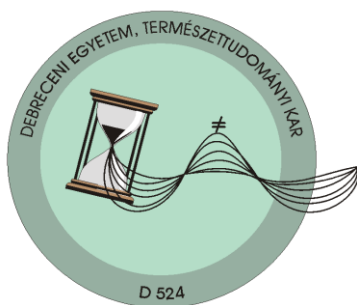




A hisztidin fotokémiai reakciója és oxidációja peroxomonoszulfát-ionnal

Tudományos Diákköri Dolgozat

Homolya Ágnes

Témavezető: Dr. Lente Gábor



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

2014

Köszönetnyilvánítás

Őszinte köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Lente Gábornak, aki lehetővé tette számomra, hogy TDK dolgozatom elkészülhessen, és munkámat a Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékén végezhessem. Hálás vagyok a segítségéért, értékes és hasznos tanácsaiért.

Szeretnék köszönetet mondani Gombár Melinda PhD hallgatónak a ^1H -NMR mérésekben nyújtott segítségért.

Megköszönöm Balogh Ágnes MSc hallgató munkáját, aki az általunk vizsgált hisztidinen kívül az összes aminosav, valamint az imidazol fotokémiai reakcióját megvizsgálta, megkönnyítve ezzel a mi munkánkat.

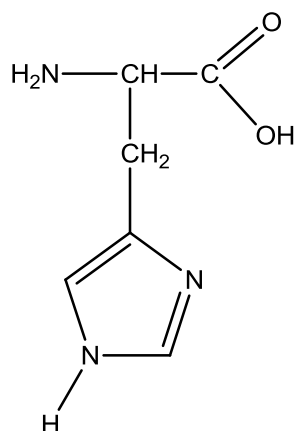
Köszönetet mondanék Szabó Mária MSc hallgatónak, és a D524-es labor többi dolgozójának, akik segítettek és támogattak a munkám során.

Tartalomjegyzék

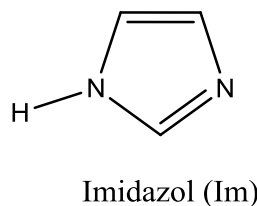
Köszönetnyilvánítás	2
Bevezetés	4
1. Irodalmi áttekintés.....	6
1.1. Oxidáció peroxomonoszulfát-ionnal	6
1.2. A hisztidin és származékainak protonációja.....	8
1.3. A hisztidin és az imidazol fotokémiája	12
2. Kísérleti rész	15
2.1. Felhasznált vegyszerek	15
2.2. A méréshez használt műszerek, programok	15
2.3. A diódasoros spektrofotométer használata fotokémiai reakciók követésére.....	16
3. Mérési eredmények és értékelésük	18
3.1. A hisztidin oxidációjának vizsgálata peroxomonoszulfát-ionnal.....	18
3.2. A hisztidin fotokémiai reakciójának vizsgálata.....	23
3.3. ^1H -NMR mérések	28
Összefoglalás.....	31
Irodalomjegyzék.....	32

Bevezetés

A hisztidin azon kilenc természetes aminosav egyike, melyeket az emberi szervezet nem képes előállítani, így valamilyen külső forrásból kell biztosítani a szervezet számára. Ezeket az aminosavakat esszenciális aminosavaknak nevezzük. A hisztidin kiemelkedő szerepet tölt be a fehérjékben, ugyanis a fémionok ezen az aminosavon keresztül kötődnek a fehérjéhez. [3, 5] A fémionok kötődésének erősségét jelentősen gyengíti, ha a hisztidin oxidált állapotban van, így fontos feladat az aminosav oxidációs reakcióinak vizsgálata.



Hisztidin (His)



A hisztidin és az imidazol szerkezeti képlete

A hisztidin az imidazol-oldalláncának köszönheti nagy jelentőségét, mert az imidazolgyűrű számos molekulában fontos funkciós csoportként van jelen. [2] Az oligopeptidekben és fehérjékben lévő hisztidenegységek többnyire döntő fontosságú fémkötőhelyek, például így az életfontosságú réz és cink megkötésére alkalmas csoportok is hisztidinek.

A hisztidin oxidációját peroxomonoszulfát-ionnal (HSO₅⁻) végeztük, [1] ami a Caro-sav (H₂SO₅) savmaradékionja. A peroxomonoszulfát-ion széles körű alkalmazását számos kedvező

tulajdonságának és könnyű kezelhetőségének köszönheti. Környezetvédelmi szempontból kedvező sajátása, hogy az oxidáció melléktermékeként szulfátió keletkezik.

Jelen dolgozat elsődleges célja, hogy megvizsgáljuk a hisztidin hogyan oxidálható peroxomonoszulfát-ionnal. A kísérletek közben fotokémiai változásokat tapasztaltunk a hisztidin vizes oldataiban, ezért ezt a folyamatot is tanulmányozni kezdtük.

1. Irodalmi áttekintés

1.1. Oxidáció peroxomonoszulfát-ionnal

A peroxomonoszulfát-ion (HSO_5^-) egy széles körűen felhasználható oxidálószer mind a szerves, mind a szervetlen kémiában. Gyakori felhasználása annak köszönhető, hogy általánosan nagy reaktivitású, és sokkal könnyebben kezelhető, mint a hidrogén-peroxid, amelyben a peroxomonoszulfát-ionhoz hasonlóan szintén található peroxokötés. Tovább szélesíti a felhasználását kedvező ára és környezetbarát tulajdonsága. [1]

Nagyon sok olyan vegyületcsoport létezik, melyeknek az oxidációja lehetséges peroxomonoszulfát-ionnal, amelyet általában az oxonoldat tartalmaz (az oxon a $2\text{KHSO}_5 \cdot \text{KHSO}_4 \cdot \text{K}_2\text{SO}_4$ képletű összetett só). [1] Ilyenek például a karbonil- és hidroxilvegyületek, aminok, N-heterociklusos, kén-, foszfor és halogéntartalmú vegyületek. Ez is azt igazolja, hogy a HSO_5^- számos területen felhasználható oxidálószer.

A peroxomonoszulfát-ion oxidáló tulajdonságára jellemző, hogy egy- és két elektronos oxidálószerként is viselkedhet különböző redoxireakciókban. A kételektronos oxidáció során felszakad a peroxomonoszulfát-ion peroxo kötése [1]:



ahol A egy oxigént befogadó reagens.

Az egyelektronos oxidáció esetében, a lezajló redoxi folyamat során a peroxomonoszulfát-ion köztiterméként szulfát-ion gyököt ($\text{SO}_4^{\bullet -}$) képez [1]:



A HSO_5^- redoxireakciói közül a kételektronos oxidáció gyakoribb, de néhány reakció esetében azonban a ritkábbik folyamat, az egyelektronos oxidáció megy végbe.

A Debreceni Egyetemen [1] különböző kísérleteket végeztek a peroxomonoszulfát-ion oxidáló tulajdonságának vizsgálatára. Az eredményeikből arra következtettek, hogy egyelektronos folyamatban oxidálódnak a Fe^{2+} és a V^{4+} ionok, és kételektronos folyamat zajlik le

a halogenid-ionok (Cl^- , Br^- , I^-) és a peroxomonoszulfát-ion között. A Ce^{3+} ion pedig csak megvilágítás hatására oxidálható.

A halogenidionok redoxireakcióinak tanulmányozására különböző kísérleteket végeztek redukálószer (halogenidion) és oxidálószer (oxon) feleslegben. A mérési eredményekből egyértelműen kiderült, hogy a keletkezett termékek különbözőek a két esetben:

- a I^- -ion esetében a I_3^- -ion a meghatározó termék redukálószer-felesleg esetén, függetlenül a vizsgált pH értékektől, míg oxidálószer-felesleg alkalmazása esetén közttermékként I_2 , végtermékként pedig IO_3^- képződik,
- a Cl^- -nál a Cl_2 a domináns végtermék Cl^- -ionfelesleg esetén, viszont ha az oxont alkalmazták feleslegben, akkor végtermékként a HOCl nevezhető meg,
- a Br^- -ionfelesleg alkalmazásakor a fő termék keletkezése függ a pH-tól: savas közegben Br_2 valamennyi Br_3^- jelenlétében, semleges közegben HOBr , enyhén lúgos közegben pedig BrO^- képződik; oxidálószer-feleslegben közttermékként Br_2 , végtermékként pedig BrO_3^- keletkezik.

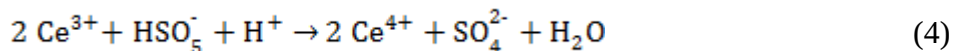
A redoxireakcióban közttermékként keletkező I_2 továbboxidálódásának követése minden gond nélkül lehetséges szemben a Br_2 oxidációjával. Ennek egyik oka, hogy ez a reakció jóval lassabb a I_2 reakciójánál, a másik pedig, hogy a Br_2 oxidációjával egy időben a HSO_5^- diszproporcionálódik is. Ekkor O_2 képződik, ez pedig lehetetlenné teszi a további méréseket.

A Cl^- esetében, a HOCl képződése ellenére mégis kimutatható a Cl_2 jelenléte a folyamat során, ami a következő egyensúlyból adódik:



A Cl^- és a HOCl jelen van a rendszerben, ennek köszönhetően valamennyi Cl_2 is képződik a folyamat során.

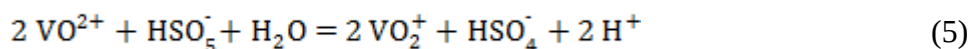
A CeCl_3 -oldat oxidációjának vizsgálatakor a két oldat összekeverése után nem volt megfigyelhető reakció a Ce^{3+} és a peroxomonoszulfát-ion között. Változás a diódasoros spektrofotométer alkalmazásakor történt, ekkor már észrevehető volt a végbemenő reakció. Mindez azzal magyarázható, hogy fotokémiai reakció zajlik le a Ce^{3+} és a HSO_5^- között. A méréseket 266 nm felett követték, ugyanis ebben a tartományban a HSO_5^- abszorbeálása jelentéktelen. A spektrális változásokat a következő reakció okozta:



A fotokémiai reakció további tanulmányozására olyan kísérleteket is végeztek, amelyekben a teljes megvilágítás idejét bizonyos időközönként sötét szakaszokkal megszakították.

A V^{4+} oxidációjának tanulmányozásakor a minták kézi keverése nem volt alkalmazható a reakció gyorsasága miatt (néhány másodperc), így stopped-flow készülékkel követték a V^{4+} és a HSO_5^- -ion között lejátszódó kémiai folyamatot.

A reakció sztöchiometriáját már korábban megállapították, ezt az újabb mérések csak megerősítették:



A fenti kísérletek mellett még a Fe^{2+} redoxireakcióját is vizsgálták a szerzők, amely esetben bonyolultabb kinetikát állapítottak meg a korábban feltételezettnél. Ebben a reakcióban elkerülhetetlenül jelen van a szulfátion, amely hatással van a lezajló folyamatra. A felhasznált reagensek tisztasága ellenére a (6) reakció alapján szulfát-ion is kerül a rendszerbe, ami a Fe^{3+} -ionnal komplexet képez.



A Fe^{3+} -nal reagáló SO_4^{2-} a peroxomonoszulfát- ionból származik, melynek jelenléte elkerülhetetlen. Hogy állandó értéken maradjon a szulfátion koncentrációja, kénsavban végezték a kísérleteket. Így azonban a szulfátion protonálódását kellett figyelembe venni. Az elvégzett mérések alapján elmondható volt, hogy a reakcióban Fe^{3+} és SO_4^{2-} képződik.

1.2. A hisztidin és származékainak protonációja

A hisztidin protonálódására és deprotonálódására vonatkozó kutatásokban [2-4] nem csak az aminosav, hanem az imidazol és a velük rokon molekulák hasonló reakcióit is vizsgálják [2, 3].

Huang és munkatársai [3, 4] gázfázisú semleges, protonált és deprotonált hisztidinkonformereket vizsgáltak. Sikertült megállapítaniuk, hogy a gázfázisú hisztidin esetében mind a protonálódás, mind a deprotonálódás az imidazol gyűrűn megy végbe [3].

A molekula biológiai funkciói sokszor nagyban függenek attól, hogy milyen konformációt vett fel az adott molekula. [3] A szabad, semleges hisztidin az imidazol oldalláncától függően kétféle formában jelenhet meg: egy N^{ϵ} -H tautomer ($\text{His}[N^{\epsilon}\text{H}]$) és egy N^{δ} -H tautomer ($\text{His}[N^{\delta}\text{H}]$) formában. Nagy pH-n a két tautomer között egyensúly áll fenn.

Az egyszeresen protonált, kanonikus hisztidin esetében a proton vagy az amincsoporthoz, ($\text{HisH}^{+}[\text{NH}_2]$) vagy az imidazol oldalláncához kapcsolódhat ($\text{HisH}^{+}[N^{\delta}]$), míg a kétszeresen protonálódott hisztidin csak egyféle tautomer formában létezik: az imidazolrészhez és az amincsoporthoz is kapcsolódik egy-egy proton (HisH_2^{2+}). A protonálódási folyamattal analógiát mutat a hisztidin deprotonálódása. Az egyszeresen negatív ion kétféleképpen képződhet: a proton leválhat a karboxilcsoportról ($\text{His}^{-}[\text{COOH}]$) és az imidazolrésztől ($\text{His}^{-}[N^{\epsilon}\text{H}]$). Ha ez a két proton leszakad a hisztidinről, akkor létrejön egy kétszeresen negatív ion (His^{2-}), amelynek csak egy tautomerje van. Az 1.2.1. ábra mutatja a lehetséges reakcióutakat a hisztidin protonálódása és deprotonálódása esetében.

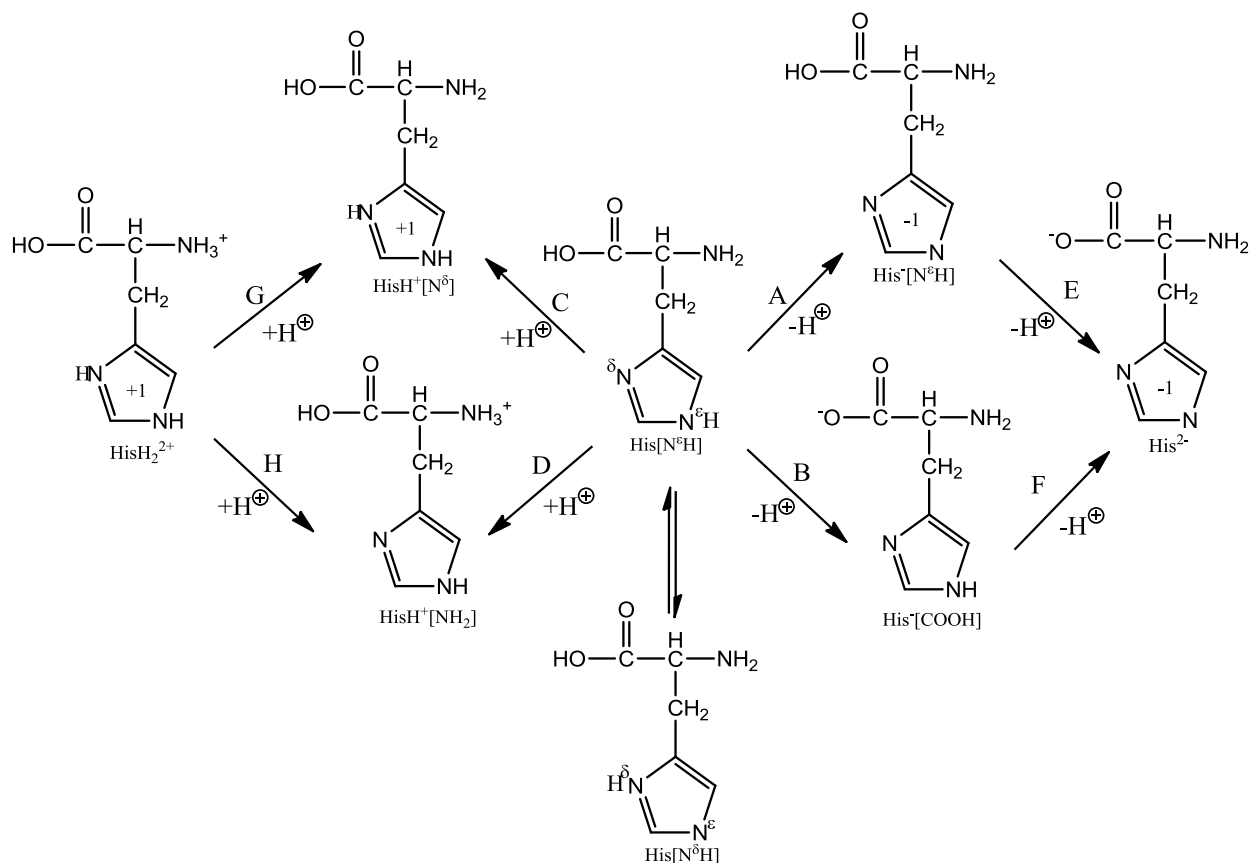
Huang és munkatársai meghatározták a hisztidintautomerek ($\text{His}[N^{\delta}\text{H}]$) [3], ($\text{His}[N^{\epsilon}\text{H}]$) [4] és a hisztidinből származó 6 ion (protonált, deprotonált) [3] stabil konformereinek számát, és vizsgálták ezen molekulák tulajdonságait (1.2.1. táblázat).

1.2.1. táblázat A hisztidin és a belőle származó ionok stabil konformereinek száma

A vizsgált molekula/ion	$\text{His}[N^{\delta}\text{H}]$	$\text{His}[N^{\epsilon}\text{H}]$	$\text{His}^{-}[\text{COOH}]$	$\text{His}^{-}[N^{\epsilon}\text{H}]$	His^{2-}	$\text{HisH}^{+}[\text{NH}_2]$	$\text{HisH}^{+}[N^{\delta}]$	HisH_2^{2+}
stabil konformerszám	40	42	12	29	10	11	27	17

A táblázatban szereplő konformerek esetében meghatározták a relatív energiákat [3,4], relatív entalpiákat [3], relatív szabad energiákat [3], rotációs állandókat [3, 4] és dipólus momentumokat [3, 4]. Ezen felül, az AIM elmélet (atoms in molecules) segítségével

azonosították a különböző konformerekben előforduló hidrogénkötéseket, és megállapították a kötések átlagos energiáit [3, 4].



1.2.1. ábra A gázfázisú hisztidin lehetséges protonálódási és deprotonálódási reakciói [3]

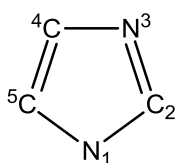
A $\text{His}[\text{N}^\delta\text{H}]$ tautomer konformereinek vizsgálata során [4] a kutatók arra jutottak, hogy az aminosav oldallánca jelentős hatással van a relatív konformációs stabilitásra, a kialakított hidrogénkötések következtében.

Termodinamikai tulajdonságok alapján sikerült igazolni, hogy a gázfázisú hisztidin protonációja és deprotonációja (A és C reakcióút az 1.2.1. ábrán) az imidazol oldalláncon történik.

Számolásokat végeztek a hisztidin és származtatott ionjai ionizációs energiáinak és az elektronegativitásuknak a meghatározására. A hisztidin vertikális ionizációs energiája függ a konformációtól, míg a deprotonált hisztidin ionizációs energiája a deprotonált ecetsavéhoz áll a legközelebb, mivel az imidazolgyűrűről jelentős mennyiségű elektron kerül a karboxilcsoportra.

Bansal és Sellers [2] polarográfiával és impulzusradiolízis segítségével vizsgálta a hisztidin, az imidazol az 1-metilimidazol és a 2-metilimidazol hidroxilgyökekkel való reakcióját vizes oldatokban.

Az imidazol impulzusradiolízissel végzett kísérleteiben, melynek során N_2O -dal telített oldatokat vizsgáltak ($[\text{Im}] = 10^{-3} \text{ M}$), megállapították, hogy a hidratált elektronok több mint 95%-a reagál a N_2O -dal és OH-gyököt képez. A OH-gyök pedig továbbreagál az imidazzal. A OH-gyök hozzákapcsolódhat az imidazol 2-es, 4-es vagy 5-ös C-atomjához, valamint lehetséges még a hidroxil-gyök 3-as N-atomhoz való kapcsolódása, ha a N-atom nincs protonálva.

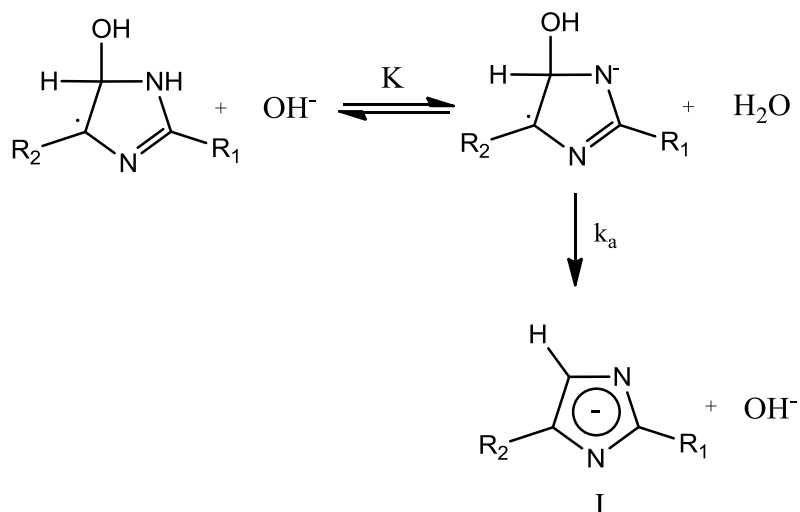


1.2.2. ábra Az imidazol molekula atomjainak számozása [2]

A keletkezett gyökök abszorpciós maximuma 300 ± 15 és $390 \pm 10 \text{ nm}$ -en figyelhető meg, és pK_a -juk kisebb, mint az eredeti vegyületeké. További kísérletekből megállapították, hogy az abszorpciós maximumra hat a pH megváltozása a 2-metilimidazol kivételével. A 7-es pK_a -nál kisebb vagy nagyobb értékek származhatnak a molekulák deprotonálódásából. A hisztidin esetében a 260, 310 és 410 nm-en mért pK_a értékek különböznek egymástól. Ebből arra a következtetésre jutottak, hogy 3 különböző gyök képződik a reakciókban. Ennek megállapítását az imidazol és az 1-metilimidazol esetében nem tudták megtenni.

A gyökök bomlását vizsgálva, a 10-nél kisebb pH-jú oldatokban az eredmények gyökgyök reakciót mutatnak, míg nagy pH-n ($\text{pH} > 11$), az 1-metilimidazol kivételével, a folyamat elsőrendű. Az 1-metilimidazol esetében az N_1 -atomhoz nem kapcsolódik ionizálható H-atom és a visszarendeződési reakció nem lehetséges.

Bansal és Sellers [2] ezt a bomlást egy bázis katalizált víz eliminációnak tulajdonította (1.2.3. ábra).



1.2.3. ábra Az 5-hidroxi adduktum vízeliminációja [2]

A hisztidinnél 410 nm-en és 3,05-ös pH-n megközelítően egy elsőrendű bomlás figyelhető meg, ami valószínűleg az eliminációs reakció sav katalizált útja, azonban ezt a reakciót más körülmények között nem tudták tovább vizsgálni.

1.3. A hisztidin és az imidazol fotokémiája

A hisztidin kiemelkedő fontosságát a fehérjékben az imidazol oldallánca adja, ugyanis ez az oldallánc gyakran részt vesz létfontosságú fémionok kötésében és katalízisekben [5]. A hisztidin fotokémiájának tanulmányozásához így elengedhetetlen az imidazol hasonló reakcióinak vizsgálata.

Wu és munkatársai [5] elsősorban ennek a két molekulának a fotokémiáját vizsgálták UVRR spektroszkópia segítségével. Az ő mérési eredményeik azért különlegesek, mert előttük fotoérzékenyítés és impulzusradiolízis segítségével vizsgálták ezeket az anyagokat.

A vizes oldatban lévő imidazol fotokémiai reakcióját lézeres Raman-spektroszkópiával és impulzusüzemű lézergyújtással is vizsgálták. Az UVRR spektrumok megváltozása (az imidazol csúcsok csökkentek, és újak képeződtek) mutatta, hogy valamilyen változás történt a mintában. A méréseket levegő jelenlétében és oxigénmentes körülmények között is elvégezték,

de a bomlás sebessége mindkét esetben hasonló volt, így megállapították, hogy az imidazol elsődleges fotokémiájában nem szerepel oxigén.

Az impulzusüzemű lézergyújtással kivitelezett kísérletekben 206, 218 és 229 nm-en is vizsgálták az imidazol bomlását. A rövidebb gerjesztési hullámhosszak azért fontosak, mert jobban megfelelnek azoknak a kutatásoknak, amelyek a fehérjék másodlagos szerkezetét vizsgálják. Mindez nem változtat a bomlás sebességén a különböző hullámhosszakon.

229 nm-en a bomlási sebesség jelentősen felgyorsult, ami azt jelenti, hogy az imidazol bomlásának mechanizmusa többfotonos.

Wu és munkatársai az imidazol UV spektrumát különböző körülmények között tanulmányozták, hogy megismerjék az UVRRL lézersugárban lezajló folyamat mechanizmusát. Ismét aerob és anaerob körülmények között végezték a méréseiket. Arra az eredményre jutottak, hogy 350 nm alatt számos fototermék keletkezik. Anaerob körülmények között 302 nm-en alakul ki egy jelentős abszorpciós sáv, míg aerob körülmények között ez a termék átalakul olyanokká, amelyek 285, 268 és 230 nm-en abszorbeálódnak.

Az imidazol fotokémiája elképzelhetően egy kétfotonos mechanizmussal jellemezhető, ami során az imidazol gerjesztett állapotba kerül, és képes még egy másik fotont abszorbeálni, így imidazol kation gyököt ($\text{ImH}^{\bullet+}$) képezni.



A keletkezett gyök deprotonálódik és dimerizálódik vagy másik imidazol molekulával vagy O_2 -nel reagál.



A hisztidin (vizes oldatbeli) fotokémiájának tanulmányozásakor megállapították, hogy a hisztidin bomlása már függ attól, hogy van-e levegő a rendszerben. A Raman spektrum-csúcsok bomlása lelassul, ha nincs jelen levegő, ellentétben az imidazzal végzett kísérletekben tapasztaltakkal. A reakció nem csak a levegő jelenlététől, hanem a pH-tól is függ. Nagy pH-n ($\text{pH} = 10$) a bomlás

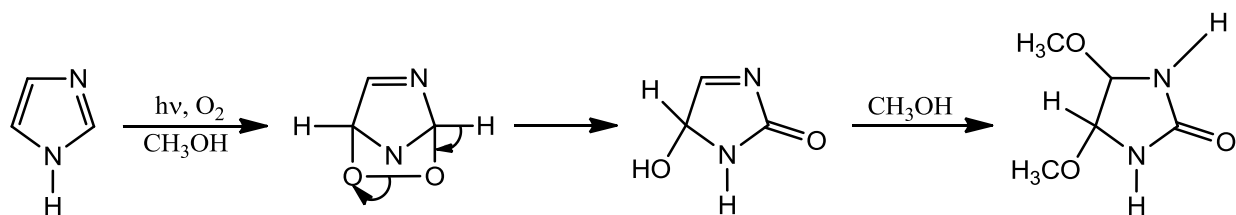
során deprotonálódás is lezajlik, azonban ha a pH-t lecsökkentjük (pH = 3-ig), akkor ez a bomlást is megakadályozza, azaz a protonálódáskor nem játszódik le fotoreakció.

A hisztidinen kívül a Cu,Zn-szuperoxid diszmutázt (Cu,Zn-SOD) és a hemoglobin CO-adduktumát is vizsgálták, amelyek hisztidin egységet tartalmaznak. A hisztidin fotobomlását nehéz UVRR spektroszkópiával követni, mert a Raman-jelek gyengék. Vannak azonban olyan hisztidinjelek, amelyeket detektálni lehet, ha az imidazol protonált állapotban van vagy fémionokhoz kötődik. Mindez akkor történik, ha cserélhető protonokat deutériummal helyettesítjük.

Ezeknél a méréseknél gömb alakú és hengeres fókuszáló lencsét is alkalmaztak. A hisztidinjelek bomlása nagyban függ attól, hogy melyik fajtát használták, a hengeres lencsékkel csökkenthető a bomlás sebessége mindkét mintában.

Az imidazol fotokémiáján belül fontos megemlíteni a molekula fotooxidációját is. Ismert, hogy a szinglet oxigén képes oxidálni különböző szerves vegyületeket, így George és Bhat [6] a heterociklusos rendszerek fotooxidációját kutatta. A szinglet oxigén és a heterociklusos vegyületek reakciójában sokszor képződik a termékek komplex keveréke. Ez néhány imidazolt tartalmazó vegyületek esetében is így történik.

Az imidazol metanol jelenlétében nagyon lassan fotooxidálódik, ami során egy dimetoxiszármazék keletkezik. (1.3.1. ábra) Más-más reakciót adnak az imidazolnak azon származékai, amikor a 2-es és 5-ös szénatomhoz proton vagy valamilyen más csoport kapcsolódik és megint más képződik, amikor a 4-es szénatomon van egy proton. Szintén az imidazolhoz köthető a hisztidin fotooxidációja is.



1.3.1. ábra Az imidazol fotooxidációja metanolban [6]

2. Kísérleti rész

2.1. Felhasznált vegyszerek

A kísérleteink egyik részében az L-hisztidint peroxomonoszulfát-ionnal oxidáltuk, amelyhez az oldatot oxonból (Sigma-Aldrich) készítettünk. A kísérleteinket friss vagy néhány napos oxonoldattal végeztük. Az oxidációs reakcióknál a pH beállítására bórapuffert (Molar Chemicals) használtunk, amelyeket szilárd bórapból készítettünk. A bórapufferek esetében is friss vagy néhány napos oldatokat használtunk. A fotokémiai reakciók vizsgálatakor a reakciókat kénsavas közegben végeztük.

A ^1H -NMR mérésekhez a szilárd anyagokat D_2O -ban (Aldrich) oldottuk fel, és D_2SO_4 -val (Alfa Aesar) biztosítottuk a savas közeget a fotokémiai reakcióhoz.

Az oldatok készítésekor MILLI-Q RG (Millipore) rendszerrel előállított, háromszor ioncserélt és ultraszűrt vizet használtunk.

2.2. A méréshez használt műszerek, programok

Az oxidációs reakciók spektrumait PerkinElmer Lambda 2S spektrofotométerrel rögzítettük, míg a fotokémiai reakciókat egy HP-8543 diódasoros spektrofotométerrel követtük. A fotoreakció esetén a mérések ideje alatt a mintákat mágneses keverő segítségével kevertettük.

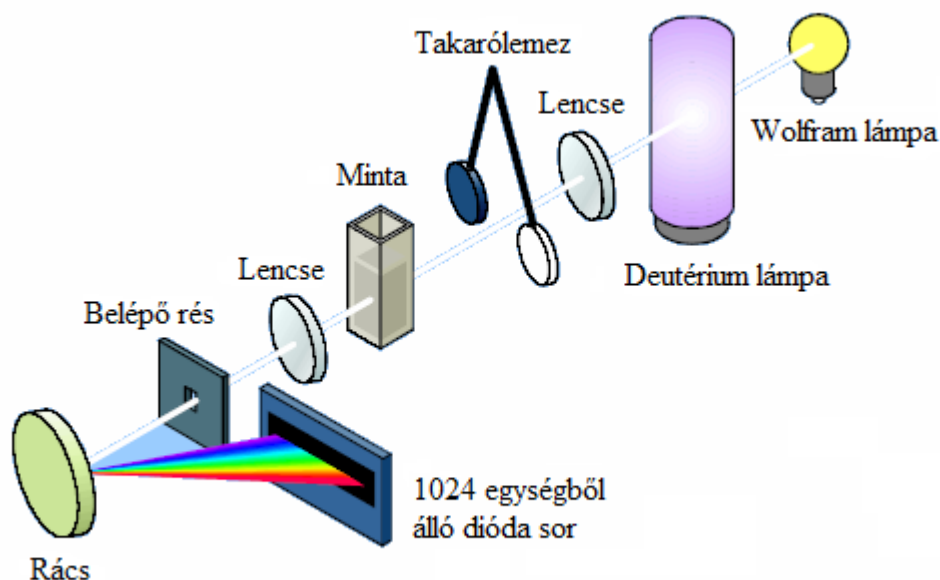
A mérési eredményeket mindkét esetben Microsoft Excel program segítségével értékeltük ki. A dolgozathoz készült ábrák a ChemDraw Ultra 12.0 program felhasználásával készültek.

2. 3. A diódasoros spektrofotométer használata fotokémiai reakciók követésére

A hisztidin fotokémiájának tanulmányozása során a legtöbb kísérletünket diódasoros spektrofotométerrel végeztük, amely alkalmas a fotoreakciók kémiájának tanulmányozására. A fotokémiai reakciók követését az teszi lehetővé, hogy a diódasoros spektrofotométer felépítése (2.3.1. ábra) különbözik a többi spektrofotométerétől. [7] Egy ilyen műszer használata esetén viszonylag nagy intenzitású és nem monokromatikus fény (polikromatikus) halad keresztül a mintán, szemben más típusú, pásztázó elven működő, általában kétsugaras spektrofotométerekkel. Éppen emiatt lehetséges fotokémiai reakció előidézése egy mintában, amit ha nem veszünk észre, akkor számos téves eredmény születhet belőle. [7-9]

A kísérleteink során a mintákat mindig a teljes mérés alatt kevertettük, hogy az oldatunk homogén maradjon, [7] mert az elsődleges fotokémiai reakciók nem mennek végbe az egész küvettában, csak azon a részen, ahol a nagy intenzitású fény a mintát megvilágítja. Ezért fontos a minták kevertetése, mert ezzel elkerülhető, hogy megismételhetetlen kinetikai görbéket kapjunk.

Diódasoros spektrofotométerek használatakor lehetőségünk van a fény intenzitásának a változtatására. [7] Ezt többféleképpen is megtehetjük, ezek közül kettőt alkalmaztunk a kísérleteink során. Megváltoztathatjuk a fény intenzitását azzal, hogy a küvettába különböző térfogatú mintákat teszünk. Ezzel az oldatok koncentrációja nem változik, viszont az egységnyi térfogatra eső fotonok száma más lesz: nagyobb térfogat esetén kevesebb foton abszorbeálódik egységnyi térfogaton, míg kisebb térfogat esetén több. Ennek a módszernek az a hátránya, hogy a térfogat változtatása csak egy kisebb intervallumban lehetséges, mert a fénynyalábnak át kell mennie a mintán. Egy 10 mm-es kvarcküvettában ez a tartomány nagyjából $1,7 \text{ cm}^3$ -tól $3,4 \text{ cm}^3$ -ig terjed.



2.3.1. ábra A diódasoros spektrofotométer rajza [9]

Ez a műszer lehetővé teszi, hogy a méréseink során a folyamatos megvilágítás mellett olyan kísérleteket is végezzünk, amelyekben a megvilágítás idejét meghatározott időközönként megszakítjuk. [7]

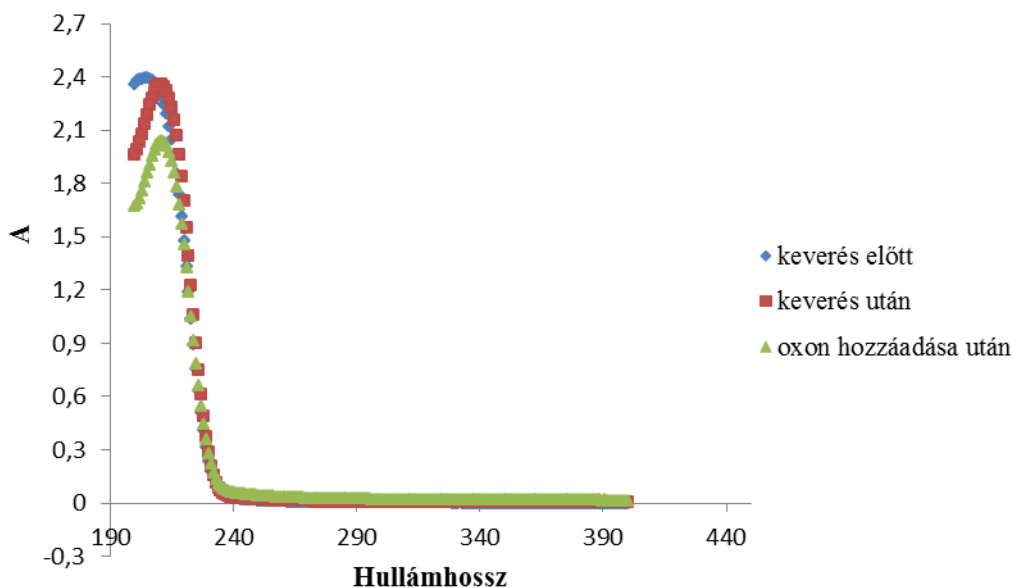
A fotokémiai reakciók követésére alternatívát jelentenek a különböző műszerek kombinálásával épített fotoreaktorok. [8] A Debreceni Egyetemen egy kutatócsoport detektorként használt optikai szálak CCD spektrofotométerből és LED fényforrásból készített fotoreaktort. A reaktor jól használható fotokémiai reakciók tanulmányozására, akárcsak a diódasoros spektrofotométer. A fotoreaktor felépítéséből, könnyű mozgathatóságából számos előny származik. További kedvező tulajdonsága, hogy egyetlen spektrum felvétele nagyon rövid ideig tart (minimum 2 ms). Ez hasznos lehet abban az esetben, ha egy gyors fotoreakciót kell követni. Ebben a fotoreaktorban a megvilágító és detektáló fénysugár független egymástól, ami szintén előnyös a diódasoros spektrofotométerrel szemben.

3. Mérési eredmények és értékelésük

3.1. A hisztidin oxidációjának vizsgálata peroxomonoszulfát-ionnal

A kísérletek megkezdésekor legelőször a hisztidin és a peroxomonoszulfát-ion közötti reakció létét szeretnénk volna igazolni spektrofotometriás módszerrel. Ehhez 200 és 400 nm között vizsgáltuk a hisztidin-és oxonoldatok elnyelését tandemküvetében. A kapott eredményeket a 3.1.1 ábra mutatja.

Emellett egyidejűleg vizsgáltuk az oldatok elnyelésének időbeni változását is, de ezekben az esetekben nem tapasztaltunk változást.



3.1.1. ábra A hisztidin és peroxomonoszulfát-ion közötti reakció igazolásának kísérlete

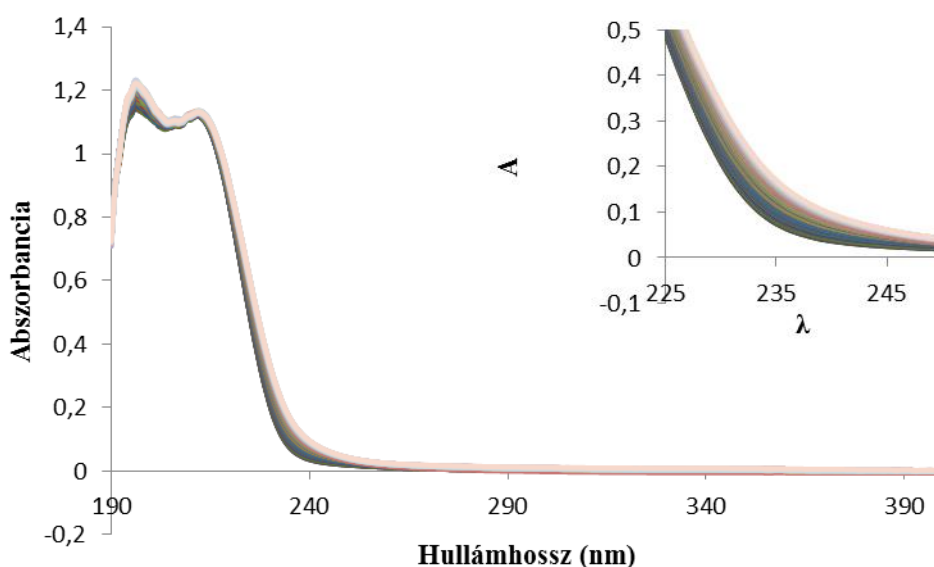
$$\begin{aligned} [\text{His}] &= 4,95 \times 10^{-4} \text{ M}, 4,95 \times 10^{-4} \text{ M}, 3,96 \times 10^{-4} \text{ M}, \\ [\text{oxon}] &= 5,01 \times 10^{-4} \text{ M}, 5,01 \times 10^{-4} \text{ M}, 6,01 \times 10^{-4} \text{ M} \end{aligned}$$

A mért eredmények alapján nem tudtuk egyértelműen eldönteni, hogy valóban létezik reakció a hisztidin és peroxomonoszulfát-ion között, így ^1H -NMR vizsgálattal ellenőriztük a méréseinket. A kapott ^1H -NMR spektrumok alapján elmondható, hogy nem játszódott le reakció

a két anyag között. Ez nagy valószínűséggel azzal magyarázható, hogy savas közegben a hisztidin protonálódik, és ezt követően már nem, vagy csak nagyon lassan megy végbe oxidációs folyamat. A spektrális változásokat minden bizonnyal a pH megváltozása okozta, annak következtében, hogy megnöveltük az oxonkoncentrációt, s ezzel együtt hidrogén-szulfátionokat is juttattunk az oldatba.

A további méréseinket bóraxpufferben végeztük, ami az oldataink gyengén lúgos kémhatását (kb. 9,2-es pH) biztosította. Legelőször arra törekedtünk, hogy a kísérleteinkben a hisztidin- és oxonoldatokat hasonló pH-val keverjük össze, így megelőzve a jelentősebb kémhatásbeli változásokat.

Hogy megtudjuk, mi történik az általunk vizsgált anyagokkal bóraxpufferben, ekvimoláris mennyiségű hisztidint és oxont tartalmazó mintának rögzítettük a spektrumát 190 és 400 nm között 1,5 óra alatt. Az eredmények és tapasztalataink alapján elmondható, hogy 235 nm-en jelentős abszorbanciaváltozás figyelhető meg. (3.1.2. ábra)



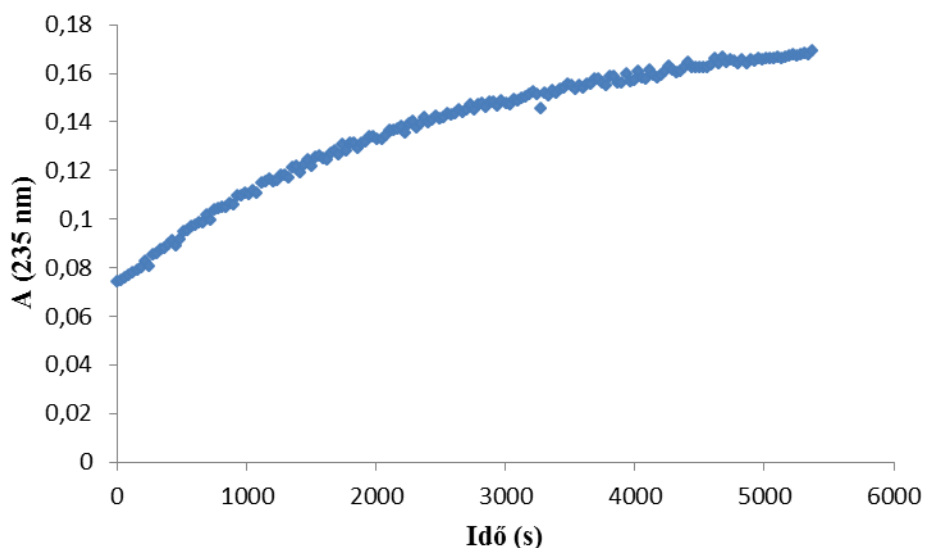
3.1.2. ábra A hisztidin- és peroxomonoszulfát-ion között bóraxpufferben lejátszódó reakció teljes spektruma

$[\text{His}] = 2,48 \times 10^{-4} \text{ M}$, $[\text{oxon}] = 2,50 \times 10^{-4} \text{ M}$, $[\text{bórax}] = 5,00 \times 10^{-3} \text{ M}$; $t = 5400 \text{ s}$; $T = 25,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$

235 nm-en 1,5 óra alatt az abszorbancia értékek 0,074-ről 0,169-ra nőttek, ami jelentős változásnak nevezhető a mérési adatok alapján. Ezekből megállapítottuk, hogy a hisztidin lúgos

közegben oxidálható, így a további méréseink során mindig bórapufferben dolgoztunk, amit feleslegben alkalmaztunk.

A 3.1.2. ábrán bemutatott, 235 nm-re vonatkozó értékeket az idő függvényében ábrázolva (3.1.3. ábra) megkapjuk ennek a mérésnek az időbeni lefolyását.



3.1.3. ábra A hisztidin és a peroxomonoszulfát-ion közötti reakció kinetikai görbéje

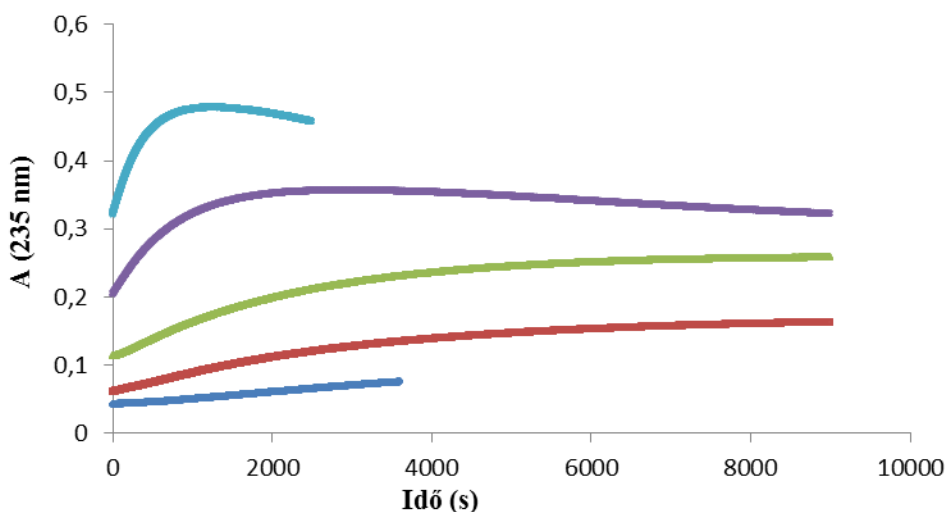
[His] = $2,48 \times 10^{-4}$ M, [oxon] = $2,50 \times 10^{-4}$ M, [bórap] = $5,00 \times 10^{-3}$ M; T = 25,0 °C

Ugyanezt a reakciót elvégeztük nagyobb bórap (3-szoros) -és oxonkoncentráció (10-szeres) mellett, és a reakció láthatóan gyorsabban ment végbe. Így a következő kísérleteinkben a végbemenő folyamat oxonkoncentráció-függését vizsgáltuk. A mérések során állandó hisztidin-és bórapkoncentrációt alkalmaztunk, valamint az össztérfogaton sem változtattunk ($3,00 \text{ cm}^3$), csak az oxon koncentrációját csökkentettük, illetve növeltük a mintákban. A reakciókat mindig 235 nm-en követtük (3.1.4. ábra).

A kapott görbék az előzetes várakozásnak megfeleltek, vagyis minél nagyobb az oxon koncentrációja, annál gyorsabban játszódik le a reakció.

Az így kapott görbék alapján meghatároztuk a kezdeti sebességeket (v_0), majd ezeket ábráztuk az oxonkoncentrációk függvényében. A kezdeti sebességek itt abszorbanciaváltozásra vonatkoznak. A sebességi egyenlet megállapításához első közelítésben a moláris abszorban-

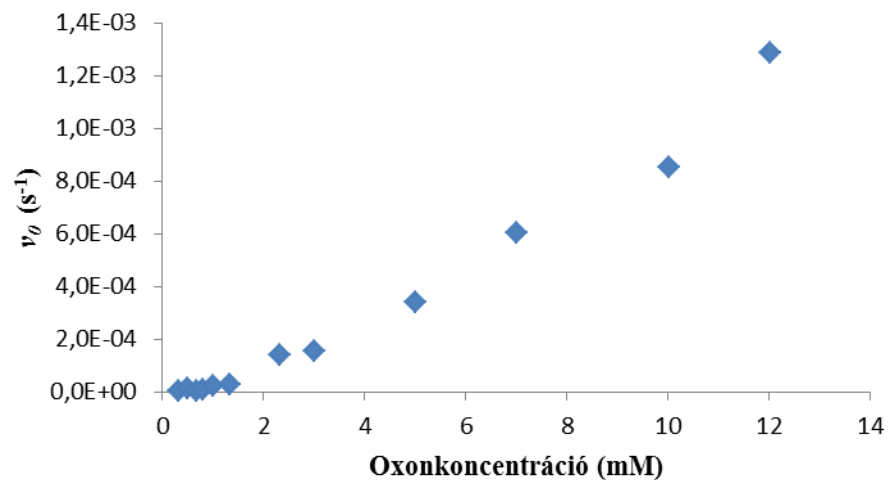
értékeire nincs szükség, hiszen az csupán egy szorzó tényező a sebességben (természetesen a sebességi állandó értékének meghatározásához ez már szükséges).



3.1.4. ábra Hisztidin és peroxomonoszulfát-ion közötti reakció bóraxpufferben különböző oxonkoncentrációk mellett

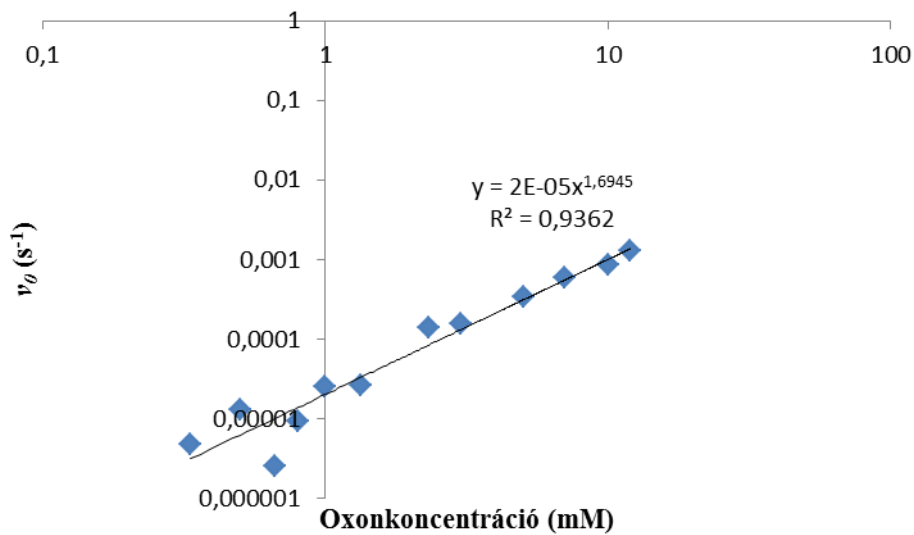
[His] = $1,66 \times 10^{-4}$ M, [bórax] = $2,50 \times 10^{-2}$ M, [oxon] = $1,67 \times 10^{-4}$ M, $3,33 \times 10^{-4}$ M, $6,66 \times 10^{-4}$ M, $1,33 \times 10^{-3}$ M, $2,33 \times 10^{-3}$ M; T = 25,0 °C

Méréseinkkel azt szeretnénk volna meghatározni, hogyan függ a kezdeti sebesség az oxonkoncentrációtól, hiszen ez megadja a sebességi egyenlet oxonra vonatkozó részét. A kapott összesített pontokat a 3.1.5. ábra mutatja. Az itt ábrázolt pontokat a kinetikai görbék körülbelül első 100 s-ára illesztett egyenesek meredekségeiből kaptuk, vagyis a kezdeti sebességeket a görbe első szakaszának lineáris illesztéséből határoztuk meg. Ennek az eljárásnak az általános tapasztalatok szerint a jellemző hibája ± 5 %, ez a mi esetünkben is érvényes volt. A 3.1.5. ábrán kapott görbe nem lineáris, így a várt elsőrendű jelleget nem sikerült igazolni. Mindkét tengelyen logaritmikus skálát alkalmazva a pontok jó közelítéssel egy egyenesre estek, amelynek meredeksége 1,7, ahogy az a 3.1.6. ábrán szerepel. Így ez a kezdeti sebességek alapján meghatározott tapasztalati részrendűségként értelmezhető.



3.1.5. ábra Kezdeti sebesség (v_0) az oxonkoncentráció függvényében

Az eredmények alapján, illetve a 3.1.4. ábrán szereplő, maximumot mutató kinetikai görbékéből (nagyobb oxonkoncentrációknál) is egyértelmű, hogy a folyamat több lépésből áll. Ebben az esetben még nincs értelme tényleges sebességi egyenletről beszélni.

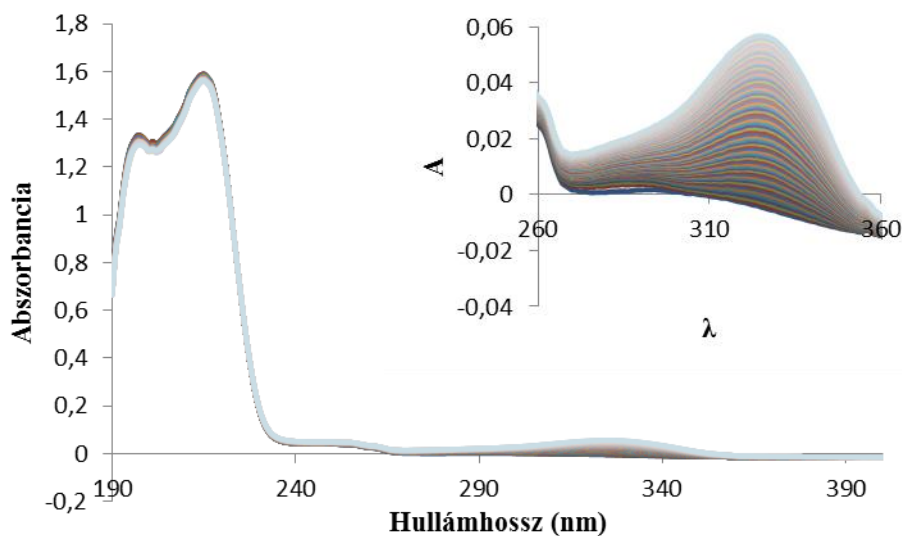


3.1.6. ábra Kezdeti sebességek az oxonkoncentrációk függvényében

3.2. A hisztidin fotokémiai reakciójának vizsgálata

A hisztidin oxidációját a peroxomonoszulfát-ionon kívül megvizsgáltuk más oxidálószerekkel is, így például kénsavval. Ekkor figyeltük meg, hogy a hisztidin és a kénsav között megvilágítás hatására fotokémiai reakció játszódik le. Jelentős változás az abszorbanciaértékekben 320 nm körül figyelhető meg. (3.2.1. ábra)

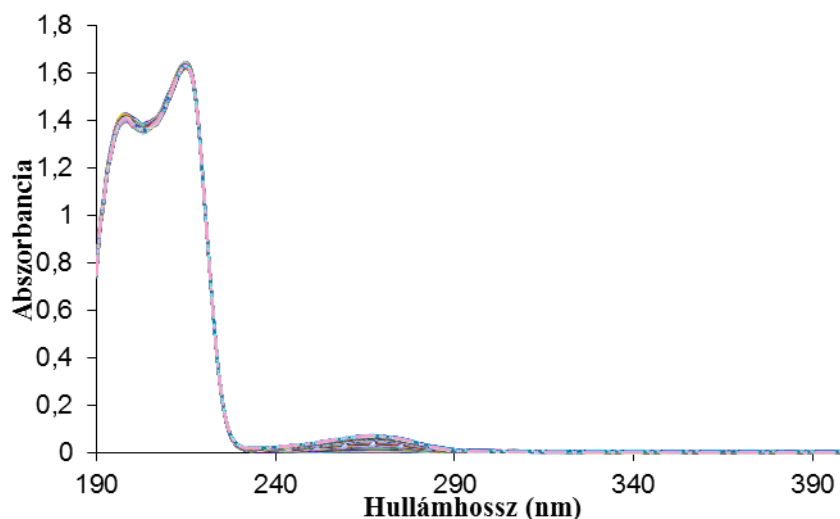
A hisztidin ezen tulajdonságát eddig még nem ismertük és az irodalomban sem találtunk rá részletes vizsgálatokat. Így szeretnénk volna tudni, hogy a többi aminosav esetében létezik-e egyáltalán ehhez hasonló fotoreakció. Párhuzamos mérések eredményeként sikerült megállapítani, hogy hasonló körülmények között a maradék 19 természetes aminosav egyike sem ad fotokémiai reakciót. Így arra a következtetésre jutottunk, hogy valószínűleg az imidazol-oldalláncnak köszönhető a hisztidin ezen tulajdonsága, amit kísérletileg is tudtunk igazolni. Az imidazol esetében 265 nm-en figyelhető meg jelentős változás az abszorbancia értékekben, spektrumát a 3.2.2. ábra mutatja.



3.2.1. ábra A hisztidin és a kénsav között végbemenő fotokémiai reakció teljes spektruma

[His] = $4,95 \times 10^{-4}$ M, [H₂SO₄] = 1,06 M; t = 1800 s; T = 25,0 °C

Az imidazol ráadásul nem csak savas közegben, hanem semleges körülmények között is fotokémiai reakciót ad vizes oldatban, amit a hisztidin esetében nem tapasztaltunk. Ennek lehetséges oka a hisztidin esetében jelenlévő amino és karbonsav jellegű funkciós csoportok módosító hatása.

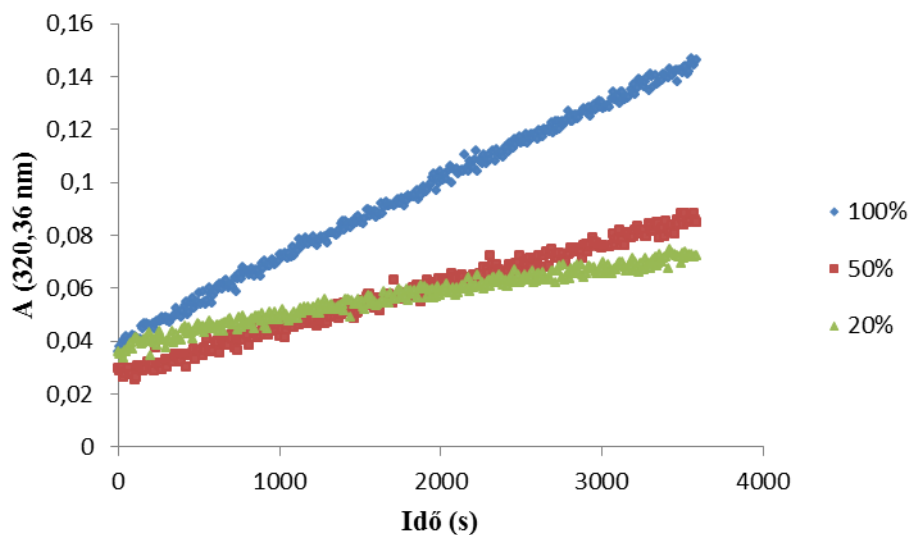


3.2.2. ábra Az imidazol spektruma teljes megvilágítás mellett

$$[Im] = 1,01 \times 10^{-3} \text{ M}; T = 25,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$$

A két spektrumot összehasonlítva jól látható közöttük a hasonlóság. Ez ismét azt igazolja, hogy a hisztidin a fotokémiai reakciót az imidazol oldalláncnak köszönhetően mutatja.

A további kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy milyen hatással van a reakció sebességére, ha a fény intenzitását csökkentjük a mérések során. Ezt kétféleképpen tettük meg. Az egyik esetben a teljes megvilágítás időtartamát bizonyos időközönként megszakítottuk, a másik esetben pedig a minta térfogatát változtattuk.

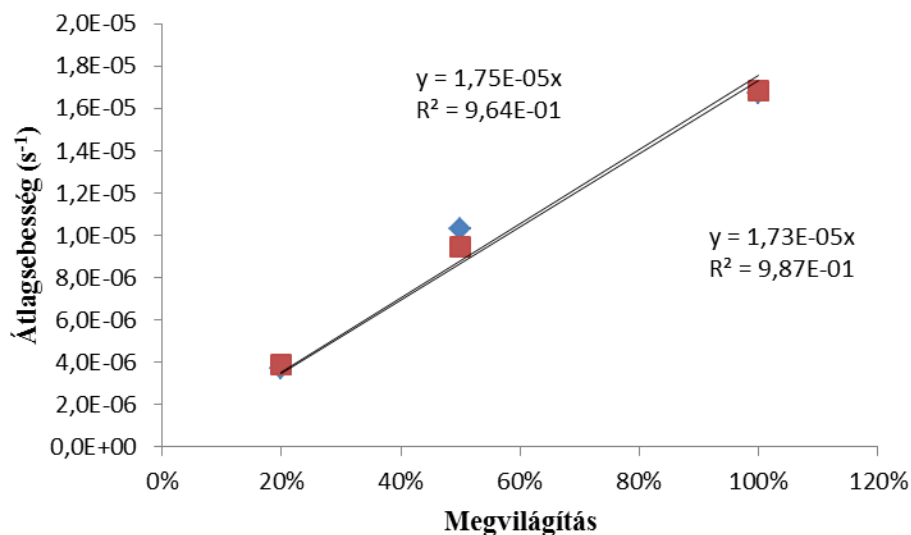


3.2.3. ábra A hisztidin fotokémiai reakciójának kinetikai görbéi különböző megvilágítási idők mellett

$$[\text{His}] = 8,89 \times 10^{-4} \text{ M}, [\text{H}_2\text{SO}_4] = 2,20 \times 10^{-1} \text{ M}; T = 25,0 \text{ } ^\circ\text{C}$$

Az első esetben, amikor a megvilágítási időt változtattuk, a reakciót teljes, 50 %-os és 20 %-os megvilágítás mellett követtük, azaz a mérési idő egészében, felében, valamint 20 %-ban érte fény a mintákat. A kapott eredmények alapján megállapítható, hogy a megvilágítás ideje arányos a végbemenő folyamat sebességével, hiszen a 3.2.3. ábrán is látható, hogy a görbék meredekségei a megvilágítási idővel egyenesen arányosan csökkennek.

További kísérletekből meghatároztuk a reakciók átlagsebességét különböző megvilágítási idők mellett, majd ezeket ábráztuk a megvilágítás függvényében (3.2.4. ábra). A pontok, valamint a két illesztett egyenes szinte egybeesik, ez azt jelenti, hogy ilyen körülmények mellett a fotokémiai reakció sebessége nem függ a kénsav koncentrációjától.



3.2.4. ábra Átlagsebességek a megvilágítás függvényében

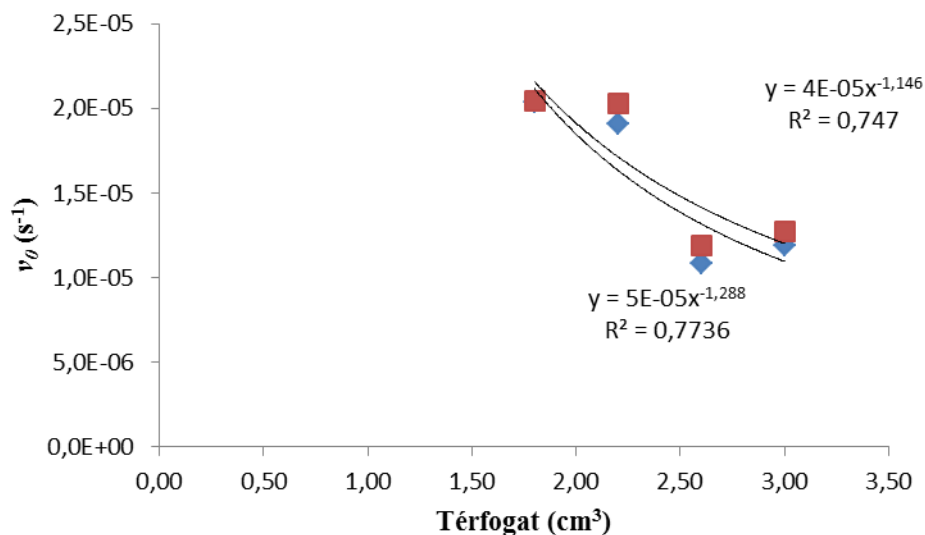
[His] = $9,18 \times 10^{-4}$ M, $9,18 \times 10^{-4}$ M, $[H_2SO_4] = 1,57 \times 10^{-1}$ M, $1,57 \times 10^{-2}$ M;

$\lambda = 320$ nm; $T = 25,0$ °C

Az előző módszeren kívül még úgy is lehetséges a mintán áthaladó fotonok számának szabályozása, hogy állandó megvilágítás mellett megváltoztatjuk a küvettában lévő oldat térfogatát. Ezzel a vizsgált anyagok koncentrációja nem változik, csak az áthaladó fotonok „koncentrációja”, ugyanis ha növelem a térfogatot, akkor egységnyi térfogatra kevesebb foton fog jutni. [7] Egy 4 kísérletből álló kísérletsorozatban egyenletesen növeltük az oldataink térfogatát $1,80 \text{ cm}^3$ -ről $3,00 \text{ cm}^3$ -re, miközben a mintákat folyamatosan érte fény.

Az elméletileg várt eredménynek ebben az esetben annak kell lennie, hogy a reakciósebesség csökken a térfogat növelésével, mert kevesebb foton halad át egységnyi térfogaton. Ebből pedig következik, hogy lassul a reakció, mert a reakciósebességet a koncentráció időbeli megváltozása alapján definiáljuk.

A kísérleti eredményeink igazolják az elméleti elgondolást. A kinetikai görbék meredekségeiből kapott átlagsebességek növekedése fordítottan arányos a térfogatok növekedésével, azaz a legkisebb térfogatú mintában a legnagyobb, míg a legnagyobb térfogatúban a legkisebb a sebesség.



3.2.5. ábra Kezdeti sebességek a térfogatok függvényében

[His] = $9,07 \times 10^{-4}$ M, $9,07 \times 10^{-4}$ M, [H₂SO₄] = $1,87 \times 10^{-1}$ M; $1,87 \times 10^{-1}$ M;

λ = 320 nm, 325 nm; T = 25,0 °C

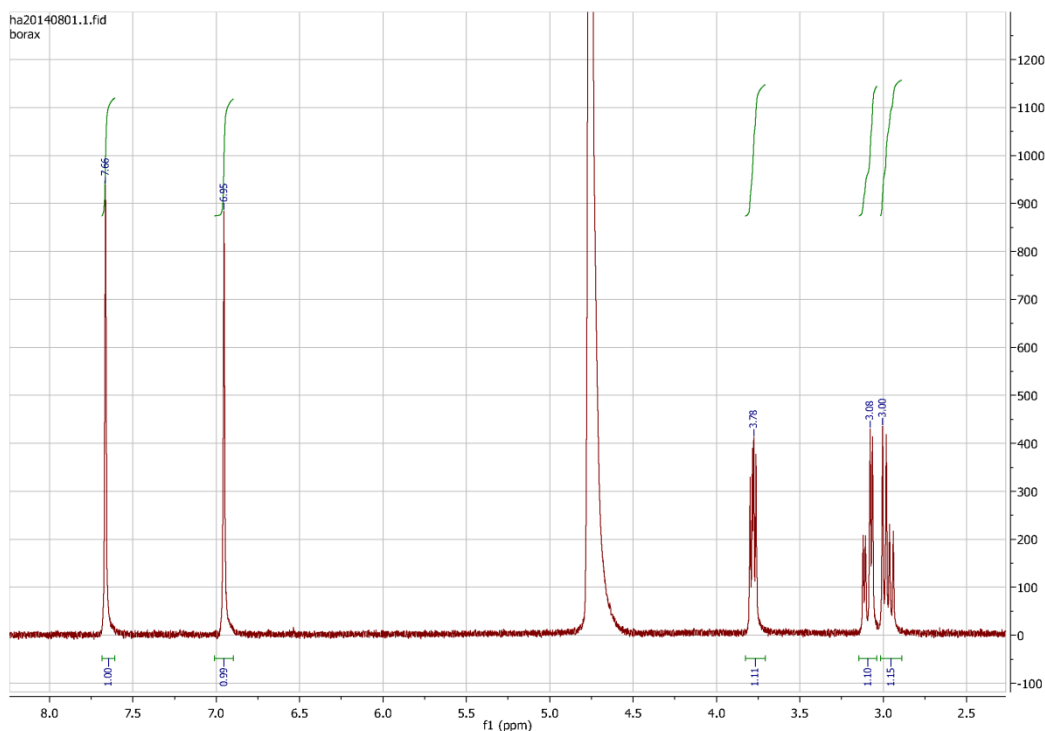
A kapott sebességértékeket ábrázoltuk a térfogat függvényében (3.2.5. ábra), és a pontok szórása ellenére látható, hogy csökken a sebesség a térfogat növelésével. A pontok szórásának több oka lehet. Adódhat abból, hogy az általunk vizsgált térfogattartomány igen szűk, és a legkisebb térfogat esetén (1,80 cm³) elképzelhető, hogy a fény egy része erőfeszítéseink ellenére sem ment át az oldaton.

Mindkét pontsorra egy-egy hatványfüggvény típusú görbét illesztettünk, amelyek egyenlete közel áll a tökéletes illesztés egyenletéhez, a hiperboláéhoz (x^{-1}), hiszen a kitevőkre $-1,15$ illetve $-1,29$ adódott.

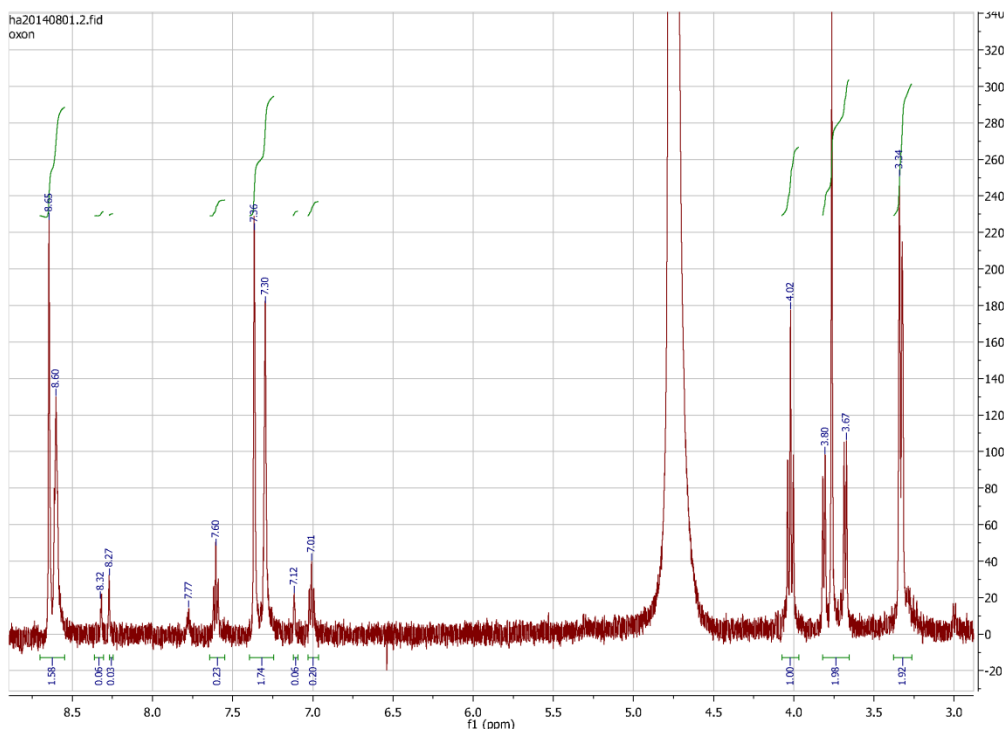
3.3. ^1H -NMR mérések

^1H -NMR mérések segítségével sikerült igazolnunk, hogy a hisztidinnek mind a két vizsgált reakciója végbemegy. Mind a két esetben egyértelműen láthatóak a termékek jelei az NMR spektrumokon.

A mintákat D_2O -ban készítettük, a fotokémiai reakcióhoz pedig D_2SO_4 -at használtunk, hogy biztosítsuk a reakcióhoz a savas közeget. Az oxidáció vizsgálatához 3-3,5 órás oldatokat használtunk. A referenciaminta lúgos közegű hisztidin volt, melyet bóraxszal biztosítottunk. A fotokémiai reakció esetében D_2SO_4 -at tartalmazó, 4 órán keresztül megvilágított oldatot vizsgáltunk, itt a referencia a megvilágítatlan minta volt. A kapott ^1H -NMR spektrumokat a 3.3.1., 3.3.2., 3.3.3. és 3.3.4. ábrák mutatják.



3.3.1. ábra A hisztidin ^1H -NMR spektruma lúgos közegben



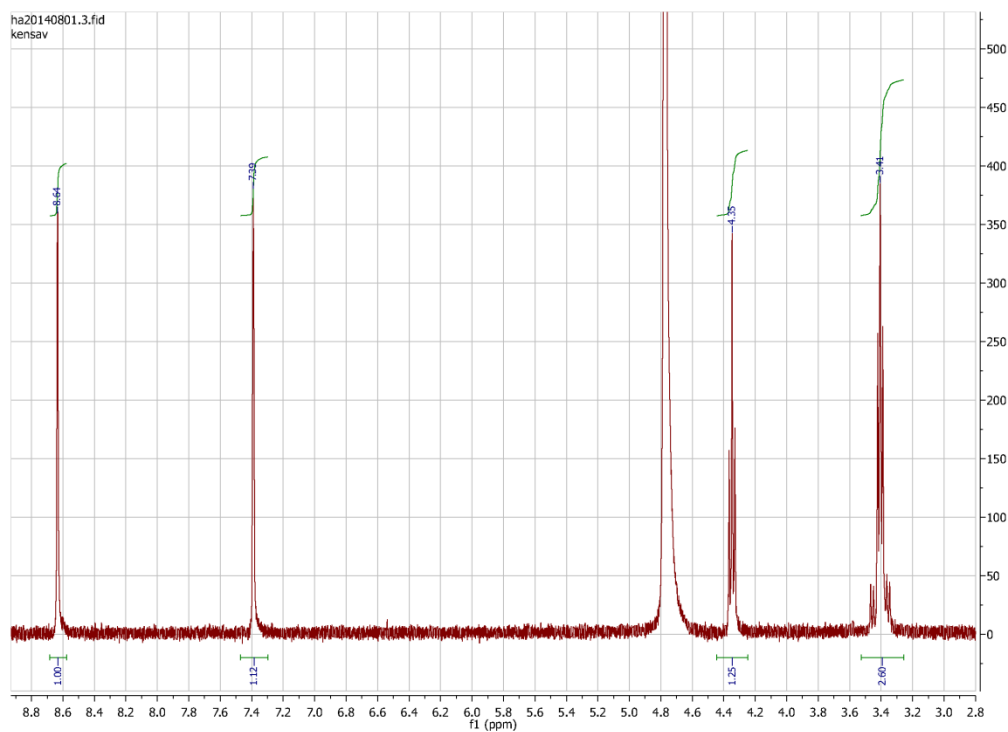
3.3.2. ábra A hisztidin oxidációs reakciójában keletkezett termék(ek) ^1H -NMR spektruma

Az oxidációs reakció két spektrumát megfigyelve, szembetűnő a változás a két eredmény között. Az oxont is tartalmazó minta esetében számos új csúcs jelent meg, míg a kiindulási anyag csúcsai lecsökkentek, vagy eltűntek.

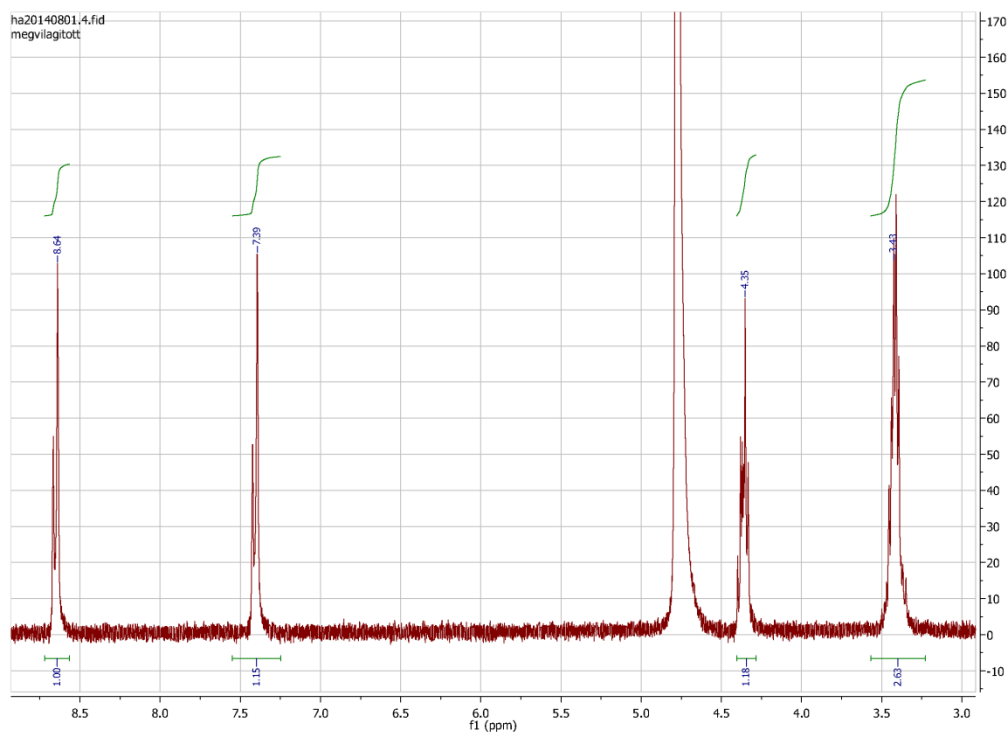
A fotokémiai reakció spektrumából látható, hogy a reakcióelegy még sok hisztidint tartalmaz, ugyanis a kiindulási anyag csúcsai még a megvilágított minta spektrumában is ott vannak, azonban már felfedezhetőek az új jelek is.

A kapott spektrumokat összehasonlítva elmondható, hogy a hisztidin oxidációja gyorsabban végbemegy a fotoreakciónál.

Az eredmények igazolják a két reakció fennállását. Az irodalom mind a hisztidin oxidációjára, mind fotokémiai átalakulására közöl adatokat, ezek alapján remélhető, hogy az NMR-ben megjelenő termékcsúcsok vegyületekhez rendelése a közeljövőben lehetséges lesz.



3.3.3. ábra A hisztidin ^1H -NMR spektruma savas közegben



3.3.4. ábra A hisztidin fotokémiai reakciója során keletkezett termék(ek) spektruma

Összefoglalás

A kutatómunkám során spektrofotometriás módszerrel vizsgáltam a hisztidin savas közegben lezajló fotokémiai reakcióját és oxidációját peroxomonoszulfát-ionnal.

Megállapítottuk, hogy az oxidációs reakció gyengén lúgos közegben megy végbe peroxomonoszulfát-ion jelenlétében, amihez a megfelelő kémhatást bórapufferrel biztosítottuk. Kinetikai vizsgálatokat végeztünk az oxonkoncentráció megváltoztatásával. A mérési eredmények azt mutatják, hogy a reakció sebességét az oxonkoncentráció befolyásolja, ugyanis nagyobb oxonkoncentráció alkalmazása esetén gyorsabb a reakció.

Sikerült meghatároznunk egy tapasztalati sebességi összefüggést az oxon koncentrációja és a kezdeti sebesség között, ami azt mutatja, hogy a hisztidin oxidációja egy többlépéses, összetett folyamat.

A hisztidin fotokémiai reakciója egyértelműen az imidazol-oldallánc következménye. Kísérletileg is be tudtuk bizonyítani feltételezésünket, ugyanis az imidazol hasonló körülmények között szintén fotokémiai reakcióban vesz részt. Ráadásul, míg a hisztidin esetében ehhez savas közeget kell biztosítani, addig az imidazol esetében ez nem szükséges.

Vizsgáltuk a fotokémiai reakció térfogatfüggését, amiből megállapítottuk, hogy a reakció sebessége csökken a fotonok mennyiségének csökkenésével. Ezen kívül kísérleteket végeztünk a megvilágítási idő változtatására. A kapott eredmények azt mutatják, hogy a reakció sebessége egyenesen arányos a megvilágítás mértékével, valamint a reakció sebessége a vizsgált körülmények között nem függ a kénsav koncentrációjától.

^1H -NMR mérésekkel igazoltuk mindkét reakció esetén a termékek képződését, azonban még további vizsgálatok szükségesek ahhoz, hogy azonosíthassuk a termékeket.

Irodalomjegyzék

- [1] G. Lente, J. Kalmár, Z. Baranyai, A. Kun, I. Kék, D. Bajusz, M. Takács, L. Veres and I. Fábián, *Inorg. Chem.* **2009**, *48*, 1763-1773.
- [2] K. M. Bansal and R. M. Sellers, *J. Phys. Chem.* **1975**, *79*, 1775-1780.
- [3] Z. Huang, Z. Lin, and C. Song, *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 4340-4352.
- [4] Z. Huang, W. Yu and Z. Lin, *J. Mol. Struct. Theochem.* **2006**, *801*, 7-20.
- [5] Q. Wu, G. Balakrishnan, A. Pevsner and T. G. Spiro, *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 8047-8051.
- [6] M. V. George and V. Bhat, *Chem. Rev.* **1979**, *79*, 447-478.
- [7] I. Fábián and G. Lente, *Pure Appl. Chem.* **2010**, *82*, 1957-1973.
- [8] M. Gombár, É. Józsa, M. Braun and K. Ősz, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2012**, *11*, 1592-1595.
- [9] Fábián István, *Spektrofotometria (oktatási segédanyag)*, **2009**,
<http://www.inorg.unideb.hu/oktatas/6/17> (utolsó elérés: 2014. november 21.)