

УДК 577.1 + 541.128 (575.2)(04)

**ХИМИЧЕСКИЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ ПРОДУКТОВ КОНДЕНСАЦИИ
ПИРИДОКСАЛЯ С АМИНОКИСЛОТАМИ В РАЗЛИЧНЫХ СРЕДАХ**

Ф.В. Пищугин, И.Т. Тулебердиев, А.С. Султанкулова, З.Ш. Шаршеналиева

Приведены данные по химическим превращениям продуктов конденсации аминокислот и пиридоксаль в зависимости от pH среды, растворителя. Предложена схема механизма распада и химических превращений оснований Шиффа в различных условиях.

Ключевые слова: кинетика; механизм; аминокислоты; пиридоксаль; pH среды; растворитель.

Критический анализ ферментативных исследований, приведенных в литературе [1–3], анализ наших кинетических и синтетических результатов (рис. 1) показал, что основания Шиффа в зависимости от их структуры и условий (pH среды, растворитель, температура), в которой они находятся в растворе, могут изменять свою структуру, претерпевать различные превращения. В этом случае основания Шиффа выступают в качестве промежуточных продуктов.

Для доказательства механизма конденсации пиридоксаль (PL) с аминокислотами изучены химические превращения синтезированных нами различных по структуре оснований Шиффа в зависимости от условий, в которых они находятся в растворе.

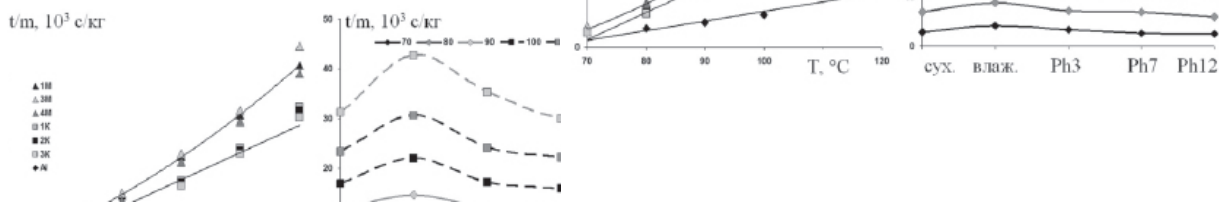
Методом кинетики спектрофотометрически проведены комплексные исследования по изучению устойчивости образующихся в процессе конденсации PL, с аминокислотами оснований Шиффа при различных условиях. Проведены квантово-химические расчеты величин зарядов реагирующих соединений.

Влияние pH среды на скорости и пути химических превращений оснований Шиффа. Изучение кинетики и механизма химических превращений оснований Шиффа при различных pH среды (рис. 1) показало, что при значениях pH

близких к нейтральным, они устойчивы в растворах. В кислых средах оптическая плотность растворов со временем уменьшается, а желтая окраска постепенно исчезает. В слабокислых средах активация реакционного центра происходит за счет протонирования атома азота пиридинового кольца (pK 5,9 [2]), а в более кислых средах – за счет протонирования атома азота C=N связи, с последующим разрушением хелатной структуры (λ_{\max} 430 нм), присоединением молекулы воды и образованием исходных компонентов – PL и аминокислот.

Иной ход реакции наблюдается при переходе в щелочную область. В щелочной среде возникает новый продукт с λ_{\max} 450 нм. Вначале наблюдается резкое уменьшение оптической плотности смеси растворов PL с аминокислотами (λ_{\max} 450 нм), а затем со временем оптическая плотность постепенно возрастает.

Снижение оптической плотности растворов оснований Шиффа в щелочных средах, по-видимому, связано с быстрым отщеплением α -водорода у аминокислотного фрагмента, перестройкой структуры в хиноидную форму. В дальнейшем хиноидная структура под действием воды гидролизует с образованием новых продуктов гидролиза – пиридоксамина (PM) и кетокислоты.



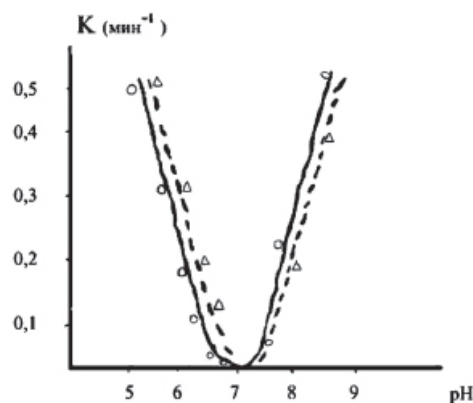


Рис. 1. Зависимость константы скорости распада пиридоксалиденглицина от pH среды (90 % водно-спиртовой буферный раствор, 150 °С, — λ_{\max} 430 нм, --- λ_{\max} 450 нм).

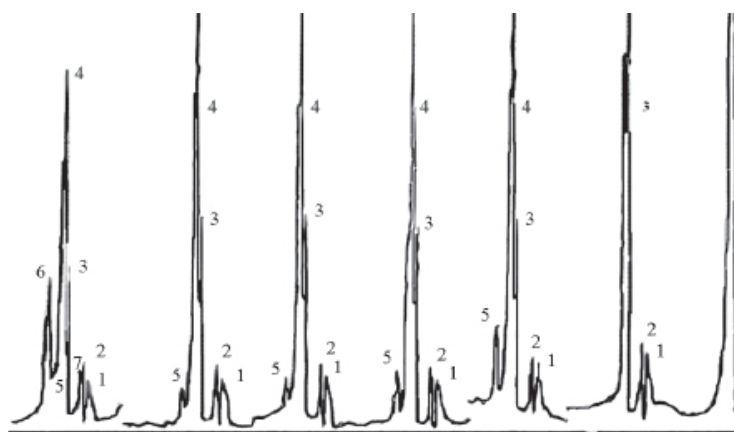


Рис. 2. Хроматограмма взаимодействия 0,0001 М смеси PL с D,L-триптофаном во времени (жидкостной высокоэффективный хроматограф PLC-20 фирмы Cole Parmer; элюент — ацетонитрил 20%, вода 80%; λ 430 нм; V 0,5 мл/мин; C — 185 микрон, интервал каждого закола — 15 мин)

Доказательством предложенной схемы распада продуктов конденсации PL с аминокислотами (оснований Шиффа) было выделение и идентификация конечных продуктов. При кислотном гидролизе после добавления в реакционную смесь избытка спирта, был выделен ряд аминокислот, которые плохо растворимы в этаноле. Выделенные продукты давали качественную реакцию с нингидрином. Оставшиеся в растворе PL после выделения его из раствора идентифицировали методами УФ-, ИК- спектроскопией.

Более сложной задачей было выделение и идентификация продуктов щелочного гидролиза оснований Шиффа. Было замечено, что в ряде случаев при щелочной обработке растворов оснований Шиффа и выдерживании смеси некоторое время, продукты конденсации PL с D,L-триптофаном или L-глутаминовой кислотой в процессе химических превращений давали осадки, которые были выделены и идентифицированы методами элементного анализа, УФ-, ИК- спектроскопией. Ими оказались соответственно натриевые соли β -(3-индолил)- α -кетопропионовой кислоты и α -кетоглутаровой кислоты (качественная реакция с 2,4-динитрофенилгидразином, УФ-, ИК- спектроскопия) [4].

На рис. 1 видно, что с увеличением кислотности скорость гидролиза [5] возрастает, при этом образуется исходные компоненты. Увеличение скорости распада оснований Шиффа при переходе в щелочную среду имеют более сложный характер, поскольку этот путь зависит от

скорости нескольких последовательных стадий: отщепления α -протона от кислотного фрагмента основания Шиффа (г-д) — перестройки основания Шиффа в хиноидную структуру, (г) — гидролиза хиноидной структуры под действием воды и образования конечных продуктов (конечный продукт) — РМ и кетокислоты.

Скорости щелочного распада зависят от степени кислотности α -водорода, pH среды и структуры оснований Шиффа. Карбонильная группа в PL, как показали наши квантово-химические исследования, в отличие от моделей, предлагаемых в работе [1], находится в плоскости, развернутой на 90° относительно плоского пиридинового кольца. Это связано, по нашему мнению, с наличием в PL в орто-положениях двух групп (ОН, CH_2OH), содержащих отрицательно заряженные атомы кислорода, которые отталкивая атом кислорода карбонильной группы, разворачивают ее плоскость на 90°. Расчеты зарядов по методу MNDO продуктов конденсации PL с триптофаном, показали, что чем больше кислотность α -водорода (+0,028) и выше pH среды, тем более вероятен переход оснований Шиффа в хиноидную структуру с последующим ее гидролизом.

Подтверждением предложенной схемы механизма распада оснований Шиффа, служат данные жидкостной хроматографии продуктов взаимодействия PL с D,L-триптофаном (рис. 2).

Анализ хроматографических исследований показал, что уже в начальные промежутки времени интенсивность пика (3) резко падает (это

связано с изменением структуры пиридинового фрагмента), интенсивность пика (5) со временем тоже падает (аминоспирт), а интенсивность (4) возрастает (основание Шиффа). При длительном выдерживании смеси (26 ч) появляются новые пики (6,7) – кетокислота и РМ.

Влияние растворителя на устойчивость оснований Шиффа. Изучение устойчивости оснований Шиффа в зависимости от растворителя показало, что с увеличением процентного содержания воды в водно-спиртовых буферных растворах скорости кислотного и щелочного гидролиза возрастают. Это связано, по-видимому, с тем, что молекулы воды участвуют в процессе распада оснований Шиффа на исходные компоненты (кислые среды) и в процессе гидролиза хиноидных структур оснований Шиффа с образованием кетокислот и пиридоксамина (щелочные среды).

Доказательством в пользу предложенной схемы служат данные по элементному анализу выпавших осадков – кетокислот, их УФ- и ИК-спектрам.

Таким образом, результаты исследований показали, что наибольшей устойчивостью продукты конденсации РЛ с аминокислотами обладают при значениях рН, близких к нейтральным. В кислых средах они распадаются в результате гидролиза на исходные компоненты. В щелочных средах происходит отщепление α -водорода у аминокислотного фрагмента основания Шиффа с образованием хиноидной структуры, последующий гидролиз которой приводит к образованию РМ и кетокислоты.

Синтез оснований Шиффа осуществлялся по методике [4] путем нагревания эквимольных количеств пиридоксаль гидрохлорида с аминокислотами при определенных условиях. Продукты идентифицировались методами элементного анализа, УФ-, ИК- спектроскопией, жидкостной и ТСХ хроматографией.

Синтез пиридоксалиден -D,L-триптофана. Навеску 0,103 г пиридоксаль гидрохлорида растворяли в 5 мл 90 %-ного этанола. Навеску 0,102 г

D,L-триптофана растворяли 72,5 мл смеси 90%-ного этанола и 2,5 мл 0,2 М 90 % ацетатного раствора. Растворы смешивали при комнатной температуре. Смесь, окрашенную в интенсивно желтый цвет, поместили в холодильник на ночь. Выпал желто-оранжевый продукт массой 0,1968 г (94 %) , $T_{пл} > 350^{\circ}\text{C}$ (чернеет с разложением).

ИК-спектр: (KBr): 3402 (N^+H), γ , cm^{-1} : 1600–1616 ($\text{C}=\text{N}, \text{C}=\text{O}, \text{COO}^-$)

УФ-спектр: λ_{max} нм : 350 и 430.

Найдено, %: С 53,1; Н 6,0; N 8,9.

$\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_4\text{Cl}_2\text{Na}$.

Вычислено, %: С 50,8; Н 5,32; N 9,35.

Синтез пиридоксалиден-L-лизина. Навеску 0,103 г пиридоксаль гидрохлорида растворяли в 7 мл 90%-ного этанола. Навеску 0,102 г L-лизина гидрохлорида растворяли при 70°C смеси 15,5 мл 90%-ного этанола и 2,5 мл 0,2 М 90%-ного ацетатного буферного раствора.

После охлаждения смесей до комнатной температуры оба раствора смешивали. Смесь окрашивалась в интенсивно желтый цвет. Смесь растворов выдерживали при комнатной температуре до выпадения желтого осадка. Осадок отфильтровывали. Выход – 0,1675 г (88%), $T_{пл}$ 240°C с разложением.

Уф-спектр: λ_{max} , нм: 350, 420.

Найдено, %: С 43,8; Н 6,23; N 10,15; зольность 6,1.

$\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{O}_4\text{N}_3\text{Cl}_2\text{Na} \cdot \text{H}_2\text{O}$.

Вычислено, %: С 43,0; Н 6,14; N 10,7; зольность 5,9.

Синтез пиридоксалиден – L-аргинина. Навеску 0,02055 г пиридоксаль гидрохлорида растворяли в 5 мл 90%-ного этанола при комнатной температуре, другую навеску 0,021 г L-аргинина растворяли в смеси 50 мл 90%-ного этанола и 3 мл 90%-ного ацетатного буферного раствора при 80°C . Растворы после охлаждения до комнатной температуры смешивали и выдерживали до установления постоянной оптической плотности при λ_{max} 430 нм. Раствор смеси выпаривали при комнатной температуре до образования осадка. Осадок отфильтровали. Выход 0,03580 г (87,5%), $T_{пл} > 306\text{--}307^{\circ}\text{C}$ с разложением.

Уф-спектр: λ_{max} , нм: 350, 420.

Найдено, %: С 39,15; Н 6,78; N 15,7; Cl 9,9.

$\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{O}_4\text{N}_3\text{Cl}_2\text{Na}$.

Вычислено, %: С 40,2; Н 6,5 ; N 16,1; Cl 10,2.

Литература

1. Браунштейн А.Е., Шемякин М.М. Биохимия. 1953. Т.18. Вып.4. С. 393–411.
2. Braunstein A.E. In: The Enzymes, 3-rd end. (P.D. Boyer, ed). 1973. Academic Press Inc. New York. Vol. 9. P. 379–481.
3. Мецлер Д. Биохимия. М.: Мир, 1980. Т.2.
4. Пицугин Ф.В., Тулебердиев И.Т. ЖОХ. 2008. Т.78. Вып.6. С. 997–1001.
5. Лейдлер К. Кинетика органических реакций. М.: Мир, 1966. С. 11–34.