

L-Histidinin Proton-Ligand Kompleks Dengelerinin Potansiyometrik Metotla İncelenmesi

Investigation of Proton-Ligand Complex Equilibria of L-Histidine By Potentiometric Method

Yüksel ALTUN*

*G.Ü. Gazi Eğitim Fakültesi, Ort. Öğrt. Fen ve Mat. Alan. Eğt. Böl., Kimya Eğitimi Anbl. Dalı, Teknikokullar/Ankara

ÖZET

Bu çalışmada, L-histidinin proton-ligand kompleks dengeleri potansiyometrik titrasyon metodu ile modifiye edilmiş kombine cam pH elektrodu kullanılarak, $25,00 \pm 0,01^{\circ}C$ 'de, 0,1 M iyonik şiddette ve azot atmosferinde incelenmiştir. L-histidinin karboksilat grubunun protonasyon dengesinin gerçekleştiği pH'nın 2'den küçük olması nedeni ile E^0, s parametrelerine ilave olarak J_H parametresi belirlenmiştir. E^0, s ve J_H parametrelerinin kullanılması ile belirlenen pH değerleri (düzeltilmiş pH) kullanılarak stokiyometrik protonasyon sabitleri BEST bilgisayar programı ile belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Potansiyometri, Protonasyon sabiti, L-Histidin,

ABSTRACT

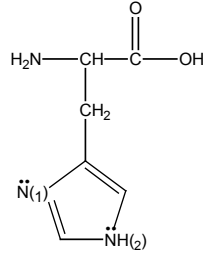
In this research, proton-ligand complex equilibrium of L-histidine was investigated using a modified glass-combined pH-electrode at $25.00 \pm 0.01^{\circ}C$, 0.1 M ionic medium and under nitrogen atmosphere by potentiometric titration method. J_H parameter should be determined in addition to E^0, s due to the fact the pH value at which the protonation equilibrium of the carboxylate group of histidine is lower than 2. The calculation of stoichiometric protonation constants of L-histidine has been carried out by BEST computer programme using pH (corrected pH) determined by the use of E^0, s and J_H parameters.

Keywords: Potentiometry, Protonation constant, L-Histidine,

GİRİŞ

Histidin, biyolojik öneme sahip iki azot atomu bulunduran aromatik bir imidazol halkası içerdiğinden, diğer amino asitlerden farklı özelliklere sahip olup, bu iki azot atomundan biri olan imidazol azotu biyolojik olarak önemli bir pH aralığı olan pH 6-7' de protonlanmaktadır (Pettit, 1984; Zabronsky, 1986). Bir histidin birimi olarak imidazol halkası, biyolojik olarak önemli moleküllerin bir kısmında geçiş metal iyonlarına karşı ligand olarak davrandığı gibi, genellikle bir çok metalloproteinlerin ve karbonik anhidraz, azurin, karboksipeptidaz, superoksit dismutaz gibi bir çok metaloenzimlerin metal bağlayan uçlarını oluşturduğundan biyolojik olarak oldukça önemli bir donör grup olarak oldukça önemli bir donör grup olarak dikkat çekmektedir (Uyar, 1990; Zabronsky, 1986). L-histidin gibi aromatik bir süstitüent olan fenilalanin, tyrosin, Dopa ve triptophan gibi süstitüentlerin geçiş metal iyonları ile oldukça önemli etkileşimleri olmasına rağmen, bu ligandlardaki etkileşim histidinden daha azdır ve termodinamik olarak daha az bir öneme sahiptir (Pettit, 1984). Bu nedenle, hem biyolojik olarak hem de kimyasal olarak diğer amino asit bileşenlerinden farklılıklar gösteren histidin ile ilgili problemlerin cevaplanabilmesi için L-histidinin ilgili donör merkezlerinin hidrojen ve metal iyonu ile etkileşimi ile ilgili bazı kantitatif bilgilerin belirlenmesinin önemli ve gerekli olduğu açıktır.

Bir ligand ve bir hidrojen iyonu arasında oluşan bir proton-ligand kompleksinin kararlılığını ve oluşum şartlarını en iyi belirleyen kantitatif faktör ise oluşan kompleksin $K_1=[HA]/[H].[A]$, $K_2=[H_2A]/[HA].[H]$, $K_n=[H_nA]/[HA].[H]$ gibi eşitlikler ile ifade edilebilen protonasyon sabiti ifadeleridir. Protonasyon sabiti ifadelerinden de anlaşılacağı gibi L-histidin ve bu gibi ligandların spesifik asit-baz tepkimelerinin ve her bir ligandın hidrojen iyonu ile kompleksleşme yeteneğinin pH değişimlerinin takip edilmesi ile mümkün olduğu söylenebilir. pH değişimlerinin takip edilmesi için ise en uygun yöntem potansiyometrik titrasyon yöntemi olup proton ve metal kompleks dengelerinin incelenmesi için kullanılan en uygun ve en başarılı tekniklerden biridir (Martell and Motakaitis, 1990).



Şekil 1. L-Histidin

Bu çalışmada, potansiyometrik titrasyon metodu ile belirlenmesi amaçlanan Şekil 1’de verilen L-histidinin ilgili protonasyon sabitlerinin stokiyometrik sabitler olabilmesi için potansiyometrik titrasyon hücresinin kalibre edilme yollarının ve doğruluğu mümkün olduğu kadar yüksek protonasyon sabitleri elde edebilmek için metod ile ilgili son literatürler incelenerek gerekli deneysel şartların en uygunun sağlanması amaçlanmıştır. Bu amaçla, amino azotu (-NH₂), imidazol azotu (-N=) ve karboksilat oksijeni (-COO⁻) olmak üzere üç protonasyon merkezine sahip olan L-histidinin protonasyon sabitlerinin büyüklükleri ile ilgili olarak bir ön inceleme yapılmıştır. Yapılan ön incelemede, histidinin amino ve imidazol azotu ile ilgili protonasyon dengeleri uygun bir pH aralığında meydana gelirken, karboksilat grubu ile ilgili protonasyon dengesinin ise pH<2 bölgesinde meydana geldiği belirlenmiştir. Dolayısıyla, L-histidinin özellikle karboksilat grubu ile ilgili protonasyon dengesinin denge sabitinin ve bu tip ligandların komplekslerinin oluşum sabitlerinin belirlenmesi için çalışılan ortamın pH’sının en azından pH 2’ nin altında olması gerektiği açıktır. Fakat, bu durumda cam elektrodun kalibrasyonun da bazı farklılıklar söz konusudur (Altun, 2000). Çünkü, potansiyometrik titrasyonda kullanılan cam elektrotların 2<pH<12 bölgelerindeki pH cevabı çok asidik pH’larda yani, pH<2 bölgesindeki pH cevabından farklılıklar göstermektedir. 2<pH<12 aralığında çalışılan bir sistem için temas potansiyelinin sabit bir değeri olmasına rağmen pH<2 bölgesinde deney çözeltisinin elektrolitinin bileşiminde önemli bir değişim söz konusu olduğundan (örneğin; L-histidin gibi ligandların protonasyon sabitinin belirlenmesi amacıyla yapılan çok düşük pH’larda yapılan titrasyonlarda, ortamda bolca bulunan hidrojen iyonları ile potasyum iyonlarının yer değiştirmesi sonucunda) temas potansiyelinde bir değişim söz konusudur. Bu değişim, elektrot potansiyelinin okunmasında bir hataya neden olur. Sonuç olarak, pH’nın 2’den küçük olduğu kuvvetli asitlerin sulu veya susuz çözeltilerinde elektrot potansiyeli (emf) ile pH arasındaki

lineerlikte bir sapmanın varlığından bahsedilebilir (Avdeef, 1983, Beck and Bottom, 1968). Bu nedenle, düşük pH'larda ($\text{pH} < 2$) cam elektrotla okunan potansiyelin bir fonksiyonu olarak hidrojen iyonu konsantrasyonunun değerlendirilmesi için Nernst eşitliği yerine aşağıda verilen eşitlik geçerlidir (Avdeef and Bucher, 1978).

$$E = E^0 + s \log[H] + J_H[H] \quad (1)$$

$\text{pH} < 2$ bölgelerinde geçerli olan bu eşitlikten de görülebileceği gibi bu pH bölgelerinde yapılan potansiyometrik çalışmalarda pH'nın belirlenmesinde temas potansiyeli düzeltilmesinin yapılması, yani lineer olmayan bir kalibrasyon parametresi olan temas potansiyeli düzeltilmesi olarak bilinen J_H parametresinin belirlenmesi gereklidir. Aksi takdirde, mV okumalarının ve dolayısıyla pH belirlenmesinin sebep olduğu hatalar nedeni ile kalibrasyon parametrelerinin ve dolayısıyla düşük protonasyon sabitine sahip olan L-histidin ve bu gibi ligandların protonasyon sabitinin güvenilir ve doğru değerlerini elde etmek mümkün olmayacaktır.

Bu nedenle, bu çalışmada L-histidinin protonasyon sabitinin belirlenmesi için kullanılan potansiyometrik titrasyon hücresinin kalibrasyonunun Eşitlik 1'in esas alınması suretiyle yapılması ve Nernst eşitliğinin geçerli olduğu $2 < \text{pH} < 12$ pH bölgelerinde yapılan kalibrasyonlarda belirlenen E^0 ve s parametrelerine ilave olarak üçüncü bir parametre olan J_H parametresinin belirlenerek protonasyon sabitlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

DENEYSEL ŞARTLAR

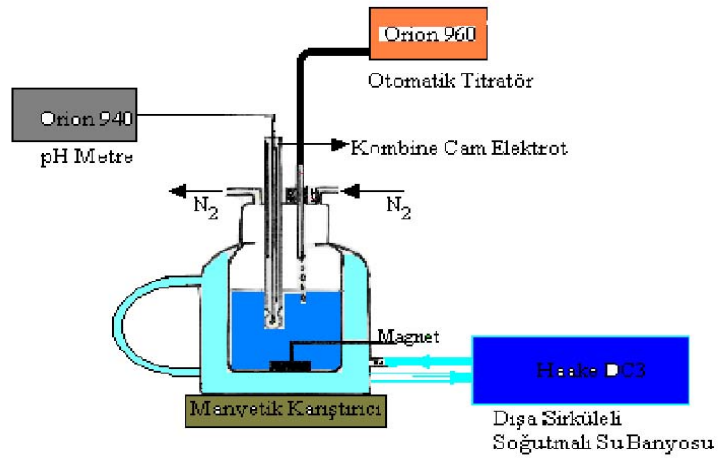
Kimyasallar ve Standart Çözeltiler

Çalışmamızda protonasyon sabitlerinin belirlenmesi amaçlanan, L-histidinin deiyonize su kullanılarak hazırlanan 0,03 M'lık stok çözeltileri silika jel içeren desikatörde bekletilen L-histidinden hazırlanmış ve deneylerde daima taze çözeltileri kullanılmıştır. L-histidin (%99>) Merck'ten temin edilmiş olup hazırlanan stok çözeltilerin safsızlığı potansiyometrik titrasyon metodu ile kontrol edilmiştir. Titrant olarak kullanılan karbonatsız 0,1 M KOH (Merck) çözeltilerinin konsantrasyonu Gran metodu ile potasyum asit ftalata karşı (Gran, 1950; Gran, 1952) belirlenmiştir. Hidroklorik asit

çözeltilerinin (Merck, %33) konsantrasyonu ayarlı baz (KOH) çözeltisine karşı Gran metodu kullanılarak belirlenmiştir. Kimyasal olarak saf KCl'ün 1 M'lık stok çözeltileri deiyonize su kullanılarak hazırlanmış ve çalışmamızda kullanılan potansiyometrik titrasyon hücrelerinin iyonik kuvvetini sabit tutmak için kullanılmıştır.

Kullanılan Cihaz

Potansiyometrik titrasyonlar inert azot (N_2) atmosferinde $25,00 \pm 0,01^\circ C$ 'da Şekil 2'de gösterilen cam reaksiyon kabında yapılmıştır. Titrantın otomatik olarak ilavesi ve her bir titrant ilavesinden sonra potansiyel verilerinin (mV) toplanması için ORION 940 pH metre ve yazıcı bağlı otomatik titratör kullanılmıştır. Ölçümlerde Ingold marka 9811-10402331 seri nolu kombine cam elektrot kullanılmıştır. Sıvı temas potansiyelini en aza indirmek için referans kısmının dolgu çözeltisi olan gümüş klorürle doymuş KCl çözeltisi boşaltılarak yerine 0,1 M KCl çözeltisi doldurulmuştur. Cam elektrodun aktif yüzeyinin dehidrasyonundan sakınmak için kullanılmadığı zamanlar sulu çözeltilerde saklanmıştır (Bates, 1954). Sıcaklık ise Haake DC3 model $\pm 0,01^\circ C$ sıcaklık hassasiyetli sirkülayonlu su banyosu ile sabit tutulmuştur.



Şekil 2. Potansiyometrik Titrasyon Hüresi

Kullanılan Hücrenin Kalibrasyonu

L-histidinin pH'nın 2'den küçük olduğu pH bölgesinde meydana gelen protonasyon dengesi ($-\text{COO}^-$) ile ilgili protonasyon sabiti ile birlikte diğer protonasyon merkezlerinin ($-\text{NH}_2$, $-\text{N}=\text{}$) protonasyon sabitlerinin belirlenmesi amacıyla kuvvetli bir asidin kuvvetli bir baz ile titrasyonundan faydalanılarak kalibrasyon parametreleri E^0 , s ve J_H 'ın belirlenmesi için Şekil 2'deki potansiyometrik titrasyon hücresinin pH'sı yaklaşık 1,6 olacak şekilde hidroklorik asit ile asitlendirilmiştir. Ortamın iyonik şiddeti ise 1 M'lık stok KCl çözeltileri kullanılarak 0,1 M olacak şekilde sabit tutulmuştur.

Standart baz çözeltisinin her bir ilavesinden sonra elektrot potansiyeli okunmuş ve elde edilen ml-mV veri çiftleri asidin konsantrasyonunun ve Peter Gans tarafından geliştirilen STRONGH bilgisayar programından kalibrasyon parametreleri E^0 , s ve J_H 'ın belirlenmesi için kullanılmıştır. Her bir titrasyon serisine (yaklaşık 6 titrasyon) başlamadan önce kullanılan hücre her defasında kalibre edilmiştir.

Suyun Stokiyometrik İyonlar Çarpımının (K_{su}) Tayini

Protonasyon sabitlerinin belirlenmesinde gerekli bir büyüklük olan 0,1 M (KCl) iyonik şiddet ve $25,00 \pm 0,01^0$ deki suyun stokiyometrik iyonlar çarpımını ($K_{su}=[\text{H}][\text{OH}]$) tayin etmek amacıyla için yukarıda bahsedilen hücre kalibrasyonun da elde edilen veriler kullanılmıştır. Ayarlı potasyum hidroksit çözeltisinin ayarlı hidroklorik asit çözeltisi ile titrasyonu sonucu bazik bölgede elde edilen veriler ve kalibrasyon parametrelerinin kullanılması suretiyle her bir titrasyon noktasına denk gelen serbest hidrojen iyonu konsantrasyonu ($[\text{H}]$) hesaplanmıştır. Çözelti stokiyometrisinden ise, $[\text{OH}]$ konsantrasyonuna geçilmiştir. Elde edilen her bir $[\text{H}]$ ve $[\text{OH}]$ veri çiftinden faydalanarak $K_{su}=[\text{H}].[OH]$ eşitliğine göre K_{su} büyüklüğü 0,1 M (KCl) iyonik şiddet ve $25,00 \pm 0,01^0$ için belirlenmiş ve $pK_{su}=13,79$ bulunmuştur.

L-Histidinin Protonasyon Sabitlerinin Tayini

Kalibrasyon parametreleri E^0 , s ve J_H 'ın belirlenmesinden sonra L-histidinin protonasyon sabitlerinin belirlenmesi için aşağıda bileşimi verilen çözeltiler KOH ile titre edilmiş ve 1,6-10 pH aralığında elde edilen titrasyon verileri azot atmosferinde ve

25,00±0,01°C'da otomatik titratörle toplanmıştır. Ortama bolca ilave edilen HCl'in iyonik şiddete katkısı da dikkate alınmak koşulu ortamın iyonik şiddeti 0,1 M olacak şekilde KCl ilavesi yapılmıştır.

Deney Çözeltisinin Bileşimi:

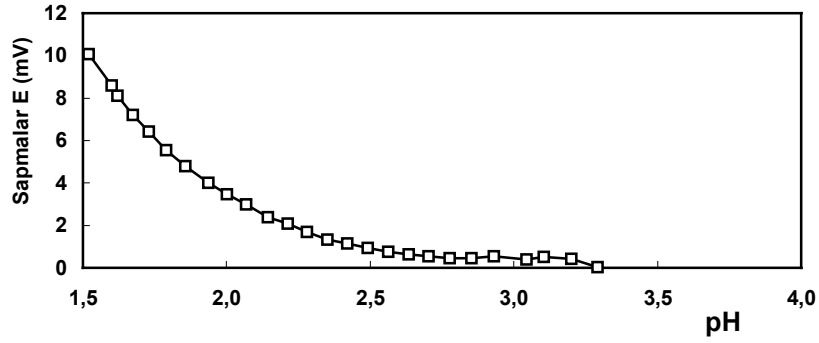
L-Histidinin Analitik Konsantrasyonu	: 1,5- 2,0 mM
Hidroklorik Asidin Analitik Konsantrasyonu	: 20 - 25 mM
Potasyum Klorürün Analitik Konsantrasyonu	: 80 - 75 mM
Toplam Hacim	: 50 ml

Yukarıda bileşimi verilen hücrelerin potansiyometrik titrasyonu sonucu elde edilen L-histidin ve bu gibi ligandların protonasyon sabitlerinin belirlenmesi için Motekaitis ve Martell tarafından geliştirilen BEST bilgisayar programı kullanılması amaçlanmıştır (Motekaitis and Martell, 1982). BEST bilgisayar programından L-histidinin protonasyon sabitlerinin belirlenmesi için her bir titrasyon noktasına denk gelen mL-mV veri çiftlerinden her bir titrasyon noktasına denk gelen pH'nın belirlenmesi gereklidir. Bu amaçla, laboratuvarımızda bir bilgisayar programının geliştirilmesine ihtiyaç duyulmuştur. Çünkü, pH<2 bölgelerinde geçerli olan $E=E^0+s\log[H]+J_H[H]$ eşitliğinden de görülebileceği gibi bu eşitliğin pH cinsinden çözümü basit matematiksel işlemlerle mümkün değildir. Geliştirilen bu program yardımı ile ilgili sabitlerin hesaplanabilmesi için titrasyonun her bir noktasına denk gelen pH değerleri hesaplanabilir duruma getirilmiş (düzeltilmiş pH değerleri) ve L-histidinin uygun ve güvenilir protonasyon sabitleri hesaplanabilmiştir. Geliştirilen bu program, C++ Builder Version 4.0 Programı kullanılarak C programlama dili ile yazılmış ve ardışık yaklaştırma prensibi ile çalışan bir programdır.

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Çalışmamızda, L-histidinin karboksilat grubu ile ilgili protonasyon merkezinin protonasyon dengesi ile ilgili protonasyon sabitinin hem de diğer protonasyon merkezlerinin (primer amino ve imidazol azotu) stokiyometrik protonasyon sabitlerinin belirlenmesi için kullanılacak hücrenin kalibrasyonu için öncelikle elde edilen $E_{hücre} - \log[H]$ eğrilerinin lineerliği lineer en küçük kareler metodu ile kontrol edilmiştir. Fakat, L-histidinin karboksilat grubu ile ilgili protonasyon dengesi pH'nın 2 den küçük olduğu

pH bölgelerinde meydana geldiğinden, $2 < \text{pH} < 12$ aralığında meydana gelen protonasyon dengelerine sahip ligandların denge sabitlerinin belirlendiği potansiyometrik titrasyon hücresinde elde edilen korelasyon katsayılarından ($\sim 0,9999$) farklı olarak korelasyon katsayılarının yaklaşık olarak 0,997 civarında ve Nernst faktörü s'in ise çalışılan bu pH aralığında ($1,70 < \text{pH} < 3,5$) 56-57 mV aralığında olduğu tespit edilmiştir. Bizim deneyimlerimize göre, iyi bir cam elektrotun termostat kontrolünün iyi yapıldığı sistemlerde eğiminin 59,16 mV değerinden bu kadar sapmaması ve ayrıca korelasyon katsayısının da bire daha yakın olması gerektiğinden (Altun, 2000), çalışmada kullanılan potansiyometrik titrasyon hücresinin yani, kalibrasyon parametrelerinin çalışılan pH aralığında uygun olmadığı sonucuna varılmıştır.



Şekil 3. Temas potansiyeli (J_H) düzeltilmesi yapılmadan Nernst emf ve gözlenen emf arasındaki sapmaların pH ile değişimi

Bu sonuç, Şekil 3'deki pH'ya karşı çizilen E(mV) eğrilerinde oldukça net bir şekilde görülmüş ve Nernst eşitliğinden ($E = E^0 + s \log[H]$) hesaplanan E(mV) değerlerinin gözlenen mV değerlerinden sapmasının titrasyonun başlangıç noktalarında oldukça büyük iken, titrasyonun ortalarında yani pH 2 den sonra önemsiz hale geldiği tespit edilmiştir. Sonuç olarak, bu eğrinin esas alınması suretiyle cam elektrotların pH'nın 2 den küçük olduğu bölgelerde daha küçük mV değerlerini okuduğu, yani daha büyük pH değerlerini okuduğu ve dolayısıyla, Nernst eşitliğinin dikkate alınması sonucu elde edilen pH değerlerinin ve bu pH değerlerinin kullanılması sonucu elde edilen protonasyon sabitlerinin hatalı ve güvenilir olmadığı söylenebilir.

Tüm bu sonuçlara dayanarak, klasik kalibrasyon parametreleri E^0 , s' 'ye ilave olarak $pH < 2$ bölgelerinde önemli hale gelen J_H parametresinin kesinlikle belirlenmesinin gerekliliğine karar verilmiştir (Lennart et al., 1976; Avdeef and Bucher, 1978; Pessoa et al., 1994). Bu parametrenin lineer olmayan bir parametre olması nedeni ile (Avdeef and Bucher, 1978; Avdeef, 1983) bu pH bölgesindeki parametreler s , E^0 , J_H lineer olmayan en küçük kareler metodu esasına göre çalışan ve Peter Gans tarafından geliştirilen STRONGH bilgisayar programları ile belirlenmiştir (P. Gans, 2000, yazılı görüşme¹). Bilgisayar programı ile yapılan belirlemenin neticesinde s eğimi bu sefer yaklaşık olarak 59 mV, korelasyon katsayısı 0,9999 civarında ve J_H parametresinin büyüklüğü ise yaklaşık olarak -250 ve -260 aralığında bulunmuştur. Sonuç olarak, elde edilen J_H parametresinin büyüklüğünden de görülebileceği gibi düşük pH 'larda mV okumalarında J_H parametresinin dikkate alınarak herhangi bir mV düzeltmesinin yapılmaması pH okumalarının hatalı olmasına sebep olmaktadır. Zaten, J_H düzeltmesi yapıldıktan sonra elde edilen potansiyel değerleri ile gözlenen potansiyel değerleri arasındaki farkın Şekil 3'de görülen yaklaşık 10 mV'luk sapmanın aksine 0,1 mV'a kadar düştüğü görülmüştür. Bu durum, yukarıda bahsedilen J_H parametresinin kullanılması gerekliliğinin bir göstergesi olarak kabul edilebilir.

J_H parametresinin dikkate alınması sonucu elde edilen kalibrasyon parametrelerin makul ve güvenilir olduğundan emin olduktan sonra, L-histidinin çeşitli konsantrasyonları için potansiyometrik titrasyon ile elde edilen veriler kullanılarak Martell ve Motekaitis tarafından geliştirilen BEST bilgisayar programı ile belirlenen stokiometrik sabitler Çizelge 1'de verilmiştir (Motekaitis and Martell, 1982). Bu sabitler en az beş deneyin verileri ile hesaplanmış sabitler olup ilgili standart sapmaları Çizelge 1'de verilmiştir. Çizelge 1'den de görülebileceği gibi çalışmamızda elde edilen sabitler literatür verileri ile oldukça uyum içerisindedir.

¹peterg@chem.leeds.ac.uk

Çizelge 1. L-Histidinin 25⁰C ve I=0,1 M (KCl)'de belirlenen protonasyon sabitleri (logK_{AH} ve logβ_{AH})

	LogK ₁₁ (logβ ₁₁)	LogK ₁₂	logβ ₁₂	LogK ₁₃	logβ ₁₃
L-Histidin	9,11^x 9,09^y±0,04	6,08^x 6,02^y±0,04	15,19^x	1,77^x 1,7^y±0,1	16,96^x

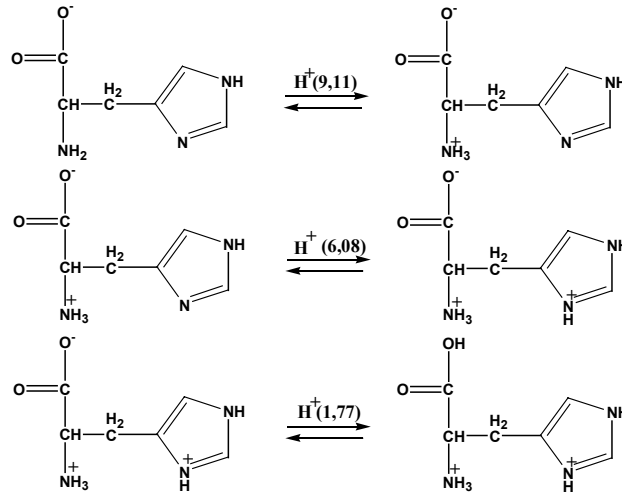
x: Çalışmamızda Bulunan Değerler($\sigma_{fit} \leq 0.01$)

y: Literatür Değerleri (Martell and Smith, 1974)

Temas potansiyeli düzeltilmesi olan J_H parametresinin dikkate alınmadığı Nernst eşitliğinden elde edilen mL-pH veri çiftleri kullanıldığında ise, elde edilen pH değerlerinin özellikle pH<2 bölgelerinde çok hatalı (~+0,5 pH birimi) olması sebebiyle BEST bilgisayar programının programın protonasyon sabitlerini belirleyemediği, belirlediği durumlarda ise elde edilen σ_{fit} değerlerinin maksimum olması gereken 0,03 değerinden oldukça büyük olduğu görülmüştür. Bu durum, pH<2 bölgesi için yapılan potansiyometrik titrasyon hücresinin kalibrasyonunda bahsedilen sonuçlarla uyum içerisinde olup Nernst eşitliğinin pH<2 bölgelerinde geçerli olmadığına bir göstergesi olarak kabul edilebilir.

Zaten, bu nedenledir ki L-histidinin 0,1 M KCl ve 25⁰C'da potansiyometrik titrasyonla belirlenmiş olan protonasyon sabitleri ile ilgili literatür verileri incelendiğinde literatürlerin bir çoğunda (aynı sıcaklık ve iyonik şiddet için), L-histidinin sadece primer amino ve imidazol azotu ile ilgili protonasyon sabitleri belirlenmiş olduğu karboksilat grubu ile ilgili protonasyon sabitinin ise belirlenmemiş olduğu (Pettit, 1984; Daniele et al., 1985) ve belirlenmiş olan literatürlerde ise sonuçların birbirinden oldukça farklı olduğu görülmüştür (Martell and Smith, 1974; Pettit, 1984). Sonuç olarak, bu durumun düşük pH'larda cam elektrotların kalibrasyonu ile ilgili problemlerden kaynaklandığı söylenebilir.

Ayrıca, L-histidinin her bir protonasyon merkezi ile ilgili stokiometrik protonasyon dengesinin tayin edilen protonasyon sabitlerinden yararlanarak L-histidinin bazikliğinin nasıl değiştiği incelenmiş ve yorumlar aşağıda verilmiştir.



Şekil 4. L-Histidinin Protonasyon Dengeleri

Özellikle, L-histidin gibi biyolojik olarak önemli bir liganda bulunan imidazol ve glisin ucunun, bu maddenin bazikliğini nasıl değiştirdiğini anlaşılması oldukça önemlidir. Yukarıda verilen denge reaksiyonlarından görülebileceği gibi, L-histidin, biyolojik olarak oldukça önemli olan imidazol azotu, amino azotu ve karboksilat oksijeni olmak üzere toplam üç donör merkez atomu bulunduran aromatik bir amino asittir. L-histidin molekülünün imidazol ucunda yer alan pirol azotunun (N(2)) paylaşılmamış elektron çifti, imidazol halkasının π sisteminin bir parçasıdır. Bu nedenle, pirol azotundaki protonun koparılması ile aromatiklik bozulacağından bu protonun ayrılması çok yüksek pH'larda meydana gelmektedir ve dolayısıyla protonasyon sabiti çok yüksektir. Piridin azotunun (N(1)) paylaşılmamış elektron çifti ise imidazol halkası ile aynı düzlemde bulunduğu için pirol azotundan daha kolay bir şekilde protonunu verebildiğinden pirol azotundan daha az bazik özelliğe sahip olduğunu söyleyebildiğimiz gibi, piridin azotunun alifatik bir amino azotundan daha az bazik olması gerektiğini de söyleyebiliriz. Sonuç olarak, tamamen iyonlaşmış histidinat anyonunda ilk protonlanan merkez primer amino azotu olduğunu ve çalışmamızda belirlenen $\log K_{11}=9,11$ protonasyon sabitinin primer amino azotu ile ilgili protonasyon sabiti olduğunu söyleyebiliriz. İkinci olarak protonlanan merkez ise, tahminde edilebileceği gibi imidazol azotu yani piridin azotu olup protonasyon sabiti $\log K_{12}=6,08$ bulunmuştur. Bu protonasyon reaksiyonları çok uygun bir pH aralığı üzerinde meydana geldiğinden bu reaksiyonlara ait sabitler oldukça doğru bir şekilde belirlenebilmiştir.

Protonlanabilir en son protonasyon merkezi olan karboksilat grubu ile ilgili protonasyon sabitinin ise $\log K_{13}=1,77$ olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla, bu denge, $\text{pH}<2$ 'de meydana geldiği için yukarıda bahsedilen nedenlerden ötürü bu belirlemenin doğruluğu diğer sabitlerin doğruluğundan biraz daha düşüktür.

Sonuç olarak, L-histidin gibi ligandların protonasyon sabitlerinin potansiyometrik olarak belirlenirken kesinlikle temas potansiyeli düzeltmesi olarak bilinen J_H parametresinin belirlenmesinin şart olduğunu söyleyebiliriz.

KAYNAKLAR

- Altun, Y., 2000, G.Ü. Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi, Cilt 20, Sayı 3, 87-100.
- Avdeef, A. and Bucher J.J., 1978, Anal. Chem., 50, 2137-2142.
- Avdeef, A., 1983, Anal. Chim. Acta, 148, 237-244.
- Bates, R.G., 1954, Electrometric pH Determination, John Wiley and Sons, New York.
- Bates, R.G., 1973, Determination of pH Theory and Practice, Second Edition, John Wiley and Sons, New York, London, Sidney, Toronto
- Beck, W.H., Bottom, A.E. and Covington, A.K., 1968, Anal. Chem., 40, 501.
- Beck, W.H. and Wynnee-Jones, W. F. K., 1952, J. Chim.Phys., 49, C97.
- Daniele, P.G., Rigano, C., and Sammartano, S., 1985, Talanta, Vol. 32, No. 1, pp 78-80.
- Gran, G., 1950, Determination of equivalent point in potentiometric titrations, Acta. Chem. Scand., 4, 559.
- Gran, G., 1952, Analyst, 77, 661.
- Lennart, P., Ingman, F. and Johansson, A., 1976, Talanta, 23, 769-780.
- Martell, A.E. and Smith, R.M., 1974, Amino Acids. Critical Stability Constants, New York.
- Motekaitis R.J. and Martell, A.E., 1982, Can.J. Chem., 60.
- Pessoa, J.C., Luz, S.M., Cavaco, I., Gillard, R.D., 1994, Polyhedron, Vol 13, No 23, p 3177-3198.
- Pettit, L.D., 1984, Pure & Appl. Chem., Vol. 56, No. 2, pp 247-292.
- Serjant, E.P., 1984, Potentiometry and Potentiometric Titrations, John Wiley and Sons, New York.
- Zabronsky, J., 1986, Ph.D. Thesis, Syracuse University, 256 p.