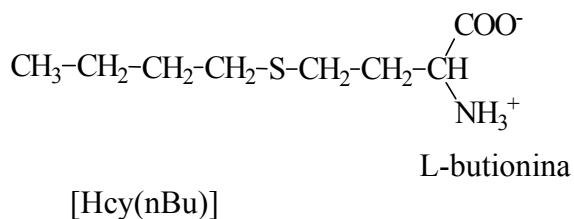
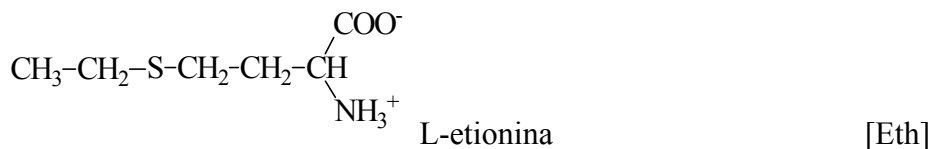
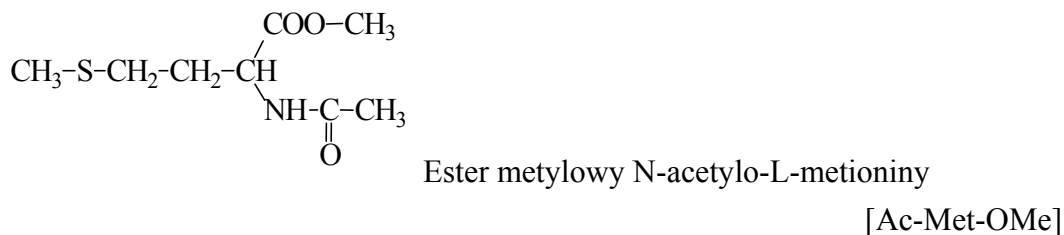
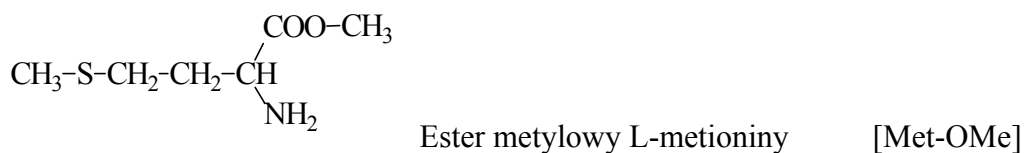
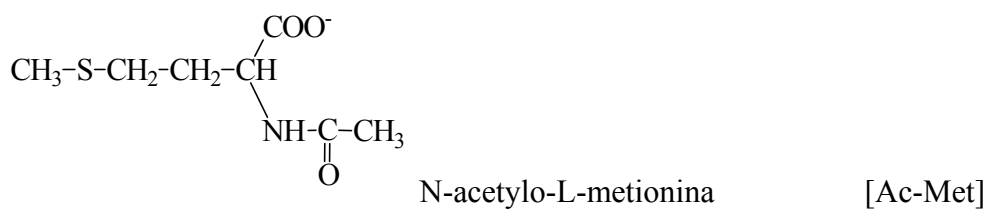
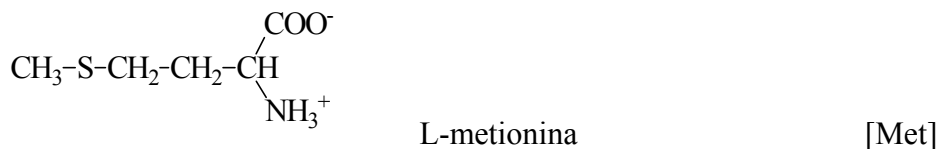


4.2.2. Metionina i jej pochodne

Badania zostały przeprowadzone dla wybranych pochodnych metioniny.

Badane związki



Taki dobór badanych związków umożliwił:

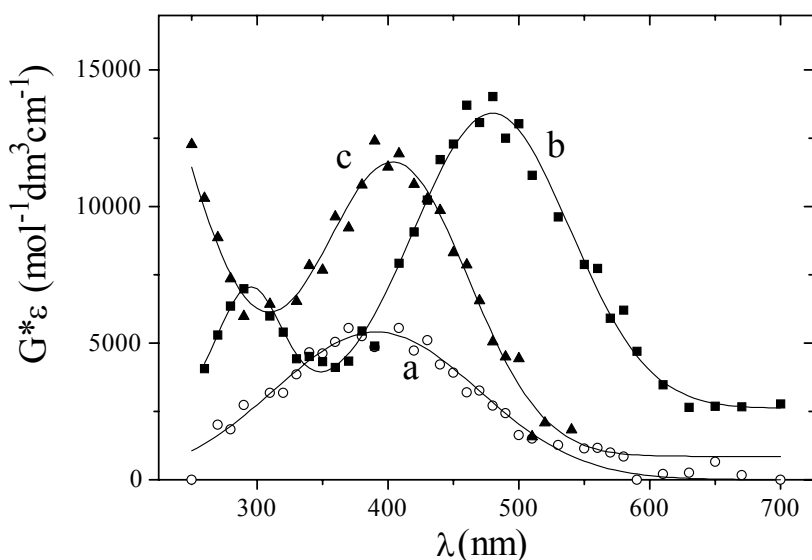
- (i) rozstrzygnięcie, który z cyklicznych rodników: kationorodnik z wewnątrzcząsteczkowym wiązaniem S.:N czy rodnik z wewnątrzcząsteczkowym wiązaniem S.:O jest produktem pośrednim w procesie prowadzącym do dekarboksylacji metioniny;
- (ii) wyznaczenie stałej szybkości reakcji wewnątrzcząsteczkowego przeniesienia protonu z grupy -NH_3^+ do rodnika hydroksysulfuranylowego. Proces ten z powinien konkurować z procesem przeniesienia protonu ze środowiska reakcji i prowadzić do powstawania kationorodników z wewnątrzcząsteczkowym wiązaniem trójelektronowym pomiędzy siarką tioeterową i azotem grupy aminowej.;
- (iii) określenie wpływu podstawnika (C_2H_5 , $\text{n-C}_4\text{H}_9$) w grupie tioeterowej na procesy rodnikowe prowadzące do kationorodników z wewnątrzcząsteczkowym wiązaniem S.:N i kationorodników dimerowych z międzycząsteczkowym wiązaniem S.:S;
- (iv) identyfikację rodnikowych produktów dekarboksylacji metioniny (rodników α -aminoalkilowych), poprzez reakcję z p-nitroacetofenonem.

4.2.2.1. Wyniki badań i ich omówienie

Radioliza impulsowa

L-metionina (Met)¹ - W środowisku silnie kwaśnym (pH 1 - 3,5) reakcja rodników OH z metioniną w skali czasowej kilkudziesięciu nanosekund prowadzi do powstania szerokiego pasma z maksimum absorpcji $\lambda_{\text{max}} \sim 390 \text{ nm}$ (rysunek 4.2.2_1 krzywa a). Absorpcja z $\lambda_{\text{max}} \sim 390 \text{ nm}$ nie występuje w Ac-Met i Ac-Met-OMe (*vide infra*) pomimo potencjalnych możliwości powstawania w tych związkach wewnątrzcząsteczkowego wiązania trójelektronowego typu S.:O. Pozwala to na przypisanie pasma obserwowanego w metioninie do kationorodnika z wewnątrzcząsteczkowym wiązaniem trójelektronowym S.:N. W skali mikrosekundowej wybudowuje się pasmo absorpcji $\lambda_{\text{max}} \sim 480 \text{ nm}$ (rysunek 4.2.2_1 krzywa b), charakterystyczne dla kationorodnika dimerowego z międzycząsteczkowym wiązaniem S.:S, któremu towarzyszy pasmo rodników α -(alkilotio)alkilowych $\lambda_{\text{max}} \sim 290 \text{ nm}$.

¹ Użycie enancjomerycznej D-metioniny nie wpływa znacząco na obraz obserwowanych zjawisk.

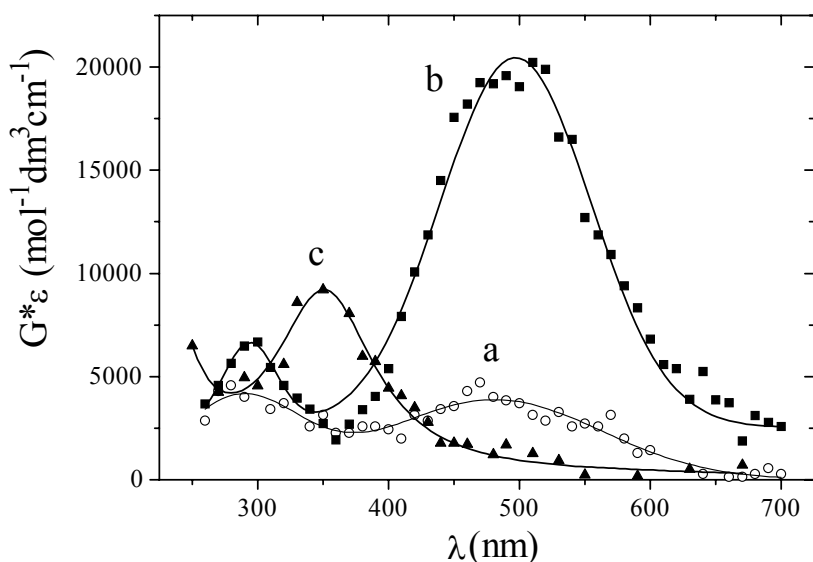


Rys. 4.2.2_1 Widma absorpcyjne produktów przejściowych $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ roztworów Met, nasyconych N_2O , w pH 1 40 ns (a) i 1,5 μs po impulsie (b), i w pH 6,9 40 ns po impulsie (c).

W pH bliskim obojętnego (pH 6,9) dominującym pasmem absorpcji jest pasmo z $\lambda_{\text{max}} \sim 390 \text{ nm}$ (rysunek 4.2.2_1 krzywa c), które w czasie około 0,8 μs przekształca się w pasmo z λ_{max} w zakresie nadfioletu przypisane rodnikom α -aminoalkilowym.

N-acetylo-L-metionina (Ac-Met) - W środowisku silnie kwaśnym (pH 1 - 3,5), w czasie około 2 μs po impulsie wybudowuje się charakterystyczne dla kationorodników dimerowych z międzycząsteczkowym wiązaniem $\text{S} \cdots \text{S}$ pasmo absorpcji z $\lambda_{\text{max}} \sim 490 \text{ nm}$ (rysunek 4.2.2_2 krzywe a i b); pasmo to w pH 1 zanika, w czasie dłuższym od 200 μs . Podobnie jak w Met, pasmu absorpcyjnemu kationorodników dimerowych $(\text{S} \cdots \text{S})^+$ towarzyszy pasmo o słabszej intensywności ($\lambda_{\text{max}} \sim 290 \text{ nm}$) przypisane rodnikom α -(alkilatio)alkilowym.

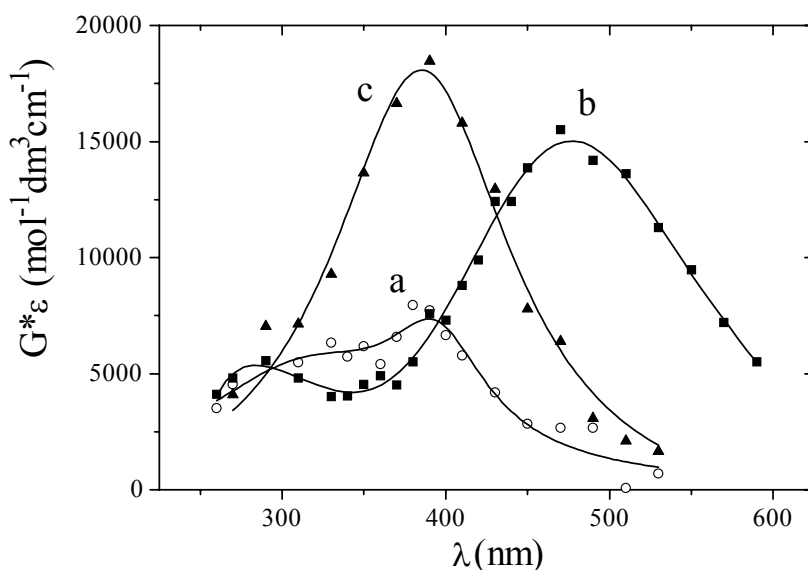
W środowisku obojętnym i zasadowym (pH 7 - 10) w Ac-Met obserwuje się, w nanosekundowej skali czasowej pasmo rodnika hydroksysulfuranylowego z $\lambda_{\text{max}} \sim 340 \text{ nm}$ (rysunek 4.2.2_2 krzywa c), pasmo to przekształca się w pasmo kationorodnika dimerowego $(\text{S} \cdots \text{S})^+$ z $\lambda_{\text{max}} \sim 490 \text{ nm}$, z szybkością zależną od pH roztworu i stężenia Ac-Met.



Rys. 4.2.2_2 Widma absorpcyjne produktów przejściowych $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ roztworów Ac-Met, nasyconych N_2O , w pH 1 40 ns (a) i 2 μs po impulsie (b), i w pH 7 40 ns po impulsie (c).

Ester metylowy L-metioniny (Met-OMe) - W środowisku silnie kwaśnym (pH 1 - 3,5) w wyniku reakcji rodników OH z Met-OMe w skali kilkudziesięciu nanosekund obserwuje się poszerzone pasmo absorpcji z $\lambda_{\text{max}} \sim 390 \text{ nm}$. Jest to spowodowane nałożeniem pasma absorpcji kationorodników z wewnątrzcząsteczkowym wiązaniem S: $\cdot$ N z pasmem absorpcji rodników hydroksysulfuranylowych (rysunek 4.2.2_3 krzywa a).

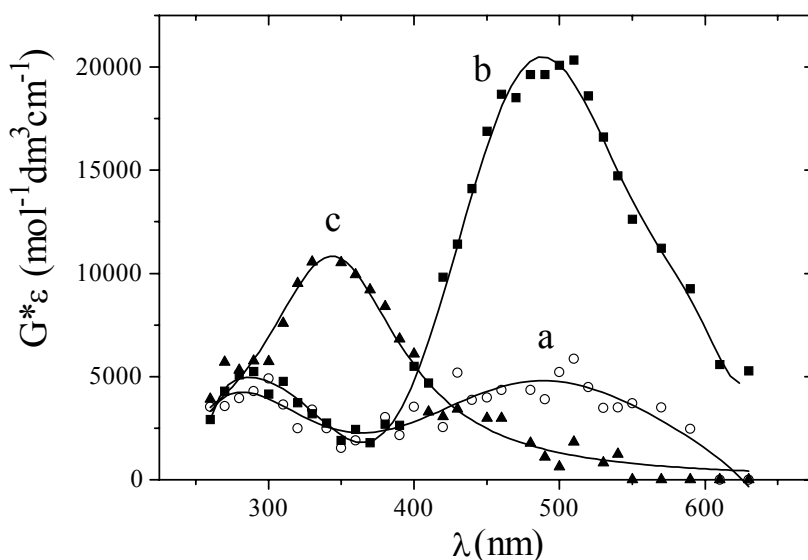
W mikrosekundowej skali czasu wybudowuje się pasmo absorpcji kationorodników dimerowych z międzycząsteczkowym wiązaniem S: $\cdot$ S z $\lambda_{\text{max}} \sim 480 \text{ nm}$, (rysunek 4.2.2_3 krzywa b), któremu towarzyszy charakterystyczne dla rodników α -(alkilotio)alkilowych pasmo $\lambda_{\text{max}} \sim 290 \text{ nm}$. W pH bliskim obojętnego (pH 6,7) dominującym pasmem absorpcji jest pasmo $\lambda_{\text{max}} \sim 390 \text{ nm}$, którego czas życia sięga setek mikrosekund (rysunek 4.2.2_3 krzywa c).



Rys. 4.2.2_3 Widma absorpcyjne produktów przejściowych $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ roztworów Met-OMe, nasyconych N_2O , w pH 1 40 ns (a) i 2 μs po impulsie (b), i w pH 6,7 90 μs po impulsie (c).

Ester metylowy N-acetylo-L-metioniny (Ac-Met-OMe) - Podobnie jak w Ac-Met, w środowisku silnie kwaśnym (pH 1 - 3,5), w czasie około 2 μs po impulsie elektronów wybudowuje się pasmo absorpcji kationorodników dimerowych z międzycząsteczkowym wiązaniem $\text{S} \cdot \cdot \text{S}$ z $\lambda_{\text{max}} \sim 490 \text{ nm}$ (rysunek 4.2.2_4 krzywe a i b). W pH 1 pasmo to zanika, w czasie dłuższym od 200 μs . Podobnie jak w pozostałych związkach pasmu kationorodnika dimerowego $(\text{S} \cdot \cdot \text{S})^+$ towarzyszy pasmo rodników α -(alkilotio)alkilowych ($\lambda_{\text{max}} \sim 290 \text{ nm}$).

W środowisku obojętnym i zasadowym (pH 7 - 10) w Ac-Met-OMe obserwuje się w nanosekundowej skali czasowej pasmo rodnika hydroksysulfuranylowego z $\lambda_{\text{max}} \sim 340 \text{ nm}$ (rysunek 4.2.2_4 krzywa c), pasmo to w czasie około 1 μs przekształca się w pasmo przypisane kationorodnikowi dimerowemu $(\text{S} \cdot \cdot \text{S})^+$ z $\lambda_{\text{max}} \sim 490 \text{ nm}$.



Rys. 4.2.2_4 Widma absorpcyjne produktów przejściowych $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ roztworów Ac-Met-OMe, nasyconych N_2O , w pH 1 40 ns (a) i 2 μs po impulsie (b), i w pH 6,8 40 ns po impulsie (c).

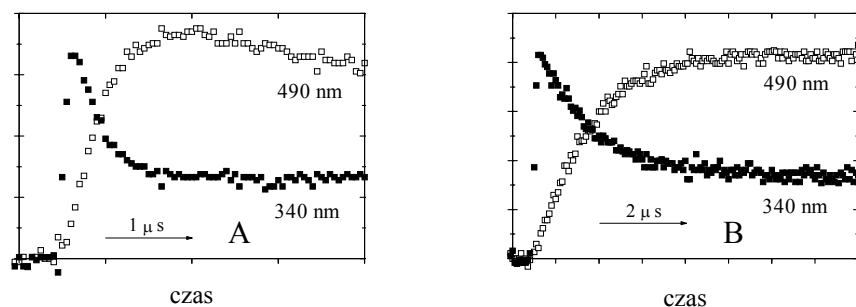
L-etionina (Eth)² i L-butionina ($\text{Hcy}(\text{nBu})$): - W środowisku silnie kwaśnym (pH 1 - 3,5) reakcja rodników OH z Eth i Hcy(nBu) w skali czasowej kilkudziesięciu nanosekund prowadzi do powstania szerokiego pasma z maksimum absorpcji $\lambda_{\text{max}} \sim 390 \text{ nm}$. Analogicznie jak w Met, w mikrosekundowej skali wybudowuje się pasmo absorpcji $\lambda_{\text{max}} \sim 480 \text{ nm}$, charakterystyczne dla kationorodnika dimerowego z międzycząsteczkowym wiązaniem S:S, któremu towarzyszy pasmo rodników α -(alkilatio)alkilowych z $\lambda_{\text{max}} \sim 290 \text{ nm}$. W środowisku obojętnym i zasadowym (pH 7 - 9,7) dominującym pasmem absorpcji jest pasmo z $\lambda_{\text{max}} \sim 390 \text{ nm}$ (S:N) które zanika w czasie około 1 μs .

Parametry kinetyczne

W Ac-Met i Ac-Met-OMe, w których acylowane grupy aminowe, na skutek elektronoakceptorowego działania podstawnika acetylowego, nie są w stanie pełnić funkcji donora protonów proces, prowadzący do powstania kationorodnika $(\text{S}:\text{S})^+$, jest główną drogą zaniku rodnika hydroksysulfuranylowego. Zarówno dla Ac-Met jak i Ac-Met-OMe zanikowi pasma absorpcji z $\lambda_{\text{max}} = 340 \text{ nm}$ charakterystycznego

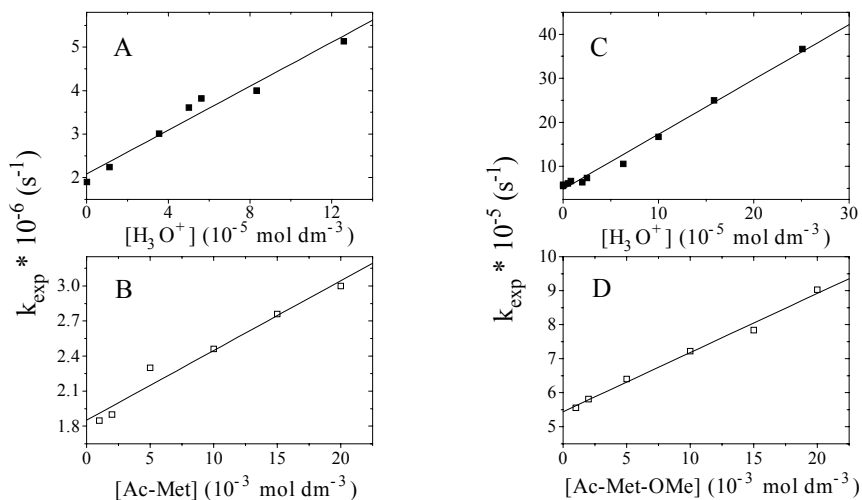
² Użycie enancjomerycznej D-etioniny nie wpływa znacząco na obraz obserwowanych zjawisk.

dla rodnika hydroksysulfuranylowego towarzyszy jednocześnie powstawanie pasma absorpcji z $\lambda_{\max} = 490 \text{ nm}$ charakterystycznego dla kationorodnika dimerowego ($S \cdots S$)⁺ (rysunek 4.2.2_5 A i B).



Rys. 4.2.2_5 Kinetyka zmian absorpcji odpowiadającej zanikowi rodników hydroksysulfuranylowych (340 nm) i powstawaniu kationorodników ($S \cdots S$)⁺ (490 nm), w $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ Ac-Met o pH 7 (A) i w $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ Ac-Met-OMe o pH 6,8 (B), w funkcji czasu.

Podobnie jak dla kwasów alkitiotiokarboksylowych, zanik rodnika hydroksysulfuranylowego w Ac-Met i Ac-Met-OMe jest procesem pseudo-pierwszorzędowym zależnym zarówno od stężenia aminokwasu [S] jak i stężenia protonów obecnych w środowisku [H_3O^+].



Rys. 4.2.2_6 Obserwowana pseudo-pierwszorzędowa stała szybkości reakcji zaniku rodnika hydroksysulfuranylowego ($\lambda_{\max} = 340 \text{ nm}$) dla Ac-Met (A i B) i Ac-Met-OMe (C i D) w zależności od [H_3O^+] stężenie aminokwasu [S] = $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) i w zależności od stężenia aminokwasu [S] (pH = 7).

Stałe szybkości k_d , k_H i k_S dla Ac-Met i Ac-Met-OMe wyznaczono metodą opisaną w punkcie 4.2.1.1 wykorzystując równanie (XXI). Rezultaty otrzymane podstawie danych przedstawionych na rysunku 4.2.2_6 zebrane są w tabeli 5.

Tabela 5
Parametry kinetyczne reakcji rodnikowych N-acetylowych
pochodnych metioniny

Związek	$k_d \cdot 10^{-6}$ [s ⁻¹]	$k_H \cdot 10^{-10}$ [mol ⁻¹ dm ³ s ⁻¹]	$k_S \cdot 10^{-7}$ [mol ⁻¹ dm ³ s ⁻¹]
Ac-Met	1,91	2,52	5,97
Ac-Met-OMe	0,50	1,24	1,74

Wydajność dekarboksylacji

G(CO₂)

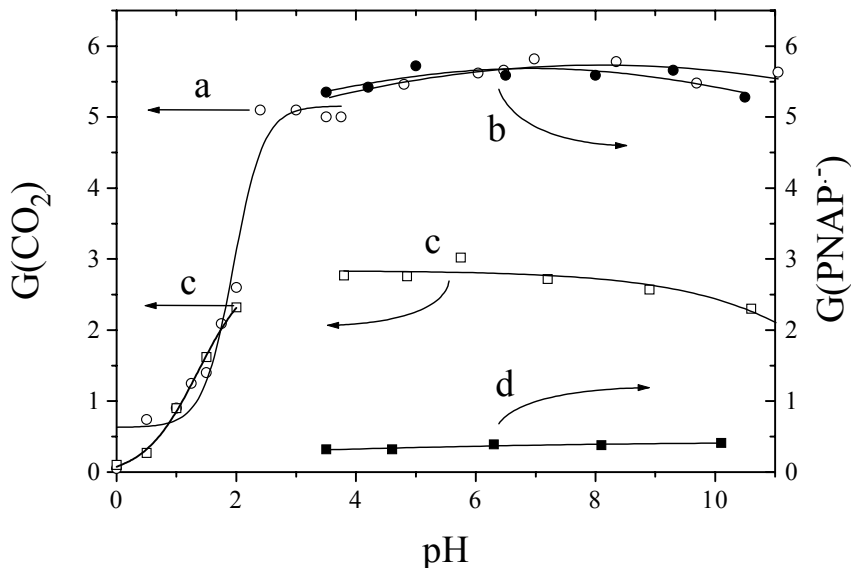
Dla Met i Ac-Met dekarboksylacja zachodzi w całym badanym zakresie pH (0 - 10,5). Wydajność G(CO₂) w zakresie pH 0 - 3 wzrasta ze spadkiem kwasowości roztworu, osiągając w pH > 2,5, w Met 80 - 100%, a w Ac-Met 45 - 55% wydajności początkowej rodników OH (rysunek 4.2.2_7 krzywe a i c).

G(PNAP·⁻)

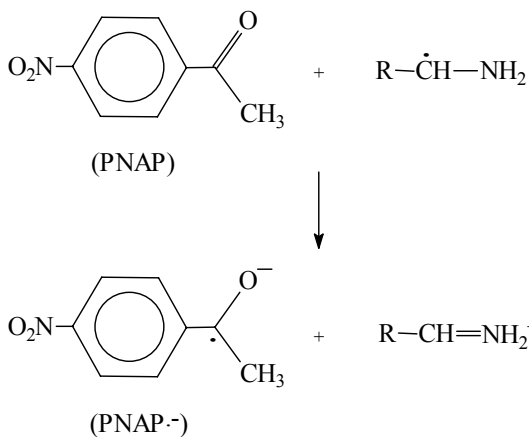
Pomiary wydajności rodnikowych produktów dekarboksylacji Met z p-nitroacetofenonem³ pokazały, że powstające rodniki α-aminoalkilowe redukują

³ Jak już wspomniano (w punkcie 2.3.3) stosunkowo niski potencjał redoks p-nitroacetofenonu (PNAP) $E^\circ(\text{PNAP}/\text{PNAP}^{\cdot-}) = -0,35 \text{ V}$ (Wardman 1989) pozwala na rozróżnienie rodników α-(alkilotio)alkilowych (słabych reduktorów) od α-aminoalkilowych. Rodniki α-aminoalkilowe redukują p-nitroacetofenon w reakcji [37].

PNAP do $\text{PNAP}^{\cdot-}$ z pełną wydajnością (rysunek 4.2.2_5 krzywa b); rodniki α -amidoalkilowe powstałe podczas dekarboksylacji Ac-Met nie redukują PNAP, $G(\text{PNAP}^{\cdot-}) < 0,3$ (rysunek 4.2.2_7 krzywa d).



Rys. 4.2.2_7 Wydajności chemoradiacyjne $G(\text{CO}_2)$ i $G(\text{PNAP}^{\cdot-})$ w Met (krzywe a - $\bigcirc$ i b - $\bullet$) i Ac-Met (krzywe c - $\square$ i d - $\blacksquare$) w zależności od pH, Dla pomiarów wydajności CO_2 w zakresie pH 0 - 3,5 stężenia związków wynosiły $10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$, a w pH > 3,5 $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, pomiary $G(\text{PNAP}^{\cdot-})$ zostały wykonane w $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ roztworach aminokwasów zawierających $3 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ PNAP.



[37]

Powstający w niej anionorodnik $\text{PNAP}^{\cdot-}$ charakteryzuje się silną absorpcją w zakresie UV-VIS z $\lambda_{\text{max}} = 350 \text{ nm}$, $\epsilon = 17600 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ i $\lambda_{\text{max}} = 545 \text{ nm}$, $\epsilon = 2900 [\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}]$ (Adams i Willson 1973, Hiller i Asmus 1983).

EPR

W napromienionej w temperaturze 77 K, próbce zawierającej $1,3 \cdot 10^{-1} \text{ mol dm}^{-3}$ Met w $10^{-1} \text{ mol dm}^{-3} \text{ HClO}_4$, w temperaturze 77 - 120 K obserwuje się widmo pułapkowanych rodników OH zbliżone do obserwowanego przez Riederer'a *i in.*, 1983, w polikrystalicznym lodzie heksagonalnym. Po rozmrożeniu do temperatury 120 - 160 K, obserwuje się tryplet o wartości współczynnika $g = 2,004$ i sprzężeniu nadsubtelnym $A_H \approx 2 \text{ mT}$. Świadczy to o powstawaniu rodnika zlokalizowanego na atomie węgla, w którym niesparowany elektron oddziałuje z dwoma protonami związanymi z tym samym atomem węgla. Widmo to jest analogiczne do obserwowanego przez Burlińską *i in.* 1994, w polikrystalicznych peptydach metioninowych wskazującego na powstawanie rodników α -(alkilotio)alkilowych. Tego typu rodniki powstają w Met podczas deprotonacji w pozycji α do atomu siarki. Dalsze ogrzewanie próbki, do temperatur 180 - 200 K prowadzi do obserwacji singletu z $g = 2,01$ i szerokości sygnału $\Delta H \approx 2,5 \text{ mT}$ charakterystycznego dla kationorodnika dimerowego $(S \cdot S)^+$ (Champagne *i in.* 1991, Pogocki *i in.* 1994).