

КИНЕТИКА РЕАКЦИИ КОБИНАМИДА С ИЗОНИАЗИДОМ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ

© 2019 г. С. О. Тумаков^а, И. А. Деревеньков^а, Д. С. Сальников^{а,*}, С. В. Макаров^а

^аИвановский государственный химико-технологический университет, Иваново, Россия

*e-mail: densal@isuct.ru

Поступила в редакцию 18.04.2018 г.

Изучена кинетика и механизм реакции диаквакобинамида (Cbi(III)) с изониазидом (гидразидом изоникотиновой кислоты, ГИК). Установлено, что состав продуктов зависит от соотношения концентраций реагентов. Добавление избытка ГИК к кобинамиду приводит к быстрому образованию стабильного комплекса Cbi(III) с двумя молекулами изониазида. Если концентрации изониазида и кобинамида близки или кобинамид находится в избытке, сначала образуется комплекс Cbi(III) с одной молекулой изониазида. Затем происходит быстрый внутрисферный перенос электрона, приводящий к образованию неустойчивого комплекса восстановленного Cbi(II) с гидразильным радикалом ((RN₂H₂)(Cbi(II))), распадающимся с образованием восстановленного кобинамида и продуктов окисления изониазида: изоникотинамида, пиридин-4-карбоксальдегида, изоникотиновой кислоты (ИНК). Сделан вывод, что при десятикратном избытке кобинамида главным продуктом окисления ГИК является ИНК.

Ключевые слова: кинетика, механизм реакции, антидот, кобинамид, изониазид

DOI: 10.1134/S0044453719020286

Отравление токсичным алкоголем, цианидом, сероводородом, оксидом углерода, а также преднамеренные или непреднамеренные передозировки медицинских препаратов стоят на втором месте по числу случаев вредного воздействия на здоровье человека [1, 2]. Одним из способов противодействия отравлению является применение веществ (антидотов), способных препятствовать или ослаблять действие ядов на организм человека. Выделяют несколько механизмов действия антидотов: 1) взаимодействие с ядами с образованием нетоксичных соединений; 2) усиление выведения ядов из организма; 3) уменьшение скорости превращения яда в более токсичные вещества; 4) конкуренция с ядом за активные центры рецепторов; 5) блокирование активных центров рецепторов усиливающих токсическое влияние яда [1, 3].

Изониазид (рис. 1а) является высокоэффективным антитуберкулезным препаратом [4, 5], включенным в список жизненно необходимых и важнейших лекарственных средств. Одной из клинических проблем связанных с применением ГИК(гидразид изоникотиновой кислоты) является его нейро- и гепатотоксичность [4, 5]. Передозировка изониазида оказывает негативное воздействие на организм человека [6]. Для снижения токсического эффекта в данном случае рекомендуется применять пиридоксаль (витамин В₆) [7]. Однако в литературе опубликованы данные, свидетельствующие

о недостаточной эффективности его применения при передозировке изониазида [8].

Кобинамид (рис. 1б) является предшественником витамина В₁₂ (кобаламина, Cbl) при его биосинтезе [9]. Отличием кобинамида от витамина В₁₂ является отсутствие в его структуре рибонуклеотидного фрагмента. Установлено, что диаквакобинамид является более эффективным антидотом на цианид [10, 11] и сероводород [12–15], чем аквакобаламин, а также может быть использован как регулятор активности NO [16].

Ранее было изучено взаимодействие витамина В₁₂ с изониазидом. Показано, что в ходе реакции происходит обратимое связывание кобаламином нейтральной молекулы ГИК [17]. Однако информация о взаимодействии изониазида с кобинамидом отсутствует.

Целью настоящей работы является определение кинетических параметров и механизма реакции изониазида с кобинамидом.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали изониазид (>98%), изоникотиновую кислоту (99%) и изоникотинамид (99%) фирмы Alfa Aesar. Диаквакобинамид был синтезирован согласно методике [18]. Другие реагенты имели марку “х.ч.”.

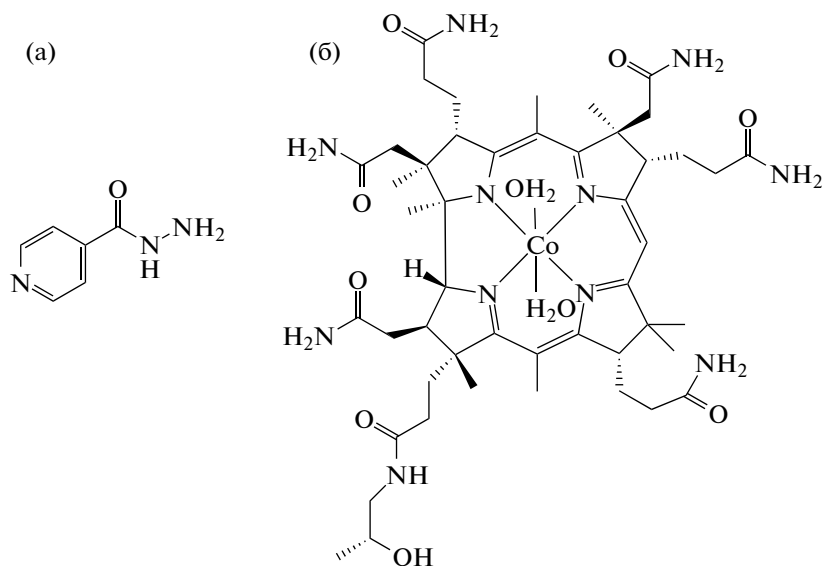


Рис. 1. Структура изониазида (а) и диаквокобинамида (б).

Определение продуктов реакции изониазида с кобинамидом в нейтральной среде проводили следующим образом. К водному раствору кобинамида добавляли водный раствор изониазида в анаэробных условиях. Соотношение реагентов Сbi(III)/ГИК в полученном растворе составляло: 1/2 и 1/4. Полученный раствор оставляли на несколько часов для полного завершения реакции. Раствор пропускали через колонку с силикагелем (1 гр) и промывали ее 100 мл дистиллированной воды. Кобинамид сорбируется и удерживается силикагелем, а изониазид и продукты его окисления вымываются из колонки. Водный раствор после хроматографической колонки упаривали под вакуумом при температуре 40°C до образования сухого осадка. Осадок растворяли в этаноле (95 об. %) и анализировали методом ГХ/МС с помощью газового хроматомакс-спектрометра GCMS-QP2010Ultra, снабженного капиллярной колонкой Zebtron ZB-5ms. В качестве подвижной фазы использовался гелий (30 мл/мин). Температура колонки (120°C) поддерживалась постоянной с помощью термостата.

Кинетические исследования проведены в анаэробных условиях на приборе Cary 50 с использованием герметичной кварцевой кюветы толщиной 1 см. Для исследования быстрых реакций использовали приставку быстрого смешения RX 2000.

Для создания анаэробных условий использовали аргон.

Скорость реакции кобинамида с изониазидом контролировали по изменению оптической плотности при длинах волн 412, 460, 520 и 537 нм.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Установлено, что добавление избытка изониазида к водному раствору кобинамида приводит к изменению цвета раствора с красного на желтый в диапазоне pH 4–13.

Анализ электронных спектров поглощения, наблюдаемых в ходе реакции кобинамида с изониазидом при pH ≥ 7.5 , показал два последовательных изменения (рис. 2).

Первое изменение происходит очень быстро и зависит от концентрации изониазида. При концентрации ГИК < 1 мМ наблюдается исчезновение пиков при 348, 495 и 517 нм (исходного кобинамида, рис. 2, спектр 1) и появление новых при 350 и 497 нм (рис. 2, спектр 2). При высокой концентрации изониазида (> 5 мМ) появляются пики при 355, 507 и 532 нм (рис. 2, спектр 3). Такие изменения характерны для реакций комплексообразования кобинамида с различными лигандами (L): тиоцианатом [19], цианамидом [20], сероводородом [13], цианидом [21]. В указанных реакциях происходит последовательное замещение координированных молекул воды с образованием LCbi(III) и (L)₂Cbi(III).

Второе изменение сопровождается исчезновением пиков первого интермедиата и появлением новых при 315 и 469 нм (рис. 2, спектр 4). Конечный спектр продукта реакции соответствует восстановленной форме кобинамида Co²⁺ (Cbi(II)) [13, 22].

При уменьшении значения pH до 4.5 реакция изониазида с кобинамидом протекает в одну стадию и сопровождается исчезновением пиков ис-

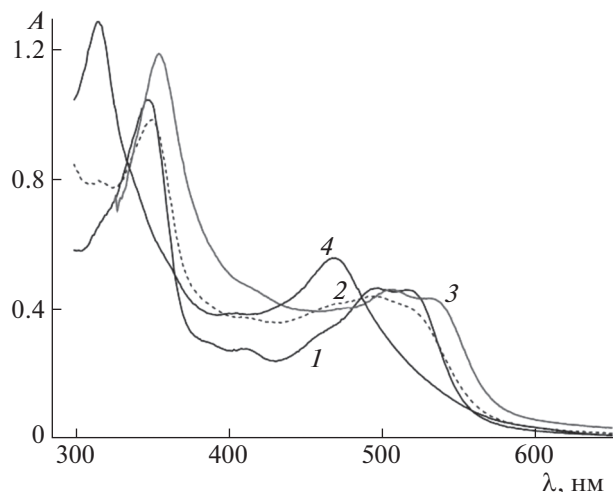


Рис. 2. Электронные спектры поглощения, записанные в ходе реакции кобинамида с изониазидом при pH 7.5: исходный кобинамид (1), промежуточные продукты (2, 3) и конечный продукт (4); $[\text{Cbi(III)}]_0 = 5 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[\text{ГИК}]_0 = 1$ (2), 50 (3) mM; 25°C, анаэробные условия.

ходного кобинамида (349 и 520 nm) и появлением новых (315 и 469 nm), соответствующих Cbi(II).

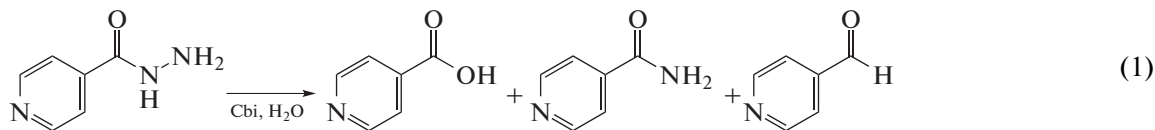
Это показывает, что кобинамид выступает в качестве окислителя изониазидов в широком диапазоне pH.

Общая стехиометрия реакции

Результаты спектрофотометрического титрования кобинамида изониазидом в анаэробных условиях представлены на рис. 3.

Установлено, что полное восстановление Cbi(III) достигается при соотношении $[\text{ГИК}] : [\text{Cbi(III)}] = 1 : 4$.

Отметим, что изониазид в редокс реакциях выступает в качестве одно- или четырехэлектронного восстановителя [23, 24].



Кинетические исследования

Кинетику реакции комплексообразования кобинамида с изониазидом изучить не удалось, так как она протекает очень быстро и заканчивается за время смешивания реагентов во всем изученном диапазоне pH.

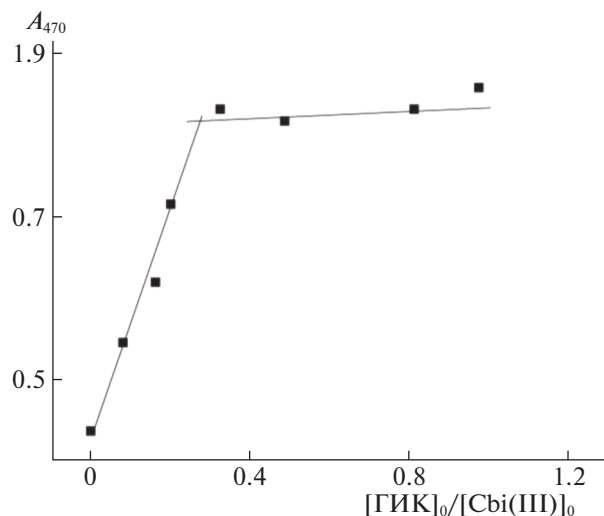


Рис. 3. Спектрофотометрическое титрование кобинамида изониазидом при pH 7.5.

Определение продуктов реакции изониазидов с кобинамидом в нейтральной среде

Методом ГХ-МС определены продукты реакции изониазидов с кобинамидом в нейтральной среде: изоникотиновая кислота, изоникотинамид и пиридин-4-карбоксальдегид (табл. 1). Исходный изониазид не был найден в исследуемом образце, что указывало на его полное окисление.

По значениям площадей пиков найдено, что главным продуктом при соотношении Cbi(III) : ГИК 1 : 2 является изоникотинамид (68%, табл. 1), а при Cbi(III) : ГИК 1 : 4 – изоникотиновая кислота (90%, табл. 1).

Аналогичные изменения наблюдаются при окислении изониазидов каталазой-пероксидазой, выделенной из палочки Коха (Catalase Peroxidase from *Mycobacterium tuberculosis*) [25].

Таким образом, общая схема окисления изониазидов кобинамидом в водных растворах в анаэробных условиях при pH 7.5 может быть представлена следующим образом:

Типичные кинетические кривые, соответствующие восстановлению кобинамида, представлены на рис. 4.

Из рис. 4 видно, что начальная оптическая плотность возрастает с увеличением концентрации изониазидов. Это объясняется образованием

Таблица 1. Характеристика продуктов реакции

| Наименование вещества | R_t , мин | m/z | Выход, % | |
|---------------------------|-------------|-------|----------------------|----------------------|
| | | | Cbi(III) : ГИК 1 : 2 | Cbi(III) : ГИК 4 : 1 |
| Пиридин-4-карбоксальдегид | 2.170 | 107 | 16 | — |
| Изоникотинамид | 3.537 | 122 | 68 | 10 |
| Изоникотиновая кислота | 4.346 | 123 | 16 | 90 |
| Изониазид | 16.257 | 137 | — | — |

комплекса кобинамида с двумя молекулами ГИК (рис. 2). Установлено также, что падение оптической плотности (соответствует накоплению восстановленной формы кобинамида (Cbi(II))) уменьшается с ростом избытка изониазиды по отношению к кобинамиду.

Кинетические кривые линейризуются в координатах $(A_0 - A_t)/(A_f - A_t)$ от времени и хорошо описываются уравнением

$$A_t = \frac{A_0 + ktA_f[\text{Cbi(III)}]_0}{1 + kt[\text{Cbi(III)}]_0}, \quad (2)$$

где A_0, A_t, A_f — оптическая плотность в начальный момент времени, в текущий момент времени и конечная оптическая плотность, $[\text{Cbi(III)}]_0$ — общая концентрация кобинамида в реакции, M, k — константа скорости реакции второго порядка, t — время, что указывает на второй частный порядок реакции по кобинамиду ($k_{\text{набл2}}, \text{M}^{-1} \text{c}^{-1}$) [26].

Зависимость $k_{\text{набл2}}$ от концентрации изониазиды при pH 7.5 нелинейна и уменьшается с увеличением его концентрации (табл. 2).

Уменьшение скорости реакции восстановления кобинамида с одновременным ростом концентрации комплекса кобинамида (III) с двумя

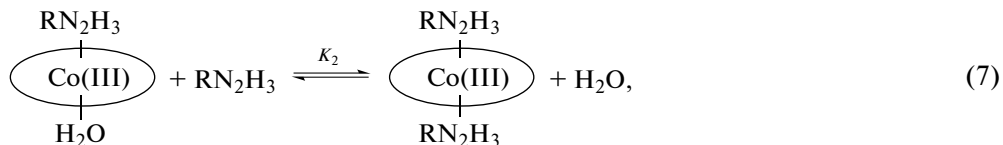
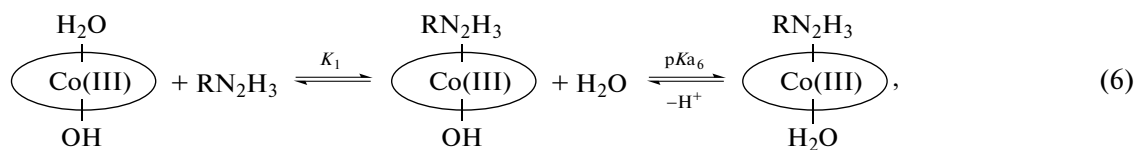
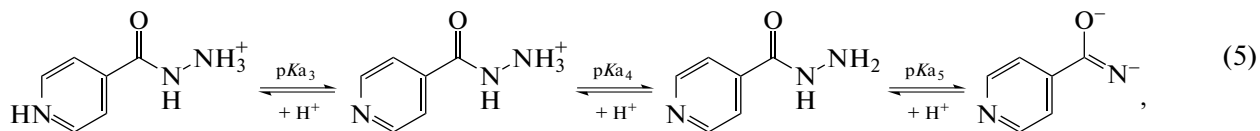
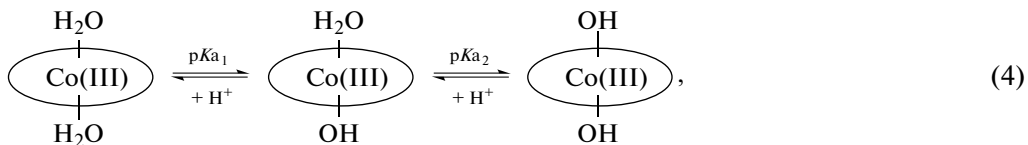
молекулами изониазиды показывает, что присоединение двух молекул ГИК к Cbi(III) стабилизирует степень окисления Co(III) и препятствует восстановлению. Отметим, что аналогичные результаты получены при взаимодействии Cbi(III) с сероводородом [13].

Типичная кинетическая кривая процесса окисления ГИК избытком Cbi(III) представлена на рис. 5. Обработкой кинетических данных в полупологарифмических координатах показано, что частный порядок реакции первый ($k'_{\text{набл2}}, \text{c}^{-1}$).

Зависимость наблюдаемой константы скорости реакции окисления ГИК от концентрации Cbi(III) нелинейна, но линейризуется в координатах $k'_{\text{набл2}} - [\text{Cbi(III)}]^2$. Это указывает на второй порядок реакции по кобинамиду. Линейная обработка указанной зависимости позволила рассчитать константу третьего порядка $k' = (4.55 \pm 0.2) \times 10^5 \text{ M}^{-2} \text{ c}^{-1}$ при pH 7.5 и 25°C в анаэробных условиях.

Таким образом, кинетические исследования показывают, что для образования восстановленного кобинамида требуется две молекулы Cbi(III), и реакция подчиняется кинетическому уравнению

$$k_{\text{набл2}} = k'[\text{Cbi(III)}]^2, \quad (3)$$



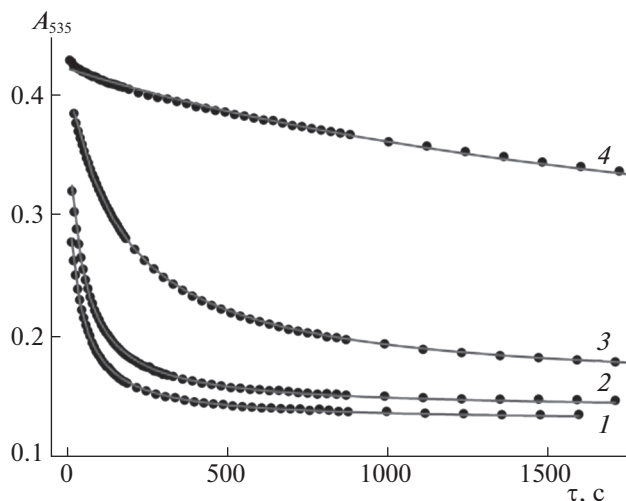


Рис. 4. Кинетические кривые восстановления кобинамида избытком изониазида $[\text{Cbi(III)}]_0 = 5 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[\text{ГИК}]_0 = 0.25$ (1), 1 (2), 5 (3), 50 (4) мМ; 25°C , pH 7.5; анаэробные условия.

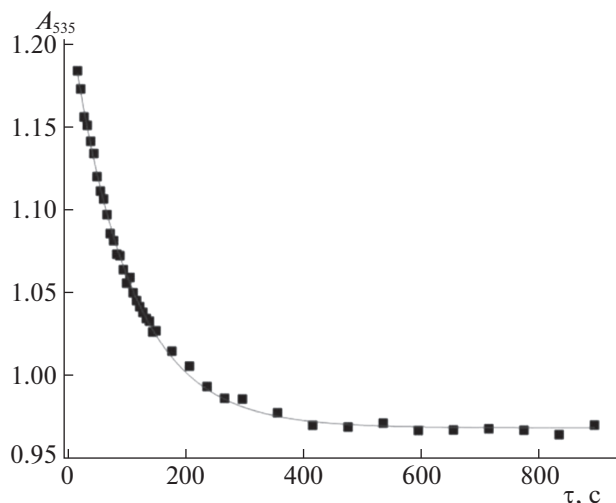
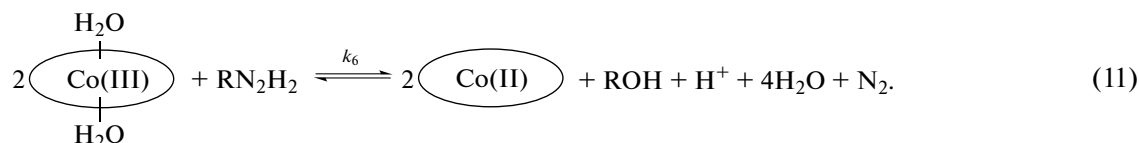
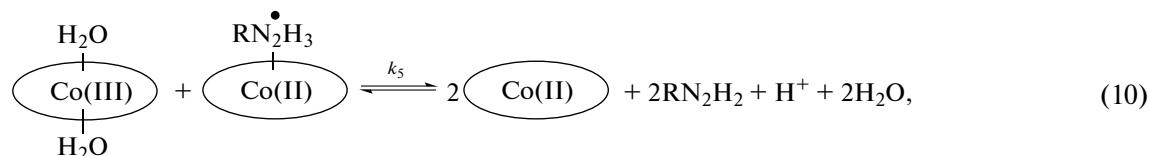
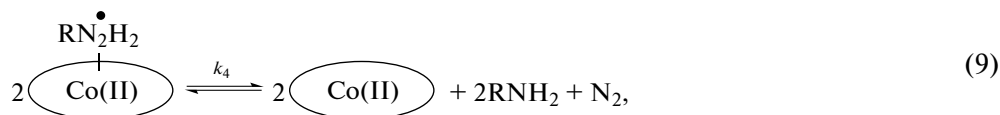
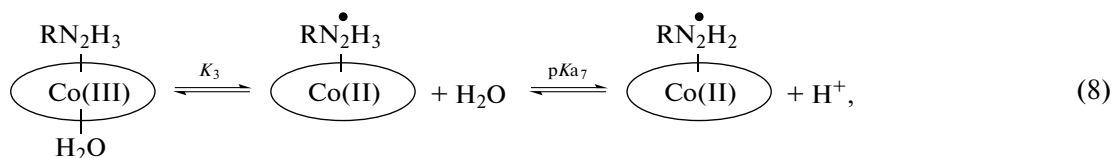


Рис. 5. Типичная кинетическая кривая восстановления кобинамида изониазидом при недостатке последнего (вторая стадия) $[\text{Cbi(III)}]_0 = 1.5 \times 10^{-4} \text{ M}$; $[\text{ГИК}]_0 = 1.25 \times 10^{-5} \text{ M}$; 25°C , pH 7.5; анаэробные условия.



Таким образом, в водном растворе кобинамид находится в виде диаквобинамида $((\text{H}_2\text{O})_2\text{Cbi(III)})$, аквагидроксокобинамида

$((\text{H}_2\text{O})(\text{OH}^-)\text{Cbi(III)})$ и дигидроксоформ $((\text{HO}^-)_2\text{Cbi(III)})$ с $pK_{a1} = 5.9$ и $pK_{a2} = 10.2$ (4) [13]. Отметим, что в реакциях комплексообразования участвуют только диаквобинамид и аквагидроксокобинамид, поскольку гидроксид-ион инертен к замещению во внутренней сфере комплекса.

Таблица 2. Зависимость $k_{\text{набл}2}$ от концентрации изониазида (pH 7.5, 25°C , анаэробные условия)

| [ГИК], мМ | $k_{\text{набл}2}$, $\text{M}^{-1} \text{c}^{-1}$ |
|-----------|--|
| 0.25 | 659 |
| 1 | 546 |
| 5 | 119 |
| 50 | 7.8 |

ГИК также обладает кислотно-основными свойствами и существует в растворе в четырех формах (5) с $pK_{a3} = 1.99$, $pK_{a4} = 3.67$, $pK_{a5} = 10.89$ [23]. При физиологическом значении pH изониазид находится преимущественно в нейтральной форме (RN_2H_3) , где R = ацил изоникотиновой кислоты).

На основании данных о продуктах и стехиометрии реакции, кинетических исследований может быть предложен следующий механизм взаимодействия изониазида с кобинамидом в нейтральной среде.

Он включает обратимые стадии последовательного связывания кобинамидом двух молекул изониазида (RN_2H_3), реакции (6), (7). В первом случае комплекс нестабилен, происходит перенос электрона с образованием комплекса восстановленного Cbi(II) с гидразильным радикалом (8). Связывание второй молекулы изониазида (7) препятствует протеканию реакции 8 и стабилизирует степень окисления кобальта $3+$ в кобинамиде. Образование комплекса кобинамида с двумя молекулами изониазида показывает, что главной формой, генерируемой после присоединения первой молекулы ГИК, является $(\text{RN}_2\text{H}_3)(\text{H}_2\text{O})\text{Cbi(III)}$, поскольку OH^- инертен к замещению.

Комплекс восстановленного Cbi(II) с гидразильным радикалом ($(\text{RN}_2\text{H}_2)(\text{Cbi(II)})$) нестабилен и разрушается. Различие в продуктах реакции показывает, что данный процесс протекает по двум механизмам. Первый заключается в диспропорционировании данного комплекса с образованием двух молекул Cbi(II) , изоникотинамида (RNH_2) и азота (9). Второй – окисление комплекса $(\text{RN}_2\text{H}_2)(\text{Cbi(II)})$ второй молекулой Cbi(III) с образованием двух молекул Cbi(II) и продукта двухэлектронного окисления изониазида (10). В обоих случаях порядок реакции по кобинамиду равен двум, т.к. в скоростьлимитирующей стадии участвуют две молекулы кобинамида.

Продукт двухэлектронного окисления изониазида (RN_2H_2) нестабилен и быстро окисляется избытком кобинамида до изоникотиновой кислоты (ROH) и азота (11).

Таким образом, в настоящей работе показано, что при рН, близких к физиологическим, кобинамид способен с высокими скоростями образовывать комплекс с одной или двумя молекулами изониазида. Связывание изониазида кобинамидом в одинаковых условиях (рН 7.5, 25°C) протекает примерно в 300 раз быстрее, чем аквакобаламином (витамин B_{12}) [17]. Комплекс Cbi(III) с одной молекулой изониазида (он образуется преимущественно в условиях, когда концентрации изониазида и кобинамида близки или кобинамид находится в избытке) не стабилен и образует восстановленный кобинамид и продукты окисления изониазида: изоникотиновую кислоту, изоникотинамид, пиридин-4-карбоксальдегид. Основным продуктом окисления ГИК избытком кобинамида является изоникотиновая кислота, которая является менее токсичной, чем ГИК. Образование ИНК указывает также на способность кобинамида окислять активные метабо-

литы (радикальные формы) ГИК, образующиеся при его окислении и ответственных за инактивацию биологических веществ [27–29].

В противоположность кобинамиду, аквакобаламин не способен окислять ГИК [17].

Комплекс кобинамида с двумя молекулами ГИК (он образуется при большом избытке изониазида) стабилен при рН 7.5 и 25°C , окисления изониазида не происходит.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (Соглашение № 14-23-00204 П). Авторы работы выражают благодарность сотрудникам лаборатории газовой хроматомасс- и ЭПР спектроскопии Центра коллективного обслуживания научных исследований Ивановского государственного химико-технологического университета Н. Печниковой за помощь в выполнении анализа продуктов окисления изониазида методом ГХ/МС.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Справочное руководство для врача скорой медицинской помощи / Под ред. А.Л. Верткина. М.: ГЭОТАР-МЕД, 2001. 285 с.
2. *Marruffa J.M., Cohen V., Howland M.A.* // *Am. J. Health Syst. Pharm.* 2012. V. 69. № 3. P. 199.
3. *Bradberry S., Vale A.* // *Medicine.* 2007. V. 35. № 10. P. 562.
4. *Preziosi P.* // *Curr. Drug. Metab.* 2007. V. 8. № 8. P. 839.
5. *Wang P.* // *Acta Pharm Sin B.* 2016. V. 6. № 5. P. 384.
6. *Watkins R.C., Hambrick E.L., Benjamin G., Chavda S.N.* // *J. Natl. Med. Assoc.* 1990. V. 82. № 1. P. 57.
7. *Sievers M.L., Herrier R.N.* // *Am. J. Hosp. Pharm.* 1975. V. 32. № 2. P. 202.
8. *Tai W.P., Yue H., Hu P.J.* // *Adv. Therapy.* 2008. V. 25. № 10. P. 1085.
9. *Scott A.I., Roessner C.A.* // *Biochem. Soc. Trans.* 2002. V. 30. № 4. P. 613.
10. *Broderick K.E. et al.* // *Exp. Biol. Med.* 2006. V. 231. № 5. P. 641.
11. *Chan A. et al.* // *Clin. Toxicol.* 2010. V.48. № 7. P. 709.
12. *Salnikov D.S., Kucherenko P.N., Dereven'kov I.A. et al.* // *Eur. J. Inorg. Chem.* 2014. P. 852.
13. *Salnikov D.S., Makarov S.V., van Eldik R. et al.* // *Eur. J. Inorg. Chem.* 2014. P. 4123.
14. *Brenner M., Benavides S., Mahon S.B. et al.* // *Clin. Toxicol.* 2014. V. 52. № 5. P. 490.
15. *Jiang J., Chan A., Ali S. et al.* // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 20831.
16. *Broderick K.E., Singh V., Zhuang S. et al.* // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. № 10. P. 8678.
17. *Tumakov S.O., Dereven'kov I.A., Salnikov D.S. et al.* // *Russ. J. Phys. Chem.* 2017. V. 91. № 10. P. 1839.
18. *Blackledge W.C., Griesel A., Mahon S.B. et al.* // *Anal. Chem.* 2010. V. 82. № 11. P. 4216.
19. *Dereven'kov I.A., Salnikov D.S., Makarov S.V. et al.* // *J. Inorg. Biochem.* 2013. V. 125. P. 32.

20. *Kucherenko P.N., Salnikov D.S., Thu Thuy Bui et al.* // *Macroheterocycles*. 2013. V. 6. № 3. P. 262.
21. *Blackledge W.C., Blackledge C.W., Griesel A. et al.* // *Anal. Chem.* 2010. V. 82. № 10. P. 4216.
22. *Dereven'kov I.A., Salnikov D.S., Silaghi-Dumitrescu R. et al.* // *Coord. Chem. Rev.* 2016. V. 309. P. 68.
23. *Dong J., Ren Y., Sun S. et al.* // *Dalton Trans.* 2017. V. 46. № 26. P. 8377.
24. *Bogdándi V., Lente G., Fábrián I.* // *RSC Adv.* 2015. V. 5. № 83. P. 67500.
25. *Johnsson K., Schultz P.G.* // *J. Am. Chem. Soc.* 1994. V. 116. № 16. P. 7425.
26. *Hynes M.J.* // *Proceedings of the Royal Irish Academy. Section B: Biological, Geological, and Chemical Science.* 1989. V. 89B. P. 435.
27. *Sinha B.K., Mason R.P.* // *J. Drug. Metab. Toxicol.* 2014. V. 5. № 3. P. 168.
28. *Metushi I., Uetrecht J., Phillips E.* // *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2016. V. 81. № 6. P. 1030.
29. *Forbes L.V. et al.* // *Biochem. Pharmacol.* 2012. V. 84. № 7. P. 949.