

A HisValGlyHis tetrapeptid réz(II) és nikkel(II) komplexeinek a vizsgálata

Készítette:

Pósán Adrienn

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.....	3
2.	Irodalmi áttekintés.....	4
2.1.	A réz szerepe az élő szervezetben.....	4
2.2.	A koordinációs kémia	5
2.3.	A két hisztidint tartalmazó peptidek	6
2.3.1.	A terminális amino csoportot tartalmazó tetrapeptid	6
2.3.2.	A terminálisan védett tetrapeptid	7
3.	Kísérleti körülmények	8
3.1.	Peptidszintézis	8
3.2.	pH-potenciometria	9
3.3.	UV-látható spektrofotometria	10
3.4.	Cirkuláris dikroizmus (CD) - spektroszkópia.....	11
4.	Kísérleti eredmények és kiértékelésük.....	13
4.1.	Az általam vizsgált ligandum sav-bázis tulajdonságai	13
4.2.	A ligandum Cu(II)- komplexei	14
4.2.1.	pH-potenciometriás vizsgálat	14
4.2.2.	Spektroszkópiai vizsgálatok	18
4.3.	A ligandum Ni(II)- komplexei.....	24
4.3.1.	pH-potenciometriás vizsgálat	24
4.3.2.	Spektroszkópiai vizsgálatok	26
5.	Összefoglalás.....	29
6.	Summary	30
7.	Felhasznált irodalom	31

1. Bevezetés

Régóta ismert, hogy bizonyos fémionok jelenléte a szervezetben létfontosságú. Ilyen fémion például a réz és a nikkell, ezek meghatározott mennyiségben vannak jelen az élő szervezetben, leginkább a fehérjék kötik meg őket. Hiányuk és többletük is okozhat különféle elváltozásokat. Ha megismerjük koordinációs készségüket és biológiai folyamatokban betöltött szerepüket, akkor lehetőségünk adódik az általuk okozott többlet- és hiánybetegségek megelőzésére, illetve kezelésére.

A fémionoknak szerepe van a szerves molekulák szintézisében, szállításában, biológiai rendszerek sav-bázis- és redoxifolyamatainak katalizálásában. Az említett folyamatokat metalloenzimek és metalloproteinek látják el. Ezen rendszerek központi ionja valamilyen átmenetifémion, amely koordinatív kötéssel kapcsolódik a ligandumként jelenlévő aminosavhoz, peptidhez, vagy azok származékához.

A Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszéken már évek óta foglalkoznak a Cu, Zn-SOD enzim aktív centrumának modellezésével. Ebbe a munkába kapcsolódtam be. A vizsgálatom célja a $\text{NH}_2\text{-HisValGlyHis-NH}_2$ (HVGH- NH_2) peptid szintetizálása, tisztaságának ellenőrzése, protonálódási állandói meghatározása pH-potenciometria segítségével, majd komplexképző sajátosságai vizsgálata volt Cu(II)- és Ni(II)-ionok jelenlétében. A kialakuló komplexek szerkezetének igazolására UV-látható spektrofotometriás és CD-spektroszkópiás vizsgálatokat végeztem.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A réz szerepe az élő szervezetben^{1,2}

A réz valamennyi ismert élő szervezet számára létfontosságú nyomelem. Redoxireakciói számos biológiai oxidációs folyamatban játszanak szerepet.

Az alacsonyabb rendű élő szervezetekben, mint például a puhatestű állatok esetében az oxigén szállításának a funkcióját a réztartalmú hemocianin tölti be.

A felnőtt emberi szervezet mintegy 120 mg rézet tartalmaz, szinte kizárólag fehérjékhez kötött formában. A réznek és vegyületeinek a mindennapi életben játszott szerepéhez kapcsolódva érdemes kiemelni, hogy a fehérjék irányába mutatott nagy affinitásából következően a rézvegyületek eléggé toxikusak. A rézmérgezés első tünetei a hányás, hasmenés, majd májműködési és idegrendszeri zavarok jellemzik. Az emberi szervezet számára szükséges réz 1 mg naponta, de a maximálisan megengedett napi dózis 10 mg. Ez a mennyiség a megfelelő táplálkozás mellett biztosítható.

A réz esetén jól ismertek az elem felhalmozódásával (Wilson-kór) és hiányával (Menkes-kór) összefüggő betegségek is.

A réztartalmú fehérjék túlnyomó többségükben enzimatis funkciókat töltenek be és a $\text{Cu}^{\text{II}} - \text{Cu}^{\text{I}}$ redoxirendszer révén a biológiai oxidációs folyamatokban vesznek részt.

A réz biokémiája nagymértékben hasonlít a vas biológiai szerepéhez, tehát a réztartalmú fehérjék egy csoportja a molekuláris oxigén részvételével lejátszódó folyamatokban szerepelnek. Fő kötési helyei a hisztidin, metionin aminosavakon található.

A réztartalmú fehérjék egy további csoportja az elektronszállító fehérjék közé tartozik, ezeket kékréz fehérjéknek nevezzük.

A réz leggyakrabban +2-es oxidációs állapotban képez komplexeket. A komplexekre általában kék- vagy zöldsín jellemző, egyetlen széles elnyelési sávval. A Cu(II) komplexvegyületeiben d^9 -es elektronkonfigurációjú, leggyakoribb koordinációs számok a 4, 5 és a 6. Szabályos geometriák csak ritkán fordulnak elő, általában tetragonálisan torzult oktaéderes és a síknégyszetes szerkezetek alakulnak ki, amelyek között nem könnyű különbséget tenni, mivel a Jahn-Teller hatás lép fel.

A réztartalmú fehérjék kémiai jellemzőinek érdekessége, hogy a vegyületekben a réz kötésmódja és/vagy koordinációs geometriája nem értelmezhető a réz különböző oxidációs állapotú modell komplexeihez rendelhető paraméterekkel. Így a réztartalmú fehérjéket három szerkezeti csoportba sorolják. Ezeknek a fehérjéknek a fémcentrumai 3 fő szerkezeti

csoportba sorolhatók és ezek működési mechanizmusa a $\text{Cu}^{\text{I}}\text{-Cu}^{\text{II}}$ redoxirendszerhez rendelhető.

Az I. csoportba a kék réz centrumot tartalmazó fehérjék tartoznak, melyek biológiai funkciója a reverzibilis elektronszállításban van. A szerkezetük erősen torzult, a rézhez 2S- és 2N-donoratom kapcsolódik. A Cu^{II} fényelnyelése 600 nm-nél van, ennek köszönhetően intenzív kék szín jellemzi őket.

A II. csoportba a normális nem-kék réz centrumot tartalmazó fehérjék tartoznak. A biológiai funkciója az oxigénmolekula aktiválás Cu^{I} állapotban szerves koenzimokkal együtt. A szerkezetük alapvetően síknégyszetes, gyenge axiális koordinációval. A Cu^{II} fényelnyelése gyenge ($\epsilon < 1000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), d-d ligandum átmenetek jellemzik.

A III. csoportba a réz dimerek tartoznak, melyeknek funkciója az oxigén felvétele $\text{Cu}^{\text{I}}\text{-Cu}^{\text{II}}$ állapotban.

A nikkel biológiai szerepe sokáig ismeretlen volt, míg az ureáz enzim nikkel-tartalmát egyértelműen nem azonosították. Az ureázok számos baktériumban és növényben megtalálhatók és a karbamid hidrolízisét katalizálják. Több különböző módszer együttes alkalmazása arra az eredményre vezetett, hogy minden ureáz enzim aktív centruma egy pár Ni(II)-iont tartalmaz.

2.2. A koordinációs kémia²

Koordinációs vegyület vagy komplex képződik akkor, amikor egy Lewis- bázis (ligandum) kapcsolódik egy Lewis-savhoz (akceptor) „magános” elektrónpáron keresztül. Ha a ligandum több atomból áll, azt az atomot, amely közvetlenül kapcsolódik az akceptorhoz „donoratomnak” nevezzük. Ez a kötéstípus az alapja az átmenetifémek kémiája döntő részének. Az átmenetifém-ion és a ligandum közötti kötés pontos természete rendkívüli módon változhat,

A ligandumokat a potenciális donoratomjaik száma szerint osztályozhatjuk, és annak éréke alapján, egy-, két-, három-, négy-, öt- vagy hatfogúaknak nevezhetjük őket. Az egyfogú ligandumok egyszerű egyatomos ionok lehetnek, mint a halogenidionok. A kétfogú ligandumok gyakran kelátképzőek, melyek a fémionnal kelátgyűrűket alkotnak, a gyűrűk a leggyakoribb kétfogú ligandumokkal öt vagy hattagúak. A háromfogú ligandumok, ha ugyanazon fémionhoz koordinálódnak, kelátgyűrűs rendszert alkotnak, ez szerkezeti korlátozást kényszeríthet a komplexre.

A komplexeket általában nem gázfázisban állítják elő komponenseikből, így a stabilitásuk mérése szükségszerűen valamilyen kiindulási anyaggal való összehasonlítást jelent. A kvantitatív mérések döntő többségét vizes oldatokban végzik, amikor a kérdéses komplex a fémion akvakomplexéből ligandumcsere- reakcióval képződik. Ha az egyszerűség kedvéért L egyfogú ligandumot jelent és a töltéseket figyelmen kívül hagyjuk, akkor a komplexképződési folyamatot egymást követő lépések soraként foghatjuk fel, melyekre a K lépcsőzetes stabilitási (képződési) állandók a következőképp adhatók meg:

$$M(H_2O)_n + L = ML(H_2O)_{n-1} + H_2O; \quad K_1 = \frac{[ML(H_2O)_{n-1}]}{[M(H_2O)_n][L]} \quad (1)$$

$$ML_{n-1}(H_2O) + L = ML_n + H_2O; \quad K_n = \frac{[ML_n]}{[ML_{n-1}(H_2O)][L]} \quad (2)$$

$$M(H_2O)_n + nL = ML_n + nH_2O; \quad \beta_n = \frac{[ML_n]}{[M(H_2O)_n][L]^n} \quad (3)$$

Ezeket az állandókat koncentrációkkal fejeztük ki, ami azt jelenti, hogy feltételezzük az aktivitási együtthatók értéke egységnyi. Tiszta víz oldószer esetén ez csak végtelen hígításban igaz. A gyakorlatban azonban sokkal általánosabb az, hogy a méréseket egy viszonylag nagy koncentrációjú inert elektrolit (pl. 3 M NaClO₄) jelenlétében végezzük el, ily módon az ionerősséget állandó értéken tartva biztosítjuk azt, hogy az aktivitási együtthatók gyakorlatilag állandók maradjanak.

A stabilitási (képződési) szorzat β_n a lépcsőzetes állandókkal adhatók meg:

$$\beta_n = K_1 * K_2 * \dots * K_n \quad (4)$$

2.3. A két hisztidint tartalmazó peptidek

2.3.1. A terminális amino csoportot tartalmazó tetrapeptid ⁸

A már korábban vizsgált HisGli₂His és HisVal₂His tetrapeptidek esetében CuLH, CuL, CuLH₋₁, CuLH₋₂ és CuLH₋₃ összetételű komplexek keletkeznek. A HisGli₂His ligandum esetén ezek mellett többmagvú komplexek is (Cu₃L₂H₋₄ és Cu₃L₂H₋₆) kimutathatóak. A pH emelésével lépcsőzetesen játszódik le az amidnitrogén deprotonálódása. A CuLH₋₁ és CuLH₋₂ komplexekben (NH₂, N⁻), illetve (NH₂, N⁻, N⁻) koordináció feltételezhető, de a C-terminális imidazolgyűrű is részt vehet a koordinációban. A CuLH₋₃ komplexben újabb deprotonált amidnitrogén koordinálódik a fémionhoz. A láncvégi imidazol már nem vesz részt a koordinációban, de (N⁻, N⁻, N⁻, ImN) izomer komplex kialakulása sem zárható ki. A többmagvú komplexekben az egyik Cu(II)-ion peptidszerű koordinációval, a másik Cu(II) pedig a szabadon maradt imidazolhoz kapcsolódhat. Izomer komplexek képződése is feltételezhető.

2.3.2. A terminálisan védett tetrapeptid ^{3,4}

A terminálisan védett peptidek esetén az N-terminális aminos csoport és a C-terminális karboxilcsoport is olyan védőcsoportot tartalmaz, amelyek nem vesznek részt a komplexképződési folyamatokban. Ezek a peptidek modellezik a különböző fehérjék aktív centrumait, hiszen a szervezetben a fémion csak az oldalláncokon keresztül tud kötődni hozzájuk.

Kutatócsoportunkban is számos több hisztidint tartalmazó peptid oldategyensúlyi viselkedését tanulmányozták. Vizsgáltak két hisztidint tartalmazó peptideket, amelyek a horgonycsoportként viselkedő hisztidin mellett aszparaginsavat is tartalmaztak. Mind az Ac-HHVGDNH₂ mind az Ac-HVGDH-NH₂ peptidekre igaz az, hogy réz(II)ionok jelenlétében a komplexképződés pH 3,5 felett kezdődik meg, amikor is [CuLH]²⁺ és [CuL]⁺ komplexek képződnek. Ezen komplexekben a fémionok először monodentát módon egy-, majd makrokelátot kialakítva két imidazolnitrogénen koordinálódnak. A pH növelésével egymást követő lépésekben játszódik le az amidnitrogén deprotonálódása, a kialakuló [CuLH₂]⁻ komplexben [N(Im), 2×N⁻, N(Im)] típusú koordináció jelenik meg, a harmadik amidnitrogén deprotonálódása eltolódik a lúgosabb pH-tartományba. A korábban vizsgált HVH peptid védett származékának vizsgálatára is sor került. Savas pH tartományban az imidazolnitrogén koordinálódásával [CuL]²⁺ komplex képződik, amelyben ugyan kialakul a makrokelátot tartalmazó szerkezet, de végbemegy az amidnitrogén deprotonálódása már a fiziológiás pH tartományban és [CuLH₂] komplex képződik [N(Im), N⁻, N⁻, N(Im)] koordinációval.

Jellemezték olyan peptideket is, amelyekben a hisztidineket két aminosav választotta el egymástól.⁴ Az Ac-HGGH-NH₂, Ac-HVVH-NH₂ tetrapeptid és az Ac-HAAHVVH-NH₂ heptapeptid esetében is a legnagyobb stabilitású komplexek Cu(II)-ionok jelenlétében képződtek. Mindkét peptid képes stabilis imidazolnitrogén koordinációt tartalmazó makrokelát kialakítására réz(II)-illetve nikkel(II)ionok jelenlétében. Az így kialakuló komplexek jelentős stabilitással rendelkeznek, mégis kevésbé stabilisak, mint a hisztidineket alternáló pozíciókban tartalmazó ligandumok hasonló szerkezetű komplexei. Azt is megállapították, hogy ezen peptidek esetében is végbemegy az amidnitrogén deprotonálódása, és az uralkodó részecske az [MLH₃]⁻ komplex lesz, amelyben [N⁻, N⁻, N⁻, N(Im)] típusú koordináció valósul meg.

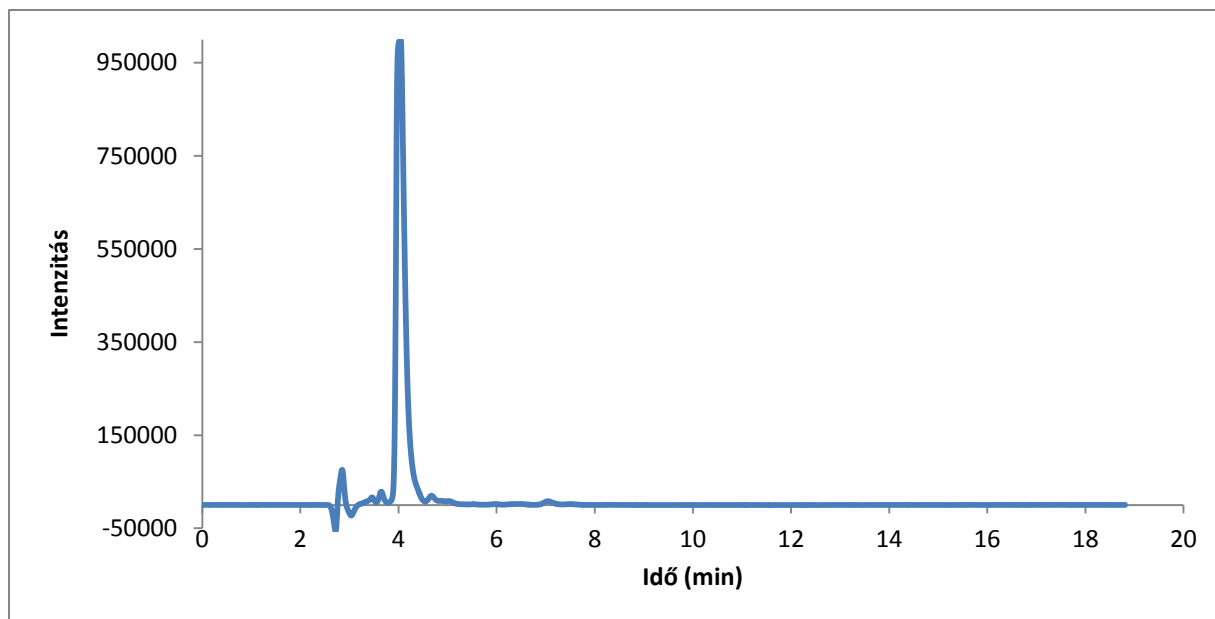
3. Kísérleti körülmények

3.1. Peptidszintézis^{3,5}

A munkám során a C-terminálisan védett His-Val-Gly-His peptidet állítottam elő szilárd fázisú peptidszintézis segítségével. Ezt a módszert 1963-ban R. B. Merrifield publikálta.⁶ A Merrifield-féle szintézis szilárd hordozón (gyantán) történik. Ez olyan finomszemcsés műanyag, amelynek 1 grammjában körülbelül 10 millió szemcse van. A szemcsék felületén és azok belsejében olyan funkciócsoportok vannak, amelyek lehetővé teszik, hogy a szemcsékhez aminosavakat vagy más vegyületeket kapcsolhassunk kémiai kötéssel. Oldószerként olyan szerves vegyület alkalmazható, amelyben a gyanta jól duzzad, így a reaktánsok könnyen bejuthatnak a szemcsékbe, illetve a melléktermékek elhagyhatják azt. A szintézis során dimetil-formamidot (DMF) használtunk.

A peptid szintézisét automatizált módon egy mikrohullámú Liberty Peptidszintetizáló készülékkel (CEM) végeztük. A szintézishez Rink Amide AM Resin gyantát alkalmaztunk, az aminosavakat pedig a 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilalminium tetrafluoro-borát (TBTU) / 1-hidroxibenzotriazol hidrát (HOBt) / diizopropil-etilamin (DIEA) technika segítségével aktiváltuk. A Fmoc védőcsoportok eltávolítását a készülék 20 % piperidint tartalmazó DMF-oldattal hajtotta végre. Ezután az aminosavak csatolása következik magasabb hőmérsékleten, mikrohullámú sugárzás hatására. A szintézis a C-terminustól halad az N-terminus felé.

A peptid gyantáról való lehasítását szobahőmérsékleten végezzük trifluoroecetsav (TFA), triizopropil-szilán (TIS), víz és 2,2'-(etiléndioxi)-dietántiol (DODT) elegyével. A gyantáról lehasított peptidet szűrővel kaptuk meg. A nyers peptidet hideg dietil-éterből választottuk le, a fehér színű csapadékot leszűrtük és argon gázzal szárítottuk. A peptid tisztaságát folyadékkromatográfiás (HPLC) módszerrel ellenőriztük. A peptidre kapott kromatogramot az 1. ábra mutatja be.



1. ábra: A HisValGlyHis tetrapeptid HPLC kromatogramja

3.2. pH-potenciometria^{5,7,8}

A ligandumok protonálódási állandóit és a különböző összetételű réz(II)- és nikkel(II)-komplexek stabilitási állandóit pH-potenciometriás mérésekkel határoztam meg. Ez az egyik legáltalánosabb módszer az oldatfázisban lejátszódó komplexképződési folyamatok egyensúlyi vizsgálatára.

A potenciometria olyan elektroanalitikai módszer, amely során egy elektrolitoldatba 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 a regisztrálására van lehetőségünk.

Az elektródpotenciál (E) és az azt kialakító elektroaktív komponens koncentrációja (c) (pontosabban aktivitása (a)) közötti összefüggést a Nernst-egyenlet (5) írja le:

$$E = E_0 + \frac{RT}{zF} \ln \frac{c_{ox}}{c_{red}} \quad (5)$$

ahol, E_0 a standard elektródpotenciál, R az egyetemes gázállandó, T az abszolút hőmérséklet, z az oxidált és redukált formák oxidációs számának a különbsége, F a Faraday állandó, c_{ox} és c_{red} az adott komponens oxidált és redukált formáinak koncentrációja.

Aktivitás helyett híg vizes oldatokban koncentráció is használható, mivel ilyen körülmények között az értékek megközelítőleg azonosak.

A pH mérésére hidrogénion szelektív elektródot használunk, amely vékony üvegmembránt tartalmaz, amelynek belsejében meghatározott pH értékű referenciaoldat van. Az elektródot különböző hidrogénion koncentrációjú oldatokba helyezve a membrán külső és

belső oldalán eltérő lesz a hidrogénionok mennyisége. Ez feszültséget eredményez, így az oldat pH-ja mérhető.

A potenciometrikus titrálás során a meghatározandó komponenst ismert koncentrációjú reagenssel visszük reakcióba. A folyamat során megmért feszültséget a titrálószer térfogatának függvényében ábrázolva felvesszük a titrálási görbét. A meghatározandó komponens koncentrációjának mérése előtt kalibrációs egyenest veszünk fel a műszer kalibrálásához. Erre a célra általában ismert pH-jú puffert alkalmazunk, ilyen pl. a káliumhidrogén-ftalát.

A ligandumom vizsgálatához potenciometrikus titrálást alkalmaztam.

A titrálószer pontosan ismert koncentrációjú, karbonátmentes káliumhidroxid oldat, amelynek adagolását automata buretta segítségével végeztem.

Az elektródot minden titrálás előtt kalibráltam 0,0500 mol/dm³ koncentrációjú káliumhidrogén-ftalát oldattal (pH= 4,005 T=298 K hőmérsékleten).

A mintáim térfogata 3,00 cm³ volt, amelyek ismert koncentrációjú ligandumot és HCl-ot tartalmaztak, illetve a mintákban az ionerősség állandó, 0,20 mol/dm³ koncentráció volt kálium-kloridra nézve.

Az állandó 298 K hőmérsékletet termosztát biztosította. A kevertetésre mágneses kevertetőt és tisztított argongáz átbuborékoltatását alkalmaztam.

Az adatok kiértékelését a SUPERQUAD és PSEQUAD számítógépes programokkal végeztem.

3.3. UV- látható spektrofotometria ^{3,5,8}

UV-látható spektrofotometriás vizsgálatokat végeztünk el az általam szintetizált ligandum Cu(II)- és Ni(II)-ionokkal alkotott komplexeire.

A Cu(II)- és Ni(II)-komplexek spektroszkópiai sajátságaira vonatkozóan sok irodalmi adat áll rendelkezésre.

A spektrofotometriás méréseket Perkin Elmer Lambda 25 típusú kétsugaras fotométeren és HP fotométeren végeztük el. A spektrumokat 1,0 cm-es küvettákban különböző pH értéken és fémion: ligandum arányánál 250-900 nm hullámhossz tartományban vettük fel.

A felvett spektrumokból következtethetünk a koordinálódó donoratomok számára és a komplexek szerkezetére, azonban a számtalan koordinációs módot és a befolyásoló tényezőket figyelembe véve nem egyszerű általános következtetéseket levonni.

A tetragonálisan torzult oktaéderes szerkezetű réz komplexek d-d átmenetei egy sávva olvadhatnak össze, melyek energiája és intenzitása a koordinálódó donortomok számától függ. Az intenzitásuk és az energiájuk függ a koordinálódó donortomok minőségétől és mennyiségétől.⁹ Az abszorpciós maximum (λ_{max}) helye a következő empirikus összefüggés alapján becsülhető meg¹⁰:

$$\lambda_{max} = \frac{10^3}{0,294 (C=O/H_2O) + 0,346(COO^-) + 0,46(NH_2) + 0,494(N=) + 0,434(Im)} \quad (6)$$

Ha a vizes oldatban lévő $[Cu(H_2O)_6]^{2+}$ -ion ekvatoriálisan elhelyezkedő víz molekuláit oxigén vagy nitrogén donortomokkal helyettesítik, akkor az abszorpciós maximum a rövidebb hullámhosszak felé tolódik el. A kvantitatív összefüggések megadását nehezíti még a kelátgyűrű mérete és a ligandumhoz kapcsolódó olyan csoportok hatása, amelyek nem vesznek részt a koordinációban. Ezeket a hatásokat figyelmen kívül hagyja az empirikus képlet.

A Ni(II)- komplexekre leginkább a 4-es és a 6-os koordinációs szám jellemző. A 6-os koordinációs számú oktaéderes komplexekhez három spinmegengedett d-d átmenet tartozik, de ezek valamennyien elég gyengék. A középső oktaéderes sáv felhasadása a komplex geometriai torzulását mutatja. A 4-es koordinációs számú, tetraéderes, valamint síknégyszetes nikkel(II) komplexek spektrumára már nagyobb intenzitású sávok jellemzőek.

3.4. Cirkuláris dikroizmus (CD)- spektroszkópia ⁵

A komplexek szerkezetének és geometriájának pontosabb meghatározására cirkuláris dikroizmus spektroszkópiai méréseket is végeztem.

A cirkuláris dikroizmus olyan spektroszkópiai módszer, amely a polarizált fény és egy optikailag aktív anyag kölcsönhatásán alapul. A síkban polarizált fény egy jobbra és egy balra cirkulárisan polarizált fénysugár összegére bontható fel. Optikailag aktív mintán áthaladva a komponensek abszorpciója eltérő lesz, tehát az optikailag aktív anyag eltérő mértékben nyeli el a síkban polarizált fény két komponensét. Ezt az abszorpciós különbséget nevezzük cirkuláris dikroizmusnak vagy Cotton-effektusnak. A kétféle fénysugár abszorpciójának különbségét a hullámhossz függvényében ábrázolva kapjuk a CD görbét. A görbe maximumai és minimumai az elektrongerjesztési abszorpciós spektrum maximuma helyén, illetve közel ahhoz találhatóak.

A fémkomplexek optikai aktivitása vagy a komplexmolekula vagy a ligandum aszimmetriájából származik. Különböző di- és tripeptidek tanulmányozása során megfigyelhető a jelek intenzitásának additivitása, azaz a nem koordinálódó oldalláncok hatása

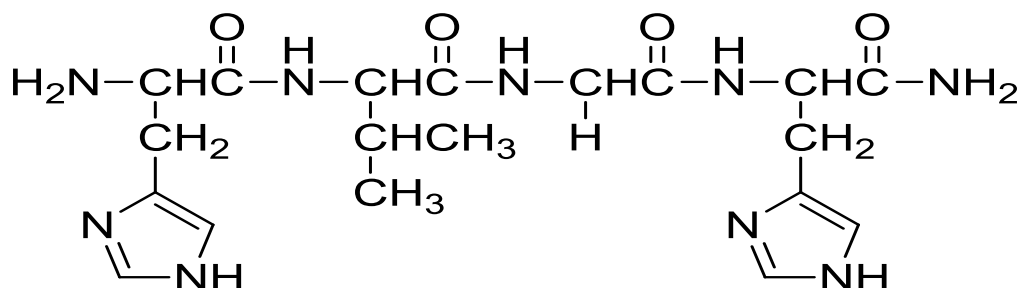
összeadódik. Azt is megállapították, hogy a Cotton-effektus nagysága eltérő, ha ugyanazon optikailag aktív csoportok a láncban más helyen találhatóak. Ennek oka, hogy a központi fémionhoz kapcsolódó különböző donorcsoportok nem azonos mértékben továbbítják a királis információt. Hatásuk csökken amid nitrogén > karboxiláttoxigén > aminonitrogén sorrendben.

A méréseket a Debreceni Egyetem Szerves Kémiai Tanszékén végeztük egy JASCO J-810 típusú spektrométeren. A mérésekhez 0,10 és 1,00 cm-es úthosszú küvettákat használtam.

4. Kísérleti eredmények és kiértékelésük

4.1. Az általam vizsgált ligandum sav-bázis tulajdonságai

A munkámat a C-terminálisan savamidcsoportot tartalmazó HisValGlyHis ligandum sav-bázis tulajdonságainak a vizsgálatával kezdtem. A peptid szerkezetét az 2. ábra mutatja be.



2. ábra: A HisValGlyHis tetrapeptid szerkezete

A méréseim során megállapítottam a protonálódási állandókat, az értékeket az 1. táblázat tartalmazza. A kapott értékeket összevetettem a C-terminálisan védett HisGly₂His és HisVal₂His, valamint a Gly₃His értékeivel.

1. táblázat: Az általam vizsgált ligandumok és az összehasonlításként alkalmazott vegyületek protonálódási állandó értékei

logβ	HisValGlyHis	HisGly ₂ His (8)	HisVal ₂ His (8)	Gly ₃ His (11)
HL	7,38 (1)	7,43	7,46	8,03
H ₂ L	13,74 (1)	13,86	13,84	14,89
H ₃ L	19,01 (1)	19,14	19,13	17,55
pK ₁	5,27	5,28	5,28	2,66
pK ₂	6,36	6,43	6,38	6,86
pK ₃	7,38	7,43	7,46	8,03

A két hisztidint tartalmazó tetrapeptidek három csoportot tartalmaznak, melyek protonálódásra képesek: két imidazol és egy terminális amino csoportot.

Mindkét imidazol csoport savas közegben protonált állapotban van. Az első és második lépésben a két imidazol csoport lépcsőzetes deprotonálódása jön létre a pH növekedésével. Utolsó lépésként az amino csoport deprotonálódása következik be. Ezekből az

értékekből számíthatjuk ki a pK értékeket, az első két érték (5,27; 6,36) az imidazol csoportokhoz, a harmadik (7,38) az amino csoporthoz tartozik.

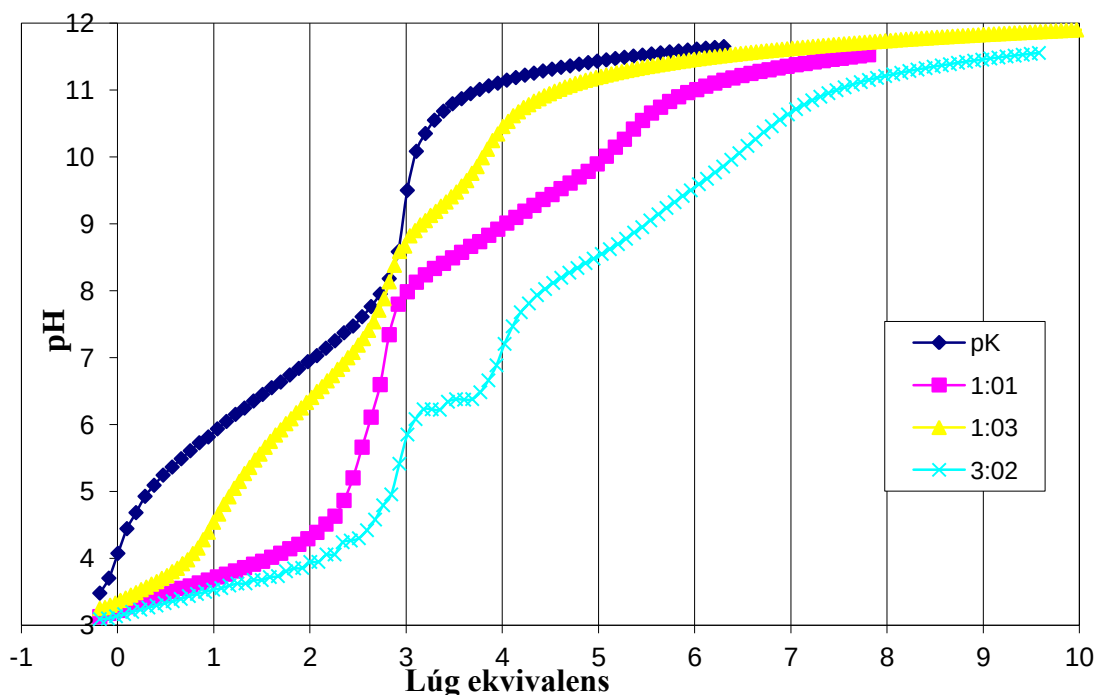
Összehasonlítva a HisGly₂His és a HisVal₂His értékeivel közel azonos protonálódási értékeket kaptunk, ami azt jelenti, hogy az oldalláncbeli csoportok száma illetve a helyzete a pK értékeket nem befolyásolja.

A Gly₃His egy kaboxil és egy imidazol csoportot tartalmaz. Ezekkel az értékekkel összehasonlítva megállapítható, hogy az első pK érték (2,66) a karboxil csoporthoz tartozik, melyet összehasonlításra nem tudunk felhasználni. A második pK érték (6,86) az imidazol csoporthoz tartozik, ami a két hisztidint tartalmazó tetrapeptidekre jellemző pK értékei között van. Ez tehát azt jelenti, hogy ez utóbbi tetrapeptideknél a hisztidin imidazolgyűrűi között kölcsönhatás lép fel. A harmadik pK érték (8,03) az amino csoporthoz tartozik, ami nagyobb, mint az általam mért érték, ez a hatás a terminális nitrogénnek köszönhető.

4.2. A ligandum Cu(II)-komplexei

4.2.1. pH-potenciometriás vizsgálat

A Cu(II)-HisValGlyHis rendszerben a titrálást a fémiont és a ligandumot 1:1, 1:3 és 3:2 arányban tartalmazó mintákban végeztem. A harmadik ábrán láthatóak a kapott titrálási görbék.



3. ábra: A Cu(II)- HisValGlyHis rendszer titrálási görbéi ($c_{\text{lig}} = 2,133 \cdot 10^{-3} \text{ mmol/cm}^3$)

A savas tartományban az 1:1 és 1:3 arányban fémiont tartalmazó görbe eltér a szabad ligandumétól, ami azt mutatja, hogy a komplexképződés már itt is elkezdődik. A görbe felugrik, ami azt jelenti, hogy ugyanazoknak az imidazol csoportoknak a deprotonálódása figyelhető meg, mint a szabad ligandumnál, csak itt ezt a folyamatot a fém elősegítette. Ezután egy laposabb szakaszt követően újabb pH ugrás következik be, ami a szabad ligandumtól eltérően megmutatja az újabb komplexképződési folyamatokat.

A fémet feleslegben tartalmazó görbén látható, hogy egy szakasza eltér a várható görbétől, ennek a magyarázata, hogy a titrálás során csapadék képződött, ami a pH növelésével feloldódott.

A kapott adatok PSEQUAD programmal való kiértékelésével meghatározott Cu(II)-komplexek összetételét és stabilitási állandóját a 2. táblázatban foglaltam össze.

2. Táblázat: Cu(II) komplexek összetétele és stabilitási állandó értékei ($\log\beta$)

Komplex	HisValGlyHis	HisGly ₂ His (8)	HisVal ₂ His (8)	Gly ₃ His (11)
[CuLH] ²⁺	14,85 (2)	14,97	15,02	12,24
[CuL] ⁺	10,95 (1)	10,90	10,03	8,47
[CuL ₂]	15,32 (8)			-
[CuLH ₋₁]	2,88 (4)	3,14	2,55	1,63
[CuLH ₋₂] ⁻	-5,81 (3)	-5,30	-6,47	-5,79
[CuLH ₋₃] ²⁻	-15,45 (3)	-15,03	-16,41	-16,67
pK (His)	3,90	4,07	4,99	3,77
pK ₁ (amid)	8,07	7,76	7,48	6,84
pK ₂ (amid)	8,69	8,44	9,02	7,42
pK ₃ (amid)	9,64	9,73	9,94	10,88

$$pK(\text{His}) = \log\beta([\text{CuLH}]^{2+}) - \log\beta([\text{CuL}]^{+})$$

$$pK_1(\text{amid}) = \log\beta([\text{CuL}]^{+}) - \log\beta([\text{CuLH}_{-1}])$$

$$pK_2(\text{amid}) = \log\beta([\text{CuLH}_{-1}]) - \log\beta([\text{CuLH}_{-2}]^{-})$$

$$pK_3(\text{amid}) = \log\beta([\text{CuLH}_{-2}]^{-}) - \log\beta([\text{CuLH}_{-3}]^{2-})$$

A táblázat adataiból megállapítható, hogy mono- és biszkomplexek keletkeznek. Bár a fém feleslegben elvégeztük a mérést, de a csapadékképződés miatt a keletkező komplexek adatait nem tudtuk meghatározni.

Kezdetben CuLH protonált komplex van jelen, majd a pH emelésével lépcsőzetes deprotonálódási folyamat játszódik le. Így CuL, CuL₂, CuLH₋₁, CuLH₋₂ és CuLH₋₃ komplexek keletkeznek.

A CuLH komplexnél hisztaminszerű koordináció alakul ki, az N-terminális amino csoport és az imidazol csoport kapcsolódik össze a rézzel, a C-terminális imidazol csoport pedig protonált formában van jelen.

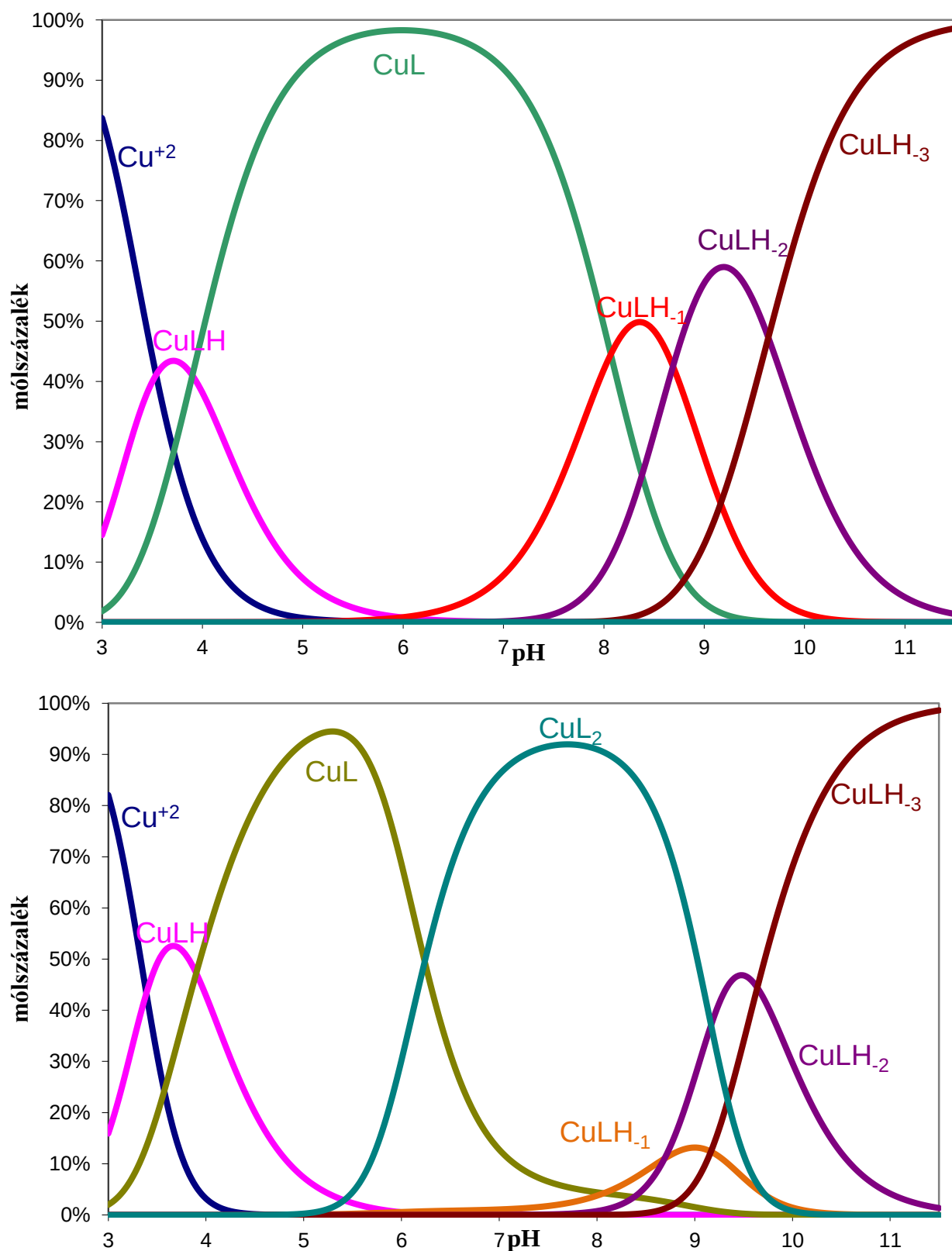
A CuL komplex esetén a C-terminális imidazol csoport deprotonálódik. Ezt a deprotonálódási állandót a $pK(\text{His})$ jellemzi. Az értéke jóval kisebb, mint a szabad ligandumé, tehát nemcsak deprotonálódás játszódik le, hanem koordinálódik a ligandum, egy háromfogú makrokelát keletkezik. A titrálási görbén látható, hogy ez pH=6-ig stabilizálja a komplexet. Ez a hatás megjelenik a HisVal₂His és a HisGly₂His esetében is.

A pH emelésével újabb deprotonálódási folyamatok indulnak el, az amidnitrogének deprotonálódnak. Így keletkeznek a CuLH₋₁, CuLH₋₂ és CuLH₋₃ komplexek. Ezekre jellemző a $pK_1(\text{amid})$, $pK_2(\text{amid})$ és a $pK_3(\text{amid})$. Ezek az eredmények nagyobbak, mint egy egyszerű réz(II)-peptid komplexnél, ami azt jelenti, hogy a makrokomplex megakadályozza az amidnitrogén deprotonálódását. A kialakuló komplex szabad amino-csoportja mellett egy, két vagy három amidnitrogén koordinálódik, de a CuLH₋₁, CuLH₋₂ szerkezetben ezek mellett a C-terminális imidazol is részt vehet a koordinációban. Ezt a spektrális adatokból tudjuk bebizonyítani.

Hasonló tendenciát megfigyelhetünk mindhárom összehasonlításként használt peptid esetében, ahol kimutatták az imidazol csoport részvételét a koordinációban.⁸

A CuL₂ komplex esetében két ligandum koordinálódik két vagy háromfogú koordinációval.

A keletkező komplexek eloszlását a pH függvényében a 4. ábra mutatja be.



4. ábra: A komponensek eloszlása a pH függvényében

a) A Cu(II)-HisValGlyHis 1:1; $c_{\text{lig}}=2,133 \cdot 10^{-3} \text{ mmol/cm}^3$, $c_{\text{Cu(II)}}=1,678 \cdot 10^{-3} \text{ mmol/cm}^3$

b) A Cu(II)-HisValGlyHis 1:3; $c_{\text{lig}}=2,133 \cdot 10^{-3} \text{ mmol/cm}^3$, $c_{\text{Cu(II)}}=6,713 \cdot 10^{-4} \text{ mmol/cm}^3$

A görbéről leolvasható, hogy az 1:1 arány esetén a CuL komplexnek széles pH-tartományban van jelen, a CuLH₁ komplex csak pH=8 fölött jelenik meg, majd ezt követően a CuLH₂ és a CuLH₃ komplex keletkezik. A ligandum felesleg esetén a CuL és a CuL₂ komplex az uralkodó a pH= 4-9 tartományban. Csak ezt követően jelenik meg a CuLH₁, CuLH₂ komplex.

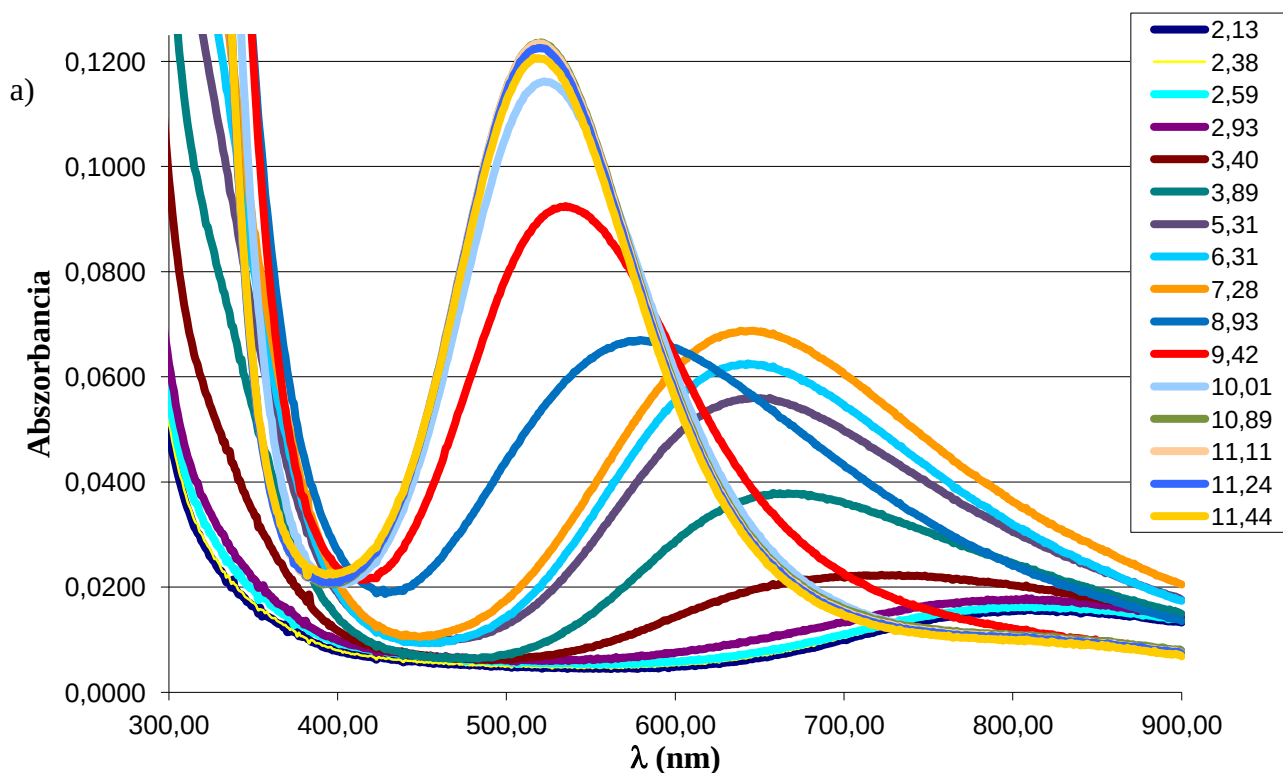
4.2.2. Spektroszkópiai vizsgálatok

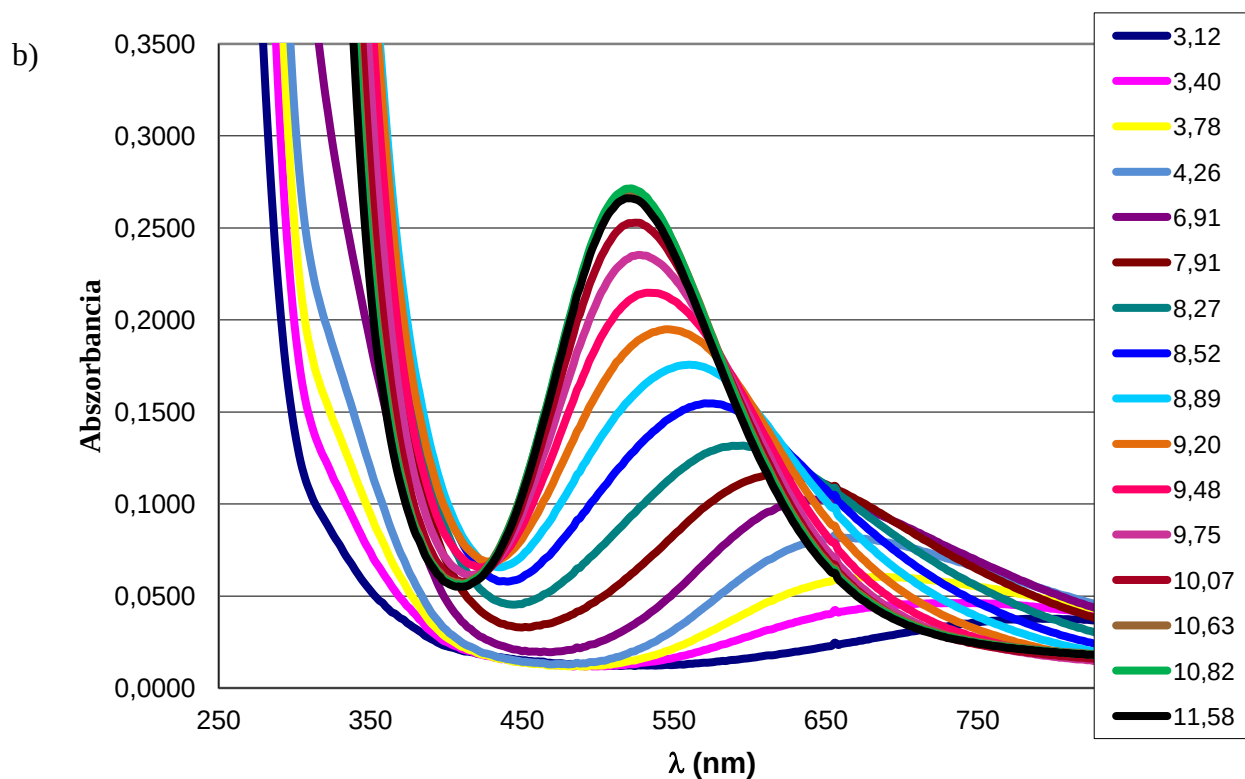
A feltételezett szerkezetek megerősítése miatt UV-látható fotometriás és CD vizsgálatokat végeztünk.

A fotometriás adatokból jól látható, hogy a két vizsgált – különböző arányban fémiont tartalmazó – rendszerben más-más a spektrumok lefutása. A spektrumok a 5. ábrán láthatóak.

A Cu(II)-HisValGlyHis 1:3 aránynál a pH=7,28 és pH= 8,93 adatokban jelentős az eltérés, ami annak köszönhető, hogy a CuL₂ komplexből CuLH₂ komplex keletkezik.

A Cu(II)-HisValGlyHis 1:1 aránynál a spektrum fokozatosan tolódik el, így a PSEQUAD program segítségével egyedi spektrumokat is számoltunk az adatokból, ami a 6. ábrán látható. A 6. ábrán az egyedi spektrum mellett a Cu(II)-HisValGlyHis 1:3 aránynál pH = 7,28 értéknél felvett (és moláris abszorbanciára átszámított) spektrum is látható, ami a CuL₂ komplexhez rendelhető.

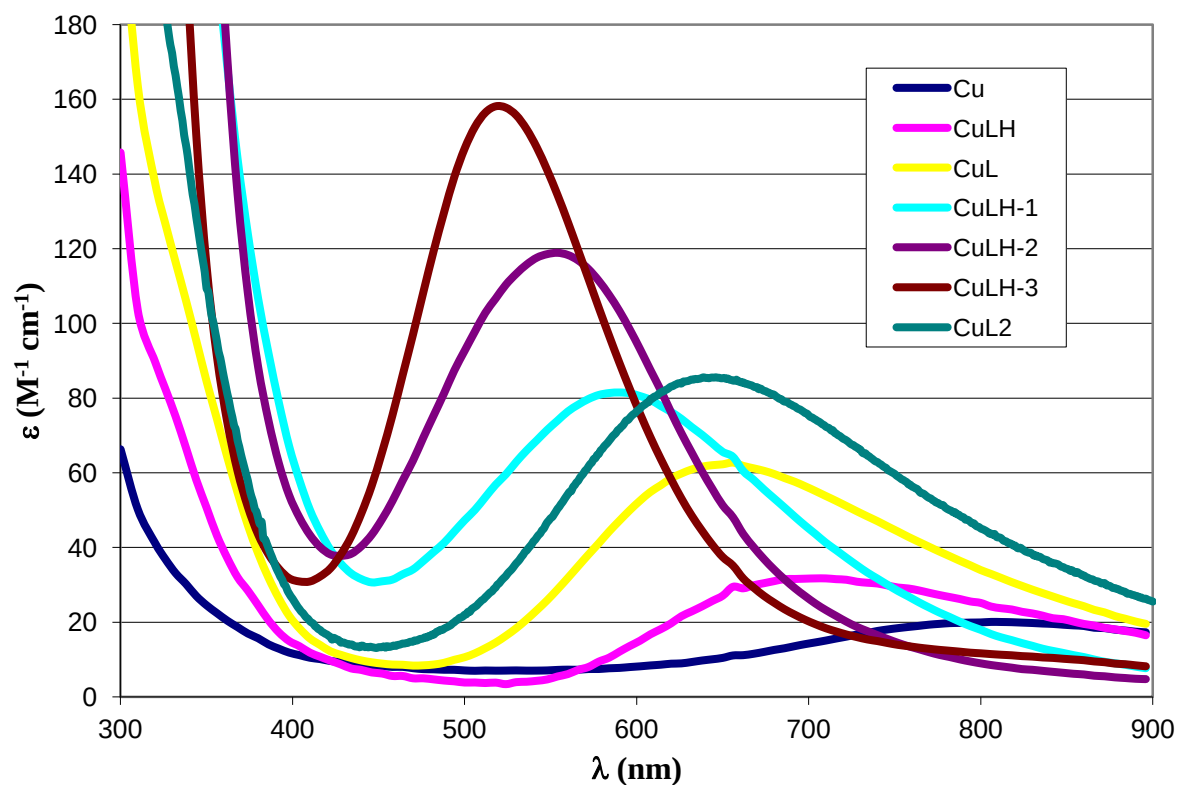




5. ábra: A Cu(II)- HisValGlyHis rendszer UV-látható spektruma a pH függvényében

a) ábra 1:3 aránynál; $c_{\text{lig}} = 2,547 \cdot 10^{-3} \text{ mmol/cm}^3$, $c_{\text{Cu(II)}} = 8,62 \cdot 10^{-4} \text{ mmol/cm}^3$

b) ábra 1:1 aránynál; $c_{\text{lig}} = 2,005 \cdot 10^{-3} \text{ mmol/cm}^3$, $c_{\text{Cu(II)}} = 1,86 \cdot 10^{-3} \text{ mmol/cm}^3$



6. ábra: A Cu(II)-HisValGlyHis 1:1 arányú rendszerben számolt egyedi spektrum

Az spektrumból leolvasható a komplexek abszorpciós maximuma ($\lambda_{\max}$) és a hozzájuk tartozó moláris abszorbancia (ϵ). Ezeket az értékeket a 3. táblázat foglalja össze.

3. Táblázat: A vizsgált és az összehasonlításként használt ligandumok Cu(II)-komplexeinek UV spektrális paramétere

Komplex	HisValGlyHis	HisGly ₂ His (8)	HisVal ₂ His (8)	Gly ₃ His (11)
	$\lambda_{\max}$ (ϵ)			
[CuLH] ²⁺	698 (31,6)	679 (39,7)	686 (28,8)	724 (42,5)
[CuL] ⁺	656 (62,7)	654 (54,9)	645 (44,3)	697 (59,2)
[CuLH ₋₁]	590 (81,5)	618 (85,7)	619 (63,6)	605 (77,7)
[CuLH ₋₂]	554 (118,9)	570 (95,1)	Széles sáv	561 (130,7)
[CuLH ₋₃] ²⁻	518 (158,2)	519 (138,7)	512 (126,5)	550 (139,8)
CuL ₂	640 (85,4)			
Cu ²⁺	806 (20,1)			

Az általam vizsgált peptidre kapott értékek megegyeznek az összehasonlításhoz használt peptidek értékeivel, tehát a keletkező komplexek szerkezete is megegyezik. Elterést egyedül a CuLH₋₂ értékénél találunk, mely inkább a Gly₃His értékéhez van közelebb.

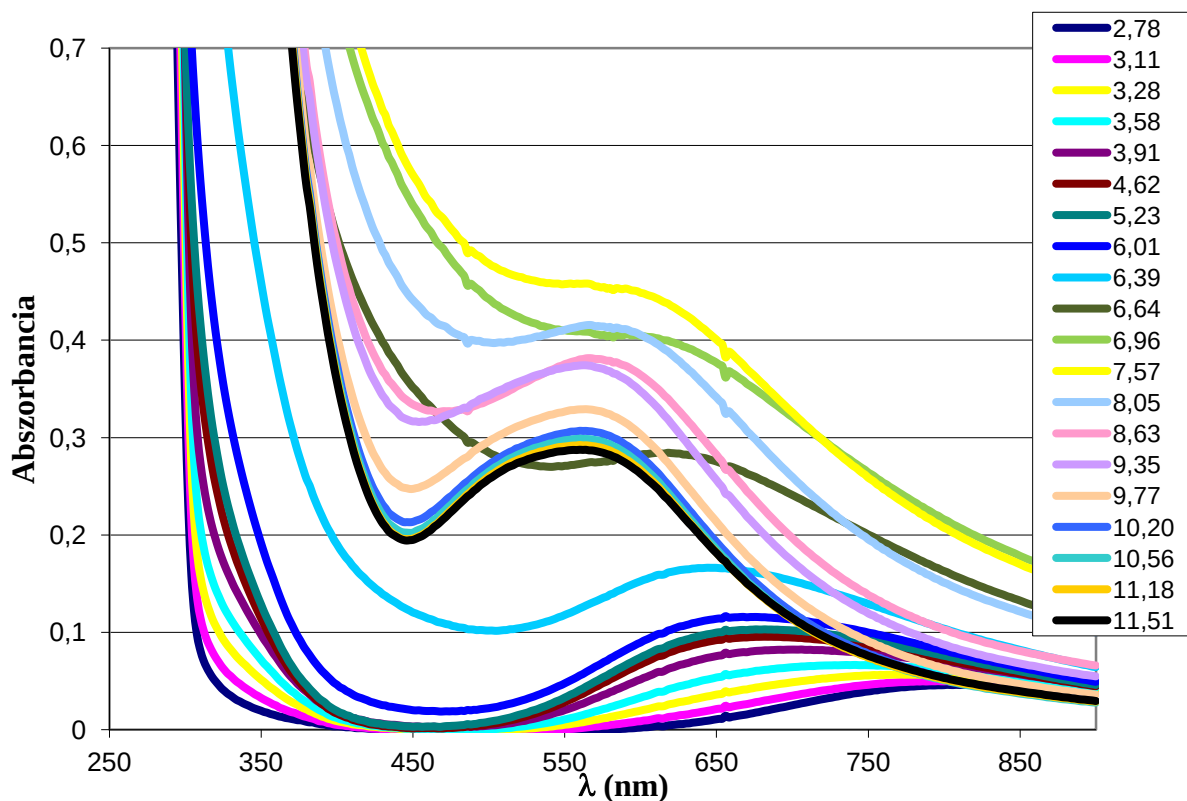
A spektrális adatok alapján feltételezhető, hogy keletkezik CuL₂ komplex is.

4. Táblázat: A (6) egyenlet alapján számított és mért abszorpciós maximum ($\lambda_{\max}$) értékek

Komplex	Koordinálódó donorcsoportok	HisValGlyHis	
		Számított $\lambda_{\max}$ (nm)	Mért $\lambda_{\max}$ (nm)
[CuLH] ²⁺	NH ₂ , Im	675	698
[CuL] ⁺	NH ₂ , Im, Im távoli	616	656
[CuLH ₋₁]	NH ₂ , N ⁻ , Im	594	590
[CuLH ₋₂]	NH ₂ , N ⁻ , N ⁻ , Im	531	554
[CuLH ₋₃] ²⁻	NH ₂ , N ⁻ , N ⁻ , N ⁻	514	518
CuL ₂	2x (NH ₂ , Im)	559	640

A mért abszorpciós maximum értékek jó egyezést mutatnak az empirikus képlettel számított értékekkel a Cu(II)-HisValGlyHis 1:1 arányú rendszerben. A CuL és a CuLH₋₂ esetében mért nagyobb adatok arra utalnak, hogy nem szabályos síknégyszetes geometriájú a keletkező komplex. Mégis a legnagyobb eltérést a CuL₂ komplex adatai mutatják. Ekkor a számított abszorpciós értéket úgy kaptuk, hogy csak két hisztaminszerű koordinációt vettünk figyelembe. A mért érték ennél jóval nagyobb, tehát a szabályos síknégyszetes geometria

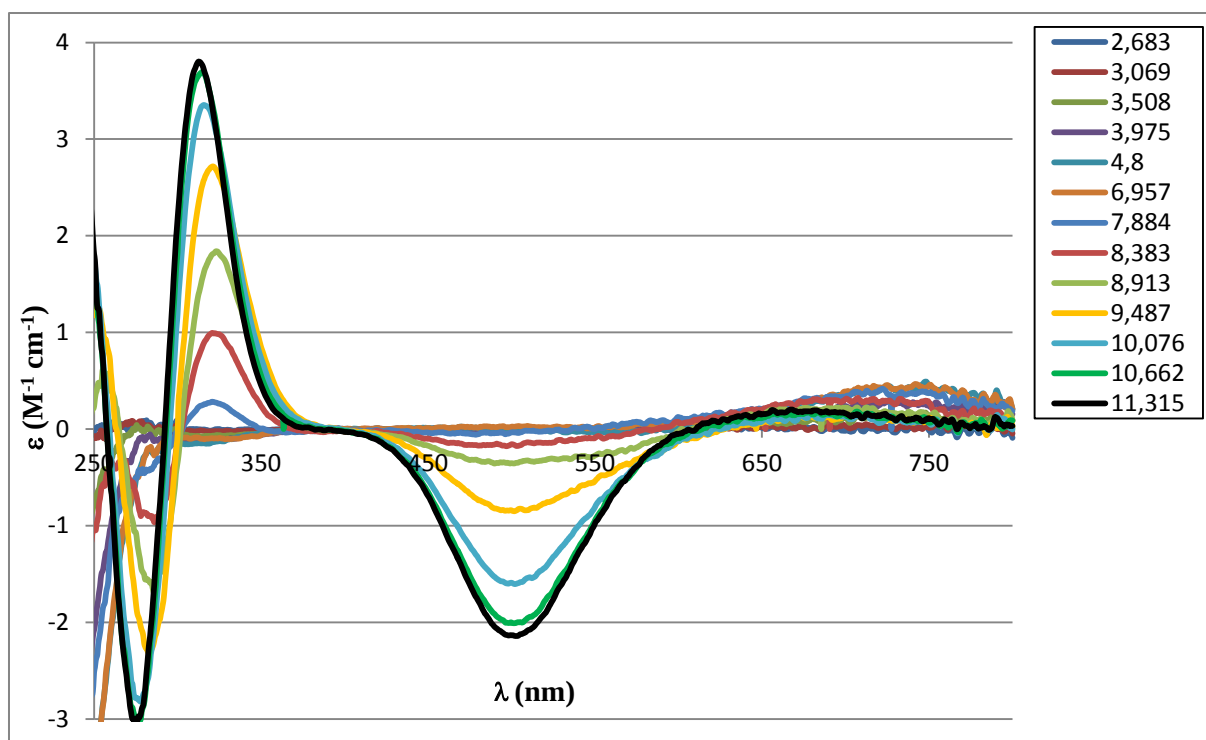
helyett torzult geometria alakul ki és a ligandumok közül az egyik háromfogú módon koordinálódik.



8. ábra: A Cu(II)- HisValGlyHis rendszer UV-látható spektruma a pH függvényében 3:2 aránynál

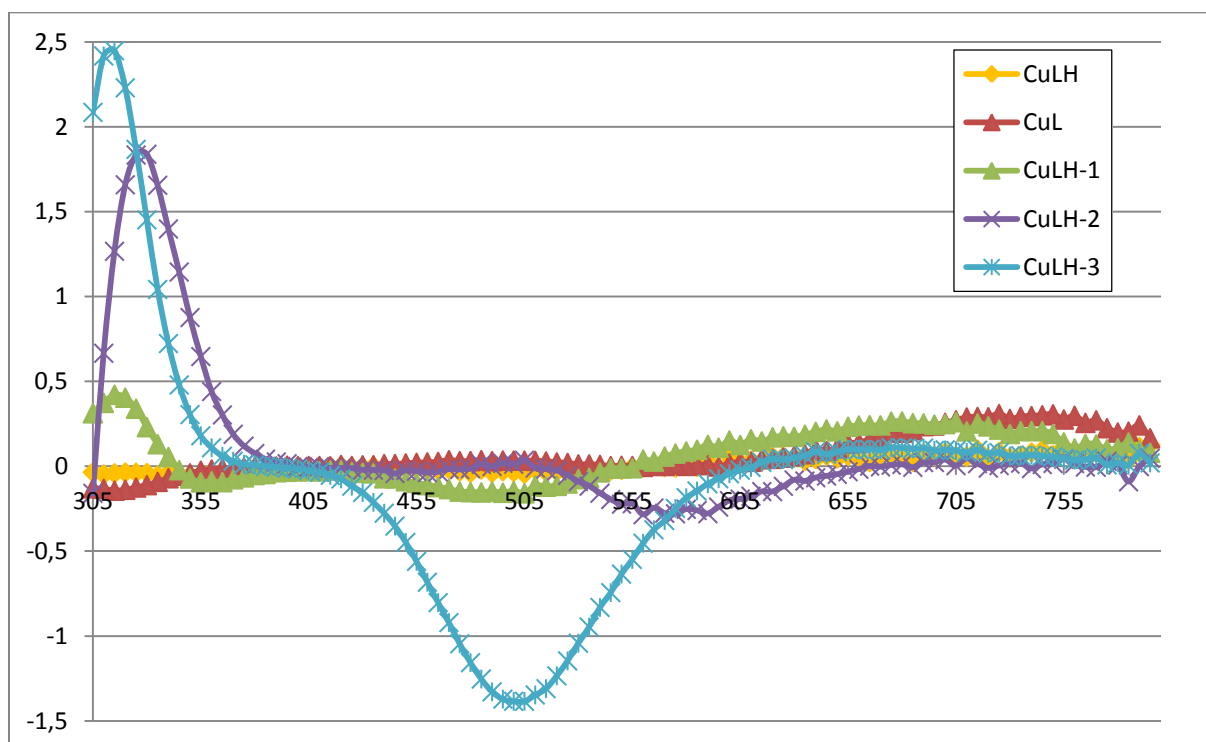
A Cu(II)-HisValGlyHis 3:2 arányú rendszer spektrumán a titrálási görbéknek megfelelően csak a savas és az erősen lúgos (pH=10 felett) tartományban felvett görbe értékelhető.

A fotometriás vizsgálat után még CD-s vizsgálatokkal (8. ábra) is ellenőriztük a feltételezett szerkezeteket. Egyedi spektrumot a Cu(II)-HisValGlyHis 1:1 arányú rendszerből számoltunk (9. ábra).



8. ábra: A Cu(II)-HisValGlyHis 1:1 arányú rendszer CD spektruma

($c_{\text{lig}} = 2,699 \cdot 10^{-3} \text{ mmol/cm}^3$, $c_{\text{Cu(II)}} = 2,513 \cdot 10^{-3} \text{ mmol/cm}^3$)



9. ábra: A Cu(II)-HisValGlyHis 1:1 arányú rendszer egyedi CD spektruma

A CD spektrumból látható, hogy a CuLH komplexnek nincs CD aktivitása, így azt feltételezzük, hogy a réz(II)ionhoz a molekula hisztaminszerűen kötődik. A CuL komplex esetében látunk egy pozitív csúcsot 735 nm-nél, mely a ligandum háromfogú koordinációja miatt jelenik meg. A CuLH₋₁, CuLH₋₂ és a CuLH₋₃ komplexek esetében negatív csúcsokat figyelhetünk meg, amely a d-d átmentre jellemző; illetve növekvő intenzitású pozitív csúcsokat 300 nm környékén. Mindkét információ arra utal, hogy a réz(II) körül az amid nitrogének koordinálódnak. A réz(II)-amid nitrogén töltésátmeneti sáv az egy, kettő, illetve három amidnitrogén koordinációjú komplexnél rendre 315 nm, 320 nm és 325 nm hullámhossznál jelenik meg. A CuLH₋₃ komplexre kapott spektrum jó egyezésben van a HisVal₂His ligandum adataival, bár itt csak közelítő spektrumok adóttak, nincs felbontva a spektrum.

5. táblázat: A vizsgált és összehasonlításként használt ligandumok Cu(II)-komplexeinek CD spektrális paraméterei

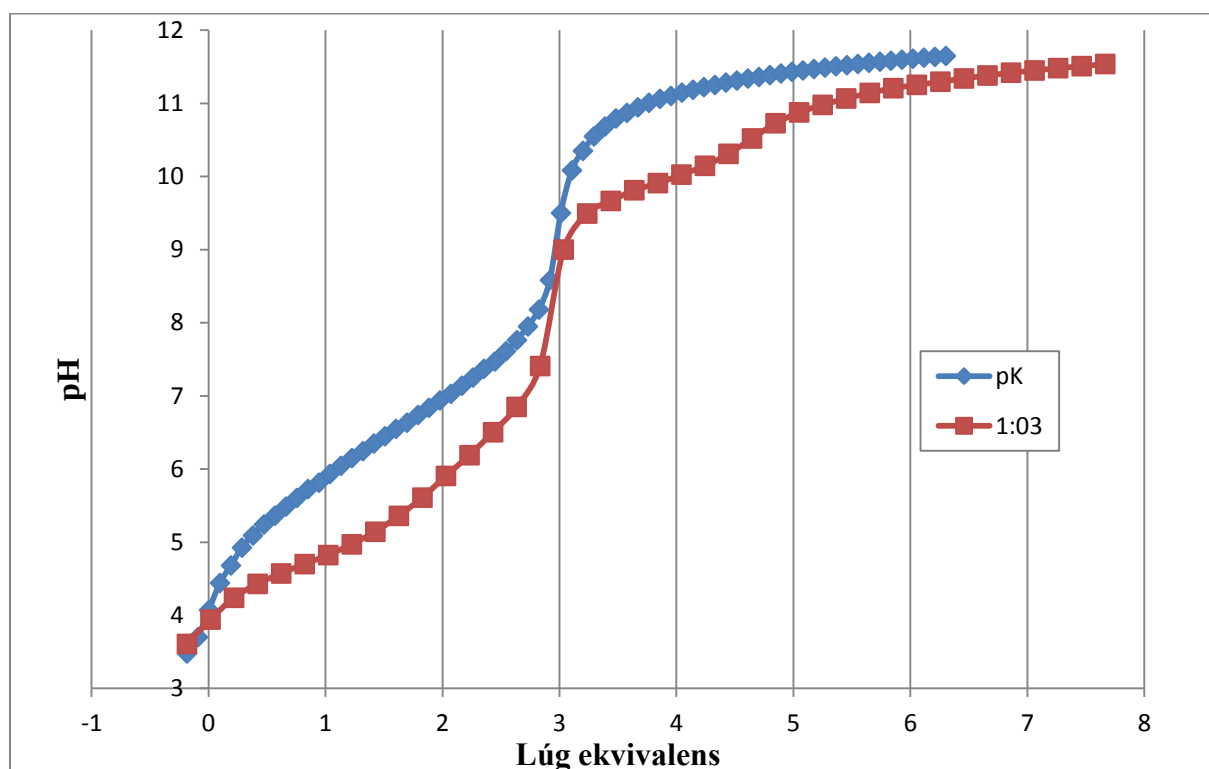
Komplex	HisValGlyHis	HisVal ₂ His (6)
	λ (ϵ)	
[CuL] ⁺	730 (+0,28)	726
[CuLH ₋₁]	685 (+0,25)	690
	485 (-0,15)	561
	355 (-0,09)	345
	315 (+0,42)	-
[CuLH ₋₂] ⁻	-	690
	575 (-0,25)	540
	325 (+1,87)	319
[CuLH ₋₃] ²⁻	500 (-1,38)	524
	315 (+2,45)	313
CuL ₂	708 (+1,85)	-

A Cu(II)-HisValGlyHis 1:3 arányú rendszer spektrumát nem bontottuk fel, de az adatok összevethetők. Ebben a rendszerben megjelent a CuL₂ komplex, amihez spektrumot is hozzá tudunk rendelni, ami pH=7-8 között van. Ez arra utal, hogy a két ligandum az amino és egy vagy két imidazol nitrogéneken keresztül kötődik, és nincs amidnitrogén deprotonálódás.

4.3. A ligandum Ni(II)-komplexei

4.3.1. pH-potenciometriás vizsgálat

A további vizsgálatokra már csak kevés ligandum maradt, így a kísérleteket csak a Ni(II)-HisValGlyHis 1:3 fémion/ligandum aránynál végeztem. A vizsgált rendszer titrálási görbéje a 10. ábrán látható.



10. ábra: A Ni(II)- HisValGlyHis rendszer titrálási görbéi

A rendszerben a komplexképződés $\text{pH} = 4$ felett kezdődött meg. $\text{pH} 9$ felett a fémiontartalmú rendszerek titrálási görbéi eltolódnak a ligandumokéhoz képest, ami extra lúgfogyasztó folyamatot jelez, vagyis újabb deprotonálódási folyamat indul meg a szabad ligandumhoz képest, ami feltételezhetően az amidnitrogének deprotonálódásával magyarázható.

A kapott adatokat PSEQUAD programmal értékeltem ki és a programmal meghatározott Ni(II)-komplexek összetételét és stabilitását a 6. táblázatban foglaltam össze.

6. Táblázat: Ni(II) komplexek összetétele és stabilitási állandó értékei ($\log\beta$)

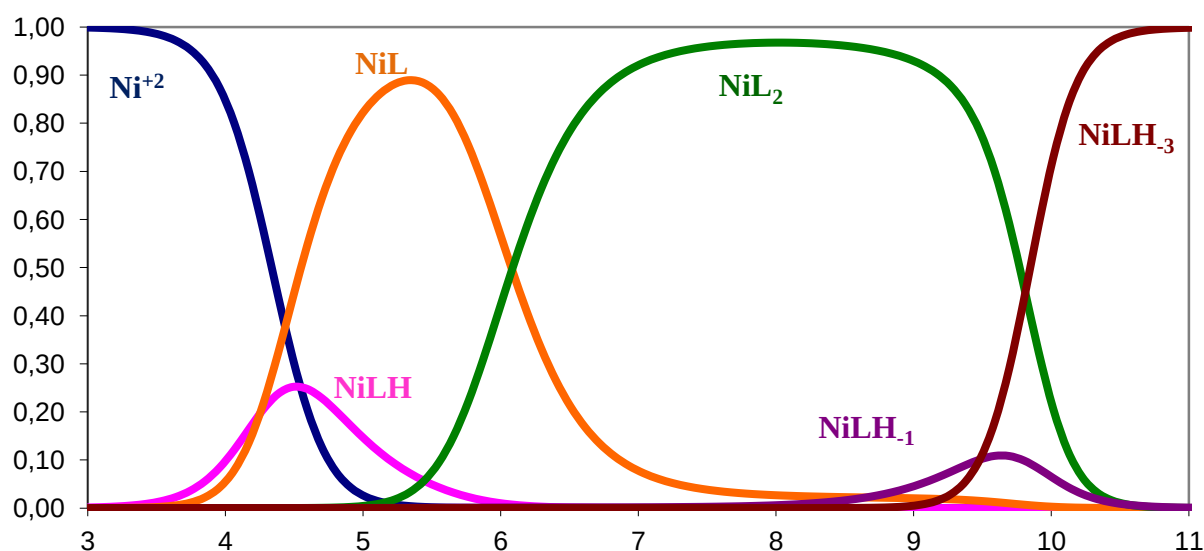
Komplex	HisValGlyHis	HisGly ₂ His (12)	HisVal ₂ His (12)
$[\text{NiLH}]^{2+}$	12,79 (18)	12,96	13,22
$[\text{NiL}]^+$	8,54 (5)	8,25	7,48
$[\text{NiL}_2]$	13,31 (10)	12,70	-
$[\text{NiLH}_{-1}]$	-0,11 (40)	-	-1,39
$[\text{NiLH}_{-2}]^-$	-	-10,04	-
$[\text{NiLH}_{-3}]^{2-}$	-19,07 (15)	-19,89	-20,39
pK (His)	4,25	4,71	5,74
pK ₁ (amid)	8,65	-	8,87
pK _{1,2} (amid)	-	9,15	-
pK _{2,3} (amid)	9,48	-	9,50
pK ₃ (amid)	-	9,85	-

$$\text{pK}(\text{His}) = \log\beta([\text{NiLH}]^{2+}) - \log\beta([\text{NiL}]^+)$$

$$\text{pK}_1(\text{amid}) = \log\beta([\text{NiL}]^+) - \log\beta([\text{NiLH}_{-1}])$$

$$\text{pK}_{2,3}(\text{amid}) = \log\beta([\text{NiLH}_{-1}]) - \log\beta([\text{NiLH}_{-3}]^{2-})/2$$

A táblázat adataiból látható, hogy egy biszkomplex és monokomplexek keletkeznek. Az összehasonlításként használt mindkét komplex esetében is ugyanezek a monokomplexek $[\text{NiLH}]^{2+}$ és $[\text{NiL}]^+$ keletkeznek. Elterést a további komplexek mutatnak. Az általam vizsgált peptid a HisGly₂His ligandumhoz hasonlóan Ni(II)-ionnal $[\text{NiL}_2]$ biszkompleket is kialakít, és eltér a HisVal₂His peptidtől, mert itt nem feltételezték biszkomplex jelenlétét. Ugyanakkor a HisVal₂His peptidhez hasonlóan $[\text{NiLH}_{-1}]^-$ és $[\text{NiLH}_{-3}]^{2-}$ komplexek keletkezését tudtuk kimutatni.



11. ábra: A komponensek eloszlása a pH függvényében

A Ni(II)-HisValGlyHis 1:3; $c_{\text{lig}} = 2,133 \cdot 10^{-3} \text{ mmol/cm}^3$, $c_{\text{Ni(II)}} = 6,937 \cdot 10^{-4} \text{ mmol/cm}^3$

A nikkel(II) tartalmú mintáknál hasonló a helyzet, mint a réz(II)iont tartalmazó minták esetében. A $[\text{NiLH}]^{2+}$ komplex savas tartományban képződik, majd a pH emelésével lépcsőzetes deprotonálódás jön létre, amely során $[\text{NiL}]^+$, $[\text{NiLH}_1]$, $[\text{NiLH}_3]^{2-}$ komplexek keletkeznek.

A $[\text{NiLH}]^{2+}$ komplex kialakulása hisztaminszerű, tehát az N-terminális hisztidin imidazolnitrogénje, és az N-terminális aminonitrogén koordinálja a Ni(II)-t, és stabil kelátgyűrű képződik, míg a C-terminális hisztidin imidazolnitrogénje még protonált formában van jelen.

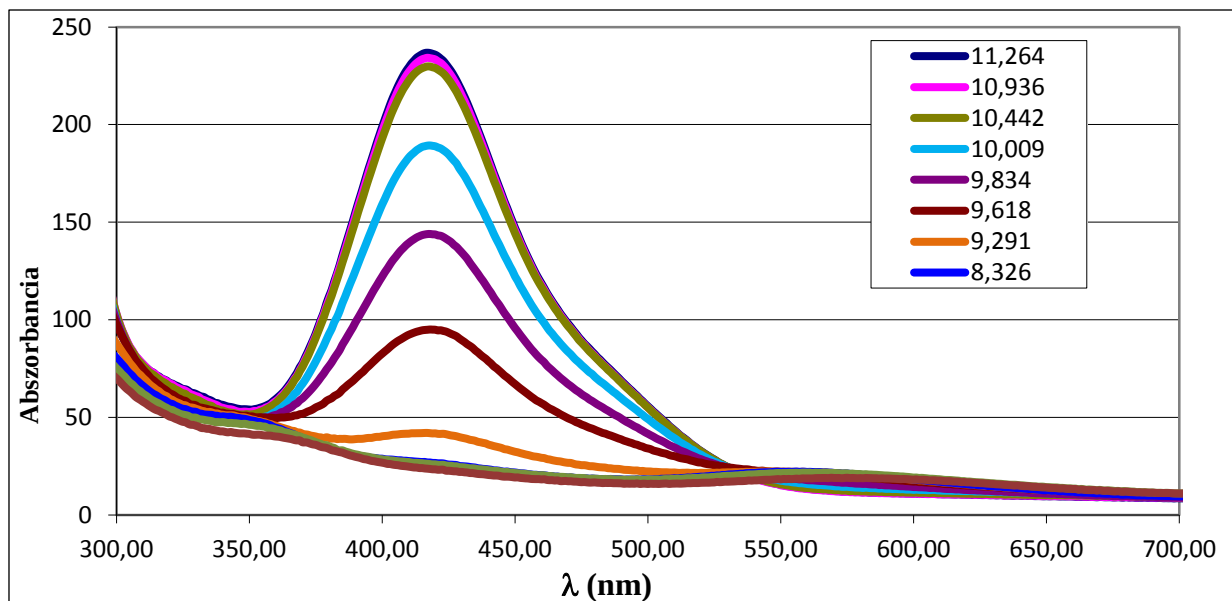
A pH emelésével $[\text{NiL}]^+$ komplex alakul ki, a C-terminális hisztidin imidazolnitrogénje is deprotonálódik. A deprotonálódásra számított érték 4,61. A ligandum háromfogú koordinációjával létrejövő komplexet oktaéderes szerkezet jellemzi.

A pH újabb emelésével extra deprotonálódási folyamat következik be, ami arra utal, hogy az amidnitrogén is deprotonálódik. Kialakulnak a $[\text{NiLH}_1]$ és $[\text{NiLH}_3]^{2-}$ komplexek. A titrálási görbéről és a táblázatból látható, hogy ez pH=9,5 fölött valósul meg. A pK értékek megmutatják, hogy két amidnitrogén kooperatív módon, míg a harmadik amidnitrogén deprotonálódása elkülönülten játszódik le. A keletkező komplexek stabilitása jó egyezést mutat az összehasonlításként használt peptidek komplexeivel.

A $[\text{NiL}_2]$ komplexben a két ligandum háromfogú koordinációja valósul meg, oktaéderes szerkezetet létrehozva

4.3.2. Spektroszkópiai vizsgálatok

A feltételezett szerkezetek megerősítése miatt UV-látható fotometriás (12. ábra) és CD vizsgálatokat végeztünk.

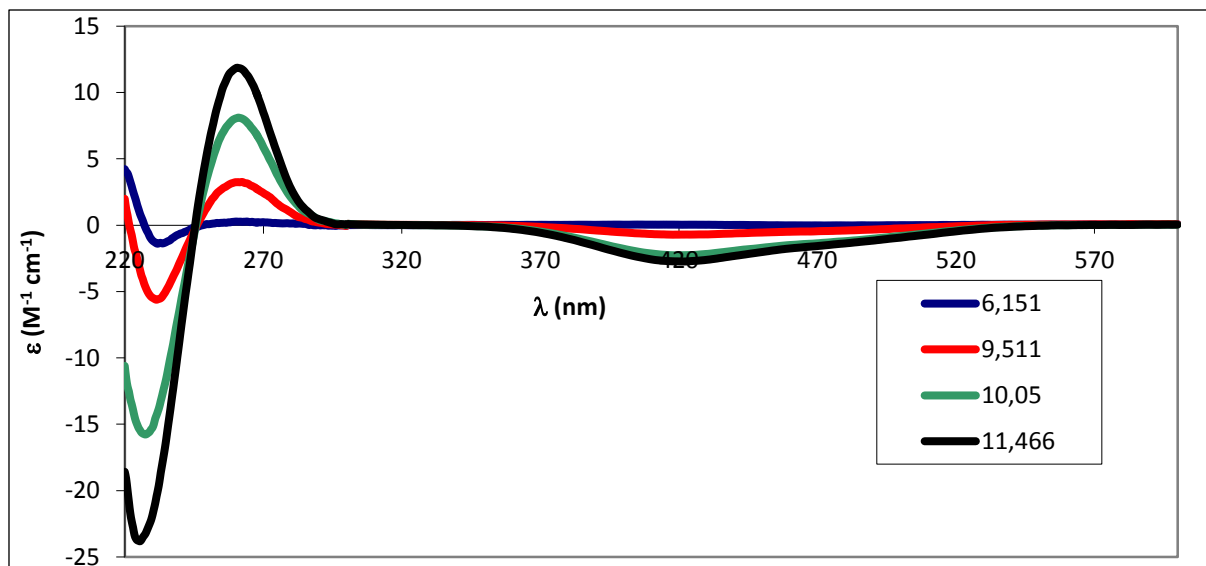


12. ábra: A Ni(II)- HisValGlyHis rendszer UV-látható spektruma a pH függvényében 1:3 aránynál

A fotometria spektrumából látható, hogy pH=9 alatt csak kis intenzitású sáv jelenik meg 560 nm körül. Ez összhangban van a $[\text{NiLH}]^{2+}$ és a $[\text{NiL}]^+$ komplexek oktaéderes geometriájával.

Az amidnitrogének deprotonálódásával párhuzamosan síknégyszetes geometriájú komplexek alakulnak ki. Ezt bizonyítja, hogy a mérés közben 9,4-es pH-n az oldat megsárgult, illetve a spektrumban nagy intenzitású csúcs jelenik meg 417 nm-nél. A spektrum intenzitása az egyre több amidnitrogén deprotonálódásával jelentősen megnő, de az abszorpciós maximum helye nem változik. Ennek alapján az feltételezhető, hogy az amino csoport és a másik három amidnitrogén deprotonálódjon és így mindkét imidazol csoport kiszoruljon a koordinációs szférából. Ez az amidnitrogén egy egyszerű tetrapeptidhez képest nagyobb pH-n játszódik le, tehát a háromfogú koordináció gátolja az amid nitrogén deprotonálódását és koordinálódását.

A feltételezett szerkezeteket CD- vizsgálatokkal is ellenőriztük (13. ábra).



13. ábra: A Ni(II)- HisValGlyHis rendszer CD spektruma a pH függvényében 1:3 arányánál

Ugyanaz a tendencia figyelhető meg a CD spektrumoknál is, mint a fotometriás spektrumoknál. Értékelhető görbe 9,5-ös pH-n jelenik meg. E fölött csak a csúcsok intenzitása változik meg, a hullámhossza nem. Ez a tetrapeptidszerű koordinációt támasztja alá.

7. táblázat: A vizsgált és összehasonlításként használt ligandumok Ni(II)-komplexeinek CD spektrális paraméterei

Komplex	HisValGlyHis	HisVal ₂ His (10)
	λ (ϵ)	
[NiLH ₋₃] ²⁻	418 (-2,71)	471 (-4,50)
	259 (+11,67)	262 (+11,93)
	-	227 (-38,92)
	224 (-23,6)	223 (+9,1)

A spektrális adatok jó egyezést mutatnak a HisVal₂His tetrapeptiddel, de eltérést tapasztaltunk a d-d átmenethez tartozó spektrumban.

A HisGly₂His peptiddel való összehasonlítást nem tettük meg, mert a szekvenciából adódóan a C-terminális hisztidinhez képest a harmadik helyen glicin aminosav van, aminek következtében a Cotton effektus ellentétes előjelűvé változik.

A HisValGlyHis peptid esetében feltételezhetően egyféle koordinációs komplex keletkezik, de ennek a pontos szerkezetének a kiderítéséhez további összehasonlítási és NMR vizsgálatokat kell elvégezni.

5. Összefoglalás

A réz és a nikkel valamennyi élő szervezet számára nélkülözhetetlen nyomelem. A réz a legnagyobb mennyiségben fehérjéhez kötötten fordul elő a szervezetben, míg a nikkel az ureáz nevű enzim aktív centrumában. Redoxireakcióik számos biológiai oxidációs folyamatban játszanak szerepet. Leggyakrabban +2-es oxidációs állapotban képeznek komplexeket. A hisztidin fontos kötési hely a nikkel(II) és a réz(II) számára is. A rendszerek központi ionja valamilyen átmenetifémion, amely koordinatív kötéssel kapcsolódik a ligandumként jelenlévő aminosavhoz, peptidhez, vagy azok származékához.

Munkám során a C-terminálisan védett HisValGlyHis tetrapeptid réz(II) és nikkel(II) komplexeit vizsgáltam. Először előállítottam a HisValGlyHis szekvenciájú aminosavat szilárd fázisú peptidszintézissel. Majd a peptid az oldategyensúlyi vizsgálatát végeztem el. A pH-potenciometriás vizsgálatok alapján SUPERQUAD és PSEQUAD programok segítségével meghatároztam a ligandumok koncentrációját, a protonálódási állandók értékeit és a keletkező komplexek stabilitási állandóit.

A pH-potenciometriás mérések alapján megállapítható, hogy a réz(II)-ion jelenlétében monokomplexek (CuLH , CuL , CuLH_{-1} , CuLH_{-2} és CuLH_{-3}) és egy biszkomplex (CuL_2); míg a nikkel esetében $[\text{NiLH}]^{2+}$, $[\text{NiL}]^+$, $[\text{NiL}_2]$, $[\text{NiLH}_{-1}]$, $[\text{NiLH}_{-3}]^{2-}$ komplexek keletkeznek. Az ML és ML_2 összetételű komplexekben a ligandum háromfogú koordinációja jön létre. A pH emelésével az amidnitrogén deprotonálódik. A nikkel(II)ion esetében pH 9 felett izomer szerkezeteket nem feltételezünk.

Az UV-látható fotometriás és CD-vizsgálatok alátámasztották a feltételezett szerkezetű komplexek jelenlétét.

6. Summary

The copper and nickel are invaluable trace elements in all living organisms. Copper bounds usually proteins in the body, whereas the nickel is in the active site of an enzyme called urease. Redox reactions play a role in many biological oxidation process. Complexes are formed most often with +2 oxidation state. Histidine is important binding site for the nickel(II) and copper(II). The complexes which can mimic these interactions contain transition metal ion as central metal ion and amino acids or peptides as ligands.

During my work I studied the copper(II) and nickel(II) complexes of a C-termini protected tetrapeptide (HVGH). In the first step I synthesized a tetrapeptid containig two histidine amino acids. The synthesis was performed by means of automated peptide synthesizer based upon the solid phase peptide synthesis. After that the equilibrium studies of the complexes of this peptide were carried out. Based on the pH-potentiometric measurements I determined the concentration and protonation constants of the ligands and the stability constants of metal complexes using SUPERQUAD and PSEQUAD computer programs.

Based on the pH-potentiometric measurements it can be confirm that the copper(II) ion forms monocomplexes (CuLH , CuL , CuLH_{-1} , CuLH_{-2} és CuLH_{-3}) and a bis(ligand) complex (CuL_2); while for nickel $[\text{NiLH}]^{2+}$, $[\text{NiL}]^+$, $[\text{NiL}_2]$, $[\text{NiLH}_{-1}]$, $[\text{NiLH}_{-3}]^{2-}$ complexes are formed. ML and ML_2 complexes are created tridentate coordination of the ligand. Increasing the pH the successive deprotonation and coordination of amide nitrogens takes place. In case of nickel(II) ions we did not assume isomer structures over at pH 9.

The supposed structures of the complexes were confirmed by UV-visible spectrophotometry and CD spectroscopy.

7. Felhasznált irodalom

1. Kiss T., Gajda T., Gyurcsik B.: *Bevezetés a bioszervetlen kémiába*, Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest (2007)
2. N.N. Greenwood, A. Earnshaw: *Az elemek kémiája*, Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest (2004)
3. Timári Sarolta: *Doktori értekezés*, Debreceni Egyetem, Debrecen, 2012
4. S. Rajkovic, C. Kállay, R. Serényi, G. Malandrinos, N. Hadjiliadis, D. Sanna, I. Sóvágó, „Complex formation processes of terminally protected peptides containing two or three histidyl residues. Characterization of the mixed metal complexes of peptides”, *Dalton Trans.*, 5059-5071. (2008)
5. Kocsi Judit: *SOD enzimet modellező peptid szintézise és réz(II) komplexek vizsgálata*, Szakdolgozat, Debreceni, 2014
6. R. B. Merrifield, *J. Am. Soc.*, 85, 2149-2154 1963
7. pH-metria, Oktatási segédanyag, Debreceni Egyetem
www.inorg.unideb.hu/oktatas/6 megnézés dátuma: 2014.11.03.
8. Serfőző Dóra: *SOD- enzimet modellező peptidek szintézise és réz komplexek vizsgálata*, Diplomamunka, Debrecen 2012
9. D. Nguyen, R. Seyer, A. Heitz and B. Castro: *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **1**, 1025 (1985)
10. H. Sigel and R.B. Martin: *Chem. Rev.*, **82**, 385 (1982)
11. K. Várnagy, J. Szabó, I. Sóvágó, G. Malandrinos, N. Hadjiliadis, D. Sanna, G. Micera; *J. Chem.Soc., Dalton Trans.*, 467 (2000)
12. Duli Tímea Gyöngyi: *Multihisztidin peptidek nikkel(II) komplexek vizsgálata*, Szakdolgozat, Debrecen, 2014