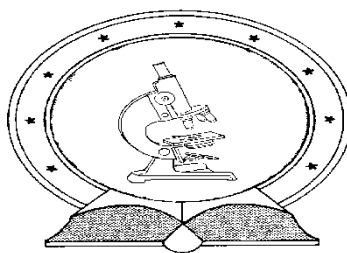


TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI DOLGOZAT

Hisztidint és aszparaginsavat tartalmazó peptidek szintézise és átmenetifém-komplexeik vizsgálata



1949

Készítette: Erdei Judit Zsuzsa
Vegyész MSc
I. évfolyam

Témavezető: Dr. Várnagy Katalin
egyetemi docens

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

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom *Prof. Dr. Fábián István* tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy dolgozatomat az általa vezetett Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszéken készíthettem el.

Köszönöm témavezetőmnek, *Dr. Várnagy Katalin* egyetemi docensnek, hogy munkámat végig nagy türelemmel és odaadással vezette, mindig fordulhattam hozzá kérdéseimmel és nagyon sokat tanultam tőle.

Köszönöm *Dr. Timári Sarolta* tudományos munkatársnak, a mérési módszerek elsajátításában nyújtott elengedhetetlen segítségét, hasznos tanácsait és hogy a munkámat végig figyelemmel kísérte.

Továbbá köszönöm *Grenács Ágnes* és *Csire Gizella* PhD-hallgatóknak, hogy a segítséget nyújtottak a peptidszintézisben és a HPLC mérésekben

Köszönet illeti a *Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoport* minden tagját, hogy a munkám elvégzéséhez baráti légkört biztosítottak és bármikor fordulhattam hozzájuk kérdéseimmel.

Végül köszönöm *Dr. Kurtán Tibornak*, hogy lehetőséget biztosított a cirkuláris dikroizmus mérések elvégzéséhez.

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

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS.....	1
2. CÉLKITŰZÉS.....	3
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	4
3.1. A vizsgált átmenetifém-ionok koordinációs kémiája	4
3.2. Peptidek sav-bázis tulajdonságai és koordinációs kémiája.....	7
3.3. Hisztidint tartalmazó peptidek komplexkémiája	8
3.4. Védett hisztidin tartalmú peptidek átmenetifém-komplexei.....	9
4. KÍSÉRLETI KÖRÜLMÉNYEK, VIZSGÁLATI MÓDSZEREK.....	12
4.1. Felhasznált vegyszerek	12
4.2. Peptidszintézis	12
4.3. pH-potenciometria	16
4.4. UV-látható spektrofotometria	18
4.5. Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia	19
4.6. ¹ H-NMR spektroszkópia.....	20
5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTELMEZÉSÜK.....	21
5.1. A vizsgált ligandumok sav-bázis tulajdonságai.....	21
5.2. A vizsgált ligandumok Cd(II)-komplexei.....	22
5.2.1. Oldategyensúlyi vizsgálatok	22
5.3. A vizsgált ligandumok Zn(II)-komplexei	24
5.3.1. Oldategyensúlyi vizsgálatok	24
5.4. A vizsgált ligandumok Ni(II)-komplexei	26
5.4.1. Oldategyensúlyi vizsgálatok	26
5.4.2. Spektroszkópiai vizsgálatok.....	32
6. ÖSSZEFOGLALÁS	39
7. SUMMARY	41
8. IRODALMI HIVATKOZÁSOK.....	42

1. BEVEZETÉS

A nikkelt az emberi szervezetben állandó, kimutatható mennyiségben van jelen. Egy 70 kg-os ember esetében 7-10 mg nikkelt lehet fel. Földünkön nagy koncentrációban fordul elő, ezért az emberi szervezetben hiánybetegség nem alakul ki. Toxikus hatása ismeretes, sőt néhány vegyülete rákkeltő és a $\text{Ni}(\text{CO})_4$ belégzése fulladást vagy akár halált is okozhat. Mégis a leggyakoribb nikkelt okozta allergiás megbetegedés a Nickel Dermatitis, a nikkelt tartalmazó tárgyak, főként ékszerek által kiváltott ekcéma jellegű bőrkiütés. A nikkelt az emberi szervezetben főleg az albuminhoz kötve található meg. Az eddig rendelkezésre álló adatok alapján azonban a nikkeltartalmú biomolekuláknak az emlősök, így például az ember esetében létfontosságú szerepe nem ismert.

Egy 1975-ben tett felfedezés rámutatott, hogy az ureáz enzim a feltételezésekkel ellentétben nem cinket tartalmaz, hanem nikkelt. Ekkortól vált ismertté a nikkelt biológiai szerepe. A nikkeltartalmú enzimet igen gyakran kimutatták baktériumok és a növények vizsgálata közben is.

A nikkelt tartalmú enzimek egy másik nagy csoportja a hidrogenázok, melyet nemrég fedeztek fel, mivel a fémion kimutatása élő szervezetekben igen nehézkes. A hidrogenáz enzim esetében végig tudták követni a nikkeltionok teljes redukcióját, mivel a nikkeltközpont egymagvú, így az ESR-jelek alapján a különböző állapotok beazonosíthatók.^{1,2}

A cink rendkívül fontos és nélkülözhetetlen fémion az emberi szervezet számára. Az élőlényekben főként az enzimek alkotójaként van szerepe. Szervezetünk napi cink szükséglete kb. 2g.

A cink több fontos enzim alkotójaként is szerepel az emberi szervezetben. Jelenlegi ismereteink szerint a metallohidrolázok leggyakrabban $\text{Zn}(\text{II})$ -ionokat tartalmaznak. Ennek oka lehet, hogy a cink inert redoxi reakciókban, erős Lewis-savként viselkedik és képes erős koordinációra, illetve benne a d-pályák telítettek, tehát a kristálytér stabilizációs energia nem befolyásol.

Az $\text{Zn}(\text{II})$ -tartalmú enzimeknek két fontos funkciója van az emberi szervezetben, egyrészt katalitikus folyamatok enzimjeinek alkotója, másrészt szerkezetalkotó funkcióval rendelkezik.

Katalízisben résztvevő enzimek például a karboxi-peptidáz, szénsav-anhidráz és a máj-alkohol-dehidrogenáz, míg az alkohol-dehidrogenázban szerkezetalkotó funkciót tölt be.

Azon enzimekben, ahol katalízisben vesz részt, leggyakrabban három koordinációs helynél a hisztidin nitrogénje foglal helyet, a negyedik általában pedig egy vízmolekula.

A működés során három mechanizmus lehet. Az első esetben a vízmolekulát kiszorítva a szubsztrát közvetlenül a cinkionhoz kötődik, vagy a vízmolekula ionizálódik és a OH- csoport kölcsönhatásba lép a szubsztráttal, míg harmadik esetben a szubsztrát az ötödik koordinációs helyet kihasználva, közvetlenül a cinkionhoz kötődik.¹

Azon enzimekben, ahol szerkezetalkító szerepe van, a négy koordinációs helyet O-,N- vagy S-donoratomok foglalják el. Ennek következtében a vízmolekula nem tud részt venni a koordinációban, mint ahogy szubsztrát sem.¹

Újabb felfedezések szerint a DNS replikáció során a cinkionoknak a genetikai információ átadásában meghatározó szerepük van, szabályozzák a folyamatot. Ezeket cink-ujjaknak hívják, melyek 9-10 cinkiont tartalmazó fehérjék. 4-4 aminosav koordinál egy cinkiont, tetraédes geometriával, ez tudja stabilizálni a fehérje kiálló, ujszerű konformációját. A nikkelionok és a cinkionok az emberi szervezetben főként hisztidint tartalmazó fehérjékhez kötődve vannak jelen.¹

A Cd(II) mérgezőbb mint az ólom. Ha kadmiummérgezés fordul elő, a csontok nagyon törékennyé válnak és az egész csontozat eltorzul. Japánban az 1950-es években okozott súlyos gondokat az Itai-itai kór, mely a rizsföldek öntözése során rendkívül szennyezett vízzel került a szervezetbe, főként idősebb nőket megbetegítve. A kadmium nagyon erősen tud kötődni a csontokban, nehezen ürül ki, ami évtizedekbe telik. Elsősorban a májban és vesében halmozódik fel, azonban más nehézfémekkel összehasonlítva nem tud átjutni a vér-agy gáton, tehát a központi idegrendszert nem károsítja.

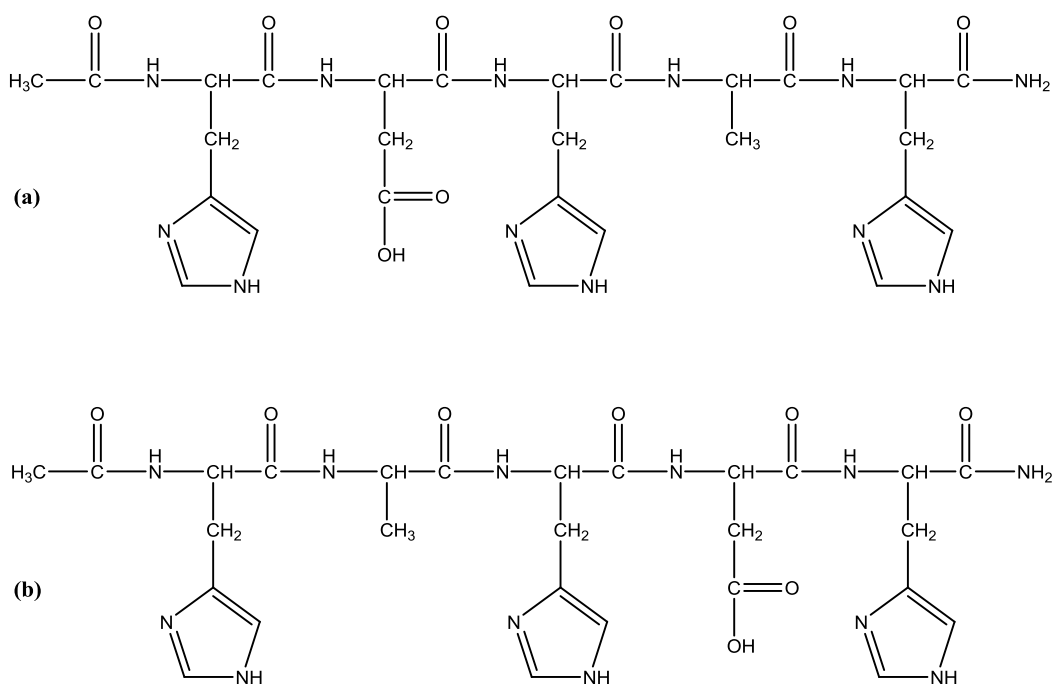
A kadmiumot főként elemek gyártása és azok bevonatainak készítése során használják, illetve a vegyületeit a festékgyártásban és műanyagok stabilizátoraként. Manapság Ni/Cd akkumulátorok gyártása során alkalmazzák.²

A kadmium fő veszélyforrása az ember számára az, hogy mivel a cinknél lágyabb tulajdonságú, képes azt kiszorítani a cisztein által koordinált kötőhelyekről, például a cink-ujj fehérjék esetében. Egy másik tulajdonsága, ami szintén a toxicitását okozza, hogy a csontokból a kalciumot képes kiszorítani, így tönkretéve az ember csontozatát.

Ezek megismeréséhez igen változatos összetételű és hosszúságú peptid átmenetifém-ion komplexének oldategyensúlyi vizsgálatát végezték el. A Tanszéken, a Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoportban is széleskörű kutatások folynak a különböző hisztidin tartalmú peptidek fémkomplexeinek terén.

2. CÉLKITŰZÉS

Célunk az volt, hogy két, aszparaginsavat is tartalmazó, multihisztidin peptidet állítsunk elő: az Ac-HisAspHisAlaHis-NH₂ (Ac-HDHAH-NH₂) (1/a. ábra) és az Ac-HisAlaHisAspHis-NH₂ (Ac-HAHDH-NH₂) (1/b. ábra). Mindkét peptid N-terminálison acetilsoporttal védett, illetve a C-terminuson savamid védőcsoportot tartalmaz.



1. ábra A két vizsgált peptid szerkezeti képlete

A két peptid szintézise után ezek átmenetifém-ionnal alkotott komplexeinek oldategyensúlyi vizsgálatával folytattam a munkát pH-potenciometriás, UV-Vis spektrofotometriás és CD-spektroszkópiás, illetve néhány Ni(II)-komplex esetében ¹H-NMR spektroszkópiás módszerek alkalmazásával.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1 A vizsgált átmenetifém-ionok koordinációs kémiája³

A nikkell komplexek esetén leggyakrabban a fémion oxidációs állapota 0 és +4 között változik. Legtöbbször a +2-es oxidációs állapot fordul elő. Megállapíthatjuk, hogy a nikkell(II) igen változatos geometriájú komplexek alkotására képes. A koordinációs szám változása azonban igen szűk határokon belül mozog, általában 4-es és 6-os, ennél nagyobb koordinációs szám melletti komplexek képzése rendkívül ritka. Előfordulnak még emellett 1-es és 3-as koordinációs számú komplexek, azonban ezek is viszonylag ritkák.

A 3-as oxidációs állapotban egymagvú komplexek fordulnak elő, melyek síkalkatúak vagy síkháromszög sztereokémiával rendelkeznek. Erre példa a K_3NiF_6 összetételű vegyület, mely ibolya színű, kristályos anyag. Ebbe a csoportba tartozik még a $[Ni(bipy)_3]^{3+}$ -ion (bipy: 2,2'-dipiridil), a $[NiBr_3(PEt_3)_2]$ (PEt_3 : trietil-foszfín), ami fekete színű és trigonális bipiramisos szerkezettel rendelkezik, illetve azon komplexek, melyekben N-donoratomot tartalmazó makrociklusos ligandum koordinálódik a nikkellhez.

A d^9 elektronkonfigurációjú, +1-es oxidációs állapotú Ni(I)-ion rendkívül ritka. Csupán néhány enzimben feltételezik létezését. Ezen oxidációs állapot komplexei sárga és vörös színig terjedő színskálán léteznek. A d^9 elektronszerkezethez mérten a Ni(I)-ion komplexei stabilisak, főként tetraéderes foszfínkomplexek alkotói és paramágneses tulajdonsággal rendelkeznek. Az ebbe a csoportba tartozó komplexek közül újonnan vált érdekessé a $K_3[NiO_2]$. Ez azért is egy figyelemre méltó vegyület a kutatók számára, mert kis oxidációs állapotának ellenére oxigéntartalmú vegyületeket alkot, ami főleg a nagyobb oxidációs számú vegyületekre jellemző.

A d^6 elektronkonfigurációjú, +4-es oxidációs állapotú komplexvegyületek oktaéderes geometriával és diamágneses tulajdonsággal bírnak.

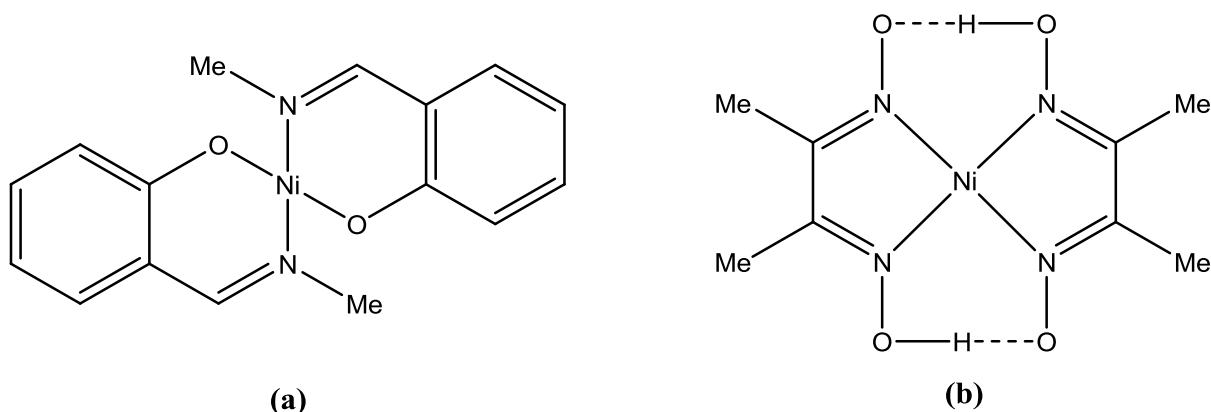
Leggyakoribbak a d^8 elektronkonfigurációjú, +2-es oxidációs állapotú komplexek. A nikkell(II) sztereokémiájának meghatározása azonban csak hosszas mérések révén vált biztossá.

A nikkell(II) alkotta komplexvegyületek esetén a legnagyobb koordinációs szám hat, nagyon ritka esetekben lehet ennél nagyobb. Négyes koordinációs szám esetén főleg oktaéderes és síknégyszetes szerkezet jellemző, de előfordulhat tetraéderes szerkezet is. Ötös

koordinációs szám esetén trigonális bipiramisos és négyzetes piramisos elrendeződés figyelhető meg.

Hatos koordinációs számmal a Ni(II) oktaéderes elrendeződésű komplexeket alkot, amelyek könnyen előállíthatóak általában a vízmolekulák helyettesítésével. Ez főként semleges nitrogéndonor ligandumokkal, így például ammóniával, bipyridinrel vagy tiocianáttal, nitritionnal vagy oxigén-donoratomot tartalmazó ligandumokkal kivitelezhető.

A nikkel(II) szinte minden anionnal sót képez, melyek általában zöld színűek, leggyakoribb a $[\text{Ni}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ -ion, ami minden vizes oldatban jelen van, mert erős komplexképző ligandum nincs a környezetében, mely koordinálódni tudna hozzá. A négyes koordinációs számmal rendelkező komplexek között leggyakoribb a síknégyzetes elrendeződés. Erre példa a [bisz(N-metil-szalicil-aldiminátó)nikkel(II)] (2/a. ábra) és [bisz(dimetil-glioximátó)nikkel(II)] (2/b. ábra), melyek vöröses színűek.



2. ábra: A [bisz-(N-metil-szalicil-aldiminátó)nikkel(II)] (a) és [bisz(dimetil-glioximátó)nikkel(II)] (b) komplexek

A Ni(II) komplexek viselkedése anomáliásnak mondható, különböző egyensúlyok figyelhetők meg oldataikban.

- a) síknégyzetes-tetraéderes egyensúly:** egyes foszfinszármazékok és nagyobb térkitöltésű komplexek esetében figyelhető meg. A tapasztalatok szerint nemkoordináló oldószerekben oldódva hőmérsékletfüggő egyensúly jön létre a tetraéderes, paramágneses és a síknégyzetes, diamágneses komplexek között.
- b) síknégyzetes-oktaéderes egyensúly:** a síknégyzetes elrendeződésű nikkel(II)-komplexek koordináló oldószerben (víz, piridin) való oldódása során igen gyakran oktaéderes komplexek képződhetnek, mivel az oldószer az oktaéder csúcsaihoz tud koordinálódni. Ilyen esetekben olyan oldatok képződnek, melyek mágneses momentuma közbenső értéket ad, tehát az oktaéderes és síknégyzetes forma is jelen

van. Ekkor a mágneses momentum értéke függ a hőmérséklettől és a koncentrációtól is. Gyakrabban fordul elő az, hogy az átalakulás teljesen végbemegy. Erre nagyon jó példa a $[\text{Ni}(\text{L-L})_2\text{X}_2]$ -összetételű komplexek, ahol L=szubsztituált etilén-diamin és X=különböző anionok. Az ilyen felépítésű komplexeket felfedezőjük után Lifschitz-féle sóknak hívják. Ezek közül előfordulnak diamágneses, síknégyszetes tulajdonságúak vagy oktaéderes és paramágneses komplexek.

- c) monomer-oligomer egyensúly:** a már fentebb említett $[\text{Ni}(\text{Me-sal})_2]$ (Me-sal: metil-szalicilaldehid) vegyület alapvetően síknégyszetes komplex. Azonban piridinben való oldódása során biszpiridin adduktummá alakul, illetve kloroformban és benzolban a koncentráció növekedésével a mágneses momentum is növekszik. A jelenség magyarázata a diamágneses tulajdonságú monomer és a paramágneses tulajdonságú dimer vegyületek közötti egyensúly. A dimer vegyület esetén a nikkell koordinációs száma minimum öt. A $[\text{Ni}(\text{acac})_2]$ (acac: acetyl-aceton) komplex trimerizációja során oktaéderes szerkezetet eredményez, azonban híg kloroformos oldatban monomer, síknégyszetes alakot vesz fel.

A cink(II) és kadmium(II) esetében csak a +2-es oxidációs állapottal találkozhatunk. Általában a cink 2-8 közötti koordinációs számmal hoz létre komplexeket. Leggyakrabban tetraéderes komplexeket alkotnak, O-donoratomokkal. A komplexképződés a Zn(II)-ionokkal könnyebben tud végre menni, mint a Cd(II)-ionokkal. A N-donor ligandumokkal – úgy mint ammónia vagy aminosavak – azonban már nagyobb stabilitású komplexeket alkotnak. Egyes komplexekben hármas koordinációs számmal találhatók, azonban a fémionok igyekeznek ennél nagyobb koordinációt elérni, így itt is nagyobb koordinációs számot fedezhetünk fel valójában. Ez a vízmolekulák jelenlétével magyarázható vagy épp a kialakuló asszociációs kölcsönhatásoknak köszönhető.

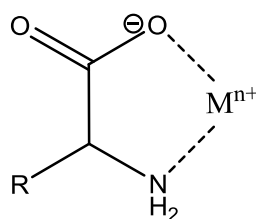
A Cd(II) esetében a cianidionokkal alkotott komplexekben térhálós szerkezet valósul meg. A $\text{Cd}(\text{CN})_2 \cdot 2/3 \text{H}_2\text{O} \cdot \text{Bu}^t\text{OH}$ -komplexben úgynevezett Cd-CN-Cd rudakat találhatunk, melyek hajlítottak és érdekessége, hogy négy cianidion a Cd(II)-ionok kétharmadát tetraéderesen, míg az egyharmadát négy cianidion és két vízmolekula oktaéderesen koordinálja.

Az eddigi eredmények alapján a két fémion esetén nagyobb koordinációs számmal létrejövő komplexek sokszor tetraéderes geometriával egyensúlyban vannak jelen és ha növeljük a ligandum koncentrációját vagy éppen nagy méretű kationokat viszünk a rendszerbe, izolálhatókká válnak. Acetyl-aceton ligandummal való komplexképzés esetén előbb ötös koordináció, majd pedig trimerizáció után hatos koordináció is kialakulhat.

A hatosnál nagyobb koordinációjú komplexek nagyon ritkák, például kelátképző nitráttal alakulhatnak ki, ahol a gyűrű tagszáma is kevés, illetve a koordináció is aszimmetrikus, tehát igen nehéz egyértelműen megállapítani a koordinációs számot.

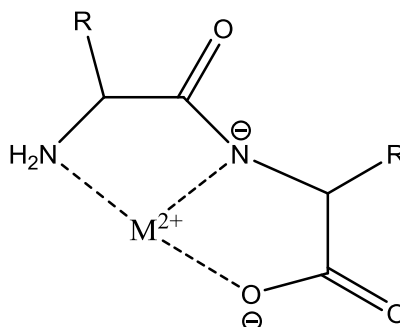
3.2 Peptidek sav-bázis tulajdonságai és koordinációs kémiája

Az aminosavakkal kapcsolatos vizsgálatokból tudjuk, hogy azok számos átmenetifémionnal igen stabilis komplexeket alkotnak, öttagú kelátgyűrűben. A fémion az amino- és karboxilátcsoportokhoz képes kapcsolódni (3. ábra). A koordinációt azonban jelentősen befolyásolják az oldalláncban található donortatomok.



3. ábra: Aminosavak fémkomplexeiben kialakuló öttagú kelátgyűrű

Peptidek esetében a koordinációban résztvevő funkciócsoportok távolabb kerülnek egymástól, így az aminosavaknál megismert módon nem képesek stabilis komplexek kialakítására. Ezen esetekben a peptidekben létrejövő amidkötés fogja szolgáltatni a fémmegkötő helyeket, az oxigén- ([ML]) és nitrogénatom révén ([MLH₁]) (4. ábra). Ez utóbbi komplexképződési folyamat csak néhány átmenetifém-ion, mint például a Cu(II), Ni(II) vagy Pd(II) esetén játszódik le.



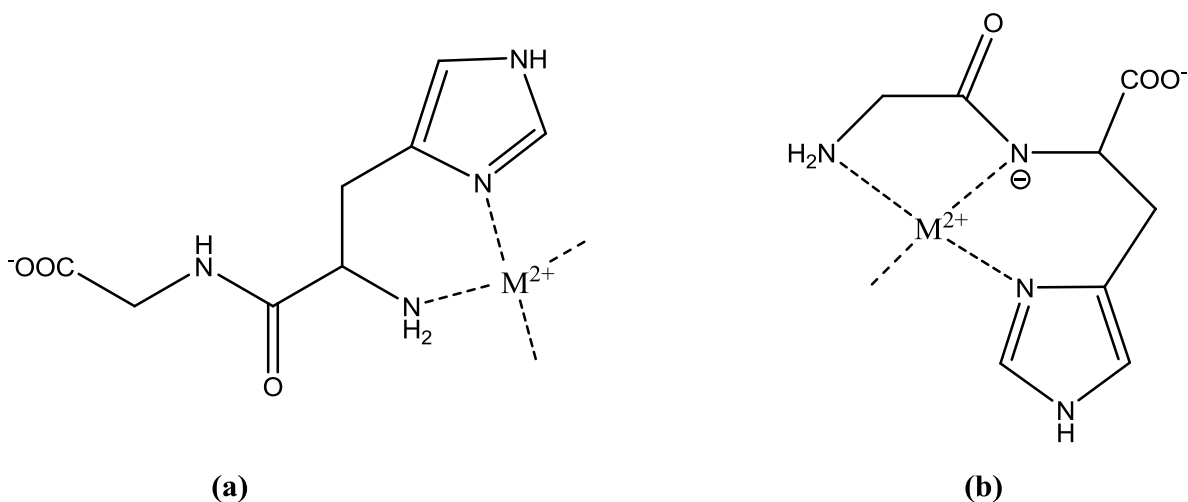
4. ábra: Dipeptidek [MLH₁] összetételű komplexe

A dipeptidek esetében mindannyiszor az amino- és karboxilátcsoport illetve az amidcsoport lehet donorcsoport (4. ábra). Ezek a hosszabb láncú peptidek esetében is jelen vannak, de az amidcsoportok száma értelemszerűen nő és az amino- és karboxilátcsoportok is távolabb kerülnek egymástól. A peptid oldalláncában szintén jelen lehetnek donorcsoportok, ahogy az a hisztidint és aszparaginsavat tartalmazó peptidek esetében is megvalósul.^{2,4}

3.3 Hisztidint tartalmazó peptidek komplexkémiája

A komplexek kialakításában meghatározó szerepet játszik a hisztidin. Külön tényezőként kell figyelembe venni, hogy a vizsgált peptid hány hisztidint tartalmaz, illetve ezek egymáshoz képest hogyan helyezkednek el. Másik meghatározó tényező még a fémion és ligandum aránya is, illetve külön tárgyalandó, hogy a peptid N-vagy C-terminális vége védett-e valamilyen védőcsoporttal.

Az N-terminálison egy hisztidint tartalmazó di- és oligopeptidek a Ni(II)-ionokkal stabilis, hattagú hisztamin típusú kelátgyűrűt képeznek (5/a. ábra). Ha azonban a C-terminális végén helyezkedik el a hisztidin, 5,6-tagú kelátrendszer alakulhat ki (5/b. ábra) egy dipeptid és 5,5,6-tagú kelátrendszer egy tripeptid esetén.



5. ábra: A hisztamin típusú (a) és az 5,6-tagú kelátot tartalmazó koordináció (b) dipeptidek esetén

A több hisztidint tartalmazó ligandumok legegyszerűbb tagja a His-His. A Cu(II)-ionokkal történt vizsgálatokkal arra mutattak rá, hogy három különböző módon köthetik a

fémiont a pH-függvényében.⁶ 4-es pH-n hisztaminszerű koordinációval $[\text{CuLH}]$ komplex alakul ki, itt a fémion a peptid N-terminális végén koordinálódik. 5-6 pH-tartományban átrendeződik és $[\text{CuL}]$ komplex alakul ki. 7-es pH felett $[\text{Cu}_2\text{L}_2\text{H}_2]$ komplex jön létre, ahol mindkét fémion körül azonos, peptidszerű a koordinációs környezet. A több hisztidint tartalmazó peptidek esetében a fémion minden esetben a hisztidin imidazolnitrogénjéhez koordinálódik.⁴

3.4 Védett hisztidin tartalmú peptidek átmenetifém- komplexei

A két és három hisztidint tartalmazó ligandumok Ni(II) -ionokkal való vizsgálata során gyengén savas pH-tartományban $[\text{NiLH}]^{3+}$ komplex kialakulását mutatták ki, pH 6-7 esetén pedig $[\text{NiL}]^{2+}$ és $[\text{NiL}_2]^{2+}$ komplexek képződnek. Ezen komplexek mindegyikében a Ni(II) -ion a molekulában lévő két, illetve három imidazolgyűrűhöz kötődik. A vizsgált peptidek $[\text{NiL}]^{2+}$ komplexei stabilitási állandóinak vizsgálata során kiderült, hogy az imidazol nitrogének számának növekedésével nő a komplex stabilitása is. A legnagyobb stabilitást akkor tapasztalták, amikor a hisztidinek között egy-egy aminosav található.

A nikkel(II)-, kobalt(II)-és kadmium(II)ionokkal alkotott komplexeket vizsgáltak Ac-HAHVH-NH₂, Ac-HVHGH-NH₂ és Ac-HGHVH-NH₂ ligandumokkal. A vizsgálatok azt mutatták, hogy a két, három és négy imidazolt tartalmazó ligandumok esetében mindannyiszor fiziológiás pH-n az $[\text{ML}]$ összetételű komplexek voltak meghatározóak.

A komplexek stabilitását az oldalláncban elhelyezkedő imidazol nitrogének koordinációja biztosítja, melyek makrokelátokat alkotnak. A stabilizáló hatás növekszik az imidazolnitrogének számának növekedésével. A szabad karboxilátcsoport pedig még további stabilizáló hatással bír. Ni(II) komplexek esetén ez a hatás kisebb, mint a koordinált imidazol nitrogének számának növekedésével bekövetkező stabilizáló hatás. A Co(II) -t és Cd(II) -t tartalmazó rendszerek esetén a stabilitás nem elegendően nagy ahhoz, hogy visszaszorítsa a fémionok hidrolízisét.

Ni(II) -ion esetében bekövetkezik az amidnitrogének deprotonálódása és koordinációja minden vizsgált ligandumnál. Lúgos tartományban (pH 8-9) az amidnitrogének deprotonálódása és koordinálódása zajlik, tehát a kialakult $[\text{NiL}]^{2+}$ komplex kialakulásával nem akadályozza meg az amidnitrogének deprotonálódását. Ezekben az esetekben $[\text{NiLH}_2]$ (6/a. ábra) és $[\text{NiLH}_3]$ (6/b. ábra) összetételű komplexek alakulnak ki lúgos tartományban és ligandumfeleslegnél. Az $(\text{N(Im)}, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N(Im)})$ koordinációjával valósul meg az $[\text{NiLH}_2]$

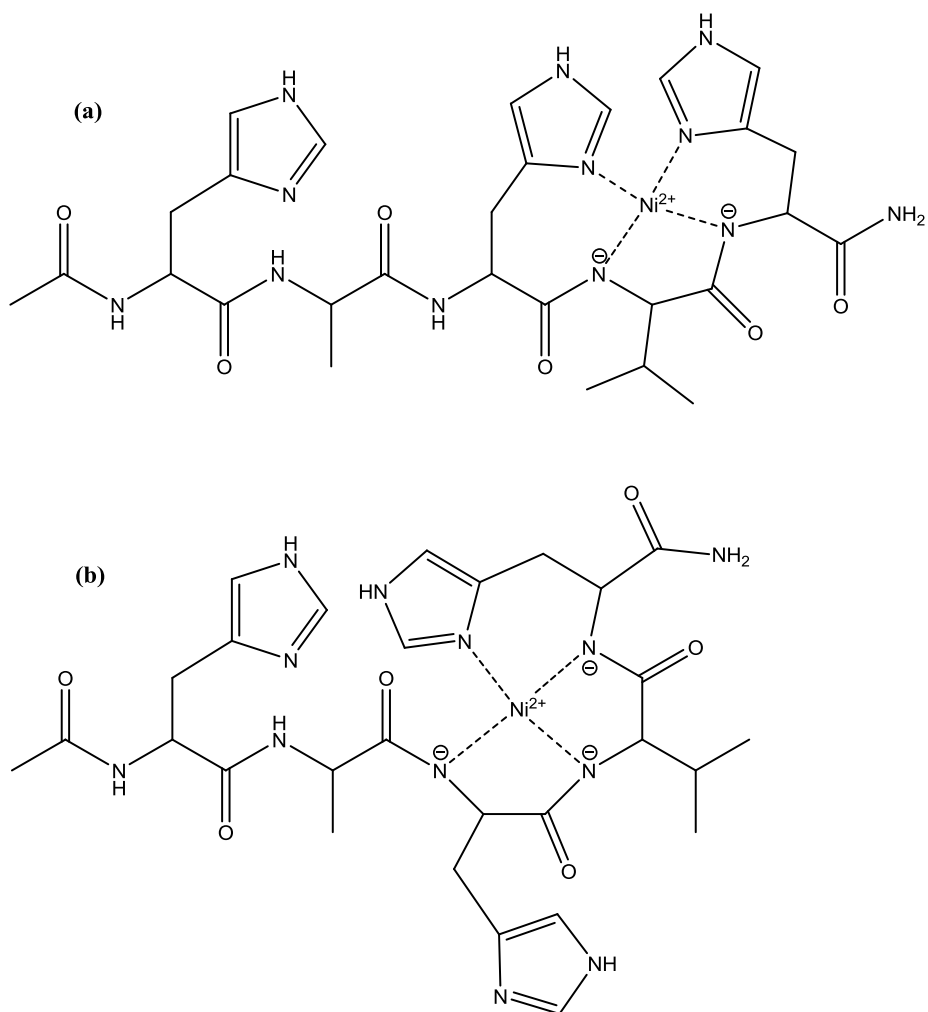
összetételű komplex, az $[\text{NiLH}_3]$ komplex pedig az $(\text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}(\text{Im}))$ koordinációja révén jön létre.

A pentapeptidek $[\text{NiLH}_2]$ és $[\text{NiLH}_3]$ komplexei esetén két izomert különböztettek meg: minden esetben a kedvezményezett koordináció a C-terminális vég felől indult. $^1\text{H-NMR}$ és CD-spektroszkópiai módszerekkel kimutatták, hogy az Ac-HGHVH-NH_2 peptid $[\text{NiLH}_3]$ komplexében a C- és N-terminálison kötődő izomerek aránya 83% : 17%.^{4,5}

Cd(II) -ionok kölcsönhatását is megvizsgálták a már említett ligandumokkal. Mindegyik ligandum esetében $[\text{MLH}]$ és $[\text{ML}]$ komplexek képződtek kettő vagy három imidazolnitrogén deprotonálódásával. Kisebb ligandumok esetén főként 1:1 arányú komplexképződés volt megfigyelhető. A hisztidinek számának növekedésével a komplexek stabilitása nőtt, illetve kedvezően hatott a karboxilátcsoport jelenléte is a stabilitásra. Összehasonlítva, az $[\text{ML}]$ komplexek esetében a Ni(II) -ionnal alkotott komplexek nagyobb stabilitást mutattak, mint a Cd(II) -iont tartalmazó komplexek.⁵

Egy másik korábbi tanulmányban tri-, tetra-, és pentapeptidek komplexképző sajátosságait vizsgálták cink(II)ionokkal.

A három hisztidint tartalmazó pentapeptidek két, illetve három imidazolnitrogén koordinációjával makrokelátokat hoznak létre, melyek $[\text{MLH}]$ és $[\text{ML}]$ komplexeket eredményeznek. Azt is kimutatták, hogy a három hisztidin tartalmú peptidek csupán egy cink(II)iont képesek megkötni, ennek következtében a $[\text{ZnLH}_1]$ összetételű komplexek egyes hidroxokomplexek, így a ligandumok nem voltak képesek visszaszorítani a fémion hidrolízisét.¹⁵



6. ábra: Az $[\text{NiLH}_2]$ (a), és az $[\text{NiLH}_3]$ (b) összetételű komplexek lehetséges szerkezetei

4. KÍSÉRLETI KÖRÜLMÉNYEK, VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

4.1 Felhasznált vegyszerek

A vizsgált ligandumok előállításához kereskedelmi forgalomban kapható Fmoc (9-fluorenil-metiloxi-karbonil) védőcsoporttal védett aminosavakat használtunk. Az aminosavak kimérése után a szintézishez különböző vegyszereket, reagenseket készítettünk elő. A szintézis előkészítéséhez először megfelelő mennyiségű N,N-dimetil-formamidot (DMF), majd 2-(1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurónium tetrafluoroborátot (TBTU) és az N-hidroxi-benzotriazol (HOBt) mértük ki. Ezután N,N-diizopropil-etilamint (DIEA) oldottunk N-metil-2-pirrolidonban (NMP) illetve az acilezési lépéshez ecetsav-anhidridet és DIEA-t oldottunk N,N-dimetil-formamidban. A védőcsoportok eltávolításához piperidint és N-hidroxi-benzotriazol használtunk.

A szintézis befejezésekor a gyanta mosásához diklór-metánt, 96%-os ecetsavat, 2-metil-2-butanolt és dietil-étert készítettünk elő. A peptid gyantáról való hasításához trifluor-ecetsavból (TFA), triizopropil-szilánból (TIS) és 2,2'-(dietilénoxi)-dietántiolból (DODT) álló elegyet használtunk fel. A szintetizált peptid kicsapásához pedig szintén dietil-étert alkalmaztunk.

4.2 Peptidszintézis

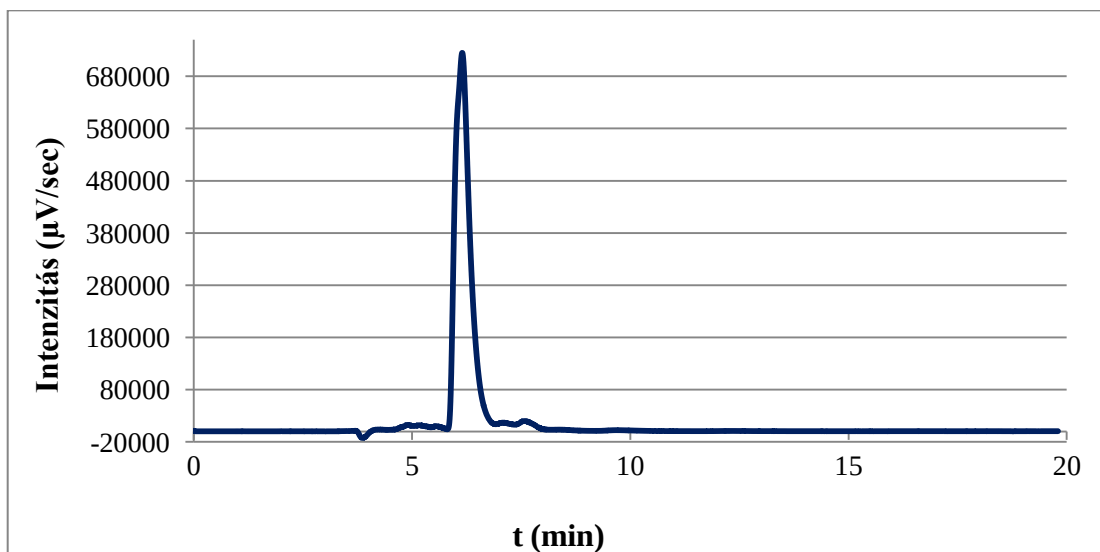
A vizsgálatokhoz szükséges peptideket szilárd fázisú peptidszintézissel állítottuk elő. A technikát úgynevezett Merrifield-féle szintézisnek hívják.⁷ A szintézis szilárd hordozón történik, egy speciális gyantán. A gyanta olyan finomszemcsés polimer, melynek felületén 1 grammjában kb. 10 millió szemcse van. A szemcsék felületén és a belsejükben is olyan funkciócsoportok vannak, amikhez kémiai kötéssel könnyen tudunk aminosavakat és egyéb vegyületeket kapcsolni. Mint azt az előző pontban is leírtam, DMF-t használtunk oldószerként, melyben a gyanta jól megduzzad.

A szintézist mikrohullámú Liberty 1 peptidszintetizáló készülékkel végeztük el. A szükséges reagensek és az aminosavak tömegének kiszámításához és a szintézis irányításához a PepDriver1 programot használtuk. A peptid szintézise végig automatizált módon történt, melyhez a különböző kritériumokat a programban állítottuk be. A szintézis első lépésében az Fmoc védőcsoportok eltávolítása 20% piperidint tartalmazó DMF-oldattal történt, 180 másodpercig, 75 °C-on és 25 W-os mikrohullámú sugárzás mellett. Az aminosavak

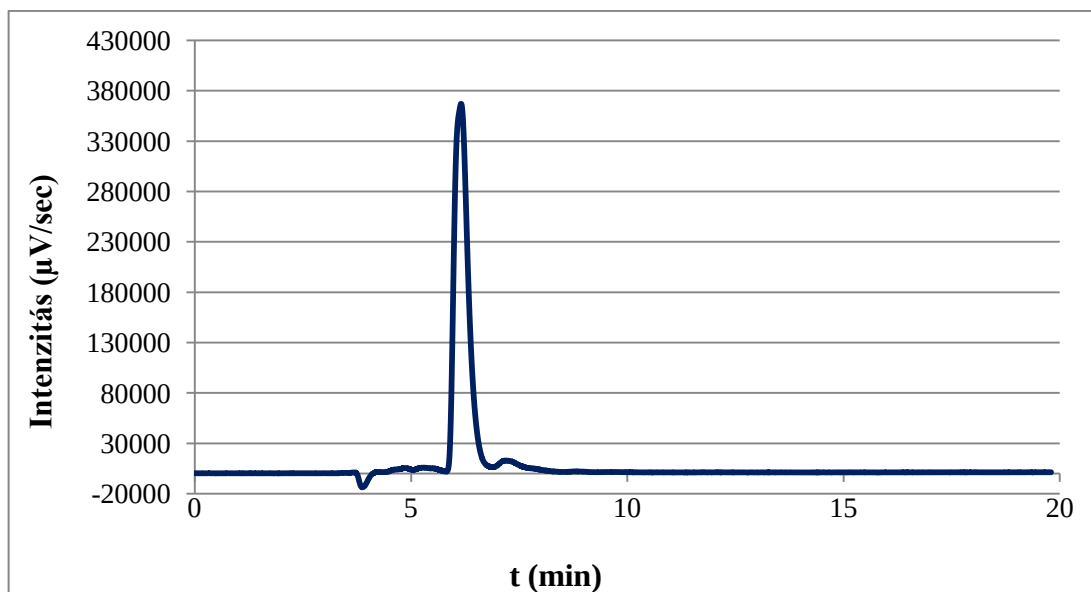
kapcsolása 300 másodpercen át tartott hasonló körülmények között. Az aminosavakat feleslegben alkalmaztuk és aktiváláshoz DMF-ben készült oldatokat használtunk; mind a TBTU, mind HOBt koncentrációja $0,5 \text{ mol/dm}^3$ volt. Az elegyhez továbbá DIEA szintén DMF-ben készült oldatát adagoltuk ($c=2,0 \text{ mol/dm}^3$). Amikor a szintézis befejeződött, a gyantát üvegszűrőre szedtük. 80 ml diklór-metánnal és, 96%-os ecetsavval, 40 ml 2-metil-2-butanollal és 80 ml dietil-éterrel mostuk. Először mindig vártunk, légköri nyomáson mostunk és csak azután vákuum alatt. A mosás után a peptid hasítását végeztük el. 20 ml hasítóelegyet használtunk fel, mely 94% TFA-t, 2,5% TIS-t, 2,5% H_2O -t és 1% DODT-t tartalmazott. A kicsapáshoz hideg dietil-étert használtunk, illetve 3 percen át centrifugáltuk 4000-es fordulatszámmal a szuszpenziót.

Utolsó lépésként az étert dekantáltuk, argon gázt vezettünk a peptid fölé, majd kis üvegcsébe átvittük, jól átöblítettük majd feloldottuk vízben és így liofilizáltuk.

A szintézis végén mindkét peptid esetében tisztasági vizsgálatot végeztünk. Először nagynyomású folyadékkromatográfiás eljárással (HPLC) (7/a., 7/b. ábra), majd tömegspektrometriás (MS) eljárással vizsgáltuk a két ligandumot (8/a., 8/b. ábra). A tisztasági vizsgálatok során ellenőriztük azt is, hogy a szintetizáló készülék a megfelelő szekvenciát állította elő.

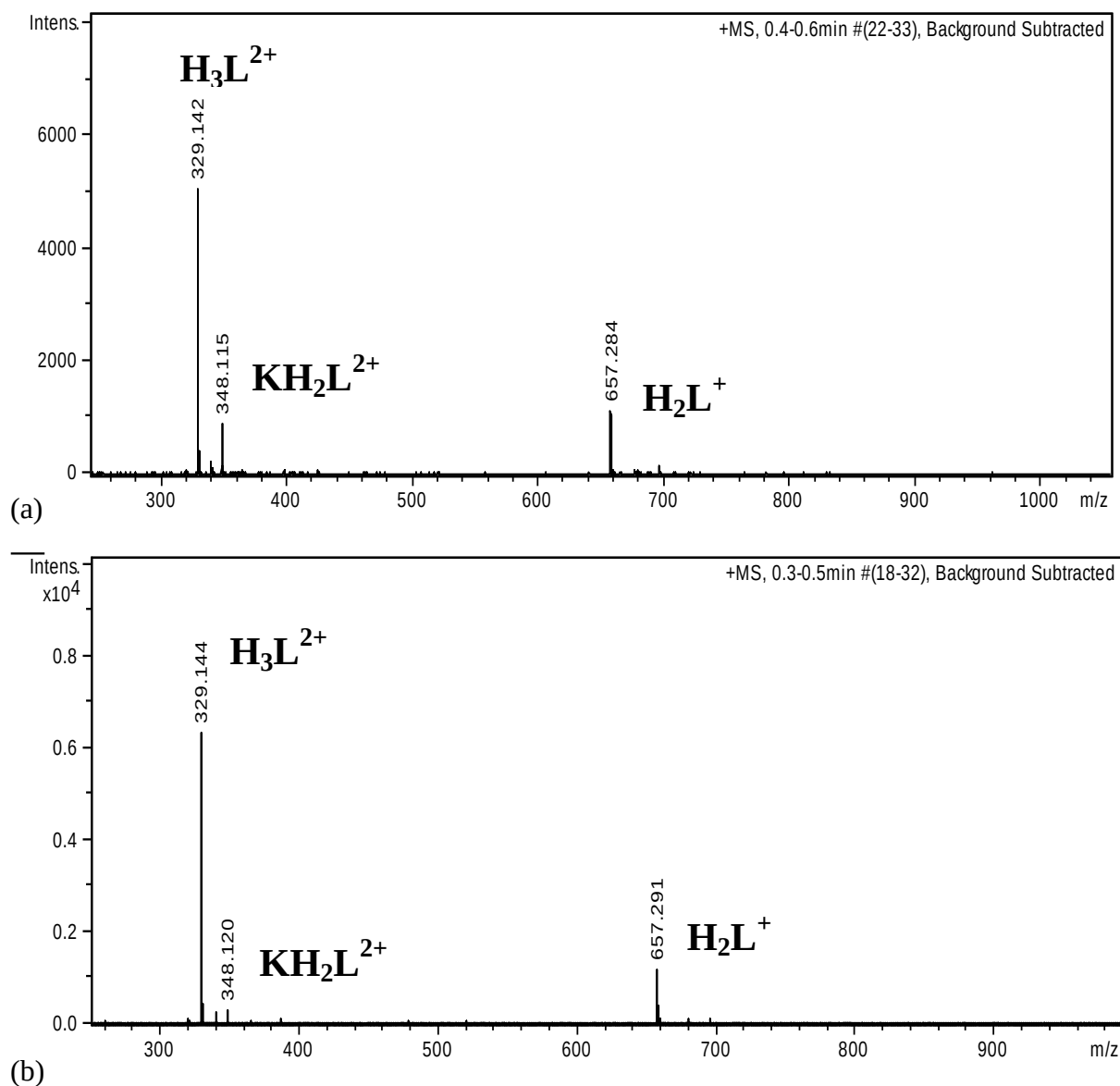


(a)



(b)

7. ábra Az Ac-HDHAH-NH₂ (a) és az Ac-HAHDH-NH₂ (b) peptid HPLC kromatogramja

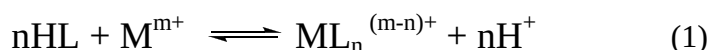


8. ábra Az Ac-HDHAH-NH₂ (a) és az Ac-HAHDH-NH₂ (b) ligandum tömegspektruma

Mindkét esetben (8/a., 8/b. ábra) a legnagyobb m/z értékhez tartozó csúcs esetében elmondható, hogy a peptidek egy protonnal ionizálódtak. A 348,115 és 348,120 m/z értékeket a ligandum egy káliumionnal és egy protonnal történő ionizálódása eredményezte, a 329,142 és 329,144 m/z- hez rendelhető csúcs pedig két protonnal való ionizálódás során jött létre.

4.3 pH-potenciometria

A pH-potenciometria az oldatfázisban lejátszódó komplexképződési folyamatoknak legáltalánosabb vizsgálati módszere. A pH-potenciometriás mérések alapján tudjuk megadni a ligandumok protonálódási állandóit, illetve a folyamat során keletkező komplexek összetételét és stabilitási állandóit határozhatjuk meg. A mérés alapvető feltétele, hogy a fémion koordinációja megváltoztassa a ligandum protonálódási folyamatait, ami mérhető pH-változással kell, hogy járjon. A folyamat során a következő egyensúly áll fenn:



A bruttó komplexképződési folyamat általános formája:



A képződő komplexek stabilitási szorzata:

$$\beta_{pqr} = \frac{[M_pL_qH_r]}{[M]^p[L]^q[H]^r} \quad (3)$$

A kifejezésekben M a fémion, L a teljesen deprotonált ligandum, H a proton, illetve p, q, r a sztöchiometriai együtthatók.

A mérési adatokból a ligandumok protonálódási állandóit SUPERQUAD⁸ programmal, míg a keletkező komplexek összetételét és stabilitási állandóit a Tanszéken kifejlesztett PSEQUAD⁹ programmal határoztuk meg.

A program rendkívül hasznos, mivel egyszerre képes kezelni különböző fémion/ligandum arányokat és különböző koncentrációkat ugyanannál a rendszernél, így tudunk vele párhuzamosan is számolni, kiértékelni. A kiértékeléshez szükséges bevinni a térfogat-pH adatpárokat, a komponenseket, illetve a komplexek számát és azok összetételét, valamint meg kell adni a pontos vagy közelítő stabilitási szorzatokat, a komponensek koncentrációját, a titráló oldat koncentrációját, a vízionszorzatot és az Irving faktort¹⁰. A program a stabilitási szorzatokat a kiindulási komponensekre felírt alábbi anyagmérlegek segítségével számolja:

$$C_H = [H] + \sum_{i=1}^n r_i \beta_{pqr} [M]_i^p [L]_i^q [H]_i^r \quad (4)$$

$$C_M = [M] + \sum_{i=1}^n p_i \beta_{pqr} [M]_i^p [L]_i^q [H]_i^r \quad (5)$$

$$C_A = [A] + \sum_{i=1}^n q_i \beta_{pqr} [M]_i^p [L]_i^q [H]_i^r \quad (6)$$

Ahol n a képződött részecskék száma, p , q és r a sztöchiometria együtthatókat jelenti. A megadott adatok alapján a program Newton-Raphson iterációval közelíti az ismeretlen stabilitási állandók értékét addig, amíg az ismert koncentrációjú titrálóoldatra megadható $\Sigma(V_{\text{mért}} - V_{\text{számított}})$ összefüggés eredménye a minimumot nem éri el. Ezek után kapjuk meg a program által számolt stabilitási állandókat és azok hibáját, melyet tizedes pontossággal zárójelben írunk fel. A számolás befejeztével lehetőség van egy adott rendszerre koncentrációeloszlás görbe rajzolására az egyes részecskék esetében. A koncentrációeloszlás görbéket a SED¹¹ program Windows alatt futó változatával, a MEDUSA-val készítettük. Az eloszlások megrajzolásához az előbbieken kiszámított koncentrációkat, illetve a részecskék stabilitási állandóit kell megadni.

A fémiont tartalmazó rendszerekben a kialakuló komplexek oldatfázisban lejátszódó folyamataira használjuk még az úgynevezett származtatott állandókat is. Ezen állandók segítségével az egyes komplexek összehasonlítását tehetjük meg a stabilitási szorzatokat felhasználva. A komplexek kialakulása során a hisztidin imidazolnitrogénjének és amidnitrogénjének deprotonálódását a $pK(\text{MLH}_n/\text{MLH}_{n-1})$ értékkel jellemezhetjük, amit az alábbi kifejezéssel számíthatunk ki:

$$\log \beta(\text{MLH}_n) - \log \beta(\text{MLH}_{n-1}) = pK(\text{MLH}_n/\text{MLH}_{n-1}) \quad (7)$$

A $pK(\text{MLH}_2/\text{MLH}_3)$ kifejezésre a továbbiakban a pK_{amid_3} jelölést használom.

Ha az amidnitrogének deprotonálódása kooperatívan történik a komplexképződés során, egy átlagos pK értéket számítunk:

$$\frac{\log \beta(\text{ML}) - \log \beta(\text{MLH}_{-2})}{2} \quad (8)$$

Ezt a dolgot az amid_{1,2} jelöléssel láttam el.

A vizsgált két peptid mindegyike vízzel oldható volt. A ligandumokból kis mennyiségű törzsoldatokat készítettünk és számítógép által vezérelt MOL-AcS bürettát és MOLSPIN pH-mérőt használtunk, amihez egy Metrohm 6.0234.100 kombinált üvegelektrod csatlakozott.

A $\sim 0,2 \text{ mol/dm}^3$ koncentrációjú KOH-titrálóoldat adagolását 1 cm^3 végtérfogatú Hamilton fecskendővel végeztük. A mérések megkezdése előtt meghatároztuk a kálium-hidroxid titrálóoldat pontos koncentrációját, illetve a vízionszorzatot és az Irving-állandót is a Gran-féle linearizálást alkalmazva¹². Az elektródot $0,050 \text{ mol/dm}^3$ koncentrációjú, 4,005 pH-jú kálium-hidrogén-ftalát oldattal kalibráltuk 25°C -on. Az állandó hőmérsékletet termosztálással, az oxigénmentes környezetet és a minta kevertetését pedig folyamatos argon gáz átbuborékolatásával biztosítottuk.

A mérésekhez minden esetben 4 cm^3 mintát használtunk fel. A komponensek koncentrációját a SUPERQUAD programmal számoltuk a görbe ekvivalencia pontjai alapján. A fémion/ligandum aránya mindkét peptid esetén 1:3 illetve 1:1 volt.

4.4 UV-látható spektrofotometria

A komplexek szerkezetének további megismerése céljából UV-Vis spektrofotometriai vizsgálatokat is végeztünk.

A Ni(II)-komplexekre leggyakrabban a 4-es és 6-os koordinációs szám jellemző. 6-os koordinációs szám esetén, az oktaédes geometriájú komplexeknek három spinmegengedett d-d átmenete van, azonban ezek mind gyengék ($\epsilon < 30 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Ezek a következő hullámhosszakhoz tartoznak: $\lambda_1=1430\text{-}770 \text{ nm}$, $\lambda_2=910\text{-}500 \text{ nm}$, $\lambda_3= 520\text{-}370 \text{ nm}$. A középső sáv felhasadása a komplex geometriájának torzulásával jár együtt. Ezen kívül létezik még egy kisebb intenzitású, spintiltott átmenet is, ez azonban csak vállként szokott megjelenni a spektrumban valamelyik csúcsnál.

4-es koordinációs számmal a tetraédes komplexek alakulnak ki. Ezen komplexek spektrumában már sokkal intenzívebb az elnyelés ($\epsilon=10^2\text{-}10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Ezek jellemzően a 900-500 nm hullámhossztartományban jelentkezőnek.

A 4-es koordinációs számú komplexek gyakran diamágneses tulajdonságúak és négyzetes geometriájú komplexeket alkotnak. Ezek főként erős terű ligandumok esetén képződnek, például peptidek amidnitrogénjei révén. Ezen komplexekre jellemző, hogy 550-400 nm hullámhossztartományban intenzív sávot adnak ($\epsilon=50\text{-}500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Ez általában a sárga, narancssárga vagy vörös szín miatt van. Ezek mellett létezik még egy intenzívebb sáv 430 nm alatt, amit gyakran töltésátvitel okoz.¹³

A spektrofotometriás méréseket 200-900 nm hullámhossztartományban végeztük. A spektrumokat Hewlett Packard HP 8453 típusú egysugaras, diódasoros spektrofotométerrel vettük fel.

4.5 Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia

A cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia módszere a polarizált fény és egy optikailag aktív anyag kölcsönhatásán alapszik. A síkban polarizált fényt egy balra és egy jobbra cirkulárisan polarizált fénysugár összegének tekinthetjük. Az optikailag aktív anyagok abszorpciós koefficiense és törésmutatója is különbözik, amennyiben két eltérő polarizált fénysugárral lép kölcsönhatásba. Ezt a különbséget nevezzük cirkuláris dikroizmusnak vagy Cotton-effektusnak. Ez az abszorpciós különbség a teljes abszorpciónak mindössze 1%-a. A jobbra és balra cirkulárisan polarizált fény különböző abszorpciós koefficienssel rendelkezik. Ezen két fénysugár abszorpciójának különbségét ($\Delta\epsilon = \epsilon_{\text{bal}} - \epsilon_{\text{jobb}}$) a hullámhossz függvényében ábrázolva kapjuk meg a CD görbét. A CD görbén a maximumok és minimumok az elektrongerjesztési abszorpciós spektrum maximuma helyén vagy ahhoz nagyon közel jelentkezők. Ezek viszonylag keskeny Gauss-görbék, az elektrongerjesztési spektrummal szemben.

A fémkomplexek optikai aktivitása a komplex aszimmetriájától vagy a ligandum aszimmetriájából származik. Amennyiben a komplex optikai aktivitása a komplexképződéssel egy időben alakul ki, két enantiomer racém elegyéhez jutunk, és ezekhez ellentétes előjelű, azonos értékű Cotton-effektus tartozik, amik ennek következtében kioltják egymást. Az enantiomereket kinetikailag inert komplexek esetén van lehetőség elválasztani.

A CD spektroszkópiai vizsgálatot jó néhány komplex szerkezetének vizsgálatánál már eredményesen alkalmazták, ilyen például a Cu(II), Ni(II) és Pd(II) peptidkomplexei. A di- és tripeptidek vizsgálata során törvényszerűségeket figyeltek meg, melyeket Sigel és Martin foglalt össze¹⁴. Arra a megállapításra jutottak, hogy peptidek komplexeinek CD spektrumai értelmezhetőek a dupla-oktán vagy hexadekán szabállyal. Ezen szabály szerint, ha a komplex koordinációs síkja feletti teret felosztjuk 8-8 szektorra és minden szomszédos szektort ellentétes előjellel látunk el, a szektorban lévő optikailag aktív csoport hatására kialakuló Cotton-effektus előjele azonos a szektor előjelével. A spektrum jellegzetessége, a jelek intenzitásának összeadódása, vagyis a nemkoordináló oldalláncok hatása összeadódik.

Azt is megállapították, hogy a különböző helyzetben lévő, de kémiai azonos, optikailag aktív csoportok különböző nagyságú Cotton-effektust okoznak :

$$\Delta\epsilon_{\lambda}^{\text{Gly-X-Gly}} > \Delta\epsilon_{\lambda}^{\text{Gly-Gly-X}} > \Delta\epsilon_{\lambda}^{\text{X-Gly-Gly}} \quad (9)$$

Ezt az okozza, hogy a központi fémionhoz, mint kromofor csoporthoz kapcsolódnak különböző donorcsoportok, melyek nem azonos sikerességgel tudják továbbítani a királis

információt. Ezek alapján az amidnitrogén > karboxilátóxién > aminonitrogén sorrend állítható fel.

A CD spektrometriás méréseket a Debreceni Egyetem Szerves Kémiai Tanszékén JASCO J-810 típusú spektrométerén végeztük. A spektrumokat szobahőmérsékletű vizes oldatokban vettük fel, különböző pH-értékeken és 1:1 illetve 1:3 fémion/ligandum arányoknál. A mérésekhez 0,1 és 1,0 cm-es küvettákat használtunk, a spektrumokat 200-800 nm hullámhossz tartományban vettük fel.

4.6 ^1H -NMR spektroszkópia

A vizsgált komplexek közül csak a síknégyzetes $[\text{NiLH}_3]$ összetételű komplexeket tudtuk ^1H NMR spektrometriás módszerrel vizsgálni, erősen lúgos oldatban. Első lépésként a szabad ligandum spektrumait vettük fel, mivel a komplex egyes jelei más kémiai eltolódás értékeknél jelennek meg, mint a szabad ligandum esetében. A jelek számából és felhasadásából következtethetünk a komplex koordinációs módjára és a megjelenő esetleges izomerekre.

A spektrumokat 99,8%-os izotóptisztaságú D_2O -ban vettük fel. A vizsgált oldatok koncentrációja $0,008 \text{ mol/dm}^3$ volt.

Az oldatok pH^* értékeit DCI- és NaOD-oldatokkal állítottuk be. A méréshez használt elektródot vizes közegű pufferre kalibráltuk, és az erről leolvasott pH^* értékekből adtuk meg a valós pH-értékeket a $\text{pH} = 0,936 \text{ pH}^* + 0,412$ összefüggéssel.

A ^1H -NMR spektrumokat BRUKER AM360 MHz FT-NMR készüléken vettük fel, standardként trimetilszilil-propánsavat (TSP) használtunk.

A kapott spektrumokat Mestrenova szoftverrel értékeltük ki.

5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTELMEZÉSÜK

5.1 A vizsgált ligandumok sav-bázis tulajdonságai

A pH-potenciometriás vizsgálatok során először a ligandumok protonálódási állandóit határoztuk meg, illetve az egyes törzsoldatok pontos koncentrációjának meghatározását is elvégeztük.

A ligandumok titrálási görbéiből számoltuk ki a ligandumok protonálódási állandóit, melyeket az 1. táblázatban tüntettem fel.

1. táblázat A ligandumok protonálódási állandói (log β)

	Ac-HAHDH-NH ₂	Ac-HDHAH-NH ₂	Ac-HAHVH-NH ₂ ⁵
HL	7,17 (8)	7,16 (1)	6,83
H₂L	13,65 (7)	13,62 (1)	13,07
H₃L	19,55 (1)	19,51 (2)	18,74
H₄L	22,96 (2)	22,91 (4)	—

A protonálódási állandókat felhasználva számítottuk ki mindegyik ligandum esetén az egyes csoportokhoz tartozó deprotonálódási állandókat (2. táblázat).

2. táblázat A csoportok deprotonálódási állandói (pK)

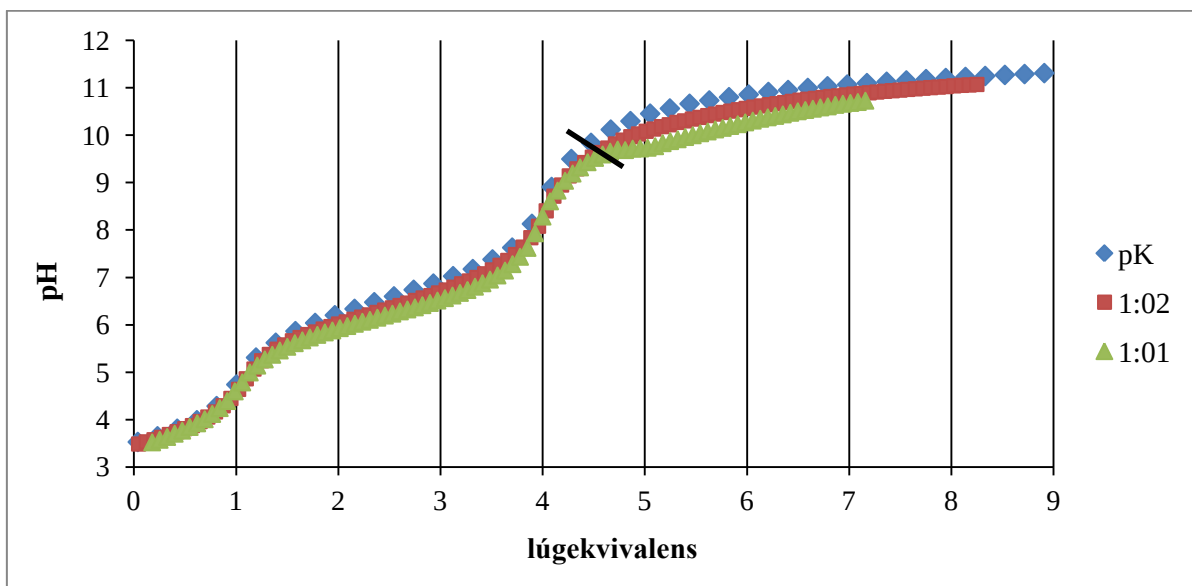
	Ac-HAHDH-NH ₂	Ac-HDHAH-NH ₂	Ac-HAHVH-NH ₂ ⁵
pK (COO⁻)	3,41	3,40	—
pK (His)₁	5,90	5,89	5,67
pK (His)₂	6,48	6,46	6,24
pK (His)₃	7,17	7,16	6,83

Mindkét vizsgált ligandum esetében megfigyelhető, hogy első lépésben a karboxilcsoport deprotonálódása zajlik, közelítően pH=3,5 és 4 között, majd a hisztidinek imidazolnitrogénjei három egymással átfedő lépésben deprotonálódnak körülbelül pH=5 és 8 között.

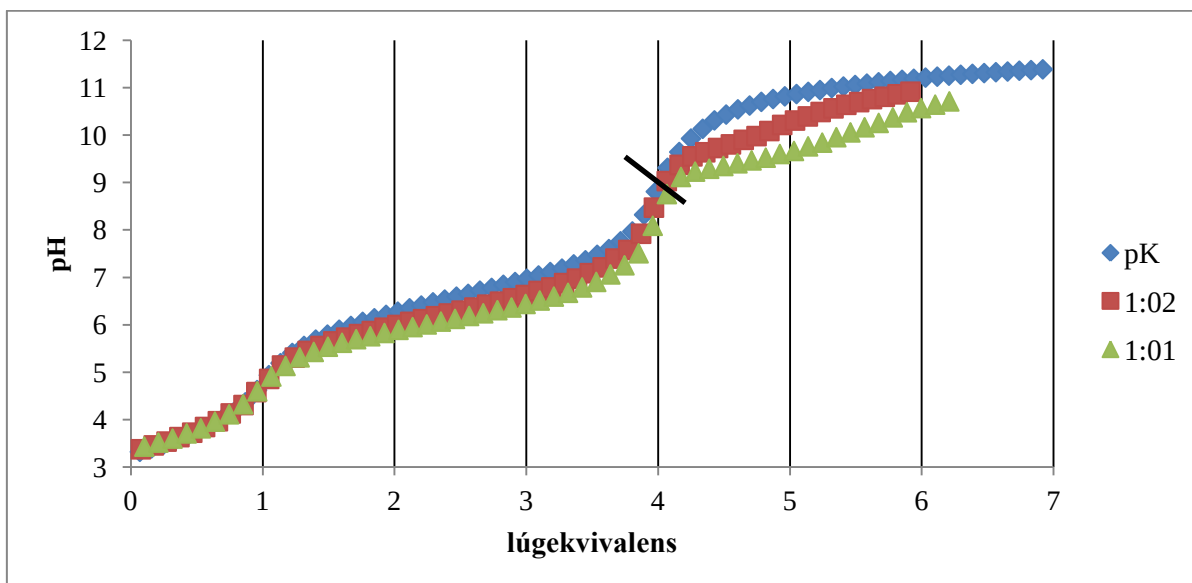
5.2. A vizsgált ligandumok Cd(II)-komplexei

5.2.1. Oldategyensúlyi vizsgálatok

A vizsgált ligandumok protonálódási állandóinak meghatározása után végeztük el a Cd(II)-komplexek vizsgálatát. Mindkét ligandum esetében 1:2 fémion:ligandum illetve 1:1 fémion:ligandum arány esetében végeztünk vizsgálatokat.



9. ábra Az Ac-HAHDH-NH₂ ligandum és Cd(II)-Ac-HAHDH-NH₂ 1:2 és 1:1 rendszerek titrálási görbéi ($c_L=0,71$ mM és $c_L=0,735$ mM)



10. ábra Az Ac-HDHAH NH₂ ligandum és Cd(II)-Ac-HDHAH-NH₂ 1:2, 1:1 arányú rendszerek titrálási görbéi ($c_L=1,38$ mM és $c_L=1,26$ mM)

A 9. és 10. ábrákon a két peptid és a két különböző arányú Cd(II)-peptid rendszerek titrálási görbéi láthatóak. A fekete vonal a csapadékképződés tartományának kezdetét jelzi.

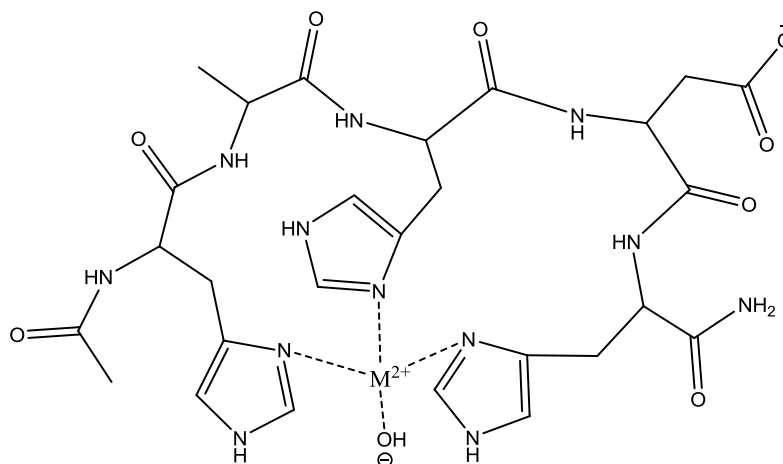
A titrálási görbéken látható, hogy kicsi a pH-effektus. Mindkét rendszer esetén körülbelül pH=5-nél kezdődött meg a komplexképződés, illetve pH=9-10 felett nem sikerült egyik esetben sem visszaszorítani a fémion hidrolízisét, csapadékképződést tapasztaltunk.

A ligandumok koncentrációinak és protonálódási állandóinak meghatározásával, meg tudtuk adni az oldatfázisban kialakuló komplexek összetételét és stabilitási állandóikat. Ezeket a 3. táblázatban foglaltam össze.

3. táblázat A Cd(II)-komplexek összetétele és stabilitási állandóik

	Ac-HAHDH-NH ₂	Ac-HDHAH-NH ₂	S2H3 ⁵	S3H4 ⁵
CdLH	10,60(3)	10,81(1)	—	10,65
CdL	4,28(2)	4,48(1)	3,67	4,14
CdLH₁	-4,62(5)	—	—	—

Az általunk vizsgált peptidek értékei mellett megtalálható a táblázatban egy korábbi vizsgálat adatai is, melyben szarkozint is tartalmazó peptidek átmenetifém-ion komplexeit vizsgálták⁵. Ezzel összehasonlítva, a [CdL] komplex esetén a három hisztidint tartalmazó S2H3 peptidhez képest jelentősebb, míg a négy hisztidint tartalmaz S3H4 peptidhez képest kismértékű stabilitás növekedés tapasztalható. Ez a jelenség a karboxilátcsoport jelenlétének tulajdonítható. Látható, hogy [CdL] komplex mindegyik ligandum esetében képződött, viszont [CdLH₁] komplex (11.ábra) képződése csak az Ac-HAHDH-NH₂ peptid vizsgálata során volt kimutatható.

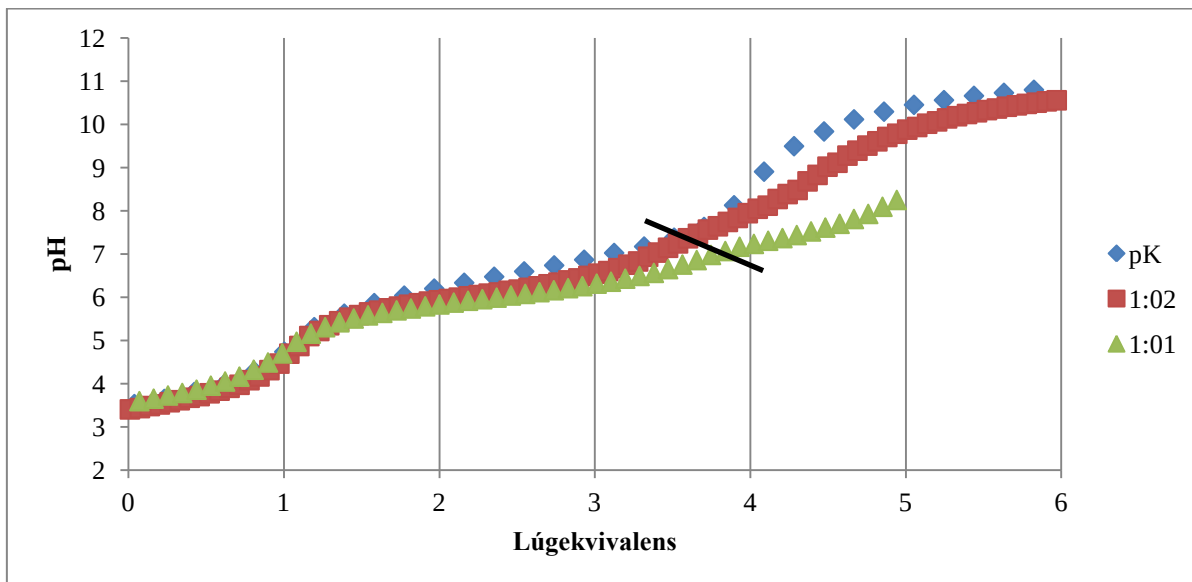


11. ábra A keletkező [CdLH₁] komplex szerkezete

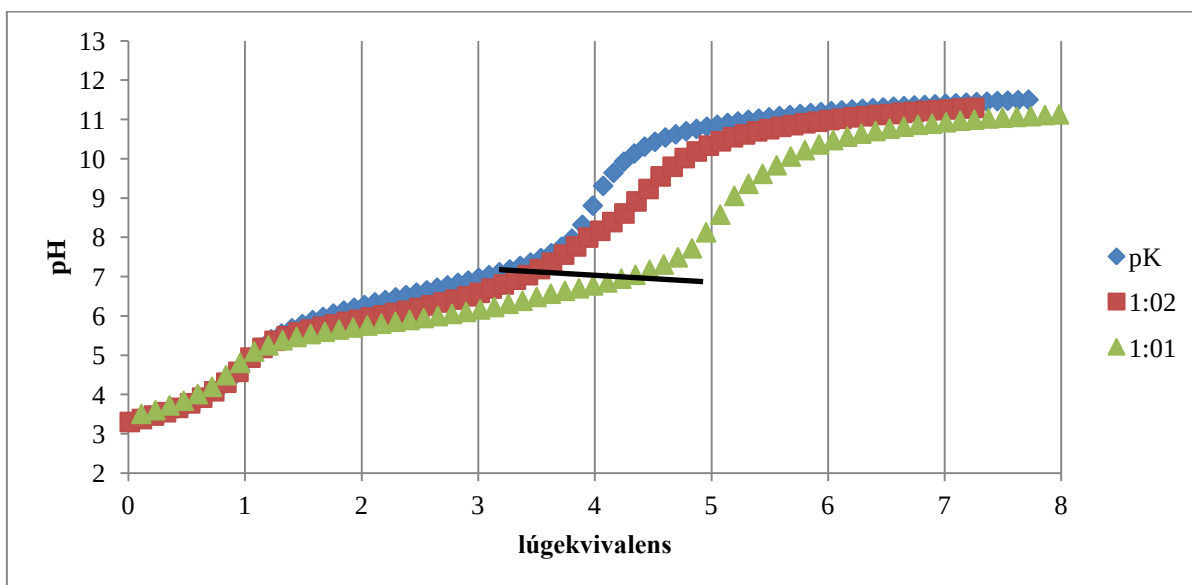
5.3. A vizsgált ligandumok Zn(II)-komplexei

5.3.1. Oldategyensúlyi vizsgálatok

A Cd(II)-komplexek vizsgálata után Zn(II)-komplexek vizsgálatát is elvégeztük a két ligandummal. A vizsgálatokat itt 1:2 és 1:1 fémion:ligandum arányok esetében folytattuk.



13. ábra Az Ac-HAHDH-NH₂ ligandum és Zn(II)-Ac-HAHDH-NH₂ 1:2 és 1:1 arányú rendszereinek titrálási görbéi ($c_L=0,84$ mM és $c_L=0,58$ mM)



14. ábra Az Ac-HDHAH-NH₂ ligandum és Zn(II)-Ac-HDHAH-NH₂ 1:2, 1:1 arányú rendszereinek titrálási görbéi ($c_L=1,305$ mM és $c_L=1,115$ mM)

A 11. és 12. ábrán láthatóak a peptidek és a Zn(II)-peptid rendszerek titrálási görbéi. A fekete vonal itt is a csapadékképződés tartományának kezdetét jelzi.

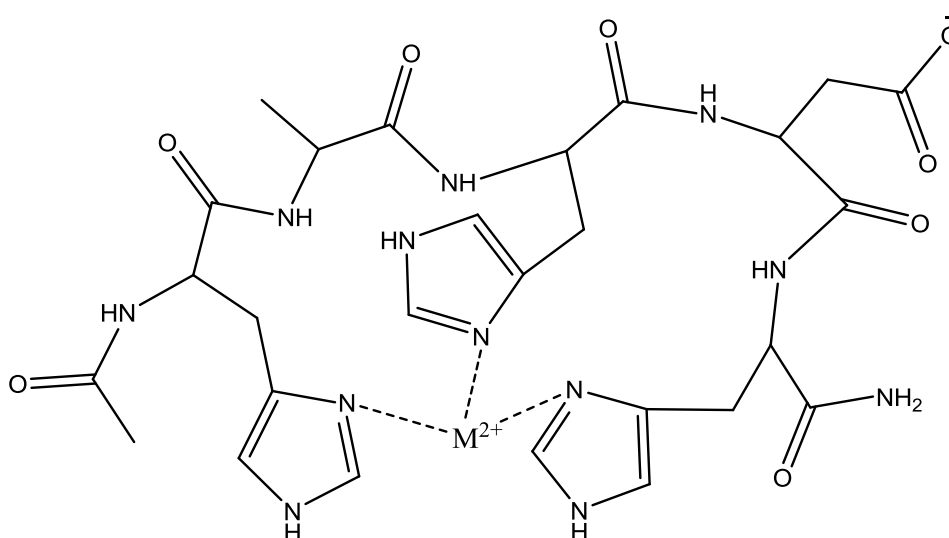
A titrálási görbéken látható, hogy pH=5 fölött kezdődött el a komplexképződés. Az Ac-HDHAH-NH₂ ligandum esetén az 1:1 aránynál szembetűnő, hogy pH=6,7- 6,9-nél további lúgfogyasztás van. Ez a hidrolízis jelenségével magyarázható, amelyet ezen ligandum esetén sem sikerült visszaszorítani, fiziológiás pH-n már csapadék kiválása volt megfigyelhető mindegyik rendszerben.

A már előbbieken számolt ligandum koncentrációk és protonálódási állandók felhasználásával itt is megadtuk a komplexek összetételét oldatfázisban és stabilitási állandóikat, melyeket a 4. táblázatban foglaltam össze.

4. táblázat A Zn(II)-komplexek összetétele és stabilitási állandók

	Ac-HAHDH-NH ₂	Ac-HDHAH-NH ₂	Ac-HAHPH-NH ₂ ¹⁵
ZnLH	—	10,84(8)	10,35
ZnL	5,14(5)	5,38(3)	5,18
ZnLH₁	—	—	2,66

A táblázatban feltüntettem egy már korábban vizsgált hasonló szekvenciájú HXHYH pentapeptid Zn(II)-komplexeit, illetve azok stabilitási állandóit¹⁵. Láthatjuk, hogy az [ML] komplexek (14. ábra) stabilitási állandóinál nincs jelentős különbség az általunk vizsgált és a HAHPH peptid esetén, ugyanakkor a HAHPH szekvenciájú peptidtől eltérően [ZnLH₁] komplexet nem sikerült kimutatni.

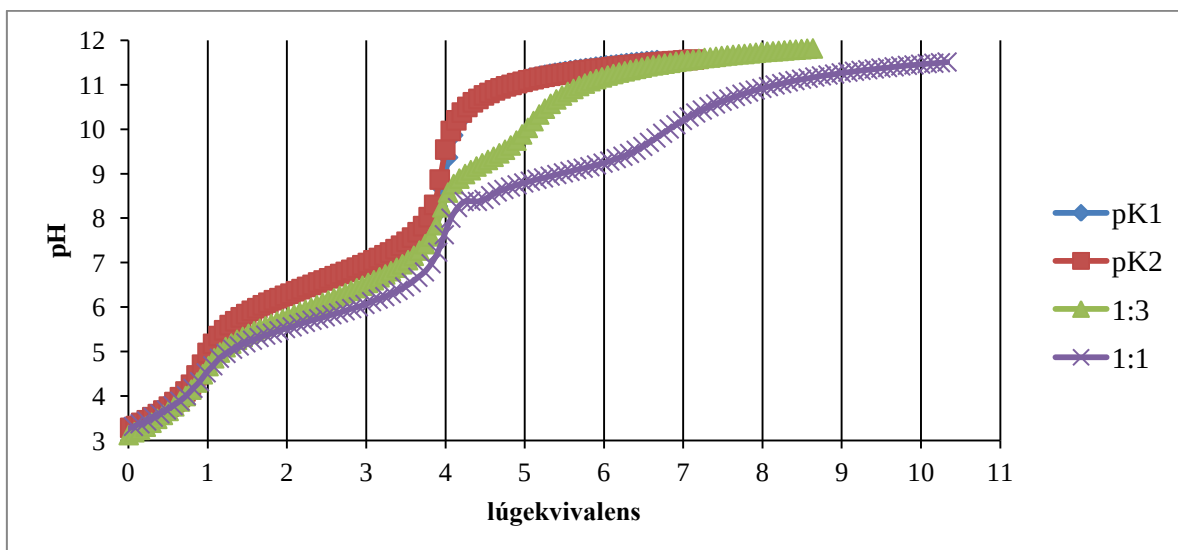


15. ábra A keletkező [ML] komplex szerkezete

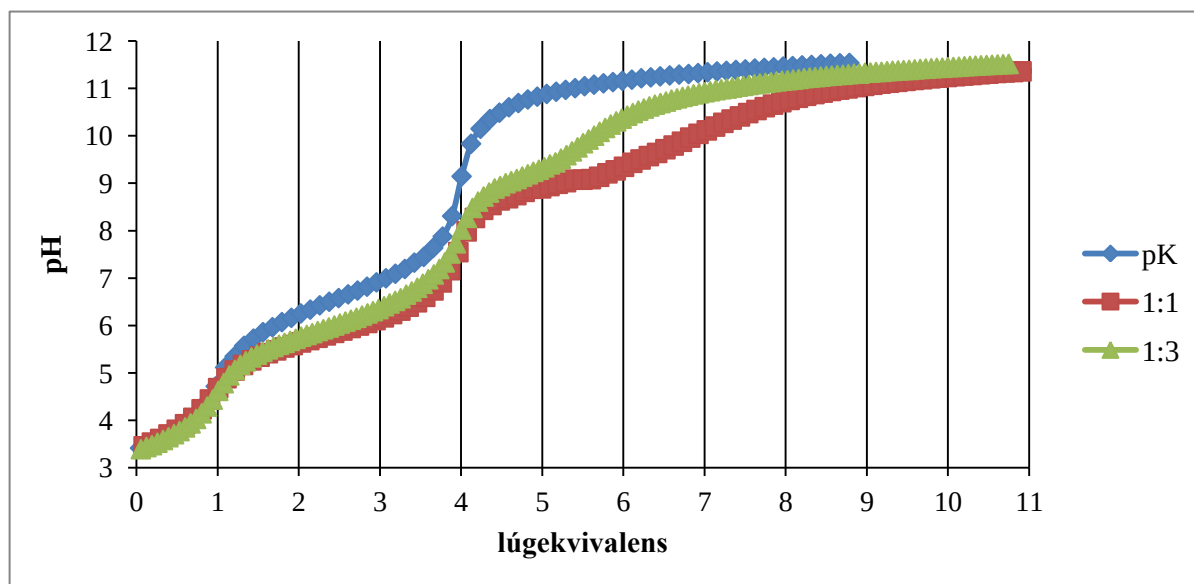
5.4. A vizsgált ligandumok Ni(II)-komplexei

5.4.1. Oldategyensúlyi vizsgálatok

A pH-potenciometriás vizsgálatokat Ni(II)-komplexek esetében fémion:ligandum 1:3 és 1:1 arányú rendszerek esetén végeztük el.



16. ábra Az Ac-HAHDH-NH₂ ligandum és a Ni(II)-Ac-HAHDH-NH₂ 1:3, 1:1 arányú rendszereinek titrálási görbéi ($c_L=2,172$ mM és $c_L=1,872$ mM)



17. ábra Az Ac-HDHAH-NH₂ ligandum és Ni(II)-Ac-HDHAH-NH₂ 1:3, 1:1 arányú rendszereinek titrálási görbéi ($c_L=1,147$ mM és $c_L=1,021$ mM)

A 15. és 16. ábrák a két peptidnek valamint a különböző arányú Ni(II)-peptid rendszereknek a titrálási görbéit mutatja be.

Mindkét titrálási görbén látszik, hogy a komplexképződés két különálló lépésben zajlik le. A pH=8 alatti tartományban az imidazol-csoportok deprotonálódása és koordinációja történik meg. pH=8 felett extra lúgfogyasztó folyamat figyelhető meg, ezzel párhuzamosan intenzív sárga szín megjelenését is tapasztaltuk. Ez jelzi az amidnitrogének deprotonálódását és koordinációját. A titrálás során erősen lúgos tartományban az 1:1 arányok esetében csapadékképződés volt megfigyelhető.

A ligandum koncentrációjának és protonálódási állandóinak ismeretében határoztuk meg az oldatfázisban keletkező komplexek összetételét és a stabilitási állandókat is, amelyeket a 3. táblázatban foglaltam össze.

5. táblázat A komplexek összetétele és stabilitási állandók

	Ac-HAHDH-NH ₂	Ac-HDHAH-NH ₂	Ac-HAHVH-NH ₂ ⁵
NiLH	11,59 (3)	11,57 (8)	11,04
NiL	5,55 (3)	5,67 (5)	5,20
NiL₂	9,37 (5)	9,77 (7)	—
NiLH₂	-11,79 (3)	-11,83 (6)	-12,62
NiLH₃	-21,89 (4)	-21,30 (6)	-22,49

Az egyes komplexek stabilitási állandói ismeretében mindkét pentapeptid-fémion rendszer esetén megadtuk a (7) és (8) egyenletek alapján számított származtatott állandókat (4. táblázat).

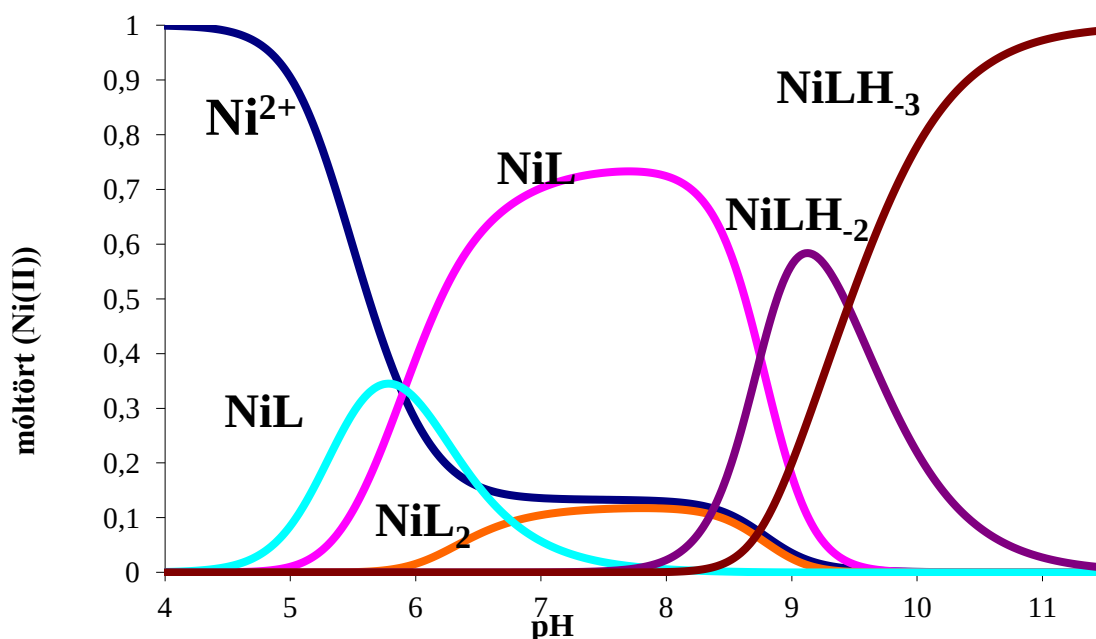
6. táblázat Származtatott stabilitási állandók

	Ac-HAHDH-NH ₂	Ac-HDHAH-NH ₂	Ac-HAHVH-NH ₂ ⁵
pK (NiLH/NiL)	6,04	5,90	5,84
pK (amid)_{1,2}	8,67	8,75	8,91
pK (amid)₃	10,10	9,47	9,87

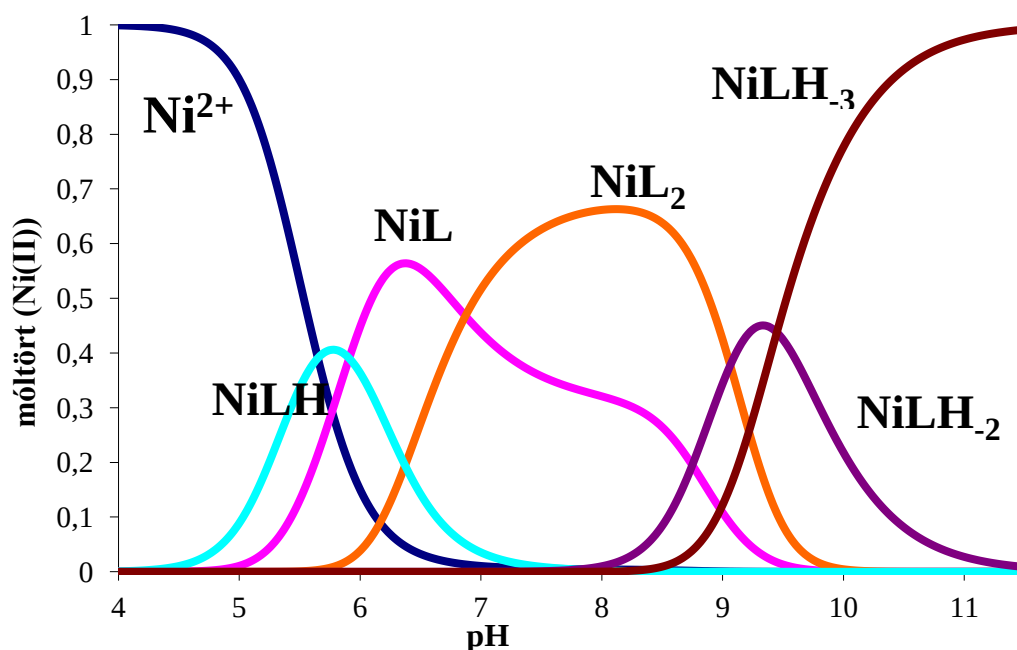
Mindegyik esetben a két vizsgált peptid értékei mellett feltüntettem egy már korábban vizsgált hasonló szekvenciájú pentapeptid stabilitási állandóit is. A két rendszer hasonló modellel írható le. Ekvimoláris oldatban 1:1 arányú komplexek képződtek, ligandum felesleg

esetén a korábban vizsgált Ac-HAHVH-NH₂ peptidtől eltérően [ML₂] komplex kialakulását feltételezzük.

A keletkező komplexek koncentrációeloszlását a MEDUSA programmal szerkesztettük meg (17., 18. ábra). [NiLH] komplex esetén két hisztidin koordinálódik a fémionhoz, a harmadik hisztidin protonált. [NiL] komplex esetén három hisztidin vesz részt a koordinációban, mely jelentős stabilitás növekedést okoz a hisztidint nem tartalmazó peptidekhez képest. A koncentráció eloszlásban is látható, hogy az [ML] és [ML₂] komplexek uralkodóak pH 6-8 tartományban.

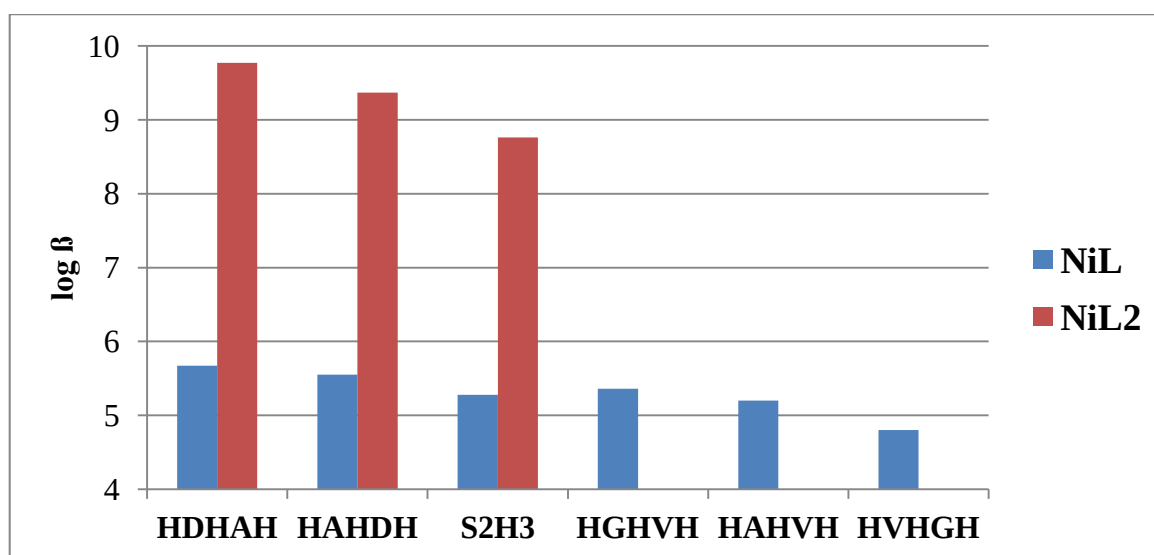


18. ábra A Ni(II)-Ac-HDHAH-NH₂ rendszerben képződő komplexek koncentrációeloszlása a pH függvényében 1:1 arány esetén (c_L=1,02 mM)



19. ábra A Ni(II)-Ac-HDHAH-NH₂ rendszerben képződő komplexek koncentrációeloszlása a pH függvényében 1:3 arány esetén ($c_L = 1,15$ mM)

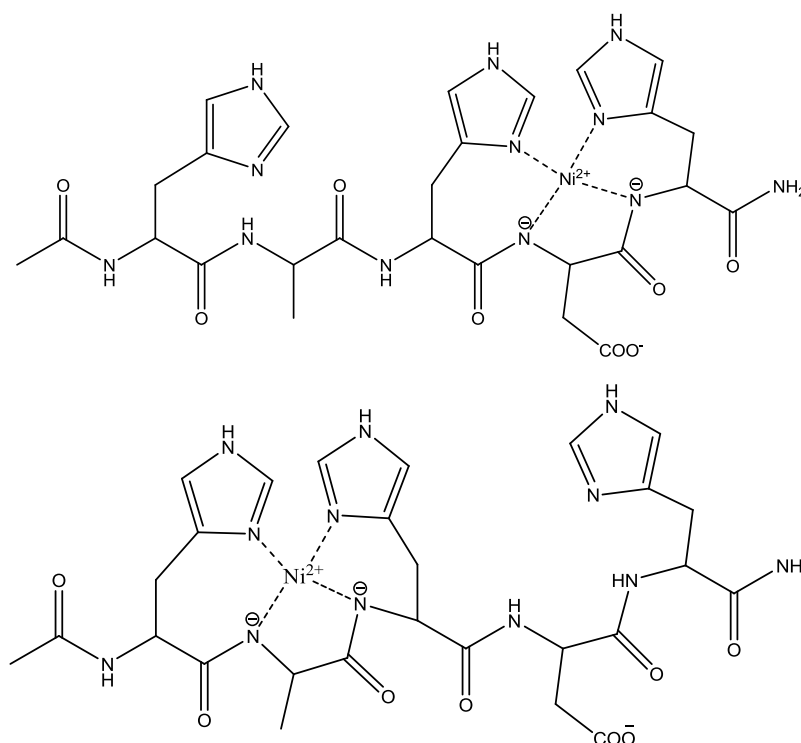
A két ligandum a korábban vizsgált peptidekhez képest egy karboxilátcsoporttal többet tartalmaz, így a keletkező $[NiL_2]$ komplex semleges. A töltés különbség a $[NiL]$ és $[NiL_2]$ komplexek stabilitását növeli. Ezt tükrözi a 13. ábra, ami az $[ML]$ és $[ML_2]$ komplexek stabilitási állandóját mutatja be néhány Ac-HXHYH-NH₂ szekvenciájú peptid esetén. Irodalmi adatokkal összehasonlítva eredményeinket látható, hogy az $[ML_2]$ komplex csak a szarkozint és hisztidint tartalmazó pentapeptidek esetében képződött (19. ábra).



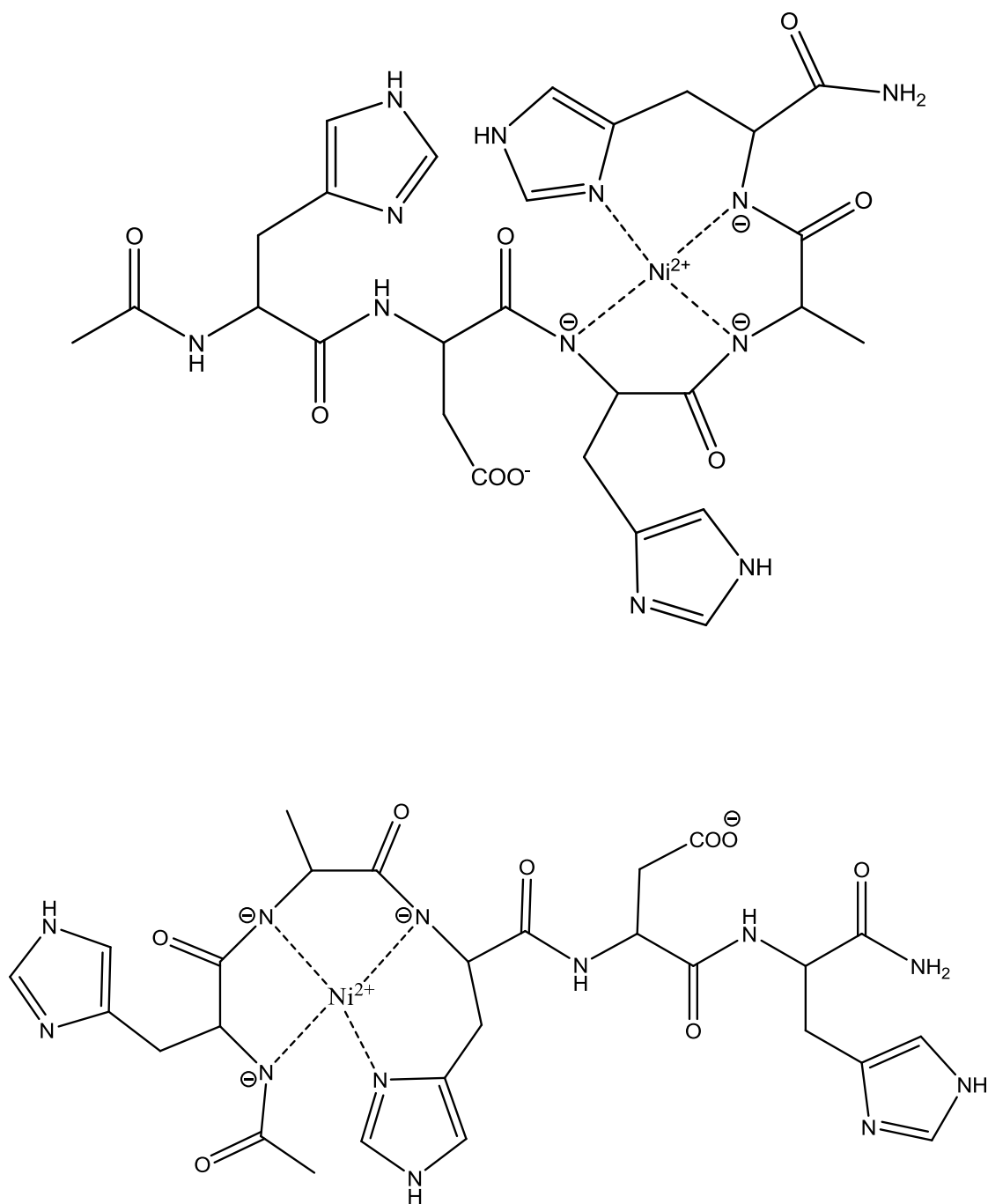
20. ábra A $[NiL]$ és $[NiL_2]$ komplexek stabilitási állandói

A $[\text{NiL}]$ és $[\text{NiL}_2]$ komplexek esetén a ligandum háromfogú koordinációja feltételezhető, amely jelentős mértékben nagyobb pH tartományba tolja az amidnitrogén deprotonálódását (pH 9 felett). Az első két amidnitrogén deprotonálódása egy lépésben játszódik le kooperatív módon.

A korábban vizsgált, hasonló peptidekkel való összehasonlításból megállapítható, hogy az amidnitrogének deprotonálódása $[\text{NiLH}_2]$ (20. ábra) és $[\text{NiLH}_3]$ (21. ábra) összetételű komplexeket eredményez. Az előbbinél imidazol és két amidnitrogén, illetve az utóbbinál imidazol és három amidnitrogén koordinálódik. Ez a koordináció azonban kétféle módon is létrejöhet, izomer szerkezetű komplexeket eredményezve.



21. ábra A $[\text{NiLH}_2]$ komplex lehetséges izomer szerkezetei

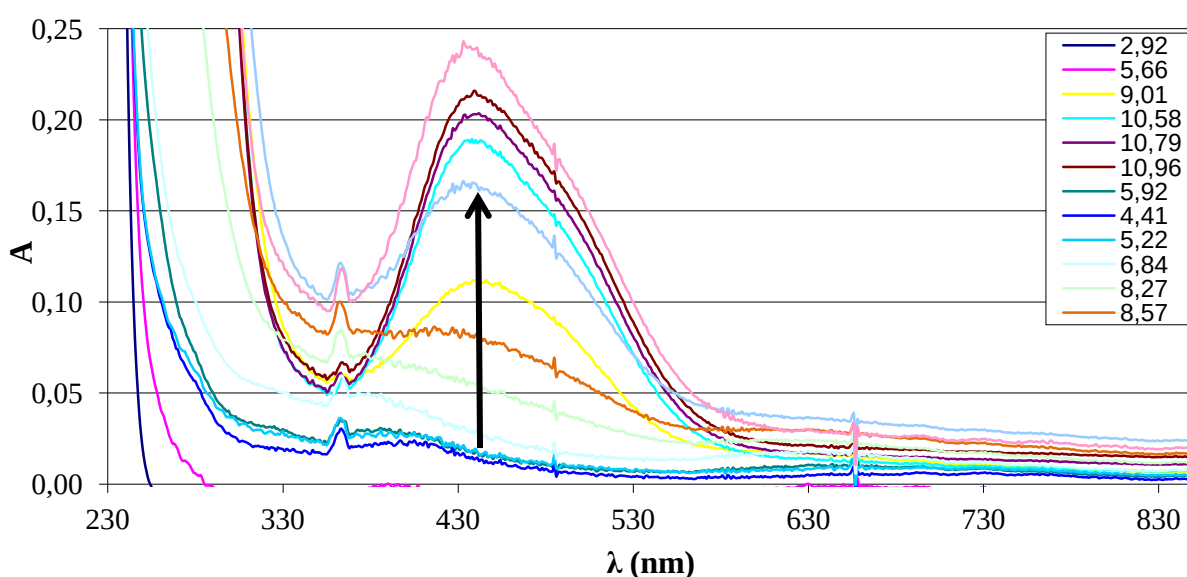


22. ábra A [NiLH₃] komplex lehetséges izomer szerkezetei

5.4.2. Spektroszkópiai vizsgálatok

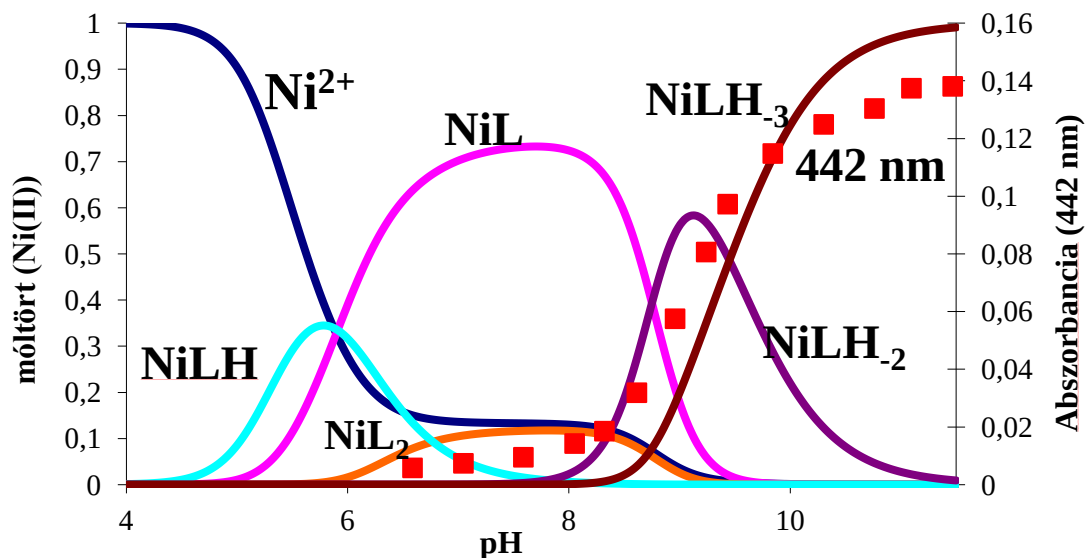
A pH-potenciometriás vizsgálatok kiértékelésével csak a keletkező komplexek összetételét tudjuk megállapítani és egy összetételhez akár több szerkezet is feltételezhető. Ezért a komplexek szerkezetének meghatározásához további, UV-Vis spektrofotometriás és CD spektroszkópiás vizsgálatokat végeztünk.

A már korábban említett $[\text{NiLH}_2]$ és $[\text{NiLH}_3]$ komplexek megjelenésével párhuzamosan intenzív sáv jelenik meg a spektrumban, körülbelül 440 nm-nél és a komplexek arányában növekvő abszorpciós maximumokat láthatunk (22. ábra).



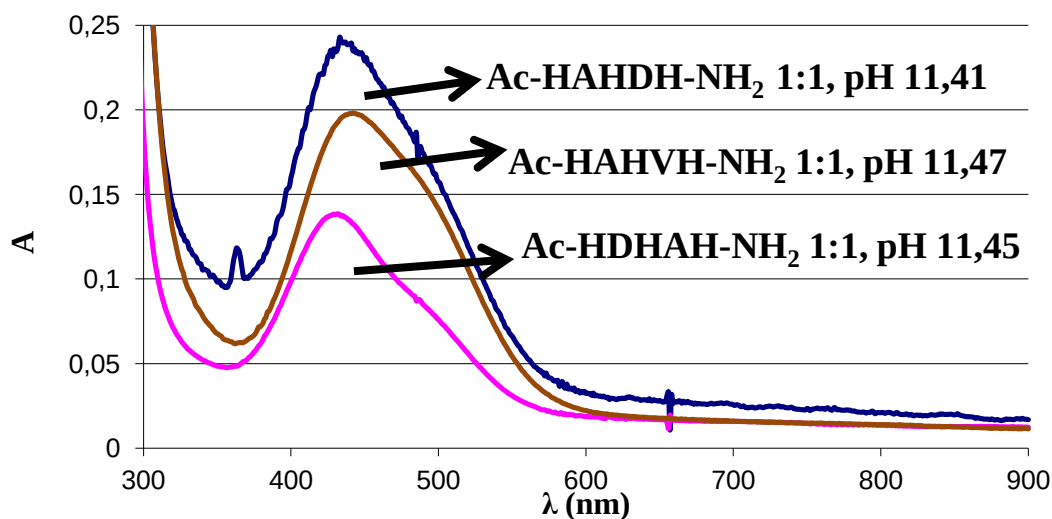
23. ábra A Ni(II):Ac-HDHAH-NH₂ 1:1 arányú rendszer UV-Vis spektrumai

A fenti megállapítást jól tükrözi az az ábra is, ahol a komplexek eloszlási görbéjével párhuzamosan az abszorpciós maximumhoz (442 nm) tartozó abszorbancia értékeket ábrázoljuk a pH függvényében. Jól látható, hogy a spektrális változások párhuzamosan követik a komplexek koncentrációeloszlását (23. ábra).



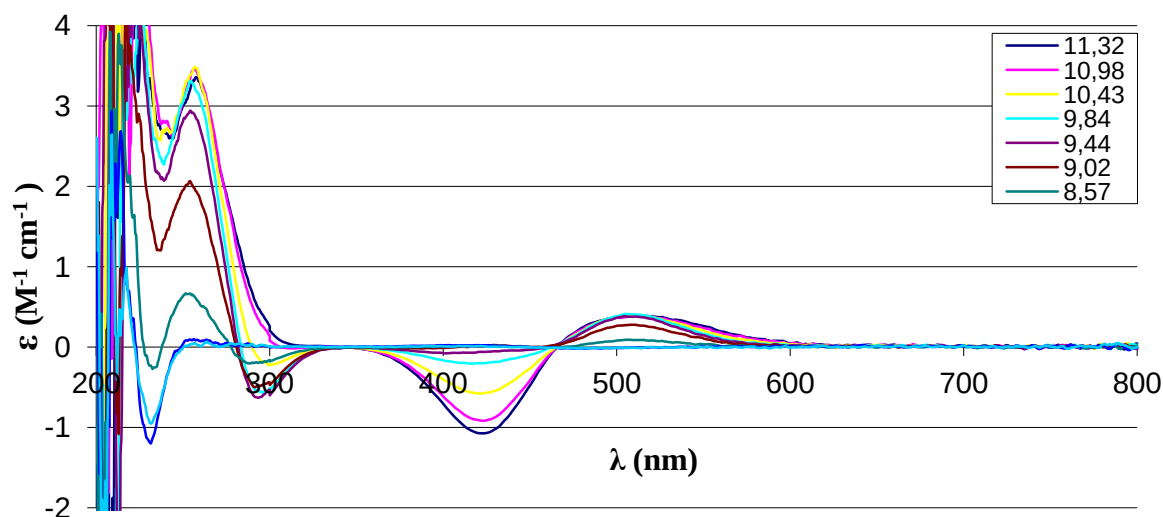
24. ábra A Ni(II)-Ac-HDHAH-NH₂ rendszerben képződő komplexek koncentrációeloszlása (1:1 arány, $c_L=1,02$ mM) és a 442 nm-hez tartozó abszorpció maximumok változása a pH függvényében

A korábbi vizsgálatok során azt állapították meg, hogy a $[\text{NiLH}_2]$ és $[\text{NiLH}_3]$ komplexek esetén izomer szerkezetek jönnek létre és általában a C-terminális részen létrejövő kötés kedvezményezett. Ha azonban a C-terminálison nagyméretű oldallánc van, akkor már nagyobb arányban jelenik meg az az izomer, ahol a fémion a közbelső hisztidinhez kötődik. A vizsgált két peptid lúgos tartományban felvett spektrumát a korábban vizsgált peptiddel, a Ac-HAHVH-NH₂ spektrumával hasonlítottuk össze (24. ábra). A három görbe hasonló, tehát ebből a keletkező izomerekre nem tudunk következtetni.

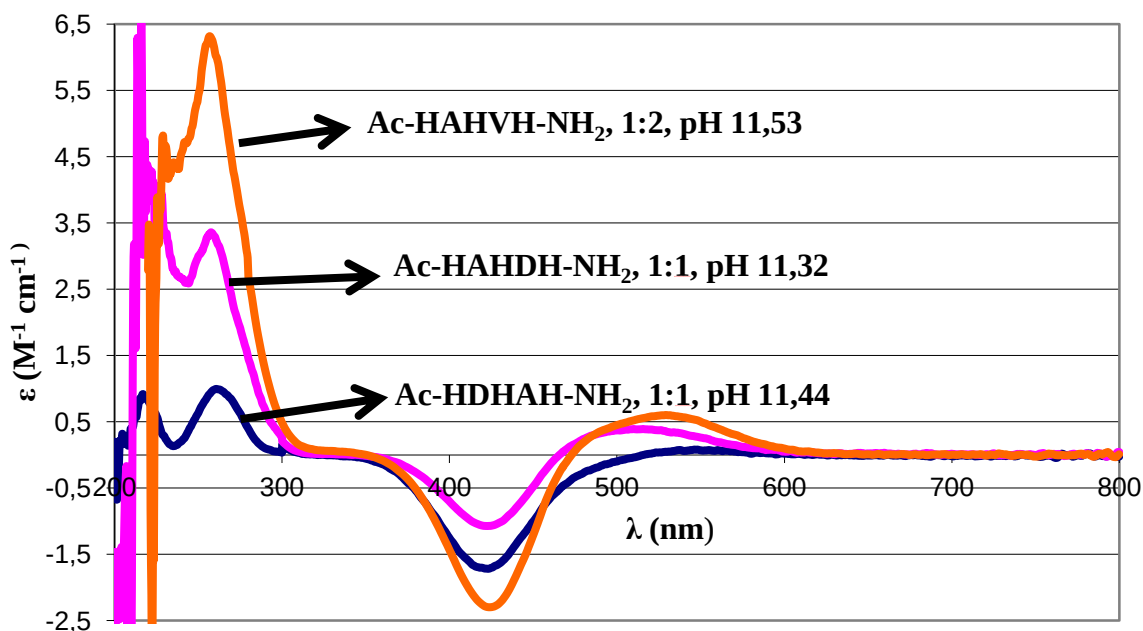


25. ábra A Ni(II) Ac-HAHDH-NH₂ és Ac-HDHAH-NH₂ UV-Vis spektrumainak összehasonlítása az Ac-HAHVH-NH₂⁵ peptiddel

A CD spektroszkópiás vizsgálat során is a $[\text{NiLH}_2]$ és $[\text{NiLH}_3]$ komplexek képződésével párhuzamosan figyelhető meg változás a spektrumban (25. ábra). A vizsgált Ac-HAHDH-NH₂ lúgos tartományban felvett CD spektruma hasonló az Ac-HAHVH-NH₂ spektrumához, míg az Ac-HDHAH-NH₂ esetén nagyobb eltérés látható (26. ábra). Feltételezhető, hogy az Ac-HDHAH-NH₂ esetén a C-terminális részen való kötődés kedvezményezett. Ezek pontos meghatározása érdekében további vizsgálatokat végeztünk.



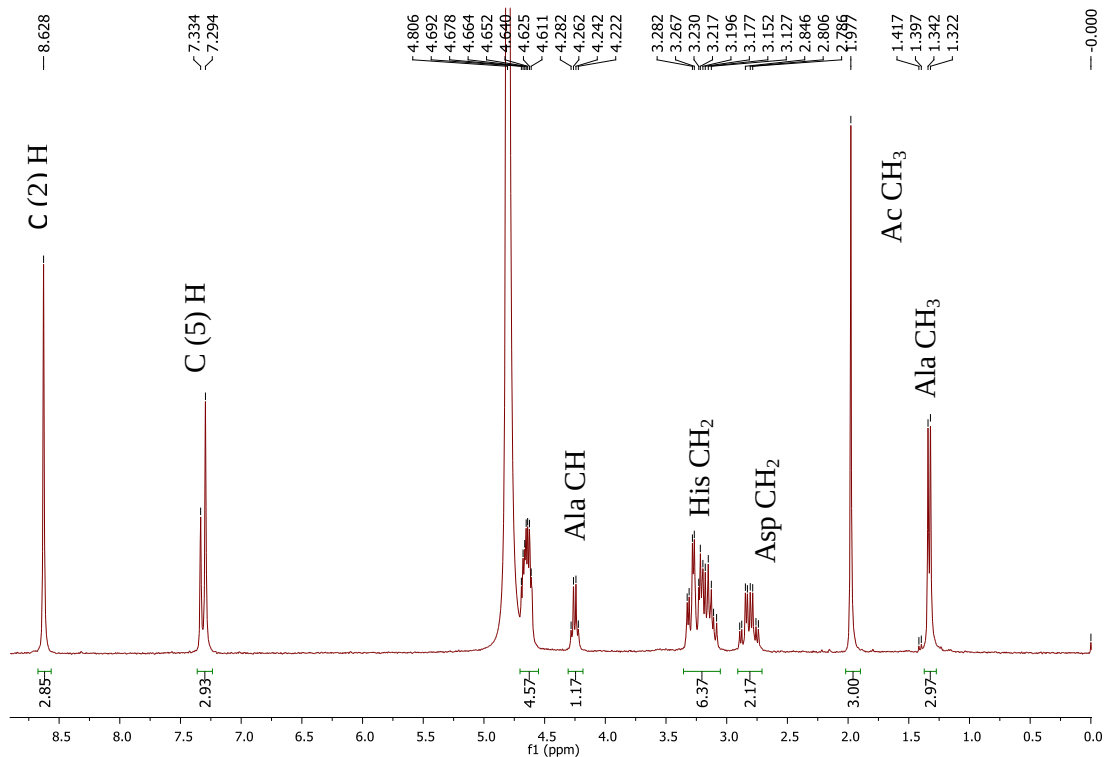
26. ábra A Ni:Ac-HDHAH-NH₂ 1:1 arányú rendszer CD spektrumai



27. ábra A Ni(II)-Ac-HAHDH-NH₂ és Ac-HDHAH-NH₂ rendszer CD spektrumainak összehasonlítása az Ac-HAHVH-NH₂⁵ peptiddel

Az ^1H -NMR spektroszkópai vizsgálatok során, mindkét ligandum esetén 1:2 fémion-ligandum arányt alkalmaztunk. Elsőként a szabad ligandum pH-függését vizsgáltuk. (27.ábra)

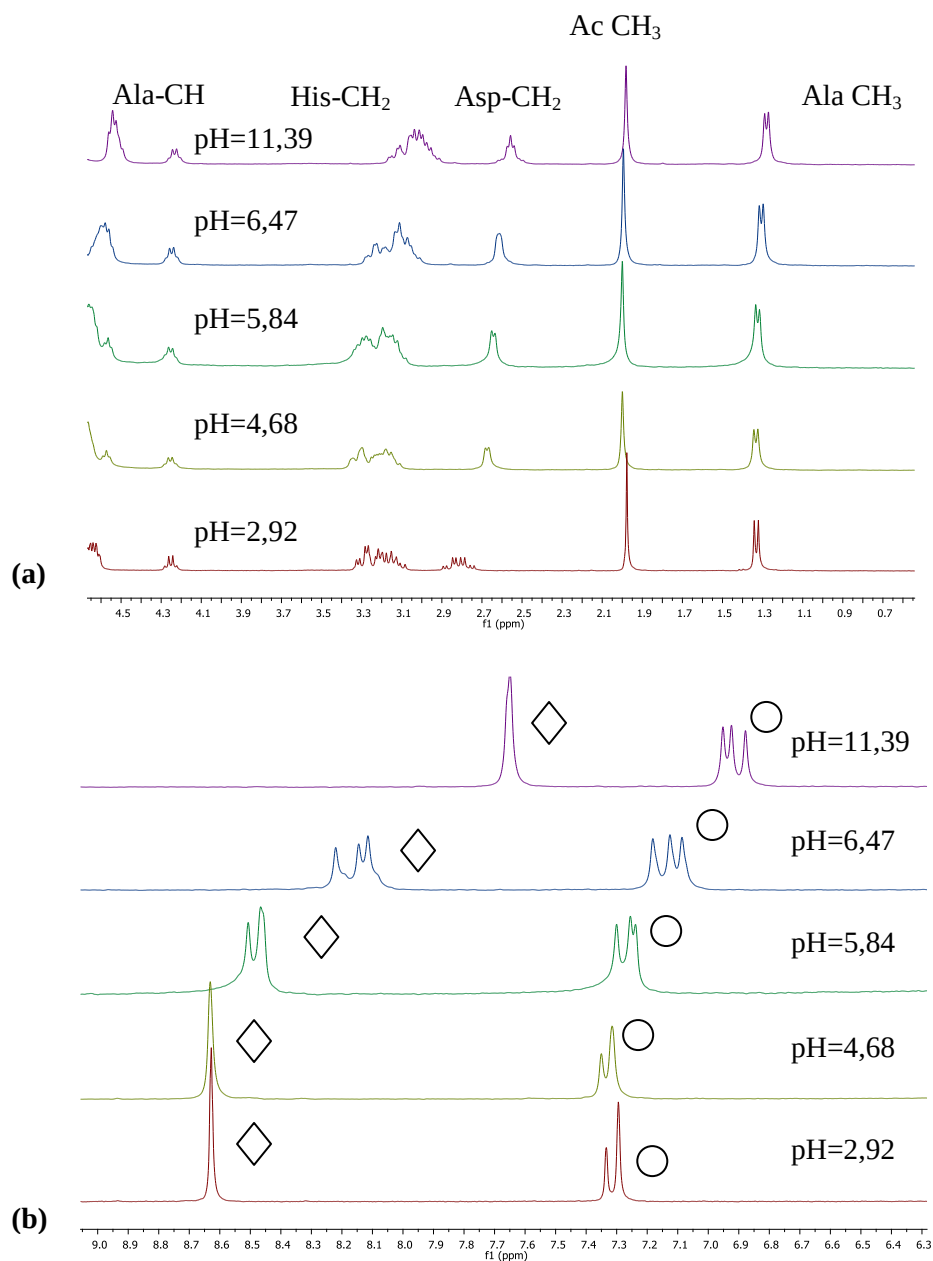
A spektrumokat kiértékelve következtethetünk a peptidben lévő metil, metilén és metin protonoknak megfelelő jelekre. A mért integrál értékek megfelelnek a vártaknak.



28. ábra: Az Ac-HDHAH-NH₂ ligandum ^1H -NMR spektruma (pH=2,9)

Az Ac-HDHAH-NH₂ vegyületre pH függvényében felvett spektrum sorozatot a 28. ábra mutatja be. Alifás tartományban az alanin metil jele nem változik a lúgos tartomány felé haladva, ez szintén elmondható az acilcsoport metiljének protonjairól. Az aszparaginsav CH₂ jelei pH=3-5 közötti tartományban azonban jelentősebb eltolódást mutatnak, mely a karboxilcsoport deprotonálódása következtében történik meg (28/a. ábra).

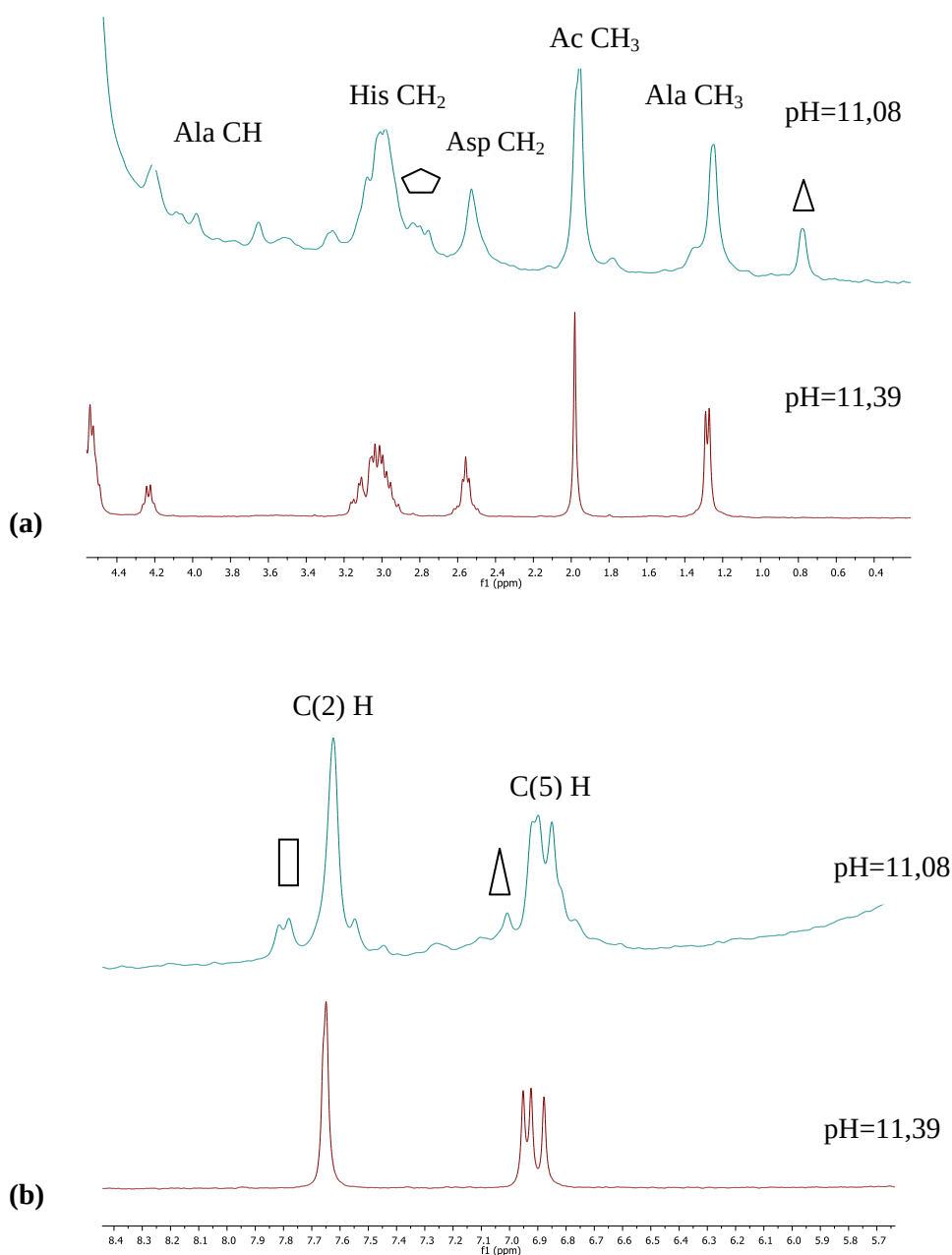
A hisztidinek metilén protonjainak jelei minimális változást mutatnak a pH emelésével, azonban az aromás protonjaik változását jobban tudjuk követni, azok jelentősebb kémiai eltolódást mutatnak, és ez pH = 5 feletti tartományban jelenik meg párhuzamosan az imidazol nitrogénatomjának deprotonálódásával (28/b. ábra).



29. ábra Az Ac-HDHAH-NH₂ ligandum pH függése alifás (a) és aromás (b) tartományban
(C(5)H:○ C(2)H ◇)

Az Ac-HAHDH-NH₂ peptid pH függvényében felvett ^1H -NMR spektrumaiban hasonló tendenciákat figyelhetünk meg, pH=5 fölött az imidazol gyűrűk C(2)H és C(5)H protonjai jeleinek jelentős eltolódását tapasztaltuk, míg a hisztidinrész CH₂ jeleinek esetében az imidazol N(3)H csoportjának deprotonálódásával párhuzamosan csak kisebb mértékű változás tapasztalható. Az aszparaginsav CH₂ protonjainak jelei az Ac-HDHAH-NH₂ ligandumhoz hasonló módon változnak.

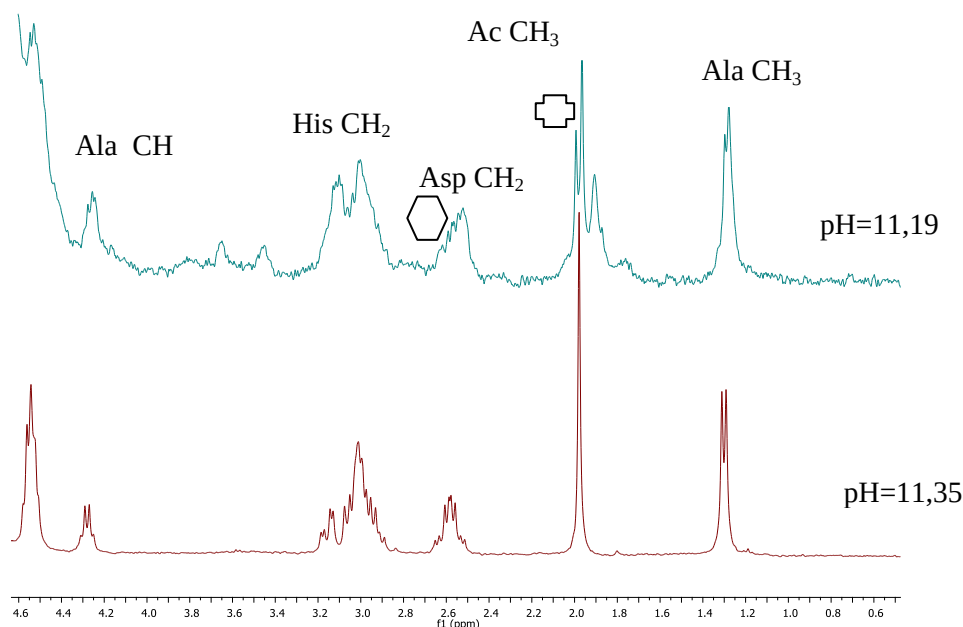
Mindkét ligandum Ni(II)-komplexének spektrumát erősen lúgos tartományban vettük fel, ahol a $[\text{NiLH}_3]$ síknégyszetes geometriájú (29.ábra). Az aromás tartományban a ligandum C(2) H protonjának jele látszódik és emellett látható elkülönülten a Ni(II)-komplex jele is (29/b.ábra). Ebből azonban nem tudunk arra következtetni, hogy a fémion melyik imidazolhoz koordinálódik. Ugyanakkor az alifás tartományban látható, hogy az alanin metil protonjainak jele mellett egy újabb jel jelenik meg, ami a Ni(II)-komplexben kötött ligandumhoz rendelhető (29/a. ábra). Minden esetben az új jeleket alakzatokkal jelöltem meg.



30. ábra Az Ac-HDHAH-NH₂ ligandum és Ni(II)-komplexének ^1H -NMR spektruma alifás (a) és aromás (b) tartományban

Az Ac-HDHAH-NH₂ ligandum esetében az alanin metilcsoportjának jelenél láthatunk számottevő változást, míg az aszparaginsav metilencsoportjának jelei és az acil-metilcsoportjának szinglettje különösebb változást nem mutat. Ebből következtethetünk arra, hogy a nikkel(II)-ionok döntő része a C-terminushoz kötődik, amire az alanin metilcsoportja lesz az érzékenyebb.

Ha az Ac-HAHDH-NH₂ ligandum és Ni(II)-Ac-HAHDH-NH₂ 1:2 rendszer spektrumát hasonlítjuk össze, azt tapasztaljuk, hogy az alifás tartományban az alanin metil protonjainak jele nem változik. A ligandum acilcsoportjának metil protonjainak jele mellett azonban új jel figyelhető meg, ami a Ni(II)-komplexben kötött ligandum acil CH₃-hoz rendelhető. Ez csak abban az esetben lehetséges, ha a fémion az N-terminális részhez kötődik.



31. ábra Az Ac-HAHDH-NH₂ ligandum és a Ni(II)-komplex ¹H-NMR spektruma lúgos pH-n

Ugyanakkor a fémionok jelenlétében a spektrumban (30.ábra) az aszparaginsav CH₂ jele lényegesen kiszélesedik a ligandumhoz képest, ez viszont arra utal, hogy olyan komplex is jelen van, ahol a fémion a C-terminális részhez kötődik. Ezt alátámasztja azt a korábbi feltételezést, hogy mindkét izomer képződik, azonban az N-terminális részhez való koordináció a kedvezményezettebb.

Az ¹H-NMR vizsgálatok alátámasztják a spektrális vizsgálatokból levont következtetéseinket: az Ac-HDHAH-NH₂ ligandum esetén a fémion elsősorban a C-terminális részhez kötődik, míg az Ac-HAHDH-NH₂-Ni(II) rendszerben mindkét izomer jelen van.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A nikkell az emberi szervezetben állandó jelleggel kimutatható. Különösebb ártalmas hatása az emberi szervezetre ez idáig nem ismeretes. Toxikus hatás azonban felléphet, ennek legfőbb megnyilvánulása a bőrön jelentkező ekcémás bőrkiütés, melyet a nikkeltartalmú tárgyak (pl: ékszerek) okoznak.

A Ni(II)-ion koordinációs kémiája nagyon változatos. Leggyakrabban +2-es oxidációs számmal alkot komplexeket, illetve a komplexek geometriája a legtöbb esetben síknégyszetes.

A cink(II)ionok az emberi szervezetben nélkülözhetetlenek. Egyes enzimekben katalitikus szerepük van, míg máshol szerkezetalkítóak. A legújabb felfedezések szerint fontos a DNS replikáció folyamatában is, ott az úgynevezett cink-ujjak szállítják az információt.

Az előbbi két átmenetifém-ionnal szemben, a kadmium rendkívül mérgező az emberi szervezetben, lágyabb tulajdonságánál fogva a létfontosságú enzimekből kiszorítva a cinket, blokkolja azok működését.

A cink(II)ion és kadmium(II)ion leggyakrabban +2-es oxidációs számmal hoz létre komplexeket.

A nikkell(II)- és cink(II)ion legtöbbször hisztidint is tartalmazó fehérjékhez kötődve van jelen. Ezek megismeréséhez vizsgálunk kisebb hisztidintartalmú peptidek átmenetifém-ionokkal alkotott komplexeit.

Ezen kutatásokba kapcsolódtam be. Munkám során két, aszparaginsavat és hisztidint is tartalmazó pentapeptidet (Ac-HAHDH-NH₂ és Ac-HDHAH-NH₂) állítottunk elő automata szintetizáló készülékkel, majd ezek átmenetifém-ionokkal alkotott komplexeit vizsgáltam.

A két szintetizált peptid a korábban vizsgált peptidekhez képest az oldalláncában egy karboxilátcsoportot tartalmaz, ami a kialakuló komplexekben eltérő töltést eredményez.

A Cd(II)- és Zn(II)-ionokkal alkotott komplexek nagy hasonlóságot mutatnak. Mindegyik ligandum esetében [ML] komplex jelenlétét mutattuk ki, de a [CdL] komplexeknél stabilitás növekedést észleltünk, a korábban vizsgált három és négy hisztidint és szarkozint is tartalmazó penta- és heptapeptidhez képest. A keletkezett [ML] komplex azonban egyik ligandum jelenlétében sem akadályozta meg a fémionok hidrolízisét.

A Ni(II)-ionokkal alkotott komplexek esetében a karboxilátcsoport jelenléte kis mértékben növeli az [ML] stabilitását és kedvezően hat az [ML₂] komplex kialakulására. Az amidnitrogének deprotonálódása játszódik le lúgos tartományban, és izomer szerkezetű komplexek képződését feltételeztük. Az UV-Vis és CD spektroszkópiás vizsgálatok azt

mutatták, hogy az az izomer komplex, melyben a C-terminálison lévő hisztidinhez kötődik a fémion, nagyobb arányban van jelen az Ac-HDHAH-NH₂ peptid esetében, mint az Ac-HAHDH-NH₂ peptid esetében. Ezen feltételezéseket erősítette meg a ¹H-NMR spektroszkópiás vizsgálat is, ahol a szabad ligandumok pH-függését, illetve lúgos tartományban a [NiLH₃] komplex spektrumát vettük fel. A kapott adatokból láthattuk, hogy izomer szerkezetek vannak jelen, mely összhangban van a CD spektroszkópiás vizsgálatokból kapott eredményekkel. Amennyiben az aszparaginsav az N-terminuson van, a fémion a C-terminális végen kötődik, míg ha az aszparaginsav a C-terminálison helyezkedik el, az N-terminális végen való kötődés a kedvezményezettebb.

7. SUMMARY

Nickel(II) ion occurs in the human body constantly. Its harmful effect has not been known yet. However, nickel containing jewellery can cause allergic reaction on skin.

Coordination chemistry of nickel(II)ion is diversified. It forms complexes most commonly with oxidation state +2, the geometry of these complexes is square planar.

Zinc(II)ions are very important in the human body. In some enzymes, they have catalytic role and in other enzymes they build the structure. The latest studies showed that zinc-fingers take place in the synthesis of DNA.

Cd(II) is very poisonous because of its soft character it can replace the Zn(II) sulphur containing metalloenzymes, as a result these enzymes cannot work anymore.

They form complexes most commonly with oxidation state +2. Nickel(II) and zinc(II) ions can be bound mostly to histidine containing peptides. To study these interactions, we investigate the transition metal complexes of small peptides containing histidines. I have joined this research. We synthesized two pentapeptides (Ac-HAHDH-NH₂, Ac-HDHAH-NH₂) containing aspartic acid and histidine by solid phase peptide synthesis and I studied their interactions with nickel(II), cadmium(II) and zinc(II) ions.

These two synthesized peptides contain a carboxylate group in their side chain, which causes different charge in the complexes.

Studies with Cd(II) and Zn(II) showed that they form similar complexes with both ligands. We found that [CdL] complexes of these two ligands are more stable than that of sarcosine containing multihistidine penta- and heptapeptide.

The carboxylate group slightly increases the stability of [ML] and it has a beneficial effect on the stability of [ML₂] complex. In the basic pH range the deprotonation of amide nitrogens takes place and we suppose the formation of coordination isomers. Spectroscopic (UV-Vis, CD and ¹H-NMR) studies indicate that the isomer in which nickel(II) is bound to the histidine on the C-termini is present in greater amount in the case of Ac-HDHAH-NH₂ peptide than the Ac-HAHDH-NH₂ peptide.

8. IRODALMI HIVATKOZÁSOK

1. Kiss T., Gajda T., Gyurcsik B. *Bevezetés a bioszervetlen kémiába*, Nemzeti Tankönyvkiadó, **2007**
2. Kállay Cs. *Doktori értekezés*, Debreceni Egyetem, Debrecen, **2005**
3. Greenwood, N.N.; Earnshaw, A. *Az elemek kémiája*, Nemzeti Tankönyvkiadó, **2004**
4. Timári S., *Doktori értekezés*, Debreceni Egyetem, Debrecen, **2012**
5. Timári S., Kállay Cs., Ősz K., Sóvágó I., Várnagy K. *Dalton Trans.*, **2009**, 1962-1971
6. C.E. Livera, L.D. Pettit, M. Bataille, H. Kozlowski, B. Radomska, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **1987**, 661-666
7. R.B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85, 2149
8. P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, „*SUPERQUAD: an improved general program for computation of formation constants from potentiometric data*”, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1985**, 6, 1195-1200.
9. L. Zékány, I. Nagypál, „*Computational Methods for the Determination of Formation Constants*”, *Computational Methods for the Determination of Formation Constants*, ed.: D.J. Legget, Plenum Press, New York, **1985**, 291-299.
10. H.M. Irving, M.G. Miles, L.D. Pettit, „*A study of some problems in determining the stoicheometric proton dissociation constants of complexes by potentiometric titration using a glass electrode*”, *Anal. Chim. Acta*, **1967**, 38, 475-488.
11. G. Eriksson, „*An algorithm for the computation of aqueous multicomponent, multiphase equilibria*”, *Anal. Chim. Acta*, **1979**, 112, 375-383.
12. Gran, G., „*Determination of the equivalent point in potentiometric titrations*”, *Acta Chem. Scand.*, **1950**, 4, 559-577.
13. H. Kozlowski, G. Micera, *Handbook of Metal-Ligand Interactions in Biological Fluids*, ed.: Berthon, G., Marcel Dekker Inc., New York, **1995**, Vol. 1, 566-582.
14. H. Sigel, R. B. Martin, „*Coordinating properties of the amide bond. Stability and structure of metal ion complexes of peptides and related ligands*”, *Chem. Rev.*, **1982**, 82(4), 385-426.
15. Kállay Cs., Ősz K., Dávid A., Valastyán Z., Malandrinos G., Hadjiliadis N., Sóvágó I., „*Zinc(II) binding ability of tri-, tetra- and penta-peptides containing two or three histidyl residues*”, *Dalton Trans.*, **2007**, 4040-4047.