



УДК 577.150.13

ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНОЕ РАВНОВЕСИЕ
ФЛАВИНОВ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ*Ксенжек О. С., Петрова С. А., Пинизале И. Д.**Днепропетровский химико-технологический институт*

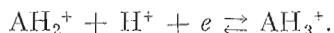
Окислительно-восстановительное равновесие в растворах рибофлавина, FMN и FAD исследовалось методом тонкослойной вольтамперометрии на золотых электродах. На диаграммах рН-потенциал построены области существования различных форм флавинов. Определены значения констант диссоциации для всех кислотно-основных и окислительно-восстановительных равновесий между сопряженными формами. Установлено, что основные различия между исследованными соединениями наблюдаются в области физиологических значений рН. В этой области образование семихинона рибофлавина происходит путем присоединения одного протона и одного электрона к окисленной форме. Для FMN реакция образования семихинона является беспротонной. FAD в этой области рН существует в виде димера, и семихинон образуется за счет присоединения одного протона и двух электронов в расчете на димер.

Флавиновые соединения (рибофлавин, FMN и FAD) играют важную роль в процессах биологического окисления [1, 2]. С этой точки зрения представляет интерес исследование их окислительно-восстановительных свойств. Редокс-потенциалы флавинов измерялись различными методами (например, полярографическим [3, 4] и потенциометрическим [5—7]), причем между данными, полученными разными авторами, имеются существенные расхождения. Как указано Байнартом [8], разброс значений равновесных потенциалов (φ_p) для рибофлавина при рН 7 превышает разность величин φ_p между рибофлавином и флавиннуклеотидами.

В настоящей работе изучено более детально, чем ранее, окислительно-восстановительное равновесие флавинов в водных растворах в широком интервале рН (см. также [9—11]).

На основании данных, полученных методом тонкослойной вольтамперометрии, были построены диаграммы состояния исследуемых систем в координатах рН — φ , представляющие окислительно-восстановительное равновесие флавинов в водных растворах (рис. 1—3). На представленных диаграммах изображены области существования различных форм исследуемых соединений; линии, разделяющие эти области, соответствуют равновесию между сопряженными формами.

На рис. 1 изображена диаграмма состояния для рибофлавина. Область 2 соответствует нейтральной окисленной форме АН, которая при рН < 7,5 переходит в катионную (АН₂⁺), а при рН > 10,1 — в анионную (А⁻). Катионная окисленная форма на первой ступени восстановления при рН < 6,3 образует семихинон АН₃⁺ по реакции



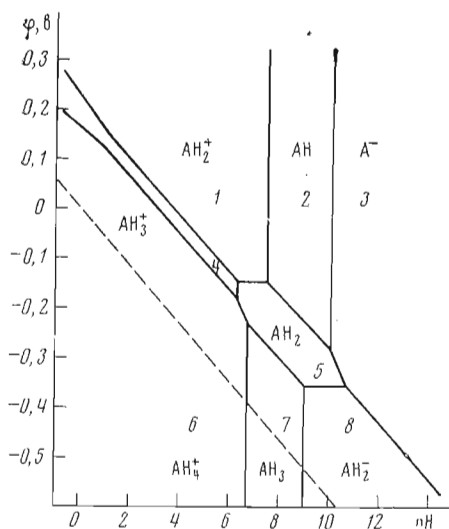


Рис. 1

Рис. 1. Диаграмма рН—φ для рибофлавина. На этом и следующих рисунках пунктирная линия — диаграмма для равновесного водородного электрода. Обозначение АН соответствует нейтральной молекуле рибофлавина

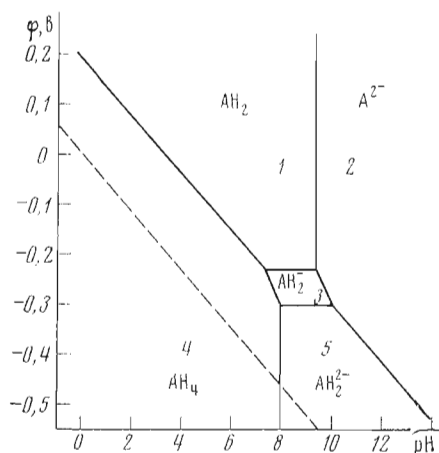


Рис. 2

Рис. 2. Диаграмма рН—φ для FMN. Обозначение АН₂ соответствует нейтральной молекуле FMN

Рис. 3. Диаграмма рН—φ для FAD. Обозначение АН соответствует нейтральной молекуле FAD. Линия Б — зависимость равновесного потенциала от рН для процессов окисления-восстановления аденинового остатка FAD (светлые кружки) и АТФ (темные кружки)

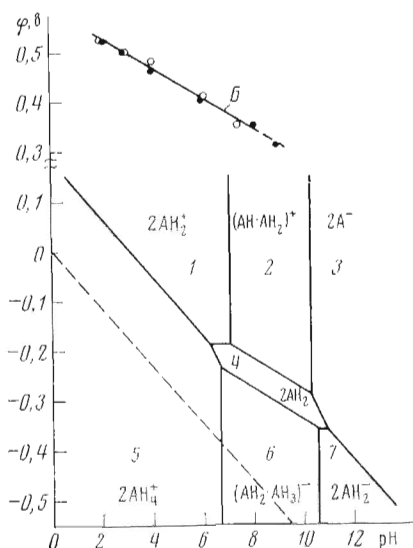


Рис. 3

На диаграмме рН — φ области существования форм АН₂⁺ и АН₃⁺ разделены линией, положение которой определяется равновесным потенциалом этой реакции:

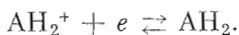
$$\varphi = \varphi^\circ + \frac{2,3RT}{nF} \lg \frac{[\text{АН}_2^+]}{[\text{АН}_3^+]} - \frac{2,3RT}{nF} \text{pH}. \quad (1)$$

При равных концентрациях окисленной и восстановленной форм уравнение (1) упрощается:

$$\varphi = \varphi^\circ - \frac{2,3RT}{nF} \text{pH}. \quad (2)$$

Таким образом, в соответствии с уравнением (2) линия перехода между формами, существующими в областях 1 и 4, представляет собой прямую с наклоном, равным 58 мВ на единицу рН.

При $6,3 < \text{pH} < 7,5$ на 1-й стадии восстановления катион АН_2^+ превращается в нейтральную промежуточную форму (семихинон АН_2):



На диаграмме $\text{pH} - \varphi$ линии перехода, разделяющей области 1 и 5, соответствует горизонтальный участок, поскольку равновесный потенциал этой реакции не зависит от pH . В области $7,5 < \text{pH} < 10,1$ семихинон АН_2 образуется за счет присоединения одного электрона и одного протона к нейтральной окисленной форме АН . Линия перехода между областями 2—5 — это прямая с наклоном $d\varphi / d\text{pH} = -58$ мВ. Области существования семихинонов АН_3^+ и АН_2 граничат по вертикальной линии (при $\text{pH} 6,3$). Соответствующее равновесие описывается реакцией



Другие вертикальные линии на диаграмме $\text{pH} - \varphi$ тоже соответствуют процессам, связанным с присоединением или отдачей протона.

Продукты полного восстановления рибофлавина существуют в катионной, нейтральной и анионной формах. Катион АН_4^+ образуется за счет присоединения одного протона и одного электрона к семихинону АН_3^+ и существует при $\text{pH} < 6,7$. В области $6,7 < \text{pH} < 9$ устойчивой является нейтральная восстановленная форма АН_3 . При $\text{pH} > 9$ образуется анион АН_2^- .

Таким образом, как видно из приведенных данных, в водных растворах возможно существование 8 форм рибофлавина, области устойчивости которых изображены на рис. 1 (семихинон АН^- , образующийся в небольших количествах в щелочной области, на диаграмме не показан). Эти формы дают соответственно 9 окислительно-восстановительных и 5 кислотно-основных равновесий. Величины pK и стандартных потенциалов для этих реакций приведены в табл. 1 и 2.

Диаграммы $\text{pH} - \varphi$ для FMN и FAD показаны на рис. 2 и 3. Как видно из рис. 2, в растворах FMN окисленное соединение существует только в двух формах — анионной и нейтральной. Соответственно при полном восстановлении FMN также образуются анионная и нейтральная формы. В области $\text{pH} 7,3-9,4$ образование семихинона происходит путем присоединения одного электрона к окисленной форме без сопутствующего присоединения протона. На диаграмме $\text{pH} - \varphi$ этой реакции соответствует горизонтальный участок, разделяющий области 1—3. Продукт полного восстановления FMN в области $\text{pH} 8-10$ образуется за счет присоединения одного электрона к семихинону АН_2^- . Этот переход также является беспротонным. На рис. 2 ему соответствует горизонтальный участок между областями 3 и 5.

Для FAD в водных растворах возможно существование трех окисленных и соответственно трех восстановленных форм. Линии перехода меж-

Таблица 1

Стандартные потенциалы окислительно-восстановительных реакций рибофлавина

Переход *	Реакция	φ° , В	Переход *	Реакция	φ° , В
1—4	$\text{АН}_2^+ + \text{H}^+ + e \rightleftharpoons \text{АН}_3^+$	+0,210	5—8	$\text{АН}_2 + e \rightleftharpoons \text{АН}_2^-$	-0,355
1—5	$\text{АН}_2^+ + e \rightleftharpoons \text{АН}_2$	-0,147	5—7	$\text{АН}_2 + \text{H}^+ + e \rightleftharpoons \text{АН}_3$	+0,162
2—5	$\text{АН} + \text{H}^+ + e \rightleftharpoons \text{АН}_2$	+0,295	5—6	$\text{АН}_2 + 2\text{H}^+ + e \rightleftharpoons \text{АН}_3^+$	+0,547
3—5	$\text{A}^- + 2\text{H}^+ + e \rightleftharpoons \text{АН}_2$	+0,880	4—6	$\text{АН}_3^+ + \text{H}^+ + e \rightleftharpoons \text{АН}_4^+$	+0,175
3—8	$\text{A}^- + 2\text{H}^+ + 2e \rightleftharpoons \text{АН}_2^-$	+0,260			

* Цифры соответствуют обозначениям на рис. 1.

рК кислотно-основного равновесия рибофлавина

Переход *	Реакция	рК	Переход *	Реакция	рК
1—2	$\text{АН}_2^+ \rightleftharpoons \text{АН} + \text{Н}^+$	7,5	6—7	$\text{АН}_4^+ \rightleftharpoons \text{АН}_3 + \text{Н}^+$	6,7
2—3	$\text{АН} \rightleftharpoons \text{А}^- + \text{Н}^+$	10,1	7—8	$\text{АН}_3 \rightleftharpoons \text{АН}_2^- + \text{Н}^+$	9,0
4—5	$\text{АН}_3^+ \rightleftharpoons \text{АН}_2 + \text{Н}^+$	6,3			

* Цифры соответствуют обозначениям на рис. 1.

Таблица 3

Стандартные потенциалы окислительно-восстановительных реакций FMN

Переход *	Реакция	φ° , В	Переход *	Реакция	φ° , В
1—4	$\text{АН}_2 + 2\text{Н}^+ + 2e \rightleftharpoons \text{АН}_4$	+0,196	3—4	$\text{АН}_2^- + 2\text{Н}^+ + e \rightleftharpoons \text{АН}_4$	+0,623
1—3	$\text{АН}_2 + e \rightleftharpoons \text{АН}_2^-$	-0,230	3—5	$\text{АН}_3^- + e \rightleftharpoons \text{АН}_2^{2-}$	-0,298
2—3	$\text{А}^{2-} + 2\text{Н}^+ + e \rightleftharpoons \text{АН}_2^-$	+0,857	2—5	$\text{А}^{2-} + 2\text{Н}^+ + 2e \rightleftharpoons \text{АН}_2^{2-}$	+0,280

* Цифры соответствуют обозначениям на рис. 2.

Таблица 4

рК кислотно-основного равновесия FMN

Переход *	Реакция	рК	Переход *	Реакция	рК
1—2	$\text{АН}_2 \rightleftharpoons \text{А}^{2-} + 2\text{Н}^+$	9,4	4—5	$\text{АН}_4 \rightleftharpoons \text{АН}_2^{2-} + 2\text{Н}^+$	7,95

* Цифры соответствуют обозначениям на рис. 2.

Таблица 5

Стандартные потенциалы окислительно-восстановительных реакций FAD

Переход *	Реакция	φ° , В	Переход *	Реакция	φ° , В
1—5	$2\text{АН}_3^+ + 4\text{Н}^+ + 4e \rightleftharpoons 2\text{АН}_4^+$	+0,182	3—7	$2\text{А}^- + 4\text{Н}^+ + 4e \rightleftharpoons 2\text{АН}_2^-$	+0,275
			4—7	$2\text{АН}_2 + 2e \rightleftharpoons 2\text{АН}_2^-$	-0,360
1—4	$2\text{АН}_3^+ + 2e \rightleftharpoons 2\text{АН}_2$	-0,187	4—6	$2\text{АН}_2 + \text{Н}^+ + 2e \rightleftharpoons (\text{АН}_2 \cdot \text{АН}_3)^-$	-0,045
2—4	$(\text{АН} \cdot \text{АН}_2)^+ + \text{Н}^+ + 2e \rightleftharpoons 2\text{АН}_2$	+0,020	4—5	$2\text{АН}_2 + 4\text{Н}^+ + 2e \rightleftharpoons 2\text{АН}_4^+$	+0,540
3—4	$2\text{А}^- + 4\text{Н}^+ + 2e \rightleftharpoons 2\text{АН}_2$	+0,905			

* Цифры соответствуют обозначениям на рис. 3.

Таблица 6

рК кислотно-основного равновесия FAD

Переход *	Реакция	рК	Переход *	Реакция	рК
1—2	$2\text{АН}_2^+ \rightleftharpoons (\text{АН} \cdot \text{АН}_2)^+ + \text{Н}^+$	7,1	5—6	$2\text{АН}_4^+ \rightleftharpoons (\text{АН}_2 \cdot \text{АН}_3)^- + 3\text{Н}^+$	6,7
2—3	$(\text{АН} \cdot \text{АН}_2)^+ \rightleftharpoons 2\text{А}^- + 3\text{Н}^+$	10,3	6—7	$(\text{АН}_2 \cdot \text{АН}_3)^- \rightleftharpoons 2\text{АН}_2^- + \text{Н}^+$	10,6

* Цифры соответствуют обозначениям на рис. 3.

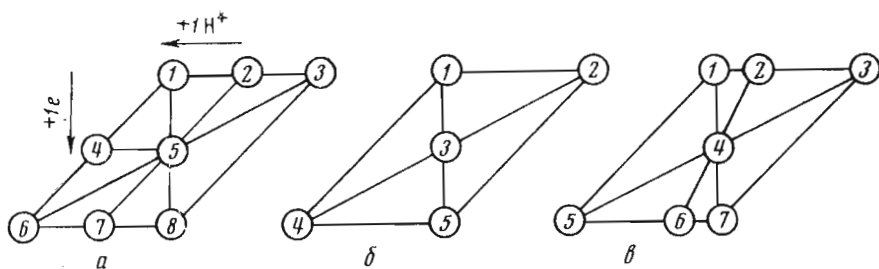


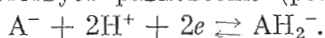
Рис. 4. Схема возможных процессов для рибофлавина (а), FMN (б) и FAD (в)

ду областями 2—4 и 4—6 (рис. 3) имеют наклон 29 мВ на единицу pH, что соответствует присоединению половины протона на один электрон в реакции восстановления. Это может быть обусловлено тем, что FAD в этой области pH находится в димерной форме. Таким образом, переход из окисленной формы в промежуточную и далее в восстановленную происходит с присоединением одного протона и двух электронов на каждый димер FAD. Нейтральная молекула FAD (АН) в водных растворах не существует, а входит в состав димера $(АН \cdot АН_2)^+$, образующегося в этой области pH.

Значения pK и стандартных потенциалов для всех кислотно-основных и окислительно-восстановительных равновесий в растворах FMN и FAD приведены в табл. 3—6.

Общая схема возможных процессов для исследованных соединений показана на диаграммах (рис. 4).

Цифры на диаграммах соответствуют обозначениям форм на рис. 1—3, а отрезки — возможным переходам между ними. Например, переход 3—8 для рибофлавина соответствует равновесию (реакция 3—8 в табл. 1):

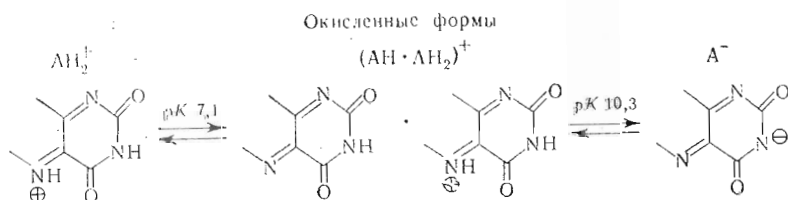


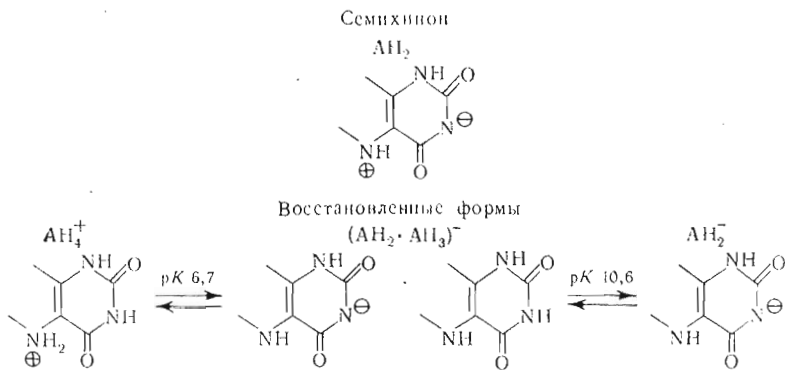
Позиции 2,6 для FAD формально соответствуют половине димерной формы.

Следует заметить, что рассматриваемые равновесия относятся к той части молекулы флавина, которая непосредственно участвует в окислительно-восстановительных процессах. Это атомы азота $N_{(1)}$, $N_{(3)}$ и $N_{(10)}$ изоаллоксазинового кольца и связанные с ним протоны. Определенные кислотно-основные свойства может проявлять и рибозо-фосфатно-адениновый остаток молекулы, однако эти свойства при данном способе исследования не фиксировались.

Возможные структуры различных форм флавинов, существующие в водных растворах, предположительно могут быть следующими. Все катионные формы рибофлавина (окисленная, промежуточная и восстановленная) имеют дополнительный протон, вероятно, у атома азота $N_{(10)}$. Анионные формы рибофлавина отличаются от нейтральных отсутствием протона у азота $N_{(3)}$. Для анионных FMN форм (A^{2-} , AH^{2-} , AH_2^{2-}), образующихся в щелочной области, характерно отсутствие двух протонов по сравнению с соответствующими нейтральными. Один протон может отщепляться от атома азота $N_{(3)}$, а другой от фосфатной группы.

Структуры основных форм FAD могут быть изображены следующим образом:





В молекуле FAD кроме изоаллоксазинового кольца электрохимическую активность проявляет также адениновый цикл. Процесс окисления-восстановления аденинового остатка протекает при значительно более положительных потенциалах, чем основная реакция (рис. 3). Следует отметить, что реакция восстановления аденина в молекуле FAD (на золотом электроде) идет только в кислых и нейтральных растворах (pH ≤ 8). В щелочной области эта часть молекулы, очевидно, блокирована. Аналогичные результаты получаются при восстановлении молекулы АТР, которая, собственно, соответствует фосфатрибозоадениновой цепи FAD.

Характерной особенностью исследованных соединений является их способность к образованию семихинонов вблизи физиологических значений pH. Основные различия между такими родственными соединениями, как рибофлавин, FMN и FAD, заключаются в структуре семихиноновой зоны. У рибофлавина и FAD эта зона находится при pH 6—10, а у FMN — только при pH 7,5—9,5. Образование семихинона в этой зоне у всех трех соединений протекает по-разному. В случае рибофлавина переход от окисленной формы к семихинону осуществляется путем присоединения одного электрона и одного протона на молекулу. Для FMN — это беспротонная реакция. Семихинон FAD образуется за счет присоединения одного протона на два электрона (в расчете на димер). Вероятно, с этим обстоятельством связаны некоторые особенности биохимического действия различных флавинов.

Количество семихинонов, образующихся вблизи нейтральной области pH, довольно велико и может достигать в максимуме 90% от общей концентрации для рибофлавина, 65% — для FMN и 60% — для FAD. За пределами физиологических значений pH также образуются семихиноны, но в значительно меньшем количестве. В щелочных растворах максимальное содержание промежуточной формы для всех исследованных соединений составляет ~30% от общей концентрации. В кислой области количество семихинонов неодинаково для разных флавинов. Максимальная концентрация равна 47% для рибофлавина, 30% для FAD и 16% для FMN.

Наличие большого количества семихинонов в физиологической области pH, по-видимому, не является случайным и может играть существенную роль в биологических процессах. Поскольку в цепи переноса электронов флавины стоят в звене, где, возможно, осуществляется переход от двух-электронного процесса к одноэлектронному (в цитохромах), то семихиноны могут быть тем функциональным механизмом, который обеспечивает этот переход [12].

Полученные нами результаты можно сопоставить с известными данными. Кислотно-основное равновесие флавинов в водных растворах изучалось различными методами: титрованием [13, 14], спектрофотометрически [15, 16] и потенциометрически [5—7]. Для реакции перехода нейтральной окисленной формы рибофлавина в анионную получены следующие значе-

ния pK : 9,5 [5], 9,93 [13] и 10,2 [15]. Полученное нами значение равно 10,4. Для окисленного FAD эта величина равна 10,4 [7] и 10,5 [16] (по нашим данным 10,3). Величина pK для семихинона рибофлавина равна 6,5 [6] (по нашим данным 6,3). Для восстановленного рибофлавина реакция диссоциации катионной формы характеризуется значением pK 6,2 [5] (по нашим данным 6,7). Для FAD полученная нами для этого процесса величина pK совпадает с данными работы [7] и равна 6,7.

Основные расхождения в значениях констант диссоциации наблюдаются для FMN. Ранее для окисленной формы FMN были получены величины pK 10,1 [14], 10,2 [16] и 10,4 [7], для восстановленного FMN — 6,7 [7]. По нашим данным, величины pK для окисленной и восстановленной формы FMN равны соответственно 9,4 и 7,95.

Окислительно-восстановительное равновесие FMN и FAD в широком интервале pH изучалось Лоуз и Кларком [7]. Полученные этими авторами и нами диаграммы pH — φ для FAD в области низких и высоких значений pH идентичны. Область существования семихинонов в работе Лоуз и Кларка [7] показана одной линией с наклоном 29 мВ на единицу pH. По данным этих авторов, диаграммы pH — φ для FMN и FAD практически одинаковы. Однако, как следует из нашего исследования, вблизи биологической области pH между этими соединениями имеются существенные различия.

Экспериментальная часть

Исследование проводили методом тонкослойной вольтамперометрии на золотых электродах [17]. Растворы, содержащие окисленную форму исследуемого вещества в 10^{-3} M концентрации при общей ионной силе 2, помещали в ячейку с очень малым объемом рабочего пространства ($2 \cdot 10^{-3}$ см³). Циклические вольтамперные кривые регистрировали при линейном изменении потенциала рабочего электрода. Благодаря малому объему ячейки и медленной развертке потенциала, в ячейке не возникало заметного градиента концентрации. При этом сводились к минимуму ограничения, обусловленные диффузией разряжающихся частиц к электроду. На вольтамперной кривой каждому электрохимическому процессу соответствовал определенный пик тока, положение которого определялось химическими свойствами изучаемой системы, а величина — концентрацией реагирующего компонента. По расположению пиков на кривых определяли равновесные потенциалы каждой стадии реакции восстановления флавинов. Более подробно методика проведения эксперимента описана ранее [9].

ЛИТЕРАТУРА

1. Б. Пюльман, А. Пюльман (1965) Квантовая биохимия, стр. 413—415, «Мир», М.
2. Г. Малер, Ю. Кордес (1970) Основы биологической химии, стр. 230—232, «Мир», М.
3. J. R. Merkel, W. J. Nickerson (1954) *Biochim. et biophys. acta*, **14**, 303—311.
4. R. C. Kaye, H. I. Stonehill (1952) *J. Chem. Soc.*, 3244—3247.
5. L. Michaelis, M. P. Schubert, C. V. Smythe (1936) *J. Biol. Chem.*, **116**, 587—607.
6. L. Michaelis, G. Schwarzenbach (1938) *J. Biol. Chem.*, **123**, 527—536.
7. H. J. Lowe, W. M. Clark (1956) *J. Biol. Chem.*, **221**, 983—989.
8. H. Beinert (1960) in *The Enzymes*, ed. by P. Boyer, H. Lardy, Academic Press, New York — London, 369—370.
9. О. С. Ксаяжек, С. А. Петрова (1973) *Электрохимия*, **9**, 1385—1390.
10. О. С. Ксаяжек, С. А. Петрова, И. Д. Пиннэлл (1975) *Электрохимия*, **11**, 832—836.
11. О. С. Ксаяжек, С. А. Петрова, И. Д. Пиннэлл (1975) *Электрохимия*, **11**, 1265—1268.
12. Л. Ингрэм (1964) Механизмы биохимических реакций, стр. 111—115, «Мир», М.
13. A. Albert (1953) *Biochem. J.*, **54**, 646—654.
14. P. Cerletti (1959) *Anal. chim. acta*, **20**, 243—250.
15. R. Kuhn, G. Moruzzi (1934) *Ber.*, **67**, 888—891.
16. E. Walaas, O. Walaas (1956) *Acta chem. scand.*, **10**, 122—133.
17. A. T. Hubbard (1969) *J. Electroanal. Chem.*, **22**, 165—174.

Поступила в редакцию
13.XI.1974

REDOX EQUILIBRIA OF FLAVIN SYSTEMS IN AQUEOUS MEDIA

KSENZHEK O. S., PETROVA S. A., PINIELLE I. D.

Institute of Chemical Technology, Dnepropetrovsk

Redox equilibria of flavin systems such as riboflavin, FMN and FAD were studied by the method of thin layer voltammetry on gold electrodes. The stability ranges of different flavin forms were shown on pH-potential diagrams. The ionization constants and standard potentials for all acid-base and redox equilibria between the conjugated forms were determined. The main differences in redox properties were observed at physiological pH where semiquinone formation in the case of riboflavin proceeds by addition of one electron and one proton to the oxidized form and that with FMN- by addition of electron only. In this pH range FAD exists as a dimer and its semiquinone is formed by the adding of one proton and two electrons per dimer.
