



УДК 547.854':455.522:535.347

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНСТАНТ АНТИ-СИН-РАВНОВЕСИЯ 5-ЗАМЕЩЕННЫХ 2'-ДЕЗОКСИУРИДИНОВ С ПОМОЩЬЮ КД-СПЕКТРОСКОПИИ

Володин Ю. Ю., Бикотъ В. С., Лобачев В. М.,
Преображенская М. Н.

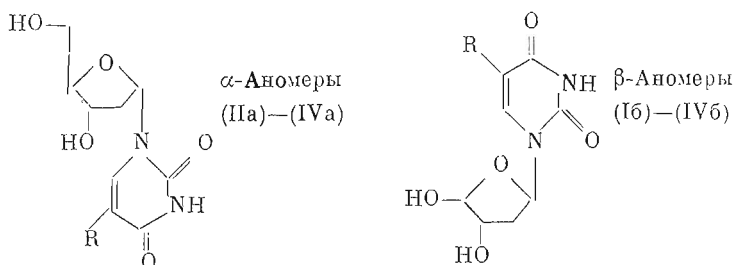
Всесоюзный онкологический научный центр
Академии медицинских наук СССР, Москва

Предложен метод определения констант *анти-син*-равновесия пиримидиновых нуклеозидов, основанный на измерении температурной зависимости спектров КД. Обработка данных проводилась в предположении равенства по абсолютной величине предельных параметров ($\Delta\epsilon$) для *анти*- и *син*-конформеров ($\Delta\epsilon_a = -\Delta\epsilon_s$). Пайдены значения констант равновесия ряда α - и β -аномеров 5-замещенных 2'-дезоксиуридинов. Показано, что как для α -, так и для β -аномеров увеличивается вес *син*-популяции при переходе от водных растворов к спиртовым.

Исследование спектров кругового дихроизма — один из способов определения положения *анти-син*-равновесия в растворах нуклеозидов. Способность нуклеозидов существовать в виде *анти*- или *син*-конформеров имеет большое биологическое значение. Положение плоскости нуклеинового основания относительно углеводного остатка является одним из факторов, определяющих вторичную структуру полинуклеотидов и нуклеиновых кислот [1]. Показано также, что для связывания нуклеотидов с ферментами в ряде случаев существенно, в какой конформации — *син* или *анти* — находится нуклеотид [2]. 6-Незамещенные уридины и 2'-дезоксиуридины существуют преимущественно в *анти*-конформации, вклад *син*-конформации обычно очень мал.

В предыдущей работе [3] мы сообщали об исследовании спектров КД 5-замещенных 2'-дезоксиуридинов. Некоторые соединения этого ряда обладают выраженной цитотоксической и противовирусной активностью [4–6]. Из сопоставления вращательных сил B_{2u} -перехода были сделаны выводы о смещении *анти-син*-равновесия при переходе от водных растворов к спиртовым для α -аномеров в сторону *син*-конформеров, а для β -аномеров — в сторону *анти*-конформеров. Однако наиболее строгим методом определения состояния равновесия являются температурные измерения.

В настоящей работе мы исследовали зависимость от температуры спектров КД ряда биологически активных α - и β -аномеров пиримидиновых нуклеозидов, содержащих в положении 5 урацильного кольца электронодонорные, в том числе объемистые, разветвленные (CH_3 , $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$, $\text{CH}(\text{OC}_2\text{H}_5)\text{CH}(\text{CH}_3)_2$) и электроноакцепторные ($\text{C}(\text{OH})(\text{CF}_3)_2$) заместители.



- (I) $\text{R} = \text{CH}_3$; (II) $\text{R} = \text{Si}(\text{CH}_3)_3$;
(III) $\text{R} = \text{CH}(\text{OC}_2\text{H}_5)\text{CH}(\text{CH}_3)_2$; (IV) $\text{R} = \text{C}(\text{OH})(\text{CF}_3)_2$

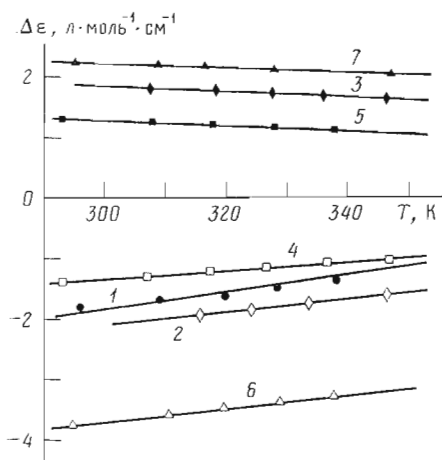


Рис. 1

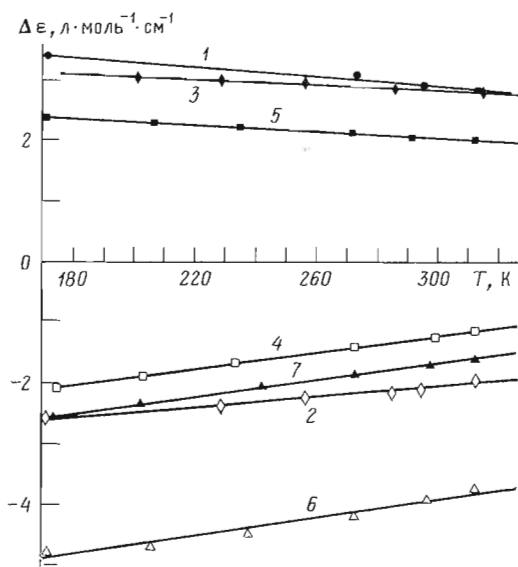


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость $\Delta\varepsilon$ от температуры для водных растворов нуклеозидов (Iб) (1), (IIа) (2), (IIб) (3), (IIIа) (4), (IIIб) (5), (IVа) (6) и (IVб) (7) в экстремумах B_{2u} -переходов (2-7) и E_{1u} -перехода (1)

Рис. 2. Зависимость $\Delta\varepsilon$ от температуры для спиртовых растворов нуклеозидов (I) - (IV) (обозначения см. в подписи к рис. 1) в экстремумах B_{2u} -переходов (1-6) и B_{1u} -перехода (7)

Эти соединения занимают крайние и среднее положения в изученных нами рядах 5-замещенных 2'-дезоксиринидинов по интенсивности эффекта Коттона (ЭК) B_{2u} -перехода и по чувствительности к изменению растворителя [3] (рис. 1, 2). При обработке экспериментальных данных учитывали зависимость от температуры плотности этанола [7] и воды [8].

В соответствии с моделью двух состояний [9] экспериментально наблюдаемая величина дихроичного поглощения для какого-либо электронного перехода может быть представлена в виде суммы по мольным долям. В таком случае

$$K = n_s/n_a = \frac{\Delta\varepsilon_a - \Delta\varepsilon}{\Delta\varepsilon - \Delta\varepsilon_s}, \quad (1)$$

где $\Delta\varepsilon$ — экспериментально наблюдаемая величина мольного дихроичного поглощения, n_a и n_s — мольные доли, а $\Delta\varepsilon_a$ и $\Delta\varepsilon_s$ — предельные параметры соответственно для *анти*- и *син*-конформеров, K — константа *анти-син*-равновесия. Известно, что *син*-форма характеризуется большим значением свободной энергии Гиббса, чем *анти*-форма [10]. Логарифмируем, а затем дифференцируем по температуре выражение Больцмана для заселенности *анти*- и *син*-состояний и, подставляя значение K из уравнения (1), получаем

$$-\frac{\partial(\Delta\varepsilon)}{\partial T} \left(\frac{1}{\Delta\varepsilon_a - \Delta\varepsilon} + \frac{1}{\Delta\varepsilon - \Delta\varepsilon_s} \right) = \frac{\Delta G^\circ}{RT}. \quad (2)$$

Приведением выражения (2) к линейному виду нельзя одновременно получить значения предельных параметров и разности свободных энергий (ΔG°). Однако если предположить на основании работ Майлса и сотр. [11, 12], что для пиримидиновых нуклеозидов

$$\Delta\varepsilon_a = -\Delta\varepsilon_s, \quad (3)$$

то выражение (2) существенно упрощается, а затем приводится к линейному виду:

$$\Delta\varepsilon^2 = \frac{\Delta\varepsilon_a}{\Delta G^\circ} \left(2RT^2 \frac{\partial(\Delta\varepsilon)}{\partial T} \right) + \Delta\varepsilon_a^2. \quad (4)$$

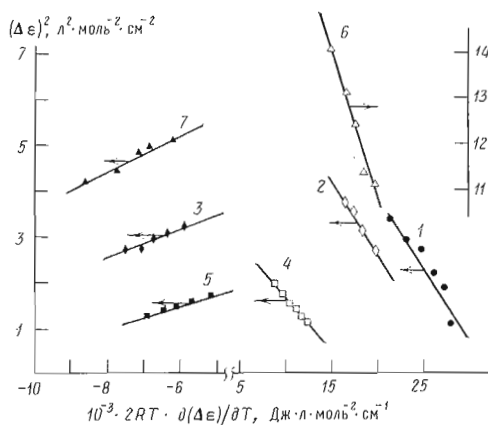


Рис. 3. Зависимость $(\Delta\epsilon)^2$ от $2RT^2\partial(\Delta\epsilon)/\partial T$ для водных растворов нуклеозидов (I)–(IV) (обозначения и электронные переходы см. в подписи к рис. 1)

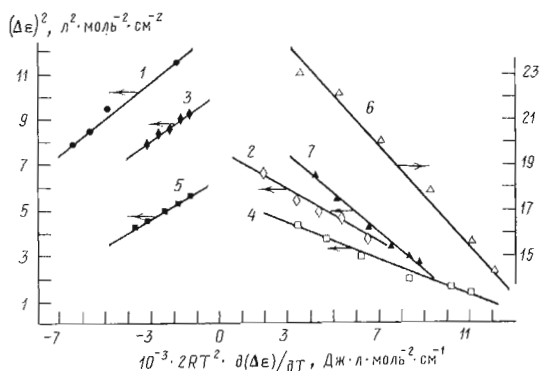


Рис. 4. Зависимость $(\Delta\epsilon)^2$ от $2RT^2\partial(\Delta\epsilon)/\partial T$ для спиртовых растворов нуклеозидов (I)–(IV) (обозначения см. в подписи к рис. 1, электронные переходы – в подписи к рис. 2)

Представив экспериментальные данные графически ($2RT^2\partial(\Delta\epsilon)/\partial T$ — ось абсцисс, $\Delta\epsilon^2$ — ось ординат), мы по отрезку, отсекаемому прямой линией 4 на оси ординат, определим $\Delta\epsilon_a^2$, а по тангенсу угла наклона прямой к оси абсцисс — $\Delta\epsilon_a/\Delta G^\circ$ (рис. 3, 4). Значения производных $\Delta\epsilon$ по температуре определяли в предположении линейной зависимости $\Delta\epsilon$ от T , что хорошо видно из рис. 1, 2. Обработка проводилась с использованием метода наименьших квадратов. Результаты расчетов по уравнению (4) для водных и спиртовых растворов приведены в таблице. Значения констант равновесия определяли из спектров КД для одного и того же соединения по разным полосам поглощения, соответствующим разным электронным переходам: B_{2u} (≈ 270 нм), B_{1u} (≈ 240 нм), E_{1ua} (≈ 220 нм). Отметим, что измерения при длинах волн, соответствующих разным полосам поглощения, теоретически должны давать одинаковые значения констант равновесия.

Мы наблюдали неодинаковую чувствительность различных полос поглощения в спектре КД к изменению температуры. Видно, что там, где чувствительность $\Delta\epsilon$ к изменению температуры достаточно велика по сравнению с экспериментальной ошибкой измерения, расчеты значений констант равновесия по разным полосам поглощения дают довольно близкие величины.

Данные по температурной зависимости спектров КД могут быть обработаны также по методу Московича [13]. Этот метод обычно используется для соединений с сильными ЭК и высокой чувствительностью к изменению температуры. В нашем случае метод Московича оказался неприменим ввиду относительно слабых ЭК и малой чувствительности их к изменению температуры. Обработка полученных нами экспериментальных данных по

Параметры *анти-син*-равновесия 5-замещенных 2'-дезоксигуридинов

Соединение	λ _{экстр} , нм		Пределыные параметры Δε _с , л·моль ⁻¹ ·см ⁻¹		Разность свободных энергий ΔG°, кДж·моль ⁻¹		K* (25°С)		Мольная доля анти-конформера n _a		Чувствительность S см. (6)
	H ₂ O	EtOH	H ₂ O	EtOH	H ₂ O	EtOH	H ₂ O	EtOH	H ₂ O	EtOH	
(I6)	E _{1ua}	247	-3,05±0,11	-4,67±0,10	11,09±0,83	3,31±0,22	0,011±0,004	0,263±0,023	0,989±0,004	0,792±0,015	-0,199
	B _{1u}	240	-1,89±0,12	-2,22±0,03	10,53±1,01	3,68±0,07	0,014±0,007	0,227±0,006	0,986±0,006	0,815±0,004	-0,173
	B _{2u}	270	***	3,61±0,03	***	4,55±0,10	***	***	***	***	0,862±0,005
(IIa)	B _{2u}	271	-3,00±0,03	-2,75±0,03	9,35±0,11	4,87±0,13	0,023±0,001	0,140±0,007	0,977±0,001	0,877±0,005	-0,103
	E _{1ua}	222	***	-2,51±0,02	***	6,19±0,10	***	***	***	0,924±0,003	
	B _{1u}	245	***	-3,14±0,03	***	5,65±0,13	***	***	***	0,907±0,004	
(II6)	B _{2u}	273	2,24±0,03	3,19±0,01	7,12±0,12	4,66±0,03	0,056±0,003	0,153±0,002	0,947±0,002	0,868±0,002	-0,084
	B _{1u}	235	0,36±0,04	0,80±0,09	13,95±1,71	9,34±1,98	0,004±0,003	0,023±0,021	0,996±0,003	0,977±0,019	-0,019
	B _{2u}	267	-1,98±0,03	-2,35±0,04	8,66±0,18	5,99±0,23	0,030±0,002	0,089±0,008	0,970±0,002	0,918±0,007	-0,054
(III6)	E _{1ua}	220	-	-1,72±0,04	-	5,47±0,21	-	0,110±0,009	-	0,901±0,008	-
	B _{1u}	245	-	-1,63±0,08	-	4,92±0,64	-	0,138±0,035	-	0,879±0,026	-
	B _{2u}	274	1,68±0,02	2,49±0,01	7,34±0,08	4,63±0,03	0,052±0,002	0,154±0,002	0,951±0,002	0,866±0,001	-0,089
(IVa)	B _{2u}	268	-4,92±0,07	-5,24±0,04	7,32±0,26	4,87±0,20	0,052±0,006	0,140±0,010	0,950±0,005	0,877±0,008	-0,077
	E _{1ua}	248	-1,31±0,06	***	8,03±0,47	***	0,039±0,008	***	0,962±0,007	***	-
	B _{1u}	239	-1,45±0,03	-3,19±0,03	7,29±0,15	3,63±0,08	0,053±0,003	0,231±0,008	0,950±0,003	0,812±0,005	-0,145
(IV6)	B _{2u}	242	2,75±0,04	***	6,87±0,19	***	0,063±0,005	***	0,941±0,004	***	-
	B _{1u}	270	***	***	***	***	***	***	***	***	-

* Значение констант равновесия рассчитывали по формуле: K_{равн} = exp(-ΔG°/RT). Коэффициенты корреляции по линейному уравнению (4) для каждой полосы поглощения варьируют от 0,855 (IIIa), B_{1u}, EtOH до 0,989 (II6), E_{1ua}, EtOH.

** Очень низкая интенсивность ЭК B_{1u} -перехода (Δε=0,204, H₂O, 20°С; Δε=0,076, EtOH, 27°С).

*** Очень низкая чувствительность полосы к изменению температуры.

методу Москoviца приводила часто к неправдоподобным значениям предельных параметров $\Delta\epsilon_a$ и $\Delta\epsilon_s$, различающимся (по модулю) иногда на 1--2 порядка, что является нереальным [11].

Полученные результаты показывают, что переход от воды к этанолу сопровождается смещением равновесия в сторону *син*-конформера как для α -, так и для β -аномеров, что можно связать с изменением полярности растворителя. Уменьшение полярности растворителя вызывает стабилизацию *син*-конформера за счет внутримолекулярных водородных связей. Для β -аномеров это $C(2)=O\dots HOC(5')$ -связь, а для α -аномеров -- $C(2)=O\dots HOC(3')$ -связь [14].

Аналогичный вывод об увеличении веса *син*-популяции α -аномеров при переходе от воды к этанолу был сделан нами в предыдущей работе [3] на основании сопоставления величин вращательных сил B_{2u} -перехода в спектрах КД 5-замещенных 2'-дезоксигуанидинов. Для β -аномеров, наоборот, предполагалось смещение равновесия в сторону *анти*-конформера [3]. Подобное несоответствие результатов оценки конформационного равновесия для β -аномеров на основании простого сопоставления величин ЭК перехода B_{2u} в разных растворителях и из расчета этого равновесия по данным зависимости спектров КД от температуры, на наш взгляд, вызвано изменением предельных параметров $\Delta\epsilon_a$ и $\Delta\epsilon_s$ при переходе от воды к спирту. Равенство (3) при этом может сохраняться.

Возможность такого влияния растворителя на ЭК следует из уравнения

$$\Delta\epsilon = \frac{\Delta\epsilon_a + K\Delta\epsilon_s}{K + 1}, \quad (5)$$

полученного преобразованием выражения (1). Из формулы (5) видно, что изменение наблюдаемой величины ЭК ($\Delta\epsilon$) при переходе от одного растворителя к другому определяется не только смещением равновесия *анти*- и *син*-конформеров, т. е. величиной K , но и изменением предельных параметров $\Delta\epsilon_a$ и $\Delta\epsilon_s$ под влиянием растворителя. Действительно, как вытекает из полученных нами экспериментальных данных (см. таблицу), $|\Delta\epsilon_a|$ всегда больше для спиртовых растворов, чем для водных. Это влияние растворителей, проявляющееся в спектрах КД, обусловлено прежде всего изменением электронных переходов хромофора за счет асимметричной сольватации; вицинальным эффектом растворителя; индуцированной оптической активностью растворителя [15, 16]. Если учесть, что коэффициент молярного поглощения (ϵ) практически не меняется при переходе от водных растворов к спиртовым [3], следует предположить, что парциальный фактор анизотропии ($g=\Delta\epsilon_a/\epsilon$) для спиртовых растворов выше, чем для водных. Вероятной причиной увеличения фактора анизотропии является асимметричная сольватация нуклеозида молекулами спирта.

Таким образом, эмпирическая зависимость между наблюдаемой интенсивностью ЭК B_{2u} -перехода и состоянием *анти-син*-равновесия, часто используемая для анализа спектров КД пиримидиновых нуклеозидов [11, 17], по-видимому, во многих случаях позволяет сделать правильные выводы. Однако иногда наблюдается увеличение интенсивности ЭК B_{2u} -перехода, хотя содержание *анти*-конформера не увеличивается, а уменьшается (β -аномеры).

Полученные нами численные значения констант равновесия позволяют оценить «чувствительность» *анти-син*-равновесия к переходу от воды к спирту [3]. Наиболее удобная величина, на наш взгляд, относительное изменение мольной доли *анти*-конформера:

$$S = \frac{n_a^{EtOH} - n_a^{H_2O}}{n_a^{H_2O}} = \frac{K_{H_2O} - K_{EtOH}}{K_{EtOH} + 1}. \quad (6)$$

Как видно из таблицы, все изученные нуклеозиды и в воде и спирте существуют преимущественно в *анти*-конформации. В водных растворах содержание *анти*-конформера составляет 95--99%. Переход от воды к этанолу сопровождается увеличением содержания *син*-конформера на 5--20%. Интересно, что тимидин оказывается наиболее чувствительным

к изменению растворителя: вес *син*-популяции возрастает на 20% при переходе от воды к спирту.

В результате проделанной работы показано, что состояние *анти-син*-равновесия в растворах 5-замещенных 2'-дезоксигуанидинов изменяется в зависимости как от заместителя в положении 5 урацильного цикла, так и от растворителя. Конформационное равновесие в случае как α -, так и β -аномеров при переходе от воды к этанолу смещается в сторону *син*-конформера.

Экспериментальная часть

КД-спектры снимали на дихрографе Roussel Jouan, Mark III S (Jobin Yvon, Франция). Использовали спирт-ректификат (96%) и бидистиллированную воду. Концентрацию растворов ($1 \cdot 10^{-4}$ М) контролировали по УФ-спектрам, снятым на спектрофотометре Specord UV-VIS (Karl Zeiss, Jena, ГДР).

Водные растворы термостатировали с точностью $\pm 0,1^\circ$ С в интервале $15-70^\circ$ С. Измерения проводили от высоких температур к низким. Для работы со спиртовыми растворами ($-100-+40^\circ$ С) использовали приставку для низкотемпературных измерений, входящую в комплект прибора. Измерения величины $\Delta\epsilon$ в зависимости от температуры проводили с относительной погрешностью, не превышающей 3% (240–270 нм) и 5% (220 нм). Предварительно прописывали нулевую линию чистого растворителя в исследуемом интервале температур. Все спектры КД были обратимы по температуре.

α - и β -аномеры нуклеозидов (II)–(IV) были получены ранее [4–6] и любезно предоставлены авторами. В работе использован тимидин фирмы Reanal (Венгрия).

ЛИТЕРАТУРА

1. Флорентьев В. Л. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 7, с. 885–899.
2. Miles D. W., Townsend L. B., Redington P., Eyring H. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1976, v. 73, № 7, p. 2384–2387.
3. Володин Ю. Ю., Кикоть Б. С., Преображенская М. Н. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 10, с. 1375–1380.
4. Мельник С. Я., Бахмедова А. А., Ярцева И. В., Преображенская М. Н., Загуляева О. А., Мамаев В. П., Чекунова Э. В., Бектемиров Т. А., Анджапаридзе О. Г. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 8, с. 1102–1107.
5. Мельник С. Я., Бахмедова А. А., Недорезова Т. П., Ворновицкая Г. И., Преображенская М. Н., Аветисян Э. А., Герман Л. С., Полицуф В. Р., Чекунова Э. В., Бектемиров Т. А., Анджапаридзе О. Г. Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 7, с. 1047–1053.
6. А. с. 671287 (СССР). 1- α - и 1- β -Дезоксирибофуранозиды 5-триметилсилилпурацила, проявляющие противовирусную активность / Мельник С. Я., Бахмедова А. А., Межевич З. М., Мамаев В. П., Загуляева О. А., Бектемиров Т. А., Чекунова Э. В., Анджапаридзе О. Г., Поздняков В. И., Майчук Ю. Ф., Щипанова А. И. Заявл. 12.01.78, № 2568453/23–04. — Оpubл. в Б. И., 1983, № 32.
7. Landolt – Börnstein. Physicalisch-chemische Tabellen. Berlin: Springer-Verlag, 1923, 5. Auflage, B. I, S. 452.
8. Landolt – Börnstein. Physicalisch-chemische Tabellen. Berlin: Springer-Verlag, 1923, 5. Auflage, B. II, S. 1231.
9. Teng N. N. H., Itzkowitz M. S., Tinoco I. J. Amer. Chem. Soc., 1971, v. 93, № 23, p. 6257–6264.
10. Wilson H. R., Rahman A. J. Mol. Biol., 1971, v. 56, № 1, p. 129–142.
11. Miles D. W., Robins M. J., Robins R. K., Winkley M. W., Eyring H. J. Amer. Chem. Soc., 1969, v. 91, № 4, p. 831–838.
12. Inskeep H. W., Miles D. W., Eyring H. J. Chem. Phys., 1972, v. 57, № 7, p. 2736–2744.
13. Moscowitz A., Wellman K., Djerassi C. J. Amer. Chem. Soc., 1963, v. 85, № 21, p. 3515–3516.
14. Plochocka D., Rubczenko A., Davies D. B. J. Chem. Soc. Perkin Trans II, 1981, № 1, p. 82–89.
15. Kirk D. N., Klyne W., Wallis S. R. J. Chem. Soc. (C), 1970, № 2, p. 350–360.
16. Hart P. A., Davies J. P. J. Amer. Chem. Soc., 1972, v. 94, № 8, p. 2572–2577.
17. Miles D. W., Robins M. J., Robins R. K., Winkley M. W., Eyring H. J. Amer. Chem. Soc., 1969, v. 91, № 4, p. 824–831.

Поступила в редакцию
10.11.1984

DETERMINATION OF *ANTI-SYN* EQUILIBRIUM CONSTANTS OF 5-
SUBSTITUTED
2'-DEOXYURIDINES BY CD SPECTROSCOPY

VOLODIN Yu. Yu., KIKOTJ B. S., LOBATCHEV V. M.,
PREOBRAZHENSKAYA M. N.

*All-Union Cancer Research Center, Academy of Medical Sciences
of the USSR, Moscow*

A method for determining the *anti-syn* equilibrium constants for pyrimidine nucleosides is proposed. It involves measuring the temperature dependence of CD spectra. The data processing is carried out basing on the main assumption on the equality of the absolute values of limit parameters for *anti*- and *syn*-conformers (i. e. $\Delta\epsilon_a = -\Delta\epsilon_s$). The *anti-syn* equilibrium constants for α - and β -anomers of 5-substituted 2'-deoxyuridines (including thymidine) are determined. It is demonstrated that for both α - and β -anomers the *syn*-population grows on transition from water to ethanolic solution.