

TDK dolgozat

Hisztidintartalmú tetrapeptid átmenetifém komplexeinek vizsgálata

Készítette:

Huszenicza Gyöngyi

IV. éves Vegyészmérnök BSc hallgató

Témavezető:

Dr. Várnagy Katalin

Egyetemi docens

DEBRECENI EGYETEM

TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS TECHNOLÓGIAI KAR
SZERVETLEN ÉS ANALITIKAI KÉMIAI TANSZÉK

Debrecen, 2014

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	1
2. Irodalmi előzmények.....	2
2.1. A réz élettani szerepe.....	2
2.2. A nikkel élettani szerepe.....	3
2.3. A cink élettani szerepe.....	3
2.4. A kadmium élettani szerepe.....	4
2.5. Hisztidintartalmú peptidek.....	5
2.5.1. Egy hisztidint tartalmazó peptidek.....	5
2.5.2. Több hisztidint tartalmazó peptidek.....	7
2.5.3. Védett multihisztidin peptidek.....	8
3. Kísérleti körülmények.....	9
3.1. Felhasznált vegyszerek, vizsgált ligandumok.....	9
3.2. Peptidszintézis.....	10
3.3. pH-potenciometria.....	11
3.4. UV-látható spektrofotometria.....	12
3.5. Cirkuláris dikroizmus (CD) - spektroszkópia.....	13
3.6. Tömegspektrometria (MS).....	13
4. Kísérleti eredmények és kiértékelésük.....	15
4.1. A vizsgált ligandum sav-bázis folyamatai.....	15
4.2. A ligandum átmenetifém komplexei.....	16
4.2.1. pH-potenciometriás mérések.....	16
4.2.2. UV-látható spektrofotometriás mérések.....	23
4.2.3. CD-spektroszkópiás mérések.....	29
4.2.4. Tömegspektrometriai mérések.....	33
5. Összefoglalás.....	36
6. Summary.....	37
7. Felhasznált irodalom.....	38

1. Bevezetés

Régóta ismert, hogy egyes átmenetifémek létfontosságúak az élő szervezetek számára. Ilyen elemek a réz, a cink és a nikkel. A biológiai rendszerekben főként fehérjéhez kötötten találhatóak meg. Az enzimeknek létfontosságú alkotójaként szerepet játszanak különböző biokémiai folyamatok katalizálásában. Hiányuk, illetve a szervezetben felhalmozott fölöslegük is különböző elváltozásokhoz, betegségekhez vezethet. A kadmium a cinkhez nagyon hasonló elem, gyakran kísérőelemeként is előfordul, de a cinkkel ellentétben erősen toxikus hatású.

A fehérjék szinte minden szervünknek a fő alkotóelemei. A metalloenzimekben a legfontosabb kötőhely a fémionok számára a hisztidin aminosav oldalláncában található imidazolnitrogén, mely fiziológiás körülmények között deprotonált formában van jelen. Ilyen metalloenzim pl. a szuperoxid-dizmutáz (SOD) enzim. Az emberi szervezetben főként réz(II)- és cink(II)iont tartalmazó CuZnSOD fordul elő, de újabb kutatások a NiSOD jelenlétére is találtak bizonyítékot.

A különböző hisztidintartalmú peptidek fémkomplexeinek vizsgálata több évre nyúlik vissza a Szervetlen és Analitikai Tanszék Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoportjában. Munkám során ebbe a kutatási folyamatba kapcsolódtam be.

Célom egy két hisztidint tartalmazó tetrapeptid előállítása volt a tanszéken üzemelő Liberty1 szilárdfázisú peptidszintetizáló készülék segítségével, mely aminosavakból képes összekapcsolni a kívánt szekvenciájú peptidet. Ennek a ligandumnak különböző átmenetifémekkel (Cu(II), Ni(II), Zn(II) és Cd(II)) alkotott komplexeit vizsgáltam. Először pH-potenciometriás, majd a komplexek feltételezett szerkezeteinek megerősítése érdekében UV-látható spktofotometriás és CD-spektroszkópiás méréseket végeztem. A többmagvú komplexek bizonyítása céljából tömegspektrometriai vizsgálatokat is alkalmaztam.

2. Irodalmi előzmények

2.1. A réz élettani szerepe^{1,2,3}

Míg az alacsonyabb rendű organizmusok (algák, kis gombák, baktériumok) számára a réz kis mennyiségben is erős mérég, addig az emberi szervezet viszonylag nagyobb mennyiségben veszi föl. Egy felnőtt szervezetben átlagosan 100-150 mg réz található meg, naponta 3-5 mg szívódik föl a tápcsatornán keresztül. A felszívódást segítik az aminosavak, melyekkel a réz(II)ion különböző szerkezetű komplexek kialakítására képes.

A réz főként fehérjéhez kötötten található meg az emberi szervezetben. A vérben az albuminhoz és a ceruloplazminhoz kapcsolódva fordul elő. Az albumin N-terminális végén XaaYaaHis szekvenciájú rész koordinálódik a fémionhoz. A hozzá kötött réz(II)ion mobilis, míg a ceruloplazmin kb. kétszeres méretéből adódóan sokkal inertebb kötésmódot alakít ki a réz(II)ionokkal. A réz segíti a vas beépülését a hemoglobinba, a kalcium és a foszfor beépülését pedig a csontokba. Az emberi vérben csekély mennyiségű eritrokuprein réz-fehérje található a vastartalmú hemoglobin mellett, a tengeri puhatestűek és rákok vérében pedig réztartalmú hemocianin helyettesíti a hemoglobint, mely légzési katalizátorként is funkcionál.

A metalloproteinek az élő szervezetek kis molekulatömegű fehérjéi, melyekhez szelektív kötőfehérjéken keresztül kapcsolódhatnak a fémionok. A legismertebb SOD enzim, a CuZnSOD, két alapegységre osztható. Mindkét egységben helyet kap egy réz(II)- és egy cink(II)ion is. A réztartalmú fehérjék képesek ellátni a vastartalmú fehérjék funkcióit.

A rézhiány vérszegénységhez, ataxiához, melaninképződési zavarhoz, elszarusodáshoz és Menkes-kórhoz vezethet, míg a szervezetben felhalmozott túlzott mennyiségű réz a májelhalás, a Wilson-kór és a magas vérnyomás oka lehet.

Az orvosi szervetlen kémia kb. 30 éves tudományág. Teljesen újszerű terápiás és diagnosztikai szerek kifejlesztésével foglalkozik, illetve a feladatkörébe tartozik a ma még gyógyíthatatlan betegségek kezelése is. Hatóköre többek között kiterjed a létfontosságú elemek (pl.: Fe, Cu, Zn, Se) kiegészítő adagolására is. Így például a réz(II)ion különböző szerves ligandumokkal (pl.: bleomicin) képzett komplexei hatásos rákellenes szerek lehetnek. Ezek kifejlesztéséhez azonban ismerni kell a fent említett Cu(II)-fehérje komplexek szerkezetét, működését és a lejátszódó folyamatok mechanizmusát.

2.2. A nikkellélettani szerepe^{3,4,5}

A nikkell kimutatása nehéz a biológiai rendszerekben, mert ebben a környezetben kis intenzitású spektruma van a látható tartományban. Általában bonyolult enzimek alkotórésze. Viszonylag nagy a környezeti koncentrációja, ami segíti a felszívódást, és ez fedezi a szükségletet, ezért ritkán alakul ki hiánybetegség.

A nikkell a hidrogenázokban is jelen van (Ni-hidrogenáz), ami a vas-hidrogenázokkal szemben változatos szerkezeteket alakít ki. Általában két fehérje alegységre osztható, a nagyobb rész tartalmazza a nikkell(II)iont. Röntgenkristallográfiai vizsgálatok rámutattak, hogy egymagvú nikkell(II) középpontú komplex helyett kétmagvú NiFe egység van a komplexek központjában.

Újabb kutatások során kiderült, hogy az eddig ismert CuZnSOD mellett a NiSOD is jelen van a biológiai rendszerekben, és jelentős szerepet játszik a különböző biokémiai reakciókban, többek között a szuperoxidok peroxiddá alakulását katalizálja. A NiSOD elsődleges aminosav szekvenciája eltér a Mn-, Fe-, és CuZnSOD-okétól. A nikkell(II)ionhoz a His1, Cys2 és a Cys6 aminosavak koordinálódnak.

A nikkellhiány törpenövést és terméketlenséget eredményez, a főleg miatt pedig tüdőrák, bőrgyulladás alakulhat ki főleg nők esetében. Ám a nikkellnek nemcsak a hiánya és feleslege okozhat megbetegedéseket. Nagyon elterjedt jelenség a nikkell allergia. Hazánk lakosságának 30%-a szenved tőle, melynek 80-90%-a nő. Az allergia kiváltó oka lehet nikkeltartalmú tárgyak érintése (ékszerek, pénzérme, szemüvegkeret, kozmetikumok). Nem köztudott, de a nikkell nem csak bőrtünetek okozója lehet. Az allergiás betegeken jelentkező „nikkell allergia szindróma” fejfájást, fáradékonyságot, vérszegénységet, hasi fájdalmat, puffadást, különböző emésztőszervi megbetegedéseket okozhat. Ezek a tünetek az étellel a szervezetbe juttatott nikkell miatt alakulnak ki⁶.

2.3. A cinklélettani szerepe^{3,7}

A cink minden életformában létfontosságú nyomelem. Szinte valamennyi sejtből megtalálható. Egy felnőtt szervezet cinktartalma 2-4 g⁸, ezáltal a második leggyakoribb nyomelemnek tekintjük. Ennek az 57%-a az izmokban, 29%-a a csontokban, a fennmaradó része pedig a szemben és különböző belső szervekben található meg.

A szervezetben csak fehérjékhez kötött fordul elő, amelyekhez az aminosav oldalláncokon keresztül kapcsolódik. A biokémiai folyamatokban katalitikus, szerkezetalkító és szabályozó szerepe van.

A cink(II)ion az enzimek aktív centrumában foglal helyet. Szénsavanhirdáz enzimhez kötött a CO₂ felvételét és leadását katalizálja. Gyorsítja a különböző sav-bázis folyamatokat, illetve segíti a fehérjék, nukleinsavak és szénhidrátok szintézisét, lebontását.

A cinktartalmú fehérjékben a cink(II) szerkezetalkító szerepe abban nyilvánul meg, hogy a másodlagos szerkezeteket stabilizálják az ionok. Ide tartozik az inzulin tárolásában nyújtott segítsége is.

A genetikai információ átadásánál csak a cink által meghatározott szerkezetek alkalmasak a molekuláris felismerésre, ezzel szabályozva az átadást.

A cink segíti a sebek gyógyulását, ami valószínűleg az A-vitaminban való jelenlétének köszönhető⁹, és támogatja az immunrendszert, ezáltal gátolja a betegségek kialakulását. Hiánya farkas vaksághoz, étvágytalansághoz, törpenövéshez, bőrelváltozásokhoz, gyulladásos megbetegedésekhez, a csontfelépülés hiányához és az immunválasz csökkenéséhez vezethet. Főleg csak nagyon nagy dózisban toxikus. Ilyen esetekben külsőleg mart sebek, belsőleg pedig fájdalmas gyulladások és emésztőszervi problémák alakulhatnak ki.

2.4. A kadmium élettani szerepe^{3,10}

A kadmium a cinkhez nagyon hasonló fém, gyakran fordul elő kísérőelemeként, de a cinkkel ellentétben erősen toxikus hatású.

A kadmium képes helyettesíteni a cinket az élő szervezetekben, annak jótékony hatása nélkül, és mérgező hatása miatt súlyos károkat okozva.

A kadmium a legtöbb élelmiszerben előfordul, mivel a műtrágyák alkotójaként bekerül a növényekbe. A növények sokáig elviselik a magas kadmium-tartalmat is. A fémion táplálékláncban felhalmozódik, így kadmiumban dúsabb élelmiszerek: a máj, a gomba, a kagylók és más puhatestűek, a tengeri moszat és a lenmag. A dohányzás is jelentős kadmium forrás.

Vas- és kalciumhiány esetén a kadmium felszívódás fokozódik, mivel mindhárom fém azonos transzporttal szívódik föl. A kadmium a májban fokozza a metallothioneinek szintézisét, melyekkel komplexeket képez, ezért a szervezet ezzel az önvédekező folyamattal megköti, és ezáltal semlegesíti a kadmium toxikus hatását.

A kadmium nagyobb mennyiségben a szervezetbe kerülve szív- és veseelégtelenséget, magas vérnyomást okoz, belégzése károsítja tüdőt, akár halálhoz is vezethet.

A csontokat is károsítja, csökkenti azok kalciumtartalmát, a kalcitriol szintézisét blokkolja, amely aktiválja a kalciumhoz kötődő fehérjéket. Japánban az „Itai-itai” betegség okozója, mely csonttritkulással, súlyosabb esetben csontlágyulással jár, ami az ágyékesigolyák összeroppanásához vezethet, így halálos kimenetelű is lehet.

A kadmium emésztőszervi panaszokat, a központi idegrendszer károsodását, pszichés zavarokat és a szaglás elvesztését is okozhatja.

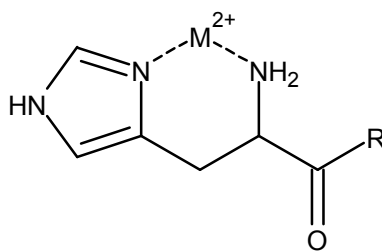
A fémmel patkánykísérleteket is végeztek, a kadmium por intramuszkuláris injekciója rákos megbetegedéseket idézett elő az állatoknál, amit a DNS sérülése okozott¹¹. CdO_2 formában prosztaták kialakulásához vezethet.

2.5. Hisztidintartalmú peptidek¹²

A metalloproteinek fémion-megkötésében meghatározó szerepet játszik a hisztidin, ezért nagyon sok, különböző helyen különböző számú hisztidint tartalmazó peptid fémkomplexeit vizsgálták. A kialakuló komplexek szerkezeti sajátosságait nagymértékben befolyásolja a peptidekben lévő hisztidinek helyzete és száma. Több hisztidint tartalmazó proteinek esetén a hisztidinek egymáshoz viszonyított pozíciója is meghatározó szerepet játszik a koordinálódás kialakításában. Ezek mellett a fémkomplexek összetétele az alkalmazott fém-ligandum aránytól is függ, valamint az is befolyásolja, hogy a peptid tartalmaz-e védőcsoportot a C- vagy az N-terminális végén.

2.5.1. Egy hisztidint tartalmazó peptidek

N-terminális hisztidint tartalmazó di- és oligopeptidek (HisXaaYaa) esetében a hisztaminszerű koordináció (*1. ábra*) a meghatározó, mely során hattagú, stabilis kelátgyűrű alakul ki a terminális amino- és hisztidin imidazolnitrogén részvételével. Ez a nikkel(II)komplexek esetében megakadályozza az amidnitrogének deprotonálódását, így $[\text{NiL}]$ és $[\text{NiL}_2]$ összetételű komplexek alakulnak ki. Azonban réz(II)komplexek esetén a kelátgyűrű csak nagyobb pH-tartományba tolja az amidnitrogének deprotonálódását. Az első amidnitrogén deprotonálódása csak pH 6 fölött játszódik le, ami kb. egy egységgel nagyobb, mint amit az oligoglicineknél mértek. Ligandumfeleslegben $[\text{CuL}_2]$ komplex képződik¹³.



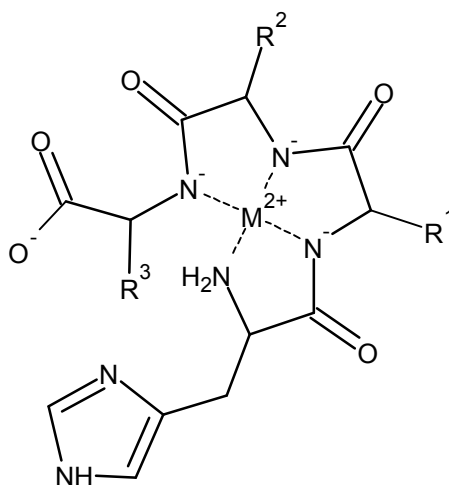
1. ábra: A hisztaminszerű koordináció

Ha a peptidben a második helyen van hisztidin (XaaHis, XaaHisYaa), akkor az $[MLH_1]$ komplexben 5,6-tagú kelátrendszer alakul ki az aminocsoport, az imidazol nitrogén és egy deprotonálódott amidnitrogén koordinálódásával. A réz(II)ion körüli négy ekvatoriális helyből hármat foglalnak el a donortatomok. A negyedik helyre akár egy másik ligandum is kapcsolódhat. A réz(II) és a nikkel(II) esetében is ez a jellemző, csak nikkel(II) jelenlétében nagyobb pH-n ($Cu(II) \sim 4$, $Ni(II) \sim 6-7$) játszódik le a folyamat, mert az amidnitrogének deprotonálódását kevésbé segíti ez a fémion¹⁴.

Harmadik helyen hisztidint tartalmazó peptid (XaaYaaHis, XaaYaaHisZaa) például a humán szérum albumin is, mely a vérplazmában található, és hozzá kapcsolódik a réz(II)- és a nikkel(II)ionok jelentős része. Az XaaYaaHis szekvenciájú peptidek számos más helyen is megjelennek az élő szervezetekben; ilyen például a SPARC peptidfragmense¹⁵, valamint ilyen peptidek segítik a DNS szekvenciák fölismerését és a hibás láncrészek kivágását is¹⁶. Az ilyen szekvenciájú peptidek mind a nikkel(II)-, mind a réz(II)ionnal $[MLH_2]$ komplexet képeznek 4-es és 5-ös pH-n. A fémionok $[NH_2, 2xN^-, N(Im)]$ típusú koordinációval kapcsolódnak a ligandumhoz a komplexben. Az amidnitrogének deprotonálódása kooperatív módon játszódik le 5,5,6-tagú kelátrendszert képezve, amely a komplexek kiugró stabilitását eredményezi. A $[NiLH_2]$ komplex esetében szerkezetváltás jön létre: az oktaéderes, paramágneses szerkezetet síknégyszetes, diamágneses váltja föl. Az amidnitrogének deprotonálódása azonban a réz(II)iont tartalmazó rendszerhez képest nagyobb pH-n játszódik le¹⁷.

A negyedik vagy attól távolabbi hisztidin esetében az imidazolnitrogén és az N-terminális aminocsoport két vagy több aminosav távolságra kerül egymástól, ezáltal megszűnik a csatolt kelátrendszer kialakulásának lehetősége. Ez összetett komplexképződésnek nyújt teret. Savas pH tartományban makrokelát jelenléte figyelhető meg a terminális aminocsoporton és egy imidazolnitrogénon keresztül, melynek stabilitása a gyűrű tagszámának növekedésével csökken. Ha növeljük a pH-t, az amidnitrogének lépcsőzetes deprotonálódása játszódik le, így jönnek létre az $[MLH_1]$, az $[MLH_2]$ és az $[MLH_3]$ összetételű komplexek^{18,19} (2. ábra). Réz(II)ion esetében a $[CuLH_1]$ és a $[CuLH_2]$ komplex képződésekor a negyedik ekvatoriális helyre az imidazolnitrogén koordinálódik, míg a

[CuLH₃] komplex jelenléte [NH₂, 3xN⁻] szerkezettel valósul meg, de az imidazolnitrogén koordinálódása is kimutatható. Az még vitatott, hogy amidnitrogének deprotonálódása a C-terminus vagy az N-terminus felé halad-e. A kisebb peptidek (penta, hexa) [NH₂, 3xN⁻], a nagyobb peptidek pedig [N(Im), 3xN⁻] szerkezet kialakításával koordinálnak a fémionokhoz. Nikkel(II) és cink(II) jelenlétében gyengén savas tartományban a molekula háromfogú koordinációjával [ML] és [ML₂] komplexek képződnek. Jelentős stabilitásnövekedés figyelhető meg az egyszerű peptidekhez képest. Nikkel(II) esetén lejátszódik az amidnitrogének deprotonálódása, egy lépésben [NiLH₂] képződik [NH₂, 2xN⁻] koordinációval, illetve [NiLH₃] komplex [NH₂, 3xN⁻] koordinációval. Az imidazolnitrogén kötődése ezekben a komplexekben már nem mutatható ki²⁰.



2. ábra: Az [MLH₃] összetételű komplex szerkezete

Az N- vagy C-terminális végén védett peptidek jelenlétében átalakulnak a kötődési viszonyok. Az aminocsoport blokkolása során az imidazol nitrogén válik horgonycsoporttá, a fémionhoz való kapcsolódása elősegíti az amidnitrogének deprotonálódását. Az N-terminális végén védett peptideknél, melyek a C-terminális végükön hisztidint tartalmaznak, a komplexképződés a C-terminuson lévő imidazolnitrogén koordinálódásával kezdődik, majd nagyobb pH-n a megelőző amidnitrogének deprotonálódása következik. Az N-terminális végtől számított első helyen hisztidint tartalmazó tetrapeptid az N-től a C-terminus irányába deprotonálódik, egyébként általában fordított a deprotonálódás iránya^{21,22}.

2.5.2. Több hisztidint tartalmazó peptidek

A legegyszerűbb több hisztidint tartalmazó dipeptid a HisHis. A réz(II)ionhoz három féle módon koordinálódhat a HisHis szekvenciájú peptid²³. 4-es pH környékén [CuLH]

komplex van jelen, melyben a fémion a peptid N-terminális végén koordinálódik az amino- és egy imidazolnitrogéneken keresztül. pH 5-6 között a fémion körüli koordinációs szférában átrendeződés figyelhető meg a $[\text{CuL}]$ kialakulása közben, melyben $[\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}(\text{Im})]$ szerkezet jön létre. 7-es pH fölött egy dimer komplex, $[\text{Cu}_2\text{L}_2\text{H}_2]$ van jelen az oldatban. Mindkét fémion körül azonos a koordináció $[\text{NH}_2, \text{N}^-, + \text{N}(\text{Im})]$. A HisValHis savas közegben $[\text{CuLH}]$ és $[\text{CuL}]$ formában van jelen hisztaminszerű koordinációval²⁴. A makrokelát kialakulása következtében a síknégyszetes szerkezet torzul, ami gátolja a biszkomplexek kialakulását és az amidnitrogének deprotonálódását. Fiziológias pH-n $[\text{CuLH}_2]$ komplex jelenlétét igazolták a mérések. GlyHisGlyHis jelenlétében a pH növekedésével a négyszetes piramisos szerkezet a $[\text{CuLH}_2]$ komplex képződése során torzult trigonális bipiramissá alakul.

2.5.3. Védett multihisztidin peptidek²⁵

Védett multihisztidin peptidek vizsgálata során azt tapasztalták, hogy enyhén savas pH-tartományban csak az imidazolnitrogének koordinálnak a fémionokhoz és $[\text{ML}]$ komplex képződik. Ez a komplexképződés mind a nikkel(II), mind a réz(II) esetében lejátszódik. Bár a kialakuló komplexek stabilitása nagyobb, mint a peptidszerű koordinációval kialakuló $[\text{ML}]$ komplexé, de nem elég nagy stabilitásúak ahhoz, hogy megakadályozzák az amidnitrogének deprotonálódását, ami enyhén lúgos tartományban játszódik le. Lúgos pH-tartományban a fémionok körül szerkezeti átrendeződés megy végbe. A koordináció az aminocsoporton, az imidazolnitrogéneken és gyakran az amidnitrogéneken keresztül valósul meg. A réz(II)-ionhoz képest a nikkel(II)-ion kevésbé segíti az amidnitrogének deprotonálódását, és merev síknégyszetes fémkomplexeket képeznek. A réz(II)ionok a legnagyobb stabilitású komplexeket a hisztidint alternáló pozícióban tartalmazó peptidekkel alkotják, melyekben a hisztidinek egy aminosav távolságra vannak egymástól.

3. Kísérleti körülmények

3.1. Felhasznált vegyszerek, vizsgált ligandumok

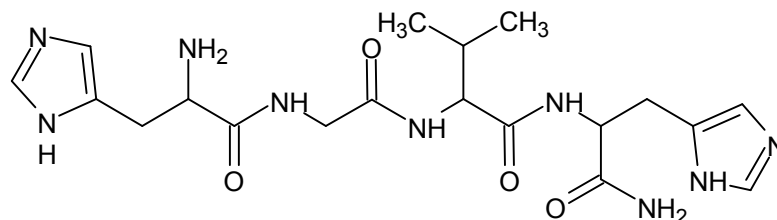
A pH-potenciometriás titrálások elvégzéséhez kb. $0,2 \text{ mol/dm}^3$, pontosan ismert koncentrációjú KOH oldatot készítettem, melyet a karbonátmentesség fenntartása céljából argon gáz alatt tartottam. A KOH pontos koncentrációját KH-ftalát oldattal pH-potenciometriásan határoztam meg, mely során a karbonátmentességet is ellenőriztem. A mintában az ionerősséget KCl oldattal biztosítottam.

A kb. $0,2 \text{ mol/dm}^3$ -es sósav- illetve salétromsavoldatot tömény sav hígításával készítettem, melynek a pontos koncentrációját a már ismert koncentrációjú KOH-oldattal való titrálás segítségével határoztam meg. A számolás során Gran-féle módszert alkalmaztam.

A komplexképződési folyamatok vizsgálatához CuCl_2 , NiCl_2 , ZnCl_2 és $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ oldatokat használtam, melyeket a.l.t. minőségű, a Reneal cég által gyártott vegyszerekből készítettek. A sóoldatok fémion-koncentrációját oxinát formájában, gravimetriásan, a fémion oldatok savkoncentrációját potenciometriásan határozták meg.

Minden oldatot háromszor ioncserélt vízzel készítettem.

A vizsgált ligandumot (HisGlyValHis-NH_2) (3. ábra) a Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszéken lévő Liberty1 típusú, szilárd fázisú, automata peptidszintetizáló készülékkel állítottam elő. A peptidszintézishez felhasznált vegyszereket a Merck Kft-től (hisztidin (Fmoc-His-Trt-OH), glicin (Fmoc-Gly-OH), valin (Fmoc-Val-OH), dimetilformamid (DMF), o-(benztriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronium-tetrafluoroborát (TBTU), piperidin, N,N-diizopropil-etilamin (DIPEA) és trifluorecetsav (TFA)), a Sigma-Aldrich cégtől (N-hidroxibenzol-triazol (HOBt), triizopropil-szilán (TIS), 1-metil-2-pirrolidin (NMP), dietil-éter), 2,2'-(etiléndioxi)-dietántiol (DODT)), a VWR International Kft-től (diklórmetán (DMF)) és a Nova Biochem-től (Rink Amide gyanta) vásároltuk.



3. ábra: A vizsgált HisGlyValHis-NH_2 ligandum szerkezete

3.2. Peptidszintézis

A peptidet szilárd fázisú szintézissel állítottam elő az őket felépítő aminosavakból Liberty 1 készülékkel a Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékén. A folyamat teljesen automatizált, számítógép vezérli az egyes lépéseket.

A Merrifield által kidolgozott szilárd fázisú peptidszintézis esetén oldhatatlan polimer (gyanta) felületén végzik a peptidláncok szintézisét²⁶. A peptid C-terminális végét a gyanta funkciós csoportjához kapcsolják. Az átmeneti amino-védőcsoport hasítása után a következő aminosav peptidkötéssel hozzákapcsolódik az előzőhöz. A kötés kialakulását különböző kapcsolószerek segítik (TBTU, HOBt), melyek aktiválják az aminosav karboxil csoportját. A kapcsoló lépések során a peptidlánc növekedik a gyantán. A reagens fölöslegétől szűréssel és mosással egyszerűen meg lehet szabadulni.

A módszer rendkívül nagy előnye, hogy a szintézis veszteségek nélkül, egyetlen reakcióelegyben megvalósítható. Ez annak köszönhető, hogy a reakcióelegy az egyes lépések után leszűrhető, így azokat az anyagokat, amelyek nem reagáltak el, könnyen el lehet távolítani²⁷. A szűrőn végül csak a gyanta és a hozzá kapcsolódott peptid marad. A folyamat hátránya azonban az, hogy a peptid izolálása csak a gyantáról való hasítás után lehetséges.

A szilárd fázisú peptidszintézis során alkalmazott Fmoc/tBu stratégia szerint az aminosav származékok α -aminocsoportjára 9-fluorenil-metoxikarbonil (Fmoc) védőcsoportot, az oldalláncok csoportjaira pedig terc-butil (tBu) védőcsoportot kapcsolnak a mellékreakciók elkerülése érdekében²⁸.

A folyamat során a készülék automatikusan adagolta a szükséges anyagokat: először az aminosavakat (Fmoc-His-Trt-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Val-OH), majd a reakciót katalizáló aktivátort (HOBt, TBTU) és aktivátor bázist (DIPEA). A kapcsolási lépések hatékonyságát mikrohullám alkalmazása növelte. Ez a módszer gyakorlatilag teljesen tiszta peptid előállítására alkalmas. A Fmoc védőcsoport eltávolítása szintén mikrohullám segítségével 20%-os piperidin-DMF eleggyel történt.

Az előállított peptid gyantáról való lehasítására már a készüléken kívül került sor a hasítóeleggyel (TFA/TIS/H₂O/EDT). Az etán-ditiolnak (EDT) a hisztidin-oldallánc oxidálódásának megakadályozásában volt szerepe. A peptidet dietil-éterrel csaptam ki. Éteres mosás, és centrifugálás után a pelyhes csapadékot nagy tisztaságú argon gáz alatt szárítottam meg. Végül kevés vízben feloldottam és liofilizálták.

3.3. pH-potenciometria

A potenciometria olyan elektroanalitikai módszer, amely során egy elektrolit oldatba merülő két elektródból összeállított elektrokémiai cella elektródjai között fennálló potenciálkülönbséget mérjük. Az elektródok felületén kialakuló elektródpotenciálok közvetlenül nem határozhatók meg, csak a két potenciál különbségének mérésére van lehetőségünk. pH mérésre általában hidrogénion-szelektív elektródot alkalmazunk, amely egy vékony üvegmembránt tartalmaz, és belülről egy adott pH-jú referenciaoldattal érintkezik. Az elektródot eltérő hidrogénion koncentrációjú (pH-jú) oldatokba helyezve a membrán külső oldalán eltérő potenciálok alakulnak ki, így az elektród felhasználható pH mérésre, mivel potenciálja megváltozik.

A ligandumok protonálódási állandóit és a különböző összetételű fémkomplexek stabilitási állandóit pH-potenciometriás mérésekkel határoztam meg. Ez a módszer a legáltalánosabb az oldatfázisban lejátszódó komplexképződési folyamatok egyensúlyi vizsgálatára. A titrálásokat egy számítógép vezérelte MOL-AcS gyártmányú buretta és egy MOLSPIN pH-meter pH-mérővel végeztem, melyhez egy kombinált üvegelektrod (Metrohm 6.0234.100) kapcsolódott.

Az elektródot $0,050 \text{ mol/dm}^3$ koncentrációjú kálium-hidrogén-ftalát oldat segítségével kalibráltam, melynek pH-ja 25°C -on $4,005\text{-}4,008$.

A méréseket kb. $0,2 \text{ mol/dm}^3$, pontosan ismert koncentrációjú karbonátmentes KOH titrálóoldattal végeztem.

Az állandó hőmérsékletet ultratermosztáttal, az oxigén kizárását argon gázzal, a megfelelő kevertetést pedig mágneses keverővel biztosítottam.

Az általam vizsgált rendszereket vizes oldatban, 3 cm^3 -es (Cd^{2+}) és 4 cm^3 -es (Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+}) mintákban tanulmányoztam.

A ligandumok teljes kezdeti koncentrációja $1,2\text{-}2,6 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ volt. A ligandumok koncentrációját a potenciometriás titrálási görbe ekvivalenciapontjai alapján számítógépes programmal határoztam meg. A minták fém-ligandum aránya $1:3\text{-}1:1$ között változott. A kiértékeléshez használt program a titrálások során fellépő térfogatnövekedést figyelembe vette.

A mintákban az ionerősség állandó, $0,2 \text{ mol/dm}^3$ volt, ezt a mintához 1 mol/dm^3 koncentrációjú KCl oldat hozzáadásával biztosítottam. Ez az ionerősség jól egyezik a mérőoldat koncentrációjával, viszont a titrálandó oldat fémion- és ligandum-

koncentrációjának összegétől jelentősen nagyobb. Ez teszi lehetővé, hogy a minta ionerőssége gyakorlatilag ne változzon a titrálás során.

A ligandumok koncentrációit és protonálódási állandóit a SUPERQUAD²⁹ nevű programmal számoltam ki, a PSEQUAD³⁰ nevű programmal pedig a különböző fémkomplexek stabilitási állandóit határoztam meg. A ligandum protonálódási állandói és a komplexek stabilitási állandói a következő általános egyensúlyi összefüggéssel fejezhetők ki:

$$pM + qL + rH = M_p L_q H_r \quad (1)$$

$$\beta_{pqr} = \frac{[M_p L_q H_r]}{[M]^p [L]^q [H]^r} \quad (2)$$

β_{pqr} a különböző lépcsőzetes folyamatok összegződéséből adódik, és további lehetőség adódik a lépcsőzetes egyensúlyokra vonatkozó állandók képzésére. A program fontos tulajdonsága, hogy képes ugyanazon rendszer különböző fémion-ligandum arányával vagy koncentrációinál kapott mérési adatait párhuzamosan kiértékelni.

3.4. UV-látható spektrofotometria

A spektrofotometriás vizsgálatokat Cu(II)-komplexek esetén 250-900 nm-es, Ni(II)-komplexek esetén 200-900 nm-es hullámhossztartományban végeztem el.

A spektrumokat Perkin Elmer Instruments Lambda 25 UV/VIS kétsugaras, és Hewlett Packard HP 8453 típusú egysugaras spektrofotométeren vettem föl, 1,00 cm-es kvarc küvettában, eltérő fém-ligandum arányoknál, különböző pH értékeken.

A kapott spektrumok elemzése segítségével következtetni lehet a képződő komplexek szerkezetére, geometriájára, a koordinálódó donorumok jellegére és számára.

A különböző fémkomplexek spektroszkópiai sajátosságairól már rengeteg információt gyűjtöttek össze, hiszen már régóta vizsgálják őket. Ennek ellenére nehéz egyértelmű következtetéseket levonni a mérések során kapott adatokból a lehetséges koordinációs módok sokfélesége és a befolyásoló tényezők nagy száma miatt. A réz(II)-komplexek tetragonálisan torzult oktaéderes szerkezetűek, melyekben a lehetséges d-d átmenetek egyetlen sávva olvadnak össze. Az intenzitásuk és az energiájuk is függ a donorumok minőségétől és mennyiségétől³¹. Az abszorpciós maximum ($\lambda_{\max}$) helye a következő empirikus képlet³² segítségével becsülhető meg:

$$\lambda_{\max} = \frac{10^3}{0,294(C = O/H_2O) + 0,346(COO^-) + 0,460(NH_2) + 0,494(N =) + 0,434(Im)} \quad (3)$$

Ez az egyenlet figyelmen kívül hagyja azt a tényt, hogy axiális koordináció következtében a $\lambda_{\max}$ értékek a nagyobb hullámhosszak felé tolódnak el.

Ha a $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ -ion ekvatoriálisan elhelyezkedő víz molekulái valamilyen más donoratomot (pl. N, O) tartalmazó ligandumra cserélődnek, akkor az abszorpció maximuma a kisebb hullámhosszak felé tolódik el. Ez az effektus főleg N-donoratomoknál jelentős.

3.5. Cirkuláris dikroizmus (CD)-spektroszkópia³³

CD-spektroszkópiás vizsgálatokat is végeztem a kialakult komplexek szerkezetének meghatározására.

A cirkuláris dikroizmus a síkban polarizált fény kölcsönhatását jellemzi az optikailag aktív anyaggal. A síkban polarizált fény felbontható két azonos amplitúdójú, jobbra illetve balra cirkulárisan polarizált fény összegére. A dikroizmus kétféle elnyelést, „kétszínűséget” jelent. A cirkuláris dikroizmus során a vizsgált optikailag aktív anyag a síkban polarizált fény két komponensét eltérő mértékben nyeli el, azaz a mintán való áthaladás után a komponensek abszorpciója és ezáltal intenzitása eltérő lesz. Ezt a különbséget nevezik Cotton-effektusnak.

Ha az abszorpciók különbségét ábrázoljuk a hullámhossz függvényében, akkor megkapjuk a cirkuláris dikroizmus görbét. A CD görbe minimumai és maximumai az elektrongerjesztési abszorpció spektrum maximuma helyén, illetve ahhoz igen közel alakulnak ki, és viszonylag keskenyek. A fémkomplexek optikai aktivitása a komplex molekula vagy akár a ligandum aszimmetriájából származhat.

A méréseket a Debreceni Egyetem Szerves Kémiai Tanszékén végeztem egy Jasco J-810 típusú készüléken. A spektrumokat eltérő fémion-ligandum arányoknál, különböző pH-értékeken vettem föl. A méréshez használt küveták 0,1 cm és 1,0 cm úthosszúságúak voltak. Az összes minta esetében 200-800 nm hullámhossz tartományban rögzítettem a spektrumokat.

3.6. Tömegspektrometria (MS)

A többmagvú komplexek jelenlétének bizonyítására elektropray ionizációs tömegspektrometriai (ESI-MS) vizsgálatokat végeztünk.

A tömegspektrometria egy műszeres analitikai módszer, mely az ionizált részecskék tömegének meghatározására alkalmas, melynek fő részei az ionizáló, a tömeganalizátor és a detektor. Az ionizálás során keletkezett ionok a tömeganalizátorban tömeg/töltés (m/z) hányadosuk alapján szétválnak, és különböző időpillanatban érkeznek meg a detektorba. Ez a módszer kvantitatív és kvalitatív meghatározásra egyaránt alkalmas: az m/z értékekből az

anyagi minőséget, a csúcs alatti területből pedig az adott anyag mennyiségét határozhatjuk meg.

Az ESI lágy ionizációs technika. A mintát porlasztó gázzal (nitrogén) keverve, egy feszültségre kapcsolt kapillárison keresztül vezetik a fűtőtérbe. A fűtőtérbe töltött cseppek kerülnek, ahol a hőmérséklet hatására az oldószer elkezd párologni. A párolgás során csökken a csepp felülete, ezáltal nő a töltéssűrűsége. A cseppet az oldószer felületi feszültsége tartja össze. Ha a benne lévő azonos töltésű ionok taszító hatása meghaladja a felületi feszültség összetartó erejét, akkor bekövetkezik a Coulomb-robbanás, mely során kisebb cseppek jönnek létre. A folyamat addig tart, míg végül addukt ionok keletkeznek, melyeket a tömeganalizátorba vezetnek, ahonnan a tömeg szerinti szeparáció után a detektorba csapódnak.

Annak ellenére, hogy ez egy lágy ionizációs módszer, nem kerülhető el a vizsgálandó molekula fragmentációja, ezért a kisebb stabilitású részecskék jelenléte nem feltétlenül bizonyítható.

Az ESI-MS spektrumokat Bruker microTOF-Q tömegspektrométeren vettük föl a Debreceni Egyetem Alkalmazott Kémiai Tanszékén. A mintákban a ligandum koncentrációja kb. $0,001 \text{ mol/dm}^3$ volt.

4. Kísérleti eredmények és kiértékelésük

4.1. A vizsgált ligandum sav-bázis folyamatai

Az általam vizsgált HisGlyValHis-NH₂ tetrapeptidet a HisGly₂, Gly₃His, Gly₄, és HisGly ligandumokkal hasonlítottam össze. A peptidek protonálódási állandóit az alábbi táblázatban foglaltam össze:

1. táblázat: A vizsgált ligandum és az összehasonlításként alkalmazott vegyületek protonálódási és deprotonálódási állandó értékei

	HisGlyValHis-NH ₂	HisGly ₂ ²⁰	Gly ₃ His ¹³	Gly ₄ ^{20,34}	HisGly ₃ ⁵
HL	7,42 (1)	7,32	8,03 (1)	7,94	7,58
H ₂ L	13,80 (1)	12,77	14,89 (2)	11,18	13,53
H ₃ L	19,10 (1)	15,86	17,55 (3)	-	16,46
pK ₁	5,30	5,45	-	-	-
pK ₂	6,38	-	6,86	-	5,95
pK ₃	7,42	7,32	8,03	7,94	7,58
pK _{COO-}	-	3,09	2,64	3,24	2,93

A HisGlyValHis-NH₂ három protonálódásra képes csoportot tartalmaz: egy terminális aminocsoportot és a két hisztidin imidazolcsoportjait. Mivel a C-terminális részen savamid csoport található, így az összehasonlításhoz használt peptidektől eltérően itt nem játszódik le a karboxil-csoport deprotonálódása.

A legnagyobb pK-érték az aminocsoportoz tartozik mind az általam vizsgált, mind az összehasonlításhoz feltüntetett peptidek esetében.

A két kisebb pK az imidazolnitrogének deprotonálódásához rendelhető hozzá.

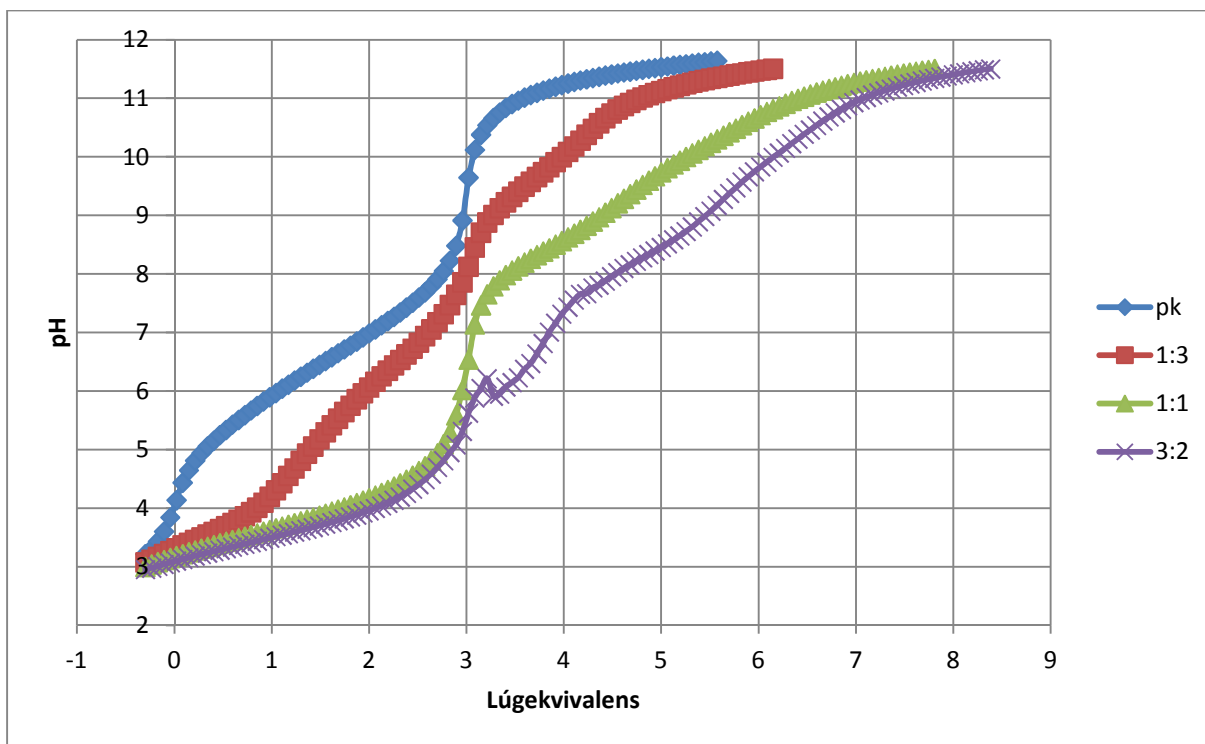
Ha a molekula az N-terminális végén hisztidint tartalmaz, akkor az aminocsoport és a mellette lévő imidazolcsoport kölcsönösen segíti egymás deprotonálódását, ezáltal ezek pK-értéke is csökken a többi peptidéhez képest.

Ha a molekulában a hisztidin távol van az N-terminális végtől (negyedik hely), akkor az imidazolcsoport pK-ja nagyobb, mint ha közel van hozzá (első hely), ezért a kisebb pK javarészt az N-terminális, a nagyobb pedig a C-terminális hisztidin imidazolcsoportjához tartozik.

4.2. A ligandum átmenetifém komplexei

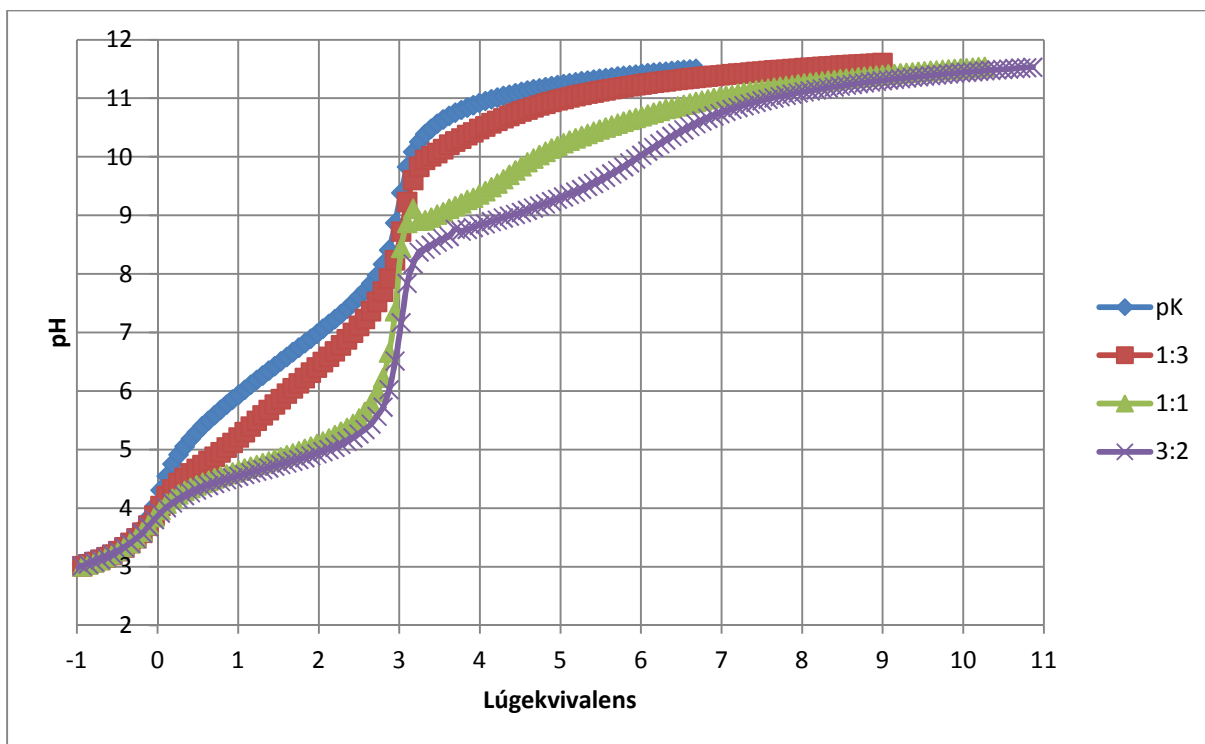
4.2.1. pH-potenciometriás mérések

A peptidet többféle fémionnal vizsgáltam. Cu(II)-ionnal ligandumfeleslegben lévő, 1:1 arányú és fémfölöslegben lévő mintákat titráltam. A csak ligandumot illetve a fémiont és ligandumot különböző arányban tartalmazó minták titrálási görbéit a 4. ábra mutatja be. 3:2 fémion-ligandum arány esetén pH 6 körül csapadék jelent meg, mely a pH visszaesését okozta. A csapadék erősen lúgos pH-tartományban ugyan feloldódott, ami többmagvú komplexek jelenlétére utalt, de ezekkel a titrálási adatokkal nem tudtuk a keletkező komplexek összetételét és stabilitási állandóit meghatározni. A többi titrálási görbe alapján meghatározott stabilitási állandókat a 2. táblázatban foglaltam össze. Kétféle modellt állítottunk fel, mindkettővel jól illeszthetőek voltak a titrálási görbék. Mindkét modellben 1:1 összetételű komplexek képződését feltételeztük, de a második modellben ezek mellett még $[ML_2]$ komplex jelenlétével is számolhatunk. A 2. táblázatban a második modell adatait tüntettem föl.

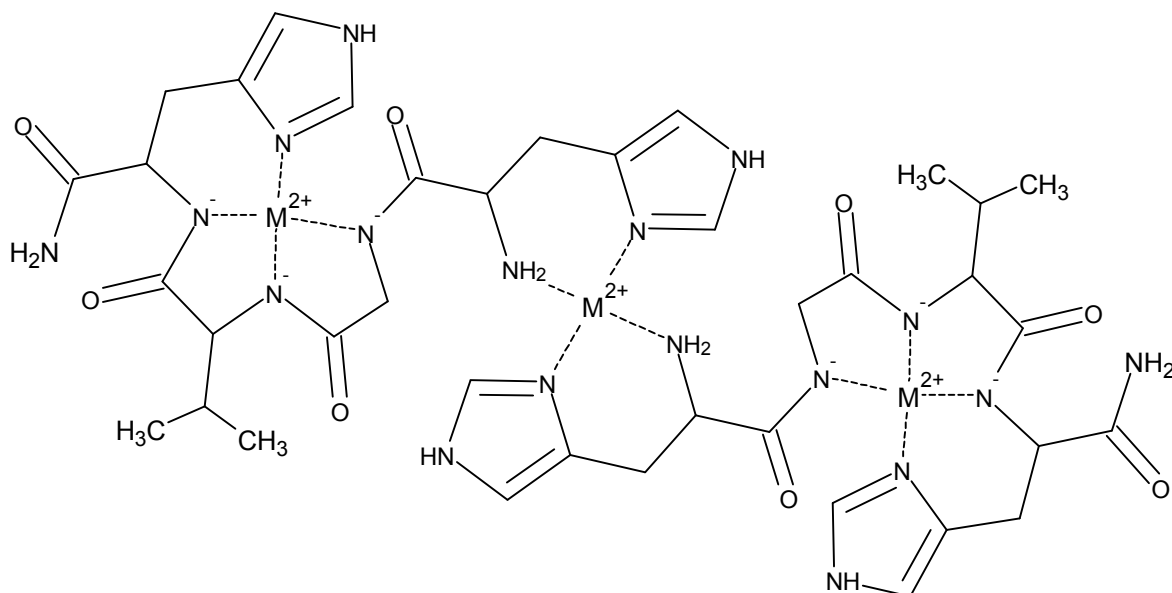


4. ábra: A HisGlyValHis-NH₂ ligandum és a Cu(II)-HisGlyValHis-NH₂ 1:3, 1:1 és 3:2 arányú rendszerének titrálási görbéi a lúgekvivalens függvényében [$c(L) = 2,62 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ (1:3); (1:1); (3:2)]

Ni(II)-ionnál a réz(II)ionhoz hasonlóan ligandumfelesleget tartalmazó, 1:1 arányú és fémfölöslegben lévő mintákat titráltam. Az 1:1 arány esetén 9-es pH környékén csapadék jelent meg a rendszerben, mely a pH visszaesését eredményezte, ez azonban titrálás folyamán feloldódott a pH kis növekedésével (5. ábra). A fémfölösleget tartalmazó minta titrálása során nem tapasztaltam csapadékképződésre utaló jelet, ami meglepő módon arra utal, hogy a ligandum hajlamosabb több nikkel(II)ionhoz koordinálódni, mint réz(II)ionhoz. A nikkel(II) jelenlétében a rézkomplexekhez hasonló összetételű és többmagvú komplexek ($[M_3L_2H_6]$, $[M_2LH_3]$) kialakulását feltételeztük. Az $[M_3L_2H_6]$ szerkezete a 6. ábrán látható. Az 1:1 fém-ligandum arányú valamint az $[ML_2]$ komplexek stabilitása kisebb, mint réz jelenlétében. Az $[MLH_1]$, $[MLH_2]$ és $[MLH_3]$ összetételű komplexek kialakulása során az amidnitrogének deprotonálódása egy pH egységgel nagyobb értékeknél játszódik le.

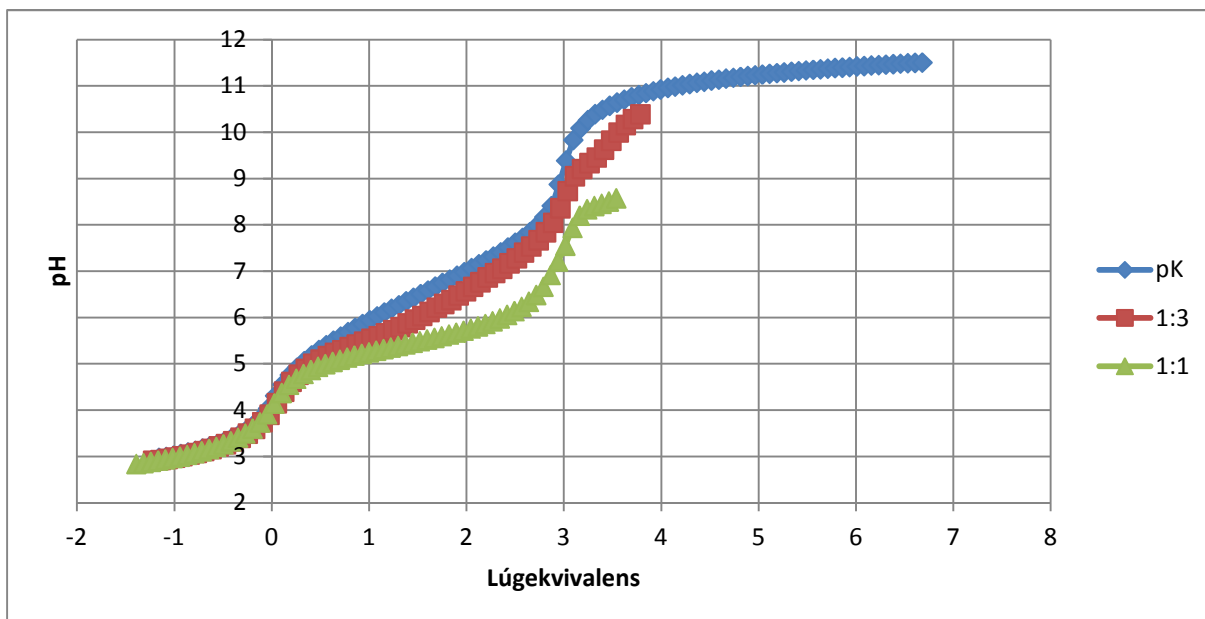


5. ábra: A HisGlyValHis-NH₂ ligandum és a Ni(II)-HisGlyValHis-NH₂ 1:3, 1:1 és 3:2 arányú rendszerének titrálási görbéi a lúekvivalens függvényében [$c(L)=1,21 \cdot 10^{-3}$ mol/dm³ (1:3); (1:1); (3:2)]

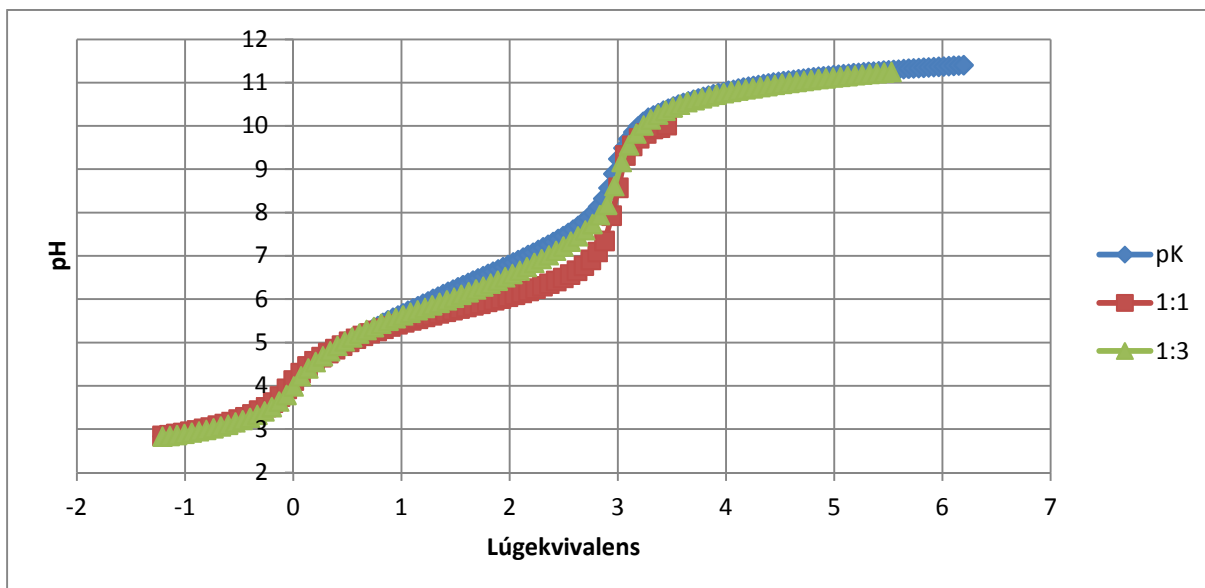


6. ábra: Az [M₃L₂H₆] összetételű komplex szerkezete

A Zn(II)- és a Cd(II)-ionokkal ligandumfölségben lévő és 1:1 arányú mintákat készítettem. A titrálás során 9-es pH környékén minden esetben csapadék jelent meg (7. és 8. ábra).



7. ábra A HisGlyValHis-NH₂ ligandum és a Zn(II)-HisGlyValHis-NH₂ 1:3 és 1:1 arányú rendszerének titrálási görbéi a lúgekivalens függvényében [$c(L)=1,21 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ (1:3); (1:1)]



8. ábra A HisGlyValHis-NH₂ ligandum és a Cd(II)-HisGlyValHis-NH₂ 1:3 és 1:1 arányú rendszerének titrálási görbéi a lúgekivalens függvényében [$c(L)=1,39 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ (1:3); $c(L)=1,46 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ (1:1)]

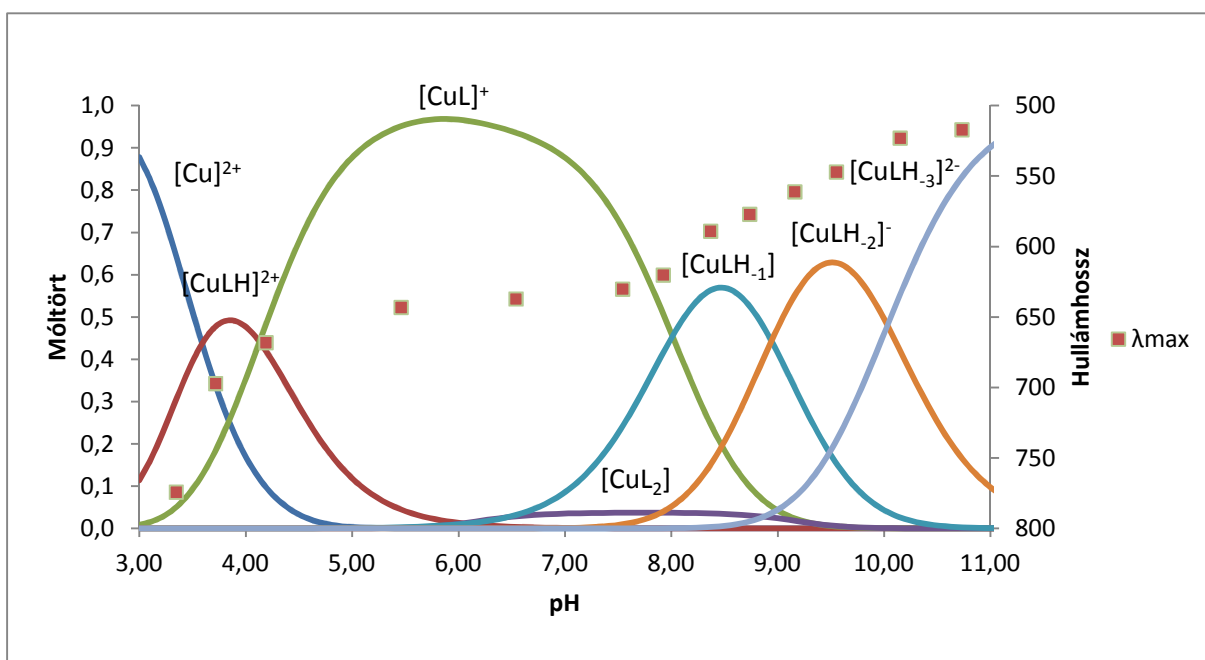
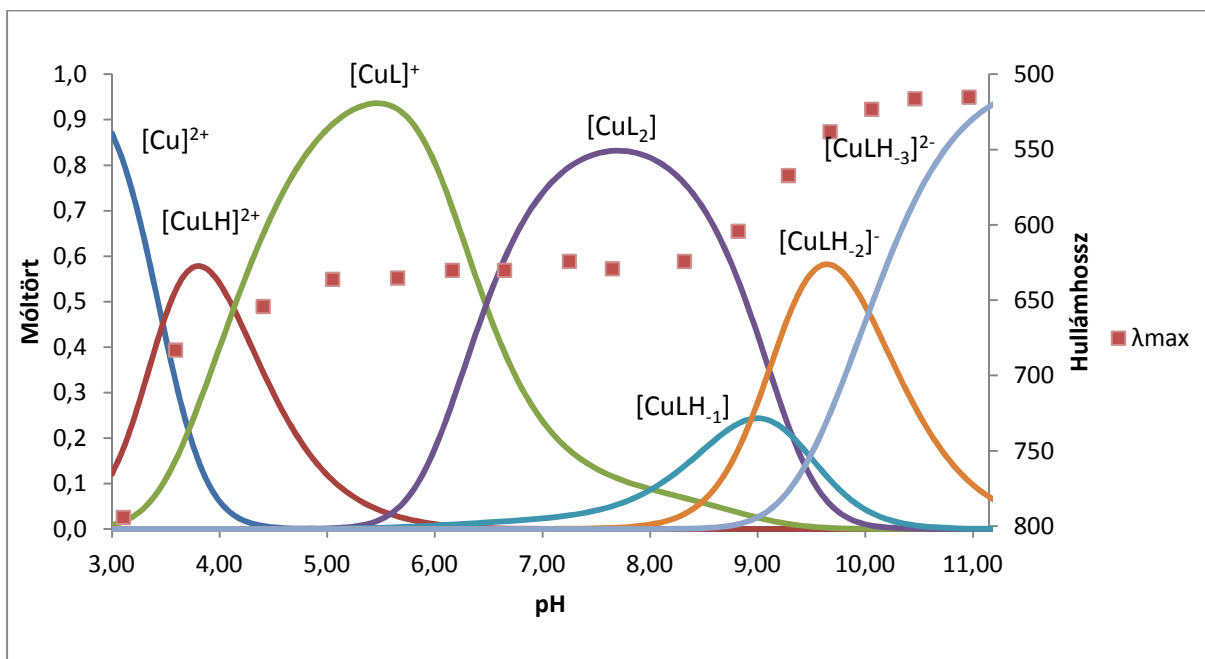
A titrálások során kapott adatokból számolt stabilitási állandókat az alábbi táblázatban foglaltam össze:

2. táblázat: A HisGlyValHis ligandum átmeneti fémionokkal alkotott komplexeinek stabilitási állandói ($\log\beta$)

	Cu^{2+}	Ni^{2+}	Zn^{2+}	Cd^{2+}
MLH	14,80 (2)	12,95 (4)	11,55 (5)	11,35 (4)
ML	10,67 (2)	8,17 (2)	6,41 (2)	5,28 (4)
ML_2	14,83 (2)	13,3 (1)	10,77 (8)	9,57 (1)
MLH_{-1}	2,66 (2)	-1,11 (15)	-	-
MLH_{-2}	-6,28 (2)	-10,29 (6)	-	-
MLH_{-3}	-16,31 (2)	-20,30 (7)	-	-
$\text{M}_3\text{L}_2\text{H}_{-6}$	-	-30,07 (9)	-	-
M_2LH_{-3}	-	-14,57 (11)	-	-

Réz(II)ion esetében ligandumfeleslegnél és az 1:1 aránynál számított eloszlási görbe (9. ábra) eltérést mutat az első rendszernél jelentkező $[\text{CuL}_2]$ komplex miatt. Ligandumfelesleg alkalmazásakor 5-ös pH fölött a $[\text{CuL}]$ összetételű komplex kialakulása figyelhető meg, amiben a ligandum az aminocsoporton és a két imidazolnitrogénen keresztül kapcsolódik a réz(II)ionhoz, ám 7-9-es pH-tartományban már a $[\text{CuL}_2]$ összetétel a meghatározó. A pH további növekedésével egy extra lúgfogyasztó folyamat figyelhető meg, ami az amidnitrogének deprotonálódásához rendelhető. A folyamat végén lúgos pH-tartományban $[\text{CuLH}_{-3}]$ összetételű komplex van jelen a legnagyobb mennyiségben.

1:1 aránynál 5-8-as pH-tartományban a $[\text{CuL}]$ komplex a meghatározó részecske, lúgosabb közegben szintén az amidnitrogének deprotonálódása következik be, de itt az átmeneti $[\text{CuLH}_{-1}]$ és $[\text{CuLH}_{-2}]$ összetételű komplexek jelenlétének meghatározóbb szerepe van, mint az előző aránynál. A deprotonálódás lépcsőzetesen, kb. egy-egy pH-egységni eltéréssel játszódik le.

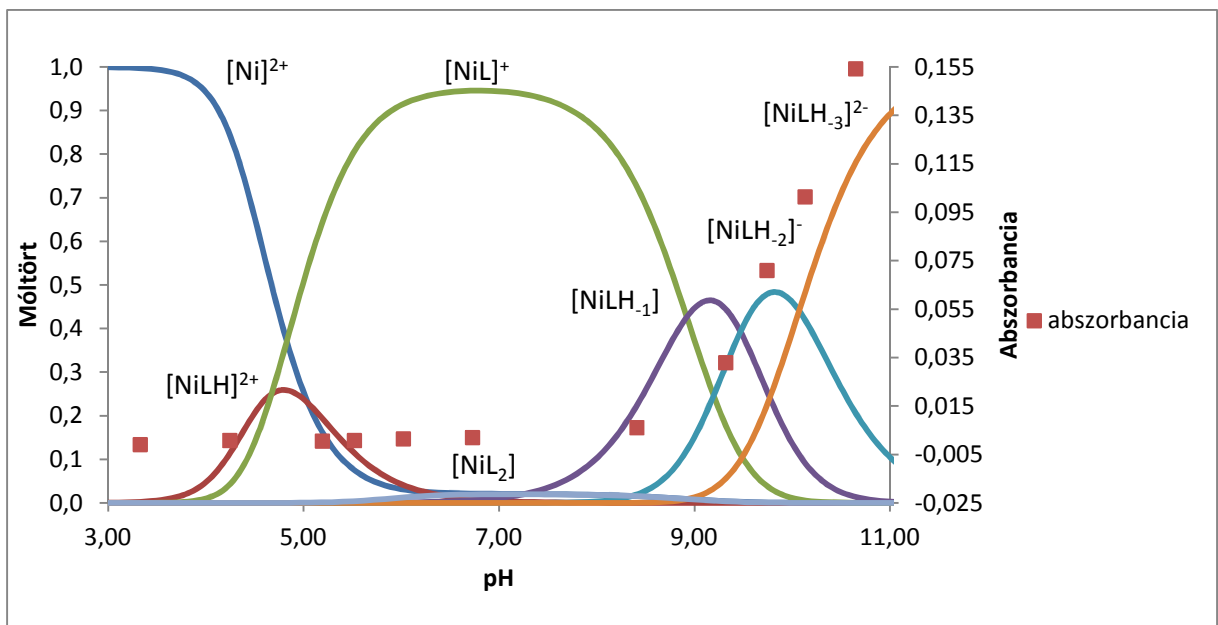
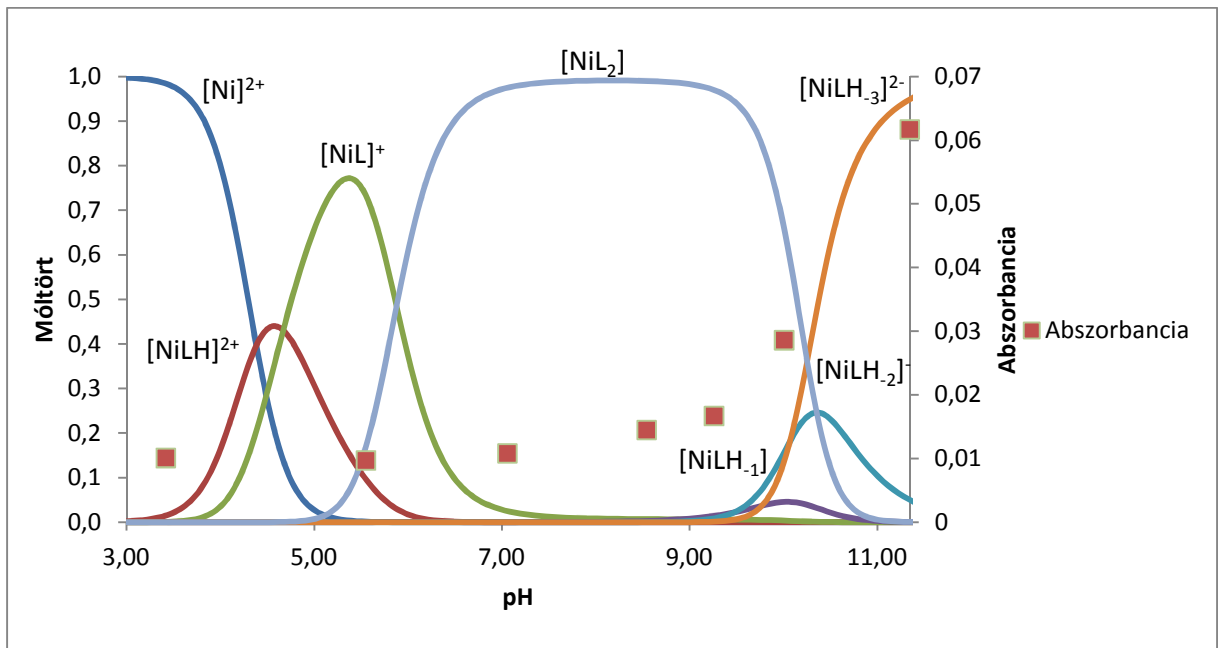


9. ábra: A Cu(II)-HisGlyValHis-NH₂ rendszerben 1:3, illetve 1:1 arányból képződő komplexek eloszlása a pH függvényében (folytonos vonal), $[c(L)=2,62 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3, (1:3); (1:1)]$; Az abszorpciós maximumhoz tartozó hullámhossz a pH függvényében (■) (a másodlagos tengelyen a hullámhossz értékek (λ) csökkenő sorrendben szerepelnek)

A nikkel(II) tartalmú mintánál (10. ábra) is hasonló a helyzet, mint a réz(II)ionot tartalmazó minták esetében. Ligandumfeleslegben 5-6-os pH között a $[NiL]$ a meghatározó részecske, 6-10-es pH-tartományban pedig szinte csak a $[NiL_2]$ jelenléte figyelhető meg, melynek nagy stabilitása a Ni(II)-ion körül kialakuló kedvező oktaédres geometriájának

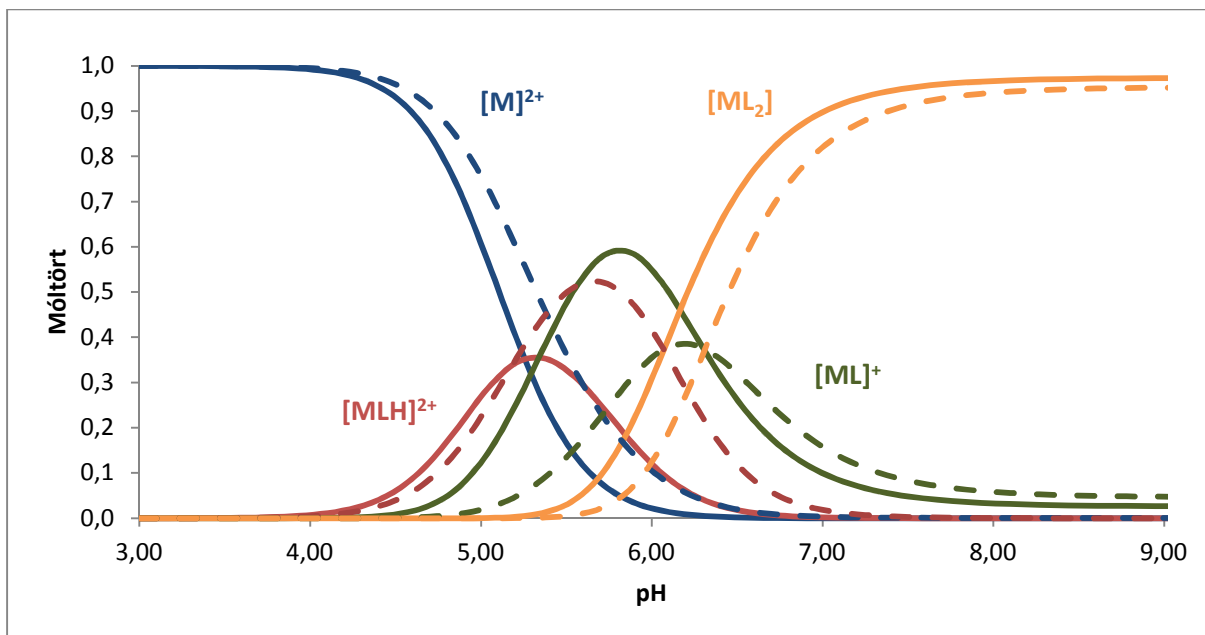
köszönhető. Ez a szerkezet a két ligandum 3-3 fogú koordinációjával alakul ki. Az amidnitrogének deprotonálódása gyakorlatilag egy lépésben játszódik le.

1:1 arány esetében a $[\text{NiL}]$ komplex a meghatározó 5-9-es pH-tartományban.



10. ábra: A $\text{Ni(II)-HisGlyValHis-NH}_2$ rendszerben 1:3, illetve 1:1 aránynál képződő komplexek eloszlása a pH függvényében (folytonos vonal), $[\text{c(L)}]=1,21 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ (1:3); (1:1)]; A λ_{max} -hoz (418 nm) tartozó abszorbancia a pH függvényében (■)

Az adatok földolgozása során cink(II) és kadmium(II) esetében $[ML]$ és $[ML_2]$ összetételű komplexek kialakulására következtettünk (11. ábra), ahol $[NH_2, Im, Im]$, illetve $2x[NH_2, Im, Im]$ koordináció alakul ki, ami a komplexek megnövekedett stabilitását eredményezi. Ennek köszönhető, hogy az egyszerű peptidekhez képest csak lúgosabb pH-tartományban jelenik meg csapadék. Az amidnitrogének deprotonálódása nem figyelhető meg.



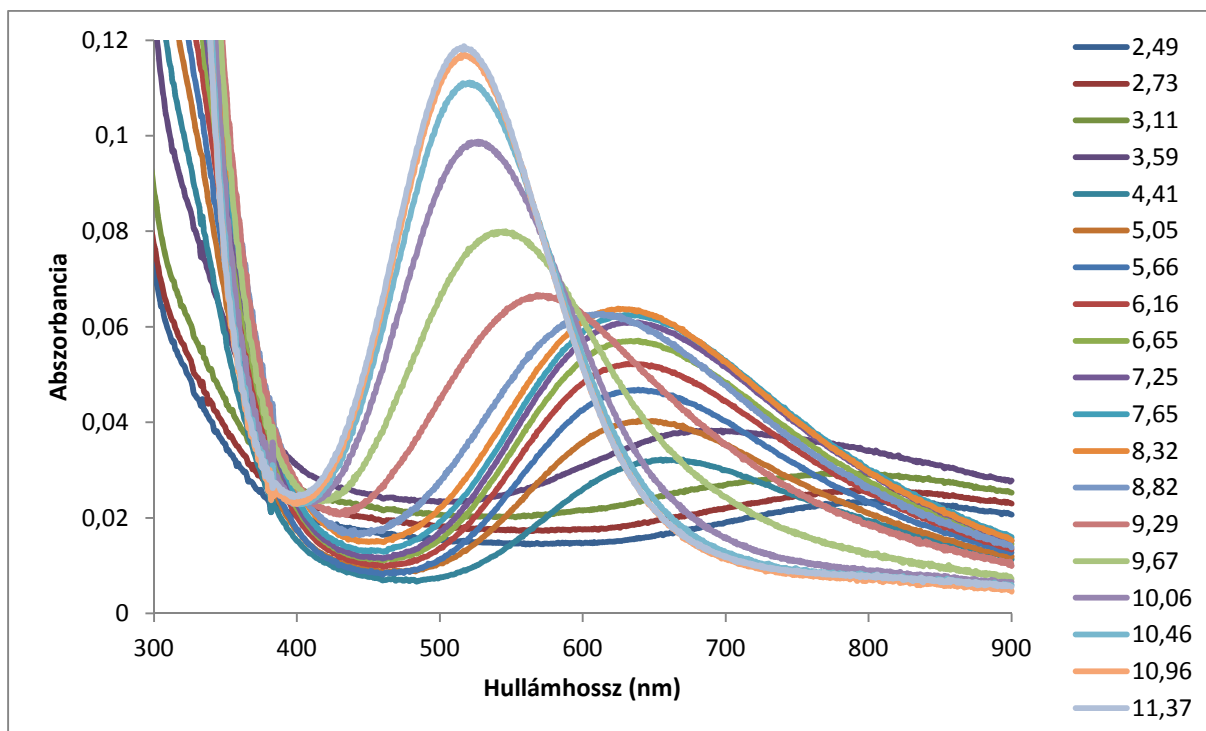
11. ábra: A Zn(II)-HisGlyValHis-NH₂ rendszerben 1:3 aránynál képződő komplexek eloszlása a pH függvényében (folytonos vonal), $[c(L)=1,21 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3 (1:3)]$;

illetve Cd(II)-HisGlyValHis-NH₂ rendszerben 1:3 aránynál képződő komplexek eloszlása a pH függvényében (szaggatott vonal), $[c(L)=1,39 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3 (1:3)]$

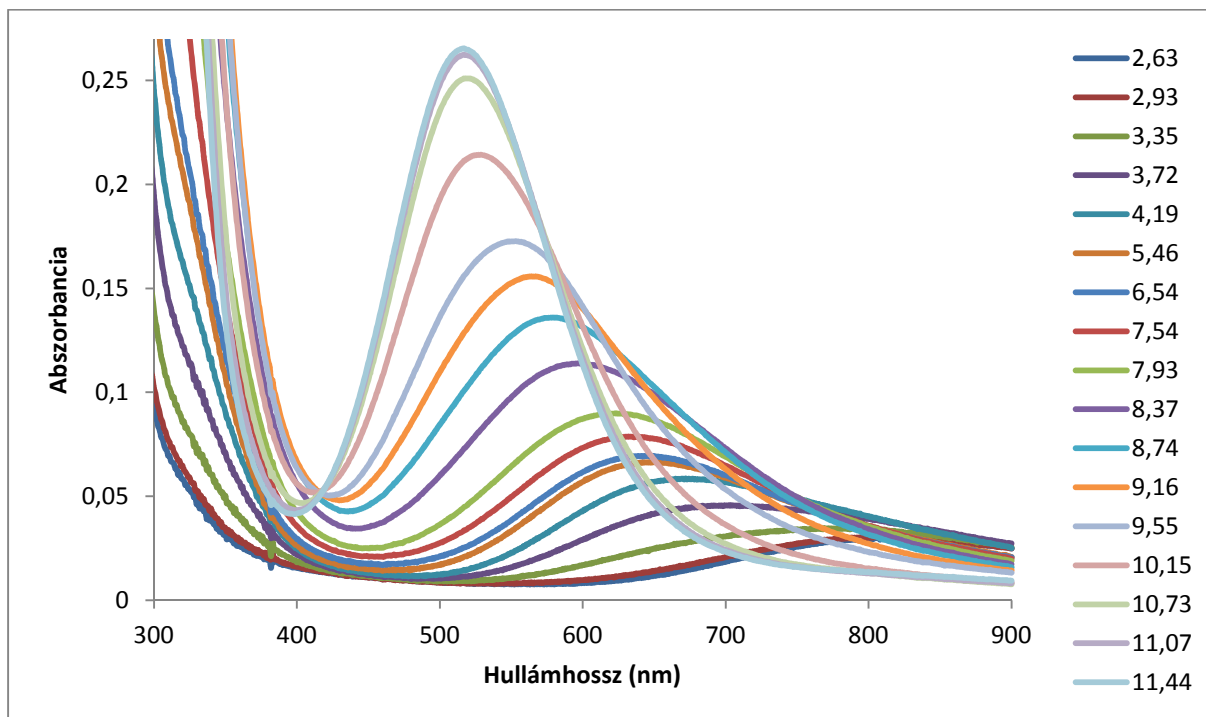
4.2.2. UV-látható spektrofotometriás mérések

Ha a réz(II) esetében a komplexképződés során biszkomplexek jelenlétét nem feltételezzük, akkor az 1:3 és az 1:1 arányú minták koncentráció eloszlási görbéje nagyon hasonló, ugyanakkor eltérés figyelhető meg a különböző arányú rendszerekben felvett UV- és CD- spektrumokban (12. és 13. ábra), ami a $[CuL_2]$ jelenlétére utal. A $[CuL]$ nagy stabilitású komplex, mivel feltételezhetően az aminosnitrogénen és a két imidazolsnitrogénen keresztül kapcsolódik a ligandum a fémionhoz kelát illetve makrokelát kialakítása közben. Az $[CuL_2]$ komplexben feltételezzük, hogy a Cu(II)-ionhoz legalább az egyik peptid háromfogú koordinációval kapcsolódik, ami torzult geometriához vezet axiális kötések kialakításával. Az empirikus képlettel kiszámolt λ_{max} értékek nem egyeznek meg a spektrumról leolvasható

értékekkel. Ez az előbb említett torzult geometriájú szerkezettel magyarázható, mely a nagyobb hullámhosszú tartomány felé tolja az abszorpciós maximumokat.



12. ábra: A Cu(II)-HisGlyValHis-NH₂ 1:3 arányú rendszer UV-látható spektrumai a pH függvényében



13. ábra: A Cu(II)-HisGlyValHis-NH₂ 1:1 arányú rendszer UV-látható spektrumai a pH függvényében

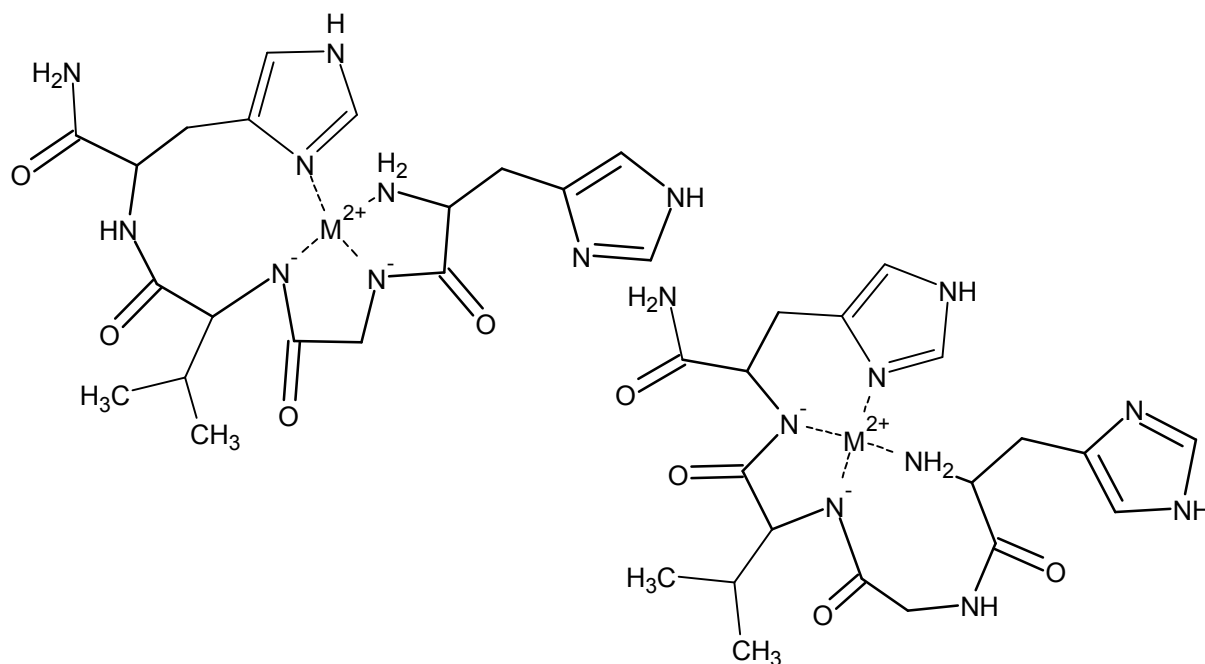
A fotometriás adatokból a PSEQUAD program segítségével kiszámítottuk az egyes komplexekre jellemző spektrumokat. A réz(II)komplexek egyedi spektrumainak $\lambda_{\max}$ és moláris abszorbancia értékeit a HisGly₂-vel hasonlítottam össze és az adatokat az alábbi táblázatban rögzítettem:

3. táblázat: A Cu(II)-HisGlyValHis-NH₂ és a Cu(II)-HisGlyGly-NH₂ rendszer egyedi spektrumainak $\lambda_{\max}$ és ϵ értékei:

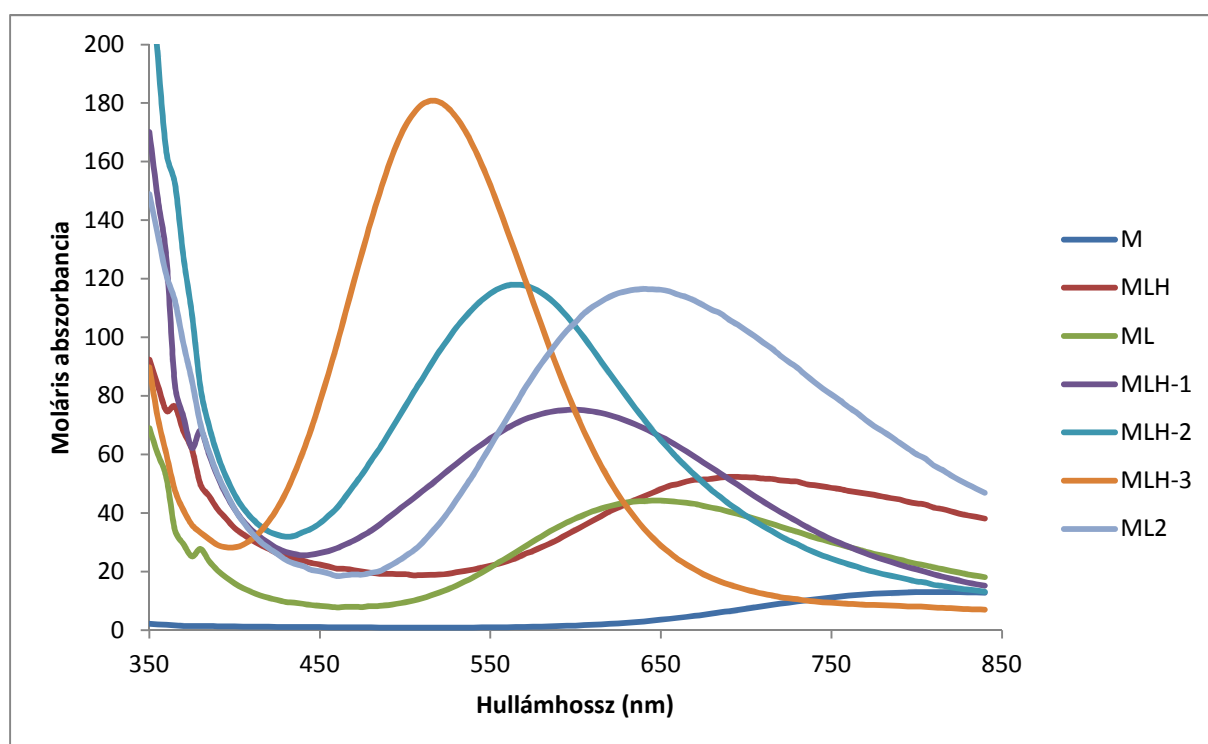
	HisGlyValHis-NH ₂		HisGly ₂ ¹³	
	$\lambda_{\max}$	ϵ	$\lambda_{\max}$	ϵ
MLH	690	44	-	-
ML	640	45	694	34
ML ₂	600	77	664	97
MLH ₁	630	108	-	-
MLH ₂	560	120	-	-
MLH ₃	515	180	-	-

A [CuLH] összetételű komplexben a tetrapeptid az aminocsoportján és az amelletti imidazolnitrogénen keresztül koordinálódik a réz(II)-ionhoz. A [CuL] összetételű komplexben a réz(II) az aminocsoporton és a két imidazolnitrogénen keresztül kapcsolódik a peptidhez. Ezt a spektrális adatok is alátámasztják, mivel ha csak egy imidazolnitrogénen keresztüli koordináció valósulna meg, akkor a HisGlyValHis-NH₂ és a HisGly₂ esetén hasonló spektrális paramétereket kapnánk (3. táblázat). Azonban a HisGly₂ [CuL] komplexre kisebb hullámhosszon jellemző az abszorpció maximum, mint az általam vizsgált peptid esetében. A [CuL₂] esetében legalább az egyik ligandum háromfogú koordinációval kapcsolódik a Cu(II)-ionhoz, de mivel a réz(II)ionnál a négyes a kedvező koordinációs szám, torzult geometriájú szerkezet alakul ki. Ez stabilizálja a komplexet, ami akadályozza az amidnitrogének deprotonálódását, mely folyamatok ennek következtében nagyobb pH-n játszódnak le. Az abszorpció maximum egyre kisebb hullámhossz felé tolódik el, és egyre növekszik az intenzitása (15. ábra). Lúgos tartományban a [CuLH₃] összetételű komplex jelenléte figyelhető meg, melyben az aminocsoport és a három amidnitrogén koordinálódik a réz(II)ionhoz. A [CuL]-ből a [CuLH₃] képződése az amidnitrogének lépcsőzetes deprotonálódásával, a [CuLH₁], [CuLH₂] komplexek képződésén keresztül történik. A [CuLH₁] esetén a fémion az aminocsoporton és egy amidnitrogénen, míg a [CuLH₂] esetén két amidnitrogénen keresztül kapcsolódik a ligandumhoz. Ezeknél a komplexeknél azonban

nem zárható ki az izomer szerkezetek kialakulása (14. ábra), az amidnitrogén deprotonálódása mellett a láncvégi imidazolnitrogén kötődése is megvalósulhat, és a láncvégi imidazolnitrogén mellett az azt megelőző amidnitrogén koordinációja is lehetséges.

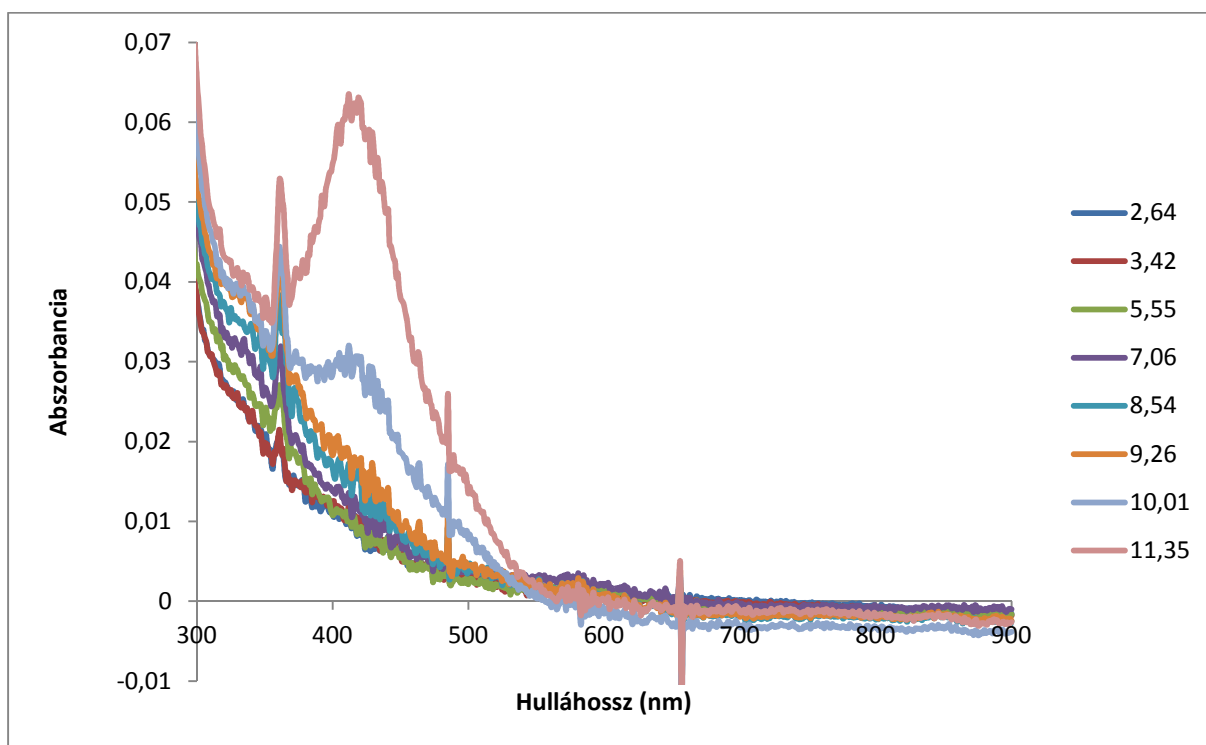


14. ábra: A $[\text{CuLH}_2]$ komplex lehetséges izomer szerkezetei



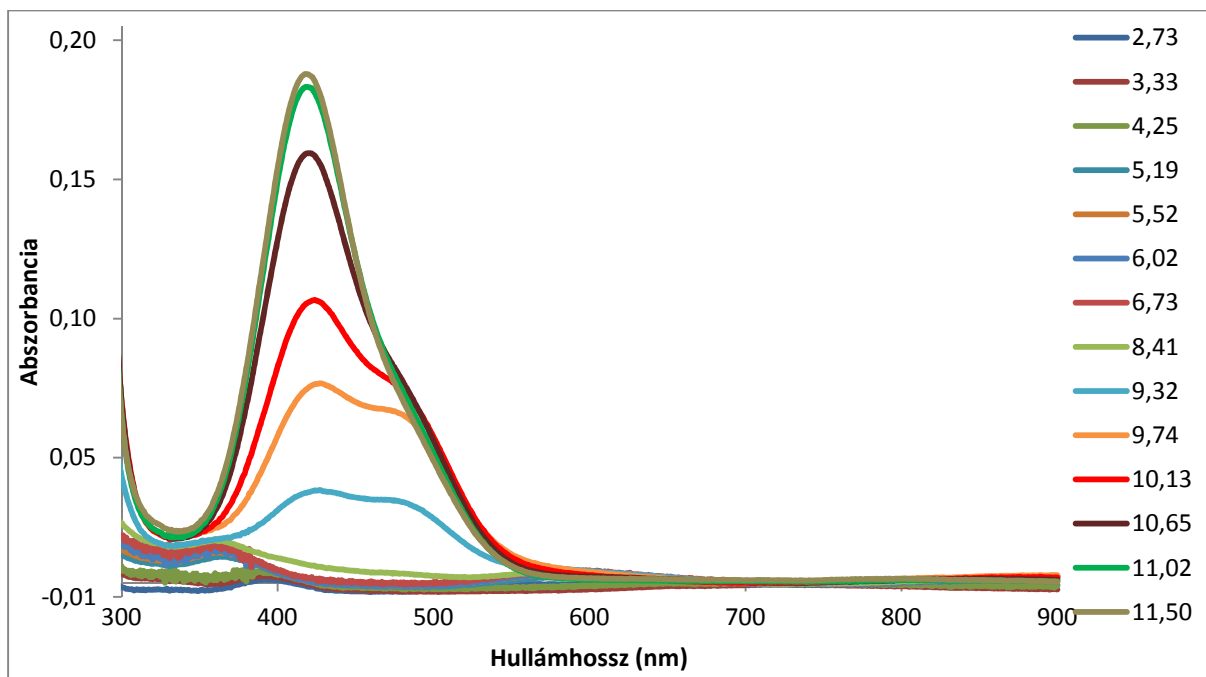
15. ábra: A $\text{Cu(II)-HisGlyValHis-NH}_2$ rendszer komplexeinek egyedi UV-látható spektrumai

A nikkel(II)-komplexek esetén az UV-látható spektrofotometriás mérésekkel elsősorban az amidnitrogének deprotonálódása követhető nyomon, azokról a komplexekről ad felvilágosítást, melyekben ez a folyamat lejátsszódik. A nikkel(II) esetében hasonló a koordináció, mint a réz(II)ionnál. A $[\text{NiLH}]$ összetételű komplexben hisztaminszerű koordináció figyelhető meg, míg az $[\text{NiL}]$ kialakulásakor az aminos csoport kötődése mellett két imidazolnitrogén kapcsolódik a nikkel(II)ionhoz. A Ni(II) -ion körül a szabályos oktaéderes geometriájú szerkezet kialakulása a kedvező ezért az $[\text{NiL}_2]$ összetételű komplex esetében mindkét ligandum háromfogú koordinációja feltételezhető. Ennek a szerkezetnek kicsi intenzitása van 560 nm-en ($\epsilon \sim 5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Az amidnitrogének deprotonálódásának jele 418 nm-nél olvasató le a spektrumról, melynek az intenzitása a deprotonálódott amidnitrogének számával párhuzamosan növekszik (16. ábra).



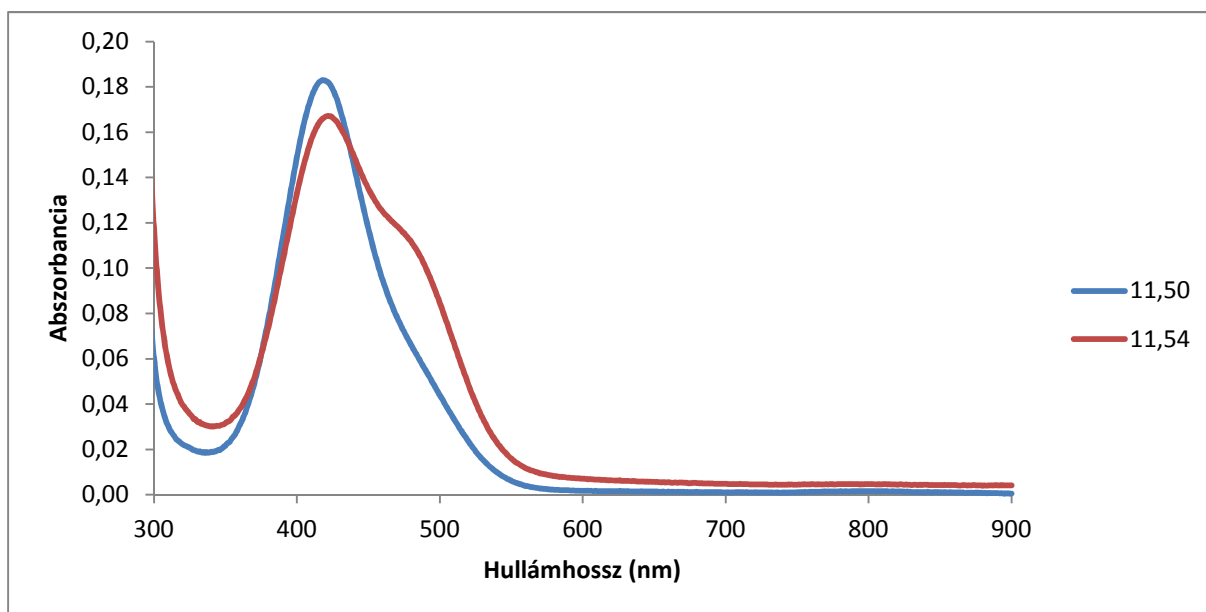
16. ábra: A $\text{Ni(II)-HisGlyValHis-NH}_2$ 1:3 arányú rendszer UV-látható spektrumai a pH függvényében

A $[\text{NiLH}_3]$ komplexben az aminos csoport mellett három amidnitrogén kapcsolódik a nikkel(II)ionhoz. Az 1:1 aránynál széles, két csúcsot, illetve nagyobb pH-n vállat tartalmazó sávot (17. ábra). Ez arra utal, hogy a Cu(II) ionhoz hasonlóan az amino- és az amidnitrogének mellett az imidazolnitrogén is részt vesz a koordinációban, ami torzult geometria kialakulásához vezet.



17. ábra: A Ni(II)-HisGlyValHis-NH₂ 1:1 arányú rendszer UV-látható spektrumai a pH függvényében

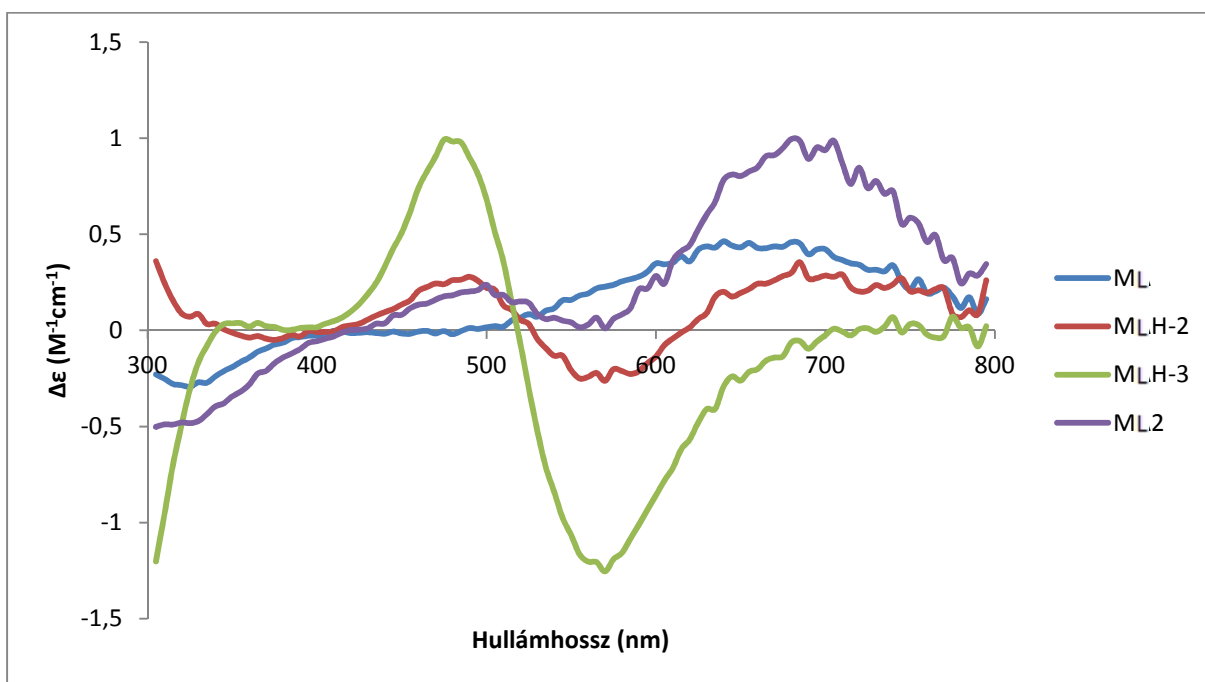
Az 1:1 és a 3:2 arányú rendszer UV-látható spektrumai között jelentős eltérés figyelhető meg lúgos pH-tartományban (18. ábra), ami az $[\text{Ni}_3\text{L}_2\text{H}_6]$ létezésére utal. 3:2 aránynál pH 11,5-nél is megmarad a széles, vállat tartalmazó csúcs, míg 1:1 aránynál a korábban látható váll visszahúzódik, majd eltűnik a pH növekedésével.



18. ábra: A Ni(II)-HisGlyValHis-NH₂ 1:1 (kék) és 3:2 (bordó) arányú rendszer UV-látható spektrumai pH 11,5 körül

4.2.3. CD-spektroszkópiás mérések

A réz(II)-iont tartalmazó minták CD-spektroszkópiás vizsgálatai során kapott eredmények alátámasztják az eddigi feltételezéseinket. A CD-görbe sorozat adataiból meghatároztuk az egyes komplexek egyedi CD-spektrumait (19. ábra). A $[\text{CuL}]$ és a $[\text{CuL}_2]$ összetételű réz(II)-komplexeknek is van a CD-aktivitása, a $[\text{CuL}]$ komplex esetén azonban az intenzitás jóval kisebb, mint a $[\text{CuL}_2]$ komplexnél (4. táblázat). A $[\text{CuLH}_1]$ -hez nem tudtunk spektrumot rendelni, mert nagyon kis mennyiségben volt jelen a rendszerben. A $[\text{CuLH}_2]$ spektruma alátámasztja azt a feltételezést, hogy az imidazolnitrogén is részt vesz a koordinációban és izomer szerkezetek alakulnak ki. A $[\text{CuLH}_3]$ komplex spektruma az $[\text{NH}_2, 3\text{xN}^-]$ koordinációt igazolja.

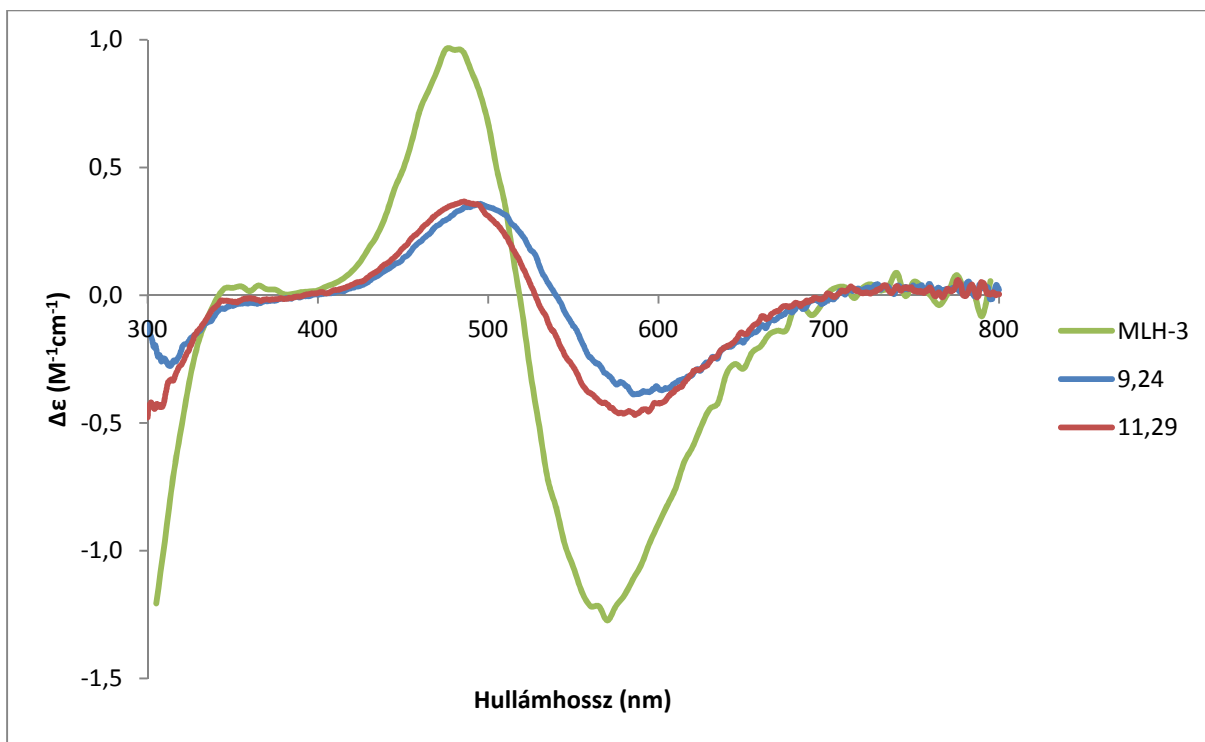


19. ábra: A Cu(II)-HisGlyValHis-NH₂ rendszer komplexeinek egyedi CD-spektrumai

4. táblázat: A Cu(II)-HisGlyValHis-NH₂ rendszer komplexeinek λ és $\Delta\epsilon$ értékei

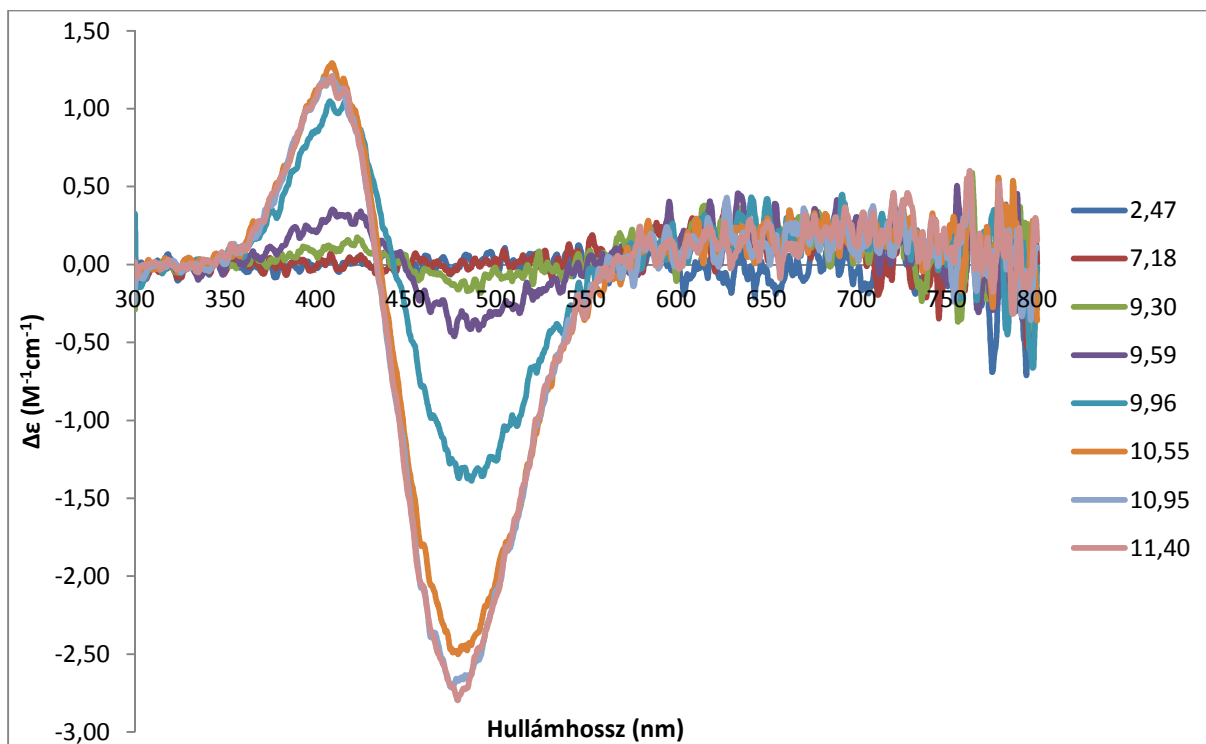
	λ (nm)	$\Delta\epsilon$ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	λ (nm)	$\Delta\epsilon$ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	λ (nm)	$\Delta\epsilon$ (M ⁻¹ cm ⁻¹)
CuL	325	-0,308	655	0,455	-	-
CuLH ₂	490	0,279	570	-0,262	700	0,285
CuLH ₃	480	0,982	570	-1,26	-	-
CuL ₂	490	0,279	570	0,011	695	0,952

3:2 fém-ligandum arányánál a lúgos tartományban lévő CD-spektrumok eltérnek az [MLH₃] komplex egyedi spektrumától (20. ábra). Az egyedi spektrumhoz képest nagyobb hullámhossz felé tolódtak a spektrumok minimum és maximum helyei, az 1:1 és 1:3 arányánál keletkező egymagvú komplexektől eltérő komplexek jelenlétére utal.

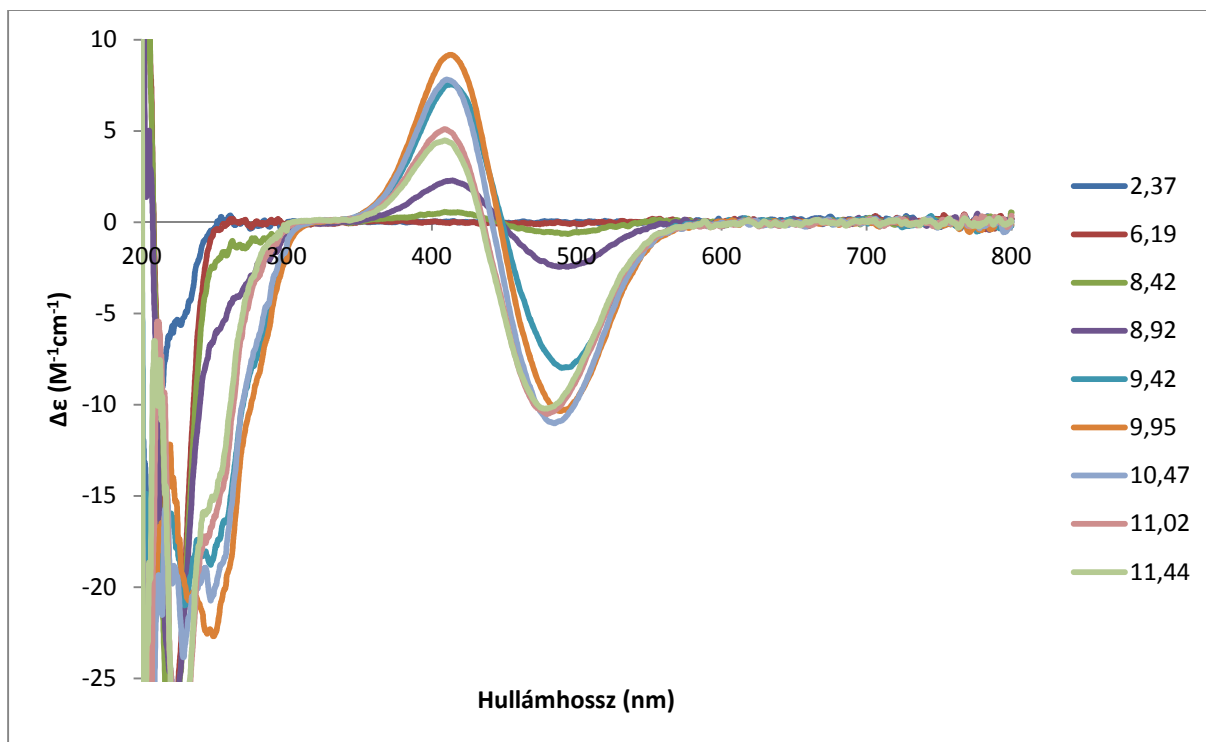


20. ábra: A Cu(II)-HisGlyValHis-NH₂ 3:2 arányú rendszer és az [MLH₃] komplex CD-spektrumának összehasonlítása

A nikkel(II)-komplexeknek csak akkor van CD-aktivitásuk, ha síknégyzetes geometriájúak. Ez a szerkezet az amidnitrogének deprotonálódásakor alakul ki. A [NiL] és a [NiL₂] komplexek CD-aktivitása elhanyagolható (21. és 22. ábra).

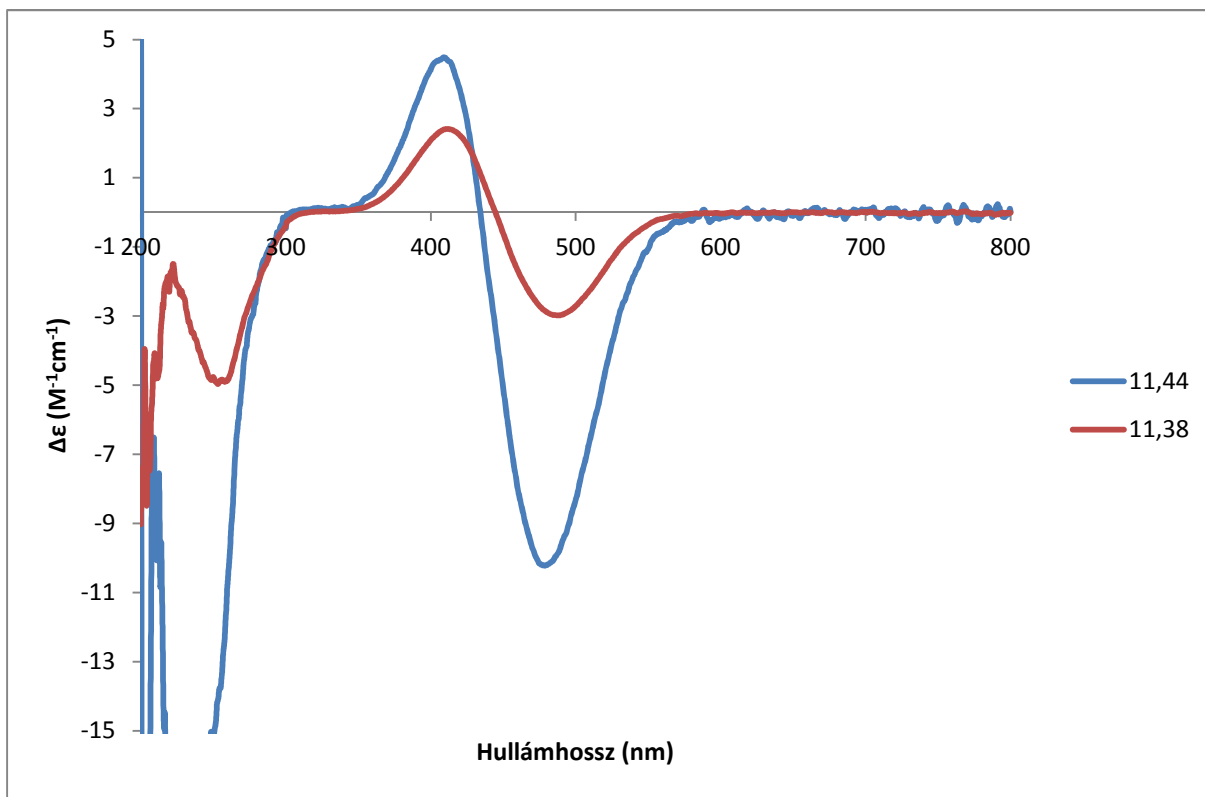


21. ábra: A Ni(II)-HisGlyValHis-NH₂ 1:3 arányú rendszer CD-spektrumai a pH függvényében



22. ábra: A Ni(II)-HisGlyValHis-NH₂ 1:1 arányú rendszer CD-spektrumai a pH függvényében

1:1 és 3:2 aránynál nemcsak az UV-látható spektrumok között, hanem a CD-spektrumoknál is eltérés figyelhető meg, mely szintén a többmagvú komplexek jelenlétével magyarázható (23. ábra).



23. ábra: A Ni(II)-HisGlyValHis-NH₂ 1:1 (kék) és 3:2 (bordó) arányú rendszer CD-spektrumai pH 11 fölött

4.2.4. Tömegspektrometriai mérések

A pH-potenciometriás, UV-látható spektrofotometriás és a CD-spektroszkópiás vizsgálatok alapján Cu(II)- és Ni(II)ion jelenlétében többmagvú komplexek képződését feltételeztük. Mindkét fémion esetén vált ki csapadék, mely a réz(II)ionnál csak erősen lúgos tartományban, nikkel(II)ionnál a pH kisebb növekedésével visszaoldódott a titrálás során. Hogy feltételezéseinket bizonyítani tudjuk, a 3:2 fém-ligandum arányú rendszerek tömegspektrometriai vizsgálatait is elvégeztük.

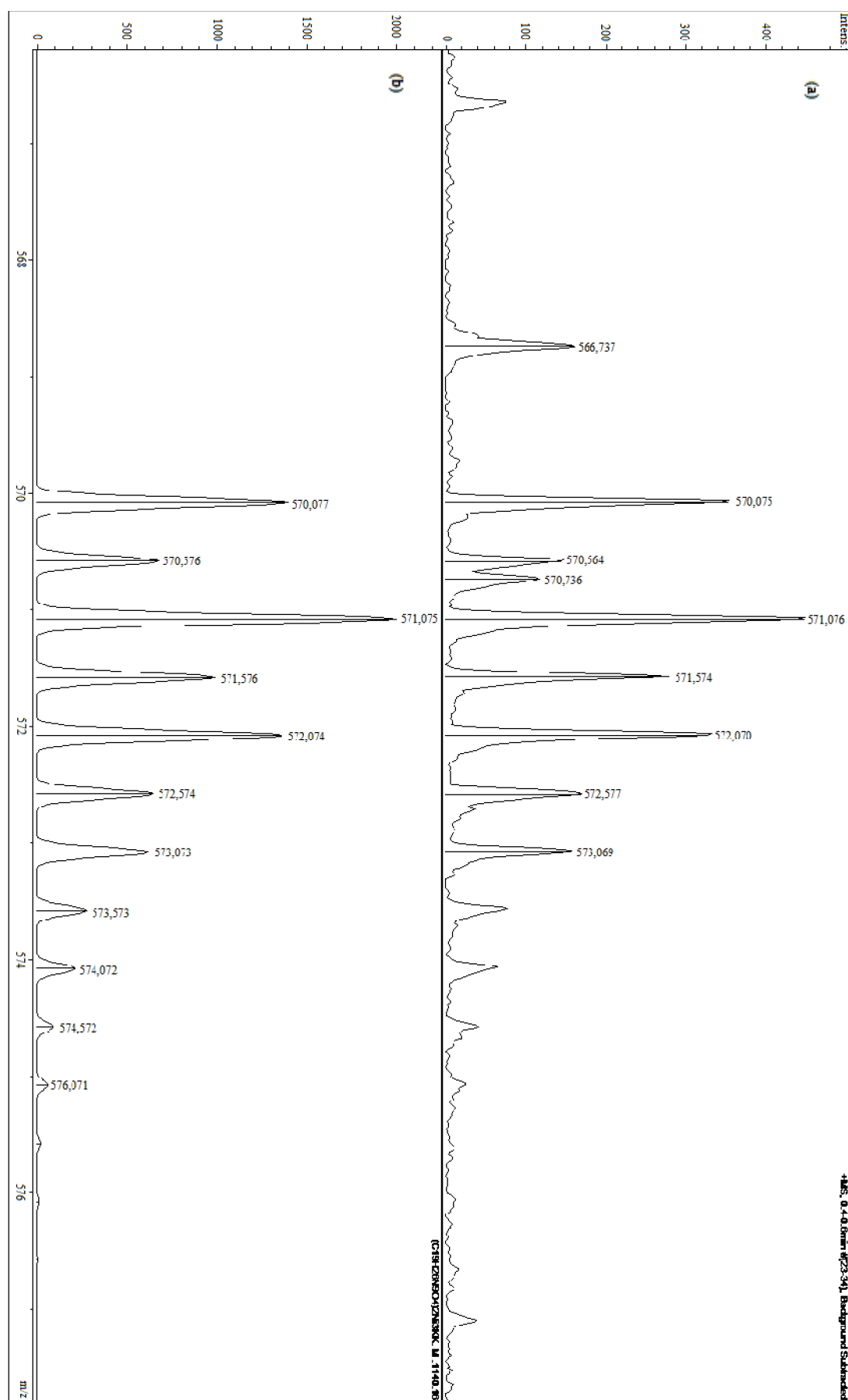
Réz(II)ion jelenlétében nem sikerült bizonyítani az $[\text{Cu}_3\text{L}_2\text{H}_6]$ létezését, de ezzel a módszerrel kizárni sem lehet, mivel az ionizáció során a kevésbé stabil részecskék fragmentálódhatnak.

Nikkel(II)ion esetén sikerült bebizonyítani az $[\text{Ni}_3\text{L}_2\text{H}_6]$ (24. ábra) és az $[\text{NiLH}_3]$ (25. ábra) jelenlétét is. Ez meglepő eredmény, hiszen a Cu(II)-komplexeknek a fémion méretéből fakadóan nagyobb a stabilitásuk a Ni(II)-komplexekhez képest. A Ni(II)ion körül kialakuló stabilis oktaéderes szerkezet lehet az oka, hogy az ionizáció során nem fragmentálódott a komplex.

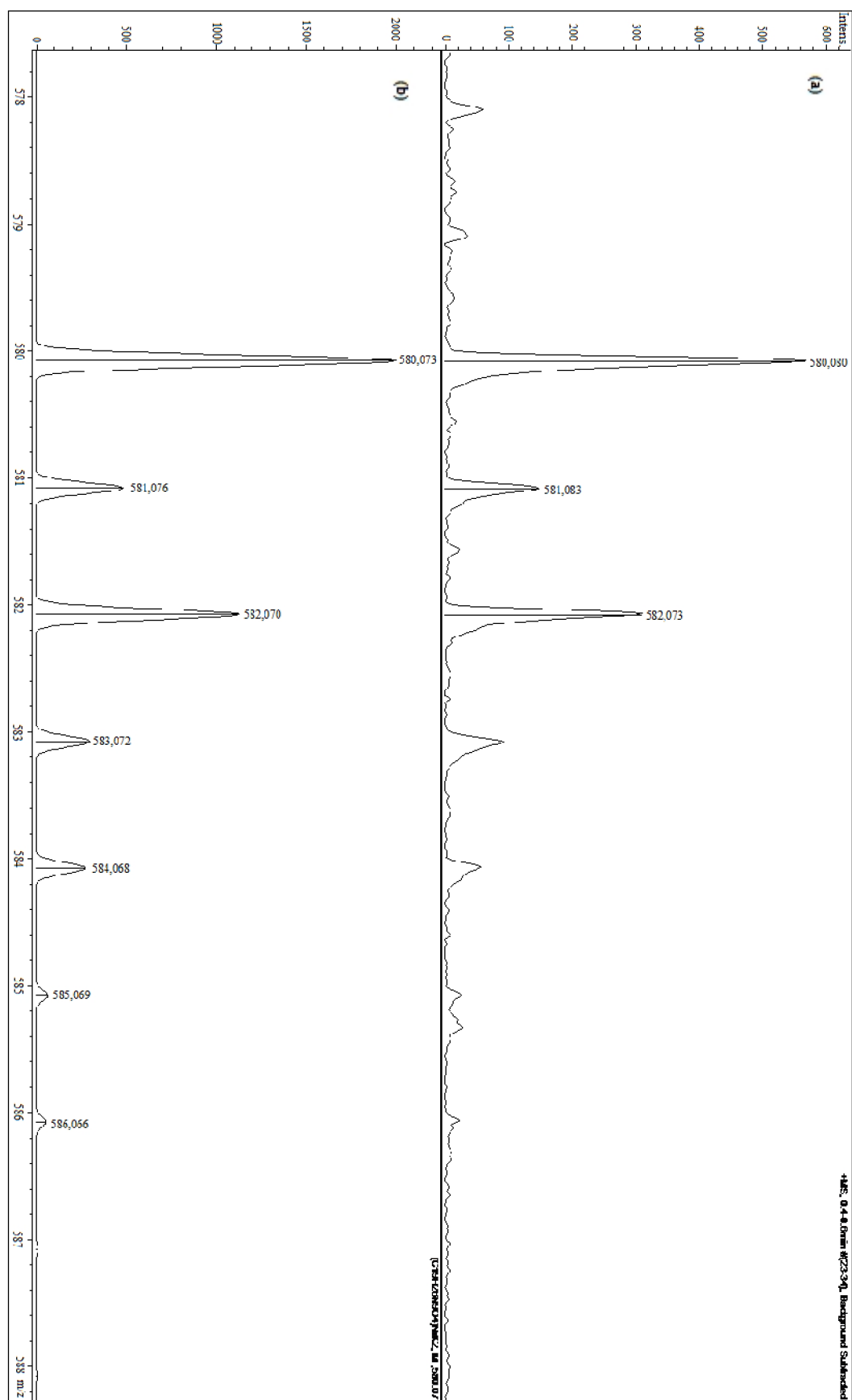
A vizsgált komplexek adatait a következő táblázatban foglaltam össze:

5. táblázat: Az MS-sel vizsgált komplexek összetétele, moláris tömege és m/z értéke

Komplex összetétele	Moláris tömeg (g/mol)	m/z
$[\text{Ni}_3\text{L}_2\text{H}_6]\text{K}_2^{2+}$	1140,1	571,07 (100 %), 570,08 (76,8 %)
$[\text{NiLH}_3]\text{K}_2^{+}$	580,07	580,08



25. ábra: A Ni(II)-HisGlyValHis-NH₂ 3:2 arányú rendszerben az $[\text{Ni}_3\text{L}_2\text{H}_6]$ komplex tömegspektruma (a) és a számított izotópeloszlás (b)



26. ábra: A Ni(II)-HisGlyValHis-NH₂ 3:2 arányú rendszerben az $[NiLH_3]$ komplex tömegspektruma (a) és a számított izotópeloszlás (b)

5. Összefoglalás

A réz(II)-, nikkel(II)- és a cink(II)ion létfontosságú az élő szervezetek számára. A biológiai rendszerekben főként fehérjéhez kötötten találhatóak meg. Az enzimeknek létfontosságú alkotójaként szerepet játszanak különböző biokémiai folyamatok katalizálásában. Hiányuk, illetve a szervezetben felhalmozott fölöslegük is különböző elváltozásokhoz, betegségekhez vezethet. A kadmium a cinkhez nagyon hasonló elem, gyakran kísérőelemeként is előfordul, de a cinkkel ellentétben erősen toxikus hatású.

A metalloenzimekben a legfontosabb kötőhely a fémionok számára a hisztidin aminosav oldalláncában található imidazol nitrogén. Az így kialakult komplexek szerkezete függ a horgonycsoportot tartalmazó hisztidin helyzetétől és az aminosav szekvenciájától, ugyanis az egyes oldalláncok is hatással vannak a koordinációra. A komplexkémiai folyamatokat nagyban befolyásolja továbbá a fémion természete és a fémion-ligandum arány.

Munkám során egy két hisztidint tartalmazó tetrapeptidet (HisGlyValHis-NH₂) állítottam elő szilárd fázisú peptidszintézissel. Először a peptid tisztaságát ellenőriztem, majd pedig a ligandum réz(II)-, nikkel(II)-, cink(II)- és kadmium(II)-komplexeit vizsgáltam pH-potenciometriás, UV-látható spektrofotometriás és CD-spektroszkópiás módszerekkel.

A pH-potenciometriás mérési adatok alapján réz(II)- és nikkel(II)ion esetében is 1:1 fémion-ligandum arányú komplexek ([MLH], [ML], [MLH₁], [MLH₂], [MLH₃]) illetve egy biszkomplex ([ML₂]) kialakulását feltételeztük, melyet az UV-látható- és a CD-spektroszkópiás mérések is alátámasztottak. A fémfölsleget tartalmazó mintákban a többmagvú komplexek ([M₃L₂H₆]) létezését tömegspektrometriai vizsgálatokkal is bizonyítottuk. Cink(II)- és kadmium(II)ion jelenlétében azonban csak [MLH], [ML] és [ML₂] összetételű komplexek keletkeztek, az amidnitrogének deprotonálódása nem játszódtott le.

Savas pH-tartományban a ligandum hisztaminszerű koordinációval kapcsolódik a fémionokhoz. A lúgos tartomány felé haladva a peptid C-terminális végén lévő imidazolnitrogén deprotonálódása és kapcsolódása is megfigyelhető. Ligandumfelesleg esetén ezt a folyamatot a biszkomplexek képződése késlelteti. A pH további növelése a réz(II)- és a nikkel(II)ion esetében az amidnitrogének deprotonálódásához vezetett, míg a cink(II) és a kadmium(II)ion esetében a titrálás során csapadék jelent meg.

6. Summary

Copper(II), nickel(II) and zinc(II) ions are essential trace elements for organism. Mainly they are found linked with proteins in biological systems. They play an important role in catalysis of different biochemical processes as essential components of enzymes. Their deficiency or excess accumulated in organism can lead to different changes, diseases. Cadmium is very similar to zinc. It often occurs as accompanying element of zinc, but in spite of zinc it has strong toxic effect.

Imidazole nitrogen in the side chain of histidine is the most important binding site for metal ions. Structure of complexes formed on this way depends on position of histidine containing group which is a primary binding site for metal ion and the sequence of amino acids because the side chains also have effect to coordination. Furthermore the complex formation processes are influenced by the nature of the metal ion and the rate of metal ion and ligand.

During my work I synthesized a tetrapeptid containing two histidine amino acids (HisGlyValHis-NH₂). The synthesis was performed by means of automated peptide synthesizer based upon the solid phase peptide synthesis. First of all I controlled the purity of the peptid, then I studied the copper(II), nickel(II), zinc(II) and cadmium(II) complexes of the ligand with pH-potentiometric, UV-visible spectrophotometric and CD-spectroscopic methods.

We supposed the formation of 1:1 complexes ([MLH], [ML], [MLH₁], [MLH₂], [MLH₃]) and one bis(ligand) complex ([ML₂]) on the strength of pH-potentiometrical data. These assumptions were supported by data of UV-visible and CD-spectroscopic measurement. The existence of multinuclear complex ([M₃L₂H₆]) in samples containing excess of metal ion was proved by mass spectrometric studies. However only [MLH], [ML] and [ML₂] complexes formed in presence of zinc(II) and cadmium(II) ions, deprotonation of amino nitrogens didn't occur.

The ligand binds to the metal ions with histamine-like coordination at acidic pH range. The deprotonation and coordination of the imidazole nitrogen on the C-termini was observed by increasing the pH. Formation of bis(ligand) complex shifts this process in case of excess of ligands. At even higher pH amide nitrogens are deprotonated at presence of copper(II) and nickel(II) ions, but precipitation appears in case of zinc(II) and cadmium(II) ions during the titration.

7. Felhasznált irodalom

1. Kiss T., Gajda T., Gyurcsik B.: Bevezetés a bioszervetlen kémiába, Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest (2007)
2. Dr. O.-A. Neumüller: Römpp Vegyészeti lexikon (IV.) Műszaki könyvkiadó, Budapest (1984)
3. Dr. Labádi I.: Oktatási segédanyag a Spec. kollégium környezettudományi és környezettan tanár szakos hallgatóknak, ill. a TTK-s hallgatóknak, mint szabadon választható tárgyhoz, Szegedi Egyetem, Természettudományi és Technológiai Kar, Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék, (2005)
4. Dr. O.-A. Neumüller: Römpp Vegyészeti lexikon (III.) Műszaki könyvkiadó, Budapest (1983)
5. P. A. Bryngelson and Michael, J Maroney: Nickel Superoxide Dismutase, in: Metal Ions in Life Science **2**, 417-444 (2007)
6. <http://www.webbeteg.hu/cikkek/allergia/3570/nikkel-allergia-szindroma> (2014. március 23.)
7. Dr. O.-A. Neumüller: Römpp Vegyészeti lexikon (I.) Műszaki könyvkiadó, Budapest (1981)
8. I. J. T. Davies et al.: J. Clin. Pathol **21**, 359 (1968)
9. Jr. J. C. Smith, E. G. McDaniel, F. F. Fan, J. A. Halsted: Science. **181**, 954 (1973)
10. Dr. O.-A. Neumüller: Römpp Vegyészeti lexikon (II.) Műszaki könyvkiadó, Budapest (1982)
11. J. C. Health, M.R. Daniel, J. T. Dingle: Nature **193**, 592-593 (1962)
12. T Kiss: Complexes of amino acids (III.) in Biocoordination Chemistry (ed.: K. Burger, E. Horwood) (1990)
13. N. I. Jakab, B. Gyurcsik, T. Körtvélyesi, I. Vosekalna, J. Jensen, E. Larsen: J. Inorg. Biochem., **101**, 1376-1385 (2007)
14. P. Daniele, O. Zerbiani, R. Aruga, G. Ostacoli: J. Chem. Soc. Dalton Trans, 1115-1120 (1988)
15. C. Conato, H. Kozlowski, P. Mlynarz, F. Pulidori, M. Demelli: Polyhedron. **21**, 1469-1474 (2002)
16. Y. Fang, B. D. Ray, C. A. Claussen, K. B. Lipkowitz, E. C. Long: J. Am. Chem. Soc., **126**, 5403-5412 (2004)
17. E. Farkas, I. Sóvágó, T. Kiss, A. Gergely: J. Chem. Soc. Dalton Trans, 611-614 (1984)

18. W. Bal, H. Kozlowski, R. Robbins, L. D. Pettit: *Inorg. Chem. Acta*, **231**, 7-12 (1995)
19. L. D. Pettit, S. Pyburn, W. Roeske, F. R. N. Gurd: *J. Biol. Chem.*, **240**, 3827-3846 (1965)
20. K. Várnagy, J. Szabó, I. Sóvágó, G. Malandrinos, N. Hadjiliadis, D. Sanna, G. Micera: *J. Chem. Soc., Dalton Trans*, 467-472 (2000)
21. G. F. Bryce, R. W. Roeske, F. R. N. Gurd: *J. Biol. Chem.*, **240**, 3837-3846 (1965)
22. G. F. Bryce, R. W. Roeske, F. R. N. Gurd: *J. Biol. Chem.*, **241**, 1439-1448 (1966)
23. C. E. Livera, L. D. Pettit, M. BAtaille, H. Kozlowski, B. Radoska: *J. Chem. Soc. Dalton Trans*, 661-666. (1987)
24. A. Myari, G. Malandrinos, Y. Deligiannakis, J. C. Plakatouras, N. Hadjiliadis, Z. Nagy, I. Sóvágó: *J. Inorg Biochem.*, **85**, 253-261 (2001)
25. Cs. Kállay, K. Várnagy, G. Malandrinos, N. Hadjiliadis, D. Sanna, I. Sóvágó: *Dalton Trans.*, 4545-4552 (2006)
26. R. B. Merrifield: *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2149 (1963)
27. R. B. Merrifield: *B. ACS*, Washington D.C., J. I. Seeman. Ed. (1993)
28. Caprino L. A., Han G. Y., *J. Org. Chem.*, **37**, 3404-3409 (1972)
29. P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca: *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1196 (1985)
30. L. Zékány, I. Nagypál, in: *Computational Methods for the Determination of Formation Constants*, (ed.: D. J. Leggett), Plenum Press, New York, 291-299 (1985)
31. D. Nguyen, R. Seyer, A. Heitz and B. Castro: *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **1**, 1025 (1985)
32. H Sigel, R. B. Martin: *Chem. Rev.*, **82**, 385 (1982)
33. Cantor C. R., Schimmel P. R., in: *Biophys. Chem.*, Vol. 2, Chapter 8 (1980)
34. I. Sóvágó, D. Sanna, A. Dessí, K. Várnagy G. Micera: *J. Inorg. Biochem.*, **63**, 99 (1996)
35. E. Farkas, I. Sóvágó, A. Gergely: *J. Che. Soc., Dalton Trans.*, 1545 (1983)

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni Prof. Fábián István tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy lehetővé tette TDK dolgozatom elkészítését az általa vezetett Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszéken.

Őszintén köszönöm témavezetőmnek, Dr. Várnagy Katalin egyetemi docensnek a munkám során nyújtott sokrétű, önzetlen segítségét.

Köszönettel tartozom a Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoport minden tagjának a munkám során adott tanácsaikért, valamint azért, hogy a munkám elvégzéséhez baráti légkört biztosítottak.

A kutatás a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0043 számú ENVIKUT projekt keretében, az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.