

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ
ИНСТИТУТ ХИМИИ И ХИМИЧЕСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ
ОШСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

МЕЖВЕДОМСТВЕННЫЙ ДИССЕРТАЦИОННЫЙ СОВЕТ Д. 02. 07. 359

На правах рукописи

УДК 577.16 +541.128 (043.3)

Тулeбepдиeв Игopь Тeмepкaнoвич

**ХИМИЧЕСКИЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ АМИНОКИСЛОТ ПОД
ДЕЙСТВИЕМ ВИТАМИНОВ ГРУППЫ В₆**

Специальность: 02. 00. 03 – органическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук**

Бишкек- 2008

Работа выполнена в лаборатории химии биологически активных соединений Института химии и химической технологии Национальной Академии наук Кыргызской Республики.

Научный руководитель: член-корреспондент НАН КР,
доктор химических наук,
профессор Пицугин Федор Васильевич

Официальные оппоненты: доктор химических наук, профессор
Шаршеналиева Зарыл Шаршеналиевна

кандидат химических наук, доцент
Токтосунова Батма Багировна


Ведущая организация: факультет химии и химической технологии
КНУ им. Ж. Баласагына

Защита состоится "31" октября 2008 г. в 9⁰⁰ часов на заседании межведомственного диссертационного совета Д. 02. 07. 359 в Институте химии и химической технологии Национальной Академии наук Кыргызской Республики (соучредитель: Ошский государственный университет Министерства образования и науки Кыргызской Республики) по адресу: г. Бишкек, проспект Чуй 267.

С диссертацией можно ознакомиться в центральной научной библиотеке НАН КР по адресу: 720071, г. Бишкек, проспект Чуй, 265-а.

Автореферат разослан "8" октября 2008 г.

Ученый секретарь межведомственного диссертационного совета, кандидат химических наук, старший научный сотрудник


Ахматова Ж.Т.

Общая характеристика работы

Актуальность работы. Ферменты играют исключительно важную роль во многих биохимических процессах. Предполагают, что основную роль в химических превращениях играют коферменты, которые способствуют селективному расщеплению химических связей. Белковые фрагменты ферментов, по-видимому, оптимизируют ориентацию расщепляемых молекул, что приводит к снижению энергетики, увеличению скоростей и однозначности химических превращений молекул.

Пиридоксаль, пиридоксаль-5'-фосфат, пиридоксамин являются коферментами более 50 ферментативных систем. Они катализируют процессы элиминирования, реакций β -замещения аминокислот, переаминирования, рацемизации, декарбок্সилирования, расщепления боковых цепей аминокислот, реакций трансальдимерования.

Изучение этих биохимических процессов представляет большие трудности из-за сложности ферментативных систем, многообразия и неоднозначности протекания процессов, больших скоростей реакций. Поэтому, очень часто для решения многих теоретических и практических проблем в качестве объектов исследований применяют модельные системы – структурные фрагменты ферментов. Работы по изучению кинетики и механизма взаимодействия аминокислот с коферментами практически отсутствуют. В литературе нет данных о влиянии структуры аминокислот и биоаминов на скорости их превращений под действием пиридоксаля и пиридоксаль-5'-фосфата. Во всех химических реакциях, в том числе и ферментативных, огромную роль играют условия их проведения (рН среды, растворитель, температура), которые изменяют не только скорости химических превращений, но и пути протекания реакций в целом. Таких работ очень мало, а работы по изучению влияния внешних условий на активность коферментов и ферментов, химических превращений оснований Шиффа практически отсутствуют. Для объяснения многих процессов взаимодействия коферментов с аминокислотами, биоаминами и установления структуры исходных, промежуточных и конечных продуктов необходимо изучение кинетики и механизма процессов, проведение квантово-химических расчетов величин зарядов, длин связей с учетом оптимизации их энергетических и геометрических параметров. Работ в этом направлении также нет. Не разработаны методики синтеза продуктов конденсации пиридоксаля и пиридоксаль-5'-фосфата с аминокислотами, биоаминами и их производными. Поэтому, в целом, проведение комплексных кинетических и синтетических исследований в предлагаемых направлениях является очень актуальными.

Исследования по изучению кинетики и механизма конденсации аминокислот с витаминами группы В₆ позволят установить зависимость структуры реагирующих компонентов, величин зарядов на их реакционных центрах, энергетических характеристик, условий взаимодействия (рН среды, растворитель, температура) на скорости и пути протекания не только отдельных стадий, но и реакций в целом; контролировать чистоту и выходы

конечных продуктов. Совокупность результатов исследований может быть использована в качестве эффективных моделей огромного числа ферментативных процессов, открывая возможности использования их в медицине и биотехнологии.

Работа выполнена по программе: “Химическая модификация углеводов, полисахаридов, витаминов для получения лекарственных и биологически активных соединений” лабораторией химии биологически активных соединений Института химии и химической технологии НАН КР, № гос. регистрации 0003939.

Цели и задачи исследования.

Цель работы - комплексные исследования закономерностей взаимодействия пиридоксала, пиридоксаль-5'-фосфата с аминокислотами и биоаминами и химических превращений оснований Шиффа в различных условиях, установление схемы механизма реакций.

Для достижения цели были поставлены задачи:

- изучить кинетику и механизм взаимодействия коферментов (пиридоксаль, пиридоксаль-5'-фосфат) с аминокислотами и биоаминами;
- определить влияние структуры коферментов, аминокислот, биоаминов, оснований Шиффа на скорости и механизм их химических превращений;
- установить зависимость скоростей химических превращений отдельных стадий и реакции в целом от pH среды, растворителя и температуры;
- разработать методики синтеза оснований Шиффа, определить их устойчивость и механизм химических превращений в различных средах;
- для установления структуры, зарядов, длин связей исходных, промежуточных и конечных продуктов провести квантово-химические расчеты молекул с учетом оптимизации их энергетических и геометрических параметров;
- установить влияние стереохимических факторов аминокислот и оснований Шиффа на пути и механизм их химических превращений;
- установить общую схему механизма взаимодействия коферментов с аминокислотами.

Научная новизна работы.

Впервые проведены комплексные исследования модельных систем ферментативных процессов - взаимодействие пиридоксала и пиридоксаль-5'-фосфата с аминокислотами и биоаминами; установлена зависимость процесса образования и химических превращений оснований Шиффа от их структуры и условий проведения реакций; определена роль фосфатной группы в пиридоксаль-5'-фосфате на скорости образования и химических превращений оснований Шиффа; квантово-химическим методом установлена пространственная структура коферментов, продуктов их взаимодействия с аминокислотами и химических превращений оснований Шиффа, определены их геометрические и энергетические параметры.

Практическая значимость полученных результатов. Результаты проведенных исследований могут быть использованы: 1 - в качестве моделей при изучении сложных ферментативных процессов с участием PLP-зависимых систем - трансаминаз, декарбоксилаз, сингетаз, дегидратаз и др.; 2 - для

подбора оптимальных условий синтеза оснований Шиффа, кетокислот и их производных с целью получения новых биологически активных соединений, которые могут найти применение в медицине, биотехнологии, разработки стимуляторов роста растений.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту.

- изучены кинетики и механизм взаимодействия пиридоксала, пиридоксаль-5'-фосфата с аминокислотами и аминами;
- установлена многостадийная схема механизма конденсации коферментов с аминокислотами и аминами;
- произведена количественная оценка скоростей отдельных стадий и реакции конденсации в целом в различных условиях;
- синтезировано 14 новых соединений, установлена их структура, доказаны схемы их химических превращений в различных условиях;
- установлено влияние структурных коферментов, аминокислот, аминов и условий среды (pH, растворитель и температура) на скорости и механизмы их химических превращений;
- определена роль стерео- и геометрических факторов аминокислот и оснований Шиффа на механизмы их химических превращений;
- предложена общая схема механизма конденсации коферментов с аминокислотами и химических превращений оснований Шиффа в различных условиях.

Личный вклад соискателя. Проведен критический анализ литературных данных; изучены кинетики и механизм конденсации пиридоксала, пиридоксаль-5'-фосфата с аминокислотами, аминами и химические превращения оснований Шиффа в различных условиях; проведены квантово-химические расчеты структур исходных, промежуточных и конечных продуктов; синтезированы 14 новых соединений, произведена их идентификация современными физико-химическими методами; установлена общая схема механизма взаимодействия коферментов с аминокислотами и схемы химических превращений оснований Шиффа.

Апробация результатов диссертации. Результаты исследований докладывались на конференции ученых ИХиХТ НАН КР, посвященной “Дню химика”, г. Бишкек, 2004 г.

Опубликованность результатов. Материалы диссертации опубликованы в 9 научных статьях, из них 1 - за рубежом (Россия).

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, 3 глав, выводов, списка используемой литературы и приложения; изложена на 135 страницах машинописного текста, включая 40 рисунков, 6 таблиц, 19 схем. Библиография состоит из 101 наименования.

Основное содержание работы

Во введении изложены актуальность поставленной проблемы, выбор объектов исследований, сформулированы цели и задачи исследования, научная

новизна и практическая ценность полученных результатов, сформулированы основные положения выносимые на защиту.

В первой главе приводится критический анализ литературных данных по физико-химическим и кислотно-основным свойствам аминокислот, пиридоксала (PL), пиридоксаль-5'-фосфата (PLP), анализ имеющихся в литературе работ, по химическим превращениям аминокислот и аминокислот под действием коферментов и ферментов, рассматриваются вопросы пространственной структуры оснований Шиффа.

Вторая глава посвящена характеристике объектов исследования, методам измерения кинетики взаимодействия пиридоксала и пиридоксаль-5'-фосфата с аминокислотами; расчетам констант скоростей каждой стадии; синтезу и идентификации оснований Шиффа и продуктов их химических превращений современными физико-химическими методами; приводятся квантово-химические расчеты структур исходных, промежуточных и конечных продуктов.

В качестве объектов исследований использовали гидрохлорид пиридоксала фирмы "Merck", пиридоксаль-5'-фосфат фирмы "Ferak", аминокислоты фирмы "Reanal". Буферные растворы готовили по общепринятой методике. Кинетику реакций конденсации и химических превращений оснований Шиффа измеряли на спектрофотометре "Spectro MOM-204" при заданных параметрах с точностью $\pm 0,02$ ед. Д. Реакционные смеси термостатировали при помощи термостата УН-8 с точностью $\pm 0,1^\circ\text{C}$. Навески пиридоксала и пиридоксаль-5'-фосфата, аминокислот и аминов в эквимольных количествах растворяли в водно-спиртовых буферных растворах и выдерживали их при заданных температурах в течение 30 мин. За начало реакции принимали момент смешивания термостатированных растворов пиридоксала или пиридоксаль-5'-фосфата и аминокислот. Кинетику гидролиза оснований Шиффа и их химических превращений снимали путем приготовления их 0,01 М растворов в буферных системах при заданных значениях pH среды. За начало реакции принимались моменты добавления в реакционную смесь растворов HCl или NaOH.

pH реакционных смесей измеряли на универсальном иономере ЭВ-74 с точностью отсчета $\pm 0,05$ ед. pH.

Кинетические измерения проводились в термостатированных кюветах толщиной 1,008 мм.

Было установлено, что УФ-спектры растворов гидрохлорида пиридоксала и пиридоксаль-5'-фосфата, ввиду наличия у них двух протон-донорных и протон-акцепторных участков, изменяются в зависимости от растворителя и pH среды. Поэтому в качестве кювет сравнения брали растворители или растворы пиридоксала или пиридоксаль-5'-фосфата в условиях, аналогичных условиям конденсации.

При таком подходе оптическая плотность смеси исходных растворов в процессе конденсации зависит только от образования промежуточных и конечных продуктов реакции и не зависит от изменения оптической плотности исходных компонентов.

Для установления механизма конденсации и расчета констант скоростей каждой стадии определяли порядок реакции путем варьирования концентраций реагирующих компонентов и измерения кинетики в сопоставимых условиях.

Константы скорости конденсации пиридоксала или пиридоксаль-5'-фосфата с аминокислотами каждой стадии и константы скорости химических превращений оснований Шиффа рассчитывали по калибровочным графикам, связывающим оптические плотности продуктов взаимодействия с их концентрациями для необратимых и обратимых реакций по уравнениям первого и второго порядка. Энергии активации реакции рассчитывали путем измерения констант скоростей реакции конденсации аминокислот с пиридоксалем и пиридоксаль-5'-фосфатом при различных температурах. (К.Лейдлер, "Кинетика органических реакций", М. "Мир", 1966).

Оптические плотности аминокислот определяли экспериментально путем измерения их в момент смешивания растворов пиридоксала или пиридоксаль-5'-фосфата с аминокислотами в условиях, при которых скорость дегидратации была минимальной. Оптические плотности синтезированных оснований Шиффа определяли путем растворения их в буферных системах при заданных условиях (Д.Мешлер, "Биохимия", М. "Мир", 1980, Т. 2).

В процессе химических превращений продуктов конденсации PL или PLP с D,L-триптофаном и L-глутаминовой кислотой в щелочных средах через определенные промежутки времени выпадали осадки соответствующих солей кетокислот, поэтому параллельно в термостате в условиях, аналогичных условиям измерения кинетики, выдерживали растворы оснований Шиффа с фиксацией времени начала выпадения осадков. Кинетика химических превращений оснований Шиффа измерялась до начала выпадения осадков.

Основания Шиффа синтезировались по общей методике. Смеси растворов эквимольных количеств гидрохлорида пиридоксала или пиридоксаль-5'-фосфата с аминокислотами нагревали при 60-70 $^\circ\text{C}$ в течение 15-30 мин с последующим выделением и перекрестилизацией конечных продуктов.

Для идентификации исходных, промежуточных и конечных продуктов использовали современные физико-химические методы исследования: УФ-спектроскопию (Spectro MOM-204), ИК-спектроскопию (Nicolet Avatar 370DtGS), хроматографию (жидкостной эффективный хроматограф PLC-20, фирмы "Cole Parmer"), элементный анализ; определение молярной массы проводили методом криоскопии и сравнения полученных результатов с литературными данными.

1) 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%-ного ацетатного буферного раствора. Растворы смешивали при комнатной температуре. Смесь, окрашенную в интенсивно желтый цвет, помещали в холодильник на ночь. Выпадал желто-оранжевый продукт массой 0,1968 г (94%), Tпл. > 350 $^\circ\text{C}$ (чернеет с разложением).

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

УФ-спектр; λ_{max} нм: 350 и 430, Найдено, %: C 53,1; H 6,0; N 8,9.



Вычислено, % : С 50,8; Н 5,32 ; N 9,35.

2) 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 в смеси 15,5 мл 90%-ного этанола и 2,5 мл 0,2 М 90%-ного ацетатного буферного раствора при 70°C.

После охлаждения смесей до комнатной температуры оба раствора смешивали. Смесью окрашивалась в интенсивно желтый цвет. Смесью растворов выдерживали при комнатной температуре до выпадения желтого осадка. Осадок отфильтровывали. Выход 0,1675 г (88%), $T_{пл}$ 230°C (с разложением).

Уф- спектр; λ_{max} , нм: 350, 420.

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

$C_{14}H_{24}N_3O_4Cl_2Na$. Вычислено, % : С 43,0; Н 6,14 ; N 10,7 ; зольность 5,9.

3) Синтез пиридоксалиден - L-аргинина.

Навеску 0,2055 г пиридоксаль гидрохлорида растворяли в 5 мл 90%-ного этанола при комнатной температуре, другую навеску 0,21 г солянокислого 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 постоянной оптической плотности при λ_{max} 430 нм. Раствор смеси выпаривали при комнатной температуре до образования осадка. Осадок отфильтровали. Выход 0,3580 г (87,5%), $T_{пл}$ > 306-307°C (с разложением).

Уф- спектр, λ_{max} , нм: 350, 420.

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

$C_{19}H_{23}N_3O_4Cl_2Na$. Вычислено, % : С 40,2; Н 6,5 ; N 16,1; Cl 10,2.

4) Синтез пиридоксалиден-L-α-аланина и пиридоксалиден- D-α-аланина производился по выше приведенным методикам.

1. Выход пиридоксалиден-L-α-аланина 0,11 г, (73%)

Найдено, % : С 41,17 Н 4,78 N 9,77 ; $C_{10}H_{13}N_2O_4 \cdot HCl$

Вычислено, % : С 42,1 Н 4,92 N 9,84

2. Выход пиридоксалиден-D-α-аланина 0,096 г, (64%)

Найдено, % : С 42,0 Н 4,85 N 9,64 ; $C_{10}H_{13}N_2O_4 \cdot HCl$

Вычислено, % : С 42,1 Н 4,92 N 9,84

ИК спектры оснований Шиффа (KBr)

γ, cm^{-1} : 1631 (C=N), 1528, 1414 (COO⁻)

Третья глава посвящена обсуждению результатов экспериментальных исследований.

Реакционная способность пиридоксаля (PL) и пиридоксаль-5'-фосфата (PLP) с аминокислотами и аминами зависит от многих факторов:

- 1- структуры аминокислот и аминов,
- 2- основности их NH₂- групп,
- 3- стерических факторов,

4- структуры коферментов,

5- кислотно-основных свойств коферментов,

6- условий взаимодействия (рН среды, температура, растворитель).

Экспериментально установлено, что при смешивании бесцветных эквимольных растворов пиридоксаля и аминокислот раствор смеси мгновенно окрашивается в желтый цвет с появлением новых максимумов поглощения: при значениях рН, близких к нейтральным - λ_{max} 430 нм, при переходе в щелочную среду появляется новый максимум поглощения - λ_{max} 450 нм.

Изучение изменения интенсивности поглощения в спектрах реакционных смесей во времени показало, что вначале оптическая плотность растворов мгновенно падает, после чего начинает медленно возрастать. Затем по истечении некоторого времени интенсивность поглощения снова падает, при этом появляются максимумы поглощения конечных продуктов (рис. 1).

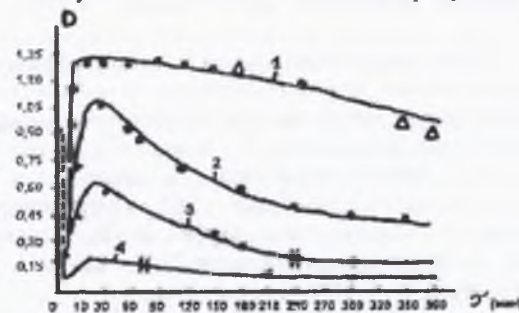


Рис. 1. Кинетика конденсации 0,01М растворов PL с D,L- Tгр в зависимости от процентного содержания спирта в водно-этанольных буферных растворах (1 - 70%, 2 - 50%, 3 - 30%, 4 - 10% ; λ_{max} 430 нм; 50°C; рН 6,45).

Было сделано предположение, что первая стадия (очень быстрая) – это присоединение аминокислоты к карбонильной группе пиридоксаля с образованием аминоспирта (падение оптической плотности растворов смеси). Вторая стадия (медленная) – дегидратация аминоспирта с образованием основания Шиффа (возрастание оптической плотности растворов смеси). Третья стадия (очень медленная) – химические превращения оснований Шиффа (рис.1).

Для доказательства предполагаемой схемы механизма была изучена кинетика отдельных стадий, определены их порядки реакций.

К сожалению, первая стадия - образование аминоспирта – протекает в данных условиях практически мгновенно, поэтому измерить ее кинетику даже при низких температурах (5°C) не удалось.

Однако, доказательством в пользу предложенной схемы механизма конденсации служат изучение кинетики взаимодействия пиридоксаля с

пиперидином и L-пролином - вторичными аминами, способными образовывать на стадии присоединения - только аминоспирты.

При взаимодействии пиридоксала со вторичными аминами (L-пролин и пиперидин) оптическая плотность уменьшается в зависимости от их структуры - для пролина (быстро), для пиперидина (медленнее) с образованием аминоспиртов. Стадия дегидратации (увеличение оптической плотности смеси) не наблюдается, так как аминоспирты с вторичной аминогруппой не способны к отщеплению воды.

Изучение кинетики и механизма взаимодействия аминокислоты, имеющей вторичную аминогруппу - пролина с пиридоксалем показало, что пролин не может участвовать в биохимических процессах под действием трансаминаз, поскольку вторичные амины из-за специфичности своей структуры не могут отщеплять молекулу воды из образующихся в процессе конденсации аминоспиртов с образованием оснований Шиффа. Они, согласно литературным данным, выполняют роль "колена" в структуре пептидов и белков.

Поскольку образование аминоспиртов в растворе протекает практически мгновенно и зафиксировать кинетику образования промежуточных продуктов не удалось, был разработан метод синтеза аминоспиртов в твердой фазе, путем растирания реагирующих компонентов в агатовой ступке. При растирании эквимольных белых навесок аминокислот и пиридоксала в ступке смесь окрашивается в интенсивный желтый цвет. Тпл. полученных желтых образцов отличается от Тпл. их механических смесей. В ИК - спектрах появляются интенсивные полосы поглощения в области $2341 - 2359 \text{ см}^{-1}$, характерные для протонированных амино-спиртовых фрагментов.

Влияние структуры аминокислот на процесс конденсации.

а) Определенный интерес представляло изучение взаимодействия различных по структуре и pK_a аминокислот с пиридоксалем в сопоставимых условиях проведения конденсации (рис 2).

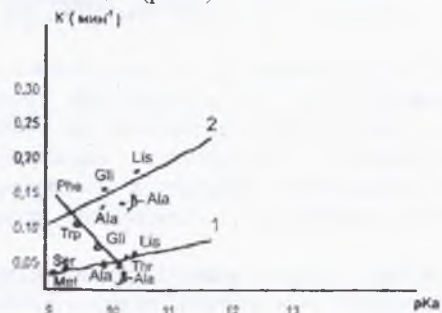


Рис. 2. Зависимость константы скорости конденсации пиридоксала с аминокислотами на стадии дегидратации аминоспиртов от pK_a (1 - 70%, 2 - 90% - буферный раствор; pH 6,75; 20°C).

Интерпретировать полученные результаты довольно сложно. Процесс образования оснований Шиффа, согласно кинетическим исследованиям, состоит из двух последовательных обратимых стадий. На стадии образования аминоспирта увеличение основности NH_2 -группы в аминокислотах приводит к возрастанию скорости образования аминоспирта, на стадии дегидратации, наоборот, увеличение основности NH_2 -группы способствует уменьшению скорости дегидратации. Поскольку изменение оптической плотности смеси растворов пиридоксала и аминокислот фиксирует суммарный процесс (быстрый - образование аминоспиртов, более медленный - образование оснований Шиффа), то разница в реакционной способности аминокислот в целом нивелируется, а константы скоростей колеблются в пределах $5 \cdot 10^{-2} - 3 \cdot 10^{-1} (\text{мин}^{-1})$.

б) Определенный интерес представляло изучение кинетики и механизма взаимодействия аминокислот, имеющих две, три аминогруппы в своей структуре.

К таким многоосновным кислотам способными вступать в реакции конденсации с пиридоксалем и пиридоксаль-5'-фосфатом относится L-лизин и L-аргинин.

Анализ литературных и наших экспериментальных данных показал, что L-лизин вступает в реакцию конденсации с пиридоксалем с $\epsilon - \text{NH}_2$ -группой, поскольку $\epsilon - \text{NH}_2$ -группа более основна ($pK_a = 10,45$) по сравнению с $\alpha - \text{NH}_2$ -группой ($pK_a = 9,00$). Выдерживание эквимольных смесей пиридоксала и L-лизина в течение длительного времени в отличие от α -аминокислот, не приводит к снижению их оптической плотности. Поэтому, как можно предположить, $\alpha - \text{NH}_2$ -группа молекулы лизина участвует в образовании пептидных связей в молекулах белков и ферментов, а $\epsilon - \text{NH}_2$ группа принимает участие в процессах трансальдимирования аминокислот под действием трансальдиназ.

Большой теоретический и практический интерес представляло изучение кинетики и механизма конденсации L-аргинина с пиридоксалем. Для определения, какая из трех аминогрупп L-аргинина участвует в процессе конденсации исследовалась кинетика и механизм взаимодействия структурного фрагмента L-аргинина, солянокислого гуанидина с пиридоксалем. Эти исследования кинетики показали, что L-аргинин взаимодействует с пиридоксалем путем взаимодействия с $\alpha - \text{NH}_2$ -группой, а

фрагмент $\begin{array}{c} \text{NH} \\ \parallel \\ \text{—NH—C—NH}_2 \end{array}$ участвует, по-видимому, в процессе образования мочевины, регенерации орнитина и биохимических превращений его с образованием NO - мощного сосудорасширяющего фактора и нейромедиатора.

в) Большой интерес представляло изучение в сопоставимых условиях кинетики и механизма взаимодействия пиридоксала с аминокислотами, аминами, их эфирами, имеющими одинаковые радикалы. Результаты исследования показали, что на стадии дегидратации наибольшей реакционной способностью обладает L-триптофан ($k_2 = 0,2919 \text{ мин}^{-1}$), наименьшей - его

метиловый эфир ($k_2 = 0,0662 \text{ мин}^{-1}$), триптомин занимает промежуточное положение в ряду активности ($k_2 = 0,0837 \text{ мин}^{-1}$).

Влияние условий среды на скорости конденсации и химических превращений оснований Шиффа

Как показали наши исследования кинетики и механизма конденсации пиридоксаль с аргинином и другими аминокислотами, скорости каждой стадии зависят от условий проведения эксперимента.

Изучение зависимости скорости конденсации на стадии образования основания Шиффа показало, что при значениях рН, близких к нейтральным, возникает продукт с λ_{max} 430 нм. При переходе в щелочную среду образуется новый продукт хиноидной структуры с λ_{max} 450 нм, интенсивность которого со временем падает с образованием в качестве конечных продуктов – кетокислот и пиридоксамина (рис.3).

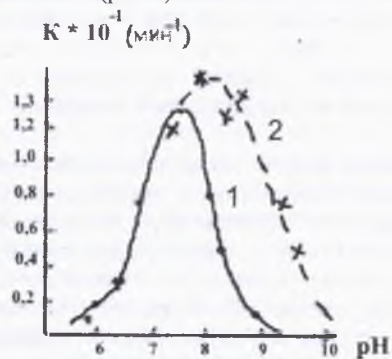


Рис. 3. Зависимость константы скорости взаимодействия L-аргинина с пиридоксаль гидроксидом на стадии образования основания Шиффа (1, λ_{max} 430 нм) и стадии перестройки в хиноидную структуру (2, λ_{max} 450 нм) от рН среды (70% - ный водно-спиртовой буферный раствор, 15°C).

Экстремальная зависимость k/pH характерна не только для модельных систем, но и для многих ферментативных процессов (Д.Мешлер, "Биохимия", М. "Мир", 1980, Т. 2).

Растворитель оказывает существенное влияние не только на скорости отдельных стадий, но и может существенно изменять механизм и пути протекания реакции в целом. Изучение влияния растворителя на скорости стадии дегидратации аминокислот показало, что при увеличении процентного содержания воды в водно-спиртовых растворах константа скорости и выходы оснований Шиффа падают.

Таблица

Зависимость константы скорости стадии дегидратации аминокислот (k) от процентного содержания спирта в водно-этанольных буферных растворах при 20°C и рН 6,65

% спирта	0	35	50	70	90
$k(\text{мин}^{-1})$	0,00081	0,00214	0,00786	0,0422	0,1835

Изучение реакции конденсации, например, пиридоксаль с аргинином при различных температурах и расчеты энергии активации стадии образования оснований Шиффа показало, что при увеличении температуры константы скорости дегидратации аминокислотов изменяются незначительно.

Расчеты энергий активации стадии дегидратации аминокислотов показали, что они лежат в пределах $3 \div 5 \text{ кКал/моль}$. Например, энергия активации конденсации фенилаланина с пиридоксаль гидроксидом на стадии дегидратации аминокислота равна $3,84 \text{ кКал/моль}$ ($16,1 \text{ кДж/моль}$).

Анализ кинетических кривых третьей стадии конденсации пиридоксаль с аминокислотами показал, что константы скорости этой стадии значительно меньше ($k_3 = 0,00326 \text{ мин}^{-1}$), чем константы скорости стадии дегидратации аминокислотов ($k_2 = 0,2348 \text{ мин}^{-1}$). Энергия активации химических превращений например, пиридоксалиден-D,L-триптофана ($E_{\text{акт}} = 20,8 \text{ кДж/моль}$) значительно выше, чем энергия активации стадии дегидратации ($E_{\text{акт}} = 12,1 \text{ кДж/моль}$).

Химические превращения оснований Шиффа.

Изучение кинетики и механизма химических превращений оснований Шиффа при различных условиях показало, что при значениях рН 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 ($\text{pK}_a 5,9$), 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 или PLP 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 или PLP с аминокислотами (λ_{max} 450 нм), а затем со временем оптическая плотность постепенно возрастает.

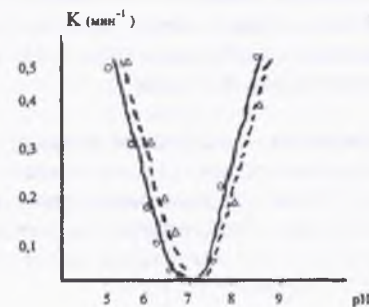


Рис. 4. Зависимость константы скорости распада пиридоксалиден-глицина от pH среды (90% водно-спиртовой буферный раствор, 15°C, — λ_{max} 430 нм, --- λ_{max} 450 нм).

Данные рис.4 показывают, что с увеличением кислотности скорость гидролиза возрастает, при этом образуются 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: 1—отщепления α -протона от кислотного фрагмента основания Шиффа, 2—перестройки основания Шиффа в хиноидную структуру, 3—гидролиза хиноидной структуры под действием воды и образования конечных продуктов — пиридоксамина (PM) и кетокислоты.

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.

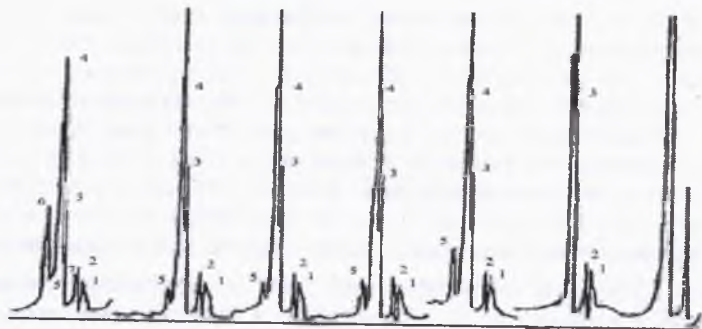
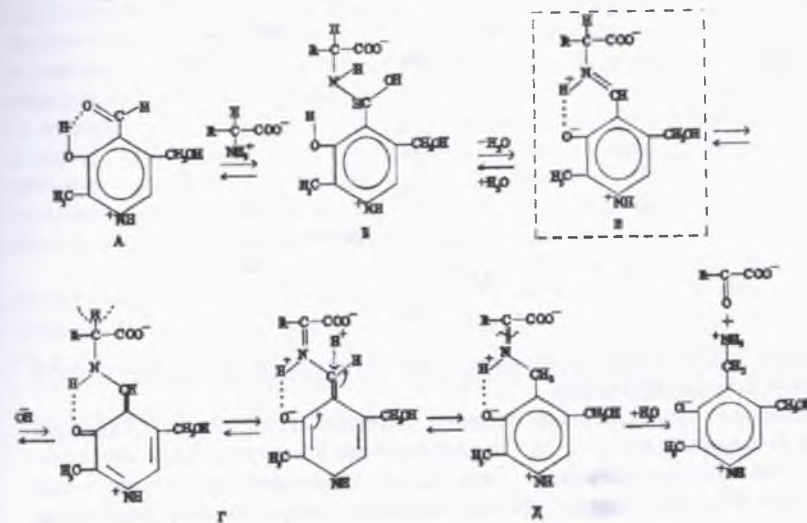


Рис. 5. Хроматограмма взаимодействия 0,0001 М смеси PL с D,L-триптофаном во времени (жидкостной высокоэффективный хроматограф PLC-20 фирмы Cole Parmer; элюент - ацетонитрил 20%, вода 80%; λ 430 нм; V 0,5 мл/мин; C — 185 микрон, интервал каждого закола 15 минут).

Анализ хроматографических исследований показал, что уже в начальные промежутки времени интенсивность пика (3) резко падает (это, по видимому, связано с изменением структуры пиридинового фрагмента), интенсивность пика (5) со временем тоже падает (аминоспирт), а интенсивность (4) опять возрастает (основание Шиффа). При длительном выдерживании смеси (26 ч) появляются новые пики (6,7) — кетокислота и PM.

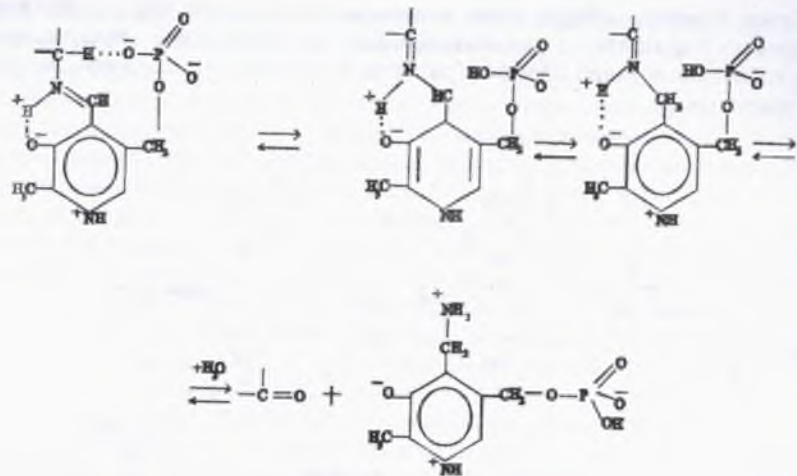
Таким образом, общую схему механизма конденсации пиридоксаля или пиридоксаля-5'-фосфата с аминокислотами и химические превращения образующихся оснований Шиффа в различных условиях эксперимента можно представить так:



Роль фосфатной группы молекулы PLP.

Определенный интерес представляло изучение сравнительной реакционной способности взаимодействия PL и PLP с аминокислотами, а также определение устойчивости образующихся оснований Шиффа в сопоставимых условиях.

Экспериментальные данные показали, что фосфатная группа PLP, обладая акцепторными свойствами, ускоряет стадию присоединения аминокислот к PLP с образованием аминоспирта и стадию дегидратации аминоспиртов. Эта группа также способствует отщеплению α -водорода аминокислотного фрагмента основания Шиффа, перестройке его в хиноидную структуру с последующим гидролизом и образованием пиридоксамина — 5'-фосфата (PMP) и выпадением в осадок натриевой соли β -(3-индолил)- α -кетопропионовой кислоты. Подтверждением этому служит время начала выпадения осадков. При конденсации PL с триптофаном ($k_3=0,08 \cdot 10^{-2} \text{ мин}^{-1}$) осадок начал выпадать после выдерживания смеси в течение 36 часов, а при конденсации PLP с триптофаном ($k_3=0,354 \cdot 10^{-2} \text{ мин}^{-1}$) в аналогичных условиях — через 9 часов. Схему механизма можно представить так:



Влияние стереохимии аминокислот на скорости конденсации и пути превращения оснований Шиффа.

Представляло определенный интерес изучение кинетики и механизма конденсации пиридоксала с L- и D- α -аланинами в сопоставимых условиях. Квантово-химическими методами определили пространственную структуру реагирующих продуктов взаимодействия, величины зарядов на их реакционных центрах, энергию исходных, промежуточных и конечных продуктов. Путем выделения, идентификации промежуточных и конечных продуктов установили механизм их химических превращений.

Анализ кинетических кривых и расчеты констант скоростей для необратимых и обратимых реакций всех стадий показал, что в трех стадиях реакции конденсации с пиридоксалем в сопоставимых условиях L- α -аланин более реакционноспособен по сравнению D- α -аланином. К сожалению измерить кинетику конденсации L- и D- аланинов на стадии их присоединения к пиридоксалу не удалось, из-за очень быстрого протекания реакций даже при низких температурах. Скорость дегидратации аминокислоты с L- α -аланиновым фрагментом несколько выше ($k_{sp}=0.1646 \text{ мин}^{-1}$), чем с D- α -аланиновым фрагментом ($k_{sp}=0.1453 \text{ мин}^{-1}$). Как показали квантово-химические расчеты, карбонильная группа в молекуле пиридоксала повернута на 180° относительно плоскости пиридинового фрагмента, поэтому на стадии присоединения к ней аминокислоты в каждом случае образуют аминокислоты с различным расположением пиридоксалевого и аминокислотных фрагментов в пространстве. Стере-избирательное местоположение структурных фрагментов в аминокислотах, по-видимому, объясняется стабилизацией их структуры за счет образования водородных связей между OH-, NH- группами. Структуры двух аминокислот, рассчитанные квантово-химическими методами, показали, что пространственное расположение и величины зарядов

на реакционных центрах более предпочтительны к дегидратации у основания Шиффа с L-аланиновым фрагментом, по сравнению с основаниями Шиффа с D-аланиновым фрагментом. Результаты кинетических измерений, показали, что скорости элиминирования на третьей стадии - образования хиноидной структуры и последующий гидролиз ее оснований Шиффа с L- α -аланиновым фрагментом ($k_3=0,00363 \text{ мин}^{-1}$) выше, чем у основания Шиффа с D- аланиновым фрагментом ($k_3=0,00173 \text{ мин}^{-1}$). Согласно предложенной Донатаном концепции, было сделано предположение, что у продуктов конденсации пиридоксала с L- α -аланином на третьей стадии происходит элиминирование α -водорода, поскольку в структуре образующегося основания Шиффа α -водород аминокислотного фрагмента располагается перпендикулярно плоскости пиридинового кольца. Далее происходит перестройка молекулы основания Шиффа в хиноидную структуру с последующим ее гидролизом и образованием пиридоксамина и пирувата.

У основания Шиффа с D- α -аланиновым фрагментом на третьей стадии происходит декарбоксилирование, поскольку карбоксильная группа основания Шиффа, в отличие от основания Шиффа, с L- аланиновым фрагментом располагается перпендикулярно плоскости пиридинового кольца, при этом образуется хиноидная структура, гидролиз которой приводит к образованию пиридоксамина и этанала (рис. 5).

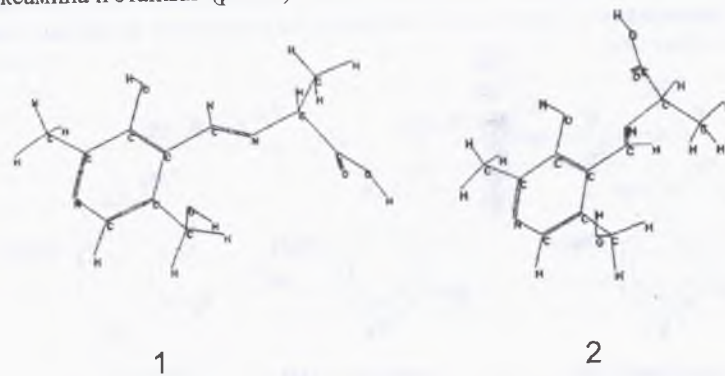


Рис. 6. Квантово-химические модели пиридоксалиден- L - α -аланина (1) и пиридоксалиден- D - α -аланина (2) (структуры представлены с учетом оптимизации энергетических и геометрических параметров).

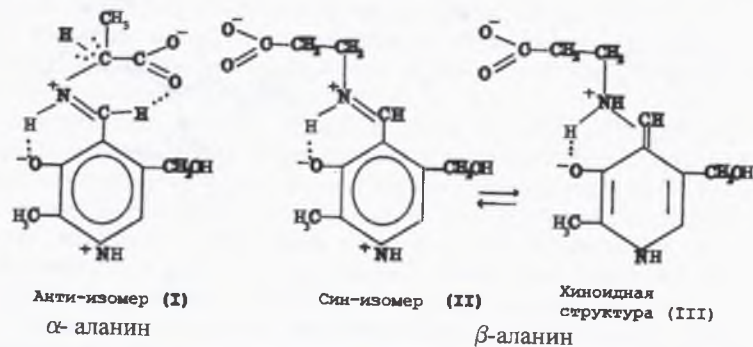
Для изучения механизма химических превращений продукта конденсации пиридоксала с D- α -аланином и доказательства декарбоксилирования в раствор смеси при установившемся постоянном значении оптической плотности (λ_{max} 350 нм и 430 нм) добавляли эквимолярное количество раствора $\text{Ba}(\text{OH})_2$. В момент добавления раствора $\text{Ba}(\text{OH})_2$ наблюдалось помутнение раствора за счет образования BaCO_3 .

Следует отметить, что в присутствии $\text{Ba}(\text{OH})_2$ помутнения раствора D- α -аланина не наблюдалось.

Геометрическая изомерия оснований Шиффа.

Квантово-химические расчеты экспериментальных данных показали, что, при взаимодействии PL с α -аминокислотами образуются преимущественно анти-изомеры, которые стабилизируются за счет образования дополнительной водородной связи между карбонильной группой аминокислоты и атомом водорода иминного фрагмента PL. При взаимодействии PL с β -аминокислотами образование таких стабильных структур не происходит, поскольку семичленные циклы термодинамически неустойчивы, поэтому при конденсации образуются преимущественно син-изомеры.

При благоприятном пространственном расположении аминокислотного фрагмента в основании Шиффа и определенных внешних условиях анти-изомеры отщепляют протон под действием акцепторной группы COOH , перестраивают свою структуру в хиноидную форму с последующим гидролизом и образованием кетокислот и пиридоксамина (PM). Несколькая иная картина наблюдается в продуктах конденсации PL с β -аминокислотами. В этом случае COOH -группа аминокислотного фрагмента удалена от $\text{C}=\text{N}$ -связи, поэтому образуется более стабильная - хиноидная структура, которую можно зафиксировать не только в растворах, но выделить в кристаллическом виде (продукт III).



Выводы

1. Комплексное изучение кинетики и механизма взаимодействия пиридоксала и пиридоксаль-5'-фосфата с аминокислотами и аминами показало, что скорости каждой из трех кинетически различимых стадий зависят от их структуры, основности NH_2 -групп, условий проведения реакций (pH среды, растворитель и температура)
2. Установлено, что образующиеся в результате конденсации основания Шиффа, обладают наибольшей устойчивостью в нейтральных средах. В кислых средах они распадаются на исходные вещества. В щелочных средах происходит отщепление α -водорода у аминокислотного фрагмента,

перестройка основания Шиффа в хиноидную структуру, гидролиз которой приводит к образованию пиридоксамина или пиридоксамина-5'-фосфата и кетокислот.

3. Впервые показано, что фосфатная группа в пиридоксаль-5'-фосфате не только ускоряет процессы образования и дегидратации аминокислот, но и процесс химических превращений оснований Шиффа.
4. На примере взаимодействия пиридоксала с L- α -аланином и D- α -аланином установлено, что основания Шиффа с L-аланиновым фрагментом образуют в качестве конечных продуктов пиридоксамин и кетокислоту, а основания Шиффа с D- α -аланиновым фрагментом в результате декарбоксилирования и последующего гидролиза образуют пиридоксамин и этаналь.
5. Показано, что α -аминокислоты в процессе конденсации с пиридоксалью образуют преимущественно анти-изомеры, а β - и ϵ -аминокислоты – син-изомеры, которые могут переходить в хиноидную структуру.
6. Синтезированы и идентифицированы методами элементного анализа, УФ-, ИК-спектроскопии и высокоэффективной жидкостной хроматографией 14 новых биологически активных соединений. Проведены квантово-химические расчеты структур исходных, промежуточных и конечных продуктов.
7. Предложен общий механизм образования и химических превращений оснований Шиффа в зависимости от их структуры и условий проведения реакций, который может быть использован в качестве моделей многих ферментативных процессов.

Список опубликованных по теме диссертации работ:

1. Кинетика и механизм взаимодействия пиридоксала с аминокислотами. // Вестник КНУ им. Ж. Баласагына – Серия 3, вып. 1. – Бишкек, 2003. – С. 96-101. (соавт.: Пишугин Ф.В., Кузьменко О.С.)
2. Влияние среды на скорости конденсации пиридоксала с лизином и глицином. // Сб. науч. трудов ИХиХТ. Проблемы и перспективы развития химии и химических технологий в Кыргызстане. – Бишкек: Илим, 2003. – С. 22-28. (соавт.: Пишугин Ф.В.)
3. Металлокомплексный и кислотно-основной катализ химических превращений гидразонов углеводов, азометинов витаминов группы B_6 . // Вестник КНУ им. Ж. Баласагына. – Серия 3, вып. 1. – Бишкек, 2004. – С. 88-92. (соавт.: Пишугин Ф.В., Кузьменко О.С.)
4. Кинетика и механизм конденсации пиридоксала с аминокислотами. // Журнал общей химии. – 2005. – Т. 75. Вып. 9. – С. 1538-1541. (соавт.: Пишугин Ф.В.)
5. "The problems and resolutions of structure and kinetics study for chemical transformations of CH-acids of carbohydrates, cyclic and uncyclic polyols under organic bases action in various media". // Selected works of members of the Division of Chemical - Technological, Medical-Biological & Agricultural Sciences of the National Academy of Sciences of the Kyrgyz Republic, Bishkek: "Ilim", 2004. – P. 265-269. (соавт.: Пишугин Ф.В.,

- Кузьменко О.С.)
6. Кислотно-основной катализ взаимодействия аминокислот с витаминами группы В₆. // Известия НАН КР. – Бишкек: Илим, 2005. – № 2. – С. 21-24. (соавт.: Пишугин Ф.В., Кузьменко О.С.)
 7. Влияние среды на процесс конденсации пиридоксала с аргинином. // Вестник КНУ им. Ж.Баласагына. – Серия 3, вып. 1. – Бишкек, 2006. – С. 9-13. (соавт.: Пишугин Ф.В.)
 8. Геометрическая изомерия и химические превращения продуктов конденсации пиридоксала с α - и β -аминокислотами. // Известия ВУЗов. – № 1-2. – Бишкек, 2006. – С. 5-8.
 9. Структурно-кинетические аспекты реакций взаимодействия пиридоксала с триптофаном в различных условиях. // Известия НАН КР. – Бишкек: Илим, 2007. – № 1. – С. 28-30. (соавт.: Пишугин Ф.В.)

Химия илимдеринин кандидаты окумуштуулук даражасына көрсөтүлгөн
Тулбердиев Игорь Темеркановичтин
«В₆ тобундагы витаминдердин таасири астында аминокислоталардын химиялык
айлануусу» деген темадагы

02.00.03 – органикалык химия адистиги боюнча диссертациясынын

КОРТУНДУСУ

Негизги сөздөр: пиридоксаль, пиридоксаль – 5- фосфат, пиридоксамин, аминокислоталар, аминдер, кетокислоталар, кинетика, кислота – негиздик катализ.

Изилдөөнүн объекттери: В₆ тобундагы витаминдер, аминокислоталар, аминдер.

Жумуштун максаты: Пиридоксальдын жана пиридоксаль – 5 – фосфаттын аминокислоталар жана аминдер менен конденсация механизмин жана кинетикасын үйрөнүү жана Шиффтин негиздеринин пайда болуусунун химиялык айлануусу; аралык жана акыркы продукттардын идентификациясы жана синтези; Шиффтин негиздеринин химиялык айлануусу жана конденсация механизминин схемасын орнотуу.

Изилдөөлөрдүн ыкмалары: элементтүү анализ, УФ-, ИК- спектроскопия, суюктуктук жогорку натыйжалуу хроматография, pH - метрия.

Аппараттар: УФ – спектрометр (Spectro – MOM – 204), ИК – спектрометр (Nicolet Avatar 370 PGTS), суюктуктук хроматография (Cale Parmer фирмасынын хроматографы, PLC – 20), элементтүү анализ (чех C,N,H анализатору), pH – метр ЭВ-74.

Илимий жанылык: пиридоксальдын жана пиридоксаль – 5 – фосфаттын аминокислоталар жана биоаминдер менен өз ара таасир этүүсү - ферментативдүү процесстердин моделдүү системасын комплекстүү изилдөө биринчи жолу жүргүзүлдү.

Шиффтин негиздеринин химиялык айлануу жана пайда болуу процесстеринин алардын түзүлүшүнө жана реакциялардын жүрүү шарттарына көз карандылыгы аныкталды; пиридоксаль – 5 – фосфат фосфаттуу тобунун

Шиффтин негиздеринин пайда болуу ылдамдыгында жана химиялык айлануусунда аткарган ролу аныкталды; кванттык – химиялык ыкмалар менен коферменттердин мейкиндиктеги түзүлүшү аныкталды; алардын продукттары менен аминокислоталардын өз ара таасир этүүлөрү жана Шиффтин негиздеринин химиялык айлануулары, геометриялык жана энергетикалык параметрлери аныкталды.

Колдонуу облусу: Витаминдердин жана аминокислоталардын химиясы жана биохимиясы, ферментативдик процесстерди моделдештирүү, биологиялык активдүү кошулмаларды синтездөө.

РЕЗЮМЕ

Тулбердиев Игорь Темерканович

“Химические превращения аминокислот под действием витаминов группы В₆” на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.03 – органическая химия

Ключевые слова: пиридоксаль, пиридоксаль-5'-фосфат, пиридоксамин, аминокислоты, амины, кетокислоты, кинетика, кислотно-основной катализ.

Объекты исследования: витамины группы В₆, аминокислоты, амины.

Цель работы: изучение кинетики и механизма конденсации пиридоксала и пиридоксаль-5'-фосфата с аминокислотами, аминами, и химических превращений образующихся оснований Шиффа в зависимости от их структуры и условий проведения реакций; синтез и идентификация промежуточных и конечных продуктов; установление схемы механизма конденсации и химических превращений оснований Шиффа.

Методы исследования: элементный анализ, УФ-, ИК- спектроскопия, жидкостная высокоэффективная хроматография, pH метрия.

Аппаратура: УФ - спектрометр (Spectro-MOM-204), ИК - спектрометр (Nicolet Avatar 370 PGTS), жидкостная хроматография (хроматограф PLC – 20, фирма Cale Parmer), элементный анализ (чешский анализатор C,N,H), pH - метр ЭВ-74.

Научная новизна: впервые проведены комплексные исследования модельных систем ферментативных процессов – взаимодействие пиридоксала и пиридоксаль-5'-фосфата с аминокислотами и биоaminaми.

Установлена зависимость процесса образования и химических превращений оснований Шиффа от их структуры и условий проведения реакций; определена роль фосфатной группы пиридоксаль-5'-фосфата на скорости образования и химических превращений оснований Шиффа; квантово-химическими методами установлена пространственная структура коферментов, продуктов их взаимодействия с аминокислотами и химических превращений оснований Шиффа, определены их геометрические и энергетические параметры.

Область применения : химия и биохимия витаминов и аминокислот, моделирование ферментативных процессов, синтез биологически активных соединений.

SUMMARY

Tuleberdiev Igor Temerkanovich

“Chemical transformations of amino acids under the influence of vitamins of B₆ group” on competition of academic degree of chemical sciences candidate by specialty 02.00.03- organic chemistry

Key words: pyridoxal, pyridoxal-5'- phosphate, pyridoxamine, amino acids, amines, keto acids, kinetics, acid-base catalysis.

Investigation objects: vitamins of B₆ group, amino acids, amines.

Work purpose: kinetics investigation and condensation mechanism of pyridoxal and pyridoxal-5'- phosphate with amino acids, amines, and chemical transformations formed bases of Schiff depending on their structure and conducted reactions conditions; synthesis and identification of intermediate and final production; establishment of condensation mechanism scheme and chemical transformations of bases of Schiff.

Investigation methods: elemental analysis, UF-, IK- spectroscopy, liquid high-performance chromatography, pH meter.

Apparatus: UF- spectrometer (Spectro-MOM-204), IK- spectrometer (Nicolet Avatar 370 PGTS), liquid chromatography (chromatograph PLC-20, Cale Parmer firm), elemental analysis (Czech analyzer C, H, N), pH- metr Ev-74.

Scientific novelty: first conducted complex investigations of model systems of fermentative processes- interaction of pyridoxal and pyridoxal-5'- phosphate with amino acids and bioamines.

Established forming process dependence and chemical transformations of bases of Schiff from their structure and conditions of conducted reactions; defined role of phosphate group of pyridoxal-5'- phosphate on formation speed and chemical transformations of bases of Schiff; quantum chemical methods established spatial pattern of coenzyme, products of their interaction with amino acids and chemical transformations of bases of Schiff, defined their geometric and energetic parameters.

Usage sphere: chemistry and biochemistry of vitamins and amino acids, modeling of fermentative processes, synthesis of biological active compounds.

алтын  тамга

24.07.2008
Зак. № 60 объем 1,2 уч. изд. л.,
Тираж 100 экз.

г. Бишкек, ул. Орозбекова 44,
тел.: 62-13-10
e-mail: romass@front.ru