

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Ammónia és aminosavak oxidációja
hipoklórossavval: kinetika és mechanizmus**

Simon Fruzsina

Témavezető: Dr. Fábián István



DEBRECENI EGYETEM

Kémia Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2023.

Bevezetés és célkitűzés

Környezetkémiai és *in vivo* jelentősége miatt napjainkban is mélyrehatóan tanulmányozzák a hipoklórossav (HOCl) és az aminocsoportot tartalmazó vegyületek között lejátszódó folyamatokat. Ezek a reakciók minden esetben klóraminok képződését eredményezik, amelyek az adott körülményektől függően igen változatos összetételűek lehetnek. A közeg pH-jától, valamint a HOCl koncentrációjától függően alkothatnak mono- és diklórozott amino vegyületeket és az ammónia esetében triklóramint is.

Az *N*-klórozott vegyületek keletkezése több tématerületen is kiemelkedő jelentőségű. A szenny- és ivóvízkezelési technológiákban fertőtlenítőszerként többnyire klórt és hipoklórossavat alkalmaznak. Így a vizekben fellelhető ammóniából, amino-vegyületekből és aminosavakból könnyen képződhetnek az említett klóraminok. Környezetkémiai szempontból ezeknek a vegyületeknek a jelenléte igen fontos szerepet tölt be. Másodlagos fertőtlenítőszernek tekinthetők, ugyanis képesek a mikroorganizmusok és vírusok elpusztítására, bár csak kisebb hatékonysággal, mint a klór vagy a hipoklórossav. Negatív hatásuk is van, ugyanis korábbi eredmények szerint jelentős mértékben hozzájárulnak a toxikus fertőtlenítési melléktermékek (*disinfection by-products*, DBP-k) képződéséhez.

Az élő szervezetben is lejátszódnak hasonló reakciók, amikben az *N*-klóraminok megjelennek. A gyulladás folyamata a szervezet természetes védekező mechanizmusa. A mieloperoxidáz enzim egy úgynevezett gyulladáshoz vezető mediátormolekula, ami a környezetében levő kloridionból és a szintén a gyulladás miatt keletkező hidrogén-peroxidból hipoklórossavat állít elő. A HOCl erős kórokozó ellenes hatású, viszonylag stabil vegyület, a betegségek során nagy mértékben fel tud

halmozódni a testben és a jelenlévő molekulákkal reagálhat, mint például az aminosavakkal, peptidekkel és fehérjékkel.

Jól ismert, hogy a klóraminok instabil vegyületek, összetételüktől függően számos molekula prekursorai, amelyeknek toxikus hatása lehet az élő szervezetben.

Az *N*-klóraminok és az *N*-klóraminosavak reakcióiról és biológiai hatásmechanizmusáról számos információt találhatunk korábbi kutatási eredményekben. Ennek ellenére az adatok nagy része ellentmondásos, valamint az *N,N*-diklóraminosavak képződési- és bomlási folyamataira nem, vagy csak igen kevés megbízható adatot találhatunk. Ahhoz, hogy az említett vegyületek tulajdonságairól bővebb információt kapjunk, a kinetikai sajátságok eddiginél jóval részletesebb vizsgálatára és a reakciókban képződő köztitermékek és termékek azonosítására van szükség.

Munkánk célja ezen vegyületek képződés- és bomláskinetikájának vizsgálata, a reakciók mechanizmusának részletes feltárása és eredményeink alapján az irodalomban található ellentmondások tisztázása.

Alkalmazott módszerek

A redoxi és a pH-potenciometriás titrálások kivitelezéséhez Metrohm 888 Titrandó automata titrátort alkalmaztunk, amihez Metrohm 6.0451.100 számú kombinált platina- és Metrohm 6.0262.100 jelű kombinált üvegelektrodót csatlakoztattunk. A pH-mérésekhez a Metrohm 913 számú pH-mérőt és a hozzá kapcsolt Metrohm 6.0234.100 jelű mikroelektrodót használtuk. Az elektrodokat kálium-hidrogén-ftalát (0,05 M) és bórax (0,01 M) standard oldatok segítségével naponta kalibráltuk. A pH-mérés során kapott adatokat konvertáltuk az Irving és munkatársai által közölt módon és az értekezésben a $\text{pH} = -\log[\text{H}^+]$ összefüggést alkalmaztuk.

Az aminosavak savi disszociációs állandóinak meghatározásához pH-metriás mérést végeztünk és a kapott adatokat a SUPERQUAD programmal értékeltük ki.

A képződéskinetikai kísérletekhez Applied Photophysics SX-20 típusú, megállított áramlásos (*stopped-flow*) készüléket alkalmaztunk. A műszerhez kapcsolt detektor fotoelektronsokszorozó volt. A kinetikai görbéket a minták koncentrációjától függően 2,00 vagy 10,0 mm-es optikai úthossz mellett detektáltuk. Egy kinetikai görbét 3 - 5 párhuzamos kísérlet átlagából határoztunk meg. Több kinetikai görbe egyidejű felvételére a szoftver *Spectra Kinetics* funkcióját, míg az összetett kinetikai görbék detektálásához a *Split Timebase* funkcióját használtuk. A kinetikai görbék illesztéséhez az OriginPro 2018 programot használtuk a megfelelő függvények és a nemlineáris legkisebb négyzetek elve alkalmazásával.

A viszonylag lassabb reakciók követésére Agilent Technologies Cary 8454 UV – Vis diódasoros spektrofotométert alkalmaztunk. Különböző megvilágítási protokollok segítségével igazoltuk, hogy

fotokémiiai reakciók nem játszódnak le a tanulmányozott rendszerekben. A mérések kivitelezéséhez a minták koncentrációjától függően 0,1; 0,2 vagy 1,0 cm fényúthosszúságú, illetve tandem küvettákat ($l = 0,874$ cm) használtunk. A készülékbe épített Peltier típusú termosztát segítségével a mérőcella hőmérsékletét állandó értéken tartottuk. A referencia tartalmazta a mérendő oldatok összetételétől függően a nátrium-hidroxid-, a puffer- és a NaClO_4 -oldatot megfelelő koncentrációban, így ezeknek a komponenseknek a fényelnyelési hozzájárulásával korrigált spektrumokat vettünk fel. A legtöbb esetben a spektrális változásokat 200 – 400 nm hullámhossztartományban követtük.

Az NMR mérésekhez Bruker DRX 400 (9,4 T) spektrométert alkalmaztunk. A berendezés Bruker VT-1000 hőmérsékletszabályozóval és BB inverz z gradiens fejjel (5 mm) van felszerelve. A kísérletek során vízelnyomósos technikát alkalmaztunk, mivel vizes oldatokkal dolgoztunk az NMR mérések esetében is. A vízben található proton jeleket (4,8 ppm) *watergate* impulzusszekvencia segítségével nyomtuk el (12,6 dB). Az NMR-csőbe a mintán kívül egy mindkét végén leforrasztott kapillárist is elhelyeztünk, ami nehézvízben oldott DSS-t (4,4-dimetil-4-szilapentán-1-szulfonsav) tartalmazott. Az ^1H -NMR jelek kémiai eltolódásának meghatározásához használtuk a DSS-t külső standardként. A DSS jelei a következő kémiai eltolódásokkal és felhasadásokkal jelentkeznek a spektrumokban: 0,00 ppm (szingulett), 0,63 ppm (triplett), 1,76 ppm (multiplett), 2,91 ppm (triplett). Az ^1H -NMR spektrumok mérése 32 pásztázással (*scan*), 1,366 s akvizíciós idővel és 90° -os impulzussal történt. A mért spektrumokat Bruker WinNMR és MestReNova szoftvercsomagok használatával értékeltük ki.

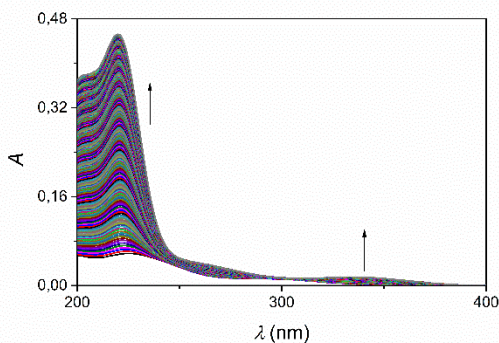
Az ionkromatográfiás (IC) kísérleteinket Thermo 5000+ kétcsatornás ionkromatográf készülékkel valósítottuk meg. Az anionos védő- és analitikai oszlop Dionex IonPacTMAG14 és Dionex IonPacTMAS14 típusú volt.

Új tudományos eredmények

1. Az ammónia – hipoklórossav rendszerben részletesen tanulmányoztuk a mono-, di- és triklóramin képződéskinetikáját savas körülmények között. Igazoltuk az egyes reakciólépésekre vonatkozó sebességi egyenleteket és meghatároztuk azok sebességi együtthatóit.

1.1. Bizonyítottuk, hogy az ammóniumion és a hipoklórossav közötti közvetlen reakció viszonylag lassú, mindkét reaktánsra nézve elsőrendű folyamat, amiben az NH_4^+ jelentős feleslege mellett is csak a triklóramin képződése figyelhető meg.

Az NH_4^+ - HOCl reakcióban a 220 és 336 nm-es abszorbancia-maximumoknál tapasztalt spektrális változás egyértelműen az NCl_3 képződéséhez rendelhető (1. ábra). A spektrumok elemzése alapján igazoltuk, hogy a reakció lefutása során NH_2Cl és NHCl_2 átmenetileg sem halmozódik fel a reakciórendszerben.

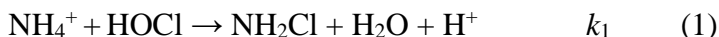


1. ábra. Az NH_4^+ és a HOCl reakciója során tapasztalt spektrális változás savas körülmények között.

$c_{\text{NH}_3^0} = 2,50 \times 10^{-3} \text{ M}$; $c_{\text{HOCl}^0} = 2,50 \times 10^{-3} \text{ M}$; $\text{pH} = 1,95$; $I = 1,00 \text{ M}$ (NaClO_4); $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$; $\Delta t = 29 \text{ s}$; $t = 7200 \text{ s}$.

A kezdeti sebességek módszere alapján igazoltuk, hogy a folyamat sebességmeghatározó lépése mind az NH_4^+ -ra, mind pedig a HOCl-re nézve elsőrendű, azaz összességében egy másodrendű folyamat.

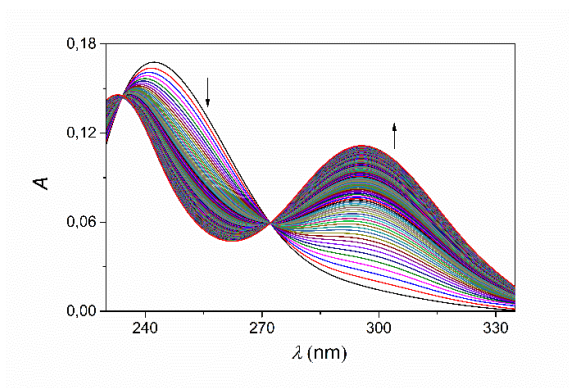
A kísérleti tapasztalatok azzal értelmezhetőek, hogy a viszonylag lassú sebességmeghatározó lépésben monoklóramin képződik (1), ami gyors reakciólépésekben tovább oxidálódik triklóraminná (*vide infra*).



A k_1 sebességi együtthatót a 220 nm hullámhosszon felvett kinetikai görbék illesztésével becsültük (1. táblázat).

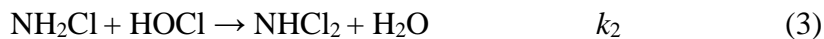
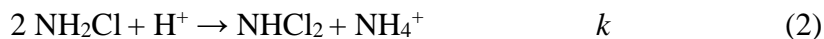
1.2. Bizonyítottuk, hogy a monoklóramin hipoklórossav által történő viszonylag gyors oxidációja mindkét reaktánsra nézve elsőrendű folyamat, és a reakció sebességi állandójának pH függése a monoklóramin protonálódási egyensúlyával értelmezhető. A monoklóramin feleslege mellett, nagyjából 0,7 : 1,0 HOCl : NH₂Cl koncentrációarányig a monoklóramin savkatalizált bomlásának és oxidációjának sebessége összemérhető.

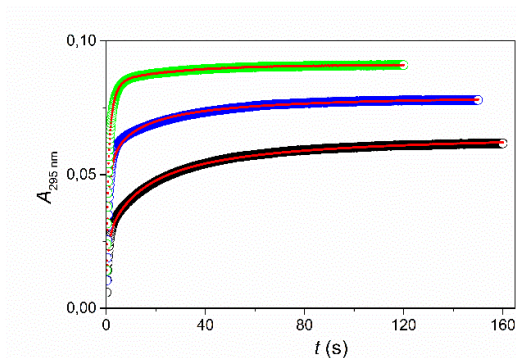
A vizsgálatokhoz az NH_2Cl -t enyhén lúgos közegben állítottuk elő, majd savas közegben reagáltattuk HOCl-lel úgy, hogy minden esetben legfeljebb egy ekvivalens HOCl-t alkalmaztunk. Ilyen körülmények között a spektrális változások a monoklóramin diklóraminná történő átalakulásával vannak összhangban (2. ábra).



2. ábra. Az NH_2Cl és a HOCl reakcióját követő spektrális változás savas körülmények között. (NH_2Cl : $\lambda_{\text{max}} = 243 \text{ nm}$, NHCl_2 : $\lambda_{\text{max}} = 292 \text{ nm}$).
 $c_{\text{NH}_2\text{Cl}}^0 = 5,00 \times 10^{-4} \text{ M}$; $c_{\text{HOCl}}^0 = 5,00 \times 10^{-4} \text{ M}$; $\text{pH} = 1,92$; $I = 1,00 \text{ M}$ (NaClO_4); $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$; $t = 7 \text{ s}$.

Összességében az ilyen körülmények között mért kinetikai görbék az NH_2Cl -re nézve másodrendű (2), valamint az NH_2Cl -re és a HOCl -re egyaránt elsőrendű (3) egyenletek figyelembevételével értelmezhetők (3. ábra).





3. ábra. Tipikus kinetikai görbék az NH_2Cl és a HOCl reakciója során, különböző HOCl koncentrációk mellett savas közegben. A kísérleti adatokat a (2) és (3) egyenletet feltételező kinetikai modell alapján illesztettük és az illesztett görbéket folytonos vonal jelöli.

$c_{\text{NH}_2\text{Cl}}^0 = 5,00 \times 10^{-4} \text{ M}$; $c_{\text{HOCl}}^0 = \bullet 1,00 \times 10^{-4} \text{ M}$; $\bullet 2,00 \times 10^{-4} \text{ M}$;
 $\bullet 3,00 \times 10^{-4} \text{ M}$; $\text{pH} = 1,92$; $I = 1,00 \text{ M (NaClO}_4)$; $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

Amikor a HOCl -t az NH_2Cl -hez képest 0,8 ekvivalensnél nagyobb koncentrációban alkalmazzuk, a kinetikai görbék kizárólag a (3) reakció figyelembevételével illeszthetők.

A (2) és (3) egyenletek sebességi állandói egyértelmű pH-függést mutatnak, ami az NH_2Cl protonálódási egyensúlyával értelmezhető (4).



$$K_p = \frac{[\text{NH}_3\text{Cl}^+]}{[\text{NH}_2\text{Cl}][\text{H}^+]}$$

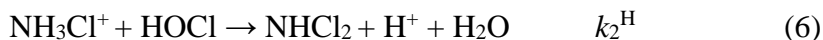
Korábban megállapították, hogy a monoklóramin bomlása a monoklóramin és a protonált formája között lejátszódó reakción keresztül történik meg (5).



azaz

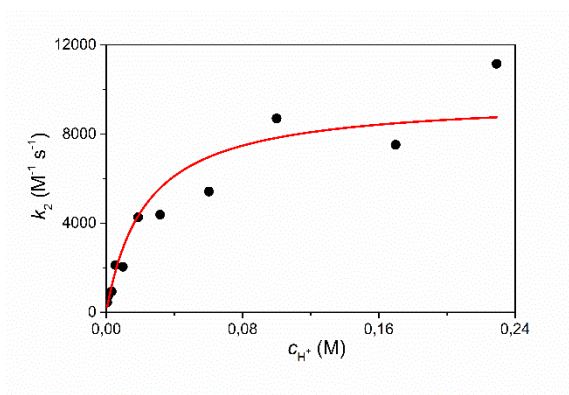
$$k = k^{\text{H}} \times \frac{\kappa_{\text{p}}[\text{H}^+]}{1 + \kappa_{\text{p}}[\text{H}^+]}$$

Eredményeink alapján a hipoklórossavval történő oxidációban a monoklóramin savi formája reaktív (4. ábra)



azaz

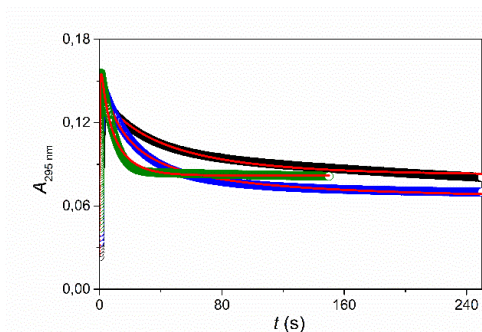
$$k_2 = k_2^{\text{H}} \times \frac{\kappa_{\text{p}}[\text{H}^+]}{1 + \kappa_{\text{p}}[\text{H}^+]}$$



4. ábra. A k_2 másodrendű sebességi állandó a hidrogénion koncentrációjának a függvényében. A sebességi állandó pH-függését értelmező összefüggés alapján illesztett görbét a folytonos vonal jelöli. $c_{\text{NH}_2\text{Cl}}^0 = 5,00 \times 10^{-4} \text{ M}$; $c_{\text{HOCl}}^0 = 5,00 \times 10^{-4} \text{ M}$; $I = 1,00 \text{ M}$ (NaClO_4); $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

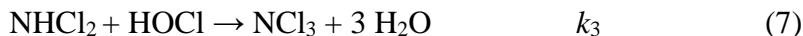
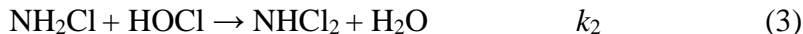
1.3. Bizonyítottuk, hogy a diklóramin triklóraminná történő oxidációja a NHCl_2 -re nézve elsőrendű a HOCl -re nézve másodrendű, azaz összességében egy harmadrendű folyamat. Az eredményeket azzal értelmeztük, hogy a reakciórendszerben a HOCl -ből egy gyors előegyensúlyban Cl_2O mindig képződik, ami lényegesen gyorsabban oxidálja a NHCl_2 -t, mint a HOCl . Igazoltuk, hogy a diklór-oxiddal való reakciónak nincs jelentősége a monoklóramin oxidációjában.

A monoklóramint ekvivalens hipoklórossavval oxidálva stabil NHCl_2 oldatot nem tudtunk előállítani, ezért a NCl_3 képződését úgy tanulmányoztuk, hogy az NH_2Cl -t 1,5 – 15 ekvivalens HOCl -lel oxidáltuk. A reakció összetett kinetikai sajátságot mutat, a kinetikai görbék első gyors szakasza a NHCl_2 képződéséhez, a második szakasza pedig a NCl_3 képződéséhez rendelhető (5. ábra). Igazoltuk, hogy a triklóramin további bomlása az alkalmazott időskálán elhanyagolható.



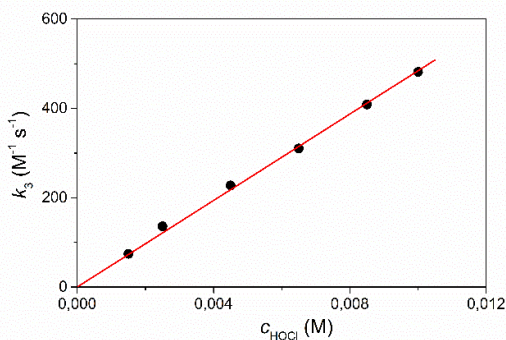
5. ábra. Tipikus kinetikai görbék az NCl_3 képződése során különböző HOCl koncentrációk mellett savas közegben. A kísérleti adatokat a (3) és (7) egyenletet feltételező modell alapján illesztettük és az illesztett görbéket folytonos vonal jelöli. $c_{\text{NH}_2\text{Cl}}^0 = 5,00 \times 10^{-4} \text{ M}$; $c_{\text{HOCl}}^0 = \bullet 7,50 \times 10^{-4} \text{ M}$; $\bullet 1,00 \times 10^{-3} \text{ M}$; $\bullet 1,50 \times 10^{-3} \text{ M}$; $I = 1,00 \text{ M}$ (NaClO_4); $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

A kinetikai görbéket a (3) és a (7) reakciókat figyelembevéve illesztettük, feltételezve, hogy mindkét reakciólépés elsőrendű a HOCl-re és az adott klóraminra nézve.



A k_2 sebességi együtthatóra kapott becült értékek jó egyezésben vannak az előzőekben részletezett eredményekkel. Bizonyítottuk, hogy a k_2 független a HOCl koncentrációjától.

Igazoltuk, hogy a k_3 lineárisan függ a HOCl-koncentrációtól (6. ábra), azaz a (7) reakció másodrendű HOCl-re nézve.



6. ábra. Az NCl_3 képződésére vonatkozó másodrendű sebességi állandók a HOCl koncentráció függvényében. Az illesztést a folytonos vonal jelöli.

$$c_{\text{NH}_2\text{Cl}}^0 = 5,00 \times 10^{-4} \text{ M}; I = 1,00 \text{ M (NaClO}_4\text{)}; T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}.$$

Az eredmények alátámasztják, hogy a NHCl_2 oxidációja a HOCl-ből egy gyors előegyensúlyban képződő Cl_2O -val játszódik le.



$$K_1 = \frac{[\text{Cl}_2\text{O}]}{[\text{HOCl}]^2}$$



azaz

$$k_3 = k_{\text{Cl}_2\text{O}} K_1 [\text{HOCl}]$$

Megállapítottuk, hogy a 0,7 – 3,2 pH-tartományban a savkoncentráció és a $k_{\text{Cl}_2\text{O}} K_1$ együttható között jó közelítéssel lineáris korreláció van. Ezt azzal értelmeztük, hogy a diklóramin is sav-bázis egyensúlyban vesz részt és a (9) reakcióban a savi forma, az NH_2Cl_2^+ a reaktív.

Az ammóniumion – hipoklórossav redoxireakció részlépéseit és a megfelelő sebességi együtthatókat az 1. táblázat foglalja össze.

1. táblázat. Az $\text{NH}_4^+ + \text{HOCl}$ reakcióban lejátszódó reakciók és sebességi állandóik.

Reakció	Paraméter	
$\text{NH}_2\text{Cl} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{NH}_3\text{Cl}^+$	$K_p^{a, b}$	$4,35 \times 10^1$
$\text{NH}_2\text{Cl} + \text{NH}_3\text{Cl}^+ \rightarrow \text{NHCl}_2 + \text{NH}_4^+$	$k^{H a, c}$	$3,35 \times 10^2$
$\text{NH}_4^+ + \text{HOCl} \rightarrow \text{NH}_2\text{Cl} + \text{H}_2\text{O} + \text{H}^+$	k_1^c	$(2,0 \pm 0,6) \times 10^{-1}$
$\text{NH}_3\text{Cl}^+ + \text{HOCl} \rightarrow \text{NHCl}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{H}^+$	$k_2^{H c}$	$(9,6 \pm 0,6) \times 10^3$
$2 \text{HOCl} \rightleftharpoons \text{Cl}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}$	K_1^b	$1,15 \times 10^{-2}$
$\text{NHCl}_2 + \text{Cl}_2\text{O} \rightarrow \text{NCl}_3 + \text{HOCl}$	$k_{\text{Cl}_2\text{O}} K_1^{d, e}$	$(1,58 \pm 0,01) \times 10^3$

a: P. Fehér et al. (2019) Dalton Trans., 48(44), 16713–16721.; b: M^{-1} ;
c: $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$; d: $\text{M}^{-2} \text{s}^{-1}$; e: pH = 1,00.

2. Részletes tanulmányoztuk öt *N*-metilaminosav és a hipoklórossav közötti reakcióban az *N*-metil-*N*-klór-származékok képződés-kinetikáját. Igazoltuk, hogy ezek bruttó másodrendű, azaz az aminosavra és a HOCl-re egyaránt elsőrendű folyamatok. A sebességi állandók pH-függését a reaktánsok protonálódási egyensúlyi reakcióival értelmeztük. Igazoltuk, hogy a szubsztituátlan aminosavak reakcióihoz képest az *N*-metilezett elágazó láncú aminosavak klórozása során az aktivált komplexben rendezetlenebb a szerkezet, ugyanakkor a reaktánsok között erősebb kötés alakul ki.

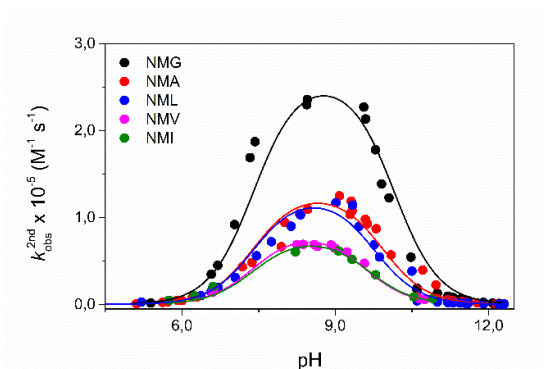
Megállapítottuk, hogy az *N*-klór-*N*-metilaminosavak képződése *N*-metilaminosavakból és hipoklórossavból a következő bruttó másodrendű sebességi egyenlettel írható le:

$$\frac{dc_{\text{NCAA}}}{dt} = k_{\text{obs}}^{2\text{nd}} c_{\text{HOCl}} c_{\text{AA}} \quad (10)$$

ahol c_{HOCl} és c_{AA} a hipoklórossav és az *N*-metilaminosav teljes koncentrációja.

A sebességi együtthatók, $k_{\text{obs}}^{2\text{nd}}$, jellegzetes haranggörbe szerinti pH-függése bizonyítja, hogy a reakció a HOCl és az aminosav teljesen deprotonált formája ($\text{CH}_3\text{NH-CH(R)-COO}^-$) között játszódik le (11) (7. ábra).





7. ábra. A $k_{\text{obs}}^{2\text{nd}}$ változása a pH-függvényében. A (12) egyenlet alapján illesztett görbéket folytonos vonalak jelölik.

$c_{\text{AA}}^0 = 7,50 \times 10^{-4} \text{ M}$; $c_{\text{HOCl}}^0 = 5,00 \times 10^{-4} \text{ M}$; $I = 1,00 \text{ M}$ (NaClO₄);

$T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

A pH-függő másodrendű sebességi állandókat a (12) egyenlettel illesztettük és meghatároztuk a reaktánsok említett formái között lejátszódó folyamatok pH-független másodrendű sebességi együtthatóját (k) (2. táblázat).

$$k_{\text{obs}}^{2\text{nd}} = k \frac{K_{\text{AA}}[\text{H}^+]}{(K_{\text{AA}} + [\text{H}^+])(K_{\text{HOCl}} + [\text{H}^+])} \quad (12)$$

ahol K_{AA} és K_{HOCl} rendre az aminosav és a hipoklórossav savi disszociációs állandója.

Hasonlóan a fehérjealkotó aminosavak N -klórozási reakcióihoz, a sebességi együtthatók értéke néhányszor $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Az N -metilglicin esetében kapott kiugróan nagy sebességi együttható azzal értelmezhető, hogy a többi aminosav-származékhoz képest az N -metil-csoport jelentősen megnöveli az aminocsoport bázikusságát, ami ezáltal aktívabbá válik egy elektrofil reaktánsal lejátszódó reakcióban. Az α -szénatomon alkil csoportot tartalmazó aminosavak esetében az

elektronküldő szubsztituens miatt ez a hatás kisebb mértékű. Eredményeink alapján feltételezhető, hogy az elágazó alkil-oldalláncú aminosavak esetében a viszonylag nagy térigényű oldallánc és az *N*-metil-szubsztituens együttesen sztérikusan gátolják a hipoklórossav támadását, ami a reakciókéesség csökkenéséhez vezet.

2. táblázat. Az *N*-metilaminosavak és a megfelelő fehérjealkotó α -aminosavak *N*-klórozására vonatkozó kinetikai paraméterek.

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

Aminosav	$k \times 10^{-7}$ ($\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	ΔS^\ddagger ^c ($\text{J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)	ΔH^\ddagger ^d (kJ mol^{-1})	$\text{p}K_{\text{AA}}$
<i>N</i> -metilglicin	$14,7 \pm 0,4$	$-29,9 \pm 1,0$	$18,8 \pm 0,3$	$10,15 \pm 0,01$
glicin ^a	3,94	-36,8	18,1	9,42
<i>N</i> -metilalanin	$4,29 \pm 0,09$	$-33,3 \pm 6,3$	$19,0 \pm 2,0$	$9,92 \pm 0,01$
α -alanin ^a	2,91	-37,1	18,4	9,60
<i>N</i> -metilleucin	$2,89 \pm 0,07$	$3,70 \pm 1,7$	$31,2 \pm 0,5$	$9,76 \pm 0,01$
leucin ^a	2,90	-73,1	7,73	9,49
<i>N</i> -metilizoleucin	$1,38 \pm 0,06$	$-10,1 \pm 2,8$	$27,8 \pm 0,9$	$9,65 \pm 0,05$
izoleucin ^a	2,65	-59,0	12,3	9,46
<i>N</i> -metilvalin	$1,24 \pm 0,02$	$-17,0 \pm 2,8$	$26,1 \pm 0,9$	$9,57 \pm 0,01$
valin ^a	3,35	-60,0	12,1	9,41

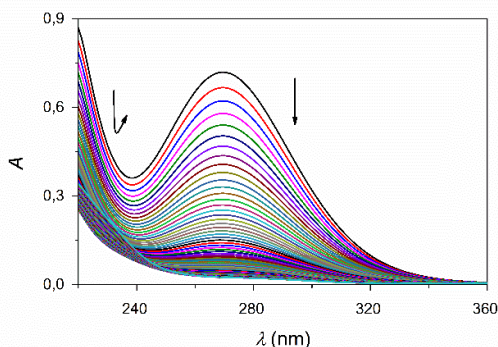
a: M. Szabó, F. Simon, I. Fábíán., *Wat. Res.*, **2019**, 165, 114994.

Meghatároztuk az *N*-klór-*N*-metilaminosavak képződési reakcióinak (11) aktiválási paramétereit és összehasonlítottuk azokat a nitrogén atomon metilcsoportot nem tartalmazó aminosavak esetében kapott adatokkal (2. táblázat). Összességében megállapítható, hogy az *N*-metilezett elágazó láncú aminosavak reakcióiban az aktivált komplexben erősebb kötés alakul ki a reaktánsok között, viszont a szerkezet rendezetlenebbé válik. Ez a jelenség az alkil-oldallánc és az *N*-metil-csoport HOCl által kiváltott pozitív induktív hatásának és a sztérikus effektusoknak az eredménye.

3. Megállapítottuk, hogy az *N*-klór-*N*-metilaminosavak több mint egy nagyságrenddel gyorsabban bomlanak el, mint a metil-szubsztituenst nem tartalmazó *N*-klórozott aminosavak. Bizonyítottuk, hogy a bomlási reakciók az *N*-klór-*N*-metilaminosavakra nézve elsőrendűek, sebességük nem függ a pH-tól, és a teljes pH-tartományban ugyanaz a végtermék képződik. Az egyetlen kivétel az *N*-klór-*N*-metilglicin, ami két párhuzamos, egy pH-független és egy hidroxidionra nézve elsőrendű, reakcióúton bomlik el, amik különböző végtermékekhez vezetnek. Fiziológias pH-n ezeknek a vegyületeknek a bomlása metil-amint és aldehideket eredményez, amelyek nem különösebben toxikusak, viszont íz- és szagproblémákat okozhatnak az ivóvízkezelés során.

Igazoltuk, hogy az *N*-klór-*N*-metilalanin (NCMA), az *N*-klór-*N*-metilleucin (NCML), az *N*-klór-*N*-metilizolucin (NCMI) és az *N*-klór-*N*-metilvalin (NCMV) esetében az időfüggő spektrális változások nagyon hasonló kinetikai viselkedést mutatnak a teljes semleges-lúgos pH-tartományban (8. ábra).¹

¹ Itt és a továbbiakban is az általános sajátságokat egy-egy konkrét rendszerre vonatkozó ábrával illusztráljuk.

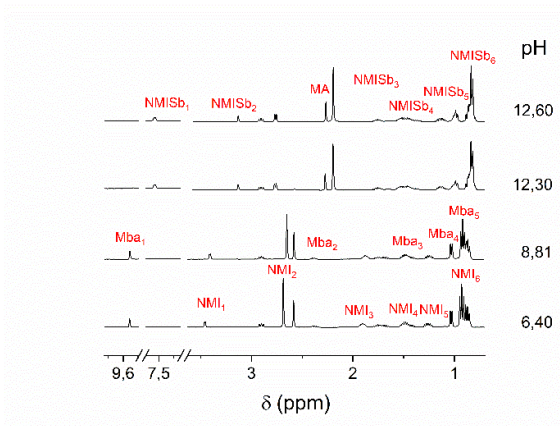


8. ábra. Az *N*-klór-*N*-metilalanin (NCMA) bomlására jellemző spektrális változás lúgos körülmények között.

$c_{\text{NCMA}}^0 = 3,00 \times 10^{-3} \text{ M}$; $c_{\text{NCMA}}^0 = 3,00 \times 10^{-3} \text{ M}$; $c_{\text{OH}^-} = 5,00 \times 10^{-2} \text{ M}$;
 $I = 1,00 \text{ M (NaClO}_4)$; $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$; $\Delta t = 5 \text{ s}$; $t = 1000 \text{ s}$.

Bizonyítottuk, hogy ezeknek az elsődrendű reakcióknak a sebességi együtthatói függetlenek a pH-tól a 6,0-13,0 tartományban. A sebességi együttható az α -szénatomon lévő alkil-oldallánc méretének növelésével csökken, jelezve a sztérikus hatások fontosságát.

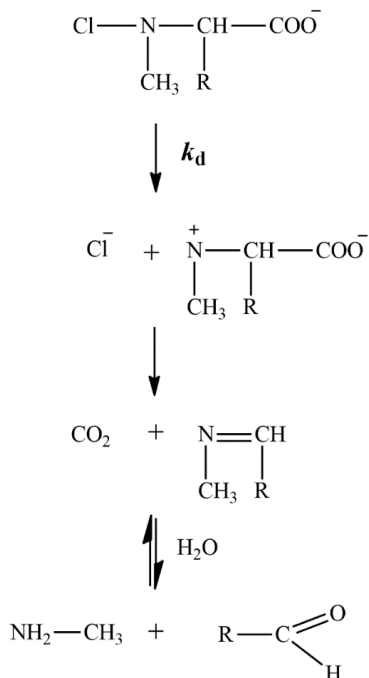
$^1\text{H-NMR}$ kísérleteket végeztünk a közti- és végtermékek azonosítására, valamint a koncentrációváltozásuk időbeli követésére. Az NCMA, NCML, NCMI és NCMV rendszerekre kapott NMR eredmények teljes mértékben analógok. Igazoltuk, hogy semleges közegben végtermékként metil-amin és a megfelelő aldehid, míg lúgos körülmények között a két termék egyensúlyi reakciójában egy Schiff-bázis képződik. A reakció pH-függését a 9. ábra mutatja az NCMI esetében.



9. ábra. Az NCMi bomlási reakciójának végén felvett ¹H-NMR spektrumok a pH-függvényében. Jel hozzárendelés: NMI: *N*-metilzoleucin, Mba: 2-metilbutiraldehid, MA: metilamin, NMISb: Schiff-bázis.

$c_{\text{NMI}}^0 = 3,00 \times 10^{-3} \text{ M}$; $c_{\text{NCMI}}^0 = 3,00 \times 10^{-3} \text{ M}$; $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

Részletes mechanizmust javasoltunk az *N*-klór-*N*-metil-alkil-szubsztituált aminosavak bomlási reakcióira (1. séma).



1. séma. Az NCMG (csak semleges körülmények között), NCMA, NCML, NCMI és NCMV bomlási reakciójának közös kinetikai modellje.

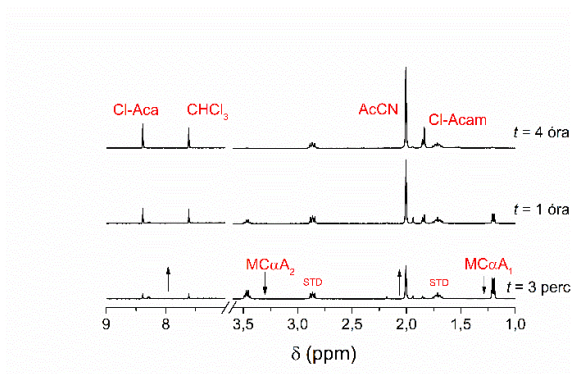
Igazoltuk, hogy lúgos közegben az *N*-klór-*N*-metilglicin bomlásának terméke a metil-amin és a glioxalátion.

4. Bizonyítottuk, hogy lúgos körülmények között a glicin, az α -alanin, valamint az elágazó láncú aminosavak (leucin, izoleucin, valin) feleslegben lévő hipoklórossavval lejátszódó reakcióiban *N,N*-diklóraminosavak nem képződnek. Minden esetben az *N*-klóraminosav gyors képződése, sebességmeghatározó lépésben történő bomlása, majd a köztitermékek további oxidációja játszódik le. $^1\text{H-NMR}$ módszerrel azonosítottuk a termékeket és megállapítottuk, hogy azok elsőrendű kinetika szerint képződnek. Részletes mechanizmusokat állítottunk fel a folyamatok értelmezésére.

Lúgos körülmények között a glicin (gly), az α -alanin (ala), a leucin (leu), az izoleucin (ileu) és a valin (val), hipoklórossav felesleg mellett történő oxidációja során az abszorbancia gyors, néhány szekundum alatt bekövetkező kezdeti növekedése a megfelelő *N*-klóraminosavak képződéséhez rendelhető. Igazoltuk, hogy a reakció az aminosavakra és a HOCl-re nézve egyaránt elsőrendű és a kinetikai görbék illesztése során kapott másodrendű sebességi állandók jó egyezésben vannak az irodalmi adatokkal.

A reakció lényegesen lassabb második szakaszában mind az öt rendszerben az OCl^- karakterisztikus fényelnyelési sávján ($\lambda_{\text{max}} = 292$ nm) az abszorbancia egy elsőrendű folyamatban jelentősen csökken.

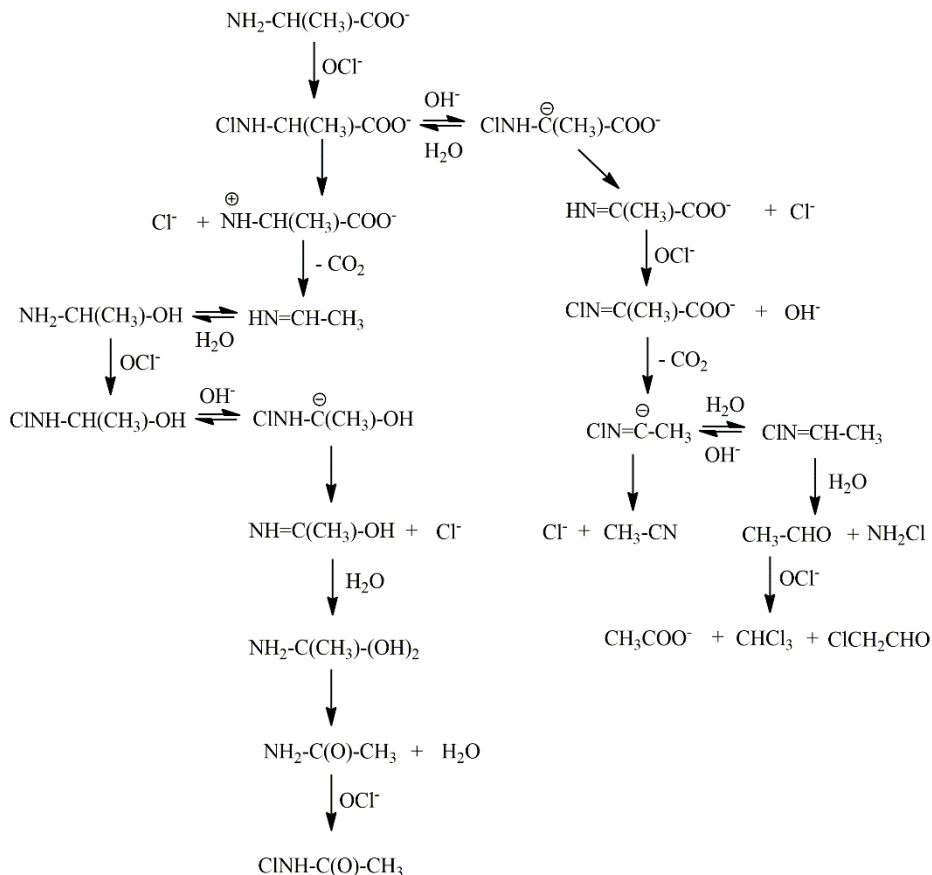
Igazoltuk, hogy a kinetikai görbék illesztésével kapott sebességi együtthatók függetlenek a HOCl koncentrációjától és az *N*-klóraminosavak sebességmeghatározó bomlásának felelnek meg. A reakciórendszerekben felvett időfüggő $^1\text{H-NMR}$ spektrumok alapján azonosítottuk a reakciók termékeit (10. ábra), illetve tanulmányoztuk képződéskinetikájukat. Megállapítottuk, hogy a spektrofotometriás és az NMR mérésekből kapott sebességi együtthatók hibahatáron belül megegyeznek, azaz a folyamat kinetikai sajátosságait ugyanaz a sebességmeghatározó lépés határozza meg.



10. ábra. Időfüggő $^1\text{H-NMR}$ spektrumok az $\text{MC}\alpha\text{A}$ bomlása során lúgos közegben. Jel hozzárendelés: $\text{MC}\alpha\text{A}$: N -klór- α -alanin, Cl-Acam : klóracetamid, AcCN : acetonitril, CHCl_3 : kloroform, Cl-Aca : klóracetaldehid, STD : standard.

$c_{\text{ala}}^0 = 7,50 \times 10^{-3} \text{ M}$; $c_{\text{HOCl}}^0 = 3,75 \times 10^{-2} \text{ M}$; $c_{\text{OH}^-} = 5,00 \times 10^{-2} \text{ M}$;
 $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

Részletese mechanizmusokat dolgoztunk ki a kísérleti adatok értelmezésére. Az N -klór- α -alanin ($\text{MC}\alpha\text{A}$) esetében az N -klóraminosavból egy gyors sav-bázis elöegyensúlyban karbanion képződik és a primer bomlás két reakcióúton játszódik le (2. séma). Ezt követően a termékek gyors hidratálási, hidrolitikus és klórozási lépéseken keresztül képződnek.



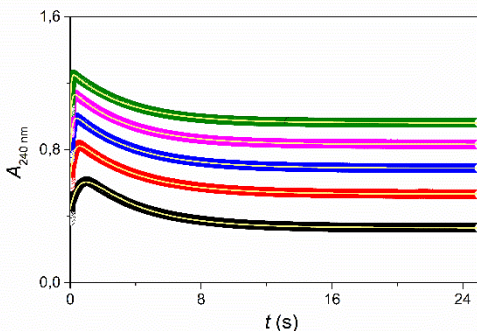
2. séma. Az MC α A bomlási mechanizmusának vázlatja hipoklórossav koncentrációfelesleg mellett lúgos közegben.

Igazoltuk, hogy az α -alkil oldallánc növelésével egyszerűsödik a mechanizmus. Az elágazó láncú aminosavak esetében csak a karbanionon keresztül játszódik le a bomlás és végtermékként a megfelelő nitril, illetve klór-acetaldehid és más klórozott származékok képződnek.

Megállapítottuk, hogy az *N*-klórglicin bomlása is kizárólag a karbanionon keresztül játszódik le. Ebben az esetben végtermékként formamid és cianátion képződik.

5. Bizonyítottuk, hogy semleges körülmények között a glicin, az α -alanin, valamint az elágazó láncú aminosavak (leucin, izoleucin, valin) feleslegben lévő hipoklórossavval történő klórozása során a megfelelő *N*-klóraminosav rendkívül gyorsan képződik, amit a következő lépésben a diklór-monoxid, Cl_2O , *N,N*-diklóraminosavvá oxidál. Igazoltuk, hogy a diklór-származékok néhány másodperc alatt dekarboxileződnek és *N*-klóriminné alakulnak. Ezek a köztitermékek lassú bomlási reakciókban alakulnak tovább. A köztitermékeket és a végtermékeket időfüggő $^1\text{H-NMR}$ módszerrel azonosítottuk és a reakciókra részletes mechanizmusokat állítottunk fel.

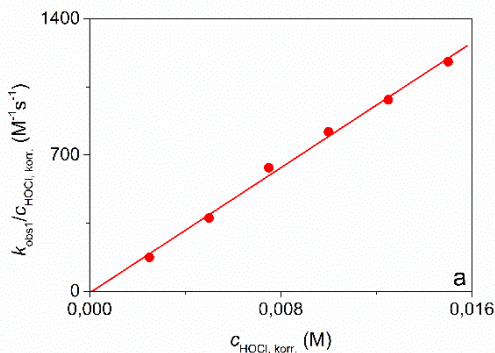
Megállapítottuk, hogy az α -alanin, valamint az elágazó láncú aminosavak hipoklórossav feleslegével lejátszódó reakciók *stopped-flow* módszerrel felvett kinetikai görbéin egy gyors abszorbancia ugrást követően két, részben átfedő, elsőrendű folyamat látható (11. ábra). Az abszorbanciaugrás összhangban van a megfelelő *N*-klóraminosav képződésével. Az említett elsőrendű folyamatokat a monoklóraminosav diklóraminosavvá történő oxidációjához (k_{obs1}), illetve a diklór-származék viszonylag stabil intermedierré történő átalakulásához rendeljük (k_{obs2}).



11. ábra. Tipikus kinetikai görbék az *N,N*-diklór- α -alanin (DC α A) képződése és bomlása során különböző HOCl koncentrációk mellett semleges közegben. A kísérleti adatokat két exponenciális tagot tartalmazó összefüggés összegével illesztettük és az illesztett görbéket folytonos vonal jelöli.

$c_{\text{ala}}^0 = 5,00 \times 10^{-4} \text{ M}$; $c_{\text{HOCl}}^0 = \bullet 5,50 \times 10^{-3} \text{ M}$; $\bullet 8,00 \times 10^{-3} \text{ M}$;
 $\bullet 1,05 \times 10^{-2} \text{ M}$; $\bullet 1,30 \times 10^{-2} \text{ M}$; $\bullet 1,55 \times 10^{-2} \text{ M}$; pH = 6,74; $I = 1,0 \text{ M}$ (NaClO₄); $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

Az *N*-klóraminosavak képződésére fogyott mennyiséggel korrigált HOCl-koncentráció, $c_{\text{HOCl, korrt}}$, függvényében ábrázolva a $k_{\text{obs1}}/c_{\text{HOCl, korrt}}$ -t egyenest kapunk (12. ábra), ami igazolja, hogy a reakció a hipoklórossavra nézve másodrendű, azaz a *N,N*-diklóraminosavak összességében harmadrendű folyamatban képződnek. Ez azzal értelmezhető, hogy a klórozási reakcióban a gyors előegyensúlyban képződő Cl₂O oxidálja a monoklór-származékot. A k_{obs2} független a HOCl koncentrációjától.



12. ábra. A $k_{\text{obs1}}/c_{\text{HOCl, kor.}}$ értéke a korrigált hipoklórossav koncentráció függvényében semleges közegben a • DC α A esetében. Az illesztést folytonos vonal jelöli.

$c_{\text{ala}}^0 = 5,00 \times 10^{-4} \text{ M}$; pH = 6,74; $I = 1,0 \text{ M}$ (NaClO₄); $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

Igazoltuk, hogy a kísérleti tapasztalatok jól értelmezhetők a (13) – (16) egyenletekkel megadott kinetikai modellel. A görbék illesztésével kapott eredményeket a 3. táblázat foglalja össze. A glicin esetében a diklór-származék több egymással átfedő folyamatban alakul át, ezek sebességi állandóira az illesztés bizonytalan eredményt adott.

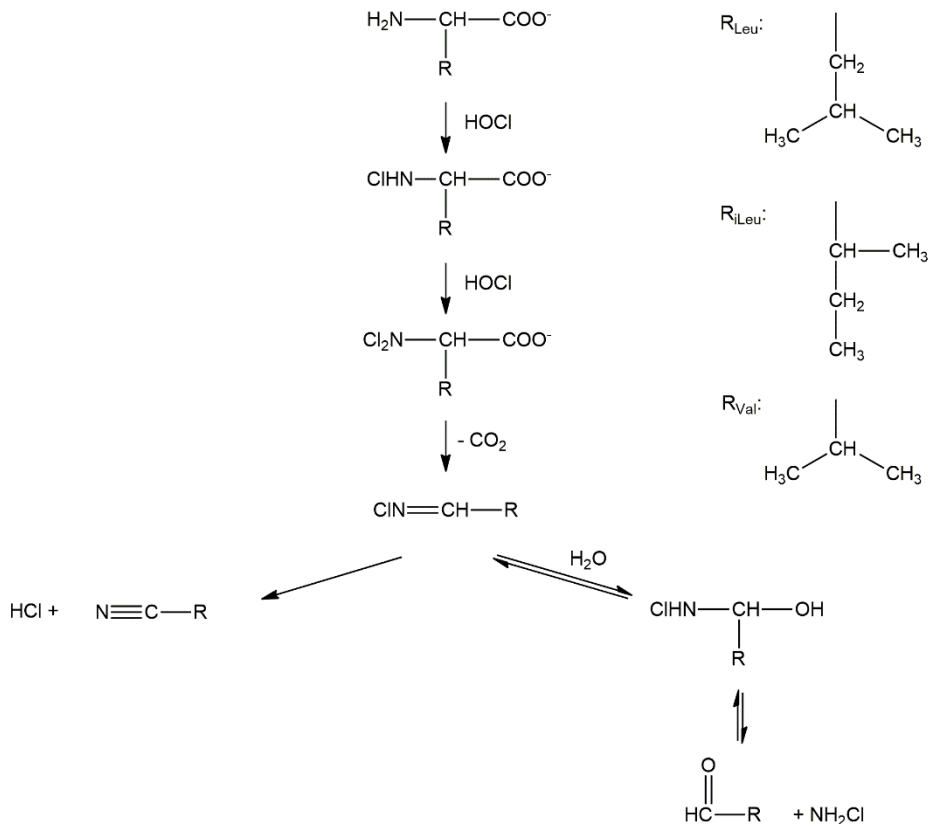


3. táblázat. A k_{Cl_2O} K_1 és k_2 értékeket összefoglaló táblázat a vizsgált aminosavak esetében.

$T = 25,0$ °C.

Aminosav	$k_{Cl_2O} K_1 \times 10^4$ ($M^{-1}s^{-1}$)	k_2 (s^{-1})	pH
α -alanin	$8,0 \pm 0,3$	$0,29 \pm 0,01$	6,74
leucin	$6,9 \pm 0,4$	$0,70 \pm 0,02$	6,92
izoleucin	$6,2 \pm 0,2$	$0,58 \pm 0,03$	6,92
valin	$7,3 \pm 0,4$	$0,46 \pm 0,01$	6,92
glicin	$8,7 \pm 0,3$	-	6,91

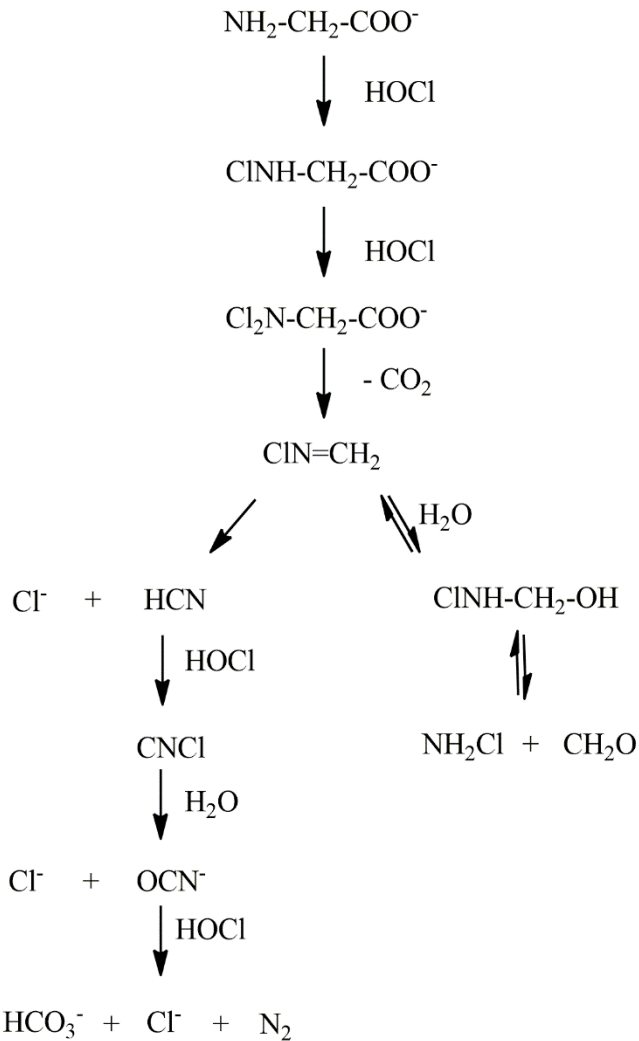
1H -NMR spektrumok alapján igazoltuk, hogy a (16) reakcióban közttermékként *N*-klórimin képződik, aminek átalakulását időfüggő NMR módszerrel követtük. Bizonyítottuk, hogy az elágazó láncú aminosavak esetében végtermékként a lúgos közegben is detektált nitril-származék képződik.



3. séma. Az DCL, DCI és DCV bomlási mechanizmusának vázlatja hipoklórossav koncentráció-felesleg mellett semleges közegben.

Az α -alanin esetében a képződő acetaldehid tovább oxidálódik ecetsavvá.

Bizonyítottuk, hogy a glicin esetében a diklór-származék kezdeti átalakulása összhangban van az általános mechanizmussal, azonban a képződő HCN tovább oxidálódik, és OCN^- képződésén keresztül teljes mineralizáció játszódik le (4. séma). Ez utóbbi köztitermék koncentrációváltozását ionkromatográfias módszerrel követtük.



4. séma. A DCG bomlási mechanizmusának vázlatja hipoklórossav koncentráció felesleg mellett semleges közegben.

Az eredmények hasznosítási lehetőségei

Munkánk során a hipoklórossav és az ammónia, *N*-metilaminosavak, valamint öt különböző aminosav között végbemenő klórozási folyamat kinetikáját és mechanizmusát vizsgáltuk. Az ezekben a reakciókban keletkező klóraminok, *N*-klór-*N*-metilaminosavak, valamint *N*-klór- és *N,N*-diklóraminosavak képződés- és bomláskinetikájának sajátosságait tanulmányoztuk és értelmeztük.

Meghatároztuk a közti- és végtermékeket, valamint ezeknek a termékeknek az egymáshoz viszonyított mennyiségét, ami hozzájárulhat a víztisztítási folyamatokban előforduló vegyületek azonosításához és vízminőségre gyakorolt hatásuk feltárásához. A képződő vegyületeknek meghatározó jelentősége van az előállított ivóvíz toxikológiai minőségében, valamint nemkívánt szag és íz problémákat okozhatnak. Eredményeink hozzájárulhatnak a víztisztítási technológiák optimalizálásához, így jobb minőségű ivóvíz előállításához.

A vizsgált folyamatok közül némelyik reakciónak biológiai vonatkozásban is fontos szerepe van, ugyanis az élő szervezetben is lejátszódhatnak. Így a vizsgált folyamatok részletes mechanizmusának felállítása *in vivo* folyamatok értelmezésében is jelentőséggel bírnak.



Nyilvántartási szám: DEENK/50/2023.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Simon Fruzsina
Doktori Iskola: Kémiai Tudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10064784

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (2)

1. **Simon, F.**, Szabó, M., Fábíán, I.: The chlorination of glycine and alpha-alanine at excess HOCl: Kinetics and mechanism.
J. Hazard. Mater. 447, 1-9, 2023. ISSN: 0304-3894.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.130794>
IF: 14.224 (2021)
2. **Simon, F.**, Kiss, E., Szabó, M., Fábíán, I.: The chlorination of N-methyl amino acids with hypochlorous acid: kinetics and mechanisms.
Chem. Res. Toxicol. 33 (8), 2189-2196, 2020. ISSN: 0893-228X.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.chemrestox.0c00222>
IF: 3.739

További közlemények

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (3)

3. Szabó, M., Bíró, V., **Simon, F.**, Fábíán, 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: 10.588
4. **Simon, F.**, Szabó, M., Fábíán, 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: 9.038





**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400

Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

5. Szabó, M., **Simon, F.**, Fábián, 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: 9.13

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 46,719

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
17,963**

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

Debrecen, 2023.02.22.

