

УДК 544.51:544.523.2:547.854.4

# СПЕКТРАЛЬНО-ЛЮМИНЕСЦЕНТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КИСЛОТНО-ОСНОВНОГО РАВНОВЕСИЯ 5- И 6-АМИНОУРАЦИЛА В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ

© 2023 г. С. С. Остахов<sup>a</sup>, Р. Р. Каюмова<sup>a</sup>, А. А. Ахияров<sup>a</sup>, С. П. Иванов<sup>a</sup>, С. Л. Хурсан<sup>a</sup>, \*<sup>a</sup>Уфимский институт химии УФИЦ РАН, просп. Октября, 71, Уфа, 450054 Россия

\*E-mail: khursansl@anrb.ru

Поступила в редакцию 14.07.2022 г.

После доработки 02.09.2022 г.

Принята к публикации 04.09.2022 г.

Исследованы спектрально-флуоресцентные характеристики 5-аминоурацила (5AU) и 6-аминоурацила (6AU) в нейтральных и щелочных водных растворах. С помощью теории функционала плотности показано, что урацилы преимущественно диссоциируют по N(1)–H связи. Флуоресцентным (ФЛ) методом определены константы кислотно-основного равновесия:  $pK_{a1}(5AU) = 9.4$ ,  $pK_{a1}(6AU) = 8.95$ . Сделан вывод, что ультракороткое время жизни возбужденных синглетов 5AU и 6AU препятствует измерению константы кислотно-основного равновесия урацилов в электронно-возбужденном состоянии.

**Ключевые слова:** 6-аминоурацил, 5-аминоурацил, флуоресценция, кислотно-основное равновесие,  $pK_{a1}$

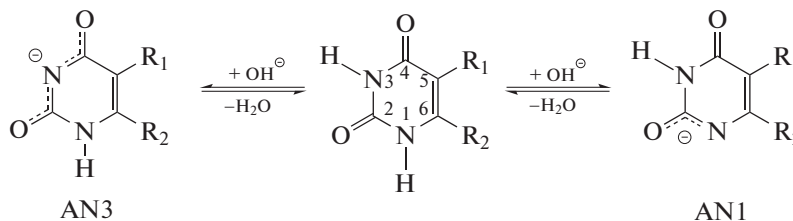
DOI: 10.31857/S0023119323010102, EDN: DCKNTA

## ВВЕДЕНИЕ

С середины XX века известно, что природные урацилы, являющиеся компонентами нуклеиновых кислот [1], принимают участие в их репликации для передачи генетической информации. Однако воздействие различных факторов (УФ-радиация, химические вещества, вирусные инфекции и др.) может приводить к нарушению в репликации ДНК, что зачастую обусловлено образованием редких тау-

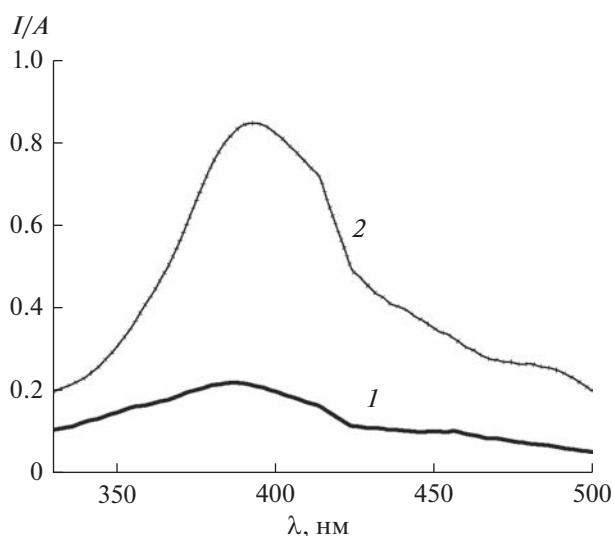
томерных форм нуклеиновых кислот [1], а также их анионов [2].

В щелочных водных растворах производные урацила выступают как слабые двухосновные кислоты [3]. Диссоциация может происходить как по N(1)–H, так и по N(3)–H связи урацилов и зависит от природы заместителей в 5- и 6-положениях пиримидинового кольца [4]. Диссоциацию по первой ступени с образованием анионов AN1 и AN3 можно представить следующими равновесиями:



Общеизвестно, что константа диссоциации  $pK_{a1}$  является термодинамической характеристикой этих равновесий. Для 5- и 6-замещенных производных урацила величины  $pK_{a1}$  в водных растворах при 298 К изменяются в широком интервале от  $pK_{a1} = 5.3$  у 5-нитроурацила [5] до  $pK_{a1} = 9.8$  у тимина [6].

На сегодняшний день, спектрофотометрическое (СФ) и потенциометрическое титрование (ПТ) являются наиболее используемыми методами экспериментального определения  $pK_a$  [7–9], наряду с квантово-химическими методами расчета констант диссоциации [9, 10]. Однако применение спектрофотометрии при определении  $pK_a$  некоторых про-



**Рис. 1.** Спектры ФЛ 6-аминоурацила при рН 6.5 (1) и 11.8 (2). Условия:  $\lambda_{\text{ex}} = 260$  нм,  $c$  [6AU] =  $5 \times 10^{-5}$  моль/л,  $l = 1$  см, 298 К.

изводных урацила ограничивается их низкой растворимостью в водных растворах и относительно малыми величинами коэффициентов молярной экстинкции. В частности, исследуемые в настоящей работе 5-аминоурацил (5AU) и 6-аминоурацил (6AU) довольно плохо растворимы в воде: согласно [11] предельная растворимость 5AU и 6AU при 25°C составляет 0.0047 моль/л, в работе [12] для 6AU приведено значение 0.006 моль/л. В этой связи возникает необходимость поиска альтернативных методов исследования кислотно-основных равновесий в урацилах, требующих меньших концентраций исследуемого вещества в растворе.

Ранее, основываясь на значительном увеличении квантового выхода ф люоресценции (ФЛ) при переходе от молекулярной к анионной форме 5-фторурацила [13], нами был предложен высокочувствительный спектрально-люминесцентный метод определения  $pK_{a1}$ , успешно апробированный на ряде водных растворов пиримидиновых оснований [14].

Целью настоящей работы является сравнительное спектрально-люминесцентное исследование кислотно-основных равновесий 5- и 6-аминоурацилов в водных растворах.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

6-Аминоурацил (873-83-6, “Реахим”) марки “ч”, 5-аминоурацил (932-52-5, “Реахим”) марки “хч”, КОН (1310-58-3, “Реахим”) марки “хч” и соляную кислоту 0.1 моль/л использовали без предварительной очистки. Спектрально-люминесцентные измерения водных растворов 5AU и 6AU проводили в интервалах рН 5.2–11.9 и 5.8–11.8 соответ-

ственно (298 К). Для определения рН использовался рН-метр рН-150 МИ с комбинированным стеклянным электродом ЭСК-10307. Калибровка электродов проводилась с помощью стандартных буферных растворов. Растворы исследуемых соединений получены в бидистиллированной воде.

Электронные спектры поглощения записывали на спектрофотометре Shimadzu UV-1800. Скорректированные спектры ФЛ регистрировали на спектрофлюориметре СМ-2203. Квантовые выходы ф люоресценции 5AU и 6AU определяли по известной методике [15] с использованием внешнего стандарта триптофана (Trp) по уравнению:

$$\phi_i = \phi_{\text{Trp}}(S_i A_{\text{Trp}})/(S_{\text{Trp}} A_i), \quad (1)$$

где  $\phi_i$  — квантовый выход ФЛ,  $\phi_{\text{Trp}}$  — квантовый выход ФЛ Trp ( $\phi_{\text{Trp}} = 0.14$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , рН 7.0, 298 К) [16],  $S_i$  и  $A_i$  — светосумма под полосой ФЛ и оптическая плотность поглощения исследуемых растворов на длине волны возбуждающего света  $\lambda_{\text{ex}}$ , соответственно,  $S_{\text{Trp}}$  и  $A_{\text{Trp}}$  — аналогично для триптофана.

Квантово-химические расчеты выполнены с использованием программного пакета Gaussian 09, Rev.C.01 [17]. Визуализацию и обработку молекул осуществляли с использованием программы ChemCraft [18]. Полная оптимизация геометрических параметров, расчет частот, учет специфической сольватации и расчет энергии Гиббса выполнены с применением теории функционала плотности в приближении обменного TPSS  $\tau$ -зависимого градиентно-скорректированного функционала [19]. Использовали базисный набор тройного валентного расщепления, дополненный поляризационными функциями  $d$ - и  $p$ -типа, а также набором диффузных функций 6-311+G(d,p) [20]. Неспецифическую сольватацию в воде оценивали с использованием поляризационно-континуальной модели Томази (PCM) [21].

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На рис. 1 представлены спектры ФЛ 6AU при рН 6.5 и 11.8, приведенные к оптической плотности на длине волны возбуждающего света.

При увеличении рН растворов 6AU в интервале 5.8–11.8 спектральный состав и смещение максимума ФЛ ( $\lambda_{\text{em}} = 392$  нм) не регистрируется (рис. 1, табл. 1). Квантовый выход ФЛ при рН 6.5 составляет  $\phi = 0.3 \times 10^{-4}$  и соответствует данным [22]. В то же время, при изменении рН наблюдается рост квантового выхода ФЛ  $0.3 \times 10^{-4}$  (рН 6.5) до  $1.1 \times 10^{-4}$  (рН 11.8) (табл. 1). Ранее в работе [13] квантово-химическим методом ядерно-независимых химических сдвигов [23, 24] нами было показано, что увеличение квантового выхода ФЛ анионов 5-фторурацила по сравнению с его молекулярной формой связано с ростом величины константы магнитного

**Таблица 1.** Спектральные характеристики 6AU и 5AU в водном растворе

| Соединение | pH   | УФ поглощение               |                                                            | ФЛ                         |                    |
|------------|------|-----------------------------|------------------------------------------------------------|----------------------------|--------------------|
|            |      | $\lambda_{\text{abs}}$ , нм | $\epsilon \times 10^{-3}$ , $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ | $\lambda_{\text{em}}$ , нм | $\phi \times 10^4$ |
| 6AU        | 6.5  | 263                         | 15.5                                                       | 392                        | 0.3                |
|            | 11.8 | 265                         | 11.9                                                       | 392                        | 1.1                |
| 5AU        | 6.7  | 290                         | 5.5                                                        | 414                        | 1.4                |
|            | 11.9 | 290                         | 4.3                                                        | 402                        | 5.1                |

Концентрация урацилов  $5.0 \times 10^{-5}$  моль/л, 298 К.

**Таблица 2.** Значения  $pK_{a1}$  5AU и 6AU ( $\text{H}_2\text{O}$ , 298 К)

| 6AU       |                   | 5AU       |                       |
|-----------|-------------------|-----------|-----------------------|
| $pK_{a1}$ | Метод определения | $pK_{a1}$ | Метод определения     |
| 8.95      | ФЛ (эта работа)   | 9.4       | ФЛ (эта работа)       |
| 8.44      | G3MP2B3+DFT [9]   | 9.77      | G3MP2B3+DFT [9]       |
| 8.59      | CBS-QB3 [9]       | 9.4       | TPSS/ aug-cc-pVTZ [9] |
| 8.7       | СФ [27]           | 9.28      | CBS-QB3 [9]           |
| 8.39      | СФ [28]           | 9.68      | ПТ [9]                |
| 8.69      | СФ [29]           | 9.52      | СФ [29]               |
| 8.85      | СФ [30]           | 9.3       | СФ [31]               |

экранирования, соответствующей увеличению сопряжения в пиримидиновом цикле аниона.

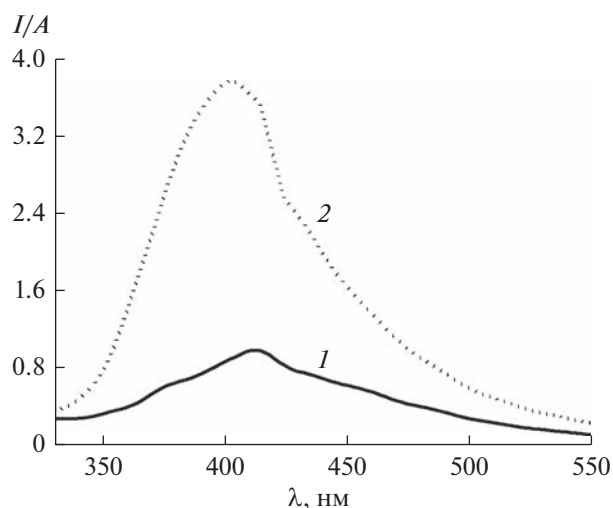
Спектры ФЛ 5AU при pH 6.7 и 11.9 представлены на рис. 2. Максимум ФЛ 5AU в нейтральных водных растворах смещен в длинноволновую область спектра (414 нм) по сравнению с 6AU и соответствует спектральному диапазону, приведенному в работах [22, 25]. В отличие от 6AU, для 5AU при увеличении pH среды наряду с ростом  $\phi$  ФЛ регистрируется сдвиг максимума ФЛ до 402 нм. По-видимому, спектрально-люминесцентные характеристики 5AU и 6AU как в нейтральных [22, 25], так и в щелочных водных растворах определяются значительными различиями в их временах жизни ( $\tau$ ) люминесценции [22]. На основании TD-DFT расчетов сделан вывод [22], что эти различия связаны с различной пространственной конфигурацией их молекул в электронно-возбужденном состоянии, разница в величинах времен жизни ФЛ довольно существенна: 6AU ( $\tau < 10^{-13}$  с), 5AU ( $\tau \approx 10^{-12}$  с) [22].

Как было показано выше, смещение кислотно-основного равновесия в растворе как 6AU, так и 5AU при изменении pH среды влияет на  $\phi$  ФЛ (табл. 1) и, таким образом, позволяет определить их  $pK_{a1}$  в водных растворах.

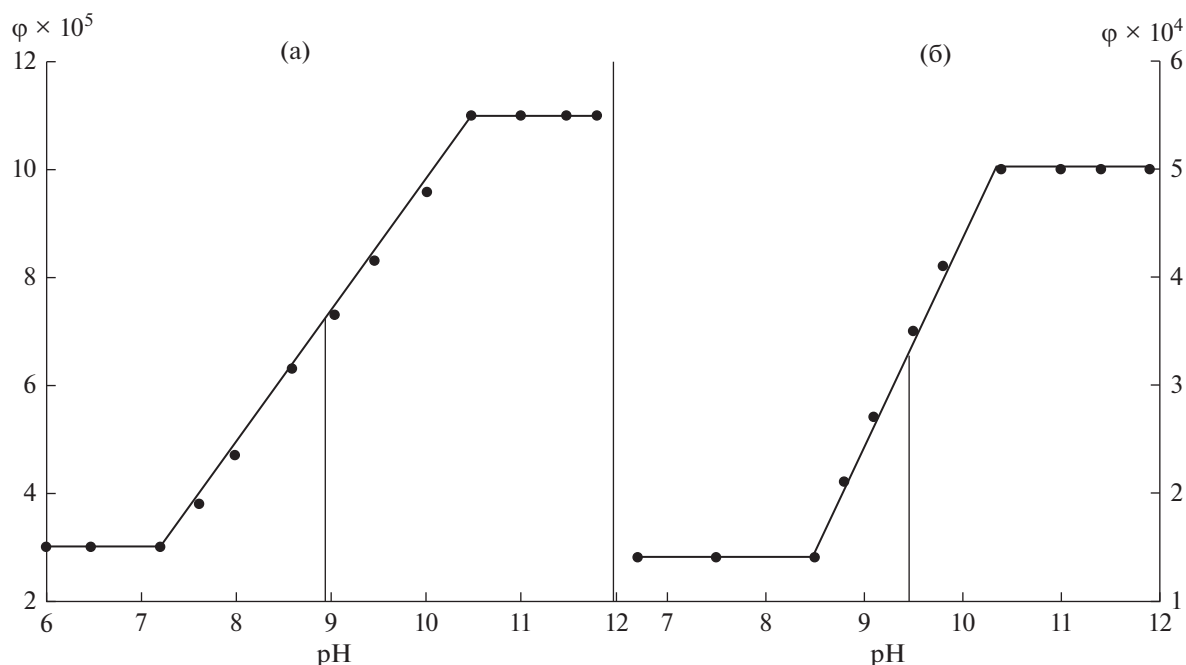
Для 6AU константа кислотно-основного равновесия, определенная графическим методом [26] из зависимостей  $\phi$  ФЛ от pH (рис. 3а) составляет 8.95. Значения  $pK_{a1}$  5AU определяли аналогично, из зависимости квантового выхода  $\phi$  ФЛ

от pH среды (рис. 3в). Найдено,  $pK_{a1} = 9.4$ . Полученные величины в пределах погрешности измерений совпадают с данными, полученными СФ и ПТ методами, а также с теоретическими оценками  $pK_a$  высокоуровневыми квантово-химическими методами (табл. 2).

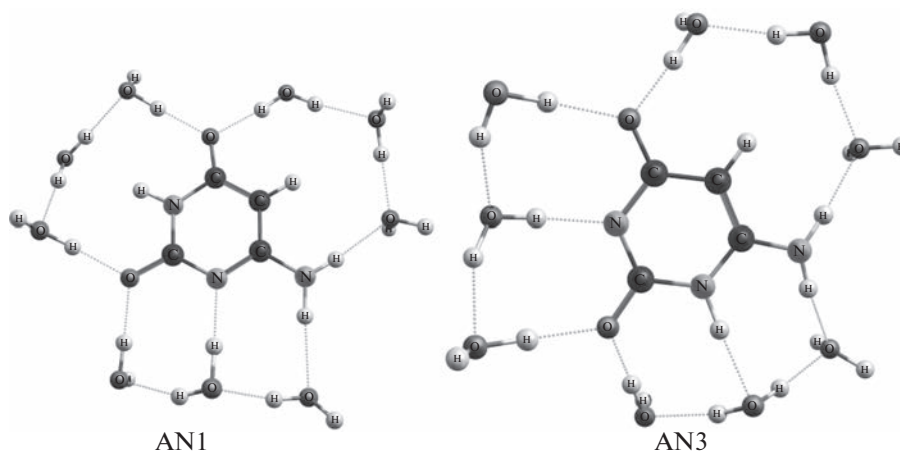
Диссоциация какой связи, N(1)–Н или N(3)–Н ответственна за наблюдаемые величины



**Рис. 2.** Спектры ФЛ 5-аминоурацила при pH 6.7 (1) и 11.9 (2). Условия:  $\lambda_{\text{ex}} = 280$  нм,  $c$  [5AU] =  $5 \times 10^{-5}$  моль/л,  $l = 1$  см, 298 К.



**Рис. 3.** Зависимость  $\phi$  ФЛ от pH водных растворов 6-аминоурацила (а) и 5-аминоурацила (б). Условия:  $5 \times 10^{-5}$  моль/л, 298 K;  $\lambda_{\text{ex}}$  (6AU) = 260 нм,  $\lambda_{\text{ex}}$  (5AU) = 280 нм.



**Рис. 4.** Строение девятиводных комплексов анионов 6-аминоурацила. Расчет в приближении TPSS/6-311 + G(d,p) + IEFPCM(SMD).

$pK_{a1}$ ? Ответ на данный вопрос дает относительная стабильность соответствующего аниона. В работе [10] найдено, что AN1 5AU термодинамически стабильнее AN3 всего на 2.4 кДж/моль, что соответствует содержанию анионов в водном растворе при комнатной температуре в соотношении 0.72 : 0.28. Сведения об относительной стабильности анионов 6AU отсутствуют. Мы провели DFT расчеты сольватных кластеров AN1  $\cdot$  9H<sub>2</sub>O и AN3  $\cdot$  9H<sub>2</sub>O (рис. 4) и установили, что AN1 анион 6AU существенно стабильнее AN3, причем разница свобод-

ных энергий Гиббса анионов составляет 20.0 кДж/моль, т.е. в водном растворе 6AU присутствует исключительно анион AN1.

Физическая природа наблюдаемых спектрально-люминесцентных закономерностей достаточно очевидна: при установлении кислотно-основного равновесия, положение которого определяется pH среды, регистрируется интенсивность ФЛ, зависящая от содержания в растворе урацила и его ионизированной формы. Однако, наряду с “обычным” кислотно-основным равновесием, в

электронно-возбужденном состоянии может протекать депротонизация без потери энергии возбуждения за время жизни ФЛ исследуемых со-

единений, характеризуемая величиной  $pK_{a1}^*$  [15]. Для ряда люминофоров — органических X—H кислот (X = C или гетероатом) — определенные из спектрально-люминесцентных измерений значе-

ния  $pK_{a1}^*$  оказались существенно ниже, чем  $pK_{a1}$  в основном состоянии [32]. Разность между вели-

чинами  $pK_{a1}$  и  $pK_{a1}^*$  с хорошей степенью точности пропорциональна разнице максимумов ФЛ кислот и щелочной форм [15]. Для 6AU и 5AU эта разность близка к нулю (рис. 1 и 2), что свидетельствует о близости показателей кислотности урацилов в основном и возбужденном состоянии и ставит вопрос о природе исследуемого нами равновесия. Для ответа на этот вопрос следует принять во внимание, что, в отличие от большинства органических люминофоров, времена жизни ФЛ которых составляют  $\tau = 10^{-8}$ — $10^{-9}$  с [15], для пиримидиновых оснований характерно ультракороткое время жизни возбужденных состояний,  $\tau = 10^{-12}$ — $10^{-13}$  с [22, 33]. Таким образом, наиболее вероятно, что ФЛ урацилов определяется сверхбыстрыми процессами  $S_1 \rightarrow S_0$  конверсии, преобладающими над скоростью фотодепротонизации с сохранением возбуждения на анионе.

На основании полученных результатов, ФЛ метод может быть предложен в качестве альтернативного СФ и ПТ титрованию при определении констант  $pK_{a1}$  кислотно-основного равновесия органических люминофоров (в частности, урацилов) с ультракороткими временами жизни в электронно-возбужденном состоянии ( $\tau \approx 10^{-12}$ — $10^{-13}$  с) в водных растворах.

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках Государственного задания по темам УФИХ УФИЦ РАН № 122031400282-9 и № 122031400255-3.

Все люминесцентные измерения и DFT вычисления проводили на оборудовании ЦКП “Химия” УФИХ УФИЦ РАН и РЦКП “Агидель” УФИЦ РАН.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Watson J.D., Crick F.H.C. // Nature. 1953. V. 171. № 4361. P. 964.
2. Sowers L.C., Shaw B.R., Veigl M.L., Sedwick W.D. // Mutat. Res. 1987. V. 177. P. 201.
3. Abdrakhimova G.S., Ovchinnikov M.Yu., Lobov A.N., Spirikhin L.V., Ivanov S.P., Khursan S.L. // J. Phys. Org. Chem. 2014. V. 27. P. 876.

4. Abdrakhimova G.S., Ovchinnikov M.Yu., Lobov A.N., Spirikhin L.V., Khursan S.L., Ivanov S.P. // J. Mol. Struct. 2018. V. 1158. P. 51.
5. Privat E.S., Sowers L.C. // Mutat. Res. 1996. V. 354. P. 151.
6. Wittenberg E. // Chem. Ber. 1966. V. 99. P. 2391.
7. Berens K., Shugar D. // Acta Biochim. Polonica. 1963. V. 10. № 1. P. 25.
8. Wempen I., Fox J.J. // J. Am. Chem. Soc. 1964. V. 86. № 12. P. 2474.
9. Ilyina M.G., Khamitov E.M., Ivanov S.P., Mustafin A.G., Khursan S.L. // J. Phys. Chem. A. 2017. V. 122. P. 341.
10. Ilyina M.G., Khamitov E.M., Ivanov S.P., Khursan S.L. // Comput. Theor. Chem. 2016. V. 1078. P. 81.
11. Zielenkiewicz W., Poznanski J., Zielenkiewicz A. // J. Solution Chem. 2000. V. 29. P. 757.
12. Ахияров А.А., Иванов С.П. // Вестник Башкирского университета. 2021. Т. 26. С. 631.
13. Ostakhov S.S., Sultanbaev M.V., Ovchinnikov M.Yu., Kayumova R.R., Khursan S.L. // High Energy Chem. 2017. V. 51. P. 108.
14. Ivanov S.P., Ostakhov S.S., Abdrakhimova G.S., Akhiyarov A.A., Khursan S.S. // Biophys. Chem. 2020. V. 266. 106432.
15. Паркер С. Фотолюминесценция растворов / Под ред. Васильева Р.Ф. М.: Мир, 1972. 510 с.
16. Tatischeff I., Klein K. // Photochem. Photobiol. 1975. V. 22. P. 221.
17. Frisch M.J., Trucks G.W., Schlegel H.B., Scuseria G.E., Robb M.A., Cheeseman J.R., Scalmani G., Barone V., Mennucci B., Petersson G.A., Nakatsuji H., Caricato M., Li X., Hratchian H.P., Izmaylov A.F., Bloino J., Zheng G., Sonnenberg J.L., Hada M., Ehara M., Toyota K., Fukuda R., Hasegawa J., Ishida M., Nakajima T., Honda Y., Kitao O., Nakai H., Vreven T., Montgomery Jr. J. A., Peralta J.E., Ogliaro F., Bearpark M., Heyd J.J., Brothers E., Kudin K.N., Staroverov V.N., Kobayashi R., Normand J., Raghavachari K., Rendell A., Burant J.C., Iyengar S.S., Tomasi J., Cossi M., Rega N., Millam J.M., Klene M., Knox J.E., Cross J.B., Bakken V., Adamo C., Jaramillo J., Gomperts R., Stratmann R.E., Yazyev O., Austin A.J., Cammi R., Pomelli C., Ochterski J.W., Martin R.L., Morokuma K., Zakrzewski V.G., Voth G.A., Salvador P., Dannenberg J.J., Dapprich S., Daniels A.D., Farkas O., Foresman J.B., Ortiz J.V., Cioslowski J., Fox D.J. // Gaussian 09, Revision D.1, Gaussian, Inc., Wallingford CT. 2009.
18. Andrienko G.A. // Chemcraft. Version 1.8 (build 489). URL: <http://www.chemcraftprog.com>.
19. Tao J., Perdew J.P., Staroverov V.N., Scuseria G.E. // Phys. Rev. Lett. 2003. V. 91. 146401.
20. Krishnan R., Binkley J.S., Seeger R., Pople J.A. // J. Chem. Phys. 1980. V. 72. P. 650.
21. Tomasi J., Mennucci B., Cammi R. // Chem. Rev. 2005. V. 105. P. 2999.
22. Bányász Á., Karpati S., Mercier Ya., Reguero M., Gustavsson T., Markovitsi D., Improta R. // J. Phys. Chem. B. 2010. V. 114. P. 12708.
23. Jimenez-Halla J.O.C., Matito E., Robles J., Sola M. // J. Organomet. Chem. 2006. V. 691. № 21. P. 4359.
24. Stanger A. // J. Org. Chem. 2005. V. 71. № 3. P. 883.

25. *Gustavsson T., Improta R., Bányász Á., Vaya I., Markovitsi D.* // J. Photochem. Photobiol. A. 2012. V. 234. P. 37.
26. *Васильев В.П.* Аналитическая химия. Ч. 1. Гравиметрический и титриметрические методы анализа. М.: Высшая школа, 1989. 320 с.
27. *Langen P., Etzold G., Barwolff D., Preussel B.* // Biochem. Pharm. 1967. V. 16. P. 1833.
28. *Stankevich E.I., Popelis Yu.Yu., Grinshtein E.E., Ozola A.Ya., Dubur G.Ya.* // Khim. Geterot. Soed. 1970. V. 6. P. 122.
29. *Barlin G.B.* // J. Chem. Soc. B. 1971. P. 1425.
30. *Hatada T., Mamori M., Nakashima K., Yoshimura M.* // Yakugaku Zasshi. 1978. V. 98. № 5. P. 668.
31. *Mori M., Teshima S., Yoshimoto H., Fujita S., Taniguchi R., Hata H., Nishimoto S.* // J. Phys. Chem. B. 2001. V. 105. № 10. P. 2070.
32. *Барлтон Дж., Койл Дж.* Возбужденные состояния в органической химии / Под ред. Кузьмина М.Г. М.: Мир, 1978. 446 с.
33. *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.