

Erősen bázikus molekulák protonálódásának jellemzése részecskespecifikus paraméterekkel

Doktori értekezés

Orgován Gábor

Semmelweis Egyetem

Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Noszál Béla egyetemi tanár, D.Sc.

Hivatalos bírálók: Dr. Demeter Ádám osztályvezető, Ph.D.

Dr. Tábi Tamás egyetemi adjunktus, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Bagdy György egyetemi tanár, D.Sc.

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Perjési Pál egyetemi tanár, C.Sc.

Dr. Kalász Huba c. egyetemi tanár, D.Sc.

Semmelweis Egyetem, Gyógyszerészi Kémiai Intézet

Budapest, 2011

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	iv
1. Bevezetés	1
2. Célkitűzések	2
3. Irodalmi áttekintés	3
3.1. A pH fogalma, különböző pH-skálák	3
3.2. A pH meghatározásának módjai.....	4
3.2.1. pH mérés kombinált üvegelektóddal.....	4
3.2.2. pH meghatározása optikai spektroszkópiával.....	6
3.2.3. pH meghatározása NMR spektroszkópiával.....	6
3.2.3.1. ^1H NMR–pH indikátormolekulák	7
3.2.3.2. ^{31}P indikátormolekulák.....	8
3.2.3.3. ^{19}F NMR–pH indikátorok	9
3.2.3.4. ^{13}C NMR–pH indikátorok.....	10
3.2.3.5. pH meghatározása a víz protonjaival	11
3.2.3.6. ^1H NMR–pH indikátormolekula-sorozatok a pH meghatározására	11
3.3. Protonálódási folyamatok makroszkopikus szintű leírása.....	15
3.3.1. Makroállandók meghatározására használt módszerek áttekintése	16
3.3.1.1. pH-potenciometriás titrálás	16
3.3.1.2. NMR–pH titrálás	17
3.4. Protonálódási mikroegyensúlyok leírása és vizsgálata.....	20
3.4.1. Háromcsoportos molekula mikroegyensúlyai	21
3.4.1.1. Kölcsönhatási tényezők, csoportállandók	23
3.4.2. Mikroállandók meghatározásának módszerei	24
3.4.2.1. Modellvegyületek bázicitásadatainak átvitele.....	25
3.4.2.2. Mikroállandók meghatározása NMR-pH titrálással.....	25

3.5.	Irodalmi áttekintés a poliaminokról.....	26
3.5.1.	A vizsgált poliaminokra közölt bázicitásadatok áttekintése.....	28
3.5.2.	A spermidin és spermin protonálódási szekvenciájának vizsgálata ...	29
3.6.	A vizsgált biguanidin-származékok.....	30
3.7.	Arginin és modellvegyületei.....	31
3.8.	Sztreptomicin és sztreptidin	32
4.	A kísérleti munkában használt anyagok és módszerek	35
4.1.	Használt vegyszerek, vizsgált molekulák.....	35
4.1.1.	NMR–pH indikátormolekulák.....	35
4.1.2.	Arginin és modellvegyületei.....	35
4.1.3.	Lineáris poliaminok és modellvegyületeik.....	36
4.1.4.	Sztreptomicin és sztreptidin	36
4.2.	Az üvegelektrod kalibrációja.....	36
4.3.	NMR–pH titrálások	37
4.3.1.	Egyedi minták módszere	37
4.3.2.	Elektrod nélküli NMR–pH titrálások	39
4.4.	Potenciometriás titrálások.....	39
4.5.	A titrálási görbék kiértékelése	39
4.5.1.	NMR–pH titrálások	39
4.5.2.	Potenciometriás titrálások.....	40
4.5.3.	A mikroállandók meghatározása	40
4.6.	Szimulált adatsorok	40
5.	Kísérleti eredmények és értékelésük	42
5.1.	¹ H NMR–pH indikátormolekula–sorozat	42
5.1.1.	A kiválasztott indikátormolekulák.....	42
5.1.2.	Az indikátorparaméterek meghatározása.....	43

5.1.2.1.	A $pH_{\text{elektród}}$ és a pH_{ind} összehasonlítása.....	49
5.1.2.2.	A pH meghatározás hibájának kiszámítása.....	50
5.2.	Biguanidinek protonálódási állandói	51
5.3.	Arginin és citrullin mikrospeciációja	53
5.3.1.	A makroállandók meghatározása NMR–pH titrálással	53
5.3.2.	A mikroállandók meghatározása	55
5.4.	Poliaminok sav-bázis tulajdonságainak vizsgálata.....	60
5.4.1.	A makroállandók meghatározása.....	60
5.4.2.	A mikroállandók meghatározása	61
5.4.2.1.	A spermidin mikroállandói	63
5.4.2.2.	A norspermidin mikroállandói	67
5.4.2.3.	A spermin mikroállandói.....	69
5.4.2.4.	A norspermin mikroállandói	74
5.5.	A sztreptomycin és a sztreptidin protonálódási állandói.....	77
5.5.1.	A makroállandók meghatározása.....	77
5.5.2.	A mikroállandók meghatározása	79
6.	Következtetések, új tudományos eredmények.....	85
7.	Összefoglalás	88
8.	Summary.....	89
9.	Hivatkozott irodalmak jegyzéke.....	90
10.	Saját publikációk jegyzéke	107
10.1.	Az értekezés alapját képező közlemények	107
10.2.	Más témákhoz kapcsolódó közlemények	107
	Köszönetnyilvánítás.....	108

Rövidítések jegyzéke

4-OHPyr	4-Hidroxipiridin
Acet	Ecetsav
APAB	4-(3-aminopropilamino)butanol
Arg	Arginin
ArgNH ₂	Arginin–amid
CEST	Chemical Exchange Saturation Transfer
Cit	Citrullin
CitOMe	Citrullin metil–észter
Cyt	Citozin
DCA	Diklórecetsav
DSS	Nátrium 3-(trimetilszilil)-1-propánszulfonát
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence
Imid	Imidazol
MCA	Klórecetsav
MG	1-Metilguanidin
NMR	Mágneses magrezonancia spektroszkópia
Norspd	Norspermidin
Norspm	Norspermin
Oxim	Aceton oxim
s	Szingulett
Sarc	Szarkozin
Spd	Spermidin
Spm	Spermin
t	Triplett
TBA	<i>terc</i> -butilamin
TEA	Tetraetilammónium
TMA	Tetrametilammónium
TRIS	Trisz(hidroximetil)metilamin
TSP	nátrium 3-(trimetilszilil)propionát- <i>d</i> ₄

1. Bevezetés

A legtöbb bio- és gyógyszermolekula két vagy több protonálható csoportot tartalmaz [1]. Az ionizálható molekulák szerkezetbeni sorsát (farmakokinetikai paramétereit) külső körülmények (a közeg pH-ja, hőmérséklete, relatív permittivitása) és belső paraméterek (molekulaszerkezet, lipofilitás, töltés és töltéseloszlás) határozzák meg. Az utóbbiakat különböző sav-bázis paraméterekkel, például a protonálódási állandóval ($\log K$) jellemezhetjük. Ezen értékek ismerete nélkülözhetetlen a gyógyszerfejlesztés minden fázisában, a törzskönyvezéshez nagy precizitással meghatározott protonálódási állandók szükségesek.

A gyógyszerek célmolekulához való kötődése már nemcsak a bruttó ionizációs állapottól függ, az egyes csoportok protonáltsági állapota is nagymértékben befolyásolja azt. Ezeket a folyamatokat a mikroszkopikus protonálódási állandókkal jellemezzük.

Ezeket a mikroállandókat pH-függő, csoportspecifikus spektroszkópai módszerrel vagy rokon szerkezetű vegyületek bázicitásadatainak átvitelével lehet meghatározni.

Számos biológiai és gyógyszerészeti szempontból fontos vegyület tartalmaz igen erősen bázikus funkciós csoportokat (guanidino, amidin stb.) amelyek protonálódási folyamatai igen erősen lúgos közegben játszódnak le, ahol a pH pontos meghatározása csak igen körülményesen lehetséges. Az irodalomban közölt protonálódási állandó értékek nagy része jelentős hibával terhelt, a magas pH-értékek meghatározásainak torzítottsága miatt.

Az egyensúlyi oldatkémia eszköztárában nem található olyan módszert, melynek segítségével egyszerűen, gyorsan és torzításmentesen határozhatóak meg akár szélsőségesen magas pH-értékek. Egy ilyen módszer kidolgozásával tehát lehetőségünk nyílna olyan molekulák $\log K$ értékeinek meghatározására, melyeket eddig nem jellemeztek kellő pontossággal.

2. Célkitűzések

Munkánk során célul tűztük ki több, biológiai és gyógyszerészeti szempontból jelentős, igen erősen bázikus vegyület protonálódási makro- és mikroegyensúlyainak vizsgálatát. Eredményeink szerint az irodalomban közölt $\log K$ értékek nagy része hibás, főként a megfelelő pH-mérési módszer hiánya miatt.

A folyamatok jellemzéséhez szükséges egy olyan módszer kidolgozása, amellyel pontosan és torzításmentesen lehet mérni akár szélsőségesen magas pH-értékeket. Célunk tehát egy olyan ^1H NMR módszer kifejlesztése, ahol indikátormolekulák kémiai eltolódásából számíthatjuk ki az oldat pH-ját a teljes 0-14 közötti pH-tartományban.

Célul tűzzük ki a legbázikusabb fehérjealkotó aminosav, az arginin mikroállandóinak pontos meghatározását ^1H NMR–pH módszerrel. A mikroállandók meghatározása csak modellvegyületek bázicitásadatának átvitelével, deduktív módszerrel lehetséges.

További célunk az elsőként felfedezett aminoglikozid-típusú antibiotikum, a sztreptomycin protonálódási folyamatainak részletes vizsgálata, a két guanidinocsoport csoportspecifikus bázicitásainak meghatározása. A sztreptidin, az egyetlen rendelkezésre álló modellvegyület segítségével a sztreptomycin major mikrorészecskéinek protonálódási állandóit határozhatjuk meg.

Végül olyan ^{15}N NMR módszert fejlesztünk ki, amellyel az egyes aminocsoportok bázicitása csoportspecifikus módszerekkel meghatározható. A módszer segítségével a sejtciklus szabályozásában igen jelentős szerepet betöltő lineáris poliaminok és nor-származékaik mikroállandóit számítjuk ki.

3. Irodalmi áttekintés

Az irodalmi összefoglalás első részében a pH definícióját, valamint a többértékű savak és bázisok ionizációjával kapcsolatos fogalmakat tekintjük át. Ezután röviden ismertetjük a protonálódási állandók meghatározásának módszereit, majd áttekintjük a jelen dolgozatban vizsgált molekulák biológiai és gyógyszerészeti jelentőségét, főbb alkalmazásait, valamint eddig publikált bázicitásadatait.

3.1. A pH fogalma, különböző pH-skálák

A pH az oldatok savasságát jellemző mérőszám, melyet Sørensen 1909-ben vezetett be, mint „hidrogénion-exponens” [2]. Ezt követően többféle pH-skála használata terjedt el, és a pH egységes definíciója több évtizedes diszkusszió eredményeként tisztult le [3-6]. A gyakorlatban kétféle pH-skálát alkalmaznak: az aktivitás- és a koncentráció-alapú skálákat.

Az aktivitás-alapú skála használata során az egyensúlyi folyamatokat a komponensek relatív aktivitásával jellemezzük, így a pH definíciója:

$$\text{pH} = \text{p}a_{\text{H}} = -\log a_{\text{H}} = -\log \frac{m_{\text{H}}\gamma_{\text{H}}}{m^0} \quad (3.1)$$

ahol m_{H} a hidrogénionok molális koncentrációja, m^0 a standard molalitás (1 mol/kg), γ_{H} az aktivitási tényező. A (3.1) és további egyenletekben: $\log \equiv \log_{10}$.

A koncentráció-alapú skála alkalmazásával a kémiai egyensúlyokat sztöchiometrikus egyensúlyi állandókkal jellemezzük, ennek megfelelően az oldat savasságát is a protonok koncentrációjából származtatjuk, azaz: $\text{p}[\text{H}] = -\log[\text{H}^+]$

A kétféle skála természetesen átszámítható egymásba, egy korrekciós tag levonásával:

$$\text{p}[\text{H}] = \text{pH} - A \quad (3.2)$$

Az NMR-pH titrálások során alkalmazott oldatok általában nehézvizet is tartalmaznak a stabil frekvencia „lock” elérése céljából. Ilyen oldatokban azonban a deutérium izotópeffektusa miatt az ionszorzat kisebb, mint könnyűvíz esetében:

$pK_w^D = 14,951$ vs. $pK_w^H = 13,995$, ennek megfelelően a pH- és a pD-skálák sem egyformák. A IUPAC nehézvízes közegre is megad elsődleges standard puffereket, melyekkel a pD skálára kalibrálható az elektród [7]. A mindennapi gyakorlatban azonban nem terjedt el az ilyen pufferek használata, főképp a deuterált vegyszerek lényegesen magasabb ára miatt. Így inkább könnyűvízes pufferekkel végzik a kalibrációt, és a nehézvízben mért értéket korrekció nélkül használják. Az így kapott skála jelölése pH^* vagy pH^D . A kétféle skála a Gross-Butler-Purlee elmélet szerint számítható át egymásba [8,9]: $pD = pH^* + 0,44$.

3.2. A pH meghatározásának módjai

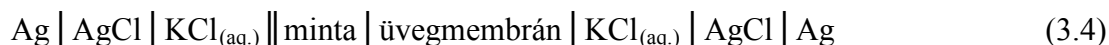
Az oldatok pH-ját legpontosabban elektrokémiai módszerrel lehet meghatározni, a IUPAC által definiált standard pufferek pH-ját ún. Harned-cellával történő méréssel határozták meg [10]. A Harned-cella diagramja:



A Harned-cellák hátránya, hogy hidrogénelektrodot tartalmaznak, így a laboratórium gyakorlatban nem terjedtek el, körülményes alkalmazásuk miatt.

3.2.1. pH mérés kombinált üvegelektróddal

A kombinált üvegelektrod lényegében egy hidrogénionra szelektív elektród, melyet egybeépítettek egy (általában ezüst/ezüst-klorid) referenciaelektróddal. Celladiagramja a következő:



Az oldatok csatlakozását \parallel jelöli, itt E_j diffúziós potenciál léphet fel. Az üvegelektrod érzékenységét az elektromotoros hatékonysággal jellemezhetjük:

$\beta = \frac{k'}{k} < 1$, ahol k' a mért, míg k a nernsti meredekség. Az eltérést a szilanolcsoportok disszociációja okozza [11]. Az elektróddal mért potenciálkülönbség tehát a következőképpen írható fel:

$$E = E^0 + E_j + k' \text{pH} = E^{0'} + k' \text{pH} \quad (3.5)$$

Erősen savas ($\text{pH} < 1$) vagy lúgos ($\text{pH} > 12,5$) oldatokban az elektród válasza nem követi a lineáris Nernst-egyenletet (3.5). Ilyen oldatokban az erősen mozgékony hidrogénionok és hidroxidionok hozzájárulása már jelentős a diffúziós potenciálhoz. Lúgos közegben a nagy koncentrációban jelen lévő alkálifém-ionok (Na^+ , Li^+ , K^+) helyettesíthetik a hidrogéniont az üvegelektrod membránján [3]. Ez a jelenség az alkálihiba, akár 1 pH egységnyi eltérést is okozhat.

Ilyen oldatok esetén a hidrogénion- vagy a hidroxidion-koncentrációt számítással lehet a legpontosabban meghatározni a IUPAC irányelvei alapján [12]. Az ionerősség beállítására, az alkálihiba csökkentése érdekében, tetraalkilammónium-sót javasolnak. A szén-dioxid abszorpció elkerülése miatt célszerű a mérések valamilyen inert gáz (nitrogén, argon) atmoszférában végezni.

A kombinált üvegelektrod alkalmas mind a pH, mind a $\text{p}[\text{H}]$ mérésre is, természetesen eltérő kalibrációval. A pH-skálára történő kalibráció során egy vagy több standard (IUPAC által definiált vagy arra visszavezethető) puffer feszültségét mérjük, majd az $E - \text{pH}$ adatpár(ok)ból számítjuk ki az elektród paramétereit a (3.5) egyenlet szerint. A VIII. Magyar Gyógyszerkönyv kétpontos kalibrációt ír elő [13], ekkor a pH mérés pontossága $\pm 0,05$ egység. Ennél pontosabb méréshez többpontos (4 vagy 5) kalibráció szükséges, az E^0 és k' elektródparamétereket pedig lineáris regresszióval határozzuk meg. Ez a módszer $\pm 0,02$ egység pontosságot tesz lehetővé.

A $\text{p}[\text{H}]$ skálára történő kalibrációja egy üres (blank) titrálással történik. Ekkor pontosan ismert koncentrációjú erős savat titrálunk egy pontosan faktorozott erős bázissal (esetleg fordítva), így minden pontra kiszámítható a $[\text{H}^+]$. A mért $E - \text{számított } \text{p}[\text{H}]$ adatpárokból súlyozott lineáris regresszióval kaphatjuk meg az elektródparamétereket [14,15].

A pH számítása megoldható spektroszkópiai adatokból is, például UV abszorbanciából, fluoreszcens emisszióból vagy NMR kémiai eltolódásból.

3.2.2. pH meghatározása optikai spektroszkópiával

A pH ilyen módon történő meghatározására több példát is találhatunk:

- Erősen lúgos oldatok pOH-ját egy cellulóz-membránhoz rögzített festék, a „Tiazol sárga” (Thiazole yellow) 512 nm-en mért abszorbanciájából számították [16].
- *In vivo* pH-mérésre számos különböző fluoreszcens festéket használtak: fluoreszceinek, rodaminok, 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-indacén festékek (BODIPY) és egyéb származékok. Ezeknél a módszereknél a fluoreszcencia intenzitása változik a protonálódás hatására, a változás mértékéből számítható a pH [17].

3.2.3. pH meghatározása NMR spektroszkópiával

Az oldatok pH-ja NMR spektroszkópiai adatokból is számítható, ha egy NMR jel kémiai eltolódása függ az oldat pH-jától.

Egy NMR-aktív mag kémiai eltolódása a következő egyenlettel írható le:

$$\delta = \frac{\nu - \nu_{ref}}{\nu_0} \cdot 10^6 = \frac{\sigma_{ref} - \sigma}{1 - \sigma_{ref}} \cong \sigma_{ref} - \sigma \quad (3.6)$$

ahol ν a vizsgált mag, ν_{ref} a referenciaanyag magjának rezonanciafrekvenciája, Hz-ben, σ és σ_{ref} ugyanezen magok árnyékolási tényezője, ν_0 pedig a spektrométer MHz-ben kifejezett alaphfrekvenciája.

A protonálódás vizes oldatban általában pillanatszerűen gyors folyamat az NMR „időskáláján” ($|\nu_{HInd} - \nu_{Ind}| \ll k$), ezért a protonált és a deprotonált forma egy közös rezonanciajelet ad a r észecskék δ_{Ind} és δ_{HInd} kémiai eltolódásainak móltörttekkel súlyozott átlagánál [18-20]:

$$\delta^{mért} = \delta_{Ind} \cdot \chi_{Ind} + \delta_{HInd} \cdot \chi_{HInd} = \frac{\delta_{Ind} + \delta_{HInd} K_{Ind} [\text{H}^+]}{1 + K_{Ind} [\text{H}^+]} \quad (3.7)$$

ahol $\delta^{mért}$ a közös rezonanciajel kémiai eltolódása, δ_{Ind} és δ_{HInd} a deprotonált és a protonált forma kémiai eltolódásai (határeltolódások), χ_{Ind} és χ_{HInd} a móltörtjeik, K_{Ind} pedig a protonálódási állandó.

A (3.7) egyenlet logaritmizálásával és Henderson-Hasselbach típusú átrendezésével közvetlenül számíthatjuk a pH-t a mért kémiai eltolódásból:

$$\text{pH} = \log K_{Ind} + \log \frac{\delta^{mért} - \delta_{HInd}}{\delta_{Ind} - \delta^{mért}} \quad (3.8)$$

Tehát, ha egy NMR–pH indikátormolekula indikátorparaméterei (határeltolódásai és protonálódási állandója) ismertek, akkor a kémiai eltolódásból számítható a pH (kellő pontossággal általában $\log K - 1 < \text{pH} < \log K + 1$ intervallumban)

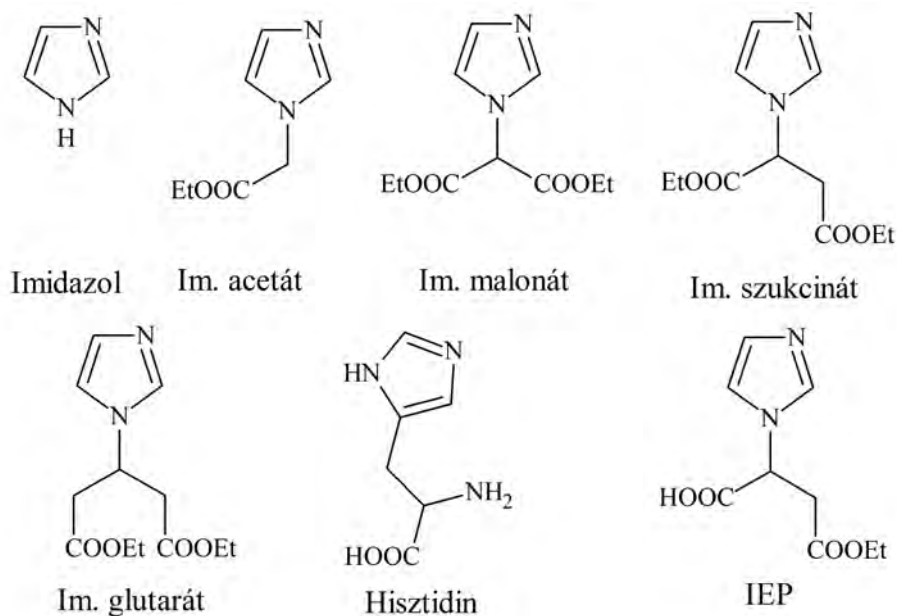
NMR–pH indikátormolekulákat szinte minden NMR–aktív magra találhatunk a szakirodalomban, a következőkben ezeket tekintjük át. A legtöbb indikátormolekulát *in vivo* vagy *ex vivo* NMR, MRI vagy MRS technikákhoz publikálták, kevés példát találhatunk *in vitro* alkalmazható pH-indikátorokra.

3.2.3.1. ^1H NMR–pH indikátormolekulák

Bár az ^1H NMR módszerek lényegesen érzékenyebbek, mint a ^{31}P vagy ^{13}C spektroszkópia, *in vivo* pH meghatározásra csak kevés indikátormolekula alkalmas, hiszen a számos biomolekula ^1H NMR jelei nagymértékben átfednek.

A szakirodalomban főként az imidazolt és származékait használták, mint indikátormolekulákat. A vegyületek képlete a 3.1 ábrán látható. Rabenstein és mtsai. intakt eritrociták intracelluláris pH-jának meghatározására imidazolt használtak [21]. Az imidazol pH–indikátorként történő alkalmazását az általános kémia gyakorlat keretében is javasolták [22]. Ezen kívül még több imidazol-származékot is alkalmaztak intra– és extracelluláris pH mérésére [23,24]: imidazol-1-ilacetát (Im. acetát), imidazol-1-ilmalonát (Im. malonát), imidazol-1-il-3-glutarát (Im. glutarát) és imidazol-1-il-2-szukcinát (Im. szukcinát). Az imidazol-1-il-2-szukcinát félészterét (imidazol-etoxikarbonilpropionsav, IEP) extracelluláris pH mérésére alkalmazták [25-27].

A citoszol pH-ját a hisztidin kémiai eltolódásából határozták meg [28]. A kapott eredmények jó egyezést mutatnak a ^{31}P spektroszkópiával kapott értékekkel [29].

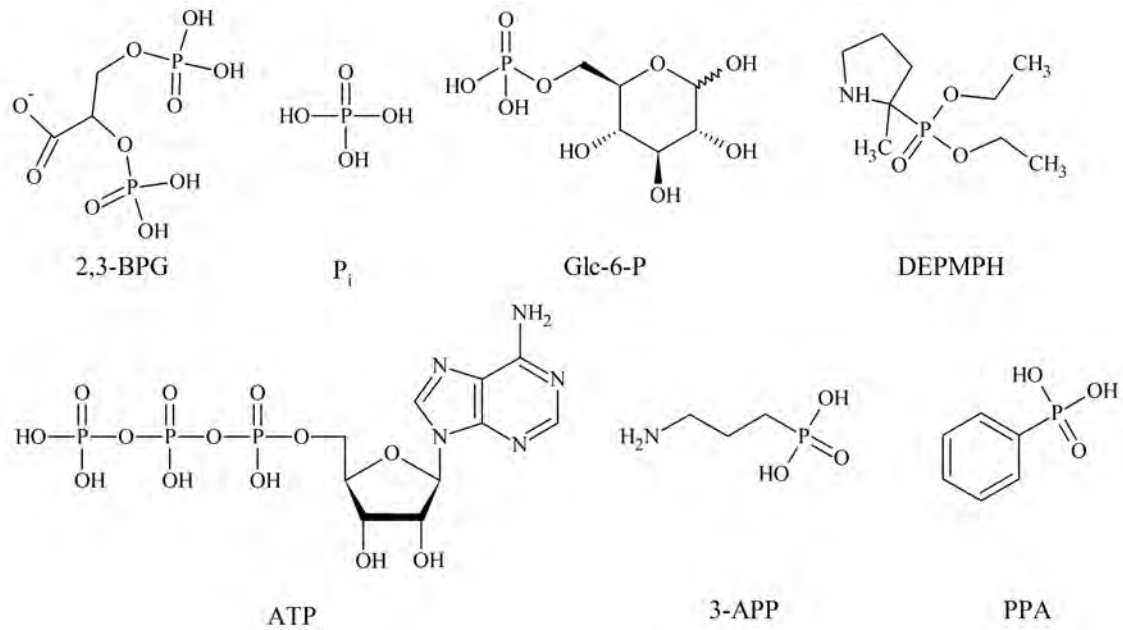
3.1. ábra: ^1H NMR–pH indikátormolekulák**3.2.3.2. ^{31}P indikátormolekulák**

Először Moon és Richards alkalmazott NMR spektroszkópiát a pH mérésére: a 2,3-biszfoszfoglicerát (2,3-BPG) két foszforjele közötti kémiai eltolódás–különbségből számították az eritrociták intracelluláris pH-ját [30].

A legtöbb esetben a foszfátion kémiai eltolódásával mérték a pH-t [31-35]. Az NMR spektrumokon a foszfokreatint használták referenciaként. A foszfátion azonban nem a legelőnyösebb pH-indikátor, hiszen a protonálódási állandó erősen függ az ionerősségtől, valamint az egyes sejtekben nagymértékben eltérnek a foszfát-koncentrációk.

Egyéb biomolekulákat is alkalmaztak a pH meghatározására: ATP, 2,3-biszfoszfoglicerát, glukóz-6-foszfát (Glc-6-P) [36-39], azonban a foszfátionnál említett okok miatt ezek sem bizonyultak kellően robusztusnak.

A fenti problémák kiküszöbölésére más szerkezetű molekulákat állítottak elő; főleg alkil- és aminoszfonsavakat: 3-aminopropilfoszfonsavat (3-APP) [40,41], fenilfoszfonsavat (PP) [42-44], metilfoszfonsavat [45,44], α - és β -foszforilált aminokat és pirrolidineket [46,47]. A vegyületek szerkezeti képlete a 3.2 ábrán látható.

3.2. ábra: ^{31}P pH-indikátormolekulák

A fentiek közül a legelőnyösebb indikátormolekulának a dietil(2-metilpirrolidin-2-il)foszfonát (DEPMPH) bizonyult, ugyanis a protonálódási állandója csak kismértékben változik az ionerősség függvényében, a kémiai eltolódás–különbség a protonált és a deprotonált forma között több mint 8 ppm.

A skaláris csatolási állandókat is használták a pH kiszámítására [48]: a foszfition egykötéses csatolási állandója ($^1J_{\text{P-H}}$) nagymértékben különbözik a foszfit és hidrogénfoszfit-ionoknál (568,1 Hz vs. 620,7 Hz). A mért csatolási állandó, hasonlóan a kémiai eltolódáshoz, a két csatolási állandó móltörttekkel súlyozott átlaga:

$$J^{\text{mért}} = \chi_{\text{PHO}_3^{2-}} J_{\text{PHO}_3^{2-}} + \chi_{\text{HPO}_3^-} J_{\text{HPO}_3^-} = \frac{J_{\text{PHO}_3^{2-}} + J_{\text{HPO}_3^-} K [\text{H}^+]}{1 + K [\text{H}^+]}$$
 (3.9)

3.2.3.3. ^{19}F NMR–pH indikátorok

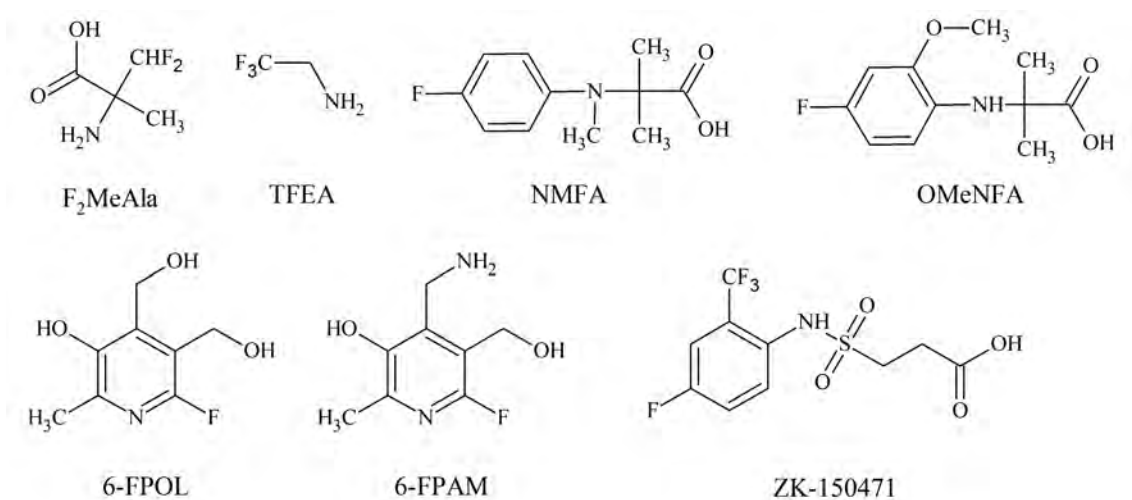
A ^{19}F -NMR előnye a ^{31}P módszerekkel szemben, hogy érzékenyebb és specifikusabb, hiszen lényegesen kevesebb fluortartalmú vegyület található az élő szervezetekben. Néhány vegyület képlete a 3.3 ábrán látható.

Fluorozott aminosavakat (pl. difluormetil-alanin, F_2MeAla) és aminokat (pl. trifluoretilamin, TFEA) használtak perfundált sejtek intracelluláris pH-jának számítására [49-52]. Néhány évvel később ugyanez a kutatócsoport fluorozott

anilinszármazékokat alkalmazott indikátorként (pl. N,N-(metil-2-karboxilizopropil)-4-fluoranilin, NMFA és *o*-metoxi-származéka, OMeNFA) [53].

Extracelluláris pH mérésére fejlesztették ki a ZK-150471 jelű szulfonamid-származékot, melynek nagy előnye, hogy csak az egyik fluor kémiai eltolódása változik a protonálódás hatására, a másik nem, így nem szükséges külső vagy belső referencia használata [54-56].

A B₆ vitamin fluorozott származékai képesek bejutni a sejtekbe, így a 6-fluorpiridoxol (6-FPOL) és 6-fluorpiridoxamin (6-FPAM) [57-59].



3.3. ábra: ¹⁹F NMR–pH indikátormolekulák

3.2.3.4. ¹³C NMR–pH indikátorok

Annak ellenére, hogy a ¹³C NMR spektroszkópia mindhárom fentebb tárgyalt módszernél kevésbé érzékeny, találhatunk példát *in vivo* és *in vitro* alkalmazásokra is (3.4 ábra).

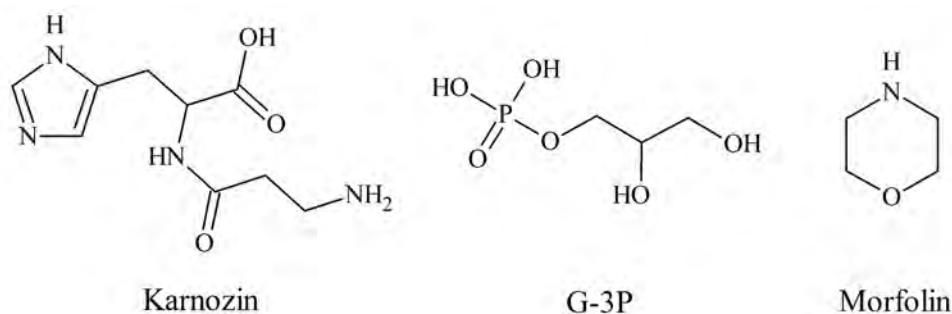
Békaizomsejtek pH-ját a karnozin (β-alanil-hisztidin) imidazolgyűrűjén lévő C2 atomjának kémiai eltolódásából számították [60]. A minták nem voltak izotópdúsítottak.

Szívizomsejteket ¹³C-jelzett glukózzal inkubáltak, majd a glikolízis során keletkező szintén izotópjelzett glicerin-3-foszfát (G-3P) C3 atomjának eltolódásából számolták a pH-t [61].

A nátrium-cianid az egyik legérzékenyebb indikátormolekula, ugyanis a kémiai eltolódás több, mint 50 ppm-mel változik a protonálódás során [62]. ¹³C jelzett nátrium-

cianidot használtak különböző alumínium-citrát komplexek pH-jának meghatározására [63].

Egy mesterséges zeolit képződéskor fellépő pH-változásokat pedig a morfolin szénjeléből számították ki [64].



3.4. ábra: ^{13}C NMR–pH indikátorok

3.2.3.5. pH meghatározása a víz protonjaival

A víz protonjából történő pH-számítást MRI vizsgálatok esetén alkalmazzák, két módszer használható: pH-függő kémiai cserén alapuló mérések (Chemical Exchange Saturation Transfer, CEST) és pH-függő relaxációs anyagok alkalmazása.

A CEST alapja, hogy a cserélhető (NH és OH) protonok szelektív besugárzása csökkenti a mágnesezettségüket, majd ez a csökkenés pH-függő sebességgel kerül át a víz protonjaira. A pH meghatározásához a vízjel amplitúdóját és a spin-rács relaxációs idejét (T_1) is mérik. Ilyen célra 5,6-dihidroxiuracilt [65] és az endogén fehérjék amidprotonjait [66] használták. A módszer legnagyobb hátránya, hogy a cserélhető protonok nagy koncentrációja szükséges (>40 mM). A CEST érzékenysége jelentősen növelhető paramágneses lantanoida-komplexek alkalmazásával [67,68].

A pH-függő relaxációs anyagok az *in vivo* pH-mérés térbeli felbontását jelentősen javították [69-72], azonban a számításokhoz szükség van a kontrasztanyag koncentrációjának pontos ismeretére. Ezért a mérésekhez pH-függő és pH-független relaxációs anyagok összehasonlítására van szükség [72].

3.2.3.6. ^1H NMR–pH indikátormolekula-sorozatok a pH meghatározására

Mivel egy-egy indikátormolekulával csak a protonálódási állandójukhoz közeli pH-tartományban lehet az oldat pH-ját számítani, így szélesebb tartomány lefedéséhez több indikátormolekulára van szükség.

Az ideális indikátormolekulával szembeni kritériumok a következők:

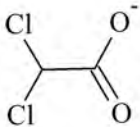
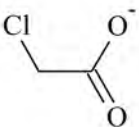
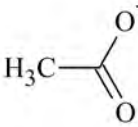
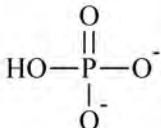
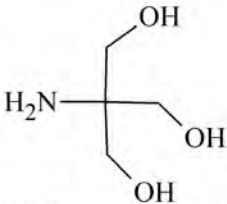
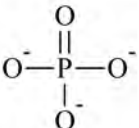
- egyszerű NMR spektrum (maximum 2, lehetőleg szingulett jel)
- minél nagyobb eltolódás-változás a protonálódás hatására
- inertség az oldat komponenseivel szemben
- stabilitás

Ezen szempontoknak megfelelő indikátormolekula-sorozatból eddig hármat közöltek a szakirodalomban.

Szakács és mtsai. egy 5 molekulából álló ^1H és ^{31}P indikátor-sorozatot használtak a 0–12 közötti pH tartományban [73]. A vegyületek képletét, protonálódási állandóit és határeltolódásait a 3.5 ábra tartalmazza.

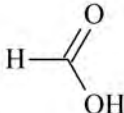
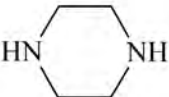

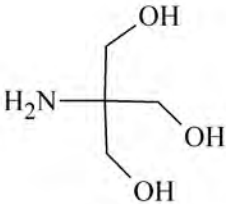
A protonálódási állandókat $p[\text{H}]$ skálán határozták meg 22 °C-on, az ionerősség 1 M volt. A munka egyik újdonsága az alacsony $p[\text{H}]$ értékek pontos meghatározása, diklórecetsav indikátorral, hiszen az üvegelektrod pontossága és torzítatlansága $\text{pH} < 1$ oldatokban kérdéses. Az eddig közöltek közül [73-75] ezzel a sorozattal lehet lefedni a legszélesebb pH-tartományt.

A módszer hátránya, hogy a ^{31}P indikátorok miatt általában külső referenciát (85% -os foszforsavat) kell használni, ami a mérések érzékenységét jelentősen rontja. A foszfátion kémiaiilag nem teljesen inert, számos molekulával kölcsönhatásba léphet. Lúgos közegben a pH-meghatározás pontossága is alacsonyabb, a teljes hiba 0,1 pH egység.

		
Dilóracetát	Klóracetát	Acetát
$\log K = 1,06$	$\log K = 2,65$	$\log K = 4,635$
$\delta_{\text{HInd}} = 6,328 \text{ ppm}$	$\delta_{\text{HInd}} = 4,285 \text{ ppm}$	$\delta_{\text{HInd}} = 2,092 \text{ ppm}$
$\delta_{\text{Ind}} = 6,067 \text{ ppm}$	$\delta_{\text{Ind}} = 4,064 \text{ ppm}$	$\delta_{\text{Ind}} = 1,916 \text{ ppm}$
		
Hidrogénfoszfát	TRIS	Foszfát
$\log K = 6,49$	$\log K = 8,521$	$\log K = 11,35$
$\delta_{\text{HInd}} = 1,381 \text{ ppm}$	$\delta_{\text{HInd}} = 3,742 \text{ ppm}$	$\delta_{\text{HInd}} = 3,992 \text{ ppm}$
$\delta_{\text{Ind}} = 3,992 \text{ ppm}$	$\delta_{\text{Ind}} = 3,515 \text{ ppm}$	$\delta_{\text{Ind}} = 6,71 \text{ ppm}$

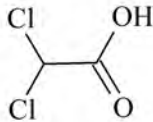
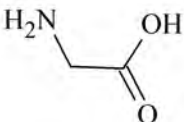
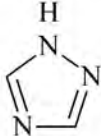
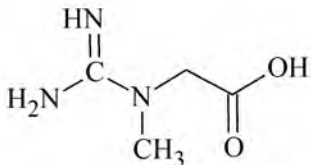
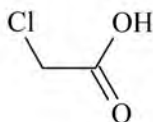
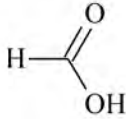
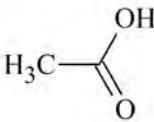
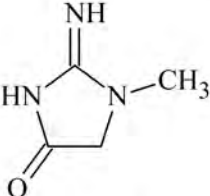
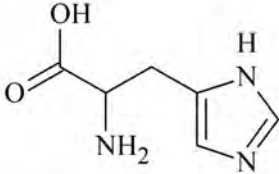
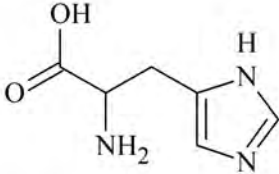
3.5. ábra: Szakács és mtsai. által használt NMR-pH indikátorok

Baryshnikova és munkatársai [74] (3.6 ábra) biológiai mérésekhez általánosan alkalmazott pufferanyagokat használták pH-indikátorként. A sorozattal a 2,5 – 9,8 közötti tartományban lehet pH-t mérni. A méréseket 30 °C -on, 0,1 M ionerősség mellett végezték.

			
Hangyasav	Piperazin	Imidazol	TRIS
$\log K = 3,56$	$\log K = 5,61$	$\log K = 7,08$	$\log K = 8,23$
$\delta_{\text{HInd}} = 8,236$	$\delta_{\text{HInd}} = 3,585$	$\delta_{\text{HInd}} = 8,672$	$\delta_{\text{HInd}} = 3,732$
$\delta_{\text{Ind}} = 8,442$	$\delta_{\text{Ind}} = 3,113$	$\delta_{\text{Ind}} = 7,765$	$\delta_{\text{Ind}} = 3,509$

3.6. ábra: Baryshnikova és mtsai. által alkalmazott indikátormolekulák

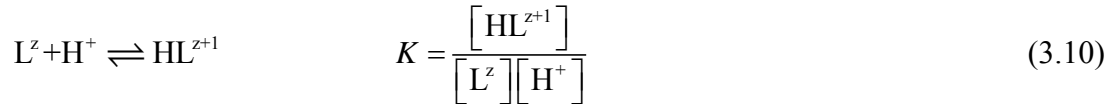
A harmadik sorozatot Tynkkynen és mtsai. közölték [75] (3.7 ábra). A molekulák savas közegben alkalmasak pH-mérésre (0-7,2 tartományban). A szerzők vizsgálták a határeltolódások és a protonálódási állandók függését az oldat ionerősségétől, és a saját fejlesztésű programjuk, a GETpHN forráskódját is közölték.

			
Diklórecetsav	Glicin	1,2,4-Triazol	
$\log K = 1,112$	$\log K = 2,404$	$\log K = 2,371$	
$\delta_{\text{HInd}} = 6,3545$	$\delta_{\text{HInd}} = 3,8986$	$\delta_{\text{HInd}} = 9,2620$	
$\delta_{\text{Ind}} = 6,0398$	$\delta_{\text{Ind}} = 3,5428$	$\delta_{\text{Ind}} = 8,3488$	
			
Kreatin (CH ₂)	Kreatin (CH ₃)	Klórecetsav	Hangyasav
$\log K = 2,705$	$\log K = 2,665$	$\log K = 2,805$	$\log K = 3,767$
$\delta_{\text{HInd}} = 4,2509$	$\delta_{\text{HInd}} = 3,0733$	$\delta_{\text{HInd}} = 4,2720$	$\delta_{\text{HInd}} = 8,2195$
$\delta_{\text{Ind}} = 3,9168$	$\delta_{\text{Ind}} = 3,0238$	$\delta_{\text{Ind}} = 4,0416$	$\delta_{\text{Ind}} = 8,4537$
			
Ecetsav	Kreatinin (CH ₂)	Hisztidin (H2)	Hisztidin (H4)
$\log K = 4,764$	$\log K = 5,035$	$\log K = 6,123$	$\log K = 6,144$
$\delta_{\text{HInd}} = 2,0812$	$\delta_{\text{HInd}} = 4,2840$	$\delta_{\text{HInd}} = 8,6681$	$\delta_{\text{HInd}} = 7,3907$
$\delta_{\text{Ind}} = 1,9185$	$\delta_{\text{Ind}} = 4,0586$	$\delta_{\text{Ind}} = 7,7355$	$\delta_{\text{Ind}} = 7,0442$

3.7. ábra: Tynkkynen és mtsai. által bevezetett molekulák.

3.3. Protonálódási folyamatok makroszkopikus szintű leírása

A sav-bázis egyensúlyokat a továbbiakban egységesen a konjugált bázis protonfelvételével jellemezzük. Ha egy vizsgált molekula csak egyetlen protonálható csoportot tartalmaz, a protonálódási folyamat egyértelműen jellemezhető a protonálódási állandóval ($\log K$).

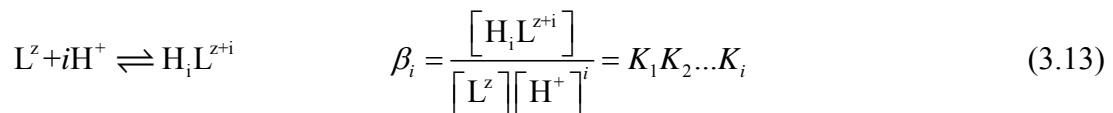
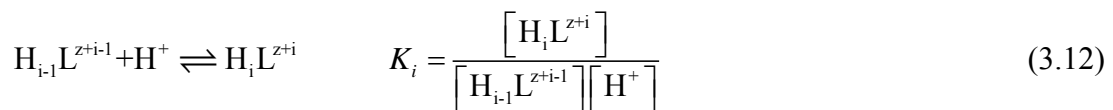


Fontos megemlíteni, hogy a mérések módjától (praktikusan az elektródkalibrációtól) függően más-más egyensúlyi állandóhoz jutunk: a látszólagos egyensúlyi állandókat a $p[H]$ skála használatakor kaphatjuk meg, a (3.10) egyenlet szerint. Ha az elektródot a hidrogénion-aktivitásra kalibráltuk, akkor az ún. ve gyes vagy Brønsted állandókhoz jutunk:

$$K = \frac{[HL^{z+1}]}{[L^z]a_{H^+}} \quad (3.11)$$

Bár minden mérésünket aktivitás-alapú pH-skála alkalmazásával végeztük, a továbbiakban nem jelöljük az egyenletekben, hogy a hidrogénion-aktivitást mértük, egységesen a $[H^+]$ jelölést alkalmazzuk.

Többcsoportos molekulák protonálódási folyamatait lépcsőzetes (K_i) vagy kumulatív (β_i) protonálódási állandókkal jellemezhetjük.



A fenti egyenletekben L^z jelöli a molekula z töltésű, legbázikusabb formáját, amely n számú protont képes felvenni.

A makroszkopikus protonálódás leírásához gyakran alkalmazott az ún. Bjerrum-görbe vagy \bar{n}_H függvény, amely adott pH-n megadja a molekulák által felvett protonok átlagos számát:

$$\bar{n}_H = \chi_{HL^{z+1}} + 2 \cdot \chi_{H_2L^{z+2}} + \dots + n \cdot \chi_{H_nL^{z+n}} = \frac{\sum_{i=0}^n i \cdot \beta_i [H^+]^i}{\sum_{i=0}^n \beta_i [H^+]^i} \quad (3.14)$$

A fenti egyenletben $\beta_0=1$.

3.3.1. Makroállandók meghatározására használt módszerek áttekintése

A makroállandók meghatározására minden olyan módszer használható, ahol a mért mennyiség a vizsgált molekula protonfelvételével kapcsolatba hozható. A továbbiakban csak az általunk használt technikákat tekintjük át.

3.3.1.1. pH-potenciometriás titrálás

A pH-potenciometriás titrálás a protonálódási állandók meghatározásának igen pontos és leggyakrabban alkalmazott módszere [76]. A mérések során a vizsgálandó anyag (általában ismert mennyiségű erős savat is tartalmazó) oldatához folyamatos kevertetés közben adagoljuk egy erős bázis pontosan faktorozott titráló oldatának kis térfogatait. Ekkor a titrálási görbe minden pontjára kiszámítható a még nem semlegesített hidrogénionok (vagy a feleslegben lévő hidroxidionok) összkoncentrációja, a szabad H^+ vagy OH^- koncentrációját pedig üvegelektóddal mérjük. A két koncentráció közötti eltérés arányos a vizsgált molekula által felvett protonok számával:

$$(c_{H^+} - c_{OH^-}) - ([H^+] - [OH^-]) = c_L \cdot \bar{n}_H \quad (3.15)$$

A fenti egyenletnek megfelelően a potenciometria 1,5-12 közötti $\log K$ értékű vegyületek mérésére alkalmas, ennél erősebben savas vagy bázikus anyagok esetén a pH-mérés vagy a titráló oldat adagolásának kis hibája is a görbe jelentős torzulásához vezethet.

Az \bar{n}_H függvény szélesebb tartományban válik mérhetővé a különbségi titrálós módszer alkalmazásával. Ekkor két titrálást végzünk: az első titrálásban ismert

mennyiségű erős savat titrálunk erős bázissal, majd a másodikban az első titrálással azonos mennyiségű erős savhoz adjuk hozzá a mérendő anyagot, és ezt az oldatot titráljuk lúg oldattal. Adott pH-n a két görbe különbsége arányos az \bar{n}_H függvénnyel. Egy n protonálható csoporttal rendelkező molekula esetén az alábbi függvény illeszthető a $\Delta V - \text{pH}$ adatsorokra:

$$\Delta V = A \cdot \frac{K_1 [H^+] + 2K_1 K_2 [H^+]^2 + \dots + nK_1 K_2 \dots K_n [H^+]^n}{1 + K_1 [H^+] + K_1 K_2 [H^+]^2 + \dots + K_1 K_2 \dots K_n [H^+]^n} - D = A \cdot \bar{n}_H - D \quad (3.16)$$

ahol A az egy protonálható csoportra fogyott mérőoldat ml-ben kifejezett térfogata, D pedig a pipettázási hibából és a ligandummal együtt bevitt protonok mennyiségéből adódó korrekciós tényező.

Gondosan megtervezett és kivitelezett kísérletekkel 1,5 alatti vagy 12 feletti protonálódási állandók is meghatározhatóak [77,78].

A pH-metriás mérések nagy előnye, hogy az egyes protonálódási lépcsőkhöz tartozó fogyások egyenlők, így különösen jól alkalmazható átfedő protonálódási állandók meghatározására.

A módszer hátrányai közé tartozik, hogy csak tiszta és nemillékony anyagok vizsgálatára alkalmas. A mérendő anyagra és az esetleges szennyezőkre fogyó mérőoldat mennyisége ugyanis nem különíthető el egymástól [62,76]. A méréseket a légköri CO_2 is zavarja, ezt inert atmoszférában végzett mérésekkel lehet kiküszöbölni. A titrálás csak akkor adnak megbízható eredményt, ha a vizsgálandó anyag legalább 0,5 mM koncentrációban oldódik, ellenkező esetben túlságosan kicsi lesz a két titrálás különbsége.

3.3.1.2. NMR–pH titrálás

Abban az esetben, ha a vizsgált anyag valamilyen szennyezőt tartalmaz, vagy több anyagot mérünk egyszerre, a pH-metriás titrálás általában nem alkalmazható. Ilyen esetekben az NMR–pH titrálás jó megoldást jelent, ha az oldat komponenseinek NMR jelei külön-külön nyomon követhetőek, akár többdimenziós technikákkal.

Az egyértékű savak és bázisok kémiai eltolódását megadó függvényt már tárgyaltuk a 3.2.3 fejezetben (6. oldal), itt most csak a többértékű ligandumok protonálódási folyamatainak leírására térünk ki.

Egy n értékű ligandum kémiai eltolódását a pH függvényében az alábbi egyenlet írja le az NMR időskálán gyors cserereakciók esetén:

$$\delta^{\text{mért}} = \delta_{L^z} \chi_{L^z} + \delta_{HL^{z+1}} \chi_{HL^{z+1}} + \dots + \delta_{H_n L^{z+n}} \chi_{H_n L^{z+n}} = \frac{\sum_{i=0}^n \delta_{H_i L^{z+i}} \beta_i [H^+]^i}{\sum_{i=0}^n \beta_i [H^+]^i} \quad (3.17)$$

ahol $\delta_{L^z}, \delta_{HL^{z+1}}, \dots, \delta_{H_n L^{z+n}}$ az egyes makroszkopikus protonáltsági állapotokhoz tartozó kémiai eltolódásokat, $\chi_{L^z}, \chi_{HL^{z+1}}, \dots, \chi_{H_n L^{z+n}}$ a móltörtjeiket jelölik.

A protonálódási állandó meghatározásának pontossága javítható, ha minél több magra szimultán illesztjük a (3.17) egyenletet.

Ha a protonálódási lépések átfedőek ($\log K_i - \log K_{i+1} < 2$), az egyensúlyi állandók meghatározása jelentős hibával terhelt, hiszen ekkor a köztes makroállapotokhoz rendelt kémiai eltolódások „bárhon” kijelölhetőek a görbe felszálló szakaszán. Az NMR–pH titrálások három vagy többsoportos molekulák átfedő protonálódási állandóinak meghatározására a p otenciometriánál kevésbé alkalmasak, hiszen itt az egyes protonálódási lépcsők „magassága” $\left| \delta_{H_i L^{z+i}} - \delta_{H_{i-1} L^{z+i-1}} \right|$ nem egyforma.

Ez abból is következik, hogy egy NMR aktív mag árnyékolási tényezője három komponensre bontható:

$$\sigma = \sigma^{\text{diam}} + \sigma^{\text{param}} + \sigma^{\text{egyéb}} \quad (3.18)$$

A diamágneses tag (σ^{diam}) a mag körüli elektronsűrűséggel arányos, az elektronok árnyékolásának hatását írja le [79]. A paramágneses tag (σ^{param}) általában negatív előjelű, a betöltetlen pályákra történő elektrongerjesztéssel arányos. Az egyéb hatások ($\sigma^{\text{egyéb}}$) közé tartozik a teljesség igénye nélkül a térközeli csoportok mágneses anizotrópiája, a van der Waals kölcsönhatások, a konformációs vagy a solvatációs hatások. ^1H NMR spektroszkópiában a három tag közül általában a diamágneses hatás

dominál [80], így főként az ionizáció okozta elektronsűrűség-változással arányos. Mivel az egyes báziscentrumok ionizációja más-más hatással van az adott mag körüli elektronsűrűségre, így a kémiai eltolódás változásához is eltérő mértékben járulnak hozzá.

Mivel a kémiai eltolódásokat minden esetben viszonyítjuk valamilyen referenshez, ezért fontos olyan anyag választása, amely a vizsgált pH-tartományban nem változtatja az ionizációs állapotát, ebből következően a kémiai eltolódását sem [81]. Vizes oldatokban általában a 3-(trimetilszilil)propionát- d_4 nátriumsóját (TSP) használják, amely csak egy jelet ad ^1H NMR spektrumokban, azonban pH=5 körül inflexiót mutat a karboxilát protonálódása miatt [75]. Helyette a titrálások során ennek szulfonátsója, a 3-(trimetilszilil)-1-propánszulfonát (DSS) alkalmazása előnyösebb, hiszen protonálódása csak $H_0 = -6$ körül következik be [82]. (H_0 a Hammett féle savassági skála [83]).

Az NMR–pH titrálásokat legalább négyféle módszerrel lehet végezni:

- Egyedi minták módszere. Az oldatok pH-ját nagyobb térfogatban, állandó kevertetés mellett üvegelektóddal mérjük, és egyenként töltjük az NMR csövekbe. A módszer meglehetősen munka- és anyagigényes.
- Egycsöves titrálás. A mérendő anyagot egyetlen NMR csőbe töltjük, ehhez $\mu\text{-es}$ mennyiségben adagoljuk a titráló oldatot, a pH-t mikroelektóddal mérjük. A módszer anyagtakarékos, azonban pontatlan, hiszen megfelelő kevertetés nélkül mérjük a pH-t. Ez és a mikroelektód használata az egyedi minták módszerénél nagyobb pontatlanságot okoz.
- *In situ* pH–meghatározás indikátormolekulákkal. A titrálást végezhetjük az egyedi minták módszere szerint vagy az egycsöves technikával. A legfőbb különbség, hogy a pH-t a megfelelő indikátormolekulák kémiai eltolódásaiból számítjuk a (3.8) egyenlet (7. oldal) szerint. Pontossága megegyezik az egyedi minták módszerének precizitásával, sőt, megfelelő indikátormolekulák használatával erősen savas vagy lúgos oldatban meg is haladja azt.
- Relatív bázicitások meghatározása. Két egyértékű, összemérhető erősségű bázis protonálódási állandóinak különbségét ($\Delta \log K$) szimultán titrálásukkor sokkal pontosabban kaphatjuk meg, mint a saját protonálódási állandóikat az egyedi $\delta^{\text{mért}}$ -pH adatsorok kiértékelésével. A módszer azon

alapul, hogy szimultán méréskor az oldat pH-ja szükségszerűen ugyanaz, így tehát a (3.8) egyenlet alapján:

$$\text{pH} = \log K_{\text{Ind}} + \log \frac{\delta_{\text{Ind}}^{\text{mért}} - \delta_{\text{HInd}}}{\delta_{\text{Ind}} - \delta_{\text{Ind}}^{\text{mért}}} = \log K_L + \log \frac{\delta_L^{\text{mért}} - \delta_{\text{HL}}}{\delta_L - \delta_L^{\text{mért}}} \quad (3.19)$$

A kiértékelések során a pH nem szerepel az egyenletekben, a vizsgált molekula kémiai eltolódását ábrázoljuk az indikátormolekula kémiai eltolódásának függvényében:

$$\delta_L^{\text{mért}} = \delta_L + \frac{(\delta_{\text{HL}} - \delta_L)(\delta_{\text{Ind}}^{\text{mért}} - \delta_{\text{Ind}})}{(1 - 10^{\Delta \log K})(\delta_{\text{Ind}}^{\text{mért}} - \delta_{\text{Ind}}) + 10^{\Delta \log K}(\delta_{\text{HInd}} - \delta_{\text{Ind}})} \quad (3.20)$$

ahol $\delta_L^{\text{mért}}$ a vizsgált molekula aktuális kémiai eltolódása, δ_L és δ_{HL} a protonált és deprotonált forma határeltolódásai, $\delta_{\text{Ind}}^{\text{mért}}$, δ_{Ind} és δ_{HInd} az indikátormolekula ugyanezen paraméterei, $\Delta \log K$ pedig a relatív bázicitás ($\log K_L - \log K_{\text{Ind}}$). A módszert először Perrin és Fabian alkalmazta [84], később Szakács és mtsai is használták [73,85].

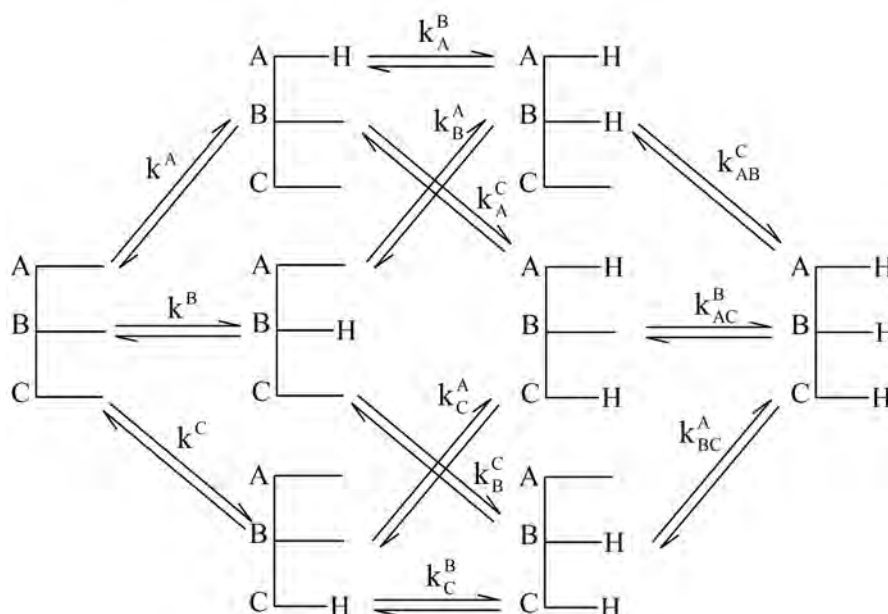
3.4. Protonálódási mikroegyensúlyok leírása és vizsgálata

Míg a makroállandók csak a felvett protonok átlagos számát adják meg, a protonok funkciós csoportok közötti eloszlását a mikroszkopikus protonálódási állandók jellemzik. Csoportspecifikus protonálódási állandókat már 1895-ben leírtak [86].

Az alapvető összefüggéseket egy háromcsoportos molekula példáján mutatjuk be. A mikroszkopikus szintű protonálódási egyensúlyok tárgyalásánál a töltéseket végig elhagyjuk.

3.4.1. Háromcsoportos molekula mikroegyensúlyai

A protonálható csoportokat A, B és C jelöli.



3.8. ábra: Egy háromcsoportos molekula protonálódási makro- és mikroegyensúlyai

A 3.8 ábrán látható, hogy a 4 protonáltsági makroállapot (L, HL, H₂L és H₃L) összesen 8 mikrorészecskével jellemezhető.

A mikro- és makrorészecskék koncentrációi között az alábbi összefüggéseket írhatjuk fel:

$$[HL]=[A]+[B]+[C] \quad [H_2L]=[AB]+[AC]+[BC] \quad (3.21)$$

A mikrospeciáció alatt az egyes mikrorészecskék pH-függő eloszlását értjük. A lépcsőzetes k mikroállandók az adott funkciós csoport bázicitását jellemzik, a többi csoport meghatározott állapotában. A jelöléseknél a felső indexben a protonálódó csoport, az alsó indexben pedig a már protonált csoportokat jelöljük, amennyiben vannak ilyenek. Az A csoport bázicitását például 4 mikrorészecskére írhatjuk fel: az L, a B, a C és a BC részecskékre, a következőképpen:

$$k^A = \frac{[A]}{[L][H^+]}, \quad k_B^A = \frac{[AB]}{[B][H^+]}, \quad k_C^A = \frac{[AC]}{[C][H^+]}, \quad k_{BC}^A = \frac{[ABC]}{[BC][H^+]} \quad (3.22)$$

A teljes mikrospeciációs séma 12 lépcsőzetes mikroállandót tartalmaz, ezek redundáns rendszert alkotnak, hiszen például az AB mikrorészecske képződése a Hess-tétel értelmében nem függhet a protonálódási útvonaltól, azaz mindegy hogy az $L \rightarrow A \rightarrow AB$ vagy az $L \rightarrow B \rightarrow AB$ útvonalon keletkezett. Ezért célszerű bevezetni az ún. kumulatív mikroállandókat (κ), hasonlóan a kumulatív makroállandókhoz (β):

$$\kappa_{AB} = \frac{[AB]}{[L][H^+]^2} = k^A k_A^B = k^B k_B^A, \quad \kappa_{ABC} = \frac{[ABC]}{[L][H^+]^3} = k^A k_A^B k_{AB}^C = k^C k_C^B k_{BC}^A \quad (3.23)$$

Így a teljes rendszer 7 κ állandóval leírható. A következő összefüggések érvényesek a makro és mikroállandók között:

$$\beta_1 = K_1 = k^A + k^B + k^C = \kappa_A + \kappa_B + \kappa_C \quad (3.24)$$

$$\beta_2 = K_1 K_2 = \kappa_{AB} + \kappa_{AC} + \kappa_{BC} = k^A k_A^B + k^A k_A^C + k^B k_B^C = k^B k_B^A + k^C k_C^A + k^C k_C^B \quad (3.25)$$

$$\beta_3 = K_1 K_2 K_3 = \kappa_{ABC} = k^A k_A^B k_{AB}^C = k^C k_C^B k_{CB}^A = \dots \quad (3.26)$$

Az egyes mikrorészecskék egymásba alakulása rendkívül gyors folyamat, így általában összetett spektroszkópai jelet adnak [87]. A legjobb esetben is csak az egyes csoportok pH-függő protonáltsági fokát kaphatjuk meg az NMR titrálási görbékből. Ezek az adott csoporton protonált részecskék móltörtjének összegei:

$$f_A = \chi_A + \chi_{AB} + \chi_{AC} + \chi_{ABC} = \frac{\kappa_A [H^+] + (\kappa_{AB} + \kappa_{AC}) [H^+]^2 + \beta_3 [H^+]^3}{\beta_1 [H^+] + \beta_2 [H^+]^2 + \beta_3 [H^+]^3} \quad (3.27)$$

$$f_B = \chi_B + \chi_{AB} + \chi_{BC} + \chi_{ABC} = \frac{\kappa_B [H^+] + (\kappa_{AB} + \kappa_{BC}) [H^+]^2 + \beta_3 [H^+]^3}{\beta_1 [H^+] + \beta_2 [H^+]^2 + \beta_3 [H^+]^3} \quad (3.28)$$

$$f_C = \chi_C + \chi_{AC} + \chi_{BC} + \chi_{ABC} = \frac{\kappa_C [H^+] + (\kappa_{AC} + \kappa_{BC}) [H^+]^2 + \beta_3 [H^+]^3}{\beta_1 [H^+] + \beta_2 [H^+]^2 + \beta_3 [H^+]^3} \quad (3.29)$$

Az egyes csoportok protonáltsági móltörtjeinek összege megegyezik az \bar{n}_H függvénnyel: $\bar{n}_H = f_A + f_B + f_C$.

Szakács és mtsai. megmutatták, hogy pusztán a kísérleti adatokból 3-nál több protonálható csoportot tartalmazó molekuláknál csak meghatározott szimetriaviszonyok esetén számítható ki egyértelműen az összes κ állandó az egyes csoportok protonáltsági móltörtjeiből [88]. Ezért célszerű az azonos protonáltsági fokhoz tartozó κ állandókat egy közös Q paraméterre összevonni, amelyeket minden esetben egyértelműen ki lehet számítani.

A Q paraméterek és mikroállandók között a következő összefüggések érvényesek:

$$Q_{A,1} = \kappa_A, \quad Q_{A,2} = \kappa_{AB} + \kappa_{AC}, \quad Q_{A,3} = \kappa_{ABC} \quad (3.30)$$

$$Q_{B,1} = \kappa_B, \quad Q_{B,2} = \kappa_{AB} + \kappa_{BC}, \quad Q_{B,3} = \kappa_{ABC} \quad (3.31)$$

$$Q_{C,1} = \kappa_C, \quad Q_{C,2} = \kappa_{AC} + \kappa_{BC}, \quad Q_{C,3} = \kappa_{ABC} \quad (3.32)$$

A Q paraméterekből a makroállandókat is megkaphatjuk:

$$\beta_1 = \frac{Q_{A,1} + Q_{B,1} + Q_{C,1}}{1}, \quad \beta_2 = \frac{Q_{A,2} + Q_{B,2} + Q_{C,2}}{2}, \quad \beta_3 = \frac{Q_{A,3} + Q_{B,3} + Q_{C,3}}{3} \quad (3.33)$$

3.4.1.1. Kölcsönhatási tényezők, csoportállandók

A többcsoportos molekulákban a párkölcsönhatási tényező (E) azt számszerűsíti, hogy az egyik csoport protonálódása hogyan változtatja meg a másik csoport bázicitását, például:

$$E^{A,B} = \frac{k_B^A}{k^A} = \frac{k_A^B}{k^B}, \quad \log E^{A,B} = \log k_B^A - \log k^A = \log k_A^B - \log k^B \quad (3.34)$$

A kismolekulákban az egyik csoport protonálódása általában csökkenti a másik bázicitását. Ez a jelenség történhet kötések keresztül (statikus induktív effektus), melynek hatása általában 4-5 nem-konjugált kötés felett elhanyagolható [87,89]. Flexibilis molekulákban a hatás téren át is létrejöhet, így a pE értéke sohasem csökken nullára, ahogyan azt a lineáris α,ω -diaminok példája is mutatja (3.1 táblázat) [90].

3.1. táblázat: Szimmetrikus diaminok kölcsönhatási tényezői (m az aminocsoportok közötti szénatomok száma, $\Delta \log K = \log K_1 - \log K_2$) [90]

Vegyület	m	$\Delta \log K$	$\log k^A$	$\log k_A^{A'}$	$pE^{A,A'}$
etilén-diamin	2	2,81	9,59	7,38	2,21
1,3-diaminopropán	3	1,80	10,26	9,06	1,20
putreszcin	4	1,28	10,42	9,74	0,68
kadaverin	5	0,93	10,48	10,15	0,33
1,6-diaminohexán	6	0,88	10,67	10,39	0,28

A háromcsoportos molekulák esetén definiálhatjuk az ún. t riplett kölcsönhatási tényezőt is ($L^{A,B,C}$), amely a harmadik csoport protonáltsági állapotának hatását számszerűsíti a másik 2 csoport kölcsönhatási tényezőjére.

A kölcsönhatási tényezők és a perturbálatlan vagy *intrinsic* bázicitások segítségével bármely tetszőleges mikroállandó kifejezhető, például:

$$\log k_B^A = \log k^A - pE^{A,B}, \quad \log k_{BC}^A = \log k^A - pE^{A,B} - pE^{A,C} - pL^{A,B,C} \quad (3.35)$$

A többcsoportos molekulák esetén természetesen a sor tovább bővíthető negyed- és magasabb rendű tagokkal, azonban a mérések szerint általában már a triplett kölcsönhatási tényező is elhanyagolható ($pL \approx 0$) [91,92].

Totálszimmetrikus molekulák esetén a mikroállandók kiszámíthatók közvetlenül a makroállandókból, hiszen az egyes csoportok bázicitása azonos. Például egy kétcsoportos szimmetrikus molekula esetén: $k^A = k^{A'}$. Ilyen esetben a m mikro- és makroállandók között a következő összefüggések érvényesek (a szimmetria miatt):

$$\log k^A = \log K_1 - \log 2 \quad (3.36)$$

$$\log k_A^{A'} = \log K_2 + \log 2 \quad (3.37)$$

3.4.2. Mikroállandók meghatározásának módszerei

A makroállandókból csak totálszimmetrikus molekulák esetén számíthatók közvetlenül a mikroállandók. Minden egyéb esetben szükség van valamilyen többletinformációra, ami lehet rokon szerkezetű vegyület bázicitásadata (deduktív

módszer) vagy valamilyen spektroszkópai méréssel nyert információ, amelyből számítható az egyes csoportok protonáltsági fokát jellemző f függvény. A spektroszkópai módszerek közül csak a jelen munkában alkalmazott NMR-pH titrálásokat tekintjük át, az optikai spektroszkópiás módszerekre nem térünk ki.

3.4.2.1. Modellvegyületek bázicitásadatainak átvitele

Már az első csoportspecifikus protonálódási állandókkal foglalkozó közleményben megemlítik, hogy a $-\text{COOH}$ és a $-\text{COOCH}_3$ csoportok hatása a másik csoport bázicitására közel azonos és jelentősen eltér a $-\text{COO}^-$ -től így a megfelelő mikroállandó a modellvegyület makroállandójának feleltethető meg [86].

Ilyen módon határozták meg a glicin minor, töltésmentes részecskéjének aminobázicitását, melyet metilészterének makroállandójával [93] azonosítottak.

Az ilyen deduktív módszereket akkor célszerű alkalmazni, ha nem lehetséges a protonálódás csoportszelektív megfigyelése vagy ha a mikrorészecskék között bármelyik koncentrációja szélsőségesen alacsony [1]. Ilyen esetekben ugyanis a minor részecske hozzájárulása az analitikai jelhez olyan csekély, hogy spektroszkópai módszerekkel csak nagy hibával kaphatunk róla információt [94].

A legegyszerűbben a $-\text{COOH}$ csoport „modellezhető”: metilészterként [93,20], etilészterként [95] vagy savamidként [96]. Az $-\text{NH}_2$ csoportot acetamidként modellezték [97], míg a protonált aminocsoportok kvaternerezett származékokkal helyettesíthetők [98].

A deduktív módszerek közé tartozik, hogy a modellvegyületnek nem a bázicitásadatait, hanem a kölcsönhatási tényezőt visszük át a vizsgált molekulára [99,91,92]. A kölcsönhatási tényezők értéke ugyanis kevésbé változik, mint maguk a mikroállandók [99,91,100,89,92].

3.4.2.2. Mikroállandók meghatározása NMR-pH titrálással

Az NMR-pH titrálás abban az esetben alkalmazható, ha bármelyik megfigyelt mag kémiai eltolódását csak egyetlen csoport befolyásolja. Ez a feltétel ^1H NMR spektroszkópiánál akkor teljesül, ha legalább öt kötési távolság van a másik báziscentrum és a megfigyelt mag között [101]. Ennek a kritériumnak azonban

legtöbbször csak peptidek vagy fehérjék oldalláncai felelnek meg [102], kismolekuláknál általában ennél közelebb vannak egymáshoz a báziscentrumok.

Ilyen esetben, ha a m egfigyelt mag eltolódását csak a p rotonálódás befolyásolja, akkor a csoport protonáltsági foka kiszámítható a kémiai eltolódásból [103]:

$$f = \frac{\delta^{\text{mért}} - \delta_L}{\delta_{H_nL} - \delta_L} = \frac{\Delta\delta^{\text{mért}}}{\Delta\delta^{\text{max}}} \quad (3.38)$$

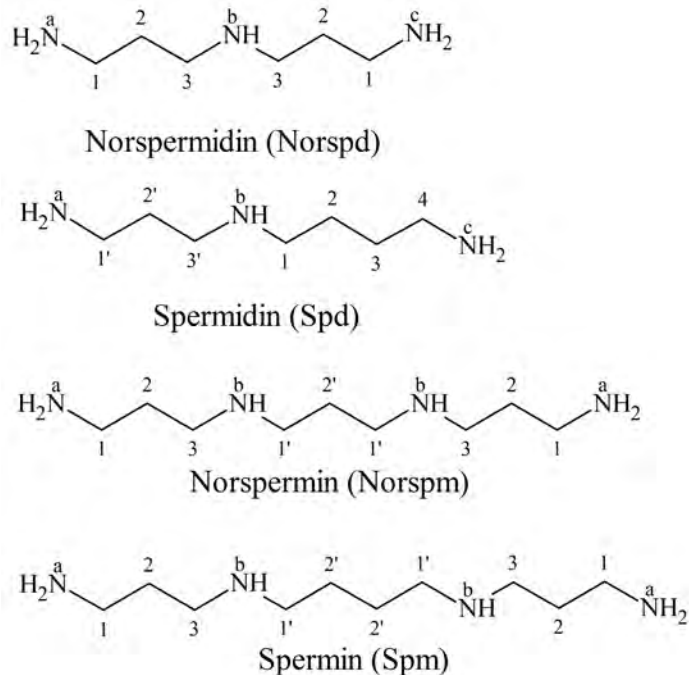
A ^{15}N NMR titrálások során közvetlenül a nitrogénatomok protonálódását figyelhetjük meg, noha alacsony természetes előfordulása (0,37 %) miatt érzékenysége kicsi (0,1 % a protonokhoz viszonyítva) [104]. A nitrogénmagok kémiai eltolódását elsősorban saját protonálódásuk befolyásolja, néhány esetben más csoportok hatását is figyelembe kell venni. ^{15}N NMR spektroszkópiával számos nitrogént tartalmazó bázis, mint lineáris poliaminok [105], gyűrűs poliaminok [106], aminoglikozid antibiotikumok [107], poliaminamidok [108], arginin [109], lizin [110], hisztidin [111], és guanidin-származékok [112] protonálódását vizsgálták.

A módszer rendkívül alacsony érzékenysége szükségessé teszi rendkívül hosszú mérési idők vagy tömény oldatok (természetes izotóparány mellett) vagy pedig ^{15}N dúsított minták használatát. Nagy térerejű, esetleg hűtött mérőfejjel ellátott NMR spektrométerek használatával a mérési idő jelentősen csökkenthető, különösen hidrogénen detektált többdimenziós módszerek alkalmazásával.

3.5. Irodalmi áttekintés a poliaminokról

Anthony van Leeuwenhoek már 1678-ban felfedezett az emberi spermában kihülés során keletkező kristályokat [113], amelyekről később bebizonyították, hogy spermin-foszfát volt.

Az élő sejtekben azóta számtalan poliamint fedeztek fel, a három leggyakoribb a putreszcin, a spermidin és a spermin [114]. Az általunk vizsgált vegyületek képleteit és számozását a 3.9 ábra mutatja.



3.9. ábra: Az általunk vizsgált poliaminok az NMR aktív magok később használt jelöléseivel

Emlősökben a poliaminok szintézise az ornitinből indul, amelyet az ornitin-dekarboxiláz enzim alakít át putreszcinné. Ez egyben a teljes reakciósor sebesség-meghatározó lépése. A $\text{Putr} \rightarrow \text{Spd}$ és az $\text{Spd} \rightarrow \text{Spm}$ lánchosszabbításokhoz a propánamin rész dekarboxilált S-adenozil-metioninből származik.

A poliaminok szerepe a sejtekben rendkívül sokrétű, a megfelelő intracelluláris koncentrációjuk elengedhetetlen a sejtek növekedéséhez és szaporodásához. Kimutatták, hogy daganatos sejtekben a poliaminok mennyisége jelentősen emelkedett a normál sejtekhez képest [115-117]. Ezért a poliaminok bioszintézisének gátlása jó terápiás célpontja lehet a tumorelles szerekek [118]. Klinikai Fázis III. tapasztalok szerint az ornitin-dekarboxiláz gátlása növeli az agydaganatban szenvedő betegek túlélését [119].

A poliaminok modulálják a DNS, az RNS, a nukleotid-trifoszfátok, a fehérjék és a savas karakterű molekulák működését [120]. A különböző sérülések utáni regenerációban is fontos szerepet játszanak [121-123], bioszintézisük gátlása akadályozza a sebgyógyulást [124].

A poliamin-raktárak kiürülése apoptózist indukálhat, ugyanis számos extrinsic apoptotikus faktor (TNF- α , glukokortikoidok) kiüríti a poliamin raktárakat [125].

A polikationos természetük miatt számos ioncsatorna funkcióit modulálják vagy gátolják. Az ioncsatornával kapcsolatos szerepüket a [126] közlemény foglalja össze.

A poliaminok szerepe más fajokban rendkívül sokrétű, például alkaloidok prekurzorai [127-130], pókok és darazsak méreganyagai – melyek a központi glutamát-receptorok inhibitorai – is tartalmazhatnak poliaminokat [131,132].

A norspermidint és a norspermint növényekben és algákban mutatták ki [133,134], pontos biológiai szerepük nem tisztázott.

3.5.1. A vizsgált poliaminokra közölt bázicitásadatok áttekintése

A vizsgált vegyületek közül mikroszkopikus protonálódási állandókat a spermidin és a spermin esetében publikáltak [135-137]. Az összes többi vegyület protonálódási folyamatait eddig csak makroállandók szintjén jellemezték. Az állandókat általában potenciometriásan határozták meg, sok esetben az ionerősséget nem tartották konstans értéken.

3.2. táblázat: A vizsgált poliaminokra közölt protonálódási makroállandók

Vegyület	Módszer, t (°C), I (M)	$\log K_1$	$\log K_2$	$\log K_3$	$\log K_4$	Ref.
Spd	pot. titr., 25 °C, 0,2 M	10,85	9,67	7,98	–	[138]
	pot. titr., 25 °C, 0,1 M	10,67	9,73	8,16	–	[139]
	pot. titr., 25 °C, 1 M	10,86	10,30	8,93	–	[140]
	pot. titr., 25 °C, 0,15 M	10,95	9,98	8,56	–	[141]
	^{13}C NMR-pH, 25 °C, ? ^a	10,5	9,4	8,2	–	[142]
	pot. titr., 23 °C, 1 M	11,06	10,15	8,88	–	[143]
	^{13}C NMR-pH, 30,7 °C, ? ^a	10,90	9,76	8,24	–	[135]
	^{13}C NMR-pH, 25 °C, ? ^a	11,02	10,02	8,57	–	[136]
	^{15}N NMR-pH, 25 °C, ? ^a	11,56	10,80	9,52	–	[105]
	pot. titr., 25 °C, 0,1 M	10,81	9,81	8,34	–	[144]
	pot. titr., 20 °C, 0,1 M	10,97	10,06	8,58	–	[145]

3.2. táblázat (folytatás): A vizsgált poliaminokra közölt protonálódási makroállandók

Vegyület	Módszer, t (°C), I (M)	log K_1	log K_2	log K_3	log K_4	Ref.
Norspd	^{13}C NMR-pH, 21 °C, ? ^a	11,20	10,54	8,87	–	[146]
	^{13}C NMR-pH, 25 °C, ? ^a	10,9	9,7	8,2	–	[142]
	pot. titr. 30 °C, 1 M	10,70	9,70	8,02	–	[147]
	pot. titr. 25 °C, 0,1 M	10,56	9,44	7,54	–	[148]
	pot. titr., 20 °C, 0,1 M	10,48	9,74	7,81	–	[145]
Spm	pot. titr., 25 °C, 1,02 M	11,12	10,42	9,32	8,44	[149]
	pot. titr., 25 °C, ? ^a	10,86	10,05	8,82	7,95	[150]
	pot. titr., 25 °C, 0,15 M	10,9	10,1	8,9	8,1	[151]
	pot. titr., 25 °C, 0 M	10,70	9,7	8,32	7,22	[138]
	pot. titr., 25 °C, 0,1 M	10,90	9,90	8,75	7,80	[139]
	pot. titr, 25 °C, 1 M	10,80	10,65	9,31	8,69	[140]
	pot. titr., 25 °C, 0,15 M	10,94	10,12	9,04	7,97	[141]
	pot. titr., 25 °C, 0 M	10,70	9,70	8,32	7,22	[152]
	pot. titr., 23 °C, 1 M	11,23	10,45	9,33	8,60	[143]
	pot. titr., 20 °C, 0,1 M	10,91	10,37	9,11	8,28	[145]
Norspm	pot. titr., 25 °C, ? ^a	10,61	9,80	8,35	7,51	[150]
	pot. titr., 20 °C, 0,1 M	10,36	10,02	8,63	7,38	[145]
	^{13}C NMR-pH, 21 °C, ?	11,35	10,60	9,30	8,40	[153]

^a: Nem beállított ionerősség

3.5.2. A spermidin és spermin protonálódási szekvenciájának vizsgálata

Kimberly és Goldstein ^{13}C NMR spektroszkópiával vizsgálták a protonálódási folyamatokat [135], az egyes aminocsoportok protonáltsági móltörtjét a Sudmeier-Reilley-közelítés [154] alapján számították ki, amely szerint az egyes protonálódási centrumok hatása a vizsgált mag kémiai eltolódására additív:

$$\Delta\delta^{mért} = \delta^{mért} - \delta_L = C_A f_A + C_B f_B + C_C f_C \quad (3.39)$$

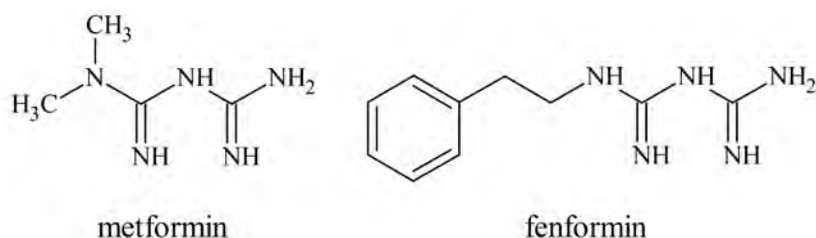
A C értékeket rokon szerkezetű vegyületekből vették, majd ezek alapján számították ki a mono-, di- és triprotonált részecskében a báziscentrumok protonáltsági móltörtjét.

Onasch és mtsai. a nitrogénekhez képest α helyzetű protonok kémiai eltolódását az egyes aminocsoportok protonálódásának szelektív indikátorának tekintette, majd ezekből számították a mikroállandókat [136].

A csoportspecifikus protonálódási állandókat ^{13}C NMR–pH titrálással határozták meg Frassinetti és mtsai. [137]. A kiértékelést az általuk kifejlesztett szoftverrel, „klaszter sorfejtéssel” végezték.

3.6. A vizsgált biguanidin-származékok

Két biguanidin-származék protonálódási állandóit határoztuk meg: metformin (1,1-dimetilbiguanidin) és fenformin (1-(2-feniletil)biguanidin).



3.10 ábra: A vizsgált biguanidin-származékok

Mindkét vegyületet orális antidiabetikumként használják [155], sőt a metformin az elsőként választandó szer 2-es típusú diabetes mellitus terápiájában a Magyar Diabetes Társaság szakmai irányelve alapján [156]. A fenformint kivonták a forgalomból az alkalmazás során kialakuló tejsavas acidózis magas incidenciája miatt.

A biguanidinek a guanidinekhez hasonlóan rendkívül erős bázisok, protonálódásuk már a $\text{pH} > 13$ tartományban végbemegy. A második protonálódási lépés csak savas közegben megy végbe, sőt igen erősen savas közegben ($\text{pH} < 0$) háromszorosan protonált részecskék is megjelennek az oldatban [157].

A metformin irodalmi protonálódási állandói ellentmondásosak, találunk példát $\log K_1 = 11,5$ [158] és $\log K_1 = 12,4$ értékre is [159]. A fenformin protonálódására $\log K_1 = 11,3$ értéket közöltek [160].

3.7. Arginin és modellvegyületei

Az arginin (Arg) a legbázikusabb fehérjealkotó aminosav, az emberi szervezet számára feltételesen esszenciális. Fontos szerepet játszik a vérnyomás szabályozásában, valamint az en dogén NO szintézisében [161,162]. A folyamat során az arginin ornitinné metabolizálódik, amely a poliaminok prekursora. Kimutatták, hogy az arginin fokozza a növekedési hormon elválasztását [163]. A szisztémásan adott Arg szívkoszorúér-betegségekben javítja a kardiovaszkuláris funkciókat [164,165].

A citrullin (Cit) nem fehérjealkotó aminosav, az emberi szervezetben az ureaciklus során keletkezik ornitiből, az ornitin karbamoiltranszferáz enzim segítségével, vagy argininből, NO szintázok közreműködésével [166].

Kimutatták, a Cit fokozza az aerob energiatermelést izomszövetben [167]. Annak ellenére, hogy nem fehérjealkotó aminosav, számos ún. citrullinált fehérjét találtak, amelyek poszttranszlációs módosítással keletkeznek ún. f ehérje-arginil deimináz (protein-arginyl deiminase, PAD) enzimek közreműködésével.

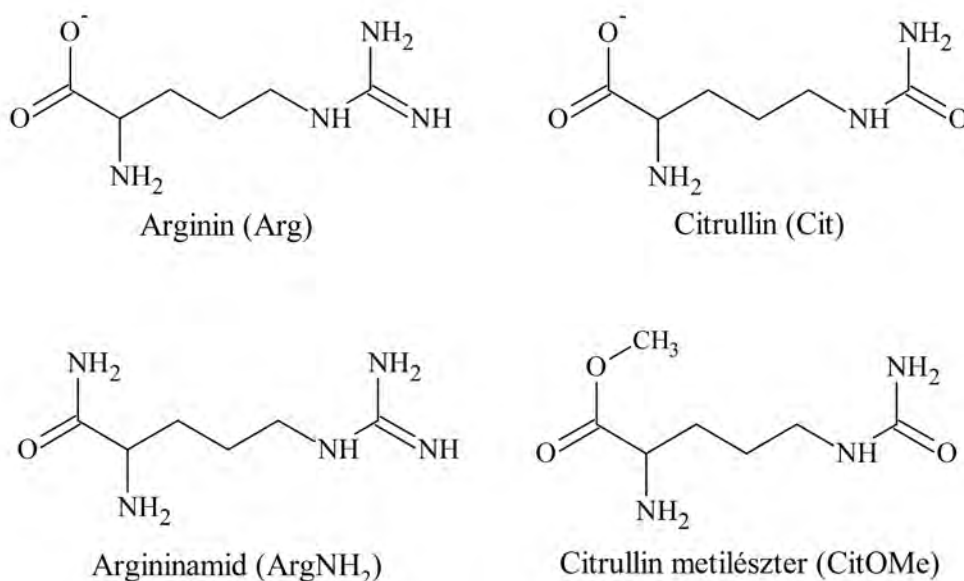
A citrullinizációnak fontos szerepe van a bőr keratinizációs folyamataiban, pikkelysömörös betegekben a citrullinált keratin szintje rendkívül alacsony [168]. A központi idegrendszerben a mielin fehérjék abnormális citrullinizációját találták sclerosis multiplexben szenvedő betegeknél [169,170]. A rheumatoid arthritis kialakulásában is szerepe van a PAD2 enzimeknek: a citrullinált fehérjék ellen (is) keletkeznek autoantitestek [171,172].

A citrullin nem csak, mint önálló molekula fontos, hanem, mint az arginin egyik legjobb modellvegyülete is, hiszen a két vegyület izoelektronos, és a deprotonált részecskék izosztérikusak, azonban az oldallánc bázicitásában jelentős a különbség a guanidino és karbamido csoportok eltérő tulajdonságai miatt.

Az Arg három protonálható csoportot tartalmaz: guanidino (G), amino (A) és karboxilát (C), melyek bázicitása jelentősen különbözik egymástól. Az összes mikroállandó meghatározása nem lehetséges csoportspecifikus módszerekkel, hiszen a minor részecskék hozzájárulása az analitikai jelhez elhanyagolható. További nehézség a mikroállandók meghatározásánál, hogy az első protonálódás igen lúgos közegben következik be, ahol a pH üvegelektóddal történő meghatározása pontatlan.

Ennek megfelelően az első protonálódási lépésre közölt makroállandók pontossága is kérdéses. Ez tükröződik az irodalomban található adatokban is, néhány közölt érték: $\log K_1 > 14$ [173], $\log K_1 = 12,48$ [174], $\log K_1 = 12,5$ [175]

A karboxiláton protonált mikrorészecskék bázicitásának méréséhez további modellvegyületeket használtunk, ahol a karboxilcsoportot a vele izoelektronos savamiddel (argininamid, ArgNH₂) illetve metilészterrel (citrullin metilészter, CitOMe) helyettesítettük. A vegyületek képlete a 3.11 ábrán látható.



3.11 ábra: Arginin és modellvegyületei

Az Arg és a Cit mikroállandóit eddig mindössze egy közlemény tárgyalta [173], ahol potenciometriás titrálással határozták meg a makroállandókat, a minor részecskék koncentrációját elhanyagolták.

3.8. Sztreptomycin és sztreptidin

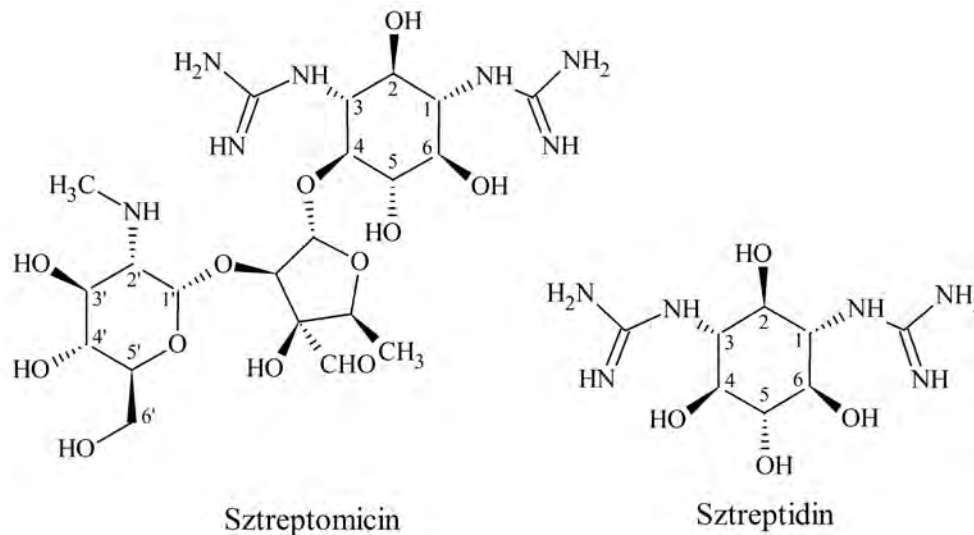
A sztreptomycin volt az első bakteriális forrásból, a *Streptomyces griseus*ból izolált antibiotikum [176], amely egyben a tuberkulózis első hatékony gyógyszerének bizonyult. Jóllehet, toxicitása miatt erősen visszaszorult a használata, napjainkban mint másodvonalbeli antituberkulotikumot és nozokomiális fertőzések elleni antibiotikumot alkalmazzák.

A sztreptomycin, mint a többi aminoglikozid, baktericid hatású, a baktériumok fehérjeszintézisét gátolja a riboszóma 30S alegységéhez kötődve [177,178], így hibás

transzlációt okoz [179]. Az aminoglikozid antibiotikumok széleskörű terápiás alkalmazását leginkább súlyos mellékhatásaik gátolják, mint a vese- [180], és ototoxicitás [181].

A sztreptomicin az aminoglikozidok 4-O-monoglikozid alcsoportjába tartozik, egy aglikonból (sztreptidin) és egy diszacharidból (sztreptobiózamin) áll. A diszacharidot L-sztreptóz (5-deoxi-3-C-formil-lixóz) és N-metil-2-deoxi-2-aminoglukóz alkotja.

A sztreptidin (1,3-diguanidino-2,4,5,6-tetrahydroxiciklohexán) nem csak mint a sztreptomicin aglikonja, hanem mint önálló molekula is jelentős, hiszen az antibiotikum-rezisztenciáért felelős aminoglikozid-módosító-enzimek, főleg az O-adeniltranszferázok gátlószereként alkalmazható a sztreptomicin-rezisztens baktériumok ellen [182].



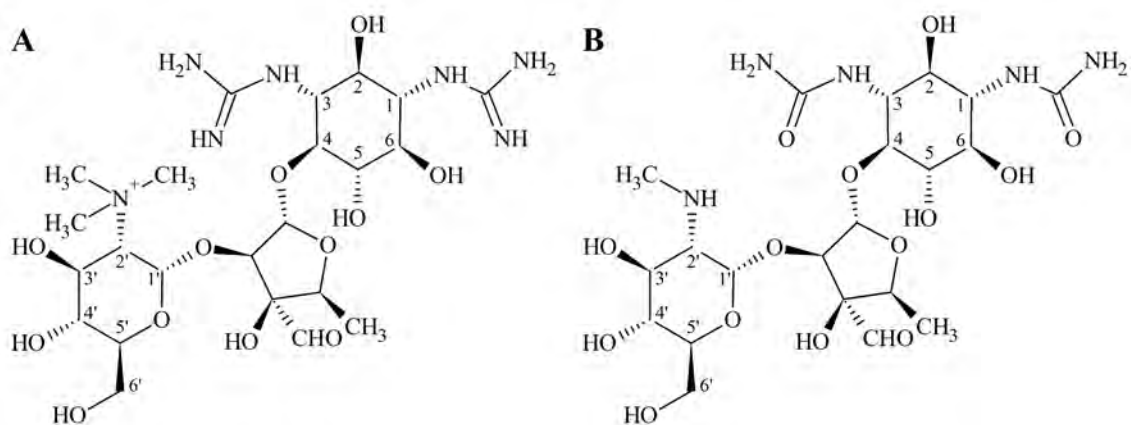
3.12 ábra: A sztreptomicin és a sztreptidin képlete, számozása.

A sztreptomicin bázicitásadatait mindössze egy közlemény tárgyalja [183]. Az erősen lúgos oldatok pH-ját egy UV-pH indikátor, az alizarinsárga abszorpciójából számították, majd ezek segítségével írták fel a sztreptomicinre jellemző Bjerrum-görbét, amelyből meghatározták a protonálódási állandókat. Az így kapott állandók: $\log K_1 = 12,11 \pm 0,05$, $\log K_2 = 11,51 \pm 0,05$, $\log K_3 = 8,46 \pm 0,02$. Az első két protonálódási lépéshez tartozó makroállandók közötti különbség 0,6 e gység, ami megfelel a szimmetrikus kétértékű bázisok protonálódó csoportjai közötti statisztikus korrelációnak, ha a két csoport közötti kölcsönhatási tényező értéke 0. Ez is rámutat a számítások elvi hibájára, hiszen azt feltételezi, hogy a négy mikroállandó értéke

megegyezik, ami véleményünk szerint nem lehetséges, hiszen a két csoport kémiai környezete is eltérő, valamint közel helyezkednek el egymáshoz, így protonáltsági állapotuk biztosan befolyásolja a másik csoport bázicitását.

A sztreptidin bázicitásáról nem állnak rendelkezésre adatok.

A sztreptomycin három báziscentrumot tartalmaz: két guanidino és egy szekunder aminocsoportot (3.12 ábra). A funkciós csoportok bázicitásában lévő nagy különbség miatt a teljes mikrospeciációs séma kiszámítása csak deduktív módszerekkel lehetséges. Az összes mikroállandó meghatározására alkalmas modellvegyület lehetne például a glukózamin kvaternerezett származéka (3.13. ábra **A**) vagy a két guanidinocsoport helyettesítése karbamidocsoportokkal (3.13. ábra **B**).



3.13. ábra: A sztreptomycin ideális modellvegyületei

Ilyen vegyületeket azonban irodalmi kutatásaink alapján nem állítottak elő, így a rendelkezésre álló adatokból csak a major mikrorészecskékre vonatkozóan kaphatunk megbízható adatokat.

4. A kísérleti munkában használt anyagok és módszerek

4.1. Használt vegyszerek, vizsgált molekulák

A mérésekhez használt alapvegyszereket (NaOH, KOH, NaCl, KCl, tömény sósav), az elektródkalibrációhoz alkalmazott pufferkomponenseket (nátrium-tetraoxalát, kálium-hidrogénftalát, KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , bórax) analitikai tisztaságban a Reanal, a Merck és a Sigma-Aldrich gyártóktól szereztük be. Az NMR–spektroszkópiához referenciaként 3-trimetilszilil-1-propánszulfonsav nátriumsót (DSS, $\geq 99\%$, Fluka), tetrametilammónium kloridot (TMA, Sigma) és tetraetilammónium kloridot (TEA, Sigma) használtunk. A titrálások oldószereként kétszer desztillált vizet alkalmaztunk.

A következő fejezetekben vegyületcsoportonként adjuk meg a vizsgált anyagok eredetét. A kereskedelemből beszerzett anyagok azonosítása és tisztaságuk ellenőrzése egy- és kétdimenziós NMR spektroszkópiával történt.

4.1.1. NMR–pH indikátormolekulák

A diklórecetsav (DCA, $\geq 99\%$), a klórecetsav (MCA, 99%), a hangyasav (99%), a szarkozin (Sarc, 98%), a *terc*-butilamin (TBA, 98%), a 4-hidroxipiridin (95%), a citozin (99%), az acetoxim (98%), az acetaminidin hidroklorid (97%), az 1-metilguanidin hidroklorid (98%), a metformin (97%) és a fenformin (97%) Sigma-Aldrich termékei voltak. A nátrium acetátot, a trisz(hidroximetil)aminometánt és az imidazolt a Reanaltól szereztük be. (A vegyületek képletei az 5.1 ábrán láthatók).

4.1.2. Arginin és modellvegyületei

Az L-arginin (Arg, 99%) a Reanal terméke volt, az L-citrullint (Cit, 98%) és az L-argininamidot (ArgNH_2 , 97%) a Sigma-Aldrichtól szereztük be. A citrullin metilészterét Li és mtsai. receptje szerint [184] állítottuk elő: 1,75 g L-citrullinhoz (10 mmol) cseppenként 2,16 g trimetil-klórszilánt (20 mmol) adtunk, majd 20 ml metanollal 24 óráig szobahőmérsékleten kevertettük. Az oldószereket rotációs vákuumbepárlóval távolítottuk el, a citrullin metilészter hidrokloridját szilárd formában izoláltuk. A vegyület szerkezetét ^1H és ^{13}C NMR spektruma alapján igazoltuk. ^1H NMR (D_2O): δ 4,20 (t, 1H), 3,85 (s, 3H), 3,19 (t, 2H), 1,98 (m, 2H), 1,64 (m, 2H). ^{13}C NMR (D_2O): δ 173,5, 164,1, 56,7, 55,6, 42,3, 30,0, 27,6 ppm.

A vegyületek képletei a 3.11 ábrán láthatóak.

4.1.3. Lineáris poliaminok és modellvegyületeik

A spermidin trihidrokloridot (Spd, 98%), a spermin tetrahidrokloridot (Spm, 99%), a norspermidint (Norspd, 98%) és a norspermint (Norspm, 95%) a Sigma-Aldrich cégtől vásároltuk. A 4-(3-aminopropilamino)butanolt (APAB) Lebreton és mtsai. receptje alapján állítottuk elő [185]: 50 ml butanolban feloldottunk 1,4 g (10 mmol) kálium-karbonátot, 0,33 g kálium-jodidot (2 mmol) és 3,0 g 1,3-diaminopropánt (40 mmol), majd cseppenként hozzáadtunk 2,2 g 4-klórbutanolt (20 mmol). Az elegyet 24 ór áig refluxáltuk, majd szűrés után vákuumdesztillációval távolítottuk el az oldószereket. A terméket olajként izoláltuk, és további tisztítás nélkül használtuk fel. ^1H NMR (D_2O): δ 3,60 (t, 2H), 2,65-2,70 (m, 6H), 1,66 (t, 2H), 1,56 (m, 4H). ^{13}C NMR (D_2O): δ 61,7, 48,3, 46,1, 38,3, 30,7, 29,3, 24,5 ppm.

A molekulák képlete és számozásai a 3.9 és az 5.15 ábrákon láthatóak.

4.1.4. Sztreptomicin és sztreptidin

A sztreptomicin szulfátot a Mercktől szereztük be. A sztreptidint Latorre és mtsai. receptje alapján szintetizáltuk: 5,0 g sztreptomicint 40 ml metanol és 1,5 ml tömény kénsav elegyében oldottunk fel. Az oldatból 72 óra múlva kivált a sztreptidin szulfát, melynek szerkezetét NMR spektroszkópiával igazoltuk. ^1H NMR (D_2O): δ 3,58 (t, 1H), 3,54 (t, 2H), 3,51 (t, 1H), 3,49 (t, 2H). ^{13}C NMR (D_2O): δ 74,8, 71,6, 70,9, 59,1 ppm.

A vegyületek képlete a 3.12 ábrán látható.

4.2. Az üvegelektrod kalibrációja

A titrálásokhoz Metrohm 6.0234.110 ka talógusszámú kombinált üvegelektrodot használtunk, melyet a mérések előtt, a IUPAC irányelveknek megfelelően [6], négy, ismert pH-jú, standard tompító oldattal kalibráltunk. Minden mérés termosztált körülmények között történt, a hőmérséklet $25 \pm 0,1$ °C volt. Az alkalmazott pufferek összetételét és deklarált pH-ját a 4.1 táblázat tartalmazza.

4.1. táblázat: A kalibráló pufferek összetétele és deklarált pH-ja

	Összetétel	pH
Oxalát	0,05 M kálium-tetraoxalát	1,68
Ftalát	0,05 M kálium-hidrogénftalát	4,005
Foszfát	0,025 M KH_2PO_4 + 0,025 M Na_2HPO_4	6,865
Bórax	0,01 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$	9,180

4.3. NMR–pH titrálások

A méréseket inverz geometriájú 5 mm-es gradiens mérőfejjel rendelkező Varian Unity Inova 600 MHz-es NMR spektrométeren végeztük $25 \pm 0,1$ °C-on.

Az NMR titrálások egységesen 5 mm-es NMR csőben történtek, az oldatok 5 v/v% D_2O -t tartalmaztak, amely a Gross-Butler-Purlee–elmélet szerint csak 0,02 egységgel változtatja meg a pH-skálát [8,9], az üvegelektóddal történő mérések pontosságán belül. Az NMR spektrumok kémiai eltolódásait 0,1 mM koncentrációjú DSS (^1H , $\delta_{\text{DSS}} = 0,000$ ppm), 20 mM TEA (^{15}N HMBC, $\delta_{\text{TEA}} = -316,7$ ppm [186]), 5 mM TMA (^{13}C HSQC, $\delta_{\text{TMA}} = 55,36$ ppm) belső referensre vonatkoztattuk. A H_2O rezonanciajelét kettős spin echo [187], (^1H mérések) vagy előtelítő (*presaturation*) pulzussal [188] nyomtuk el (2D NMR mérések). Az NMR spektrométer belső skálájának referenciapontjai TMS (^1H és ^{13}C), illetve nitrometán (^{15}N) voltak.

4.3.1. Egyedi minták módszere

Indikátormolekulák NMR–pH titrálása. Az egyenként összemért minták sorozata 0,5 – 2 mM koncentrációban tartalmaztak indikátormolekulákat. Az ionerősséget HCl, NaOH és KCl hozzáadásával állítottuk 0,15 M vagy 1,00 M értékre. A mintaoldatok pH-ját Metrohm üvegelektóddal határoztuk meg, 25 °C -on, a D_2O tartalomra korrekciót nem végeztünk. Mivel az acetamidin lúgos közegben gyorsan hidrolizál acetamidra és ammóniára, így a pH = 10 – nél lúgosabb mintákhoz 1 μl 1 M acetamidin–törzsoldatot adtunk, majd késedelem nélkül rögzítettük ^1H NMR spektrumát.

Arginin és modellvegyületeinek NMR–pH titrálása. Három vegyületből (Arg, ArgNH_2 , Cit) különböző pH-jú oldatok készültek 1,00 M ionerősség mellett. A

törzsoldatok 0,5 – 2 mM koncentrációban tartalmaztak indikátormolekulákat, a vizsgált molekulára nézve koncentrációjuk 5 mM volt. Az egyes oldatok pH értékét üvegelektroddal ($\text{pH} < 12$) határoztuk meg, illetve az indikátormolekulák kémiai eltolódásaiból számítottuk ($\text{pH} > 7$).

Poliaminok NMR–pH titrálása. A vizsgált vegyületekből 50 mM koncentrációjú, 20 mM TEA-t tartalmazó törzsoldatokat készítettünk melyek ionerősségét NaOH, HCl és KCl segítségével 1,00 M-ra állítottuk. A lúgos törzsoldat 0,98 M NaOH volt, ebben oldottuk fel az 50 mM koncentrációnak megfelelő poliamint. A lúgos oldathoz egyforma mennyiségben adtunk savas törzsoldatot (0,98 M HCl) és KCl-os törzsoldatot (1,98 M KCl) amíg az oldat pH-ja el nem érte a $\text{pH} = 7$ értéket. Ennél kisebb pH-k beállítása már csak a savas törzsoldattal történt. Az oldatok indikátormolekulákat is tartalmaztak 0,5 – 2,0 mM közötti koncentrációban, melyek kémiai eltolódásaiból számítottuk az egyes minták pH-ját. A mintákról ^1H , ^{15}N HMBC és szükség szerint ^{13}C HSQC spektrumokat rögzítettünk.

A HMBC spektrumok felvétele az alábbi beállítások mellett történt: 32 inkrementum, 16-32 tranziens. A vízjelet előtelítő pulzussal nyomtuk el. Mind a direkt, mint az indirekt dimenziókban a lehető legszűkebb spektrális ablakok alkalmazására törekedtünk, így például a nitrogénmagok kémiai eltolódását csak a -315 – -360 ppm közötti kémiai eltolódás-tartományban rögzítettük

HSQC spektrumokat azon oldatokról rögzítettünk, melyeknél az ^1H NMR spektrum alapján, a j-ek átfedése miatt, nem lehetett az egyes magok kémiai eltolódását egyértelműen leolvasni. Itt is a lehető legszűkebb spektrális ablakban rögzítettük a spektrumokat, az egyes oldatokról 2-4 tranziens és 32 inkrementumot regisztráltunk.

Sztreptomicin és sztreptidin NMR–pH titrálása. A sztreptomicin lúgos oldatban gyors bomlást szenved; az ^1H NMR spektrumon megjelenő legjellegzetesebb bomlástermék a maltol (3-hidroxi-2-metil-4H-pirán-4-on) [189]. Ennek elkerülésére a törzsoldatok nem tartalmaztak sztreptomicint, csak indikátormolekulákat (0,5 – 2 mM között változó koncentrációban) és 5 mM TMA-t. Két törzsoldat (1 M NaOH és 1 M KCl) elegyítésével készítettük el a különböző pH-jú oldatokat, melyeknek 800 μl -ében oldottunk fel ~12 mg sztreptomicin szulfátot, majd az oldatot ^1H és HSQC spektrumait késedelem nélkül rögzítettük.

A sztreptidin lúgos és savas közegben is stabil, így 5 mM koncentrációban oldottuk fel a KCl-os (1,00 M KCl) és lúgos (1M NaOH) törzsoldatban is. Az oldatok indikátormolekulákat és 5 mM TMA-t is tartalmaztak.

4.3.2. Elektród nélküli NMR–pH titrálások

Az indikátormolekulákat és a KCl-ot tartalmazó törzsoldatban 5 mM-nak megfelelő mennyiségű CitOMe-t oldottunk fel, majd a kapott oldat 600 μ l-ét NMR csőbe vittük át. A 0,2 M NaOH és 0,8 M KCl tartalmú titrálószer számított mennyiségeit (1 – 10 μ l) adagoltuk az NMR csőbe, és homogenizálás után regisztráltuk a spektrumot. Az oldat pH-ját az indikátormolekulák kémiai eltolódásaiból számítottuk ki.

4.4. Potenciometriás titrálások

A titrálásokat a 4.2 fejezetben leírt módon kalibrált Metrohm 6.0234.110 üvegelektrod mellett, $25 \pm 0,1$ °C-on végeztük. Az oldatok ionerőssége 1 M volt. A titrálásokat 1 μ l névleges adagolási pontosságú és 0,1 mV mérési felbontású Metrohm 716 DMS Titrino autobürettával végeztük, mely automatikusan felvette a titrálási görbéket.

A protonálódási makroállandókat különbségi pH- potenciometriás módszerrel határoztuk meg. Egy üres titrálást végeztünk, miszerint 2 ml 0,5 M HCl + 0,5 M KCl oldatot titráltunk 0,5 M KOH + 0,7 M KCl oldattal. A második titrálás során 2 ml sósavas oldatban feloldottuk a vizsgálandó vegyületet 50 m M koncentrációnak megfelelő mennyiségben, majd ezt titráltuk KOH-dal.

4.5. A titrálási görbék kiértékelése

Minden titrálási görbe kiértékeléséhez az OriginPro 8.0 szoftvert használtuk, mely alkalmas nemlineáris paraméterillesztésre többváltozós adatsorok szimultán kiértékelésekor.

4.5.1. NMR–pH titrálások

A vizsgált vegyületek valamennyi szénkötésű protonjának $\delta^{mért}$ –pH adatsorára egyszerre illesztve a (3.17) egyenletet megkapjuk az egyes makrorészecskék egyedi kémiai eltolódásait valamint a $\log K_i$ lépcsőzetes protonálódási állandókat.

A relatív bázicitások meghatározása során a (3.20) egyenletet illesztettük a $\delta_L^{mért} - \delta_{Ind}^{mért}$ adatsorok valamennyi lehetséges kombinációjára. (például a citozin – aceton oxim pár esetén összesen 4 adatsorra illesztettük szimultán a (3.20) egyenletet). Az illesztések során az indikátormolekula határeltolódásait (δ_{Ind} és δ_{HInd}) fixen tartottuk.

4.5.2. Potenciometriás titrálások

A két titrálás során mért pH – V_{KOH} adatsorokból kiszámítottuk az azonos pH- hoz tartozó fogyáradatok különbségei (ΔV). A különbségi görbét az Origin szoftver beépített „Substract reference data” algoritmusával számítottuk ki.

A kapott ΔV –pH görbe arányos a Bjerrum-függvénnyel, így a (3.16) egyenlet szerinti nemlineáris paraméterillesztéssel kiszámíthatóak a lépcsőzetes makroállandók.

Az illesztések pontossága tovább javítható a potenciometriás és NMR–pH titrálások szimultán kiértékelésével.

4.5.3. A mikroállandók meghatározása

A mikroállandók kiszámítását az arginin és a sztreptomicin esetén a makroállandókból végeztük, deduktív módszerrel. A poliaminok mikroállandóinak meghatározása az egyes nitrogénmagok kémiai eltolódásából történt, az 5.4.2 fejezetben leírtak szerint. Az illesztésekhez valamennyi nitrogén kémiai eltolódására szimultán illesztettük a megfelelő egyenleteket.

4.6. Szimulált adatsorok

A makroállandók és az indikátorparaméterek meghatározhatóságát szimulált adatsorokból is ellenőriztük. A szimulációk során a hibamentes adatsorokat a Microsoft Excel programmal generáltuk. Az adatsorok generálása során arra törekedtünk, hogy a vizsgálandó paraméterekhez hasonló értékeket használjunk.

Az egyes adatsorokat véletlenszerű hibával terheltük, melyet az Excel RANDBETWEEN függvényét felhasználva adtuk hozzá. A hiba mértéke $\pm 0,03$ pH-egység illetve $\pm 0,001$ vagy $\pm 0,002$ ppm kémiai eltolódás volt. Az adatsorokat a leolvasási pontosságnak megfelelően kerekítettük (pH esetén 0,01, kémiai eltolódásnál

0,001 egység pontosságra). Az adatsorokat az OriginPro 8.0 szoftverrel értékeltük ki, nemlineáris paraméterillesztéssel. Az illesztőfüggvény a kísérleti adatok kiértékelése során is alkalmazott függvény volt.

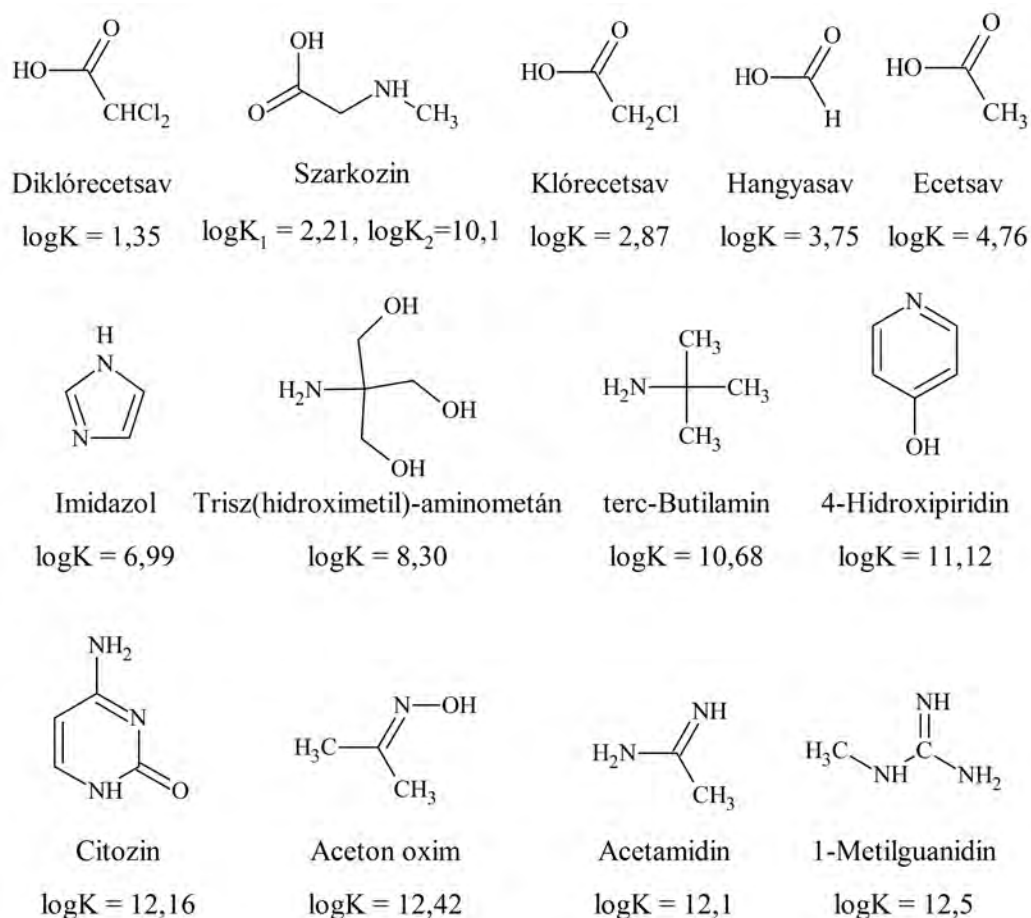
A módszer ellenőrzésére a hibamentes adatsorokból is meghatároztuk a vizsgált értékeket, a nemlineáris paraméterillesztéssel minden esetben gyakorlatilag szórással nélkül kaptuk vissza a kiindulási adatokat ($\sigma \approx 10^{-16}$).

5. Kísérleti eredmények és értékelésük

5.1. ^1H NMR–pH indikátormolekula–sorozat

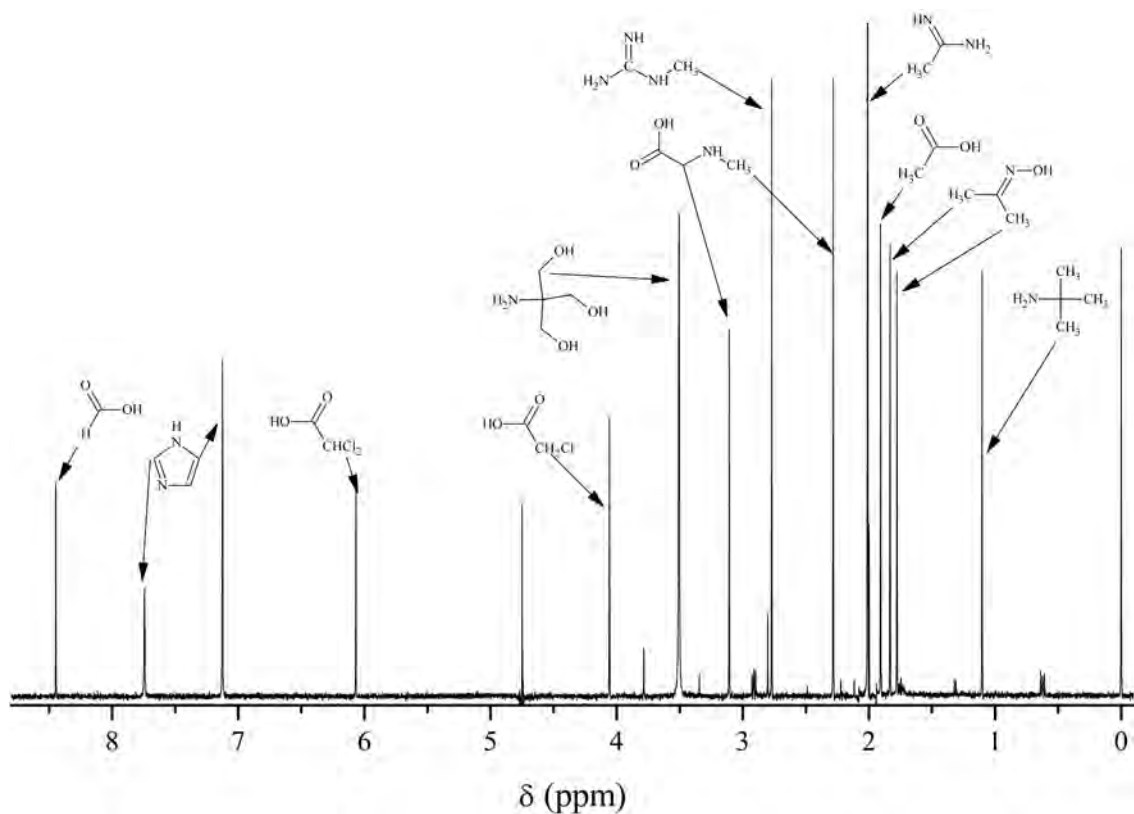
5.1.1. A kiválasztott indikátormolekulák

Összesen 13 molekulát vizsgáltunk, melyek alkalmasak lehetnek a pH meghatározására. A vegyületek képletei és irodalmi $\log K$ értékeik [175] az 5.1 ábrán láthatóak.



5.1. ábra: A kiválasztott indikátormolekulák és irodalmi protonálódási állandóik [175]

A molekulák egy részét már korábban is használták NMR–pH indikátorként [73-75] (diklórecetsav, klórecetsav, hangyasav, ecetsav, imidazol, TRIS), a többit (szarkozin, *terc*-butilamin, 4-hidroxipiridin, citozin, aceton oxim, acetamidin és 1-metilguanidin) irodalmi protonálódási állandóik [175] és egyszerű NMR spektrumuk alapján választottuk ki. A molekulák ^1H NMR spektruma az 5.2 ábrán látható.

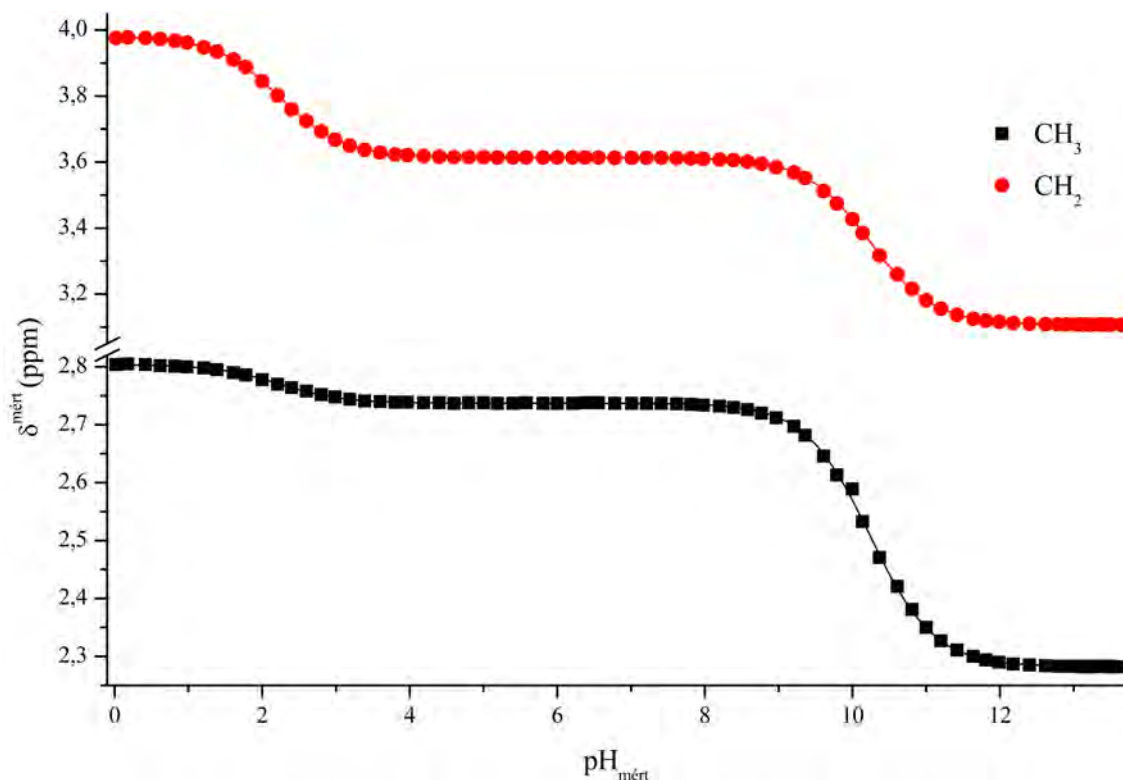


5.2. ábra: Az indikátormolekulák NMR spektruma és asszignációja pH=12,5 I=1,00 M oldatban.

Fontos szempont volt, hogy a vegyületek NMR spektruma legfeljebb két jelet tartalmazzon, és sem egymással, sem más molekulákkal ne lépjenek reakcióba.

5.1.2. Az indikátorparaméterek meghatározása

A 13 vizsgált molekulát egy oldatban titráltuk, a protonálódási állandókat és a határeltolódásokat a $\delta^{mért}$ – pH adatsorokból határoztuk meg a (3.7) egyenlet alapján, azokban az esetekben, ahol a $\log K$ értéke 2-12 közé esett.



5.3. ábra: A szarkozin NMR-pH titrálási görbéi

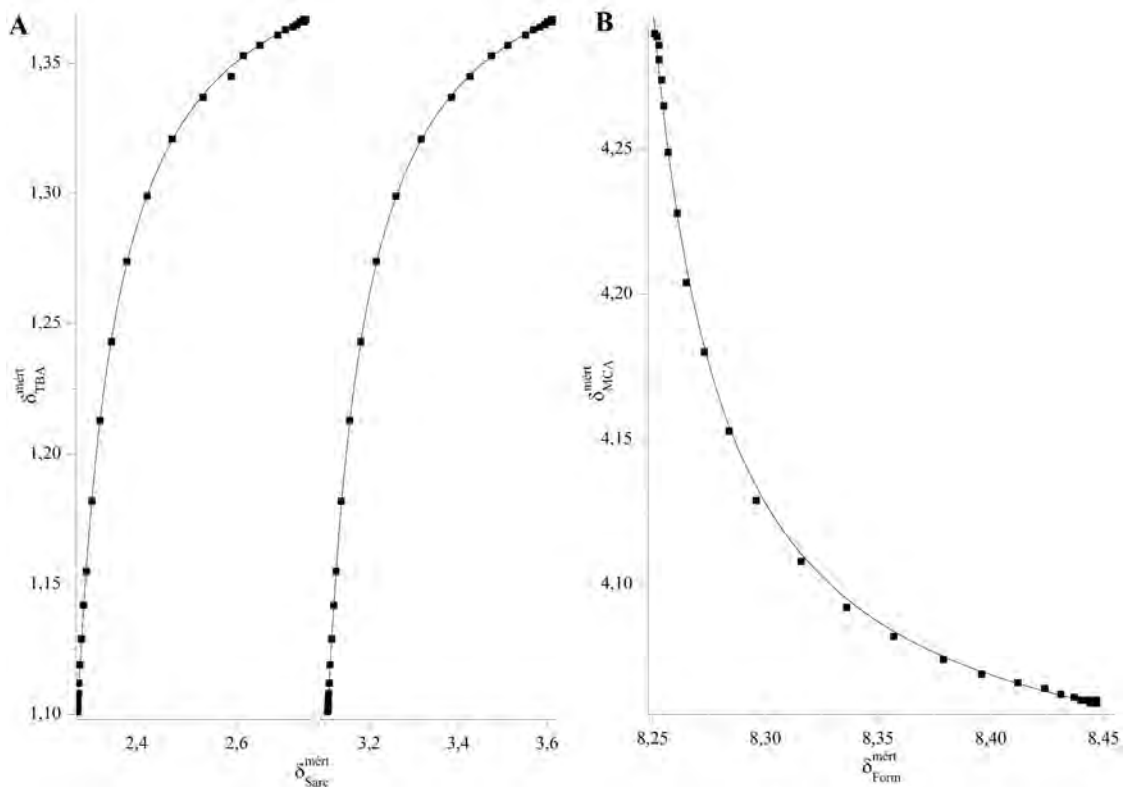
Ennél kisebb vagy nagyobb protonálódási állandójú molekuláknál a relatív bázicitásokat ($\Delta \log K$) számítottuk ki a $\delta_L^{mért} - \delta_{Ind}^{mért}$ adatsorokból a Perrin-Fabian módszer alkalmazásával a (3.20) egyenlet szerint, mely lehetővé teszi, hogy egy megfelelően összeállított indikátormolekula-sorozattal extrém magas vagy alacsony protonálódási állandókat is meghatározzunk, ugyanis a pH nem szerepel az illesztőfüggvényben.

Ilyen módon akkor határozhatóak meg pontosan a soron következő indikátormolekula paraméterei, ha $\Delta \log K \leq 1,3$. Ezt a határértéket szimulált adatsorok segítségével állapítottuk meg. A szimulációk során a szarkozin indikátorparamétereiből indultunk ki, és a következő indikátormolekula (TBA) paramétereit a határeltolódásokat minden esetben a TBA határeltolódásainak megfelelő értéknek vettük, míg a $\Delta \log K$ értékét 0,4 és 1,5 között, 0,1 egységnyi lépésenként változtattuk. A kiértékelések során a $0,4 \leq \Delta \log K \leq 1,3$ tartományban az indikátorparaméterek mérési hibán belül megegyeztek a kiindulási értékekkel, míg ennél nagyobb protonálódási állandókülönbség esetén már nagyobb volt az eltérés (0,003 ppm a határeltolódásokban és 0,05

egység a protonálódási állandóban). Ha megvizsgáljuk a $\delta_{szimulált}^{TBA} - \delta_{illesztett}^{TBA}$ értékeket, azt tapasztalhatjuk, hogy a $\Delta \log K > 1,3$ tartományban a különbség jelentősen megnő, akár 0,02 ppm is lehet, szemben a kisebb $\Delta \log K$ értékekhez tartozó maximum 0,005 ppm eltéréssel.

Az indikátorparamétereket a következő sorrendben számítottuk ki:

- Savas tartomány: hangyasav → klórecetsav → szarkozin → acetoxim → → diklórecetsav.
- Lúgos tartomány: szarkozin → *terc*-butilamin → (citozin) → acetoxim → → acetamidin → metilguanidin → imidazol.



5.4. ábra: A *terc*-butilamin (A) és a klórecetsav (B) indikátorparamétereinek meghatározása

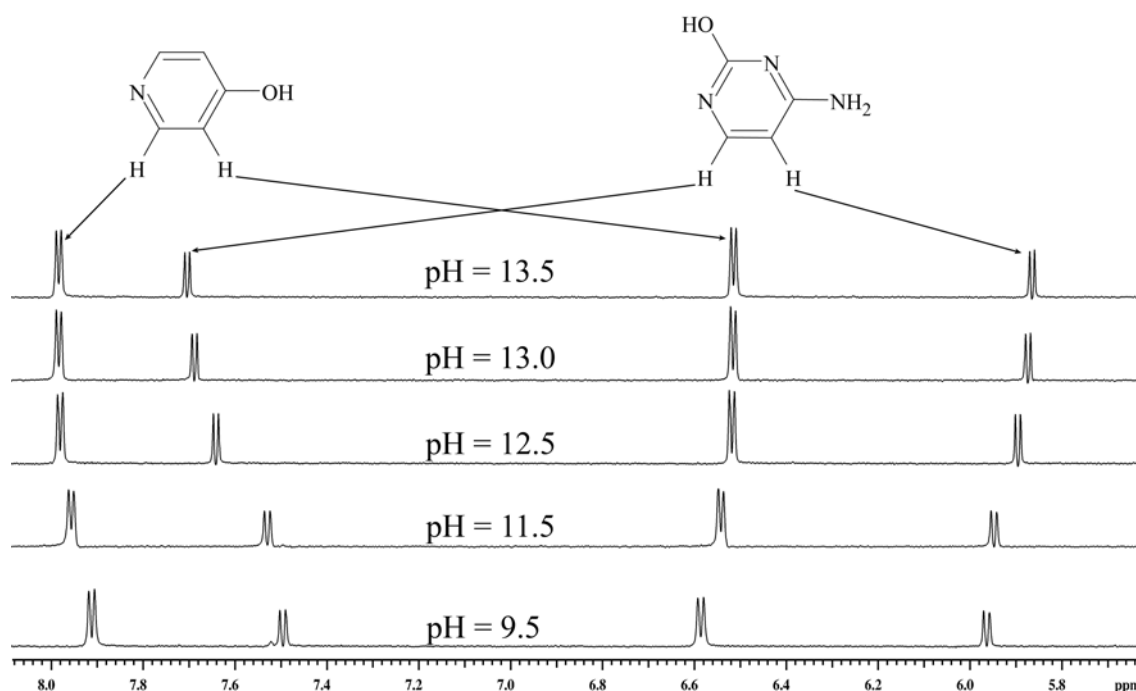
Az indikátorparaméterek helyességének ellenőrzésére az első két Perrin-Fabian módszerrel meghatározott molekula $\log K$ értékeit és határeltolódásait összehasonlítottuk a „klasszikus”, kémiai eltolódás – pH adatsorokból számított értékekkel, ugyanis az üvegelektrod ezekben a tartományban még megbízható.

5.1. táblázat: A különböző kiértékelési módszerek összehasonlítása

	<i>tert</i> -Butilamin		Klórecetsav	
	Perrin-Fabian módszer	pH _{elektród} alapján	Perrin-Fabian módszer	pH _{elektród} alapján
log <i>K</i>	11,07 ± 0,01	11,08 ± 0,01	2,63 ± 0,01	2,62 ± 0,01
δ_{Ind}	1,101 ± 0,001	1,101 ± 0,001	4,059 ± 0,001	4,059 ± 0,001
δ_{HInd}	1,367 ± 0,001	1,367 ± 0,001	4,294 ± 0,001	4,294 ± 0,001

Az 5.1 táblázatból jól látszik, hogy a két módszer mérési hibahatáron belül egyező értékeket ad, így várhatóan a többi „soron következő” indikátor indikátorparaméterei is pontosan meghatározhatók.

A titrálások során három indikátormolekula egyes kémiai eltolódásai diamágneses irányba változtak meg a protonálódás során (5.5 ábra), ez az ún. *wrong way shift* jelenség, melynek oka nem ismert. Érdekes, hogy ekkor mindhárom vegyület oxigénatomon deprotonálódik: hangyasav, 4-hidroxi-piridin és citozin.



5.5. ábra: A 4-hidroxi-piridin és a citozin NMR spektrumainak pH-függése

A 4-hidroxi-piridin indikátormolekulának kevésbé alkalmas, két ok miatt: a protonálódási állandója rendkívül közel esik a TBA állandójához ($\Delta \log K \approx 0,1$),

valamint a kémiai eltolódása csekély mértékben változik a protonálódás hatására ($\Delta\delta \approx 0,08 \text{ ppm}$).

A citozint szintén nem alkalmaztuk a későbbi mérések során, mert két dublett jelet ad a spektrumokon, melyek kémiai eltolódásának meghatározása pontatlanabb, mint egy szinguletté.

Két indikátormolekula hidrolizál: az acetoximból acetoxim keletkezik erősen savas közegben ($t_{1/2} \approx 120 \text{ min}$, pH=0-nál), az acetamidin acetamiddá bomlik erősen lúgos oldatban ($t_{1/2} \approx 5 \text{ min}$, pH=14-nél).

Az indikátormolekulák protonálódási állandóit és határeltolódásait a két leggyakrabban használt ionerősségen (0,15 M és 1 M) határoztuk meg, a pontos értékeket az 5.2 és 5.3 táblázatok tartalmazzák.

5.2. táblázat: Az indikátorparaméterek és a pH meghatározásra alkalmas tartomány 1 M ionerősségű oldatban

	$\log K$	δ_{Ind}	δ_{HInd}	pH tartomány
Diklórecetsav	$1,04 \pm 0,02$	$6,072 \pm 0,001$	$6,346 \pm 0,002$	< 2,0
Acetoxim	$1,73 \pm 0,01$	$1,896 \pm 0,001$	$2,338 \pm 0,001$	0,5 – 3,1
Szarkozin (CH ₂)	$2,24 \pm 0,01$	$3,614 \pm 0,001$	$3,983 \pm 0,001$	1 – 3,6
Szarkozin (CH ₃)		$2,737 \pm 0,001$	$2,804 \pm 0,001$	1,8 – 2,6
Klórecetsav	$2,63 \pm 0,01$	$4,059 \pm 0,001$	$4,294 \pm 0,001$	1,6 – 3,7
Hangyasav	$3,52 \pm 0,01$	$8,446 \pm 0,001$	$8,251 \pm 0,001$	2,4 – 4,6
Ecetsav	$4,57 \pm 0,01$	$1,907 \pm 0,001$	$2,093 \pm 0,001$	3,5 – 5,6
Imidazol (H2)	$7,26 \pm 0,01$	$7,781 \pm 0,001$	$8,696 \pm 0,001$	5,5 – 8,9
Imidazol (H4)		$7,139 \pm 0,001$	$7,487 \pm 0,001$	5,9 – 8,6
TRIS	$8,36 \pm 0,01$	$3,507 \pm 0,001$	$3,738 \pm 0,001$	7,2 – 9,5
Szarkozin (CH ₂)	$10,24 \pm 0,01$	$3,107 \pm 0,001$	$3,613 \pm 0,001$	8,7 – 11,8
Szarkozin (CH ₃)		$2,283 \pm 0,001$	$2,737 \pm 0,001$	8,8 – 11,7

5.2. táblázat (folytatás): Az indikátorparaméterek és a pH meghatározásra alkalmas tartomány 1 M ionerősségű oldatban

	$\log K$	δ_{ind}	δ_{HInd}	pH tartomány
<i>terc</i> -Butilamin	$11,07 \pm 0,01$	$1,101 \pm 0,001$	$1,367 \pm 0,001$	9,8 – 12,3
Citozin (H5)	$12,08 \pm 0,01$	$5,874 \pm 0,001$	$5,991 \pm 0,001$	11,3 – 12,8
Citozin (H6)		$7,736 \pm 0,001$	$7,511 \pm 0,001$	11,1 – 13,2
Aceton oxim	$12,22 \pm 0,01$	$1,828 \pm 0,001$	$1,895 \pm 0,001$	11,8 – 12,7
Aceton oxim		$1,770 \pm 0,001$	$1,897 \pm 0,001$	11,4 – 13,1
Acetamidin	$12,74 \pm 0,01$	$1,960 \pm 0,001$	$2,230 \pm 0,001$	11,6 – 13,8
1-Metilguanidin	$13,57 \pm 0,02$	$2,689 \pm 0,002$	$2,824 \pm 0,001$	> 12,7
Imidazol (H2)	$13,89 \pm 0,02$	$7,620 \pm 0,003$	$7,781 \pm 0,001$	> 13

5.3. táblázat: Az indikátorparaméterek és a pH meghatározásra alkalmas tartomány 0,15 M ionerősségű oldatban

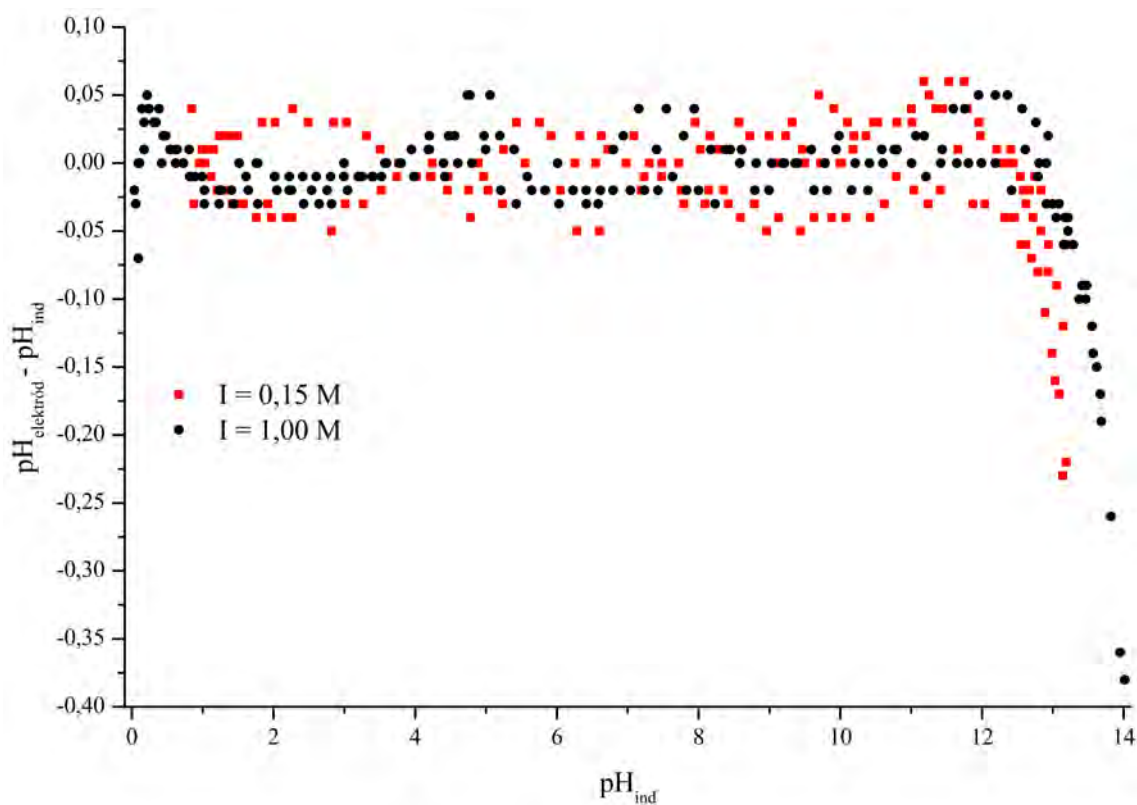
	$\log K$	δ_{ind}	δ_{HInd}	pH tartomány
Diklórecetsav	$1,17 \pm 0,02$	$6,051 \pm 0,001$	$6,303 \pm 0,002$	< 2,3
Aceton oxim	$1,65 \pm 0,01$	$1,893 \pm 0,001$	$2,316 \pm 0,001$	< 2,8
Szarkozin (CH ₂)	$2,26 \pm 0,01$	$3,602 \pm 0,001$	$3,958 \pm 0,001$	1 – 3,5
Szarkozin (CH ₃)		$2,729 \pm 0,001$	$2,792, \pm 0,001$	1,9 – 2,6
Klórecetsav	$2,73 \pm 0,01$	$4,046 \pm 0,001$	$4,272 \pm 0,001$	1,7 – 3,8
Hangyasav	$3,57 \pm 0,01$	$8,442 \pm 0,001$	$8,230 \pm 0,001$	2,5 – 4,7
Ecetsav	$4,61 \pm 0,01$	$1,906 \pm 0,001$	$2,085 \pm 0,001$	3,6 – 5,6
Imidazol (H2)	$7,18 \pm 0,01$	$7,767 \pm 0,001$	$8,676 \pm 0,001$	5,5 – 8,9
Imidazol (H4)		$7,128 \pm 0,001$	$7,473 \pm 0,001$	5,8 – 8,5
TRIS	$8,28 \pm 0,01$	$3,508 \pm 0,001$	$3,731 \pm 0,001$	7,1 – 9,4
Szarkozin (CH ₂)	$10,20 \pm 0,01$	$3,106 \pm 0,001$	$3,602 \pm 0,001$	8,7 – 11,6
Szarkozin (CH ₃)		$2,284 \pm 0,001$	$2,729 \pm 0,001$	8,8 – 11,6
<i>terc</i> -Butilamin	$10,93 \pm 0,01$	$1,102 \pm 0,001$	$1,359 \pm 0,001$	9,7 – 12,2

5.3. táblázat (folytatás): Az indikátorparaméterek és a pH meghatározásra alkalmas tartomány 0,15 M ionerősségű oldatban

	$\log K$	δ_{ind}	δ_{Hind}	pH tartomány
Citozin (H5)	$12,17 \pm 0,01$	$5,856 \pm 0,001$	$5,966 \pm 0,001$	11,5 – 12,8
Citozin (H6)		$7,726 \pm 0,001$	$7,491 \pm 0,001$	11,1 – 13,1
Aceton oxim	$12,34 \pm 0,01$	$1,827 \pm 0,001$	$1,892 \pm 0,001$	11,9 – 12,8
Aceton oxim		$1,773 \pm 0,001$	$1,893 \pm 0,001$	11,6 – 13,1
Acetamidin	$12,68 \pm 0,01$	$1,963 \pm 0,001$	$2,217 \pm 0,001$	> 11,6
1-Metilguanidin	$13,53 \pm 0,03$	$2,691 \pm 0,005$	$2,816 \pm 0,001$	> 12,8

5.1.2.1. A $pH_{elektrod}$ és a pH_{ind} összehasonlítása

Minden mért oldatban kiszámítottuk a megfelelő indikátormolekula kémiai eltolódásából a pH-t, majd az elektróddal mért és a kémiai eltolódásokból számított értékek különbségét vizsgáltuk a pH_{ind} függvényében (5.6 ábra)



5.6. ábra: A mért és a számított pH-értékek különbsége

Az üvegelektrod mérési hibája 0,05 pH egység alatt marad a 0,5 – 12,5 közötti tartományban. Erősen savas oldatban a véletlen hiba jelentősen megnő, úgy tűnik, hogy a mérés pontossága romlik. Lúgos oldatokban viszont a különbség szinte lineárisan változik a pH-val, a mérés jelentős szisztematikus hibával terhelt.

5.1.2.2. A pH meghatározás hibájának kiszámítása

A pH-számítás pontosságát Gauss négyzetes hibaterjedési szabályát [190] alkalmazva számszerűsítettük, amely alapján Szakács és mtsai. is meghatározták az általuk bevezetett indikátormolekulák hibáját [73].

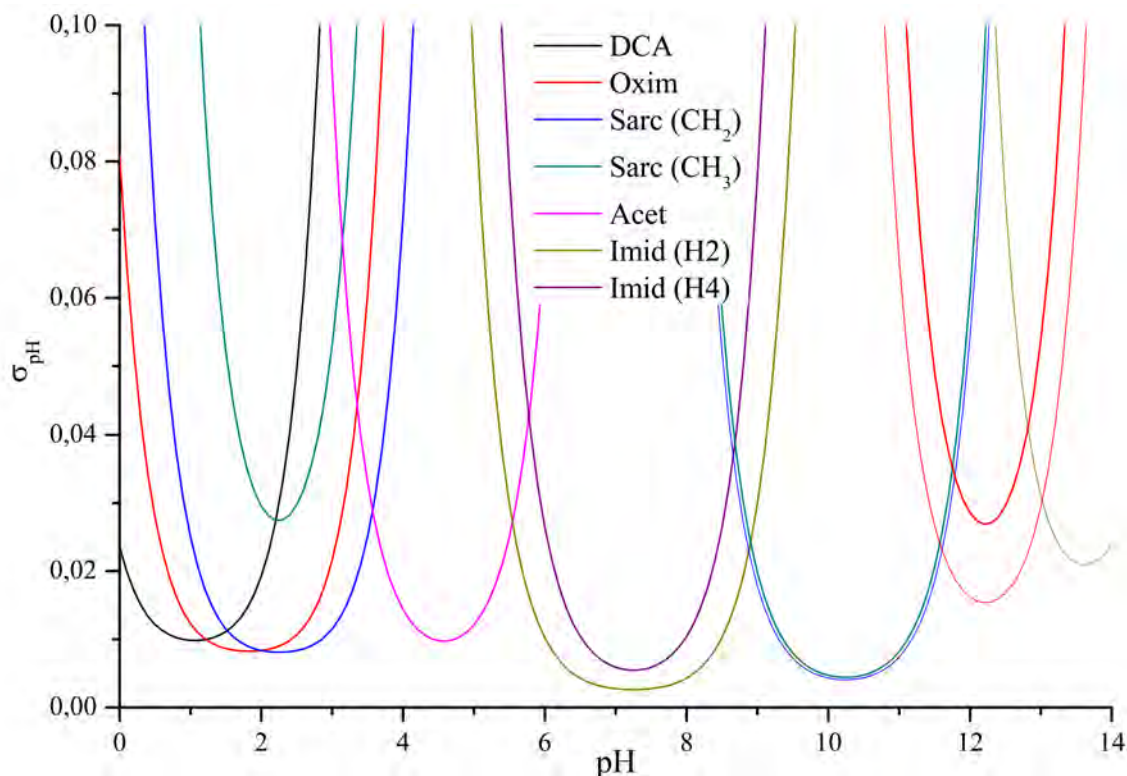
A hibaterjedés törvénye szerint az egyes mennyiségek varianciáit vesszük alapul, a teljes variancia pedig a (3.8) egyenlet alapján négy tényezőből tevődik össze:

$$\sigma_{pH}^2 = \left(\frac{\partial pH}{\partial \log K} \right)^2 \sigma_{\log K}^2 + \left(\frac{\partial pH}{\partial \delta_{Ind}^{mért}} \right)^2 \sigma_{\delta_{Ind}^{mért}}^2 + \left(\frac{\partial pH}{\partial \delta_{HInd}} \right)^2 \sigma_{\delta_{HInd}}^2 + \left(\frac{\partial pH}{\partial \delta_{Ind}} \right)^2 \sigma_{\delta_{Ind}}^2 \quad (5.1)$$

Az (5.1) egyenlet átrendezésével megkapjuk a pH-számítás hibáját:

$$\sigma_{pH}^2 = \sigma_{\log K}^2 + \frac{(\delta_{Ind} - \delta_{HInd})^2 \sigma_{\delta_{Ind}^{mért}}^2 + (\delta_{Ind}^{mért} - \delta_{Ind})^2 \sigma_{\delta_{HInd}}^2 + (\delta_{HInd} - \delta_{Ind}^{mért})^2 \sigma_{\delta_{Ind}}^2}{(\ln 10)^2 (\delta_{HInd} - \delta_{Ind}^{mért})^2 (\delta_{Ind}^{mért} - \delta_{Ind})^2} \quad (5.2)$$

A számításokhoz a $\sigma_{\log K}$, $\sigma_{\delta_{Ind}}$ és $\sigma_{\delta_{HInd}}$ értékeit az 5.2 és 5.3 táblázatokból vettük, a mért kémiai eltolódás hibáját 0,001 ppm-nek vettük irodalmi adatok alapján [191].



5.7. ábra: Az ^1H NMR indikátorokkal végzett pH-számítás hibája néhány indikátormolekula esetén

Az 5.2 és 5.3 táblázatokban szereplő pH-tartományt úgy határoztuk meg, hogy a pH-számítás hibája legfeljebb 0,03 egységnyi legyen.

Az eredményeink alapján a teljes (0-14 közötti) pH-skála lefedhető akár öt (!) indikátormolekulával: diklórecetsav (0 – 2), acetoxim (0,5 – 3,1 és 11,4 – 13,1), szarkozin (1 – 3,6 és 8,7 – 11,8), ecetsav (3,5 – 5,6) és imidazol (5,5 – 8,9 és 13 – 14).

5.2. Biguanidinek protonálódási állandói

A makroállandókat NMR–pH titrálásokkal határoztuk meg, ahol a pH-t az 5.1 fejezetben leírt indikátormolekulák segítségével számítottuk ki. Mindkét molekula igen erős bázis, így a titrálási görbék kiértékelése is nehezebb: az illesztéshez használt (3.17) egyenletben δ_L értékét nem lehet a titrálási görbékről leolvasni.

A protonálódási állandók meghatározásához a deprotonált forma határeltolódását a Perrin-Fabian módszerrel határoztuk meg a $\delta_{\text{biguanidín}}^{\text{mért}} - \delta_{\text{MG}}^{\text{mért}}$ adatsorokból. Ez a kiértékelési mód – a végzett szimulációk szerint – jóval nagyobb pontossággal adja meg

a pH-skálán kívül eső határeltolódást, mint a „klasszikus” kiértékelési mód ($\delta^{mért} - \text{pH}$). A két kiértékelési mód összehasonlítására legjobb megoldás a $\delta_L - \log K$ közötti korrelációs koefficiens ($\rho_{\log K, \delta_L}$) értékét vizsgálni. Ennek értéke a Perrin-Fabian módszer esetén -0,71-nek adódott, míg a $\delta^{mért} - \text{pH}$ adatsorokra történő illesztéskor -0,99-nek. A szimulációk során kapott eredményeket a táblázat tartalmazza.

5.4. táblázat: A különböző kiértékelési módok összehasonlítása

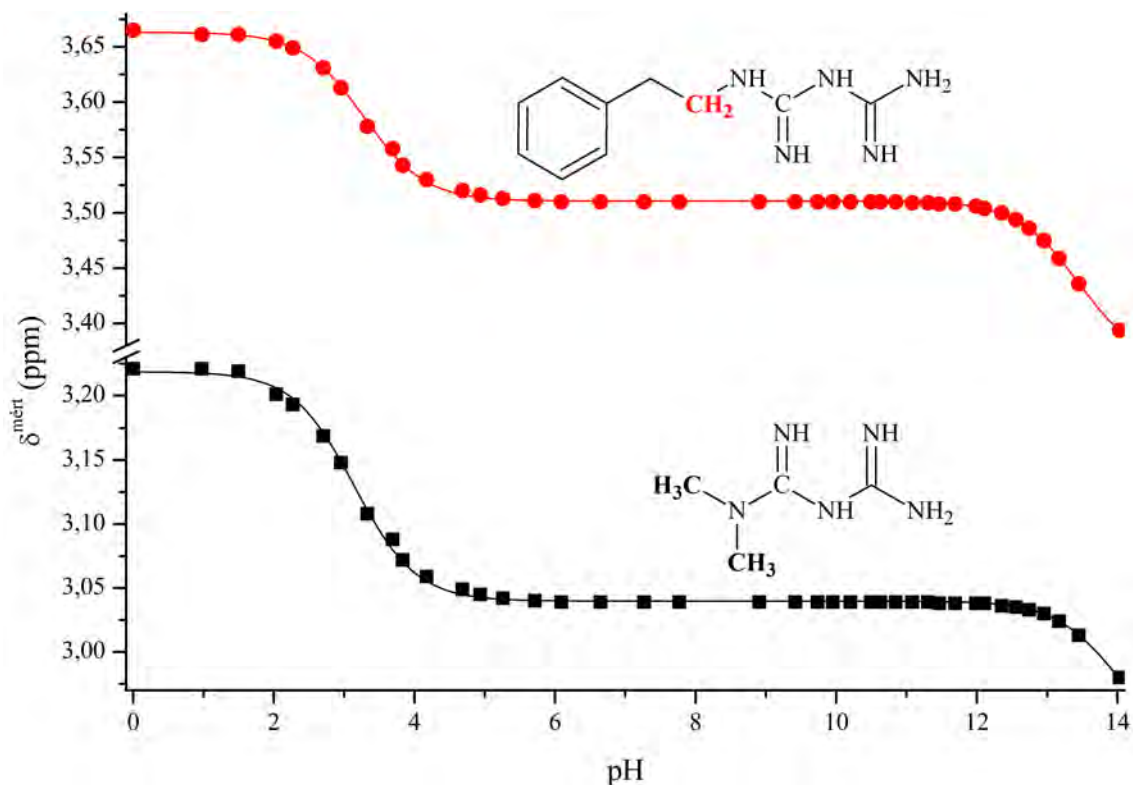
	Bemeneti adat	$\delta^{mért} - \text{pH}$	Perrin-Fabian módszer
$\log K$	13,95	$13,93 \pm 0,11$	$13,96 \pm 0,03$
δ_L	2,929	$2,933 \pm 0,005$	$2,930 \pm 0,002$
$\rho_{\log K, \delta_L}$	–	-0,993	-0,714

Mivel a molekulák kétértékű bázisok, a relatív bázicitás meghatározása önmagában nem adja meg a második protonálódási állandót, így az illesztések során a $\delta^{mért} - \text{pH}$ adatsorokból számoltunk (5.8. ábra), a δ_L értékét pedig a Perrin-Fabian módszerrel meghatározott értéken fixen tartottuk.

A két molekula protonálódási állandóit az 5.5 táblázatban foglaltuk össze.

5.5. táblázat: A biguanidin-származékok protonálódási állandói

	Metformin	Fenformin
$\log K_1$	$13,85 \pm 0,03$	$13,27 \pm 0,03$
$\log K_2$	$3,14 \pm 0,02$	$3,26 \pm 0,02$



5.8. ábra: A metformin metilcsoportjának és a fenformin 1-es helyzetű metilén csoportjának NMR–pH titrálási görbéi

5.3. Arginin és citrullin mikrospeciációja

Az arginin mikrospeciációjához a következőket végeztük el:

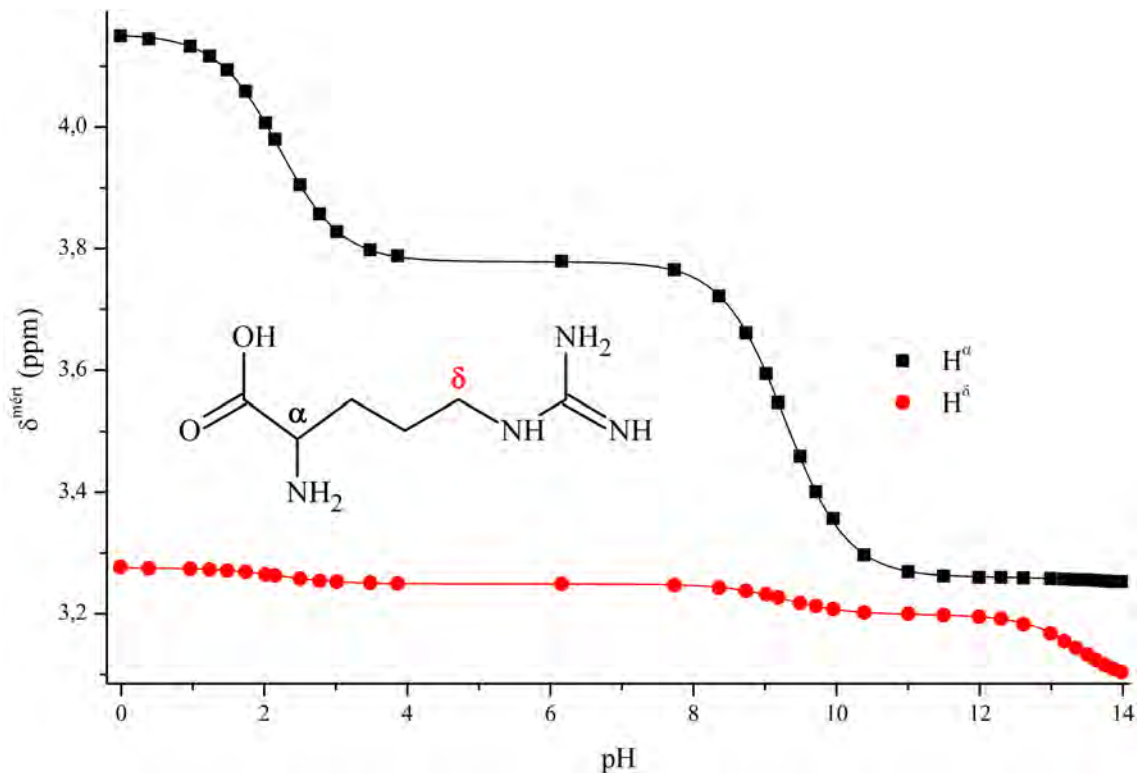
- az Arg, a Cit, az ArgNH₂ és a CitOMe ¹H NMR–pH titrálását, melynek során a pH-t *in situ* indikátormolekulákkal mértük.
- a 3, 2, 2 és 1 makroállandó meghatározását a titrálási görbékből
- a mikroállandók és a mikrorészecskék eloszlásának kiszámítását
- a számítások validálását a CitOMe makroállandójával

5.3.1. A makroállandók meghatározása NMR–pH titrálással

Mind a négy vegyület 4 féle nem cserélő protont tartalmaz az α , a β , a γ és a δ szénatomokon. A négy közül a β és a γ protonok jelei átfedőek, valamint a multiplicitásuk is összetett, ezért a titrálások kiértékeléséhez az α és a δ protonok tripletjeiből könnyen leolvasható kémiai eltolódásokat használtuk. Az utóbbiak a

protonálódó csoportok mellett helyezkednek el, így ezek jelzik legérzékenyebben a protonálódási folyamatokat (Lásd a 3.11 ábrát).

A makroállandókat a (3.17) egyenlet alapján határoztuk meg a $\delta^{\text{mért}} - \text{pH}_{\text{Ind}}$ adatsorokból. Az 5.9 ábráról is jól látható, hogy egyes lépések élesen elkülönülnek, így feltétlenül szükség van modellvegyületek alkalmazására az összes mikroállandó kiszámításához.



5.9. ábra: Az Arg ^1H NMR – pH titrálási görbéi

A makroállandók értékeit az 5.6. táblázat tartalmazza.

5.6. táblázat: A vegyületek kumulatív makroállandói

	Arg	ArgNH ₂	Cit
$\log \beta_1$	$13,54 \pm 0,01$	$13,41 \pm 0,03$	$9,50 \pm 0,01$
$\log \beta_2$	$22,82 \pm 0,01$	$20,94 \pm 0,04$	$11,83 \pm 0,02$
$\log \beta_3$	$25,03 \pm 0,01$		

5.3.2. A mikroállandók meghatározása

A makro- és mikroállandók közötti összefüggéseket a (3.24), (3.25) és (3.26) egyenletek mutatják. Mivel mind a Cit, mind az ArgNH₂ igen jól modellezi a megfelelő mikroállapotokat, így ezek bázicitásadatait korrekció nélkül használtuk fel a mikroállandók számításához. A három vegyület makroállandóiból az Arg összes mikroállandója kiszámítható:

$$k^C = \frac{\beta_3^{Arg}}{\beta_2^{ArgNH_2}} = \frac{k^C k_C^A k_{AC}^G}{k_C^A k_{AC}^G} \quad (5.3)$$

$$k^G = \beta_1^{Arg} - \beta_1^{Cit} = (k^A + k^C + k^G) - (k^A + k^C) \quad (5.4)$$

$$k^A = \beta_1^{Cit} - k^C = (k^A + k^C) - k^C \quad (5.5)$$

$$k_C^A = \frac{\beta_2^{Cit}}{k^C} = \frac{k^C k_C^A}{k^C} \quad (5.6)$$

$$k_A^C = \frac{\beta_2^{Cit}}{k^A} = \frac{k^A k_A^C}{k^A} \quad (5.7)$$

$$k_C^G = \beta_1^{ArgNH_2} - k_C^A = (k_C^G + k_C^A) - k_C^A \quad (5.8)$$

$$k_A^G = \frac{\beta_2^{Arg} - k^A k_A^C - k^C k_C^G}{k^A} = \frac{(k^A k_A^G + k^A k_A^C + k^C k_C^G) - k^A k_A^C - k^C k_C^G}{k^A} \quad (5.9)$$

A Hess-tétel értelmében a kétszer protonált részecskék képződési entalpiája független a protonálódási sorrendtől, így:

$$k_G^A = \frac{k^A \cdot k_A^G}{k^G} \quad \text{és} \quad k_G^C = \frac{k^C \cdot k_C^G}{k^G} \quad (5.10)$$

$$k_{AG}^C = \frac{\beta_3^{Arg}}{k^A k_A^G} = \frac{k^A k_A^G k_{AG}^C}{k^A k_A^G} \quad (5.11)$$

$$k_{CG}^A = \frac{\beta_3^{Arg}}{k^C k_C^G} = \frac{k^C k_C^G k_{CG}^A}{k^C k_C^G} \quad (5.12)$$

$$k_{AC}^G = \frac{\beta_3^{Arg}}{\beta_2^{Cit}} = \frac{k^A k_A^C k_{AC}^G}{k^A k_A^C} \quad (5.13)$$

A mikroállandók értéke mellett a szórásuk is fontos jelzője a számítások helyességének, ugyanis ha bármelyik állandót túlságosan nagy szórással kapjuk meg, azt jelenti, hogy deduktív módszer esetén elvi hibát követtünk el, nem megfelelően modelleztük a minor speciesteket.

A mikroállandók szórását itt is a Gauss-féle négyzetes hibaterjedési törvény [190] szerint számoltuk ki. Például a k^G mikroállandó hibája:

$$\sigma_{\log k^G}^2 = \left(\frac{\partial \log k^G}{\partial \log \beta_1^{Arg}} \right)^2 \sigma_{\log \beta_1^{Arg}}^2 + \left(\frac{\partial \log k^G}{\partial \log \beta_1^{Cit}} \right)^2 \sigma_{\log \beta_1^{Cit}}^2 \quad (5.14)$$

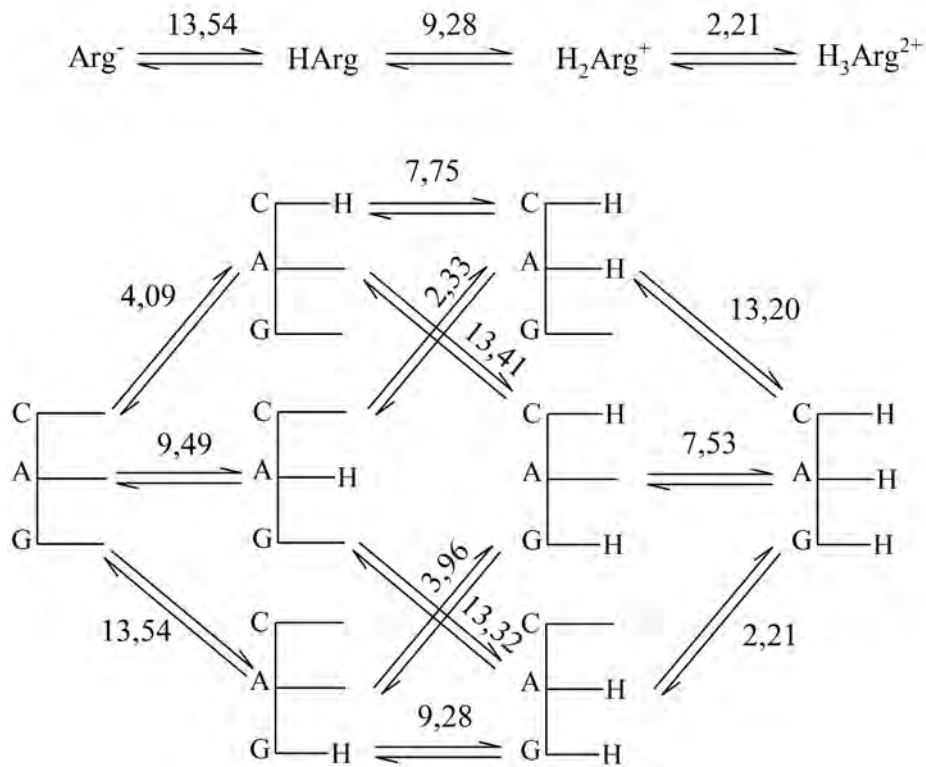
Amelyből megfelelő matematikai átalakítások után kaphatjuk meg az állandó szórását:

$$\sigma_{\log k^G} = \sqrt{\left(\frac{10^{\log \beta_1^{Arg}}}{10^{\log k^G}} \right)^2 \sigma_{\log \beta_1^{Arg}}^2 + \left(\frac{10^{\log \beta_1^{Cit}}}{10^{\log k^G}} \right)^2 \sigma_{\log \beta_1^{Cit}}^2} \quad (5.15)$$

A mikroállandók értékeit és hibáit az 5.7. táblázat tartalmazza. A jobb áttekinthetőség érdekében grafikusán is ábrázoltuk az 5.10 ábrán.

5.7. táblázat: Az Arg mikroállandói

Karboxilát csoport		Amino csoport		Guanidino csoport	
Állandó	Érték	Állandó	Érték	Állandó	Érték
$\log k^C$	$4,09 \pm 0,04$	$\log k^A$	$9,49 \pm 0,01$	$\log k^G$	$13,54 \pm 0,01$
$\log k_A^C$	$2,33 \pm 0,02$	$\log k_C^A$	$7,75 \pm 0,04$	$\log k_A^G$	$13,32 \pm 0,04$
$\log k_G^C$	$3,96 \pm 0,05$	$\log k_G^A$	$9,28 \pm 0,02$	$\log k_C^G$	$13,41 \pm 0,04$
$\log k_{AG}^C$	$2,21 \pm 0,02$	$\log k_{CG}^A$	$7,53 \pm 0,05$	$\log k_{AC}^G$	$13,20 \pm 0,06$



5.10. ábra: Az Arg mikroállandói

A mikroállandókból kiszámítottuk az egyes csoportok közötti kölcsönhatási tényezőket, értékeit az 5.8 táblázatban foglaltuk össze.

5.8. táblázat: Az Arg párkölcsönhatási tényezői

Kölcsönhatási tényező	Érték
$pE^{A,C}$	$1,74 \pm 0,04$
$pE_G^{A,C}$	$1,75 \pm 0,05$
$pE^{A,G}$	$0,22 \pm 0,04$
$pE_C^{A,G}$	$0,21 \pm 0,07$
$pE^{C,G}$	$0,13 \pm 0,06$
$pE_A^{C,G}$	$0,12 \pm 0,02$

Az arginin esetén a tripllett kölcsönhatási tényező $pL^{A,C,G}$ értéke gyakorlatilag 0, ugyanis a párkölcsönhatási tényezők mérési hibán belül megegyeznek a harmadik csoport protonáltsági állapotától függetlenül.

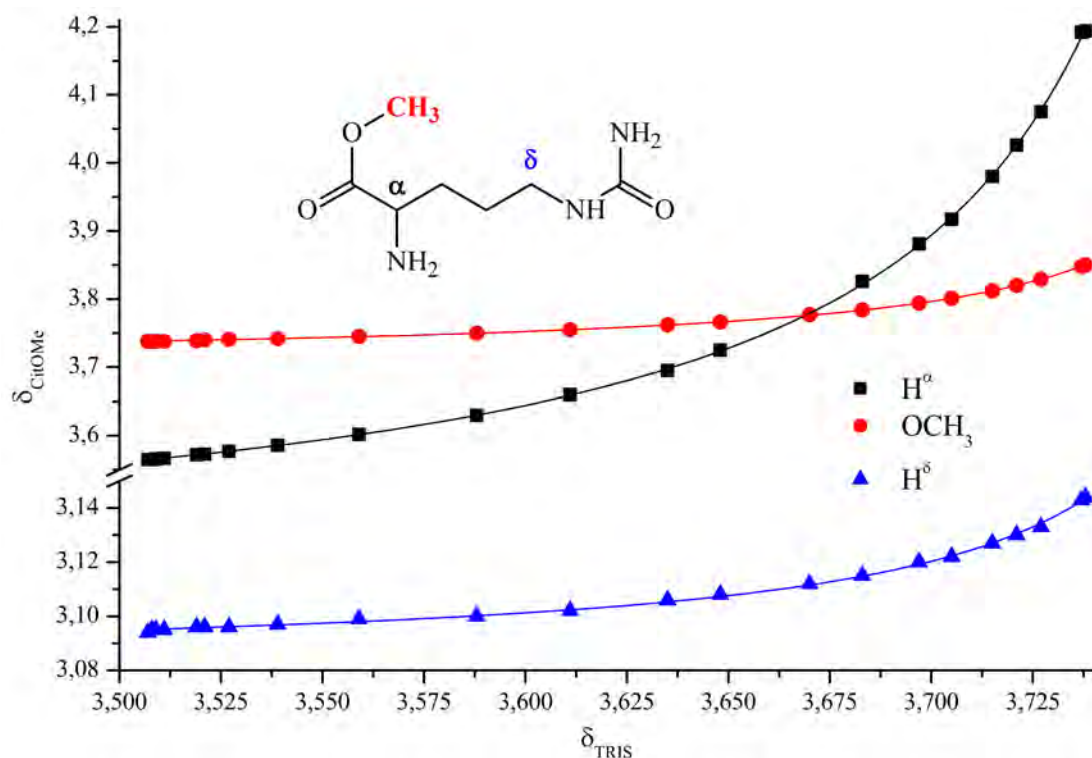
A citrullin mikrospeciációs sémája lényegesen egyszerűbb, négy mikrorészecskét tartalmaz. A mikroállandók értékei az Arg megfelelő mikroállandóival azonosak, értékeiket az (5.3), (5.5)–(5.7) egyenletek alapján számítottuk és az 5.9 táblázatban foglaltuk össze.

5.9. táblázat: A Cit mikroállandói

Mikroállandó	Érték
$\log k^A$	$9,49 \pm 0,01$
$\log k^C$	$4,09 \pm 0,04$
$\log k_C^A$	$7,75 \pm 0,04$
$\log k_A^C$	$2,33 \pm 0,02$

A deduktív módszer helyességét egy független mérésből származó állandóval erősítettük meg: a CitOMe makroállandóját hasonlítottuk össze az Arg megfelelő mikroállandójával (k_C^A).

A CitOMe állandóját a Perrin-Fabian módszerrel, egycsöves NMR–pH titrálással határoztuk meg: a (3.20) egyenlet illesztésével a $\delta_{CitOMe}^{mért} - \delta_{TRIS}^{mért}$ adatsorokra. A titrálási görbe az 5.11 ábrán látható.

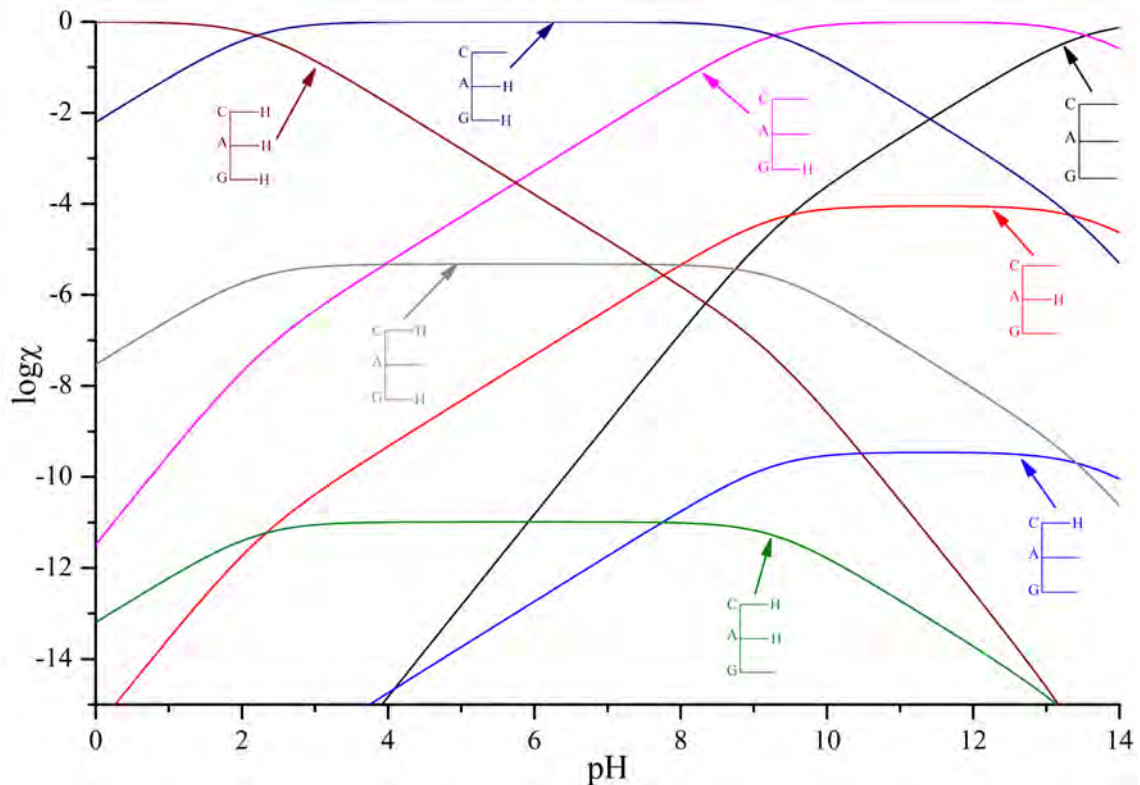


5.11. ábra: A CitOMe Perrin-Fabian módszerrel mért titrálási görbéje

A nemlineáris illesztés során a relatív bázicitás értéke $\Delta\log K = -0,669 \pm 0,002$, vagyis a CitOMe savasabb, mint a TRIS, a protonálódási állandója pedig: $\log K_{\text{CitOMe}} = \log K_{\text{TRIS}} + \Delta\log K = 7,69 \pm 0,02$.

A deduktív módszerrel számolt és a kísérletileg meghatározott mikroállandók értékei hibahatáron belül megegyeznek ($7,75 \pm 0,04$ vs. $7,69 \pm 0,02$), a csekély, 0,06 log egységnyi különbséget az eltérő modellvegyületek alkalmazása okozhatja, hiszen az észter és a savamid csoport nem izosztérikus. A karboxamid mindazonáltal jobban modellezi a protonált karboxilátcsoportot, hiszen azzal izoelektronos.

A mikroállandók alapján kiszámítottuk a nyolc arginin mikrorészecske pH-függő eloszlását (5.12 ábra). A minor protonáltsági izomerek a majornál 5 é s 10 nagyságrenddel kisebb koncentrációban vannak jelen az oldatban.



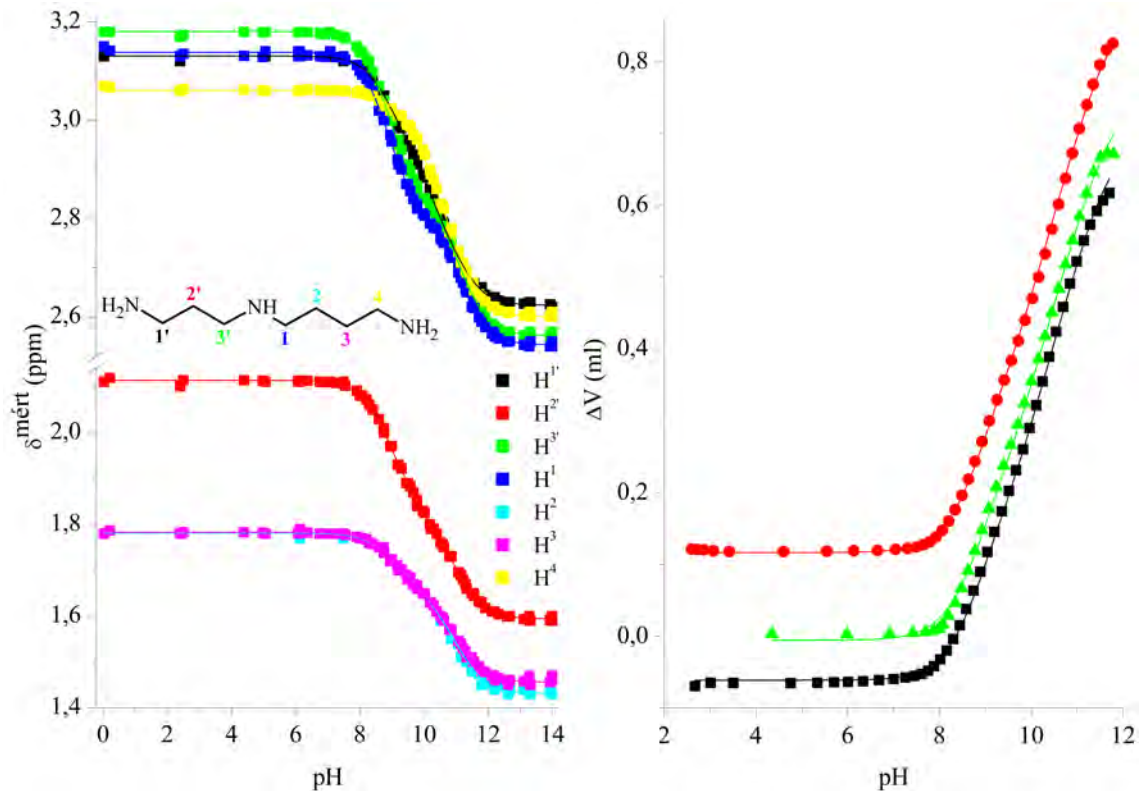
5.12. ábra: Az Arg mikrorészecskéinek pH függő eloszlása

Az Arg izoelektromos pontja 11,41, tehát szöveti pH-n egyértelműen kationos formában fordul elő. A Cit izoelektromos pontja 5,91, 5,5 egységgel alacsonyabb, mint az Arg-é. Tudomásunk szerint két izoelektronos molekula között ez az eddig között legnagyobb eltérés.

5.4. Poliaminok sav-bázis tulajdonságainak vizsgálata

5.4.1. A makroállandók meghatározása

A makroállandókat a potenciometriás és az ^1H NMR–pH titrálások szimultán kiértékelésével határoztuk meg. 3 illetve 4 átfedő protonálódási folyamat állandóit NMR–pH titrálással nem lehet pontosan meghatározni, mert a (3.17) egyenlet szerint az $\delta_{\text{H},L}$ és a β_i erősen korrelált mennyiségek, így szimultán meghatározásuk rosszul kondicionált.



5.13. ábra: A Spd ^1H NMR–pH és három párhuzamos potenciometriás titrálásainak szimultán kiértékelése

A négy vegyület makroállandóit az 5.10 táblázatban foglaltuk össze.

5.10. táblázat: A molekulák protonálódási makroállandói

	Spd	Norspd	Spm	Norspm
$\log K_1$	$11,19 \pm 0,01$	$11,02 \pm 0,02$	$11,22 \pm 0,02$	$10,97 \pm 0,02$
$\log K_2$	$10,13 \pm 0,01$	$9,96 \pm 0,02$	$10,39 \pm 0,01$	$10,22 \pm 0,01$
$\log K_3$	$8,86 \pm 0,01$	$8,29 \pm 0,03$	$9,20 \pm 0,01$	$9,04 \pm 0,01$
$\log K_4$			$8,50 \pm 0,01$	$7,78 \pm 0,01$

5.4.2. A mikroállandók meghatározása

A molekulák mikroállandóit ^{15}N NMR–pH titrálások alapján számítottuk ki. A kiértékelések során abból a feltételezésből indultunk ki, hogy a nitrogén kémiai eltolódása önmaga protonálódásával párhuzamosan változik.

A kémiai eltolódás tehát arányos a protonáltsági móltörttel, amelyből kifejezhetők a mikroállandók:

$$f_A = \frac{\delta_A^{mért} - \delta_A^0}{\delta_A^+ - \delta_A^0} = \frac{Q_{A,1}[H^+] + Q_{A,2}[H^+]^2 + Q_{A,3}[H^+]^3}{1 + \beta_1[H^+] + \beta_2[H^+]^2 + \beta_3[H^+]^3} \quad (5.16)$$

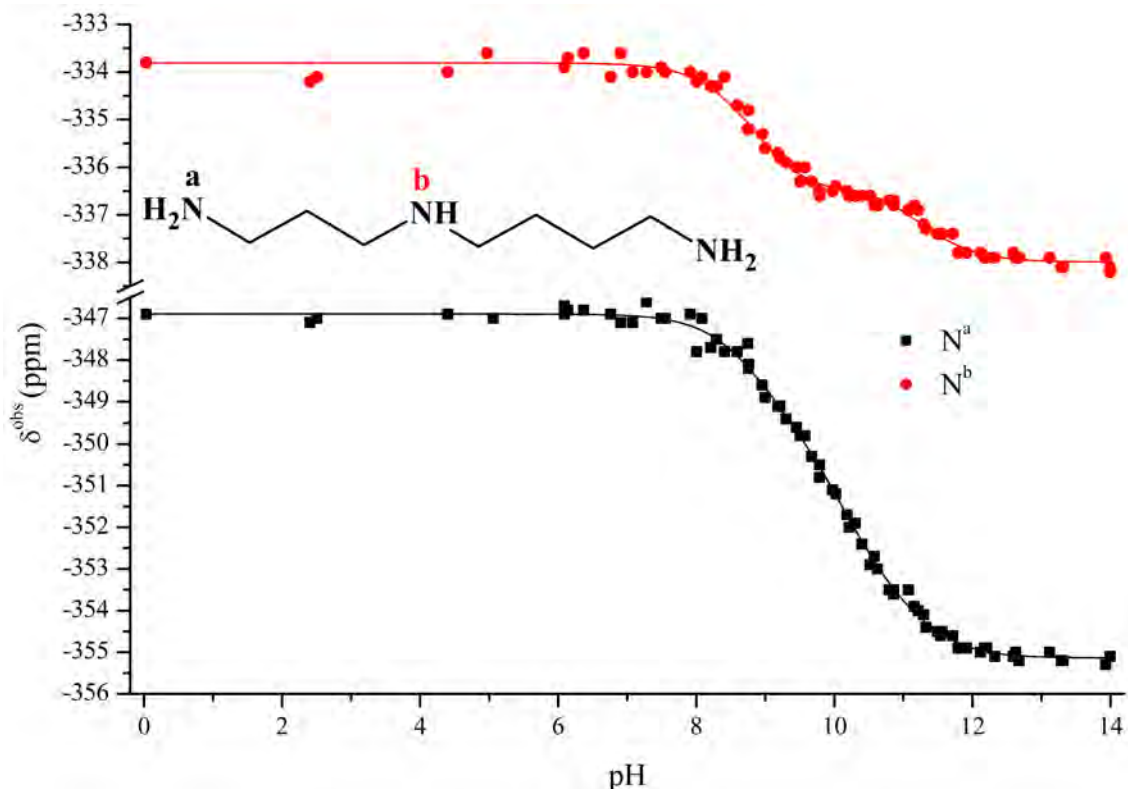
ahol $\delta_A^{mért}$ az **a** nitrogén mért kémiai eltolódása, δ_A^0 és δ_A^+ ugyanezen nitrogén deprotonált és protonált határeltolódásai.

A $\delta^{mért}$ –pH adatsorokra az (5.16) egyenlet átrendezésével kapott (5.17) egyenlet szerint végeztük a nemlineáris paraméterillesztést:

$$\delta_A^{mért} = \delta_A^0 + (\delta_A^+ - \delta_A^0) \frac{Q_{A,1}[H^+] + Q_{A,2}[H^+]^2 + Q_{A,3}[H^+]^3}{1 + \beta_1[H^+] + \beta_2[H^+]^2 + \beta_3[H^+]^3} \quad (5.17)$$

Az illesztés során a kumulatív mikroállandókból származtatott Q tényezőket használtuk. Ezek azokban az esetekben is meghatározhatóak, ha az összes mikroállandót nem lehet többletinformációk nélkül kiszámítani a csoportspecifikus titrálásokból [88].

A mérési eredmények igazolták a feltételezésünket, miszerint a nitrogének kémiai eltolódása arányos a protonáltsági móltörtjükkel. A spermidin két nitrogénjének titrálási görbéi az 5.14 ábrán láthatóak.



5.14. ábra: A spermidin ^{15}N NMR–pH titrálási görbéi

Az illesztések során a makroállandók potenciometriával és ^1H NMR–pH titrálással mért értékeit fixen tartottuk, hogy a Q tényezőket nagyobb pontossággal kaphassuk meg. A mikroállandók szórását a Gauss-féle négyzetes hibaterjedés törvény alapján számítottuk.

5.4.2.1. A spermidin mikroállandói

A Spd három, nem szimmetriaekvivalens nitrogént tartalmaz. Ezek közül kettőt tudtunk detektálni, az **a** és **b** jelűeket, a **c** nitrogén nem adott korrelációt egyik protonnal sem a 8 Hz-re optimalizált HMBC titrálás során. A makroállandók ismeretében elegendő két csoport protonálódását követni, a harmadik számítható.

A két nitrogén $\delta^{\text{mért}}$ – pH adatsoraira illesztve az (5.17) egyenletet megkapjuk a $Q_{A,n}$ és $Q_{B,n}$ paramétereket, amelyekből a $Q_{C,n}$ értékek számíthatóak:

$$Q_{C,1} = \beta_1 - Q_{A,1} - Q_{B,1} \quad \text{és} \quad Q_{C,2} = 2\beta_2 - Q_{A,2} - Q_{B,2} \quad (5.18)$$

A kumulatív mikroállandókat az (5.19)–(5.21) egyenletek szerint számítottuk a Q paraméterekből:

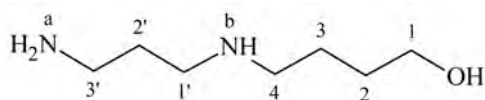
$$\kappa_A = Q_{A,1}; \quad \kappa_B = Q_{B,1}; \quad \kappa_C = Q_{C,1} \quad (5.19)$$

$$\kappa_{AB} = \frac{Q_{A,2} + Q_{B,2} - Q_{C,2}}{2}; \quad \kappa_{AC} = \frac{Q_{A,2} + Q_{C,2} - Q_{B,2}}{2}; \quad \kappa_{BC} = \frac{Q_{B,2} + Q_{C,2} - Q_{A,2}}{2} \quad (5.20)$$

$$\kappa_{ABC} = Q_{A,3} = Q_{B,3} = Q_{C,3} = \beta_3 \quad (5.21)$$

A κ értékek számítása során a κ_{AB} értéke negatívnak adódott, amely abból következik, hogy a kétszeresen protonált részecskék közül ez a minor species, itt helyezkednek el egymáshoz legközelebb a pozitív töltések.

A κ_{AB} meghatározásához szükséges az $E^{A,B}$ kölcsönhatási tényező. Ezt egy redukált számú protonálható csoportot tartalmazó modellvegyület, a 4-(3-aminopropilamino)butanol (APAB, 5.15 ábra) mikroállandóiból számítottuk.



4-(aminopropilamino)butanol (APAB)

5.15. ábra: Az APAB szerkezeti képlete és számozása

A mikroállandókat a spermidinnel analóg titrálásokból számítottuk: a makroállandókat ^1H , a mikroállandókat ^{15}N NMR–pH titrálásokkal határoztuk meg. A mért állandókat az 5.11 táblázat tartalmazza.

5.11 táblázat: Az APAB mikroállandói

Mikroállandó	Érték	Mikroállandó	Érték
$\log k^A$	$10,34 \pm 0,02$	$\log k_B^A$	$9,29 \pm 0,03$
$\log k^B$	$10,50 \pm 0,02$	$\log k_A^B$	$9,45 \pm 0,03$

A kérdéses kölcsönhatási tényező értéke: $pE^{A,B} = 1,05 \pm 0,02$, amelynek segítségével kiszámítottuk a minor részecske kumulatív mikroállandóját.

Az összes többi mikroállandó már számítható a Q tényezőkből, értékeik az 5.12 táblázatban és az 5.16.A ábrán láthatóak.

5.12. táblázat: A spermidin mikroállandói

N^A		N^B		N^C	
Állandó	Érték	Állandó	Érték	Állandó	Érték
$\log k^A$	$10,50 \pm 0,03$	$\log k^B$	$10,79 \pm 0,02$	$\log k^C$	$10,78 \pm 0,04$
$\log k_B^A$	$9,45 \pm 0,05$	$\log k_A^B$	$9,75 \pm 0,05$	$\log k_A^C$	$10,64 \pm 0,06$
$\log k_C^A$	$10,36 \pm 0,07$	$\log k_C^B$	$10,05 \pm 0,12$	$\log k_B^C$	$10,03 \pm 0,11$
$\log k_{BC}^A$	$9,35 \pm 0,11$	$\log k_{AC}^B$	$9,03 \pm 0,06$	$\log k_{AB}^C$	$9,93 \pm 0,04$

A hat párkölcsönhatási tényező értékeit az 5.13 táblázatban foglaltuk össze.

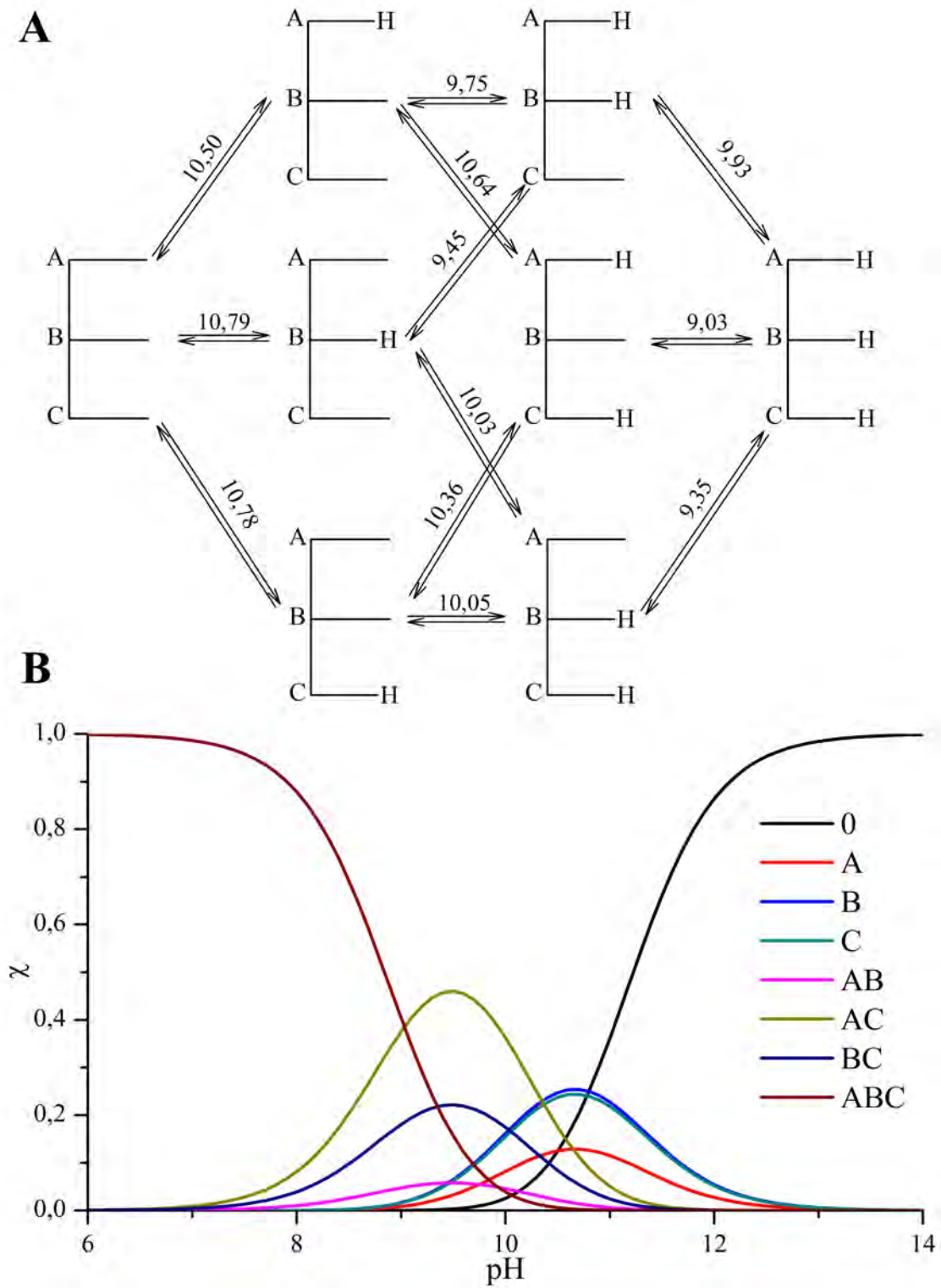
5.13. táblázat: A spermidin párkölcsönhatási tényezői

Kölcsönhatási tényező	Érték	Kölcsönhatási tényező	Érték	Kölcsönhatási tényező	Érték
$pE^{A,B}$	$1,05 \pm 0,02$	$pE^{A,C}$	$0,14 \pm 0,07$	$pE^{B,C}$	$0,75 \pm 0,08$
$pE_C^{A,B}$	$1,01 \pm 0,13$	$pE_B^{A,C}$	$0,10 \pm 0,12$	$pE_A^{B,C}$	$0,72 \pm 0,08$

A kölcsönhatási tényezőket a szimmetrikus α,ω -diaminok irodalmi kölcsönhatási tényezőivel [90], (3.1. táblázat, 24. oldal) összevetve hasonló értékeket találhatunk (1,20 vs. 1,05, illetve 0,68 vs. 0,75). Az eltéréseket az eltérő ionerősség mellett meghatározott állandók okozhatják (0,10 M vs. 1,00 M).

Az általunk mért mikroállandók jó egyezést mutatnak az Onasch és mtsai. által meghatározott állandókkal [136]: egyszeresen protonált állapotban a B és a C csoporton ionizált részecskék előfordulása a nagyobb, a kétszer protonáltak közül pedig az AC mikrorészecske a kedvezményezett.

Az egyes mikrorészecskék eloszlási görbéről leolvasható, hogy szöveti pH-n (pH=7,4) a Spd több, mint 95 %-ban háromszorosan protonált állapotban van jelen, a kétszeresen protonált részecskék közül az AB, az AC és a BC móltörtje rendre 0,003; 0,022; 0,011.



5.16. ábra: **A:** A spermidin mikroállandói; **B:** A mikrorészecskék pH-függő eloszlása

5.4.2.2. A norspermidin mikroállandói

A Norspd a mikroszkopikus protonálódási folyamatok szempontjából a háromcsoportos A_2B szimmetriájú molekulák csoportjába tartozik. A mikrospeciációs sémája egyszerűbb, mint az aszimmetrikus háromcsoportos vegyületeké. $A=A'$, így minden megfelelő mikroállandó értéke is azonos.

Az állandókat a Spd-nel analóg módon határoztuk meg, a κ_{AB} értéke itt is negatívnak adódott, ami arra utal, hogy ez a minor részecske. A megfelelő mikroállandók meghatározásához ebben az esetben is felhasználtuk az APAB kölcsönhatási tényezőjét. A mikroállandók értéi az 5.14 táblázatban és az 5.17.A ábrán láthatóak.

5.14. táblázat: A norspermidin mikroállandói

$N^A = N^{A'}$		N^B	
Mikroállandó	Érték	Mikroállandó	Érték
$\log k^A = \log k^{A'}$	$10,51 \pm 0,03$	$\log k^B$	$10,41 \pm 0,06$
$\log k_B^A = \log k_B^{A'}$	$9,46 \pm 0,09$	$\log k_A^B = \log k_{A'}^B$	$9,36 \pm 0,07$
$\log k_{A'}^A = \log k_A^{A'}$	$10,41 \pm 0,04$		
$\log k_{A'B}^A = \log k_{AB}^{A'}$	$9,40 \pm 0,08$	$\log k_{AA'}^B$	$8,35 \pm 0,05$

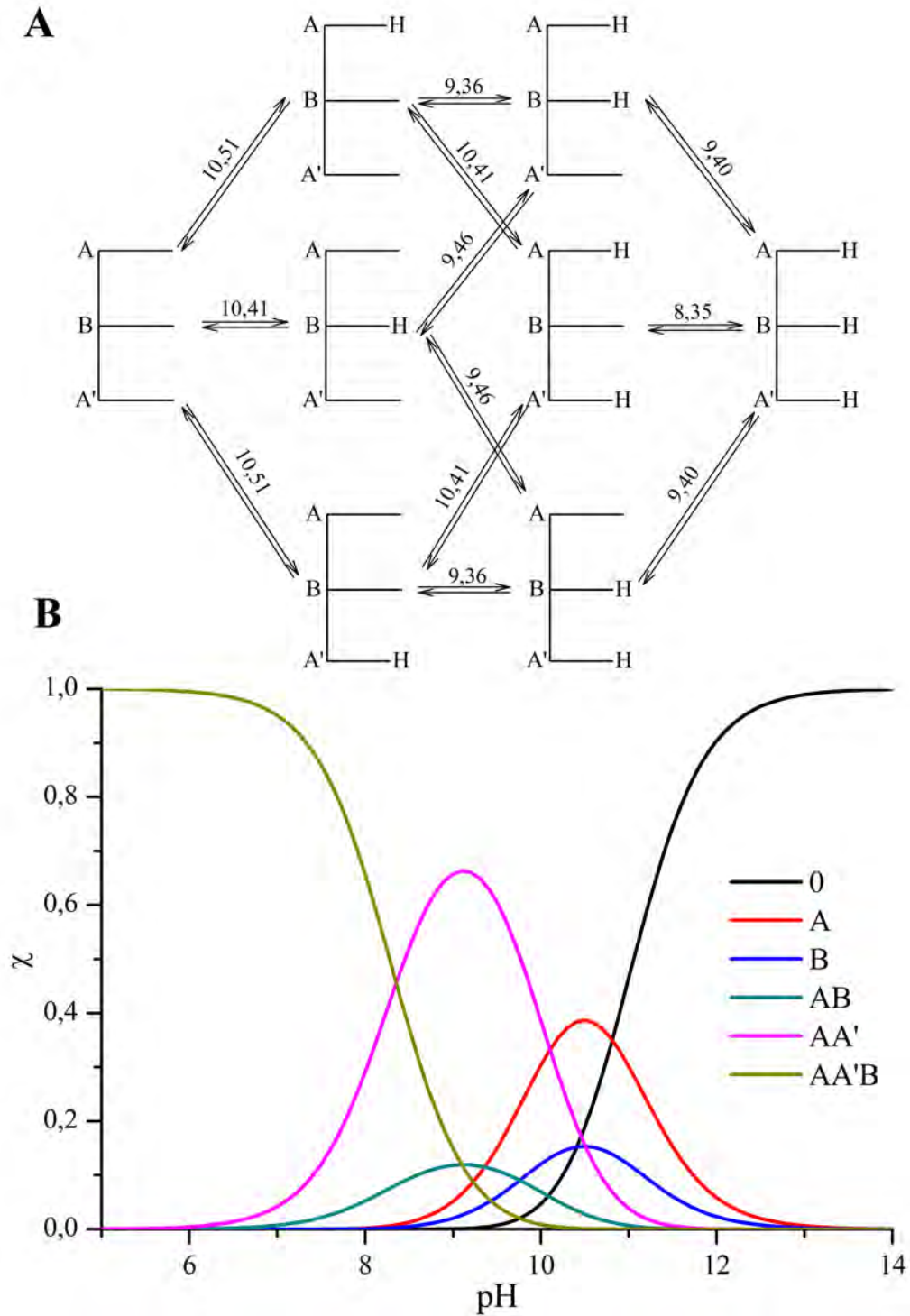
A molekula szimmetriaviszonyai miatt a párkölsönhatási tényezők száma 4, hiszen $E^{A,B} = E^{A',B}$ és $E_{A'}^{A,B} = E_A^{A',B}$. Értékeiket az 5.15 táblázat tartalmazza.

5.15. táblázat: A Norspd párkölsönhatási tényezői

Kölsönhatási tényező	Érték	Kölsönhatási tényező	Érték
$pE^{A,B} = pE^{A',B}$	$1,05 \pm 0,02$	$pE^{A,A'}$	$0,11 \pm 0,07$
$pE_{A'}^{A,B} = pE_A^{A',B}$	$1,01 \pm 0,09$	$pE_B^{A,A'}$	$0,06 \pm 0,12$

Mind a Spd, mind a Norspd kölsönhatási tényezőiből látszik, hogy a harmadik csoport protonáltsági állapota gyakorlatilag nem befolyásolja a másik két csoport kölsönhatását, az eltérés a mérési hibahatáron belül van.

A pH-függő részecske-eloszlási görbéről (5.17.**B** ábra) leolvasható, hogy a primer aminocsoporton protonált speciestek előfordulása lényegesen nagyobb, mint a szekunder nitrogénezen protonáltaké.



5.17. ábra: A Norspd mikroállandói (**A**); a mikrorészecskék pH-függő eloszlása (**B**)

5.4.2.3. A spermin mikroállandói

Mint négycsoportos molekula, a spermin mikrospeciációs sémája 16 mikrorészecskével és 32 mikroállandóval jellemezhető (5.18. ábra).

A molekula A_2B_2 típusú szimmetriája miatt több mikrorészecske ekvivalens ($A = A'$; $B = B'$; $AB = A'B'$; $AB' = A'B$; $ABB' = BB'A$; $ABA' = A'B'A$), így az egyedi részecskék és a mikroállandók száma is kevesebb: 10 és 16.

A kísérleti eredményekből nem lehet ennyi mikroállandót sem meghatározni, a makroállandókon kívül csak a 3-3 Q paramétert lehet kiszámítani. A egyszer és háromszor protonált részecskék állandói egyértelműen meghatározhatóak a Q tényezőkből. A négyféle kétszer protonált részecske kumulatív mikroállandóira csak kényszerfeltételek bevezetése mellett kaphatunk információt, hiszen két egyenletből négy ismeretlent nem lehet meghatározni.

A mikroállandókat az alábbi összefüggések szerint számítottuk ki:

$$\kappa_A = \kappa_{A'} = Q_{A,1} \quad \kappa_B = \kappa_{B'} = Q_{B,1} \quad (5.22)$$

$$\kappa_{ABA'} = \kappa_{AB'A'} = \frac{2 \cdot Q_{A,3} - Q_{B,3}}{3} \quad \kappa_{ABB'} = \kappa_{BB'A'} = \frac{2 \cdot Q_{B,3} - Q_{A,3}}{3} \quad (5.23)$$

A kétszer protonált részecskékre felírva:

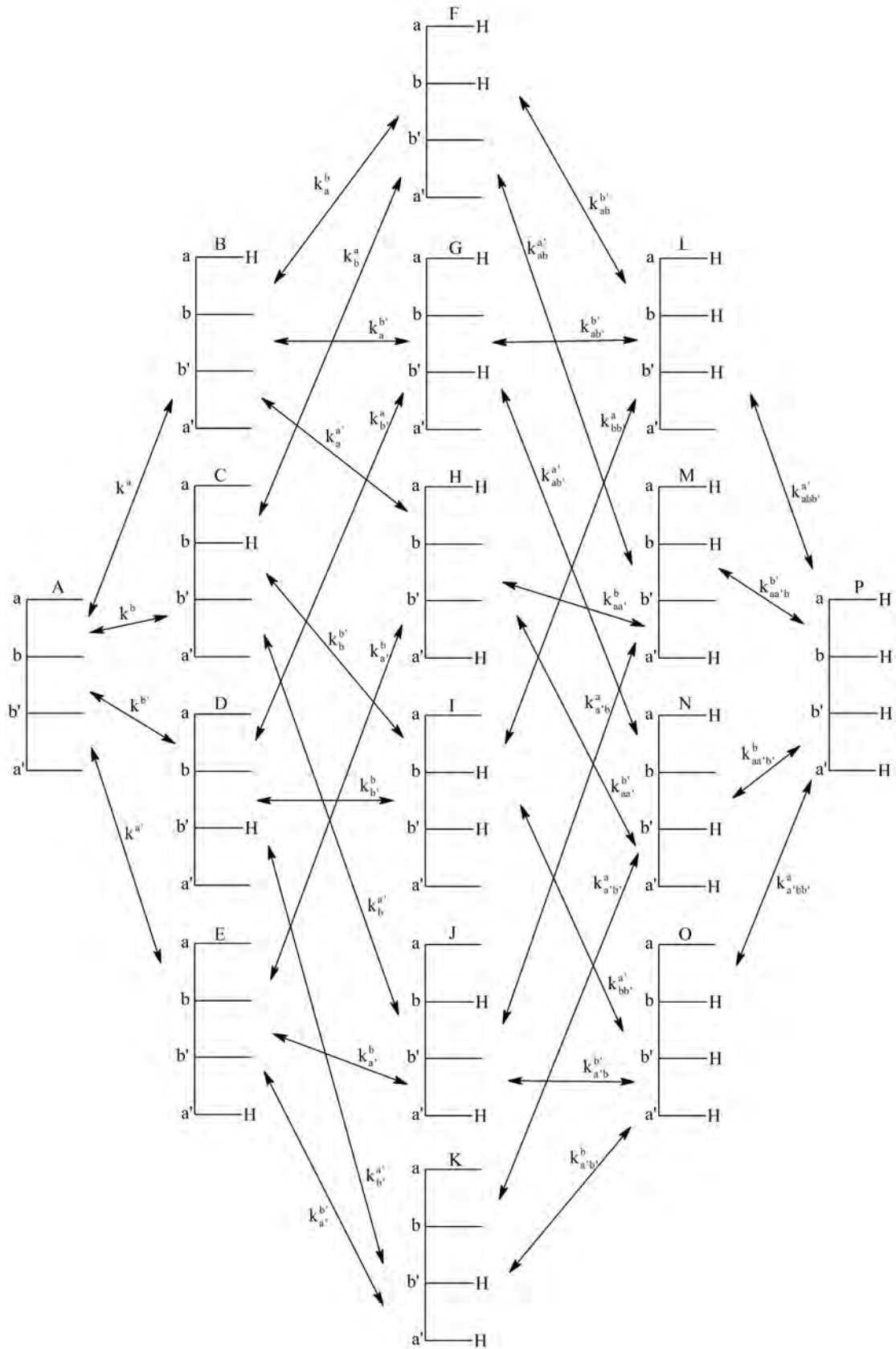
$$Q_{A,2} = \kappa_{AA'} + \kappa_{AB} + \kappa_{A'B} \quad Q_{B,2} = \kappa_{BB'} + \kappa_{AB} + \kappa_{AB'} \quad (5.24)$$

Az (5.24) egyenletek megoldásához szükség van két kölcsönhatási tényezőre, ezeket a Spd-ből vettük. A behelyettesítésnél célszerű a várhatóan minor részecskék kölcsönhatási tényezőit behelyettesíteni (AB és BB'), mert ekkor a hibaterjedési törvény értelmében nagyobb pontossággal számíthatjuk ki a major részecskék állandóit.

A kölcsönhatási tényezők behelyettesítésével kifejezhetjük minden kétszeresen protonált mikrorészecske kumulatív mikroállandója az alábbiak szerint:

$$\begin{aligned} \kappa_{AB} &= \kappa_A \kappa_B E^{A,B} & \kappa_{BB'} &= \kappa_B \kappa_{B'} E^{B,B'} \\ \kappa_{AB'} &= Q_{B,2} - \kappa_{AB} - \kappa_{BB'} & \kappa_{AA'} &= Q_{A,2} - \kappa_{AB} - \kappa_{AB'} \end{aligned} \quad (5.25)$$

A mikroállandók értékeit az 5.16 táblázat és az 5.20.B ábra tartalmazza.



5.18. ábra: Négycsoportos, A_2B_2 szimmetriájú molekula mikroszkopikus protonálódási sémája

5.16. táblázat: A spermin mikroállandói

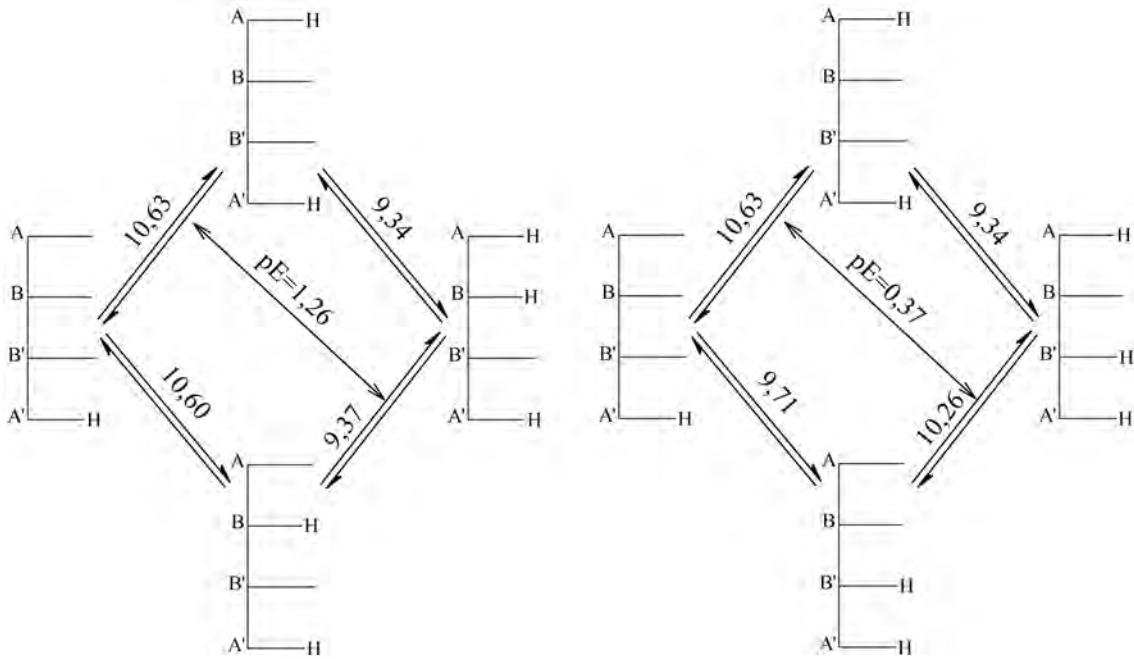
$k^A = k^{A'} = 10,38 \pm 0,03$	$k^B = k^{B'} = 10,76 \pm 0,03$
$k_B^A = k_{B'}^{A'} = 9,33 \pm 0,05$	$k_A^B = k_{A'}^{B'} = 9,70 \pm 0,05$
$k_B^{A'} = k_{B'}^A = 10,23 \pm 0,08$	$k_A^B = k_{A'}^{B'} = 10,60 \pm 0,05$
$k_A^{A'} = k_{A'}^A = 10,63 \pm 0,08$	$k_B^{B'} = k_{B'}^B = 10,01 \pm 0,13$
$k_{AB}^{A'} = k_{A'B'}^A = 10,26 \pm 0,05$	$k_{AB}^{B'} = k_{A'B'}^B = 9,95 \pm 0,05$
$k_{AB'}^{A'} = k_{A'B}^A = 9,36 \pm 0,08$	$k_{A'B}^{B'} = k_{AB'}^B = 9,05 \pm 0,08$
$k_{BB'}^A = k_{BB'}^{A'} = 9,27 \pm 0,12$	$k_{AA'}^B = k_{AA'}^{B'} = 9,34 \pm 0,04$
$k_{ABB'}^{A'} = k_{BB'A'}^A = 9,28 \pm 0,03$	$k_{AB'A'}^B = k_{ABA'}^{B'} = 8,96 \pm 0,03$

A mikroállandókból kiszámíthatjuk a párkölcsönhatási tényezőket (5.17. táblázat).

5.17. táblázat: A spermin kölcsönhatási tényezői

$pE^{A,B} = 1,05 \pm 0,02$	$pE^{A,B'} = 0,15 \pm 0,09$	$pE^{B,B'} = 0,75 \pm 0,11$	$pE^{A,A'} = -0,24 \pm 0,09$
$pE_{A'}^{A,B} = 1,26 \pm 0,11$	$pE_{A'}^{A,B'} = 0,37 \pm 0,09$	$pE_A^{BB'} = 0,65 \pm 0,10$	$pE_B^{AA'} = -0,03 \pm 0,10$
$pE_{B'}^{A,B} = 0,96 \pm 0,15$	$pE_B^{A,B'} = 0,06 \pm 0,14$		
$pE_{A'B'}^{A,B} = 0,99 \pm 0,05$	$pE_{A'B}^{A,B'} = 0,09 \pm 0,08$	$pE_{AA'}^{BB'} = 0,38 \pm 0,08$	$pE_{BB'}^{AA'} = 0,00 \pm 0,13$

A mikroállandókat megvizsgálva látható, hogy az AA' részecske kiemelt stabilitású, amit alátámaszt a kölcsönhatási tényező negatív értéke is ($pE^{A,A'} = -0,24$). Ez nem kooperativitást, hanem intramolekuláris protonátrendeződést jelent. Ezt a feltételezést igazolja, hogy csak a $pE^{A,A'}$ tényező értéke negatív. Ha a szekunder aminocsoport(ok) protonált állapotban van(nak), akkor a kölcsönhatási tényező értéke gyakorlatilag 0. Ezzel párhuzamosan az AB és AB kölcsönhatási tényezők értéke 0,2 logaritmus egységgel nő meg, ha az A' csoport protonálva van, hiszen ekkor az egyik mikrorészecske a kiemelt stabilitású AA' speciesz (5.19. ábra).



5.19. ábra: A spermin két párkölcsönhatási tényezője

Az ABA' részecske kumulatív mikroállandója 30,35, a melyet az *intrinsic* bázicitásokkal és a kölcsönhatási tényezőkkel is kifejezhetünk:

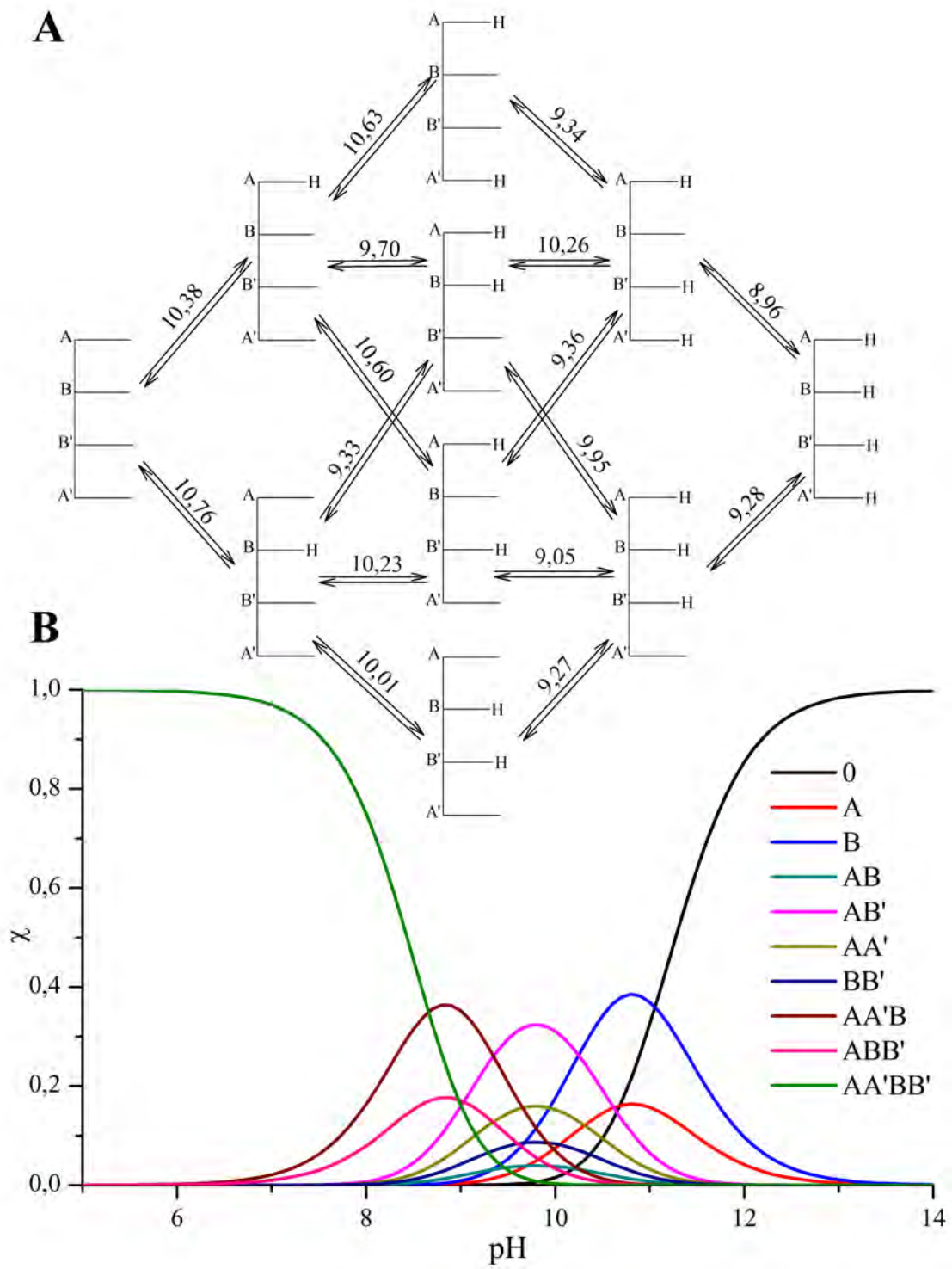
$$\log \kappa_{ABA'} = 2 \cdot \log \kappa_A + \log \kappa_B - pE^{AB} - pE^{AB'} - pE^{AA'} \quad (5.26)$$

Ide a megfelelő értékeket behelyettesítve $pE^{AA'} = 0,03 \pm 0,15$.

A másik háromszorosan protonált származékra az analóg egyenletet felírva:

$$\log \kappa_{ABB'} - (\log \kappa_A + 2 \log \kappa_B - pE^{A,B} - pE^{A,B'} - pE^{B,B'}) = 0,08 \pm 0,15 \quad (5.27)$$

A számított állandók jó egyezést mutatnak Frassinetti és mtsai. eredményeivel [137], jóllehet ők csak az AB és BB' kölcsönhatásokat vették figyelembe, a távolabbiakat elhanyagolták.



5.20. ábra: **A:** A Spm mikroállandói; **B:** A mikrorészecskék pH-függő eloszlása.

5.4.2.4. A norspermin mikroállandói

Az állandókat a Spm-nel analóg módon számítottuk, a Norspd kölcsönhatási tényezőit használtuk fel: $pE^{A,B} = pE^{B,B'} = 1,05 \pm 0,02$.

A mikroállandók értékeit az 5.18 táblázatban és az 5.21.A ábrán foglaltuk össze.

5.18. táblázat: A Norspm mikroállandói

$k^A = k^{A'} = 10,44 \pm 0,02$	$k^B = k^{B'} = 10,29 \pm 0,03$
$k_B^A = k_{B'}^{A'} = 9,39 \pm 0,04$	$k_A^B = k_{A'}^{B'} = 9,24 \pm 0,05$
$k_{B'}^A = k_B^{A'} = 10,33 \pm 0,06$	$k_{A'}^B = k_A^{B'} = 10,18 \pm 0,05$
$k_{A'}^A = k_A^{A'} = 10,42 \pm 0,03$	$k_{B'}^B = k_B^{B'} = 9,24 \pm 0,05$
$k_{A'B'}^A = k_{AB}^{A'} = 10,25 \pm 0,04$	$k_{A'B'}^B = k_{AB}^{B'} = 9,11 \pm 0,05$
$k_{A'B}^A = k_{AB'}^{A'} = 9,31 \pm 0,04$	$k_{AB'}^B = k_{BA'}^{B'} = 8,16 \pm 0,05$
$k_{BB'}^A = k_{BB'}^{A'} = 9,26 \pm 0,04$	$k_{AA'}^B = k_{AA'}^{B'} = 9,07 \pm 0,05$
$k_{BB'A'}^A = k_{ABB'}^{A'} = 9,22 \pm 0,03$	$k_{AB'A'}^B = k_{ABA'}^{B'} = 8,08 \pm 0,03$

5.19. táblázat: A Norspm párkölcsönhatási tényezői

$pE^{A,B} = 1,05 \pm 0,02$	$pE^{A,B'} = 0,11 \pm 0,05$	$pE^{B,B'} = 1,05 \pm 0,02$	$pE^{A,A'} = 0,03 \pm 0,04$
$pE_{A'}^{A,B} = 1,11 \pm 0,06$	$pE_{A'}^{A,B'} = 0,17 \pm 0,07$	$pE_A^{B,B'} = 1,08 \pm 0,07$	
$pE_{B'}^{A,B} = 1,08 \pm 0,07$	$pE_B^{A,B'} = 0,13 \pm 0,06$		$pE_B^{A,A'} = 0,08 \pm 0,07$
$pE_{AB'}^{AB} = 1,01 \pm 0,05$	$pE_{A'B}^{A,B'} = 0,08 \pm 0,05$	$pE_{AA'}^{B,B'} = 0,99 \pm 0,08$	$pE_{BB'}^{A,A'} = 0,01 \pm 0,09$

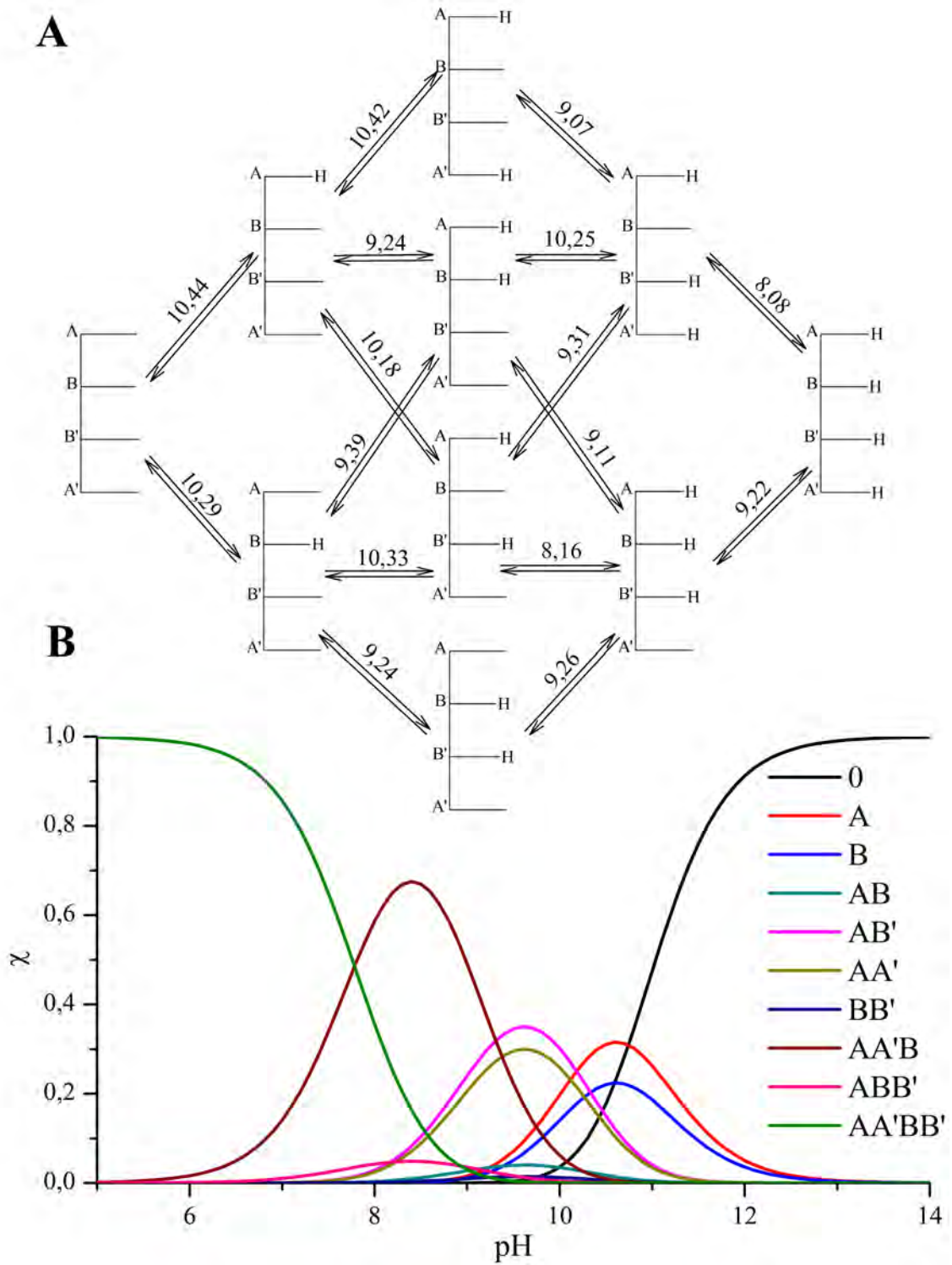
Az AB' kölcsönhatási tényező egyezést mutat a Norspd AA' kölcsönhatási tényezőjével (0,13 vs. 0,11, 5.19. táblázat). A két primer aminocsoport egymástól gyakorlatilag függetlenül protonálódik. A magasabb rendű kölcsönhatási tényezők értéke itt is gyakorlatilag 0, vagyis az egyes mikroállandók jól egyeznek az intrinsic bázicitások és a megfelelő kölcsönhatási tényezők szorzatával, például:

$$\log k_{AB'}^A = \log k^A - pE^{A,B} - pE^{A,B'} - pE^{A,A'} = 9,25 \pm 0,09 \quad (5.28)$$

Ez az érték mérési hibahatáron belül megegyezik a mért Q paraméterekből számított állandóval ($9,25 \pm 0,08$ vs. $9,31 \pm 0,06$).

A sperminnél és a norspermin is az AA' részecske kumulatív protonálódási mikroállandója ($\kappa_{AA'}$) a legnagyobb értékű. Itt azonban az AA' kölcsönhatási tényező értéke ($pE^{A,A'}$) nem negatív, amit minden bizonnyal az okoz, hogy itt a primer aminoszoportok *intrinsic* bázicitása nagyobb, mint a szekundereké, így nem tapasztalunk olyan szignifikáns intramolekuláris protonátrendeződést, mint a spermin esetén.

A részecskék közül itt is az AA' és az AB' a nagyobb előfordulású, hiszen a töltések itt helyezkednek egymástól a legtávolabb. A Spm-nel ellentétben itt a primer aminoszoport a bázikusabb. A három pozitív töltésű speciesek közül egyértelműen az ABA' a kedvezményezett, az ABB' egy nagyságrenddel kisebb koncentrációban fordul elő (5.21.B. ábra).



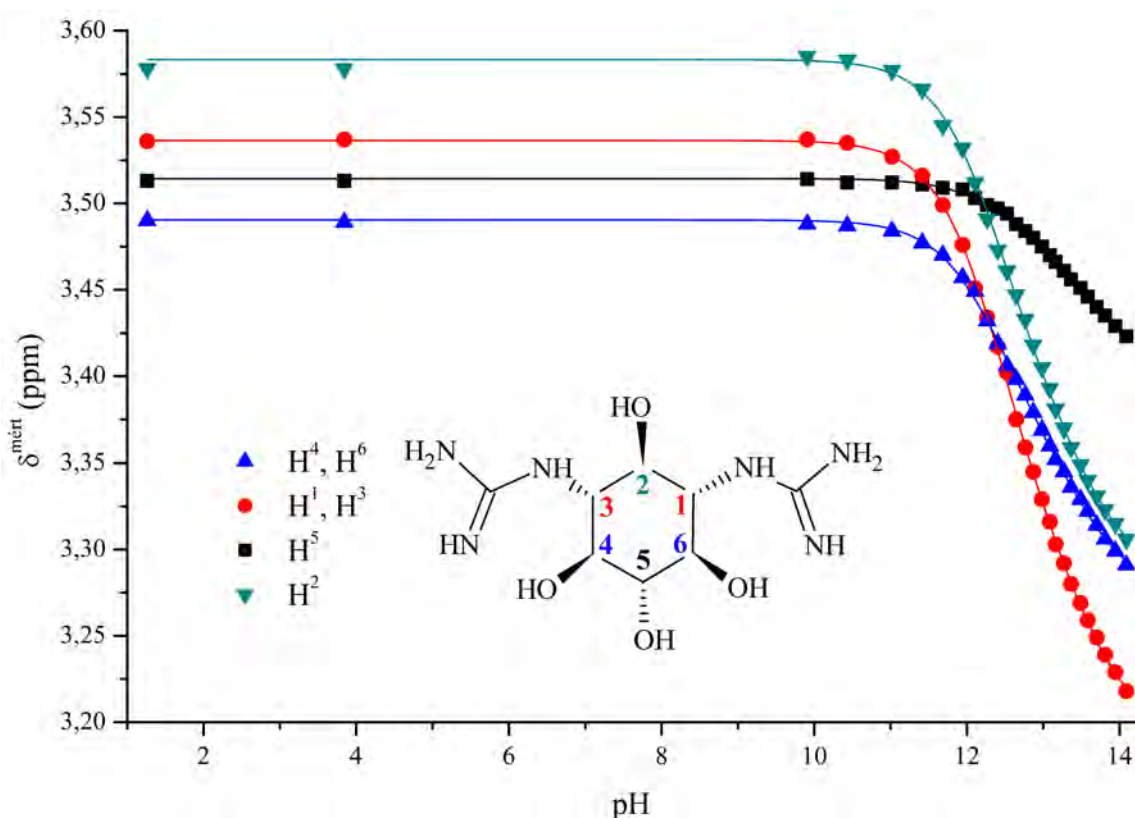
5.21. ábra: **A**: A Norspm mikroállandói; **B**: a részecskék pH-függő eloszlása

5.5. A sztreptomicin és a sztreptidin protonálódási állandói

5.5.1. A makroállandók meghatározása

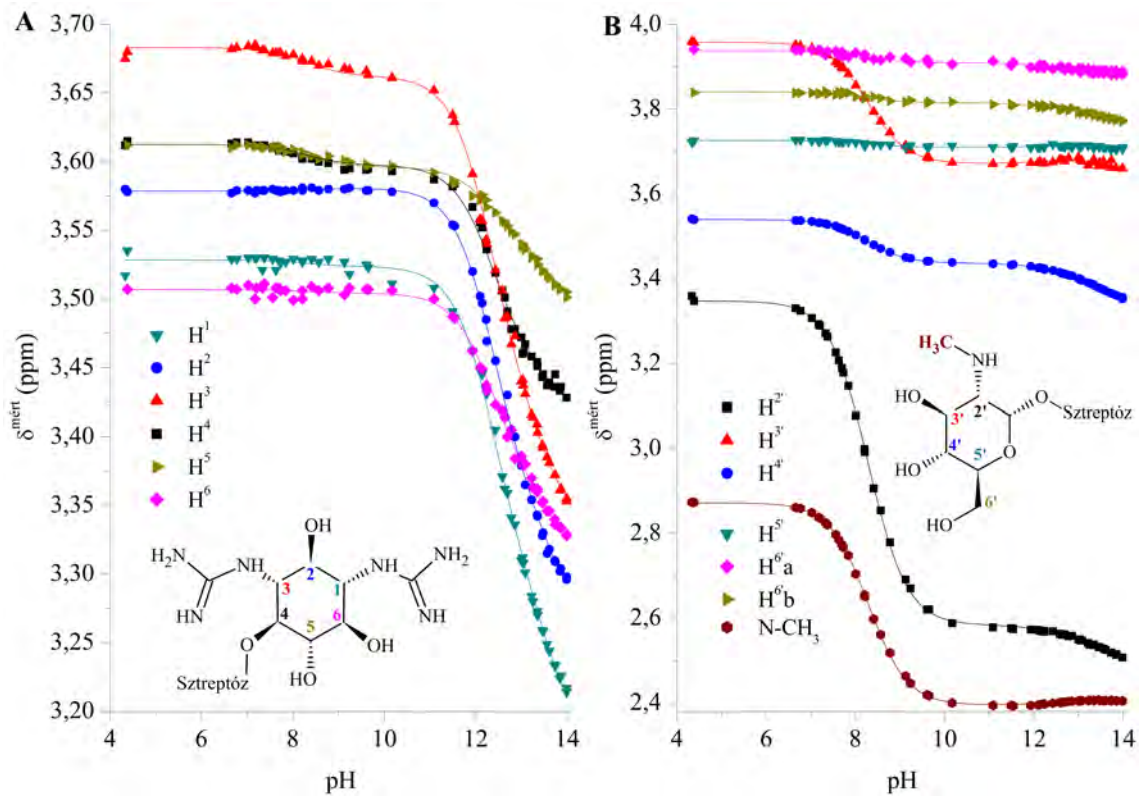
Mivel mindkét vegyület két erősen bázikus guanidino csoportot tartalmaz, melyek $\log K$ értékei közel esnek egymáshoz, ezért δ_L értéke nem olvasható le a titrálási görbéről, sőt a Perrin-Fabian módszerrel sem határozható meg. A $\log K$ értékek meghatározása érdekében a $\text{pH} > 11$ tartományban igen közeleső pH-értékeknél mértük meg az oldatok NMR spektrumait, így megfelelő pontossággal és torzítatlansággal kaphatjuk meg a protonálódási állandókat.

A makroállandókat mindkét molekula esetén a (3.17) egyenlet szerint számítottuk ki. A sztreptidin 4 jelet ad az ^1H NMR spektrumon, a H^1 és a H^3 illetve a H^4 és a H^6 protonok ekvivalensek (5.22. ábra).



5.22. ábra: A sztreptidin NMR–pH titrálási görbéi

A sztreptomicin esetén 13 jel pH-függését figyeltük: a sztreptidingyűrű hat (5.23.A ábra), illetve az N-metil-glukózin hét protonjának (5.23.B ábra) jeleit. Az anomer proton jele a titrálás során áthalad a vízjel alatt, így nem értékelhető.



5.23. ábra: A sztreptomycin NMR–pH titrálási görbéi

A kétféle funkciós csoport bázicitása jelentősen eltér: a guanidino az erősen lúgos pH tartományban protonálódik ($\log K \approx 13$), míg az aminocsoport kevésbé bázikus ($\log K \approx 9$), gyengén lúgos közegben ionizálódik. Így tehát az első és második protonálódási lépés egyértelműen a guanidino-, míg a harmadik az aminocsoporthoz rendelhető.

A sztreptomycin titrálási görbéin jól látható, hogy bár a báziscentrumok egymástól távol helyezkednek el, a tőlük távoli protonok kémiai eltolódása is változik a protonálódásukkor. Például a glukózamin gyűrű H^2 , H^3 , H^4 és $N-CH_3$ kémiai eltolódásai is változnak a guanidincsoportok protonálódásakor, sőt, az N-metilprotonok jele diamágneses irányba változik, 0,01 ppm-mel. Ezzel párhuzamosan a sztreptidingyűrű H^3 , H^4 és H^5 jeleinek eltolódása változik 0,05 ppm-mel az aminocsoport protonálódásakor. Az említett protonokat és a báziscentrumokat minden esetben legalább 7 kötés választja el egymástól.

A mért makroállandókat az 5.20. táblázat tartalmazza.

5.20. táblázat: A sztreptidin és a sztreptomycin makroállandói

	Sztreptidin	Sztreptomycin
$\log K_1$	$13,53 \pm 0,04$	$13,55 \pm 0,06$
$\log K_2$	$12,39 \pm 0,02$	$12,33 \pm 0,02$
$\log K_3$		$8,29 \pm 0,01$

A mérési eredmények pontosságának igazolása érdekében szimulációkat végeztünk. Ezek során négy magra számítottuk ki a $\delta^{\text{mért}} - \text{pH}$ adatsorokat, majd a pontos értékeket véletlenszerű hibával terheltük. A hiba mértéke $\pm 0,001$ ppm kémiai eltolódás, illetve $\pm 0,03$ pH egység volt. Az adatsorok a mért adatpontok sűrűségében tértek el; a mérési pontok közötti távolság rendre 0,25; 0,20; 0,15; 0,10 és 0,05 pH-egység volt.

Az eredményeket az 5.21. táblázat tartalmazza.

5.21. táblázat: A protonálódási állandó meghatározhatóságának vizsgálata

	Pontos érték	Nemlineáris paraméterillesztéssel számított értékek				
		$\Delta\text{pH} = 0,25$	$\Delta\text{pH} = 0,20$	$\Delta\text{pH} = 0,15$	$\Delta\text{pH} = 0,10$	$\Delta\text{pH} = 0,05$
$\log K_1$	13,48	$13,28 \pm 0,03$	$13,41 \pm 0,05$	$13,53 \pm 0,04$	$13,50 \pm 0,04$	$13,49 \pm 0,03$
$\log K_2$	12,52	$12,30 \pm 0,05$	$12,46 \pm 0,04$	$12,47 \pm 0,02$	$12,53 \pm 0,02$	$12,53 \pm 0,02$

Az eredményeink alapján még ilyen erősen bázikus, két átfedő lépésben protonálódó molekulák esetén is elfogadható pontossággal határozhatóak meg a protonálódási állandók kellő számú mérési pontból. A gyakorlatban ez azt jelenti, hogy kb. 0,1 pH-egységenként kell rögzíteni az oldatok NMR spektrumát. Természetesen a megfigyelt magok számának növelésével is javíthatunk a meghatározás pontosságán.

5.5.2. A mikroállandók meghatározása

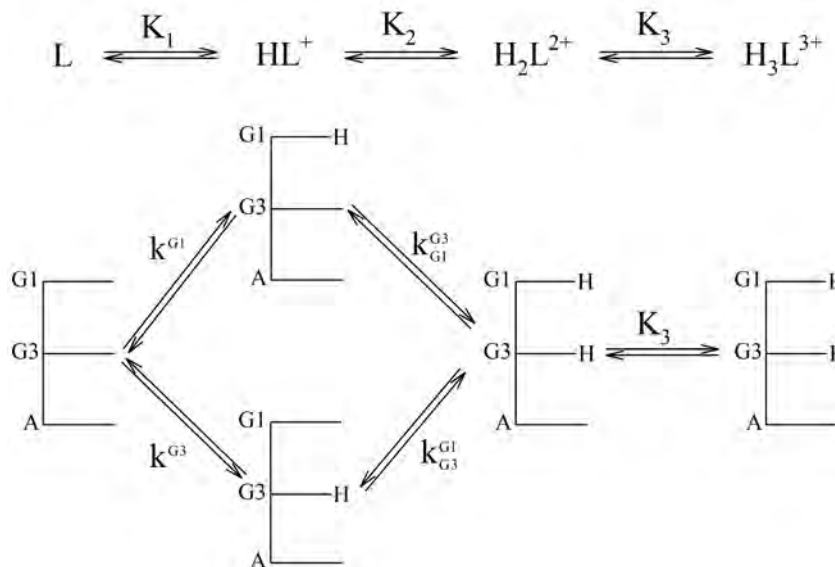
A sztreptomycin guanidino- és aminocsoportjainak bázicitása jelentősen eltér egymástól, így az összes mikroállandó kiszámításához olyan modellvegyületekre lenne szükség, amelyek bázicitása megfeleltethető valamely minor részecske bázicitásának. Irodalmi kutatásaink szerint ilyen molekulákat még nem állítottak elő. A rendelkezésre álló adatokból a major részecskék mikroállandóit lehet kiszámítani.

Következésképpen a protonálódási séma egyszerűbb, mint az általános háromcsoportos molekulák esetén, hiszen a K_3 makroállandó gyakorlatilag megegyezik az aminocsoport bázicitásával (5.24. ábra).

A G1 és G3 csoportspecifikus bázicitásainak kiszámításához a makroállandókon kívül még szükséges egy mikroállandó vagy a kölcsönhatási tényező.

A sztreptomycin megfelelő mikroállandóit a poliaminok protonálódási állandóinak meghatározásához alkalmazott ^{15}N NMR–pH módszerrel terveztük megmérni, azonban a molekula nagymérvű bomlékonysága miatt ezt nem lehetett megvalósítani. Az állandókat ezért deduktív módszerrel számítottuk ki.

Modellvegyületként a sztreptidint választottuk, melynek kölcsönhatási tényezőjét felhasználva meghatározhatóak a sztreptomycin major mikrorészecskéinek protonálódási állandói.



5.24. ábra: A sztreptomycin mikroszkopikus protonálódási sémája

A sztreptidin totálszimmetrikus molekula, a mikroállandói kiszámíthatóak a makroállandókból, a két csoport bázicitása megegyezik:

$$k^{G1} = k^{G3} \quad k_{G3}^{G1} = k_{G1}^{G3} \quad K_1 = 2 \cdot k^{G1} \quad K_2 = \frac{k_{G3}^{G1}}{2} \quad (5.29)$$

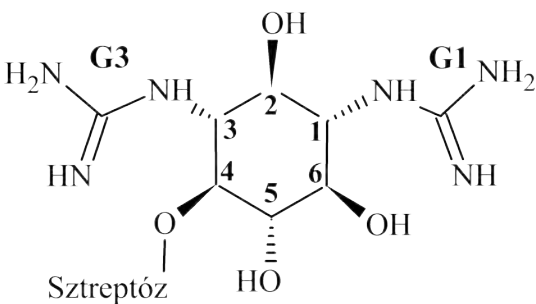
Ennek megfelelően a makroállandókból a kölcsönhatási tényező is kiszámítható:

$$pE^{G1,G3} = \log K_1 - \log K_2 - \log 4 = 0,54 \pm 0,04 \quad (5.30)$$

A mikroállandók hozzárendeléséhez meg kell határozni a csoportok bázicitásának sorrendjét. Megvizsgáltuk, hogy az egyszeresen protonált makrorészecskében mekkora az egyes jelek kémiai eltolódásának változása ($\Delta\delta = \delta_{HL^+} - \delta_L$), ugyanis a nagyobb mértékben protonálódó csoport közelében várhatóan nagyobb lesz az értéke. A hat sztreptidinprotonra mért $\Delta\delta$ értékeket az 5.22 táblázatban foglaltuk össze.

5.22. táblázat: A sztreptomycin $\Delta\delta$ értékei a szteptidinprotonokon

$\Delta\delta$ (ppm)	
H ¹	0,137
H ²	0,102
H ³	0,098
H ⁴	0,046
H ⁵	0,054
H ⁶	0,063



Jól látható, hogy a G1 csoport közelében lévő H¹ és H⁶ protonok eltolódásának változása nagyobb, mint a G3 csoporthoz közelebbi H³ és H⁴ protonoké, így a G1 csoport bázicitását tekintettük erősebbnek. Ez molekulaszervezeti megfontolásokkal is alátámasztható: a G1 csoport sztérikusan lényegesen kevésbé árnyékolt, a sztreptózyűrűtől a lehető legmesszebb, *para* helyzetben található.

A guanidinocsoportok mikroállandóit kifejezhetjük a makroállandók és a sztreptidinből vett kölcsönhatási tényező segítségével:

$$K_1 = k^{G^1} + k^{G^3} \quad \text{és} \quad K_1 \cdot K_2 = \frac{k^{G^1} \cdot k^{G^3}}{E^{G^1, G^3}} = k^{G^1} \cdot k_{G^1}^{G^3} = k^{G^3} \cdot k_{G^3}^{G^1} \quad (5.31)$$

A fenti egyenletek átrendezésével közvetlenül megkaphatjuk a kívánt állandókat:

$$\log k^{G^1} = \log \left(\frac{10^{\log K_1} + \sqrt{10^{2 \cdot \log K_1} - 4 \cdot 10^{\log K_1 + \log K_2 + p E^{G^1, G^3}}}}{2} \right) \quad (5.32)$$

$$\log k^{G^3} = \log \left(\frac{10^{\log K_1} - \sqrt{10^{2 \cdot \log K_1} - 4 \cdot 10^{\log K_1 + \log K_2 + p E^{G^1, G^3}}}}{2} \right) \quad (5.33)$$

$$\log k_{G^3}^{G^1} = \log K_1 + \log K_2 - \log k^{G^3} \quad (5.34)$$

$$\log k_{G^1}^{G^3} = \log K_1 + \log K_2 - \log k^{G^1} \quad (5.35)$$

A mikroállandók értékeit az 5.23. táblázat és az 5.25.A ábra tartalmazza. Szórásukat a Gauss-féle négyzetes hibaterjedési törvény alapján számítottuk ki [190]. A $\log k^{G^1}$ állandó hibája:

$$\begin{aligned} \sigma_{\log k^{G^1}}^2 = & \frac{\left(\sqrt{10^{2 \cdot \log K_1} - 4 \cdot 10^{\log K_1 + \log K_2 + \log E^{G^2-G^4}}} - 2 \cdot 10^{\log K_2 + \log E^{G^2-G^4}} + 10^{\log K_1} \right)^2 \sigma_{\log K_1}^2}{\sqrt{10^{2 \cdot \log K_1} - 4 \cdot 10^{\log K_1 + \log K_2 + \log E^{G^2-G^4}}} - 4 \cdot 10^{\log K_2 + \log E^{G^2-G^4}} + 10^{\log K_1}} + \dots \\ & \dots + \frac{\left(2 \cdot 10^{\log K_2 + \log E^{G^2-G^4}} \right)^2 \left(\sigma_{\log K_2}^2 + \sigma_{\log E^{G^2-G^4}}^2 \right)}{\sqrt{10^{2 \cdot \log K_1} - 4 \cdot 10^{\log K_1 + \log K_2 + \log E^{G^2-G^4}}} - 4 \cdot 10^{\log K_2 + \log E^{G^2-G^4}} + 10^{\log K_1}} \end{aligned} \quad (5.36)$$

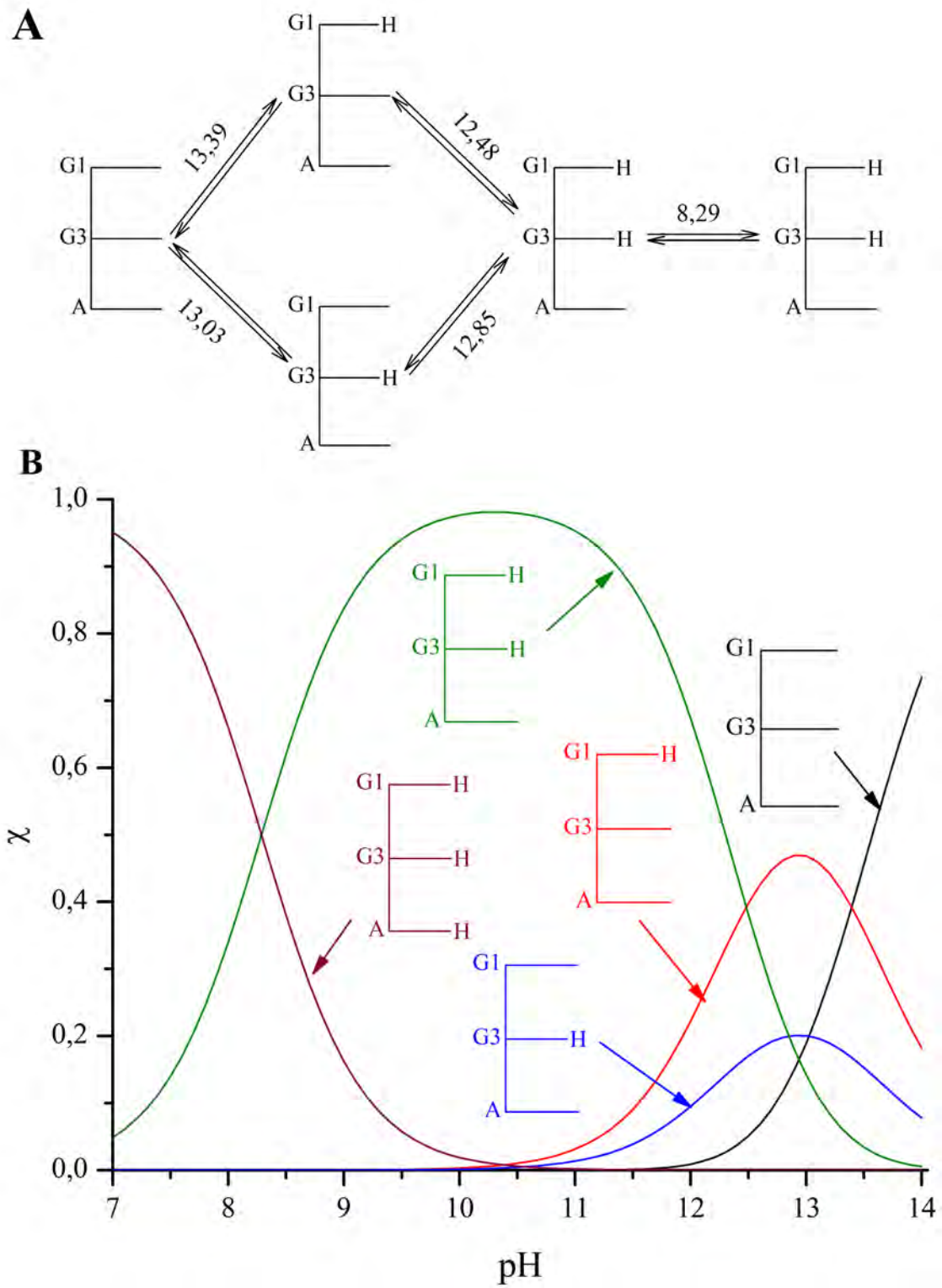
5.23. táblázat: A sztreptomycin guanidino csoportjainak mikroállandói

Mikroállandó	Érték
$\log k^{G^1}$	$13,39 \pm 0,11$
$\log k^{G^3}$	$13,03 \pm 0,10$
$\log k_{G^1}^{G^3}$	$12,48 \pm 0,13$
$\log k_{G^3}^{G^1}$	$12,85 \pm 0,11$

Ha a két csoport kölcsönhatási tényezőjét összehasonlítjuk a poliaminoknál meghatározott kölcsönhatási tényezőkkel, láthatjuk, hogy jóval nagyobb a báziscentrumok egymásra gyakorolt hatása az 1,3-diaminopropán jellegű vegyületekben. Feltételezhető, hogy a sztreptomycin guanidinocsoportjain a pozitív töltés nem lokalizálható a szénlánchoz kapcsolódó nitrogénatomokra, valószínűleg nagyobb mértékben rendelhető a terminális nitrogénekhez.

Tudomásunk szerint eddig még nem publikálták semmilyen két guanidinocsoporttal rendelkező molekula mikroállandóinak meghatározását.

A sztreptomycin olyannyira erős bázis, hogy a molekulák 25%-a még 1 M NaOH oldatban is protonált állapotban van jelen (5.25.**B** ábra).



5.25. ábra: **A:** A sztreptomycin mikroállandói; **B:** A főbb mikrorészecskék pH-függő eloszlása

6. Következtetések, új tudományos eredmények

Doktori munkám során biológiai és gyakorlati szempontból jelentős vegyületek csoportspecifikus bázicitását tanulmányoztam pH-potenciometriás és NMR titrálásokkal, valamint az erősen lúgos oldatokban történő pH-meghatározás lehetőségeit vizsgáltam. Az elért eredményeket az alábbi pontokban összegzem.

1. Kidolgoztunk egy ^1H NMR alapú pH-meghatározási módszert, melynek segítségével a teljes (0 – 14) pH-tartományban pontosan és torzításmentesen határozható meg az oldat pH-ja. Az indikátormolekulák indikátorparamétereit a két leggyakrabban alkalmazott ionerősségen (0,15 M és 1,00 M) határoztuk meg. Eredményeink alapján 1,00 M-os ionerősségen a teljes pH-tartomány lefedhető öt indikátormolekulával (diklórecetsav, acetoxim, szarkozin, ecetsav, imidazol). A pH-tartományt úgy határoztuk meg, hogy a pH-számítás maximális hibája 0,03 egység legyen.

Az általunk kidolgozott indikátormolekula-sorozat segítségével lehetővé válik az igen magas pH-értékek és ebből következően az igen erősen bázikus molekulák protonálódási állandóinak pontos és torzításmentes meghatározása.

2. Meghatároztuk két erősen bázikus, orális antidiabetikumként használt biguanidin-származék, a metformin és a fenformin, protonálódási állandóit. Megmutattuk, hogy az irodalomban található $\log K_1$ értékek jelentősen eltérnek az általunk meghatározott torzításmentes értékektől.
3. Deduktív módszerrel és ^1H NMR-pH titrálásokkal meghatároztuk a legbázikusabb fehérjealkotó aminosav, az arginin összes mikroállandóját. A molekula három báziscentrumot tartalmaz: egy guanidino- (G), egy amino- (A) és egy karboxilátcsoportot (C). A csoportok bázicitása, mint ismert, jelentősen eltér egymástól, így a mikroállandók kiszámítása csak deduktív módszerrel lehetséges, hiszen a minor mikrorészecskék több nagyságrenddel kisebb koncentrációban fordulnak elő. Modellvegyületként két, az argininrel izoelektronos vegyületet választottunk, melyek csak két-két protonálható csoportot tartalmaznak: citrullint és argininamidot. A számításokat egy független kísérleti adattal támasztottuk alá: a

citrullin metilészterének, az arginin rokon származékának makroállandója jó egyezést mutatott az arginin megfelelő mikroállandójával.

Az első protonálódási állandó irodalmi értéke egy logaritmus egységgel alacsonyabb, mint az általunk mért érték, így ennek megfelelő az izoelektromos pont is magasabb (11,41). Ezzel szemben az izoelektronos citrullin izoelektromos pontja 5,5 e gységgel alacsonyabb (6,91). Ez az irodalomban közölt legnagyobb eltérés két izoelektronos molekula között.

Eredményeink szerint a minor mikrorészecskék koncentrációja 5, illetve 10 nagyságrenddel kisebb, mint a major részecskéké.

4. Meghatároztuk két lineáris triamin (spermidin és norspermidin) és két tetraamin (spermin és norspermin) összes makro- és mikroállandóját. A makroállandókat pH-potenciometriás és ^1H NMR-pH titrálási görbék szimultán kiértékelésével számítottuk ki. A mikroállandókat az egyes csoportok protonáltságának szelektív nyomon követésével, ^{15}N NMR-pH titrálásokkal határoztuk meg. Az irodalomban a csoportspecifikus protonálódási állandókat csak ^{13}C NMR-pH titrálási adatokból határoztak meg, azonban az eredmények megbízhatósága kérdéses, hiszen a báziscentrumok igen közel helyezkednek el egymáshoz, így a szénatomok kémiai eltolódása nem tekinthető a mellettük lévő aminocsoport protonálódására szelektívnek.

A minor protonálódási útvonalhoz tartozó mikroállandókat azonban a ^{15}N NMR-pH titrálási görbék alapján nem lehet pontosan meghatározni, hiszen hozzájárulásuk az analitikai jelhez elhanyagolható. Ezért deduktív módszerrel határoztuk meg ezeket a mikroállandókat, egy kevesebb protonálható csoportot tartalmazó modellvegyület párkölcsönhatási tényezőjének átvitelével.

A négycsoportos vegyületek mikroállandóit azonban elvileg sem lehet meghatározni a kísérleti adatokból, az összes állandó kiszámításához további adatokra is szükség van. Ezek a spermidin és norspermidin megfelelő párkölcsönhatási tényezői voltak, így már összes mikroállandó kiszámíthatóvá vált.

Eredményeink szerint a többszörösen protonált részecskék között minden esetben azok a fordulnak elő nagyobb arányban, ahol a töltések egymástól minél távolabb

helyezkednek el. A kétszeresen protonáltak esetén ezek az AB' és az AA' részecskék, a háromszor protonáltak közül pedig az ABA' species.

5. Megmértük az elsőként felfedezett aminoglikozid típusú antibiotikum, a sztreptomycin és aglikonja, a sztreptidin protonálódási állandóit. A molekulák három, illetve két báziscentrumot tartalmaznak (két guanidino és egy szekunder amino illetve két guanidino). Elsőként sikerült meghatároznunk két guanidino csoport párkölcsönhatási tényezőjét, amelynek értéke lényegesen alacsonyabbnak bizonyult, mint az 1,3-diaminopropán két nitrogénje közötti kölcsönhatási tényező. Ezt azzal magyarázhatjuk, hogy a protonált guanidinocsoportokon a töltések valószínűleg nagyobb mértékben találhatóak a „távolabbi” nitrogénatomokon. A kiterjedt delokalizáció miatt azonban a töltést nem lehet egyik nitrogénhez sem egyértelműen hozzárendelni. A sztreptidinből számított kölcsönhatási tényező átvitelével meghatároztuk a sztreptomycin egyes guanidinocsoportjaik bázicitását. Eredményeink szerint az 1-es helyzetű, sztérikusan kevésbé árnyékolt csoport bázicitása kétszer nagyobb, mint a 3-as helyzetűé. A molekula olyan erős bázis, hogy a molekulák 25 %-a még 1 M NaOH oldatban is protonált állapotban található.
6. A Gauss-féle négyzetes hibaterjedési törvény alkalmazásával elsőként számítottuk ki a mikroállandók hibáját. Megmutattuk, hogy deduktív módszer esetén csak akkor számíthatjuk ki reális hibával a mikroállandókat, ha a modellvegyületek a valóban minor részecskéknek feleltethetőek meg. Az egyes báziscentrumok protonálódásának szelektív nyomon követésével viszont csak összemérhető bázicitások esetén kaphatjuk meg a mikroállandókat reális hibával.

7. Összefoglalás

Az igen erősen lúgos oldatok pH-jának pontos és torzításmentes meghatározása rendkívül nehéz feladat, hiszen a leggyakrabban használt módszer, a kombinált üvegelektroddal történő pH-mérés pontossága nem megfelelő. E hiányosság kiküszöbölésére kidolgoztunk egy ^1H NMR-alapú pH-meghatározási eljárást. Ennek során NMR-pH indikátormolekulák kémiai eltolódásából számíthatjuk az oldat pH-ját. A sorozat indikátorparamétereit a hidrogénion-aktivitás alapú pH-skálán, 25 °C-on, a két leggyakrabban használt ionerősségen (0,15 M és 1,00 M) határoztuk meg. Megmutattuk, hogy öt indikátormolekula segítségével (diklórecetsav, aceton oxim, szarkozin, ecetsav és imidazol) a teljes (0–14 közötti) pH-tartomány lefedhető.

Ez a pontos és torzításmentes pH-meghatározási módszer lehetővé tette számos, igen erősen bázikus molekula protonálódási folyamatainak jellemzését.

Meghatároztuk két, igen erősen bázikus biguanidin-típusú orális antidiabetikum, a metformin és a fenformin két-két protonálódási állandóját.

Meghatároztuk a legbázikusabb fehérjealkotó aminosav, az arginin mindhárom makroállandóját, és deduktív módszerek alkalmazásával kiszámítottuk a molekula 12 csoportspecifikus protonálódási mikroállandóját. A mikroállandók alapján az arginin minor mikrorészecskéi 5, illetve 10 n agyságrenddel kisebb koncentrációban fordulnak elő a domináns részecskéknél.

Elsőként határoztuk meg két guanidincsoporttal rendelkező molekulák (sztreptomycin és sztreptidin) protonálódási állandóit és számítottuk ki két guanidincsoport kölcsönhatási tényezőit. Meghatároztuk a sztreptomycin major protonálódási útvonalához tartozó mikroállandókat.

Meghatároztuk két lineáris triamin (spermidin és norspermidin) és két lineáris tetraamin (spermin és norspermin) összes makro- és mikroállandóját. A makroállandókat ^1H NMR-pH és pH-potenciometriás titrálási görbék szimultán kiértékelésével számítottuk ki. A mikroállandókat ^{15}N NMR-pH titrálások alapján határoztuk meg.

Elsőként számítottuk ki a mikroállandók standard hibáját, a Gauss-féle négyzetes hibaterjedési törvény alkalmazásával.

8. Summary

The measurement of high pH has always been a difficult task, as for highly basic solutions the accuracy and precision of the glass electrode is not sufficient. We have, therefore, elaborated a ^1H NMR-based method for the accurate measurement of high pH. By this method, the pH is calculated from the observed chemical shifts of indicator molecules. The indicator parameters were determined at 25 °C, at the two most commonly used ionic strengths (0,15 M and 1,00 M), in terms of the activity based pH-scale. It was shown, that the whole (0-14) pH range can be cover by five indicator molecules (dichloroacetic acid, acetone oxime, sarcosine, acetic acid and imidazole).

This unbiased method enables the characterization of highly basic molecules in terms of protonation constants.

We have determined the protonation constants of two highly basic biguanide type oral antidiabetics, metformin and phenformin.

We have determined the protonation macroconstants of arginine, the most basic natural amino acid. The 12 microconstants were calculated by deductive methods. The pH-dependent distribution of the 8 microspecies was calculated. The results showed that the occurrence of the minor species are 5 and 10 orders of magnitude lower, than the major ones.

We have determined protonation constants of molecules containing two guanidino groups (streptomycin and streptidine) and the interactivity parameter between the two guanidino groups. We have calculated the microconstants of the major microspecies of streptomycin.

We have also determined the macro- and microconstants of two linear triamines (spermidine and norspermidine) and two tetraamines (spermine and norspermine). The macroconstants were calculated by the simultaneous evaluation of potentiometric and ^1H NMR-pH titrations. In order to determine the microconstants ^{15}N NMR-pH titrations were carried out.

The standard error of the microconstants was calculated for the first time, by the quadratic error propagation rule of Gauss.

9. Hivatkozott irodalmak jegyzéke

1. Noszál B. (1990) Acid-base properties of bioligands. In: Burger K. (ed) Biocoordination Chemistry: Coordination Equilibria in Biologically Active Systems. Ellis Horwood, Chichester, pp 18-55
2. Sørensen S. P. L. (1909) Enzymstudien. 11 Mitteilung. Über die Messung und die Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration bei enzymatischen Prozessen. Biochem. Z. 21:131-304.
3. Bates R. G. (1973) Determination of pH: theory and practice. 2nd edn. John Wiley & Sons, New York,
4. Covington A. K., Buetikofer H. P., Camoes M. F. G. F. C., Ferra M. I. A., Rebelo M. J. F. (1985) Procedures for testing pH responsive glass electrodes at 25, 37, 65 and 85 °C and determination of alkaline errors up to 1 mol dm⁻³ Na⁺, K⁺, Li⁺. Pure Appl. Chem. 57 (6):887-898.
5. Baucke F. (2002) New IUPAC recommendations on the measurement of pH - background and essentials. Anal. Bioanal. Chem. 374 (5):772-777.
6. Buck R. P., Rondinini S., Covington A. K., Baucke F. G. K., Brett C. M. A., Camões M. F., Milton M. J. T., Mussini T., Naumann R., Pratt K. W., Spitzer P., Wilson G. S. (2002) Measurement of pH. Definition, standards, and procedures (IUPAC Recommendations 2002). Pure Appl. Chem. 74 (11):2169-2200.
7. Mussini P. R., Mussini T., Rondinini S. (1997) Reference value standards and primary standards for pH measurements in D₂O and aqueousorganic solvent mixtures: New accessions and assessments. Pure Appl. Chem. 69 (5):1007-1004.
8. Purlee E. L. (1959) On the solvent isotope effect of deuterium in aqueous acid solutions. J. Amer. Chem. Soc. 81 (2):263-272.
9. Glasoe P. K., Long F. A. (1960) Use of glass electrodes to measure acidities in deuterium oxide. J. Phys. Chem. 64 (1):188-190.
10. Harned H. S. (1943) The physical chemistry of electrolytic solutions. Reinhold Publishing Corporation, New York ;,
11. Baucke F. G. K. (1994) Thermodynamic origin of the sub-nernstian response of glass electrodes. Anal. Chem. 66 (24):4519-4524.

12. Popov K., Rönkkömäki H., Lajunen L. H. J. (2006) Guidelines for NMR measurements for determination of high and low pK_a values: (IUPAC technical report). *Pure Appl. Chem.* 78 (3):663-675.
13. A pH potenciometriás meghatározása (2003). In: Ph. Hg. VIII. I. kötet 2.2.3. p 27
14. Irving H. M., Miles M. G., Pettit L. D. (1967) A study of some problems in determining the stoichiometric proton dissociation constants of complexes by potentiometric titrations using a glass electrode. *Anal. Chim. Acta* 38:475-488.
15. Gans P., O'Sullivan B. (2000) GLEE, a new computer program for glass electrode calibration. *Talanta* 51 (1):33-37.
16. Safavi A., Abdollahi H. (1998) Optical sensor for high pH values. *Anal. Chim. Acta* 367 (1-3):167-173.
17. Wang R., Yu C., Yu F., Chen L. (2010) Molecular fluorescent probes for monitoring pH changes in living cells. *Trends Anal. Chem.* 29 (9):1004-1013.
18. Gutowsky H. S., Saika A. (1953) Dissociation, chemical exchange, and the proton magnetic resonance in some aqueous electrolytes. *J. Chem. Phys.* 21 (10):1688-1694.
19. Grunwald E., Loewenstein A., Meiboom S. (1957) Application of nuclear magnetic resonance to the study of acid-base equilibria. *J. Chem. Phys.* 27 (3):641-642.
20. Loewenstein A., Roberts J. D. (1960) The ionization of citric acid studied by the nuclear magnetic resonance technique. *J. Amer. Chem. Soc.* 82 (11):2705-2710.
21. Rabenstein D. L., Isab A. A. (1982) Determination of the intracellular pH of intact erythrocytes by ^1H NMR spectroscopy. *Anal. Biochem.* 121 (2):423-432.
22. Hagan W. J., Edie D. L., Cooley L. B. (2007) Imidazole as a pH probe: an NMR experiment for the general chemistry laboratory. *J. Chem. Educ.* 84 (7):1188-null.
23. Gil M. S., Cruz F., Cerdán S., Ballesteros P. (1992) Imidazol-1-ylalkanoate esters and their corresponding acids. A novel series of extrinsic ^1H NMR probes for intracellular pH. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2 (12):1717-1722.
24. Gil S., Zaderenzo P., Cruz F., Cerdán S., Ballesteros P. (1994) Imidazol-1-ylalkanoic acids as extrinsic ^1H NMR probes for the determination of intracellular pH, extracellular pH and cell volume. *Bioorg. Med. Chem.* 2 (5):305-314.
25. van Sluis R., Bhujwala Z. M., Raghunand N., Ballesteros P., Alvarez J., Cerdán S., Galons J.-P., Gillies R. J. (1999) In vivo imaging of extracellular pH using ^1H MRSI. *Magn. Reson. Med.* 41 (4):743-750.

26. García-Martín M. L., Hérigault G., Rémy C., Farion R., Ballesteros P., Coles J. A., Cerdán S., Ziegler A. (2001) Mapping extracellular pH in rat brain gliomas *in vivo* by ^1H magnetic resonance spectroscopic imaging: Comparison with maps of metabolites. *Cancer Res*, 61 (17):6524-6531.
27. Bhujwalla Z. M., Artemov D., Ballesteros P., Cerdan S., Gillies R. J., Solaiyappan M. (2002) Combined vascular and extracellular pH imaging of solid tumors. *NMR Biomed*. 15 (2):114-119.
28. Vermathen P., Capizzano A. A., Maudsley A. A. (2000) Administration and ^1H MRS detection of histidine in human brain: Application to *in vivo* pH measurement. *Magn. Reson. Med*. 43 (5):665-675.
29. Gasparovic C., Barba I., Born J., Barton S., Arús C., Mann P. (1998) A Study of imidazole-based nuclear magnetic resonance probes of cellular pH. *Anal. Biochem*. 261 (1):64-72.
30. Moon R. B., Richards J. H. (1973) Determination of intracellular pH by ^{31}P magnetic resonance. *J. Biol. Chem*. 248 (20):7276-7278.
31. Seo Y., Murakami M., Watari H., Imai Y., Yoshizaki K., Nishikawa H., Morimoto T. (1983) Intracellular pH determination by a ^{31}P -NMR technique. The second dissociation constant of phosphoric acid in a biological system. *J. Biochem*. 94 (3):729-734.
32. Petroff O. A. C., Prichard J. W., Behar K. L., Alger J. R., den Hollander J. A., Shulman R. G. (1985) Cerebral intracellular pH by ^{31}P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Neurology* 35 (6):781.
33. Madden A., Leach M. O., Sharp J. C., Collins D. J., Easton D. (1991) A quantitative analysis of the accuracy of *In Vivo* pH measurements with ^{31}P NMR spectroscopy: Assessment of pH measurement methodology. *NMR Biomed*. 4 (1):1-11.
34. Stubbs M., Bhujwalla Z. M., Tozer G. M., Rodrigues L. M., Maxwell R. J., Morgan R., Howe F. A., Griffiths J. R. (1992) An assessment of ^{31}P MRS as a method of measuring pH in rat tumours. *NMR Biomed*. 5 (6):351-359.
35. Barker P. B., Butterworth E. J., Boska M. D., Nelson J., Welch K. M. A. (1999) Magnesium and pH imaging of the human brain at 3.0 Tesla. *Magn. Reson. Med*. 41 (2):400-406.

36. Schliselfeld L. H., Burt C. T., Labotka R. J. (1982) Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance of phosphonic acid analogs of adenosine nucleotides as functions of pH and magnesium ion concentration. *Biochemistry* 21 (2):317-320.
37. Robitaille P.-M. L., Robitaille P. A., Gordon Brown G., Brown G. G. (1991) An analysis of the pH-dependent chemical-shift behavior of phosphorus-containing metabolites. *J. Magn. Reson.* 92 (1):73-84.
38. Williams G. D., Mosher T. J., Smith M. B. (1993) Simultaneous determination of intracellular magnesium and pH from the three ^{31}P NMR Chemical Shifts of ATP. *Anal. Biochem.* 214 (2):458-467.
39. Soto G. E., Zhu Z., Evelhoch J. L., Ackerman J. J. H. (1996) Tumor ^{31}P NMR pH measurements in vivo: A comparison of inorganic phosphate and intracellular 2-deoxyglucose-6-phosphate as pH_{nmr} indicators in murine radiation-induced fibrosarcoma-1. *Magn. Reson. Med.* 36 (5):698-704.
40. Gillies R. J., Liu Z., Bhujwala Z. (1994) ^{31}P -MRS measurements of extracellular pH of tumors using 3-aminopropylphosphonate. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 267 (1):C195-C203.
41. Ojugo A. S. E., McSheehy P. M. J., McIntyre D. J. O., McCoy C., Stubbs M., Leach M. O., Judson I. R., Griffiths J. R. (1999) Measurement of the extracellular pH of solid tumours in mice by magnetic resonance spectroscopy: a comparison of exogenous ^{19}F and ^{31}P probes. *NMR Biomed.* 12 (8):495-504.
42. Fisher M., Dillon P. (1987) Phenylphosphonate: a ^{31}P -NMR indicator of extracellular pH and volume in the isolated perfused rabbit bladder. *Circ. Res.* 60 (4):472-477.
43. Clarke K., Anderson R. E., Nedelec J. F., Foster D. O., Ally A. (1994) Intracellular and extracellular spaces and the direct quantification of molar intracellular concentrations of phosphorus metabolites in the isolated rat heart using ^{31}P NMR spectroscopy and phosphonate markers. *Magn. Reson. Med.* 32 (2):181-188.
44. Bruynseels K., Gillis N., Van Hecke P., Vanstapel F. (1997) Phosphonates as ^{31}P -NMR markers of extra- and intracellular space and pH in perfused rat liver. *NMR Biomed.* 10 (6):263-270.
45. DeFronzo M., Gillies R. J. (1987) Characterization of methylphosphonate as a ^{31}P NMR pH indicator. *J. Biol. Chem.* 262 (23):11032-11037.

46. Pietri S., Miollan M., Martel S., Le Moigne F., Blaive B., Culcasi M. (2000) α - and β -phosphorylated amines and pyrrolidines, a new class of low toxic highly sensitive ^{31}P NMR pH indicators: Modeling of pK_a and chemical shift values as a function of substituents. *J. Biol. Chem.* 275 (26):19505-19512.
47. Pietri S., Martel S., Culcasi M., Delmas-Beauvieux M. C., Canioni P., Gallis J. L. (2001) Use of diethyl(2-methylpyrrolidin-2-yl)phosphonate as a highly sensitive extra- and intracellular ^{31}P NMR pH indicator in isolated organs. Direct NMR evidence of acidic compartments in the ischemic and reperfused rat liver. *J. Biol. Chem.* 276 (3):1750-1758.
48. Eykyn T. R., Kuchel P. W. (2003) Scalar couplings as pH probes in compartmentalized biological systems: ^{31}P NMR of phosphite. *Magn. Reson. Med.* 50 (4):693-696.
49. Taylor J. S., Deutsch C., McDonald G. G., Wilson D. F. (1981) Measurement of transmembrane pH gradients in human erythrocytes using ^{19}F NMR. *Anal. Biochem.* 114 (2):415-418.
50. Deutsch C., Taylor J. S., Wilson D. F. (1982) Regulation of intracellular pH by human peripheral blood lymphocytes as measured by ^{19}F NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79 (24 I):7944-7948.
51. Taylor J. S., Deutsch C. (1983) Fluorinated alpha-methylamino acids as ^{19}F NMR indicators of intracellular pH. *Biophys. J.* 43 (3):261-267.
52. Deutsch C., Taylor J. S., Price M. (1984) pH homeostasis in human lymphocytes: Modulation by ions and mitogen. *J. Cell Biol.* 98 (3):885-893.
53. Deutsch C. J., Taylor J. S. (1989) New class of ^{19}F pH indicators: fluoroanilines. *Biophys. J.* 55 (4):799-804.
54. Frenzel T., Koler S., Bauer H., Niedballa U., Weinmann H. J. (1994) Noninvasive *in vivo* pH measurements using a fluorinated pH probe and fluorine-19 magnetic resonance spectroscopy. *Investig. Radiol.* 29:S220-S222.
55. Aoki Y., Akagi K., Tanaka Y., Kawai J., Takahashi M. (1996) Measurement of intratumor pH by pH indicator used in ^{19}F -magnetic resonance spectroscopy: Measurement of extracellular pH decrease caused by hyperthermia combined with hydralazine. *Investig. Radiol.* 31 (11):680-689.

56. Miyazawa T., Aoki Y., Akagi K., Takahashi M., Fritz-Zieroth B., Frenzel T., Weinmann H.-J. (1996) Application of ZK 150 471, a fluorinated pH probe for ^{19}F -magnetic resonance spectroscopy, to in vivo pH measurement after hyperthermic treatment of tumors in mice. *Academic Radiology* 3 (Supplement 2):S363-S364.
57. Mehta V. D., Kulkarni P. V., Mason R. P., Constantinescu A., Aravind S., Goomer N., Antich P. P. (1994) 6-Fluoropyridoxol: A novel probe of cellular pH using ^{19}F NMR spectroscopy. *FEBS Lett.* 349 (2):234-238.
58. He S., Mason R. P., Hunjan S., Mehta V. D., Arora V., Katipally R., Kulkarni P. V., Antich P. P. (1998) Development of novel ^{19}F NMR pH indicators: synthesis and evaluation of a series of fluorinated vitamin B6 analogues. *Bioorg. Med. Chem.* 6 (9):1631-1639.
59. Mason R. P. (1999) Transmembrane pH gradients in vivo: Measurements using fluorinated vitamin B₆ derivatives. *Curr. Med. Chem.* 6 (6):481-499.
60. Arús C., Chang Y.-C., Bárányi M. (1985) The separation of phosphocreatine from creatine, and pH determination in frog muscle by natural abundance ^{13}C -NMR. *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell. Res.* 844 (1):91-93.
61. Chacko V. P., Weiss R. G. (1993) Intracellular pH determination by ^{13}C -NMR spectroscopy. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 264 (3):C755-760.
62. Bányai I., Blixt J., Glaser J., Tóth I. (1992) On the dissociation of hydrogen cyanide in aqueous solutions containing different ionic media. A combined potentiometric and carbon-13 NMR study. *Acta Chem. Scand.* 46:142-146.
63. Bodor A., Bányai I., Zékány L., Tóth I. (2002) Slow dynamics of aluminium-citrate complexes studied by ^1H - and ^{13}C -NMR spectroscopy. *Coord. Chem. Rev.* 228 (2):163-173.
64. Vistad Ø. B., Akporiaye D. E., Taulelle F., Lillerud K. P. (2003) Morpholine, an in situ ^{13}C NMR pH meter for hydrothermal crystallogenes of SAPO-34. *Chem. Mater.* 15 (8):1650-1654.
65. Ward K. M., Balaban R. S. (2000) Determination of pH using water protons and chemical exchange dependent saturation transfer (CEST). *Magn. Reson. Med.* 44 (5):799-802.

66. Zhou J., Payen J.-F., Wilson D. A., Traystman R. J., van Zijl P. C. M. (2003) Using the amide proton signals of intracellular proteins and peptides to detect pH effects in MRI. *Nat. Med.* 9 (8):1085-1090.
67. Zhang S., Winter P., Wu K., Sherry A. D. (2001) A novel europium(III)-based MRI contrast agent. *J. Amer. Chem. Soc.* 123 (7):1517-1518.
68. Aime S., Barge A., Delli Castelli D., Fedeli F., Mortillaro A., Nielsen F. U., Terreno E. (2002) Paramagnetic Lanthanide(III) complexes as pH-sensitive chemical exchange saturation transfer (CEST) contrast agents for MRI applications. *Magn. Reson. Med.* 47 (4):639-648.
69. Aime S., Botta M., Geninatti Cich S., Giovenzana G., Palmisano G., Sisti M. (1999) Novel paramagnetic macromolecular complexes derived from the linkage of a macrocyclic Gd(III) complex to polyamino acids through a squaric acid moiety. *Bioconjugate Chem.* 10 (4):701-701.
70. Zhang S., Wu K., Sherry A. D. (1999) A novel pH-sensitive MRI contrast agent. *Angew. Chem. Int. Ed.* 38 (21):3192-3194.
71. Mikawa M., Miwa N., Bräutigam M., Akaike T., Maruyama A. (2000) Gd³⁺-loaded polyion complex for pH depiction with magnetic resonance imaging. *J. Biomed. Mater. Res.* 49 (3):390-395.
72. Raghunand N., Howison C., Sherry A. D., Zhang S., Gillies R. J. (2003) Renal and systemic pH imaging by contrast-enhanced MRI. *Magn. Reson. Med.* 49 (2):249-257.
73. Szakács Z., Hägele G., Tyka R. (2004) ¹H/³¹P NMR pH indicator series to eliminate the glass electrode in NMR spectroscopic pK_a determinations. *Anal. Chim. Acta* 522 (2):247-258.
74. Baryshnikova O., Williams T., Sykes B. (2008) Internal pH indicators for biomolecular NMR. *J. Biomol. NMR* 41 (1):5-7.
75. Tynkkynen T., Tiainen M., Soininen P., Laatikainen R. (2009) From proton nuclear magnetic resonance spectra to pH. Assessment of ¹H NMR pH indicator compound set for deuterium oxide solutions. *Anal. Chim. Acta* 648 (1):105-112.
76. Avdeef A. (2001) Physicochemical profiling (solubility, permeability and charge state). *Curr. Top. Med. Chem.* 1:277-351.
77. STAN, Sirius Technical Application Notes (1994), vol 1. Sirius Anal. Instr. Ltd., Forest Row,

78. STAN, Sirius Technical Application Notes (1995), vol 2. Sirius Anal. Instr. Ltd., Forest Row,
79. Allred A. L., Rochow E. G. (1957) The nuclear magnetic resonance absorption of hydrogen in methyl groups. The electronegativity of substituents. *J. Amer. Chem. Soc.* 79 (20):5361-5365.
80. Sterk H., Holzer H. (1974) Relation between chemical shifts and charge densities. *Org. Magn. Reson.* 6 (3):133-143.
81. Wishart D. S., Sykes B. D. (1994) Chemical shifts as a tool for structure determination. *Methods in Enzymology* 239:363-392.
82. Koeberg-Telder A., Cerfontain H. (1975) Solutes in sulphuric acid. Part VI. A nuclear magnetic resonance study of organic sulphonic acids and ^1H nuclear magnetic resonance standards; pK_{BH} determination of sulphonic acids. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* (3):226-229.
83. Hammett L. P., Deyrup A. J. (1932) A series of simple basic indicators. I. The acidity functions of mixtures of sulfuric and perchloric acids with water. *J. Amer. Chem. Soc.* 54 (7):2721-2739.
84. Perrin C. L., Fabian M. A. (1996) Multicomponent NMR titration for simultaneous measurement of relative pK_{a} s. *Anal. Chem.* 68 (13):2127-2134.
85. Szakács Z., Noszál B. (2006) Determination of dissociation constants of folic acid, methotrexate, and other photolabile pteridines by pressure-assisted capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 27 (17):3399-3409.
86. Wegscheider R. (1895) Über die Affinitätsconstanten der mehrbasischen Säuren und der Estersäuren. *Monatsh. Chem.* 16 (1):153-158.
87. Noszál B. (1986) Group constant: A measure of submolecular basicity. *J. Phys. Chem.* 90 (17):4104-4110.
88. Szakács Z., Noszál B. (1999) Protonation microequilibrium treatment of polybasic compounds with any possible symmetry. *J. Math. Chem.* 26 (1):139-155.
89. Borkovec M., Spiess B. (2004) Microscopic ionization mechanism of inositol tetrakisphosphates. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 6 (6):1144-1151.
90. Bencini A., Bianchi A., Garcia-España E., Micheloni M., Ramirez J. A. (1999) Proton coordination by polyamine compounds in aqueous solution. *Coord. Chem. Rev.* 188 (1):97-156.

91. Santos A. M., Esteves A. M., Vaz C. M., Frausto da Silva J. J. R., Noszal B., Farkas E. (1997) Microscopic acid-base equilibria of a synthetic hydroxamate siderophore analog, piperazine-1,4-bis(N-methylacetohydroxamic acid). *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* (10):1977-1983.
92. Marosi A., Kovács Z., Béni S., Kökösi J., Noszal B. (2009) Triprotic acid-base microequilibria and pharmacokinetic sequelae of cetirizine. *Eur. J. Pharm. Sci.* 37 (3-4):321-328.
93. Ebert L. (1926) Determination of double ions in solution of ampholytes. *Z. Phys. Chem.* 121:385-400.
94. Gajda T., Henry B., Delpuech J.-J. (1994) Multinuclear NMR and potentiometric study on t automerism during protonation and zinc(II) complex formation of some imidazole-containing peptide derivatives. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* (1):157-164.
95. Neuberger A. (1936) Dissociation constants and structures of glutamic acid and its esters. *Biochem. J.* 30 (11):2085-2094.
96. Noszal B., Sandor P. (1989) Rota-microspeciation of aspartic acid and asparagine. *Anal. Chem.* 61 (23):2631-2637.
97. Szilágyi L., Pusztahelyi Z. S., Jakab S., Kovács I. (1993) Microscopic protonation constants in tobramycin. An NMR and pH study with the aid of partially N-acetylated derivatives. *Carbohydr. Res.* 247:99-109.
98. Kovács Z., Hosztafi S., Noszal B. (2006) Site-specific acid-base properties of pholcodine and related compounds. *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (6):1709-1716.
99. Burger K., Sipos P., Véber M., Horváth I., Noszal B., Löw M. (1988) Formation microequilibria of proton, calcium and magnesium complexes of the γ -carboxyglutamate ion and related compounds. *Inorg. Chim. Acta* 152 (4):233-239.
100. Borkovec M., Brynda M., Koper G. J. M., Spiess B. (2002) Resolution of microscopic protonation mechanisms in polyprotic molecules. *Chimia* 56 (12):695-701.
101. Hagen R., Roberts J. D. (1969) Nuclear magnetic resonance spectroscopy. Carbon-13 spectra of aliphatic carboxylic acids and carboxylate anions. *J. Amer. Chem. Soc.* 91 (16):4504-4506.
102. Rabenstein D. L., Hari S. P., Kaerner A. (1997) Determination of acid dissociation constants of peptide side-chain functional groups by two-dimensional NMR. *Anal. Chem.* 69 (21):4310-4316.

103. Rabenstein D. L., Sayer T. L. (1976) Determination of microscopic acid dissociation constants by nuclear magnetic resonance spectrometry. *Anal. Chem.* 48 (8):1141-1146.
104. Witanowski M., Stefaniak L., Webb G. A. (1987) Nitrogen NMR Spectroscopy. *Annual Reports on NMR Spectroscopy* 18:1-211.
105. Takeda Y., Samejima K., Nagano K., Watanabe M., Sugeta H., Kyogoku Y. (1983) Determination of protonation sites in thermospermine and in some other polyamines by ^{15}N and ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Eur. J. Biochem.* 130 (2):383-389.
106. Craik D. J., Levy G. C., Lombardo A. (1982) Carbon-13 and nitrogen-15 nuclear magnetic resonance of polycyclic polyamines. A study of solution nitrogen-hydrogen hydrogen bonding and protonation. *J. Phys. Chem.* 86 (19):3893-3900.
107. Botto R. E., Coxon B. (1983) Nitrogen-15 nuclear magnetic resonance spectroscopy of neomycin B and related aminoglycosides. *J. Amer. Chem. Soc.* 105 (4):1021-1028.
108. Kricheldorf H. R. (1981) ^{15}N -NMR spectroscopy 32. Synthesis and characterization of polyelectrolytes based on polyaminamides. *J. Polymer Sci. Polymer Chem.* 19 (9):2195-2214.
109. Kanamori K., Roberts J. D. (1983) A nitrogen-15 NMR study of the barriers to isomerization about guanidinium and guanidino carbon-nitrogen bonds in L-arginine. *J. Amer. Chem. Soc.* 105 (14):4698-4701.
110. Naulet N., Tomé D., Martin G. J. (1983) ^{15}N NMR studies of amino acids and their reaction products with formaldehyde. *Org. Magn. Reson.* 21 (9):564-566.
111. Witanowski M., Stefaniak L., Webb G. A. (1982) Nitrogen NMR Spectroscopy. *Annual Reports on NMR Spectroscopy* 11B:1-486.
112. Tai A. W., Lien E. J., Moore E. C., Chun Y., Roberts J. D. (1983) Studies of N-hydroxy-N'-aminoguanidine derivatives by nitrogen-15 nuclear magnetic resonance spectroscopy and as ribonucleotide reductase inhibitors. *J. Med. Chem.* 26 (9):1326-1329.
113. Lewenhoeck D. A. (1677) *Observationes D. Anthonii Lewenhoeck, De Natis E Semine Genitali Animalculis.* *Phil. Trans.* 12:1040-1046.

114. Morgan D. M. L. (1998) Polyamines: an introduction. In: Morgan D. M. L. (ed) Polyamine Protocols. Methods in Molecular Biology, vol 79. Humana Press, Totowa, NJ, pp 3-30
115. Russell D., Snyder S. H. (1968) Amine synthesis in rapidly growing tissues: ornithine decarboxylase activity in regenerating rat liver, chick embryo, and various tumors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 60 (4):1420-1427.
116. Morgan D. M. L. (1990) Polyamines and cellular regulation: perspectives. Biochem Soc. Trans. 18:1080-1084.
117. Gerner E. W., Meyskens F. L. (2004) Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. Nat. Rev. Cancer. 4 (10):781-792.
118. Casero R. A., Marton L. J. (2007) Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases. Nat. Rev. Drug Discov. 6 (5):373-390.
119. Levin V. A., Hess K. R., Choucair A., Flynn P. J., Jaeckle K. A., Kyritsis A. P., Yung W. K. A., Prados M. D., Bruner J. M., Ictech S., Gleason M. J., Kim H.-W. (2003) Phase III randomized study of postradiotherapy chemotherapy with combination α -difluoromethylornithine-PCV versus PCV for anaplastic gliomas. Clin. Cancer Res. 9 (3):981-990.
120. Igarashi K., Kashiwagi K. (2000) Polyamines: Mysterious Modulators of Cellular Functions. Biochem. Biophys. Res. Comm. 271 (3):559-564.
121. Wang J. Y., Johnson L. R. (1990) Luminal polyamines stimulate repair of gastric mucosal stress ulcers. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 259 (4):G584-G592.
122. Wang J. Y., Johnson L. R. (1991) Polyamines and ornithine decarboxylase during repair of duodenal mucosa after stress in rats. Gastroenterology 100 (2):333-343.
123. Babal P., Manuel S. M., Olson J. W., Gillespie M. N. (2000) Cellular disposition of transported polyamines in hypoxic rat lung and pulmonary arteries. Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol. 278 (3):L610-L617.
124. Ahuja V., Abrams J. M., Tantry U., Park J., Barbul A. (2003) Effect of difluoromethylornithine, a chemotherapeutic agent, on wound healing. J. Surg. Res. 114 (2):308-309.
125. Grassilli E., Desiderio M. A., Bellesia E., Salomoni P., Benatti F., Franceschi C. (1995) Is polyamine decrease a common feature of apoptosis? Evidence from γ -rays- and heat shock-induced cell death. Biochem. Biophys. Res. Comm. 216 (2):708-714.

126. Williams K. (1997) Modulation and block of ion channels: A new biology of polyamines. *Cell. Signal.* 9 (1):1-13.
127. Guggisberg A., Hesse M. (1984) Putrescine, spermidine, spermine, and related polyamine alkaloids. In: Arnold B. (ed) *The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology*, vol 22. Academic Press, New York, pp 85-188
128. Leete E. (1990) Recent developments in the biosynthesis of the tropane alkaloids. *Planta Med.* 56 (04):339-352.
129. Niwa H., Watanabe M., Yamada K. (1993) Monodontamides A, B, and C, three new putrescine alkaloids from the marine gastropod mollusc *Monodonta labio* (Linné). *Tetrahedron Lett.* 34 (46):7441-7444.
130. Lounasmaa M., Tamminen T. (1994) The tropane alkaloids. In: Geoffrey A. C. (ed) *The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology*, vol 44. Academic Press, pp 1-114
131. Saccomano N. A., Volkmann R. A., Jackson H., Parks T. N. (1989) Polyamine spider toxins: unique pharmacological tools. In: Richard C. A. (ed) *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, vol 24. Academic Press, New York, pp 287-293
132. Jasys V. J., Kelbaugh P. R., Nason D. M., Phillips D., Rosnack K. J., Saccomano N. A., Stroh J. G., Volkmann R. A. (1990) Isolation, structure elucidation, and synthesis of novel hydroxylamine-containing polyamines from the venom of the *Agelenopsis aperta* spider. *J. Amer. Chem. Soc.* 112 (18):6696-6704.
133. Hamana K., Matsuzaki S. (1982) Widespread occurrence of norspermidine and norspermine in eukaryotic algae. *J. Biochem.* 91 (4):1321-1328.
134. Hamana K., Niitsu M., Samejima K. (1998) Unusual polyamines in aquatic plants: the occurrence of homospermidine, norspermidine, thermospermine, norspermine, aminopropylhomospermidine, bis(aminopropyl)ethanediamine, and methylspermidine. *Can. J. Bot.* 76 (1):130-133.
135. Kimberly M. M., Goldstein J. H. (1981) Determination of pK_a values and total proton distribution pattern of spermidine by carbon-13 nuclear magnetic resonance titrations. *Anal. Chem.* 53 (6):789-793.
136. Onasch F., Aikens D., Bunce S., Schwartz H., Nairn D., Hurwitz C. (1984) The interactions between nucleic acids and polyamines : III. Microscopic protonation constants of spermidine. *Biphys. Chem.* 19 (3):245-253.

137. Frassinetti C., Alderighi L., Gans P., Sabatini A., Vacca A., Ghelli S. (2003) Determination of protonation constants of some fluorinated polyamines by means of ^{13}C NMR data processed by the new computer program HypNMR2000. Protonation sequence in polyamines. *Anal. Bioanal. Chem.* 376 (7):1041-1052.
138. De Stefano C., Giuffrè O., Sammartano S. (1998) Thermodynamic parameters for the binding of ATP by protonated open-chain polyamines. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 94 (8):1091-1095.
139. Mernissi-Arifi K., Zenkour M., Schlewer G., Spiess B. (1996) Quantitative investigation of the interactions between inositol-tris(phosphates) and polyamines. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 92 (17):3101-3107.
140. Labadi I., Jenei E., Lahti R., Lönnberg H. (1991) Interaction of pyrophosphate ion with di-, tri- and tetra-amines in aqueous solution: a potentiometric and calorimetric study. *Acta. Chem. Scand.* 45 (10):1055-1059.
141. Templeton D. M., Sarkar B. (1985) Fletcher–Powell minimization of analytical potentiometric data by microcomputer: application to the Cu(II) complexes of biological polyamines. *Can. J. Chem.* 63 (11):3122-3128.
142. Delfini M., Segre A. L., Conti F., Barbucci R., Barone V., Ferruti P. (1980) On the mechanism of protonation of triamines. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 2 (6):900-903.
143. Kanavarioti A., Baird E. E., Smith P. J. (1995) Use of Phosphoimidazolide-Activated Guanosine to Investigate the Nucleophilicity of Spermine and Spermidine. *J. Org. Chem.* 60 (15):4873-4883.
144. Palmer B. N., Powell H. K. J. (1974) Polyamine complexes with seven-membered chelate rings: complex formation of 3-azaheptane-1,7-diamine, 4-aza-octane-1,8-diamine (spermidine), and 4,9-diazadodecane-1,12-diamine (spermine) with copper(II) and hydrogen ions in aqueous solution. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* (19):2089-2092.
145. Jastrzab R., Lomozik L. (2008) Non-Covalent Interaction in Binary Thymidine/Polyamine Systems in Aqueous Solution. *J. Solution Chem.* 37 (7):1015-1029.
146. Dagnall S. P., Hague D. N., Moreton A. D. (1988) Zinc(II) complexes of dipropylenetriamine and N-(2-aminoethyl)propane-1,3-diamine: a carbon-13 nuclear magnetic resonance study. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* (7):1989-1997.

147. Hares G. B., Fernelius W. C., Douglas B. E. (1956) Equilibrium constants for the formation of complexes between metal ions and polyamines. *J. Amer. Chem. Soc.* 78 (9):1816-1818.
148. May B. L., Kean S. D., Easton C. J., Lincoln S. F. (1997) Preparation and characterization of 6^A-polyamine-mono-substituted β -cyclodextrins. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* (21):3157-3160.
149. De Stefano C., Giuffrè O., Sammartano S. (2005) Protonation constants of ethylenediamine, diethylenetriamine, and spermine in NaCl(aq), NaI(aq), (CH₃)₄NCl(aq), and (C₂H₅)₄NI(aq) at different ionic strengths and $t = 25$ °C. *J. Chem. Eng. Data* 50 (6):1917-1923.
150. Bergeron R. J., Weimar W. R., Wu Q., Feng Y., McManis J. S. (1996) Polyamine analogue regulation of NMDA MK-801 binding: A structure–activity study. *J. Med. Chem.* 39 (26):5257-5266.
151. Geall A. J., Blagbrough I. S., Taylor R. J., Earll M. E., Eaton M. A. W. (1998) Synthesis of cholesterol-polyamine carbamates: pK_a studies and condensation of calf thymus DNA. *Chem. Comm.* (13):1403-1404.
152. Abate L., Stefano C. D., Foti C., Sammartano S. (1999) Binding of glyphosate by open-chain polyammonium cations. *Environ. Toxicol. Chem.* 18 (10):2131-2137.
153. Hague D. N., Moreton A. D. (1994) Protonation sequence of linear aliphatic polyamines by ¹³C NMR spectroscopy. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* (2):265-270.
154. Sudmeier J. L., Reilley C. N. (1964) Nuclear magnetic resonance studies of protonation of polyamine and aminocarboxylate compounds in aqueous solution. *Anal. Chem.* 36 (9):1698-1706.
155. Krentz A. J., Bailey C. J. (2005) Oral antidiabetic agents: Current role in type 2 diabetes mellitus. *Drugs* 65 (3):385-411.
156. Jermendy G. (2005) A diabetes mellitus kórismézése, a cukorbetegség kezelése és gondozása a felnőttkorban. *Diabetol. Hung.* 14:1. supplementum.
157. Wellman K. M., Harris D. L., Murphy P. J. (1967) Structure of mono-, di-, and tri-protonated biguanides. *Chem. Comm.* (12):568-569.
158. Hale, Kristensen, Hackett, Kohan, Ilett (2002) Transfer of metformin into human milk. *Diabetologia* 45 (11):1509-1514.

159. Bristol-Myers-Squibb (2008) GLUCOPHAGE® alkalmazási előirat http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2008/020357s031,021202s016lbl.pdf.
160. Beckmann R. (1968) The fate of biguanides in man. Ann. New York Acad. Sci. 148 (3):820-832.
161. Beaumier L., Castillo L., Ajami A. M., Young V. R. (1995) Urea cycle intermediate kinetics and nitrate excretion at normal and "therapeutic" intakes of arginine in humans. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 269 (5):E884-896.
162. Castillo L., Beaumier L., Ajami A. M., Young V. R. (1996) Whole body nitric oxide synthesis in healthy men determined from [15N] arginine-to-[15N]citrulline labeling. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93 (21):11460-11465.
163. Lewis B., Langkamp-Henken B. (2000) Arginine enhances *in vivo* immune responses in young, adult and aged mice. J. Nutr. 130 (7):1827-1830.
164. Maxwell A. J., P J. C. (1998) Cardiovascular effect of L-arginine. Curr. Opin. Nephrol. Hypertens. 7 (1):63-70.
165. Wu G., Meininger C. J. (2000) Arginine nutrition and cardiovascular function. J. Nutr. 130 (11):2626-2629.
166. Curis E., Nicolis I., Moinard C., Osowska S., Zerrouk N., Bénazeth S., Cynober L. (2005) Almost all about citrulline in mammals. Amino Acids 29 (3):177-205.
167. Bendahan D., Mattei J. P., Ghattas B., Confort-Gouny S., Le Guern M. E., Cozzone P. J. (2002) Citrulline/malate promotes aerobic energy production in human exercising muscle. Br. J. Sports Med. 36 (4):282-289.
168. Ishida-Yamamoto A., Senshu T., Takahashi H., Akiyama K., Nomura K., Iizuka H. (2000) Decreased Deiminated Keratin K1 in Psoriatic Hyperproliferative Epidermis. J. Investig. Dermatol. 114 (4):701-705.
169. Moscarello M. A., Pritzker L., Mastronardi F. G., Wood D. D. (2002) Peptidylarginine deiminase: a candidate factor in demyelinating disease. J. Neurochem. 81 (2):335-343.
170. Nicholas A. P., Sambandam T., Echols J. D., Tourtellotte W. W. (2004) Increased citrullinated glial fibrillary acidic protein in secondary progressive multiple sclerosis. J. Comp. Neurol. 473 (1):128-136.

171. van Venrooij W., Pruijn G. (2000) Citrullination: a small change for a protein with great consequences for rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 2 (4):1-3.
172. György B., Tóth E., Tarsas E., Falus A., Buzás E. I. (2006) Citrullination: A posttranslational modification in health and disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38 (10):1662-1677.
173. Noszál B., Kassai-Tánczos R. (1991) Microscopic acid-base equilibria of arginine. *Talanta* 38 (12):1439-1444.
174. Carey F. A. (2000) *Organic chemistry*. McGraw-Hill, Columbus, OH, p. 1059
175. Dissociation constants of organic acids and bases (2009). In: Lide R. D. (ed) *CRC handbook of chemistry and physics*. 90th edn. CRC Press/Taylor and Francis, Boca Raton, FL, pp 8-42 - 48-51
176. Schatz A., Bugie E., Walkman S. A. (1944) Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 55:66-69.
177. Cox E. C., White J. R., Flaks J. G. (1964) Streptomycin action and the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 51 (4):703-709.
178. Davies J. E. (1964) Studies on the ribosomes of streptomycin sensitive and resistant strains of *Escherichia Coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 51 (4):659-664.
179. Davies J., Gilbert W., Gorini L. (1964) Streptomycin, suppression, and the code. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 51 (5):883-890.
180. Rougier F., Claude D., Maurin M., Sedoglavic A., Ducher M., Corvaisier S., Jelliffe R., Maire P. (2003) Aminoglycoside nephrotoxicity: modeling, simulation, and control. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47 (3):1010-1016.
181. Waguespack J. R., Ricci A. J. (2005) Aminoglycoside ototoxicity: permeant drugs cause permanent hair cell loss. *J. Physiol.* 567 (2):359-360.
182. Latorre M., Peñalver P., Revuelta J., Asensio J. L., García-Junceda E., Bastida A. (2007) Rescue of the streptomycin antibiotic activity by using streptidine as a "decoy acceptor" for the aminoglycoside-inactivating enzyme adenyl transferase. *Chem. Comm.* (27):2829-2831.
183. Nys P. S., Savitskaya E. M., Kolygina T. S. (1971) Determination of ionization constants of streptomycin by the indicator method. *Pharm. Chem. J.* 5 (9):576-579.

184. Li J., Sha Y. (2008) A convenient synthesis of amino acid methyl esters. *Molecules* 13 (5):1111-1119.
185. Lebreton L., Annat J., Derrepas P., Dutartre P., Renaut P. (1999) Structure-immunosuppressive activity relationships of new analogues of 15-deoxyspergualin. 1. Structural modifications of the hydroxyglycine moiety. *J. Med. Chem.* 42 (2):277-290.
186. Vogl O., Rehman A.-u., Zarras P. (2000) Polycationic Salts V [1]. ^{15}N NMR spectra of amines, ammonium salt monomers, and polymers of styrene based trialkylammonium salts. *Monatsh. Chem.* 131 (5):437-449.
187. Hwang T. L., Shaka A. J. (1995) Water suppression that works. Excitation sculpting using arbitrary wave-forms and pulsed-field gradients. *J. Magn. Reson. A* 112 (2):275-279.
188. Hoult D. I. (1976) Solvent peak saturation with single phase and quadrature fourier transformation. *J. Magn. Reson.* 21 (2):337-347.
189. Schenck J. R., Spielman M. A. (1945) The formation of maltol by the degradation of streptomycin. *J. Amer. Chem. Soc.* 67 (12):2276-2277.
190. Drog M. (2009) Basics on Uncertainties. In: *Dealing with Uncertainties*. Springer Berlin Heidelberg, pp 17-48
191. Frassinetti C., Ghelli S., Gans P., Sabatini A., Moruzzi M. S., Vacca A. (1995) Nuclear magnetic resonance as a tool for determining protonation constants of natural polyprotic bases in solution. *Anal. Biochem.* 231 (2):374-382.

10. Saját publikációk jegyzéke

10.1. Az értekezés alapját képező közlemények

1. Orgován G., Noszál B. (2011) Electrodeless, accurate pH determination in highly basic media using a new set of ^1H NMR pH indicators. J. Pharm. Biomed. Anal. 54 (5):958-964.
2. Orgován G., Noszál B. (2011) The complete microspeciation of arginine and citrulline. J. Pharm. Biomed. Anal. 54 (5):965-971.

10.2. Más témákhoz kapcsolódó közlemények

1. Orgován G., Tihanyi K., Noszál B. (2009) NMR analysis, protonation equilibria and decomposition kinetics of tolperisone. J. Pharm. Biomed. Anal. 50 (5):718-723.
2. Orgován G., Noszál B. (2011) Transporterization: a tool for drug delivery. In: Tihanyi K., Vastag M. (eds) Solubility, Delivery and ADME problems of drugs and drug-candidates. Bentham Science Publishers, *közlésre elfogadva*,

Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek, Dr. Noszál Béla tanszékvezető egyetemi tanárnak, a már diákkörös hallgatóként is nyújtott szakmai támogatásért és munkám irányításáért.

Köszönet illeti Dr. Szakács Zoltánt, a Richter Gedeon Nyrt. munkatársát az értékes konzultációkért és az NMR mérésekhez nyújtott segítségéért. Szeretném megköszönni Dr. Mazák Károly egyetemi adjunktusnak a potenciometriás mérések megtervezésében és kiértékelésében nyújtott segítségét, valamint Mazákné Dr. Kraszni Márta egyetemi adjunktusnak és Dr. Béni Szabolcs egyetemi tanársegédnek az NMR mérésekhez nyújtott útmutatásukat.

Hálával tartozom a G yógyszerészi Kémiai Intézet valamennyi munkatársának a baráti atmoszféra megteremtéséért. Külön szeretném Dr. Bohus Eszter tudományos segédmunkatársnak megköszönni az irodalmazásban nyújtott segítségét.

Köszönöm Dr. Szőke Éva egyetemi tanárnak, a Gyógyszertudományi Doktori Iskola vezetőjének, hogy doktori tanulmányait elvégezhettem, valamint a számomra megítélt predoktori ösztöndíjat.

Végül, de kiemelten szeretném hálás köszönetemet kifejezni Feleségemnek és Szüleimnek, hogy nyugodt, szeretetteljes háttérrel biztosítottak számomra.