

**ХИМИЯ**

УДК 577.16 + 541.128

**Пищугин Ф.В.***член-корреспондент НАН КР,  
и фитотехнологии НАН КР**д.х.н, профессор, заведующий лабораторией «Органическая химия» Института химии***Тулбердиев И.Т.***к.х.н., в.н.с. Института химии и фитотехнологии НАН КР***Дерепаска С.С.***научный сотрудник 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***Тулбердиев И.Т.***х.и.к., ж.и.к., КР УИАнын  
Химия жана фитотехнология институту***Дерепаска С.С.***илимий кызматкер,  
КР УИАнын  
Химия жана фитотехнология институту***Pishugin F.V.***doctor of chemistry, professor, Institute of Chemistry and FitoTechnology,  
NAS KR***Tuleberdiev I.T.***cand. chem. sci., Institute of Chemistry and FitoTechnology,  
NAS KR***Derepaska S.S.***Institute of Chemistry and FitoTechnology,  
NAS KR***ХИМИЧЕСКИЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ ПРОДУКТОВ КОНДЕНСАЦИИ  
ПИРИДОКСАЛЯ С L-А- ВАЛИНОМ И D-А-ВАЛИНОМ**

**Аннотация.** Изучена кинетика и механизм взаимодействия пиридоксаля с L- $\alpha$ - и D- $\alpha$ -валинами. В сопоставимых условиях конденсация L- $\alpha$ - и D- $\alpha$ -валинов с пиридоксалем протекает через три кинетически различные стадии: первая быстрая стадия - присоединение аминокислоты к пиридоксалю с образованием аминокспирта, вторая, более медленная стадия – дегидратация аминокспирта с образованием основания Шиффа и третья очень медленная стадия – отщепление  $\alpha$ -атома водорода от L- $\alpha$ -аминокислотного фрагмента и декарбоксилирования у D- $\alpha$ -аминокислотного фрагмента, перестройка оснований Шиффа в хиноидную структуру, последующий гидролиз которой приводит к образованию

пиридоксамина, кетокислоты или альдегида соответственно. Предложена схема химических превращений продуктов конденсации пиридоксаля с L- $\alpha$ - и D- $\alpha$ -валинами.

**Ключевые слова:** Витамины B<sub>6</sub>, аминокислоты, структуры аминокислот и оснований Шиффа.

### ПИРИДОКСАЛДЫН L- $\alpha$ -ВАЛИН ЖАНА D- $\alpha$ -ВАЛИН МЕНЕН БОЛГОН КОНДЕНСАЦИЯСЫНЫН ПРОДУКТУЛАРЫНЫН ӨЗ АРА АРАКЕТТЕНИШҮҮСҮ

**Аннотация.** Пиридоксалдын L- $\alpha$ - жана D- $\alpha$ -валин менен аракеттенишүү механизми жана кинетикасы изилденди. Салыштырмалуу шарттарда L- $\alpha$ - жана D- $\alpha$ -валин менен пиридоксалдын конденсациясы ар түрдүү үч кинетикалык стадия аркылуу жүрөт: биринчи тез стадия- амин кислоталарынын пиридоксалга кошулуп амин спиртин пайда кылуусу, экинчи, жай жүрүүчү стадия-амин спиртинин Шиффтин негиздерин пайда кылуу менен жүргөн дегидратациясы, жана үчүнчү эң жай жүрүүчү стадия - L- $\alpha$ -аминкислоталык фрагменттен суутектин  $\alpha$ -атомунун бөлүп чыгуусу жана D-аминкислотасынын фрагментинен декарбоксилдешүүнүн жүрүүсү, Шиффтин негиздеринин хиноиддик структураны кайра пайда кылуусу, андан кийин жүргүзүлгөн гидролиз пиридоксаминдин, кетокислотанын жана альдегиддин пайда болуусуна алып келет. L- $\alpha$ -жана D- $\alpha$ -валиндин пиридоксалы менен болгон конденсациясынын продуктуларынын химиялык айлануусунун схемасы келтирилген.

**Негизги сөздөр:** B<sub>6</sub> витаминдери, аминокислоталар, аминокислоталардын түзүлүшү жана Шифф негиздери.

### CHEMICAL TRANSFORMATIONS OF THE CONDENSATION PRODUCTS OF PYRIDOXAL WITH L-A- VALINE AND D-A- VALINE

**Abstract.** The kinetics and mechanism of the reactions of pyridoxal with L- $\alpha$ - and D- $\alpha$ - valine were studied. Under comparable conditions, the condensation of L- $\alpha$ - and D- $\alpha$ - valine with pyridoxal includes three kinetically different steps. The first fast step is addition of the amino acid to pyridoxal with formation of the corresponding amino alcohol, the second (slower) step is dehydration of the amino alcohol to give Schiff base, and the third (very slow) step is elimination of  $\alpha$ -hydrogen atom from the L- $\alpha$ -amino acid fragment or decarboxylation of the D- $\alpha$ -amino acid fragment, followed by isomerization of the Schiff base to quinoid structure whose subsequent hydrolysis yields pyridoxamine and pyruvic acid or acetaldehyde, respectively. A scheme was proposed for chemical transformations of the pyridoxal condensation products with L- $\alpha$ - and D- $\alpha$ -valine.

**Keywords:** Vitamins B<sub>6</sub>, Amino acids, Structure of amino acids and bases Schiff.

Пиридоксаль и пиридоксаль-5'-фосфат являются коферментами огромного количества ферментативных систем, катализирующих биохимические превращения аминокислот и аминов – переаминирование, элиминирование, декар-боксилрование, расщепление боковой цепи аминокислот и т.д. Опубликован ряд работ по изучению механизма действия этих ферментов и их моделей [1]. Однако, ввиду сложности этих

систем, быстрого и иногда неоднозначного протекания ферментативных реакций вопросы кинетики и механизма химических превращений аминокислот остаются открытыми.

В ряде работ [2-7] УФ-спектрометрическим и поляриметрическим методами изучены реакции пиридоксаля и пиридоксаль-5'-фосфата с аминокислотами. Показано, что реакции аминокислот

включают несколько стадий. Первая очень быстрая стадия – присоединение аминокислот к коферментам с образованием аминок спиртов. Вторая стадия более медленная – дегидратация аминок спиртов с образованием оснований Шиффа. Третья самая медленная стадия – элиминирование структурных фрагментов аминокислот с образованием хиноидных структур, гидролиз которых приводит к конечным продуктам – пиридоксамину, кетокислотам или альдегидам. Скорости каждой из этих стадий зависят от растворителя, рН среды, температуры.

Представляло интерес изучить кинетику конденсации пиридоксаля с L- $\alpha$ - и D- $\alpha$ -стереоизомерами валина в сопоставимых условиях, методами квантовой химии оценить пространственную структуру, заряды на реакционных центрах, энергию исходных соединений, промежуточных и конечных продуктов, а также попытаться выделить и идентифицировать промежуточные и конечные продукты реакций и установить механизм их превращений.

Валин обладает широким спектром воздействия на человека. Аминокислота – оказывает положительное влияние при бессоннице и нервозе. Также доказана

эффективность в лечении мышц и регуляции работы иммунной системы. А желающие сбросить вес принимают это вещество как средство от чрезмерного аппетита.

Другие свойства валина: незаменимая аминокислота, обладающая стимулирующим эффектом, необходима для мышечного метаболизма, роста, восстановления тканей и правильной координации. Будучи глюкоаминокислотой, обеспечивает организм дополнительной глюкозой. Полезен для лечения печени и желчного пузыря. Помогает скорректировать баланс аминокислот в организме (например, при наркомании). Способствует активации умственной деятельности, поддерживает спокойное настроение, избавляет от депрессий. Важен для регулирования концентрации азота в организме. В высокой концентрации содержится в мышечной ткани. Любое физическое напряжение, а также хирургические вмешательства являются причиной для повышения суточной нормы валина, лейцина, изолейцина. Облегчает избавление от алкогольной и наркотической зависимости.

Улучшает состояние при склерозе. Необходим людям с повышенной чувствительностью к перепадам температурных режимов. (рис. 1)

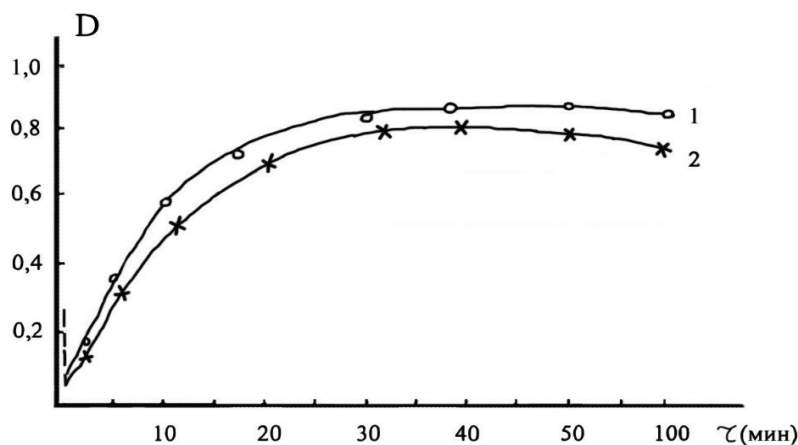


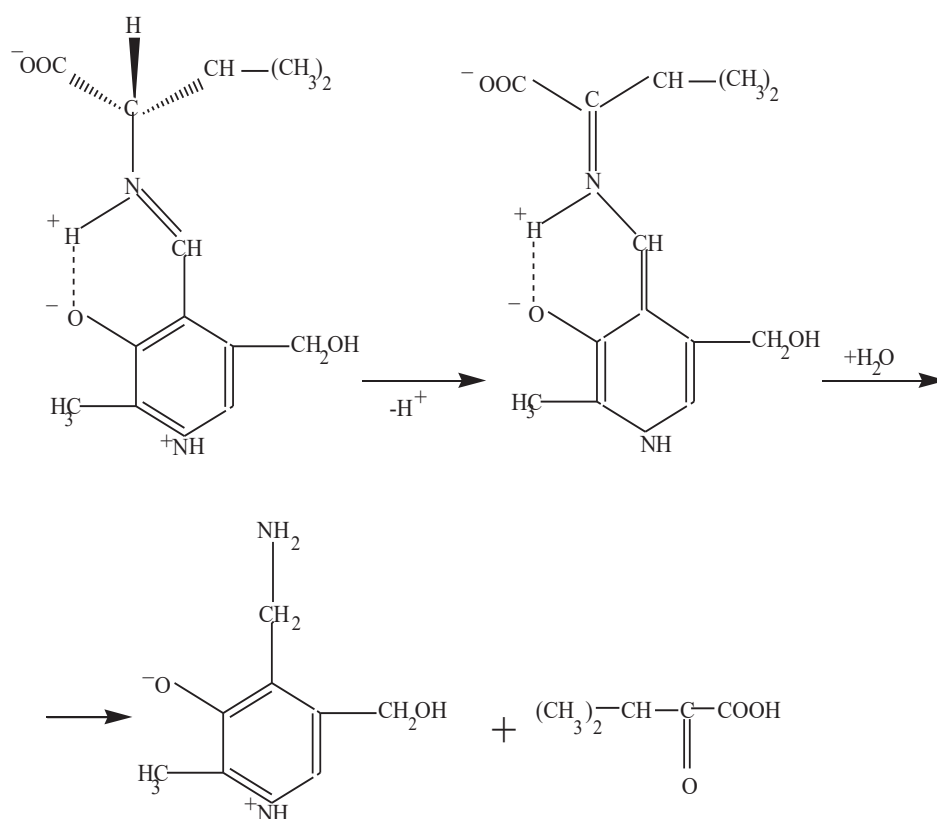
Рис. 1. Изменение оптической плотности эквимольной смеси (0.01 M) растворов пиридоксаля с D- $\alpha$ -валином (1), L- $\alpha$ -валином (2);  $\lambda_{max}$  430 нм, (70 %-ный ацетатный водно-спиртовой буферный раствор, рН 6.78, T 20°C).

Анализ кинетических кривых (рис. 1) и расчеты констант скоростей всех необратимых и обратимых стадий показали, что D- $\alpha$ -валин в целом более реакционноспособен, чем L- $\alpha$ -валин в конденсации с пиридоксальем. К сожалению, измерить кинетику присоединения стереоизомеров валина к пиридоксалью не удалось из-за очень высокой скорости реакций даже при низких температурах. Скорость дегидратации аминокспирта с D- $\alpha$ -валин фрагментом несколько выше, чем скорость дегидратации стереоизомера с L- $\alpha$ -валином фрагментом. Поскольку карбонильная группа в пиридоксале повернута на 180° относительно плоскости пиридинового фрагмента, присоединение стереоизомерных аминокислот в каждом случае дает аминокспирты с различным расположением пиридинового

и аминокислотных фрагментов. Структура аминокспиртов, по-видимому, стабилизируется за счет образования водородных связей между группами OH и NH. Квантово-химические расчеты (MNDO), показали, что пространственное расположение и величины зарядов на реакционных центрах более благоприятны для дегидратации аминокспирта с фрагментом D-валина, по сравнению с аминокспиртом с L-валиновым фрагментом, поэтому скорость дегидратации первого выше. Особый интерес представляло изучение кинетики и механизма третьей стадии, которая может протекать по нескольким направлениям:

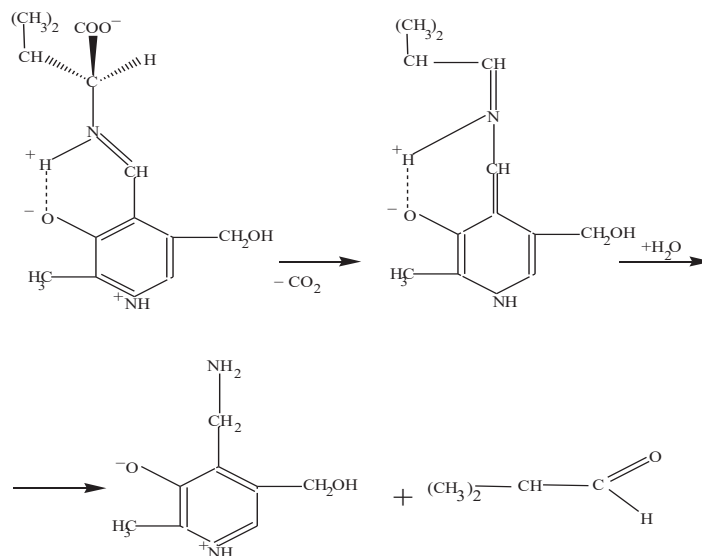
1. Элиминирование  $\alpha$ -водорода и перестройка основания Шиффа в хиноидную структуру, последующий гидролиз которой приводит к образованию пиридоксамина и кетокислоты (схема 1).

Схема 1



2. Декарбоксилирование основания Шиффа, переход в хиноидную структуру и последующий гидролиз с образованием пиридоксамина и альдегида (схема 2).

Схема 2



Результаты кинетических измерений (рис.1) показали, что скорость третьей стадии, включающей элиминирование, образование хиноидной структуры и последующий гидролиз для основания Шиффа с D- $\alpha$ -валиновым фрагментом выше, чем для основания Шиффа с L-валиновым фрагментом. Квантово-химические исследования структур стереоизомерных оснований Шиффа с оптимизацией энергетических и геометрических параметров показали, что в обоих изомерах группа  $-CH=N-$  находится вне плоскости пиридинового кольца, а в молекуле основания Шиффа с L- $\alpha$ -валиновым фрагментом связь C-N аминокислотного остатка располагается перпендикулярно плоскости пиридинового кольца, а в молекуле основания Шиффа с D- $\alpha$ -валиновым фрагментом группа  $COO^-$  расположена в плоскости перпендикулярной плоскости пиридинового кольца.

Согласно предложенной Данатаном концепции [1] можно предположить, что продукт конденсации пиридоксаля с L- $\alpha$ -валином на третьей стадии подвергается элиминированию  $\alpha$ -атома водорода, пе-

рестройке структуры в хиноидную форму с последующим гидролизом до пиридоксамина и кетокислоты (схема 1).

В случае основания Шиффа с D- $\alpha$ -валиновым фрагментом на третьей стадии происходит декарбоксилирование с образованием хиноидной структуры, гидролиз которой приводит к пиридоксамину и альдегиду (схема 2). Для доказательства предложенных схем были синтезированы соответствующие основания Шиффа. При конденсации пиридоксаля с L- $\alpha$ -валином, была выделена и идентифицирована кетокислота. При конденсации пиридоксаля с D- $\alpha$ -валином в реакционную смесь с установившимся значением оптической плотности при  $\lambda$  350 нм и 430 нм добавляли эквимолярное количество раствора  $Ba(OH)_2$ . В момент добавления наблюдалось помутнение раствора вследствие образования  $BaCO_3$ . Следует отметить, что помутнение раствора с L- $\alpha$ -валином в присутствии  $Ba(OH)_2$  не наблюдалось.

Согласно предложенной схеме конденсация пиридоксаля с L- $\alpha$ - и D- $\alpha$ -валинами в качестве промежуточного продукта образуется аминокислоты с возникновением в них хиральных центров.

Для объяснения причины различия в реакционной способности L- $\alpha$ - и D- $\alpha$ -валинами с пиридоксалем были проведены кинетических измерения методом поля-

риметрии. На (рис. 2) показано изменение удельного угла вращения смеси 0,04 М растворов пиридоксала с L- $\alpha$ - и D- $\alpha$ -валинами.

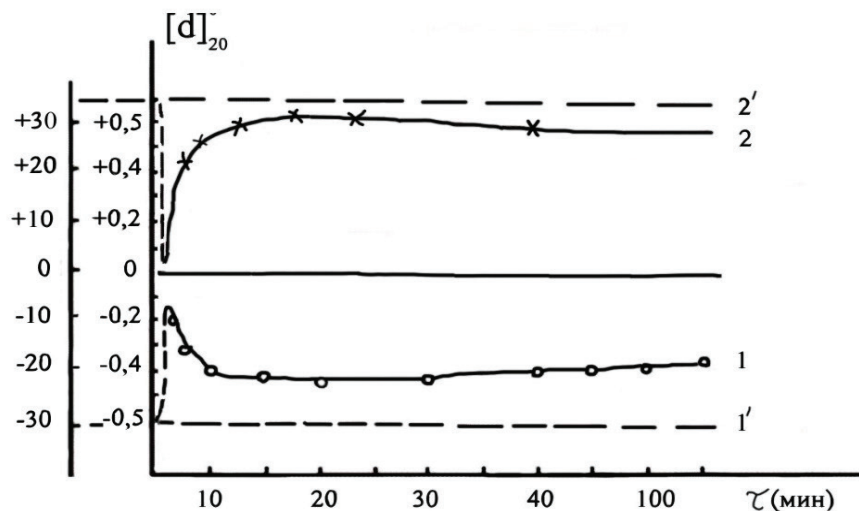


Рис. 2. Изменение удельных углов вращения продуктов взаимодействия 0,04 М эквимольных растворов смеси пиридоксаль гидрохлорида с D- $\alpha$ -валином (1) и L- $\alpha$ -валином (2), D- $\alpha$ -валин (1') и L- $\alpha$ -валин (2'); (70 %-ный ацетатный водно-спиртовой буферный раствор, рН 6.78, T 20°C).

Результаты проведенных кинетических исследований трудно объяснить с позиций устаревших, по нашему мнению, взаимодействия альдегидов с аминами и аминокислотами. При взаимодействии пиридоксала с L- $\alpha$ - и D- $\alpha$ -валинами возникает хиральный центр в аминспирте со знаками (+) при взаимодействии пиридоксала с D- $\alpha$ -валином и знаком (-) при взаимодействии PL с L- $\alpha$ -валином, абсолютные величины которых со временем увеличиваются, а затем уменьшаются (рис.2). Эти результаты можно объяснить:

1.- присоединение NH<sub>2</sub> -группы аминокислот происходит не перпендикулярно плоскости карбонильной группы пиридоксала, а в вдоль ее плоскости с образованием аминспирта и появлением хиральных центров.

2.-далее, по видимому, происходит поворотная изомерия с образованием промежуточных и конечных продуктов

путем оптимизации их энергетических и геометрических параметров (изменение абсолютных значений удельных углов вращения во времени).

На первый взгляд, это предположение противоречит предложенной схеме механизма конденсации аминокислот с пиридоксалем. Дегидратация аминспиртов должна приводить к уменьшению концентрации аминспиртов, что должно привести к уменьшению количества хиральных центров, а следовательно к изменению абсолютного значения удельного угла вращения. Можно предположить, что величина удельного угла вращения продуктов взаимодействия пиридоксала с L- $\alpha$ - и D- $\alpha$ -валинами, зависит не только от их концентрации, но и в большей степени от пространственного расположения функциональных групп при хиральном центре. Возникает вопрос почему L- $\alpha$ - и D- $\alpha$ -валины при взаимодействии с пиридоксалем

образуют аминокспирты с различными знаками удельного угла вращения, а также почему абсолютные величины их со временем изменяются?

Для выяснения этого сложного вопроса были рассмотрены структуры продуктов взаимодействия пиридоксала с L- $\alpha$ - и D- $\alpha$ -валинами с учетом оптимизации их геометрических и энергетических параметров в программе Nurg Chem - аминокспиртов и оснований Шиффа. Структура этих продуктов рассматривалась путем расположения фрагмента пиридинового кольца  $\sim 90^\circ$  от глаза наблюдателя (совмещение его атомов углерода в орто- и мета- положениях). Анализ рассматриваемых структур, показал, что OH – группа располагается приблизительно в одной плоскости пиридинового кольца (условно «левая часть»), CH<sub>2</sub>OH – группа ввиду нелинейности ее структуры выступает за плоскость пиридинового кольца (условно «правая часть»). CH<sub>2</sub>OH – группа в аминокспиртах находится слева, а аминокислотный фрагмент - справа от плоскости пиридинового кольца в случае конденсации D- $\alpha$ -валина с пиридоксалем. Обратная картина наблюдается для аминокспиртов в случае конденсации L- $\alpha$ -валина с пиридоксалем - (CH<sub>2</sub>OH - группа – справа, аминокислотный фрагмент слева). Такое же расположение наблюдается и у оснований Шиффа –  $>C=N-R$  – группа - слева для D- $\alpha$ -валинового фрагмента и справа для L- $\alpha$ -валинового фрагмента.

### Экспериментальная часть

В качестве объектов исследования использовали гидрохлорид пиридоксала фирмы Ferak Berlin и аминокислоты – L- $\alpha$ -валин и D- $\alpha$ -валин фирмы Reanal. Буферные растворы готовили по общепринятой методике. Кинетику конденсации измеряли на спектрофотометре СФ-26 «ЛОМО». Реакционные смеси термостатировали при помощи термостата УН-4 с точностью  $\pm 0.10^\circ\text{C}$ . Навески эквимолярных количеств пиридоксала и аминокислот в растворяли в водно-спиртовых буферных растворах и выдерживали при заданной температуре в течение 30 мин. За начало реакции принимали момент смешения термостатированных растворов реагентов. Кинетические измерения проводили в термостатированных кюветах толщиной 1.008 мм. Поскольку УФ спектры растворов гидрохлорида пиридоксала изменяются в зависимости от растворителя и рН среды, в кюветы сравнения заливали соответствующие растворители или буферные растворы. Константы скорости конденсации пиридоксала с аминокислотами рассчитывали по компьютерной программе по уравнениям первого и второго порядка для обратимых и необратимых реакций [8]. Исходные, промежуточные и конечные продукты синтезированы по методикам работ [2-7] и идентифицированы методами элементного анализа, УФ и ИК спектроскопии ((Nicolet Avatar 370 PGTS, табл. КВr) ).

### Литература

1. Мецлер Д. Биохимия. М.: Мир, 1980. Т. 2. С. 527.
2. Пищугин Ф.В., Шаршеналиева З.Ш. // Биохимия. 1988. Т. 53. № 9. С. 1509.
3. Пищугин Ф.В., Тулебердиев И.Т. // ЖОХ. 2005. Т. 75. Вып. 9. С. 1538.
4. Пищугин Ф.В., Тулебердиев И.Т. // Там же. 2008. Т. 78. Вып. 6. С. 997.
5. Пищугин Ф.В., Тулебердиев И.Т. // Там же. 2009. Т. 79. Вып. 1. С. 120.
6. Пищугин Ф.В., Тулебердиев И.Т. // Там же. 2010. Т. 80. Вып. 9. С. 1518.
7. Пищугин Ф.В., Тулебердиев И.Т. // Там же. 2012. Т. 82. Вып. 7. С. 1168.
8. Лейдлер К. Кинетика органических реакций. М.: Мир, 1966. С. 31.