

Взаимодействие аквакобаламина и диаквакобинамида с цианамидом

П. Н. Кучеренко, Д. С. Сальников, Тху Тхюи Буй, С. В. Макаров[®]

ФГБОУ ВПО «Ивановский государственный химико-технологический университет», 153000 Иваново, Россия
[®]E-mail: makarov@isuct.ru

Проведено спектрофотометрическое исследование взаимодействия аквакобаламина ($H_2OCbl(III)$) и диаквакобинамида ($(H_2O)_2Cbi(III)$) с цианамидом ($CNNH_2$). Установлено, что в обоих случаях протекает реакция комплексообразования. В случае кобинамида в щелочных средах процесс протекает в две стадии, на которых происходит последовательное присоединение двух молекул цианамида к кобинамиду. Найдены константы связывания цианамида аквакобаламином и диаквакобинамидом. Предложена схема исследуемых реакций.

Ключевые слова: Комплексообразование, аквакобаламин, диаквакобинамид, цианамид.

Interaction of Aquacobalamin and Diaquacobinamide with Cyanamide

Polina N. Kucherenko, Denis S. Salnikov, Thu Thuy Bui, and Sergei V. Makarov[®]

Ivanovo State University of Chemistry and Technology, 153000 Ivanovo, Russia
[®]Corresponding author E-mail: makarov@isuct.ru

Cobalt corrin complexes (cobalamins) are of great interest for coordination chemistry, biochemistry and medicine. Serving as cofactors of some enzymes, they take part in many processes, which occur in human body, for example, in methionine synthesis from homocysteine. Cobalamins and their reduced forms interact with many biologically active substances including ascorbic acid, nitric oxide and thiocyanate. Reduced forms of cobalamins are effective radical traps. Such properties as solubility in water, low toxicity and ability to form stable complexes with some toxic substances allow considering cobalamins as antidotes in the case of poisoning. In a number of papers, the application of cobalamins and their precursor cobinamide for cyanide poisoning treatment is considered. In this work the interaction between aquacobalamin ($H_2OCbl(III)$) and diaquacobinamide ($(H_2O)_2Cbi(III)$) with cyanamide ($CNNH_2$) has been studied spectrophotometrically. Cyanamide is a rather toxic compound. It is rapidly absorbed from the gastrointestinal tract with variable bioavailability (45-80 %) depending on the dose. It is necessary to note, however, that after-effects of cyanamide influence on human body have not been studied in details. Preliminary experiments showed that oxygen does not affect the interaction of cobalamin and cobinamide with cyanamide. The reaction of cobalamin (Cbl) with cyanamide at pH 3.5-11.4 is accompanied by spectral changes, such as disappearance of absorption bands characteristic for initial complex and formation of new bands at 359 and 543 nm. Positions of the peaks of the reaction product are the same within the pH range studied. This shows that within the pH range the same product is generated. UV-visible spectrum of the latter differs from that of cyanocobalamin. Spectrophotometric titration of H_2OCbl with $CNNH_2$ shows that the dependence between absorbance and initial $CNNH_2$ concentration is non-linear and it is typical for complex formation. In the case of cobinamide (Cbi) the complex formation takes place too. However here two consecutive spectral changes are observed during the reaction at pH 9.2. At pH 5.5 only the first step of the reaction is observed, and at pH 3 the interaction does not occur at all. In alkaline media, the dependence between absorbance and initial $CNNH_2$ concentration is linear, and equivalence point is observed at $[Cbi]: [CNNH_2] = 1:1$. With pH reduction to 7.5 the titration curve becomes non-linear. Similar changes were observed for the second stage of the reaction. Equilibrium constants of the reactions of H_2OCbl and $(H_2O)_2Cbi$ at different pH were calculated from the data of titration. With pH reduction, equilibrium constants of both complexes decrease. Therefore, one can

suppose that the active form of cyanamide is a deprotonated form. Comparing binding constants of cyanamide by H_2OCbl and $(H_2O)_2Cbi$ with that of cyanide one can conclude that cobalamin and cobinamide bind cyanamide much weaker than cyanide. As a result of the work probable schemes of reactions of H_2OCbl and $(H_2O)_2Cbi$ with cyanamide were proposed.

Keywords: Complexation, aquacobalamin, diaquacobinamide, cyanamide.

Введение

Корриновые комплексы кобальта (кобаламины) представляют большой интерес для координационной химии, биохимии и медицины. Являясь кофакторами ряда ферментов, они участвуют во многих процессах, протекающих в организме человека, в частности, в синтезе метионина из гомоцистеина.^[1] Кобаламины и их восстановленные формы взаимодействуют со многими биологически активными веществами, включая аскорбиновую кислоту,^[2] оксид азота(II)^[3] и тиоцианат.^[4] Восстановленные формы кобаламинов являются эффективными ловушками радикалов.^[5] Такие свойства, как растворимость в воде, низкая токсичность и способность образовывать прочные комплексы с некоторыми токсичными веществами дают возможность рассматривать кобаламины в качестве антидотов при отравлениях. В ряде работ изучена возможность использования кобаламинов и их предшественника – кобинамида – для лечения отравлений цианидами.^[6,7] В настоящей работе проведено спектрофотометрическое исследование взаимодействия аквакобаламина (H_2OCbl (III)) и диаквакобинамида ($(H_2O)_2Cbi$ (III)) с другим соединением, содержащим цианогруппу – цианамидом ($CNNH_2$). Цианамид является токсичным соединением. Он быстро всасывается в желудочно-кишечном тракте, его биодоступность составляет 45-80 %.^[8] Следует отметить, однако, что последствия воздействия цианамида на человеческий организм изучены пока недостаточно.

Экспериментальная часть

Гидрокобаламин (Рисунок 1а) ($HOcbl$, $\geq 98\%$) и цианамид $CNNH_2$ (50 %, водный раствор) фирмы Sigma-Aldrich использовались без дополнительной очистки. Диаквакобинамид (Рисунок 1б) был получен гидролизом гидрокобаламина в кислой среде и очищен по методике, предложенной в работе.^[9] Другие использованные в данной работе вещества имели марку “х.ч.”. Дистиллированная вода использовалась для приготовления всех растворов. Для поддержания постоянного значения pH использовались буферные растворы: ацетатный (0,1 моль/л), фосфатный (0,1 моль/л), тетраборатный (0,1 моль/л) и карбонатный (0,1 моль/л).

Спектрофотометрические исследования выполнены в аэробных условиях на приборе Cary 50, снабженном водяным термостатом LT 100 (± 0.1 °C); использовалась герметичная кварцевая кювета толщиной 1 см. Полученные данные обрабатывались в программе Origin 7.5. Предварительными опытами, проведенными в отсутствие и присутствии кислорода, показано, что последний не влияет на взаимодействие кобаламина и кобинамида с цианамидом.

Обсуждение результатов

Взаимодействие $Cbl(III)$ с избытком цианамида в диапазоне pH 3,5-11,4 сопровождается исчезновением полос поглощения исходного комплекса (Рисунок 2, спектр 1) и появлением в спектре максимумов поглощения при 359 и 543 нм (спектр 2, Рисунок 2). Добавление цианамида к кобаламину в сильноокислых ($pH < 3$) и сильнощелочных ($pH > 12$) средах не приводит к изменению спектра последнего.

Положение максимумов в спектре продукта данной реакции во всем исследуемом диапазоне pH одинаково, что говорит об образовании одного и того же соединения. Спектр продукта реакции кобаламина с цианамидом отличается от спектра цианокобаламина.^[10,11]

Спектрофотометрическое титрование аквакобаламина цианамидом показало, что зависимость оптической плотности при 545 нм от начальной концентрации $CNNH_2$ нелинейна и выходит на плато при $[CNNH_2]_0 > 0,2$ моль/л (Рисунок 3). Данная зависимость характерна для реакций комплексообразования.

Добавление цианамида к кобинамиду при pH 9,2 (последний находится в слабощелочной среде преимущественно в аквагидроксиформе^[4]) приводит к двум последовательным изменениям в спектре (Рисунок 4). На первой стадии происходит снижение интенсивности поглощения при 347 нм, исчезновение полосы поглощения при 517 нм, соответствующей исходному комплексу (Рисунок 4, спектр 1) и появление новой полосы при 514 нм (Рисунок 4, спектр 2). На второй стадии с ростом концентрации цианамида наблюдается увеличение интенсивности поглощения при 513 нм и образование новых пиков при 358 и 546 нм (Рисунок 4, спектр 3). В обоих случаях полученные спектры отличаются от спектров цианоаква- и дицианокобинамида.^[12,13]

Необходимо отметить, что при pH 5,5 наблюдается только первая стадия реакции, а при pH 3 реакция между кобинамидом и цианамидом не протекает.

Зависимости оптической плотности от начальной концентрации цианамида были получены при 520 и 538 нм, соответствующим изосбестическим точкам для второй и первой стадий, соответственно. Типичные кривые титрования для первой и второй стадии при разных pH представлены на Рисунках 5 (а и б) и 6 (а и б).

Сравнение Рисунка 5 (а и б) и Рисунка 6 (а и б) наглядно демонстрирует, что первая стадия завершается раньше второй при всех значениях pH .

Из Рисунка 5(а) видно, что для первой стадии в щелочных средах зависимость имеет линейный вид, и точка эквивалентности наблюдается при концентрации

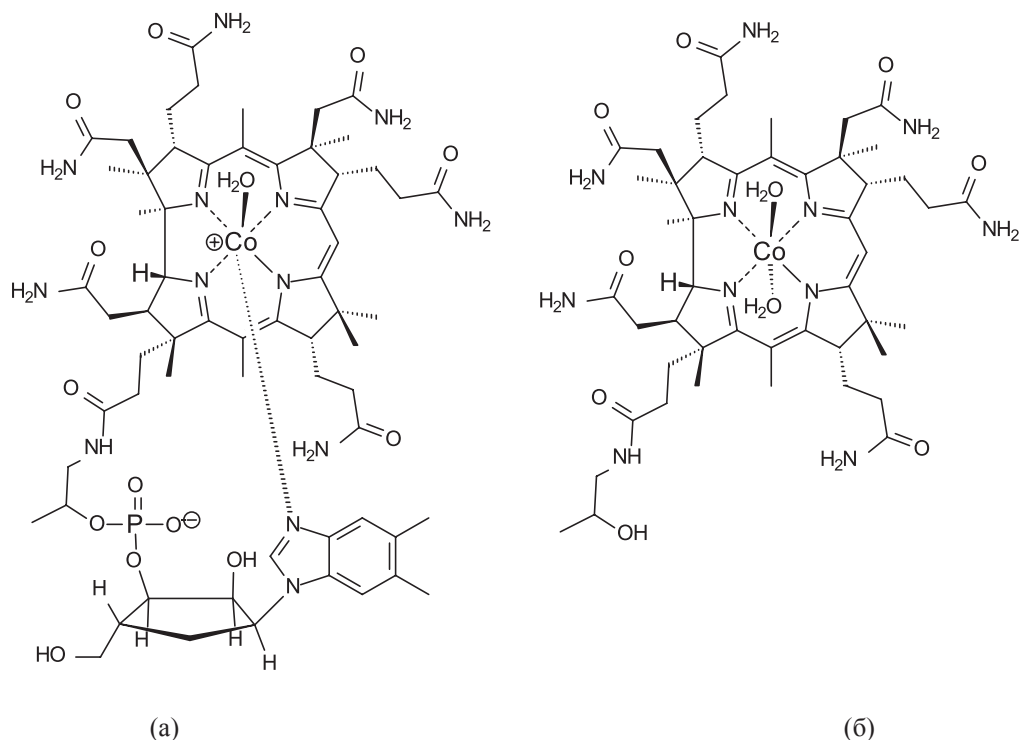


Рисунок 1. Структурные формулы аквакобаламина (а) и диаквакобинамида (б).

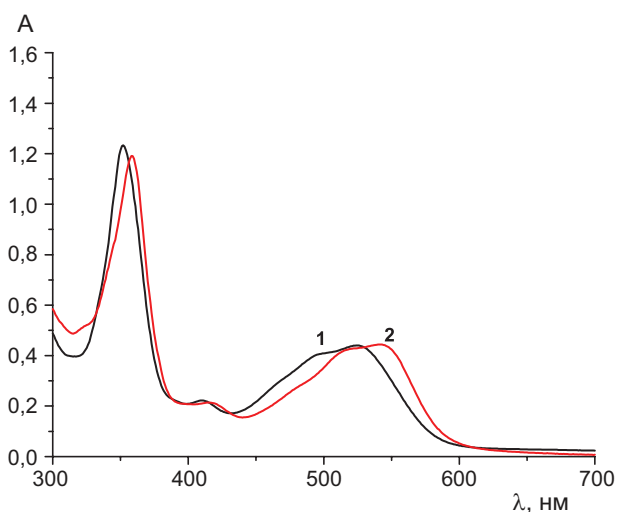


Рисунок 2. Электронные спектры кобаламина (Cbl(III)) (спектр 1) и продукта его взаимодействия с цианамидом при pH 5,5 (спектр 2); $[Cbl(III)]_0 = 5 \cdot 10^{-5}$ моль/л; $[CNNH_2]_0 = 0,08$ моль/л; $I = 1$ моль/л (KCl), 25 °С.

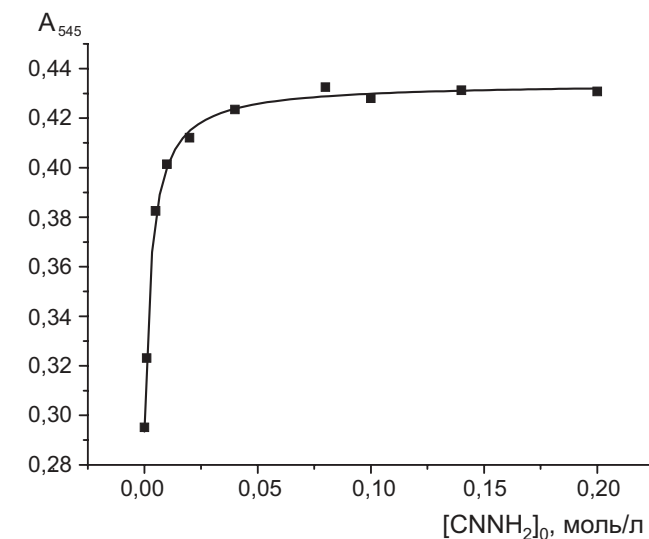
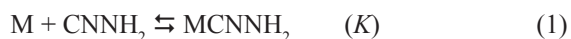


Рисунок 3. Зависимость оптической плотности при 545 нм от начальной концентрации $CNNH_2$ для реакции кобаламина с цианамидом: $[Cbl(III)]_0 = 5 \cdot 10^{-5}$ моль/л; $I = 1$ (KCl); pH 5,5; 25 °С.

цианамида, равной концентрации кобинамида, т.е. цианамид взаимодействует с комплексом в соотношении 1:1. При снижении pH до 7,5 форма кривой титрования становится нелинейной, и плато достигается при $[CNNH_2]_0 > 6 \cdot 10^{-4}$ моль/л (Рисунок 6 (а)). Аналогичные зависимости получены и для второй стадии.

Процесс комплексообразования можно описать уравнением (1),^[14] где М – металлокомплекс (Cbl или Cbi).



Тогда константа равновесия (K) будет равна (уравнение 2):

$$K = \frac{[MCNNH_2]}{[M] \cdot [CNNH_2]_0} \quad (2),$$

где $[CNNH_2]_0$ – общая концентрация цианамида.

Равновесные концентрации исходного и связанного с цианамидом металлокомплексов можно определить по уравнениям (3) и (4):

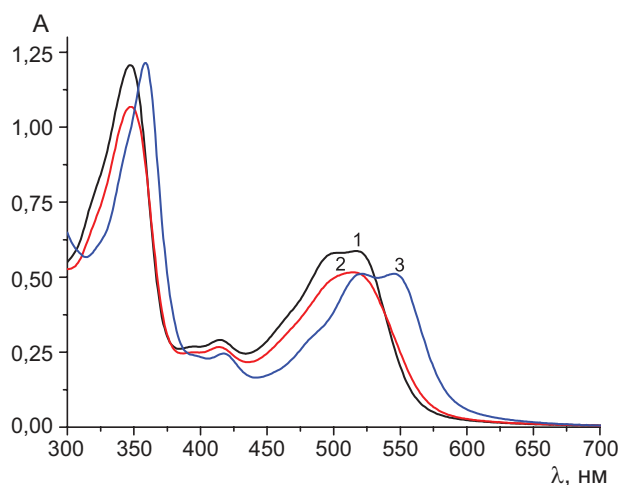


Рисунок 4. Электронные спектры поглощения, полученные при титровании кобинамида (спектр 1) цианамидом (2, 3 – продукты реакции) при pH 9,2: $[Cbi(III)]_0 = 5 \cdot 10^{-5}$ моль/л; $[CnNH_2]_0 = 5 \cdot 10^{-5}$ моль/л (для спектра 2); $[CnNH_2]_0 = 0.01$ моль/л (для спектра 3); $I = 1$ моль/л (KCl), 25 °С.

$$[M] = \frac{[M]_0}{1 + K \cdot [CnNH_2]_0} \quad (3)$$

$$[MCnNH_2] = \frac{[M]_0 \cdot K \cdot [CnNH_2]_0}{1 + K \cdot [CnNH_2]_0} \quad (4),$$

где $[CnNH_2]_0$ – общая концентрация цианамида, $[M]_0$ – общая концентрация металлокомплекса.

Оптическая плотность раствора A при любой фиксированной длине волны зависит от $[CnNH_2]_0$ и описывается уравнением (5) при условии, что концентрация лиганда намного больше концентрации металлокомплекса, т.е. $\log K < 4$.^[14]

$$A_t = \frac{A_0 + A_1 \cdot K_{\text{набл}} \cdot [CnNH_2]_0}{1 + K_{\text{набл}} \cdot [CnNH_2]_0} \quad (5)$$

A_t – текущая оптическая плотность, A_0 , A_1 – оптическая плотность исходного и конечного комплексов, $K_{\text{набл}}$ – наблюдаемая константа равновесия (л/моль), зависящая от pH , $[CnNH_2]_0$ – общая концентрация цианамида.

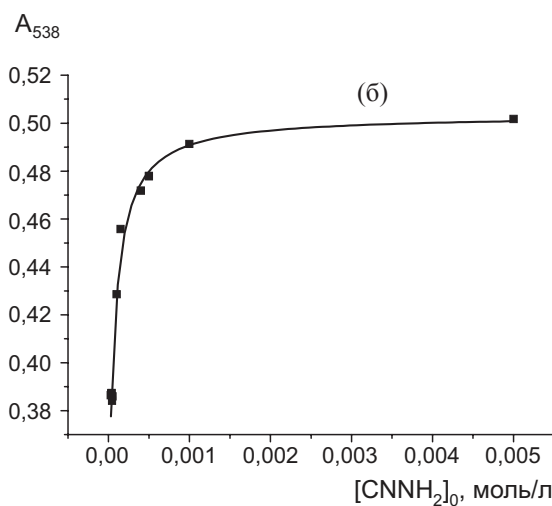
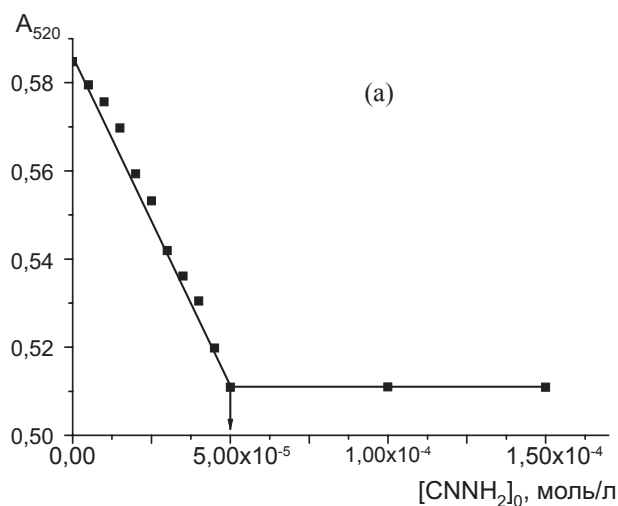


Рисунок 5. Зависимость оптической плотности от начальной концентрации $CnNH_2$ для первой (при 520 нм, (а)) и второй (при 538 нм, (б)) стадий реакции кобинамида с цианамидом: $[Cbi(III)]_0 = 5 \cdot 10^{-5}$ моль/л; $I = 1$ моль/л (KCl); pH 9.2; 25 °С.

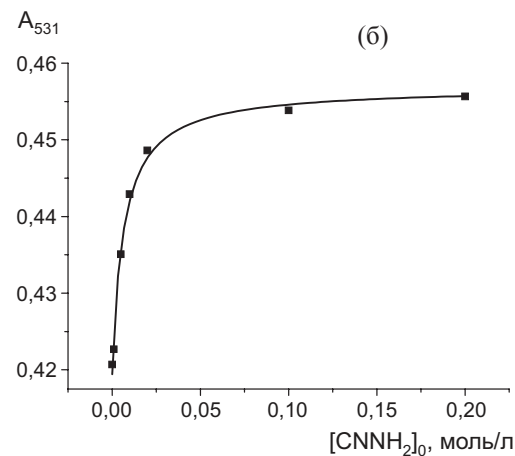
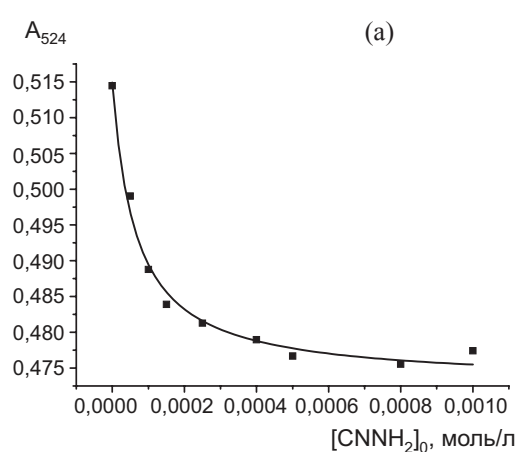


Рисунок 6. Зависимость оптической плотности при 519 нм от начальной концентрации $CnNH_2$ для первой (при 524 нм, (а)) и второй (при 531 нм, (б)) стадий реакции кобинамида с цианамидом: $[Cbi(III)]_0 = 5 \cdot 10^{-5}$ М; $I = 1$ моль/л (KCl); pH 7.4; 25 °С.

В случае, когда переход диаквакобинамида в цианамидный комплекс происходит в области концентраций цианамидов, соизмеримых с концентрацией металлокомплекса и концентрацией связанного цианамидов пренебречь нельзя, т.е. $\log K \geq 4$, зависимость оптической плотности при любой фиксированной длине волны от начальной концентрации цианамидов может быть описана уравнением (6) (вывод уравнения представлен в приложении к статье^[15]):

$$A = \{A_{\infty}(X-Y)/2K_{\text{набл.}}[M]_0\} + \{([M]_0 - (X-Y)/2K_{\text{набл.}})A_0/[M]_0\} \quad (6),$$

$$\text{где } X = K_{\text{набл.}}[MCNNH_2] + K_{\text{набл.}}[CNNH_2] + 1, \\ Y = \{X^2 - 4K_{\text{набл.}}^2 [MCNNH_2][CNNH_2]\}^{1/2}$$

Полученные с помощью уравнений (5) и (6) значения наблюдаемой константы равновесия для кобаламина и кобинамида приведены в Таблицах 1 и 2. Из данных таблиц видно, что с понижением pH константы связывания цианамидов обоими комплексами уменьшаются. Следовательно, можно полагать, что в реакции с кобаламином и кобинамидом участвует депротонированный цианамид ($pK_{a4} = 10,3$ ^[16]).

Зависимость $K_{\text{набл.1}}$, $K_{\text{набл.2}}$ и $K_{\text{набл.3}}$ от $[H^+]$ может быть описана уравнением (7):

$$K_{\text{набл.}} = K \cdot \frac{K_{a4}}{K_{a4} + [H^+]} \cdot \frac{[H^+]}{K_a + [H^+]} \quad (7),$$

$K_{\text{набл.}}$ – константа равновесия для реакции цианамидов с металлокомплексом, полученная при определенном значении pH, K_a – константа кислотно-основного равновесия металлокомплекса (реакции 8, 10), K_{a4} – константа кислотно-основного равновесия цианамидов (реакция 11), K – константа равновесия реакции цианамидов с металлокомплексом, не зависящая от pH.

С использованием уравнения (7) рассчитаны константы равновесия реакции аквакобаламина и аквагидрокобинамида с ионом цианамидов (K_1 , K_2 и K_3) (Таблицы 1, 2).

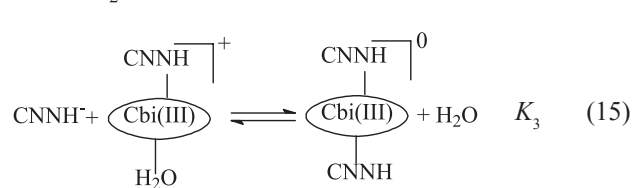
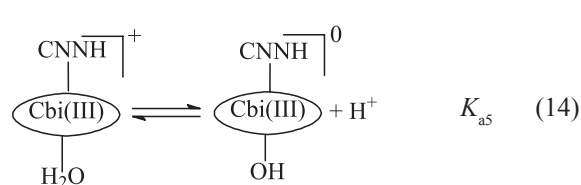
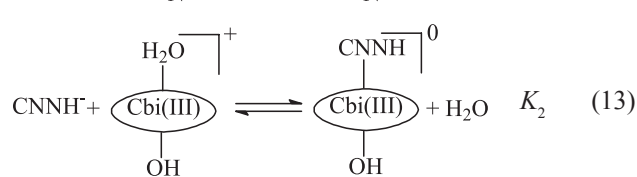
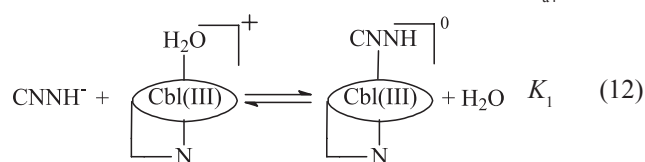
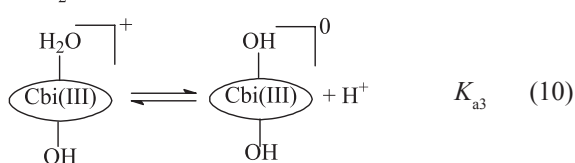
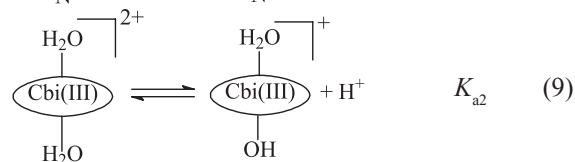
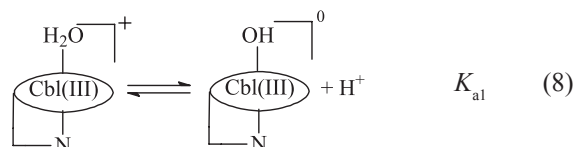
Таблица 1. Зависимость константы равновесия для реакции аквакобаламина с цианамидом от pH ($K_{\text{набл.1}}$ – наблюдаемая константа равновесия реакции присоединения молекулы цианамидов).

pH	$K_{\text{набл.1}}$, л/моль	K_1 , л/моль
4,5 ± 0,1	50 ± 12	(3,1 ± 1,0)·10 ⁷
5,5 ± 0,1	312 ± 34	(1,97 ± 0,2)·10 ⁷
6,5 ± 0,1	4254 ± 143	(2,8 ± 0,1)·10 ⁷
7,5 ± 0,1	11663 ± 745	(1,1 ± 0,1)·10 ⁷
8,5 ± 0,1	25557 ± 1537	(1,0 ± 0,1)·10 ⁷

Таблица 2. Зависимость констант равновесия для реакции кобинамида с цианамидом от pH ($K_{\text{набл.2}}$ – наблюдаемая константа равновесия реакции присоединения первой молекулы цианамидов и $K_{\text{набл.3}}$ – наблюдаемая константа равновесия присоединения второй молекулы цианамидов).

pH	$K_{\text{набл.2}}$, л/моль	$K_{\text{набл.3}}$, л/моль	K_2 , л/моль	K_3 , л/моль
6,5 ± 0,1	1707,0 ± 17,0	–	(1,1 ± 0,01)·0 ⁷	–
7,0 ± 0,1	5200,0 ± 60,0	9,0 ± 0,1	(1,0 ± 0,01)·10 ⁷	(5,7 ± 0,01)·10 ⁴
7,5 ± 0,1	25200,0 ± 3428,0	91 ± 12,0	(1,2 ± 0,2)·10 ⁷	(5,8 ± 0,13)·10 ⁴
8,5 ± 0,1	–	920 ± 60,0	–	(5,9 ± 0,07)·10 ⁴

Используя полученные данные, можно предложить следующую схему взаимодействия аквакобаламина (реакции 8, 12) и диаквакобинамида (реакции 9, 10, 13, 14, 15) с цианамидом:



Отметим, что в данной схеме в качестве активных форм указаны анион цианамидов, аквагидрокобинамид и аквацианамидокобинамид. В случае аквацианамидокобинамида нам не удалось определить константу кислотно-основного равновесия (K_{a5}) ввиду влияния на изучаемый процесс pK_{a4} цианамидов.

Константа связывания цианида кобаламином равна 10^{12} л/моль, константы связывания кобинамидом 10^{14} (для связывания первого цианид-иона) и 10^8 л/моль (для связывания второго иона цианида),^[17] что на несколько порядков выше констант связывания цианамидом. Таким образом, кобаламин и кобинамид связывают цианамид намного слабее, чем цианид. Следовательно, можно полагать, что цианамид не будет снижать эффективность действия кобаламина и кобинамида как антидотов на цианид.

Благодарность. Работа выполнена в соответствии с научной программой гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых (МК-1145.2012.3) и гранта РФФИ 11-03-00132а.

Список литературы

References

1. Kräutler B. *Biochem. Soc. Trans.* **2005**, 33, 806-810.
2. Pratt J.M. *Inorganic Chemistry of Vitamin B12*. New York: Academic Press Inc, **1972**. 347 p.
3. Wolak M., Zahl A., Schnepfenseper T., Stochel G., van Eldik R. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 9780-9791.
4. Dereven'kov I. A., Salnikov D. S., Makarov S. V., Surducun M., Silaghi-Dumitrescu R., Boss G.R. *J. Inorg. Biochem.* **2013**, 125, 32-39.
5. Salnikov D. S., Silaghi-Dumitrescu R., Makarov S. V., van Eldik R., Boss G.R. *Dalton Trans.* **2011**, 40, 9831-9834.
6. Marraffa J.M., Cohen V., Howland M.A. *Am. J. Health-Syst. Pharm.* **2012**, 69, 199-212.
7. Borron S.W., Baud F.J., Barriot P., Imbert M., Bismuth C. *Ann. Emerg. Med.* **2007**, 49, 794-801.
8. Schep L., Temple W., Beasley M. *Clin. Toxicol.* **2009**, 47, 58-60.
9. Broderick K.E., Singh V., Zhuang S., Kambo A., Chen J.C., Sharma V.S., Pilz R.B., Boss G.R. *J. Biol. Chem.* **2004**, 280, 8678-8685.
10. Chemaly S.M. *Dalton Trans.* **2008**, 42, 5766-5773.
11. Salnikov D. S., Dereven'kov I. A., Artyushina E. N., Makarov S. V. *Zh. Fiz. Khim.* **2013**, 87, 52-56 (in Russ.) [*Russ. J. Phys. Chem.* **2013**, 87, 44-48].
12. Zhou K., Zelder F. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2011**, 2011, 53-57.
13. Blackledge W.C., Blackledge C.W., Griesel A., Mahon S.B., Brenner M., Pilz R.B., Boss G.R. *Anal. Chem.* **2010**, 82, 4216-4221.
14. Marques H.M., Munro O.Q., Crawcour M.L. *Inorg. Chim. Acta.* **1992**, 196, 221-229.
15. Xia L., Cregan A.G., Berben L.A., Brasch N.E. *Inorg. Chem.* **2004**, 43, 6848-6857.
16. Güthner T., Mertschenk B. Cyanamides. In: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. John Wiley & Sons. Ltd., **2006**. pp. 6-10.
17. Brenner M., Mahon S.B., Lee J., Kim J., Mukai D., Goodman S., Kreuter K.A., Ahdout R., Mohammad O., Sharma V.S., Blackledge W., Boss G.R. *J. Biomed. Opt.* **2010**, 15(1), 017001.

Received 15.09.2012

Accepted 07.10.2013