

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ  
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ И НЕФТЕХИМИИ

На правах рукописи

МИЩЕНКО Ирина Николаевна

КАТАЛИЗ ОКИСЛЕНИЯ ДИГИДРОПИРИДИНОВ НА УГЛЯХ

02.00.10 - Биоорганическая химия, химия природных  
и физиологически активных веществ

АВТОРЕФЕРАТ  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

КИЕВ - 1993

AB 27.249

Работа выполнена в отделе химии фотосинтеза  
Института биоорганической химии и нефтехимии  
Академии наук Украины

Научные руководители: член-кор. АН Украины, д. х. н.  
А. А. Ясников  
кандидат химических наук  
А. В. Увиенко

Официальные оппоненты: д. х. н., профессор  
В. И. Станинец  
д. х. н., профессор  
В. А. Тёртых

Ведущая организация: Институт коллоидной химии и химии воды  
Академия наук Украины

Защита состоится "21" мая 1993г. в 10 часов  
на заседании Специализированного Совета Д 016.65.01 в  
Институте биоорганической химии и нефтехимии АН Украины  
( 252660, Киев, ул. Мурманская, 1 ).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института  
биоорганической химии и нефтехимии АН Украины.

Автореферат разослан "20" апреля 1993г.

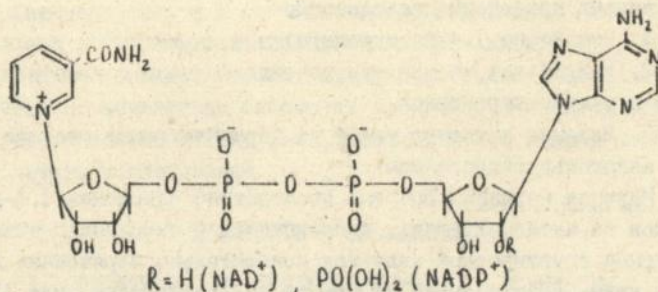
Учёный секретарь  
Специализированного Совета *Федорук* Д. М. Федорук

ЛНБ України ім. В. Стефаніка  
  
00803026 (J)

ЛНБ ім. В. Стефаніка  
АН України

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Никотинамидные коферменты НАД(Р) (Н)



являются основными переносчиками электронов и водорода в биологических окислительно-восстановительных процессах. В этих реакциях происходит обратимый перенос эквивалента гидрид-иона от восстановленного кофермента на подходящий акцептор или от донорного субстрата на окисленный кофермент, что сопровождается редокс-превращениями окисленного и восстановленного коферментов:



Два электрона и протон могут переноситься в разной последовательности:  $e^-$ ,  $H^+$ ;  $e^-$ ,  $H^+$ ;  $H^-$ , т.е. перенос может быть радикальным (первые два случая) или гидридным. Выяснение механизма этого переноса является одной из фундаментальных задач биоорганической химии.

Исследования, входящие в диссертацию, выполнены в рамках планов научных работ отдела химии фотосинтеза Института органической химии АН Украины (до 1986 г.) и Института биоорганической химии и нефтехимии АН Украины, а также Общесоюзной научно-технической программы ГИИТ 0.69.07 "Разработать и внедрить в практику методы и средства диагностики и коррекции нарушений внутренней среды организма" (Постановление ГИИТ СССР № 555 от 30.10.85).

Цель работы. Изучение модельных окислительно-восстановительных реакций с участием никотинамидных коферментов, выяснение механизма переноса протона и электронов в этих реакциях. Для решения этой задачи проведены исследования:

1. Окисление 1,4-дигидропиридинов на активных углях.
2. Разработка модели супероксиддисмутазы с участием активных углей и макрогетероциклов.
3. Влияние активных углей на ферментативные реакции (на примере алкогольдегидрогеназы).

Научная новизна. Впервые исследовано окисление 1,4-дигидропиридинов на активных углях, сопровождаемое окислением этанола. Акцепторной группировкой является положительно заряженная поверхность угля  $СН^+$  или хинонная группа на поверхности угля АУА.

Показано, что металлокомплексы макрогетероциклов ингибируют эти реакции. На основе исследований предложена модель фермента - супероксиддисмутазы, уничтожающая супероксид-радикалы, состоящая из активного угля  $СН^+$  и макрогетероциклов.

Изучение алкогольдегидрогеназной реакции на активном угле позволило сделать заключение о том, что активные угли могут воздействовать на ферментативные реакции в живом организме.

Научно-практическая значимость. Исследование модельных реакций 1,4-дигидропиридинов на гетерогенных катализаторах раздвинуло рамки представлений о механизмах этих реакций. Кроме чисто теоретических достижений, некоторые результаты могут представить научно-практический интерес. В частности, активные угли могут быть использованы для биомиметических реакций 1,4-дигидропиридинов. В связи с воздействием углей на ферментативные реакции, открываются перспективы их использования совместно с дигидроникотинамидами для лечения различных заболеваний. Найденная модель супероксиддисмутазы может найти применение в медицинской практике для устранения супероксид-радикалов, возникающих при различных патологиях.

Апробация работы. По результатам работы сделаны доклады на III и IV Украинских конференциях по сорбентам медицинского назначения (Днепропетровск, 1985; Донецк, 1988), XV Украинской республиканской конференции по органической химии (Ужгород, 1986), VII Всесоюзном совещании "Комплексы с переносом заряда и ион-радикальные соли" (Черноголовка, 1988), XV Всесоюзном симпозиуме по инженерной энзимологии (Вильнюс, 1988), III Всесоюзной конференции по химии и биохимии макроциклических соединений (Иваново, 1988).

Публикации. По материалам диссертации опубликованы 13 работ, в том числе 6 научных статей и 7 тезисов докладов.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 119 страницах машинописного текста и состоит из введения, пяти глав, включающих 5 таблиц и 29 рисунков, выводов и списка литературы, содержащего 121 наименование. Первая глава представляет собой литературный обзор по механизмам окисления 1,4-дигидроникотинамидов. Во второй главе изложены методы исследований. В 3-5 главах представлены результаты исследований.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### I. ОКИСЛЕНИЕ 1,4-ДИГИДРОПИРИДИНОВ НА УГЛЯХ СЖН

I.1. Окисление N-бензил-1,4-дигидроникотинамида. Синтетические гемо- и энтеросорбенты широко используются в медицинской практике для лечения различных заболеваний. Наряду со способностью поглощать различные ксенобиотики, они могут катализировать различные окислительно-восстановительные реакции, а также иммобилизовать ферменты. Обладая универсальными лечебными свойствами, углеродные сорбенты влияют на метаболические процессы в различных органах, в частности, активируют ряд ферментов энергетического обмена, в том числе дегидрогеназ, коферментами которых являются производные никотинамида.

Для моделирования алкогольдегидрогеназной реакции нами изучено окисление N-бензил-1,4-дигидроникотинамида (ВНАН) на энтеросорбентах типа СЖН.

Скорость окисления ВНАН на угле подчиняется кинетическому уравнению первого порядка. Результаты измерений представлены в табл. I. По логарифмической зависимости начальных скоростей окисления ВНАН от навесок угля определен порядок реакции по углю:  $n = 0,5$ , что типично для гетерогенного каталитического радикально-цепного механизма.

Наблюдаемая (кажущаяся) энергия активации, рассчитанная по данным табл. I,  $E = 14$  кДж/моль. Процесс окисления ВНАН на угле не может контролироваться внешней диффузией, т.к. для нее энергия активации меньше 4 - 8 кДж/моль. Предположение о том, что низкое значение активации определяет диффузионный процесс, следует отвергнуть, т.к. для процессов, лимитированных внутренней диффузией, скорость реакции должна быть пропорциональна навеске угля.

Таблица I

Окисление ВНАН и этанола на активном угле СМН-К

[ВНАН] · 10 <sup>3</sup> , моль/л	СМН-К, мг	t, °C	κ · 10 <sup>2</sup> , мин <sup>-1</sup>	Окислившийся этанол, моль/л
-	100	37	-	0,37
0,5	100	37	6,70	1,77
0,75	100	37	-	2,88
I	100	37	8,40	3,24
I	100	37	8,87	3,74
2	100	37	6,05	-
I	25	37	3,14	-
I	50	37	3,58	2,75
I	100	37	9,20	-
I	200	37	11,70	5,90
I	300	37	16,70	-
I	100	20	6,64	-
I	100	70	15,20	-
I	10	37	-	2,43
I	100	50	16,80	-

Примечания: 50 %-ный этанол ( 8,7 моль/л); фосфатный буфер 0,05 моль/л, pH 7,55; общий объем 10 мл; газохроматографическое определение этанола проводилось через 48 ч после начала реакции; средняя квадратичная ошибка среднего арифметического ± 5 %.

Вероятно, каталитический и адсорбционный процессы накладываются друг на друга. Адсорбционные (поверхностные) процессы проявляются и в том, что скорость реакции увеличивается при измельчении угля и перемешивании. Большая отрицательная энтропия активации ( $\Delta S = -253$  Дж/моль·К), вероятно, означает, что на поверхности угля имеется небольшое количество активных центров.

Окисление ВНАН на угле сопровождается поглощением кислорода и окислением этанола, присутствующего в реакционной смеси в качестве растворителя или специально добавленного в раствор. Из рис. I и табл. I видно, что окисление этанола и скорость поглощения кислорода увеличиваются с повышением концентрации ВНАН. Скорость поглощения кислорода возрастает также с увеличением концентрации кислорода или навесок угля (данные не представлены). Так, при взаимодействии на угле  $3 \cdot 10^{-7}$  моля ВНАН с 3 мл 50 %-ного этанола по-

глощается  $3 \cdot 10^{-6}$  моля кислорода.

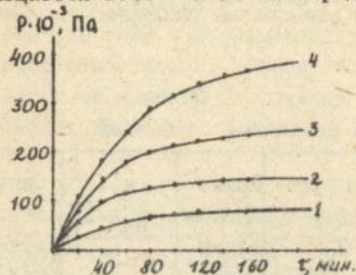


Рис. I. Кинетические кривые поглощения кислорода.  
50 %-ный этанол; уголь 100 мг; общий объем 3 мл. ВНАН, моль/л: 1 - 0; 2 -  $1,5 \cdot 10^{-5}$ ; 3 -  $2,25 \cdot 10^{-5}$ ; 4 -  $3 \cdot 10^{-5}$ .

Для более точного определения окислившегося спирта была проведена реакция в ацетонитриле (ацетонитрил 8 мл; фосфатный буфер в воде 0,1 моль/л, pH 7,17 - 8 мл; этанол 0,16 мл; уголь 500 мг; 37°C). При этом в присутствии ВНАН ( $1 \cdot 10^{-3}$  моль/л) окисляется 38 % спирта, а в его отсутствие - лишь 15 %. Рассчитано, что в присутствии 0,01 % (мол.) ВНАН по отношению к этанолу окисление последнего увеличивается в 10 раз, а всего на один моль окислившегося ВНАН окисляется до  $3 \cdot 10^3$  моля этанола.

Продуктом окисления ВНАН является четвертичная соль  $\text{ВНА}^+$ , а этанол окисляется в ацетальдегид, образование которого доказано методом газо-жидкостной хроматографии и элементарным анализом полученного 2,4-динитрофенилгидразона.

На скорость окисления ВНАН влияют различные добавки. Реакцию ингибируют пара-динитробензол и другие нитросоединения, 2,5-диметилхинон, орто-нафтохинон, имидазол, ионы железа (III). Реакция ускоряется при УФ-облучении, а также в присутствии перекиси водорода, триптофана, триэтиламина. Специфически влияет ацетальдегид, добавка которого в начале реакции существенно ее ускоряет и не оказывает влияния при введении в развившийся процесс. Ингибитор альдегиддегидрогеназы - тетраэтилтиурамдисульфид (антабус) не влияет на окисление дигидропиридина и этанола. Добавки иона  $\text{Zn}^{2+}$  в глициновом буфере приводят к тому, что наряду с четвертичной солью образуется продукт гидратации - N-бензил-6-окси-1,4,5,6-тетрагидроникотинамид, поглощающий при 290 нм.

Широко известный активированный уголь - карболен также ускоряет совместное окисление ВНАН и этанола.

Приведенные данные о влиянии добавок свидетельствуют о радикальном механизме окисления ВНАН.

Для выяснения вопроса о природе акцепторных группировок на поверхности угля изучено окисление ВНАН и этанола на различных сорбентах (табл.2).

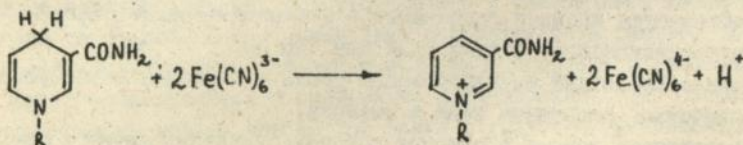
Таблица 2  
Окисление ВНАН и этанола на различных сорбентах

Марка сорбента	СОЕ, мг-экв/г	Фенольные группы, мг-экв/г	Размер мезо-пор, Å	Удельная поверхность, м <sup>2</sup> /г	Поглощение O <sub>2</sub> , см <sup>3</sup>	Время поглощения, мин	к, 10 <sup>2</sup> мин <sup>-1</sup>	Окисление этанола, %
СКН-2М	0,2	0	700-720	1000	1,2 · 10 <sup>-1</sup>	60	3,28	18
СКН-2Мок	1,5	0,4	700-720	1000	9,0 · 10 <sup>-2</sup>	180	1,92	28
СКС-3	0,1	0	350	800	1,6 · 10 <sup>-1</sup>	200	2,60	24
СКС-3 ок	1,4	0,4	350	800	1,1 · 10 <sup>-1</sup>	200	2,57	11

Примечания: Фосфатный буфер - 0,05 моль/л, pH 7,55; уголь - 100 мг; 37°С. Окисление ВНАН и поглощение кислорода: ВНАН - 1,5 · 10<sup>-5</sup> моль/л; 50 %-ный этанол; общий объем - 3 мл. Окисление этанола: ВНАН - 1 · 10<sup>-3</sup> моль/л; 50 %-ный ацетонитрил в воде с добавлением 1 % этанола; общий объем - 8 мл.

Из табл.2 видно, что поглощение кислорода и окисление ВНАН и этанола мало зависят от марки угля: окисленные и неокисленные угли катализируют реакцию примерно одинаково. Это означает, что в катализе участвуют определенные, одинаковые для различных углей участки.

1.2. Окисление 1,4-дигидроникотинамидов феррицианид-ионом на угле. Изучение реакции окисления ВНАН феррицианид-ионом на угле отвечает на вопрос о лимитирующей стадии реакции. Обычно окисление дигидроникотинамидов феррицианид-ионом протекает по уравнению:



Эта реакция подчиняется кинетическому уравнению второго порядка (по ВНАН и феррицианид-иону). Однако, окисление на угле имеет свою особенность: наблюдается только первый порядок (по ВНАН), т.е. скорость реакции не зависит от концентрации феррицианид-иона (табл. 3).

Таблица 3  
Окисление ВНАН феррицианид-ионом на активном угле

[ВНАН] X X 10 <sup>3</sup>	[ФЦ] · 10 <sup>3</sup>	Уголь, мг	t, °C	k · 10 <sup>2</sup> , мин <sup>-1</sup>	[ВНАН] X X 10 <sup>3</sup>	[ФЦ] · 10 <sup>3</sup>	Уголь, мг	t, °C	k · 10 <sup>2</sup> , мин <sup>-1</sup>
I	-	50	25	3,96	I	2	100	25	6,08
I	I	50	25	3,57	I	4	100	25	6,67
I	2	50	25	3,78	0,5	2	100	25	6,66
I	4	50	25	3,57	2	2	100	25	7,34
0,5	2	50	25	3,59	I	-	100	37	7,98
I	2	50	25	4,06	I	2	100	37	8,43
2	2	50	25	4,26	I	-	200	37	14,00
I	-	100	25	6,30	I	2	200	37	15,00
I	I	100	25	5,77					

Примечания: Фосфатный буфер - 0,05 моль/л, pH 7,5; 50 %-ный этанол; общий объем - 20 мл.

Помимо гетерогенно-каталитического окисления ВНАН феррицианид-ионом на угле, имеют место окисление ВНАН кислородом и феррицианид-ионом без участия угля. Последняя реакция существенна при малых навесках угля.

Вторая важная особенность этой реакции - феррицианид-ион тормозит окисление этанола. В присутствии феррицианид-иона спирта окисляется на порядок меньше, чем без феррицианид-иона: соответственно 0,26 и 3,24 моля (концентрация, моль/л: ВНАН - 1 · 10<sup>-3</sup>, феррицианид - 2 · 10<sup>-3</sup>, этанол - 8,7; уголь - 100 мг; общий объем - 10 мл; 37°C; 48 ч).

Специфическое действие оказывает феррицианид-ион и на окисление НАДН на угле: без феррицианид-иона реакция идет крайне медленно и не до конца, а в присутствии феррицианид-иона вначале ускоряется, а затем замедляется.

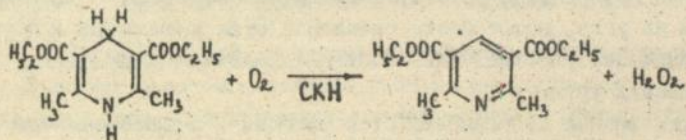
Независимость скорости окисления ВНАН на угле от концентрации феррицианид-иона предполагает, что лимитирующей стадией реакции является взаимодействие ВНАН с поверхностью угля, а не с молекулой феррицианид-иона. В случае НАДН этот эффект не наблюдается, очевидно, вследствие меньшей реакционной способности НАДН по сравнению с ВНАН. Ингибирование окисления НАДН и этанола феррицианид-ионом указывает на взаимодействие промежуточных радикальных частиц:



Ингибирование окисления НАДН избытком феррицианид-иона может быть связано со значительным повышением адсорбции феррицианид-иона.

1.3. Окисление эфира Ганча на угле СКН. Использование эфира Ганча (2,6-диметил-3,5-дикарбокси-1,4-дигидропиридин) на активных углях открывает возможности для биомиметических синтезов в кислых средах, в которых эфир Ганча, в отличие от других 1,4-дигидропиридинов, не подвергается гидратации.

Эфир Ганча без углей не окисляется кислородом. Типичные условия опытов: эфир Ганча -  $(0,25 + 1) \cdot 10^{-3}$  моль/л; ацетатный или фосфатный буфер - 0,05 моль/л (рН соответственно 3,55 и 7,50); уголь - 25 - 200 мг; общий объем - 10 мл; 37°C. Окисление эфира Ганча на угле протекает по уравнению:

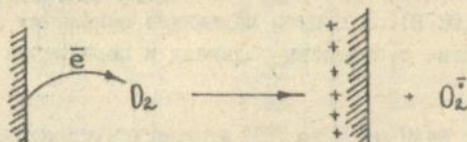


Эта реакция подчиняется кинетическому уравнению первого порядка. Значение константы скорости, в зависимости от количества угля, находится в пределах  $1 \cdot 10^{-2}$  -  $1 \cdot 10^{-1}$  мин<sup>-1</sup>. Окисление эфира Ганча ускоряется в присутствии перекиси бензоила (молярная доля 50 - 100 % по отношению к дигидропиридину) в полтора раза. На скорость окисления не влияют добавки феррицианид-иона (молярная доля 100 - 200 %). Добавки (молярная доля 10 - 20 % по отношению к эфиру Ганча) орто-нафтохинона, 2,5-диметилхинона, триптофана и

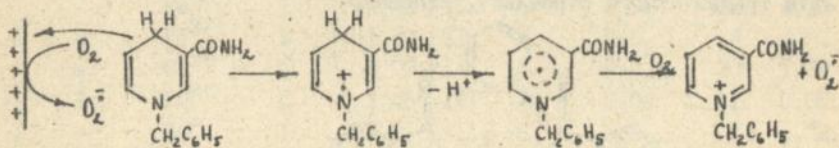
дибензо-1В-крауна-6 замедляют окисление эфира Ганча соответственно в 2; 4; 2 и 1,3 раза.

\* \* \*

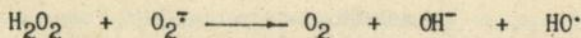
При рассмотрении механизма окисления 1,4-дигидроникотинамидов необходимо ответить на вопросы о природе акцепторной группировки на поверхности угля и лимитирующей стадии реакции. Можно было предположить, что первичной стадией реакции является перенос электрона на карбонильную или хиноидную группировку на поверхности сорбента. Однако, окисление ВНАН и этанола не зависит от марки угля и степени его окисления (табл. 2). Вопрос о природе акцепторных групп решается, если исходить из электрохимических представлений о поверхности угля, поверхность которого при контакте с воздухом заряжается положительно:



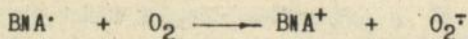
Общая схема окисления ВНАН на угле имеет вид:



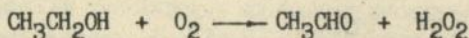
Первая стадия реакции - перенос электрона на положительно заряженную поверхность угля и образование катион-радикала ВНАН<sup>+</sup> - является лимитирующей, поскольку скорость окисления ВНАН на угле не зависит от концентрации феррицианид-иона, на нее влияют тол ко концентрация ВНАН и навески угля. Участие пиридиновых радикалов в процессе доказывается ингибированием реакции хинонами, нитросоединениями и т.д. и ускоряющим действием УФ-облучения, перекиси водорода, триэтиламина и др. Триэтиламин, очевидно, способствует депротонированию катион-радикала ВНАН<sup>+</sup>, а перекись водорода - образованию сильного окислителя, например, гидроксильного радикала  $OH^\cdot$ , аналогично реакции Хабера-Вайсса.



Супероксид-радикал образуется не только на поверхности угля, но и при окислении пиридинильного радикала:

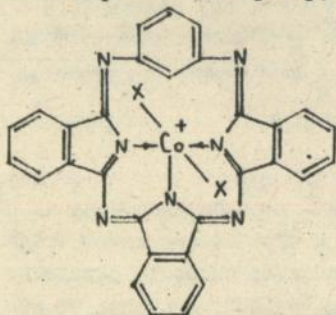


Окисление этанола кислородом протекает по суммарному уравнению:



Исходя из окислительно-восстановительных потенциалов кислорода и ацетальдегида (соответственно  $-0,74$  и  $-0,18$  В при pH 7), супероксид-радикал не может быть окислителем этанола. Таким окислителем является, очевидно, протонированная форма супероксид-радикала  $\text{HO}_2^\cdot$  ( $E_0 = +1,08$  В). В цепном механизме окисления этанола возможно также участие супероксид-радикала и перекисных соединений.

1.4. Окисление ВМАН на угле СМН в присутствии макрогетероциклов. Макрогетероциклы металлов (мономерные и полимерные фталоцианины кобальта и марганца, а также галогенсодержащий комплекс кобальта тридентатного строения), например,



снижают скорость окисления ВМАН. Макрогетероциклы вносились в реакционную смесь в количестве 1 - 2 % по отношению к массе угля. Результаты расчетов констант скорости первого порядка (средняя квадратичная ошибка среднего арифметического не превышает 5 %) представлены в табл. 4.

Таблица 4

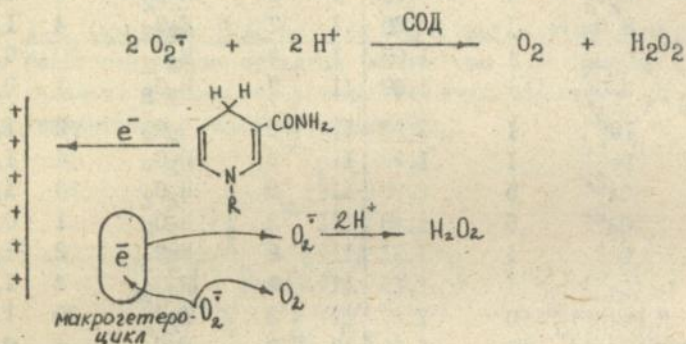
Скорость окисления ВНАН на угле СМН в присутствии макрогетероциклов

Макрогетероцикл		Окислитель	С. IO <sup>4</sup> , моль/л	к. IO, мин <sup>-1</sup>	Макрогетероцикл		Окислитель	С. IO <sup>4</sup> , моль/л	к. IO, мин <sup>-1</sup>
№ МГЦ	Масса, мг				№ МГЦ	Масса, мг			
-	-	O <sub>2</sub>	2,5	1,47	III	1	K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	20	1,31
i	2	O <sub>2</sub>	2,5	1,13	III	2	K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	20	1,12
II	2	O <sub>2</sub>	2,5	1,28	III	4	K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	20	0,71
III	2	O <sub>2</sub>	2,5	1,28	IV	2	K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	20	1,35
IV	2	O <sub>2</sub>	2,5	1,32	У	2	K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	20	1,23
У	2	O <sub>2</sub>	2,5	1,40	-	-	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1	1,79
-	-	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	4	2,57	-	-	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2	1,71
I	2	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1	1,65	-	-	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	20	1,69
I	2	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2	1,81	I	2	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1	0,88
I	2	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	4	1,93	I	2	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2	0,94
II	2	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1	1,60	I	2	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	4	1,06
IV	2	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1	1,69	I	2	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	20	0,83
У	2	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1	1,69	II	2	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1	0,98
-	-	Fe <sup>3+</sup>	1	1,63	II	2	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2	1,10
I	2	Fe <sup>3+</sup>	1	1,29	II	2	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	4	1,06
-	-	Cu <sup>2+</sup>	5	2,79	II	2	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	20	1,19
I	2	Cu <sup>2+</sup>	5	1,48	III	2	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1	0,88
-	-	Cu <sup>+</sup>	1	1,31	III	2	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2	1,22
I	2	Cu <sup>+</sup>	1	1,15	III	2	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	4	1,29
-	-	K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	20	1,47	III	2	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	20	1,33
I	1	K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	20	1,10	IV	2	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1	0,97
I	2	K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	20	0,98	IV	2	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2	1,29
I	4	K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	20	0,75	IV	2	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	4	1,29
II	1	O <sub>2</sub>	2,5	1,44	IV	2	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	20	1,40
II	2	O <sub>2</sub>	2,5	1,25	У	2	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1	1,15
II	4	O <sub>2</sub>	2,5	1,13	У	2	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2	1,22
					У	2	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	4	1,38

Примечания: Концентрация, моль/л: ВНАН - 0,001; фосфатный или глициновый буфер - 0,05; pH 7,50; 50 %-ный этанол; общий объем - 10 мл; уголь - 0,1 г; 37°C; I - МГЦ Со тридентатный; II - полимерный фталоцианин Со; III - дихлоркобальтфталоцианин; IV - фталоцианин Мп; У - мономерный фталоцианин Со.

Из анализа данных, представленных в табл. 4, вытекает, что макрогетероциклы в наибольшей степени замедляют окисление ВНАН кислородом, несколько меньше - перекисью водорода, ионами  $\text{Cu}^{2+}$  и  $\text{Fe}^{3+}$  в присутствии кислорода. Металлокомплексы макрогетероциклов (массовая доля 2-5 % по отношению к углю) также ингибируют окисление эфира Ганча кислородом (снижение скорости в 1,5-2 раза). Самая важная особенность макрогетероциклов в том, что они полностью выключают сопряженное с дегидрированием 1,4-дигидропиридинов окисление этанола.

Понижение скорости окисления ВНАН происходит при сравнительно малых относительно угля добавках макрогетероциклов. Очевидно, эти соединения блокируют активную поверхность угля и затрудняют адсорбцию дигидропиридинов, вытесняя их с поверхности. Но более важно то, ВНАН и продукты его окисления не выключают окисление спирта, проходящее, очевидно, через супероксид-радикал. Отсюда следует, что макрогетероциклы совместно с углем функционируют подобно ферменту - супероксиддисмутазе:



Сам по себе макрогетероцикл этими свойствами не обладает. Не проявляет свойств фермента и уголь, но совместно макрогетероцикл и уголь разлагают супероксид-радикалы подобно ферменту.

## 2. ОКИСЛЕНИЕ N-БЕНЗИЛ-1,4-ДИГИДРОНИКОТИНАМИДА НА АКТИВНОМ УГЛЕ АУА

Выбор угля АУА обусловлен его большей доступностью и дешевой по сравнению с сорбентами типа СИН. Его получают из донецкого антрацита путем паро-газовой активации. Уголь АУА может быть

использован в качестве энтеросорбента в медицине и ветеринарии.

Из логарифмических анаморфоз кинетических кривых расходования ВНАН при различных начальных концентрациях ВНАН и навесках угля были определены кинетические порядки реакции: по ВНАН - первый, а по углю - дробный ( $n = 0,7$ ). Значения констант скорости находятся в доверительном интервале  $(1,42 \pm 0,11) \cdot 10^{-1} \text{ мин}^{-1}$ ; средняя квадратичная ошибка среднего арифметического не превышает 5 %. Скорость окисления ВНАН не зависит от pH в интервале значений 5 - 9,2.

Продуктом окисления ВНАН является четвертичная соль ВНА<sup>+</sup>. Однако, из анализа спектральных данных вытекает, что в каждый момент времени ВНА<sup>+</sup> образуется меньше, чем теоретически ожидается. Исходя из значений молярных экстинкций ВНАН 7300 (355 нм), 2200 (265 нм) и ВНА<sup>+</sup> 4300 (265 нм), была рассчитана зависимость количества предположительно образуемого ВНА<sup>+</sup> от предположительно расходуемого ВНАН (рис. 2).

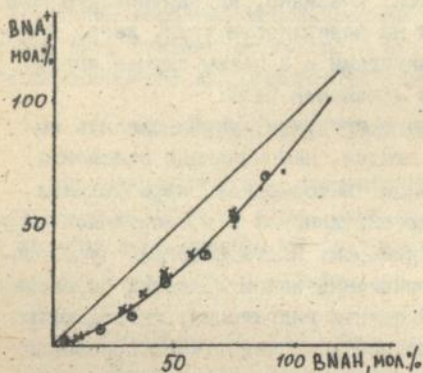


Рис. 2. Зависимость концентрации предположительно образуемого ВНА<sup>+</sup> от концентрации ВНАН.

50 %-ный этанол; фосфат-0,1 моль/л, pH 7,45; уголь АУА - 100 мг; общий объем-16 мл. ВНАН, моль/л:  
 ○  $1 \cdot 10^{-3}$ ; ×  $1,5 \cdot 10^{-3}$ ;  
 •  $2 \cdot 10^{-3}$ . Прямая-зависимость теоретическая.

Из рис. 2 видно, что в начальный период превращения ВНАН образуется около 50 % ожидаемого количества ВНА<sup>+</sup>. Это отклонение значительно превышает значение адсорбции ВНА<sup>+</sup> на угле (не более 10 %). При дальнейшем окислении ВНАН на угле количество образуемого ВНА<sup>+</sup> приближается к теоретическому. Отсюда можно сделать вывод, что помимо ВНА<sup>+</sup> образуются промежуточные продукты, поглощающие в

той же области спектра.

Характерное отличие от аналогичной реакции на угле СКН - отсутствие поглощения кислорода, независимо от условий проведения реакции: при высоких (100 - 200 мг) и малых (1 - 5 мг) навесках угля, за время до 4 ч, в кислой, нейтральной и щелочной среде. Несмотря на отсутствие поглощения кислорода, в реакции происходит окисление этанола. Так, в растворе с объемной долей этанола 50 %, содержащимся над углями АУА (100 мг) в течение 5 суток, не происходило окисления этанола. Однако, в присутствии ВНАН ( $1 \cdot 10^{-3}$  моль/л) окислилось приблизительно 6 % спирта, что соответствует окислению 0,5 моль/л этанола.

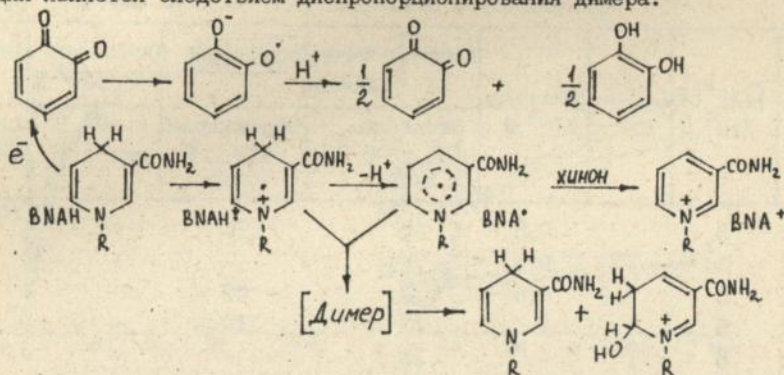
Полученные данные позволяют выдвинуть гипотезу о механизме окисления ВНАН на угле АУА. Поскольку кислород не используется, следует предположить, что окислителем ВНАН является сам уголь. Уголь АУА не содержит, в частности, ионов  $Cu^{2+}$ , а после удаления содержащихся в нем ионов  $Fe^{3+}$  окисление ВНАН протекает с той же скоростью и кислород не поглощается. Очевидно, каталитическую роль могут играть хинонные группировки на поверхности угля, легко вступающие в реакции с дигидроникотинамидами и в нашем случае играющие роль первичного акцептора при окислении ВНАН.

Учитывая наличие промежуточного продукта, можно сделать вывод, что реакция протекает в две стадии, напоминающие окисление ВНАН феррицианид-ионом и солями меди. Интермедиат, образующийся вначале, содержит фрагменты дигидропиридиновой и четвертичной структур никотинамида, т.е. является димером. Подтверждением существования димера в реакции ВНАН с феррицианид-ионом является образование в равных количествах  $ВНА^+$  и продукта гидратации, поглощающего при 290 нм. Образованию димера способствуют недостаток основания и достаточно высокая концентрация реагентов (порядка  $10^{-2}$  моль/л). Попытки выделить димер были безуспешны.

Продукт гидратации наблюдается также при окислении ВНАН на угле АУА, притом тем больше, чем меньше навеска угля. В контрольном опыте (ВНАН + пара-бензохинон без угля) также образуется продукт гидратации. Его образование является, возможно, моделью т.н. НАДН-Х как формы существования НАДН в кислой среде, способной ферментативно превращаться в НАДН и далее  $НАД^+$ .

Существование димера становится тем более обоснованным, что в реакционной среде отсутствует окислитель, способный принять электроны от пиридиныльного радикала. Промежуточный димер имеет кван-

тово-химическое подтверждение. Очевидно, образование продуктов реакции является следствием диспропорционирования димера:

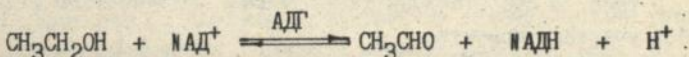


Поскольку кислород в реакции не расходуется, то можно предположить, что окислителем этанола на угле АУА является сам уголь с участием пиридиновых радикалов.

Таким образом, использование угля АУА в медицинской практике может быть связано не только с его адсорбционными свойствами, но и со способностью катализировать окислительные процессы.

### 3. АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗНАЯ РЕАКЦИЯ НА УГЛЕ

На основании того, что модельное соединение ВНАН катализирует окисление этанола на угле, нами исследовано окисление этого спирта в алкогольдегидрогеназной реакции на угле СКН и на угле с иммобилизованной алкогольдегидрогеназой (АДГ):



Ферментативная реакция с иммобилизованной на угле АДГ замедляется по сравнению с обычными условиями, но по мере увеличения навесок угля происходит смещение равновесия в сторону образования НАДН и увеличение скорости образования этого кофермента. Уменьшение скорости АДГ-реакции по сравнению с нативными условиями происходит вследствие иммобилизации фермента на угле. Из табл. 5 видно, что сорбент несколько увеличивает окисление этанола. Меньшее влияние угля на окисление этанола в АДГ-реакции по сравнению с совместным окислением ВНАН и этанола можно объяснить обратимостью ферментативной реакции.

Таблица 5  
АДГ-реакция и окисление НАДН на угле СКН-К

АДГ, %	[НАД <sup>+</sup> ] X 10 <sup>4</sup> , М	СКН-К, мг	[Этанол] X 10 <sup>2</sup> , М	Алкогольдегидрогеназная реакция		Окисление НАДН, 10 <sup>-3</sup> М	
				Окисление EtOH за 5 ч, % (мол.)	Образование НАДН, % (мол.)	к. 10 <sup>3</sup> , мин <sup>-1</sup>	% (мол.)
0,1	5	-	0,5	62	16	-	-
0,1	5	1	0,5	72	-	-	-
0,1	5	1,4	0,5	-	57	-	-
0,1	5	-	4	12	19	-	-
0,1	5	1	4	13	-	-	-
0,1	5	1,4	4	-	60	-	-
0,1	5	-	5	23	21	-	-
0,1	5	1	5	26	-	-	-
0,1	5	1,4	5	-	61	-	-
-	-	-	5	-	-	0,23	8
-	-	0,6	5	-	-	0,60	16
-	-	1	5	-	-	1,13	28
-	-	1,8	5	-	-	1,80	40

Примечания: Фосфатный буфер - 0,1 моль/л, pH 7,55; общий объем - 3 мл; 25°C

В табл. 5 представлены также данные по окислению НАДН на угле без участия фермента.

Если АДГ не иммобилизована, то наблюдается несколько иная картина: с увеличением концентрации НАД<sup>+</sup> или этанола ферментативная реакция ускоряется не только в обычных условиях, но и на угле (данные не представлены). При этом наблюдается увеличение количества и скорости образования восстановленного кофермента. По кинетическим кривым образования НАДН, пользуясь методом Лайнуивера-Берка, были рассчитаны константы Михаэлиса  $K_m$  для ферментативной реакции как без угля, так и с участием угля, соответственно: по НАД<sup>+</sup> -  $5,80 \cdot 10^{-4}$  М и  $8,89 \cdot 10^{-4}$  М; по этанолу -  $3,57 \cdot 10^{-2}$  М и  $2,9 \cdot 10^{-2}$  М.

Кинетика образования НАДН в алкогольдегидрогеназной реакции

с иммобилизованным ферментом зависит от времени протекания реакции (рис. 3 и 4).

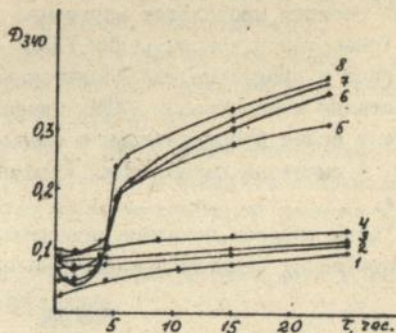
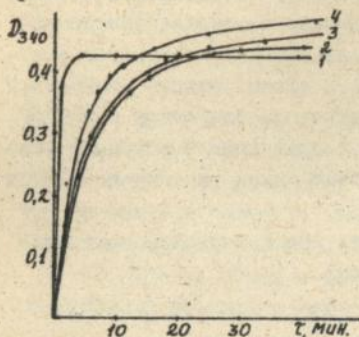


Рис. 3. Образование НАДН в АДГ-реакции.

АДГ -  $3,33 \cdot 10^{-3}$  %; концентрация, моль/л:  $\text{НАД}^+$  -  $7,5 \cdot 10^{-3}$ ; этанол - 0,33; фосфатный буфер -  $5 \cdot 10^{-2}$ , pH 7,55; общий объем - 3 мл;  $25^\circ\text{C}$ ; 1 - без угля; 2 - 4 - 0,5; 1,2; 2,2 мг сорбента соответственно.

Рис. 4. Образование НАДН в АДГ-реакции в зависимости от концентрации этанола при продолжительном протекании реакции.

АДГ - 0,1 %; концентрация, моль/л:  $\text{НАД}^+$  -  $5 \cdot 10^{-4}$ ; фосфатный буфер - 0,1, pH 7,55; общий объем 3 мл;  $25^\circ\text{C}$ . 1 - 4 - без угля; этанол, ммоль/л: 1 - 5; 2 - 25; 3 - 40; 4 - 50. 5 - 8 - уголь 1,4 мг; концентрация этанола соответствует 1 - 4.

При длительном проведении реакции (несколько часов) образование НАДН протекает по сложному графическому закону, причем реакция еще больше сдвигается в сторону образования НАДН (рис. 4).

Вследствие обратимости АДГ-реакции, окисление этанола в ней на 5 - 10 % меньше, чем в реакции, индуцированной НАДН. С помощью манометрического и других методов доказано выделение ацетальдегида в реакции на угле. Точное количество его определить не удалось, т.к. ацетальдегид исчезает из сферы реакции, превращаясь в продукты конденсации. Фермент на угле не выполняет альдегиддегидрогеназной функции, и возможное появление НАДН в АДГ-реакции не связано ни с ацетальдегидом, ни с продуктами его конденсации. Прямыми опытами показано, что альдоль и кротоновый альдегид быстро сорбируются на угле, превращаясь в продукты конденсации.

Сложный характер кривых образования НАДН (рис. 4) объясняется следующим образом: вслед за достижением равновесия в ферментативной реакции происходит медленная химическая стадия окисления НАДН (уменьшение концентрации НАДФ); дальнейшее исчезновение ацетальдегида и продуктов его конденсации из сферы реакции приводит к возрастанию концентрации НАДН. Следовательно, благодаря углю АДГ работает более продолжительное время по сравнению с обычными условиями, а смещение равновесия увеличивает выход реакции по НАДН в 4 раза.

Таким образом, показана возможность углей воздействовать на ферментативные реакции в живом организме.

### ВЫВОДЫ

1. Изучено каталитическое окисление кислородом 1,4-дигидропиридинов (N-бензил-1,4-дигидроникотинамид, эфир Ганча, НАДН) на углеродных энтеросорбентах типа СКН. Окисление дигидропиридинов ускоряется на угле и усиливается при действии УФ-облучении, в присутствии перекиси водорода, триэтиламина, ацетальдегида, триптофана, а при действии нитросоединений, хинонов, имидазола, ионов  $Fe^{3+}$  замедляется.

2. Окисление 1,4-дигидропиридинов описывается кинетическим уравнением первого порядка (по дигидропиридинам) и дробным (по углю). Изучение окисления в присутствии феррицианид-иона показало, что лимитирующей стадией реакции является перенос электрона от дигидропиридина на поверхность угля.

3. Исследование окисления на разных марках углей показало, что акцепторной группой является положительно заряженная поверхность угля.

4. 1,4-Дигидропиридины совместно с углем промотируют окисление этанола, которое осуществляется супероксид-радикалами, возникающими при окислении пиридинильных радикалов кислородом и при адсорбции кислорода на угле.

5. Макрогетероциклы металлов ингибируют окисление дигидропиридинов и сопряженное с ним окисление этанола.

6. Предложена модель фермента супероксиддисмутазы, состоящая из активированного угля и макрогетероциклов, устраняющая супероксид-радикалы.

7. Окисление N-бензил-1,4-дигидроникотинамида на активном угле АУА протекает по кинетическому уравнению первого порядка (по

ВНАН) и дробному - по углю. Несмотря на отсутствие поглощения кислорода, происходит окисление этанола. Сделан вывод, что окисление этанола происходит с участием пиридиновых радикалов.

8. Окислителем ВНАН на угле АУА является сам уголь, а именно хинонные группировки на поверхности. Окисление ВНАН протекает с участием промежуточного димерного соединения.

9. Продукт окисления этанола в алкогольдегидрогеназной реакции на угле - ацетальдегид превращается в продукты конденсации, что приводит к смещению равновесия ферментативной реакции и увеличению выхода реакции по МАДН в 4 раза.

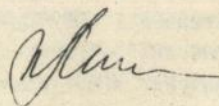
10. Сделан вывод о возможности углей воздействовать на ферментативные реакции в живом организме.

Основное содержание диссертации отражено в следующих работах:

1. Ясников А.А., Стрелко В.В., Мищенко И.Н. и др. Сопряженное окисление этанола и N-бензил-1,4-дигидроникотинамида на активном угле СН // Докл.АН УССР. Сер.Б.- 1985.- № 12.- С.45-48.
2. Узиенко А.Б., Мищенко И.Н., Ясников А.А. Изучение механизма действия углеродного гемосорбента СН на окисление этанола // Тез.докл. на III Украинской конференции "Новые средства и сферы клинического применения сорбционной детоксикации организма".- Днепропетровск: 1985.- С.130-131.
3. Узиенко А.Б., Бойко Т.С., Мищенко И.Н. и др. Гомогенный и гетерогенный катализ реакций присоединения и окисления дигидроникотинамидов // Тез.докл. XV Украинской республиканской конференции по органической химии.- Ужгород: 1986.- С.115.
4. Мищенко И.Н., Узиенко А.Б., Ясников А.А. Исследование алкогольдегидрогеназной реакции на активных углях СН // Тез.докл. 9 конференции молодых ученых Института органического синтеза АН Латвийской ССР "Синтез и исследование биологически активных соединений".- Рига: 1987.- С.87.
5. Мищенко И.Н., Узиенко А.Б., Ясников А.А. и др. Кинетика и механизм окисления производных никотинамида и этанола на активных углях // Укр.хим.журн.- 1989.- 55, № 3.- С.279-282.
6. Узиенко А.Б., Бойко Т.С., Мищенко И.Н., Ясников А.А. Окисление дигидроникотинамидов феррицианид-ионом на активном угле // Там же.- 1988.- 54, № 12.- С.1303-1305.
7. Узиенко А.Б., Мищенко И.Н., Михаловский С.В. и др. Механизм окисления дигидроникотинамидов и этанола на углеродных гемосор-

- бентах // Тез. докл. IУ Украинской республиканской конференции "Сорбенты медицинского назначения и механизмы их лечебного действия". - Донецк: 1988. - С. 35-36.
8. Узиенко А.В., Мищенко И.Н., Бойко Т.С. и др. Ион-радикалы и перенос электрона в реакциях окисления дигидроникотинамидов на активных углях // Тез. докл. VII Всесоюзного совещания "Комплексы с переносом заряда и ион-радикальные соли". - Черногоровка: 1988. - С. 239.
9. Узиенко А.В., Ясников А.А., Мищенко И.Н. и др. Алкогольдегидрогеназная реакция на углеродных гемосорбентах // Тез. докл. на VI Всесоюзном симпозиуме по инженерной энзимологии "Получение и применение биокатализаторов в народном хозяйстве и медицине". - Вильнюс: 1988. - Ч. I. - С. 47-48.
10. Узиенко А.В., Бойко Т.С., Мищенко И.Н. и др. Окисление дигидроникотинамидов на активных углях в присутствии металлокомплексов макрогетероциклов // Тез. докл. на III Всесоюзной конференции по химии и биохимии макроциклических соединений". - Иваново: 1988. - С. 300.
11. Мищенко И.Н., Узиенко А.В., Ясников А.А. и др. Алкогольдегидрогеназная реакция на активных углях // Укр. биохим. журн. - 1989. - 61, № 5. - С. 99-102.
12. Узиенко А.В., Мищенко И.Н., Бойко Т.С. и др. Окисление дигидроникотинамидов на активных углях в присутствии металлокомплексов макрогетероциклов // Журн. общ. химии. - 1990. - 60, № 4. - С. 891-895.
13. Мищенко И.Н., Узиенко А.В., Ясников А.А., Головка Л.В. Окисление N-бензил-1,4-дигидроникотинамида на активном угле АУА // Докл. АН Украины. Сер. В. - 1992. - № 10. - С. 130 - 133.

Соискатель



Подп. к печ. 6 04. 93      Формат 60x84/16 Бумага Тм. № 2  
Печ. офс. Усл. печ. л. 1,16      Уч.-изд. л. 0,83      Тираж 100  
Зак. 3-3528

Киевская книжная типография научной книги. Киев, Репина, 4.

464866

Ab 27.249  
**AB 27.249**