羟自由基与 Neu5Gc 抽氢反应的理论动力学研究

常瑞[1]，何江[2]，罗先锟[2]，黄运安[1]，朱秋劲[1]
（1.贵州大学酿酒与食品工程学院，贵州省农畜产品贮藏与加工重点实验室，贵州贵阳 550025）
（2.贵阳市农产品质量安全监督检验测试中心，贵州贵阳 550004）

摘要：红肉风险物质 N-羟乙酰神经氨酸（Neu5Gc）可诱发炎症，但与食品消费代谢和加工贮藏过程相关的羟自由基（OH·）互作机制未知。体外 OH·模拟试验表明过氧化氢（H_2O_2）添加量 2%，254 nm 紫外灯 15 处理 60 min 时对 Neu5Gc 标准品含量降低效果最佳为 76.23%±2.17%。为探究该过程机制，首先在气相、水和苯相下以 M062X/6-31+G（d, p）理论水平对 OH·作用 Neu5Gc 分子中羟基氢和非羟基氢抽提反应的各驻点进行优化和焓值校正，M062X/def2TZVP 水平计算能垒。其次，298 K~453 K 内以过渡态理论和三参数阿伦尼乌斯方程分别获得反应速率和动力学参数。结果表明: 气相和苯相下 Neu5Gc 中 H24 位抽氢能垒最低，分别为 13.20 kJ/mol 和 19.54 kJ/mol；水相下 H 29 位能垒最低 6.25 kJ/mol；气相下活化能最低为 H 39 位 8.09 kJ/mol，苯相下最低为 H 38 位 1.72 kJ/mol，水相最低为 H 24 位 14.3 kJ/mol；273 到 453 K 间，Neu5Gc 分子中非羟基氢处抽氢速率最大可高于羟基氢 10^8 倍。综上，OH·主要通过对 Neu5Gc 非羟基氢原子的氢抽提反应进行相互作用。

关键词：N-羟乙酰神经氨酸；密度泛函；过渡态理论；抽氢反应；活化能
文章篇号：1673-9078(2019)010-66-75 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.10.011

Theoretical and Kinetic Study of the Hydrogen Atom Abstraction Reactions of Neu5Gc with Hydroxyl Radical

CHANG Rui[1], HE Jiang[2], LUO Xian-kun[2], HUANG Yun-an[1], ZHU Qiu-jin[1]
(1.School of Liquor and Food Engineering, Guizhou Province Key Laboratory of Agricultural and Animal Products Processing and Storage, Guizhou University, Guiyang 550025, China)
(2.Agricultural Product Quality Safety Supervision and Testing Center of Guiyang, Guiyang 550004, China)

Abstract: The new red meat and it's products risk factor N-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc) can induced inflammation, but the interaction mechanism with the hydroxyl radicals (OH·) that related to the food consumption, metabolism process and inflammation is unclear. The OH· simulation test showed that the optimal rate of Neu5Gc content decrease was 76.23%±2.17% at the conditions bellow, the amount of hydrogen peroxide (H_2O_2) was 2% and the 254 nm UV lamp was treated for 15 minutes. To explore the reaction mechanism, the density functional theory was used to optimize the station points and enthalpy correction of all one-step hydrogen abstraction channels of OH· on Neu5Gc hydroxyl hydrogen and non-hydroxy hydrogen at the theoretical level of M062X/6-31+G(d, p) in the gas phase, aqueous phase and benzene phase. The energy barrier was calculated at the level M062X/def2TZVP. Reaction rates and kinetic parameters were obtained in the 298 K~453 K range by the transition state theory and the three-parameter Arrhenius equation. Theoretical calculations showed that the minimum hydrogen extraction energy barrier occurred at the H 24 position of Neu5Gc under the gas and benzene phase with 13.20 kJ/mol and 19.54 kJ/mol, respectively, the lowest energy barrier in the aqueous phase was 6.25 kJ/mol at H 29 position. For the lowest activation energy, in the gas phase was 8.09 kJ/mol at the H 39 position, in the benzene phase was 1.78 kJ/mol at the H 38 position, in the aqueous phase was 14.3 kJ/mol at the H 24 position. In the range of 273 to 453 K, the hydrogen extraction rate of the non-hydroxyl hydrogen in the Neu5Gc molecule can be up to 10^8 times higher than that of the hydroxyl hydrogen. In summary, the interaction mechanism of OH· with Neu5Gc was mainly through the hydrogen extraction of Neu5Gc non-hydroxyl hydrogen atoms.

Key words: N-glycolylneuraminic acid; density functional theory; transition state theory; hydrogen abstraction reaction; activation energy

收稿日期：2019-05-05
基金项目：国家自然科学地区基金项目（31660496）；贵州省高层次创新型人才培养项目（黔科合平台人才[2016]5662）
作者简介：常瑞（1993-），男，硕士研究生，研究方向：食品科学
通讯作者：朱秋劲（1969-），男，博士，教授，研究方向：食品营养与安全

红肉是指所有类型的哺乳动物肌肉，由于血红素铁的氧化和化学转化特性，与血红蛋白和肌红蛋白非共价结合，使红肉具有明显区别于白肉的颜色。结肠直肠癌是全球第三大常见癌症，和动脉粥样硬化性心血管疾病，II 型糖尿病及其他炎症和癌症都存在关联[1]。国际癌症研究机构在 2015 年 10 月 26 日报告宣布红肉被归为二类可能致癌[2]。最近的流行病学研究表明，人类对红肉相关疾病的风险倾向于与红肉中微量的非人源唾液酸 N-羟乙酰神经氨酸（N-glycolylneuraminic acid，Neu5Gc）代谢掺入人体组织有关[3]，由日常饮食外源摄入的 Neu5Gc 使机体内产生识别 Neu5Gc 的抗体，促进慢性炎症和肿瘤生长[4]。2018 年美国牛肉消费量为 1218 万 t，中国猪肉消费量为 5540 万 t[5]，因此 Neu5Gc 成为重要的食品风险物质[6]。

Neu5Gc 合成的关键前体物质 N-乙酰神经氨酸（N-glycolylneuraminic acid，Neu5Ac）俗称燕窝酸，是对人脑发育有益的营养物质[7]。在细胞质中胞苷单磷酸-N-乙酰神经氨酸羟化酶（CMP-Neu5Ac hydroxylase，CMAH）催化下，Neu5Ac 的 N-乙酰基被还原成 N-羟乙酰，形成 Neu5Gc，两者分子结构仅相差一个羟基[8]。有研究表明 Neu5Ac 和 Neu5Gc 具有抵抗 H_2O_2 氧化应激的能力[9]。而活性氧粒子（O^{2-}、H_2O_2、OH·等）广泛存在于生物体氧化呼吸作用、能量代谢等食品消费和红肉宰后加工过程，是诱导产生癌症的因素之一[10,11]，其中羟自由基（OH·）氧化能力最强，可攻击和破坏诸多生物分子和有机物结构[12]。例如，线粒体是生物体内重要的呼吸作用细胞器，与其相关的线粒体乌头酸酶是羟基自由基的来源之一[13]，线粒体呼吸链通过芬顿氧化可将过氧化氢（H_2O_2）转化为羟自由基（OH·）[14,15]。红肉肌肉蛋白组织血红素中螯合的 Fe^{3+}与细胞氧化压力产生的 H_2O_2 形成芬顿氧化体系，产生大量 OH·[16]。红肉非热加工处理如超声空化效应[17]、辐照效应[18]、脉冲强光等均会产生 OH·[19]，贮藏期间由于光照、金属离子、氧气等环境因素也可产生活性氧和 OH·，表明 OH·与 Neu5Gc 的互作涉及红肉加工与安全性诸多方面。

目前已有关于红肉及其制品在高温、油炸、微波处理后，Neu5Gc 含量降低的报道[20]，但红肉中 Neu5Gc 在食品非热加工和生物体消费代谢过程中与 OH·相互作用的机制和过程尚不清楚。本文首次以密度泛函和过渡态理论在气相、非极性苯相、强极性水相环境下研究 OH·对 Neu5Gc 所有可能发生的一步抽氢过程，为深入研究该新型食品风险因子在体内外活性氧压力胁迫下的变化提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

Neu5Gc 标准品，纯度>97%，购自美国 Sigma 公司；30% H_2O_2 溶液，分析纯，购自天津科密欧试剂厂；254 nm 波长紫外灯（5 W、10 W、15 W），购自佳鑫照明；沃特世三重四级杆液相色谱质谱联用仪（Waters Xevo TQ），Mill-Q 超纯水仪，美国；Neu5Gc 分子结构取自 PubChem 数据库（ID 号：440001）。KiSThelP 软件[21]，Gaussian View 6，Gaussian 16（Revision A.03），由贵州大学云计算平台支持。

1.2 方法

1.2.1 体外羟自由基模拟体系

为探究不同瓦数的紫外灯（254 nm）在不同处理时间下对 Neu5Gc 含量的影响，选取紫外灯（5、10、15 W）分别处理 1 mL、100 μmol/L 浓度的 Neu5Gc 标准品溶液，处理时间设定为 10、30、60、120 min 四个梯度，空白对照组为 1 mL、100 μmol/L 的 Neu5Gc 标准品。为探究添加不同浓度 H_2O_2 协同紫外处理对 Neu5Gc 的作用效果，以 1 mL、100 μmol/L 的 Neu5Gc 标准品溶液为待处理样本，考察不同 H_2O_2 添加水平（质量比 0.1%、0.5%、1.0%、2.0%）、不同瓦数（5、10、15 W），不同处理时间（30、60 min）下对 Neu5Gc 的作用效果，空白对照为 1 mL、100 μmol/L 的 Neu5Gc 标准品。每组处理设定三个平行，通过液相质谱检测处理前后 Neu5Gc 含量变化，峰面积归一化法计算 Neu5Gc 降解率，以上体系反应均在 4 ℃下进行。

取反应液 1 μL 进样分析，液相条件：UITY UPLC C18 色谱柱（1.7 μm，2.1×100 mm），流动相为 100%乙腈（A）-0.1%甲酸水溶液（B），梯度洗脱（0~3 min 5% A，3~5 min 10% A，5~6 min 100% A，6~7 min 5% A），流速 0.2 mL/mL，柱温 25 ℃。质谱条件：离子源为电喷雾化离子源（ESI），源温度 100 ℃，探针温度 450 ℃，毛细管电压 3000 V，锥孔电压 19 V，脱溶剂气 1000 L/h，负离子方式检测，多重反应监测（MRM）扫描。定量分析离子对 323.8/116.0 时，碰撞气能量为 17 V；定量分析离子对 323.80/185.80 时，碰撞气能量为 15 V。

1.2.2 一步抽氢过程理论动力学计算

在 M062X/6-31+G(d,p)水平上完成 Neu5Gc 几何构型优化和频率振动分析，得到能量极小的无虚频结构，并在优化任务中同时得到各个原子的自然电荷分布情况。对 OH·与 Neu5Gc 分子中两类氢原子一步抽

氢反应过程中的反应物、过渡态、产物在 M062X/6-31+G（d, p）水平下优化得到能量极小的结构，并得到零点校正能，ZPE 校正因子为 0.967[22]。溶剂效应由 SMD 溶剂模型考察，溶剂选择为极性的苯相和非极性的水相。对优化好的过渡态结构进行反应内秉性坐标 IRC（Intrinsic reaction coordinate）验证。为得到高精度的反应能垒值，采用 M062X/def2TZVP 水平对所有反应物进行能量计算。最后在 KiSThelP 软件包上基于过渡态理论以反应自由能计算抽氢反应速率，隧道校正效应以 Wigner 方法进行校正[23]。过渡态理论反应速率计算公式如（1）：

$$k^{TST}=\sigma\frac{k_b T}{h}\left(\frac{Q^{TS}}{N_A Q^R}\right)e^{-\frac{\Delta G}{k_b T}} \qquad \sigma=\frac{n^*\times\sigma^R}{n^R\times\sigma^*} \tag{1}$$

式中：σ 是反应路径简并度，k_b 是波兹曼常数，T 为温度，h 为普朗克常量。N_A 是阿佛加德罗常数。Q^{TS} 是过渡态的配分函数，Q^R 是反应物的配分函数。

Wigner 校正计算公式如（2）：

$$k^{TST/W}=\kappa(T)k^{TST}=\left[1+\frac{1}{24}\left(\frac{h\upsilon^{\#}}{kb}\right)^2\right]k^{TST} \tag{2}$$

ΔG 是反应物和过渡态的标准自由能差值(单位是 J/mol)，$\upsilon^{\#}$为反应物过渡态虚频绝对值。隧道效应由 Wigner's 校正系数拟合。其中，n*和 n^R 分别指过渡态和反应物的手性异构体数，σ*和 σ^R 是其旋转对称数。为了模拟食品加工中高温对反应速率的影响，考察 298 K~453 K（25 ℃~180 ℃）范围内的反应速率。

2 结果与讨论

2.1 紫外-H_2O_2 对 Neu5Gc 降解作用

对紫外协同 H_2O_2 处理 Neu5Gc 标准品后溶液进行液相质谱检测，峰面积归一化法求得对照组和处理组的 Neu5Gc 含量变化，进而得到对 Neu5Gc 标准品的降解率（以下简称降解率），结果见图 1。由图 1a 可知，固定紫外灯功率时，降解率随处理时间增加而升高。紫外灯瓦数对降解率的影响差异显著(p<0.05)，处理 10 min 和 120 min 差异显著(p<0.05)，但 30 min 和 60 min 处理时间差异不显著。在紫外灯功率为 5 W、10 W、15 W 时，最大降解率分别为 8.84%±1.36%，21.65%±1.43%，34.65%±1.77%。由图 1b 可知，添加一定量的 H_2O_2 后，降解率呈现上升趋势，且 60 min 处理组的降解效果均高于 30 min 处理组，表明增加处理时间可以提高降解率。对于该 UV-H_2O_2 体系，不同瓦数处理组间差异显著(p<0.05)，不同 H_2O_2 添加组间差异也显著(p<0.05)。当 H_2O_2 添加量为 2%处理 30 min 时，5 W~15 W 的最佳降解率分别为：44.23%±1.56%，61.71%±1.74%，69.68%±1.77%，处理 60 min 时，最佳降解效率分别为 50.51%±1.89%，65.72%±1.65%，76.23%±2.17%，表明适量添加 H_2O_2 可有效提高对 Neu5Gc 的降解率。根据图 1B 可知，处理组合为 15 W，60 min，2% H_2O_2 时对 Neu5Gc 的降解效果最佳。

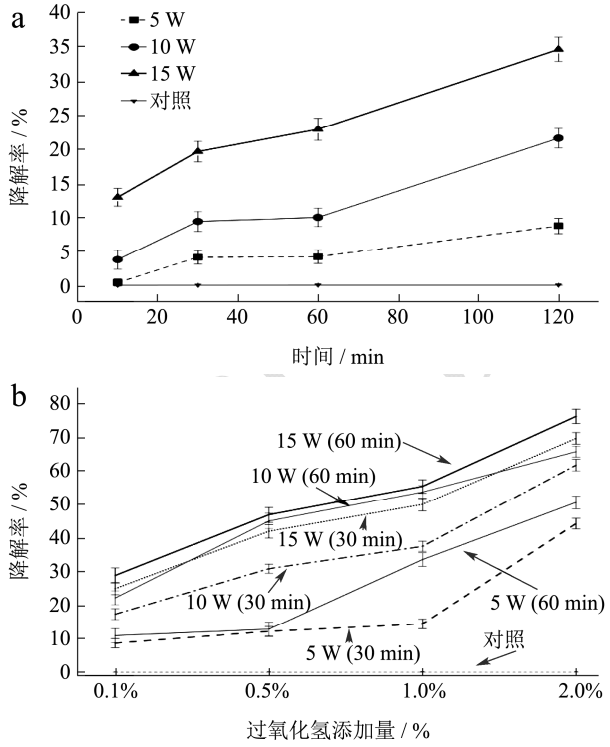


图 1 紫外-H_2O_2 体系降解 Neu5Gc 效果

Fig.1 Neu5Gc degradation effect of UV-H_2O_2 system

2.2 Neu5Gc 自然电荷布居分析

Neu5Gc 优化后结构示意图如图 2 所示，对 Neu5Gc 分子中各氢原子的自然电荷进行计算，结果见于表 1。原子电荷与分子中供体和受体的电荷转移相关，原子电荷分布可以表示和预测分子的反应活性，常见的原子电荷种类有：Mulliken，CHELPG，Hirshfeld，ADCH 等。其中负电荷越多的区域或原子表示越易被亲电试剂攻击，正电荷越多的区域(或原子)表示其越易被亲核试剂攻击[24]。

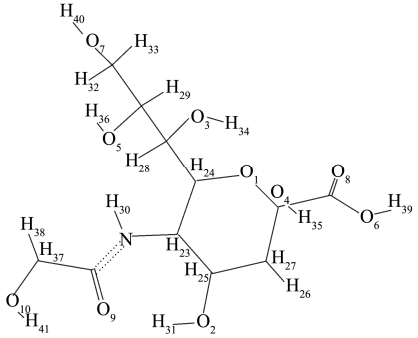


图 2 Neu5Gc 结构示意图

Fig.2 Schematic of Neu5Gc

表 1 Neu5Gc 氢原子 NPA 电荷

Table 1 The NPA charge of Neu5Gc hydrogen atom

Neu5Gc	气相	苯相	水相	Neu5Gc	气相	苯相	水相
H23	0.2224	0.2384	0.2376	H37	0.1906	0.1976	0.2139
H24	0.2089	0.2241	0.2148	H38	0.1866	0.1939	0.2062
H25	0.1804	0.1839	0.1995	H31	0.5051	0.5016	0.5014
H26	0.2324	0.2349	0.2381	H34	0.5039	0.4872	0.5038
H27	0.2331	0.2358	0.2463	H35	0.4878	0.4908	0.5194
H28	0.1753	0.2013	0.2036	H36	0.5011	0.4901	0.5103
H29	0.1840	0.1877	0.1772	H39	0.5018	0.5087	0.5415
H30	0.4430	0.4201	0.4371	H40	0.4757	0.4792	0.5083
H32	0.1674	0.1698	0.1792	H41	0.4882	0.4888	0.5072
H33	0.1950	0.1885	0.1872				

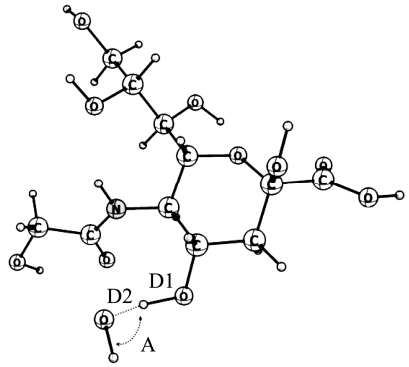


图 3 Neu5Gc-OH·过渡态结构

Fig.3 Transition State Structure of Neu5Gc-OH·

从图 2 可知，Neu5Gc 的羟基氢为 H31、H34、H35、H36、H39、H40、H41，分别对应为 O2、O3、O4、O5、O6、O7、O10 位羟基氢。从表 1 可知，Neu5Gc 分子羟基氢原子电荷中，羟基氢 H40 在苯相和气相下具有最小电荷值，分别为 0.4757 和 0.4792。羟基氢 H31 在气相下具有最大值 0.5051，在水相下则变为最小值 0.5014。羟基氢 H39 在水相和苯相下具有最大电荷值。对非羟基氢，H32 位在气相和苯相下具有最小值，H29 位在水相下具有最小值，三种介质下，H30 均为最大值。气相和苯相下，电荷值满足 H34<H31，H32<H24，H38<H24；水相下满足 H34<H39，H26<H27。三种介质下非羟基氢电荷大小满足 H25<H24，羟基氢满足 H40<H36，表明亲核活性 H24>H25，H36>H40，从表 1 可看出，氮氧原子所连氢原子的电荷值均普遍大于碳原子上相连的氢原子，表明羟基氢原子比其他氢原子易受亲核试剂攻击，这可能是由于氮氧原子电负性强于碳原子[25]，但由于 Neu5Gc 中非羟基氢数目比羟基氢多 5 个，故其发生亲核反应的总体效应还需进一步考察。

2.3 Neu5Gc 与 OH · 一步抽氢势能面

根据 OH·与 Neu5Gc 所有可能的 19 条反应通路进行计算，包括 7 个羟基氢和 12 个非羟基氢，绘制抽氢反应势能面(PES，Potential Energy Surface)，如图 4~6 所示，反应能垒和产物能量如表 2 所示。

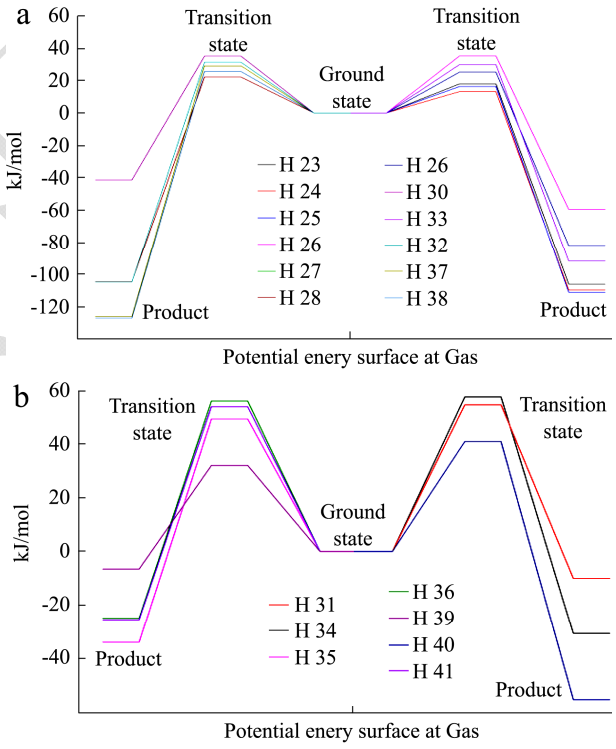


图 4 Neu5Gc 气相抽氢势能图

Fig.4 PES of Neu5Gc hydrogen extraction at gas

结合图 4~6 和表 2 可以看出，气相和水相下 Neu5Gc 各羟基氢抽氢反应需要翻越的能垒最大均为 H34，分别为 57.57 kJ/mol 和 57.37 kJ/mol，苯相下最大为 H41 处 53.45 kJ/mol。气相下最小为 H39，22.57 kJ/mol。而对非羟基氢，苯相和气相下需要能垒最小的为 H24，分别为 13.2 kJ/mol 和 19.54 kJ/mol；水相下最小的为 H29，6.25 kJ/mol。水相下非羟基氢 H32 和 H38 位抽氢能垒值均明显小于苯相和气相条件下，

表明水相下其亲核能力提高。三种介质下，羟基氢能垒大小满足 H40<H36 的顺序，非羟基氢能垒大小满足 H24<H25 顺序，这和自然电荷分布规律一致，表明亲核活性越高，与羟自由基作用需要的能垒越低。

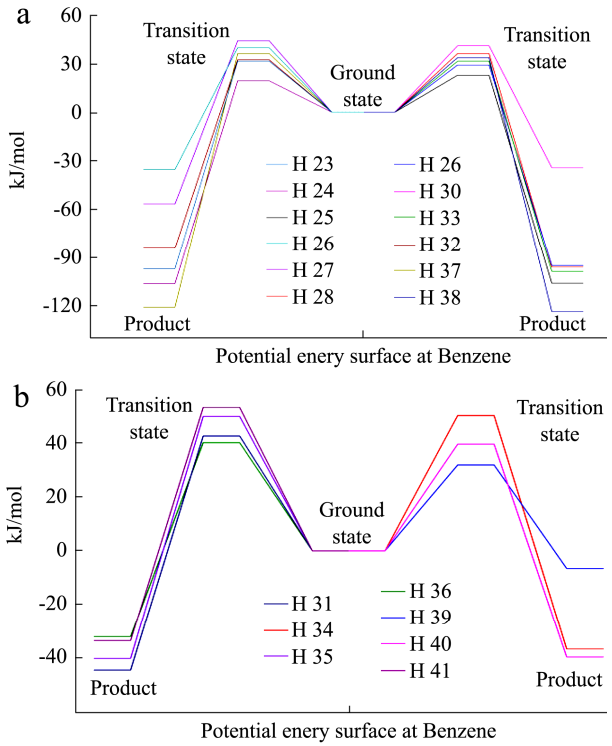


图 5 Neu5Gc 苯相抽氢势能图

Fig.5 PES of Neu5Gc hydrogen extraction at benzene

从表 2 中产物相对能量可以看出，三种介质下 H39 位产物相对能量均大于非羟基氢原子处，表明该处被 OH·夺氢后对分 Neu5Gc 分子结构影响较小。H38 位在气相和苯相下产物相对能量最低，分别为-127.28 kJ/mol 和-124.09 kJ/mol，水相下 H37 位产物相对能量最低，-144.72 kJ/mol。非羟基氢 H38 和 H32 位抽氢后产物相对能量水相下均小于苯相下能量，这和抽氢所需能垒大小是一致的。从表 2 中可以看出，羟基氢抽提所需能垒数值普遍高于非羟基氢。气相、苯相和水相下，羟基氢抽提能垒值最大可分别高于非羟基氢 44.37 kJ/mol，30.87 kJ/mol，49.14 kJ/mol。气相、苯相和水相下，羟基氢抽提能垒平均值分别高于非羟基氢 20.09 kJ/mol，10.77 kJ/mol，25.83 kJ/mol。表明，Neu5Gc 氢原子易于在极性溶剂中发生氢转移机制，这与课题组已报道的研究结论一致[26]。

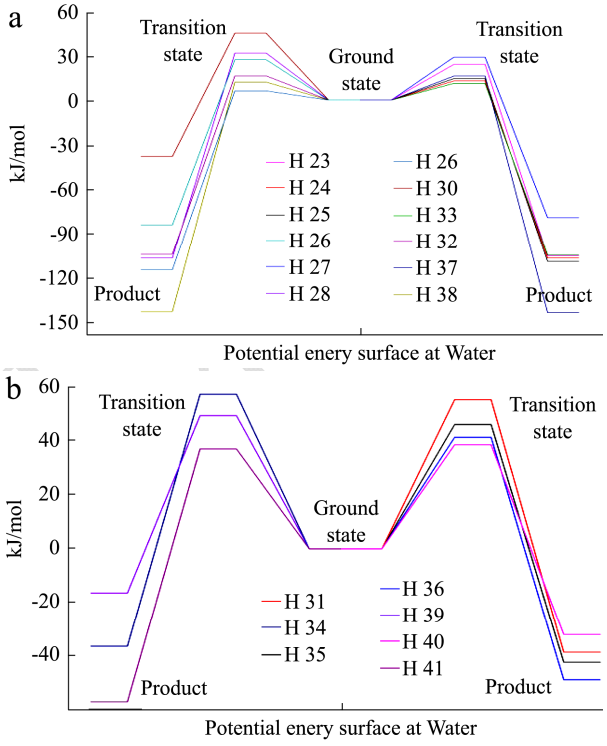


图 6 Neu5Gc 水相抽氢势能图

Fig.6 PES of Neu5Gc hydrogen extraction at water

表 2 Neu5Gc 各抽氢反应通道能垒和产物相对能量

Table 2 Energy barrier and product relative energy of all hydrogen abstraction channel of Neu5Gc

Neu5Gc 路径	气相		苯相		水相	
	能垒	产物ΔE/(kJ/mol)	能垒	产物△E/(kJ/mol)	能垒	产物△E/(kJ/mol)
H23	18.01	-106.13	31.69	-97.50	24.20	-106.00
H24	13.20	-109.81	19.54	-106.78	12.97	-107.70
H25	16.35	-111.20	22.98	-106.55	14.54	-109.82
H26	35.19	-59.45	40.00	-35.50	27.42	-84.78
H27	52.01	-71.80	44.39	-56.98	29.11	-79.88
H28	22.18	-104.73	36.46	-96.40	31.93	-107.70
H29	25.27	-82.02	29.30	-95.45	6.25	-115.63
H30	35.08	-41.38	41.28	-34.34	45.41	-38.22
H32	31.31	-104.83	31.65	-99.06	11.30	-105.54
H33	29.90	-91.85	32.55	-84.67	16.44	-105.20

转下页

接上页

H37	29.11	-126.25	36.38	-121.44	16.28	-144.72
H38	25.60	-127.28	33.89	-124.09	12.17	-144.03
H31	54.65	-10.04	42.77	-44.55	55.39	-38.67
H34	57.57	-30.77	50.41	-36.74	57.37	-36.46
H35	49.33	-34.07	50.09	-40.25	46.14	-42.44
H36	56.01	-24.92	40.29	-32.13	41.40	-48.98
H39	22.57	-16.48	32.05	-6.55	49.45	-16.47
H40	40.95	-55.45	39.77	-39.72	38.64	-32.04
H41	53.92	-25.53	53.45	-33.63	37.08	-57.23

表 3 Neu5Gc 各抽氢通道过渡态结构

Table 3 Transition state structure of Neu5Gc all hydrogen abstraction reaction channel

位置	气相			苯相			水相		
	D1	D2/Å	A/°	D1	D2/Å	A/°	D1	D2/Å	A/°
H23	1.150	1.508	153.9	1.148	1.523	155.3	1.155	1.511	173.3
H24	1.142	1.532	164.2	1.142	1.532	165.9	1.151	1.518	170.0
H25	1.139	1.650	148.6	1.133	1.702	157.5	1.142	1.612	161.8
H26	1.206	1.323	159.9	1.201	1.339	159.8	1.180	1.408	164.6
H27	1.174	1.414	154.9	1.176	1.414	155.2	1.177	1.403	169.0
H28	1.144	1.553	165.0	1.156	1.528	159.7	1.147	1.568	170.7
H29	1.168	1.471	166.5	1.165	1.495	169.6	1.154	1.558	157.1
H30	1.170	1.239	147.3	1.176	1.227	148.9	1.130	1.298	154.8
H32	1.170	1.458	153.4	1.165	1.482	153.2	1.155	1.540	151.6
H33	1.192	1.354	144.1	1.172	1.404	157.2	1.152	1.509	173.2
H37	1.159	1.481	153.0	1.155	1.508	155.8	1.160	1.522	162.2
H38	1.149	1.567	157.1	1.151	1.559	158.6	1.157	1.526	170.8
H31	1.090	1.252	142.9	1.089	1.256	144.6	1.092	1.250	150.5
H34	1.108	1.238	139.2	1.100	1.242	142.8	1.088	1.255	148.1
H35	1.111	1.220	147.3	1.113	1.219	147.4	1.120	1.209	152.5
H36	1.130	1.199	143.2	1.097	1.227	155.4	1.091	1.250	148.1
H39	1.186	1.228	152.9	1.185	1.229	153.1	1.192	1.226	153.6
H40	1.093	1.233	148.3	1.081	1.253	148.1	1.078	1.264	148.1
H41	1.100	1.247	138.7	1.101	1.243	140.5	1.079	1.272	147.7

2.4 Neu5Gc 与 OH·一步抽氢过渡态结构

获取 OH·与 Neu5Gc 抽氢反应中过渡态的结构示意图如图 2 所示，参数如表 3 所示。其中 D1 表示目标抽氢位点氢原子过渡态时 C-H/O-H/N-H 的键长。D2 表示 OH·氧原子与抽氢位点上氢原子的距离，单位为 Å；A 表示上述三者间的角度值，单位为°。

从表 3 可以看出，气相下羟基氢原子与 OH·氧原子形成过渡态结构时，距离最长为 H31 位 1.252 Å，其自身羟基 O-H 键最大可被拉长到 1.186 Å，并在 H39 位形成最大角度 152.9°。苯相下羟基氢原子与 OH·氧原子产生过渡态时，同样在 H31 位形成最大距离 1.256 Å，H39 位 O-H 键最长 1.185Å，H36 位角度最大 155.4°。水相下 OH·氧原子产生过渡态时，在 H31 位形成最大距离 1.256 Å，H39 位 O-H 键最长 1.185 Å，H36 位角度最大 155.4°。水相下羟基氢原子与 OH·氧原子形成过渡态结构时，距离最长为 H41 位 1.272，自身 O-H 键键长最大为 H39 位 1.192，在 H39 位产生最大角度 153.6°。这和甲醇羟基氢原子与 HCO·抽氢反应过渡态结构中 O-H 距离最大 1.371 Å，角度值 166.82°情况相近[27]。

气相下非羟基氢原子与 OH·氧原子距离最长为 1.650 Å(H25 位)，H26 位 C-H 键键长最大为 1.206 Å，H29 位角度最大 166.5°。苯相下非羟基氢原子与

OH·氧原子产生过渡态时，H27 位距离最长 1.702，H26 位 C-H 键键长最长 1.201，H29 位角度最大 169.6°。水相下非羟基氢原子与 OH·氧原子距离最长为 H25 位 1.612，H26 位 C-H 键键长最长 1.180 Å。这和 OH·作用烷基过氧化氢时过渡态角度 164°相近，表明 Neu5Gc 非羟基氢原子具有烷基氢性质[28]。

2.5 298~453K 温度范围内反应速率

对 Neu5Gc 不同氢原子位点抽氢反应在 298~453 K 温度范围内进行计算，得到不同温度下的反应速率。为模拟食品加工过程中反应速率变化情况，列出常温 298 K(25 ℃)、蒸煮温度 373 K(100 ℃)和油炸最高温度 453 K(180 ℃)下的各通道反应速率，结果如表 4。

从表 4 可以看出，不同介质条件下抽氢反应速率随温度逐步上升，呈现出温度效应。298 K 到 453 K 间，三种介质下非羟基氢位总反应速率均高于羟基氢（H31、H34、H35、H36、H39、H40、H41）总反应速率。不同氢原子间反应速率，非羟基氢原最大可高于羟基氢位 10^8 倍。373 K 到 453 K 间，气相非羟基氢 H27 位反应速率仅增快 17 倍，苯相下仅增快 10 倍，水相下 H30 位氢原子位反应速率仅增快 9 倍，表明 H27 和 H30 位抽氢是动力学上不利的。从表 4 可知，除 H27 和 H30 外，非羟基氢与 OH·反应速率在 1E-19 到 1E-16 cm^3/molecule/s 范围之间，这远小于杜蒙蒙等以 OH·对二噁英降解计算得到的反应速率[29]，也远小于丙酸甲酯与 OH·一步抽氢的速率范围（1E-12 到 1E-13 cm^3/molecule/s）[30]，表明 Neu5Gc 分子非羟基氢较为稳定，不易被温和氧化。通过比较 Garzón 等以香豆酸和 OH·、·OCH_3 等活性氧粒子相互作用计算得到的结果，发现 Neu5Gc 与 OH·的反应速率远远小于香豆酸，仅和·OCH_3 的反应速率相当[31]，表明 Neu5Gc 有一定的抗氧化能力，同样的，Neu5Gc 羟基脱氢最低解离能值（433.43 kJ/mol）也表征出其具有一定抗氧化能力[32]。

表 4 298 K、373 K 和 453 K 下 Neu5Gc 抽氢反应速率(单位：cm^3/molecule/s)

Table 4 Rate of hydrogen abstraction of Neu5Gc at 298K、373K and 453K (cm^3/molecule/s)

T	气相			苯相			水相		
	298 K	373 K	453 K	298 K	373 K	453 K	298 K	373 K	453 K
H23	3.48E-17	1.59E-16	4.95E-16	2.00E-19	2.82E-18	1.93E-17	7.43E-18	4.18E-17	1.51E-16
H24	1.31E-16	3.98E-16	9.30E-16	1.65E-17	8.31E-17	2.78E-16	8.04E-16	1.88E-15	3.70E-15
H25	4.17E-17	1.98E-16	6.30E-16	3.60E-18	3.31E-17	1.66E-16	1.54E-16	4.82E-16	1.14E-15
H26	8.93E-19	8.75E-18	4.69E-17	1.13E-19	1.70E-18	1.24E-17	1.81E-18	1.29E-17	5.50E-17
H27	5.96E-22	3.02E-20	5.17E-19	5.69E-20	1.43E-18	1.50E-17	4.90E-18	3.49E-17	1.51E-16
H28	2.27E-17	1.37E-16	5.24E-16	3.20E-20	5.47E-19	4.35E-18	2.60E-19	3.10E-18	1.91E-17
H29	1.72E-17	1.09E-16	4.31E-16	4.19E-18	3.74E-17	1.89E-16	3.81E-15	5.35E-15	7.34E-15
H30	9.42E-19	9.45E-18	5.09E-17	1.45E-19	2.40E-18	1.82E-17	5.86E-21	1.30E-19	1.20E-18
H32	1.03E-18	1.08E-17	6.05E-17	4.92E-18	5.12E-17	2.88E-16	1.09E-14	2.44E-14	4.62E-14
H33	4.03E-18	3.54E-17	1.75E-16	2.13E-18	2.09E-17	1.12E-16	1.58E-16	4.95E-16	1.18E-15
H37	2.11E-17	1.79E-16	8.74E-16	5.38E-19	8.66E-18	6.63E-17	1.67E-16	4.37E-16	9.18E-16
H38	1.08E-17	8.23E-17	3.73E-16	1.89E-18	2.63E-17	1.83E-16	2.51E-15	4.73E-15	7.97E-15
总和	2.86E-16	1.32E-15	4.59E-15	3.43E-17	2.69E-16	1.35E-15	1.85E-14	3.78E-14	6.88E-14
H31	2.41E-21	1.08E-19	1.70E-18	4.25E-19	7.93E-18	6.60E-17	2.85E-21	1.24E-19	1.84E-18
H34	1.52E-22	9.35E-21	1.78E-19	3.63E-21	1.29E-19	1.66E-18	1.06E-21	5.36E-20	8.82E-19
H35	2.89E-20	7.97E-19	8.58E-18	7.35E-20	2.11E-18	2.35E-17	1.45E-19	2.68E-18	2.15E-17
H36	1.34E-20	5.89E-19	8.93E-18	1.04E-18	1.40E-17	7.82E-17	1.76E-19	2.80E-18	2.04E-17
H39	6.83E-17	3.48E-16	1.14E-15	1.04E-18	1.12E-17	6.21E-17	1.12E-21	4.66E-20	6.65E-19
H40	1.60E-18	2.29E-17	1.57E-16	5.69E-18	7.01E-17	4.39E-16	9.55E-19	1.27E-17	8.20E-17
H41	4.50E-21	2.03E-19	3.15E-18	8.65E-21	3.48E-19	4.98E-18	2.86E-18	2.89E-17	1.55E-16
总和	7.00E-17	3.73E-16	1.32E-15	8.28E-18	1.05E-16	6.75E-16	4.13E-18	4.73E-17	2.82E-16

373 K 时，羟基氢原子抽氢速率最大的分别是位气相下 H39 位 3.48E-16；苯相下 H40 位 7.01E-17；水相下 H41 位 2.89E-17 cm^3/molecule/s。对非羟基氢原子，抽氢速率最低的分别为气相下 H27 位 3.02E-20，苯相下 H28 位 5.47E-19，水相下 H28 位 3.1E-18，最大的分别为气相下 H24 位 3.98E-16；水相下 H24 位

8.31E-1，苯相下 H32 位 2.44E-14。453 K 时，羟基氢原子抽氢速率最大的分别为气相下 H39 位 1.14E-15，苯相下 H40 位 4.39E-16，水相下 H41 位 1.55E-16。对非羟基氢原子，抽氢速率最低的分别为气相下 H27 位 5.17E-19，苯相下 H28 位 4.35E-18，水相下 H28 位 1.91E-17，抽氢速率最大的分别是气相下 H24 位 9.30E-16，H32 位 2.88E-16，H38 位 7.97E-15 cm^3/molecule/s。对比李明静等气相下对 CH_3CH_2O 与 HO_2 在 375 K 和 500 K 下抽氢反应的速率，可知 OH·在与同类型的 C-H 键抽氢时，反应速率明显较 HO_2 (1E-40~1E-20 cm^3/molecule/s)快[33]。从表 2 反应势能分析可知，由于 OH·作用 Neu5Gc 非羟基氢原子时，其所要翻越的能垒值远远低于羟基氢原子，故对于该抽氢反应过程，非羟基氢原子的氢抽提反应通道为主通道反应。

2.6 Neu5Gc 一步抽氢反应动力学参数

表 5 Neu5Gc 与 OH·一步抽氢反应动力学参数(298 K~453 K)

Table 5 Kinetic parameters of one-step hydrogen abstraction of Neu5Gc and OH· (298 K~453 K)

位置	气相			苯相			水相		
	A	n	Ea/(kJ/mol)	A	n	Ea/(kJ/mol)	A	n	Ea/(kJ/mol)
H23	8.71E-20	1.99	13.18	1.41E-19	1.98	27.07	4.22E-20	2.02	15.67
H24	3.85E-20	2.00	8.09	5.35E-20	2.02	14.30	2.70E-20	2.13	4.56
H25	4.39E-19	1.80	14.17	2.54E-18	1.67	22.67	1.27E-19	1.87	8.80
H26	2.89E-20	2.17	22.08	1.07E-20	2.32	26.95	4.05E-20	1.99	18.64
H27	1.14E-20	2.43	41.58	1.81E-20	2.52	32.68	1.04E-20	2.33	17.70
H28	3.11E-20	2.28	15.80	1.28E-20	2.21	28.86	1.40E-20	2.24	24.30
H29	2.35E-20	2.31	16.27	3.09E-20	2.32	20.52	8.06E-21	2.16	1.83
H30	3.53E-19	1.83	23.32	9.85E-19	1.76	29.61	1.81E-18	1.42	34.22
H32	2.43E-20	2.26	22.58	7.87E-20	2.32	22.43	1.76E-19	2.20	3.72
H33	3.87E-19	1.93	21.42	6.58E-20	2.18	22.09	4.63E-20	2.02	8.40
H37	7.30E-20	2.39	19.69	5.89E-20	2.35	27.70	3.59E-20	1.94	6.42
H38	2.37E-20	2.38	18.40	5.22E-20	2.45	25.66	2.03E-20	2.18	1.72
H31	3.29E-19	2.05	41.10	3.62E-18	1.82	30.98	5.77E-17	1.30	42.87
H34	1.75E-18	1.63	46.18	5.74E-18	1.52	39.70	3.42E-17	1.34	44.59
H35	2.51E-17	1.43	36.85	3.95E-17	1.53	37.09	1.99E-16	1.07	32.94
H36	1.53E-17	1.73	41.81	4.49E-19	1.88	23.85	3.43E-17	1.24	30.60
H39	4.13E-17	1.26	16.54	2.58E-17	1.26	25.76	4.02E-17	1.18	42.63
H40	4.45E-18	1.79	27.76	1.18E-18	2.06	25.19	4.77E-17	1.31	28.22
H41	3.89E-18	1.79	41.97	2.37E-18	1.87	40.31	8.45E-18	1.53	24.23

为模拟 298 K~453 K 常见食品加工温度范围内 Neu5Gc 与 OH·抽氢反应的动力学性质，对以上 19 条抽氢通道速率常数进行三参数阿伦尼乌斯公式拟合(Euclides et al.，2017)。在 KiSThelP 程序中[21]，三参数阿伦尼乌斯方程公式如(3)，其中 A 为指前因子，Ea 为活化能，n 是温度指数，结果如表 5 所示。

$$k(T) = A \times T^n e^{-\frac{Ea}{RT}} \quad (3)$$

从表 5 中可知，OH·与 Neu5Gc 的抽氢反应活化能值均为正值，表明该反应不存在负温度效应。这和 HO2 与丙基苯在 300~1500 K 范围内拟合的抽氢反应过程活化能为正是一致的[34]。对于 Neu5Gc 非羟基氢原子，其在气相下 H24 位具有最低的活化能 8.09 kJ/mol，其次为 H23 位 13.18 kJ/mol，最大为 H27 位 41.58 kJ/mol。在水相下，H24 位活化能提高到 14.3 kJ/mol，其次为 H29 位 20.52 kJ/mol，H23 位提高到 27.07 kJ/mol，最高为 H27 位 32.68 kJ/mol。苯相下则 H38 位最低 1.72 kJ/mol，其次 H29 位 1.83 kJ/mol，H24 位变为 4.56 kJ/mol，最高为 H30 位 34.22 kJ/mol。对于 Neu5Gc 羟基氢原子，其在气相下 H39 位最低，活化能为 16.54 kJ/mol，H34 位最高，活化能为 46.18 kJ/mol。水相下 H36 位最低，活化能为 23.85 kJ/mol，H39 位提高到 25.76 kJ/mol，H41 位活化能最高为 40.31 kJ/mol。苯相下 H41 位却为最低，24.23 kJ/mol，H34 位最高 44.59 kJ/mol，H39 位提高到 42.63 kJ/mol。气相和苯相下活化能呈现出 H31<H34，H24<H32 的规律，水相下满足 H39<H34 和 H27<H26 的规律，和自然电荷分布对这些氢原子处亲核活性比较结论一致，

表明此处氢原子容易得到电子。考察气相、苯相、水相下，非羟基氢平均活化能，其分别为 19.71、25.04、12.16 kJ/mol，羟基氢原子处抽氢平均活化能分别为：36.03、31.84、35.15 kJ/mol，结合反应速率表 4 可知，OH·作用 Neu5Gc 非羟基氢是热力学上和动力学上均较羟基氢有利的反应，且在水相下，更加易于发生该过程。这表明，虽然局部羟基氢自然分布电荷值略微高于非羟基氢，但考虑到 Neu5Gc 分子中非羟基氢数量明显多于羟基氢，故 Neu5Gc 与 OH·发生抽氢反应主要是通过对非羟基氢的抽提。

3 结论

基于体外羟自由基试验和密度泛函理论计算，获得了 OH·作用 Neu5Gc 的抽氢路径、反应能垒、主抽氢反应通道信息，主要结论如下：

3.1 OH·模拟体系表明紫外处理过程中适量添加 H_2O_2 可提高对 Neu5Gc 的降解效率，4 ℃下当处理组合为 15 W，60 min，H_2O_2 添加量 2%时降解效果最佳为 76.23%±2.17%。

3.2 对 OH·与 Neu5Gc 中两类氢原子(羟基氢原子和非羟基氢原子)一步抽氢过程热力学计算表明：抽氢过渡态结构满足 X...H (X=N,O,C) 键长范围为 1.078~1.206 Å，X-H...O 键长范围为 1.209~1.650 Å，键角范围为 138.7~173.2°。对反应能垒，气相和苯相下 Neu5Gc 的 H24 位氢最小分别为 13.20 kJ/mol 和 19.54 kJ/mol，水相下 H29 位最低 6.25 kJ/mol。反应活化能气相下最低的为 H39 位 8.09 kJ/mol；苯相下则 H38 位最低 1.72 kJ/mol，水相下 H24 位最低 14.3 kJ/mol。表明 Neu5Gc 非羟基氢原子处的抽提比羟基氢处热力学上有利。

3.3 食品加工温度 298 K~453 K 范围内，OH·对 Neu5Gc 抽氢反应速率表明气相、苯相和水相下，373 K 时抽氢速率最大的分别是 H24 位 3.98E-16，H24 位 8.31E-17，H32 位 2.44E-14 cm^3/molecule/s，453 K 时反应速率最大的分别为 H39 位 1.14E-15、H40 位 4.39E-16，H38 位 7.97E-15 cm^3/molecule/s。对于两类氢原子，非羟基氢原子处的氢抽提反应速率可高于羟基氢处 10^8 倍，表明 Neu5Gc 非羟基氢抽提比羟基氢抽提在动力学上有利。因此，OH·降低 Neu5Gc 含量的主要原因是对其非羟基氢原子的氢抽提反应。

参考文献

[1] Crippa A, Larsson S C, Discacciati A, et al. Red and processed meat consumption and risk of bladder cancer: a dose-response meta-analysis of epidemiological studies [J]. European journal of nutrition, 2018, 57(2), 689-701

[2] Johnson I T. The cancer risk related to meat and meat products [J]. British medical bulletin, 2017, 121(1): 73-81

[3] Alisson-Silva F, Kawanishi K, Varki A. Human risk of diseases associated with red meat intake: Analysis of current theories and proposed role for metabolic incorporation of a non-human sialic acid [J]. Molecular Aspects of Medicine, 2016, 51: 16-30

[4] Ssmraj A N, Pearce O M, Läubli H, et al. A red meat-derived glycan promotes inflammation and cancer progression [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2015, 112(2): 542-547

[5] United States Department of Agriculture Foreign Agricultural Service, Livestock and Poultry: World Markets and Trade-World Production, Markets, and Trade Reports [DB/OL], (2019, 4, 9) [2019, 4,15] https://www.fas.usda.gov/data/livestock-and-poultry-world-markets-and-trade

[6] Pearce O M, Läubli H. Sialic acids in cancer biology and immunity [J]. Glycobiology, 2015, 26(2): 111-128

[7] Wang B, Brand-Miller J. The role and potential of sialic acid in human nutrition [J]. European Journal of Clinical Nutrition, 2003, 57(11): 1351

[8] Samraj A, Läubli H, Varki N, et al. Involvement of a non-human sialic acid in human cancer [J]. Frontiers in Oncology, 2014, 4: 33

[9] Iijimar R, Takahashi H, Ikegami S, et al. Characterization of the reaction between sialic acid (N-acetylneuraminic acid) and hydrogen peroxide [J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2007, 30(3): 580-582

[10] Ohnishi S, M A N, Thanan R, et al. DNA damage in inflammation-related carcinogenesis and cancer stem cells [J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2013, ID:387014

[11] Valko M, Rhoders C, Moncol J, et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer [J]. Chemico-biological interactions, 2006, 160(1): 1-40

[12] Muruganandham M, Swaminathan M. Decolourisation of reactive orange 4 by Fenton and photo-Fenton oxidation technology [J]. Dyes and Pigments, 2004, 63(3): 315-321

[13] V á squez-Vivar J, Kalyanaraman B, Kennedy M C. Mitochondrial aconitase is a source of hydroxyl radical an electron spin resonance investigation [J]. Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(19): 14064-14069

[14] Biliński T, Krawiec Z, Liczmański A, et al. Is hydroxyl radical generated by the Fenton reaction *in vivo*? [J].

Biochemical and biophysical research communications, 1985, 130(2): 533-539

[15] Raha S, Robinson B H. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing [J]. Trends in Biochemical Sciences, 2000, 25(10): 502-508

[16] Puppo A, Halliwell B. Formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron. Is haemoglobin a biological Fenton reagent? [J]. Biochemical Journal, 1988, 249(1): 185-190

[17] Kang D C, Zou Y H, Cheng Y P, et al. Effects of power ultrasound on oxidation and structure of beef proteins during curing processing [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2016, 33: 47-53

[18] Caluccl L, Pinzino C, Zandomeneghi M, et al. Effects of γ-irradiation on the free radical and antioxidant contents in nine aromatic herbs and spices [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 1(4): 927-934

[19] Choe E, Min D B. Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods [J]. Journal of Food Science, 2005, 70(9): 142-159

[20] 梁美莲,朱秋劲,刘春丽,等.不同加工处理方式对牛肉中Neu5Gc 解离的影响[J].食品科学,2018,39(10):28-34
LIANG Mei-lian, ZHU Qiu-jin, LIU Chun-li, et al. Dissociation effect of different treatments on n-glycolylneuraminic acid in beef [J]. Food Science, 2018, 39(10): 28-34

[21] Canneaux S, Bohr F, Henon E. KiSThelP: a program to predict thermodynamic properties and rate constants from quantum chemistry results [J]. Journal of Computational chemistry, 2014, 35(1): 82-93

[22] Alecu I, Zheng J, Zhao Y, et al. Computational thermochemistry: scale factor databases and scale factors for vibrational frequencies obtained from electronic model chemistries [J]. Journal of Chemical Theory and Computation, 2010, 6(9): 2872-2887

[23] Wigner E. Über das überschreiten von potentialschwellen bei chemischen reaktionen [J]. Zeitschrift für Physikalische Chemie, 1932, 19(1): 203-216

[24] Anzovino M E, Bretz S L. Organic chemistry students' ideas about nucleophiles and electrophiles: the role of charges and mechanisms [J]. Chemistry Education Research and Practice, 2015, 16(4): 797-810

[25] O'hagan D. Understanding organofluorine chemistry. An introduction to the C-F bond [J]. Chemical Society Reviews, 2008, 37(2): 308-319

[26] Chang R, Yang B, Zhu Q J. Theoretical studies on the electronic structure parameters and reactive activity of neu5gc and neu5ac under food processing solvent environment [J]. Molecules, 2019, 24(2): 313

[27] Shi J, Ra J Y, Qin C L, et al. Kinetic mechanisms of hydrogen abstraction reactions from methanol by methyl, triplet methylene and formyl radicals [J]. Computational and Theoretical Chemistry, 2015, 1074: 73-82

[28] 陈芳芳,孙晓慧,姚倩,等.烷基过氧化氢中氢提取反应类大分子体系的反应能垒与速率常数的精确计算[J].化学学报,2018,76(4):311-318
CHENG Fang-fang, SUN Xiao-hui, YAO Qian, et al. Accurate calculation of the energy barriers and rate constants of the large-size molecular reaction system for abstraction from alkyl hydroperoxides [J]. Acta Chimica Sinica, 2018, 76(4): 311-318

[29] 杜蒙蒙,温正城,李源,等.OH·自由基降解二英 OCDD 的反应机理及动力学研究[J].环境科学学报,2018,38(3):961-967
DU Meng-meng, WEN Zheng-cheng, LI Yuan, et al. Mechanism and kinetic study on the destruction of OCDD by OH radical [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 38(3): 961-967

[30] Mahmoud M A, El-demerdash S H, Gogary T M E, et al. Oxidation of methyl propanoate by the OH radical [J]. Russian Journal of Physical Chemistry A, 2018, 92(12): 2476-2484

[31] Garzon A S, Bravo I N, Barbero A J, et al. Mechanistic and kinetic study on the reactions of coumaric acids with reactive oxygen species: a DFT approach [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(40): 9705-9710

[32] 常瑞,梁美莲,周樱子,等.N-羟乙酰神经氨酸分子的结构性质[J].食品科学,2018,39(23):7-15.
CHANG Rui, LIANG Mei-lian, ZHOU Yin-zi, et al. Theoretical study on structural properties of N-Glycolylneuraminic acid [J]. Food Science, 2018, 39(23): 7-15

[33] 李明静,张宇航,王凯,等.CH_3CH_2O 与 HO_2 抽氢反应与主通道速率常数的理论研究[J].分子科学学报,2018,34(3): 211-217
LI Ming-jing, ZHANG Yu-hang, WANG Kai, et al, Theoretical study on the hydrogen abstraction and the main channel rate constant of CH_3CH_2O and HO_2 [J]. Journal of Molecular Science, 2018, 34(3): 211-217

[34] Altarawneh M, Dlugogorski B Z. Reactions of HO_2 with n-propylbenzene and its phenylpropyl radicals [J]. Combustion and Flame, 2015, 162(4): 1406-1416