

УДК 577.16 + 541.128

Пищугин Ф.В.

*член-корреспондент НАН КР, д.х.н, профессор,
заведующий лабораторией «Органическая химия»*

Института Химии и фитотехнологии

НАН КР

Пищугин Ф.В.

х.и.д. , профессор, КР УИАнын мүчө-корр., Химия жана фитотехнология институтунун

“Органикалык химия” лабораториясынын башчысы

Pishugin F.V.

doctor of chemistry, professor,

Institute of chemistry and fito technology NAS KR

Тулбердиев И.Т.

к.х.н., в.н.с. Института Химии и фитотехнологии НАН КР

Тулбердиев И.Т.

х.и.к., в.н.с., КР УИАнын Химия жана фитотехнология институту

Tuleberdiev I.T.

cand. chem. sci., institute of chemistry and fitotechnology NAS KR

Дерепаска С.С.

научный сотрудник Института Химии и фитотехнологии НАН КР

Дерепаска С.С.

н.с КР УИАнын Химия жана фитотехнология институту

Derepaska S.S.

Institute of chemistry and fitotechnology NAS KR

ХИМИЧЕСКИЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ ПРОДУКТОВ КОНДЕНСАЦИИ ПИРИДОКСАЛЯ И ПИРИДОКСАЛЬ-5'-ФОСФАТА С L-А-ЦИСТЕИНОМ,

L-А-СЕРИНОМ И L-А-МЕТИОНИНОМ

Аннотация. Кинетическим методом изучены механизмы конденсации L-α-цистеина, L-α-метионина, L-α-серина с пиридоксалем и пиридоксаль-5' фосфатом. Показано, что в отличие от метионина и серина, цистеин при конденсации с пиридоксалем и пиридоксаль-5' -фосфатом образует устойчивый продукт с тиазолидиновым циклом. Методами элементарно-

го анализа, УФ-, ИК- спектроскопией, квантово-химическими расчетами установлены их структуры. Показано, что тиазолидиновый фрагмент продукта конденсации пиридоксаль с L-α-цистеином развернут ~ 90° по отношению к плоскости пиридинового кольца за счет взаимного отталкивания отрицательных зарядов на атомах кислорода в орто-положении пиридоксалевого фрагмента и отрицательно заряженных атомов серы и азота тиазолидинового цикла.

Ключевые слова: пиридоксаль, пиридоксаль-5'-фосфат, цистеин, серин, метионин, кинетика.

**ПИРИДОКСАЛЬ ЖАНА ПИРИДОКСАЛЬ - 5'-ФОСФАТ МЕНЕН
L-А-ЦИСТЕИНДИН, L-А-СЕРИНДИН ЖАНА L-А-МЕТИОНИНДИН
КОНДЕНСАЦИЯ АЗЫКТАРЫНЫН ХИМИЯЛЫК АЙЛАНУУЛАРЫ**

Аннотация. Кинетикалык ыкма менен L-α- цистеиндин L-α-метиониндин, L-α-сериндин пиридоксаль жана пиридоксаль-5'-фосфатынын конденсациясынын механизмдери изилденди. Метионин менен серинден айырмаланып, цистеин пиридоксаль жана пиридоксаль-5'-фосфатынын менен тиазолидин циклин пайда кылуу менен туруктуу затты пайда кылат. Элементтик анализдин ыкмалары, УФ, ИК- спектроскопиянын, кванттык-химиялык эсептөөлөрдүн негизинде алардын структурасы аныкталды. L-α- цистеин менен пиридоксалдын конденсациясынан алынган азыктагы тиазолидин фрагменти мейкиндикте пиридин шакекчесине карата 90° ка бурулган, бул болсо пиридоксаль фрагменттинин орто абалындагы кычкылтектин атомдорунда терс заряддардын ошондой эле тиазолидин циклиндеги азоттун жана күкүрттүн терс заряддарынын түртүлүшүүгө жараша болору аныкталган.

Негизги сөздөр: пиридоксаль, пиридоксаль-5'-фосфат, цистеин, серин, метионин, кинетика.

**CHEMICAL TRANSFORMATIONS OF PYRIDOXAL
AND PYRIDOXAL 5'-PHOSPHATE PRODUCTS WITH L-CYSTEINE,
L-SERINE AND L-METHIONINE**

Abstract. The mechanisms of condensation of L-cysteine, L-methionine, and L-serine with pyridoxal and pyridoxal-5-phosphate with L-cysteine were studied by the kinetic method. Unlike methionine and serine, the condensation of cysteine with pyridoxal and transaldimination with N-pyridoxylidene-β-alanine involves intermediate formation of stable product having a thiazolidine ring. Its structure was determined by elemental analysis, UV, and IR spectroscopy, and quantum-chemical calculations. The thiazolidine fragment in the pyridoxal condensation product with L-cysteine is turned through an angle of 90° with respect to the pyridine ring plane due to mutual repulsion of the negatively charged oxygen atom in the *ortho* position of the pyridine ring and sulfur and nitrogen atoms in the thiazolidine ring.

Key words: pyridoxal, pyridoxal-5'-phosphate, cysteine, serine, methionine, kinetics.

Серин, метионин и цистеин и являются структурными фрагментами многих биополимеров, пептидов, белков, ферментов. Основу биополимеров составляют аминокислотные остатки соединенных между собой при помощи пептидных связей. Физико-химические и биологические свойства их определяются структурой полимерной цепи, последовательностью аминокислотных фрагментов, их количеством, а также структурой радикала. Боковые группы формируют в значительной степени поверхность биополимеров, определяя многие физические и химические свойства белков, пептидов и ферментов.

L- α -цистеин участвует в формировании пространственных структур ряда белков и пептидов, например инсулина и иммуноглобулинов, участвует в процессах формирования тканей кожи, способствует формированию коллагена, улучшает эластичность и текстуру кожи, помогает обезвреживать некоторые токсические вещества и защищает организм от повреждающего действия радиации. Он является антиоксидантом, причем его антиоксидантное действие усиливается при одновременном приеме витамина *C* и селена, является предшественником глутатиона – вещества, оказывающего защитное действие на клетки печени и головного мозга от повреждения алкоголем, некоторых лекарственных препаратов и токсических веществ, содержащихся в сигаретном дыме.

L- α -метионин оказывает некоторое липотропное действие, повышает синтез холина, лецитина и других фосфолипидов, в некоторой степени способствует снижению содержания холестерина в крови и улучшению соотношения фосфолипиды/холестерин, уменьшению отложения нейтрального жира в печени и улучшению функции печени, может оказывать умеренное антидепрессивное действие (по-видимому, за счёт влияния на биосинтез адреналина).

Литературными [1-3] и нашими работами [4-10] на основании изучения кинетики

и механизма взаимодействия пиридоксала и пиридоксаль-5'-фосфата с различными по структуре аминокислотами установлено:

1 – α -аминокислоты (аланин, глицин, лейцин, фенилаланин, триптофан, аргинин, и др.) взаимодействуют с коферментами с образованием оснований Шиффа, которые после перехода их в хиноидную форму в зависимости от структуры и условий реакций претерпевают различные химические превращения (переаминирование, декарбоксилирование, расщепление боковых цепей, трансальдемирание и т.д.).

2 – β - и γ -аминокислоты (β -аланин, L-лизин), образуют устойчивые к химическим превращениям основания Шиффа.

3 – L-аргинин взаимодействует с пиридоксалем по α -NH₂-группе, гуанидиновый фрагмент, по-видимому, участвует в образовании мочевины, регенерации орнитина и химических превращений с образованием NO.

4 – L-пролин влияет, по-видимому, на характер укладки полипептидной цепи.

5 – D- α -аланин в отличие от L- α -аланина при взаимодействии с пиридоксалем подвергается декарбоксилированию с образованием пиридоксамина, пирувата или этанала.

Большой интерес вызывает изучение кинетики и механизма взаимодействия в сопоставимых условиях пиридоксала и пиридоксаль - 5'-фосфата с аминокислотами – цистеином, серином, метионином, которые имеют близкие по структуре радикалы (цистеин – CH₂ SH, серин - CH₂ OH, метеонин -(CH₂)₂ SCH₃), но отличаются гетероатомами, их основностью, кислотно-основными свойствами, реакционной способностью. Данные, приведенные на *рис.1* (кривая 3), показывают, что при взаимодействии L- α -серина с пиридоксалем реакции конденсации протекают через три кинетически различные стадии: 1 – стадия – присоединение

α -аминокислот к пиридоксалу с образованием аминспиртов (резкое уменьшение оптической плотности смесей растворов), 2 – стадия – дегидратация аминспиртов с образованием основания Шиффа (увеличения оптической плотности), 3– стадия – переход

оснований Шиффа в хиноидную форму и в зависимости от ее структуры происходят химические превращения аминокислот – переаминирование, декарбоксилирование, расщепление боковой цепи аминокислот (очень медленная стадия).

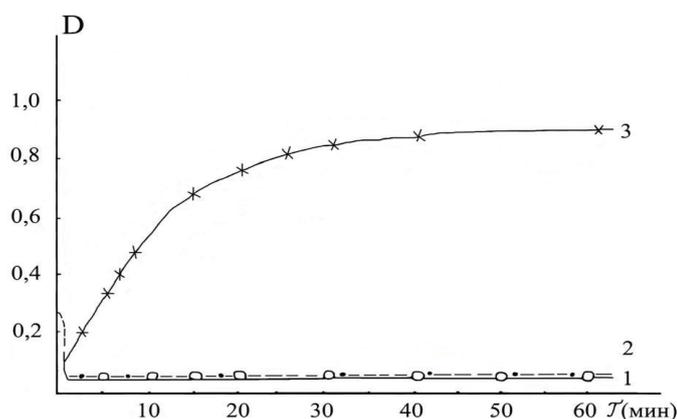


Рис. 1 Изменение оптической плотности смесей 0,01 М растворов L- α -цистеина с пиридоксалем (1), пиридоксаль-5'-фосфатом (2) и L- α -серина с пиридоксалем (3) в 70% спиртово-водном буферном растворе (λ 430 нм, рН 6,8, T 25 $^{\circ}$ C).

Данных, кинетических измерений (рис 1, кривая 3) и ТСХ показали, что при взаимодействии серина с пиридоксалем основания Шиффа после перехода их в хиноидную структуру приводят к альдольному расщеплению боковой цепи с образованием глицина и формальдегида (медленное уменьшение оптической плотности растворов во времени). Наличие формальдегида в реакционной смеси была доказано качественной реакцией с 2,4 динитрофенил гидразином, а наличие глицина качественной реакцией с нингидрином и данными ТСХ. Определенный интерес представляло изучение сравнительной кинетики и механизма взаимодействия L- α -серина и L- α -цистеина с пиридоксалем. Цистеин и серин отличаются друг от друга только гетероатомами в радикале. Несколько неожиданно протекает реакция L- α -цистеина с пиридоксалем и пиридоксаль-5'-фосфатом (рис.1, кривая 1,2). Вместо увеличения оптической плотности смеси во времени (появление желтой окраски), которая характерна при взаимо-

действии всех (кроме пролина), изученных нами α -, β -, ϵ - аминокислот (аланина, фенилаланина, триптофана, аспарагиновой и глутаминовой кислот, глицина, лизина, аргинина и др.) на стадии дегидратации аминспиртов (λ 350, 420-430 нм) оптическая плотность смеси L- α -цистеина с пиридоксалем или пиридоксаль-5'-фосфатом мгновенно падает до нуля и не изменяется в течении длительного выдерживания смеси. Окраска смеси реагирующих растворов не меняется по сравнению с растворами исходных веществ. В литературе [1-2] имеются сведения о взаимодействии производного цистеина, L-пенициламина, с пиридоксаль зависимыми ферментами. Авторы статьи предположили, что в результате образуется устойчивый тиазолидиновый цикл за счет присоединения SH-группы к C=N – связям основания Шиффа. Однако, прямых доказательств этого предположения в приведенной работе нет, по видимому, из-за сложности структуры объектов исследования и анализа продуктов их взаимодействия.

Анализ литературных [1-3] и наших экспериментальных данных [4-10] показал, что L- α -цистеин, имея два нуклеофильных центра (α -NH₂ и γ -SH -группы) при взаимодействии с пиридоксалем имеет возможность образовать тиазолидиновый цикл. Такой необычный механизм взаимодействия L- α -цистеина с пиридоксалем и пиридоксаль-5'-фосфатом можно объяснить: на первой стадии очень быстро происходит присоединение α -NH₂- группы L- α - цистеина к карбонильной группе пиридоксаля или пиридоксаль-5 фосфата с образованием аминок спирта, на второй стадии – происходит дегидратация аминок спирта с образованием основания Шиффа, на третьей стадии – в момент образования основания Шиффа происходит одновременно нуклеофильная

атака SH-группы L- α -цистеинового фрагмента на C=N – связи основания Шиффа с образованием тиазолидинового цикла. Третья стадия, согласно кинетическим исследованиям и данным ТСХ, является необратимым процессом. В результате необратимого перехода основания Шиффа (λ_{\max} 350 нм и 420-430 нм) в циклический тиазолидиновый фрагмент происходит исчезновение оптического поглощения смеси растворов в видимой области их УФ-спектров.

Для подтверждения предложенного механизма конденсации L- α - цистеина с пиридоксалем и пиридоксаль-5'-фосфатом была изучена кинетика и механизм взаимодействия L- α -метионина с этими коферментами (рис.2 , кривая 1,2).

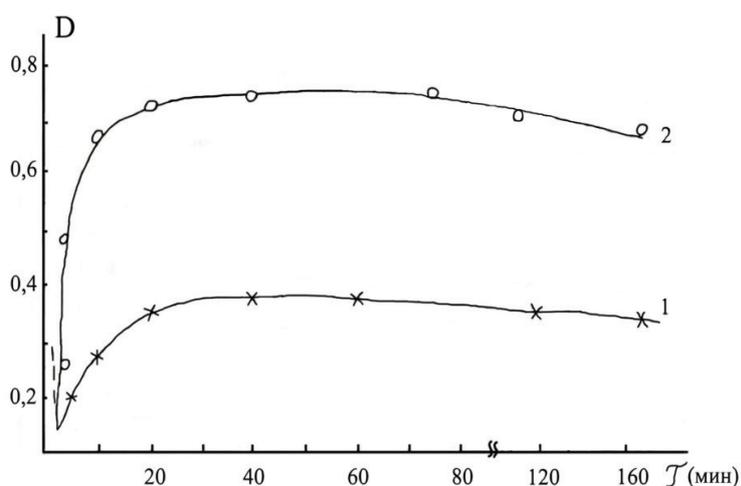


Рис 2. Изменение оптической плотности смесей 0,01 М растворов L- α -метионина с пиридоксалем (1) и пиридоксаль-5'-фосфатом (2) в 70%-ном спиртово-водном буферном растворе (λ 430 нм, рН 6,6 , T 25⁰С).

В метионине атом водорода SH-группы замещен на CH₃ – группу. Данные кинетических исследований и расчеты констант скоростей показали, что метионин взаимодействует с пиридоксалем, как и все другие аминокислоты, с образованием устойчивого основания Шиффа с λ_{\max} 350 нм и

420-430 нм . Показано, что метилирование SH-группы не приводит к образованию циклических продуктов. Схему взаимодействия L- α - цистеина с пиридоксалем и пиридоксаль-5'-фосфатом можно представить:

Схема 1

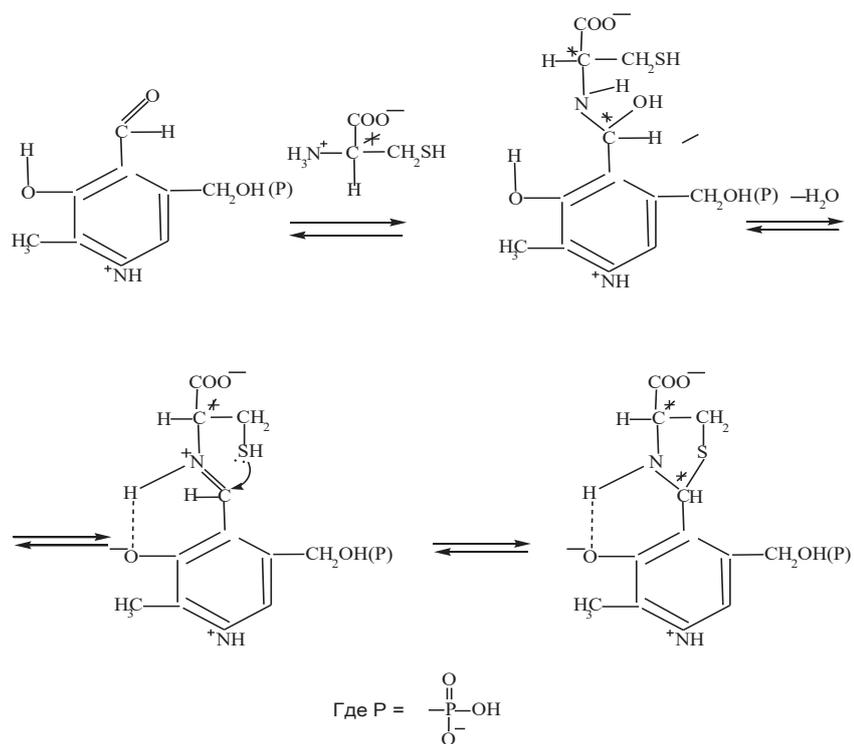
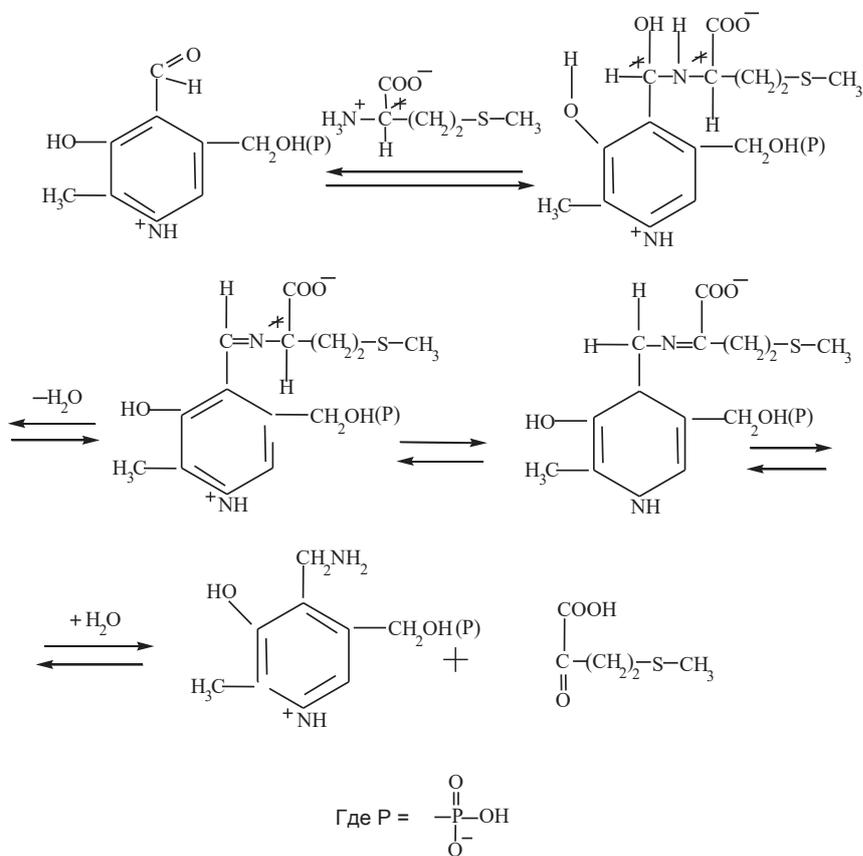


Схема 2



Данные, приведенные на рис. 2 и расчеты констант скоростей продуктов конденсации пиридоксаль-5'-фосфата с L-α-метионином на стадии присоединения и дегидратации, образующихся аминоспиртов, гораздо выше, чем скорости конденсации пиридоксала с L-α-метионином. Это можно объяснить акцепторной способностью фосфатной группы пиридоксаль-5'-фосфата приводящей к увеличению положительного заряда на атоме углерода карбонильного фрагмента, приводящего к увеличению скорости конденсации на стадиях присоединения и дегидратации аминоспиртов.

Квантово-химические расчеты с учетом оптимизации энергетических и геометрических параметров продукта взаимодействия L-α-цистеина с пиридоксалем показали,

что тиазолидиновый фрагмент развернут по отношению к плоскости пиридинового кольца на $\sim 90^\circ$. Поворот тиазолидинового цикла относительно пиридоксалевого фрагмента на 90° объясняется, по-видимому, взаимным отталкиванием отрицательно заряженных атомов кислорода в орто-положении пиридоксалевого фрагмента и отрицательно заряженных атомов серы и азота тиазолидинового цикла.

При конденсации пиридоксала с L-α-цистеином в качестве конечного продукта образуется тиазолидиновый фрагмент с новым хиральным центром приводящим в целом к изменению оптических свойств молекулы. Были изучены кинетика и механизм продуктов взаимодействия L-α-цистеина с пиридоксалем и пиридоксаль-5'-фосфатом (рис.3) поляриметрическим методом.

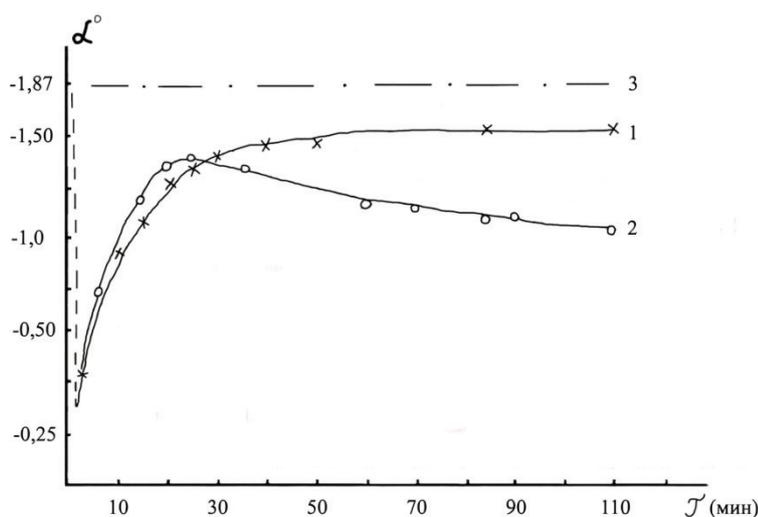


Рис.3. Изменение наблюдаемых углов вращения смесей (0,04 М) растворов L-α-цистеина с пиридоксалем (1) и пиридоксаль-5'-фосфатом (2) в 50% -ном спиртово-водном буферном растворе, рН 5,5, Т 25°C), (3) наблюдаемый угол вращения L-α-цистеина гидрохлорида

Данные приведенные на рис. 3 показывают, что наблюдаемые углы вращения солянокислого L-α-цистеина в первом промежутке времени резко уменьшаются от $-1,87^\circ$ для цистеина до $-0,25^\circ$ на стадии присоединения L-α-цистеина к карбонильной группе пиридоксала и пиридоксаль-5'-фосфата с образованием аминоспиртов. На второй стадии - дегидратации аминоспиртов с

последующей одновременной стадией нуклеофильной атакой атомов серы C=N связи, образующихся оснований Шиффа, при этом происходит уменьшение абсолютных значений наблюдаемых углов вращения на атоме углерода тиазолидинового фрагмента. Увеличение отрицательных углов вращения, по-видимому, связаны с появлением нового хирального центра в структу-

ре тиазолидинового фрагмента конечного продукта конденсации L- α -цистеина с пиридоксалем или пиридоксаль-5'-фосфатом.

Возник вопрос почему замена атома серы (в цистеине) на атом кислорода (в молекуле серина) не приводит к циклизации аминокислотного фрагмента? По-видимому, отсутствие процесса циклизации объясняется меньшей основностью атома кислорода OH-группы в молекуле серина, по сравнению с атомом серы SH-группы в молекуле цистеина. Константа скорости конденсации серина с пиридоксалем на стадии дегидратации аминокислот (к=0,0112 мин⁻¹) меньше, чем константа скорости конденсации этого кофермента на стадии дегидратации с метионином (к₂=0,0197 мин⁻¹).

Экспериментальная часть

В качестве объектов исследования были взяты пиридоксаль гидрохлорид марки «хч» и пиридоксаль-5-фосфат фирмы «Ferak Berlin» и аминокислоты фирмы «Reanal» венгерского и английского производства. Буферные растворы готовили по общепринятой методике. Кинетику измеряли на спектрофотометре «Spektromom-204», СФ-26 «ЛОМО», и сахариметре Automatic Saccharimeter Digipof DS (USA). Термостатирование реакционной смеси проводили при помощи термостата УН-8 с точностью до $\pm 0,1^\circ\text{C}$. Навески пиридоксаля или пириксаль-5-фосфата и аминокислот в эквимольных количествах растворяли в водно-спиртовых буферных растворах и выдерживали при заданной температуре в течении 30 минут. За начало реакции принимался момент смешивания термостатированных растворов пиридоксаля или пириксаль-5-фосфата и аминокислот. Кинетические измерения проводили в термостатированных кюветах толщиной 1,008 мм. Поскольку УФ-спектры растворов пиридоксаля изменяются в зависимости от pH среды и растворителя, в кюветы сравнения заливали эквимольные растворы пиридоксаля в условиях анало-

гичных условиям конденсации. При такой методике изменения оптической плотности смеси исходных компонентов зависит от образования промежуточных и конечных продуктов и не зависит от изменения оптической плотности исходных веществ. Константы скорости конденсации рассчитывались по компьютерной программе для обратимых и необратимых реакций [11]. Продукты конденсации синтезировались по методикам, приведенной в работах [4-10]. Исходные и конечные продукты идентифицировались методом элементного анализа, УФ- и ИК- спектроскопией, хроматографией.

Синтез N(3-гидрокси-5-гидрокси-метил-2-метилпиридин-4-илметил)-4'-карбокситиазолидина

К смеси 0,103 г гидрохлорида пиридоксаля и 0,072 г L- α -цистеина добавили 5 мл 96%-ного этанола и нагревали смесь в течении 20 минут при T + 50 $^\circ\text{C}$ до полного растворения продуктов взаимодействия. Контроль осуществлялся УФ-спектрофотометрически (отсутствие полос поглощения в видимой области 335-500 нм), ТСХ (исчезновение пятен исходных продуктов и появление пятен конечных продуктов). Раствор выпаривали при комнатной температуре до выпадения слегка желтого кристаллического осадка. Выход 0,128 г (74,8%). Т пл. + 144-145 $^\circ\text{C}$ (интенсивное разложение с выделением газообразных продуктов), $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -4,5^\circ$ (70% спирт).

ИК- спектр (KBr, γ , см⁻¹ : 1512, 1411) (C=O, COO⁻), 504 (C-S), полоса поглощения 1584 (C=N), которая характерна для продукта взаимодействия пиридоксаля с L-метионином отсутствует.

Найдено, % C 42,75 H 4,80 N 9,05
C₁₁H₁₅N₂O₄S · HCL

Вычислено, % C 42,9 H 4,88 N 9,1

Литература

1. *Мецлер Д.* Биохимия. М. : Мир, 1980, т.2.С.224.
2. *Браунштейн А.Е., Шемякин М.М.* // Биохимия, 1953. Т. 18. Вып. 4. С. 393.
3. *Баранников В. П., Баделин В. Г., Венедиктов Е. А., Межевой И. Н., Гусейнов С. С.*// ЖФХ. 2011. Т.85. № 1. С.20.
4. *Пицугин Ф.В., Тулебердиев И.Т.* // ЖОХ.2005. Т. 75. Вып. 9.С. 1538.DOI: 10.1007/s11176-005-0447-z.
5. *Пицугин Ф.В., Тулебердиев И.Т.* // ЖОХ. 2008. Т. 78. Вып. 6. С. 997.DOI: 10.1134/S1070363208060212.
6. *Пицугин Ф.В., Тулебердиев И. Т.* // ЖОХ. 2009. Т. 79.Вып. 1. С. 120.DOI: 10.1134/S1070363209010174
7. *Пицугин Ф.В., Тулебердиев И.Т.* // ЖОХ. 2010. Т. 80. Вып. 9. С. 1518.DOI: 10.1134/S1070363210090203.
8. *Пицугин Ф.В., Тулебердиев И.Т.* // ЖФХ.2017. Т.91 № 10. С.1648. DOI: 10.7868/S0044453717100326
9. *Пицугин Ф.В., Тулебердиев И.Т.* // ЖФХ.2021. Т.95 № 1. С.34. DOI: 10.31857/S0044453721010222
10. *Пицугин Ф.В., Тулебердиев И.Т.* // ЖФХ.2021. Т.95 № 7. С.1012.DOI: 10.31857/S0044453721070207
11. *Лейдлер К.* Кинетика органических реакций. М: Мир, 1966, С. 31.