

氮氧自由基研究

XX. 哌啶氧铵溴化物与半胱氨酸于酸性水溶液中的反应和机理

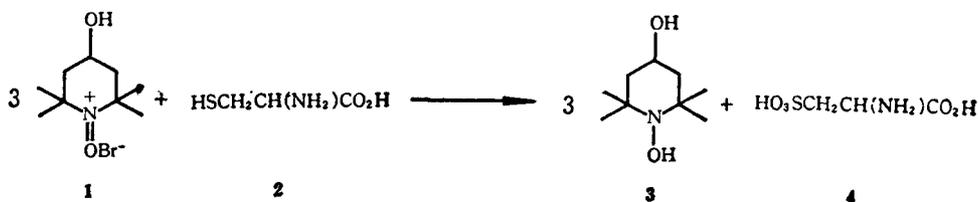
刘有成* 张发

(兰州大学化学系, 兰州)

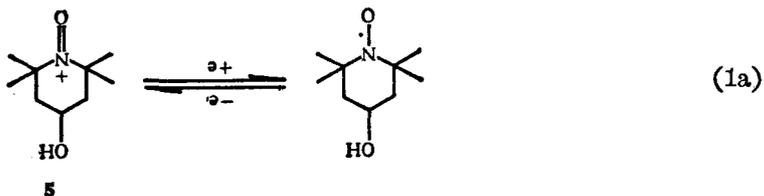
氧铵盐是氮氧自由基失去单电子后生成的高价化合物, 其氧化性较氮氧自由基强。据报道^[1], 氧铵盐可氧化醇成醛或酮, 相应氮氧自由基无此特性。Stier等^[2]指出, 氮氧自由基可作为反应中间体存在于生物细胞的某些酶作用过程。Yamaguchi等^[3]发现, 氮氧自由基可被 H_2O_2/Fe^{2+} /氨基酸或 H_2O_2 /血红蛋白体系氧化为氧铵盐。鉴于 Fe^{2+} , $\cdot OH$ 以及氨基酸存在于生物体内, 因此研究氧铵盐与生物分子间的反应是有一定意义的。本文从反应产物, 化学反应计量关系, 电化学模拟和动力学测定诸方面对氧铵盐 **1** 与 *dl*-半胱氨酸(**2**)于盐酸水溶液中的反应作了研究。

结果与讨论

反应产物及化学计量关系 在室温、避光、绝氧条件下, **1** 和 **2** 在 HCl 水溶液中反应, TLC 和柱色谱分离鉴定表明, 反应产物仅为哌啶羟胺(**3**)和磺基丙氨酸(**4**)。定量薄层扫描表明, 反应的计量关系为:



半胱氨酸对氮氧自由基单电子氧化循环伏安(CV)特性的影响 CV法研究指出^[4], 在 pH 1.8 水溶液中, 哌啶氮氧自由基(**5**)能发生可逆单电子氧化电极反应, 氧化产物为氧铵正离子:



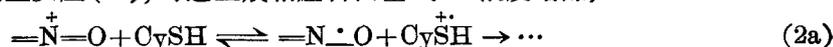
本文进一步考察了 **2** 对反应(1a)的影响。图 1 给出在不同 **2** 浓度下 **5** 的 CV 曲线, 阴极峰随 **2** 的浓度增加而逐渐消失, 同时阳极峰电位 E_{pa} 不断降低(表 1)。表 1 还给出, **2** 浓度为定值时, E_{pa} 随 **5** 浓度的增大而增加。 **2** 不存在时, E_{pa} 与 **5** 的浓度无关。这可能是由于电极氧化

表1 E_{pa} 与 **2**, **5** 浓度的关系

$[5]/10^{-1} \text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$	2.5				
$[2]/10^{-1} \text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$	0	0.38	0.76	1.5	3.0
E_{pa}/V	0.615	0.608	0.575	0.558	0.555
$[2]/10^{-1} \text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$	3.8				
$[5]/10^{-1} \text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$	2.0	4.0	9.7	12	14
E_{pa}/V	0.550	0.556	0.560	0.570	0.585

扫速: $\pm 2 \text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

产物氧铵正离子与 **2** 发生反应(2a), 可逆生成相应自由基 **5**. **2** 浓度增加,



反应速率增加, 电极上氧铵正离子的量减小, 阴极峰降低, 平衡(1a)右移, 有利于 **5** 失去电子, E_{pa} 降低. 另一方面, **2** 浓度固定时, **5** 浓度增加, 反应(2a)受到抑制, 平衡(2a)右移程度减小, E_{pa} 增加. 由于反应(2a)生成的氮氧自由基系氧铵正离子的单电子还原产物, 故认为 **2** 可能失去单电子被氧化为相应的正离子自由基 $\text{Cy}\overset{+}{\text{S}}\text{H}$, 在水溶液中后者会进一步反应.

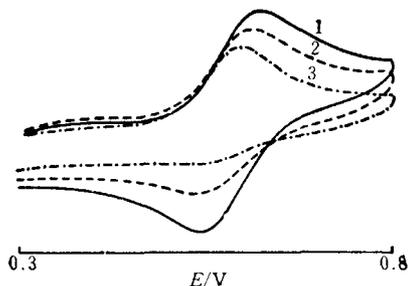


图1 不同 **2** 的浓度下 **5** 的 CV 曲线
 $[5]=2.5 \times 10^{-1} \text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $[2]=0$ (1),
 3.8×10^{-2} (2), 7.6×10^{-2} (3) $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$.
 扫速: $\pm 10 \text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$

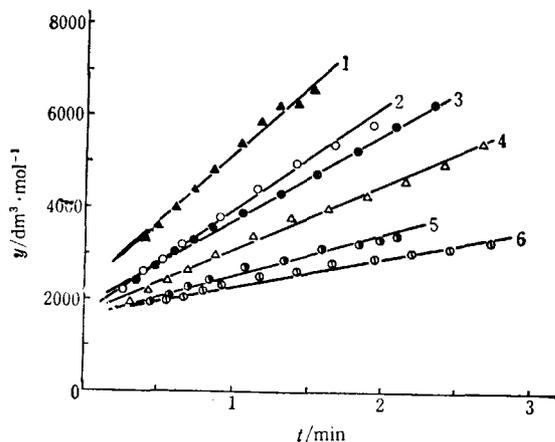


图2 **1** 和 **2** 于不同酸性条件下的反应动力学
 $[1]_0=2.5 \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $[2]_0=1.2 \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $[\text{H}^+]=3.19$ (1),
 3.75 (2), 4.02 (3), 4.35 (4), 4.71 (5), 5.14 (6) $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$

值得指出的是, 反应(2a)生成的氮氧自由基如果不参与其它反应, 则反应(1a), (2a)为一电极催化过程, 阳、阴极峰电流之比 i_{pa}/i_{pc} 应接近 1, 不随反应(2a)速率增加而变化^[5], 与图 1 结果不符. 这表明氮氧自由基可能参与了 $\text{Cy}\overset{+}{\text{S}}\text{H}$ 的进一步反应. 如果该电极过程还存在类似于反应(2a)的平行反应, 上述解释也是合理的(见机理讨论).

该电极反应与 EO 反应(electrochemical reaction followed by a chemical reaction)类似, 由 Shain 等^[6]的理论研究可知, 对于涉及电极氧化反应的 EC 过程, 后继化学反应的速率增加, E_{pa} 降低, i_{pa}/i_{pc} 增加, 与本文表 1, 图 1 结果一致.

流动-停止 UV 光谱法动力学研究 **1** 和 **2** 的反应速率较快, 用常规方法跟踪反应较困难, 加之体系中仅 **1** 于 480 nm 处有光吸收. 本文用流动-停止 UV 光谱法测量 **1** 的吸光度随时间的变化, 考察了反应的动力学行为.

据前述化学计量关系,假定反应对于 **1**, **2** 均为一级动力学,可求得:

$$y = -\frac{3}{3[2]_0 - [1]_0} \ln \frac{A}{(A_0/[1]_0)(3[2]_0 - [1]_0) + A} = kt + c$$

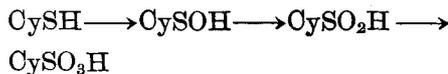
其中, $[1]_0$, $[2]_0$ 表示 **1**, **2** 的起始浓度; A 为体系于 480 nm 处的吸光度; A_0 为起始吸光度; t , k 分别为反应时间和反应表观速率常数; c 为常数. 实验表明, A 与 **1** 的浓度关系符合 Beer 定律.

图 2 给出 **1** 与 **2** 在不同 HCl 水溶液中反应时的 $y-t$ 关系. $y-t$ 线性关系良好(相关系数 >0.99), 表明前述动力学假定是合理的. 由直线斜率求得 HCl 浓度为 3.19, 3.75, 4.02, 4.35, 4.71, 5.14 mol·dm⁻³ 时的 k 值分别为 3.1×10^3 , 2.4×10^3 , 2.0×10^3 , 1.4×10^3 , 0.86×10^3 , 0.61×10^3 dm³ mol⁻¹·min⁻¹. k 与 HCl 浓度成线性关系, 斜率为负值, 截距为 7.3×10^3 .

图 3 给出 $[1]_0$ 为 2.5 mmol·dm⁻³, HCl 浓度为 5.14 mol·dm⁻³, 不同 $[2]_0$ 条件下 **1** 与 **2** 反应的 $y-t$ 线性关系良好, $[2]_0$ 为 0.65, 1.22, 2.47, 4.97 mmol·dm⁻³ 时, k 值分别为 0.66×10^3 , 0.61×10^3 , 0.65×10^3 , 0.61×10^3 dm³·mol⁻¹·min⁻¹. $y-t$ 的线性关系和 k 均不随 $[2]_0$ 的改变而变化, 进一步表明前述动力学假定是合理的.

我们还用快速流动法对该反应进行了 ESR 测量, 未观察到任何自由基信号.

反应机理 Gilbert 认为^[7], 金属离子 Ce(IV) 将半胱氨酸氧化为磺酸的机理是半胱氨酸的巯基经次磺酸, 亚磺酸逐级氧化至磺酸:



反应经历巯基自由基中间体 $\text{CyS}\cdot$. Kertesz^[8] 指出, $\text{CyS}\cdot$ 二聚为胱氨酸的速率非常快 (10^9 dm³·mol⁻¹·s⁻¹).

本文实验表明, **1** 和 **2** 反应的产物中无胱氨酸. 在图 2 曲线 6 的条件下, **1** 和 **2** 反应 2 min, **1** 的转化率达 65% 以上. 在相同的 HCl 浓度下, **1** (2.5 mmol·dm⁻³) 和胱氨酸 (1.25 mmol·dm⁻³) 反应 2 min, **1** 的转化率小于 5%, 可以认为, **2** 的氧化不是经胱氨酸中间体所致, 反应不涉及 $\text{CyS}\cdot$ 中间体.

我们认为 **1** 和 **2** 的反应机理可能为:

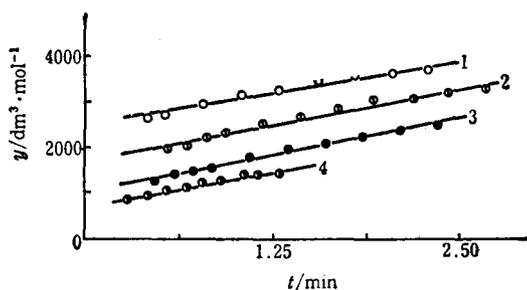
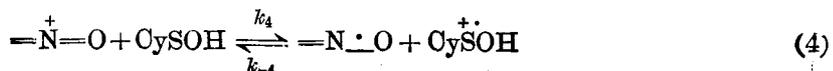
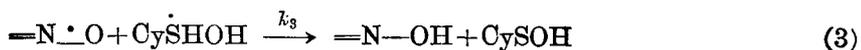
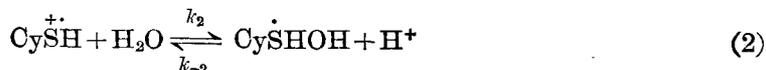
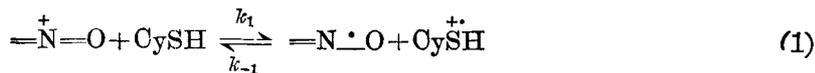
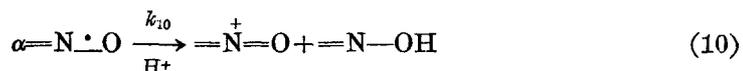
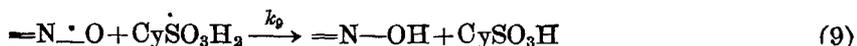
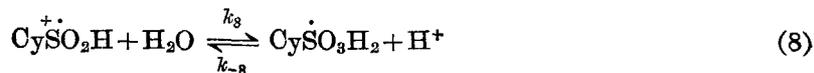
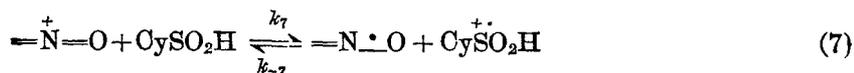
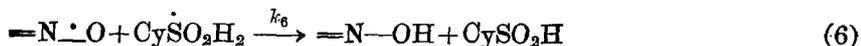
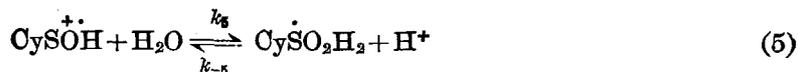


图 3 不同 $[2]_0$ 条件下 **1** 和 **2** 反应的动力学
 $[1]_0 = 2.5$ mmol·dm⁻³; $[\text{HCl}] = 5.14$ mol·dm⁻³;
 $[2]_0 = 0.65$ (1), 1.22 (2), 2.47 (3), 4.97 (4)
 mmol·dm⁻³



半胱氨酸经次磺酸, 亚磺酸逐级氧化至磺酸, 与 Gilbert^[7] 的假定一致, 反应(1), (4), (7) 为 **1** 的单电子转移可逆反应, 由本文 CV 结果得到佐证。反应(2), (5), (8) 为各自由基正离子与介质水的反应, 可逆生成中性自由基和质子, 与 Evans 等^[9] 关于硫蕙自由基正离子 Th^+ 与水反应生成中性自由基 $\text{Th}-\text{OH}$ 和质子的研究结果相近。反应(3), (6), (9) 为氮氧自由基与以硫为中心的中性自由基间的氢转移反应, 氮氧自由基可夺氢被还原是其已知性质之一^[10]。本文 CV 结果表明, 氮氧自由基进一步参与 $\text{Cy}\overset{\cdot\cdot}{\text{S}}\text{H}$ 的反应过程, 与此机理假定一致。反应(10)为氮氧自由基在强酸性条件下的自歧化反应。我们^[4] 曾以 ESR 动力学方法对此进行过研究, 速率 $k_{10} = 0.17 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-3} \cdot \text{min}^{-1}$, 反应对于酸和氮氧自由基均为二级动力学。与 **1** 和 **2** 的反应相比, 反应(10)较慢。快速流动 ESR 测量也未观察到氮氧自由基的信号, 说明 **1** 和 **2** 反应生成的氮氧自由基消失很快, 其浓度低于检测限量, 故认为氮氧自由基不是完全按照反应(10)方式衰解, 可能主要通过反应(3), (6), (9) 消耗。动力学处理时可以将反应(10)忽略。

由前述机理假定, 应用质量作用定律和稳态假定得:

$$d[\text{=}\overset{+}{\text{N}}=\text{O}]/dt = -3(k_1[\text{=}\overset{+}{\text{N}}=\text{O}][\text{Cy}\overset{\cdot\cdot}{\text{S}}\text{H}] - k_{-1}[\text{=N}\overset{\cdot\cdot}{\text{O}}][\text{Cy}\overset{\cdot\cdot}{\text{S}}\text{H}]) \quad (11)$$

$$\begin{aligned} [\text{=N}\overset{\cdot\cdot}{\text{O}}][\text{Cy}\overset{\cdot\cdot}{\text{S}}\text{H}] &= (k_{-2}[\text{H}^+] + k_3[\text{=N}\overset{\cdot\cdot}{\text{O}}])(k_1[\text{=}\overset{+}{\text{N}}=\text{O}][\text{Cy}\overset{\cdot\cdot}{\text{S}}\text{H}] \\ &\quad - k_{-1}[\text{=N}\overset{\cdot\cdot}{\text{O}}][\text{Cy}\overset{\cdot\cdot}{\text{S}}\text{H}]) / k_2 k_3 \end{aligned} \quad (12)$$

由于 $[\text{=N}\overset{\cdot\cdot}{\text{O}}]$ 和 $[\text{Cy}\overset{\cdot\cdot}{\text{S}}\text{H}]$ 均非常小, 式(12)可近似为:

$$\begin{aligned} [\text{=N}\overset{\cdot\cdot}{\text{O}}][\text{Cy}\overset{\cdot\cdot}{\text{S}}\text{H}] &\cong k_{-2}[\text{H}^+] \cdot k_1[\text{=}\overset{+}{\text{N}}=\text{O}][\text{Cy}\overset{\cdot\cdot}{\text{S}}\text{H}] / k_2 k_3 \\ &= (k_{-2} k_1 / k_2 k_3) [\text{H}^+] [\text{=}\overset{+}{\text{N}}=\text{O}][\text{Cy}\overset{\cdot\cdot}{\text{S}}\text{H}] \end{aligned}$$

将该式代入式(11):

$$\begin{aligned} d[\text{=}\overset{+}{\text{N}}=\text{O}]/dt &= -3\{k_1 - (k_1 k_{-1} k_{-2} / k_2 k_3) [\text{H}^+]\} [\text{=}\overset{+}{\text{N}}=\text{O}][\text{Cy}\overset{\cdot\cdot}{\text{S}}\text{H}] \\ &= -k [\text{=}\overset{+}{\text{N}}=\text{O}][\text{Cy}\overset{\cdot\cdot}{\text{S}}\text{H}] \end{aligned}$$

反应对于 **1**, **2** 均为一级动力学, 与图 2, 3 结果一致。 $k = 3k_1 - (3k_1 k_{-1} k_{-2} / k_2 k_3) [\text{H}^+]$, 为反应表观速率常数, k 与 $[\text{H}^+]$ 成线性关系, 斜率为负值, 与本文结果吻合, 表明本文提出的反

应机理是合理的。由作图截距求得 $k_1 = 2.4 \times 10^8 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

实 验

仪器和试剂 日本岛津 CS-910 薄层色谱扫描仪; 西德 Bruker ESR-200D 电子自旋共振波谱仪; 美国 EG&G PARC 370 电化学分析系统; 日本岛津 UV-240 紫外可见分光光度计。自由基 **5** 按前报^[11]方法合成; 哌啶氧铵溴化物 **1** 按文献[12]法合成; *dl*-半胱氨酸和 *dl*-胱氨酸系商品, 未作进一步提纯。

实验方法

反应产物的分离与鉴定

(a) **1** 和 **2** 起始浓度分别为 2.61×10^{-2} , $2.96 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 的 $3.75 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ HCl 水溶液, 静置反应数小时, 经 TLC 分离, 标样对照, 证明产物只有哌啶羟胺(**3**)和磺基丙氨酸(**4**)。TLC 层析条件为: 高效硅胶 TLC(青岛海洋化工分厂), 以 4:1:2.5 正丁醇-乙酸-水(体积比)为展开剂, R_f 值: 0.48(**2**), 0.69(**3**), 0.17(**4**); 硅胶 60TLC(西德 Merck), 以 4:1:2 正丁醇-乙酸-水(体积比)为展开剂, R_f 值: 0.31(**2**), 0.66(**3**), 0.13(**4**)。用碘蒸气和茚三酮显色。

(b) 0.6g **1** 和 0.2g **2** 于 10 mL $3.75 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ HCl 水溶液中反应数小时, 浓缩反应液, 用乙腈洗去未反应的 **1**, 残余固体以硅胶色谱柱分离, 依次用乙腈, 水洗脱, 得二白色固体, 鉴定为 **3** 和 **4**。

OV 特性曲线 工作电极 Pt, 参比电极 SCE, 辅助电极 Pt, 待测溶液以氩气除氧后记录 OV 曲线。

流动-停止 UV 光谱法 室温 21°C, 氩气除氧, 使 **1**, **2** 的 HCl 水溶液分别快速流动 ($2 \times 0.75 \text{ mL} \cdot \text{s}^{-1}$) 至比色皿中混合反应, 当体系于波长 480 nm 的吸光度达稳态后, 停止流动, 记录吸光度随时间的衰减曲线。用同样方法考察 **1** 与胱氨酸的反应。

参 考 文 献

- [1] Голубев, В. А.; Розанцев, З. Г.; Нейман, И. Б., *Изв. АН СССР, Сер. хим.*, **1965**, 1927.
- [2] Stier, A.; Clauss, R.; Lücke, A.; Reitz, I., *Xenobiotica*, **1980**, 10, 661.
- [3] (a) Yamaguchi, T.; Nakano, T.; Kimoto, E., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1984**, 120, 534.
(b) Yamaguchi, T.; Nagaloshi, A.; Kimoto, E., *FEBS Lett.*, **1985**, 192, 259.
- [4] 刘有成, 张发, 江致勤. 化学学报, **1987**, 45, 477.
- [5] Anson, F. 讲授, 黄慰曾等编译, 高小霞, 杨文治校, “电化学和电分析化学”, 北京大学出版社, 北京, **1983**, p. 27.
- [6] Nicholson, R. S.; Shain, I., *Anal. Chem.*, **1964**, 36, 707.
- [7] Gilbert, B. C.; Laue, H. A. H.; Norman, R. O. C.; Sealy, R. C., *J. Chem. Soc., Perkin II*, **1975**, 892.
- [8] Kertesz, J. C.; Wolf, M. B.; Wolf, W.; Chen, L. A., *J. Pharm. Sci.*, **1974**, 63, 880.
- [9] Evans, J. F.; Blount, H. N., *J. Org. Chem.*, **1977**, 42, 976.
- [10] Васерман, А. М.; Бучаченко, А. Л., *Изв. АН СССР, Сер. хим.*, **1967**, 1947.
- [11] 刘有成, 江致勤, 高等学校化学学报, **1980**, 1(1), 71.
- [12] Жданов, Р. И.; Голубев, В. А.; Розанцев, З. Г., *Изв. АН СССР, Сер. хим.*, **1970**, 186.

Studies on Nitroxides

XX. A Mechanistic Study on Reaction between 2, 2, 6, 6-Tetramethyl-4-hydroxypiperidine Oxoammonium Bromide and Cysteine in Acidic Aqueous Medium

Liu You-Cheng* Zhang Fa

(Department of Chemistry, Lanzhou University, Lanzhou)

Abstract

The products of the reaction between 2, 2, 6, 6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine oxoammonium bromide (**1**) and *dl*-cysteine (**2**) in aqueous HCl solution have been identified as the corresponding hydroxylamine and cysteic acid. The stoichiometry of the reaction was determined by TLC scan method to be 3:1. According to the cyclic voltammetric study, one-electron transfer process is assumed to be involved in the reaction. The flow-stop UV kinetic experiments showed that the reaction was first order to both **1** and **2**, the reaction rate decreased with the increase of the acidity of the medium. A mechanism for the reaction is proposed.