztidintartalmú peptidok számos kutatásban bizonyultak hatékony SOD utánzó komplexek alkotójának. A SOD aktivitás jellemzésére szolgáló IC₅₀ értékek meggyőzőek: *Várnagy* és munkatársai multihisztidin típusú oligopeptidek rézkomplexeinek kiemelkedő SOD aktivitását mutatták be (Ac-S3H4-NH₂: IC₅₀ = 0.0442 μM, Ac-HAHPH-NH₂: IC₅₀ = 0.0532 μM), s támasztották alá elektrokémiai mérésekkel [11]. Szintén előnyös SOD aktivitással rendelkezik a H₂N-HGDHMHNHDTK-OH szekvenciájú oligopeptid semleges pH tartományban képződő mono-réz(II)komplexe (IC₅₀ = 0.19 μM), amely ligandum szekvenciája megegyezik a *Haemophilus ducreyi* baktérium Cu/Zn-szuperoxid dizmutáz enzimének hisztidingazdag N-terminális fragmensével [12]. Egy hasonló, a tanszéken vizsgált

bakteriális SOD enzim N-terminális centrumát modellezi a HADHDHKK-NH₂ peptid, melynek réz(II)komplexe pH 7.4-en tekintélyes 0.11 μ M-os IC₅₀ értékkel jellemezhető [13], mely felveti az N-terminális szakasz szerepét a natív enzim aktivitásában. Ezek alapján elmondható, hogy a peptid típusú rézkomplexek ígéretes funkcionális modelljei lehetnek a szuperoxid dizmutáz enzimeknek is.

2. Célkitűzés

Tudományos diákköri munkám során a tripodális peptidek közül egy eddig még nem vizsgált NTA (nitrilotriecetsav) alapú ligandum (továbbiakban NTAHis₃, 4. ábra) előállítását, és átmenetifémionokkal alkotott komplexeinek oldategyensúlyi és szerkezeti tanulmányozását tűztem ki célul. E ligandum az amidnitrogének mellett szabad imidazol- és karboxilátcsoportokkal rendelkezik, melyek a metalloproteinek aktív centrumában, a két leggyakrabban előforduló fémkötő csoport. Kísérleteimet a Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszéken végeztem.



4. ábra: A vizsgálni kívánt NTAHis₃ vegyület szerkezete.

A kívánt vegyület előállítására oldatfázisú peptidszintézis módszerével kívántuk funkcionálisítani a nitrilotriecetsav karboxilcsoportjait. Az így kapott vegyület merev tripodális álványzattal rendelkezik, amely által kialakított preorganizált fémkötőhely várhatóan nagy stabilitással köti a fémionokat. A reakcióelegytől való elválasztást HPLC-s módszerrel kívántuk megvalósítani. Az így előállítandó nagytisztaságú ligandum és ligandum-réz(II) oldatfázisú egyensúlyait potenciometriás és spektroszkópiás (UV-Vis, CD) módszerekkel kívántuk tanulmányozni. A képződő réz(II)komplexek enzimutánzó tulajdonságainak vizsgálatára szuperoxid dizmutáz és pirokatechin oxidáz modellreakciókat terveztünk. A ligandummal kapcsolatos eredmények felhasználhatóak lehetnek további hatékony enzimutánzó fémkomplexek tervezésére.

3. Kísérleti rész

3.1. Szintézis és tisztítás

A ligandum szintézise és tisztítása során felhasznált anyagok és rövidítései:

NTA = *nitriotiecentsav* (Fluka), $M_r = 191.14$

His-OCH₃ = *L-hisztidin metilészter dihidroklorid* (Sigma-Aldrich), $M_r = 242.10$

DCC = *N,N'-diciklohexil-karbodiimid* (Fluka), $M_r = 206.33$

HOBt = *1-hidroxibenzotriazol* (NovaBiochem), $M_r = 135.13$

CHCl₃ = *kloroform* (VWR), $M_r = 119.38$

CH₃CN = *acetonitril* (VWR), $M_r = 41.05$

TFA = *trifluorecentsav* (Reanal), $M_r = 114.02$

TEA = *tietil amin* (Reanal), $M_r = 101.9$

MeOH = *metanol* (VWR), $M_r = 32.04$

Az NTA tripodális karbonsavszármazék és a C-terminálisan védett hisztidin aminosav összekapcsolására az oldatfázisú peptidszintézis módszerét alkalmaztuk. Kapcsolószerként diciklohexil-karbodiimidet és 1-hidroxibenzotriazolt használtunk, a His-OCH₃ felszabadításához szükséges bázis TEA-volt, oldószerként kloroformot alkalmaztunk. A kiindulási anyagok közül a DCC kapcsolószert utolsóként adtuk hozzá a reakcióelegyhez egy kompetitív mellékreakció, a DCC-NTA addukt átrendeződésének (*O*-acil-izokarbamid *N*-acil-izokarbamid) megakadályozása végett [14]. A reakció előrehaladtát vékonyréteg-kromatográfiás módszerrel követtük. A reakcióelegyet ~6 órán át kevertettük szobahőmérsékleten, ennek elteltével a vékonyréteg-kromatogramokon már nem tapasztaltunk változást. A reakció végbemenetele után az oldatot elválasztottuk a kivált csapadéktól, majd szárazra pároltuk.

A metilészter védőcsoport hasítását a termékhez viszonyítva ötszörös feleslegben adagolt NaOH oldattal végeztük (H₂O:MeOH=2:1) A metilészter védő csoport hidrolízise 17 óra alatt kvantitatíven lejátszódott, az elegyet szűrővel választottuk el a kivált csapadéktól majd semleges pH-ra állítottuk. Az így kapott termékvegyületet HPLC-s módszerrel választottuk el, egy Shimadzu típusú nagyhatékonyságú folyadékkromatográf segítségével (részei: DGU-20A5 gázmentesítő egység, LC-20AD pumpa, SIL-20A automata adagolórendszer, CBM-20A kommunikációs egység, SPD-20A UV-Vis detektoregység), egy Supelco C18-as, 25 cm x 10 mm geometriájú, 5 µm pórusátmérőjű szemipreparatív kolonnán. Eluensként acetonitril-víz elegyet alkalmaztunk gradiens-elúciós módban, az acetonitril-tartalom az elúció során 0–

4% között változott. A terméket tartalmazó részleteket összeöntve liofilizáltuk, a termék azonosítását és tisztaságvizsgálatát ESI-LC-MS (Finnigan TSQ-7000, hármass kvadrupól analízátor), illetve ^1H NMR módszerek segítségével végeztük el.

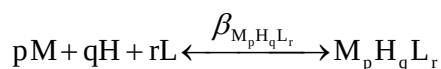
3.2. Potenciometria

Az oldatbeli egyensúlyi vizsgálatokhoz, a ligandum (de)protonálódási és komplexképződési állandóinak meghatározásához potenciometriás módszert alkalmaztunk. A módszer alkalmazhatóságának elvi háttere az, hogy a vizsgált folyamat valamilyen módon az oldatbeli hidrogénion-koncentráció megváltozását okozza, mely az üvegelektrod által érzékelt potenciálváltozást eredményez. Az általunk tanulmányozott rendszerek mindegyike megfelel ennek a követelménynek, hiszen a proton és a fémion verseng egymással a funkciócsoporthoz.

A pH-metriás titrálásokat vizes közegben, állandó hőmérsékleten (25°C) és állandó ionerősség (0.1 M) mellett végeztük. Az ionerősség beállítására minden esetben analitikai tisztaságú NaCl-ot (Reanal) használtunk. A CO_2 távoltartására oldatainkba argon inert gázt buborékolattunk. Mérőoldatként NaOH ~ 0.1 M-os vizes oldatát használtunk (Sigma-Aldrich), koncentrációját pontos beméréssel készített kálium-hidrogénftalát (Fluka) oldat titrálásával határoztuk meg. A fémionok törzsoldatainak elkészítéséhez $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$ -ot (Sigma-Aldrich) használtunk fel, az oldatok koncentrációinak meghatározását komplexometriás titrálással végeztük. A titrálások során IBM-kompatibilis PC által vezérelt Dosimat 665 típusú Metrohm automata bürettát és Orion 710A precíziós pH-mérőt alkalmaztunk. Az Orion 8103BN típusú szemimikro-kombinált üvegelektrod kalibrálásához egy erős savat (HCl) titráltunk. Az így nyert $E_{\text{rel,mV}}$ vs. V_{mL} adatsorok értékelése a módosított Nernst-egyenlet alapján történt [15]:

$$E = E_0 + K \cdot \log[\text{H}^+] + J_{\text{H}} \cdot [\text{H}^+] + \frac{J_{\text{OH}} \cdot K_{\text{w}}}{[\text{H}^+]},$$

melyben az ismert paraméterek mellett J_{H} és J_{OH} az üvegelektrod savas illetve lúgos hibájának, valamint a folyadék–folyadék határfelületi potenciálból adódó hibáknak a korrekciójára szolgáló illesztési paraméterek, $K_{\text{w}} = 10^{-13,75} \text{ M}^2$ pedig a víz autoprotolízis-állandója [16]. A paraméterek kiszámítása a nemlineáris legkisebb négyzetek módszere szerint történt. A rendszerekben képződő részecskék az alábbi általános egyensúlyi folyamattal, ill. képződési állandóval jellemezhetők:



$$\beta_{M_p H_q L_r} = \frac{[M_p H_q L_r]}{[M]^p [H]^q [L]^r},$$

ahol M a fémiont, L a nemprotonált ligandummolekulát jelöli (a dolgozatban az egyszerűség kedvéért a komplexek töltésétől eltekintettünk, de ezek könnyen számolhatóak, ha figyelembe vesszük, hogy a teljesen protonált ligandum LH_6^{3+} formájú). A protonálódási és komplexképződési állandók meghatározását a PSEQUAD nevű számítógépes programmal végeztük [17]. A protonálódási állandók meghatározása 4, a komplexképződési állandók meghatározása 6–8 független titrálással történt, az egyes adatsorok egyenként 70–90 adatpontot tartalmaztak. A fém-ligandum arányt 1:1 és 2:1 között, a fémion koncentrációt $1.65 \times 10^{-3} - 3.3 \times 10^{-3}$ M tartományban változtattuk.

3.3. UV-Vis spektrofotometria, CD spektroszkópia

Az oldatban képződő komplexek koordinálódó donorcsoportjainak száma és minősége felőli tájékozódás végett spektroszkópiás méréseket végeztünk. Erre az ad lehetőséget, hogy az UV- és látható tartományban fényelnyelő tulajdonságú molekularészek koordinációs viszonyainak megváltozása az elnyelési spektrum megváltozásával járhat: bizonyos csoportok koordinációjakor új elnyelési sáv jelenik meg, valamint a koordinálódó ligandumok/donorcsoportok cseréjekor a már meglévő elnyelési sávok maximumhelyei eltolódhatnak. Ezen jelenségek alapján következtethetünk a koordinálódó donorcsoportok minőségére a különböző pH-kon felvett abszorpciós spektrumok tanulmányozásával. A CD (cirkuláris dikroizmus) spektroszkópia alapjai azon a tapasztalaton nyugszanak, hogy a síkban polarizált fény egy jobbra és egy balra forgató cirkulárisan poláros komponensre bontható fel. Az optikailag aktív anyagok oldata eltérő mértékben nyeli el ezt a két cirkulárisan poláros komponenst, ezt a jelenséget nevezik cirkuláris dikroizmusnak. A jelenséget felhasználó spektroszkópiai módszer lényege, hogy a balra és a jobbra cirkulárisan poláros fény abszorpciós (extinkciós) koefficienseinek különbségét ($\Delta\epsilon = \epsilon_{\text{bal}} - \epsilon_{\text{jobb}}$) a hullámhossz függvényében ábrázolva az optikailag aktív mintára jellemző CD spektrumot kapjuk.

Mind az UV-Vis, mind a CD spektroszkópia alkalmas a minták mennyiségi jellemzésére: az adatsorok értékelésének alapjául a fényelnyelést produkáló molekulafajta koncentrációja (c) és az abszorbancia (A) közötti összefüggést leíró Lambert-Beer-törvény szolgál.

$$A = \lg(I_0/I) = \epsilon \times c \times l,$$

ahol I_0 a beeső fény intenzitása, I az oldatmintából kilépő (transzmittált) fény intenzitása, ε az egyes molekulafajták moláris abszorbanciája, l a küvetta hossz (cm-ben). Az UV-tartományban elsősorban a ligandumok kromofór csoportjai mutatnak elnyelést, illetve ennél kisebb intenzitással az ún. töltésátviteli vagy „charge transfer” (CT) sávok is itt jelennek meg, melyek a fémion és a ligandum közti elektronátmenetekre jellemzők). A látható fény hullámhossz-tartományában rendszerint a fémionok jóval kisebb intenzitású $d-d$ átmeneti sávjai találhatók.

Az átmenetifém-komplexek kiralitása többféle aszimmetriaforrásból adódhat (centrális, helikális, konformációs kiralitás stb.). A ligandum kiralitáscentrumai a kötéseken keresztül hatást gyakorolnak a fémion $d-d$ átmeneteire. Az tehát, hogy a $d-d$ átmenetek hullámhossz-tartományában CD aktivitást tapasztalhatunk, önmagában is egy királis ligandum koordinációját bizonyítja. A spektrum alakja, előjele és intenzitása pedig a fémion körül kialakult térbeli szerkezetre jellemző.

A CD méréseket a Szegedi Biológiai Kutatóközpontban végeztük egy Jasco J-815 spektropolariméteren 300–800 nm hullámhossztartományban. Különböző réz(II)-ligandum (1:1, 2:1) arányokat vizsgáltunk vizes oldataikban. A CD spektrumokat 2.1–11.3 pH tartományon belül 14–19 különböző pH-n vettük fel. A ligandum koncentrációja a mérések során 1.5×10^{-3} M körüli volt. Az UV-Vis spektrumokat egy Unicam HELIOS α típusú kétutas spektrofotométeren, és egy Thermo Scientific típusú spektrofotométeren vettük fel, 1 cm-es hosszúságú teflondugós kvarcküvetákban. A spektrofotometriás titrálásaink savas pH-tól kezdve, 0.3–0.4 pH egységenként, kellő mennyiségű oldatrészletet a mérőcellába kimérve vettük fel az oldatok abszorpciós spektrumát a 200–1000 nm-es hullámhossztartományban. A mérések során a ligandum-fémion arány 1:1 – 1:2 között változott, a ligandum koncentrációja $\sim 1.6 \times 10^{-3}$ M volt az oldatban. A spektrofotometriás és CD adatsorok kiértékelése – a komplexek egyedi moláris spektrumainak számítása – a már említett PSEQUAD nevű számítógépes programmal történt [17].

3.4. Az enzimutánzó aktivitás mérése

Kutatócsoportunk hosszabb távú célja a tripodális ligandumok fémkomplexeinek potenciális enzimmodellekké való fejlesztése. Ezen folyamat első szakasza az általunk vizsgált, viszonylag egyszerű felépítésű tripodális ligandum-fémkomplexek enzimutánzó aktivitásának felderítése.

Kinetikai méréseink a kezdeti sebességek módszerén alapulnak: amennyiben az enzimkatalizált reakció termékének képződését spektrofotometriásan követni tudjuk, az abszorbancia-idő függvény kezdeti, közel lineáris szakaszára illesztett egyenes meredekségéből, a moláris abszorbancia és a Lambert-Beer törvény segítségével számolható a kezdeti sebesség.

$$dA/dt = \varepsilon_{\lambda} \times l \times dC/dt \rightarrow dC/dt = (dA/dt)/(\varepsilon_{\lambda} \times l).$$

A jellemzésre szolgáló látszólagos sebességi együttható (k_{obs}) és pszeudoelsőrendű sebességi együttható (k') a következő összefüggés alapján számolható:

$$(dA/dt)/(\varepsilon_{\lambda} \times l \times [S]_0) = k_{obs} = k' \times [\text{komplex}],$$

ahol: dA/dt az abszorbancia-idő függvényre illesztett egyenes meredeksége,

ε_{λ} a termék moláris abszorbanciája ($M^{-1}cm^{-1}$ egységben),

$[S]_0$ a modellszubsztrát koncentrációja a mérés kezdetekor (M),

[komplex] az enzimként viselkedő részecske koncentrációja (M),

l a kuvetta hossza (cm).

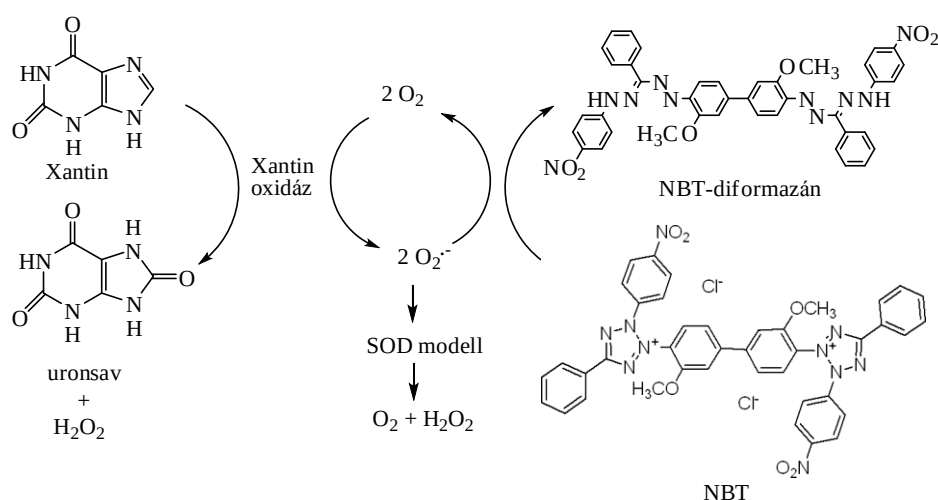
A kezdeti sebességek módszerének alkalmazhatósági feltétele az, hogy a mérés ideje alatt a reaktánsoknak maximálisan 3–5%-a alakulhat át, ekkor a görbe észrevehető elhajlást még nem mutat. A számolt kinetikai adatokat minden szükséges esetben korrigáltuk a katalizátorként funkcionáló komplexet nem tartalmazó oldatokban mért autooxidációval/autohidrolízissel, vagyis a sebességi állandókból levontuk a mért autooxidáció/autohidrolízis sebességi állandóját.

Rendszereinkről első közelítésben egy tájékozódó jellegű, átfogó képet szeretnénk volna kapni kinetikai szempontból, ezért méréseinket olyan módon végeztük, hogy a kiválasztott fémkomplexeknek megfelelő fém-ligandum arányt és pH értéket állítottunk be, s az aktivitásokat ezen egyedi mintáknál mértük, majd minden esetben kiszámítottuk az aktivitás jellemzésére szolgáló k_{obs} látszólagos sebességi együtthatót (s^{-1}), valamint a k' pszeudomásodrendű sebességi együtthatót ($s^{-1}M^{-1}$). Ezen tesztmérések mellett a pirokatechin-oxidáz aktivitást réz(II)-ligandum 3:2 aránynál az összes résztvevő komponenstől való függés követésével teljeskörűen jellemeztük.

3.4.1. Szuperoxid-dizmutáz aktivitás

Az eukarióta szervezetekben működő Cu,Zn-szuperoxid-dizmutáz (SOD) enzim az oxigénmolekula monovalens (egyelektronos) redukciója során keletkező szuperoxid

gyökionion diszproporcióját katalizálja ($k' \sim 2 \times 10^9 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$, $\text{pH} = 7.4$). Réz(II)tartalmú komplexeink enzimutánczó működését az ún. McCord-Fridovich-féle indirekt tesztreakcióval vizsgáltuk [18]. A módszer alapja egy modellfolyamat: a xantin-oxidáz enzim által *in situ* termelt $\text{O}_2^{\bullet -}$ és a 'nitroblue-tetrazolium-chloride' (NBT, Sigma) közötti reakció nyomon követése (5. ábra). Az NBT szuperoxidgyökkel történő redukciója NBT-diformazán képződését eredményezi, melynek jellemző kékeslila színe is jelzi az 560 nm-nél mérhető intenzív fényelnyelő képességét. A szuperoxid-koncentrációt csökkenteni képes rendszerek (ami esetünkben a Cu(II)-L 2:1 arányú komplexe) tulajdonképpen inhibiálják ezt a reakciót, s így jelenlétükben az 560 nm-en mért abszorbancia lassabban növekszik, mint az aktív fémkomplexet nem tartalmazó referencia rendszerben (vak minta).



5. ábra: A SOD aktivitás méréséhez használt modellreakció.

A SOD aktivitás mérése során foszfátpufferben (Na_2HPO_4 és NaH_2PO_4 , $C = 5.0 \times 10^{-2} \text{ M}$, Reanal) oldott, $1.5 \times 10^{-3} \text{ M}$ koncentrációjú NBT törzsoldatot használtunk, a reakcióelegyben a koncentrációja $1.0 \times 10^{-4} \text{ M}$ volt. A xantin (Sigma) koncentrációját az oldatban $1.2 \times 10^{-4} \text{ M}$ -ra állítottuk be. Az NBT-diformazánnak tulajdonítható abszorbancianövekedést egy Unicam HELIOS α típusú forgócellás spektrofotométeren végeztünk 1 cm úthosszúságú műanyag küvettákban, minden egyes komplexkoncentráció esetén egy vakmintával együtt mérve az A_{560} értékeket. A xantin-oxidáz (Sigma) mennyiségét úgy állítottuk be, hogy az abszorbancia .változás 560 nm-nél $0.015 - 0.02 \text{ min}^{-1}$ érték között legyen. Az NBT redukcióját változó koncentrációjú, 2:1 fém-ligandum arányú réz(II)komplex jelenlétében, illetve annak távollétében is vizsgáltuk. Mivel a xantin oxidáz oldatban viszonylag gyorsan bomlik, mindig három küvettában mértünk egyszerre, ezek közül az egyik oldatban nem volt komplex, és az ebben mért reakciósebességhez hasonlítottuk a másik kettőt. Elegendő mennyiségű NBT hiányában réz(II)-ligandum 1:1 aránynál nem végeztünk méréseket.

A SOD aktivitást az irodalomban elfogadott gyakorlatnak megfelelően az IC₅₀ értékkel jellemeztük. Ez azt a komplexkoncentrációt jelenti, ahol a diformazán képződése a komplex távollétében mért érték 50%-ára csökken. Egy állandó pH-értéknél elvégzett mérésorozat megjelenítésekor a % inhibíció értékeket ábrázoljuk a komplexkoncentráció függvényében, s az 50 %-os inhibícióhoz tartozó koncentrációérték megadja az IC₅₀ értéket. A % inhibícióra vonatkozó formula az alábbiak szerint adható meg:

$$\% \text{ inhibíció} = \frac{\left(\frac{\Delta A}{\text{perc}}\right)^{\text{vak}} - \left(\frac{\Delta A}{\text{perc}}\right)^{\text{komplex}}}{\left(\frac{\Delta A}{\text{perc}}\right)^{\text{vak}}} \times 100$$

Tehát minél kisebb az IC₅₀ érték, annál jobban működő szuperoxid-dizmutáló képességű az adott komplex.

4.6.3. Pirokatechin-oxidáz aktivitás

A pirokatechin-oxidáz enzimek orto-fenol származékok kinonná történő átalakulását katalizálják. Kísérleteink során a 3,5-di-tercbutil-pirokatechin (H₂DTBC) oxigénnel való reakcióját vizsgáltuk, a termék rossz vízoldhatósága miatt 50 (V/V)%-os etanol-víz elegyben, és tanulmányoztuk a Cu(II)-L 2:1 illetve 1:1 arányú komplexeinek katecholáz utánzó sajátságát ($c_{\text{komplex}} = 5 \times 10^{-5}$ M a reakcióelegyben). A folyamat során keletkező 3,5-di-tercbutil-1,2-benzokinon (DTBQ) sárga színű, így képződése jól követhető spektrofotometriásan, 400 nm-es hullámhosszon ($\epsilon_{400} = 1900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). A reakcióban hidrogén-peroxid is keletkezik, ennek jelenléte kimutatható.

Az oxigén koncentrációjának állandóságát a kiindulási reakcióelegyekben azonos mennyiségű (1 ml), O₂-nel telített etanol hozzáadásával biztosítottuk. Az alkoholt egy porlasztós gázmosópalackban tartottuk, és állandó sebességgel oxigént buborékolattunk át rajta. Az ionerősséget analitikai tisztaságú NaCl-dal állítottuk be (0.06 M), az oldatok pH-ját pedig biológiai pufferek (MES, CHES, HEPES) keverékével tartottuk állandó értéken. Mivel etanol-víz elegyben dolgoztunk, a mért pH-k eltérnek a valós értékektől, ami azzal magyarázható, hogy az üvegelektrod potenciálját az etanol jelenléte bizonyos mértékben megváltoztatja. Az ábrákon a már korrigált pH-értékeket tüntettük fel (az 50% etanol-víz elegyre jellemző korrekciós tényező értéke 0.21 [19]). A puffer koncentrációja az elegyben 0.04 M volt, így az ionerősség közelítőleg 0.1 M. Méréseinkhez a H₂DTBC-nek 0.01 M, 0.05 és 0.1 M koncentrációjú etanolos törzsoldatát használtuk a mérési körülményektől függően. A

reaktánsok összemérése és termosztálása (25 °C) után a H₂DTBC hozzáadásával indítottuk kinetikai méréseinket, melyeket 1 cm-es teflondugós kvarcküvetében egy Unicam HELIOS α típusú spektrofotométeren végeztünk. Mivel az általunk vizsgált reakció többé-kevésbé hasonlít az enzimreakciókhoz, az adatok kezelését a Michaelis-Menten enzimkinetikai modell szerint végeztük.

Egy enzimreakció általában egy előegyensúlyi reakcióból (enzim-szubsztrát addukt képződés) és egy ezt követő reakcióból áll, melynek során a szubsztrát termékké alakul, az enzim pedig regenerálódik:



A reakcióra a steady-state közelítést alkalmazva (azaz hogy a köztitermék, az ES koncentrációja viszonylag kicsi és állandó), a termék képződésére a következő differenciálegyenletet kapjuk:

$$\frac{d[P]}{dt} = k[E]_o, \quad k = \frac{k_b[S]}{K_M + [S]},$$

ahol $[E]_o$ a teljes (bemérési) enzim-koncentráció, és K_M az ún. Michaelis-állandó:

$$K_M = \frac{k_b + k'_a}{k_a}.$$

A fenti összefüggés alkalmazhatóságának feltétele, hogy (i) a szubsztrát koncentrációja lényegesen nagyobb legyen az enzim koncentrációjánál, (ii) a reakció folyamán a szubsztrát koncentrációja ne változzon (ezért alkalmazzuk a kezdeti sebességek módszerét), (iii) a termék ne képezzen stabil komplexet az enzimmal, (iv) az enzim kötőhelyeihez csak egy szubsztrát-molekula kapcsolódjon. Ezen megkorlátozások vizsgálataink során teljesültek. Minthogy esetünkben az oxigén is reakciópartnerként szerepel, a reakció sebessége függ az $[O_2]$ -től is. Méréseink során az oxigén koncentrációja állandó volt, ezért azt a meghatározott k sebességi együtthatók tartalmazták.

A Michaelis-Menten mechanizmus szerint a reakciósebesség lineárisan függ $[E]_o$ -tól, de bonyolultabb kapcsolatban van szubsztráttal. Ha igen sok szubsztrát van jelen ($[S] \gg K_M$), akkor a sebességi egyenlet $[S]$ -re nulladrendűvé válik:

$$d[P]/dt = k_b[E]_o.$$

Ilyenkor minden enzim kötött állapotban van, tehát a reakciósebesség $[S]$ további növelésével nem nő. Ha kevés szubsztrát van jelen ($K_M \gg [S]$), akkor a sebesség egyenesen arányos $[S]$ -el:

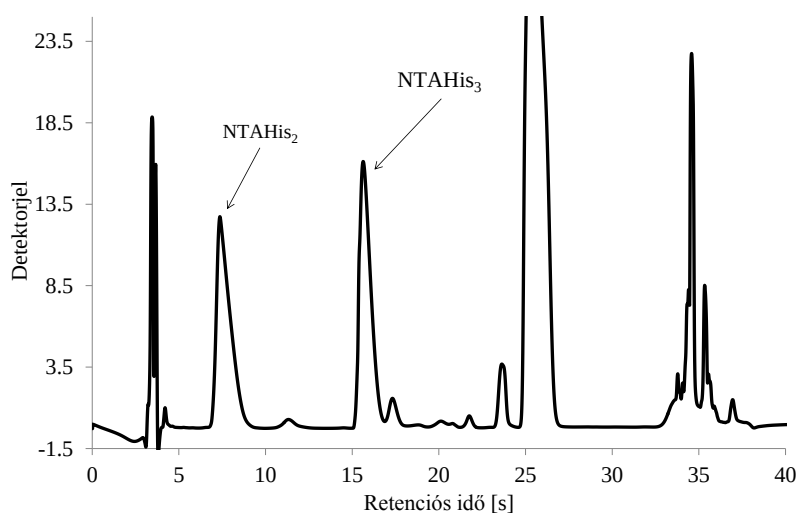
$$d[P]/dt = (k_b/K_M)[E]_o[S].$$

Tehát a szubsztrátfüggési görbe egy telítési görbe, amelyből a reakciót jellemző K_M és k_b állandók meghatározhatók, pl. a legkisebb négyzetek módszerével végzett paraméterillesztéssel.

4. Kísérleti eredmények és értékelésük

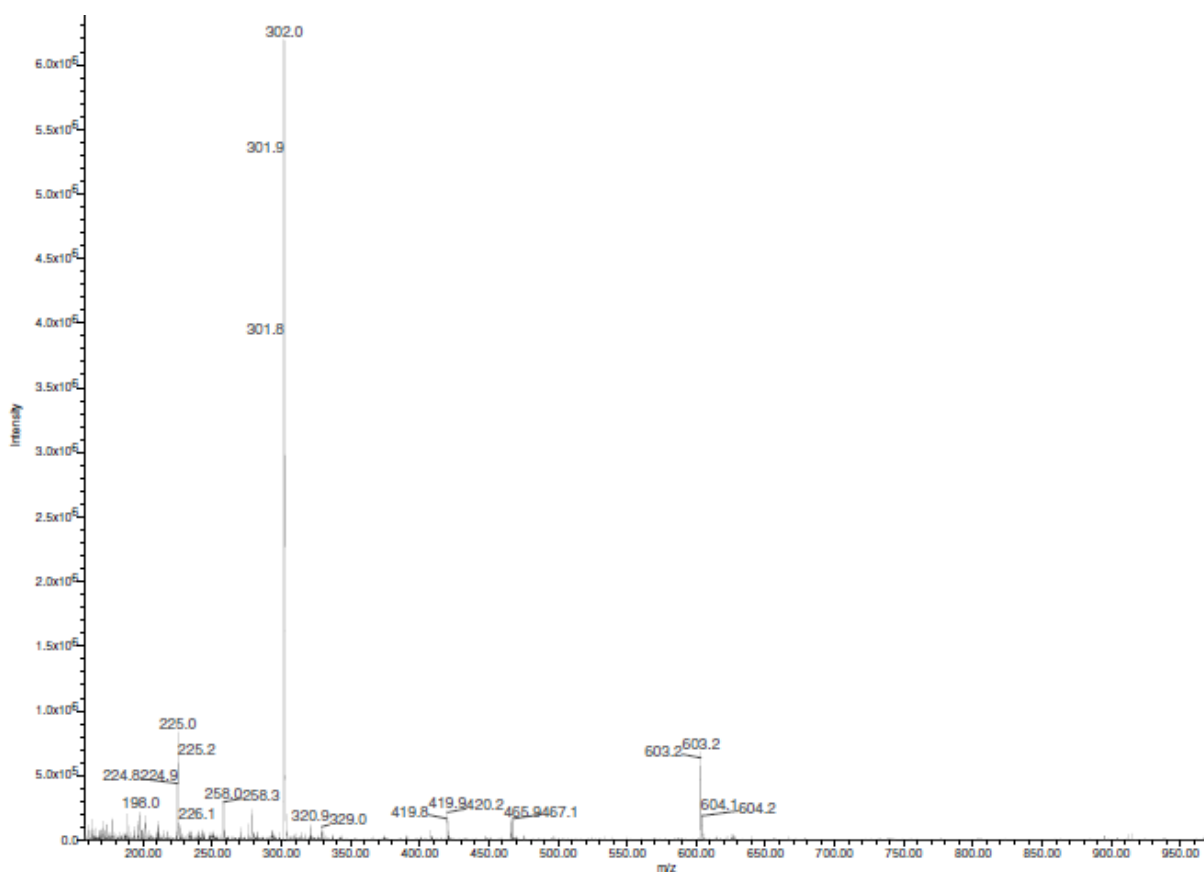
4.1. A ligandum azonosítása, tisztítása

A ligandum szintézisét követően a szintézis elegy szétválasztása preparatív HPLC-s módszerrel történt. A nagy tisztaságban elválasztani kívánt NTAHis₃-hoz tartozó csúcsot, a csúcshoz tartozó eluátum tömegspektrometriás méréseivel egyértelműen azonosítottuk. A vizsgálatok eredményeként még elmondható, hogy a statisztikai eloszlásnak megfelelően nem csak a háromszorosán, hanem a kétszeresen funkcionáliszt molekula is kimutatható mennyiségben keletkezett. A tisztítás folyamata alatt a kromatogramok nem mutattak szemmel látható változást, az elválasztandó elegyben mellékreakciók nem játszódtak le a kapcsolást követően. Az alábbiak a reakcióelegy egy HPLC kromatogramját szemléltetik (6. ábra).



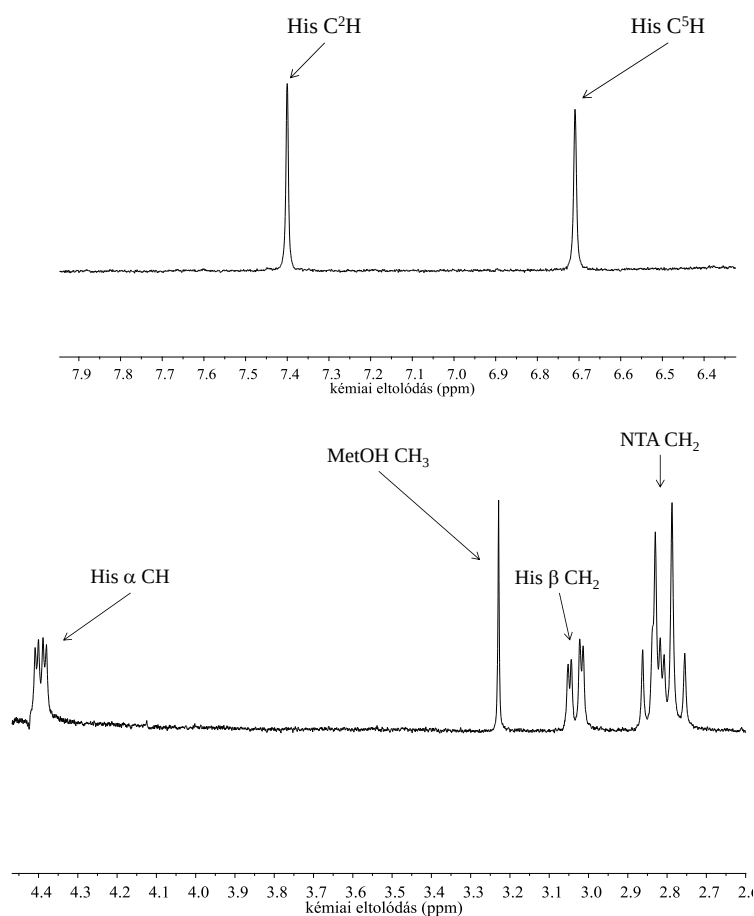
6. ábra: Az NTAHis₃ ligandum reakcióelegyének HPLC kromatogramja (eluensőszetétel: 0–4% acetonitril – 100–96% víz, gradiens elúció, áramlási sebesség: 1 mL/perc).

A preparatív kolonnán való tisztítás sikerességéről tömegspektrometriás és NMR spektroszkópiás vizsgálatokkal győződünk meg. Az 7. ábrán látható tömegspektrum legnagyobb relatív gyakoriságú csúcsai az általunk keresett ligandumhoz tartoznak (603.2 (1+), 302.0 (2+) m/z).



7. ábra: Az NTAHis₃ ligandum tömegspektruma.

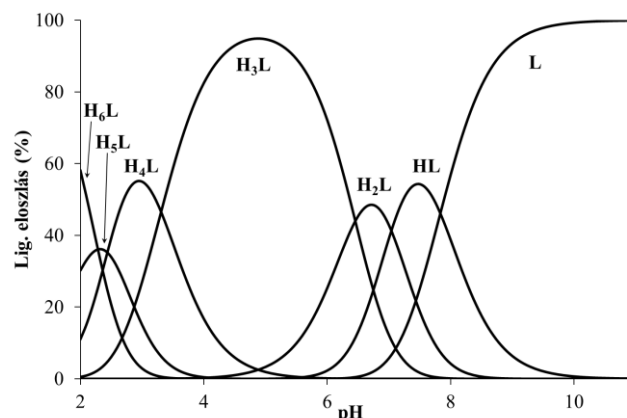
A megtisztított ligandum azonosítását ¹H NMR spektroszkópia segítségével lúgos pH tartományban végeztük. A spektrumon megjelenő vonalak asszignációját a 8. ábrán tüntettem fel. A MeOH CH₃ jel metanol jelenlétére utal, amely az NMR cső falán megtapadt oldószer maradványnak tudható be. Az említett jel nem a vizsgált ligandumhoz tartozik, mivel pH változtatására kémiai eltolódása nem változott. Ezek alapján kijelenthetjük, hogy az előállított ligandum megfelelő tisztaságú további vizsgálatainkhoz.



8. ábra: Az NTAHis₃ ligandum aromás (fent) és alifás (lent) régióban található ¹H NMR jelei (pH~9; a metanol az NMR-cső tisztítására használt oldószer maradványa).

4.2. A ligandum oldategyensúlyi viszonyai

A fémmentes ligandum potenciometriás titrálási adatainak értékelése alapján hat különböző deprotonálódási folyamatot azonosíthatunk a mért pH tartományban. A savas pH tartományban lévő, nagymértékben átfedő deprotonálódások a C-terminális karbonsavcsoportokhoz köthetők, míg a semleges körüli pH tartományban lévők az imidazolnitrogének protonvesztésének tulajdoníthatók. Mivel a hasonló donorcsoportok esetében a protonvesztési folyamatok erősen átfednek, ezért a kapott pK-k valójában makroállandók; a tényleges folyamatokat tükröző mikro-deprotonálódási állandókat kizárólag potenciometriás mérések segítségével nem tudjuk megadni, viszont az azonos csoportok azonos környezetét feltételezve ezek becsülhetők, mint a makroállandók átlaga (karboxil csoportok: $pK_{\text{mikro}} \sim 2.67$; imidazolnitrogének: $pK_{\text{mikro}} \sim 7.11$). A különböző protonáltsági állapotú részecskék pH-függő eloszlását a 9. ábra szemlélteti.



9. ábra: Az NTAHis₃ ligandum különböző protonáltsági állapotainak megoszlása a pH függvényében ($C_{\text{lig}} = 1.7 \text{ mM}$, $I = 0.1 \text{ M}$, $T = 25^\circ\text{C}$).

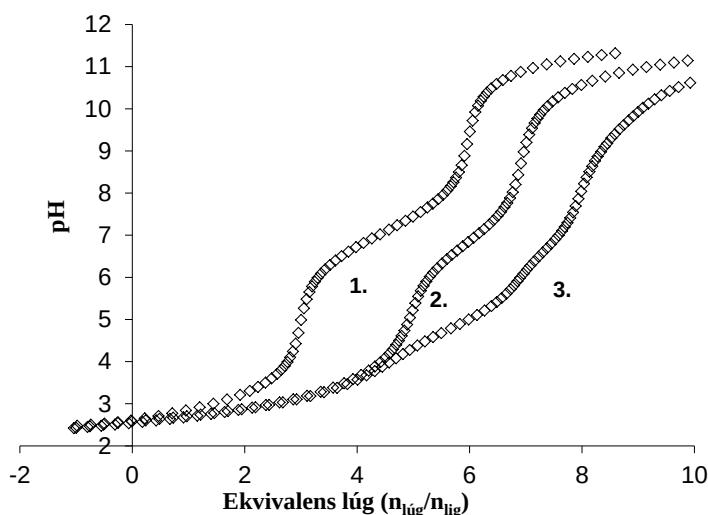
A különböző protonáltsági állapotú részecskék mért lépcsőzetes és képződési állandói az 1. táblázatban vannak feltüntetve.

H_qL_r	$\log\beta$	pK
HL	7.83(1)	7.83
H ₂ L	14.87(1)	7.04
H ₃ L	21.33(1)	6.46
H ₄ L	24.64(1)	3.31
H ₅ L	27.07(1)	2.44
H ₆ L	29.36(1)	2.28

1. táblázat: A NTAHis₃ ligandum képződési és lépcsőzetes deprotonálódási állandói (zárójelben az utolsó értékes jegy hibája).

4.3. A ligandum réz(II)komplexei

A ligandum réz(II)ionokkal alkotott komplexeinek vizsgálata céljából pH potenciometriás, UV-látható spektrofotometriás, illetve CD spektroszkópiás méréseket végeztünk. A potenciometriás méréseket méréseket 1:1 és 2:1 fém-ligandum aránynál végeztük (10. ábra). Csapadékképződés az említett arányoknál a teljes vizsgált pH tartományban nem volt észlelhető, viszont a 3:1 fém-ligandum aránynál a semleges pH tartomány közelében csapadékkiválás akadályozta a további mérést.



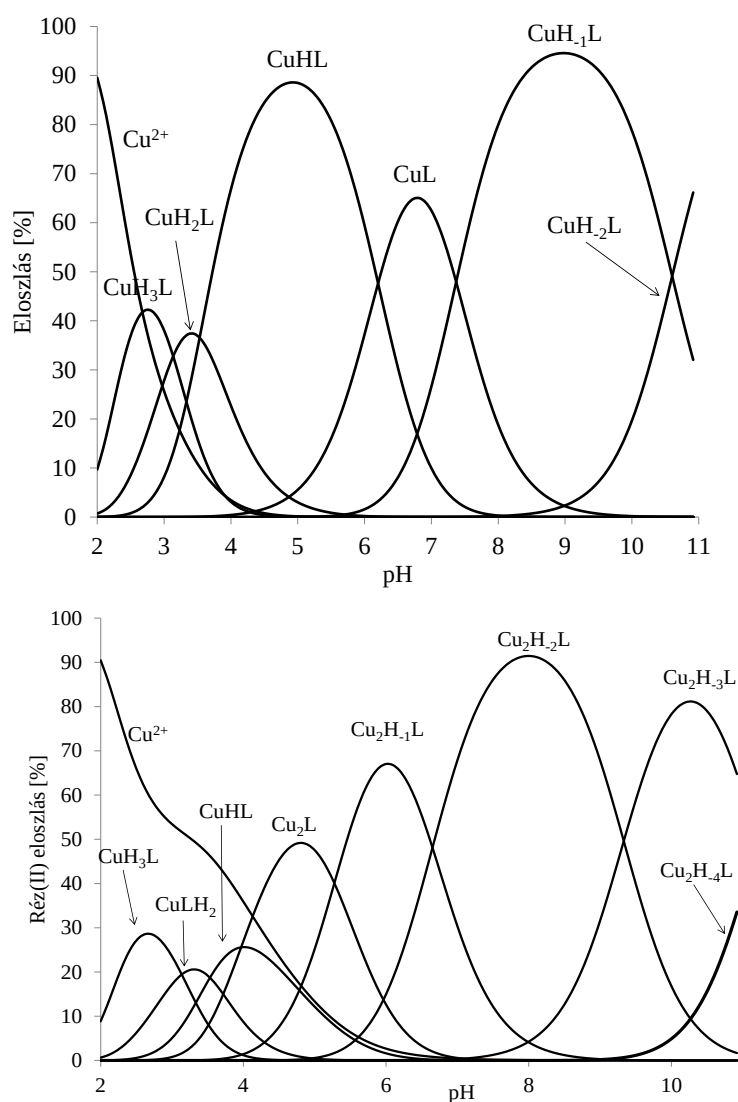
10. ábra: A szabad ligandum (1.), a ligandum-réz(II) 1:1 (2.) és a ligandum-réz(II) 1:2 (3.) arányánál mért titrálási görbék a ligandumra vonatkoztatott ekvivalens lúgmennyiség függvényében.

pH=3 alatt már jelen vannak a réz komplexek, ez jól látható a fémmentes (1.) és a fém tartalmazó (1. 2.) titrálási görbék különbségén. A 2. és 3. görbe felfutásában nincs számottevő különbség a négy lúgekvivalens adagolásáig, utána azonban elválnak egymástól; ez arra utal, hogy e pH felett kétmagvú komplexek képződése indul meg fémfelesleg esetén. A 2. görbén öt lúgekvivalensnél megjelenő ekvivalenciapont egy viszonylag nagy stabilitású részecske, a CuHL képződésével magyarázható, míg 7 lúgekvivalensnél a CuH_{-1}L részecske a domináns forma. A 2:1 réz-ligandum arányú görbénél (3.) nem figyelhető meg határozott ekvivalenciapont, ez a nagymértékben átfedő lépcsőzetes folyamatok eredménye.

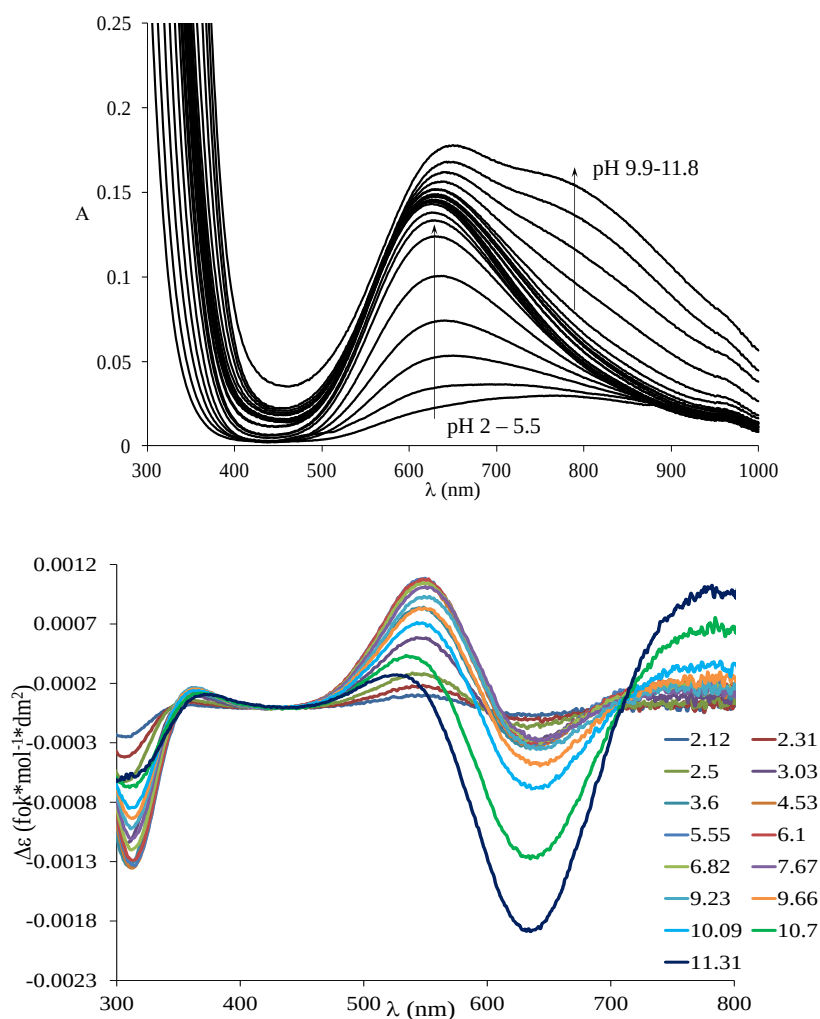
A réz(II)ionok jelenlétében képződő komplexek bruttó stabilitási állandóit a potenciometriás és az UV-látható spektroszkópiás adatok együttes értékelésével számoltuk, a kapott állandók a 2. táblázatban láthatók. A 11. ábra az állandók alapján számolt részecskeeloszlási diagramjait mutatja be a pH függvényében. A réz(II)komplexekre vonatkozó szerkezeti információkat UV-látható és CD spektroszkópiás mérések eredményeiből nyertük.

$\text{Cu}_p\text{L}_r\text{H}_q$	$\log\beta$	pK	$\text{Cu}_p\text{L}_r\text{H}_q$	$\log\beta$	pK
CuLH_3	25.64(1)	3.14	Cu_2L	17.84(1)	5.28
CuLH_2	22.50(2)	3.53	$\text{Cu}_2\text{LH}_{-1}$	12.56(1)	6.65
CuLH_1	18.97(2)	6.20	Cu_2LH_2	5.91(1)	9.33
CuL	12.77(3)	7.37	Cu_2LH_3	-3.42(1)	11.20
CuLH_{-1}	5.4(3)	10.60	Cu_2LH_4	-14.63(1)	
CuLH_2	-5.21(4)				

2. táblázat: A ligandum réz(II)komplexeinek bruttó stabilitási és deprotonálódási állandói.



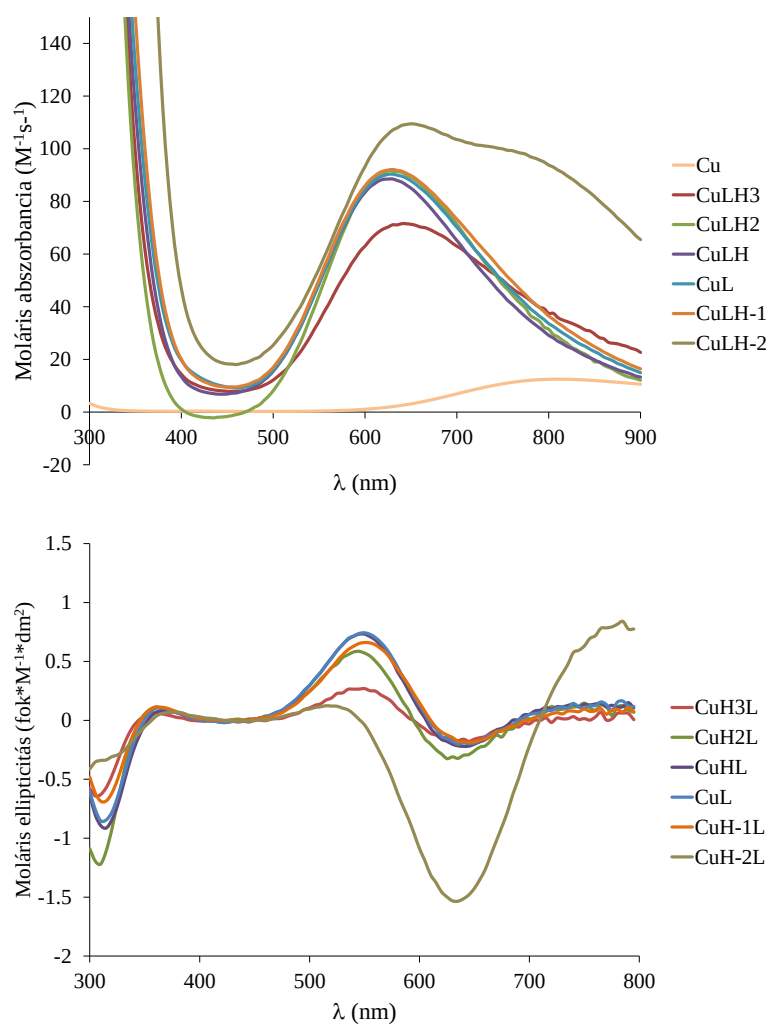
11. ábra: A ligandum-réz(II) 1:1 (fent) és 1:2 (lent) aránynál számolt részecskeeloszlási diagramjai ($c_{\text{ligandum}} = 0.0017 \text{ M}$).



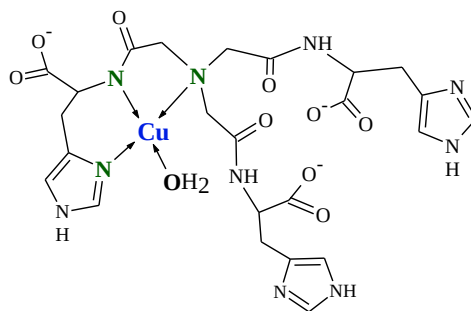
12. ábra: A ligandum-réz(II) 1:1 arányú rendszerében mért UV-látható (fent) és CD (lent) spektrumai.

A potenciometriás eredmények alapján elmondható, hogy már pH 2 körül elindul a komplexek képződése. Az elsőként kialakuló CuH_3L , CuH_2L és CuHL komplexek erősen átfedő folyamatokban keletkeznek, közülük csak a CuHL válik domináns részecskévé pH 5 körül, így utóbbi spektrális sajátosságai pontosan meghatározhatóak. E komplex d-d átmenetének elnyelési maximuma 615 nm-nél van (12. ábra), s ez a spektrumalak tulajdonképpen változatlanul megjelenik a CuL és CuH_{-1}L komplexnél is. Mindebből arra következtethetünk, hogy e két deprotonálódási lépés nem érinti a fémion környezetét, az valószínűleg a szabad imidazolgyűrűk deprotonálódásához rendelhető. Ezt megerősítik pK_{CuHL} és pK_{CuL} értékei, melyek igen közeliek a szabad ligandumban mért imidazol pK-khoz. Fentiek viszont csak úgy lehetségesek, ha már a CuHL komplexben is jelen van egy fémionhoz kötődő amidnitrogén. Azaz mindhárom komplexben $\{\text{N}_{\text{terc}}, \text{N}^-, \text{N}_{\text{im}}, \text{O}\}$ típusú

koordinációs mód valósul meg a réz ekvatoriális síkjában (14. ábra), ahol az O donoratom tartozhat vízhez, amid- vagy karboxilát csoporthoz is. Mindez azt jelenti, hogy az amidnitrogén fémionindukált deprotonálódása már nagyon alacsony pH-n megtörténik. Ez azonban nem meglepő, mert a $\{N_{\text{terc}}, N^-, N_{\text{im}}, O\}$ típusú koordináció analóg a Gly-His [6] vagy glicil-hisztamin [20] esetén kialakuló kötés móddal (ld. irodalmi előzmények, 2. ábra), s fenti peptidek esetén is már igen alacsony pH-n megjelenik az amidkoordináció. Sőt, a CuH_2L komplexre számolt moláris spektrum is megegyezik fenti komplexek spektrumával. Bár ez utóbbi az átfedő egyensúlyok miatt bizonytalan, mégis arra utalhat, hogy már ebben a komplexben is jelen van az amidkoordináció. Erre magyarázatot adhat az a tény, hogy jelen ligandum tercier nitrogénje jóval kevésbé bázikus, mint fenti peptidek terminális aminos csoportja, így már pH 4 alatt is lehetőség nyílt a $\{N_{\text{terc}}, N^-, N_{\text{im}}, O\}$ típusú koordinációra.

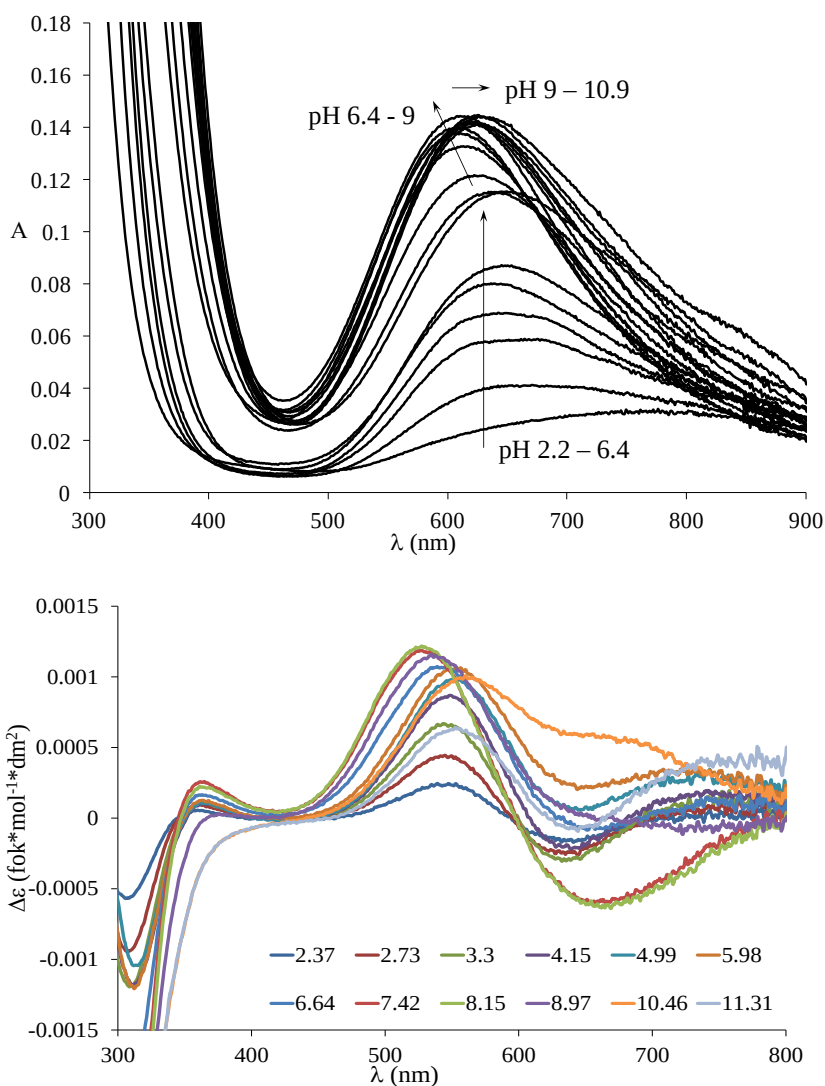


13. ábra: A NTAHis₃ ligandum 1:1 fém-ligandum arányú réz(II)komplexeinek számolt egyedi moláris UV-Vis (fent) és CD (lent) spektrumai.

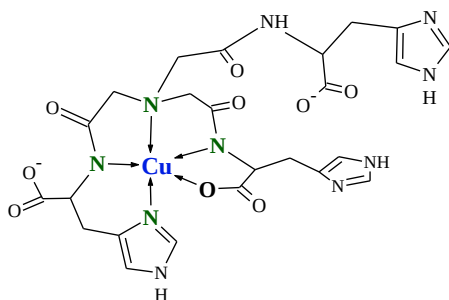


14. ábra: A CuH₁L részecske feltételezett szerkezete.

A CuH₁L komplex pH 10 felett lejátszódó deprotonálódása alapvető változást eredményez mind a látható, mind a CD spektrumokon, ami jelentős szerkezeti átalakulásra utal, így a koordinált víz deprotonálódása kizárható. Legvalószínűbb egy további amidnitrogén koordinációja, ami kiegészülhet kelátképző helyzetben további donorcsoportokkal (pl. karboxilát-oxigénnel). Az egyedi moláris spektrumon két közel azonos intenzitású elnyelési sáv látható 765 és 645 nm-nél (13. ábra). Figyelembe véve, hogy a CuH₂L komplexben 4N/5N-es koordináció valósul meg (azaz torzult oktaéderes geometria esetén 550 nm körül lenne várható az elnyelési maximum), a 13. ábrán látható jellegzetes spektrum ötös koordinációs számra, egy a trigonális bipiramis és tetragonális piramis közötti geometria kialakulására utal [21]. Bár az ötös koordináció tripodális ligandumokra jellemző, peptid típusú ligandumok réz(II)komplexeinél igen ritka és különleges. A komplex feltételezett szerkezetét az 16. ábra mutatja be.



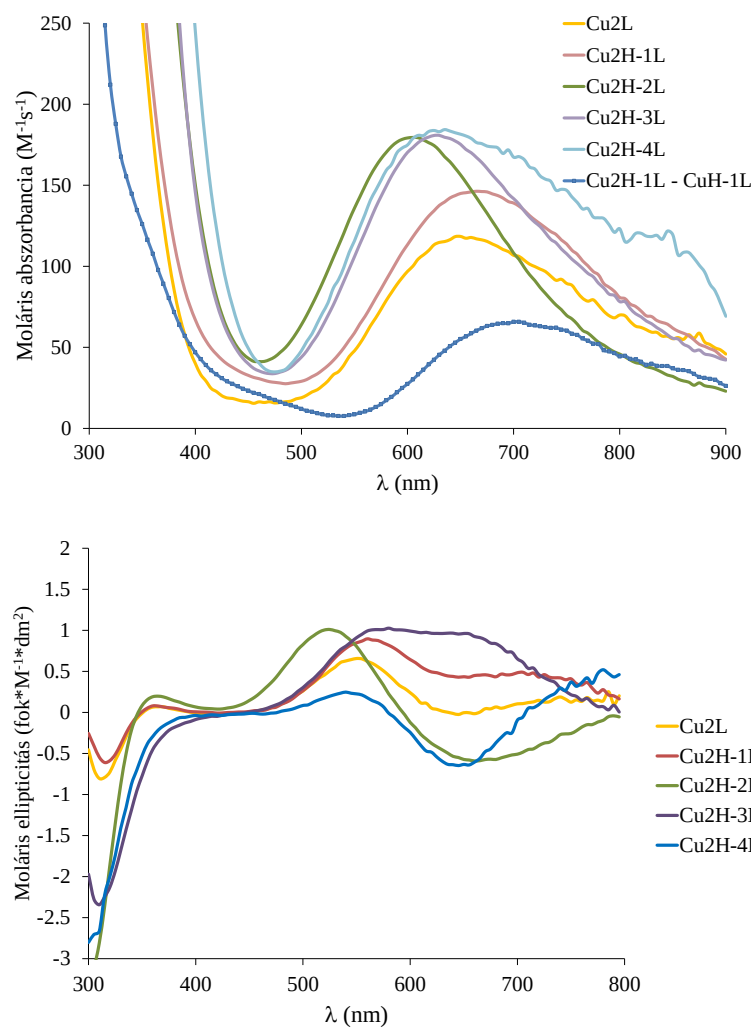
15. ábra: A ligandum-réz(II) 1:2 arányú rendszerében mért UV-látható (fent) és CD (lent) spektrumai.



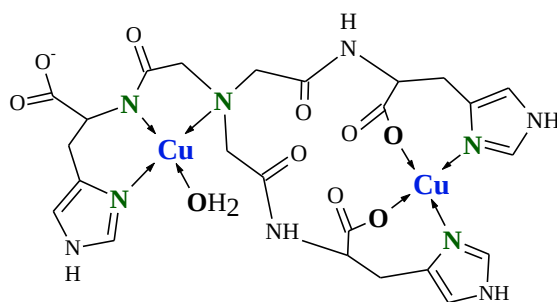
16. ábra: A CuH_2L részecske feltételezett szerkezete.

Ligandum-réz(II) 1:2 arány mellett az első domináns mennyiségben képződő kétmagvú komplex a $\text{Cu}_2\text{H}_1\text{L}$, amelynek koncentrációja pH 6 körül mutat maximumot (11. ábra). Az

előző tapasztalatok és a viszonylag intenzív egyedi CD spektruma (17. ábra) alapján e komplexben valószínűleg már jelen van egy koordinált amid-nitrogén. Ha moláris látható spektrumából kivonjuk a CuHL/CuL/CuH₁L komplexekre jellemző spektrumot (17. ábra), akkor a második rézre egy kb. 700 nm-nél maximumot mutató 'számolt spektrumot' kapunk. Ez kb. megfelel egy olyan {2N_{im},2COO⁻} típusú réz(II) környezetnek (18. ábra), amit a ligandum rendelkezésre álló további donorcsoportjai alakíthatnak ki (ui. ekkor az összes imidazolgyűrű deprotonált).

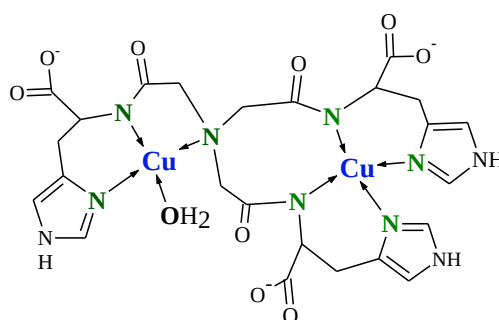


17. ábra: A NTAHis₃ ligandum 2:1 fém-ligandum arányú réz(II)komplexeinek számolt egyedi moláris UV-Vis (fent) és CD (lent) spektrumai.



18. árba: A $\text{Cu}_2\text{H}_1\text{L}$ részecske feltételezett szerkezete.

A következő két deprotonálódás során a d-d elnyelési sávok jelentősen eltolódnak a nagyobb energiák felé, valamint drámai változások következnek be az egyedi CD spektrumokon is (17. árba). Mindezek két további amid-nitrogén koordinációjára utalnak, így a $\text{Cu}_2\text{H}_3\text{L}$ komplexben feltehetően $\{\text{N}_{\text{terc}}, \text{N}^-, \text{N}_{\text{im}}, \text{O} + 2\text{N}_{\text{im}}, 2\text{N}^-\}$ típusú koordináció valósul meg (19. árba).



19. árba: $\text{Cu}_2\text{H}_3\text{L}$ részecske feltételezett szerkezete.

pH 10 felett egy újabb deprotonálódást volt tapasztalható. Bár a $\text{Cu}_2\text{H}_4\text{L}$ részecskére viszonylag csekély mennyiség képződik a vizsgált pH tartományban, így egyedi spektrumát a szokottnál nagyobb bizonytalanság terheli, a 17. árba alapján ezt a folyamatot tekintélyes CD jelalak változás kíséri, így az feltehetően nem egy koordinált víz deprotonálódásához, inkább egy imidazolgyűrű pirrolszerű nitrogénjének fémionhoz történő koordinációjához köthető.

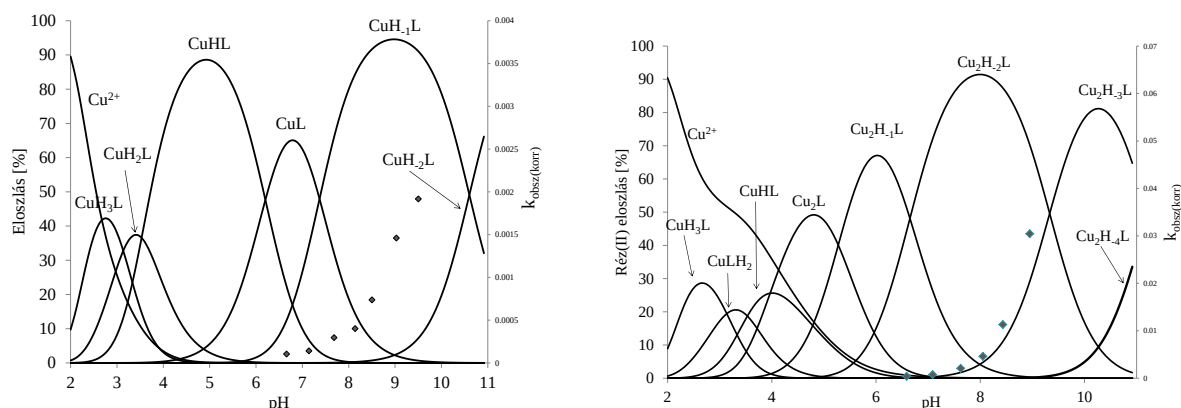
4.4. A réz(II) komplexek enzimutánzó sajátsága

4.4.1. Pirokatechin-oxidáz aktivitás

Vizsgálataink során szubsztrátként 3,5-di-tercbutil-pirokatechint (H_2DTBC) használtunk. A reakciók végbemenetele után újra megmértük a pH-értékeket, hogy megbizonyosodjunk azok állandóságáról a mérések ideje alatt. A 3,5-di-terc-butilpirokatechin oxidációja révén keletkező 3,5-di-terc-butil-1,2-benzokinon (DTBQ) 400 nm-es hullámhosszon intenzív fényelnyelést mutat, ezért képződése spektrofotometriásan követhető. Az abszorbancia-idő profil kezdeti szakasza lineáris, azonban a vártnál jóval hamarabb elhajlást mutat, mivel az oldott dioxidigén nem pótlódik. Ezért adataink értékelésénél, a kezdeti sebességek módszerének megfelelően csak a kezdeti, lineáris szakaszt vettük figyelembe.

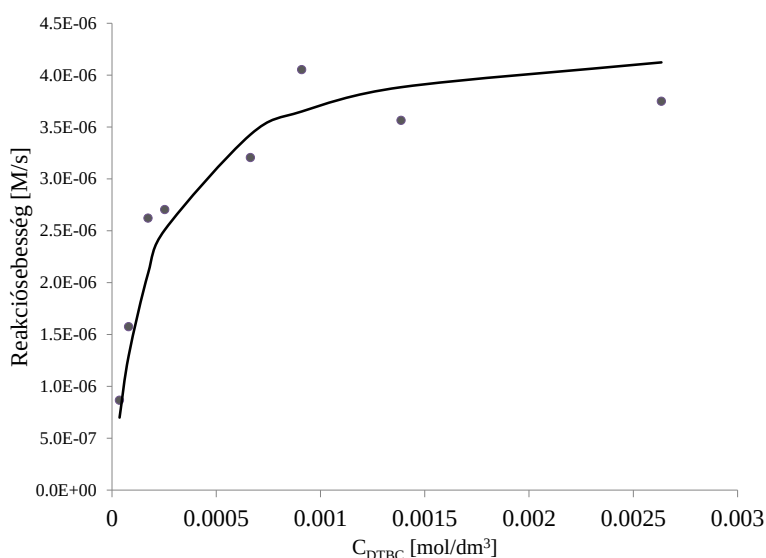
A vizsgálat során a H_2DTBC oxidációja két párhuzamos folyamatban valósul meg, egyrészt a fémkomplex(ek) által katalizált reakcióban, másrészt a szubsztrát autooxidációja révén. Az autooxidáció pH-függését a csoportban korábban már részletesen vizsgálták, így azt minden esetben korrekcióba vettük.

Első lépésben a komplex(ek) által elősegített oxidáció pH-függését vizsgáltuk 1:1 és 2:1 fém ligandum arányú rendszerekben (20. ábra). A meghatározott látszólagos sebességi együtthatók pH függése hasonló a két rendszerben, azonban 1:2 ligandum-réz(II) arány esetén azok értéke kb. harmincszor nagyobb, így a további vizsgálatokat csak utóbbi rendszerben végeztük el. Bár lehet némi különbség a komplexek vízben és 50 m/m % etanol vízben mérhető eloszlás görbéi között, a látszólagos sebességi együtthatók növekedése párhuzamot mutat a Cu_2H_3L részecske koncentrációjával. Ez alapján az feltételezzük, hogy a mért pirokatechin oxidáz aktivitás döntően a Cu_2H_3L összetételű komplexhez rendelhető.



20. ábra: A H₂DTBC oxidációjának pH-függése a Cu(II)-L 1:1 (bal) és Cu(II)-L 2:1 (jobb) rendszerekben (50 m/m% EtOH/H₂O, c_{H₂DTBC} = 0,0008 M, [Cu(II)]_{tot} = 5,0×10⁻⁵ M; I = 0,1 M) és a vizes közegben mért részecskeeloszlási görbék.

Vizsgáltuk a reakció kezdeti sebességének a szubsztrát koncentrációtól való függését is 2:1 fém:ligandum arány és pH 8.9 mellett. Amint az a 21. ábrán látható, viszonylag kis H₂DTBC koncentráció mellett a reakció sebessége azzal egyenes arányban nő, majd a szubsztrát kb. tízszeres feleslegénél telítésbe hajlik. Ez egy előegyensúlyra, a szubsztrátot és a komplexet tartalmazó terner komplex kialakulására utal. E szerint a folyamat leírható a Michaelis-Menten enzimkinetikai modell segítségével. A Michaelis-Menten modellben szereplő k_b és K_M értékeket nemlineáris paraméterillesztéssel határoztuk meg ($k_b = 0.4440 \text{ s}^{-1}$, $K_M = 1.93 \times 10^{-4} \text{ M}$, a 21. ábrán a folytonos vonal az ezekből számolt kezdeti sebességeket mutatja). A meghatározott értékek igen erős szubsztrát-komplex kölcsönhatásra és gyors intramolekuláris elektroncserére utalnak. A 3. táblázatban felsorolt korábban vizsgált peptidkomplexek adataival összehasonlítva kimagasló értékekről beszélhetünk. Az, hogy a kétmagvú komplex aktivitása jóval meghaladja az egymagvú réz(II)-peptid komplexek aktivitásainak dupláját, arra utal, hogy a katalitikus reakció során a két rézcentrum részvétele szinergikus hatást fejt ki az aktivitásra, a réz(II)ionok együttműködése révén tekintélyes pirokatechin oxidáz utánzó hatás valósul meg.



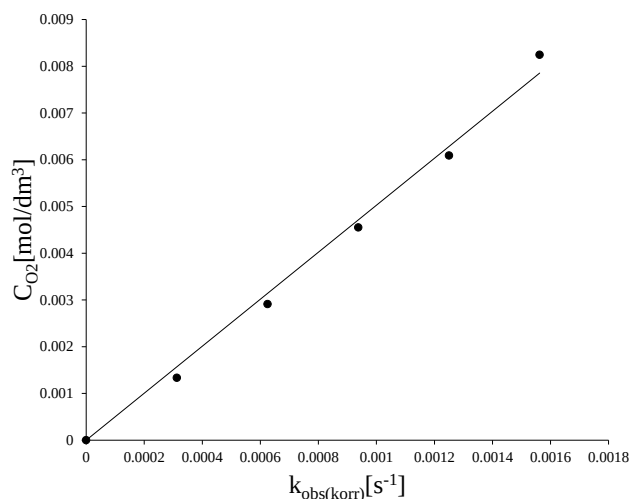
21. ábra: A H₂DTBC oxidációjának függése a H₂DTBC koncentrációjától a L-Cu(II) 1:2 rendszer jelenlétében ($[Cu^{2+}]_{tot} = 1 \times 10^{-4}$ M, $pH_{corr} \sim 9.0$).

	<i>Cu(II)-L komplexek jellemző kinetikai paraméterei</i>		
	k_b [s ⁻¹]	K_M [M]	k_b/K_M [M ⁻¹ s ⁻¹]
NTAHis₃ (Cu/L=2:1 ; pH = 9)	0.444	1.93x10⁻⁴	2300.5
trenHis ₃	0.0708	1.12x10 ⁻⁴	631.4
Ac-KAHEFGHSLGLDHSK-NH ₂	0.333	7.46x10 ⁻⁴	446.2
Ac-RHQAGPPHSR-NH ₂	0.0513	2.407x10 ⁻⁴	213.1
HADHDHKK-NH ₂	0.0398	5.82x10 ⁻⁴	68

3. táblázat: A vizsgált valamint néhány korábbiakban vizsgált peptid-réz(II) komplexek pirokatechin oxidáz aktivitásának összehasonlítása.

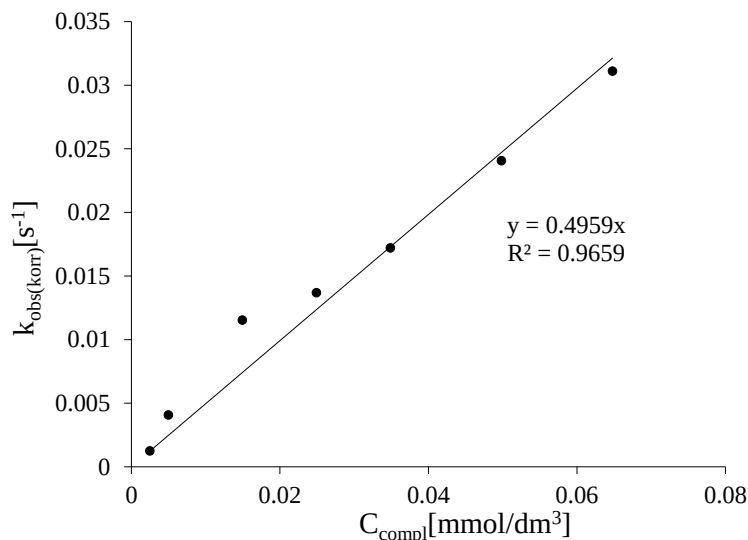
A reakcióban reaktánsként szerepel a dioxigén, ezért megvizsgáltuk az oxidáció sebességének [O₂]-tól való függését. A dioxigénfüggést 9.1 pH-jú oldatban, 5×10^{-5} M komplex és 7.28×10^{-4} M H₂DTBC koncentráció mellett végeztük. A mérések során az argonnal oxigénmentesített, valamint oxigéngázzal telített etanol (és a komplexet tartalmazó vizes oldatok) elegyítésével állítottuk elő különböző mennyiségű oldott dioxigént tartalmazó oldatainkat. Követtünk egy olyan reakciót is, ahol csak oxigénmentesített etanolt adtunk a vizes oldathoz (utóbbi tartalmazott oldott oxigént), és az ehhez tartozó sebességi állandóval

korrigáltuk a növekvő oxigénkoncentráció mellett meghatározott értékeket. Ez a korrekció a görbe meredekségét nem befolyásolja (viszont így a 22. ábrán látható értékek nem hasonlíthatók össze közvetlenül a pH-függésnél bemutatott értékekkel). Az eredmények szerint a reakció sebességi együtthatója egyenesen arányos az oxigén koncentrációjával.



22. ábra: A H_2DTBC oxidációjának függése az oldott oxigén koncentrációjától a Cu(II)-L 2:1 arányú rendszer jelenlétében ($C_{\text{komplex}} = 5 \times 10^{-5} \text{ M}$, $\text{pH}_{\text{kor}} \sim 9$).

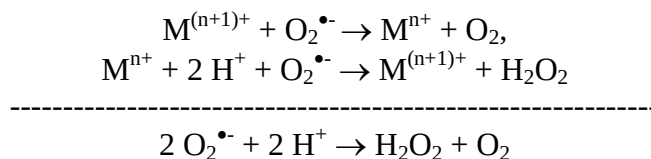
A sebességi együtthatónak a komplex koncentrációjától való függését is vizsgáltuk ($\text{pH} \sim 8.8$, $[\text{H}_2\text{DTBC}] = 4.3 \times 10^{-4} \text{ M}$). A látszólagos sebességi együttható értékét, mint mindig, a lejátszódó autooxidációval most is korrigáltuk. A 23. ábra alapján megállapíthatjuk, hogy komplex koncentrációja és a sebességi együttható értéke között lineáris kapcsolat van. Az adatsorra illesztett egyenes meredeksége a folyamat látszólagos másodrendű sebességi együtthatóval egyenlő, mely az enzimkinetika szerint megegyezik $k_b/(K_M + [S])$ értékével, ami $0.67 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Ez az érték viszonylag jó egyezést mutat a 23. ábrából leolvasható meredekséggel ($0.4959 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).



23. ábra: A H_2DTBC oxidációjának függése a komplex koncentrációjától a Cu(II)-L 2:1 arányú rendszer jelenlétében ($C_{\text{H}_2\text{DTBC}} \sim 4.3 \times 10^{-4} \text{ M}$, $\text{pH}_{\text{korr}} \sim 8.8$).

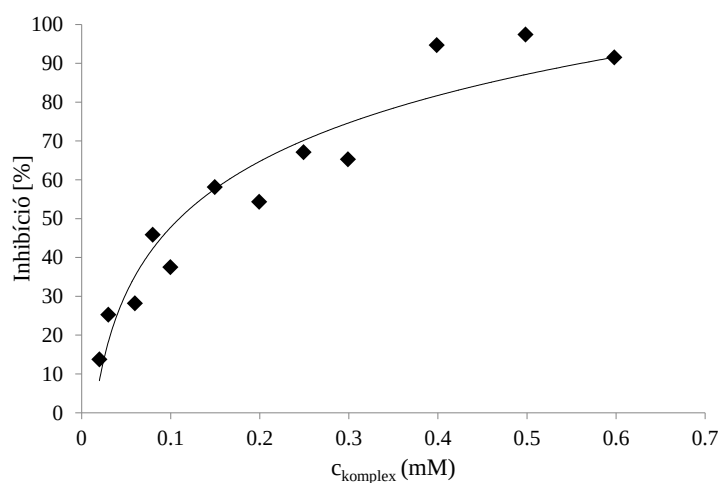
4.4.2. Szuperoxid dizmutáz aktivitás vizsgálata

Szuperoxid dizmutáz aktivitással kapcsolatos méréseinket a fiziológias körülményeknek megfelelő $\text{pH} = 7.4$ -nél végeztük. A szuperoxid dizmutázok által katalizált diszproporciós reakció önmagában is lejátszódik, de sebessége ($k' = 10^{-4} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $\text{pH} = 7.4$) nem elég nagy ahhoz, hogy a képződő gyökök károsító hatását kiküszöbölje. A szervezetben működő SOD enzimek a diffúziós kontroll határát elérő sebességgel ($k' \sim 2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $\text{pH} = 7.4$) reagálnak a szuperoxid-gyökionnal, így fontos védelmet jelentenek az oxidatív stressz ellen. A reakció az alábbi mechanizmus szerint játszódik le:



Réz(II)komplexeink szuperoxid-dizmutáz aktivitását a McCord-Fridovich-féle indirect tesztreakción keresztül tanulmányoztuk [18]. A mérési körülmények által megkívánt komplexkoncentráció a potenciometriás méréseknél alkalmazott koncentrációviszonyokhoz képest igen kicsiny, ezért szimuláltuk a réz(II)-ligandum 2:1 arányú rendszerben, $\sim 1.5 \times 10^{-5} \text{ M}$ -os komplexkoncentráció nagyságrendnél képződő komplexek eloszlását. Eredményként azt tapasztaltuk, hogy még ilyen kis koncentráció mellett is dominánsak a kétmagvú komplexek, tehát a mért aktivitás nagyrészt ezekhez rendelhető.

A kiszámított inhibíciót [%] a komplexkoncentráció függvényében ábrázolva (24. ábra) leolvasható az IC₅₀ érték (a mi komplexünk esetében ez 0.13 μ M), melyet néhány irodalmi adattal együtt a 4. táblázatban tüntettem fel. Ez az érték a korábban vizsgált réz(II)-peptid komplexekkel összehasonlítva viszonylag hatékony SOD aktivitásra utal. A 24. ábrán látható mérési pontok szórása azonban viszonylag nagy, így a kielégítő pontosságú SOD aktivitás megadásához még további párhuzamos mérések szükségesekcsakúgy mint az 1:1 réz-ligandum arányú rendszert illetően.



24. ábra: A Cu(II)-L 2:1 arányú rendszer SOD aktivitása pH = 7.4-nél a komplexkoncentráció függvényében.

Komplex	IC ₅₀ [μ M]
Cu.Zn-SOD (pH 6.8)	0.0045
Cu(II) –RHQAGPPHSR; 1/1 (pH 7.4)	0.1
Cu(II) –HADHDHKK; 1/1 (pH 7.0)	0.11
Cu(II)-NTAHis₃; (pH 7.4)	0.13
Cu(II)–trenHis ₃ ; 1/1 (pH 7.4)	0.17
Cu(II)–Ac-HVH-NH ₂ ; 1/1 (pH 7.4)	0.2
Cu(HPO ₄) (pH 7.4)	1.06

4. táblázat: A Cu(II)-L 2:1 rendszer és néhány korábban vizsgált réz(II)-peptid komplex SOD aktivitása.

5. Összefoglalás

Elsőként állítottunk elő szabad imidazol- és karboxilcsoportokat tartalmazó tripodális pszeudopeptidet (NTAHis₃). Az ligandum protonálódását és réz(II)komplexeinek képződését pH potenciometriás mérésekkel jellemeztük. A képződött komplexek szerkezetének meghatározására cirkuláris dikroizmus és UV-látható spektroszkópiás módszereket alkalmaztunk. A kutatócsoport célkitűzéseinek megfelelően, a réz(II)komplexek katalitikus sajátosságait is megvizsgáltuk SOD és pirokatechin oxidáz utánzó funkcióban.

A ligandum réz(II)ionok jelenlétében 1:1 illetve 2:1 fém-ligandum arányú komplexeket képez. Spektroszkópiás mérések alapján az imidazolnitrogének koordinációja mellett a monokomplexekben már igen alacsony pH-n (pH ~ 3) megindul az amidnitrogének fémion-indukált deprotonálódása, emellett a tripodális alap központi tercier aminocsoportja is részt vesz a réz(II)ion megkötésében. Ez a folyamat egy nagy stabilitású {N_{amino},N',N_{im}} koordináció kialakulásához vezet, amely analóg a Gly-His dipeptid domináns CuH₁L komplexével. A lúgos pH tartományban egy további amidnitrogén koordinációja során egy szokatlan 5-ös koordinációs számú CuH₂L komplex képződik.

Fémfelesleg esetén már viszonylag alacsony pH-n képződnek kétmagvú réz(II)komplexek, melyekben az egyik fémion környezetében a már említett {N_{amino},N',N_{im}} típusú koordináció valósul meg, míg a másik réz(II)ion savas körülmények között {2N_{im},2COO⁻}, lúgos pH-n {2N_{im},2N⁻} kötésmóddal bír. Vizsgáltuk a komplexek pirokatechin oxidáz és szuperoxid dizmutáz utánzó tulajdonságait. A képződő kétmagvú komplexek mindkét modellreakcióban kiemelkedő aktivitást mutattak.

6. Irodalomjegyzék

- [1] A. G. Blackman, *Polyhedron*, **2005**, 24, 1–39.
- [2] A. M. Pujol, C. Gateau, C. Lebrun, P. Delangle, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, 6928–6929.
- [3] Gelinsky M, Vogler R, Vahrenkamp H., *Inorg Chem.*, **2002**, 41, 2560-4.
- [4] Ibrahim M. M., Mersal G. A., *J. Inorg. Biochem.*, 2010, 1041, 1195-204.
- [5] I. Sóvágó, E. Farkas, A. Gergely, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* (1982) 2159
- [6] I. Sóvágó, 'Metal complexes of peptides and their derivatives', in K. Burger (Ed.), *Biocoordination Chemistry*, Ellis Horwood, Chichester, 1990
- [7] Kiss T., Gajda T., Gyurcsik B., *Bevezetés a bioszervetlen kémiába*, Nemzeti Tankönyvkiadó, 2007
- [8] K. Selmeczi, M. Réglér, M. Giorgi, G. Speier, *Coord. Chem. Rev.*, **2003**, 245, 191–201.
- [9] A. Neves, L. M. Rossi, A. J. Bortoluzzi, B. Szpoganicz, C. Wierzchicki, E. Schwingel, W. Haase, S. Ostrovsky, *Inorg. Chem.*, **2002**, 41, 1788–1794.
- [10] A. Jancsó, Z. Paksi, N. Jakab, B. Gyurcsik, A. Rockenbauer, T. Gajda, *Dalton Trans.*, **2005**, 3187–3194.
- [11] S. Timári, R. Cerea, K. Várnagy, *J. Inorg. Biochem.*, **2011**, 105, 1009–1017.
- [12] Z. Paksi, A. Jancsó, F. Pacello, N. Nagy, A. Battistoni, T. Gajda, *J. Inorg. Biochem.*, **2008**, 102, 1700–1710.
- [13] D. Árus, A. Jancsó, D. Szunyogh, F. Matyuska, N. V. Nagy, E. Hoffmann, T. Körtvélyesi, T. Gajda, *J. Inorg. Biochem.*, **2012**, 106, 10–18.
- [14] W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.*, **1970**, 103, 788–798.
- [15] F. J. C. Rosotti, H. Rosotti, *The determination of stability constants*, McGraw-Hill Book Co., New York, **1962**, 149.
- [16] E. Högfeltdt, *Stability Constants of Metal-Ion Complexes*, Part A. Inorganic Ligands, Pergamon, New York, **1982**, 32.
- [17] L. Zékány, I. Nagypál, G. Peintler, *PSEQUAD for chemical equilibria*, Technical Software Distributors: Baltimore, MD, **1991**.
- [18] J. M. McCord, I. Fridovich, *J. Biol. Chem.*, **1969**, 244, 6049.
- [19] R.G. Bates, *Determination of pH*, John Wiley & Sons, New York, **1964**, pp. 226-227.

- [20] Gajda T., Henry B., Delpuech J.J., *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **1993**, 1301-1306.
- [21] Groves JT, Chambers RR *J. Am. Chem. Soc.*, 106, **1984**, 630-638