醛肟类神经性毒剂防治药物的新型解毒分子作用机制

任福荣^{1,2}, 肖璇^{1,2}, 谢琳娜^{1,2}, 徐丹^{1,2}, 邵杰^{1,2}, 黄春华^{1,2*}, 朱本占^{1,2*}

1. 中国科学院生态环境研究中心, 环境化学与生态毒理学国家重点实验室, 北京 100085

2. 中国科学院大学, 北京 100049

*通讯作者, E-mail: bjsyhch@126.com; bzhu@rcees.ac.cn

收稿日期: 2018-04-07; 接受日期: 2018-08-08; 网络版发表日期: 2018-09-21

中国科学院战略性先导科技专项(B类) (编号: XDB01020300)和国家自然科学基金(编号: 21577149, 21477139, 21621064, 21777180)资助项目

摘要 吡啶盐醛肟类药物是一类常见的有机磷类神经性毒剂和农药的解毒剂。卤代苯肟是一类致癌性的活性中间体, 最近在饮用水消毒副产物中也被检出。我们发现, 2-吡啶盐醛肟类代表性药物如解磷定可快速促进四氯-1,4-苯肟通过连续两步的脱氯水解反应转化为2,5-二氯-3,6-二羟基-1,4-苯肟, 比其自然水解的速率提高了18万倍。然而, 当解磷定中的氮羟基被掩蔽后则不能促进四氯-1,4-苯肟水解。通过联合运用多种分离和分析鉴定方法发现, 解磷定最终转化为其相应的腈类化合物。采用¹⁸O-H₂O标记等实验, 最终确定2-吡啶盐醛肟类药物对四卤苯肟类致癌物的解毒机理是通过亲核取代同时伴随两次Beckmann裂解反应。本文介绍了这类可在正常生理条件下发生的连续两步Beckmann裂解反应, 以期对将来研究这两类具有重要生物学和环境学意义的醛肟类药物及多卤代腈类环境致癌物具有指导作用。

关键词 Beckmann裂解反应, 吡啶盐醛肟, 神经性毒剂防治药物, 四氯-1,4-苯肟, 解毒机理

1 引言

有机磷(OP)农药和神经毒剂是经典的胆碱酯酶抑制剂, 会造成乙酰胆碱累积从而导致类胆碱综合征。严重时会导致呼吸衰竭从而中毒致死。常见的治疗有机磷中毒的药物包括: 阿托品(Atropine, 抗毒蕈碱药物)、安定(Diazepam)和作为有机磷乙酰胆碱酯酶(AChE)活化剂的四级N-烷基吡啶盐醛肟类药物, 即吡啶盐醛肟类药物^[1~13]。

1951年, Wilson报道了羟胺可恢复OP抑制的

AChE活性, 即在使用1.2 M NH₂OH处理1 h之后, 50% AChE的活性基本恢复^[2]。进一步研究发现, AChE的活性中心存在阴离子位点(该位点在磷酸化之后仍然保持完好), 因此他们考虑可以设计一种用于OP解毒的定点的肟类解毒剂, 即碘化N-甲基-2-吡啶醛肟(2-PAM)。基于这样的结构, 基团肟可以增强分子的亲核性(α -亲核试剂), 而四级氮则使该分子可以与AChE的阴离子部位很好地结合, 同时使阴离子正好朝向磷原子, 这种合适的分子构造使得2-PAM对AChE的活化十分高效, 因此之后被广泛用作解毒剂。在20世纪50年

引用格式: Ren FR, Xiao X, Xie LN, Xu D, Shao J, Huang CH, Zhu BZ. A new detoxification mechanism for aldoxime therapeutic antidotes for chemical warfare nerve-agents. *Sci Sin Chim*, 2018, 48, doi: 10.1360/N032018-00084

代, Wilson及其同事的这项先驱性工作对于此后50年间超过1000种肟类活化剂的合成和评估无疑具有奠基性意义, 促使众多研究者致力于该类物质的研究. 2-PAM和几种双四级吡啶醛肟(图1)在某些国家已用于临床治疗. 在众多神经毒剂抑制的人类AChE的解毒剂中, Hlo-7目前被认为是最经典的体外活化剂, 是一种非常有优势的醛肟类药物.

在对OPs进行亲核取代反应中, α -亲核试剂 $\text{Pyr}^+-\text{CH}=\text{N}-\text{O}^-$ 对磷原子进攻. 实际上, 肟阴离子的浓度取决于其酸度常数 pK_a 和溶剂的pH, pK_a 值的大小表现出肟阴离子对亲电试剂(如OP)的亲合力. 吡啶盐醛肟类药物的 pK_a 一般为7.3~8.5 (2-PAM: 7.68; HI-6: 7.28; TMB-4: 7.78~8.2; Obidoxime: 7.54~8.48) [14-20]. 值得一提的是, 2-PAM较3-PAM和4-PAM对AChE的活化效果要好, 这可能与后面两种醛肟的 pK_a 较大(3-PAM: $\text{pK}_a > 9$; 4-PAM: $\text{pK}_a = 8.27$)以及醛肟基团的位置(影响对P原子的进攻)有关[21-23].

如图2所示, 醛肟在活化AChE后, 最终生成磷酸化的肟(phosphorylated oximes, POXs), 这是一种经典的中间体, 其产生浓度很低并且不稳定, 会减慢活化的过程. 因此, 在寻找新的肟类活化剂时, 必须考虑到POXs的性质, 评估它在体外的动力学过程. 在生理pH条件下, 醛肟POXs的稳定性要低于酮肟; 2-吡啶醛肟的POXs的水解半衰期 $t_{1/2}$ 约为1 min, 较4-吡啶醛肟

POXs的水解速率快50~100倍. 基于以上讨论, 醛肟基团处于四级氮邻位的3种醛肟(I、II、V)形成的POXs比处于对位的3种醛肟(III、IV、VI)有优势, 因为前者分解速率快, 不会阻碍OP-AChE的再生. 值得一提的是, POXs是OP水解酶(如细菌磷酸三酯酶、哺乳动物对氧磷酶)很好的底物, 因此它们在体内的积累并不会达到影响酶活化的水平.

关于几种吡啶盐醛肟类药物的毒性, 对I~V 5种醛肟有大量的报道, 大部分认为其毒性与吡啶环上的四级氮有关, 而不是醛肟基团. 在啮齿动物中, 醛肟IV静脉注射的半数致死量 LD_{50} 值为200~400 mg/kg, 醛肟IV的毒性是I、II、V的3~6倍. 醛肟VI是报道中毒性最低的药物, LD_{50} 值为2950 mg/kg, 而醛肟III是这6种醛肟中毒性最高的双四级氮吡啶醛肟. 有研究者定量评估了醛肟II、IV、V, 他们对肟在实验动物狗和猴子中导致的毒性症状进行了记录和排序[2]. 他们评估醛肟II、IV、V影响10%猴子的计量分别为616、133和296 $\mu\text{mol/kg}$, 这与啮齿动物的毒性测定结果一致. 在接近致死剂量时, 最常见的中毒症状为呕吐、分泌唾液、反应迟缓和抽搐. 在人体中, 也进行了吡啶盐醛肟类药物的安全性测试. 选择750位志愿者, 静脉注射肟类药物250~500 mg后, 不良反应主要有血压变化、脉搏变化、头晕、恶心、视力模糊; 经口摄入醛肟的主要不良反应是肠胃不适.

图1 几种吡啶盐醛肟类活化剂的化学结构式[2]

Figure 1 Chemical structures of several pyridinium aldoxime reactivators [2].

AChE的活化过程:

图2 膦类药物活化磷酸化乙酰胆碱酯酶的反应^[2]

Figure 2 Proposed scheme of chemical reactions involved in the reactivation of phosphorylated cholinesterase by oxime reactivator [2].

五氯酚(pentachlorophenol, PCP)是一种在世界范围内广泛存在的持久性环境污染物,它的存在给环境和人类健康安全带来巨大威胁^[24]. 2009年,PCP及其盐和酯类被列入斯德哥尔摩公约,成为了持久性有机污染物(POPs)的一员. 已经有充足的流行病学数据证明,PCP的暴露可以导致非霍奇金淋巴瘤(Non-Hodgkin lymphoma),因此2016年国际癌症研究组织(IARC)已经将PCP的致癌等级从Group 2B (人类可能致癌物)提升至Group 1 (人类致癌物)^[25-29]. 此外,近年来研究证明,在PCP的生产与应用中,会产生含有高毒性的氯代二苯并二噁英(PCDDs)、四氯代二苯并呋喃(TCBDFs)等多种污染物^[30].

PCP是一种氯代的酚类化合物,主要被用作木材保护剂、杀虫剂、除草剂^[31]. 在中国和其他发展中国家,PCP还被用于杀灭钉螺以预防血吸虫病. 从20世纪50年代中期开始,血吸虫病在中国长江流域的多省流行. 其中12个省受到了血吸虫病的影响,有大约1200万人感染,几百万人死亡. PCP在当年控制血吸虫病的传播中发挥了巨大的作用. 但是由于PCP会危及人类健康,因此从1997年开始,中国限制PCP及其钠盐的生产. 然而,由于血吸虫病在传统地区的再度流行,PCP的生产再一次增加,在2003年的年产量高达3000 t. PCP的再次使用无疑对环境和人类健康带来了影响. 因为应用广泛和稳定性好,PCP成为无处不在的环境污染物. 目前我国已将PCP列为高毒农药禁止生产和使用,但是PCP造成的环境残留污染以及其环境毒性

效应仍存在^[24]. 目前,尽管PCP的毒性机制并不十分清楚,但是已经发现其醌类和半醌代谢产物在其中起着重要的作用,如图3所示.

在人体、大鼠细胞以及啮齿类动物的活体实验中均发现,PCP可以被肝脏微酶体系中的细胞色素P450s氧化酶氧化脱氯形成四氯-1,4-氢醌(TCHQ). 生成的四氯氢醌会继续被氧化,通过四氯半醌自由基进一步氧化为四氯-1,4-苯醌(TCBQ). TCHQ和TCBQ具有较强的基因毒性和致癌性^[32-34],在氧化还原的过程中会产生大量的活性氧,进而发生氧化应激反应,对生物大分子造成损伤. 在各种活性氧中,普遍认为是羟基自由基($\cdot\text{OH}$)导致了DNA的氧化损伤. 那么羟基自由基是如何产生的呢? 根据文献报道,羟基自由基很可能是在超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)转化为 H_2O_2 之后,再进一步与金属离子反应产生的^[33,35,36].

虽然PCP对DNA没有明显的毒性反应活性,但是其代谢产物TCHQ在体外DNA、多种细胞系和小鼠的肝脏中均可以导致DNA断裂. TCHQ还可以在V79细胞的HPRT中心造成微核的形成以及变异,在V79细胞和小鼠中可以导致8-羟基-2-脱氧鸟苷(8-OH-dG)的形成. 此外,TCHQ在肿瘤细胞中也可以诱导形成加合物和缺嘌呤/缺嘧啶的位点(AP位点)^[37-44].

我们先前的研究发现,氯代苯醌可以和 H_2O_2 通过不依赖于金属离子的途径产生高活性的羟基自由基($\cdot\text{OH}$)^[45]. 反应机制如图4所示: H_2O_2 对TCBQ进行亲核攻击,形成不稳定的三氯氢过氧基-1,4-苯醌(TrCBQ-

图3 五氯酚(PCP)及其致癌性醌类和半醌类代谢物

Figure 3 PCP and its carcinogenic quinone and semiquinone metabolite.

图4 TCBQ和H₂O₂反应产生•OH的可能作用机制^[45]

Figure 4 Proposed mechanism for •OH production by TCBQ and H₂O₂ [45].

OOH)中间产物, 该中间产物均裂产生•OH和三氯-羟基-1,4-苯醌自由基(TrCBQ-O•). TrCBQ-O•随后歧化形

成三氯-羟基-1,4-苯醌(TrCBQ-O⁻). 有资料表明, 卤代醌与H₂O₂产生•OH的反应可能在生物系统中存在, 因此这极可能是卤代醌具有毒性的重要原因之一.

2013年, Li课题组^[46-53]在饮用水消毒副产物中检出了12种卤代醌(图5), 其中包括TCBQ在内的其他低氯代苯醌、溴代苯醌、碘代苯醌, 这是除PCP等卤代芳烃发生化学或生物代谢生成的途径以外, TCBQ类卤代醌生成的又一途径. 对饮用水进行消毒是自20世纪以来最重要的保护公共健康安全的举措之一, 它在降低霍乱、伤寒和疟疾传播等方面发挥了重要的作用, 保障了世界各国众多人口的饮用水安全. 然而, 饮用水消毒副产物(disinfection byproducts, DBPs)也随之出现, 带来了新的健康问题, 据报道, 癌症(尤其是膀胱癌)的发生和发展也可能与之相关. 消毒剂(如氯气和氯胺)与水体中的天然有机质(natural organic matter, NOM)反应, 可以产生DBPs. 从20世纪70年代以来, 已经检出了数百种DBPs, 然而, 从总有机氯含量分析, 这些消毒副产物只占氯代消毒副产物的30%^[54,55]. 因此对这些新型卤代醌类消毒副产物进行解毒研究十分关键.

我们在研究羟胺类药物对有机农药及醌类致癌物的解毒作用机制^[56-61]时意外发现, 苯基异羟肟酸(BHA)可以对TCBQ通过两次Lossen重排反应进行解毒(图6)^[58]. 首先, 一分子的BHA与TCBQ发生亲核取代反应, 形成中间体, 中间体脱去氢质子, 经过第一次Lossen重排产生三氯-羟基-1,4-苯醌(TrCBQ-OH)和一分子的苯基异氰酸酯; 接着, 另一分子的BHA与生成的TrCBQ-OH发生第二步亲核取代反应, 并经过类

图5 饮用水消毒副产物中检出的12种卤代醌^[46]

Figure 5 The structure of twelve halogenated quinones identified as chlorination disinfection byproducts in drinking water [46].

图6 苯基异羟肟酸对四氯苯醌解毒的反应机制: 自杀式亲核进攻伴随着两次Lossen重排反应^[58]

Figure 6 Proposed mechanism for the dramatic acceleration of TCBQ hydrolysis by BHA: suicidal nucleophilic attack coupled with an unusual double Lossen rearrangement [58].

似的中间体, 发生第二次Lossen重排反应, 最终生成二氯二羟基-1,4-苯醌(DDBQ)和另一分子苯基异氰酸酯。上述反应过程有两点优势: (1) 与原始反应物TCBQ相比, 终产物DDBQ毒性低得多, BHA促使TCBQ水解为DDBQ的速率与TCBQ自然水解为DDBQ的速率相比, 提高了15万倍; (2) 经典的Lossen重排需要在碱性或加热条件下才能进行; 而TCBQ诱导的BHA重排反应可以在室温条件下的中性甚至弱酸性环境中进行。

然而, 当把TCBQ换为其他低氯代苯醌(C_n BQs)时发现, 它们与BHA的反应有所不同。根据呈现出的反应规律的不同, 我们将氯代苯醌分为两类: DCBQ类和TCBQ类(图7)。BHA与DCBQ类氯代苯醌反应时会生成稳定的中间体, 而与TCBQ类氯代苯醌则反应过快, 无法检测到中间体。此外, 与DCBQ类反应生成的脱氯水解产物的 $pK_a > 2.5$, 而与TCBQ类反应生成的脱氯水解产物的 $pK_a \leq 2.5$ ^[59]。这说明BHA与氯代苯醌的反应状况与氯代苯醌的氯原子取代数目、取代位置以及对应苯醌的脱氯水解产物的 pK_a 有关。

那么当将BHA替换为其结构类似物时, 又会出现何种结果呢? 我们发现, BHA结构中氮原子上取代基的微小改变, 或者氯代苯醌中氯原子数目发生变化, 都

图7 DCBQ类和TCBQ类氯代苯醌。*代表反应位点^[59](网络版彩图)

Figure 7 DCBQ-type and TCBQ-type chlorinated benzoquinones (1:1, * represents reaction site) [59] (color online).

会对反应机理有较大的影响。当BHA结构中氮原子上的氢变为甲基时, 即 N -MeBHA, 我们发现它同样可以与2,5-二氯-1,4-苯醌发生亲核取代反应, 不同的是, 生成的中间体的 N -O键发生均裂, 生成氮自由基和醌氧自由基, 醌氧自由基发生共振互变, 转化为醌酮自由基, 后者随后与氮自由基发生自由基偶联生成 C - N 相连的加合物, 该加合物同样可以发生烯醇-酮式共振互

变,生成最终产物.当把BHA结构中N原子上的氢变为苯基时,我们发现*N*-苯基-BHA (*N*-PhBHA)同样会与2,5-二氯-1,4-苯醌发生亲核取代反应,生成中间体CBQ-O-*N*-PhBHA.中间体随后发生类Claisen重排反应,即N-O结合转变为C-C键结合,再经过酮-烯醇互变,最终得到产物.

有趣的是,我们前面提到的醛肟类药物在结构上与BHA相似,均含有N-OH结构,即均是羟胺的衍生物,也均是 α -亲核试剂.但是二者不同的地方在于:醛肟类药物是C=N双键,而BHA与氮原子相连的是羰基.既然醛肟类药物与BHA既有结构相似之处,也有明显的结构区别,那么醛肟与卤代苯醌反应时的机理又会与BHA存在何种异同之处呢?它与卤代苯醌反应的具体分子机理具体为何呢?

为此,我们针对TCBQ和吡啶盐醛肟类药物之间的反应进行了仔细研究,采用高效液相色谱串联质谱(HPLC/MS)、核磁共振(NMR),并结合O-18同位素标记的方法对反应产物进行了分离、纯化和鉴定.最终发现,吡啶盐醛肟类药物对TCBQ的解毒反应是一类非同寻常的在正常生理条件下发生的连续两次Beckmann裂解反应.

2 醛肟类神经性毒剂防治药物的新型解毒分子作用机制

2.1 吡啶盐醛肟类药物加速TCBQ水解生成DDBQ的产率-时间的分析比较

在中性水溶液中,TCBQ会先水解生成初级羟基化中间产物——三氯-一羟基-1,4-苯醌(TrCBQ-OH),随后进一步缓慢水解生成最终的二羟基化产物——2,5-二氯-3,6-二羟基-1,4-苯醌(2,5-dichloro-3,6-dihydroxy-1,4-benzoquinone, DDBQ)^[62].我们发现,吡啶盐醛肟类药物能够显著加速TCBQ的水解,这一加速水解的现象可以通过配备有紫外检测器的HPLC在DDBQ出峰处波长332 nm的峰面积来定量.在4种2-吡啶盐醛肟类药物中,2-PAM对TCBQ的水解作用最为高效(图8).又考虑到2-PAM是自1955年以来在临床上应用最早和最广的药物,而且它在4种吡啶盐醛肟类药物中结构最简单,因此我们选择2-PAM作为模型化合物来进行进一步的机理研究.

之前的研究发现,TCBQ的一级水解产物和二级

图8 在2-PAM及其他吡啶盐醛肟类药物作用下,TCBQ水解产生DDBQ的产率-时间曲线^[61]

Figure 8 The yield-time curves for DDBQ by 2-PAM and other pyridinium aldioxime antidotes^[61].

水解产物分别为TrCBQ-OH和DDBQ,通过电喷雾离子化-四极杆-飞行时间-质谱(ESI-Q-TOF-MS)分析发现,在TCBQ/2-PAM体系中,TCBQ的脱氯水解过程也是如此.生成的TrCBQ-OH和DDBQ的产量与反应物2-PAM和TCBQ的摩尔比相关:低摩尔比(2-PAM:TCBQ $\leq$ 1)时,生成的产物主要为TrCBQ-OH;高摩尔比(2-PAM:TCBQ $>$ 1)时,TCBQ首先转变为TrCBQ-OH,随后进一步反应生成终产物DDBQ.为证实2-PAM能否直接加速TrCBQ-OH水解转化为DDBQ,我们根据文献^[58,62]合成了TrCBQ-OH,结果发现确实如此.

值得注意的是,2-PAM促进四氯苯醌水解的反应并不局限于两者之间,其他四卤代醌化合物(如四溴-1,4-苯醌、四氟-1,4-苯醌、四氯-1,4-氢醌以及四氯-1,2-苯醌)与2-PAM反应时,都会发生类似的反应.此外,当把2-PAM换为其他醛肟类药物,如Trimedoxime、Obidoxime和HI-6时,也会对TCBQ水解有类似的促进作用.这些研究结果表明,醛肟类药物促使四卤代苯醌水解的反应具有普遍性.

此外还发现,2-PAM促进TCBQ水解的速率也依赖于二者的摩尔比,摩尔比越高,水解速率越快.例如,在0.2、0.5、1.0、2.0和5.0 mM的2-PAM存在条件下(pH 7.4),TCBQ (0.05 mM)水解成DDBQ的半衰期分别为10、2.39、0.50、0.25和 <0.17 min.与之前文献报道的TCBQ自然水解的半衰期21 d^[62]相比,2-PAM可以将TCBQ水解转化为DDBQ的速率提高18万倍(TCBQ, 0.05 mM; 2-PAM, 5.0 mM).

2.2 游离的2-PAM阴离子在TCBQ加速水解过程中的作用

2-PAM介导的TCBQ水解转化为DDBQ的速率依赖于缓冲液的pH. 当pH≤4时, TCBQ几乎不发生水解, 但随着pH增加, 水解速率逐步上升. 这表明游离的2-PAM阴离子可能是2-PAM (pK_a 为7.68)参与反应的活性态. 如果确实如此, 那么游离的2-PAM阴离子被掩蔽后, 应该不能促进TCBQ的水解. 为进一步证实此说法是否属实, 我们根据文献[63]合成了*O*-甲基-2-PAM ($Py^+(CH_3)-CH=N-O-CH_3$)^[61], 以阻止在反应中形成游离的氧阴离子. 结果发现, *O*-甲基-2-PAM确实不能促进TCBQ的水解, 即使当缓冲溶液的pH高达10时也无任何促进作用. 上述结果明确表明, 游离的2-PAM阴离子对促进TCBQ水解至关重要.

2.3 2-PAM与TCBQ反应后的主要产物的分析鉴定

当2-PAM存在时, TCBQ水解速率比其自然水解的速率要快得多, 这似乎表明2-PAM可以催化这一水解反应的进程. 然而我们发现, 在与TCBQ反应的过程中, 随着2-PAM的消耗, 伴随着生成了质荷比为 m/z 119的新物质. 这表明, 在TCBQ的水解反应中, 2-PAM并不是真正意义上的催化剂.

为了进一步探索TCBQ/2-PAM反应的分子机制,

我们联合运用HPLC-ESI-MS和NMR对2-PAM反应后生成的终产物进行了分离、纯化、鉴定. 通过与标准品比对, 发现产物为*N*-甲基-2-吡啶甲腈(2-CMP) (反应式(1)).

这说明, 2-CMP为2-PAM与TCBQ反应后生成的最终产物, 其产率高达97.4%. 不仅如此, 我们在TrCBQ-OH/2-PAM反应体系中也得到了类似的实验结果.

那么2-CMP是如何从2-PAM转化得到的呢? 根据以往的文献报道, 一个可能的典型反应路径是通过Beckmann裂解反应, 即将肟($R_1-(R_2)C=N-OH$)经过氮正离子或者碳正离子中间体转化为相应的腈($R_1-C\equiv N$)的反应^[2,64-67] (反应式(2)). 在该反应中, 将肟的N-OH转化为更好的离去基团(通过离子化、醚化或者酯化)十分必要. 也就是说, 醛肟基团氧原子通过活化剂(活化剂通常是强的亲电试剂如二乙基磷酰氯、氯磺酸)活化, 对于Beckmann裂解反应的发生十分关键(A表示活化剂丢失卤素或者其他活性基团的部分, OA表示离去基团).

值得一提的是, 如果将TCBQ替换为其他四卤代醌, 如TBrBQ、TFBQ、TCHQ和*O*-TCBQ, 同样也检测到了2-CMP的生成, 其产率分别为97.1%、96.8%、74.2%和100%.

2.4 2-PAM促进TCBQ加速水解的分子反应机制

根据上述研究结果以及之前有关Beckmann裂解反应的相关研究文献, 考虑到2-PAM阴离子是一种有效的 α -亲核试剂, 我们提出了2-PAM促进TCBQ水解的独特反应机制(图9): 在中性溶液中, 2-PAM阴离子($Py^+(CH_3)-CH=N-O^-$)对TCBQ发生亲核进攻, 首先形

成不稳定的过渡态中间产物 $Py^+(CH_3)-CH=N-O-$ 三氯-1,4-苯醌. 该中间体发生第一次Beckmann裂解反应生成一级水解产物TrCBQ- O^- (2-PAM/TCBQ摩尔比例较低时)和一分子的碳正离子中间体 $Py^+(CH_3)-C^+=NH$, 其可共振互变为氮正离子中间体 $Py^+(CH_3)-C\equiv NH^+$. 后者脱除氢质子产生一分子的*N*-甲基-2-吡啶甲腈(2-CMP). 当2-PAM过量时, 生成的TrCBQ- O^- 进一步与过量的2-PAM反应, 通过形成类似的过渡态中间产物, 发生第二次Beckmann裂解反应生成二羟基化的终产物DDBQ和另一分子2-CMP.

如果上述提出的两次Beckmann裂解反应机制正

图9 2-PAM加速TCBQ脱氯水解的可能的分子机制: 亲核进攻伴随着两次非同寻常的Beckmann裂解反应^[61]

Figure 9 Proposed mechanism for the dramatic acceleration of dechlorination and dihydroxylation of TCBQ by 2-PAM: nucleophilic attack coupled with an unusually facile double Beckmann fragmentation under physiological conditions ^[61].

确的话, 那么TCBQ反应后得到的TrCBQ-OH和DDBQ中的氧原子应该来源于2-PAM中的N-OH, 而不是H₂O. 为了进一步证实该反应的机理, 我们采用同位素标记的方法, 将2-PAM与TCBQ的反应在¹⁸O标记的水

([¹⁸O]-H₂O)配制的缓冲溶液中进行. 如果水是上述两种产物中氧原子的来源, 那么在使用¹⁸O标记水配制的反应液中产生的TrCBQ-OH和DDBQ的分子离子峰, 与未标记的水配制的反应液中获得的产物的分子离子峰相比, 在质荷比(*m/z*)上应分别显示2个或4个质量数的偏移, 这样才足以表明¹⁸O标记的水参与了反应. 但是结果发现, 在¹⁸O标记水配制的溶液中反应并未观察到质荷比的位移^[61], 表明水分子根本没有参与到TrCBQ-OH和DDBQ产物的形成. 这些同位素标记实验结果进一步支持了所提出的上述反应机制.

2.5 该Beckmann裂解反应非同寻常的原因

在Beckmann裂解反应中, 醛肟基团中的氧原子活化对于反应的发生至关重要. 因此, Beckmann裂解反应通常选择O-活化的醛肟衍生物, 或者使醛肟和不同的活化剂(如浓硫酸、二乙基磷酰氯、氯氟酸等)共存, 通过质子化、醚化或酯化来进行(表1)^[67,68]. 据我们所知, Beckmann裂解反应机制研究发现TCBQ和其他四卤代苯醌可作为一类醛肟活化剂, 通过形成不稳定的O-三卤代苯醌醛肟中间体, 从而自发发生连续两次的Beckmann裂解反应.

之前报道的Beckmann裂解反应通常是在强酸性或者加热到特定温度在有机溶剂中发生的一步反应^[2,67]. 2-PAM与TCBQ的反应是连续两次的Beckmann

表1 醛肟发生Beckmann裂解的方法^[61]

Table 1 The reaction conditions to convert aldoximes to corresponding nitriles ^[61]

Catalyst	Concentration (mol%)	Solvent	Temperature (°C)	Time	Yield (%)
Cyanuryl chloride	100	DMF	Room temperature	4 h	100
Propylphosphonic anhydride	15	THF	70	1~3 h	>84
Chloral	50	None	120~140	2.5~7.5 h	>67
Chlorosulfonic acid	3.3	Toluene	90	0.5 h	≈100
Silphos	20	THF	Microwave irradiation	3~6 min	>79
Silica-PCl ₃	—	MeCN	Room temperature	8~10 h	>87
FeCl ₃ -Montmorillonite K	40	Toluene	Reflux	5~12 h	>91
Metaboric acid	3	None	140	7~58 h	>62
Diethyl chlorophosphate	100	Toluene	Reflux	20~120 h	≈90
Ph ₃ P/ <i>N</i> -chlorosuccinimide	120~150/120~150	CH ₂ Cl ₂	Room temperature	0.5 h	75~97
(Cl ₃ CO) ₂ CO	0.3	DMF/MeCN	Reflux	1 h	>72
HCl (gas)	—	—	70~130	5~48 h	>67
AlCl ₃ /KI	100/300	H ₂ O/MeCN	Room temperature/80	0.5/6 h	70~96

裂解反应, 在室温(25℃)、中性(即生理条件), 甚至碱性条件下均可发生. 这可能是因为推测生成的 O -三氯苯醌醛肟(O -三氯苯醌-2-PAM)肟醚中间产物能快速且极易发生裂解反应. 此外, 在最近的研究中发现, 氯代苯醌活化BHA生成的中间体的稳定性与对应的脱氯羟基化的氯代苯醌共轭酸的 pK_a 有关^[59]. 基于此, 我们推测此规律也适用于中间体 O -三氯苯醌醛肟. 由于阴离子离去基团的共轭酸TrCBQ-OH (pK_a : 1.10)和DDBQ (pK_{a1} : 0.58; pK_{a2} : 2.72)的强酸性, 因此 O -三氯代苯醌醛肟中间产物的重排反应速率应该非常快. 一旦形成, 这些中间产物就能在室温和中性pH条件下快速地发生裂解. 这可解释为何2-PAM在生理学条件下可以显著加速TCBQ (或TrCBQ-OH)水解转化为DDBQ. 此外, 这解释了为何在本研究中没能分离、鉴定出推测的反应中间产物, 这一点与大多数 O -取代的肟醚反应明显不同.

2.6 2-PAM/TCBQ/H₂O₂反应体系的DNA凝胶电泳实验

在之前的研究中, 我们发现TCBQ和H₂O₂能够通过不依赖于金属离子的途径产生高活性的羟基自由基($\cdot OH$), 进而导致DNA链断裂^[45,69]和碱基氧化^[70,71]. 上述研究还发现, 2-PAM能使高毒性的TCBQ水解脱毒为低毒性的TrCBQ-OH和DDBQ, 这意味着2-PAM的加入可能会抑制TCBQ介导的生物大分子如DNA的氧化损伤. 为此, 我们考察了2-PAM对TCBQ介导的DNA氧化损伤的影响. 采用质粒pBR322 DNA作为模型DNA进行凝胶电泳实验. 环状双链超螺旋pBR322 DNA(form I)在羟基自由基的作用下会转化为单链断裂形式(form II)或者双链断裂的线状DNA形式(form III), 不同形式的DNA在电泳条件下移动速率不同, 从而实现其分离和分析监测, 该方法被用于凝胶电泳实验以检测DNA链的断裂. 研究结果如预期所示, 2-PAM可以抑制TCBQ/H₂O₂导致的DNA双链断裂. 为进一步证实2-PAM可以间接阻止 $\cdot OH$ 的产生(2-PAM能使高毒性的TCBQ水解脱毒为低毒性的TrCBQ-OH和DDBQ, 从而阻止TCBQ与H₂O₂产生 $\cdot OH$), 我们还采用对苯二甲酸(TPA)为捕获剂的荧光方法对此进行检测, 结果发现2-PAM可以有效抑制TCBQ/H₂O₂产生羟基自由基.

2.7 2-PAM/TCBQ反应体系的细菌和细胞毒性实验

为进一步探究2-PAM对TCBQ等卤代醌介导生物毒性的保护作用, 我们将研究由单独的DNA扩展至细菌*P. phosphoreum*和哺乳动物细胞HepG2两种模式系统中进行实验. *P. phosphoreum*毒性实验, 通常又称为Microtox实验^[72], 是一种常见的用来评估化学品、环境样品、垃圾废弃物处理或修复过程产物的急性水生毒性的方法. *P. phosphoreum*的荧光与其呼吸活动直接相关, 因此荧光强度可以用于监测化合物对其代谢活性的影响乃至产生的细胞毒性^[62].

在*P. phosphoreum*细菌体系中发现, 2-PAM对TCBQ毒性的保护作用非常明显, 并且呈现明显的剂量依赖效应, 1.0 mM的2-PAM对TCBQ的保护作用可达67.2%. 在对照实验中, 通过比较TCBQ、TrCBQ-OH、DDBQ、2-PAM和2-CMP对*P. phosphoreum*细菌毒性的半抑制浓度(IC₅₀)发现, DDBQ (IC₅₀为676.9 μM)比TCBQ和TrCBQ-OH的毒性要低得多(TCBQ和TrCBQ-OH的IC₅₀分别为2.6和19.5 μM).

此外, 由于卤代醌和卤代酚可以导致肝毒性^[33,34,70], 因此我们选择HepG2细胞作为人的肝脏模型细胞进行进一步研究. 采用MTT方法来进行TCBQ的细胞毒性研究, 结果也表明2-PAM对TCBQ导致的细胞毒性有保护作用. TCBQ、TrCBQ-OH和DDBQ的IC₅₀值分别为2.0、94.0和613.9 μM . 有趣的是, 在*P. phosphoreum*和HepG2两种不同细胞实验结果看来, DDBQ的IC₅₀值远远大于TCBQ, 充分表明在两种细胞体系中2-PAM将TCBQ转化为DDBQ为解毒过程.

3 可能的环境与生物学意义

我们发现, 这种新型的两次Beckmann裂解反应机制并不局限于2-PAM和TCBQ, 而是普遍存在于所有四卤代醌类化合物与吡啶醛肟类化合物中. 因此, 这一发现可能具有重要的生物学与环境学意义: 许多广泛使用的多卤代芳香化合物(公认的POPs和可能的人体致癌物), 包括多卤代酚类(如普遍存在的PCP与溴代阻燃剂3,3', 5,5'-四溴双酚A)、橙剂、六氯苯、六六六和多氯联苯(PCBs)等可通过体内代谢、化学反应或酶促反应途径脱卤生成相应的卤代醌^[33,34,69,73~79]. 在造纸厂排放的污水中也检出了多氯代醌类化合物^[80]. 最近有研究报道, 在饮用水消毒副产物和游泳池中检出了

12种多卤代肟, 其中多种是可疑的膀胱致癌物^[81]。据了解, 与大多数传统的消毒副产物相比, 这些多卤代肟类消毒副产物会导致更强的细胞毒性或者发育毒性^[47]。细胞研究表明, 卤代肟可以产生活性氧物种(ROS), 降低细胞谷胱甘肽水平, 影响细胞抗氧化酶, 从而进一步造成细胞氧化应激和细胞DNA、蛋白质、脂质的氧化损伤^[34,45,47,69]。ROS的形成伴随着MAPK信号的活化可以解释PCP触发的肿瘤形成机理^[82]。我们最近的研究发现, 多卤代肟与H₂O₂或者有机氢过氧化物共存可以导致DNA损伤, 可将5mdC氧化为其甲基氧化产物^[70,83], 导致脂质过氧化等^[84]。因此, 如何在正常生理条件下破坏或降解这类对哺乳动物具有潜在致癌性的多卤代肟类物质显得尤为重要。

有趣的是, 4种吡啶盐醛肟类药物(2-PAM、TMB-4、Obidoxime、HI-6)均已被应用于临床, 以治疗有机磷农药和神经毒剂的中毒^[1,3]。吡啶盐醛肟类药物之所以具有良好的解毒效果, 是由于吡啶的正电部分能够很强烈地结合到酶的活性部位, 而醛肟基团则可将有机磷农药结构中的有机磷部分取代下来。多卤代肟是一类致癌中间体, 并且最近在饮用水消毒产物中有检出,

正如研究中发现, 吡啶醛肟类化合物对卤代肟类化合物的解毒作用也十分有效。有趣的是, 研究发现吡啶盐醛肟类药物可直接与有机磷神经毒剂(如Sarin和Soman, 均为氟代有机磷毒剂)反应, 或者通过活化受抑制的酶而形成磷酸化肟, 其可在体外分解为磷酸和相应的腈^[1,85], 该反应机理可能也是通过类似的Beckmann裂解反应。值得一提的是, 吡啶盐醛肟类药物也用于氨基甲酸酯类农药的解毒, 亦可能是通过类似于有机磷毒剂的胆碱解毒途径^[86,87]。因此, 本研究体系的卤代肟与2-PAM的亲核取代反应, 并同时伴随着发生Beckmann裂解的反应机制可能是吡啶盐醛肟类药物的一类共同的但先前未被认知的解毒机制。近年来, 多卤代芳香族污染物和吡啶盐醛肟类药物这两类物质不仅已经引起科研工作者, 而且还引起了社会公众的广泛关注。我们的研究结果可能对今后深入研究这两类与生物医学和环境领域密切相关的化合物具有重要的化学、生物学和环境学方面的意义。然而, 尽管研究表明, 醛肟类药物具有解毒作用, 但其能否作为安全有效的预防药物, 用于预防或治疗多卤代肟类致癌物导致的肝癌和膀胱癌等疾病尚需进一步研究。

参考文献

- 1 Eyer PA, Worek F. Oximes. In: Marrs TC, Maynard RL, Sidell FR, Eds. *Chemical Warfare Agents: Toxicology and Treatment*. 2nd Ed. Weinheim: Wiley, 2007. 305–329
- 2 Pereira MMA, Santos PP. Rearrangements of hydroxylamines, oximes and hydroxamic acids. In: Rappoport Z, Liebman JF, Eds. *The chemistry of Hydroxylamines, Oximes and Hydroxamic Acids*. Weinheim: Wiley, 2009. 386–473
- 3 Jokanovic M, Prostran M. *Curr Med Chem*, 2009, 16: 2177–2188
- 4 Eyer P. *Toxicol Rev*, 2003, 22: 165–190
- 5 Noort D, Benschop HP, Black RM. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2002, 184: 116–126
- 6 Marrs TC. *Pharmacol Ther*, 1993, 58: 51–66
- 7 Gray AP. *Drug Metab Rev*, 1984, 15: 557–589
- 8 Brown MA, Brix KA. *J Appl Toxicol*, 1998, 18: 393–408
- 9 Hackley Jr B, Owens O. *J Org Chem*, 1959, 24: 1120
- 10 Green AL, Saville B. *J Chem Soc*, 1956, 3887
- 11 Wilson IB. *J Am Chem Soc*, 1955, 77: 2383–2386
- 12 Ashani Y, Bhattacharjee AK, Leader H, Saxena A, Doctor BP. *Biochem Pharmacol*, 2003, 66: 191–202
- 13 Antonijevic B, Stojiljkovic MP. *Clinical Med Res*, 2007, 5: 71–82
- 14 Poziomek EJ, Hackley Jr BE, Steinberg GM. *J Org Chem*, 1958, 23: 714–717
- 15 Bieger D, Wassermann O. *J Pharm Pharmacol*, 1967, 19: 844–847
- 16 Hagedorn I, Stark I, Lorenz HP. *Angew Chem Int Ed*, 1972, 11: 307–309
- 17 Eyer P, Hell W, Kawan A, Klehr H. *Arch Toxicol*, 1986, 59: 266–271
- 18 Eyer P, Hagedorn I, Ladstetter B. *Arch Toxicol*, 1988, 62: 224–226

- 19 Kalisiak J, Ralph EC, Zhang J, Cashman JR. *J Med Chem*, 2011, 54: 3319–3330
- 20 Dohnal V, Musilek K, Kuča K. *J Chromatogr Sci*, 2014, 52: 246–251
- 21 Dewangan HK, Nagwanshi R, Ghosh KK, Satnami ML. *Catal Lett*, 2017, 147: 602–611
- 22 Mercey G, Verdelet T, Renou J, Kliachyna M, Baati R, Nachon F, Jean L, Renard PY. *Acc Chem Res*, 2012, 45: 756–766
- 23 Ashani Y, Silman I. Hydroxylamines and oximes: Biological properties and potential uses as therapeutic agents. In: Rappoport Z, Liebman JF, Eds. *The Chemistry of Hydroxylamines, Oximes and Hydroxamic Acids*. Weinheim: Wiley, 2009. 637–646
- 24 Zheng W, Yu H, Wang X, Qu W. *Environ Int*, 2012, 42: 105–116
- 25 Ruder AM, Yiin JH. *Chemosphere*, 2011, 83: 851–861
- 26 Demers PA, Davies HW, Friesen MC, Hertzman C, Ostry A, Hershler R, Teschke K. *Cancer Causes Control*, 2006, 17: 749–758
- 27 Guyton KZ, Loomis D, Grosse Y, El Ghissassi F, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Mattock H, Straif K. *Lancet Oncology*, 2016, 17: 1637–1638
- 28 Collins JJ, Bodner K, Aylward LL, Wilken M, Swaen G, Budinsky R, Rowlands C, Bodnar CM. *J Occup Environ Med*, 2009, 51: 1212–1219
- 29 Gunawardana B, Singhal N, Swedlund P. *Environ Eng Res*, 2011, 16: 187–203
- 30 Song RX, Ruan HJ, Jing XY, Liu ZT. Genotoxicity of sodium pentachlorophenol. *Carcinog, Teratog Mutag*, 2007, 19: 355–357 (in Chinese) [宋瑞霞, 阮鸿洁, 景欣月, 刘征涛. 五氯酚钠的细胞遗传毒性研究. 癌变, 畸变, 突变, 2007, 19: 355–357]
- 31 Rao K. *Pentachlorophenol: Chemistry, Pharmacology, and Environmental Toxicology*. Berlin: Springer Science & Business Media, 1978
- 32 Renner G, Mücke W. *Toxicol Environ Chem*, 1986, 11: 9–29
- 33 Bolton JL, Trush MA, Penning TM, Dryhurst G, Monks TJ. *Chem Res Toxicol*, 2000, 13: 135–160
- 34 Song Y, Wagner BA, Witmer JR, Lehmler HJ, Buettner GR. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 9725–9730
- 35 O'Brien PJ. *Chem Biol Interact*, 1991, 80: 1–41
- 36 Halliwell B, Gutteridge JM. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4th Ed. Oxford: Oxford University Press, 2007
- 37 Witte I, Juhl U, Butte W. *Mutat Res/DNA Repair Rep*, 1985, 145: 71–75
- 38 Dahlhaus M, Almstadt E, Henschke P, Lüttgert S, Appel KE. *Arch Toxicol*, 1996, 70: 457–460
- 39 Ehrlich W. *Mutat Res Lett*, 1990, 244: 299–302
- 40 Dahlhaus M, Almstadt E, Appel KE. *Toxicol Lett*, 1994, 74: 265–274
- 41 Wang YJ, Ho YS, Chu SW, Lien HJ, Liu TH, Lin JK. *Chem Biol Interact*, 1997, 105: 1–16
- 42 Jansson K, Jansson V. *Mutat Res/Genet Toxicol*, 1992, 279: 205–208
- 43 Dahlhaus M. *Mutat Res/Fundamental Mol Mech Mutagenesis*, 1995, 329: 29–36
- 44 Lin PH, Nakamura J, Yamaguchi S, La DK, Upton PB, Swenberg JA. *Carcinogenesis*, 2001, 22: 635–639
- 45 Zhu BZ, Kalyanaraman B, Jiang GB. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 17575–17578
- 46 Huang R, Wang W, Qian Y, Boyd JM, Zhao Y, Li XF. *Anal Chem*, 2013, 85: 4520–4529
- 47 Li J, Wang W, Moe B, Wang H, Li XF. *Chem Res Toxicol*, 2015, 28: 306–318
- 48 Zhao Y, Anichina J, Lu X, Bull RJ, Krasner SW, Hrudey SE, Li XF. *Water Res*, 2012, 46: 4351–4360
- 49 Qian Y, Wang W, Boyd JM, Wu M, Hrudey SE, Li XF. *Environ Sci Technol*, 2013, 47: 4426–4433
- 50 Li J, Wang W, Zhang H, Le XC, Li XF. *Toxicol Sci*, 2014, 141: 335–343
- 51 Wang W, Qian Y, Jmaiff LK, Krasner SW, Hrudey SE, Li XF. *Environ Sci Technol*, 2015, 49: 9898–9904
- 52 Li J, Moe B, Vemula S, Wang W, Li XF. *Environ Sci Technol*, 2016, 50: 6744–6752
- 53 Wang W, Moe B, Li J, Qian Y, Zheng Q, Li XF. *TrAC Trends Anal Chem*, 2016, 85: 97–110
- 54 Richardson SD, Plewa MJ, Wagner ED, Schoeny R, Demarini DM. *Mutat Res/Rev Mutat Res*, 2007, 636: 178–242
- 55 Villanueva CM, Cantor KP, Grimalt JO, Malats N, Silverman D, Tardon A, Garcia-Closas R, Serra C, Carrato A, Castaño-Vinyals G, Marcos R, Rothman N, Real FX, Dosemeci M, Kogevinas M. *Am J Epidemiol*, 2007, 165: 148–156
- 56 Zhu BZ, Har-El R, Kitrossky N, Chevion M. *Free Radic Biol Med*, 1998, 24: 360–369
- 57 Witte I, Zhu BZ, Lueken A, Magnani D, Stossberg H, Chevion M. *Free Radic Biol Med*, 2000, 28: 693–700
- 58 Zhu BZ, Zhu JG, Mao L, Kalyanaraman B, Shan GQ. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 20686–20690
- 59 Shan GQ, Yu A, Zhao CF, Huang CH, Zhu LY, Zhu BZ. *J Org Chem*, 2015, 80: 180–189
- 60 Li F, Huang CH, Xie LN, Qu N, Shao J, Shao B, Zhu BZ. *Sci Rep*, 2016, 6: 39207

- 61 Xie LN, Huang CH, Xu D, Li F, Zhu JG, Shen C, Shao B, Gao HY, Kalyanaraman B, Zhu BZ. *J Org Chem*, 2017, 82: 13084–13092
- 62 Sarr DH, Kazunga C, Charles MJ, Pavlovich JG, Aitken MD. *Environ Sci Technol*, 1995, 29: 2735–2740
- 63 Lees G, Holmes F, Underhill AE, Powell DB. *J Chem Soc A*, 1971, 337–341
- 64 Grob CA. *Angew Chem Int Ed*, 1969, 8: 535–546
- 65 Gawley RE. The Beckmann reactions: rearrangements, elimination-additions, fragmentations, and rearrangement-cyclizations. In: Kende AS, Paquette LA, Overman LE, Denmark SE, Eds. *Organic Reactions. Vol. 35*. Weinheim: Wiley, 1988. 3–53
- 66 Drahl MA, Manpadi M, Williams LJ. *Angew Chem Int Ed*, 2013, 52: 11222–11251
- 67 Chandrasekhar S. The Beckmann and related reactions. In: Knochel P, Molander GA, Eds. *Comprehensive Organic Synthesis II. Vol. 7*. Amsterdam: Elsevier, 2014. 770–800
- 68 De Luca L, Giacomelli G, Porcheddu A. *J Org Chem*, 2002, 67: 6272–6274
- 69 Zhu BZ, Shan GQ. *Chem Res Toxicol*, 2009, 22: 969–977
- 70 Shao J, Huang CH, Kalyanaraman B, Zhu BZ. *Free Radic Biol Med*, 2013, 60: 177–182
- 71 Jia S, Zhu BZ, Guo LH. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 397: 2395–2400
- 72 Ribo JM, Kaiser KLE. *Environ Toxicol Water Qual*, 1987, 2: 305–323
- 73 Gupta SS, Stadler M, Noser CA, Ghosh A, Steinhoff B, Lenoir D, Horwitz CP, Schramm KW, Collins TJ. *Science*, 2002, 296: 326–328
- 74 Meunier B. *Science*, 2002, 296: 270–271
- 75 Sorokin A, Meunier B, Séris JL. *Science*, 1995, 268: 1163–1166
- 76 Chignell CF, Han SK, Mouithys-Mickalad A, Sik RH, Stadler K, Kadiiska MB. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2008, 230: 17–22
- 77 Teuten EL, Xu L, Reddy CM. *Science*, 2005, 307: 917–920
- 78 Kelly BC, Ikononou MG, Blair JD, Morin AE, Gobas FAPC. *Science*, 2007, 317: 236–239
- 79 Gao HY, Mao L, Li F, Xie LN, Huang CH, Shao J, Shao B, Kalyanaraman B, Zhu BZ. *Environ Sci Technol*, 2017, 51: 2934–2943
- 80 Zhu BZ, Mao L, Huang CH, Qin H, Fan RM, Kalyanaraman B, Zhu JG. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 16046–16051
- 81 Zhao Y, Qin F, Boyd JM, Anichina J, Li XF. *Anal Chem*, 2010, 82: 4599–4605
- 82 Chen HM, Lee YH, Wang YJ. *Chem Res Toxicol*, 2015, 28: 339–350
- 83 Zhao B, Yang Y, Wang X, Chong Z, Yin R, Song SH, Zhao C, Li C, Huang H, Sun BF, Wu D, Jin KX, Song M, Zhu BZ, Jiang G, Rendtlew Danielsen JM, Xu GL, Yang YG, Wang H. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42: 1593–1605
- 84 Qin H, Huang CH, Mao L, Xia HY, Kalyanaraman B, Shao J, Shan GQ, Zhu BZ. *Free Radic Biol Med*, 2013, 63: 459–466
- 85 Lee JY, Lee YH, Byun YG. *Phosphorus Sulfur Silicon Relate Elem*, 2012, 187: 641–649
- 86 Natoff IL, Reiff B. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1973, 25: 569–575
- 87 Fukuto TR. *Environ Health Perspect*, 1990, 87: 245–254

A new detoxification mechanism for aldoxime therapeutic antidotes for chemical warfare nerve-agents

Fu-Rong Ren^{1,2}, Xuan Xiao^{1,2}, Lin-Na Xie^{1,2}, Dan Xu^{1,2}, Jie Shao^{1,2}, Chun-Hua Huang^{1,2*}, Ben-Zhan Zhu^{1,2*}

¹ State Key Laboratory of Environmental Chemistry and Ecotoxicology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China

² University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

*Corresponding author (email: bjshyhch@126.com; bzhu@rcees.ac.cn)

Abstract: Pyridinium aldoximes are best-known as therapeutic antidotes for organophosphorus chemical warfare nerve-agents and pesticides. Polyhalogenated quinones are a class of carcinogenic intermediates and newly identified chlorination disinfection byproducts in drinking water. However, it is not clear what is the exact chemical mechanism underlying such detoxication. Here we showed that pralidoxime, one of the representatives of pyridinium aldoximes, can markedly enhance the dechlorination and hydroxylation of the highly reactive and toxic tetrachloro-1,4-benzoquinone (also called chloranil) in two-consecutive steps to produce the much less toxic 2,5-dichloro-3,6-dihydroxy-1,4-benzoquinone (chloranilic acid), with rate acceleration of up to 180000-times. In contrast, no enhancing effect was observed when the hydroxylamine group was blocked via methylation to form *O*-methylated pralidoxime. The major reaction product from pralidoxime was characterized as its corresponding nitrile (2-cyano-1-methylpyridinium chloride). Along with oxygen-18 isotope-labeling studies, we proposed that nucleophilic substitution coupled with an unprecedented double Beckmann fragmentation reaction was responsible for this dramatic enhancement of the detoxification reaction. This paper reviewed the unprecedented double Beckmann fragmentation reaction. Our findings may have broad biological and environmental implications for future research on the aldoxime therapeutic agents and carcinogenic polyhalogenated quinones, which are two important classes of compounds of major biomedical and environmental interest.

Keywords: double Beckmann fragmentation, tetrachloro-1,4-benzoquinone (*p*-chloranil), pyridinium aldoximes, nerve-agent antidotes, detoxification

doi: [10.1360/N032018-00084](https://doi.org/10.1360/N032018-00084)