

УДК 544.51:544.523.2:547.854.4

СПЕКТРАЛЬНО-ЛЮМИНЕСЦЕНТНОЕ И СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ И АНИОННЫХ ФОРМ N-МЕТИЛПРОИЗВОДНЫХ 5-ФТОРУРАЦИЛА В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ

© 2022 г. С. С. Остахов^{а, *}, Г. С. Абдрахимова^а, Р. Р. Каюмова^а, С. П. Иванов^а, С. Л. Хурсан^а

^аУфимский институт химии УФИЦ РАН, просп. Октября, 71, Уфа, 450054 Россия

*E-mail: chemlum@anrb.ru

Поступила в редакцию 23.12.2021 г.

После доработки 10.01.2022 г.

Принята к публикации 14.01.2022 г.

Спектрофотометрическим и флуоресцентным (ФЛ) методами исследованы растворы N-метилпроизводных 5-фторурацила (FU): 1-метил-5-фторурацил (1М-FU), 3-метил-5-фторурацил (3М-FU) и 1,3-диметил-5-фторурацил (1,3DM-FU) в нейтральной (рН 6.8) и щелочной (рН 11) водных средах. Впервые зарегистрированы параметры флуоресценции (ФЛ): спектры и квантовые выходы (φ) ФЛ 1М-FU, 3М-FU и 1,3DM-FU, а также их анионных форм. Обнаружены батофлорные сдвиги максимумов ФЛ и увеличение квантовых выходов ФЛ данных соединений по сравнению с незамещенным FU при рН 6.8 и рН 11. Приводится интерпретация установленных закономерностей.

Ключевые слова: флуоресценция, спектрофотометрия, метилпроизводные 5-фторурацила, пиримидиновые основания, анионы

DOI: 10.31857/S0023119322030081

С середины XX века известно, что природные урацилы являются компонентами нуклеиновых кислот [1]. В это же время были открыты медико-биологические свойства некоторых замещенных пиримидинов. В частности, были синтезированы 5-галоурацилы (F⁻, Cl⁻, Br⁻, J⁻), обладающие ярко выраженными противоопухолевыми, антибактериальными и противовирусными свойствами [2, 3]. В настоящее время 5-фторурацил (фармацевтические препараты: “Фторурацил-ЛЭНС”, “5-Фторурацил-Эбеве”) широко используется в онкологии при лечении опухолей толстого кишечника, желудка, поджелудочной железы, легких и метастазах в эти органы [4]. Метилированные производные урацила, в частности, 6-метилурацил (лекарственный препарат “Метилурацил”) эффективно применяется как иммуностимулятор, улучшающий трофику и регенерацию тканей [5], проявляет выраженные гепатопротекторные и антиоксидантные свойства [6], а его 5-гидрокси-производное демонстрирует выраженный антигипоксический эффект [6].

В 1953 г. Уотсоном и Криком было высказано предположение, что редкие таутомерные формы нуклеиновых кислот способны вызывать нарушения в репликации ДНК [1]. Позже в работе [7] подобное поведение было обнаружено и у их анион-

ных форм. В 60-е годы прошлого века, в работах [8, 9] спектрофотометрическим методом исследованы водные растворы всего ряда 5- и 6-галогенурацилов, а также их метилзамещенных производных. Определены константы первой и второй ступеней диссоциации, установлено процентное содержание моноанионных форм 5-фторурацила [8–10].

Известно, что урацил и его производные обладают флуоресценцией [11, 12]. Спектрально-люминесцентный метод, позволяет не только регистрировать низкие концентрации пиримидиновых оснований в растворах [11, 12], и кристаллическом состоянии [13, 14], но также исследовать их кетосольные [14–17] и анионные формы [12].

В то же время, несмотря на большой объем проведенных исследований с использованием различных физико-химических методов, ФЛ изучение анионных форм урацилов носило эпизодический характер. В этой связи целью настоящей работы являлось определение и сравнительный анализ спектрально-люминесцентных параметров метилпроизводных 5-фторурацила (FU): 1-метил-FU (1М-FU), 3-метил-FU (3М-FU) и 1,3-диметил-FU (1,3DM-FU) и их анионных форм в нейтральных (рН 6.8) и щелочных (рН 11.0) водных растворах.

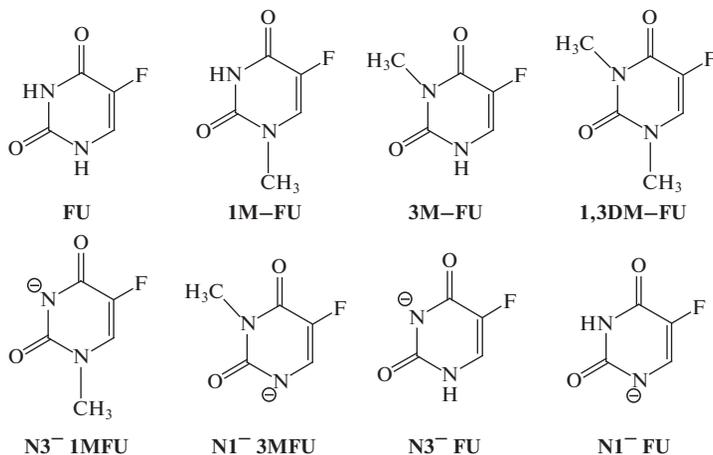


Рис. 1. Структурные формулы молекулярных и анионных форм 5-фторурацила и его метилпроизводных.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре “Shimadzu UV-1800”, скорректированные спектры ФЛ на спектрофлюориметре “СМ-2203” в кварцевой кювете ($l = 1$ см). Фотовозбуждение образцов проводили на длине волны возбуждающего света $\lambda_{\text{ex}} = 250$ нм. Спектры ФЛ записаны в интервале длин волн эмиссии $\lambda_{\text{em}} = 300\text{--}500$ нм с разрешением ± 2 нм.

Квантовые выходы ФЛ определяли по известной методике [18] с использованием внешнего стандарта L-триптофана (Трп) по уравнению (1):

$$\phi = \phi_{\text{Трп}} (SA_{\text{Трп}}) / (S_{\text{Трп}}A), \quad (1)$$

где ϕ – квантовый выход ФЛ субстрата, $\phi_{\text{Трп}}$ – квантовый выход ФЛ Трп ($\phi_{\text{Трп}} = 0.14$ [19]), S и A – светосумма под полосой ФЛ и оптическая плотность по поглощению субстрата на длине волны возбуждающего света, соответственно, $S_{\text{Трп}}$ и $A_{\text{Трп}}$ – то же для триптофана.

1M-FU, 3M-FU и 1,3DM-FU синтезированы по методике [20]. FU (“Sigma-Aldrich”, $\geq 99.0\%$), Трп (“Sigma-Aldrich”, 99.5%) и КОН квалификации “х. ч.” использовали без предварительной очистки. Растворы FU и его метилпроизводных ($c = 1.0 \times 10^{-5}$ моль/л) готовили в дважды перегнанной воде при pH 6.8 и 11.0.

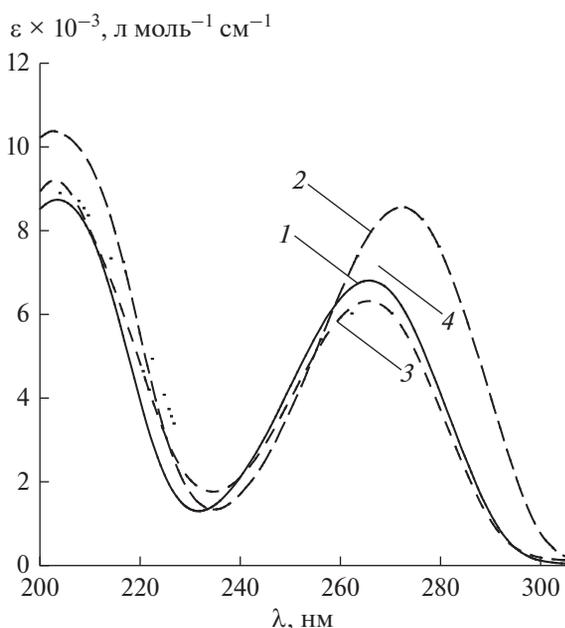


Рис. 2. Спектры поглощения: 1 – FU, 2 – 1M-FU, 3 – 3M-FU, 4 – 1,3DM-FU ($c = 1.0 \times 10^{-5}$ моль/л, H_2O , pH 6.8, 298 К).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Введение CH_3 -заместителей в N1, N3-положение FU позволяет провести достоверное отнесение УФ- и ФЛ-спектров молекулярных (pH 6.8) и анионных (pH 11.0) форм метилпроизводных FU (рис. 1), а также определить их спектрально-люминесцентные параметры.

Известно, что при введении алкильных заместителей в пиримидиновое основание в УФ- и ФЛ-спектрах регистрируются: батохромные и батофлорные сдвиги, гиперхромные эффекты, а также увеличение ϕ ФЛ в нейтральных водных растворах [8, 11].

На рис. 2 приведены спектры поглощения нейтральных (pH 6.8) водных растворов FU и его метилпроизводных (рис. 1).

При сопоставлении максимумов поглощения (λ_{abs}) и молярных десятичных коэффициентов поглощения (ϵ) исследованных соединений обнаружено, что введение CH_3 - заместителя в N1 положение FU приводит к батохромному сдвигу на ≈ 8 нм и гиперхромному эффекту (рис. 2, спектр 2, табл. 1).

Таблица 1. Спектральные характеристики молекулярных и анионных форм водных растворов FU и его метилпроизводных ($c = 1.0 \times 10^{-5}$ моль/л, $\lambda_{\text{ex}} = 250$ нм, H_2O , 298 К)

Соединение	Поглощение		Люминесценция	
	λ_{abs} , нм	$\varepsilon \times 10^{-3}$, л моль $^{-1}$ см $^{-1}$	λ_{em} , нм	$\phi \times 10^4$
		рН 6.8		
FU	266	6.8	340	2.2
1M-FU	274	8.6	367	11.5
3M-FU	266	6.3	363	6.7
1,3DM-FU	273	7.6	340	2.0
		рН 11.0		
N1-FU	300 ¹	—	372 ¹	35 ¹
N3-FU	269 ¹	—	358 ¹	11 ¹
N3-1M-FU	272	3.6	367	12.0
N1-3M-FU	293	9.1	375	41.5

Примечание. ¹ – данные работы [12]. Погрешность измерений $\pm 5\%$.

Спектральные характеристики 3M-FU идентичны 5-фторурацилу (рис. 2, спектр 3, табл. 1). В то же время, параметры поглощения 1,3DM-FU (рис. 2, спектр 4, табл. 1) близки к таковым для 1M-FU. Аналогичные тенденции наблюдались в работе [8] при введении CH_3 -заместителей в N1 и N3 положения 5-бромурацила (1M-BrU, 3M-BrU и 1,3DM-BrU), а также в ряду метилпроизводных урацила [11].

Из вышеприведенных результатов следует, что кардинальное влияние на энергию S_0-S_1 перехода оказывает наличие CH_3 группы именно в N1, а не N3 положении 5-фторурацила. Теоретическая трактовка данного экспериментального факта дана в работе [11]. Квантово-химические расчеты проводились с помощью метода РСМ-TD-РВЕО для тетрагидратной модели первой сольватной оболочки FU. Показано, что вклад N3 атома урацила в граничные орбитали очень мал, поэтому заместитель в третьем положении не приводит к значительному сдвигу электронного S_0-S_1 перехода. Напротив, CH_3 -группа в положении N1 и атом фтора в C5 положении пиримидинового цикла дают антисвязывающий вклад в НОМО орбиталь, тем самым увеличивая ее энергию. Эти заместители оказывают антисвязывающий эффект и на LUMO орбиталь, но значительно меньший, чем в НОМО. Энергетический зазор между НОМО и LUMO при введении заместителей уменьшается, что приводит к батохромному сдвигу S_0-S_1 перехода по отношению к таковому в незамещенном урациле [11].

Остается невыясненным вопрос о влиянии метилирования на S_1-S_0 излучательные переходы FU в электронно-возбужденном состоянии. В спектре ФЛ в результате присоединения CH_3 -группы в N1 положение FU в нейтральных (рН 6.8) водных

растворах регистрируются батохромный сдвиг (≈ 27 нм) и увеличение квантового выхода ФЛ 1M-FU в 5 раз (рис. 3, спектр 2, табл. 1).

Батохромный сдвиг и гиперхромный эффект в УФ-спектрах 1M-FU, как было показано выше, не столь значителен. Введение метильного заместителя в N3 положение пиримидинового основания, в отличие от УФ-спектров, также приводит к длинноволновому смещению ФЛ 3M-FU (≈ 23 нм) (рис. 3, спектр 3) и повышению его квантового выхода ФЛ в 3 раза (табл. 1). Очевидно влияние электронного возбуждения на спектрально-люминесцентные параметры FU вследствие присоединения CH_3 -группы как в N1, так

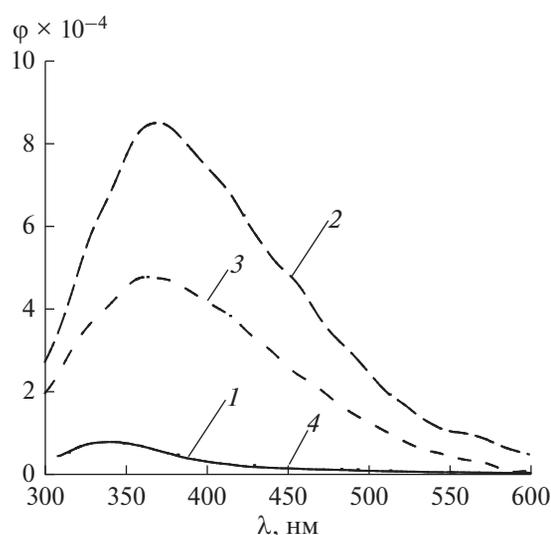


Рис. 3. Спектры ФЛ: 1 – FU, 2 – 1M-FU, 3 – 3M-FU, 4 – 1,3DM-FU ($c = 1.0 \times 10^{-5}$ моль/л, $\lambda_{\text{ex}} = 250$ нм, H_2O , рН 6.8, 298 К).

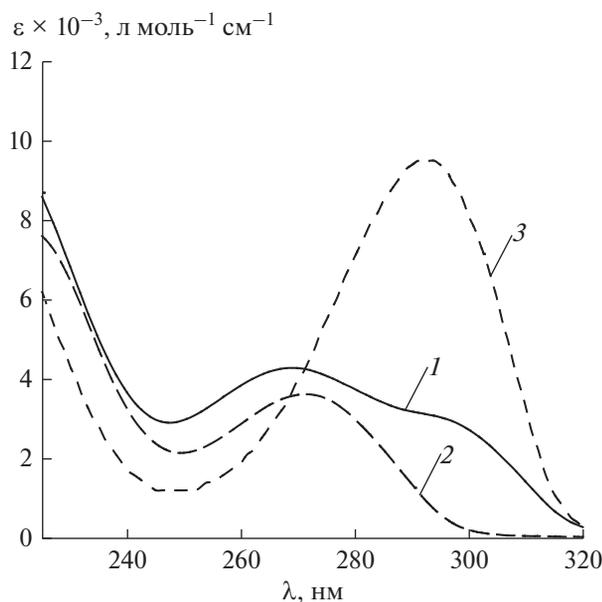


Рис. 4. Спектры поглощения: 1 – FU, 2 – 1M-FU, 3 – 3M-FU ($c = 1.0 \times 10^{-5}$ моль/л, H_2O , pH 11.0, 298 K).

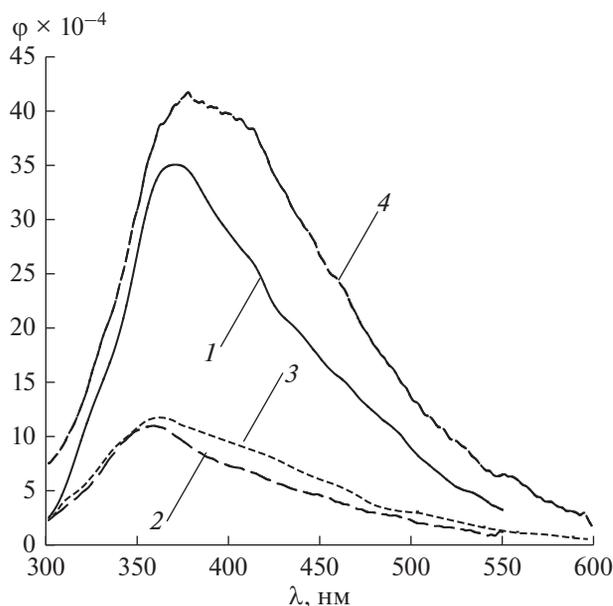


Рис. 5. Спектры ФЛ: 1 – N1⁻FU [11], 2 – N3⁻FU [11], 3 – N3⁻1M-FU, 4 – N1⁻3M-FU ($c = 1.0 \times 10^{-5}$ моль/л, $\lambda_{ex} = 250$ нм, H_2O , pH 11.0, 298 K).

и в N3 положении пиримидинового основания. Таким образом, с одной стороны, спектральные сдвиги и рост ϕ ФЛ при метилировании N1 и N3 положения FU более значительны для S_1-S_0 чем для S_0-S_1 переходов, с другой, – доминирующее влияние CH_3 группы в N1 положении FU не столь существенно в его электронно-возбужденном состоянии (табл. 1). Для 1,3DM-FU, переход S_0-S_1 в поглощении соответствует таковому для 1M-FU, а в электронно-возбужденном состоянии спектрально-люминесцентным параметрам 5-фторурацила (табл. 1).

Выше было приведено сравнительное исследование влияния метилирования FU на его УФ- и ФЛ-спектральные параметры в нейтральных (pH 6.8) водных растворах. Представляет интерес изучение депротонирования метилпроизводных FU в щелочных (pH 11) водных растворах. На рис. 4 приведены УФ-спектры анионных форм FU и его метилпроизводных: N3⁻FU, N1⁻FU, N1⁻3M-FU, N3⁻1M-FU (рис. 1).

Ранее [12] спектр поглощения FU в водных растворах при pH 11 (рис. 4, спектр 1) с максимумом $\lambda_{abs} = 269$ нм и перегибом в области 300 нм был отнесен к анионам N3⁻FU и N1⁻FU соответственно (рис. 1, табл. 1). Из сравнения спектральных параметров, приведенных на рис. 4 и в табл. 1, очевидно совпадение, в пределах погрешности измерений, максимумов поглощения N1⁻FU с N1⁻3M-FU и N3⁻FU с N3⁻1M-FU. Депротонирование N1 положения FU, также как и метилирование, оказывает наибольшее влияние на УФ-спектры 5-фторурацила (табл. 1). Однако, в спек-

тре поглощения N1⁻3M-FU (рис. 4, спектр 3), в отличие от его молекулярной формы (рис. 2, спектр 3), фиксируется существенный батохромный сдвиг на ≈ 27 нм и гиперхромный эффект (табл. 1). В то же время значения максимумов поглощения молекулярной и анионной форм 1M-FU (табл. 1) значительно не изменяются, а молярный десятичный коэффициент поглощения при образовании аниона N3⁻1M-FU, напротив, уменьшается в ≈ 2 раза. Следует отметить, что аналогичная тенденция в изменениях спектральных параметров при переходе из молекулярной формы в анионную прослеживается при исследовании щелочных (pH 10–14) водных растворов 1M-BrU, 3M-BrU и 1,3DM-BrU [8].

Таким образом, аналогично метилированию FU в нейтральных водных растворах (pH 6.8), его депротонирование по N1 положению (pH 11.0), также оказывает наибольшее влияние на его спектрофотометрические параметры.

На рис. 5 представлены спектры ФЛ щелочных (pH 11.0) водных растворов FU и его метилзамещенных производных.

В спектре ФЛ (рис. 5, спектр 2) в результате присоединения CH_3 -группы в N1 положение FU регистрируются существенный батофлорный сдвиг (27 нм) и увеличение квантового выхода ФЛ 1M-FU в 5 раз (табл. 1). Наличие метильного заместителя в N3 положение пиримидинового основания, также как в нейтральных водных растворах, приводит к длинноволновому смещению в

спектре ФЛ 3М-FU (23 нм) (рис. 5, спектр 3) и повышению ф ФЛ в 3 раза (табл. 1).

Как в спектральных параметрах поглощения, так и ФЛ анионов незамещенного [12] и метилзамещенных производных FU при pH 11 можно отметить их совпадение в пределах погрешности измерений (табл. 1). Максимумы УФ-поглощения: N1-FU и N1-3MFU – $\lambda_{\text{abs}} = 300$ и 293 нм; N3-FU и N3-1MFU – $\lambda_{\text{abs}} = 269$ и 272 нм. Максимумы ФЛ: N1-FU и N1-3MFU – $\lambda_{\text{em}} = 372$ и 275 нм; N3-FU и N3-1MFU – $\lambda_{\text{em}} = 358$ и 367 нм. Величины ф ФЛ: N1-FU и N1-3MFU – $\phi = 35.0$ и 41.5×10^4 ; N3-FU и N3-1MFU – $\phi = 11.0$ и 12.0×10^4 соответственно (табл. 1).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из анализа полученных результатов следует, что изменение pH существенного влияния на УФ и ФЛ спектры, а также ф люминесценции 1М-FU не оказывает. Однако введение CH_3 -группы в N1 положение и депротонирование N1 положения 3М-FU приводит к значительному длинноволновому сдвигу в УФ и ФЛ спектрах, гиперхромному эффекту и увеличению ф люминесценции (табл. 1).

В работе [12] показано, что в ряду FU, N3-FU, N1-FU длинноволновый сдвиг в УФ и ФЛ спектрах коррелируется с увеличением расчетной величины – константой магнитного экранирования (σ), полученной в рамках метода ядерно-независимых химических сдвигов [21, 22]. Константа магнитного экранирования является одним из критериев увеличения степени сопряжения в пиримидиновом цикле, а значит и ароматичности [23]. Такая достаточно стабильная структура способна сохранять индуцированный кольцевой ток в цикле при воздействии магнитного поля извне, что приводит к уменьшению безызлучательных потерь энергии [24] и, соответственно, увеличению ф ФЛ.

Таким образом, полученные результаты могут быть непротиворечиво интерпретированы с точки зрения увеличения степени сопряжения и, как следствие, повышение стабильности в пиримидиновом цикле при метилировании и депротонировании FU и его производных, а квантовый выход ФЛ можно рассматривать как количественную оценку ароматичности.

БЛАГОДАРНОСТИ

Спектрально-люминесцентные измерения выполнены на оборудовании ЦКП “Химия” УФИХ УФИЦ РАН и РЦКП “Агидель” УФИЦ РАН.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках Государственного задания по темам НИР УФИХ УФИЦ РАН: “Механизм и кинетические закономерности окислительных трансформаций с участием высокоактивных интермедиатов

в химических и биохимических процессах”, “Установление структуры, состава и физико-химических свойств органических, биоорганических, полимерных молекул и комплексных соединений методами хроматографии, масс-спектрометрии, ИК, УФ, ЭПР и ЯМР-спектроскопии”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Watson J.D., Crick F.H.C.* // Nature. 1953. V. 171. № 4361. P. 964.
2. *Blackburn G.M., Gait M.J.* (Eds.) Nucleic Acids in Chemistry and Biology. N.Y.: Oxford University Press, 1996. 470 p.
3. *Morris S.M.* // Mutat. Res. 1993. V. 297. P. 39.
4. *Машковский М.Д.* Лекарственные средства. М.: Новая волна, 2002. Т. 2. 608 с.
5. Большая Медицинская Энциклопедия / Под ред. Петровского Б.В.: М.: “Советская энциклопедия”, 3-е издание. 1981. Т. 15. 576 с.
6. *Gimadieva A.R., Myshkin V.A., Mustafin A.G., Chernyshenko Y.N., Borisova N.S., Zimin Y.S., Abdrakhmanov I.B.* // Pharm. Chem. J. 2014. V. 48. P. 93.
7. *Sowers L.C., Shaw B.R., Veigl M.L., Sedwick W.D.* // Mutation Research. 1987. V. 177. P. 201.
8. *Berens K., Shugar D.* // Acta Biochimica Polonica. 1963. V. 10. № 1. P. 25.
9. *Wempen I., Fox J.J.* // J. Am. Chem. Soc. 1964. V. 86. № 12. P. 2474.
10. *Abdrakhimova G.S., Ovchinnikov M.Yu., Lobov A.N., Spirikhin L.V., Ivanov S.P., Khursan S.L.* // Journal of Physical Organic Chemistry. 2014. V. 27. P. 876.
11. *Gustavsson T., Bányász Á., Lazzarotto E., Markovitsi D., Scalmani G., Frisch M.J., Barone V., Improta R.* // J. Am. Chem. Soc. 2006. V. 128. № 2. P. 607.
12. *Остахов С.С., Султанбаев М.В., Овчинников М.Ю., Каюмова Р.Р., Хурсан С.Л.* // Химия высоких энергий. 2017. Т. 51. № 2. С. 116.
13. *Остахов С.С., Султанбаев М.В., Хурсан С.Л., Шишлов Н.М., Лебедев Ю.А., Кинзябулатов Р.Р.* // Химия высоких энергий. 2014. Т. 48. № 5. С. 379.
14. *Ostakhov S.S., Sultanbaev M.V.* // Mendeleev Communication. 2012. V. 22. № 1. P. 23.
15. *Suwaiyan A., Morsy M.A., Odah K.A.* // Chemical Physics Letters. 1995. V. 237. P. 349.
16. *Султанбаев М.В., Остахов С.С., Ганцев Ш.Х., Халиуллин Ф.А., Казаков В.П.* // Химия высоких энергий. 2010. Т. 44. № 5. С. 415.
17. *Ostakhov S.S., Ovchinnikov M.Y., Masyagutova G.A., Khursan S.L.* // J. Physical Chemistry A. 2019. V. 123(37). P. 7956.
18. *Паркер С.* Фотолюминесценция растворов. М.: Мир, 1972. 510 с.
19. *Tatischeff I., Klein R.* // Photochem. photobiol. 1975. V. 22. № 6. P. 221.
20. *Бурганбаева Р.С., Лобов А.Н., Грабовский С.П., Иванов С.П.* // Вестник Башкирского университета. 2017. Т. 22. № 1. С. 48.
21. *Jiménez-Halla J.O.C., Matito E., Robles J., Sola M.* // J. Organometallic Chemistry. 2006. V. 691. № 21. P. 4359.
22. *Stanger A.* // The J. Org. Chem. 2005. V. 71. № 3. P. 883.
23. *Schleyer P.R., Jiao H.* // Pure Appl. Chem. 1996. V. 68. № 2. P. 209.
24. *Красовицкий Б.М., Болотин Б.М.* Органические люминофоры. М.: Химия, 1984. 336 с.