

NITROGÉN- ÉS OXIGÉNDONOR BIOLIGANDUMOK PROTONÁLÓDÁSI,
VALAMINT KALCIUM- ÉS MAGNÉZIUMION KOORDINÁCIÓS EGYENSÜLYAI

Egyetemi doktori értekezés

Írta: Sipos Pál

JATE
Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék
Szeged, 1988.



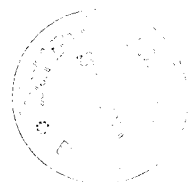
I.

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	1. oldal
2. KISÉRLETI RÉSZ	4. oldal
2.1. A felhasznált anyagok	4. oldal
2.2. A mérések kivitelezése	4. oldal
2.3. A mérési adatok értékelése	8. oldal
3. A γ -KARBOXI GLUTAMINSAV ÉS NÉHÁNY ROKONVEGYÜ- LETÉNEK PROTONÁLÓDÁSI, KALCIUM- ÉS MAGNÉZIUM- -KOMPLEXKÉPZÉSI MIKROFOLYAMATAI	11. oldal
3.1. Irodalmi összefoglalás	11. oldal
(A γ -karboxi glutaminsavtartalmu oligo- és polipeptidek egyensúlyi kémiai vizs- gálatának eddigi eredményei)	
3.2. Értékelő módszer a mikroállandók meg- határozására	14. oldal
3.3. A kísérleti eredmények ismertetése	22. oldal
3.3.1. Protonálódási folyamatok	22. oldal
3.3.2. A Ca^{2+} és Mg^{2+} komplexképzési folyamatok	26. oldal
3.4. Diszkusszió	30. oldal
4. NÉHÁNY MONO- ÉS BISZ-INDOL ALKALOIDA PRO- TONÁLÓDÁSI ÉS KALCIUMKOMPLEX-KÉPZÉSI EGYENSÜLYAI	34. oldal

II.

4.1. Bevezetés	34. oldal
4.2. Kísérleti eredmények ismertetése, diskusszió	38. oldal
5. ÖSSZEFOGLALÁS	57. oldal
6. IRODALOM	59. oldal



1. BEVEZETÉS

A fémion-bioligandum kölcsönhatások között különleges szerepet tölt be a kalcium- és magnéziumionok koordinációja. Az élő szervezet nagymolekulájú szerves vegyületei és a szövetekben a kétértékű ionok között legnagyobb koncentrációban ($1-3 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) jelenlevő kalcium- és magnéziumionok közötti koordinációs kémiai kölcsönhatások eredményeként változatos összetételű és egyensúlyi stabilitású komplexek jöhetnek létre. Ezekben a fémionok általában a bioligandumok oxigén donoratomjaikhoz kapcsolódnak, a komplexek összetétele az esetek többségében a ligandum protonáltsági állapotától is függ. A fémionkoordináció eredményeként megváltozik a bioligandumok szerkezete, töltése, ezen keresztül biológiai hatása, reakciókészsége; ezen alapul a két ion enzímreakciókban betöltött fontos szerepe. (Pl. véralvadás, tejképződés, idegingerület-vezetés, izomműködés, stb..)

A kalcium- és magnéziumionok néhány "kedvezőtlen" tulajdonsága (lezárt elektronhéj, "szintelenség", diamágnesség, "gyenge" koordinációs képesség) a koordinációs kémiai tanulmányozásukra alkalmazható módszerek körét erősen korlátozza.

Munkám során két biológiailag aktív vegyületcsalád néhány képviselőjének protonálódási ill. kalcium- és mag-

néziunion-koordinációját tanulmányoztam potenciometriás módszerekkel.

A γ -karboxil-glutaminsav (GLA) és rokonvegyületeinek tanulmányozásához az a közismert kísérleti tapasztalat adott indítást, amely szerint a vér alvadási folyamataiban a kalciumionok döntő szerepet játszanak és, hogy az alvadási folyamatokat szabályozó enzimek (véralváadási faktorok) között több olyan is található, amelynek aktív formája a kalciumkomplexe. A képződő kalciumkomplexek meglepően nagy stabilitásuak, sőt a bennük szereplő ligandumok szelektívek a kalciumionra. Újabb kísérleti tapasztalatok alapján az is bizonyítottnak tekinthető, hogy a véralváadási faktorokban a kalciumionok a glutaminsav oldalláncokból a K-(koagulációs-) vitamin hatására poszt szintetikus uton képződő γ -karboxi-glutamát oldalláncokhoz kötődnek.

A bisz-indol alkaloidok között a vinkrisztin és a vinblasztin a vérrák és más légyszöveti tumoros megbetegedések kemoterápiájában nyert alkalmazást. Sajnos, e vegyületek vizes oldatai bomlékonyak, ami számos gyógyszertechnológiai nehézséget okozott (pl. a sterilizálást nem tette lehetővé, ill. a gyógyszert porampullában kellett forgalmazni, stb.). Az a megfigyelés, mely szerint ekvivalens mennyiségű cink-, kalcium- vagy magnéziumion jelenlétében e vegyületek vizes oldatai hosszú időn át bomlás nélkül tárolhatók, és hőkezeléssel sterilizálhatók, szintén koor-

dinációs kémiai kölcsönhatásra utalt.

Ezek alapján célunk a fenti ligandumok, valamint kalcium- és magnéziumionok közötti koordinációs kémiai kölcsönhatás tanulmányozása, a képződő komplexek stabilitási állandóinak meghatározása, e rendszerek minél sokoldalubb jellemzése volt. Doktori értekezésemben e kutatások eredményeiről számolok be.

2. KISÉRLETI RÉSZ

2.1. A felhasznált anyagok

A GLA-t és származékait az [1]-ben leírt módon Lőw Miklós és munkatársai szintetizálták. A DL-glutaminsav, glutársav és malonsav Fluka a.l.t. minőségű volt.

A vizsgált mono- és bisz-indol alkaloidákat, amelyeket a Richter Gedeon Gyógyszervegyészeti Gyár, Budapest bocsátott rendelkezésünkre, fénytől és nedvességtől védve, zárt edényben -18°C -on tároltuk, a [2] előíratának megfelelő módon.

A mérésekhez használt egyéb vegyszerek Fluka ill. Reanal gyártmányu, a.l.t. minőségűek voltak. A méréseket $25,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ -ra termosztált zárt mérőedényben, állandó (1 mol dm^{-3} ill. $0,15 \text{ mol dm}^{-3}$) ionerősség mellett hajtottuk végre.

2.2. A mérések kivitelezése

A pH-metriás mérésekhez a NaOH mérőoldatot 50 v%-os karbonátmentes NaOH törzsoldatból állítottuk elő, a higitáshoz frissen kiforralt és lehűtött kétszer desztillált vizet használtunk. Az ionerősséget NaNO_3 -tal ill. NaCl-dal állítottuk be. A mérőoldatot levegőtől elzárva, nátronmeszes levegőszűrővel ellátott edényben tároltuk és pontos koncentrációját

minden mérés előtt ellenőriztük.

A titrálások során hidrogénionra mintegy $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ ismert koncentrációju erős sav (HNO_3 ill. HCl) oldatot titráltunk a NaOH mérőoldattal a ligandum ill. a komplexképző fémion jelenlétében ill. távollétében $10^{-3} - 5 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ligandumkoncentráció mellett.

A $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ erős savoldatot ismert térfogatu és koncentrációju erős sav törzsoldat pontos higitásával állítottuk elő, a higitás során állítva be a megfelelő sóval a kívánt (1 mol dm^{-3} ill. $0,15 \text{ mol dm}^{-3}$) ionerősséget. A komplexképző fémionok ismert mennyiségét is a higitás során juttattuk az oldatba. A ligandumok ismert koncentrációju oldatát úgy állítottuk elő, hogy a szilárd mintát pontos bemérést követően ismert térfogatu erős sav törzsoldatban oldottuk fel.

A megfelelően nagy fémionfölösleg biztosításához a Calvin-féle deprotonálódási vizsgálatok során az ionerősséget a megfelelő kalcium- ill. magnézium-sóval állítottuk be.

A mérésekhez "Radiometer" G202B félmikrométerű üvegelektrodát és "Radelkis" OP08303 típusu kettős diffúziós határrétegű Ag/AgCl vonatkoztatási elektrodát alkalmaztunk. A szén-dioxid távoltartására az oldaton nagytisztaságú N_2 gázt buborékolattunk keresztül.

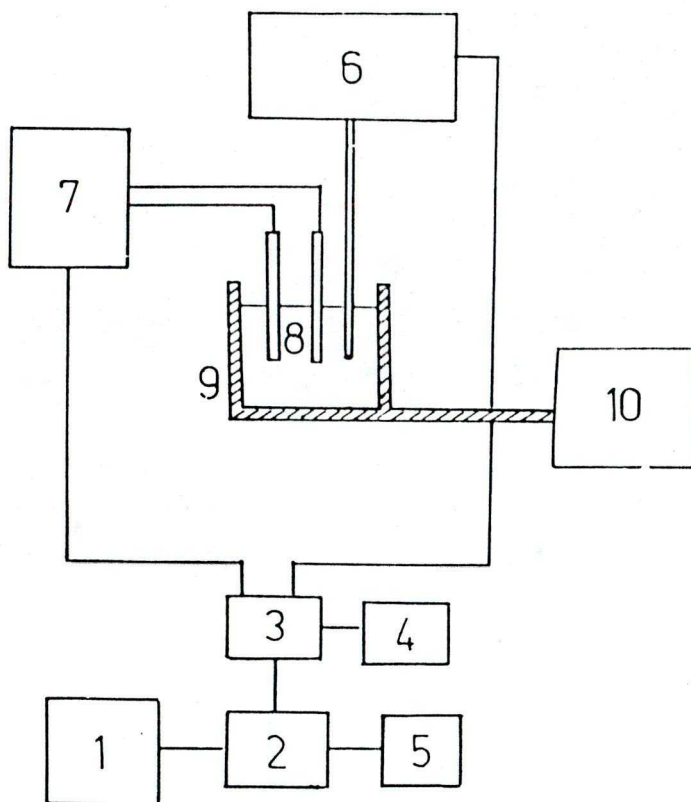
A kalciumionszelektív membránelektrodos potenciomet-

riás egyensúlyi vizsgálatok során a ligandumok 10^{-3} mol dm $^{-3}$ koncentrációjú oldatát titráltuk 0,05 mol dm $^{-3}$ -es Ca(NO $_3$) $_2$ mérőoldattal. A pH-t NaAc/HAc pufferrel tartottuk állandó (pH = 5,5) értéken.

A kalciumionszelektív elektród membránját [3]-nak megfelelően állítottuk elő. A membrán hordozója PVC, elektroaktív anyag dioktil-oxifenil-foszforsav, lágyítója dioktil-oxifenil-foszfónát. Az elektród belső elektrolit-oldata 0,01 mol dm $^{-3}$ CaCl $_2$; referens elektródként "Radelkis" OP 08303 típusú kettős diffúziós határrétegű Ag/AgCl elektród szolgált.

A méréseket házi készítésű, potenciometriás mérések kivitelezésére alkalmas számítógépvezérlésű automata titrálóberendezés segítségével hajtottuk végre. A berendezés bloksémáját az 1. ábrán mutatjuk be.

Az elektródpotenciált Radelkis OP 208/1 típusú precíziós digitális mV ill. pH-mérővel határoztuk meg (reprodukálhatóság $\pm 0,5$ mV, ill. $\pm 0,005$ pH-egység). A mérőoldatot Radelkis OP 930/1 típusú automata bürettával adagoltuk (adagolási pontosság $\pm 0,002$ cm 3). A fenti két berendezést házi készítésű interface közbeiktatásával egy ZX Spectrum számítógéphez csatlakoztattuk. A pH-mérő BCD jeleit 8255 típusú programozható perifériális interface továbbította a számítógéphez. Ugyanez az interface működtette az automata bürettát is. A rendszer vezérlését BASIC



1. ábra. Az automata titrálóberendezés blokk-sémája

1. tápegység és feszültségstabilizátor
2. ZX - Spectrum személyi számítógép
3. paraméterillesztő és memóriabővítő egység
4. kimenő egységek (sornyomtató, TV)
5. magnetofon (programrögzítő ill. beolvasó egység)
6. automata bűretta
7. digitális pH-mérő
8. elektródok
9. mérőcella
10. termosztát



nyelven írott program végezte. A mérés során a komputer automatikusan hajtotta végre a különböző mérőoldatrészletek adagolását, és gondoskodott arról is, hogy az elektródpotenciált csak az egyensúly beállta után rögzítse. Emellett az eredményeket megjelenítette a hozzákapcsolt monitoron és kinyomtatta egy Sinclair-ZX sornyomtatón. A berendezéssel sorozatmérések esetén a mérési adatok "on line" kezelése is lehetséges volt.

2.3. A mérési adatok értékelése

A pH-metriás mérési adatok értékelésekor először az elektód kalibrációs adatait határoztuk meg ismert koncentrációju erős sav oldatnak ismert koncentrációju erős bázis mérőoldattal történő titrálásával. A kalibrációt az érdemi mérés előtt legalább kétszer, és utána egyszer elvégeztük, és akkor fogadtuk el, ha az azonos fogyáshoz tartozó potenciálértékek különbsége nem haladta meg a $\pm 0,5$ mV-ot.

A kalibráció összetartozó fogyás - e.m.e. értékpárjaiból a módosított Nernst egyenlet

$$E = E_0 + M \lg [H^+] + J_H \cdot [H^+] + J_{OH} \cdot [OH^-]$$

ismeretlen paramétereit (E_0 , M , J_H , J_{OH}) legkisebb négyzetes finomitással határoztuk meg, annak figyelembe vételével

vel, hogy savas tartományban

$$[H^+] = \frac{C_{sav} \cdot V_o - C_{lug} \cdot V_i}{V_o + V_i} = C_H^+ \quad (1)$$

és a lugos tartományban

$$[OH^-] = \frac{K_w}{[H^+]} = \frac{C_{lug} \cdot V_i - C_{sav} \cdot V_o}{V_o + V_i} = C_{OH}^- \quad (2)$$

ahol C_{sav} az erős sav törzsoldat analitikai koncentrációja

C_{lug} a lugmérőoldat analitikai koncentrációja

V_o a kezdeti térfogat

V_i az egyes mérőoldat fogyás értékek.

A kalibrációs paraméterek ismeretében mért potenciál-értékeket a módosított Nernst egyenletnek $[H^+]$ -ra történő megoldásával transzformáltuk pH-értékké.

A ligandum jelenlétében és távollétében kapott titrálási görbékről a Bjerrum-féle komplexképződési függvény értékeit számítottuk ki, majd ezekből az

$$\bar{n} = \frac{\sum_{i=1}^N i \beta_i [H^+]^i}{\sum_{i=0}^N \beta_i [H^+]^i} \quad (3)$$

modellfüggvény alapján a protonálódási állandókat legkisebb négyzetes finomítással, számítógépi programmal határoztuk meg.

A kalciumionszelektív membránelektróddal végzett mérések során az elektród kalibrációs adatait 1 mol dm^{-3} ione-
rősségű, $\text{pH} = 5,5$ oldatnak ismert koncentrációju $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$
mérőoldattal történő titrálásával határoztuk meg, a pH-met-
riás részben ismerttetett követelmények szem előtt tartásá-
val. A Nernst-egyenlet alapján a ligandum jelenlétében mért
e.m.e. adatokból közvetlenül olvastuk le az aktuális szabad
fémionkoncentrációt ill. számítottuk a Bjerrum-féle komplex-
képződési függvény megfelelő értékeit.

3. A γ -KARBOXI-GLUTAMINSAV ÉS NÉHÁNY ROKONVEGYÜLETÉNEK PROTONÁLÓDÁSI, KALCIUM- ÉS MAGNÉZIUM-KOMPLEXKÉPZÉSI MIKROFOLYAMATAI

3.1. Irodalmi összefoglalás

A γ -karboxi-glutaminsavtartalmu oligo- és polipeptid- dek egyensúlyi kémiai vizsgálatának eddigi eredményei

A γ -karboxi-glutaminsavat (GLA) 1974-ben fedezték fel a protrombin szekvenciájában [4]. Számos kísérleti tapasztalat utal arra, hogy a GLA oldalláncok résztvesznek a K-vitamin dependens véralvadási faktorok (a protrombin mellett a VIII, IX, X, XIII véralvadási faktorok) és más kalciumfüggő fehérjék (dentinek, elmeszesedett szövetek, osteokalcin; csont-GLA-protein) kalciumion koordinációjában.

A K-vitamin dependens véralvadási faktorok "nagy" ($\log K = 4-5$) és "kicsiny" ($\log K = 2-3$) egyensúlyi stabilitásu kalcium-komplexeik formájában fejtik ki hatásukat [5-9]. Ez az enzimatisz aktivitás és a fémkoordinációs készség azonban jelentősen csökken, ha a polipeptidekből a GLA-tartalmu N-terminális részt eltávolítják [10, 11] vagy ha a GLA oldalláncokat termikusan [12] vagy formaldehides-morfolinos kezeléssel [13] specifikusan dekarboxilezik [12-16].

Biokémiai szempontból, pl. a vér alvadási folyamatainak megértéséhez igen fontos a képződött komplexek szerkezetének megismerése. Az e tárgyban megjelent számos összefoglaló mű alapján [17-23] a GLA-tartalmu polipeptidek kalciumkomplexei szerkezeti szempontból az alábbi típusokba sorolhatók:

1. a magányosan vagy párosával elhelyezkedő GLA oldal-láncok kalciumiont kötnek meg,
2. a molekula egymástól távol eső részeinek GLA oldal-láncai kalcium-hidon keresztül összekapcsolódhatnak, ami megváltoztathatja a fehérje szekunder strukturáját és ezzel reakciókészségét (templáthatás),
3. két fehérje kapcsolódhat össze kalcium-hidak révén (enzim-szubsztrát kapcsolát),
4. a kalciumion hídaként szerepelhet a GLA-membránfoszfolipid vegyesligandumu komplexben, ami a polipeptidek membránfelületi megkötődését teszi lehetővé.

A GLA-t szintetikusan 1976-ban állították elő [24], protonálódási makroállandóit pH-metriás, elektroforetikus [25] és ^{13}C NMR [26] módszerrel határozták meg. Az így nyert protonálódási állandók azonban - főleg az alacsonyabb pH-tartományban - jelentősen eltérnek egymástól.

A GLA és szintetikusan előállított, a K-vitamin dependens fehérjéket funkcionálisan modellező GLA-tartalmu kis-peptidek fémion-koordinációjának vizsgálata is ellentmondá-

sos eredményekre vezetett. Megállapították, hogy a szabad GLA kalciumionnal csak kevésbé stabil 1:1 összetételű komplexet képez ($\log K = 1,3$) [25, 26], viszont a két szomszédos GLA-t ("tandem") tartalmazó kispeptidek már közel olyan egyensúlyi stabilitású kalciumkomplexet képeznek [25, 27, 28], mint a protrombin ($\log K = 3,5$) [8]. Megállapították, hogy a biner M-GLA komplexekben ($M = \text{Gd}^{3+}, \text{Tb}^{3+}, \text{Eu}^{3+}, \text{Mg}^{2+}$) a fémion koordinációs szférájának egyik fele szabad, így hozzáférhető egy másik ligandum (pl. egy másik GLA oldallánc vagy a membránfoszfolipid hidrofíli rész) számára [26, 28, 29]. A GLA-nak ezt a sajátosságát később röntgenszerkezeti adatokkal [30] és elméleti számításokkal [31] is igazolták.

A fentieknek ellentmond, hogy a magányos GLA-t és a GLA-tandemet tartalmazó kispeptidek Eu^{3+} -komplexeit szerkezeti és stabilitási szempontból hasonlóknak találták [32].

A fenti eredmények alapján felvetődik az a kérdés, hogy vajon a nagy stabilitású komplexek kialakulásához több GLA oldallánc együttes részvétele szükséges, vagy a polipeptidlánc induktív effektusai már egy magányos GLA oldalláncot is képessé tesznek a kalciumion nagy egyensúlyi stabilitású megkötésére.

A kérdés eldöntésére modellkísérletet terveztünk, melynek célja a GLA és néhány származéka protonálódási mikroyegyensúlyainak egzakt megismerése és ezen keresztül annak ki-

mutatása, hogy a polipeptidlánc milyen hatást gyakorol a GLA oldalláncára, hogyan változtatja meg a protonálódó csoportok bázicitását és ezzel fémion-koordinációs készségét.

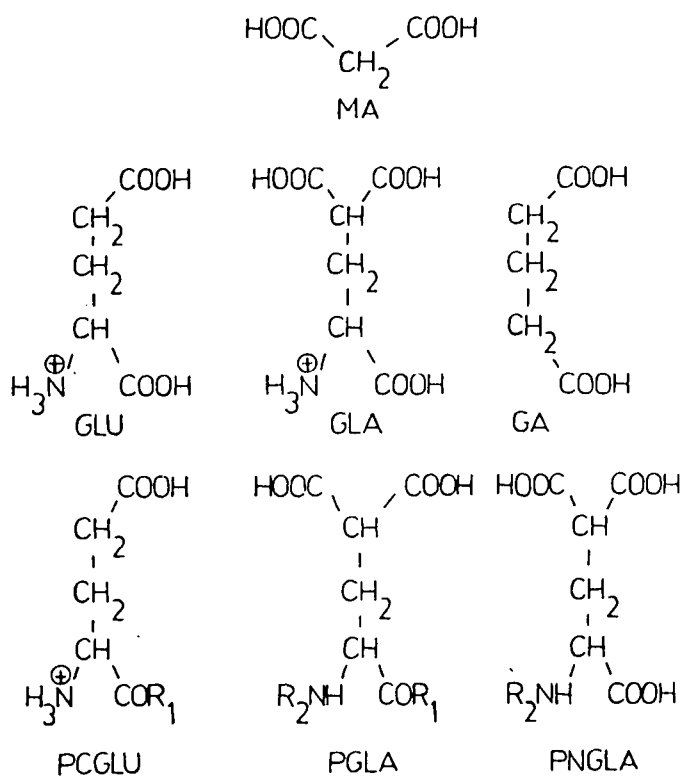
E célból az alábbi vegyületek vizsgálatát végeztük el: (2. ábra) (zárójelben a szövegben alkalmazott rövidítések)

- γ -karboxi-DL-glutaminsav (GLA)
- N-acetil- γ -karboxi-DL-glutaminsav (PNGLA)
- N-acetil- γ -karboxi-DL-glutaminsav- α -metilamid (PGLA
- ez a vegyület funkcionálisan modellezi a polipeptidbe beépült magányos GLA oldalláncot)
- DL-glutaminsav- α -metilamid (PCGLU)
- DL-glutaminsav (GLU)
- malonsav (MA)
- glutársav (GA)

A méréseket pH-metriás módszerrel, 1 mol dm⁻³ NaCl ion-erősségen hajtottuk végre.

3.2. Értékelő módszer a mikroállandók meghatározására

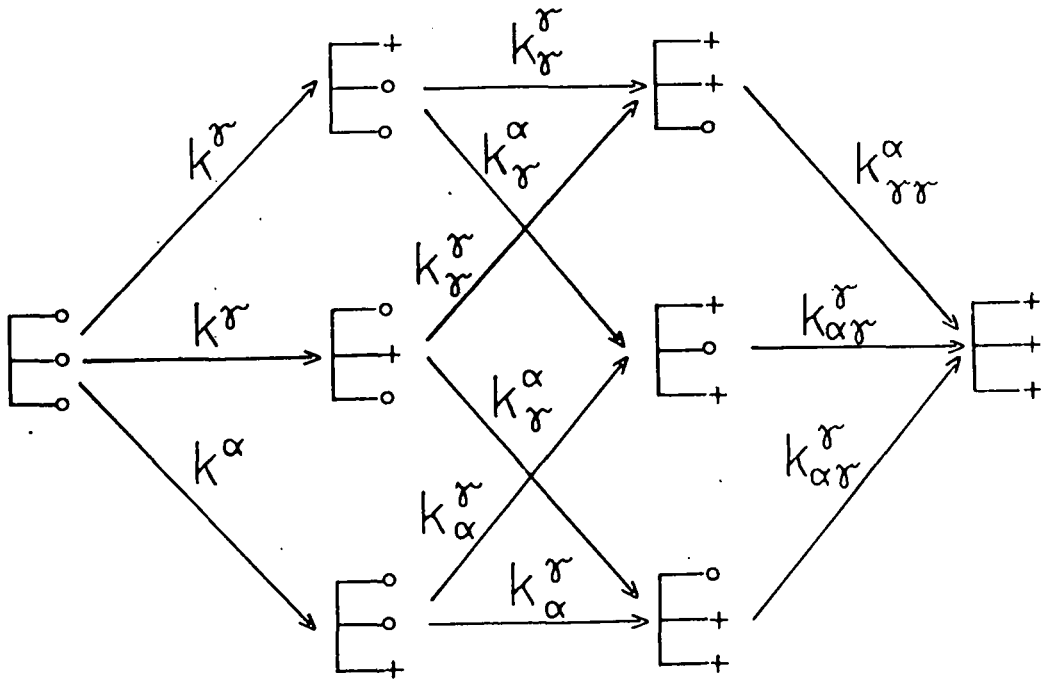
Protonálódási mikroállandók meghatározására számos kombinált pH-metriás és spektroszkópiás módszert dolgoztak ki [33, 34]. E módszerek azonban a GLA típusu vegyületek esetében nem használhatók a funkciós csoportok spektroszkópiás tulajdonságainak hasonlósága és a köztük lévő szénatomok kis száma miatt [35]. Mikroállandókat az ilyen esetekben de-



2. ábra. A GLA és a tanulmányozott rokonvegyületeinek szerkezeti képletei

($\text{R}_1 = -\text{NHCH}_3$, $\text{R}_2 = -\text{COCH}_3$)

duktív módszerrel lehet meghatározni [36]. E módszert a GLA és a PNGLA esetében a következőképpen alkalmaztuk. A három karboxilcsoport protonálódási sémája (figyelembe véve, hogy a GLA α -aminocsoportjának protonáltsági állapota e pH tartományban nem változik): *



$$\beta_1 = 2k^\gamma + k^\alpha \quad (4)$$

$$\beta_2 = k^\gamma \cdot k^\gamma_\gamma + k^\gamma \cdot k^\alpha_\gamma + k^\alpha \cdot k^\gamma_\alpha \quad (5)$$

$$\beta_3 = k^\alpha \cdot k^\gamma_\alpha \cdot k^\gamma_{\alpha\gamma} = k^\gamma \cdot k^\gamma_\gamma \cdot k^\alpha_{\gamma\gamma} = k^\alpha \cdot k^\gamma_\alpha \cdot k^\gamma_{\alpha\gamma} \quad (6)$$

Azonos csoportra vonatkozó megfelelő mikroállandók hányadosával két csoport kölcsönhatásának a mértéke kvantitativén megadható.

* Az E sémán a két felső csoport az ekvivalens γ -, az alsó az α -COO⁻-csoportot jelöli. A mikroállandók indexelése úgy történt, hogy a felső indexben az adott folyamatban protonálódó, az alsó index(ek)ben a már protonált csoportokat tüntettük fel.

$$\text{pl. } \frac{k_j^i}{k_i} = \frac{k_i^j}{k_j} = E_{i,j} \quad (7)$$

ahol $E_{i,j}$ az i és j csoportok közti kölcsönhatási tényező.
Szimmetrikus dikarbonsavak (pl. MA, GA) esetén ennek értéke a makroállandókból is számítható:

$$E_{i,j} = \frac{K_1}{4K_2} \quad (8)$$

A kölcsönhatási tényezők felhasználásával a (4)-(6) egyenletekben levő alsó indexszel is jelölt mikroállandók az alábbi módon fejezhetők ki:

$$k_Y^Y = k^Y \cdot E_{YY} \quad (9)$$

$$k_Y^\alpha = k^\alpha \cdot E_{\alpha Y} \quad (10)$$

$$k_\alpha^Y = k^Y \cdot E_{\alpha Y} \quad (11)$$

$$k_{\alpha Y}^Y = k_\alpha^Y \cdot E_{YY} = k^Y \cdot E_{\alpha Y} \cdot E_{YY} \quad (12)$$

$$k_{YY}^\alpha = k_Y^\alpha \cdot E_{\alpha Y} = k^\alpha \cdot E_{\alpha Y}^2 \quad (13)$$

(9)-(13)-at visszahelyettesítve (4)-(6)-ba

$$\beta_1 = 2k^Y + k^\alpha \quad (14)$$

$$\beta_2 = (k^Y)^2 \cdot E_{YY} + 2k^Y k^\alpha E_{\alpha Y} \quad (15)$$

$$\beta_3 = (k^Y)^2 k^\alpha E_{YY} E_{\alpha Y}^2 \quad (16)$$

A β_1 , β_2 , β_3 állandókat* az ismertetett pH-metriás módszerrel, az E_{YY} , $E_{\alpha Y}$ felhasadási tényezőket pedig az MA és GA makroállandóiból meghatározva k^α , k^Y protonálódási mikroállandókhoz, majd a (9)-(13) egyenletben megadott mikroállandókhoz jutottunk. Számításaink során a GLA és a PNGLA esetében azokat a k^α , k^Y értékpárokat határoztuk meg, amelyek a legkisebb eltéréssel egyszerre elégítik ki mindhárom egyenletet.

A protonálódási mikroállandók ismeretében megadhatók a részecskék képződési fok függvényei. Speciálisan a GLA és a PNGLA esetére a következő összefüggések érvényesek:

$$\alpha_{E_0} = \frac{1}{A} \quad (17)$$

$$\alpha_{E_0^+} = \frac{2k^Y \cdot [H^+]}{A} \quad (18)$$

$$\alpha_{E_0^+} = \frac{k^\alpha \cdot [H^+]}{A} \quad (19)$$

$$\alpha_{E_0^+} = \frac{k^Y \cdot k_Y^Y \cdot [H^+]^2}{A} \quad (20)$$

$$\alpha_{E_0^+} = \frac{2k^\alpha k_Y^\alpha [H^+]^2}{A} \quad (21)$$

* A GLA esetében: $\beta_1 = K_2$
 $\beta_2 = K_2 K_3$
 $\beta_3 = K_2 K_3 K_4$

mivel K_1 az α -aminocsoport protonálódási állandója, és a karboxilcsoport protonálódási tartományában protonáltsági állapota nem változik.

$$\alpha_{E_{\pm}^{\dagger}} = \frac{k_Y \cdot k_Y \cdot k_{YY}^{\alpha} \cdot [H^+]^3}{A} \quad (22)$$

$$A = \sum_{i=0}^3 \beta_i \cdot [H^+]^i \quad (23)$$

Figyelembevée, pl. az

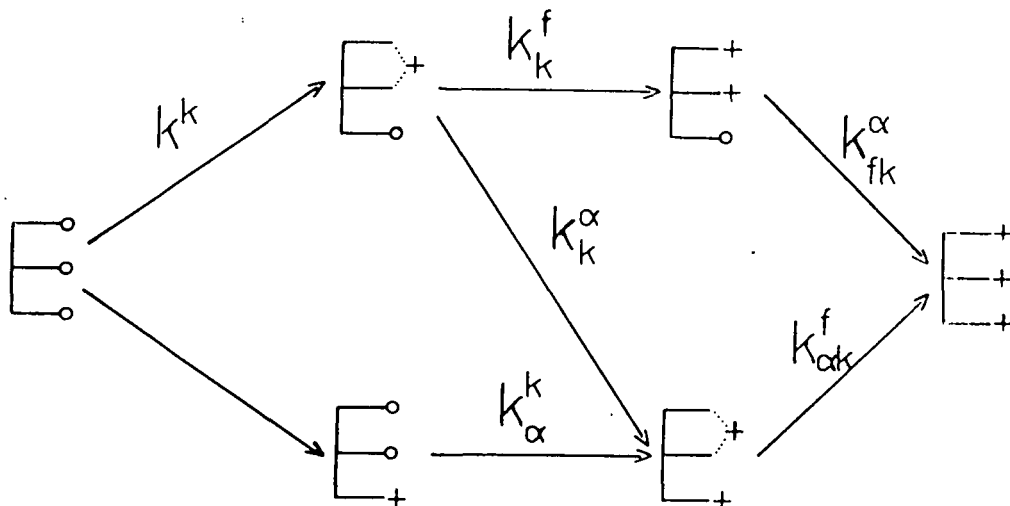
$$\frac{[E_0^{\dagger}]}{[E_0^{\dagger}] + [E_{\pm}^{\dagger}]} = \frac{2k_Y}{\beta_1} \quad (24)$$

hányados megadja az egyszer protonált részecskék közül azoknak a hányadát, amelyek a γ -karboxilát csoportjukon protonáltak. Mivel ez a számítás elvégezhető a kétfajta lehetséges kétszer protonált részecskékre is, kiszámítható, hogy a GLA és PNGLA három különböző lehetséges protonálódási utvonala közül - a szó statisztikai értelmében - melyik milyen valószínűségű.

A két karboxilcsoportot tartalmazó vegyületek mikroállandóinak ill. α -pH-függvényeinek kiszámítása a fenti összefüggésekkel analóg összefüggésekkel oldható meg.

Itt kell megjegyezni, hogy a protonálódási folyamatok során a geminális karboxilcsoportokra belépő proton a két karboxilt összekötő hidrogén-hid képződéséhez is vezethet. Az ilyen képződmény kialakulását e mérésekkel sem alátámasztani, sem megcáfolni nem lehet. Ennek a feltételezésnek az

alábbi protonálódási séma felelne meg:



$$\beta_1 = k^k + k^\alpha \quad (25)$$

$$\beta_2 = k^k \cdot k_k^f + k^\alpha \cdot k_\alpha^k \quad (26)$$

$$\beta_3 = k^\alpha \cdot k_\alpha^k \cdot k_{\alpha f}^f = k^k \cdot k_k^f \cdot k_{fk}^\alpha = k^k \cdot k_k^\alpha \cdot k_{\alpha k}^f \quad (27)$$

(14)-(16)-ot összevetve az (25)-(27)-tel

$$k^k = 2k_Y^\gamma \quad (28)$$

$$k_\alpha^k = 2k_\alpha^\gamma \quad (29)$$

$$k_k^f = \frac{1}{2} k_Y^\gamma \quad (30)$$

$$k_{k\alpha}^f = \frac{1}{2} k_{Y\alpha}^\gamma \quad (31)$$

$$k_{fk}^\alpha = k_{Y\gamma}^\alpha \quad (32)$$

míg a megfelelő eloszlásfüggvényekből

$$\alpha_{E_0^{2+}} = \alpha_{E_0^{+}} \quad (33)$$

$$\alpha_{E_+^{2+}} = \alpha_{E_+^{+}} \quad (34)$$

vagyis a felyázolt két protonálódási séma közötti különbség pusztán formai, hiszen a részecskéket ugyanaz az eloszlásfüggvényrendszer írja le. A GLA protonálódási mikrofolyamatait a továbbiakban a korábban leírt formalizmus szerint tárgyaljuk.

A képződő Ca^{2+} - és Mg^{2+} -komplexek stabilitási állandóinak kiszámításához a ligandumoknak a komplexképző fémion jelenlétében kapott $\bar{H}$ függvényeiből indultunk ki. Az alkalmazott modellfüggvény általános alakja

$$\begin{aligned} \bar{H} &= \frac{\text{ligandumhoz kötött proton}}{\text{összes ligandum}} = \\ &= \frac{\sum_{i=1}^N \beta_i \cdot [\text{H}^+]^i + \sum_{i=1}^{N-1} i \cdot K_i^C \cdot k_i^M \cdot [\text{H}^+]^i \cdot [\text{M}^{2+}]}{\sum_{i=0}^N \beta_i [\text{H}^+]^i + \sum_{i=0}^{N-1} K_i^C \cdot k_i^M \cdot [\text{H}^+]^i \cdot [\text{M}^{2+}]} \quad (35) \end{aligned}$$

ahol N a protonok maximális száma, k_i^M az i -szeresen protonált részecskékhez tartozó megfelelő mikroállandók szorzata, K_i^C pedig az i -szeresen protonált részecske fémkomplexének stabilitási állandója. A $K_i^C \cdot k_i^M$ szorzatokat számítógépes program segítségével, legkisebb négyzetes finomítással határoztuk meg. E számításokat az összes olyan ligan-

dumra elvégeztük, amelyek geminálisan két protonálódó csoportot tartalmaznak.

3.3. Kísérleti eredmények ismertetése

3.3.1. Protonálódási folyamatok

A vizsgált vegyületek protonálódási makroállandóit az 1. táblázatban mutatjuk be. Az állandók reprodukálhatósága:

$$\log K > 3 : 0,05$$

$$2 < \log K < 3 : 0,1$$

$$2 > \log K : 0,2$$

A MA* és PGLA protonálódási makroállandóinak ismeretében az $\log E_{\gamma\gamma} = -1,68$, a GA esetében $\log E_{\alpha\gamma} = -0,11$. Ezek az adatok jó egyezést mutatnak a GA és MA irodalmi adataival [37].

A (14)-(16) egyenletek alapján kiszámított karboxilát mikroállandókat a 2. táblázatban tüntettük fel. A GLA és a PNGLA esetében a (14)-(16) egyenletek bal és jobb oldala közötti eltérés nem haladja meg a 0,02 log egységet, ez természetesen az illesztés és nem a mérés hibája. Ez a feltűnő-

*A GLA γ -helyzetű karboxilcsoportjaihoz szerkezetileg hasonló MA karboxilcsoportokat γ -val jelöltük.

1. táblázat

A GLA és rokonvegyületeinek protonálódási makroállandói

	$\log K_1$	$\log K_2$	$\log K_3$	$\log K_4$
MA	4,97	2,71	-	-
GA	4,82	4,11	-	-
GLU	9,50	4,07	2,39	-
PCGLU	7,87	3,94	-	-
GLA	9,60	4,33	2,66	1,80
PNGLA	4,82	3,32	2,45	-
PGLA	4,68	2,38	-	-

2. táblázat

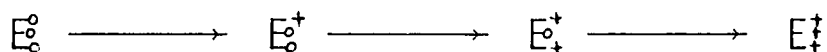
A GLA és rokonvegyületeinek a karboxilát-csoportokra vonatkozó protonálódási mikroállandói. (A táblázatban *-gal jelezte értékekre vonatkozó magyarázatot lásd a szövegben.)

	$\log k^Y$	$\log k^{\alpha}$	$\log k^Y_{\gamma}$	$\log k^{\alpha}_{\gamma}$	$\log k^Y_{\alpha}$	$\log k^{\alpha}_{\gamma\gamma}$	$\log k^Y_{\alpha\gamma}$
MA	4,67	-	3,01	-	-	-	-
GA	4,52	-	-	4,41	-	-	-
GLU	4,06	2,51	-	2,40	3,95	-	-
PCGLU	3,94	-	-	-	3,94*	-	-
GLA	4,02	2,66	2,34	2,55	3,91	2,44	2,23
PNGLA	4,52	3,39	2,84	3,28	4,41	3,17	2,73
PGLA	4,38	-	2,68	-	4,38*	-	2,68*

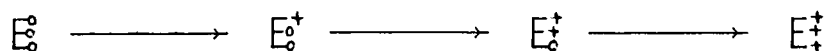
en jó egyezés megerősíti a GLA $\log K_4 = 1,8$ -as értékét: ez az érték éppen az elektroforézissel ($\log K_4 = 1,6$) [25] és a ^{13}C NMR-rel ($\log K_4 = 2,0$) [26]. korábban meghatározott makroállandók közé esik.

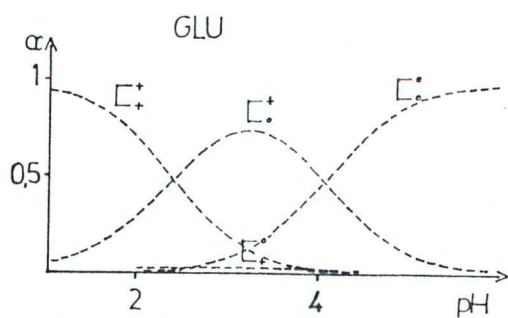
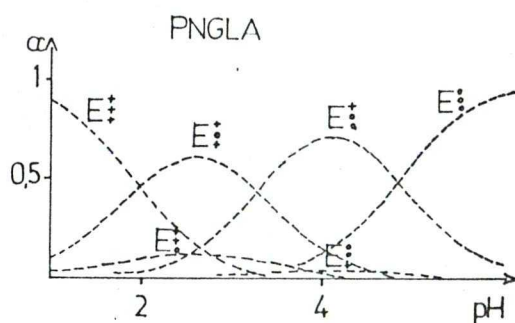
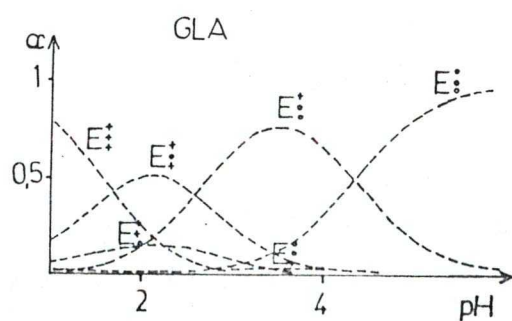
A mikroállandók ismeretében kiszámítottuk a GLA, PNGLA és GLU α -pH eloszlásfüggvényeit, amelyeket a 3. ábrán mutatunk be. Kiszámítottuk a különböző egyszer, ill. kétszer protonált részecskék arányát az összes egyszer, ill. kétszer protonált részecskékhez képest. Ennek alapján az egyszer protonált GLA részecskék 98 %-ban a γ -, 2 %-ban az α -karboxil csoporton, míg a kétszer protonált részecskék 24 %-ban két γ -, 76 %-ban az α - és γ -karboxil csoportokon protonáltak. (Ugyanezek az adatok a PNGLA-ra: 96 % γ -, 5 % α - az egyszeresen, 84 % α , γ és 16 % γ - γ a kétszeresen protonált részecskék megoszlása.)

Ennek alapján a



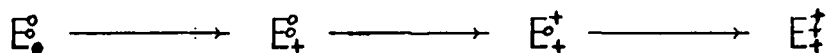
protonálódási utvonal valószínűsége 0,74 a GLA, 0,80 a PNGLA esetében; ez az utvonal tekinthető a protonálódási folyamat "főutvonalának". A





3. ábra. A GLA, PNGLA és GLU mikrorészecskék eloszlás-függvényei

utvonal valószínűsége 0,24, a GLA, 0,16 a PNGLA esetében ez a protonálódási folyamat "mellékutvonala". A



utvonal valószínűsége a legkisebb, 0,02 a GLA, és 0,04 a PNGLA esetében.

3.3.2. A Ca^{2+} és Mg^{2+} komplexképzési folyamatok

A geminálisan két protonálódó csoportot tartalmazó vegyületek fémkomplexeinek stabilitási állandóit a 3. táblázatban mutatjuk be. A kapott állandókat az következőképpen nyertük:

A MA és PGLA komplexképző fémionok jelenlétében kapott pH-metriás titrálási görbéinek leírását a

$$\bar{H} = \frac{\beta_1 \cdot [H^+] + 2 \cdot \beta_2 \cdot [H^+]^2 + K_{MHA} \cdot k^Y \cdot 2 \cdot [M^{2+}] \cdot [H^+]}{1 + \beta_1 \cdot [H^+] + \beta_2 \cdot [H^+]^2 + K_{MA} \cdot [M^{2+}] + K_{MHA} \cdot k^Y \cdot 2 \cdot [M^{2+}] \cdot [H^+]} \quad (36)$$

függvénnyel kíséreltük meg; itt

$$K_{MA} = \frac{[MA]}{[M^{2+}] \cdot [A]} \quad (37)$$

$$K_{MHA} = \frac{[MHA]}{[M^{2+}] \cdot [HA]} \quad (38)$$

és $[M^{2+}] = C_M$, mert $\frac{C_M}{C_A} = 120-140$

3. táblázat

A kalcium- és magnéziumkomplexek stabilitási állandói. (A csillaggal jelölt értékek becsült adatok, a megfelelő magyarázatot lásd a szövegben.)

	A ligandum protonáltsági állapota	Ca ²⁺ -komplex		Mg ²⁺ -komplex	
		log K ₁		log K ₁	
		γ-helyzet	α-helyzet	γ-helyzet	α-helyzet
MA	A ²⁻	1,15	-	1,73	-
PGLA	A ²⁻	0,84	-	1,03	-
GLU	A ²⁻	-	0,60	-	1,33
PNGLA	H _α A ⁻	0,84*	-	1,03*	-
	A ³⁻	1,06	-	1,15	-
GLA	H _α A ⁻	0,4*	-	0,7*	-
	A ²⁻	0,60	-	0,92	-
	A ³⁻	-	0,64	-	1,42

A legkisebb négyzetes finomítások során a $K_{MHA} \cdot k^Y$ szorzat nullával vált egyenlővé, míg a K_{MA} -ra irodalmi adatokkal összhangban levő adatokat kaptunk. Ennek nyilvánvaló kémiai tartalma, hogy az adott körülmények között egyszer protonált komplexek nem képződnek mérhető mennyiségben a rendszerben. Mivel a GLA és a PNGLA γ -helyzetű donorcsoportjainak esetében analóg komplexképzési viselkedés várható, e vegyületek esetében a karboxiljain teljesen deprotonált ligandum mellett azt a részecskét vettük figyelembe, amely csak az α -COOH csoporton protonált. Az ennek megfelelő modellfüggvény:

$$\bar{H} = \frac{\sum_{i=1}^3 i \cdot \beta_i \cdot [H^+]^i + K_{MH_\alpha A} \cdot k^\alpha \cdot [M^{2+}] \cdot [H^+]}{\sum_{i=0}^3 \beta_i \cdot [H^+]^i + K_{MA} \cdot [M^{2+}] + K_{MH_\alpha A} \cdot k^\alpha \cdot [M^{2+}] \cdot [H^+]} \quad (39)$$

$$\text{ahol } K_{MH_\alpha A} = \frac{[MH_\alpha A]}{[M^{2+}] \cdot [H_\alpha A]} \quad (40)$$

és $H_\alpha A$ jelenti az α -karboxilcsoporton protonált részecskét. A finomítás során ebben az esetben a $k^\alpha \cdot K_{MH_\alpha A}$ állandó vált nullává, míg a K_{MA} -ra ismét reális érték adódott. A GLA és a PNGLA esetében tehát olyan fémkomplex, amely γ -helyzetű karboxiljainál fogva fémhez kötött, α -karboxilcsoportján pedig protonált, nem képződik mérhető mennyiségben. A kísérletileg kapott $\bar{H}$ függvény e részecske föltételezése nélkül is jól leírható. Ez az eredmény nem meglepő, hiszen a $H_\alpha A$ ré-

szecske képződési valószínűsége mindkét vegyület esetében kicsi, az egyszer protonált részecskére vonatkozó relatív móltörtjük nem haladja meg a 0,02 ill. 0,04 értéket.

A GLA-n és a GLU-n az α -aminocsoport deprotonálódásával egy új, potenciális koordinációs hely alakul ki. Az erre a helyre történő fémbekötést a GLU esetében a

$$\bar{H} = \frac{K_1 \cdot [H^+]}{1 + K_1 \cdot [H^+] + K_{MA} \cdot [M^{2+}]} \quad (41)$$

függvény jól modellezi. (Itt K_1 az α -aminocsoport protonálódási állandója.) Ami igazán meglepő, hogy a GLA fémionok jelenlétében kapott $\bar{H}$ függvényét is jól le tudtuk írni ezzel az egyszerű modellel. Még szembetűnőbb, hogy adott fém esetében közel ugyanazt a K_{MA} állandót kaptuk a GLA-ra és a GLU-ra. Ezek az adatok azt sugallják, hogy a GLA α -helyzetű fémmegkötését nem befolyásolja lényegesen az, hogy a γ -helyzetű karboxilcsoportok fémhez kötöttek vagy sem.

A fentiek alapján megadható a fémion γ - és α -helyzetben is koordinált M_2 GLA kétmagvu komplexek stabilitási állandója, ami az α - és γ -helyzetű fémbekötésre vonatkozó stabilitási állandók szorzata, ha a fentiek figyelembevételével mellett még azt is feltételezzük, hogy az α -aminocsoport deprotonálódása nem változtatja meg az aminocsoport elektronszívó effektusát oly mértékben, hogy az lényegesen befolyásolná a γ -karboxilcsoportok bázicitását, s így a

létrejövő fémbekötés egyensúlyi állandóját. Ennek alapján:

$$\log \frac{[(Ca_2 GLA)^+]}{[Ca^{2+}]^2 \cdot [GLA^{3-}]} = 1,24$$

$$\log \frac{[(Mg_2 GLA)^+]}{[Mg^{2+}]^2 \cdot [GLA^{3-}]} = 2,34$$

3.4. Diszkusszió

A protonálódási mikroállandók összevetése számos érdekes következtetésre vezet:

A MA, GA és PNGLA $\log k^Y$ mikroállandók közel azonosak, a PGLA-é már valamivel kisebb, a GLA-é, GLU-é és PCGLU-é a legkisebbek, de közel azonosak. Ez azzal magyarázható, hogy az utóbbi három vegyületben α -helyzetben erős elektronszívó hatást kifejtő protonált aminocsoport van. Ezzel szemben az acetilezett α -aminocsoport kevésbé elektronszívó. Ez az oka az első három vegyület $\log k^Y$ értékei egybeesésének. Ugyanez a tendencia figyelhető meg a $\log k_\alpha^Y$ értékek esetében is.

A $\log k^\alpha$ ill. $\log k_\gamma^\alpha$ értékek a GA > PNGLA > GLU ~ GLA sorban csökkennek. A GA $\log k^\alpha$ -ja azért kiugró érték, mert nem hat rá a geminális aminocsoport elektronszívó hatása. A fentiekből az is kitűnik, hogy az acetilezett aminocsoport elektronszívó hatása gyengébb, mint a protonált aminocsoporté. Ez magyarázza egyuttal a GLA és a PNGLA $\log_{\alpha\gamma}^Y$ -i

közötti különbségeket is.

Szembeötlő a GLU $\log k_{\alpha}^Y$ és a PCGLU $\log k^Y$ -ja közötti egyezés. Hasonlóképpen a mérési hibahatáron belül egyezik a PNGLA $\log k_{\alpha}^Y$ ill. $\log k_{\alpha\gamma}^Y$ -értéke a PGLA $\log k^Y$ ill. $\log k_{\gamma}^Y$ -értékével (ld. a *-gal jelölt adatokat a 2. táblázatban). Ez arra utal, hogy a savamid-csoport elektronszívó hatás szempontjából ekvivalens a protonált karboxilát-csoporttal. Ezt a korábbi megfigyelést [38] újabban NMR mérésekkel is igazolták [39].

A fentiek figyelembevételével a PCGLU $\log K_1 = 7,87$ -es makroállandója tekinthető a GLU ill. GLA $\log k_{\alpha}^{\alpha\text{-amino}}$ mikroállandójának, jóllehet ez a részecske nem képződik a rendszerben mérhető mennyiségben.

A komplexképző fémionok jelenlétében kapott $\bar{H}$ -függvények értékelése során egyszer protonált MH_{α} komplexeket a GLA és a PNGLA esetében nem tudtunk kimutatni. A protonált karboxil és savamid csoportok elektronszívó hatás szempontjából kimutatott ekvivalenciája alapján e részecskék egyensúlyi adatai is megbecsülhetők voltak. E szerint a PGLA kalcium- ill. magnéziumkomplexének stabilitási állandója tekinthető az α -helyzetben protonált PNGLA megfelelő komplexei stabilitási állandóinak. Nem meglepő, hogy az utóbbi állandók kisebbek mint a teljesen deprotonált PNGLA-ra vonatkozó állandók, hiszen az α -karboxilcsoport protonálódásával a γ -helyzetű karboxilcsoportok bázicitásának s ezzel

a képződő komplex stabilitásának csökkennie kell.

A fentiek alapján várható, hogy a GLA α -karboxilon protonált megfelelő komplexeinek stabilitási állandója is kb. ugyanannyival kisebb, mint a PNGLA esetében, vagyis 0,1-0,2 log egységgel alacsonyabb, mint a karboxiljain teljesen deprotonált GLA komplexé. Az e föltételezés alapján az $M H_{\alpha} GLA$ és $M H_{\alpha} PNGLA$ komplexekre vonatkozó becsült stabilitási állandókat a 3. táblázatban *-gal jelöltük meg.

Összevetve a szabad GLA és a fehérjeláncba beépült GLA modelljéül szolgáló PGLA azon fémkomplexeinek stabilitási állandóit, amelyek a vér pH-ján képződhetnek ($pH = 7,3-7,5$), megállapítható, hogy a PGLA stabilisabb komplexet képez a Ca^{2+} -mal és a Mg^{2+} -mal, mint a GLA. Ez a kis stabilitásnövekedés két hatás eredőjeként adódik: az acetilezett aminocsoport kevésbé elektronszívó, mint a protonált aminocsoport, míg a protonált karboxilcsoporttal ekvivalens savamid-csoport erősebb elektronszívó mint a protonálatlan karboxilát-csoport. E két ellentétes hatás eredményeként a PGLA γ -karboxilát-csoportjainak bázicitása, és ezzel komplexeinek stabilitása is kismértékben megnő. A PGLA kalciumkomplexének stabilitási állandója azonban még így is messze elmarad a GLA-tartalmu véralvadási faktorok kalciumkomplexeinek az irodalomban közölt stabilitási állandóitól. (Pl. protrombin $\log K = 3,5$ [8] Faktor IX: $\log K = 4,0$ [5]). A fehérjeláncba beépült magányos GLA oldalánc tehát csakugy mint a sza-

bad aminosav nem képes stabil kalciumkomplex képzésére. A nagy stabilitású kalciumionra specifikus kötőhelyek kialakulásához tehát más extrastabilizáló hatásoknak kell fellépniük; itt elsősorban a fehérjemolekula szekunder strukturájának megváltozására ill. vegyesligandumú komplexek képződésére gondolhatunk.

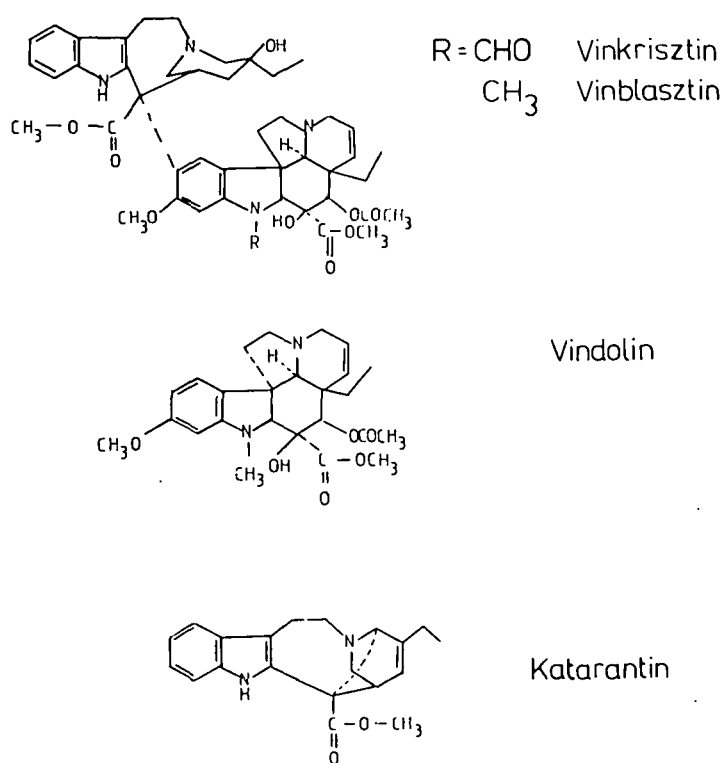
4. NÉHÁNY MONO- ÉS BISZ-INDOL ALKALOIDA PROTONÁLÓDÁSI ÉS KALCIUMKOMPLEX-KÉPZÉSI EGYENSÜLYAI

4.1. Bevezetés

A "Vinca Rosea" növény kivonatának fehérvérsejtszám csökkentő hatását az 1950-es években ismerték fel [40]. A hatóanyagok izolálása során a vinblasztin [41] és a vinkrisztin [42] bisz-indol alkaloidák bizonyultak leginkább hatékonynak, s a vérrák valamint egyéb lágyszöveti tumoros megbetegedések kemoterápiájában nyertek alkalmazást [43-45].

A vinkrisztin és a vinblasztin egy indolváz (katarantin-szerű) és egy dihidroindolváz (vindolin-szerű) molekularészletből épül fel. Szerkezetüket a 4. ábra mutatja be.

A sikeres gyógyászati alkalmazást követően még számos mono- és bisz-indol alkaloidát is előállítottak szintetikus úton [46, 47], melyeknek főleg farmakológiai hatását tanulmányozták, és a kémiai tárgy vizsgálataikat is gyógyászati céloknak rendelték alá. Így elsősorban a vegyületek szerkezetének spektroszkópiás módszerekkel történő felderítésére tettek erőfeszítéseket [pl. 48-54], összefüggést keresve a vegyületek szerkezete és biológiai hatékonysága között. Emellett számos nagy pontosságú ana-



4. ábra. A vinkrisztin, vinblasztin, vindolin és katarantin szerkezeti képlete

litikai módszert is kidolgoztak az indol-alkaloidák mennyiségi meghatározására [55-60]. Ugyanakkor e nitrogén- és oxigéndonor atomokat tartalmazó molekulák koordinációs kémiai tulajdonságai ma még szinte teljesen felderítetlenek. Pedig az orvosi és biokémiai szakirodalomban számos szerző utal arra, hogy e molekulák biológiai aktivitása komplexképző fémionok (kalcium, magnézium, cink) jelenlétében megváltozik. Kimutatták, hogy a vinkrisztin és a vinblasztin inhibiálja a TTP-áz enzim kalcium-transzportját [61]. Néhány vinkrisztinre rezisztens leukémia sejtben meglepően nagy kalciumkoncentrációt mutattak ki [62], ugyanezekben a sejtekben kalcium-antagonisták megnövelték a vinkrisztin fölhalmozódását [63].

Magnéziumionok hatására a tubulin - az agyban található fehérje - vinblasztin-indukált önasszociációjának megnövekedését mutatták ki [64], ugyanakkor a tubulin cinkionok indukálta asszociációjának tanulmányozásakor azt tapasztalták, hogy ezt a vinblasztin inhibiálja, és az inhibíciós hatás függ a közeg magnéziumion-koncentrációjától [65].

A fönti adatok azt mutatják, hogy a vinkrisztin és a vinblasztin "in vivo" fémionfüggő folyamatokban vesz részt. E folyamatok mélyebb megismeréséhez minden bizonnyal szükséges lenne a két bisz-indol alkaloida fémionkoordinációs sajátságának pontos ismerete is.

A vinkrisztin és a vinblasztin "in vitro" tanulmányo-

zása során megállapították, hogy e vegyületek vizes oldatai igen bomlékonyak [2], emiatt porampullában kerülnek forgalomba, és vizes oldatukat közvetlenül a felhasználás előtt készítik el. Ugyanakkor ekvivalens mennyiségű kalcium-, magnézium- vagy cinksók hozzáadásával stabil injekciós oldatot sikerült előállítani [66]. Mivel a bioligandumok fémkomplexei általában kevésbé hajlamosak a hidrolitikus bomlásra, mint a szabad ligandumok [67], kézenfekvő volt az a föltételezés, hogy komplexképződés okozza a látványos stabilitásnövekedést.

Polarográfiás módszerrel sikerült is bebizonyítani, hogy a cinkionok nagy stabilitású komplexet képeznek a vinkrisztinnel és a vinblasztinnal, azonban a ligandumok elektródfelületi adszorpciójának viasszaszorításához alkalmazott nagy ionerősség (10 mol dm^{-3}) hatására az elektródreakció oly mértékben irreverzibilissé vált, hogy a képződő komplex stabilitási állandóját nem lehetett meghatározni. Kiszorításos módszerrel az is bizonyítást nyert, hogy a cink több nagyságrenddel stabilabb komplexet képez a vinkrisztinnel, mint a kalcium vagy a magnézium [68, 69].

Mivel a polarográfiás módszer a fenti rendszerekre csak kvalitatív információkat adott, pH-metriás és kalciumion-szelektív membránelektrodos méréseket terveztünk, hogy megállapítsuk a képződő komplexek egyensúlyi állandóit és hogy e rendszereket minél sokoldalubban jellemezz-

zük. Vizsgálatainkat kiterjesztettük a vindolinra és katarantinra is, mivel e vegyületek szerkezetileg igen hasonlóak a vinkrisztin és a vinblasztin indol- ill. indolin-vázis molekularészleteihez, lehetőséget adva a bisz-indol alkaloidok protonálódási folyamatainak alaposabb megismerésére illetve a fémion-koordinációs helyének pontosabb behatárolására.

4.2. A kísérleti eredmények ismertetése, diszkusszió

A ligandumok pH-metriás titrálási görbéi alapján a két különböző ionerősségen ($0,15 \text{ mol dm}^{-3}$ ill. $1,0 \text{ mol dm}^{-3}$) meghatározott protonálódási állandókat, amelyek a vegyületek tercier-nitrogén donoratomjaihoz rendelhetők, a 4. táblázatban mutatjuk be. (Az egyszer protonált vinblasztin és magasabb ionerősségen a deprotonált katarantin kivált az oldatból, ezért az e folyamatokhoz tartozó protonálódási állandókat nem tudtuk meghatározni.)

Mint a táblázat adataiból kitűnik, a vindolin protonálódási állandója a vinkrisztin és a vinblasztin savanyubb protonálódási állandóihoz áll közel, míg a katarantiné a vinkrisztin bázikusabb protonálódási állandójához. Ennek alapján föltételezhető, hogy fiziológiás pH-n a vinkrisztin és a vinblasztin vindolin-szerű részének donornitrogénje kvantitatíven deprotonált, míg a katarantin-szerű része pro-

4. táblázat

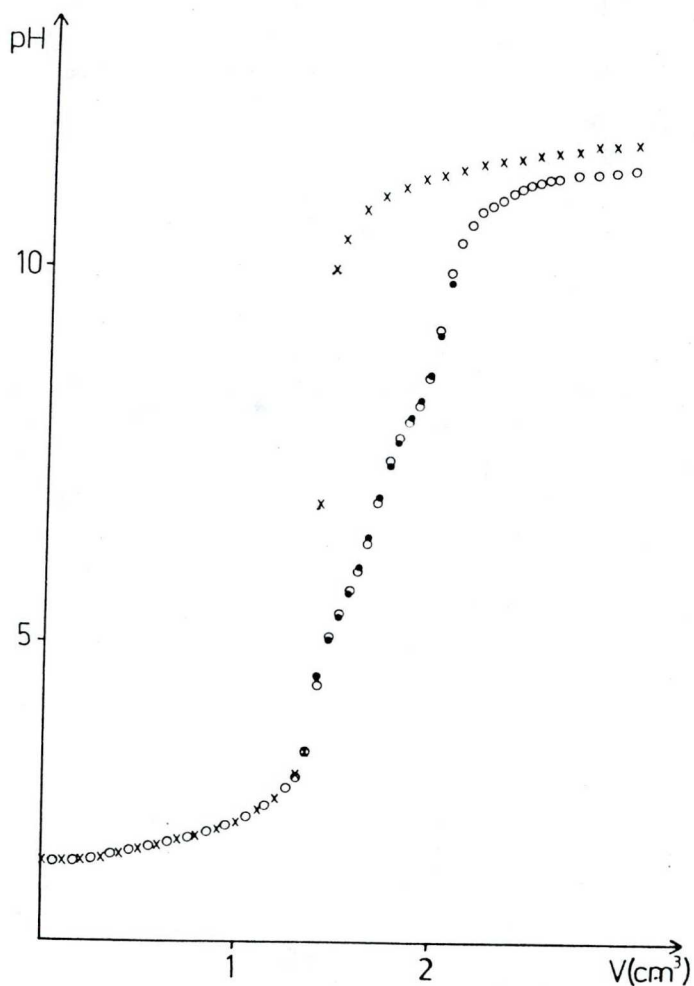
A vinkrisztin, vinblasztin, vindolin és katarantin protonálódási állandói

	$I = 0,15 \text{ mol dm}^{-3}$		$I = 1,0 \text{ mol dm}^{-3}$	
	$\log K_1$	$\log K_2$	$\log K_1$	$\log K_2$
Vinkrisztin	8,10	5,50	8,5	5,75
Vinblasztin	-	5,7	-	-
Vindolin	-	6,08	-	6,19
Katarantin	7,40	-	-	-



tonált állapotú. Ez utóbbi adat összhangban áll azzal a feltételezéssel, mely szerint a bisz-indol alkaloidák ("in vivo") akkor képesek reverzibilis, kovalens kötést kialakítani a tubulinnal, ha a folyamatban a katarantin-szerű rész donornitrogénje protonált [70].

A Calvin-féle deprotonálódási vizsgálatok során a cinktartalmu rendszer esetében a cinket a ligandummal ekvivalens mennyiségben alkalmaztuk, mivel a polarográfiás mérések szerint a cinkkomplex nagy stabilitása miatt már 1:1 fém:ligandum arány esetén kvantitatív a komplexképződés. A kalcium- és magnéziumtartalmu rendszerekben viszont az ionerősség beállítására kalcium- ill. magnézium-nitrátot alkalmaztunk, így módon nagy fémionfelesleggel biztosítva a kvantitatív komplexképződést. A fémmentes ill. fémiontartalmu rendszerek titrálási görbéi közül néhányat az 5-6. ábrákon mutatunk be. A kalcium- és cinkion jelenlétében kapott titrálási görbék a mérési hiba határain belül megegyeztek a fémmentes alkaloidoldatok megfelelő görbéivel. Ez azt bizonyítja, hogy a cink- és a kalciumkomplex képződése pH-független folyamat. A magnéziumtartalmu rendszerekre kapott titrálási görbe kis, de még éppen szignifikáns eltérést mutat a fémion-mentes oldattal kapott analóg görbétől. Ennek alapján föltételezhető, hogy a magnéziumionok, ha ilyen nagy fölöslegben vannak, a pH-független komplexképzési folyamat mellett kisrészben pH-függő



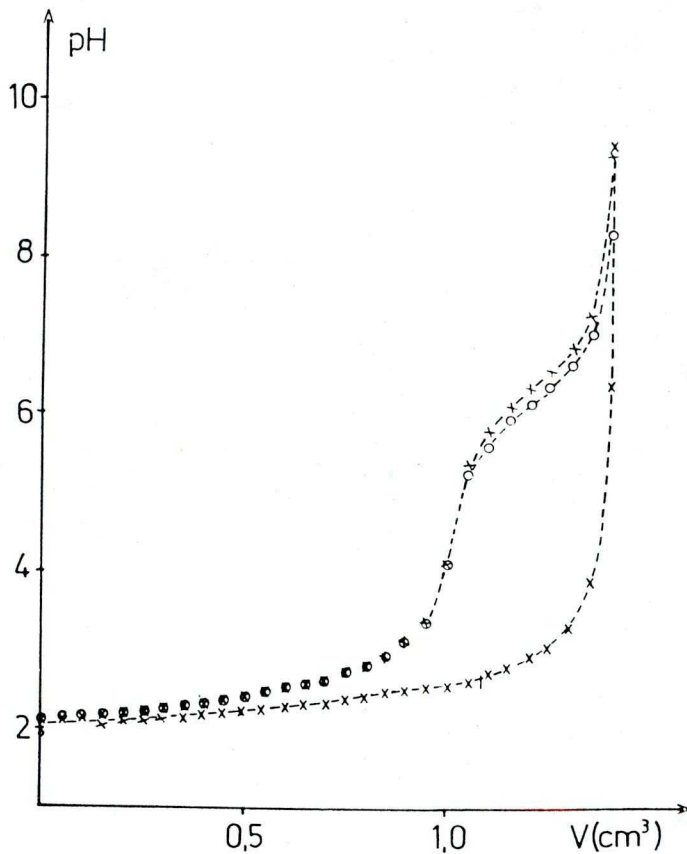
5. ábra. A vinkrisztin pH-metriás titrálási görbéje kalcium-ionok jelenlétében

x: $10 \text{ cm}^3 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3} \text{ HNO}_3$ -oldat titrálása $0,07410 \text{ mol dm}^{-3}$ oldattal

I = $1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaNO}_3$

o : a x $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ vinkrisztin jelenlétében

• : a o $0,33 \text{ mol dm}^{-3} \text{ Ca}(\text{NO}_3)_2$ jelenlétében



6. ábra. A vindolin pH-metriás titrálási görbéje magnézium-ionok jelenlétében

x: $10 \text{ cm}^3 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3} \text{ HNO}_3$ titrálása $0,07410 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaOH}$ -dal

I = $1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaNO}_3$

+ : $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ vindolin jelenlétében

o : + $0,33 \text{ mol dm}^{-3} \text{ Mg}(\text{NO}_3)_2$ jelenlétében

komplexxképződési folyamatban is részt vesznek. A két titrálási görbe közti kis különbség azonban a pH-függő folyamat alárendelt voltát mutatja.

E vizsgálatok tehát azt bizonyítják, hogy a bisz-indol alkaloidok cink-, kalcium- és magnéziumionokkal való komplexképződési folyamataiban a fémionok nem a ligandumok amino nitrogénatomjaihoz kapcsolódnak. (Ennek valószínűleg a bázisos nitrogének kedvezőtlen sztereokémiai elhelyezkedése az oka - ez a 7. ábrán bemutatott kalottamodell alapján is belátható.) A Calvin-féle titrálások ezért a komplexek stabilitására tájékoztatást nem nyújtottak.

A bisz-indol alkaloidok a két tercier amino-nitrogénen kívül oxigéndonor atomokat is tartalmaznak. Ezek a következők: két hidroxil, egy metoxil, egy acetoxil, két metilészter és a vinkrisztin esetében egy formil donoroxigén. Mivel ezek a tanulmányozott pH-tartományban nem protonálódnak, feltehető, hogy a fémionok pH-független komplexképzési folyamatban a felsorolt oxigéndonor atomok közül valamelyekhez kapcsolódnak. A vinkrisztin és vinblasztin vindolin-szerű részén egymáshoz közel helyezkedik el egy alkoholos hidroxil, egy metilészter és egy etilacetát csoport. Kézenfekvőnek tűnt annak feltételezése, hogy a fémionkoordináció e csoportok oxigénatomjain keresztül történik. ^1H NMR mérések alapján [69] a vinkrisztin, vinblasztin és vindolin ^1H NMR spektrumában a fönti csoportok rezonanciajelei fémionok

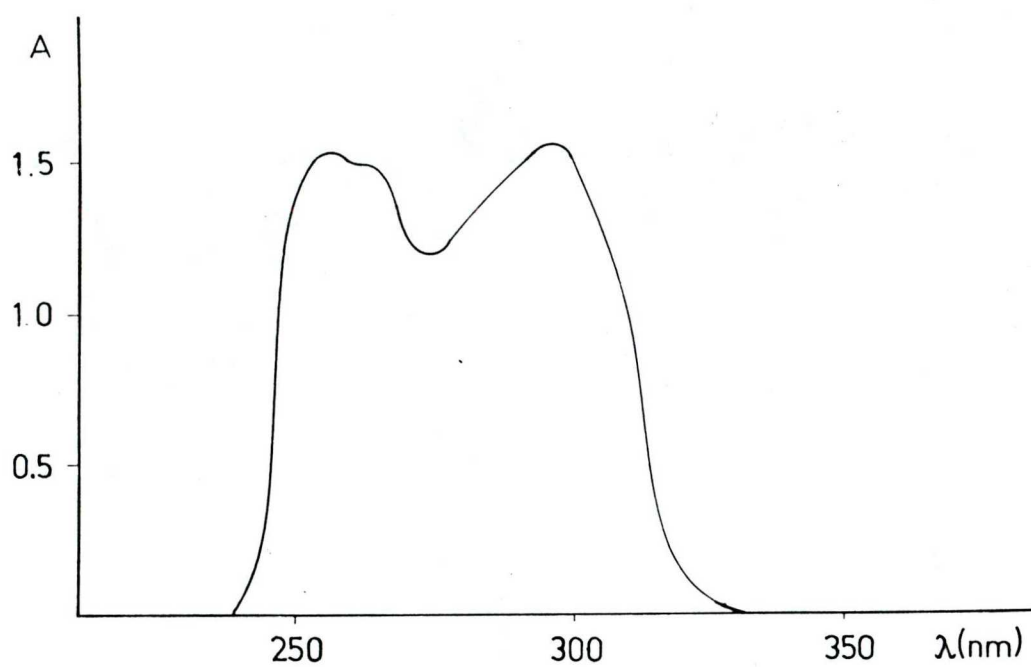


7. ábra A vinkrisztinmolekula kalottamodellje. A fehér gömbök a hidrogén-, a pirosak az oxigén-, a kékek a nitrogén-, a feketék a szénatomokat jelképezik. A terciér amino-nitrogén báziscentrumokat nyilakkal jelöltük meg. A fémionok föltehetően az ábra bal alsó részén látható térközeli helyzetben lévő oxigénatomokhoz koordinálódhatnak.

hatására eltolódtak, míg a többi jel változatlanul maradt, ami igazolni látszik a fönti elképzelést.

A kalciumion koordináció potenciometriás vizsgálatára irányuló előkísérletek során azt tapasztaltuk, hogy a potenciometriás mérésekhez szükséges nagy (10^{-3} mol dm $^{-3}$) vinkrisztin koncentrációju rendszerekben a kalciumionok hatására csapadék vált ki az oldatból. Mivel a vinkrisztin szulfát-só formában állt rendelkezésünkre, felmerült az a gondolat, hogy a kivált csapadék kalcium-szulfát. A csapadékot az oldatból centrifugálással eltávolítva és a felülusztó spektrofotometriásan analizálva azt találtuk, hogy a csapadékképződés során az oldat vinkrisztin-koncentrációja a felére csökkent. Ezt követően elvégeztük a csapadék teljes analizisét. A vinkrisztintartalmat spektrofotometriásan határoztuk meg. A molekula UV spektrumát a 8. ábra szemlélteti. Az analizishez a 296 nm hullámhossznál mért fényelnyelést használtuk. A 9. ábrán a vinkrisztin spektrofotometriás mérésének lineáris kalibráció görbáját mutatjuk be. A szulfátionokat Zimmermann-módszerrel ugyancsak spektrofotometriásan, a kalciumtartalmat atomabszorpciós módszerrel mértük. A desztillált vízzel kimosott és vákuumexikkátorban foszforpentoxid fölött 20 órán át szárított csapadék összetétele $\text{CaV}(\text{SO}_4)_2$ -nek adódott, ahol V jelenti a kétszer protonált vinkrisztin molekulát.

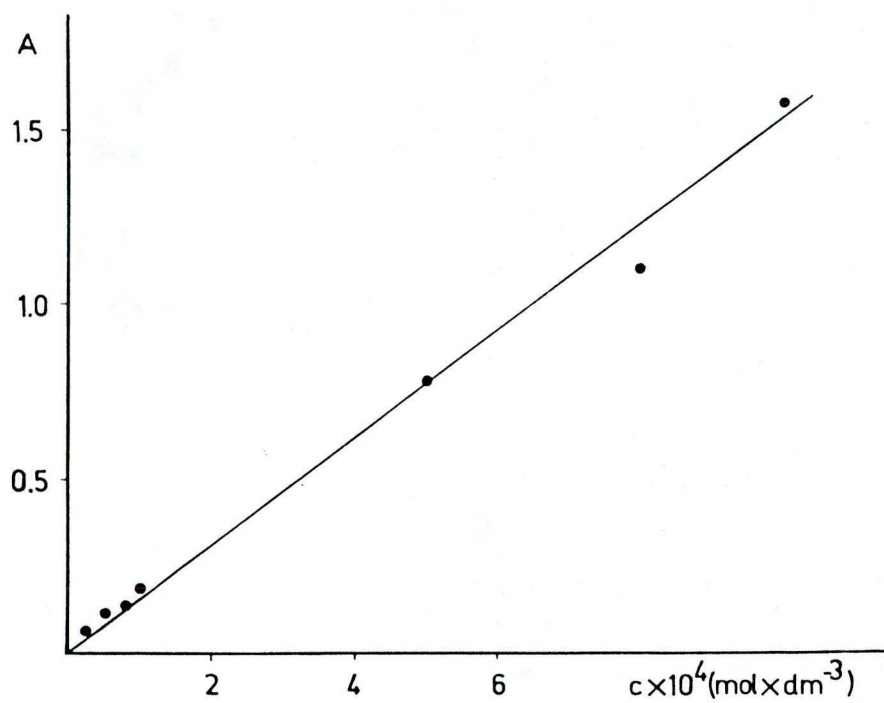
A továbbiakban föltételeztük, hogy a csapadékként ki-



8. ábra. A vinkrisztin UV spektruma

($l = 0,1 \text{ cm}$, $c = 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$)





9. ábra. A vinkrisztin abszorbanciájának függése az alkaloida koncentrációtól ($\lambda = 296 \text{ nm}$, $d = 0,1 \text{ cm}$)

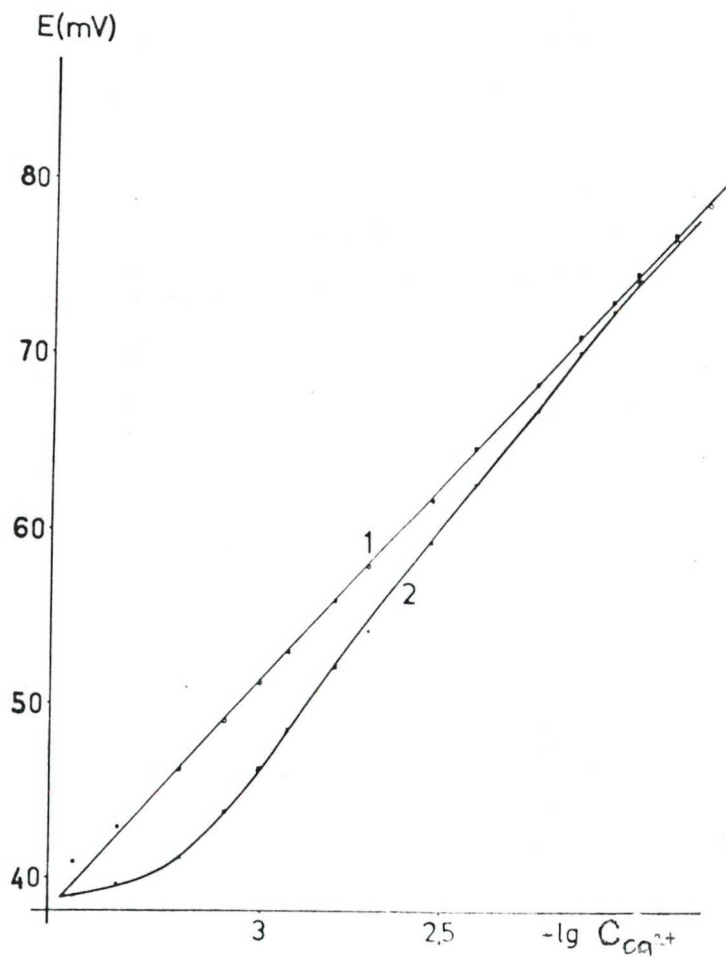
váló komplex rossz vizoldékonysága a nagy SO_4^{2-} -tartalom eredménye, az azt követő kísérleteinkben az összes szulfát só formájában rendelkezésre álló ligandumban a szulfátionokat klorid- ill. nitrátionokra cseréltük. Ilyen körülmények között kalciumos titrálás során az oldatokból csapadékkiválást nem tapasztaltunk.

Az előkísérletek másik fontos tanulsága, hogy $0,15 \text{ mol dm}^{-3}$ ionerősség mellett a vinkrisztin az elektródfelületet kismértékben mérgezte, az e mérgezést okozó vinkrisztin adszorpció azonban az oldat ionerősségének növelésével csökkenthető volt, és 1 mol dm^{-3} ionerősség mellett elhanyagolhatóan kis értékűvé vált.

A fenti tapasztalatok alapján a titrálások során $10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ koncentrációju szulfátmentesített vinkrisztinoldatot titráltunk meg $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ Ca}(\text{NO}_3)_2$ mérőoldattal $1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaNO}_3$ ionerősség mellett, $\text{pH} = 5,5$ -en. Az így kapott titrálási görbét a hozzátartozó kalibrációs egyenessel együtt a 10. ábrán mutatjuk be. A mérési adatokból kiszámítottuk a kalcium-vinkrisztin rendszer Bjerrum-féle komplexképződési függvényét (11. ábra), amelyről leolvasható, hogy a vizsgált koncentráció-tartományban egy vinkrisztinmolekula egy kalciumiont koordinál

$$\log K = 3,27 \pm 0,1$$

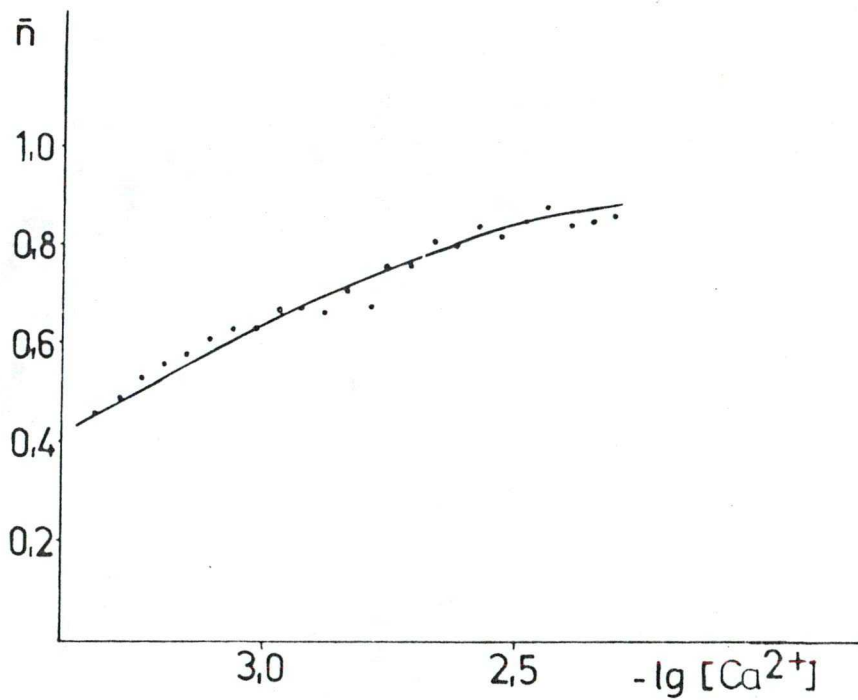
egyensúlyi állandóval.



10. ábra. A vinkrisztin titrálása kalciumszelektív membrán-elektrod mellett

1. kalibrációs egyenes

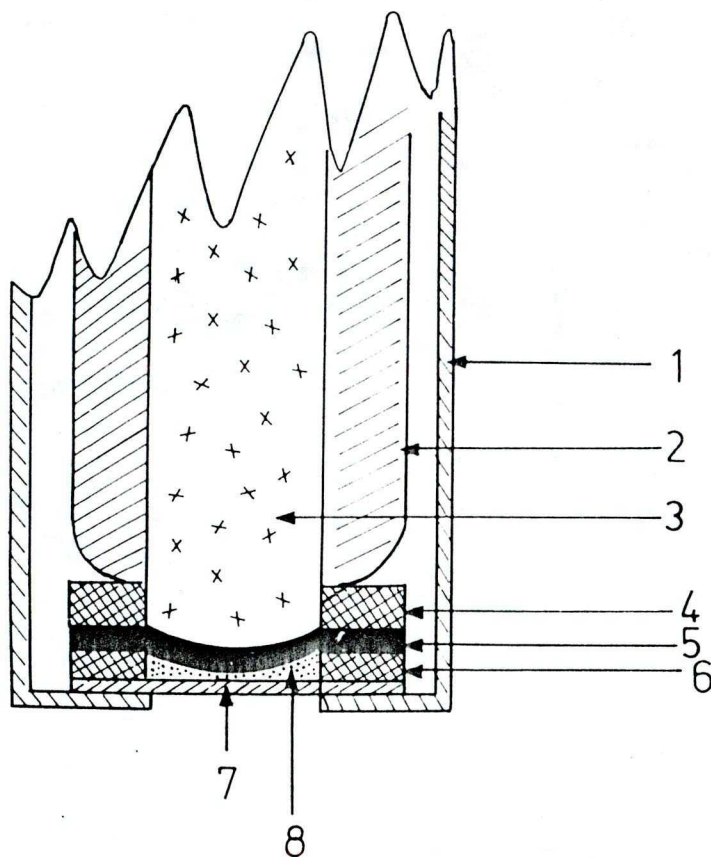
2. 10^{-3} mol dm^{-3} vinkrisztin titrálási görbéje



11. ábra. A kalcium-vinkrisztin rendszer Bjerrum-féle komplexképződési függvénye. A pontok a kísérletileg talált, a folytonos vonal a számított értékeket jelenti.

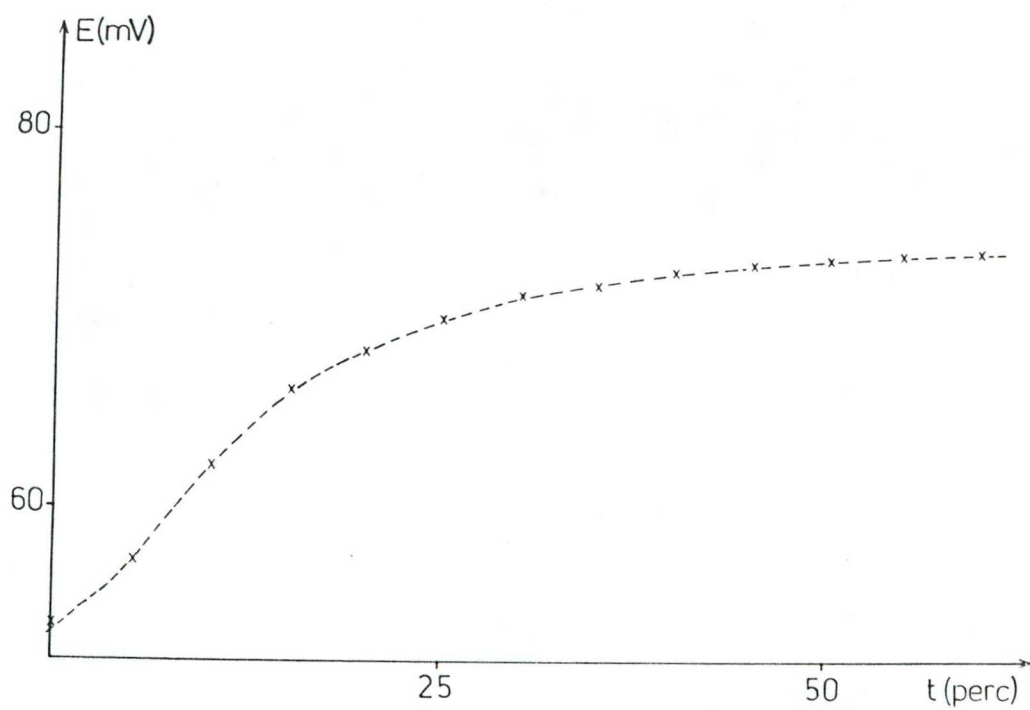
Sajnos, a vinblasztin, vindolin és a katarantin elektród-felületi adszorpcióját 1 mol dm^{-3} ionerősség alkalmazásával sem lehetett kiküszöbölni. Ezért e vizsgálatainknál az elektród felületét "Amicon"-Diaflo UM-05 típusu dializismembránnal fedtük be, ez a kereskedelmi forgalomban beszerezhető legkisebb pórusátmérőjű membrán. A gyári előiratok szerinti előkezelés után a membrán az 500 D-nál nagyobb molekulatömegű molekulák számára áthatolhatatlan, így a 909-es relatív molekulatömegű vinblasztin nem juthat át az elektród felületére, míg a kalciumion igen.* A dializismembránnal fedett kalciumszelektív membránelektrodot a 12. ábrán mutatjuk be. E berendezéssel a titrálást igen erős keverés mellett kellett végezni, így is jelentékeny időre volt szükség a kalciumion koncentráció kiegyenlítődéséhez a dializismembrán két oldalán. E folyamat időfüggését a 13. ábra mutatja, amelyből kiderül, hogy egy-egy mérési pontban az egyensúly beállításához 60-70 percre volt szükség. Sajnos, e berendezéssel nem lehetett a méréseinknél általánosan használt két kalibrációs egyenest (az egyiket a mérés előtt, a másikat a mérés után) az érdemi titrálással azonos napon megszerkeszteni. Ezért a titrálást megelőző és az követő napokon kapott pontok átlagát használtuk a mérések értékelésénél. Az így nyert kalibráló egyenest és a hozzátartozó titrálási görbét a 14. ábrán mutatjuk be. A fenti vizsgálatok -----

*A vindolin és a katarantin esetében, kisebb molekulatömegük miatt e módszer nem volt alkalmazható.

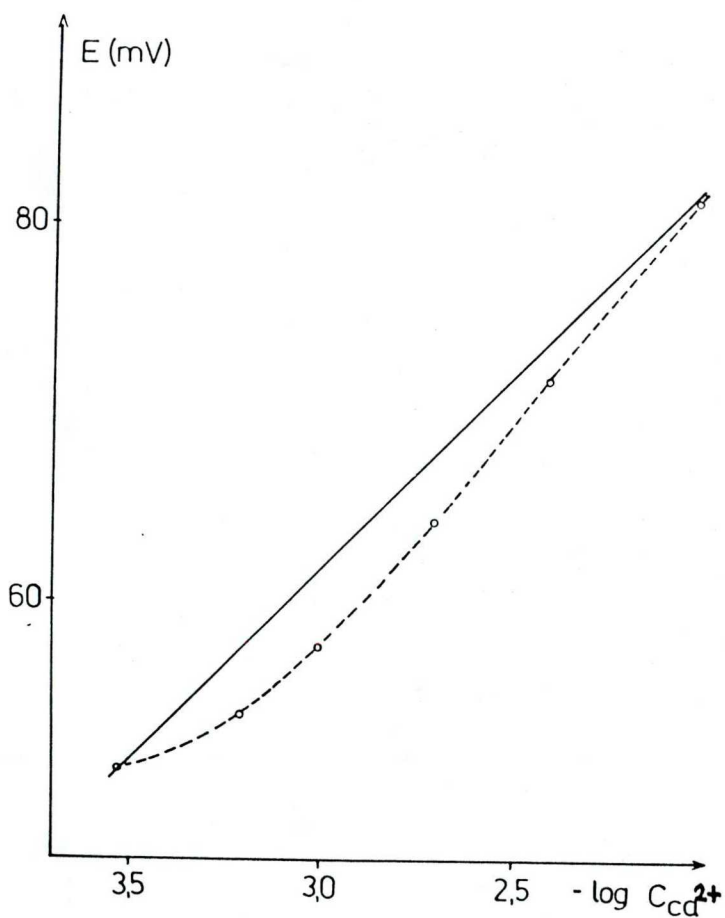


12. ábra. Dializismembránnal fedett kalciumszelektív membrán-elektród keresztmetszeti rajza

1. elektródfej
2. elektródtest
3. belső referens oldat ($0,01 \text{ mol dm}^{-3} \text{ CaCl}_2$)
- 4., 6. tömitőgyűrűk
5. kalciumion-szelektív membrán
7. Diaflo - UM-05 dializismembrán
8. közvetítőfolyadék



13. ábra. Dializismembránnal fedett kalciumszelektív membránelektród válaszjelének időfüggése



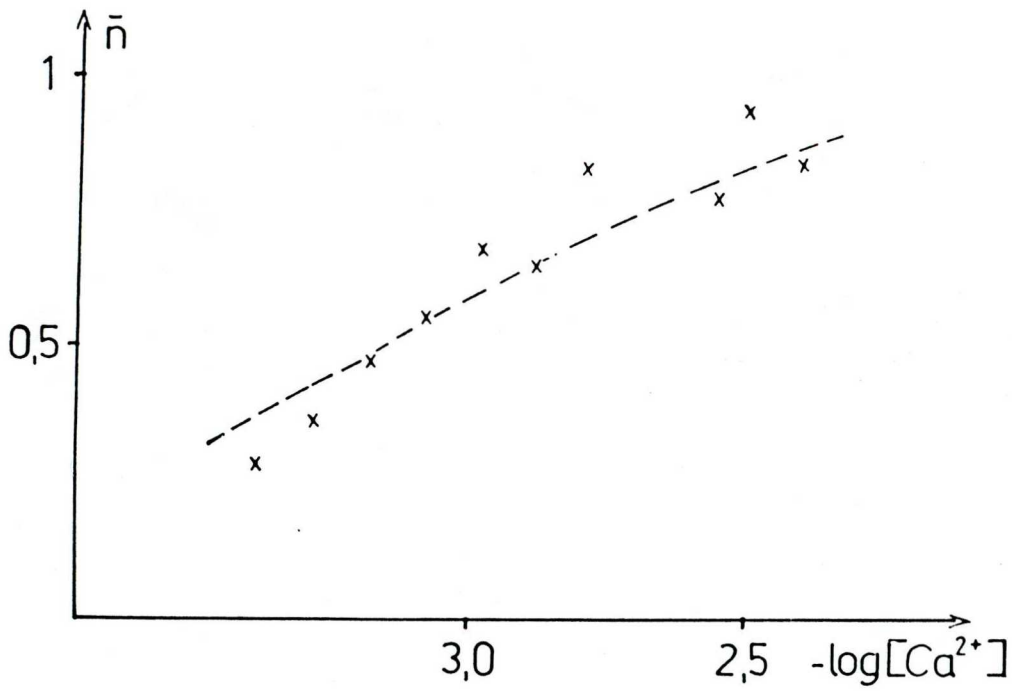
14. ábra. A vinblasztin titrálása dializismembránnal fedett kalciumion-szelektív membránelektród mellett

- kalibrációs egyenes

o $10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ vinblasztin titrálási görbéje

a kalcium-vinkrisztin rendszerhez hasonlóan a kalcium-vinblasztin rendszerben is 1:1 fém:ligandum összetételű komplex képződését mutatta (15. ábra). A mérési adatokból számított egyensúlyi állandó értéke ($\log K = 3,2 \pm 0,2$) is egybeesett a vinkrisztin komplex stabilitási állandójával. Ez azt mutatja, hogy a vinblasztint a vinkrisztintől megkülönböztető metilszubsztituens sem a komplex összetételében, sem annak stabilitásában nem okozott változást. Ezzel együtt az előzőekben vázolt kísérleti nehézségek miatt az egyensúlyi állandó hibája a vinblasztin komplex esetében esetleg jóval nagyobb is lehet a vinkrisztinnél, ez a kalcium-vinblasztin rendszer komplexképződési függvényéből is kiderül. Így a kalcium-vinblasztin-komplexre kapott egyensúlyi állandó csak tájékoztató jellegű adatnak tekinthető.

A vinkrisztin és vinblasztin terápiás dózisának (10 mg/ampulla), a kalcium-komplexek stabilitási állandóinak, valamint a vér egyensúlyi kalcium-koncentrációjának ismeretében belátható, hogy a vinkrisztin és a vinblasztin mintegy 75 %-ban kalcium-komplexe formájában van jelen a vérben. Ez utóbbi adat is arra utal, hogy a fémionkoordináció jelentős szerepet játszhat a főnti gyógyhatású anyagok biológiai aktivitásában.



15. ábra. A kalcium-vinblasztin rendszer Bjerrum-féle komplexképződési függvénye

x : kísérletileg talált adatok

--- : számított függvény

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Dolgozatomban két biológiailag aktív vegyületcsalád néhány képviselőjének protonálódási ill. kalcium- és magnéziumion-koordinációs egyensúlyi adatait mutatom be.

A γ -karboxi-glutaminsav (GLA) fontos szerepet játszik a K-vitamin-dependens véralvadási faktorok kalciumion-koordinációjában.

Munkám során pH-metriás módszerrel meghatároztam a GLA és néhány származékának protonálódási makro- ill. mikroállandóit. A protonálódási mikroállandók alapján megadtam a különféleképpen protonált donorcsoportoknak a szomszéd csoportokra kifejtett hatását. A különböző független protonálódási utvonalakat gráfokkal szemléltetve meghatároztam az egyes utvonalak valószínűségeit.

Meghatároztam a különféleképpen protonált ligandumok és komplexképző fémionok (kalcium, magnézium) közötti kölcsönhatás egyensúlyi állandóit és a proton helyét a komplexben. Az egyensúlyi állandók alapján következtetéseket vonok le az "in vivo" képződő fémkomplexek szerkezetére vonatkozóan is.

A vinkrisztin, vinblasztin bisz-indol-alkaloidok, a vér-rák kemoterápiájában nyernek alkalmazást. E vegyületek tiszta vizes oldatai bomlékonyak, azonban komplexképző fémionok (kalcium, magnézium, cink) jelenlétében hosszú ideig bom-

lás nélkül eltarthatók. Munkám során Calvin-féle titrálási módszerrel bebizonyítottam, hogy a fémion-alkaloida kölcsönhatás nem a bázikus nitrogénatomokon, hanem a bejárt pH-tartományban nem protonálódó donorcsoportokon megy végbe. Kalciumion-szelektív elektród alkalmazásával meghatároztam a vinkrisztin és a vinblasztin kalciumkomplexének egyensúlyi állandóját, és ennek alapján valószínűsítettem a fémion kötési helyét a komplexben.

6. IRODALOM

- [1] Burger K., Sipos P., Véber M., Horváth I., Noszál B., Lőw M.: Inorg. Chim. Acta, közlésre elfogadva
- [2] 'U.S.A. Pharmacopeia XX (USPXX)', United States Pharmacopeia Convention Inc., 12601 Twinbrook Parkway, Rockwille, Md. 20852, 1980.
- [3] J. Siemroth, J. Marika, P. Hartmann: NDK Szabadalom 146 101, 1981.
- [4] J. Stenflo, P. Fernlund, W. Egan, P. Roepstorff: Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 71, 2730 (1974)
- [5] G. W. Amphlett, R. Byrne, F. J. Castellino: J. Biol. Chem., 253, 6774 (1978)
- [6] T. K. Lim, V. A. Bloomfield, G. L. Nelsesteuen: Biochem. 16, 9 (1977)
- [7] G. L. Nelsesteuen: J. Biol. Chem., 251, 5648 (1976)
- [8] S. P. Bajaj, R. J. Butkowski, K. G. Mann: J. Biol. Chem., 250, 2150 (1975)
- [9] D. L. Enfield, L. H. Ericsson, K. A. Walsh, H. Neurath, K. Titani: Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 72, 16 (1975)
- [10] T. Morita, B. S. Isaacs, C. T. Esmon, A. E. Johnson: J. Biol. Chem., 259, 5698 (1984)
- [11] T. Sugo, I. Björk, A. Holmgren, J. Stenflo: J. Biol. Chem., 259, 5705 (1984)
- [12] S. P. Bajaj, P. A. Price, W. A. Russel: J. Biol. Chem., 257, 3726 (1982)

- [13] S. F. Wright, C. D. Bounre, R. A. Hoke, K. A. Koehler, R. G. Hiskey: Anal. Biochem., 139, 82 (1984)
- [14] S. F. Wright, P. Berkowitz, D. W. Deerfield, II, P. A. Byrd, D. L. Olson, R. S. Larson, G. C. Hinn, K. A. Koehler, L. G. Pedersen, R. G. Hiskey: J. Biol. Chem., 261, 10598 (1986)
- [15] G. B. Sherrill, D. L. Straight, R. G. Hiskey, H. R. Roberts, H. J. Griffith: Biochem. Biophys. Res. Comm., 124, 256 (1984)
- [16] D. L. Straight, G. B. Sherrill, C. M. Noyes, H. G. Trapp, S. F. Wright, H. R. Roberts, R. G. Hiskey, M. J. Griffith: J. Biol. Chem., 260, 2890 (1985)
- [17] E. W. Davie, D. J. Hanahan: "The Plasma Proteins" (Putnam, F. W., ed.) 3, 421 (1977)
- [18] C. M. Jackson, Y. Nemerson: Ann. Rev. Biochem., 49, 765 (1980)
- [19] Y. Nemerson, B. Furie: CRC Crit. Rev. Biochem., 9, 45 (1980)
- [20] J. W. Suttie: CRC Crit. Rev. Biochem., 8, 191 (1980)
- [21] J. W. Suttie, C. M. Jackson: Physiol. Rev., 57, 1 (1977)
- [22] J. Stenflo, J. W. Suttie: Ann. Rev. Biochem., 46, 157 (1977)
- [23] J. P. Burnier, M. Borowski, B. C. Furie, B. Furie: Mol. Cell. Biochem., 39, 191 (1981)
- [24] W. Märki, R. Schwyzer: Helv. Chim. Acta, 58, 1471 (1975)

- [25] W. Märki, M. Oppliger, R. Schwyzer: *Helv. Chim. Acta*, 60, 807 (1977).
- [26] R. Sperling, B. C. Furie, M. Blumenstein, B. Keyt, B. Furie: *J. Biol. Chem.*, 253, 3898 (1978)
- [27] P. Robertson, K. A. Koehler, R. G. Hiskey: *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 86, 265 (1979)
- [28] P. Robertson, R. G. Hiskey, K. A. Koehler: *J. Biol. Chem.*, 253, 5880 (1978)
- [29] B. C. Furie, M. Blumenstein, B. Furie: *J. Biol. Chem.*, 254, 12521 (1979)
- [30] A. Zell, H. Einspahr, C. E. Bugg: *Biochem.*, 24, 533 (1985)
- [31] G. A. Long, R. G. Hiskey, L. G. Pedersen: *J. Mol. Struct.*, 108, 173 (1984)
- [32] M. M. Sarashua, M. E. Scott, J. A. Helpern, P. B. W. Ten Kortenaar, N. T. Boggs III., L. G. Pedersen, K. A. Koehler, R. G. Hiskey: *J. Am. Chem. Soc.*, 102, 3404 (1980)
- [33] R. B. Martin: *J. Phys. Chem.*, 75, 2657 (1971)
- [34] D. L. Rabenstein, T. L. Sayer: *Anal. Chem.*, 48, 1141 (1976)
- [35] C. A. Evans, R. Guevremont, D. L. Rabenstein: "Complexes of Aspartic Acid and Glutamic Acid", "Metal Ions in Biological Systems" (Sigel, H., ed.) Vol. 9., 48. o., M. Dekker, New York, Basel, 1985.

- [36] R. B. Martin: "Antibiotics and Their Complexes", "Metal Ions in Biological Systems", Vol. 19., 19. o., M. Dekker, New York, Basel, 1985.
- [37] Critical Stability Constants, A. E. Martin, R. M. Smith, ed., Plenum, New York, 1977
- [38] L. Ebert: Z. Phys. Chem., 121, 385 (1926)
- [39] Noszál B., Sándor P.: közlés alatt
- [40] R. L. Noble, C. T. Beer, J. H. Cutts: Ann. N. Y. Acad. Sci., 76, 882 (1958)
- [41] G. H. Svoboda, A. J. Barnes, Jr., R. J. Armstrong: USA Szabadalom 3 205 220, 1965.
- [42] N. Neuss, M. Gorman, W. Hargrove, N. J. Cone, K. Biemann, G. Büchi, R. R. Manning: J. Am. Chem. Soc., 86, 1140 (1964)
- [43] I. S. Johnson, J. G. Armstrong, M. Gorman, J. P. Burnett: J. Cancer Res., 23, 1390 (1963)
- [44] W. W. Hargrove: USA Szabadalom 3 387 001, 1968.
- [45] G. H. Svoboda: USA Szabadalom 3 370 057, 1968.
- [46] W. I. Taylor: "The Vinca Alkaloids", "The Alkaloids" (Manske, H., ed.) Vol 11., 102 o., Academic Press, New York, London, 1968.
- [47] G. A. Cordell, J. E. Saxton: "Bisindole Alkaloids", "The Alkaloids" (Manske, H. ed.) Vol. 20., 1. o., Academic Press, New York, London, 1981.

- [48] G. H. Svoboda, I. S. Johnson, M. Gorman, N. Neuss: J. Pharm. Sci., 51, 707 (1962)
- [49] N. Neuss, M. Gorman, H. E. Boar, N. J. Coan: J. Am. Chem. Soc. 84, 1509 (1962)
- [50] E. Wenkert, D. W. Cochran, E. W. Hagaman, F. M. Schell, N. Neuss, A. S. Katner, P. Potier, C. Kan, M. Plat, M. Koch, H. Mehri, J. Poison, N. Kunesch, Y. Rolland: J. Am. Chem. Soc., 95, 4990 (1973)
- [51] E. Wenkert, E. W. Hagaman, B. Lal, G. A. Gutowski, A. S. Kotner, J. C. Miller, N. Neuss: Helv. Chim. Acta, 58, 1560 (1975)
- [52] D. E. Dorman, J. W. Paschal: Org. Magn. Res., 8, 413 (1976)
- [53] N. Langlois, F. Gueritte, Y. Langlois, P. Potier: J. Am. Chem. Soc., 98, 4504 (1968)
- [54] J. P. Kutney, D. E. Gregoris, P. Imhat, I. Hoh, E. Jahngen, A. J. Scott, N. K. Chan: J. Am. Chem. Soc., 97, 5013 (1975)
- [55] E. Temizer: Talanta, 33, 791 (1986)
- [56] M. DeSmet, S. J. P. van Belle, G. A. Storme, D. L. Massart: J. Chromatogr., 345, 309 (1985)
- [57] R. T. Sane, V. B. Nayak, V. B. Malkar, M. L. Kubal: Indian Drugs, 22, 89 (1984)
- [58] W. Hoffmann, K. H. Kubecska, F. C. Czigan: Z. Naturforsch. C: Biosci., 38, 201 (1983)

- [59] P. Horváth, G. Iványi: Acta Pharm. Hung., 52, 150 (1982)
- [60] T. Daldrup, F. Susanto, P. Michalke: Fresenius' Z. Anal. Chem., 308, 413 (1981)
- [61] K. Gietzen, A. Wuetrich, H. Bader: Mol. Pharmacol., 22, 413, (1982)
- [62] T. Tsuruo, H. Iida, H. Kawabata, S. Tsukagashi, Y. Sakurai: Cancer Res., 44, 5095 (1984)
- [63] T. Tsuruo, H. Iida, S. Tsukagashi, Y. Sakurai: Cancer Res., 142, 4730 (1982)
- [64] G. C. Na, S. N. Timasheff: Biochem., 25, 6222 (1986)
- [65] A. Bannerjee, S. Roychowdhury, B. Battarcharyya: Biochem. Biophys. Res. Comm., 105, 1503 (1982)
- [66] Takácsi-Nagy G., Szepesi G., Gazdag M., Pap L., Burger K.: Magyar Szabadalom, 18 589, 1984.
- [67] Burger K.: "Protonation and Complexation of Macromolecular Polypeptides: Corticotropin Fragments and Basic Trypsin Inhibitor", "Metal Ions in Biological Systems" (Sigel, H., ed.) Vol. 9., 213. o., Marcel Dekker, New York, Basel, 1979.
- [68] Burger K., Véber M., Sipos P., Galbács Z., Horváth I., Szepesi G., Takácsi-Nagy G., J. Siemroth: Inorg. Chim. Acta, 124, 175 (1986)
- [69] Véber M., Sipos P., Szepesi G., Burger K.: Coll. Abstr. of XXIVth ICCC, Athene, 1986.
- [70] P. Potier, Pure & Appl. Chem., 58, 737 (1986)

Köszönetet mondok Dr. BURGER KÁLMÁN tanszékvezető egyetemi tanárnak, a kémiai tudomány doktorának, hogy lehetővé tette számomra a kutatócsoport munkájába történő bekapcsolódást, hogy figyelmemet a témára irányította és értékes szakmai tanácsaival segítette előrehaladásomat.

Köszönettel tartozom Dr. VÉBER MARGIT tudományos munkatársnak, aki munkámat hosszú időn át közvetlenül irányította és bevezetett az analitikai laboratóriumok műhelytitkaiba.

Külön köszönöm feleségemnek és munkatársamnak, SIPOSNÉ NAGY GABRIELLÁNAK az értékes szakmai vitákat és a kutatómunkához nélkülözhetetlen kiegyensúlyozott családi háttér biztosítását.

Hálával gondolok Dr. NOSZÁL BÉLÁRA a kémiai tudomány kandidátusára, aki a protonálódási mikrofolyamatok jelentőségére fölhivt a figyelmemet, tanácsaiért és észrevételeiért.

E helyen szeretnék köszönetet mondani SIMON ERNŐNÉNEK és MÓZSIK ÉVÁNAK a dolgozat igényes és gondos gépeléséért, NAGY FERENCNÉNEK pedig a dolgozat ábraanyagának elkészítéséért.

Végül megköszönöm a JATE Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék valamennyi dolgozójának, hogy segítséget nyújtottak a munkám során adódó részfeladatok megoldásához.