2. CZĘŚĆ LITERATUROWA

2.1. Utlenianie aminokwasów, peptydów i białek rodnikiem OH¹

2.1.1. Utlenianie aminokwasów.

Kierunek i szybkość reakcji rodników hydroksylowych z aminokwasami zależy głównie od budowy aminokwasu (tj. rodzaju, ilości i położenia grup funkcyjnych w łańcuchu bocznym) oraz pH środowiska wodnego.

Główne kierunki reakcji rodnika OH z aminokwasami to:

(1) – odrywanie wodoru od węgla α oraz wodorów z grup funkcyjnych w łańcuchu bocznym (np. –SH),

(2) - przyłączanie do układów p- lub s- elektronów grup funkcyjnych.

W przypadku <u>aminokwasów alifatycznych</u>, pierwszy kierunek reakcji dominuje w warunkach pH $< pK_a(NH_3^+)$ (Barker 1971). Rodnik OH reaguje tutaj głównie przez oderwanie atomu wodoru z łańcucha bocznego [3] (Neta *i in*. 1970, Marković *i in*. 1974).

$$\cdot OH + R - CH(CO_2^{-})NH_3^{+} \rightarrow \cdot R(-H) - CH(CO_2^{-})NH_3^{+} + H_2O$$
 [3]

Reakcje te zachodzą ze stosunkowo niewielkimi szybkościami (np. dla glicyny w pH = 5,2, k = 1,6*10⁷ dm³mol⁻¹s⁻¹) (Dorfman i Adams 1973). Głównymi produktami cząsteczkowymi reakcji rodnika OH z aminokwasami alifatycznymi w pH zbliżonym do obojętnego są: amoniak, kwasy karboksylowe i ketokwasy. W niewielkich ilościach jest obserwowane również powstawanie dwutlenku węgla – (Stein i Weiss 1949, Maxwell *i in*. 1954, 1955, Sharpless *i in*. 1955, Weeks i Garrison 1958, Kopoldova *i in*. 1961, 1962, 1963a, 1963b, 1963c).

Za zachodzącą pod wpływem rodników OH deaminację odpowiedzialna jest dysproporcjonacja [4]

$$2(^{+}H_{3}N - CR - CO_{2}^{-}) \rightarrow ^{+}H_{2}N = CR - CO_{2}^{-} + ^{+}H_{3}N - CHR - CO_{2}^{-}$$
[4]

¹ Rodnik OH charakteryzuje się absorpcją w zakresie UV; $\lambda_{max} \sim 230$ nm, $\varepsilon = 575$ dm³mol⁻¹cm⁻¹ (Czapski i Bielski 1993), pomiary radiolizy impulsowej w obszarze absorbcji obejmującym pasmo 230 nm są możliwe do wykonania tylko w niewielu ośrodkach na świecie stąd większość danych dotyczących reakcji OH pochodzi z obserwacji zaniku reagentów lub powstawania produktów.

i następująca po niej hydroliza powstałego kwasu α-iminokarboksylowego [5].

$$HN=CR-CO_2^- + H_2O \rightarrow NH_3 + O=CR-CO_2^-$$
[5]

W przypadku aminokwasów czynnych optycznie reakcji dysproporcjonacji towarzyszy racemizacja układu (Kochetkov *i in*. 1970, Bonner *i in*. 1979). Jeszcze łatwiejszy jest proces deaminacji w przypadku aminokwasów zawierających grupę OH w pozycji β do grupy aminowej. Proces ten, zachodzący zgodnie z ogólnym równaniem [6],

$$R-C(OH)-CH(CO_2)NH_3^+ \rightarrow R-CO-CH-CO_2^- + NH_3 + H^+$$
[6]

został szczegółowo opisany w pracach (Foster i West 1973, 1974, Behrens i Koltzenburg 1985).

Dla pH > pK_a(NH₃⁺) dla ataku rodnika elektrofilowego dostępna staje się wolna para elektronowa zlokalizowana na azocie grupy aminowej, stąd wzrost pH powoduje wyraźne zwiększenie stałej szybkości reakcji rodnika OH z aminokwasami (dla glicyny w pH = 10,8, k = 5*10° dm³mol⁻¹s⁻¹) (Dorfman i Adams 1973) oraz wydajności chemoradiacyjnej dwutlenku węgla (dla glicyny $G(CO_2) = 2,3$ (pH = 6) i 4,0 (pH = 8,9) wykrywanego wśród cząsteczkowych produktów utleniania (Mönig *i in*. 1985b). Zwiększenie wydajności dekarboksylacji wraz ze wzrostem pH nie jest obserwowane w aminokwasach alifatycznych, w których grupa karboksylowa i aminowa znajdują się przy różnych atomach węgla (β-alanina, kwasy 3- i 4- aminobutylowe) (Mönig *i in*. 1985b).

Mechanizm procesu dekarboksylacji zaproponowany przez Möniga i wsp. zakłada powstawanie adduktu OH w wyniku ataku rodnika hydroksylowego na wolną parę elektronową azotu [7],

$$\begin{array}{rcl} & & & & & & & \\ & & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & & \\ & &$$

który następnie ulega dekarboksylacji [8]:

$$\begin{array}{c} \text{R-CH} & \xrightarrow{\text{CO}_2^-} \\ & \stackrel{\text{NH}_2}{\overset{\circ}{}_{|}} & \xrightarrow{\text{OH}^-} & \text{OH}^- & \text{CO}_2 & + & \text{R-CH-NH}_2 \\ & \stackrel{\text{NH}_2}{\overset{\circ}{}_{|}} & & \text{OH} \end{array}$$

$$(8]$$

Powstające w tej reakcji rodniki α -aminoalkilowe są stabilizowane rezonansowo poprzez oddziaływanie z wolną parą elektronową azotu (Burkey *i in*. 1983)². Wykazana została także możliwość, konkurencyjnego do addycji, odrywania atomu wodoru od deprotonowanej grupy aminowej – (Garrison 1968, Neta i Fessenden 1971) prowadząca do powstania rodnika aminylowego [9],

który miałby być prekursorem dekarboksylacji. Znaczaca wydajność chemoradiacyjna CO₂ powstającego podczas utleniania (rodnikiem OH) N,Ndimetyloglicyny (której cząsteczka nie zawiera protonów związanych z atomem azotu) sugeruje, że nie jest to reakcja odpowiedzialna za wzrost wydajności dekarboksylacji w środowisku zasadowym (Mönig i in. 1985b). Powstające w reakcji [9] rodniki aminylowe najprawdopodobniej zanikają W reakcii międzycząsteczkowego przeniesienia protonu, której produktem są rodniki z miejscem rodnikowym ulokowanym na jednym z węgli w łańcuchu alifatycznym aminokwasu.

W <u>aminokwasach aromatycznych</u> (fenyloalanina, tyrozyna, tryptofan, histydyna) dominującym kierunkiem reakcji jest przyłączanie rodnika OH do pierścieni aromatycznych. Są to reakcje bardzo szybkie (z reguły stałe szybkości są o dwa rzędy wyższe od stałych szybkości w aminokwasach alifatycznych) gdyż powstające addukty OH, o charakterze rodnikowym, są stabilizowane przez oddziaływania rezonansowe układu aromatycznego (Land i Elbert 1967, Chrysochoos 1968, Armstrong i Swallow 1969, Bansal i Sellers 1975, O'Neil *i in*. 1977, Steenken i O'Neil 1977, Prütz i Land 1979, Dizdaroglu i Simic 1980, Solar *i in*. 1984a, 1984b, Solar 1985).

(Utlenianie aminokwasów i peptydów zawierających siarkę tioeterową zostało omówione w punkcie 2.3.)

² Szerzej własności rodników α -aminoalkilowych i α -(alkilotio)alkilowych zostaną omówione w punkcie 2.3.3.

2.1.2. Utlenianie peptydów i białek

Kierunek reakcji rodnika OH z cząsteczkami <u>peptydów zawierających</u> <u>aminokwasy alifatyczne</u> daje się przewidzieć na podstawie reaktywności poszczególnych reszt aminokwasowych wchodzących w skład peptydu (Hayon *i in*. 1971, Dorfman i Adams 1973). Decydujący wpływ ma tutaj pH środowiska wodnego, podobnie jak dla aminokwasów alifatycznych w pH < $pK_a(NH_3^+)$ dominuje odrywanie wodoru od atomów węgla w pozycji α do azotu wiązania peptydowego (Rao i Hayon 1975, Hayon i Simic 1971, Simic 1978, Stadman 1993, Sharpatyi 1995). Powstałe w tych procesach rodniki stosunkowo łatwo dimeryzują (sieciowanie) – (Dizdaroglu i Simic 1983, Garrison 1981, Liebster i Kopoldova 1966), przy czym powstała mieszanina produktów ma z reguły charakter racemiczny. Istotną cechą powstałych w tym procesie wiązań jest ich odporność na działanie enzymów, która może mieć daleko idące konsekwencje dla organizmu (Dizdaroglu *i in*. 1984). W pH > $pK_a(NH_3^+)$ analogicznie jak dla aminokwasów atakowana jest deprotonowana grupa aminowa.

Miejsca ataku OH w cząsteczce <u>peptydu zawierającego reszty aminokwasów</u> <u>aromatycznych</u> zależą od szybkości reakcji tych rodników z poszczególnymi aminokwasami. Podobnie jak dla aminokwasów aromatycznych najistotniejsze są reakcje przyłączania OH do pierścieni aromatycznych, prowadzące z reguły do powstawania dimerów (Kim *i in*. 1984a, 1984b, Simic *i in*. 1985, Yamamoto 1973, Prütz *i in*. 1983, Boguta i Dancewicz 1981, 1983, Karam *i in*. 1984, Simic i Dizdaroglu 1985).

Podobnie jak w peptydach również w <u>białkach</u> przybliżonej oceny reaktywności względem OH można dokonać na podstawie analizy stałych szybkości tych rodników z poszczególnymi resztami aminokwasowymi (Braams 1967). Pomimo potencjalnie dużej różnorodności miejsc ataku wolnych rodników w białkach <u>najbardziej narażonymi na atak są aminokwasy zawierające siarkę i aminokwasy aromatyczne.</u> Zmierzone stałe szybkości reakcji z białkami są rzędu 10¹¹ dm³ mol⁻¹ s⁻¹. Wynika to w głównej mierze z dużych wymiarów makrocząsteczek białek, co zwiększa częstość zderzeń partnerów reakcji (Dorfman i Adams 1973).

Niezależnie od silnie utleniających własności rodników OH, mogą one indukować ciąg przemian rodnikowych prowadzących do redukcji jonów metali zawartych w białkach (Simic i Taub 1977). Rodniki OH reagują z grupami zlokalizowanymi na powierzchni cząsteczki białka. Rodniki organiczne powstałe na

powierzchni (np. rodnikowe produkty dekarboksylacji aminokwasów) mogą redukować jony metalu (Simic i Taub 1978, van Leeuwen *i in*. 1978).

Reakcje rodnikowe z udziałem aminokwasów występujących w białkach mogą prowadzić do uszkodzeń takich jak: agregacja – (Davies 1986, 1987, Schuessler i Hergert 1980, Sharpatyi 1995), sieciowanie – (Boguta i Dancewicz 1983, Schuessler i Schiling 1984, Hashimoto *i in.* 1981, Sharpatyi 1995), fragmentacja – (Davies 1986, 1987, Wolff *i in.* 1986, Sharpatyi 1995), utrata własności enzymatycznych i związana z nią zmiana konformacji cząsteczek (Hashimoto *i in.* 1981, Davies i Delsignore 1987, Armstrong i Buchanan 1978, Stadman 1986, Adams *i in.* 1969, 1972, 1974, Roberts 1973, Redpth 1975, Dunster 1975, von Sonntag 1987).

2.2. Utlenianie związków zawierających grupę tioeterową

2.2.1. Utlenianie alkilowych tioeterów (siarczków)

Organiczne związki siarki, a wśród nich <u>tioetery</u> dość łatwo ulegają utlenianiu. Wynika to ze względnie niskiej energii jonizacji tych cząsteczek, której wartość w fazie gazowej leży zwykle poniżej 10 eV (w fazie ciekłej należy oczekiwać wartości podobnych lub nawet niższych) (CRC Handbook 1992 wraz z literaturą cytowaną). Utlenianie siarczków w procesie dwuelektronowym³ w zależności od warunków prowadzi do powstawania sulfotlenków, sulfonów lub soli sulfonowych. Również utleniacze jednoelektronowe mogą stosunkowo łatwo odrywać elektron od siarki, która jest bardzo prawdopodobnym miejscem ich ataku⁴.

Wykonane w latach 80-tych prace, głównie przez grupę Asmusa (Niemcy) metodą radiolizy impulsowej z detekcją konduktometryczną i spektrofotometryczną oraz grupę Gilberta i Symonsa (Wielka Brytania) metodą EPR (vide infra),

³ Utlenianie dwuelektronowe można przeprowadzić elektrochemicznie lub za pomocą utleniaczy takich jak: H₂O₂, I₂, IO₄⁻, *chloroamina-T*, *N-chlorosukcynimid*, ¹O₂ itp. (Parker., 1973, Shechter *i in*. 1975, Sysak *i in*. 1977, Chamber., 1978, Doi i Musker., 1981, Coleman *i in*. 1982)

⁴ Większość utleniaczy jednoelektronowych takich jak SO_4 , CCl_3O_2 , Tl^{2+} , $(CH_3I)_2^+$, czy stany trypletowe, reaguje z siarką tioeterową poprzez przeniesienie elektronu i bezpośrednie tworzenie kationorodnika (>S⁺) (Redpath i Willson, 1975, Mönig *i in*. 1985a i b, Mahling *i in*. 1987, Mohan i Asmus, 1987, Mohan i Moorthy, 1990a i b, Engman *i in*. 1994, Bobrowski *i in*. 1992, 1994a i b, Marciniak *i in*. 1993, 1994,1995a i b)

pozwoliły na przedstawienie ogólnego mechanizmu utleniania alkilowych tioeterów przez rodniki OH w roztworach wodnych (Schemat 1).

siarka tioeterowa tworzac Rodnik OH reaguie z addukt (rodnik hydroksysulfuranylowy, $\lambda_{max} \approx 340 \text{ nm})^5$ w bardzo szybkiej reakcji (1) \rightarrow (2) (k \approx 10¹⁰ dm³mol⁻¹s⁻¹) (Bonifaćić i in. 1975, Janata i in. 1980, Schöneich i Bobrowski 1993, Engman i in. 1994, Merenyi i in. 1996). Dalszy przebieg reakcji zależy od stężenia tioeteru. Dla małych stężeń tioeterów ($< 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) rodnik hydroksy-sulfuranylowy może ulegać nieodwracalnej dehydratacji na drodze reakcji (2) \rightarrow (4) dając stabilizowane rezonansowo rodniki α -(alkilotio)alkilowe (Bonifaćić i in. 1975). Dla dużych steżeń tioeterów rodnik hydroksysulfuranylowy (2) tworzy kompleks z drugą cząsteczką tioeteru (2) \rightarrow (3).



Schemat 1

⁵ (i) Powstawanie adduktu stwierdzono również w fazie gazowej, podczas fotolitycznego utleniania dwumetylosiarczku rodnikiem OH (Hynes *i in.* 1986) oraz neutralizacji protonowanego dwumetylosulfotlenku metodą spektrometrii masowej (NRMS) (Gu i Turecek 1992); jednak ostatnie obliczenia *ab initio* kwestionują wiązalny charakter tego indywiduum przypisując mu strukturę kompleksu dipol-dipol, który w roztworze może być dotatkowo stabilizowany (Turecek 1994). (ii) Jak dotychczas powstawanie adduktu nie zostało potwierdzone metodą EPR. (iii) Prawdopodobnie na skutek zawady przestrzennej dla siarczku dwu-tert-butylowego nie powstają addukt OH (2) ani dimer (6) (Asmus, 1975, Janata *i in.* 1980, Gara *i in.* 1979).

Eliminacja OH⁻ z kompleksu (3) prowadzi do powstania kationorodnika z międzycząsteczkowym wiązaniem trójelektronowym pomiędzy siarkami (6)⁶. Badania kinetycznych efektów izotopowych wykonane dla *tioeteru dimetylowego* pokazały, że niezależna od steżenia reakcja (2) \leftrightarrow (5) ma charakter czysto dysocjatywny a reakcja (3) \leftrightarrow (6) wymaga katalizy przez wodę lub protony środowiska (Schöneich i Bobrowski 1993). Dimerowy kationorodnik (6) jest względnie stabilny (czas życia rzędu 10⁻⁵ s) i zanika poprzez odwracalną reakcję (6) \leftrightarrow (5) i deprotonację, dając rodniki α -(alkilotio)alkilowe ($\lambda_{max} \approx 285$ nm) (Bonifaćić *i in.* 1975, Bonifaćić i Asmus 1986, Janata *i in.* 1980, Göbl i Asmus 1984, Davies *i in.* 1984, Mönig *i in.* 1986,).

Należy podkreślić. że jedynymi nieodwracalnymi procesami zachodzącymi w tym układzie są dehydratacja rodnika sulfuranylowego (2) i deprotonacja monomerycznego kationorodnika (5). Produkty tych reakcji (rodniki α - (alkilotio)alkilowe) mają własności redukujące (Göbl i Asmus 1984, Schäfer i Asmus 1981, Asmus 1990a), podczas gdy kationorodniki⁷ R₂S·+ i (R₂S)₂·+, jak już wspomniano w punkcie 1.2.2, są dość silnymi utleniaczami zdolnymi np. utleniać tiole (Bonifaćić *i in*. 1985) oraz brać udział w procesach przenoszenia elektronu w układach biologicznych.

⁶ Budowa i własności indywiduów z wiązaniem trójelektronowym są omówione w punkcie 2.2.2.

⁷ Kationorodnikom >S.⁺ i (>S.:.S<)⁺ poświęcona jest bogata literatura, otrzymywano je różnymi drogami i identyfikowano różnymi metodami np.: redukcja DMSO/radioliza impulsowa - Chaudhri *i in.* 1984; fotofragmentacja soli sulfonowych - Glass *i in.* 1992; radioliza w zamrożonej fazie stałej/EPR - Symons., 1974, Rao *i in.* 1984, Ambroż i Kemp., 1985, Ambroż *i in.* 1991; utlenianie anodowe/EPR - Gara *i in.* 1979; utlenianie politioeterów/radioliza impulsowa - Asmus *i in.* 1978, Bonifaćić i Asmus., 1986, Anklam *i in.* 1990; spektrometria masowa Ilies i in. 1988, Sülzle., 1990, Syage *i in.* 1991, spektroskopia Ramana - Wilbrandt *i in.* 1981, sensybilizowane fotoutlenianie Bobrowski *i in.*1992, 1994a i b, Marciniak *i in.* 1993, 1994,1995a i b), czy utlenianie tioeterów innymi niż OH utleniaczami jednoelektronowymi w radiolizie impulsowej - Redpath i Willson, 1975, Bonifaćić i Asmus., 1980, Mönig *i in.* 1985b, Bonifaćić i Asmus., 1986, Mahling *i in.* 1987, Mohan i Moorthy, 1990ab, Engman *i in.* 1994, Bobrowski *i in.*1994, EPR w fazie ciekłej - Gilbert *i in.* 1973, Musker i Walford., 1976, Musker *i in.* 1978.

2.2.2. Stabilizacja utlenionego centrum siarkowego w tioeterach. Tworzenie wiązań trójelektronowych. Absorpcja optyczna cząsteczek z wiązaniem trójelektronowym

Utlenione centrum siarkowe (>S·⁺) wykazuje silną tendencję do <u>stabilizacji</u> <u>poprzez koordynację z innymi donorami elektronów</u>. W konsekwencji prowadzi to do zmniejszenia jego reaktywności, w wyniku obniżenia potencjału redoks (Schwarz i Dodson, 1984, Prütz *i in*. 1989, Huie *i in* 1991, Engman *i in*. 1994, Merenyi *i in*. 1996). W takim procesie rolę donora elektronów może spełniać atom z V – VII grup układu okresowego, jeśli podobnie jak siarka dysponuje wolną parą elektronową (najlepiej –*p*.) Nakładanie się nieobsadzonego orbitalu *p* donora (HOMO) z obsadzonym jednym elektronem orbitalem *p* siarki (SOMO) prowadzi do powstania wiązania trójelektronowego, w którym stany dwóch elektronów są opisywane przez orbital molekularny wiążący typu σ a jednego elektronu przez orbital antywiążący σ^* (Asmus 1990b). Wiązanie takie jest o około połowę słabsze od wiązania pojedynczego (Baird 1977, Gill i Radom 1988) (dla ((CH₃)₂S)₂·⁺ energia dysocjacji ma wartość około 100 kJ/mol (*c.a.* 25 kcal/mol) Chaudhri *i in*. 1984, Asmus 1990b, Deng *i in*. 1995)⁸.

Diagram poziomów energetycznych dla wiązania $2\sigma/1\sigma^*$ dimeru (>S::S<)⁺ przedstawiony jest na rysunku 2.2.2_1.



Rys. 2.2.2_1 *Diagram poziomów energetycznych dla wiązania* $2\sigma/\sigma 1 * w$ *dimerze typu* (>S:.S<)⁺.

⁸ Symbol "∴" - jest ogólnie przyjętym zapisem wiązania trójelektronowego, wprowadzonym przez Asmusa.

Charakterystyczną cechą cząsteczek zawierających wiązanie trójelektronowe jest ich absorpcja optyczna⁹, która z reguły występuje jako szerokie i pozbawione struktury pasmo w zakresie widzialnym. W pierwszym przybliżeniu może ono być przypisane do przejścia elektronowego $\sigma \rightarrow \sigma^*$. Bardziej dokładne podejście teoretyczne (obliczenia *ab initio*) wykazało, że poziom σ zawiera pewien udział niewiążących elektronów z orbitalu s (przejście optyczne odbywa się pomiędzy orbitalem "mieszanym" σ -n a orbitalem antywiążącym σ^* . Dla najprostszego układu $(H_2S:SH_2)^+$ obliczona różnica pomiędzy poziomami σ -n i σ^* wynosi 3.25 eV (380 nm) (Clark 1981). Uzyskana bardzo dobra zgodność z danymi eksperymentalnymi λ_{max} = 375 nm (Chaudhri i Asmus 1981) w pełni potwierdza zasadność koncepcji wiązania trójelektronowego. Zgodnie z tą koncepcją dla układu symetrycznego (S:S) absorpcja optyczna może być miarą siły wiązania trójelektronowego. Dlatego zwiększenie siły wiązania powinno prowadzić do "niebieskiego" a zmniejszenie do "czerwonego" przesunięcia pasma absorpcji wiązania.

Na gruncie tej teorii można wytłumaczyć obserwowane dla tioeterów zjawisko przesunięcia "czerwonego" pasma absorpcji charakterystycznej dla wiązania S.: S, w stosunku do $(H_2S::SH_2)^+$, wraz ze zwiększeniem elektrodonorowości podstawników przy siarce (np. dla ((CH₃)₂S)₂·+ $\lambda_{max} = 465$ nm). Jest ono wywołane zwiększeniem gęstości elektronowej na orbitalu antywiążącym σ^* a tym samym osłabieniem siły wiązania (Göbl *i in*. 1984, Asmus 1990b). Podobnie, ograniczenia przestrzenne utrudniające nakładanie się orbitali donora i akceptora wywołują "czerwone" przesunięcie pasma absorpcji (Asmus 1979, 1990b, Asmus *i in*. 1979, Bonifaćić i Asmus 1986, Rogowski *i in*. 1994, Rogowski 1995). Krańcowym przypadkiem jest tu przykład kationu 1,3-ditiacyklopentanu, dla którego wzajemne, niemal równoległe położenie orbitali *p* siarki przeciwdziała ich nakrywaniu się i tworzeniu silnego wiązania σ ($\lambda_{max} > 650$ nm). (Asmus 1979, 1990b, Asmus *i in*. 1979, Bonifaćić i Asmus 1986).

Jakkolwiek teoria przewiduje, że stabilność wiązania trójelektronowego nie jest liniową funkcją nakładania orbitali (efekt destabilizujący antywiążącego elektronu σ * rośnie bardziej ze wzrostem nakładania się orbitali niż stabilizujący efekt dwóch

⁹ Powstawanie wiązań trójelektronowych zostało także potwierdzone pomiarami EPR - w widmie EPR $((CH_3)_2S)_2$.⁺ rozszczepienie wskazuje na oddziaływanie niesparowanego elektronu z dwunastoma jednakowymi protonami. Badania te potwierdzją również antywiążący charakter niesparowanego elektronu. (Gilbert *i in.* 1973, Petersen *i in.* 1978, Gara *i in.* 1980, Bonazzola *i in.* 1988).

elektronów σ) (Baird 1977, Gill i Radom 1988), to w przypadku wiązania siarkasiarka mamy zbliżone energie i stosunkowo małe nakładanie orbitali a więc optymalną sytuację dla tworzenia stabilnego wiązania trójelektronowego (Asmus 1979, Clark 1981)

Clark wykazał, że siła wiązania trójelektronowego jest proporcjonalna do e^{-(δ} ^{IP)}, gdzie δIP jest różnicą potencjałów jonizacji pomiędzy dwoma oddziaływującymi partnerami (Clark 1988).

Uproszczony diagram energetyczny dla wiązania $S \therefore X$ przedstawiony na rysunku 2.2.2_2 pokazuje, że zysk energetyczny dla takiego układu w stosunku do wyjściowych substratów jest mniejszy niż dla symetrycznego systemu $S \therefore S$, a jednocześnie przejścia absorpcyjne mogą zachodzić przy niższych długościach fali (dla wiązań $S \therefore N$, $S \therefore O$, $S \therefore Br$, $S \therefore I$ czy $S \therefore Cl$ obserwuje się pasma absorpcji 380 – 410 nm (Asmus 1990b, Carmichael 1996)).



Rys. 2.2.2_2 Diagram poziomów energetycznych dla wiązania $2\sigma/1\sigma^*$ w układach typu S:.X.

Zgodnie z obliczeniami Clarka stabilność wiązania S∴X powinna być większa jeśli zmniejszy się różnica energii pomiędzy orbitalami SOMO akceptora i HOMO donora. Dlatego wiązania trójelektronowe powstające z rodników dodatnio naładowanych (niższa energia SOMO) są stabilniejsze. Podobnie, zwiększenie stabilności wiązania powinno się uzyskać zwiększając energię HOMO przez dodatni efekt indukcyjny podstawników przy heteroatomie donora pary elektronowej. Szacując stabilność wiązań trójelektronowych należy również brać pod uwagę wpływ rozpuszczalnika, gdyż różnica δIP w roztworze jest z reguły inna niż w stanie gazowym (Clark 1981,1982).

2.2.3. Utlenianie pochodnych tioeterów

Obecność podstawników (-OH, -OR, -NH₂, -CO₂H, -CO₂R, -I, -Cl, Br) wpływa na przebieg utleniania tioeterów poprzez efekty indukcyjne, przestrzenne i rezonansowe, a przede wszystkim przez <u>stabilizację utlenionego centrum siarkowego</u> <u>z udziałem sąsiadujących grup funkcyjnych.</u> Ten ostatni efekt polega na tworzeniu przez podstawniki wiązań z centrum reaktywnym w stanie lub produkcie przejściowym (Glass 1990). Obecność podstawników wpływa również na kierunek reakcji prekursora utlenionego centrum siarkowego $>S \cdot +$, rodnika hydroksysulfuranylowego (Schöneich *i in.* 1994, Schöneich i Bobrowski 1993, Schöneich i Yang 1996).

W zależności od warunków – stężenia tioeteru oraz pH, tworzenie wewnątrzcząsteczkowych wiązań trójelektronowych konkuruje z powstawaniem kationorodników dimerowych z międzycząsteczkowym wiązaniem (>S:.S<)⁺ oraz z nieodwracalnym procesem dehydroksylacji (reakcje (2) \rightarrow (3) i (2) \rightarrow (5) w schemacie 1). Ich trwałość jest uwarunkowana ponadto budową przestrzenną związku. Wewnątrzcząsteczkowe wiązania trójelektronowe w układach siarkaheteroatom były obserwowane dotychczas tylko w strukturach cyklicznych pięcio– lub sześcioczłonowych, dla których ich trwałość jest największa.

Alkilotio(halogeno)alkany

Dla *alkilotio(halogeno)alkanów* (X–(CH₂)_n–S–R) zawierających I lub Br oddzielonych od siarki więcej niż trzema grupami metylenowymi (n = 3 – 6) obserwuje się stabilizację >S · ⁺ poprzez tworzenie wewnątrzcząsteczkowych wiązań S .: I lub S .: Br. Trwałość wewnątrzcząsteczkowych wiązań S .: X zmniejsza się w szeregu I > Br > Cl (w *alkilotio(bromo)alkanach* już w zakresie stężeń > 10⁻⁴ mol dm⁻³ dominująca jest stabilizacja przez tworzenie kationorodników dimerowych z międzycząsteczkowym wiązaniem S .: S, a w *alkilotio(chloro)alkanach* powstawania wewnątrzcząsteczkowych wiązania S .: Cl w ogóle nie zaobserwowano). Pokrywa się to z założeniami teorii wiązań trójelektronowych, gdyż w tym samym porządku rośnie różnica potencjałów jonizacji pomiędzy siarką a chlorowcami (Anklam *i in*. 1987ab, 1988, Asmus 1990b)¹⁰.

¹⁰ Podobny efekt zaobserwowano również dla międzycząsteczkowych wiązań S∴I, S∴Br i S∴Cl (Bonifaćić i Asmus 1980, Anklam *i in*. 1987b).

Alkilotioaminy

W przypadku 3-(metylotio)propyloaminy utlenianej przez OH tworzenie wewnątrzcząsteczkowego wiązania S.: N dominuje w zakresie pH > 2 (reakcja [10]). W tym procesie protonowana grupa aminowa jest donorem protonów skutecznie konkurujących z protonami środowiska w procesie dehydratacji rodnika hydroksysulfuranylowego.



W zakresie pH < 2 przeważa katalizowana protonami środowiska eliminacja OH⁻ prowadząca do monomerycznego kationorodnika >S \cdot + (reakcja [11]).

$$CH_{3} \xrightarrow{OH} CH_{3}^{+} H_{3}^{+} H_{3}^{+} H_{4}^{+} \longrightarrow CH_{3} \xrightarrow{H_{3}} CH_{3}^{+} H_{2}^{+} H_{2}^{-} O$$

$$[11]$$

Przy odpowiednio dużym stężeniu tioeteru do kationorodnika dimerowego (reakcja [12])¹¹ (Asmus *i in*. 1985).

[12]

$$CH_3 \longrightarrow NH_3^+ + CH_3 \stackrel{\circ}{\cdot} \stackrel{\circ}{S} (CH_2)_3 \stackrel{\circ}{\cdot} NH_3^+ \longrightarrow S \stackrel{\circ}{\cdot} \stackrel{\circ}{S} \stackrel{\circ}{\bullet} \stackrel{\circ$$

Badając utlenianie 3-(metylotio)propyloaminy przez rodnik OH metodą EPR w układzie przepływowym, prawdopodobnie ze względu na małą rozdzielczość czasową, w całym zakresie pH stwierdzono powstawanie wyłącznie rodników α -(alkilotio)alkilowych¹² (Davies *i in*. 1983).

W przeciwieństwie do 3-(metylotio)propyloaminy, 2-(etylotio)etyloaminautleniana rodnikiem OH nie tworzy stabilnego indywiduum z wewnątrzcząsteczkowym wiązaniem S: N, gdyż ze względu na długość łańcucha oddzielającego azot i siarkę niemożliwe jest utworzenie pierścienia

¹¹ Kationorodnik $(>S:.S<)^+$ jest obserwowany aż do pH 8 jeśli utlenianie *3-(metylotio)propyloaminy* przeprowadzi się za pomocą CCl_3O_2 . Dopiero w pH 8, w którym grupa aminowa jest zdeprotonowana i odsłonięta jest para elektronowa na azocie, powstaje wiązanie S:.N (Mönig., 1985).

¹² Żadną z metod nie stwierdzono powstawania rodników α -aminoalkilowych (miejsce rodnikowe w pozycji α do grupy aminowej) (Davies *i in.* 1983, Asmus *i in.* 1985).

pięcioczłonowego. W pH 1 jedynymi obserwowanymi produktami były rodniki α -(alkilotio)alkilowe, a w pH < 1 dimerowe kationorodniki z międzycząsteczkowym wiązaniem trójelektronowym S::S (Asmus *i in*. 1985).

Tioetery hydroksyalkilowe

Podobnie jak dla alkilotioamin mechanizm utleniania tioeterów hydroksyalkilowych zależy od długości łańcucha alifatycznego oddzielającego grupę tioeterową od hydroksylowej.

Wiązania S.: O powstają gdy grupy tioeterowa i hydroksylowa są rozdzielone <u>trzema</u> (rysunek [13-1]) (*tioeter 3,3'-dihydroksydipropylowy*) (Schöneich i Bobrowski 1993) lub <u>czterema</u> grupami metylenowymi (pochodna norbornenu) (rysunki [13-2a i 2b]) (Glass *i in*. 1984, 1985, 1988, Mahling *i in*. 1987). W tym drugim przypadku konieczne, do powstania wiązania S.: O zbliżenie grup -S- i -OH, było wymuszone sztywną strukturą związku (stereoizomer *endo-*, *endo-* i obecność utrudniających rotację grup metylowych).



Dla tioeterów hydroksyalkilowych, w których grupy tioeterowa i hydroksylowa są oddzielone dwoma grupami metylenowymi nie obserwuje się powstawania pasma absorpcji charakterystycznej dla produktów przejściowych z wewnątrzcząsteczkowym wiązaniem S.:.O. Produktami przejściowymi tworzącymi się podczas zaniku rodnika hydroksysulfuranylowego są kationorodniki dimerowe z międzycząsteczkowymi wiązaniami trójelektronowymi S.:.S (pH < 3) i rodniki α -(alkilotio)alkilowe (Gilbert *i in.* 1973, Gilbert i Marriott 1979, Göbl i Asmus 1984, Mönig *i in.* 1985a, Mohan i Mittal 1991, Schöneich i Bobrowski 1993).

Interesująca z punktu widzenia mechanizmu badanej reakcji jest bardzo mała wydajność powstawania dimerowych kationorodników w pH > 3. Porównanie kinetycznych efektów izotopowych dla tych związków z kinetycznymi efektami izotopowymi dla *tioeteru dimetylowego*, oraz wykrycie i ilościowe oznaczenie powstałego w procesie formaldehydu (Schöneich i Bobrowski 1993) wykazało jednoznacznie, że grupa β -hydroksylowa bierze aktywny udział w procesie zaniku

rodnika hydroksysulfuranylowego. Tworzenie niewielkich ilości dimeru z międzycząsteczkowymi wiązaniami trójelektronowymi S: S zachodzi w tioeterach hydroksyalkilowych, w zależnym od stężenia procesie [14], którego jednym z etapów jest reakcja wewnątrzcząsteczkowego przeniesienia protonu z grupy β -hydroksylowej do rodnika hydroksysulfuranylowego.



Szybkość tego procesu jest limitowana tworzeniem odpowiedniej konformacji cząsteczki umożliwiającej powstanie sześcioczłonowej struktury pośredniej.

Z powstawaniem dimeru konkuruje, niezależny od stężenia proces wewnątrzcząsteczkowego przeniesienia wodoru prowadzący do powstania rodników alkoksylowych [15].



Zanik rodników alkoksylowych może odbywać się dwiema drogami, poprzez przeniesienie wodoru δ [16] lub α - β -fragmentację [17].



Ta ostatnia reakcja jest źródłem powstawania aldehydu mrówkowego.

Kwasy alkilotiokarboksylowe

Utlenianie kwasów alkilotiokarboksylowych prowadzi do powstania produktów przejściowych z międzycząsteczkowym wiązaniem trójelektronowym S.: S lub wewnątrzcząsteczkowym wiązaniem trójelektronowym S.: O. W tym ostatnim przypadku grupy tioeterowa i karboksylowa muszą być oddzielone przez <u>dwie</u> lub <u>trzy</u> grupy metylenowe (*kwas 3,3'-tiodipropionowy* oraz *kwasy endo-6-* (*metylotio*)-*bicyklo*[2.2.1]heptano-endo-2-karboksylowy i 4-(metylotio)butanowy (rysunek [18]) (Glass *i in*. 1984, 1985,1988, Asmus *i in*. 1985, Mahling *i in*. 1987, Mohan 1990).



Podobnie jak dla tioeterów hydroksyalkilowych usztywniona struktura związku, stabilizująca powstawanie pierścienia sześcioczłonowego, powoduje zwiększenie wydajności wewnątrzcząsteczkowego wiązania S \therefore O (wiązanie S \therefore O dla (2) jest trwalsze niż w przypadku związku (3). Dla związku (2) nie obserwowano powstawania międzycząsteczkowego wiązania S \therefore S, w przeciwieństwie do (3), dla którego obserwuje się absorpcję odpowiadającą kationorodnikowi dimerowemu z międzycząsteczkowym wiązaniem S \therefore S. Produkty przejściowe zanikają w wyniku deprotonacji, która prowadzi do powstania rodników α -(alkilotio)alkilowych, Dla tych kwasów alkilotiokarboksylowych nie obserwowano powstawania produktów dekarboksylacji (Gilbert i Marriott 1979).

Dla *kwasu 2,2'-tiodietanowego (tiodiglikolowego*) obserwowano pasmo absorpcji w bliskim nadfiolecie ($\lambda_{max} = 285 \text{ nm}$) (absorpcja ta została przypisana produktom deprotonacji (HOOC-·CH-S-CH₂-COOH)¹³), zwiększając stężenie kwasu powyżej 4 mol dm⁻³ obserwowano powstawanie kationorodnika dimerowego z międzycząsteczkowym wiązaniem S: S (Mohan i Moorthy 1990, Maity i Mohan 1993).

¹³ Budowa tych rodników nie została potwierdzona metodą EPR, ponadto nie oznaczono trwałych produktów utleniania.

Zaproponowany przez Mohana i wsp. (Mohan i Moorthy 1990) mechanizm reakcji nie uwzględnia procesu dekarboksylacji, co jest sprzeczne z wynikami EPR potwierdzającymi powstawanie w procesie rodników typu \cdot CH₂-S-CH₂-COOH (Gilbert i Marriott 1979).

Estry kwasów alkiltiokarboksylowych i acetale aldehydów tioalkilowych

Obecność w cząsteczce tioeteru grup karbonylowych i metoksylowych w pozycji β w stosunku do grupy tioetrowej (CH₃-S-CH₂-X) w znaczący sposób zwiększa stabilność rodników hydroksysulfuranylowych (Bobrowski i Schöneich 1993). Obserwowany efekt stabilizacii iest wynikiem tworzenia sie wewnątrzcząsteczkowego wiązania wodorowego pomiędzy atomami tlenu tych grup a wodorem rodnika hydroksysulfuranylowego. Co przejawia się ponad 20-krotnym obniżeniem stałej szybkości spontanicznej rodników dysocjacji hydroksysulfuranylowych (reakcja $(2) \rightarrow (5)$ w schemacie 1) w stosunku do *tioeteru* dimetylowego. Powstawanie wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych jest szczególnie ułatwione gdy prowadzi do powstania stabilnych sześcioczłonowych struktur cyklicznych (Bobrowski i Schöneich 1993, Dziembowska 1994).

2.3. Utlenianie aminokwasów i peptydów zawierających grupę tioeterową

2.3.1. Utlenianie aminokwasów tioeterowych

Tak jak dla większości pochodnych tioeterów, głównym kierunkiem reakcji rodnika OH z aminokwasami zawierającymi grupę tioeterową jest addycja rodnika do układu elektronów p– siarki tioeterowej i tworzenie rodnika hydroksy–sulfuranylowego.¹⁴ Droga na jakiej następuje rozpad tego rodnika silnie zależy od pH środowiska, decydującego o formie jonowej pozostałych grup funkcyjnych aminokwasu (NH₂/NH₃⁺, COO⁻/COOH patrz punkt 5.1), a w konsekwencji o ich roli w przemianach rodnikowych.

W zakresie niskiego pH, pH < pK_a(COOH), rodnik hydroksysulfuranylowy eliminuje wodę z udziałem protonów środowiska dając monomeryczny

¹⁴ W przypadku *metioniny* około 80% rodników OH reaguje z aminokwasem w ten sposób pozostałe 20% poprzez oderwanie atomu wodoru z łańcucha bocznego w pozycji α do siarki tioeterowej (Hiller *i in.* 1981).

kationorodnik >S·⁺, który jest stabilizowany przez addycję do nieutlenionej grupy tioeterowej drugiej cząsteczki aminokwasu tworząc kationorodnik dimerowy z międzycząsteczkowym wiązaniem trójelektronowym ($\lambda_{max} = 480 - 500$ nm). Kationorodnik dimerowy jest dość stabilny (czas życia rzędu µs) i zanika poprzez deprotonację, dając rodniki α-(alkilotio)alkilowe ($\lambda_{max} \approx 285$ nm) (Gilbert *i in*. 1973, Hiller *i in*. 1979, 1981, Davies *i in*. 1983)¹⁵.

Z kolei, w miarę podwyższania pH, pH > pK_aCOOH rodnik hydroksysulfuranylowy może eliminować wodę w procesie wewnątrzcząsteczkowym z udziałem protonu z protonowanej grupy aminowej (Hiller *i in*. 1981, Asmus 1985, Mönig *i in*. 1985a). W konsekwencji, w przypadku metioniny następuje szybkie zamknięcie pięcioczłonowego pierścienia prowadzące do powstania kationorodnika z wewnątrzcząsteczkowym wiązaniem trójelektronowym S∴N, o charakterystycznej absorpcji λ_{max} = 390 nm [19].



Siłą napędową tego procesu jest stabilność wiązania S.:.N oraz powstawanie uprzywilejowanego przestrzennie pierścienia pięcioczłonowego. Indywiduum to zanika w rezultacie przeniesienia elektronu z grupy karboksylowej do azotu, prowadzącego do utlenienia grupy karboksylowej i dekarboksylacji (Asmus *i in*. 1985)[20].



Z kolei, siłą napędową procesu dekarboksylacji [20] jest powstawanie stabilizowanych rezonansowo, poprzez oddziaływanie z wolną parą elektronową azotu, rodników α-aminoalkilowych (Hiller *i in*. 1981, Hiller i Asmus 1983, Davies *i in*. 1983, Burkey *i in*. 1983).

¹⁵ W tym zakresie pH mechanizm utleniania aminokwasów tioeterowych jest identyczny z mechanizmem utleniania alifatycznych tioeterów przedstawionym w schemacie 1.

Według Asmusa i wsp. (Hiller *i in*. 1979, 1981) proces dekarboksylacji zachodzi efektywnie wtedy, gdy grupa karboksylowa aminokwasu jest deprotonowana, pH > pK_a(COOH). Pozwala to na przedstawienie drugiego, alternatywnego mechanizmu utleniania metioniny, zakładającego bezpośredni udział zjonizowanej grupy karboksylowej w dehydratacji rodnika hydroksysulfuranylowego. Postulowano zachodzącą na atomie siarki reakcję podstawienia anionu hydroksylowego (OH⁻) przez -COO⁻ (w procesie między lub wewnątrzcząsteczkowym) (Hiller *i in*. 1979, Davies *i in*. 1983) [21].



Bezpośrednią konsekwencją utlenienia grupy karboksylowej miałaby być bardzo szybka dekarboksylacja [22].



Mechanizm został jednak zakwestionowany, przez eksperymenty z *N*acetylometioniną dla której obserwuje się zmniejszenie o połowę, w stosunku do metioniny, wydajności chemoradiacyjnej dekarboksylacji a jedynym obserwowanym produktem jest dimer z międzycząsteczkowym wiązaniem trójelektronowym S.: S (Hiller *i in*. 1981, Gilbert 1990)¹⁶. Niższą wydajności dekarboksylacji w *N*acetylometioninie niż w metioninie można wyjaśnić w oparciu o mechanizm pierwszy [20] zakładający w etapie pośrednim utlenianie azotu grupy aminowej. Zgodnie tym mechanizmem zastąpienie jednego z wodorów grupy aminowej w metioninie przez elektronoakceptorową grupę acetylową powodujące obniżenie

¹⁶ Produkty utleniania metioniny, N-acetylometioniny i etioniny, w szkliwach LiCl i LiBr posiadające wiązania trójelektronowe, zostały scharakteryzowane metodą EPR. Dla wszystkich trzech aminokwasów stwierdzono powstawanie produktów z wiązaniem S \therefore S, a tylko dla metioniny produkty z wiązaniem S \therefore N (Champagne *i in*. 1991).

potencjału redox grupy aminowej zmniejszając wydajność utleniania azotu, a tym samym wydajność dekarboksylacji (Hiller *i in*. 1981)¹⁷.

Dodatkowym argumentem przemawiającym za zachodzeniem dekarboksylacji metioniny poprzez tworzenie wewnątrzcząsteczkowego wiązania S. N było otrzymanie indywiduum o prawie identycznym paśmie absorpcji ($\lambda_{max} \approx 400$ nm) na drodze redukcji *dehydrometioniny* przez elektron solwatowany [23] (Asmus *i in*. 1985).

$$\begin{array}{c} CH_{3} \\ S^{+} - NH \\ CO_{2}^{-} \end{array}^{+} e^{-}aq \end{array} \xrightarrow{CH_{3}} S \therefore NH \\ CO_{2}^{-} \end{array}$$

$$\begin{array}{c} CH_{3} \\ S \therefore NH \\ CO_{2}^{-} \end{array}$$

$$\begin{array}{c} CH_{3} \\ CO_{2}^{-} \end{array}$$

$$\begin{array}{c} CH_{3} \\ CO_{2}^{-} \end{array}$$

$$\begin{array}{c} CH_{3} \\ CO_{2}^{-} \end{array}$$

Produkt tej reakcji różni się od powstającego podczas utleniania metioniny tylko stopniem protonowania azotu.

Powstawanie wewnątrzcząsteczkowego wiązania S::O obserwowano dla usztywnionej pochodnej metioniny; kwasie exo-2-amino-endo-6-(metyltio)-bicyklo[2.2.1]heptano-endo-2-karboksylowym, w którym ograniczenia przestrzenne nie pozwalają na powstawanie wewnątrzcząsteczkowego wiązania S::N [24] (Steffen *i in*. 1991)¹⁸.



[24]

Odmienna zależność wydajności dekarboksylacji i intensywności pasma absorpcji $(\lambda_{max} = 340 \text{ nm})$ przypisanego temu indywiduum od pH wskazuje, że indywiduum z wewnątrzcząsteczkowym wiązaniem S.: O nie jest prekursorem dekarboksylacji. Jego powstawanie konkuruje z dekarboksylacją, która wg. Steffena i wsp. zachodzi jednocześnie z deprotonacją protonowanego rodnika hydroksy sulfuranylowego [25] (Steffen *i in*. 1991).

¹⁷ Ponadto, wprowadzenie elektronoakceptorowej grupy acetylowej, zmniejsza gęstość elektronową na azocie, co osłabia "siłę napędową" procesu dekarboksylacji poprzez zmniejszenie trwałości rodników α-aminoalkilowych (Hiller i Asmus., 1983).

¹⁸ Dla izomeru tego związku *endo*-amino/*exo*-karboksylo obserwowano absorpcję (λ_{max} = 400 nm) przypisana produktowi przejściowemu z wewnątrzcząsteczkowym wiązaniem trójelektronowym S∴N (Bonifaćić *i in.* 1991).

$$H_{3}C \xrightarrow{O}_{H} H$$

$$H_{3}C \xrightarrow{O}_{H} H$$

$$H_{3}C \xrightarrow{O}_{H} H$$

$$(B = zasada, n.p., H_{2}O)$$

[25]

Utlenianie *S-metylocysteiny* (aminokwasu, w którym długość łańcucha alifatycznego pomiędzy siarką tioeterową a grupami –COOH i –NH₂ jest mniejsza o jedną jednostkę –CH₂– w porównaniu do metioniny) w środowisku kwaśnym, pH < ~3 podobnie jak dla innych tioeterów, prowadzi do deprotonacji monomerycznego kationorodnika >S·⁺ (Davies *i in*. 1983). W tym zakresie pH dla stężeń aminokwasu rzędu 10⁻⁴ mol dm⁻³ nie obserwuje się powstawania kationorodnika dimerowego z międzycząsteczkowym wiązaniem S.: S (oczekiwane pasmo absorpcji, $\lambda_{max} \approx 500$ nm) a powstawanie indywiduum przejściowego o absorpcji $\lambda_{max} = 385$ nm (Asmus *i in*. 1985). Absorpcję $\lambda_{max} = 385$ nm przypisano produktowi z wewnątrz–cząsteczkowym wiązaniem S.: O ¹⁹. Indywiduum to jest w równowadze z kationo-rodnikiem dimerowym z międzycząsteczkowym wiązaniem trój-elektronowym S.: S [26], którego powstawanie (charakterystyczna absorpcja z $\lambda_{max} = 500$ nm) zaobserwowano zwiększając stężenie aminokwasu do 2*10⁻² mol dm⁻³ i obniżając pH do 0 (Asmus *i in*. 1985).



Z drugiej strony po podwyższeniu pH powyżej pK_a grupy karboksylowej (~ 3) powstająca deprotonowana forma produktu cyklicznego jest bardzo nietrwała i ulegała, zgodnie z ówczesnymi poglądami autorów, szybkiej dekarboksylacji (Hiller *i in.* 1981, Davies *i in.* 1983, Hiller i Asmus 1983, Asmus *i in.* 1985). Tylko niewielka część produktów dekarboksylacji *S-metylocysteiny*, rodników α-aminoalkilowych (około 4% w stosunku do *metioniny*), jest zdolna redukować słabe

¹⁹ Ze względów przestrzennych nie może to być produkt z wewnątrzcząsteczkowym wiązaniem S ∴N, gdyż oddziaływanie siarka - azot prowadzi do powstania niestabilnego pierścienia czteroczłonowego.

utleniacze takie jak *metylowy viologen* czy *p*-*nitroacetofenon* (Hiller *i in*. 1981, Hiller i Asmus 1983). Przyczynę tego zjawiska tłumaczono zachodzeniem fragmentacji monomerycznego kationorodnika $>S \cdot +$, której produkty rodnikowe (CH₃-S) zaobserwowano metodą EPR (*spin traping*) w pH > 9,2 (Davies *i in*. 1983). Mechanizm zaproponowany do wyjaśnienia tego procesu, zakłada atak nukleofilowy deprotonowanej grupy aminowej na węgiel β [27] (Davies *i in*. 1983).

$$CH_{3} \xrightarrow{\cdot} CH_{2} \xrightarrow{\cdot} CH_{2} \xrightarrow{\cdot} CH_{2} \xrightarrow{\cdot} CH_{3} \xrightarrow{\cdot} CH_{3} \xrightarrow{\cdot} CH_{3} \xrightarrow{\cdot} CH_{2} \xrightarrow{\cdot} CH_{$$

Mechanizm ten nie wyjaśnia jednak procesów fragmentacji w zakresie pH kiedy grupa aminowa jest protonowana²⁰.

2.3.2. Utlenianie prostych peptydów zawierających pojedyncze grupy tioeterowe²¹

Wydajność chemoradiacyjna przejściowych jak i końcowych produktów utleniania peptydów metionylowych rodnikiem OH zależy od liczby i położenia reszt metioninowych w cząsteczce peptydu (Bobrowski *i in*. 1991a).

Z danych przedstawionych przez Bobrowskiego i wsp. (Bobrowski *i in*. 1991a) wynika, że dekarboksylacja w dwupeptydach zawierających metioninę zachodzi tylko wtedy, gdy grupa tioeterowa i karboksylowa znajduje się w tej samej C-końcowej jednostce peptydu (tj. w peptydach typu X-Met, gdzie X = Gly, Ala,

²⁰ Podobnie nie wyjaśniono jak dotychczas przyczyny, dla której wydajność powstawania rodników α -(amino)alkilowych w *homometioninie* (aminokwasie, w którym długość łańcucha alifatycznego pomiędzy siarką tioeterową, a grupą aminową jest większa o jedną jednostkę metylenową w porównaniu z *metioniną*) jest o około jedną trzecią niższa niż w metioninie (Hiller *i in*.1981, Hiller i Asmus1983).

²¹ W peptydach zawierających dwie lub więcej reszt metioninowych mechanizm generowania i stabilizacji wiązań trójelektronowych oraz nieodwracalnej degradacji peptydów jest bardziej złożony niż w peptydach z pojedynczą resztą metioninową ze względu na powstawanie wewnątrzcząsteczkowych wiązań S.:.S. Istotne znaczenie mają tu kontrolowane równowagami kwasowo-zasadowymi procesy wewnątrzcząsteczkowej konwersji pomiędzy wiązaniami trójelektronowymi (Bobrowski i Holcman., 1986, 1989, Bobrowski, 1990, Holcman *i in.* 1991).

Val, Leu, Pro, Ser i Thr). Zaproponowany mechanizm dekarboksylacji zakłada wewnątrzcząsteczkowe przeniesienie elektronu od deprotonowanej grupy karboksylowej do monomerycznego utlenionego centrum siarkowego [28].²²



Proces ten konkuruje z drugim nieodwracalnym procesem tj. deprotonacją monomerycznego kationorodnika >S · ⁺ w pozycji α do siarki [29].

Zwiększeniu wydajności deprotonacji sprzyja obecność dwu ładunków dodatnich w cząsteczce peptydu, tj. protonowanej N-końcowej grupy aminowej i utlenionego centrum siarkowego, oddziaływujących na siebie siłami elektrostatycznego odpychania, co w konsekwencji prowadzi do destabilizacji kationorodnika $>S \cdot +$. Z kolei utrata protonu przez grupę aminową zwiększa stabilność $>S \cdot +$, powodując zwiększenie wydajności dekarboksylacji (obserwowane jest zwiększenie wydajności dekarboksylacji (bekarboksylacji (bekarboksylacji wydajności dekarboksylacji wydajności de

Na wydajność dekarboksylacji wpływają własności elektronodonorowe łańcucha bocznego N-końcowej reszty aminokwasowej, od których zależy wartość pK_a grupy aminowej. W dwupeptydach typu X-Met obserwuje się zmniejszenie wydajności dekarboksylacji wraz ze zwiększającą się zasadowością grupy aminowej reszty aminokwasowej X-²³ (Bobrowski *i in*. 1991a). Z kolei dla trójpeptydów, wpływ destabilizujących oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy dodatnio naładowanymi grupami funkcyjnymi jest mniejszy i w konsekwencji obserwuje się wyższe wydajności dekarboksylacji oraz stabilizacji kationorodnika >S·+ poprzez tworzenie kationorodnika dimerowego z międzycząsteczkowym wiązaniem S \therefore S.

²² Jest to mechanizm typu "pseudo-Kolbego" (Gassman i Fox 1967, Coleman i Eberson 1971, Eberson 1987).

²³ Wydajność dekarboksylacji w dwupeptydach typu X-Met zmniejsza się w następującym porządku Gły-Met > Ala-Met > Val-Met > Leu-Met > Pro-Met (Bobrowski *i in.* 1991a).

Zmiana sekwencji peptydu, prowadząca do rozdzielenia grup funkcyjnych tioeterowej i karboksylowej (w peptydach Met-Gly, Met-Glu, Met-Gly-Gly, Gly-Met-Gly) praktycznie hamuje dekarboksylację (Bobrowski *i in.* 1991a). W peptydach tego typu (Met-X) dominuje tworzenie kationorodników z wewnątrzcząsteczkowym wiązaniem S \therefore N [30].



Wysoką wydajność chemoradiacyjną CO_2 obserwuje się w γ -Glu-Met, w której obydwie grupy karboksylowe mogą uczestniczyć w dekarboksylacji, a o kierunku reakcji decyduje stabilność odpowiedniego prekursora – >S·-OH (31a) lub >S·+ (31b) (Bobrowski 1990, Bobrowski *i in*. 1991a). Dekarboksylacja na N-końcu peptydu zachodzi prawdopodobnie poprzez powstający pierwotnie rodnik hydroksysulfuranylowy >S·-OH, który eliminuje wodę z udziałem protonu z protonowanej grupy aminowej w procesie wewnątrzcząsteczkowym. Natomiast dekarboksylacja na C-końcu, zachodzi w wyniku przeniesienia elektronu z C-końcowej grupy karboksylowej do kationorodnika >S·+ w procesie identycznym jak w innych peptydach typu X-Met [28], [31].



N-końcowa dekarboksylacja

C-końcowa dekarboksylacja

W przeciwieństwie do γ -Glu-Met, w S-alkilowych pochodnych glutationu nie ma możliwości wewnątrzcząsteczkowego przeniesienia elektronu z C-końcowej grupy karboksylowej do >S·⁺ ponieważ grupa tioeterowa i karboksylowa nie znajdują się w tej samej jednostce aminokwasowej. Manifestuje się to znacznym zmniejszeniem wydajności chemoradiacyjnej dekarboksylacji (w stosunku do γ -Glu-Met), która zachodzi tylko na N-końcu peptydu w procesie takim jak w γ -Glu-Met [32a] (Bobrowski 1990, Bobrowski *i in*. 1991b)



C-końcowa dekarboksylacja

Obserwowane zmniejszenie wydajności dekarboksylacji w S-alkilowych pochodnych glutationu wraz ze wzrostem efektu indukcyjnego podstawnika R, tłumaczy się zwiększeniem gęstości elektronowej na siarce, co sprzyja rezonansowej stabilizacji protonowanego rodnika hydroksysulfuranylowego $(>S.:OH_2)^+$ (rozpad tego rodnika prowadzi do kationorodnika >S.+ a w konsekwencji do deprotonacji) (Bobrowski 1990, Bobrowski *i in*. 1991b).

W dwupeptydach metioninowych zawierających N-końcowe hydroksyaminokwasy (Ser i Thr), utlenianie rodnikiem OH poza C-końcową dekarboksylacją prowadzi do N-końcowej fragmentacji z wydzieleniem odpowiedniego aldehydu [33].



Produktem pośrednim w tym ostatnim procesie jest ośmioczłonowy kationorodnik cykliczny z wewnątrzcząsteczkowym wiązaniem S \therefore N ($\lambda_{max} = 385 \text{ nm}$)²⁴ (Schöneich *i in*. 1994).

32

²⁴ Mechanizm ten był jak dotąd sprawdzony dla modelowych dwupeptydów ale wg. autorów może on działać w większych petydach lub białkach, które zawierają Ser lub Thr na N-końcu i są dostatecznie giętkie aby umożliwić kontakt tych jednostek aminokwasowych z Met.

Na podstawie tej obserwacji należy także oczekiwać, że podobne kationorodniki cykliczne, odpowiednio dziewięcio i dziesięcio członowe, mogą powstawać podczas N-końcowej dekarboksylacji w γ-Glu-Met i S-alkiloglutationach.

2.3.3. Procesy nieodwracalne deprotonacja: dekarboksylacja i β -fragmentacja, i ich produkty rodnikowe

Utlenianie związków zawierających grupę tioeterową prowadzi do nieodwracalnych procesów deprotonacji i fragmentacji²⁵, których produktami rodnikowymi są rodniki α -(alkilotio)alkilowe (α S) ($\lambda_{max} \approx 285$ nm) i α aminoalkilowe (α N) ($\lambda_{max} < 260$ nm). Względna trwałość tych rodników, wynikająca ze stabilizujących oddziaływań rezonansowych niesparowanego elektronu, stanowi "siłę napędową" w/w procesów. Boczne nakładanie się częściowo zapełnionego orbitalu typu *p* węgla α , z zapełnionym orbitalem sp³ heteroatomu (π -koniugacja)²⁶ zostało potwierdzone metodą EPR, której rezultaty wskazują na znaczącą delokalizację niesparowanego spinu (Symons 1973, 1987, Gilbert *i in.* 1973, Davies *i in.* 1983)

Pomiary spektrometrii masowej oraz obliczenia *ab initio* wykonane dla prostych tioeterów i amin alifatycznych w stanie gazowym dowiodły, że energia stabilizacji $(E_s)^{27}$ wynikającej z tego rodzaju oddziaływań dla rodników α S zwykle nie przekracza 10 – 12 kcal mol⁻¹ (40 – 50 kJ mol⁻¹) (Clark 1990), natomiast dla rodników α N, E_s jest prawie dwukrotnie większa, rzędu 14 – 20 kcal mol⁻¹ (60 – 80 kJ mol⁻¹) (Griller i Lossing 1981, Burkey *i in*. 1983, Fossey *i in*. 1995). Z tego powodu procesy prowadzące do powstawania rodników α -aminoalkilowych są korzystniejsze termodynamicznie od tych, które prowadzą do rodników α -(alkilotio)alkilowych.

Rodniki α -aminoalkilowe są silniejszymi reduktorami od α -(alkilotio) alkilowych ponieważ, podobnie jak rodniki, odpowiednie karbokationy typu α N są lepiej stabilizowane rezonansowo niż karbokationy typu α S (zmierzone wartości energii jonizacji rodników α N są z reguły niższe od 6 eV (Griller i Lossing 1981, Burkey *i in*. 1983) a rodników α S wynoszą około 7 eV (Kuhns *i in*. 1994)).

Różnica w potencjałach redoks pomiędzy rodnikami αN i αS pozwala na ich rozróżnienie w reakcjach ze słabymi utleniaczami takimi jak np. p-nitroacetofenon

²⁵ Dekarboksylacji w przypadku kwasów i aminokwasów tioalkilowych, peptydów metioninowych oraz β -fragmentacji w przypadku tioeterów hydroksy alkilowych i peptydów metioninowych zawierających N-końcowe hydroksyaminokwasy (*vide supra*).

²⁶ π -*koniugację* można również opisać jako wytworzenie dodatkowego, trójelektronowego wiązania $2\sigma/1\sigma^*$ pomiędzy węglem i heteroatomem (Griller i Lossing., 1981).

²⁷ Energia stabilizacji rodnika R· jest z definicji różnicą pomiędzy energią dysocjacji wiązania C-H w metanie, traktowanym jako odniesienie, a energią dysocjacji wiązania R-H (Fossey *i in.* 1995).

(PNAP), czy metylowy viologen (MV), które mogą być redukowane przez rodniki α -aminoalkilowe²⁸. Reaktywność rodników α -aminoalkilowych pochodzących z dekarboksylacji aminokwasów jest na tyle duża, że jak dotychczas, metodą EPR rejestrowano je jedynie z zastosowaniem tzw. pułapek spinowych (*spin traping*) (Davies *i in*. 1983), natomiast bezpośrednie zarejestrowanie widm EPR rodników α -(alkilotio)alkilowych nie przedstawia większych trudności (Gilbert *i in*. 1973, Davies *i in*. 1983).

2.4. Podsumowanie aktualnego stanu badań procesów rodnikowych w aminokwasach i peptydach zawierających grupę tioeterową

Opierając się na przedstawionym powyżej przeglądzie literaturowym, dotyczacym w szczególności procesów rodnikowych zachodzacych w aminokwasach i peptydach siarkowych zawierających grupę tioeterową indukowanych rodnikami wodorotlenkowymi, można stwierdzić, że nie ma systematycznego i ilościowego przedstawienia i wyjaśnienia mechanizmu utleniania tej grupy związków. Opublikowane prace dotyczą głównie metioniny i ograniczają się do analizy niektórych indywiduów przejściowych (głównie w skali czasowej mikrosekundowej i dłuższej) oraz w nielicznych przypadkach do analizy produktu końcowego, dwutlenku węgla. Pomimo faktu, że właściwie w pełni jest poznany mechanizm utleniania rodnikami wodorotlenkowymi prostych alkilowych tioeterów, to nie wyjaśnia on większości obserwacji procesów rodnikowych w związkach zawierających poza grupą tioeterową inne grupy funkcyjne. Z przeglądu literaturowego wynika jednoznacznie, że obecność grup funkcyjnych wpływa w zasadniczy sposób na kierunek reakcji rodnikowych. W tym kontekście, szczególnie ważne i interesujące jest wyjaśnienie, w jakim stopniu istotna jest rola w tych procesach sasiadujących grup funkcyjnych (tj. grupy aminowej i karboksylowej) na charakter tworzących się indywiduów przejściowych i produktów trwałych, a co za tym idzie na kierunek przemian rodnikowych w aminokwasach i peptydach zawierających grupę tioeterową. Ważną rolę w tych procesach powinien odgrywać rodnik hydroksysulfuranylowy, którego rolę w procesach utleniania aminokwasów i

²⁸ Obliczone potencjały redoks dla rodników α -aminoalkilowych pochodzących od prostych amin znajdują się w przedziale od -1,9 do -1.4 V (Armstrong *i in.* 1993), natomiast potencjały redoks stosowanych do identyfikacji utleniaczy wynoszą opowiednio: E°(PNAP/PNAP⁻)=-0,35 V; E°(MV²⁺/MV⁺) = -0,45 V (Wardman 1989).

peptydów do tej pory prawie całkowicie pomijano. Sprzeczne są doniesienia co do roli w procesie dekarboksylacji indywiduów z wewnatrzczasteczkowymi wiazaniami trójelektronowymi pomiędzy siarką i tlenem oraz siarką i azotem. Całkowitego mechanizm utleniania aminokwasów wyjaśnienia wymaga siarkowych zawierających grupę tioeterową w pozycji β do wegla C_a. Proces ten prowadzi wprawdzie do dekarboksylacji cząsteczki, ale do chwili obecnej nie został jednoznacznie udowodniony udział grupy aminowej W tym procesie. Nierozwiązanym problemem jest mechanizm reakcji rodnikowych w którym uczestniczą powstające w procesie dekarboksylacji tej grupy aminokwasów rodniki α -aminoalkilowe. Interesującym zagadnieniem z punktu widzenia mechanizmu utleniania rodnikami wodorotlenkowymi aminokwasów i peptydów z grupa tioeterową (które do tej pory nie zostało nigdy podjęte) jest obecność w cząsteczce dwóch potencjalnie dostępnych miejsc dla addycji rodnika wodorotlenkowego tj. grupy tioeterowej oraz deprotonowanej grupy aminowej, wzajemne ułożenie w przestrzeni i różna liczba grup funkcyjnych (aminowej i karboksylowej) w stosunku do grupy tioeterowej oraz zmiana swobody konformacyjnej czasteczki wymuszona cyklizacja łańcucha bocznego albo zawada steryczną.

Przechodząc z kolei do układów bardziej złożonych, a mianowicie peptydów zawierających grupę tioeterową, kluczową sprawą jest wyjaśnienie na ile opracowane mechanizmy wyjaśniające procesy rodnikowe zachodzące w pojedynczych aminokwasach mogą wyjaśnić procesy rodnikowe zachodzące w tej klasie związków. Pierwsze nieliczne eksperymenty związane z tym zagadnieniem zostały podjęte dopiero w ostatnich kilku latach. Wiąże się to z określeniem na ile i czy zmieni się mechanizm reakcji rodnikowych gdy grupa tioeterowa jest oddzielona od końcowych grup funkcyjnych (aminowej i karboksylowej) wiązaniem peptydowym, oraz jaka jest rola wiązania peptydowego w tworzeniu indywiduów przejściowych.

Zasygnalizowane powyżej niektóre problemy związane z utlenianiem aminokwasów i peptydów z grupą tioeterową rodnikiem wodorotlenkowym oraz sugerowane w literaturze znaczenie tych procesów w układach biologicznych skłoniły mnie do podjęcia próby choć częściowego ich wyjaśnienia.