

ХИМИЧЕСКАЯ КИНЕТИКА  
И КАТАЛИЗ

УДК 577.16.+541.128

ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПИРИДОКСАЛЬ  
ГИДРОХЛОРИДА С L- $\alpha$ -АСПАРАГИНОМ ПО СРАВНЕНИЮ  
С L- $\alpha$ - И D- $\alpha$ -АСПАРАГИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ

© 2021 г. Ф. В. Пищугин<sup>a,\*</sup>, И. Т. Тулебердиев<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Национальная академия наук Киргизии, Институт химии и фитотехнологии, 720071, Бишкек, Киргизия

\*e-mail: pishugin@rambler.ru

Поступила в редакцию 05.02.2020 г.

После доработки 26.02.2020 г.

Принята к публикации 17.03.2020 г.

Методами УФ-спектроскопии и поляриметрии изучены кинетика и механизм конденсации пиридоксаль гидрохлорида с L- $\alpha$ -аспарагином, L- $\alpha$ - и D- $\alpha$ -аспарагиновыми кислотами. Установлено, что L- $\alpha$ -аспарагин, имея  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> и  $\gamma$ -NH<sub>2</sub>-группы взаимодействует с пиридоксалем по  $\gamma$ -NH<sub>2</sub>-группе с образованием устойчивых к химическим превращениям оснований Шиффа, которые в результате перестройки образуют циклическую структуру аминокислотного фрагмента. L- $\alpha$ - и D- $\alpha$ -аспарагиновые кислоты при взаимодействии с пиридоксалем по  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>-группам образуют основания Шиффа, которые после отщепления  $\alpha$  – водорода или CO<sub>2</sub> образуют хиноидные структуры, последующий гидролиз которых приводит к образованию пиридоксамина,  $\alpha$ -кетокислоты и альдегидокислоты соответственно. Предложены схемы механизмов конденсации L- $\alpha$ -аспарагина, L- $\alpha$ -, D- $\alpha$ -аспарагиновых кислот с пиридоксаль гидрохлоридом.

*Ключевые слова:* кинетика, катализ, пиридоксаль гидрохлорид, L- $\alpha$ -аспарагин, L- $\alpha$ - и D- $\alpha$ -аспарагиновые кислоты

DOI: 10.31857/S0044453721010222

Стереохимия аминокислот играет ключевую роль в структуре белков, пептидов, ферментов человека и животных. Компонентами этих биологических объектов являются L-аминокислоты. С этим связана стереоспецифика действия ферментов с теми субстратами, которые имеют определенную конфигурацию. Аминокислоты D-ряда встречаются во многих пептидах, процедурируемых микроорганизмами, входя в состав биополимеров их клеточных тканей. Включение в структуры белков и ферментов D- $\alpha$ -аминокислот у человека приводит к фатальному исходу. Аспарагиновая кислота играет центральную роль в удалении азота из органических соединений. Реакция переаминирования служит начальным этапом катаболизма избыточных аминокислот. В организме аспарагиновая кислота является одним из компонентов образования и удаления азота в форме мочевины [1, 2]. В белках боковые звенья аспарагиновой аминокислоты и аспарагина, по видимому, выполняют роль не только для того, чтобы придавать им гидрофильные или гидрофобные свойства и формировать структуру белков, но и в зависимости от их физико-химических свойств принимать участие во многих биохимических процессах.

В литературе имеется ряд работ по изучению кинетики и механизма взаимодействия пиридоксаль-5'-фосфата с аргинином, лизином, аланином, аспарагиновой и глутаминовой кислотами в различных условиях эксперимента.

Предложены схемы их взаимодействия, рассчитаны константы скорости реакций, приведены термодинамические характеристики этих реакций, показано, что реакции контролируются энтропийным фактором [3–5].

В настоящее время ученые смогли полностью остановить рост самых агрессивных форм рака груди, обнаружив, что его клетки не могут проникать в другие части тела без аспарагина, одной из двадцати самых распространенных аминокислот. Когда биологи заблокировали работу гена *Asns*, отвечающего за сборку молекул аспарагина, распространение метастаз по телу мышей полностью прекратилось, что говорит о высокой перспективности такой методики борьбы с раком. Представляло большой интерес изучение кинетики и механизма взаимодействия пиридоксаль гидрохлорида с L- $\alpha$ - и D- $\alpha$ -аспарагиновыми кислотами, имеющими по одной  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>-группе и L-аспарагина, имеющего две  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>- и  $\gamma$ -NH<sub>2</sub>-группы.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовались пиридоксаль гидрохлорид марки “х.ч.” (Ferak Berlin), аминокислоты и их амиды (Reanal, Англия). Буферные растворы готовили по общепринятой методике. Кинетику реакции измеряли на спектрофотометре СФ-26 и сахариметре DigiPol DS Automatic Sacharimeter. Термостатирование реакционных смесей проводили при помощи термостата УН-8 с точностью до  $\pm 0.1^\circ\text{C}$ . Навески пиридоксала гидрохлорида, аминокислот и их амидов в эквимольных количествах растворяли в водно-спиртовых буферных растворах и выдерживали 30 мин при заданной температуре. За начало реакции принимали момент смешивания термостатированных растворов пиридоксала, аминокислот и их амидов. Кинетические измерения проводили в термостатированных кюветах толщиной 1.008 мм и поляриметрических трубках длиной 1.9 дм. Поскольку УФ-спектры растворов пиридоксала изменяются в зависимости от рН среды и растворителя, в кюветах сравнения помещали эквимольные растворы пиридоксала в том же растворителе, с таким же значением рН среды. рН растворов измеряли на универсальном ионметре ЭВ-74 с точностью до  $\pm 0.1$  единицы рН. Константы скорости конденсации пиридоксала с L- $\alpha$ -, D- $\alpha$ -аспарагиновыми кислотами и L- $\alpha$ -аспарагином рассчитывали по компьютерным программам для обратимых и необратимых реакций [6]. Исходные и конечные продукты идентифицировались методами элементного анализа, УФ- и ИК-спектроскопией, ТСХ и ЖХ. ИК-спектры снимались на ИК-спектрофотометре Nicolet Impact 420. Анализ продуктов взаимодействия проводился на жидкостном хроматографе PLC-20 фирмы Cole Parmer с сорбентом С-185 микрон, элюент  $\text{H}_2\text{O} : \text{CH}_3\text{CN} = 80 : 20\%$ . Структура и величины зарядов на атомах с условием оптимизации геометрических и термодинамических факторов определялись по программе Nuser Chem (методом MNDO). Синтез и идентификацию продуктов конденсации пиридоксала с L- $\alpha$ - и D- $\alpha$ -аспарагиновыми кислотами проводили по методикам, приведенным в работах [7–13].

Методика синтеза продукта взаимодействия пиридоксаль гидрохлорида с L-аспарагином по  $\gamma$ - $\text{NH}_2$ -группе:

*Синтез 2-(3-гидрокси-5-гидроксиметил-2-метил-4-ил)-пиримидин-4-оксо-5-карбоната натрия*

0.132 г пиридоксала гидрохлорида растворяли в 5 мл 96% этилового спирта и 0.085 г L- $\alpha$ -аспарагина растворяли в (11 мл спирта + 3 мл 90%-ацетатного водно-этанольного буферного раствора) при нагревании до полного их растворения. После охлаждения оба бесцветных раствора смешивали

при этом смесь окрашивалась в интенсивный желтый цвет с появлением новых максимумов поглощения в УФ-спектрах в области 350 и 430 нм. Смесь выливали в чашку Петри и выпаривали при комнатной температуре до выпадения осадка. Ход реакции контролировали УФ спектрофотометрически (максимальные значения оптической плотности в области 350, 430 нм), ТСХ и ЖХ (исчезновение пятен и пиков исходных продуктов и появление пятен и пиков конечных продуктов). Выход 0.157 г (~79%),  $T_{\text{пл}} > 340^\circ$  (с обугливанием).

ИК-спектр (KBr),  $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ : 3150–3350  $\text{cm}^{-1}$  (NH); 1625  $\text{cm}^{-1}$  (C=N – отсутствует) и 1570  $\text{cm}^{-1}$  и 1620  $\text{cm}^{-1}$  (полосы “амид-1” и “амид-2”), УФ-спектр,  $\lambda_{\text{max}}$  350 нм. Поляриметрия,  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -0.21^\circ$  (70%-й этиловый спирт)

Вычислено, %: С 47.2; Н 5.25 N 13.77

Найдено, %: С 47.4; Н 5.2 N 12.9:  $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_5 \cdot \text{Na}$

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

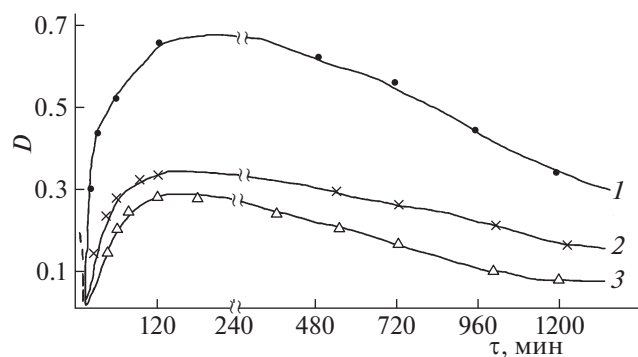
Изучение кинетики и механизма взаимодействия различных по структуре аминокислот (L- $\alpha$ -аланин,  $\beta$ -аланин, глицин, аргинин, триптофан и др.) с пиридоксалем методами УФ-спектроскопии показало, что при смешивании без цветных растворов исходных компонентов появляется интенсивное желтое окрашивание с  $\lambda_{\text{max}}$  350 и 430 нм (за счет образования C=N связей) с высокими выходами образуются основания Шиффа, за исключением продуктов конденсации его с амидами аминокислот – глутаминовой и аспарагиновой (рис. 1).

Сделано предположение, что продукты конденсации пиридоксала с глутаминовой и аспарагиновой аминокислотами (основания Шиффа) быстрее подвергаются химическим превращениям с образованием конечных продуктов, по-видимому, за счет концевых акцепторных  $\text{COOH}$ -групп, которые благоприятствуют отщеплению атома  $\alpha$ -водорода в L- $\alpha$ - или  $\text{CO}_2$  в D- $\alpha$ -аспарагиновых аминокислотах.

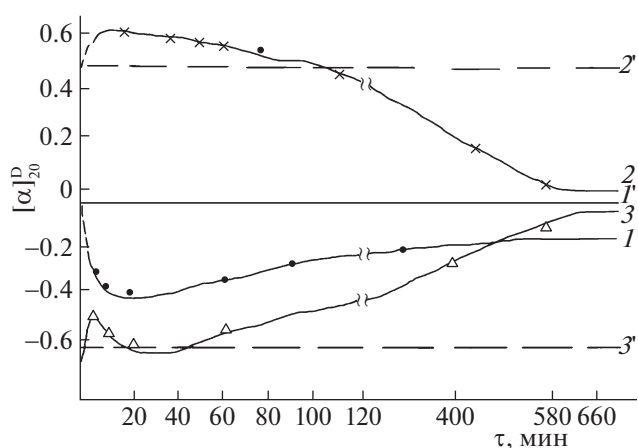
Особый интерес представляло изучение кинетики и механизма взаимодействия пиридоксала с L- $\alpha$ -аспарагином, имеющего два атома азота.

Изучение структуры и величин зарядов на атомах азота  $\alpha$ - $\text{NH}_2$  (–0.280) и  $\gamma$ - $\text{NH}_2$  (–0.338) группах в молекуле L- $\alpha$ -аспарагина по программе Nuser Chem методом MNDO показало, что вероятность взаимодействия их с пиридоксалем по  $\gamma$ - $\text{NH}_2$ -группе и пространственным факторам более предпочтительно по сравнению с  $\alpha$ - $\text{NH}_2$ -группой для образования устойчивых к химическим превращениям оснований Шиффа.

Результаты, приведенных на рис. 1 и 2, показали существенные различия в скоростях и меха-



**Рис. 1.** Изменение оптической плотности смесей 0.01 М растворов пиридоксаль гидрохлорида с L- $\alpha$ -аспарагином (1), D- $\alpha$ - (2) и L- $\alpha$ - (3) аспарагиновыми кислотами во времени на стадиях образования, дегидратации аминоспиртов и их химических превращений (70%-ный спиртово-водный буферный раствор, pH 6.45,  $T = 20^\circ\text{C}$ ).



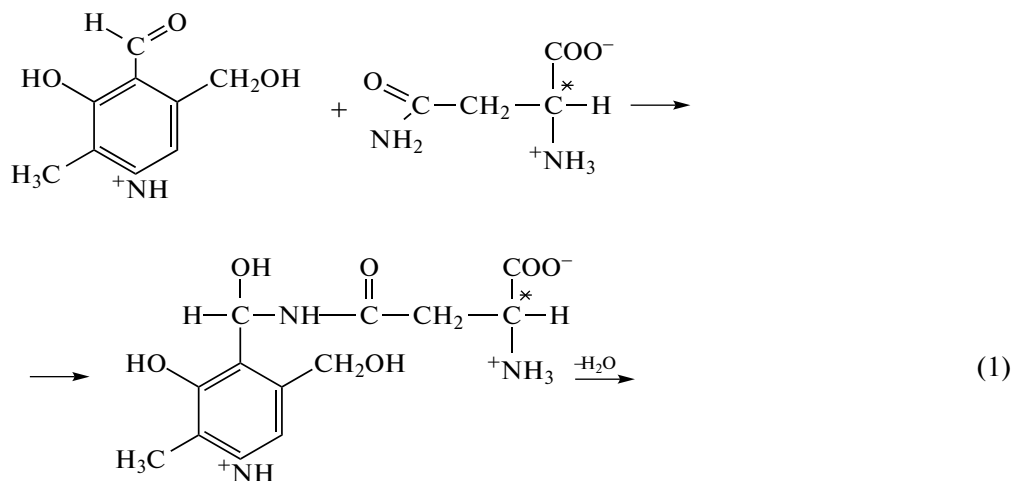
**Рис. 2.** Изменение удельных углов вращения смесей 0.04 М растворов пиридоксаль гидрохлорида с L- $\alpha$ -аспарагином (1), D- $\alpha$ -аспарагиновой кислотой (2), L- $\alpha$ -аспарагиновой кислотой (3) на стадиях образования, дегидратации аминоспиртов и их химических превращений; удельные углы вращения исходных аминокислот: L- $\alpha$ -аспарагина (1'), D- $\alpha$ -аспарагиновой кислоты (2'), L- $\alpha$ -аспарагиновой кислоты (3'), (70%-ный спиртово-водный буферный раствор, pH 6.45,  $T = 20^\circ\text{C}$ ).

низме образования аминоспиртов и оснований Шиффа при взаимодействии пиридоксаль с L- $\alpha$ -аспарагином по сравнению с взаимодействием его с L- $\alpha$ -аспарагиновой кислотой. При взаимодействии пиридоксаль с L- $\alpha$ -аспарагином на стадии образования аминоспиртов и последующей стадии их дегидратации с большим их выходом образуются устойчивые к химическим превращениям основания Шиффа. При этом оптическая активность аминокислотного фрагмента сохраняется.

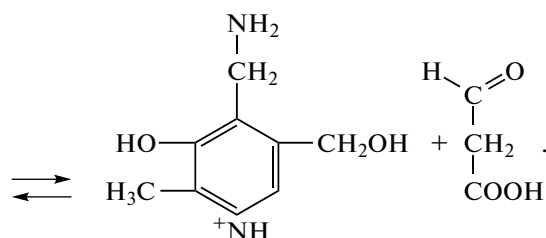
При продолжительном выдерживании растворов смеси пиридоксаль гидрохлорида с L- $\alpha$ -аспарагином, интенсивность УФ-спектров поглощений в области 430 нм очень медленно со временем уменьшается практически до нуля по сравнению с интенсивностью поглощения образующихся в начальный период времени основаниями Шиффа (рис. 2). Выделение и идентификация конечных продуктов методами элементного анализа, поляриметрией, ИК-спектроскопией и ЖХ позволили предположить возможность образования

циклических форм аминокислотного фрагмента при нуклеофильной атаке свободной электронной пары атома азота  $\alpha$ - $\text{NH}_2$  группы на  $\text{C}=\text{N}$ -связь основания Шиффа. Очень малая скорость стадии циклизации основания Шиффа, по-видимому, объясняется большими стерическими факторами аминокислотного фрагмента.

Изучение структуры исходных, промежуточных и конечных продуктов конденсации L- $\alpha$ -аспарагина по  $\gamma$ - $\text{NH}_2$ -группе с пиридоксалем по программе Nureg Chem. методом MNDO показало, что OH-группа в аминоспиртах и азометиновый фрагмент в основаниях Шиффа и его циклический фрагмент расположен перпендикулярно плоскости пиридинового кольца пиридоксаль и развернут относительно его  $\sim 90^\circ$ .







Можно предположить, что такие структуры имеющие пиримидиновый цикл и напоминающие модифицированную структуру урацила, входящего в состав РНК, может стать одной из причин препятствия распространения метастаз в другие органы при раке.

Взаимодействие пиридоксаль гидрохлорида с L- $\alpha$ - и D- $\alpha$ -аспарагиновыми кислотами и расчеты констант скоростей показали, что при конденсации пиридоксаль с L- $\alpha$ -аспарагиновой кислотой на стадии дегидратации аминоспиртов ( $k = 0.089 \times 10^{-2} \text{ мин}^{-1}$ ) согласно конвенции Данатана [1] в основаниях Шиффа  $\alpha$ -водород аминокислотного фрагмента находится в положении благоприятствующему его отщеплению и переходу основания Шиффа в хиноидную структуру, последующий гидролиз которой приводит к образованию пиридоксамина и кето-бутан-дионовой кислоты. При взаимодействии пиридоксаль с D- $\alpha$ -аспарагиновой кислотой ( $k = 0.781 \times 10^{-2} \text{ мин}^{-1}$ ) образуется основание Шиффа, в котором аминокислотный фрагмент развернут относительно плоскости пиридинового кольца на  $180^\circ$ , в результате чего образуется основание Шиффа с предпочтительным отщеплением  $\text{CO}_2$ , образованием хиноидной структуры, гидролиз которой приводит к получению пиридоксамина и пропальоновой кислоты-1,3. Доказательством предложенного постулата служат данные кинетики конденсации пиридоксаль с L- $\alpha$ - и D- $\alpha$ -аспарагиновыми кислотами поляриметрическим методом (рис. 2).

Результаты проведенных измерений методом поляриметрии показывают, что на первой стадии конденсации происходит быстрое уменьшение абсолютных значений удельных углов вращения смеси растворов пиридоксаль+L- $\alpha$ -аспарагиновая кислота (3) и увеличение их для смеси пиридоксаль+D- $\alpha$ -аспарагиновая кислота (2), а затем абсолютные значения удельных углов этих смесей постепенно со временем уменьшаются. На стадии образования аминоспиртов в обоих случаях возникают новые хиральные центры с различными по величине знаками удельных углов вращения. Если исходить из устаревших представлений, что нуклеофильные реагенты атакуют плоскость карбонильной группы с равной вероятностью с обеих сторон ее плоскости, то изменение величин и знаков удельных углов вращения

не должно быть, поскольку в этом случае образуются рацематы. Объяснить эти противоречия можно только предположив, что нуклеофильная атака на карбонильную группу происходит вдоль ее плоскости с образованием промежуточного продукта – аминоспирта с быстрым изменением оптической плотности смеси растворов (рис. 1) или их удельных углов вращения (рис. 2) во времени. Далее происходит медленная стадия – поворотная изомерия образующихся аминоспиртовых фрагментов путем оптимизации их энергетических и геометрических параметров, способствующих отщеплению  $\alpha$ -водорода или  $\text{CO}_2$  группы с образованием хиноидных структур, гидролиз которых приводит к получению конечных продуктов. Подтверждением этого предположения служат данные по структурам аминоспиртов и оснований Шиффа выполненные по программе Nuser Chem (методом MNDO) с учетом оптимизации их геометрических и энергетических параметров. Результаты этих исследований показали, что продукты конденсации пиридоксаль (аминоспирты и основания Шиффа) с L- $\alpha$ - и D- $\alpha$ -аспарагиновыми кислотами различаются друг от друга различным расположением аминокислотных фрагментов относительно плоскости пиридинового кольца пиридоксаль. Пиридиновый фрагмент оснований Шиффа и промежуточных продуктов – аминоспиртов имеют плоскую структуру. OH-группа в пиридиновом фрагменте приблизительно находится в одной плоскости с плоскостью пиридинового кольца.  $\text{CH}_2\text{OH}$ -группа ввиду ее нелинейности выступает за пределы пиридинового кольца т.е. она может быть “меткой” при рассмотрении стереохимии карбонильной группы пиридоксаль, OH-группы аминоспиртов и азометиновых фрагментов в основаниях Шиффа. Результаты исследований структур, выполненных по программе Nuser Chem (MNDO) с учетом оптимизации геометрических и энергетических параметров показали, что в пиридоксале, аминоспиртах и основаниях Шиффа – продукты конденсации пиридоксаль с L- $\alpha$ - и D- $\alpha$ -аспарагиновыми кислотами по  $\alpha$ - $\text{NH}_2$ -группе, карбонильная группа и азометиновые фрагменты развернуты на  $\sim 90^\circ$  и находятся по одну сторону относительно “метки”, а в аминоспиртах OH-группа и аминокислотный фрагмент по разные стороны от “метки”.

Продукты взаимодействия L- $\alpha$ - и D- $\alpha$ -аспарагиновых кислот с пиридоксалем в результате отщепления  $\alpha$ -водорода в L-аспарагиновом фрагменте или CO<sub>2</sub> в D-аспарагиновом фрагменте полностью теряют оптическую активность. Скорости каждой из стадий зависят от структуры начальных, промежуточных и конечных продуктов, pH среды, растворителя, температуры, стерических и термодинамических факторов. Анализ литературных и наших экспериментальных данных показал, что с увеличением основности NH<sub>2</sub>-групп скорости на стадии присоединения и образования аминоспиртов возрастают, а скорости дегидратации аминоспиртов уменьшаются. В целом скорость образования оснований Шиффа зависит от соотношения констант скоростей этих двух стадий.

На основании проведенных кинетических и экспериментальных данных можно сделать вывод, что пиридоксаль гидрохлорид взаимодействует с L- $\alpha$ -аспарагином по  $\gamma$ -NH<sub>2</sub>-группе с образованием продукта конденсации циклической структурой аминокислотного фрагмента, а L- $\alpha$ -D- $\alpha$ -аспарагиновые кислоты взаимодействуют с ним по  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>-группам с образованием в качестве конечных продуктов — пиридоксамина, кетокислот и альдегидокислот соответственно.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Мецлер Д.* Биохимия. М.: Мир, 1980. Т. 2. С. 527.
2. *Ivanov V.I., Karpeisky M.Ya.* // Adv. Enzymol. 1969. Т. 32. С. 21.
3. *Лейдлер К.* Кинетика органических реакций. М.: Мир, 1966. С. 31.
4. *Пищугин Ф.В., Тулебердиев И.Т.* // ЖОХ. 2005. Т. 75. Вып. 9. С. 1538.
5. *Баделин В.Г., Венедиктов Е.А., Баранников В.П.* // Химия и химическая технология. 2007. Т. 50. Вып. 12. С. 34.
6. *Пищугин Ф.В., Тулебердиев И.Т.* // ЖОХ. 2008. Т. 78. Вып. 6. С. 997.
7. *Венедиктов Е.А., Баранников В.П., Баделин В.Г.* // Химия и химическая технология. 2009. Т. 52. Вып. 1. С. 36.
8. *Пищугин Ф.В., Тулебердиев И.Т.* // ЖОХ. 2009. Т. 79. Вып. 1. С. 120.
9. *Пищугин Ф.В., Тулебердиев И.Т.* // Там же. 2010. Т. 80. Вып. 9. С. 1518.
10. *Баранников В.П., Баделин В.Г., Венедиктов Е.А., и др.* // Журн. физ. химии. 2011. Т. 85. № 1. С. 20.
11. *Пищугин Ф.В., Тулебердиев И.Т.* // ЖОХ. 2012. Т. 82. Вып. 7. С. 1168.
12. *Пищугин Ф.В., Тулебердиев И.Т.* // Там же. 2014. Т. 84. Вып. 7. С. 1167.
13. *Пищугин Ф.В., Тулебердиев И.Т.* // Журн. физ. химии. 2017. Т. 91 № 10. С. 1648.