

## **Amino Asitlerin Mikroskopik Denge Sabitleriyle İlgili Çalışmalar**

### **The Studies Related to the Microscopic Equilibrium Constants of Amino Acids**

Alev DOĞAN\*

\* G.Ü. Gazi eğitim Fakültesi, Orta Öğretim Fen ve Matematik Alanları Eğitimi Bölümü.

#### **ÖZET**

*Bu çalışmada, canlı organizmasında peptitlerin, proteinlerin ve enzimlerin yapı taşı olan amino asitler hakkında çok kısa bilgi verilerek bunların, biyokimyasal açıdan önemli bir çok molekülün reaksiyon mekanizmalarının aydınlatılması için gerekli olan mikroskopik sabitlerinin nasıl hesap edilebileceği özetlenmiştir. Ayrıca, günümüze kadar amino asitlerin mikroskopik sabitleri ile ilgili çalışmalar kısaca verilmiştir.*

**Anahtar Kelimeler:** Amino asit, dipolar iyon, mikroskopik sabit.

#### **ABSTRACT**

*In this study a brief introduction about amino acids, the foundation stone peptides, proteins and enzymes, in living organisms will be made and the calculation of their microscopic constants wich are of quite a big importance in enlightening the reaction mechanisms of many biologically important molecules will be summarized.*

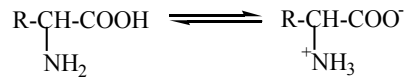
**Key Words:** Amino acid, zwitterion, microscopic constant.

### Amino Asitler ve Dipolar İyonlar

Mikroskopik sabitler ve dipolar iyon oranının belirlenmesi çok sayıda biyolojik molekülün bileşimini anlamak açısından son derece önemlidir. Tüm proteinler bu sınıfa girer. Bu maddelerin kimyasal ve biyolojik aktiviteleri iyonlaşma derecesi ile değişir. Bu sebepten dolayı dipolar iyonik maddelerin iyonlaşma sabitlerinin bilinmesi bunların kimyasal ve biyolojik proseslerinin mekanizmalarının anlaşılması için şarttır. Ne yazık ki 100'den daha az sayıda madde için mikroskopik sabit tespit edilmiş olup bu moleküller içinde sadece birkaç tanesi için dipolar iyonik sabit bulunmuştur (Martell, A.E. ve Motekaities., R.J., 1988, Benesch, R.E., ve Benesch, R., 1955, Grafius, M.A. ve Neilands, J.B., 1955, Martin, R.B., J.,1971). Ayrıca literatürde bir düzineden az sayıda madde için pH'nın fonksiyonu olarak çeşitli mikroskopik türlerin kesirleri belirlenmiştir. Bu ölçümlerin çoğu alifatik amino asit türevleri ve glisin veya sistein gibi iki iyon bölgesi moleküller ile sınırlı kalmıştır.

Amino asitler, canlı organizmasında peptitlerin, proteinlerin ve enzimlerin yapı taşları olduklarından çeşitli kimyasal madde grupları arasında özel bir öneme sahiptirler. Molekülünde hem amin grubu (-NH<sub>2</sub>), hem de karboksilik asit grubu (-COOH) bulunan organik bileşiklere amino asitler denir. Bir amino asit genel olarak R(NH<sub>2</sub>)CH-COOH şeklinde gösterilebilir (R= çeşitli fonksiyonel gruplar).

Amino asitler dipolar iyon yapısına sahiptirler (zwitterion). Bu yapıda, karboksilik asit grubunun protonu amin grubunun azotuna bağlanmış, dolayısıyla her iki fonksiyonlu grup da iyon haline dönüşmüştür.



Yüksüz molekül

Dipolar iyon

Dipolar iyon "iç tuz" yapısına karşılıktır ve suda çözünme, organik çözücülerde çözünmeme, dipol momentin çok büyük olması ve uçucu olmama, çözündüğü zaman suyun polarlığının artması gibi gözlenen fiziksel özellikler hep bu yapıdan yansıyan özelliklerdir. Gerçek yapı bu olmakla birlikte, nötral molekül halinde yazmak gelenek

haline gelmiştir. Amino asidin dipolar iyon yapısında,  $-\text{NH}_3^+$  grubunun bir protonunun  $-\text{COO}^-$  grubuna geri bağlanacağı da düşünülebilir. Ama böyle olmaz, çünkü mono karboksilik asitlerin  $K_a$  değerleri  $10^{-5}$ , alifatik primer aminlerin  $K_b$  değerleri  $10^{-4}$ - $10^{-5}$  civarındadır. Sulu çözeltilerde  $K_a K_b = 10^{-14}$  olduğundan, karboksilat anyonunun bazlığı amin grubunun bazlığından 10000-100000 kez daha azdır; dolayısıyla, karboksilat anyonuna proton bağlanma olasılığı, amin grubuna proton bağlanma olasılığından daha azdır (Tüzün, C., 1988).

Bir madde suda çok çözünüp, organik maddelerde daha az çözünüyorsa ve sadece tek bir iyonlaşabilen grup içeren benzer maddelerden daha yüksek erime noktasına sahipse, bu maddenin bir dipolar iyon olduğu düşünülebilir. Bütün bu özellikler bir tuz karakterinin işaretidir. Ancak bir dipolar iyonun varlığı için yetersiz delillerdir. Çünkü oldukça yüksek dipol momente sahip elektrolit olmayan pek çok maddede de bu özellikler bulunur. Dipolar iyonların varlığını kontrol etmek için kolayca uygulanan deneylerden bazıları şunlardır:

1.  $pK_a$  değerlerinden birisi, bir esteri veya bir O-eteri gibi kısmen bloke olmuş türevinin  $pK_a$ 'sından önemli ölçüde farklı ise madde bir dipolar iyondur.

2. Asitle titrasyon sonucunda bulunan  $pK_a$  değeri %50-%70 etanol ortamında titrasyon yapıldığında azalma yerine sabit kalıyor veya yükseliyorsa maddenin bir dipolar iyon olduğu söylenebilir. Bununla beraber madde bir dipolar iyon olduğu halde (1) ve (2) negatif olabilir (Jukes, T.H. ve Schmidt, C.L.A., 1935).

3. Madde UV'de absorpsiyon yapıyorsa ve iyonlaşan gruplardan birisi bir karboksilik asitse (ki bunun spektrumu iyonlaşma sırasında önemli ölçüde değişmemelidir), diğer grup da aromatik bir amino grubu ise, spektrumun daha uzun-dalga boylu bandında baz ilavesinde daha kısa dalga boylarına büyük bir kayma görülmesi, maddenin bir dipolar iyon olduğunu gösterir. Bu kural biraz değiştirilerek pridin karboksilik asitlerin dipolar iyonik karakterlerini göstermek için kullanılmaktadır (Green, R.W. ve Tong, H.K., 1956).

Bazen dipol moment ölçümleri ile de bileşiğin dipolar iyon formunda olup olmadığına karar verilir. Bir dipol iyonun en az 15D dipol momente sahip olduğu düşünülür. Fakat dipol momentleri dioksanda ölçülen aromatik dipolar iyon serileri için bu durumun

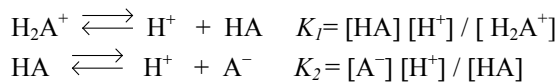
gerçek olmadığı bulunmuştur (Serjeant, E.P., 1964). Örneğin %90'dan daha fazla dipolar iyon formunda bulunan p-metoksi-fenilglisin'in dioksandaki dipol momenti esterinin dipol momentinden sadece 0,18D daha büyüktür (her iki bileşikte yaklaşık 2D dipol momente sahiptir).

Etanolün hem asitlerin hem bazların iyonlaşmasını baskı altına almak suretiyle asidin  $pK_a$ 'sını düşürdüğü dikkate alınarak bileşiklerin dipolarlığına karar verirken, ikinci maddeyi kullanırken dikkatli davranmak gerekir.

Etanol ilavesinden sonra beklenen  $pK_a$  değişmesi göstermeyen aromatik ve heteroaromatik dipolar iyonlar için madde2'de belirtilen deney genellikle iyi sonuç vermez. Fakat, bu test alifatik amino asitlere faydalı bir şekilde uygulanmaktadır.

### **Makroskopik ve Mikroskopik Denge Sabitleri**

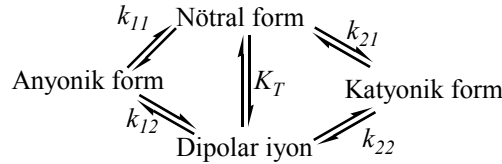
Bir Bronsted asiti proton verici, Bronsted bazı da proton alıcı olarak tanımlanır. Çözeltilerin asit-baz özellikleri, genellikle asidin çözeltiye proton verme meylini veya bazın proton alma meylini gösteren iyonlaşma sabitleri cinsinden verilir. Bir asidin bir çözücü içindeki kuvveti, iyonlaşma sabiti cinsinden belirlenir. Kimya ve biyokimyasal açıdan önemli olan bir çok molekül, birden fazla asidik ve/veya bazik grup içerir. Amino asitler, peptitler, proteinler ve nükleik asitler gibi makromoleküller ise, bu tip çok fazla grup içerir. Bu moleküller çok sayıda ve farklı şekilde iyonlanmış halde bulunabilir. Asidik gruplar, asidik çözeltilerde yüksüz, yeterince bazik çözeltilerde ise negatif yüklü olarak bulunurlar. Bazik gruplar ise, kuvvetli asidik çözeltilerde pozitif yüklü (protonlanmış), bazik çözeltilerde ise yüksüz haldedirler. İki iyonlaşabilen proton içeren asidik bileşiklerde (protonlanmış glisin gibi), iyonlaşma dengesi aşağıdaki şekildedir:



$pK_1$  ve  $pK_2$  çeşitli yöntemlerle (pH titrasyonu veya spektroskopik ölçümlerle) deneysel olarak tayin edilebilir. Ölçülen bu  $pK$  değerlerine *makroskopik sabitler* denir.

İlgilenilen türlerde protonlardan hangisinin iyonlaştığı veya protonun hangi merkeze bağlandığı belirli olmayabilir. Çözeltide bulunan her bir türle ilgili dengele ise, *mikroskopik sabitler* adı verilir (Perrin, D.D., Dempsey, B, Serjeant, E.P., 1981).

Bu mikroskopik sabitler doğrudan ölçülemeyebilir veya tek tek tayin edilemeyebilir. Daha önceden de bahsedildiği gibi amino asitler dipolar iyonları şeklinde bulunan moleküllere birer örnektir. Sulu çözeltilerde dipolar iyonlar ve yüksüz molekül denge halindedir. Bu denge, iyonlaşan grubun asit ve baz kuvvetine bağlıdır. Glisin gibi iki tane iyonlaşabilir bölgeye sahip olan molekülde bu işlem Şekil 1'deki gibi gösterilebilir. Her iyonlaşabilen gruba ait iki tane mikroskopik sabit vardır. Bunlar ilk protonun verilmesi ile ilgili  $k_{11}$  ve  $k_{12}$ , ikinci protonun verilmesi ile ilgili  $k_{21}$  ve  $k_{22}$  sabitleridir. Şekil 1'de verilen  $K_T$  ise dipolar iyonik sabit (tautomerik sabit) adını alır.



**Şekil 1.** Mikroskopik sabitler  $k_{11}$ ,  $k_{12}$ ,  $k_{21}$ ,  $k_{22}$  ve dipolar iyonik sabit  $K_T$

Glisinde olduğu gibi iyonlaşan grupların  $pK_a$  değerleri arasında büyük fark varsa, oluşan tür sayısının pH'a bağlılığını bulmak için iki tane makroskopik sabit  $K_1$  ve  $K_2$ 'nin bilinmesi yeterlidir.

Ancak N-fenilglisinde olduğu gibi,  $pK_a$  değerleri  $3pK_a$  birimi veya daha yakınsa daha ayrıntılı bir inceleme gerekir. Bu tip bir durumda, iki makroskopik sabit ( $K_1$  ve  $K_2$ );  $k_{11}$ ,  $k_{12}$ ,  $k_{21}$ ,  $k_{22}$  ve dipolar iyonik sabit  $K_T$  ile belirlenen dengeleri tanımlamak için yeterli olmaz.

Bu mikroskopik iyonlaşma sabitleri, mikroskopik türlerin asit-baz kimyasını tam olarak tanımladığı halde, iki makroskopik  $pK_a$  değeri ise dengeyi tam olarak tanımlayamaz. Gerçekten de makroskopik sabit  $K_1$ , sadece  $k_{11}$ ,  $k_{12}$  ve  $K_T$ 'nin temel bileşenler olduğu dengelerin toplamını gösterir. Makroskopik sabit  $K_2$  ise  $k_{21}$ ,  $k_{22}$  ve  $K_T$ 'nin bir bileşimidir (Hilal, S.H. ve Karickhoff, S.W., 1995, Hilal, S.H., Carreira, L.A. ve Karickhoff, S.W., 1994).

Daha fazla iyonlaşan grup içeren amino asitlerde durum biraz farklıdır. N tane iyonlaşan kısım bulunduran bir molekül için  $2^{N-1} \times N$  tane mikroskopik iyonlaşma sabiti ve  $2^N$  mikroskopik açıdan farklı tür bulunmaktadır. Örneğin bir amino asit olan tyrosinin protonlanmış formu  $H_3L^+$  şeklinde gösterilir ve bu protonlar karboksil, aromatik hidroksil ve amino grubuna bağlıdır. Bu üç fonksiyonel gruptan her biri iki halden birinde bulunabilir (protonlanmış veya protonlanmamış). Üç gruptan her birinde iki durum (asit veya baz) söz konusudur. Bu nedenle tyrosin mikroskopik açıdan sekiz ( $2^3$ ) farklı şekilde olabilir. Sekiz durumdan en pozitif olan katyonun net yükü  $z = 1$ , en negatif olan anyonun net yükü  $z = -2$  dir. Ortadaki iki durumdan her birinin net yükleri sırayla  $z = 0$  ve  $z = -1$  olup mikroskopik açıdan üç farklı formları olabilir. Tyrosin içerisindeki iyonlaşabilir gruplardan her biri dört mikroskopik sabit ile karakterize edilmiştir. Gruplardan her birinin bir protonu kabul etme veya protonu verme eğilimi diğer iki grubun iyonlaşma durumuna bağlıdır (Martin, R.B., Edsall; J.T., Wetlaufer, D.B., Hollingworth, B.R., 1958).

Yine ikiden fazla iyonlaşan grup bulunduran glutatonda da mikroskopik sabitlerin bulunması biraz karışıktır. Glutation iki  $-CO_2H$  grubu, bir  $-SH$  grubu ve bir de  $-NH_3^+$  grubu olmak üzere çözeltilde iyonlaşabilir dört grup bulundurur. Bu dört grubun her biri hem asidik hem bazik olmak üzere iki durumda da bulunabilir.

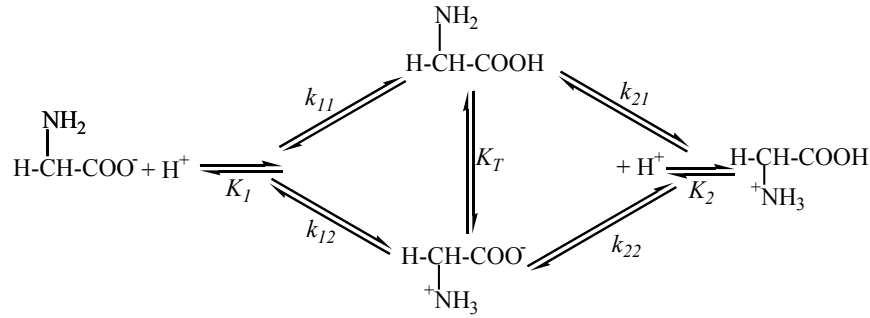
Genel olarak, bir moleküldeki N tane iyonlaşabilir kısım için NI tane mikroskopik sabit vardır ki, bu da S tane iyonlaşma hali verir ( S, iyonlaşabilen merkez sayısıdır ve  $S \leq N$  dir.). NI şöyle verilebilir:

$$NI = N! / [(S-1)! (N-S)!]$$

Örneğin glutatonda  $N=4$ 'dür ve toplam 32 mikroskopik sabiti olması gerekir(Hilal, S.H.; Carreira, L.A. ve Karickhoff, S.W., 1995).

### Mikroskopik Denge Sabitleri ile İlgili Temel Eşitlikler

Amino diprotik bazlardır ve bu diprotik bazlar simetrik değildir. Örneğin amino karboksilat iyonunun protonlanmasını düşündüğümüzde, Şekil 2' de gösterildiği gibi, A bazı (A: amino asidin anyonudur) iki farklı uca sahiptir ve iki taraftan protonlanabilir: yüksüz  $-NH_2$  grubu ile negatif yüklü  $-COO^-$  grubu. Bunu glisin iyonu üzerinde açıklayalım: Glisin iyonuna ( $A^-$ )bir proton ilave edildiğinde, ya yüksüz asiti ( $H_2N-CH_2-COOH$ ) ya da dipolar iyon ( $H_3N^+-CH_2-COO^-$ ) oluşur. Biz bu türleri sırasıyla ( $HA^0$ ) ve ( $HA^+$ ) olarak göstereceğiz. Glisine ikinci bir proton ilave edildiğinde katyonik asit olan ( $H_3N^+-CH_2-COOH$ ) türü oluşur ( $H_2A^+$ ).



Şekil 2. Glisinat iyonunun protonlanması

Burada  $k_{11}$  ve  $k_{12}$   $HA^0$  ve  $HA^+$  'nın mikroskopik protonasyon sabitleridir.  $k_{21}$  ve  $k_{22}$ ,  $H_2A^+$ 'nın basamaklı mikroskopik protonasyon sabitleridir.

Dipolar iyonik oranlar üzerine yapılan çalışmaların sonucunda makroskopik sabitlerle mikroskopik sabitleri birbirine bağlayan aşağıdaki eşitlikler türetilmiştir(Albert, A., Serjeant, E.P. 1984).

Burada tek proton bağlanmış glisinatın analitik derişimi  $[HA]$  şöyle verilir:

$$[\text{HA}] = [\text{HA}^0] + [\text{HA}^\pm] \quad (1)$$

Ortamdaki türler göz önünde bulundurularak makroskopik sabitler  $K_1$  ve  $K_2$  aşağıdaki gibi yazılır:

$$K_1 = ([\text{HA}^0] + [\text{HA}^\pm]) / ([\text{H}^+] [\text{A}^-]) \quad (2)$$

$$K_2 = ([\text{H}_2\text{A}^+]) / ([\text{HA}^0] + [\text{HA}^\pm] [\text{H}^+]) \quad (3)$$

Şekil 2'den görüleceği üzere mikroskopik sabitler şu şekilde yazılabilir:

$$k_{11} = [\text{HA}^0] / [\text{A}^-] [\text{H}^+] \quad (4)$$

$$k_{12} = [\text{HA}^\pm] / [\text{A}^-] [\text{H}^+] \quad (5)$$

$$k_{21} = [\text{H}_2\text{A}^+] / [\text{HA}^0] [\text{H}^+] \quad (6)$$

$$k_{22} = [\text{H}_2\text{A}^+] / [\text{HA}^\pm] [\text{H}^+] \quad (7)$$

$$K_T = [\text{HA}^\pm] / [\text{HA}^0] \quad (8)$$

Makroskopik sabit  $K_1$  ve  $K_2$  ile mikroskopik sabitler arasında aşağıdaki gibi bir ilişki vardır:

$$K_1 = k_{11} + k_{12} \quad (9)$$

$$1/K_2 = 1/k_{21} + 1/k_{22} \quad (10)$$

Dört mikroskopik sabit ( $k_{11}$ ,  $k_{12}$ ,  $k_{21}$ ,  $k_{22}$ ) mikroskopik türlerin asit baz kimyasını tam olarak tanımlarken, iki makroskopik sabit dengeleri tam olarak tanımlayamaz ve bu dört mikroskopik sabit bağımsız olmayıp aralarında  $k_{12}/k_{11} = k_{21}/k_{22}$  ilişkisi vardır. Moleküler türlerin pH'ya bağımlılığını hesaplamak için  $K_T$ 'nin de hesaplanması gerekir.  $K_T$  Şekil 2'de verilen sağdaki ve soldaki dengelerden birini kullanarak hesaplanabilir:

$$K_T = k_{12} / k_{11} = k_{21} / k_{22} \quad (11)$$

Yukarıdaki eşitliklerden yararlanılarak dört mikroskopik sabitin ( $k_{11}$ ,  $k_{12}$ ,  $k_{21}$ ,  $k_{22}$ ) değeri ve dipolar iyonik sabit ( $K_T$ ),  $K_1$  ve  $K_2$  makroskopik sabitleri ile bilinen herhangi bir mikroskopik sabiti kullanarak hesaplanabilir.

Amino asit esterlerinin davranışları ile onların türedikleri amino asitlerin yüksüz formlarının davranışları arasındaki benzerliklerden yararlanılarak;  $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOR}$



şeklindeki bir ester için protonasyon sabiti değerinin  $H_2N-(CH_2)_n-COOH$  asidi için  $\log k_{21}$  değeri ile aynı olduğu kabulü yapılarak yukarıda verilen eşitliklerin çözümü ile amino asitler için mikroskopik sabitler hesaplanabilir (Rossotti, H. 1978., Hill, L.T,1948).

### **Mikroskopik Sabitlerle İlgili Çalışmalar**

Günümüze kadar amino asitlerin mikroskopik sabitleriyle ilgili çok az sayıda çalışma yapılmış olup bunlar aşağıda kısaca özetlenmiştir:

1933 yılında Edsall ve Blanchard' ın yapmış olduğu çalışmada bazı amino asitler ve onlarla ilgili esterlerinin iyonlaşma sabitleri potansiyometrik yöntemle belirlenmiş, çalışılan bütün maddeler için sulu çözeltide amino asitlerin dipolar formunun daha baskın olduğu fakat dikarboksilik amino asitlerde, mono karboksilik asitlere göre bu formun daha az olduğu görülmüş, dielektrik sabitinin küçük olduğu çözücülerde de polar dipolar derişiminin oldukça düşük olduğu bulunmuştur. Ayrıca amino asitteki  $-COOH$  grubunun amino asit esterlerindeki  $-COOCH_3$  veya  $-COOC_2H_5$  grupları ile eşdeğer olduğu kabulü yapılarak amino asitler için mikroskopik sabitler hesaplanmıştır(Edsall, J.T.ve Blanchard M.H., 1933).

Benesh 1955 yılında sistein ile çalışmış ve sisteinin dört mikroskopik formunun bağıl derişimlerini hesaplamıştır (Benesch, R.E.,ve Benesch,, R., 1955). Buna göre  $(S-R-NH_3^+)/ (HS-RNH_2)$  oranının Grafius'un (Grafius, M.A. ve Neilands, J.B., 1955),dediğinin aksine 1/1 değil de 2/1 olduğunu bulmuştur. Bu uyuşmazlık mikroskopik sabitlerin ve farklı türlerin bağıl derişimlerinin hesabında yapılan yaklaşımdaki belirsizliğin büyüklüğünü göstermektedir.

Martin ve arkadaşlarının 1958 yılında yapmış olduğu çalışmada tyrosin ve türevlerinin iyonlaşma sabitleri, ayrıca tyrosin molekülünde bulunan üç iyonlaşan grubun her biri için dört tane mikroskopik iyonlaşma sabiti farklı pH değerlerinde, farklı iyonik şiddetlerde spektroskopik ölçümlerle ve bu sabitler arasındaki çeşitli ilişkiler kullanılarak tayin edilmiş, amonyum ve fenolik gruplar arasındaki etkileşimden, bu iki grup arasındaki mesafe  $7A^\circ$  olarak, karboksil ve fenolik gruplar arasındaki mesafe ise  $7,7A^\circ$  olarak belirlenmiş, bu değerlerin molekül modelleri kullanılarak elde edilen

değerlerle uyum içinde olduğu görülmüş ve  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{OH}$  ve  $-\text{NH}_3^+$  gruplarının iyonlaşması sonucu oluşan mikroskopik sabitler çizelgeler halinde verilmiştir (Martin, R.B., Edsall; J.T., Wetlaufer, D.B., Hollingworth, B.R., 1958).

Bryson, Davies ve Serjeant'ın 1963 yılında yapmış olduğu çalışmada N-süstitüe-fenilglisin ve esterlerinin spektrofotometrik yöntemle iyonlaşma sabitleri incelenmiş, N-süstitüe-fenilglisinin mikroskopik sabitleri hesaplanmış, süstitüentlerin yapısının dipolar oranı  $K_T$ 'nin büyüklüğünü kontrol eden faktör olduğu belirtilmiş, amino asitler ve bunların esterlerinin iyonlaşma sabitleri arasında bir karşılaştırılma verilmiş, elde edilen mikroskopik sabitlerin, amino asitlerin etil esterlerinin moleküler formlarının UV spektrumları amino asitlerin dipolar iyon olmayan moleküler türleri ile benzer olduğu zaman geçerli olduğu belirtilmiştir (Bryson A, N.R. ve Serjeant, E.P.; 1963).

Martin'in 1971'de yapmış olduğu çalışmada 2,3-dihidroksi fenilalaninin  $pK_1$ ,  $pK_2$  iyonlaşma sabitleri 0,16 M iyonik şiddette,  $25^\circ\text{C}$ 'da potansiyometrik titrasyon yöntemi ile belirlenmiş ( $pK_1=8,76$  ve  $pK_2=9,84$ ), deprotonasyonların asitlik sabitlerini tespit etmek için fenolik grubun iyonizasyonuna göre 295 nm'de absorpsiyon artış miktarları analiz edilerek,  $K_1$  asitlik sabitinin % 61 fenolik iyonizasyon ve % 39 da amonyum deprotonasyonundan oluştuğu ve dipolar iyonun nötral forma oranının 1,6 olduğu tespit edilmiş, literatürdeki spektrofotometrik sonuçların analizine göre bu oranın norpinefrinde 3 civarında, epinefrinde 4 civarında olduğu sonucuna varılmıştır (Martin; R.B., J. 1971).

Rabenstein'in 1973'de yapmış olduğu çalışmada glutation için potansiyometrik titrasyon yöntemi ve kimyasal kayma ölçümlerinden faydalanılarak iyonlaşma sabitleri tayin edilmiş, protonlanmış glutationun amonyum grupları ve sülfür hidril için mikroskopik iyonlaşma sabitleri; S-metil glutationun amonyum grubunun iyonlaşma sabitinin, glutationun diprotonlanmış formunun iyonlaşma sabitine eşit olduğu kabul edilerek tespit edilmiştir. Elde edilen mikroskopik sabitlerin  $pK_{123}=8,92$ ;  $pK_{124}=9,20$ ;  $pK_{1234}=9,44$ ;  $pK_{1243}=9,16$  şeklinde ve amino asitler için sunulan değerlerden daha küçük olduğu sonucuna varılmış, bu durumun glutationdaki kısmi grupların asitliğini etkileyen komşu süstitüentlerden kaynaklandığı tespit edilmiştir (Rabenstein, D.L., 1973).

1977 yılında Rabenstein, Greenberg ve Evans'ın yapmış olduğu çalışmada glisil-L-histidil-L-lisin, glisil-L-histidin, glisil-L-histidil-glisin gibi maddelerin asit-baz kimyaları proton manyetik rezonans çalışmaları ile belirlenmiş, her peptit için mikroskopik ve makroskopik asit ayrışma sabitleri kimyasal kayma verilerinden bulunmuştur (Rabenstein, D.L., GeenBerg, M.S. ve Evans, A.C., 1977).

Hughes ve arkadaşlarının 1986'da yaptıkları çalışmada on tane amino asidin  $pK_a$  değerleri ve onların esterlerinin  $pK_a$ 'ları seyreltik dimetil sülfoksit çözeltilerinde spektrofotometrik olarak tayin edilmiş, dipolar iyon/yüksüz form denge sabiti değerleri bulunmuş, çalışılan  $\alpha$ -amino asitlerin  $pK_a$  değerlerinin 6,3-7,5 aralığında ve amino asit esterlerinin  $pK_a$  değerlerinin de 6,4-8,7 aralığında değiştiği görülmüştür. Dipolar iyon formundaki amino asitin oranı dimetil sülfoksit içinde 2-40 aralığında olduğu tespit edilmiş, bu oran su ortamı ile karşılaştırılmış (suda bu oran  $10^4$ - $10^5$  aralığındadır) bu farklılığın sebebi su ve dimetil sülfoksitin karboksilat anyonuna çözücü etkisinin farklı olmasına bağlanmış ve  $H_3N^+CH_2COOH$  amino asidi için bulunan sonuçlar aşağıda verilmiştir (Hughes, D.L., Bergan, J. ve Grabowski, E.J. 1986).

Amino Asit	$pK_a$	$pK_a(\text{etil ester})$	$pK_{COOH}$	$PK_{NH}$	$K_{dipolar\ iyon}$
$H_3N^+CH_2COOH$	7,5	8,7	7,5	9,1	40

Hilal ve Karickhoff'un 1995 de yapmış olduğu çalışmada SPARC programını kullanarak, teorik olarak 3685 tane maddenin  $pK_a$ 'sı tayin edilmiş, deneysel değerlerle karşılaştırılmıştır. Bazı maddeler için hesaplanan izoelektrik nokta değerleri Tablo 1'de verilmiştir (Hilal, S.H. ve Karickhoff, S.W. 1955).

**Tablo 1.** Bazı maddeler için SPARC ile hesaplanmış izoelektrik nokta değerleri

Molekül	Glisin	Sistin	Lisin	Glutamik asit	Penisilamin	Fenilglisin
$PI$	5,8	5,0	9,8	3,2	5,0	3,2

Alev Doğan'ın 2000 de yapmış olduğu çalışmada, bazı  $\alpha$ -amino asitlerin mikroskopik protonasyon sabitleri aynı amino asitlerin etil ve metil esterinin protonasyon sabitlerinden yararlanılarak, çeşitli etanol-su ortamlarında hesaplanmış ve mikroskopik sabitlerin çözücü bileşimi ile değişimi de araştırılmıştır. Glisinin çeşitli etanol-su

ortamlarında metil esterinden hesaplanan mikroskopik protonasyon sabitleri Tablo 2' de verilmiştir (Doğan, A., 2000).

**Tablo 2.** Glisinin çeşitli etanol-su ortamlarında metil esterinden hesaplanan mikroskopik protonasyon sabitleri

Ortam	%20Etanol	%30Etanol	%40Etanol	%50Etanol	%60Etanol	%70Etanol	%80Etanol
$Logk_{11}$	4,43±0.01	4,90±0.01	5,10±0.01	5,16±0.01	5,25±0.01	5,18±0.01	5,22±0.01
$Logk_{12}$	9,30±0.01	9,54±0.01	9,39±0.01	9,35±0.01	9,20±0.01	9,05±0.01	9,00±0.01
$Logk_{21}$	7,55±0.01	7,45±0.01	7,18±0.01	7,09±0.01	7,00±0.01	6,93±0.01	6,88±0.01
$Logk_{22}$	2,68±0.01	2,81±0.01	2,89±0.01	2,90±0.01	3,05±0.01	3,06±0.01	3,10±0.01
$LogK_T$	4,87±0.01	4,64±0.01	4,29±0.01	4,19±0.01	3,95±0.01	3,87±0.01	3,78±0.01

## KAYNAKLAR

- Albert, A., Serjeant, E.P. 1984., The Determination of Ionization Constant A Laboratory Manual.
- Benesch, R.E., and Benesch, R., 1955., J. Am. Chem. Soc., 77,5877.
- Bryson A, N.R. and Serjeant, E.P.; 1963., The Ionization Constant N-(substituted-phenyl)-glycines, J. Am.Chem. Soc. 85,1933.41.
- Doğan, A., 2000, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Edsall, J.T. and Blanchard M.H., 1933., The Activity Ratio of Zwitterions and Uncharged Molecules in Ampholyte Solutions. The Dissociation Constants of Amino Acid Esters., J.Am. Chem. Soc.,59, 2337.
- Grafius, M.A. and Neilands, J.B., 1955,J. Am. Chem. Soc., 77, 3389.
- Green, R.W. and Tong, H.K., 1956., J. Am. Chem. Soc., 90, 6453.
- Hilal, S.H. and Karickhoff, S.W. 1955., A Rigorous test for SPARC's Chemical Reactivity Models Estimation of More Than 4300 Ionization pKa ,Quant. Struc. Act. Relat. 14, 348.

- Hilal, S.H. and Karickhoff, S.W., 1995., Estimation of microscopic, zwitterionic ionization constants isoelectric point and molecular speciation of organic compounds.
- Hilal, S.H., Carreira, L.A. and Karickhoff, S.W., 1994., Quantitative Treatment of Solute /Solvent Interactions, P.Polizer and J.S. Murray ed, Elsevier, Amsterdam.
- Hilal, S.H., Carreira, L.A. and Karickhoff, S.W., 1995., Quant. Struct Act. Relat., 14, 345.
- Hill, L.T., 1948., J. Phys. Chem. 48, 101.
- Hughes, D.L., Bergan, J. And Grabowski, E.J. 1986., Amino Acid Chemistry in Dipolar Aprotic Solvents Dissociation Constants and Ambident Reactivity. J. Org. Chem. 51,2579.
- Jukes, T.H. and Schmidt, C.L.A., 1935., J. Biol. Chem.,1139.
- Martell, A.E. and Motekaities, R.J., 1988, The determination use of stability constants, Weinheim, New York, VCH publisher.
- Martin, R.B., Edsall; J.T., Wetlaufer, D.B., Hollingworth, B.R., 1958., J. Biol. Chem., 233, 1429.
- Martin; R.B., J. 1971, Phys. Chem, 75,.2657.
- Perrin, D.D., Dempsey, B, Serjeant, E.P., 1981., pKa prediction for organic acids and bases.
- Rabenstein, D.L., GeenBerg, M.S. and Evans, A.C., 1977., Determination of the Microscopic and Macroscopic Acid Dissociation Constant of glycly-L-histidyl-L-lysine and Related Histidine Peptides, Biochemistry, 16, 977.
- Rabenstein, D.L., Nuclearmagnetic Rezonance Studies of the Acid-Base Chemistry of Amino Acids and Peptides . 1973. J.Am.Chem.Soc. 95,2797.
- Rossotti, H. 1978., The Study of Ionic Equilibria, Longman, London and New York.
- Serjeant, E.P. 1964., Personal Observation
- Tüzün, C., 1988, Organik Kimya.