

# **Kadmium(II)-peptid rendszerek oldategyensúlyi vizsgálata**

**Tudományos Diákköri Dolgozat**

**Készítette:** Lukács Márton

I. évfolyam vegyész MSc

**Témavezető:** Dr. Várnagy Katalin

Egyetemi docens

Debreceni Egyetem, Természettudományi és Technológiai Kar

Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék

2014

# Kadmium(II)-peptid rendszerek oldategyensúlyi vizsgálata



Tudományos Diákköri Dolgozat

**Készítette:** Lukács Márton

I. évf. vegyész MSc

**Témavezető:** Dr. Várnagy Katalin

Egyetemi docens

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

2014

# Tartalomjegyzék

|                                                                                         |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. Bevezetés .....</b>                                                               | <b>3</b>  |
| <b>2. Irodalmi bevetés .....</b>                                                        | <b>4</b>  |
| 2.1. A kadmium kémiaja és felhasználása.....                                            | 4         |
| 2.2. Kadmium a környezetünkben.....                                                     | 4         |
| 2.3. Kadmium feldúsulása és veszélyei.....                                              | 5         |
| 2.4. A kadmium biokémiaja .....                                                         | 6         |
| 2.5. A kadmium koordinációs kémiaja.....                                                | 8         |
| 2.6. Aminosavakkal és peptidekkel képzett komplexek eddigi vizsgálata.....              | 9         |
| <b>3. Kísérleti körülmények .....</b>                                                   | <b>12</b> |
| 3.1. Felhasznált anyagok .....                                                          | 12        |
| 3.2. pH-potenciometria.....                                                             | 12        |
| 3.3. Szilárdfázisú peptidszintézis .....                                                | 15        |
| 3.4. A Gly-Cys-kadmium(II) rendszerből szilárd formában kivált komplex vizsgálata ..... | 16        |
| 3.4.1. UV-látható spektrofotometria.....                                                | 16        |
| 3.4.2. Atomabszorpciós spektrometria (FAAS) .....                                       | 16        |
| 3.5. $^1\text{H}$ NMR spektroszkópia.....                                               | 17        |
| <b>4. Eredmények kiértékelése.....</b>                                                  | <b>18</b> |
| 4.1. A vizsgált peptidek konstitúciós képletei.....                                     | 18        |

|                                                                                                                        |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.2. Oldalláncukban karboxilcsoportot tartalmazó ligandumok sav-bázis tulajdonságai.....                               | 19        |
| 4.3. Az aszparaginsavat/glutaminsavat tartalmazó peptidek kadmium(II)ionokkal alkotott rendszereinek vizsgálatai ..... | 21        |
| 4.4. Az oldalláncukban tiolcsoportot tartalmazó peptidek sav-bázis tulajdonságai ..                                    | 28        |
| 4.5. A vizsgált cisztein aminosavat tartalmazó peptidek Cd(II)komplexei.....                                           | 30        |
| 4.5.1. Glicil-cisztein kadmium(II)komplexei.....                                                                       | 30        |
| 4.5.2. Az Ac-Cys-Ser-Ser-Cys-NH <sub>2</sub> kadmium(II)komplexei .....                                                | 33        |
| 4.6. A Gly-Cys kadmium(II) rendszerben kialakult [CdA <sub>2</sub> H <sub>2</sub> ] komplex vizsgálata ..              | 34        |
| <b>5. Összefoglalás .....</b>                                                                                          | <b>37</b> |
| <b>6. Felhasznált irodalom .....</b>                                                                                   | <b>39</b> |

## 1. Bevezetés

A koordinációs kémia múlt évszázadban bekövetkező fejlődésével egy időben sikerült megismernünk az aminosavak, peptidek, fehérjék, nukleinsavak és makrociklusok komplexképző sajátságait. Ismeretes, hogy az átmenetifém-ionok létfontosságú biokémiai folyamatok irányításában vesznek részt, oly módon, hogy az imént említett molekulákkal kölcsönhatásba lépve biológiailag is aktív szerepet betöltő részecskéket hoznak létre.

Ezek mellett tudatába kerültünk annak is, hogy az enzimek fémkötő helyein leggyakrabban valamilyen olyan aminosav rész szerepel, amely oldalláncában imidazol típusú nitrogént, vagy cisztein/metionin kénatomot, esetleg aszparaginsav/glutaminsav karboxiloxigént tartalmaz.

Ezen csoportok képesek arra, hogy a szervezet számára szükséges fémionok mellett kölcsönhatásba lépjenek olyan fémek ionjaival is, amelyek az élő szervezetek számára toxikusak. Ilyen toxikus fémionok a Cd(II), Pb(II), As(III) és a Hg(I).

A Cd(II)-ion lágy tulajdonsága révén könnyen alakíthat ki koordinatív kötést a cisztein aminosav oldalláncában található tiolátcsoport kénatomjával. Emellett az aszparaginsav/glutaminsav esetén a kialakuló karboxilátcsoport negatív töltése szintén lehetőséget adhat a fémion megkötésére, valamint csatolt kelát kialakulására is van lehetőség, abban az esetben, ha a fémion képes az amidcsoport deprotonálását indukálni (mint például a réz(II)- és nikkel(II)ionok).

**Célunk** volt a vizsgálatok során, hogy a fentebb említett lehetséges koordinációs viszonyokat tanulmányozzuk több dipeptid, illetve egy tri-, és két tetrapeptid esetén.

Az aszparaginsav/glutaminsav oldalláncbeli karboxilcsoportjának hatását a peptidek kadmiummegkötő képességére az Asp-Ala, Glu-Glu, Asp-Glu, Asp-Asp, Asp-Asp-Asp és az Asp-Asp-Asp-Asp kadmium(II)komplexein keresztül tanulmányoztam.

A cisztein oldalláncában kialakuló tiolátcsoportjának hatását pedig a Gly-Cys dipeptid és az Ac-Cys-Ser-Ser-Cys-NH<sub>2</sub> szekvenciájú peptid Cd(II)-komplexein keresztül szerettem volna vizsgálni. A terminálisan védett tetrapeptid nem kapható kereskedelmi forgalomban, így ebben az esetben elsődleges cél a szintézis megvalósítása, az optimális feltételek megtalálása volt. Ezt követően terveztük a fémkötő képesség vizsgálatát.

## 2. Irodalmi áttekintés

### 2.1. A kadmium kémiaja és felhasználása<sup>[1]</sup>

A kadmium a periódusos rendszer II.b mellékcsoportjában, a d-mező elemei között található átmeneti fém, amely megközelítőleg 0,16 ppm mennyiségben fordul elő a földkéregben. Ezüstfehér színű szilárd fém, melynek szerkezetére jellemző a hexagonális, szoros illeszkedésű torzult kristályrács. Ezen torzulás olyan mértékű, hogy a fématomok mindössze csak hat közvetlen szomszédos atommal érintkeznek egy azonos síkban - a hexagonális szoros illeszkedésű fémrács típusra jellemző tizenkettő helyett -, illetve a további három szomszédos atom a következő síkban mintegy 10%-kal helyezkedik el távolabb. A kadmium és a vele egy csoportban található cink és higany alkotják a cinkcsoport elemeit.

A kadmium a természetben szulfidjaként – a szfalerit (ZnS) kísérőjeként - fordul elő. A sósav és a kénsav nehezen oldja fel, míg a salétromsav könnyebben. Vegyületeiben Cd(II)-ion formájában van jelen; sóinak vizes oldata pedig szintelen és savas kémhatású.<sup>[2]</sup>

Először 1817-ben ismerték fel, mint a cink-karbonát egy szennyezőjét. A huszadik század első felére már széles körben elterjedt az iparban, mint műanyag stabilizátor, festékszínező, fémorganikus vegyület, illetve, mint elektródanyag a nikkel-kadmium elemekben.

### 2.2. Kadmium a környezetünkben<sup>[3]</sup>

A fém kibocsátása a levegőbe, a termőföldekre és a vizekbe is megtörténik. Ennek több módja is lehet: színes fémek bányászata és feldolgozása, foszfát tartalmú műtrágyák alkalmazása, szennyvíz-, és csatornaiszapok nem megfelelő kezelése, fosszilis tüzelőanyagok égetése, gumik kopása.

A kadmium klorid, oxid vagy szulfát vegyület formájában, de gyakran fémpor alakban jut a levegőbe, ahol vízgőz vagy kisméretű szemcsék (<1 µm) felületéhez kötődik. Az atmoszférában így a mérgező fém akár több kilométer távolságra is képes eljutni a kibocsátás helyétől. Ezt követően a fémvegyületek leülepszene a föld-, illetve a vízfelszínre, s ily módon bekerülnek a termőföldekbe. Az így felhalmozódott fém - különböző mozgékonyaságú ionjait - a növények képesek felvenni, amely folyamat

eredményeképpen a kadmium, valamint vegyületei bekerülnek az emberi táplálkozási láncba.

A vízzeloldható fémsók révén a természetes vizekbe jutó kadmium(II)ionok képesek összekapcsolódni több szerves, illetve szervetlen eredetű molekulával, ami azt eredményezi, hogy a vízi élőlények szervezetében is feldúsul az erősen toxikus fém.

### **2.3. A kadmium feldúsulása és veszélyei<sup>[3]</sup>**

A népesség nem dohányzó tagjainak szervezetébe javarészt a táplálkozás útján kerül a mérgező fémion. Azok a növényi eredetű termékek, amelyek magas százalékban tartalmaznak kadmiumot: a zöldség-, és gabonafélék. Ennek oka, hogy az előbb említett csoportokban több olyan növény is található, amely képes nagy mennyiségben a fémnek és vegyületeinek a felvételére és tárolására, anélkül, hogy az valamilyen külső elváltozást okozna (pl. rizs). Természetesen nem csak a növényi eredetű élelmiszerekben lehet magas a kadmium(II)ion koncentrációja, hanem az állati eredetű élelmiszerekben is. Több puhatestű élőlény kadmium-toleranciája is meglepően magas (pl. kagylók). Természetesen a felvett fémvegyületek mennyisége függ attól, hogy a termőföld hol helyezkedik el, milyen annak összetétele, fizikai-kémiai paraméterei, illetve, hogy milyen a földön termesztett növények fajtája. A nem dohányzó emberek szervezetébe a bevitt kadmium kevesebb mint a 10%-a az ivóvízből származik. A dohányzó közösség körében, a kadmium fő forrása a cigaretta füst, amelyből a tüdőn keresztül a kadmium, akár fém akár ionos formában is könnyen felszívódik.

A kadmium az emberi szervezetben nem tölt be semmilyen alapvető biológiai funkciót. Az evolúció során, mint nyomelem nem épült be az emberi agyagcsere-folyamatokba, így nem rendelkezik önálló transzporttal és/ vagy szervezeten belüli körfolyamattal. Az első élettani hatásait az 1930-as években tapasztalták. Ekkor még csak tüdőkárosodásra lettek figyelmesek, s csak az 1940-es években derült fény arra, hogy egészségkárosító hatása kiterjed a csontokra és a vesére is.

A csontokra kifejtett hatása a második világháború után kitört ún. itai-itai kór kapcsán vált nyilvánvalóvá. A csontlágyulással járó betegséget Japánban azonosították, ahol a Jinzu folyó vonalán elhelyezkedő Toyama lakosságának idősebb női tagjainál tapasztalták a megbetegedés tüneteit. A város lakossága a földet a folyóból locsolta, amely a fokozódott fémkitermelés folytán kadmiummal erősen szennyezett volt. A kutatások rámutattak arra, hogy a Cd(II)-ion képes beépülni a csontokba a Ca(II)-ion helyett.

A belső szervek közül a vese az, amely a legnagyobb veszélynek van kitéve. A kadmium ugyanis képes felgyűlni a szerv belső szöveteiben, ahonnan több mint tíz éves biológiai felezési idővel ürül ki.

A kadmiumot és vegyületeit karcinogén anyagoknak sorolták be az 1990-es évek elején. Epidemiológiai kutatások azt mutatták, hogy a tüdő és a prosztata rák kapcsolatba hozható a fémmel és vegyületeivel, melynek oka, hogy a kadmium képes az oxidatív stressz kiváltása révén reaktív szabadgyököket a szervezetbe juttatni, és ezzel akár közvetve befolyásolni a sejthalál folyamatát.

#### **2.4. A kadmium biokémiája<sup>[3][4]</sup>**

Miután a fém a táplálkozás útján, ionos vagy valamilyen komplex formájában kötött módon a szervezetbe került, a megfelelő sejtek, illetve szövetek segítségével felszívódik és bejut a szervezet ionháztartásába. A felszívódás pillanatától kezdődően végbemenő folyamatok kapcsán inkább csak feltételezésekbe tudnak a kutatók bocsátkozni, ezáltal több elképzelés is született már a kadmium belső transzport folyamatait illetően.

Első lépésben a toxikus fémion valószínűleg fehérjékkel kapcsolódik össze, amelyek leggyakrabban albumin, transzferin és metallotionen lehet. A fémion a fizikai-kémiai paraméterek változásával egyidejűleg folyamatos ligandumcserek sorozatában vesz részt. A kadmium szervezeten belüli körforgása lehetséges Cd(II)-ion formájában, illetve ezen ion komplex vegyületei formájában is.

Lehetőség nyílhat az emberi szervezetben arra, hogy a különböző biológiai szempontból meghatározó fémek transzportjába a kadmium bekapcsolódhasson. Több elektrofiziológias beszámoló szerint a fém sójának nagy koncentrációban való megjelenése a sejtek között gátolja a nátrium, kálium, magnézium és kalcium áramlását. Ez a gátló hatás azonban nem csak egy egyszerű kompetitív folyamat a fentebbi fiziológias fémek ionjaival, hanem egy sokkal erősebb kölcsönhatás azok enzimjeivel. A kadmium ugyanis képes arra, hogy lágy tulajdonsága, ionrádiusza, illetve koordinációs sajtságai révén ezen enzimek szubsztrátja lehessen.

Ugyan nem támasztja alá elegendő bizonyíték, de a Cd(II)-ion transzportja megtörténhet a Ca(II)-ion kiszorításával. Ekkor az ún. kalcium csatornákon keresztül a Cd(II)-ion szállítódni képes a ZnT-1 mikronutriens transzport gén család révén.

A membrán fehérjék aktívan részt vesznek a szervezet számára gyakran szükséges fiziológias fémionok (pl. Na(I)-ionok) transzportjában, de sokáig úgy vélték a Cd(II)-

ionokat nem engedik át. A meglévő adatokból azonban arra következtethetünk, hogy van kivétel néhány olyan enzim esetén, amely valamilyen alapvetően fontos átmenetifém-iont szállít. Ilyen a DMT1 (divalent metal transporter 1), amely fő feladata a vas szállítása a szervezetben. Az enzim azonban nem rendelkezik kellő szelektivitással, így a kadmium(II)ionok könnyen az enzim szubsztrátjává válhatnak.

A szabad, töltéssel rendelkező fémionok képesek a legnagyobb kárt okozni a szervezetben, így néhány molekula számára elsődleges feladat a detoxifikáció. Ilyen molekulák lesznek a tiolcsoportot tartalmazó glutation (GSH) és metallotionein (MT). A membránfehérjék a lehető legkevesebb kadmium tartalmú szerves vegyületet engedik át, így a keletkező Cd(II)-GSH komplex (el)szállítását az ABC fehérjék (ATP-kötő kazetta transzporterek) családja végzi, míg a Cd-MT komplexek transzportja még nem tisztázott.

Még egy lehetőség nyílik a kadmium szervezeten belüli szállítására. Ez az ún. receptor-közvetített endocitózis, amely folyamán a már előzőleg bejutott kadmium(II)ionok által erősen indukált MT-ek átjutnak a sejtmembránon - a 24p3R receptor közreműködésével - és redukálják a szabad fémionokat. Ettől kezdve a vese nephron csatornasejtjein lévő receptorok már a kadmiummal kötésben lévő MT tartalmú fehérjéket is átengedik.

A MT-ek kis molekulatömegű fehérjék, amelyek cisztein tartalma igen magas, ezzel lehetőséget biztosítva a fém-tiol ( $M-SH$ ) klaszterek kialakulására. A MT-ek Zn(II), Cd(II) és Cu(II) felé mutatott affinitásuk igen nagy, sőt a Cd(II)-ion a szervezetbe kerülve képes a thionein molekulák képződést indukálni. Szerkezetükre jellemző, hogy aromás aminosavak csupán csak elvétve fordulnak elő, és a Cys-X(-X)-Cys szekvencia hétszeri ismétlődése található meg bennük. Az X jelölhet bármilyen tetszőleges aminosavat, de az aromás oldalláncúak, mint azt fentebb láttuk, kevésbé jellemzőek.

Az állati Mt-ek hét darab, két vegyértékű átmenetifém-iont képesek koordinálni fém-tiol kapcsolattal, ami két klaszter kialakulására ad lehetőséget. Az egyik klaszter  $M(II)_3S_9$  képletű és az N-terminális aminosav  $\beta$  doménjén keresztül jön létre. Míg a másik klaszter, amely  $M(II)_4S_{11}$  összetételű a C-terminális aminosav  $\alpha$  doménjén keresztül jön létre. Az állati Mt-ekben a fém meghatározza a fehérje negyedleges szerkezetét, és ők maguk a belső doménekhez koordinálódva helyezkednek el. A peptidlánc pedig körbe veszi a két klasztert és rögzíti a hét átmeneti fémiont tetraéderes térszerkezetet kialakítva, kizárólag csak a cisztein aminosav kén donoratomjait felhasználva

A szervezetbe bekerült kadmium tárolására nem minden MT képes, ugyanis a kadmium detoxifikálása nem elsődleges feladata ezen molekuláknak. A MT egy reaktív molekula, amely a fémek sejtek közötti elosztásában vesz részt. Ligandumcsere folytán a MT-ek képesek a kadmium lecserélésére, olyan molekula közreműködésével, amely szintén tiolcsoportokban gazdag.

## 2.5. A kadmium koordinációs kémiája<sup>[5]</sup>

A kadmium toxicitása, mint azt fentebb már láttuk, függ attól, hogy a fém milyen formában van jelen az élő szervezetben. Az esetek nagytöbbségében, sőt szinte kizárólag, azt mondhatjuk, hogy a fém az emberi szervezetben, valamilyen bioligandummal képzett komplexe formájában található meg, amely komplexek stabilitása eltérő lehet.

A kadmium(II)ion  $4d^{10}$  elektronszerkezet, lágy karakter és nagyfokú polarizálhatóság jellemzi, ám ettől függetlenül nem tartozik a tipikusan soft kationok közé. A soft ligandumokkal képzett koordinációs kötéseire jellemző, hogy kovalens jellegűek is lehetnek. A legstabilisabb komplexet a S, N, és O donoratomokkal képzik, ahol a sorrend az ezen atomok felé mutatott csökkenő affinitást is kifejezi. A kialakuló fehérje, nukleinsav (P donoratom) és egyéb komplexek stabilitása annak függvénye, hogy milyen a komplexképződést kísérő energiaváltozás. Az energiaváltozás mértéke a részt vevő ligandum kémiai, sztereo kémiai és kemény-lágy tulajdonságától, valamint a keláteffektus fellépésétől függ.

A kadmium(II)ion sztereokémiai viselkedése meglehetősen változatos. Az általa képzett komplex vegyületeiben koordinációs száma 2 és 8 között változhat. A  $4d^{10}$  elektronkonfiguráció ellenére elég gyakran jelennek meg torzult geometriájú komplexek is. A kadmiumra(II)ionra jellemző a tetraéderes geometria, amely szintén az elektronszerkezet következménye.

Általánosan igaz, hogy a kialakított komplex stabilitása arányosan növekszik a ligandum koordinálódni képes donorcsocsoportjainak számának növekedésével. Következésképpen egy polidentát ligandum, amely tiolcsoportokban gazdag, könnyen stabilis komplexet alkot a Cd(II)-ionnal. Ilyen stabilis komplexeket képeznek a már előzőleg is tárgyalt MT-ek.

## 2.6. Aminosavakkal és peptidekkel képzett komplexek eddigi vizsgálata<sup>[6][7]</sup>

Az  $\alpha$ -aminosavak vizes oldatban ikerionos formában vannak jelen. Ennek a formának köszönhetően mind proton leadására, mind pedig proton felvételére képesek ezek a vegyületek. Ennek oka a molekulában kialakuló karboxilát- és ammóniumcsoport protonáltsági foka.

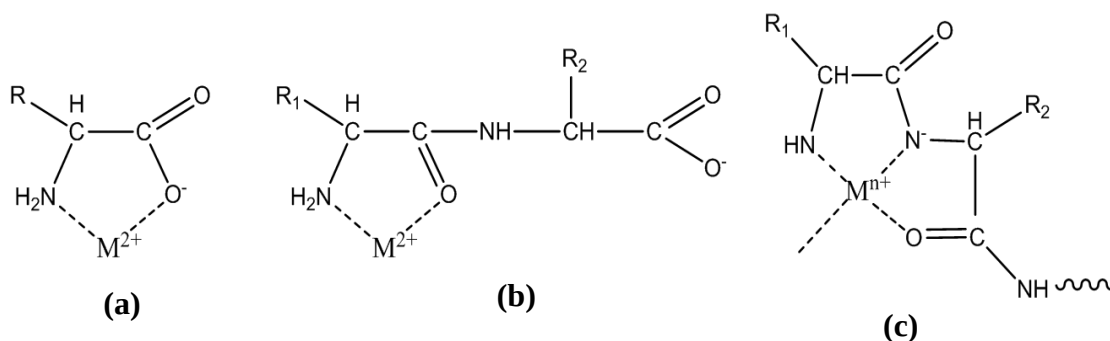
Ismeretes, hogy az aminosavak különböző átmenetifém-ionokkal stabilis bisz- és triszkomplexeket képezhetnek. A képződő komplexek szerkezete, valamint stabilitása az illető fémion Lewis sav-bázis sajátosságától és az aminosav donorcsoportjainak számától függ. Az oldalláncukban donorcsoportot nem tartalmazó aminosavak az amino- és karboxilátcsoporton keresztül képesek koordinálódni a fémionhoz, ezzel öttagú kelátgyűrűt kialakítva (1.(a) ábra).

A peptidekben a két terminális csoport egymástól távol helyezkedik el a peptidlánc két végén, így azok egyidejű koordinációja nem valósul meg. Szintén a fémion sajátossága az, amely meghatározza, hogy az amino- és karboxilátcsoportok közül melyik lesz az elsődleges kötőhely az adott fémion számára. Átmenetifém-ionok esetén a peptidek aminocsoportja lesz a horgonycsoport, és a peptidkötés karboniloxigénjének részételével (1.(b) ábra) alakul ki egy kelát, amely közepes stabilitású, [MA] komplex kialakulását eredményezi. Ez a komplex azonban csak savas pH-tartományban képes a fémion hidrolízisét visszaszorítani, így ha az amidnitrogén deprotonálódása nem következik be a pH emelésével, fémhidroxid csapadék leválásával kell számolni. Azonban az amidnitrogén nemkötő elektronpárja a peptidkötésben részt vevő atomokon delokalizálódik, aminek hatására a szén-nitrogén kötés kettőskötés karakterűvé válik, és az amidcsoport a teljes pH-tartományban semleges lesz (természetesen nagyon lúgos, illetve savas közegben nagyon gyenge savként és bázisként viselkedhet)

Az irodalomban ismert, hogy az amidnitrogén deprotonálódása csak akkor következik be, ha a ligandum az amidnitrogénnel kelátképző helyzetben tartalmaz egy erősen koordinálódó horgonycsoportot. Hogy egy adott ligandum esetén, mely csoport tölti be ezt a szerepet az nagyban függ a fémion tulajdonságaitól, kemény-lágy sajátosságától. Ilyen amidnitrogén deprotonálódást indukáló fémek a Pd(II), Pt(II), Cu(II) és a Ni(II).

Az amidcsoport mérhető pH-tartományon bekövetkező deprotonálódása után a peptid tagszámától függően lehetőség nyílhat arra, hogy több amidnitrogén is részt vegyen a fémion megkötésében (peptidszerű koordináció). Az így kialakulni képes [MAH<sub>1</sub>] (1.(c) ábra), később [MAH<sub>2</sub>] komplexek kiugróan nagy stabilitásúak, és lúgosabb pH-

tartományban is képesek visszaszorítani a fémion hidrolízisét. Az  $[\text{MAH}_{-1}]$  összetételű komplexben a fémionhoz az amino- és amidnitrogén mellett a dipeptidek esetén a karboxilát-oxigén, míg oligopeptidek esetén a következő karboniloxigén koordinálódik.



**1. ábra:** Egy aminosav **(a)** és egy dipeptid **(b)**  $[\text{MA}]$ , valamint egy peptid  $[\text{MAH}_{-1}]$  **(c)** komplexének szerkezete<sup>[6][7]</sup>

Azzal kapcsolatosan, hogy a különböző aminosavak, és peptidek milyen komplexek kialakítására képesek a kadmium(II)ionnal, illetve, hogy kialakul-e kettős kelátgyűrű a fémion jelenlétében, már megelőzően foglalkozott a Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoport. A kapott eredményeket a vizsgált peptidek oldalláncában levő donorcsoportok szerint szeretném bemutatni:

*1.) Az oldalláncban koordinálódó donorcsoportot nem tartalmazó peptidek koordinációs sajátosságai<sup>[8][10]</sup>*

A terminális aminos csoport erősebb kapcsolatot képes kialakítani a soft jellegű fémionokkal, mint például a  $\text{Cd(II)}$ ,  $\text{Pb(II)}$ ,  $\text{Zn(II)}$ . Szilárd fázisban a terminális karboxilcsoport koordinációja is tapasztalható ezen fémionokkal, így a  $\text{Cd(II)}$  számára egy peptid mindkét terminális csoportja jelenthet kötőhelyet a megfelelő körülmények között. A legegyszerűbb, de kis stabilitású komplexet biztosító koordináció, peptidekkel történő kölcsönhatás során, az  $(\text{NH}_2, \text{CO})$ , amely a láncvégi aminos csoporttal szomszédos karbonilcsoport részvételével jön létre. A  $\text{Zn(II)}$ -ionok az amidnitrogén deprotonálódását nem képesek indukálni. A  $\text{Cd(II)}$ -ionnal mutatott hasonló tulajdonságaik miatt, sejthető, hogy ezen fémion sem képes erre. A várakozásoknak megfelelő eredményt kaptak kutatócsoportunk tagjai, ugyanis úgy találták, hogy a  $\text{Cd(II)}$ -ion a 3d átmentifémekhez képest nagyobb ionméretéből következően valóban nem indukálja az amidnitrogén deprotonálódását.

2.) *Az oldalláncban imidazolgyűrűt tartalmazó peptidek koordinációs sajátosságai*<sup>[8]</sup>

A peptidek szekvenciájában található hisztidin hatására a Cd(II)-ion képes lehet az amidnitrogén deprotonálására, azonban ez csak erősen lúgos közegben valósulhat meg (pl. Gly-His).

3.) *Az oldalláncban tioéterkén-atomot tartalmazó peptidek koordinációs sajátosságai*<sup>[6][10]</sup>

A tioéterkénatomot tartalmazó peptidek a kadmium(II)ionokkal az egyszerű peptidekre jellemző komplexképződési folyamatokat mutatnak. [MA] komplexek keletkeznek a fémionnal alkotott rendszerekben legnagyobb mennyiségben, amelyek koordinációja (NH<sub>2</sub>, CO).

4.) *Az oldalláncban tiolcsoportot tartalmazó peptidek koordinációs sajátosságai*<sup>[10][19]</sup>

A kadmium(II)ion és a tiolkénatom között kialakuló kölcsönhatás erős, kovalens kötés jellegű. Kadmium(II)ionok esetén azonban a tiolkénatom nem képes kelátképző helyzetben horgonycsoportként elősegíteni az amidnitrogén deprotonálódását, de a C-terminális helyzetben ciszteint tartalmazó di- és tripeptidek a peptidlánc C-terminális részén kötik a fémiont (S<sup>-</sup>, COO<sup>-</sup>) koordinációval. Ezzel a koordinációval egy stabilis hattagú kelátgyűrű alakul ki, amely egy stabilis komplex létrejöttét eredményezi.

Ha a fémion és a tiolkénatomot tartalmazó peptidek esetén kialakuló lehetséges koordinációs módokat összehasonlítjuk egymással, akkor azok erőssége a (S,N,O) > (S,N) > (S,O,O) > (S,O) sorrendben csökken.

### 3. Kísérleti körülmények

#### 3.1. Felhasznált anyagok

A kadmium(II)-oldatok elkészítéséhez a Reanal cég analitikai minőségű termékét és egy az egyetemen kristályosított  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$  sót használtam.

A titrálásokat  $\sim 0,2 \text{ mol/dm}^3$ , pontosan ismert koncentrációjú, karbonátmentes, argon alatt készített és tárolt KOH-oldattal végeztem. Vizsgálataim során az állandó ionerősséget  $1,0 \text{ mol/dm}^3$  koncentrációjú  $\text{KNO}_3$ -oldattal biztosítottam.

A  $^1\text{H}$  NMR vizsgálatához 99,8%-os izotóptisztaságú, az ISOTEC Inc. cég által előállított NaOD-t, HDO<sub>3</sub>-t és D<sub>2</sub>O-t használtuk.

Az Ac-Cys-Ser-Ser-Cys-NH<sub>2</sub> a szilárdfázisú peptidszintézishez szükséges vegyszereket szintén kereskedelmi forgalomból szereztük be, és további tisztítás nélkül használtuk fel őket. A Fmoc-védőcsoportot tartalmazó aminosavakat, a 2-(1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurónium tetrafluoroborátot (TBTU) és N-hidroxibenzotriazol (HOBt) az InBios cégtől, a piperidint, a triizopropil-szilánt (TIS), az ecetsavanhidridet, az N,N-diizopropil- etilamint (DIEA), dietil-étert (Et<sub>2</sub>O) és trifluor-ecetsavat (TFA), a 3,6-dioxa-oktánditiolt (DODT) a Sigma-Aldrich-től rendeltük. Az N,N-dimetil-formamid (DMF), az acetonitril (ACN) és a diklórmétán (DCM) a Labscan Analytical Sciences író cégtől kerültek hozzánk. A Novasyn TGR gyanta pedig a Novabiochem svájci cégtől érkezett.

Az oldategyensúlyi vizsgálatához használt további peptid molekulák a Gly-Cys, Asp-Asp, Asp-Asp-Asp, Asp-Asp-Asp-Asp, Asp-Ala, Asp-Glu, Glu-Glu peptidek forgalomban kapható vegyszerek, amelyeket a Bachem cégtől vásároltunk.

#### 3.2. A pH-potenciometria<sup>[9][10]</sup>

Az oldatfázisban lejátszódó komplexképződési folyamatok vizsgálatára a pH-potenciometria módszerét használják a legelterjedtebben. Alkalmazásának feltétele, hogy a vizsgált fémion hatással legyen a ligandum protonálódási egyensúlyára, azaz, hogy a komplexképződést pH-effektus kísérje.

A pH-potenciometriás mérések a különböző fémion-ligandum arányoknál lehetőséget adnak arra, hogy a rendszerben képződő részecskék összetételét, illetve stabilitási állandóit ( $\log\beta$ ) meghatározhassuk.

A potenciometria az elektrolit oldatba merülő elektród felületén kialakuló elektródpotenciál mérését jelenti. Az elektród felületén kialakuló potenciál és az elektróddaktív komponens aktivitása közötti kapcsolatot a Nernst- egyenlet írja le:

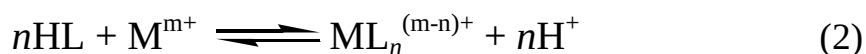
$$\varepsilon = \varepsilon^{\circ} + \frac{RT}{nF} \ln a \quad (1)$$

ahol  $\varepsilon^{\circ}$  a rendszer formálpotenciálja [V], R a gázállandó [J/molK], T a termodinamikai hőmérséklet [K], n az elektronszám-változás, a az elektróddaktív komponens aktivitása és F a Faraday-állandó [96486 C/mol].

Az aktivitás és a koncentráció az analitikában vizsgált híg oldatokban, jó közelítéssel egyenlőnek tekinthető. Az elektródpotenciálból tehát az elektróddaktív anyag koncentrációját számolni tudjuk. Egyetlen elektród felületén kialakuló potenciált nem tudunk mérni közvetlenül, ezért az indikátorelektrod (esetünkben pH-érzékeny üvegelektrod) potenciálját egy konstans potenciálú viszonyító elektróddal szemben mérjük. Mivel a viszonyító elektród pontos potenciálját sem tudjuk pontosan mérni, ezért a mérés során mindig csak potenciálkülönbségek rögzítésére van lehetőségünk, s ezekből kell a megfelelő kalibráció segítségével analitikai információkhoz jutnunk.

A leggyakrabban használt viszonyító elektródok az ezüst/ezüst-klorid-elektrod, illetve a higany/higany(I)-klorid másodfajú elektródok. Ezeknek a rendszereknek a potenciálja állandó.

A lúg mérőoldattal történő titrálás, amely során a fémion verseng a hidrogénionnal a kötőhelyért, a következő egyenlettel jellemezhető:



A bruttó komplexképződési folyamat általános formája, amelyben az egyszerűség kedvéért a töltéseket nem tüntettem fel, a következő egyenlettel írható le:



Az M a fémion, az L a ligandum, a p, q és r pedig a sztöchiometriai együtthatók. Egy  $M_pL_qH_r$  összetételű komplex bruttó stabilitási állandója a következő képlettel számolható:

$$\beta_{pqr} = \frac{[M_p L_q H_r]}{[M]^p [L]^q [H]^r} \quad (4)$$

A potenciometriás titrálás során regisztrált pH és a hozzáadott lúg térfogat adatpárt felhasználva számolni tudtam a ligandum valódi koncentrációját a törzsoldatokban. Ehhez a SUPERQUAD<sup>[11]</sup> nevű számítógépes programot használtam. A különböző arányban fémiont és ligandumot tartalmazó rendszerekben képződő komplex részecskék stabilitási állandóit szintén egy számítógépes program segítségével számoltuk. Ez a program a Tanszéken fejlesztett PSEQUAD<sup>[12]</sup> program, amely képes a bevitt adatok ismeretében (titrálás pH-térfogat adatpárjai, kiindulási fémion-ligandum-hidrogénion koncentráció, a titráló lúgoldat koncentrációja, vízionszorzat, Irving állandó, a számolni kívánt részecskék becsült vagy pontos stabilitási állandója) Newton-Rapson iterációval a stabilitási állandók kiszámítására. Ezek az állandók a következő anyagmennyiség-egyenletek alapján számolhatók:

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

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

$$C_L = [L] + \sum_{i=1}^n q_i \beta_{pqr} [M]_i^p [L]_i^q [H]_i^r \quad (7)$$

Az így kapott értékek felhasználásával eloszlásokat tudunk készíteni, amelyeket a MEDUSA<sup>[13]</sup> program segítségével szerkesztettem meg.

A mérésekhez egy számítógép által vezérelt automata MOL-AcS burettát használtam, ahol a karbonátmentes KOH-mérőoldat adagolása egy 2,5 cm<sup>3</sup> végtérfogatú Hamilton fecskendőből történt. A pH mérés egy MOLSPIN pH-mérővel történt, amihez egy Metrohm 6.0234.110 kombinált üvegelektrod volt csatlakoztatva.

A mérések során vizes oldatokat használtam, amelyek kiindulási térfogata három, illetve négy cm<sup>3</sup> volt, és az állandó 0,2 mol/dm<sup>3</sup> ionerősség biztosítására szükséges mennyiségben tartalmaztak 1 mol/dm<sup>3</sup> koncentrációjú KNO<sub>3</sub>-oldatot.

Az elektród kalibrálása 0,05 mol/dm<sup>3</sup> koncentrációjú kálium-hidrogénftalát-oldattal történt, amely pH-ja 298 K hőmérsékleten 4,008. Az állandó 25°C (±1°C) hőmérsékletet egy ultratermosztáttal; a minták kevertetését és a levegőkizárását pedig katalitikusan tisztított Ar gázzal biztosítottam.

A diffúziós potenciál kiküszöbölésére az Irving és munkatársai által kidolgozott

módszert alkalmaztam.<sup>[14]</sup>

### 3.3. Szilárdfázisú peptidszintézis

Az oldategyensúlyi vizsgálatokhoz használni kívánt ligandumok közül az acetil-ciszteinil-szerinil-szerinil-ciszteinil-amid (Ac-Cys-Ser-Ser-Cys-NH<sub>2</sub>) szintézisére került sor Merrifield-féle szilárd fázisú peptidszintézis útján. R. B. Merrifield 1962-ben publikált cikkében ismertette azt az általa kidolgozott szintézismódszert, amely később lehetővé tette a folyamat automatizálását.

A Merrifield-féle módszer<sup>[15][16]</sup> során a peptidek szintézise szilárd fázishoz kötve történik. A hordozó egy klórmetilézett sztirol-divinil-benzol kopolimer (gyanta), amelynek egy grammjában körülbelül tíz millió szemcse van. A szemcsék felületén és azok belsejében olyan funkciócsoportok vannak, amelyek lehetővé teszik, hogy a szemcsékhez aminosavak kötődjenek. A reaktánsok és termékek ezen csoportokhoz való kötődését és lehasadását elősegítendő a gyantához olyan szerves oldószereket adnak, amelyben jól duzzad.

A peptidek lépésenkénti szintézisében két lépés ismétlődik: a védőcsoport eltávolítása a védett aminosavról majd később a peptidről, valamint a másik N-terminusán védett és aktivált aminosav hozzákapcsolása a szabaddá vált aminosavhoz.

A peptid szintézisét automatizált módon egy mikrohullámú Liberty Peptidszintetizáló készülékkel végeztük. A szintézishez NovaSyn TGR gyantát használtunk, az aminosavakat a TBTU/HOBt/DIEA technika segítségével aktiváltuk.

A Fmoc védőcsoportok eltávolítását a készülék 20% piperidint tartalmazó DMF-oldattal hajtotta végre 180 másodpercig 75 °C-on 25 W teljesítményű mikrohullámú sugárzás segítségével. Az aminosavak csatolása 300 másodpercig szintén 75 °C-on, 25 W teljesítményű mikrohullámú sugárzás hatására ment végbe, amelyhez az aminosavakat négyszeres feleslegben alkalmaztuk, aktiválásukra pedig a következő elegyet használtuk: 0,5 mol/dm<sup>3</sup> HOBt, 0,5 mol/dm<sup>3</sup> TBTU DMF-ben oldva, 2,0 mol/dm<sup>3</sup> DIEA-oldat. A szintézis utolsó lépésében az előállított peptidet tartalmazó gyantát, amelyről a Fmoc védőcsoport eltávolítása megtörtént, 5 V/V% ecetsav-anhidridet és 6 V/V% DIEA-t tartalmazó oldat hozzáadásával kezelte a készülék azért, hogy a peptid N-terminális végére acetil védőcsoportot tudjon kiépíteni.

A peptid gyantáról történő hasítását, és az oldalláncbeli cisztein védőcsoportjának eltávolítását szobahőmérsékleten végeztük el 94,0 V/V% TFA, 1 V/V% DODT, 2,5

V/V% TIS, 2,5 V/V% H<sub>2</sub>O elegyével. A gyantáról lehasított peptidet szűréssel különítettük el. A nyers peptidet hideg dietil-éterbe csepegtetve választottuk le, az így keletkezett anyagot dekantálással és centrifugával való tömörítés után argon gázzal szárítottuk, vízben feloldottuk és végül liofilizáltuk.

Az alkalmazott oldószer mind a gyanta duzzasztására, mind a szintézis folyamán DMF volt.

A szintetizált ligandum tisztaságát több módszerrel is ellenőriztük: egy fordított fázisú folyadékkromatográfiás berendezéssel, amely egy Prostar diódasoros detektorral ellátott VarianPrepstar 200 model SD-1 készülék, egy BRUKER AM360 MHz FT-NMR készülékkel, valamint egy BRUKER micrOTOF-Q 9 típusú tömegspektrométerrel.

A tisztaságvizsgálat rámutatott arra, hogy a nyers peptid kétkomponensű volt. Megközelítőleg ~20%-ban szennyezett volt olyan peptid molekulákkal, amelyek tartalmazták oldalláncukban azt a tercbutilcsoportot, amely a szintézis alatt védőcsoportként volt jelen a szerin oldalláncban található tiolcsoporton.

### **3.4 A Gly-Cys-kadmium(II) rendszerből szilárd formában kivált komplex vizsgálata**

A glicil-cisztein kadmium(II) 1:2 arányú rendszerében 7,4 pH érték körül, szilárd formában kivált komplex összetételét UV látható spektrofotometria és atomabszorpciós spektrometria (FAAS) segítségével ellenőriztük.

#### **3.4.1. UV-látható spektrofotometria**

A mérés Perkin Elmer Lambda 25 kétsugaras fotométeren történt, amihez 1,000 cm-es úthosszú küvettát használtam. A spektrális vizsgálatot 250-900 nm-es hullámhossz tartományon végeztem.

#### **3.4.2. Atomabszorpciós spektrometria (FAAS)**

A mérés egy 200 SERIES AA, 240 FS AA típusú (Agilent Technologies, Malajzia) készüléken történt, 228,8 nm hullámhosszon. A használt résszélesség 0,5 nm volt, továbbá a mérésekhez a levegőre nézve 13,5 L/s, acetilén gázra nézve pedig 2,00 L/s áramlási sebességű acetilén-levegő gázelegyet használtunk. A standard oldatokat 1000 mg/L koncentrációjú, analitikai tisztaságú FLUKA törzsoldatból készülték,

amelyeket  $0,1 \text{ mol/dm}^3$  koncentrációjú salétromsav-oldattal hígítottunk a kívánt koncentrációra. Deutérium lámpás háttérkorrekciót alkalmaztunk a vizsgálatok során.

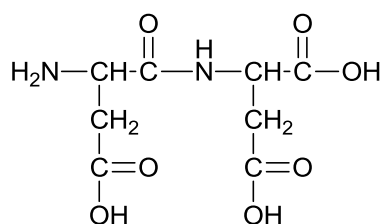
### 3.5. $^1\text{H}$ NMR spektroszkópia

Az Asp-Ala ligandum, valamint a ligandumot és a Cd(II)-ionokat 3:1 arányban tartalmazó rendszer  $^1\text{H}$  NMR spektrumát vizsgáltuk a pH függvényében. A szilárd peptidet 99,8%-os izotóptisztaságú  $\text{D}_2\text{O}$ -ban oldottuk fel, és a mérések során a közeg pD értékének beállításához NaOD- és  $\text{DNO}_3$ -oldatokat használtunk. A spektrumok felvétele BRUKER AM360 MHz készüléken történt és a standard nátrium-3-trimetil-szilil-propánszulfonát (TSP) volt, amelyre  $\delta(\text{TSP}) = 0 \text{ ppm}$ . A kiértékeléshez az Mnova számítógépes szoftvert használtuk.

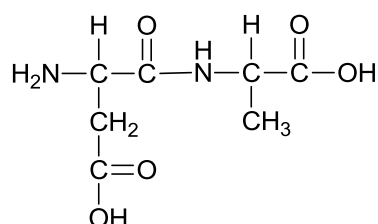
## 4. Eredmények kiértékelése

### 4.1. A vizsgált peptidok konstitúciós képletei

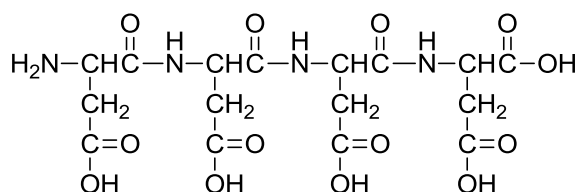
Az eredmények könnyebb áttekintéséhez, illetve értelmezéséhez ennek a fejezetnek az elején a vizsgálatokhoz használt ligandumok konstitúciós képleteit mutatom be. Az oldalláncban karboxilcsoportot tartalmazó peptidok a 2. ábrán, a tiolesoportot tartalmazók a 3. ábrán találhatók.



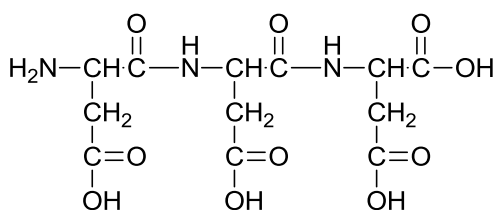
Asp-Asp



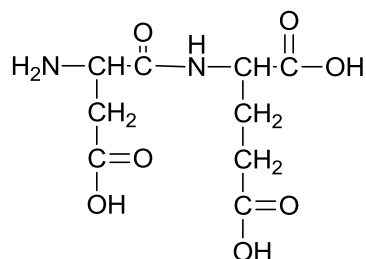
Asp-Ala



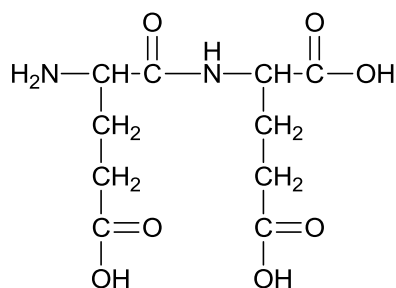
Asp-Asp-Asp-Asp



Asp-Asp-Asp

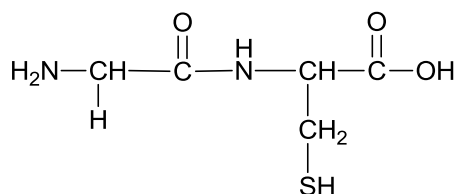


Asp-Glu

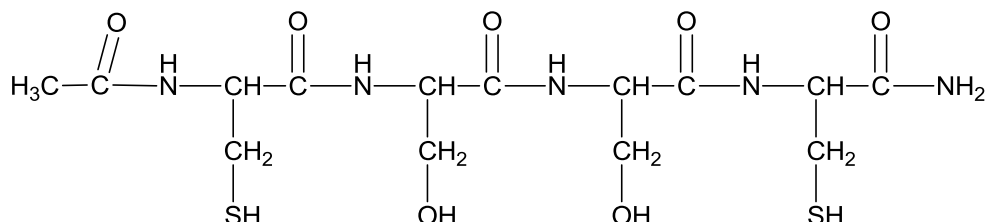


Glu-Glu

2. ábra: A felhasznált, oldalláncukban karboxilcsoportot tartalmazó peptidok



Gly-Cys

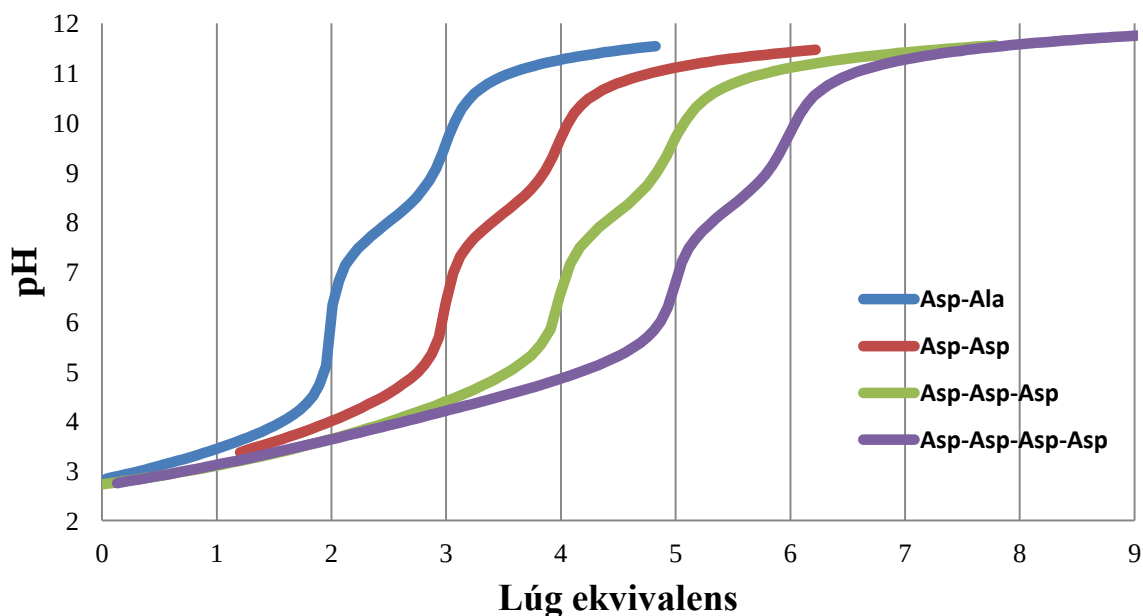


Ac-Cys-Ser-Ser-Cys-NH<sub>2</sub>

**3. ábra:** A felhasznált, oldalláncukban tiols csoportot tartalmazó peptidek

#### 4.2. Oldalláncukban karboxilcsoportot tartalmazó ligandumok sav-bázis tulajdonságai

A vizsgált aszparaginsav/glutaminsav tartalmú peptidek egy aminocsoportot és 2-5 karboxilcsoportot tartalmaznak. Azaz 3-6 deprotonálódási állandóval tudjuk jellemezni őket. A következő (4. ábra) az Asp-Ala, Asp-Asp, Asp<sub>3</sub> és Asp<sub>4</sub> peptidek titrálási görbéit egy ábrán tüntettem fel:



**4. ábra:** A mért pH a titrálás során adagolt ekvivalens lúg mennyiség térfogatának függvényében

A titrálási görbéken két pH ugrás látható: az első lépcsőben a karboxilcsoportok a második lépcsőben pedig az ammóniumcsoport deprotonálódása játszódik le. A titrálási görbék jól tükrözik, hogy minél több karboxilcsoportot tartalmaz egy molekula, annál több titráló oldat szükséges az első deprotonálódási szakaszhoz. Így rendre kettő, három, négy, illetve öt ekvivalens KOH-oldat hozzáadása után figyelhető meg a pH ugrás az egy, kettő, három, illetve négy aszparaginsavat tartalmazó peptideknél. Hasonló lefutású titrálási görbéket kaptunk a glutaminsavat tartalmazó peptidek esetében is.

Az általunk mért, illetve számolt deprotonálódási állandók (1. és 2. táblázat) közül a legnagyobbak az aminocsoportokhoz rendelhetők, míg a legkisebbek javarészt a peptidlánc végén található karboxilcsoportokhoz. A köztes értékek szinte minden esetben az oldalláncban levő karboxilcsoportoknak tulajdoníthatók. Azonban mivel a karboxilcsoportokhoz tartozó protonálódási egyensúlyok nagymértékben átfednek, ezért a deprotonálódási állandók ezen funkciócsoportokhoz való egyértelmű hozzárendelése nem lehetséges.

**1. táblázat:** Az aszparaginsavat tartalmazó peptidek deprotonálódási állandói  $T = 298\text{ K}$ ,  $I = 0,2\text{ mol/dm}^3$  ( $\text{KNO}_3$ )

|                                              | Asp-Ala    | Asp-Asp    | Asp <sub>3</sub> | Asp <sub>4</sub> | $\beta$ -Ala <sup>[20]</sup> |
|----------------------------------------------|------------|------------|------------------|------------------|------------------------------|
| $\lg\beta(\text{HA})$                        | 7,899 (9)  | 8,075 (8)  | 8,100 (1)        | 8,246 (8)        | 10,080                       |
| $\lg\beta(\text{H}_2\text{A})$               | 11,500 (2) | 12,410 (2) | 12,810 (2)       | 13,270 (2)       | 13,790                       |
| $\lg\beta(\text{H}_3\text{A})$               | 14,230 (2) | 15,680 (2) | 16,650 (3)       | 17,620 (2)       | -                            |
| $\lg\beta(\text{H}_4\text{A})$               | -          | 18,200 (1) | 19,660 (5)       | 21,410 (3)       | -                            |
| $\lg\beta(\text{H}_5\text{A})$               | -          | -          | 21,600 (1)       | 24,570 (3)       | -                            |
| $\lg\beta(\text{H}_6\text{A})$               | -          | -          | -                | 26,970 (6)       | -                            |
| $\text{p}K_1$                                | 2,730      | 2,520      | 1,940            | 2,400            | 3,710                        |
| $\text{p}K_2$                                | 3,601      | 3,270      | 3,010            | 3,160            | 10,080                       |
| $\text{p}K_3$                                | 7,899      | 4,335      | 3,840            | 3,790            | -                            |
| $\text{p}K_4$                                | -          | 8,075      | 4,710            | 4,350            | -                            |
| $\text{p}K_5$                                | -          | -          | 8,100            | 5,024            | -                            |
| $\text{p}K_6$                                | -          | -          | -                | 8,246            | -                            |
| $\text{p}K(\text{NH}_3^+)_{\text{ligandum}}$ | 7,899      | 8,075      | 8,100            | 8,246            | 10,080                       |

Az N-terminális helyzetben levő aszparaginsav az aminocsoport  $\text{p}K$  értékét kismértékben csökkenti. Ez a tendencia az irodalomban már jól ismert.<sup>[18]</sup>

**2. táblázat:** A glutaminsavat tartalmazó peptidek  $T = 298 \text{ K}$ ,  $I = 0,2 \text{ mol/dm}^3$  ( $\text{KNO}_3$ )

|                                                | Asp-Glu   | Glu-Glu   | Ala-Ala <sup>[17]</sup> |
|------------------------------------------------|-----------|-----------|-------------------------|
| $\lg\beta(\text{HA})$                          | 8,02 (1)  | 8,09 (1)  | 8,26                    |
| $\lg\beta(\text{H}_2\text{A})$                 | 12,45 (2) | 12,62 (2) | 11,34                   |
| $\lg\beta(\text{H}_3\text{A})$                 | 15,83 (3) | 16,35 (3) | -                       |
| $\lg\beta(\text{H}_4\text{A})$                 | 18,29 (5) | 18,76 (6) | -                       |
| $\text{p}K_1$                                  | 2,46      | 2,41      | 3,08                    |
| $\text{p}K_2$                                  | 3,38      | 3,73      | 8,26                    |
| $\text{p}K_3$                                  | 4,43      | 4,53      | -                       |
| $\text{p}K_4(\text{NH}_3^+)_{\text{ligandum}}$ | 8,02      | 8,09      | 8,26                    |

#### 4.3. Az aszparaginsavat/glutaminsavat tartalmazó peptidek kadmium(II)-ionokkal alkotott rendszereinek vizsgálatai

A fémiont is tartalmazó rendszerek titrálási görbéi a szabad ligandum titrálási görbétől eltérést mutattak, azaz a rendszerben történt komplexképződés. A különböző arányban fémiont és ligandumot tartalmazó rendszerek titrálási görbéiből számítógépes programmal különböző összetételű komplexeket tudunk leírni (3. táblázat). Mono- és biszkomplexek a különböző rendszerekben egyaránt keletkeztek. (A komplexek jelölésénél a töltések feltüntetésétől eltekintettem, mert azok értéke függ a ligandumok oldalláncbeli donoratomjainak minőségétől.)

**3. táblázat:** A peptidek kadmium(II)ionokkal képzett komplexeinek stabilitási állandói  $T = 298 \text{ K}$ ,  $I = 0,2 \text{ mol/dm}^3$  ( $\text{KNO}_3$ )

| $\lg\beta(\text{MA}_x\text{H}_y)$           | Asp-Ala   | Asp-Asp   | Asp <sub>3</sub> | Asp <sub>4</sub> | Asp-Glu   | Glu-Glu   | $\beta\text{-Ala}^{[20]}$ |
|---------------------------------------------|-----------|-----------|------------------|------------------|-----------|-----------|---------------------------|
| $\text{CdAH}_2$                             | -         | -         | -                | 15,74 (3)        | -         | -         | -                         |
| $\text{CdAH}$                               | -         | 9,61 (16) | 10,32 (2)        | 11,08 (2)        | 10,23 (5) | 10,58 (3) | -                         |
| $\text{CdA}$                                | 2,81 (9)  | 3,38 (2)  | 3,82 (4)         | 4,20 (3)         | 3,70 (3)  | 3,68 (3)  | 3,42                      |
| $\text{CdA}_2$                              | 5,24 (19) | -         | -                | -                | -         | -         | 6,06                      |
| $\text{CdAH}_{-1}$                          | -         | -5,87 (5) | -6,13 (2)        | -                | -5,30 (3) | -5,52 (8) | -6,69                     |
| $\text{CdA}_2\text{H}_{-1}$                 | -         | -         | -                | -                | -         | -         | -3,30                     |
| $\text{p}K(\text{NH}_3^+)_{\text{komplex}}$ | -         | 6,23      | 6,50             | 6,87             | 6,87      | 6,90      | -                         |
| $\text{p}K(\text{CdA}/\text{CdAH}_{-1})$    | -         | 9,25      | 9,95             | -                | 9,00      | 9,20      | 13,11                     |
| $\text{p}K(\text{CdAH}_2/\text{CdAH})$      | -         | -         | -                | 4,67             | -         | -         | -                         |

$$\text{p}K(\text{CdA}/\text{CdAH}_{-1}) = \lg\beta(\text{CdA}) - \lg\beta(\text{CdAH}_{-1})$$

$$\text{p}K(\text{NH}_3^+)_{\text{komplex}} = \lg\beta(\text{CdAH}) - \lg\beta(\text{CdA})$$

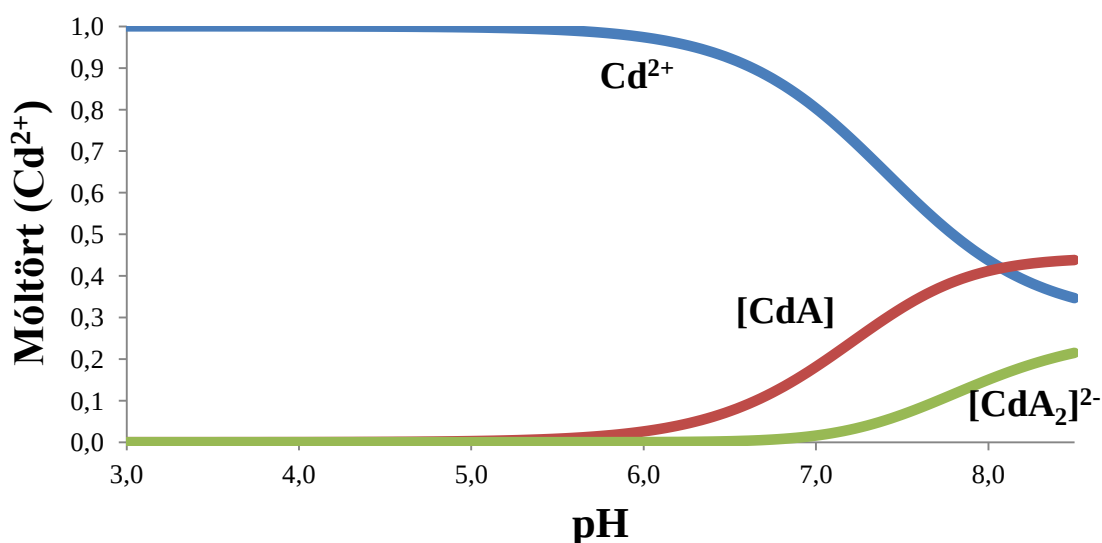
$$\text{p}K(\text{CdAH}_2/\text{CdAH}) = \lg\beta(\text{CdAH}_2) - \lg\beta(\text{CdAH})$$

A savas pH-tartományon, egy kivételtől eltekintve, mindegyik vizsgált ligandum esetén le tudunk írni egy  $[\text{CdAH}]$  összetételű protonált komplexet, amely komplexben az aminos csoport feltételezhetően protonált formában volt jelen. A fémion megkötése ebben az esetben valamely karboxilcsoport deprotonálódásával és koordinációjával kezdődik meg, és a kialakuló komplex több karboxilátcsoport részvételével jön létre. Az Asp-Ala esetén  $[\text{CdA}]$  és  $[\text{CdA}_2]^{2-}$  komplex összetételt tudunk számolni. A koordináció ebben az esetben feltételezhetően  $\beta$ -alanin szerű ( $\text{NH}_2$ ,  $\text{COO}^-$ ) koordináció, amely létrejött a terminális aszparaginsav jelenlétének köszönhető.

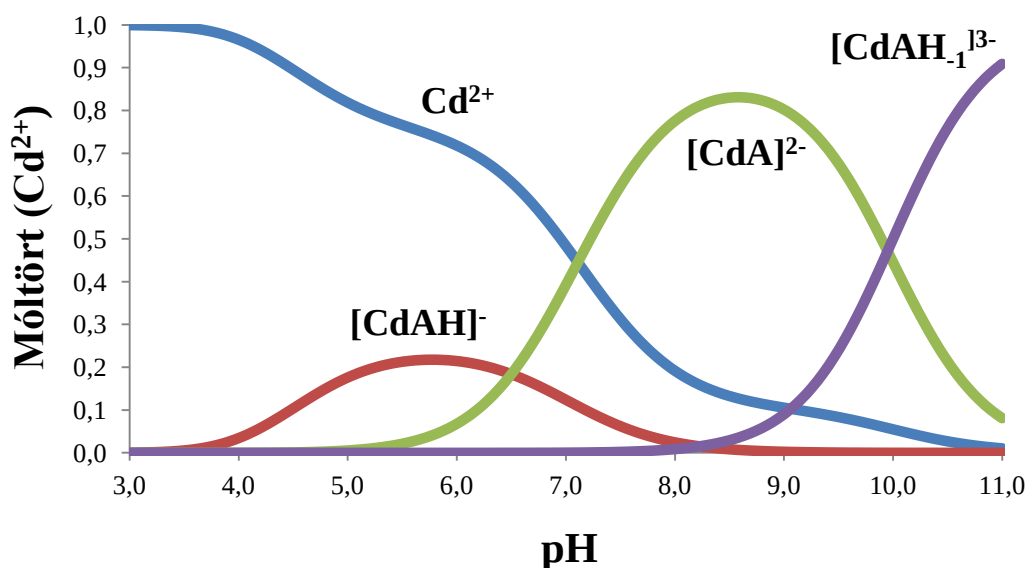
A  $[\text{CdAH}]$  komplex a pH emelésével deprotonálódik és  $[\text{CdA}]$  összetételű komplexszé alakul. E folyamat során az ammóniumcsoportról egy disszociálható proton hasad le, és az így kialakuló aminos csoport nagy valószínűséggel részt vesz a fémion megkötésében. Ezt támasztja alá az a tény is, hogy a 3. táblázatban számolt  $\text{pK}(\text{NH}_3^+)_{\text{komplex}}$  értéke kisebb, mint a csak szabad ligandumot tartalmazó rendszerek esetén a  $\text{pK}(\text{NH}_3^+)_{\text{ligandum}}$  értéke (1. táblázat).

Az Asp<sub>4</sub> tetrapeptid esetén egy  $[\text{CdAH}_2]$  összetételű komplex is megjelent, amelyben nem csak az ammóniumcsoport, de egy karboxilcsoport is protonált formában található meg. Az ebben az esetben képezhető  $\text{pK}(\text{CdAH}_2/\text{CdAH})$  (3. táblázat) érték jó egyezésben van a szabad tetrapeptid egy karboxilcsoportjának deprotonálódási állandójával ( $\text{pK}_5$ ) (1. táblázat).

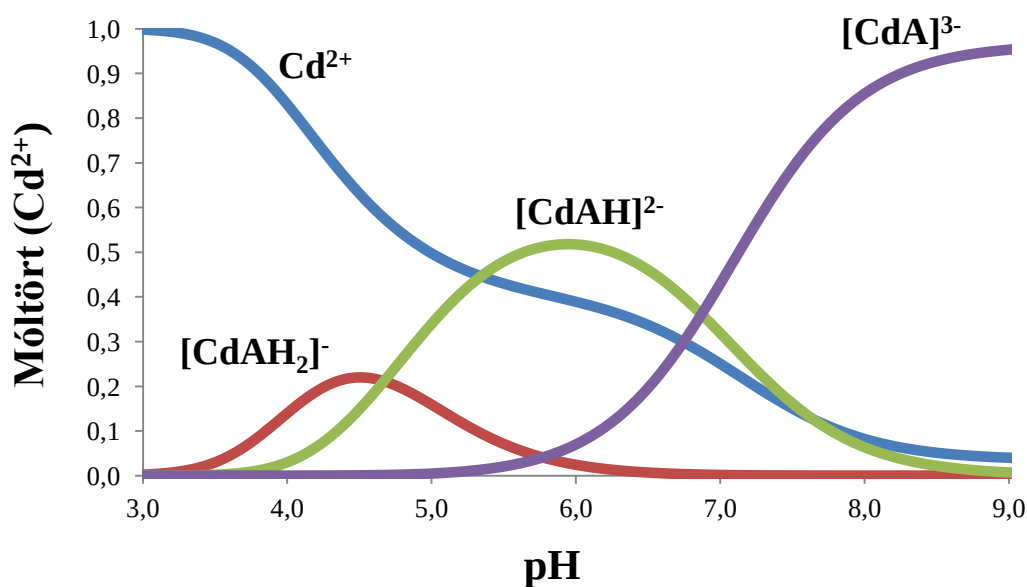
Az 5., 6., és 7. ábrákon az Asp-Ala, Asp<sub>3</sub> és Asp<sub>4</sub> ligandumok koncentráció eloszlásgörbéi láthatók.



**5. ábra:** Az Asp-Ala: Cd(II) 3:1 arányú rendszerében keletkező komplexek koncentráció eloszlása a pH függvényében, ahol  $c_L = 3,27 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$



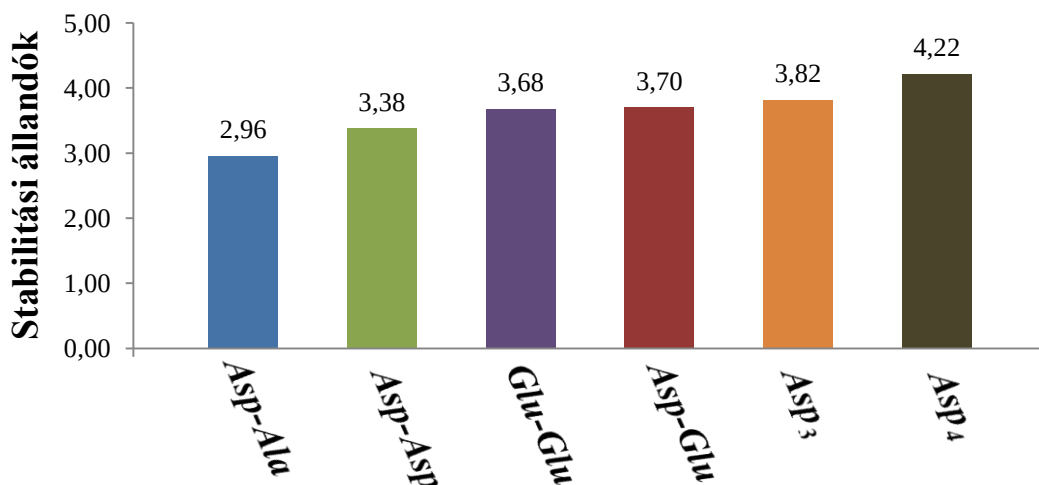
**6. ábra:** Az Asp<sub>3</sub>:Cd(II) 2:1 arányú rendszerében keletkező komplexek koncentráció eloszlása a pH függvényében, ahol  $c_L = 2,18 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$



**7. ábra:** Az Asp<sub>4</sub>: Cd(II) 2:1 arányú rendszerében keletkező komplexek koncentráció eloszlása a pH függvényében, ahol  $c_L = 3,03 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$

Nagyobb pH értékeken a titrálások során minden esetben - feltételezhetően  $\text{Cd}(\text{OH})_2$  - csapadék leválását tapasztaltuk. Azokat a pH-tartományokat, ahol a titrált minta csapadékos volt az ábrákon nem tüntettem fel. A keletkező komplexek koncentráció eloszlása a pH függvényében jól mutatja, hogy a komplexben nem kötött fémion mennyisége számottevő az egész titrálás során, ami a Cd(II)-ion és a vizsgált ligandumok között kialakult gyenge kölcsönhatás eredménye.

A keletkező komplexek stabilitási sorrendjét szemlélteti a 8. ábra, amelyen jól látható, hogy az  $\text{Asp-Ala} < \text{Asp}_2 < \text{Glu}_2 \sim \text{Asp-Glu} < \text{Asp}_3 < \text{Asp}_4$  irányban a kialakuló [CdA] komplexek stabilitása nő.



**8. ábra:** A kialakuló [CdA] komplexek stabilitása növekvő sorrendben

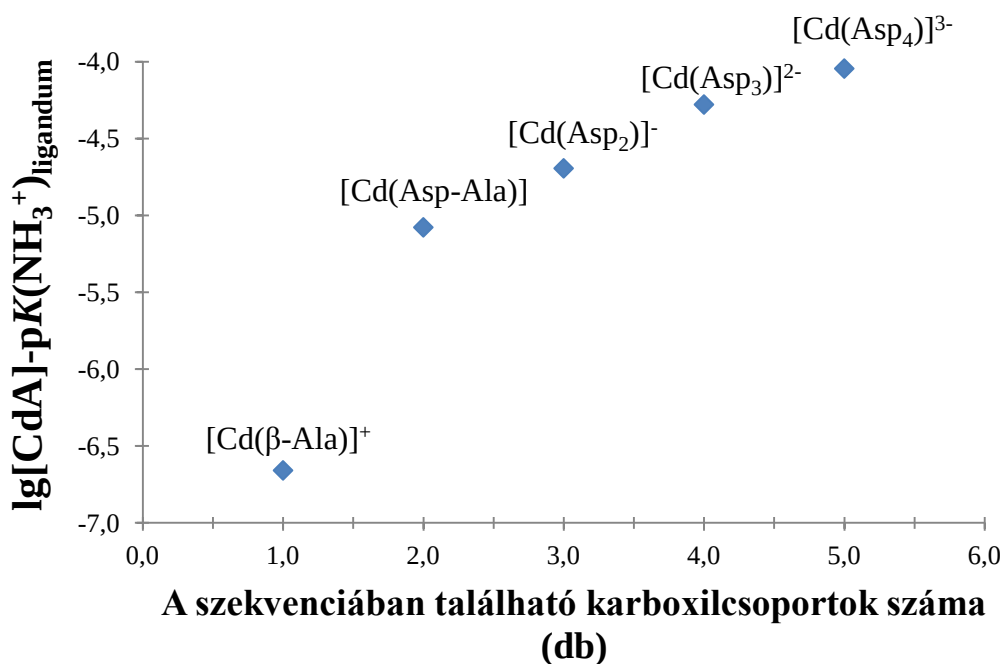
A karboxilátcsoportok számának növekedése a stabilitási állandó értékének növekedéséhez vezet, amely arra utal, hogy a karboxilátcsoportok - a vizet kiszorítva - bekerülnek a fémion koordinációs szférájába, és aktívan részt vesznek a [CdAH] és [CdAH<sub>2</sub>] komplexek kialakításában, azaz a fémion megkötésében.

A fent említett tendencia eltér attól, amelyet a réz(II)ion esetén tapasztaltak aszparaginsavat és/vagy glutaminsavat szekvenciájukban különböző számban tartalmazó peptidek esetén. Ott ugyanis a kialakuló karboxilátcsoportok számának növekedésével a komplexek stabilitása egy adott donorcsoport szám felett már csökkent, amelynek oka a növekvő számú negatív töltés destabilizáló hatása.<sup>[18]</sup>

Ha a keletkező [CdA] komplexek stabilitási állandóiból a szabad ligandumok  $pK(\text{NH}_3^+)_{\text{ligandum}}$  értékeit kivonjuk, és ezt ábrázoljuk a peptidek szekvenciájában található karboxilcsoportok számának függvényében, akkor a fentebb említett növekvő tendencia jól megfigyelhetővé válik (9. ábra). A 9. ábra alapján az is belátható, hogy a komplexek negatív töltésének növekedése nem gátolja a komplexképződést.

A 3. táblázatban a  $\beta$ -alaninra vonatkozó irodalmi értékeket  $0,5 \text{ mol/dm}^3$  ( $\text{NaClO}_4$ ) ionerősségű oldatban mérték. A  $\beta$ -alanin kadmium(II)komplexeinek stabilitásai alapján nem tudjuk sem alátámasztani, sem megcáfolni az  $(\text{NH}_2, \text{COO}^-)$  koordináció létrejöttét az Asp-Ala dipeptid esetén. A  $\lg\beta(\text{Cd}(\beta\text{-alanin})) > \lg\beta(\text{Cd}(\text{Asp-Ala}))$  (3. táblázat),

ugyanakkor a protonálódási állandóval korrigált érték a  $\beta$ -alanin kadmium(II)komplexére kisebb (9. ábra).

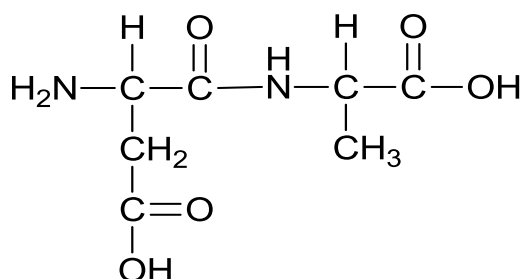


**9. ábra:** A vizsgált peptidek szekvenciájában található karboxilcsoportok számának függvényben a  $\lg[\text{CdA}]\text{-p}K(\text{NH}_3^+)\text{ligandum}$  értéke

A kialakult  $[\text{CdAH}_2]$  komplex feltételezhetően vegyes hidroxó komplex, amely úgy alakul ki, hogy a kadmium(II)ion koordinációs szférájában található víz molekula deprotonálódik a pH emelkedés hatására. Ez a komplex azonban nem elég stabil ahhoz, hogy a fémion hidrolízisét a lúgos tartományban megakadályozza.

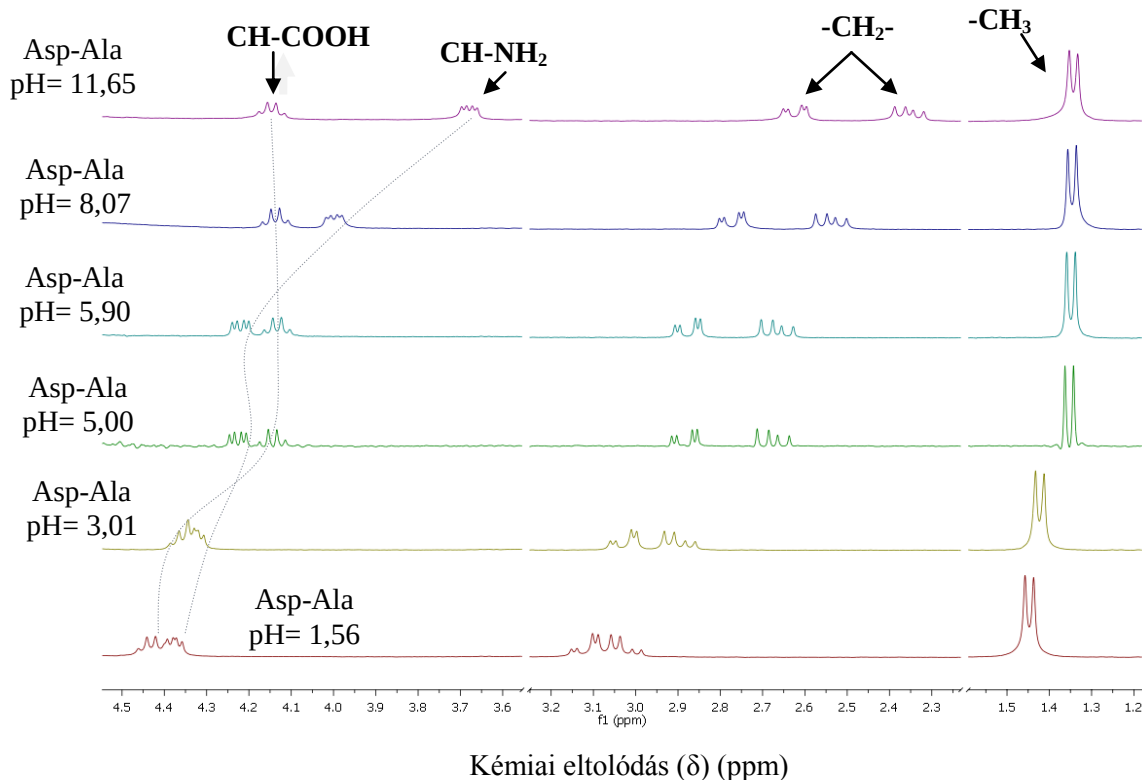
Az  $\text{Asp}_4$  ligandum esetén ilyen komplex képződését nem tudtuk kimutatni, ez szintén alátámasztja, hogy a karboxilcsoportok számának növekedésével több karboxilátcsoport koordinálódik a fémionhoz, kiszorítva ezzel a víz molekulát a  $\text{Cd(II)}$ -ion koordinációs szférájából. Ugyanakkor a csapadékképződés ebben az esetben is bekövetkezett.

A feltételezett koordinációk helyességéről  $^1\text{H}$  NMR spektroszkópiás vizsgálattal szeretnénk volna meggyőződni. A legegyszerűbb spektrumot adó Asp-Ala ligandum (10. ábra), illetve Asp-Ala: Cd(II) 3:1 arányú oldat vizsgálatát végeztük el.

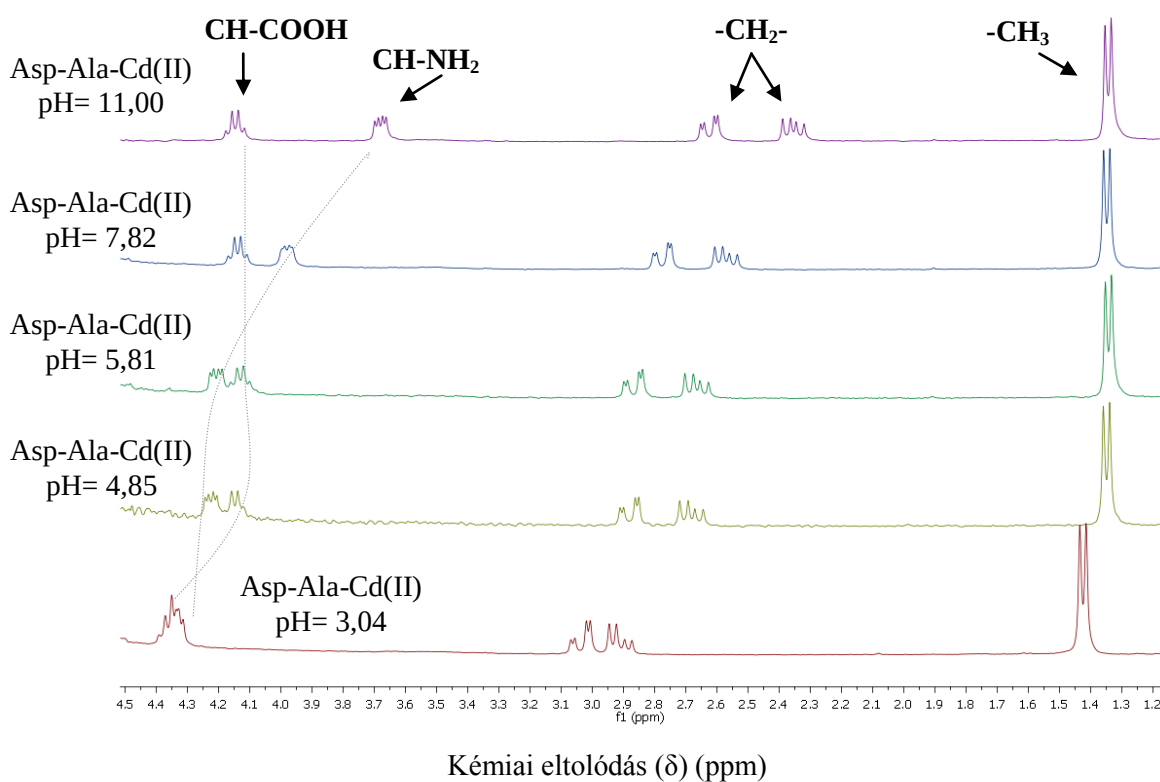


**10. ábra:** Az Asp-Ala ligandum konstitúciós képlete

A pH változtatásával a következő eredményekre jutottunk (11. és 12. ábra):



11. ábra: Az Asp-Ala dipeptid  $^1\text{H}$  NMR spektruma  $c_L=0,01 \text{ mol/dm}^3$

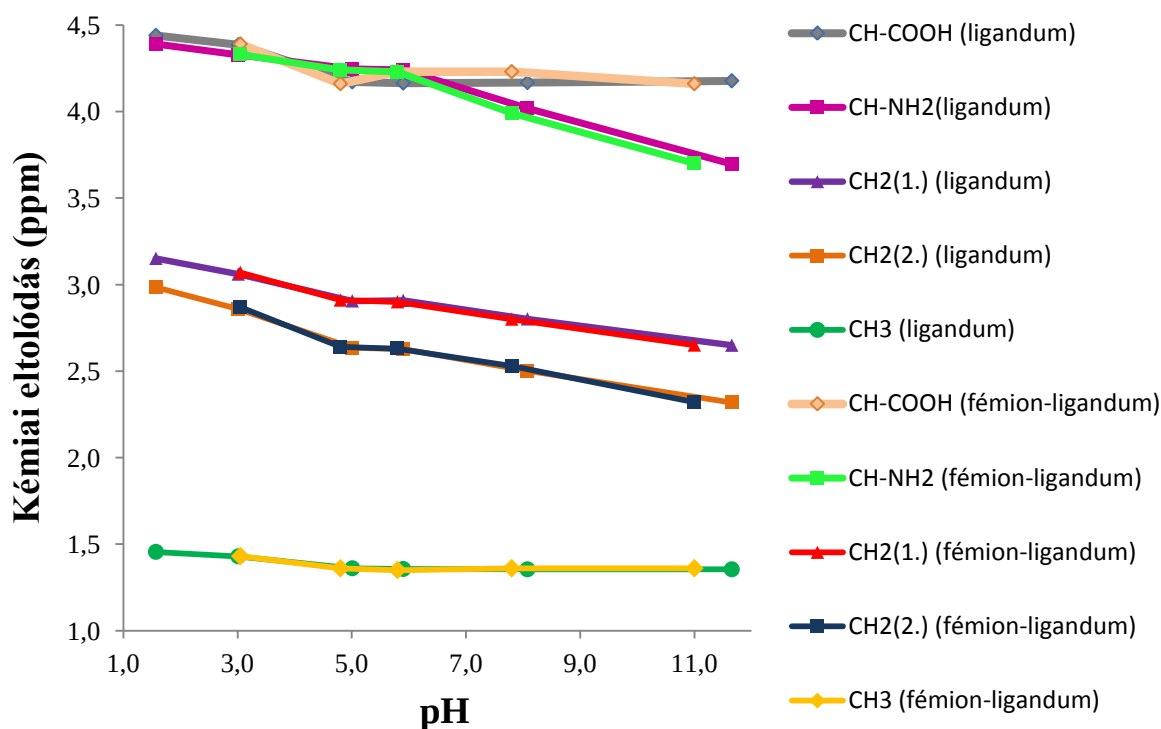


12. ábra: Az Asp-Ala: Cd(II) 3:1 arányú mintájának  $^1\text{H}$  NMR spektruma

$c_L = 0,01 \text{ mol/dm}^3$

A terminális karboxilcsoport deprotonálódása a metilcsoport és a molekulában mellette elhelyezkedő -CH csoport protonjaira van hatással. A peptid lánc végén lévő aminocsoport deprotonálódása pedig a mellette lévő -CH csoport protonjaira fejt ki hatást.

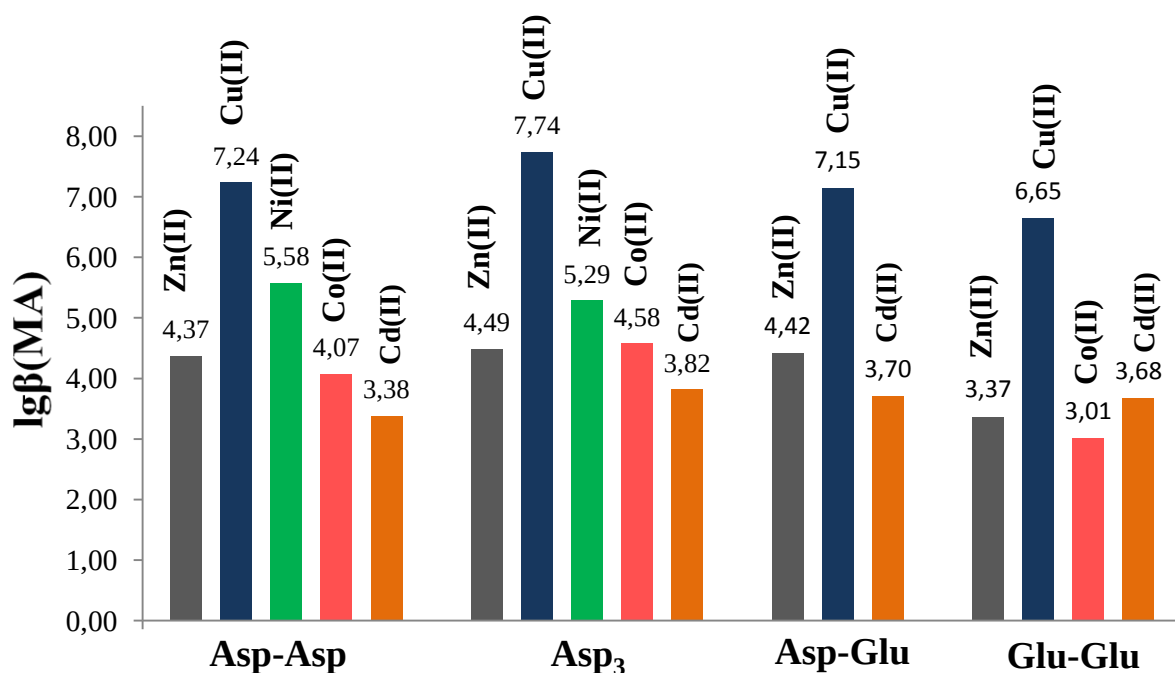
A szabad ligandum és a Cd(II)-iont is tartalmazó minták esetén mért kémiai eltolódásokat a pH függvényében ábrázolva (13. ábra) arra a következtetésre jutottunk, hogy a jelek gyakorlatilag azonos kémiai eltolódással jelennek meg a spektrumban abban az esetben is, amikor a mért minta kadmium(II)ionokat ugyancsak tartalmaz.



**13. ábra:** A peptidet, illetve a peptidet és a fémiont tartalmazó rendszerek kémiai eltolódása a beállított pH függvényében

Mivel a meglévő körülmények között a komplexképződést  $^1\text{H}$  NMR spektroszkópiával nem tudtuk követni, ezért vizsgálatainkat ezzel a módszerrel nem folytattuk tovább.

A Zn(II)-ionok, illetve a Co(II)-ionok szintén nem képesek az amidnitrogén deprotonálására, így komplexeik koordinációs viszonyai hasonlóak a Cd(II)-ionéhoz.<sup>[21]</sup> A 14. ábrán az általunk mért, és számolt néhány [CdA] komplex stabilitási állandójának összevetése látható más fémionok Asp-Asp, Asp<sub>3</sub>, Asp-Glu és Glu-Glu [MA] komplexeinek stabilitási állandóival.



**14. ábra:** Az Asp-Asp, Asp<sub>3</sub>, Asp-Glu és Glu-Glu ligandumok [MA] komplexeinek stabilitási állandói a Zn(II)<sup>[21]</sup>,- Co(II)<sup>[21]</sup>,- Ni(II)<sup>[18]</sup>,- Cu(II)<sup>[18]</sup>- és Cd(II)-ionokkal alkotott rendszerekben

A hasonló komplexképződési folyamatokon túl a cink(II)ion már képes biszkomplexek kialakítására is, illetve a kialakuló komplexek stabilitása nagyobb, mint a kadmium(II)ionok részvételekor. A koordinációs mód a [ZnAH] komplexekben is a karboxilátszoportok részvételével történik, és a kialakuló [ZnA] komplexben a már előzőleg deprotonálódó aminocsoport szintén részt vesz.

Ha egyéb más fémionokat is tekintünk akkor a kialakuló [MA] komplexek stabilitása alapján azt mondhatjuk, hogy a kialakított Lewis sav-bázis kölcsönhatások a peptidekkel a következő sorrendben csökkenek: Cu(II) > Ni(II) > Zn(II) ~ Co(II) > Cd(II). Azonban ennél az összehasonlításnál figyelembe kell venni, a Cu(II)- és Ni(II)ionok azon tulajdonságát, hogy az amidnitrogén deprotonálódását a mérhető pH-tartományon képesek indukálni.<sup>[10]</sup>

#### 4.4. Az oldalláncukban tiolsoprotot tartalmazó peptidek sav-bázis tulajdonságai

Ezen két vizsgált peptid közül csak a kereskedelmi forgalomban kapható glicil-cisztein dipeptid állandóit fogom bemutatni, míg a szennyezett, ezért kétkomponensű szintetizált peptidét nem.

A glicil-cisztein egy olyan ligandum, amely három deprotonálódásra képes csoportot tartalmaz. Ez a terminális amino- és karboxilcsoportok, illetve az oldalláncban található tiolcsoport.

**4. táblázat:** A glicil-cisztein és más dipeptidek deprotonálódási állandói  $T = 298\text{ K}$ ,  $I = 0,2\text{ mol/dm}^3$  ( $\text{KNO}_3$ )

|                                 | Gly-Cys   | Ala-Cys <sup>[19]</sup> | Cys-Gly <sup>[19]</sup> | Gly-Gly <sup>[8]</sup> | Gly-His <sup>[8]</sup> |
|---------------------------------|-----------|-------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|
| $\log\beta(\text{HA})$          | 9,38 (1)  | 9,53                    | 9,23                    | 8,08                   | 8,49                   |
| $\log\beta(\text{H}_2\text{A})$ | 17,32 (2) | 17,49                   | 16,12                   | 11,11                  | 15,37                  |
| $\log\beta(\text{H}_3\text{A})$ | 20,07 (3) | 20,37                   | 19,29                   | -                      | 17,87                  |
| $pK(\text{COOH})$               | 2,75      | 2,88                    | 3,17                    | 3,03                   | 2,5                    |
| $pK(\text{NH}_3^+)$             | 7,94      | 7,96                    | 6,89                    | 8,08                   | 6,88                   |
| $pK(\text{SH})$                 | 9,38      | 9,53                    | 9,23                    | -                      | 8,44                   |

A legkisebb  $pK$  érték a lánc végén található karboxilcsoporthoz rendelhető (4. táblázat). Ez valamivel kisebb a Cys-Gly, illetve a Gly-Gly dipeptidekre jellemző értéknél. Ebből arra következtethetünk, hogy az oldalláncban lévő tiolcsoport elősegíti a karboxilcsoport deprotonálódását hasonlóan, mint az Ala-Cys esetén. Azonban ez a hatás nem olyan jelentős, mint azon peptideknél, ahol az oldalláncban imidazol gyűrű található: a Gly-His dipeptid és az általam mért ligandum  $pK(\text{COOH})$  értékének különbsége nagyobb, mint a glicil-cisztein és az alanil-cisztein  $pK(\text{COOH})$  értékének különbsége.

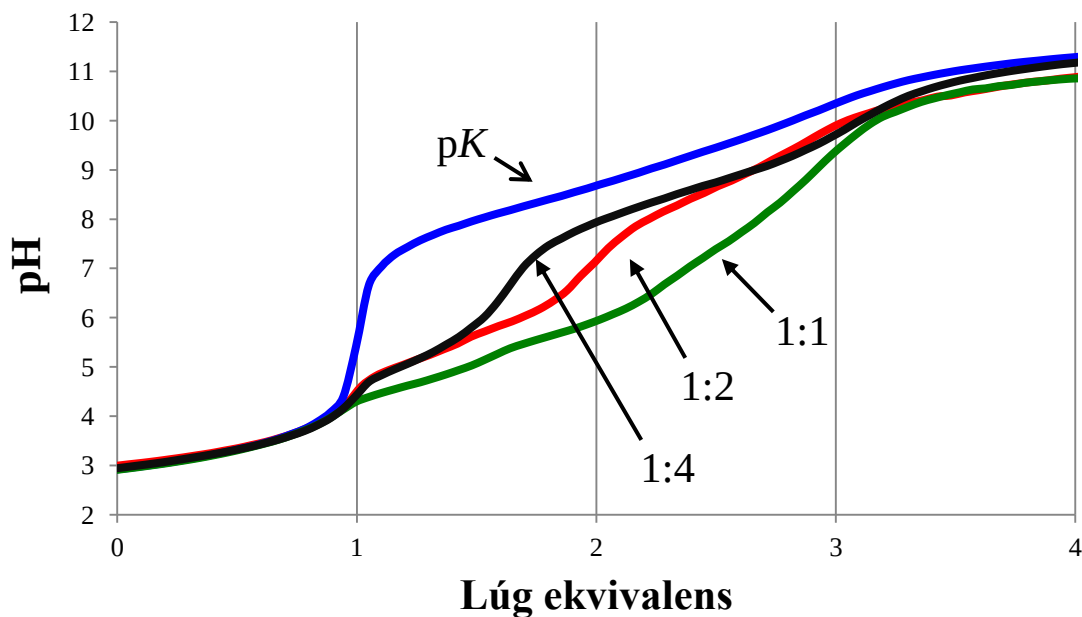
Az aminocsoport deprotonálódási folyamatához megközelítőleg a második  $pK$  érték rendelhető hozzá, amely jó egyezésben van az Ala-Cys peptid esetén kapott értékkel, és valamivel kisebb, mint a Gly-Gly esetén. Azaz az alaninban található metilcsoport nincs jelentős hatással a deprotonálódási folyamatokra. A tiolcsoport ezzel szemben nagyban befolyása ezt a folyamatot, főképp akkor, ha a cisztein aminosav N-terminális pozícióban található az illető peptid szekvenciájában.

A tiolcsoport deprotonálódási állandójának értéke a Cys-Gly < Gly-Cys < Ala-Cys sorrendben nő. Tehát a deprotonálódás könnyebben megy végbe egy olyan dipeptid esetén, ahol a tiolcsoportot is tartalmazó aminosav az N-terminális pozícióban helyezkedik el.

## 4.5. A vizsgált cisztein aminosavat tartalmazó peptidek Cd(II)komplexei

### 4.5.1. Glicil-cisztein Cd(II)komplexei

A szabad ligandum, illetve a ligandumot és a fémiont különböző mennyiségben tartalmazó rendszerek titrálási görbéi a 15. ábrán láthatók.



**15. ábra:** A glicil-cisztein és a glicil-cisztein: Cd(II)-ionokat különböző arányban tartalmazó rendszerek titrálási görbéi  $c_L = 3,20 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ ,  $2,41 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$

A fémiont is tartalmazó rendszerekben nagy pH effektus jelentkezett, azaz számottevő volt a komplexképződés a mérések során. A titrálások során több esetben csapadék megjelenését tapasztaltam: 5,5 pH érték körül vált le a csapadék, ami 1:2 aránynál 10,3 pH érték körül, 1:4 aránynál 7,5 pH érték körül feloldódott, míg 1:1 aránynál a csapadék a titrálás végéig megmaradt. A számítógépes programmal történő kiértékelés során nem vettük figyelembe azokat a pH-tartományokat, ahol a titrált minta csapadékos volt.

Mono- és biszkomplexek keletkezését egyaránt tapasztaltuk, hasonlóan az Ala-Cys dipeptid Cd(II)-ionnal alkotott rendszeréhez (5. táblázat). Ez utóbbi dipeptidet, mint modell molekulát tekintve, úgy gondoljuk, hogy a glicil-cisztein kétfogú ligandumként viselkedik a kadmium(II)ion jelenlétében. A koordináció valószínűleg a kisebb pH értékeken már kialakuló karboxilátcsoport részvételével kezdődik el (horgonycsoport). Két protonált komplex alakul ki - a  $[\text{CdAH}]^+$  és  $[\text{CdA}_2\text{H}_2]^-$ , amelyek felépítésében az ammóniumcsoport nem vesz részt. Az 5. táblázat képzett álladójának ( $\text{pK}(\text{CdA}_2\text{H}_2/\text{CdA}_2)_{\text{átlag}}$ ) értéke valamivel kisebb, mint a szabad ligandum esetén

számolt  $pK(NH_3^+)$  érték, azonban ez a különbség annyira kicsi, hogy a kialakuló aminocsoport feltételezhetően nem vesz részt a fémion megkötésében a deprotonálódás lejátszódása után. Ebben a rendszerben is feltételezhető  $[CdAH_1]^{3-}$  összetételű komplex képződése, amely egy hidroxó komplex, de stabilitása nem elég nagy ahhoz, hogy a fémion hidrolízisét megakadályozza.

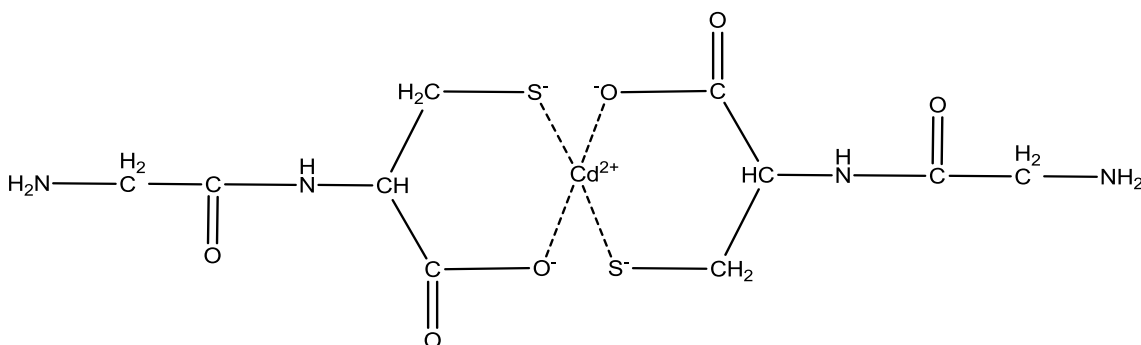
**5. táblázat:** A keletkezett komplexek stabilitási állandói, más dipeptidek állandóival együtt  $T = 298\text{ K}$ ,  $I = 0,2\text{ mol/dm}^3$  ( $KNO_3$ )

| $\lg\beta(MA_xH_y)$                 | Gly-Cys    | Ala-Cys <sup>[19]</sup> | Cys-Gly <sup>[19]</sup> | Gly-Gly <sup>[8]</sup> | Gly-His <sup>[8]</sup> |
|-------------------------------------|------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|
| $CdA_2H_2$                          | 29,66 (5)  | 30,28                   | -                       | -                      | -                      |
| $CdA_2H$                            | -          | 22,40                   | -                       | -                      | -                      |
| $CdAH$                              | 14,23 (17) | 15,30                   | -                       | -                      | 11,05                  |
| $CdA_2$                             | 14,49 (9)  | 13,71                   | 17,36                   | 4,86                   | 5,44                   |
| $CdA$                               | -          | -                       | 9,84                    | 2,89                   | 3,69                   |
| $CdAH_{-1}$                         | -          | -                       | -                       | -                      | -                      |
| $CdA_2H_{-1}$                       | 5,51 (11)  | 2,88                    | -                       | -                      | -                      |
| $pK(CdA_2H_2/CdA_2)_{\text{átlag}}$ | 7,59       | 8,29                    | -                       | -                      | -                      |
| $pK(CdA_2/CdA_2H_{-1})$             | 8,98       | 10,83                   | -                       | -                      | -                      |

$$pK(CdA_2H_2/CdA_2)_{\text{átlag}} = [\log\beta(CdA_2H_2) - \log\beta(CdA_2)]/2$$

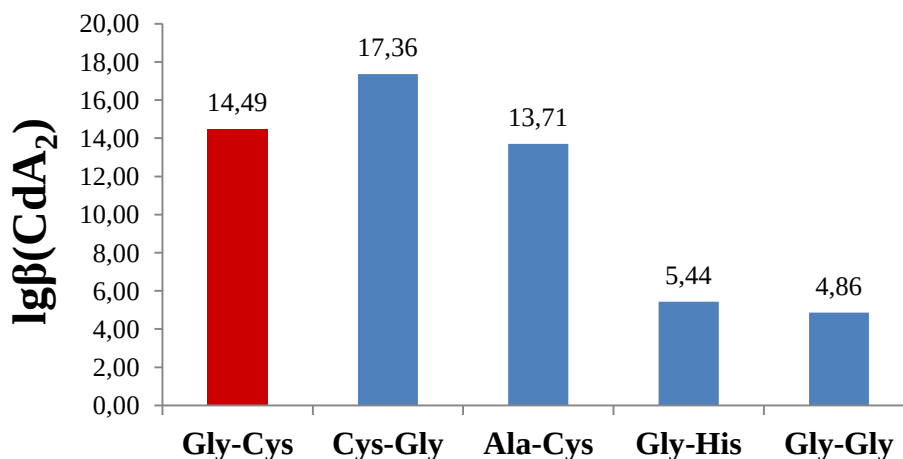
$$pK(CdA_2/CdA_2H_{-1}) = \log\beta(CdA_2) - \log\beta(CdAH_{-1})$$

A kialakult  $[CdA_2]^{2-}$  komplexben a ligandum kétfogú kötődése révén (S,O) koordináció alakul ki, a molekulában létrejövő karboxilát,- és tiolátcsoportok részvételével (16. ábra).



**16. ábra:** A kialakuló  $[CdA_2]^{2-}$  komplex konstitúciós képlete

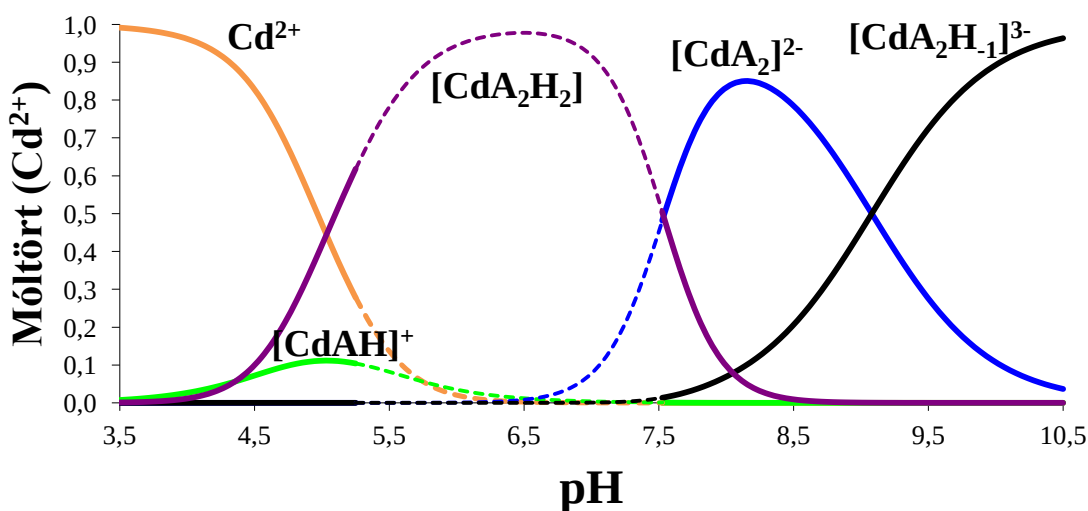
Ez a koordináció egy stabilis komplexet eredményez, amelyet jól tükröz a 17. ábrán látható oszlopdiagram, melyen a kadmium(II)ion más dipeptidekkel képzett rendszereiben kialakuló  $[\text{CdA}_2]$  összetételű komplexeinek stabilitási állandóit tüntettem fel.



**17. ábra:** Kadmium(II)ion különböző dipeptidekkel alkotott rendszereiben megjelenő  $[\text{CdA}_2]$  komplexek stabilitási állandóinak értéke

A  $[\text{Cd}(\text{Gly-Cys})_2]$  komplex stabilitása nagyobb, mint az Aly-Cys, Gly-His és Gly-Gly dipeptidek kadmium(II)ionnal alkotott komplexeinek stabilitása. Ettől nagyobb stabilitást csak akkor tapasztalhatunk, amikor N-terminális cisztein van a molekulában, ahol az amino- és tiolátcsoportok vesznek részt a fémion megkötésében.

A 18. ábrán a kadmium(II):Gly-Cys 1:4 arányú rendszerének eloszlását tüntettem fel, amelyen a titrálásnak azt a szakaszát, ahol csapadék volt jelen szaggatott vonallal jelöltem.

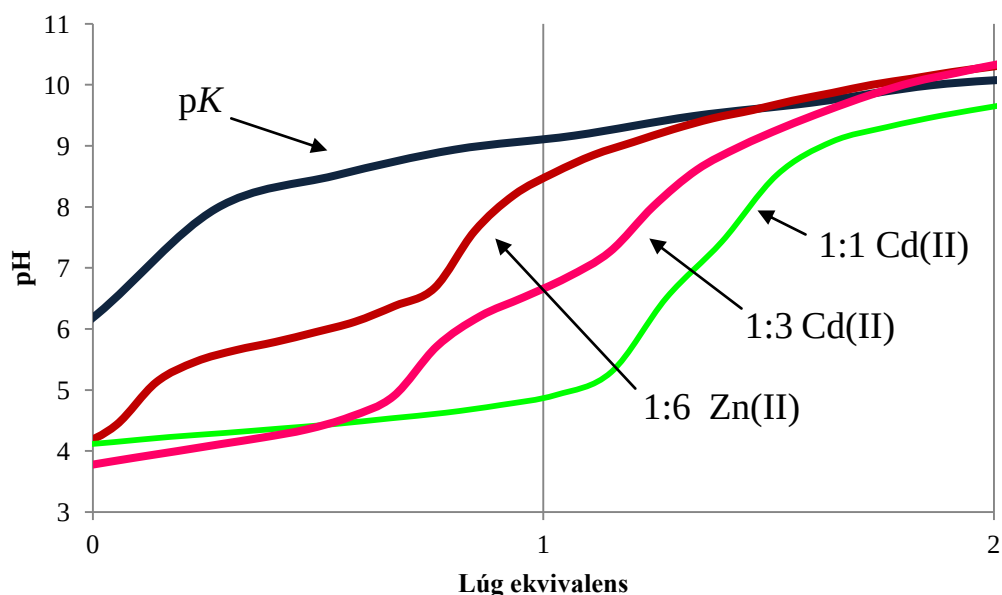


**18. ábra:** Az Gly-Cys: Cd(II) 4:1 arányú rendszerében keletkező komplexek koncentráció eloszlása a pH függvényében, ahol  $c_L = 3,203 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$

A  $[\text{CdA}_2\text{H}_2]$  komplex egy semleges töltésű komplex. Ezen tulajdonsága eredményezhette, hogy ilyen összetétel mellett csapadék formájában leváljon a titrált mintákban. Ez a feltételezés helytállónak tűnik, mivel a nagyobb arányban ligandumot tartalmazó rendszerek esetén a keletkezett csapadék feloldódott. Ez annak a következménye, hogy a protonált komplexben a két ammóniumcsoport deprotonálódásával ionos komplex jön létre, amely már vízoldható ( $[\text{CdA}_2]^{2-}$ ).

#### 4.5.2. Az Ac-Cys-Ser-Ser-Cys-NH<sub>2</sub> kadmium(II)komplexei

A két komponensű nyers peptid titrálási görbéi és a különböző mennyiségben fémiont és ligandumot tartalmazó rendszerek titrálási görbéit a 19. ábrán tüntettem fel.



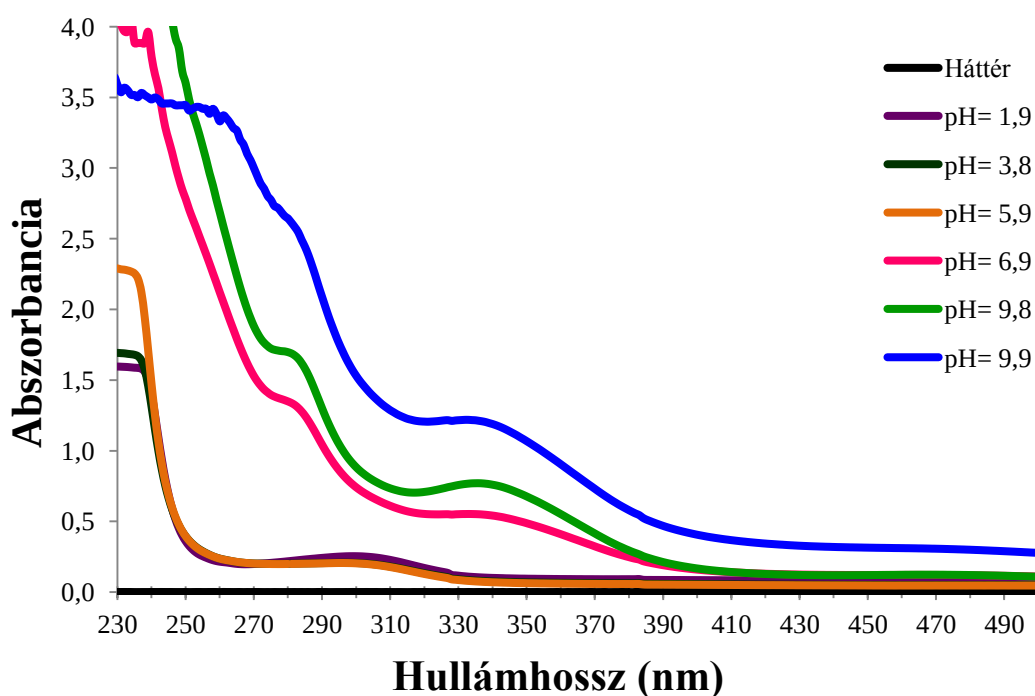
**19. ábra:** Az Ac-Cys-Ser-Ser-Cys-NH<sub>2</sub> ligandum, illetve kadmium(II)ion: Ac-Cys-Ser-Ser-Cys-NH<sub>2</sub> 1:1, 1:3 arányú rendszerének, valamint zink(II)ion: Ac-Cys-Ser-Ser-Cys-NH<sub>2</sub> 1:6 arányú rendszerének titrálási görbéi (becsült koncentrációk)

A lúg ekvivalens számolásához azt a feltételezést tettük meg, hogy a ligandum vagy kétfogú koordinációval képes megkötni a fémiont vagy a szekvenciában lévő tercbutilcsoport miatt egyáltalán nem képes a fémion megkötésére. A titrálások során egyik esetben sem vált le csapadék, a fémiont a ligandum a teljes pH tartományon oldatban tudta tartani. A lúg fogyások alapján 1:2 összetételű komplexek keletkezését valószínűsítjük. A görbék elhelyezkedése alapján elmondható, hogy a kadmium(II)ionnal kialakult kölcsönhatás nagyobb, mint a cink(II)ion esetén.

#### 4.6. A Gly-Cys kadmium(II) rendszerben kialakult $[\text{CdA}_2\text{H}_2]$ komplex vizsgálata

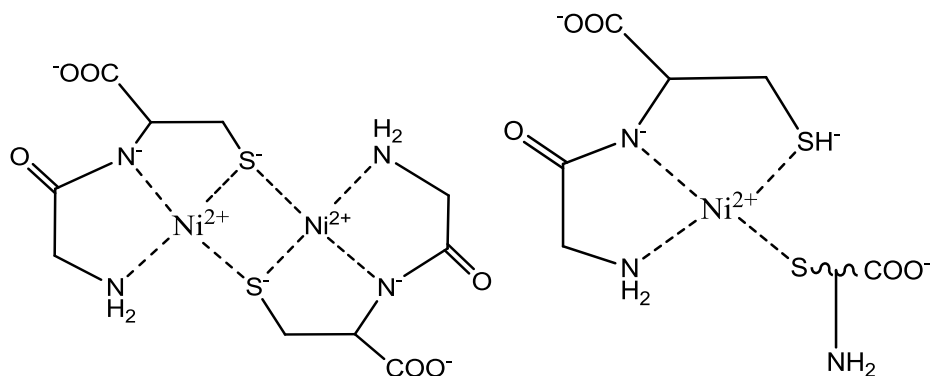
A titrálásokhoz használt törzsoldatból Gly-Cys: Cd(II) 1:2 arányú oldatot készítettem. Ehhez annyi lúgot adagoltam, hogy a pH  $\sim 7,40$  legyen. Az így keletkező feltételezhetően  $[\text{CdA}_2\text{H}_2]$  szilárd csapadékot egy előzőleg lemerített tömegű szűrőpapíron leszűrtem, és vízzel mostam. A nedves szűrőpapírt egy exsikkátorba helyeztem, amelyben a csapadékot tömegállandóságig szárítottam és lemértem. A száraz papírról egy  $\sim 0,2 \text{ mol/dm}^3$  koncentrációjú salétromsav-oldat segítségével egy  $10,0 \text{ cm}^3$  térfogatú mérőlombikba mostam a szilárd komplexet, ezzel  $10,0 \text{ cm}^3$  törzsoldatot készítve belőle.

Az így kapott minta  $2 \text{ cm}^3$  térfogatához  $0,1 \text{ cm}^3$  Ni(II)-oldatot adtam, és azonnal felvettem a minta UV látható spektrumát 250-900 nm között különböző pH értéken (20. ábra).



20. ábra: A glicil-ciszteint és nikkell(II)ionokat tartalmazó oldat UV-látható spektruma

A hozzáadott Ni(II)-ionok mennyisége annyi volt, hogy a számolt ligandum mennyiségnek a fele legyen. A mérés során, a nikkell(II)ionok Gly-Cys dipeptiddel alkotott komplexeinek vörös színe szabad szemmel is látható volt  $\sim 7$  pH értéktől. A létrejövő komplexek összetétele kétféle lehet:  $[\text{Ni}_2\text{A}_2\text{H}_2]^{2-}$  valamint  $[\text{NiA}_2\text{H}_1]^{2-}$ <sup>[22]</sup>. Ezek összetétele a 21. ábrán látható. A nikkell(II)komplex mellett megjelent csapadékot szűrővel eltávolítottam az oldatból.



**21. ábra:** A kialakuló  $[\text{Ni}_2\text{A}_2\text{H}_2]^{2-}$  valamint  $[\text{NiA}_2\text{H}_1]^{2-}$  komplexek konstitúciós képlete<sup>[22]</sup>

A kialakult komplex(ek) azonosítását az irodalomban a Ni(II)-Gly-Cys komplexekre közölt abszorpciós maximumok alapján végeztem (6. táblázat)<sup>[22]</sup>.

| Komplex                                                    | Átmenet                              | $\lambda_{\text{max}}$ (nm) |            |
|------------------------------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------|------------|
|                                                            |                                      | Irodalmi érték              | Mért érték |
| $\text{Ni}_2\text{A}_2\text{H}_2 / \text{NiA}_2\text{H}_1$ | $S_{\pi x} \rightarrow \text{Ni}$    | 335                         | <b>338</b> |
|                                                            | $S_{\sigma y} \rightarrow \text{Ni}$ | 280                         | <b>275</b> |

**6. táblázat:** Az irodalomban rögzített, illetve az általam mért abszorpciós maximumokhoz ( $\lambda_{\text{max}}$ ) tartozó hullámhossz értékek

Az értékek közel azonosak egymással, így biztos, hogy a vizsgált minta glicil-cisztein ligandumot tartalmazott, és a tirálások során minden bizonnyal nem egy hidroxokomplex, hanem egy kétszeresen protonált komplex vált le csapadék formájában.

A savas mosás után kapott minta maradék részének koncentrációját atomabszorpciós spektrometriával (FAAS) határoztuk meg. Ezen mérés alapján a savas oldat koncentrációja kadmiumra nézve 80,97 mg/L. Annak a szűrőpapírnak, amelyet a szűréshez használtam a tömege a szűrés előtt 0,54439 g volt. A savas mosás után szárazra szárítva a papír tömege 0,54679 g lett. Azaz a teljes csapadék tömege  $2,4000 \cdot 10^{-3}$  g. A lemért koncentráció alapján az oldatban  $8,0970 \cdot 10^{-4}$  g kadmium(II)ion van. Ezek alapján kiszámítható a csapadékban a Cd(II)-ligandum anyagmennyiség aránya Ez az arány 1:1,2.

Ez az arány nem felel meg a  $[\text{CdA}_2\text{H}_2]$  komplexben található 2:1 aránynak, azonban több mint 1:1, így ez nem jelenti, hogy az előző komplex feltételezett összetétele hibás.

A kisebb arány abból fakadhat, hogy a tömegmérés bizonytalansága nagy volt, a kis bemért tömegeknek köszönhetően.

## 5. Összefoglalás

A kadmium a periódusos rendszer II.b mellékcsoportjában, a d-mező elemei között található átmeneti fém, amelyet először 1817-ben ismertek fel. Elterjedt a fém ipari használata, amellyel kibocsátása a környezetbe óhatatlanul megnőtt. Ezzel a folyamattal párhuzamosan az emberei és állati táplálkozási láncban is megjelent, azonban nem, mint nyomelem, hanem mint mérgező anyag. Az evolúció során a kadmium nem épült be az emberi anyagcsere-folyamatokba, így szervezeten belüli transzportfolyamatokkal nem rendelkezik. Képes a szervezetben található különböző bioligandumokkal erős kölcsönhatást kialakítani, amely a szervezeten belüli biológiai felezési ideje akár a tíz évre is képes megnövelni.

Ezen ligandumok gyakran ciszteint vagy aszparaginsavat/glutaminsavat tartalmaznak szekvenciájukban, így **célunk** volt olyan különböző tagszámú peptidek kadmium(II)ionokkal kialakított kölcsönhatásának vizsgálata, amelyek tartalmazzák ezeket az aminosavakat. Szerettük volna felderíteni a kialakuló kadmium(II)komplekek szerkezetén keresztül a koordinációs viszonyokat, illetve a terminálisan védett tetrapeptid esetében elsődleges cél volt a szintézis megvalósítása, az optimális feltételek megtalálása. Majd ezt követően terveztük a fémkötő képesség vizsgálatát.

Az aszparaginsavat/glutaminsavat tartalmazó peptidek esetén pH-potenciometriás és  $^1\text{H}$  NMR spektroszkópiás vizsgálatokat végeztem. Ezek eredményei rámutattak arra, hogy a kialakuló kölcsönhatás a  $\text{Cd(II)}$ -ion és a dipeptid ligandumok között kicsi, és az amidnitrogén atomok deprotonálódása sem indukálódik a fémion jelenlétében. A kölcsönhatás erőssége a vizsgált ligandumok  $[\text{CdA}]$  komplexei esetén az  $\text{Asp-Ala} < \text{Asp}_2 < \text{Glu}_2 \sim \text{Asp-Glu} < \text{Asp}_3 < \text{Asp}_4$  irányban nő. Azaz a karboxilcsoportok számának növekedése a fémion koordinációs szférájában növeli a kialakuló komplexek stabilitását. Általában  $[\text{CdAH}]$  komplex kialakul, amelyben az aminos csoport protonált formában van jelen. A pH emelésével azonban ez a csoport deprotonálódik, és részt vesz a koordinációban. A pH további emelésével  $[\text{CdAH}_1]$  komplex megjelenésére is van lehetőség, amely egy vegyes hidroxó komplex, és egy vízmolekula deprotonálódásával jöhet létre. A titrálások során minden esetben levált egy fehér színű csapadék, amely valószínűleg  $\text{Cd(OH)}_2$  volt. A kadmium(II)ion koordinációs viszonyait más fémionokkal összehasonlítva elmondható, hogy a ligandumok kedvezőbb koordinációs viszonyokat biztosítanak a  $\text{Zn(II)}$ -ionok számára, ugyanis képesek

stabilabb komplexek, illetve akár biszkomplexek kialakítására is. Ha olyan fémekkel is összehasonlítjuk, amelyek képesek az amidnitrogén deprotonálására akkor a kialakított Lewis sav-bázis kölcsönhatások a peptidekkel a következő sorrendben csökkenek:  $\text{Cu(II)} > \text{Ni(II)} > \text{Zn(II)} \sim \text{Co(II)} > \text{Cd(II)}$ .

A ciszteint tartalmazó peptidek közül a kereskedelmi forgalomban nem kapható Ac-Cys-Ser-Ser-Cys-NH<sub>2</sub> egy olyan anyag volt, amely körülbelül ~20%-ban tartalmazott olyan molekulákat, amelyek szekvenciájában még megtalálható volt az a tercbutilcsoport, amely védőcsoport volt a szintézis során.

A glicil-cisztein ligandumot és Cd(II)-ionokat különböző mennyiségben tartalmazó rendszerek titrálása során minden esetben egy fehér csapadék leválását tapasztaltuk. Ez feltételezhetően nem  $\text{Cd(OH)}_2$ , hanem egy kétszeresen protonált semleges részecske. A kialakuló mono- és biszkomplexek alapján az Ala-Cys dipeptidhez hasonlóan (S,O) koordináció kialakulására következtettünk. A komplexképződésben az aminocsoportok nem vesznek részt.

A Cd(II)-ion glicil-ciszteinnel kialakított  $[\text{CdA}_2\text{H}_2]$  komplexének UV látható spektrofotometriás vizsgálata alapján sikerült igazolnunk, hogy a komplex valóban a vizsgált ligandumot tartalmazta.

A tetrapeptid vizsgálata során egyik esetben sem vált le csapadék, a fémiont a ligandum a teljes pH-tartományon oldatban tudta tartani, és a kadmium(II)ionnal kialakult kölcsönhatás nagyobb, mint a Zn(II)-ion esetén.

## 6. Felhasznált irodalom

- <sup>[1]</sup> N. N. Greenwood, A. Earnshaw, Az elemek kémiája, Nemzeti Tankönyvkiadó (1999)
- <sup>[2]</sup> L. Barcza, Á. Buvári, A minőségi kémiai analízis, Medicina Könyvkiadó Zrt. (2008)
- <sup>[3]</sup> M. Kippler, *Interactions Between Cadmium And Micronutrients In Pregnant And Lactating Women*, Karolinska Intitutet (2009)
- <sup>[4]</sup> A. Siegel, H. Siegel, R. K. O. Siegel, Cadmiium: From toxicity to Essentiality, Springer Science Business Media (2013)
- <sup>[5]</sup> O. Andersen, Chelation of cadmium, Environmental Health Perspectives, vol. **54**, pp. 249-266 (1984)
- <sup>[6]</sup> Bóka B., Tioéter- és imidazolcsoportot tartalmazó peptidek fémkomplexeinek vizsgálata, Doktori értekezés Debreceni Egyetem, Debrecen (2003)
- <sup>[7]</sup> Nagy E. M., Átmenetifém-ionok kölcsönhatása kis biomolekulákkal. Újabb eredmények a ligandumok fémion szelektivitásában. Doktori Értekezés, Debreceni Egyetem, Debrecen (2006)
- <sup>[8]</sup> I. Sóvágó, K. Várnagy, A. Bényei, *Aminosavak és peptidek kadmium(II) komplexeinek egyensúlyi viszonyai*, Magyar Kémiai Folyóirat 92. évf. 3. sz. (1986)
- <sup>[9]</sup> B. Károly, Az analitikai kémia alapja, Semmelweis Kiadó (2012)
- <sup>[10]</sup> Várnagy K., Az imidazolgyűrű szerepe a fémionmegkötésben: Oldalláncban több donorcsoportot tartalmazó peptidek és származékaik átmenetifém komplexeinek egyensúlyi és redoxi sajátságai, MTA Doktori értekezés, Debreceni Egyetem, Debrecen (2013)
- <sup>[11]</sup> P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, *SUPERQUAD: an improved general program for computation of formation constants from potentiometric data*, J. Chem. Soc., Dalton Trans., **6**, 1195-1200. (1985)

- [12] 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, 291-299. (1985)
- [13] I. Puigdomenech, *Hydra/Medusa Chemical Equilibrium Database and Plotting Software*, KTH Royal Institute of Technology, 2004  
[http://www.kemi.kth.se/medusa/freely\\_downloadable\\_software\\_at](http://www.kemi.kth.se/medusa/freely_downloadable_software_at).
- [14] 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, **38**, 475-488 (1987)
- [15] R. B. Merrifield, *Solid Phase Peptide Synthesis I. The Synthesis of a Tetrapeptide*, J. Am. Chem. Soc., **85**, 2149-2154. (1963)
- [16] Á. Furka, Szerves kémia, Nemzeti Tankönyvkiadó (1998)
- [17] A. Gergely and I. Nagypál, *Studies on transition-metal-peptide complexes. Part 2. Equilibrium study of the mixed complexes of copper(II) with aliphatic dipeptides and amino-acids*, J. Chem. Soc., Dalton Trans., 1109 (1977)
- [18] Kállay Cs., Oldalláncban karboxil- és imidazolil-csoportot tartalmazó aminosav- és peptidszármazékok átmenetifém-komplexei, Doktori értekezés, Debrecen Egyetem, Debrecen (2005)
- [19] H. Kozłowski, J. Urmanska, I. Sóvágó, K. Várnagy, A. Kiss, J. Spychała, K. Cherifi, *Cadmium ion interaction with sulphur containing amino acid and peptide ligands*, Polyhedron. No 6., **9**, 831-837 (1990)
- [20] F. Gaizer, G. Gondos, L. Gera, *Protonation and complex formation of the cis and trans isomers of alicyclic  $\beta$ -amino acids*, Polyhedron, **5**, 1149 (1986)
- [21] Raics M., Oldalláncban karboxilátcsoportot tartalmazó di- és tripeptidok cink(II)ionnal való kölcsönhatásának tanulmányozása, Szakdolgozat, Debreceni Egyetem, Debrecen (2012)

- <sup>[22]</sup> H. Kozłowski, B. D. Révérend, D. Ficheux, C. Loucheux, I. Sovágó, *Nickel(II) complexes with sulfhydryl containing peptides. potentiometric and spectroscopic studies*, Journal of Inorganic Biochemistry, **29**, 187-197 (1987)

## Témavezetői Nyilatkozat

Dr. Várnagy Katalin, a Debreceni Egyetem Természettudományi és Technológiai Karának egyetemi docense nyilatkozom, hogy Lukács Márton, a Debreceni Egyetem Természettudományi és Technológiai Karának Vegyész szakos, MSc. nappali képzésben résztvevő I. évfolyamos hallgató iránymutatásommal készítette a

„Kadmium(II)-peptid rendszerek oldategyensúlyi vizsgálata”

című tudományos diákköri munkáját.

Felelősséggel kijelentem, hogy a hallgató pályamunkáját saját kutatásaira támaszkodva készítette, a szakirodalmat és a felhasznált adatokat megítélésem szerint korrekt módon kezelte.

A pályamunkát bemutatásra javaslom a 2014/2015. tanévi Kari Tudományos Diákköri Konferencián.

Debrecen, 2014. november 21.

.....

Témavezető aláírása

## Hallgatói Nyilatkozat

Lukács Márton, a Debreceni Egyetem Természettudományi és Technológiai Karának Vegyész szakos, MSc. nappali képzésben résztvevő I. évfolyamos hallgató nyilatkozom, hogy a 2014/2015. tanévi Tudományos Diákköri Konferenciára

„Kadmium(II)-peptid rendszerek oldategyensúlyi vizsgálata”

címmel benyújtott pályamunka a saját munkám eredménye, a felhasznált irodalmat és adatokat korrekt módon kezeltem.

Debrecen, 2014. november 21.

.....

Hallgató aláírása

## Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom *Prof. Dr. Fábíán István* prorektor, tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy az általa vezetett Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszéken készíthettem el Tudományos Diákköri dolgozatomat.

Ezúton szeretném megköszönni mind a dolgozat elkészítésében nyújtott odaadó munkáját mind az analitikai kémia terén átadott mélyebb ismereteket, témavezetőmnek *Dr. Várnagy Katalin* egyetemi docensnek.

Köszönetem szeretném kifejezni a mérések, illetve a munka során nyújtott önzetlen segítségért *Csire Gizella és Lihi Norbert* PhD hallgatóknak, valamint *Godó Attila* műszaki szolgáltatónak, akikhez bármikor bizalommal fordulhattam, ha kérdésem volt vagy segítségre volt szükségem.

Hálával és köszönettel tartozom *Fehérné Baranyi Edina* tanársegédnek az atomspektroszkópiai módszerek közelebbről való megismeréséért, illetve a kadmium(II)ionokat tartalmazó oldat pontos koncentrációjának meghatározásáért.

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