

FOLYÉKONY AMMÓNIÁBAN FÉMNÁTRIUMMAL MEGVALÓSÍTOTT
REAKCIÓK MENNYISÉGI VIZSGÁLATA

EGYETEMI DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Lukács Ferenc

JATE

Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék
Szeged, 1989.

I.

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	1. oldal
2. IRODALOM	4. oldal
2.1. Ammóniás fémoldatok irodalmának rövid áttekintése	4. oldal
2.2. A nátriumos redukció peptidkémiai alkalmazása a védett oxitocin vé- dőcsoport-hasítási reakcióinak tükrében	7. oldal
2.3. Fémnátriumos redukciós reakciók protonforrást is tartalmazó ammóniaoldatban	11. oldal
3. KISÉRLETI RÉSZ	17. oldal
3.1. Felhasznált anyagok	17. oldal
3.2. A mérőberendezés	18. oldal
3.3. A mérés menete	20. oldal
3.4. A folyadékkromatográfiás mérő- berendezés	22. oldal
3.5. A folyadékkromatográfiás méré- sek kivitelezése	23. oldal

II.

4. KISÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	28. oldal
4.1. A modellvegyületek vizsgálata	28. oldal
4.2. A védett oxitocin titrálása	45. oldal
4.3. Az oxitocin szintézis optima- lizálása	51. oldal
5. ÖSSZEFOGLALÁS	65. oldal
6. IRODALOMJEGYZÉK	68. oldal

1. BEVEZETÉS

Különböző védőcsoportok (benzil típusu és tozil) eltávolítására a peptidkémiaiban több évtizede használják a fémnátriumot redukálószerként cseppfolyós ammóniában. Ezzel a módszerrel sikerült megvalósítani többek között 1935-ben a karnozin, 1936-ban a glutation, 1954-ben az oxitocin, 1957-ben a lizin- és arginin vazopresszin szintézisét [1]. Az elmúlt évtizedek alatt nélkülözhetetlenné vált ez az eljárás a cisztein egységet tartalmazó peptidek szintézisében [1]. A reakció menete, sztöchiometriája csak részben ismert, ezért mindmáig sokéves tapasztalatra épülő empirikus előiratok alapján alkalmazzák. A folyamatok pontosabb megismerése céljából a reakciók kvantitatív követésére alkalmas összetett módszert (elektrokémiai-HPLC) dolgoztunk ki. Elsődleges célunk - egy ipari-
lag is fontos eljárás - a védett oxitocein védőcsoport lehasítási reakcióinak kvantitatív vizsgálata volt. Az oxitocin méhösszehúzó és tejelválasztó hatásu, biológiailag aktív peptid.

A védett oxitocein molekula összetett volta miatt, kémiai reakcióinak megértéséhez néhány modellvegyület vizsgálatából indultunk ki. A triglicin és az N-védett-triglicin vizsgálatával a peptidkötések viselkedését tanulmányoztuk a redukció során. A benzil-oxi-karbonil vé-

dőcsoport-hasítási lehetőségeit a benzil-benzoát, míg a molekulához tioéter kötéssel kapcsolódó benzilcsoportok redukciós reakcióit az etil-S-benzil-tioglikolát (ESBT) nátriumos redukciója útján vizsgáltuk. Savamidcsoport redukciós lehetőségeit védett aszparaginin tanulmányoztuk.

Irodalmi előzmények alapján [1-4] feltételezhető volt, hogy a redukciós folyamatok lejátszódásában a rendszer savasságának szerepe van. A szerep mikéntje nem tisztázott [1]. A redukálandó molekulában lévő protonforrás deprotonálódása mellékreakciót okozhat. Ezért feltételezhető, hogy a külső protonforrás a védőcsoport-hasítási reakciókkal párhuzamosan fellépő mellékreakciókat visszaszorítja. Megfelelő tulajdonságai miatt a védett oxitocin redukciós reakciójában protonforrásként karbamidot választottunk, amely folyékony ammóniában gyenge sav ($pK_a = 12,9$ [5, 6]).

Tanulmányoztuk a karbamid savamidok redukciójára gyakorolt hatását is, összevetve az irodalomban már ismert, metanol adalék jelenlétében végzett kísérletekkel [1, 4].

Munkánk másik célja az oxitocin előállítás optimalizálása volt.

A védett oxitocin fémnátriummal folyékony ammóniában történő védőcsoport-hasítási reakciója során

az oxitocin nátriumsója képződik, mely vízben hidrolizál oxitocinné és nátrium-hidroxiddá.

Az oxitocin vizes oldatban enyhe oxidációs hatásra alakul oxitocinná.

Ezért egyrészt tanulmányoztuk a védett oxitocin → oxitocin redukciós reakció lejátszódását különböző kísérleti feltételek mellett. Így vizsgáltuk a védett oxitocin koncentrációjának, az adagolt karbamidnak, a hőmérsékletnek, a nátrium adagolásmódjának a hatását a fenti reakcióra.

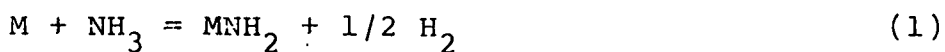
Másrészt tanulmányoztuk az oxitocin → oxitocin oxidációs reakció kísérleti körülményeit. Ennek során vizsgáltuk a vizes oxitocin oldat pH-jának, különböző oxidálószer alkalmazásának, az [oxigén]/[oxitocin] arálynak és az oxitocin oldat koncentrációjának a folyamatra gyakorolt hatását.

2. IRODALOM

2.1. Ammóniás fémoldatok irodalmának rövid áttekintése

Weyl több mint száz évvel ezelőtt írta le a nátrium és kálium cseppfolyós ammóniás oldatát [7]. Seely pár évvel később kimutatta, hogy a nátriumot változatlanul visszanyerjük, ha az oldószert elpárologtatjuk [8]. Tekintélyes számú kísérlet elvégzése után Kraus 1908-ban arra a következtetésre jutott, hogy az alkálifémek ammóniás oldata szolvatált kationokat és szolvatált elektronokat tartalmaz [9]. A következő évtizedekben főleg preparatív szempontból volt nagy az érdeklődés az oldat iránt. Az utóbbi 30 évben a kutatás az oldat sajátságainak feltárására is irányult.

Jolly az 50-es évek végén kimutatta, hogy azok a fémek oldódnak jól folyékony ammóniában, amelyek vizes közegben a legnegatívabb redoxipotenciállal rendelkeznek [10]. A kapott oldatok viszonylag stabilak. Ha tiszta oldószert és készüléket használunk, az oldatot pedig megfelelően hűtjük a bomlás mértéke napi 0,1 % alatt tartható [2]. A fém és az oldószer között lejátszódó reakcióra (1)

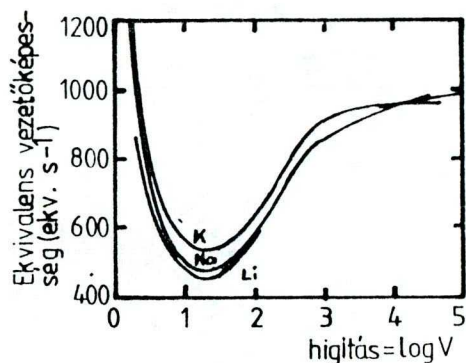


sok anyagnak van katalitikus hatása. Ezek közül a legismertebb és a fém-amid előállításánál legelterjedtebben használt katalizátorok az átmenetifémek és vegyületeik (pl. a platinázott-platina, FeCl_3 , stb.).

Tanulmányozták a nátrium és folyékony ammónia közötti reakció kinetikáját is, és mivel különböző reakcióedényekben különböző sebességi állandókat nyertek, a reakciót falkatalizáltnak tekintették [11].

A hig oldatok (bármelyik fém oldatáról legyen szó) kék színűek, míg a töményebbek bronz színűek. Ez azt jelenti, hogy az oldott fém minőségétől függetlenül az oldatok szerkezete hasonló. A hig oldatok paramágnesesek, míg a koncentráltak diamágnesesek [2, 12, 13]. A hig oldatok vezetőképessége 5-10-szer nagyobb mint a szervetlen sók vizes oldatáé. Végtelen higitásu oldatból kiindulva a koncentrációt növelve a vezetőképesség csökken és $\sim 0,04 \text{ mol dm}^{-3}$ koncentrációnál minimumot ér el (1. ábra). Ez aggregációs folyamatok lejátszódására utal. A koncentráció további növelésével a vezetőképesség tovább növekszik és fémekre jellemző értéket ér el. (Pl. a telített litiumoldatnak nagyobb a vezetőképessége mint a fémhiganynak szobahőmérsékleten [13]).

A fémek folyékony ammóniával mint oldószerrel készült oldatait két redukáló tulajdonságu anyaggal jellemezhetjük: a szolvatált elektronnal (e_s^-), és a fém-



1. ábra Ammóniás fémoldatok ekvivalens vezetőképessége $-33,5^{\circ}\text{C}$ -on. V = ammóniaoldat térfogata (dm^3), mely 1 mól fémet tartalmaz (a [2] irodalomból átvéve)

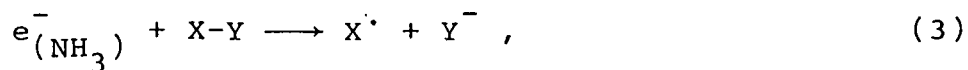
-anionokkal (M^-). Híg oldatokban ($C < 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) szolvatált elektron van jelen [2, 3, 12, 13, 14]. Tömény oldatokban ($C > 1 \cdot 10^{-1} \text{ mol dm}^{-3}$) az elektronpár képződés teljesnek tekinthető [13], másszóval M^- jelenlétével kell számolni [14].

A rendszerrel számos redukciós reakció kivitelezhető, melyeket három fő típusba sorolhatjuk:

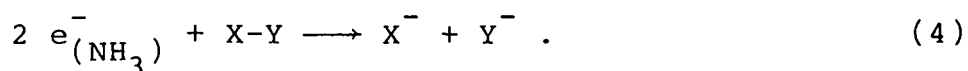
1. elektronaddíció kötéshasadás nélkül



2. kötéshasadás egy elektron addíciójával



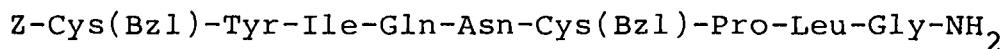
3. kötéshasadás két elektron addíciójával



A képződött Brönsted bázisok ammonolizist is szenvedhetnek [2].

2.2. A nátriumos redukció peptidkémiai alkalmazása a védett oxitocin védőcsoport-hasítási reakcióinak tükrében

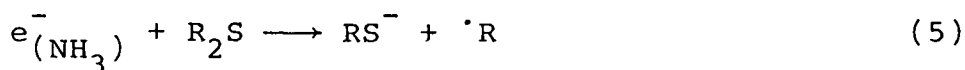
A peptidkémiaiában az 1930-as évektől használják a fémnátriumos redukciót cseppfolyós ammóniában benzil típusu és tozil védőcsoportok eltávolítására [1]. Az oxitocin szintézisét ezzel a módszerrel 1954-ben sikerült megvalósítani. A védett oxitocin két benzil (Bzl) és egy benzil-oxi-karbonil (Z) védőcsoportot tartalmaz:



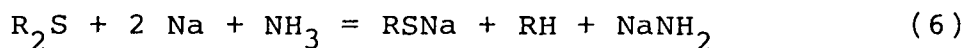
A szintézisek során cisztein egység legrégebbi és még ma is általánosan használt védési módja a benzil-csoport beépítés, melynek eltávolítására nátriumos re-

dukciót használnak [1, 15, 16]. Vizsgálták az elektrolitikus redukció lehetőségét néhány modellvegyületen és a védett oxitoceinen is [17]. A modellvegyületekről nem, illetve csak részben tudták eltávolítani a benzilcsoportot. A védett oxitocein elektrolitikus redukciós termékének biológiai aktivitása megegyezett a nátriumos redukcióval nyert mintáéval, a módszer azonban szélesebb körben mégsem terjedt el.

Megfigyelték, hogy szerves szulfidok a következőképpen reagálnak szolvatált elektronnal [2]:

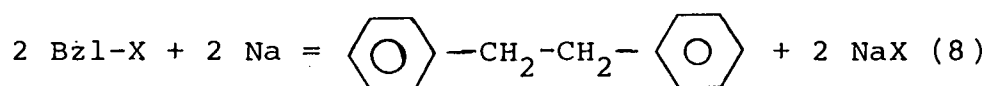
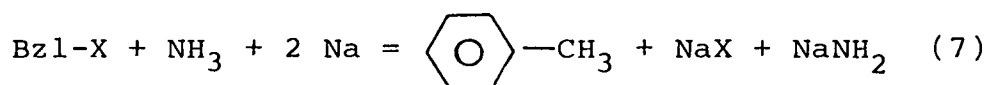


Az alifás szulfidok redukciójához szükséges nátrium mennyiségét pontosan meghatározták és az, ellentétben az előző (5) egyenletben leírtakkal, 2 mól Na/mólnak adódott. Figyelembe véve nátrium-amid képződését is a reakció folyamán, a reakcióegyenletet a következőképpen írták fel [18]:



A merkapto funkció védésére használt benzilcsoport eltávolításához szükséges nátrium pontos mennyisége nem ismert. A reakció végpontjának az elegy kék színének

megmaradását tartották, ez nyilvánvalóan a nátrium feleslegbe kerülésekor észlelhető. A képet bonyolította az a megfigyelés, hogy a benzilcsoport hasítása kétféle uton mehet végbe [19, 20, 21, 22]. Két mól nátrium hatására toluol, egy mól nátriuméra difenil-etán keletkezik:



A kétféle reakció arányát meghatározó tényezők nem ismeretesek.

Az amidképződés visszaszorítására néhány esetben a redukciós reakciót protonforrás jelenlétében valósították meg. Rudinger erre a célra oxitocin analógok szintézise során karbamidot használt [23]. Később N-tozilcsoport redukciójának teljessé tételére szintén karbamid használatát javasolta [24].

A védett oxitocein másik védőcsoportja az N-benzil-oxi-karbonil-csoport redukciója során is toluol és difenil-etán képződik. A sztöchiometria meghatározására modellkísérleteket végeztek [22]. Néhány benzil-oxi-karbonil-csoportot tartalmazó kis peptidet különböző molarányokig reagáltattak nátriummal. Megállapították, hogy kö-

zelítőleg 2 ekvivalens nátrium szükséges a Z csoport lehasítására (összhangban a régebbi megfigyeléssel [25, 26]). A pontos sztöchiometria függ a képződő difenil-etán és toluol arányától, a peptid koncentrációtól és a védett vegyület szerkezetétől, de ennek meghatározásával nem foglalkoztak.

A nátriumos redukció népszerűsége akkor csökkent, mikor a tozilcsoporttal védett ACTH-szegmensek hasításánál a polipeptidlánc meghatározott részein a Gly-Lys-Pro-szekvencia táján kötéshasadást észleltek [27]. Ezt követően a kritikus peptidkötéseket tartalmazó vegyületek egész sorát vizsgálták és megállapították, hogy gondosan vizmentesített ammónia használatakor e bomlás nagy mértékben viasszasoritható [15]. Későbbi vizsgálatok arra mutattak, hogy a kötéshasadás nem korlátozódik a Lys-Pro-peptidkötésre. A Thr-Pro-kötés részleges hasadását is megfigyelték a félszintetikus és szintetikus inzulin előállítása során [28-30]. Katsoyannis szerint e mellékreakció elmarad ha a redukciót nagy mennyiségű NaNH_2 jelenlétében végezzük [28, 29]. A javaslat erősen vitatható, mert a Na-NH_2 a Lys-Pro-kötést biztosan nem stabilizálja [31]. A redukciót az ammóniás nátriumoldat peptidoldatához való csepegtetésével oldották meg a helyi nátriumfellesleg elkerülésére [29]. Szisztematikus vizsgálatokkal megállapították, hogy a peptidkötés hasadása független a

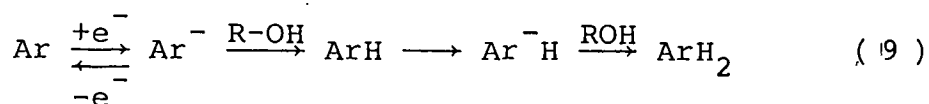
molekulán lévő protondonor komponensek számától és a Thr-Pro-kötés hasadása csökkenthető a nátrium mennyiségének és a kezelés időtartamának optimálásával [32].

A mellékreakciók elkerülésére a nátrium óvatos adagolásával próbálkoztak. Ennek egy érdekes megoldását találjuk Nesvadba [33] munkájában. Az ammóniás peptid-oldatot gömblombikban forralták. A lombikra metanol-szárazjég eleggyel hűtött visszafolyós hűtőt szereltek. A lombik szájára épített tálcán helyezték el a nátriumot. A hűtőből visszacsepegő ammónia oldotta a nátrium egy részét, így a nátrium finom adagolását sikerült megoldani, de a mennyiségi bemérés nehezen kivitelezhető.

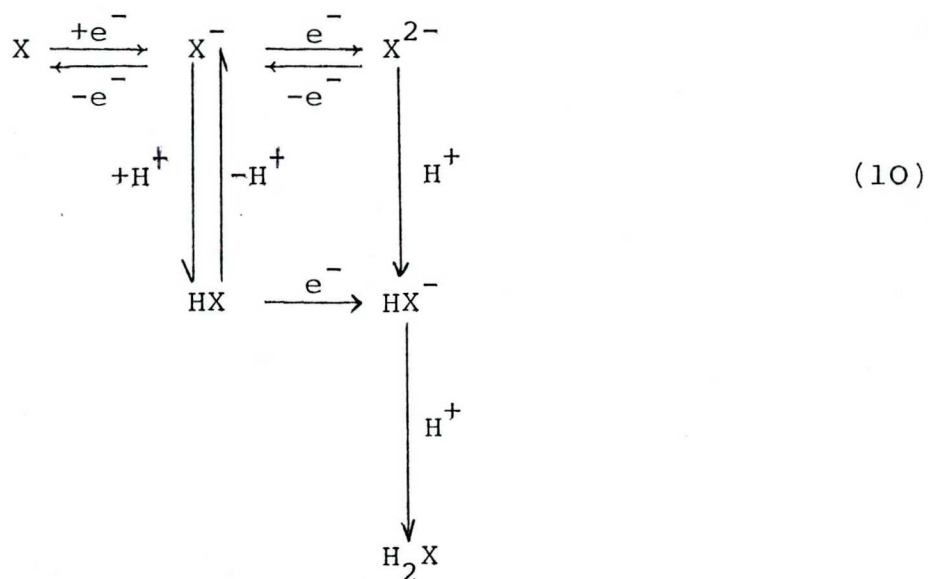
2.3. Fémnátriumos redukciós reakciók protonforrást is tartalmazó ammóniaoldatban

Megfigyelték, hogy sok redukciós reakció csak akkor játszódik le, ha a reakcióelegy protondonor komponenseket (Brönsted savakat) is tartalmaz [2, 3]. Így például a benzol folyékony ammóniában nem reagál észrevehető mértékben fémnátriummal. Alkohol jelenlétében a redukció lejátszódik, 1,4-ciklohexadién keletkezik.

A reakciót a következő egyenlettel irták le [3]:



E reakciók lejátszódását az ammóniában gyenge savként viselkedő vegyületek pufferoló hatásával magyarázzák. Egy X vegyület redukciója H_2X vegyületté a következő mechanizmussal írható le [2]:

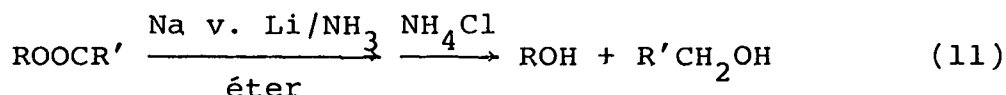


A legtöbb esetben X^{2-} termodinamikailag instabil, ezért gyakorlatilag ezen a köztiterméken keresztül nem játszódik le reakció. A HX/X^- arány függ az oldat pH-jától. Protonforrás hiányában az oldat pH-ja gyorsan nő és a reakció lelassul. Azaz (kivéve ha a HX nagyon gyenge sav) a HX koncentráció annyira lecsökken, hogy a reakció gyakorlatilag megáll. Protonforrás, savi erősségétől függően, az oldatot pufferolja. Ha az oldathoz adott sav megfelelően erős, a HX/X^- arány nagy lesz és a reakció folyamatosan haladhat.

Protonforrásként erős sav (pl. ammóniumsó) nem használható, mivel a gyors reakcióban hidrogén fejlődés közben reagál a redukáló fémmeel [3]. Pufferoló anyagként megfelelően gyenge savat célszerű választani, mint a már említett alkoholokat ($pK_a \sim 16-18$ [3]).

A protonforrás jelenléte nemcsak a fenti reakciók teljessé tételére szolgál, hanem egyes esetekben új reakcióutakat nyit meg.

Nátriumos vagy litiumos redukcióval folyékony ammóniában az észterek járulékos protonforrás távollétében alkohollá redukálódnak [34]:



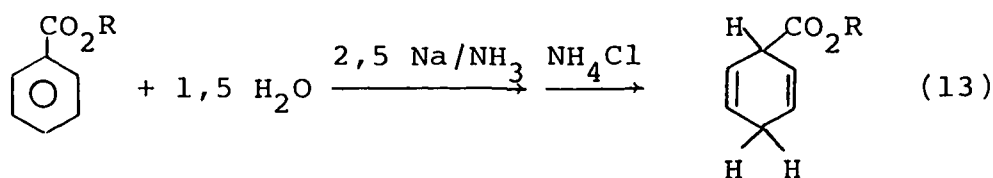
Például hexil-benzoáttól 6 ekvivalens litiummal 2 óra reakcióidő elteltével és a fém feleslegét NH_4Cl -al elbontva a termékben 84 % hexanolt találtak.

Kharasch etil-benzoát nátriumos redukciója során a következő jelenséget figyelte meg:



1e

Az észterek redukcióját viz, mint protonforrás jelenlétében végezve, alkil-benzoátok esetén a kiindulási vegyület 1,4-dihidro-komponense lett a termék [35]:



R = Et, t-Bu

A protonforrás szerepét azzal magyarázzák, hogy az a reakció első lépésében keletkező anion gyököt protonálja. Protonforrás nélkül a gyökök rekombinálnának (összhangban Kharasch eredményével).

Ezen kísérletek fontos eredménye, hogy az elektronaddíció gyorsabban játszódik le, mint a nátrium reakciója a protonforrással.

A polinukleáris aromás rendszerek protonforrás jelenlétében végrehajtott nátriumos redukciója hasonló eredményre, az azomás rendszer redukciójára vezetett [35, 36].

Aromás gyűrű redukciója játszódtott le benzonitril, O-metoxi-benzonitril, N,N-dimetil-benzamid esetében is [37]. (Protonforrásként t-butil-alkoholt használtak.)

A módszert telített és telítetlen ketonok redukálására is alkalmazták, vizsgálták sztereokémiai vonatkozásait is [3, 38].

Savamidokat reagáltatva folyékony ammóniában oldott fémnátrium reagenssel főleg só képződik, és ezzel párhuzamosan a $-\text{CONH}_2$ -csoport redukciója is lejátszódik alkohol képződése közben [1, 3, 4, 22]. A redukció nem megy teljesen végbe. A redukált termék mennyisége független az alkalmazott Na feleslegtől és a kezelés időtartamától. Amennyiben ezt a reakciót protonforrás jelenlétében hajtjuk végre teljessé tehető a redukció [4].

A védőcsoport-hasítási reakciók protonforrás jelenlétében való kivitelezésére csak néhány példát találtunk az irodalomban [1, 23, 24], melyet az előző fejezetben említettünk.

A Z-Ala-Pro-OH Birch redukcióját MeOH jelenlétében vizsgálták és a peptidkötés teljes hasadását tapasztalták [39]. Mivel alifás harmadrendű amidok alkálifémekkel alkoholokká redukálhatók hexametil-fosforsav-triamidban [40], feltételezhetően a harmadrendű amidcsoport jelenlétének köszönhető az acil-prólin kötés érzékenysége.

Az irodalmi adatokat összefoglalva a következő megállapításokat tehetjük:

- hig nátrium - folyékony ammóniaoldatot használva a szolvatált elektron a redukáló tulajdonságú anyagfajta,

- a cisztein merkaptó csoportjának védésére használt benzilcsoport hasítását egy, illetve két elektronos mechanizmussal írják le, difenil-etán és toluol keletkezése közben, de a pontos sztöchiometria nem tisztázott,
- a benzil-oxi-karbonil csoport eltávolításához közelítőleg 2 ekvivalens nátrium szükséges,
- a redukciós reakciók lejátszódásában járulékos protonforrás szerepet játszik,
- az elektronaddíció egy aromás rendszerre gyorsabban játszódik le, mint a fém reakciója, a megfelelően választott protondonorral,
- a nátriumos redukció során (főleg prolin egyseget tartalmazó peptidek esetén) peptidkötés hasadás is előfordul, melynek mértéke a helyi nátriumfelesleg kiküszöbölésével csökkenthető.

A nátriumos redukció fontosságát a mai napig meglévő széleskörű alkalmazása bizonyítja [16, 41, 42].

3. KISÉRLETI RÉSZ

3.1. Felhasznált anyagok

A védett oxitocein, oxitocin, N-acetil-triglicin, triglicin, benzil-benzoát, etil-tioglikolát, etil-S-benzil-tioglikolát (ESBT), difenil-etán, N-terc(butil-oxi-karbonil)-L-aszparagin (Boc-Asn-OH), N-terc(butil-oxi-karbonil)-L-homoszerin-diciklohexil-amin só (Boc-Hse-OH.DCHA), N-terc-butil-oxi-karbonil-L-homoszerin-lakton (Boc-Hse[□]), N-terc-butil-oxi-karbonil-L-aszparaginsav-4-metil-észter-diciklohexil-amin só (Boc-Asn(OME)-OH.DCHA) mintákat a Kőbányai Gyógyszerárugyár (Budapest) bocsátotta rendelkezésünkre. Az oxitocin minta tényleges oxitocintartalmát spektrofotometriás uton határoztuk meg, SERVA p.a. tirozint használva a hitelesítéshez.

A tirozin- és az oxitocinminta fényelnyelését 263 nm-nél mérve az abszorbancia értékek alapján az oxitocinminta oxitocintartalma 84,9 %-nak adódott.

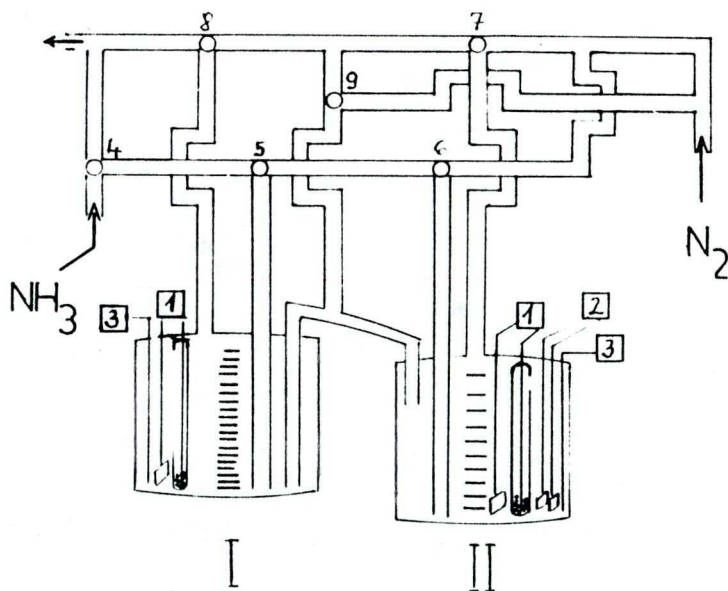
Az eluensek elkészítésénél alkalmazott oldószerek (acetonitril, metanol, 2-propanol) Merck (Darmstadt, NSZK) gyártmányúak, HPLC tisztaságúak voltak. Az eluensek és oldatok készítésénél kétszer desztillált, 10 µm pórusátmérőjű szűrőn szűrt vizet használtunk.

A mérések során alkalmazott ammóniát (Nitrokémia,

Pét) gázpalackból nyertük. A felhasznált egyéb vegyszerek Reanal (Budapest), Merck (Darmstadt, NSZK) és BDH (Poole, Anglia) gyártmányuak, a.l.t. minőségűek voltak.

3.2. A mérőberendezés

A folyékony ammóniában végrehajtott nátriumos redukció kvantitatív jellemzésére üvegkészüléket (2. ábra)



2. ábra Titráló berendezés a folyékony ammóniában fém-nátriummal kivitelezett redukciós reakciók kvantitatív követésére. I. buretta; II. mérőcella; 1. platina-referens elektródpár; 2. két platina elektród; 3. termisztor; 4-9. csapok



konstruáltunk, amelyben titrálásszerűen követtük a reakciókat. A mérés során az oldat hőmérsékletét, elektromos vezetőképességét és redoxipotenciálját regisztráltuk.

A 2. ábrán az I. jelzésű edény a tulajdonképpeni bűretta a II. jelzésű a mérőcella. Mindkét edényben mértük az oldatok hőmérsékletét. A bűrettában a redoxipotenciál mérésével ellenőriztük a nátriumoldat stabilitását. A mérőcellában a potenciál- és vezetőképességváltozást mértük, így a reakciókat kvantitatíven követtük.

A hőmérsékletmérést D 1216 típusú Digital Multiméterre (Norma Messtechnik, NSZK) kapcsolt termisztorral végeztük. A vezetőképesség mérésére OK-102/1 típusú konduktométerhez (Radelkis) csatlakozó két Pt-lemez elektród szolgáltat. A redoxipotenciál mérésére PHM 52b típusú Radiometer Digital pH Meterhez (Radiometer, Dánia) csatlakozó, házilag előállított Pt-lemez indikátorelektrodát és $\text{Ag/KCl}_{(\text{telített})}$ - $\text{AgCl}_{(\text{telített})}$ - $(\text{NH}_3\text{-oldatban})$ referens elektródot használtunk [43].

Mindkét edény osztással ellátott és kalibrált, így az oldat térfogata közvetlenül leolvasható volt. Az oldószer kondenzáltatását és az oldatok hűtését szárazjég-aceton hűtőeleggyel végeztük és a megfelelő hőmérsékletre N_2 -gáz átbuborékoltatásával állítottuk be.

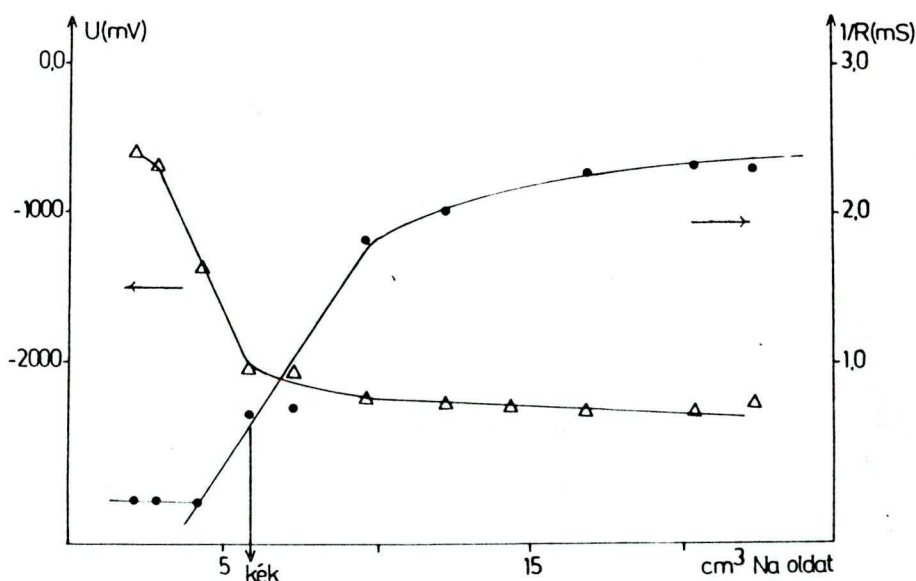
3.3. A mérés menete

A készüléket 403 K hőmérsékleten 3 órán keresztül szárítottuk. A méréseket szárított (CoCl_2 -al kevert aszkarit molekulaszűrőn majd NaOH-on átvezetett) nitrogén atmoszférában végeztük. A folyamatos N_2 gázáramlás az oldatok keverését is szolgálta. Az ammóniát nátriumról desztillálva tisztítottuk [2, 12, 13].

A titrálandó anyagot ($\sim 10^{-4}$ mól) a II. cellába mértük, majd megfelelő mennyiségű ammóniát kondenzáltunk rá. Ezt követően a bürettába (I. edény) kondenzáltunk ammóniát. Ebben oldottuk a méréshez használt fémnátriumot. A referens elektródokba az elektródfolyadék ammóniát ugyancsak kondenzáltatással vittük be. Mindkét cellában az oldat térfogatát további ammónia kondenzáltatással állítottuk be a kívánt térfogatra. Az oldatokat a titrálás megkezdése előtt 30 percen keresztül nitrogénnel kevertettük, ezt követően a titráló oldat alikvot részleteit nitrogéngázzal nyomtuk át a mérőcellába. Minden adagolás után mindkét oldat hőmérsékletét 228 K-re állítottuk be mielőtt leolvastuk volna a térfogatváltozásokat és a mérési adatokat.

A mérési adatok hibája minden esetben pozitív, ami a fémnátrium rendkívüli reakciókészségével magyarázható. Több órán át magas hőmérsékleten (200–500 °C) és vákuum-

ban szárított üvegedény is tartalmaz annyi redukálható nedvességet, amely ezt a hibát okozhatja [2, 12, 13]. Ezért megmértük kísérleti rendszerünk nátrium fogyasztását. A mérőedénybe kondenzált 50 cm^3 ammóniára $1,8 \cdot 10^{-4}$ - $2,1 \cdot 10^{-4}$ mól nátrium fogyott külön-külön kísérletekben. (A 3. ábrán egy, a fent leírt körülmények között felvett titrálási görbe látható.)



3. ábra Mérőberendezésünk nátriumfogyasztása. A titráló nátriumoldat koncentrációja: $0,04\text{ mol dm}^{-3}$; a rendszer nátriumfogyasztása:
- a műszeres végpontjelzésből számolva: $1,8 \cdot 10^{-4}$ mól
- az oldat kék színének megjelenéséből számolva: $2,5 \cdot 10^{-4}$ mól.

Figyelemre méltó, hogy a műszeres analitikai módszerek az oldat kék színének megjelenése előtt jelzik a reakció végpontját.

A nátriumos reakció után az ammóniát elpárologtattuk és a visszamaradt terméket megfelelő előkészítés után folyadékkromatográfiás vizsgálatoknak vetettük alá. A termékek koncentrációját kalibráló oldatok segítségével határoztuk meg.

A triglicin és az N-acetil-triglicin nátriummal való reakciójának termékét vízben oldottuk fel. Az oldat pH-ját perklórsavval $\text{pH} = 2,2$ -re, az ionerősséget a folyadékkromatográfiás analízishez nátrium-perkloráttal $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ -ra állítottuk be.

A benzil-benzoát és ESBT redukciós termékét metanolban, a Boc-Asn-OH redukciós termékét pedig $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ foszfát pufferben ($\text{pH} = 2,7$) oldottuk fel.

A védett oxitocin redukciós termékét vízben oldottuk, majd az oldat pH-ját és koncentrációját az oxitocin $\rightarrow$ oxitocin átalakulás kinetikai vizsgálatánál részletezett módon különböző értékekre állítottuk be.

3.4. A folyadékkromatográfiás mérőberendezés

A folyadékkromatográfiás vizsgálatokhoz LKB (LKB

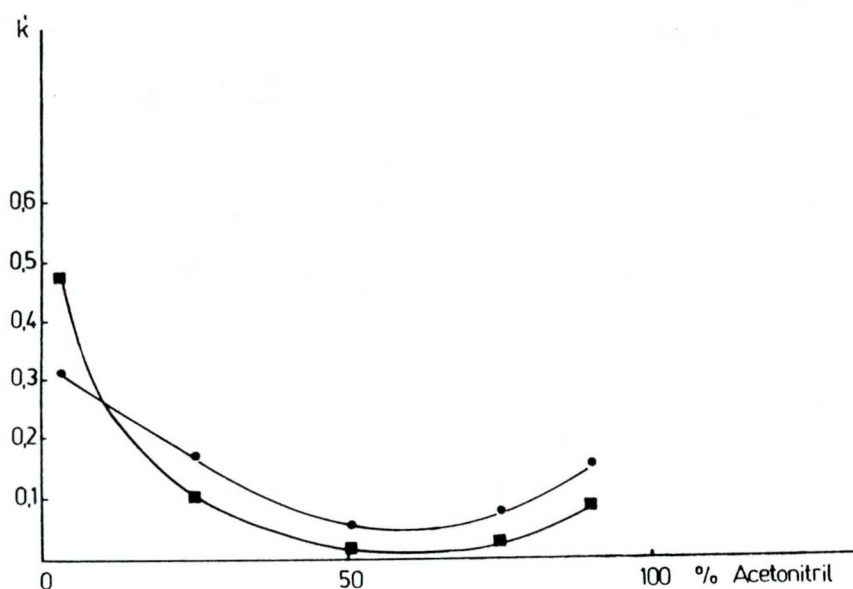
Bromma, Svédország) és Liquochrom OE 330 (Labor MIM, Budapest) típusu folyadékkromatográfokat használtunk. A kromatográfokhoz LKB Uvicord S és UV 308 detektorok csatlakoztak. Az adagoló Rheodyne típusu, 20 μ l ürtartalmu volt. A mérésekhez használt kolonna 250x4,6 mm I.D. méretű, 10 μ m szemcseátmérőjű Hypersyl ODS töltetű kolonna (Bioszeparációs GMK, Budapest) volt. Az oszlopon az eluensek áramlási sebessége minden esetben 0,8 cm^3/perc volt. Az oszlop holt térfogata $2,27 \pm 0,10 \text{ cm}^3$.

3.5. A folyadékkromatográfiás mérések kivitelezése

Az elektrokémiai (potenciometriás és vezetőképességi) mérések mellett a cseppfolyós ammóniában végrehajtott nátriumos redukció követésére legalkalmasabb módszernek a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia bizonyult. Ezért az egyes modellvegyületek vizsgálatához külön-külön eljárást dolgoztunk ki a kiindulási anyagok, közti- és végtermékek kromatográfiás meghatározására. A vizsgálatok eredményét a következőkben összegezzük.

A triglicin és az N-acetil-triglicin folyadékkromatográfiás analízise a molekulák hasonló polaritása és kis móltömege folytán nehéz feladat. Számos eluensrendszerrel próbáltunk ki, az általunk hatékonynak talált acetonitril - 0,01 mol dm^{-3} foszfát puffer (pH = 2,2)

rendszer, mely $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ nátrium-perklorátot tartalmazott, optimálását a 4. ábrán mutatjuk be.



4. ábra A triglicin (•) és az N-acetil-triglicin (■) kapacitásarányainak függése az eluens acetonitril tartalmától

Eluens: acetonitril - $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ foszfát puffer (pH = 2,2), $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ nátrium-perklorát

Jó elválasztást 3:97 arányu acetonitril-foszfát puffer összetételénél találtunk. A detektálás 220 nm-nél történt. Ilyen körülmények között a triglicin kapacitásaránya: $k' = 0,32$, az N-acetil-trigliciné: $k' = 0,48$ volt.

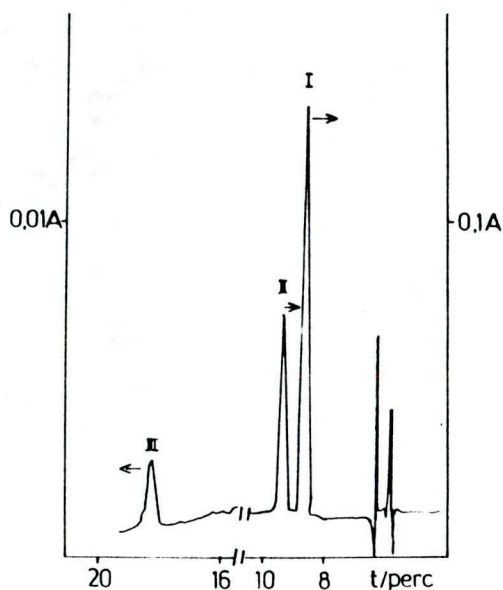
A benzil-benzoát és redukciós termékeinek (benzaldehyd, toluol, benzil-alkohol, benzoesav) valamint a difenil-etán analízisét metanol-viz eluensrendszerrel

tudtuk legjobban megvalósítani. Optimális eluensösszetételnek a 80:20 metanol-víz arány bizonyult, a detektálás 254 nm hullámhosszon történő fényabszorpció mérésével történt.

A kapacitás arányok: benzaldehid $k' = 0,84$; benzilalkohol $k' = 0,57$; benzoésav $k' = 0,19$; toluol $k' = 1,10$; difenil-etán $k' = 2.85$.

Boc-Asn-OH és redukciós termékeinek, Boc-Hse-OH, Boc-Hse- analízisének abból a megfontolásból indultunk ki, hogy általában az acetonitril szerves fázist tartalmazó eluensek hatékonyabbak a metanoltartalmuakénál. Az optimálás során az acetonitril : 0,01 mol dm⁻³ foszfát puffer (pH = 2,2) 15:85 arányú eluens, mely 0,1 mol dm⁻³ nátrium-perklorátot tartalmazott bizonyult a leghatékonyabbnak. A detektálás 220 nm-nél történt. Ilyen körülmények között a kapacitás arányok a következőképpen alakultak: Boc-Asn-OH $k' = 1,86$; Boc-Hse-OH $k' = 2,35$; Boc-Hse- $k' = 4,48$. Egy jellegzetes kromatogramot a 5. ábrán mutatunk be.

A Boc-Asn(OME)-OH-nak az előző eluensrendszerben a kapacitás aránya 7,0 volt. A molekula apolárosabb lévén a retenciós idő csökkentése érdekében növeltük a szerves fázis arányát. Az alkalmazott eluens acetonitril: 0,01 mol dm⁻³ foszfát puffer (pH = 2,2) 25:75 arányú elegye volt. Ilyen körülmények között a Boc-Asn(OME)-



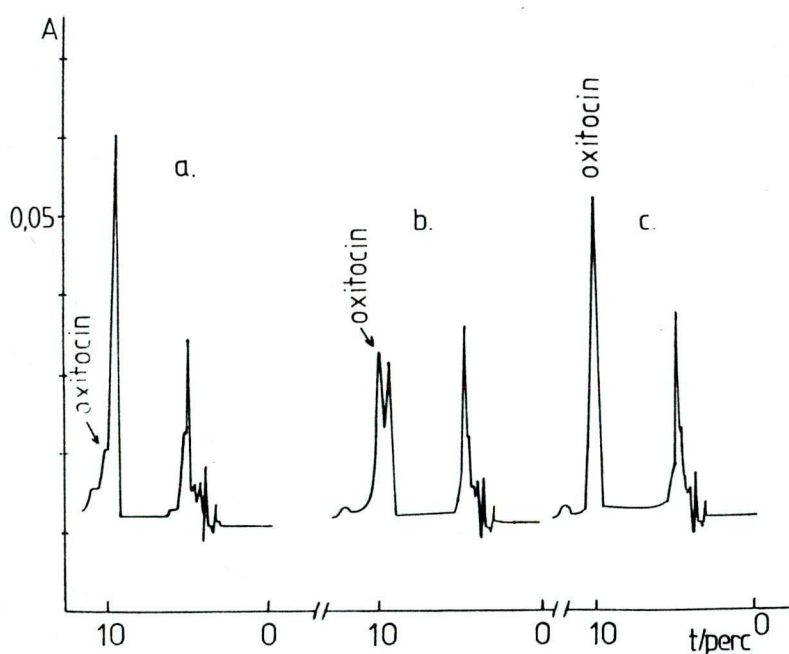
5. ábra A Boc-Asn-OH és redukciós termékeinek kromatogramja

I: Boc-Asn-OH; II: Boc-Hse-OH; III: Boc-Hse-

-OH kapacitás aránya: $k' = 2,51$.

Az oxitocin folyadékkromatográfiás analizisére számos példa van az irodalomban [44-61]. Vizsgálatainkhoz azonban nemcsak az oxitocin mérésére volt szükség, hanem az oxitocin-oxitocein együttes analizisét is meg kellett oldanunk, melyre egyetlen példát találtunk az irodalomban [52]. Az oxitocin analizisére általánosan használt rendszerek metanol, acetonitril szerves fázist, és vizes fázisként foszfát puffert, acetátot, trifluor-ecetsavat, ammónium-szulfátot, stb.

tartalmaztak. Többféle próbálkozás után, szem előtt tartva az oxitocin-oxitocein elválasztás igényét is, acetonitril - $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ foszfát puffer ($\text{pH} = 2,2$) 25:75 arányu elegye, mely $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ nátrium-perklorátot tartalmazott, bizonyult a legalkalmasabbnak. A detektálás 220 nm-en történt. Jellegzetes termékkromatogramokat a 6. ábrán mutatunk be. A kapacitásarányok: oxitocein: 3,0; oxitocin: 3,4.

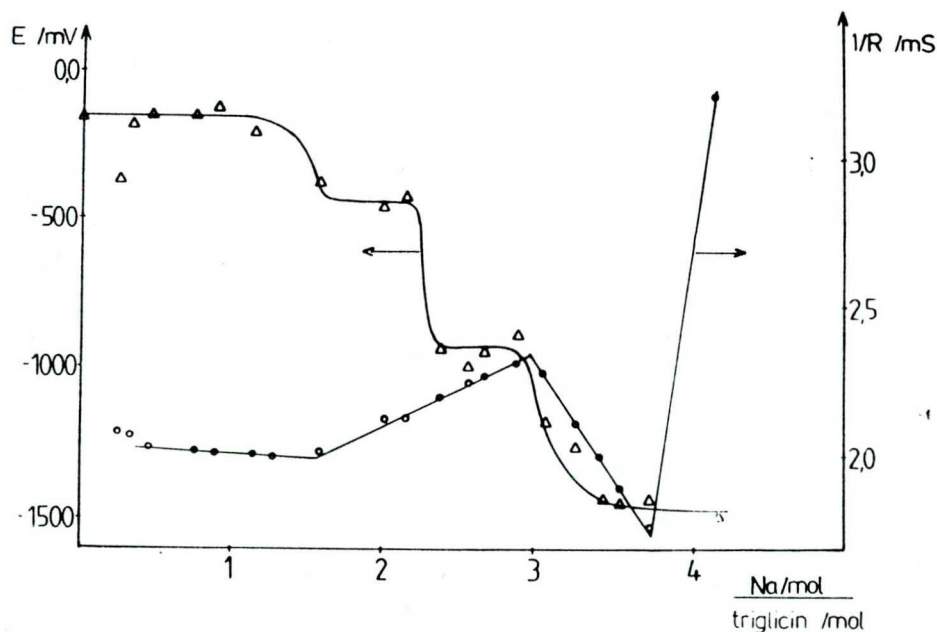


6. ábra A védett oxitocein redukciós termékének kromatogramja. A védett oxitocein koncentrációja folyékony ammóniában $6 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$. A nátrium/védett oxitocein mólarány: 9,29. A reakciótermékek vízben való feloldása után a./ 0,7 órával, b./ 5,7 órával, c./ 8 órával.

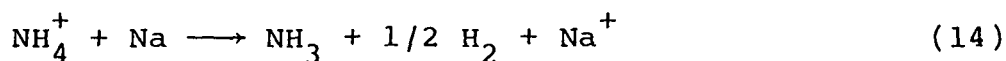
4. KISÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEÉSÜK

4.1. A modellvegyületek vizsgálata

A peptidmolekulák folyékony ammóniában fém-nátriummal reagáló csoportjainak hozzárendelésére elsőként a triglicin viselkedését tanulmányoztuk. E vegyület, mint a 7. ábrából kitűnik, 3 egyenérték nátriummal reagál. A titrálás első szakaszában az ammóniában erős savként viselkedő terminális karboxil-csoportból származó NH_4^+ -ionok redukciója játszódik le:

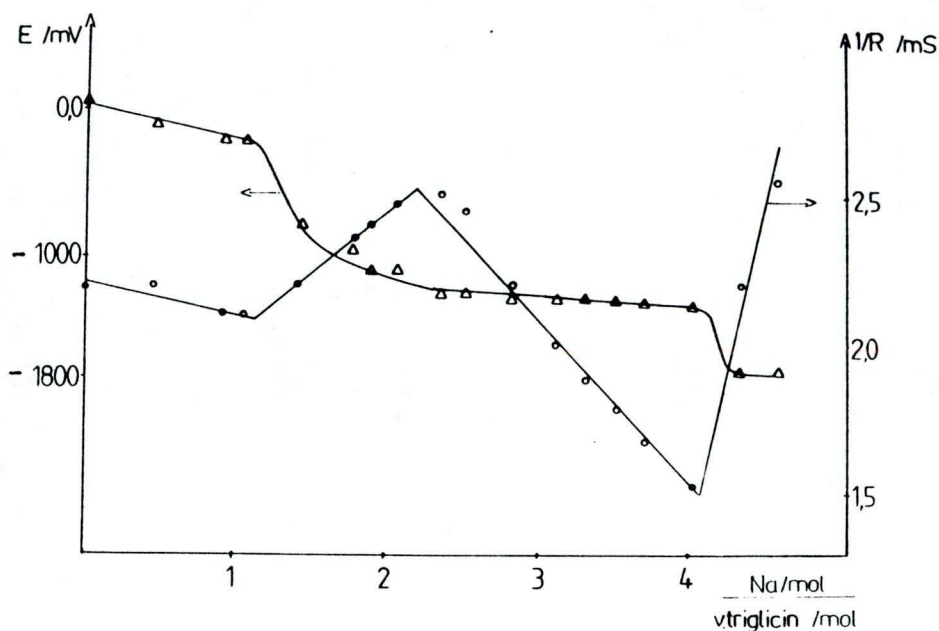


7. ábra A triglicin potenciometriás (Δ) és konduktometriás (O) titrálási görbéi. A triglicin kezdeti koncentrációja $8,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$



Az NH_4^+ és Na^+ -ionok mozgékonyága ammóniában közel megegyezik [62], a keletkező nátriumsó nagyobb asszociációja miatt a vezetőképesség kismértékű csökkenését tapasztaljuk. Az első ekvivalenciapont után, a rendszer még további két ekvivalens nátriumot fogyasztott. Annak eldöntésére, hogy utóbbi lépésben a peptid hidrogének vagy a terminális aminocsoport hidrogénjei reagálnak a nátriummal, megvizsgáltuk az aminocsoportján védett triglicin (N-acetil-triglicin) analóg viselkedését.

Az N-acetil-triglicin redukciójának első lépése a karboxil protonból származó NH_4^+ -ionokhoz rendelhető. (8. ábra). A következő 3 ekvivalens nátrium a peptid-hidrogénekkel kell, hogy reakcióba lépjen, mivel a molekula más redukálható protont nem tartalmaz. A vezetőképességi görbéből arra következtethetünk, hogy a második lépésnél keletkező két negatív töltésű anion tartalmazó nátriumsó még disszociál. A további redukciónál az egyre nagyobb negatív töltéssel bíró anion a nátriumionokkal egyre nagyobb foku asszociációra kényszerül, ami a vezetőképesség csökkenésében jelentkezik. A teljes folyamat végét a redoxipotenciál változás és a szabad elektronok megjelenése okozta erőteljes vezetőképesség növekedés jelzi.



8. ábra Az N-acetil-triglicin potenciometriás (Δ) és konduktometriás (O) titrálási görbéi. Az N-acetil-triglicin kezdeti koncentrációja: $6,3 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ (Az ábrán $v.\text{triglicin.}$)

Az N-acetil-triglicin viselkedése alapján arra következtethetünk, hogy a triglicin esetében is a második és harmadik ekvivalens nátrium a gyengén savas peptid-hidrogénnel reagál. Ezen a szakaszon a sóképződés miatt a vezetőképesség előbb nő, majd az egyre nagyobb asszociáció miatt csökken. A potenciálgörbén a két peptid-hidrogén redukciója külön lépcsőben jelentkezik, ami a peptidkötések eltérő kémiai környezetével magya-

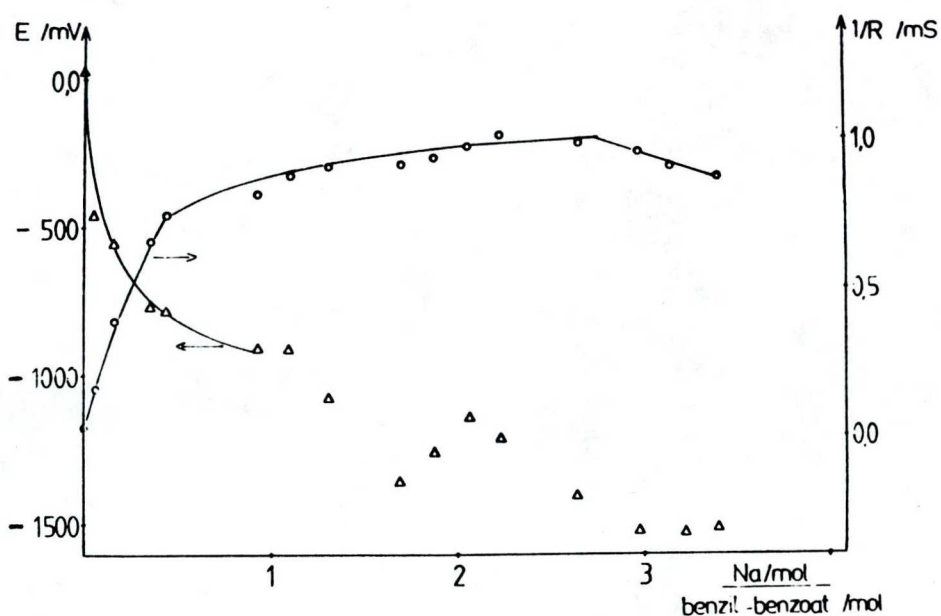
rázható. Annak eldöntésére, hogy a nátriumos redukció jár-e peptidkötés szakadással, folyadékkromatográfiás módszerrel azonosítottuk a triglicin és a védett triglicin reakciójának termékeit. A vizsgálatokból kitűnt, hogy a triglicin redukciójának termékét vízben oldva az nagyrészt (~ 90 %) visszaalakul triglicinné, tehát a nátriumos redukció csak részben járt peptidkötés szakadással. A kimutatható melléktermékek (kisebb peptid) mennyisége nem érte el a 10 %-ot. Az N-acetil-triglicint különböző nátrium/peptid mólarányokig külön-külön kísérletekben titrálva a bemért N-acetil-triglicin 70-75 %-át mutattuk ki. A minta kb. 10 %-ánál a reakció során a terminális aminocsoportról az acetilcsoport lehasadt, a reagáltatott anyag kb. 15 %-a egyéb mellékreakciókban vett részt (1. táblázat).

A benzil-oxi-karbonil védőcsoport lehasadásának modellezésére a benzil-benzoát nátriumos reakcióját kívántuk alkalmazni. E vegyület titrálási görbéje sajnos nem értékelhető (9. ábra), mivel a kiindulási anyag nem oldódik ammóniában, és ezért az heterogén reakcióban redukálódik, amit színváltozása is jelez. Az így nyert reakciótermék HPLC vizsgálata azt mutatta, hogy a kiindulási anyag teljesen elreagált. A kromatogramon többek között a benzoésav, toluol, benzaldehid és benzil-alkohol jellemző sávjai jelentek meg. Ez alapján a benzil-

1. táblázat

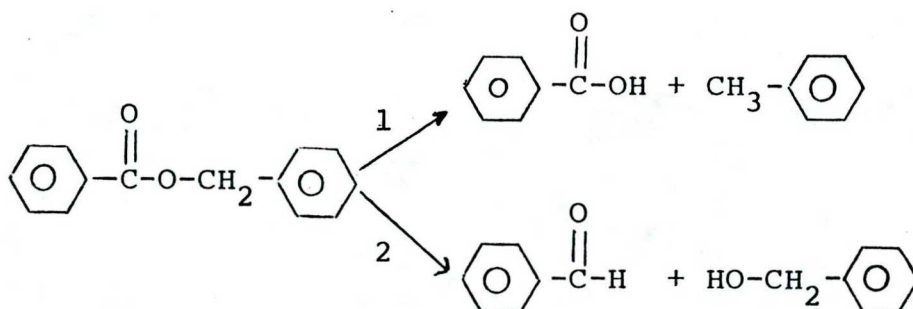
Az N-acetil-triglicin redukciójának anyagmérlege

Bemért N-acetil- -triglicin mol dm ⁻³ · 10 ⁻³	nátrium/N-acetil- -triglicin mólarány	A reakciótermékben kimutatható	
		triglicin %	N-acetil-triglicin %
3,45	3,66	9	72
3,40	4,71	12	74
3,48	5,07	15	75



9. ábra A benzil-benzoát potenciometriás (Δ), konduktometriás (O) titrálási görbéi

-benzoát hasadása az alábbi két uton képzelhető el.



Mivel a termékek közül a toluol keletkezik a legnagyobb

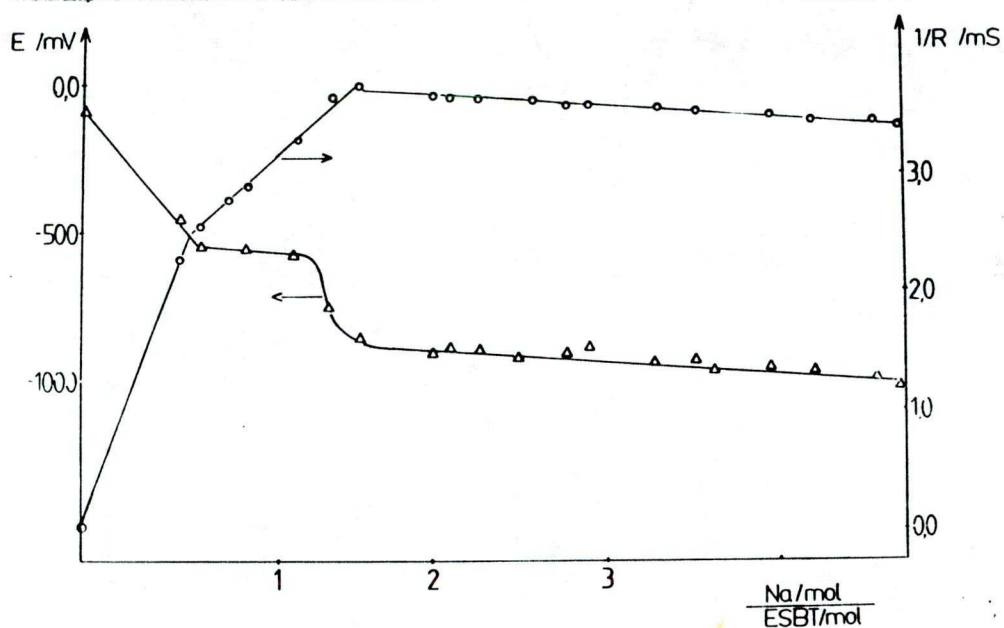
menyiségben az 1-gyel jelölt reakcióút látszik kedvezményezettnek. (A toluol mennyiségi meghatározásáról lásd a 48. oldalt.)

Észterek folyékony ammóniás közegben ammonolizist szenvedhetnek. Ezt a folyamatot ammóniumsók katalizálják. HPLC vizsgálataink szerint a benzil-benzoát még ammónium-klorid jelenlétében sem alakul át benzamiddá és benzil-alkohollá.

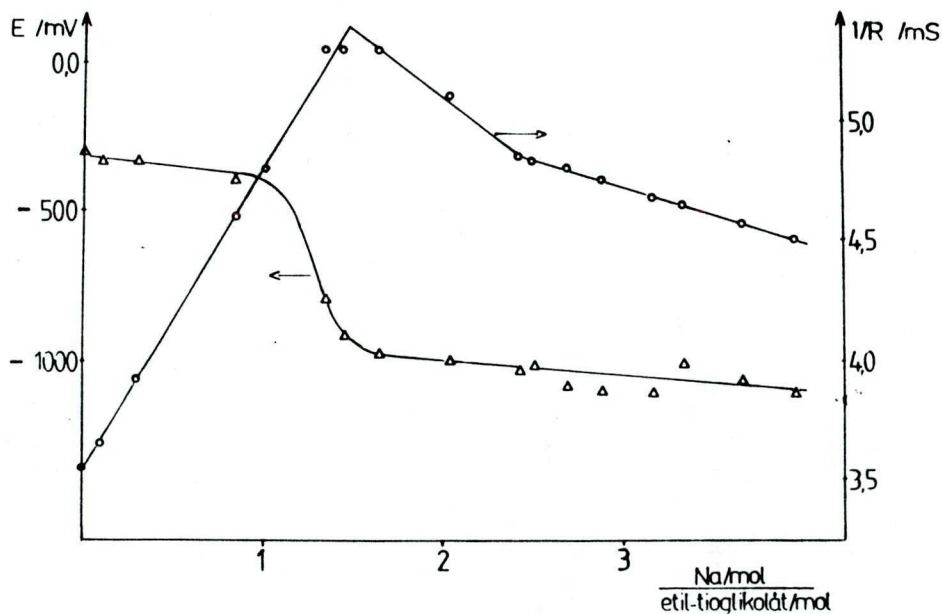
A merkaptó kénhez kapcsolódó benzil védőcsoport nátriumos redukciójának modellezésére az ESBT reakcióját használtuk. E vegyület vezetőképességi és potenciometriás titrálási görbéin (10. ábra) egyaránt 1 ekvivalens nátrium hozzáadása után jelentkezik egyenérték-pont. A rendszer az ekvivalenciapont után is fogyaszt nátriumot, a szolvatált elektronok megjelenését jelző vezetőképesség növekedés nem jelentkezik. Ez a reakciótermékek valamelyikének a nátriumamid képződésére ($\text{Na} + \text{NH}_3 \longrightarrow \text{Na}^+ + \text{NH}_2^- + 1/2 \text{H}_2$) gyakorolt katalitikus hatásával látszik magyarázhatónak.

Ezt az elképzelést támasztja alá az etil-tioglikolat reakciója nátriummal (11. ábra). A titrálási görbén a várakozásnak megfelelően 1 ekvivalens nátrium hozzáadása után jelentkezik a merkaptocsoport protonjának letitrálását jelző egyenérték-pont. Bár a képződött termék reakcióképes csoportokat már nem tartalmaz, szolvatált elektronokra jellemző vezetőképesség, növeke-

2

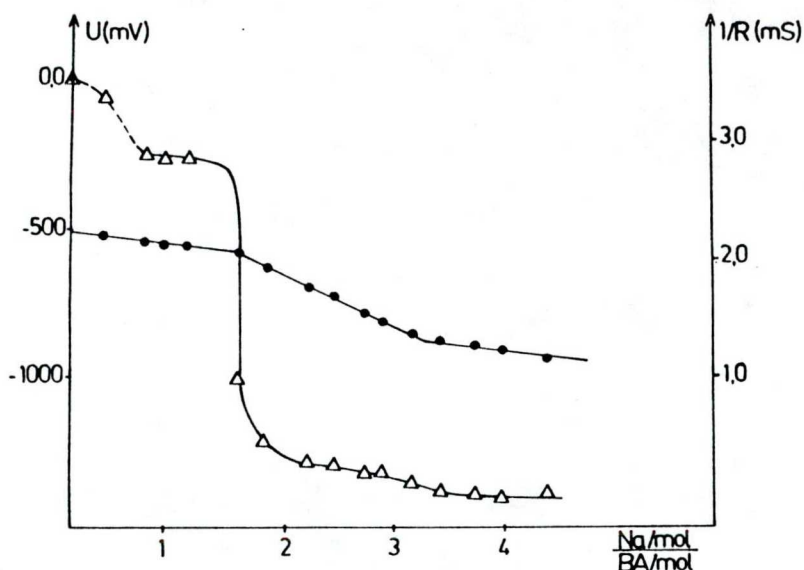


10. ábra Az ESBT potenciometriás (Δ) és konduktometriás (O) titrálási görbéi. Az ESBT kezdeti koncentrációja: $9,2 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$

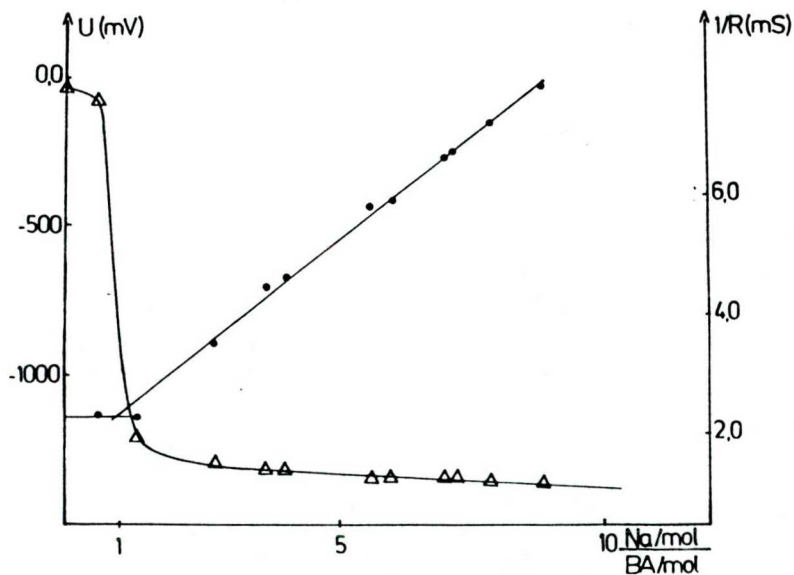


11. ábra Az etil-tioglikolát potenciometriás (Δ) és konduktometriás (O) titrálási görbéi. Az etil-tioglikolát kezdeti koncentrációja: $1,1 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$

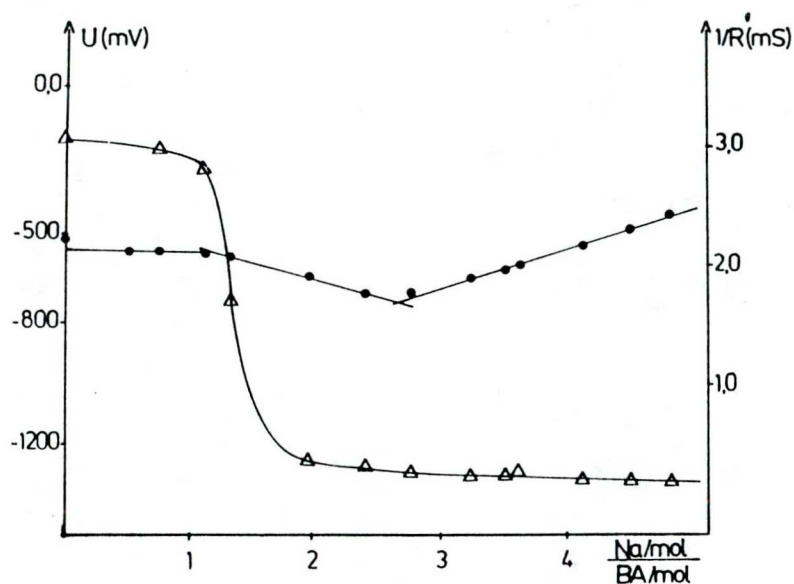
Tekintettel arra, hogy a védett oxitocin redukcióját protonforrásként szereplő karbamid alkalmazásával kívántuk teljessé tenni, meg kellett vizsgálnunk nem okoz-e a karbamid a savamid redukcióból eredő hibát. Ennek vizsgálatára modellvegyületként a Boc-Asn-OH-t választottuk, melynek redukcióját fémnátriummal titrálás-szerű reakcióban vizsgáltuk. Az első kísérletsorozatban a kiindulási vegyületet ammóniás fémnátrium oldattal titráltuk, majd megismételtük a reakciót metanol, illetve karbamid jelenlétében. A 12. ábrán a Boc-Asn-OH, a 13. és 14. ábrán ugyanennek a vegyületnek metanol illetve karbamid jelenlétében felvett titrálási görbéje látható. A Boc-Asn-OH karboxilcsoportja erős savként viselkedik ammóniában. Mindhárom potenciometriás titrálási görbén egy ekvivalens nátrium hozzáadása után jelentkezik a potenciál ugrás, amely karboxilcsoport disszociációjából származó NH_4^+ redukciójához rendelhető. A potenciometriás titrálási görbéken további végpont nem jelentkezik. Ez részben azzal magyarázható, hogy az alkalmazott reakciókörülmények között a savamid redukcióját lassan megy végbe, másrészt azzal is, hogy nem kvantitatív a redukció. Az ekvivalenciapont után minden titráló oldatrészlet kék színe 20-40 perc alatt tűnik el. A redukció termékében karbamidadalék alkalmazása esetén nyomokban, a metanoladalék alkalmazása esetén pedig 15 %



12. ábra A Boc-Asn-OH (az ábrán BA) potenciometriás (Δ) és konduktometriás (O) titrálási görbéi. A Boc-Asn-OH kezdeti koncentrációja: $9,6 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$



13. ábra A Boc-Asn-OH (az ábrán BA) potenciometriás (Δ) és konduktometriás (O) titrálási görbéi 30-szoros mólfelesleg metanol jelenlétében. A Boc-Asn-OH kezdeti koncentrációja $9,6 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$



14. ábra A Boc-Asn-OH (az ábrán BA) potenciometriás (Δ) és konduktometriás (O) titrálási görbéi nyolcszoros mólfelesleg karbamid jelenlétében. A Boc-Asn-OH kezdeti koncentrációja: $9,6 \cdot 10^{-3}$ mol dm⁻³

Boc-Hse-OH-t tudtunk kimutatni. Ezért feltételezhetjük, hogy a savamid redukciójának sebessége, jelen kísérleti körülmények között, összemérhető a nátrium-amid képződésének sebességével, mivel az utóbbi reakciót az elektródként alkalmazott platina lemezek katalizálják.

A titrálások első szakaszában a vezetőképesség állandó, illetve enyhe csökkenést mutat, mivel az NH_4^+ és Na^+ -ionok mozgékonyága ammóniában közel megegyezik [62]. Ezért a konduktometriás titrálási görbéken is az első töréspont a Boc-Asn-OH erősen savas protonjaihoz rendel-

hető. A vezetőképességi görbék lefutása a titrálás további szakaszában különböző. Ez egyrészt a lejátszódó reakciók különböző mechanizmusára, másrészt különböző töltésű és mozgékonyoságu részecskék keletkezésére utal.

A II. táblázatban a Boc-Asn-OH különböző körülmények között vezetett redukciós reakciójának termékmegoszlását tüntettük fel. (Egyik kísérletsorozatban sem követtük a potenciál és vezetőképesség változást.)

Az A kísérletsorozatban ~6 ekvivalens nátriummal reagáltattuk a savamidot. Pufferolt közegben nagyobb Boc-Hse-OH hozamot értünk el, mint a nem pufferoltban, de a kiindulási anyag mintegy 50 %-a változatlan maradt. Ezért a B kísérletsorozatban megnöveltük a nátrium mennyiségét. Ez csak a protonforrást nem tartalmazó kísérletnél eredményezett kitermelésnövekedést. Mindhárom esetben, de főleg a karbamiddal pufferolt kísérletnél az anyagmérleg romlott. Ebből arra következtethetünk, hogy lassu reakcióban a reakciótermék Boc-Hse-OH is reagál a nátriummal (és ezt az átalakulást is elősegíti a karbamid). Ezt igazolják a C kísérletsorozat eredményei is. Ebben az esetben a ~12 ekvivalens nátrium hozzáadása után 30 percig kevertettük az oldatot és a reagensfelesleget 30 perc után 20 ekvivalens NH_4Cl hozzáadásával elreagáltattuk. Az anyagmérleg láthatóan javult.

II. táblázat

A Boc-Asn-OH redukciója különböző kísérleti körülmények között

	Na/mól Boc-Asn-OH/mól	adalék/mól Boc-Asn-OH/mól	Nyert Boc-Hse-OH %	Reagált Boc-Asn-OH %	Anyag- mérleg %
A	6,49	-	13	42	61
	5,68	MeOH(30)	46	53	92
	5,91	karbamid(8)	41	58	83
B	11,55	-	17	48	69
	12,17	MeOH(30)	41	55	86
	12,43	karbamid(8)	26	75	52
C	12,18	-	32	32	100
	11,41	MeOH(30)	55	55	100
	12,24	karbamid(8)	42	59	83
D	11,48	karbamid(4)	42	47	95
	12,24	karbamid(8)	42	59	83
	13,00	karbamid(12)	51	78	73
	15,26	NH ₄ Cl(20)	0	2	98

$$C_{\text{Boc-Asn-OH}} = 9,6 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$$

A C és D kísérletsorozatban a nátrium hozzáadása után 30 percig kevertettük az oldatot, ezután 20 ekvivalens NH₄Cl-al elregááltattuk a nátriumfelesleget.

A feltételezés alátámasztására, hogy a termék továbbalakul, Boc-Hse-OH-t reagáltattunk ~11 ekvivalens Na-mal 12-szeres mólf felesleg karbamid alkalmazása mellett. A Boc-Hse-OH-t díciklohexil-amin só (DCHA) formában bemérve a reakciótermékben a kiindulási anyagnak csak 44 %-át találtuk. Párhuzamos kísérletben a DCHA sójából felszabadított Boc-Hse-OH-t éteres oldatban mértük be. Az eljárás közben a vegyület 1,5 %-a laktonná alakult. A nátriumos redukció után a termékben laktont nem tudtunk kimutatni, a Boc-Hse-OH 45 %-a átalakult. Ezenkívül a termékben 5 új anyag csucsá jelent meg. Annak eldöntésére, hogy a Boc-Asn-OH savamidcsoportjának redukcióján kívül más reakciókban részt vesz-e a vegyület Boc-Asn(OME)OH.DCHA származékát reagáltattuk 10,4 ekvivalens nátriummal. A reakciótermékben 74 % Boc-Hse-OH-t mutattunk ki.

Feltételezhető lett volna az is, hogy a redukció befagyasztására szolgáló NH_4Cl adagolás esetén az NH_4Cl nátriumos redukciójából származó hidrogén - amely keletkezésének pillanatában naszcensz állapotban van - redukál. Ezért megvizsgáltuk a reakciót 20-szoros mólf felesleg NH_4Cl jelenlétében is. A reakciótermékben Boc-Hse-OH-t nem találtunk és a bemért Boc-Asn-OH-t kvantitatíven kimutattuk.

A D kísérletsorozatban a karbamid koncentrációját

változtattuk. Látható, hogy a protonforrás koncentrációjának növelésével a reakció konverziója növekszik.

Elképzelhető, hogy metanol¹adalék alkalmazása esetén először nátrium-metilát képződik és ez játszik szerepet a redukcióban. Ennek eldöntésére a bürettában előállított nátrium-metilátot adtunk a savamid oldatához. A termékben a kiindulási Boc-Asn-OH-t kvantitativén kimutattuk, a nátrium-metiláttal lejátszódó reakció így kizárható.

Összefoglalóan megállapíthatjuk, hogy minden kísérletsorozatban (A-D) egyértelmű összefüggés van a Boc-Asn-OH konverziója és a közeg protonkoncentrációja között. MeOH és karbamid jelenlétében végrehajtott reakciók sorában a konverzió növekszik.

A konverzió növekedése azonban nem minden esetben vezet a redukált termék, Boc-Hse-OH keletkezéséhez. Ennek egyik magyarázata, hogy a Boc-Hse-OH továbbalakul, csak köztitermék szerepét tölti be. Másik lehetséges magyarázat, hogy a Boc-Asn-OH redukciója nemcsak Boc-Hse-OH keletkezéséhez vezet, a kromatogramokon a kiindulási anyagon és a terméken kívül két-három új csucs is megjelenik. Továbbá elképzelhető, hogy a védőcsoport-hasítási reakció is lejátszódik, az így képződő termék az alkalmazott detektálási módszerrel nem észlelhető.

A tirozin egység fenolos hidroxiljának modellezése a fenolt választottuk. A fenol mint várható volt egy ekvivalens nátriummal reagált és gyenge savként viselkedett.

Schön és munkatársai [1] a Z-Tyr-NH₂ redukcióját már vizsgálták. A védőcsoport két ekvivalens nátrium hatására hasadt le a molekuláról. Ezért valószínű, hogy a fenolos OH reakciója csak a védőcsoport-hasítási reakciók után játszódik le.

A modellvegyületekkel végzett kísérletek alapján összefoglalóan megállapíthatjuk:

- a mérési módszer alkalmas redukciós reakció kvantitatív követésére,
- a triglicin és a N-acetil-triglicin potencio-metriás vizsgálata alapján a protonok savassága illetve a nátriummal való reakciókészsége a következő sorrendben csökken: karboxil-H > peptidkötés-H ~ amid-H > amino-H,
- a nátriumos redukció során kismértékű peptidkötés hasadás is lejátszódik,
- a benzil-oxi-karbonil védőcsoport hasításának főterméke toluol,
- a merkapto kénhez kapcsolódó benzilcsoport ~ egy ekvivalens nátrium hatására eltávolítható,
- az $\text{S-CH}_2\text{COOEt}$ ion katalizálja a nátrium-amid képződési reakciót,

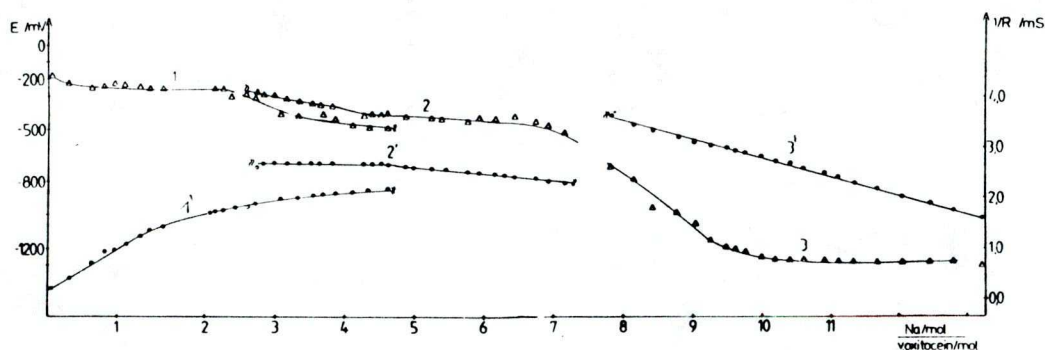
- savamidcsoportok csak igen lassu reakcióban redukálhatók, (ez a reakció lényegesen lassabban játszódik le mint a védőcsoport-hasítási reakciók),
- a karbamid protonforrásként alkalmazható.

4.2. A védett oxitocin titrálása

A modellvegyületekkel szerzett kísérleti tapasztalatok birtokában láttunk hozzá a védett oxitocin redukciójának tanulmányozásához. A buretta viszonylag kis térfogata miatt a védett oxitocin titrálási görbáját először három titrálási szakaszban vettük fel. A 15. ábra a védett oxitocin ilyen módon nyert potenciometriás (1, 2, 3) és konduktometriás (1', 2', 3') titrálási görbéit mutatja.

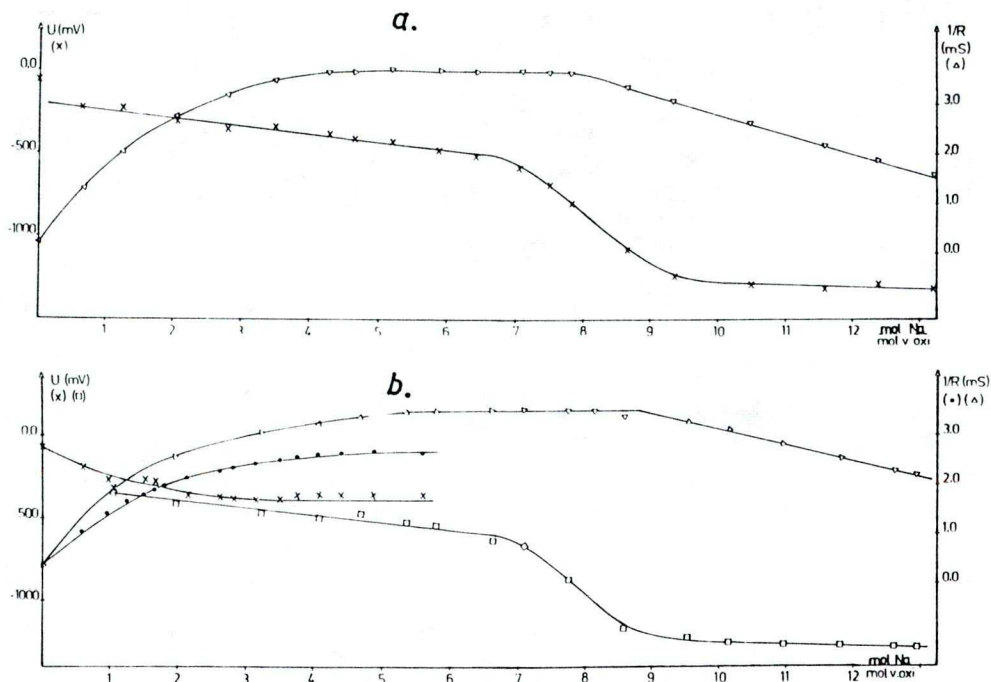
Mivel a potenciometriás görbén csak egy elnyult potenciálugrást találtunk, a titrálást töményebb Na-oldat alkalmazásával is elvégeztük (16a. ábra). A reakciótermékeket HPLC vizsgálatokkal azonosítottuk. E célból külön titrálásokban a reakciót különböző nátrium:peptid molarányoknál leállítottuk, a reakciótermékekről az ammóniát elpárologtattuk, majd a szilárd maradékot vízben oldva folyadékkromatográffal analizáltuk.

A védett oxitocin redukciója a nátriummal felte-



15. ábra A védett oxitocin potenciometriás (1, 2, 3) és konduktometriás (1', 2', 3') titrálási görbéi.
A védett oxitocin kezdeti koncentrációja:
 $6,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$

hetően a benzil és benzil-oxi-karbonil védőcsoportok lehasításával kezdődik. A reakció során az oxitocin nátriumsója képződik, mely só a vezetőképességet növeli. A vezetés jelentős csökkenése ~7 ekvivalens nátrium hozzáadása után tapasztalható. A potenciometriás görbén szintén ~7 ekvivalens nátrium hozzáadása után elnyult potenciálugrás jelentkezik, ami arra utal, hogy a három védőcsoport leszakítása egymással párhuzamosan és nem konszekutív reakcióban történik (összhangban az irodalmi előzmé-



16. ábra a./ A védett oxitocin (az ábrán v. oxi.) potenciometriás (x) és konduktometriás (∇) titrálási görbéi. A védett oxitocin kezdeti koncentrációja: $6,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$.

b./ A védett oxitocin (az ábrán v. oxi.) potenciometriás (x, □) és konduktometriás (•, ∇) titrálási görbéi a védett oxitocinre számolt hatszoros mólfelesleg karbamid jelenlétében. A védett oxitocin kezdeti koncentrációja: $6,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$.

nyekkel [1]). Ezt támasztja alá az a tapasztalat, hogy kis nátrium/védett oxitocin mólarányoknál is találtunk a reakció termékében oxitocint.

A titrálás további szakaszán (mivel már nincsenek védőcsoportok a molekulán, mint ezt a termék HPLC analízisének eredménye mutatja) a nátrium a peptid-hidro-

génekkel a savamidcsoporttal és a fenolos hidroxilcsoporttal reagál illetve részben hasítja a peptidkötéseket. A töredék molekulák folyadékkromatográfiásan kimutathatók. Egyre nagyobb negatív töltésű részek keletkeznek, melyek egyre nagyobb asszociációra kényszerülnek a nátriumionokkal.

A benzil és benzil-oxi-karbonil védőcsoportok hasadása nátrium hatására 1 illetve 2 elektronos lépésben történhet difenil-etán illetve toluol képződése közben. Ezért vizsgáltuk a redukciós termék toluol és difenil-etán tartalmát. A toluol kvantitatív analízisének nehezíti, hogy a redukció végén az ammónia elpárologtatása során a toluol egy része is eltávozik. Tapasztalatunk szerint toluolra ammóniát kondenzáltatva majd azt elpárologtatva és a maradékot metanolban oldva a toluolnak mintegy egytized-egyhuszad részét nyerjük vissza. Difenil-etán a reakcióban csak nyomokban keletkezett. A toluol mennyisége változónak bizonyult, esetenként összevethető volt a keletkezett oxitocin mennyiségével (III. táblázat), így figyelembe véve a párologás okozta veszteséget, a toluol és a difenil-etán analízis a benzilcsoport hasítására a (7) egyenlettel leírt mechanizmust valószínűsíti.

A titrálási görbéken tapasztalt ~7 ekvivalens nátrium fogyás biztosan több mint a három védőcsoport el-

III. táblázat

A védett oxitocin redukciója során keletkező toluol és
oxitocin mennyisége

(A védett oxitocin koncentrációja: $6,0 \cdot 10^{-3}$ mol dm⁻³)

[nátrium] [védett oxitocin] mólarány	toluol mol dm ⁻³	oxitocin mol dm ⁻³
7,10	$5,1 \cdot 10^{-5}$	$1,98 \cdot 10^{-3}$
9,29	$1,5 \cdot 10^{-3}$	$1,68 \cdot 10^{-3}$
7,20	$3,16 \cdot 10^{-3}$	$2,22 \cdot 10^{-3}$
7,90	$3,24 \cdot 10^{-3}$	$2,22 \cdot 10^{-3}$
8,81	$1,09 \cdot 10^{-3}$	$2,03 \cdot 10^{-3}$
6,65	$1,66 \cdot 10^{-3}$	$2,17 \cdot 10^{-3}$
8,18	$1,72 \cdot 10^{-3}$	$2,03 \cdot 10^{-3}$

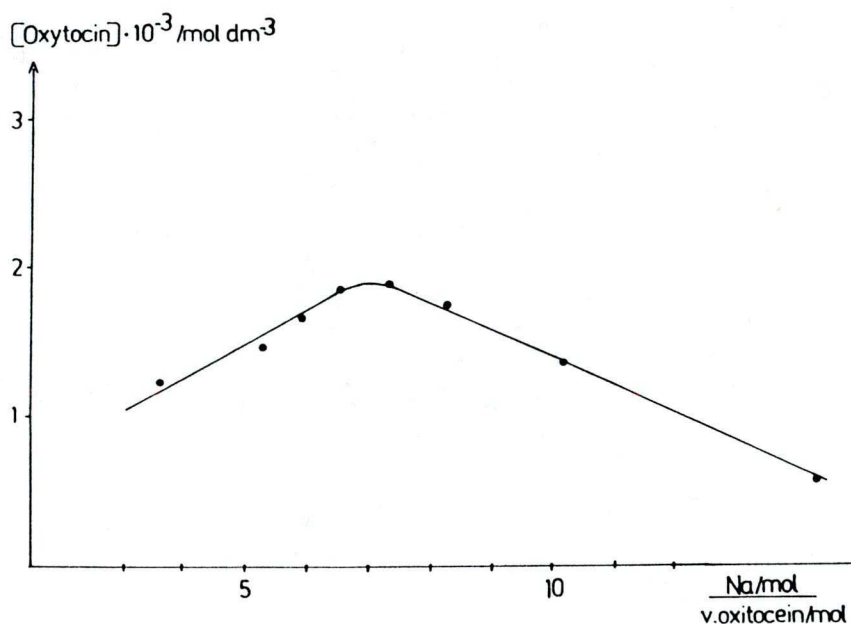
távolításához szükséges mennyiség. Ezért valószínű,
hogy a titrálás első szakaszában a védőcsoport-hasítá-
si reakciók mellett mellékreakciók (pl. peptidkötés ha-
sadás) is lejátszódnak. Ezt a feltételezést alátámaszt-
ja az a kísérleti tény is, hogy a redukció során 7 e-
gyenérték nátrium alkalmazása esetén a peptid 1/3 része
analitikailag nem mutatható ki.

A titrálás során fogyott fémnátrium mennyisége és
a keletkezett oxitocin mennyisége közötti összefüggés

megállapítására 3-4 részletben adagoltuk a nátriumoldatot a védett oxitocin $6 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ koncentrációjú ammóniás oldatához a kívánt nátrium védett oxitocin molarány eléréséig és a terméket megfelelő előkészítés után HPLC analízisnek vetettük alá.

A védett oxitocin nátriumos redukciója során az oxitocin nátriumsója képződik. Ez vízben hidrolizálva oxitocint ad, mely molárisabb lévén az oxitocinnál a kromatogramon az oxitocin előtt jelentkezik (6. ábra). Az oxitocin enyhe oxidációs behatásra oxitocinná alakul. Oxidálószerként a levegő oxigénjét használtuk. A 17. ábra a keletkezett oxitocin mennyiségét a nátrium/védett oxitocin molarány függvényében mutatja be. Látható, hogy a maximális termelést egy védett oxitocinre jutó ~7 egyenérték nátrium eredményez. (A termelést a folyadékkromatográfiás csúcsterületek alapján számoltuk.) Ez arra utal, hogy a védőcsoportok teljes eltávolítása előtt már lejátszódnak azok a mellékreakciók, amelyek az oxitocin hozam csökkenését okozák.

A IV. táblázatban a védett oxitocin redukciójának anyagmérlegét tüntettük fel. A redukció termékét közel semleges rendszerben oldva, oxidáció után az oxitocin mellett keletkező kisebb és nagyobb tagszámú peptideket is mértük. Figyelembe véve az analitikai módszer korlá-



17. ábra A keletkezett oxitocin mennyisége a nátrium/
/védett oxitocin mólarány függvényében. Az
oxitocin koncentrációja 100 %-os redukciót
feltételezve a vizes oldatban $3,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$

tait, az anyagmérleg igen jónak mondható.

4.3. Az oxitocin szintézis optimalizálása

Az oxitocin hozam optimalizálására külön kísérlet-sorozatot végeztünk. Ennek során egyrészt tanulmányoztuk a védett oxitocin $\rightarrow$ oxitocin redukciós reakció lejátszódását különböző kísérleti feltételek mellett. Így vizsgáltuk a védett oxitocin koncentrációjának, az

IV. táblázat

Védett oxitocin redukciójának anyagmérlege

Bemért v. oxitocin mol dm ⁻³ *	Na v. oxitocin mólarány	Redukció után nyert peptid %			
		oxitocin	oxitocinnál		összes peptid
			kisebb mozgékonyaságú	nagyobb peptid**	
3.10 ⁻³	6,76	83	2	12	97
	7,53	78	2	11	91
	7,65	78	7	8	93
	8,47	76	5	7	88
6.10 ⁻³	7,76	67	5	13	85
12.10 ⁻³	7,46	57	15	15	87

A redukció után a szilárd terméket vízben oldottuk (pH = 6,8)

* A védett oxitocin koncentrációja az ammóniában

** Redukció után nyert, oxitocinnál kisebb illetve nagyobb mozgékonyaságú peptidek %-os arányát területeik arányában fejeztük ki.

adagolt karbamidnak, a hőmérsékletnek, a nátrium adagolás módjának hatását. Másrészt tanulmányoztuk a oxitocein $\rightarrow$ oxitocin oxidációs reakció kísérleti körülményeit. Ennek során vizsgáltuk a vizes oxitocein oldat pH-jának, különböző oxidálószer alkalmazásának, az [oxigén]/[oxitocein] arálynak, az oxitocein oldat koncentrációjának a folyamatra gyakorolt hatását. /ma

Mérési eredményeinket az V. és VI. táblázatban foglaltuk össze. Mivel a maximális oxitocein hozam ~ 7 nátrium/védett oxitocein mólaránynál érhető el, a kísérleteinket e pont környezetében végeztük.

A redukciónak a védett oxitocein koncentrációjától való függését három koncentrációnál vizsgáltuk. A felső határt a védett oxitocein oldékonysága behatárolta. Így a legnagyobb koncentráció ($12 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) a védett oxitoceinre nézve közelítőleg telített oldatot jelent cseppfolyós ammóniában (hatszoros karbamidfelesleg jelenlétében). A másik két vizsgált koncentráció $6 \cdot 10^{-3}$ illetve $3 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ volt. A táblázat adataiból látható, hogy a védett oxitocein koncentrációjának csökkentése az oxitocin hozam növekedésével jár. Ennek egyik lehetséges magyarázata, hogy hig oldatokban a melléreakciók viasszaszorulnak. Másik lehetséges magyarázat, hogy a védett oxitoceinen lévő gyengén savas csoportok disszociációjának mértéke a

V. táblázat

Oxitocin kitermelés (%)

A védett oxitocein koncentrációja folyékony ammóniában (mol dm ⁻³)													
3.10 ⁻³ 6.10 ⁻³ 12.10 ⁻³													
A karbamid koncentrációja folyékony ammóniában (mol dm ⁻³)													
Hőmérséklet (K)		018.10 ⁻³				036.10 ⁻³				072.10 ⁻³			
		R	%	R	%	R	%	R	%	R	%	R	%
A nátrium adagolás módja titrálásszerűen szilárd formában	228	6,14	61	6,26	60*	7,32	67	7,52	78	6,24	49	6,29	59
		7,29	77	8,02	80					6,75	52	6,82	66
		8,45	79	8,33	87*			9,29	52	7,26	65	7,52	76
		9,48	60	9,28	66*					7,27	64	7,89	74
										7,75	62	8,17	75
										8,50	55	9,54	55
	228									9,76	42		
		6,76	83	7,06	86	7,75	65	6,56	62	7,46	57	7,26	75
		6,98	83	7,50	89*	7,76	67	7,32	85*				
	240			8,47	76								
		7,12	82	7,57	79					6,80	64	7,34	71
		7,53	78	8,31	79					7,48	69	7,68	76
	7,65	78	8,50	76									

R: nátrium/védett oxitocein molarány; * A karbamid koncentrációja: $72 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$; Az oxitocein oldat pH-ja 6,8.

VI. táblázat
Oxitocin kitermelés (%)

Hőmérséklet (K)		A védett oxitocin koncentrációja folyékony ammóniában mol dm ⁻³												
		3.10 ⁻³				6.10 ⁻³				12.10 ⁻³				
		A karbamid koncentrációja folyékony ammóniában mol dm ⁻³												
		0		18.10 ⁻³		0		36.10 ⁻³		0		72.10 ⁻³		
		R	%	R	%	R	%	R	%	R	%	R	%	
A nátrium adagolás módja titrálásszerűen szilárd formában	228	6,14	67	6,26	70*	7,32	80	7,52	78	6,24	57	6,29	65	
		7,29	86	8,02	99	7,90	75	7,90	75	6,75	62	6,82	73	
		8,45	90	8,33	88*			9,29	50	7,26	74	7,52	83	
		9,48	68	9,28	85*					7,29	71			
										7,75	69	8,17	83	
										8,50	63	9,54	66	
									9,76	50				
	228	6,76	90	7,06	97	7,75	70	6,56	60	7,46	80	7,26	86	
		6,98	95	7,50	96*	7,76	69	7,32	91*					
				8,47	88									
	240	7,12	95	7,57	87					6,80	75	7,34	86	
		7,53	87	8,31	90					7,48	75	7,68	78	
7,65		90	8,50	91										

R: nátrium/védett oxitocin molarány; * karbamid koncentráció: 72.10⁻³ mol dm⁻³

Az oxitocin oldat pH-ja: 11,8

hígítással növekszik. Ezért az oldat proton koncentrációja növekszik, ami feltételezésünk alapján szerepet játszik a redukció lejátszódásában (lásd a bevezetésben).

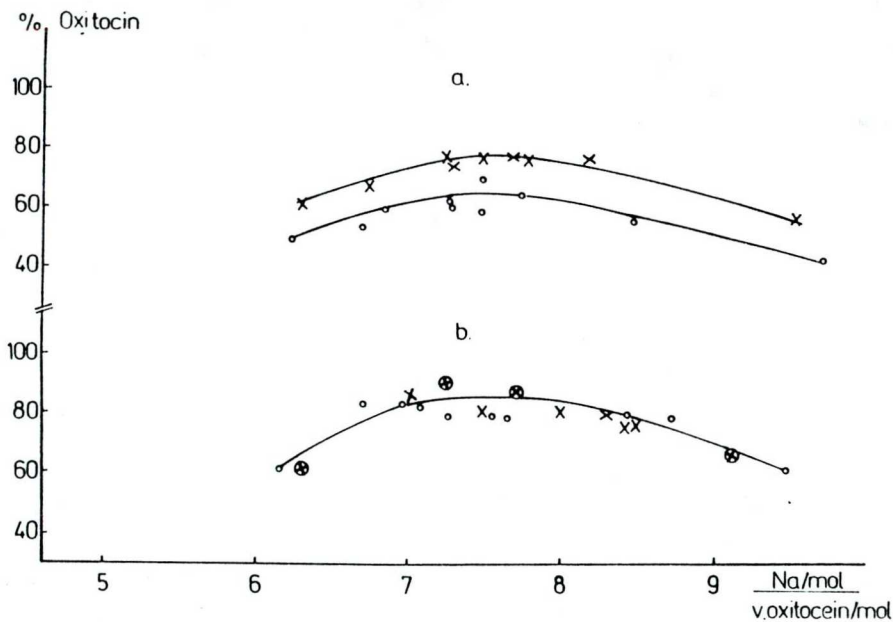
A protonkoncentráció szerepének tisztázásához a nátriumos redukciót járulékos protonforrás, karbamid jelenlétében is elvégeztük.

A 16b. ábrán a védett oxitocein 6-szoros karbamidfelesleg mellett felvett titrálási görbéi láthatók.

A karbamid jelenlétében felvett potenciometriás görbén is ~7 ekvivalens nátrium hozzáadása után jelentkezik az elnyult potenciálugrás. A vezetőképesség csökkenése is 7-szeres nátrium mólfelesleg után jelenik meg. Ennek alapján állíthatjuk, hogy karbamid jelenlétében is a védőcsoportok párhuzamosan távoznak a molekuláról.

A karbamid koncentráció hatásának vizsgálatához elvégeztük a védett oxitocein nátriummal való redukcióját, 3-12-szeres mólfelesleg karbamid mellett. $12 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ védett oxitocein koncentrációnál 6-szoros mólfelesleg karbamid adagolását találtuk optimálisnak. Megvizsgáltuk a további két védett oxitocein koncentrációtartományban a karbamid hatását, ugyanezt a karbamid mólfelesleget alkalmazva illetve a karbamid koncentrációját állandó értéken tartva.

A karbamid peptidkitermelést növelő hatása a legkisebb koncentrációtartományban $3 \cdot 10^{-3}$ mol dm⁻³ nem jelentkezett. Töményebb oldatokban ez a hatás egyre kifejezettebb, $12 \cdot 10^{-3}$ mol dm⁻³ védett oxitocin kezdeti koncentrációnál eléri a 15 %-ot (18. ábra).



18. ábra Az oxitocin kitermelés a nátrium/védett oxitocin mólarány függvényében, karbamidot tartalmazó illetve nem tartalmazó oldatokban.

- a. a védett oxitocin kezdeti koncentrációja folyékony ammóniában $12 \cdot 10^{-3}$ mol dm⁻³
- b. a védett oxitocin kezdeti koncentrációja folyékony ammóniában $3 \cdot 10^{-3}$ mol dm⁻³

karbamid/védett oxitocin arány: r

• r = 0; x r = 6; ⊗ r = 24

Az oxitocin oldat pH-ja: 6,8

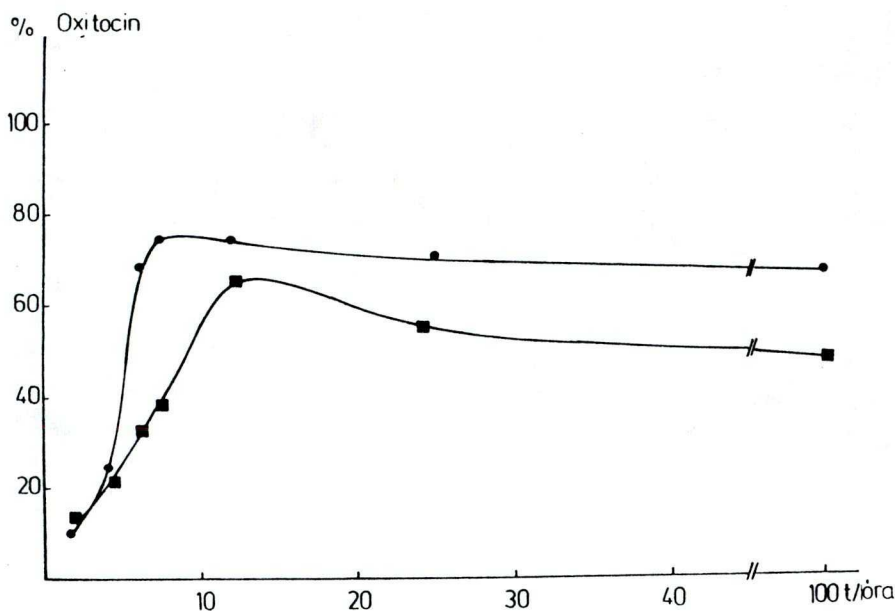
A hőmérséklet hatásának vizsgálatára a kísérleteket két hőmérsékleten végeztük. A vizsgálható hőmérséklettartományt a kísérleti feltételek behatárolták. Ezért az egyik vizsgálati hőmérséklet a titrálási görbék felvételénél alkalmazott 228 K, a másik a forró ammónia hőmérséklete (~240 K) volt. A mérési eredményekből megállapítható, hogy ebben a szűk tartományban a hőmérsékletnek nincs lényeges hatása a termelésre.

Megvizsgáltuk a redukálószer nátrium adagolás módjának hatását az oxitocin hozamára. A "titrálósos" módszer a mechanizmus tanulmányozása szempontjából rendkívül hasznos ugyan, de iparilag előnyösebb a fémnátrium szilárd formában való adagolása. Ezért a nátriumot szilárd formában és ammóniás oldatként is adagoltuk a védett oxitocin oldatához. Tapasztalataink alapján a nátrium adagolás módjának nincs hatása a keletkező oxitocin mennyiségére. Az a jelenség, hogy a peptidtermelés nem függ a nátrium adagolási módjától azal magyarázható, hogy a mi kísérleti körülményeink között a nátrium reakciója a peptiddel gyorsabb, mint a nátrium oldódása ammóniában.

Vizsgálat tárgyát képezte az oxitocin oxitocinná történő oxidációjának menete is.

A mérések során a következőképpen jártunk el: a nátriummal történő redukció és az ammónia eltávolítá-

sa után a visszamaradt szilárd oxitocin-nátriumot vízben oldottuk úgy, hogy az oldat koncentrációja (100 %-os átalakulást feltételezve) oxitocinre nézve $3,0 \cdot 10^{-3}$ ill. $7,5 \cdot 10^{-4}$ mol dm⁻³ legyen. Ilyen körülmények között az oldat erősen lúgos, pH ~11,7-11,9. A vizsgálatok egy részéhez ezen oldatok pH-ját sósavval pH = 6,8 értékre állítottuk be. Az így nyert oldatokat nyitott pohárban hagytuk állni, hogy a levegő oxigénjével szabadon érintkezzenek. Bizonyos időközönként a poharakból mintát vettünk és folyadékkromatográfiás analízissel követtük az oxitocin-oxitocin koncentráció alakulását. A mérési eredményeinket a 19-20. ábrákon mutatjuk be. Azokban a kísérletekben, amelyeknél az adott pH-n az oxitocin koncentráció illetve az [oxitocin]/[oxigén] molarány nagy, az oxitocin koncentráció időben később éri el maximális értékét. Ez részben az oxigén kis vízoldékonyságának (293 K-en $1,35 \cdot 10^{-3}$ mol dm⁻³) következménye, a vízben oldott oxigén mennyisége összevethető az oxitocin mennyiségével (a vizsgált koncentrációtartományban). Így érthető, hogy a csak diffúzió útján pótlódó oxigén hatása kevesebb oxitocint tartalmazó rendszerben nagyobb. Amennyiben a fent leírt módon elkészített oxitocin oldatot mágneses keverővel kevertettük (így elősegítve az oxigén oldatba jutását) lényegesen meggyorsult az oxitocin oxidációja (21. ábra).



19. ábra Az oxitocin kitermelés változása az oxidációs idő függvényében.

A védett oxitocin kezdeti koncentrációja folyékony ammóniában: $6 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$.

A nátrium/védett oxitocin mólarány: 7,9.

A karbamid/védett oxitocin mólarány: 6.

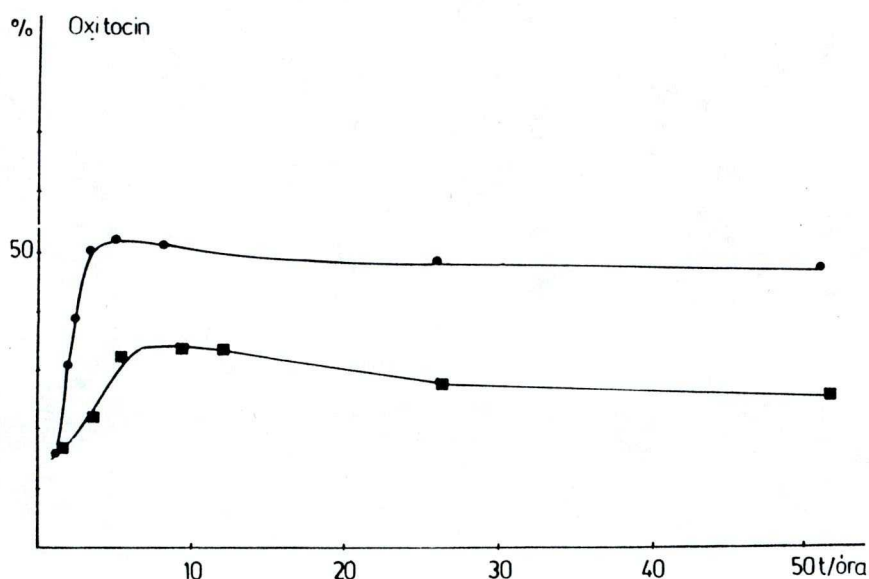
Az oxidálódó oxitocin koncentrációja (100 %-os redukciót feltételezve): $3 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$.

■ $3 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$

• $7,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$

pH = 11,8

Az oxitocinra nézve nagyobb koncentrációju oldatban az oxitocin mennyisége a maximum elérése után időben erősebben csökken, mint a hígabb oldatban, továbbá töményebb oldatban az oxitocin termelés nem éri el a



20. ábra Az oxytocin termelés változása az oxidációs idő függvényében.

A védett oxitocein kezdeti koncentrációja folyékony ammóniában $6 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$.

A nátrium/védett oxitocein molarány: 8,9.

A karbamid/védett oxitocein molarány: 6.

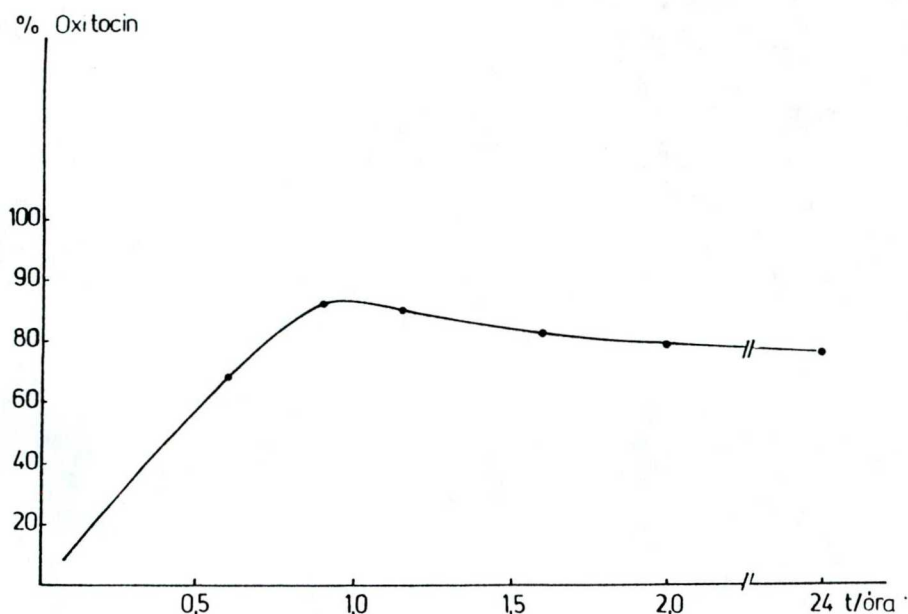
Az oxidálódó oxitocein koncentráció (100 %-os redukciót feltételezve):

■ $3 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$

• $7,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$

pH = 6,8

higabban nyert értéket. Ilyen körülmények között a kromatogramokon az oxitocein után megjelenő csúcsok nagyobbak, illetve időben növekednek. Feltételezhetően dimerek képződnek.

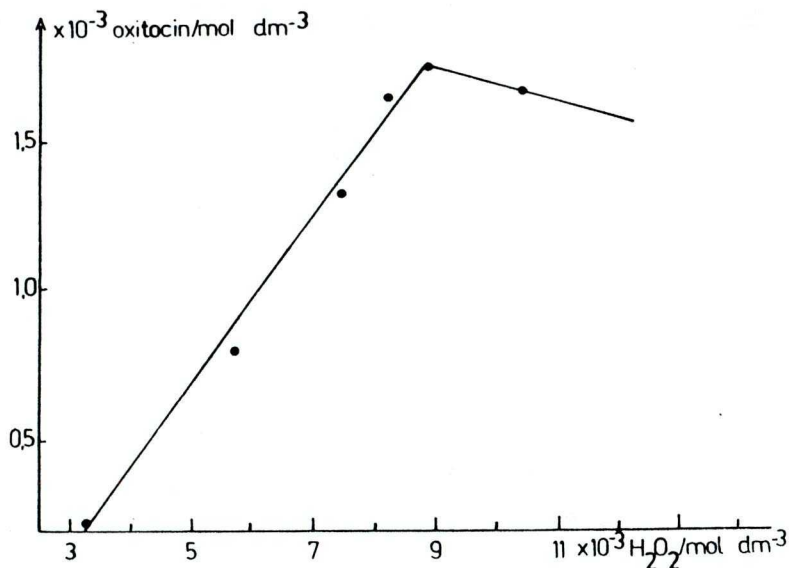


21. ábra Az oxitocin termelés változása az oxidációs idő függvényében kevert oldatban
A védett oxitocin koncentrációja folyékony ammóniában: $3 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$
A nátrium/védett oxitocin mólarány: 7,06
A karbamid/védett oxitocin mólarány: 6
Az oxidálódó oxitocin koncentrációja (100 %-os redukciót feltételezve): $7,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$
pH = 6,8

Az oxidációt lugos oldatban kivitelezve az oxitocin helyén nagyobb csucsokat tudtunk regisztrálni. A magas pH-ju oldatokban a peptidek dezaminálódhatnak [63], és az oxitocin biológiai aktivitása csökken. Feltételezhető, hogy ilyen kromatográfiás körülmények

között a dezaminálódott oxitocin nem válik el az oxitocintól.

Elvégeztük az oxitocein oxidációját hidrogén-peroxiddal való titrálással is. Az eredményt a 22. ábrán tüntetjük fel. A titrálást oxigénmentesített oldatokkal nitrogén atmoszférában végeztük, az oxigén hatá-



22. ábra Az oxitocin termelés változása az oxidáló hidrogén-peroxid koncentráció függvényében.

A védett oxitocein koncentrációja folyékony ammóniában: $6 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$.

A nátrium/védett oxitocein molarány: 8,2

A karbamid/védett oxitocein molarány: 3

Az oxidálódó oxitocein koncentrációja (100 %-os redukciót feltételezve): $3 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$

pH = 6,8

sának kiküszöbölésére zárt titráló berendezést állítottunk össze. A fokozatos oxidáció során az oxitocin mennyisége növekszik, körülbelül 4,5-szeres hidrogén-peroxid mólfelesleg mellett maximumot mutat, majd mennyisége csökken. Az oxidációs görbe jellege hasonló a levegőn történő oxidációval nyerthez, azonban peroxidos oxidáció esetén az oxitocin hozam igen érzékeny a peroxid adagolás ütemére, illetve tuladagolására.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A folyékony ammóniában fémnátriummal kivitelezett redukciós reakciók mennyiségi követésére alkalmas módszerrel dolgoztunk ki. Olyan készüléket szerkesztettünk, melyben az irodalomban eddig nem tárgyalt módon a redukciós reakciókat titrálásszerűen tudtuk megvalósítani. A nátriumos redukció hátrányaként említik a redukálószer helyi feleslegbe kerülése miatt fellépő mellékreakciókat. Módszerünk az előbbi problémát kiküszöbölte, a nátrium finom adagolását tette lehetővé.

A mérések során a rendszer elektromotoros erő- és elektromos vezetőképesség változását regisztráltuk. Az így nyert potenciometriás és konduktometriás titrálási görbék tájékoztattak a redukciós folyamatok lépéseinek sztöchiometriájáról.

A nátriumos redukció során keletkező termékek azonosítására nagyteljesítményű folyadékkromatográfiás (HPLC) módszert dolgoztunk ki.

Ezzel az új kísérleti technikával elért eredményeinket a következőkben foglalhatjuk össze:

A triglicin és N-acetil-származékának potenciometriás vizsgálatával kimutattuk, hogy a protonok affinitása a nátriumhoz a következő sorrendben csökken: karboxil-H > peptid-H ~ amid-H > amino-H, ami megfelel e

protonok saverősségi sorrendjének. A kémiai környezet saverősséget befolyásoló hatása szintén megfigyelhető volt a potenciometriás mérések alapján.

A vezetőképességi mérések egyrészt ionok képződését és azok asszociációját, másrészt a redukálószer feleslegbe jutását és ezzel a reakció végpontját jelezték.

Az etil-S-benzil-tioglikolát potenciometriás és konduktometriás titrálási görbéi alapján megállapítottuk, hogy a merkaptó kénhez kapcsolódó benzilcsoport ~1 ekvivalens nátrium hatására eltávolítható.

Az elektroanalitikai és HPLC vizsgálatok eredményei alapján kimutattuk, hogy

- a peptidkötés deprotonálódása reverzibilis folyamat abban az értelemben, hogy a reakció termékét vízben oldva az visszaalakul a kiindulási vegyületté,
- a nátriumos redukció során kismértékű peptidkötés hasadás is lejátszódik,
- a savamidcsoportok csak igen lassu reakcióban redukálhatók,
- a védett oxitocin három védőcsoportja párhuzamos reakcióban távozik a molekuláról,
- a védett oxitocin védőcsoport-hasítási reakciójának fő termékei az oxitocin és a toluol.

Meghatároztuk az oxitocein előállítás optimális kísérleti körülményeit. (A termelés értékeket folyadékkromatográfiás uton határoztuk meg.) Ennek során vizsgáltuk a védett oxitocein $\rightarrow$ oxitocein redukciós reakciót és megállapítottuk, hogy karbamid jelenlétében illetve híg oldatban kivitelezve növelhető az oxitocin termelés.

Tanulmányoztuk az oxitocein $\rightarrow$ oxitocin oxidációs reakció kinetikáját és kimutattuk a reakció koncentráció és pH-függését.

6. IRODALOMJEGYZÉK

1. Schön, I., Chem. Rev., 84, 287 (1984).
2. Jolly, W. L., Hallada, C. J. in T. C. Waddington (ed.)
Non-Aqueous Solvent Systems, Academic Press, London,
New York, 1965. 1-45. o.
3. Birch, A. J., Subba Rao, G., Adv. Org. Chem., 8, 1-65
(1972).
4. Schön, I., Szirtes, T., Überhardt, T., Csehi, A., J.
Org. Chem., 48, 1916 (1983).
5. Watt, G. W., Sowards, D. M., McBride, W. R., J. Am.
Chem. Soc., 77, 5835 (1955).
6. Herlem, M., Bull. Soc. Chim., Fr. 1687 (1967).
7. Weyl, Poggendorffs Annalen., 121, 601 (1864).
8. Seely, C. A., Chem. News, 23, 169 (1871)..
9. Kraus, C. A., J. Am. Chem. Soc., 30, 1323 (1908).
10. Jolly, W. L., Progr. Inorg. Chem., 1, 235 (1959).
11. Chou, D. Y. P., Pribble, M. J., Jackman, D. C., Keeman,
C. W., J. Am. Chem. Soc., 85, 3530 (1963).
12. Lagowsky, The Chemistry of Non-Aqueous Solvents, Vol.
VII. Academic Press, New York, London, 1967, 6-7 fej.
13. Nicholls, D., Inorganic Chemistry in Liquid Ammonia,
Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, 1979.
14. Dye, J. L., J. Chem. Educ., 54, 332 (1977).
15. Medzihradszky, K., A kémia újabb eredményei 3., 1970.

Akadémiai Kiadó, Budapest,

16. Bodanszky, M., Int. J. Peptide Protein Res., 25, 449 (1985).
17. Ives, D. A. J., Canadian J. of Chem., 47, 3697 (1969).
18. Williams, F. E., Gebauer-Fuelnegg, E., J. Am. Chem. Soc., 53, 352 (1931).
19. Siffered, R. H., Vigneaud, V. du., J. Biol. Chem., 108, 735 (1935).
20. Patterson, W. J., Vigneaud, V. du., J. Biol. Chem., 111, 393 (1935).
21. Schön, I., Szirtes, T., Überhardt, T., J. Chem. Soc. Chem. Commun., 639 (1982).
22. Schön, I., Szirtes, T., Überhardt, T., Rill, A., Csehi, A., Hegedüs, B., Int. J. Peptide Protein Res., 22, 92 (1983).
23. Mühlemann, M., Titov, M. I. Schwyzer, R., Rudinger J., Helv. Chim. Acta, 55, 2854 (1972).
24. Rudinger, J., van den Brink-Zimmermanová, H. M., Helv. Chim. Acta, 56, 2216 (1973).
25. Wüncsh. E. (ed.) Synthese von Peptiden, (Houben-Weyl Methoden der Organische Chemie) Georg Thieme, Stuttgart, 1974, Vol. 15.
26. Bajusz, S., Medzihradszky, K., (1963) in Peptides 1962 Young, G. T., ed. 49-52 Pergamon Press, Oxford.

27. Hofmann, K., Stutz, E., Spühler, G., Yajima, H.
Schwartz, E. T., J. Am. Chem. Soc., 82, 3727 (1960).
28. Katsoyannis, P. G., Zalut, C. Tometsko, A., Tilak,
M. Johnson, S., Trakatellis, A. C., J. Am. Chem.
Soc., 93, 5871 (1971).
29. Katsoyannis, P. G., Ginos, J., Zalut, C., Tilak, M.
Johnson, S., Trakatellis, A. C., J. Am. Chem. Soc.,
93, 5877 (1971).
30. Marglin, A., Merrifield, R. B., J. Am. Chem. Soc.,
88, 5051 (1966).
31. Bajusz, S., A kémia újabb eredményei, 47. (1980)
Akadémiai Kiadó, Budapest
32. Marglin, A., Int. J. Protein Res., 4, 47 (1972).
33. Nesvadba, H. Roth, H., Monatshefte, 98, 1432 (1967).
34. Pinnick, H. W., Fernandez, E., J. Org. Chem., 44,
2810 (1979).
35. Rabideau, P. W., Huser, D. L., Nyikos, S. J., Tetra-
hedron Lett., 21, 1401 (1980).
- 36.a. Rabideau, P. W., Wetzel, D. M., Young, D. M., J.
Org. Chem., 49, 1544 (1984).
- 36.b. Rabideau, P. W., Tetrahedron, 45, 1579 (1989).
37. Schultz, A. G., Macielag, M., J. Org. Chem., 51,
4983 (1986).
38. Pradhan, S. K., Tetrahedron, 42, 6351 (1986).
39. Ressler, C., Kashelkar, D. V., J. Am. Chem. Soc.,

- 88, 2025 (1966).
40. Lacheveque, M., Cuvighy, T. C. R., Hebd, Seances Acad. Sci., Ser. C., 276, 279 (1973).
 41. Bodanszky, M., Tolle, J. C., Bednarek, M. A., Schiller, P. W., Int. J. Peptide Protein Res. 17, 444 (1981).
 42. Tzougraki, C., Makofske, R. C., Gabriel, T. F., Michalewsky, J. Meienhofer, J. Li, C. H., Int. J. Peptide Protein Res., 15, 377 (1980).
 43. Navaneethankishnan, J., Warf, J. C., J. Inorg. Nucl. Chem., 36, 1311 (1974).
 44. Maxl., F., Krummen, K., Pharm. Acta Helv., 53, 207 (1978).
 45. Larsen, B., Fox, B. L., Burke, M. F., Hruby, V. J. Int. J. Peptide Protein Res., 13, 12 (1979).
 46. O'hare, M. J., Nice, E. C., J. Chromatogr., 171, 209 (1979).
 47. Krummen, K., Pharm. Technol. Inst., 2, 37 (1979).
 48. Krummen, K., Maxl., F., Nachtman, F., Pharm. Technol. Inst., 3, 77 (1979).
 49. Krummen, K., J. Liquid Chromatogr., 3, 1243 (1980).
 50. Pask-Hughes, R. A., Corran, P. H., Calam. D. H., J. Chromatogr., 214, 307 (1981).
 51. Hearn, M. T. W., Grego, B., J. Chromatogr., 203, 349 (1981).

52. Gazdag, M., Szepesi, G., J. Chromatogr., 218, 603
(1981).
53. Wehr, C. T., Correia, L., Abbott, S. R., J. Chromatogr. Sci., 20, 114 (1982).
54. Hearn, M. T. W., Grego, B., J. Chromatogr., 255, 125
(1983).
55. Mabuchi, H., Nakahashi, H., J. Chromatogr., 213, 275
(1981).
56. Mabuchi, H., Nakahashi, H., J. Chromatogr., 233, 107
(1982).
57. Browne, C. A., Benett, H. P. J., Solomon, S., Anal. Biochem., 224, 201 (1982).
58. Cohen, K. A., J. Chromatogr., 282, 423 (1983).
59. White, M. W., J. Chromatogr., 262, 420 (1983).
60. Hermann, K., Lang, R. E., Unger, T., Bayer, C., Ganten, D., J. Chromatogr., 312, 273 (1984).
61. Maximilian, A., J. Chromatogr., 351, 341 (1986).
62. Sipos-Nagy, G., Horváth, I., Burger, K., Inorg. Chim. Acta, 130, 75 (1987).
63. Bodanszky, M., Martinez, J., in the Peptides, E. Gross, J. Meienhofer, Eds. Academic Press, New York
(1983). 112. o.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Felhasználom az alkalmat és e helyen is köszönetet mondok Dr. BURGER KÁLMÁN tanszékvezető egyetemi tanárnak, a kémiai tudomány doktorának, aki munkám kiindulópontját adta, munkámat mindvégig nagy figyelemmel kísérte és értékes szakmai tanácsaival segítette előrehaladásomat.

Köszönetemet fejezem ki Dr. PÉTER ANTAL egyetemi docensnek a kémiai tudomány kandidátusának a sokoldalú segítségéért, a szakmai vitákért és utmutató tanácsaiért.

Hálával gondolok Dr. SCHÖN ISTVÁN-ra a kémiai tudomány kandidátusára a hasznos együttműködésért és a kézirat elolvasásakor a mindenre kiterjedő figyelméért és értékes észrevételeiért.

Megköszönöm KUHN MIKLÓSNÉ vegyésztechnikus, SIMON ERNŐNÉ előadó és NAGY FERENCNÉ laboráns nélkülözhetetlen technikai segítségét.