

Kelátképző ligandumot tartalmazó
aminosavszármazékok előállítása és
átmenetifém-komplexeik vizsgálata

Készítették: Lennert Lídia (ELTE)
Ósz Katalin (KLTE)

Témavezetők: Dr. Süliné Vargha Helga (ELTE)
Dr. Várnagy Katalin (KLTE)

Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés	4
	A vizsgálatok célja.....	4
2.	Irodalmi áttekintés	6
2.1.	Oldatfázisú kapcsolási eljárások peptidkötés kialakítására	6
	Azidos kapcsolás.....	6
	Savkloridos kapcsolás.....	6
	Vegyés anhidrides kapcsolás.....	6
	Karbodiimides kapcsolások.....	7
	Aktív észteres kapcsolások.....	7
2.2.	Peptidek sav-bázis és komplexkémiail viselkedése	7
2.2.1.	Nem-koordinálódó donorcsoportot tartalmazó aminosavak és peptidek sav-bázis sajátosságai	8
2.2.2.	Lehetséges koordinációs módok nem-koordinálódó donorcsoportot tartalmazó peptidekkel	9
	Cu(II)komplexek.....	11
	Ni(II)komplexek.....	12
	Zn(II)komplexek.....	13
2.2.3.	Hisztidintartalmú peptidek sav-bázis sajátosságai	14
2.2.4.	Lehetséges koordinációs módok hisztidintartalmú peptidekkel	14
	Cu(II)komplexek.....	15
	Ni(II)- és Zn(II)komplexek.....	17
2.3.	Bisz(2-imidazolil)származékok komplexkémiail viselkedése	17
3.	Kísérleti eredmények és értékelésük	21
	Rövidítésjegyzék.....	21
3.1.	A ligandumok szintézise	21
3.1.1.	Bisz(2-piridil)-metil-amin előállítása	21
3.1.2.	Oldatfázisú kapcsolási eljárások N-glicil-bisz(2-piridil)-metil-amin előállítására	22
3.1.3.	N-hisztidil-bisz(2-piridil)-metil-amin előállítása különféle védőcsoportok és kapcsolási eljárások alkalmazásával	26

3.2.	Az oldategyensúlyi mérések eredményei.....	29
3.2.1.	N-glicil-bisz(2-piridil)-metil-amin.....	29
	Cu(II)-GlyBPMA rendszer.....	30
	Ni(II)-GlyBPMA rendszer.....	34
	Zn(II)-GlyBPMA rendszer.....	37
3.2.2.	N-hisztidil-bisz(2-piridil)-metil-amin.....	40
	Cu(II)-HisBPMA rendszer.....	41
4.	Kísérleti körülmények, vizsgálati módszerek.....	44
4.1.	A ligandumok előállítása.....	44
4.1.1.	Előállítási és vizsgálati módszerek.....	44
	Futtatóelegyek.....	44
	Vékonyrétegekromatográfia.....	44
	Olvadáspont meghatározás.....	44
	Flash-kromatográfiás elválasztás.....	44
	Oszlopkromatográfia.....	45
	RP HPLC.....	45
	NMR.....	45
4.1.2.	A szintézisek menete.....	45
4.1.3.	Boc védőcsoport eltávolítása.....	50
4.2.	Oldategyensúlyi vizsgálatok.....	51
4.2.1.	Potenciometria.....	51
	Az egyensúlyi számítások elméleti alapjai.....	52
4.2.2.	Spektrofotometria.....	52
	Ni(II)komplexek.....	53
	Cu(II)komplexek.....	54
4.2.3.	NMR-spektroszkópia.....	55
4.2.4.	ESR-spektroszkópia.....	56
5.	Összefoglalás.....	57
	Irodalomjegyzék.....	59
	Függelék.....	62

1. Bevezetés

A vizsgálatok célja:

Különböző fémionok fontos szerepet játszanak az élő szervezetek szerves molekuláinak szintézisében és szállításában, ill. biológiai rendszerek sav-bázis- és redoxifolyamatainak a katalizálásában.

Az egyik legfontosabb fémmegekötőhelyet a proteinek képezik. Ezek találhatóak meg a metalloenzimekben is, ahol a fémionok a polipeptidlánc speciális aminosavjaihoz (pl. a hisztidin aminosav imidazolil-oldalláncához) kötődve alakítják ki a fehérje harmadlagos szerkezetét és az enzim aktív centrumát.

A különféle oligopeptidekkel képzett fémkomplexek vizsgálata nagyban elősegíti a fémion és a protein közötti kölcsönhatás megértését, mivel ezek a kismolekulák alkalmasak lehetnek a metalloproteinek aktív centrumának a modellezésére.

Azok a metalloenzimek, amelyek karbonsavészterek, amidok, peptidek vagy foszfátok hidrolízisében vesznek részt, majdnem mindig cink(II)iont tartalmaznak az aktív centrumban. A mátrix metalloproteinázok (MMP) is cinktartalmú enzimek, amelyekre jellemző, hogy két cink(II)iont tartalmaznak: egyet az aktív centrumában (ez az úgynevezett katalitikus cink), egyet pedig az enzim más helyéhez kötődve (úgynevezett szerkezeti cink, amelynek a fehérje harmadlagos szerkezetének a kialakításában van szerepe). A mátrix metalloproteinázok felelősek az extracelluláris mátrix anyagainak lebontásáért. Zimogén formában szekretálódnak, s proteolitikus hasadás által válnak aktív enzimekké. A proenzimek aktiválódása egyensúlyi folyamat, amelynek a megbomlása különböző betegségek kialakulásához vezethet. Bizonyos esetekben fokozott enzimaktivitás léphet fel, melyet valamilyen módon csökkenteni kell. Mind a fiziológiás, mind a patológiás folyamatok megértéséhez fémmegekötő, jelen esetben cink(II)kötő ligandumok komplexképző sajátságainak a vizsgálata szükséges.

A koordinációs kémia utóbbi 40 évben tapasztalható fejlődésének az eredményeként ma már jelentős mennyiségű információ áll rendelkezésre a fémion-protein kölcsönhatás jellegéről, így néhány általános törvényszerűséget is sikerült megállapítani. Ezek egyike az, hogy az átmenetifém-ionok egy része (pl.: palládium(II)-, réz(II)-, nikkel(II)- és cink(II)ion) különféle peptidek esetében képes elősegíteni az amid-nitrogén deprotonálódását, és így peptidszerű koordináció alakulhat ki a fémion körül.

Korábban az MTA Peptidkémiai Kutatócsoportban cinkproteázok gátlására előállított bisz(2-imidazolil) fémmegkötő csoportot tartalmazó peptidszármazékok átmenetifém-komplexeit vizsgálták a KLTE Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékén.

Ismeretes, hogy a bisz(2-imidazolil)-metil-aminnal (BIMA) analóg bisz(2-piridil)-metilamin (BPMA) szintén stabil komplexeket képez az átmenetifém-ionokkal, ezért vizsgálatainkat ilyen csoportot tartalmazó aminosav- és peptidszármazékokra terjesztettük ki.

Munkánk során bisz(2-piridil)-metil-amint állítottunk elő az irodalomban közölt eljárás alapján, majd ezt az aminoszármazékot kapcsoltuk glicin illetve hisztidin aminosavak karboxilcsoportjához. Az irodalomban még nem közölt vegyületek előállítására a peptidkémiai alkalmazott oldatfázisú kapcsolási eljárásokat alkalmaztuk.

Az így előállított vegyületeknél azt tanulmányoztuk, hogy a glicin vagy a hisztidin aminosav C-terminális végéhez kapcsolódó bisz(2-piridil)rész hogyan befolyásolja a peptidszerű koordináció kialakulását. Képes-e a piridin-nitrogén a réz(II)-, nikkel(II)- és cink(II)ionhoz való koordinációban az imidazolil-csoporttal analóg módon horgonycsoportként viselkedni, ezáltal elősegítve az amid-nitrogén deprotonálódását.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Oldatfázisú kapcsolási eljárások peptidkötés kialakítására ^[1,2]

Peptidkötés kialakítására a szerves kémiában oldatfázisú illetve szilárd fázisú (gyantán történő) kapcsolási eljárásokat alkalmaznak. Ahhoz, hogy két különböző aminosav csak egyféleképpen tudjon összekapcsolódni, az egyiknek az amino-, a másiknak a karboxilcsoportját kell védeni. Az oldatfázisú peptidszintézis legáltalánosabban alkalmazott módszereit a következőkben foglaljuk össze.

Azidos kapcsolás:

Az N-terminális végén védett aminosav metilészteréből vagy savkloridjából azidszármazékot állítunk elő. Ezt az azidszármazékot reagáltatjuk a másik aminosavval vagy annak nátriumsójával. A fő reakcióút mellett mellékreakcióként az azidszármazék Curtius-átrendeződése, amidképződés is végbemehet, valamint egy azidszármazék egy hidrazinszármazékkal reagálva diacil-hidrazin aminosavat szolgáltat. Ennek a kapcsolási módszernek az az előnye, hogy jó termeléssel és minimális racemizációval megy a reakció.

Savkloridos kapcsolás:

Acil-aminosavkloridot egy másik aminosav nátriumsójával vagy észterével reagáltatjuk NaOH jelenlétében. Ma már nem alkalmazzák ezt a kapcsolási eljárást, mert a reakció során racemizáció következik be.

Vegyes anhidrides kapcsolás:

Az N-terminálisan védett aminosavszármazék vegyes anhidridjét klór-hangyasav-észter segítségével, bázis jelenlétében állítjuk elő, és ezzel acilezzük a karboxilcsoportján védett aminosavat. A vegyes anhidridképzés $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on történik, mert $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ hőmérsékleten diszproporcionálódás következhet be. Egy másik mellékreakciója ennek a kapcsolási eljárásnak az uretánképződés. Előnye, hogy jó termeléssel megy a reakció, és lépésenkénti gyors szintézisre alkalmas a lépések közötti izolálás nélkül is.

Karbodiimides kapcsolások:

Diciklohexil-karbodiimiddel reagáltatjuk az aminokomponens karboxilcsoportját, majd a keletkezett átmeneti termék reagál a karboxil-komponenssel, melynek során dipeptid és diciklohexil-urea keletkezik. Ebben a kapcsolási eljárásban a diciklohexil-karbodiimidet kondenzálószerként alkalmazzuk. A mellékreakciók elkerülésére segédreagensek használatával gyorsítható a reakció.

Aktív észteres kapcsolások:

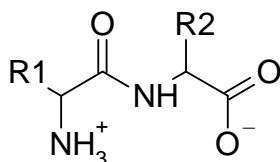
Előállítjuk az N-terminálisan védett aminosav alkil- vagy arilészterét, és ezzel megacilezzük a C-terminálisan védett aminosavat. Előnye ennek a módszernek, hogy az aktív észterek kristályosak, a kapcsolás gyorsan lejár szódik és ezért kevés mellékreakcióra van lehetőség, kicsi a racemizáció mértéke és lépésenkénti gyors peptidszintézis hajtható végre.

2.2. Peptidek sav-bázis és komplexkémiai viselkedése

Jól ismert, hogy az aminosavak különböző átmenetifém-ionokkal stabil bisz- vagy triszkomplexeket képeznek. Ezen komplexekben a fémion az α -amino- és a karboxilcsoportokhoz koordinálódik, stabilis öttagú kelátot képezve.

Ez az alapvető koordinációs mód módosulhat, ha az aminosav oldallánca is tartalmaz valamilyen koordinálódásra hajlamos donoresortot.

Di-, tri- és oligopeptidek esetében az amino- és a karboxilcsoport túlságosan távol helyezkedik el egymástól, így nem tud öttagú kelátgyűrű képződni a két terminális helyzetű csoporton keresztül:



1. ábra: Egy dipeptid általános szerkezeti képlete

Másrésről viszont már a dipeptidekben is minimum négy donortom található (amino-nitrogén, karbonil-oxigén, amid-nitrogén és karboxil-oxigén), melyek mindegyike egy lehetséges koordinációs hely lehet a fémion számára. Itt is előfordulhatnak egyéb kötőhelyek is az oldalláncban, és ez nagyon változatos összetételű fémion-peptid komplexek kialakulását teszi lehetővé.

2.2.1. Nem-koordinálódó donorcsoportot tartalmazó aminosavak és peptidek sav-bázis sajátságai

Minden dipeptid minimum három, egymástól elkülönülő funkciócsoportot tartalmaz:

- terminális aminocsoport (-NH₂)
- terminális karboxilcsoport (-COO⁻)
- amidcsoport, azaz peptidkötés (-CONH-)

Kettőnél nagyobb tagszámú oligopeptidek esetében is ugyanezek a funkciócsoportok jelennek meg azzal a különbséggel, hogy a terminális csoportok messzebb kerülnek egymástól és több (n -számú aminosavat tartalmazó oligopeptidlánc esetében $(n-1)$) amidcsoport található a molekulában.

Ezeknek az oligopeptideknek a sav-bázis sajátságait tanulmányozva azt találták, hogy ha az oldalláncban nincs valamilyen funkciócsoport, akkor az oligopeptidnek csak két protonálódási állandója esik a mérhető pH-tartományban ($0 < \text{pH} < 14$)^[3-6]:

1. táblázat: Glicin aminosav és glicint tartalmazó peptidek protonálódási állandói

(mérési körülmények: T=298 K; I=0,1 mol/dm³)

ligandum	pK ₂ (-NH ₃ ⁺)	pK ₁ (-COOH)
Gly	9,60 ^[5]	2,37 ^[5]
GlyGly	8,13 ^[6]	3,21 ^[3]
GlyGlyGly	7,96 ^[6]	3,27 ^[4]
GlyGlyGlyGly	7,97 ^[6]	3,24 ^[4]

Az 1. táblázat adataiból látszik, hogy az ammónio- és a karboxilcsoport deprotonálódási lépése jól elkülönül mindegyik aminosav és peptid esetében. A két csoport pK-ja közötti különbség az aminosavnál a legnagyobb, mert a peptidkötés csökkenti mind az aminocsoport bázicitását, mind a karboxilcsoport savasságát. A tri- és tetraglicin pK-értékei közti hasonlóság alapján újabb glicin-egységek peptidszerű kapcsolódása már nem lenne jelentős hatással a peptid (ligandum) két pK-értékére.

Az amidcsoport két lehetséges fém- vagy protonmegkötő donoratomot (karbonil-oxigént és amid-nitrogént) tartalmaz. Azonban az aminocsoportban még magányos elektronpárt tartalmazó nitrogén elveszíti a bázicitását amikor amidcsoportot alakít ki, mivel az amidcsoportban a karboxilcsoport C=O π -kötése az OCN-atomokon delokalizálódik, aminek következtében a C-N kötés részben kettőskötés jellegűvé válik. Így a peptidkötés széles pH-tartományban semleges, és csak nagyon bázikus vagy savas oldatokban képes igen gyenge savként vagy bázisként viselkedni. Ez a tartomány potenciometriásan már nem mérhető meg.

Szintén a delokalizáció miatt a kialakult peptidkötés planáris szerkezetű.

2.2.2. Lehetséges koordinációs módok nem-koordinálódó donorcsoportot tartalmazó peptidekkel

Az amidcsoport neutralitása miatt a terminális amino- és karboxilcsoport a legfontosabb fémmegkötőhely. Azt azonban szterikus okok megakadályozzák, hogy a két terminális csoport ugyanahhoz a fémionhoz koordinálódhasson. Az amino- és a karboxilcsoport így egymástól független, elsődleges kötőhelyei a fémionoknak, és a kölcsönhatások erőssége erősen függ a fémion kémiai jellegétől.

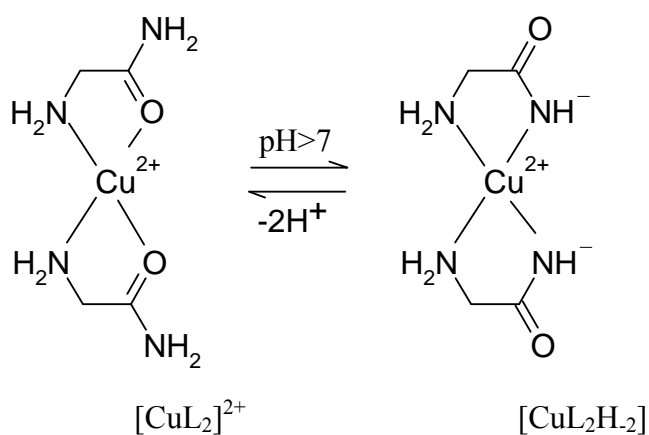
A glicinamid és az N-acetil-glicin a két legegyszerűbb vegyület a peptidek N-, ill. C-terminális végének a modellezéséhez:



2. ábra: A glicinamid és az N-acetil-glicin modellvegyületek szerkezete

Ezen kismolekulák komplexkémiái sajátosságait vizsgálva azt tapasztalták, hogy az N-acetil-glicin egyszerű karboxilátként koordinálódik a fémionhoz [7,8]. Ez a viszonylag gyenge kötés nem képes megakadályozni semleges pH-jú vizes oldatban a fémhidroxidcsapadék leválását. Az amidcsoport kelátképző helyzetben van ugyan a karboxilcsoporthoz képest, de ennek a koordinációja csak az amid-nitrogén deprotonálódása után mehetne végbe az amidcsoport kis bázicitása miatt. Ezt a deprotonálódást egyetlen N-acetil-aminosav esetében sem sikerült kimutatni. A monodentát koordinálódás következtében a peptidek terminális karboxilcsoportja gyenge fémmegkötőhely, így szerepe csak a komplexképződés irányításában lehet.

Ugyanezt mutatja a glicinamid komplexkémiái viselkedése is [9]:



3. ábra: A Cu(II)-glicinamid rendszerben különböző pH esetén képződő komplexek szerkezete

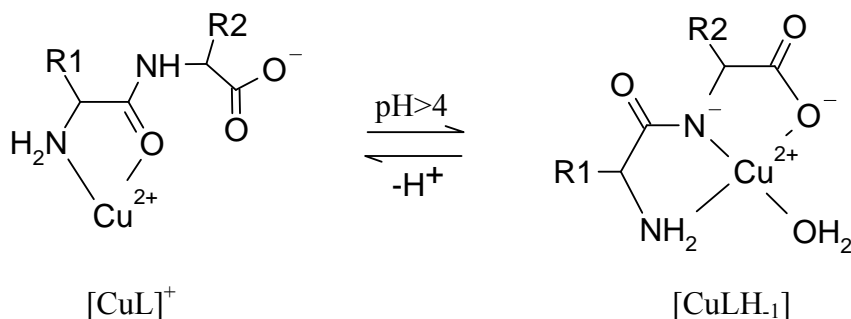
A koordináció a terminális aminocsoporton kezdődik el. Ezután a glicinamid öttagú kelátot képezhet mind az amid-nitrogén, mind a karboxil-oxigén koordinálódásával. Azt, hogy ezek közül melyik valósul meg, az határozza meg, hogy az amid-nitrogén deprotonálódott-e már, és így lehetővé vált-e a peptidszerű (amid-nitrogéneken keresztüli) koordináció kialakulása.

A karboxil-oxigéneken keresztül kialakuló kötés ($[\text{CuL}_2]^{2+}$ összetételű komplex) az aminosavak koordinálódására hasonlít. Az aminosavkomplexek azonban töltés nélküliek, és így stabilitási állandójuk valamivel nagyobb mint a peptid- vagy a glicinamidkomplexeké, és jóval magasabb mint a karboxilátkomplexeké.

A karboxilátkomplexekhez viszonyított stabilitásnövekedés glicinamidkomplex esetén lehetővé teszi a fémion oldatban maradását gyengén bázikus közegben is, ahol már az amid-nitrogén deprotonálódhat és így az amid-nitrogén koordinálódhat a fémionhoz. Ebben az

esetben a két terminális aminos csoport és a két deprotonált amid-nitrogén képes telíteni a Cu(II) koordinációs szféráját ([CuL₂H₂] összetételű komplex).

Dipeptidek esetében ugyanígy kialakulhat a peptidszerű koordináció:



4. ábra: A Cu(II)-diglicin rendszerben különböző pH esetén képződő komplexek szerkezete

A Cu(II)-diglicin rendszerben képződő [CuLH₁] összetételű komplex két öttagú kelátgyűrűt is tartalmaz, ami a komplex megnövekedett stabilitásához és az amidcsoport pK-jának a csökkenéséhez (pK=4,23^[10]) vezet.

Összegzésképpen megállapíthatjuk, hogy az oligopeptidek terminális aminos csoportja az átmenetifém-ionok elsődleges koordinálódási helye. Savas pH-tartományban (pH<4) az amino-nitrogénen és a szomszédos peptidcsoport karbonil-oxigénjén keresztül közepes stabilitású öttagú kelátszerkezet képződhet. Ezt a szerkezetet az aminosavkomplexekénél kisebb stabilitási állandóval ugyan, de minden vizsgált fémion esetében sikerült kimutatni. Lúgos közegben azonban csak az amid-nitrogén deprotonálódása és koordinálódása képes megakadályozni a fémion hidrolízisét. Ezt a deprotonálódási folyamatot csak néhány fémion képes indukálni. A legfontosabb ilyen fémion a Pd(II)-, Cu(II)- és Ni(II)ion. Ezek a fémionok az amid-nitrogén deprotonálódását a fiziológias pH-tartományba vagy akár az alá is képesek leszorítani.

Cu(II)komplexek:

A Cu(II)ion minden oligomerrel elsősorban 1:1 összetételű, tetragonális térszerkezetű komplexeket alkot.

A Cu(II)-diglicin rendszerben^[3,10-14] savas tartományban csak egyféle, [CuL]⁺ összetételű komplex alakul ki az amino-nitrogénen és a karbonil-oxigénen keresztüli koordinálódással. A pH-t 4 fölé emelve az amid-nitrogén deprotonálódik és kialakul a peptidszerű koordináció. Az így képződött, [CuLH₁] összetételű komplexnek van egy szabad

koordinációs helye, ahová a pH-tól és a fémion/ligandum aránytól függően [10,13,15] deprotonált ligandum, H₂O-molekula vagy OH⁻-ion kötődhet be.

Biszkomplexek esetében a második ligandum axiális-ekvatoriális helyzetben kötődik a két terminális csoportján keresztül. Ekkor nem történik meg a második ligandum amid-nitrogénjének a deprotonálódása, és ez a komplex stabilitásának a csökkenését eredményezi. Ez a szerkezet nem képes megakadályozni pH=9 körül különböző vegyes hidroxokomplexek kialakulását. Erre utal az abszorpciós spektrumban megfigyelhető gyenge vörös eltolódás és a redoxipotenciál csökkenése is [16].

Tri- és tetraglicin esetén [4,6,17,18] is végbemegy Cu(II)-vel az amid-nitrogén deprotonálódása, és így a terminális aminoscsoport mellett az amid-nitrogének telítik a Cu(II)ion koordinációs szféráját.

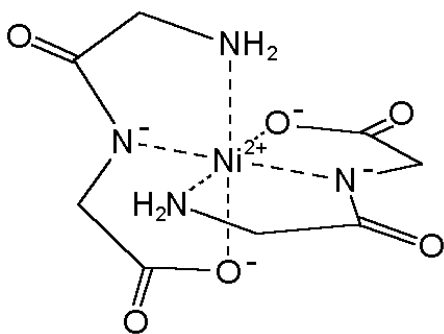
Az egymást követő amid-nitrogén deprotonálódási lépések pK-értéke növekszik, de sokkal alacsonyabb mint a szabad ligandumé (ami potenciometriás módszerrel nem is minden esetben mérhető).

Az amid-nitrogén deprotonálódását nem csak a potenciometriás adatok, hanem a kalorimetriás, spektrofotometriás és röntgendiffrakciós mérések eredményei is egyértelműen alátámasztják [12,18-22].

Ni(II)komplexek:

Gyengén lúgos közegben a Ni(II)ion is képes indukálni az amid-nitrogén deprotonálódását és koordinálódását [23-26]. A keletkező komplexek sztöchiometriája és szerkezete azonban eltér a Cu(II)komplexekétől.

A Ni(II)-diglicin rendszerben mind a potenciometriás, mind a spektrofotometriás adatok alapján biszkomplexek képződnek, és pH=10 körül már mindkét kapcsolódó ligandum amid-nitrogénje deprotonálódott és koordinálódott.



5. ábra: A Ni(II)-diglicin rendszerben képződő [NiL₂H₋₂]²⁻ összetételű komplex szerkezete

Az itt jelenlévő $[\text{NiL}_2\text{H}_1]^-$ és $[\text{NiL}_2\text{H}_2]^{2-}$ összetételű komplexek oktaédes szerkezetűek és paramágneses tulajdonságúak. A röntgendiffrakciós vizsgálatok is kimutatták a hatos koordinációs számú Ni(II)komplex jelenlétét az oldatfázisban ^[27].

Ezzel szemben a Ni(II)-triglicin és a Ni(II)-tetraglicin rendszerben síknégyszetes, diamágneses, intenzív sárga színű komplex kialakulása jellemző. A potenciometrikus adatok alapján pH=8-9 körül a ligandum már (diglicin esetében) két, (triglicin esetében) három protont veszített. Az amid-nitrogének deprotonálódásának pH-értékei nem állapíthatók meg pontosan, mert a deprotonálódási lépések a síknégyszetes komplex képződése miatt kooperatív mechanizmussal mennek végbe ^[28]. A $[\text{NiLH}_1]$ összetételű komplex koncentrációja minden fémion/ligandum aránynál és minden pH-nál elhanyagolható, így a stabilitási állandója nem adható meg pontosan.

Ugyanezek állapíthatók meg a Ni(II)-tetraglicin rendszerről is, ahol a három amid-nitrogén kooperatív deprotonálódása a $[\text{NiLH}_3]^{2-}$ összetételű, síknégyszetes geometriájú komplex képződését teszi lehetővé. Ez a fajta szerkezet a Cu(II)-tri- és tetraglicin komplexeknél talált szerkezettel analóg, de itt nincs axiális helyzetben fém-ligandum kölcsönhatás. A feltételezett, amid-nitrogéneken keresztüli síknégyszetes diamágneses koordinációt igazolja a röntgendiffrakciós kristályszerkezet ^[29], az abszorpciós spektrum és az NMR-vizsgálatok ^[18,24,26] is.

Az oligopeptidek Ni(II)komplexeinek másik fontos jellemzője a különböző deprotonált formák egymásba való lassú átalakulása. A kinetikai inertség, és ezzel együtt a potenciometriás mérés nehézsége növekszik a deprotonált peptidcsoportok számának a növekedésével.

Zn(II)komplexek:

Savas és gyengén bázikus oldatban még a Zn(II)-peptid rendszerek is vizsgálhatók csapadék leválása nélkül ^[30]. pH>5 esetén kelátgyűrű képződik a terminális aminosoporton és a szomszédos karbonilcsoporton keresztül. Habár a Zn(II)ion koordinálni tudja a peptidmolekulákat, egyszerű (oldalláncban donorcsoportot nem tartalmazó) dipeptidek esetén nem képes elősegíteni az amid-nitrogén deprotonálódását.

2.2.3. Hisztidintartalmú peptidek sav-bázis sajátságai

A hisztidint tartalmazó peptidekre vonatkozóan található irodalmi adatokból láthatjuk, hogy a különböző típusú funkciócsoportokra kapott pK-értékeket nem nagyon befolyásolja a hisztidin peptidláncon belül elfoglalt helye:

2. táblázat: *Hisztidin aminosav és hisztidint tartalmazó peptidek protonálódási állandói*
(mérési körülmények: T=298 K; I=0,1 mol/dm³)

ligandum	pK ₃ (-NH ₃ ⁺)	pK ₂ (imidazol-nitrogén)	pK ₁ (-COOH)
His ^[31]	9,09	6,02	1,7
GlyHis ^[32]	8,22	6,77	2,51
HisGly ^[32]	7,59	5,94	2,96
GlyHisGly ^[33]	7,98	6,35	2,06
GlyGlyHis ^[33]	7,96	6,64	2,92

Itt is tapasztalható az amidcsoport azon hatása, hogy csökkenti mind az aminos csoport bázicitását, mind a karboxilcsoport savasságát.

Az imidazol-N3 pK₂ értéke nő, ha a hisztidin aminosav egy glicin aminosavhoz C-terminálisan kapcsolódik, és ugyan kisebb mértékben, de csökken, ha ez a kapcsolódás N-terminális.

2.2.4. Lehetséges koordinációs módok hisztidintartalmú peptidekkel

Az imidazol-N3 az egyik legfontosabb, metalloenzimekben előforduló fémmegkötőhely. Ilyen típusú kötés van pl. a szénsavanhidrázban, ahol három imidazolgyűrűhöz, a karboxipeptidázban és a termolizinben, ahol két imidazolgyűrűhöz és egy karboxilát anionhoz Zn(II)ion, és a plasztocianinban, ahol két imidazolgyűrűhöz és két kénatomhoz réz(II)ion kapcsolódik^[34].

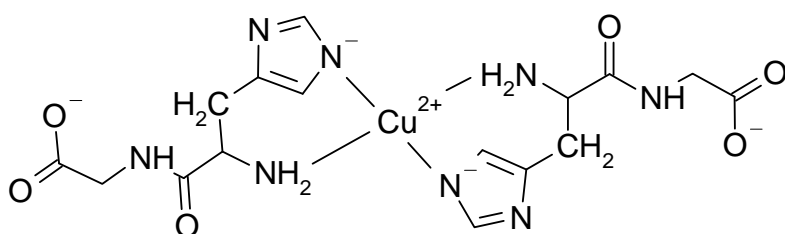
Az imidazol-N3 donortom képes versengeni az aminosav kötőhelyeivel, és jelentősen növeli a komplex stabilitását. A hatás nagyban függ az imidazolrésznek a peptidláncon belül elfoglalt helyétől [8].

Általánosan megállapítható, hogy az imidazolil-oldalláncot C-terminális részen tartalmazó dipeptid amid-nitrogénjének a deprotonálódását az oldallánc kölcsönhatása a fémionnal elősegíti. Oligopeptidekben ugyanígy a nem N-terminális helyen lévő oldallánc elősegíti az előtte lévő amid-nitrogén deprotonálódását. Ezzel szemben az N-terminális részen levő oldallánc erős koordinálódása a fémionhoz gátolhatja, vagy akár meg is akadályozhatja a deprotonálódást [32,35].

Cu(II)komplexek:

Az irodalomban megjelent adatok alapján az N- és a C-terminális hisztidintartalmú dipeptidek koordinációs kémiája eltérő.

A Cu(II)-HisGly rendszerben képződött komplexek összetétele és szerkezete a fémion/ligandum aránytól függ. Az N-terminális hisztidinszármazéknál az amino-nitrogén és az imidazol-N3 megfelelő pozícióban van ahhoz, hogy hattagú kelátgyűrűt képezzen. Ligandumfelesleg esetén az amid-nitrogén deprotonálódás nem tud lejátszódni, és hisztaminszerű koordinációval stabil biszkomplex ($[\text{CuL}_2]^{2-}$) képződik [32].



6. ábra: ACu(II)-HisGly rendszerben képződött $[\text{CuL}_2]^{2-}$ összetételű komplex szerkezete

1:1 fémion/ligandum arány esetén a Cu(II)ion koordinációs szférája telítetlen, ami lehetővé teszi az amid-nitrogén deprotonálódását és koordinálódását. pH=6 körül a diglicinnél is megfigyelhető koordinációs mód lép fel: a ligandum az amino-nitrogéneken, amid-nitrogéneken és karbonil-oxigéneken keresztül kötődik a központi fémionhoz. A Cu(II)ion negyedik koordinációs helyét egy másik $[\text{CuLH}_1]$ egység imidazolil-oldallánca foglalja el, és így dimer szerkezet képződik.

A deprotonált komplex képződése hidroxohidas szerkezettel is értelmezhető ^[36], de további potenciometriás ^[37-39] és spektrofotometriás ^[40] vizsgálatok az amid-nitrogén deprotonálódást támasztották alá.

Ha azonban a hisztidin aminosav C-terminális végéhez egy hosszú, nemkoordinálódó oldallánc kapcsolódik, amely sztérikusan nehezíti a dimerizációt, monomer-dimer egyensúly alakul ki az oldatban ^[41].

A Cu(II)-GlyHis rendszer esetében sztérikus okok kizárják a hisztaminszerű koordinációt, így megvan a lehetőség egy 3N-es, [CuLH₁] összetételű komplex kialakulására a termiális amino-nitrogén, deprotonált amid-nitrogén és imidazol-N3 donoratomokon keresztül. Ezt a fajta kötést először Martin & Edsall írta le ^[42] és bizonyította potenciometriás és spektrofotometriás mérésekkel. Ugyanezt a fajta szerkezetet igazolták mások potenciometriás, spektrofotometriás és röntgendiffrakciós szerkezetvizsgálatai is ^[36,38,43-46]. A [CuLH₁] összetételű komplexben a fémionnak van egy szabad koordinációs helye, amely képes egy másik GlyHis-hez koordinálódni. A második ligandum monodentát ligandumként kötődik a terminális amino-nitrogéneken vagy az imidazol-N3-en keresztül. Ugyanezt a koordinációs módot találták más, C-terminális helyzetben hisztidin aminosavat tartalmazó dipeptidek esetében is ^[32,44].

A hisztidintartalmú peptidek másik fontos vonása az imidazolgyűrű pirrol-N1-jének a kémiai jellegéből adódik. A szabad ligandumban ez a csoport nagyon gyenge sav (pK>14), így általában nem vesz részt a koordinációban ^[47]. Az imidazol-N3 és a fémion közti kölcsönhatás azonban elősegítheti a pirrol-N1 deprotonálódását ^[48]. Korábban már történtek ilyen jellegű vizsgálatok Cu(II)-, Ni(II)- és Zn(II)-hisztidin ill. -hisztamin törzs- és vegyes ligandumú komplexeire vonatkozóan. Ennek során megállapították, hogy a Ni(II)- és Zn(II)ion a pirrol-N1 ionizációját nem befolyásolja lényegesen a szabad ligandumhoz képest. Ezzel szemben a folyamat Cu(II)iont és hisztidintartalmú dipeptideket tartalmazó rendszerekben lejátszódik, de a pirrol-N1 pK-ja itt is jelentősen függ a komplex kötésmódjától. A legalacsonyabb értéket (pK~10,5) a Cu(II)-GlyHis rendszerben kapták. Ebben az esetben a deprotonálódást a d-d átmenet jellegzetes kék eltolódása kíséri. Morris & Martin ^[49] kimutatta, hogy a [CuLH₁] egységekből [Cu₄L₄H₈]⁴⁺ tetramerek képződnek, ha csak ezt sztérikus faktorok nem akadályozzák meg (mint pl. ProHis esetében a prolin aminosav nagyméretű oldallánca ^[50]).

Cu(II)-HisGly rendszer esetében [CuL₂] összetételű komplexnél 11-nél nagyobb pK-értéket kapunk az imidazol-N1 protonálódási állandójára. Itt az imidazolgyűrű nem csak

hídligandumként szerepel, hanem egy kelátgyűrű része ^[43]. Az olyan dimer komplexekben, ahol az imidazol csak hídligandumként szerepel, hidrolízis játszódik le.

Ni(II)- és Zn(II)komplexek:

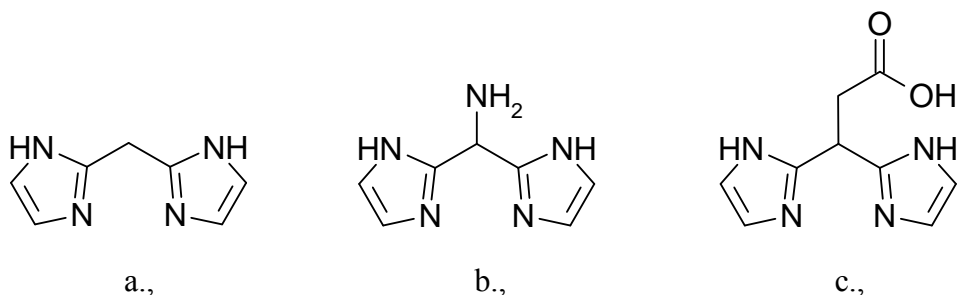
A hisztidin aminosavat tartalmazó peptidek a rézen kívül más átmenetifém-ionokkal is könnyen komplexet képeznek. Ezen komplexek szerkezetét jelentősen befolyásolja az imidazolil-oldallánc peptiden belül elfoglalt helye.

A HisGly ligandum amid-nitrogénjének a deprotonálódása csak bizonyos fémion/ligandum arányoknál mehet végbe. Ez azzal magyarázható, hogy elegendő ligandum esetén hisztaminszerű koordinációval $[ML_2]$ összetételű biszkomplex képződik. Ez a komplex elég stabil ahhoz, hogy megakadályozza a peptidcsoportnak a fémion koordinációs szférájába kerülését és deprotonálódását.

Ezzel szemben a ligandumként GlyHis-t tartalmazó rendszerekben $[MLH_1]^{2-}$ összetételű komplex képződik, hasonlóan mint Cu(II)ionnal, ahol a terminális aminos-nitrogén, deprotonált amid-nitrogén és imidazol-N3 donoratomokon keresztül megy végbe a koordináció ^[42,49,51].

2.3. Bisz(2-imidazolil)származékok komplexkémiai viselkedése

Metalloenzimekben a hisztidin aminosav imidazol-nitrogénje gyakran a fémionok kötődési helye. Ezen enzimek aktív centrumában a fehérjemolekula háromdimenziós szerkezete az imidazolgyűrűket olyan közeli helyzetbe hozza, hogy azok képesek egyazon fémionhoz koordinálódni. Így ezeknek az enzimeknek jó modelljei lehetnek azok az egyszerű imidazolszármazékok, amelyekben két imidazolgyűrűt alifás szénlánc köt össze ^[52,53]. Három ilyen alapvegyület szintézise és vizsgálata történt meg ^[52-56].



7. ábra: A legegyszerűbb bisz(2-imidazolil)származékok szerkezete

a.: bisz(2-imidazolil)-metán (BIM)

b.: bisz(2-imidazolil)-metil-amin (BIMA)

c.: 3[bisz(2-imidazolil)]-propionsav (BIP)

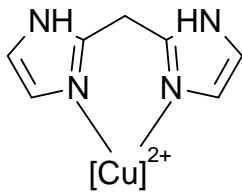
A bisz(2-imidazolil)-metil-amin és a 3[bisz(2-imidazolil)]-propionsav szerkezete lehetővé teszi, hogy hozzájuk C- ill. N-terminálisan aminosavat, vagy akár egy hosszabb peptidláncot kapcsoljunk ^[52,53].

Ha valamely metalloenzim szelektív gátlását akarjuk elérni, akkor ehhez a fémiont jól koordinálni képes bisz(imidazolil)csoporthoz olyan vegyületrészt (ebben az esetben egy peptidláncot) kell kapcsolni, amely modellezi az enzim által hasítani képes szubsztrátot, vagy annak hasadó kötés körüli környezetét. Ezen elképzelés alapján próbálták

kifejleszteni az emlős kollagenáz enzim (egy, a -ProLeuGlyIleAlaGly- kollagén szekvenciát hasító, Zn(II)iont tartalmazó metalloenzim) szelektív inhibitorát ^[52,53,57].

Egy ilyen összetett komplexkémiai rendszernek a vizsgálatánál, mint amilyen pl. egy bisz(2-imidazolil)csoporthoz tartozó peptidszármazék Zn(II)ionnal történő komplexképzése, célszerű először a ligandum részegységeinek az adott fémionnal történő viselkedését tisztázni. Az átmenetifémek peptidekkel alkotott komplexeit, mint azt az előző (2.2.) fejezet is mutatja, nagyon sokféle szempontból vizsgálták már, így ezen a területen nincs szükségünk újabb mérések elvégzésére. A bisz(2-imidazolil)rész komplexkémiai viselkedésével kapcsolatos irodalmi adatok viszont még igen hiányosak.

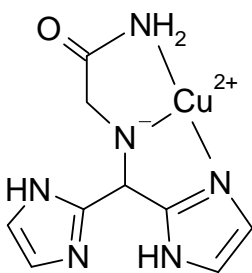
Az ez utóbbi csoportot tartalmazó ligandumok átmenetifém-komplexeinek eddigi vizsgálata ^[55,58-60] egyrészt azt mutatják, hogy a bisz(2-imidazolil)csoporthoz erős fémmegekötő sajátságú. Ez az imidazolgyűrűk π -akceptor sajátságával és a hattagú, stabilis kelátszerkezet kialakulásával magyarázható.



8. ábra: Cu(II)-BIM rendszerben képződő $[CuL]^{2+}$ összetételű komplex szerkezete

A szabad terminális aminocsoportot nem tartalmazó metán- és a karbonsavszármazék alapvegyületek (BIM és BIP), ill. az N-terminális végükön védett aminosavak és peptidek bisz(2-imidazolil)származékainak Cu(II)ionnal való komplexképzését tanulmányozva azt találták, hogy a Cu(II)ion körül a teljes pH-tartományban a bisz(2-imidazolil)csoportok koordinálódnak, stabilis mono- ill. biszkomplexekeket képezve. Ezt a koordinációs módot egy deprotonált karboxil- vagy egy, a peptidszekvenciában lévő hisztidin aminosavhoz tartozó imidazolcsoport nem képes lényegesen megváltoztatni, vagyis ezek a donorcsoportok csak gyengébb, axiális koordinációra képesek.

Másrészt a vizsgálatok azt mutatták, hogy a koordinációs módot egy szabad terminális aminocsoport jelenléte alapvetően képes megváltoztatni. Ebben az esetben ugyanis deprotonálódása után az aminocsoport képes konkurálni a bisz(2-imidazolil)csoporttal az erősebb, ekvatoriális kötőhelyekért. Ha az aminocsoporttal kelátképző helyzetben amidcsoport található, akkor az aminocsoport deprotonálódásával párhuzamosan lejátszódik az amid-nitrogén deprotonálódása is, és peptidszerű koordináció alakul ki a fémion körül ^[57].



9. ábra: Cu(II)-GlyBIMA rendszerben képződött $[CuLH_1]^+$ összetételű komplex koordinációs módja

A 9. ábrán látszik, hogy a Cu(II)ion körül még van egy szabad ekvatoriális koordinációs hely, és a ligandum egyik imidazolnitrogénje még szintén koordinálódásra képes. Ez lehetőséget teremt dimer szerkezet kialakulására, melynek jelenlétét a Cu(II)-GlyBIMA

rendszerben spektrofotometriásan és ESR-spektroszkópiával is sikerült is kimutatni ^[57] ($[\text{Cu}_2\text{L}_2\text{H}_2]^{2+}$ összetételű komplex).

Ezeknek a dimer szerkezeteknek a jelenléte jelentősen megnehezíti a vizsgálatokat, mivel a monomerek és a dimerek közti különbség potenciometriásan nem mérhető ki egyértelműen. Ennek a kiküszöbölésére kezdtük el a bisz(2-imidazolil)származékokkal analóg bisz(2-piridil)származékok vizsgálatát. Ezekben a vegyületekben az imidazolil-csoportokat kisebb π -akceptor sajátosságú, így koordinálódásra és dimer képzésére kevésbé hajlamos piridil-csoportokkal helyettesítettük. Ezen ligandumok átmenetifém-komplexeivel kapcsolatban az irodalomban eddig az alapvegyületeken kívül ^[61,62] csak a prolinszármazékról (N-prolil-bisz(2-piridil)-metil-amin, azaz ProBPMA) jelentek meg adatok ^[63].

A ligandumként bisz(2-piridil)származékot tartalmazó rendszerek komplexkémiai viselkedésének tisztázása segítséget nyújthat a bonyolultabb, bisz(2-imidazolil)származékokat tartalmazó rendszerek koordinációs kémiai jellemzéséhez.

3. Kísérleti eredmények és értékelésük

Rövidítésjegyzék:

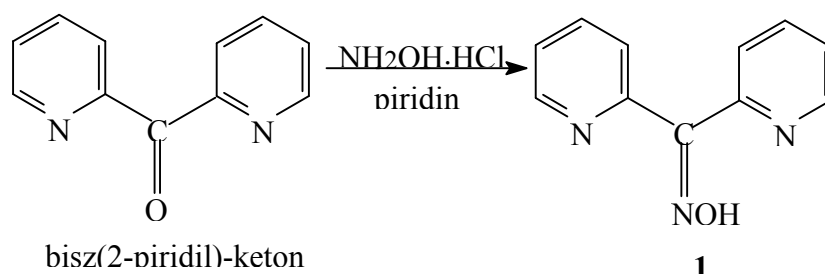
Boc	terc. butil-oxi-karbonil-csoport
BOP	benztriazol-1-il-oxi-trisz(dimetilamino)-foszfónium-hexafluorofoszfát
DCHA	diciklo-hexil-amin
DMF	dimetil-formamid
EtOAc	etil-acetát
HOBt	1-hidroxi-benztriazol
NMM	N-metil-morfolin
TFA	trifluor-ecetsav

3.1. A ligandumok szintézise

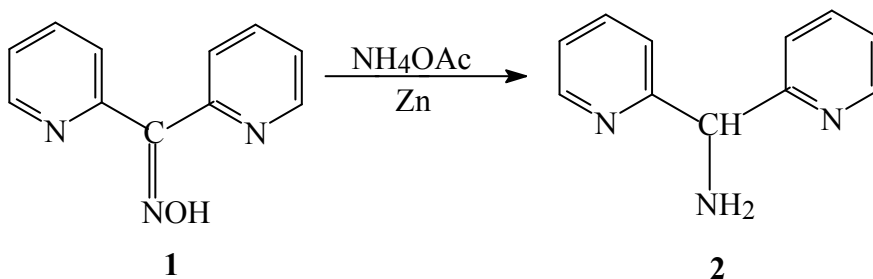
3.1.1. Bisz(2-piridil)-metil-amin előállítása

bisz(2-piridil)-ketonból ^[64,65]

Bisz(2-piridil)-ketonból első lépésként bisz(2-piridil)-ketonoximot (**1**) állítottunk elő, és az így kapott kristályos termékből állítottuk elő a bisz(2-piridil)-metil-amint (**2**):



10. ábra: Bisz(2-piridil)-ketoxim előállítása



11. ábra: Bisz(2-piridil)-metil-amin szintézise

A feldolgozás során eltértünk az irodalmi eljárástól, amely szerint pH=10-re történő lúgosítás után a termék éterbe átrázható. Ez a művelet a mi kísérletünk során nem volt elég hatékony, ezért az elegyet tovább lúgosítottuk és kloroformba ráztuk át.

3.1.2. Oldatfázisú kapcsolási eljárások alkalmazása

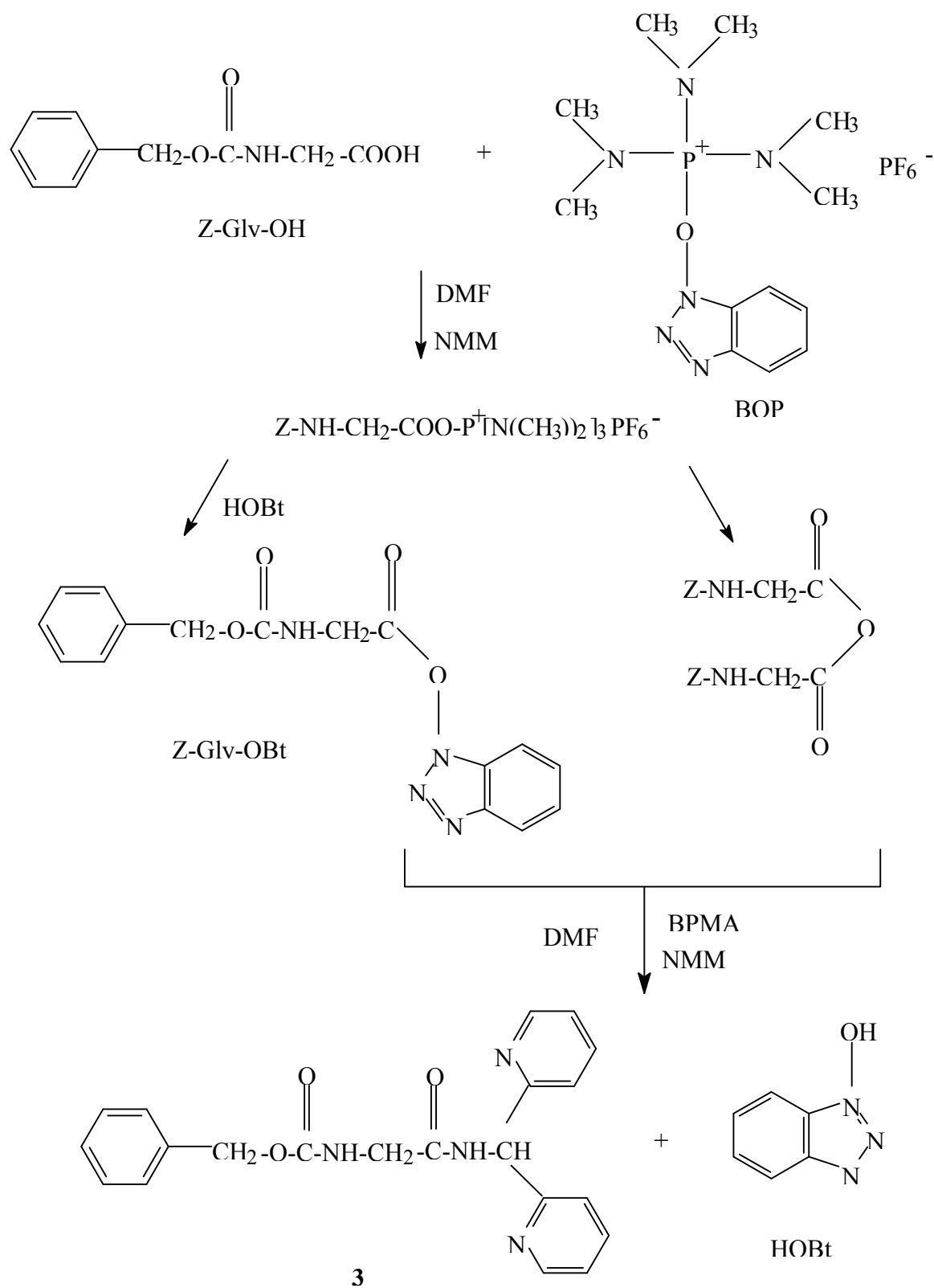
N-glicil-bisz(2-piridil)-metil-amin előállítására

Az N-glicil-bisz(2-piridil)-metil-amin (5) előállítását kétféle úton hajtottuk végre:

- I. Z-Gly-OH kapcsolása BPMA-val BOP reagens alkalmazásával, majd a Z védőcsoport eltávolítása
- II. Boc-Gly-OH vegyesanhidrides kapcsolása BPMA-val, majd a Boc védőcsoport eltávolítása

I. a) Z-Gly-BPMA (3) előállítása:

Az aminocsoportján benzil-oxi-karbonil-csoporttal védett glicint BOP-os aktívészteres eljárással kapcsoltuk a BPMA-val:



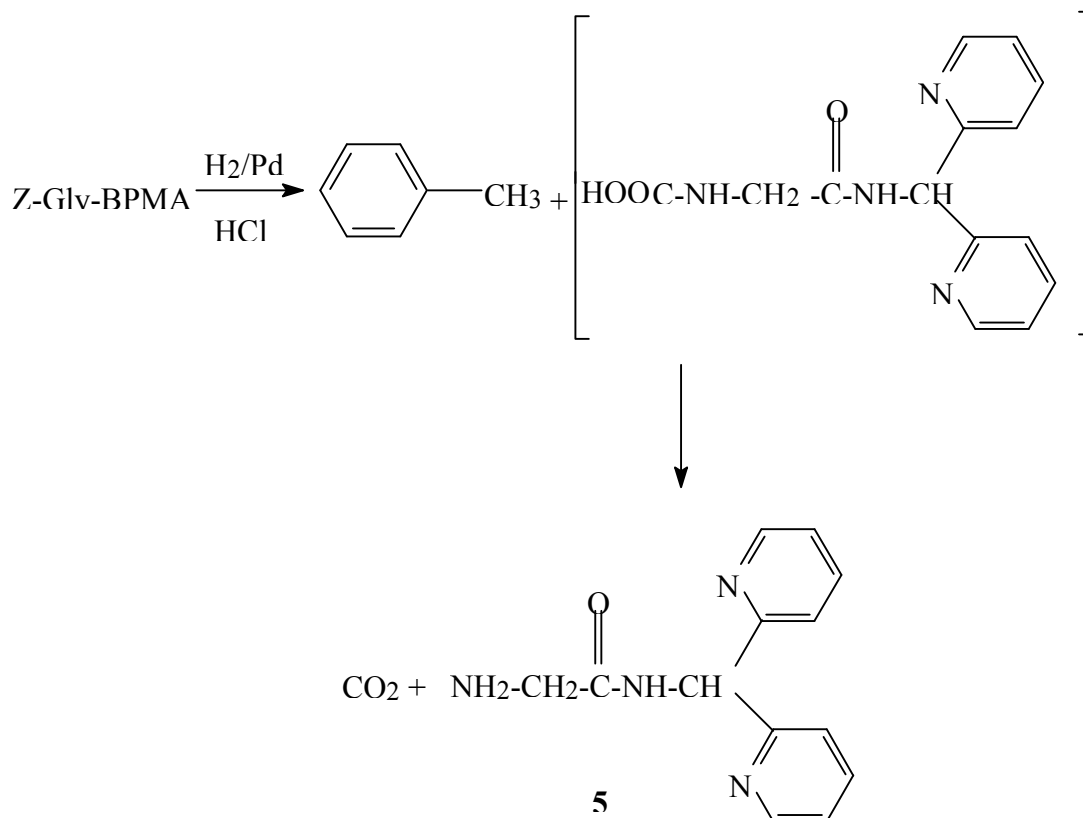
12. ábra: Z-Gly-BPMA előállítása

A reakciót vékonyrétegekromatográfiával (VRK) követtük a reagensek elfogyásáig. A reakció közben felszabaduló HOBt-től NaHCO_3 -os kirázással szabadultunk meg.

A vékonyrétegkromatográfia szennyezést mutatott a termék mellett, amitől oldószerelleggyel (ld.kísérleti rész) való eldörzsöléssel szabadultunk meg.

I.b) H-Gly-BPMA (5) előállítása, a Z védőcsoport eltávolítása:

A Z-Gly-BPMA vegyületről a Z védőcsoportot katalitikus hidrogénezéssel hasítottuk le:



13. ábra: H-Gly-BPMA előállítása

A Z védőcsoport hasítása savkatalízissal sem nem ment végbe teljes mértékben, egy idő után leállt a hidrogénezési reakció. A vékonyrétegkromatogram alapján azonosított Z-Gly-BPMA-t és H-Gly-BPMA-t flash-kromatográfia alkalmazásával választottuk el egymástól. A kapott anyagot bepároltuk, liofilizáltuk. A termék tisztaságát HPLC-vel vizsgáltuk és szerkezetét az NMR-spektrum alapján azonosítottuk (ld. függelék).

2.a) Boc-Gly-BPMA (4) előállítása:

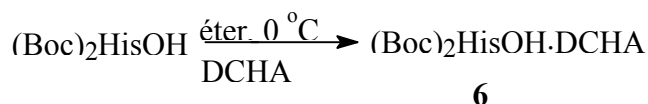
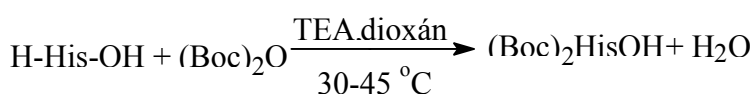
A Z védőcsoport hasításakor fellépő nehézségek miatt Boc-Gly-OH-t használtunk kiindulási vegyületté. A Boc-Gly-OH-ból klórszénsav-etilészter segítségével vegyes anhidridet készítettünk, és ezzel acileztük a BPMA-t.

3.1.3. N-hisztidil-bisz(2-piridil)-metil-amin előállítása különféle védőcsoportok és kapcsolási eljárások alkalmazásával

A H-His-BPMA (12) előállítására háromféle eljárást próbáltunk ki:

- I. H-His-OH-ből Boc-His(Boc)-OH.DCHA sót állítottunk elő, majd sójából felszabadítottuk, és az így megtisztított Boc-His(Boc)-OH-t BOP-os aktív észteres kapcsolással BPMA-hoz kapcsoltuk. A következő lépésben eltávolítottuk a Boc védőcsoportokat.
- II. Z-His-N₂H₃ -t azidosan kapcsoltuk BPMA-val, és a Z védőcsoportot katalitikus hidrogénezéssel ill. HBr/jégecet eleggyel hasítottuk.
- III. Boc-His(Boc)-OMe-ből Boc-His-N₂H₃-t állítottunk elő, és ezt BPMA-val azidosan kapcsoltuk, majd TFA-val lehasítottuk a Boc védőcsoportot.

1.) H-His-BPMA előállítása BOP-os aktívészteres kapcsolással:

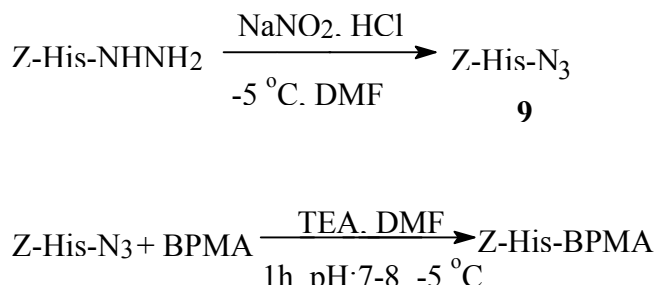


16. ábra: Boc-His(Boc)-OH.DCHA (6) előállítása ^[65]

A Boc-His(Boc)-OH-t (7) DCHA-t sójából felszabadítottuk ^[66] és az így kapott olajos anyagot BPMA-val aktív észteres eljárással kapcsoltuk, miközben a reakció menetét VRK-val követtük. A kapott Boc-His(Boc)-BPMA-ról (8) 4,4 N HCl/EtOAc-os eleggyel hasítottuk le a Boc védőcsoportokat. A VRK alapján a reakció gyorsan lezajlott, és a H-His-BPMA barnás csapadékként vált ki az oldatból. Az oldatot átráztuk, a szerves fázist bepároltuk. A nyersterméket vízben oldottuk és HPLC-n tisztítottuk. Végül a terméket az NMR-spektruma alapján azonosítottuk. A reakció nem ment elég jó kitermeléssel, ezért egy újabb kapcsolási eljárással próbálkoztunk.

2.) H-His-BPMA előállítása Z-His-NHNH₂-ből azidos kapcsolással:

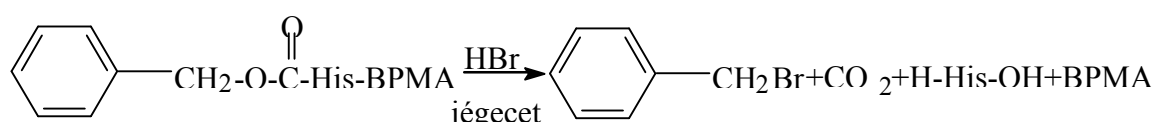
A Z-aminosav hidrazid-származékából azid-származékot (**9**) állítottunk elő, majd az azidos kapcsolási eljárásoknak megfelelően az azid-származékot izolálás nélkül rögtön kapcsoltuk BPMA-val:



17. ábra: Z-His-BPMA előállítása

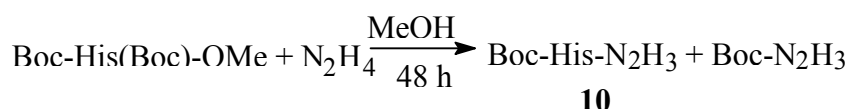
A VRK szerint a reakcióelegy szennyezést is tartalmazott, amitől éteres eldörzsöléssel nem sikerült megszabadulni, ezért a nyersterméket használtuk fel a továbbiakban. A Z védőcsoport eltávolítására katalitikus hidrogénezést alkalmaztunk. A hidrogénezés során nem kaptunk egységes terméket, ezért a Z védőcsoport eltávolításának egy másik módját választottuk: HBr/jégecetes hasításra tértünk át.

Ninhidrin pozitív terméket izoláltunk, melyet tömegspektrometriás elemzésre küldtünk el. A tömegspektrum szerint az izolált anyag hisztidin volt, vagyis az aminosav és a bisz(2-piridil)-metil-amin közötti amidkötés elhasadt a Z védőcsoport hasítása során:



18. ábra: A HBr/jégecetes kezelés eredménye

3.) H-His-BPMA előállítása Boc-His(Boc)-OMe-ből:

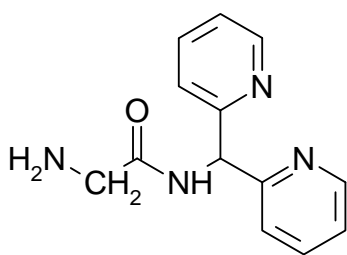


19. ábra: BocHisN₂H₃ (**10**) előállítása

Sárga, olajos terméket kaptunk, amely a VRK alapján Boc-N₂H₃ mellékterméket tartalmazott. A terméket, melyet éteres eldörzsöléssel tisztítottunk, azidosan kapcsoltunk a BPMA-al. A reakcióelegyben levő Boc-His-BPMA-t (11) oszlopkromatográfiás eljárással tisztítottuk meg a többi mellékterméktől, és a Boc védőcsoportot TFA-val hasítottuk. A kapott TFA-só kis mintáját HCl-sóra cseréltük és liofilizáltuk. Ez a művelet a liofilizátum VRK-ja alapján az anyag bomlását okozta. Részből hisztidin is keletkezett, hasonlóan mint a Z-His-BPMA HBr/jégecetes kezelésekor. Ennek alapján feltételezzük, hogy a H-His-BPMA erős savra érzékeny vegyület, ezért TFA-só formájában izoláltuk. A Z védőcsoport katalitikus hidrogénezésénél fellépő nehézségek pedig a bisz(2-piridil)rész fémmegkötő képességével magyarázható, mint ahogy azt a Z-Gly-BPMA vegyületnél is láttuk. Ennek a feltételezésnek az igazolására további vizsgálatokra van szükség. A H-His-BPMA tisztaságát HPLC-vel vizsgáltuk, és szerkezetét NMR-rel azonosítottuk (ld. függelék).

3.2. Az oldategyensúlyi mérések eredményei

3.2.1. N-glicil-bisz(2-piridil)-metil-amin (GlyBPMA)



20. ábra: Az *N*-glicil-bisz(2-piridil)-metil-amin szerkezete

A ligandum két piridingyűrűt és egy aminocsoportot tartalmaz. Az ezekhez tartozó mért protonálódási állandó értékek, ill. az összehasonlításhoz használt ligandumok ezen adatai:

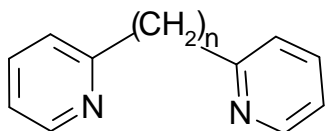
3. táblázat: *GlyBPMA* és az összehasonlításként használt vegyületek protonálódási állandói (mérési körülmények: $T=298\text{ K}$; $I=0,2\text{ mol/dm}^3$)

ligandum	pK(piridin-nitrogén)	pK(piridin-nitrogén)	pK(-NH ₃ ⁺)
GlyBPMA	<1,5	3,34(1)	7,91(5)
GlyGly ^[6]	–	–	8,13
GlyGlyHis ^[33]	–	–	7,96
GlyBIMA ^[63]	–	–	7,95
piridin ^[62]	5,31	–	–
ProBPMA ^[63]	< 1,5	3,19	8,59

Az aminocsoport pK-ja hasonló egy di- vagy tripeptid, vagy a GlyBPMA-val analóg bisz(2-imidazolil) származék GlyBIMA ugyanezen csoportjának pK-jával.

A ligandumban levő mindkét piridin-nitrogén pK-ja lecsökkent a szabad piridin pK-jához képest. Ez azzal magyarázható, hogy a két protonált piridin-nitrogén közeli helyzete szterikusan és elektrosztatikusan is kedvezőtlen, így az aromás gyűrűk kölcsönhatása csökkenti a piridin-nitrogének pK-ját, elősegíti azok deprotonálódását.

A két gyűrű közti távolság, azaz az ezeket összekötő alifás lánc hosszának növelésével a gyűrűk közti kölcsönhatás csökken, így a pK-értékek közelebb esnek a piridin esetén mért értékhez. Ezt bizonyítják az α,ω -bisz(2-piridil)-alkánok protonálódási állandói ^[62]:



21. ábra: Egy α,ω -bisz(2-piridil)-alkán általános szerkezete

4. táblázat: α,ω -bisz(2-piridil)-alkánok protonálódási állandói

(mérési körülmények: T=298 K; I=0,2 mol/dm³)

n	0	1	2	3	4	5	6	piridin
pK ₁	–	2,69	3,99	4,80	5,27	5,45	5,61	5,31
pK ₂	4,49	5,18	5,80	6,15	6,25	6,33	6,38	–

A mi esetünkben tehát ez alapján az n=1 esetében kapott értékeket várnánk. Azonban a bisz(2-piridil)-metánszármazékok pK-értékét a metincsoporton lévő szubsztituensek is befolyásolják elektronszívó vagy elektronküldő hatásuk révén. Ezen ligandum esetén az amidcsoport elektronszívó hatása az, ami a pK-értékek további csökkenését okozza.

Cu(II)-GlyBPMA rendszer:

A rendszerben képződött komplexek sztöchiometriája és stabilitása leginkább a Cu(II)-ProBPMA rendszerhez ^[63] hasonlít, mivel a két ligandumnak a szerkezetükből következően azonos típusú koordinálódási helyei vannak.

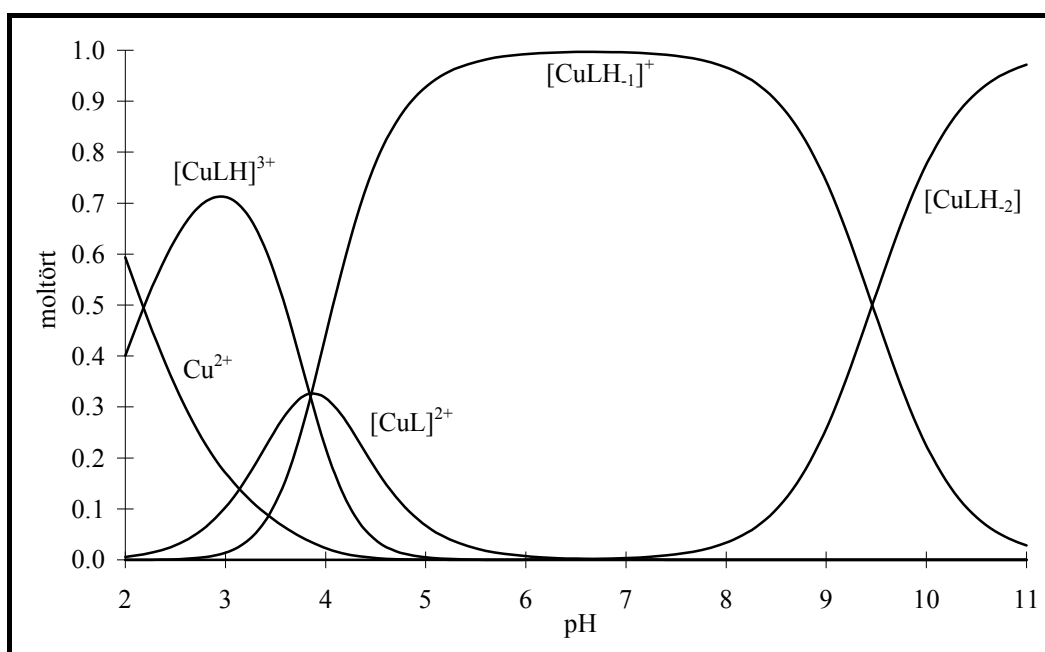
A potenciometriás mérések alapján a Cu(II)-GlyBPMA rendszer a következő komplexekkel írható le:

5. táblázat: A Cu(II)-GlyBPMA rendszerben és az összehasonlításként használt rendszerekben

képződött komplexek sztöchiometriája és stabilitási állandói ^[63,57]

(mérési körülmények: T=298 K; I=0,2 mol/dm³)

komplex összetétele	$\lg\beta(\text{Cu(II)-GlyBPMA})$	$\lg\beta(\text{Cu(II)-ProBPMA})$	$\lg\beta(\text{Cu(II)-GlyBIMA})$
$[\text{CuLH}]^{3+}$	11,96(8)	13,21(8)	17,11(9)
$[\text{CuL}]^{2+}$	8,12(5)	9,71(8)	–
$[\text{CuLH}_1]^+$	4,27(6)	6,08(7)	–
$[\text{Cu}_2\text{L}_2\text{H}_2]^{2+}$	–	–	18,43(2)
$[\text{CuLH}_2]$	-5,19(7)	-3,36(7)	-0,92(4)
$[\text{CuL}_2\text{H}_2]^{4+}$	–	–	31,64(9)
$[\text{CuL}_2]^{2+}$	–	–	18,96(5)
$[\text{CuL}_2\text{H}_1]^+$	–	–	11,30(8)



22. ábra: A komponensek eloszlása a Cu(II)-GlyBPMA rendszerben ($\text{H}_3\text{L}=\text{GlyBPMA}$) a pH függvényében

(kiindulási koncentrációk: $c_{\text{GlyBPMA}} = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$; $c_{\text{Cu(II)}} = 2 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$)

Ezen komplexek képződését igazolták az ESR-spektrumok is, melyek alapján kizárható mind a biszkomplexek, mind a dimerek vagy más oligomerek képződése.

A koordináció savas tartományban a két piridingyűrűn kezdődik el ($[\text{CuLH}]^{3+}$ összetételű komplex), majd az ammónio-csoport deprotonálódásával és gyenge axiális koordinációjával kis mennyiségű $[\text{CuL}]^{2+}$ alakul ki. Ez a max. 30% körüli mennyiség nem elegendő ahhoz, hogy az ESR-spektroszkópia kimutassa. Az axiális koordinációra mégis az utal, hogy ennek a hiányában az ammónio-csoport deprotonálódása a szabad ligandummal azonos pH-tartományban (csak $\text{pH} = 8$ körül) menne végbe.

Ezután $\text{pH}=4$ körül az ammónio-csoporttal párhuzamosan az amid-nitrogén is deprotonálódik, és így peptidszerű koordináció alakul ki a fémion körül ($[\text{CuLH}_{-1}]^{+}$ összetételű komplex). A teljes fiziológiás pH-tartományban ez a részecske az uralkodó.

$\text{pH} = 9$ fölött egyes hidroxó-komplexek ($[\text{CuLH}_{-2}]$) képződését tapasztaltuk.

Az UV-látható spektrofotometriás adatok alapján is csak monomer komplexek mutathatók ki, ugyanis több nitrogén koordinálódása (ami bekövetkezik dimer és más oligomer komplexek esetén) kisebb λ_{max} értékeket okozna az 1:2 fémion/ligandum aránynál felvett spektrumokban az 1:1 aránynál mért adatokhoz képest.

6. táblázat: A Cu(II)-GlyBPMA rendszerben különböző fémion/ligandum arányoknál és különböző pH-értékeken felvett spektrumok λ_{max} értékei

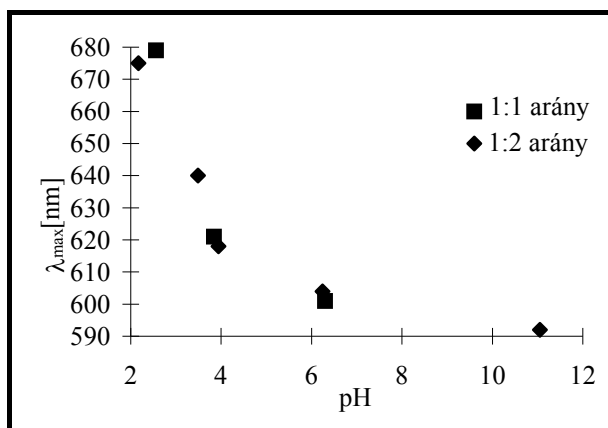
(mérési körülmények: $T=298 \text{ K}$)

1:2 arány: $c_{\text{GlyBPMA}} = 5,76 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$; $c_{\text{Cu(II)}} = 2,85 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$

1:1 arány: $c_{\text{GlyBPMA}} = 5,76 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$; $c_{\text{Cu(II)}} = 5,70 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$)

1:2 arány		1:1 arány	
pH	$\lambda_{\text{max}}[\text{nm}]$	pH	$\lambda_{\text{max}}[\text{nm}]$
2,17	675	2,56	679
3,49	640	3,84	621
3,94	618	6,30	601
6,24	604		
11,05	529		

Az 1:1 és 1:2 fémion/ligandum arányánál tapasztalt azonos spektrális viselkedés az előző táblázat adatai alapján szerkesztett ábrán is jól látszik:



23. ábra: λ_{max} változása a pH függvényében 1:1 és 1:2 fémion/ligandum arányánál

A rendszer hasonlóságot mutat a Cu(II)-GlyBIMA rendszerrel ^[63], ahol ugyancsak 1:1 komplexek keletkeznek túlnyomó többségben, bár már megjelennek a biszkomplexek is. A Cu(II)-GlyBIMA rendszerben mind a spektrofotometriás, mind az ESR-vizsgálat dimer szerkezet kialakulását mutatta ($[\text{Cu}_2\text{L}_2\text{H}_2]^{2+}$ összetételű komplex), míg itt még ligandumfelesleg esetén is csak 1:1 összetételű komplexek keletkeztek.

Az imidazolgyűrű erősebb fémmegkötőhely lévén képes lehet hidcsoportként működni, míg a gyengébb fémmegkötő piridinggyűrű erre nem alkalmas, így nem segíti elő a dimer szerkezetek kialakulását.

A biszkomplexek hiányát szintén a piridil-csoport kisebb fémmegkötő képessége okozhatja. Emellett szterikus tényezők is gátolhatják a második ligandum kapcsolódását. $[\text{CuL}_2\text{H}_2]$ összetételű komplex kialakulására (amely a Ni(II)-GlyBIMA rendszerben ligandumfölösleg esetén pH>8 tartományban uralkodó komplex volt) nincs is lehetőség a Cu(II)ionra jellemző torzult oktaéderes geometria miatt.

Ni(II)-GlyBPMA rendszer:

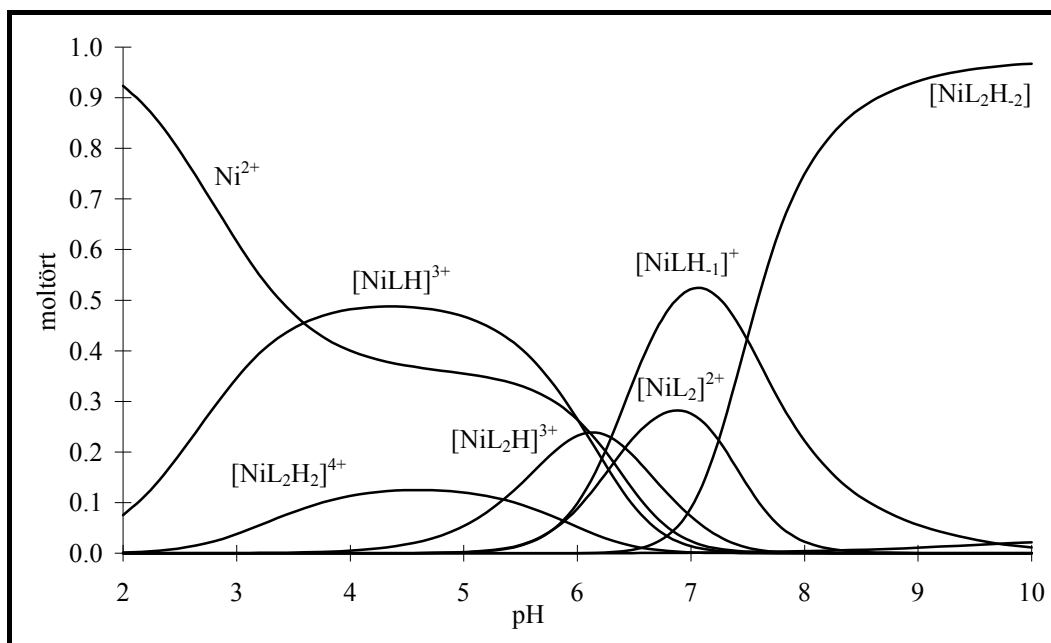
Az összehasonlítást itt ugyancsak a ProBPMA és a GlyBPMA ligandumot tartalmazó rendszerekkel ^[63] végeztem el:

7. táblázat: A Ni(II)-GlyBPMA rendszerben és az összehasonlításként használt rendszerekben képződött komplexek sztöchiometriája és stabilitási állandóik ^[63,57]
(mérési körülmények: T=298 K; I=0,2 mol/dm³)

komplex összetétele	lgβ(Ni(II)-GlyBPMA)	lgβ(Ni(II)-ProBPMA)	lgβ(Ni(II)-GlyBIMA)
[NiLH] ³⁺	10,97(5)	11,85(1)	14,24(3)
[NiL] ²⁺	–	5,30(3)	–
[NiLH ₁] ⁺	-1,46(2)	-1,02(1)	-0,01(2)
[NiLH ₂]	-11,17(3)	–	-7,81(2)
[NiL ₂ H ₂] ⁴⁺	21,2(1)	–	27,79(3)
[NiL ₂ H] ³⁺	15,88(5)	–	21,17(6)
[NiL ₂] ²⁺	9,46(4)	9,66(10)	13,26(6)
[NiL ₂ H ₁] ⁺	–	–	4,5(1)
[NiL ₂ H ₂]	-5,03(3)	-5,00(2)	–
log(K ₁ /K ₂)	0,710	–	0,690

$$\log(K_1/K_2) = \log K(\text{MLH}) - \log K(\text{ML}_2\text{H}_2) = 2\log\beta(\text{MLH}) - \log\beta(\text{ML}_2\text{H}_2)$$

A log(K₁/K₂) értékek azt mutatják meg, hogy mennyire kedvezményezett a második lidandum belépése a fémion koordinációs szférájába. Itt ez az érték kb. megegyezik a statisztikusan számolható értékkel, és a Ni(II)-GlyBPMA ill Ni(II)-GlyBIMA rendszerre kapott hasonló log(K₁/K₂) értékek is azt mutatják, hogy a bisz(2-imidazolil)- és bisz(2-piridil) koordináció esetén kb. egyformán kedvezményezett a biszkomplexek kialakulása.



24. ábra: A komponensek eloszlása a Ni(II)-GlyBPMA rendszerben ($H_3L = \text{GlyBPMA}$) a pH függvényében.

(kiindulási koncentrációk: $c_{\text{GlyBPMA}} = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$; $c_{\text{Ni(II)}} = 2 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$)

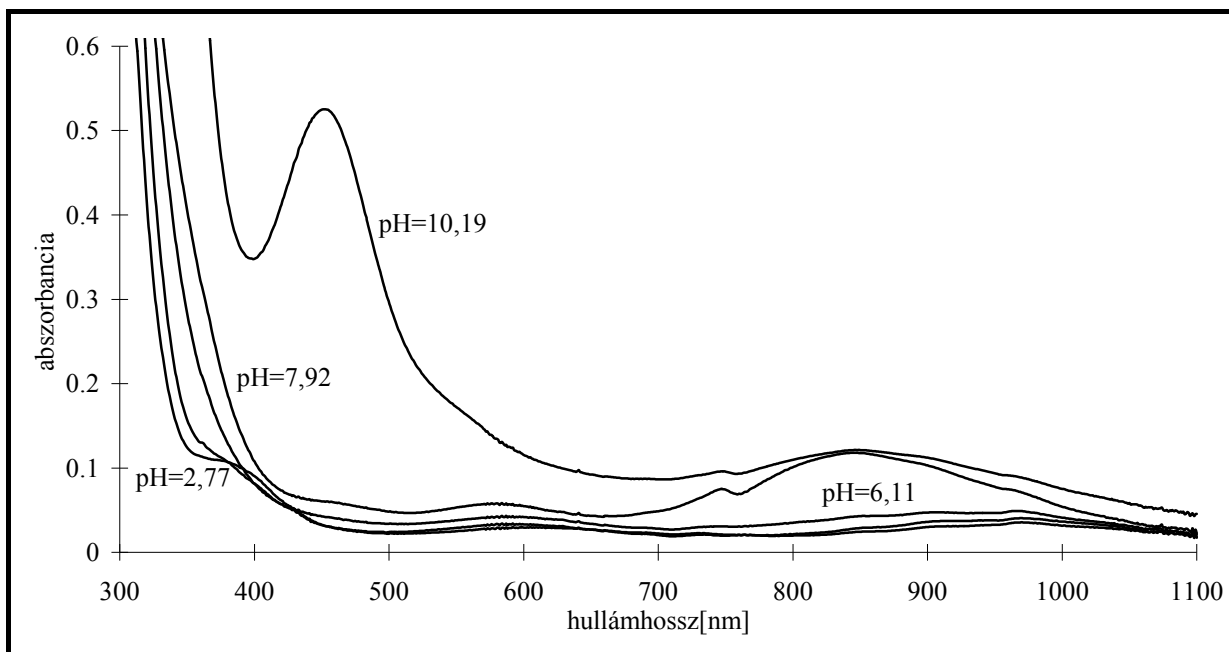
Savas tartományban jóval kisebb mértékű az $[\text{NiLH}]^{3+}$ összetételű komplex képződése, mint a $[\text{CuLH}]^{3+}$ összetételű komplexé volt. A piridingyűrű kevésbé stabilan koordinálódik a Ni(II)ionhoz mint Cu(II)ionhoz. Ezzel szemben az analóg BIMA-származék^[57,63] képes volt megkötni már a Ni(II)iont is savas tartományban.

A Ni(II)-ProBPMA rendszerrel szemben itt protonált biszkomplexek ($[\text{NiL}_2\text{H}_2]^{4+}$ ill. $[\text{NiL}_2\text{H}]^{3+}$) képződését is sikerült kimutatnunk, ezek azonban még 1:2 fémion/ligandum aránynál is csak kis mennyiségben képződtek.

A Ni(II)-GlyBPMA rendszerben is bekövetkezik a pH emelésével az amid-nitrogén deprotonálódása. Ez a folyamat alacsonyabb pH-n ($\text{pH} > 6$) megy végbe mint a Ni(II)-GlyBIMA rendszerben, éppen a bisz(2-piridil)csoport kisebb fémmegkötő képessége miatt. A kialakuló komplexek összetétele függ a fémion/ligandum aránytól:

1:2 aránynál különféle összetételű oktaédes biszkomplexek, $\text{pH} = 10$ körül a $[\text{NiL}_2\text{H}_2]$ sztöchiometriájú, szintén oktaédes komplex a meghatározó, melyben a Ni(II)ionhoz két ligandum kapcsolódik peptidszerű koordinációval. (Ezzel szemben a Ni(II)-GlyBIMA rendszerben^[57] ezen a pH-n már 1:1 összetételű vegyes hidroxó-komplexek képződése figyelhető meg ligandumfelesleg esetén is).

1:1 fémion/ligandum arányánál elsősorban monokomplexek keletkeznek. Az itt domináló $[\text{NiLH}]^{3+}$, $[\text{NiL}]^{2+}$ és $[\text{NiLH}_1]^+$ összetételű komplexek a spektrofotometriás adatok alapján egyértelműen oktaéderez geometriájúak. $\text{pH} > 10$ esetén azonban ($[\text{NiLH}_2]$ összetételű komplex) síknégyzetes sáv jelenik meg, ami oktaéderez-síknégyzetes egyensúlyra utalhat.



25. ábra: A Ni(II)-GlyBPMA rendszerben 1:1 fémion/ligandum arányánál, különböző pH-értékeken felvett spektrumok
(mérési körülmények: $c_{\text{Ni(II)}} = 5,88 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$)

A Ni(II)-GlyBPMA rendszerben képződött komplexek stabilitása hasonlít a Ni(II)-ProBPMA rendszerben képződött, azonos sztöchiometriájú komplexekéhez. Ez a két rendszer hasonló koordinációs lehetőségeit mutatja. Mindkét ligandumban azonos típusú és kötéseerősségű donoratomok vannak. Az ennek ellenére tapasztalható eltérő sztöchiometriát a sztérikus gátlások okozhatják.

Zn(II)-GlyBPMA rendszer:

A Zn(II)-GlyBPMA rendszer ugyancsak hasonlít a Zn(II)-ProBPMA rendszerhez, ill. semleges és lúgos tartományban a Ni(II)-GlyBPMA rendszerhez:

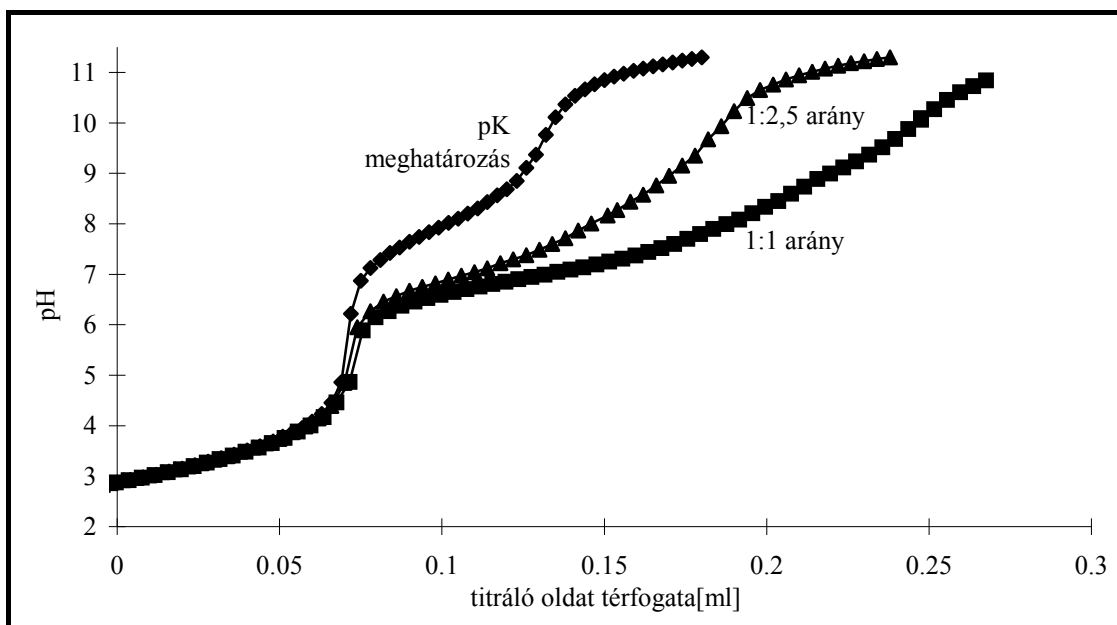
8. táblázat: A Zn(II)-GlyBPMA rendszerben és az összehasonlításként használt rendszerben képződött komplexek sztöchiometriája és stabilitási állandóik (mérési körülmények: T=298 K; I=0,2 mol/dm³)

komplex összetétele	lgβ(Zn(II)-GlyBPMA)	lg β (Zn(II)-ProBPMA)
[ZnLH ₁] ⁺	-3,23(1)	-2,68(1)
[ZnLH ₂]	-11,94(1)	–
[ZnL ₂] ²⁺	6,66(7)	–
[ZnL ₂ H ₁] ⁺	-0,7(1)	-0,5(1)
[ZnL ₂ H ₂]	-9,12(7)	-8,59(2)

A számolási eredmények és a titrálási görbe alapján is látható, hogy savas tartományban (pH<5) pH-metriásan nem mutatható ki kölcsönhatás a dipiridilrésszel. A kötés kialakulása nem zárható ki, de csak a ligandum deprotonálódása után mehet végbe a koordináció, ezért ez nem okoz mérhető pH-effektust.

A pH emelésével végbemegy az amid-nitrogén deprotonálódása. Oktaédes geometriájú, [ZnL₂H₁]⁺ és [ZnL₂H₂] összetételű biszkomplexek (1:2 fémion/ligandum aránynál), ill. [ZnLH₁]⁺ komplex képződése számolható. A bisz(2-piridil)-csoport tehát képes ebben a rendszerben is horgonycsoportként viselkedve elősegíteni az amid-nitrogén deprotonálódását és a peptidszerű koordináció kialakulását. Az irodalom szerint erre Zn(II)ion esetén az eddig vizsgált ligandumok közül csak a C-terminális végükön hisztidin aminosavat tartalmazó peptidok voltak képesek [42,49,51].

pH=9 felett vegyes hidroxó-komplexek ([ZnLH₂] összetételű komplex) képződése számolható, és 11-es pH-ig nem megy végbe a Zn(II)ion hidrolízise.



26. ábra: A Zn(II)-GlyBPMA rendszer titrálási görbéje

(mérési körülmények: $T=298\text{ K}$; $I=0,2\text{ mol/dm}^3$;

$$V_o=3,0\text{ cm}^3; c_{\text{lüg}}=0,2\text{ mol/dm}^3$$

pK meghatározás: $c_L=3,93 \cdot 10^{-3}\text{ mol/dm}^3$; $c_H=8,54 \cdot 10^{-3}\text{ mol/dm}^3$;

1:1 fémion/ligandum arány: $c_L=3,93 \cdot 10^{-3}\text{ mol/dm}^3$; $c_H=8,54 \cdot 10^{-3}\text{ mol/dm}^3$;

$$c_{\text{Zn(II)}}=3,603 \cdot 10^{-3}\text{ mol/dm}^3;$$

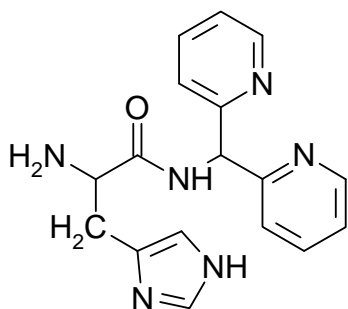
1:2,5 fémion/ligandum arány: $c_L=3,93 \cdot 10^{-3}\text{ mol/dm}^3$; $c_H=8,54 \cdot 10^{-3}\text{ mol/dm}^3$;

$$c_{\text{Zn(II)}}=1,638 \cdot 10^{-3}\text{ mol/dm}^3;)$$

Az amid-nitrogén deprotonálódását NMR-spektroszkópiával sikerült bizonyítanunk. A ligandum spektruma alapján vizsgáltuk, hogy a különböző csoportok deprotonálódásának következtében melyik csúcsok tolódnak el

3.2.2. N-hisztidil-bisz(2-piridil)-metil-amin

(HisBPMA)



28. ábra: Az *N*-hisztidil-bisz(2-piridil)-metil-amin szerkezete

A ligandum két piridin-nitrogént, egy aminocsoportot és egy hisztidin imidazol-nitrogént tartalmaz. Az ezekhez tartozó protonálódási állandó értékek:

10. táblázat: HisBPMA és az összehasonlításként használt vegyületek protonálódási állandó (mérési körülmények: $T=298\text{ K}$; $I=0,2\text{ mol/dm}^3$)

ligandum	pK(piridin-nitrogén)	pK(piridin-nitrogén)	pK(imidazol-nitrogén)	pK(-NH ₃ ⁺)
HisBPMA	< 1,5	2,91(2)	5,43(1)	7,31(1)
GlyBPMA	< 1,5	3,34(1)	–	7,91(5)
HisGly ^[32]	–	–	5,94	7,59
GlyHis ^[32]	–	–	6,77	8,22
GlyGlyHis ^[33]	–	–	6,64	7,96
HisBIMA ^[63]	–	–	5,777	7,251
GlyBIMA ^[63]	–	–	–	7,856
Piridin ^[62]	5,31	–	–	–
ProBPMA ^[63]	< 1,5	3,19	–	8,59

Az aminocsoport pK-jára hasonló értéket kaptunk, mint egy hasonló környezetben lévő aminocsoport pK-jára.

A hisztidin oldallánc imidazol-nitrogénjének pK-ja szintén közel áll egy szabad aminocsoportot tartalmazó hisztidinszármazék (pl. HisGly) pK-értékéhez.

A két piridin-nitrogén pK-ja összevethető a GlyBPMA és a ProBPMA bisz(piridil)-csoportjának pK-értékeivel. A szabad piridinhez képesti pK-csökkenés a GlyBPMA-val azonos módon itt is az aromás gyűrűk közötti kölcsönhatással magyarázható [62].

Cu(II)-HisBPMA rendszer:

11. táblázat: Cu(II)-HisBPMA rendszerben képződött komplexek sztöchiometriája és stabilitási állandóik

(mérési körülmények: T=298 K; I=0,2 mol/dm³)

komplex összetétele	lgβ
[CuLH] ³⁺	14,641(8)
[CuL] ²⁺	10,36(1)
[Cu ₂ L ₂ H ₂] ²⁺	12,58(3)
[CuLH ₂]	-4,47(2)

A koordináció savas tartományban itt is a két piridingyűrűn kezdődik, de ezzel a koordinációs móddal képes konkurálni az imidazol-nitrogénnel és aminocsoporton keresztüli, azaz hisztaminszerű koordináció (az ESR-spektrumok pH=4 körül már ezen koordináció kialakulását mutatják).

A ligandum két végén lévő két koordinációs hely (bisz(2-piridil)- ill. hisztaminszerű koordináció) miatt fémfölösleg esetén lehetőség van [Cu₂L]⁴⁺ összetételű komplex képződésére is.

Biszkomplexek még ligandumfölösleg esetén sem számolhatóak ebben a rendszerben, és ezt igazolja az ESR-spektrum is. Biszkomplexek már a lényegesen kisebb méretű ligandumot tartalmazó Cu(II)-GlyBPMA rendszerben sem képződtek, itt pedig a HisBPMA nagyobb mérete miatt még erősebb a két ligandum egyazon fémionhoz való koordinálódását akadályozó szterikus gátlás.

12. táblázat: A Cu(II)-HisBPMA rendszerben különböző fémion/ligandum arányoknál és különböző pH-értékeken felvett spektrumok spektrális paraméterei

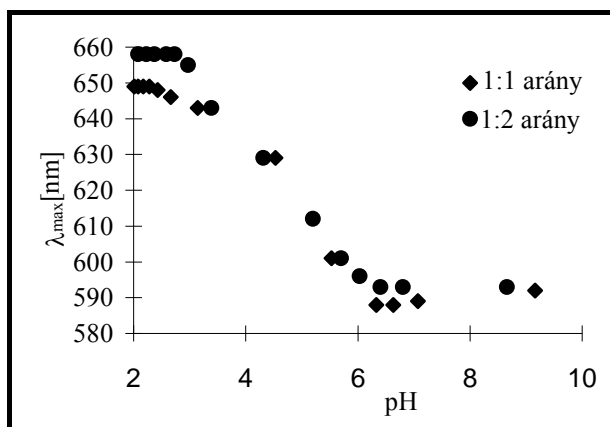
(mérési körülmények: T=298 K

1:2 arány: $c_{\text{HisBPMA}} = 2,12 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$; $c_{\text{Cu(II)}} = 2,85 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$

1:1 arány: $c_{\text{HisBPMA}} = 2,15 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$; $c_{\text{Cu(II)}} = 1,09 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$)

1:2 arány			1:1 arány		
pH	$\lambda_{\text{max}}[\text{nm}]$	$\epsilon [\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}]$	pH	$\lambda_{\text{max}}[\text{nm}]$	$\epsilon [\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}]$
2,08	658	93,8	2,01	649	66,3
2,37	658	76,0	2,08	649	66,4
2,58	658	91,7	2,17	649	70,5
2,73	658	100,0	2,28	649	71,5
2,97	655	86,9	2,43	648	71,5
3,39	643	83,9	2,66	646	77,5
4,31	629	104,3	3,14	643	77,7
5,20	612	120,7	4,53	629	102,0
5,70	601	140,9	5,53	601	116,7
6,03	596	135,0	6,33	588	129,0
6,40	593	140,0	6,63	588	131,5
6,80	593	135,1	7,07	589	131,7
8,66	593	142,4	9,16	592	128,2

A 12. táblázat és az ezen adatok alapján szerkesztett 29. ábra a biszkomplexek hiányát mutatja. Biszkomplexek esetén ugyanis az 1:1 és 1:2 fémion/ligandum aránynál felvett spektrumok λ_{max} és ϵ értékeinek nagyobb mértékben el kellene térniük. Ezek az adatok viszont a kisebb pH-értékeknél egyértelműen két nitrogéne keresztül koordinációt mutatnak (ld.: a 13. táblázat adatait).

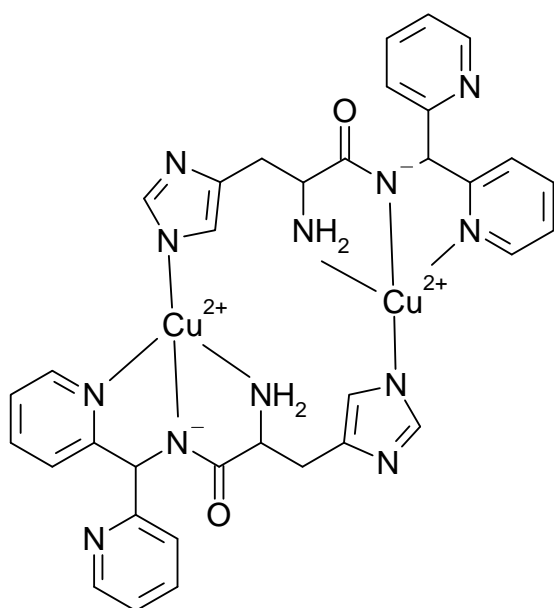


29. ábra: λ_{max} változása a pH függvényében 1:1 és 1:2 fémion/ligandum arányánál

A pH emelésével bekövetkezik az amid-nitrogén deprotonálódása. A Cu(II)-HisBPMA rendszer a potenciometriás eredmények alapján leírható monomer és dimer szerkezetű deprotonált komplex ($[\text{CuLH}_2]^{2+}$ vagy $[\text{Cu}_2\text{L}_2\text{H}_2]^{2+}$) feltételezésével is. Az ESR-vizsgálatok azonban pH=5,5-9 tartományban egyértelműen dimer vagy más oligomer szerkezetek képződését mutatták.

A Cu(II)ion körüli nitrogének száma ebben a pH-tartományban az UV-látható spektrum alapján 4. Ez szintén dimer vagy oligomer szerkezet kialakulására utal.

A piridin-csoport ugyan nem, de a hisztidin imidazolil-oldallánca képes hidrcsoportként elősegíteni a dimer szerkezet kialakulását:



30. ábra: A $[\text{Cu}_2\text{L}_2\text{H}_2]^{2+}$ összetételű komplex szerkezete

4. Kísérleti körülmények, vizsgálati módszerek

4.1. A ligandumok előállítása

4.1.1. Előállítási és vizsgálati módszerek

Futtatólegyek:

4:1:1:1	butanol:piridin:jégecet:víz
Törzsoldat (TO);piridin:AcOH:H ₂ O	20:6:11

"9-esek"	EtOAc:TO
1/2x9:	3:0,975
1x9:	3:1,85
2x9:	3:3,7

(A számok az egyes oldószerek egymáshoz viszonyított térfogatarányaira vonatkoznak.)

Vékonyrétegekromatográfia (VRK):

Merck 11844 0,25 mm-es szilikagél réteget és 4:1:1:1, 1/2x9, 1x9, 2x9 futtatólegyeket használtunk. Az előhívás tolidin/Cl₂ és ninhidrinnel történt.

Olvadáspont meghatározás:

A mérést Büchi 530 készülékkel végeztük.

Flash-kromatográfiás elválasztás:

eluens:1x9

oszlopméret: 250x20

töltet: 0,040-0,063 mm szilikagél

Oszlopkromatográfia:

eluens: 1x9

oszlopméret: 450x20

töltet: 0,040-0,063 mm szilikagél

RP HPLC:

Az aminosavszármazékok tisztaságát fordított fázisú HPLC mérésekkel ellenőriztük, illetve bizonyos származékokat HPLC-vel tisztítottunk. Vydac C18 oszlopot használtunk (21 mm pórusméret), 220 nm-en detektáltunk. 550x35 mm átmérőjű oszlopot használtunk izokratikus módszerrel, acetonitril-víz (0,1 % eluenssel). Frakciókat gyűjtöttünk, majd a tiszta frakciókat egyesítettük, és HPLC-n ellenőriztük a tisztaságot.

Folyássebesség: 1 ml/min

Gradiens: H-His-BPMA esetén: 0-40 perc 0-40 % acetonitril

H-Gly-BPMA esetén: 0-40 perc 0-20 % acetonitril

Injektálási térfogat: 20 ml

Oldatok koncentrációja: 1 mg/ml

NMR:

A ^1H , ^{13}C NMR-felvételek Bruker 500 MHz készüléken történtek.

4.1.2. A szintézisek menete

Bisz(2-piridil)-ketoxim (1):

5,468 g (29 mmol) bisz-piridil-ketont 29 ml absz. piridinben oldunk. Halványsárga oldatot kapunk, amelybe 4,030 g (58 mmol) NH_4ClO -t szórunk (hidroxil-amin HCl sója) és 4 órán át olajfürdőn 110 °C-on visszafolyós hűtő alatt kevertetjük. A kész oldathoz vizet öntünk és a piridint rotációs bepárlón vízszugár vakuumban ledesztilláljuk.

Nyerstermék: 4,853 g

Op. = 136-140 °C (Irod. op. = 143-144,5 °C)

Ezután a nyersterméket 41 ml 50 térfogatszázalékos etanol/víz elegyből átkristályosítjuk. A kristályokat üvegszűrőn szűrjük és jeges desztillált vízzel mossuk.

Átkristályosítás után:

Termék: 4,322 g (74,8 %)

Op. = 141,5-142,6 °C (Irod. op. = 143-144,5 °C)

Bisz(2-piridil)-metilamin (2):

4,322 g (21,7 mmol) bisz(2-piridil)-ketonoximot és 1,80 g (23,4 mmol) ammónium-acetátot 65 cm³ tömény vizes ammónia, 43 cm³ víz, 43 cm³ absz. etanol keverékében feloldunk.

A forráshőmérsékleten cinkport adunk hozzá kis adagokban, kb. 2 óra alatt. Végül a keveréket visszafolyó hűtő alatt melegítjük. A lehűtés után leszűrjük, a szűrletet vakuumban bepároljuk. N₂ -t vezetünk át a lombikon, s az utolsó lépésben 4N nátrium-hidroxiddal (10 csepp) erősen (pH=10) meglúgosítjuk az oldatot. Túrós, rózsaszín-bordós anyagot kaptunk, melyet 3x60 ml kloroformba átrázunk. Az első átrázásnál a kloroform lila színű, a második ill. harmadik átrázásnál már halványsárga színű. A vizes fázis pH-ját 11-ig lúgosítjuk a második átrázásnál, és desztillált vízzel hígítjuk. A kloroformos oldatot bepároljuk és a maradékot mélyhűtőben tároljuk.

Termék: 3,260 g (81,1%)

R_{f4:1:1:1}=0,5

Z-Gly-BPMA (3):

0,273 g Z-Gly-OH-t (2,5 mmol) keverés közben 5ml DMF-ban oldunk. Oldódás után 0,4 ml (3,75 mmol) NMM-et (M = 101,15 g/mol, ρ = 0,91 g/ml) csepegtetünk hozzá, majd 1,109 g (2,5 mmol) BOP aktiválószeret és 0,339 g (2,5 mmol) HOBt-t adunk hozzá. 5-10 percig csiszolatos Erlenmeyer-lombikban kevertetjük CaCl₂-os cső használatával. Ekvivalens mennyiségű 0,464 g (2,5 mmol) BPMA-t tartalmazó 20 %-os DMF oldatot hozzácsepegtetjük a Z-Gly-OH BOP-pal aktivált oldatához, és egy órán át kevertetjük 25°C-on, N₂ atmoszférában.

A reakciót vékonyrétegekromatográfiával követjük, a reagensek elfogyásáig. A DMF-es oldatot bepároljuk, majd az anyagot 10 ml EtOAc-ban oldjuk, és NaHCO₃-os (3·3 ml) átrázásokat végzünk rázótlécsérben. A vizes fázisokat is átrázzuk EtOAc-tal, s végül az egyesített fázisokat 2-3 ml vízzel rázzuk át. Az oldatot rotációs bepárlón vízszugárvakuumban bepároljuk. Ha a vékonyrétegekromatográfia (futtatóelegy: 4:1:1:1) szennyezést (R_f

4:1:1:1=0,58) mutat a termék mellett, akkor 1x9-es oldószerleggyel való eldörzsöléssel szabadulhatunk meg tőle.

Termék: 0,355 g (37,6 %)

$M_{ZGlyBPMA} = 376,42$

$R_f 4:1:1:1=0,72$; $R_f 1x9=0,78$; $R_f 1/2x9=0,70$

Boc-Gly-BPMA (4):

0,631 g (3,6 mmol) Boc-Gly-OH-t oldunk 15 ml absz. diklórometánban. Az Erlenmeyer-lombikra $CaCl_2$ -os csövet teszünk, s $-5\text{ }^\circ\text{C}$ -on kevertetjük. 0,4 ml (3,6 mmol) NMM-t csepegtetünk hozzá, majd 0,4 ml klórszénsav-etilésztert, és 15-20 percig kevertetjük $-5\text{ }^\circ\text{C}$ -on. Végül 8 ml diklórometánban oldott 0,62 g (3,35 mmol) BPMA-t csepegtetünk a vegyesanhidrides oldathoz, pH-át 7-8 közöttire állítjuk és szobahőmérsékleten kevertetjük az oldatot. A szerves fázist $NaHCO_3$ -os, és $NaCl$ -os átrázásokkal tisztítjuk, Na_2SO_4 -en szárítjuk, bepároljuk és a maradékot éterrel eldörzsöljük, szűrjük.

Termék: 0,772 g (67,4%)

$M_{BocGlyBPMA} = 342,19$

$R_f 1/2x9=0,67$

Boc-His(Boc)-OH·DCHA (6):

9,301 g (60 mmol) H-His-OH-t 30 ml desztillált vízben feloldunk. Szuszpenzió keletkezik, melyhez 25 ml TEA-t adva feloldódik a hisztidin. Az oldathoz lassan csepegtetünk 33,0 g (150 mmol) 30 ml dioxánban oldott $(Boc)_2O$ -t és $30-45\text{ }^\circ\text{C}$ -on kevertetjük éjszakán át. 60 ml desztillált vizet adunk hozzá és 2x20 ml EtOAc-tal, majd 2x20 ml éterrel mossuk a reakcióelegyet. Jeges hűtés közben 3M H_2SO_4 -val pH 3-ra savanyítjuk, és a vizes fázist 1x200 ml, majd 2x100 ml EtOAc-al mossuk. A szerves fázist 4-szer telített $NaCl$ oldattal mossuk, $MgSO_4$ -on szárítjuk. Bepároljuk, és a maradékot 300 ml éterben oldjuk. Az oldathoz 10,86 g (60 mmol) deszt. DCHA-t csepegtetünk jeges hűtés közben. Éjszakára hűtőbe tesszük. A kivált sót leszűrjük, éterrel mossuk.

Termék: 13,466 g (41,9 %)

Op. = $156-158\text{ }^\circ\text{C}$ (Irod. op. = $157-159\text{ }^\circ\text{C}$)

Boc-His(Boc)-OH (7):

4,720 g 6 88 ml hideg etil-acetáttal, 10 ml hideg 1N H₂SO₄-al és 13 ml hideg desztillált vízzel rázzuk. Elválasztás után az éteres fázist 4x18 ml hideg vízzel mossuk, és MgSO₄-on szárítjuk szobahőmérsékleten. Bepárlás után olajas terméket kapunk.

Termék: 1,855 g (56,0 %)

R_{f 1x9}=0,40

Boc-His(Boc)-BPMA (8):

Az eljárás ugyanaz, mint a Z-Gly-OH BPMA-val történő aktív észteres kapcsolásánál, azzal a különbséggel, hogy itt DIEA-t használtunk bázisként NMM helyett. A következő anyagmennyiségekkel dolgoztunk:

	Tömeg	Anyagmennyiség	Térfogat
Boc-His(Boc)-OH	0,680 g	1,9·10 ⁻³ mol	
DMF			3,8 ml
DIEA	0,368 g	2,85·10 ⁻³ mol	0,48 ml
BOP	0,844 g	1,9·10 ⁻³ mol	
HOBt	0,257 g	1,9·10 ⁻³ mol	
BPMA	0,352 g	1,9·10 ⁻³ mol	
DMF	1,408 g	19·10 ⁻³ mol	

Termék: 0,680 g (68,5 %)

R_{f1x9}=0,87

Z-His-BPMA (9):

5 ml DMF-ben oldunk 0,934 g (3,23 mmol) Z-His-N₂H₃-ot. Ha nem oldódik, kicsit megmelegítjük az oldatot. Megvárjuk, amíg szobahőmérsékletre hűl, majd acetonos szárazjéggel -5 °C-ra hűtjük. Ezután 3 ekvivalens desztillált azeotrópos sósavat, majd 1,1 ekvivalens telített vizes NaNO₂ oldatot öntünk a hidrazidos oldathoz, s öt percig kevertetjük. 0,615 g 3 ml DMF-ban oldott BPMA oldatot 0 °C-ra hűtjük és 1,3 ml TEA-t öntünk hozzá.

-5 °C-ra hűtjük az oldatot és az azidos oldatot hozzáöntjük. A reakcióelegyet pH:7-8 között tartjuk TEA segítségével, s addig kevertetjük amíg a pH már nem változik. A reakcióelegyből kiszűrjük a kikristályosodott TEA-t, és a reakcióelegyet bepároljuk. A

bepárlási maradékot EtOAc-ban oldjuk és vizes extrahálásokat végzünk. Az EtOAc-os fázist Na₂SO₄-on szárítjuk és bepároljuk.

Termék: 1,306 g (91,5 %)

R_{f1x9}=0,35 ; R_{f4:1:1:1}=0,70

Boc-His-N₂H₃ (10):

1,1 g (3,3 mmol) (Boc)₂HisOMe-t 6 ml metanolban oldunk és 0,75 g (15 mmol) hidrazinhidrátot adunk hozzá, majd 48 órán át szobahőmérsékleten kevertetjük. Sárga olajat kapunk, melyet éterben eldörzsölünk.

Termék: 0,580 g (65,2 %)

R_{f 1/2x9}=0,07

Boc-His-BPMA (11):

Ugyanazt a kapcsolási eljárást alkalmazzuk, mint a Z-His-N₂H₃ BPMA-val történő azidos kapcsolásánál. A következő anyagmennyiségekkel dolgoztunk:

	Tömeg	Anyagmennyiség	Térfogat
Boc-His- N ₂ H ₃	0,580 g	2,15·10 ⁻³ mol	
DMF			4 ml
6 N HCl		6,45·10 ⁻³ mol	0,93 ml
NaNO ₂	0,166 g	2,4·10 ⁻³ mol	
BPMA	0,425 g	2,3·10 ⁻³ mol	
DMF			2 ml
TEA		6,45·10 ⁻³ mol	0,9 ml+0,14 ml

Termék: 0,650 g (66,6 %)

R_{f1x9}=0,55

H-Gly-BPMA (5):

Hidrogénező feltétellel ellátott edényt hidrogénnel öblítünk 5 percig. Ezután 3 ml metanolban szuszpendált (40 mg) PdO/C katalizátort csepegtetünk az edénybe és 1 ml oldószerrel bemossuk. 10 percig hidrogénezzük az elegyet, s utána az 5 ml-ben feloldott (200

mg) Z-Gly-BPMA-t és 1,6 ml N HCl-at adunk hozzá, s az oldatot becsepegtetjük, majd öt órán át hidrogénezzük.

Az oldatot bepároljuk, és a maradékot flash-kromatográfiás elválasztásnak vetjük alá.

$R_{f\text{H-Gly-BPMA},1\times 9}=0,10$

Flash-kromatográfiával elválasztott **5** tömege: 0,77 g (57,5%)

(Az NMR és HPLC-felvételeket lásd a Függelékben.)

4.1.3. Boc védőcsoport eltávolítása

H-Gly-BPMA (5):

0,558 g (1,63 mmol) Boc-Gly-BPMA-t 6 ml TFA-ban oldunk és 40 percig kevertetjük szobahőmérsékleten. Bepároljuk a terméket, és vakuumban szárítjuk. 508 mg nyersterméket HPLC-n tisztítunk.

Termék: 0,250 g (63,4%)

$R_{f\text{H-Gly-BPMA},4:1:1:1}=0,67$

(Az NMR és HPLC-felvételek megegyeznek az előzőekkel.)

H-His-BPMA (12):

I.) 0,680 g (1,30 mmol) Boc-His(Boc)-BPMA-hoz 8 ml 4,4N HCl/EtOAc oldatot adunk és 20 percig hagyjuk állni szobahőmérsékleten az oldatot. A keletkezett terméket szűrjük.

Termék: 0,400 g (59,6 %)

$R_{f\text{H-His-BPMA},1\times 9}=0,07$

$R_{f\text{H-His-BPMA},2\times 9}=0,34$

(Az NMR és HPLC-felvételeket lásd a Függelékben.)

II.) 0,520 g (1,15 mmol) Boc-His-BPMA-t 5 ml TFA-ban oldunk, és 20 percig kevertetjük. Éterben eldörzsöljük a terméket, szűrjük.

Termék: 0,300 g (81,1 %)

$R_{f\text{H-His-BPMA},4:1:1:1}=0,43$

(Az NMR és HPLC-felvételek megegyeznek az előzőekkel.)

4.2. Oldategyensúlyi vizsgálatok

4.2.1. Potenciometria

Potenciometriás mérésekkel határoztuk meg a ligandumok protonálódási állandóit ill. a különböző összetételű komplexek stabilitási állandóit. A méréseket pHM 84 (Radiometer) digitális pH-mérővel és 6.0234.100 (Metrohm) kombinált elektróddal végeztük. A $\sim 0,2$ mol/dm³-es, pontosan ismert koncentrációjú KOH adagolását Dosimat 715 (Metrohm) automata buretta segítségével valósítottuk meg.

A pH-mérőt 0,05 mol/dm³ koncentrációjú kálium-hidrogén-ftalát oldatra puffereltük, melynek pH-ja 25,00 °C-on 4,008. Az állandó hőmérsékletet ultratermosztáttal, az oxigén kizárását és a kevertetést pedig katalitikusan tisztított argongáz átbuborékolatásával biztosítottuk.

Valamennyi rendszert vizes oldatban tanulmányoztuk.

A ligandumok kezdeti teljes koncentrációja $\sim 4,00 \cdot 10^{-3}$ mol/dm³ volt. A fémion/ligandum arány 1:3 és 2:1 között változott. A titrálások során fellépő térfogatnövekedést a kiértékelésre használt számítógépes program figyelembe vette.

A minták állandó ionerősségét (0,2 mol/dm³) megfelelő mennyiségű 1 mol/dm³ koncentrációjú KCl-oldatnak a titrálandó oldathoz való hozzáadásával biztosítottuk. Ez az ionerősség jó pontossággal megegyezik a titrálóoldal koncentrációjával, ugyanakkor jóval nagyobb mint a titrálandó oldat fémion- és ligandum-koncentrációjának az összege. Ez lehetővé teszi azt, hogy a titrálás során fellépő ionerősség-változást elhanyagoljuk.

A diffúziós potenciál kiküszöbölésére Irwing és munkatársai által javasolt módszert ^[67] alkalmaztunk.

A titrálóoldat készítésénél ügyeltünk arra, hogy a lug karbonátmentes legyen. Ezt ellenőriztük is az oldat koncentrációjának a meghatározásakor.

A potenciometriás mérések eredményeinek a kiértékelését számítógépes program segítségével végeztük el. Mind a ligandumok protonálódási állandóit, mind a komplexek stabilitási állandóit PSEQUAD programmal ^[68] számoltuk ki. Ez a program I. G. Sayce és D. D. Perrin SCOGS nevű programjának Zékány László és Nagypál István által továbbfejlesztett változata.

Az egyensúlyi számítások elméleti alapjai:

Az egyensúlyi rendszerre felírható a tömeghatás törvénye:

$$C_k = \sum_{j=1}^n \alpha_{jk} [S_j] = \sum_{j=1}^n \alpha_{jk} \beta_j \prod_{l=1}^k [c_l]^{\alpha_{jl}}$$

ahol n : a rendszerben lévő molekulafajták száma, beleértve a komponenseket is

S_j : a j -edik, rendszerben jelenlévő molekulafajta

k : a rendszerben lévő komponensek száma. Az általam vizsgált rendszerekben 2 vagy 3 ilyen komponens fordul elő: a ligandumok protonálódási állandóinak a meghatározásánál H^+ (H) és a ligandum teljesen deprotonált formája (L), a fémkomplexek stabilitási állandóinak a vizsgálatánál pedig ezek mellett harmadik komponensként megjelenik a fém (M) is.

$[c_1] \dots [c_k]$: a komponensek egyensúlyi (szabad) koncentrációja

β_j : a különféle molekulafajták képződési állandója. (A komponensek képződési állandója egységnyi.)

α_{ji} : sztöchiometriai szám, amely megadja a j -edik molekulafajtában az i -edik komponens számát

Vizes rendszerekben, melyeket én is tanulmányoztam, az hidroxidion sztöchiometriai száma hidrogénionra -1 , a többi komponensre 0 . Ebből következően a OH^- -ion képződési állandója $K_w = [H^+] [OH^-]$. Ennek a figyelembe vétele szükségessé válik a titrálás lúgos tartományában.

A program képes ugyanazon rendszer különböző fémion/ligandum aránynál vagy koncentrációknál kapott mérési adatait párhuzamosan kiértékelni.

4.2.2. Spektrofotometria

Spektrális vizsgálatokat Cu(II)- és Ni(II)komplexek esetében végeztünk, 250-800 ill. 190-1100 nm-es hullámhossztartományban.

A spektrumokat Hewlett Packard HP 8453 típusú egysugaras fotométeren, 1,000 cm-es küvettában vettük fel különböző fémion/ligandum arányoknál, a potenciometriás számolási eredmények alapján megszerkesztett eloszlásgörbék maximumainak megfelelő pH-értékeken.

A kapott spektrumok elemzését a gyártó cég által biztosított kezelő- és kiértékelő programmal végeztük.

A spektrumok elemzésével a képződött komplexek szerkezetére, geometriájára, a koordinálódó donoratomok számára és kémiai jellegére lehet következtetni.

Ni(II)komplexek ^[69] (d^8 elektronszerkezet):

A Ni(II)komplexek koordinációs száma 2 és 7 között változhat, de a leggyakoribb koordinációs szám 4 és 6.

A 6-os koordinációs számú, oktaédes geometriájú komplexeknek három spinmegengedett d-d átmenete van a látható hullámhossztartományban, de mindhárom elég gyenge ($\epsilon < 30 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) a Laporte-szabályban megfogalmazott tiltás miatt. Ezen átmenetek hullámhossztartományai:

$$\lambda_1 = 1430-770 \text{ nm } (^3A_2 \rightarrow ^3T_2 \text{ termék közötti átmenet})$$

$$\lambda_2 = 910-500 \text{ nm } (^3A_2 \rightarrow ^3T_1(F) \text{ átmenet})$$

$$\lambda_3 = 520-370 \text{ nm } (^3A_2 \rightarrow ^3T_1(P) \text{ átmenet})$$

A komplexgeometria tetragonális torzulása a középső sáv felhasadását eredményezheti.

Ezek mellett az átmenetek mellett létezik egy még kisebb intenzitású spintiltott ($^3A_2 \rightarrow ^1E$) átmenet is, amely általában csak vállként jelenik meg valamelyik csúcson. Ezeket az átmeneteket magyarázza meg az oktaédes Ni(II)komplexek Orgel-diagramja.

A 4-es koordinációs számú, tetraédes geometriájú komplexek spektruma sokkal intenzívebb ($\epsilon = 10^2 - 10^3 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A látható sáv hullámhossztartománya 900-500 nm.

4-es koordinációs számmal gyakran képződnek diamágneses sajátságú, síknégyszetes geometriájú komplexek is, különösen erős terű ligandumokkal való kölcsönhatásban (amid-nitrogént tartalmazó peptidek esetében). Ezek könnyen alakulnak ki más geometriájú szerkezetekből. Az ilyen szerkezetű komplexek 550-400 nm körül adnak egy elég intenzív ($\epsilon = 50-500 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) sávot. Egy második, még intenzívebb sáv található 430 nm alatt, amely gyakran töltésátviteli eredetű.

Ezek a diamágneses komplexek (vagyis ahol a 8 d-elektron párosítva helyezkedik el a négy alacsonyabb energiájú d-pályán) könnyen kimutathatóak NMR-spektroszkópiával is.

Cu(II)komplexek ^[69] (d^9 elektronszerkezet):

A Cu(II)komplexek spektroszkópiai sajátságait különösen sokan vizsgálták már, így rengeteg irodalmi adat áll rendelkezésünkre. Ennek ellenére általános törvényszerűségeket nehéz levonni a koordinációs módok sokfélesége, a sok befolyásoló tényező miatt.

A tetragonálisan torzult, oktaéderes szerkezetű komplexekben gyenge és erős terű ligandumokkal különbözőképpen ugyan, de mindkét esetben négyfelé hasad az energiadiagram (a d^9 -elektronok energiaszintje az Orgel-diagramból is leolvashatóan oktaéderes térben kétfelé hasad a ligandum krisrálytérerősségének megfelelő mértékben, majd a tetragonális torzulás mindkét energiaszintet még kétfelé hasítja). Az így létrejött szintek között háromféle energiájú d-d átmenetnek kellene megjelennie.

Ezek az átmenetek gyakran összeolvadnak egyetlen sávzá, és az energiájuk ill. az intenzitásuk erősen függ attól, hogy a ligandumnak hány donoratomja koordinálódott a fémionhoz ^[70] :

13. táblázat: Cu(II)komplexek spektrális paramétereinek a változása a koordinált nitrogének számának a változásával

koordinált N-ek száma	λ_{\max} [nm]	ϵ [dm ³ mol ⁻¹ cm ⁻¹]
1	680-730	30-60
2	620-670	40-120
3	540-590	100-150
4	500-530	120-200

Ezen kívül a λ_{\max} értékeket befolyásolja a komplex pontos geometriája és a donoratomok kémiai minősége is. Ez utóbbinak a hatását Sigel és Martin ^[8], valamint Pettit és munkatársai ^[70] vizsgálták.

A négy ekvatoriális H₂O-molekula O- vagy N-donorokkal történő szubsztitúciója a Cu²⁺_(aqua)-ion abszorpciós maximumát a rövidebb hullámhosszak felé tolja el. Ez az effektus különösen N-donoroknál jelentős. Egy kvantitatív összefüggés megadását az nehezíti, hogy az effektus nagysága a donoratom kémiai természetén kívül függ a kelátgyűrű méretétől és a ligandumhoz kapcsolódó, de a koordinációban részt nem vevő szubsztituensektől is. (Ezeket a hatásokat figyelmen kívül hagyva a közelítő egyenlet 2% pontossággal adja meg a várható λ_{\max} helyét.)

Gly-tartalmú peptidekre:

$$\lambda_{\max}[\text{nm}] = 10^3 / [0,301(\text{C}=\text{O}/\text{H}_2\text{O}) + 0,342(\text{COO}^-) + 0,453(\text{NH}_2) + 0,485(\text{N}=\text{O})]$$

nem Gly-származékok esetében:

$$\lambda_{\max}[\text{nm}] = 10^3 / [0,294(\text{C}=\text{O}/\text{H}_2\text{O}) + 0,346(\text{COO}^-) + 0,460(\text{NH}_2) + 0,494(\text{N}=\text{O}) + 0,434(\text{imidazol-N})]$$

Sokkal kényelmesebben alkalmazható az egyenlet, ha csak azokat a koordinációs helyeket vesszük figyelembe, ahol a H_2O , OH^- vagy karbonil-oxigén más koordinálódó csoportokkal van helyettesítve:

$$\lambda_{\max}[\text{nm}] = 10^3 / [1,18 + 0,052(\text{COO}^-) + 0,166(\text{NH}_2) + 0,200(\text{N}=\text{O}) + 0,140(\text{imidazol-N})]$$

Ezek az összefüggések nem alkalmazhatóak, ha kelátképződés van az egyik axiális pozícióval. Az axiális koordináció ugyanis a λ_{\max} értékeinek kismértékű eltolódását eredményezi a nagyobb hullámhosszak felé (vörös eltolódás).

4.2.3 NMR-spektroszkópia

A Zn(II)komplexek esetén a komplex szerkezetének a felderítésére nem alkalmas a spektrofotometria, mivel ezeknek a komplexeknek a látható tartományban nincs fényelnyelése. Ezen módszer helyett itt számításba vehető az NMR-spektroszkópia lehetősége, ahol az egyes csoportokra (az általam alkalmazott ^1H -NMR esetén a protonokra) jellemző jelek spektrumban való megjelenéséből vagy helyéből (kémiai eltolódás értékéből) következtethetünk a ligandum különböző csoportjainak protonáltságára, ill. fémhez való koordinálódására.

A szilárd anyagokat 99,8 %-os tisztaságú D_2O -ban oldottuk fel, és a fémsót $\sim 0,1 \text{ mol/dm}^3$ -es koncentrációjú vizes oldat formájában adtuk hozzá. Az oldat pH-ját DCI- és NaOD-oldatok segítségével állítottuk be a kívánt értékre.

A ^1H -NMR spektrumokat BRUKER AM360-as típusú NMR-spektrométerrel vettük fel, belső standardként a fémsóval bevitt H_2O NMR-jelét (kémiai eltolódás = 4.7 ppm) használva.

A kapott spektrumokat 1D WinNMR nevű, Windows alatt futó program segítségével értékeltük ki.

4.2.4. ESR-spektroszkópia

Cu(II)komplexek esetén ESR-spektroszkópiás vizsgálatok is történtek. A méréseket Olaszországban (Department of Chemistry, University of Sassari, Italy) végezte Daniele Sanna és Giovanni Micera. A spektrumokat Varian E-9 spektrométeren (9,15 GHz), etilén-glikol hozzáadása után 120 K hőmérsékletűre lehűtött oldatokban vették fel különböző koncentrációknál ill. fémion/ligandum arányoknál.

5. Összefoglalás

Különböző fémionok fontos szerepet játszanak az élő szervezetek szerves molekuláinak szintézisében és szállításában, ill. biológiai rendszerek sav-bázis- és redoxifolyamatainak a katalizálásában.

Az egyik legfontosabb fémmegkötőhelyet a proteinek képezik. Ezek találhatóak meg a metalloenzimekben is, ahol a fémionok a polipeptidlánc speciális aminosavjaihoz (pl. a hisztidin aminosav imidazolil-oldalláncához) kötődve alakítják ki a fehérje harmadlagos szerkezetét és az enzim aktív centrumát.

A szénsavanhidrázban és a karboxipeptidázban ez az imidazolil-oldallánchoz kapcsolódó központi fémion a Zn(II)ion, a plaztocianinban pedig a Cu(II)ion.

A több, megfelelő helyzetben lévő imidazolil-oldallánc ezen átmenetifémekhez történő erős kötődése lehetővé teszi, hogy ezek a ligandumok (pl. bisz(imidazolil)származékok) enzimek aktív centrumának a modelljeként vagy szelektív enziminhibítorként viselkedjenek.

A különféle oligopeptidekkel képzett fémkomplexek vizsgálata nagyban elősegíti a fémion és a protein közötti kölcsönhatás megértését, mivel ezek a kismolekulák alkalmasak lehetnek a metalloproteinek aktív centrumának a modellezésére. A koordinációs kémia utóbbi 40 évben tapasztalható fejlődésének az eredményeként ma már jelentős mennyiségű információ áll rendelkezésre a fémion-protein kölcsönhatás jellegéről, így néhány általános törvényszerűséget is sikerült megállapítani. Ezek egyike az, hogy az átmenetifém-ionok egy része (pl.: Pd(II)-, Cu(II)-, Ni(II)- és Zn(II)ion) különféle peptidek esetében képes elősegíteni az amid-nitrogén deprotonálódását, és így peptidszerű koordináció alakulhat ki a fémion körül.

Méréseink során azt tanulmányoztuk, hogy a glicin vagy a hisztidin aminosav C-terminális végéhez kapcsolódó bisz(2-piridil)csoport hogyan befolyásolja ezen koordináció kialakulását. Képes-e a piridin-nitrogén a réz(II)-, nikkell(II)- és cink(II)ionhoz való koordinációban horgonycsoportként viselkedni, ezáltal elősegítve az amid-nitrogén deprotonálódását.

Munkánk során N-glicil-bisz(2-piridil)-metil-amin és N-hisztidil-bisz(2-piridil)-metil-amin szintézisét és komplexképző sajátosságainak a jellemzését végeztük el.

Mindkét vegyület szintézisénel az amino-terminálisan védett származékok előállítására elsőként aktív észteres kapcsolást alkalmaztunk, majd a kitermelés növelésére egyéb kapcsolási módszereket is kipróbáltunk. A Boc-glicin származéknál vegyes anhidrides, a

hisztidin származéknál pedig azidos kapcsolásra térünk át, mert a hisztidin az imidazolil oldallánca miatt nem alkalmas a vegyes anhidrides kapcsolásra.

A Z-Gly-BPMA ill. Z-His-BPMA vegyületekről a Z védőcsoport hasítása katalitikus hidrogénezéssel nem megy teljes mértékben végbe. Kísérletileg ugyan még nem igazoltuk, de feltételezzük, hogy a bisz(2-piridil)-metil-amin katalizátorméregként viselkedik. A Z védőcsoportnak erős savakkal (HBr/jégecet) történő eltávolításakor pedig a Z-His-BPMA vegyület esetében az aminosav és a bisz(2-piridil)-metil-amin közötti kötés elhasadhat. Szintetikus tapasztalataink alapján azt a következtetést vontuk le, hogy mindkét vegyület előállításakor Boc védőcsoport alkalmazása a célszerű, és a glicinszármazék esetében a vegyes anhidrides, a hisztidinszármazék esetében pedig az azidos módszer előnyös.

Mindkét kapott ligandum pK-értékei jól magyarázhatók az eddigi, hasonló típusú vegyületeken végzett potenciometriás mérések alapján.

A bisz(2-piridil)rész fémmegkötő képessége kisebb mint a bisz(2-imidazolil)részé. Emiatt a bisz(2-piridil)csoportot tartalmazó ligandumok a vizsgált átmenetifémionokkal egyszerűbb rendszereket alkotnak. Ezen rendszerek komplexkémiai viselkedésének tisztázása segítséget nyújthat az analóg bisz(2-imidazolil)csoportot tartalmazó rendszerek megértéséhez.

A rendszerekben képződött $[MLH]^{3+}$ összetételű komplexek stabilitása az Irwing-Williams sornak megfelelően $[CuLH]^{3+} > [NiLH]^{3+} > [ZnLH]^{3+}$ sorrendben csökken. Zn(II)ion esetén savas pH-tartományban potenciometriásan nem is tudtunk komplexképződést kimutatni.

A bisz(2-piridil)csoport horgonycsoportként viselkedik, így nagyobb pH esetén kialakul a peptidszerű koordináció (az aminocsoporton, a deprotonált amid-nitrogéneken és a piridin-nitrogéneken keresztül) mindhárom vizsgált fémion esetében.

A ligandumoknak Cu(II)ionnal történő kölcsönhatása esetén a Cu(II)ionra jellemző síknégyzetesen torzult oktaéderes geometriájú komplexek képződése jellemző, míg Ni(II)- és Zn(II)ionok esetében ligandumfeleslegnél az oktaéderes szerkezetű komplexek a meghatározóak.

Dimer szerkezetek kialakulása GlyBPMA ligandum esetében nem jön létre a GlyBIMA-nál tapasztaltakkal ellentétben, mert a piridingyűrű a kisebb fémmegkötő képességének megfelelően nem képes hídként koordinálódni.

HisBPMA esetében a hisztidinrész imidazolgyűrűje megteremti a lehetőséget dimer vagy más oligomer szerkezetek kialakulására is.

Irodalomjegyzék

- [1] Medzihradzky K.: A természetes peptidek szintézise, A kémia újabb eredményei **3** (1970).
- [2] Bajusz S.: Peptidszintézis, A kémia újabb eredményei 47 (1980).
- [3] Kim, M. K.; Martell, A. E.: *Biochemistry*, **3**, 1169 (1964).
- [4] Kim, M. K.; Martell, A. E.: *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 914 (1966).
- [5] Kiss, T.; Sóvágó, I.; Gergely, A.: *J. Pure Appl. Chem.* (19).
- [6] Sigel, H.; Griesser, R.; Prijs, B.: *Z. Naturforsch. (B)*, **27**, 353 (1972).
- [7] Udupa, M. R.; Krebs, B.: *Inorg. Chim. Acta*, **31**, 251 (1978).
- [8] Sigel, H.; Martin, R. B.: *Chem. Rev.*, **82**, 385 (1982).
- [9] Sóvágó, I.; Harman, B.; Gergely, A.; Radomska, B.: *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 235 (1986).
- [10] Gergely, A.; Nagypál, I.: *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1104 (1977).
- [11] Dobbie, H.; Kermack, W. O.: *Biochem. J.*, **59**, 246 (1955).
- [12] Brunetti, A. P.; Lim, M. C.; Nancollas, G. H.: *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 5120 (1968).
- [13] Farkas, E.; Kiss, T.: *Polyhedron* **8**, 2463 (1989).
- [14] Shtyrlin, V. G.; Gogolashvili, E. L.; Zakharov, A. V.: *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1293 (1989).
- [15] Kaneda, A.; Martell, A. E.: *J. Coord. Chem.*, **4**, 159 (1975).
- [16] Saato, M.; Matsuki, S.; Ikeda, M.; Nakaya, J.: *Inorg. Chim. Acta*, **125**, 49 (1986).
- [17] Dobbie, H.; Kermack, W. O.: *Biochem. J.*, **59**, 257 (1955).
- [18] Kim, M. K.; Martell, A. E.: *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 872 (1969).
- [19] Strandberg, B.; Lindqvist, I.; Rosenstein, R.: *Z. Kristallogr.* **116**, 266 (1961).
- [20] Freeman, H. C.; Schoene, J. C.; Sime, J. G.: *Acta Cryst.*, **18**, 381 (1965).
- [21] Freeman, H. C.; Taylor, M. R.: *Acta Cryst.*, **18**, 939 (1965).
- [22] Freeman, H. C.: Crystal structures of metal peptide complexes; In: *Advances in Protein Chemistry*, **22**, Academic Press, New York (1967).
- [23] Martin, R. B.; Chamberlin, M.; Edsall, J. T.: *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 495 (1960).
- [24] Kim, M. K.; Martell, A. E.: *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 5138 (1967).
- [25] Davies, G.; Kustin, K.; Pasternack, R.F.: *Inorg. Chem.*, **8**, 1535 (1969).

- [26] Dorigatti, T. F.; Billo, E. J.: *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **37**, 1515 (1975).
- [27] Freeman, H.C.; Guss, J. M.: *Acta Cryst.*, **B34**, 2451 (1978).
- [28] Billo, E. J.; Margerum, D. W.: *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 6811 (1970).
- [29] Freeman, H.C.; Guss, J. M.; Sinclair, R.L.: *Acta Cryst.*, **B34**, 2459 (1978).
- [30] Rabenstein, D. L.; Libich, S.: *Inorg. Chem.*, **11**, 2960 (1972).
- [31] Martell, A. E.; Smith, R. M.: *Critical stability constants*, Vol 5, Plenum, New York (1982).
- [32] Sóvágó, I.; Farkas, E.; Gergely, A.: *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 2159 (1982).
- [33] Farkas, E.; Sóvágó, I.; Kiss, T.; Gergely, A.: *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 611 (1984).
- [34] Várnagy, K.; Sóvágó, I.; Ágoston, K.; Likó, Zs.; Süli-Vatgha, H.; Sanna, D.; Micera, G.: *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 2939 (1994).
- [35] Farkas, E.; Sóvágó, I.; Gergely, A.: *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1545 (1983).
- [36] Agarwal, R. P.; Perrin, D. D.: *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 268 (1975).
- [37] Aiba, H.; Yokoyama, A.; Takana, H.: *Bull. Chem. Soc. Japan*, **47**, 136 (1974).
- [38] Brookes, G.; Pettit, L. D.: *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 2112 (1975).
- [39] Daniele, P. G.; Zerbinati, O.; Aruga, R.; Ostacoli, G.: *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1115 (1988).
- [40] Boggers, R. K.; Martin, R. B.: *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **37**, 1097 (1975).
- [41] Radomska, B.; Kiss, T.; Sóvágó, I.: *J. Chem. Soc. Chem. Res. (S)*, 156 (1987).
- [42] Martin, R. B.; Edsall, J. T.: *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 1107 (1960).
- [43] Sóvágó, I.; Farkas, E.; Gergely, A.: *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 2159 (1982).
- [44] Ensuque, A.; Demaret, A.; Abello, L.; Lapluye, G.: *J. Chim. Phys.*, **79**, 185 (1982).
- [45] Heut, J.; Vilkas, E.: *Inorg. Chim. Acta*, **91**, 43 (1984).
- [46] Blount, J. F.; Fraser, K. A.; Freeman, H. C.; Szymanski, J. T.; Wang, C. H.: *Acta Cryst.*, **22**, 396 (1967).
- [47] Sundberg, R. J.; Martin, R. B.: *Chem. Rev.*, **74**, 471 (1974).
- [48] Sóvágó, I.; Kiss, T.; Gergely, A.: *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 964 (1978).
- [49] Morris, P. J.; Martin, R. B.: *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **33**, 2913 (1971).
- [50] Livera, C. E.; Pettit, L. D.; Bataille, M.; Perly, B.; Kozlowski, H.; Radomska, B.: *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 661 (1987).
- [51] Farkas, E.; Sóvágó, I.; Gergely, A.: *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1545 (1983).

- [52] Várnagy, K.; Sóvágó, I.; Ágoston, K.; Likó, Zs.; Süli-Vargha, H.; Sanna, D.; Micera, G.: *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 2939 (1994).
- [53] Várnagy K.; Sóvágó I.; Ágoston K.; Likó Zs.; Süli-Vargha H.: *Magyar Kémiai Folyóirat*, **100**, 127 (1994).
- [54] Likó, Zs.; Süli-Vargha, H.: *Tetrahedron Lett.*, **34**, 1673 (1993).
- [55] Drey, D. N. C.; Fruton, J. S.: *Biochemistry.*, **4**, 1 (1965).
- [56] Irwing, H. M.; Miles, M. C.; Pettit, L. D.: *Anal. Chim. Acta*, **38**, 475 (1967)
- [57] Várnagy, K.; Sóvágó, I. (1997). *Molecular Modeling and Dynamics of Bioinorganic Systems*, (eds.: Banci, L.; Comba, B.) NATO ASI Series, Dordrecht/Boston/London, p. 441
- [58] Drey, D. N. C.; Fruton, J. S.: *Biochemistry.*, **4**, 1258 (1965).
- [59] Tang, C. C.; Davalian, D.; Huang, P.; Breslow, R.: *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 3918 (1978).
- [60] Mohan, M. S.: *Ind. J. Chem., Sect. A*, **20**, 252 (1981).
- [61] Bernhard, P. V.; Comba, P.; Rickenbach, A. M.; Stebler, S.; Steiner, S.; Várnagy, K.; Zehnder, M.: *Inorg. Chem.*, 4195 (1992).
- [62] Bühler, H.; Anderegg, G.: *Chimia*, **24**, 433 (1970).
- [63] Várnagy, K.; Sóvágó, I.; Goll, W.; Süli-Vargha, H.; Micera, G.; Sanna, D.: *Inorg. Chim. Acta*, Vol. 283/1, 233 (converdate: 1 december 1998).
- [64] Niemers, E.; Hiltmann, R.: *Synthesis*, 593 (1976).
- [65] Nguyen, D.; Seyer, R.; Heitz, A.; Castro, B.: *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **1**, 1025 (1985).
- [66] Li, C. H.; Yarashimo, D.: *J. Am. Chem. Soc.*, 7608 (1970).
- [67] Irwing, H. M.; Miles, M. C.; Pettit, L. D.: *Anal. Chim. Acta*, **38**, 475 (1967).
- [68] Zékány, L.; Nagypál, I. (1985). *Computation Methods for the Determination of Formation Constants*, Vol. 8 (ed.: Leggett, D. J.), Plenum Press, New York, p. 291
- [69] Kozłowski, H.; Micera, G. (1995). *Handbook of Metal-Ligand Interactions in Biological Fluids*, Vol. 1 (ed.: Berthon, G.), Marcel Dekker, Inc., New York, p. 566
- [70] Petit, L. D.; Gregor, J. E.; Kozłowski, H. (1991). *Perspectives on Bioorganic Chemistry*, Vol. 1 (eds.: Hay, R. W.; Dilworth, J. R.; Nolan, K. B.), JAI Press, London
- [71] ESR