

A csoportállandó-meghatározási módszer alkalmazását a 32 aminosavból álló adrenokortikotrop hormon fragmens (ACTH₁₋₃₂) protonálódási egyensúlyainak példáján mutatjuk be^{6, 40}.

Összefoglalás

Módszert dolgoztunk ki sokfajú ligandumok protonálódási egyensúlyainak csoportállandók segítségével történő jellemzésére. Levezettük a

Budapest, ELTE, Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék.

Érkezett: 1980. IV. 22.

⁴⁰ Noszál B., Burger K.: Magy. Kém. Folyóirat, 87. 175. 1981., Inorg. Chim. Acta, közlésre benyújtva.

makro- és csoportállandók összefüggéseit, megvizsgáltuk a csoportállandók bevezetésének kémiai feltételeit és számításának néhány lehetőségét.

Protonation equilibria of polyfunctional ligands. Group constants and their determination. B. Noszál

A method has been elaborated for the characterization of the protonation equilibria of polyfunctional ligands by the use of „group constants”. The correlations between the conventional macro equilibrium constants and the group constants, the conditions of their introduction and the computation methods of their determination are discussed in the paper.

Az oldószer hatása a corticotropin (ACTH) fragmensek protonálódási egyensúlyaira

NOSZÁL BÉLA és BURGER KÁLMÁN

ELTE Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszéke, 1088 Budapest, Múzeum krt. 4b.

Cirkuláris dikroizmus vizsgálatok¹ kimutatták, hogy a corticotropin (ACTH) molekula konformációja vizes oldatban függ az oldat kémhatásától. Különböző lánchosszúságú ACTH fragmensek protonálódási egyensúlyainak vizsgálata során kimutattuk² a konformációváltozással járó pH-függő rendeződés hatását a protonálódási egyensúlyokra.

Különböző oldószerekben elvégzett CD vizsgálatok^{1, 3} az ACTH molekula konformációjának oldószerfüggését is bizonyították. A vizes oldatban már bizonyos kezdeti rendeződést mutató polipeptid (gombolyag) trifluoro-etanolban részlegesen α -helix szerkezetet vesz fel. Víz—trifluoro-etanol oldószerkeletben a komponensek arányától függően változik a rendezettség mértéke.

Jelen célkitűzésünk annak kimutatása volt, hogy milyen hatást gyakorol az oldószer-csere, illetve az ACTH fragmensek konformációjának az oldószerfüggése a protonálódási egyensúlyokra. Ez a hatás a különböző oldószerkeletben meghatározott protonálódási makroállandókban is tükröződik⁴. Részletes értelmezését az akadályozta eddig, hogy a molekula számos, hasonló bázikusságú donoratomjának protonálódási folyamatai annyira átfedik egymást, hogy az egyedi donoresortok kvantitatív jellemzésére alkalmas protonálódási állandók nem voltak nyerhetők. A protonálódási makroállandók a teljes, összetett

folyamatot kvantitatíven leírják és megadják az oldatban jelenlevő ionfajták összetételének (peptid—kötött proton arány) változását a pH függésében, de a polifunkciós ligandum több protonálódási izomerjének keletkezése miatt az egyedi csoportok egzakt jellemzésére nem alkalmasak.

A feladat megoldását a polifunkciós ligandumok lépcsőzetes protonálódásának kvantitatív jellemzését szolgáló „csoportállandók” meghatározásához vezető új értékelő eljárásunk⁵ tette lehetővé.

Következő feladatunk a víznél kisebb relatív permittivitású és eltérő szolvatáló tulajdonságú oldószerkeletnek a pH-metriás egyensúlymérések kísérleti adataira gyakorolt hatásának kvantitatív figyelembe vételére alkalmas módszer kidolgozása volt. Erről és a segítségével az ACTH fragmensek protonálódási vizsgálata terén elért eredményekről az alábbiakban számolunk be.

Az oldószerkelet autoprotolízis állandójának meghatározása

Ahhoz, hogy az oldószerkeletben mért elektromotoros erő értékekből az egyensúlyi számításokhoz használható (a szabad hidrogénion-koncentrációval közvetlenül korrelációba hozható) adatokat nyerjünk, elsőként az oldószerkelet autoprotolízis állandóját kellett meghatároznunk. Ezt — egybekötve a mérőlánc nernsti funkciójának ellenőrzésével és a mV—pH kalibrálással — egy HClO₄—NaOH titrálási görbe adatai alapján végeztük el.

⁵ Noszál B.: Magy. Kém. Folyóirat, 87. 168. 1981.

⁶ B. Noszál, K. Burger: Acta Chim. Hung., 100. 275. 1979.

¹ D. Greff, F. Toma, S. Fermandjian, M. Löw, L. Kisfaludy: Biochim. Biophys. Acta, 439. 219. 1976.

² K. Burger, F. Gaizer, B. Noszál, M. Pékli, G. Takácsi-Nagy: Bioinorg. Chem., 7. 335. 1977.

³ P. G. Squire, T. Bewley: Biochem. Biophys. Acta, 109. 234. 1965.

⁴ K. Burger: Metal Ions in Biological Systems, 9. 213. 1979.

A titrálást az adott oldószerkegyekben az ACTH fragmensek protonálódási vizsgálatával analóg módon $0,3 \text{ mol dm}^{-3}$ ionerősségű oldatokban végeztük. A titrálási görbéknek azon pontjait (egy-egy titrálásnál 16–20-at) használtuk fel, melyek érintőjének iránytangense kb. 0,5 és 2 közé esik, így az elektromotoros-erő-mérés és a térfogatleolvasás hibájának hatása e szakaszokon összemérhető. A kiértékelés alapját saját és irodalmi^{7, 8} tapasztalatok felhasználásával a következő munkaeqyenletek képezték:

$$E = E'_0 - x$$

$$\cdot \lg \left[\frac{C_H V_H - C_{Na} V_{Na}}{V_H + V_{Na}} + \left[\left(\frac{C_H V_H - C_{Na} V_{Na}}{V_H + V_{Na}} \right)^2 + 4K_V \right]^{1/2}}{2} \right] \quad (1)$$

$$K_V = \frac{2 \cdot 10^{\frac{E'_0 - E}{x}} - \frac{C_H V_H - C_{Na} V_{Na}}{V_H + V_{Na}}}{4} - \left[\frac{C_H V_H - C_{Na} V_{Na}}{V_H + V_{Na}} \right]^2 \quad (2)$$

$$x = \frac{m \Sigma E \lg [H^+] - \Sigma \lg [H^+] \Sigma E}{m \Sigma (\lg [H^+])^2 - (\Sigma \lg [H^+])^2} \quad (3)$$

$$E'_0 = \frac{\Sigma E - x \Sigma \lg [H^+]}{m} \quad (4)$$

Ahol E az elektromotoros erő, E'_0 a mérőlánc egészének pH-független állandója, x a nernsti $RT/2,303 F$ kifejezés tapasztalati értéke, C_H és V_H a perklorosav, C_{Na} és V_{Na} a nátronlúg analitikai koncentrációja és térfogata, K_V az oldószerkegy autoprotolízis állandója a $0,3 \text{ mol dm}^{-3}$ ionerősségű és 25°C hőmérsékletű oldatokban, m a mérési pontok száma, $[H^+]$ az egyensúlyi hidrogénion-koncentráció [az (1) egyenlet logaritmizált része].

Az E'_0 , x és K_V állandók számítására iterációs módszert dolgoztunk ki. Az (1) egyenlet az elektromotoros erőnek az analitikai koncentráció- és térfogatadatoktól, valamint a rendszert jellemző előbbi állandóktól való függését adja meg. Ebből a lineáris legkisebb négyzetek elvén történő hibaminimalizálással az összes adathoz legjobban simuló iránytangens és tengelymetszet a (3) és (4) kifejezések szerint számítható. Mivel a K_V hasonló módon történő egyidejű számítása nem megoldható, ezért első közelítésben feltételezett autoprotolízis állandót kellett behelyettesítenünk, melynek hibája az E'_0 és x értékek torzulását okozza. Ennek kiküszöbölése végett a frissen kapott E'_0 és x felhasználásával a (2) összefüggés alapján az oldószerkegy autoprotolízis állandóját minden pontban kiszámoljuk, átlagoljuk, majd az i -edik és $(i-1)$ -edik közelítésben nyert értékük számtani közepét képezzük. Az $(i+1)$ -edik közelítésben E'_0 és x számításához már ezeket az adatokat helyettesítjük be. Az egész eljárás többszöri megismétlése az E'_0 , x és K_V konstansoknak a valósághoz hű értékek irányába történő lassú,

de biztos konvergenciáját eredményezi, amit a számított és mért E -kből kapott korrigált tapasztalati szórás kiszámításával és tiszta vizes közegben való alkalmazással ellenőriztünk. Az ily módon meghatározott autoprotolízis állandó érték $50 \text{ v/v}\%$ $\text{F}_3\text{C}-\text{CH}_2\text{OH}-\text{H}_2\text{O}$ elegyben $10^{-11,04}$, $50 \text{ v/v}\%$ $\text{HOCH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_3-\text{H}_2\text{O}$ elegyben pedig $10^{-13,53}$. Az oldószerkegyek relatív permittivitása rendre 55 és 59 volt.

Az ACTH fragmensek protonálódási csoportállandóinak meghatározása

Az egyensúlyi adatokat korábbi dolgozatainkban^{2, 4, 5} leírt módon a Kőbányai Gyógyszerárugyár egyenértéknyi mennyiségű sósavval kétszer liofilizált perprotonált ACTH_{1-4} és ACTH_{1-32} corticotropin fragmenseinek $0,01 \text{ M}$, illetve $0,1 \text{ M}$ NaOH mérőoldattal végzett alkalimetriás titrálási görbéiből, illetve a belőlük szerkesztett \bar{H} -pH függvényekből nyertük (ahol \bar{H} az átlagosan egy peptidmolekuláról ledisszociált protonok száma). A vizsgálatokat vizes oldatban és a komponenseket 1:1 térfogatarányban tartalmazó trifluoroetanol-víz, valamint propilén-glikol-víz oldószerkegyekben végeztük. Vizes oldatban analóg módon elvégeztük az ACTH_{1-14} protonálódási vizsgálatát is.

A \bar{H} -pH adatképekből, illetve a makroállandókból számítógépi eljárással közvetlenül a megfelelő csoportállandókat⁵ nyertük, melyek a szokásos módon számított komplexszorzatokkal, pl. egy három lépéses folyamatban, az alábbi összefüggésben vannak:

$$\beta_1 = K_A + K_B + K_C$$

$$\beta_2 = K_A K_B + K_A K_C + K_B K_C$$

$$\beta_3 = K_A K_B K_C$$

ahol K_A , K_B és K_C az A, B és C hasonló bázikuságú donorcsoportok protonálódási csoportállandói, β_1 , β_2 , β_3 a szokásos módon meghatározott komplex szorzatok. Analóg módon felírható a fenti összefüggés többlépésű folyamatokra is.

A perprotonált vegyületek alkalimetriás titrálási görbéiből, valamint a belőlük szerkesztett \bar{H} -pH függvényekből megállapítható volt, hogy ACTH_{1-4} -nél lépcsőzetes, az ACTH_{1-32} -nél már teljesen egybefolyó, soklépésű protodisszociációs folyamatokkal kell számolnunk, melyek felölelik a vizsgált teljes pH-tartományt.

A titrálási görbék értékelését és a csoportállandók meghatározását több tényező nehezíti. A tirozin fenolos hidroxil és a lizin ϵ -ammónium-csoportok protonvesztési pH tartományában (különösen annak felső szakaszán) az arginin guanidinium csoportok deprotonálódási folyamatai már nem elhanyagolhatóak. Az ezekhez tartozó ($\lg K = 12-13$) makroállandók a peptidok általunk alkalmazott $5 \cdot 10^{-4}-10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ koncentrációja mellett csak nagy bizonytalansággal volnának meghatározhatóak. Ugyanakkor e folyamatok a fenolátokhoz és ϵ -aminocsoportokhoz

⁷ D. Dyrssen: Svensk. Kem. Tidskr., 64. 213. 1952.

⁸ N. Ingri, G. Lagerström, M. Frydman, L. G. Sillén: Acta Chem. Scand., 11. 1034. 1957.

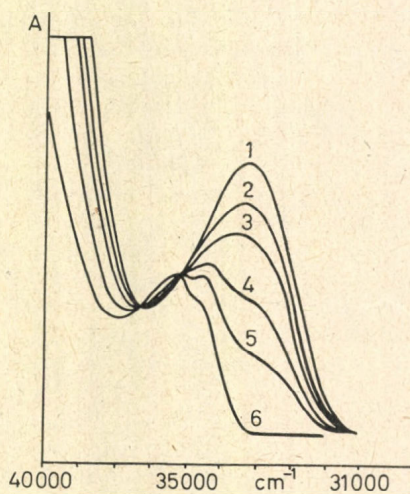
tartozó $\lg K > 8$ értékű állandókban is érzetik hatásukat. Ez kiküszöbölhető lenne a peptid és a titráló NaOH-oldat koncentrációjának növelésével, amit azonban két tényező is korlátoz. Egyrészt a számos — e tartományban főként negatív — töltéssel rendelkező csoportot magában foglaló molekula ionerősség-befolyásoló hatását elhanyagolhatóan alacsony szinten kell tartani, másrészt az ionerősség növelésével a peptidok és fehérjék konformációja változást szenvedhet. További hibát okozhat, hogy e nagymolekulájú peptidok analitikai koncentrációja általában $\pm 1-2\%$ -nál pontosabban nem határozható meg.

A trifluoro-etanol-tartalmú oldószerkeletben a pH-skála összeszűkül ($\lg K_v = -11,04$ a vízben érvényes -14 helyett) és ez az erősen bázikus csoportok protonálódási állandója meghatározásának pontosságát tovább csökkenti.

Ezen okok miatt a rendszerekben potenciometriásan meghatározott állandók pontossága szükségszerűen alatta marad a kisebb ligandumokat tartalmazó rendszerekre vonatkozóknak. Így — annak ellenére, hogy segítségükkel a kísérleti mV és a származtatott \bar{H} adatok a mérési hibahatáron belüli pontossággal ($\pm 0,1$ mV, illetve $\pm 0,02 \bar{H}$) visszaszámolhatók voltak — bizonytalanságuk tetemes, $0,05-0,15$ lg egységre tehető.

A potenciometriás adatok alátámasztására ezért elvégeztük az $ACTH_{1-4}$ és $ACTH_{1-32}$ protonálódásának UV spektroszkópiás vizsgálatát is.

Az $ACTH_{1-4}$ különböző kémhatású trifluoro-etanol—víz oldószerkeletben felvett UV spektrumait az 1. ábra mutatja be. Hasonló görbesoro-



1. ábra

Az $ACTH_{1-4}$ különböző kémhatású 50 v/v %-os trifluoro-etanol—víz oldószerkeletben felvett ultraibolya spektrumai: 1. pH = 11,95; 2. pH = 10,69; 3. pH = 10,38; 4. pH = 9,94; 5. pH = 9,58; 6. pH = 7,95

kat kaptunk a peptid vizes oldatban és propilén-glikol—víz oldószerkeletben végzett vizsgálatok során is. Ezen görbék $34\,200\text{ cm}^{-1}$ hullámhossznál mért abszorbanca értékeinek pH-függéséből az $ACTH_{1-4}$ tirozinja fenolos oxigénjének protonálódási csoportállandóját határoztuk meg. A kapott értékek az 1. táblázatban közölt potencio-

1. táblázat

ACTH fragmensek protonálódási csoportállandói vizes oldatban (logaritmus értékek)

Funkciós csoport	$ACTH_{1-4}$	$ACTH_{1-14}$	$ACTH_{1-32}$
Terminális COO^-	3,20	3,47	3,54
Glutaminsav + COO^- Aszparaginsav		4,19	3,59 ! 4,10 4,25 5,03 !
Hisztidin N		6,31	6,43
Terminális NH_2	7,27 !	7,29 !	7,47
Lizin NH_2		9,94	9,70 ! 10,13 10,45 10,82
Tirozin OH	10,70	10,86	10,94 10,98

metriásan meghatározott adatokkal a mérési hiba határain belüli egyezést mutatnak.

Az $ACTH_{1-32}$ peptid analóg vizsgálatában nehézségeket okozott, hogy a tirozin molekularészletek protonvesztésére érzékeny $34\,200\text{ cm}^{-1}$ körüli színeképtartományban e molekula triptofán indolgyűrűjének is igen erős, a tirozin fenoláténál is nagyobb intenzitású elnyelése van, és a fenilalanin és hisztidin aromás oldallánca is rendelkezik kisebb mértékű, pH-független fényabszorpcióval. Ennek következtében a potenciometriás módszerrel meghatározottnál pontosabb állandókat spektrofotometriásan sem kaphattunk.

Az $ACTH_{1-4}$, $ACTH_{1-14}$ és $ACTH_{1-32}$ polipeptidok vizes oldatban meghatározott protonálódási csoportállandóit az 1. táblázatban foglaltuk össze. A három különböző lánchosszúságú molekula állandóit egymással és a megfelelő aminosavak analóg adataival összehasonlítva, a vizsgált rendszerekről az alábbi következtetések szűrhetők le:

1. A C-terminális aminosavak karboxiljaihoz rendelt állandók ($ACTH_{1-4}$ -metionin: $\lg K = 3,20$; $ACTH_{1-14}$ -glicin: $\lg K = 3,47$ és $ACTH_{1-32}$ -alanin: $\lg K = 3,54$) a megfelelő aminosavban meghatározottakénál kb. egy lg egységgel nagyobbak adódtak. Nagyságuk sorrendje ugyanaz, mint az aminosavakban. Így értékük a peptidkötés és az oldallánc együttes hatásával magyarázható.

2. Az $ACTH_{1-14}$ $\lg K = 4,19$ csoportállandója feltehetőleg a hidrogénhidas kapcsolatoktól mentes, csak a peptidkötések által befolyásolt láncközi karboxilát bázicitását tükrözi. Ehhez hasonló értékű két csoportállandót az $ACTH_{1-32}$ -molekulában is meghatároztunk, ahol azonban másik két karboxiláthoz rendelt állandó értéke jelentősen eltér. Tekintve, hogy egy hidrogénhíd képződéséhez $(A + B + H^+ \rightleftharpoons A-H^+-B)$ és felbomlásához $(A-H^+-B + H^+ \rightleftharpoons HA + HB)$ tartozó két csoportállandó a pillércsoportokkal azonos de H-hídban részt nem vevő csoportok protonálódási állandóinál elvileg azonos értékkel kell, hogy

magasabb, illetve alacsonyabb legyen, az ACTH_{1-32} $\lg K = 4,25$ és $4,10$ értékű állandói legvalószínűbben az egymástól távol levő és így H-hidat nem képező 5. helyzetű glutaminsavhoz és a 29. helyzetű aszparaginsavhoz, míg a $\lg K = 5,03$ és $3,59$ értékű állandók a 28. és 30. helyzetű glutaminsavak γ -karboxiljaihoz rendelhetők. Utóbbiak H-híddal kapcsolódhatnak, ez jelentkezik az állandók nagy különbségében.

3. Az ACTH_{1-4} és ACTH_{1-14} terminális aminosoportjának protonálódási csoportállandója szignifikánsan kisebb mint az ACTH_{1-32} -é. Ez arra utal, hogy előbbieket hidrogénhidat kapcsolatba léphetnek valamilyen nagyobb protonálódási állandójú csoporttal.

4. A lizin ε -aminocsoportjához, és peptidek oldallánci, szabad primer aminosoportjaihoz tartozó állandóktól való legnagyobb eltérést az ACTH_{1-32} $\lg K = 9,70$ értékű protonálódási csoportállandója mutatja. Hasonló adattal az ACTH_{1-14} molekulában is találkozunk ($\lg K = 9,94$), a jelenségért tehát az ACTH_{1-32} molekulában is bizonyára olyan molekularészlet felelős, ami a kisebb peptidben is jelen van. Ilyen a 11. helyzetű lizin ε -aminocsoportja. Mivel a hozzá tartozó csökkent állandónak nincs megfelelően magasabb értékű párja (illetve az a vizsgált pH-tartományban „nem jelentkezik”) az ε -aminocsoport hidrogénhidképzésben résztvevő párja ez esetben nyilván olyan csoport (szerin alkoholos hidroxil, arginin guanidinium vagy peptidkötésű $-\text{NH}-$), melynek protonvesztése csak magasabb — jelen munka során nem vizsgálható — pH-nál játszódik le.

5. Az általunk még értékelte pH-tartomány leglúgosabb részében protonját vesztő öt csoport (melyek az aminosavakban közel azonos mértékben savanyú fenolos hidroxil- és ε -ammónium-csoportokhoz rendelhetők) egymásközi és a molekula egyéb részeivel való kölcsönhatását és a konformáció kialakításában játszott fontos szerepét mutatja, hogy állandóik korántsem azonosak, középértéküktől ($\lg K = 10,66$) átlagosan $\pm 0,3$ $\lg K$ egységgel térnek el.

Az ACTH_{1-4} és ACTH_{1-32} polipeptidek oldószerkegyekben meghatározott protonálódási csoportállandóit a 2. táblázatban foglaltuk össze. Ezeket egymással és a vizes oldatban meghatározott adatokkal összevetve az oldószernek a protonálódási folyamatra gyakorolt hatására következtethetünk.

Az ACTH_{1-4} példáján a legfontosabb funkcióscsoport-típusok (karboxilát-, amino- és fenolos hidroxilcsoport) bázicitásának az oldószer cseréjével járó változása figyelhető meg.

A terminális karboxilátcsoporthoz az oldószerkegyekben meghatározott nagyobb protonálódási állandói ($\lg K = 3,88$, illetve $3,89$, szemben a vízben meghatározott $\lg K = 3,20$ értékkel) az oldószerkegyek kisebb relatív permittivitásával magyarázhatók, mely a semleges részecskék keletkezésének kedvez ($\text{RCOO}^- + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{R-COOH}$).

A terminális aminosoporthoz tartozó $\lg K = 6,77$, illetve $6,87$ állandók, a vizes oldatban kapott megfelelő állandóhoz ($\lg K = 7,27$) viszo-

nyítva csökkenést mutatnak, ami a protonátlan, illetve protonált aminosoport szolvatációs viszonyában bekövetkező, az előbbi számára kedvező változásokkal magyarázható. Hasonló megállapításokat tehetünk ACTH_{1-32} molekulában

2. táblázat

ACTH fragmensek protonálódási csoportállandói oldószerkegyekben (logaritmus értékek)

Funkciós csoport	Trifluoro-etanol—víz		Propilénglikol—víz	
	ACTH_{1-4}	ACTH_{1-32}	ACTH_{1-4}	ACTH_{1-32}
Terminális COO^-	3,88	4,08	3,84	4,00
Glutaminsav + COO^-		4,17		4,21
Aszparaginsav		4,73		4,46
		4,80		5,02
		5,47		5,29
Hisztidin N		6,13		6,06
Terminális NH_2	6,77	6,77	6,87	6,82
Lizin $\varepsilon\text{-NH}_2$		8,41 !		8,56 !
		9,49		9,73
		9,75		9,84
		9,82		9,84
Triozin OH	9,95	9,84	10,04	9,84
		9,87		9,84

az imidazolcsoporthoz is. Tulajdonképpen e csoportoknál is az oldószerkegy az elektromosan semleges állapot kialakulásának kedvez.

A fenolos hidroxilok (a vizes közeghez képest) csökkent állandóinak a kialakulásában a két oldószerkegyben feltehetően különböző hatások játszanak közre. A propilénglikol-tartalmú oldatban a deprotonált fenolláttal kelátjellegű H-híd képzésére alkalmas propilénglikolnak a fenollát oxigénnel való kölcsönhatása, míg a trifluor-etanoltartalmú oldatban utóbbinak a protonra gyakorolt specifikus szolvatációja (vö.: $\text{p}K_v = 11,04$) a felelős a kisebb protonálódási csoportállandókért.

Az ACTH_{1-32} protonálódási csoportállandóinak a fentiekől eltérő oldószerfüggése a másodlagos szerkezet módosulásával magyarázható.

Az ACTH_{1-32} ε -aminocsoportjaihoz rendelhető állandóinak legalacsonyabbika mindkét oldószerkegyben a megfelelő vizes közegű értékhez képest is fokozott csökkenést mutat, ugyanakkor a legbázikusabb öt csoporthoz tartozó állandó egymástól és a középértékűtől való átlagos eltérése (trifluor-etanolos oldatban $0,11$, propilénglikolosban $0,03$) jóval kisebb, mint vízben. Ez arra utal, hogy a vízkoncentráció csökkenésével bekövetkező helikális rendeződés a kiugróan alacsony stabilitási állandót eredményező hidrogénhidat kapcsolat kialakulásának kedvez, a vizes oldatra jellemző (gombolyag) szerkezetet hordozó további hidrogénhidat képződését azonban gátolja.

Kísérleti rész

A pH-metriás egyensúlyi vizsgálatokat vizes oldatban kálium-nitráttal, az oldószerkegyekben nátrium-perkloráttal $0,3 \text{ mol dm}^{-3}$ állandó ionerősségre beállított $25,00 \pm 0,1$ °C hőmérsékletre termosztált oldatokban végeztük. Mérőműszerünk Radiometer pH M 64 precíziós pH-mérő volt. A titráló $0,01$, majd $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ karbonátmentes NaOH adagolására Radiometer ABU 12 automata bürettát használtunk. A mérőelektród Radiometer G 202 B üvegelektrod, a viszonyító elektród Wilhelm hídban⁹ $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ ezüst-nitráttal egyensúlyban levő Radiometer P 501 ezüstelektród volt.

Mivel az aminosavak és származékaik töltése a hidrogénion-aktivitástól függően különböző lehet, s ennek befolyása van az ionerősségre, ezért koncentrációjukat úgy választottuk meg, hogy hatásuk elhanyagolható legyen az ionerősség $0,3 \text{ mol dm}^{-3}$ -as értékéhez képest, de érje el vagy haladja meg az $5 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3} -at. Ennek megfelelően mindegyik potenciometriás vizsgálatot $5 \cdot 10^{-4}$ és $10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ peptidkoncentrációjú oldatban végeztük.

A perprotonált peptidet a megfelelő ionerősségű $0,1$ vagy $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ savkoncentrációjú oldatban feloldottuk, majd $0,01$, illetve $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ NaOH mérőoldattal történő titrálás közben mértük a pH változása által okozott elektromotoros erő változást.

Az üvegelektrodot a mérések előtt legalább 16 óráan keresztül a megfelelő oldószerrel készült savoldatban áztattuk. A vizes oldatban végzett mérések során közvetlenül a mérések előtt és után módosított összetételű $0,3 \text{ mol dm}^{-3}$ ionerősségre beállított Britton–Robinson¹⁰ pufferrel — az egész mérőlánccal együtt — kalibráltuk. Az oldószerkegyekben a mérőlánc kalibrálása $0,01$ és $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ koncentrációban elvégzett HClO_4 — NaOH titrálások segítségével történt. Az alkalmazott koncentrációknál az üvegelektrodnak fehérjehibája (lassú beállítás, nehéz reprodukálhatóság) nem volt megfigyelhető. Az egyensúlyok pillanatszerűen beálltak.

A csoportállandóknak^{5,6} a mérési adatokból (elektromotoros erő értékek és összkoncentrációk) történő kiszámítási módját külön dolgozatban⁵ részletesen tárgyaljuk.

A vizsgálatokhoz felhasznált corticotropin fragmensek a Kőbányai Gyógyszerárugyár, Budapest termékei. Átengedésükért ezúton is köszönetet mondunk.

⁹ W. Forsling, S. Hietanen, L. G. Sillén: Acta Chem. Scand., 6. 905. 1952.

¹⁰ H. T. S. Britton, R. A. Robinson: J. Chem. Soc., 458. 1931.

Összefoglalás

Potenciometriás egyensúlymérési módszerrel meghatároztuk két corticotropin fragmens, az N-terminális 4 aminosavból álló ACTH_{1-4} és az N-terminális 32 aminosavból álló ACTH_{1-32} protonálódási csoportállandóit vizes oldatban és $50 \text{ v/v}\%$ -os trifluoro-etanol—víz, valamint propilén-glikol—víz oldószerkegyekben, továbbá az N-terminális 14 aminosavból álló corticotropin fragmens (ACTH_{14}) protonálódási csoportállandóit vizes oldatban.

Az eredmények az intramolekuláris H-hidak képződésének és a solvatációnak a protonálódási folyamatokra gyakorolt hatását mutatják.

The effect of solvents on protonation equilibria of corticotropin (ACTH) fragments. B. Noszál and K. Burger

Potentiometric equilibrium measurements were used to determine the protonation group constants characteristic of the individual donor groups in the polyfunctional molecule of two corticotropin fragments, the N-terminal ACTH_{1-4} containing 4 amino acids and the N-terminal ACTH_{1-32} containing 32 amino acids, in aqueous solution and in trifluoroethanol—water ($50 \text{ v/v}\%$) and propylene glycol—water ($50 \text{ v/v}\%$) solvent mixtures. The protonation group constants of the N-terminal corticotropin fragment (ACTH_{1-14}) containing 14 amino acids were also established in water. The results reflect the effect of the formation of intramolecular H-bonds and solvation on the protonation processes.

Budapest, ELTE, Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék.

Érkezett: 1980. IV. 22.

Ritkaföldfém(III)-diethylentriamin-pentaacetát komplexek és az Eu^{3+} ionok közötti kicserélődési reakciók kinetikai vizsgálata

BRÜCHER ERNŐ és LAURENCZY GÁBOR

Kossuth Lajos Tudományegyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszéke, Debrecen, 4010

A ritkaföldfém(III)-etiléndiamin-tetraacetát (Lnedta) és -transz-1,2-diaminociklohexán-tetraacetát (Lndcta) komplexek stabilitási állandói monoton nőnek¹, míg a központi ionjaik kicserélődési

reakcióinak a sebessége csökken a rendszám növekedésével²⁻⁸.

A kicserélődési reakciók túlnyomóan a komplexek proton katalizált disszociációjával folynak

¹ Stability Constants of Metal-Ion Complexes. Compiled by L. G. Sillén, A. E. Martell. Spec. Publ. No. 17. The Chem. Soc. London, 1964.

² R. H. Betts, D. F. Dahlinger, D. M. Munro: „Radioisotopes in Scientific Research”, Ed. R. C. Extermen, Vol. 2., Pergamon Press, London, 1958. 326 l.

³ P. Glentworth, B. Wisall, C. L. Wright, A. J. Mahmood: J. inorg. nucl. Chem., 30. 967. 1968.

⁴ E. Brücher, P. Szarvas: Inorg. Chim. Acta, 4. 632. 1970.

⁵ T. Ryhl: Acta Chem. Scand., 26. 3955. 1972.

⁶ G. A. Nyssen, D. W. Margerum: Inorg. Chem., 9. 1814. 1970.

⁷ T. Asano, S. Okada, S. Taniguchi: J. inorg. nucl. Chem., 32. 1287. 1970.

⁸ P. Glentworth, D. A. Newton: J. inorg. nucl. Chem., 33. 1701. 1971.