

КОНСТАНТЫ ПРОТОЛИТИЧЕСКИХ РАВНОВЕСИЙ В ВОДНОМ РАСТВОРЕ ГИДРАЗОНА ПИРИДОКСАЛЬ-5'-ФОСФАТА И L-ТИРОЗИНА

© 2022 г. Е. С. Розанов^а, К. В. Граждан^{а,*}, А. Н. Киселев^б, Г. А. Гамов^а

^а Ивановский государственный химико-технологический университет, Иваново, Россия

^б Институт химии растворов им. Г.А. Крестова РАН, Иваново, Россия

*e-mail: grazhdan_kv@isuct.ru

Поступила в редакцию 12.10.2021 г.

После доработки 12.10.2021 г.

Принята к публикации 14.10.2021 г.

Спектрофотометрическим методом при $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ и близкой к нулю ионной силе определены константы протолитических равновесий в водном растворе гидразона пиридоксаль-5'-фосфата и L-тирозина. Полученные константы согласуются с литературными данными по схожим соединениям.

Ключевые слова: гидразон, пиридоксаль-5'-фосфат, L-тирозин, константы протолитических равновесий, спектрофотометрия

DOI: 10.31857/S0044453722040264

Пиридоксаль-5'-фосфат (далее PLP) — основная биокаталитически активная форма витамина B₆, которая, наряду с другими витаминами B₆, используется в качестве лекарственного средства [1]. Ферменты, в состав которых входит PLP, катализируют множество биохимических реакций, включая трансаминирование, дезаминирование, биосинтез нейротрансмиттеров и др. [2, 3]. L-тирозин — биологически активный энантиомер аминокислоты, входящей в состав белков множества живых организмов. Тирозин входит в состав ферментов, во многих из которых именно тирозину отведена ключевая роль в ферментативной активности и её регуляции. В составе ферментов соединение участвует в липидном обмене, регулирует аппетит, улучшает синтез меланина, нормализует работу надпочечников, гипофиза, щитовидной железы [4].

Гидразоны витамина B₆, образующиеся при сочетании PLP (альдегида) с гидразидами, также привлекают внимание исследователей, благодаря своей биологической активности, которая включает антимикобактериальное [5], антипролиферативное [6] и антиоксидантное действие [7]. Эти гидразоны могут рассматриваться также в качестве потенциальных хелатирующих агентов для выведения из организма ионов тяжелых металлов [8], а их металлокомплексы с двухзарядными катионами d-металлов (например, с Cu²⁺) как заменители ферментов, вовлеченных в нейтрализацию активных форм кислорода. Как было недавно установлено, гидразоны витамина B₆ и

пиридинкарбогидразидов являются эффективными хелатирующими лигандами по отношению к ионам Cu(II), Zn(II) [8, 9], Ni(II), Co(III) [8, 10]. Таким образом, во-первых, хелатирующие агенты могут использоваться в качестве противоядия при интоксикации солями тяжелых металлов, а во-вторых, они могут лишать патогенных микроорганизмов ионов металлов, необходимых им для роста.

В растворах процессы комплексообразования и кислотно-основного взаимодействия часто являются конкурирующими. Количество и расположение в молекуле гидразона присоединенных протонов значительно влияет на его способность присоединять ионы металлов. В связи с этим, при исследовании координационных равновесий (то есть устойчивости образующихся комплексов) необходимо изучить кислотно-основные свойства лиганда. Более того, константы протонирования связаны с фармакокинетическими характеристиками потенциальных лекарственных средств, и потому определение их является одним из требований, предъявляемых при разработке новых фармацевтических препаратов [11].

Структурная формула гидразона пиридоксаль-5'-фосфата и L-тирозина (далее PLP-LTyр) приведена на рис. 1.

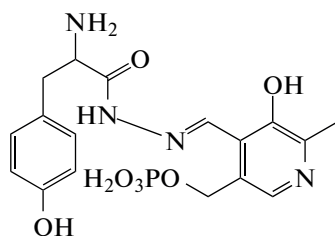


Рис. 1. Структурная формула гидразона.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

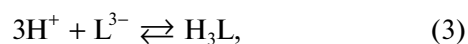
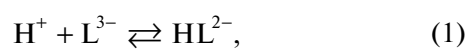
Гидразон PLP-LTyg синтезировали из пиридоксаль-5'-фосфата и L-тирозина по методике, описанной в работе. Успешность синтеза и чистота гидразона были подтверждены сравнением ^1H , ^{13}C ЯМР-спектроскопии и ^1H , ^{13}C HSQC спектров [12].

Гидроксид натрия марки “х.ч.” и хлорную кислоту марки “ч.” применяли без предварительной очистки, концентрации определяли по стандартным методикам [13]. Растворы готовились на бидистиллированной воде ($\kappa = 3.6$ мкСм/см 3 , pH 6.6).

В водных растворах PLP находится в виде цвиттер-ионов с протонированным атомом азота гетероцикла [14, 15], как и другие аналогичные производные пиридина (например, пиридоксин [16–18]). При растворении в воде гидразон, как и пиридоксаль-5'-фосфат, депротонируется по фосфатной группе с отщеплением двух протонов [19].

В ходе эксперимента был проведен ряд титрований частично нейтрализованного гидроксидом натрия раствора гидразона PLP-LTyg хлорной кислотой со снятием оптических спектров поглощения на спектрофотометре Shimadzu UV1800 в интервале длин волн 200–500 нм.

Измерения проводились в интервале pH от 3 до 13. В этом диапазоне возможно протекание реакций:



где L^{3-} – депротонированный по трем ступеням гидразон.

В ходе планирования эксперимента при помощи программного обеспечения KEV [20] были подобраны концентрационные условия для опре-

деления констант протолитических равновесий гидразона.

Для определения константы равновесия (1) раствор гидразона PLP-LTyg с концентрацией 0.00025 моль/л, нейтрализованный 0.002 моль/л NaOH, титровался 0.0054 моль/л раствором хлорной кислоты.

Для определения констант равновесий (2) и (3) раствор гидразона PLP-LTyg с концентрацией 0.00025 моль/л, нейтрализованный 0.0005 моль/л NaOH, титровался 0.0034 моль/л раствором HClO_4 . Результаты спектрофотометрического титрования также обрабатывали в KEV [20].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Примеры полученных спектров поглощения растворов гидразона PLP-LTyg с различной кислотностью, использовавшиеся для расчета констант кислотно-основных равновесий, приведены на рис. 2.

Примеры индивидуальных спектров форм растворов гидразона PLP-LTyg приведены на рис. 3. Из этих данных видно, что спектры максимально ионизированного и однократно протонированного гидразона схожи между собой, однако, протонирование увеличивает интенсивность светопоглощения во всем спектральном диапазоне. Это может указывать на то, что в исследуемом гидразоне первый протон присоединяется не к иминному атому азота, как в его аналогах [19, 21], а к фосфатной группе, т.к. известно, что протонирование кислород- и азотсодержащих функциональных групп существенно влияет на спектр поглощения хромофорной системы [22, с. 239]. При присоединении второго и третьего протона к гидразону, светопоглощение в интервале 360–430 нм ослабевает, следовательно, протонирование может идти по атомам азота или гидроксогруппе в положении 3 остатка PLP. Аналогичные спектральные изменения при протонировании наблюдались и ранее [19].

Логарифмы констант равновесия рассчитывались при помощи программы KEV: Constant Evaluator [20]. Данная программа производит расчет констант равновесий на основании заданных общих концентраций участников реакции и спектров поглощений в каждой точке титрования. KEV реализует статистический подход к решению задач равновесия, поэтому его можно широко применять в различных системах с получением более точного и надежного результата (по сравнению с традиционными графическими методами).

Полученные логарифмы констант протолитических равновесий приведены в таблице 1 вместе с литературными данными по родственным гидразонам. Данные по гидразонам пиридоксаль-5'-

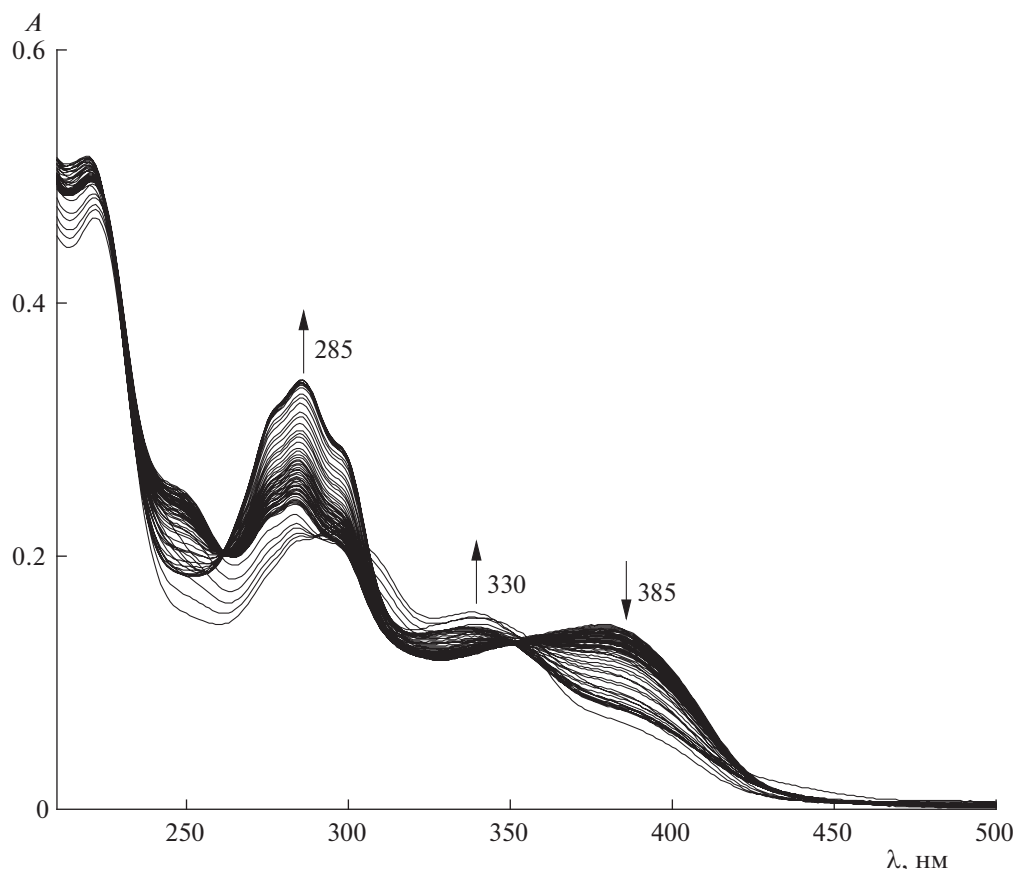


Рис. 2. Пример спектрофотометрического титрования гидразона PLP–LTyг. Стрелками показаны изменения оптической плотности при разных длинах волн по мере добавлений HClO₄ к гидразону.

фосфата и гидразида изоникотиновой кислоты (PLP–INH), пиридоксаль-5'-фосфата и гидразида фурановой кислоты (PLP–F2H), пиридоксаль-5'-фосфата и гидразида тиофен-2-карбоновой кислоты (PLP–T2H), пиридоксаль-5-фосфата и гидразида тиофен-3-карбоновой кислоты (PLP–T3H), пиридоксаль-5'-фосфата и гидразида пиразиновой кислоты (PLP–TZAH), указанные в таблице 1, взяты в работе [19].

Как видно из данных таблицы 1, значения констант протолитических равновесий гидразона PLP–LTyг близки к значениям, полученным для родственных гидразонов на основе PLP.

По полученным константам построена диаграмма долевого распределения частиц в зависимости от pH (рис. 4). На этой диаграмме можно выделить интервал pH, близкой к 6–6.5 ед., в котором преобладает одна форма гидразона PLP–LTyг – H₂L⁻. За пределами этого диапазона в растворе присутствуют одновременно минимум две формы гидразона, что необходимо учитывать при исследовании координационных равновесий с его участием. Следует также отметить, что соединение PLP–LTyг растворяется тем лучше, чем в большей степени оно диссоциирует, следовательно-

Таблица 1. Логарифмы констант протолитических равновесий

Гидразон	PLP–INH	PLP–F2H	PLP–T2H	PLP–T3H	PLP–PZAH	PLP–LTyг*
lg β ₁	11.37	11.43	11.47	11.48	11.36	11.04 ± 0.08*
lg β ₂	19.60	19.72	19.75	19.31	19.62	20.20 ± 0.11*
lg β ₃	23.81	23.79	24.24	24.15	24.26	23.68 ± 0.12*

* Данные, полученные в настоящей работе.

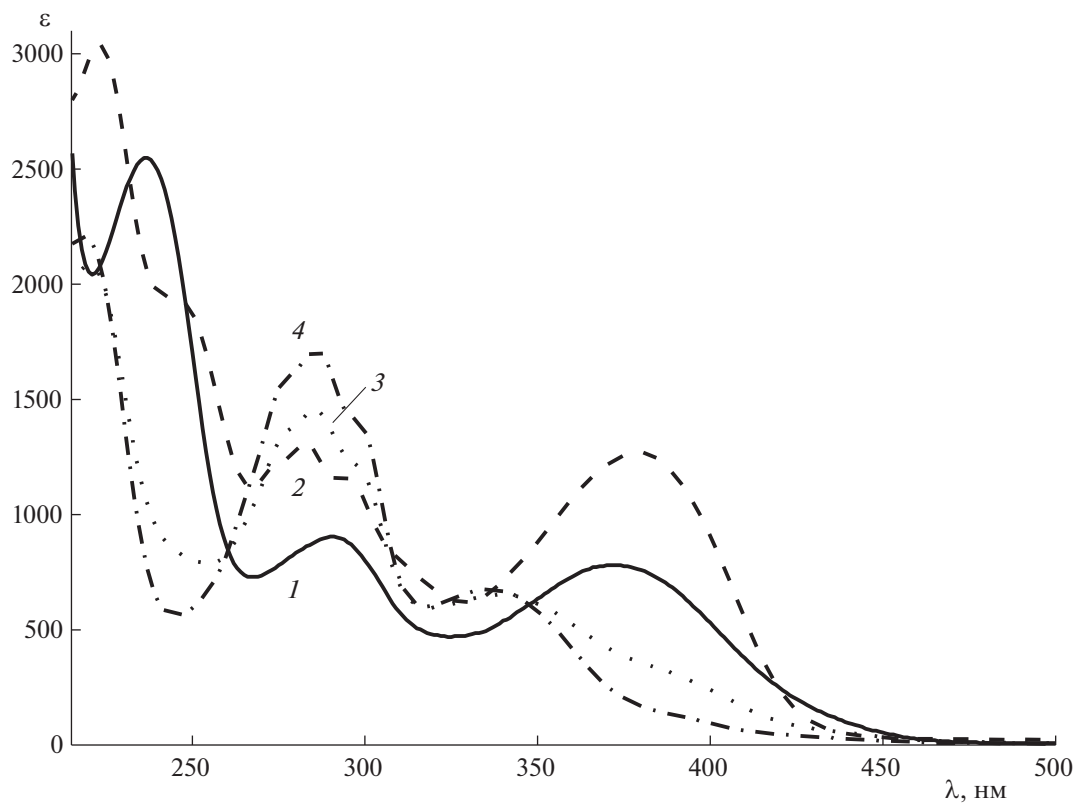


Рис. 3. Электронные спектры поглощения различных протонированных форм гидразона пиридоксаль-5'-фосфата и L-тирозина: L^{3-} – 1, HL^{2-} – 2, H_2L^{-} – 3, H_3L – 4.

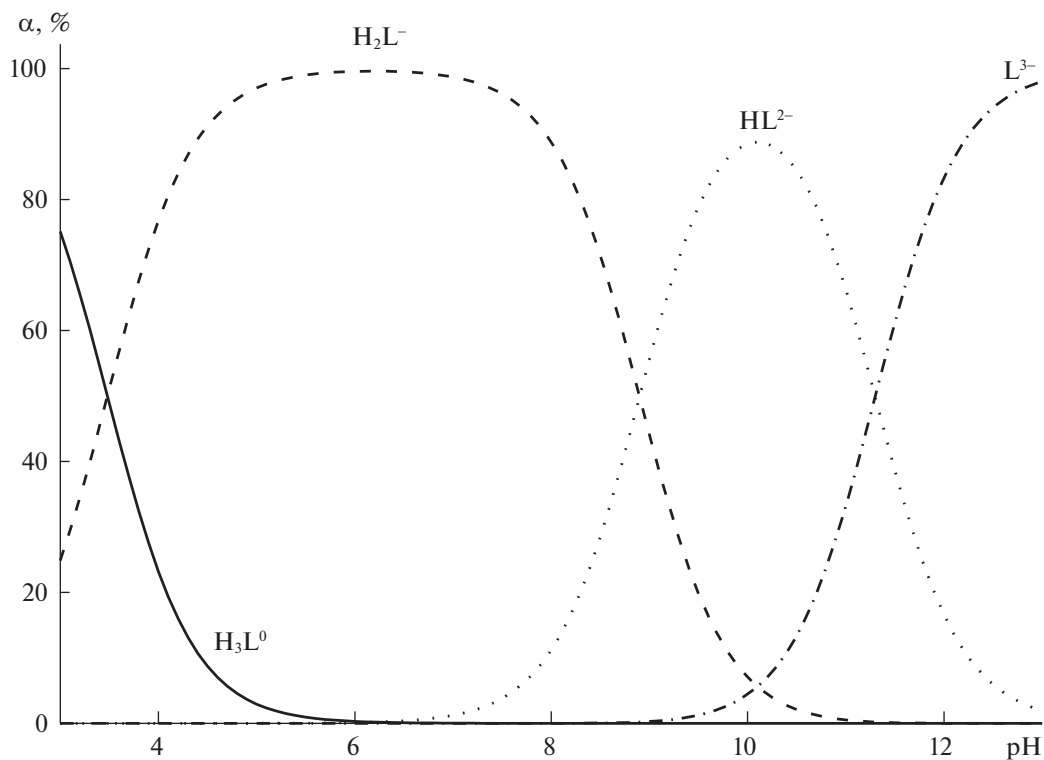


Рис. 4. Зависимости выхода частиц L^{3-} , HL^{2-} , H_2L^{-} и H_3L от pH раствора.

но, при рН, равной физиологическому значению, гидразон будет малорастворим.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (государственное задание, проект № FZZW-2020-0009) с использованием ресурсов Центра коллективного пользования научным оборудованием ИГХТУ (при поддержке Минобрнауки России, соглашения № 075-15-2021-671).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *McCormick D.B.* Biochemistry of coenzymes / R.A. Meyers (Ed.), Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine, V. 1. VCH. Weinheim, Germany, 1996. P. 396.
2. *di Salvo M.L., Safo M.K., Contestabile R.* // Front. Biosci. (Elite Ed.). 2012. V. 4. P. 897. <https://doi.org/10.2741/428>
3. *Percudani R., Peracchi A.* // EMBO Rep. 2003. V. 4 (9). P. 850. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.embor914>
4. *Мнджоян О.Л., Агаджанян Ц.Е.* // Хим.-фарм. журн. 1971. № 7. С. 4.
5. *Nogueira T.C.M., dos Santos Cruz L., Lourenço M.C., de Souza M.V.N.* // Letters in Drug Design & Discovery. 2019. V. 16. Iss. 7. P. 792. <https://doi.org/10.2174/1570180815666180627122055>
6. *Richardson D.R., Tran E.H., Ponka P.* // Blood. 1995. V. 86. Iss. 11. P. 4295. <https://doi.org/10.1182/blood.V86.11.4295.bloodjournal86114295>
7. *Hermes-Lima M., Gonçalves M.S., Andrade R.G.* // Mol. Cell Biochem. 2001. V. 228. P. 73. <https://doi.org/10.1023/A:1013348005312>
8. *Гамов Г.А., Завалишин М.Н., Хохлова А.Ю. и др.* // Журн. общ. химии. 2018. Т. 88. № 7. С. 1144. DOI: (*Gamov G.A., Zavalishin M.N., Khokhlova A.Y. et al.* // Russ. J. Gen. Chem. 2018. V. 88. № 7. P. 1436. <https://doi.org/10.1134/S1070363218070149>). <https://doi.org/10.31857/S0044457X20010201>
9. *Siqueira J.D., Pellegrin S.F., dos Santos S.S. et al.* // J. Inorg. Biochem. 2020. V. 204. P. 110950. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.110950>
10. *Gamov G.A., Zavalishin M.N., Khokhlova A.Y. et al.* // J. Coord. Chem. 2018. V. 20. P. 3304. <https://doi.org/10.1080/00958972.2018.1512708>
11. *Manallack D.T.* // Perspectives in Medicinal Chemistry. 2007. V. 1. P. 25. <https://doi.org/10.1177/1177391X0700100003>
12. *Гамов Г.А., Завалишин М.Н.* // Журн. неорган. химии. 2021. Т. 66. № 10. Принята к печати.
13. *Пономарёв В.Д.* Аналитическая химия, ч. 2. М.: Высш. школа, 1982. 288 с.
14. *Szpoganicz B., Martell A.E.* // J. Am. Chem. Soc. 1984. V. 106. Iss. 19. P. 5513. <https://doi.org/10.1021/ja00331a020>
15. *Limbach H.H., Chan-Huot M., Sharif S. et al.* // Biochim. Biophys. Acta. 2011. V. 1814. P. 1426. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.06.004>
16. *Sanchez-Ruiz J. M., Llor J., Cortijo M.* // J. Chem. Soc. Perk. Trans. 2. 1984. P. 2047. <https://doi.org/10.1039/P29840002047>
17. *Llor J., Munoz L.* // J. Org. Chem. 2000. V. 65. P. 27162722. <https://doi.org/10.1021/jo991821t>
18. *Metzler D.E., Harris C.M., Johnson R.J. et al.* // Biochem. 1973. V. 12. Iss. 26. P. 5377. <https://doi.org/10.1021/bi00750a022>
19. *Gamov G.A., Meshkov A.N., Zavalishin M.N. et al.* // J. Mol. Liq. 2020. V. 305. Article number 112822. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.112822>
20. *Meshkov A.N., Gamov G.A.* // Talanta. 2019. V. 198. P. 200. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.01.107>
21. *Echevarría G.R., Basagoitia A., Santos J.G., Blanco F.G.* // J. Mol. Cat. A: Chem. 2000. P. 209–215. [https://doi.org/10.1016/S1381-1169\(00\)00266-1](https://doi.org/10.1016/S1381-1169(00)00266-1)
22. *Чекалин М.А., Пассет Б.В., Иоффе Б.А.* Технология органических красителей и промежуточных продуктов. Л.: Химия, 1980. 472 с.