



1949

N-KLÓRAMINOSAVAK KÉPZŐDÉS- ÉS BOMLÁSKINETIKÁJA

egyetemi doktori (PhD) értekezés

Szabó Mária

Témavezető: Dr. Fábián István, egyetemi tanár

DEBRECENI EGYETEM

Természettudományi és Informatikai Doktori Tanács

Kémiai Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2019.

*Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi és Informatikai Doktori Tanács **Kémiai Tudományok Doktori Iskola K/2 programja** keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.*

Debrecen, 2019.09.01.

a jelölt aláírása

*Tanúsítom, hogy **Szabó Mária** doktorjelölt **2016 - 2019** között a fent megnevezett Doktori Iskola **K/2** programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javaslom.*

Debrecen, 2019.09.01.

a témavezető aláírása

N-KLÓRAMINOSAVAK KÉPZŐDÉS- ÉS BOMLÁSKINETIKÁJA

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a Kémia tudományágban

Írta: **Szabó Mária** okleveles vegyész

Készült a Debreceni Egyetem Kémiai Tudományok doktori iskolája
(Koordinációs és analitikai kémia programja) keretében

Témavezető: **Dr. Fábián István** egyetemi tanár

A doktori szigorlati bizottság:

elnök:	Dr. Kéki Sándor	
tagok:	Dr. Horváth Attila	
	Dr. Deák György	

A doktori szigorlat időpontja: 2018. július 2.

Az értekezés bírálói:

Dr. Joó Ferenc	
Dr. Horváth Attila	

A bírálóbizottság:

elnök:	Dr. Kövér Katalin	
tagok:	Dr. Farkas Etelka	
	Dr. Tóth Ágota	
	Dr. Tircsó Gyula	
	Dr. Lendvay György	

Az értekezés védésének időpontja: 2019. október

Köszönetnyilvánítás

Hálásan köszönöm témavezetőmnek, *Dr. Fábán Istvánnak*, hogy az elmúlt 8 évben segítette a munkám előrehaladását és minden támogatást megadott annak érdekében, hogy szakmailag fejlődjek és a PhD fokozatot megszerezsem.

Köszönöm *Dr. Gáspár Attila* tanszékvezetőnek, hogy a tanszéken végzett munkámhoz a szükséges feltételeket biztosította.

Köszönettel tartozom kollégáimnak, *Dr. Bellér Gábornak*, *Dr. Kalmár Józsefnek* és *Horváth Ágnesnek*, hogy mind elméleti, mind gyakorlati vonatkozásban segítették a kutatómunkámat.

Nagyon hálás vagyok hallgatóimnak, *Simon Fruzsínának*, *Angyal Dávidnak* és *Bíró Viviennek* a laboratóriumi munkában nyújtott segítségükért.

Köszönet illeti a *Környezetkémiai Reakciómechanizmusok Kutatócsoport* minden egykori és jelenlegi tagját, akik tanácsaival, tapasztalataival segítették a kutatásaimat. Köszönöm a *Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék dolgozóinak* a barátságos légkör megteremtését.

El nem múló hálával köszönöm meg legjobb barátaimnak, *Anettnek*, *Zsófinak*, *Norbinak* és *Julcsinak*, hogy mindig, minden örömben és nehézségben mellettem állnak és támogatnak az élet minden területén.

Hálás vagyok drága *szüleimnek* és *testvéreimnek*, *Attinak* és *Istunak*, hogy megteremtették azt a nyugodt és vidám családi hátteret, amiben kiegyensúlyozottan tudtam minden tanulmányommal előre haladni. Köszönöm el nem múló szeretetüket és örök támogatásukat, ami minden nehézségen átsegít, illetve nem utolsó sorban azt, hogy minden feltételt megteremtettek a tanulmányaim elvégzéséhez és a doktori fokozat megszerzéséhez.

Szeretném megköszönni keresztszüleimnek, *Katának* és *Zolinak*, illetve unokatestvéremnek, *Dorcinak*, hogy velem együtt örülnek minden sikeremnek és figyelemmel kísérik az előrehaladásomat.

Szeretettel gondolok velünk élő és a mennybe elköltözött *nagyszüleimre*, akiket leírhatatlan büszkeséggel tölt el, hogy a tanulmányaimat legjobb tudásom szerint végeztem és a családban elsőként a PhD fokozatot megszerzem.

A kutatás a GINOP-2.3.2-15-2016-00008 és GINOP-2.3.3-15-2016-00004 számú projektek keretében, az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával valósult meg. A kutatáshoz támogatást nyújtott továbbá a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal: OTKA K-124983, NK-105156. Emellett a dolgozat az Emberi Erőforrások Minisztériuma ÚNKP-17-3 és ÚNKP-18-3 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának támogatásával készült.

Tartalomjegyzék

Az értekezésben előforduló rövidítések magyarázata	5
1. BEVEZETÉS	6
2. IRODALMI ELŐZMÉNYEK	7
3. KÍSÉRLETI KÖRÜLMÉNYEK	15
3.1 Felhasznált vegyszerek.....	15
3.2 Műszerek	16
3.3 Vizsgált aminosavak.....	18
4. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK.....	24
4.1 <i>N</i> -klóraminosavak képződéskinetikája	24
4.2 <i>N</i> -klóraminosavak bomláskinetikája.....	41
4.2.1 <i>N</i> -klórglicin (MCG) bomlása	41
4.2.2 <i>N</i> -klóralanin (MCA) bomlása	58
4.2.3 <i>N</i> -klórvalin, -leucin és izoleucin bomlása	71
5. ÖSSZEFOGLALÁS	90
6. SUMMARY.....	92
7. HIVATKOZÁSOK.....	94
8. FÜGGELÉK	101

Ábrajegyzék

1. ábra	Vizes oldatban a klór speciációja a pH-függvényében. ³	7
2. ábra	A hipoklórossav képződése <i>in vivo</i> az extracelluláris térben. ¹⁵	9
3. ábra	Az aminosav és a hipoklórossav összekeverése előtt és azt követően tandemküvettában felvett spektrumok.	24
4. ábra	A $k_{\text{obs}}^{1\text{st}}$ változása az aminosav-koncentráció függvényében, lúgos körülmények között.	25
5. ábra	A $k_{\text{obs}}^{1\text{st}}$ változása az oxidálószer-koncentráció függvényében, lúgos körülmények között.	26
6. ábra	A $k_{\text{obs}}^{2\text{nd}}$ pH-függése. A kísérleti eredményeket a pontok, a (10) összefüggések alapján történő illesztésüket a folytonos vonal jelzi.	27
7. ábra	A tirozin és a tirozin – HOCl reakcióelegy ^1H NMR spektruma.	33
8. ábra	A triptofán és a triptofán – HOCl reakcióelegy ^1H NMR spektruma.	34
9. ábra	A hisztidin – HOCl reakció sebességi állandójának pH-függése és a párhuzamos reakcióutak hozzájárulása a reakcióhoz.	35
10. ábra	A HOCl – hisztidin reakcióelegy ^1H NMR spektrumának aromás tartománya a pH függvényében, néhány perccel a reaktánsok összekeverése után.	36
11. ábra	Néhány <i>N</i> -klóraminosav képződésének másodrendű sebességi állandója a hőmérséklet függvényében.	37
12. ábra	A $\log k$ és az aminosavak $\text{p}K_{\text{AA}}$ értéke közötti korreláció.	38
13. ábra	Néhány aminosav HOCl-lel lejátszódó reakciójának sebességi állandója.	39

- 14. ábra** Néhány aminosav HOCl-lel lejátszódó reakciójának számolt relatív sebessége. 40
- 15. ábra** A hipoklorition és glicin összekeverése után detektált spektrális változás. 41
- 16. ábra** A karakterisztikus spektrális változás a glicinhez képest kétszeres HOCl-felesleg mellett. 42
- 17. ábra** Tipikus kinetikai görbék az MCG bomlása során 280 (a) és 228 (b) nm-en, különböző glicinfelesleg esetén. A kísérleti adatokat a (28) és (29) összefüggésekkel illesztettük. 43
- 18. ábra** A sebességi állandók (k_{obs1} (■) és k_{obs2} (●)) a hidroxidion-koncentráció függvényében. 45
- 19. ábra** Időfüggő ^1H NMR spektrumok az MCG bomlása során vizes közegben. A spektrumok két része különböző nagyításban van ábrázolva. 46
- 20. ábra** Az ^1H NMR csúcsok intenzitása az idő függvényében az MCG bomlása során: reaktánsok (a), köztitermék (b) és végtermékek (c), (d). 48
- 21. ábra** ^1H - ^1H NMR spektrum az MCG bomlása után. A bekarikázott jelek a CHO és CH_2 csoportok korrelációját mutatják. 49
- 22. ábra** A ^{13}C NMR spektrum az MCG bomlása után. 50
- 23. ábra** Az MCG bomlása (●), valamint az MCG formaldehiddel (◆) és glioxalátiónnal (▲) lejátszódó reakciói során kapott kinetikai görbék 280 (a) és 228 (b) nm-en. 54
- 24. ábra** Az MCG és a glioxalátió összekeverése után kapott ^1H NMR spektrumok az idő függvényében. 56
- 25. ábra** Az MCA bomlását kísérő spektrális változás ($\lambda_{\text{max}} = 253 \text{ nm}$). 58
- 26. ábra** Tipikus kinetikai görbék az MCA bomlása során lúgos közegben. A kísérleti adatokat a (28) és (29) összefüggésekkel illesztettük. 59
- 27. ábra** Az MCA bomlását kísérő spektrális változás enyhén lúgos közegben. 60

- 28. ábra** A pszeudo-elsőrendű sebességi állandók az alaninkoncentráció függvényében. 61
- 29. ábra** Az MCA bomlása során kapott pszeudo-elsőrendű sebességi állandó a pH függvényében. 62
- 30. ábra** Az MCA bomlása során kapott pszeudo-elsőrendű sebességi állandó a hidroxidion-koncentráció függvényében. 63
- 31. ábra** Az ^1H NMR spektrumok (a) és a jelek intenzitása (b) az MCA (● 3,51 ppm), a Pyr (■ 2,35 ppm) és az NAA (▲ 2,00 ppm) esetében az idő függvényében. A folytonos vonal a (28) összefüggéssel történő illesztést mutatja. 65
- 32. ábra** Az MCA bomlási reakciójának végén kapott ^1H NMR spektrumok különböző pH-n. 66
- 33. ábra** Az MCA bomlása során kapott ^1H NMR spektrumok. 67
- 34. ábra** A 12,3 és 7,12 pH-nál kapott reakcióelegyek ionkromatogramja. 68
- 35. ábra** Időfüggő spektrális változás az MCI bomlása során. 72
- 36. ábra** Időfüggő spektrális változás az MCL bomlása során. 73
- 37. ábra** Kinetikai görbék az MCL bomlása során a hidroxidion-koncentráció függvényében. 74
- 38. ábra** Az *N*-klóraminosavak bomlása során kapott pszeudo-elsőrendű sebességi állandók a hidroxidion-koncentráció függvényében. 75
- 39. ábra** Az izoleucin HSQC spektruma D_2O -ban. 80
- 40. ábra** Az ^1H NMR spektrumok (a) és a jelek intenzitása (b) az MCV (■ 3,18 ppm) és az Iba (● 9,57 ppm; ▲ 1,08 ppm) esetén az idő függvényében. A folytonos vonal a (28) összefüggéssel történő illesztés eredményét mutatja. 81
- 41. ábra** A jelek intenzitása az MCL (a) (■ 3,47 ppm), az Iva (● 2,16 ppm; ▲ 2,38 ppm), az MCI (b) (■ 3,28 ppm) és Mba (● 9,56 ppm; ▲ 1,05 ppm) esetén az idő függvényében. A folytonos vonal a (28) összefüggéssel történő illesztést mutatja. 82

- 42. ábra** A reakció lejátszódását követően a reakcióelegyek ^1H NMR spektruma a pH függvényében az MCV bomlása során. 83
- 43. ábra** Az Iba ^1H NMR spektruma a pH függvényében. 84
- 44. ábra** A Schiff-bázis jelintenzitásának növekedése növekvő aminosav koncentráció esetén. 85
- 45. ábra** Az ^1H NMR spektrumok (a) és a jelek intenzitása (b) az idő függvényében MCV bomlása során: MCV (■ 3,18 ppm) és ValSb (▲ 1,01 ppm). A folytonos vonal a (28) összefüggéssel történő illesztés eredményét mutatja. 87

Az értekezésben előforduló rövidítések magyarázata

Ala	alanin
Arg	arginin
Asn	aszparagin
Asp	aszparaginsav
BCAA	elágazó láncú aminosavak (<i>branched-chain amino acids</i>)
COO ⁻	karboxilátcsoporthoz tartozó
Cys	cisztein
DBP	a fertőtlenítés melléktermékei (<i>disinfection by-products</i>)
Gln	glutamin
Glu	glutaminsav
Gly	glicin
His	hisztidin
Iba	izobutiraldehid
Ile	izoleucin
Iva	izovaleraldehid
Leu	leucin
Lys	lizin
Mba	2-metilbutiraldehid
MCI	N-klórizoleucin
MCL	N-klórleucin
MCV	N-klórvalin
Met	metionin
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-tetrazólium bromid
NAA	N-acetilalanin
NH ₂	aminocsoport
Phe	fenilalanin
Pro	prolin
Ser	szerin
Thr	treonin
Trp	triptofán
Tyr	tirozin
Val	valin

1. BEVEZETÉS

Az utóbbi években a környezetkémi 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. Környezetkémi szempontból a szenny- és ivóvízkezelési technológiák miatt érdekesek, mert a klórt vagy hipoklórossavat alkalmazó eljárásokban a jelenlévő aminosavakból könnyen képződnek.¹ Másodlagos fertőtlenítőszer, hiszen részt vesznek a mikroorganizmusok elpusztításában.

Biológiai rendszerekben is kiemelkedő jelentőségük ezek a vegyületek. A szervezetben a gyulladásos folyamatok során hipoklórossav képződik a kloridion és hidrogén-peroxid mieloperoxidáz enzim által katalizált reakciójában. A hipoklórossav erőlyes 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. Amellett, hogy részt vesznek a szervezet patogénekkal 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 számos citotoxikus és genotoxikus hatást is feltételezhetünk, amit a bomlás során keletkező termékek okozhatnak.

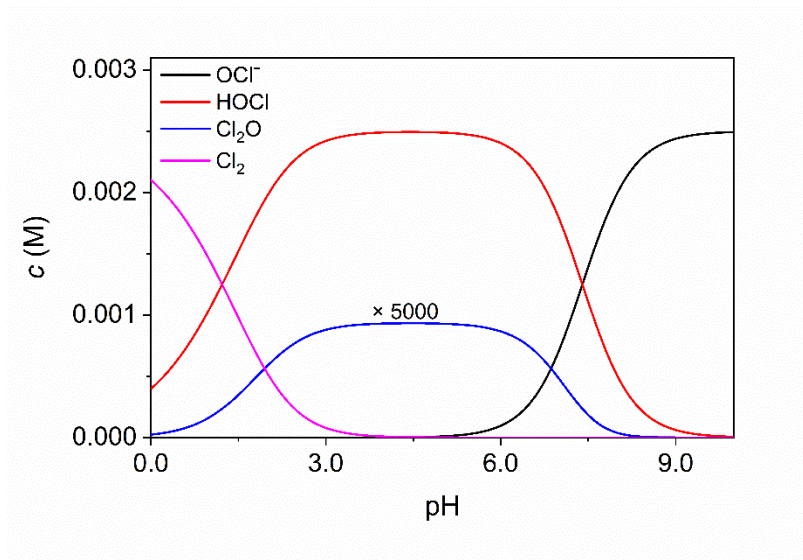
Az *N*-klóraminok kémiáját és biológiai hatásmechanizmusát már régóta vizsgálják, azonban számos kérdés megválaszolatlan vagy ellentmondásos napjainkig is. Emiatt célunk volt ezen tisztázatlan kérdések megválaszolása, a képződési- és bomlási reakciók kinetikájának és mechanizmusának mélyebb megértése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

2. IRODALMI ELŐZMÉNYEK

A hipoklórossav (HOCl) a klór legegyszerűbb oxosavja, ami kloridion jelenlétében, savas közegben egyensúlyban van a klórral (1) és gyors protonálódási egyensúlyban vesz részt a hipokloritonnal (2). Emellett viszonylag kis koncentrációban Cl_2O is képződik (3). A HOCl erősebb oxidálószer, mint a konjugált bázis párja², ezért az a HOCl/ OCl^- oxidációs reakciók erős pH-függést mutatnak. Erélyes oxidáló hatása miatt fertőtlenítő- és fehérítőszerként kiterjedten használják. Sói a hipokloritok, amelyek szintén oxidálószer.



Vizes közegben az (1) – (3) egyensúlyi folyamatok figyelembevételével az 1. ábra mutatja be a klór speciációjának pH-függését.



1. ábra Vizes oldatban a klór speciációja a pH-függvényében.³
 $c_{\text{Cl}_2} = 2,50 \times 10^{-3} \text{ M}$.

A víztisztítási technológiákban költséghatékonysága miatt gyakran klórt vagy hipoklórossavat alkalmaznak fertőtlenítőszerként.¹ Ezekben az eljárásokban gyakran egészségkárosító klórozott termékek képződnek a jelenlévő szerves komponensekkel. Egyre szélesebb körben használják a klórozás felváltására alkalmas környezetkímélő technológiákat, amik alkalmazásával elkerülhető a káros melléktermékek képződése.⁴

A vízben előforduló aminosavakkal ez az oxidálószer *N*-klór- (4) vagy *N*, *N*-diklór (5) vegyületeket képez az adott koncentrációviszonyoktól, illetve a pH-tól függően. Az ammónia klórozásával triklóramin (NCl₃) képződik (6), ami rendkívül instabil, így spontán bomlik nitrogéngáz fejlődése közben (7). Ez a folyamat a törésponti klórozás alapja.⁵⁻⁹



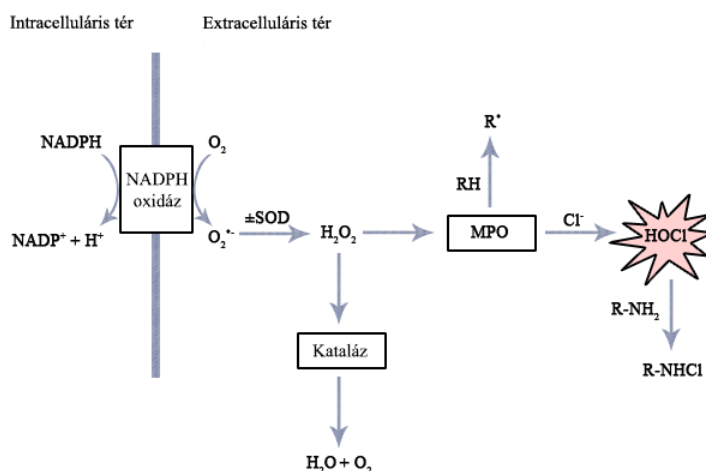
Az *N*-klórvegyületek másodlagos fertőtlenítőszeresek, mivel kisebb hatékonysággal, de képesek különböző baktériumok és mikroorganizmusok elpusztítására. A vízkezelési technológiák során lényegesen eltérő körülményeket alkalmaznak, ezért a klóraminok képződése és bomlása viszonylag széles pH-tartományban megtörténhet. Emiatt alapvető jelentőséggel bír, hogy ezen folyamatok lejátszódásának részleteit minél szélesebb pH-tartományban tisztázzuk.

Az *N*-klór- α -aminosavak képződését és bomlását először Langheld¹⁰ közölte, aki azt írta le, hogy az α -aminosavak reakciója hipoklórossavval olyan módon játszódik le, hogy mono- vagy diklórozott származékok képződnek.

A 70-es évek elejétől az érdeklődés középpontjába kerültek a fertőtlenítés során képződő melléktermékek (*disinfection by-products*, DBP-k) a klórozott ivóvízben és kiterjedt vizsgálatokat végeztek ezek kialakulásának és kezelésének megértése érdekében. Bár több mint 600 DBP-t már azonosítottak, ezeknek a vegyületeknek az előfordulásával vagy toxicitásával kapcsolatban csak korlátozott információ áll rendelkezésre.¹¹

A természetes és ivóvizekben az *N*-klóraminosavak jelenlétével kapcsolatos problémákat és potenciális veszélyforrásokat már korábban felismerték, azonban az emögött meghúzódó kémiai magyarázat nem teljeskörű. Ebből a szempontból különösen érdekes kérdés, hogy az *N*-klóraminosavak milyen folyamatokban vesznek részt, különös tekintettel a DBP-k képződésére.

Az élő szervezetek patogénekkal szembeni védekező mechanizmusában HOCl képződik a kloridion hidrogén-peroxiddal lejátszódó oxidációjában, amit a mieloperoxidáz enzim katalizál (2. ábra).^{6-9, 12, 13} A jelenlévő aminosavakból és rokon vegyületekből (peptidek, fehérjék) a HOCl-lel lejátszódó gyors reakciókban különböző oxidációs termékek, köztük *N*-klóraminosavak képződnek. A szervezetben a 3-klórtirozin megjelenése jelzi a HOCl képződését.¹⁴



2. ábra A hipoklórossav képződése *in vivo* az extracelluláris térben.¹⁵

A hipoklórossav ellentmondásos szerepet tölt be az élő rendszerekben, hiszen amellet, hogy a szervezetet védi a kórokozóktól azok sejtjeinek roncsolásával, az egészséges sejtekben is ugyanazon folyamatokat indukálja.¹⁵⁻¹⁸

A HOCl *in vivo* fagocita sejtekből szabadul fel és jelentős oxidatív stresszt okozhat a gazdasejtekben és szövetekben.¹⁵ A HOCl-ről kimutatták, hogy számos olyan sejtalkotó szintjének és aktivitásának megváltoztatásáért felelős, amik a sejtműködés fenntartásában fontosak. Az ATP-szint lecsökken a sejtek HOCl-lel történő kezelésének hatására. A tumorsejtekben a HOCl a NAD csökkenését és a sejtlegzés gátlását indukálja.¹⁵ Ezen kívül a megbetegedett veseszövetekben és az érszűkületi plakkokban is hipoklórossav képződését bizonyították.¹⁵ Azok a laphámsejtek, amik az érfalak belső részét képezik (endotélsejtek) kis mennyiségű HOCl jelenlétében apoptózist szenvednek, míg nagyobb HOCl-koncentráció mellett a sejtek nekrotikus halála következik be.¹⁵ A HOCl reagálhat a DNS-sel is. A reakció

lassú és a DNS inaktiválásához vezet, mivel a hidrogénkötés megszűnése a kettős szál disszociációját eredményezi.⁴

Az élő szervezet alapköveinek tekinthetjük a fehérjéket, hiszen nagyrészt ezek a biomakromolekulák építik fel. Az emberi szervezetben megtalálható fehérjék 20 különböző *L*- α -aminosavból épülnek fel. Ezek a vegyületek egységesen amino- és karboxilcsoportot tartalmaznak az α -C-atomon, de oldalláncaik eltérőek, ennek megfelelően különböző mérettel, töltéssel és fizikai-kémiai tulajdonsággal bírnak. A glicin kivételével optikailag aktív molekulák, mivel aszimmetrikus C-atomot tartalmaznak. Semleges körülmények között a molekulák karboxilcsoportja deprotonált, míg az aminocsoportja protonált formában van jelen, vagyis ikerionos szerkezet alakul ki.

Az aminosavaknak kiemelkedő szerepük van az élő rendszerek energiagazdálkodásában is, hiszen olyan nitrogéntartalmú vegyületek, mint a hormonok, nukleotidok kialakulásához is aminosavakra van szükség. Az aminosavak szénhidrátokból és nitrogénből képződnek, ami közel 80 különböző enzim lebontó és felépítő munkáját igényli. Vannak az α -aminosavak közül olyanok, amik szintézisét a szervezet még így sem képes, vagy nem megfelelő mennyiségben képes elvégezni, ezeket esszenciális (hisztidin, izoleucin, leucin, valin, lizin, metionin, fenilalanin, treonin, triptofán) és szemiesszenciális (arginin) aminosavaknak nevezzük.

A hipoklórossav *in vivo* körülmények között a jelenlévő, aminocsoportot tartalmazó vegyületeket, mint például aminosavakat vagy peptidek oldalláncait a megfelelő *N*-klór-származékokká alakítja át. Az aminosavak nagy feleslegben vannak a HOCl-hez képest, így csak *N*-klóraminosavak keletkeznek és az *N*, *N*-diklór-származékok képződése várhatóan nem történik meg fiziológiai körülmények között.

A klóraminok biológiai rendszerekben kifejtett hatásáról igazolták, hogy a sejtkárosodás mediátorai, kevésbé reaktívak, lassabban oxidálnak és szelektívebbek mint a HOCl, azonban a sejtmembránon át tudnak diffundálni, így a HOCl képződésének helyétől messzebb is ki tudják fejteni oxidatív hatásukat.¹⁹ A klóraminok toxikusak a sejtekre és baktériumokra, aminek a mértéke függ a szerkezetüktől és a plazmamembránon való áthatoló képességüktől.^{15, 20} Az α -aminosavakból képződő klóraminok ráadásul aldehidekre bomlanak, ami citotoxikussá teszi őket.¹⁵

Az előzőekben említettek miatt az *N*-klóraminosavak hipoklórossavból és aminosavakból történő képződése évtizedek óta a kutatások középpontjában áll.²¹⁻³¹

A legalaposabb tanulmányokat Armesto és munkatársai végezték.^{32, 33} Megállapították, hogy a folyamatra jellemző sebességi állandó erősen függ a közeg pH-jától.¹⁴ Leírták továbbá, hogy a bimolekulás sebességi együttható értéke a pH

függvényében maximumgörbe szerint változik és a legnagyobb sebességi állandó a HOCl és aminosav megfelelő pK_a -i átlagánál van, vagyis a reakciósebesség pH-függése a reagensek sav - bázis egyensúlyai alapján értelmezhető.⁴

Az általuk vizsgált klóraminok esetében a képződésre jellemző k nagyságrendileg $10^7 - 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, ami megfelelő körülmények között csak *stopped-flow* módszerrel vizsgálható.⁴ Korábban arra a következtetésre jutottak, hogy a domináns reakcióútban a deprotonált aminosav és a protonált HOCl forma vesz részt a (9) egyenlet szerint.³³⁻³⁷



A reakció bruttó másodrendű, elsőrendű az aminosavra és a HOCl-re nézve is. A klóraminok képződésére jellemző sebességi állandó ($k_{\text{obs}}^{2\text{nd}}$) pH-függése tehát a (10) egyenlettel adható meg.³⁸

$$k_{\text{obs}}^{2\text{nd}} = k \frac{K_{\text{AA}}[\text{H}^+]}{(K_{\text{AA}} + [\text{H}^+])(K_{\text{HOCl}} + [\text{H}^+])} \quad (10)$$

ahol $k_{\text{obs}}^{2\text{nd}}$, K_{HOCl} és K_{AA} a pH-függő másodrendű sebességi állandó és a hipoklórossav, valamint az aminosav protonált aminocsoportjának savi disszociációs állandója.

Néhány aminosav esetében az α -szénatomhoz kapcsolódó oldalláncok olyan funkciós csoportokat tartalmaznak, amik reagálhatnak a HOCl-lel és az oxidálószer teljes mennyisége vagy ezekkel a csoportokkal való reakcióban fogy el, vagy az alkalmazott körülményeknek megfelelően kompetíció indul el az aminocsoport és ezen oldalláncokat tartalmazó funkciós csoportok reakciói között.

Kimutatták, hogy a HOCl sokkal gyorsabban reagál a tiolcsoporttal, mint az aminocsoporttal, így először a jelen lévő SH szubsztituált vegyületek oxidálódnak az élő szervezetben.^{2, 39-42} A cisztein és a metionin esetében a termékek a megfelelő diszulfidok és szulfoxidok. Igazolták, hogy a fehérjék HOCl hatására történő oxidációja keresztkötéshez vagy aggregációhoz vezethet.^{15, 43}

A ciszteinnel diszulfidok és oxi-savak képződnek, köztiterméként szulfenil-kloridok, metioninnal pedig szulfoxid jön létre.¹⁴ A folyamat ebben az esetben is bruttó másodrendű és a sebességi állandó erősen függ a pH-tól, egyre lúgosabb közegben egyre kisebb.² Semleges, enyhén lúgos közegben a reakció olyan gyors, hogy *stopped-flow* módszerrel sem követhető.²

Annak a bizonyítására, hogy a kéntartalmú aminosavak esetében nem az aminocsoport klórozása történik meg leírták, hogy 255 nm-en nem jelenik meg az *N*-klóraminosavakra jellemző abszorpciós sáv, továbbá hasonló pK_a értékek mellett a

kén atomot nem tartalmazó aminosavak legalább egy nagyságrenddel lassabban reagálnak, mint a Cys és a Met. Emellett az *N*-klórvegyületek bomlásakor aldehidek, ketonok, alfa ketosavak és nitril vegyületek jelennek meg különböző körülmények között, azonban ezek egyikét sem lehetett azonosítani a kéntartamú aminosavak HOCl-lel lejátszódó reakciója esetében.²

Az aromás oldalláncot tartalmazó aminosavak esetében is felmerül a kérdés, hogy *N*-klórvegyületek képződnek-e az oxidálószerrel lejátszódó folyamatokban, vagy az aromás csoportok reagálnak-e a HOCl-lel.

A hisztidin esetében a pH-tól függően klórozódhat az aminocsoport és az imidazol gyűrű is.¹⁴ A tirozin – HOCl reakcióban a primer aminocsoport mellett a gyűrű is klórozható funkciós csoport, de aminosav felesleg mellett *N*-klórtirozin képződik, amit NMR mérésekkel bizonyítottak.⁸

Az aminosavak relatív reaktivitása a HOCl-lel történő oxidációjukban is intenzív kutatások tárgyát képezi.^{11, 14, 36} Pattison és Davies több aminosav oxidációs reakcióját hasonlította össze és reaktivitási sorrendet állapítottak meg.¹⁴ Hasonló tanulmányban How és munkatársai az aminosavak kompetícióját vizsgálták klórozás közben az aminosavval megegyező koncentrációjú HOCl mellett.¹¹ Ezeket a vizsgálatokat körülbelül 7,4 pH-n végezték, mivel az *N*-klóraminosavak képződését fiziológiás pH-n tartották relevánsnak. Nem vették azonban figyelembe azt a tényt, hogy a kloridion mieloperoxidáz enzim (MPO) által katalizált oxidációja hipoklórossavvá enyhén savas körülmények között is lejátszódhat a fagoszómában.

Végeztek olyan kísérletet is amiben a HOCl koncentrációját változtatták és 20 aminosavból készült oldattal reagáltatták, hogy a relatív reakcióképességet vizsgálják.¹¹ Amikor kétszeres aminosav felesleget alkalmaztak, akkor a kiindulási aminosavak 90%-a nem alakult át, de a metionin, cisztein és triptofán alig volt jelen kimutatható koncentrációban, tehát ezek az aminosavak reagáltak a leggyorsabban.¹¹

Na és Olson is vizsgálta az aminosavak relatív reaktivitását 17 aminosav esetében.³⁶ A folyamatot jellemző sebességi állandót hibás képlettel számolták ki, mivel a hipoklórossav sav-bázis egyensúlyát nem vették figyelembe. Az aminosavakat a reakció előtt és három órával a folyamat elindítása után HPLC módszerrel kvantitatíven analizálták fluoreszcens detektorral. Reaktivitásuk alapján három csoportra osztották az aminosavakat. A probléma ezzel a megközelítéssel az, hogy közvetlenül nem a reakciók kinetikáját követték, tehát lehetséges, hogy a viszonylag hosszú várakozási idő alatt transzklórozási vagy egyéb mellékreakciók is lejátszódtak, amik megváltoztatják a primer reakcióban képződő *N*-klóraminosavak koncentrációját.

Az *N*-klóraminosavak nem stabil vegyületek, jellemzően elsőrendű folyamatban bomlanak és belőlük az élő szervezetre ártalmas közti-, mellék- és

végtermékek képződhetnek. Az *N*-klóraminosavak reakcióinak vizsgálatát nem csak az alapvegyületek, hanem a bomlásuk során keletkezett termékek potenciális biológiai hatásai is motiválták. A klóraminok bomlásából képződő, biológiailag aktív termékek átalakulásán keresztül keletkező vegyületek másodlagos hatásai szintén relevánsak lehetnek.⁴⁴⁻⁴⁶

Korábban az volt a meghatározó elképzelés, hogy az *N*-klóraminosavak bomlása a Grob mechanizmus szerint történik, ami azt feltételezi, hogy a deaminálás, valamint a kloridion és a CO₂ lehasadása egyidejűleg történik meg. Így tehát egy olyan aldehid vagy keton képződik, ami egy szénatommal rövidebb, mint a kiindulási aminosav. Köztiterméként iminek képződését feltételezik ebben a mechanizmusban.^{3, 4, 47-50} A folyamat elsőrendű az *N*-klóraminosavra nézve, független a pH-tól és az ionerősségtől, de gyorsul az oldószer polaritásának csökkentésével.⁴

Az a megállapítás, hogy a Grob mechanizmus minden rendszerben működőképes, erősen vitatható. A folyamat ugyanis számos, egymástól távoli kötés egyidejű felhasadását és új kötések kialakulását feltételezi, ami vélhetően egy reakciólépésben nem történhet meg.

Az *N*-klórglicin (MCG) bomlaskinetikáját Hand és munkatársai részletesen vizsgálták⁴⁹ és a folyamatot a következő, (11) és (12) reakcióegyenletekkel írták le.



Termékként formaldehidet és glioxálsavat, valamint ammóniát azonosítottak. Megállapították, hogy a reakció egyszerű elsőrendű kinetikával leírható, azonban a kinetikai görbék elején szisztematikus eltérést tapasztaltak, ami feltételezésük szerint az MCG oldat előállítása során kis mértékben képződő *N*, *N*-diklórglicin bomlásával értelmezhető. Ennek a feltételezésnek némiképpen ellentmond az MCG rendkívül gyors képződése a (9) folyamatban, mert várhatóan glicin felesleg mellett a HOCl teljes mennyisége elfogy, mielőtt reakcióba léphetne a képződő MCG-vel, azaz a diklór-származék legfeljebb elhanyagolható koncentrációban képződhet. Eredményeik szerint a sebességi együttható értéke pH = 5 – 9 tartományban 25,0 °C-on: $k = (4,2 \pm 0,4) \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$.⁴⁹

Az MCG bomlássebességének pH-függésére vonatkozó korábbi irodalmi eredmények is ellentmondásosak. Awad és munkatársai, illetve Armesto és kutatócsoportja is arról számoltak be, hogy a MCG bomlássebessége nem függ a pH-tól lúgos közegben.^{50, 51} Ugyanakkor egy másik munkában Armesto és munkatársai azt találták, hogy a bomlás sebessége lineárisan függ a hidroxidion koncentrációjától

erősen lúgos közegben.³² How és munkatársai kísérleti is azt bizonyították, hogy a pH növelése destabilizálja a klóraminokat.¹¹

Az irodalomban számos adatot találunk az α -alaninból képződő *N*-klór- α -alanin bomlására vonatkozóan is. Hand és munkatársai kísérletei szerint a reakció egyszerű elsőrendű kinetikával jellemezhető és pH = 5 – 9 tartományban 25,0 °C-on a sebességi együtthatóra $k = (2,67 \pm 0,02) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ értéket határoztak meg. Eredményeik alapján a bomlási reakció sebessége független az alkalmazott pH-tól. Termékeként piroszölősavat, acetaldehidet és ammóniát azonosítottak.⁴⁹

Awad és munkatársai 6 – 13 közötti pH-tartományban vizsgálták az *N*-klór- α -alanin bomlását. Megállapították, hogy a bomlás sebessége független a kezdeti alaninkoncentrációtól, az ionerősségtől, az alkalmazott puffer koncentrációtól, valamint a pH-tól.⁵⁰

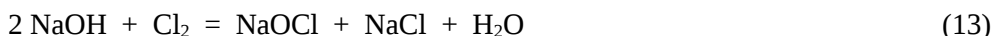
Scully és kutatócsoportja is behatóan tanulmányozta a klóraminok képződését és bomlását különböző aminosav/HOCl arányok esetében. Azt találták, hogy izoleucin esetében, aminosav felesleg mellett mono-*N*-klórizoleucin képződik, ami 2-metilbutiraldehiddé alakul át a bomlási folyamatban.⁵² A leucin – HOCl reakcióban izobutiradehid képződését írták le.⁵³ Ezekben a vizsgálatokban a folyamatok végén analizálták a reakcióelegyet a termékek meghatározása céljából, azonban időben nem követték a reakciókat, vagyis nem vették figyelembe, hogy esetleges mellékreakciók is lejátszódhattak.

Annak érdekében, hogy megértsük ezen vegyületek biológiai rendszerekben kifejtett hatását, ezeknek a reakcióknak az alapos kinetikai leírása, a közti- és végtermékek azonosítása és végül ezek alapján a reakciók mechanizmusának felállítása elsődleges fontosságú.

3. KÍSÉRLETI KÖRÜLMÉNYEK

3.1 Felhasznált vegyszerek

Nátrium-hipoklorit oldatot elsősorban klórgáz NaOH-oldatba történő bevezetésével állíthatunk elő a (13) egyenlet alapján.



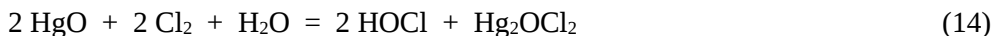
Savas körülmények között, kloridion jelenlétében az (1) egyensúly a klórképződés felé tolódik el, vagyis az oxidálószer két formája összemérhető koncentrációban van jelen egyidejűleg az oldatban, ezért a kloridionmentes NaOCl-oldat előállítása alapvető fontosságú, hogy a kinetikai sajátságokat egyértelműen tudjuk értelmezni.



A kloridionmentes oldat előállítása során ~ 40 g sárga higany-oxidot 300 cm³ vízben szuszpendáltatunk, majd a szuszpenzióba közepes áramban klórgázt vezettünk 6 – 7 órán keresztül. A szilárd fázis a kezdeti feketedés után kifehéredett. Ezt követően a feleslegben lévő klór eltávolítására még ~ 5 g higany-oxidot adtunk a szuszpenzióhoz.

A reakcióban képződött Cl₂O-t 0,5 M koncentrációjú, folyamatosan hűtött NaOH-oldatba fűvattuk át argon gázzal. A képződött NaOCl-oldat pH-ja nem csökkenhet pH ~ 9 alá, mert ilyen körülmények között elkezdődik a hipoklórossav autokatalitikus bomlása klorát- és kloridionra⁵⁴, ezért folyamatosan ellenőriztük a fogadó oldat kémhatását az átfűtás során.

Az előállítás reakcióegyenletei:



Arról, hogy az előállított NaOCl-oldat valóban nem tartalmaz kloridiont, spektrofotometriás méréssel bizonyosodtunk meg. Egy tandemküvetta egyik felébe 0,2 M koncentrációjú perklórsav oldatot, míg a másik felébe 0,002 M koncentrációjú hipoklórossav oldatot pipettáztunk és felvettük a spektrumot az oldatok összekeverése előtt és azt követően is. A deprotonált OCl^- -forma abszorpciós maximuma 292 nm-en, míg a protonált HOCl formáé 235 nm-en van. Amennyiben az oldat kloridionokat tartalmaz, az (1) egyenlet a klórképződés irányába tolódik el és megjelenik a klórra jellemző elnyelési sáv, melynek maximuma 325 nm-nél van. Ezzel a módszerrel kis koncentrációban is kimutatható a kloridionok jelenléte viszonylag tömény NaOCl oldatban, mivel a klórnak kellően nagy a moláris abszorpciós koefficiense ($\epsilon_{325 \text{ nm}} = 69,7 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).⁵⁵

Az NaOCl törzsoldatot 4 °C-on, sötétben tároltuk. Az oldat pontos koncentrációjának meghatározásához savanyítás után KI-t adtunk az oldat egy részletéhez és a képződött jódot ismert koncentrációjú $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -oldattal titráltuk.⁵⁶ A törzsoldat egy másik részletét a feleslegben lévő lúg mennyiségének meghatározására perklórsav mérőoldattal titráltuk. Ebben a titrálásban két ekvivalencia pontot kaptunk, amiből mind az OCl^- , mind az NaOH koncentrációja kiszámolható. A két analitikai módszerből kapott hipoklorition-koncentráció 1%-on belül megegyezett.

Az értekezésben bemutatott kísérletekhez további tisztítás nélkül, analitikai minőségű vegyszereket használtunk. A mintákat kétszeresen ioncserélt és ultraszűrt vízzel készítettük a Purelab Classic (ELGA) víztisztító rendszerrel. A kinetikai vizsgálatokat (a hőmérsékletfüggő mérések kivételével) $25,0 \pm 0,1$ °C-on és 1,00 M ionerősség mellett végeztük. Az ionerősség beállításához használt NaClO_4 -et HClO_4 -ból (Sigma-Aldrich) és NaOH-ból (Sigma-Aldrich) állítottuk elő.⁵⁷ A hidroxidion-koncentrációt pontos koncentrációjú NaOH-oldattal állítottuk be.

Az ionkromatográfiás mérések során az eluens $5,00 \times 10^{-2}$ M koncentrációjú NaOH-oldat volt.

3.2 Műszerek

A jodometriás és pH-metriás titrálásokat Metrohm 888 titrátorral végeztük. A Titrandó rendszerhez Metrohm 6.0451.100 számú platina és Metrohm 6.0262.100 számú kombinált üvegelektrodot csatlakoztattunk. A kombinált üvegelektrodot naponta kalibráltuk KH-ftalát (0,05 M) és bórax (0,01 M) standard oldatok alkalmazásával. A pH-mérővel mért adatokat Irving és munkatársai által leírt módon konvertáltuk és a dolgozatban a $\text{pH} = -\log[\text{H}^+]$ jelölést alkalmazzuk.⁵⁸ Az aminosavak savi disszociációs állandóját pH-metriás titrálással határoztuk meg és a kapott adatok kiértékelését a SUPERQUAD programmal végeztük el.⁵⁹

Az *N*-klóraminosavak képződésének vizsgálatához Applied Photophysics SX-20 típusú, megállított áramlásos (*stopped-flow*) készüléket használtunk, amiben a detektor fotoelektronsokszorozó volt. A kinetikai görbékét 10,0 mm-es optikai úthossz alkalmazásával vettük fel. Egy kinetikai görbét 3 - 5 párhuzamos mérés átlagából kaptunk meg. A megállított áramlásos rendszer holtidejét – $t_d = 1,51$ ms – úgy határoztuk meg, hogy 2,6-diklór-fenol-indofenol (DCPIP) aszkorbinsavval történő redukcióját pszeudo-elsőrendű körülmények között, a redukálószer feleslege mellett vizsgáltuk.⁶⁰ Az elsőrendű kinetikai görbékét a műszer vezérlőszoftverével értékeltük ki. Minden más adatillesztést a megfelelő függvény alapján az OriginPro 2018 programcsomaggal végeztünk és a nemlineáris legkisebb négyzetek elvét alkalmaztuk.⁶¹

A bomláskinetikai vizsgálatok során Agilent Technologies Cary 8454 UV – Vis diódasoros spektrofotométerrel végeztük a méréseket. A nem kívánt fotoreakciók lehetőségét különböző megvilágítási protokollok segítségével teszteltük.⁶² A tanulmányozott rendszerekben nem volt megfigyelhető fotokémiai hatás. A méréseket lezárt tandemküvetékben végeztük, amik fényútja 8,74 mm. A cella hőmérsékletét a készülékbe beépített Peltier típusú termosztáttal tartottuk állandó értéken. A legtöbb esetben a spektrofotometriás kísérletek alapvonalát az aminosav feleslegét tartalmazó mintával vettük fel, így az aminosavnak UV-tartományban (240 nm alatt) nem volt spektrális hozzájárulása a mért spektrumhoz. A kísérletek során az aminosav és a hipoklorit ion oldatok összekeverése után a spektrális változásokat a 220 – 400 nm-es spektrumtartományban követtük.

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. A DSS jelei a spektrumokban a következők: 0,00 ppm (szingulett), 0,63 ppm (triplett), 1,76 ppm (multiplt), 2,91 ppm (triplett). Az ¹H NMR spektrumok felvételéhez egy kísérletben 32 pásztázást (*scan*) végeztünk, 1,366 s akvizíciós idővel és 90°-os impulzussal. A kapott spektrumokat Bruker WinNMR és MestReNova szoftvercsomagokkal elemeztük. A J-modulált ¹³C-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 NOESY kísérletekben a keveredési idő (D8) 300 ms volt.

Az ionkromatográfiás méréseket Thermo ICS 5000+ rendszerrel végeztük, szuppresszált vezetőképességi detektálással.

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).

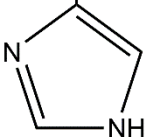
A bomlási folyamatokban megjelenő színes részecskék számának meghatározásához mátrixrang-analízist végeztünk MatLab⁶³ program segítségével.

3.3 Vizsgált aminosavak

1. táblázat Az értekezésben bemutatott kutatásokhoz használt aminosavak

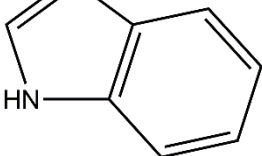
aminosav	rövidítés	szerkezet
Alanin	Ala	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
Arginin	Arg	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{NH} \\ \\ \text{C}=\text{NH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$

Aszparagin	Asn	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} $
Aszparaginsav	Asp	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{OH} \end{array} $
Cisztein	Cys	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{SH} \end{array} $
Fenilalanin	Phe	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array} $

Glicin	Gly	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H} \end{array}$
Glutamin	Gln	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$
Glutaminsav	Glu	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{OH} \end{array}$
Hisztidin	His	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{Imidazole ring} \end{array}$ 

Izoleucin	Ile	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $
Leucin	Leu	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $
Lizin	Lys	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} $

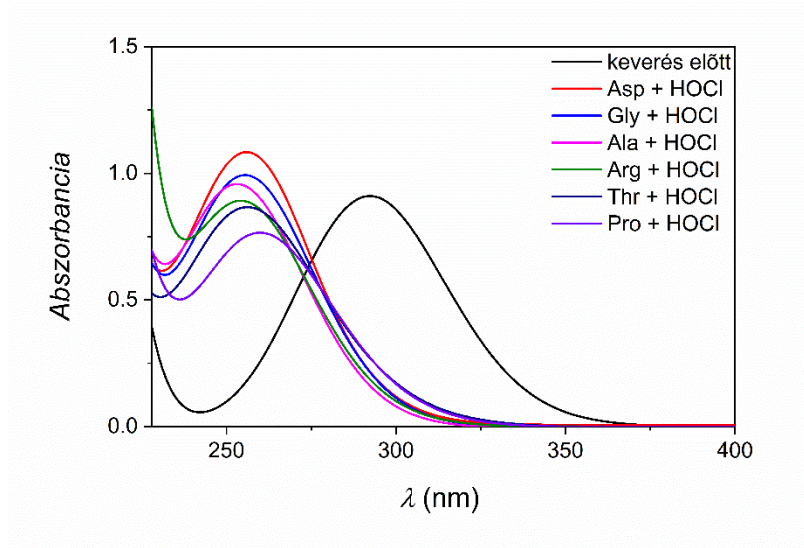
Metionin	Met	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{S} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $
Prolin	Pro	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{HN} \quad \text{Cyclopentane ring} \end{array} $
Szerin	Ser	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{OH} \end{array} $
Tirozin	Tyr	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_4 \\ \\ \text{OH} \end{array} $

Treonin	Thr	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $
Triptofán	Trp	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{Indole ring} \end{array} $ 
Valin	Val	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $

4. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEÉSÜK

4.1 *N*-klóraminosavak képződés-kinetikája

A hipoklórossav és a feleslegben lévő aminosavak reakciójában gyorsan képződik a megfelelő *N*-klóraminosav, aminek jellegzetes abszorpciós maximuma van 255 nm körül. A spektrumokat a 3. ábra, az abszorpciós maximumok hullámhosszát és a moláris abszorpciós együtthatók értékét a 2. táblázat tartalmazza.



3. ábra Az aminosav és a hipoklórossav összekeverése előtt és azt követően tandemküvetében felvett spektrumok.

$$c_{\text{HOCl}} = 3,00 \times 10^{-3} \text{ M}; c_{\text{AA}} = 6,00 \times 10^{-3} \text{ M}; c_{\text{OH}} = 5,00 \times 10^{-2} \text{ M}; \\ I = 1,00 \text{ M (NaClO}_4\text{)}; T = 25,0 \text{ } ^\circ\text{C}.$$

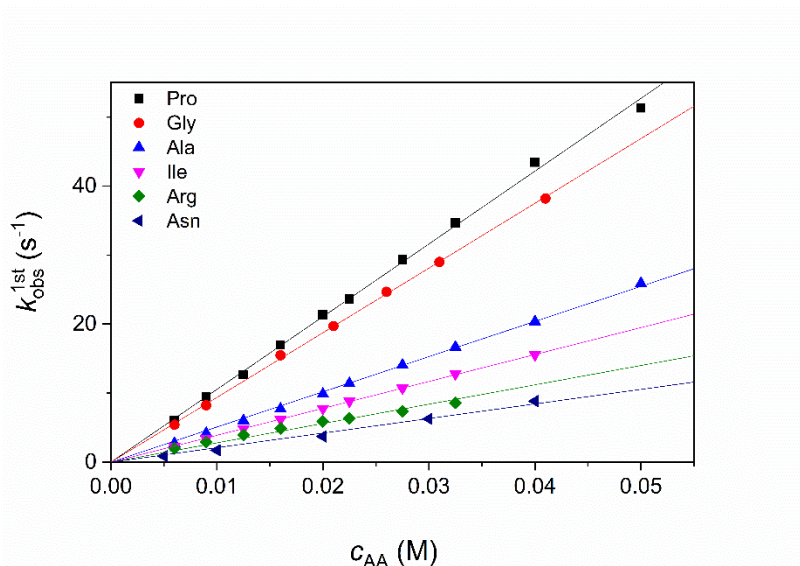
2. táblázat Az *N*-klóraminosavak abszorpciós maximumának hullámhossza és a megfelelő moláris abszorpciós együtthatók.

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

Aminosav	λ_{max} (nm)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)
alanin	253	365,7
arginin	254	340,5
aszparagin	260	441,0
aszparaginsav	256	412,9
glutaminsav	255	382,4

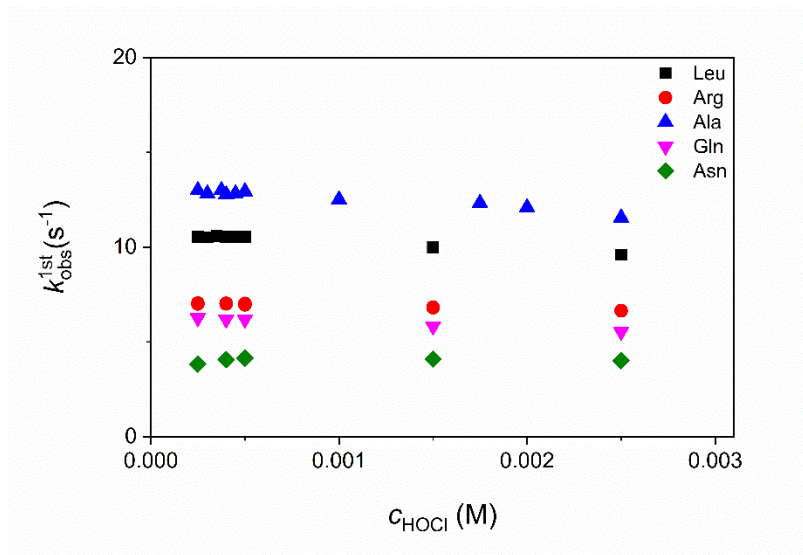
Aminosav	$\lambda_{\max}$ (nm)	ε (M ⁻¹ cm ⁻¹)
glutamin	255	371,9
glicin	255	378,7
izoleucin	256	377,6
leucin	255	381,2
lizin	253	374,6
prolin	260	291,9
szerin	255	340,4
treonin	256	330,5
valin	256	370,2

Az *N*-klórvegyületek képződése a különböző aminosavakból hasonló kinetikai viselkedést mutat. Lúgos körülmények között, az aminosav feleslegében egyszerű elsőrendű kinetikai görbéket kaptunk. A megfelelő pszeudo-elsőrendű sebességi állandók ($k_{\text{obs}}^{1\text{st}}$) origóból induló lineáris függést mutatnak az aminosav-koncentráció függvényében (4. ábra). A várakozásoknak megfelelően, ilyen körülmények között a $k_{\text{obs}}^{1\text{st}}$ nem függ a HOCl koncentrációjától (5. ábra).



4. ábra A $k_{\text{obs}}^{1\text{st}}$ változása az aminosav-koncentráció függvényében, lúgos körülmények között.

$c_{\text{HOCl}} = 1,00 \times 10^{-3}$ M; $c_{\text{OH}} = 5,00 \times 10^{-2}$ M; $I = 1,00$ M (NaClO₄); $T = 25,0$ °C.



5. ábra A $k_{\text{obs}}^{1\text{st}}$ az oxidálószer-koncentráció függvényében, lúgos körülmények között.

$$c_{\text{AA}} = 2,50 \times 10^{-2} \text{ M}; c_{\text{OH}} = 5,00 \times 10^{-2} \text{ M}; I = 1,00 \text{ M (NaClO}_4\text{)}; T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}.$$

Ezek az eredmények azt bizonyítják, hogy a reakció mindkét reaktánsra nézve elsőrendű, azaz a reakció bruttó másodrendű (16).

$$\frac{dc_{\text{HOCl}}}{dt} = -k_{\text{obs}}^{2\text{nd}} c_{\text{HOCl}} c_{\text{AA}} \quad (16)$$

ahol a c_{HOCl} és a c_{AA} a hipoklórossav és az aminosav teljes koncentrációja.

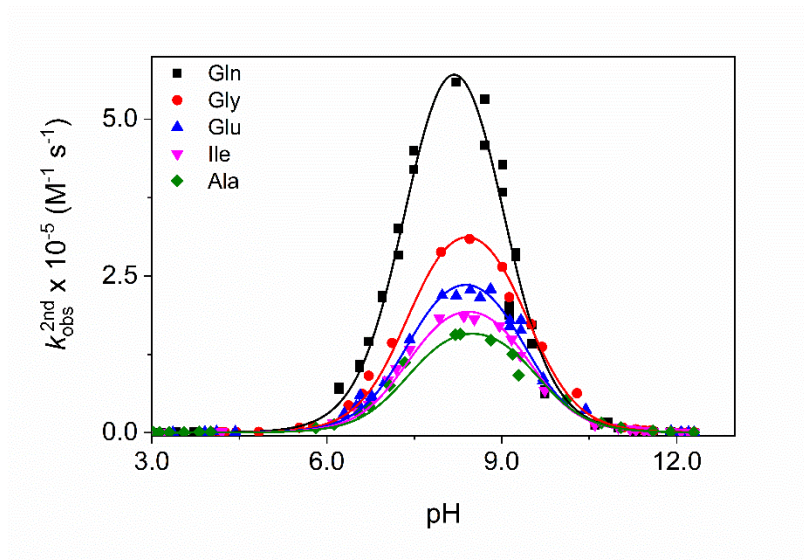
Az *N*-klóraminosavak képződése egyre gyorsabb a pH csökkentésével és végül a pszeudo-elsőrendű feltételek nem alkalmazhatók a *stopped-flow* kísérletekben, mert a folyamat a készülék holtideje alatt jórészt lejátszódik. Ezért enyhén lúgos körülmények között a reagenseket közel azonos koncentrációban használtuk és a kapott kinetikai görbéket a (17) másodrendű összefüggéssel illesztettük.

$$Abs = (\epsilon'_{\text{HOCl}} - \epsilon'_{\text{NCl}}) \frac{\Delta_0 [\text{HOCl}]_0}{[\text{AA}]_0 \exp(k_{\text{obs}}^{2\text{nd}} \Delta_0 t) - [\text{HOCl}]_0} + \epsilon'_{\text{NCl}} [\text{HOCl}]_0 \quad (17)$$

ahol *Abs* a mért abszorbancia, ϵ'_{HOCl} és ϵ'_{NCl} a hipoklórossav és az *N*-klóraminosav látszólagos moláris abszorpciós koefficiense az adott pH-n, $[\text{HOCl}]_0$ és $[\text{AA}]_0$ a hipoklórossav és az aminosav kiindulási koncentrációja, Δ_0 a $[\text{HOCl}]_0$ és $[\text{AA}]_0$ különbsége, a $k_{\text{obs}}^{2\text{nd}}$ az *N*-klóraminosav képződésére jellemző, pH-függő másodrendű

sebességi állandó. A másodrendű sebességi együtthatók ($k_{\text{obs}}^{2\text{nd}}$) pH-függését a 6. ábra mutatja.

Korábbi eredmények szerint extrém gyors másodrendű folyamatok esetében figyelembe kell venni, hogy a reaktánsok tökéletes keveredése nem játszódik le a *stopped-flow* készülék optikai cellájának feltöltési ideje alatt.⁶⁴ Esetünkben ez a probléma nem jelentkezik, mivel a tanulmányozott reakciók felezési ideje lényegesen nagyobb, mint a cella feltöltési ideje.



6. ábra A $k_{\text{obs}}^{2\text{nd}}$ pH-függése. A kísérleti eredményeket a pontok, a (10) összefüggések alapján történő illesztésüket a folytonos vonal jelzi.
 $c_{\text{HOCl}} = 5,00 \times 10^{-4} \text{ M}$; $c_{\text{AA}} = 7,50 \times 10^{-4} \text{ M}$; $I = 1,00 \text{ M (NaClO}_4\text{)}$; $T = 25,0^\circ \text{ C}$.

Ezen megfigyelések koherens értelmezéséhez figyelembe kell venni, hogy az *N*-klóraminosavak elvileg négy, egymással versengő reakcióúton képződhetnek, amint azt a (18) – (21) egyenletek mutatják.



Ezek a reakcióutak a HOCl és az aminosav NH₂ vagy NHR (prolin esetében) csoportjának sav-bázis egyensúlyának figyelembevételével írhatók fel. Az aminosavak karboxilcsoportjai a vizsgált pH-tartományban teljesen deprotonált formában vannak jelen és így a megfelelő sav-bázis egyensúlynak nincs jelentősége a pH-függés értelmezésében. Azok a reakcióutak elhanyagolhatók, amikben mindkét reagens protonált (18), valamint deprotonált (21) formában van jelen. A reagensek protonálódási egyensúlyai rendkívül gyorsak, tipikusan diffúziókontrolláltak, ezért a másik két út (19, 20) kísérleti módszerekkel megkülönböztethetetlen. Korábbi irodalmi eredmények egyértelműen igazolták, hogy a HOCl forma lényegesen reaktívabb, mint a deprotonált, vagyis a folyamat nagy valószínűséggel a (20) egyenlet alapján játszódik le³⁸. Így a $k_{\text{obs}}^{2\text{nd}}$ a (10) összefüggéssel adható meg.

$$k_{\text{obs}}^{2\text{nd}} = k \frac{K_{\text{AA}}[\text{H}^+]}{(K_{\text{AA}} + [\text{H}^+])(K_{\text{HOCl}} + [\text{H}^+])} \quad (10)$$

ahol $k_{\text{obs}}^{2\text{nd}}$, k , K_{HOCl} és K_{AA} a pH-függő, a pH-független pszeudo-másodrendű sebességi állandó, valamint a hipoklórossavnak és az aminosav protonált aminocsoportjának a savi disszociációs állandója. A (10) összefüggés alapján a $k_{\text{obs}}^{2\text{nd}}$ a pH függvényében haranggörbét ad, aminek maximuma a $\text{p}K_{\text{HOCl}}$ és $\text{p}K_{\text{AA}}$ átlagánál van. Saját kísérleti eredményeink alapján az aminosavak savi disszociációs állandóit a 3. táblázat tartalmazza. Ezek az értékek jó egyezésben vannak az irodalmi adatokkal.⁶⁵

3. táblázat A tanulmányozott aminosavak amino-, karboxilcsoportjainak, valamint oldalláncainak $\text{p}K_{\text{a}}$ értékei.

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

Aminosav	$\text{p}K_{\text{COOH}}$	$\text{p}K_{\text{NH}_3^+}$	$\text{p}K_{\text{R}}^*$
alanin	2,37(1)	9,60(1)	
arginin	2,10(3)	9,08(1)	
aszparagin	2,44(1)	8,72(1)	
aszparaginsav	2,08(2)	9,49(1)	3,74(1)
glutaminsav	2,20(2)	9,37(1)	4,17(1)
glutamin	2,26(1)	8,97(1)	
glicin	2,46(2)	9,42(1)	
izoleucin	2,26(2)	9,46(1)	
leucin	2,51(1)	9,49(1)	

Aminosav	pK_{COOH}	$pK_{\text{NH}_3^+}$	pK_R^*
lizin	2,44(2)	9,25(3)	10,81(2)
prolin	2,18(4)	10,49(2)	
szerin	2,08(2)	8,92(1)	
treonin	2,19(1)	8,87(1)	
valin	2,59(2)	9,41(1)	
triptofán	2,42(1)	9,28(1)	
tirozin	2,41(1)	8,99(1)	9,90(1)
hisztidin	1,88(1)	9,10(1)	6,29(1)
fenilalanin	2,20(1)	9,02(1)	
metionin	2,45(2)	9,05(1)	
cisztein	2,12(1)	8,15(1)	10,12(1)

* Asp, Glu: karboxilcsoport; Lys: ϵ -ammóniumcsoport;

His: imidazolium csoport; Tyr: hidroxilcsoport; Cys: tiolcsoport

A HOCl pK -ja korábbi irodalmi előzmények alapján $pK_a = 7,40$.⁵⁴. A kísérleti kinetikai adatokat a (10) összefüggéssel illesztettük a nem-lineáris legkisebb négyzetek elvét alkalmazva, miközben a hipoklórossav és az aminosav pK_a -it rögzített értéken tartottuk. A mért és illesztett adatok kiváló egyezést mutatnak (6. ábra). A pH-független másodrendű sebességi együtthatókat (k) a 4. táblázat tartalmazza.

4. táblázat Az aminosavak aminocsoportjainak klórozását jellemző kinetikai paraméterek.

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

Aminosav	$k \times 10^{-7} (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$	$\Delta S^\ddagger (\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1})$	$\Delta H^\ddagger (\text{kJ mol}^{-1})$
alanin	$2,91 \pm 0,06$	$-37,1 \pm 4,5$	$18,4 \pm 1,4$
arginin	$2,15 \pm 0,05$	$-40,5 \pm 1,5$	$18,2 \pm 0,5$
aszparagin	$1,74 \pm 0,04$	$-73,0 \pm 2,0$	$9,64 \pm 0,63$
aszparaginsav	$2,89 \pm 0,05$	$-40,4 \pm 2,2$	$18,1 \pm 0,7$
glutaminsav	$2,78 \pm 0,05$	$-39,7 \pm 0,8$	$18,3 \pm 0,2$
glutamin	$2,82 \pm 0,06$	$-33,6 \pm 6,5$	$22,4 \pm 2,0$
glicin	$3,94 \pm 0,09$	$-36,8 \pm 1,1$	$18,1 \pm 0,3$
izoleucin	$2,65 \pm 0,03$	$-59,0 \pm 0,8$	$12,3 \pm 0,2$
leucin	$2,90 \pm 0,04$	$-73,1 \pm 3,6$	$7,73 \pm 1,1$

N-klóraminosavak képződés- és bomláskinetikája

lizin	$4,32 \pm 0,08$	$-36,3 \pm 3,3$	$16,4 \pm 1,0$
prolin	$7,02 \pm 0,01$	$-72,2 \pm 7,7$	$24,5 \pm 2,4$
szerin	$2,60 \pm 0,04$	$-43,2 \pm 1,4$	$18,0 \pm 0,4$
treonin	$1,55 \pm 0,03$	$-65,5 \pm 1,6$	$12,2 \pm 0,5$
valin	$3,35 \pm 0,07$	$-60,0 \pm 1,1$	$12,1 \pm 0,3$
tirozin	$1,98 \pm 0,19$	$-59,1 \pm 1,9$	$12,7 \pm 0,6$
hisztidin	$2,74 \pm 0,10$	$-49,3 \pm 1,2$	$16,4 \pm 0,4$
fenilalanin	$2,53 \pm 0,06$	$-40,6 \pm 1,2$	$18,4 \pm 0,4$

Azoknál az aminosavaknál, ahol az α -aminocsoport mellett más reaktív funkciós csoport is van a molekulában, minden esetben meg kell vizsgálni, hogy ezen funkciós csoportok részt vesznek-e kompetitív reakciókban az α -aminocsoporttal. Ebben az esetben két párhuzamos klórozási reakciót és két sav – bázis előegyensúlyt kell figyelembe venni a következők szerint.



$$K_{A1} = \frac{[\text{HA}][\text{H}^+]}{[\text{H}_2\text{A}]}$$



$$K_{A2} = \frac{[\text{A}][\text{H}^+]}{[\text{HA}]}$$

$$v = k_1[\text{HA}][\text{HOCl}] + k_2[\text{A}][\text{HOCl}] \quad (24)$$

Ezek alapján a $k_{\text{obs}}^{2\text{nd}}$ a (25) egyenlettel adható meg:

$$k_{\text{obs}}^{2\text{nd}} = \frac{k_1 K_{A1} [\text{H}^+]^2 + k_2 K_{A1} K_{A2} [\text{H}^+]}{(K_{A1} K_{A2} + K_{A1} [\text{H}^+] + [\text{H}^+]^2)(K_{\text{HOCl}} + [\text{H}^+])} \quad (25)$$

ahol k_1 és k_2 a HOCl-nek az aminosav HA, valamint A formáival lejátszódó reakcióinak sebességi állandói. Feltételezzük, hogy HA az α -aminocsoport deprotonált és az oldallánc funkciós csoportja protonált állapotban van, míg A a teljesen deprotonált formája az adott aminosavnak. Ez alól kivételt képez a hisztidin, ahol a HA a teljesen protonált α -aminocsoportot tartalmazó formát jelöli.

A következő részben azon aminosavak HOCl-lel lejátszódó reakcióit tárgyaljuk részletesen, ahol az oldallánc sav – bázis egyensúlyát, vagy klórozásra való hajlamát figyelembe kell venni.

A korábbi kutatások alapján a glutamin és az aszparagin esetében az amid-nitrogén klórozása lassú és elhanyagolható a HOCl és az alifás aminocsoport közötti reakció mellett, ha az aminosavat feleslegben alkalmazzuk.³

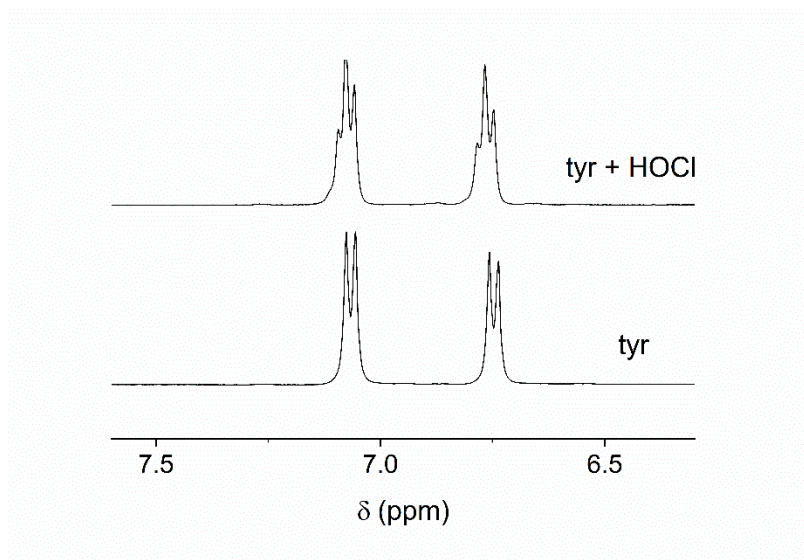
Az arginin esetében a guanidin-csoport erősen bázikus, deprotonálódása csak erősen lúgos körülmények között történik meg, azaz a csoport klórozása csak nagy pH-n lehetne releváns. A guanidincsoport szerkezeti jellemzői azonban erősen hasonlítanak az amidcsoportéhoz, ami sokkal kevésbé reaktív, mint az alifás aminocsoport. Tehát nem valószínű, hogy a guanidincsoport a klórozási folyamatban az aminocsoporttal verseng.

A lizin esetében az ϵ -aminocsoport bázikusabb ($pK = 10,81$), mint az α -aminocsoport ($pK = 9,25$). A megfelelő pK_a értékek alapján a HA és A formák koncentrációja összemérhetővé válik $pH = 10$ fölött. Valószínű, hogy a két aminocsoport reaktivitása HOCl-lel nem tér el jelentősen, ezért először $pH = 9,5$ -ig illesztettük az adatokat a (10) egyenlettel ($k = 4,32 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), azaz a (24) összefüggésben a második tagot ($k_2[A][HOCl]$) elhanyagoltuk. A k_2 sebességi állandójú reakcióútnak a teljes folyamathoz való hozzájárulását olyan módon becsültük, hogy az előző illesztésből kapott k_1 sebességi állandót rögzítettük és a teljes pH-tartományban kapott kísérleti adatokat a (25) összefüggéssel illesztettük. Ahogy az várható volt, a k_2 sebességi állandóra nagyon bizonytalan, de a k_1 -gyel azonos nagyságrendű becsült értéket kaptunk ($k_2 = (5,58 \pm 2,67) \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Ezen eredmények alapján nem zárható ki, hogy az α - és ϵ -aminocsoportok klórozása erősen lúgos közegben párhuzamosan játszódik le, de nyilvánvaló, hogy fiziológias pH-n döntően az α -aminocsoport oxidációja történik meg.

Az aromás oldalláncú aminosavak esetében felvetődik az aromás gyűrű konkurens klórozásának lehetősége is. Korábban az ilyen aminosavak reakcióit elsősorban peptidláncokban tanulmányozták HOCl vagy klóramin indukált oxidációs reakciókban.^{14, 19, 66, 67} Így ezeknek a komponenseknek az aminocsoportjai a peptidkötések miatt blokkoltak voltak.

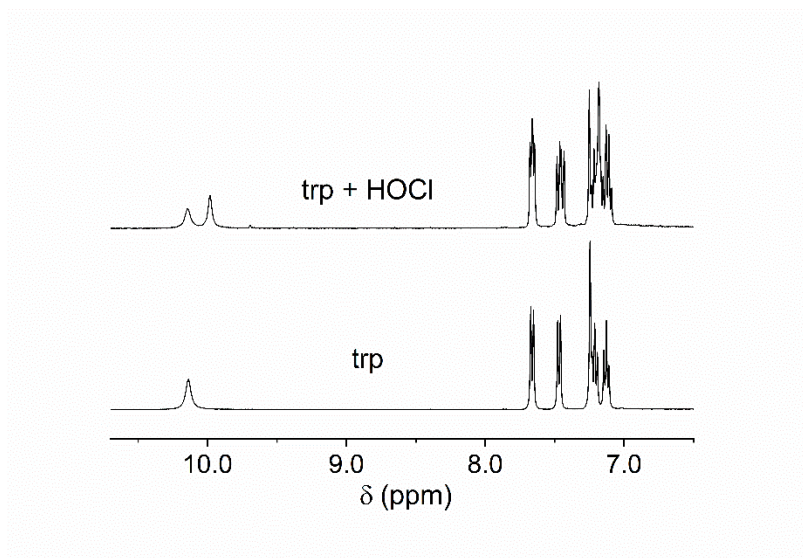
Az aromás oldalláncot tartalmazó aminosavak esetében a legegyszerűbb eset a fenilalanin klórozása, ahol a reakcióra jellemző másodrendű sebességi állandó értéke az N-klóramin képződésére utal. A korábbi eredményekkel¹⁴ összhangban igazoltuk, hogy az aromás gyűrű nem reagál a hipoklórossavval. Amikor az aminosavat 3-fenilpropánsavval helyettesítettük, vagyis nem volt aminocsoport a molekulában, nem tapasztaltunk klórozási reakcióra utaló abszorbanciaváltozást a reaktánsok összekeverését követően.

Részletes vizsgálatok szerint a triptofán és a tirozin oxidációja 2-oxindol és 3-klórtirozin vagy 3,5-diklórtirozin képződéséhez vezet. Régóta igazolt, hogy a 3-klórtirozin kiváló markere a HOCl által kiváltott fehérje oxidációnak.¹⁵ Ez a molekula peptidláncokban kötött tirozin transzklórozási reakciójában alakulhat ki.^{14, 46, 66, 67} A szabad tirozin aromás gyűrűjének klórozására vonatkozóan eredmények vitatottak aminosav felesleg esetén.^{14, 67} Valójában egy ilyen folyamat akkor mehet végbe, ha feltételezzük, hogy az aminocsoport klórozása kevésbé kedvezményezett, mint az aromás gyűrűé, ami nem valószínű, ha figyelembe vesszük az aminocsoport nagy reakcióképességét. A tirozinban az aromás OH-csoport deprotonálódása megváltoztathatja a klórozás általános kinetikai profilját. A megfelelő kinetikai adatokat a (25) összefüggéssel illesztettük. Az eredmények alapján megállapítható, hogy az OH-csoport deprotonálódása nem befolyásolja az aminocsoport reaktivitását, vagyis $k_1 \approx k_2$. Annak kizárása érdekében, hogy az aromás gyűrű klórozásának van-e szerepe a teljes reakcióban, összehasonlítottuk a szabad és a klórozott tirozin ^1H NMR spektrumát (7. ábra). Ehhez a reakcióelegy spektrumát a reagensek összekeverése után a lehető legrövidebb időn, jellemzően 3 – 4 percen belül vettük fel. Ezekben a vizsgálatokban ionerősséget nem állítottunk és az aminosavat 20%-os feleslegben alkalmaztuk. A klórozási reakció néhány másodpercen belül befejeződött és UV – látható spektrofotometriás módszerrel igazoltuk, hogy az *N*-klóraminosav bomlása nem jelentős az NMR mérések időskáláján. Az ^1H NMR spektrumok aromás tartománya az alapvegyület és a klórozott termék esetében nagyon hasonló, ami igazolja, hogy nincs új szubsztituens az aromás gyűrűn (7. ábra). Ez azt jelenti, hogy az aromás gyűrű érintetlen marad a klórozási reakció során. Ez azonban nem zárja ki annak lehetőségét, hogy a tirozin aromás gyűrűje klórozható, ha az aminocsoportját egy biológiailag fontos molekula peptidkötése védi. Eredményeink csak azt zárják ki, hogy a 3-klórtirozin képződése a HOCl és a tirozin közötti közvetlen reakcióban megtörténik.



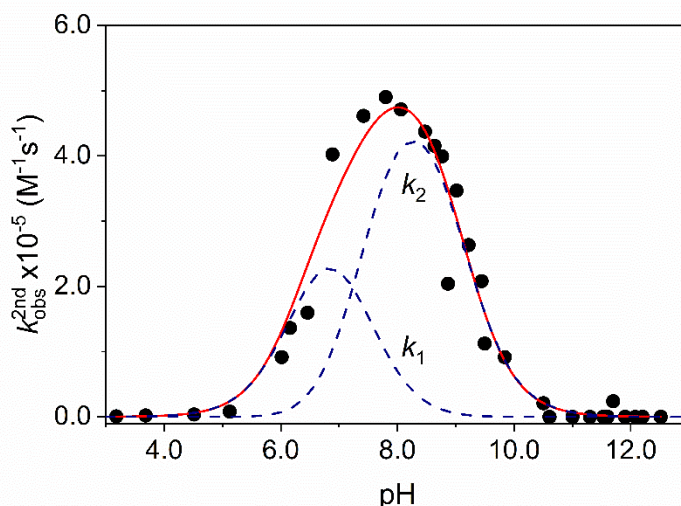
7. ábra A tirozin és a tirozin – HOCl reakcióelegy ^1H NMR spektruma.
 $c_{\text{HOCl}}^0 = 5,00 \times 10^{-3} \text{ M}$; $c_{\text{AA}}^0 = 6,00 \times 10^{-3} \text{ M}$; $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

A triptofán klórozása nagyon komplex kinetikai sajátosságokat mutat, amint azt korábban is leírták.¹⁴ Egyértelműen látszik, hogy a klóramin képződése és az azt követő bomlás nem válik el időben úgy, mint a többi tanulmányozott rendszerben. A reakció kvantitatív kinetikai értékelése további alapos vizsgálatokat igényel. Figyelemre méltó azonban, hogy az ^1H NMR spektrum aromás részének szerkezete a klórozási folyamat következtében nem változik jelentősen. Bár a két jelcsoport között erős átfedés van, egyértelműen megállapítható, hogy a triptofán és a klórozott termék azonos spektrális jellemzőkkel bír mind semleges, mind lúgos körülmények között (8. ábra). Korábban a 2-oxindol képződését írták le a triptofánt tartalmazó peptidek oxidációjában.¹⁴ Azonban egy ilyen vegyületben a pirrol gyűrű elveszti aromás jellegét és jelentős változás lenne várható az ^1H NMR spektrumban. Következésképpen nem valószínű, hogy a HOCl és a szabad triptofán indol gyűrűje reagál egymással.



8. ábra A triptofán és a triptofán – HOCl reakcióelegy ^1H NMR spektruma.
 $c_{\text{HOCl}}^0 = 5,00 \times 10^{-3} \text{ M}$; $c_{\text{AA}}^0 = 6,00 \times 10^{-3} \text{ M}$; $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

A hisztidin - HOCl reakció két pH-függő, párhuzamos reakcióúton megy végbe. A (25) összefüggéssel történő illesztéssel a következő eredményeket kaptuk: $k_1 = (3,7 \pm 0,4) \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ és $k_2 = (2,74 \pm 0,10) \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. A két reakcióút hozzájárulását a teljes folyamathoz a 9. ábrán mutatjuk be. A két sebességi állandó az aromás gyűrű klórozásához és az *N*-klóramin képződéséhez rendelhető hozzá. Ezt támasztja alá egyfelől az, hogy a k_1 jó egyezésben van az *N*-acetilhisztidin imidazol gyűrűjének klórozásakor kapott sebességi állandóval ($8,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).¹⁴ Másfelől, a k_2 értéke összhangban van többi rendszerben az *N*-klóramin képződésére kapott eredményekkel (4. táblázat). Amint az várható volt, ez utóbbi reakció domináns a lúgos pH-tartományban. A 9. ábra alapján a két különböző klórozott termék azonos mennyiségben képződik pH = 7,1 körül. Megpróbáltuk igazolni ezen molekulák együttes létezését olyan módon, hogy UV-látható spektrumokat vettünk fel pH = 5,6 – 8,7 tartományban. Összességében csak kismértékű változásokat figyeltünk meg a HOCl teljes fogyását követően felvett spektrumokban (1 s után), bár az alifás *N*-klóraminra jellemző 255 nm-es fényelnyelési sáv abszorbanciája valamelyest csökken a pH csökkentésével. Ez a változás ugyan nem mond ellent a kinetikai megfigyeléseknek, de nem szolgáltat közvetlen bizonyítékot sem a termékek eloszlására vonatkozóan.



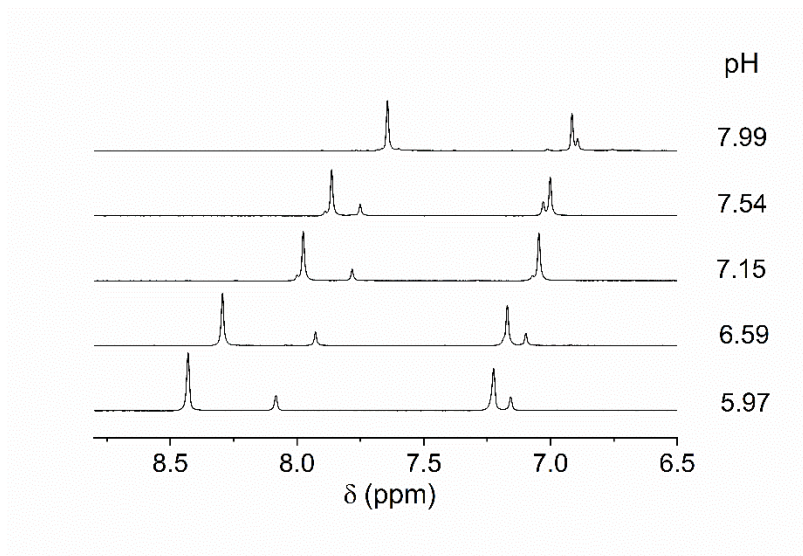
9. ábra A hisztidin – HOCl reakció sebességi állandójának pH-függése és a párhuzamos reakcióutak hozzájárulása a reakcióhoz.

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

A klórozott termékek képződését pozitív ionmódú MS kísérletekkel is próbáltuk igazolni 6,0; 7,1 és 8,0 pH-jú reakcióelegyekben. Minden esetben detektáltuk a klórozott hisztidin H^+ -nal és Na^+ -nal képzett adduktumjaira jellemző $m/z = 190,0379$ és $212,0194$ csúcsokat. Mivel a két termék molekulatömege és töltése megegyezik, ezzel a kísérlettel nem állapítható meg, hogy a klór az aminocsoporthoz vagy az imidazol gyűrűhöz kapcsolódik-e. Ezt követően MS/MS kísérleteket is végeztünk, hogy a fragmensionok alapján megerősítsük a két különböző termék jelenlétét. Az első fragmentáció minden mintában a Cl leszakadásához vezetett és így a további fragmensionok megegyeztek a különböző pH-jú minták esetében.

A reakcióelegyek pH-függő ^1H NMR spektrumainak aromás tartományát mutatja a 10. ábra a hisztidin és a HOCl összekeverését követően. Az δ és ϵ protonok megfelelő csúcsai között erős átfedés van pH $\sim 7,0$ körül, ahol három független komponens jeleit látjuk a spektrumban (hisztidin és 2 klórozott termék). pH = 7,15 és 7,54 értéken a hisztidin ϵ protonok jelei 7,81 és 7,75 ppm kémiai eltolódással jelennek meg. A 7,98 ppm és 7,86 ppm kémiai eltolódásnál kapott jelek a klórozott vegyületek ϵ protonjaihoz rendelt csúcsok, amiknél vállcsúcsok mutatkoznak. Figyelemre méltó, hogy a δ és ϵ protonok kémiai eltolódásai szignifikánsabbak kisebb pH-n. Ez a trend összhangban lehet kisebb pH-n egy N -klórozott aromás gyűrű kialakulásával, mivel ez a reakció várhatóan nagyobb hatást gyakorol az aromás CH protonok kémiai

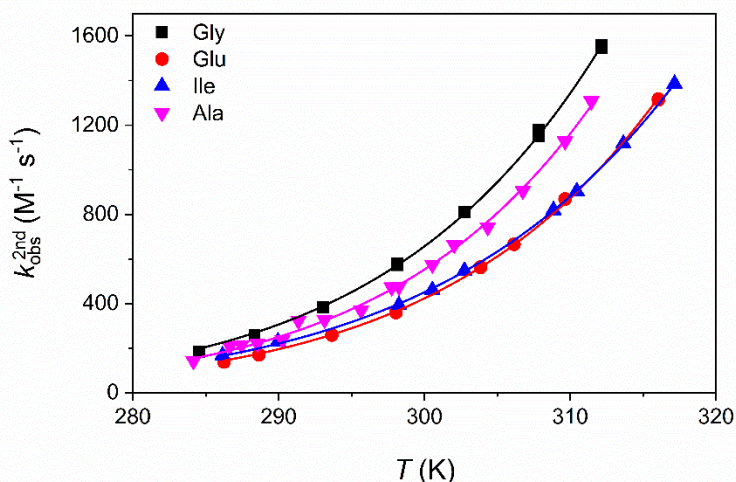
eltolódására, mint az *N*-klóramin kialakulása. Úgy tűnik tehát, hogy a megfigyelések összhangban vannak a két különböző *N*-klórozott termék jelenlétével ebben a rendszerben. Hangsúlyozni kell azonban, hogy minden ilyen mérést néhány perccel a reagensek összekeverése után végeztünk és a primer klórozott termék részt vehet további reakciókban. Korábban igazolták, hogy a hisztidin *N*-klór-aromás gyűrűje képes α -aminocsoportok viszonylag gyors klórozására, tehát transzklórozási reakció is lejátszódhat.¹⁹



10. ábra A HOCl – hisztidin reakcióelegy ^1H NMR spektrumának aromás tartománya a pH függvényében, néhány perccel a reaktánsok összekeverése után.
 $c_{\text{HOCl}}^0 = 5,00 \times 10^{-3} \text{ M}$; $c_{\text{AA}}^0 = 6,00 \times 10^{-3} \text{ M}$; $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

Az *N*-klóraminosavak képződésének hőmérsékletfüggését 0,05 M NaOH-ban, 11 – 40 $^\circ\text{C}$ tartományban vizsgáltuk. A $k_{\text{obs}}^{2\text{nd}}$ hőmérsékletfüggését az 11. ábra szemlélteti néhány aminosav esetében. Ilyen körülmények között $K_{\text{HOCl}} \gg [\text{H}^+]$ és $K_{\text{AA}} \gg [\text{H}^+]$. A (10) összefüggés így a következőképpen egyszerűsödik (K_w a vízionszorzat):

$$k_{\text{obs}}^{2\text{nd}} = k \frac{1}{[\text{OH}^-]} \frac{K_w}{K_{\text{HOCl}}} \quad (26)$$



11. ábra Néhány *N*-klóraminosav képződésének másodrendű sebességi állandója a hőmérséklet függvényében.

$c_{\text{HOCl}}^0 = 1,00 \times 10^{-3} \text{ M}$; $c_{\text{AA}}^0 = 1,10 \times 10^{-2} \text{ M}$; $c_{\text{OH}} = 5,00 \times 10^{-2} \text{ M}$; $I = 1,00 \text{ M}$ (NaClO_4).

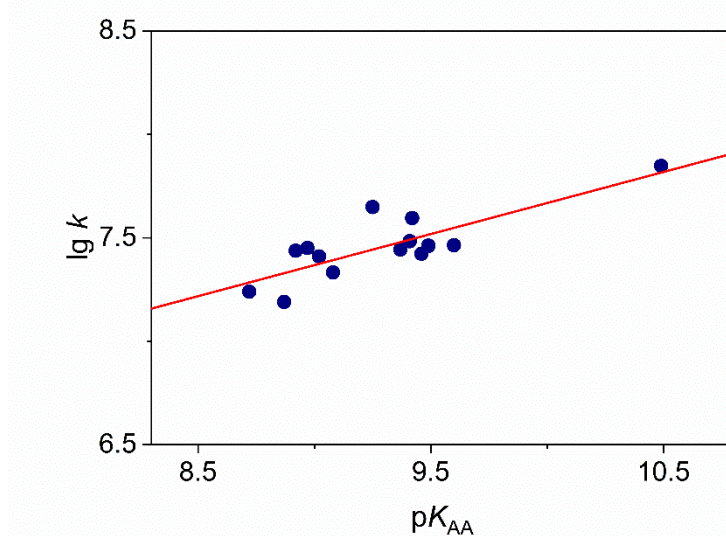
A k , K_w és K_{AA} hőmérsékletfüggését az Eyring-Polányi és a van't Hoff egyenletek felhasználásával írhatjuk le. Így a (26) egyenlet a következő formában írható fel:

$$k_{\text{obs}}^{2\text{nd}} = \frac{k_B T}{h} e^{\frac{\Delta S^\ddagger}{R}} e^{-\frac{\Delta H^\ddagger}{RT}} \frac{1}{[\text{OH}^-]} \frac{e^{-\frac{\Delta H_w}{RT}} e^{\frac{\Delta S_w}{R}}}{e^{-\frac{\Delta H_{\text{HOCl}}}{RT}} e^{\frac{\Delta S_{\text{HOCl}}}{R}}} \quad (27)$$

A kísérleti adatokat a (27) összefüggéssel illesztettük és a számított aktiválási paramétereket ($\Delta H^\ddagger$ és $\Delta S^\ddagger$) a 4. táblázatban foglaltuk össze. Az irodalomban 0 M ionerősségnél ismert a K_w hőmérsékletfüggése, ezért munkánk során 1,00 M NaClO_4 ionerősség mellett, erős sav – erős bázis titrálás alapján határoztuk meg különböző hőmérsékleten a moláris entalpiát és entrópiát, majd a kapott primer adatokat a van't Hoff egyenlettel illesztettük: $\Delta H_w = 48,7 \pm 2,2 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, $\Delta S_w = -97,8 \pm 6,8 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$. A HOCl disszociációjának termodinamikai paraméterei az irodalomban megtalálhatók: $\Delta H_{\text{HOCl}} = 12,4 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$; $\Delta S_{\text{HOCl}} = -99,7 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$.⁵⁴ Ezeket a termodinamikai paramétereket az illesztések során rögzítettük.

Az aminosocsoport klórozására jellemző másodrendű sebességi állandók nagyon hasonlóak, $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ nagyságrendűek (4. táblázat). Ennek megfelelően gyenge korreláció van az aminosocsoport reaktivitása és bázikussága között (12. ábra). Nagyon

hasnó tendenciát mutattak a különböz aminok klórozására kapott korábbi eredmények is.⁶⁸

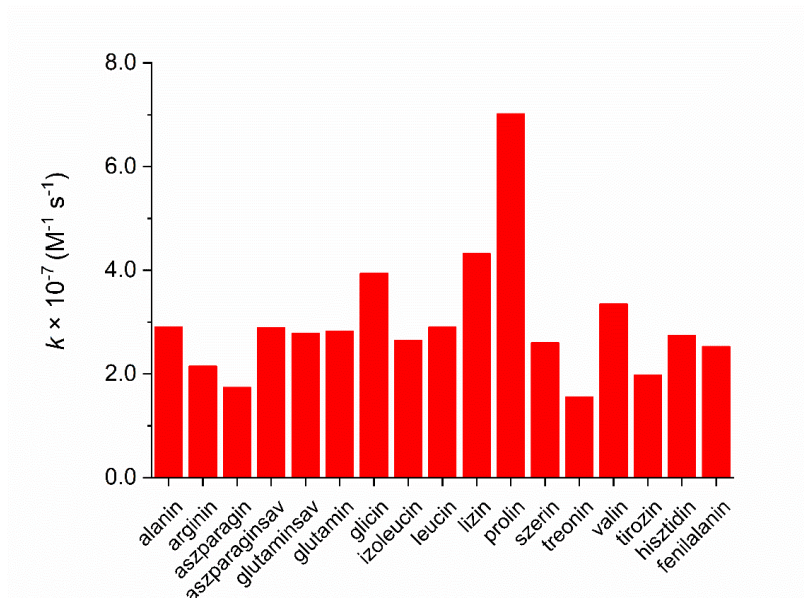


12. ábra A $\log k$ és az aminosavak pK_{AA} értéke közötti korreláció.
 $I = 1,00 \text{ M (NaClO}_4\text{)}; T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}.$

Az aktiválási paraméterek nem mutatnak az aminosavak szerkezeti vagy egyéb jellemzőit tükröz jelentős tendenciát. Az aktiválási entalpia és aktiválási entrópia értéke azt jellemzi, hogy milyen nagy a N – Cl kötéserősség, illetve mennyire rendezett az átmeneti állapot. Az eredmények alapján feltételezhető, hogy a nagyméretű oldalláncok valamelyest csökkentik a reagensek közötti kötődés erősségét és a szerkezetet diffúzabbá teszik az átmeneti állapotban. Ebben a tekintetben érdemes megjegyezni, hogy a glutamin hosszabb oldallánca az amidcsoportot távolabb tartja a reakcióközponttól az aszparaginhoz képest. Következésképpen ennek a két, szerkezetileg hasonló aminosavnak az aktiválási paraméterei jelentősebben különböznek egymástól. Vélhetően a leucin és a prolin esetében is a szubsztituens hatására vezethető vissza a viszonylag negatívabb aktiválási entrópia.

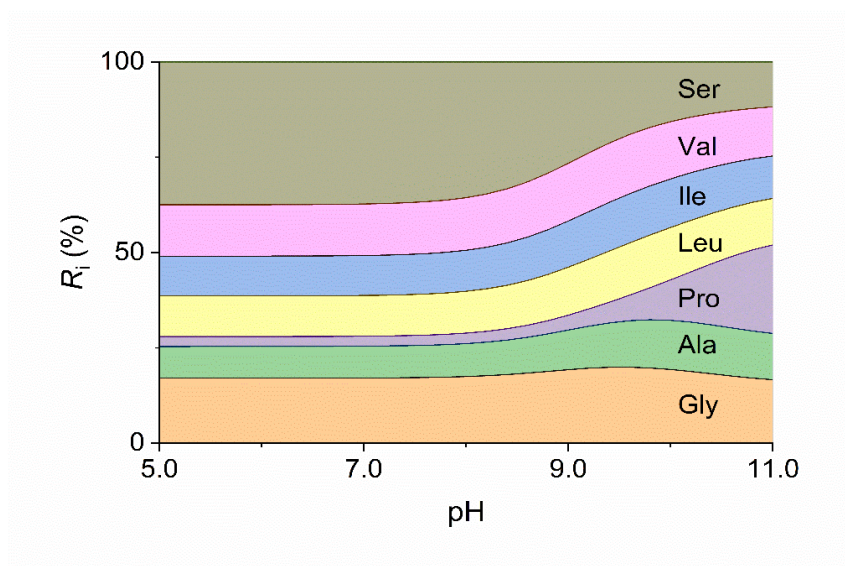
Számos kísérlet történt az aminosavak reaktivitási sorrendjének meghatározására a korábbi szakirodalomban.^{14, 36, 42} Elég gyakran ezek a vizsgálatok csak a fiziológiás pH-tartományra korlátozódtak ($\text{pH} = 7,2 - 7,4$) és a következtetéseket ezek alapján vonták le. Amint az irodalmi előzmények ismertetése során kifejtettük, gyakran téves megközelítést használtak.

Az egyes aminosavak és hipoklórossav közötti reakció sebességi állandói (4. táblázat) közötti eltéréseket a 13. ábra mutatja be.



13. ábra Néhány aminosav HOCl-lel lejátszódó reakciójának sebességi állandója.
 $I = 1,00 \text{ M (NaClO}_4\text{); } T = 25,0 \text{ } ^\circ\text{C}.$

Ezen sebességi állandók könnyen felhasználhatók az aminosavak hipoklórossavval szembeni reaktivitási sorrendjének modellezésére széles pH tartományban. Ennek illusztrálására feltételezzük, hogy egy 7 aminosavat ekvimoláris mennyiségben és feleslegben tartalmazó oldat reagál az oxidálószerrel. Az egyes klórozási sebességeket a pH függvényében lehet kiszámítani a (10) egyenlet alapján. Az egyes aminosavak relatív hozzájárulása a HOCl fogyáshoz a 14. ábrán látható. Kevéssé savas, semleges körülmények között – $[\text{H}^+] \gg K_{\text{AA}}$ – a relatív sebesség nem változik a pH változásával. Ez a helyzet jelentősen megváltozik, amikor az aminocsoportok sav-bázis egyensúlya a deprotonálódás felé ($\text{pH} > 8,5$) tolódik el. Lúgos körülmények között a relatív arányokat erősen befolyásolja az aminosavak K_{AA} -értéke. Ebben a tekintetben érdekes megjegyezni, hogy a legnagyobb sebességi együtthatót a prolinra kaptuk. Mindazonáltal pH 7,0-nél a HOCl-lel lényegesen lassabban reagál, mint a többi aminosav a viszonylag nagy $\text{p}K_{\text{AA}}$ miatt. A prolin klórozásának relatív sebessége a pH növelésével jelentősen nő, mivel a deprotonált formájának koncentrációja fokozatosan összemérhetővé válik a többi aminosavével.



14. ábra Néhány aminosav HOCl-lel lejátszódó reakciójának számolt relatív sebessége.

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

A Na és Olson,³⁶ valamint az általunk kapott eredmények közötti jelentős eltérés a különböző kísérleti megközelítések következménye lehet. Vizsgálataink során a sebességi állandókat közvetlen kinetikai kísérletekből nyertük, amik lehetővé tették a reakciósebességek közvetlen összehasonlítását. Az idézett munkában viszont a reakcióelegyek analizisét hosszú idővel a klórozási folyamat befejezése után végezték, így másodlagos folyamatok, pl. a klóraminok bomlása vagy transzklórozási reakciók miatt téves következtetésekre juthattak.

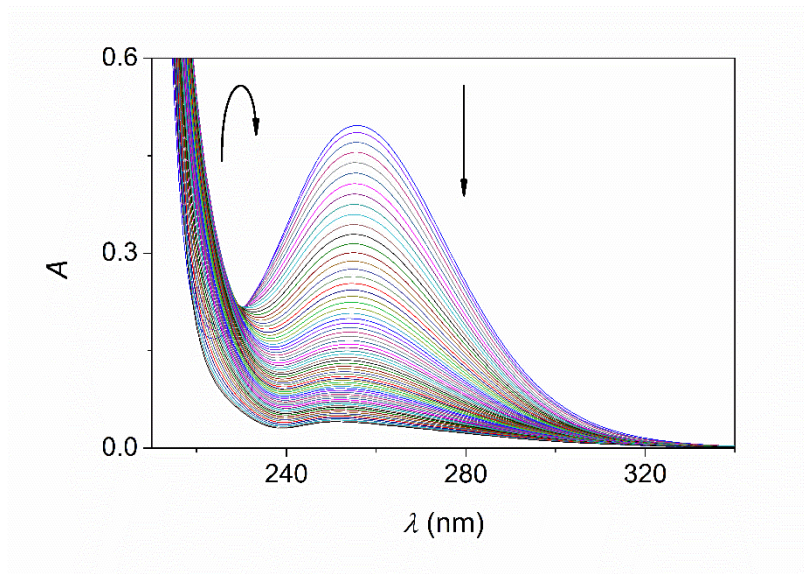
Pattison és Davis modellezni kívánták a hisztidin imidazol gyűrűjének klórozását a HOCl és 4-imidazolecetsav között lejátszódó reakcióval. Arra a következtetésre jutottak, hogy az alifás amin kevesebb, mint 30%-kal reaktívabb, mint az imidazol csoport pH = 8,0-on.¹⁴ Adataink azt igazolják, hogy ezen csoportok reaktivitásában hatszoros különbség van ilyen körülmények között és a gyűrű klórozása csak pH = 7,0 alatt válik meghatározóvá (9. ábra).

4.2 *N*-klóraminosavak bomláskinetikája

4.2.1 *N*-klórglicin (MCG) bomlása

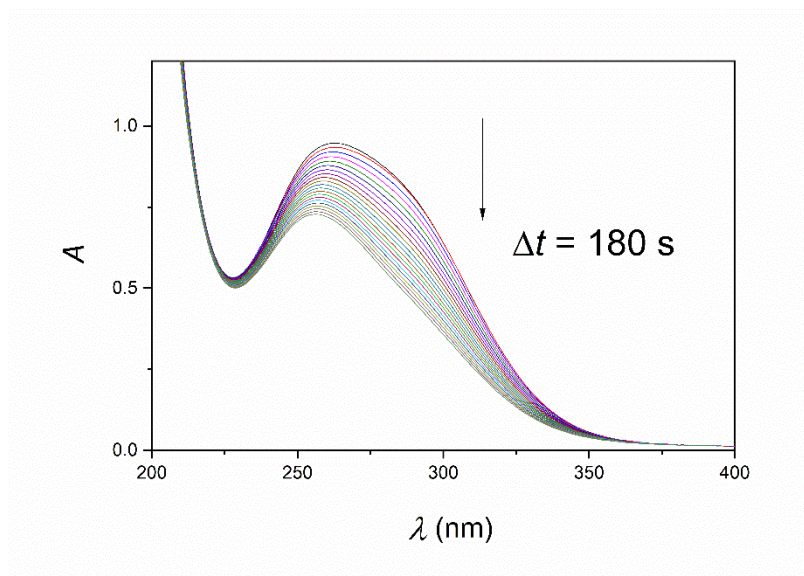
A feleslegben lévő glicin és HOCl reakciójában pillanatszerűen képződő MCG viszonylag lassan bomlik semleges – lúgos pH-tartományban. A karakterisztikus elnyelési csúcson ($\lambda_{\text{max}} = 255 \text{ nm}$) monoton abszorbancia csökkenést tapasztalunk, míg kisebb hullámhosszaknál kezdetben az abszorbancia nő majd csökken (15. ábra).

Amikor HOCl felesleget alkalmazunk az MCG elnyelési sávján egy váll figyelhető meg, ami az *N*, *N*-diklórglicin képződésével magyarázható (16. ábra). Ennek a mellékreakciónak a kizárására a vizsgálatok során a HOCl-hez képest mindig feleslegben alkalmaztuk a glicint.



15. ábra A hipoklorit és glicin összekeverése után detektált spektrális változás.

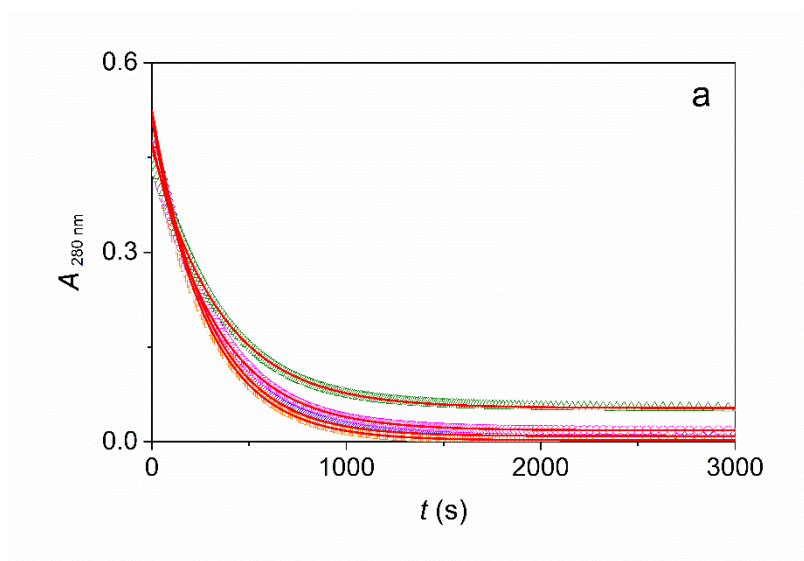
$c_{\text{Gly}}^0 = 2,00 \times 10^{-4} \text{ M}$; $c_{\text{MCG}}^0 = 1,00 \times 10^{-3} \text{ M}$; $c_{\text{OH}} = 5,40 \times 10^{-2} \text{ M}$, $I = 1,00 \text{ M}$
(NaClO_4); $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$; $t = 5000 \text{ s}$; $\Delta t = 40 \text{ s}$.

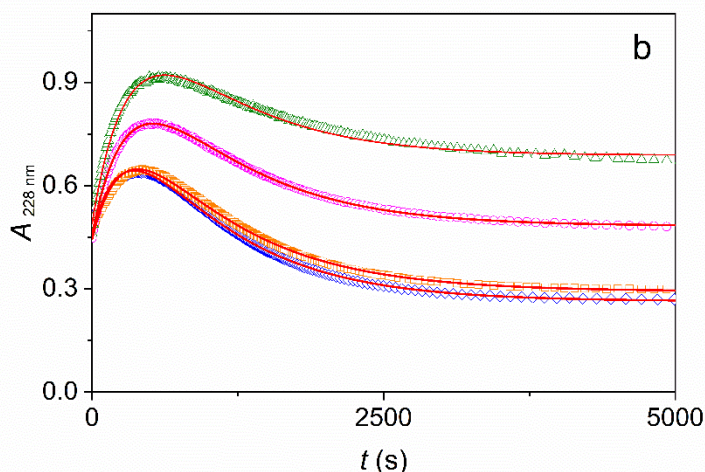


16. ábra A karakterisztikus spektrális változás a glicinhez képest kétszeres HOCl-felesleg mellett.

$c_{\text{Gly}}^0 = 2,00 \times 10^{-3} \text{ M}$; $c_{\text{HOCl}}^0 = 4,00 \times 10^{-3} \text{ M}$; $c_{\text{OH}} = 5,40 \times 10^{-2} \text{ M}$; $I = 1,00 \text{ M}$ (NaClO_4); $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$; $t = 3600 \text{ s}$; $\Delta t = 180 \text{ s}$.

A kinetikai vizsgálatok során kapott görbéket a 17a. és 17b. ábra mutatja.





17. ábra Tipikus kinetikai görbék az MCG bomlása során 280 (a) és 228 (b) nm-en, különböző glicinfelesleg esetén. A kísérleti adatokat a (28) és (29) összefüggésekkel illesztettük.

$c_{\text{MCG}}^0 = 3,00 \times 10^{-3} \text{ M}$; $c_{\text{OH}} = 5,40 \times 10^{-2} \text{ M}$; $c_{\text{Gly}}^0 = 1,50 \times 10^{-3} \text{ (}\diamond\text{)}$; $3,00 \times 10^{-3} \text{ (}\square\text{)}$; $1,20 \times 10^{-2} \text{ (}\circ\text{)}$; $2,70 \times 10^{-2} \text{ (}\triangle\text{) M}$; $I = 1,00 \text{ M (NaClO}_4\text{)}$; $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

A 280 nm-en kapott kinetikai görbéket egyszerű elsőrendű összefüggéssel lehet illeszteni (28).

$$A = A_0 e^{-k_{\text{obs1}} t} + A_\infty \quad (28)$$

ahol A az abszorbancia, k_{obs1} az MCG bomlására jellemző elsőrendű sebességi együttható. A legnagyobb glicinkoncentráció mellett az A_∞ 0-tól való eltérése azt jelzi (17a. ábra), hogy legalább egy terméknek spektrális hozzájárulása van a mért görbékhez 280 nm-en. Kisebb hullámhosszakon (240 nm alatt) a kinetikai görbe köztitermék(ek) képződésével és továbbalakulásával értelmezhető (17b. ábra).

A különböző pH-n, lúgos közegben mért spektrális változásokat mátrixrang-analízissel elemeztük⁶⁹ egyrészt csak egy-egy adott pH-hoz tartozó adatokat kiértékelve, másrészt a teljes mérési sorozat együttes figyelembe vételével (5. táblázat). A színes részecskék száma a nem nulla sajátértékek számával egyenlő. Gyakorlati probléma, hogy a fényelnyelés mérése is hibával terhelt, ezért a sajátértékek soha nem válnak nullává, csupán monoton csökkennek. Ennek a problémának a kiküszöbölésére azokat a sajátértékeket tekintjük nullától eltérőnek, amelyek jelentősen nagyobbak, mint a következő sajátérték. Minél nagyobb egy

sajátérték, annál nagyobb a hozzájárulása a fényelnyeléshez az adott részecskének. Az eredmények egyértelműen mutatják, hogy a háttérként felvett glicin mellett 3 fényelnyelő részecskét tartalmaz a reakcióelegy. Ezek vélhetően az MCG, egy köztitermék és egy végtermék. A mátrixrang-analízis eredményei teljes összhangban vannak a 17.b ábrán látható abszorbancia változással is.

5. táblázat Az időfüggő spektrumok mátrixrang-analízise során kapott első 7 sajátérték különböző pH-kon, illetve az összes adat kiértékelése során.

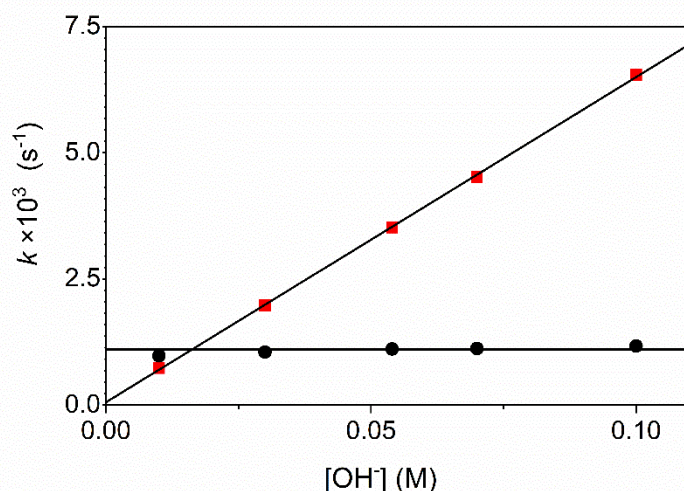
pH	12,15	11,65	10,30	9,84	összes
1	15,59	40,30	30,03	68,08	123,05
2	5,140	8,224	5,761	9,942	27,56
3	0,039	0,192	0,098	0,081	1,791
4	0,013	0,086	0,023	0,021	0,796
5	0,007	0,031	0,011	0,018	0,311
6	0,004	0,020	0,009	0,011	0,063
7	0,004	0,017	0,005	0,010	0,038

A 228 nm-en kapott kinetikai görbéket két exponenciális tag összegéből álló összefüggéssel tudtuk illeszteni (29).

$$A = A_1 e^{-k_{\text{obs1}} t} + A_2 e^{-k_{\text{obs2}} t} + A_{\infty} \quad (29)$$

ahol k_{obs1} megegyezik a (28) egyenletben szereplő paraméterrel, k_{obs2} pedig a köztitermék tovább alakulására jellemző sebességi együttható. A két sebességi állandó értéke nagyon hasonló, ami bizonytalanná teszi az illesztést. Emiatt először 280 nm-en illesztettük a kinetikai görbéket és a kapott k_{obs1} értéket rögzítettük a 228 nm-en mért görbék illesztése során. A kapott sebességi állandók a következők: $k_{\text{obs1}} = (3,2 \pm 0,3) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ és $k_{\text{obs2}} = (1,2 \pm 0,1) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$.

A 18. ábra a sebességi állandók hidroxidion-függését mutatja be.



18. ábra A sebességi állandók (k_{obs1} (■) és k_{obs2} (●)) a hidroxidion-koncentráció függvényében.

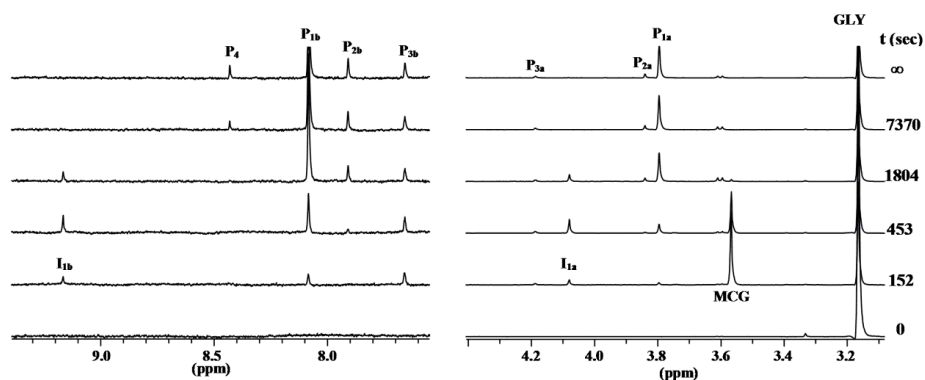
$I = 1,00 \text{ M (NaClO}_4\text{)}; T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}.$

A k_{obs1} a teljes MCG bomlási folyamat első lépéséhez rendelhető. Ennek a lépésnek a sebessége arányos a hidroxidion koncentrációjával. A reakcióban olyan köztitermék képződik, ami a következő lépésekben egy másik köztiterméké és végül a terméké alakul át. A második, pH-független sebességi állandó ezen reakciólépések egyikéhez rendelhető.

A kinetikai eredmények összhangban vannak a Hand és munkatársai által leírtakkal, amennyiben az MCG bomlásának első lépése egy elsőrendű folyamat.⁴⁹ Ugyanakkor saját eredményeink alapján egyértelműen igazolható, hogy kisebb hullámhosszon az elsőrendű viselkedéstől való eltérés nem az általuk feltételezett *N*, *N*-diklórglicin jelenlétével magyarázható, hanem a köztitermék képződésével és tovább alakulásával. Ezt a hatást minden korábbi vizsgálatban figyelmen kívül hagyták, mivel csak a jellemző MCG sávon ($\lambda_{\text{max}} = 255 \text{ nm}$) mértek abszorbanciaváltozást.

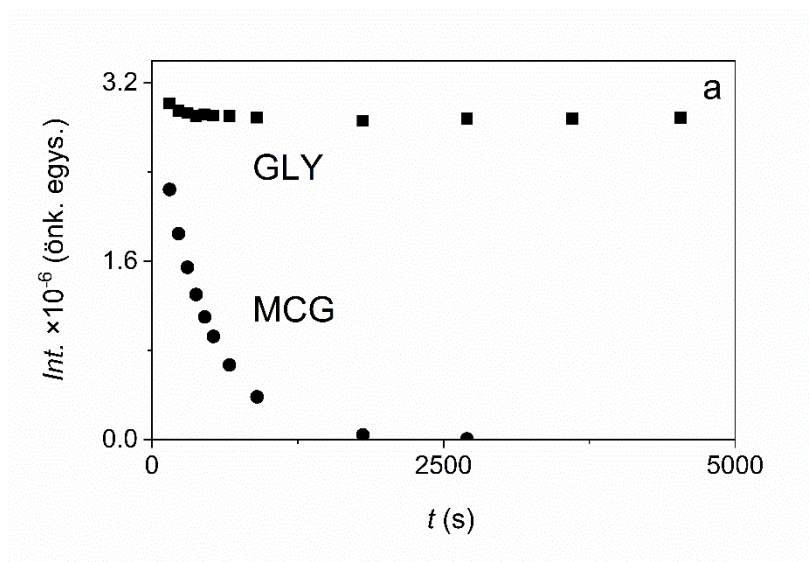
Ennek a reakciórendszernek egy érdekes és rendkívül szokatlan jellemzője, hogy míg a k_{obs1} és a k_{obs2} független a glicin koncentrációjától, mégis a végső abszorbancia egyértelműen nő a reagens feleslegének növelésével. Ez a megállapítás összhangban van egy olyan kinetikai modellel, ami magában foglal két, a köztitermékek képződésével és tovább alakulásával kapcsolatos sebességmeghatározó reakciólépést, valamint több gyors reakciót a teljes folyamat utolsó szakaszában. A kompetitív reakcióutak relatív sebessége határozza meg a termékek végső sztöchiometriai arányát.

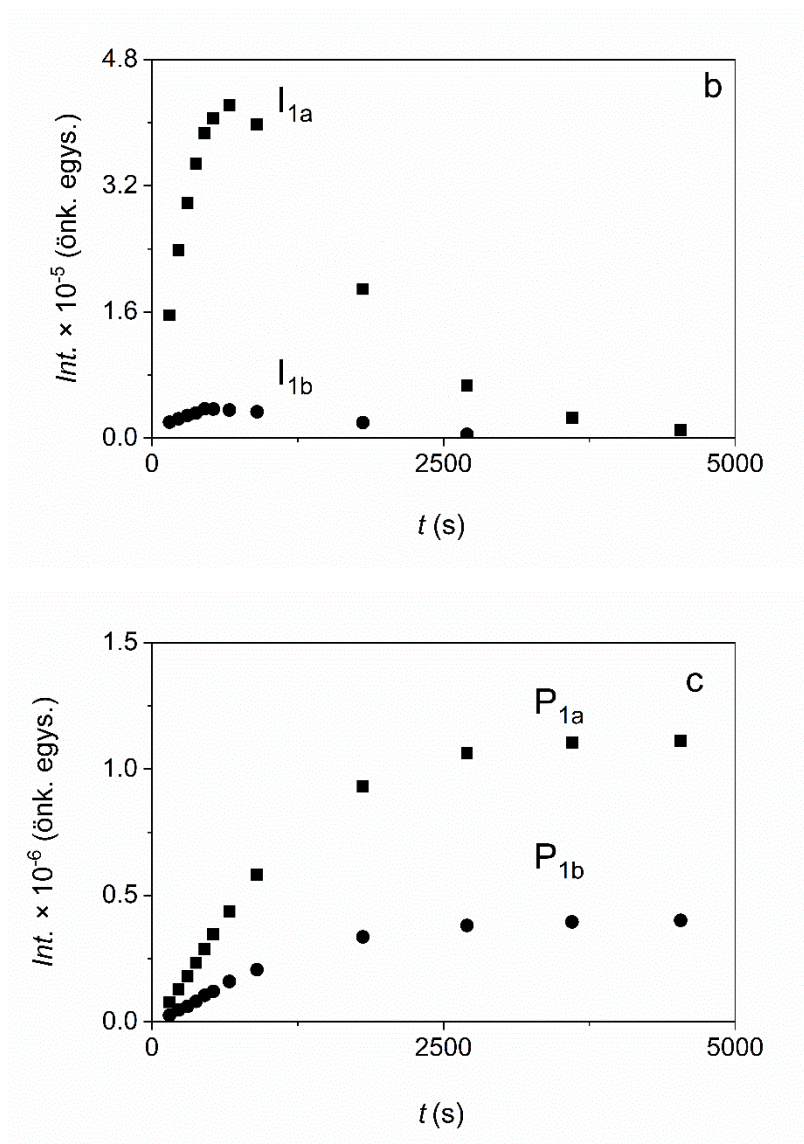
Az UV-tartományban megfigyelt spektrális változások nem alkalmasak az intermedierek és a termékek azonosítására. Ezért ^1H és ^{13}C NMR vizsgálatokat végeztünk, hogy részletes információt kapjunk ezen vegyületek szerkezetéről. Meg kell jegyezni, hogy az NMR spektrométert minden esetben a reakcióelegyre hangoltuk és simmeltük, ami több percet igényelt. E műveletek során az MCG bomlása előrehaladt, ezért a reakció kezdeti fázisát nem lehetséges ezzel a módszerrel tanulmányozni. Az első spektrumot a reagensek összekeverése után ~ 3 perccel vettük fel. A tipikus ^1H NMR spektrumokat az idő függvényében a 19. ábra mutatja be és ehhez kapcsolódóan az MCG, a közttermék és termékek csúcsintenzitásainak időbeli változása a 20. ábrán látható.

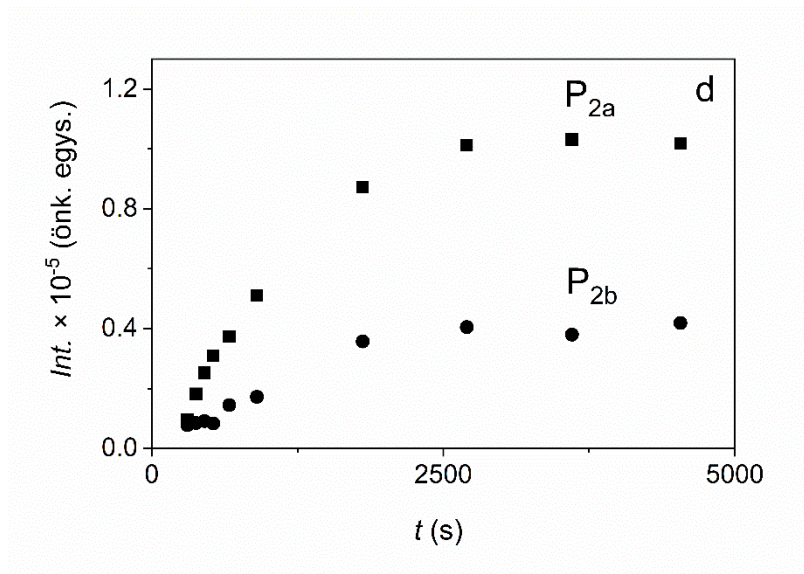


19. ábra Időfüggő ^1H NMR spektrumok az MCG bomlása során vizes közegben. A spektrumok két része különböző nagyításban van ábrázolva.

$c_{\text{MCG}}^0 = 1,00 \times 10^{-2} \text{ M}$; $c_{\text{GLY}}^0 = 1,00 \times 10^{-2} \text{ M}$; $c_{\text{OH}} = 5,40 \times 10^{-2} \text{ M}$; $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$.



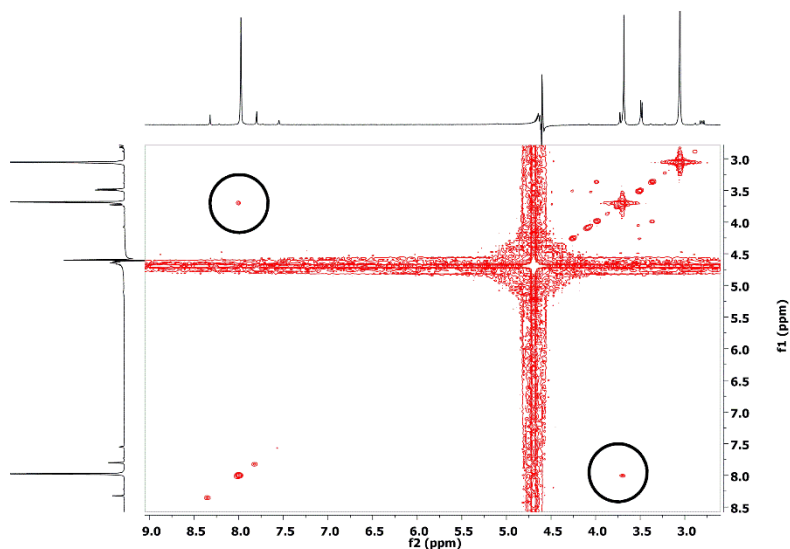




20. ábra Az ^1H NMR csúcsok intenzitása az idő függvényében az MCG bomlása során: reaktánsok (a), köztitermék (b) és végtermékek (c), (d).

$c_{\text{MCG}}^0 = 1,00 \times 10^{-2} \text{ M}$; $c_{\text{Gly}}^0 = 1,00 \times 10^{-2} \text{ M}$; $c_{\text{OH}} = 5,40 \times 10^{-2} \text{ M}$; $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

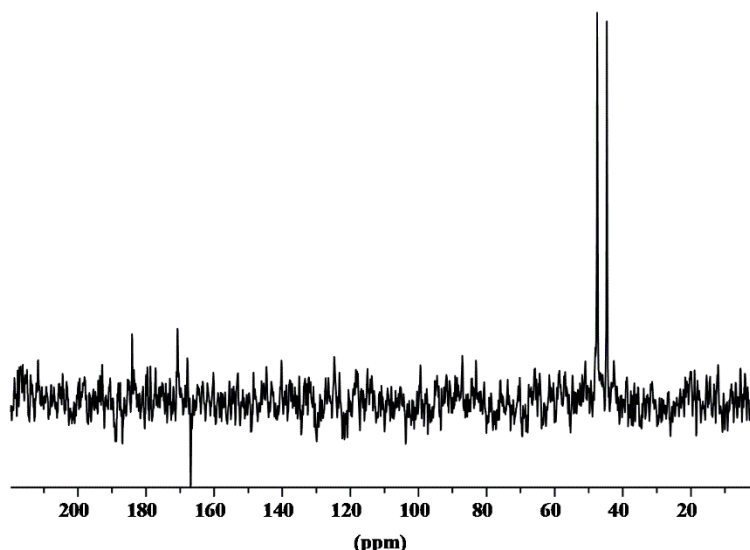
A 3,16 (Gly) és 3,57 (MCG) ppm-nél látható csúcsok a glicin és az MCG CH_2 csoportjaihoz tartoznak. Ezen csúcsok intenzitásának időbeli változása összhangban van az MCG teljes eltűnésével és a glicin koncentrációjának enyhe csökkenésével (20a. ábra). A 3,80 (P_{1a}) és 8,08 (P_{1b}) ppm kémiai eltolódású csúcsok a reakció végtermékéhez tartoznak, mivel intenzitásuk hosszabb reakcióidőknél állandó értéket ér el (20c. ábra). Ezek a csúcsok megegyeznek egy CH_2 és egy aldehidcsoport (CHO) jelével, amik ugyanazon molekulához tartoznak a COSY spektrum alapján (21. ábra).



21. ábra ¹H - ¹H NMR spektrum az MCG bomlása után. A bekarikázott jelek a CHO és CH₂ csoportok korrelációját mutatják.

$C_{\text{MCG}}^0 = 1,00 \times 10^{-2} \text{ M}$; $C_{\text{Gly}}^0 = 1,00 \times 10^{-2} \text{ M}$; $C_{\text{OH}} = 5,40 \times 10^{-2} \text{ M}$; $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

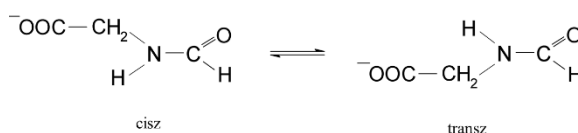
Többféle módon igazoltuk, hogy a reakció terméke az *N*-formilglicin. Így a szakirodalomban⁷⁰ leírt módon előállított *N*-formilglicin vizes oldatának NMR spektrumában ugyanazon csúcsokat találtuk, mint a MCG bomlása során kapott reakcióelegy spektrumában. További bizonyítékot ad a termékre a reakció végén negatív ion módban felvett MS spektrum, amiben $m/z = 102,022$ és $124,006$ -nál megjelennek az *N*-formilglicinnek a H^+ -nal és Na^+ -nal képződő adduktumok csúcsai. A ¹³C NMR spektrumokban 48 (CH₂), 184 (COO⁻) és 167 (CHO) ppm kémiai eltolódásnál kapott csúcsok szintén megerősítik a termékre vonatkozó következtetést (22. ábra). A glicin jelei a spektrumban 43 (CH₂) és 171 (COO⁻) ppm kémiai eltolódásnál jelennek meg. Ezek az eredmények összhangban vannak az *N*-formilglicin D₂O-ban felvett ¹H NMR spektrumával is, amiben a CH₂ és a CHO csúcsok 3,78 – 3,86 és 8,06 ppm-en jelennek meg.⁷¹



22. ábra A ^{13}C NMR spektrum az MCG bomlása után.

$c_{\text{MCG}}^0 = 1,00 \times 10^{-2} \text{ M}$; $c_{\text{Gly}}^0 = 1,00 \times 10^{-2} \text{ M}$; $c_{\text{OH}} = 5,40 \times 10^{-2} \text{ M}$; $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

Az amidkötés körül a formilcsoport forgása gátolt az *N*-formilglicinben és így ennek a vegyületnek két különálló izomer formája van jelen vizes oldatban az 1. séma szerint.



1. séma Az *N*-formilglicin izomer formái.

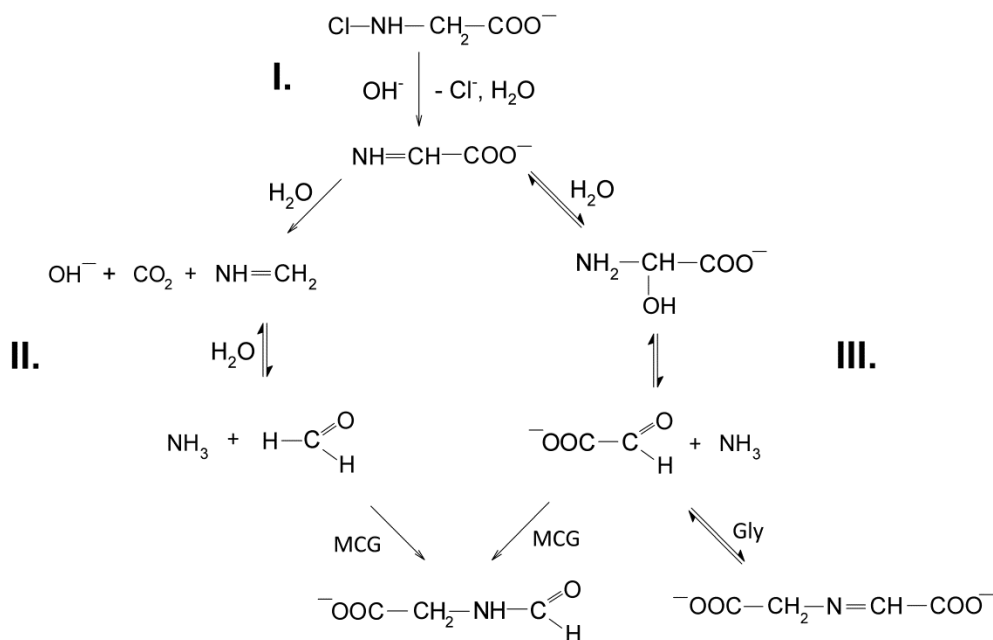
Általában a *cisz* izomer aldehyd-proton jelei várhatóan kisebb kémiai eltolódást mutatnak a *transz* formához (P_{1a} , P_{1b}) képest. Így a megfelelő csúcsok kémiai eltolódásának összehasonlítása azt mutatja, hogy a két kisebb intenzitású csúcs a *cisz* izomerhez tartozik 3,84 ppm (P_{2a} , CH_2) és 7,91 ppm (P_{2b} , CHO). A vegyület képződésének időbeli lefutását a 20d. ábra szemlélteti. A megfelelő csúcsok intenzitásának aránya 10:1 (CH_2) és 9:1 (CHO), azaz a *transz* izomer körülbelül 9-szeres feleslegben van jelen a másik formához képest.

Általában az ^1H NMR csúcsok 4,8 ppm vízjel körüli integrálját nem lehet kvantitatív értékelésre használni a vízelnyomás alkalmazása mellett, mert a víz protonok teljesen szelektív és szűk tartományban történő mágnesezése nem érhető el. Ilyen probléma nem várható az MCG, a glicin és az *N*-formilglicin CH_2 csúcsaival kapcsolatban, mivel ezek messze vannak a vízjeltől. Fontos megjegyezni, hogy a főtermék két izomerje CH_2 -intenzitásának összege az MCG kezdeti CH_2 -intenzitásának közel fele. Ez arra utal, hogy egy *N*-formilglicin molekula kialakulásához két MCG molekula átalakulása szükséges.

A szakirodalmi eredmények alapján feltételezhető, hogy ebben a rendszerben a formaldehid köztitermékként képződik. Egy korábbi tanulmány⁴⁹ és kísérleti megfigyeléseink, amiket a későbbiekben tárgyalunk, egyértelműen megerősítik a glioxalation képződését is. Független NMR kísérletekben megerősítettük, hogy a formaldehid ^1H NMR jele nem mutatható ki vízben az itt alkalmazott körülmények között. Ugyanakkor a glioxalation esetében a semleges – enyhén lúgos reakcióelegyekben 5,33 ppm-nél csúcsokat figyeltünk meg, amik a korábban ismertetett spektrumokkal összhangban a glikoxalation hidratált formájához tartoznak.

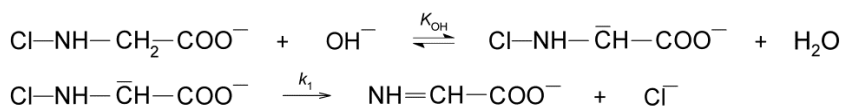
A reakcióelegyben két kisebb csúcs az ^1H NMR spektrumokban 4,19 (P_{3a}) és 7,66 (P_{3b}) ppm-nél megerősíti egy kisebb mennyiségben képződött termék jelenlétét. Amikor glicint és formaldehidet kevertünk össze, akkor ezek a csúcsok nem jelentek meg a spektrumokban, azonban a glicin glioxalationnal történő elegyítése után a P_{3a} és P_{3b} csúcsok azonnal megjelentek. A glicin koncentrációjának növelése növeli ezen csúcsok intenzitását. Amikor ezeket a reagenseket 1:1 arányban elegyítjük, a spektrumban még viszonylag nagy intenzitású marad a glicin CH_2 csúcsa, ami megerősíti, hogy a glicin jelentős mennyisége nem alakul át a reakcióelegyben. Ez a megfigyelés arra a következtetésre vezet, hogy a reaktánsok egyensúlyban vannak az említett termékkel, ami feltehetően a glioxalation és a glicin között képződött Schiff-bázis. Egy korábbi vizsgálatban részletesen tanulmányozták a különböző aldehidek és ketonok Schiff-bázisaival réz(II)-komplexek képződését és megállapították, hogy számos komplexet lehet előállítani ilyen ligandumokkal.⁷² A glioxálsav és a glicin közötti Schiff-bázissal képződő komplexet nem állították elő, de köztitermékként feltételezték ennek a jelenlétét. Legjobb tudomásunk szerint a Schiff-bázisra vonatkozóan nem állnak rendelkezésre jellemző NMR adatok az irodalomban. Kivétel a megfelelő diészter-etil-(*E*)-*N*-[(etoxikarbonil)-metilén]-glicinát,⁷³ aminek CDCl_3 -ban felvett spektrumában a jelek 4,10 (CH_2) és 7,85 ($=\text{CH}$) ppm kémiai eltolódásnál jelentek meg, ami jó egyezést mutat a vizes közegben általunk kapott jelekkel. Ezek a csúcsok hosszabb idő elteltével eltűnnek a spektrumokból, mivel a megfelelő Schiff-bázis lassan elbomlik.

A kinetikai és az NMR eredmények kombinációja alapján részletes mechanizmust javasoltunk az MCG bomlására. A mechanizmus vázlata a 2. sémán látható, míg a mechanizmus részleteit a 3 – 5. sémák mutatják be.



2. séma Az MCG bomlásmechanizmusának vázlata.

A 2. sémán bemutatott, két konszekutív lépésből álló kinetikai modell azt bizonyítja, hogy az MCG bomlása nem mehet végbe a korábban feltételezett egy lépéses Grob fragmentációs mechanizmus szerint.⁴⁹⁻⁵¹ Az első lépésben az elsőrendű sebességi állandó $[\text{OH}^-]$ -függése (18. ábra) alapján feltételezhető, hogy az MCG bomlását egy karbanion képződése indítja el, ami a következő sebességmeghatározó reakciólépésben elveszít egy kloridiont és iminné alakul (3. séma).



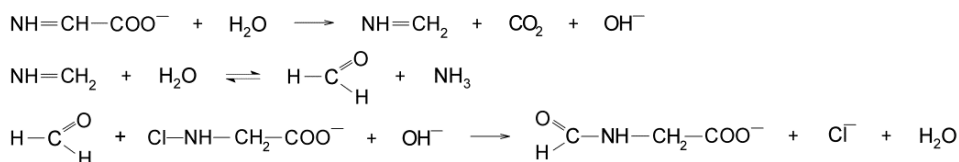
3. séma Az MCG bomlásának kezdeti lépései. (I. rész a 2. sémában).

Az MCG CH₂ csoportjának pK_a értéke várhatóan nagy⁷⁴, így a 3. sémában mutatott egyensúly balra van eltolódva. Ebből következik, hogy a k_{obs1} a következőképpen fejezhető ki:

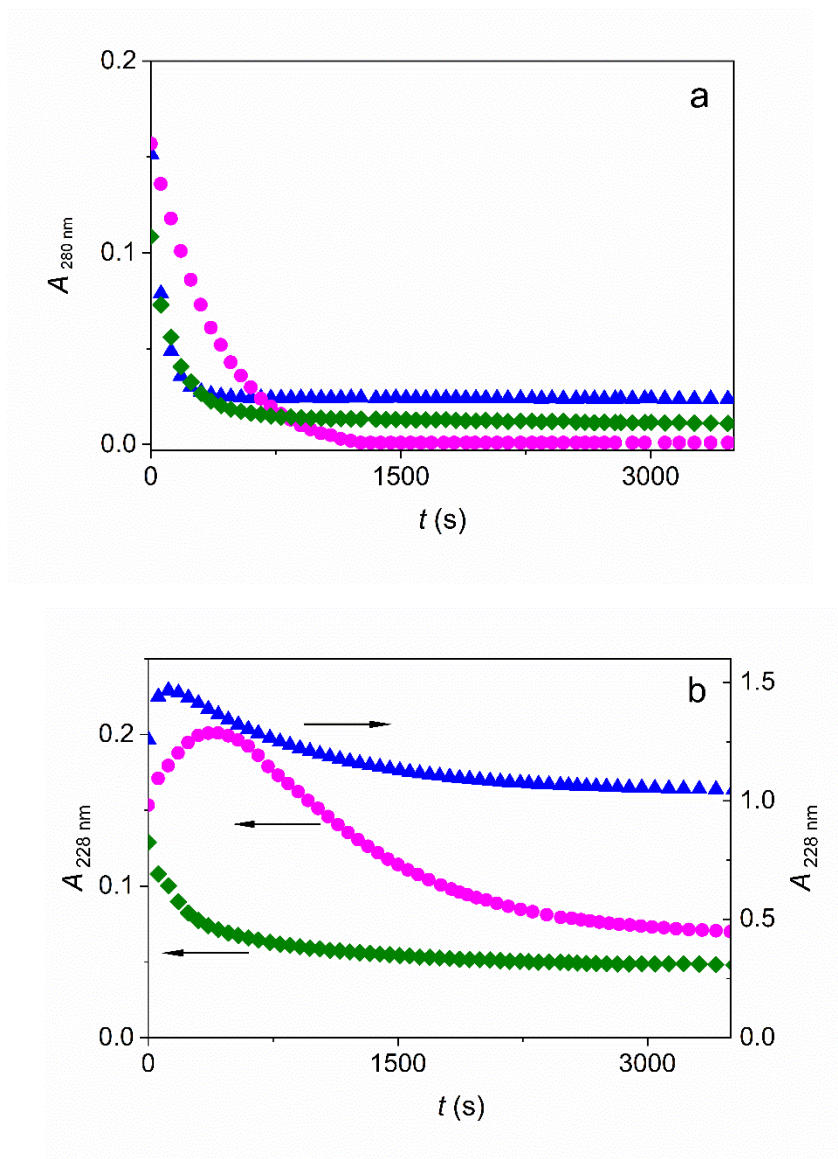
$$k_{\text{obs1}} = K_{\text{OH}} k_1 [\text{OH}^-] \quad (30)$$

A 18. ábrán látható adatok egyenessel történő illesztése $K_{\text{OH}} k_1 = (6,4 \pm 0,1) \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ meredekséget eredményez, ami jó egyezést mutat egy korábbi, 0,5 M NaCl-ban végzett vizsgálatban kapott eredménnyel ($4,4 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).⁷⁵

Az iminoacetát hidrolízise két, egymással versengő párhuzamos reakcióúton valósulhat meg (II. és III. rész a 2. sémában), melyek során termékként ammónia is képződik. A képződött ammónia mennyiségét nem határoztuk meg, de a Nessler-próba⁵⁶ a korábban közölt eredményekkel összhangban megerősítette jelentős mértékű képződését.^{49-51, 75} A II. reakcióúton a dekarboxilezés formaldimin képződéséhez vezet, ami egy további hidrolitikus lépésben formaldehidet eredményez (2. séma). A közttermékek lehetséges szerepének tisztázására összehasonlítottuk az MCG bomlása során, valamint az MCG – formaldehid és – glioxalation reakciókban kapott kinetikai görbéket (23. ábra). A két különböző hullámhosszon kapott kinetikai görbék igazolják, hogy formaldehiddel az MCG bomlása gyorsabbá válik, viszont ebben az esetben közttermék képződése nem észlelhető 228 nm-en. Ezekkel a megfigyelésekkel összhangban a formaldehid – MCG reakcióban felvett ¹H NMR spektrumok csak az *N*-formilglicin és a glicin jellegzetes csúcsait tartalmazzák. A javasolt mechanizmus akkor van összhangban ezekkel az eredményekkel, ha feltételezzük, hogy a képződött formaldehid az MCG-vel gyorsan tovább reagál (4. séma).



4. séma Az *N*-formilglicin képződése iminoacetátból formaldehid köztterméken keresztül. (II. rész a 2. sémában).

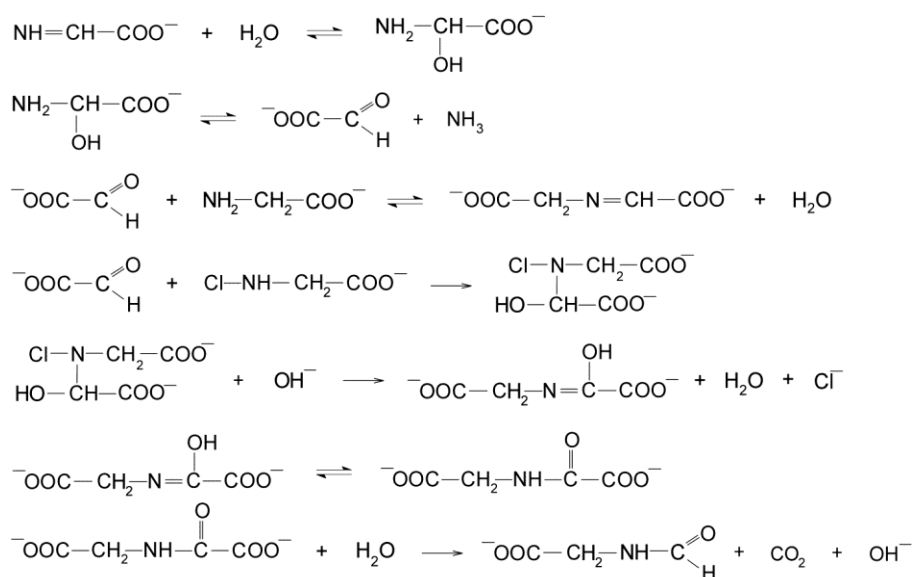


23. ábra Az MCG bomlása (●), valamint az MCG formaldehiddel (◆) és glioxaláttionnal (▲) lejátszódó reakciói során kapott kinetikai görbék 280 (a) és 228 (b) nm-en.

$c_{\text{GLY}}^0 = 2,00 \times 10^{-4} \text{ M}$; $c_{\text{MCG}}^0 = 1,00 \times 10^{-3} \text{ M}$; $c_{\text{OH}^-} = 5,40 \times 10^{-2} \text{ M}$;
 $c_{\text{CHOH}}^0 = 2,00 \times 10^{-3} \text{ M}$; $c_{\text{GLYOX}}^0 = 1,00 \times 10^{-3} \text{ M}$; $I = 1,00 \text{ M (NaClO}_4\text{)}$; $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

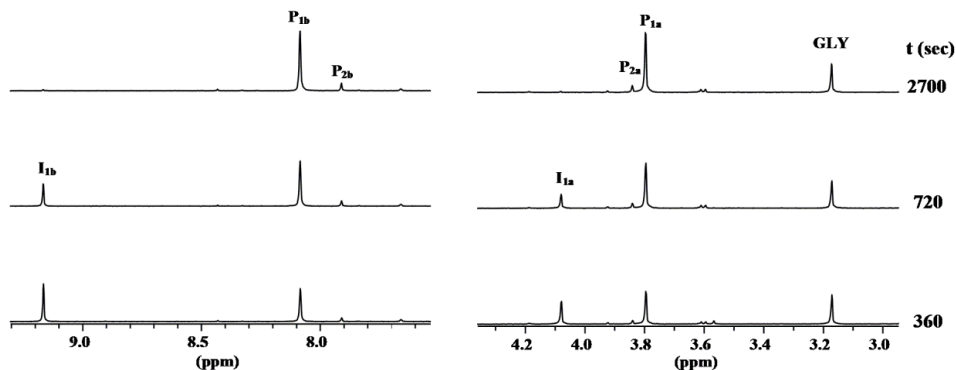
Az *N*-formilglicin képződésének másik útját a 5. séma mutatja be (III. rész a 2. sémában). Ez figyelembe veszi, hogy az iminoacetát egyensúlyban van a glioxaláttionnal és az ammóniával a hidroxiglicinen keresztül. Mint az előzőekben már

tárgyaltuk, a glicin és glioxalácion közötti egyensúlyi reakcióban a megfelelő Schiff-bázis képződik. Ezek az egyensúlyi lépéseket az imin hidrolízise felé tolódnak el, amikor a glioxalácion koncentrációját megnöveljük. A 23b. ábrán 228 nm-en éles kezdeti abszorbancia növekedés figyelhető meg, mert a glioxalácion gyorsan fogyasztja az MCG-t. Ezt követően egy lassabb reakcióban képződik a végtermék. A kinetikai profil nagyon hasonló az MCG hozzáadott glioxalácion nélkül lejátszódó bomlásakor megfigyelthez. Az egyetlen különbség az, hogy az abszorbanciaváltozás jelentősebb és a növekedés sokkal gyorsabb a glioxalácion – MCG reakció első szakaszában. Ebből következik, hogy ez a reakció felelős a reaktív közttermék képződéséért az MCG bomlása során, amiből további reakciólépésben *N*-formilglicin képződik.



5. séma Az *N*-formilglicin képződése iminoacetátból glioxalácionon keresztül.
(III. rész a 2. sémában).

Az ^1H NMR mérések teljes mértékben alátámasztják ezeket a megfontolásokat. Amikor az MCG-t és a glioxaláciont ekvimoláris koncentrációban összekeverjük az MCG CH_2 csúcsa gyakorlatilag eltűnik mire az első spektrum felvételre kerül (~ 6 perc). Az MCG fogyása után a két közttermékhez tartozó csúcs intenzitása folyamatosan csökken, míg az *N*-formilglicinhez tartozó csúcsok intenzitása folyamatosan növekszik (24. ábra).



24. ábra Az MCG és a glioxalátion összekeverése után kapott ^1H NMR spektrumok az idő függvényében.

$c_{\text{GLY}}^0 = 4,00 \times 10^{-3} \text{ M}$, $c_{\text{MCG}}^0 = 2,00 \times 10^{-2} \text{ M}$, $c_{\text{OH}^-} = 5,40 \times 10^{-2} \text{ M}$, $c_{\text{GLYOX}}^0 = 2,00 \times 10^{-2} \text{ M}$, $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

Az ezt követő kísérletekben a bomlási reakciót körülbelül 5 perces reakcióidő elteltével, amikor a közttermék koncentrációja elérte a maximális értéket hirtelen fagyasztással leállítottuk. A befagyasztott mintát liofilizáltuk és a szilárd anyag ^1H NMR spektrumát D_2O -ban vettük fel. Ez a kísérlet ismét megerősítette, hogy a glioxalátion és az MCG reakciója generálja az intermediert, ami az *N*-formilglicin képződéséhez vezet. A 4,08 és 9,17 ppm-nél kapott csúcsok intenzitásaránya 2:1. Ezeket a csúcsokat az *N*-oxalilglicin CH_2 és NH csoportjaihoz rendeltük, feltételezve, hogy az NH proton a negatív töltésű karboxilátcsoporthoz egy belső hidrogénkötésen keresztül kapcsolódik és így gyors cserefolyamatban nem vesz részt. Ez a feltételezés összhangban van a korábbi ^1H NMR eredményekkel, amiben 3,80 és 8,97 ppm csúcsok jelentek meg az *N*-oxalilglicin $\text{DMSO}-d_6$ oldatában.⁷⁶

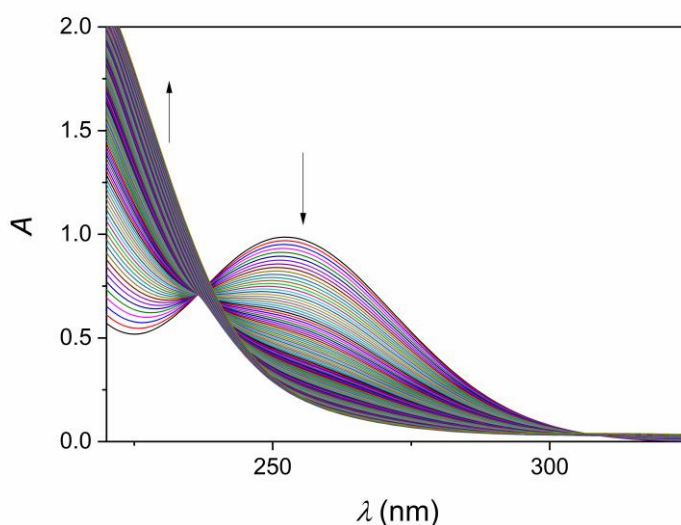
A kinetikai görbék kiértékelése során (17b. ábra) $k_{\text{obs}2} = (1,2 \pm 0,1) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ értéket kaptunk. A legegyszerűbb magyarázat az lenne, hogy ez az állandó az iminoacetát hidrolitikus bomlására jellemző. A reakció irreverzibilis, ha a bomlás formaldehid képződésén keresztül történik meg (II. reakcióút) és ha az egyensúly a glioxalátion képződése felé tolódik el, akkor az alternatív úton is elsőrendű folyamatnak tekinthető. Ez a magyarázat azonban nem felel meg az NMR mérések eredményeinek, mivel nem magyarázza a 4,08 és 9,17 ppm kémiai eltolódású csúcsokkal jellemzett közttermék képződését. Ezen kívül a kísérleti adatok egyértelműen arra utalnak, hogy a közttermék képződéséhez glioxalátion jelenléte szükséges, ami maga is az iminoacetátból képződő közttermék. Tehát a $k_{\text{obs}2}$ sebességi állandóval jellemezhető reakciónak a glioxalátion képződését követően kell lejátszódnia. Feltételezzük, hogy a közttermék az *N*-oxalilglicin, ami gyorsan kialakul a 5. sémában bemutatott reakciósorozatban és viszonylag lassan bomlik egy

elsőrendű folyamatban, amit a $k_{\text{obs}2}$ állandó jellemez. Ennek a feltételezésnek a megerősítése érdekében a glioxalátion – MCG reakcióban 228 nm-en kapott kinetikai görbe 500 s utáni szakaszát exponenciális függvényvel (28) illesztettük. A kapott sebességi állandó $k = (1,2 \pm 0,1) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ kiváló egyezésben van az MCG bomlása során nyert $k_{\text{obs}2}$ állandóval. Ez erősen alátámasztja a leírt mechanisztikus megfontolásokat.

Kulcskérdés, hogy a 2. sémában bemutatott két út hogyan járul hozzá a teljes reakcióhoz. A kísérleti eredmények egyértelműen bizonyítják, hogy a glioxalátion fontos közttermék az MCG bomlásában. A kísérleti eredmények nem lennének értelmezhetők ezen vegyület nélkül. Következésképpen a III. reakcióútnak jelentős szerepet kell játszania a reakcióban. Ezzel szemben a formaldehid jelentősége megkérdőjelezhető, annak ellenére, hogy ennek a vegyületnek a kialakulását a korábbi vizsgálatokban az MCG bomlás végtermékeként írták le, mert sem közvetlen, sem közvetett bizonyítékot nem találtunk a képződésére vonatkozóan. Más szóval, a II. reakcióút csak alárendelt szerepet játszhat, vagy akár ki is hagyható a mechanizmusból, anélkül, hogy veszélyeztetné a kísérleti eredmények értelmezésének érvényességét.

4.2.2 *N*-klóralanin (MCA) bomlása

Az MCA bomlását spektrofotometriás módszerrel követtük (25. ábra). Lúgos közegben 253 nm-en és ennél nagyobb hullámhosszon a spektrális változás az MCA fogyásával értelmezhető (26a. ábra), kisebb hullámhosszon pedig a reakcióban képződő termékek koncentrációjának növekedését detektáltuk (26b. ábra). Az aminosav feleslegben volt minden kísérletben, hogy elkerüljük az *N*, *N*-diklóralanin képződését.

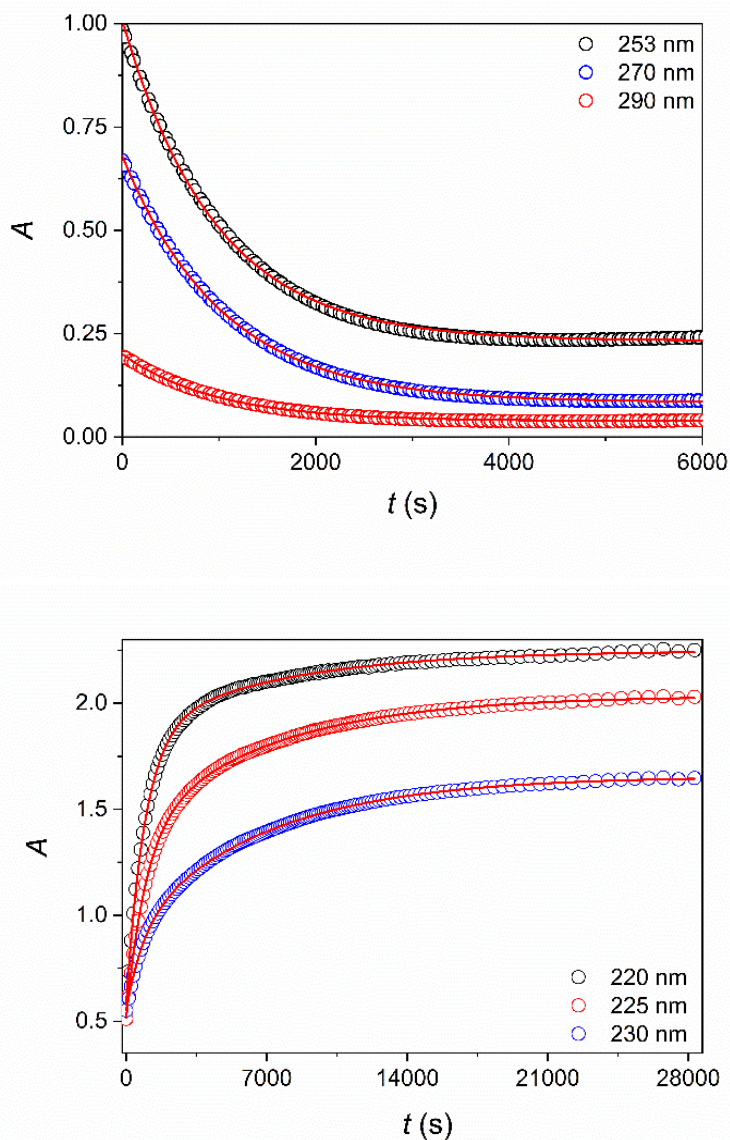


25. ábra Az MCA bomlását kísérő spektrális változás ($\lambda_{\text{max}} = 253 \text{ nm}$).

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

$I = 1,00 \text{ M (NaClO}_4\text{)}$; $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$; $\Delta t = 30 \text{ s}$; $t = 7200 \text{ s}$.

Lúgos tartományban, nagyobb hullámhosszakon a kinetikai görbéket egy exponenciális tagot tartalmazó összefüggéssel (28), 240 nm alatt pedig két exponenciális tag összegét tartalmazó függvénnyel (29) tudtuk leírni. A k_{obs1} pseudoelsőrendű sebességi állandó az MCA bomlásához rendelhető, a 250 nm fölött különböző hullámhosszakon meghatározott sebességi állandók jó egyezést mutatnak: $k_{\text{obs1}} = (1,04 \pm 0,01) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ és ezzel van összhangban a 240 nm alatt kapott eredmény is: $k_{\text{obs1}} = (1,09 \pm 0,01) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. A második folyamatra jellemző elsőrendű sebességi állandó: $k_{\text{obs2}} = (1,46 \pm 0,02) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$.



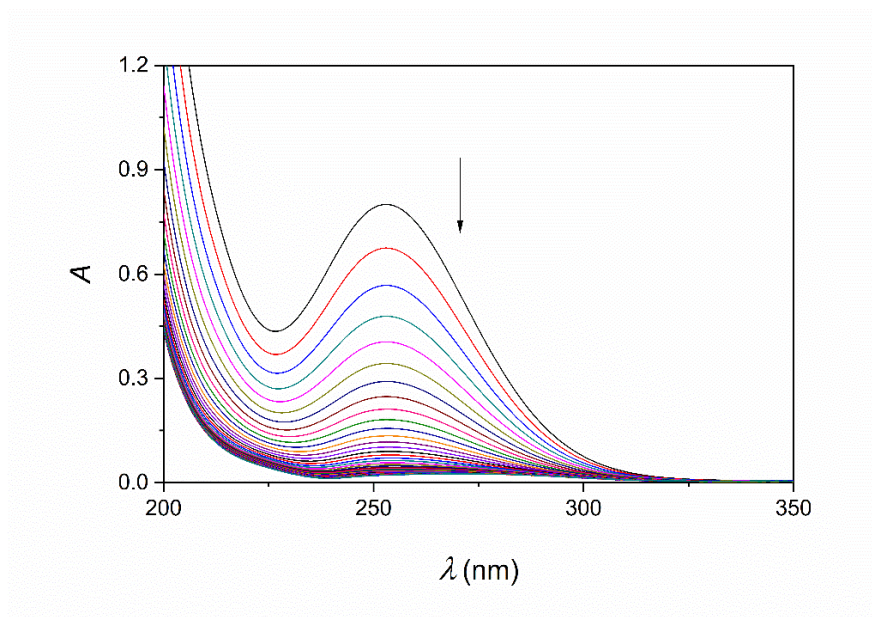
26. ábra Tipikus kinetikai görbék az MCA bomlása során lúgos közegben. A kísérleti adatokat a (28) és (29) összefüggésekkel illesztettük.

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

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

Az enyhén bázikus (pH = 8,94) és az erősen lúgos közegben kapott kapott spektrális változások jelentősen különböznek (25. és 27. ábrák). Ez arra utal, hogy a pH-tól függően más reakcióúton keresztül játszódik le a bomlás, és a közti-, valamint

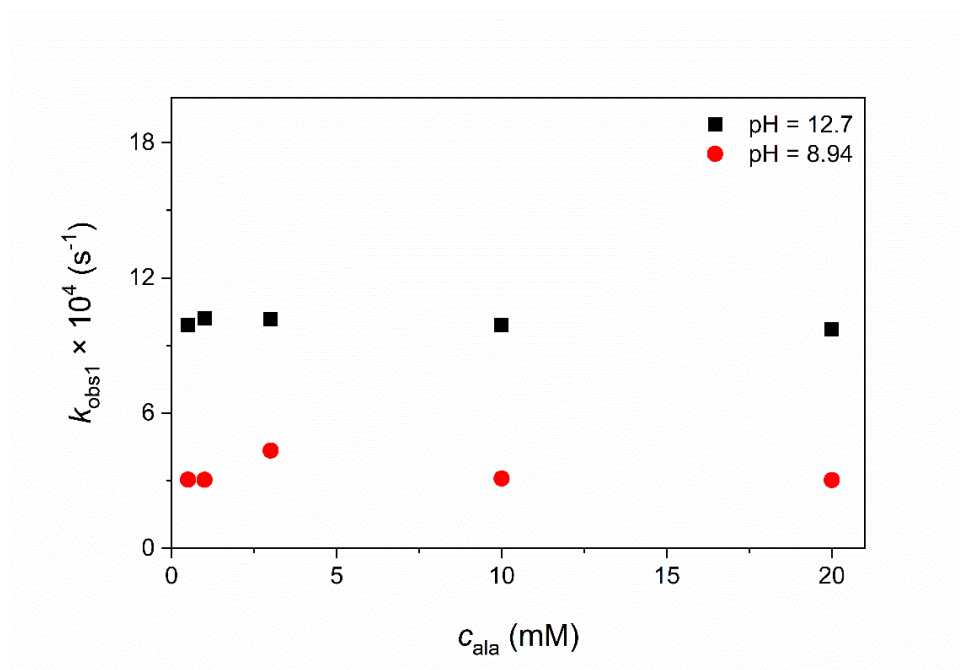
végtermékek különböznek a lúgos közegben meghatározottaktól. A (28) összefüggéssel történő illesztéssel kapott sebességi állandók 220 – 290 nm hullámhossz tartományban rendkívül jó egyezésben vannak: $k_{\text{obs1}} = (2,97 \pm 0,03) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Eredményünk összhangban van a Hand és munkatársai ($k = 2,67 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$; pH = 6,85; $T = 25,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$)⁴⁹, valamint a Stanbro és Smith ($k = 2,50 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$; pH = 6,51; $T = 25,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$) által közölt adatokkal.



27. ábra Az MCA bomlását kísérő spektrális változás enyhén lúgos közegben.

$c_{\text{ala}}^0 = 2,50 \times 10^{-3} \text{ M}$; $c_{\text{MCA}}^0 = 2,50 \times 10^{-3} \text{ M}$; pH = 8,94;
 $I = 1,00 \text{ M (NaClO}_4\text{)}$; $T = 25,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$; $\Delta t = 600 \text{ s}$; $t = 30000 \text{ s}$.

A 28. ábra azt mutatja, hogy a k_{obs1} értéke háromszorosára nő a pH 8,94-ről 12,3-ra történő növelésére. A feleslegben lévő alanin koncentrációjának növelése nem változtatja a bomlás sebességi állandóját, vagyis a szubsztrátum nem vesz részt a sebességmeghatározó lépésben.

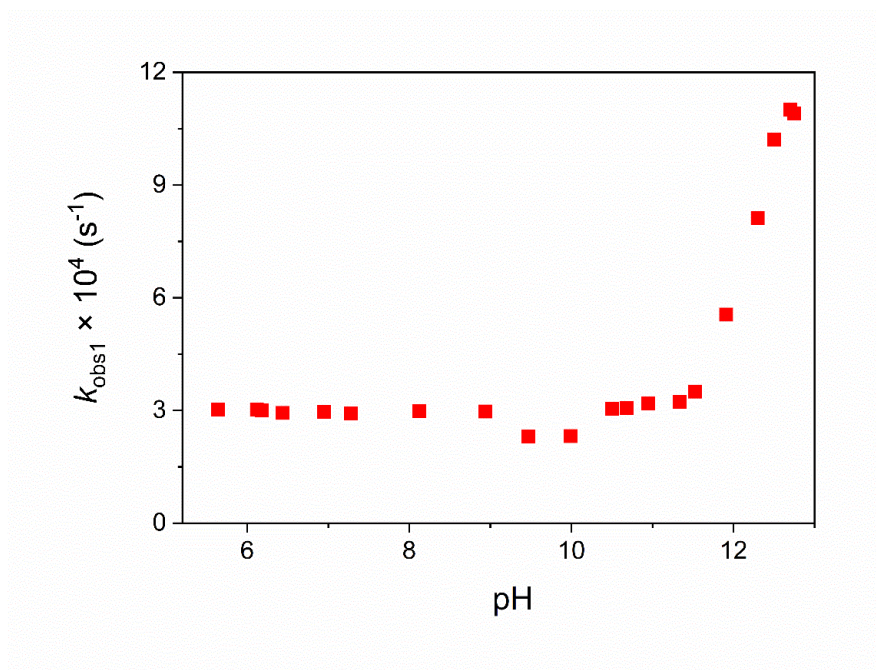


28. ábra A pszeudo-elsőrendű sebességi állandók az alaninkoncentráció függvényében.

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

Korábbi irodalmi előzmények alapján az MCA bomlás sebessége független a pH-tól lúgos közegben^{49, 50}. Saját kísérleti munkánk során azt tapasztaltuk, hogy semleges, enyhén lúgos közegben viszonylag stabil MCA oldat állítható elő, azonban a pH növelésével, egyre lúgosabb közegben az MCA-oldat stabilitása jelentősen csökken. Az irodalmi eredményektől való eltérés abból adódik, hogy korábban számos esetben csak nagyon szűk pH-tartományban végeztek kísérleteket, ami nem volt alkalmas a pH-változtatás hatásának felismerésére.

Az MCA bomlása során a 253 nm-en és ennél nagyobb hullámhosszakon kapott pszeudo-elsőrendű sebességi állandó pH-függését a 29. ábra mutatja be.

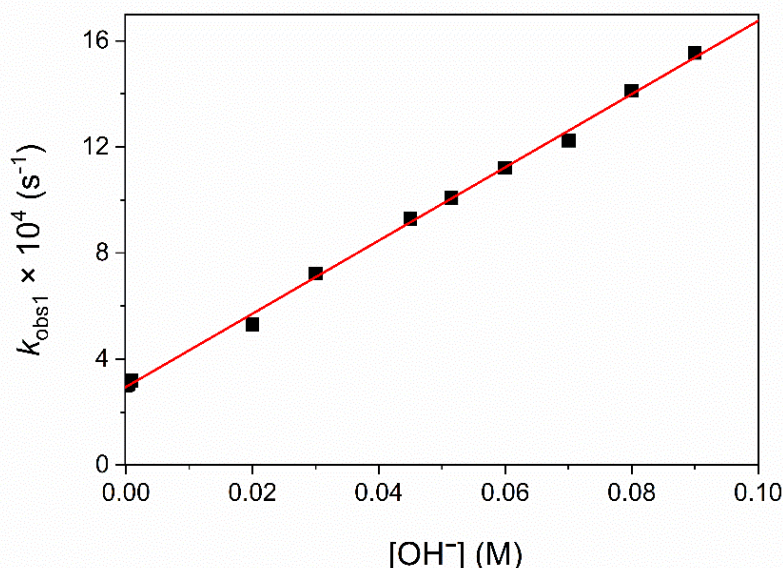


29. ábra Az MCA bomlása során kapott pszeudo-elsőrendű sebességi állandó a pH függvényében.

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

A pszeudo-elsőrendű sebességi állandó lineárisan függ az alkalmazott hidroxidion koncentrációjától. Az MCG bomlása során tapasztaltaktól eltérően az egyenes tengelymetszete nem nulla, vagyis a hidroxidion katalizálja a bomlási folyamatot, de egy pH-tól független, párhuzamos reakcióúton is lejár szódik a reakció.

$$k_{\text{obs1}} = k + k_{\text{OH}} [\text{OH}^-] \quad (31)$$



30. ábra Az MCA bomlása során kapott pszeudo-elsőrendű sebességi állandó a hidroxidion-koncentráció függvényében.

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

A 30. ábrán bemutatott pontok illesztésével a következő sebességi állandókat kaptuk: $k_{\text{OH}} = (1,38 \pm 0,02) \times 10^{-2} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ and $k = (2,95 \pm 0,09) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. A k jó egyezésben van a pH = 8,94-en kapott állandóval (29. ábra).

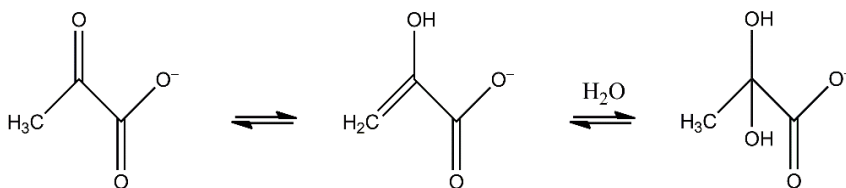
A kísérleti adatok alapján látható, hogy a tanulmányozott reakciórendszer összetett kinetikai sajátságokat mutat. A spektrális változások alapján a fényelnyelő részecskék számát mátrixrang-analízissel határoztuk meg. A különböző pH-n felvett spektrumsorok kiértékelésével azt kaptuk, hogy négy fényelnyelő komponens van a reakcióelegyben, amik feltehetően az *N*-klóralanin, a köztitermék és két termék.

A köztitermékek és a végtermékek azonosítására időfüggő ^1H NMR méréseket végeztünk. (31. ábra). Az első spektrumban az α -alanin és az MCA jellegzetes csúcsai könnyen hozzárendelhetők a következők szerint: CH_3 (d): 1,21 (Ala₁), 1,25 (MCA₁) ppm és CH (q): 3,30 (Ala₂), 3,51 (MCA₂) ppm. Az MCA esetében a megfelelő csúcsok nagyobb kémiai eltolódásai a Cl elektronvonzó hatásának köszönhetők.

Amint az várható volt, az Ala csúcsok intenzitása állandó, míg az MCA csúcsok intenzitása csökken a bomlási folyamat során. Ezzel egyidejűleg a spektrumokban három csúcs intenzitása növekszik 1,31 (d), 2,00 (s) és 2,35 (s) ppm kémiai eltolódásnál. A 2,35 ppm-es csúcs a piruvátion CH_3 -csoportjához tartozik, amint azt egy tiszta piruvátion oldat spektrumának 12,3 pH-n történő felvételével igazoltuk. A

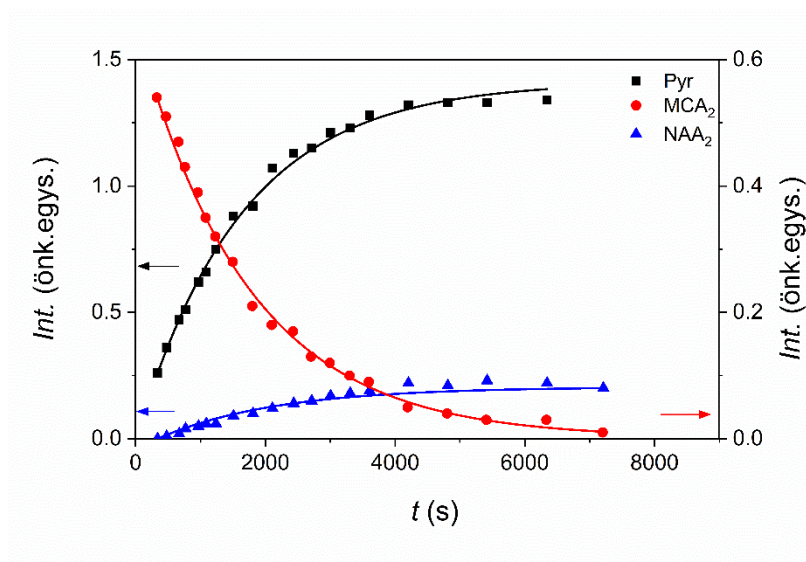
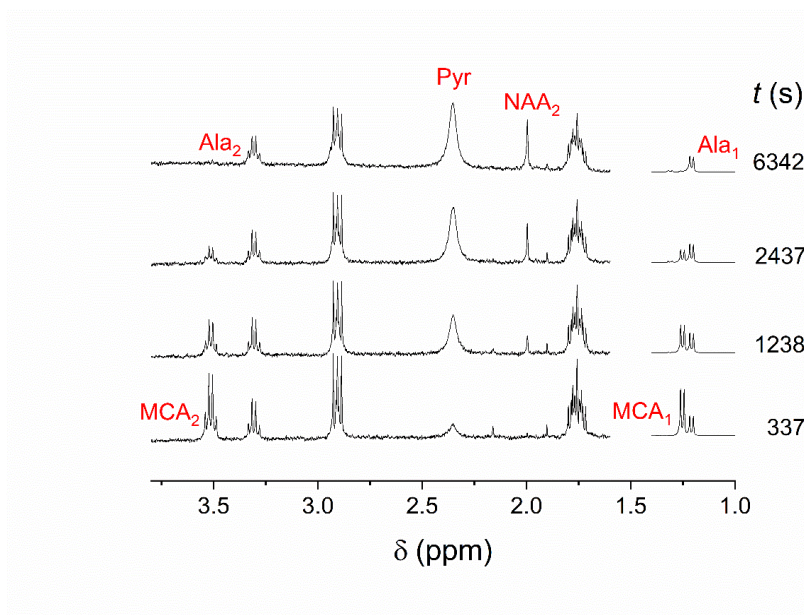
piroszölősav pK_a értéke $\sim 2,0$, így a vegyület savas formája elhanyagolható lúgos oldatban. A piruvátion hidratációs és keto-enol tautomerizációs egyensúlyokban vesz részt (6. séma). Irodalmi eredmények alapján a keto és a hidratált (diol) forma összemérhető, míg az enol elhanyagolhatóan kis koncentrációban van jelen.⁷⁷ A diol 1,47 ppm-nél jelentkező CH_3 csúcsa egyértelműen azonosítható a tiszta piruvát oldatok $pH = 6,18 - 11,53$ tartományban felvett NMR spektrumaiban. A 31. ábrán ez a csúcs nem látszik, aminek az az oka, hogy erősen lúgos oldatban a diol részlegesen deprotonálódik és a savas és bázikus forma közötti gyors protoncsere miatt a jel kiszélesedik és belesimul az alapvonalba. Vélhetően a piruvátion különböző formáinak egymásba történő báziskatalizált átalakulásához rendelhető cserefolyamatok miatt szélesedik ki a CH_3 jel (2,35 ppm) is. Az enol forma CH_2 -proton jele a kis koncentráció miatt sem és a víz protonjével való átfedés miatt sem detektálható.

Az említett másik két csúcs egyidejűleg nő a reakció előrehaladtával. Ezeket az *N*-acetilalanin (NAA) α - CH_3 (1,31 ppm) és acetil- CH_3 (2,00 ppm) csoportjához rendeltük a tiszta *N*-acetilalanin NMR spektruma alapján.



6. séma A piruvátion keto – enol tautomerizációs és hidratációs egyensúlya.

Az MCA, Pyr és NAA jellegzetes csúcsainak intenzitását az idő függvényében a 31. ábrán mutatjuk be. Úgy tűnik, hogy a piruvátion az MCA bomlásával egyidejűleg képződik, miközben van egy kismértékű késés az NAA csúcsok növekedésében. Az MCA bomlására és a piruvátion képződésére kapott pszeudo-elsőrendű sebességi állandók jó egyezésben vannak: $6,15 \times 10^{-4}$ és $5,49 \times 10^{-4} s^{-1}$. Az *N*-acetilalanin lényegesen kisebb koncentrációban képződik, mint a piruvátion és a megfigyelések erőteljesen azt sugallják, hogy ez egy másodlagos termék, ami valamilyen módon a piruvátionból képződik a bomlási reakcióban. Technikai okokból az NMR kísérletekben ionerősséget nem állítottunk, így az NMR kinetikai adatokat nem lehet közvetlenül összehasonlítani a spektrofotometriás kísérletekből nyert sebességi állandókkal. Mindazonáltal a két módszerrel kapott értékek közel állnak egymáshoz. A megfelelő jelintenzitásokat figyelembe véve megállapítható, hogy a bomlás során a Pyr / NAA koncentráció arány folyamatosan csökken, és végül eléri a $\sim 6 : 1$ arányt.



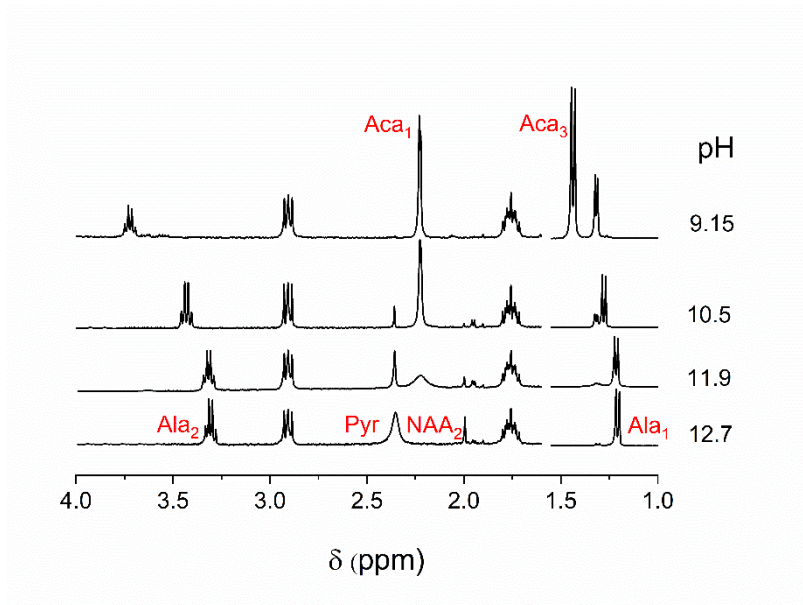
31. ábra Az ^1H NMR spektrumok (a) és a jelek intenzitása (b) az MCA (● 3,51 ppm), a Pyr (■ 2,35 ppm) és az NAA (▲ 2,00 ppm) esetében az idő függvényében.

A folytonos vonal a (28) összefüggéssel történő illesztést mutatja.

$$c_{\text{Ala}}^0 = 3,00 \times 10^{-3} \text{ M}; c_{\text{MCA}}^0 = 3,00 \times 10^{-3} \text{ M}; c_{\text{OH}^-} = 5,00 \times 10^{-2} \text{ M}; T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}.$$

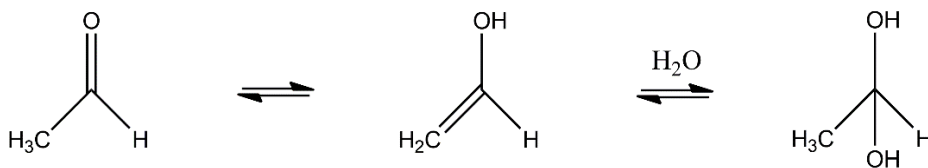
Felvettük a különböző pH-jú reakcióelegyek ^1H NMR spektrumát a bomlási folyamat végén. Amint a 32. ábrán látható, a pH csökkentésével a piruvátion és az *N*-acetilalanin csúcsai eltűnnek és négy új csúcs jelenik meg (az ábrán csak kettő

látható). Független kísérletekben megerősítettük, hogy ezek a csúcsok az acetaldehidhez tartoznak, ami szintén részt vesz hidratálási⁷⁸ és keto-enol tautomerizációs egyensúlyokban (7. séma). A csúcsokat az alábbiak szerint rendeljük a keto-formához (acetaldehid): CH₃ 2,25 ppm (Aca₁), CHO 9,67 ppm (Aca₄) és a hidratált formához: CH₃ 1,35 ppm (Aca₃), CH 5,26 ppm (Aca₂). Az enol forma ebben az esetben sem detektálható.



32. ábra Az MCA bomlási reakciójának végén kapott ¹H NMR spektrumok különböző pH-n.

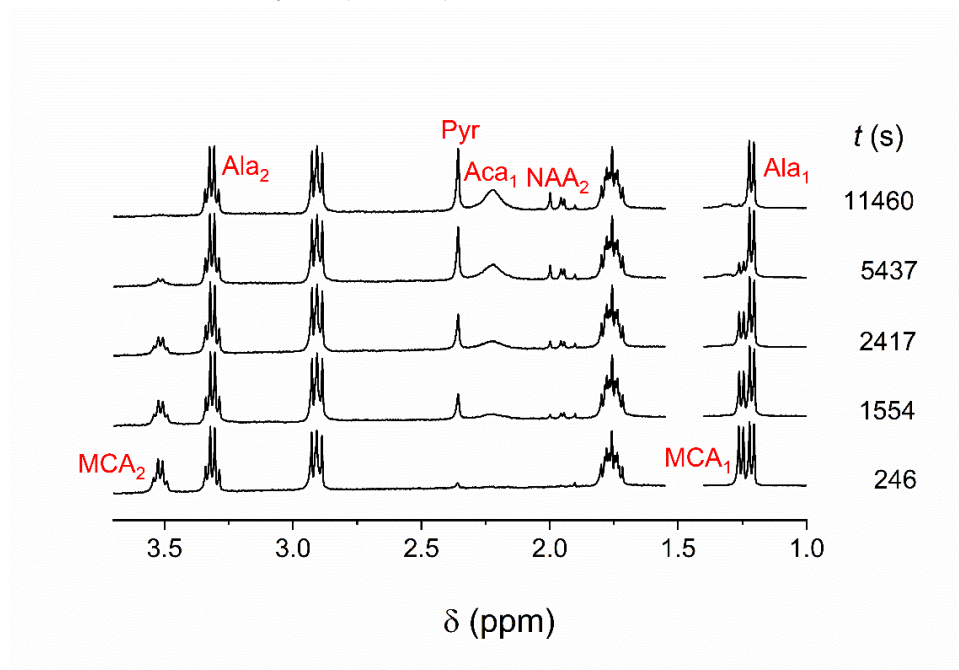
$$c_{\text{ala}}^0 = 2,50 \times 10^{-3} \text{ M}; c_{\text{MCA}}^0 = 2,50 \times 10^{-3} \text{ M}; T = 25,0 \text{ } ^\circ\text{C}.$$



7. séma Az acetaldehid – vinil-alkohol keto – enol tautomerizációs és hidratációs egyensúlya.

Az eredmények megerősítik, hogy az MCA bomlása két különböző reakcióúton keresztül történik. Erősen lúgos oldatban az MCA hidroxidion által katalizált bomlása piruvátion és *N*-acetilalanin képződéséhez vezet. Az acetaldehid semleges – enyhén

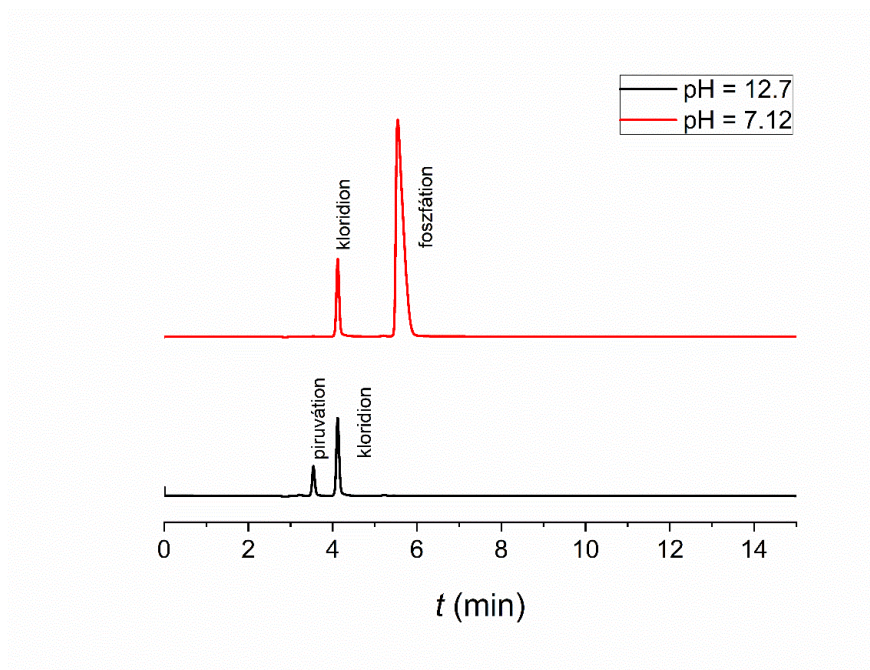
lúgos pH-tartományban, pH-független úton képződik. Ebből következik, hogy a két reakcióút egymáshoz viszonyított súlyát a pH-val lehet szabályozni. Az időfüggő ^1H NMR spektrumok egyértelműen bizonyítják mindkét termék egyidejű képződését pH = 10,5 – 11,9 tartományban (33. ábra).



33. ábra Az MCA bomlása során kapott ^1H NMR spektrumok.

$c_{\text{ala}}^0 = 2,50 \times 10^{-3} \text{ M}$; $c_{\text{MCA}}^0 = 2,50 \times 10^{-3} \text{ M}$; pH = 11,91; $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

A reakcióelegyek ionkromatográfiás elemzése megerősíti a fent leírt következtetéseket (34. ábra). pH = 12,3-nál kapott reakcióelegyben a piruvát- és kloridion csúcsai: $t_r = 3,54$ perc és 4,12 perc retenciósidőnél jelentkeznek. A pH = 7,12-nél kapott reakcióelegy kromatogramjában a piruvátion-csúcs hiánya megerősíti, hogy ez a vegyület semleges körülmények között nem képződik. (Ez a kromatogram a foszfátion csúcsát is tartalmazza, amit pufferként használunk a pH beállításához.)



34. ábra A 12,3 és 7,12 pH-nál kapott reakcióelegyek ionkromatogramja.
 $c_{\text{ala}}^0 = 5,00 \times 10^{-3} \text{ M}$; $c_{\text{MCA}}^0 = 2,50 \times 10^{-3} \text{ M}$; $c_{\text{PO}_4^{3-}} = 1,00 \times 10^{-2} \text{ M}$; $T = 30,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

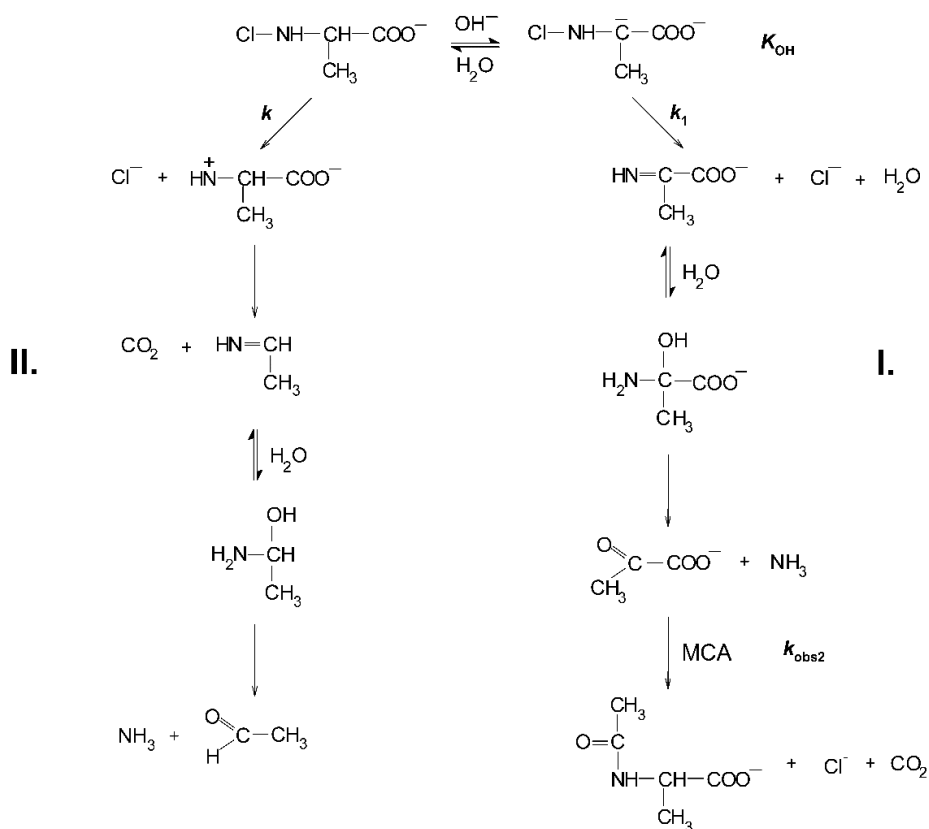
A kinetikai megfigyelések alapján kizárható annak lehetősége, hogy az MCA bomlása egyszerű Grob mechanizmuson keresztül történik. A kísérleti eredményekkel összhangban olyan kinetikai modellt javasolunk, ami két párhuzamos reakcióutat feltételez (8. séma). A 9. séma részletesen értelmezi az OH^- katalizált bomlást (I. reakcióút). Az *N*-klórglicin (MCG) bomlási mechanizmusához hasonlóan⁷⁹ a reakciót egy gyors előegyensúly indítja, ami egy karbanion képződéséhez vezet. Ezt követően a karbanion elveszíti a kloridiont egy sebességmeghatározó lépésben. Ezen megfontolások alapján k_{OH} a (32) egyenlet alapján adható meg. Feltételezhető, hogy az ebben a reakcióban képződött imin a fényelnyelő közttermék az időfüggő UV spektroszkópiai kísérletekben.

$$k_{\text{OH}} = K_{\text{OH}} k_1 \quad (32)$$

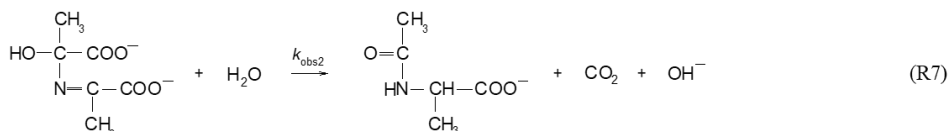
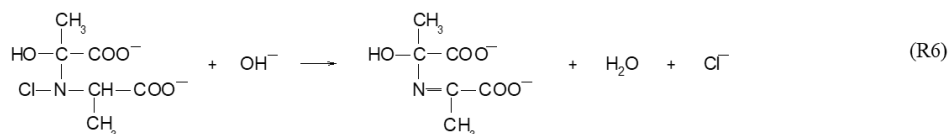
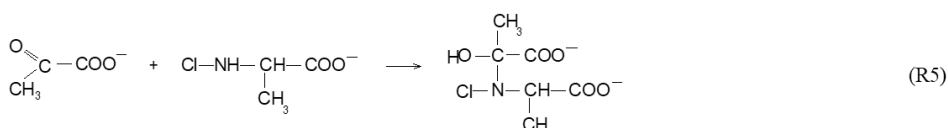
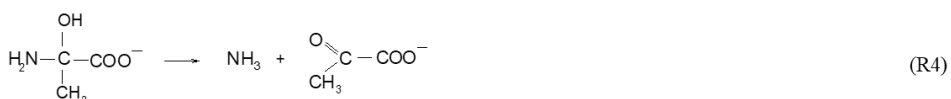
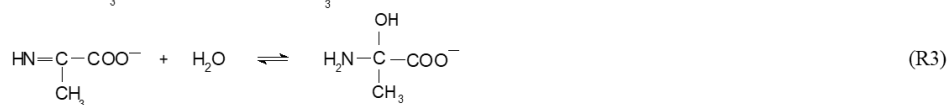
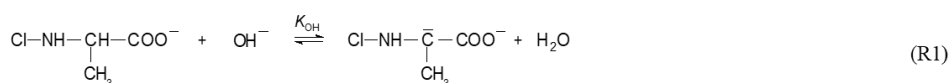
Az MCA-ból származó iminopropionát képződése csaknem ötször lassabb, mint az MCG-rendszer megfelelő reakciója ($k_{\text{OH}} = 1,38 \times 10^{-2}$ vs. $6,4 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Ezt a különbséget az MCA-ban lévő elektronküldő CH_3 -csoport jelenlétének figyelembevételével magyarázhatjuk. Ez a szubsztituens várhatóan növeli az elektron

sűrűségét a CH 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. Ezen megfontolások alapján nagy valószínűséggel a metilcsoport jelentősen nagyobb hatást gyakorol az α -hidrogén savasságára, mint az N – Cl kötés reaktivitására.

Az iminopropionát vízzel való reakciója hidroxialanint termel, ami piruvátiórra és NH_3 -ra bomlik. Az iminopropionát hidratálása viszonylag lassú lépés, amit a hidroxialanin gyors átalakulása követ. Ezt a feltevést alátámasztja az a tény is, hogy a hidroxialanin jellegzetes csúcsait nem találtuk meg az 1H NMR spektrumokban. Ha a második reakció lassú lenne, akkor a hidroxivegyület felhalmozódhatna a reakcióelegyen. A záró lépés a piruvátiórra való reakciója MCA-val.



8. séma Az MCA bomlásmechanizmusának vázlata.



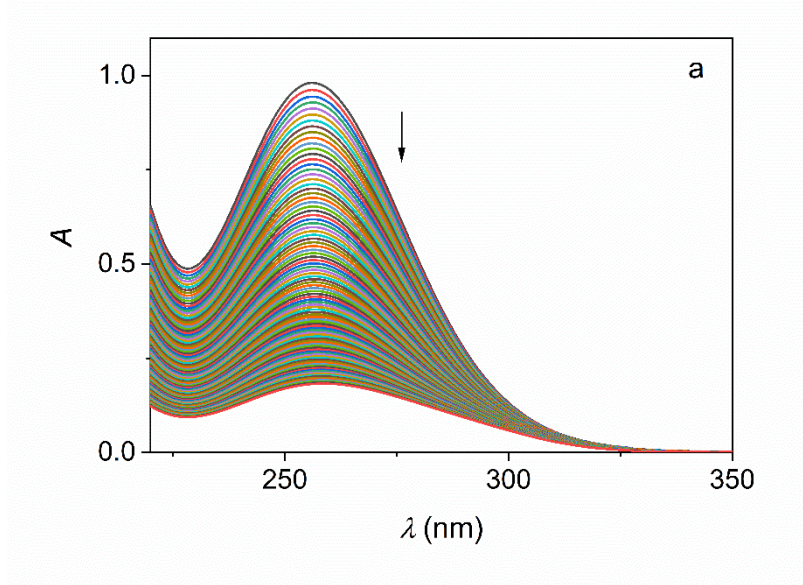
9. séma A hidroxidion katalizált MCA bomlás mechanizmusa.

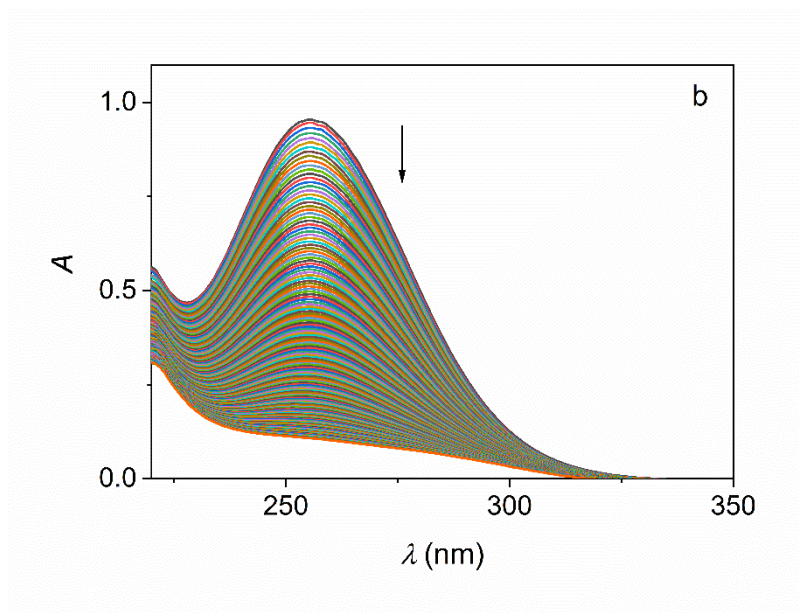
Az MCG bomlása során a közttermékként képződő glioxalátion gyorsan reagál az MCG-vel aminek következtében a reaktáns (MCG) – termék (*N*-formilglicin) arány jó közelítéssel 2 : 1. Az MCA bomlása során viszont a Pyr fel tud halmozódni, mert további reakciója az MCA-val viszonylag lassú. Így az *N*-acetilalanin csak kis koncentrációban, másodlagos termékként képződik.

A pH-független, acetaldehid képződését a 8. séma II. reakcióútja értelmezi, aminek első, sebességmeghatározó lépése az MCA spontán disszociációja. Az MCG esetében ilyen reakciólépést nem észleltünk. A különbség minden bizonnyal az MCA-ban az elektronküldő metilcsoporthoz rendelhető, ami a N-atom elektronsűrűségét növelve elősegíti a Cl⁻ távozását. Ezt követően imin képződésén és hidratációján keresztül képződik a végtermék.

4.2.3 *N*-klórvalin, -leucin és izoleucin bomlása

Az elágazó oldalláncot tartalmazó aminosavak (*branched-chain amino acids*, BCAA-k) *N*-klór származékainak (*N*-klórleucin: MCL, *N*-klórvalin: MCV, *N*-klórizoleucin: MCI) bomlása során kapott időfüggő spektrális változások igazolják, hogy az MCV és MCI bomlása nagyon hasonló kinetikai viselkedést mutat a teljes semleges – lúgos pH tartományban. Példaként a 35. ábra az MCI bomlását mutatja be. Az egyes hullámhosszaknál kapott kinetikai görbék a teljes hullámhossz-tartományban jól illeszthetők a (28) egyenlettel és a pszeudo elsőrendű sebességi állandók értéke 1 – 2 % szórással becsülhető.

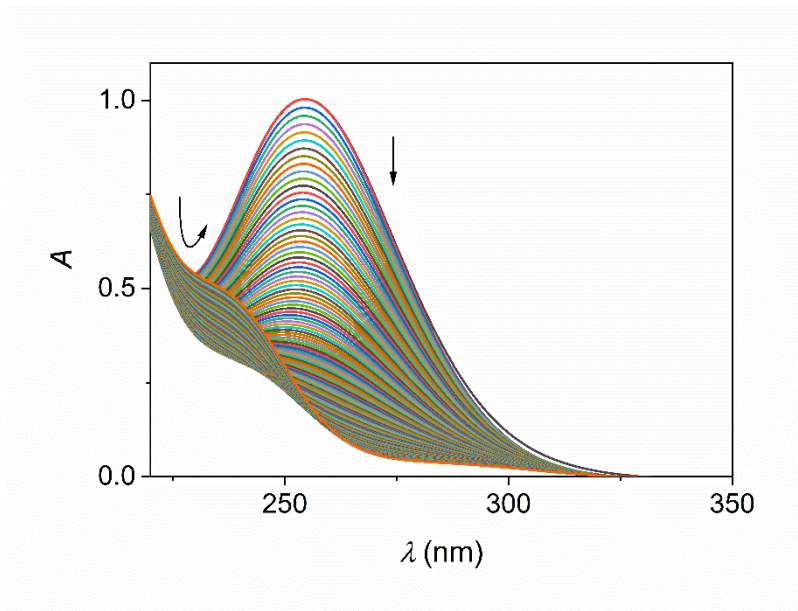




35. ábra Időfüggő spektrális változás az MCI bomlása során.

$c_{\text{Ne}}^0 = 3,00 \times 10^{-3} \text{ M}$; $c_{\text{MCI}}^0 = 3,00 \times 10^{-3} \text{ M}$; $I = 1,00 \text{ M (NaClO}_4\text{)}$; $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$; $\Delta t = 60 \text{ s}$; $t = 10800 \text{ s}$. a: $\text{pH} = 7,41$; b: $c_{\text{OH}} = 5,00 \times 10^{-2} \text{ M}$.

Lúgos körülmények között az MCL esetében a spektrális változások jelentős eltérést mutatnak a másik két klóraminnál tapasztaltakhoz képest. Amint az a 36. ábrán látható, az abszorbancia változás 270 nm-nél és nagyobb hullámhosszakon összhangban van az MCL bomlásával és a másik két rendszerhez hasonlóan elsőrendű kinetikai görbéket kapunk. Kisebb hullámhosszakon egy másodlagos folyamat lejátszódása is egyértelműen látható.

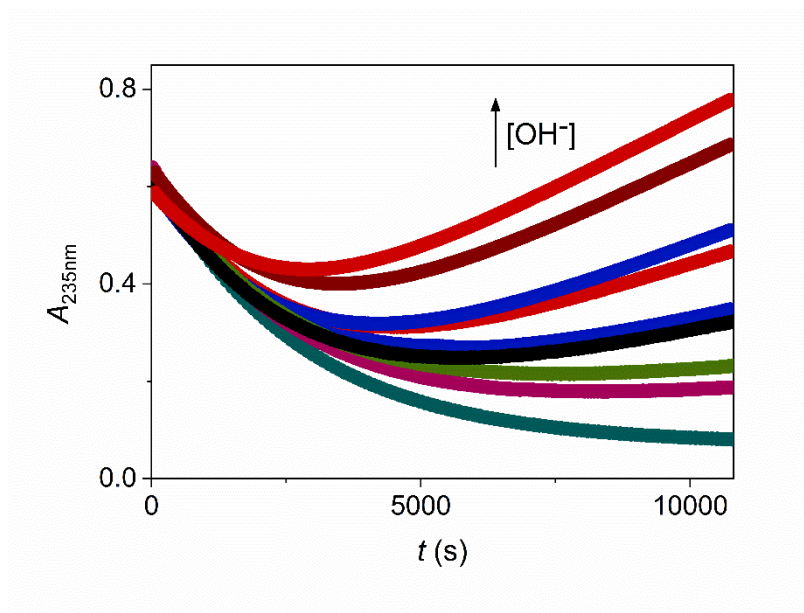


36. ábra Időfüggő spektrális változás az MCL bomlása során.

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

$I = 1,00 \text{ M (NaClO}_4\text{)}$; $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$; $\Delta t = 60 \text{ s}$; $t = 10800 \text{ s}$.

Ebben a hullámhossz tartományban a kinetikai görbék részletes tanulmányozása azt mutatja, hogy ez a viszonylag lassú folyamat egy jelentős fényelnyelésű termék képződésével jár. Ennek a reakciónak a sebessége a pH növelésével növekszik (37. ábra), azonban a folyamat nem fejeződik be 12 óra után sem, a legnagyobb vizsgált pH-n sem.

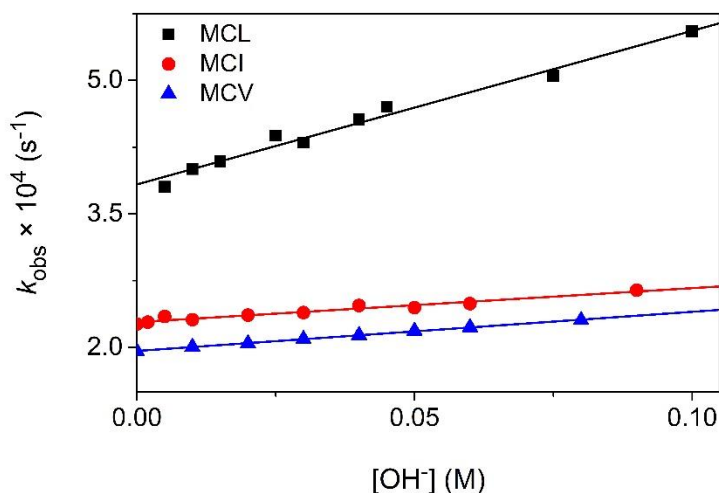


37. ábra Kinetikai görbék az MCL bomlása során a hidroxidion-koncentráció függvényében.

$c_{\text{Leu}}^0 = 3,00 \times 10^{-3} \text{ M}$; $c_{\text{MCL}}^0 = 3,00 \times 10^{-3} \text{ M}$; $I = 1,00 \text{ M (NaClO}_4\text{)}$;
 $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$; $\Delta t = 60 \text{ s}$; $t = 10800 \text{ s}$; $[\text{OH}^-] = 5,00 \times 10^{-3} - 1,00 \times 10^{-1} \text{ M}$.

Megállapítottuk, hogy az aminosav feleslege egyik vizsgált rendszerben sem befolyásolja a bomlás sebességét, bár a folyamat primer terméke egy további, gyors reakciólépésben reagálhat az aminosavval.

Az *N*-klóraminosavak bomlási sebessége a pH növelésével nő, hasonlóan az MCG és MCA rendszerekben tapasztaltakhoz a k_{obs} az $[\text{OH}^-]$ lineáris függvénye (38. ábra, (30) egyenlet). Az egyeneseknek ebben az esetben sem nulla a tengelymetszete (ld. MCA bomlása), azaz a bomlási folyamat ebben az esetben is két egymással versengő reakcióúton keresztül játszódik le.



38. ábra Az *N*-klóraminosavak bomlása során kapott pszeudo-elsőrendű sebességi állandók a hidroxidion-koncentráció függvényében.

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

$$k_{\text{obs}} = k + k_{\text{OH}}[\text{OH}^-] \quad (30)$$

Az MCI és MCV reaktivitása nagyon hasonló, viszont az MCL bomlása a pH-független és az OH^- -függő reakcióúton rendre körülbelül kétszer és négyszer gyorsabb (6. táblázat).

6. táblázat Az *N*-klór-BCAA-k bomlásának sebességi állandói.

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

<i>N</i> -klór-BCAA	$k \times 10^4 \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$k_{\text{OH}} \times 10^4 \text{ (M}^{-1} \text{s}^{-1}\text{)}$
MCI	$2,28 \pm 0,01$	$3,81 \pm 0,29$
MCV	$1,96 \pm 0,01$	$4,39 \pm 0,06$
MCL	$3,83 \pm 0,04$	$17,2 \pm 0,90$

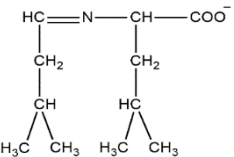
Semleges körülmények között felvettük a folyamat lejátszódását követően a reakcióelegyek ^1H NMR spektrumait. Az ezekben a folyamatokban résztvevő összes vegyület jeleinek hozzárendelését a 7. táblázatban adjuk meg.

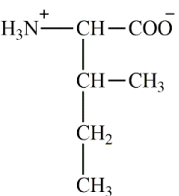
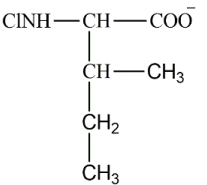
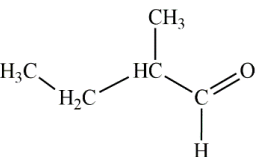
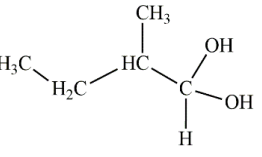
7. táblázat A BCAA-k bomlásában szereplő összes vegyület ¹H NMR csúcsai.

pH	Vegyület neve	Vegyület szerkezete	Proton	Rövidítés	Multiplicitás	Kémiai eltolódás (ppm)
6,75	valin	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{N}^+ - \text{CH} - \text{COO}^- \\ \\ \text{CH} - \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	CH _α	Val ₁	d	3,60
			CH	Val ₂	m	2,26
			2 x CH ₃	Val ₃	d, d	0,97; 1,02
	N-klórvalin	$\begin{array}{c} \text{ClNH} - \text{CH} - \text{COO}^- \\ \\ \text{CH} - \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	CH _α	MCV ₁	d	3,18
			CH	MCV ₂	m	1,83
			2 x CH ₃	MCV ₃	d, d	0,95
	izobutiraldehid	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{H}_3\text{C} - \text{HC} - \text{C} = \text{O} \\ \\ \text{H} \end{array}$	CHO	Iba ₁	s	9,57
			CH	Iba ₂	m	2,54
			2 x CH ₃	Iba ₃	d, d	0,90; 1,08
12,3	valin	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{N}^+ - \text{CH} - \text{COO}^- \\ \\ \text{CH} - \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	CH _α	Val ₁	d	3,04
			CH	Val ₂	m	1,90
			2 x CH ₃	Val ₃	d, d	0,84; 0,91
	N-klórvalin	$\begin{array}{c} \text{ClNH} - \text{CH} - \text{COO}^- \\ \\ \text{CH} - \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	CH _α	MCV ₁	d	3,18
			CH	MCV ₂	m	1,83
			2 x CH ₃	MCV ₃	d, d	0,91; 0,95
	Schiff-bázis ^a	$\begin{array}{c} \text{HC} = \text{N} - \text{CH} - \text{COO}^- \\ \quad \quad \\ \text{CH} \quad \quad \text{CH} \\ / \quad \backslash \quad / \quad \backslash \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{CH}_3 \quad \text{H}_3\text{C} \quad \text{CH}_3 \end{array}$	N = CH	ValSb ₁	d	7,48
			CH - N	ValSb ₂	d	vízjel alatt

pH	Vegyület neve	Vegyület szerkezete	Proton	Rövidítés	Multiplicitás	Kémiai eltolódás (ppm)
6,47	leucin	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{N}^+ - \text{CH} - \text{COO}^- \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH} - \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	CH _α	Leu ₁	t	3,72
			CH ₂	Leu ₂	m	1,69
			CH	Leu ₃		
			CH ₃	Leu ₄	dd	0,94
	N-klórleucin	$\begin{array}{c} \text{ClNH} - \text{CH} - \text{COO}^- \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH} - \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	CH _α	MCL ₁	t	3,48
			CH ₂	MCL ₂	m	1,43
			CH	MCL ₃		
			CH ₃	MCL ₄	dd	0,90
	izovaleraldehid	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} - \text{HC} - \text{H}_2\text{C} - \text{C}=\text{O} \\ \qquad \qquad \\ \text{CH}_3 \qquad \qquad \text{H} \end{array}$	CHO	Iva ₁	t	9,65
			CH ₂	Iva ₂	dd	2,39
			CH	Iva ₃	m	2,16
			CH ₃	Iva ₄	d	0,94
	izovaleraldehid (diol forma)	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} - \text{HC} - \text{H}_2\text{C} - \text{C}(\text{OH})_2 \\ \qquad \qquad \\ \text{CH}_3 \qquad \qquad \text{H} \end{array}$	OH-CH(OH)-	Iva ₅	d	vízjel alatt
			CH ₂	Iva ₆	dd	1,48
			CH	Iva ₇	m	1,68
			CH ₃	Iva ₈	d	0,90
12,3	leucin	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{N}^+ - \text{CH} - \text{COO}^- \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH} - \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	CH _α	Leu ₁	t	3,25
			CH ₂	Leu ₂	m	1,36; 1,44
			CH	Leu ₃	m	1,63
			CH ₃	Leu ₄	dd	0,89
	N-klórleucin	$\begin{array}{c} \text{ClNH} - \text{CH} - \text{COO}^- \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH} - \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	CH _α	MCL ₁	t	3,46
			CH ₂	MCL ₂	m	1,41
			CH	MCL ₃	m	1,62
			CH ₃	MCL ₄	dd	0,89

N-klóraminosavak képződés- és bomláskinetikája

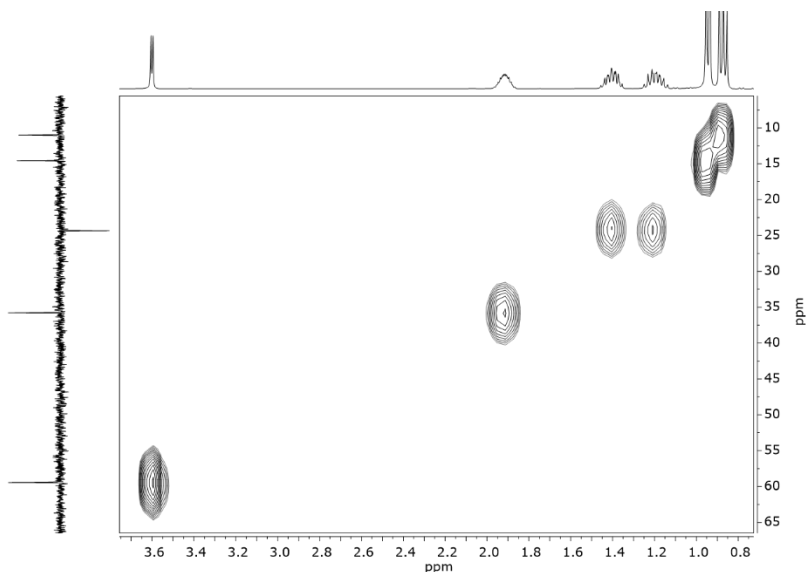
pH	Vegyület neve	Vegyület szerkezete	Proton	Rövidítés	Multiplicitás	Kémiai eltolódás (ppm)
12,3	Schiff-bázis ^a		N = CH	LeuSb ₁	t	7,66
			CH - N	LeuSb ₂	t	vízjel alatt

6,45	izoleucin		CH _α	Ile ₁	d	3,66
			CH	Ile ₂	m	1,96
			CH ₂	Ile ₃	m	1,45; 1,24
			CH ₃	Ile ₄	d	0,99
			CH ₃	Ile ₅	t	0,92
	N-klórizoleucin		CH _α	MCl ₁	d	3,29
			CH	MCl ₂	m	1,64
			CH ₂	MCl ₃	m	1,51; 1,18
			CH ₃	MCl ₄	d	0,88
			CH ₃	MCl ₅	t	0,86
	2-metil-butiraldehid		CHO	Mba ₁	d	9,56
			CH	Mba ₂	m	2,41
			CH ₂	Mba ₃	m	1,71; 1,47
			CH ₃	Mba ₄	d	0,91
			CH ₃	Mba ₅	t	0,87
	2 -metil-butiraldehid (diol forma)		OH-CH(OH)-	Mba ₆	d	vízjel alatt
			CH	Mba ₇	m	1,51
			CH ₂	Mba ₈	m	1,14
			CH ₃	Mba ₉	d	0,92
			CH ₃	Mba ₁₀	t	0,88

pH	Vegyület neve	Vegyület szerkezete	Proton	Rövidítés	Multiplicitás	Kémiai eltolódás (ppm)
12,3	izoleucin	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{N}^+ - \text{CH} - \text{COO}^- \\ \\ \text{CH} - \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	CH _α	Ile ₁	d	3,09
			CH	Ile ₂	m	1,64
			CH ₂	Ile ₃	m	1,39; 1,12
			CH ₃	Ile ₄	d	0,89
			CH ₃	Ile ₅	t	0,86
	N-klórizoleucin	$\begin{array}{c} \text{ClNH} - \text{CH} - \text{COO}^- \\ \\ \text{CH} - \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	CH _α	MCI ₁	d	3,29
			CH	MCI ₂	m	1,64
			CH ₂	MCI ₃	m	1,51; 1,21
			CH ₃	MCI ₄	d	0,89
			CH ₃	MCI ₅	t	0,86
	Schiff-bázis ^a	$\begin{array}{c} \text{HC} = \text{N} - \text{CH} - \text{COO}^- \\ \qquad \qquad \\ \text{H}_3\text{C} - \text{CH} \qquad \text{CH} - \text{CH}_3 \\ \qquad \qquad \\ \text{CH}_2 \qquad \qquad \text{CH}_2 \\ \qquad \qquad \\ \text{CH}_3 \qquad \qquad \text{CH}_3 \end{array}$	N = CH	IleSb ₁	dd	7,45
			CH - N	IleSb ₂	d	vízjel alatt

a: az alifás oldallánc proton NMR csúcsai átfednek a megfelelő aminosav jeleivel

Néhány csúcs azonosítása céljából HSQC proton – szén korrelációs spektrumokat is felvettünk, példaként az izoleucin spektrumát a 39. ábrán mutatjuk be.



39. ábra Az izoleucin HSQC spektruma D₂O-ban.

A CH₂ protonok diasztereotróp tulajdonságainak köszönhetően két különálló multipllett jelet adnak.

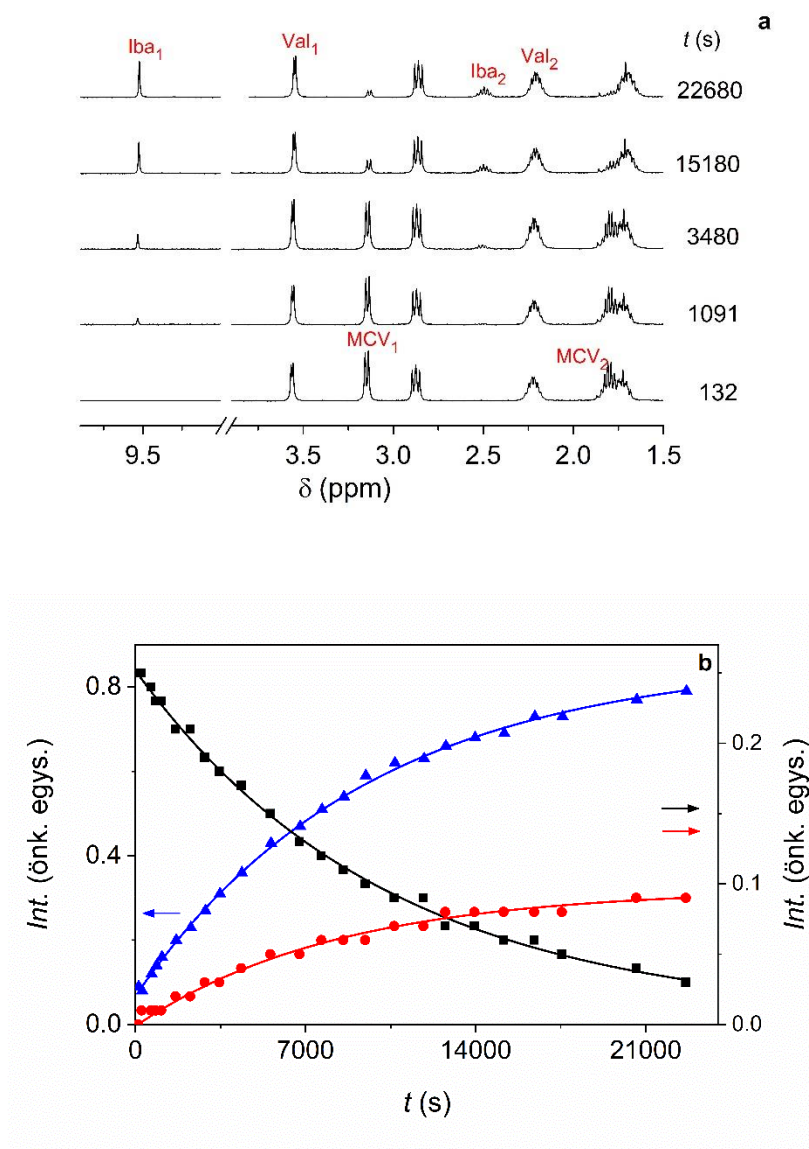
(CH₃ (t): 0,87 – 10,98 ppm; CH₃ (d): 0,94 – 14,59 ppm; CH₂ (m): 1,20; 1,40 – 24,33; CH (m): 1,92 – 35,77 ppm; CH (d): 3,60 – 59,43 ppm.)

Mindhárom *N*-klóraminosav esetében a megfelelő aldehid képződését tapasztaltuk semleges közegben, melyek CHO proton jelei a következők. Iva: 9,65 ppm, Mba: 9,56 ppm, Iba: 9,57 ppm. Ezt a bruttó folyamatot a (33) egyenlet írja le.



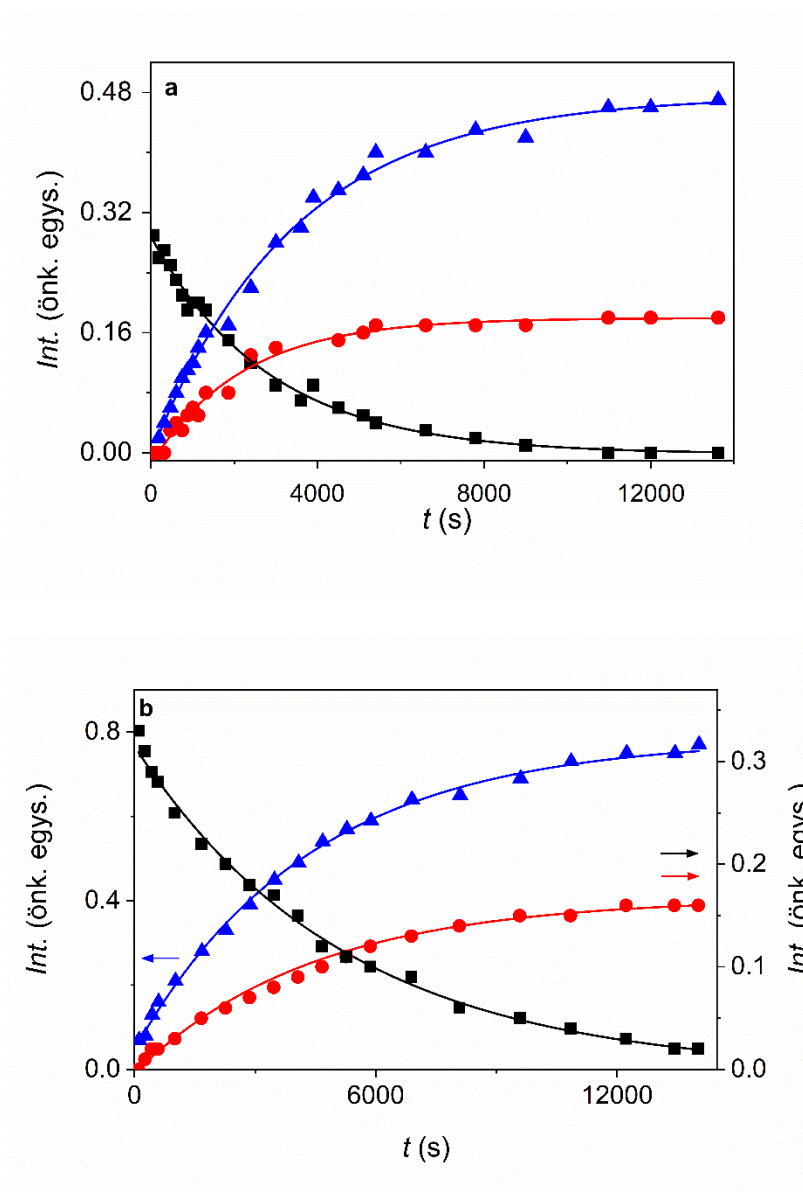
Az aldehidek képződését a pozitív ionmódban végzett TOF-MS mérések is megerősítették. Az MS spektrumokban az aldehidek Na⁺-nal képzett adduktumjaira jellemző csúcsok a következő m/z értékeknél jelentkeztek: 109,0623 (Iva), 109,0622 (Mba), 95,0466 (Iba). Az *N*-klóraminosavak bomlását és a megfelelő aldehidek képződését szelektíven követtük NMR módszerrel semleges pH-tartományban. Az MCV bomlása során rögzített spektrumokat és az MCV, illetve a termék (Iba) kiválasztott ¹H NMR csúcsainak intenzitását az idő függvényében a 40. ábrán mutatjuk be. Az MCL és MCI esetében kapott intenzitás – idő görbéket a 41. ábra mutatja. Az NMR és a spektrofotometriás mérésekből kapott sebességi állandók jó egyezésben vannak minden rendszerben, annak ellenére, hogy a kísérleti körülmények

némileg eltérőek voltak, hiszen az NMR kísérletekben nem állítottunk állandó ionerősséget.

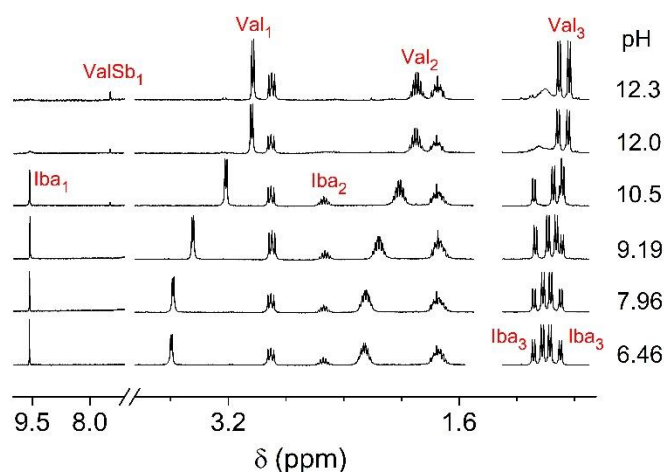


40. ábra Az ¹H NMR spektrumok (a) és a jelek intenzitása (b) az MCV (■ 3,18 ppm) és az Iba (● 9,57 ppm; ▲ 1,08 ppm) esetén az idő függvényében. A folytonos vonal a (28) összefüggéssel történő illesztés eredményét mutatja.

$c_{\text{Val}}^0 = 3,00 \times 10^{-3} \text{ M}$; $c_{\text{MCV}}^0 = 3,00 \times 10^{-3} \text{ M}$; pH = 6,75; $T = 25,0 \text{ } ^\circ\text{C}$.



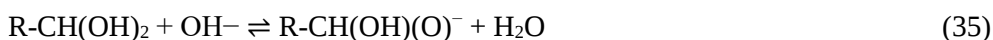
41. ábra A jelek intenzitása az MCL (a) (■ 3,47 ppm), az Iva (● 2,16 ppm; ▲ 2,38 ppm), az MCI (b) (■ 3,28 ppm) és Mba (● 9,56 ppm; ▲ 1,05 ppm) esetén az idő függvényében. A folytonos vonal a (28) összefüggéssel történő illesztést mutatja. $c_{\text{AA}}^0 = 3,00 \times 10^{-3} \text{ M}$; $c_{\text{NCl}}^0 = 3,00 \times 10^{-3} \text{ M}$; a: pH = 6,47; b: pH = 6,46; $T = 25,0 \text{ } ^\circ\text{C}$.



42. ábra A reakció lejátszódását követően a reakcióelegyek ^1H NMR spektruma a pH függvényében az MCV bomlása során.

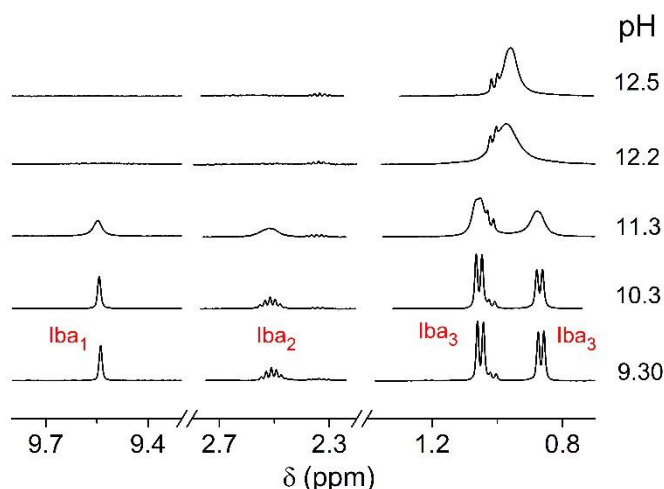
$$c_{\text{Val}}^0 = 3,00 \times 10^{-3} \text{ M}; c_{\text{MCV}}^0 = 3,00 \times 10^{-3} \text{ M}; T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}.$$

A pH növelésével az Iba jellegzetes csúcsai szélesebbé válnak és végül eltűnnek a spektrumról (42. ábra). Ennek a jelenségnek a megértéséhez figyelembe kell venni, az aldehidek korábban tárgyalt reakcióit, vagyis azt, hogy részt vesznek hidratációs (34) és keto-enol tautomerizációs egyensúlyokban (36). Ezekben a rendszerekben a hidratált forma gyakran nagyobb koncentrációban van jelen a többihez képest. Mind a geminális diol, mind az enol forma deprotonálódhat nagyobb pH-n ((35), (37)).



A diol és az enol CH csúcsai várhatóan egybeesnek a szuppresszált vízjelekkel és így nem detektálhatók. Jól ismert, hogy a keto-enol tautomerizációs egyensúly báziskatalizált, ahogyan az aldehidek hidratálása is.^{80, 81} Így a pH növelésével kapott spektrális effektusok az aldehidek három különböző formája közötti gyors kémiai

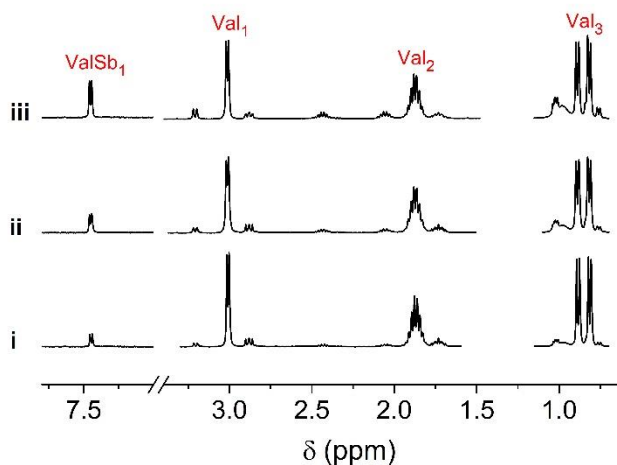
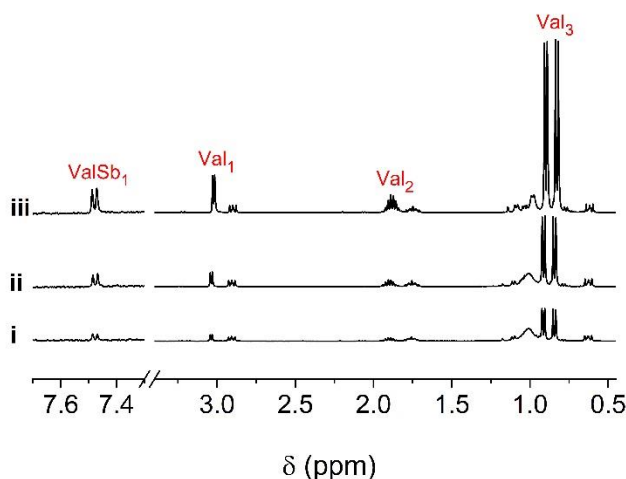
cserével magyarázhatók. Ezeket a megfontolásokat a tiszta aldehidek vizes oldataiban felvett ^1H NMR spektrumok igazolják, amennyiben a megfelelő csúcsok kiszélesednek és eltűnnek lúgos körülmények között (43. ábra).



43. ábra Az Iba ^1H NMR spektruma a pH függvényében.

$c_{\text{Iba}}^0 = 0,20 \text{ M}$; $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

A pH növelésével az NMR spektrumokban új jeleket láthatunk 7,5 ppm körül (42. ábra). Ez az aldehid és a feleslegben lévő aminosav közötti reakcióban képződő, megfelelő Schiff-bázis megjelenésével magyarázható, azaz a 4-metil-2-[(3-metil-butilidén)-amino]-pentanoát (LeuSb), 3-metil-2-[(2-metil-butilidén)-amino]-pentanoát (IleSb) és 3-metil-2-[(2-metil-propilidén)-amino]-butanoát (ValSb) képződik. Ezek az ^1H NMR csúcsok a várt multiplicitásokat mutatják és az MS csúcsok negatív ionmódban 198,1539 (LeuSb), 198,1530 (IleSb), 170,1180 (ValSb) m/z értékek megjelenésével megerősítik a Schiff-bázis létezését mindegyik vizsgált rendszerben. A Schiff-bázisok az aldehid és az aminosav teljesen deprotonált formája közötti reverzibilis folyamatokban képződnek. Amikor az *N*-klóraminosav lúgos bomlása befejeződött, néhány reakcióelegy pH-ját foszfát puffer hozzáadásával enyhén savasra ($\text{pH} = 5,23$) állítottuk be. Ezeknek az oldatoknak az NMR spektrumában ugyanazokat a $-\text{CHO}$ -csúcsokat detektáltuk, mint a semleges reakcióelegyek spektrumában, azaz az aminosav protonálódása a Schiff-bázis képződését visszafelé tolja el.



44. ábra A Schiff-bázis jelintenzitásának növekedése növekvő aminosav koncentráció esetén.

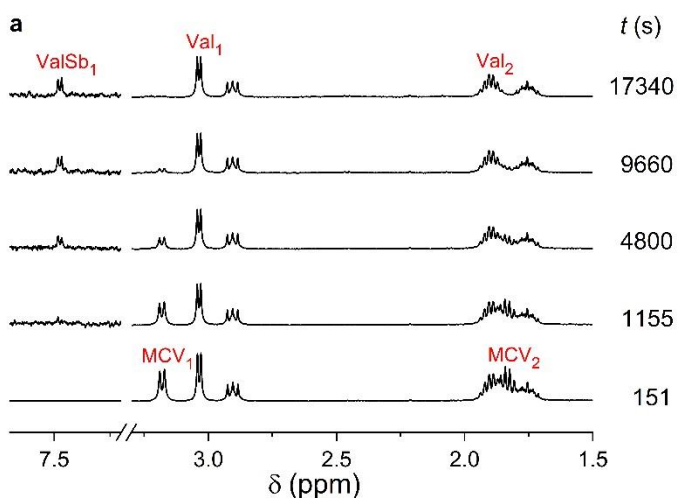
a) az MCV bomlásának lejátszódását követően a reakcióelegy spektrumában és b) a Val és Iba közötti reakcióelegy spektrumában.

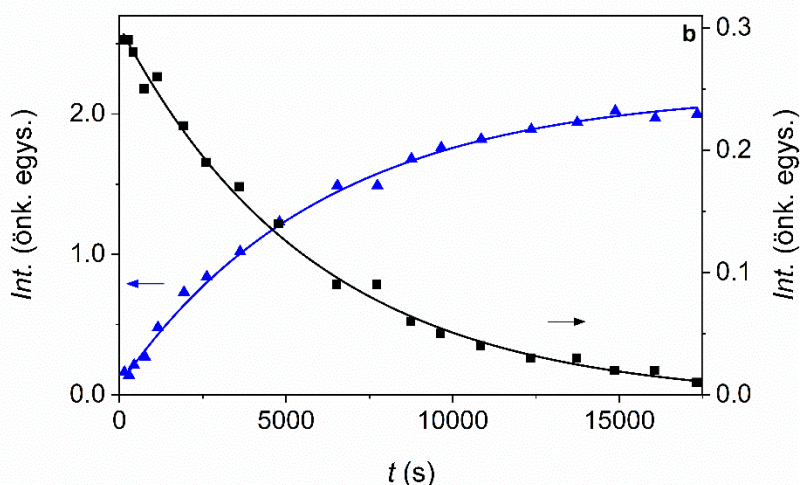
a: $c_{\text{Val}}^0 = \text{i: } 1,50 \times 10^{-3} \text{ M; ii: } 3,00 \times 10^{-3} \text{ M; iii: } 9,0 \times 10^{-2} \text{ M; } c_{\text{NCl}}^0 = 3,00 \times 10^{-3} \text{ M; } c_{\text{OH}^-} = 5,00 \times 10^{-2} \text{ M; } T = 25,0 \text{ } ^\circ\text{C}.$

b: $c_{\text{Val}}^0 = 4,00 \times 10^{-2} \text{ M; } c_{\text{Iba}}^0 = \text{i: } 1,00 \times 10^{-2} \text{ M; ii: } 2,00 \times 10^{-2} \text{ M; iii: } 4,00 \times 10^{-2} \text{ M; } c_{\text{OH}^-} = 1,00 \times 10^{-1} \text{ M; } T = 25,0 \text{ } ^\circ\text{C}.$

Az aminosavak és a megfelelő aldehidek reakcióelegyeinek NMR vizsgálata szintén alátámasztja ezeket az eredményeket, mivel a bomlási reakciókban kapott Schiff-bázis jeleit látjuk ezen rendszerek NMR spektrumaiban is (44. ábra). Az aminosav koncentrációját növelve a Schiff-bázis 7,5 ppm kémiai eltolódásnál látható 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.

Lúgos közegben is követtük NMR módszerrel is az *N*-klóraminosavak bomlását. Mivel az aminosav feleslege gyakorlatilag állandó ezen kinetikai mérések során, a Schiff-bázis csúcsintenzitása arányos a képződött aldehid koncentrációjával (45. ábra) és az időfüggő NMR mérésekből kapott pszeudo-elsőrendű sebességi állandók megegyeznek az UV – Vis kísérletekből kapottakkal.





45. ábra Az ^1H NMR spektrumok (a) és a jelek intenzitása (b) az idő függvényében MCV bomlása során: MCV (■ 3,18 ppm) és ValSb (▲ 1,01 ppm). A folytonos vonal a (28) összefüggéssel történő illesztés eredményét mutatja.

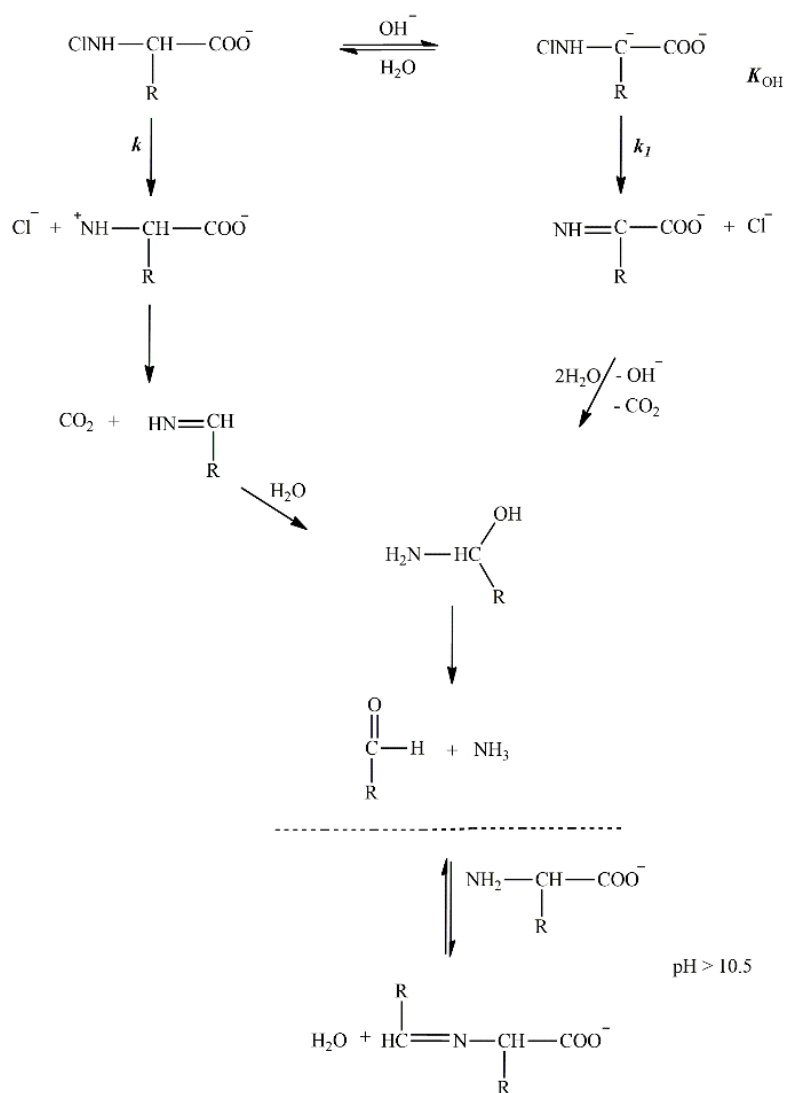
$$c_{\text{Val}}^0 = 3,00 \times 10^{-3} \text{ M}; c_{\text{MCV}}^0 = 3,00 \times 10^{-3} \text{ M}; c_{\text{OH}^-} = 5,00 \times 10^{-2} \text{ M}; T = 25,0 \text{ } ^\circ\text{C}.$$

Az *N*-klór-BCAA-k bomlása az MCG-vel és az MCA-val összehasonlítva eltérő kinetikai sajátosságokat 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*-klór-aminosavak közötti reakciókkal értelmeztük. Ilyen folyamat nem játszódik le az *N*-klór-BCAA-k bomlásakor. MCL esetén, lúgos közegben egy további reakciólépés figyelhető meg, azonban ez túl lassú ahhoz, hogy egy köztitermék és az *N*-klór-vegyület reakciójához rendeljük. Valójában a második folyamat az MCL teljes bomlása után még hosszú ideig folytatódik, vagyis ez a reakció valószínűleg a bomlástermék tovább alakulásához rendelhető. Ezzel összhangban a több napos időskálán felvett ^1H NMR spektrumok a Schiff-bázis lassú bomlását mutatják.

A semleges közegben tapasztalt elsőrendű kinetikai viselkedés elvileg magyarázható lenne a Grob fragmentációs mechanizmussal, amiben az összes termék képződése egyidőben történik meg a (33) egyenlet alapján. A másik lehetőség az, hogy egy sebességmeghatározó lépésben képződik egy köztitermék, ami gyors reakcióban alakul át termékekké. A glicin- és alanin-klór-amin bomlása során kapott eredmények alapján úgy véljük, hogy a BCAA-k átalakulása is az utóbbi mechanizmussal magyarázható. Ennek megfelelően feltételezhető, hogy a pH-független reakcióúton a klór spontán lehasadása dekarboxileződés után egy imin

képződésével jár. Az imin hidratálódása egy nagyon instabil hemiaminál létrejöttét eredményezi, ami a végtermékké alakul át (10. séma).

A kísérleti eredmények szerint a pH-független és az $[\text{OH}^-]$ -függő reakcióúton az *N*-klór-BCAA-k bomlása során ugyanaz az aldehid képződik. Ez váratlan eredmény, különösen, ha figyelembe vesszük az MCA bomlása során semleges és erősen lúgos körülmények között különböző termékek képződnek. Feltételezhető, hogy hasonlóan az MCG és MCA bomlásához a BCAA-k bomlása során a OH^- részvételével lejártszódó gyors egyensúlyi lépésben karbanion képződik, ami deklórozás révén iminné alakul át a k_1 sebességmeghatározó lépésben. Az MCA esetében az imin deaminálása a 2-keto-karbonsav termék stabilizálásához vezet. Ez a reakciólépés kizárható a BCAA-k esetében, mivel a dekarboxilezésnek a deaminálást meg kell előznie, hogy aldehidet kapjunk végtermékként. A viszonylag nagy alkillánc jelenléte a BCAA-k oldalláncában előidézhetheti a CO_2 felszabadulását az NH_3 helyett (10. séma). Ez a szekvencia ugyanannak a hemiaminálnak a képződéséhez vezet, mint a pH-független reakcióút.



10. séma Az *N*-klór-BCAA-k bomlásának mechanizmusa.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Doktori munkám során a korábbi tanulmányokhoz képest sokkal részletesebben vizsgáltuk az *N*-klóraminosavak képződés- és bomláskinetikáját.

Megerősítettük, hogy az *N*-klóraminosavak képződése a protonált HOCl és a deprotonált aminosav között játszódik le egy bruttó másodrendű reakcióban. *Stopped-flow* módszerrel meghatároztuk a folyamatokra jellemző pH-független másodrendű sebességi állandók értékét, valamint hőmérsékletfüggő kísérletek alapján leírtuk a képződési reakciókat jellemző aktiválási entalpiát és entrópiát a különböző aminosavakból képződő *N*-klór származékok esetében. A kapott eredmények alapján ezekben a vegyületekben a N – Cl kötése erősség közel azonos és az átmenti komplex rendezettségében sem találtunk kiugró különbséget.

Bizonyítottuk, 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. Alátámasztottuk, hogy a fenilalanin esetében az aromás oldallánc nem reagál a HOCl-lel. Részletes vizsgálatok 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 kijelenthető, 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.

Az MCG bomlási reakciója során egyértelműen igazoltuk egy köztitermék ki- és továbbalakulását 228 nm-en. Ezt NMR vizsgálatokkal is alátámasztottunk, illetve bizonyítottuk különböző szerkezetvizsgálati módszerek segítségével, hogy a reakció köztiterméke az *N*-oxalilglicin, aminek az élő szervezetben jelentős demetiláz inhibitor szerepe van.⁸²⁻⁸⁶ A bomlási folyamat két konszekutív lépésből áll, ami cáfolja a korábban leírt Grob mechanizmus létjogosultságát. A reakció végterméke az *N*-formilglicin, ami *cisz* és *transz* izomer formákban képződik az NMR spektrumok alapján. Ennek a vegyületnek fontos szerepe van a szulfatáz enzim aktiválásában.⁸⁷⁻⁹¹

Az MCA bomlása során azt tapasztaltuk, hogy a pH-tól függően két reakcióúton mehet végbe a folyamat. Semleges, enyhén lúgos közegben acetaldehid képződik, míg erősen lúgos közegben a főtermék a piruvátion, ami a kiindulási MCA-val kis mennyiségű *N*-acetalalanint képez. Az MCA-val ellentétben pH-független folyamatot nem találtunk az MCG bomlása során. A különbség az MCA-ban lévő

metilcsoport jelenlétének köszönhető, ami növeli az N-atomon az elektronsűrűséget, ezáltal elősegíti a kloridion távozását. Valószínűleg ez a sebességmeghatározó lépés.

A BCAA-k esetében az adott klóramin bomlása a megfelelő aldehid kialakulásához vezet. Az MCV, MCL és MCI esetében nem azonosítottunk két parallel reakcióutat, azonban lúgos közegben az aminosav és a képződött aldehid egy egyensúlyi folyamatban Schiff-bázist képez. Az ezekben a rendszerekben képződött aldehidek mérsékelt toxicitással rendelkeznek. Az ivóvíz kezelése során azonban íz- és szagproblémák léphetnek fel a képződő aldehidek miatt, ezért ezen vegyületek koncentrációját a vízkezelési technológiákban ellenőrizni kell.

A vizsgált *N*-klóraminosavak semleges közegben viszonylag stabilak, azonban erősen lúgos közegben a stabilitásuk az alkalmazott hidroxidion-koncentrációval lineárisan csökken.

6. SUMMARY

My thesis reports the results we have obtained on the formation and decomposition kinetics and mechanisms of *N*-chloro amino acids. These studies offer much more detailed descriptions of these systems than the ones reported previously. We also have clarified some of the controversies found in the earlier literature.

We have confirmed that the formation of *N*-chloro amino acids occurs in an overall second order reaction. The corresponding second order rate constants were determined by the stopped-flow method. The pH-dependence of the rate constants can be interpreted in the terms of the acid – base equilibria of the reactants. We have concluded that the protonated HOCl and the deprotonated amino acid are the reactive species in these processes. On the basis of temperature dependent experiments, the activation enthalpies and entropies were determined for the formation of the *N*-chloro derivatives. The results strongly suggest that there are no significant differences in the N – Cl binding strengths and the structures of the transient complexes.

We have proved that the α -amino group of lysine is chlorinated under physiological conditions, however, the reaction between HOCl and the ϵ -amino group cannot be excluded in alkaline solution. We have confirmed that the aromatic side chain of phenylalanine does not react with HOCl. Based on detailed studies in the neutral – alkaline pH range, the deprotonation of the OH group of the tyrosine side chain does not affect the reactivity of the amino group. In the case of tryptophan and tyrosine, the NMR spectra of the corresponding reaction mixtures confirm that the aromatic rings of the side chains are not chlorinated by HOCl when the amino acid is used in excess.

We have shown that the chlorination process proceeds via two pH-dependent parallel paths in the histidine – HOCl system. As demonstrated by NMR experiments, these reaction paths can be assigned to the formation of *N*-chloramine and the *N*-chlorination of the aromatic side chain.

Kinetic studies on the decomposition of MCG clearly demonstrated the formation and further decomposition of an intermediate at 228 nm. It was confirmed by NMR measurements, and also proved by various other methods that the intermediate of the reaction is *N*-oxalylglycine. This compound plays a significant role in inhibiting demethylase inhibition in living organisms. The final product of the reaction is *N*-formylglycine which is formed in *cis* and *trans* isomeric forms according to the NMR spectra. This compound has an important role in the activation of the sulfatase enzyme under *in vivo* conditions.

In the decomposition of MCA, it was found that the process takes place via two distinct reaction paths depending on the pH. In neutral – slightly alkaline medium acetaldehyde is formed, while the main product is pyruvate in strongly alkaline medium, which is included in a subsequent reaction with MCA and produces a small amount of *N*-acetylalanine. Unlike to MCA, a pH-independent process was not found in the decomposition of MCG. The noted difference is due to the presence of the methyl group in MCA, which increases the electron density of the N atom, thus facilitating the spontaneous departure of chloride ion. Most likely this is the rate determining step via the pH-independent path.

In the case of BCAAs, the decomposition of the *N*-chloramines leads to the formation of the corresponding aldehydes. Two reaction paths – a pH-independent and an $[\text{OH}^-]$ -dependent – were identified in these systems. The unique feature of these reactions is that the two paths lead to the formation of the same aldehyde as primary product. The aldehyde form a Schiff base with the excess of amino acid in an equilibrium process under alkaline conditions. The aldehydes formed in these systems have moderate toxicity. However, taste and odor problems may arise due to the presence of aldehydes in drinking water, therefore the concentration of these compounds should be controlled in water treatment technologies.

Our overall assessment is that the *N*-chloro amino acids are relatively stable under neutral conditions, but their stability decreases linearly with increasing hydroxide ion concentration in strongly alkaline medium.

7. HIVATKOZÁSOK

1. White, G. C., *Handbook of Chlorination and Alternative Disinfectants*. Van Nostrand Reinhold: New York, 1992.
2. Armesto, X. L.; Canle L, M.; Fernández, M. I.; García, M. V.; Santaballa, J. A., First Steps in the Oxidation of Sulfur-Containing Amino Acids by Hypohalogenation: Very Fast Generation of Intermediate Sulfenyl Halides and Halosulfonium Cations. *Tetrahedron* **2000**, 56, (8), 1103-1109.
3. Deborde, M.; von Gunten, U., Reactions of chlorine with inorganic and organic compounds during water treatment—Kinetics and mechanisms: A critical review. *Water Res.* **2008**, 42, (1), 13-51.
4. Armesto, X. L.; Canle, M.; Garcia, M. V.; Santaballa, J. A., Aqueous chemistry of N-halo-compounds. *Chem. Soc. Rev.* **1998**, 27, (6), 453-460.
5. Kumar, K.; Shinness, R. W.; Margerum, D. W., Kinetics and mechanisms of the base decomposition of nitrogen trichloride in aqueous solution. *Inorg. Chem.* **1987**, 26, (21), 3430-3434.
6. Foote, C. S.; Goyne, T. E.; Lehrer, R. I., Assessment of Chlorination by Human-neutrophils. *Nature* **1983**, 301, (5902), 715-716.
7. vanDalen, C. J.; Whitehouse, M. W.; Winterbourn, C. C.; Kettle, A. J., Thiocyanate and chloride as competing substrates for myeloperoxidase. *Biochem. J* **1997**, 327, 487-492.
8. How, Z. T.; Linge, K. L.; Busetti, F.; Joll, C. A., Chlorination of Amino Acids: Reaction Pathways and Reaction Rates. *Environ. Sci. Technol.* **2017**, 51, (9), 4870-4876.
9. Laingam, S.; Frosio, S. M.; Bull, R. J.; Humpage, A. R., In vitro toxicity and genotoxicity assessment of disinfection by-products, organic N-chloramines. *Environ. Mol. Mutag.* **2012**, 53, (2), 83-93.
10. Langheld, K., Über das Verhalten von α -Aminosäuren gegen Natriumhypochlorit. *Chem. Ber.* **1909**, 42, 2360-2374.
11. How, Z. T.; Linge, K. L.; Busetti, F.; Joll, C. A., Organic chloramines in drinking water: An assessment of formation, stability, reactivity and risk. *Water Res.* **2016**, 93, 65-73.
12. Hazen, S. L.; Hsu, F. F.; Heinecke, J. W., p-Hydroxyphenylacetaldehyde Is the Major Product of L-Tyrosine Oxidation by Activated Human Phagocytes: A Chloride-dependent Mechanism for the Conversion of Free Amino Acids into Reactive Aldehydes by Myeloperoxidase *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, (4), 1861-1867.
13. Kettle, A. J.; Winterbourn, C. C., Myeloperoxidase: A key regulator of neutrophil oxidant production. *Redox Rep.* **1997**, 3, (1), 3-15.

14. Pattison, D. I.; Davies, M. J., Absolute Rate Constants for the Reaction of Hypochlorous Acid with Protein Side Chains and Peptide Bonds. *Chem. Res. Toxicol.* **2001**, *14*, (10), 1453-1464.
15. Pullar, J. M.; Vissers, M. C. M.; Winterbourn, C. C., Living with a Killer: The Effects of Hypochlorous Acid on Mammalian Cells. *IUBMB Life* **2000**, *50*, (4-5), 259-266.
16. Heinzelmann, M.; Mercer-Jones, M. A.; Passmore, J. C., Neutrophils and renal failure. *Am. J. Kidney Dis.* **1999**, *34*, (2), 384-399.
17. Zhang, C. X.; Yang, J.; Jacobs, J. D.; Jennings, L. K., Interaction of myeloperoxidase with vascular NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species in vasculature: implications for vascular diseases. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **2003**, *285*, (6), H2563-H2572.
18. Klebanoff, S. J., Myeloperoxidase: friend and foe. *J. Leukoc. Biol.* **2005**, *77*, (5), 598-625.
19. Pattison, D. I.; Davies, M. J., Kinetic Analysis of the Role of Histidine Chloramines in Hypochlorous Acid Mediated Protein Oxidation. *Biochemistry* **2005**, *44*, (19), 7378-7387.
20. Peskin, A. V.; Midwinter, R. G.; Harwood, D. T.; Winterbourn, C. C., Chlorine transfer between glycine, taurine, and histamine: Reaction rates and impact on cellular reactivity. *Free Radical Biol. Med.* **2004**, *37*, (10), 1622-1630.
21. Hawkins, C. L.; Davies, M. J., Inactivation of protease inhibitors and lysozyme by hypochlorous acid: Role of side-chain oxidation and protein unfolding in loss of biological function. *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, *18*, (10), 1600-1610.
22. Nagy, P.; Ashby, M. T., Reactive Sulfur Species: Kinetics and Mechanism of the Oxidation of Cystine by Hypochlorous Acid to Give N,N'-Dichlorocystine. *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, *18*, (6), 919-923.
23. Kang, J. I., Jr.; Sowers, L. C., Examination of hypochlorous acid-induced damage to cytosine residues in a CpG dinucleotide in DNA. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, (6), 1211-1218.
24. Summers, F. A.; Morgan, P. E.; Davies, M. J.; Hawkins, C. L., Identification of plasma proteins that are susceptible to thiol oxidation by hypochlorous acid and N-chloramines. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, (9), 1832-1840.
25. Pattison, D. I.; Hawkins, C. L.; Davies, M. J., What Are the Plasma Targets of the Oxidant Hypochlorous Acid? A Kinetic Modeling Approach. *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, *22*, (5), 807-817.
26. Nagy, P.; Winterbourn, C. C., Reaction of Hydrogen Sulfide with the Neutrophil Oxidant Hypochlorous Acid to Generate Polysulfides. *Chem. Res. Toxicol.* **2010**, *23*, (10), 1541-1543.

27. Stanley, N. R.; Pattison, D. I.; Hawkins, C. L., Ability of Hypochlorous Acid and N-Chloramines to Chlorinate DNA and Its Constituents. *Chem. Res. Toxicol.* **2010**, 23, (7), 1293-1302.
28. Yang, M.; Chordia, M. D.; Li, F.; Huang, T.; Linden, J.; Macdonald, T. L., Neutrophil- and Myeloperoxidase-Mediated Metabolism of Reduced Nimesulide: Evidence for Bioactivation. *Chem. Res. Toxicol.* **2010**, 23, (11), 1691-1700.
29. Pattison, D. I.; O'Reilly, R. J.; Skaff, O.; Radom, L.; Anderson, R. F.; Davies, M. J., One-Electron Reduction of N-Chlorinated and N-Brominated Species Is a Source of Radicals and Bromine Atom Formation. *Chem. Res. Toxicol.* **2011**, 24, (3), 371-382.
30. Curtis, M. P.; Neidigh, J. W., Kinetics of 3-nitrotyrosine modification on exposure to hypochlorous acid. *Free Radical Res.* **2014**, 48, (11), 1355-1362.
31. Nauseef, W. M., Myeloperoxidase in human neutrophil host defence. *Cell. Microbiol.* **2014**, 16, (8), 1146-1155.
32. Armesto, X. L.; Canle, M. L.; Santaballa, J. A., α -amino acids chlorination in aqueous media. *Tetrahedron* **1993**, 49, (1), 275-284.
33. Armesto, X. L.; Canle L, M.; García, M. V.; Losada, M.; Santaballa, J. A., N Reactivity vs. O reactivity in aqueous chlorination. *Int. J. Chem. Kinet.* **1994**, 26, (11), 1135-1141.
34. L. Armesto, X.; Canle L, M.; V. Garcia, M.; A. Santaballa, J., Aqueous chemistry of N-halo-compounds. *Chem. Soc. Rev.* **1998**, 27, (6), 453-460.
35. Armesto, X. L.; Canle, M.; Santaballa, J. A., Alpha-Amino-Acids Chlorination in Aqueous-Media. *Tetrahedron* **1993**, 49, (1), 275-284.
36. Na, C.; Olson, T. M., Relative reactivity of amino acids with chlorine in mixtures. *Environ. Sci. Technol.* **2007**, 41, (9), 3220-5.
37. Nagy, P.; Ashby, M. T., Kinetics and mechanism of the oxidation of the glutathione dimer by hypochlorous acid and catalytic reduction of the chloroamine product by glutathione reductase. *Chem. Res. Toxicol.* **2007**, 20, (1), 79-87.
38. Qiang, Z. M.; Adams, C. D., Determination of monochloramine formation rate constants with stopped-flow spectrophotometry. *Environ. Sci. Technol.* **2004**, 38, (5), 1435-1444.
39. Peskin, A. V.; Winterbourn, C. C., Kinetics of the reactions of hypochlorous acid and amino acid chloramines with thiols, methionine, and ascorbate. *Free Radical Biol. Med.* **2001**, 30, (5), 572-579.
40. Nagy, P.; Ashby, M. T., Reactive Sulfur Species: Kinetics and Mechanisms of the Oxidation of Cysteine by Hypohalous Acid to Give Cysteine Sulfenic Acid. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, (45), 14082-14091.
41. Storkey, C.; Davies, M. J.; Pattison, D. I., Reevaluation of the rate constants for the reaction of hypochlorous acid (HOCl) with cysteine,

methionine, and peptide derivatives using a new competition kinetic approach. *Free Radical Biol. Med.* **2014**, 73, 60-66.

42. Winterbourn, C. C., Comparative reactivities of various biological compounds with myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride, and similarity of oxidant to hypochlorite. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1985**, 840, (2), 204-210.

43. Schraufstatter, I. U.; Browne, K.; Harris, A.; Hyslop, P. A.; Jackson, J. H.; Quehenberger, O.; Cochrane, C. G., Mechanisms of hypochlorite injury of target cells. *J. Clin. Invest.* **1990**, 85, (2), 554-562.

44. Szabó, M.; Baranyai, Z.; Somsák, L.; Fábíán, I., Decomposition of N-Chloroglycine in Alkaline Aqueous Solution: Kinetics and Mechanism. *Chem. Res. Toxicol.* **2015**, 28, (6), 1282-1291.

45. Simon, F.; Szabo, M.; Fabian, I., pH controlled byproduct formation in aqueous decomposition of N-chloro-alpha-alanine. *J. Hazard. Mater.* **2019**, 362, 286-293.

46. Kettle, A. J., Neutrophils convert tyrosyl residues in albumin to chlorotyrosine. *FEBS Lett.* **1996**, 379, (1), 103-106.

47. Hawkins, C. L.; Davies, M. J., Reaction of HOCl with amino acids and peptides: EPR evidence for rapid rearrangement and fragmentation, reactions of nitrogen-centred radicals. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1998**, (9), 1937-1945.

48. Stanbro, W. D.; Smith, W. D., Kinetics and Mechanism of the Decomposition of N-Chloroalanine in Aqueous-Solution. *Environ. Sci. Technol.* **1979**, 13, (4), 446-451.

49. Hand, V. C.; Snyder, M. P.; Margerum, D. W., Concerted Fragmentation of N-Chloro-Alpha-Amino Acid Anions. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, (12), 4022-4025.

50. Awad, R.; Hussain, A.; Crooks, P. A., Kinetics and mechanism of decomposition of N-chloro-[small alpha]-amino acids. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1990**, (7), 1233-1238.

51. Armesto, X. L.; Canle L, M.; Losada, M.; Santaballa, J. A., Concerted Grob Fragmentation in N-Halo-.alpha.-amino Acid Decomposition. *J. Org. Chem.* **1994**, 59, (16), 4659-4664.

52. Nweke, A.; Scully, F. E., Stable N-chloroaldimines and other products of the chlorination of isoleucine in model solutions and in a waste-water. *Environ. Sci. Technol.* **1989**, 23, (8), 989-994.

53. McCormick, E. F.; Conyers, B.; Scully, F. E., N-chloroaldimines. 2. Chlorination of valine in model solutions and in a waste water. *Environ. Sci. Technol.* **1993**, 27, (2), 255-261.

54. Adam, L. C.; Fabian, I.; Suzuki, K.; Gordon, G., Hypochlorous acid decomposition in the pH 5-8 region. *Inorg. Chem.* **1992**, 31, (17), 3534-3541.

55. Cooper, J. N.; Margerum, D. W., Kinetics and Mechanism of the Oxidation of Hydroxylamine by Aqueous Chlorine. *Inorg. Chem.* **1993**, 32, (26), 5905-5910.
56. Vogel, A. I., *Quantitative Inorganic Analysis*, 5th ed. Longman: London, 1989.
57. Fabian, I.; Gordon, G., Complex formation reactions of the chlorite ion. *Inorg. Chem.* **1991**, 30, (19), 3785-3787.
58. Irving, H. M.; Miles, M. G.; Pettit, D. L., A study of some problems in determining the stoichiometric proton dissociation constants of complexes by potentiometric titrations using a glass electrode. *Anal. Chim. Acta* **1967**, 38, 475-488.
59. Gans, P.; Sabatini, A.; Vacca, A., SUPERQUAD: an improved general program for computation of formation constants from potentiometric data. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1985**, (6), 1195-1200.
60. Tonomura, B.; Nakatani, H.; Ohnishi, M.; Yamaguchi-Ito, J.; Hiromi, K., Test reactions for a stopped-flow apparatus. Reduction of 2,6-dichlorophenolindophenol and potassium ferricyanide by L-ascorbic acid. *Analytical biochemistry* **1978**, 84, (2), 370-83.
61. *OriginPro 2018b*, Microcal Software Inc.: Northampton, MA, 2018.
62. Fabian, I.; Lente, G., Light-induced multistep redox reactions: The diode-array spectrophotometer as a photoreactor. *Pure Appl. Chem.* **2010**, 82, (10), 1957-1973.
63. *MatLab for Windows 4.2c1*, The Mathworks Inc.: Natick, MA, USA, 1994.
64. Meagher, N. E.; Rorabacher, D. B., Mathematical Treatment for Very Rapid Second-Order Reversible Kinetics As Measured by Stopped-Flow Spectrophotometry with Corrections for the Cell Concentration Gradient. *J. Phys. Chem.* **1994**, 98, (48), 12590-12593.
65. IUPAC Stability Constants Database—Completion of Data Collection up to 2006. In *Chemistry International -- Newsmagazine for IUPAC*, 2006; Vol. 28, p 26.
66. Domigan, N. M.; Charlton, T. S.; Duncan, M. W.; Winterbourn, C. C.; Kettle, A. J., Chlorination of Tyrosyl Residues in Peptides by Myeloperoxidase and Human Neutrophils. *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, (28), 16542-16548.
67. Fu, S.; Wang, H.; Davies, M.; Dean, R., Reactions of Hypochlorous Acid with Tyrosine and Peptidyl-tyrosyl Residues Give Dichlorinated and Aldehydic Products in Addition to 3-Chlorotyrosine. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, (15), 10851-10858.
68. Antelo, J. M.; Arce, F.; Parajó, M., Kinetic study of the formation of N-chloramines. *Int. J. Chem. Kinet.* **1995**, 27, (7), 637-647.
69. Peintler, G.; Nagypál, I.; Jancsó, A.; Epstein, I. R.; Kustin, K., Extracting Experimental Information from Large Matrixes. 1. A New

Algorithm for the Application of Matrix Rank Analysis. *Journal of Physical Chemistry A* **1997**, *101*, 8013-8020.

70. Muramatsu, I.; Murakami, M.; Yoneda, T.; Hagitan, A., 38, 244 - 246., The formylation of amino acids with acetic formic anhydride *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1965**, *38*.

71. Saladino, R.; Crestini, C.; Neri, V.; Ciciriello, F.; Costanzo, G.; Di Mauro, E., Origin of informational polymers: The concurrent roles of formamide and phosphates. *ChemBioChem* **2006**, *7*, (11), 1707-1714.

72. Nakao, Y.; Sakurai, K.; Nakahara, A., The Stability of Fused Rings in Metal Chelates. III. The Relative Stability of Copper(II) Complexes of Aldehyde- and Ketone-Schiff Bases. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1966**, *39*, 1471-1476.

73. Maroto, E. E.; Filippone, S.; Suarez, M.; Martinez-Alvarez, R.; de Cozar, A.; Cossio, F. P.; Martin, N., Stereodivergent Synthesis of Chiral Fullerenes by 3+2 Cycloadditions to C-60. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, (2), 705-712.

74. Richard, J. P.; Amyes, T. L.; Toteva, M. M., Formation and stability of carbocations and carbanions in water and intrinsic barriers to their reactions. *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, (12), 981-988.

75. Armesto, X. L.; Canle, M.; Losada, M.; Santaballa, J. A., Decomposition of N-chloro-alpha-amino acids in alkaline medium. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1993**, (2), 181-185.

76. Cunliffe, C. J.; Franklin, T. J.; Hales, N. J.; Hill, G. B., Novel Inhibitors of Prolyl 4-Hydroxylase. 3. Inhibition by the Substrate-analog N-Oxaloglycine and its Derivateves. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, (14), 2652-2658.

77. Esposito, A.; Lukas, A.; Meany, J. E.; Pocker, Y., The reversible enolization and hydration of pyruvate: possible roles of keto, enol, and hydrated pyruvate in lactate dehydrogenase catalysis. *Can. J. Chem.* **1999**, *77*, (5-6), 1108-1117.

78. Peterson, A. L.; Waterhouse, A. L., ¹H NMR: A Novel Approach To Determining the Thermodynamic Properties of Acetaldehyde Condensation Reactions with Glycerol, (+)-Catechin, and Glutathione in Model Wine. *J. Agric. Food. Chem.* **2016**, *64*, (36), 6869-6878.

79. Szabo, M.; Baranyai, Z.; Somsak, L.; Fabian, I., Decomposition of N-Chloroglycine in Alkaline Aqueous Solution: Kinetics and Mechanism. *Chem. Res. Toxicol.* **2015**, *28*, (6), 1282-1291.

80. Pocker, Y.; Dickerson, D. G., Hydration of propionaldehyde, isobutyraldehyde, and pivalaldehyde. Thermodynamic parameters, buffer catalysis and transition state characterization. *J. Phys. Chem.* **1969**, *73*, (11), 4005-4012.

81. Green, L. R.; Hine, J., Isobutyraldehyde. Kinetics of acid and base-catalyzed equilibrations in water. *J. Org. Chem.* **1973**, *38*, (16), 2801-2806.

82. Del Rizzo, P. A.; Krishnan, S.; Trievel, R. C., Crystal Structure and Functional Analysis of JMJD5 Indicate an Alternate Specificity and Function. *Mol. Cell. Biol.* **2012**, 32, (19), 4044-4052.
83. Hagos, Y.; Schley, G.; Schoedel, J.; Krick, W.; Burckhardt, G.; Willam, C.; Burckhardt, B. C., alpha-Ketoglutarate-related inhibitors of HIF prolyl hydroxylases are substrates of renal organic anion transporters 1 (OAT1) and 4 (OAT4). *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology* **2012**, 464, (4), 367-374.
84. Hamada, S.; Suzuki, T.; Mino, K.; Kosek, K.; Oehme, F.; Flamme, I.; Ozasa, H.; Itoh, Y.; Ogasawara, D.; Komaarashi, H.; Kato, A.; Tsumoto, H.; Nakagawa, H.; Hasegawa, M.; Sasaki, R.; Mizukami, T.; Miyata, N., Design, Synthesis, Enzyme-Inhibitory Activity, and Effect on Human Cancer Cells of a Novel Series of Jumonji Domain-Containing Protein 2 Histone Demethylase Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, (15), 5629-5638.
85. Hamada, S.; Kim, T.-D.; Suzuki, T.; Itoh, Y.; Tsumoto, H.; Nakagawa, H.; Janknecht, R.; Miyata, N., Synthesis and activity of N-oxalylglycine and its derivatives as Jumonji C-domain-containing histone lysine demethylase inhibitors. *Biorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, (10), 2852-2855.
86. Kalliri, E.; Grzyska, P. K.; Hausinger, R. P., Kinetic and spectroscopic investigation of Co-II, Ni-II, and N-oxalylglycine inhibition of the Fe-II/alpha-ketoglutarate dioxygenase, TauD. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, 338, (1), 191-197.
87. Bojarova, P.; Williams, S. J., Sulfotransferases, sulfatases and formylglycine-generating enzymes: a sulfation fascination. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, 12, (5), 573-581.
88. Frese, M.-A.; Dierks, T., Formylglycine Aldehyde Tag-Protein Engineering through a Novel Post-translational Modification. *ChemBioChem* **2009**, 10, (3), 425-427.
89. Schlotawa, L.; Ennemann, E. C.; Radhakrishnan, K.; Schmidt, B.; Chakrapani, A.; Christen, H.-J.; Moser, H.; Steinmann, B.; Dierks, T.; Gaertner, J., SUMF1 mutations affecting stability and activity of formylglycine generating enzyme predict clinical outcome in multiple sulfatase deficiency. *Eur. J. Hum. Genet.* **2011**, 19, (3), 253-261.
90. Riano, V. M.; Rademann, J., Formylglycine-peptides for the identification of novel pTyr mimetics through a fragment based dynamic ligation screening (DLS) approach. *J. Pept. Sci.* **2012**, 18, S72-S72.
91. Schlotawa, L.; Radhakrishnan, K.; Wachs, M.; Dierks, T.; Gaertner, J.; Schmidt, B., Protein disulfide isomerase is a key regulator for residual formylglycine generating enzyme (FGE) in multiple sulfatase deficiency. *J. Inherit. Metab. Dis.* **2012**, 35, S22-S22.

8. FÜGGELÉK

Az értekezés alapját képező közlemények

Tudományos folyóiratban megjelent közlemények

1. **M. Szabó, V. Bíró, F. Simon, I. Fábián**
The decomposition of N-chloramines of essential branched-chain amino acids: kinetics and mechanism
J. Haz. Mat., **2020**, 382, 120988.
DOI: 10.1016/j.jhazmat.2019.120988
[Q1, IF.: 7.650, Cit.: 0/0]
2. **M. Szabó, F. Simon, I. Fábián**
The formation of N-chloramines with proteinogenic amino acids
Wat. Res., **2019**, 165, 114994.
DOI: 10.1016/j.watres.2019.114994
[Q1, IF.: 7.913, Cit.: 0/0]
3. F. Simon, **M. Szabó, I. Fábián**
pH controlled byproduct formation in aqueous decomposition of N-chloro- α -alanine
J. Haz. Mat., **2019**, 362, 286-293.
DOI: 10.1016/j.jhazmat.2018.09.004
[D1, IF.: 6.434, Cit.: 1/2]
4. **M. Szabó, G. Bellér, J. Kalmár, I. Fábián**
The Kinetics and Mechanism of Complex Redox Reactions in Aqueous Solution: The Tools of the Trade
Adv. Inorg. Chem.: Inorganic Reaction Mechanisms, **2017**, 70, 1-61.
DOI: 10.1016/bs.adioch.2017.02.004
[Q1, IF: 1.316, Cit.: 0/1]
5. **M. Szabó, Z. Baranyai, L. Somsák, I. Fábián**
The Decomposition of N-Chloroglycine in Alkaline Aqueous Solution: Kinetics and Mechanism
Chem. Res. Toxicol. **2015**, 28 (6), 1282–1291
DOI: 10.1021/acs.chemrestox.5b00084
[Q1, IF: 3.025, Cit.: 2/8]

Az értekezés anyagához szorosan nem kapcsolódó közlemények

1. A. Gáspár, A. Pesti, **M. Szabó**, A. Kecskeméti
Determination of chlorine species by capillary electrophoresis – mass spectrometry
Electrophoresis, **2019**, *0*, 1-8.
DOI: 10.1002/elps.201900138
[Q2, IF.: 2.754, Cit.: 0/0]
2. J. Kalmár, **M. Szabó**, N. Simic, I. Fábián
Kinetics and mechanism of the chromium(VI) catalyzed decomposition of hypochlorous acid at elevated temperature and high ionic strength
Dalton Trans., **2018**, *47*, 3831-3840.
DOI: 10.1039/C8DT00120K
[Q1, IF.: 4.099, Cit.: 2/6]
3. **M. Szabó**, J. Kalmár, T. Ditrói, G. Bellér, G. Lente, N. Simic, I. Fábián
Equilibria and kinetics of chromium(VI) speciation in aqueous solution – a comprehensive study from pH 2 to 11
Inorg. Chim. Acta **2017**, *472*, 295-301.
DOI: 10.1016/j.ica.2017.05.038
[Q2, IF.: 2.264, Cit.: 11/12]
4. F. Najóczki, G. Bellér, **M. Szabó**, I. Fábián
Substituent effect on the N-oxidation of 1,10-phenanthroline derivatives by peroxomonosulfate ion
New J. Chem., **2017**, **41**, 9947-9953.
DOI: 10.1039/C7NJ01860F
[Q1, IF.: 3.201, Cit.: 1/1]
5. G. Bellér, **M. Szabó**, G. Lente, I. Fábián
Formation of 1,10-phenanthroline- N,N'-dioxide under mild conditions: the kinetics and mechanism of the oxidation of 1,10-phenanthroline by peroxomosulfate ion (Oxone)
J. Org. Chem., 2016, *81* (13), 5345–5353
DOI: 10.1021/acs.joc.6b00641
[D1, IF: 4.849, Cit.: 4/7]

Az értekezés anyagához kapcsolódó előadások (lectures)

1. Simon Fruzsina, **Szabó Mária**, Dr. Fábián István
N-klór- α -alanin és szubsztituált származékainak képződés- és bomláskinetikája
XLI. Kémiai Előadói Napok, Szeged, Magyarország, 2018.
2. Fábián István, Simon Fruzsina, **Szabó Mária**
N-klór-aminosavak képződés- és bomláskinetikája
Válogatás a koordinációs kémia és bioszervetlen kémia újabb eredményeiből, Debreceni Akadémiai Bizottság (DAB) Kémiai Szakbizottság Ülése, Debrecen, Magyarország, 2018.
3. Fruzsina Simon, **Mária Szabó**, István Fábián
Substituent effects in the decomposition of N-chloro-amino acids: kinetics and mechanism
European Colloquium on Inorganic Reaction Mechanisms, Barcelona, Spain, 2018.
4. **Mária Szabó**, István Fábián
The reactions of hypochlorous acid with amino acids
European Young Chemists' Network Delegates' Assembly, Torino, Italy, 2018.
5. **Szabó Mária**, Simon Fruzsina, Kiss Eszter, Zsögön-Bögözi Reanáta, Bartha Zsolt, Fábián István
Kinetikai vizsgálatok az aminosavak hipoklórossavval történő oxidációjában
XV. Professzorok az Európai Magyarorszáért Konferencia, Budapest, Magyarország, 2017.
6. Simon Fruzsina, **Szabó Mária**, Fábián István
N-klóralaninok képződés- és bomláskinetikája
MTA Reakciókinetikai és Fotokémiai Munkabizottsági Ülés, Budapest, Magyarország, 2017.
7. **Szabó Mária**, Simon Fruzsina, Kiss Eszter, Zsögön-Bögözi Reanáta, Bartha Zsolt, Fábián István
Aminosavak oxidációja hipoklórossavval
XL. Kémiai Előadói Napok, Szeged, Magyarország, 2017.
8. Simon Fruzsina, **Szabó Mária**, Fábián István
A hipoklórossav reakciója α -, β - és N-metil-alaninnal
XL. Kémiai Előadói Napok, Szeged, Magyarország, 2017.

9. Simon Fruzsina, **Szabó Mária**, Fábián István
A hipoklórossav-alanin reakció: kinetika és mechanizmus
MTA Reakciókinetikai és Fotokémiai Munkabizottsági Ülés, Mátraháza, Magyarország, 2016.
10. István Fábián, **Mária Szabó**
The decomposition of N-Chloroglycine in Alkaline Aqueous Solution
6th Global Summit on Toxicology and Applied Pharmacology, Houston, Texas, USA, 2016.
11. **Szabó Mária**
A HOCl-glicin reakció kinetikája és mechanizmusa
Kémiai Előadói Napok, Szeged, Magyarország, 2015.
12. **Szabó Mária**
Az N-klórglicin bomlása lúgos közegben
DETEP Konferencia, Debrecen, Magyarország, 2015.
13. **Szabó Mária**
Az N-klórglicin bomlása lúgos közegben
Országos Tudományos Diákköri Konferencia, Veszprém, Magyarország, 2015.
14. **Szabó Mária**
A glicin-klóramin bomlása lúgos közegben
Tudományos Diákköri Konferencia, Debrecen, Magyarország, 2014.
15. **Szabó Mária**
A HOCl – glicin reakció kinetikája és mechanizmusa
MTA Reakciókinetikai és Fotokémiai Munkabizottsági Ülés, Mátrafüred, Magyarország, 2014.

Az értekezés anyagához kapcsolódó poszterek (posters)

1. Bíró Vivien, Szabó Mária, Fábián István
N-klór-leucin, -izoleucin és -valin bomláskinetikája
I.FKF Szimpózium, Debrecen, Magyarország, 2019.
2. Simon Fruzsina, Szabó Mária, Fábián István
A hipoklórossav reakciója fehérjealkotó aminosavakkal
I.FKF Szimpózium, Debrecen, Magyarország, 2019.
3. Mária Szabó, István Fábián
Kinetics of N-chloro-amino acids formation and decomposition
Frühjahrssymposium & EYChem Conference, Bremen, Germany, 2019.
4. Mária Szabó, István Fábián
Formation and decomposition kinetics of simple N-chloro-amino acids
European Young Chemists' Network Delegates' Assembly, Bremen, Germany, 2019.
5. István Fábián, Mária Szabó
Formation and decomposition kinetics of simple N-chloro-amino acids
7th EuCheMS Chemistry Congress, Liverpool, UK, 2018.
6. Mária Szabó, István Fábián
The comparative study of the formation and decomposition kinetics of N-chloro-amino acids
7th EuCheMS Chemistry Congress, Liverpool, UK, 2018.
7. Simon Fruzsina, Szabó Mária, Fábián István
Az α -, β - és N-metil-alanin oxidációja hipoklórossavval
XXIII. Nemzetközi Vegyészkonferencia, Déva, Románia, 2017.
8. Szabó Mária, Simon Fruzsina, Kiss Eszter, Zsögön-Bögözi Reanáta, Bartha Zsolt, Fábián István
N-klór-aminosavak képződéskinetikája
XXIII. Nemzetközi Vegyészkonferencia, Déva, Románia, 2017.
9. Mária Szabó, István Harangi, Fruzsina Simon and István Fábián
Comparison of the decomposition kinetics of N-chloroglycine and N-chloroalanine
4th EuCheMS Inorganic Chemistry Conference, Copenhagen, Denmark,

10. **Mária Szabó**, Fruzsina Simon, István Fábián
Decomposition Kinetics of *N*-Chloro-Alanine in Alkaline Aqueous Solution
6th Global Summit on Toxicology and Applied Pharmacology, Houston, Texas, USA, 2016.
11. Fruzsina Simon, **Mária Szabó**, István Fábián
The decomposition of *N*-chloro- α -alanine
3rd European Colloquium on Inorganic Reaction Mechanisms, Kraków, Poland, 2016.
12. **Mária Szabó**, Zsolt Baranyai, László Somsák, István Fábián
The Decomposition of *N*-chloro-glycine in Alkaline Aqueous Solution: Kinetics and Mechanism
Gordon Research Conference, Inorganic Reaction Mechanisms, Galveston, TX, USA, 2015.
13. **Mária Szabó**, István Fábián
Kinetic studies on the decomposition of glycine chloramines
5th EuCheMS Chemistry Congress, Istanbul, Turkey, 2014.
14. **Mária Szabó**, István Fábián
Kinetic observations in the glycine-hypochlorite ion system
European Colloquium on Inorganic Reaction Mechanisms, Debrecen, Hungary, 2014.