

Doktori (PhD) értekezés tézisei

***N*-klóraminosavak képződés- és bomláskinetikája**

Szabó Mária

Témavezető: Dr. Fábián István



DEBRECENI EGYETEM
Kémiai Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2019.

Bevezetés és célkitűzés

Az utóbbi években a környezatkémiai és az *in vivo* folyamatok jelentősége miatt intenzív kutatások tárgyát képezik a klór és a hipoklórossav reakciói aminosavakkal, aminosavakkal és peptidekkel. Ezek a reakciók a körülményektől függően sokféle *N*-klóramin kialakulásához vezetnek. Az *N*-klóraminok képződése több területen is fontos szerepet tölt be. Környezatkémiai szempontból a szenny- és ivóvízkezelési technológiák miatt érdekesek, mert a klórt vagy hipoklórossavat alkalmazó eljárásokban a jelenlévő aminosavakból könnyen képződnek. Másodlagos fertőtlenítőszerként, hiszen részt vesznek a mikroorganizmusok elpusztításában.

Biológiai rendszerekben is kiemelkedő jelentőségűek ezek a vegyületek. A szervezetben a gyulladásos folyamatok során hipoklórossav képződik a kloridion és hidrogén-peroxid mieloperoxidáz enzim által katalizált reakciójában. A hipoklórossav erőteljes oxidálószer, ami gyorsan reagál aminosavakkal. Az *N*-klóraminok kialakulása rövid idő alatt történik (néhány másodperc), azonban ezek a vegyületek nem stabilak, így a bomlásuk során további intermedierek és termékek keletkeznek. Emellett, hogy részt vesznek a szervezet patogéneivel szembeni védekező mechanizmusában, biológiai szempontból a képződésük részben negatív hatású, mert a sejtfalon történő áthatolás után ezek a molekulák oxidatív stresszt váltanak ki, ami az egészséges sejtek pusztulásához is vezethet. Emellett közvetett citotoxikus és/vagy genotoxikus hatása is lehet ezeknek a vegyületeknek, amit a bomlás során keletkező termékek okozhatnak.

Az *N*-klóraminok kémiáját és biológiai hatásmechanizmusát már régóta vizsgálják, azonban számos kérdés megválaszolatlan vagy ellentmondásos napjainkig is. Célunk volt ezen kérdések megválaszolása, a képződési- és bomlási reakciók kinetikájának és mechanizmusának mélyebb megértése és az ellentmondások tisztázása.

Alkalmazott módszerek

A jodometriás és pH-metriás titrálásokat Metrohm 888 típusú titrátorral végeztük, amihez Metrohm 6.0451.100 számú platina vagy Metrohm 6.0262.100 számú kombinált üvegelektrodát csatlakoztattunk.

Az aminosavak savi disszociációs állandóját pH-metriás titrálással határoztuk meg és a kapott adatok kiértékelését a SUPERQUAD programmal végeztük el.

Az N-klóraminosavak képződésének vizsgálatához Applied Photophysics SX-20 típusú, megállított áramlásos (*stopped-flow*) készüléket használtunk, amiben a detektor fotoelektronsokszorozó volt. A kinetikai görbét 10,0 mm-es optikai úthossz alkalmazásával vettük fel. Egy kinetikai görbét 3 – 5 párhuzamos mérés átlagából kaptunk meg. Az elsőrendű kinetikai görbét a műszer vezérlőszoftverével értékeltük ki. Minden más adatillesztést a megfelelő függvény alapján az OriginPro 2018 programcsomaggal végeztünk és a nemlineáris legkisebb négyzetek elvét alkalmaztuk.

A bomláskinetikai vizsgálatok során a méréseket Agilent Technologies Cary 8454 UV – Vis diódasoros spektrofotométerrel lezárt tandemküvetékben végeztük, amik fényútja 8,74 mm. A cella hőmérsékletét a készülékbe beépített Peltier típusú termosztáttal tartottuk állandó értéken.

Az NMR méréseket Bruker DRX 400 (9,4 T) spektrométeren végeztük, ami Bruker VT-1000 hőmérsékletszabályzóval és BB inverz z gradiens fejjel (5 mm) felszerelt. Mivel az NMR méréseket is vizes oldatokkal végeztük, vízelnyomásos technikát alkalmaztunk. A vízben lévő protonok jelét (4,8 ppm) watergate impulzusszekvenciával nyomtuk el (12,6 dB). A kísérletekhez az NMR-csőben a vizsgálandó mintán kívül egy mindkét végén leforrasztott kapillárist is elhelyeztünk, ami D₂O-ban oldott DSS-t (4,4-dimetil-4-szilapentán-1-szulfonsav)

tartalmazott. A DSS külső standardként szolgált az ^1H NMR jelek kémiai eltolódásának megállapításához. Az ^1H NMR spektrumok felvételéhez egy kísérletben 32 pásztázás (scan) történt, 1,366 s akvizíciós idővel és 90° -os impulzussal. A kapott spektrumokat Bruker WinNMR és MestReNova szoftvercsomagokkal elemeztük. A J-modulált ^{13}C NMR spektrumokat 22075 Hz-es ablakban, 90° -os impulzussal, 0,74 s akvizíciós- és 5 s relaxációs idővel vettük fel. A COSY, NOESY, HSQC és HMBC kísérletekhez standard Bruker impulzus programokat alkalmaztunk.

A tömegspektrumokat pozitív és negatív ionmódban rögzítettük Bruker micrOTOF-Q típusú Qq-TOF-MS készülékkel. A paramétereket a kívánt tömegtartományra (50 - 500 m/z) optimalizáltuk. A belső kalibrálásához minden minta után Na-formiát-oldatot injektáltunk (a relatív tömeghiba < 2 ppm). A reakciótermékek MS/MS vizsgálatakor ütközés által indukált fragmentációt (CID) használtunk. Különböző ütközési energiákat alkalmaztunk 5 és 30 eV között, az optimális fragmentációs energia ~ 13 eV volt. A tömegspektrumokat az otofControl 4.1 verziójával rögzítettük és a Compass DataAnalysis 4.4 verziójával dolgoztuk fel (200.55.2969).

A bomlási folyamatokban megjelenő színes részecskék számának meghatározásához mátrixrang-analízist végeztünk MatLab program segítségével.

Új tudományos eredmények

1. Meghatároztuk 17 N-klóraminosav képződésére jellemző sebességi állandót széles pH-tartományban. Bizonyítottuk, hogy a reakciósebesség pH-függését a reaktánsok protonálódási egyensúlyai szabályozzák. Igazoltuk, hogy a klórozási reakció a HOCl és a deprotonált aminocsoport között játszódik le.

Megállapítottuk, hogy az N-klóraminosavak képződése hipoklórossavból és aminosavakból bruttó másodrendű reakcióban megy végbe az (1) összefüggés szerint.

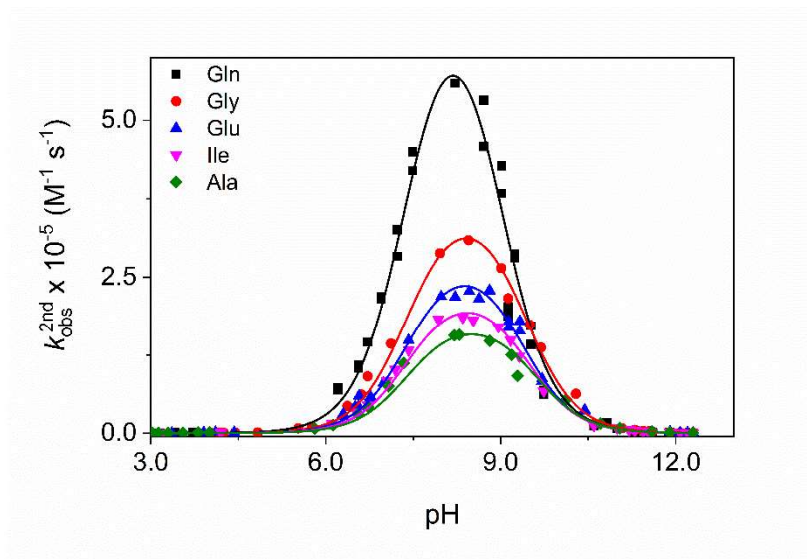
$$\frac{dc_{\text{HOCl}}}{dt} = -k_{\text{obs}}^{2\text{nd}} c_{\text{HOCl}} c_{\text{AA}} \quad (1)$$

Stopped-flow módszerrel meghatároztuk a folyamatokra jellemző pH-függő sebességi állandók értékét ($k_{\text{obs}}^{2\text{nd}}$), amit a pH függvényében az 1. ábra mutat.

A kísérleti eredmények alapján egyértelműen igazoltuk, hogy a lehetséges reakcióutak közül a protonált HOCl forma és a deprotonált aminosav között megy végbe az N-klóraminosavak képződése.

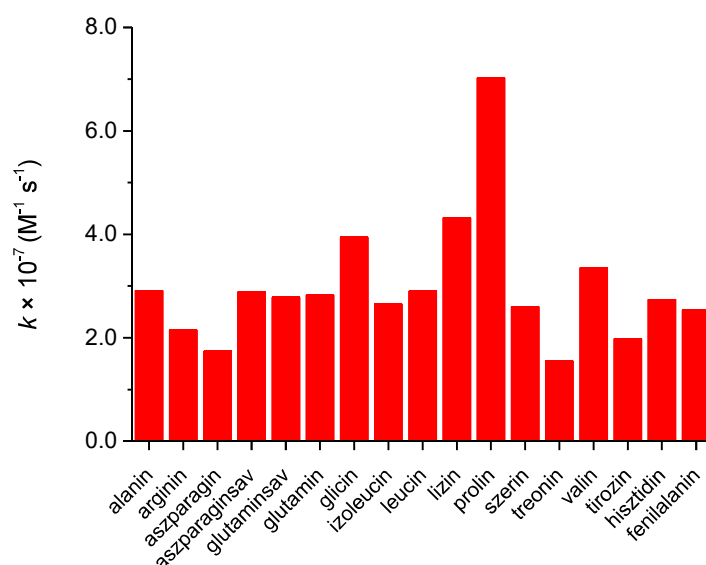
A 1. ábrán látható sebességi állandók (2) összefüggéssel történő illesztéséből meghatároztuk a pH-független másodrendű sebességi állandók (k) értékét (2. ábra), valamint hőmérsékletfüggő kísérletek alapján megadtuk a képződési reakciókat jellemző aktiválási entalpiát és entrópiát a különböző aminosavakból képződő N-klór származékok esetében. A kapott eredmények alapján az átmeneti komplexekben a N – Cl kötéserősség közel azonos és rendezettségükben sem találtunk kiugró különbséget.

$$k_{\text{obs}}^{2\text{nd}} = k \frac{K_{\text{AA}}[\text{H}^+]}{(K_{\text{AA}} + [\text{H}^+])(K_{\text{HOCl}} + [\text{H}^+])} \quad (2)$$



1. ábra A $k_{\text{obs}}^{2\text{nd}}$ pH-függése. A kísérleti adatokat a pontok, a (2) összefüggés alapján történő illesztésükkel kapott eredményeket a folytonos vonalak jelzik.

$c_{\text{NCl}} = 5,00 \times 10^{-4} \text{ M}$; $c_{\text{AA}} = 7,50 \times 10^{-4} \text{ M}$; $I = 1,00 \text{ M (NaClO}_4\text{)}$;
 $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$.



2. ábra A pH-független másodrendű sebességi állandó (k) a különböző aminosavak esetében az aminocsoport klórozási reakciójára vonatkozóan.

$I = 1,00 \text{ M (NaClO}_4\text{)}$; $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

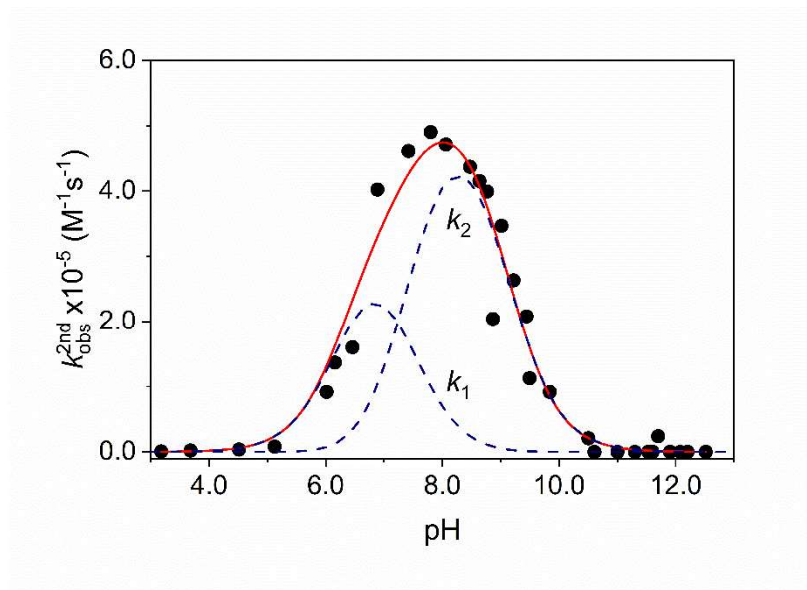
Megállapítottuk, hogy fiziológiás körülmények között a lizin klórozása nagy valószínűséggel csak az α -aminocsoporton történik meg, azonban lúgos közegben nem zárható ki az ε -aminocsoport reakciója sem.

2. Bizonyítottuk, hogy az aromás oldalláncot tartalmazó aminosavak esetében az aminosavat feleslegben alkalmazva a hisztidin kivételével nem történik meg az aromás funkciós csoport klórozása. Igazoltuk, hogy a hisztidin – HOCl reakcióban a pH-tól függően az aminocsoport és az imidazolgyűrű klórozási reakciója is lejátszódik.

Alátámasztottuk, hogy a fenilalanin esetében az aromás oldallánc nem reagál a HOCl-lel. Részletes vizsgálataink alapján a tirozin oldalláncában található OH-csoport deprotonálódása nem befolyásolja az aminocsoport reaktivitását. A triptofán és a tirozin esetében a megfelelő reakcióelegyek NMR spektruma alapján bizonyítottuk, hogy az adott körülmények között nem játszódik le az oldalláncokban lévő aromás gyűrűk klórozása.

A hisztidin – HOCl reakció tanulmányozása során bizonyítottuk, hogy két, pH-függő, párhuzamos reakcióúton megy végbe a folyamat, vagyis adott körülmények között megtörténhet az *N*-klóramin képződése és az aromás oldallánc klórozása is, amit NMR vizsgálatokkal támasztottunk alá. A mért másodrendű sebességi állandókat a pH függvényében ábrázoltuk és a két reakcióút hozzájárulását figyelembe véve illesztettük a kísérleti adatokat a (3) összefüggéssel (3. ábra).

$$k_{\text{obs}}^{2\text{nd}} = \frac{k_1 K_{A1} [H^+]^2 + k_2 K_{A1} K_{A2} [H^+]}{(K_{A1} K_{A2} + K_{A1} [H^+] + [H^+]^2) (K_{\text{HOCl}} + [H^+])} \quad (3)$$



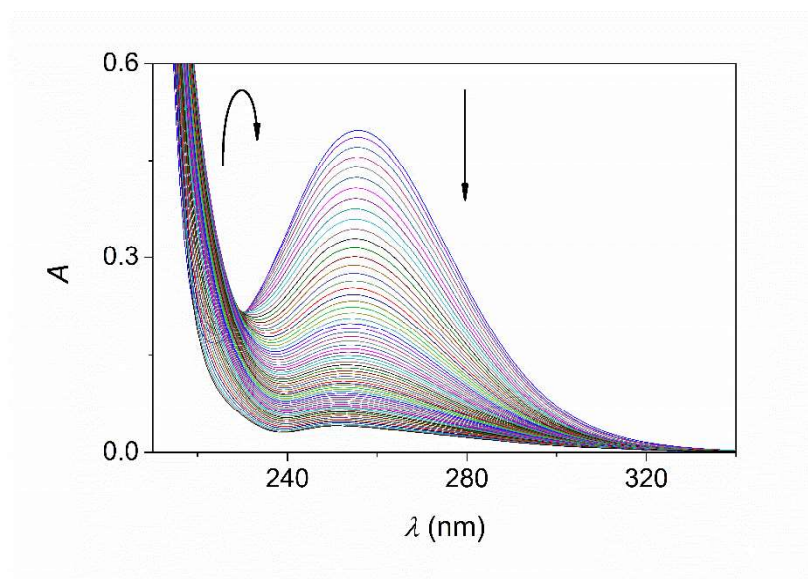
3. ábra A hisztidin – HOCl reakció sebességi állandójának pH-függése és a párhuzamos reakcióutak hozzájárulása a reakcióhoz.

$c_{\text{NCl}}^0 = 5,00 \times 10^{-4} \text{ M}$; $c_{\text{AA}}^0 = 7,50 \times 10^{-4} \text{ M}$; $I = 1,00 \text{ M (NaClO}_4\text{)}$; $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

3. Feltártuk az *N*-klórglicin bomlásának kinetikai sajátosságait, valamint felállítottuk a reakció részletes mechanizmusát. Bizonyítottuk, hogy a reakció főterméke az *N*-formilglicin, egyik fontos köztterméke pedig az *N*-oxalilglicin.

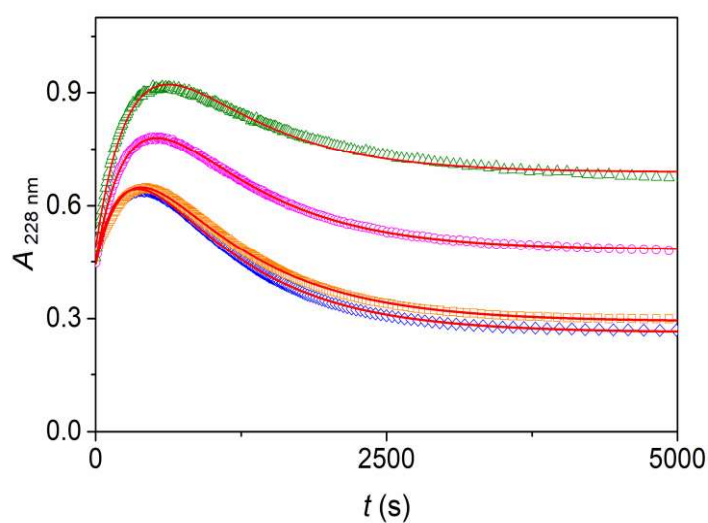
Az *N*-klórglicin (MCG) bomlása során (4. ábra) az abszorpciós maximumon ($\lambda_{\text{max}} = 255 \text{ nm}$) és annál nagyobb hullámhosszakon az exponenciális abszorbancia-csökkenést a klóramin bomlásával értelmezzük (k_{obs1}). Kisebb hullámhosszakon ($\lambda < 240 \text{ nm}$) az abszorbancia kezdeti növekedése majd csökkenése egy közttermék képződését majd egy elsőrendű folyamatban történő tovább alakulását igazolja (k_{obs2}) (5. ábra). Különböző hullámhosszakon a kinetikai görbék (4) egyenlettel történő illesztésével meghatároztuk a két folyamatra jellemző sebességi állandót. Igazoltuk, hogy nagyobb hullámhosszakon a második folyamat nem járul hozzá az abszorbancia-változáshoz, ezért a számítások során a k_{obs2} -t tartalmazó tagot elhanyagoltuk.

$$A = A_1 e^{-k_{\text{obs1}} t} + A_2 e^{-k_{\text{obs2}} t} + A_\infty \quad (4)$$



4. ábra A hipokloriton és glicin összekeverése után detektált időfüggő spektrális változás.

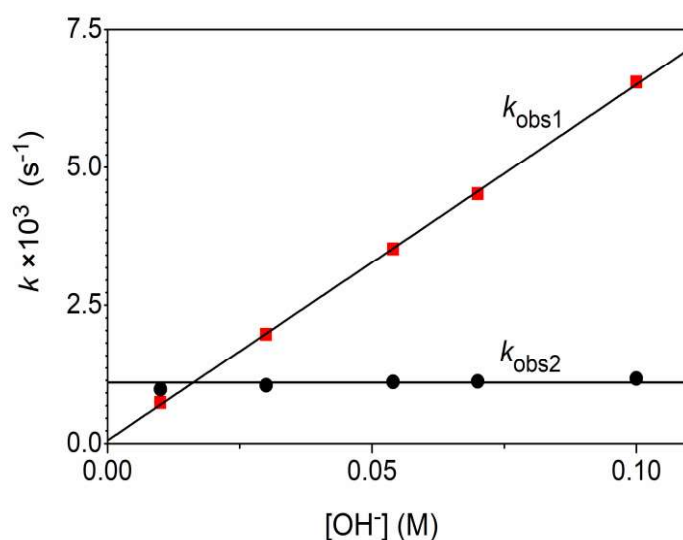
$c_{\text{Gly}}^0 = 2,00 \times 10^{-4} \text{ M}$; $c_{\text{NCl}}^0 = 1,00 \times 10^{-3} \text{ M}$; $c_{\text{OH}} = 5,40 \times 10^{-2} \text{ M}$, $I = 1,00 \text{ M}$ (NaClO_4); $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$; $t = 5000 \text{ s}$; $\Delta t = 40 \text{ s}$.



5. ábra Tipikus kinetikai görbék az MCG bomlása során 228 nm-en, különböző glicinfelesleg esetén. A kísérleti adatokat a (4) összefüggéssel illesztettük.

$k_{\text{obs1}} = (3,2 \pm 0,3) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$; $k_{\text{obs2}} = (1,2 \pm 0,1) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$
 $c_{\text{NCl}}^0 = 3,00 \times 10^{-3} \text{ M}$; $c_{\text{OH}} = 5,40 \times 10^{-2} \text{ M}$; $c_{\text{Gly}}^0 = 1,50 \times 10^{-3} \text{ M}$ ($\diamond$); $3,00 \times 10^{-3} \text{ M}$ ($\square$); $1,20 \times 10^{-2} \text{ M}$ ($\circ$); $2,70 \times 10^{-2} \text{ M}$ ($\triangle$); $I = 1,00 \text{ M}$ (NaClO_4); $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

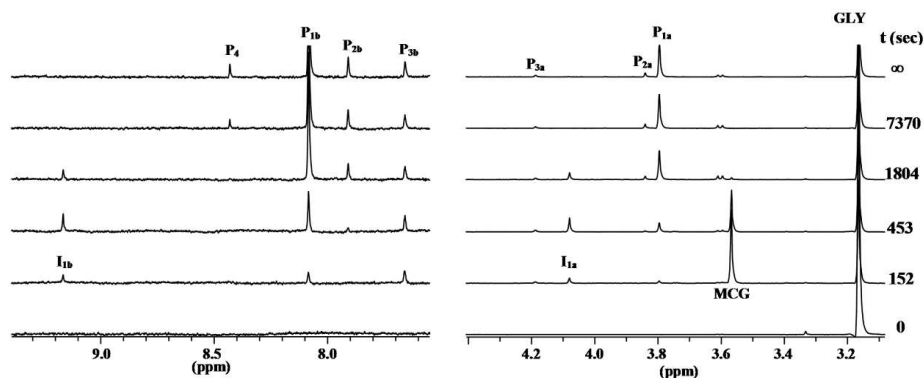
Igazoltuk, hogy a bomlási reakció sebessége jelentősen függ a pH-tól, a k_{obs1} sebességi állandó lineárisan nő a hidroxidion koncentrációjának növelésével. Semleges közegben a bomlás rendkívül lassan játszódik le. A k_{obs2} állandóval jellemzett reakció sebessége független a hidroxidion koncentrációjától (6. ábra).



6. ábra Az MCG bomlása során meghatározott sebességi állandók a hidroxidion-koncentráció függvényében.

$I = 1,00 \text{ M (NaClO}_4\text{)}; T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}.$

^1H és ^{13}C NMR módszerrel is követtük a reakciók időbeli lefutását és bizonyítottuk, hogy az *N*-klórglicin bomlásában a főtermék az *N*-formilglicin, aminek cisz és transz formája 1:9 arányban képződik (7. ábra). Köztiterméként az *N*-oxalilglicint azonosítottuk. A feleslegben lévő glicin és a bomlás során képződő másik köztitermék, a glioxalátion egyensúlyi folyamatban Schiff-bázist képez, aminek NMR csúcsait egyértelműen azonosítottuk a spektrumokban. Ez a termék lényegesen kisebb koncentrációban képződik a főtermék *N*-formilglicinhez képest.



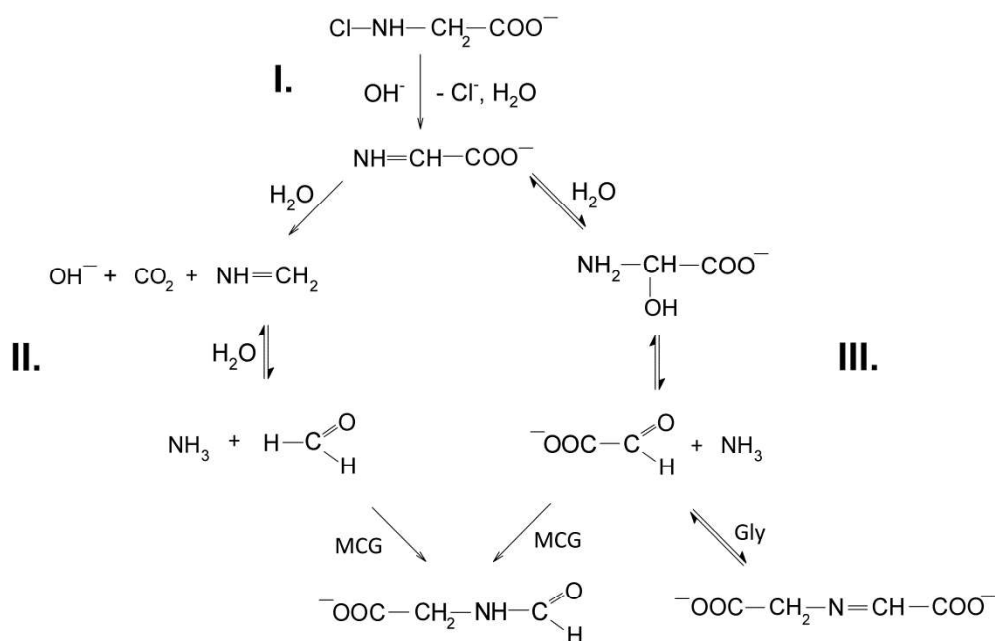
7. ábra Időfüggő ^1H NMR spektrumok az MCG bomlása során vizes közegben. A spektrumok két része különböző nagyításban van ábrázolva.

MCG: *N*-klórglicin; Gly: glicin; P_1 : *transz-N*-formilglicin; P_2 : *cisz-N*-formilglicin; P_3 : Schiff-bázis; P_4 : formiátion.

$$c_{\text{NCl}}^0 = 1,00 \times 10^{-2} \text{ M}; c_{\text{Gly}}^0 = 1,00 \times 10^{-2} \text{ M};$$

$$c_{\text{OH}} = 5,40 \times 10^{-2} \text{ M}; T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}.$$

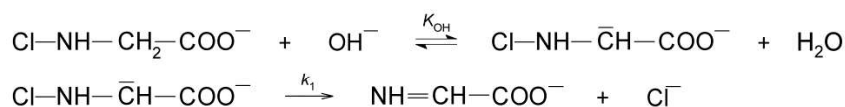
A kinetikai és NMR vizsgálatok alapján részletes mechanizmust állítottunk fel az *N*-klórglicin bomlására. A mechanizmus vázlatát az 1. séma szemlélteti.



1. séma Az *N*-klórglicin bomlásmechanizmusának vázlata.

Igazoltuk, hogy a k_{obs1} sebességi állandóval jellemzett sebességmeghatározó lépés két folyamatra bontható. Az első egy karbanion képződése az *N*-klórglicinből egy egyensúlyi deprotonálódási lépésben (K_{OH}), ami ezt követően egy irreverzibilis reakcióban iminoacetáttá alakul (k_1) (2. séma).

$$k_{\text{obs1}} = K_{\text{OH}} k_1 [\text{OH}^-] \quad (5)$$

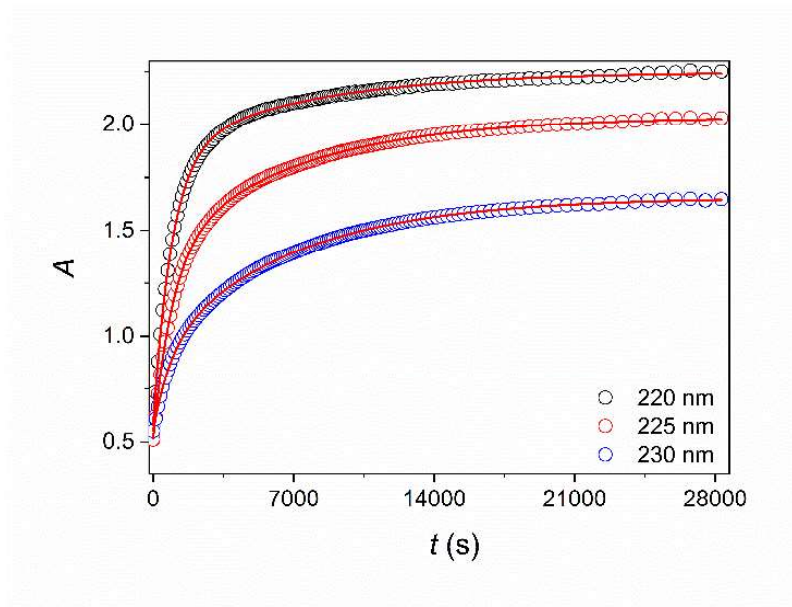


2. séma Az *N*-klórglicin bomlásának kezdeti lépései. (I. rész az 1. sémában).

A mechanizmusban a k_{obs2} állandóval jelölt folyamatot az *N*-oxalilglicin köztitermék *N*-formilglicin főtermékké történő átalakulásával értelmezzük.

4. Igazoltuk, hogy az *N*-klóralanin bomlási reakciója két parallel reakcióúton játszódik le, amit az alkalmazott pH szabályoz. Semleges közegben az acetaldehid, míg lúgos közegben a piruvácion a reakció főterméke. Bizonyítottuk, hogy az *N*-klórglicin és az *N*-klóralanin bomlása eltérő mechanizmus szerint játszódik le.

Megállapítottuk, hogy az aminosavak oldallánci funkcióscsoportjának jelentős hatása van a klóraminosavak bomlására nézve. Igazoltuk, hogy lúgos közegben, nagyobb hullámhosszakon az exponenciálisan csökkenő kinetikai görbék az *N*-klóralanin bomlásához tartoznak (k_{obs1}), míg kisebb hullámhosszakon a kinetikai görbék a bomláshoz és a termékképződéshez rendelhetők (k_{obs2}). Ezeket a görbéket a (4) összefüggéssel illesztettük (8. ábra).



8. ábra Tipikus kinetikai görbék az *N*-klóralanin bomlása során lúgos közegben.

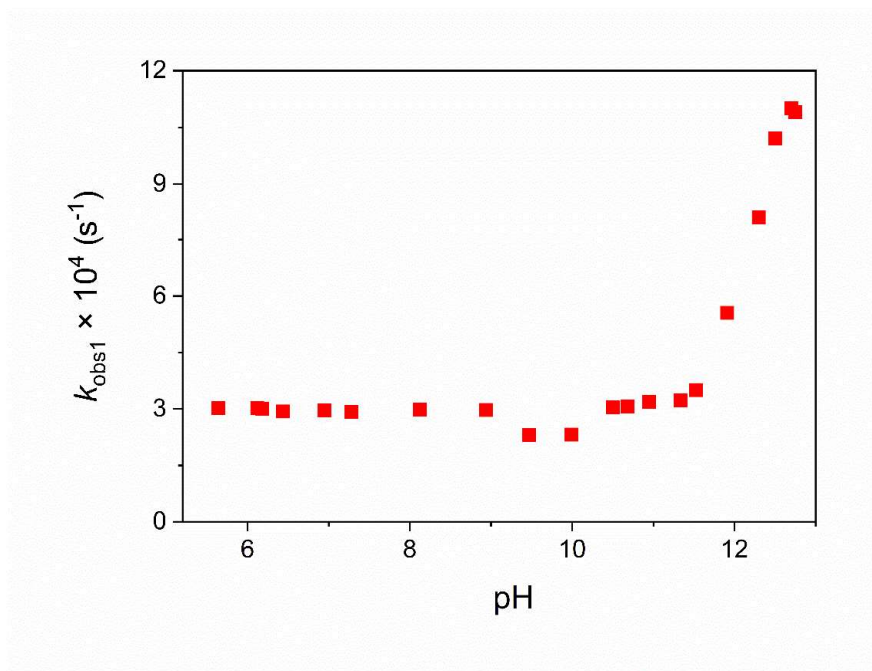
A kísérleti adatokat a (4) összefüggéssel illesztettük:

$$k_{\text{obs1}} = (1,09 \pm 0,01) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}; k_{\text{obs2}} = (1,46 \pm 0,02) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$$

$$c_{\text{Ala}}^0 = 3,00 \times 10^{-3} \text{ M}; c_{\text{NCl}}^0 = 3,00 \times 10^{-3} \text{ M}; c_{\text{OH}^-} = 5,00 \times 10^{-2} \text{ M};$$

$$I = 1,00 \text{ M (NaClO}_4\text{)}; T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}.$$

Megállapítottuk, hogy semleges és enyhén lúgos közegben a spektrális változások lényegesen eltérnek az erősen lúgos közegben tapasztaltakhoz képest. Ez alapján egyértelmű, hogy a pH-tól függően más reakcióúton játszódik le a bomlási folyamat, így a közti- és végtermékek is különböznek. Igazoltuk, hogy a pH növelésével a bomlás sebességi állandója (k_{obs1}) nő, azaz a klóramin-oldat stabilitása egyre csökken (9. ábra).



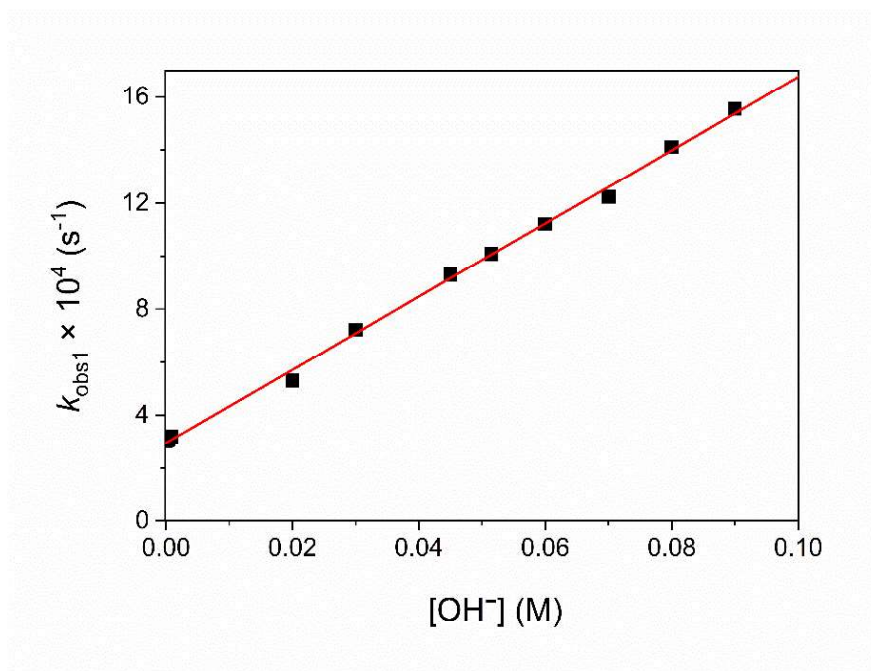
9. ábra Az *N*-klóralanin bomlása során kapott pszeudo-elsőrendű sebességi állandó a pH függvényében.

$c_{\text{Ala}}^0 = 2,50 \times 10^{-3} \text{ M}$; $c_{\text{NCl}}^0 = 2,50 \times 10^{-3} \text{ M}$; $I = 1,00 \text{ M (NaClO}_4\text{)}$;
 $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

Amint azt a 10. ábrán a nem nulla tengelymetszet igazolja, az *N*-klóralanin bomlása két párhuzamos reakcióúton, egy spontán és egy hidroxidion-katalizált folyamatban játszódik le. Ezzel összhangban a bomlásra jellemző pszeudo-elsőrendű sebességi állandó (k_{obs1}) a (6) összefüggéssel adható meg, ahol k és k_{OH} a két reakcióútra jellemző sebességi állandó. A kísérleti adatok illesztése alapján: $k = (2,95 \pm 0,09) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ és $k_{\text{OH}} = (1,38 \pm 0,02) \times 10^{-2} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

$$k_{\text{obs1}} = k + k_{\text{OH}} [\text{OH}^-] \quad (6)$$

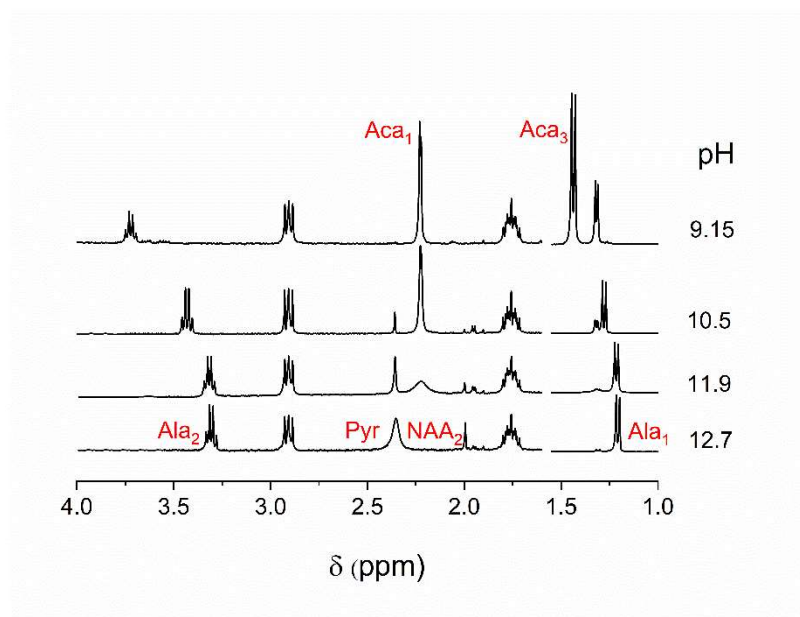
Az *N*-klóralanin esetében a két reakcióút sebessége összemérhető a vizsgált pH-tartományban, míg az *N*-klórglicin bomlása során a spontán reakció sebessége elhanyagolható, amit a 6. ábrán az origóból induló egyenes is bizonyít. Ezt a különbséget az α -alanin α -szénatomján lévő metil-szubsztituens elektronküldő hatásával értelmeztük.



10. ábra Az *N*-klóralanin bomlása során kapott pszeudo-elsőrendű sebességi állandó a hidroxidion-koncentráció függvényében.
 $c_{\text{Ala}}^0 = 2,50 \times 10^{-3} \text{ M}$; $c_{\text{NCl}}^0 = 2,50 \times 10^{-3} \text{ M}$; $I = 1,00 \text{ M (NaClO}_4\text{)}$; $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

NMR vizsgálatok alapján bizonyítottuk, hogy erősen lúgos közegben az *N*-klóralanin báziskatalizált bomlásában a piruvátion a főtermék, melléktermékként kis koncentrációban pedig *N*-acetilalanin képződik a piruvátion és a klóramin reakciójában. A reakcióelegy pH-jának csökkentésével ezen termékek jeleinek az intenzitása egyre csökken és pH ~ 10 alatt az acetaldehid válik főtermékké (11. ábra).

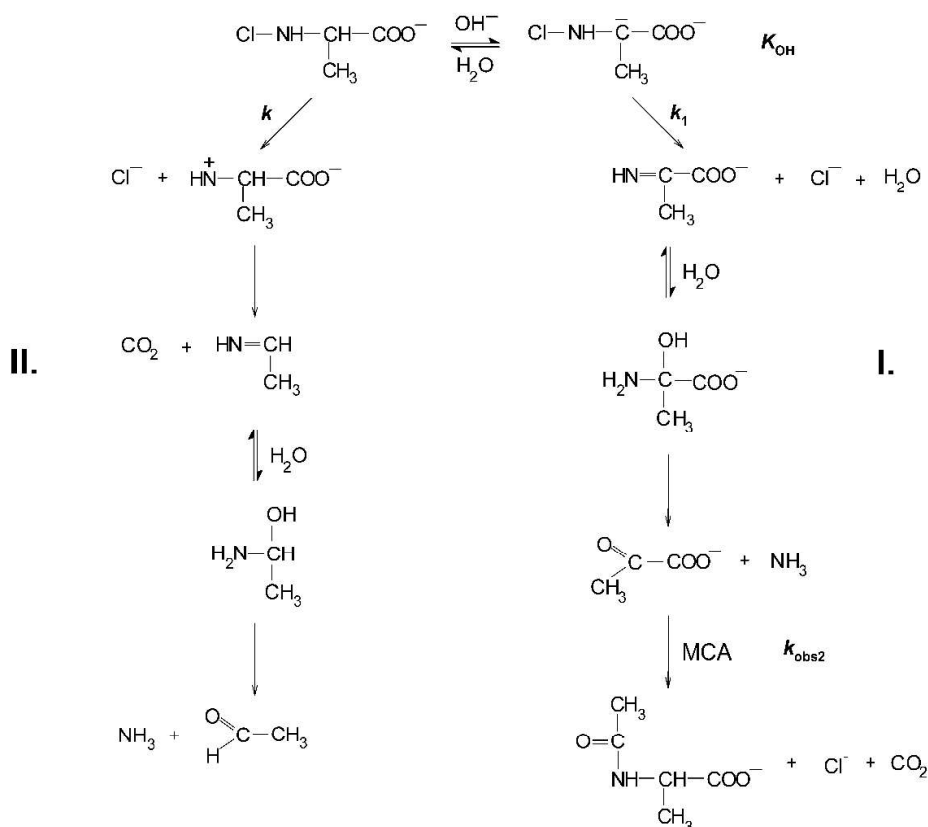
Azonosítottuk mind a piruvátionnak, mind az acetaldehydnek a hidratált, geminális diol formájához tartozó jeleit is az NMR spektrumokban.



11. ábra Az *N*-klóralanin bomlási reakciójának végén kapott ¹H NMR spektrumok különböző pH-n.

$$c_{\text{Ala}}^0 = 2,50 \times 10^{-3} \text{ M}; c_{\text{NCl}}^0 = 2,50 \times 10^{-3} \text{ M}; T = 25,0 \text{ } ^\circ\text{C}.$$

Bizonyítottuk továbbá, hogy korábbi irodalmi feltételezésekkel ellentétben az *N*-klóralanin bomlása sem az egylépéses Grob-mechanizmus alapján játszódik le. A kísérleti eredményekkel összhangban felállítottuk a bomlási reakció részletes mechanizmusát. Ennek egyszerűsített vázlatát mutatja a 3. séma. Az *N*-klórglicin bomlásához hasonlóan a hidoxidion katalitikus hatását egy karbanion képződésével értelmezzük.



3. séma Az N-klóralanin bomlásmechanizmusának vázlata.

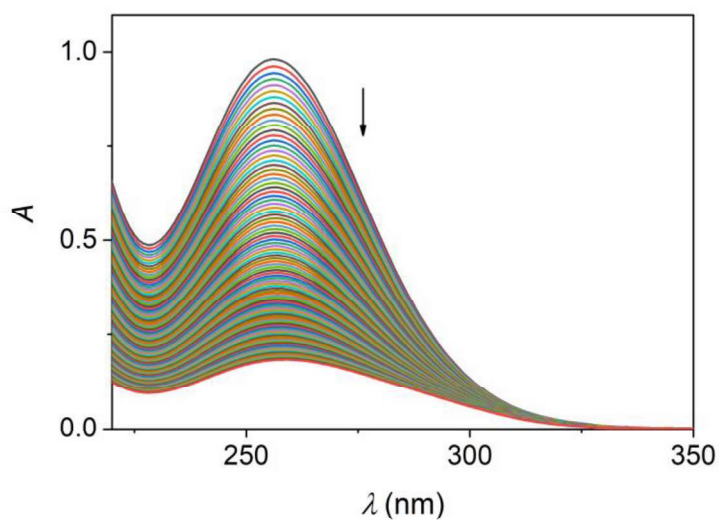
A karbanion a k_1 -gyel jelölt, sebességmeghatározó lépésben kloridion vesztésével iminopropionáttá alakul, azaz $k_{\text{OH}} = K_{\text{OH}} k_1$. Az N-klóralaninból származó iminopropionát képződése csaknem ötször lassabb, mint az N-klórglicin rendszer megfelelő reakciója ($k_{\text{OH}} = 1,38 \times 10^{-2}$ és $6,4 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Ezt a különbséget az N-klóralaninban lévő elektronküldő CH_3 -csoport jelenlétéhez rendeljük. Ez a szubsztituens várhatóan növeli az elektron sűrűségét az α -szénatomon és a nitrogénatomon. Ennek a hatásnak köszönhetően a CH csoport gyengébb savvá válik, következésképpen a K_{OH} kisebb lesz. Ezzel ellentétben az N-atomon a megnövekedett elektronsűrűség kedvezőbbé teszi a kloridion disszociációját és a k_1 -et növeli. A k_{OH} sebességi állandó értékét alapvetően ennek a két ellentétes hatásnak az összjátéka határozza meg.

Az iminopropionát vízzel való reakciója hidroxialanint termel, ami piruvátióra és ammóniára bomlik. Az iminopropionát hidratálása viszonylag lassú lépés, amit a hidroxialanin gyors átalakulása követ.

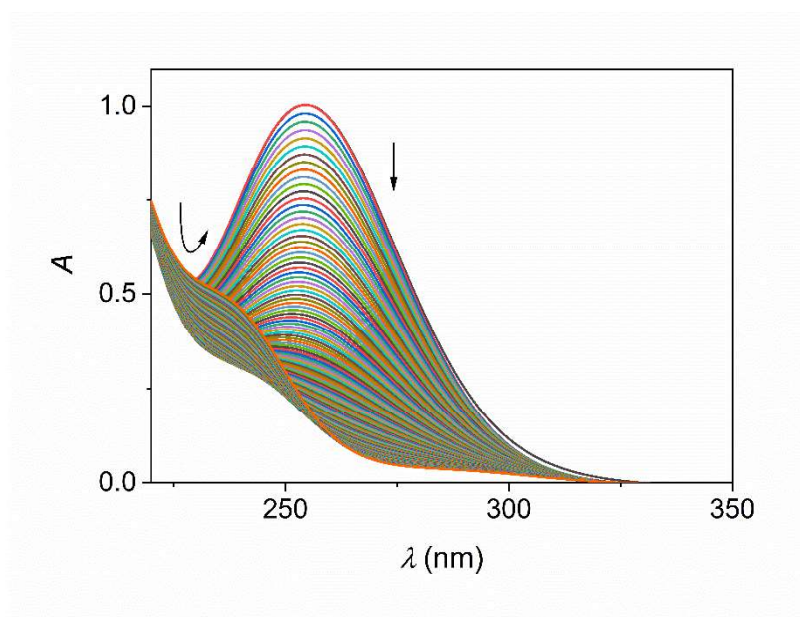
5. Megállapítottuk, hogy az elágazó láncú aminosavakból képződő *N*-klóraminosavak bomlása minden pH-n ugyanazon, az aminosavhoz képest eggyel rövidebb szénláncú aldehid képződéséhez vezet. Feltártuk a reakciók kinetikai sajátosságait és részletes mechanizmust dolgoztunk ki a bomlási folyamatok értelmezésére. Igazoltuk, hogy lúgos közegben egyensúlyi folyamatokban a megfelelő Schiff-bázisok is képződnek.

Az elágazó oldalláncot tartalmazó aminosavak *N*-klór származékainak (*N*-klórleucin, *N*-klórvalin és *N*-klórizoleucin) bomlása során kapott időfüggő spektrális változások alapján megállapítottuk, hogy az *N*-klórvalin és *N*-klórizoleucin bomlása nagyon hasonló kinetikai viselkedést mutat a teljes semleges – lúgos pH tartományban (12. ábra). Az egyes hullámhosszaknál kapott kinetikai görbék a teljes hullámhossz-tartományban jól illeszthetők egy exponenciális tagot tartalmazó egyenlettel, a különböző hullámhosszakon kapott pszeudo-elsőrendű sebességi állandók értéke 1 – 2 % szórással megegyezik.

Igazoltuk, hogy lúgos körülmények között az *N*-klórleucin esetében a spektrális változások jelentős eltérést mutatnak a másik két klóraminnal tapasztaltakhoz képest (13. ábra). 270 nm-nél és nagyobb hullámhosszakon a másik két rendszerhez hasonlóan elsőrendű kinetikai görbéket kapunk. Kisebb hullámhosszakon egy másodlagos folyamat lejátszódása is egyértelműen látható, azonban ez a reakció 12 óra alatt sem megy végbe teljesen, vagyis közvetlenül nem az *N*-klórleucin bomlásához rendelhető.

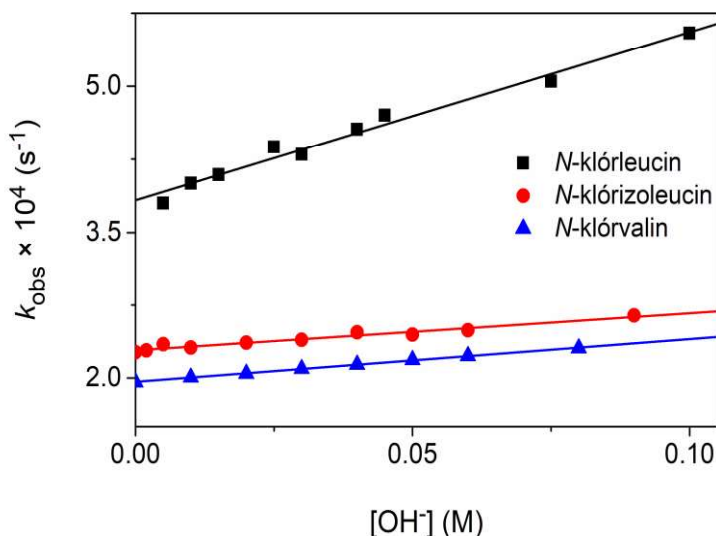


12. ábra Időfüggő spektrális változás az *N*-klórizoleucin bomlása során.
 $c_{\text{Ile}}^0 = 3,00 \times 10^{-3} \text{ M}$; $c_{\text{NCl}}^0 = 3,00 \times 10^{-3} \text{ M}$; $I = 1,00 \text{ M (NaClO}_4\text{)}$; $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$;
 $\Delta t = 60 \text{ s}$; $t = 10800 \text{ s}$; $c_{\text{OH}^-} = 5,00 \times 10^{-2} \text{ M}$.



13. ábra Időfüggő spektrális változás az *N*-klórleucin bomlása során.
 $c_{\text{Leu}}^0 = 3,00 \times 10^{-3} \text{ M}$; $c_{\text{NCl}}^0 = 3,00 \times 10^{-3} \text{ M}$; $c_{\text{OH}^-} = 5,00 \times 10^{-2} \text{ M}$;
 $I = 1,00 \text{ M (NaClO}_4\text{)}$; $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$; $\Delta t = 60 \text{ s}$; $t = 10800 \text{ s}$.

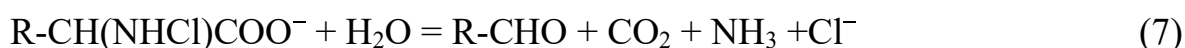
Megállapítottuk, hogy az *N*-klóraminosavak bomlási sebessége a pH növelésével nő, hasonlóan az alanin- és glicinklóraminhoz, vagyis a k_{obs} az $[\text{OH}^-]$ lineáris függvénye (14. ábra, (6) egyenlet). Az egyeneseknek ebben az esetben sem nulla a tengelymetszete, azaz a bomlási folyamat az *N*-klóralanin bomlásával analóg módon két egymással versengő reakcióúton keresztül játszódik le.



14. ábra Az *N*-klóraminosavak bomlása során kapott pszeudo-elsőrendű sebességi állandók a hidroxidion-koncentráció függvényében.
 $c_{\text{AA}}^0 = 3,00 \times 10^{-3} \text{ M}$; $c_{\text{NCl}}^0 = 3,00 \times 10^{-3} \text{ M}$; $I = 1,00 \text{ M}$ (NaClO_4); $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

Bizonyítottuk továbbá, hogy az izoleucin és valin esetében a reaktivitás nagyon hasonló, viszont az *N*-klórleucin bomlása a pH-független és az OH^- -függő reakcióúton rendre körülbelül kétszer és négyszer gyorsabb.

Mindhárom *N*-klóraminosav esetében a megfelelő aldehid képződését tapasztaltuk semleges közegben, így a bruttó folyamatot a (7) egyenlet írja le.

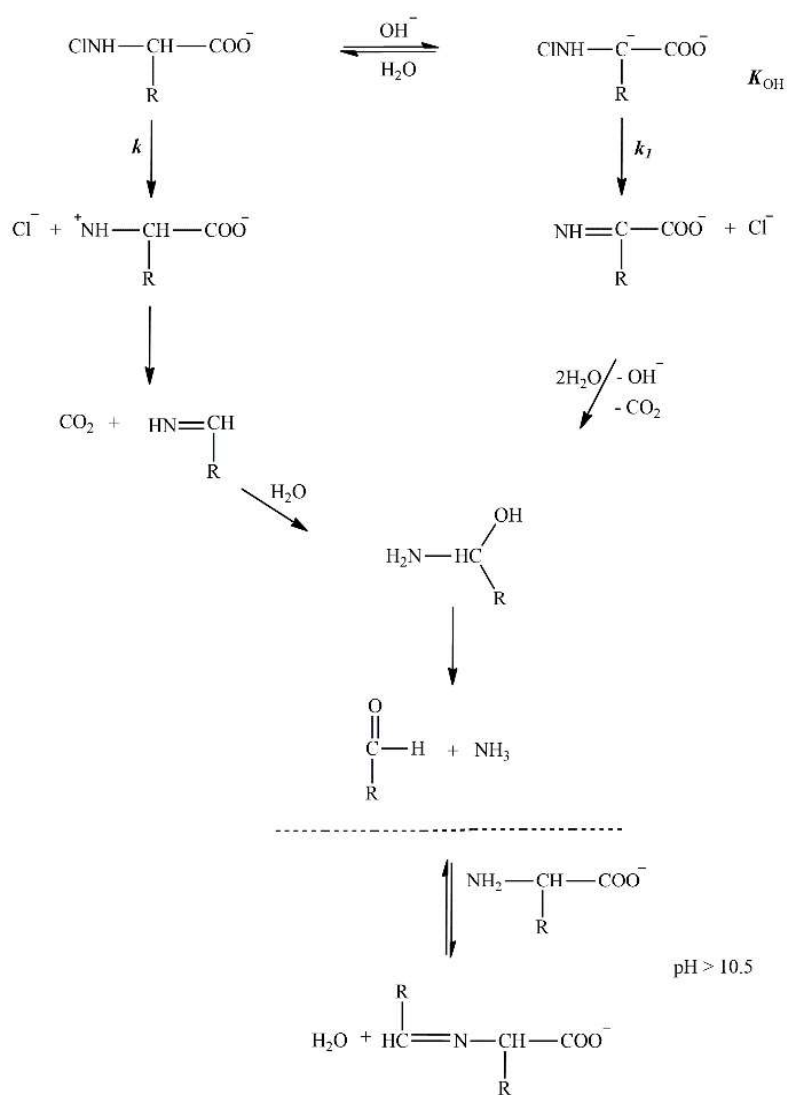


A pH növelésével az NMR spektrumokban új jeleket azonosítottunk. Igazoltuk, hogy ezek az aldehid és a feleslegben lévő aminosav közötti egyensúlyi reakcióban képződő megfelelő Schiff-bázisokhoz rendelhetők. Az aminosav

koncentrációját növelve a Schiff-bázis jelének intenzitása folyamatosan nő, még akkor is, amikor az aminosav és az aldehid koncentrációaránya nagyobb, mint 1:1. Ez azt jelenti, hogy az aldehidnek csak egy része alakul át Schiff-bázissá az alkalmazott körülmények között.

Az elágazó láncú aminosavakból képződő klóraminok bomlása a glicin- és alanin-klóraminokkal összehasonlítva eltérő kinetikai sajátságokat mutat. Utóbbi vegyületek bomlásakor két egymást követő elsőrendű sebességmeghatározó lépést igazoltunk a hidroxidion által katalizált reakcióúton. A második lépést a reaktív intermedierek és az *N*-klóraminosavak közötti reakciókkal értelmeztük. Ilyen folyamat nem játszódik le az *N*-klórleucin, -izoleucin és -valin bomlásakor. A kísérleti eredmények alapján a pH-független és az $[\text{OH}^-]$ -függő reakcióúton ugyanaz az aldehid képződik. Ez váratlan eredmény, különösen, ha figyelembe vesszük, hogy az *N*-klóralanin bomlása során semleges és erősen lúgos körülmények között különböző termékek képződnek.

Hasonlóan az előző fejezetekben tárgyalt rendszerekhez, az elágazó láncú aminosavakból képződő klóraminok bomlása során a pszeudo elsőrendű sebességi együttható (k_{obs}) $[\text{OH}^-]$ -függését azzal értelmezzük, hogy az OH^- részvételével egy gyors egyensúlyi lépésben karbanion képződik, ami deklórozás révén iminné alakul át a k_1 -gyel jellemzett sebességmeghatározó lépésben. Az *N*-klóralanin esetében az imin deaminálása a 2-keto-karbonsav termék stabilizálásához vezet. Ez a reakciólépés kizárható a most tárgyalt klóraminok esetében, mivel a dekarboxilezésnek a deaminálást meg kell előznie, hogy aldehidet kapjunk végtermékként. Feltételezésünk szerint a viszonylag nagy alkilánc jelenléte az oldalláncban a CO_2 felszabadulását idézi elő az NH_3 helyett (4. séma). Ez a szekvencia ugyanannak a hemiaminálnak a képződéséhez vezet, mint a pH-független reakcióút.



4. séma Az elágazó láncú aminosavakból képződő *N*-klóraminok bomlásának mechanizmusa.

Az eredmények hasznosítási lehetőségei

Munkánk során a hipoklórossav és különböző aminosavak között lejátszódó klórozási reakció kinetikáját és mechanizmusát tanulmányoztuk. Az ezekben a folyamatokban képződő N-klóraminosavak képződés- és bomláskinetikájának sajátosságait tisztáztuk. Azonosítottuk a közti- és végtermékeket, illetve azok arányát, ami hozzájárul a vízkezelési technológiákban megjelenő vegyületek feltérképezéséhez. A képződő vegyületek alapvetően meghatározzák az ivóvíz ízét és szagát, ami a felhasználás során problémát jelenthet, tehát eredményeink a vízkezelési eljárások optimalizálásához, jobb minőségű ivóvíz előállításához is hozzájárulhatnak.

A tanulmányozott reakcióknak jelentős biológiai szerepük is van, hiszen az élő szervezetben is végbemennek. Így a tanulmányozott reakciók részletes mechanizmusának feltárása biológiailag is fontos, *in vivo* folyamatok mélyebb megértéséhez is hozzájárul. Az azonosított köztitermékek és termékek közül több aktívan részt vesz különböző biológiai folyamatokban, például hatással van enzimek működésére. Így eredményeink elősegítik az *in vivo* képződő N-klóraminosavak bomlásához rendelhető biológiai hatások molekuláris hátterének értelmezését is.



Nyilvántartási szám: DEENK/308/2019.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Szabó Mária
Neptun kód: DYWHQD
Doktori Iskola: Kémiai Tudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10051172

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

Idegén nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (5)

1. **Szabó, M.**, Bíró, V., Simon, F., Fábán, I.: The decomposition of N-chloro amino acids of essential branched-chain amino acids: kinetics and mechanism.
J. Hazard. Mater. 382, 1-8, 2020. ISSN: 0304-3894.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.120988>
IF: 7.65 (2018)
2. Simon, F., **Szabó, M.**, Fábán, I.: pH controlled byproduct formation in aqueous decomposition of N-chloro- α -alanine.
J. Hazard. Mater. 362, 286-293, 2019. ISSN: 0304-3894.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.09.004>
IF: 7.65 (2018)
3. **Szabó, M.**, Simon, F., Fábán, I.: The formation of N-chloramines with proteinogenic amino acids.
Water Res. 165, 1-8, 2019. ISSN: 0043-1354.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2019.114994>
IF: 7.913 (2018)
4. **Szabó, M.**, Bellér, G., Kalmár, J., Fábán, I.: The Kinetics and Mechanism of Complex Redox Reactions in Aqueous Solution: The Tools of the Trade.
Adv. Inorg. Chem. 70, 1-61, 2017. ISSN: 0898-8838.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.adioch.2017.02.004>
IF: 1.316
5. **Szabó, M.**, Baranyai, Z., Somsák, L., Fábán, I.: Decomposition of N-Chloroglycine in Alkaline Aqueous Solution: Kinetics and Mechanism.
Chem. Res. Toxicol. 28 (6), 1282-1291, 2015. ISSN: 0893-228X.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.chemrestox.5b00084>
IF: 3.025





További közlemények

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (5)

6. Gáspár, A., Pesti, A., **Szabó, M.**, Kecskeméti, Á.: Determination of chlorine species by capillary electrophoresis: mass spectrometry.
Electrophoresis. Epub, 1-8, 2019. ISSN: 0173-0835.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/elps.201900138>
IF: 2.754 (2018)
7. **Szabó, M.**, Kalmár, J., Ditroi, T., Bellér, G., Lente, G., Simic, N., Fábán, I.: Equilibria and kinetics of chromium(VI) speciation in aqueous solution ? A comprehensive study from pH 2 to 11.
Inorg. Chim. Acta. 472, 295-301, 2018. ISSN: 0020-1693.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ica.2017.05.038>
IF: 2.433
8. Kalmár, J., **Szabó, M.**, Simic, N., Fábán, I.: Kinetics and mechanism of the chromium(IV) catalyzed decomposition of hypochlorous acid at elevated temperature and high ionic strength.
Dalton Trans. 47 (11), 3831-3840, 2018. ISSN: 1477-9226.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/C8DT00120K>
IF: 4.052
9. Najóczki, F., Bellér, G., **Szabó, M.**, Fábán, I.: Substituent effect on the N-oxidation of 1,10-phenanthroline derivatives by peroxomonosulfate ion.
New J. Chem. 41 (18), 9947-9953, 2017. ISSN: 1144-0546.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/C7NJ01860F>
IF: 3.201
10. Bellér, G., **Szabó, M.**, Lente, G., Fábán, I.: Formation of 1,10-Phenanthroline-N,N'-dioxide under Mild Conditions: The Kinetics and Mechanism of the Oxidation of 1,10-Phenanthroline by Peroxomonosulfate Ion (Oxone).
J. Org. Chem. 81 (13), 5345-5353, 2016. ISSN: 0022-3263.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.joc.6b00641>
IF: 4.849

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 44,843

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
27,554**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2019.09.03.

