

Analízis ($C_{32}H_{35}BF_4NO_9P$, 695,43):

Számított: C: 55,27%, H: 5,07%, P: 4,45%, F: 10,93%

Talált: C: 54,75%, H: 5,24%, P: 3,92%, F: 10,58%

B) 1,0 g (1,65 mmól) tetraacetil-glükózil-foszfinimint 4 cm^3 1:5 arányú konc. sósav—ecetsavanhidrid elegyben feloldva, majd 40 cm^3 vízmentes éterrel elegyítve a cukorfoszfinimin-hidroklorid olajos termék formájában válik ki, amely vízmentes éterrel digerálva megszilárdul. Leszívva és vízmentes éterrel mosva 0,9 g amorf termék nyerhető. Op.: 105–106 °C, $[\alpha]_D = -5^\circ \rightarrow +25^\circ$ (diklór-metán, $c = 5$). A reakcióelegyből állás közben további 0,15 g anyag válik ki. Össztermelés 98%.

A nyers cukorfoszfinimin-hidrokloridot (0,4 g) 12 cm^3 etil-acetáttal felforraltva, szárítva és bepárlás után a maradékot 3 cm^3 vízben oldva, majd 0,2 g nátrium-[tetrafluoroborát(III)] 2 cm^3 vizes oldatával elegyítve a tetraacetil-glükózilaminofoszfinimin-[tetrafluoroborát(III)] kristályosan válik ki: 0,29 g (67%). Op.: 191–193 °C; $[\alpha]_D = +6,5$ (kloroform, $c = 5$).

Összefoglalás

Az Appel-reakció — primer aminok reakciója trifenil-foszfin—szén-tetraklorid eleggyel — szénhidrátkémiai alkalmazása jó termeléssel szolgáltatja a megfelelő cukor-amino-foszfiniumsókat (IV és V) 2-amino-2-dezoxi-1,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -*D*-glükopiranozból (II) és 6-amino-6-dezoxi-1,2:3,4-di-*O*-izopropilidén- α -*D*-galaktopiranozból (III). A IV hidrokloridból a VI foszfiniminbázis könnyen felszabadítható. Meglepő módon, hasonló körülmények között a 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -*D*-glükopiranozilamin (I) főtermékként diglükózil-

amin-oktaacetátot (XIII) ad, a várt cukor-amino-foszfiniumsó (XIIa) csak melléktermékként képződik. Ez utóbbi anomális reakcióra valószínű mechanizmust javasolunk.

Synthesis of sugar phosphinimine derivatives from amino sugars. I. Pintér, J. Kovács and A. Messmer

The application of the Appel reaction, i.e. treatment of primary amines with triphenylphosphine-carbon tetrachloride, afforded a simple method to prepare new carbohydrate aminophosphonium salts (IV and V) in the case of 2-amino-2-deoxy-1,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -*D*-glucopyranose (II) and 6-amino-6-deoxy-1,2:3,4-di-*O*-isopropylidene- β -*D*-galactopyranose (III). From the salt IV the corresponding sugar phosphinimine base (VI) could readily be obtained. Surprisingly, under usual conditions 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -*D*-glucopyranosylamine (I) gave diglucosylamine octaacetate (XIII) as the main product, in addition to the expected sugar aminophosphonium chloride (XIIa). A probable mechanism of this reaction is discussed.

Budapest, Magyar Tudományos Akadémia Központi Kémiai Kutató Intézete.

Érkezett: 1976. IX. 2.

Polipeptidek koordinációs kémiai vizsgálata, II.*

A szintetikus α_H -Corticotropin_{1–32} cinkkomplexének egyensúlyi vizsgálata

BURGER KÁLMÁN, GAIZER FERENC, ZAY ISTVÁN, PÉKLI MÁRTA és NOSZÁL BÉLA

Bevezetés

Előző — polarográfiás — vizsgálataink¹ során kimutattuk, hogy a cinkionok a Corticotropin_{1–32} (ACTH) vizes oldatában e polipeptid funkció csoportjaihoz koordinálódnak. A mérésekből kitűnt, hogy a rendszerben a Zn : ACTH aránytól függően lépcsőzetesen több különböző stabilitású komplex képződik. Ezek összetétele azonban az elektródfolyamat irreverzibilitása miatt csak feltételezhető volt. Jelen vizsgálataink célja ezért a cink—Corticotropin rendszer potenciometriás egyensúlyi vizsgálata a komplexek összetételének és stabilitási állandóinak meghatározása céljából.

A cinkionaktivitás mérésére és ezen keresztül cinkkomplexek potenciometriás egyensúlyi vizsgálatára a cink-amalgám-elektrod bevált². Österberg³ még az albumin fehérjemolekula cinkkomplexének vizsgálatára is eredményesen használta.

Már előkísérleteink során kitűnt azonban, hogy a Corticotropin molekula a cinkamalgám-elektrodot mérgezi. Ezért vizsgálatainkhoz egy, a mérendő rendszerhez dialízis membránnal kapcsolódó olyan amalgám-elektrodot dolgoztunk ki, mely a cinkionaktivitás mérésére a makromolekulájú polipeptid Corticotropin jelenlétében is alkalmas. Ezzel a klasszikus egyensúlyi kémia elvei szerint^{4,5} állandó ionerősségű, de különböző analitikai összetételű oldatokban meghatároztuk a szabad cinkion-koncentrációt. Ennek ismeretében a cink és ACTH össz-koncentrációkból számítógépi értékeléssel⁶ nyertük a lépcsőzetesen képződő komplexek összetételét és stabilitási állandóit.

Az ilyen típusú vizsgálatokat kis molekulájú ligandumok — így néhány aminosavból álló polipeptidek⁷ — esetében is rutinszerűen végzik. A makromolekulájú, nagyszámú és különböző donor-

⁴ F. J. C. Rossotti and H. Rossotti: The Determination of Stability Constants. McGraw Hill, New York, 1961.

⁵ M. T. Beck: Chemistry of Complex Equilibria. Van Nostrand, London, 1970.

⁶ Gaizer F.: A kémia újabb eredményei. Megjelenés alatt.

⁷ L. G. Sillén and A. E. Martell: Stability Constants of Metal Ion Complexes. Chem. Soc. London, 1964.

* I. közlemény: 1.

¹ Burger, K., Farsang, G., Ladányi, L., Noszál, B., Pékli, M. és Takácsi-Nagy, G.: Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 2. 329. 1975.

² L. G. Sillén and B. Liljeqvist: Svensk. Kem. Tidskr., 56. 85. 1944.

³ R. Österberg: Acta Chem. Scand., 25. 3827. 1971.

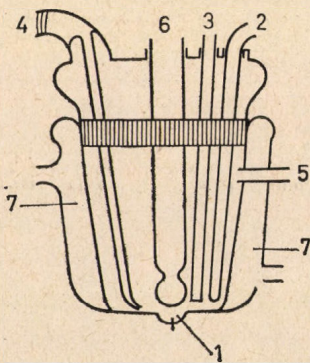
erősségű funkciók csoportot tartalmazó ligandumoknál, amilyen az általunk vizsgált Corticotropin fragmens is, a komplexképzésben résztvevő donoratomoknak az egyes lépcsőzetesen képződő komplexekhez történő hozzárendelése rendkívül nehéz feladat. Ehhez nyújtanak segítséget korábbi¹ polarográfiás és deprotonálódási egyensúlyi vizsgálataink és a Corticotropin különböző nagyságú fragmenseinek pH-metrián meghatározott protonálódási állandói. Ez utóbbiakhoz vezető vizsgálatainkat következő dolgozatunkban közzöljük⁸.

A vizsgálataink tárgyát képező 32 aminosav-részből álló Corticotropin (ACTH) fragmens 15 különböző aminosavat tartalmaz. Komplexképződés szempontjából számításba jövő funkciók csoportjai: a peptidkötések, 5 karboxil-, 5 primer amino-, 3 guanidino-csoport, 2 fenolos hidroxil, 3 alkoholos hidroxil, 1 imidazol-nitrogén, 1 indol-nitrogén és 1 tioéter kénatom.

Jelen vizsgálataink célja az egyensúlymérések útján nyerhető összetétel és stabilitási adatok meghatározása mellett az egyes funkciók csoportoknak a komplexképződési folyamat különböző lépcsőjéhez történő valószínű hozzárendelése volt.

Kísérleti rész

A méréseinkhez konstruált zárt üvegedényt az 1. ábrán mutatjuk be. Az 1-es számmal jelzett zsebben helyezkedik el a mérőelektrodként szolgáló cinkamalám-csepp, amely egy dialízismembránon keresztül csatlakozik a vizsgálandó oldathoz (az elektród és a membrán között kb. 1 mm vastag 0,3 mólos KNO_3 réteggel) és egy beforrasztott platinadrót segítségével a mérőrendszerhez. Csiszolt dugós csatlakozáson keresztül nyúlik az oldatba a viszonyító elektróddal összekötő Wilhelm-híd⁹ (2), a cinkoldat-tartalmú Radiometer ABU 12 precíziós automata buretta (3), az oxigénmentesített nitrogéngáz be- és kivezetése (4 és 5) és a pH ellenőrzésére szolgáló üvegelektrod (6). Az edényt a termosztáló vizet tartalmazó üvegköpeny (7) veszi körül.



1. ábra
A cinkamalám-elektrods mérőrendszer

A cinkamalám-elektrod csak teljesen oxigénmentes közegben ad helyes mérési eredményeket, ezért az amalgám-cseppnek az edényben történő elhelyezése és a vizsgálandó oldat bemérése után a rendszeren gondosan oxigénmentesített nagytisztaságú nitrogéngázt kell kb. 1 óráig átbuborékolni mielőtt a tulajdonképpeni mérést elkezdhetnénk.

⁸ Burger K., Noszál B., Gaizer F., Pékli M. és Takácsi Nagy G.: Magy. Kém. Folyóirat, megjelenés alatt.

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

A dialízis-membrán alkalmazásával az általunk konstruált egyszerű edény alkalmassá vált a cinkionaktivitás mérésére olyan makromolekulájú ligandumok jelenlétében is, amelyek az elektródfelületen fellépő adszorpciójuk esetleg kemiszorpciójuk útján az elektródot mérgezik.

A dialízis-membrán alkalmazásának hátránya, hogy lassítja a szabad cinkionoknak az elektródfelületre való jutását. Ezért minden mérési pontban 120 percet kellett várni az egyensúly teljes beállásáig.

Az egyensúlyméréseket kálium-nitráttal $I = 0,3$ ion-erősségre beállított $25,0 \pm 0,1$ °C hőmérsékletre termosztált pH = 5,90 kémhatású (az alapanyag saját pH-ja) oldatban végeztük. A Corticotropin kiindulási koncentrációi: 10^{-3} illetve $5 \cdot 10^{-4}$ mól dm^{-3} . Titrálásra 0,01 és 0,1 mól dm^{-3} $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ mérőoldatokat használtunk.

Az alkalmazott reagensek analitikai tisztaságúak (pro anal.) voltak. A $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ -oldat koncentrációját komplexometriás titrálással ellenőriztük.

A használt Corticotropin₁₋₃₂ a Kőbányai Gyógyszerárugár terméke, amelynek átengedéséért a szerzők e helyen is köszönetet mondanak. A gyári készítményben a polipeptid acetát-sója formájában volt. Az ugyancsak komplexképző acetátion eltávolítására a mintát számított mennyiségű sósavval liofilizálva klorid-sóvá alakítottuk. Az így nyert termék polipeptidtartalmát új potenciometriás analitikai eljárással¹⁰ mértük meg, amely a molekula primer-aminocsoportjainak meghatározásán alapul. Az analízis eredményének ellenőrzésére a liofilizált termék kloridtartalmát argentometrián, nedvességtartalmát Karl Fischer szerint meghatároztuk.

A szabad cinkion-koncentráció kiszámítására az amalgámelektroddal mért elektromotoros erő értékekből, szűkségünk volt a rendszer E_0 értékének ismeretére. Tapasztalataink szerint a rendszer peptidtartalma az elektród Nernsti cinkfunkcióját nem torzította, de az E_0 értékét befolyásolta. Ezért az E_0 meghatározását olyan nagy cinkkoncentrációjú peptidtartalmú oldatban mért elektromotoros erő értékekből végeztük, amelyben a peptidhez kötött cinkkoncentráció az össz-cinkkoncentrációhoz képest elhanyagolható kicsi. Ebben a koncentrációtartományban az E_0 értéke a peptid: cink aránytól nem függ. Az E_0 értékeket ezzel a módszerrel minden 3–4 mérési pont felvétele után ellenőriztük.

Egyes Corticotropin₁₋₃₂ minták fényomokkal, elsősorban vas(III)-mal voltak szennyezve. Már kis mennyiségű nehéz-, vagy átmenetifém szennyező jelenléte zavarta az amalgámelektrod működését. Ezért az egyensúlyi vizsgálat megkezdése előtt a Corticotropin kvalitatív emissziós színképvizsgálatát is elvégeztük és a szennyezett Corticotropinból a fényomokat ditizonos extrakcióval eltávolítottuk.

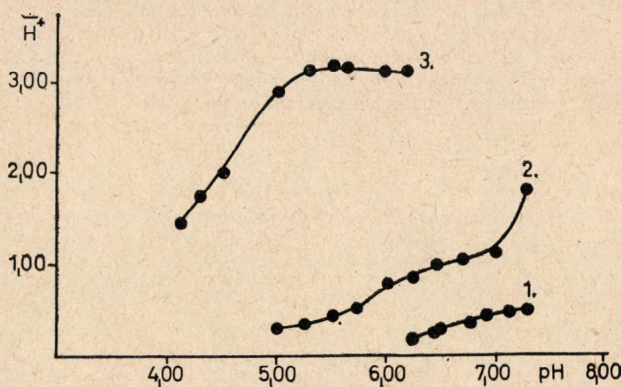
A kísérleti $\text{mV} - \lg [\text{Zn}^{2+}]$ görbékéből, illetve az össz-ligandum-, össz-cinkion- és szabad cinkion-koncentrációkból számolt $\bar{n} - \lg [\text{Zn}^{2+}]$ görbékéből (ahol $\bar{n} = \frac{[\text{Zn}^{2+}]_{\text{kötött}}}{[\text{ACTH}]_{\text{total}}}$)

látható, hogy a rendszer négy, maximálisan öt komplex képződésével leírható és egy polipeptidhez maximálisan 13 cinkion kapcsolódhat. Ennek megfelelően a számítógépi értékelésnél az összetartozó kísérleti $\text{mV} - \lg [\text{Zn}^{2+}]$ értékpárokat, illetve $\text{mV} - \lg [\text{Zn}^{2+}]$ görbéket olyan modellek alapján szimuláltuk, amelyekben négy, majd öt különböző összetételű komplex lépcsőzetes képződését tételeztük fel. E modellek összeállításánál a komplexek összetételének minden egyszerű kombinációját figyelembe vettük, és kiszámítottuk, hogy a különböző modellek milyen hibával írják le a kísérleti görbéket. A mért értékpárokat a teljes koncentrációtartományban a kísérleti hibával megegyező pontossággal leíró néhány modell közül kémiai megfontolások alapján választottuk ki – a megítélésünk szerint – a valóságot helyesen tükröző képet.

Az eredmények és értékelésük

Korábbi deprotonálódási kísérleteink¹ ki-mutatták, hogy a vizsgált pH-tartományban még százszoros cinkfelesleg hatására is egy Cortico-

¹⁰ Burger K., Pékli M. és Noszál B.: Acta Pharm. Hung., megjelenés alatt.

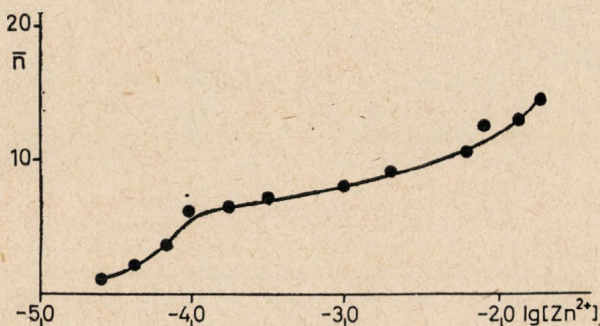


2. ábra

A cinkion-koordináció hatására fellépő deprotonálódás. Az egy Corticotropin molekuláról leszorított protonok száma a pH függvényében ábrázolva. 1. ötszörös, 2. húszszoros, 3. százszoros cinkionfelesleg mellett $(\text{ACTH})_{\text{tot.}} = 5 \cdot 10^{-4}$ mól dm^{-3}

tropin molekuláról a cink koordinációja maximálisan három protont szorít le (2. ábra).

A cinkamalgámelektrodos mérések adataiból szerkesztett $\bar{n} - \lg[\text{Zn}^{2+}]$ görbe (3. ábra) viszont egyértelműen azt bizonyítja, hogy egy Corticotropin molekula maximálisan 13 cinkiont köt meg.



3. ábra

Az egy Corticotropin molekulához kötött cinkionok száma (\bar{n}) a szabad cinkionkoncentráció logaritmusában ábrázolva

E két független vizsgálat azt bizonyítja, hogy a cinkionok nagy része a Corticotropin olyan donoratomjaihoz koordinálódik, amelyek a vizsgálatok pH-ján ($\text{pH} = 5,9$) nincsenek protonálva. Ilyen a molekula 5 karboxilátesoportja, a metionin tioéter kénatomja, a hisztidin imidazolgyűrűjének egyik nitrogénje és a 3 arginin guanidincsoportjainak egyik nitrogénje, összesen 10 funkciós csoport.

A deprotonálódási vizsgálatok szerint csak három cinkion kapcsolódik az adott pH-nál eredetileg protonált donoratomokhoz. Ilyenek a molekula 5 primer aminocsoportjának nitrogénjei, 2 fenolos OH-csoportjának oxigénjei, a hisztidin imidazolgyűrűjének másik nitrogénje, a 3 arginin guanidincsoportjainak további nitrogénjei, összesen 11 donoratom.

Korábbi polarográfiás vizsgálataink¹ során a cinkion koordinációja hatására fellépő katalitikus hidrogénlépcső pH-függése egyértelműen azt bi-

zonyította, hogy a cinkkomplexben a cinkion többek között a hisztidin imidazolgyűrűjének nem protonált nitrogénjéhez koordinálódik, így katalizálja annak protonált nitrogénje hidrogénjének redukcióját.

Ez a katalitikus hatás Corticotropin felesleget tartalmazó rendszerekben is jelentkezik, indikálja, hogy a cinkion és a megfelelő hisztidin-nitrogén közötti koordinatív kötés már a kis cinkkoncentrációnál első lépésben képződő komplexben alakul.

A cinkionok koordinációjának hatására lejátszódó deprotonálódás viszont cinkionfelesleget igényel (1. a 2. ábrát). Ez arra utal, hogy az eredetileg protonált donoratomok részvételére a komplexképződésben csak a nagyobb cinktartalmú rendszerekben kerül sor. E donorcsoportok protonálódási állandóinak⁸ sorrendje alapján feltételezhető, hogy a koordináció okozta deprotonálódás a terminális aminocsoporton és 2 lizin aminocsoporton játszódik le.

A fenti megfontolások alapján értelmeztük az amalgámelektrodos egyensúlymérések eredményeit és megkíséreltük annak megállapítását, hogy az egyes komplexképződési lépcsőkben mely donorcsoportok vesznek részt.

Az egyensúlymérési adatok számítógépi értékelése kimutatta, hogy a kísérleti görbéket a következő 5 komplex képződését feltételező modell tökéletesen leírja:

Zn_2ACTH , Zn_6ACTH , Zn_8ACTH , $\text{Zn}_{10}\text{ACTH}$ és $\text{Zn}_{13}\text{ACTH}$, ahol ACTH a 32 aminosavból álló Corticotropin fragmenst jelöli.

A vizsgálatok pH-értékére vonatkozó látszólagos stabilitási állandókat és a donorcsoportok hozzárendelését az 1. táblázatban foglaltuk össze.

1. táblázat

A cink—ACTH komplexek látszólagos komplexszorzatai, lépcsőzetes stabilitási állandói ($\text{pH} = 5,9$) és a funkciós csoportok feltételezett hozzárendelése

Komplex	$\lg \beta_n$	$\lg K_n$	Funkciós csoport
Zn_2ACTH	8,93	K_1K_2 8,93	Hisztidin-N, —COO ⁻
Zn_6ACTH	25,48	$K_3K_4K_5K_6$ 16,55	—COO ⁻
Zn_8ACTH	32,84	K_7K_8 7,36	Tioéter-S, term-NH ₂
$\text{Zn}_{10}\text{ACTH}$	37,69	K_9K_{10} 4,85	$\epsilon\text{-NH}_2$
$\text{Zn}_{13}\text{ACTH}$	44,34	$K_{11}K_{12}K_{13}$ 6,65	Arginin-N

Standard deviáció: 1,85 mV

A 2. és 3. ábra adatait összevetve nyilvánvaló, hogy az első két komplex (Zn_2ACTH és Zn_6ACTH) képződése nem jár protonledobással. Így az első 6 cinkion koordinációjában a $\text{pH} = 5,9$ kémhatású oldatban deprotonált alakban levő 5 karboxilát csoport játszik szerepet.

A hisztidin imidazolcsoportjához történő cinkion koordinációra visszavezethető katalitikus hidrogénlépcső a Corticotropin felesleget tartalmazó

rendszerben viszont arra utal, hogy a Zn_2 ACTH komplexben az egyik cinkion a hisztidin eredetileg nem protonált nitrogénjéhez kötődik.

A 2. és 3. ábra adataiból kiszámítható volt, hogy a Zn_8 ACTH és a Zn_{10} ACTH kialakulása 3 proton ledobásával jár. Így e két komplexben szerepelnek feltehetőleg az oldat pH-ján eredetileg protonált primer aminos csoportok, valamint egy eredetileg is deprotonált donortom, valószínűleg a tioéter-kén.

Figyelembe véve, hogy az utolsó komplex kialakulása megint nem járhat proton leadással és azt, hogy még milyen nem protonált donortomok vannak a polipeptid molekulán, feltételezhető, hogy a Zn_{13} ACTH komplexek képződésében a 3 arginin guanidinos csoportjainak nem protonált nitrogénjei vesznek részt.

A fenti eredmények összhangban vannak a független polarográfiai egyensúlyméréseink¹ nyújtotta képpel. Utóbbiak szerint az első két lépcsőzetesen képződő komplex 2–3, illetve 4–6 cinkatomot tartalmaz. A polarográfiai vizsgálat a komplexek összetételének pontosabb meghatározását nem tette lehetővé.

Egyensúlymérési adataink fenti értelmezésénél feltételeztük, hogy a koordinált cinkionoknak csak egy-egy koordinációs helyéhez kapcsolódik a Corticotropin donortomja, a többi koordinációs helyet vízmolekulák foglalják el. Ezt a feltételezést a makromolekulájú sok cinket tartalmazó komplexek jó vízdoldékonysága alátámasztja.

A cinkhez koordinált vízmolekulák jelenlétére utal a Corticotropin-komplexben az is, hogy a pH emelésével a szabad cinkion hidrolízisének megfelelő kémhatásúnál kisebb pH-értékű oldatban megkezdődik a Corticotropinhoz koordinált cink hidrolízise és ezzel a cink-hidroxid–ACTH vegyes komplexek kiválása az oldatból.

E megfontolások nem zárják ki annak a lehetőségét, hogy a kis cinktartalmú komplexekben, elsősorban a Zn_2 ACTH-ban a cink további koor-

dinációs helyeihez is kapcsolódjanak a rendszer pH-ján eredetileg is deprotonált donorcsoportok. A rendszer cinkion-koncentrációjának növelése az eredetileg kialakult komplex átrendeződését is okozhatja.

Az 1. táblázatban közölt egyensúlyi állandók segítségével kiszámítható volt a képződő komplexek megoszlása a különböző analitikai koncentrációjú oldatokban. A megoszlási görbéket a 4. ábrán mutatjuk be, amelyből közvetlenül leolvasható, hogy a cinkionkoncentráció változásával hogyan változik a lépcsőzetesen képződő komplexek aránya a rendszerben.

Összefoglalás

A szerzők a mérőelektrodát a mérendő oldattól dialízismembránnal elválasztva olyan cinkamalgamelektrodos mérőrendszert dolgoztak ki, amely alkalmas a cinkionaktivitás mérésére az elektrodát különben mérgező makromolekulák jelenlétében is.

E berendezés segítségével végzett egyensúlymérésekkel és a mérési adatok számítógépes értékelésével meghatározták a Corticotropin (ACTH) 32 aminosavból álló fragmensének vizes oldatában cinkionok hatására képződő komplexeinek összetételét és pH = 5,9 kémhatású rendszerre vonatkozó látszólagos stabilitási állandóit.

Korábbi független deprotonálódási és polarográfiai egyensúlyi vizsgálatok alapján feltételezték, hogy a polipeptid nagyszámú donorcsoportjai közül melyek vesznek részt az egyes komplexek képződésében.

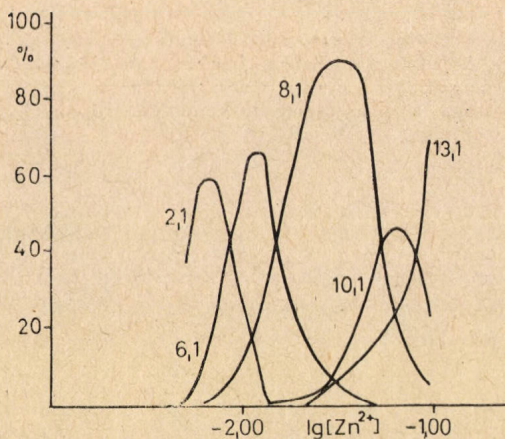
Coordination chemical studies on polypeptides II. Equilibrium studies on the zinc complex formation of synthetic α_H -Corticotropine. K. Burger, F. Gaizer, I. Zay, M. Pékli and B. Noszál

A zinc amalgam electrode separated by a dialysis membrane from the solution investigated and thus suitable for use in the presence of macromolecules otherwise poisonous for the electrode was constructed by the authors.

With the help of this electrode and using a computer for the evaluation of the data the conditional stability constants of zinc complexes formed with the fragment of Corticotropine containing 32 amino acids were determined in aqueous solution of pH = 5.9.

On the basis of former polarographic and deprotonation equilibrium measurements the functional groups taking part in the complex formation process were assigned.

Budapest, Eötvös Loránd Tudományegyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszéke és Hódmezővásárhely, Élelmiszeripari Főiskola
Érkezett: 1976. IX. 10.



4. ábra

A Corticotropin₁₋₃₂ cinkkomplexeinek megoszlása a cinkionkoncentráció logaritmusára függvényében ábrázolva