

УДК 544.176:544.183

СТРОЕНИЕ СОЛЬВАТОВ ПИРИДОКСИНА В ВОДНОМ РАСТВОРЕ
ПО ДАННЫМ КВАНТОВО-ХИМИЧЕСКИХ РАСЧЕТОВ И СПЕКТРОСКОПИИ ЯМРГ.А. Гамов¹, В.В. Александрийский^{1,2}, В.А. Шарнин^{1,2}¹Ивановский государственный химико-технологический университет, Россия

E-mail: georgegamov38@gmail.com

²Институт химии растворов РАН им. Г.А. Крестова, Иваново, Россия

E-mail: nmr@isuct.ru

Статья поступила 12 апреля 2016 г.

В настоящей работе осуществлена геометрическая оптимизация нейтральной, цвиттер-ионной и протонированной форм пиридоксина в вакууме и воде с учетом растворителя в рамках модели поляризованного континуума (PCM). Оптимизированы структурные параметры комплексов пиридоксина в нейтральной и цвиттер-ионной формах с 4–10 молекулами воды. Исследовано влияние количества молекул растворителя, задаваемого в модель, на сходство расчетных и экспериментальных спектров ЯМР.

DOI: 10.15372/JSC20170208

Ключевые слова: пиридоксин, DFT, ЯМР, сольватация, таутомерное равновесие.

ВВЕДЕНИЕ

Пиридоксин (PN), наряду с пиридоксалем (PL) и пиридоксамином (PM), является одной из свободных форм витамина B₆. В организме человека из этих трех соединений синтезируется пиридоксаль-5-фосфат (PLP), который выступает в качестве кофермента большого числа ферментов азотистого обмена (трансаминаз, декарбоксилаз и др.) [1]. Производные PLP проявляют активность в 140 [2]–60 [1] биохимических реакциях. PLP-зависимые ферменты играют ключевую роль в метаболизме аминокислот, жиров и углеводов, а также биосинтезе гормонов, нейротрансмиттеров и гема [3, 4].

Важной особенностью пиридоксина является его способность к существованию в водном или водно-органическом растворе в виде двух таутомерных форм — молекулярной (PN⁰) и цвиттер-ионной (PN[±]) [5–7] (схема 1, K_z):

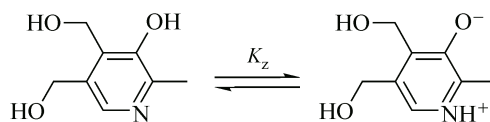


Схема 1. Таутомерное равновесие пиридоксина

Вовлеченность пиридоксина в основные биохимические процессы в живых организмах, протекающие в водной среде, обуславливают значение изучения его гидратации в растворе.

Целью настоящей работы является выявление особенностей строения гидратной оболочки пиридоксина. Для этого была осуществлена оптимизация геометрических характеристик пиридоксина и его комплексов с 4–10 молекулами воды. В качестве критериев близости расчетных

структур к реально существующим в водном растворе использовали сходство экспериментальных и расчетных ЯМР спектров.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ И МЕТОДИКА РАСЧЕТОВ

Пиридоксин (PN) фирмы "Fisher BioReagents" (Нью-Джерси, США) использовался без предварительной очистки. Содержание основного вещества в приобретенном реактиве определяли потенциометрическим титрованием раствора его навески раствором 0,01000 моль/л HCl и оно составило 99,8 % (масс.). В оксиде дейтерия изотопной чистоты 99,8 % фирмы "abcr GmbH" (Карлсруэ, Германия) предварительно определяли концентрацию ионов D⁺ и электропроводность ($pD = 7,1$; $\kappa = 2,0$ мкОм/см).

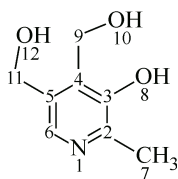
Растворы пиридоксина имели реакцию среды 7,1, близкую к изоэлектрической точке данного соединения в воде ($pI \sim 7$, учитывая pK_b (PN) = 4,969 [8] и $pK_a = 8,97$ [9]). Расчет равновесного состава в растворах пиридоксина, проведенный при помощи программы RRSU [10], показал, что равновесные концентрации протонированного пиридоксина и пиридоксина, диссоциировавшего по кислотному типу, не превышают 0,01 м.д. Таким образом, можно пренебречь вкладом ионизированных частиц в ЯМР спектры.

¹⁵N, ¹H НМВС, ¹³C, ¹H НМВС, ¹³C, ¹H HSQC и ¹H, ¹H COSY спектры растворов пиридоксина в D₂O концентрацией 0,1000 моль/кг были зарегистрированы на ЯМР спектрометре Avance III Bruker 500 (Bruker Biospin, Germany) при температуре 293,2 К. Рабочая частота на ядрах ¹H составляла 500,17 МГц, на ядрах ¹⁵N — 50,701 МГц, на ядрах ¹³C — 125,77 МГц. Использовались внешние стандарты — нитрометан (для регистрации сигналов атомов ¹⁵N) и циклогексан (для регистрации сигналов атомов ¹H и ¹³C).

Экспериментальная погрешность определения величин химических сдвигов не превышала 0,005 млн д. для ¹H и ¹³C и 0,1 млн д. для ¹⁵N. Точность поддержания температуры образцов с использованием термостата BVT-3000 составляла $\pm 0,1$ К.

Отнесение сигналов ЯМР было проведено с использованием как экспериментальных 2D спектров, так и инструментов прогнозирования ЯМР спектров [11].

Результаты ¹H ЯМР эксперимента, млн д.: H₆ 6,787 (s, 1 протон); H₇ 1,592 (s, три протона); H₉ 3,981 (s, 2 протона); H₁₁ 3,873 (s, 2 протона). ¹³C ЯМР, млн д.: C₂ 143,963; C₃ 159,916; C₄ 138,366; C₅ 135,059; C₆ 124,768; C₇ 15,185; C₉ 58,436; C₁₁ 63,354. ¹⁵N ЯМР, млн д.: -167,8. Данные настоящей работы хорошо согласуются с экспериментальными ЯМР спектрами, полученными ранее авторами [7].



Квантово-химические расчеты выполнены с помощью пакета программ Gaussian 03 [12] в рамках теории функционала плотности. Для оптимизации геометрии нейтральной и цвиттер-ионной форм пиридоксина и их комплексов с молекулами воды был выбран функционал B3LYP [13] и базисный набор 6-311G++(d,p) [14]. Спектры ¹⁵N, ¹³C и ¹H ЯМР (GIAO [15]) были рассчитаны относительно химических сдвигов нитрометана, бензола и метанола, оптимизированных на том же уровне теории (табл. 1).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На рис. 1 приведены оптимизированные структуры нейтральной, цвиттер-ионной и протонированной форм пиридоксина в вакууме (a—в соответственно) и в воде (PCM, z—e соответственно). Они хорошо согласуются с выполненными ранее по длинам связей и величинам полной энергии [16, 17].

Т а б л и ц а 1

Константы экранирования тетраметилсилана (ТМС), нитрометана, бензола и метанола использованных в качестве эталонов при расчете химических сдвигов пиридоксина (млн д.)

Базисный набор	6-311G++(d,p)						
Соединение	ТМС (вакуум)			Нитрометан (вакуум)			
Ядро	Н	С	Si	Н	С	Н	О
Константа экранирования	31,976	184,115	339,347	27,869	119,346	-152,482	-367,519
Соединение	Бензол (вакуум)			Метанол (вакуум)			
Ядро	Н		С	Н	С	О	
Константа экранирования	24,408		49,670	28,396 (CH ₃); 32,516 (OH)		129,921	317,812
Соединение	ТМС (H ₂ O PCM)			Нитрометан (H ₂ O PCM)			
Ядро	Н	С	Si	Н	С	Н	О
Константа экранирования	31,977	184,821	338,976	27,582	116,353	-164,372	-3426898
Соединение	Бензол (H ₂ O PCM)			Метанол (H ₂ O PCM)			
Ядро	Н		С	Н	С	О	
Константа экранирования	24,201		49,089	28,325 (CH ₃); 31,629 (OH)		129,132	324,669

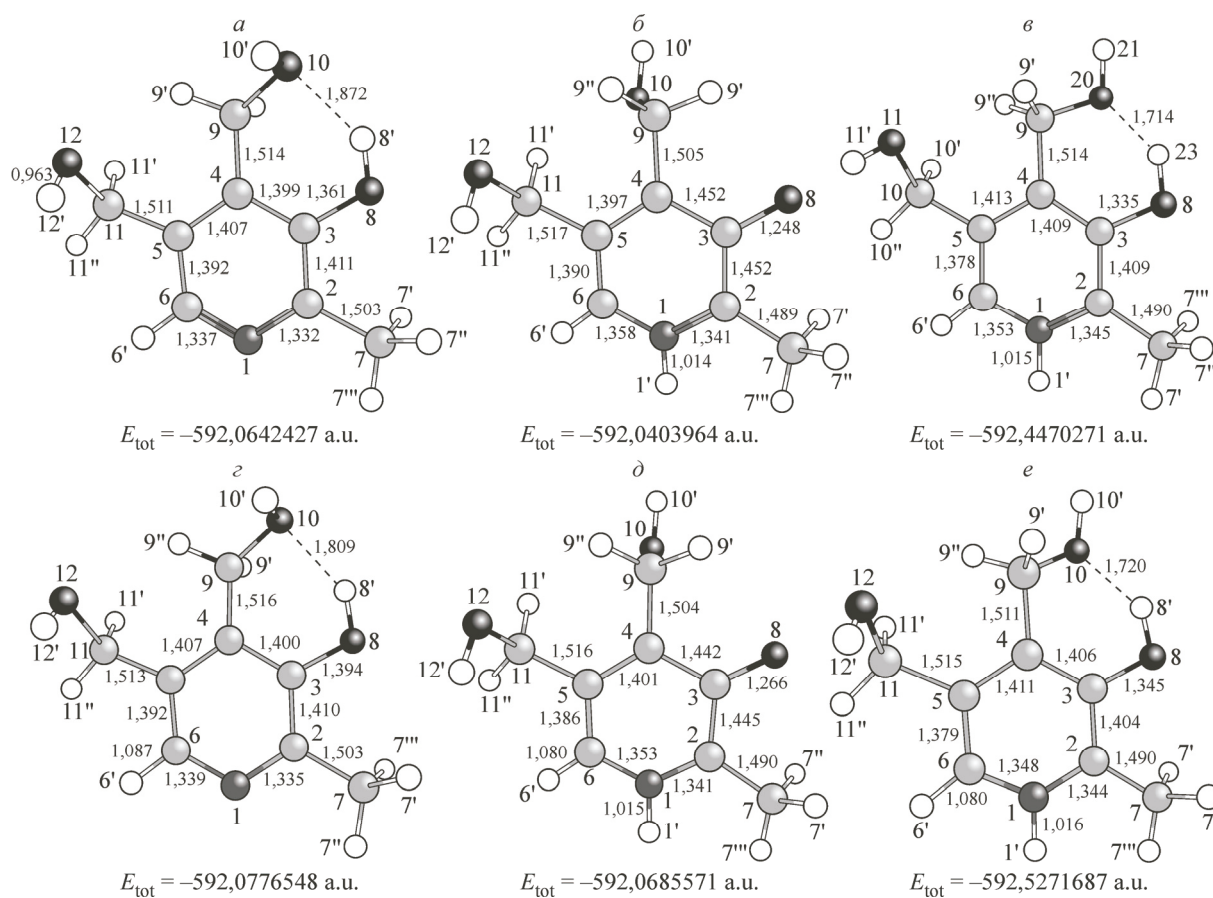


Рис. 1. Оптимизированные модели нейтральной, цвиттер-ионной и протонированной формы пиридоксина в вакууме (а–в) и воде (PCM, г–е). Длины связей даны в Å

Данные моделирования показывают, что нейтральная и протонированная формы пиридоксина дополнительно стабилизированы за счет внутримолекулярной водородной связи между атомом водорода гидроксогруппы в положении 3 и атомом кислорода заместителя O10. Гидроксогруппа O12—H12' во всех трех структурах ориентирована под примерно одинаковым углом (108,23—126,57°) к плоскости пиридинового кольца, в то время как угол между ароматическим ядром и гидроксогруппой O10—H10' изменяется от 138,08° (в нейтральной форме) до 26,15° (в протонированной форме).

Образование цвиттер-иона вносит некоторое искажение в геометрию пиридинового кольца. В PN^\pm длины связей $\text{C}_2\text{—C}_3$ и $\text{C}_3\text{—C}_4$ возрастают на 0,04—0,05 Å по сравнению с нейтральной формой, увеличивается N—C_6 и несколько уменьшаются $\text{C}_4\text{—C}_5$ и $\text{C}_5\text{—C}_6$ (см. рис. 1, а, б и з, д). Протонирование приводит к увеличению длин связей гетероатома азота с соседними атомами углерода и укорочению связи $\text{C}_5\text{—C}_6$ (ср. рис. 1, а и в, 1, з и е), в то время как длины других связей изменяются менее значительно.

Наличие в водном растворе обеих форм пиридоксина одновременно означает, что наблюдаемые экспериментально химические сдвиги ЯМР являются усредненными [7]:

$$\delta_{\text{набл}} = \delta_{\pm} \cdot X_{\pm} + \delta_0 \cdot X_0, \quad (1)$$

где $\delta_{\text{набл}}$ — экспериментально определенное значение химического сдвига; δ_{\pm} и δ_0 — химические сдвиги того же ядра в цвиттер-ионной и нейтральной формах пиридоксина соответственно; X_{\pm} и X_0 — мольные доли цвиттер-ионной и нейтральной форм пиридоксина.

Мольные доли различных форм пиридоксина в воде могут быть вычислены с использованием константы его таутомерного равновесия K_z [5, 6, 8, 9]:

$$K_z = \frac{X_{\pm}}{X_0}. \quad (2)$$

Принимая значение $K_z = 2,35$ [8], получаем $X_{\pm} = 0,7015$ и $X_0 = 0,2985$.

Расчетные химические сдвиги нейтральной и цвиттер-ионной форм пиридоксина, связанного в комплексы с молекулами воды, даны в табл. 2. Экспериментальные спектры ЯМР приводятся в экспериментальной части.

Результаты квантово-химических расчетов как комплексов, включающих молекулы воды, так и пиридоксина с учетом растворителя в приближении РСМ отличаются от экспериментальных данных. В качестве критериев правдоподобности расчетов обычно используют среднюю абсолютную ошибку (MAE) [18—20]:

$$\text{MAE} = \frac{\sum_{i=1}^n |\delta_{\text{exp}} - \delta_{\text{calc}i}|}{n}, \quad (3)$$

где δ_{exp} и δ_{calc} — экспериментальный и расчетный химический сдвиг i -го атома; n — число атомов, для которых рассчитаны химические сдвиги.

Значения MAE сведены в табл. 3. Величина MAE сильно зависит от выбора стандарта. Тетраметилсилан, используемый в качестве эталона в экспериментальной ЯМР спектроскопии, не является оптимальным соединением в квантово-химических расчетах [20]. Бензол является более подходящим эталоном для расчета химических сдвигов sp^2 -гибридизованных атомов углерода, а метанол может быть использован для вычисления констант экранирования sp^3 -гибридизованных атомов [21]. В этом случае расчетные химические сдвиги определяются следующим образом:

$$\delta_i = \sigma_{\text{ref}} - \sigma_i + \delta_{\text{ref}}, \quad (4)$$

где δ_i — расчетный химический сдвиг; σ_{ref} — константа экранирования эталона; σ_i — константа экранирования атома в моделируемом соединении; δ_{ref} — экспериментально определенный химический сдвиг стандарта.

В настоящей работе мы приняли $\delta_{\text{C}} = 128,5$, $\delta_{\text{H}} = 7,16$ млн д. для бензола и $\delta_{\text{C}} = 49,1$, $\delta_{\text{CH}_3} = 3,31$ млн д. для метанола [22]. Химические сдвиги атомов углерода и водорода пиридинового

Т а б л и ц а 2

Расчетные химические сдвиги пиридоксина в вакууме, комплексах водородной связи с водой в вакууме, а также в воде (PCM) (млн д.)

Ядро	Химический сдвиг, млн д.*					
	Вакуум	4H ₂ O	6H ₂ O	8H ₂ O	10H ₂ O	PCM
Нейтральная форма						
N	-51,599	-69,349	-75,897	-66,430	-70,458	-77,124
C ₂	153,284	154,754	152,221	154,000	156,280	150,903
C ₃	154,871	154,251	153,771	154,476	152,645	154,550
C ₄	129,007	131,160	130,819	130,819	133,809	131,593
C ₅	130,986	133,504	135,982	135,982	135,210	132,387
C ₆	139,873	140,295	144,705	144,705	144,404	140,664
C ₇	18,043	18,399	18,959	18,669	18,226	17,137
C ₉	61,984	54,188	53,939	54,720	54,341	62,103
C ₁₀	62,097	61,431	58,903	60,071	59,131	61,026
H ₇	2,315	2,297	2,265	2,144	2,450	2,250
H ₉	4,950	4,456	4,455	4,559	4,655	5,040
H ₁₀	4,226	4,443	4,671	4,750	4,765	4,298
H ₆	7,581	7,791	8,329	7,879	7,967	7,417
Цвиттер-ион						
N	-205,255	-200,351	-198,195	-198,309	-197,073	-209,159
C ₂	145,049	144,161	145,539	145,532	148,022	147,319
C ₃	165,659	165,825	166,295	165,677	168,594	167,625
C ₄	145,655	148,608	143,554	143,648	142,260	141,646
C ₅	141,335	136,241	139,508	138,664	138,961	139,698
C ₆	107,132	110,761	112,383	114,033	110,902	114,643
C ₇	17,397	15,022	15,610	15,314	15,308	15,387
C ₉	53,829	58,109	53,977	54,016	53,569	53,867
C ₁₀	62,742	63,763	63,868	63,874	61,572	61,285
H ₇	2,059	2,415	2,439	2,406	2,459	2,094
H ₉	5,249	5,067	5,029	5,167	5,267	4,897
H ₁₀	4,640	5,190	4,812	4,808	4,762	4,394
H ₆	5,857	6,124	6,163	6,305	6,211	6,413
Равновесная смесь форм						
N	-159,389	-161,247	-161,689	-158,943	-159,278	-169,747
C ₂	147,507	147,323	147,534	148,060	150,487	148,389
C ₃	162,439	162,370	162,557	162,334	163,833	163,722
C ₄	140,686	143,400	139,753	139,819	139,737	138,645
C ₅	138,246	135,424	138,455	137,863	137,841	137,516
C ₆	116,905	119,577	122,031	123,189	120,902	122,410
C ₇	17,590	16,030	16,610	16,315	16,179	15,909
C ₉	56,263	56,939	53,966	54,226	53,799	56,325
C ₁₀	62,549	63,067	62,386	62,739	60,843	61,208
H ₇	2,135	2,380	2,387	2,328	2,456	2,141
H ₉	5,160	4,885	4,858	4,986	5,084	4,940
H ₁₀	4,516	4,967	4,770	4,791	4,763	4,365
H ₆	6,372	6,622	6,810	6,775	6,735	6,713

* Результаты расчета даны по отношению к константам экранирования бензола/метанола в рамках мультиэталонного подхода (см. текст для пояснений).

Сходство между расчетными и экспериментальными химическими сдвигами

Равновесная смесь форм	Параметр			Равновесная смесь форм	Параметр		
	Линейная корреляция	R^2	МАЕ		Линейная корреляция	R^2	МАЕ
Базисный набор 6-311G++(d,p)							
Вакуум	$0,98560\delta_{\text{exp}} + 1,74687$	0,99858	2,716	8H ₂ O	$0,98857\delta_{\text{exp}} + 1,85923$	0,99906	2,241
4H ₂ O	$0,99118\delta_{\text{exp}} + 1,47623$	0,99908	2,141	10H ₂ O	$0,99117\delta_{\text{exp}} + 1,63650$	0,99845	2,872
6H ₂ O	$0,99391\delta_{\text{exp}} + 1,26443$	0,99918	2,200	PCM	$1,01311\delta_{\text{exp}} - 0,35917$	0,99955	1,771

кольца (C(2)—C(6) и H(6)) были вычислены с использованием констант экранирования бензола. Химические сдвиги атомов углерода и водорода в заместителях (—CH₃ и две группы —CH₂—) были рассчитаны из констант экранирования метанола.

Расчеты химических сдвигов, выполненные относительно тетраметилсилана, дают МАЕ ~4—5 млн д., что неприемлемо много, и в настоящей работе не приводятся.

Данные табл. 3 показывают, что все модели примерно одинаково согласуются с экспериментальными спектрами ЯМР. Попытки учесть специфическое взаимодействие пиридоксина с молекулами растворителя не приводит к увеличению правдоподобности расчета по сравнению с моделью поляризованного континуума.

Отметим, что комплексы с 4, 6 и 8 молекулами воды показывают незначительное возрастание МАЕ с ростом числа частиц. Однако добавление еще одной пары молекул растворителя приводит к значительному увеличению МАЕ.

Расчеты показывают, что молекулы воды окружают цвиттер-ионную и нейтральную форму пиридоксина по-разному (рис. 2).

Например, в случае комплекса PN⁰·6H₂O четыре равномерно распределенных молекулы воды непосредственно образуют водородные связи с пиридоксином (см. рис. 2, а). Оставшаяся молекула воды не взаимодействует с пиридоксином непосредственно. Они связаны водородной связью с молекулой растворителя, которая взаимодействует с группой O12—H12'. В случае цвиттер-иона все 6 молекул воды связаны водородными связями непосредственно с пиридоксином: 4 частицы расположены поблизости групп O10—H10' и O12—H12' и по одной взаимодействуют с протоном пиридиния и атомом O₃⁻. Комплекс цвиттер-иона с шестью молекулами воды занимает больший объем, чем комплекс нейтральной формы с таким же числом молекул растворителя (~700 Å³ против ~400 Å³). Вероятно, вследствие этого цвиттер-ион оказывает более значительное возмущающее воздействие на структуру воды, чем нейтральная молекула.

Поскольку при отсутствии растворителя, в вакууме, а также с учетом растворителя в рамках РСМ нейтральная форма пиридоксина является более предпочтительной, чем цвиттер-ион (исходя из величин полной энергии (ср. рис. 1, а и б; 1, з и д)), именно перестроение ближай-

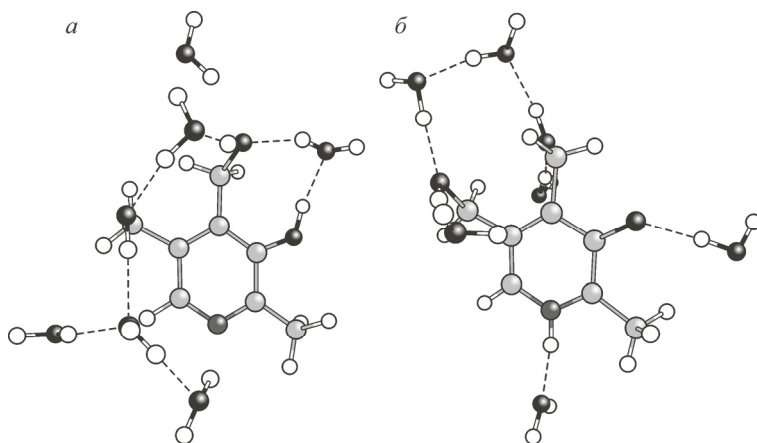


Рис. 2. Оптимизированные комплексы водородной связи нейтральной (а) и цвиттер-ионной (б) форм пиридоксина с 6 молекулами воды

шего сольватного окружения пиридоксина может способствовать протеканию процесса внутримолекулярного переноса иона водорода в воде.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе проведена оптимизация геометрии пиридоксина (в вакууме и воде (PCM)) и его комплексов с 4—10 молекулами воды. Рассчитаны спектры ЯМР (GIAO). Показано, что попытки учесть специфическое взаимодействие пиридоксина с молекулами растворителя не приводит к увеличению правдоподобности расчета по сравнению с моделью, в которой растворитель задается как поляризованный континуум. Полученные расчетные данные указывают на то, что микроструктура сольватов цвиттер-ионной и нейтральной форм пиридоксина значительно различается.

Работа выполнена в Институте термодинамики и кинетики химических процессов ИГХТУ в рамках государственного задания Министерства образования и науки Российской Федерации, проект № 2293 при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 16-33-60017) и Совета по грантам при Президенте Российской Федерации (проект № 14.Z56.16.5118-МК).

Авторы выражают признательность проф. Г.В. Гиричеву за помощь в осуществлении квантово-химических расчетов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *di Salvo M.L., Safo M.K., Contestabile R.* // *Front. Biosci. (Elite Ed.)*. – 2012. – **4**, N 1. – P. 897.
2. *Percudani R., Peracchi A.* // *EMBO Rep.* – 2003. – **4**, N 9. – P. 850.
3. *McCormick D.B.* Biochemistry of coenzymes, in: *Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine*. Ed. R.A. Meyers. Vol. 1. – Weinheim: VCH, 1996. – P. 396–406.
4. *Leklem J.E.* Vitamin B6, in: *Handbook of Vitamins*. Ed. L. Machlin. – New York: Marcel Decker Inc., 1991. – P. 341–378.
5. *Llor J., Asensio S.B.* // *J. Solut. Chem.* – 1995. – **24**, N 12. – P. 1293.
6. *Sanchez-Ruiz J.M., Llor J., Cortijo M.* // *J. Chem. Soc. Perk. Trans. 2.* – 1984. – P. 2047.
7. *Llor J., Mumoz L.* // *J. Org. Chem.* – 2000. – **65**. – P. 2716.
8. *Gamov G.A., Khokhlova A.Yu., Gushchina A.S., Grazhdan K.V., Sharnin V.A.* // *J. Chem. Thermodyn.* – 2016. – **97**. – P. 322.
9. *Metzler D.E., Harris C.M., Johnson R.J., Siano D.B., Thomson J.A.* // *Biochem.* – 1973. – **12**, N 26. – P. 5377.
10. *Васильев В.П., Бородин В.А., Козловский Е.В.* Применение ЭВМ в химико-аналитических расчетах (*Computers application for chemical and analytical calculations*). – М.: Высшая школа, 1993.
11. <http://www.nmrdb.org/>
12. *Frisch M.J., Trucks G.W., Schlegel H.B., Scuseria G.E., Robb M.A., Cheeseman J.R., Montgomery J.A. Jr., Vreven T., Kudin K.N., Burant J.C., Millam J.M., Iyengar S.S., Tomasi J., Barone V., Mennucci B., Cossi M., Scalmani G., Rega N., Petersson G.A., Nakatsuji H., Hada M., Ehara M., Toyota K., Fukuda R., Hasegawa J., Ishida M., Nakajima T., Honda Y., Kitao O., Nakai H., Klene M., Li X., Knox J.E., Hratchian H.P., Cross J.B., Bakken V., Adamo C., Jaramillo J., Gomperts R., Stratmann R.E., Yazyev O., Austin A.J., Cammi R., Pomelli C., Ochterski J.W., Ayala P.Y., Morokuma K., Voth G.A., Salvador P., Dannenberg J.J., Zakrzewski V.G., Dapprich S., Daniels A.D., Strain M.C., Farkas O., Malick D.K., Rabuck A.D., Raghavachari K., Foresman J.B., Ortiz J.V., Cui Q., Baboul A.G., Clifford S., Cioslowski J., Stefanov B.B., Liu G., Liashenko A., Piskorz P., Komaromi I., Martin R.L., Fox D.J., Keith T., Al-Laham M.A., Peng C.Y., Nanayakkara A., Challacombe M., Gill P.M.W., Johnson B., Chen W., Wong M.W., Gonzalez C., Pople J.A.* Gaussian 03, Revision C.02. – Gaussian Inc., Wallingford CT, 2004.
13. *Kim K., Jordan K.D.* // *J. Phys. Chem.* – 1994. – **98**. – P. 10089.
14. *Curtiss L.A., McGrath M.P., Blaudeau J.-P., Davis N.E., Binning R.C. Jr., Radom L.* // *J. Chem. Phys.* – 1995. – **103**. – P. 6104.
15. *Ditchfield R.* // *Mol. Phys.* – 1974. – **27**. – P. 789.
16. *Ristila M., Matxain J.M., Strid A., Eriksson L.A.* // *J. Phys. Chem. B.* – 2006. – **110**. – P. 16774.
17. *Wu M., Xu Q., Strid A., Martell J.M., Eriksson L.A.* // *J. Phys. Chem. A.* – 2011. – **115**. – P. 13556.
18. *Bagno A., Rastrelli F., Saielli G.* // *J. Org. Chem.* – 2007. – **72**. – P. 7373.
19. *Smith S.G., Paton R.S., Burton J.W., Goodman J.M.* // *J. Org. Chem.* – 2008. – **73**. – P. 4053.
20. *Lodewyk M.W., Siebert M.R., Tantillo D.J.* // *Chem. Rev.* – 2012. – **112**. – P. 1839.
21. *Sarotti A.M., Pellegrinet S.C.* // *J. Org. Chem.* – 2009. – **74**. – P. 7254.
22. <http://www.chem.ucla.edu/~webspectra/NotesOnSolvents.html>